

"مقاله پژوهشی"

اثر ازن دهی اولیه بر میزان تخم‌گشایی سیست‌های آرتیمیا (*Artemia franciscana*)

فرهاد محمودی^۱، مهرداد فتح‌اللهی^{۱*}، فردین شالویی^۱، نعمت پیکران مانا^۲

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم زمین، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۹/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۷/۳

چکیده

به منظور بررسی اثر گاز ازن بر تخم‌گشایی سیست‌های آرتیمیا، در این آزمایش با به کارگیری تیمارهایی با میزان ۵، ۱۰، ۱۵، ۳۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر از ازن دمیده شده به ظروف محیط هیچ سیست‌های گونه *Artemia franciscana* که به مدت ۱/۵، ۳، ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه به ترتیب طول کشید، همزمان با یک گروه از سیست‌های ازن دهی شده به صورت خشک به مدت ۱۵ دقیقه و گروه شاهد بدون ازن دهی تفریح شدند. در نتایج به دست آمده تفاوت نهایی میزان تخم‌گشایی آرتیمیاها در گروه‌های تیماری در مقایسه با گروه شاهد (بدون دمیدن ازن)، بعد از ۳۶ ساعت، معنی دار نبود. تحلیل نتایج در اولین آزمایش نشان داد که تیمارهای با دزهای کمتر از ۱۵ میلی گرم ازن در لیتر، موجب کاهش هیچ در ساعت‌های اولیه (در مدت ۲۴ ساعت) نسبت به شاهد ($p < 0.05$) شده‌اند. پس از این کاهش ابتدایی، میزان تفریح این تیمارها تا ساعت ۳۶ جبران گردید و میزان شکوفایی سیست‌های همه گروه‌های تیماری و شاهد یکسان شد ($p > 0.05$). با به کارگیری دزهای کمتر ازن دهی اولیه، با میزان ۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم در لیتر، تیمار ۲/۵ میلی گرم ازن در لیتر، توانست موجب افزایش معنی دار تخم‌گشایی با حدود ۹۳.۵٪ در مقایسه با شاهد (۸۵.۵٪) شود. با توجه به نتایج، ازن دهی با دز پایین، علاوه بر ضدعفونی سیست‌ها، نتایج تفریح بهتری را برای سیست‌های آرتیمیا به دنبال می‌آورد.

کلمات کلیدی: سیست، آرتیمیا، شکوفایی، گاز ازن

مقدمه

غذاهای زنده در پرورش لارو آبزیان علاوه بر تامین نیازهای غذایی جانور، به دلیل تناسب این نوع غذا با رژیم غذایی طبیعی ماهی و عدم ایجاد آلودگی در محل پرورش، مورد ترجیح و اقبال زیادی از پرورش دهندگان قرار دارد (Camara, 2020; Sorgheloos *et al.*, 1993). ارزش غذایی آرتمیا در مرحله ناپلئوس با حداکثر ۶۶ درصد پروتئین و ۱۴ درصد چربی و همچنین کلیه اسیدهای آمینه ضروری و اکثر اسیدهای چرب بسیار بالاست، از این رو آرتمیا عملاً از بهترین غذاهای زنده آبزیان به شمار می‌رود (آق، ۱۳۷۵؛ ۱۳۸۱؛ Agh and Obayes *et al.*, 2020; Sorgheloos, 2005). آرتمیا یک جانور زیست مند کهن در آب شور است که با بروز ناملايمات محیطی و دریافت برخی از سیگنالهای محیطی کشنده و نیز تحریک ضروری ناشی از آن سیگنالها در فصول مورد نیاز، فازهای تشکیل پوشش جنینی در آن آغاز می‌شود (دادگر و حافظیه، ۱۳۹۳) و جانور در مرحله گاسترولا با حدود ۴۰۰۰ سلول در رشد و نمو دچار توقف می‌شود و به حالت سیست وارد می‌شود تا از جمعیت خود در مقابل خشکی و یا شوری نامطلوب رخ داده در زیستگاه، حفاظت نماید (Morris and Afzelius, 1967; Anderson *et al.*, 1970). اولین و مهمترین عامل برای شروع دیاپوز، دریافت محرکهای محیطی لازم برای آن است، و پس از وقوع این تحریکات، دیگر شرایط مطلوب هم نمی‌تواند جنین را وادار به ادامه نمو کند و فرآیند دیاپوز شروع و به انجام خواهد رسید (Chen *et al.*, 2009). بالاترین و مقاومترین حالت در زندگی جانوران در مقابل سختی‌های

محیطی، حالت سیست و مرحله دیاپوز است (Clegg and Trotman, 2002).

شکستن دیاپوز بعد از وقوع خواب جنینی روی می‌دهد و سیستها پس از آن وارد مرحله نمو سریع می‌شوند و برای آغاز این امر باید شرایط محیطی بهینه فراهم گردد. هر جنین متوقف شده در مرحله گاسترولا یعنی سیست آرتمیا برای ادامه ی نمو و شروع فرآیند متابولیسم کامل نیاز به آبکشی اولیه و همزمان وجود کسژن محلول در آب دارد (Gajardo and Beardmore 2012; Dumitrascu, 2011).

طبق نظر محققین شکستن دیاپوز بیشتر یک فرآیند مکانیکی است تا یک فرآیند فیزیولوژیک، زیرا در آزمایش‌ها و مشاهده‌های انجام شده زمان و تقویم رخداد دی-هیدراسیون به عنوان شرط ابتدایی شروع هچ، بر روی میزان هچ تاثیر ندارد؛ آب از دست دادن و آبگیری چند باره برای شکست دیاپوز گاهی ضروری می‌باشد؛ و اینکه تغییرات فیزیولوژیک شدیدی در این خصوص در سیستها مشاهده نشده است (Abatzopoulos *et al.*, 2002). بدیهی است برای این رخداد نیاز به وجود عوامل محیطی بسیار مهمی است که به محض شکستن دیاپوز، نمو سریع و رفتن به مرحله پس از دیاپوز در ظرف ۲۴ ساعت و تولید ناپلئوس و لارو در آرتمیا آغاز می‌شود (زاهدی و همکاران، ۱۳۹۵). به همین علت نحوه پوسته زدایی و روشهای هچ یا تفریح سیستهای آرتمیا برای استحصال ناپلئوس آنها در تغذیه لاروها و پرورش آنها به وسیله محلولهای مختلف شیمیایی مورد تلاش محققین بوده است (فلاحکار و همکاران، ۱۳۹۰؛ پیرعلی خیرآبادی و منصورى، ۱۳۹۵؛ موسوی ندوشن و فرحناک، ۱۳۹۵). در مراحل بعد از هچ، مقاومت مناسب و موفق در مقابل

کاربرد غیرکننده ازن و با غلظت محدود، برای شکستن پیوستگی و استحکام پوسته خارجی سلول‌های بذر به منظور افزایش جوانه زنی و شکستن خواب زیستی در بازه کاری تحریک بذرها در کشاورزی و مرتعداری، از کاربردهایی است که مورد توجه محققان قرار گرفته است (Penfield *et al.*, 2005).

از کاربرد غیر تهاجمی و درمانی ازن شامل خاصیت تحریک‌کنندگی رشد و نمو بیشتر در بازه‌ی درمانی و پزشکی گزارش شده است. Ekta و Elvis در سال ۲۰۱۱ در یک مرور کلی، اثرات درمانی ازن و استفاده در پزشکی با رعایت تنظیم دز دقیق آن را مرور کرده‌اند. استفاده از گاز ازن به شیوه غیرتنفسی، برای درمان‌های دندانپزشکی، کاهش کلسترول و انگیزش و تحریک به پاسخ‌های اکسیداتیو، اکسیژن‌سازی در ماهیچه‌های در حال استراحت و درمان هایپوکسی بافتها (بی‌اکسیژنی) به کار رفته است. براساس همین گزارش انگیزش (ایجاد تحریک) در متابولیسم اکسیژنی (Stimulation of oxygen metabolism) از سوی ازن برای افزایش گلبولهای قرمز خون، که منجر به افزایش میزان ۲ و ۳ دی فسفوگلیسرات در بافتها شده و در نتیجه افزایش اکسیژن‌رسانی به بافت صورت پذیرد، موثر بوده است. ازن چرخه کربس را فعال کرده و این ساز و کار با افزایش اکسیداتیو کربوکسیلاسیون پیرووات و تحریک تولید ATP صورت می‌گیرد. این روند همچنین باعث کاهش معنی‌دار NADH و کمک به روند اکسیداسیون در سیتوکروم C در سلولها می‌شود. به کارگرفتن ازن، تولید آنزیم‌های گلوتامین پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دسموتاز را که به‌عنوان اسکاونجر یا خورنده رادیکال‌های آزاد مضر و محافظان دیواره سلولی هستند، تحریک می‌کند.

مشکل شوری و تنظیم اسمزی با ایجاد یک همی لطف با ساختار و ترکیبی کاملاً پایین تر و کم غلظت تر از محیط شور اطراف لاروهای به دنیا آمده با جذب آب و کاهش نمک‌ها از بدن به محیطی با گرادیان بالاتر صورت می‌گیرد که سیستم‌های پمپ سدیم و پتاسیمی نقشی بسزا در این فرآیند دارند (Clegg and Trotman, 2002). همچنین با توجه به پایین آمدن میزان اکسیژن محلول در آبهای شور نیز این مشکل با بالا رفتن کارایی ناپلئوس و لاروها در تبادل اکسیژن از محیط و نیز در بدن به خوبی صورت می‌گیرد (Clegg and Trotman, 2002; Conte, 1984; Dwivedi *et al.*, 1987).

گاز ازن با نسبت طبیعی ۰/۰۱ تا ۰/۰۴ قسمت در میلیون در هوای آزاد دارای خاصیت اکسیدکنندگی قوی و نیز ضد عفونی‌کنندگی است که قدرت طبیعی غیرفعال سازی مواد فعال اکسیدکننده و ارگانسیم‌ها را در محیط دارد (Wen, 2001; Bruice *et al.*, 2020). مدت ماندگاری گاز ازن در آب نیز ۱۰ تا ۱۵ دقیقه است.

پرورش دهندگان با وجود کاربرد موثر ازن برای ضد عفونی کردن آب اذعان می‌دارند که ازن یک کشنده به تمام معنا است و با کاربرد آن در صورتی که کاملاً از آب خارج نشود، تلفات بالایی میان لاروهای ماهیان رخ می‌دهد. پژوهش در خصوص تاثیرات متفاوت کشنده و یا غیرکشنده ازن، نشان داده است که در هنگام در معرض قرارگرفتن باکتری‌ها به ازن با غلظت پایین، این تماس باعث می‌شود تا همه باکتری‌ها به‌طور کامل از بین نروند و ازن تنها با از بین بردن دیواره باکتری‌ها، با دز مناسب به عاملی کشنده برای آنها تبدیل می‌گردد (Thanomsab *et al.*, 2002).

تا با قرار دادن نتایج درصد تفریح تیمارها در کنار شاهد (بدون ازن دهی)، نشانه های صدمه یا عدم صدمه به سیستمهای آرتمیا (و آثار میکروسکوپی احتمالی بر پوسته و بافت) مشخص شود. برای تیمارهای دیگر در آزمایش اول، سیستمها به مدت ۹۰ دقیقه آبکشی (هیدراته) شدند. بعد از آنگیری اولیه در آزمایش اول با به کارگیری تیمارهای پنجگانه میزان ۵، ۱۰، ۱۵، ۳۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر ازن در محیط سیستمهای آبکشی شده، با مدت ۱/۵، ۳، ۴/۵، ۱۱ و ۱۵ دقیقه دمیدن ازن (به ترتیب) اعمال شد، میزان و درصد تخم گشایی سیستمهای آرتمیای تیمارها با گروه شاهد (بدون ازن دهی) مقایسه شد. آزمایش اول در یک طرح آزمایش کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و سه تکرار ازن دهی شده در پایان آبکشی اولیه و یک شاهد بدون ازن دهی و یک گروه شاهد منفی (ازن دهی سیست خشک به مدت گفته شده) در آزمایشگاه اکولوژی آبریان دانشگاه شهرکرد انجام پذیرفت. هدف از به کارگیری تیمارها در کل آزمایش، مشاهده میزان هچ در تیمارها نسبت به شاهد و مشاهده تلفات یا عدم تلفات در اثر ازن دهی، و سرانجام رسیدن به بهترین دز پیشنهادی برای به کارگیری جهت رسیدن به بیشترین شکوفایی در سیستمها (ناشی از فرض اثر مطلوب غیرکشنده ازن بر سیستمها در هچ) بوده است. پس از گذشت ۱۲، ۱۵، ۱۸، ۲۴ و ۳۶ ساعت از شروع انکوباسیون، از هر تکرار در هر تیمار، سه میلی لیتر برداشت نمونه جهت شمارش و تعیین میزان هچ صورت گرفت (با ۳ تکرار در قرائت). تعداد سیستمهای تفریح نشده، سیستمها در حالت چتری و همچنین ناپلیوس های به دنیا آمده در این نمونه ها شمارش شدند و درصد تفریح هر تیمار محاسبه و برآورد شد. نمونه های تیمار سیستمهای خشک در

تحریک تولید بیشتر پروتاسیکلین (نوعی پروستوگلاندین)، که یک واسودیلاتور (کاهنده فشار خون) است، نیز توسط مولکولهای ازن تاثیر می پذیرد (Komanapalli and Lau, 1996).

این مجموعه از فرآیندها نشان از خاصیت تحریک کنندگی ازن برای افزایش فعالیت های زیستی درون و برون سلولی در انسان دارد که شاید تاکنون از دید محققان حوزه آبریان دور مانده است. در خصوص استفاده از ازن برای بررسی تاثیر آن در شکوفایی و هچ سیست آرتمیا گزارش و منابع ویژه ای یافت نشده است که شاید این امر مربوط به فرض اولیه خطر و اثر کشنده ازن بر لاروهای آبریان بوده و هدف استفاده شیلاتی ازن تنها برای ایجاد کشنده گی بر میکروارگانیسم ها و بازدارندگی از بروز بیماری ها بوده است. در این تحقیق با فرض اینکه یک دوز بی خطر ازن در محیط زیست سیستمهای آرتمیا، موجب تحریک سیستمهای در حال هچ شده و یا اینکه شکافتی ایمن در غشای جنین را فراهم می نماید، تاثیر احتمالی آن در میزان هچ سیستمهای آرتمیا بررسی شده است.

مواد و روش ها

در آزمایش اول در یک تیمار، سیست های آرتمیا به صورت خشک در مقابل ازن دمیده شده قرار گرفتند. سیستمهای خشک آرتمیا فرانسیسکانا، ایران آرتمیا، ایران، تهران. نرخ هچ ۸۵٪، ۲۰۰۰ لوکس) به مدت ۱۵ دقیقه ازن دهی شدند (با یک ازن ساز با دبی ۲۰۰ میلی گرم در ساعت ازن دهی) و سپس این سیستمها با روش معمول بعد از آبکشی ۹۰ دقیقه ای، در انکوباسیون همراه با تیمارهای دیگر (یعنی تیمارهایی که در انتهای آبکشی اولیه مورد دمیدن ازن قرار گرفتند) تفریح شدند

معرض ازن در هوا به مدت ۱۵ دقیقه، به صورت جداگانه از نظر شکستگی و آسیب بافتی احتمالی بعد از تثبیت در فرمالین و برای مشاهده و ثبت تصویر، نگهداری شدند تا در صورت مشاهده پدیده های رخ داده احتمالی، نوع آسیبهای غیر معمول گزارش شوند. با مشخص شدن نتایج اولین آزمایش، آزمایش دوم برای مشاهده اثر زیستی ازن محدودتر و کم دز در انکوباسیون سیستمهای آرتیمیا، و با توانایی احتمالی ازن در تحریک و افزایش فعالیت زیستی جنین داخل سیستم در فرآیند هیچ انجام شد. با توجه به نتیجه مشاهده شده در آزمایش نخست و مشاهده تاخیر در روند هیچ ناشی از دزهای پایین‌تر (کاهش میزان نمو و رشد جنین)، سه تیمار با غلظت پایین از ازن در زمان های ۳، ۱/۵، ۴۵ ثانیه دمیدن یعنی حل شدن ۱۰، ۵ و ۲/۵ میلی گرم ازن در آب به ترتیب در شروع هیچ به عنوان تیمارهای مناسب برای بیشترین تحریک کنندگی و افزایش هیچ احتمالی در آزمایش دوم برآورد و در نظر گرفته شدند. پس از اعمال این دزهای ازن به آب انکوباتورها بعد از آبکشی سیستمها (نیم ساعت آبکشی اولیه)، و مشابه شرایط آزمایش اول درصد تفریح سیستمها در زمان ۸ و ۲۴ ساعت (زمان مورد علاقه پرورش دهندگان ماهیان زینتی) از انکوباسیون آزمایشی محاسبه شد.

سیستم انکوباسیون و برآورد تخم‌گشایی سیستم‌ها

یک آکواریوم شیشه‌ای با حجم ۱۳۰ لیتر جهت استقرار ۲۵ انکوباتور ۱/۵ لیتری در کنار هم در نظر گرفته شد (حجم آب محیط کشت ۱ لیتر در نظر گرفته شد). جهت هم‌دما کردن آب اولیه انکوباتورها و

رساندن دمای آنها به ۲۷ درجه سانتی‌گراد از بخاری ترموستات‌دار استفاده شد و در اتاق آزمایشگاه حرارت مناسب از بخاری گازسوز معمولی نیز تامین می‌شد. برای تخم‌گشایی سیستم‌ها در انکوباتورها از سنگ نمک (بدون ید) استفاده و داخل هر انکوباتور ۱ لیتر آب شور ppt ۲۵ با pH= ۸/۵-۹ ریخته شد. تنظیم pH با اضافه کردن سودسوز آور ۴۰ درصد انجام گرفت (عملاً این افزودن با قطره چکان صورت پذیرفت) و لوله‌های هوادهی برای هر انکوباتور به صورت جداگانه تعبیه گردیدند. لوله‌های هوادهی در هر انکوباتور به صورتی قرار گرفتند که سنگ هوا در کف انکوباتورها قرار گیرد تا هوادهی به صورت کامل از کف انجام و گردش کامل سیستمها در درون انکوباتورها صورت پذیرد. کلیه انکوباتورها تحت نور ۲۰۰۰ لوکس قرار گرفتند و از ورود سایر نورهای محیطی به محل آزمایش ممانعت به عمل آمد (پیرعلی خیرآبادی و منصورى، ۱۳۹۵؛ Agh and Sorgeloos, 2005). انجام هوادهی برای شروع هیچ بلافاصله بعد از دمیدن ازن های تیمار با در نظر گرفتن مدت آن شروع شد.

از هر انکوباتور ۳ نمونه ۳ میلی‌لیتری برداشت و برای تثبیت و شمارش آنها از فرمالین ۴ درصد استفاده شد. جهت تعیین درصد تخم‌گشایی، تعداد ناپلیوس (N)، تعداد سیستم‌هایی که در مرحله چتری قرار داشتند (U) و تعداد سیستم‌های تخم‌گشایی نشده (E) به صورت جداگانه در لام بوگارف مورد شمارش قرار گرفتند. برای ارزیابی درصد هیچ (H%) برای هر تیمار، از فرمول $H = \frac{N+U}{N+U+E} \times 100$ استفاده شد (پیرعلی خیرآبادی و منصورى، ۱۳۹۵؛ موسوی ندوشن و فرحناک، ۱۳۹۵).

تجزیه و تحلیل های آماری

برای تحلیل نتایج مربوط به تاثیر معنی دار تیمارهای آزمایش و نیز تغییرات در میانگین تفریح سیستمها از نرم افزار SPSS ver. 20 و آزمون ANOVA و از نرم افزار اکسل ۲۰۱۹ برای رسم و تحلیل نمودارهای نتایج آزمایش استفاده شد.

نتایج

نتایج مقایسه میزان هیچ سیستمهایی که در انکوباسیون، بعد از زمان هیدراتاسیون به میزان ۵، ۱۰، ۱۵، ۳۵ و ۵۰ میلی گرم در لیتر ازن به عنوان تیمارهای آزمایش دریافت کرده بودند با دو گروه دیگر شامل گروه شاهد (آب ازن دهی نشده) و گروهی که سیستمها به مدت ۱۵ دقیقه به صورت خشک ازن دهی شدند (شاهد منفی)، به صورت درصد هیچ در جدول ۱ ارائه شده است.

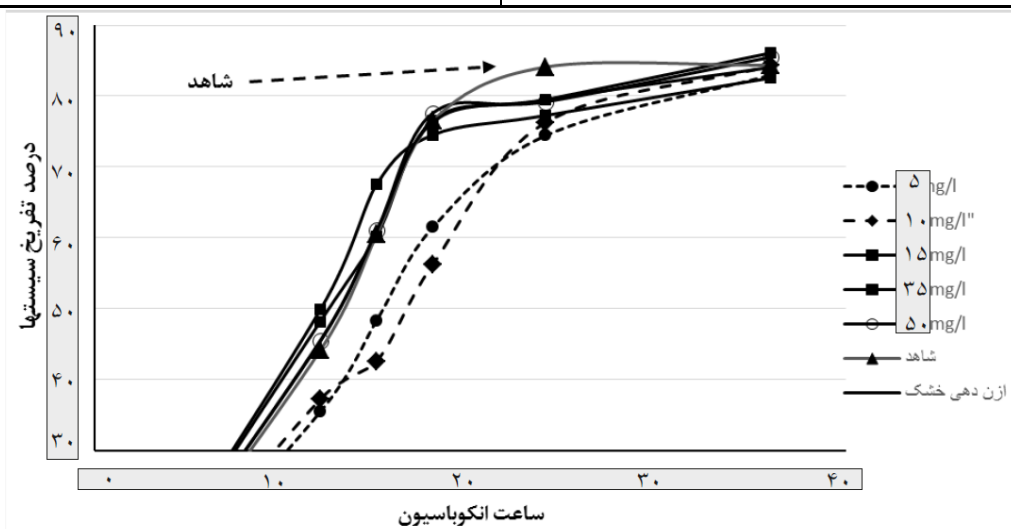
انجام آزمون آماری هیچگونه اختلاف معنی داری بین گروههای آزمایشی و شاهد از نظر درصد تفریح سیستمها را بعد از ۳۶ ساعت دوره کامل انکوباسیون نشان نداد ($p > 0.05$). میزان هیچ تضمین شده کارخانه برای بسته بندی آرمیا ۸۵ درصد بود که با توجه به میزان میانگین گروههای تیماری، همه ی تیمارها به میزانی از هیچ رسیدند که با هیچ تضمینی کارخانه نیز تفاوت معنی داری نداشته اند ($p > 0.05$). با توجه به نتایج جدول ۱، در همه تیمارهای آزمایشی بعد از ۳۶ ساعت اتمام دوره انکوباسیون، میزان تفریح سیستمها با شاهد برابر و از سویی درصد تفریح سیستمها در گروه

ها و شاهد از ۸۵ درصد (تضمین استاندارد کارخانه) نیز بالاتر نرفته است.

در قبل از اتمام دوره انکوباسیون یعنی در مدت ۲۴ ساعت از ۳۶ ساعت کل زمان انکوباسیون میزان هیچ شاهد به حدود ۸۴ درصد رسید و در همین مدت از فرآیند انکوباسیون، میزان هیچ سیستمها در سه گروه تیماری ۵، ۱۰ و ۱۵ میلی گرم در لیتر ازن دهی نسبت به شاهد به طور معنی داری کمتر بوده اند ($p < 0.05$). در تیمارهای آزمایشی با دزهای کمتر از ۱۵ میلی گرم به این ترتیب ازن دهی باعث کاهش اولیه (در مدت ۲۴ ساعت از ۳۶ ساعت فرایند انکوباسیون) سرعت تفریح در سیستمها شد، ولی میزان تفریح در زمان نهایی و اتمام دوره انکوباسیون یعنی ۳۶ ساعت در هیچ گروهی نسبت به هم، نسبت به شاهد و تضمین کارخانه کاهش نداشته است. نتایج جدول یک در ساعتهای ۱۲، ۱۸ و ۲۴ انکوباسیون و مشاهده روند میزان هیچ در نمودار شکل ۱ در تیمارهایی که میزان ازن دهی به آب نسبت به سایر تیمارها کمتر بوده است (سه تیمار ۱۵، ۱۰ و ۵ میلی گرم ازن در لیتر به ترتیب با مدت ۴/۵، ۳ و ۱/۵ دقیقه ازن دهی)، کاملاً بازگوگر روند تفریح کمتر سیستمها بوده و تاثیر ازن دهی قابل مشاهده است. سیستمهایی که به صورت خشک تحت تأثیر ازن قرار داده شدند نیز از نظر میزان تفریح با تیمار شاهد تفاوتی نداشتند، و فرض کشته شدن سیستمها در مقابل دمیدن ازن با توجه به میزان هیچ در همه ی تیمارها و نیز شاهد منتفی است.

جدول ۱: میانگین درصد تفریخ (\pm SE) در تیمارهای آزمایشی (میزان ازن به کار گرفته شده) در زمان‌های مختلف انکوباسیون

تیمار (mg/lit)	زمان تفریخ (ساعت)	میانگین (%)	\pm SE	تیمار (mg/lit)	زمان تفریخ (ساعت)	میانگین (%)	\pm SE
شاهد (۰)	۱۲	۴۴/۱	۰/۹۸	۵۰	۱۲	۴۵/۴	۵/۶۰
	۱۵	۶۰/۴	۲/۲۷		۱۵	۶۱	۳/۱۰
	۱۸	۷۶/۵	۰/۶۹		۱۸	۷۶/۴	۱/۷۰
	۲۴	۸۴/۱	۰/۳۶		۲۴	۷۹/۵	۰/۹۰
	۳۶	۸۴/۴	۰/۸۷		۳۶	۸۴/۱	۱/۱۰
سیست خشک ازن دهی شده ۵۰	۱۲	۴۸/۲	۱/۵۰	۵۰	۱۲	۴۵/۵	۰/۰۳
	۱۵	۶۰/۲	۲/۱۰		۱۵	۸۴/۳	۱/۰۱
	۱۸	۷۶/۶	۰/۹۵		۱۸	۶۱/۵	۰/۷۵
	۲۴	۷۹/۵	۱/۳۰		۲۴	۷۴/۴	۰/۹۰
	۳۶	۸۶/۱	۱/۲۰		۳۶	۸۲/۹	۰/۷
تضمین کارخانه %/۸۵	۱۲	۴۵/۵	۱/۸۰	۱۰	۱۲	۳۷/۲	۱/۱۰
	۱۵	۶۱/۰	۰/۶۳		۱۵	۴۲/۶	۱/۱۰
	۱۸	۷۷/۶	۱/۲۰		۱۸	۵۶/۳	۱/۶۰
	۲۴	۷۹/۲	۱/۳۰		۲۴	۷۶/۳	۰/۷۰
	۳۶	۸۵/۵	۰/۶		۳۶	۴۸/۳	۱/۹۰



شکل ۱: میزان و روند تفریخ سیست‌ها از شروع آزمایش تا پایان تفریخ (انکوباسیون ۳۶ ساعته) در تیمارهای مختلف ازن دهی بر حسب میلی گرم ازن در ساعت (درصد هچ بر ساعت)

۲/۵ میلی گرم در لیتر نسبت به سایر گروه‌ها بالاتر بوده است ($p < 0.05$). (جدول ۲).

بحث

توانایی یک موجود برای ایجاد یک حالت زیستی نهفته (cryptobiotic) در طول زندگی، ساز و کاری مهم برای زنده ماندن در بین جمعیت‌های ساکن بیوتیپ‌ها با شرایط نامساعد محیطی است که بقای افراد جمعیت را تضمین می‌کند (Saygi, 2003). آرتمیا به‌عنوان نماینده چنین گروهی از آبزیان در طول دوره‌های قبل از خشک شدن یا دمای شدید و شوری آب زیستگاه، از طریق ایجاد دیپوز در وضعیت جنینی، بقای خود را سالها در مقابل نابودی تضمین می‌کند و منشأ جمعیتی جدیدی در مکان و زمانی می‌شود که پارامترهای زیستی و غیرزیستی زیستگاه دوباره مطلوب می‌گردد (Saekil Yun *et al.*, 2020; Hazael *et al.*, 2019; Lavens *et al.*, 1986). بعد از شکسته شدن خواب سیستمها و به دنیا آمدن ناپلی‌ها در زیستگاه، فرآیندهای ویژه سازگاری و تنظیم اسمزی برای زیستن آغاز می‌گردد (Croghan, 1958 a,b).

در این مطالعه تلاش شد که اثر ازن دهی اولیه بعد از آبکشی اولیه، بر روی تفریخ سیستم‌های آرتمیا بررسی گردد. نتایج مطالعه نشان داد میزان هیچ سیستم‌های در معرض ازن دهی اولیه، حتی در دوزهایی بالا از غلظت ازن که در اثر دمیدن با توان ۳۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر حاصل از ۱۰ و ۱۵ دقیقه دمیدن در محیط ایجاد شد، با شاهد تفاوتی معنی‌دار نداشته‌اند و به‌طور کلی آب ازن‌دهی شده باعث کاهش درصد تفریخ سیستم‌ها و همچنین بروز مرگ‌ومیر ناشی از مرگ جنین در داخل سیستم‌ها نشده است. دمیدن ازن

در نتایج آزمایش دوم که با اعمال دوزهای کمتر از ۱۵ میلی‌گرم در لیتر که در کاهش ابتدایی تفریخ در آزمایش نخست نقش داشتند، انجام شد، در مدت ۸ و ۲۴ ساعت انکوباسیون (زمان مورد علاقه پرورش دهندگان ماهیان زینتی)، نتایج این سه تیمار از دمیدن ازن ملایم در شروع هیچ، در مدت ۳، ۱/۵ دقیقه و ۴۵ ثانیه یعنی حل شدن ۱۰، ۵ و ۲/۵ میلی‌گرم ازن در آب در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲: میانگین درصد تفریخ (\pm SE) سیستم‌های آرتمیا با تیمارهای آزمایشی با دز پایین ازن در زمان‌های ۸ تا ۲۴ ساعت انکوباسیون

زمان تفریخ (ساعت)	تیمار mg.l ⁻¹	میانگین (%)	خطای معیار (SE)
۸	شاهد	۴۱/۵ ^{ns}	۱/۸
	۲/۵	۳۹/۵ ^{ns}	۲/۲
	۵	۳۷/۴ ^{ns}	۱/۴
	۱۰	۴۲/۷ ^{ns}	۲/۱
۲۴	شاهد	۸۰/۹ ^a	۱/۱
	۲/۵	۹۳/۷ ^b	۰/۹
	۵	۸۵/۳ ^a	۱/۷
	۱۰	۸۰/۷ ^a	۱/۱

حروف انگلیسی نشان دهنده معنی داری تفاوت بین میانگین تیمارها می‌باشد

بر اساس داده‌های این جدول میزان تفریخ سیستم‌ها در زمان ۲۴ ساعت، تیماری که آب سیستم‌های هیدراته شده در آن با ۲/۵ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۴۵ ثانیه ازن‌دهی شده بود، میزان تفریخ به بالاتر از استاندارد کارخانه (۸۵٪) یعنی 93.7 ± 0.9 ٪ رسیده است. نتایج حاصل از بررسی مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون ANOVA و نیز نتایج آزمون دانکن حاکی از آن است که کارایی میزان هیچ در تیمار ازن‌دهی شده به میزان

علاوه بر عوامل تاخیر و سرکوب فرآیند تخم‌گشایی که به آن اشاره شد، وجود عوامل محیطی تسریع‌کننده رشد (مثلاً کاهش زمان اولین لارو به دنیا آمده) در جنین آبزیان نیز می‌تواند باعث کاهش موفقیت هیچ و نیز ماندگاری لاروها در هنگام به دنیا آمدن و بعد از به دنیا آمدن لاروها گردد. برای نمونه در آزمایش انجام شده بر روی کفشک آلاسکا *Lepidopsetta polyxystra* نتایج نشان داد که درجه حرارت بالاتر به عنوان یک عامل شناخته شده در تسریع رشد و زودتر انجام شدن فرآیند هیچ در آبزیان، باعث کوچک ماندن سائز لاروهای به دنیا آمده و کاهش نرخ تفریخ، در عین حال بزرگ تر بودن کیسه زرده لاروهای به دنیا آمده شده است، که افزایش فعالیت زیستی لاروها و جنین در اثر عامل خارجی دما در چنین آزمایشی، همزمان با افزایش سرعت نمو، باعث بروز پدیده‌هایی همچون گرسنگی در لاروهای به دنیا آمده و در نتیجه افزایش نیاز به انرژی و سرانجام تلفات ناشی از آن می‌گردد (Laurel and Blood, 2011).

در تحقیق جاری، طی ساعتهای اولیه هیچ تا ۲۴ ساعت از ۳۶ ساعت کل (با توجه به ثبت گام به گام درصد هیچ - جدول ۱) نرخ هیچ در تیمارهای ازن‌دهی شده زیر ۱۵ میلی گرم در لیتر از شاهد عقب مانده است و نوعی مهار اولیه در تخم‌گشایی جنین داخل سیستم رخ داده است، ولی در پایان دوره کامل هیچ ۳۶ ساعته، میزان تفریخ تیمارها در همه تیمارهای آزمایشی از دزهای کم تا شدیدتر از ازن‌دهی، به همان میزان مشخص از حد اعلام شده توسط تولیدکننده محصول (۸۵٪) رسیده است و اختلاف میان تیمارها با شاهد معنی دار نبوده است. این نتیجه نشان می‌دهد که

به سیستمها در محیط بدون آب و خشک با میزان ۵۰ میلی گرم ازن (به مدت ۱۵ دقیقه) نیز تاثیر منفی بر زنده مانی آنها در هیچ نسبت به شاهد نداشته و خطر از بین رفتن سیستمها با ازن تا حدود زیادی منتفی است. به نظر می‌رسد پوسته‌ی این سیستمها در مقابل ازن با غلظت زیاد، همچون ناملايمات دیگر محیط زیست مانند خشکی، شوری و اشعه ماوراء بنفش مقاوم می‌باشند (Mat Taib et al., 2020). اگرچه مطالعه‌ای در زمینه تفریخ سیستم آرتمیا با استفاده از ازن در منابع مشاهده نشد، مطالعات مشابه در زمینه استفاده از ازن برای تفریخ تخم ماهی‌ها نشان می‌دهد در تحقیقات انجام شده، در بسیاری از موارد، افزایش مرگ‌ومیر در تفریخ آبزیان، ناشی از مرگ جنین‌های تخم‌گشایی نشده یعنی تاثیر ازن بر پوسته تخم، روی داده است. در مطالعه‌ای که روی تخم‌های ماهی هالیبوت (*Hippoglossus hippoglossus*) انجام شده است بالاترین میزان مرگ‌ومیر در تخم‌هایی مشاهده شده است که با تنها ۴ میلی‌گرم در لیتر ازن به مدت ۱ دقیقه تحت تاثیر قرار گرفته بودند (Grotmol and Totland, 2000). مطالعات نشان داده است که اثرات منفی قرار گرفتن در معرض ازن بر تخم‌گشایی ممکن است ناشی از ایجاد تغییر پلیمر پروتئینی پوسته به وسیله عملکرد اکسیدان‌ها باشد که جنین را نسبت به آنزیم‌ها برای انجام تخم‌گشایی مقاوم تر و امتناع گر می‌سازد و از سوی دیگر، ترشح آنزیم از سلولهای تخم‌گشای جنین در این مرحله احتمالاً در داخل جنین مهار می‌شود و روند تخم‌گشایی با کمک آنزیم‌ها با موفقیت همراه نمی‌گردد (Hall and Sobsey, 1981; Arimoto et al., 1996; Grotmol et al., 2003).

از ندهی آب بعد از زمان هیدراتاسیون اولیه باعث کاهش نهایی میزان تفریح سیستمها و اختلال در گشایش پوسته در مدت نهایت فرآیند انکوباسیون (۳۶ ساعت)، به عنوان یک تاثیر سوء نگشته است ولی اعمال دوزهای ازن در تیمارهای زیر ۱۵ میلی گرم در لیتر باعث شده کندی نمو و رشد جنین تا ساعت ۲۴ از کل ۳۶ ساعت انکوباسیون مشاهده شود (روند و نرخ هیچ گروههای مختلف تیماری در نمودار شکل یک را ملاحظه فرمایید). این نتایج معیاری برای انتخاب دزهای زیر ۱۵ میلی گرم در لیتر، برای مشاهده نتایج تاثیر زیستی ازن بر میزان هیچ احتمالی در آزمایش بعدی شد. در مطالعه Totland و Grotmol (۲۰۰۰) عنوان شده است تیمارهای تخمهای چشمزده قزل آلا که در معرض ازن قرار گرفتند، با پدیده تأخیر در تخم گشایی یا عدم تخم گشایی و تلفات مواجه می شوند. در این مطالعه تخمهای قزل آلا که در دزهای بالاتر دچار تلفات و کاهش هیچ شده بودند، در معرض پایین ترین مقدار ازن (۴ میلی گرم در لیتر به مدت یک دقیقه)، رخداد تخم گشایی اولیه غیرهم زمان و با تأخیر را نشان دادند که بعد از ۲ روز روند تخم گشایی تجمعی به حالت عادی رسیده است. در تخم گشایی آرتمی در آزمایش جاری نیز در نهایت ۳۶ ساعت، نرخ تجمعی تخم گشایی در همه گروههای تیماری و شاهد یکسان شد.

با تاثیر مهاری ابتدایی بر تخم گشایی سیستمها در دزهای زیر ۱۵ میلی گرم در لیتر احتمال بروز اثر ازن در نرخ شکوفایی سیستمها قابل مشاهده و ملموس تر در نظر گرفته شد. در آزمایش دوم، سیستمهای تحت تاثیر تیمارهای ۱۰، ۵ و ۲/۵ میلی گرم در لیتر ازن با مدت های ۳ و ۱/۵ دقیقه و ۴۵ ثانیه، با تیمار ۲/۵ میلی گرم در لیتر

از ن دادن اولیه به سیستمهای آبکشیده، بیشترین میزان درصد تفریح نسبت به شاهد و میزان تضمین کارخانه بروز نمود. این میزان هیچ نسبت به میزان تضمینی هیچ برای مشتریان توسط تولیدکننده (۸۵٪) و شاهد آزمایش به طور معنی داری بیش تر شده است. میزان هیچ در زمان ازن دهی با یک و نیم دقیقه، بعد از تیمار ۴۵ ثانیه ای، نیز از شاهد بیشتر بوده است ولی این اختلاف با شاهد و نیز میزان تضمین کارخانه معنی دار نبوده است.

طبق نظر محققین شکستن دیابوز فرآیندی مکانیکی است تا یک فرایند فیزیولوژیک، و تاثیر نخست عوامل شکستن دیابوز به صورت فیزیکی است، زیرا زمان و تاریخ رخداد دی-هیدراسیون سیستم (فصل و تاثیرات آن) بر میزان نرخ تخم گشایی و تفریح سیستمها تاثیری ندارد؛ آب از دست دادن و آبرگیری چند باره برای شکست دیابوز گاهی ضروری است؛ و اینکه مشاهدات، تغییرات فیزیولوژیک شدید در این خصوص را در سیستمها و ناپلئوس ها نشان نداده اند (Abatzopoulos *et al.*, 2002). بدیهی است برای این رخداد نیاز به وجود عوامل محیطی بسیار مهمی است که به محض شکستن دیابوز، نمو سریع و رفتن به مرحله پس از دیابوز در ظرف ۲۴ ساعت و تولید ناپلئوس و لارو در آرتمی آغاز شود. عدم تاثیر دزهای فزاینده ازن بر پوسته سیستمها، عدم صدمات مکانیکی بر آن و در نتیجه بر میزان تفریح به دلیل مقاومت زیاد پوسته ها به عوامل خارجی محیطی است.

بر اساس نظر Benoit و Matlin (۱۹۶۶) تحمل متفاوت تخمها و لاروهای ماهی و آبزیان در تلفات یا زنده مانی را می توان با میزان سرعت واکنش ازن با غشای تخم ماهیان و نه با نفوذ یا عدم نفوذ به سلولهای

بالای کوریون، ممکن است همان دوز بی‌تأثیر بوده و منجر به کاهش درصد تفریخ نیز شود (Mat Taib *et al.*, 2020; Treece 2000).

با وجود آنچه در فوق به آن اشاره شد برخی از محققان معتقدند که در پدیده‌ی شکستن خواب و دیپوز، خروج جنین از پوسته تخم و نیز پدیده‌ی تأثیر کشنده ازن بر باکتری‌ها با تأثیر مکانیکی بر لایه خارجی و میزان دز و مدت آن ایجاد می‌گردد. در حالیکه آزمایش جاری نتایج نشان داد که با وجود اعمال دز بالای ۵۰ میلی‌گرم بر سیستم‌های خشک، و عدم تغییر میزان تفریخ در همه‌ی گروه‌های تیماری در پایان دوره هیچ تأثیر مکانیکی مانند شکستن لایه خارجی و منجر به تلفات از سوی ازن مشاهده نشده ولی از سوی دیگر تأثیر ازن با دز پایین بر جنین موجب کاهش نمو در ساعات اولیه هیچ در آزمایش اول شده است. از آنجاکه فرایند شروع هیچ با در معرض آب قرار گرفتن سیستمها (فشار اسمزی) و با میزان اکسیژن مناسب محلول در آب اتفاق می‌افتد، می‌توان عوامل موثر بر ترکیبات و نیز میزان اکسیژن محلول را در انگیزش سلولها به نمو زودتر علاوه بر آنچه به صورت مکانیکی برگشایش پوسته سیستمها کارگر باشد، محتمل دانست. شدت کم ازن به عنوان یک مولکول مهاجم و فعال برخلاف آنچه ازن با شدت زیاد بر روی سلولها ایجاد می‌کند ماهیتی غیرکشنده دارد که در مقدمه به کاربردهای درمانی دوزهای محدود و کنترل شده اشاره شد.

خروج از حالت‌های خواب و دیپوز علاوه بر جانوران، در سلولهای سلسه گیاهان هم از نظر تأثیر بر پوسته یا جنین بذر مورد توجه و تحقیق پژوهشگران بوده است. Sudhakar و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای

جنینی در معرض ازن مرتبط دانست. در این خصوص McNair Scott و Leshner (۱۹۶۳) نیز معتقدند که ازن در باکتری‌ها نیز، محتوای خود سلول باکتریایی را به دام نمی‌اندازد، اما بر روی غشا و دیواره سلولی عمل نموده تا باعث لیز یا تجزیه بافتی آن شود. Asbury و Coler (۱۹۹۰) اعلام کردند که میزان تحمل ازن توسط تخم‌های ماهی که در معرض ازن قرار می‌گیرند، کوتاه بوده که این امر عمدتاً بر خواص مرتبط با غشا، از جمله وجود یا عدم وجود ماتریس ژلاتینی خارجی است (بسته به گونه) که در مقابل آن مقاومت می‌کند و ویژگی‌های جنین درون آن در این تأثیر نقش چندانی ندارد. با توجه به این نظریات، باید گفت که مقاومت سیستمهای سخت و غیر قابل نفوذ آرتمیا و عدم تأثیر ازن بر زنده مانی آنها در تحقیق ارائه شده در نتیجه وجود لایه خارجی مقاوم در سیستمهاست. تفاوت در تحمل و پاسخ به تیمارها در آزمایشها ممکن است ژنتیکی (خصوصیت نژاد) یا به دلیل ماهیت فاکتورهای زیست‌محیطی باشد. بررسی‌های بیش‌تر در مورد ساختار سیستم در تمام گونه‌های آرتمیا بیان‌گر این واقعیت است که اگرچه ساختار سیستم در تمام گونه‌های آرتمیا یکسان است، ولی این سیستمها در جزئیات دارای اختلافاتی هستند که از آن جمله می‌توان به تفاوت ضخامت لایه کوریون در آن‌ها اشاره کرد. نوع و درصد ماده به کار رفته برای رفع کوریون سیستمها در پوسته زدایی برای افزایش و کاهش مدت هیچ، می‌تواند باتوجه به ضخامت کوریون سیستم نیز متفاوت باشد و حتی استفاده از غلظت استاندارد توصیه شده در سیستم‌هایی که دارای ضخامت کم‌تر هستند، گاهی می‌تواند باعث صدمه به جنین و در نهایت افت درصد تفریخ شود. برعکس درمورد سیستم‌هایی با ضخامت

از ازن برای از بین بردن خواب بذر گیاه گوجه فرنگی استفاده کردند. آنها معتقدند که به طور کلی واکنش O_3 بر روی سطح بذرها از طریق یک نوع تبادل جامد-گازی صورت می‌گیرد و به دنبال آن انتشار درون ساختار سلولی بذر انجام می‌شود. در این بین تداخلات احتمالی ROS (Reactive Oxygen Species) و هورمون‌های گیاهی، ارتباط بین H_2O_2 و ABA (آبسزیک اسید یک هورمون موثر در عدم جوانه زنی) محتمل در نظر گرفته شده است. این فرضیه نشان می‌دهد که ROS، به عنوان عواملی که در سلولها و بافتهای جانوری نیز عملکردی بسیار فعال دارند، با هورمون‌ها و به ویژه آبسزیک اسید نقش مهمی را در محو خواب و تکمیل جوانه زنی ایفا می‌کند. با افزودن و انتشار ازن به بذرها، تجمع ROS سلولی، سطوح هورمون‌ها را به تناسب تغییر داده و می‌تواند فعالیتهای بعدی سلولها را برانگیخته کند و در نهایت عملکردهای پروتئینی داخل جنین از طریق اکسیداسیون دچار تغییر شوند. در گزارش مربوط به فرآیندهای فیزیولوژیکی تفریح سیستم مورد می‌توان به عملکرد آنزیم پروتئیناز سیستمین شبه کتسین اشاره کرد که در داخل زرده تامین کننده پروتئاز، بازدارنده های پروتئاز، و نیز کاپرونها یا chaperones (p26, Hsp70) هاست که از انعقاد پروتئین های داخل جنین و مرگ آنها در دیابوز جلوگیری می‌کنند. در سلولهای قرار گرفته در تنش محیطی، Hsp70 و p26 به سمت هسته جنین حرکت کرده و ماتریکس پروتئینی را تثبیت و از جمود سریع (vitrification) جنین هایی که به مرحله سیستم یافته، جلوگیری می‌کنند. در این فرآیند، قندهای تره هالوز (trehalose) که برای محافظت از سلولها در سطح سلول موجودند، در هنگام روندهای نامطلوب

فیزیکی محیط مثل یخبندان و یا خشکی، سلولها را از تخریب ناشی از خشکی یا دی هیدراسیون دور نگه می‌دارند (Clegg and Trotman, 2002) و عملکرد عوامل محیطی که تغییرات داخل سلولی جنین مرتبط با آنزیمهای عملگر مربوط به نمو و شکستن پوسته را موجب کردند قطعا در نتیجه انکوباسیون نقش خواهند داشت.

در نمونه ای از تاثیر این عوامل محیطی، معلوم شده است که حساسیت به نور در سیستمها و واکنش به آن در تفریح می‌تواند به تراکم رنگدانه‌های موجود در پوسته سیستم مربوط باشد. قرارگیری سیستم در معرض نور و محیط مرطوب منجر به اکسیداسیون یا سفید شدن رنگدانه هماتین (نفوذ هماتین به درون پوست سیستم) می‌گردد و باعث نفوذ بیشتر نور در طول زمان به داخل سیستم می‌شود که از عوامل مهم برای شروع هیچ و تحریک به هیچ می‌باشد. معلوم شده است که پس از جذب نور توسط هماتین، تحریک به هیچ با تنفس و متابولیسم کربوهیدرات‌ها در سیستم شروع می‌شود؛ آنزیم‌های تره هالوز فعال شده و پس از تجزیه تره هالوز به گلیکوژن و گلیسرول، تخم‌گشایی سیستم اتفاق می‌افتد (Van der Linden *et al.*, 1991). به همین علت برای هیچ سیستم آرمیا استفاده از نور فلورسنت دارنده اشعه ماورا بنفش کم و مناسب برای تحریک زیستی، توصیه شده است. در تحقیق جاری احتمالا استفاده از ازن به صورت محدود به عنوان یک مولکول فعال اکسیدگر، در مسیر منتهی به برانگیختن جنین سیستمهای هیدراته شده از طریق لایه خارجی حساس به موقعیتهای محیطی مانند اکسیژن و نور و تسهیل عبور آن با توجه به میل زیاد به شکستن در سیستمها در محیط مناسب، موثر بوده است. در گزارش Cardile و

منابع

۱. آق، ن.، ۱۳۷۵، *Artemia urmiana*، سیکل زندگی و ارزش غذایی. انتشارات مؤسسه تحقیقات و آموزشی شیلات ایران، ۹۳ ص.
۲. آق، ن.، ۱۳۸۱، بررسی بیولوژیکی و اکولوژیکی آرتمیای دریاچه ارومیه. گزارش نهایی طرح مصوب پژوهش، مرکز تحقیقات آرتمیا و جانوران آبی، دانشگاه ارومیه. ۱۵۱ ص.
۳. پیرعلی خیرآبادی، ا.، منصوری، ع.، ۱۳۹۵. تأثیر سولفات سدیم، هیدراکسید آلومینیوم و استات آلومینیوم بر پوسته‌زدایی سیست آرتمیا (*Artemia franciscana*). مجله علمی شیلات ایران، (۳) ۲۵، ۸۰-۷۳.
۴. دادگر، ش.، حافظیه، م.، ۱۳۹۳. تأثیر نوع غنی ساز و مدت زمان آن بر محتوای غذایی ناپلیوس آرتمیا ارومیانا (*Artemia urmiana*). نشریه توسعه آبی پروری، (۴) ۳۷، ۸-۲۳.
۵. زاهدی، م.ر.، بحری، ا.ه.، یحیوی، م.، فلورا محمدی‌زاده، ف.، یاسمی، م.، ۱۳۹۵. اثر غنی سازی آرتمیای فرانسیسکانا با اسیدهای چرب بلند زنجیره و ویتامین E بر میزان رشد، بازماندگی و مقاومت در برابر استرس‌های دما و شوری در لارو ماهی مرکب ببری (*Sepia pharaonis*). نشریه توسعه آبی پروری. (۴) ۶۱، ۱۰-۵۱.
۶. فلاحتکار، ب.، رضایی، ف.، جهان بین درگاه، ص.، ۱۳۹۰. تعیین مناسب‌ترین دوز و زمان کپسول‌زدایی سیست آرتمیای دریاچه مهارلو (*Artemia parthenogenetica*) با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم. مجله شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر. (۱) ۵، ۳۹-۴۷.

همکاران (۱۹۹۵) ازن در دزهای غیرکشنده برای سلولها در شرایط آزمایشگاهی بر سلولهای پوستی انسان تاثیر تحریکی داشته و اکنش‌های ضد ملانوما ایجاد می کند که می تواند نشان از تحریک ازن برای تغییرات ناشی از ملاتونین و سایر رنگدانه ها در سلولها و پوسته جنین در حالت خواب باشد که در شکوفایی سیستمها و نرخ هج موثر هستند.

ارتباط مولکولهای ازن با روند تاثیر بیشتر عوامل محیطی مانند نور و یا اکسیژن محلول که بیشتر آثار تحریک کنندگی آن بر روی فرایند شروع و بهبود هج مشخص شده است، می تواند در تحقیقات بعدی مورد نظر قرار گیرد.

در پژوهش انجام شده معلوم شد در صورت بیم داشتن از آلودگی سیستمها و آلوده شدن نوزادگاههای ماهی با سیستمهای هج شده می توان بدون مشکل با غلظت مناسب کشنده میکروارگانیسرها از ازن در حالت خشک استفاده نمود، و در روند هج نیز با بکار گیری ازن، کاهش راندمان تفریخ بروز نمی نماید. از سوی دیگر با توجه به نتایج این تحقیق، با به کار بردن دز پایین ازن (۲/۵ میلی گرم در لیتر ازن) و با فرض ایجاد تحریک در سیستمهای آبگیری شده، میزان تفریخ از میزان شاهد نیز بالاتر می رود.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می دانیم که از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نمایم.

- arthropod *Artemia franciscana*. BMC Genomics, 10, 52, 1-9.
18. Clegg, J.S., Trotman, C., 2002. Physiological and biochemical aspects of *Artemia* ecology. In *Artemia Basic and Applied Biology*, eds T.J. Abatzopoulos, J.A. Beardmore, J.S. Clegg, and P. Sorgeloos (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), 129–170. P.250.
 19. Conte, F.P., 1984. Structure and function of the crustacean larval salt gland. *International Review of Cytology*, 91, 45–106.
 20. Croghan P.C., 1958a. The survival of *Artemia salina* (L.) in various media. *Journal of experimental biology*, 35, 213–218.
 21. Croghan, P.C., 1958b. The mechanism of osmotic regulation in *Artemia salina* (h.): the physiology of the branchiae. *Journal of experimental biology*, 35, 234–242.
 22. Dumitrascu, M., 2011. *Artemia salina*. *Balneo-Research Journal*, 2(4), 119-122.
 23. Dwivedi, S.N., Diwan, A.D., Iftexhar, M.B., 1987. Oxygen uptake in the brine shrimp *Artemia* in relation to salinity. *Indian Journal of Fisheries*, 34, 359–361.
 24. Elvis, A.M., Ekta, J.S., 2011. Ozone therapy: A clinical review. *Journal of Natural Sciences and Biological Medicines*, 2, 66-70.
 25. Gajardo, G.M., Beardmore J.A., 2012. The brine shrimp *Artemia* adapted to critical life conditions. *Frontiers in Physiology*. 3, Article 185, 1-8.
 26. Grotmol, S., Totland, G.K., 2000. Surface disinfection of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* eggs with ozonated sea-water inactivates nodavirus and increases survival of the larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*, 39: 89-96.
 27. Grotmol, S., Dahi-Paulsen, E., Totland, G.K., 2003. Hatchability of eggs from Atlantic cod, turbot and Atlantic halibut after disinfection with ozonated seawater. *Aquaculture*, 221, 245-254.
 28. Hall, R.M., Sobsey, M.D., 1993. Inactivation of Hepatitis A virus and MS2 by ozone and ozone-hydrogen peroxide in ۷. موسوی ندوشن، ر.، فرحناک، س.، ۱۳۹۵. تأثیر هیدروژن پراکسید بر پایه نقره بر کپسول‌زدایی و تخم‌گشایی سیست (*Artemia urmiana*). *مجله پژوهش‌های علوم و فنون دریایی*، (۲) ۱۱، ۴۰-۳۴.
 8. Abatzopoulos, T.J., Beardmore, J.A., Clegg, J.S., Sorgeloos P., 2002. *Artemia: Basic and Applied Biology*. Springer. 2-end Edition, P. 428.
 9. Agh, N., Sorgeloos, P., 2005. Handbook of protocols and guidelines for culture and enrichment of live food for use in larviculture. *Artemia & Aquatic Animals Research Center*, 60 p.
 10. Anderson E, Lochhead J.H., Lochhead M.S., Huebner E., 1970. The origin and structure of the tertiary envelope in thick-shelled eggs of the brine shrimp, *Artemia*. *Journal of Ultrastructure Research*, 32(5-6), 497-525.
 11. Arimoto, M., Sato, J., Maruyama, K., Mimura, G., Furusawa I., 1996. Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquaculture*, 143, Issue 1, 15-22.
 12. Asbury, C., Coler, R., 1990. Toxicity of Dissolved ozone to fish eggs and larvae. *Water Environment Federation*, 52(7). 1990-1997.
 13. Benoit, R.F., Matlin, N.A., 1966. Control of saprolegniasis on eggs of rainbow trout (*Salmo gairdineri*) with ozone. *Transaction of the American Fisheries Society*, 95: 403-412.
 14. Bruice, P.Y., 2001. *Organic Chemistry: Study Guide & Solutions Manual*. Pearson College Div; 2nd edition. 760 p.
 15. Camara, M.R., 2020. After the gold rush: A review of *Artemia* cyst production in northeastern Brazil. *Aquaculture Reports*, 17 (2020) 100359, 1-8.
 16. Cardile, V., Jiang, X., Russo, A., Casella, F., Renis, M., Bindoni, M., 1995. Effects of ozone on some biological activities of cells in vitro. *Cell Biololgy Toxicology*, 11, 11–21.
 17. Chen, W.H., Ge, X., Wang, W., Yu, J., Hu, S., 2009. A gene catalogue for post-diapause development of an anhydrobiotic

- Proceeding of Royal Society, B 276, 3561–3569.
38. Saekil Yun, S., Yoon, S.Y., Sib, E.J., Giri Sang, S., Sang, G.K., Who K.S., et al. 2020. Effect of plasma-activated water, used as a disinfectant, on the hatch rate of dormant cysts of the *Artemia salina*. *Aquaculture* 523 (30), 735232.
 39. Saygi, Y.B., 2003. Effects of hydrogen peroxide, cold storage and decapsulation on the hatching success of *Artemia* cysts. *Journal of Aquaculture- bamidgeh*, 55(2), 107-113.
 40. Sorgeloos, P., 1980. Life history of the brine shrimp, *Artemia*. In: *The brine shrimp Artemia., Ecology, Culturing, Use in aquaculture*. Universa Press., Wettern, Belgium, 456 p.
 41. Sudhakar, N., Nagendra-Prasad, D., Mohan, N., Hill B., Gunasekaran, M., Murugesan, K., 2011. Assessing Influence of Ozone in Tomato Seed Dormancy Alleviation. *American Journal of Plant Sciences*.2, 443-448.
 42. Thanomsub, B., Anupunpisit, V., Chanphetch, S., Watcharachaipong, T., 2002. Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 48(4), 193-199.
 43. Treece, G.D., 2000. *Artemia* production for marine larval fish culture. SARPUB. No. 702. P. 58.
 44. Van der Linden A. Gadeyne J. Van Onckelen H. Van Laere A. Declair, W. 1991. Involvement of cyclic nucleotides in light induced resumption of development of *Artemia* embryos. *Journal of Experimental Zoology*. 258(3): 312-321.
 45. Wen, G., Liang, ZH., Xu, Xi., Cao, R., Wan, Q., Ji, G., et al., 2020. Inactivation of fungal spores in water using ozone: Kinetics, influencing factors and mechanisms. *Water Research*. 185, 116218.
 - bufferd water. *Water Scientific Technology*, 27, 371-378.
 29. Hazael, R., Matsuda, S., Mori, Y., Fitzmaurice, B.C., Appleby-Thomas, G., Painter, J.D., 2019. Pressure tolerance of *Artemia* cysts compressed in water medium. *High Pressure Research* (in: 10th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2018)), 39, Issue 2.
 30. Komanapalli, I.R., Mudd, J.B., Lau, H.S., 1997. The effects of ozone on the metabolic activities of *Escherichia coli* K-12. *Toxicology Letters*, 90, 61-66.
 31. Lauel, B.J.; Blood, D.M., 2011. The effects of temperature on hatching and survival of northern rock sole larvae (*Lepidopsetta polyxystra*). *Aqua Docs*. 109, 282–291.
 32. Lavens, P., Tackaert, W., Sorgeloos, P., 1986. International study on *Artemia*. XLI. Influence of culture conditions and specific diapause deactivation methods on the hatchability of *Artemia* cysts produced in a standard culture system. *Marine Ecology Progress Series*, 31, 197-203.
 33. Mat Taib, M., Irvani, M., Sorgeloos, P., Danish-Daniel, M., Pau Tan, M., Wong, L.L., 2020. Cyst viability and stress tolerance upon heat shock prote in 70 knockdowns in the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Cell Stress and Chaperones*. 25, 1099–1103.
 34. McNair Scott, D.B., Leshner, E.C., 1963. Effect of ozone on survival and permeability of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 85(3), 567–576.
 35. Morris, J.E, Afzelius, B.A., 1967. The structure of the shell and outer membranes in encysted *Artemia* next term *salina* embryos during cryptobiosis and development. *Journal of Ultrastructure Research*. 20(3–4), 244-259.
 36. Obayes, L.M. , Abd Al-Rezzaq, A.J., Al-Amari, M.J., 2020. The effect of some environmental factors in the hatching of *artemia* cysts isolated from three Babylon Province's ponds, *Ann Trop Med & Public Health*; 23(S19), SP232114.
 37. Penfield, S., King, J., 2005. Towards a systems biology approach to understanding seed dormancy and germination.