

# Utjecaj probiotika na rast češljače *Aequipecten opercularis* uz promjenu klimatskih uvjeta

---

**Kolić, Valentina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Pula / Sveučilište Jurja Dobrile u Puli**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:137:993099>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-09**



*Repository / Repozitorij:*

[Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula](#)



Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Fakultet prirodnih znanosti

Valentina Kolić

**Utjecaj probiotika na rast češljače *Aequipecten opercularis*  
uz promjenu klimatskih uvjeta**

Završni rad

Pula, lipanj, 2023.

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Fakultet prirodnih znanosti

Valentina Kolić

**Utjecaj probiotika na rast češljače *Aequipecten opercularis*  
uz promjenu klimatskih uvjeta**

Završni rad

**JMBAG: 03030898168, redoviti student**

**Studijski smjer: Znanost o moru**

**Predmet: Molekularna toksikologija i ekotoksikologija**

**Znanstveno područje: Prirodne znanosti**

**Znanstveno polje: Interdisciplinarno**

**Znanstvena grana: Znanost o moru**

**Mentor: Doc. dr. sc. Petra Burić**

**Komentor: Izv. prof. dr.sc. Ines Kovačić**

Pula, lipanj, 2023.



## IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisana Valentina Kolić, kandidatkinja za prvostupnicu Znanosti o moru, ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mogega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Završnog rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da nijedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

Studentica

---

U Puli, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ godine.



## IZJAVA

### o korištenju autorskog djela

Ja, Valentina Kolić dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom "Utjecaj probiotika na rast češljače *Aequipecten opercularis* uz promjenu klimatskih uvjeta" koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu s Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama.

Za korištenje autorskog djela na gore navedeni način ne potražujem naknadu.

U Puli, \_\_\_\_\_ (datum)

Potpis

---

Sadržaj:

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Probiotici</b> .....	1
<b>1.1.2. Utjecaj klimatskih promjena na školjkaše</b> .....	1
<b>1.1.3. Korist probiotika u marikulturi</b> .....	4
<b>1.1.4. Rod <i>Lactobacillus sp.</i> u morskim organizmima</b> .....	5
<b>1.2. Školjkaši</b> .....	7
<b>1.2.1. Češljača <i>Aequipecten opercularis</i></b> .....	8
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	10
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	11
<b>3.1. Uzorkovanje školjkaša</b> .....	11
<b>3.2. Postavljanje posebnih uvjeta uzgoja školjkaša u bazenima</b> .....	11
<b>3.3. Mjerenje morfometrijskih parametara češljača</b> .....	12
<b>3.4. Statistička obrada podataka</b> .....	14
<b>4. REZULTATI</b> .....	15
<b>4.1. Analiza parametara morske vode u bazenima</b> .....	15
<b>4.2. Analiza morfometrijskih parametara češljače</b> .....	17
<b>5. RASPRAVA</b> .....	25
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	31
<b>7. LITERATURA</b> .....	33
<b>9. ABSTRACT</b> .....	38

# 1. UVOD

## 1.1. Probiotici

Riječ probiotik potječe iz grčkog jezika, a znači “za život”. Izvorno se odnosi na pojavu gdje u zajedničkom uzgoju dvaju organizama, jedan proizvodi tvari koje potiču rast drugoga (Mohamed, 2003). Probiotici su nepatogeni mikroorganizmi koji, kada se daju u odgovarajućim količinama, pridonose zdravstvene dobrobiti domaćinu (Sohn i sur., 2016). Kako bi probiotik ostvario svoju namjenu, djeluje na različite načine. Unutar organizma probiotik je u kompeticiji za nutrijente s drugim prisutnim bakterijama, proizvodi antibakterijske tvari, prijanja se za stjenku probavnog trakta čime onemogućava kolonizaciju patogenih mikroorganizama. Osim toga, potiče poboljšanje imunološkog sustava povećavanjem broja antitijela, enzimske i makrofagne aktivnosti koje su uključene u poticanju imunološkog odgovora i poboljšanju otpornosti na patogene mikrobne infekcije. Kompeticija za željezo je također važna, budući da je patogenim bakterijama prnova željeza ključna za njihov opstanak u organizmu domaćina. Probiotici također poboljšavaju kvalitetu vode (u kontekstu marikulture) kroz modulaciju i poboljšanje mikroflore vode (Ringø, 2020; Sridhar, 1998). Danas se koriste najviše u prehrambenoj industriji. U industriji probiotika potrebno je voditi računa o činjenici da dobar probiotik mora imati dobra tehnološka svojstva kako bi se mogao proizvesti te ugraditi u prehrambene proizvode bez gubitka održivosti i funkcionalnosti (Saarela i sur., 2000).

### 1.1.2. Utjecaj klimatskih promjena na školjkaše

Klima se globalno zagrijava kao rezultat pretjerane ljudske aktivnosti izgaranjem fosilnih goriva od 1850-ih godina do danas. Poznato je da posljedice povećanja koncentracije CO<sub>2</sub> u atmosferi te prekomjerno povećanje temperature zemlje proširuju učinak globalnog zagrijavanja unutar ekosustava mora i oceana. Količina CO<sub>2</sub> iz atmosfere disperzijom ulazi u ocean te putem kemijskih reakcija uslijed dotoka s vodom stvara bikarbonat (HCO<sup>3-</sup>) koji nadalje disocira na karbonat (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) te otpušta vodikov ion H<sup>+</sup> u vodu. Procesom povećanja koncentracije H<sup>+</sup> iona u vodenom stupcu pH mora se smanjuje te posljedično medij postaje sve kiselij. Razlog velikom ulasku CO<sub>2</sub> iz atmosfere u vodu je to što se parcijalni tlakovi između ova dva medija nastoje

izjednačiti. Od početka industrijske revolucije, globalna srednja pH vrijednost površine mora pala je za 0,1 jedinicu (s 8,2 na 8,1), što je ekvivalentno povećanju kiselosti oceana od 30%. Zakiseljavanje morske vode dovodi do pomaka u ravnoteži anorganskog ugljika prema višim koncentracijama bikarbonatnih ( $\text{HCO}_3^-$ ) i nižih karbonatnih iona ( $\text{CO}_3^{2-}$ ). Očekuje se da će antropogene klimatske promjene uzrokovati daljnje smanjenje globalne srednje vrijednosti pH površine mora do 0,32 jedinice, što bi moglo doseći pH 7,4 do 2300. godine (Soon i sur., 2019). Zakiseljavanje mora otežava preživljavanje mnogobrojnih organizama. Nepogodnost nad školjkašima može se vidjeti time da pri sniženom pH, školjkaši ulažu manje energije za stvaranje ljuštura kako bi se unutrašnje meko tkivo nastavilo razvijati. Acidifikacija također smanjuje dostupnost karbonatnih minerala koje školjkaši koriste za izgradnju ljuštura, što dovodi do abnormalnog i smanjenog rasta ljuštura. U ovakvim uvjetima su školjkaši primjerice podložniji razaranju ljuštura u prirodi (Gosling, 2008).

Osim zakiseljavanja, porast temperature mora djeluje kao pokretač rasta i razmnožavanja mikroorganizama u moru, pa tako i patogenih mikroba koji time dobivaju dobru podlogu za stvaranje infekcija u drugim živim organizmima, dok će porast prosječnih temperatura zraka značajno povećati rizik od kvarenja školjkaša tijekom skladištenja i distribucije prema potrošačima. Također, potrebno je voditi računa i o negativnom utjecaju povećanja temperature na bioenergetiku školjkaša što dovodi do prekomjerne potrošnje energije, utječe na njihov rast, reprodukciju i imunitet, što može dovesti do umiranja organizma (Soon i sur., 2019). Ovisno o vrsti školjkaša raspon tolerancije temperature se razlikuje te prelazeći tu granicu naglo se povećava smrtnost (Filgueira i sur., 2016). Zbog globalne promjene temperature u narednim godinama, sezonski obrasci padalina na umjerenim širinama vjerojatno će se promijeniti, pri čemu će ljeto i proljeće postati sušniji, a zima i jesen više kišoviti. To će potencijalno uzrokovati povećanje donosa hranjivih tvari zimi, dok će u proljeće i ljeto biti oskudno. Obzirom da okolišni uvjeti poput osunčanosti pogoduju produktivnost planktona tijekom proljeća i ljeta, a ne u jesen ili zimu, desiti će se ukupno smanjenje godišnje primarne i sekundarne proizvodnje planktona te povećati izvor za neiskorištene hranjive tvari u Jadransko more tijekom hladnijih sezona (Soon i sur., 2019).

Uzgoj morskih proizvoda za konzumaciju postaje sve veći, kao rezultat pretjeranog izlova svjetskih oceana i sve veća postaje potražnja za plodovima mora (Anguirre-



Guzman i sur., 2012). U dobu globalnog zagrijavanja, procvat akvakulture i marikulture te povećanje intenziteta kao i ekonomske koristi koja s time dolazi, stvorilo je probleme pogoršanja kvalitete vode i tla te izbijanja bolesti uslijed bakterijskih infekcija uzgojnih organizama (Mohamed, 2003). Glavna posljedica toga jest gubitak cijelih proizvodnih skupova, što dovodi ne samo do ekonomskih problema u industriji, već i do neredovitosti opskrbe ciljanog tržišta (Prado i sur., 2010).

Izazovi kojima se marikulturni uzgoj školjkaša suočava uvelike proizlaze upravo iz klimatskih promjena. Povećanje temperature mora uzrokuje pomor uzgojnih školjkaša zbog čestih bolesti koje uzrokuju mikrobnim patogeni. Također, može dovesti do isušivanja rijeka i suhe klime zbog čega se količina hranjivih tvari koja ulazi u more i posljedično količina fitoplanktona može smanjiti do razine da više ne pogoduje preživljavanju školjkaša. Znanstvena istraživanja upravo ukazuju na rastući svjetski trend masovne smrtnosti uzgojnih dagnji, kunjki, kamenica i češljača, koji utječu na sve životne faze školjkaša od ličinki do mladih i odraslih jedinki (Soon i sur., 2019). Budući da se školjkaši hrane dostupnim fitoplanktonom, u kontekstu uzgoja školjkaša u otvorenim morskim sustavima, hranjenje i održavanje broja jedinki postat će sve teže kako bi komercijalna korist ostala pozitivna (Melaku Canu i sur., 2010). Zaključivo je dakle da su klimatske promjene, posebice globalno zagrijavanje i zakiseljavanje oceana, dvije osnovne prijetnje za koje se predviđa da će povećati učestalost i intenzitet pojave smrtnosti školjkaša (Tan Kar, 2019).

### 1.1.3. Korist probiotika u marikulturi

Primjena antibiotika u marikulturi, s osnovnim ciljem sprječavanja pomora organizama, nije pogodna zbog adaptacije i stvaranja imunosti bakterija nakon dužeg vremena dodavanja manjih doza antibiotika. Bakterijska imunost na antibiotike svojstvo je koje je moguće prenijeti ne samo s bakterije na potomka, nego i s jedne na druge vrste bakterija u procesu konjugacije. Tijekom konjugacije između dviju bakterija, dešava se razmjena plazmida (DNA) unutar kojih se nalazi svojstvo za antibiotsku otpornost (Ringø, 2020). Nadalje, u konzumiranoj hrani tretiranoj antibioticima moguće je pronaći ostatke antibiotika što povećava rizik mogućnosti razvoja raznih alergija. Radi svega navedenog, razvila se potreba za pronalaskom alternativne metode kontrole bolesti u marikulturnom uzgoju kako bi se postigao bolji rast i preživljavanje organizama bez negativnih nuspojava (Sridhar, 1998).

Alternativni pristup pronađen je u probioticima. Dodatak probiotika u marikulturu morskih plodova postao je u zadnjih par desetljeća vrlo čest dio procesa proizvodnje. Sposobnost probiotika jest da smanji broj štetnih bakterija, udjela organske tvari i ksenobiotika koji mogu imati negativan učinak na uzgojni organizam. Probiotici također poboljšavaju probavni i imunološki sustav kontrolirajući autohtonu mikrofloru organizma (Shumway i Parsons, 2016). Također, važan koristan učinak primjene probiotika, koji je pokazao značajnu razliku, jest učinkovitost hranjenja (uz probiotik), odnosno bolja probavljivost hrane i iskorištavanje nutrijenata iz hrane te poticanje rasta (Aguirre-Guzman i sur., 2012).

Probiotički sojevi za marikulturnu upotrebu izoliraju se iz autohtone mikroflore ciljanog morskog organizma. Iz navedenog razloga probiotički soj može bolje djelovati u sličnom okruženju (npr. hemolimfa školjkaša) iz kojeg je izvorno izoliran (Saarela i sur., 2000). Idealno, mikrobni probiotici trebali bi imati blagotvoran učinak i ne uzrokovati štetu organizmu domaćinu (Aguirre-Guzman i sur., 2012). U akvakulturi školjkaša koristi se nekoliko vrsta probiotika; *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Alteromonas*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Microbacterium*, *Phaeobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodospiridium*, *Roseobacter*, *Streptomyces*, *Vibrio* i drugi (Ringø, 2020). Probiotik može biti suplementiran organizmima dodavanjem sojeva bakterija u hranu kao tzv. starter kultura kako bi unutar hrane postojali "dobri" bakterijski sojevi i pri hranjenju se spriječio rast patogenih bakterija. Osim toga, može se dodavati i u

kulturu vode (medij) korišten za uzgoj (Shumway i Parsons, 2016). Organski sustav uzgojnog organizma koji će prvi odustati uslijed pojave stresnih uvjeta je probavni sustav budući se kroz njega omogućava i ulaz patogenih organizama. Upravo iz tog razloga, dodavanje probiotika u hranu školjkaša općenito se više koristi te je uspješnije (Ringø, 2020).

Probiotici su veoma važna karika u ovom istraživanju i postavljenom eksperimentu zato što u okolišu kao što je akvarij, sa stalnim protokom morske, postoji i stalan protok bakterija kroz sve odjeljke (morska voda, fitoplankton, ličinke i rezervoari), tj. postoji mnogo puteva za unos potencijalnih patogena u školjkaše. U ovakvim istraživanjima probiotici pronalaze svoju korist u borbi protiv patogenih bakterija i u produljenju vijeka trajanja školjkaša, koji su jedna od najvažnijih komponenta njihovog uspješnog uzgoja (Aguirre-Guzman i sur., 2012).

#### **1.1.4. Rod *Lactobacillus sp.* u morskim organizmima**

Rod *Lactobacillus* sastoji se od genetski i fiziološki raznolike skupine štapićastih, gram-pozitivnih, nepigmentskih, mikroaerofilnih do striktno anaerobnih bakterija mliječne kiseline (eng. *lactic acid bacteria* – LAB) koje ne tvore spore. Rod *Lactobacillus* je danas najkorištenija skupina probiotičkih mikroorganizama zbog svoje široke mogućnosti primjene. Bakterije roda *Lactobacillus* mogu preživjeti u ekstremno kiselim uvjetima (pH 2,5 do 3,5) do bazičnih uvjeta (pH 7,5 do 8,5). Dodavanje probiotičkih bakterijskih kultura poput *Lactobacillus sp.* stimulira rast poželjnih mikroorganizama dok ubija potencijalno štetne bakterije i jača prirodni obrambeni mehanizam organizma (Saarela i sur., 2000). Iz spomenutih se razloga, bakterijska se starter kultura uvelike koristi u prehrambenoj industriji. Dodaje se mliječnim proizvodima poput sirovog mlijeka, probiotskih sireva, jogurta i fermentiranog mlijeka iz tehnoloških razloga ili radi stvaranja dobrobiti za zdravlje potrošača (Hoque i sur., 2010).

Bakterije roda *Lactobacillus* primjenu su našle i u marikulturi gdje provode „biokontrolu” putem proizvodnje antimikrobnih tvari zvanih bakteriocini (Ringø, 2020). Biokontrola podrazumijeva metode tretiranja pomoću antagonizma među mikroorganizmima gdje patogeni mogu biti potpuno uklonjeni ili smanjeni u broju (Prado i sur., 2010). Proizvodnja mliječne kiseline od strane bakterija mliječne kiseline poput *Lactobacillus sp.* smanjuje pH probavnog trakta organizma. Istraživanja *in vitro* pokazala su da pH

manji od 4,5 sprječava rast mnogih bakterija uključujući koliforme, ali ipak dopušta rast sojeva *Lactobacillus sp.* (Mohamed, 2003). Pokazalo se da laktobacili inhibiraju patogene bakterije kao što su *Escherichia coli*, *Listeria monocytogens*, *Salmonella sp.*, stafilokoke i druge. Ostali klinički dokazani učinci na zdravlje su antikancerogeni učinci i imunomodulatorni učinci, a svi se oni smatraju pozitivnim vrijednostima kriterija za probiotike (Lee i sur., 2011).

Primjena i uspješnost vrste *L. plantarum* može se prepoznati u uzgoju rakova, na što ukazuju tri studije koje su proveli Dash i sur. (2014., 2015., 2016.) u kojima su korišteni tigrasti škampi i pacifički bijeli škampi. Otkrili su da je uključivanje bakterije *L. plantarum* u ishranu značajno povećalo prirast težine, specifičnu stopu prirasta, učinkovitost konverzije hrane i učinkovitost proteina, dok je omjer konverzije hrane značajno smanjen. U ovom eksperimentu, tijekom hranjenja škampa probioticima broj LAB značajno se povećao u crijevima uz istodobno smanjenje broja patogenih bakterija. Međutim, broj bakterija mliječne kiseline smanjio se nakon povratka na osnovnu prehranu, što jasno ukazuje da vrsta *L. plantarum* nije u stanju trajno kolonizirati crijeva pacifičkih bijelih škampa te ga treba kontinuirano dodavati kako bi se održao njegov korisni učinak (Ringø, 2020).

U sklopu projekta "Integrirani sustav uzgoja alternativnih vrsta školjkaša u uvjetima klimatskih promjena" ispitano je više sojeva probiotika (*Lactobacillus plantarum* I, *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus plantarum* 2, *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis*) od strane partnera na projektu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, a soj *Lactobacillus plantarum* I, koji je korišten u ovom istraživanju, pokazao je najbolje karakteristike stoga je i odabran među ostalima te u konačnici dodavan u bazen zajedno s osnovnom prehranom algi. Naime, vrsta *Lactobacillus plantarum* I jedna je od stotinu različitih vrsta probiotskih baterija koje tvore rod *Lactobacillus* (Kovačić i sur., 2023).

## 1.2. Školjkaši

Školjkaši pripadaju koljenu *Mollusca* (hrv. Mekušci), skupini koja uključuje različite organizme kao što su *Bivalvia* (školjkaši), *Gastropoda* (puževi) i *Cephalopoda* (glavonošci). Mekušci su najveće koljeno u moru, čineći oko 20% svih poznatih morskih organizama. Razred školjkaša tvori preko 9200 vrsta životinja sa specifičnim fizičkim i funkcionalnim karakteristikama (Haszprunar i Wanninger, 2012). Karakterizira ih vapnenačka ljuštura koja potpuno ili djelomično zatvara meki dio tijela. Ljuštura se sastoji od dva spojena dijela koja su lateralno pritisnuta i izdužena. U unutarnjem dijelu ljušture nalazi se mišić zatvarač ili aduktor koji spaja dva dijela ljušture. Škrge su kod školjkaša dobro razvijeni organi, specijalizirani ne samo za disanje nego i za hranjenje filtriranjem okolne vode. Prehranu im primarno čine planktonski organizmi kao što su fitoplankton i mikroalge. Mnogi školjkaši prilagodili su se životu u različitim uvjetima. Žive na različitim staništima morskog dna, poput pjeskovitog, muljevitog i stjenovitog dna. Ovisno o uvjetima staništa, neke vrste kao što su vrste roda *Pectinidae* mogu slobodno plivati kratke udaljenosti kako bi pobjegle od opasnosti. Većina školjkaša ipak preferira skrivanje u pijesku ili mulju, gdje izvan sedimenta izbacuju duge cijevi, sifone kako bi se prehranili. U stopalu izlučuju bisusne niti kojima se čvrsto vežu za podlogu. Drugi pak preferiraju ugrađivanje u strukture stijena poput prstaca *Lithophaga lithophaga* (Turk, 2011; Gosling, 2008).

U Hrvatskoj se od školjkaša uzgajaju dagnje (*Mytilus galloprovincialis*), kamenice (*Ostrea edulis*), brbavice (*Venus verrucosa*), kunjke (*Arca noae*) i Jakobove kapice (*Pecten jacobaeus*). Kamenica ima dugu tradiciju uzgoja, dok su se dagnje uvele kao uzgojna vrsta tek početkom prošloga stoljeća. Jakobova kapica razvila se na ovom području kao otmjeno jelo, no zbog relativno težeg uzgoja većinom se vadi iz mora. Uzgoj školjkaša u Hrvatskoj većinom je intenzivan, što znači da se obavlja u uvalama na način da se u morsku vodu urone školjkaši koji se tijekom rasta hrane dostupnim hranjivima iz mora. Ako filtriraju morsku vodu, pod utjecajem su promjena u moru, poput rasta temperature i sniženja pH. Spomenute promjene negativno utječu na zdravlje, rast, metabolizam i razmnožavanje školjkaša te je zato danas najveći problem u njihovom uzgoju promjena uvjeta u moru (Román i sur., 1999; Scaramuca i sur., 1997). Uzgajatelji školjkaša također se susreću s drugim problemima kao što je obolijevanje školjkaša usred dotoka s parazitom. Jedan od takvih primjera jest obolijevanje i masovni pomor plemenitih periski (*Pinna nobilis*) u području Španjolske,

zaraza koja se 2019. godine proširila sve do Jadrana. Ovom parazitu pogoduje porast temperaturnih uvjeta u moru što dovodi do zaključka da je i u ovom kontekstu globalno zagrijavanje jedan od osnovnih sudionika u pojavi smrtnosti školjkaša (Haop.hr, 2021). Osim obolijevanja plemenitih periski, slično se nedavno dogodilo u Novigradskome moru gdje su uzgojne dagnje pomrle te se laboratorijskim istraživanjem otkrilo da je uzrok također parazit. Štete mogu biti vrlo velike budući metode za liječenje od parazita još uvijek ne postoje, što ukazuje na potrebu za dodatnim istraživanjima u znanosti (Tportal.hr, 2023).

### **1.2.1. Češljača *Aequipecten opercularis***

Češljače su školjkaši velikog globalnog značaja u ribarstvu i u marikulturi. Velika brzina rasta, ekonomska vrijednost i rana zrelost omogućuju njihovu široku upotrebu u marikulturi na globalnoj razini. Češljače pripadaju nadporodici školjkaša pod imenom *Pedctinoidea* te su jedna od najraznovrsnijih porodica školjkaša s čak 400 poznatih vrsta. Većina vrsta češljača nastanjuje dubine sublitoralnih grebena, pješčane uvale i livade morskih cvjetnica na kontinentskom šelfu, dok neke vrste uspijevaju preživjeti i do 7000 m dubine u prostoru abisala (Shumway i Parsons, 2016). Moguće ih je naći duž istočne obale sjevernog Atlantika, kao što su Sredozemno i Jadransko more (Kovačić i sur., 2023). Češljače su poznate po svojoj sposobnosti plivanja, nastaloj kao obrambeni odgovor koji im omogućuje bijeg od raznih predatora kao što su ribe, rakovi, jastozi te njihov glavni predator, morske zvjezdače *Asteroidea* (Himmelman i sur., 2009).

Najrasprostranjenije vrste češljača u sjevernom Jadranu pripadaju potporodici *Pectinidae* te na ovom području imaju visoku komercijalnu vrijednost. Osim vrlo poznate jakobove kapice *Pecten jacobus*, u potporodicu *Pectinidae* spada i češljača *Aequipecten opercularis*. Za razliku od komercijalnih vrsta školjkaša Sredozemlja kao što su kamenica *Ostrea edulis* i mediteranska dagnja *Mytilus galloprovincialis*, češljača *Aequipecten opercularis* puno se manje koristi u ljudskoj prehrani. Međutim, zbog velike potražnje, prelova i visoke tržišne cijene vrsta poput srodne Jakobove kapice, češljača *A. opercularis* je od velikog interesa kao alternativna vrsta školjkaša za uzgoj (Scaramuca i sur., 1997).

Organizam ovog istraživanja bila je upravo češljača *Aequipecten opercularis* (Slika 1), vrsta koja trenutno ne posjeduje hrvatsko ime, dok joj se na engleskom jeziku pridodaje naziv „kraljice“ (eng. *Queen scallop*). Naime, *Aequipecten opercularis* odabrana je kao alternativna vrsta školjkaša zato što ima najveći potencijal za marikulturni uzgoj u uvjetima klimatskih promjena. Nije komercijalno dostupna na tržištu kao određene vrste, te se posljedično ne koristi toliko često u ljudskoj ishrani. Izgledno predstavlja široku ljušturu s uzdužnim naborima poput lepeze, dok boje variraju od ljubičasto-bijele do narančaste u obliku zraka i mrlja. Ljuštura školjke može narasti do 9 cm u dijametru i asimetrična je s donjom spljoštenom ljušturicom, dok je gornja ljuštura konkavnijeg oblika. Ljuštura je često prekrivena raznim organizmima, posebno inkrustrirajućim spužvama. Ovaj odnos je objašnjen kao zaštitni mutualizam, gdje se smatra da spužva štiti školjkaša od grabežljivaca morskih zvjezdica, dok spužve bivaju zaštićene od morskih puževa koji se njima hrane (Carter, 2008). Češljača se u prirodi lovi povlačnim ribolovnim alatima, poput dredža i mreža potegača. Za razliku od većine školjkaša, češljača *A. opercularis* je hermafrodit što znači da ima istovremeno muške i ženske spolne stanice i organe. Može preživjeti do čak 8 godina u prirodi te nastanjuje umjerena mora istočnog Atlantika i Mediterana temperaturnih raspona između 5 – 24 °C, i saliniteta između 30 i 40 psu, na morskoj podlozi do 200 m dubine (Johnson i sur., 2015). Kako je već ranije navedeno, češljača *A. opercularis*, zajedno s drugim vrstama češljača, jedna je od nekolicine školjkaša s mogućnosti “plivanja na pogon”, za vrijeme kojeg istiskuje vodu iz mišićne šupljine te se kreće vodenim stupcem u suprotnom smjeru. Ovakav način plivanja omogućuje joj međusobno djelovanje ljuštice, mišića aduktora i plašta (Shumway i Parsons, 2016).



Slika 1. Ljuštice češljače *Aequipecten opercularis* (privatna arhiva doc. dr. sc. Petre Burić).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

U eksperimentu je ispitana održivost češljače *Aequipecten opercularis* u *ex situ* tj. akvarijskom uzgoju, uz manipulaciju parametara unutar bazena kako bi simulirali uvjete globalnog zagrijavanja. Cilj istraživanja bio je utvrditi učinak promijenjenih parametara okoliša na preživljavanje i rast češljača s promjenom temperature za 2 °C i pH za 0,2 jedinice zasebno i u kombinaciji s dodatkom probiotičke ishrane žive bakterijske kulture bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus plantarum* l.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Uzorkovanje školjkaša

Češljače su sakupljane kočaricom oko 1,9 km jugozapadno od pličine oko otoka Albanež (sjeverni Jadran) u ožujku 2020. godine. Nakon sakupljanja jedinki, odmah su potom smještene u termoizolirane spremnike punjene morskom vodom kako bi se tijekom transporta održavali stalni temperaturni uvjeti jednaki morskoj vodi s mjesta uzorkovanja. Po dolasku u Aquarium Pula, češljače su stavljene u okrugle protočne bazene od 1900 L (165 × 90 cm) u prostorijama Akvarija Pula na aklimatizaciju. Protok vode održavan je na brzini od 200 L / h. Nakon 14 dana aklimatizacije započet je eksperiment te je 60 jedinki prebačeno u tri manja protočna bazena. Svaki bazen sadržavao je 20 jedinki te su unutar bazena uvjeti postavljeni kako je opisano u poglavlju 3.2. Postavljanje posebnih uvjeta uzgoja školjkaša u bazenima. Svaka je jedinka označena malim plastičnim brojem kako bi se mogli pojedinačno pratiti njezini parametri i na početku i kraju eksperimenta.

#### 3.2. Postavljanje posebnih uvjeta uzgoja školjkaša u bazenima

Istraživanje je provedeno tijekom mjesec dana praćenja jedinki u tri različita bazena s protokom morske vode te redovitom ishranom koja se sastojala od fitoplanktonske mješavine kulture živih mikroalgi (*Tetraselmis sp.* i *Isochrysis sp.*) i liofiliziranih mikroalgi (*Skeletonema sp.*, *Phytoplankton*) uzgojenih također u Aquariumu. Kako bi količina hranjiva bila proporcionalno točna, određena je ovisno o broju jedinki u bazenu. Bazeni su odijeljeni u K1-K3 (Slika 2). U prvi „kontrolni bazen“ (Kontrola) uvjeti temperature i pH vrijednosti nisu mijenjani te su školjkaši hranjeni samo osnovnom hranom mješavine fitoplanktona. Drugi je bazen bio s „promijenjenim klimatskim uvjetima“ ( $\Delta pH\Delta T$ ), tako što je temperaturna vrijednost povišena za 2 °C, a pH vrijednost snižena za 0,2 jedinica uz osnovno prihranjivanje kao u kontrolnom bazenu. U trećem eksperimentalnom bazenu uvjeti temperature i pH isto tako bili su izmijenjeni kao u drugom bazenu, ali je uz osnovnu prehranu dodana i probiotička kultura bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus plantarum* I (žive mokre mase) kao nadohrana ( $\Delta pH\Delta T + LAB$ ). U svaki od bazena stavljeno je 20 jedinki češljača za praćenje. Parametri vode (temperatura, pH, oksidacijsko reduksijski potencijal, vodljivost,

koncentracija otopljenog kisika) mjereni su višeparametarskom sondom Hanna HI98194.



Slika 2. Eksperimentalni bazeni u koje su postavljene česljače tijekom perioda od 28 dana.

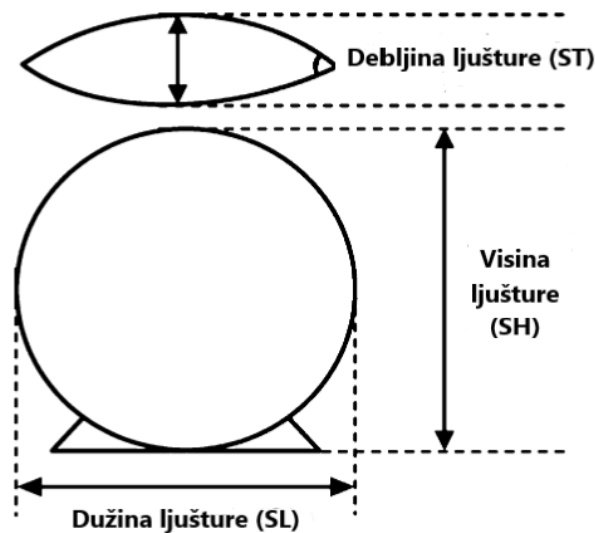
Parametri okoliša u bazenima su promijenjeni na način da je vrijednost pH smanjena putem cijevi koja je iz plinske boce ispuštala mjehuriće ugljikovog dioksida u vodu čime se smanjio pH vode bazena. Cijev je sagrađena sa sustavom spirale kako bi se mjehurići plina polako otapali u vodi bez izdizanja na površinu i prelaska u atmosferu. Temperatura je povišena pomoću grijača za akvarij koji je konstantno grijao bazen. U jednom bazenu s promijenjenim uvjetima okoliša, dodan je i probiotik. Probiotik je za školjkaše primijenjen uz ishranu kao Starter kultura.

### **3.3. Mjerenje morfometrijskih parametara česljača**

Svi su morfološki parametri uzeti na početku i na kraju eksperimenta. Nadalje, iz svakog bazena, od ukupnih preživjelih jedinki 5 je jedinki poslano u Zagreb na Prehrambeno-biotehnološki fakultet gdje je isti dan odrađena mikrobiološka analiza dok su ostale jedinke analizirane istog dana. Česljače su izvađene pomoću mrežice te osušene ručnikom kako bi rukovanje njima bilo lakše. Ostrugan je obraštaj s ljuštura pomoću skalpela te skinuti broj koji je bio zalijepljen na ljušturi za raspoznavanje svakog školjkaša. Ovi procesi čišćenja školjkaša potrebni su kako bi njihova masa mogla biti točno izmjerena. Nakon pripreme školjkaša, slijedilo je vaganje ukupne

mase školjkaša (eng. *total weight* - TW), mjerenje dužine (eng. *shell length* - SL), visine (eng. *shell height* - SH) i debljine (eng. *shell thickness* - ST) školjkaša pomoću digitalne pomične mjerke preciznosti 0,01 (Slika 3). Nadalje smo otvorili školjkaše te pažljivo odvojili mišić aduktor, gonade, hepatopankreas te ljušturu (Slika 4). Sva su tkiva također zasebno izvagana kako bi se kasnije mogle uočiti promjene u rastu ljušture naspram rasta mekog tkiva češljača.

Izračunata je stopa prirasta i specifična stopa prirasta duljine ljušture i mokre težine češljača. Ovi parametri određeni su za trideset matičnih jedinki po spremniku putem izračunavanja promjene duljine i težine tijekom eksperimentalnog razdoblja. Korištene su sljedeće jednadžbe: Stopa prirasta prema duljini (GRI) =  $(L_f - L_i)/t$ ; Stopa prirasta prema masi (GRw) =  $(W_f - W_i)/t$ ; Stopa specifičnog prirasta prema dužini (SGRI) =  $\ln(\ln(L_f) - \ln(L_i))/t \times 100$ ; i Stopa specifičnog prirasta prema masi SGRw =  $\ln(\ln(W_f) - \ln(W_i))/t \times 100$ , gdje je  $L_f$  konačna prosječna duljina ljušture,  $W_f$  je mokra težina organizma na kraju eksperimenta,  $L_i$  je početna prosječna duljina ljušture,  $W_i$  je mokra težina na početku eksperimenta,  $\ln$  označava prirodni logaritam, a  $t$  je vrijeme eksperimenta u danima.



Slika 3. Morfometrijski parametri češljače (Prilagođeno iz: Schmidt i sur., 2008).



Slika 4. Proces odvajanja dijelova mekog tkiva češljača za izračunavanje morfometrijskih parametara.

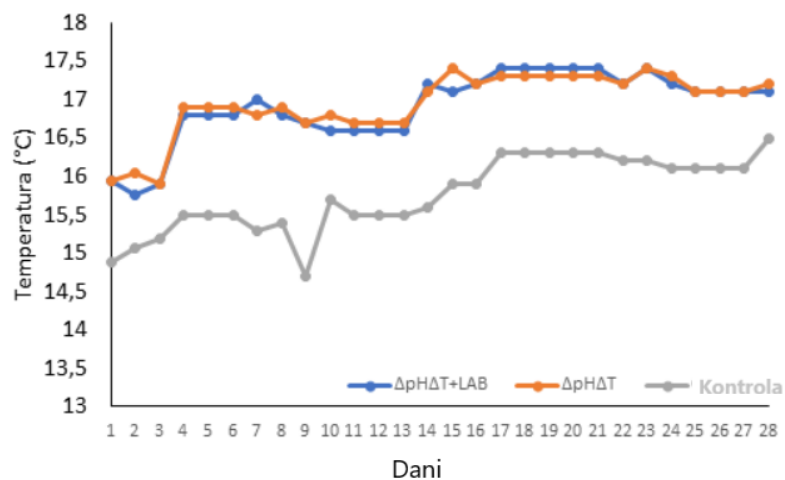
### 3.4. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani u grafovima prema srednjoj vrijednosti i pripadajućim standardnim devijacijama. Razlike između morfometrijskih parametara češljača u kontrolnom i eksperimentalnim bazenima izračunate su ANOVA analizom, a potom je korišten *post hoc* Tukey HSD test kako bi se utvrdila statistička razlika između dvije skupine školjkaša u programu Statistika 9.0.

## 4. REZULTATI

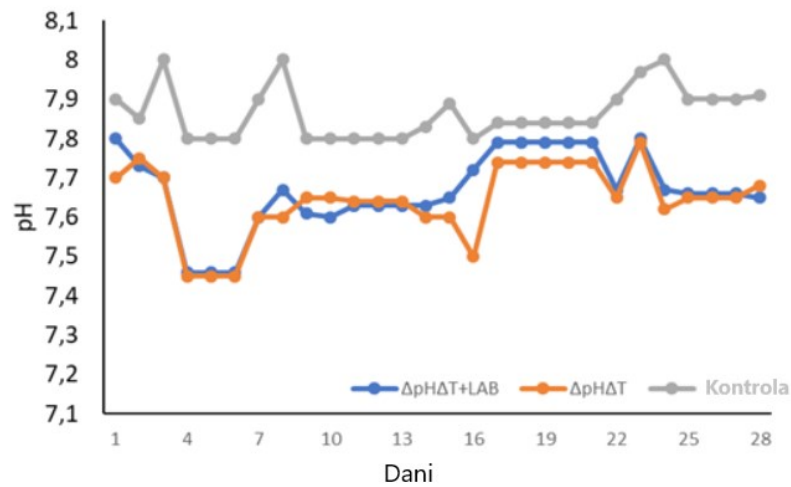
### 4.1. Analiza parametara morske vode u bazenima

Na Slici 5 prikazana je promjena temperature tijekom 28 dana trajanja eksperimenta. Temperaturni uvjeti u kontrolnom bazenu (Kontrola) nisu mijenjani, a ovisili su isključivo o temperaturi morske vode koja je tekla bazenom. Varirali su između 14,5 °C i 16,5 °C te predstavljaju uvjete u kojima bi se školjkaš nalazio u prirodi. U bazenu s uvjetima klimatskih promjena ( $\Delta pH\Delta T$ ) konstantno su održavani uvjeti povišene temperature za 2 °C u rasponu između 15,9 °C i 17,4 °C što dokazuje da je temperatura u usporedbi s Kontrolnim bazenom povišena kako bi se simulirali uvjeti globalnog zagrijavanja. U bazenu s kombiniranim učinkom klimatskih promjena i dodatkom probiotika *Lactobacillus plantarum* I ( $\Delta pH\Delta T$ +LAB), temperaturni uvjeti varirali su između 15,6 °C i 17,3 °C. U sva tri eksperimentalna bazena primijećen je porast temperature za oko 1 °C od prvog do dvadesetosmog dana, zbog zagrijavanja morske vode uslijed povišenja temperature u atmosferi tijekom proljeća.



Slika 5. Temperatura u kontrolnom bazenu (Kontrola), u uvjetima klimatskih promjena ( $\Delta pH\Delta T$ ) i u bazenu s kombiniranim učinkom klimatskih promjena i dodatkom probiotika *Lactobacillus plantarum* I ( $\Delta pH\Delta T$ +LAB).

Na Slici 6 vidljivo je da je kontrolni bazen (Kontrola) imao varijacije u vrijednosti pH između 7,8 i 8,0. Vrijednost pH je u bazenima s promijenjenim uvjetima bila za 0,2 manja u usporedbi s kontrolnim bazenom. Bazeni s uvjetima klimatskih promjena ( $\Delta\text{pH}\Delta\text{T}$ ) predstavljao je varijacije u pH između 7,4 i 7,8, isto vrijedi i za bazen s kombiniranim učinkom klimatskih promjena i dodatkom probiotika *Lactobacillus plantarum* I ( $\Delta\text{pH}\Delta\text{T}+\text{LAB}$ ). Vrijednosti pH snižavale su se i povisivale kroz dan, no vrijednosti u sva tri bazena bile su uniformne u promjenama.



Slika 6. Prikaz vrijednosti pH u kontrolnom bazenu (Kontrola), u uvjetima klimatskih promjena ( $\Delta\text{pH}\Delta\text{T}$ ) i u bazenu s kombiniranim učinkom klimatskih promjena i dodatkom probiotika *Lactobacillus plantarum* I ( $\Delta\text{pH}\Delta\text{T}+\text{LAB}$ ).

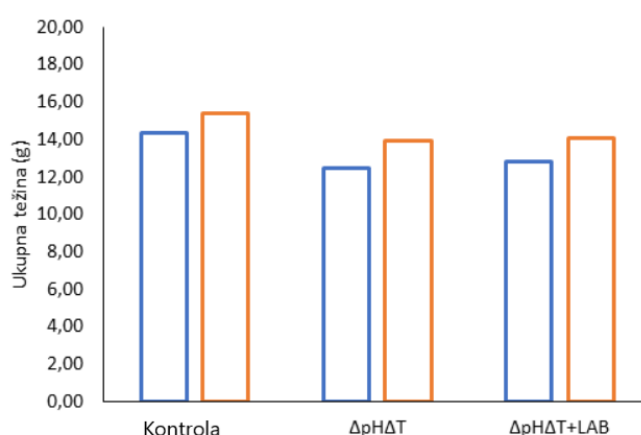
## 4.2. Analiza morfometrijskih parametara češljače

Svi morfometrijski parametri češljača iz kontrolnog i dva eksperimentalna bazena ukazuju na porast tijekom eksperimenta, ali bez statistički značajnih promjena što je vidljivo u Tablici 1. gdje  $p$  vrijednost za sve parametre prelazi 0,05.

Tablica 1. Rezultati analize morfometrijskih parametara češljača (N = 60): SS- suma kvadrata odstupanja; df- broj stupnjeva slobode između i unutar skupina; MS- srednja vrijednost sume kvadrata; F- izračun omjera varijance između i unutar skupina;  $p$  - vrijednost značajnosti (statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) su podebljane).

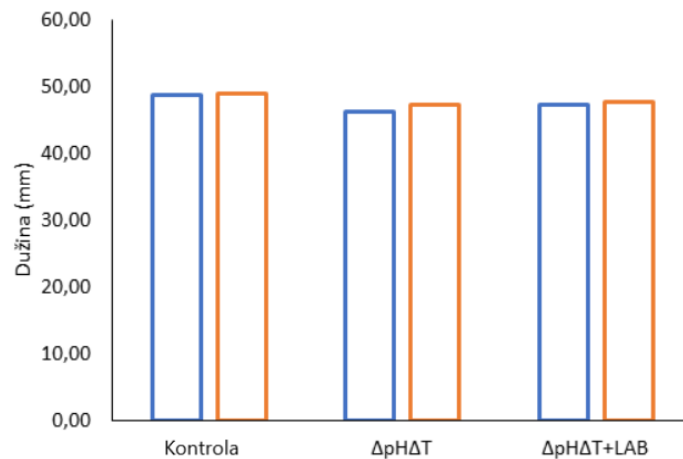
Parametar	SS	df	MS	F	$p$
<b>Ukupna masa (TW)</b>	1,63	1	1,63	0,179	0,674788
<b>Dužina (SL)</b>	0,023931	2	0,011965	2,562071	0,089442
<b>Širina (ST)</b>	3,942	1	3,942	0,7805	0,384240
<b>Visina (SH)</b>	0,25	1	0,25	0,07	0,787888

Prosječna ukupna masa češljača iz kontrolnog bazena (Kontrola) pokazuje porast s 14,32 na 15,36 g. Prosječna težina u uvjetima klimatskih promjena ( $\Delta pH\Delta T$ ) pokazuje porast s 12,45 na 13,93 g te u bazenu s kombiniranim učinkom klimatskih promjena i dodatkom probiotika *Lactobacillus plantarum* I ( $\Delta pH\Delta T$ +LAB) pokazuje porast s 12,82 na 14,10 g (Slika 7).



Slika 7. Ukupna masa češljača (g) u kontrolnom bazenu (Kontrola), u bazenu s postavljenim uvjetima klimatskih promjena ( $\Delta pH\Delta T$ ) i u bazenu s kombiniranim učinkom klimatskih promjena i dodatkom probiotika *Lactobacillus plantarum* I ( $\Delta pH\Delta T$ +LAB). Plavi stupac predstavlja ukupnu masu češljača na početku postavljanja eksperimenta dok narančasti stupac predstavlja istu vrijednost na kraju eksperimenta.

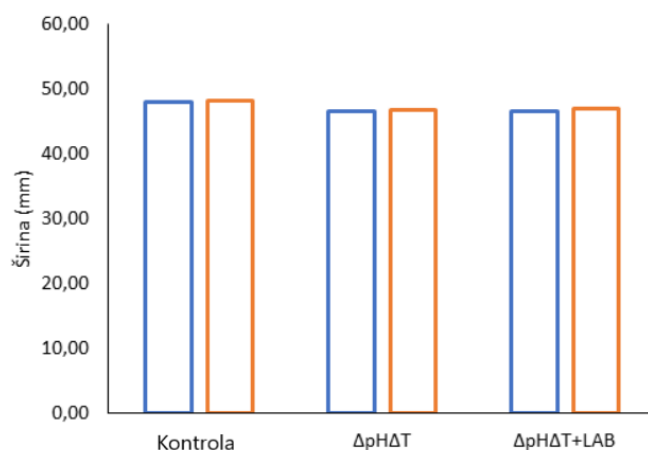
Na Slici 8 za prosječnu dužinu češljača nije uočena statistički značajna razlika u kontrolnom bazenu (Kontrola) te je parametar stagnirao od 48,63 do 48,85 mm. U bazenu s uvjetima klimatskih promjena ( $\Delta pH\Delta T$ ) vidljiv je mali porast s 46,32 na 47,28 mm, dok u bazenu s kombiniranim učinkom klimatskih promjena i dodatkom probiotika *Lactobacillus plantarum* I ( $\Delta pH\Delta T + LAB$ ) javio se porast s 46,28 na 47,62 mm.



Slika 8. Dužina češljača (mm) u kontrolnom bazenu (Kontrola), u uvjetima klimatskih promjena ( $\Delta pH\Delta T$ ) i u bazenu s kombiniranim učinkom klimatskih promjena i dodatkom probiotika *Lactobacillus plantarum* I ( $\Delta pH\Delta T + LAB$ ). Plavi stupci predstavljaju dužinu na samom početku eksperimenta dok narančasti predstavljaju dužinu na kraju eksperimenta.

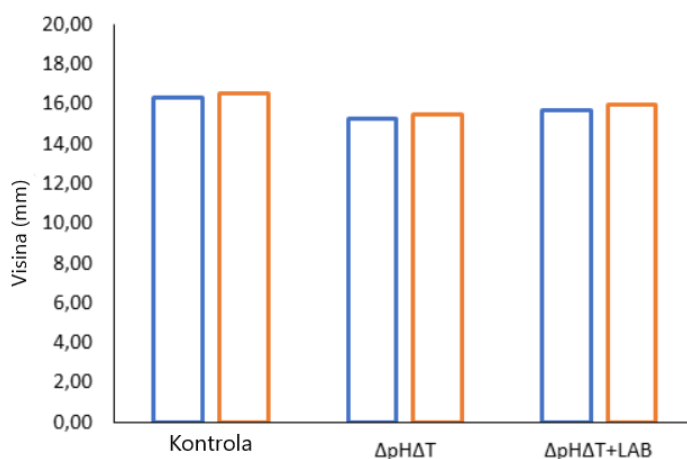
Slika 9 prikazuje debljinu češljača u tri eksperimentalna bazena. Rezultati ukazuju da nije došlo do značajne promjene prosječne debljine u kontrolnom bazenu (Kontrola) gdje su češljače porasle u širini s početnih 47,94 na 48,21 mm. U bazenu s uvjetima klimatskih promjena ( $\Delta pH\Delta T$ ) također nije vidljivo povećanje debljine češljača s 46,53 na 46,62 mm, dok u bazenu s kombiniranim učinkom klimatskih promjena i dodatkom probiotika *Lactobacillus plantarum* I ( $\Delta pH\Delta T + LAB$ ) vidljiv je nešto veći, ali još uvijek minimalan, porast s 46,60 na 46,98 mm.





Slika 9. Debljina češljača (mm) u kontrolnom bazenu (Kontrola), u uvjetima klimatskih promjena ( $\Delta pH\Delta T$ ) i u bazenu s kombiniranim učinkom klimatskih promjena i dodatkom probiotika *Lactobacillus plantarum* I ( $\Delta pH\Delta T+LAB$ ). Plavi stupci predstavljaju debljinu češljača na samom početku eksperimenta dok narančasti predstavljaju širinu na kraju eksperimenta.

Sa slike 10 zaključivo je da prosječna visina češljača u kontrolnom bazenu (Kontrola) predstavlja minimalan rast sa 16,32 na 16,52 mm. Češljače u bazenu s uvjetima klimatskih promjena ( $\Delta pH\Delta T$ ) prikazuju promjenu s 15,26 na 15,46 mm, dok u bazenu s kombiniranim učinkom klimatskih promjena i dodatkom probiotika *Lactobacillus plantarum* I ( $\Delta pH\Delta T+LAB$ ) prikazuju promjenu s 15,68 na 15,94 mm, no sve promjene u visini nisu statistički značajne.



Slika 10. Visina češljača (mm) u kontrolnom bazenu (Kontrola), u uvjetima klimatskih promjena ( $\Delta pH\Delta T$ ) i u bazenu s kombiniranim učinkom klimatskih promjena i dodatkom probiotika *Lactobacillus plantarum* I ( $\Delta pH\Delta T+LAB$ ). Plavi stupci predstavljaju visinu na samom početku eksperimenta dok narančasti predstavljaju visinu na kraju eksperimenta.

### 4.3. Analiza prirasta češljače

Prirast češljača pokazuje statistički značajne promjene u masi (P – masa) i specifičnom prirastu prema masi (SP – masa) te prirastu prema dužini (P – dužina). Specifičan prirast prema dužini nije statistički značajan između bazena s češljašama ( $p=0,439714$ ) (Tablica 2.).

Tablica 2. Rezultati analize prirasta mase (P) i specifičnog prirasta mase (SP) češljača (N = 60) prema masi i dužini: SS- suma kvadrata odstupanja; df- broj stupnjeva slobode između i unutar skupina; MS- srednja vrijednost sume kvadrata; F- izračun omjera varijance između i unutar skupina;  $p$  - vrijednost značajnosti (statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) su podebljane).

Parametar	SS	df	MS	F	p
P - masa	0,059598	2	0,029799	16,02901	<b>0,000008</b>
P - dužina	0,023931	2	0,011965	2,562071	<b>0,059442</b>
SP - masa	0,592916	2	0,296458	5,42862	<b>0,007813</b>
SP - dužina	0,026915	2	0,013457	0,837167	0,439714

Iz Tablice 3. vidljivo je da postoji značajna razlika u pojedinim grupama uzoraka (bazenima) ovisno o parametru koji se ispituje. Promatrajući prirast prema masi može se zaključiti da je u  $\Delta pH\Delta T$  bazenu u usporedbi s kontrolnim bazenom razlika u prirastu prema masi statistički značajna. U  $\Delta pH\Delta T+LAB$  bazenu je razlika u prirastu prema masi također značajna u usporedbi s prirastom u Kontrolnom bazenu i  $\Delta pH\Delta T$  bazenu.

Razlika u prirastu prema dužini u  $\Delta pH\Delta T$  bazenu u usporedbi s kontrolnim bazenom je statistički značajna, dok je razlika u prirastu prema dužini u  $\Delta pH\Delta T+LAB$  bazenu statistički značajna isključivo u usporedbi s kontrolnim bazenom, no u usporedbi s  $\Delta pH\Delta T$  bazenom nije prisutna statistički značajna razlika (Tablica 3.).

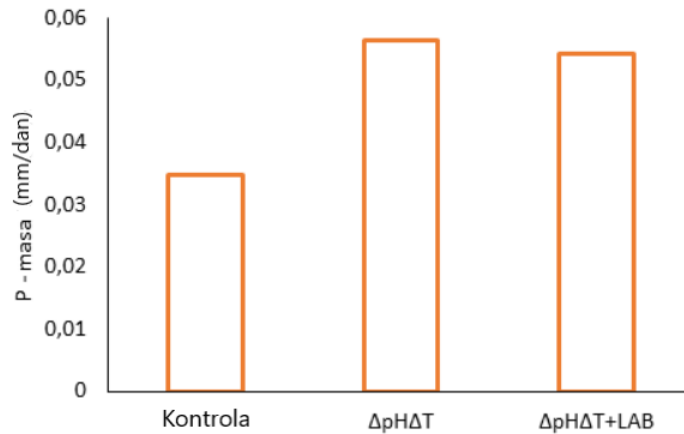
Značajna statistička razlika vidljiva je i u specifičnom prirastu prema masi, ali jedino u  $\Delta pH\Delta T+LAB$  bazenu u usporedbi s  $\Delta pH\Delta T$  bazenom, dok nije uočena značajna razlika između  $\Delta pH\Delta T$  i  $\Delta pH\Delta T+LAB$  bazena u usporedbi s kontrolnim bazenom (Tablica 3.).

Kod specifičnog prirasta prema dužini nema statistički značajne razlike u vrijednosti parametara između sva tri eksperimentalna bazena (Tablica 3.).

Tablica 3. Prikaz  $p$  vrijednosti Tukey HSD testa prema prirastu mase i dužine i specifičnom prirastu mase i dužine, između pojedinih češljača u tri eksperimentalna bazena. Statistički značajne vrijednosti su označene podebljano.

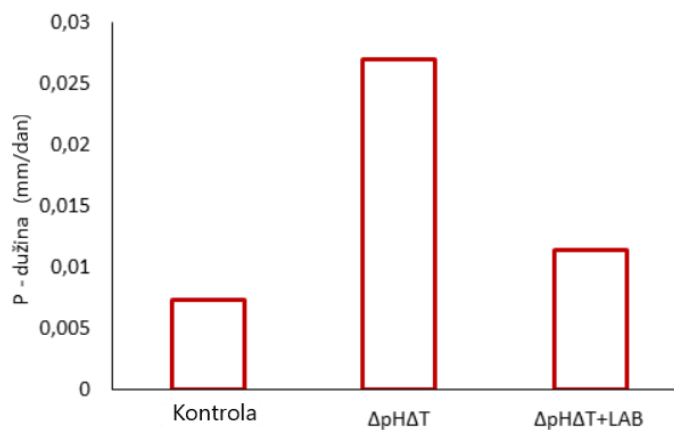
Parametar	Bazen	$\Delta p_H \Delta T$	$\Delta p_{HT+LAB}$
P - masa	Kontrola	<b>0,008128</b>	<b>0,024862</b>
	$\Delta p_{HT}$		<b>0,000125</b>
P - dužina	Kontrola	<b>0,001567</b>	<b>0,057229</b>
	$\Delta p_{HT}$		0,980750
SP - masa	Kontrola	0,501109	0,070717
	$\Delta p_{HT}$		<b>0,006200</b>
SP - dužina	Kontrola	0,419439	0,937499
	$\Delta p_{HT}$		0,683768

Slika 11 prikazuje prirast češljača prema masi u tri različita bazena. U kontrolnom bazenu (Kontrola) vidljiv je prirast prema masi od 0,035 mm/dan. Bazen s uvjetima klimatskih promjena ( $\Delta p_H \Delta T$ ) prikazuje prirast od 0,056 mm/dan, dok u bazenu s kombiniranim učinkom klimatskih promjena i dodatkom probiotika *Lactobacillus plantarum* I ( $\Delta p_H \Delta T + LAB$ ) vidljiv je vrlo sličan prirast onome u  $\Delta p_H \Delta T$  bazenu od 0,054 mm/dan, ali s većim oscilacijama u prirastu nego u bazenu sa samo promijenjenim uvjetima bez dodatka probiotika *Lactobacillus plantarum* I. Prirast prema masi u svakom od bazena je statistički značajan ( $p = 0,000008$ , Tablica 2).



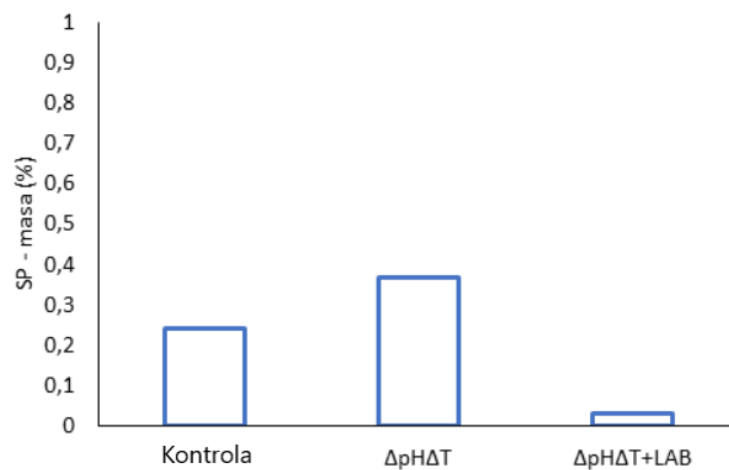
Slika 11. Prirast češljača prema masi u kontrolnom bazenu (Kontrola), u uvjetima klimatskih promjena ( $\Delta pH\Delta T$ ) i u bazenu s kombiniranim učinkom klimatskih promjena i dodatkom probiotika *Lactobacillus plantarum* I ( $\Delta pH\Delta T+LAB$ ).

Slika 12 prikazuje prirast češljača prema dužini u tri različita bazena. U kontrolnom bazenu (Kontrola) vidljiv je prirast prema dužini od 0,007 mm/dan, dok je u bazenu s uvjetima klimatskih promjena ( $\Delta pH\Delta T$ ) 0,027 mm/dan. U bazenu s kombiniranim učinkom klimatskih promjena i dodatkom probiotika *Lactobacillus plantarum* I ( $\Delta pH\Delta T+LAB$ ) javlja se prirast od 0,011 mm/dan. Sveukupna promjena prirasta u dužinu je statistički značajna ( $p= 0,059442$ ).



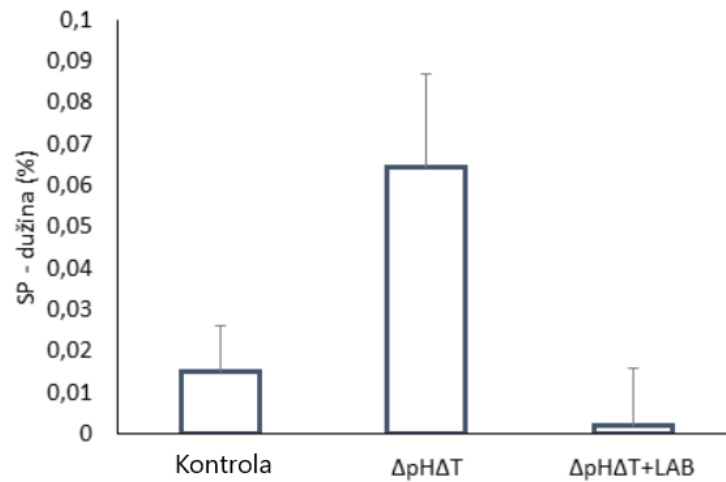
Slika 12. Prirast češljača prema dužini u kontrolnom bazenu (Kontrola), u uvjetima klimatskih promjena ( $\Delta pH\Delta T$ ) i u bazenu s kombiniranim učinkom klimatskih promjena i dodatkom probiotika *Lactobacillus plantarum* I ( $\Delta pH\Delta T +LAB$ ).

Na Slici 13 prikazan je specifičan prirast češljača prema masi. U kontrolnom bazenu (Kontrola) vidljiv je specifičan prirast prema masi od 0,243% u cjelokupnom periodu eksperimenta, dok je u bazenu s uvjetima klimatskih promjena ( $\Delta pH\Delta T$ ) narastao nešto više te pokazuje prirast od 0,367%. U bazenu s kombiniranim učinkom klimatskih promjena i dodatkom probiotika *Lactobacillus plantarum* I ( $\Delta pH\Delta T$ +LAB) vidljiv je najmanji specifičan prirast (0,032%) prema masi uspoređujući sa SP prema masi u kontrolnom bazenu bez probiotika. SP prema masi u uvjetima klimatskih promjena ( $\Delta pH\Delta T$ ) je statistički je značajan od bazena s kombiniranim učinkom klimatskih promjena i dodatkom probiotika *Lactobacillus plantarum* I ( $\Delta pH\Delta T$ +LAB) ( $p= 0,006200$ , Tablica 3).



Slika 13. Specifični prirast češljača prema masi u kontrolnom bazenu (kontrola), u uvjetima klimatskih promjena ( $\Delta pH\Delta T$ ) i u bazenu s kombiniranim učinkom klimatskih promjena i dodatkom probiotika *Lactobacillus plantarum* I ( $\Delta pH\Delta T$  +LAB).

Slika 14 predstavlja specifičan prirast češljača prema dužini. Specifičan prirast prema dužini u kontrolnom bazenu (Kontrola) pokazuje mali rast od 0,015%, u bazenu s uvjetima klimatskih promjena ( $\Delta pH\Delta T$ ) prikazuje nešto veći SP prema dužini od 0,064%. Češljače u bazenu s kombiniranim učinkom klimatskih promjena i dodatkom probiotika *Lactobacillus plantarum* I ( $\Delta pH\Delta T+LAB$ ), imaju najmanji SP prema dužini od 0,002%. U ovom slučaju SP prema dužini nije statistički značajan ( $p= 0,439714$ ).



Slika 14. Specifični prirast češljača prema dužini u kontrolnom bazenu (Kontrola), u uvjetima klimatskih promjena ( $\Delta pH\Delta T$ ) i u bazenu s kombiniranim učinkom klimatskih promjena i dodatkom probiotika *Lactobacillus plantarum* I ( $\Delta pH\Delta T+LAB$ ).

## 5. RASPRAVA

Istraživanje je osmišljeno kao odgovor na kontinuirane izazove za dugoročnu održivost sektora marikulture te zbog sigurnosti i zdravlja konzumenata morskih proizvoda u uvjetima klimatskih promjena. Osnovni cilj istraživanja bio je uočavanje utjecaja i ranjivosti živih organizama uslijed klimatskih promjena te o samim mogućnostima prilagodbe određenih vrsta na takve promjene. Tijekom trajanja eksperimenta, promjena parametara temperature i pH vrijednosti u bazenima gdje su držani školjkaši primijenjena je kako bi se utvrdio učinak nad ovom vrstom češljače. Parametri koji su se u prijašnjim istraživanjima utvrdili kao najosjetljiviji u rastu češljača (Kovačić i sur. 2023.). Nastojali su se simulirati kao uvjeti globalnog zagrijavanja *ex situ*.

U kontrolnom bazenu temperatura i pH predstavljali su karakteristične vrijednosti ovih parametara uzetih s dubine od 30 m (dubina na kojoj su uzorkovane češljače) te njihove normalne fluktuacije kroz proljetni period u Jadranskom moru (Kovačić i sur. 2022). Bazeni s promijenjenim uvjetima predstavljali su povišenje temperature za 2 °C te smanjenje pH od 0,2 jedinice. Osim promjene uvjeta u bazenima, češljačama je u jedan bazen dodana i živa probiotička kultura u ishranu. Žive bakterijske kulture moraju se držati na određenim temperaturnim uvjetima u hladnjači kako bi zadržale sposobnost učinka tijekom primjene (Ringø, 2020). Primjena živih bakterijskih kultura morskim organizmima predstavlja učinkovitost u rastu i razvoju te u imunološkom odgovoru, kao pokazano u radu od Avella i sur., 2010. u kojem je korišten probiotski soj *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501 kojeg su primjenjivali ribi klaun vrste *Amphiprion ocellaris* (jedinke iz svakog životnog stadija) dva puta na dan u vodeni medij kao i u ishranu. Rezultati su prikazali mnogo bolje preživljavanje i ubrzani razvoj organizama u skupinama tretiranim sa živim probiotikom, budući da su ličinke ribe klauna metamorforizirale 3 dana ranije od ličinki u kontrolnoj skupini. Tjelesna se masa juvenilnih jedinki nakon 5 dana povećala za tri puta u usporedbi s jedinkama iz kontrolne skupine sa manjom učestalosti deformiteta. Što se tiče imunološkog odgovora uz probiotik, tretirane ribe predstavljale su znatno manju ekspresiju HSP70 gena za razliku od kontrolne skupine riba što je u korelaciji s povećanjem preživljavanja, rasta i razvoja.

Nakon 28 dana u eksperimentalnim uvjetima, češljačama su izmjereni morfometrijski parametri te dobiveni rezultati za ukupnu težinu (TW), dužinu (SL), debljinu (ST), visinu (SH), za prirast prema masi i dužini te za specifičan prirast prema masi i dužini. Prirast označava količinu proizvedene biomase tj. ukupan rast organizma od početne veličine do završne u određenom vremenskom periodu (ovdje mm/dan) te je ovisan o početnoj količini biomase tj. početnoj veličini organizma. Specifičan prirast međutim označava količinu proizvedene biomase u određenom periodu vremena te uzima u obzir početnu veličinu organizma no ona ne određuje krajnji rast. Specifičan prirast je specifičan za određeni organizam u određenim standardnim uvjetima te može dati uvid u vrstu organizma i u njegova svojstva.

Dosadašnja istraživanja pokazuju kako se za kraj 21. stoljeća predviđa dodatno smanjenje pH u rasponu od 0,06 i 0,32 jedinice, ovisno o razmatranom scenariju emisije stakleničkih plinova. Zakiseljavanje oceana u sjeverozapadnom Sredozemnom moru već je vidljivo, uz smanjenje od 0,0013 pH jedinica godišnje (između 2003. i 2005.), blizu stopa zakiseljavanja uočenih u drugim područjima svjetskih oceana. Temperaturne promjene u moru također su uočljive u području Sredozemlja gdje ukazuju na potencijalno povećanje temperature površine mora od 1-1,5 °C u istočnom Mediteranu, Egejskom i Jadranskom moru do 2050. godine. Među ostalim posljedicama globalnog zagrijavanja, pokazalo se da je povećanje temperature mora odgovorno za događaje masovne smrtnosti, povećanu osjetljivost na patogene, morfološke promjene te promjene u metabolizmu morskih organizama (Rodrigues i sur., 2015).

Pretpostavka istraživanja bila je da će promjena temperaturnih i pH uvjeta doprinijeti manjem rastu češljača za razliku od kontrolne skupine te da će probiotik poboljšati njihovo preživljavanje i rast upravo suprotnim djelovanjem. Međutim, prema dobivenim rezultatima neosporivo je da ovakvi promijenjeni klimatski uvjeti pogoduju rastu i pozitivnom razvoju *A. opercularis*. Ta činjenica potvrđuje ispravnost odabira alternativne vrste češljače kao pogodnog organizma za uspješno preživljavanje u uvjetima promjenjivih klimatskih promjena povišenja temperature i sniženja pH. Uspoređujući rezultate u "prirodnim uvjetima" s ostalim rezultatima, zaključivo je također da je češljačama okoliš optimalniji u budućim uvjetima globalnog zagrijavanja nego u trenutnim prirodnim uvjetima. Moguće je takav pozitivan rast pripisati višoj razini



stresa kojem su organizmi izloženi pri promjenjivim klimatskim uvjetima, čime značajnije ulažu u rast kako bi mogućnost preživljavanja bila veća.

Slično ovome radu, pozitivan odnos rasta na povišenje temperature i sniženje pH vidljiv je u još jednom istraživanju provedenom nad morskom zvjezdačom *Pisaster ochraceus*, što je u suprotnosti s prethodnim istraživanjima. Jedinke su zasebno izlagane na temperaturama vode u rasponu od 5 °C do 21 °C. Povišenje temperature izazvalo je linearno povećanje brzine rasta prema višim temperaturama te je ubrzalo brzinu hranjenja, sa optimumom između 15 i 20 °C. Ispitano je i simultano djelovanje temperature i pH koji su imali pozitivne učinke na stope rasta morskih zvjezdača. Iako je relativna kalcificirana masa *P. ochraceus* opadala s povećanjem CO<sub>2</sub>, ukupna stopa rasta nije bila promijenjena. Moguće je zato što kalcificirani dio ovog organizma čini relativno mali udio njegove ukupne mase. Postoji također moguće objašnjenje da smanjeni pH povećava učinkovitost hranjenja. Na primjer, nešto niži pH morske vode mogao bi biti od pomoći u probavi tkiva plijena, čineći hranjenje energetski manje zahtjevnim. Naglašuje se kako povećanje ova dva parametra neće imati izravne negativne učinke na sve morske beskralješnjake (Gooding i sur., 2009).

Potpuno različite rezultate dobili su Gazeau i sur. 2014. godine koji ukazuju da su odrasle jedinke dagnje *Mytilus galloprovincialis* vrlo osjetljive na zagrijavanje mora sa 100% smrtnošću uočenom pri povišenoj temperaturi tijekom ljeta od +3 °C iznad gornje kritične temperaturne granice dagnji (25–28 °C). Pregledom literature radova na sličnu tematiku pronađeno je istraživanje koje su proveli Watson i sur. 2012. godine. Istraživanje se temelji na utjecaju acidifikacije mora u simultanom djelovanju s povišenjem temperature što je rezultiralo negativnim djelovanjem na žljebastu divovsku školjku *Tridacna squamosa* koja je pokazala mnogo slabije preživljavanje od <20% kada se sniženi pH (7,83) kombinirao s povišenom temperaturom (~ 30 °C). Iako ova vrsta nastanjuje pretežito topla mora južnog Pacifičkog i Indijskog oceana, ne pokazuje dobru mogućnost preživljavanja pri uvjetima globalnog zagrijavanja. Činjenica je da se većina postojećih radova temelji na već komercijalnim vrstama školjkaša te nije uzeto u obzir detektiranje vrste čija je adaptacija moguća u stresnim uvjetima.

U pogledu marikulture školjkaša postoji važna mogućnost umjetne evolucijske prilagodbe uzgajanih komercijalnih vrsta. U rijetkim slučajevima, istraživanja su

identificirala reakcije na zakiseljavanje mora, koje rezultiraju različitom osjetljivošću između populacija iste vrste. Tako su primjerice, Parker i sur., 2011. otkrili su da je rast ljuštura mladih jedinki iz populacija kamenica *Saccostrea glomerata* selektivno uzgojenih u akvakulturi (za brži rast i otpornost na bolesti) bio manje osjetljiv tijekom akutne izloženosti povišenim pCO<sub>2</sub> (4 dana na -0,4 pH) nego kod prirodne populacije (Gazeau i sur., 2013).

Iako čimbenici nisu praćeni zasebno, smatra se da je povećanje temperature iznad prirodnih uvjeta vjerojatno najvažniji pogodujući faktor za češljaču *A. opercularis* zbog toga što češljači ubrzava hranjenje, metabolizam i rast. Ova je vrsta školjkaša ograničena na toplije vode, stoga zauzima vode čija se temperatura kreće od prosječnog zimskog minimuma od 5 °C do prosječnog ljetnog maksimuma od 24 °C. Zbog široke temperaturne tolerancije, vjerojatnost je da je češljača *A. opercularis* sposobna adaptaciji na ovakvu varijabilnost u temperaturi (Johnson i sur., 2000). Simultana kombinacija sniženja pH i porasta temperature nije pokazala vidljiv negativan utjecaj na veličinu ljuštore češljača, što znači da je izgradnja ljuštore normalno napredovala usprkos sniženju pH vrijednosti. Zapravo, promjena ovih parametara pogoduje češljači *A. opercularis*, što se može zaključiti prema podacima morfometrijskih parametara tj. ukupne težine, prosječne dužine i visine češljača koji u usporedbi s podacima za kontrolni bazen predstavljaju nešto veći ili jednaki porast ovih parametara. Jedino se debljina češljače pokazala veća u kontrolnom bazenu nego u bazenu s promijenjenim uvjetima morske vode.

Bazen sa izmijenjenim uvjetima daje veći prirast i konkretne rezultate, no razlog tome je zato što su jedinke bile izložene stresu, što bi se moglo potvrditi daljnjim ispitivanjem enzimskog oksidacijskog stresa. Pretpostavka je da bi enzimi bili povišeni uz izmijenjene okolišne uvjete, dok ne bi bili povišeni uz izmijenjene uvjete i dodatak probiotika, kako on nastoji ublažiti stresno stanje češljače. Prema rezultatima prirasta i specifičnog prirasta češljača vidljivo je da probiotik dodan u ishranu češljača jednom na dan u kombinaciji s promjenom klimatskih uvjeta daje manje vrijednosti u usporedbi samo s bazenom u kojem su izmijenjeni klimatski uvjeti. Uspoređujući sa češljačama u kontrolnom bazenu s prirodnim uvjetima, češljačama iz bazena s dodatkom probiotika se općenito poboljšalo stanje, što je pozitivna strana dodavanja probiotika u populaciju češljača. Isključuje se mogućnost nedostatka hranjiva kao uzrok neuspjeha boljeg razvoja češljača uz probiotik zato što, znajući da koncentracija nutrijenata

uvelike utječe na rast organizma, nutrijenti su dodani u jednakim količinama kako prehrana ne bi utjecala na proučavane promjene parametara. Međutim, pretpostavka je da primjena probiotika školjkašima poboljšava imunološki odgovor u susretu s patogenim organizmima i ostalim izvorima bolesti koji su pozitivno korelirani s povišenom temperaturom, što bi se u tom slučaju prikazalo kao koristan učinak probiotika na ciljani uzgojni organizam. Dobiveni rezultati ukazuju na potrebu za dodatnim i opširnijim istraživanjima u području korištenja probiotika mliječne kiseline kao suplementa za školjkaše, posebice u vidu ispitivanja stanja oksidacijskog stresa u čeljačama iz ovog istraživanja.

Činjenica je da izmijenjeni klimatski uvjeti pridonose povišenom prirastu češljača, no mogući su i drugi razlozi za objašnjenje pozitivnog prirasta u masu i dužinu te specifičnog prirasta u masu i dužinu, koji su mogli indirektno utjecati na ishod eksperimenta. Moguće je da je rast morfoloških parametara češljača indirektno bio pod utjecajem sezonskih promjena kako se period eksperimenta odvijao tijekom ožujka te je u proljeće veća prirodna koncentracija hranjiva u moru uslijed čega češljače brže rastu. Uz indirektan utjecaj sezone eksperimenta, moguće je da su češljače prikazale bolji rast nego u prirodnom okruženju zato što su uvjeti u akvarijima u kojima su držane bili idealni (dovoljna stalna količina hrane, svjetlosti, cirkulacija vode itd.), kakvi u prirodi nisu.

Još jedan mogući indirektan razlog povećanja mase školjkaša jest bliženje sezone mrijesta. Razdoblje razmnožavanja češljača počinje od travnja i traje do rujna u Sredozemnom moru. Najveća stopa razmnožavanja dešava se sredinom ljeta u Jadranskom moru, osobito u srpnju i kolovozu (Kovačić i sur., 2023). U istom razdoblju, s maksimumom u srpnju i kolovozu, navodi se sezona mrijesta za druge vrste školjkaša kao kamenica *Crassostrea gigas* (Enríquez-Díaz i sur., 2009). Približavanjem vremenu razmnožavanja, češljača usredotočuje rast i razvoj u gonade kako bi do ljeta bila spremna proći kroz gametogenezu i stvaranje spolnih stanica. Budući se češljača razmnožava ljeti, gonadosomatski indeks u periodu proljeća, za vrijeme odvijanja eksperimenta, trebao bi biti povišen. Veličina gonada školjkaša je dakle mogla biti povećana što povećava ukupnu masu mekog tkiva češljače. Istovremeno uslijed rasta gonada bi masa ostalog mekog tkiva češljače trebala stagnirati zbog toga što se tada energija za rast prestaje trošiti.



## 6. ZAKLJUČAK

Vrsta češljače *A. opercularis* pogodna je za uzgoj u uvjetima globalnog zagrijavanja zbog širokog raspona tolerancije na temperaturne oscilacije i mogućnosti prilagodbe promjenama u okolišu.

Povećanje temperature i smanjenje pH vrijednosti u eksperimentalnim bazenima u trajanju od jednog mjeseca doprinijelo je boljem rastu češljača u usporedbi s rezultatima koji su zabilježeni za češljače u nepromijenjenim kontrolnim uvjetima.

Eksperiment se odvijao tijekom proljeća kada su temperature općenito najoptimalnije za razvoj školjkaša, međutim rezultati su pokazali da su i više temperature te niži pH pogodni za razvoj ove vrste.

Češljača *Aequipecten opercularis* dobar je primjer alternativne vrste školjkaša za konzumaciju na području Mediterana i Jadranskog mora, pošto će biti dostupnija od drugih prekomjerno izlovljenih vrsta. Također, ova vrsta češljače dobra je alternativna vrsta školjkaša zbog toga što je pod povišenom temperaturom i sniženim pH pokazala znatno bolje rezultate nego li u kontrolnim trenutnim uvjetima okoliša te je za pretpostaviti da će ju biti moguće i lakše uzgajati u budućim, izmijenjenim okolišnim uvjetima koji se predviđaju do kraja stoljeća.

Budući u eksperimentu nije razmotren najgori mogući scenarij za povišenje temperature mora u Mediteranu, za vrijeme ljetnih toplinskih valova, postoji mogućnost da iznad određene temperature češljača *A. opercularis* neće preživjeti ili će posljedice povišenja temperature više od 2 °C biti negativne za njezin daljnji pozitivan rast i razvoj. Zbog toga su potrebna daljnja istraživanja kako bi se mogla isključiti spomenuta mogućnost.

Potrebna su dodatna istraživanja o tome kako sniženi pH utječe na gradnju ljuštura kalcificirajućih organizama nakon dugog vremenskog perioda, posebice kod ličinki i kod mlađi ove vrste školjkaša.

Iako je primjena probiotika rezultirala općenito pozitivnim ishodom, prednost primijene probiotičkih kultura bakterija mliječne kiseline mogla bi se jasnije vidjeti na jedinkama koje dođu u kontakt s izvorom bolesti, uspoređujući preživljavanje s jedinkama koje nisu hranjene probiotikom. U tom bi se slučaju jasnije moglo zaključiti o prednosti

dodatka probiotika u populaciju školjkaša. Dodatna su istraživanja stoga svakako potreba na temu ispitivanja prednosti primjene probiotičkih starter kultura u uzgoju školjkaša.

## 7. LITERATURA

Aguirre-Guzman G., Lara-Flores M., Sánchez-Martínez J., Campa-Córdova A., Luna A. 2012. The use of probiotics in aquatic organisms: A review. *African Journal of Microbiology Research*, 6(23):4845-4857.

Avella M. A., Olivotto I., Silvi S., Place A. R., Carnevali O. 2010. Effect of dietary probiotics on clownfish: a molecular approach to define how lactic acid bacteria modulate development in a marine fish. *Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298(2):359–371.

Beck K. 2018. What is the Tuckey HSD test? Raspoloživo na: <https://sciencing.com/what-is-the-tukey-hsd-test-12751748.html> (pristupljeno 12. svibnja 2023.).

Campa-Córdova A.I., Luna-González A., Mazón-Suastegui J.M., Aguirre-Guzmán G., Ascencio F., González-Ocampo H.A. 2011. Effect of probiotic bacteria on survival and growth of Cortez oyster larvae, *Crassostrea corteziensis* (Bivalvia: Ostreidae). *Revista de Biología Tropical*, 59(1):183-91.

Carter M.C. 2008. *Aequipecten opercularis* Queen scallop. In Tyler-Walters H. and Hiscock K. Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Reviews. Plymouth: Marine Biological Association of the United Kingdom. Dostupno na: <https://www.marlin.ac.uk/species/detail/1997> (pristupljeno 10. svibnja 2023.).

Enríquez-Díaz M., Pouvreau S., Chávez-Villalba J., Le Pennec M., 2009. Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquaculture International*, 17(5):491–506.

Filgueira R., Guyondet T., Comeau L.A., Tremblay R. 2016. Bivalve aquaculture-environment interactions in the context of climate change. *Global Change Biology*, 22(12):3901-3913.

Gazeau F., Parker L.M., Comeau S., Gattus J.P., O'Connor W.A., Martin S., Pörtner H.O., Ross P.M. 2013. Impacts of ocean acidification on marine shelled molluscs. *Marine Biology*, 160:2207–2245.

- Gazeau F., Alliouane S., Bock C., Bramanti L., López C.M., Gentile M., Hirse T., Pörtner H. and Ziveri P. 2014. Impact of ocean acidification and warming on the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Frontiers in Marine Science*, 1:62.
- Gooding R.A., Harley C.D.G., Tang E., 2009. Elevated water temperature and carbon dioxide concentration increase the growth of a keystone echinoderm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(23):9316–9321.
- Gosling E. 2008. Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture. *John Wiley and Sons*, 456 str.
- Haszprunar G., Wanninger A. 2012. Molluscs. *Current Biology*, 22(13):510-514.
- Himmelman J.H., Guderley H.E., Duncan P.F. 2009. Responses of the saucer scallop *Amusium balloti* to potential predators. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 378(1-2):58–61.
- Hoque M.Z., Akter F., Hossain K.M., Rahman M.S.M., Billah M.M., Islam K.M.D. 2010. Isolation, Identification and Analysis of Probiotic properties of *Lactobacillus* Spp. from selective regional yoghurts. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 5(1):39-46.
- Haop.hr Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja Republike Hrvatske (2021) Plemenita periska (*Pinna nobilis*) i masovna smrtnost. Raspoloživo na: <https://www.haop.hr/hr/tematska-podrucja/prirodne-vrijednosti-stanje-i-ocuvanje/bioraznolikost/morske-vrste/plemenita> (pristupljeno 9. svibnja 2023.)
- Johnson A.L.A., Hickson J.A., Swan J., Brown M.R., Heaton T.H.E., Chenery S., Balson P.S. 2000. The Queen Scallop *Aequipecten opercularis*: a new source of information on late Cenozoic marine environments in Europe. Geological Society, London, Special Publications, 177(1):425–439.
- Johnson A.L.A., Valentine A.M., Schöne B.R., Leng M.J., Sloane H.J., Janeković I. 2021. Growth-increment characteristics and isotopic ( $\delta^{18}\text{O}$ ) temperature record of sub-thermocline *Aequipecten opercularis* (Mollusca:Bivalvia): evidence from modern Adriatic forms and an application to early Pliocene examples from eastern England, *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 561:110046.



- Kovačić I., Žunec A., Matešković M., Burić P., Iveša N., Štifanić M., Frece J. 2023. Commercial Quality, Biological Indices and Biochemical Composition of Queen Scallop *Aequipecten opercularis* in Culture. *Fishes*, 8(1):48.
- Lee J., Yun H.S. Cho K.W., Oh S., Kim S.H., Chun T., Kim B., Whang K.Y. 2011. Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated *Lactobacillus* spp.: Immune modulation and longevity. *International Journal of Food Microbiology*, 148(2):80-86.
- Melaku Canu D., Solidoro C., Cossarini G., Giorgi F. 2010. Effect of global change on bivalve rearing activity and the need for adaptive management. *Climate Research*, 42:13-26.
- Mohamed K.S. 2003. Probiotics and its application in mariculture. U: Winter school on Recent Advances in Mariculture Genetics and Biotechnology, 4- 24 November 2003, Cochin, 17 str.
- Parker L.M., Ross P.M., O'Connor W.A. 2011. Populations of the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, vary in response to ocean acidification. *Marine Biology*, 158:689–697.
- Prado S., Romalde J. L., Barja J.L. 2010. Review of probiotics for use in bivalve hatcheries, *Veterinary Microbiology*, 145(3–4):187-197.
- Ringø E. 2020. Probiotics in shellfish aquaculture. *Aquaculture and Fisheries*, 5(1):1-27.
- Rodrigues L.C., Bergh J.C.J.M. Van Den, Massa F., Theodorou J.A., Ziveri P., Gazeau F. 2015. Sensitivity of Mediterranean Bivalve Mollusc Aquaculture to Climate Change, Ocean Acidification, and Other Environmental Pressures: Findings from a Producer Survey. *Journal of Shellfish Research*, 34(3):1161–1176.
- Román G., Campos M.J., Acosta C.P., Cano J. 1999. Growth of the queen scallop (*Aequipecten opercularis*) in suspended culture: influence of density and depth. *Aquaculture*, 178(1-2):43-62.
- Saarela M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J., Mattila-Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3):197-215.

Scaramuca B., Teskeredžić Z., Teskeredžić E. 1997. Marikultura u Hrvatskoj, povijest i perspektive. *Ribarstvo*, 55(1):19-26.

Schmidt M., Philipp E.E.R., Abele D. 2008. Size and age-dependent changes of escape response to predator attack in the Queen scallop *Aequipecten opercularis*. *Marine Biology Research*, 4(6):442-450.

Shumway S.E., Parsons G.J. 2016. *Scallops: Biology, Ecology, Aquaculture, and Fisheries*. Treće izdanje. Elsevier: 1214 str.

Sohn S., Lundgren K.M., Tammi K., Karim M., Smolowitz R., Nelson D.R., Rowley D.C., Gómez-Chiarri M. 2016. Probiotic Strains for Disease Management in Hatchery Larviculture of the Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research*, 35(2):307-317.

Soon T.K., Zheng H. 2019. Climate Change and Bivalve Mass Mortality in Temperate Regions. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 251:109–129.

Sridarh M. 1998. Probiotics in mariculture - applications and future prospects. Proceedings of the first National Seminar on Trends in Marine Biotechnology. Institute for Coastal Area Studies, Nagercoil, str. 121-129.

Turk T. 2011. Pod površinom Mediterana, Školska knjiga, 592 str.

Tportal.hr (2023) Misteriozni pomor dagnji: Što se to događa u Novigradskom moru? 2023. Raspoloživo na: <https://www.tportal.hr/biznis/clanak/misteriozni-pomor-dagnji-sto-se-to-dogada-u-novigradskom-moru-20230117> (pristupljeno 4. svibnja 2023.)

Verschuere L., Rombaut G., Sorgeloos P., Verstraete W. 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4):655–671.

Watson S., Southgate P.C., Miller G.M., Moorhead J.A., Knauer J. 2012. Ocean acidification and warming reduce juvenile survival of the fluted giant clam, *Tridacna squamosa*. *Molluscan Research*, 32(3):177-180.

## 8. SAŽETAK

Klimatske promjene posljedica su globalnog zagrijavanja površine Zemlje, koje se odvija kako na kopnu tako i u oceanu. Pretpostavka je da će temperatura mora porasti za 2 °C u narednih 50-ak godina što bi mnoge organizme koji se koriste u marikulturi moglo dovesti do ruba preživljenja. Najveću prijetnju školjkašima danas predstavljaju promjena temperature i zakiseljavanje mora. Povišenje temperature mora utječe na metabolizam i preživljavanje školjkaša dok smanjenje pH može dovesti do onemogućenja gradnje ljuštura. U ovom je radu stoga provedeno ispitivanje utjecaja povišenja temperature (za 2 °C) i sniženja pH (za 0,2) nad alternativnom vrstom školjkaša za uzgoj češljačom *Aequipecten opercularis* kroz mjesec dana u zatočeništvu. U istraživanju su uz kontrolni bazen postavljena dva eksperimentalna bazena s povišenom temperaturom za 2 °C i sniženom pH vrijednosti za 0,2 jedinice od kojih je u jednom uz dodatak u prehrani žive probiotske bakterije uključen i soj *Lactobacillus plantarum* 1. Nakon perioda od 28 dana mjereni su morfometrijski parametri svih jedinki češljače *A. opercularis* iz triju bazena. Rezultati otkrivaju da promjena uvjeta tijekom perioda od mjesec dana pozitivno utječe na rast i razvoj češljača, što potvrđuje odabir ove vrste kao alternativne vrste školjkaša koji bi se mogao dobro prilagoditi na predstojeće klimatske promjene. Dodatak probiotika u prehranu češljača doveo je do pozitivnog prirasta, ali je isti bio smanjen u usporedbi sa skupinom češljača iz bazena samo s promijenjenim uvjetima okoliša. Dobivene je rezultate moguće objasniti činjenicom kako je probiotik normalizirao stanje organizma u stresnim uvjetima tj. odgovor češljača na promjene uvjeta okoliša, radi čega su rezultati tretmana češljača s izmijenjenim uvjetima okoliša uz dodatak probiotika bili sličniji onima u kontrolnoj skupini.

## 9. ABSTRACT

Climate change is a consequence of global warming of the Earth's surface, which takes place both on land and in the ocean. The assumption is that the sea temperature will rise by 2 °C in the next 50 years, which could bring many organisms used in mariculture to the brink of survival. The biggest threat to shellfish today is the temperature change and sea acidification. An increase in sea temperature affects the metabolism and survival of bivalves, while a decrease in pH can lead to the inability to build outer shells. Therefore, the influence of temperature increase (by 2 °C) and pH decrease (by 0.2) was investigated in this study on an alternative species for farming the bivalve mollusc conventionally called the queen scallop (*Aequipecten opercularis*) during one month in captivity. In the research, two experimental pools with a temperature increase of 2 °C and a pH value lower by 0.2 units were set up in addition to the control pool, in one of which the live probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* I strain was included in the diet. After a period of 28 days the morphometric parameters of all individual Queen scallops *A. opercularis* from three pools were measured. The results reveal that the change in conditions over a period of one month positively affects the growth and development of the queen scallop, which confirms the selection of this species as an alternative bivalve species that could adapt well to the upcoming climate changes. The addition of probiotics to the diet of queen scallops led to a positive increase in growth, but it was reduced compared to the group of queen scallops from the pool with changed environmental conditions only. The obtained results can be explained by the fact that the probiotic normalized the state of the organism under stressful conditions, i.e. the queen scallops' response to changes in environmental conditions, which is why the results of the treatment of *A. opercularis* with changed environmental conditions with the addition of probiotics were more similar to those from the control group.