

ЕРИТРОГРАМ КАЛИФОРНИЈСКЕ ПАСТРМКЕ (*Oncorhynchus mykiss*) ИЗ РИБЊАЧКИХ И ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИХ УСЛОВА

Декић Радослав¹, Иванц Алекасандар², Мирошљевић Дарко³, Бакрач-Бећирај Азра⁴

¹Универзитет у Бањој Луци, Природно-математички факултет, Бања Лука, Младена Стојановића 2, 78 000 Бања Лука (rdekic@yahoo.com)

²Државни универзитет у Новом Пазару, Вука Караџића бб, 36300 Нови Пазар

³Основна школа „Свети Сава“, Бања Лука

⁴Универзитет у Бихаћу, Биотехнички факултет Бихаћ

Abstract

DEKIC, R¹., A. IVANC², D. MIROSLJEVIC³, A. BAKRAC-BECIRAJ⁴: ERYTHROGRAM OF RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*) FROM FISH PONDS AND EXPERIMENTAL CONDITIONS (¹University of Banja Luka, Faculty of Natural Sciences and Mathematics; ²State University of Novi Pazar, Vuka Karadzica bb, 36300 Novi Pazar, Serbia; ³Elementary School „Sveti Sava“ Banja Luka, ⁴University of Bihac, Biotechnical faculty)

Temperature as one of the factors of water quality has influence on a number of physiological processes in aquatic organisms, mostly changing rate of these processes. Different methods of researching blood and body fluids are used for monitoring the health and condition of the fish. Parameters of erythrocyte cell line (number of erythrocytes, hemoglobin concentration, hematocrit, MCV, MCH and MCHC) of rainbow trout from a fish farm and from experimental conditions are studied after being exposed to different ambient temperatures. In experimental conditions fish were kept at water temperature from 9°C and 14°C, with constant monitoring of the water quality. During the experiment the fish was given the pelleted feed, equally divided in daily portions. Results show that in fish kept on 14°C values of MCV and hematocrit were increased, as well as MCH, comparing to individuals from the fish farm. Increased values in these individuals are probably conditioned with water temperature in their habitat.

Key words: erythrocytes, fish, experiment

Сажетак

Температура као један од фактора квалитета воде дјелује на низ физиолошких процеса у организму, доводећи до промјене у брзини одвијања процеса. За праћење здравља и кондиције риба користе се различите методе испитивања крви и тјелесних течности. У раду су праћени параметри еритроцитне лозе пастрмке из рибњачких и температурно различитих експерименталних услова. Параметри еритроцитне лозе су обухватили: број еритроцита, концентрацију хемоглобина, хематокрит, MCV, MCH и MCHC. У експерименталним условима рибе су гајене на температури воде од 9°C и 14°C, уз константно праћење квалитета воде. У току експеримента риба је храњена пелетираном храном, која је равномјерно подијељена у дневне оброке. Резултати показују да је код риба гајених на 14°C дошло до повећавања просјечне запремине еритроцита и хематокрита, као и вриједности MCH у поређењу са јединкама из рибњака. Повећавање вриједности код ових јединки вјероватно је условљено температуром воде у којој су боравиле.

Кључне ријечи: еритроцити, риба, експеримент.

УВОД

Животна средина као комплекс фактора, врши константан утицај на низ физиолошких и биохемијских процеса у организму, изазивајући одређене периодичне промјене тих процеса и функција. Температура представља један од најзначајнијих фактора средине који утиче на сва жива бића, а њено дејство је нарочито изражено код

појикилотермних организама. Као фактор утиче на низ физиолошких процеса у организму мијењајући брзину њиховог одвијања. Рибе ће се на промјену температуре животне средине адаптирати, али ако температура пређе одређени праг наступа термички стрес. Посљедице термичког стреса зависе од интензитета и трајања промјене термичког режима.

Термичка толеранција калифорнијске пастрмке (*Oncorhynchus mykiss*) креће се у распону од 5 до 23°C, док се оптималним сматрају температуре од 9 до 17°C.

Поред температуре, на физиолошке параметре могу утицати и многи други фактори као што су концентрације кисеоника, количина органске супстанце у води, рН итд. Оптимална концентрација кисеоника раствореног у води износи од 8 до 12 mg/l, зависно од температуре воде. Поузданија је мјера засићење воде кисеоником која не смије да буде мања од 80%, јер у супротном код риба долази до хипоксије мањег или већег интензитета.

Вриједност рН неопходна за нормалну физиолошку активност анализиране врсте износи од 6,5 до 8,5 (Molony, 2001). С тим у вези истраживања крви и тјелесних течности имају велики значај за праћење здравља и кондиције риба како у природним стаништима, тако и у аквакултури (Ivanс и сар., 2005).

Подаци о вриједностима одређених физиолошких параметара дате врсте доприносе познавању граница варирања ових параметара у различитим амбијенталним условима, различитим фазама животног циклуса, као и одређивању нормалних вриједности типичних за ту врсту (Ivanс и Милјановић, 2003).

Хематолошки параметри риба такође представљају поуздане индикаторе стања животне средине, јер параметри као што су хемоглобин, хематокрит, крвне ћелије, седиментација еритроцита, диференцијални тестови крви користе се као индикатори болести и стреса. Многе студије су показале промјене варијабилности крви, а које су посљедица дјеловања различитих фактора средине као што су температура, радијација, хипоксија, и присуство различитих загађивача (Rowan, 2007)

Према Rehulka и Adamс (2004), еритроцити одражавају стање организма током дугог временског периода, а истовремено су значајан и поуздан показатељ различитих извора стреса.

Циљ рада је да се утврде вриједности основних хематолошких параметара (еритрограм) код јединки из рибњачких и температурно различитих експерименталних услова у сврху повећања сазнања о утицају температуре на еритроцитну лозу код наведене врсте.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Узорци риба кориштених у експерименту су узети из Рибњака „Тропик” који је смјештен у насељу Рибник. Све јединке су биле исте узрасне класе, старости до једне године. Непосредно по уловљавању (јануар 2006. године), узети су узорци крви 25 јединки за хематолошке анализе, а остале јединке су транспортоване у одговарајућим посудама са довољном количином воде и обезбјеђеним ваздушним пумпама.

Експериментални дио рада је обављен у просторијама виваријума Природно-математичког факултета. Јединке пастрмке су распоређене у два акваријума, запремине 170 литара, а количина воде била је сразмјерна маси рибе.

Одговарајуће физичко-хемијске карактеристике воде постигнуте су употребом уређаја за аерацију и пречишћавање који се састоје из одговарајућих компресора ниског притиска са два излаза марке „CHAMPION CX-0098”(50 Hz, 6 W) и угаоног филтера који садржи два слоја вате и слој активног угља. Сваки акваријум био је снабдјевен са двије пумпе и четири угаона филтера, који су током експеримента чишћени два пута дневно, а сваких четири до пет дана су мењани вата и угљ у филтерима. Истовремено са чишћењем филтера вршена је замјена половине запремине

воде у акваријумима. Вода која је служила за замјену је претходно одстојала и имала температуру као она у акваријуму, што се постизало хлађењем ледом или загријавањем гријачима.

Температура у једном акваријуму је износила 9°C, док је други акваријум имао температуру воде од 14°C, што је регулисано помоћу гријача са термостатом марке „PEAR AQUATICS Y 978” (50 Hz, 100 W).

С обзиром да је истовремено праћен и прираст, рибе су током експеримента храњене два пута дневно са тачно одваганом количином хране. Дневна количина хране и дисперзија оброка зависе од температуре воде, старости риба, те од врсте хране (Тгеет и сар., 1995).

Квалитет воде

Да би се постигле одговарајуће физичко-хемијске карактеристике воде, током експеримента редовно су праћени концентрација кисеоника, НРК, присуство амонијака, температура и рН.

Хематолошке методе

Крв за анализе узета је пункцијом срца, стерилном иглом промјера 1.2 mm, уз примјену свих правила стерилног рада. За одређивање броја еритроцита примијењен је метод одређивања броја еритроцита у комори (хемотометру) уз разрјеђење крви раствором Кекића и Иванца (1982).

Концентрација хемоглобина одређена је примјеном Drabkin-ове методе (Blaxhall и Daisley, 1973) која се заснива на превођењу хемоглобина у цијанметхемоглобин и поређењу боје са бојом стандардног раствора познате концентрације.

Хематокрит је одређен центрифугирањем помоћу хематокрит центрифуге, а на основу добијених параметара израчунате су вриједности хематолошких индекса (MCV, MCH, MCHC). Комплетна статистичка обрада је урађена помоћу програма Microsoft Excel 2003.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Квалитет воде

Вриједности концентрације кисеоника кретале су се у дозвољеним границама и нису имале значајна одступања, као ни вриједности НРК, тј. количина органске супстанце, која је такође била унутар дозвољених граница. Вриједности рН код оба испитивана акваријума су се кретале од 7,4 до 7,9, односно од 7,4 до 8,0. (Табела 1).

Табела 1. Физичко-хемијске карактеристике воде

Датум	ТЕМПЕРАТУРА ВОДЕ 9°C			ТЕМПЕРАТУРА ВОДЕ 14°C		
	Концентрација O ₂ (mg/l)	Утрошак KMnO ₄ (mg/l)	pH	Концентрација O ₂ (mg/l)	Утрошак KMnO ₄ (mg/l)	pH
26.01.2006.	11,55	7,804	7,4	11,40	9,522	7,4
27.01.2006.	12,96	6,612	7,6	11,97	8,732	7,7
01.02.2006.	11,27	7,400	7,6	11,97	9,324	7,5
13.02.2006.	11,26	7,902	7,8	9,86	11,204	7,8
23.02.2006.	13,11	8,100	7,9	11,27	10,182	8,0
24.02.2006.	12,96	7,800	7,5	11,40	4,425	7,6
01.03.2006.	12,11	9,482	7,7	11,40	11,011	7,8

Хематолошки параметри

Вриједности праћених хематолошких параметра јединки узетих из рибњака, као и јединки из експерименталних услова приказани су табеларно (Табела 2), а потом је извршена компарација добијених резултата

Табела 2. Хематолошке вриједности јединки из рибњака и јединки гајених на 9°C и 14°C

Хематолошке вриједности јединки из рибњака						
Параметри	Hct l/l	Hb g/l	Еритроцити 10 ¹² /l	MCV fl	MCH pg	MCHC g/l erit.
Средња вриједност	0,334	41,20	0,894	364,581	45,657	125,244
Стандардна девијација	0,058	12,52	0,144	60,654	12,274	33,840
Минимална вриједност	0,200	18,52	0,490	212,963	24,005	66,477
Максимална вриједност	0,414	62,96	1,080	486,364	69,190	207,200
Коефицијент варирања	17,509	30,37	23,080	16,634	26,883	27,019
Хематолошке вриједности јединки гајених на 9°C						
Средња вриједност	0,311	42,52	0,872	373,657	51,572	137,432
Стандардна девијација	0,044	4,91	0,177	96,560	16,130	18,041
Минимална вриједност	0,218	33,33	0,330	256,471	33,979	107,354
Максимална вриједност	0,390	51,85	1,130	718,182	112,233	169,894
Коефицијент варирања	14,084	11,56	20,281	25,842	31,277	13,127
Хематолошке вриједности јединки гајених у акваријуму на 14°C						
Средња вриједност	0,344	44,11	0,823	431,667	55,244	129,350
Стандардна девијација	0,043	7,22	0,151	98,787	13,779	22,193
Минимална вриједност	0,276	33,33	0,570	294,792	35,958	103,666
Максимална вриједност	0,442	59,26	1,120	631,429	92,593	185,185
Коефицијент варирања	12,636	16,37	18,388	22,885	24,942	17,158

Компарација добијених резултата за три групе јединки калифорнијске пастрмке које су обухваћене овим истраживањима показује постојање значајне разлике код већине параметра. Тако су највеће вриједности броја еритроцита констатоване код јединки код којих је анализа рађена непосредно на рибњаку и биле су значајно различите у односу на вриједности код јединки гајених на 14°C ($p = 0,025$). Супротно од броја еритроцита вриједности просјечне запремине еритроцита показују значајно повећање вриједности са повећавањем температуре, а разлика је сигнификантна у односу на јединке из рибњака ($p = 0,010$), док се у поређењу вриједности код експерименталних јединки уочава разлика на граници статистичког значаја ($p = 0,05$). Када су у питању вриједности хематокрита разлика на нивоу статистичког значаја ($p = 0,016$) утврђена је у поређењу резултата код јединки из експерименталних услова, са већим вриједностима код риба гајених на 14°C. Значајна разлика ($p = 0,020$) утврђена је и у поређењу средњих вриједности MCH јединки из рибњака и гајених јединки на 14°C.

Гледајући укупне резултате параметара еритроцитне лозе калифорнијске пастрмке из рибњачких и експерименталних услова може се констатовати да су уочене мале разлике у поређењу вриједности до којих се дошло код јединки из рибњачких услова и јединки гајених на температури од 9°C. Знатно веће разлике забиљежене су у поређењу вриједности јединки из рибњака и јединки гајених на температури од 14°C.

На основу резултата уочљиво је да код риба гајених на 14°C долази до повећавања просјечне запремине еритроцита, што условљава и веће вриједности хематокрита иако имају мањи број еритроцита. Такође код ових јединки су

констатоване и нешто веће вриједности концентрације хемоглобина, а у вези с тим и количина хемоглобина по еритроциту већа је код једики гајених на 14°C, што вјероватно представља адаптацију на повећавање температуре.

Наиме повећавање вриједности температуре воде доводи до промјене у интезитету метаболизма код риба и прилагођавању риба. На промјене температуре воде већина риба може да се прилагоди, али уз велику потрошњу енергије. Тако се код шарана уочава да након промене температуре воде са 3°C на 20°C (у току 4 сата) у наредних 14 дана потроши 50 % залиха телесних масти. Промене температуре су много боље подношљиве када су постепене (Schreckenbach, 2002). Према Houstonu и сар. (1996) кључни догађај у хематолошком одговору на повећање температуре је замјена зрелих и остарјелих еритроцита младим ћелијама које су метаболички компетентне при том имајући у виду редукацију ефикасности транспорта гасова код старих еритроцита.

Слични резултати констатовани су и у другим истраживањима. Тако Rehulka и Adames (2004) наводе да су јединке калифорнијске пастрмке које су узгајане у систему кавеза (температура воде $17 \pm 3^\circ\text{C}$, надморска висина 291 m) и базенима (температура воде $9 \pm 2,5^\circ\text{C}$, надморска висина 651 m) имале различите вриједности параметара еритроцитне лозе. Оба локалитета су снабђевана водом из исте ријеке, а рибе су храњене истом храном. Јединке узгајане у кавезима (температура $17 \pm 3^\circ\text{C}$) су имале значајно веће вриједности параметара еритроцитне лозе, у односу на рибе гајене у базенима. Резултати су показали да технологија узгоја рибе, различита физичка и хемијска својства воде, те расположивост природне хране имају утицај на еритропоезу. На процес еритропоезе утичу броји фактори животне средине и то мора узети у обзир када се раде параметри еритроцитне лозе.

Промијене параметара црвене лозе сличне нашим добијене су и у истраживањима утицаја краткотрајног термичког стреса на јединке сапаче (*Barbus balcanicus*). У овим истраживањима констатовано је повећавање вриједности, просјечне запремине еритроцита и хематокрита код термички третираних јединки, док су вриједности МСНС-а биле значајно веће код јединки које нису излагане повећању температуре воде (Ivanc и сар., 2007).

Код истраживања утицај акутног хипоксичног стреса на параметре еритроцитне лозе калифорнијске пастрмке констатован је пораст броја еритроцита и хематокрита уз истовремено смањење концентрације хемоглобина и величине еритроцита (Valenzuela и сар., 2007).

Истраживања утицаја температуре воде на хематолошке параметре проведена су у експерименту на три врсте риба и то: тилапија (*Sarotherodon mossambicus*), шаран (*Cyprinus carpio*) и пастрмка (*Oncorhynchus mykiss*). Јединке кориштене у овом експерименту, биле су аклиматизоване на лабораторијске услове у периоду од два мјесеца. Температура воде у лабораторији кретала се око 19°C. Након та два мјесеца индивидуе сваке врсте биле су аклиматизоване на температуру од 15°C, 20°C и 25°C у периоду од три седмице, након чега се почело са анализирањем хематолошких параметара. Веће су разлике примијећене између јединки аклиматизованих на 15°C и 20°C него између јединки аклиматизованих на 20°C и 25°C. Код тилапије са порастом температуре расте и средња вриједност броја еритроцита, док су ове вриједности код шарана и пастрмке остале константне. Повећање броја еритроцита није било праћено и повећањем концентрације хемоглобина. МCV је био температурно независан код свих врста. Код шарана су и МСН и МСНС такође температурно независни, а код пастрмке је МСН остао непромијењен. МСН и МСНС су такође били температурно независни и код тилапије, док је код пастрмке позитиван однос био посматран само за МСНС (Smit и сар., 1981). Ово истраживање показује да хематолошки индекси нису имали

значајне промјене, односно да температура воде није имала велики утицај не вриједности ових параметра, изузев МСНС код пастрмке.

ЗАКЉУЧЦИ

- Истраживањем је обухваћено 75 јединки, при чему је 25 јединки анализирано одмах по узорковању, док је преосталих 50 јединки гајено у експерименталним условима на различитим температурама.
- Број еритроцита показује статистички значајну разлику код јединки узетих из рибњака и јединки гајених на 14°C.
- Вриједност хематокрита показују значајну разлику у поређењу јединки гајених на 9°C и 14°C та разлика је статистички значајна.
- Вриједности средње вриједности запремине еритроцита показују статистички значајне разлике у поређењу јединки из рибњака и гајених јединки на 14°C, а може се констатовати и разлика између јединки гајених на 9°C и 14°C.
- Вриједности МСН јединки из рибњака и гајених јединки на 14°C показује да постоји статистички значајна разлика.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bastardo, H. R. C., Z. J. M. Coche, P. J. Salinas, I. Hernandez (1992): Determinaciones hematologicas en Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Universidad de 101 Andes, Facultad de Ingenieria Forestal.
2. Blaxhall, P. C., K. W. Daisky (1973): Routine hematological methods for use with fish blond. – J. Fish. biol. , 5: 771-781.
3. Bogut, I., D. Novoselić, J. Pavličević (2006): Biologija riba. Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku, Sveučilište u Mostaru.
4. Densmore, C. L., V. S. Blazer, T. B. Waldrop, P. S. Pooler (2001): Effects of Whirling Disease on Selected Hematological Parameters in Rainbow Trout. National Fish Health Research Laboratory, Leetown Science Center.
5. Ellis, A. E. (1977) : The leucocytes of fish: A review. J. Fish Biol., 11 : 453 – 491.
6. Ivanc A., R. Dekić, E. Hasković, J. Dulčić, Glamuzina B., M. Mitrasinović, D. Suljević i M. Bubić (2007): The effects of thermal stress on red blood cell parameters of *Barbus peloponnesis*. ECI XII, XII European Congress of Ichthyology, Cavtat (Dubrovnik).
7. Ivanc, A. i B. Miljanović (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 Vojvodine” Novi Sad.
8. Ivanc, A., E. Hasković, S. Jeremić, R. Dekić (2005): Hematological Evaluation of welfare and health of fish, *Praxis veterinaria* 53, 3: 191-202. Zagreb, 2005.
9. Ivanova, N. T. (1983): Atlas kletok krvi ryb. Legkaja i piščevaja promišljenost, Moskva.
10. Kekić, H., A. Ivanc (1982): A new direct method for counting fish blood cells. *Ichthyologia*, 14, 1 : 55.
11. Molony, B. (2001): Environmental requirements and tolerances of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Brown trout (*Salmo trutta*) with special reference to Western Australia: A review fisheries research report No. 130.
12. Rehulka, J., V. Adamec (2004): Red Blood Cell Indices for Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) Reared in Cage and Raceway Culture. Department of Zoology, Silesian Museum.

13. Rowan, M. W. (2007): Use of blood parameters as biomarkers in brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) from lake erie tributaries and cape cod ponds. Dissertation. The Ohio State University,.
14. Schreckenbach, K. (2002): Einfluss von Umweltbedingungen auf Karpfen. *Fischer & Teichwirt* 53, 207-208, 2002.
15. Smit, G. L., J. Hattingh, J. T. Ferreira (2000): The physiological responses of blood during thermal adaptation in three freshwater fish species. Rand Afrikans University.
16. Treer, T., R. Safner, I. Aničić, M. Lovrinov (1995): Ribarstvo. Nakladni zavod Globus, Zagreb.
17. Venezuela, A., K. Alveal, E. Terifeno (2007): Haematological response of trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) to the acute hypoxic stress: res blood cells. Universided de Concepcion, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanograficas.
18. Houston, A.H., N. Dobric, R. Kahurananga (1996): The nature of hematological response in fish. *Studies on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to simulated winter, spring and summer conditions.* Fish Physiology and Biochemistry. 15, 4: 339-347.

Примљено: 15. 02. 2011.

Одобрено: 12. 07. 2011.