

površinskih slatkih voda su: koliformne bakterije, anaerobne vrste bakterija, alge i cijanobakterije te protozoe (Frece & Mark, 2015).

Utjecaj parazita na organizme je varijabilan, a u konačnici može dovesti i do smrti domaćina/domadara (Levsen *et al.*, 2008). Potencijalni domaćini različitih obligatnih ili fakultativnih parazita su i mnogobrojne vrste slatkovodnih riba (Ricklefs & Mille, 2000; Peek, 2012). Egzoparazitske vrste se kod riba nalaze na koži ili krljuštima, perajima te na škrgama i u usnoj šupljini. Endoparaziti se lociraju u mišićima, unutrašnjim organima (najčešće crijevima) i membranama koje obavijaju unutarnje šupljine organizma (Peek, 2012).

Razvoj specifičnih životnih ciklusa ribljih parazita je najvećim dijelom posljedica načina ishrane riba (Bellay *et al.*, 2015). Tako za određene vrste riba koje se hrane organskim detritusom na dnu voda postoji mogućnost unosa jaja parazita koja su odložena od strane drugih inficiranih jedinki (Iyaji & Eyo, 2008). Predatorske vrste riba se također mogu inficirati ako u ishrani koriste drugu riblju vrstu zaraženu parazitima. Pojedine riblje vrste imaju tendenciju migracije iz određene riblje vrste u povoljne dijelove organskih sistema (najčešće probavnog) druge vrste (Yanong, 2017). Zbog svojih biološko-ekoloških karakteristika ribe se koriste kao bioindikatori dalekosežnijih i dugoročnijih posljedica promjena u akvatičnim ekosistemima te detekciju specifičnih kontaminanata (Riđanović & Riđanović, 2016). Kod riba postoje dva jednako važna načina unosa polutanata: preko škrge – direktno iz vode i oralnim putem – asimilacijom zagađene hrane (Kleinow *et al.*, 1987).

Histopatološka analiza ribljih tkiva također omogućava detekciju izlaganja nizu antropogenih zagađivača. Simptomi kod inficiranih jedinki se mogu uočiti makroskopskim pregledom jedinki, a također i kasnijim seciranjem ribe i analizom histoloških preparata pojedinih tkiva. Najčešće korišteni organi riba za ove analize su škrge i jetra (Fatima *et al.*, 2014). Uspješnost odbrane od patogena zavisi od stanja površine tijela, imunog sistema i cijelog organizma riblje vrste te o broju i osobinama patogena (Fijan, 2006).

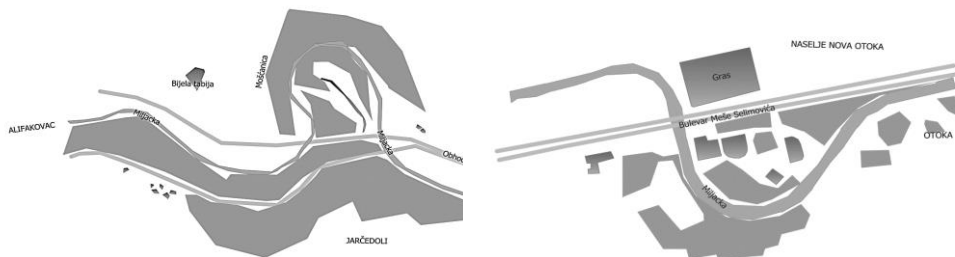
Fizičko – hemijski parametri vodenih ekosistema ukazuju na trenutno stanje kvaliteta vode određenog akvatičnog ekosistema. Odabir parametara zavisi od tipa istraživanja i drugih okolnosti, a neki od njih su: gustoća i boja vode, površinska napetost, temperatura, svjetlost, kisik (koncentracija i zasićenost), minerali, tip supstrata (dna, korita) te koncentracija ugljika i azotnih jedinjenja, boja vode, pH vrijednost, elektroprovodljivost itd. (Smith & Smith, 2001; Bogut *et al.*, 2006).

Istraživanja u ovoj studiji su vršena na ribljjoj vrsti *Barbus balcanicus* Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb & Berrebi, 2002 (potočna mrena, balkanska/velika mrena, balkanska sapača, engl. *Danube Barbel*, *Mediterranean Barbel*). Kao sinonimi za ovu vrstu u literaturi se mogu naći *Barbus meridionalis* Risso, 1826 i *Barbus caninus* (Bonaparte, 1839) (Mrakovčić *et al.*, 2004). Njen IUCN status je osjetljiva (VU) te nije na Crvenoj listi. Međunarodno je zaštićena Bernskom konvencijom (Dodatak III) i Europskom direktivom o zaštiti staništa. Potočnu mrenu ugrožava onečišćenje vodotoka, nestajanje prirodnih i mrijesnih staništa, pregradnja rijeka i regulacija gornjih tokova rijeka (Mrakovčić *et al.*, 2004; Miloš, 2009). Predstavlja pogodnu bioindikatorsku,

riblju vrstu (objekat/model) za ispitivanje zagađenosti vodenih ekosistema zbog njene osjetljivosti na različite promjene u okolišu (Bašić, 1980) te odsustvo s crvene liste. Miljacku, rijeku sliva rijeke Bosne, najvećim dijelom sačinjavaju Paljanska i Mokranjska Miljacka. Cjelokupni riječni sistem Miljacke uzvodno od proširenja aluvijalne ravnine (kod naselja Babića Bašta) ima obilježja planinskog toka, s vrlo strmim i neusaglašenim uzdužnim profilom. Nizvodno od navedenog lokaliteta rijeka Miljacka teče kroz aluvijalnu ravan sa vrlo malim padom. Nalazi se između 487 m i 1699 m nadmorske visine (Žunić, 2010). Rijeka Miljacka je izložena različitim izvorima zagađenja, naročito u donjem dijelu toka koji je pod velikim antropogenim pritiskom. Cilj ove studije je bio parazitološka i histopatološka analiza tkiva vrste *Barbus balcanicus* iz rijeke Miljacke, kao vodenog ekosistema izloženog negativnim antropogenim uticajem. Svrha je bila detektiranje povezanosti i komplementarnosti između prisustva parazita i histopatoloških promjena na tkivima odabrane vrste s kontaminiranošću vode rijeke Miljacke. Eventualno prisustvo parazita je značajno zbog toga što nivo parazitarnosti može značajno uticati na strukturu zajednice te se može koristiti kao biološki parametar ekološkog statusa kompletnog akvatičnog ekosistema. Potencijalna detekcija parazitskih vrsta opasnih za riblje vrste na primjeru ove bioindikatorske vrste podrazumijeva i detekciju „biološke opasnosti“, kako po ostale vrste ihtiofaune, tako i po cjelokupan živi svijet ovog akvatičnog ekosistema. Isto tako, u drugom smjeru posmatrano – nivo zagađenosti vode može odrediti uslove za razvoj parazita (pogodovati ili ne). Histopatološka analiza je vršena s ciljem detekcije veze s parazitskim infekcijama te povezanosti između bakterioloških parametara u vodi i upalnih procesa u tkivima riba, te ona na neki način korelira i objedinjuje sve aspekte.

MATERIJAL I METODE RADA

Uzorkovanje vrste *Barbus balcanicus* iz rijeke Miljacke je izvršeno u mjesecu julu, 2021. godine na dva lokaliteta rijeke Miljacke, Dariva (L1) i Otoka (L2) (slika 1). Korištena je metoda „elektroribolova“ uz korištenje agregata "Honda" EZ 2.200 jačine 2 kW i "ELT 61 II" jačine 2 kW. Ukupno je izlovljena 21 jedinka potočne mreže od čega 12 jedinki sa lokaliteta Dariva i 9 sa lokaliteta Otoka. Identifikacija istraživane vrste rađena je na terenu i u laboratoriji Centra za ihtiologiju i ribarstvo (CIR) Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Sarajevu prema referentnom ključu za ovu vrstu (Kottelat & Freyhof, 2007).



Slika 1. Mjesto uzorkovanja na lokalitetima: Dariva (lijevo), Otoka (desno)
 Figure 1. Sampling sites: Dariva (left), Otoka (right)

Pomoću digitalnog ihtiometra na terenu su izmjerene osnovne morfometrijske mjere svih prikupljenih jedinki riba: ukupna dužina tijela (longitudo totalis, TL) i standardna dužina (longitudo corporis, SL). Masa uzoraka određena je pomoću analitičke vage sa tačnošću od 0,1 g. Dob jedinki je određena na osnovu uzetih krljušti, a spol na osnovu gonada tokom kasnije disekcije jedinki. Osim što je ovo standardna procedura, određeni parametri su bitni u tumačenju rezultata.

Provedena je i standardna analiza odabranih fizičko – hemijskih parametara vode. Ispitivani fizičko-hemijski parametri prilikom ovog istraživanja bili su: temperatura vode na mjestu uzorkovanja (°C), rastvoreni O₂ (mg/l), zasićenje O₂ (%), pH vrijednost vode i elektro-provodljivost vode (μS/cm). Navedeni parametri su mjereni na terenu pomoću multi-set aparata za mjerenje (WTW Oxi 3310 IDS Set 1), a odabrani prema svrsishodnosti ciljeva studije. Na odabranim lokalitetima rijeke Miljacke određena je nadmorska visina i geografska širina i dužina. Mjerenja su izvršena pomoću GPS-a, Garmin, oregon 600.

Uzorci vode za mikrobiološku analizu uzorkovani su u skladu sa BAS EN ISO 19458. Nakon uzorkovanja vode na lokalitetima, uzorci su u ručnom frižideru transportovani do laboratorije za Mikrobiologiju voda na Prirodno-matematičkom fakultetu u Sarajevu. Sve analize su urađene u okviru 24h, standardnim postupcima i metodama. Za određivanje ukupnog broja aerobnih/fakultativno anaerobnih heterotrofnih bakterija (cfu/ml pri 22°C/68h) i mezofilnih bakterija (cfu/ml pri 35 ±1 °C/48h) korištena je metoda zasijavanja u agar ploču u skladu sa BAS EN ISO 6222. Za određivanje broja ukupnih koliformnih bakterija i fekalnih (termotolerantnih) koliformnih bakterija i detekciju *Escherichia coli* primijenjena je metoda membranske filtracije u skladu sa ISO 9308-1:2014. Za određivanje ukupnog broja koliformnih bakterija i termotolerantnih koliformnih bakterija koristio se hromogeni koliformni agar i nM-TEC agar. Za potvrdu prisustva *Escherichia coli* na suspektne kolonije apliciran je Kovačev reagens, a pojava crvene boje bila je potvrda stvaranja indola. Za potvrdu *E. coli* određivana je i reakcija aktivnosti oksidaze tako da se jedna pojedinačna suspektna kolonija bakterije, prenijela sterilnom ezom na trakicu za određivanje reakcije. Nakon pet sekundi izostanak

tamnoplave boje na trakici ukazivao je na negativnu reakciju koja je karakteristična za bakteriju *E. coli*. Ukupan broj i detekcija fekalnih enterokoka u 100 ml izvršena je membranskom filtracijom prema metodi ISO 7899-2:2000. Za određivanje fekalnih enterokoka koristio se eskulin azidni žučni agar i temperatura inkubacije od 44,0±0,5°C. Nakon izlova i identifikacije jedinki, uzeti su uzorci škruga za daljnje laboratorijske analize. Važno je napomenuti da nisu svi uzorci podvrgnuti i parazitološkim i histopatološkim analizama, budući da to nije bilo izvodivo. Dio uzoraka, sedam jedinki sa L1 i četiri sa L2, protokolarno su pohranjeni u plastične vreće i potom transportovani u prenosivom frižideru (s ledom) do Odjeljenja za akvakulturu Veterinarskog fakulteta u Sarajevu, u svrhu parazitološke analize.

Drugi dio uzorka, pet jedinki sa L1 i pet sa L2, transportovano je u prenosivom frižideru do Laboratorije za Histologiju i embriologiju životinja i čovjeka Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Sarajevu za potrebe dalje histološke analize.

Vanjske i unutrašnje parazitološke pretrage ribe

Parazitološka istraživanja su bila usmjerena na pregled peraja, škržnih listića, kože i organa probavnog sistema. Najprije je izvršen spoljni, adspekcijski pregled jedinki vrste *Barbus balcanicus*, utvrđivanjem eventualnih povreda na tijelu, crvenila na različitim dijelovima tijela, kao i drugih promjena na tijelu, te prisustva cisti i ektoparazita.

Nakon adspekcijskog pregleda izvršena je eutanazija ulovljenih jedinki potočne mreke, radi daljne analize.

Za parazitološku analizu napravljeni su nativni preparati uzoraka uzetih sa kože i škruga. Uzimane su strugotine blagim struganjem površine kože i peraja skalpelom u kranialno-kaudalnim smjeru po tijelu ribe te napravljeni trajni preparati. Posmatranje je vršeno pod mikroskopom Leica DM 500, pod uvećanjem 150x i 600x, te je vršena detekcija i determinisanje parazita.

Potom se pristupilo disekciji jedinki pri čemu je dobijen jasan uvid u organe trbušne šupljine i škrge. Svi unutrašnji organi pregledani se u svrhu analize boje, konzistencije i patoloških promjena (krvarenja, edemi, ciste, neoplazije, paraziti). Nakon toga su analizirane izvađene škrge, a potom odvajani škržni listići, te pravljene strugotine kao u prethodnom slučaju. Materijal za mikroskopski pregled škruga, listić škruga, odrezan je na drugom luku. Strugotine su pretraživane na eventualno prisustvo parazita (u Petrijevim posudama) korištenjem binokularne lupe.

Digestivni trakt je seciran iz svježe ribe standardnim priborom. Pravljenjem strugotina crijeva se mogu detektirati paraziti. Crijevni sadržaj je bio bez parazita i razvojnih oblika parazita, te se nije pristupalo daljnjoj analizi.

Determinacija svih parazitskih vrsta vršena je prema relevantnim ključevima za identifikaciju (Byhovskaja – Pavlovskaja *et al.*, 1962; Bruno *et al.*, 2006), a u nedostatku većeg broja adekvantnih i referentnih ključeva konsultirane su knjige, priručnici i časopisi/radovi sljedećih autora: Stefanović (1948), Čanković *et al.* (1968), Antal *et al.* (1974), Kiškarolj (1977), Brajković (2001, 2004), Fijan (1974, 2006) te djelo *Opređelitel parazitov presnovodnih rib fauni SSSR* (1962., 1984., 1985. i 1987.).

Histološka analiza tkiva

Nakon disekcije, uzeti su uzorci jetre i škrge (drugi desni škržni luk) koji su fiksirani u 10% puferiranom neutralnom formalinu. Dehidracija tkiva rađena je sa uzlaznom serijom alkohola (30, 50, 70, 90 i 100%) tokom 2h, a zatim očišćena u ksilenu i uklapana u parafinske blokove. Mikrotomom (LEICA RM 2145) su izrezani presjeci debljine 5-6 mikrona. Tkiva su zatim hidratizirana opadajućom serijom alkohola. Presjeci su obojeni hematoksilinom i eozinom za opštu strukturu, a zatim je izliven kanada balzam i prekriven pokrovnim staklom (Presnell & Schreibman, 1997). Preparati su pregledani pomoću svjetlosnog mikroskopa BestScope BS-2035DA1 pri uvećanju od 400x i 1000x, u programu Scopelimage 9.0.

REZULTATI RADA I DISKUSIJA

U julu 2021. godine, iz rijeke Miljacke uzorkovano je i analizirano ukupno 21 jedinka vrste *Barbus balcanicus* (potočne mreže) sa dva odabrana lokaliteta (Dariva i Otoka).

Rezultati hidromorfoloških i fizičko-hemijskih analiza

Lokalitet Dariva (L1) je smješten u kanjonu Miljacke na istočnom ulazu u grad. Tokom uzorkovanja pH vrijednost je bila blago alkalna sa vrijednostima od 8,4 što ukazuje na III - IV klasu kvaliteta vode. Pri temperaturi vode od 13,1 °C, koncentracija rastvorenog O₂ iznosila je 10,75 mg/l, a zasićenje O₂ 94,9% (tabela 1).

Lokalitet Otoka (L2) pripada gradskom dijelu i smatra se zagađenim područjem, jer je izložen uticaju otpadnih voda okolnih naselja. Ovdje je pH bila blago alkalna sa vrijednostima od 8,1 što je također ukazivalo na III - IV klasu kvaliteta. Pri temperaturi vode od 16,2 °C, koncentracija rastvorenog O₂ iznosila je 10,28 mg/l, a zasićenje O₂ 88% (tabela 1).

Tabela 1. Hidromorfološki, fizički i hemijski parametri lokaliteta istraživanja

Table 1. *Hydromorphological, physical, and chemical parameters of research sites*

Parametar	L1	L2
Dužina lokaliteta (m)	100	60
Širina lokaliteta (m)	12	15
Površina lokaliteta (m ²)	1200	900
Prosječna dubina vodenog stuba (m)	0,50	0,60
Nadmorska visina (m)	510	558
Geografska dužina	N 43°50'47"	N 43°51'14"
Geografska širina	E 18°21'39"	E 18°22'27"
Vrijeme uzimanja uzorka	13.00	9.00
Temperatura vode na mjestu uzorkovanja (°C)	16,2	13,1

Rastvoreni O ₂ (mg/l)	10,28	10,75
Zasićenje O ₂ (%)	88,0	94,9
pH vrijednost vode	8,10	8,40
Električna provodljivost vode μS/cm	419	412

Temperatura vode, kao jedan od glavnih faktora kada su u pitanju paraziti, ovisila je uglavnom o temperaturi okolnog zraka. Zabilježene vrijednosti su se kretale između 13,1°C (Dariva) i 16,2°C (Otoka). Količina rastvorenog kisika i zasićenost vode kisikom su kompatibilni na oba lokaliteta. Vrijednosti zasićenja vode kisikom niže od 40% nepovoljno djeluju na prehranu riba, a time i na njihov prirast (Debeljak *et al.*, 1993). Posljedice toga su slaba tjelesna kondicija, te pojava i širenje bolesti kod riba (Teskeredžić & Račić, 1985).

Vrijednosti fizičko-hemijskih parametara generalno pokazuju trenutno, a ne dugoročno stanje kvaliteta vode i opterećenosti vodenog ekosistema. U istraživanjima ovog tipa mogu poslužiti kao značajna dopuna procjene stanja, naročito kada je u pitanju parazitološka i histopatološka analiza ribljih vrsta. No, bitno je detektirati da je pH vrijednost vode na oba lokaliteta ulazivala na kontaminiranu vodu (III-IV klasu kvaliteta).

Rezultati mikrobiološke analize vode

Rezultati mikrobiološke analize vode na dva istraživana lokaliteta rijeke Miljacke potvrđuju prisutnost koliformnih bakterija, *Escherichia coli* i *Enterococcus* sp. koji su značajni pokazatelji fekalne kontaminacije vode (tabela 2). Prema Kohlu (1975, izmijenjeno), Kavka i Poetsch (2002, modificirano) i prema EPCEU direktivama 2006/7 EEC voda na lokalitetu Dariva (L1) pripada II klasi kvaliteta površinske vode na osnovu broja intestinalnih enterokoka, dok klasi III na osnovu broja fekalnih koliformnih bakterija. Analizirana voda na lokalitetu Otoka (L2) pripada IV klasi kvaliteta vode na osnovu svih analiziranih parametara što ukazuje na prekomjerno fekalno zagađenje.

Tabela 2. Rezultati mikrobiološke analize vode rijeke Miljacke

Table 2. Results of the microbiological analysis of the Miljacka River water

Parameter	L1	L2
Ukupne koliformne bakterije cfu/100ml	13023	980 300
Fekalne koliformne bakterije cfu/100ml	4738	61 829
<i>E. coli</i> cfu/100ml	3789	49 456
Enterococcus cfu/100ml	3834	198 300

Rezultati analize starosne dobi, spola i osnovnih morfoloških mjera uzorkovanih jedinki potočne mreže

Rezultati mjerenih morfometrijskih parametara jedinki uzrokovanih za histološku analizu dati su u tabeli 3. Vrijednosti parametara predstavljene su kao srednje vrijednosti, standardna devijacija, minimalne i maksimalne vrijednosti uzoraka. Za potrebe ove analize analizirano je 10 uzoraka od čega (4 mužjaka i 6 ženki). Na lokalitetu Dariva analizirane jedinke dominantno su pripadale starosnoj dobi od jedne godine, a na lokalitetu Otoka podjednako su bile zastupljene jedinke starosti dobi od 2-3 godine.

Tabela 3. Morfometrijski parametri jedinki uzorkovanih za histološku analizu organa od interesa

Table 3. Morphometric parameters of specimens sampled for histological analysis of organs of interest

Lokalitet	Dariva			Otoka		
	TL (mm)	SD (mm)	Masa (g)	TL (mm)	ST (mm)	Masa (g)
Morfometrijski parametri						
Srednja vrijednost	126	108	21,93	211	182,9	104,09
Stand. devijacija	5,3	5,1	4,77	17,7	17,4	24,68
Min. vrijednost	118,8	99,9	18,2	183	155	73,6
Maks. vrijednost	135,7	115,7	32,1	236	209	136,3

Rezultati mjerenih morfometrijskih parametara (7+4 jedinke), starosti i spola jedinki uzrokovanih za parazitološku analizu dati su u tabeli 3 uz podatke o prisustvu parazita. Prosječna masa uzorkovanih riba je iznosila 61,29 g. Prosječan SL za uzorkovane ribe je iznosio 76,85 mm, s tim da je najmanji SL iznosio 18,7 mm (lokalitet Otoka), a najveći 115,77 mm (lokalitet Dariva). Prosječan TL je 89,83 mm (najmanji je evidentiran na L1 - 22,3 mm, a najveći na L2 - 135,75). Dobna struktura jedinki se kretala od 1-3 godine, s tim da su bile dominantne jedinke starosne dobi 1+. Mlade jedinke ribljih vrsta su prijemčivije za razvoj parazita, jer je veća mogućnost invazije i pojave znakova bolesti (Yanong, 2017). Ovi navodi su išli u prilog parazitološkoj analizi istraživane vrste.

Rezultati parazitološke analize istraživane riblje vrste

Na osnovu adspekcijskog i sekcijskog pregleda svih uzoraka riblje vrste *Barbus balcanicus*, na oba lokaliteta, nisu ustanovljeni klinički manifestni simptomi koji bi ukazivali na prisustvo bolesti.

Mikroskopskim pregledom strugotina ustanovljene su ukupno četiri vrste parazita kod svih 11 uzoraka/jedinki vrste *Barbus balcanicus*. U tabeli 4 su pored toga prikazani

rezultati svih ostalih već spomenutih mjerenih parametara (spol, starost, morfometrijski parametri i masa).

Tabela 4. Spol, starost, morfometrijski parametri (TL i SL), masa i prisustvo parazita (*Barbus balcanicus* iz rijeke Miljacke na oba lokaliteta uzorkovanja)

Table 4. Sex, age, morphometric parameters (TL and SL), weight, and presence of parasites (*Barbus balcanicus* from the Miljacka River at both sampling sites)

Broj (lokalitet)	uzorka	Masa (g)	TL (mm)	SL (mm)	Spol	Starost	Prisustvo parazita
1	(L1)	22,6	130	112,9	M	2+	+
2	(L1)	26,7	135,75	115,77	M	2+	+
3	(L1)	22,65	127,93	110,72	M	1+	+
4	(L1)	18,26	123,14	99,94	Ž	1+	+
5	(L1)	18,62	125,72	107,6	M	1+	+
6	(L1)	32,08	129,44	109,38	M	1+	+
7	(L1)	20,19	124,57	109,04	M	1+	+
8	(L2)	136,3	22,7	20,9	Ž	3+	+
9	(L2)	136,1	23	20,6	Ž	3+	+
10	(L2)	135,2	23,6	19,9	Ž	3+	+
11	(L2)	105,5	22,3	18,7	Ž	3+	+

Kod sedam analiziranih jedinki potočne mreže iz rijeke Miljacke sa lokaliteta Dariva (L1) ustanovljena je jedna vrsta protozoa i dvije vrste metilja (Trematoda). Na lokalitetu Otoka (L2) analizirane su četiri jedinke istraživane vrste, kod kojih je potvrđeno prisustvo dvije vrste protozoa i jedna vrsta trematoda (tabela 5). Prisustvo vrste *Ichthyophthirius multifiliis* utvrđeno je kod svih analiziranih jedinki, na oba lokaliteta. Do nivoa vrste identifikovana je i vrsta *Chilodonella cyprini*. Ostali paraziti su determinisani do nivoa roda, konkretno rodovi *Dactylogyrus* i *Diplozoon*.

Rod *Dactylogyrus* (Monogenea; Trematoda), evidentiran na oba lokaliteta istraživanja, je metilj koji je ustanovljen i na koži i na perajima ispitivanih uzoraka (tabela 4). Daktilogiroza je vrlo česta bolest slatkovodnih riba koju uzrokuju paraziti iz grupe homogenih („jednodomaćinskih“) metilja (Yamaguti, 1968). Na perajima i koži ciprinidnih riba, parazitira veći broj vrsta metilja roda *Dactylogyrus*, što može uzrokovati ugibanje mlađi posebno u prvom mjesecu života (Ćirković *et al.*, 2002).

Diplozoon je jedinstven rod unutar monogenetskih trematoda u kojoj odrasle jedinke ostaju ujedinjene u parovima u stalnoj kopulaciji u obliku križa (Yamaguti, 1963). Prema podacima od strane Kawatsu (1978) *Diplozoon* može da izazove hipohromnu anemiju. Lokalizacija parazitiranja vrste roda *Diplozoon* (tabela 4) kod svih inficiranih jedinki je koža.

Praživotinje (Protozoa; Protista) parazitiraju na koži, škragama, u unutrašnjim organima i krvi riba. Parazitski oblici Protozoa u malom broju su bezopasni, međutim kada se namnože mogu izazvati ozbiljne posljedice u razvoju riba, pa čak i smrt. Na istoj ribi može se javiti više vrsta parazitskih Protozoa što predstavlja dodatni problem.

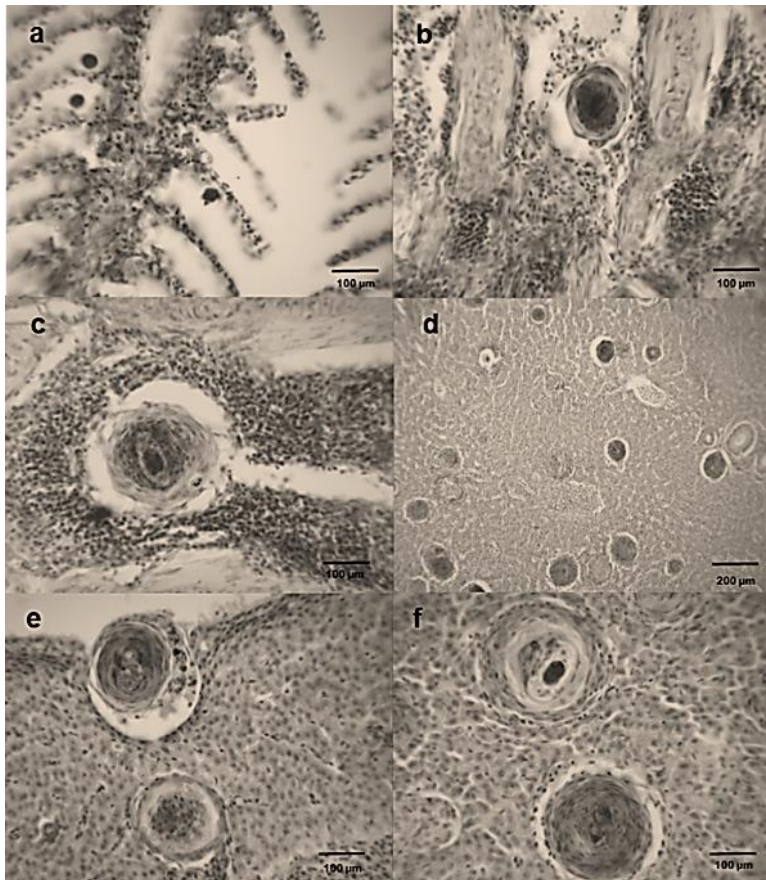
Protozojska vrsta trepljara, *Ichthyophthirius multifiliis*, je ustanovljena kod svih ispitivanih jedinki analizirane riblje vrste. Lokalizacija ove vrste je koža, peraja i škrge (tabela 5). U ukupnom ihtiozorku najvišu prevalenciju infestacije ostvarila je, dakle, ova vrsta. Izgleda da *I. multifiliis* parazitira na svim slatkovodnim ribama i nema podataka o vrstama koje su prirodno otporne na nju, iako postoje razlike u osjetljivosti među vrstama (MoInar, 1995). Pogodni faktori za širenje bolesti su gustoća populacije u uzgoju, stres, loši parametri okoliša i temperatura. Više temperature ubrzavaju razvojni ciklus parazita. Prema svemu navedenom, a s obzirom na prethodno navedene rezultate, ova parazitska vrsta nije mogla doseći svoj „maksimum“ u vrijeme uzorkovanja. Morbiditet i mortalitet je izražen u visokom postotku, naročito kod mlađi, dok starije ribe ugibaju sporadično, ali su istovremeno parazitonoše (Jažić *et al.*, 2009). Protozojska, cilijatna vrsta *Chilodonella cyprini*, evidentirana je samo na lokalitetu Otoka na koži istraživane vrste (tabela 4). Ove parazitske vrste parazitiraju na tijelu i perajama riba. Izazivaju iritaciju kože i pojačavaju mukoznu sekreciju. Utvrđeno je da trajanje aktivnog stanja parazita izvan tijela domaćina/ribe ovisi o temperaturi. Najaktivnije se dijeli na 5 - 10°C. Na 20°C podjela praktično prestaje (Bauer & Nikol'skaya, 1957). Izmjerene temperature na mjestu uzorkovanja naše vrste nisu pogodovale ni jednom ni drugom. Odlučujući uticaj ima svakako fiziološko i kondiciono stanje ribe.

Vrsta *Barbus balcanicus* u našoj studiji ima evidentirane parazite čiji je intenzitet infestacije generalno slabog stepena (+) (tabela 5). *Dactylogirus sp.* i *Chilodonella cyprini* parazitiraju na koži i perajama, *Ichthyophthirius multifiliis* i *Diplozoon sp.* na škragama.

Tabela 5. Mikroskopski pregled strugotina istraživane riblje vrste (Ø/O/+/++/+++ - simboli uzlazne gradacije promjena izazvanih parazitskim vrstama)

Table 5. Microscopic examination of scrapes from the investigated fish species (Ø/O/+/++/+++ - symbols indicating the ascending severity of changes caused by parasitic species)

Lokalitet Dariva		
Organ	Nalaz	Stepen promjena (Ø/O/+/++/+++)
Koža, peraje	<i>Dactylogirus sp.</i> , <i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	O/+
Škrge	<i>Diplozoon sp.</i> , <i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	O/+
Crijeva	Bez parazita i razvojnih oblika parazita	Ø
Lokalitet Otoka		
Organ	Nalaz	Stepen promjena (+/++/+++)
Koža, peraje	<i>Chilodonella cyprini</i> , <i>Dactylogirus sp.</i> ,	=/+
Škrge	<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>	O/+
Crijeva	Bez parazita i razvojnih oblika parazita	Ø



Slika 2. Histopatološke lezije u škrgama (a, b, c) i jetri (d, e, f) *Barbus balcanicus*
 Figure 2. Histopathological lesions in gills (a, b, c) and liver (d, e, f) of *Barbus balcanicus*

Rezultati parazitoloških i histoloških analiza tkiva vrste *Barbus balcanicus* u odnosu na stepen opterećenosti/kontaminiranosti vode rijeke Miljacke

Poulin (2014) navodi kako raznolikost parazitskih vrsta ovisi o više faktora. Jedan od faktora se odnosi prvenstveno na specifičnost parazitskih vrsta. Manje specifične vrste inficiraju pripadnike različitih taksonomskih skupina, dok su one visoko specijalizirane vrste najčešće ograničene na samo jednu vrstu ili rod.

Ekološki faktori u kojima domaćin obitava također mogu imati veliki uticaj na brojnost parazitskih vrsta, a utiču i na opće stanje domaćina koje predstavlja još jedan od značajnih elemenata pri čemu Poulin i Morand (2000) spominju i važnost raspoloživog prostora za parazite, tačnije samu veličinu domaćina. Bagge *et al.* (2004) ističu veću važnost u brojnosti jedinki u populaciji naspram gustoće populacije, što

znači da prema navedenom autoru za daljnje širenje parazita veću ulogu igra broj raspoloživih jedinki od bliskog kontakta između domaćina.

Ribljii paraziti se obično nalaze u hrskavici škržnih lukova, slušnog i statičkog organa, kao i u kičmi. Spore se mogu naći u svim dijelovima tijela. Ovom činjenicom možemo tumačiti da i žive, prividno zdrave ribe koje su preboljele invaziju mogu lučiti spore, te na taj način predstavljaju direktnu opasnost za širenje oboljenja. Parazitarne bolesti mogu izazvati ogromne štete, naročito ukoliko nastanu takvi ekološki uslovi koji djeluju negativno na otpornost riba, kao što su nepravilna ishrana, promjene fizičko-hemijskog sastava vode i prenaseljenost pojedinih rijeka (Skenderović, 2015).

Vrijednosti temperature i vodostaj u vrijeme uzorkovanja tokom našeg istraživanja nisu bili izuzetno povoljni za razvoj kožnih, ektoparazitskih protozoa. S tim smo povezali izostanak invazije i samim tim ispoljavanje simptoma bolesti. Sprovedena ihtioparazitološka istraživanja su time potvrdila da je pojava ektoparazita usko povezana sa mikroklimatskim faktorima sredine, gustom ihtipopulacija u akvatičnom ekosistemu, stepenom kvaliteta vode i ekoloških uslova datog ekosistema. Na temelju detektovanih parazita, kao svojevrsnih ekoloških pokazatelja, evidentno je da je voda oba lokaliteta rijeke Miljacke zagađena. To je svakako potvrdila mikrobiološka analiza vode na osnovu čijih je parametara određena kategorizacija vode (umjereno do jako zagađena) te djelimično i fizičko-hemijska analiza vode.

Histološke analize su također pokazale promjene u tkivima (škragama i jetri) sa većim stepenom upravo na onom lokalitetu gdje voda ima veći stepen zagađenija na osnovu mikrobiološke analize, ali i sa dominacijom opasnih protozojskih parazita. Osim što se pregledom literature ove promjene povezuju s bakteriološkim patogenima, kako i jeste potvrđeno u ovoj studiji, također indiciraju prisustvo parazita. Jednokratno uzorkovanje i tada prisutni parametri su svakako nedostatak za donošenje definitivnih zaključaka, ali prediktivni su potpuno osnovani. Već sama detekcija ovih parazita je utemeljenje za navedeno, ali i potvrda da se i u limitiranoj frekvenciji uzorkovanja, pa i broju lokaliteta i jedinki, ovi aspekti analiza mogu dovesti u vezu i dati značajnu kompenzaciju cjelokupnog ekološkog stanja istraživanih lokaliteta. Odabrana riblja vrsta sigurno može biti dobar model upravo za ovakav tip istraživanja, naročito što je relativno kvantitativno dobro zastupljena u istraživanom području.

Rezultati mikrobiološke analize kvaliteta vode rijeke Miljacke i analize fizičko-hemijskih parametara vode, kao i ostalih ekoloških uslova istraživanog područja, svakako ukazuju da je rijeka Miljacka veoma povoljna sredina za razvoj parazita. Samo prisustvo parazita i histološka analiza tkiva određene vrste i njihovo frekventnije praćenje bi nam sigurno ukazalo na kvalitet vode istraživane rijeke, u slučaju da nismo u mogućnosti izvršiti mikrobiološku analizu ili nekog drugog biološkog elementa kvaliteta vode. Iako je multidisciplinarnost analiza jednog akvatičnog ekosistema i bioindikatorskih vrsta koji tu obitavaju najsigurniji način za dobivanje uvida u realno i kompletno stanje i ekološki status površinskih voda, uspostava i značaj ovih korelacija je veliki.

ZAKLJUČAK

Vrsta na kojoj je vršena parazitološka i patohistološka analiza, *Barbus balcanicus* Tsigenopoulos, Ráb & Berrebi, 2002, predstavlja adekvatan model i bioindikator za ispitivanje zagađenosti vodenih ekosistema zbog senzitivnosti na parazitske vrste i manifestno djelovanje različitih mikrobioloških patogena na njena tkiva. U ovom radu je tako njena bioindikativnost podignuta na veći nivo, zbog njene osjetljivosti na parazite i uzročno-posljedično pratećih histopatoloških promjena.

Ihtioparazitološka istraživanja u rijeci Miljacka, na odabranoj vrsti, su pokazala prisustvo četiri vrste parazita: *Dactylogyrus sp.*, *Ichthyophthirius multifiliis*, *Diplozoon sp.* i *Chilodonella cyprini*, s tim da najveću infestiranost pokazuje vrsta *Ichthyophthirius multifiliis*. Adspekcijskim i sekcijskim pregledom jedinki nisu ustanovljeni klinički manifestni simptomi koji bi ukazivali na prisustvo bolesti. Sprovedena ihtioparazitološka istraživanja su pokazala da je pojava ektoparazita usko povezana sa mikroklimatskim faktorima sredine, gustom ihthiopolucijom u akvalnom ekosistemu, stepenom kvaliteta vode i ekološkim uslovima datog ekosistema. Uvidom u rezultate mikrobiološke analize te analize fizičko-hemijskih parametara vode utvrđen je stepen zagađenosti, pri čemu je očekivano veći na lokalitetu Otoka usljed veće naseljenosti i izraženijeg antropogenog uticaja. Histopatološkom analizom utvrđeno je prisustvo patoloških lezija u tkivu škrge i jetre jedinki sa nešto većim stepenom promjena u uzorcima jedinki uzorkovanih na navedenom lokalitetu. Povezanost ovih promjena sa parazitskim infekcijama i prisustvom patogenih mikroorganizama u našem istraživanju je potvrđena primarna hipoteza rada.

Uzimajući u obzir rezultate svih aspekata istraživanja, rijeka Miljacka pogoduje razvoju parazita. Da bismo u potpunosti potvrdili ovaj zaključak, te da bismo ispitali prisustvo, brojnost i diverzitet parazitskih vrsta u perspektivi, neophodno je sprovesti istraživanje u svim sezonama na istim ili pak na više lokaliteta. Preporuka za sveobuhvatnost procjene stanja površinskih voda i jasnije procjene korelacije između ovih značajnih segmenata istraživanja ribljih vrsta i ekološkog statusa njihovog biotopa bi bila da se uključi i više ribljih vrsta i jedinki uz neophodne dodatne analize. Bez obzira na neophodne dopune, iz ovog istraživanja je jasno da kontaminirani akvatični ekosistem uslovljava prisustvo parazita i histopatološke promjene određenih tkiva ribljih vrsta, ali i obrnuto – parazitske infekcije i promjene u tkivu ukazuju na kontaminiranost određenog vodenog ekosistema. Navedeno predstavlja više „alata“ kao i mogućnost izbora za ostvarivanje ovakvih ili sličnih ciljeva istraživanja.

LITERATURA

- Alexandre Sebastião, F., LaFrentz, B. R., Shelley, J. P., Stevens, B., Marancik, D., Dunker, F., & Soto, E. (2019). Flavobacterium inkyongense isolated from ornamental cichlids. *Journal of Fish Diseases*, 42(9).
- Antal, A., & Istvan, T. (1974). ABC Ribnjačarstva. Glas Slavonije, s.248, Osijek.

- European Parliament and the Council of the European Union - EPCEU (2006) Directive 2006/7/EC of the European Parliament and of the Council of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC. Official J L 64/37.
- Fatima, M., Usmani, N., & Hossain, M.M. (2014). Heavy metal in aquatic ecosystem emphasizing its effect on tissue bioaccumulation and histopathology: A review: *Journal of Environmental Science and Technology*.
- Fijan, N. (1974). *Bolesti riba i rakova*. Sveučilišnja naklada Liber, s.105, Zagreb.
- Fijan, N. (2006). *Zaštita zdravlja riba*. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
- Frece, J., & Morkov, K. (2015). *Uvod u mikrobiologiju i fizikalno-hemijsku analizu voda*. Slovenija: Institut za sanitarno inženjerstvo.
- Iyaji, F.O., & Eyo, J.E. (2008). Parasites and their Freshwater Fish Host. *Bio-Research*, vol. 6 (1), pp. 328-338
- Jažić, A., Zuko, A., Omeragić, A., Fejzić, N., & Grbo, S. (2009). *Priručnik za upravljanje zdravljem životinja u akvakulturi BiH*. Veterinarski fakultet, Veterinarski institut, odjeljenje za akvakulturu, Sarajevo.
- Kaur, H., & Katoch, A. (2014). Gill disease caused by *Thelohanellus bifurcata* Basu and Haldar, 1999 a pathogenic myxozoan parasite in cultured Indian carp, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) in Punjab, India. *J. Anim. Health Prod.*, 2, 19–24.
- Kavka, G. G. & Poetsch, E. (2002). *Microbiology*. U P. Literáthy, V. Koller Kreimel & I. Liska, Technical Report of the International Commission for the Protection of the Danube River (138-150), Eigenverlag ICPDR
- Kilian, E., & Avenant-Oldewage, A. (2013). Infestation and pathological alterations by *Ergasilus sarsi* (Copepoda) on the Tanganyika Killifish from Africa. *Journal of Aquatic Animal Health*, 25, 237–242.
- Kiškarolj, M. (1977). Istraživanje parazitofaune riba slatkovodnih ribnjaka BiH. I. Ciprinidni ribnjaci. A. Monogeni trematodi 1. *Veterinaria* 26, 2-3, 195-208, Sarajevo.
- Kleinow, K.M., Melancon, M.J., & Lech, J.J. (1987). Biotransformation and induction: implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish. *Environmental Health Perspectives*.
- Kohl, W. (1975). Über die Bedeutung bakteriologischer Untersuchungen für die Beurteilung von Fließgewässern, dargestellt am Beispiel der österreichischen Donau, *Arch, Hydrobiol/Suppl*, 44(4), 392-461. doi: 10.1127/agdonauforschung/5/1979/392
- Kottelat, M., & Freyhof, J. (2007). *Handbook of European freshwater fishes*. Publications Kottelat, Cornol, Switzerland.
- Leusen, A., Lunestad, B.T., & Berland, B. (2008). 17- parasites in farmed fish and fishery products. In Lie Q., (Ed.), *Improving Farmed Fish Quality and Safety*. In Woodhead Publishing Series in Food Science, Techology and Nutrition Woodhead Publishing.
- Mahmoud, M. A., Abdelsalam, M., Mahdy, O. A., El Miniawy, H. M., Ahmed, Z. A., Osman, A. H., ... & Ewiss, M. Z. (2016). Infectious bacterial pathogens,

- parasites and pathological correlations of sewage pollution as an important threat to farmed fishes in Egypt. *Environmental Pollution*, 219, 939-948.
- Miloš, M. (2009). Prehrana potočne mreže (Barbus balcanicus Kotlik, Tsigeropoulos, Rabb i Berrebi 2002). Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet. Sveučilište u Zagrebu.
- Molnar, K. (1995). Phylum Apicomplexa. *Fish Diseases and Disorders*. Vol 1, Woo P.T.K, Cabi Publishing.
- Mrakovčić, M., Brigić, A., Buj, I., Čaleta, M., Mustafić, P., & Zanella, D. (2004). Crvena knjiga slatkovodnih riba Hrvatske. Ministarstvo kulture i medija Republike Hrvatske. Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.
- Novotny, L., Halouzka, R., Matlova, L., Vavra, O., Bartosova, L., Slany, M., & Pavlik, I. (2010). Morphology and distribution of granulomatous inflammation in freshwater ornamental fish infected with mycobacteria. *Journal of Fish Diseases*, 33(12), 947-955.
- Opređelitel parazita presnovodnih rib SSSR (1962). Izdateljstvo Ak. N. SSSR, Moskva-Leningrad.
- Opređelitel parazita presnovodnih rib fauni SSSR (1984). Tom 1. Parazitičke prostejšie (Opređeliteli po faune SSSR izdavaemie Zoologičeskim institutom AN SSSR), Nauka, Leningrad.
- Opređelitel parazita presnovodnih rib fauni SSSR. (1985). Tom 2. Parazitičke mnogokletočnie, I dio (Opređeliteli po faune SSSR izdavaemie Zoologičeskim institutom AN SSSR), Nauka, Leningrad. Opređelitel parazita presnovodnih rib fauni SSSR. (1987). Tom 3. Parazitičke mnogokletočnie, II dio (Opređeliteli po faune SSSR izdavaemie Zoologičeskim institutom AN SSSR), Nauka, Leningrad.
- Poulin, R. (2014). Parasite biodiversity revisited: frontiers and constraints. *International Journal for Parasitology*.
- Poulin, R., & Morand, S. (2000). The Diversity of Parasites. *The Quarterly Review of Biology*, 75(3), 277-293.
- Presnell, J. K., & Schreibman, M. P. (1997). *Humason's animal tissue techniques*, (pp. 572). MD: John Hopkins University Press, Baltimore.
- Rajme-Manzur, D., Gollas-Galván, T., Vargas-Albores, F., Martínez-Porchas, M., Hernández-Oñate, M. Á., & Hernández-López, J. (2021). Granulomatous bacterial diseases in fish: An overview of the host's immune response. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 261, 111058.
- Ricklefs, R.E., & Miller, G.L. (2000). *Ecology*. 4th Edition, W.H. Freeman, New York.
- Riđanović, L., & Riđanović, S. (2016). Ekološke i mikrobiološke karakteristike rijeke Neretve. Univerzitet "Džemal Bijedić", Mostar.
- Skenderović, I. (2015). Biodiverzitet parazita hidroakumulacije Modrac. "OFF-SET" Tuzla, Tuzla.
- Smith, R.L., & Smith, T.M. (2001). *Ecology and field biology*. USA: Benjamin Cummings.

- Sofradžija, A. (2009). Slatkovodne ribe BiH. Sarajevo: Vijeće kongresa bošnjačkih intelektualaca.
- Stefanović, D. (1948). Rasna i ekološka ispitivanja na ohridskim salmonidama. Srpska akademija nauka, Beograd.
- Teskeredžić, E., & Račić, I. (1985). Izvještaj o učestalosti bolesti šarana u ribnjacima SR Hrvatske od 1982. do 1984. godine. IRB, OOUR CIM Zagreb.
- Yamagoti, S. (1968). Monogenetic trematodes of Hawaiian fishes, University of Hawaii Press.
- Yanong, R.P.E. (2017). Nematode (Roundworm) Infections in fish. University of Florida, Fisheries and Aquatic Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, IFAS Extension Document CIR91.
- Žunić, L. (2010). Rijeka Miljacka-osnovne potamološke karakteristike (hidrografski prikaz). Časopis Sarajevo.

HISTOPATHOLOGICAL AND PARASITOLOGICAL ANALYSIS OF *Barbus balcanicus* Kotlík, Tsigenopoulos, Ráb & Berrebi, 2002 TISSUES AS A BIOINDICATOR OF MILJACKA RIVER

Summary

Water ecosystem pollution causes stress in fish species and leads to diseases as a consequence of interaction with opportunistic pathogens. Parasitic species pose a particular threat to fish health, being transmitted from one fish to another through direct and/or indirect means. This research conducted a parasitological analysis of the bioindicator species *Barbus balcanicus*. Histological analysis was performed to detect the relationship with parasitic infections, as well as the correlation between water bacteriological parameters and inflammatory processes in fish tissues. Sampling was carried out in July 2021 at two locations in the Miljacka River. Analysis of the tissue samples from the individuals detected the presence of parasites from the groups Protozoa and Trematoda, which were identified up to the level of genus or species using relevant keys and literature. Alongside ichthyoparasitological research, an analysis of physicochemical water microbiological analysis was conducted, with results indicating pollution of the Miljacka River and favorable conditions for parasite development. Histological analysis confirmed the presence of pathological lesions in the gill and liver tissues of individuals, linked to parasitic infections and the presence of pathogenic microorganisms. Various pollutants in water ecosystems contribute to the presence of parasites and histopathological changes in fish species, while parasitic infections and tissue changes indicate poor ecological status and contamination of surface waters.

Key words: barbel, parasitology, pathohistology, pollutants, biological elements of water quality