

SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU
ODJEL ZA AKVAKULTURU
DIPLOMSKI STUDIJ MARIKULTURA

Luka Tešović

**Adaptacija riblje mladi na nove uzgojne uvjete: transport - fiziološki
aspekti prilagodbe**

DIPLOMSKI RAD

Mentor: doc. dr.sc. Ana Gavrilović

Dubrovnik, 2016.

Ovaj diplomski rad izrađen je pod stručnim vodstvom doc. dr.sc. Ane Gavrilović, u sklopu diplomskog studija Marikultura na Odjelu za akvakulturu Sveučilišta u Dubrovniku. Rad je izveden u suradnji s tvrtkom Cromaris na komercijalnim transportima riblje mladi.

ZAHVALA

Veliku zahvalnost, u prvom redu dugujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Ani Gavrilović koja je imala najveći utjecaj na moj profesionalni razvoj u posljednje četiri godine. Hvala joj na podršci, korisnim savjetima i što je uvijek imala strpljenja i vremena za moje brojne upite.

Posebno se zahvaljujem tvrtki Cromaris na suradnji i mr.sc. Mariju Lovrinovu što mi je omogućio ovo istraživanje. Također se zahvaljujem svim zaposlenicima i rukovodećem osoblju na uzgajalištima Lim i Budava na susretljivosti i pomoći u eksperimentalnom djelu istraživanja.

Ovim putem se želim zahvaliti i Tehnološkom i poslovno - inovacijskom centru za marikulturu MARIBIC-u Sveučilišta u Dubrovniku za ustupanje tehničke i laboratorijske opreme.

Veliko hvala dr. Alexisu Conidesu za pomoć pri statističkoj obradi podataka i dipl.ing. Marini Brailo na pomoći kod laboratorijske obrade uzoraka.

Također zahvaljujem se svojoj šefici dr. sc. Mileni Mičić i kolegama iz Aquariuma Pula na razumijevanju i podršci.

Želio bih se zahvaliti i svim svojim prijateljima i kolegama koji su uvijek bili uz mene i bez kojih cijeli ovaj tijek mog studiranja ne bi prošao tako lako i zabavno.

Posebnu zahvalnost iskazujem cijeloj svojoj obitelji koja me je uvijek podržavala i upućivala na pravi put.

I na kraju, najveću zaslugu za ono što sam postigao pripisujem svojim roditeljima, koji su uvijek bili tu, uz mene, bez obzira da li se radilo o teškim ili sretnim trenucima i bez kojih sve ovo što sam dosad postigao ne bi bilo moguće.

Veliko HVALA svima!

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Dobrobit ribe u transportu	1
1.2. Stres	2
1.3. Karakteristike transportnih sredstava	3
1.4. Gustina naseljenosti transportnih tankova	6
1.5. Priprema za transport	7
1.6. Utovar	7
1.7. Aklimatizacija	7
1.8. Istovar	8
1.9. Kvaliteta vode	8
1.9.1. Kisik.....	9
1.9.2. Ugljikov dioksid.....	10
1.9.3. UAN – ukupni amonijakalni dušik.....	11
1.9.4. Nitrit.....	13
1.9.5. Nitrat.....	13
1.9.6. Temperatura.....	13
1.9.7. pH vrijednost.....	14
1.9.8. Konduktivitet.....	14
1.9.9. Alkalinitet.....	15
1.9.10. Salinitet i osmoregulacija.....	15
1.10. Kemijska sredstva za tretiranje vode i ribe tokom transporta	16
1.10.1. Anestetici.....	16
1.10.2. Sredstva za tretiranje vode.....	18
2. MATERIJALI I METODE.....	19
3. REZULTATI.....	22
3.1. Podatci o transportu	22
3.2. Parametri kvalitete vode	23
3.2.1. Temperatura.....	23
3.2.2. Kisik.....	23
3.2.3. Ugljični dioksid.....	24

3.2.4.	Salinitet.....	24
3.2.5.	pH – vrijednost.....	25
3.2.6.	Alkalinitet.....	25
3.2.7.	Amonijak.....	27
3.2.8.	Nitriti.....	28
3.2.9.	Nitrati.....	28
3.3.	Biološki parametri.....	29
3.3.1.	Gustina ribe u tankovima.....	29
3.3.2.	Masa ribe.....	30
3.3.3.	Indeks kondicije.....	31
3.3.4.	Preživljavanje.....	32
3.3.5.	Stupanj kanibalizma.....	34
3.4.	Statistička obrada podataka.....	35
4.	RASPRAVA.....	36
5.	ZAKLJUČAK.....	43
6.	LITERATURA.....	45

SAŽETAK

Adaptacija riblje mladi na nove uzgojne uvjete: transport - fiziološki aspekti prilagodbe

U ovom je istraživanju utvrđivan utjecaj pojedinačnih čimbenika kvalitete transportne vode (kisika, temperature, saliniteta, pH - vrijednosti, alkaliniteta, ugljikovog dioksida, amonijaka, nitrita, nitrata), dužine transporta i nasadne gustoće jedinki pri transportu na preživljavanje i rast riblje mladi. Pored toga, u radu je opisan negativnog učinak pojedinačnih manipulativnih stresora u transportu na dobrobit ribe. Uzorkovanja su vršena po prispjeću komercijalnih transporta riblje mladi brancina *Dicentrarchus labrax* i orade *Sparus aurata* na uzgajališta tvrtke Cromaris Budava i Lim.

Dobiveni rezultati pokazali su da su trajanje transporta, gustina naseljenosti transportnih tankova, salinitet i amonijak čimbenici sa najznačajnijim učinkom na preživljavanje. Na osnovu rezultata također se može zaključiti da mrijestilišta koriste neadekvatne transportne protokole, ili ih pak ne poštuju.

Na osnovu rezultata i poznavanja manipulativnih stresora, koji su gotovo neizbježni u transportu, predložene su tehnološke mjere kojima bi se mogao minimalizirati stres i unaprijediti transport.

Ključne riječi: transport mladi, lubin *D. Labrax*, orada *S. Aurata*, stres, kvaliteta vode, manipulacija.

ABSTRACT

Fish fry adaptation on new farming conditions: transport - physiological aspects of adaptation

This research studied impact of individual water quality factors (oxygen, temperature, salinity, pH, alkalinity, carbon dioxide, ammonia, nitrates, nitrites), duration of transport and stocking density on growth and survival of fish fry. Furthermore, this study describes each particular stressor, including handling, equipment failures and their impact on transport efficacy and fish welfare. Sampling was carried out at the arrival of commercial transports of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and Sea bream (*S. aurata*) on the Cromaris company farms Budava and Lim.

Results indicates that the transport duration, stocking density, salinity and ammonia are factors with the most significant influence on the survival. Based on the results of this research, also can be concluded that hatcheries use inadequate fish fry manipulation protocols, or in most of cases they do not respect existing protocols.

Based on the results and existing knowledge about handling stressors, which are almost unavoidable issue for fish transportation, the technical improvements are suggested to minimize the stress and improve transportation.

Key words: fish fry transportation, sea bass *D. Labrax*, sea bream *S. Aurata*, stress, water quality, fish handling.

1. UVOD

U akvakulturi se vrlo često javlja potreba za transportom žive ribe. Postoje razne metode transporta, a najčešće su: obalni transport brodovima u tankovima, tegalj kaveza, cestovni transport i transport helikopterom na kratke udaljenosti (EFSA 2004). Kod kaveznog uzgoja brancina, *Dicentrarchus labrax* i orade, *Sparus aurata* u Republici Hrvatskoj često se javlja problem nedostatka raspoložive količine riblje mlađi zbog malih kapaciteta domaćih mrijestilišta koja ne mogu podmiriti potrebe domaćeg uzgoja. Iz tog razloga primorani smo uvoziti mlađ iz drugih zemalja, najčešće Francuske i Italije. Zbog dugog trajanja transporta i lokacija farmi koje se nalaze na razvedenoj Hrvatskoj obali i otocima, najčešći oblik transporta je cestovni transport kamionima.

Osnovna svrha transporta je siguran prijevoz maksimalne količine ribe u jedinici volumena uz postizanje što boljeg preživljavanja. No minimaliziranje stresnih čimbenika u transportu nije samo pitanje profitabilnosti i smanjenja gubitaka iz ekonomskog aspekta. Potrebno je voditi brigu o dobrobiti same ribe te osigurati jedinkama siguran transport koji neće izazvati osjećaj boli, patnje, tjeskobe i posljedice uzrokovane stresom.

1.1. Dobrobit ribe u transportu

Zadnjih se godina znatno povećala svijest o pitanju dobrobiti životinja, pogotovo u granama prehrambene industrije. Sam koncept dobrobiti i stavovi vezani za nju, predmet su rasprava javnosti i znanstvenika. Postoji više definicija dobrobiti životinja, a najpoznatiji je koncept pet sloboda koji uključuje: slobodu od gladi i žeđi, slobodu od bola, povreda i bolesti, slobodu od straha i stresa, slobodu od neudobnosti i slobodu izražavanja normalnog ponašanja (Ashley, 2007). Postoje i polemike oko pitanja može li riba osjetiti bol i strah. Rose (2002) tvrdi da u ribljem mozgu nedostaju strukture koje bi omogućile ribi da osjeti bol, dok kasnija istraživanja pokazuju da riba može osjetiti patnju u obliku boli i straha (Braithwaite i Huntingford, 2004; Chandroo i sur., 2004a,b; Portavella i sur., 2003, 2004a,b; Sneddon, 2003; Sneddon i sur., 2003a,b; Dunlop i Laming, 2005). S obzirom da ne postoji mjera za dobrobit koriste se razne fiziološke, biokemijske i metode procjene ponašanja kako bi se procijenila dobrobit (Broom, 1997).

Tijekom transporta i u svim fazama manipulacije vezanima za transport treba voditi računa o dobrobiti ribe i pravilnim rukovanjem minimalizirati stres i narušavanje dobrobiti.

Dobrobit ribe tijekom prijevoza zakonski je regulirana u Europskoj Uniji i Republici Hrvatskoj (EZ br. 1/2005; NN, br. 125/13).

1.2. Stres

Unutrašnji fiziološki mehanizmi odgovorni za adaptaciju na stres uključuju živčane, imunološke i hormonalne mehanizme (Selye, 1973). Uz adaptaciju dolazi do metaboličkog utroška, što znači da se utrošak energije preusmjerava sa normalnih funkcija na funkcije koje nastoje savladati stres (Barton i Iwama, 1991). Ti odgovori često se kategoriziraju kao primarni, sekundarni i tercijarni odgovori na stres. Primarni odgovor je otpuštanje hormona u optjecajni sustav, što zatim pokreće sekundarne odgovore koji se mogu manifestirati kroz pojačan rad srca, protok krvi kroz škrge, veću metaboličku aktivnost, kao i smanjenu koncentraciju klorida, natrija i kalija u krvnoj plazmi (Portz i sur., 2006). Tercijarni odgovori na stres mogu uključivati otpornost na bolest, promjene u ponašanju, smanjenu stopu rasta, reproduktivne poremećaje, termalnu toleranciju i toleranciju na hipoksiju (Barton i Iwama, 1991). Sam fiziološki odgovor na stres može dovesti do sloma homeostatskih mehanizama i/ili toliko iscrpiti jedinke da na koncu postane štetan (Barton i Iwama, 1991).

Stresori koji djeluju na ribu dijele se na akutne (kratkotrajne) i kronične (dugotrajne) stresore (Davis, 2006). Akutni stresori uključuju manipulaciju, zatočenje, nagle promjene u kvaliteti vode i nepravilnu aklimatizaciju, dok kronični stresori uključuju duže periode loše kvalitete vode, neprikladnu gustinu, lošu prehranu. Jak akutni stres kod ribe može rezultirati neposrednim mortalitetima, što je najčešće posljedica osmoregulacijskih poremećaja (McDonald i Milligan, 1997), dok kronični stres obično rezultira jako oslabjelim imunitetom i/ili smanjenim zalihama energije (Portz i sur., 2006). Pad imuniteta povećava prijemljivost ribe na bolesti (Wedemeyer, 1997). Čest je slučaj zakašnjelih mortaliteta, od nekoliko dana do nekoliko tjedana, ovisno o uzroku i intenzitetu. Egzaktan uzrok ovoj pojavi još nije utvrđen (Barton i Iwama, 1991; Noga 2000), no pretpostavlja se da je bar djelomice posljedica disbalansa krvnih elektrolita (Wedemeyer, 1996).

Mnogi uzroci stresa u transportu se ne mogu izbjeći, ali se stres može minimalizirati pravilnom transportnom procedurom i tehnološkim mjerama kao što su: pravilna manipulacija, izbjegavanje hranjenja mlađi prije utovara, ograničeno snižavanje temperature vode uz postupnu adaptaciju jedinki, opremljenost transportnih sredstava aeratorima i termoizoliranim bazenima, smanjenje gustine naseljenosti transportnih tankova, minimiziranje trajanja samog prijevoza, postupna aklimatizacija prije istovara i naseljavanja jedinki u uzgojne jedinice (Little, 2002; Fijan, 2006; Ashley, 2007; OIE, 2013). Održavanje optimalne kvalitete vode tokom transporta od velike je važnosti za smanjenje fiziološkog stresa.

1.3. Karakteristike transportnih sredstava

Kod cestovnog transporta žive ribe koriste se razni oblici kamiona prilagođeni da održe ribu na životu tijekom prijevoza (Berka, 1986). Kod transporta mlađi brancina *D. labrax* i orade *S. aurata* uglavnom se koriste kamioni sa više pojedinačnih u nizu poredanih tankova, opremljeni s uređajima za hlađenje, aeraciju, oksigenaciju i pumpama za mijenjanje vode (Slika 1).



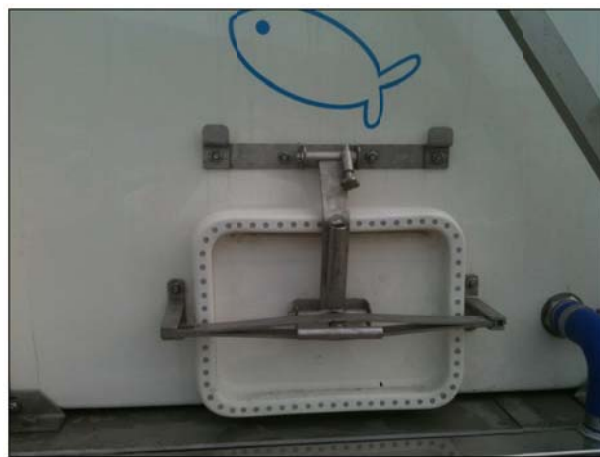
Radi bolje iskoristivosti prostora tankovi su četvrtasti, uobičajenog kapaciteta od 1600 do 2500 l. S unutrašnje strane obloženi su gel-premazom i kutevi su zaobljeni kako bi se minimaliziralo ozljeđivanje ribe (FAO). Materijal od kojeg je izrađen tank i njegova

termoizolacijska svojstva igraju veliku ulogu u održavanju željene temperature tokom transporta, pogotovo ako je velika razlika između temperature vode i temperature zraka (Tablica 1). Uglavnom se koriste stijenke od aluminijske ili stakloplastike između kojih je poliuretanska pjena. Što je manja toplinska vodljivost to su bolja izolacijska svojstva materijala.

tnih
Air

Materijal	Toplinska vodljivost (k)
šperploča	0,8
aluminij	1532
stakloplastika	0,25
poliuretan	0,16
uretan	0,18
ekspandirani polistiren	0,26

Sa strane tanka nalazi se široki četvrtasti odvod kuda se pomoću uklonjivog žlijeba i fleksibilne cijevi istovaruje riba (Slika 2). Tankovi su opremljeni i sa sigurnosnim vratašcima sa unutarnje strane koja služe za brzo oslobađanje ribe (Slika 3).



ibe



Da bi se tokom transporta uspješno održavala optimalna količina otopljenog kisika koriste se razne metode oksigenacije. Kod dugotrajnih transporta i pri visokim gustinama riba potroši velike količine kisika što je posljedica njene povećane potrebe za kisikom uzrokovane stresom. Korištenje tekućeg kisika pokazalo se kao najučinkovitija metoda, međutim aeracija je također preporučljiva za sigurnost u slučaju da prva metoda zakaže (Carmichael i sur., 1992). Stoga su kamioni opremljeni spremnicima za tekući kisik i puhalima (slika 4 i 5).





Difuzori su smješteni na dnu tanka. Tip difuzora od velike je važnosti jer dirigira veličinu mjehurića. Manji mjehurići imaju veću učinkovitost jer je kod njih veća specifična površina između vode i plina. Aeracijom i oksigenacijom se osim obogaćivanja vode kisikom, pospješuje cirkulacija unutar tanka i uklanja ugljikov dioksid i amonijak. Ukoliko su tankovi potpuno zatvoreni, u zračnom prostoru iznad vode može doći do povećanja parcijalnog tlaka CO_2 , uslijed njegovog oslobađanja iz vode, što rezultira njegovom akumulacijom u vodi. Iz tog razloga preporučljivo je da na vrhu tanka postoji otvor kako bi se zračni prostor iznad vode mogao ventilirati (Harmon, 2009). Forsberg i Summerfelt (1999) objavili su u svom istraživanju bolje rezultate uklanjanja CO_2 iz tankova opremljenih s ventilatorima.

Od kamiona do kamiona postoje neke različitosti i zapravo nema određenog standarda koji transportna sredstva moraju zadovoljavati, već se sve temelji na iskustvu osoba koje se time bave već godinama.

1.4. Gustina naseljenosti transportnih tankova

Količina ribe koja se može uspješno transportirati u određenom volumenu vode ovisi o kvaliteti vode, trajanju transporta, temperaturi, veličini i vrsti ribe. Kod transporta mlađi potrebno je više prostora i više kisika nego kod iste količine odrasle ribe (Moretti, 1999). Pored toga morske vrste su puno osjetljivije nego slatkovodne, što iziskuje niže gustoće naseljenosti u transportnim tankovima.

1.5. Priprema za transport

Riba koja se namjerava transportirati mora biti zdrava i u dobroj kondiciji. Također poželjno je da se eliminiraju oslabljene jedinke te da one bude što ujednačenije kako bi se izbjegao kanibalizam, koji je u transportu često prisutan zbog izgladnjivanja. Pravilna priprema ribe za transport obuhvaća ograničeno snižavanje temperature vode uz postupnu adaptaciju jedinki i izbjegavanje hranjena prije utovara. Preporučeno je izgladnjivanje ribe barem 24 sata prije transporta kako bi se minimalizirala akumulacija fecesa i amonijaka (Carmichael i sur., 2001). Kod kanibalističkih vrsta kao što su brancin i orada preporučuje se kraće trajanje izgladnjivanja uz kontrolu predacije. To se postiže držanjem ribe u tami i povećanjem turbiditeta vode. Također se mogu koristiti i anestetici u malim dozama (Harmon, 2009).

1.6. Utovar

Preporučljivo je da se kod punjenja transportnih tankova koristi voda iste kvalitete kao i u tankovima za kondicioniranje ribe prije transporta, a poželjno je i promijeniti vodu nakon utovara kako bi se eliminirali prljavština, feces, pjena i mukus koji su ušli u tank zajedno s ribom (Moretti i sur., 1999). Prvih 30 – 60 minuta u transportu je najkritičnije, zbog povećane aktivnosti ribe (Piper i sur, 1982.). Kod kanalskog somića (*Ictalurus punctatus*) zabilježen je pad koncentracije kisika sa 20 na <5 mg/l u tankovima pri samom početku utovara (Fries i sur., 1993). Stoga je neophodno saturirati, štoviše, presaturirati vodu sa kisikom prije utovara velike količine mladi u transportni tank. Valja napomenuti da izlov i selekcija ribe prije utovara također uznemiruju ribu te narušavaju metabolizam kisika, što treba uzeti u obzir te povećati razinu kisika i tokom kondicioniranja prije utovara (Harmon, 2009.)

1.7. Aklimatizacija

Ribu je pri istovaru potrebno postupno priviknuti na nove uvjete, odnosno vodu drugačije kvalitete. Aklimatizacija se izvodi tako što se uz pomoć pumpi postepeno izmjenjuje voda u transportnim tankovima. Noga (2000) preporučuje promjene temperature od 1° C po satu za većinu vrsta, uz napomenu da će neke vrste podnijeti i veće promjene. S

druge strane Wedemeyer (1996) objavljuje da zdravi lososi u dobroj kondiciji mogu podnijeti promjene temperature i do 10° C po satu uz lagani stres. U praksi se aklimatizacija vrši postepeno kroz nekoliko sati, čak i kada su promjene temperature veće od 10° C. Većina vrsta riba puno bolje tolerira nagli pad temperature od naglog skoka temperature (Noga, 2000). Timmons i sur. (2002) preporučuju da promjena temperature ne prelazi 5,5° C u 20 minuta. Također preporučuju, ukoliko je pH različit za više od 1, izmjenu vode 10% volumena tanka svakih 10 – 20 minuta dok se vrijednosti ne izjednače. U slučaju naglog porasta pH u tanku, do čega može doći prilikom mijenjanja vode, dolazi do prelaska netoksičnog amonijaka (NH_4^+) u toksični oblik (NH_3).

1.8. Istovar

Mlađ se iskrcava kroz odvod sa strane tanka, pomoću uklonjivog žlijeba i fleksibilne cijevi. Preporučljivo je da promjer cijevi za istovar mlađi ne bude manji od 20 – 30 cm (Horváth i sur., 1984). Nužno je da unutrašnjost cijevi bude glatka bez oštih površina te da se eliminiraju bilo kakve „stepenice“ na spojevima kako bi se izbjeglo sudaranje i ozljeđivanje ribe. U slučaju da postoji značajna visinska razlika između kaveza, gdje se namjerava nasaditi riba, i kamiona smanjuje se razina vode u tanku kako bi se smanjila brzina istovara. Za to vrijeme treba pojačati dotok kisika jer dolazi do pretrpanosti ribe u tanku uslijed smanjenja razine vode, što uz istovar može uzrokovati snažan stres i naškoditi dobrobiti ribe. Mlađ se nasaduje u pripremljene kaveze kojima su mreže dignute na 1 metar dubine kako bi se moglo promatrati ribu i njeno ponašanje nakon istovara. S obzirom da je riba gladovala nekoliko dana nije loše odmah probati dati malo hrane kako bi se izbjegao kanibalizam, mada u velikom broju slučajeva riba odbija hranu zbog stresa. Narednih nekoliko dana riba se oporavlja od transporta. Za to vrijeme prati se njezino ponašanje i sakuplja mortalitet, nakon čega se može izvršiti tegalj na željenu lokaciju.

1.9. Kvaliteta vode

Tijekom transporta može doći do značajne promjene u kvaliteti vode, kao transportnog medija, uslijed nagomilavanja produkata metabolizma. To se u prvom redu odnosi na povećanu potrošnju kisika, povećanje temperature, nagomilavanje ugljikovog dioksida,

nagomilavanje dušičnih spojeva (prvenstveno amonijaka) i promjenu pH (Weirich i Tomasso 1991).

1.9.1. Kisik

Najvažniji faktor kvalitete vode je količina otopljenog kisika. Tijekom transporta potrebno je održavati optimalnu količinu kisika te konstantno pratiti koncentraciju pomoću odgovarajućih uređaja. Topivost kisika u vodi ovisi o temperaturi, tvrdoći, salinitetu i ukupnom tlaku. Opada s povišenjem temperature i saliniteta, a raste povišenjem tlaka. Mjerimo ga u miligramima otopljenog plina u litri vode (mg/l). Saturacija ili zasićenje predstavlja količinu otopljenog plina u vodi kada su vodena i atmosferska faza u ekvilibriju (Piper i sur, 1982.). Idealna saturacija koju bi trebalo održavati tijekom transporta je 100%. Unatoč tome u tankovima često dolazi do supersaturacije koja se dešava kada je koncentracija otopljenog plina veća od koncentracije ekvilibrija (Colt, 1984). Obilje kisika unutar transportnog tanka ne indicira nužno da je riba u dobroj kondiciji. Sposobnost ribe da troši kisik ovisi o njevoj toleranciji na stres, temperaturi vode, pH, koncentraciji ugljikovog dioksida i metaboličkih produkata kao što je amonijak (Berka, 1986).

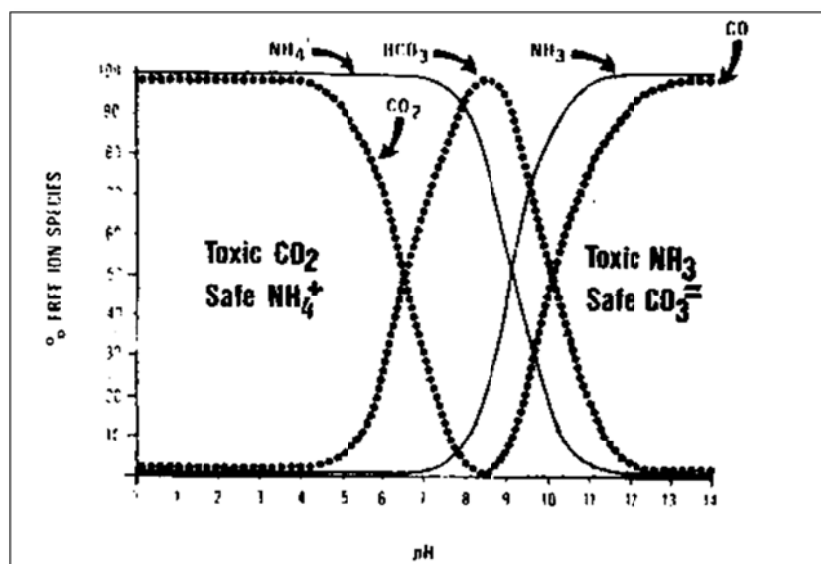
Krucijalni faktori koji utječu na potrošnju kisika i metabolizam kisika tokom transporta su masa ribe i temperatura vode. Veće jedinke i ribe koje se prevoze u vodi više temperature trebaju više kisika. Ako se primjerice temperatura poveća za 10°C (s 10°C na 20°C) potrošnja kisika će se udvostručiti (Berka, 1986).

Potrošnja kisika se također znatno povećava zbog uzbuđenja ribe izazvanog manipulacijom. Uzbuđenje povećava potrošnju kisika tri do pet puta nakon čega je, na primjer, kod mlađi salmonidnih vrsta potrebno i do nekoliko sati da se metabolizam kisika vrati na normalan nivo (Lusk and Krcál, 1974). U vodi s neograničenom količinom kisika, riba koja miruje će potrošiti minimalnu količinu kisika. Kod transporta će riba potrošiti znatno veću količinu od minimuma budući da nije u mirovanju. Štoviše, ako je riba još i uzbuđena prilikom utovara ili uznemirena tijekom transporta potrošiti će maksimalnu količinu kisika (Berka, 1986). Količina kisika koju riba potroši također ovisi o dostupnoj količini otopljenog kisika. Kod visokih koncentracija riba će potrošiti normalnu količinu ovisno koliko joj je potrebno, dok će kod nižih koncentracija potrošnja biti manja i nedostatna za normalan metabolizam kisika bez obzira na stupanj aktivnosti. Ako razina kisika nije dovoljna za potrebe ribe koja se nalazi u

tanku, jedinke će početi crpiti kisik iz zaliha u tijelu, odnosno počet će koristiti anaerobni metabolizam. To zaduženje kisikom riba mora nadoknaditi čim dođe u uvjete s normalnom razinom kisika, ili dolazi do hipoksije i smrti (Carmichael, 1984).

1.9.2. Ugljikov dioksid

Ugljikov dioksid u transportnom tanku nastaje kao produkt respiracije i bakterijske razgradnje. U visokim koncentracijama štetan je za ribu i može biti limitirajući faktor u transportu (Berka, 1986). Sudjeluje u puferskom sustavu vode koji djeluje preko karbonatno bikarbonatne ravnoteže tako što s vodom tvori ugljičnu kiselinu (H_2CO_3) koja disocira na H^+ i HCO_3^- uzrokujući pad pH vrijednosti. Ova promjena pH vrijednosti djeluje na promjenu omjera koncentracija ioniziranog i neioniziranog amonijaka (slika 6) (Amend i sur., 1982).



Riba je u tanku tijekom transporta izložena postepenom povišenju koncentracije CO_2 što do određene granice može tolerirati zbog postepene adaptacije. Ako se koncentracija CO_2 naglo povisi, što je slučaj kod utovara velikih količina ribe, dolazi do distresa. Kod istovara također treba voditi računa o adaptaciji ribe na nove uvjete jer ako se riba naglo nađe u okolišu s niskom koncentracijom CO_2 dolazi do naglog pada CO_2 u krvi što izaziva jaku metaboličku alkalozu, ekstremno stresnu za ribu (Wedemeyer, 1996). To se sprječava pravilnom

manipulacijom i mijenjanjem vode kako bi se riba postepeno adaptirala na nove uvjete prije transporta.

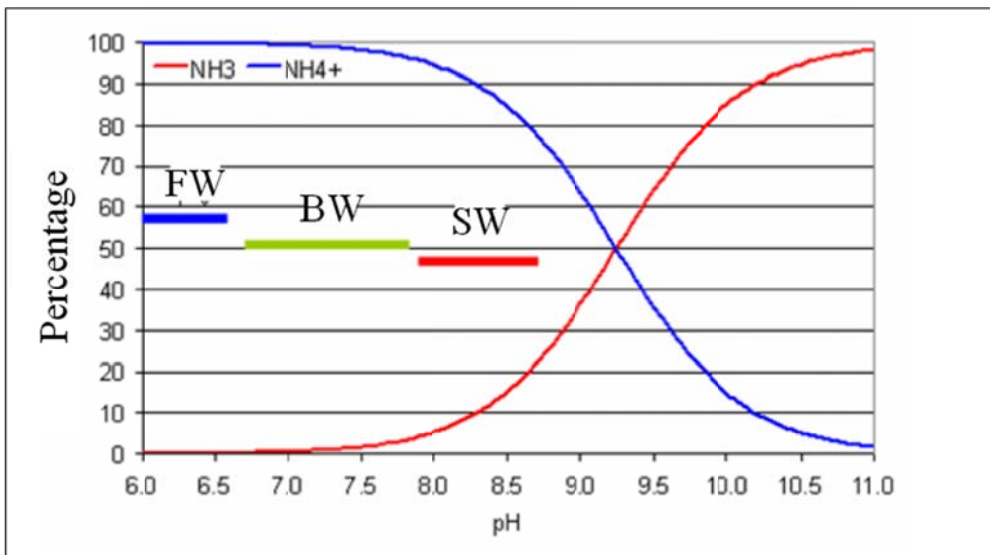
Kruzhalina i sur., 1970 daju preciznije specifikacije o kritičnim koncentracijama CO₂ te preporučuju koncentracije ispod 60 – 70 mg/l za salmonidne vrste, 40 mg/l za odrasle jesetre, 20 mg/l za mlađ jesetre, 140 – 160 mg/l za odrasle herbivorne vrste, 100 mg/l za mlađ herbivornih vrsta i 80 mg/l za ličinke herbivornih vrsta.

Kako bi se CO₂ učinkovito oslobađao iz vode transportne jedinice moraju biti opremljene adekvatnom ventilacijom zračnog prostora u tanku i aeratorima. Niže temperature su pogodnije za oslobađanje CO₂ jer mu topivost u vodi raste s povećanjem temperature. (Timmons i sur., 2002).

1.9.3. UAN – ukupni amonijakalni dušik

Amonijak primarno nastaje kao nusproizvod metabolizma proteina u organizmu i izlučuje se difuzijom preko škrga (Colt i Armstrong, 1981), a sekundarno nastaje bakterijskom razgradnjom hrane u probavnom sustavu i izlučuje se fecesom. Definiran je kao ukupni amonijakalni dušik (TAN izražen u mg/l) i predstavlja sumu ioniziranog (NH₄⁺) i neioniziranog (NH₃) amonijaka. Riba izlučuje neionizirani amonijak NH₃, a njegov prijelaz u netoksični NH₄⁺ ovisan je o pH, temperaturi i salinitetu (Slika 7)(Pillay i Kutty, 2005). Izlučeni amonijak ostaje to više u toksičnom obliku što su viši pH i temperatura (Tablica 1).

NH₃ je najtoksičniji kemijski oblik, uzrokuje brojne štetne fiziološke efekte kao što su poremećaji u osmoregulaciji, oštećenja škrga, a pri višim koncentracijama i oštećenja živčanog sustava. Njegova toksičnost veća je na višoj temperaturi i pri višim salinitetima jer se u morskoj vodi permeabilnost membrane škrga poveća do 10 puta, a uz to i povišen pH morske vode pridonosi transformaciji NH₄⁺ u NH₃ oblik (Girard, 1980).



snosti o
rske vode

od 0°

Temperature (°C)	pH				
	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0
0	0.008	0.08	0.82	7.64	45.3
2	0.01	0.10	0.97	8.90	49.3
4	0.01	0.12	1.14	10.3	53.5
6	0.01	0.14	1.34	11.9	57.6
8	0.02	0.16	1.57	13.7	61.4
10	0.02	0.19	1.83	15.7	65.1
12	0.02	0.22	2.13	17.9	68.5
14	0.03	0.25	2.48	20.2	71.7
16	0.03	0.29	2.87	22.8	74.7
18	0.03	0.34	3.31	25.5	77.4
20	0.04	0.40	3.82	28.4	79.9
22	0.05	0.46	4.39	31.5	82.1
24	0.05	0.53	5.03	34.6	84.1
26	0.06	0.61	5.75	37.9	85.9
28	0.07	0.70	6.56	41.2	87.5
30	0.08	0.80	7.46	44.6	89.0

1.9.4. Nitrit

Nitrit (NO_2) je intermedijarni produkt u procesu nitrifikacije, oksidacije amonijaka do nitrata (NO_3). Toksičan je za ribu jer utječe na sposobnost hemoglobina da prenosi kisik. Oksidira željezo u molekuli hemoglobina iz Fe^{3+} u Fe^{2+} stanje čime sprječava vezanje kisika. Produkt koji nastaje je methemoglobin, karakteristične je smeđe boje, a uzrokuje „bolest smeđe krvi“ (Timmons i sur., 2002). Količina nitrita koji ulazi u krv ovisi o omjeru nitrita i klorida u vodi s time da povišena koncentracija klora smanjuje apsorpciju NO_2 . Kod uzgoja kanalskog somića, tilapije i dužičaste pastrve u ribnjacima preporučuje se omjer $\text{Cl} - \text{NO}_2$ u odnosu 20 : 1 (Timmons i sur., 2002; Pillay i Kutty, 2005). U recirkulacijskim sistemima preporučuju se koncentracije niže od 1.0 mg/l NO_2 (Pillay i Kutty, 2005).

1.9.5. Nitrat

Nitrat je krajnji produkt nitrifikacijskog procesa. Smatra se najmanje toksičnim dušičnim produktom, sa 96 % letalnom koncentracijom od preko 1000 mg/l NO_3 za neke uzgajane vrste (Timmons i sur., 2002). Optimalne koncentracije u recirkulacijskim sustavima su ispod 10 mg/l NO_3 (Pillay i Kutty, 2005).

1.9.6. Temperatura

Ribe su poikilotermi što znači da je njihova tjelesna temperatura ovisna o temperaturi vode, kao životnog medija. Povećanjem ambijentalne temperature povećava se i intenzitet metabolizma. Kada temperatura vode premašuje optimalne vrijednosti za vrstu dolazi do termalnog šoka i eventualno smanjenog preživljavanja (Elliott, 1981; Portz i sur., 2006). Većina se ribljih vrsta može postepeno aklimatizirati na temperaturne promjene, ali nagle promjene temperature, koje su moguće tokom utovara i transporta, mogu rezultirati termalnim šokom i letalnim uvjetima (Portz i sur. 2006). Uslijed termalnog šoka može doći do poremećaja ionskih i osmoregulatornih funkcija (Finstad i sur., 1988; Houston i Schrapp, 1994). Tipični simptomi termalnog šoka su: smanjeno uzimanje hrane, smanjen rast, usporeno plivanje, iznenadni i nagli pokreti popraćeni sudaranjem o stijenke tanka i s drugim jedinkama, pojačana regurgitacija i ventiliranje škrga te pojačana defekacija (Elliott, 1981; Kieffer, 2000; Portz i sur., 2006).

Preporučeno je da kod utovara temperatura vode u tanku bude izjednačena s temperaturom vode u kojoj je riba do tad boravila kako bi se izbjegao termalni šok (Wedemeyer, 1996). Kod nekih se ribljih vrsta stres prilikom transporta može minimalizirati ako se obavlja u zimskim mjesecima ili u rashlađenoj vodi (Carmichael i sur., 1984; Erickson i sur., 1997). Niža temperatura vode usporava metaboličke procese kao što su trošenje kisika i ekskrecija amonijaka, smanjuje razinu aktivnosti, a povećava topivost kisika u vodi. Snižavanjem temperature za 10° C u transportu većina toplovodnih vrsta će smanjiti potrošnju kisika i ekskreciju amonijaka za 50 %. Stoga se preporučuje snižavanje temperature 5° - 10° C. Izuzetno je važno da se pritom temperatura snizuje postepeno, ne brže od 1° C dnevno, kako ne bi došlo do termalnog šoka (Wedemeyer, 1997). Druga istraživanja preporučuju temperature više od 15 – 20 °C kada se prevozi mlad (Pecha i sur., 1983; Orlov, 1971, 1974; Shevchenko, 1978).

Prije istovara nužno je minimalizirati temperaturnu razliku sa novim ambijentom te postepeno aklimatizirati ribu polaganim mijenjanjem vode.

1.9.7. pH vrijednost

Izlaganje ekstremnim pH vrijednostima može biti stresno i letalno za ribu. Još značajniji je indirektni efekt pH u interakciji sa drugim parametrima kvalitete vode, koji ovise o acido baznoj ravnoteži, kao što su CO₂, odnos NH₃ – NH₄ (Pillay i Kutty, 2005).

Niske vrijednosti pH povećavaju topivost nekih teških metala kao što je aluminij, bakar, kadmij i cink. Njihove visoke koncentracije u vodi toksične su za ribu, a uz to i povećavaju toksičnost sumporovodika za ribu (Fivelstad i sur., 2003).

U recirkulacijskim sustavima nisu preporučene fluktuacije veće od 0.5 (Aquafarmer, 2004).

1.9.8. Konduktivitet

Konduktivitet je mjera sposobnosti vode da provodi električnu energiju. Ta sposobnost direktno je povezana sa koncentracijom iona u vodi. Što više iona ima u vodi to je veća vodljivost. Ti ioni potječu od otopljenih soli i anorganskih materijala kao što su lužine, kloridi, sulfidi i karbonatni spojevi. Mjeri u mikro- ili mili- simensima po centimetru (μS/cm ili mS/cm) (Miller i sur., 1988),

1.9.9. Alkalinitet

Alkalinitet je kapacitet vode da neutralizira kiseline bez porasta pH. Ukupni alkalinitet predstavlja količinu baza koje su dostupne u vodi, i to: bikarbonate (HCO_3^-), karbonate (CO_3^{2-}) i u nekim slučajevima hidrokside (OH^-) (Wurts i Durborow, 1992).

Voda niskog alkaliniteta ima jako slab kapacitet da se odupre promjenama pH i zato je treba izbjegavati u većini slučajeva, pogotovo u transportu. U slatkovodnim akvakulturnim sustavima preporučuje se alkalinitet u rasponu od 20 – 200 mg/l (Stickney, 1979).

Alkalinitet morske vode je uvijek poprilično visok zbog obilja karbonata u moru, prisutnih u morskim sedimentima i otopljenih u vodi. pH vrijednost vode utječe na udio baza u ukupnom alkalinitetu, odnosno količinu ugljične kiseline, bikarbonata i karbonata. Na taj odnos također utječu temperatura i salinitet. Primjerice, u morskoj vodi pH vrijednosti 8,0 i temperature 24°C malo više od 8 % ukupnog alkaliniteta je u obliku karbonata, dok je u slatkoj vodi pri istom pH i temperaturi manje od 0,5 % ukupnog alkaliniteta zastupljeno karbonatnim ionima (Spotte, 1970.)

1.9.10. Salinitet i osmoregulacija

Salinitet je udio otopljenih soli u vodenoj otopini. Definiran je kao ukupna količina krutih tvari otopljenih u jednom kilogramu morske vode kada su svi karbonati pretvoreni u okside, brom i jod zamjenjeni klorom i sva organska tvar kompletno oksidirana (Sverdrup i sur., 1942). Vrijednost saliniteta treba biti prilagođena optimumu za vrstu jedinki koje se transportiraju i ne smije odstupati od one pri kojoj je riba aklimatizirana za transport (FAO, 1999).

Osmoregulacija predstavlja niz fizioloških mehanizama čija je osnovna zadaća održavanje osmolariteta tjelesnih tekućina konstantnim. Za razliku od morskih vrsta, tjelesne tekućine slatkovodnih riba koštunjača su hipertonične u odnosu na okolnu vodu što rezultira povećanim unosom vode i gubljenjem elektrolita pri poremećaju osmoregulacije (Moyle i Cech, 1988; Portz i sur., 2006). Zbog toga se kod transporta većine slatkovodnih vrsta preporučuje dodavanje soli u vodu kako bise smanjio osmotski gradijent, između okolne vode i tjelesnih tekućina ribe, te spriječio osmotski stres (Collins i Hulsey, 1963; Tomasso i sur.,

1980; Johnson i Metcalf, 1982; Carmichael i sur., 1984; Mazic i sur., 1991; Barton i Zitzow, 1995; Cech i sur., 1996; Swanson i sur., 1996). Izotonični uvjeti za slatkovodne koštunjače su otprilike jedna trećina koncentracije soli morske vode (Moyle i Cech, 1988). Većina gore navedenih istraživanja preporučuju salinitete od 5 – 10 ‰ kod transporta slatkovodnih riba.

1.10. Kemijska sredstva za tretiranje vode i ribe tokom transporta

U svrhu poboljšanja kvalitete vode i sprečavanja nastanka fizioloških i zdravstvenih oštećenja kod ribe u transportu moguće je koristiti razna kemijska sredstva. To uključuje anestetike i sredstva za tretiranje vode kao što su: stabilizatori pH, sredstva za uklanjanje amonijaka, baktereristatici i sredstva protiv pjenjenja.

1.10.1. Anestetici

Anestetici se primjenjuju prije i tokom transporta kako bi se usporio metabolizam ribe što rezultira smanjenjem potrošnje kisika, produkcije CO₂ i amonijaka. Također se koriste za ublažavanje stresa izazvanog povećanom aktivnošću ribe i manipulacijom (Wedemeyer, 1996). Idealan nivo sedacije u transportu je anestezija 2. stupnja (Summerfelt i Smith, 1990). To uključuje gubitak reaktivnosti na vanjske podražaje, smanjenje metaboličke aktivnosti uz održavanje homesotaze (McFarland, 1959). Optimalna doza je krucijalan faktor i varira od vrste do vrste.

Danas se na tržištu može nabaviti širok spektar anestetika koji se koriste za ribu, međutim u skladu s novijim zakonskim propisima, u većini zemalja dozvoljen je samo najskuplji, trikain-metan-sulfonat (MS-222). MS 222 veoma blago djelovanje i riba se brzo oporavlja od njega. Široko se upotrebljava u šaranskoj akvakulturi, a optimalne doze variraju od vrste do vrste. Prodaje se pod nazivima „Tricaine-S™ i Finquel™“ kao bijeli kristalasti prah koji se otapa u vodi do 11% zasićenosti otopine. Horváth i sur. (1984) preporučuju doze od 20 mg/l za šarana i amura, 10 mg/l za tolstolobika, *Hypophthalmichthys molitrix* i 35 mg/l za tolstolobika, *Hypophthalmichthys nobilis* i soma. Woynarowich i Horváth (1980) preporučuju slične koncentracije uz primjenu pune doze prije transporta te polovičnu dozu tokom samog

transporta. S obzirom da MS-222 snizuje pH vode, dodaje se natrijev bikarbonat kao pufer. Učinak mu je jači u toplijoj vodi manje tvrdoće. U Americi je ovaj anestetik i jedini dozvoljeni za ribe namijenjene prehrani, s trajanjem karence od 21 dan (Schnick, 2006).

Quinaldin (2–4 metilkinolin) je jeftiniji u odnosu na MS-222 ali je toksičan za ribu i kancerogen te se s njime treba pažljivo rukovati. Zbog njegove slabe topivosti u vodi treba ga prvo otopiti u acetonu ili alkoholu, pa tek onda pomiješati s vodom. S obzirom da su otopine s quinaldinom dosta kisele, koristi se soda bikarbena kao pufer. Preporučene doze u transportu su 25 mg/l (Woynarowich i Horváth, 1980), 15 – 30 mg/l (Dupree i Huner, 1984). Zbog smanjene apsorpcije pri nižim temperaturama praktičniji je za korištenje kod toplovodnih vrsta, dok za neke druge vrste može biti štetan.

2-fenoksietanol je još jedan anestetik koji se, iako u najvećem broju zemalja neodobren za ribu, također koristi. Blaži je i manje efikasan od MS-222 ali je zato mnogo jeftiniji. Preporučena doza je 30 – 40 ml na 100 l vode (Woynarowich i Horváth, 1980). Otopina, osim anestetičkog, ima bakteriostatičko i fungicidno djelovanje.

Benzokain (etil-4-aminobenzoat) je lokalni anestetik po kemijskom sastavu dosta sličan trikain metan sulfonatu (Mattson i Ripley, 1989; Burka i sur., 1997; Ross i Ross, 1999). Gotovo je netopiv u vodi pa ga prvo treba otopiti u acetonu, etanolu ili propilen glikolu, otapalima koja štetno djeluju na vid ribe (Burka i sur., 1997; Ross i Ross, 1999). Ne utječe na pH u otopini kao MS-222. Ima visoku sigurnosnu granicu pri nižim temperaturama. Tvrdoća vode i pH ne utječu na njegovu efikasnost. Primjenjuju se slične koncentracije kao i kod trikaina. Nije ga moguće pronaći u tkivu ribe nakon 24 sata (Allen, 1988), no u Americi i Norveškoj je propisano trajanje karence od 21 dan (Ross i Ross, 1999; Horsberg i Samuelson, 1999).

Ulje klinčića je poznati biljni derivat koji se široko koristi u industriji hrane kao aromatizer i stomatologiji kao lokalni anestetik (Anderson i sur. 1997). Dobiva iz stabljike, listova i pupoljaka biljke *Eugenia caryophyllata*. Aktivni sastojak je eugenol i sačinjava 90-95% ulja (Briozzo i sur., 1989). Pored anestetičkog djelovanja ulje klinčića ima antibakterijsko (Krapmar i Aktug, 1987; Briozzo, i sur., 1989) i fungicidno djelovanje (Bullerman i sur., 1977) te antioksidativna svojstva (Cort, 1974). Doza od 40-120 mg/l uzrokuje efikasnu anesteziju kod šarana, *Cyprinus carpio*, dok je kod dužičaste pastrve, *Oncorhynchus mykiss* dovoljna doza od 2-5 mg/l za uspješan transport (Coyle i sur., 2004).

*Aqui-S*TM relativno je nov riblji anestetik koji se proizvodi u Novom Zealandu. Napravljen je po uzoru na ulje klinčića i sastoji se 50 % od izo-eugenola i 50 % polisorbata 80. Uz anestetičko djelovanje sprječava fiziološki stres i oslobađanje kortizola u krv (Coyle i sur., 2004). Dozvoljen je za korištenje na ribi namijenjenoj za prehranu u Australiji i Novom Zealandu bez propisane karence. Efektivna doza za većinu ribljih vrsta je 20 mg/l (Coyle i sur., 2004).

1.10.2. Sredstva za tretiranje vode

Sredstva za tretiranje vode tokom transporta koriste se u svrhu održavanja parametara kvalitete vode na optimalnoj razini.

Kako bi se pH održao na optimalnoj razini od 7 do 8 mogu se koristiti puferi kao što su soda bikarbona (natrijev bikarbonat) i tris-pufer (tris-hidroksimetil amino metan). Tris-pufer lako je topiv, stabilan i jednostavan za primjenu. Do sada je testiran na 29 različitih vrsta riba i nije pokazao negativan učinak. Kod transporta se preporučuju doze od 1,3 – 2,6 g/l (Piper i sur., 1982).

Za održavanje amonijaka na optimalnoj razini tokom transporta može se koristiti zeolitni mineral klinoptilolit. To je prirodni alumosilikat koji ima visok afinitet prema pozitivno nabijenim ionima, odnosno djeluje kao ionski izmjenjivač i vezuje na sebe amonijev ion (NH_4^+). Amend i sur. (1982) preporučuju dozu od 14 g klinoptilolita po litri vode. U drugim istraživanjima korištene su doze od 10 do 40 g/l. Koncentracija neioniziranog amonijaka u tankovima sa klinoptilolitom nije prelazila 0,017 mg/l, dok je u kontrolnom tanku bez klinoptilolita bila 0,074 mg/l (Bower i Turner, 1982).

Formacija pjene i prljavštine na površini vode u tanku rezultat je aeracije, povećane ekskrecije mukusa i otpadnih produkata koje riba izlučuje pri dugotrajnim transportima, a također može biti i posljedica primjene lijekova (Berka, 1986; Rosten i sur., 2007). S obzirom da pjena smanjuje izmjenu plinova, moguće je rabiti sredstva protiv pjenjenja. Najčešće spominjane u literaturi su silikonske emulzije protiv pjenjenja. Na tržištu je najpoznatiji „Dow Corning AF“ od Austrijskog proizvođača. Za transport ribe preporučuje se 10 % otopina Dow Corning-a u dozi od 0,05 ml/l vode (Leitritz i Lewis, 1976; Dupree i Huner, 1984).

2. MATERIJALI I METODE

Istraživanje je obavljeno u razdoblju od svibnja do kolovoza 2014. godine. Uzorkovanja su vršena po prispjeću komercijalnih transporta riblje mlađi brancina *D. labrax* i orade *S. aurata* na uzgajališta tvrtke Cromaris Budava i Lim. Ukupno je praćeno osam uvoznih pošiljki, četiri na uzgajalištu Lim i četiri na uzgajalištu Budava.

Neposredno po dolasku transportnog sredstva s mlađi na uzgajalište uzimani su uzorci vode i ribe iz transportnih tankova prijevoznog sredstva za kasnije analize (Slika 8), dok su određeni parametri kvalitete vode mjereni na licu mjesta:

- temperatura
- postotak zasićenosti kisikom
- koncentracija otopljenog kisika
- pH
- salinitet
- konduktivitet



je iz

Navedeni parametri mjereni su multiparametarskom sondom YSI 85, izuzevši pH koji je mjeran ručnim pH-metrom YSI EcoSense pH 10A.

Uzorci vode iz tankova prikupljani su u čiste označene plastične boce i zaleđivani radi daljnjih analiza kvalitete vode. U ovim uzorcima analizirani su sljedeći parametri:

- alkalinitet
- koncentracija nitratnog dušika (NO₃-N)
- koncentracija nitritnog dušika (NO₂-N)
- koncentracija ukupnog amonijakalnog dušika (UAN)
- Koncentracija neioniziranog amonijaka (NH₃)
- koncentracija ioniziranog amonijaka (NH₄⁺)
- koncentracija otopljenog ugljičnog dioksida

Ukupni alkalinitet i koncentracija nitritnog dušika (NO₂-N) mjereni su fotometrom YSI 9300. Koncentracija nitratnog dušika (NO₃—N) određena je metodom redukcije hidrazinom prema Bower & Holm-Hansen (1980b). Koncentracija ukupnog amonijakalnog dušika (UAN) određena je indofenolnom metodom (Bower & Holm-Hansen, 1980a). Mjerenja vrijednosti za posljednje dvije navedene metode obavljena su spektrofotometrom SECOMAM Uvi Light PC 2 (Nova Analytics company, Ales, Francuska) u MARIBIC-u Sveučilišta u Dubrovniku. Nakon mjerenja, izračunata je koncentracija neioniziranog amonijaka (NH₃) s obzirom na pH, temperaturu i salinitet prema sljedećoj jednadžbi (Johansson & Wedborg, 1980):

$$\% \text{NH}_3 = 100 / [1 + 10^{(\log K_1 - \text{pH})}]$$

gdje je

$$\log K_1 = -0,467 + 0,00113 \times S + 2887,9 \times T^{-1}$$

$$K_1 = \text{antilog} (-0,467 + 0,00113 \times S + 2887,9 \times T^{-1})$$

pri čemu je K_1 konstanta disocijacije, S salinitet (g/L) i T temperatura (°K).

Koncentracija ugljikovog dioksida i ioniziranog amonijaka izračunata je na osnovu prethodno izmjerenih parametara prema metodi opisanoj u Timmons i Losordo (1994) te Timmons i sur. (2001).

Uz navedene parametre kakvoće vode na kraju transporta i sljedeća dva mjeseca nakon nasađivanja svake transportne skupine u uzgojne kaveze, bilježeni su podaci o masi (W) i

dužini jedinki (L) uz pomoć digitalne vage CSS 3500 i ihtiometra. Na osnovu tih podataka izračunat je indeks kondicije za pojedine kaveze po sljedećoj formuli (Adamek, 2002):

$$IK(\text{indeks kondicije}) = [W(\text{težina ribe})/L^3(\text{duljina}^3)] \times 100$$

Mjerenja su obavljena prilikom rutinskog pregleda ribe na uzgajalištu, koje je potrebno radi utvrđivanja zdravstvenog stanja, fiziološke kondicije i određivanja potrebne koncentracije hrane. Također su se tijekom mjesec dana od nasadivanja, za potrebe analiza koristili podatci tvrtke Cromaris o dnevnim mortalitetima.

Za svaku transportnu skupinu prikupljeni su podaci o trajanju prijevoza, gustoći ribe po volumenu transportnog medija te stupnju kanibalizma (Slika 9 i 10), koji se očituje po nagriženosti peraja.



itaka o

Za obradu podataka, izradu tablica i grafikona korišten je program Microsoft excell. Za određivanje korelacije između više od dviju varijabli, kako bi se prikazao utjecaj pojedinačnih mjerenih čimbenika na stupanj preživljavanja načinjena je analiza višestruke linearne regresije prema ZARR-u (1999). Kako bi se pojednostavile jednačbe, eliminacija promjenjivih varijabli, koje imaju neznatan ili nemaju nikakav učinak na određenu nepromjenjivu varijablu, načinjena je na razini značajnosti od 5%. Pritom je za utvrđivanje statističke značajnosti korelacije između varijabli upotrijebljena tablica ANOVA testa (SPSS, 2007). Analize su provedene u programu Prism 3.01.

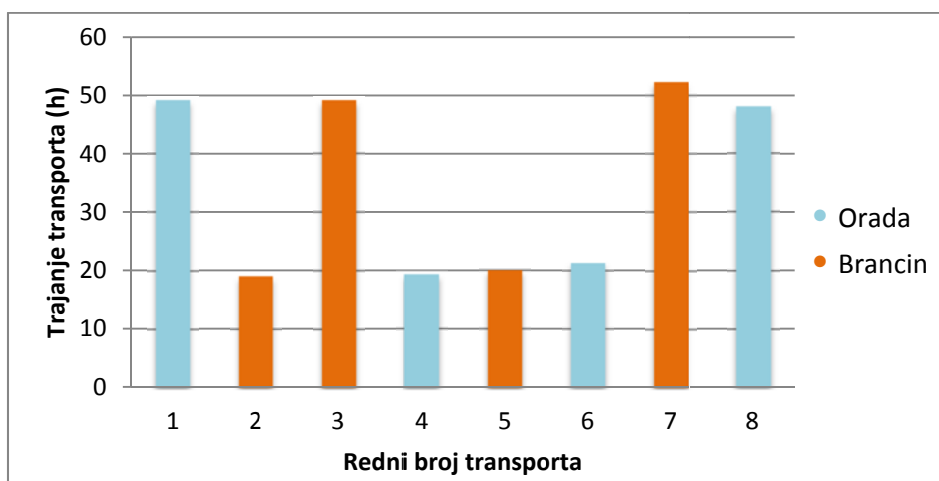
3. REZULTATI

3.1. Podatci o transportu

U tablici 3. prikazani su osnovni podatci o istraživanim transportima uvezene riblje mlađi (vrsta ribe, datum utovara, datum istovara, mjesto istovara i trajanje transporta). U četiri slučaja prevozila se orada *S. aurata*, a u četiri slučaja brancin *D. labrax*. Iz podataka je vidljivo da su prisutne razlike u trajanju pojedinih transporta, što je ujedno prikazano i na slici 11.

Tablica 3. Podatci o transportu (S.A. – *Sparus aurata*; D.L. - *Dicentrarchus labrax*)

Redni broj transporta	Vrsta ribe	Datum utovara	Datum istovara	Uzgjajalište	Trajanje transporta
1.	S.A.	20.05.2014.	22.05.2014.	Budava	49,20 h
2.	D.L.	26.05.2014.	27.05.2014.	Lim	19,00 h
3.	D.L.	27.05.2014.	29.05.2014.	Budava	49,10 h
4.	S.A.	10.06.2014.	11.06.2014.	Lim	19,30 h
5.	D.L.	17.06.2014.	18.06.2014.	Lim	20,00 h
6.	S.A.	19.06.2014.	20.06.2014.	Lim	21,30 h
7.	D.L.	06.08.2014.	08.08.2014.	Budava	52,30 h
8.	S.A.	12.08.2014.	14.08.2014.	Budava	48,05 h

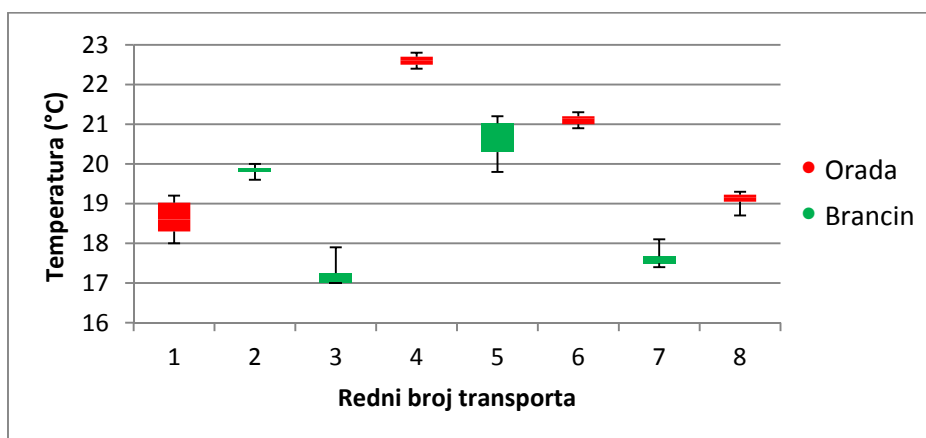


3.2. Parametri kvalitete vode

Vrijednosti parametara kvalitete vode u transportnim tankovima, pri različitim transportima prikazane su na slikama 12 – 28. Korišteni su box plot dijagrami kako bi se pokazala odstupanja vrijednosti parametara među tankovima istog transporta.

3.2.1. Temperatura

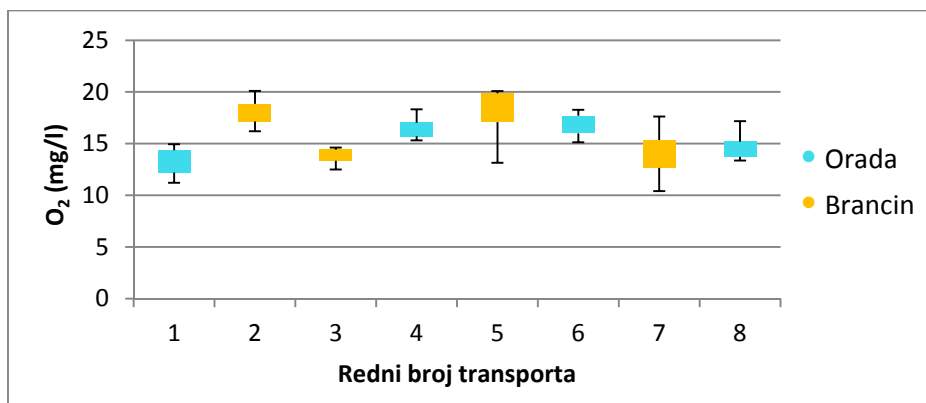
Temperatura je varirala od 17° C do 22,8° C s najvišim izmjerenim vrijednostima kod 4.,5.,6. i 8. transporta, a najnižim kod 3. i 7. transporta (Slika 12).



Slika 12. Temperatura vode pri pojedinim transportima

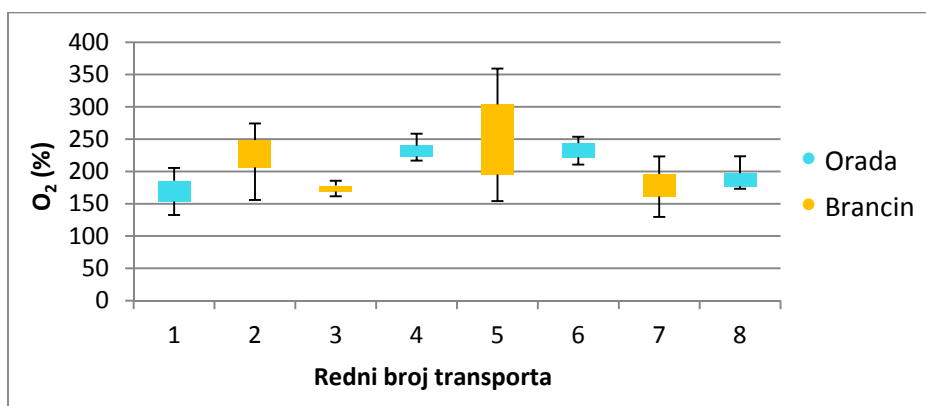
3.2.2. Kisik

Koncentracija otopljenog kisika kretala se u rasponu od 11,22 mg/l do 20,1 mg/l s najnižim koncentracijama kod 1., 3. i 7. transporta dok je kod 2. i 5. transporta zabilježena relativno visoka koncentracija (Slika 13).



Slika 13. Koncentracija otopljenog kisika pri pojedinim transportima

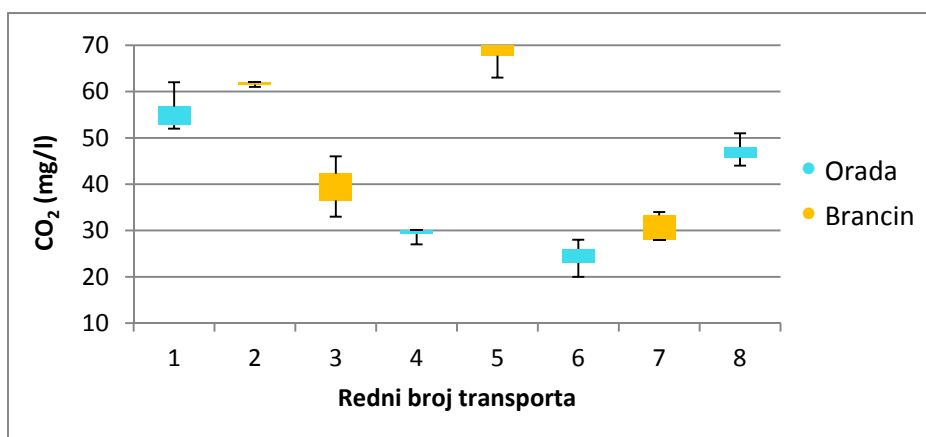
Postotak zasićenosti kisikom također je bio visok i kretao se u rasponu od 129,7 % do 359,3%. Kod 1., 3. i 7. transporta izmjerene su najniže vrijednosti dok su kod 2. i 5. transporta izmjerene najviše vrijednosti sa značajnim razlikama među tankovima (slika 14).



Slika 14. Postotak zasićenosti kisikom pri pojedinim transportima

3.2.3. Ugljični dioksid

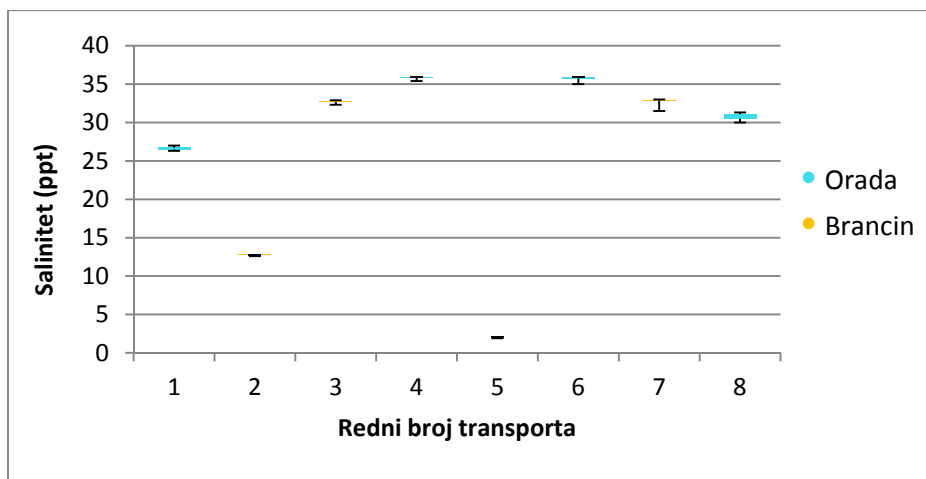
Koncentracija otopljenog ugljičnog dioksida kretala se u rasponu od 20 mg/l do 73 mg/l. Najniže koncentracije zabilježene su kod 6. transporta dok su više koncentracije izmjerene kod 1. i 2. transporta s maximumom kod 5. transporta (slika 15).



Slika 15. Koncentracija ugljičnog dioksida pri pojedinim transportima

3.2.4. Salinitet

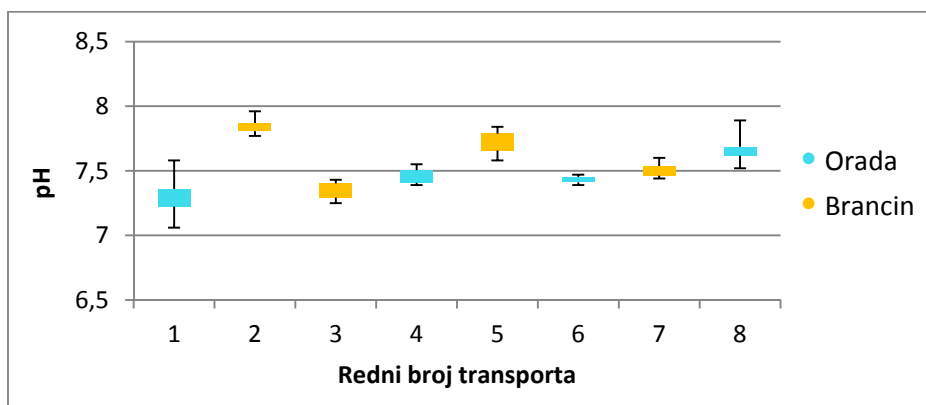
Izmjerene vrijednosti saliniteta kretale su se u rasponu od 2 do 35,9 ppt. Kod 2. i 5. transporta izmjerene su izuzetno niske vrijednosti, dok su kod ostalih transporta izmjerene uobičajene vrijednosti (Slika 16).



Slika 16. Salinitet pri pojedinim transportima

3.2.5. pH – vrijednost

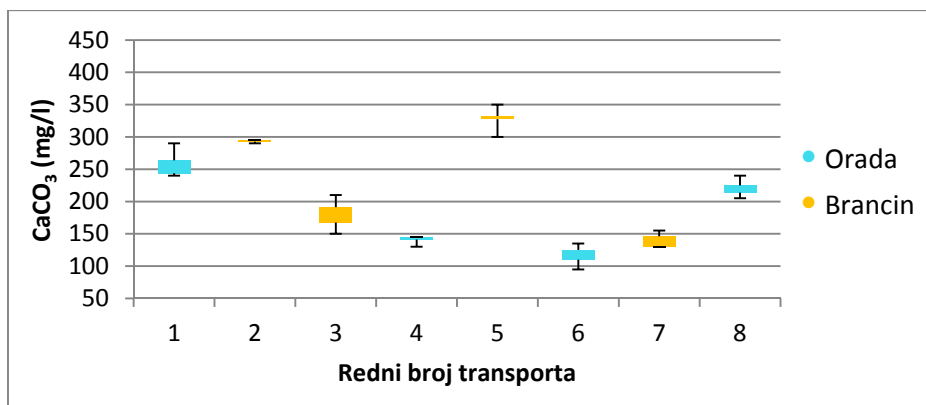
Vrijednost pH kretala se u rasponu od 7,06 do 7,96 s najnižom izmjerenom vrijednosti kod 1. transporta, dok je najviša izmjerena vrijednost bila kod 2. transporta (Slika 17).



Slika 17. pH vrijednost pri pojedinim transportima

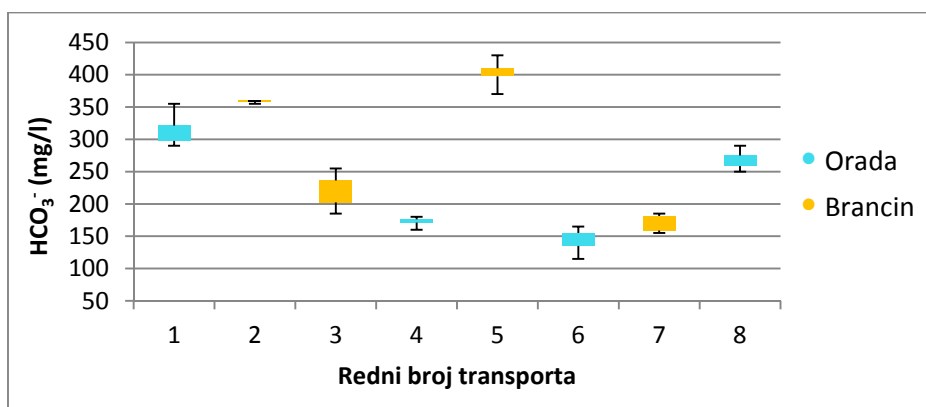
3.2.6. Alkalinitet

Koncentracija kalcijevog karbonata (CaCO_3) kretala se u rasponu od 95 mg/l do 350 mg/l s najnižim vrijednostima izmjenjenim kod 5.,7. i 8. transporta, dok je najviša vrijednost izmjerena kod 6. transporta (slika 18).



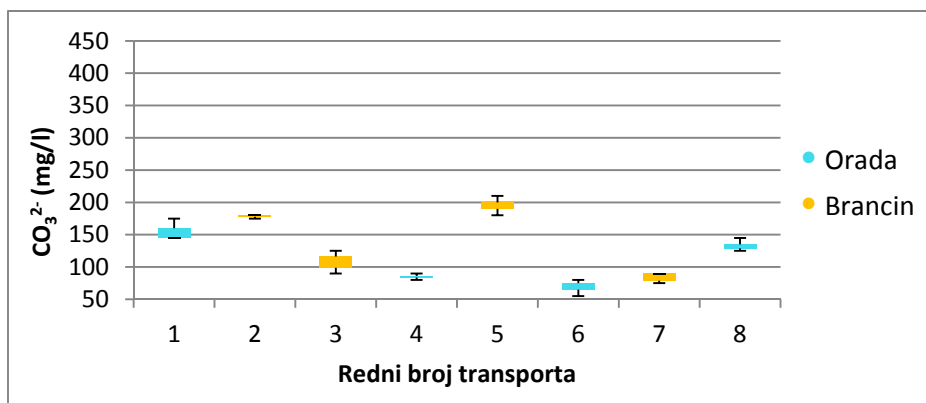
Slika 18. Koncentracija kalcijevog karbonata (CaCO₃) pri pojedinim transportima

Koncentracija bikarbonata (HCO₃⁻) kretala se u rasponu od 115 mg/l do 430 mg/l, također s najnižim vrijednostima izmjerenim kod 5., 7. i 8. transporta, a najvišim vrijednostima kod 6. transporta (slika 19).



Slika 19. Koncentracija bikarbonata (HCO₃⁻) pri pojedinim transportima

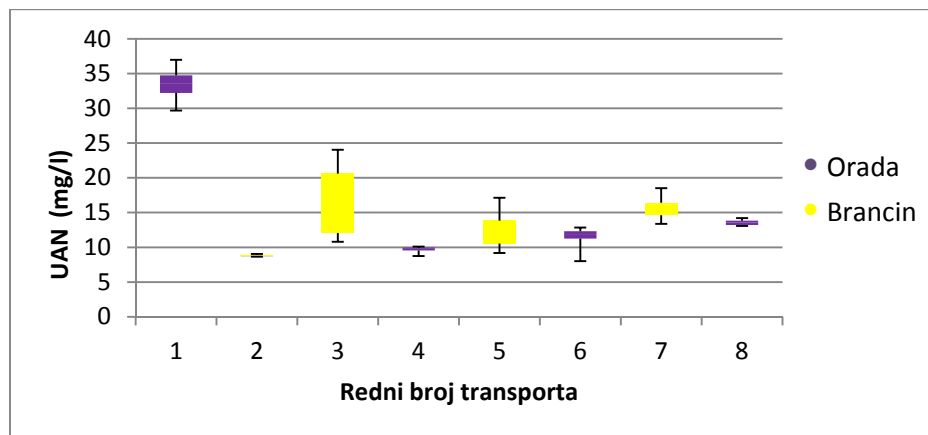
Koncentracija karbonata (CO₃²⁻) kretala se u rasponu od 65 mg/l do 210 mg/l, također s najnižim vrijednostima izmjerenim kod 5., 7. i 8. transporta, a najvišim vrijednostima kod 6. transporta (slika 20).



Slika 20. Koncentracija karbonata (CO₃²⁻) pri pojedinim transportima

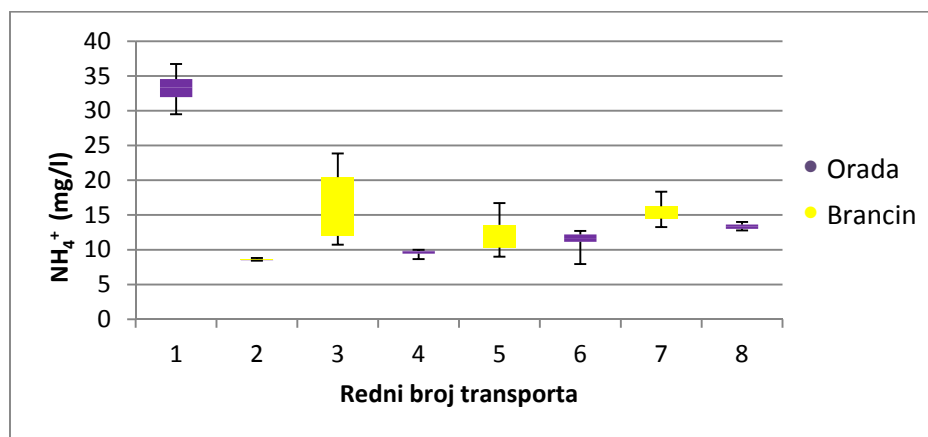
3.2.7. Amonijak

Koncentracija ukupnog amonijakalnog dušika kretala se u rasponu od 8,018 mg/l do 36,973 mg/l. Najviše koncentracije izmjerene su kod 1. transporta (slika 21).



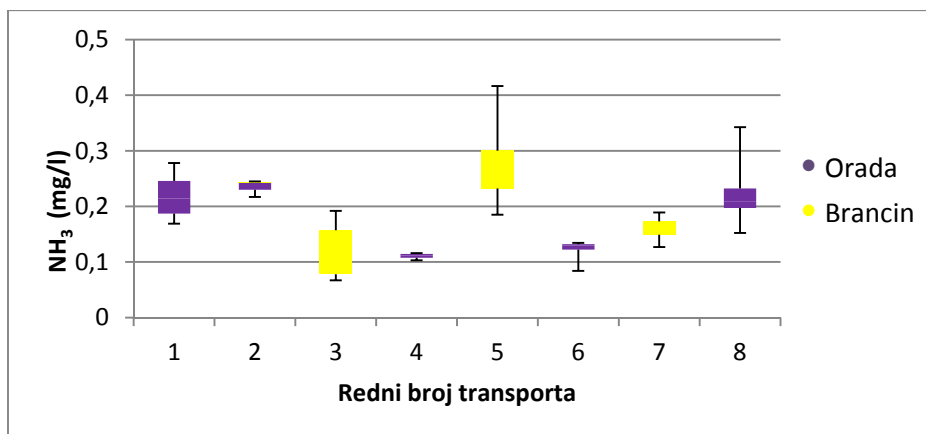
Slika 21. Koncentracija ukupnog amonijakalnog dušika pri pojedinim transportima

Koncentracija ioniziranog amonijaka (NH_4^+) kretala se u rasponu od 7,934 mg/ do 36,739 mg/l, također s najvišim izmjerenim vrijednostima kod 1. transporta (slika 22).



Slika 22. Koncentracija ioniziranog amonijaka (NH_4^+) pri pojedinim transportima

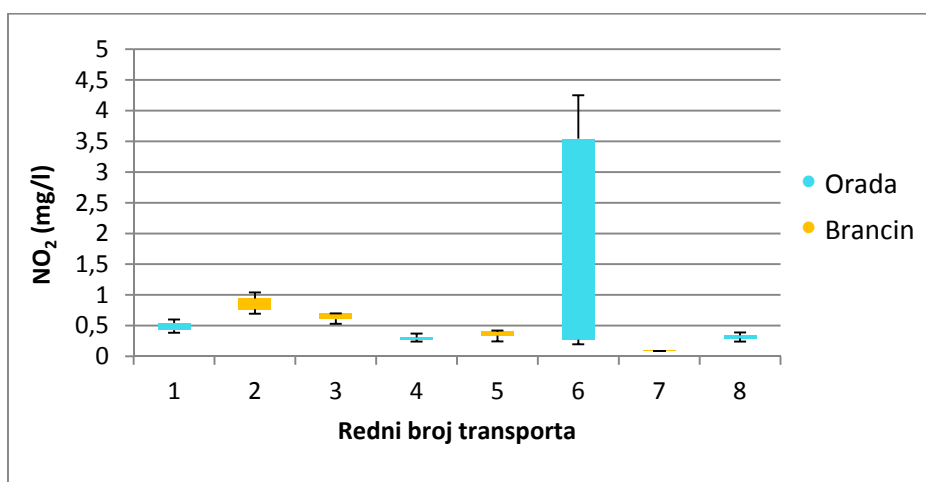
Koncentracija neioniziranog amonijaka (NH_3) kretala se u rasponu od 0,067 mg/l do 0,417 mg/l. Najviše koncentracije izmjerene su kod 4., 6. i 9. transporta (slika 23).



Slika 23. Koncentracija neioniziranog amonijaka (NH₃) pri pojedinim transportima

3.2.8. Nitriti

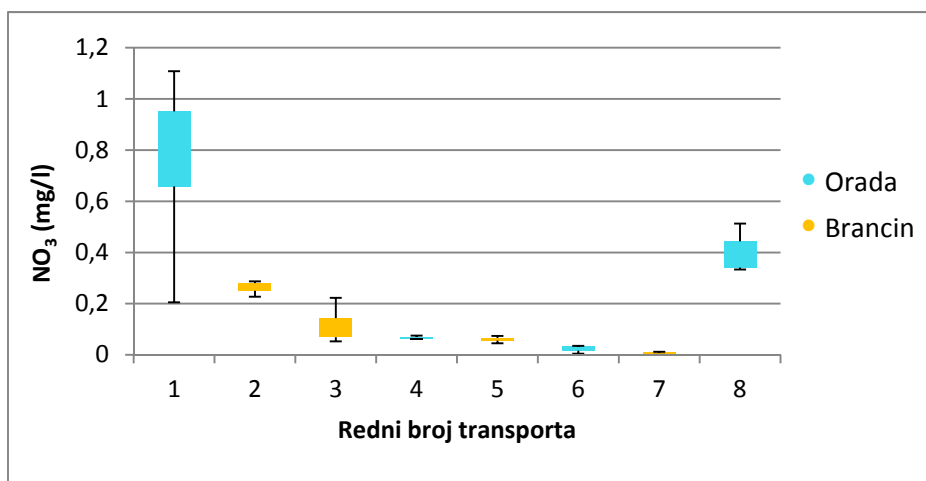
Koncentracija nitrita (NO₂) kretala se u rasponu od 0,197 mg/l do 4,25 mg/l, s najvišom koncentracijom izmjenenom kod 7. transporta (slika 24).



Slika 24. Koncentracija nitrita (NO₂) pri pojedinim transportima

3.2.9. Nitrati

Koncentracija nitrata (NO₃) kretala se u rasponu od 0 mg/l do 1,108 mg/l. Najviša koncentracija izmjerena je kod 1. transporta, dok su kod 2. i 9. transporta izmjerene nešto niže koncentracije, a kod ostalih transporta vrlo niske koncentracije (slika 25).



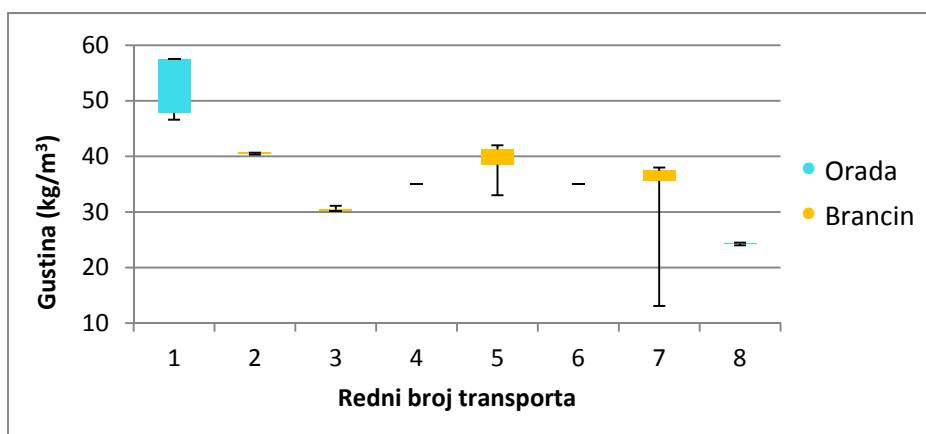
Slika 25. Koncentracija nitrata (NO₃) pri pojedinim transportima

3.3. Biološki parametri

Na slikama 26. – 36. prikazani su podatci o masi ribe, indeksu kondicije, preživljavanju i stupnju kanibalizma koji su mjereni, izračunati i bilježeni odmah po dospijeću pošiljke ribe te sljedeća dva mjeseca nakon nasađivanja u uzgojne jedinice.

3.3.1. Gustina ribe u tankovima

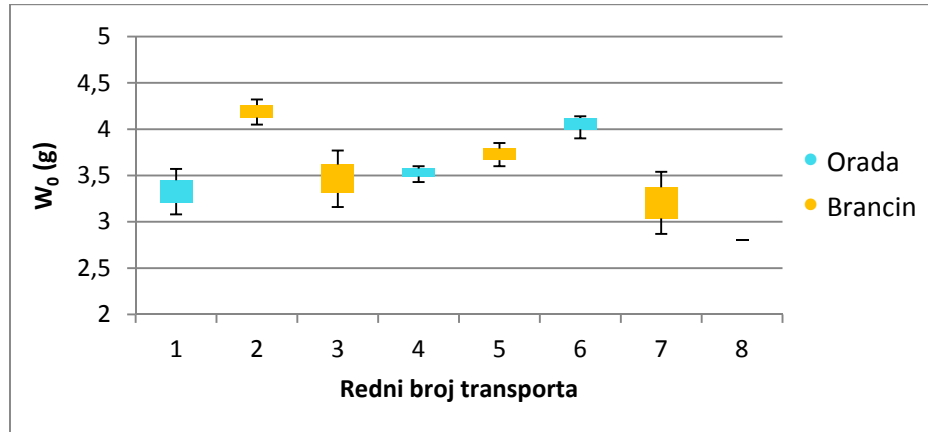
Gustina ribe u tankovima kretala se u rasponu od 13,1 kg m⁻³ do 51,5 kg m⁻³. Više gustine zabilježene su kod 1., 2. i 5. transporta (Slika 26).



Slika 26. Gustina ribe u tankovima pri pojedinim transportima

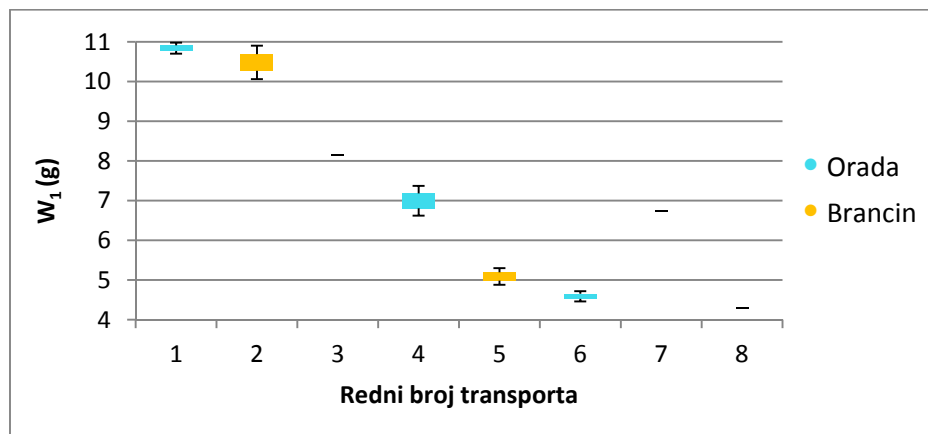
3.3.2. Masa ribe

Prosječna masa jedinki nakon transporta (W_0) kretala se u rasponu od 2,8 g do 4,32 g. Najniža prosječna masa jedinke izvagana je kod uzoraka iz 7. i 8. transporta (Slika 27).



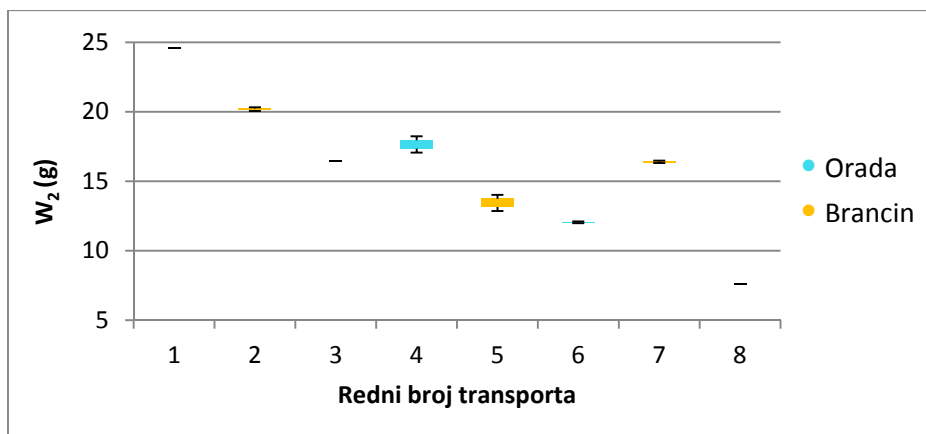
Slika 27. Prosječna masa jedinki po pojedinim transportima (W_0)

Mjesec dana nakon nasađivanja u kaveze prosječna masa jedinki (W_1) kretala se u rasponu od 4,30 g do 10,98 g s najnižim vrijednostima zabilježenim kod kaveza s ribom koja je dopremljena 5., 6. i 8. transportom (Slika 28).



Slika 28. Prosječna masa jedinki mjesec dana nakon transporta (W_1)

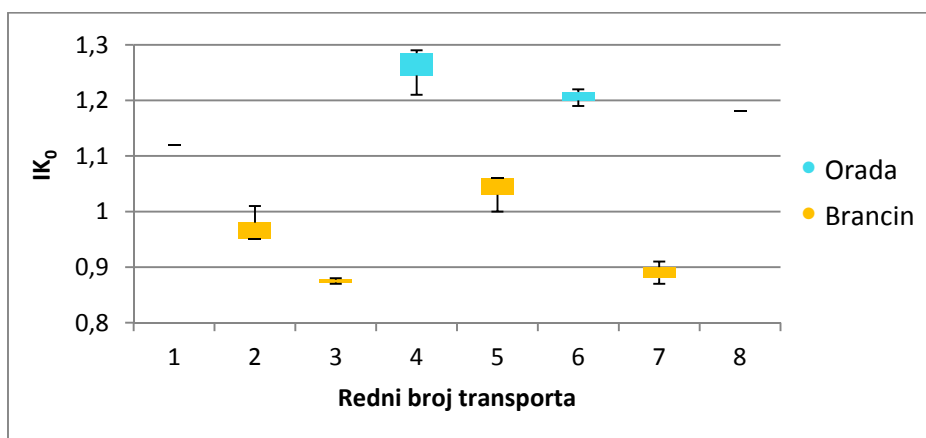
Prosječna masa jedinki, dva mjeseca nakon nasađivanja u kaveze (W_2) kretala se u rasponu od 7,59 g do 24,61 g, a najniže vrijednosti zabilježene su kod kaveza s ribom dopremljenom 5., 6. i 8. transportom (slika 29).



Slika 29. Prosječna masa jedinki dva mjeseca nakon transporta (W_2)

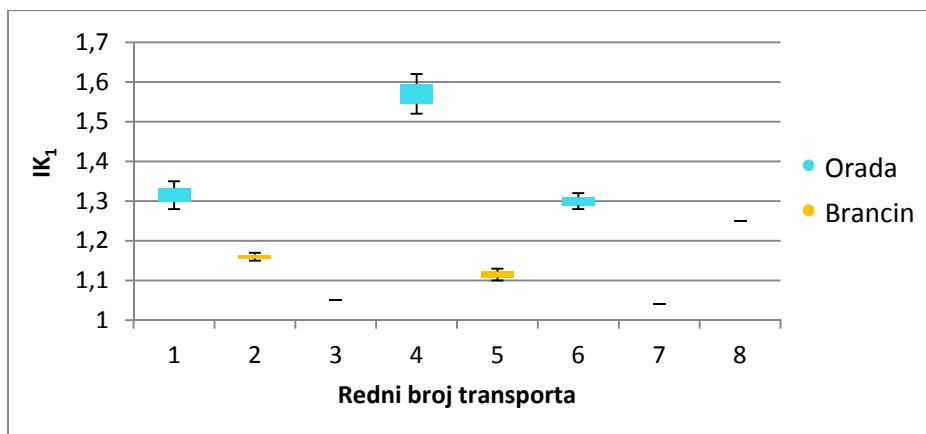
3.3.3. Indeks kondicije

Vrijednosti indeksa kondicije nakon transporta (IK_0) kretale su se u rasponu od 0,87 do 1,29. Najniže vrijednosti zabilježene su kod 3. i 7. transporta, dok su najviše vrijednosti zabilježene kod 4. transporta (slika 30).



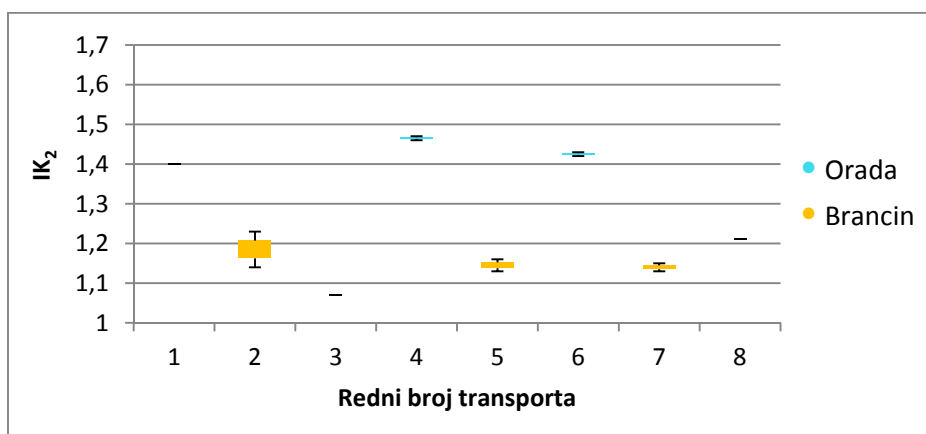
Slika 30. Indeks kondicije pri pojedinim transportima (IK_0)

Na slici 31 prikazane su vrijednosti indeksa kondicije mjesec dana nakon nasađivanja u uzgojne jedinice (IK_1). Vrijednosti su varirale u rasponu od 1,04 do 1,62. Najniže vrijednosti zabilježene su kod kaveza nasađenih ribom dopremljenom 3. i 7. transportom dok su najviše vrijednosti zabilježene kod ribe dopremljene 1., 4. i 6. transportom.



Slika 31. Indeks kondicije jedinki mjesec dana nakon transporta (IK₁)

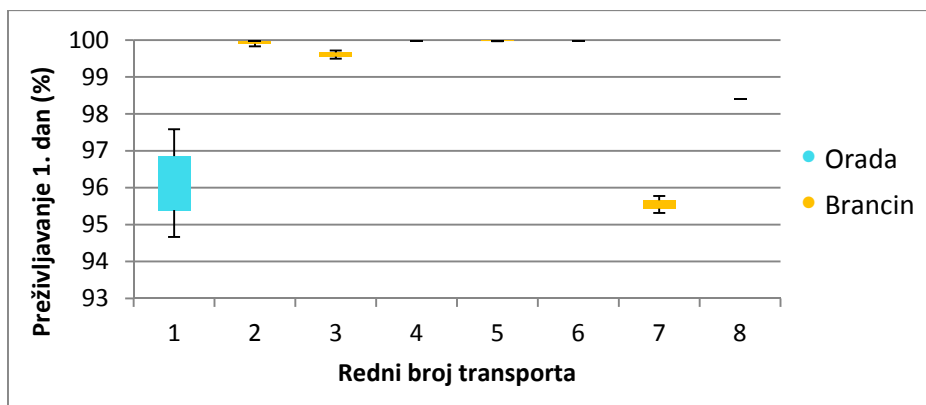
Indeks kondicije jedinki dva mjeseca nakon nasadivanja u kaveze (IK₂) kretao se u rasponu od 1,07 do 1,47 s najnižim zabilježenim vrijednostima kod kaveza nasadenih s ribom dopremljenom 3. transportom. Najviše vrijednosti IK zabilježene su kod kaveza nasadenih s ribom dopremljenom 1., 4. i 6. transportom (slika 32).



Slika 32. Indeks kondicije jedinki dva mjeseca nakon transporta (IK₂)

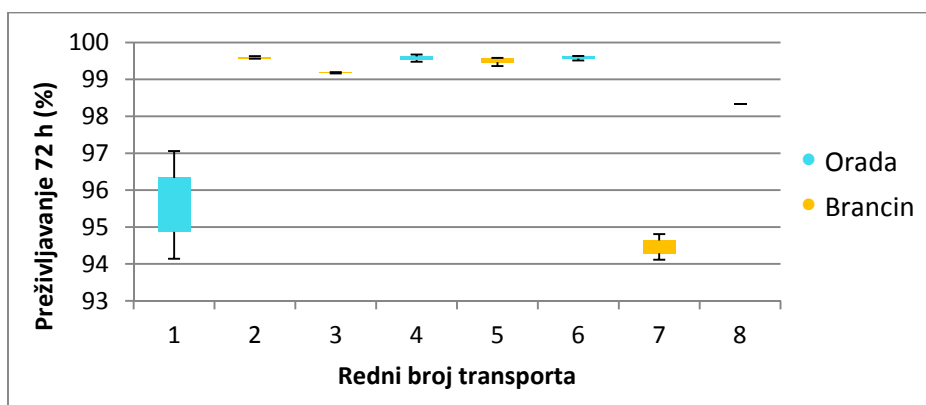
3.3.4. Preživljavanje

Postotak preživljavanja jedinki nakon transporta kretao se u rasponu od 94,66 % do 99,97 %. Najniže preživljavanje zabilježeno je kod 1. i 7. transporta (slika 33).



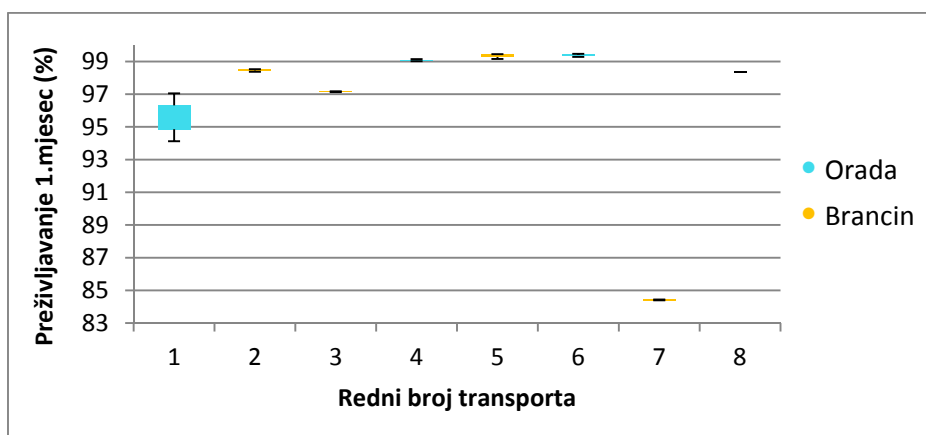
Slika 33. Preživljavanje jedinki prvi dan nakon transporta

Postotak preživljavanja jedinki 72 sata nakon transporta kretao se u rasponu od 94,11 % do 99,67 %. Najniže preživljavanje zabilježeno je kod 1. i 7. transporta (slika 34).



Slika 34. Preživljavanje jedinki 72 sata nakon transporta

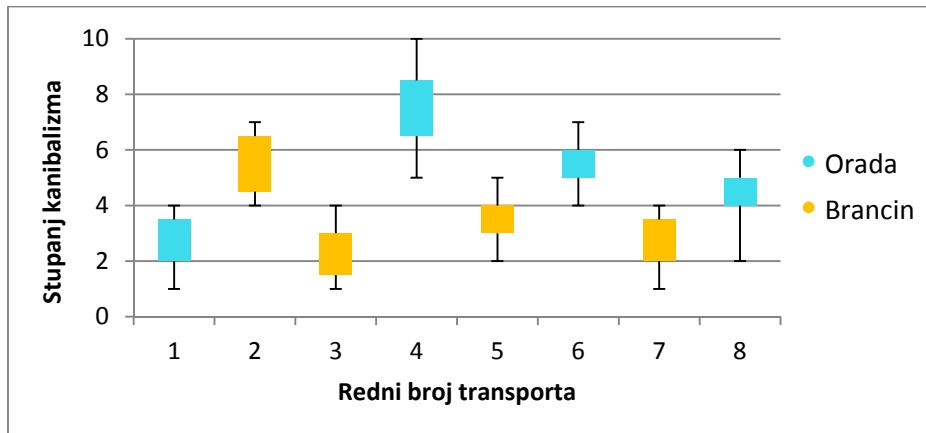
Postotak preživljavanja jedinki mjesec dana nakon transporta kretao se u rasponu od 84,39 % do 99,37 %. Najniže preživljavanje zabilježeno je kod 7. transporta (slika 35).



Slika 35. Preživljavanje jedinki mjesec dana nakon transporta

3.3.5. Stupanj kanibalizma

Stupanj kanibalizma određivan je nakon transporta po ljestvici od 1 – 10. Kretao se u rasponu od 1 do 9 s najvišim stupnjem kod uzoraka iz 1. transporta. Općenito je zabilježen viši stupanj kanibalizma kod orade nego kod brancina (slika 36).



Slika 36. Stupanj kanibalizma pri pojedinim transportima

3.4. Statistička obrada podataka

U tablici 4. prikazani su rezultati višestruke linearne regresije kojom je utvrđen odnos između preživljavanja i uvjeta transporta, odnosno biotskih i abiotskih čimbenika koji, ovisno o intenzitetu, mogu potencijalno negativno utjecati na stupanj preživljavanja. Utvrđeni parcijalni koeficijenti korelacije jasno pokazuju da je postotak preživljavanja jedinki rezultat međusobne interakcije više stresora.

Tablica 4. Višestruka linearna regresija (P - preživljavanje, ρ - gustina naseljenosti transportnih tankova, T - temperatura, S - salinitet, O - koncentracija otopljenog kisika, Z - postotak zasićenosti kisikom, pH - pH vrijednost, UAN - ukupni amonijakalni dušik, NO₂ - nitriti, NO₃ - nitrati, C - koncentracija ugljikovog dioksida)

Redni broj transporta	Vrsta ribe	Višestruka linearna regresija	R ² (%)
1.	S. aurata	$P = -21,1298*\rho - 40,3*T + 104,415*S + 1,07882*O - 0,383843*Z + 22,8378*pH + 23,399*UAN + 4,40494*NO_2 + 1,03719*NO_3 - 10,1412*C$	99.99
2.	D.labrax	$P = 75,7465*\rho + 6,31065*T - 10,5768*S - 0,877533*O + 0,259416*Z - 10,0598*pH + 83,9483*UAN - 9,37437*NO_2 + 4,73466*NO_3 - 52,5643*C$	100.00
3.	D.labrax	$P = 30,871*\rho + 51,246*S - 0,5*O + 6,229*Z - 45,77*pH - 0,164*UAN - 3,978*NO_2 + 0,6*NO_3$	99.99
4.	S. aurata	$P = -24,154*T + 24,743*S - 1,257*O + 1,537*Z - 27,047*pH - 226,817*UAN + 38,144*NO_2 - 68,174*NO_3 + 234,177*C$	99.99
5.	D.labrax	$P = -9,359*\rho + 5,882*T - 14,259*S - 27,035*O + 4,156*Z + 179,813*pH + 4,358*UAN - 26,029*NO_2 + 38,802*NO_3 - 17,073*C$	99.99
6.	S. aurata	$P = 70,85*T + 8,221*S + 54,132*O - 54,474*Z + 54,305*pH - 0,39*UAN + 0,504*NO_2 - 0,291*NO_3 + 6,519*C$	99.99
7.	D.labrax	$P = -7,526*\rho - 69,33*T + 76,074*S - 34,157*O + 32,206*Z + 37,917*pH + 8,133*UAN + 2,455*NO_2 - 0,019*NO_3 + 3,738*C$	99.99
8.	S. aurata	$P = 16,856*\rho + 109,492*T - 48,533*S - 0,772*O + 8,146*pH + 6,121*UAN + 4,862*NO_2 - 5,232*NO_3$	99.99

4. RASPRAVA

U ovom je istraživanju utvrđivan utjecaj pojedinačnih čimbenika kvalitete transportne vode, dužine transporta i nasadne gustoće jedinki pri transportu na preživljavanje i rast riblje mladi. Navedeno, uz poznavanje negativnog učinka pojedinačnih manipulativnih stresora tijekom transporta mladi predstavlja osnovu za predlaganje tehnoloških mjera kojima bi se transport mogao unaprijediti.

Najveći izazov u transportu žive ribe je minimaliziranje stresa kojem izlažemo ribu. Stres u transportu definiran je kao stanje u kojem životinja ne može održavati svoje normalne fiziološke funkcije zbog različitih čimbenika koji negativno djeluju na njenu dobrobit (Francis-Floyd, 2002). On kod ribe može bit uzrokovan biološkim, fizičkim i kemijskim negativnim uvjetima. Kod transporta je riba često u kratkom vremenu izložena većem broju stresora. Čest je slučaj da i uz pravilnu manipulaciju i pažljiv transport nekoliko blažih stresora djeluju zajedno i uzrokuju mortalitete (Carmichael i sur., 2001). Karakteristični stresori prisutni u transportu su: neprikladna gustoća (Piper i sur., 1982), trajanje transporta (Davis i Parker, 1986), loša kvaliteta vode (Weirich i Tomasso 1991; Carmichael i sur., 1992), manipulacija (Maule i sur., 1988; Cech i sur., 1996) i adaptacija na nove uvjete okoliša (Carmichael i sur., 1984; Brick i Cech, 2002). Negativni učinci tih stresnih čimbenika utječu na respiraciju, fiziologiju stresa i osmoregulaciju ribe što kao posljedicu može imati visoku smrtnost tokom i nakon transporta, slabo preživljavanje, smanjenje intenziteta rasta i otpornosti prema infekcijama (Winton, 2001; Fijan, 2006; OIE, 2013).

Za transport žive ribe na veće udaljenosti, čije je trajanje dužim od 24 sata, preporučuje se kompletna izmjena vode u tankovima (Moretti i sur., 1999). To se obično radi na dobro poznatim i unaprijed određenim lokacijama s dobrom kvalitetom morske vode. Na komercijalnim transportima ribe koji su istraživani u ovom radu nije bilo mijenjanja vode tijekom puta, što je ustanovljeno razgovorom s vozačima nakon svakog transporta. Iz naših rezultata je vidljivo da su 1., 3., 7. i 8. transport trajali i duže od 48 sata, što je na koncu rezultiralo nižim preživljavanjem mladi iz tih transporta, pogotovo 1. i 7. transporta. Rezultati kvalitete vode također se poklapaju sa trajanjem transporta, što se najbolje vidi po izmjenjenim koncentracijama ukupnog amonijakalnog dušika (TAN) u tankovima.

Optimalna gustina ribe u tankovima usko je povezana s trajanjem transporta. Prema dosadašnjoj praksi, kod prijevoza mlađi brancina *D. labrax* i orade *S. aurata*, preporučuje se da gustina naseljenosti transportnih tankova ne premašuje 20 – 25 kg/m³ za duže transporte u trajanju od 2 – 3 dana, dok su za kraće transporte (≤ 24 h) dozvoljene gustine do 35 kg/m³ (Moretti i sur., 1999). Kod 1. i 7. transporta zabilježene su visoke gustine koje se ne preporučuju pri dugotrajnim transportima kao što je u tim slučajevima. Primjerice, gustina je kod 1. transporta u našem istraživanju iznosila 51,5 kg/m³. Utvrđene visoke nasadne gustine također poklapaju s nižom stopom preživljavanja kod ta dva transporta. Višestruka linearna regresija pokazuje da je gustina naseljenosti tankova parametar sa visokim utjecajem na preživljavanje te pokazuje negativnu korelaciju sa preživljavanjem kod 1., 5., 7. i 8. transporta.

Temperatura vode u transportnim tankovima kretala se u optimalnom rasponu, sličnom vrijednostima koje preporučuju Pecha i sur. (1983), Orlov i sur. (1971, 1974) te Shevchenko (1978).

Koncentracija otopljenog kisika i zasićenje bili su relativno visoki kod svih 8 transporta. Kad se u transportnom sustavu koristi čisti kisik, što je najčešći slučaj kod transporta mlađi, vrlo lako je moguće da dođe do supersaturacije vode kisikom. Takvo stanje može dovesti do bolesti plinskih mjehurića, odnosno formiranja mjehurića kisika u krvi koji mogu uzrokovati emboliju ili izići i oštetiti tkiva. Uginuća od bolesti plinskih mjehurića obično se ne dešavaju kod saturacija ispod 200% (Wedemeyer, 1996). Kod hiperoksija pri visokim saturacijama još je češći slučaj smanjenja stope ventilacije škrga u takvom omjeru da ometa ekskreciju CO₂, što dovodi do njegovog povišenja u krvi i acidoze (Heisler, 1984; Wedemeyer, 1996). Kisik ima i toksične efekte, što se odnosi na formaciju slobodnih radikala kao što je superoksid anion O₂⁻ koji u vodi direktno izaziva permeabilnost membrana, degeneraciju proteina, i peroksidaciju membranskih lipida što dovodi do oksidacijskog stresa (Rohn i sur. 1996). Vrijednosti koncentracije i zasićenja kisika izmjerene kod 2. i 5. transporta (274,4 % i 337,2 %) bile su više od kritične granice koju preporučuje Wedemeyer (1996). Analizom višestruke linearne regresije utvrđeno je da povišena koncentracija otopljenog kisika i saturacija imaju negativan učinak na preživljavanje kod 5., 6. i 7. transporta, s najvišim parcijalnim koeficijentom korelacije kod i 5. transporta. Uzrok tako visokih koncentracija i zasićenja O₂ kod ta dva transporta sigurno je i niži salinitet koji je izmjeren kod tih dvaju transporta, pri kojem je povećana topivost kisika u vodi. Vrlo vjerojatno je oprema za oksigenaciju na kamionu bila prilagođena za jače oksigeniranje vode višeg saliniteta.

Pri povišenim koncentracijama CO₂ u transportnom tanku dolazi do smanjenja koncentracijskog gradijenta između krvi i okolne vode što otežava difuziju preko škrga. To može rezultirati hiperkapnijom, povišenom koncentracijom CO₂ u krvi i acidozom te vrlo lako moguće narkozom i smrti (Wedemeyer, 1997). Još jedan štetni učinak povišenih koncentracija CO₂ je smanjenje afiniteta hemoglobina za kisik što narušava kapacitet prenošenja kisika krvlju, a to može dovesti do hipoksije u tkivima i u konačnici smrti (Wedemeyer, 1996). S druge strane niske koncentracije CO₂ u tanku (3-6 ppm) mogu biti korisne jer sprečavaju rast pH i nastajanje toksičnog amonijaka (Moretti i sur., 1999). Ravnoteža u omjeru ioniziranog (NH₄⁺) i neioniziranog (NH₃) amonijaka ovisna je o pH vrijednosti s time da se sa povećanjem vrijednosti pH povećava i udio neioniziranog amonijaka. Kritična koncentracija CO₂ u zatvorenom sustavu kreće se oko 140 mg/L za termofilne vrste i oko 40 mg/L za vrste koje preferiraju hladnije uvjete (Pechai sur., 1983). Wedemeyer (1996) također preporučuje koncentracije ispod 30 – 40 mg/L CO₂ tokom transporta. Kod transporta brancina *D. labrax* LC₅₀ zabilježen je pri koncentraciji CO₂ od 100 mg/L (Grøttum i Sigholt, 1996). Koncentracije ugljikovog dioksida u transportnim tankovima prelazile su vrijednosti preporučene u gore navedenim istraživanjima kod 1., 2. i 5. transporta. Analiza višestruke linearne regresije također indicira negativnu korelaciju ugljikovog dioksida sa preživljavanjem kod 1., 2. i 5. transporta. Uzrok visokih koncentracija CO₂ kod sva tri transporta vrlo vjerojatno je visoka gustina ribe u tankovima, čije su najviše vrijednosti također zabilježene kod 1., 2. i 5. transporta. Kod 1. transporta još jedan uzrok visokog CO₂ zasigurno je i dugo trajanje transporta (49 h 20min).

Kako bi se smanjio stres, salinitet u transportnom tanku treba biti jednak onome na kojeg je riba adaptirana u mrijestilištu, a to se obično kreće oko 35 ‰. Međutim boćata voda, saliniteta 20 – 25 ‰, umanjuje stres tokom transporta jer je potrebna manja količina energije za osmoregulaciju. Naime morske ribe koštunjače piju velike količine morske vode kako nebi dehidrirale jer gube vodu zbog manje osmolarnosti tjelesnih tekućina u odnosu na okolnu vodu (Moyle i Cech, 1988). Kod uzbuđenja ili kod stresnih uvjeta, koji su obično prisutni u transportu, epinefrin (adrenalin) se otpušta u krvotok i povećava permeabilnost škržnog epitela za vodu (Moyle i Cech, 1988). U takvim uvjetima dolazi do pojačanog unosa iona i gubitka vode što rezultira narušavanjem osmoregulatorne homeostaze (Portz i sur., 2006). Štoviše morske ribe koštunjače tokom stresa prestanu uzimati vodu što vrlo lako rezultira dehidracijom. Do toga dolazi usljed mišićne kontrakcije želuca koju inducira hormon kateholamin koji se otpušta u krvotok tokom stresa (Mazeaud i sur., 1977). Dodatna

prednost transporta u boćatoj sredini je povećan kapacitet topivosti kisika (Moretti i sur., 1999). Prethodno se preporučuje adaptirati ribu na niže salinitete nekoliko dana prije transporta. Kod 2. i 5. transporta izmjerene su znatno niže vrijednosti saliniteta. Radilo se o transportu brancina *D. Labrax* koji je eurihalina vrsta i može podneti vrlo niske salinitete (Moretti i sur., 1999), ali je salinitet od 2 ‰ u slučaju 5. transporta bio ekstremno nizak. Mogući razlog bi eventualno mogla biti pojava vibrioze u mrijestilištu s obzirom da je snižavanje saliniteta uspješna terapijska mjera kod vibrioze mladi.

Akumulaciju amonijaka tokom transporta možemo minimalizirati snižavanjem temperature vode i samim time usporavanjem metabolizma ribe i ekskrecije amonijaka. Ekskreciju amonijaka nastalog bakterijskom razgradnjom možemo spriječiti tako što prevozimo ribu koja je već probavila hranu te ima prazan želudac i probavni sustav. Temperatura i vrijeme zadnjeg hranjenja ključni su faktori koji reguliraju ekskreciju amonijaka. Primjerice pastrva će na temperaturi od 1° C lučiti 66 % manje amonijaka nego na 10° C (Berka, 1986), a riba koja se nije hranila 63 sata prije utovara proizvest će upola manje amonijaka nego riba hranjena netom prije utovara (Phillips i Brockway, 1954). Prema Piper-u i sur. (1982) ribu manju od 10 cm treba izgladnjivati barem 48 sati, a veću od 20 cm 72 sata. Kod transporta salmonidnih vrsta prakticira se izgladnjivanje 48 – 72 sata prije transporta (Wedemeyer, 1996). Usporedbom podataka izmjerene temperature s koncentracijama TAN-a i neioniziranog amonijaka pri pojedinim transportima može se zaključiti da temperatura nije bila od velike značajnosti za akumulaciju amonijaka. S druge strane izmjerene koncentracije ukupnog amonijakalnog dušika poklapaju se s vrijednostima stupnja kanibalizma u tankovima pri pojedinim transportima. Tako je kod 1. i 3. transporta, gdje su izmjerene najviše koncentracije TAN-a, zabilježen najniži stupanj kanibalizma, dok su kod 2., 4. i 6. transporta izmjerene najniže koncentracije TAN-a i najviše vrijednosti stupnja kanibalizma. S obzirom na činjenicu da je stupanj kanibalizma viši kod ribe koja je gladna, moglo bi se pretpostaviti da je mogući uzrok prekomjerne akumulacije amonijaka, pogotovo kod 1. i 3. transporta hranjenje prije transporta ili nedovoljno izgladnjivanje jedinki, što potvrđuju i gore navedena istraživanja. Međutim, ovdje treba biti oprezan jer brojni utvrđeni parametri, u koje spada i hranjenje te kvatliteta vode upućuju i na neadekvatne transportne protokole samih mrijestilišta, ili pak na njihovo nepoštivanje. Stoga bi mogući uzrok kanibalizma mogao biti i neprikladna manipulacija s ribom tijekom pripreme za transport, uslijed čega je došlo do oštećenja pojedinih dijelova tijela jedinki, što također može prouzročiti jači kanibalizam. Drugi faktor koji bi mogao utjecati na akumulaciju amonijaka je trajanje transporta. Kod svih transporta

zabilježene su visoke koncentracije neioniziranog amonijaka, posebice kod 1., 2., 5. i 8. transporta. Kod 1. i 8. transporta se to odrazilo na preživljavanje značajno, jer su ti transporti trajali puno duže (49,20 h i 48,05 h) u odnosu na 2. i 5. transport (19 h i 20 h). Koncentracije ukupnog amonijakalnog dušika su također bile visoke kod svih transporta i premašivale su koncentracije preporučene u istraživanju koje objavljuje Rosten (2000). Analizom višestruke linearne regresije utvrđena je negativna korelacija ukupnog amonijakalnog dušika na preživljavanje samo kod 4. transporta, što se prema istraživanju koje objavljuje Rosseland (1999) može pripisati visokoj temperaturi (22,4° C - 22,8° C) koja je imjerena kod 4. transporta. Mortaliteti se u praksi mogu javiti prilikom mijenjanja vode prije istovara jer dolazi do naglog porasta pH, što dovodi do promjene kemijske ravnoteže i prisutni amonijak prelazi u toksični neionizirani oblik (NSCFS, 2008). Kod tako visokih koncentracija TAN-a vrlo je važna postepena aklimatizacija. Timmons i sur. (2002) preporučuju, ako je pH različit za više od 1, izmjenu vode 10% volumena tanaka svakih 10 – 20 minuta dok se vrijednosti ne izjednače.

Kod analize bioloških parametara (masa ribe i IK) pokazalo se da nije bilo značajnih odstupanja među transportima kada se usporede uzorci koji su uzeti mjesec dana i dva mjeseca nakon transporta te bismo mogli pretpostaviti da svi mjereni stresori imaju najveći utjecaj na preživljavanje jedinki.

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da je za minimiziranje stresa i postizanja maksimalnog preživljavanja tijekom transporta potrebno unaprijediti sve faze transportnog postupka. Općenito, transport riblje mlađi u akvakulturi obuhvaća nekoliko faza manipulacije (izlov, utovar, prijevoz, istovar i nasađivanje u uzgojne jedinice), što može imati za posljedicu izazivanje stresa kod ribe uz duži period oporavka (Specker and Schreck, 1980; Schreck i sur., 1989; Davis i Parker, 1986; Iversen i sur., 1998). Istraživanja pokazuju da je u najviše slučajeva manipulacija tokom izlova, kondicioniranja i utovara stresnija za ribu od samog transporta (Robertson i sur., 1988; Maule i sur., 1988; Johnson i Metcalf, 1982). Stoga je preporučljivo ribu pažljivo pripremati za transport te tehnološkim mjerama i ispravnom manipulacijom minimalizirati stres. Preporučljivo je da se s ribom rukuje tako da se izbjegava njeno vađenje iz vode. McDonald i Milligan, (1997) objavljuju u svojem istraživanju da čak i kratkotrajno izlaganje ribe zraku utječe na stopu mortaliteta. Nažalost korištenje mreža i izlaganje ribe zraku je neizbježno tokom utovara i izlovljavanja. Preporučuje se korištenje mreža koje su manje abrazivne. Primjerice, mreže napravljene od polipropilena ili polietilena treba izbjegavati jer su prekrute i mogu oštetiti ribu (Yeager i sur., 1990). Oštećenja kože i

uklanjanje sluzi povećavaju rizik od bakterijskih, virusnih i gljivičnih bolesti. Sluz ima ulogu bakteriostatika a i sama po sebi je fizička barijera između patogenih organizama u vodi i ribe (Francis-Floyd, 2002). Pored toga, oštećenja na koži mogu pospješiti pojavu kanibalizma te je ovom problemu također potrebno posvetiti značajnu pažnju i s ovog aspekta.

U mrijestilištima brancina i orade na jugu Europe koristi se stara metoda kalkulacije biomase namijenjene transportu. Naime riba se važe u tariranim tankovima s vodom s time da se prije toga izlovljava i prenosi sa mrežom. Pored toga, da bi se povećala preciznost mjerenja, pušta se da se mreža sa ribom iscijedi kako bi se minimalizirao udio vode. To je neprecizna i zastarjela metoda koja također izaziva stres kod ribe i ujedno povećava mogućnost nastanka mehaničkih ozljeda kože i škruga. Korištenje mreže za izlov i izlaganje ribe zraku najveći su manipulativni stresori u transportu i štetno utječu na dobrobit ribe (Maule i sur., 1988). Međutim, u današnje vrijeme postoje razne novije tehnološke metode kojima se može izbjeći ili barem minimalizirati taj tip stresora. Primjerice pumpe za ribu kojima se riba prebacuje iz jednog tanka u drugi kroz fleksibilne cijevi manje su stresne za ribu od izlovnih mreža. Za kalkulaciju biomase i brojanje jedinki postoje digitalni i laserski brojači sa visokom preciznošću koji nemaju gotovo nikakvog negativnog učinka na ribu i na njezinu dobrobit. Neka mrijestilišta su već odavno opremljena takvom tehnologijom, pa tako i farme brancina i orade u Francuskoj i Italiji imaju tendenciju prelaska na učinkovitije tehnologije.

Uz dosad navedeno, ribu je i prije istovara potrebno priviknuti na nove uvjete. U protivnom, ako riba nije pravilno adaptirana na nove uvjete okoliša, dolazi do stresa, imunosupresije i vrlo lako do zakašnjelih mortaliteta (Harmon, 2009). To podrazumjeva postepeno mjenjanje vode i izbjegavanje naglih promjena temperature, pH, saliniteta i tvrdoće (Noga, 2000).

Iako se tijekom komercijalnih transporta mlađi brancina i orade ne primjenjuje, u literaturi se u posljednje vrijeme često spominje i primjena kemijskih sredstava koja poboljšavaju kvalitetu vode ili uzrokuju blagu anesteziraju ribe (Ashley, 2007; OIE, 2013). Uporabom anestetika usporava se metabolizam ribe, a time i ekskrecija amonijaka i potrošnja kisika, generalno se smanjuje aktivnost ribe, olakšava manipulacija i ublažava odgovor na stres (Cooke i sur., 2004). Tokom transporta preporučljiva je samo lagana sedacija a ne anestezija (Wedemeyer, 1997). Ukoliko se koriste velike doze anestetika može doći do narušavanja fizioloških funkcija, riba prestaje plivati, narušava se orijentacija u vodenom stupcu što može rezultirati nagomilavanjem ribe na dnu tanka i uginućima. Preporučuje se primjena cijele doze anestetika prije utovara u tankovima za kondicioniranje i pola doze u transportnom tanku

(Woynarowich i Horváth, 1980). Izbor adekvatnog anestetika obično ovisi o nekoliko čimbenika kao što su: dostupnost odobrenih anestetika, vlastita sigurnost, ekonomičnost, efikasnost, lakoća korištenja i općenito djelovanje i reaktivnost anestetika (Cho i Heath, 2000).

Pored anestetika, i sredstva za tretiranje vode kao što su stabilizatori pH, bakteriostatici, sredstva za uklanjanje amonijaka i sredstva protiv pjenjenja koriste se po potrebi i u skladu sa zakonskim regulativama. U Americi je primjerice primjena većine takvih sredstava zabranjena na ribi namjenjenoj ljudskoj prehrani. Nije preporučljivo prevoziti bolesnu ribu, no u praksi se to zna dešavati pogotovo ako je posrijedi samo površna infekcija. Upotreba zeolitnih minerala za uklanjanje amonijaka je rijedak slučaj kod komercijalnih transporta, no istraživanja pokazuju pozitivan učinak na uklanjanje amonijaka tokom transporta (Bower i Turner, 1982). Formacija pjene i prljavštine na površini vode u tanku rezultat je aeracije, povećane ekskrecije mukusa i otpadnih produkata koje riba izlučuje pri dugotrajnim transportima, a također može biti i posljedica primjene lijekova (Berka, 1986; Rosten i sur., 2007). Pjena narušava interakciju površina-atmosfera i uvelike smanjuje izmjenu plinova. Pored toga otežava opservaciju ribe tokom transporta, te ju je iz tih razloga poželjno uklanjati. S obzirom da je to radnja koja iziskuje zaustavljanje i utrošak vremena, primjena kemijskih sredstava protiv pjenjenja pokazala se kao praktično rješenje. Uzimajući u obzir rezultate našeg istraživanja, bilo bi uputno pored uobičajnih mjera za unapređenje transportnih protokola, razmisliti i o primjeni anestetika te sredstava za uklanjanje pjene.

5. ZAKLJUČAK

1. Analizom višestruke linearne regresije pokazalo se da su gustina naseljenosti transportnih tankova i salinitet čimbenici koji najviše utječu na preživljavanje.
2. Jedan od razloga povišenih koncentracija amonijaka u transportnim tankovima je zasigurno dugo trajanje transporta, za koje se također pokazalo da ima negativan učinak na preživljavanje.
3. Drugi razlog povišenih koncentracija amonijaka je vjerojatno hranjenje prije transporta ili nedovoljno izgladnjivanje ribe.
4. Općenito se iz rezultata ovog istraživanja može zaključiti da mrijestilišta koriste neadekvatne transportne protokole, ili ih pak ne poštuju.
5. Prisutnost kanibalizma, odnosno oštećenja repnih i prsnih peraja, vrlo lako može biti posljedica nepravilne manipulacije tokom pripreme za transport, utovara i istovara.
6. Statistička obrada podataka pokazala je da previsoka zasićenost kisikom negativno utječe na preživljavanje. Potrebno je prilagoditi sustav za oksigenaciju ili aeraciju ostalim uvjetima transporta te vršiti redoviti monitoring tokom prijevoza.
7. Provedenim istraživanjem pokazalo se da je povišena koncentracija ugljikovog dioksida u tankovima posljedica visoke gustine naseljenosti transportnih tankova i dugog trajanja transporta. Stoga je nužno prilagoditi gustinu naseljenosti transportnih tankova trajanju i ostalim uvjetima transporta.
8. Pravilna priprema ribe za transport i pravilna aklimatizacija prije istovara igraju vrlo važnu ulogu kod ostvarivanja uspješnog transporta.

9. Velik broj stresora u transportu je neizbježan, međutim pravilnom manipulacijom i tehnološkim mjerama, uporabom anestetika i sredstava za tretiranje vode moguće je minimalizirati stres i time umanjiti gubitke mlađi uzrokovane transportom.

6. LITERATURA

- Adamek, Z. 2002. Uzgoj salmonidnih riba. Ribogojstvo. Ivan Bogut. Poljoprivredni fakultet Sveučilišta u Osijeku. 219-347.
- Alabaster, J. S. i Lloyd, R. 1982. Water quality criteria for freshwater fish. 2nd edition. Butterworth Scientific, London. 361 str.
- Allen, J. L. 1988. Residues of benzocaine in rainbow trout, largemouth bass, and fish meal. Prog. Fish-Cult. 50 (1): 59-60.
- Amend, D. F., D. R. Croy, B. A. Goven, K. A. Johnson i D. C. McCarthy, 1982. Transportation of fish in closed system; Methods to control ammonia, carbon dioxide, pH and bacterial growth. Trans.Am.Fish.Soc. 111 (5): 603-11
- American Society of Heating, Refrigerating and Air-Conditioning Engineers., 1981. ASHRAE Handbook. ASHRAE, Atlanta.
- Anderson, W. G., McKinley, R. S. i Colavecchia, M. 1997. The use of Clove oil as an anaesthetic for Rainbow trout and its effects on swimming performance. N. Am. J. Fish. Man. 17: 301-307.
- Aquafarmer. 2004. The farming of Arctic charr. Technical Institute of Iceland, the Holar University College and The Aquaculture Development Centre of Ireland. November 2007 –January 2008; <http://www.holar.is/~aquafarmer/>
- Ashley, P.J. 2007. Fish welfare: Current issues in aquaculture. Applied Animal Behaviour Science, [104\(3-4\)](#): 199–235.
- Åtland, Å., Bæverfjors, G., Heier, L.S., Rosseland, B.O. og Rosten, T. 2007. Vannkvalitet i norske settefiskanlegg. Problem og tiltaksvurdering. I: Bjerknes, V. (red.) Vannkvalitet og smoltproduksjon, Kapittel 4, str. 125-158, Juul forlag, ISBN 978-82-8090-018-0.
- Barton, B. A., Iwama, G. K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Annual Review of Fish Diseases 1: 3–26.

- Barton, B. A., Zitzow, R. E., 1995. Physiological responses of juvenile walleyes to handling stress with recovery in saline water. *The Progressive Fish Culturist* 57 : 267–276.
- Berka, R., 1986. The Transport of Live Fish: A Review. EIFAC Technical Paper 6. Fries, J.N., Berkhouse, C. S. , Morrow, J. C., Carmichael, G. J. 1993. Evaluation of an aeration system in a loaded fish-hauling tank. *The Progressive Fish Culturist* 55: 187–190.
- Bower, C. E. i D. T. Turner 1982. Ammonia removal by clinoptilolite in the transport of ornamental freshwater fishes. *Progr.Fish.Cult.* 44 (1): 19–23
- Bower, C. E. i Holm-Hansen, T. 1980a. Salicylate-Hypochlorite Method for Determining Ammonia in Seawater. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37 (5): 794-798.
- Bower, C. E. i Holm-Hansen, T. 1980b. A simplified hydrazine-reduction method for determining high concentrations of nitrate in recirculated seawater. *Aquaculture* 21 (3) 281-286.
- Braithwaite, V. A., Huntingford, F. A. 2004. Fish and welfare: do fish have the capacity for pain perception and suffering? *Anim. Welfare.* 13: 87-92.
- Brick, M. E., Cech, J. J. Jr. 2002. Metabolic responses of juvenile striped bass to exercise and handling stress with various recovery environments. *Transactions of the American Fisheries Society* 131: 855–864.
- Briozzo, J. L., Chirife, J., Herzage, L. i D'Aquino, M. 1989. Antimicrobial activity of clove oil dispersed in a concentrated sugar solution. *J. App. Bact.* 66: 69-75.
- Broom, D. M., 1997. Welfare evaluation. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 54: 21–23.
- Bullerman, L. B., F. Y. Lieu i S. A. Seir. 1977. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils; cinnamic aldehyde and eugenol. *Journal of Food Science* 42:1107-1116.
- Burka, J. F., Hammel, K. L., Horsberg, T. E., Johnson, G. R., Rainnie, D. J. and Spears, D. J. 1997. Drugs in salmonid aquaculture – A review. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 20: 333-349.

- Carmichael, G. J., Tomasso, J. R., Schwelder, T. E. 2001. Fish transportation. In: Wedemeyer, G. A. (ed.) *Fish Hatchery Management*, str. 641–660. American Fisheries Society, Bethesda, MD.
- Carmichael, G. J., Jones, R. M., Morrow, J. C. 1992. Comparative efficacy of oxygen diffusers in a fish-hauling tank. *The Progressive Fish Culturist* 54: 35–40.
- Carmichael, G. J., Tomasso, J. R., Sinnco, B. A. i Davis, K. B. 1984. Characterization and alleviation of stress associated with hauling largemouth bass. *Trans. Am. Fish. Soc.* 113: 778-785.
- Cech, J. J., Bartholow, S. D., Young, P. S., Hopkins, T. E. 1996. Striped bass exercise and handling stress in freshwater: physiological responses to recovery environment. *Transactions of the American Fisheries Society* 125 : 308–320.
- Chandoo, K. P., Duncan, I. J. H., Moccia, R. D. 2004a. Can fish suffer? Perspectives on sentience, pain, fear and stress. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 86: 225–250.
- Chandoo, K. P., Yue, S., Moccia, R. D., 2004b. An evaluation of current perspectives on consciousness and pain in fishes. *Fish Fish.* 5: 281–295.
- Cho, G. K. i Heath, D. D. 2000. Comparison of tricane metanesuphonate (MS222) and clove oil anaesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Aqua. Res.* 31: 537-546.
- Collins, J. L., Hulsey, A. H. 1963. Hauling mortality of threadfin shad reduced with MS-222 and salt. *Transactions of the American Fisheries Society* 25: 105–106.
- Colt J. E. 1984. Computation of dissolved gas concentrations in water as a function of temperature, salinity, and pressure. *American Fisheries Society Special Publication* 14. American Fisheries Society, Bethesda, MD.
- Colt, J. E., Armstrong, D. A. 1981. Nitrogen toxicity to crustaceans, fish, and molluscs. In: Allen, L. J., Kinney, E. C. (eds.) *Proceedings of the Bio-engineering Symposium for Fish Culture*, str. 34–47; 16–18 October 1979. American Fisheries Society, Bethesda.
- Cooke, S. J., Suski, C. D., Ostrand, K. G., Tufts, B. T. i Wahl, D. H. 2004. Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling

- and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture* 239: 509-529.
- Cort, W. M. 1974. Hemoglobin peroxidation test screens antitoxins. *Food Technology* 28: 60-66.
- Coyle, S. D., Durborow, R. M., Tidwell, J. H. 2004. *Anesthetics in Aquaculture*. Texas: SRAC Publication No. 3900; str. 3-4.
- Davis, K. B. 2006. Management of physiological stress in finfish aquaculture. *North American Journal of Aquaculture* 68: 116–121.
- Davis, K. B., Parker, N. C. 1986. Plasma corticosteroid stress response of fourteen species of warmwater fish to transportation. *Transactions of American Fisheries Society* 115: 495–499.
- Dunlop, R., Laming, P. 2005. Mechanoreceptive and nociceptive responses in the central nervous system of goldfish (*Carassius auratus*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Pain* 6: 561–568.
- Dupree, H. K. i J. V. Huner, 1984. The status of warmwater fish farming and progress in fish farming research. Washington, D.C., U.S. Fish and Wildlife Service, str. 165–76
- Elliott, J. M. 1981. Some aspects of thermal stress on freshwater teleosts. In: Pickering, A. D. (ed.), *Stress and Fish*. Academic Press, London, 209-245 str.
- Emerson, K., Lund, R. E., Thurston, R. V. i Russo, R. C. 1975. Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. *J.Fish.Res.Board Can.* 32 (12): 2379-83
- Erickson, U., Sigholt, T. i Seland, A. 1997. Handling stress and water quality during live transportation and slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 149: 243-252.
- European Food Standards Authority (EFSA), 2004. The welfare of animals during transport: Scientific report of the scientific panel on animal health and welfare on a request from the commission related to the welfare of animals during transport (Question no. EFSA-Q-2003-094). Accessed May 25, 2008. Izvor:

http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/ahaw_report_animaltransportwelfare_en1.pdf

- FAO, 1999. Manual on Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream - Volume 1. Rome, Italy. M-42, ISBN 92-5-104380-9.
- Fijan, N. 2006. Zaštita zdravlja riba. Gradska i sveučilišna knjižnica Osijek. Osijek: Poljoprivredni fakultet, str. 300.
- Finstad, B., Staurnes, M. i Reite, O. B. 1988. Effect of low temperature on sea-water tolerance in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquaculture* 72: 319-328.
- Forsberg, J. A., Summerfelt, R. C. 1999. Effects of ram-air ventilation during transportation on water quality and physiology of fingerling walleyes. *North American Journal of Aquaculture* 61: 220–229.
- Francis-Floyd, R. 2000. Stress – Its Role in Fish Disease. University of Florida IFAS Extension Circular 919, University of Florida, Gainesville.
- Fries, J. N., Berkhouse, C. S., Morrow, J. C., Carmichae, G. J. 1993. Evaluation of an aeration system in a loaded fish-hauling tank. *The Progressive Fish Culturist* 55 : 187–190.
- Girard, J. P i P. Payan, 1980. Ion exchange through respiratory and chloride cell in freshwater – and seawater –adapted teleostans. *Am. J. Physiol.* 238: 260-268.
- Harmon, T. S. 2009. Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. *Reviews in Aquaculture*, 2009. 1: 58–66.
- Heisler, N. 1984. Acid-base regulation in fishes. In: Hoar, W. S., Randall, D. J. (eds.), *Fish Physiology X. Part A: Anatomy, gas transfer and acid-base regulation*. Academic Press, London, str. 315-401.
- Horsberg, T. E. i Samuelsen, O. B. 1999. Behandling. In: Poppe, T. (ed.). *Fiskehelse og fiske sykdommer*. Universitetsforlaget, Oslo, Norway, 324-338 str.
- Horváth, L., G. Tamás i I. Tölg, 1984. *Special methods in pond fish husbandry*. Seattle, Halver Corporation, 146 str.

- Houston, A. H. i Schrapp, M. P. 1994. Thermoacclimatory haematological response: have we been using appropriate conditions and assessment methods? *Can. J. Zool.* 72: 1238-1243.
- Ishiwata N. 1969b. Ecological studies on the feeding of fishes VIII. Frequency of feeding and growth. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 35 (10): 987-990
- Ishiwata, N. 1969a. Ecological studies on the feeding of fishes VII. Frequency of feeding and satiation amount. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 35 (10): 979-986
- Iversen, M., Finstad, B. i Nilssen, K. J. 1998. Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) smolts. *Aquaculture.* 168 str.
- Johansson, O., Wedborg, M. 1980. The ammonia–ammonium equilibrium in seawater at temperatures between 5 and 25 °C. *J. Solut. Chem.* 9: 37– 44.
- Johnson, D. L., Metcalf, M. T. 1982. Causes and controls of fresh- water drum mortality during transportation. *Transactions of the American Fisheries Society* 111: 58–62.
- Karapmar, M., S. E. Aktug. 1987. Inhibition of foodborne pathogens by thymol, eugenol, methanol, and anethole. *International Journal of Food Microbiology* 4: 161-166.
- Kieffer, J. D. 2000. Limits to exhaustive exercise in fish. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 126: 161-179.
- Knoph, M. B. 1996. Gill ventilation frequency and mortality of atlantic salmon (*Salmo salar L.*) exposed to high ammonia levels in seawater. *Wat. Res.* 30 (4): 837-842.
- Kruzhalina, E. I., I. Averina i G. Vol'nova, 1970. Ispytanie zhivorubnykh emkosteí. (Investigation on live-fish capacities.) *Rybov.Rybolov.* 13 (5): 13.
- Leitritz, E. i R. C. Lewis, 1976. Trout and salmon culture (Hatchery methods). *Fish Bull. Calif. Dep. Fish Game,* (164): 128–37
- Little, E. E. 2002. Behavioral measures of environmental stressors in fish, *Biological Indicators of Stress in Fish*, 2nd edition. American Fisheries Society. Bethesda, str. 431.
- Lusk, S. i J. Krcál, 1974. Preprava plôdika lososovitých rýb s kyslíkom (Transporting the fry of salmonids with oxygen.) *Polov.Rybár.,* (2): 32

- Mattson, N. S., Ripple, T. H. 1989. Metomidate, a better anesthetic for cod (*Gadus morhua*) in comparison with benzocaine, MS-222, chlorobutanol, and phenoxyethanol. *Aquaculture* 83: 89-94.
- Maule, A. G., Schreck, C. B., Samual, B.C., Barton, B. A. 1988. Physiological effects of collecting and transporting emigrating juvenile chinook salmon past dams on the Columbia River. *Transactions of the American Fisheries Society* 117: 245–261.
- Mazic, P. M., Simco, B. A., Parker, N. C. 1991. Influence of waterhardness and salts on survival and physiological characteristics of striped bass during and after transport. *Transactions of the American Fisheries Society* 120 : 121–126.
- McDonald, G., Milligan, L. 1997. Ionic, osmotic and acid–base regulation in stress. In: Iwama, G. W., Pickering, A. D., Sumpter, J.P., Schreck, C. B. (eds.) *Fish Stress and Health in Aquaculture*, str. 119–144. Cambridge University Press, New York.
- McFarland, W. N. 1959. A study of the effects of anaesthetics on the behaviour and physiology of fishes. *Publ. Inst. Mar. Sci., Univ. Tex.* 6: 23-55.
- Miller, R. L., Bradford, W. L., i Peters, N. E. 1988. Specific Conductance: Theoretical Considerations and Application to Analytical Quality Control. In U.S. Geological Survey Water-Supply Paper. [Preuzeto sa: http://pubs.usgs.gov/wsp/2311/report.pdf](http://pubs.usgs.gov/wsp/2311/report.pdf)
- Moretti, A., Pedini, Fernandez-Criado, M., Cittolin, G., Guidastrì, R. 1999. Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream. Volume 1. Rome, FAO. 194 str.
- Moyle, P. B., Cech, J. J. Jr. 1988. *Fishes: An Introduction to Ichthyology*. Prentice Hall, Englewood Cliffs. 559 str.
- Noga, E. J. 2000. *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*. Iowa State University Press, Ames. 173 str.
- Norwegian Scientific Committee for Food Safety, 2008. Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety: Transportation of fish within a closed system, ISBN: 978-82-8082-242-0.
- OIE, 2013. *Aquatic Animal Health Code*.

- Orlov, Yu. I. 1971. Kakoe kolichestvo vodnykh organizmov sleduet pomeshchat v transportnye emkosti (What amounts of aquatic organisms should be kept in transport tanks) *Rybov.Rybolov.*, 14 (2): 12–3
- Orlov, Yu. I. 1974 *Transportirovka zhivoi ryby v germeticheskikh emkostyakh. Spravochnoe posobie* (Live fish transport in hermetically sealed containers. Information manual) Moskva, Izd. Pishchevaya Promyshlennost', 97 str.
- Pecha, O., R. Berka i J. Kouril, 1983. Preprava pludku v polyetylenovych vacích (Fry transport in polyethylene bags) *Ser.Metod.VURH Vodnany*, (10): 16.
- Phillips, A. M., Brockway, D. R. 1954. Effect of starvation, water temperature, and sodium amytal on the metabolic rate of brook trout. *The Progressive Fish Culturist*. April, str. 65–68.
- Pillay, T. V. R. i Kutty, M. N. 2005. *Aquaculture, Principles and Practices*, 2nd Edition. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. 630.
- Piper R. G., McElwain I. B., Orme, L. E., McCraren, J. P., Fowler, L. G., Leonard, J. R. 1982. *Fish Hatchery Management*. American Fisheries Society, Bethesda, MD. 517 str.
- Portavella, M., Salas, C., Vargas, J. P., Papini, M. R., 2003. Involvement of the telencephalon in spaced-trial avoidance learning in the goldfish (*Carassius auratus*). *Physiol. Behav.* 80: 49–56.
- Portavella, M., Torres, B., Salas, C. 2004a. Avoidance response in goldfish: Emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic pallium. *J. Neurosci.* 24: 2335–2342.
- Portavella, M., Torres, B., Salas, C., Papini, M. R., 2004b. Lesions of the medial pallium, but not of the lateral pallium, disrupt spaced-trial avoidance learning in goldfish (*Carassius auratus*). *Neurosci.* 362: 75–78.
- Portz, D. E., Woodley, C. M. i Cech, J. J. Jr. 2006. Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. *Rev. Fish. Biol. Fisheries* 16: 125-170.
- Robert, R. Stickney, 1979. *Principles of warmwater aquaculture*. Wiley, New York, ISBN 0-471-03388-x.

- Robertson, L., Thomas, P., Arnold, C. R., 1988. Plasma cortisol and secondary stress responses of cultured red drum (*Sciaenops ocellatus*) to several transportation procedures. *Aquaculture* 68: 115–130.
- Rohn, T. T., Hinds, T. R. i Vincenzi, F. F. 1996. Inhibition of Ca²⁺-Pump ATPase and the Na⁺/K⁺-Pump ATPase by Iron-Generated Free Radicals Protection by 6,7-dimethyl-2,4-di-L-Pyrrolidinyl-7h-Pyrrolo[2,3-~]pyrimidine Sulfate (U89843~), A Potent, Novel, Antioxidant/ Free Radical Scavenger. *Biochem. Pharmacol.*, 51: 471-476.
- Ross, L. G. i Ross, B. 1999. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. Second edition, Blackwell Science, UK, London, 159 str.
- Rosseland, B. O., Salbu, B., Kroglund, F., Hansen, T., Teien, H-C., Håvardstun, J., Åtland, Å., Østby, G., Kroglund, M., Kvellestad, A., Pettersen, O., Bjerknes, V., WendelaarBonga, S., vanHam, E.H., Lucassen, E., Berntssen, M. H. G. ad Lohne, S. 1998. Changes in metal speciation in the interface between freshwater and seawater (estuaries), and the effects on Atlantic salmon and marine organisms. - Final Report to The Norwegian Research Council, Contract no. 108102/122.
- Rosten, T. 2000. The evaluation of the cause of mortality during a 30 h closed transport of smolt from Western Norway to Northern Norway, KPMG Centre for Aquaculture and Fisheries private client.
- Rosten, T., Urke, H. A., Åtland, Å., Kristensen, T. og Rosseland, B.O. 2007. Sentrale drifts- og vannkvalitetsdata fra VL Laks – undersøkelsene fra 1999 – 2006. NIVA Rapport, Lnr. 5352-2007, 16 s. ISBN 82-577-4918-4.
- Schnick, R. 2006. Zero withdrawal anesthetic for all finfish and shellfish: need and candidates. *Fisheries* 31: 122–126.
- Schreck, C. B., Solazzi, M. F., Johnson, S. L., Nickelson, T. E., 1989. Transportation stress affects performance of coho salmon, (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 82: 15–20.
- Selye, H. 1973. The evolution of the stress concept. *American Scientist* 61 : 692–699.
- Shevchenko, V. V., 1978 Khranenie i transportirovanie zhivoi ryby (Storage and transport of live fish). Moskva, Izd. Ekonomika., 71 str.

- Sigma Environmental Consultants Ltd. 1983. Summary of water quality criteria for salmonid hatcheries SECL 8067. Report to department of Fisheries and Oceans, Vancouver, BC.
- Sneddon, L. U., 2003. The evidence for pain in fish: the use of morphine as an analgesic. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 83: 153–162.
- Sneddon, L. U., Braithwaite, V. A., Gentle, M. J., 2003a. Novel object test: examining nociception and fear in the rainbow trout. *J. Pain* 4: 431–440.
- Sneddon, L. U., Braithwaite, V. A., Gentle, M. J., 2003b. Do fishes have nociceptors? Evidence for the evolution of a vertebrate sensory system. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* 270: 1115–1121.
- Specker, J. L. i Schreck, C. B. 1980. Stress responses to transportation and fitness for marine survival in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) smolts. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. Str. 37.
- Spotte, S. H. 1970. *Fish and invertebrate culture*. Wiley, New York, 145 str.
- SPSS, 2007. *Base 16.0 User's Guide*. SPSS Inc.
- Stefansson, S., Bjerknes, V. Bjørn, P. A., Bæverfjord, G., Finn, R. N., Finstad, B., Fivelstad, S., Handeland, S., Hosfeld, C. D., Kristensen, T., Kroglund, F., Nilsen, T., Rosseland, B. O., Rosten, T., Salbu, B., Teien, H-C., Toften, H. og Åtland, Å. 2007. Fysiologiske egenskaper ved rogn, yngel og smolt. I: Bjerknes, V., Liltved, H., Rosseland, B. O., Rosten, T., Skjelkvåle, B. L., Stefansson, S., og Åtland, Å. (red.) *Vannkvalitet og smoltproduksjon*, Kapittel 3, side 94-124, Juul forlag, ISBN 978-82-8090-018-0.
- Summerfeldt, R. C. and Smith, L. S. 1990. Anaesthesia, surgery, and related techniques. In: Schreck, C.B. and Moyle, P.B. (eds.). *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda, MD, str. 213-272.
- Sverdrup, H. N., M. W. Johnson, and R. H. Fleming, 1942. *The Oceans*. Prentice – Hall, Englewood Cliffs, N.J. 1087 str.
- Swanson, C., Mager, R.C., Doroshov, I., Cech, J. J. Jr. 1996. Use of salts, anesthetics, and polymers to minimize handling and transport mortality in delta smelt. *Transactions of the American Fisheries Society* 125 : 326–329.

- Timmons, M. B., Ebeling, J. M., Wheaton, F. W., Summerfelt, S. T., Vinci, B. J. 2001. Recirculating Aquaculture Systems. Cayuga Aqua Ventures. Ithaca, NY, 647 str.
- Timmons, M. B., Ebeling, J. M., Wheaton, F. W., Summerfelt, S. T. i Vinci, B. J. 2002. Recirculating Aquaculture Systems, 2nd Edition. Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, NY 14850, USA. 1 (2): 800
- Timmons, M. B., Losordo, T. M. 1994. Engineering Design and Management of Aquaculture Water Reuse Systems. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 27: 209–234.
- Tomasso, J. R., Davis, K. B., Parkr, N. C. 1980. Plasma cortico- steroid and electrolyte dynamics of hybrid striped bass (white bass/striped bass) during netting and hauling. *Proceedings of the World Mariculture Society* 11: 303–310.
- Uredba Vijeća (EZ)br.1/2005 o zaštiti životinja tijekom prijevoza i s prijevozom povezanih postupaka.
- Wedemeyer, G. A. 1996. Transportation and handling. In: Pennel, W., Barton, B. (eds.), *Principles of Salmonid Culture*. *Developments in aquaculture and fisheries science*, 29. Elsevier, Amsterdam, str. 727-758.
- Wedemeyer, G. A. 1997. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. In: Iwama, G. W., Pickering, A. D., Sumpter, J. P., Schreck, C. B. (eds), *Fish Stress and Health in Aquaculture*, Cambridge University Press, New York. Str. 35–72.
- Weirich, C. R., Tomasso, J. R. 1991. Confinement- and transport-induced stress on red drum juveniles: effects of salinity. *The Progressive Fish Culturist* 53: 146–149.
- Winton, J. R. 2001. Fish health management. In: Wedemeyer GA (ed.) *Fish Hatchery Management*, American Fisheries Society, Bethesda, MD. Str. 559–639.
- Wojnarowich, E. i L. Horváth, 1980 *The artificial propagation of warm-water finfishes - a manual for extension*. *FAO Fish.Tech.Pap.*, 201: 138–47.
- Wurts, William, A. i Robert, M. Durborow. 1992. Interactions of hardness, alkalinity, pH and carbon dioxide. *SRAC*, 464: 1-4.

Yeager, D. M., Van Tassel, J. E., Wooley, C. M. 1990. Collection, transportation, and handling of striped bass brood stock. In: Harrell, R. M., Kerby, J. H., Monton, R. V. (eds), Culture and Propagation of Striped Bass and its Hybrids, American Fisheries Society, Bethesda, MD. Str. 39–42.

Zakon o provedbi Uredbi Europske unije o zaštiti životinja, NN,br.125/13.

ZARR, J. 1999. Biostatistical analysis. Prentice Hall, New Jersey.