

مقایسه اثر بی‌هوشی تسکینی نانو داروی گیاهی به‌لیمو-میخک و میخک با تریکابین متان سولفانات بر برخی پارامترهای خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

سید امیر حسین زورمان، حسنا قلیپور کنعانی، محمد فرهنگی*، حسین آدینه

گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس، گنبدکاووس، ایران.

*نویسنده مسئول: s.farhangi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۲/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۷/۲۱

چکیده

در تحقیق حاضر اثرات نانو اسانس به‌لیمو-میخک، میخک و تریکابین متان سولفانات بر برخی از فاکتورهای خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به‌عنوان یک ماده بی‌هوشی مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۱۲۰ قطعه بچه ماهی با میانگین وزنی 50 ± 12 گرم به‌صورت تصادفی انتخاب و در آزمایشات استفاده شد. ماهیان به تعداد ۱۰ قطعه در سه تیمار آزمایشی با سه تکرار جایابی شدند. تیمارهای بی‌هوشی شامل به‌لیمو-میخک با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر (NLBC)، نانو اسانس میخک با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر (NCL) و تریکابین متان سولفانات با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر (MS) بود. از روش غوطه‌وری برای حمام بی‌هوشی استفاده شد. تیمار شاهد بدون ماده بی‌هوشی بود. در طول آزمایش به گروه شاهد و تیمارهای بی‌هوشی اکسیژن‌خالص تزریق شد. زمان رسیدن به بی‌هوشی تسکینی ثبت شد. ماهیان به مدت ۲۴ ساعت در حالت بی‌هوشی تسکینی نگه داشته شدند و سپس فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب اندازه‌گیری شد. از هر تیمار آزمایشی، ۳ قطعه ماهی به صورت تصادفی انتخاب و خونگیزی از ساقه دمی صورت گرفت. فاکتورهای بیوشیمیایی (اوره، سدیم، پتاسیم و کلراید) و ایمنی خون (لاکتات، گلوکز، کورتیزول، لیزوزیم، سوپر اکساید دیسموتاز و کمیلمان) اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که نانو اسانس به‌لیمو-میخک اثر معنی‌داری بر کاهش مصرف اکسیژن محلول و دفع آمونیاک در ماهیان نسبت به گروه شاهد دارد ($P < 0.05$). نتایج پارامترهای غیراختصاصی ایمنی خون ماهی نشان داد که نانو اسانس گل‌میخک-به-لیمو توانست به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) گلوکز، لیزوزیم و سوپر اکسید دیسموتاز را بهبود بخشد. همچنین زمان رسیدن به مرحله بی‌هوشی تسکینی در تیمار نانو اسانس به‌لیمو-میخک نسبت به سایر تیمارها سریعتر بود، بدون آن که تلفاتی مشاهده شود. مطالعه آزمایش حاضر نشان داد، نانو اسانس به‌لیمو-میخک نسبت به ماده بی‌هوشی میخک و تریکابین متان سولفانات عملکرد بهتری دارد.

واژگان کلیدی: نانو اسانس، گل‌میخک، به‌لیمو، تریکابین متان سولفانات، قزل‌آلا.

مقدمه

اثرات آن، عدم ایجاد مقاومت نسبی عوامل بیماری‌زا نسبت به آن‌ها، نداشتن اثرات سوء بر جانداران و محیط‌زیست، تولید کم‌هزینه و کاربرد مقرون به‌صرفه آن‌ها از لحاظ اقتصادی در کشور، در مقایسه با سایر ترکیبات شیمیایی دارویی (آنتی‌بیوتیک‌ها) پیش از این مورد توجه می‌باشد (Ghasemi Pirbaluti et al., 2011).

استفاده از مواد بی‌هوشی جهت بی‌هوشی تسکینی ماهی در شرایط استرس حمل و نقلی برای زنده‌مانی و کاهش ترشح آمونیاک محیط، توسط برخی از محققین گزارش شده است (Akar, 2011; Parodi et al., 2014). بررسی کمی متغییرهای

تحقیقات نشان داده که استفاده از ماده‌های بیهوشی شیمیایی در آبی‌پروری ضمن آن که گرانتر می‌باشد، دارای تبعاتی از جمله خطر باقی‌ماندن اثرات در گوشت ماهیان مورد تغذیه انسان و نیز مسئله آلودگی‌های زیست محیطی می‌باشد (Zah et al., 2012; Kheawfu et al., 2017). در این بین استفاده از گیاهان دارویی و مشتقات آن‌ها (اسانس‌ها و عصاره‌ها) دارای طیف‌گسترده‌ای از عملکردهای ضد میکروبی (انواع پاتوژنیک و مولد فساد در مواد-غذایی) و ضد اکسیدانی می‌باشد، به‌طوری که با وجود اثرگذاری کند، به دلیل عواملی چون پایدارتر بودن

تریکایین متان سولفانات با منشاء شیمیایی و یک داروی وارداتی است، از این رو هدف از اجرای این طرح انتخاب داروی مناسب بی‌هوشی با منشاء گیاهی است تا از این طریق ضمن صرفه اقتصادی و کاهش اثرات سمیت برای ماهی، اثرات زیست‌محیطی آن نیز به حداقل برسد. از این رو در تحقیق حاضر اثرات نانو اسانس به‌لیمو-میخک، میخک و تریکایین متان سولفانات بر برخی از فاکتورهای خونی ماهی قزل آلی رنگین کمان به‌عنوان یک ماده بی‌هوشی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۵۰ قطعه ماهی قزل‌آلی رنگین‌کمان با میانگین وزنی 12 ± 50 گرم از مرکز پرورش ماهیان سردابی شهرستان آمل تهیه شد. ماهیان بعد از ۲۴ ساعت قطع غذا و بررسی سلامت و گواهی بهداشت صادره از دامپزشکی با تانکر مخصوص حمل بچه‌ماهی به آزمایشگاه بهداشت آبزیان دانشکده کشاورزی دانشگاه گنبدکاووس منتقل شدند. جهت سازگاری ماهیان به مدت ۱۰ روز در دو مخزن بتونی ۲۰۰ لیتری قرنطینه شدند. توصیف مراحل بی‌هوشی ماهیان و علائم بی‌هوشی بر اساس جدول ۱ مورد ارزیابی قرار گرفت (Ross and Ross, 2008).

به‌منظور تعیین غلظت‌های تسکینی نانو اسانس‌ها و تریکایین متان سولفانات و به‌منظور شبیه‌سازی حمل و نقل ماهی زنده تسکین‌یافته، تست‌های اولیه انجام شد و غلظت‌های نانو اسانس به‌لیمو-میخک و نانو-اسانس میخک هر یک به مقدار ۱۰ میلی‌گرم در لیتر و تری‌کائین متان سولفانات ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تعیین گردید. هر سه ماده بی‌هوشی به مخزن حمام بی‌هوشی ماهیان با حجم آبیگری ۱۰ لیتر اضافه شدند. تیمارهای آزمایشی (هر یک با ۳ تکرار) در نایلون‌های مخصوص حمل و نقل با تراکم ۱۰ قطعه در هر ۱۰ لیتر و بعد از تزریق اکسیژن به نسبت ۲ به ۳ به آب، بسته‌بندی و به مدت ۲۴ ساعت در مرحله تسکینی (فاز ۱) نگهداری شدند (جدول ۱). یک گروه فاقد

خونی در مراحل اولیه رشد و نمو ماهیان به‌عنوان یک شاخص مهم وضعیت فیزیولوژیک محسوب گردیده و می‌تواند در تکثیر و پرورش ماهیان مهم باشد. به طوری که واکنش و تغییر شاخص‌های خونی در استرس‌های محیطی مختلف به‌عنوان شاخص زیستی مناسب برای ارزیابی وضعیت سلامت ماهی در پاسخ به آلودگی‌های مختلف شناخته شده‌اند (Gressler et al., 2012). آنالیزهای بیوشیمیایی نیز برای کشف اختلالات متابولیک و بیماری‌های زیرکشنده که روی کارایی تولید تأثیر می‌گذارند، مورد استفاده قرار می‌گیرند. فاکتورهای خونی و سرمی در ماهیان و گونه‌های مختلف ماهی با هم تفاوت دارند و همچنین یک ارتباط و وابستگی بین آن‌ها و شرایط محیطی، تغذیه‌ای، سن و غیره وجود دارد (صادق‌امیدوار و همکاران، ۱۳۹۵).

مطالعات در زمینه نانو اسانس‌ها به‌ویژه نانو اسانس به‌لیمو-میخک در بی‌هوشی ماهی کمتر مورد توجه بوده است، هر چند مطالعات مشابهی در زمینه اسانس‌های مختلف گیاهی همچون میخک (علیشاهی و همکاران، ۱۳۹۳؛ روحی و همکاران، ۱۳۹۵؛ Akar, 2011) و به‌لیمو (Parodi et al., 2016) و نانو اسانس‌های گیاهی همچون نانو اسانس به‌لیمو و نانو اسانس میخک به‌تنهایی صورت گرفته است که هر کدام اثرات متفاوتی را بر روی گونه‌های ماهی نشان داده است (Kheawfu et al., 2017; Gholipour, 2019; Kanani et al., 2018; Almeida et al., 2019). Kheawfu و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی نانو اسانس میخک در بی‌هوشی ماهی تیلاپیا نشان دادند که با توجه به کوتاهی زمان رسیدن به بی‌هوشی در ماهی تحت نانو اسانس میخک و عدم تلفات، می‌تواند به‌عنوان یک ماده بی‌هوشی مطمئن در آبی‌پروری مورد استفاده قرار گیرد. Almeida و همکاران (۲۰۱۹) استفاده از ماده بی‌هوشی به‌لیمو را جهت حمل و نقل ماهی بسیار موثر بیان کردند، به طوری که کمترین استرس را در زمان حمل و نقل سبب می‌شود. بنابراین با توجه به آن که داروی بی‌هوشی

جدول ۱- توصیف مراحل بی‌هوشی ماهیان و علائم بی‌هوشی در هر مرحله (Ross and Ross, 2008)

فاز	توصیف	علائم فیزیولوژیک و رفتاری
۱	زمان تسکین عمیق	فقدان کامل عکس العمل به محرک های بینایی و تماسی - تعادل طبیعی - کاهش سطح تنفس - کاهش تونوس عضلات.
۲	زمان تخدیر عمیق	عدم پاسخ به تغییر وضعیت - کاهش در سطح تنفس - فقدان کامل تعادل - واکنش به تحریک خارجی - کاهش تونوس عضلات.
۳	زمان بی‌هوشی عمیق	فقدان کامل عکس العمل - تنفس بسیار کم - ضربان قلب آهسته
بازگشت	بازگشت تعادل	بازگشت کامل تعادل، افزایش تعداد تنفس

جدول ۲- نتایج حاصل از اندازه گیری فاکتورهای فیزیوشیمیایی در حمام های بیهوشی.

فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب	شاهد	NCL	NLBC	MS
پی‌اچ	۶/۶۸ ± ۰/۰۸ ^a	۶/۵۱ ± ۰/۰۱ ^b	۶/۷۰ ± ۰/۰۳ ^a	۶/۶۲ ± ۰/۰۹ ^{ab}
کل مواد جامد محلول (میلی گرم در لیتر)	۴۵۸/۰۰ ± ۱۵/۴۰	۴۷۷/۳۳ ± ۳/۰۵	۴۷۳/۰۰ ± ۲۰/۸۰	۴۵۷/۰۰ ± ۵/۱۹
هدایت الکتریکی (میکروزیمنس بر سانتی متر)	۹۳۸/۰۰ ± ۳۰/۵۱	۹۷۰/۳۳ ± ۶/۶۵	۹۶۱/۶۶ ± ۴۰/۱۵	۹۲۷/۶۶ ± ۱۲/۵۰
اکسیژن محلول (میلی گرم در لیتر)	۱۵/۰۴ ± ۱/۰۷ ^c	۱۱/۴۴ ± ۰/۱۸ ^d	۲۰/۵۴ ± ۱/۶۸ ^a	۱۷/۰۳ ± ۰/۴۳ ^b
آمونیاک کل (میلی گرم در لیتر)	۱/۱۸ ± ۰/۲۱ ^a	۰/۵۴ ± ۰/۱۹ ^b	۰/۲۳ ± ۰/۰۲ ^c	۰/۹۵ ± ۰/۱۶ ^a

در هر ردیف حروف لاتین غیرمشترک نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد ($P < 0.05$).

تجزیه و تحلیل آماری: قبل از اجرای تجزیه و تحلیل آماری نرمال بودن داده‌ها با تست Shapiro Wilk بررسی شد. با توجه به نرمال بودن داده‌ها آنالیز داده‌ها به‌طور مجزا با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و آزمون مقایسه میانگین تیمارها به‌وسیله آزمون توکی (Tukey) صورت گرفت. کلیه آنالیزهای آماری در سطح معنی‌دار $P < 0.05$ صورت گرفت و میانگین داده‌ها به همراه خطای معیار ($Mean \pm SD$) ارائه شده است. کلیه آنالیزها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و رسم نمودارها در نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۰ انجام شد.

نتایج

فاکتورهای کیفیت آب: نتایج بیانگر اختلاف معنی‌دار بین فاکتورهای اکسیژن محلول، پی‌اچ و آمونیاک در بین تیمارها بود ($P < 0.05$). تفاوت آماری معنی‌داری از نظر میزان شوری، EC و TDS بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد ($P > 0.05$). کمترین میزان پی‌اچ در تیمار NCL و بیشترین میزان آن در تیمار NLBC مشاهده شد. بیشترین و کمترین میزان اکسیژن محلول در این آزمایش به ترتیب در

ماده بی‌هوشی به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. به منظور تهیه نانوآسانس‌های مورد نیاز آسانس‌های به‌لیمو و میخک از شرکت باریج آسانس تهیه شد و با استفاده از سورفکتانت‌های لسیتین و تویین ۸۰ محلول نانوآمولسیون تشکیل شد (Gholipourkanani et al., 2018). ماهیان در حالت تسکین به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند و پس از پایان زمان مورد نظر (۲۴ ساعت)، از هر تیمار ۳ قطعه ماهی به صورت تصادفی انتخاب و خونگیری از ساقه دمی انجام شد. فاکتورهای بیوشیمیایی (اوره، سدیم، پتاسیم و کلراید)، استرسی (گلوکز و کورتیزول) و ایمنی (لیزوزیم، سوپر اکساید دیسموتاز، پروتئین کمپلمان) طبق روش‌های استاندارد و توسط آزمایشگاه پاتوبیولوژی شهرستان رشت تعیین شد. ماهیان پس از انجام آزمایشات به مدت ۹۶ ساعت در شرایط بهینه قرار گرفتند. بعد از انجام آزمایش فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب شامل درجه حرارت، اکسیژن محلول، پی‌اچ، هدایت الکتریکی به کمک دستگاه مولتی پارامتر هک (Hack, Model 2000) و آمونیاک به روش اسپکتوفتومتری اندازه‌گیری شد (APHA, 2005).

جدول ۳- نتایج حاصل از بررسی فراسنجه‌های خونی در قزل‌الای رنگین کمان ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی.

تیمار				
MS	NCL	NBLC	شاهد	پارامترهای خون
۱۳/۱۳ ± ۰/۳۵ ^c	۱۵/۷۳ ± ۰/۰۵ ^b	۱۵/۱۰ ± ۰/۳۲ ^b	۲۶/۵۳ ± ۰/۹۶ ^a	لاکتات Unit/ml
۷۶/۳۳ ± ۰/۵۷ ^a	۷۷/۶۶ ± ۶/۵۰ ^a	۶۴/۶۶ ± ۲/۰۸ ^b	۶۰/۱۰ ± ۴/۵۸ ^b	گلوکز (نانوگرم / میلی‌لیتر)
۸۰/۰۰ ± ۸/۱۸ ^b	۹۷/۳۳ ± ۵/۱۳ ^a	۷۴/۰۰ ± ۹/۵۳ ^b	۴۶/۶۶ ± ۴/۷۲ ^c	کورتیزول ng/ml
۱۸/۰۰ ± ۱/۰۰ ^c	۳۷/۳۳ ± ۳/۵۱ ^a	۲۸/۳۳ ± ۴/۵۰ ^b	۱۹/۶۶ ± ۲/۵۱ ^c	لیزوزیم (unit/ml)
۴۶/۰۰ ± ۱/۰۰ ^b	۵۴/۳۳ ± ۱/۵۲ ^a	۵۲/۶۶ ± ۰/۵۷ ^a	۴۸/۰۰ ± ۳/۶۰ ^b	unit/ml SOD
۱۳۰/۳۳ ± ۱/۵۲ ^a	۱۰۸/۶۶ ± ۳/۰۵ ^b	۱۱۲/۰۰ ± ۲/۰۰ ^b	۱۰۵/۳۳ ± ۳/۲۱ ^c	(unit/ml) ACH50

در هر ردیف حروف لاتین غیرمشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$).

جدول ۴- نتایج حاصل از بررسی الکترولیت‌های سرم خون در قزل‌الای رنگین کمان ۲۴ ساعت بعد از بیهوشی.

تیمار				
MS	NCL	NBLC	شاهد	پارامترهای خون
۲/۴۳ ± ۰/۴۵ ^c	۱/۵۰ ± ۰/۲۰ ^d	۴/۵۳ ± ۰/۳۵ ^b	۵/۹۶ ± ۰/۵۰ ^a	اوره mg/dl
۱۲۸/۹۶ ± ۰/۷۰ ^b	۱۲۷/۹۰ ± ۱/۴۱ ^b	۱۲۷/۸۶ ± ۰/۷۵ ^b	۱۳۱/۴۰ ± ۱/۶۰ ^a	سدیم mEq/L
۱۰۳/۳۰ ± ۰/۵۵ ^a	۱۰۳/۳۳ ± ۰/۱۵ ^a	۱۰۰/۹۳ ± ۰/۶۶ ^b	۱۰۲/۸۰ ± ۰/۴۵ ^a	کلرید mEq/L
۰/۶۶ ± ۰/۰۲ ^d	۱/۵۳ ± ۰/۰۷ ^b	۱/۰۷ ± ۰/۰۱ ^c	۱/۹۰ ± ۰/۰۳ ^a	پتاسیم mEq/L

در هر ردیف حروف لاتین غیرمشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$).

تیمارهای آزمایشی بود. در هر صورت بیشترین میزان اوره، کلراید، سدیم و پتاسیم در گروه شاهد دیده شد (جدول ۴).

بی‌هوشی تسکینی در ماهیان: پس از انجام آزمایشات ماهیان به مدت ۹۶ ساعت در شرایط طبیعی قرار داشتند و هیچ تلفات یا رفتار غیرطبیعی در ماهیان دیده نشد. زمان رسیدن به بی‌هوشی تسکینی (فاز ۱ از جدول ۱) در تیمار MS222 نسبت به دو تیمار نانواسانس به‌لیمو-میخک و نانو اسانس میخک به‌طور قابل توجهی طولانی‌تر بود ($P < 0.05$). کم‌ترین زمان رسیدن به بی‌هوشی تسکینی در تیمار به‌لیمو-میخک (48 ± 18 ثانیه) به‌دست آمد (جدول ۵).

بحث

به‌طور کلی ماهیان در طول حیات خود تحت استرس‌های زیادی چه در محیط‌های طبیعی چه در محیط پرورشی هستند. از این‌رو استفاده از مواد بی‌هوشی به‌منظور کاهش یا رفع استرس به‌کار می‌رود. مواد بی‌هوشی جهت بی‌حس کردن ماهی در بسیاری

تیمار NLBC (20.1 ± 54.68 میلی‌گرم در لیتر) و NCL (1.0 ± 44.18 میلی‌گرم در لیتر) مشاهده گردید (جدول ۲).

نتایج پارامترهای خون: نتایج نشان داد که در بین تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری بین فاکتورهای لاکتات، گلوکز، کورتیزول، لیزوزیم، سوپراکسیداز و پروتئین کمپلمان وجود دارد ($P < 0.05$)، به طوری که در گروه شاهد بیشترین میزان لاکتات خون (26.53 ± 0.96) و کمترین آن در تیمار MS (13.0 ± 13.35) مشاهده شد. حداقل گلوکز خون در گروه شاهد و حداکثر در تیمار NCL و MS به ثبت رسید (جدول ۳). با توجه به نتایج تفاوت معنی‌داری بین تیمارها از نظر سوپراکسیداز دیسموتاز و پروتئین کمپلمان (SOD و ACH50) وجود داشت ($P < 0.05$), بیشترین مقدار SOD در تیمار NCL (54.1 ± 33.52) و کمترین مقدار آن در MS (46.1 ± 0.00) و بیشترین و کمترین مقدار ACH50 در تیمار MS (130.1 ± 33.52) و شاهد (105.3 ± 33.21) بود. همچنین نتایج فاکتورهای بیوشیمیایی خونی بیانگر اختلاف معنی‌داری در بین

جدول ۵- نتایج زمان‌های بی‌هوشی تسکینی بر حسب ثانیه در تیمارهای آزمایشی.

MS	NCL	NBLC	مرحله
۱۱۴/۱۶±۱۱/۲ ^a	۷۴±۹ ^a	۴۸±۱۸ ^b	مدت زمان رسیدن به مرحله بیهوشی تسکینی (ثانیه)

در هر ردیف حروف لاتین غیرمشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$).

ها همچنین بیان کردند، گونه‌های مختلف ماهیان سرعت زنش سرپوش آبششی متفاوتی دارند که می‌تواند میزان جذب داروی بیهوش‌کننده و القاء بی‌هوشی را نشان دهد. اصولاً آبیان دارای شش مرحله مختلف بی‌هوشی هستند، به طوری که هر مرحله بی‌هوشی بستگی به نوع عمل کار با غلظت‌های متفاوت ماده بی‌هوشی، دارای واکنش‌ها و علائم خاص خود می‌باشد. مواد بی‌هوش‌کننده به خاطر داشتن مواد موثر پس از حل شدن در آب، از طریق آبشش جذب، بر روی نوروئ‌های مغز ماهی اثر گذاشته، به طور موقت ارتباط گیرنده‌های عصبی را قطع و ماهی در ابتدا یک دوره شنای توام با بی‌قراری و به دنبال آن نامنظم داشته سپس بی‌تحرک شده و به حالت بی‌هوشی، به پهلو یا پشت می‌افتد (حلاجیان و همکاران، ۱۳۹۰).

نتایج متغیرهای فیزیکی‌شیمیایی آب نشان داد که در تیمار NBLC بیشترین مقدار اکسیژن محلول وجود داشت که نسبت به سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان داد. این امر نشان‌دهنده کاهش متابولیسم حاصل از بی‌هوشی سریع ماهی و در نتیجه کاهش مصرف اکسیژن محلول می‌باشد. استفاده از بی‌هوشی تسکینی برای حمل و نقل طولانی مدت، سبب می‌شود که متابولیسم پایه ماهی، کاهش و در نتیجه با کاهش نیاز اکسیژنی می‌توان تعداد ماهی بیشتری در واحد حجم انتقال داد که صرفه اقتصادی به همراه دارد (Akar, 2011; Parmodo *et al.*, 2014). در مطالعه حاضر نیز میزان آمونیاک در بین تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری داشت. به طوری که بیشترین آن در گروه شاهد و کمترین میزان آن در تیمار NBLC ثبت شد. بنابراین کاهش متابولیسم و کاهش عملکرد گوارشی و نتیجه آن کاهش دفع

از فعالیت‌های آبی‌پروری جهت کاهش استرس و جلوگیری از آسیب‌های فیزیکی امری ضروری است (Sampaio *et al.*, 2016)، که البته فاکتورهای متعددی از جمله گونه، جنس، اندازه، فاکتورهای کیفی آب، غلظت و نوع ماده بی‌هوشی در عملکرد مواد بی‌هوشی موثر است (Zhal *et al.*, 2012; Kheawfu1 *et al.*, 2017). شاید مهمترین معیار برای انتخاب نوع ماده بی‌هوشی، طبیعی بودن آن و عدم آسیب‌رسانی به انسان و طبیعت باشد. از این رو استفاده از مواد گیاهی امروزه بیشتر مورد توجه قرار گرفته است و مطالعه حاضر نیز در این راستا می‌باشد (Parodi *et al.*, 2014).

پیشنهاد شده است که یک ماده بی‌هوش‌کننده مطلوب برای ماهی بایستی به ترتیب زمان القاء بی‌هوشی و احیای کامل پس از بی‌هوشی کمتر از ۳ و ۵ دقیقه داشته باشد (Khosravani Zadeh *et al.*, 2011). مطالعه حاضر نشان داد که نانواسانس‌های مورد آزمایش توانست بدون هیچ تلفاتی سبب بی‌هوشی ماهی شود، به طوری که مدت زمان بی‌هوشی تسکینی برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان برای نانواسانس گل‌میخک حدود ۱ دقیقه (۷۴±۹۰ ثانیه) و برای نانواسانس به‌لیمو-میخک کمتر از ۱ دقیقه (۴۸±۱۸ ثانیه) بود که در مقایسه با ماده بی‌هوشی تریکاپین‌متان‌سولفانات کمتر (۱۱۴/۱۶±۱۱/۲ ثانیه) و موثرتر بود. بررسی رفتار ماهی در زمان بی‌هوشی نشان داد که پس از افزودن ماده بی‌هوش‌کننده، ابتدا سرعت زنش آبشش‌های ماهی تند و با گذشت زمان کاهش یافت. تحقیقات حاضر با نتایج Roohi و Imanpoor (۲۰۱۵) مطابقت داشت. آن‌ها نشان دادند که افزایش غلظت ماده بی‌هوشی سبب افزایش سرعت زنش سرپوش‌های آبشش ماهی کپور شد، آن-

را داشت که بیانگر کاهش شرایط استرس ماهی بود، هرچند که با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشت. دلیل این امر را می‌توان داشتن ترکیبات ژرانیول، نرول، نرال، ژرانیال، لیمونن در به‌لیمو دانست (اقبال و همکاران، ۱۳۹۵). Zeppenfeld و همکاران (۲۰۱۶) با مطالعه اثر آرام‌بخشی و بی‌هوشی روغن اسانس گیاه به‌لیمو در گربه‌ماهی بیان داشتند که این گیاه از طریق جلوگیری از افزایش پلاسمای سرم، منجر به کاهش استرس در ماهی شده است. در مطالعات Almeida و همکاران (۲۰۱۹) بیان شد، در شرایط استرس، پاسخ ارگانیسم به‌صورت تغییر در فعالیت متابولیسمی می‌باشد، به‌طوری که این تغییر شامل افزایش سطح گلوکز، کورتیزل، لاکتات، تیروزین (T4) و کاهش سطوح پروتیین می‌باشد. آن چه مشخص است غلظت کورتیزول در پلاسمای به‌عنوان اولین پاسخ اصلی هورمونی به استرس می‌باشد و در واقع به‌عنوان شاخص مورد توجه است (Silva et al., 2015). مطالعات حاضر نیز موید این امر است. براساس نتایج، تحت مواد بی‌هوشی سطوح گلوکز و کورتیزول خون افزایش معنی‌داری را نشان داد. لایزوزیم در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری را نشان داد، به‌طوری که بیشترین و کمترین مقدار لایزوزیم به ترتیب در تیمار NCL ($37/3 \pm 33/51$ میلی‌لیتر/دقیقه) و MS222 ($17/1 \pm 0/0$ میلی‌لیتر/دقیقه) به دست آمد. لایزوزیم توسط نوتروفیل‌ها و منوسیت‌ها و به مقدار کمتری توسط ماکروفاژها تولید می‌شوند و یکی از شاخص‌های مهم در ایمنی ذاتی ماهی و از مهم‌ترین اجزای ایمنی غیراختصاصی ماهی محسوب می‌شود که موجب تخریب جداره باکتری‌ها، فعال‌سازی کمپلمان و افزایش فعالیت بیگانه‌خواری در ماهی می‌شود. بنابراین بررسی فعالیت لایزوزیم به‌عنوان یک عامل مهم ضد میکروبی حائز اهمیت است (Thanikachalam et al., 2010). بالا رفتن لایزوزیم به‌دنبال ورود تحریک‌کننده‌های ایمنی به بدن در ماهی تیلاپیا (Ndong and Fall, 2011) به اثبات رسیده است. در مطالعه قلی‌پور (۱۳۸۹)

خود سبب کاهش میزان آمونیاک موجود در آب شده است که خود اثر بخشی ماده بی‌هوش‌کننده را تأیید می‌کند. استفاده از مواد بی‌هوشی باعث جلوگیری از کاهش کیفیت آب در حین شرایط حمل و نقل و هم-چنین باعث کاهش تلفات می‌گردد که خود نقش موثری در تجارت محصولات حاصل از آبی‌پروری دارد (Zahl et al., 2012). Pamodo و همکاران (۲۰۱۴) با مطالعه بر روی گربه‌ماهی نقره‌ای (*Rhamdia quelen*) و Almeida و همکاران (۲۰۱۹) با مطالعه بر روی ماهی آفریقایی (*Serrasalmus eigenmanni*) بیان داشتند که استفاده از مواد بی‌هوشی به‌لیمو سبب کاهش مصرف اکسیژن در حمل و نقل و متعاقب آن کاهش محصولات دفعی نظیر آمونیاک و نیتريت شده است. گلوکز شاخصی متداول برای پاسخ به استرس در ماهیان استخوانی است. نتایج تأثیرگذاری انواع مواد بی‌هوشی در تیمارهای مختلف نشان داد که در تیمار NBLC کمترین میزان گلوکز را در مقایسه با تیمارهای MS و NCL داشت که نسبت به گروه شاهد بیشتر بود. این نشان داد که ماده بی‌هوشی سبب استرس در ماهی و بالا رفتن میزان گلوکز خون شده است. با این حال استرس ایجاد شده توسط نانواسانس به لیمو-میخک در مقایسه با نانواسانس میخک و تریکاپین متان سولفانات کمتر بود. این امر خود بیانگر عملکرد بهتر تیمار NBLC در مقایسه با سایر مواد بی‌هوشی مورد استفاده در این آزمایش بود. مطالعه حاضر با نتایج سایر محققان همخوانی دارد (روحی و همکاران، ۱۳۹۵). سیستم ایمنی ذاتی ماهیان اولین خط دفاعی آن‌ها در برابر عوامل بیماری‌زا می‌باشد و کورتیزول از مهم‌ترین عوامل هورمونی مؤثر در ارزیابی پاسخ فیزیولوژیکی استرس در ماهیان محسوب می‌شود. ترکیبات و عوامل متعددی سبب افزایش سطح کورتیزول خون و کاهش اکسیژن‌رسانی به بافت می‌شود و از جمله آن مواد بی‌هوشی است (Readman et al., 2013). در بین تیمارهای آزمایشی NBLC کمترین میزان کورتیزول

(*al.*, 2016).

تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف آزمایشی از نظر مقدار کلرید مشاهده شد. به این صورت که حداقل کلرید در تیمار NBLC ($10.0/0 \pm 93/66$) و حداکثر کلرید در تیمار NCL ($10.3/0 \pm 33/15$) به ثبت رسید. همچنین در خصوص مقدار یون پتاسیم‌ها تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها دیده شد، به گونه‌ای که حداقل پتاسیم در تیمار MS ($0/0 \pm 66/02$) و بیشترین در گروه شاهد ($1/90 \pm 0/03$) بود. مطالعات مختلف بیانگر آن است که تغییر در غلظت‌های سدیم و پتاسیم نتیجه‌ی اختلال در تعادل اسمزی یون‌ها است (Toni *et al.*, 2014). Silva و همکاران (۲۰۱۵) با مطالعه اثرات بی‌هوشی گیاه ریحان بر روی گربه‌ماهی نقره‌ای بیان کردند که عوامل استرس‌زا سبب تغییر در یون‌های اصلی خون همچون سدیم، پتاسیم و کلر می‌شود. در هر صورت با توجه به آن که پس از انجام آزمایشات ماهیان به مدت ۹۶ ساعت در شرایط طبیعی قرار داشتند و هیچ تلفات یا رفتار غیرطبیعی در ماهیان دیده نشد، به نظر می‌رسد که هیچ کدام از مواد بی‌هوشی مورد استفاده نمی‌تواند اثرات مخفی بر فیزیولوژی یا رفتار ماهی داشته باشد. شاید در آزمایش فعلی زمان تحت‌نظر گرفتن ماهی بعد از بی‌هوشی کوتاه بوده است، بنابراین بررسی اثرات درازمدت استفاده از مواد بی‌هوش‌کننده امری ضروری به نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

نتایج بیانگر اثربخشی بهتر نانواسانس به‌لیمو-میخک نسبت به ماده بی‌هوشی تریکایین‌متان‌سولفانات بود. با توجه به بالا بودن هزینه‌های مواد بی‌هوشی رایج آبزیان و اثرات خطرآفرین، استفاده از مواد بی‌هوشی گیاهی مانند نانواسانس میخک و نانواسانس به‌لیمو-میخک می‌تواند امنیت زیستی در راستای توسعه آبی‌پروری پایدار با کم‌ترین آسیب به محیط‌زیست را احیا کند، هرچند ممکن است فرایند تولید نانواسانس‌ها هزینه‌بر باشد.

افزایش فعالیت لایزوزیم و کاهش قدرت بیگانه‌خواری گلبول‌های سفید خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مواجه با بی‌هوشی گل‌میخک به ثبت رسیده است، که همگی همسو با نتایج حاضر می‌باشد.

افزایش کورتیزول تاثیر منفی در تولید سایتوکین‌های میانجی سلول‌های ایمنی داشته و تولید پروتئین‌های مرتبط ایمنی را کاهش می‌دهد (Misra *et al.*, 2006)، بنابراین یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های ایمنی که گروه کمپلمان‌ها هستند نیز کاهش یافته و موجب کاهش عملکرد فعالیت می‌گردد (Misra *et al.*, 2006). در گزارش قلی‌پور (۱۳۸۹) تاثیر اثر بی‌هوشی با گل‌میخک را باعث نوعی سرکوب ایمنی و کاهش پروتئین‌های ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان اعلام نمود، که با نتایج حاضر در تضاد است.

با توجه به نتایج تفاوت معنی‌داری بین تیمارها از نظر ترکیبات اوره وجود داشت و بیشترین مقدار اوره در تیمار گروه شاهد ($5/96 \pm 5/0$) و کمترین مقدار آن در تیمار NCL ($1/0 \pm 5/20$) مشاهده شد. مطالعات در خصوص اثرات بی‌هوشی به‌لیمو در حمل و نقل ماهی توسط Parodi و همکاران (۲۰۱۶) ثابت کرد، استفاده از ماده بی‌هوشی نقش موثری در کاهش میزان دفع آمونیاک دارد، که این کاهش نتیجه‌ای از کاهش متابولیسم ماهی و در واقع کاهش فعالیت شنا است. از طرفی به نظر می‌رسد که کاهش آمونیاک و اوره در دستگاه گوارشی و به‌طبع کاهش این معیارها در خون می‌تواند منجر به توسعه سلامت حیوان و افزایش رشد گردد (Johnston *et al.*, 1981). در مطالعات بیوشیمیایی خون تفاوت معنی‌داری در بین فاکتورهای اوره، سدیم، کلرید و پتاسیم مشاهده شد. در ماهیان آبشش‌ها اندام اصلی دفع اوره در مقایسه با کلیه هستند، بنابراین افزایش غلظت اوره پلاسما به-عنوان شاخصی در بیماری‌های پوششی آبشش به-حساب می‌رود، به طوری که کاهش دفع آمونیاک متناسب با افزایش سطح اوره سرم خونی نتیجه‌ای از نقص در عملکرد آبشش است (Mazandarani *et al.*).

- Gholipourkanani H., Houshmand P., Harsij M., Gholamalipour Alamdari E. 2018. Applying new formulated herbal anesthetic comparing to tricaine methanesulfonate (MS-222) in beluga (*Huso huso*). *Iranian Journal of Aquatic Animal Health* 4(1), 109-123.
- Gressler L.T., Riffel A.P.K., Parodi T.V., Saccol E.M.H., Koakoski G., Costa S.T., Pavanato M.A., Heinzmann B.M., Caron B., Schmidt D., Llesuy S.F., Barcellos, L.J.G., Baldisserotto B. 2012. Silver catfish (*Rhamdia quelen*) immersion anesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. *Aquaculture Research* 45, 1061-1072.
- Johnston N.L., Quarles C.L., Fagerberg D.J., Caveny D.D. 1981. Evaluation of yucca saponin on broiler performance and ammonia suppression. *Poultry Science* 60(10), 2289-2292.
- Kheawfu K., Pikulkaew S., Chaisri W., Okonogi S. 2017. Nanoemulsion: A suitable nanodelivery system of clove oil for anesthetizing Nile tilapia. *Drug Discoveries and Therapeutics* 11(4), 181-185.
- Khosravani Zadeh A., Ghaffari M., Khajeh M., Abtahi B., Salehi H., Zaki Pour Rahimabady A., Ahmadi Pour Nezam Abadi Kh. 2011. Using of clove extract (*Eugenia caryophyllata*) loaded with iron nanoparticles to induce anesthesia in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Scientific Fisheries Journal* 4, 43-52.
- Mazandarani M., Hoseini S.M., Ghomshani M.D. 2017. Effects of linalool on physiological responses of *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) and water physico-chemical parameters during transportation. *Aquaculture Research* 48(12), 5775-5781.
- Misra C.K., Das B.K., Mukherjee S.C., Meher P.K. 2006. The immunomodulatory effects of tuftsin on the non-specific immune system of Indian Major carp, *Labeo rohita*. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 728-738.
- Ndong D., Fall J. 2011. The effect of garlic (*Allium sativum*) on growth and immune responses of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*). *Journal of Clinical Immunology and*
- منابع
- روحی ز، ایمان پور م. ر.، محمدی ح.، محمدی م. ۱۳۹۵. اثرات میخک و امولسیون اسانس نعناع و متیل-سالیسیلات بر بیهوشی و گلوکز خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله پژوهش‌های جانوری، ۲۹(۲): ۱۹۴-۱۸۶.
- حلاجیان ع.، کاظمی ر.، یوسفی جوردهی ا. ۱۳۹۰. اثر پودر گل میخک بر مدت زمان بیهوشی و بازگشت از بیهوشی در فیل ماهی پرورشی ۴ ساله. مجله شیلات، دانشگاه آزاد واحد آزادشهر. ۵(۲): ۱۴۰-۱۳۳.
- صادق امیدوار ا.، قاسمی م.، امیدوار ز.، حقیقی س.، زلفی-نژاد ک. ۱۳۹۵. تغییرات شاخص‌های خونی و ایمنی ماهی سفید دریای خزر در مواجهه با رابدو ویروس کارپو. نشریه توسعه آبی‌پروری، ۱۰(۴): ۳۸-۲۷.
- علیشاهی م.، راضی جلالی، م.، اکبری، ن.، نداد، ه. ۱۳۹۳. مقایسه تاثیر داورهای بیهوشی ام-اس ۲۲۲، اسانس گل‌میخک و ۲-فنوکسی اتانول بر فاکتورهای خونی و آنزیم‌های سرم کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). نشریه بهره برداری و پرورش آبزیان، ۴۸-۳۳.
- قلی‌پور ح. ۱۳۸۹. مطالعه اثر بیهوشی ناشی از الکتریسیته، اسانس گل میخک و تریکائین متان سولفانات بر برخی پاسخ‌های ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). پایان نامه دکتری دانشکده دامپزشکی تهران، ۷۷ صفحه.
- Akar A.M.A. 2011. Effects of clove oil on the response of blue tilapia (*Oreochromis aureus*) by Transportation Stress. *Journal of the Arabian Aquaculture Society* 6(1): 77-86.
- Almeida A.P.G., Correia T.G., Heinzmann, B.M., Luis VaL A., Baldisserotto B. 2019. Stress-reducing and anesthetic effects of the essential oils of *Aloysia triphylla* and *Lippia alba* on *Serrasalmus eigenmanni* (Characiformes: Serrasalminidae). *Neotropical Ichthyology* 17(2), 1-8.
- Ghasemi Pirbaluti A., Piralı A., Pishkar Gh.R., Jalali S.M.A., Raesi M., Jafarian Dehkordi M., Hamedi B. 2011. The essential oils of some medicinal plants on the immune system and growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Herbal Drugs* 2, 149-155.

- Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. *Fish Physiology and Biochemistry* 38(1), 201-218.
- Zeppenfeld C.C., Hernández D.R., Santinón J.J., Heinzmann B.M., Cunha M.A., Schmidt D., Baldisserotto B. 2016. Essential oil of *Aloysia triphylla* as feed additive promotes growth of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Aquaculture Nutrition* 22, 933-940.
- Immunopathology Research* 3(1), 1-9.
- Parodi T.V., Santos C.A., Veronez A, Gomes L.C., Heinzmann B.M., Baldisserotto B. 2016. Anesthetic induction and recovery time of *Centropomus parallelus* exposed to the essential oil of *Aloysia triphylla*. *Ciencia Rural* 46(12), 2142-47.
- Parodi T.V., Cunha M.A., Becker A.G., Zeppenfeld C.C. 2014. Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Fish Physiol Biochem* 40, 323-334.
- Readman G.D., Owen S.F., Murrell J.C., Knowles T.G. 2013. Do fish perceive anaesthetics as aversive? *PLoS One* 8(9), 1-7.
- Roohi Z., Imanpoor M.R. 2015. The efficacy of the oils of spearmint and methyl salicylate as new anesthetics and their effect on glucose levels in common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. *Aquaculture* 437, 327-332.
- Ross L.G., Ross B. 2008. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals, 3rd ed. Blackwell Science, Oxford. 240 P.
- Sampaio F.D.F., Freire C.A. 2016. An overview of stress physiology of fish transport: changes in water quality as a function of transport duration. *Fish and Fisheries* 17(4), 1055-1072.
- Silva L.L., Garlet Q.I., Koakoski G., Oliveria T.A., Barcellos L.J.G., Baldisserotto B., Pereira A.M.S., Heinzmann B.M. 2015. Effects of anesthesia with the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. in parameters of fish stress. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 17(2), 215-223.
- Thanikachalam K., Kasi M., Rathinam X. 2010. Effect of garlic peel on growth, hematological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in African catfish *Clarias gariepinus* (Bloch) fingerlings. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 1, 614-618.
- Toni C., Becker A.G., Simões L.N., Pinheiro C.G., Silva L.D.L., Heinzmann B.M., Caron B.O., Baldisserotto B. 2014. Fish anesthesia: effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiology and Biochemistry* 40, 701-714.
- Zahl I.H., Samuelsen O., Kiessling A. 2012.

The comparison of lemon beebrush-clove oil and clove oil nano emulsions and trichine methane sulfanate effects on some blood parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Seyed Amir Hossein Zorman, Hosna Gholipour Kanani, Mohammad Farhangi*, Hoseein Adineh

Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Gonbad kavous, Gonbad kavous, Iran.

*Corresponding author: s.farhangi@yahoo.com

Received: 2020/10/12

Accepted: 2021/5/7

Abstract

In this study, the effects of Nano emulsions of clove oil (NCL), nano emulsions of lemonbeebrush plus clove oil (NLBC) and Tricaine Methanesulfonate (MS222) as anesthetic agents were investigated on blood parameters for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The experiments were accomplished by 120 fish with average weight 50 ± 12 g. The fish were sorted into 3 treatments each with 3 replicates (consisting of 10 fish in each replicate). The treatments consisted of NBLC with 10 mg/l concentration (T1) and NCL with 10 mg/l concentration (T2) and MS with 10 mg/l (T3). Bath method was used for anesthetic bath treatments. The control group was not exposed to any type of the anesthetic. The anesthetics treatments and control were saturated with oxygen. The time to reach the sedation stage was recorded. Fish were kept in sedation stage for 24h and then the chemical parameters of water were measured. 3 fishes randomly were selected from treatments and blood samples were collected through caudal vein. Blood biochemical (Urea, Na, Cl, K) and immunity parameters including (lactate, glucose, cortisol, lysozyme, SOD, ACH50) were measured. The results showed that NBLC can significantly decrease oxygen consumption and ammonia excretion compared to the control ($P < 0.05$). The results of non-specific immune parameters showed that NLBC could significantly improve the glucose, lysozyme and superoxide dismutase (SOD). The result of this experiment clearly indicated that, NBLC induced sedation quicker comparing to other treatments, without any mortality. However, the result of this experiment indicated that, NBLC have the most effect comparing to NCL and MS222.

Keywords: Nano emulsions, Clove, Lemonbeeprush, MS222, Rainbow trout.