پاسخ جمعیت‌های مختلف *Artemia urmiana*, Günther, ۱۸۹۰ پرورش یافته در پساب فاضلاب شهری به استرس دما و شوری

- **وحید افشارهزارخانی**:گروه بیوتکنولوژی،پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه،دانشگاه ارومیه،کدپستی: ٥٧١٤٩٤٤٥١٤
- **رامین مناف‌فر***: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، کدپستی: ٥٧٥٦١٥١٨١٨
- **هادی بذرافشان**: گروه بیوتکنولوژی،پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه،دانشگاه ارومیه،کدپستی: ٥٧١٤٩٤٤٥١٤
- **هاله خلیل‌پور**: گروه بیوتکنولوژی،پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه،دانشگاه ارومیه،کدپستی: ٥٧١٤٩٤٤٥١٤
- **مهران حبیبی‌رضائی**: گروه سلولی و مولکولی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تهران، صندوق پستی: ١٤١٧٦١٤٤١٨
- **علی‌اکبر موسوی‌موحدی**: گروه بیوفیزیک، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، صندوق پستی: ١٤١٧٦١٤٤١٨

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۵

چکیده

به‌دلیل محدودیت در بهره‌برداری از منابع آبی سالم، پرورش آبزیان نمی‌تواند تقاضای روزافزون این محصولات را برآورده نماید. آرتمیا از جمله مدل‌های تحقیقاتی مهم و غذاهای زنده حایز اهمیت در صنعت آبزی‌پروری می‌باشد که پرورش آن به‌صورت صنعتی مورد توجه است. به‌منظور مطالعه کیفیت آرتمیای پرورش یافته در پساب فاضلاب شهری، ٤ جمعیت مختلف *A. urmiana*، متعلق به نواحی مختلف دریاچه ارومیه، در شوری ۷۵ گرم در لیتر در ۲ تیمار آب معمولی و پساب کلر زنی شده (۳ ppm) فاضلاب شهری ارومیه پرورش داده شد. تغذیه با ترکیبی از جلبک‌های تک سلولی (*Dunaliela salina*) و مخمر تک سلولی براساس پروتکل استاندارد صورت گرفت. میزان رشد و بقاء آرتمیا در روزهای سوم، هفتم، یازدهم، پانزدهم و بیستم مورد بررسی قرار گرفت. در انتهای دوره، مقاومت آرتمیاهای بالغ نسبت به تنش دمای بالا (۳۵ و ۳۸ درجه سانتی‌گراد) و شوری‌های ۱۲۰ppt، ۱۸۰ppt، ۲٤۰ppt، ۲۸۰ppt، ۳٦۰ ppt مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تفاوت‌های معنی‌داری در میزان رشد و بقاء مابین جمعیت‌های مختلف *A. urmiama* از نواحی مختلف دریاچه در رشد و بقاء و مقاومت نسبت به استرس‌های محیطی وجود دارد ($p<۰/۰۵$). هم‌چنین پرورش در پساب توانست نتیجه بسیار موفقی را در فاکتورهای رشد و مقاومت نسبت به استرس‌های محیطی در مقایسه با آب معمولی نشان دهد ($p<۰/۰۵$). نتایج این تحقیق نشان داد که پساب شهری کلرزنی شده محیط مناسبی برای پرورش مصنوعی آرتمیا می‌باشد و می‌توان با استفاده از این آب، توده زنده‌ای با رشد بهتر و مقاوم نسبت به شرایط محیطی تولید نمود.

کلمات کلیدی: آرتمیا، استرس، بقاء، پساب فاضلاب شهری، رشد

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Raminmanaffar@gmail.com

مقدمه

با توجه به کاهش اکوسیستم‌های آبی طبیعی، افق جدیدی در بسیار از کشورها برای استفاده مجدد از فاضلاب‌های شهری و صنعتی باز شده است. در ایران نیز همانند اغلب کشورهای پیش‌رو، استفاده از فاضلاب‌های تصفیه شده با رعایت ضوابط و استانداردهای مربوط صورت می‌گیرد (معاونت برنامه ریزی و نظارت راهبردی رئیس جمهور، ۱۳۸۹). با این‌که استفاده از این آب جهت مصارف کشاورزی در ایران و در دنیا سابقه طولانی دارد (WHO، ۲۰۰۶a)، اما استفاده از فاضلاب در آبزی‌پروری ایران سابقه‌ای ندارد. این درحالی است که آبزی‌پروری با استفاده از فاضلاب تاریخچه‌ای طولانی در چندین کشور شرق، جنوب و جنوب‌شرقی آسیا خصوصاً در چین داشته به قرن‌های گذشته می‌رسد (Edwards، ۲۰۰۰و۱۹۹۲؛ Edwards و Pullin، ۱۹۹۰). هم اکنون از فاضلاب شهری به‌صورت عمده در پرورش انواع آبزیان در کشورهایی نظیر بنگلادش (Haq و Ghosal، ۲۰۰۰؛ Gijzen و Ikramullah، ۱۹۹۹)، چین (Li، ۱۹۹۷)، هندوستان (Bose، ۱۹۹۴؛ Edwards، ۱۹۹۲)،اندونزی (Djajadiredja و همکاران، ۱۹۷۹)، ویتنام (Little و Pham، ۱۹۹۵) استفاده می‌شود. فقط در کشور اندونزی در وسعتی بیش از ۱۰۰۰۰ هکتار انواع مختلفی از آبزیان خصوصاً کپور ماهیان و تیلاپیا در پساب فاضلاب‌های شهری کشت داده می‌شود. تجارب پرورش آبزیان با پساب فاضلاب در نواحی دیگر دنیا از جمله قاره‌آمریکا، اروپا، آفریقا وحتی منطقه غرب اقیانوس آرام بسیار محدود و یا غیرمتمرکز گزارش شده است (WHO، ۲۰۰۶a).

درحالی‌که در صنعت آبزی‌پروری تامین آب مناسب از مهم‌ترین نیازهای سیستم می‌باشد، میزان منابع طبیعی موجود نمی‌تواند تامین کننده نیاز آبزی پروران را تامین کند. آرتمیا با حدود ۵۵٪ پروتئین، ۴ تا ۲۰٪ چربی، کلیه اسیدهای آمینه اساسی و اکثر اسیدهای چرب در حدمطلوب از بهترین غذاهای آبزیان خصوصاً در دوران لاروی می‌باشد که در سال‌های اخیر تولید طبیعی آن دست‌خوش مشکلاتی شده است. هم‌اکنون، کشورهایی نظیر آمریکا سالانه هزاران تُن سیست آرتمیا، به ارزش میلیون‌ها دلار، از زیستگاه‌های طبیعی استحصال می‌کند. بسیاری از کشورهای دیگر نیز اقدام به پرورش متمرکز و فوق متمرکز در استخرها و مخازن کوچک نموده، و آن‌را در امر آبزی‌پروری مورد استفاده قرار می‌دهند. البته آرتمیا به‌عنوان یک مدل تحقیقاتی نیز در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه بوده و بدین منظور کشت داده می‌شود (Manaffar، ۲۰۱۲؛ Gajardo و همکاران، ۲۰۰۲). مصرف بالا و بحران‌های زیست محیط موجب شده است که برداشت این موجود با ارزش از منابع طبیعی نیز دچار بحران شود. این مسئله خصوص در مورد گونه‌هایی مانند *A. urmiana* که به‌دلیل خشک شدن دریاچه ارومیه در بحران انقراض می‌باشند نگران کننده‌تر است (Manaffar، ۲۰۱۲). به‌دلیل همین محدودیت‌ها تقاضای روزافزون به این آرتمیا و دیگر آبزیان نمی‌تواند از منابع آبی طبیعی و سالم تامین شود لذا پرورش مصنوعی آرتمیا در استخرهای خاکی و سیستم‌های نیمه‌طبیعی با استفاده از پساب فاضلاب اهمیت بیش‌تری پیدا می‌کند. بایستی اشاره کرد که آرتمیا قابلیت این را دارد که در استخرهای تولید نمک خورشیدی و یا استخرهای پلی اتلینی و یا بتونی کشت داده شود (Lavens و Sorgeloos، ۱۹۹۶). تحقیقات نشان داده است که جمعیت‌های مختلف آرتمیا دارای توان‌های مختلف برای پرورش به‌صورت مصنوعی هستند و محصول تولید شده به‌شدت می‌تواند در میزان رشد و بقا، متغیر باشد. هم‌چنین تحقیقات اخیر نیز نشان داده است که در دریاچه ارومیه نیز با توجه به گستردگی اقلیم این دریاچه جمعیت‌های مختلفی آز آرتمیا با توان رشد، بقاء و آستانه تحمل‌های مختلف وجود دارد (Manaffar، ۲۰۱۲؛ Hontoria و Amat ، ۱۹۹۲).

با توجه به این‌که پساب فاضلاب شهری حتی پس از کلرزنی اولیه منبع بسیار خوبی از انواع باکتری‌ها، املاح و مواد عالی و بعضاً پری‌بیوتیک‌هاست پیش‌بینی می‌شود بتوان جمعیت مناسبی از آرتمیا را با میزان بقاء و رشد و مقاومت بالاتر برای پرورش در این محیط معرفی نمود.

هدف از تحقیق حاضر بررسی تنوع جمعیتی ۴ جمعیت مختلف *Artemia urmiana* در پاسخ به پرورش در پساب فاضلاب شهری و تعیین آستانه تحمل آن‌ها به استرس شوری و دمائی بالا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی تاثیر پرورش در محیط غنی پساب از ۴ جمعیت مختلف آرتمیای دریاچه ارومیه *A. urmiana* استفاده شد. در انتخاب جمعیت‌ها سعی شد همگی درصد سیست‌گشایی بالای ۷۰٪ داشته باشند تا هیچ‌گونه اختلاف درون جمعیتی براساس انتخاب نمونه‌های برتر رخ‌ندهد. هم‌چنین جمعیت‌هایی با بیش‌ترین اختلاف در ویژگی‌های رشد و بقاء (حاصل از مطالعات پیشین) انتخاب شدند (Manaffar، ۲۰۱۲). پرورش و بررسی زیستی آرتمیا با استفاده از روش استاندارد تعریف شده برای این موجود انجام شد (Sorgeloos، ۱۹۹۷). آب مورد استفاده در این تحقیق آب لوله‌کشی شهری و آب پساب خروجی تصفیه‌خانه شهرستان ارومیه بود که مستقیماً از پساب خروجی تصفیه خانه شهر ارومیه تهیه شد. شوری این آب پس از فیلتراسیون (۳۰۰ میکرونی)، به‌وسیله آب دریاچه ارومیه به ۷۵ گرم بر لیتر رسانیده شد. جهت از بین بردن باکتری‌های بیماری‌زا از کلرزنی ۳ میلی‌گرم در لیتر به‌مدت ۲۴ استفاده شد (قدیمی و منافی‌فر، ۱۳۹۳).

غذای استاندارد برای تغذیه آرتمیا ترکیبی از مخمر و جلبک‌های تک سلولی می‌باشد که هر دو در آزمایشگاه تهیه شدند. آماده‌سازی مخمر تک سلولی با مخلوط نمودن مقادیر مشخصی از مخمر خشک (Coutteau و همکاران، ۱۹۹۲) در سرم فیزیولوژیکی صورت پذیرفت. اما جلبک تک سلولی مورد نیاز در آزمایشگاه کشت داده شد. استوک‌های آماده جلبک *Dunaliella tertiolecta* از بانک جلبک پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه تهیه و به‌طور انبوه کشت داده شد. بدین منظور ابتدا به‌میزان لازم از آب شور فیلتر و سپس توسط دستگاه اتوکلاو استریل شد و بعد از خنک شدن آن با استفاده از آب مقطر به شوری بهینه برای کشت این نوع جلبک که ۱۲۰ گرم در لیتر بود رسانده شد. هرگاه غلظت جلبک‌ها در ارلن‌ها به حداکثر مقدار خود رسید، عمل هوادهی را قطع کرده و جلبک موجود شمارش شد. برای شمارش جلبک از لام هموسیتومتر (نئوبار) استفاده گردید. برای محاسبه تعداد واقعی سلول جلبک در هر میلی‌لیتر از این رابطه $d=N\times 1000\times A/0/1$ استفاده شد که در آن d میزان رقیق‌سازی جلبک و A تعداد شمارش شده است. بعد از شمارش جلبک، تراکم آن به تعداد 18×10^{6} Cell/ml رسانده شد و سپس در تغذیه آرتمیا مورد استفاده قرار گرفت.

بهترین میزان شوری برای تفریخ سیست‌های آرتمیا آب شور با شوری ۳۵ گرم در لیتر می‌باشد که در ابتدا به‌منظور جداسازی هر گونه آلودگی فیلتراسیون (۳۰۰ میکرونی) انجام شده و سپس با آب شیر رقیق شد (Sorgeloos، ۱۹۹۷). پس از تفریخ، لاروهای ناپلیوس اینستار یک با استفاده از نورگرایی مثبت آنان جدا شده و سپس به تعداد ۵۰۰ عدد در هر لیتر به درون ضروف مخروطی شکل با حجم آب ۱ لیتر انتقال داده شدند. پرورش آرتمیا در داخل مخروط‌های پلاستیکی ۱/۵ لیتری که در داخل آکواریومی قرار داده شده بودند صورت گرفت. جهت تنظیم دمای آکواریوم (۱±۲۷ درجه سانتی‌گراد) از یک بخاری آکواریومی استفاده شد. هر یک از ظروف پرورشی توسط یک پیپت پلاستیکی و لوله‌های هوادهی متصل به پمپ مرکزی هوادهی شدند. لاروهای آرتمیا در طی چندین ساعت ابتدایی پس از تفریخ یافتن از ذخیره کیسه زرده استفاده کرده و تقریباً هیچ غذایی در روز اول مصرف نمی‌کنند. لذا غذادهی از روز اول (حدود ۲۴ ساعت پس از تفریخ) شروع شده و میزان غذا بر طبق جدول غذادهی Coutteau و همکاران (۱۹۹۲) به‌صورت روزانه و برحسب تعداد آرتمیا محاسبه و انجام شد. غذای مورد استفاده در پرورش نیز به‌صورت ترکیبی از جلبک تک سلولی *Dunaliella tertiolecta* و مخمر با غلظت ۳ گرم در ۳۰۰ میلی‌لیتر آب با شوری ۱۵-۱۰ گرم در لیتر بود. شوری ظروف پرورش آرتمیا هر روز یک‌بار توسط دستگاه شوری‌سنج سنجش می‌شد و در صورت افزایش یا کاهش شوری، به‌ترتیب با افزودن آب مقطر یا آب شور، شوری آب آرتمیاها تنظیم می‌شد.

درصد بقاء با شمارش تعداد آرتمیاهای هر تکرار و مقایسه آن نسبت به تعداد آرتمیاهای روز اول همان تکرار صورت گرفته و نتایج به‌صورت درصد در جداول ثبت گردید. جهت بررسی دقیق بقاء آرتمیاهای هر تکرار در روزهای سوم، هفتم، یازدهم، پانزدهم و نوزدهم کلیه آرتمیاها از محیط کشت جدا و شمارش شدند (Sorgeloos، ۱۹۹۷). با توجه به این‌که شمارش و انتقال لاروها در ابتدا با روش ساب سمپل صورت می‌گیرد لذا نتایج بقاء روز سوم در جداول ارائه نشد. جهت زیست‌سنجی نیز هم‌زمان با شمارش بقاء آرتمیا از هر تکرار ۵ عدد آرتمیا برداشت شده و زیست‌سنجی طول کلی آنان شامل طول بدن از ناحیه چشم سوم تا انتهای بدن انجام شد. عمل کشتن و فیکس کردن آرتمیاها با استفاده از افزودن چند قطره لوگل ۱٪ صورت گرفت. در این مرحله طول کلی آرتمیاها در روزهای فوق از با استفاده از دستگاه دیجیتایزر مجهز به استریومیکروسکوپ اندازه‌گیری شد (Sorgeloos، ۱۹۹۷؛ Triantaphyllidis و همکاران، ۱۹۹۷a-b).

در انتهای دوره پرورش مقایسه میزان مقاومت به استرس دمای ۳۵ و ۳۸ درجه‌سانتی‌گراد در میان ۴ جمعیت مورد نظر صورت گرفت. سنجش مقاومت به این استرس‌ها در داخل فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری با آب شور ۷۵ گرم در لیتر صورت گرفت. برای هر استرس و هر جمعیت ۲۴ عدد آرتمیا در نظر گرفته شد و میزان تلفات جمعیت‌ها هر ۱ ساعت تا زمان مرگ همه آرتمیاها ثبت شد. اما استرس شوری بالا در ۵ شوری مختلف انجام شد (آب دریاچه ارومیه (۱۲۰، ۱۸۰، ۲۴۰، ۲۸۰، ۳۶۰ ppt). برای تهیه این شوری‌ها آب دریاچه به‌میزان مورد نیاز با آب معمولی رقیق شد. بقیه مراحل آزمون مطابق با استرس دمائی بود مگر دمای محیط که طی این دوره ۱±۲۷ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. ۲۴ ساعت پیش از استرس و در طول دوره استرس هیچ‌گونه تغذیه‌ای صورت نگرفت. انتخاب شرایط دمائی و شوری برای اعمال استرس‌ها براساس آزمون‌های اولیه روی همین گونه صورت گرفت. اندازه‌گیری منظم دما توسط دماسنج دیجیتال کالیبره شده و سنجش شوری توسط شوری‌سنج Atago refractometer, 2483 Master 28m صورت گرفت.

آنالیز آماری: جامعه آماری شامل ۴ جمعیت مختلف از آرتمیاهای پرورش یافته در آب شور معمولی (مجموعاً ۴ تیمار و ۱۲ تکرار) و در آب پساب (مجموعاً ۴ تیمار و ۱۲ تکرار) می‌باشد. نتایج زیست‌سنجی و بقاء در طول دوره پرورش تا ۱۹ روز و هم‌چنین نتایج بررسی میزان مقاومت به استرس‌ها در انتهای دوره آزمایش (در آرتمیاهای کشت داده شده در آب شور و پساب) مورد بررسی آماری قرار گرفت. بدین منظور از بسته نرم‌افزاری SPSS و آنالیز آماری One-way ANOVA و آزمون Tukey و آزمون T مستقل (برای مقایسه زیست‌سنجی و بقاء و مقاومت به استرس بین دو محیط) استفاده شد (Triantaphyllidis و همکاران، ۱۹۹۷a-b).

نتایج

زیست‌سنجی: در این تحقیق جمعیت‌های *A. urmiana* با نام‌های پرورشی نسل اول (سیست تجاری پرورش یافته در استخرهای خاکی در حاشیه شرقی دریاچه ارومیه): A، پرورشی نسل دوم (سیست تولید شده از نسل اول سیست تجاری فوق): Q، سیست دریاچه ایستگاه آرزو (جنوب‌شرق دریاچه ارومیه): T، سیست دریاچه ساحل کبودان (جنوب‌شرق دریاچه ارومیه): V کد گذاری شدند. نتایج زیست‌سنجی و رشد آرتمیاها در جداول ۱ و ۲ آورده شده است. این نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری مابین جمعیت‌های مختلف آرتمیا در انتهای دوره پرورش در میزان رشد وجود دارد (جداول ۱ و ۲). هم‌چنین در انتهای دوره پرورش مشخص شد که پرورش در پساب موجب شده است آرتمیا رشد بهتری نسبت به آب معمولی دریاچه ارومیه داشته باشد (جداول ۳ و ۴). اما از نظر میزان بقاء شرایط پرورش در آب دریاچه ارومیه کمی بهتر از پرورش در پساب بود به‌طوری‌که در انتهای دوره پرورش میزان بقاء آرتمیا در آب شور دریاچه ارومیه با اختلاف معنی‌دار در تمامی روزها بهتر از پساب بود ($p<0/05$).

جدول ۱: زیست‌سنجی رشد (میانگین ± انحراف استاندارد) ۴ جمعیت *A. urmiana* در آب شور در روزهای ۳، ۷، ۱۱، ۱۵ و ۱۹

	جمعیت	روز سوم	روز هفتم	روز یازدهم	روز پانزدهم	روز نوزدهم
آب دریاچه	A	۱/۶۲±۰/۲۶^{a}	۲/۹۸±۰/۴۱^{a}	۷/۱۸±۰/۶۰۳^{b}	۶/۹۱±۰/۶۰^{a}	۶/۶۰±۰/۸۶۰^{a}
	Q	۱/۴۷±۰/۱۳^{a}	۲/۹۴±۰/۶۷^{a}	۵/۷۳±۰/۸۰^{a}	۶/۷۵±۰/۶۹^{a}	۶/۸۶±۰/۸۲۱^{ab}
	T	۱/۶۹±۰/۲۳^{a}	۳/۲۵±۰/۳۳^{a}	۷/۲۲±۰/۶۹^{b}	۷/۹۶±۰/۸۹^{a}	۸/۰۰±۰/۵۷۹^{b}
	V	۱/۵۶±۰/۱۸^{a}	۲/۷۸±۰/۲۳^{a}	۶/۵۰±۰/۷۱^{ab}	۷/۳۱±۰/۹۱^{a}	۷/۶۰±۰/۷۸۴^{ab}
پساب	A	۱/۸۲±۰/۲۸^{ab}	۳/۹۸±۰/۴۳^{a}	۷/۴۳±۱/۰۸^{ab}	۸/۶۸±۰/۵۶^{a}	۸/۸۹±۰/۳۸۵^{a}
	Q	۱/۵۲±۰/۰۶^{bc}	۳/۸۲±۰/۳۲^{a}	۸/۱۳±۰/۵۷^{a}	۸/۱۲±۰/۷۸^{a}	۹/۳۵±۰/۸۴۸^{a}
	T	۱/۴۸±۰/۰۸^{c}	۲/۹۸±۰/۲۵^{b}	۶/۶۷±۰/۸۲^{a}	۷/۷۴±۱/۰۱^{a}	۹/۳۹±۰/۶۴۷^{a}
	V	۱/۹۹±۰/۱۸^{a}	۳/۴۳±۰/۶۱^{ab}	۶/۴۶±۰/۸۰^{b}	۸/۰۳±۰/۵۸^{a}	۱۱/۱±۱۵/۰۷^{b}

اعداد در ستون (مجموعه آب دریاچه یا آب پساب) با حروف لاتین متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری می‌باشند ($p<0/05$).

جدول ۲: زیست‌سنجی رشد (میانگین±انحراف استاندارد) *A. urmiana* در آب شور دریاچه و پساب

روزهای زیست‌سنجی	محیط پرورش		t	سطح معنی‌داری (t)
	آب دریاچه	پساب		
روز سوم	۱/۵۶±۰/۱۹	۱/۶۸±۰/۲۵	-۱/۷	۰/۰۹۶
روز هفتم	۲/۹۹±۰/۴۴	۳/۵۵±۰/۵۶	-۳/۵۴	۰/۰۰۱
روز یازدهم	۶/۵۶±۰/۹۳	۷/۱۶±۱/۰۱	-۱/۹۱	۰/۰۶۳
روز پانزدهم	۷/۲۳±۰/۸۶	۸/۱۴±۰/۷۸	-۳/۴۸	۰/۰۰۱
روز نوزدهم	۷/۲±۱/۰۱	۹/۵۳±۱/۱۳	-۶/۸۸	۰/۰۰۰

جدول ۳: درصد بقاء، (میانگین ± انحراف استاندارد) ۴ جمعیت *A. urmiana* در آب شور در روزهای ۷، ۱۱، ۱۵ و ۱۹

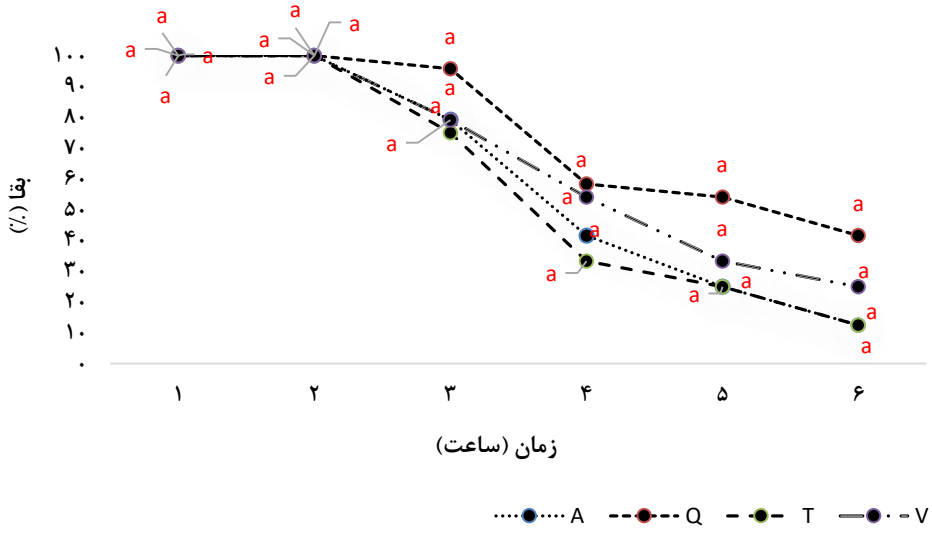
	جمعیت	روز هفتم	روز یازدهم	روز پانزدهم	روز نوزدهم
آب دریاچه	A	۹۶/۱±۰۷^{b}	۹۲/۲±۰۷^{c}	۸۵/۰±۲۰/۷۲^{bc}	۷۸/۱±۳۳/۹۷^{b}
	Q	۹۴/۷۳±۰/۶۴^{ab}	۹۳/۳۳±۰/۶۱^{c}	۸۷/۶۷±۲/۰۴^{c}	۷۸/۶۷±۱/۵۲^{b}
	T	۸۷/۸۷±۲/۵۷^{a}	۷۶±۱^{a}	۷۰/۶±۲^{a}	۶۸±۲/۹۸^{a}
	V	۸۹/۵۳±۴/۷۱^{b}	۸۵/۶±۴/۱۹^{b}	۸۲/۰۷±۱/۷۹^{b}	۷۵/۷۳±۱/۸۵^{b}
پساب	A	۸۹/۳±۷۳/۷۵^{b}	۷۶/۳۳±۰/۵۷^{c}	۷۳/۳۳±۲/۳۸^{b}	۶۷/۴۷±۱/۲^{b}
	Q	۷۶/۱۷±۵/۸۹^{a}	۷۳±۰/۰۰^{b}	۷۱/۴۰±۱/۷۳^{b}	۶۷/۲۷±۰/۶۴^{b}
	T	۸۷/۳۳±۳/۷۱^{b}	۸۰±۱^{d}	۷۹/۳۳±۰/۹۴^{c}	۷۲/۲±۲/۲۷^{c}
	V	۷۶/۱±۶/۱۳^{a}	۶۲±۰/۰۰^{a}	۳±۵۷/۱۱^{a}	۵۲/۳±۵/۲۵^{a}

اعداد در ستون (مجموعه آب دریاچه یا پساب) با حروف لاتین متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری می‌باشند ($p<0/05$).

جدول ۴: مقایسه درصد بقاء (میانگین±انحراف استاندارد) در آب شور و پساب

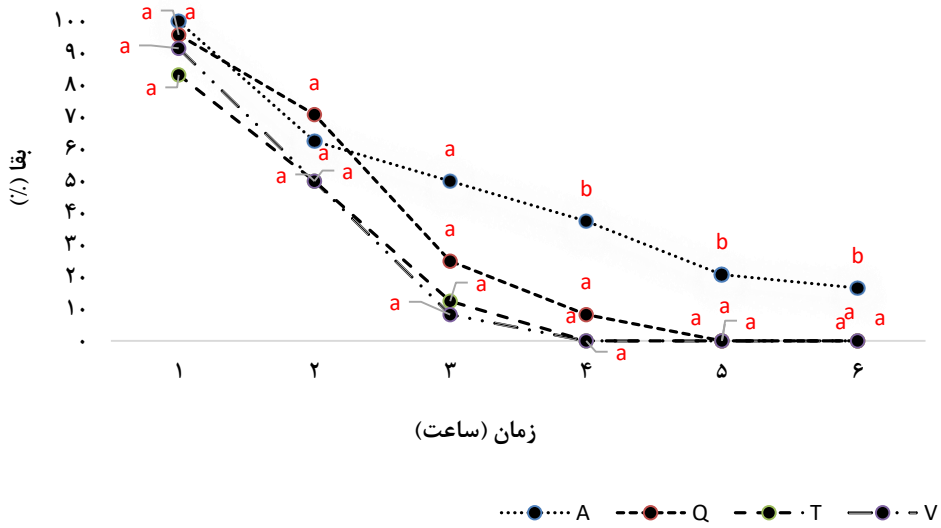
روزهای شمارش	محیط پرورش		t	سطح معنی‌دار (t)
	آب دریاچه	پساب		
روز هفتم	۹۲/۰۵±۴/۲۸	۷۶/۰۸±۲۴/۹۶	۲/۱۸	۰/۰۴
روز یازدهم	۸۶/۷۵±۷/۴۵	۶۷/۶۷±۲۲/۱۸	۲/۸۲	۰/۰۱
روز پانزدهم	۸۱/۳۸±۶/۹۸	۶۵/۵۲±۲۲	۲/۳۸	۰/۰۲
روز نوزدهم	۷۵/۱۸±۴/۸۵	۶۰/۴۸±۲۰/۲۴	۲/۴۴	۰/۰۲

نتایج میزان بقاء تحت استرس دمائی در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ آورده شده است. این بررسی نشان داد که آرتمیا پرورش یافته در پساب بسیار مقاوم‌تر آرتمیای تولید شده در آب دریاچه ارومیه می‌باشد به‌طوری‌که در استرس ۳۵ درجه سانتی‌گراد هیچ تلفاتی در جمعیت‌های آرتمیا مشاهده نشد ولی در جمعیت پرورش یافته در آب دریاچه ارومیه درانتهای دوره ۶ ساعته بقاء به حدود ۱۰ الی ۴۰ درصد رسید. این نتایج هم‌چنین نشان‌داد اختلاف‌زیادی‌در بین جمعیت‌های آرتمیا در میزان بقاء در انتهای دوره پرورش وجود دارد. اما در استرس دمای ۳۸ درجه مشاهده شد که کاهش بقاء در جمعیت پرورش یافته در آب دریاچه ارومیه تدریجی بوده ولی در آرتمیای پرورش یافته در پساب تلفات با تاخیر آغاز شده است. در هر دو جمعیت استرس در ساعت ۳ پس از آغاز آن موج ایجاد تلفات شدید شده است که نهایتاً در انتهای دوره ۶ ساعته تلفات را به حداکثر رسانده است. آنالیز آماری انجام شده هیچ اختلاف آماری در بین ۴ جمعیت مورد مطالعه در میزان بقاء تحت استرس‌دمائی مشاهده نشد($p>0/05$) (شکل ۱الی ۳). در بررسی میزان بقاء در استرس‌های شوری بالا مشخص شد که در تمامی تیمارها به‌صورت معنی‌داری بقاء بهتری در آرتمیای پرورش یافته در پساب نسبت به آب دریاچه ارومیه وجود دارد ($p<0/05$). بر اساس این نتایج درحالی‌که هیچ تلفاتی در آرتمیای پرورش یافته با آب پساب در بین تیمارها در استرس‌های شوری دیده نمی‌شد تلفات بالایی در انتهای دوره در تمامی جمعیت‌های پرورش یافته در آب دریاچه وجود داشت (شکل ۴). این آنالیز هم‌چنین نشان داد که در اغلب موارد اختلاف معنی‌داری در بین جمعیت‌های مختلف آرتمیا از دیدگاه بقاء در استرس شوری وجود ندارد ($p<0/05$).



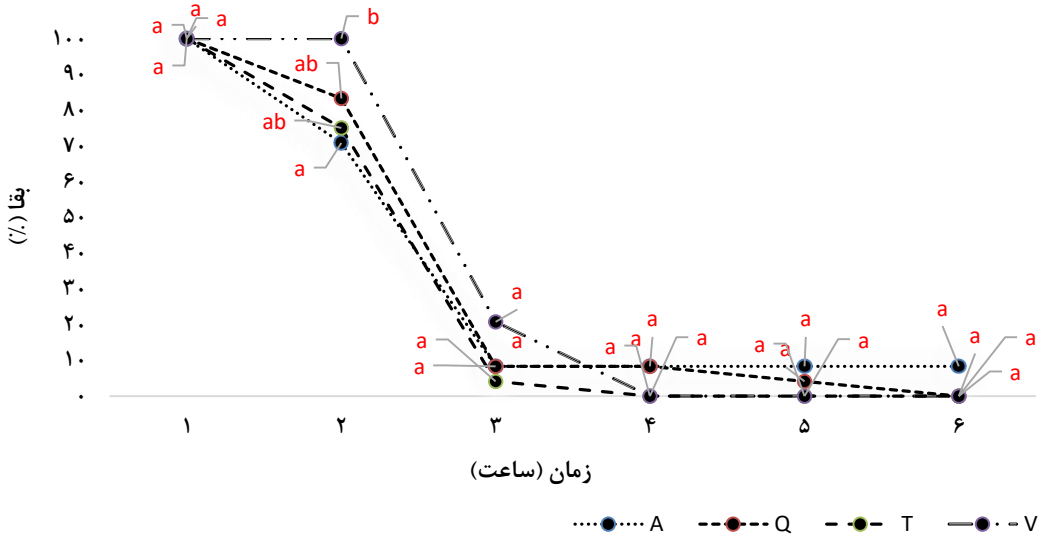
شکل ۱: درصد بقاء ۴ جمعیت *A. urmiana* کشت داده شده در آب دریاچه ارومیه در استرس دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد

(حروف متفاوت در هر ساعت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $P<0/05$ می‌باشد)



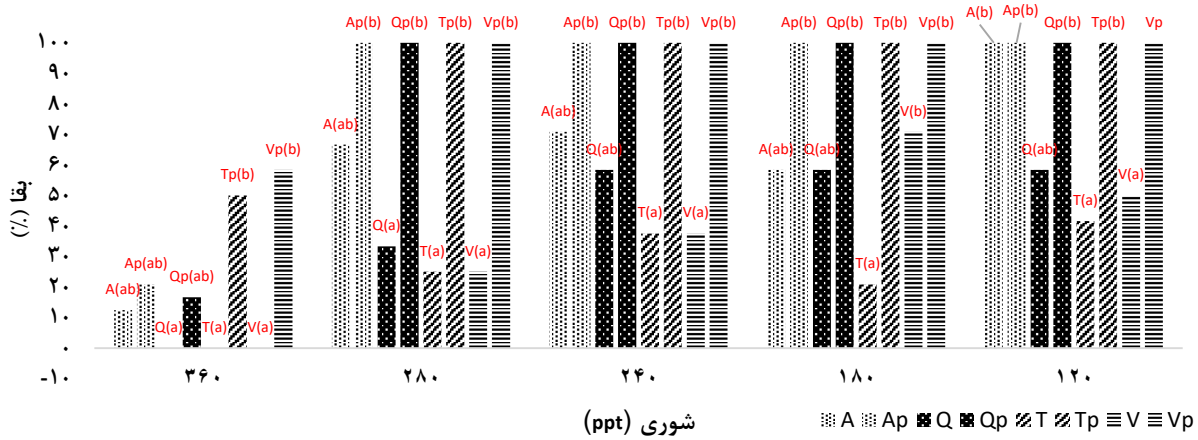
شکل ۲: درصد بقاء ۴ جمعیت *A. urmiana* کشت داده شده در آب دریاچه ارومیه در استرس دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد

(حروف متفاوت در هر ساعت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح p<۰/۰۵ می‌باشد)



شکل ۳: درصد بقاء ۴ جمعیت *A. urmiana* کشت داده شده در پساب در استرس دمایی ۳۸ درجه سانتی‌گراد

(حروف متفاوت در هر ساعت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح p<۰/۰۵ می‌باشد)



شکل ۴: مقایسه درصد بقاء ۴ جمعیت *A. urmiana* کشت داده شده در آب شور دریاچه و پساب در استرس‌های شوری درانتهای دوره ۶ ساعته استرس (تیمارهای پرورش یافته با پساب با حرف P مشخص شده‌اند)

(حروف متفاوت در هر شوری (داخل پرانتز) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد).

بحث

تمامی نتایج این تحقیق موید این واقعیت است که پرورش در پساب می‌تواند آرتمیاهایی با سرعت رشد و مقاومت بالا نسبت به استرس‌های محیطی ایجاد نماید. وجود منابع غنی از مواد آلی و معدنی معلق، باکترهای باقی‌مانده، اجزاء باکتری‌های متلاشی شده و هم‌چنین میکروارگانیسم‌های دیگر که مورد تغذیه آرتمیا قرار می‌گیرند می‌تواند دلیل اصلی تاثیر مثبت پرورش آرتمیا در سیستم فاضلاب باشد (قدیمی و منافر، ۱۳۹۳؛ WHO، ۲۰۰۶a).

استفاده مجدد از فاضلاب در صنایع کشاورزی سابقه‌ای بسیار طولانی داشته (WHO، ۲۰۰۶a) لیکن تحقیق حاضر در ادامه بررسی امکان استفاده از پساب فاضلاب شهری برای پرورش آرتمیا (قدیمی و منافر، ۱۳۹۳) از معدود تحقیقات انجام شده در ایران می‌باشد. ارائه راهکارهای استفاده از پساب اهمیت زیادی دارد زیرا که طبق پیش‌بینی به‌عمل آمده، در سال ۱۴۰۰، سالانه بیش از ده میلیارد متر مکعب آب در بخش‌های شرب و صنعت مصرف خواهد شد که حدود ۷ میلیارد متر مکعب آن به‌صورت پساب قابل بازیابی و استفاده مجدد می‌باشد. ایران به‌عنوان یکی از کشورهای خاورمیانه با کاهش منابع آب تجدید شونده مواجه بوده و در این راستا متولیان امر، پالایش و استفاده مجدد از پساب‌های شهری و صنعتی و هم‌چنین آب‌های برگشتی را به‌عنوان منابعی جدید برای جبران بخشی از این کمبودها مورد توجه قرار داده‌اند. بررسی و جمع‌بندی تجربیات جهانی استفاده از این منابع نشان می‌دهد که با توجه به کمبود آب، استفاده از این منابع به‌عنوان یک منبع ارزشمند آب مطرح بوده و با گذشت زمان اهمیت آن بیش‌تر نیز خواهد شد.

درایران نیز همانند اغلب کشورهای مترقی ضوابطی برای استفاده مجدد از آب پساب تعریف شده است (معاونت برنامه‌ریزی و نظارت راهبردی رئیس جمهور، ۱۳۸۹). براساس دستورالعمل تهیه شده توسط این سازمان که مطابق با دستوالعمل سازمان بهداشت جهانی می‌باشد پساب مورد استفاده برای استخرهای پرورش ماهی باید عاری از تخم انگل نماتودها بوده و تعداد کلی‌فرم مدفوعی در آن‌ها بیش از ۱۰۰۰ عدد در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر نباشد (سازمان بهداشت جهانی و معاونت برنامه‌ریزی و نظارت راهبردی رئیس جمهور، ۱۳۸۹؛ WHO، ۲۰۰۶a). مقادیر مجاز آلودگی در پساب مورد استفاده در آبزی‌پروری شامل pH برابر ۹-۶، BOD کم‌تر از ۱۰میلی‌گرم بر لیتر، کدورت برابر با ۲ میلی‌گرم بر لیتر و کلی‌فرم مدفوعی از ۰ تا کم‌تر از ۱۰۳ در ۱۰۰ میلی‌لیتر می‌باشد(معاونت برنامه‌ریزی و نظارت راهبردی رئیس جمهور، ۱۳۸۹). بعضی از نماتودها از جمله کلونورکیس، شیستوزوما از جمله انگل‌هایی هستند که در استفاده از این منابع برای آبزی‌پروری دارای محدودیت می‌باشد ولی در استفاده از پساب‌های شهری در آبزی‌پروری مهم‌ترین عامل محدودیت‌زا، کلی‌فرم، فکال کلی‌فرم و تخم انگل نماتود می‌باشد.

تحقیق حاضر از پژوهش‌های اولیه موجود در زمینه استفاده و بهره‌وری از این آب می‌باشد. نتایج بررسی‌های اولیه حاکی از آلودگی

شدید پساب کلرزنی شده توسط تصفیه‌خانه به انواع میکروب‌های بیماری‌زا بود چیزی‌که پیش از آزمایش با اعمال تیمارهای مختلف کلرزنی و افزایش شوری به استاندارد جهانی رسید (قدیمی و منافی‌فر، ۱۳۹۳ و نتایج ارائه نشده از تحقیق حاضر).

اخیراً پیشرفت‌های قابل توجهی در استفاده از پساب تصفیه خانه‌های شهری در کشاورزی و صنایع حاصل شده است (WHO، ۲۰۰۶a-b). در سیستم‌های پیشرفته پیش از وارد نمودن پساب به استخرهای پرورش ماهی انواع دیگری از موجودات از جمله انواع باکتری‌ها، جلبک‌های پرسلولی و تک‌سلولی، حتی زئوپلانکتون‌ها و گیاهان در چنین پسابی پرورش داده می‌شود. این کار ضمن تولید محصول خاص، خود موجب تصفیه‌سازی ثانویه آب شده و حتی پساب تولید شده از چنین مزارع پرورش ماهی در ادامه جهت پرورش سخت پوستان دیگر که نیازمند آبی با کیفیت پائین‌تر هستند، به‌کار می‌رود. توانایی پرورش آرتمیا به‌عنوان یک زئوپلانکتون بسیار مقاوم و با ارزش تجاری بالا در چنین سیستم‌هایی، باعث می‌شود تا بتوان حتی از پساب‌هایی با کیفیت پائین جهت پرورش این دسته از موجودات استفاده کرد. این روند غیر از این‌که می‌تواند باعث تولید محصولی شود که می‌تواند به‌عنوان غذای آبزیان دیگر مورد استفاده قرار گیرد موجب ارتقاء کیفیت آب شده و می‌تواند این آب را برای استفاده در حوزه‌های دیگر محیا سازد. به‌هرحال، حتی در صورت استفاده از آرتمیا برای پرورش با پساب، این آب تا حد امکان بایستی بتواند شاخص‌های سلامتی اولیه را حائز گردد تا بتواند در اختیار آبزی پرور و صنعت آبزی پروری قرار گیرد. بررسی‌های اولیه انجام شده نشان دهنده بار آلودگی نسبتاً بالای پساب تصفیه‌خانه فاضلاب شهر میاندوآب است که به‌عنوان یک تیمار ساده و استاندارد در طی آزمایش باید نسبت به ضدعفونی پساب اقدام نمود.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که اندازه آرتمیاهای پرورش یافته در پساب در تمامی موارد از آرتمیای پرورش یافته در آب معمولی (نمونه شاهد) بزرگ‌تر می‌باشد که نشان‌دهنده رشد بهتر این آرتمیا احتمالاً به‌دلیل استفاده از باکتری‌های باقی‌مانده (باکتری‌های گرم مثبت) محیط پساب به‌عنوان مواد غذایی می‌باشد. مقایسه نتایج فوق با نتایج مشابه درخصوص پرورش آرتمیا در چنین سیستم‌های آزمایشگاهی با استفاده از آب معمولی نشان می‌دهد که در اغلب موارد پرورش آرتمیا با پساب حتی تضمین کننده رشد و بقاء بهتری نیز می‌باشدکه می‌تواند ناشی از بیان ژن‌های مختلف از جمله HSP باشد (جعفری، ۱۹۹۳). تمامی نتایج فوق نشان می‌دهد که پساب پس از کلرزنی غیر از این‌که محیط مناسبی برای رشد آرتمیا فراهم می‌نماید باعث حذف تقریباً کامل آلودگی باکتریایی شده و نهایتاً باعث می‌شود که محصولی (زی‌توده آرتمیا) فاقد بار آلودگی تولید شود. نتایج این بخش از تحقیق نشان داد که در صورت استفاده از چنین زی‌توده‌ای احتمال انتقال آلودگی باکتریایی به موجودات مصرف کننده (همانند ماهیان آکواریومی) به حداقل می‌رسد.

به‌طورکلی ماهیان و آبزیان دارای بیش‌ترین میزان فراوانی تغییرات در ویژگی‌های مورفولوژیکی درون گروهی و بین جمعیت‌هایشان می‌باشند که این تغییرات مربوط به وجود شرایط محیطی متفاوت مانند شوری، دسترسی به منابع مختلف تغذیه‌ای و تفاوت در منشاء تولیدمثلی است که تفاوت در جمعیت‌های *A. urmiana* در این تحقیق را می‌توان تا حدی با آن مرتبط دانست. پیش از این نیز گزارش شده بود که آرتمیای دوجنسی دریاچه ارومیه دارای جمعیت‌های مختلفی با سرعت رشد، بقاء و تولیدمثل متفاوت می‌باشد (Manaffar، ۲۰۱۲). تفاوت‌های ریختی (مثل سرعت رشد در حین بلوغ) بین جمعیت‌های مختلف یک گونه می‌تواند به‌واسطه تفاوت‌های ژنتیکی و انعطاف‌پذیری ریختی تحت تاثیر شرایط محیطی باشد. فاکتورهای محیطی به‌واسطه انتخاب طبیعی سبب افزایش کارایی یک ریخت در بین افراد یک زیستگاه و درنتیجه جداسازی ریختی جمعیت‌های آن در زیستگاه‌های مختلف می‌گردد (Klingenberg، ۲۰۱۱؛ Adams و همکاران، ۲۰۰۴؛ Abdoli، ۲۰۰۰؛ Turan، ۲۰۰۰). براساس ویژگی‌های خاص هر منطقه افزایش کارایی یک ژن و انتخاب طبیعی براساس بیان آن ژن و یا فنوتیپ متفاوت می‌باشد. پس این امکان وجود دارد که یک ویژگی ریختی در یک زیستگاه برتر باشد، اما در زیستگاه دیگر سبب کاهش قابلیت استفاده از منابع دیگر شود. برهمین اساس Hontoria و Amat (۱۹۹۲) آرتمیاهای ماده بالغی که متعلق به ۲۵ جمعیت از سرتاسر آمریکا بودند را مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها قادر بودند به‌وضوح جمعیت‌ها را به ۲ گونه تقسیم‌بندی کنند. براساس این گزارش‌ها می‌توان از اختلافات درون گونه‌ای یک موجود استفاده نموده و با انتخاب یک جمعیت برتر شرایط را برای کشت تجاری آن بهینه نمود.

کشور ایران دارای پهنه وسیع و نسبتا" گرم و خشک می‌باشد که می‌تواند برای پرورش آرتمیا مورد استفاده قرارگیرد. به‌نظر می‌رسد کمبود آب‌های جاری و سالم مهم‌ترین مشکل در تجاری‌سازی پروژه پرورش انبوه این آبزی ارزشمند در استان‌های گرم و خشک مرکزی و حاشیه خلیج فارس باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که در صورت انتخاب جمعیت مناسب آرتمیا می‌توان در تجاری سازی کشت انبوه آرتمیا اقدام نمود. همچنین توانایی استفاده از پسابهای فاضلاب شهری در این راستا می‌تواند کاملا کاربردی گردد زیرا محصول تولید شده در پساب حتی از نظر رشدو مقاومت نسبت به استرس برتر از آرتمیا پرورش یافته در آب تمیز می‌باشد. البته لازم به ذکر است بر اساس بررسی‌های پیشین و نظر به این‌که آرتمیا عمدتاً در مراحل لاروی ماهیان استفاده می‌شود و عملاً فاقد پاتوژن‌های

بیماری‌زاست لذا احتمال انتقال بیماری به انسان بسیار ناچیز می‌باشد. لیکن رعایت راه‌کارهای حفظ و ارتقاء کیفیت و سلامتی آب و محصول تولید شده بایستی مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه بابت تامین مالی این پروژه کمال تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

منابع

۱. **جعفری، گ.، ۱۳۹۳.** تاثیر تغذیه با پروتئین‌های شوک حرارتی مخمر تک‌سلولی بر میزان رشد و بقاء *A. urmiana* و *A. franciscana* در شرایط استرس. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد دانشگاه ارومیه. ۸۹ صفحه.

۲. **دفتر نظام فنی اجرایی معاونت برنامه‌ریزی و نظارت راهبردی رییس جمهور. ۱۳۸۹.** ضوابط زیست محیطی استفاده مجدد از آب‌های برگشتی و پساب‌ها. صفحات ۱۷ تا ۱۹.

۳. **قدیمی، س. و منافی‌فر، ر.، ۱۳۹۳.** بررسی امکان پرورش آرتمیا با پساب تصفیه‌خانه فاضلاب شهر میاندوآب. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی. سفارش شرکت آب و فاضلاب شهری آذربایجان‌غربی. ۱۱۸ صفحه.

۴. **معاونت برنامه‌ریزی و نظارت راهبردی رئیس جمهور. ۱۳۸۹.** ضوابط زیست محیطی استفاده مجدد از آب‌های برگشتی و پساب‌ها. نشریه شماره ۵۳۵. ۱۵۵ صفحه.

۵. **منافی‌فر، ر.، ۱۳۸۵.** مطالعه جامع آرتمیای دریاچه مهارلو. گزارش نهایی طرح مشترک دانشگاه ارومیه و اداره کل شیلات استان فارس. ۱۵۰ صفحه.

۶. **Abdoli, A., 2000.** The Inland Water Fishes of Iran. Iranian Museum of Nature and Wildlife, Tehran. In Farsi. 378 p.

۷. **Adams, D.C.; Rohlf, F.J. and Slice, D.E., 2004.** Geometric Morphometrics: Ten Years of Progress Following the 'Revolution'. Italian Journal of Zoology. Vol, 71, pp: 5-16.

۸. **Bose, P.C., 1944.** Calcutta sewage and fish culture. Proceedings of the National Institute of Sciences of India. Vol. 4, pp: 443-454.

۹. **Coutteau, P.; Brendonck, L.; Lavens, P. and Sorgeloos, P., 1992.** The use of manipulated baker's yeast as an algal substitute for laboratory culture of Anostraca. Hydrobiologia. pp: 25-32.

۱۰. **Djajadiredja, R.; Koesoemadinata, S.; Jangkaru, Z.; Kodijat, S. and Kertaman, O., 1979.** The role of nightsoil and household wastes in freshwater fish culture: a case study in West Java, Indonesia. Paper presented at International Development Research Centre Nightsoil Survey Leaders'Meeting.

۱۱. **Edwards, P., 1992.** Reuse of human wastes in aquaculture, a technical review. Water and sanitation report no.2. UNDP World Bank Sanitation Program, World Bank, Washington, DC. pp: 33-50.

۱۲. **Edwards, P., 2000.** Wastewater-fed aquaculture: state-of-the-art. Waste recycling and resource management in the developing world. University of Kalyani, India and International Ecological Engineering Society, Switzerland. pp: 37-49.

۱۳. **Edwards, P. and Pullin, R.S.V., 1990.** Wastewater-fed Aquaculture, Proceedings of the International Seminar on Wastewater Reclamation and Reuse for Aquaculture, Calcutta, December 1988. Bangkok, Thailand: Asian Institute of Technology, Environment Sanitation Information Center. pp: 1-295.

۱۴. **Gajardo, G.; Abatzopoulos, T.J.; Kappas, I. and Beardmore, J.A., 2002.** Chapter V. Evolution and speciation. InAbatzopoulos, T.J., Beardmore, J.A., Clegg, J.S., Sorgeloos, P. (Eds). *Artemia*basic and applied biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. pp: 225-250.

۱۵. **Gijzen, H.J. and Ikramullah M., 1999.** Pre-feasibility of duckweed-based wastewater treatment and resource recovery in Bangladesh. World Bank report. pp: 185.

۱۶. **Haq, A.H.M.R. and Ghosal, T.K., 2000.** Wastewater reclamation using duckweed. In: Jana BB et al., eds. Waste recycling and resource management in the developing world: ecological engineering approach. Kalyani, University of Kalyani, and Wolhusen, International Ecological Engineering Society. pp: 495-499.

۱۷. **Hontoria, F. and Amat, F., 1992.** Morphological characterization of adult *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda) from different geographical origins. American populations. Journal of Plankton Research. Vol. 14, pp: 1461-1471.

۱۸. **Klingenberg, C.P., 2011.** MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. Molecular Ecology Resources. Vol. 11, pp: 353-357.

۱۹. **Lavens, P. and Sorgeloos, P., 1996.** Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper No. 361.

۲۰. **Li, S.F., 1997.** Aquaculture and its role in ecological wastewater treatment. In: Etnier C, Guterstam B, eds. Ecological engineering for wastewater treatment, 2nd ed. Proceedings of the international conference at Stensund Folk College, Trosa, Sweden. Boca Raton, FL, CRC Press. pp: 37-49.

۲۱. **Little, D.C. and Pham, A.T., 1995.** Overview of freshwater fish seed production and distribution in Vietnam. Bangkok, Asian Institute of Technology (Working Paper No. NV-6).

۲۲. **Manaffar, R., 2012.** Genetic diversity of *Artemia* populations in Lake Urmia, Iran. PhD thesis, Ghent University, Belgium. 160 p.

۲۳. **Sorgeloos, P.; Lavens, P. and Leger, P., 1997a.** Determination and identification of biological characteristics of Artemia urmiana for application in aquaculture. Univ. of Gent Belgium, Item A. 110 P.

۲۴. **Sorgeloos, P.; Lavens, P. and Leger, P., 1997b.** A resource assessment of Urmiah Lake Artemia cycts and biomas. Uni of Gent, Belgium-Item B. 110 p.

۲۵. **Triantaphyllidis, G.V.; Criel, G.R.J.; Abatzopoulos, T.J. and Sorgeloos, P., 1997a.** International Study on *Artemia*. LIII. Morphological study of *Artemia* with emphasis to Old World strains. I. Bisexual populations. Hydrobiologia. Vol. 357, pp: 139-153.

۲۶. **Triantaphyllidis, G.V.; Criel, G.R.J.; Abatzopoulos, T.J. and Sorgeloos, P., 1997b.** International Study on *Artemia*. LIV. Morphological study of *Artemia* with emphasis to Old World strains. II. Parthenogenetic populations. Hydrobiologia. Vol. 357, pp: 155-163.

۲۷. **Turan, C., 2000.** Otolith shape and meristic analysis of Herring (*Clupea harengus*) in the northeast Atlantic. Arch. Fish. Mar. Res. Vol. 48, pp: 283-295.

۲۸. **WHO. 2006a.** Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater Volume 3: Wastewater and excreta use in aquaculture.

۲۹. **WHO. 2006b.** Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater Volume 4, Excreta and greywater use in agriculture.