

УТИЦАЈ САЛИНИТЕТА НА МОРФОЛОГИЈУ РАЗВОЈНИХ ФОРМИ *ARTEMIA SALINA* (BRANCHIOPODA: ANOSTRACA)

Милица Лукач, Бранка Билбија

Природно-математички факултет, Универзитет у Бањој Луци, Младена Стојановића 2, 78000 Бања Лука

Abstract

LUKAČ Milica, Branka BILBIJA: IMPACT OF SALINITY ON GROWTH FORMS MORPHOLOGY OF *ARTEMIA SALINA* (BRANCHIOPODA: ANOSTRACA) [Faculty of Science, University of Banja Luka, 78000 Banja Luka, Mladena Stojanovića 2 Street]

Artemia salina (Leach, 1819) inhabits mainly salt lakes and is characterized with high tolerance on salinity variations. We analysed 139 specimen of different growth forms (77 metanauplius and 62 individuals of later instar form), with the aim to establish the impact of various salt concentrations on morphometric characteristics. We monitored these parameters: total length (TL), nauplius eye width (WNE), nauplius eye length (LNE) in metanauplius, and total length (TL), abdominal length (AL), width of head (WH), diameter of compound eye (DY) and maximal distance between eyes (DBY) in later instar form. Research is conducted in laboratory conditions, where the eggs of *Artemia salina* were cultivated in three various salinity mediums. Physical and chemical parameters were also monitored (temperature, the concentration of oxygen and oxygen saturation). Statistical analysis (applying t-test) showed significant differences in decreased and control group metanauplius forms for TL and LNE, and for later instar form those were WH and DY ($p < 0,05$).

Key words: *Artemia salina*, metanauplius, later instar, salinity, morphometric characteristics

Сажетак

Artemia salina (Leach, 1819) настањује углавном слана језера и карактеристична је по томе шта може да толерише велике варијације салинитета. Анализиране су 139 јединке различитих развојних форми (77 метанауплиуса и 62 јединке форме касног инстара) са циљем да се утврди утицај различитих концентрација соли на морфометријске карактере. Параметри који су праћени код развојних форми су: тотална дужина (TL), ширина науплиусовог ока (WNE), дужина науплиусовог ока (LNE) код метанауплиуса, као и тотална дужина (TL), дужина абдомена (AL), ширина главе (WH), дијаметар сложеног ока (DY) и максимална дистанца између очију (DBE) код касног инстара. Истраживање је спроведено у лабораторијским условима, при чему су јаја врсте *Artemia salina* узгајана у срединама са три различита салинитета. При томе су праћени и физичко-хемијски параметри воде (температура, концентрација кисеоника и сатурација кисеоника). Статистичка обрада резултата (примјеном t-теста) показала је значајна одступања у смањеној и контролној групи и то код метанауплиуса за TL и LNE, и код касног инстара за WH и DY ($p < 0,05$).

Кључне ријечи: *Artemia salina*, метанауплиус, касни инстар, салинитет, морфометријски карактери

УВОД

Врсте рода *Artemia* су широко распрострањене на свим континентима осим Антарктика. Настањују слана језера, нека језера (Каспијско језеро), камените обале (јужно од Сан Франциска), мање водене површине са било којим садржајем соли као што је међупланински пустињски регион (западни дио САД), слане мочваре у близини обале као и вјештачке солане широм свијета (Grzimek, 1972; Pennak, 1989). Као и многе врсте водених ракова спадају у еурохалине организме тј. имају широк спектар толеранције на различите концентрације салинитета. Да би то постигли користе осморегулаторне механизме који омогућавају јонски баланс између протока јона из спољашње средине и њихове хемолимфе. Захваљујући томе се обезбјеђује оптимална јонска регулација и боља стопа раста (Abatzopoulous et al., 2002a). Представници рода *Artemia* су једни од ријетких организама који су адаптирани да преживе у веома различитим животним условима. Могу преживјети у салинитету од 10g/l (Anatzopoulous et al., 2006 a,b) до 340g/l (Post et Youssef, 1977). Неколико њихових карактеристика их чини идеалним за употребу у аквакултури, а то су: прилагодљиви на различите срединске услове, неселективни при избору хране и способни да расту у веома великим густинама популације. Такође, имају високу нутритивну вриједност, ефикасност конверзије, кратко генерацијско вријеме, високу стопу фекундитета и знатно дуг животни вијек (Soundarapandian et Saravanakumar, 2009). Једна од најпознатијих врста овог рода је *Artemia salina* која се сматра живим фосилом јер се није битније мијењала посљедњих 100 милиона година (Žikić i sar., 2012).

Циљ овог истраживања је да се утврди да ли стопа раста одређених морфометријских карактеристика *Artemia salina* одговара специфичним концентрацијама салинитета у лабораторијским условима. Добијени резултати могу бити корисни за потенцијални узгој и употребу у аквакултури и акваристици.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

За извођење овог експеримента кориштена су јаја јединки *Artemia salina* (*Artemia salina* eggs profi, произвођача Dajana pet s.r.o., Република Чешка) (Slika 1a). По 1g јаја наведене врсте стављено је у три стаклене посуде са различитом концентрацијом соли (10g/l, 35g/l и 60 g/l) у ½ l воде („Vivia“ произвођача Витинка АД Козлук-Зворник). Кориштена је со произвођача „SO KOMERC PLUS“ D.O.O. Бања Лука, која садржи 98-99.8% чистог NaCl-а. Количина присутних хемијских елемената у води (mg/l), према декларацији на „Vivia“ паковању је: Na⁺ 0.9, K⁺ 0.5, Ca²⁺ 47.3, Mg²⁺ 6.8, HCO³⁻ 256.2, Cl⁻ <5.0, SO₄²⁻ 11.5. Вода у свим посудама је аерисана током читавог експеримента помоћу пумпе за кисеоник (Champion aquarium air pump, 220-240 V, 50-60 Hz). Сваки дан су, у свим посудама, помоћу НАСН HQ30d flexi мјерени сљедећи параметри: температура воде, концентрација O₂ и сатурација O₂, уз напомену да се комплетан експеримент изводио на собној температури ваздуха. Јединке су храњене алгом рода *Spirulina* у облику таблета (*Spirulina* tablets, произвођача Dajana pet s.r.o., Република Чешка) (Slika 1б), при чему се у сваку стаклену посуду након појављивања ларви науплиус, убацивало 1/8 таблете (око 0,11g).

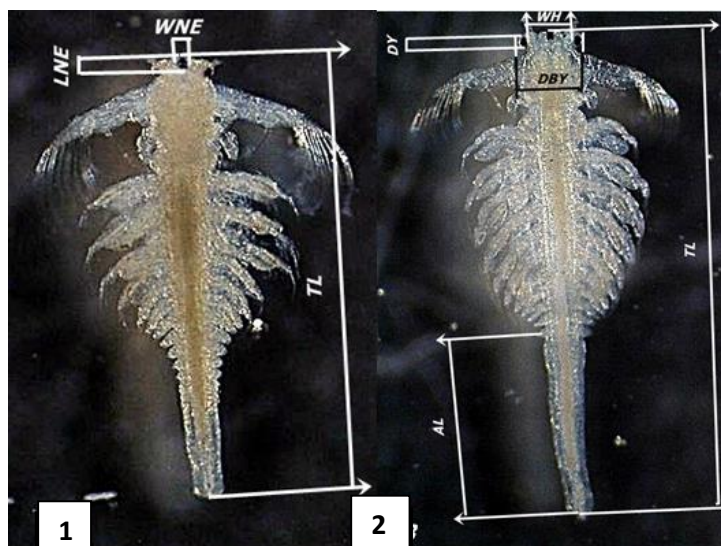


Слика 1. Комерцијално паковање јаја *Artemia salina* (а) и алге рода *Spirulina* (б)

Од 5-12. дана од почетка експеримента из посуде је помоћу пипете узимано 10-ак јединки при чему су исте одлагане у кивете и фиксиране 96% етанолом. Након тога, формирана је база фотодокумената, тако што је свака јединка фотографисана помоћу стереомикроскопа Leica EZ4D. Примјеном рачунарског програма Digimizer Image Analyzer Version 4.1, анализирани су фотографије организама, тако што су мјерени одабрани карактери, према Hontoria и Amat (1994), чија је листа приказана у Табели 1. Приказ испитиваних карактера и положај референтних тачака приказан је на Слици 2.

Табела 1. Анализирани морфометријски карактери ракова врсте *Artemia salina* у експерименталним условима при различитој концентрацији салинитета

Ред.бр.	Карактер	Ознака	Развојни стадијум код кога је мјерен
1.	Тотална дужина	TL	метанауплиус, касни инстар
2.	Ширина науплиусовог ока	WNE	матанауплиус
3.	Дужина науплиусовог ока	LNE	матанауплиус
4.	Дужина абдомена	AL	касни инстар
5.	Ширина главе	WH	касни инстар
6.	Дијаметар сложеног ока	DY	касни инстар
7.	Максимална дистанца између очију	DBY	касни инстар



Слика 2. Мјерени карактери и положај референтних тачака метанауплиса (1) и касног инстара (2) врсте *Artemia salina*

Измјерене вриједности морфометријских карактера су обрађене статистички (средња вриједност, минимум, максимум, стандардна девијација, коефицијент варирања, т-тест), примјеном статистичког програма Microsoft Office Excel 2007, интерпретиране и упоређене са доступним подацима из литературе.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Током извођења експеримента биљежени су физичко-хемијски параметри воде. У Табели 2. приказани су параметри само у данима морфометријски анализираних јединки.

Табела 2. Физичко-хемијски параметри воде анализирани у данима мјерења морфометријских карактера метанауплиуса и касног инстара врсте *Artemia salina*

Датум	20.5.2015.			21.5.2015.			22.5.2015.			23.5.2015.		
Салинитет (g/l)	10	35	60	10	35	60	10	35	60	10	35	60
Т° воде (°C)	22,5	22,8	22,6	21,9	22,1	21,7	21,3	21,6	21,1	19,8	20,2	20,0
O_2 (mg/l)	8,04	7,79	8,26	8,31	7,87	8,47	8,32	7,87	8,52	4,39	8,41	8,22
O_2 (%)	95,5	93,2	98,3	96,8	92,2	98,3	96,1	91,4	98,0	48,2	95,2	92,6

Током експеримента, праћена је и појава развојних форми- метанауплиуса и касног инстара. Развојни стадијум науплиус је такође констатован, и то другог дана од почетка експеримента у средини са смањеним салинитетом, док је у друге двије средине регистрована њихова појава трећег дана. Јединке су узорковане током седам дана експеримента (од њихове појаве), а анализирани су само оне којих је у одређеном дану експеримента било довољно за статистичку обраду података. Статистичком

обрадом се нису могле обухватити јединке из средине салинитета 60 g/l, јер су све јединке угинуле у развојном стадијуму метанауплиуса, прије самог узорковања из свих експерименталних средина (Табела 3). Број констатованих развојних форми приказан је у табели 3. У све три експерименталне групе, јединке су угинуле прије достизања адултног стадијума.

Табела 3. Број констатованих развојних форми врсте *Artemia salina* по данима узорковања

Дани узорковања	Број констатованих јединки					
	Салинитет од 10 g/l		Салинитет од 35 g/l		Салинитет од 60 g/l	
	Метанауплиус	Касни инстар	Метанауплиус	Касни инстар	Метанауплиус	Касни инстар
1	-	-	1	-	9	-
2	-	-	8	-	10	-
3	12	-	7	-	4	-
4	18	-	24	2	-	-
5	19	-	16	6	-	-
6	9	12	6	14	-	-
7	5	18	1	18	-	-

Резултати анализе три одабрана морфометријска карактера 18 метанауплиуса четвртог дана и 19 метанауплиуса петог дана узорковања јединки из средине са смањеним салинитетом, су представљени табеларно као средња вриједност, минимум, максимум, стандардна девијација и коефицијент варирања (Табела 4). У табели 5 приказани су исти параметри за 24 метанауплиуса четвртог дана и 16 метанауплиуса петог дана, узоркованих из средине са оптималним салинитетом (контролна група). Средња вриједност за параметар TL петог дана узорковања у средини са смањеним салинитетом износила је $2,380 \pm 0,250$ mm, док је за WNE и LNE износила $0,056 \pm 0,010$ mm и $0,063 \pm 0,014$ mm. Исти параметри у контролној групи износили су $2,017 \pm 0,200$ mm, $0,053 \pm 0,006$ mm и $0,050 \pm 0,008$ mm. Према Ven Nasseur et al. (2012) који су пратили морфолошку варијабилност врсте *A. salina* у срединама са салинитетом од 40-330 g/l, утврђено је да се вриједности параметра TL смањују са повећањем салинитета, са минималним одступањима. Вриједности морфометријских карактера добијених током нашег експеримента се дјелимично уклапају у овај опсег варирања, што је уочено и за остале параметре. До сличних резултата дошли су и El-Vertawi et al. (2004) који наводе да је максимум параметра TL достигнут у средини са најмањим салинитетом.

Статистичка значајност морфометријских карактера развојне форме метанауплиус врсте *A. salina* узгајаних у лабораторијским условима провјерена је т-тестом. У четвртог дану узорковања није постојала статистички значајна разлика при компарацији јединки из узорка са смањеном концентрацијом соли и контролне групе ($p > 0,05$). Када је у питању пети дан узорковања, резултати показују статистички значајна одступања за све анализирани карактере метанауплиуса ($p < 0,05$).

Табела 4. Вриједности морфометријских карактера метанауплиуса врсте *Artemia salina* из средине са смањеном концентрацијом соли (вриједности су изражене у mm)

Салинитет 10 g/l	20.5.2015.			21.5.2015.		
	TL	WNE	LNE	TL	WNE	LNE
MIN	1.521	0.041	0.044	2.025	0.042	0.038
MAX	2.284	0.072	0.074	2.880	0.076	0.099
AV	1.864	0.055	0.059	2.380	0.056	0.063
SD	0.254	0.008	0.009	0.250	0.010	0.014
KV	0.136	0.137	0.154	0.105	0.181	0.227

Табела 5. Вриједности морфометријских карактера метанауплиуса врсте *Artemia salina* из средине са оптималном (контрола) концентрацијом соли (вриједности су изражене у mm)

Салинитет 35 g/l	20.5.2015.			21.5.2015.		
	TL	WNE	LNE	TL	WNE	LNE
MIN	0.945	0.040	0.042	1.791	0.042	0.037
MAX	2.481	0.062	0.080	2.625	0.063	0.072
AV	2.002	0.052	0.055	2.207	0.053	0.050
SD	0.339	0.005	0.009	0.200	0.006	0.008
KV	0.169	0.105	0.164	0.090	0.111	0.160

За развојни стадијум касног инстара анализирано је пет морфометријских карактера. Мјерења су извршена на 12 јединки касног инстара који су узорковани шестог дана и 18 који су узорковани седмог дана из средине са смањеним салинитетом (Табела 6). У табели 7 приказани су исти параметри за 14 јединки касног инстара узоркованих шестог дана и 18 узоркованих седмог дана из средине са оптималним салинитетом (контролна група).

Код развојне форме касни инстар параметар WH у средини са смањеним салинитетом шестог дана узорковања узносио је $0,196 \pm 0,016$ mm, а DY $0,059 \pm 0,012$ mm, а седмог дана $0,226 \pm 0,059$ mm и $0,065 \pm 0,015$ mm. У контролној групи шести дан исти параметри су имали сљедеће вриједности: $0,167 \pm 0,013$ mm и $0,069 \pm 0,008$ mm; а седмог дана: $0,186 \pm 0,036$ mm и $0,088 \pm 0,015$ mm.

Вриједност параметра WH опада са повећањем салинитета, што је случај и у истраживању Triantaphyllidis et al. (1995), гдје су вриједности за адулте у најмањој концентрацији соли (35 g/l) износила $1,56 \pm 0,09$ mm, а у највећој $0,67 \pm 0,16$ mm.

Испитивање утицаја салинитета на морфометријске параметре (TL, AL, WH, DY и DBY) спровели су и Ben Nasseur et al. (2012) и забиљежили највише вриједности свих у средини са најмањим салинитетом (54 g/l) а најниже у средини са највишим салинитетом (265 g/l). Тенденција опадања вриједности морфометријских параметара са повећањем салинитета је забиљежена код адултних стадијума и мужјака и женки. Наша испитивања развојних форми показала су исту тенденцију.

Табела 6. Вриједности морфометријских карактера касног инстара врсте *Artemia salina* из средине са смањеном концентрацијом соли (вриједности су изражене у mm)

Салинитет 10 g/l	22.5.2015.					23.5.2015.				
	TL	AL	WH	DY	DBY	TL	AL	WH	DY	DBY
MIN	2.446	0.744	0.170	0.039	0.335	2.674	0.960	0.156	0.038	0.336
MAX	3.064	1.059	0.217	0.082	0.404	4.929	1.928	0.381	0.092	0.671
AV	2.808	0.876	0.196	0.059	0.368	3.537	1.351	0.226	0.065	0.449
SD	0.233	0.103	0.016	0.012	0.023	0.629	0.326	0.059	0.015	0.097
KV	0.083	0.117	0.082	0.195	0.063	0.178	0.241	0.262	0.236	0.217

Табела 7. Вриједности морфометријских карактера касног инстара врсте *Artemia salina* из средине са оптималном (контрола) концентрацијом соли (вриједности су изражене у mm)

Салинитет 35 g/l	22.5.2015.					23.5.2015.				
	TL	AL	WH	DY	DBY	TL	AL	WH	DY	DBY
MIN	2.607	0.713	0.150	0.057	0.317	2.752	0.866	0.139	0.066	0.359
MAX	3.412	1.172	0.193	0.084	0.442	4.250	1.667	0.266	0.126	0.586
AV	2.981	0.935	0.167	0.069	0.384	3.500	1.267	0.186	0.088	0.441
SD	0.275	0.139	0.013	0.008	0.034	0.390	0.197	0.036	0.015	0.065
KV	0.092	0.148	0.078	0.113	0.088	0.111	0.156	0.191	0.176	0.146

Код развојне форме касног инстара, т-тест је показао статистички значајну разлику, и то код параметара WH и DY, у оба дана узорковања ($p < 0,05$).

Према Amat (цитирано у Rodríguez-Almaraz et al., 2006) салинитет је најважнији фактор који утиче на морфометријске карактеристике *Artemia*. Amat et al. и Naegel i Rodríguez су констатовали да у већем салинитету јединке *Artemia* имају мање вриједности морфометријских параметара (цитирано у Rodríguez-Almaraz et al., 2006), што се подудара са резултатима нашег истраживања. Максимална величина адултних форми је забиљежена у морској води (34-55 g/l), а минимална у слаткој води (0,2-0,4 g/l) показала су истраживања која су спровели Soundarapandian и Saravanakumar (2009). Међутим, када су у питању развојне форме науплиус и метанауплиус врсте *A. urmiana*, највећа величина достигнута је у салинитету 25 g/l, а најмања у 45 g/l (Asem и Rastegar-Pouyani, 2010), што одговара нашим резултатима.

ЗАКЉУЧАК

Јединке *Artemia salina* узгајане су у срединама са три различите вриједности салинитета (10g/l, 35g/l и 60 g/l).

Анализирана су три морфометријска карактера развојне форме матенауплиус и пет морфометријских карактера развојне форме касни инстар.

Добијене вриједности морфометријских карактера се дјелимично уклапају у познати опсег варијабилности досадашњих истраживања (развојних форми и адулта).

Статистички значајна одступања забиљежена су код свих параметара у петом дану узорковања развојног стадијума метанауплиус ($p < 0,05$).

Код развојне форме касни инстар, статистички значајна одступања су забиљежена код параметара WH и DY у шестом и седмом дану узорковања ($p < 0,05$).

Примјећена је тенденција опадања вриједности морфометријских параметара са повећањем салинитета.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abatzopoulos, TJ., Beardmore, JA., Clegg, JS., Sorgeloos, P. (2002a.): **Artemia: Basic and Applied Biology**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
2. Abatzopoulos, TJ., Agh, N., Van Stappen, G., Razavi-Rouhani, GM., Sorgeloos, P. (2006a): *Artemia* sites in Iran. *J. Mar. Biol. Assoc.* 86(2): 229-307. United Kingdom.
3. Abatzopoulos, TJ., Baxevanis, AD., Triantaphyllidis, GV., Criel, G., Pador, EL., Van Stappen, G., Sorgeloos, P. (2006b): Quality evaluation of *Artemia urmiana* Günther (Urmia Lake, Iran) with especial emphasis on its particular cyst characteristics (International Study on *Artemia*, LXIX). *Aquaculture* 254: 442-454. Elsevier.
4. Asem, A., Rastegar-Pouyani, N. (2010). Different salinities effect on biometry of nauplii and meta-nauplii of two *Artemia* (Crustacea; Anostraca) populations from Urmia Lake basin. *Int. J. Aqu. Sci* 1 (1): 10-13.
5. Ben Naceur, H., Ben Rejeb Jenhani, A., Romdhane, SM. (2011): In situ study of adult *Artemia salina* morphometry and its relationship to the physicochemical water parameters in the saltwork of Sahline (Tunisia). *International Journal of Oceanography and Hydrobiology* 40 (4): 44-51. Poland.
6. Ben Naceur, H., Ben Rejeb Jenhani, A., Romdhane, SM. (2012): Impacts of Salinity, Temperature, and pH on the Morphology of *Artemia salina* (Branchipoda: Anostraca) from Tunisia. *Zoological Studies* 51 (4): 453-462. Taiwan.
7. Grzimek, B. (1972): **Grzimek's Animal Life Encyclopedia**, Vol. 1 "Lower Animals". New York: Van Nostrand Reinhold Co. New York.
8. El-Bermawi, N., Baxevanis, AD., Abatzopoulos, TJ., Van Stappen, G., Sorgeloos, P. (2004): Salinity effects on survival, growth and morphometry of four Egyptian *Artemia* populations (International Study on *Artemia*, LXIX). *Hydrobiologia* 523: 175-188. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
9. Hontoria F., Amat, F. (1994): Morphological characterisation of adult *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda) from different geographical origin. Mediterranean populations. *Mediterranean Artemia, training course and site survey*. Tunisia and Libya, May 25-30 1994.

10. Žikić V., Stanković S.S., Ilić-Milošević M., Petrović A. (2012): **Praktikum iz zoologije beskičmenjaka**. Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet. Niš.
11. Rodríguez-Almaraz, GA., Zavala, C., Mendoza, R., Maeda-Martínez, AM. (2006): Ecological and biological notes on the brine shrimp *Artemia* (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca) from Carmenn Island, Baja California Sur, México. *Hydrobiologia*. 560: 417-423.
12. Pennak, R. (1989): **Fresh-Water Invertebrates of the United States**. John Wiley and Sons, Inc. Canada.
13. Post, FJ., Youssef, NN. (1977): A procaryotic intracellular symbionts of the Great Salt Lake shrimp *Artemia salina*. *Can. J. Microbiol.* 23: 1232-1236.
14. Soundarapandian P., Saravanakumar G., (2009). Effect of Different Salinities on the Survival and Growth of *Artemia Spp.* *Current Research Journal of Biological Sciences* 1(2): 20-22. Taiwan.
15. Triantaphyllidis, GV., Pouloupoulou K., Abatzopoulus, TJ., Pinto Pérez, CA., Sorgeloos, P. (1995): International Study on *Artemia*, LXIX. Salinity effects of survival, maturity, growth, biometrics, reproductive and lifespan characteristics of bisexual and parthenogenetic population of *Artemia*. *Hydrobiologia* 302: 215-227. Belgium

Примљено: 20. 11. 2015.
Одобрено: 28. 04. 2016.