

پاسخ جمعیت‌های مختلف *Artemia urmiana*, Günther, 1890

پرورش یافته در پساب فاضلاب شهری به استرس دما و شوری

وحید افشارهزارخانی¹، رامین منافار^{2*}، هادی بذرافشان¹، هاله خلیلپور¹، مهران حبیبی رضانی³، علی اکبر موسوی موحدی⁴

1. گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، کدپستی 5714944514

2. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، کدپستی: 5756151818

3. گروه سلولی و مولکولی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه تهران، صندوق پستی: 1417614418

4. گروه بیوفیزیک، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، صندوق پستی: 1417614418

ایمیل: Raminmanaffar@gmail.com

* آدرس مسئول مکاتبات: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، کدپستی: 5756151818

Vahid Afsharhezarkhani¹, Ramin Manaffar^{2*}, Hadi Bazrafshan¹, Haleh Khalilpur¹, Mehran Habibirezaei³, Aliakbar Musavaimovahedi⁴

1. Department of Biotechnology, Urmia Lake Research Institute, Urmia University. Zip code: 5714944514

2. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University. Zip code: 5756151818

3. Department of cellular and molecular, Faculty of science, Tehran university. Zip code: 1417614418

4. Department of biophysics, Institute of Biochemistry & Biophysics (IBB), University of Tehran. Zip code: 1417614418.

*Address: Urmia, Urmia University, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Zip code: 5756151818,

Email: Raminmanaffar@gmail.com

چکیده

به دلیل 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 آبی پروری می‌باشد که پرورش آن بصورت صنعتی مورد توجه است. به منظور مطالعه کیفیت آرتمیای پرورش یافته در پساب فاضلاب شهری، 4 جمعیت مختلف *A. urmiana*، متعلق به نواحی مختلف دریاچه ارومیه، در شوری 75 گرم در لیتر در 2 تیمار آب معمولی و پساب کلر زنی شده (3 ppm) فاضلاب شهری ارومیه پرورش داده شد. تغذیه با ترکیبی از جلبک‌های تک سلولی (*Dunaliella salina*) و مخمر تک سلولی بر اساس 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 (35 و 38 درجه سانتی‌گراد) و شوری‌های 120 ppt، 180ppt، 240ppt، 280ppt، 360ppt مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تفاوت‌های معنی‌داری در میزان رشد و بقاء مابین جمعیت‌های مختلف *A. urmiana* از نواحی مختلف دریاچه در رشد و بقاء و مقاومت نسبت به استرس‌های محیطی وجود دارد ($p < 0.05$). 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 ($p < 0.05$). نتایج این تحقیق نشان داد که پساب شهری کلرزنی شده محیط مناسبی برای پرورش مصنوعی آرتمیا می‌باشد و می‌توان با استفاده از این آب بیومسی با رشد بهتر و مقاوم نسبت به شرایط محیطی تولید نمود.

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

Responses to thermal and salinity stress in different *Artemia urmiana*, Günther, 1890, populations grown in municipal wastewater

Abstract:

Due to limitations in the exploitation of cline water resources, aquaculture cannot meet the growing demand of populations. *Artemia* is known as one of the important model organisms in researches and the most important live food in the aquaculture industry. In order to investigate the possibility of rearing and quality of cultured *Artemia* in present study, four different populations of *A. urmiana*, harvested from different areas of Urmia Lake, were reared in 75g/l salinity in two treatments of fresh water and chlorinated (3 ppm) waste water. The animals were

fed with a combination of single-celled algae and single-celled yeast according to standard protocols. The growth and survival of the *Artemia* were measured on the third, seventh, eleventh, fifteenth and twentieth day of culture. At the end of the period, resistance to high temperatures of 35 and 38 centigrade and high salinities 360, 280, 240, 180, 120ppt were examined by adult *Artemia*. This study showed there are significant differences in the growth and resistance to environmental stresses ($p < 0.05$) between different populations of *A. urmiana* obtained from different areas of the Lake. According to the results, rearing by the waste water was very effective in all growth factors, survival and resistance to environmental stresses compared to fresh water ($p < 0.05$). **The results of present study revealed that the chlorinated municipal wastewater is suitable for artificial rearing of *Artemia* which could produce a biomass with better growth rate and resistant to environmental conditions.**

Key words: *Artemia*, Stress, Survival, Waste water, Growth.

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، 1389). با اینکه استفاده از این آب جهت مصارف کشاورزی در ایران و در دنیا سابقه طولانی دارد (WHO، 2006a)، اما استفاده از فاضلاب در آبی‌زی پروری ایران سابقه‌ای ندارد. این درحالیست که آبی‌زی پروری با استفاده از فاضلاب تاریخی‌های طولانی در چندین کشور شرق، جنوب و جنوب شرقی آسیا خصوصاً در چین داشته به قرن‌های گذشته می‌رسد (Edwards، 2000 و Pullin، 1990). هم اکنون از فاضلاب شهری بصورت عمده در پرورش انواع آبزیان در کشورهای نظیر بنگلادش (Haq و Ghosal، 2000؛ Gijzen و Ikramullah، 1999)، چین (Li، 1997)، هندوستان (Edwards، 1992؛ Bose، 1994)، اندونزی (Djajadiredja و همکاران، 1979)، ویتنام (Little و Pham، 1995) استفاده می‌شود. فقط در کشور اندونزی در وسعتی بیش از 10000 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 قاره آمریکا، اروپا، آفریقا و حتی منطقه غرب اقیانوس آرام بسیار محدود و یا غیر متمرکز گزارش شده است (WHO، 2006a).

درحالیکه در صنعت آبی‌پروری تامین آب مناسب از مهمترین نیازهای سیستم می‌باشد، میزان منابع طبیعی موجود نمی‌تواند تامین کننده نیاز آبی پروران را تامین کند. آرتمیا با حدود 5% پروتئین، 4 تا 20% چربی، کلیه اسیدهای آمینه اساسی و اکثر اسیدهای چرب در حد مطلوب از بهترین غذاهای آبزیان خصوصاً در دوران لاروی می‌باشد که در سالهای اخیر تولید طبیعی آن دستخوش مشکلاتی شده است. هم اکنون، کشورهای نظیر آمریکا سالانه هزاران تن 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 تانکرهای کوچک نموده، و آنرا در امر آبی‌پروری مورد استفاده قرار می‌دهند. البته آرتمیا به عنوان یک مدل تحقیقاتی نیز در سالهای اخیر بسیار مورد توجه بوده و بدین منظور کشت داده می‌شود (Manaffar، 2012؛ Gajardo و همکاران، 2002). مصرف بالا و بحرانهای زیست محیطی موجب شده است که برداشت این موجود با ارزش از منابع طبیعی نیز دچار بحران شود. این مسئله خصوصاً در مورد گونه‌هایی مانند *A. urmiana* که به دلیل خشک شدن دریاچه ارومیه در بحران انقراض می‌باشند نگران کننده‌تر است (Manaffar، 2012). به دلیل 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 نیمه طبیعی 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 اتیلنی و یا بتونی کشت داده شود (Sorgeloos و Lavens، 1996). تحقیقات نشان داده است که جمعیت‌های مختلف آرتمیا دارای توانهای مختلف برای پرورش بصورت مصنوعی هستند و محصول تولید شده به شدت می‌تواند در میزان رشد و بقاء، متغیر باشد. همچنین تحقیقات اخیر نیز نشان داده است که در دریاچه ارومیه نیز با توجه به گستردگی اقلیم این دریاچه جمعیت‌های مختلفی از آرتمیا با توان رشد، بقاء و آستانه تحمل‌های مختلف وجود دارد (Manaffar، 2012؛ Amat و Hontoria، 1992).

با توجه به اینکه پساب فاضلاب شهری حتی پس از کلرزنی اولیه منبع بسیار خوبی از انواع باکتریها، املاح و مواد عالی و بعضاً پری بیوتیکهاست پیش بینی 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 4 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 روش کار

به منظور بررسی تاثیر پرورش در محیط غنی پساب از 4 جمعیت مختلف آرتمیای دریاچه ارومیه *A. urmiana* استفاده شد. در انتخاب جمعیتها سعی شد همگی درصد سیست‌گشایی بالای 70% داشته باشند تا هیچگونه اختلاف درون جمعیتی بر اساس انتخاب نمونه‌های برتر رخ ندهد. همچنین جمعیت‌هایی با بیشترین اختلاف در ویژگیهای رشد و بقاء (حاصل از مطالعات پیشین) انتخاب شدند (Manaffar، 2012). پرورش و بررسی زیستی آرتمیا با استفاده از روش استاندارد تعریف شده برای این موجود انجام شد (Sorgeloos، 1997). 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 (300 میکرونی)،

بوسیله آب دریاچه ارومیه به 75 گرم بر لیتر رسانیده شد. جهت از بین بردن باکتری‌های بیماری‌زا از کلرزنی 3 میلی‌گرم در لیتر به مدت 24 استفاده شد (قدیمی و مناف فر، 1393).

غذای استاندارد برای تغذیه آرتمیا ترکیبی از مخمر و جلبکهای تک سلولی می‌باشد که هر دو در آزمایشگاه تهیه شدند. آماده سازی مخمر تک سلولی با مخلوط نمودن مقادیر مشخصی از مخمر خشک (Coutteau و همکاران، 1992) 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 به طور انبوه کشت داده شد. بدین منظور ابتدا به میزان 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 120 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 هموسیئومتر (ننوبار) استفاده گردید. برای محاسبه تعداد واقعی سلول جلبک در هر میلی لیتر 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 تفریح سیستم‌های آرتمیا آب شور با شوری 35 گرم در لیتر می‌باشد که در ابتدا به منظور جداسازی هر گونه آلودگی فیلتراسیون (300 میکرونی) انجام شده و سپس با آب شیر رقیق شد (Sorgeloos، 1997). پس از تفریح، لاروهای ناپلیوس اینستار یک با استفاده از نورگرایی مثبت آنان جدا شده و سپس به تعداد 500 عدد در هر لیتر به درون ظروف مخروطی شکل با حجم آب 1 لیتر انتقال داده شدند. پرورش آرتمیا در داخل مخروطهای پلاستیکی 1.5 لیتری که در داخل آکواریومی قرار داده شده بودند صورت گرفت. جهت تنظیم دمای آکواریوم (27 ± 1 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 تفریح یافتن از ذخیره کیسه زرده استفاده کرده و تقریباً هیچ غذایی در روز اول مصرف نمی‌کنند. لذا غذادهی از روز اول (حدود 24 ساعت پس از تفریح) شروع شده و میزان غذا بر طبق جدول غذادهی Coutteau و همکاران (1992) به صورت روزانه و بر حسب تعداد آرتمیا محاسبه و انجام شد. غذای مورد استفاده در پرورش نیز بصورت ترکیبی از جلبک تک سلولی *Dunaliella tertiolecta* و مخمر با غلظت 3 گرم در 300 میلی لیتر آب با شوری 15-10 گرم در لیتر بود. شوری ظروف پرورش آرتمیا هر روز یکبار توسط دستگاه شوری سنج سنجش می‌شد و در صورت افزایش یا کاهش شوری، به ترتیب 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 بصورت درصد در جداول ثبت گردید. جهت بررسی دقیق بقاء آرتمیاهای هر تکرار در روزهای سوم، هفتم، یازدهم، پانزدهم و نوزدهم کلیه آرتمیاهای از محیط کشت جدا و شمارش شدند (Sorgeloos، 1997). 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 بیومتری نیز همزمان با شمارش بقاء آرتمیا از هر تکرار 5 عدد آرتمیا برداشت شده و بیومتری طول کلی آنان شامل طول بدن از ناحیه چشم سوم تا انتهای بدن انجام شد. عمل کشتن و فیکس کردن آرتمیاهای با استفاده از افزودن چند قطره لوگل 1% صورت گرفت. در این مرحله طول کلی آرتمیاهای در روزهای فوق از با استفاده از دستگاه دیجیتالیزر مجهز به استریومیکروسکوپ اندازه گیری شد (Sorgeloos، 1997؛ Triantaphyllidis و همکاران، 1997a-b).

در انتهای دوره پرورش مقایسه میزان مقاومت به استرس دمای 35 و 38 درجه سانتی‌گراد در میان 4 جمعیت مورد نظر صورت گرفت. سنجش مقاومت به این استرسها در داخل فالكون‌های 50 میلی‌لیتری با آب شور 75 گرم در لیتر صورت گرفت. برای هر استرس و هر جمعیت 24 عدد آرتمیا در نظر گرفته شد و میزان تلفات جمعیت‌ها هر 1 ساعت تا زمان مرگ همه آرتمیاهای ثبت شد. اما استرس شوری بالا در 5 شوری مختلف انجام شد (آب دریاچه ارومیه (360ppt)، 280ppt، 240ppt، 180ppt، 120 ppt). برای تهیه این شوری‌ها آب دریاچه به میزان مورد نیاز با آب معمولی رقیق شد. بقیه مراحل آزمون مطابق با استرس دمایی بود مگر دمای محیط که طی این دوره 27 ± 1 درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. 24 ساعت پیش از استرس و در طول دوره استرس هیچ گونه تغذیه‌ای صورت نگرفت. انتخاب شرایط دمایی و شوری برای اعمال استرسها بر اساس تستهای اولیه روی همین گونه صورت گرفت. اندازه‌گیری منظم دما توسط دماسنج دیجیتال کالیبره شده و سنجش شوری توسط شوری سنج Atago refractometer, 2483 Master 28m صورت گرفت.

آنالیز آماری

جامعه آماری شامل 4 جمعیت مختلف از آرتمیاهای پرورش یافته در آب شور معمولی (مجموعاً 4 تیمار و 12 تکرار) و در آب پساب (مجموعاً 4 تیمار و 12 تکرار) می‌باشد. نتایج بیومتری و بقاء در طول دوره پرورش تا 19 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 نرم افزاری SPSS و آنالیز آماری One-way ANOVA و آزمون Tukey و آزمون T مستقل (برای مقایسه زیست سنجی و بقاء و مقاومت به استرس بین دو محیط) استفاده شد (Triantaphyllidis و همکاران، 1997a-b).

نتایج زیست سنجی

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 (جنوب شرق دریاچه ارومیه): T، سیست دریاچه ساحل کیودان (جنوب شرق دریاچه ارومیه): V کد گذاری شدند. نتایج بیومتری و رشد آرتمیایها در جداول 1 و 2 آورده شده است. این نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری مابین جمعیت‌های مختلف آرتمایا در انتهای دوره پرورش در میزان رشد وجود دارد (جدول 1 و 2). همچنین در انتهای دوره پرورش مشخص شد که پرورش در پساب موجب شده است آرتمایا رشد بهتری نسبت به آب معمولی دریاچه ارومیه داشته باشد (جدول 3 و 4). اما از نظر میزان بقاء شرایط پرورش در آب دریاچه ارومیه کمی بهتر از پرورش در پساب بود بطوریکه در انتهای دوره پرورش میزان بقاء آرتمایا در آب شور دریاچه ارومیه با اختلاف معنی‌دار در تمامی روزها بهتر از پساب بود ($p < 0.05$).

جدول 1: زیست سنجی رشد (میانگین \pm انحراف استاندارد) 4 جمعیت *A. urmiana* در آب شور در روزهای سوم، هفتم، یازدهم، پانزدهم و نوزدهم (آزمون ANOVA ($p < 0/05$))

جمعیت	روز سوم	روز هفتم	روز یازدهم	روز پانزدهم	روز نوزدهم
آب دریاچه	A	1/62 \pm 0/26 ^a	2/98 \pm 0/41 ^a	7/18 \pm 0/603 ^b	6/91 \pm 0/60 ^a
	Q	1/47 \pm 0/13 ^a	2/94 \pm 0/67 ^a	5/73 \pm 0/80 ^a	6/86 \pm 0/821 ^{ab}
	T	1/69 \pm 0/23 ^a	3/25 \pm 0/33 ^a	7/22 \pm 0/69 ^b	8/00 \pm 0/579 ^b
	V	1/56 \pm 0/18 ^a	2/78 \pm 0/23 ^a	6/50 \pm 0/71 ^{ab}	7/60 \pm 0/784 ^{ab}
پساب	A	1/82 \pm 0/28 ^{ab}	3/98 \pm 0/43 ^a	7/43 \pm 1/08 ^{ab}	8/68 \pm 0/56 ^a
	Q	1/52 \pm 0/06 ^{bc}	3/82 \pm 0/32 ^a	8/13 \pm 0/57 ^a	9/35 \pm 0/848 ^a
	T	1/48 \pm 0/08 ^c	2/98 \pm 0/25 ^b	6/67 \pm 0/82 ^a	9/39 \pm 0/647 ^a
	V	1/99 \pm 0/18 ^a	3/43 \pm 0/61 ^{ab}	6/46 \pm 0/80 ^b	11/1 \pm 15/07 ^b

• اعداد در ستون (مجموعه آب دریاچه یا آب پساب) با حروف لاتین متفاوت نشان دهنده اختلاف آماری می باشند ($p < 0/05$).

جدول 2: زیست سنجی رشد (میانگین \pm انحراف استاندارد) *A. urmiana* در آب شور دریاچه و پساب (آزمون t- مستقل ($p < 0/05$))

روزهای بیومتری	محیط پرورش		t	سطح معناداری (t)
	آب دریاچه	پساب		
روز سوم	1/56 \pm 0/19	1/68 \pm 0/25	-1/7	0/096
روز هفتم	2/99 \pm 0/44	3/55 \pm 0/56	-3/54	0/001
روز یازدهم	6/56 \pm 0/93	7/16 \pm 1/01	-1/91	0/063
روز پانزدهم	7/23 \pm 0/86	8/14 \pm 0/78	-3/48	0/001
روز نوزدهم	7/2 \pm 1/01	9/53 \pm 1/13	-6/88	0/000

جدول 3: درصد بقاء، (میانگین \pm انحراف استاندارد) 4 جمعیت *A. urmiana* در آب شور در روزهای هفتم، یازدهم، پانزدهم و نوزدهم (آزمون ANOVA ($p < 0/05$))

جمعیت	روز هفتم	روز یازدهم	روز پانزدهم	روز نوزدهم
آب دریاچه	A	96/1 \pm 07 ^b	92/2 \pm 07 ^c	85/0 \pm 20/72 ^{bc}
	Q	94/73 \pm 0/64 ^{ab}	93/33 \pm 0/61 ^c	78/67 \pm 1/52 ^b
	T	87/87 \pm 2/57 ^a	76 \pm 1 ^a	68 \pm 2/98 ^a
	V	89/53 \pm 4/71 ^b	85/6 \pm 4/19 ^b	75/73 \pm 1/85 ^b
پساب	A	89/3 \pm 73/75 ^b	76/33 \pm 0/57 ^c	73/33 \pm 2/38 ^b
	Q	76/17 \pm 5/89 ^a	73 \pm 0/00 ^b	71/40 \pm 1/73 ^b
	T	87/33 \pm 3/71 ^b	80 \pm 1 ^d	72/2 \pm 2/27 ^c
	V	76/1 \pm 6/13 ^a	62 \pm 0/00 ^a	52/3 \pm 5/25 ^a

• اعداد در ستون (مجموعه آب دریاچه یا پساب) با حروف لاتین متفاوت نشان دهنده اختلاف آماری می باشند ($p < 0/05$).

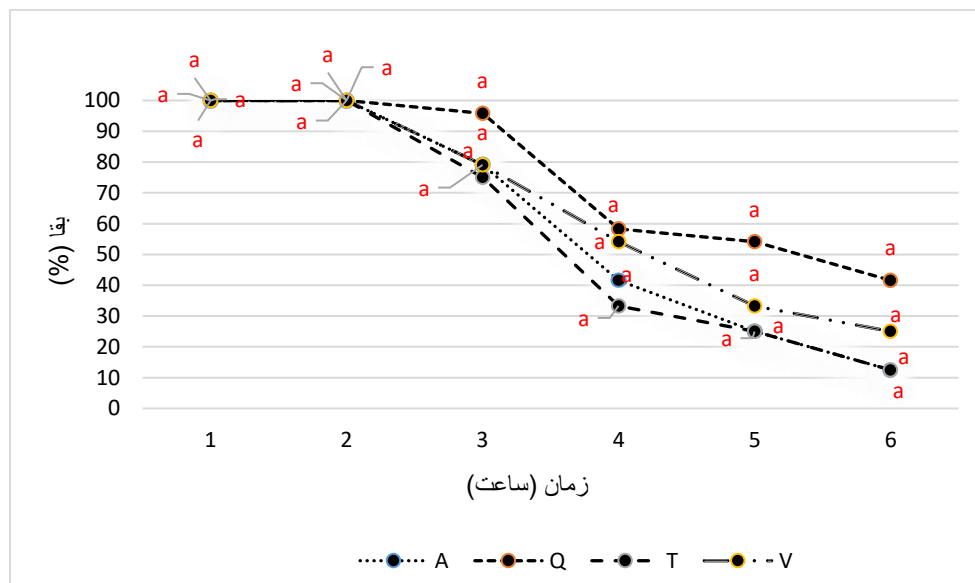
جدول 4: مقایسه درصد بقاء (میانگین \pm انحراف استاندارد) در آب شور و پساب (آزمون t- مستقل ($p < 0/05$))

روزهای شمارش	محیط پرورش		t	سطح معنی دار (t)
	آب دریاچه	پساب		

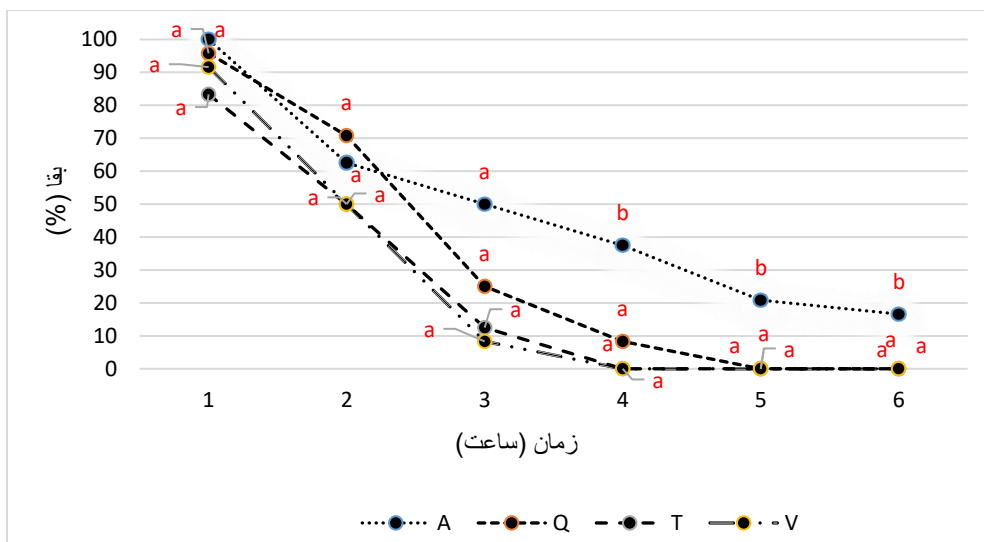
0/04	2/18	76/08±24/96	92/05±4/28	روز هفتم
0/01	2/82	67/67±22/18	86/75±7/45	روز یازدهم
0/02	2/38	65/52±22	81/38±6/98	روز پانزدهم
0/02	2/44	60/48±20/24	75/18±4/85	روز نوزدهم

نتایج میزان بقاء تحت استرس دمائی در شکل‌های 1، 2 و 3 آورده شده است. این بررسی نشان داد که آرتیمیا پرورش یافته در پساب بسیار مقاوم‌تر آرتیمیای تولید شده در آب دریاچه ارومیه می‌باشد بطوریکه در استرس 35 درجه سانتی‌گراد هیچ تلفاتی در جمعیت‌های آرتیمیا مشاهده نشد ولی در جمعیت پرورش یافته در آب دریاچه ارومیه در انتهای دوره 6 ساعته بقاء به حدود 10 الی 40 درصد رسید. این نتایج همچنین نشان داد اختلاف زیادی در بین جمعیت‌های آرتیمیا در میزان بقاء در انتهای دوره پرورش وجود دارد. اما در استرس دمای 38 درجه مشاهده شد که کاهش بقاء در جمعیت پرورش یافته در آب دریاچه ارومیه تدریجی بوده ولی در آرتیمیای پرورش یافته در پساب تلفات با تاخیر آغاز شده است. در هر دو جمعیت استرس در ساعت 3 پس از آغاز آن موج ایجاد تلفات شدید شده است که نهایتاً در انتهای دوره 6 ساعته تلفات را به حداکثر رسانده است. آنالیز آماری انجام شده هیچ اختلاف آماری در بین 4 جمعیت مورد مطالعه در میزان بقاء تحت استرس دمائی مشاهده نشد ($p>0/05$). (شکل 1 الی 3).

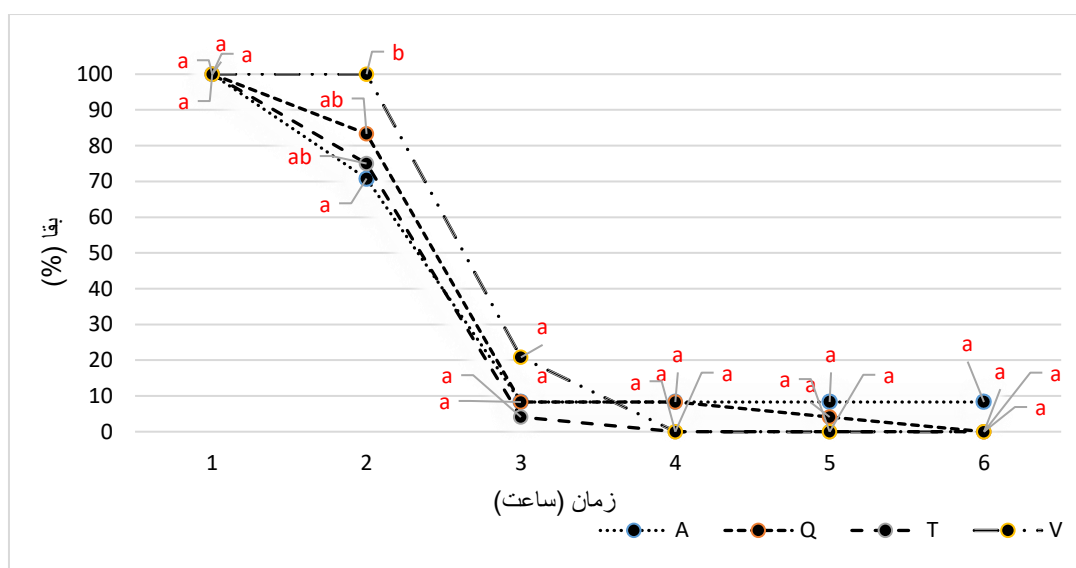
در بررسی میزان بقاء در استرس‌های شوری بالا مشخص شد که در تمامی تیمارها بصورت معنی‌داری بقاء بهتری در آرتیمیای پرورش یافته در پساب نسبت به آب دریاچه ارومیه وجود دارد ($p<0/05$). بر اساس این نتایج درحالی‌که هیچ تلفاتی در آرتیمیای پرورش یافته با آب پساب در بین تیمارها در استرس‌های شوری دیده نمی‌شد تلفات بالایی در انتهای دوره در تمامی جمعیت‌های پرورش یافته در آب دریاچه وجود داشت (شکل 4). این آنالیز همچنین نشان داد که در اغلب موارد اختلاف معنی‌داری در بین جمعیت‌های مختلف آرتیمیا از دیدگاه بقاء در استرس شوری وجود ندارد ($p<0/05$).



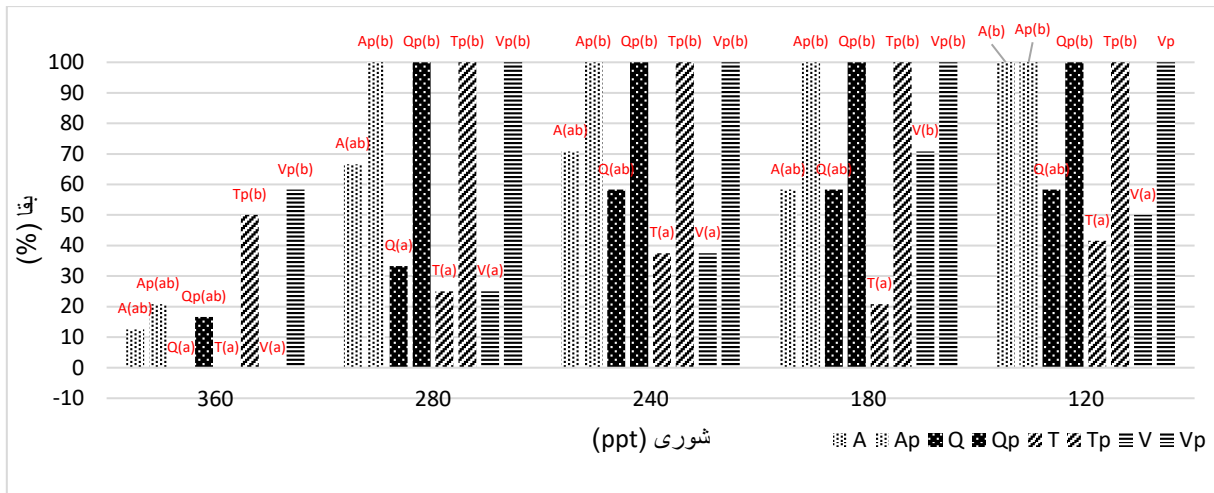
شکل 1: درصد بقاء 4 جمعیت *A. urmiana* A. کشت داده شده در آب دریاچه ارومیه در استرس دمای 35 درجه سانتی‌گراد (حروف متفاوت در هر ساعت نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $p<0/05$ می‌باشد).



شکل 2: درصد بقاء 4 جمعیت *A. urmiana* کشت داده شده در آب دریاچه ارومیه در استرس دمایی 38 درجه سانتی‌گراد (حروف متفاوت در هر ساعت نشان دهنده‌ی اختلاف معنی دار در سطح $p < 0/05$ می‌باشد).



شکل 3: درصد بقاء 4 جمعیت *A. urmiana* کشت داده شده در پساب در استرس دمایی 38 درجه سانتی‌گراد (حروف متفاوت در هر ساعت نشان دهنده‌ی اختلاف معنی دار در سطح $P < 0/05$ می‌باشد).



شکل 4: مقایسه درصد بقاء 4 جمعیت *A. urmiana* کشت داده شده در آب شور دریاچه و پساب در استرسهای شوری در انتهای دوره 6 ساعته استرس (تیمارهای پرورش یافته با پساب با حرف p مشخص شده‌اند) (حروف متفاوت در هر شوری (داخل پرانتز) نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0/05$ 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 باقی مانده، 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 مناف فر، 1393؛ WHO، 2006a).

استفاده مجدد از فاضلاب در صنایع کشاورزی سابقه‌ای بسیار طولانی داشته (WHO، 2006a) لیکن تحقیق حاضر در ادامه بررسی امکان استفاده از پساب فاضلاب شهری برای پرورش آرتمیا (قدیمی و مناف فر، 1393) از معدود تحقیقات انجام شده در ایران می باشد. ارائه راهکارهای استفاده از پساب اهمیت زیادی دارد زیرا که طبق پیش بینی به عمل آمده، در سال 1400، سالانه بیش از ده میلیارد متر مکعب آب در بخش‌های شرب و صنعت مصرف خواهد شد که حدود 7 میلیارد متر مکعب آن به صورت پساب قابل بازیابی و استفاده مجدد می‌باشد. ایران به عنوان 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 هم چنین آب‌های برگشتی را به عنوان 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 به عنوان یک منبع ارزشمند آب مطرح بوده و با گذشت زمان اهمیت آن بیشتر نیز خواهد شد.

در ایران نیز همانند اغلب کشورهای متری ضوابطی برای استفاده مجدد از آب پساب تعریف شده است (معاونت برنامه ریزی و نظارت راهبردی رئیس جمهور، 1389). بر اساس دستور العمل تهیه شده توسط این سازمان که مطابق با دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی می‌باشد پساب مورد استفاده برای استخرهای پرورش ماهی باید عاری از تخم انگل نامتودها بوده و تعداد کلیرم مدفوعی در آنها بیش از 1000 عدد در هر 100 میلی‌لیتر نباشد (سازمان بهداشت جهانی و معاونت برنامه ریزی و نظارت راهبردی رئیس جمهور، 1389؛ WHO، 2006a). **مقادیر مجاز آلودگی در پساب مورد استفاده در آبی پروری شامل pH برابر 9-6، BOD کمتر از 10 میلی گرم بر لیتر، کدورت برابر با 2 میلی گرم بر لیتر و کلی‌فرم مدفوعی از 0 تا کمتر از 103 در 100 میلی لیتر می‌باشد (معاونت برنامه ریزی و نظارت راهبردی رئیس جمهور، 1389).** بعضی از نامتودها از جمله کلونورکیس، شپیتوزوما از جمله انگل‌هایی هستند که در استفاده از این منابع برای آبی پروری دارای محدودیت می‌باشد ولی در استفاده از پساب‌های شهری در آبی پروری مهم‌ترین عامل محدودیت زاء، کلیفرم، فکال کلیفرم و تخم انگل نامتود می‌باشد.

تحقیق حاضر از پژوهش‌های اولیه موجود در زمینه استفاده و بهره‌وری از این آب می‌باشد. نتایج بررسی‌های اولیه حاکی از آلودگی شدید پساب کلرزی شده توسط تصفیه خانه به انواع میکروب‌های بیماری‌زا بود چیزی که پیش از آزمایش با اعمال تیمارهای مختلف کلرزی و افزایش شوری به استاندارد جهانی رسید (قدیمی و مناف فر، 1393؛ و نتایج ارائه نشده از تحقیق حاضر).

اخیرا پیشرفت‌های قابل توجهی در استفاده از پساب تصفیه خانه‌های شهری در کشاورزی و صنایع حاصل شده است (WHO، 2006a-b). در سیستم‌های پیشرفته پیش از وارد نمودن پساب به استخرهای پرورش ماهی انواع دیگری از موجودات از جمله انواع باکتری‌ها، جلبک‌های پرسولولی و تک‌سلولی، حتی زئوپلانکتون‌ها و گیاهان در چنین پسابی پرورش داده می‌شود. این کار ضمن تولید محصول خاص، خود موجب تصفیه سازی 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 پایین‌تر هستند، بکار می‌رود. توانایی پرورش آرتمیا به عنوان یک زئوپلانکتون بسیار مقاوم و با ارزش تجاری بالا در چنین سیستم‌هایی، ما را قادر می‌سازد که بتوانیم حتی از پساب‌هایی با کیفیت پایین جهت پرورش این دسته از موجودات استفاده کنیم. این روند غیر اینکه می‌تواند باعث تولید محصولی شود که می‌تواند به عنوان غذای آبیان دیگر مورد استفاده قرار گیرد موجب ارتقاء کیفیت آب شده و می‌تواند این آب را برای استفاده در حوزه‌های دیگر محیا سازد. به هر حال، 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 آبی پرور و صنعت آبی پروری قرار گیرد. بررسی‌های اولیه انجام

شده نشان دهنده بار آلودگی نسبتاً بالای پساب تصفیه خانه فاضلاب شهر میاندوآب است که به عنوان یک تیمار ساده و استاندارد در طی آزمایش باید نسبت به ضد عفونی پساب اقدام نمود.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سائز آرتمیاهای پرورش یافته در پساب در تمامی موارد از آرتمیای پرورش یافته در آب معمولی (نمونه شاهد) بزرگتر می‌باشد که نشان دهنده رشد بهتر این آرتمیا احتمالاً به دلیل استفاده از باکتری‌های باقی‌مانده (باکتریهای گرم مثبت) محیط پساب به عنوان مواد غذایی می‌باشد. مقایسه نتایج فوق با نتایج مشابه در خصوص 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 می‌باشد که می‌تواند ناشی از بیان ژنهای مختلف از جمله HSP باشد (جعفری، 1993). تمامی نتایج فوق نشان می‌دهد که پساب پس از کلر زنی غیر از اینکه محیط مناسبی برای رشد آرتمیا فراهم می‌نماید باعث حذف تقریباً کامل آلودگی باکتریایی شده و نهایتاً باعث می‌شود که محصولی (بیومس آرتمیا) فاقد بار آلودگی تولید شود. نتایج این بخش از تحقیق نشان داد که در صورت استفاده از چنین بیومسی احتمال انتقال آلودگی باکتریایی به موجودات مصرف کننده (همانند ماهیان آکواریومی) به حداقل می‌رسد.

به طور کلی ماهیان و آزیان دارای بیشترین میزان فراوانی تغییرات در ویژگی‌های مورفولوژیکی درون گروهی و بین جمعیت-هایشان می‌باشند که این تغییرات مربوط به وجود شرایط محیطی متفاوت مانند شوری، دسترسی به منابع مختلف تغذیه‌ای و تفاوت در منشاء تولیدمثل 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 تولید مثل متفاوت می‌باشد (Manaffar, 2012).** تفاوت‌های ریختی (مثل سرعت رشد در حین بلوغ) بین جمعیت‌های مختلف یک گونه می‌تواند به واسطه تفاوت‌های ژنتیکی و انعطاف‌پذیری ریختی تحت تاثیر شرایط محیطی باشد. فاکتورهای محیطی به واسطه انتخاب طبیعی سبب افزایش کارایی یک ریخت در بین افراد یک زیستگاه و در نتیجه جداسازی ریختی جمعیت‌های آن در زیستگاه‌های مختلف می‌گردد (Abdoli, 2000; Adams, 2000; همکاران، 2004؛ Klingenberg, 2011؛ Turan, 2000). بر اساس ویژگی‌های خاص هر منطقه افزایش کارایی یک ژن و انتخاب طبیعی بر اساس 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. بر همین اساس Hontoria و Amat در سال 1992 آرتمیاهای ماده بالغی که متعلق به 25 جمعیت از سرتاسر آمریکا بودند را مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها قادر بودند به وضوح جمعیت‌ها را به 2 گونه تقسیم‌بندی کنند. بر اساس 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.

نتیجه‌گیری و پیشنهاد:

کشور ایران دارای پهنه وسیع و نسبتاً گرم و خشک می‌باشد که می‌تواند برای پرورش آرتمیا مورد استفاده قرار گیرد. بنظر میرسد کمبود آبهای جاری و سالم مهمترین مشکل در تجاری سازی پروژه پرورش انبوه این ایزی 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 کاملاً کاربردی گردد زیرا محصول تولید شده در پساب حتی از نظر رشد 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 بیماری زاست لذا احتمال انتقال بیماری به انسان بسیار ناچیز می‌باشد. لیکن رعایت راه کارهای حفظ و ارتقاء کیفیت و سلامتی آب و محصول تولید شده بایستی مورد توجه قرار گیرد.

تقدیر و تشکر:

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه بابت تأمین مالی این پروژه کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع:

1. جعفری، گ.، 1393. تاثیر تغذیه با پروتئینهای شوک حرارتی مخمر تک سلولی بر میزان رشد و بقاء *A. urmiana* و *A. franciscana* در شرایط استرس. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه ارومیه. 89 صفحه.
2. دفتر نظام فنی اجرایی معاونت برنامه ریزی و نظارت راهبردی رییس جمهور، 1389. ضوابط زیست محیطی استفاده مجدد از آب های برگشتی و پسابها، ص 17-19.
3. قدیمی، س. و مناف فر، ر.، 1393. بررسی امکان پرورش آرتمیا با پساب تصفیه خانه فاضلاب شهر میاندوآب. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی. سفارش شرکت آب و فاضلاب شهری آذربایجان غربی. 118 صفحه.
4. معاونت برنامه ریزی و نظارت راهبردی رییس جمهور، 1389. ضوابط زیست محیطی استفاده مجدد از آب های برگشتی و پسابها. نشریه شماره 535. 155 صفحه.
5. مناف فر، ر.، 1385. مطالعه جامع آرتمیای دریاچه مهارلو. گزارش نهایی طرح مشترک دانشگاه ارومیه و اداره کل شیلات استان فارس. 150 صفحه.
6. Abdoli, A., 2000. The Inland Water Fishes of Iran. Iranian Museum of Nature and Wildlife, Tehran. In Farsi, 378 p.
7. 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.
8. Bose, P.C., 1944. Calcutta sewage and fish culture. *Proceedings of the National Institute of Sciences of India*, Vol. 4, pp: 443-454.

9. **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.
10. **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.
11. **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.*
12. **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.*
13. **Edwards, P. and Pullin, R.S.V., (Eds.) 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.
14. **Gajardo, G.; Abatzopoulos, T.J.; Kappas, I. and Beardmore, J.A., 2002.** Chapter V. Evolution and speciation. In Abatzopoulos, T.J., Beardmore, J.A., Clegg, J.S., Sorgeloos, P. (Eds). *Artemiabase and applied biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. pp: 225-250.
15. **Gijzen, H.J. and Ikramullah M., 1999.** Pre-feasibility of duckweed-based wastewater treatment and resource recovery in Bangladesh. World Bank report. pp: 185.
16. **Haq, AHMR. 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.
17. **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.
18. **Klingenberg, C.P., 2011.** MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*. Vol, 11, pp: 353-357.
19. **Lavens, P. and Sorgeloos, P. (eds). 1996.** Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper No. 361.
20. **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.
21. **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).
22. **Manaffar, R., 2012.** Genetic diversity of *Artemia* populations in Lake Urmia, Iran. PhD thesis, Ghent University, Belgium. 160 p.
23. **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.
24. **Sorgeloos, P.; Lavens, P. and Leger, P., 1997b.** A resource assessment of Urmiah Lake *Artemia* cysts and biomass. Uni of Gent, Belgium-Item B, 110 p.
25. **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* 357, pp: 139-153.
26. **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* 357, pp: 155-163.
27. **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.
28. **WHO., 2006a.** Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater Volume 3: Wastewater and excreta use in aquaculture.
29. **WHO., 2006b.** Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater Volume 4, Excreta and greywater use in agriculture.