شناسایی آلاینده‌های باکتریایی در سطح سیست‌های *Artemia urmiana* پرورشی در مرکز تحقیقات آرتمیای کشور، ارومیه

- **فائزه براتی‌محمدپناه:** دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، صندوق‌پستی: ٩٦٩
- **یوسفعلی اسدپور*:** مرکز تحقیقات آرتمیای کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ارومیه، صندوق پستی: ٣٦٥

تاریخ دریافت: مهر ١٣٩٤ تاریخ پذیرش: دی ١٣٩٤

چکیده

این تحقیق به‌منظور بررسی آلودگی‌های احتمالی باکتریایی سیست دز آرتمیا ارومیانا پرورشی انجام پذیرفته است. نمونه‌های سیست با استفاده از توری استریل چشمه ۱۰۰ میکرونی از استخرهای پرورش آرتمیای مرکز تحقیقات آرتمیای کشور صید گشته و درون ظروف نمونه‌برداری استریل به آزمایشگاه باکتری‌شناسی مرکز منتقل شد. نمونه‌ها، به‌طور جداگانه داخل هاون چینی له گردیدند. ۱ گرم از نمونه له شده داخل ۹ سی‌سی پپتون واتر قرار گرفته و به‌مدت ۱۸ تا ۲٤ ساعت در انکوباتور ۳۵ تا ۳۷درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از این مدت گرم‌خانه گذاری، هر یک از نمونه‌ها ابتدا در محیط کشت عمومی آگار و سپس در محیط اختصاصی سوپ مغذی با ۳ در صد نمک طعام، مورد شناسائی نهایی قرار گرفتند. در نتایج پژوهش با انجام انواع آزمایشات رنگ‌آمیزی، کلید شناسائی مورفولوژیک و غیره، باکتری‌های ویبریو سالینا، سودوموناس آیروژینوزا، آئروموناس هیدروفیلا، کوکسی‌ها، اشریشیا کولای، باسیل سرئوس و سالمونلا تیفی موریوم در سیست‌های آرتمیا مشاهده گردیدند که این آلودگی‌ها می تواند به آبزی مصرف‌کننده انتقال یابند.لذا انواع سیست‌ها مورد استفاده در صنعت آبزی‌پروری، ابتدا بایستی با ترکیبات ضدعفونی کننده، عفونت زدائی شده وسپس بسته‌بندی شود.

کلمات کلیدی: آلاینده‌های باکتریایی، سیست،*آرتمیا ارومیانا*، پرورشی، ارومیه

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: dr.asadpour@outlook.com

مقدمه

تکثیر و پرورش آرتمیا در توسعه صنعت شیلات ایران بالاخص در صنعت تکثیر و پرورش میگوها، ماهیان زینتی، ماهیان خاویاری و انواع ماهیان سردآبی و گرم‌آبی حایز اهمیت خاص و منحصر به فردی می‌باشد (Abbaspour وNazaridoust، ۲۰۰۷).

با توجه به ممنوعیت برداشت سیست آرتمیا از دریاچه ارومیه، تأمین نیازهای کنونی کشور به این محصول، موجبات اهمیت تکثیر و پرورش آن در سایر مناطق مستعد کشور را فراهم آورده است (Agh و Nouri، ۲۰۱۱؛ Abbaspour و Nazaridoust، ۲۰۰۷). از آن‌جایی‌که آرتمیا در سطح وسیعی در صنعت تکثیر و پرورش انواع آبزیان در سطح کشور مورد استفاده قرار می‌گیرد، استفاده از سیست‌های آرتمیاهای پرورشی به‌علت عدم بهره‌برداری آن از زیستگاه‌های طبیعی امروزه زیاد شده است (Asadpour، ۲۰۰۶).

شناسائی باکتری‌های آلوده‌کننده در سیست‌های آرتمیاهای مورد مصرف در صنعت آبزی‌پروری بسیار مهم است، آرتمیا به عنوان یک غذای زنده با ارزش در صنعت آبزی‌پروری استفاده می‌شود و می‌تواند این آلودگی را منتقل کند (Patra و Mohamed، ۲۰۰۳).

درحال حاضر از سیست آرتمیاهای پرورشی برای تغذیه آبزیان استفاده می‌شود که ممکن است دارای آلودگی‌هایی بوده و آن‌ها را به آبزی مصرف‌کننده منتقل نموده و ایجاد تلفات نمایند (Agh و Noori، ۲۰۱۱ ؛ Michel و همکاران، ۲۰۰۷). از این‌رو در این تحقیق اقدام به شناسایی آلودگی‌های باکتریایی سیست-های آرتمیاهای پرورشی در استخرها گردید. از دیگر اهداف این تحقیق شامل بررسی امکان آلودگی باکتریایی در سیست‌های آرتمیاهای پرورشی، تعیین و شناسایی نوع باکتری‌های آلوده‌کننده و تعیین درصد و بار آلودگی بود.

سؤالات تحقیق حاضر این بود که آیا در سیست‌های آرتمیای پرورشی آلودگی باکتریایی وجود دارد؟ اگر وجود دارد، شامل کدام باکتری‌ها می‌باشند؟ و راهکارهای اصلاحی آن‌ها چیست؟

مواد و روش‌ها

در این پژوهش نمونه سیست های آرتمیا از استخرهای پرورش آرتمیای مرکز تحقیقات آرتمیای کشور برداشت گردیدند. برای این منظور از هریک از چهار جهت استخر یک ظرف ۱ لیتری و در مجموع ۴ نمونه از آب هر یک از استخرها برداشت گردید. سیست‌ها با استفاده از توری‌های استریل با چشمه ۱۰۰ میکرونی از آب جداسازی گشته و داخل ظروف نمونه‌برداری استریل به آزمایشگاه باکتری‌شناسی مرکز منتقل شدند.

در این پژوهش ابتدا سه نمونه یک گرمی از شیرابه کود گاوی برداشت و برای آزمون باکتری‌شناسی مطابق آن‌چه که در مورد سیست تخم گشائی شده آرتمیا انجام شد، مراحل باکتری شناسی شیرابه کود هم صورت پذیرفت.

پس از انتقال نمونه‌ها اعم از نمونه‌های شیرابه و سیست‌ها به داخل آزمایشگاه، هر نمونه به‌طور جداگانه داخل هاون چینی له گردید و ۱ گرم از آن داخل ۹ سی‌سی پپتون واتر قرار داده شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور در دمای ۳۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از این مدت گرم خانه گذاری، هر یک از نمونه‌ها ابتدا در محیط‌های عمومی کشت عمومی مک کانکی و بلادآگار استفاده شد. در مرحله بعد، محیط کشت اختصاصی مولر هینتون آگار + ۳٪ نمک به‌منظور بررسی رشد باکتری‌های هالوفیت به‌ویژه ویبریوها مورد استفاده قرار گرفت. در این مرحله حدود ۳/۴ گرم از محیط کشت اختصاصی مولر هینتون با ۳٪ نمک استریل مخلوط شده و در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر حل گردید. پس از آن مطابق روش قبلی، ترکیب حاصله حدود ۳۰دقیقه در داخل اتوکلاو در ۱۲۰۰ دمای درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا محیط کشت تشکیل شود. بعد از انجام این مراحل اقدام به تهیه گسترش و کشت نمونه بر روی محیط‌های کشت شد. مقدار یک گرم از سیست‌های آرتمیای پرورشی بعد از منجمد شدن و آماده شدن محیط‌ها در پلیت‌ها، جدا گردیده و پس از الک کردن از تورسیمی با منافذ چشمه ۱۵۰ میکرون عبور داده شدند. نمونه‌ها بعد از جداسازی با ته آنس استریل له شده و در ادامه اقدام به تهیه گسترش از سیست‌های له شده روی محیط‌های کشت اختصاصی گردید. گسترش مطابق روش رایج تهیه کشت خطی استاندارد بود. پس از یادداشت کلیه مشخصات در پشت پلیت‌ها، نمونه‌ها جهت رشد و انجام آزمایش های بعدی، به درون انکورباتور با دمای ۳۷۰ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند (AkhavanSepahy و همکاران، ۲۰۱۴).

برای آزمایشات بعدی سیست‌ها روی محیط‌های کشت عمومی و اختصاصی، اقدام به تهیه گسترش از سیست‌های پرورشی آرتمیا شد. برای انجام این کار، سیست‌های مورد نیاز جدا شده و به‌صورت روش استاندارد خطی روی پلیت‌ها گسترش

داده شدند. برای حصول اطمینان در نتیجه‌گیری از هرکدام از محیط‌های کشت عمومی و اختصاصی ۳ پلیت تهیه شد.

پس از گسترش، نمونه‌های پلیت‌ها برای رشد باکتریایی به داخل انکوباتور ۳۷۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شده و با توجه به نیاز زمانی باکتری برای رشد، ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور باقی ماندند. پس از این مدت نمونه‌ها از داخل انکوباتور خارج شده و مورد بررسی قرار گرفتند. برای انجام آزمایشات تکمیلی جهت تشخیص نهایی، باکتری‌های رشد یافته بر روی نمونه ها، مورد رنگ آمیزی گرام و سایر آزمون‌های تشخیص افتراقی قرار گرفته و روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی شامل رشد در محیط اختصاصی، همولیز، ژلاتین، محرک اوره آز، ایندول، اکسیداز، کاتالاز، لاکتوز، VP، MR و شکل باکتری براساس کلیدهای شناسائی ریخت‌شناسی انجام گردید (AkhavanSepahy و همکاران، ۲۰۱۴).

نتایج

نتایج حاصله از بررسی‌های باکتریایی مورد مشاهده در جدول ۱ آورده شده است. به‌طورکلی میانگین درصد و نوع باکتری‌های به‌دست آمده از محیط‌های کشت عمومی و اختصاصی شامل ۳۳ درصد باکتری *ویبریو سالینا*، ۱۱ درصد *سودوموناس آیروژینوز*، ۱۹ درصد *کوکسی‌ها*، ۱۷در صد *اشریشیا کولای*، ۹ درصد *باسیلوس سرئوس* و ۴ درصد *سالمونلا تیفی‌موریوم* بود.

نتایج تست‌های تشخیص اقتراقی در گروه‌های باکتریایی شناخته شده حاصل از رشد در محیط‌های کشت اختصاصی LD، EMB، MYP به‌همراه نمک ۳ درصد و آنالیزورهای همولیز و ژلاتین و محرک‌های اوره‌آز، ایندول، اکسیداز، کاتالاز، لاکتوز، VP، MR و شکل باکتری براساس کلیدهای شناسائی ریخت شناسی در جدول ۲ آورده شده است.

جدول۱: فراوانی باکتری‌های جدا شده از سیست آرتمیا

جدایه	فراوانی (درصد)
Vibrio salina	۸۶/۱۴±۴
Bacillus cereus	۶۱/۷۳±۵
Aeromonas hydrophylla	۳۱/۲۰±۵
Pseudomonas aeruginosa	۳۳/۰۹±۵
Eschershia coli	۴۲/۸۵±۳

جدول۲: فراوانی باکتری‌های جداشده از شیرابه کود گاوی مصرف شده در استخر

جدایه	فراوانی (درصد)
Yersina entrocolitica	۷۵/۲۳±۷
Kalbesla pnamy	۵۹/۶۷±۳
Entrobactera erogenos	۲۸/۱۵±۱
Pseudomonas aeruginosa	۴۱/۱۳±۵
Eschershia coli	۵۰/۲۵±۲

هم‌چنین نتایج مربوط به آزمون‌های بیوشیمیایی و تخمیر کربوهیدرات‌ها در جدول ۳ آورده شده است. براساس این آزمون‌ها، جنس و گونه باکتری‌ها تا حد امکان مشخص گردید.

جدول۳: نتایج مربوط به آزمون‌های بیوشیمیایی و تخمیر کربوهییدرات‌ها

آزمون	*ویبریو سالینا*	*باسیلوس سرئوس*	*آئروموناس هیدروفیلا*	*سودوموناس آئروژینوزا*	*اشرشیا کولای*
Vp	مثبت	-	منفی	منفی	منفی
تست وزیروسکویز (با چرخه تخمیر بوتانیل)	منفی	-	مثبت	منفی	منفی
Mr	منفی	مثبت	ضعیف	مثبت	منفی
تست متیل رد	متغیر	بتا	بتا	بتا	متغیر
ژلاتین	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت
همولیز	منفی	مثبت	مثبت	مثبت	منفی
تحرک	منفی	منفی	منفی	متغیر	منفی
اوره	مثبت	منفی	مثبت	مثبت	مثبت
اندول	منفی	مثبت	مثبت	مثبت	منفی
اکسیداز	مثبت	مثبت	منفی	منفی	منفی
کاتالاز	منفی	مثبت	منفی	منفی	منفی
شکل باکتری (ریخت‌شناسی)	باسیل	میله‌ای	میله‌ای پلی‌مورف	باسیل	میله‌ای
رنگ‌آمیزی گرام (مثبت و منفی)	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت	منفی

بحث

نتایج این پژوهش، وجود باکتری‌های سودوموناس ائروژینوز، *کوکسی گرم منفی*، *باسیل سرئوس*، *اشرشیا کولای*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *آئروموناس هیدروفیلا* و *ویبریو سالینا* را در سیست‌های آرتمیاهای پرورشی نشان داد. وجود آلایندگی‌های مذکور احتمالاً می‌تواند ناشی از سرایت از کودهای حیوانی و آب آلوده بوده باشد. لذا مناسب‌ترین راهکار پیش‌گیری از انتقال آلودگی به این شیوه این است که کودهای حیوانی مورد استفاده به‌مدت زیادی در زیر تابش مستقیم نور آفتاب قرار گرفته و نیز در موقع استفاده با۱۰۰کیلوگرم پودر آهک به‌ازای هر تن کود حیوانی مخلوط و آن‌گاه مورد استفاده قرار گیرد (Abbaspour و Nazaridoust، ۲۰۰۷).

یکی از مسایل و مشکلات اصلی در آغاز مرحله پرورش لارو ماهیان دریایی و میگو، ابتلای این لاروها به عفونت‌های میکروبی است (Tenover، ۲۰۰۶؛ Sorgeloos و همکاران، ۲۰۰۱). غذای زنده یکی از راه‌های مهم انتقال عوامل بیماری‌زا است که می‌بایست دقت کافی درخصوص نحوه استفاده از آن‌ها اعمال گردد (Tenover، ۲۰۰۶). لذا با توجه به مصرف روزافزون سیست آرتمیا و اهمیت این غذا در پرورش لارو انواع آبزیان، ضروری است که برای جلوگیری از ورود عوامل بیماری‌زا از این طریق، به سیستم‌های پرورش لاروها، تدابیر علمی و بهداشتی به‌کار گرفته شود (Agh و Noori، ۲۰۱۱). آلودگی سیست‌های پرورشی می‌تواند یکی از عوامل اصلی در این مورد باشد که یکی از منابع اصلی بیماری آبزیان پرورشی محسوب می‌شود. نتایج این تحقیق نیز وجود انواع باکتری‌های آلاینده باکتریائی در سیست‌ها را تأیید می‌کند و این نتایج با یافته‌های حاصل از تحقیقات Sarveh (۲۰۱۲) و Nabi و همکاران (۲۰۱۴)، که در مطالعات خود آلودگی‌های باکتریائی سیست‌های جمع‌آوری شده از استخرهایی که با کودهای حیوانی بارور شده بودند را مورد مطالعه قرار داده بودند، مطابقت و هم‌خوانی دارد.

نتایج این بررسی نشان داد که فقط دو گونه باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشرشیا کولای* در ترکیب فون باکتریائی شیرابه کود گاوی مصرف شده در استخر حاوی سیست‌ها و فون جمعیت باکتریائی سیست‌ها مشترک بود. این بدان معنا می‌باشد که وجود سایر باکتری‌های یافت شده در سیست آرتمیا ممکن است ناشی از آلودگی آب ورودی استخر به سایر گونه‌های باکتری یافت شده در سیست آرتمیا و یا سایر عوامل ناشناخته باشد. در طی سال‌های ۱۳۷۷-۱۳۷۶، آلودگی در مراکز تکثیر در ایران باعث مرگ و میر پست لاروهای میگوها گردیده و در نهایت پس از بررسی‌های علمی مستمر، دانشمندان (Abbaspour و Nazaridoust، ۲۰۰۷؛ Asadpour، ۲۰۰۳) به این نتیجه رسیدند که در پوسته خارجی کلیه سیست‌های آرتمیاهای مورد استفاده در آن کارگاه‌ها، آلودگی‌های باکتریایی وجود دارد که تحت شرایط مساعد در انکوباتورهای هچ، رشد نموده و سبب ایجاد بیماری می‌شوند (Agh و Nouri، ۲۰۱۱؛ Asadpour، ۲۰۰۳). تنها راهکار برای حذف این مشکل، ضدعفونی و کپسول‌زدایی سیست‌ها می‌باشد. در صنعت آبزی‌پروری سیست آرتمیا قبل از استفاده به روش‌های مختلف قابل ضدعفونی است (Asadpour، ۲۰۰۳). ضمن این‌که ترکیب فون باکتریائی شیرابه کود آزمایش به‌دست آمده در مطالعه قیاسی و همکاران (۱۳۹۲) نیز مشابه با یافته‌های مطالعه حاضر بود.

در بررسی‌های López-Torres و Lizárraga-Partida (۲۰۰۱)، ۹۵٪ از جمعیت باکتری‌های شناسایی شده از سیست *آرتمیا فرانسیسکانا* با رنگ‌آمیزی گرام مثبت تشخیص داده شده بودندکه دلالت بر غالب بودن ترکیب باکتری‌های گرام مثبت در سیست آرتمیا داشت. هم‌چنان‌که در تحقیق حاضر نیز هر چهار باکتری *ویبریو سالیتا*، *باسیلوس سرئوس*، *آئروموناس هیدروفیلا* و *سودوموناس آئروژینوزا*، سوا شده از سیست *آرتمیا اورمیانا* گرام مثبت بودند.

سیست آرتمیا در پرورش انواع آبزیان نظیر انواع لارو ماهی‌های خاویاری، زینتی، قزل‌آلا و ماهیان‌گرمابی و میگوها در سطح وسیعی استفاده می‌شود. این سیست‌ها قبل از استفاده در انکوباتورها هچ می‌شوند. شرایط انکوباتور از نظر دما، pH و شوری، برای فعالیت مجدد باکتری‌ها به‌ویژه باکتری‌های هالوفیت مناسب می‌باشد و بنابراین احتمال انتقال آلودگی از سیست به ناپلیوس آرتمیا وجود دارد. باتوجه به این موضوع قبل از انکوباسیون کردن سیست‌ها، عفونت‌زدائی آن‌ها با ترکیبات شیمیایی و داروهای طبیعی هم‌چون آویشن می‌تواند در کاهش آلودگی بسیار موثر باشد (Singh و همکاران، ۲۰۰۳). در گزارش تحقیقاتی Lavens و Sorgeloos (۲۰۰۰)، ضدعفونی سیست‌های استحصال شده از منابع و زیستگاه‌های طبیعی نظیر دریا توصیه شده است که این با نتیجه تحقیق حاضر در مورد سیست‌های پرورشی صدق نموده و هم‌خوانی دارد.

Orrozco-Medina و همکاران (۲۰۰۲) اعلام نمودند که برخی از باکتری‌های یافت شده در سیست و ناپلیوس آرتمیا دارای عناصر مغذی بوده و یا دارای خواص پروبیوتیکی می‌باشند. آن‌ها هم‌چنین اعلام نمودند که برخی باکتری‌ها به

تنهائی اثرات منفی بر رشد و توسعه تیمارها (لارو آرتمیا) داشتند ولی به‌صورت ترکیب باهم، تاثیر افزاینده رشد و توسعه تیمار مربوطه داشتند. براین مبنا پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آینده مشابه این مطالعات بر روی سیست *آرتمیا اورمیانا* نیز تکرار شود. چه بسا که باکتری‌های شناسایی شده از این طریق اثرات آگونیستی (مکمل) با هم داشته و با تولید عناصر مغذی یا پروبیوتیک به ارزش غذائی لارو و یا سیست آرتمیا کمک کنند.

تشکروقدردانی

این پژوهش بر مبنای طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی ارومیه به‌شماره ٩٨٢١/١٣/٠٢ مورخه ٩٣/٤/٢١ می‌باشد. بدین‌وسیله از پرسنل پرورش آرتمیای مرکز تحقیقات آرتمیای کشور، مرکز آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی ارومیه، مرکز آزمایشگاهی مرکز تحقیقات منابع طبیعی و جهاد کشاورزی استان آذربایجان‌غربی که در انجام این پژوهش یاری نمودند، نهایت تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

منابع

١. **قیاسی، م.؛ پورغلام، ر.؛ نصراله‌زاده‌ساروی، ح.؛ زاهدی، آ. و بینایی، م.، ١٣٩٢.** مقایسه فلور میکروبی و فاکتورهای فیزیکوشیمیایی در استخر پرورش کپورماهیان کوددهی شده با شیرابه کود گاوی و کود شیمیایی. سال ٧، شماره ۴، صفحات ۶٧ تا ٧۶.

٢. **Abbaspour, M. and Nazaridoust, A., ٢٠٠٧.** Determination of environmental water requirements of Lake Urmia, Iran: an ecological approach. Int J Environ Stud. Vol. ٦٤, No.٢, pp: ١٦١-١٦٩.

٣. **Agh, N. and Noori, F., ٢٠١١.** Hatchery produced Persian sturgeon, *Acipenserpersicus* and Beluga, *Husohuso*. Aqua Res. doi:١٠,١١١١/j.١٣٦٥-.٠٣٠٣١.

٤. **AkhavanSepahy, A.; Irannejad, Sh.; Amoozegar, M.A. and Tukmechi, A., ٢٠١٤.** The presentation of Novel Strains of Halophile Bacteria *Salinivibrio*sp from Urmia Lake. Cell. Mol. Res J. Vol. ٢٧, No, ٣, pp; ٣٣٥-٣٤٥.

٥. **Asadpour, Y.A., ٢٠٠٣.** Extracting chitin and chitosan from Artemia through Biotechnology. PhD thesis. Tarbiat Modarres University. ١٢٥ p.

٦. **Asadpour, Y.A., ٢٠٠٦.** A study on the risk points for processing aquatics and Artemia, Iran Fishery Sciences Research Center, research project. ١٢١ p.

٧. **Lavens, P. and Sorgeloos, P., ٢٠٠٠.** The history, present status and prospects of the availability of Artemia cysts for aquaculture. Aquac. Vol. ١٨١, No.٣, pp; ٣٩٧-٤٠٣.

٨. **López-Torres, M.A. and Lizárraga-Partida, M.L., ٢٠٠١.** Bacteria isolated on TCBS media associated with hatched Artemia cysts of commercial brands. Aquac. Vol.١٩٤, No.١, pp: ١١-٢٠.

٩. **Michel, C.; Pelletier, C.; Boussaha, M.; Douet, D.G.; Lautraite, A. and Ailliez, P., ٢٠٠٧.** Diversity of Lactic acid bacteria associated with fish and fish farm environment, Established by amplified rRNA gene restriction analysis. Appl. Environ. Microbiol. Vol. ٧٣, No. ٩, pp: ٢٩٤٧-٢٩٥٥.

١٠. **Nabi, A.; Khalili, M.A. and Halvaei, I., ٢٠١٤.** An Investigation of Bacterial Infection of Seminal Fluid in Men with Infertility with Unknown Etiology. Qom Univ Med Sci J. Vol. ٨, No. ٥, pp: ٢٣-٣١.

١١. **Patra, S.K. and Mohamed, K.S., ٢٠٠٣.** Enrichment of Artemia nauplii with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* and its resistance against a pathogenic *Vibrio*. Aquac. Int. Vol. ١١, No. ٥, pp: ٥٠٥-٥١٤.

١٢. **Sarveh, G.H., ٢٠١٢.** Optimizing enriching *Artemia urmiana* and *Artermiafranciscana* with Colza oil, Master's degree thesis, Urmia University. ١٤٣p.

١٣. **Singh, N.; Singh R.K. and Bhunia A.K., ٢٠٠٣.** Sequential disinfection of Escherichia coli O١٥٧: H٧ inoculated alfalfa seeds before and during sprouting using aqueous chlorine dioxide,

ozonated water, and thyme essential oil. LWT-Food Scie. Technol. Vol. ٣٦, No. ٢, pp: ٢٣٥-٢٤٣.

١٤. **Sorgeloos, P.; Dhert, P. and Candreva, P., ٢٠٠١.** Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. Aquac. Vol. ٢٠٠, No, ١, pp: ١٤٧-١٥٩.

١٥. **Tenover, F.C., ٢٠٠٦.** Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. Am J Infect Control? Vol. ١١٩, No. ٦, pp: S٣-S١٠.