

HEMATOLOŠKI PARAMETRI RIBA KAO INDIKATORI STANJA ŽIVOTNE SREDINE

¹RADOSLAV DEKIĆ, ²ALEKASANDAR IVANC, ³AZRA BAKRAČ-BEĆIRAJ,
²JELENA BOŠKOVIĆ², ¹SVJETLANA LOLIĆ
¹*Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, Mladena Stojanovića 2,
78000 Banja Luka, rdekic@yahoo.com*
²*Fakultet za biofarming, Megatrend Univerzitet Beograd, Maršala Tita 39, 24 300
Bačka Topola*
³*Biotehnički fakultet, Univerzitet u Bihaću, Kulina bana 2, 77 000 Bihać*

HEMATOLOGICAL PARAMETERS OF FISHES AS THE INDICATORS OF ENVIRONMENT

Abstract

Hematological parameters are reliable indicators of the state of the organism, and the state of the environment indirectly. Research on haematological parameters have been carried out on the species *Barbus peloponnesius* at two different locations. The following parameters were determined: number of erythrocytes, hemoglobine concentration, packed cell volume, Mean Corpuscular Volume (MCV), Mean Corpuscular Haemoglobin (MCH) and Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration (MCHC) and parameters of differential blood picture. The physico-chemical and hydrobiological analyzes water quality have been carried out at the same time.

Key words: hematology, Barbus peloponnesius, waterways.

UVOD

Životna sredina kao kompleks faktora, vrši konstantan uticaj na niz fizioloških i bi-hemijskih procesa u organizmu, izazivajući određene periodične promjene tih procesa i funkcija. Kompleks faktora spoljašnje sredine karakterističan je za određenu sezonu godine i kao rezultat njegovog složenog uticaja nastaju odgovarajuće funkcionalne adaptacije u organizmu, okarakterisane nizom mjerljivih promjena. Za praćenje zdravlja i kondicije riba u prirodnim staništima, kao i riba u akvakulturi, veliku važnost imaju istraživanja koja se odnose na krv i tjelesne tečnosti (Ivančić i sar., 2005). Promjene

određenih uslova životne sredine, dovode i do specifičnih ili nespecifičnih promjena hematološkog statusa određene vrste ribe, a ove promjene zajedno sa sezonskim promjenama takođe u značajnoj mjeri utiču na fiziologiju i biohemiju krvi.

Za definisanje fizioloških cirkualnih, kao i staništom uslovljenih karakteristika vrste visoku dijagnostičku vrijednost upravo ima hematološki status koji obuhvata eritroidnu i mijeloidnu lozu. Parametri eritrocitne i leukocitne loze predstavljaju veoma značajne pokazatelje zdravstvenog stanja riba, te njihove vrijednosti za datu vrstu doprinose poznavanju granica njihovog variranja u različitim fazama životnog ciklusa, kao i određivanju normalnih vrijednosti tipičnih za tu vrstu (Ivančić, 2003).

Vrijednosti parametara hematološkog statusa osciliraju pod različitim uticajima spoljašnje sredine. Promjene u krvnoj slici mogu biti rezultat promjene unutrašnjeg fiziološkog stanja i različitosti ekoloških faktora u vremenu i prostoru.

U ovoj studiji proučen je hematološki status vrste *Barbus peloponnesius* iz dva vodoka različitog stepena saprobnosti.

MATERIJAL I METODE

U istraživanjima su korištene jedinke vrste *Barbus peloponnesius* koje su lovljene na rijeci Suturliji i Jakotinskoj rijeci, odnosno vodama slivnog područja rijeke Vrbas. Lov jedinki i određivanje vrijednosti hematoloških parametara provedeno je u maju mjesecu 2004 godine.

Rijeka Suturlija svojim tokom i svojim slivnim područjem nalazi se na području jugozapadno od Banje Luke, a samo ušće u rijeku Vrbas, kao lijeve pritoke, nalazi se u naselju Srpske Toplice (Gornji Šeher), na nadmorskoj visini od 159 m. Izvor se nalazi kod naselja Goleši, na visini od 390 m, dok osnov slivnog područja predstavlja Dedića točak, brdo na nadmorskoj visini od 466 m.

Jakotinska rijeka je lijeva pritoka Vrbanje sa dužinom toka od oko 15 km, kotom izvora na nadmorskoj visini od 670 m, kotom ušća na 260 m i ukupnim padom riječnog korita od 410 m (Topografska karta, 1977; 1977a). Ima karakter stalnog vodotoka.

Za uzorkovanje ribe korišten je aparat za elektroribolov, sa impulsnom istosmjernom strujom i mogućnošću prilagođavanja izlaznog napona (u zavisnosti od provodljivosti vode u kojoj se vrši uzorkovanje), marke IG 600, snage 1,2 KW (sl. 6), a sakupljanje riba pomoću meredova.

Istovremeno su uzeti i uzorci vode za fizičko-hemijsku analizu kvaliteta, kao i uzorci faune dna za potrebe hidrobioloških analiza. Fizičko-hemijska analiza kvaliteta vode obuhvatala je određivanje dvadeset parametara, a klasifikacija kvaliteta vode izvršena je prema važećoj Uredbi o klasifikaciji voda i kategorizaciji vodotoka (Službeni glasnik RS, 42/2001).

Hematološke analize

Uzimanje krvi za hematološke analize obavljeno je punktiranjem srca oštrom i širokom sterilnom iglom (1.0 do 1.2 mm), uz primjenu pravila sterilnog rada. Nativna krv bez dodatka antikoagulativnog sredstva koristila se za dalju analizu.

Analiza broja uobličjenih elemenata određena je postupkom brojanja u komori (hemocitometru) metodom K e k i ć a i I v a n c a (1982), dok je za određivanje koncentracije hemoglobina (Hb) korištena Drabkinova hemiglobin cijanidska metoda (B l a x h a l l i D a i s l y, 1973).

Hematokrit (Hct) je određen centrifugiranjem, korištenjem mikrohematokrit centrifuge, dok su hematološki indeksi određeni računski na osnovu vrijednosti hematokrita, broja eritrocita i koncentracije hemoglobina.

$$\text{Srednja vrijednost zapremine eritrocita (MCV)} \quad MCV = \frac{Hct}{B \text{ .eritrocita/l}}$$

$$\text{Srednja vrijednost količine hemoglobina u eritrocitu (MCH)} \quad MCH = \frac{H / l}{B \text{ .eritrocita/l}}$$

$$\text{Srednja vrijednost hemoglobina u litri eritrocita (MCHC)} \quad MCHC = \frac{H / l}{Hct}$$

Za potrebe diferencijalne krvne slike izvršena je priprema krvnih razmaza, a nakon sušenja na vazduhu i pripreme za bojenje, razmazi su bojeni metodom po Pappenheimu.

REZULTATI I DISKUSIJA

Kvalitet vode

Na osnovu vrijednosti nitrata i ukupnih suspendovanih materija voda rijeke Suturlije pripada II klasi kvaliteta vode, dok ostali praćeni parametri odgovaraju prvoj klasi kvaliteta.

Vrijednosti parametara za kvalitet vode Jakotinske rijeke ukazuju na I klasu kvaliteta, izuzev vrijednosti suspendovanih materija koje su imale vrijednost druge klase.

Prema provedenim hidrobiološkim analizama oba ispitivana vodotoka spadaju u β -mezosaprobnu kategoriju, ali im se indeksi saprobnosti značajno razlikuju.

Jakotinska rijeka u uzorku iz maja mjeseca ima graničnu indeksa (1.505) između oligosaprobne i β -mezosaprobne, dok voda rijeke Suturlije spada u β -mezosaprobnu kategoriju sa indeksom saprobnosti 1.960.

Hematološki parametri

Kod svih ispitivanih jedinki utvrđeni su parametri eritrocitne i leukocitne loze. Uzorak sapače iz rijeke Suturlije obuhvatao je ukupno dvadesetpet jedinki, dok je iz Jakotinske rijeke u istraživanju korištena tridesetjedna jedinka.

Rezultati istraživanja predstavljeni su tabelarno za svaki vodotok posebno (Tab.1), a komparacija dobijenih rezultata data je tekstualno.

Tabela 1. Parametri eritrocitne loze sapače iz rijeke Suturlije i Jakotinske rijeke

	Hb g/l	Hct l/l	Broj erit. $\times 10^{12}/l$	MCV fl	MCH pg	MCHC g/l erit.
<i>Suturlija</i>						
Srednja vrijednost	67.48	0.411	1.148	359.08	58.80	165.79
Standardna devijacija	9.830	0.058	0.052	54.733	8.197	24.943
Minimum	51.85	0.329	1.060	282.458	43.942	109.629
Maksimum	88.89	0.522	1.230	470.185	73.462	214.820
Koeficijent variranja	14.569	14.033	4.609	15.242	13.940	15.045
<i>Jakotinska rijeka</i>						
Srednja vrijednost	74.55	0.437	1.099	398.547	67.947	171.498
Standardna devijacija	8.96	0.046	0.061	46.740	8.551	20.734
Minimum	44.44	0.327	1.000	302.232	41.925	111.100
Maksimum	88.89	0.531	1.220	495.050	85.471	226.791
Koeficijent variranja	12.017	10.467	5.587	11.728	12.585	12.090

Komparacija rezultata eritrocitnih parametara sapače sa dva lokaliteta pokazuje postojanje značajnih razlika kod većine ispitivanih parametara.

Tako su kod jedinki iz Jakotinske rijeke konstatovane značajno veće vrijednosti koncentracije hemoglobina ($p = 0.008$), vrijednosti prosječne zapremine eritrocita ($p = 0.006$) i količine hemoglobina po eritrocitu ($p = 0.000$), dok su jedinke iz rijeke Suturlije imale značajno veći broj eritrocita ($p = 0.002$). Ostali praćeni hematološki parametri nisu pokazivali značajnu razliku.

Ovakav odnos praćenih parametara stoji u vezi sa slabijim kvalitetom vode Suturlije, što kod sapače iz ove rijeke uslovljava prisustvo u cirkulaciji većeg broja mladih, nezrelih, formi eritrocita i zrelih eritrocita sa značajno manjom količinom hemoglobina, koje ribe proizvode kao odgovor na uslove staništa.

Produkcija mladih formi eritrocita, s druge strane uslovljava, kod ovih jedinki manje vrijednosti prosječne zapremine eritrocita, jer se radi o nezrelim formama manje zapremine.

Na takvu konstataciju ukazuju veličina i oblika jedra eritrocita koje je manje i s nešto izmijenjenim elipsastim oblikom u odnosu na jedro eritrocita jedinki iz Jakotinske rijeke.

Prisustvo manje prosječne zapremine eritrocita uzrokuje i manje vrijednosti prosječne količine hemoglobina po eritrocitu (MCH), kao i manje vrijednosti ukupnog hemoglobina.

Do istih rezultata došlo se i u istraživanjima hematoloških parametara šarana i lipljena iz različitih ekoloških uslova (Ivančić i sar., 1993; 1994), a različite vrijednosti hematoloških parametara konstatovane su i kod pastrmke (Kekeć, 1985).

Ovakvi rezultati konstatovani su i kod istraživanja hematologije klena iz različitih vodotoka (Đurđević i sar., 2005).

Analiza hematoloških parametara šarana s tri lokaliteta pokazuje da su postojale izvjesne razlike u vrijednostima hematokrita po lokalitetima, a razlikovale su se i diferencijalne krvne slike, odnosno učešće pojedinih formi leukocita (Fotić i Harmon, 1999).

Istraživanja hematoloških parametara vrste *Clarias gariepinus* pokazuju da na vrijednosti hematoloških parametara u značajnoj mjeri utiču pol ribe, period aklimatizacije, kao i samo stanište, odnosno da li je riba uzeta iz akvakulture ili iz njenih prirodnih uslova (G a b r i e l i s a r., 2004).

Kod svih ispitivanih jedinki određene su i vrijednosti broja leukocita, te parametri diferencijalne krvne slike (Tab.2).

Tabela 2. Parametri leukocitne loze sapače iz rijeke Suturlije i Jakotinske rijeke

Broj ind.	Broj leukocita (x 10 ⁹)	Proporcije pojedinih formi leukocita				
		Neutrofil	Pseudoeozinofil	Limfocit	Monocit	Bazofil
<i>Suturlija</i>						
Srednja vrijednost	17.520	0.290	0.130	0.500	0.056	0.024
Standardna devijacija	1.960	0.068	0.046	0.069	0.023	0.014
Minimum	14.000	0.200	0.050	0.340	0.020	0.000
Maksimum	22.000	0.500	0.230	0.650	0.100	0.070
Koeficijent variranja	11.189	23.302	35.393	13.779	41.560	56.417
<i>Jakotinska rijeka</i>						
Srednja vrijednost	18.777	0.353	0.104	0.473	0.050	0.020
Standardna devijacija	1.668	0.051	0.045	0.065	0.027	0.015
Minimum	16.000	0.240	0.040	0.350	0.010	0.000
Maksimum	22.000	0.490	0.190	0.600	0.110	0.060
Koeficijent variranja	8.882	14.452	43.460	13.804	54.650	74.608

Poređenjem parametara diferencijalne krvne slike uočavaju se jasne razlike među ribama sa različitih lokaliteta.

Tako je proporcija neutrofilnih granulocita značajno veća ($p = 0.000$) kod jedinki iz Jakotinske rijeke, a ove jedinke su imale i značajno veći broj leukocita ($p = 0.013$), dok su jedinke iz rijeke Suturlije imale veće vrijednosti pseudoeozinofila ($p = 0.041$). Ostali praćeni parametri ne pokazuju postojanje značajnih razlika.

Promjena broja leukocita i proporcije pojedinih formi mogu biti uzrokovane i povećanjem organskog opterećenje u vodi, tako se u krvi šarana uočava povećanje proporcija granulocita i monocita, što vjerovatno predstavlja adaptivni odgovor na povećanje broja fakultativno patogenih mikroorganizama (I v a n c i s a r. 1993).

Sama promjena ambijentalne temperature dovodi do promjene u krvnoj slici i utiče na proporciju nespecifičnih toksičnih ćelija u krvi šarana, te je njihova zastupljenost značajno veća u hladnoj vodi, dok je u toploj vodi registrovana veća proizvodnja antitijela (L e m o r v a n i s a r. 1996).

Takođe, promjene broja leukocita i proporcije limfocita u okviru leukocitarne formule mogu biti povezana sa mnogim infektivnim i neinfektivnim poremećajima stanja

organizma riba uključujući i trovanje teškim metalima (M u r a d i H o u s t o n, 1988), trovanje amonijakom (W l a s o n i D a b r o w s k a, 1989) i bakterijske infekcije (N o y a i s a r. 1995).

ZAKLJUČCI

- Parametri kvaliteta vode pokazuju prema većini praćenih parametara I klasu kvaliteta vode, s tim da je prema nekim parametrima rijeka Suturlija u II klasi, a Jakotinska rijeka samo na osnovu vrijednosti suspendovanih materija.
- Hematološki parametri vrste *Barbus peloponnesius* sa dva ispitivana lokaliteta pokazuju značajne razlike.
- Veće vrijednosti koncentracije hemoglobina, prosječne zapremine eritrocita i količine hemoglobina po eritrocitu konstatovane su kod jedinki iz Jakotinske rijeke, dok je veća vrijednost broja eritrocita utvrđena kod jedinki iz rijeke Suturlije.
- Odnos praćenih parametara sapače sa dva ispitivana lokaliteta, može se objasniti činjenicom da je kvalitet vode rijeke Suturlije lošiji u odnosu na Jakotinsku rijeku, što uslovljava veći broj mladih eritrocita, koji imaju i manju zapreminu.
- Broj leukocita i proporcija neutrofila su značajno veće kod jedinki iz Jakotinske rijeke, dok su jedinke iz rijeke Suturlije imale značajno veće vrijednosti pseudoeozinofila.

LITERATURA

Blaxhall, P.C. i Daisley, K.W. (1973). Routine hematological methods for use with fish blood.-*J. Fish. Biol.*, 5:771-781.

Durđević Svyetlana, Dekić, R., Vuković Dragojla., Ivanc, A. (2005). Kvalitet vode i morfološke, merističke i hematološke karakteristike klena (*Leuciscus cephalus*), Prvi Simpozijum biologa Republike Srpske, 2005.

Foott, S. J. and Harmon, R. (1999). Health Evaluation of Adult Carp (*Cyprinus carpio*) from Lake Mead and Lake Mohave.-*U. S. Fish i Wildlife Service California-Nevada Fish health Center.*

Gabriel, U. U., Ezeri, G.N.O. and Opabunmi, O.O. (2004). Influence of sex, source, health status and acclimation on the haematology of *Clarias gariepinus* (Burch,1822). *African Journal of Biotechnology* Vol. 3, No. 9, September, 2004 pp. 463-467.

Ivanc, A., S. Maletin, K. Kojčić, N. Đukić, V. Pujin (1993). Leukocitarna formula riba kao pokazatelj uticaja organskog opterećenja vode Kanala Hidrosistema DTD kod Vrbasa."Zaštita voda 93", Arandelovac, Zbornik radova: 240-245.

Ivanc, A., Maletin, S., Djukić, N., Pujin, V., Miljanović, B. (1994). Populations- und saisonmassige Schwankungen der Leukocytenzahl und des Differentialblutbildes der Aesche (*Thymallus thymallus* L.), 30. Arbeitstagung der IAD, Zuoz - Engadin (Schweiz), *Limnologische Berichte Donau* 1994, Band I, Wissenschaftliche Kurzreferate: 207-210.

Ivanc, A. i Jeremić S. (1999). Hematološki status u dijagnostici oboljenja riba. U monografiji "Zaštita životne sredine pri intenzivnom gajenju riba", Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Institut za biologiju, Ekološki pokret grada Novog Sada Urednici: Smiljka Šimić i Aleksandar Ivanc, Novi Sad, 86-95.

Ivanc A. i Miljanović, B. (2003). Hidroakumulacije, Multidisciplinovani pristup održivom razvoju, Monografija, Prirodno-matematički fakultet Novi Sad, Ministarstvo za zaštitu prirodnih bogatstava i životne sredine, Zavod za zaštitu zdravlja “Timok” Zaječar, JVP “Vode Srbije”, JVP “Vode Vojvodi.” Novi Sad.

Ivanc, A., Hasković, E., Jeremić, S., Dekić, R. (2005). Hematological Evaluation of welfare and health of fish, Praxis veterinaria 53 (3) 191-202.

Kekić, H. i Ivanc, A. (1982). A new direct method for counting fish blood cells Ichthyologia, 14, 1: 55.

Kekić H. Pavlović V, Gvozdrenović O, Ivanc A, Mijatović N, Pejić K. (1985). Differential blood count in brown trout (*Salmo trutta m. fario*) under natural conditions of habitat in various seasons. Jugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta. 21, Suppl. 4, 121.

Lemorvan, C., P. Deschaux and D. Troutaud (1996). Effects and mechanisms of environmental temperature on carp (*Cyprinus carpio*) anti-Dnp antibody-response and nonspecific cytotoxic-cell activity - A kinetic study. Developmental and comparative immunology, 20, 5 : 331-340.

Murad, A., Houston, A. H. (1988). Leucocytes and leucopoietic capacity in goldfish, *Carasius auratus*, exposed to sublethal levels of cadmium. Aquatic Toxicology, 13: 141- 154.

Noya, M., Magarinos, B., Toranzo, A. E., and Lamas, J. (1995). Sequential pathology of experimental pasteurellosis in gilthead seabream *Sparus aurata*. A light and electron- microscopic study. Diseases of Aquatic Organismus, 21: 177 – 186.

Službeni glasnik RS, Uredba o klasifikaciji voda i kategorizaciji vodotoka (42/2001).

Topografska karta 1:25000 Banja Luka 1-4, Broj lista 423-1-2 (Šaškinovci), Vojnogeografski institut, drugo dopunjeno izdanje, 1977.

Topografska karta 1:25000 Banja Luka 4-3, Broj lista 423-4-3 (Rađići), Vojnogeografski institut, drugo dopunjeno izdanje, 1977a.

Wlason, T., H. Dabrowska (1989). Cellular changes in the blood and hematopoietic tissues of common carp exposed to a sublethal concentration of ammonia. Aquatic Living Resources, 2: 169 - 174.