13 (1) 239-246, Spring 2021

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

The efficacy of clove powder *Eugenia caryophyllata* as an anesthetic for snow trout *Schizothorax zarudnyi* broods and measurement of blood biochemical and immunity parameters

Abdolali Rahdari*[1], Ali Khosravanizadeh [1], Ahmad Gharaei [1], Alireza Afahari [2], Samira Sarani [3]

[1] *Department of Fisheries, Hamoun International Wetland Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran*
[2] *Deputy of Aquaculture, General Office of Sistan and Baluchistan Fisheries, Iran Fisheries Organization, Zabol, Iran*
[3] *Fish Hatchery Center, General Office of Sistan and Baluchistan Fisheries, Iran Fisheries Organization, Zahak, Iran*

Key Words

Anesthesia
Brood
Snow trout
Immunity
Clove powder

Abstract

Introduction: Clove (*Eugenia caryophyllata*) powder is used as a fish anesthetic because it is a natural and inexpensive product with low toxicity risks. The goal of the present study was to determine the appropriate concentration of clove powder for anesthetizing of snow trout, *Schizothorax zarudnyi* broods to be used in artificial reproduction.

Materials & Methods: We applied three different clove powder concentrations (200, 250 and 300 mg/L) with 7 replicates for each concentration on female (1240.1±291.3 g) and male (407.14±55.8 g) broods. In addition to the time required for anesthesia and reduction, serum biochemistry parameters including glucose, total protein, IgM, C3 and C4 were monitored before and after anesthesia.

Result: Results showed that time elapsed for anesthesia and recovery of female broods at 250 mg/L was 160.14±9.78 and 145±12.1 seconds, respectively, which was less than 200 (319±20.2 sec. for anesthesia and 108.63±12.15 sec. for recovery) and 300 (117±7.86 sec. for anesthesia and 271±22.24 sec. for recovery) mg/L concentrations. Also, this time for male broods at 300 mg/L (86±3.73 sec. for anesthesia and 64.71±11.25 sec. for recovery) was less than the 200 (155.71±7.81 sec. for anesthesia and 56.43±7.73 sec. for recovery) and 250 (116.86±12.57 sec. for anesthesia and 70.71±14.44 sec. for recovery) mg/L concentrations. The anesthesia did not change blood glucose, total protein, and C4 levels, but IgM concentration was decreased at 300 mg/L in both female and male fish ($p<0.05$) and C3 concentration was increased at 300 mg/L in the male brood ($p<0.05$).

Conclusion: We conclude that 250 mg/L of clove oil is the most efficient dose that requires fish euthanization for artificial reproduction.

* Corresponding Author's email: rahdari57@uoz.ac.ir
Received: 11 March 2020; Reviewed: 4 June 2020; Revised: 27 June 2020; Accepted: 16 July 2020
(DOI): 10.22034/aej.2020.133528

مقاله پژوهشی

کارایی پودر گل میخک *Eugenia caryophyllata* جهت بی‌هوشی مولدین ماهی سفیدک سیستان *Schizothorax zarudnyi* و سنجش پارامترهای بیوشیمیایی و ایمنی خون

عبدالعلی راهداری[1*]، علی خسروانی‌زاده[1]، احمد قرایی[1]، علیرضا افشاری[2]، سمیرا سارانی[3]

[1] گروه شیلات، پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون، دانشگاه زابل، زابل، ایران

[2] معاونت آبزی پروری، اداره کل شیلات آب‌های داخلی سیستان و بلوچستان، سازمان شیلات ایران، زابل، ایران

[3] مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان بومی و گرمابی، اداره کل شیلات آب‌های داخلی سیستان و بلوچستان، سازمان شیلات ایران، زهک، ایران

کلمات کلیدی

بی‌هوشی
مولد
سفیدک سیستان
ایمنی
گل میخک

چکیده

مقدمه: گل میخک (*Eugenia caryophyllata*) به‌دلیل این‌که محصولی طبیعی و ارزان قیمت می‌باشد و خطرات سمیت کمی دارد به‌عنوان ماده بی‌هوشی در ماهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. مطالعه حاضر به‌منظور تعیین غلظت مناسب بی‌هوشی مولدین ماهی سفیدک سیستان *Schizothorax zarudnyi* توسط پودر گل میخک جهت استفاده در تکثیر مصنوعی این ماهی انجام شد.

مواد و روش‌ها: مولدین نر (۸/۵۵±۴۰۷/۱۴ گرم) و ماده (۳/۲۹۱±۱۲۴۰/۱ گرم) با غلظت‌های ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک و ۷ تکرار برای هر غلظت بی‌هوش شدند. علاوه بر مدت زمان لازم برای طی مراحل بی‌هوشی و احیا، پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون شامل گلوکز و پروتئین کل و پارامترهای ایمنی سرم خون شامل C3، C4 و IgM قبل و بعد از بی‌هوشی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج: نتایج نشان داد مدت زمان صرف‌شده برای طی‌مراحل بی‌هوشی و احیا مولدین ماده درغلظت ۲۵۰ میلی‌گرم درلیتر به‌ترتیب ۹/۷۸±۱۶۰/۱۴ و ۱۲/۱±۱۴۵ ثانیه بودکه مجموعاً کم‌تر از غلظت‌های ۲۰۰ (۲۰/۲±۳۱۹ ثانیه بی‌هوشی و ۱۲/۱۵±۱۰۸/۶۳ ثانیه احیا)و ۳۰۰(۷/۸۶±۱۱۷ ثانیه بی‌هوشی و ۲۲/۲۴±۲۷۱ ثانیه احیا) میلی‌گرم در لیتر بود. هم‌چنین، برای مولدین نر این زمان درغلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر (۳/۷۳±۸۶ ثانیه بی‌هوشی و ۱۱/۲۵±۶۴/۷۱ ثانیه احیا) کم‌تر از غلظت‌های ۲۰۰ (۷/۸۱±۱۵۵/۷۱ ثانیه بی‌هوشی و ۷/۷۳±۵۶/۴۳ ثانیه احیا) و ۲۵۰ (۱۲/۵۷±۱۱۶/۸۶ ثانیه بی‌هوشی و ۱۴/۴۴±۷۰/۷۱ ثانیه احیا) میلی‌گرم در لیتر بود. مقادیر گلوکز، پروتئین کل و C4 تحت تاثیر بی‌هوشی تغییر نکردند، ولی مقدار IgM در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر مولدین نر و ماده کاهش معنی‌دار و مقدار C3 در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر مولدین نر افزایش معنی‌دار داشت ($p<0/05$).

نتیجه‌گیری و بحث: نتایج نشان داد که غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر برای بی‌هوشی مولدین ماهی سفیدک سیستان مناسب می‌باشد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: rahdari57@uoz.ac.ir

تاریخ دریافت: ۲۱ اسفند ۱۳۹۸؛ تاریخ داوری: ۱۵ خرداد ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۷ تیر ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۲۶ تیر ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/aej.2021.133528

مقدمه

با توجه به تقلای ماهی در حین صید و دستکاری که بر فیزیولوژی و رفتار آن تاثیر می‌گذارد، معمولاً ضروری است که قبل از انجام هر کاری، ماهی بی‌حرکت شود. به‌همین جهت استفاده از بی‌هوشی اجتناب‌ناپذیر است. بی‌هوشی حالتی است که با به‌کارگیری یک ماده خارجی حاصل می‌شود و با تحت تاثیر قرار دادن سیستم عصبی، موجب از دست دادن حس موجود زنده می‌گردد (Ross و Ross، ۲۰۰۸). هدف اصلی بی‌هوشی، آرام نمودن و کم کردن تحرک ماهی هنگام دستکاری جهت انجام آزمایشات می‌باشد. ماده بی‌هوش کننده ایده‌آل ماده‌ای است که عمل بی‌هوشی را با کم‌ترین استرس و در کم‌ترین زمان ممکن القا کند و در عین حال ماهی را در وضعیت مطلوب حفظ کند. هم‌چنین،وقتی ماهی ازمحیط حاوی‌ماده بی‌هوشی کننده خارج شود، سریعاً احیا شود. ماده بی‌هوش‌کننده باید در غلظت‌های پایین تاثیر خود را بگذارد و ضمناً غلظت کشنده آن نسبت به غلظت بی‌هوش کننده به حدی فاصله داشته باشد که یک حاشیه اطمینان قابل قبول ایجاد کند. از طرفی، نباید ماده بی‌هوش‌کننده اثرات فیزیولوژیک طولانی مدت داشته باشد و سریعاً از بدن پاک و خارج شود، حلالیت بالایی در آب داشته باشد، به آسانی قابل تهیه و ارزان قیمت باشد و برای انسان و محیط زیست سمی نباشد (Coyle و همکاران، ۲۰۰۴؛ Mylonas و همکاران، ۲۰۰۵). گل میخک (*Eugenia caryophyllata*) به‌صورت پودر و یا روغن به‌میزان زیادی برای بی‌هوشی ماهیان آب شیرین مورد استفاده قرار می‌گیرد تا در هنگام دستکاری ماهی‌ها جهت وزن‌کشی، اندازه‌گیری طول، تکثیر مصنوعی‌وحتی‌حمل و نقل استرس‌ماهی کاهش پیدا کند (Fernandes و همکاران، ۲۰۱۷). از طرف دیگر، گل میخک تاثیر سو کمی بر وضعیت هومئوستازی بدن می‌گذارد و به‌همین دلیل میزان مرگ و میر در هنگام بی‌هوشی با این ماده بسیار کم می‌شود (Becker و همکاران، ۲۰۱۳). مکانیسم تاثیر گل میخک به این صورت است که اولاً بر سیستم‌عصبی ماهی به‌ویژه قشر مغز تاثیر می‌گذارد و حساسیت عصبی آن را کاهش می‌دهد (Schreck و Moyle، ۱۹۹۰) و ثانیاً اثر بازدارنده بر سیستم تنفسی ماهی دارد و در نتیجه نرخ تنفس کاهش می‌یابد(Keene و همکاران، ۱۹۹۸).غلظت‌ماده‌بی‌هوشی مورد استفاده بستگی به سطح بی‌هوشی مورد انتظار دارد. درصورتی‌که بی‌هوشی عمیق مدنظر باشد غلظت باید زیاد باشد و بالعکس (Silva و همکاران، ۲۰۰۹). هم‌چنین، ماهیان کوچک نسبت به بزرگ غلظت کم‌تری نیاز دارند. بنابراین، میزان تاثیر گل میخک به گونه ماهی و اندازه آن‌ها بستگی دارد (Ross و Ross، ۲۰۰۸). از جمله موارد متعدد استفاده از گل میخک برای بی‌هوشی ماهیان در ایران می‌توان به مطالعه اثرات هوشبری اسانس و عصاره گل میخک (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۰) و استفاده از عصاره روغنی میخک برای القای بی‌حسی و بی‌هوشی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (صدیق‌بازکیاگوراب و همکاران، ۱۳۹۱) و اسانس گل میخک برای بی‌هوشی ماهیان زینتی (خسروانی‌زاده، ۱۳۹۷) اشاره نمود. پارامترهای ایمنی بیوشمیایی و سرم خون ماهیان تحت تاثیر عوامل مختلفی قرار می‌گیرند که بی‌هوشی یکی از این عوامل می‌باشد (Velišek و Svobodova، ۲۰۰۴). ایمونوگلوبین‌ها از جمله IgM و کمپلمان‌های C3 و C4 پارامترهایی هستند که برای ارزیابی وضعیت ایمنی ماهی مورد استفاده قرار می‌گیرند. ایمونوگلوبین‌ها نقش اساسی در پاسخ‌های ایمنی اکتسابی (Adaptive immune responses) ایفا می‌کنند (Uribe و همکاران، ۲۰۱۱) و سیستم کمپلمان جزو اصلی‌ترین مکانیسم‌های موثر در ایمنی ذاتی و اکتسابی هستند. فرآورده‌های این سیستم با میکروب‌ها،آنتی‌بادی‌های پیوسته به میکروب‌ها و سایر آنتی‌ژن‌ها پیوند کووالانسی برقرار نموده و موجب متلاشی شدن آن‌ها می‌شوند (Ringø و همکاران، ۲۰۱۲). ماهی سفیدک سیستان (*Schizothorax zarudnyi*) متعلق به زیرخانواده Barbinae و خانواده کپور ماهیان (Nelson و همکاران، ۲۰۱۶) بومی جنوب‌شرق کشور در حوضه سیستان می‌باشد و از ماهیان بسیار ارزشمند اقتصادی منطقه می‌باشد. در پی بروز خشکسالی‌های طولانی و متعدد، نسل این ماهی به شدت کاهش یافت. به همین جهت در سنوات اخیر تکثیر مصنوعی آن جهت احیا جمعیت ماهی سفیدک سیستان در منابع آبی منطقه انجام می‌شود. یکی از ابزارهای مدیریتی اساسی در فرآیند تکثیر ماهیان به‌کارگیری روش‌های ایمن بی‌هوشی و آرام سازی ماهی است، این مسئله درخصوص گونه سفیدک اهمیت بیش‌تری دارد زیرا به‌دلیل اهلی نبودن این گونه، عدم استفاده از یک داروی بی‌هوشی با غلظت مناسب اثرات جدی بر سلامت و ایمنی ماهی و سلول‌های جنسی آن خواهد گذاشت. بنابراین ارزیابی داروهای بی‌هوشی مورد استفاده در این گونه در فرآیند تکثیر مصنوعی از جنبه ایمنی یک‌ضرورت اجتناب ناپذیر است.مطالعات‌زیادی‌راجع به‌اثر پودر گل میخک‌روی گونه‌های‌مختلف ماهیان انجام شده است ولی علی‌رغم استفاده از این ماده برای بی‌هوشی مولدین در مرکز تکثیر مصنوعی ماهی سفیدک سیستان، تاکنون مطالعه‌ای پیرامون غلظت بهینه پودر گل‌میخک در این ماهی انجام‌نشده است. بنابراین، هدف از این مطالعه تعیین غلظت مناسب پودر گل میخک برای بی‌هوشی مولدین ماده و نر ماهی‌سفیدک سیستان و ارزیابی تاثیر غلظت‌های‌مختلف‌گل میخک بر پارامترهای استرس و ایمنی مولدین نر و ماده این ماهی بود.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی: مطالعه حاضر در مرکز حفاظت و بازسازی ذخایر ژنتیکی ماهیان بومی و گرمابی زهک (زهک، سیستان و بلوچستان)

انجام شد. مولدین نگه‌داری شده در استخرهای خاکی با تور پره صید و با وان حمل ماهی مجهز به هوادهی به سالن تکثیر منتقل شدند. از بین این مولدین، تعداد ۲۱ مولد ماده و ۲۱ مولد نر به‌طور تصادفی انتخاب شدند. برای هر غلظت تعداد ۷ مولد نر و ۷ مولد ماده مورد آزمایش قرار گرفتند که در واقع هر غلظت شامل ۷ تکرار بود (جدول ۱).

آزمایش بی‌هوشی مولدین: گل میخک تهیه شده از عطاری با آسیاب برقی کاملاً پودر شد. برای انجام بی‌هوشی در هر تیمار دو وان ۵۰ لیتری برای انجام بی‌هوشی (حاوی آب و پودر گل میخک) و احیا (حاوی آب تازه مجهز به هواده) مولدین درنظر گرفته شدند. متناسب با غلظت موردنظر، پودر گل میخک با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ میلی‌گرم توزین و کاملاً در آب وان حل شد. برای آزمایش بی‌هوشی مولدین سه غلظت ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک با هفت تکرار برای هر غلظت درنظر گرفته شدند (اخلاقی و میراب بروجردی، ۱۳۷۸). روش انجام آزمایش به این صورت بود که ابتدا از هر مولد خونگیری صورت می‌گرفت. سپس، مولد درون وان حاوی غلظت مورد نظر رها می‌شد تا مراحل بی‌هوشی طی شود. برای شروع مراحل احیا، ماهی از وان خارج و پس از خونگیری به وان دیگر منتقل می‌شد. مدت زمان لازم برای مراحل بی‌هوشی و احیا طبق جدول ۲ با کرونومتر ثبت گردید. بی‌هوشی چندین مولد با غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر نشان داد که زمان بسیار طولانی (حدود ۱۵ دقیقه و گاهی بیش‌تر) برای بی‌هوش شدن ماهی‌ها با این غلظت لازم بود. لذا به‌علت طولانی بودن این مدت که عملاً کارایی لازم را نداشت، غلظت ۱۵۰ حذف شد. از طرف دیگر، با توجه به تعداد بسیار محدود مولدین ماهی سفیدک سیستان و لزوم حفظ ذخیره اندک این مولدین، مرحله ۳ بی‌هوشی (توقف حرکات سرپوش آبششی، جدول ۲) انجام نشد تا احتمال تلفات یا آسیب دیدن مولدین به‌حداقل برسد. از طرف دیگر، در شرایط عملی نیز نیاز به بی‌هوشی عمیق در هنگام تکثیر مصنوعی ماهی نمی‌باشد (Husen و Sharma، ۲۰۱۴). بالطبع، با حذف مرحله ۳ بی‌هوشی، در مراحل احیا نیز مرحله ۱ حذف می‌شود.

جدول ۱: مشخصات مولدین ماهی سفیدک سیستان *Schizothorax zarudnyi* (خطای استاندارد ± میانگین؛ تکرار برای هر تیمار n=۷)

جنس مولدین	مشخصات	تیمار ۱ (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر)	تیمار ۲ (۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر)	تیمار ۳ (۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر)
ماده	وزن بدن (گرم)	۱۳۷۱/۹ ± ۱۴۵/۵	۱۱۳۱/۷ ± ۳۴/۴	۱۱۹۷/۹ ± ۸۶/۴۵
	طول کل (سانتی‌متر)	۵۰/۷۵ ± ۱/۹	۴۹/۴ ± ۰/۴۳	۴۹/۷ ± ۱/۳۲
نر	وزن بدن (گرم)	۴۴۴/۳ ± ۲۷/۶	۳۵۰/۳ ± ۴۴/۲	۴۲۷/۹ ± ۴۰/۸
	طول کل (سانتی‌متر)	۳۶/۷ ± ۰/۹۹	۳۳/۲ ± ۱/۵۵	۳۵/۵۷ ± ۰/۹۷

جدول ۲ مراحل بی‌هوشی و احیا ماهی (Iwama و همکاران، ۱۹۸۹)

مراحل بی‌هوشی و احیاء	توصیف
بی‌هوشی:	
مرحله ۱	از دست دادن تعادل
مرحله ۲	از دست دادن حرکات عادی بدن ولی حرکات سرپوش آبششی ادامه دارد.
مرحله ۳	مانند مرحله ۲ ولی حرکات سرپوش آبششی متوقف می‌شود.
احیاء:	
مرحله ۱	بدن غیرمتحرک ولی حرکات سرپوش آبششی شروع می‌شود.
مرحله ۲	حرکات منظم سرپوش آبششی ولی حرکات بدن نامتوازن است.
مرحله ۳	به‌دست آوردن تعادل و وضعیت ماهی همانند قبل از بی‌هوشی می‌شود.

خونگیری: خونگیری از مولدین ماده و نر قبل و بعد از بی‌هوشی با سرنگ ۲ میلی‌لیتری فاقد هپارین از سیاهرگ دمی انجام شد. جهت کاهش تحرک ماهی‌ها و جلوگیری از صدمه دیدن مولدین، هنگام خونگیری قبل از بی‌هوشی، مولد درون حوله خیس و نرم قرار داده می‌شد و با پوشاندن چشم ماهی و گرفتن ساقه دمی، خونگیری در زمانی کم‌تر از یک دقیقه انجام می‌گرفت و بلافاصله مولد درون محلول بی‌هوشی با دوز موردنظر قرار داده می‌شد. خونگیری پس از مراحل بی‌هوشی نیز به سرعت در زمان کم‌تر از یک دقیقه انجام می‌گرفت. نمونه‌های خون به‌مدت ۶-۵ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس، برای تهیه سرم، به‌مدت ۱۰ دقیقه در g ۱۵۰۰ سانتریفوژ شدند. سرم به‌دست آمده تا زمان سنجش پارامترهای بیوشیمیایی در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند (Harikrishnan و همکاران، ۲۰۱۲).

سنجش پارامترهای بیوشیمیایی خون: گلوکز به‌روش فتومتریک (آنزیمی، کالری‌متری جهت سنجش تک نقطه‌ای) و پروتئین کل به‌روش Biuret در طول موج ۵۴۶ نانومتر، هم‌چنین، ایمونوگلوبین

(IgM) و کمپلمان‌ها (C3 و C4) به‌روش ایمونوتوربیدیمتریک در طول موج ۳۴۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Vis مدل Libra S12 (Bichrom Ltd. Cambridge, UK) مطابق پروتکل ارائه شده توسط شرکت سازنده کیت‌های تشخیصی پارس آزمون (کرج، ایران) اندازه-گیری شدند (Burtis و همکاران، ۲۰۱۱).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: نرم‌افزار (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) SPSS 19.0 جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس‌ها به‌ترتیب از طریق آزمون‌های Kolmogorov–Smirnov و Levene بررسی گردید. تاثیر غلظت ماده بی‌هوشی بر مدت زمان بی‌هوشی و احیا با آنالیز یک‌طرفه (one-way ANOVA) Anova بررسی شد. از آزمون t-test جفتی (Samples T Test Paired) جهت مقایسه مقدار پارامترها قبل و بعد از هر بی‌هوشی و آزمون t مستقل (Independent-Samples T Test) برای مقایسه تاثیر بی‌هوشی بین مولدین نر و ماده استفاده شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel (Microsoft office، ۲۰۱۶) استفاده گردید. همه داده‌های متن به‌صورت خطای استاندارد ± میانگین (mean ± S.E) ارائه شده‌اند.

نتایج

بی‌هوشی مولدین: نتایج مربوط به مراحل بی‌هوشی و احیا در جدول ۳ ارائه گردیده است. براساس این نتایج، مجموع زمان صرف شده برای طی مراحل بی‌هوشی و احیا مولدین ماده در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر حدود ۶ دقیقه بود که کم‌تر از زمان صرف شده در غلظت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود، ولی برای مولدین نر این زمان در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر کم‌تر از غلظت‌های ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر بود.

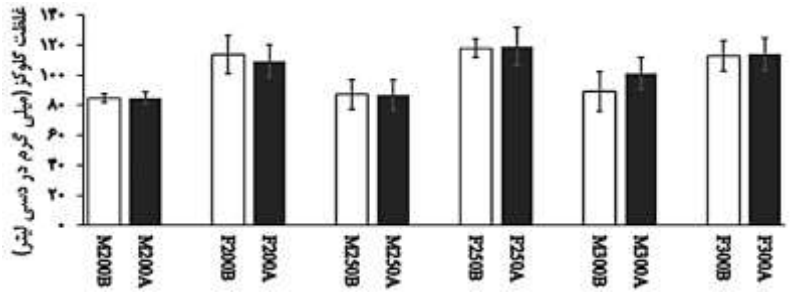
گلوکز و پروتئین کل: به‌طورکلی مقدار گلوکز در مولدین نر کم‌تر از مولدین ماده بود (نر: ۳/۴۷±۸۹/۰۳ و ماده: ۳/۷۷±۱۱۴/۵۸ میلی‌گرم در دسی‌لیتر). مقدار گلوکز بعد از بی‌هوشی فقط در مولدین نر که با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر بی‌هوش شده بودند مقداری افزایش یافت که البته معنی‌دار نبود، در بقیه گروه‌ها تغییر محسوس و معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$) و حتی در برخی غلظت‌ها مقدار گلوکز بعد از بی‌هوشی اندکی کاهش یافت (شکل ۱). با افزایش غلظت ماده بی‌هوشی از ۲۰۰ به ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر، مقدار گلوکز در هر دو جنس افزایش یافت. هم‌چنین، مقدار گلوکز در مولدین ماده نسبت به نر بیش‌تر بود، هرچند اختلاف بین نر و ماده معنی‌دار نبود (جدول ۴، $p>0/05$).در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیترمقدارپروتئین کل مولدین ماده به‌طور معنی‌داری کم‌تر از مولدین نر بود (جدول ۴، $p<0/05$).

پارامترهای‌ایمنی(IgM، C3 و C4):مقدار IgM درغلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر هر دو جنس نر ($P=0/0160$، $df=2$، $t=4/30$) و ماده ($P=0/0167$، $df=2$، $t=4/30$) کاهش معنی‌داری داشت (شکل ۳) ولی مقدار C3 فقط در جنس نر غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش معنی‌داری داشت (شکل ۴، $P=0/03$، $df=2$، $t=4/30$). مقدار C4 در هیچ‌یک از تیمارها تغییر معنی‌داری نداشت (شکل ۵، $P>0/05$). مقدار IgM در تیمار ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر در مولدین ماده نسبت به نر به‌طور معنی‌داری بیش‌تر بود(جدول ۴، $p<0/05$). مقدارکمپلمان‌ها (C3 و C4) به‌جز مقدار C4 در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، در مولدین ماده نسبت به نر کم‌تر بود که این تفاوت در غلظت‌های ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر برای C3 معنی‌دار بود (جدول ۴، $p<0/05$).

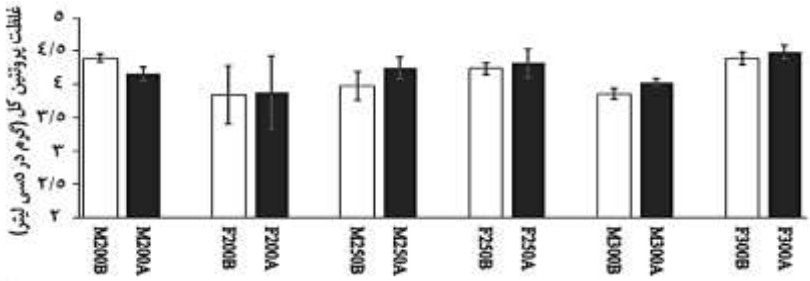
جدول ۳ زمان مراحل بی‌هوشی و احیا مولدین ماده و نر ماهی سفیدک سیستان *Schizothorax zarudnyi* در غلظت‌های مختلف پودر گل میخک (خطای استاندارد ± میانگین؛ تکرار برای هر تیمار n=۷).

	مراحل بی‌هوشی و احیا	غلظت گل میخک (میلی‌گرم در لیتر)		
	(ثانیه)	۲۰۰	۲۵۰	۳۰۰
مولدین ماده	مرحله ۱ بی‌هوشی	۱۶۰/۷۵ ± ۱۸/۵۲a	۶۴/۲۹ ± ۷/۴۲b	۵۲/۲۹ ± ۳/۸۱b
	مرحله ۲ بی‌هوشی	۳۱۹ ± ۲۰/۲a	۱۶۰/۱۴ ± ۹/۷۸b	۱۱۷ ± ۷/۸۶c
	مرحله ۲ احیا	۶۵/۷۱ ± ۹/۱۸b	۹۰ ± ۸/۱b	۱۸۰/۳ ± ۱۸/۳a
	مرحله ۳ احیا	۱۰۸/۶۳ ± ۱۲/۱۵b	۱۴۵ ± ۱۲/۱b	۲۷۱/۲۹ ± ۲۲/۲۴a
مولدین نر	مرحله ۱ بی‌هوشی	۶۹/۷۱ ± ۳/۷۰a	۵۹/۴۳ ± ۵/۵۳a	۴۳ ± ۲/۳۷b
	مرحله ۲ بی‌هوشی	۱۵۵/۷۱ ± ۷/۸۱a	۱۱۶/۸۶ ± ۱۲/۵۷b	۸۶ ± ۳/۷۳c
	مرحله ۲ احیا	۳۵/۵ ± ۵/۴۱	۴۴/۴۳ ± ۱۰/۲۶	۴۰/۲۸ ± ۸/۱
	مرحله ۳ احیا	۵۶/۴۳ ± ۷/۷۳	۷۰/۷۱ ± ۱۴/۴۴	۶۴/۷۱ ± ۱۱/۲۵

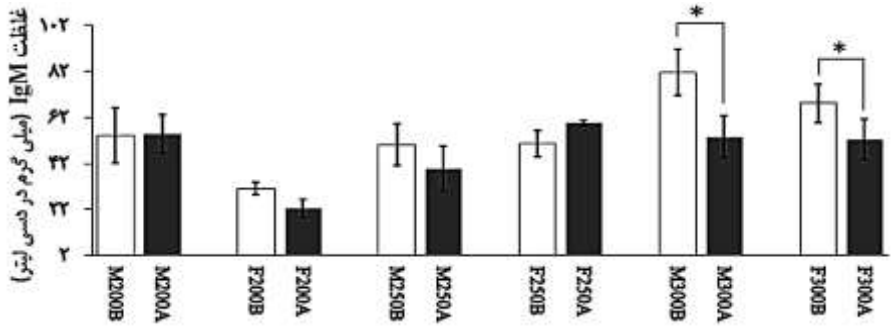
حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین پارامتر مذکور هستند ($P<0/05$).



شکل ۱: مقدار گلوکز سرم خون مولدین ماهی سفیدک سیستان *Schizothorax zarudnyi* (M= مولد نر، F= مولد ماده، B= قبل از بی‌هوشی، A= بعد از بی‌هوشی و اعداد غلظت گل میخک بر حسب میلی‌گرم در لیتر می‌باشند)

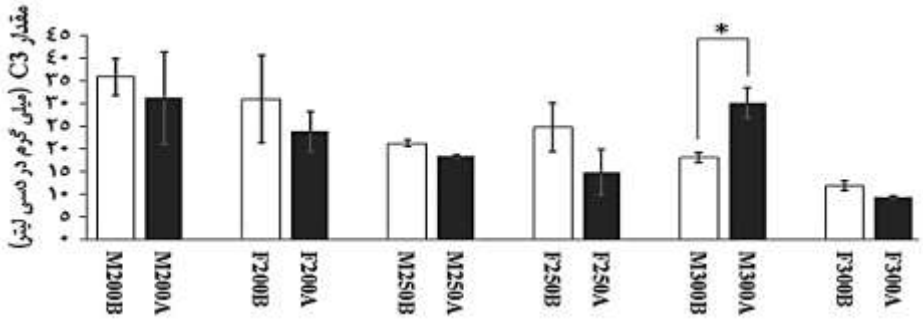


شکل ۲: مقدار پروتئین کل سرم خون مولدین ماهی سفیدک سیستان *Schizothorax zarudnyi* (M= مولد نر، F= مولد ماده، B= قبل از بی‌هوشی، A= بعد از بی‌هوشی و اعداد غلظت گل میخک بر حسب میلی‌گرم در لیتر می‌باشند)



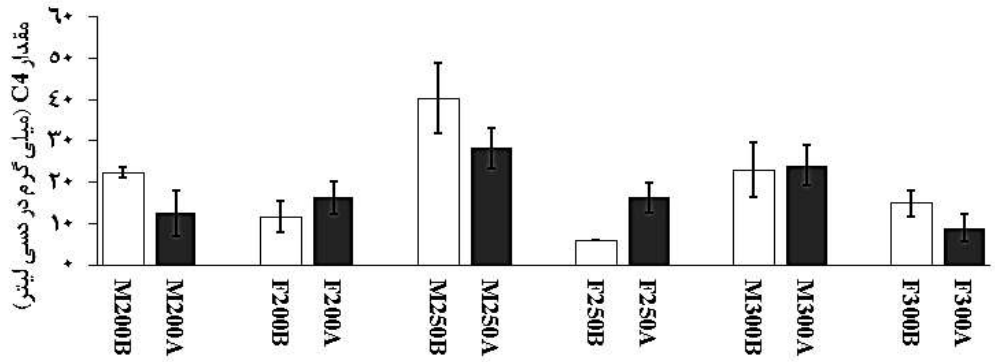
شکل ۳: مقدار IgM سرم خون مولدین ماهی سفیدک سیستان *Schizothorax zarudnyi* (M= مولد نر، F= مولد ماده، B= قبل از بی‌هوشی، A= بعد از بی‌هوشی و اعداد غلظت گل میخک بر حسب میلی‌گرم در لیتر می‌باشند)

* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین دو گروه می‌باشد (P<۰/۰۵).



شکل ۴ مقدار C3 سرم خون مولدین ماهی سفیدک سیستان *Schizothorax zarudnyi* (M= مولد نر، F= مولد ماده، B= قبل از بی‌هوشی، A= بعد از بی‌هوشی و اعداد غلظت گل میخک بر حسب میلی‌گرم در لیتر می‌باشند)

* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین دو گروه می‌باشد (P<۰/۰۵).



شکل ۵ مقدار C4 سرم خون مولدین ماهی سفیدک سیستان *Schizothorax zarudnyi* (M= مولد نر، F= مولد ماده، B= قبل از بی‌هوشی، A= بعد از بی‌هوشی و اعداد غلظت گل میخک بر حسب میلی‌گرم در لیتر می‌باشند)

جدول ۴ مقایسه تاثیر غلظت پودر گل میخک بر مولدین نر و ماده ماهی سفیدک سیستان *Schizothorax zarudnyi* (خطای استاندارد ± میانگین؛ تکرار برای هر تیمار n=۷)

غلظت[1]	گلوکز					پروتئین کل					IgM				
	نر	ماده	df	t	P	نر	ماده	df	t	P	نر	ماده	df	t	P
۲۰۰	۸۴/۹ ± ۴/۱۲	۱۰۹/۴۸ ± ۱۰/۸	۴	-۲/۱۲۶	۰/۲۴۲	۴/۱۶ ± ۰/۱*	۳/۸۸ ± ۰/۵۴*	۲/۱۵۲	۰/۵۱۵	۰/۰۴۷	۵۴/۸۳ ± ۸/۲۱	۲۲/۳۵ ± ۳/۹۷	۴	۳/۵۶	۰/۱۶۹
۲۵۰	۸۶/۷۷ ± ۱۰/۳	۱۱۹/۲۷ ± ۱۲/۵۸	۴	-۱/۹۹۹	۰/۶۰۱	۴/۲۴ ± ۰/۱۶	۴/۲۲ ± ۰/۲۱	۴	-۰/۲۷۹	۰/۵۵۴	۳۹/۶۵ ± ۹/۹۲*	۵۹/۵۹ ± ۱/۳۳*	۲/۰۷۱	-۱/۹۹	۰/۰۴۶
۳۰۰	۱۰۱/۳۶±۱۰/۴۳	۱۱۴/۱۷ ± ۱۰/۷۴	۴	-۰/۸۵۶	۰/۴۴۹	۴/۰۳ ± ۰/۰۵	۴/۴۸ ± ۰/۱	۴	-۳/۸۱۹	۰/۲۶۱	۵۳/۵۵ ± ۱۵/۱	۵۲/۳۵ ± ۸/۹۶	۴	۰/۰۶۸	۰/۴۵۱

غلظت[1]	C3					C4				
	نر	ماده	df	t	P	نر	ماده	df	t	P
۲۰۰	۳۱/۲۲ ± ۱۰/۲	۲۳/۸۵ ± ۴/۴۵	۴	۰/۶۶۲	۰/۲۱۶	۱۲/۶ ± ۵/۴۷	۱۶/۲۷ ± ۳/۹۵	۴	-۰/۵۵۸	۰/۶۲
۲۵۰	۱۸/۲۷ ± ۰/۴*	۱۴/۸۶ ± ۵/۱۲*	۲/۰۲۴	۰/۶۸۴	۰/۰۲۱	۲۸/۳ ± ۴/۹۵	۱۶/۳۷ ± ۳/۵۷	۴	۱/۹۶۱	۰/۴۲۷
۳۰۰	۳۰/۱۵ ± ۳/۲۲*	۹/۳۰ ± ۰/۳۵*	۲/۰۴۵	۶/۲۴۸	۰/۰۲۸	۲۴/۱ ± ۴/۹۴	۹/۰۳ ± ۳/۲۹	۴	۲/۵۲	۰/۳۷۳

۱- غلظت پودر گل میخک مورد استفاده برای بی‌هوشی مولدین بر حسب میلی‌گرم در لیتر، علامت * و مقدار **P-value** نشان‌دهنده همبستگی معنی‌دار بین دو فراسنجه می‌باشد.

بحث

در این آزمایش غلظت‌های ۲۰۰ تا ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک مورداستفاده قرار گرفتند. در کپورمعمولی *Cyprinus carpio* از غلظت ۴۰ تا ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر (Cagiltay و همکاران، ۲۰۱۷)، در قزل‌آلای رنگین‌کمان از غلظت ۲۵ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر (Woolsey و همکاران، ۲۰۰۴)و در ماهی میگر *Argyrosomus regius* از غلظت ۸۵ میلی‌گرم در لیتر (Barata و همکاران، ۲۰۱۶) روغن میخک استفاده شده است. نتایج مدت زمان لازم برای بی‌هوشی و احیای مولدین نر و ماده در تیمارهای مختلف و نیز تغییر مقادیر ایمونوگلوبین و C3 در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مطالعه حاضر نشان داد که غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک برای بی‌هوش نمودن مولدین ماده و نر ماهی سفیدک سیستان مناسب می‌باشد. مولدین نر و ماده پس از این‌که در معرض غلظت مذکور قرار گرفتند مراحل متداول بی‌هوشی (Iwama و همکاران، ۱۹۸۹) را طی نموده و پس از خارج شدن از محلول حاوی ماده بی‌هوشی در زمان کوتاهی(۱۲/۱±۱۴۵ثانیه مولدین ماده و ۱۴/۴۴±۷۰/۷۱ ثانیه مولدین نر) احیا شدند. علت تفاوت غلظت گل میخک استفاده شده برای ماهی سفیدک سیستان با سایر گونه‌ها را می‌توان به‌دلایلی از قبیل اختلاف گونه‌ای، تفاوت وزن و سن و ویژگی‌های خاص بیولوژیک این گونه نسبت داد. از ویژگی‌های ماده بی‌هوش‌کننده این است که در زمانی کم‌تر از ۳ دقیقه ماهی را بی‌هوش نماید و در مدت کم‌تر از ۱۰ دقیقه احیا شود (Gilderhus و Marking، ۱۹۸۷) که چنین شرایطی در این مطالعه وجود داشت. مطالعات قبلی نشان داده است که اگر بی‌هوشی به‌نحو صحیح انجام شود، اثرات منفی استرس بر کارایی ماهی را کاهش می‌دهد و احتمال ایجاد جراحت فیزیکی در حین دستکاری ماهی از بین می‌رود(Wedemeyer، ۱۹۹۷؛ Bressler و Ron، ۲۰۰۴). در این مطالعه، در هیچ‌کدام از غلظت‌های بی‌هوشی استفاده‌شده مرگ و میر مولدین اتفاق نیفتاد که نشان داد غلظت‌های به‌کار رفته در مدت زمان القای بی‌هوشی برای مولدین سفیدک سیستان کشنده

نیست. از طرف دیگر، یکی از معیارهای تشخیص تناسب ماده مورد استفاده برای بی‌هوشی، مدت زمانی است که بی‌هوشی القا و ماهی احیا می‌گردد. هر چه این مدت کوتاه‌تر باشد، در شرایط عملی و در کارگاه تکثیر ماهی قابلیت استفاده و کاربرد بیش‌تری خواهد داشت. طبق نتایج به‌دست آمده، برای مولدین ماده، در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر مدت القای بی‌هوشی و در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر مدت زمان لازم برای احیا طولانی بود ولی در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر هر دو مرحله بی‌هوشی و احیا در حد متوسط بوده و مجموعاً کم‌تر از غلظت‌های ۲۰۰ و ۳۰۰ بود. هر چند برای مولدین نر زمان صرف شده در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم کمتر از دو غلظت دیگر بود ولی تفاوت بین دو غلظت ۲۵۰ و ۳۰۰ تنها یک دقیقه بود. بنابراین، با در نظر گرفتن ویژگی‌های لازم برای ماده بی‌هوش‌کننده مناسب و داده‌های مربوط به IgM و C3، به‌نظر می‌رسد غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر برای مولدین نر و ماده مناسب‌تر می‌باشد. از طرف دیگر، با توجه به این‌که گل میخک با قیمت مناسب در عطاری‌ها عرضه می‌گردد، این ماده از دو ویژگی در دسترس و ارزان بودن نیز برخوردار می‌باشد. هم‌چنین، استفاده از یک ماده طبیعی نسبت به موادشیمیایی از قبیل بنزوکایین یا ۲-فنوکسی اتانول برای حفظ سلامتی انسان و محیط زیست ترجیح داده می‌شود. مطالعات زیادی صورت گرفته تا از طریق پایش پارامترهای بیوشیمیایی از قبیل گلوکز، واکنش‌های مربوط به استرس‌های ایجاد شده در طول دوره تخم‌ریزی و تکثیر مصنوعی ماهیان را تجزیه و تحلیل کنند (Suljević و همکاران، ۲۰۱۷). غلظت گلوکز خون یکی از شاخص‌های نشان‌دهنده بروز استرس می‌باشد زیرا اولاً از شاخص‌های ثانویه و قابل اعتماد سیستم اندوکرین در مقابل عوامل استرس‌زا می‌باشد و ثانیا به سادگی قابل اندازه‌گیری است (Schreck، ۱۹۸۱). در این مطالعه، مقدار گلوکز خون پس از این‌که مولدین در معرض غلظت‌های مختلف بی‌هوشی قرار گرفتند تغییر معنی‌داری نکرد. پس از این‌که ماهی در معرض استرس قرار می‌گیرد مقدار گلوکز خون افزایش می‌یابد که این افزایش، پاسخ ثانویه ماهی به استرس می‌باشد، کما این‌که افزایش کورتیزول پاسخ اولیه ماهی به استرس است (Percin و Konyalioglu، ۲۰۰۸). علت افزایش گلوکز، آزاد شدن کتکول آمین‌ها و گلوکوکورتیکوئیدها از بافت آدرنال ماهی می‌باشد (Shaluei و همکاران، ۲۰۱۲). هم‌چنین، عوامل استرس‌زا باعث مصرف انرژی قابل توجهی در بدن موجود می‌شوند. گلوکز یکی از مهم‌ترین منابع تامین انرژی بدن محسوب می‌شود و انرژی مورد نیاز برای مواجهه با استرس وارد شده از طریق افزایش تولید گلوکز تامین می‌شود (Wedemeyer، ۱۹۹۶). مطالعات صورت گرفته روی ماهی سیم دریایی *Sparus aurata* (Ortuno و همکاران، ۲۰۰۲) و کفشک ماهی زبان گاوی *Soleasene galensis* (Velisek و همکاران، ۲۰۰۷) تاثیر بی‌هوشی با ۲-فنوکسی اتانول را بر افزایش قند خون نشان داده‌اند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که غلظت‌های مختلف گل میخک که برای بی‌هوشی مولدین نر و ماده ماهی سفیدک سیستان در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت، باعث ایجاد استرس به میزانی که منجر به افزایش معنی‌دار گلوکز خون گردد نشده‌اند. در واقع، احتمالاً شدت این استرس پایین‌تر از آستانه مورد نیاز برای ایجاد پاسخ افزایش گلوکز بوده است (Thomas و Robertson، ۱۹۹۱). در مطالعه حاضر، مقدار IgM در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر گل میخک در هر دو گروه مولدین نر و ماده کاهش معنی‌داری پیدا نمود. ثابت شده است که مقادیر پایین IgM باعث ایجاد نقص در سیستم ایمنی می‌شود، از طرفی مقادیر بالای آن مربوط به ایجاد شرایط التهابی و پاتولوژیک در بدن می‌باشد (Buckley، ۱۹۸۶). بنابراین، می‌توان بیان نمود که احتمالاً غلظت بالای پودر گل میخک اثرات سویی بر سیستم ایمنی ماهی سفیدک سیستان می‌گذارد. در مطالعه حاضر، تغییر معنی‌داری در مقدار C4 در هیچ یک از گروه‌ها مشاهده نشد و فقط مقدار C3 در مولدین نر و غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک افزایش معنی‌داری داشت. افزایش فعالیت کمپلمانی برای بهبود ایمنی هومورال بسیار مهم است. افزایش یافتن C3 در یکی از گروه‌ها و عدم تغییر آن در سایر گروه‌ها و نیز عدم تغییر C4 را می‌توان به این صورت تبیین نمود که عمل بی‌هوشی با گل میخک، سلامتی مولدین ماهی سفیدک سیستان را تحت تاثیر قرار نداده است. در ماهی کپور معمولی، بی‌هوشی با اسانس گل میخک تاثیری بر فعالیت کمپلمانی آن نداشته است (علیشاهی و همکاران، ۱۳۹۲). مطالعه اخیر نشان داد که غلظت مناسب پودر گل میخک برای بی‌هوشی مولدین ماهی سفیدک سیستان با درنظر گرفتن مراحل بی‌هوشی و احیا و نیز شاخص‌های استرس و ایمنی، ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک می‌باشد.

تقدیر و تشکر

از مدیرکل و معاونت محترم آبزی‌پروی اداره کل شیلات آب‌های داخلی سیستان و بلوچستان که امکان انجام این تحقیق را فراهم نمودند و پرسنل عزیز مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر ماهیان بومی و گرمابی زهک که همکاری صمیمانه‌ای داشتند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. **اخلاقی، م. و میراب‌بروجردی، م.، ۱۳۷۸.** بررسی اثر بی‌هوش کنندگی گل میخک در ماهی و تعیین LC50 آن. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. دوره ۵۴، شماره ۲، صفحات ۴۹ تا ۵۲.

۲. **خسروانی‌زاده، ع.، ۱۳۹۷.** مقایسه اثرات بی‌هوش‌کننده اسانس گل میخک در ماهیان آنجل (*Pterophyllum scalare*)، گوپی (*Poecilia*

reticulate) و طلایی (*Carassius auratus*). فصلنامه محیط زیست جانوری. دوره ۱۰، شماره ۳، صفحات ۳۱۵ تا ۳۲۲.

۳. **سلطانی، م.؛امیدبیگی، ر.؛رضوانی، س.؛مهرابی، م.وچیت‌ساز، ح.، ۱۳۸۰.** مطالعه اثرات هوشبری اسانس و عصاره گل میخک در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت برخی شرایط کیفی آب. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. دوره ۵۶، شماره ۴، صفحات ۸۵ تا ۸۹.

۴. **صدیق‌بازکیاگوراب، م.؛ ایمانپورنمین، ج. و موسی‌پورشاجانی، م.، ۱۳۹۱.** اثرات بی‌حسی و بی‌هوشی عصاره روغنی میخک (*Clove oil*) و عصاره سنبل الطیب (*Valeriana officinalis* L.) بر قزل آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). فصلنامه محیط زیست جانوری. دوره ۴، شماره ۴، صفحات ۱۶۳ تا ۱۶۸.

۵. **علیشاهی، م.؛ چشمه، ب.؛ پیغان، ر.؛ قربانپور، م. و محمدیان، ت.، ۱۳۹۲.** بررسی تاثیر بی‌هوشی با MS222، اسانس گل میخک و فنوکسی اتانول بر برخی شاخص‌های ایمنی ماهی کپورمعمولی. فصلنامه اکوبیولوژی تالاب. دوره ۵، شماره ۱۸، صفحات ۲۳ تا ۳۲.

6. **Barata, M.; Soares, F.; Aragao, C.; Almeida, A.C.; Pousao-Ferreira, P. and Ribeiro, L., 2016.** Efficiency of 2-phenoxyethanol and clove oil for reducing handling stress in reared meagre, *Argyrosomus regius*. Journal of the World Aquaculture Society. Vol. 47, pp: 82-92.

7. **Becker, A.G.; Cunha, M.A.; Garcia, L.O.; Zeppenfeld, C.C.; Parodi, T.V.; Maldaner, G.; Morel, A.F. and Baldisserotto, B., 2013.** Efficacy of eugenol and the methanolic extract of *Condalia buxifolia* during the transport of the silver catfish *Rhamdia quelen*. Neotropical Ichthyology. Vol. 11, pp: 675-681.

8. **Bressler, K. and Ron, B., 2004.** Effect of anesthetics on stress and the innate immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata*). The Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh. Vol. 56, pp: 5-13.

9. **Buckley, R.H., 1986.** Humoral immunodeficiency. Clinical Immunology and Immunopathology. Vol. 40, pp: 13-24.

10. **Burtis, C.A.; Ashwood, E.R. and Bruns, D.E., 2011.** Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Saunders, 5th edition. 2256 p.

11. **Cagiltay, F.; Atanasoff, A.; Saglam, M.; Cagatay, S.; Nikolov, G.; Ekim, O. and Secer, F.S., 2017.** Comparison of different anesthetic protocols for morphometric measurements of carp (*Cyprinus carpio*). Advanced Research in Life Sciences. Vol. 1, pp: 81-84.

12. **Coyle, S.D.; Durborow, R.M. and Tidwell, J.H., 2004.** Anesthetics in Aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center Publication no. 3900, pp: 6.

13. **Fernandes, I.M.; Bastos, Y.F.; Barreto, D.S.; Lourenço, L.S. and Penha, J.M., 2017.** The efficacy of clove oil as an anaesthetic and in euthanasia procedure for small-sized tropical fishes. Brazilian J of Biology. Vol. 77, pp: 444-450.

14. **Gilderhus, P.A. and Marking, L.L., 1987.** Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. North American J of Fisheries Management. Vol. 7, pp: 288-292.

15. **Harikrishnan, R.; Kim, J.S.; Balasundaram, C. and Heo, M.S., 2012.** Immunomodulatory effects of chitin and chitosan enriched diets in *Epinephelus bruneus* against *Vibrio alginolyticus* infection. Aquaculture. Vol. 326, pp: 46-52.

16. **Husen, M.A.; Sharma. S., 2014.** Efficacy of anesthetics for reducing stress in fish during aquaculture practices a review. Journal of Sciences, Engineering and Technology. Vol. 10, pp: 104-123.

17. **Iwama, G.K.; McGeer, J.C. and Pawluk, M.P., 1989.** The effects of five fish anaesthetics on acid-base balance, hematocrit, cortisol and adrenaline in rainbow trout. Canadian Journal of Zoology. Vol. 67, pp: 2065-2073.

18. **Keene, J.L.; Noakes, D.L.; Moccia, R.D. and Soto, C.G., 1998.** The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout. Aquaculture Research. Vol. 9, pp: 89-101.

19. **Mylonas, C.C.; Cardinaletti, G.; Sigelaki, I. and Polzonetti-Magni, A., 2005.** Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. Aquaculture. Vol. 246, pp: 467- 481.

20. **Nelson, J.S.; Grande, T.C. and Wilson, M.V.H., 2016.** Fishes of the World. John Wiley & Sons, Fifth edition. 752 p.

21. **Ortuno, J.; Esteban, M.A. and Messeguer, J., 2002.** Effects of four anesthetics on the innate immune response of gilthead seabream. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 12, pp:49-59.

22. **Ringø, E.; Olsen, R.E.; Vecino, J.L.G.; Wadsworth, S. and Song, S.K., 2012.** Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: a review. Journal of Marine Science: Research & Development. Vol. 2, pp: 1-22.

23. **Ross, G.L. and Ross, B., 2008.** Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals. Blackwell Scientific, Oxford, UK, 3rd edition. 240 p.

24. **Schreck, C.B., 1981.** Stress and compensation in teleostean fishes: responses to social and physical factors. pp: 295-321. In: Pickering, A.D., Stress in Fish. Academic Press, London.

25. **Schreck, C.B. and Moyle, P.B., 1990.** Methods for fish biology. Maryland: American Fisheries Society.

26. **Shaluei, F.; Hedayati, A.; Jahanbakhshi, A. and Baghfalaki, M., 2012.** Physiological responses of great sturgeon to different concentrations of 2-phenoxyethanol as an anesthetic. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 38, pp: 1627-1634.

27. **Silva, E.M.P.; Oliveira, R.H.F.; Ribeiro, M.A.R. and Coppola, M.P., 2009.** Anesthetic effect of clove oil on lambari (*Astyanax altiparanae*). Revista de Ciência Rural. Vol. 39, pp: 1851-1856.

28. **Suljević, D.; Alijagić, A. and Islamagić, E., 2017.** Temporal influence of spawning on serum biochemical parameters in brown trout *Salmo trutta* (teleostei: salmonidae). Bulgarian Journal of Agricultural Science. Vol. 23, pp: 485-490.

29. **Thomas, P. and Robertson, L., 1991.** Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anesthesia with MS 222, quinaldine sulphate and metomidate. Aquaculture. Vol. 96, pp: 69-86.

30. **Uribe, C.; Folch, H.; Enriquez, R. and Moran, G., 2011**. Innate and adaptive immunity in teleost fish: A review. Veterinarni Medicina. Vol. 56, pp: 486-503.

31. **Velišek, J. and Svobodova, Z., 2004.** Anaesthesia of common carp with 2-phenoxyethanol: Acute toxicity and effects on biochemical blood profile. Acta Vetrinaria Brno. Vol. 73, pp: 247-252.

32. **Velisek, J.; Svobodova, Z. and Piackova, V., 2007.** Effects of 2-phenoxyethanol anesthesia on haaematological profile on common carp (*Cyprinus carpio*) and rainbow trout. Acta Vetrinaria Brno. Vol. 76, pp: 487-492.

33. **Wedemeyer, G.A., 1997.** Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. pp. 35-72. In: Iwama G.K., Pickering A.D., Sumpter J.P., Schreck C.B. (eds.). Fish Stress and Health in Aquaculture. Cambridge University Press, Cambridge.

34. **Woolsey, J.; Holcomb, M.; and Ingermann, R.L., 2004.** Effect of temperature on clove oil anesthesia in steelhead fry. North American Journal of Aquaculture. Vol. 66, pp: 35-41.