بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد هفتم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۷
http://japu.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/japu.2019.15072.1437

تعیین دوز بیهوش‌کنندگی، کشندگی و بررسی تأثیر اسانس گل میخک (*Eugenia caryophyllata*) بر فاکتورهای خونی ماهی برزم لب پهن (*Barbus barbulus*)

نرجس پذیرش[۱]، *نرگس جوادزاده[۲] و حدیده معبودی[۳]

[۱]دانشیار گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران،
[۲]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران،
[۳]استادیار گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۲۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۳/۲۲

چکیده

پژوهش حاضر با هدف تعیین دوز بیهوش‌کنندگی، کشندگی و بررسی تأثیر اسانس گل میخک بر شاخص‌های خونی ماهی برزم لب پهن (*Barbus barbulus*) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، تعداد ۷۸ قطعه ماهی برزم لب پهن به وزن ۳ $\pm$ ۱۰۰ گرم بعد از طی مراحل سازش‌یابی، در ۵ تیمار بدون بیهوشی، بیهوشی با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ mgl^{-1} برای بیهوش‌کنندگی و غلظت‌های ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ mgl^{-1} برای تیمار کشندگی مورد آزمایش قرار گرفتند. با توجه به غلظت‌های فوق دوز مؤثر بیهوشی برای اسانس گل‌میخک ۲۰۰ mgl^{-1} تعیین شد. دوز صددرصد کشندگی در ۱۳ برابر دوز مؤثر بیهوشی و به میزان ۲۶۰۰ mgl^{-1} به‌دست آمد. به‌منظور بررسی فاکتورهای خونی، از ورید ساقه دمی در ساعات صفر، شش، دوازده و بیست و چهار بعد از بیهوشی خونگیری انجام شد، فاکتورهای خونی از جمله تعداد گلبول‌های سفید، تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت و حجم متوسط گلبولی (MCV)، مقدار متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH)، تغییرات غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCHC) اندازه‌گیری و مقایسه گردید. در بررسی نتایج، درصد هماتوکریت افزایش معنی‌داری در تیمار کشندگی با تیمار شاهد نشان داد ($P<۰/۰۵$) ولی میزان هموگلوبین، تغییرات غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز، تعداد گلبول قرمز، تعداد گلبول سفید، درصد هتروفیل، لنفوسیت، ائوزینوفیل، مونوسیت و میزان حجم متوسط گلبولی در ساعات متفاوت پس از بیهوشی بین تیمارهای مورد بررسی اختلاف معنی‌دار نداشتند ($P>۰/۰۵$) و روند رو به افزایش حجم متوسط گلبول قرمز، بین تیمارهای مورد بررسی به‌ترتیب از تیمار شاهد به سمت تیمارکشندگی مشاهده شد. در مورد میزان غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز افزایش معنی‌داری در تیمارکشندگی با سایر تیمارها (به‌جز تیمار ساعت ۲۴) مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). در نهایت با توجه به این‌که ماده بیهوشی اسانس گل میخک تأثیرات منفی پایدار بر فاکتورهای خونی ماهی برزم لب پهن نداشته و این تأثیرات بعد از ۲۴ ساعت تقریبا به حالت

*مسئول مکاتبه: nargesjavadzadeh@yahoo.com

اولیه برگشته‌اند و به لحاظ ایمن بودن این ماده بیهوشی (در دوز مؤثر بیهوشی) برای ماهی مورد استفاده و همچنین نداشتن تأثیرات منفی بر محیط زیست، این ماده بیهوش کننده جهت کاهش استرس در راستای توسعه آبزی پروری توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *Barbus barbulus*، فاکتورهای خونی، بیهوش کنندگی، کشندگی، اسانس گل میخک

مقدمه

رشد روز افزون جمعیت جهان و نیاز جوامع انسانی به منابع غذایی، استفاده از منابع آب‌های داخلی را از اهمیت ویژه‌ای برخوردار نموده است و برنامه ریزی‌های اصولی جهت بهره‌برداری بهینه از این منابع در اکثر کشورها از اولویت خاصی برخوردار می‌باشد و در سال‌های اخیر تکثیر و پرورش بسیاری از ماهیان به‌خصوص ماهیان بومی در جهان مورد توجه قرار گرفته است. پرورش ماهی در سیستم‌های پرورشی و محیط‌های مصنوعی منجر به قرار گرفتن ماهیان در معرض فاکتورهای استرس‌زای مختلفی گردیده که در شرایط طبیعی مشابه این حالت برای آنها ایجاد نمی‌گردد (صولتی و فلاحتکار، ۲۰۰۷). یکی از اهداف مهم توسعه برای مدیریت شیلاتی رویکرد تکثیر و پرورش ماهیان بومی ایران است و اقتصادی‌ترین گونه‌های مستعد تکثیر و پرورش در ایران متعلق به جنس باربوس ماهیان می‌باشد (کاویانی، ۲۰۰۸). ماهی برزم لب پهن (*Barbus barbulus*) یکی از گونه‌های بومی استان خوزستان می‌باشد و در حوزه رودخانه‌های کر، دجله و کارون پراکنش دارد (نجف‌پور و همکاران، ۱۹۹۵). امروزه بسیاری از گیاهان دارویی و جایگزینی آنها با مواد شیمیایی پرخطر در صنعت آبزی پروری رو به افزایش نهاده است. یکی از دلایل این امر وجود باقیمانده‌های مواد دارویی شیمیایی در بافت آبزیان، امکان مقاومت دارویی و عدم تأثیر مناسب این داروها بر آبزیان از یک طرف و وجود اثرات سمی و سرطان زا بر روی اکوسیستم‌های زنده و انسان‌ها از سوی دیگر است (موسوی و همکاران، ۲۰۱۳)، بنابراین نیاز به جایگزینی آن با دارویی که فاقد چنین معایبی بوده و مؤثر نیز باشد، وجود دارد. اما استفاده از هر داروی جدید و جایگزین کردن آن با داروهایی که به‌طور معمول در یک سیستم بیولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرند، باید بعد از انجام یکسری آزمایشات و تعیین سمیت دارو، اثرات جانبی و غلظت قابل استفاده آن در گونه موردنظر صورت گیرد (میرزرگر و سیدگر، ۲۰۰۵). یکی از داروهای گیاهی مورد استفاده عصاره گل میخک است که عمدتا در صنعت آبزی پروری برای کاهش تنش، بیهوشی و آرام بخشی استفاده می‌گردد (موسوی و همکاران، ۲۰۱۳). به‌دلیل این‌که پاسخ‌های استرس در بین گونه‌ها بسیار متنوع می‌باشد، لذا اغلب بررسی غلظت‌ها و مواد بیهوشی مختلف بر گونه‌های پرورشی لازم و ضروری به‌نظر می‌رسد. استفاده از مواد ضد استرس یک فرآیند مورد توجه در آبزی‌پروری مدرن می‌باشد. غلظت موردنیاز برای بیهوشی مناسب بر اساس نوع ماده بیهوشی و سایر فاکتورهای دیگر نظیر دمای آب، سختی، شوری، میزان اکسیژن محلول، وزن بدن، میزان سطح بدن و مساحت آبشش‌ها و نوع گونه ماهی متغیر می‌باشد (روس و رزی، ۲۰۰۸). اسانس گل میخک از مشتقات برگ، ساقه، گل و جوانه درخت (*Eugenia caryopyllata*) به‌دست می‌آید ماده مؤثر آن یوژنول است که ۹۰-۷۰ درصد اسانس گل میخک دارد و به‌صورت یک مایع زرد رنگ یا قهوه‌ای رنگ است که

در آب نا محلول است ولی در الکل اتانول به نسبت ۱ به ۱۰ حل می‌شود (ایورسن و همکاران، ۲۰۰۸). مجموع تغییرات فیزیولوژیک که در زمان مواجهه ماهی با تغییرات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک به‌عنوان واکنش بوقوع می‌پیوندد و ماهی در جهت جبران آن و سازش تلاش می‌کند به‌عنوان واکنش به استرس نامیده می‌شود. تغییرات فاکتورهای خون ماهیان پاسخی است بر استرس‌های محیطی و با بررسی دقیق آنها می‌توان اطلاعات ارزشمندی را در رابطه با حد تحمل ماهی در برابر فاکتورهای استرس زا ارائه نمود. تعداد گلبول‌های قرمز، میزان هموگلوبین و هماتوکریت در ارتباط با گونه، جنسیت، سن ماهیان و عوامل محیطی استرس‌زا (درجه حرارت، عمق آب، شوری و...) تغییر می‌کند (ودمیر و همکاران، ۱۹۹۰). مطالعات متعددی در خصوص اثرات بیهوش کنندگی و کشندگی مواد مختلف بر ماهیان انجام شده است از جمله آنها می‌توان به مطالعه شریف‌پور و همکاران (۲۰۰۲)، بررسی اثر بیهوش‌کنندگی اسانس گل میخک در شرایط مختلف pH و درجه حرارت در بچه ماهی کپور معمولی، سلطانی و همکاران (۲۰۰٤)، بررسی اثرات اسانس گل میخک هندی بر پارامترهای هماتولوژیک و برخی آنزیم‌های خون و آسیب‌شناسی بافت‌های کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، معینی و همکاران (۲۰۱۱)، بررسی دو روش بیهوشی با یخ و گل میخک و کشتار خارج از آب بر پاسخ استرس و برخی شاخص‌های کیفی ماهی کپور معمولی، مرتضوی‌زاده و همکاران (۲۰۱۲)، مطالعه غلظت مناسب داروی بیهوشی پروپوفول در ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*)، جهانبخشی و همکاران (۲۰۱٤) تأثیر ماده ۲- فنوکسی اتانول به عنوان ماده بیهوش کننده بر شاخص‌های خونی ماهی کلمه (*Rutilus rutilus caspicus*)، جوادزاده و همکاران (۲۰۱٤)، اثرات ماده بیهوشی MS222 بر شاخص‌های خونی ماهی شیربت (*Barbus grypus*)، میلوناس و همکاران (۲۰۰۵)، مقایسه تأثیر روغن میخک و ۲- فنوکسی اتانول روی ماهی باس دریایی (*Dicentrachus labrax*) و سیم دریایی (*Sparus aurata*) در دماهای متفاوت، ولیسک و همکاران (۲۰۰۵a) تأثیر اسانس گل میخک بر فاکتورهای خونی ماهی کپور معمولی، ولیسک و همکاران (۲۰۰۵-b) تأثیر اسانس گل میخک بر فاکتورهای خونی قزل‌آلای رنگین‌کمان، ولیسک و همکاران (۲۰۰۷)، بررسی اثر بیهوش کنندگی ۲- فنوکسی اتانول بر فاکتورهای خونی ماهی کپور معمولی و قزل‌آلای رنگین‌کمان، ایمان‌پور و همکاران (۲۰۱۰)، اثرات بیهوشی اسانس گل میخک بر پارامترهای خونی تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)، پریدیکاریس و همکاران (۲۰۱۰)، تأثیرات ماده بیهوشی عصاره گل میخک و ارتباط آن با اندازه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی حوض (*Carassius auratus*)، عبدالعزیزی و همکاران (۲۰۱۱) تأثیر اسانس گل میخک بر فاکتورهای خونی ماهی کاراس، پاور و همکاران (۲۰۱۱)، اثر چهار ماده بیهوش کننده اسانس گل میخک، بنزوکائین، ۲- فنوکسی اتانول و MS222 در اسب دریایی زرد (*Hippocampus kuda*)، اشاره کرد. با توجه به مطالعات انجام شده و از آنجایی‌که ماهی برزم لب پهن یکی از گونه‌های ارزشمند و بومی استان خوزستان می‌باشد، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر ماده بیهوشی اسانس گل میخک بر فاکتورهای خونی ماهی برزم در دوزهای بیهوش کنندگی و کشندگی و تعیین مناسب‌ترین غلظت این ماده بیهوشی با کمترین تأثیرگذاری بر فاکتورهای خونی ماهی برزم لب پهن انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در مرکز تکثیر و پرورش ماهیان بومی سوسنگرد در سال ۱۳۹۳ انجام شد. برای این منظور تعداد ۷۸ قطعه ماهی برزم لب پهن با میانگین وزنی ۳ ± ۱۰۰ گرم و میانگین طولی ۲ ± ۲۰ سانتی‌متر جداسازی و با تراکم ۳ عدد در مترمکعب درون حوضچه‌های مخصوص نگهداری بچه ماهی، ذخیره‌سازی گردید. غذادهی دو بار در روز با استفاده از غذای کنسانتره ساخت شرکت بتا به میزان ۱۰ درصد وزن بدن انجام گرفت. در این مدت فاکتورهای کیفی آب اندازه‌گیری و ثبت گردید (دما: ۲/٦٥ ±۲۰ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول: ppm ۱/۲ ±۱۰، pH: ۷/۵-۸). اسانس گل میخک از شرکت سیگما (Sigma Co. USA) تهیه گردید و پیش از استفاده به نسبت ۱ به ٤ در اتانول حل گردید. این ماده توسط فرآیند تقطیر با دستگاه کلونجر به روش فارماکوپه مجارستان تهیه می‌گردد (حسینی و جعفرنوده، ۲۰۱۳). غلظت مناسب ماده بیهوشی اسانس گل میخک محاسبه گردید. مبنای انتخاب غلظت مناسب داروی بیهوشی، القای بیهوشی در ۳ دقیقه و بازگشت از بیهوشی حداقل در ۵ دقیقه بود (قلی‌پور، ۲۰۰۱). بدین منظور اسانس گل میخک در ٤ تیمار با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰،۱۵۰، ۲۰۰ mgl^{-1} به‌همراه تیمار شاهد، برای تعیین دوز بیهوش‌کنندگی استفاده گردید. زمان از دست دادن تعادل Time of losing the Equilibrium (T.L.E) و زمان ایجاد بیهوشی Time of Induce Anaesthesia (I.T.A) ثبت گردید و سپس ماهی از ظرف حاوی محلول بیهوشی به ظرف حاوی آب تمیز منتقل و زمان بازگشت تعادل Time of Equilibrium (T.E.R) Recovering و زمان بازگشت واکنش به محرک Time of Response Recovery(T.R.R) توسط زمان‌سنج اندازه‌گیری شد. سطح دو از مرحله ۲ بیهوشی برای زمان از دست دادن تعادل در نظر گرفته شد، که در این مرحله ماهی کوششی برای مستقیم نگه داشتن خود نمی‌کند. سطح یک از مرحله ۳ بیهوشی برای زمان ایجاد بیهوشی در نظر گرفته شد که در این سطح ماهی کاملا بی‌حرکت است و به فشاری که بر ساقه دمی‌اش با انگشت وارد می‌شود واکنش نشان نداده و به فشار زیادی که با وسیله‌ای نوک تیز وارد می‌شود واکنش نشان می‌دهد، مرحله ۳ بازگشت برای زمان بازگشت تعادل در نظر گرفته می‌شود که ماهی کاملا تعادلش را حفظ می‌کند و مرحله ٤ بازگشت برای زمان بازگشت، واکنش به محرک خارجی در نظر گرفته شد که در این مرحله ماهی به محرک خارجی از جمله ضربه زدن به ظرف پاسخ می‌دهد (شریف‌پور و همکاران، ۲۰۰۱). برای بررسی غلظت کشندگی، غلظت‌های بالاتر از دوز بیهوشی مؤثر یعنی ۵ برابر، ۱۰ برابر و ۱۵ برابر آن در نظر گرفته شد. در هر غلظت ۱۰ قطعه ماهی ۱۰۰ گرمی قرار داده شد و ماهی‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در غلظت‌های مذکور قرارگرفتند و ماهیانی که تا مدت زمان ۲ ساعت ریکاوری نشدند مرده تلقی شدند. به‌منظور مطالعه فاکتورهای خونی، خون‌گیری توسط سرنگ هپارینه ۲/۵ سی سی از ناحیه ورید ساقه دمی صورت پذیرفت. به‌منظور جلوگیری از بروز استرس و آسیب‌های فیزیکی و با توجه به سایز کوچک ماهی‌ها، نمونه‌ها توسط ضربه متوسط به ناحیه سر بیهوش شدند. خونگیری در ساعت‌های ۰، ٦، ۱۲ و ۲٤، ساعت پس از بیهوشی از غلظت موثر بیهوشی و همچنین از غلظت کشنده به‌منظور سنجش فاکتورهای خونی مرتبط با استرس انجام گرفت (عامری مهابادی، ۱۹۹۹). شمارش کلی گلبول‌های قرمز (RBC) به روش دستی و با استفاده از لام نئوبار صورت گرفت. شمارش کلی گلبول‌های سفید (WBC) به روش مستقیم همانند شمارش گلبول‌های سفید پرندگان با

رقیق کردن خون به نسبت ۱ به ۲۰۰ با محلول رقیق کننده نات- هریک انجام شد (ترال، ۲۰۰٤). برای شمارش تفریقی گلبول‌های سفید اقدام به تهیه گسترش خون گردید (نظیفی، ۱۹۹۷). هموگلوبین (Hb) به روش سیانومت هموگلوبین مورد سنجش قرار گرفت (فلدمان و همکاران، ۲۰۰۰). هماتوکریت (Hct) به روش میکرو هماتوکریت و به‌مدت ۱۰ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به‌وسیله سانتریفیوژ میکروهماتوکریت اندازه‌گیری شد. شاخص‌های مهم گلبول‌های قرمز نظیر حجم متوسط گلبولی (MCV)، مقدار متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH) و تغییرات غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCHC) نیز مطابق با فرمول‌های ذیل تعیین گردید (فلدمان و همکاران، ۲۰۰۰؛ ترال، ۲۰۰٤).

$$MCV = \frac{\text{هماتوکریت} \times ۱۰}{\text{تعداد گلبول‌های قرمز (میلیون در میلی‌متر مکعب)}}$$

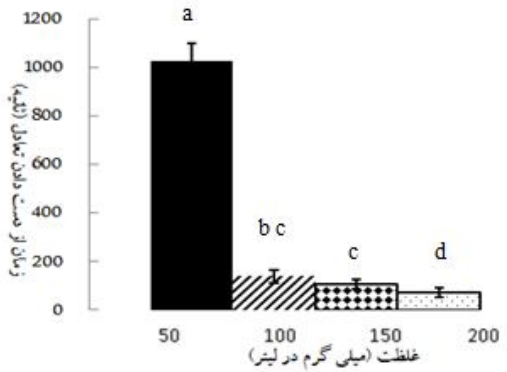
$$MCH = \frac{\text{هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر)} \times ۱۰}{\text{تعداد گلبول‌های قرمز (میلیون در میلی‌متر مکعب)}}$$

$$MCHC = \frac{\text{هموگلوبین}}{\text{هماتوکریت}} \times ۱۰۰$$

نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk مورد بررسی قرار گرفت سپس مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA انجام شد، جهت بررسی اختلاف معنی‌دار بین تیمارها از آزمون دانکن در سطح آماری ۹۵ درصد استفاده گردید.تمامی آنالیزها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱٦ و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام گرفت.

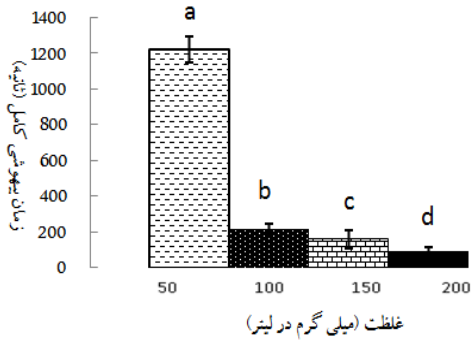
نتایج

نتایج بررسی تأثیر غلظت‌های متفاوت ماده بیهوشی بر زمان از دست دادن تعادل در شکل ۱ نشان داده شده است. از لحاظ زمان، از دست دادن تعادل در تیمارهای اول تا چهارم کاهش یافته و ماهیان با افزایش غلظت ماده بیهوشی سریع‌تر تعادل خود را از دست دادند، این افزایش از نظر آماری اختلاف معنی‌دار داشت ($P<۰/۰۵$). همچنین نتایج نشان داد که بین تیمار دوم با سوم از نظر زمان از دست دادن تعادل اختلاف معنی‌دار آماری وجود نداشت ($P>۰/۰۵$).



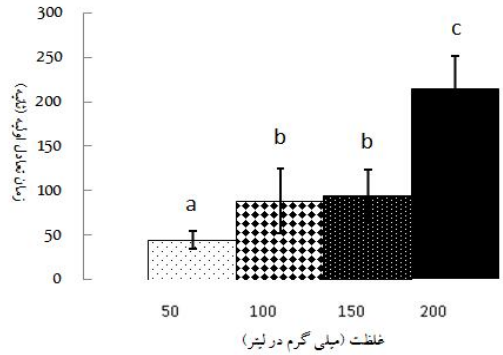
شکل ۱. نتایج بررسی تاثیر غلظت‌های متفاوت ماده بیهوشی بر روی زمان از دست دادن تعادل

از لحاظ مدت زمان بیهوشی کامل در تیمارهای اول تا چهارم کاهش دیده شد و ماهیان با افزایش غلظت ماده بیهوشی سریع‌تر بیهوش شدند، همچنین این افزایش از نظر آماری اختلاف معنی دار داشت (P<۰/۰۵) (شکل ۲).



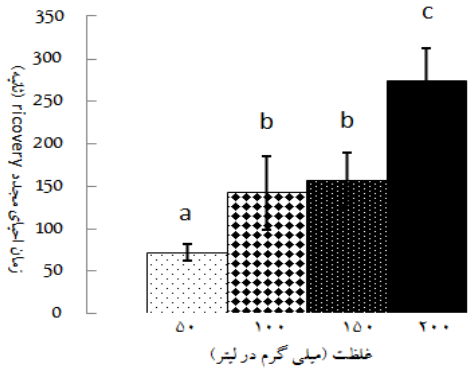
شکل ۲. نتایج بررسی تأثیر غلظت‌های متفاوت ماده بیهوشی بر روی زمان بیهوشی کامل

از لحاظ زمان تعادل اولیه در تیمارهای اول، دوم، سوم و چهارم افزایش دیده شد و ماهیان با افزایش غلظت ماده بیهوشی دیرتر به تعادل اولیه رسیدند، این افزایش از نظر آماری اختلاف معنی‌دار نشان داد (P<۰/۰۵). بین تیمار دوم با سوم از نظر زمان تعادل اولیه اختلاف معنی‌دار آماری وجود نداشت (P>۰/۰۵) (شکل ۳).



شکل ۳. نتایج حاصل از بررسی تأثیر غلظت‌های متفاوت ماده بیهوشی بر روی زمان تعادل

در مدت زمان مورد نیاز برای احیای مجدد در تیمارهای اول تا چهارم افزایش دیده شد و ماهیان در معرض غلظت بالاتر ماده بیهوشی، زمان بیشتری را برای رسیدن به زمان احیای مجدد سپری نمودند، این افزایش زمان از نظر آماری اختلاف معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵). البته بین تیمار دوم و سوم از نظر زمان احیای مجدد اختلاف معنی‌دار وجود نداشت (P>۰/۰۵) (شکل ٤).



شکل ٤. نتایج بررسی تاثیر غلظت‌های متفاوت ماده بیهوشی بر روی زمان احیای مجدد

نتایج حاصل از بررسی آماری پارامترهای خون‌شناسی شامل گلبول قرمز، گلبول سفید، هوگلوبین، هماتوکریت و اندیس‌های گلبولی در تیمارهای مختلف بیهوشی و کشندگی با اسانس گل میخک در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. نتایج حاصل از تأثیر داروی بیهوشی اسانس گل میخک بر فاکتورهای خونی ماهی برزم لب پهن در فواصل زمانی مختلف پس از بیهوشی و کشندگی (میانگین ± انحراف معیار)

		RBC	WBC	HCT	HB	MCV	MCH	MCHC
کنترل (۰)		۱/٤ +۰/۱۳	٥/٤+۲/۳	۲۷/۳+۷/۳	٦/٤+۰/۷	۱۹۳/٦+٥۹/٥	٤٥/۹+۸/۱	۲٥/٦+۱۰/۷۷
تیمار کشندگی	۱ ساعت	۱/٥+۰/۰٦	٦/٦+۱/٤	۳۷/۷+۱/٥	٦/٥+۱/۸	۲۰۸/۷+٤٥/۹	۳۷/۸+۳/٦	۲۰/۸+۸/۰
	٦ ساعت	۱/۷+۰/۲٤	٤/۹+۱/۹	۳٤/۷+٤/۱	۷/۱+۰/۰	۲۰۸/٥+۲٦/۰	٤۳+٦/۰	۲۱+۲/٦
	۱۲ ساعت	۱/٥+۰/۱۷	٥/۱+۰/۲	۳۲/۳+۳/۲	٦/۱+۱/۲	۲۱۷/۸۳+۳٦/٤	٤۰/٦+٤/۱	۲۲/٤+٥/۷
	۲٤ ساعت	۱/٤+۰/٤۳	٦/۱+۱/۰	۳۹/۷+۳/۷	۷/٤+۲/۰	۲۸۳/۹+۷٤/۳	٥۰/۹+۱۰/۲٥	۱۸/۷+٥/۱
تیمار کشندگی		۱/۳+۰/۲	٥/۲+۱/٦	٤۲/۷+٦/۱*	۸/۷+۰/٥	۳۳۲/۹+۸۲/۹	٦۷/۹+۹/٤*	۲۱+٤/٥

*اعداد نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل می‌باشد.

بررسی تعداد گلبول قرمز نشان داد اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مورد بررسی وجود ندارد (P>۰/۰٥). بیشترین میزان گلبول قرمز در تیمار ٦ ساعت بعد از بیهوشی و کمترین میزان در تیمار کشندگی مشاهده شد. تعداد گلبول‌های سفید بین تیمار شاهد با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار نداشت (P>۰/۰٥). و از ساعت ٦ تا ساعت ٢٤ روندی افزایشی مشاهده گردید، همچنین بیشترین میزان گلبول سفید در تیمار یک ساعت بعد از بیهوشی و کمترین آن در تیمار ٦ ساعت بعد از بیهوشی مشاهده شد. نتایج حاصل از بررسی درصد هماتوکریت حاکی از وجود افزایش معنی‌دار در تیمار کشندگی در مقایسه با تیمار شاهد بود (P>۰/۰٥). ولی مقادیر هموگلوبین بین تیمارهای مورد بررسی تفاوت معنی‌دار نداشت (P>۰/۰٥). کمترین میزان هموگلوبین در تیمار ۱۲ ساعت بعد از بیهوشی و بیشترین میزان هموگلوبین در تیمار کشندگی مشاهده شد. حجم متوسط گلبول قرمز (MCV) اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مورد بررسی نشان نداد (P>۰/۰٥). روند رو به افزایش میزان MCV، بین تیمارهای مورد بررسی به‌ترتیب از تیمار شاهد به سمت تیمار کشندگی مشاهده شد. در نتایج مربوط به

مقدار متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH) افزایش معنی‌داری در تیمار کشندگی با سایر تیمارها وجود داشت (P>۰/۰۵). در تیمار ٢٤ ساعت، میزان MCH نسبت به تیمار شاهد و سایر تیمارهای بیهوشی افزایش نشان داد که این افزایش معنی‌دار نبود. همچنین افزایش در تیمار کشندگی نسبت به تیمار ٢٤ ساعت بعد از بیهوشی معنی‌دار نبود. تغییرات غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) در بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵). بیشترین غلظت در تیمار شاهد و کمترین غلظت در تیمار ٢٤ ساعت بعد از بیهوشی مشاهده شد. نتایج حاصل از شمارش تفریقی گلبول‌های سفید در تیمارهای مختلف بیهوشی و کشندگی با اسانس گل میخک در ماهی برزم لب پهن در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲. نتایج حاصل از تأثیر داروی بیهوشی اسانس گل میخک بر شمارش تفریقی گلبول‌های سفید خونی ماهی برزم لب پهن در فواصل زمانی مختلف پس از بیهوشی و کشندگی (میانگین ± انحراف معیار)

		هتروفیل	لنفوسیت	ائوزینوفیل	منوسیت
کنترل (۰)		٤٨/٣+٦/٥	٥٢/٣+٣/٢	۱+۰	۱+۰
تیمار کشندگی	۱ ساعت	٤٦+٢	٤٥+٥	۱+۰	۱+۰
	٦ ساعت	٤٦/٣+۰/٥	٥٢+١	۱/۳+۰/۵	۱+۰
	۱۲ ساعت	٤٧/٣+١/١	٥۰/٣+١/٥	۱/۳+۰/۵	۱+۰
	٢٤ ساعت	٣٧/٣+٨/٧	٥٩/٣+٨/١	۲/۳+۱/۵	۱+۰
تیمار کشندگی		٤٧/٧+۰/٥	٥۰+١/١	۱/۳+۰/۵	۱+۰

درصد هتروفیل اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مورد بررسی نشان نداد (P>۰/۰۵). کمترین درصد هتروفیل در تیمار ٢٤ ساعت بعد از بیهوشی مشاهده گردید. نتایج درصد لنفوسیت نشان داد اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مورد بررسی وجود ندارد (P>۰/۰۵). کمترین درصد لنفوسیت در زمان یک ساعت بعد از بیهوشی و بیشترین درصد لنفوسیت در ٢٤ ساعت بعد از بیهوشی به‌دست آمد. درصد ائوزینوفیل اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مورد بررسی نشان نداد (P>۰/۰۵). یک روند افزایشی در تیمارهای بیهوشی از ساعت یک تا ساعت ٢٤ بعد از بیهوشی مشاهده گردید. در تیمار کشندگی روند کاهشی نسبت به تیمار ٢٤ ساعت بعد از بیهوشی مشاهده شد. بیشترین درصد ائوزینوفیل در تیمار ٢٤ ساعت بعد از بیهوشی و کمترین درصد آن در تیمار شاهد وجود داشت. درصد مونوسیت اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مورد بررسی نشان نداد (P>۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از مواد بیهوشی در کاهش استرس به‌خوبی در مطالعات شیلاتی و آبزی پروری مورد بررسی و تأیید قرارگرفته است اما استفاده از داده‌های یک گونه در خصوص پذیرش ماده بیهوشی به‌طور مؤثر و ایمن در گونه دیگر ممکن است منجر به بروز خطراتی برای گونه موردنظر گردد (پاور و همکاران، ۲۰۱۱). در مطالعه حاضر اسانس گل میخک در غلظت $۲۰۰ mgl^{-1}$ بیهوشی را بدون هیچ‌گونه تلفاتی در مدت زمان کمتر از ۲ دقیقه ایجاد کرد و بازگشت از بیهوشی در مدت زمانی کمتر از ۵ دقیقه انجام شد و در غلظت $۱۰۰۰ mgl^{-1}$ علائم

استرس شدید، از جمله شنای با شتاب در مسیرهای کوتاه و به‌صورت دورانی، همچنین تغییر رنگ پوست از تیره به روشن مشاهده گردید. حاشیه درمانی اسانس گل میخک در مطالعه حاضر mgl^{-1} ۱۰۰۰ تعیین گردید. هر چقدر که بر غلظت اسانس گل میخک افزوده می‌شد میزان ترشح موکوس در سطح بدن ماهی افزایش داشت. میزان ترشح موکوس به میزان غلظت ماده بیهوشی اسانس میخک و زمان مجاورت با آن وابسته است. این افزایش ترشح موکوس از غلظت‌های mgl^{-1} ۱۰۰۰ به بعد آشکارتر می‌شد. ترشح بیش از حد موکوس مانع از انتقال اکسیژن آب به مویرگ‌های آبششی گردیده و با ایجاد اختلال تنفسی و دیگر عوارض، موجب بروز تلفات می‌شود. در مطالعه حاضر غلظت mgl^{-1} ۲۶۰۰، غلظت صددرصد کشندگی به‌دست آمد. غلظت ۱۵ برابر غلظت مؤثر بیهوشی، غلظت بسیار سمی و بحرانی برای گونه برزم لب پهن ۱۰۰ گرمی با فاکتورهای کیفی مذکور تعیین گردید زیرا در این غلظت، ماهیان در زمان صفر پس از استفاده از اسانس وارد فاز عمیق بیهوشی شدند و پس از مدت یک ساعت تلفات بـه ۱۰۰ درصد رسید و هیچگونه برگشت از حالت بیهوشی مشاهده نگردید. حاشیه امنیت برای اسانس گل میخک برای ماهی برزم لب پهن ۲/۶ به‌دست آمد. در نهایت غلظت mgl^{-1} ۲۰۰ اسانس گل میخک که بیهوشی مؤثر و ایمن را در گونه برزم لب پهن ۱۰۰ گرمی در دمای آب ۲۰ درجه سانتی‌گراد ایجاد نمود، پیشنهاد می‌گردد. ارتباط بین غلظت ماده بیهوشی و زمان بیهوشی و احیاء در تمام تیمارهای مورد بررسی مشاهده گردید. بر اساس نتایج این مطالعات زمان‌های بیهوشی به‌طور معنی‌دار با افزایش غلظت، کاهش نشان دادند زمان القای بیهوشی در این ماده با افزایش غلظت ماده بیهوشی رابطه معکوس و زمان بهبودی با افزایش غلظت ماده بیهوشی افزایش یافت ($P<0/05$). این نتایج با سایر مطالعات گذشته مطابقت دارد از جمله، مایلوناس و همکاران (۲۰۰۵) با مطالعه تأثیر روغن میخک و ۲- فنوکسی اتانول بر روی ماهی باس دریایی و سیم دریایی در دماهای متفاوت، پاور و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی اثر چهار ماده بیهوش کننده اسانس گل میخک، بنزوکائین، ۲- فنوکسی اتانول و MS222 در اسب دریایی زرد، محمدی‌آرانی (۲۰۰۶) با بررسی اثر اسانس گل میخک بر بیهوشی بچه تاس ماهی ایرانی اعلام داشتند با افزایش غلظت ماده بیهوشی، زمان شروع بیهوشی کاهش می‌یابد و زمان احیاء طولانی می‌شود. شریف‌پور و همکاران (۲۰۰۲) اثر بیهوش کنندگی اسانس گل میخک را در شرایط مختلف pH و دما در بچه ماهی کپور معمولی بررسی نمودند، نتایج نشان داد اسانس گل میخک به‌عنوان یک بیهوش کننده مناسب برای بچه ماهی کپور معمولی مورد تأیید است و در هیچ مرحله‌ای تلفات مشاهده نشده است که با نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر مطابقت دارد. با توجه به نتایج حاصله از تحقیق حاضر بین تیمار شاهد با تیمارهای بیهوش‌کنندگی و کشندگی در مورد تعداد گلبول قرمز، میزان هموگلوبین، MCV و MCHC اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید ($P>0/05$). بر اساس مطالعات ولیسک و همکاران (۲۰۰۵-b) با مطالعه اسانس گل میخک بر ماهی کپور معمولی و مطالعه سلطانی و همکاران (۲۰۰۴) با بررسی اثرات اسانس گل میخک هندی بر پارامترهای هماتولوژیک، برخی آنزیم‌های خون کپور معمولی، اختلاف معنی‌داری در مقادیر گلبول‌های قرمز، MCV و MCHC نسبت به گروه شاهد مشاهده نگردید که با تحقیق حاضر مطابقت دارد. بر اساس مطالعات صورت گرفته در مورد تأثیر اسانس گل میخک بر فاکتورهای خونی، مطالعات عبدالعزیزی و همکاران (۲۰۱۱) بر ماهی کاراس، ایمانپور و همکاران (۲۰۱۱) بر تاس ماهی ایرانی، در تعداد گلبول‌های قرمز نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ولی میزان هموگلوبین نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد همچنین نتایج مطالعه انجام شده توسط یوکار

و آتامانالپ (۲۰۱۰) به منظور بررسی اثرات بیهوشی روغن گل میخک و ۲- فنوکسی اتانول بر پارامترهای هماتولوژی قزل‌آلای رنگین کمان از نظر میزان MCV و MCHC با مطالعه حاضر همخوانی ندارد و علت آن تفاوت در گونه ماهی مورد آزمایش است. براساس نتایج حاصل از تحقیق بین تیمار شاهد و تیمار کشندگی در مورد هماتوکریت و MCH اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$)، بر اساس مطالعات صورت گرفته در مورد تأثیر اسانس گل میخک بر فاکتورهای خونی توسط ولیسک و همکاران (a-۲۰۰۵) و همچنین سلطانی و همکاران (۲۰۰٤) بر ماهی کپور معمولی اختلاف معنی‌داری در میزان هماتوکریت و MCH نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد که با تحقیق حاضر مطابقت ندارد. عدم تغییر در میزان هماتوکریت در مطالعه حاضر دلیلی بر استرس‌زایی کمتر اسانس گل میخک در ماهی برزم لب پهن می‌باشد و علت تفاوت در نوع ماهیان مورد آزمایش و همچنین دمای آب مورد استفاده می‌باشد. در تحقیق حاضر تفاوت معنی‌داری در تعداد گلبول‌های سفید، درصد مونوسیت، هتروفیل، ائوزینوفیل و لنفوسیت بین تیمارهای بیهوشی با تیمار شاهد و تیمار کشندگی مشاهده نشد. این عدم اختلاف حاکی از استرس‌زایی کم ماده بیهوشی مورد مطالعه با شرایط موجود در آزمایش می‌باشد. در مطالعات صورت گرفته توسط ایمان‌پور و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی تأثیر ماده بیهوش اسانس گل میخک بر پارامترهای خونی تاس ماهی ایرانی، اختلاف معنی‌داری در جمعیت گلبول‌های سفید نسبت به گروه شاهد مشاهده نشد که با تحقیق حاضر مطابقت دارد. ولیسک و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی ماده بیهوشی ۲- فنوکسی اتانول بر شاخص‌های خونی ماهی کپور معمولی اعلام کردند که ۱۰ دقیقه قرارگیری در معرض این بیهوش کننده، در مقادیر هماتوکریت و مونوسیت افزایش معنی‌داری را باعث شده است و ۲٤ ساعت پس از بیهوشی این مقادیر به حالت نرمال بازگشتند. اختلافات موجود در نتایج تحقیقات مختلف می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که گونه‌های متفاوت ماهیان می‌توانند پاسخ‌های بسیار متفاوتی نسبت به یک ماده بیهوش کننده نشان دهند از سوی دیگر تفاوت در نوع ماده بیهوش کننده نیز خود عاملی برای بروز نتایج متفاوت می‌باشد. به‌طور کلی در تحقیق حاضر به‌علت عدم وجود تلفات در ماهی‌ها پس از بازگشت از حالت بیهوشی احتمال کشندگی اسانس گل میخک منتفی شد و با توجه به این‌که پس از انجام آزمایشات، تلفات یا رفتارهای غیر طبیعی در ماهی‌ها طی ٤۸ ساعت نگهداری و تحت نظر گرفتن آنها مشاهده نگردید، و از سوی دیگر با توجه به نتایج و بررسی فاکتورهای خونی تیمار شده با اسانس گل میخک که استرس‌زایی کم، در ساعات اولیه و اثرات کوتاه مدت بر فاکتورهای خونی داشت به نظر می‌رسد اسانس گل میخک اثرات مخرب بلندمدت بر فیزیولوژی ماهی ندارد. در نهایت می‌توان با توجه به خصوصیاتی مانند ارزان بودن، در دسترس بودن، تجزیه پذیر بودن در طبیعت و نهایتاً گیاهی بودن، این ماده بیهوشی را در کنار سایر بیهوش‌کننده‌ها به‌عنوان یک داروی بیهوشی مؤثر و مطلوب مدنظر قرار داد.

منابع

1. Abdolazizi, S., Ghaderi, E., Naghdi, N., and Bahrami Kamangar, B. 2011. Effects of Clove oil as an anesthetic on some hematological parameters of *carassius auratus*. Journal of Aquaculture research and development. 2(1): 1-3.
2. Ameri Mahabadi, M. 1999. Laboratory Methods of veterinary hematology. Tehran University press, 126p. (In Persian)
3. Barton, A.B., and Iwama, G.K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the

response and effect of consticosteroids. Annual Review of Fish Diseases, 1, 3-26.
4. Feldman, B.F, Zinkl, J.G., and Jain, N.C. 2000. Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed Lippincott Williams and Wilkins. pp. 1120-1124.
5. Gholipour, H. 2001. Effects of anesthesia with electricity, clove oil and tricaine methanesulfonate on some immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ph.D. thesis, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, 77p. (In Persian)
6. Hoseini, S.M., and Jafar Nodeh, A. 2013. Changes in blood biochemistry of Common Carp (*Cyprinus carpio*), following exposure to different concentrations of Clove solution. Comparative Clinical Pathology, 22: 9-13.
7. Imanpoor, M.R., Bagheri, T., and Hedayati, S.A.A. 2010. The Anesthetic Effects of Clove Essence in Persian Sturgeon, *Acipenser persicus*. World Journal of Fish and Marine Sciences 2(1): 29-36.
8. Iversen, M., Finstad, B., Mckinley, R.S., and Eliassen, R.A. 2003. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S and Benzoak as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. Aquaculture, 221: 549- 566.
9. Jahanbakhshi, A., Hedayati, A., and Javadimousavi, M. 2014. Effect of 2-phenoxyethanol as an anesthetic substance on Hematological indices of Roach *(Rutilus rutilus caspicus)*. Journal of Animal research. 27(3): 338-347. (In Persian)
10. Javadzadeh, N., Maboudi, H., and Mangashti, Z. 2014. The effect of MS222 on hematological indices of *Barbus grypus* in anesthetic and lethal concentration. First national conference on aquaculture, Islamic Azad University, Ahvaz. (In Persian)
11. Kayvani, Y. 2008. Summary of phylogenetic classification of fish, Isfahan University press, 219p. (In Persian)
12. Mirzargar, S., and Seidger, M. 2005. Anesthetic and sedation Techniques in Aquatic. Tehran University Press. Tehran. 227p. (In Persian)
13. Mohammadi Arani, M. 2006. Study on Anesthetization of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) Fingerlings using Clove (*Eugenia caryophyllata*) Oil. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 22(3): 188-192. (In Persian)
14. Moini, S., Mouloodi, Z., Shabanpour, B., and Rahmanifarah, K. 2011. Effects of Stunning by Ice and Clove Oil, and Asphyxia on Stress Responses and Quality Indicators in Common Carp (*Cyprinus Carpio*). Journal of Natural Environmental, Iranian Journal of Natural Resources. 64(2): 153-162. (In Persian)
15. Mortazavizadeh, A., Peyghan, R., Youneszadeh Feshalami, M., and Sharifian, M. 2012. Determine of appropriate concentration of propofol anesthetic drug in Benni (*Barbus sharpeyi*). Iranian Scientific Fisheries Journal. 21(2): 133-142. (In Persian)
16. Mousavi, S.M., Majdinasab, A., Yavari, V., Rajabzadeh, A., and Razi Jalali, M. 2013. Determination of the toxicity and semi-lethal concentration (Lc50) of Eugenol in *Barbus sharpeyi*. Iranian Journal of Medical and Aromatic Plants., 29(3): 551-560. (In Persian)
17. Mylonas, C.C., Cardinaletti, G., Sigelaki, I., Polzonetti-Magni, A. 2005. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. Aquaculture, 246(4): 467-481.
18. Najafpour, N., Eskandari, G., and Dehghan Mediseh, S. 1995. Identification of freshwater fish of Khuzestan province. Iranian Fisheries Research center. (In Persian)
19. Nazifi, S. 1997. Hematology and Clinical Biochemistry of Birds. Shiraz University Press, 276p. (In Persian)
20. Pawer, H.B., Sanaye, S.V., Sreepada, R.A., Harish, V., Suryavanshi, U., Tanu Ansari, Z.A. 2011. Comparative efficacy

of four anaesthetic agents in the yellow seahorse, (*Hippocampus kuda* Bleeker, 1852). Aquaculture, 311: 155-161.

21. Pridikaris, C., Cosmas, N., Evanglia, G., Ugwemorubong Ujagwung, G., Konestantina, B., Fotini, A., Ageliki, P., and Ioannis, P. 2010. Size- relative Effectivess of clove oil as an Anaesthetic for Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* walbaum, 1792) and Gold fish (*Carassius auratus* Linneaeus, 1758) Acta vet. Brno., 79: 481-490.
22. Ross, L.G., and Ross, B. 2008. Anesthetic and sedative techniques for aquatic animals, 3nd edn. Blackwell, Oxford. 222p.
23. Sharifpour, A., Soltani, M., Abdolhai, H., and Qayomi, R. 2002. Effect of *Eugenia caryophyllata* on common carp (*Cyprinus carpio*) in different pH and temperature conditions. Iranian Journal of Fisheries. 11(4): 59-75. (In Persian)
24. Solati, N.H., and Falahatkar, B. 2007. Stress responses in sub-yearling great sturgeon to the air exposure. Caspian Jornal of Envirmental Sciences., 5(2): 99-103.
25. Soltani, M., Ghaffari, M., Khazraeinia, P., and Bokaei, S. 2004. Effects of clove oil (*Eugenia caryophyllata*) anesthesia on hematological parameters, cettain serum enzymes and some tissues in common carp (*Cyprinus carpio*), Journal of Veterinary Research, University of Tehran., 59(3): 295-299. (In Persian)
26. Summerfelt, R.C., and Smith, L.S. 1990. Anaesthesia, surgery and related techniques. In: Methods for Fish Biology. (eds. C.B. Schreck and P.B. Moyle), pp. 213-272. Bethesda MD: American Fisheries Society.
27. Thrall, M.A. 2004. Veterinary Hematology and clinical chemistry. Lippincott Williams and Wilkis. USA, 544p.
28. Ucar, A., and Atamanalp, M. 2010. The Effects of Natural (Clove Oil) and Synthetical (2-phenoxyethanol) anesthesia Substances on Hematology Parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Brown Trout (*Salmo trutta fario*). Journal of Animal and Veterinary Advances, 9(14): 1925-1933.
29. Velisek. J., Svobodova, Z., and Piackova, V. 2005 a. Effects of clove oil anaesthesia on Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Acta, Vet. Brno., 74: 139-146.
30. Vlisek, J., Svobodova, Z., Piackova, V., Groch, L., Nepejchalova, L. 2005b. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio*). Vet. Med. Czech., 6: 269-275.
31. Velisek, J., Svobodova, Z., and Piackova, V. 2007. Effects of 2-phenoxyethanol Anaesthesia on Haematological Profile on Common Carp (*Cyprinus carpio*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). Acta Vet. Brno, 76: 487-492.
32. Velisek, J., Stara, A., Li, Z-H., Silovska, S., and Turek, J. 2011. Comparison of the effects of four anaethetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. Aquaculture, 310: 369–375.
33. Wedemeyer, G.A., Barton, B.B., and McLeay, D.J. 1990. Stress and acclimation. In: Schreck CB and Moyle P.B. (eds) Methods for fish biology. American Fisheries Society, Bethesda, Pp: 451-489.