

## بررسی کارایی آرام بخشی لیدوکائین بر مولدین ماهی تیلاپای نیل

### *Oreochromis niloticus*

#### چکیده

در این مطالعه تأثیر آرام بخشی لیدوکائین بر مولدین گونه تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*) در مرکز تحقیقات آبی پروری آب‌های شور داخلی - ایستگاه تحقیقاتی بافق در شرایط آزمایشگاهی باهدف تعیین غلظت‌های مناسب و مؤثر داروی فوق بررسی گردید. برای این منظور از ۴ غلظت متفاوت در ۴ تیمار (۶۰، ۸۰، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) استفاده شد. میزان اثربخشی این غلظت‌ها با اندازه‌گیری زمان‌های بیهوشی و احیا در تیمارهای مختلف بررسی گردید. زمان‌های بیهوشی به‌طور معنی‌داری با افزایش غلظت ماده بیهوشی برای تمام تیمارها کاهش نشان داد. زمان احیاء نیز با افزایش غلظت مواد بیهوشی افزایش نشان داد ( $P < 0/05$ ). ضرایب همبستگی بین زمان‌های احیاء و غلظت‌ها به‌صورت ( $R^2 = 0/93$ )  $IS_3 = 153/25x^{-1/065}$  برای لیدوکائین محاسبه گردید. به‌طور مشابه ارتباط معنی‌دار مثبت ( $P < 0/05$ ) بین غلظت مواد بیهوشی و زمان رسیدن به احیاء کامل ( $RS_3$ ) مشاهده گردید. ضرایب همبستگی بین زمان‌های احیاء و غلظت‌ها به‌صورت ( $R^2 = 0/99$ )  $RS_3 = 0/0321x^{1/1598}$  برای لیدوکائین محاسبه گردید. بنابراین با توجه به نتایج به‌دست‌آمده لیدوکائین در غلظت‌های پایین‌تر بر میزان بیهوشی و احیاء مجدد در ماهی تیلاپای نیل مؤثرتر است. همچنین این ماده از نظر ایمن بودن و کم‌هزینه بودن نسبت به سایر مواد بی‌هوش کننده، ارجح است.

**واژگان کلیدی:** آرام بخشی، لیدوکائین، ماهی تیلاپای نیل، *Oreochromis niloticus*.

امیر هوشنگ بحری<sup>۱\*</sup>

اسماعیل رشیدی<sup>۲</sup>

۱. استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس، بندرعباس، ایران
۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس، بندرعباس، ایران

\*مسئول مکاتبات:

amirbahri52@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۶/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۷/۱۳

کد مقاله: ۱۳۹۴۰۴۰۳۳۶

#### مقدمه

تولید آبزیان از دو منبع آبی‌پروری و صید بر اساس آمار سازمان خوار و کشاورزی طی ۵ دهه اخیر افزایش یافته و در سال ۲۰۱۲ به رقم ۱۵۸ میلیون تن رسیده است. نرخ افزایش تولید آبزیان برای مصرف انسانی در ۵ دهه گذشته به‌طور متوسط معادل ۳/۲ درصد بوده که نسبت به نرخ افزایش جمعیت جهانی در همین زمان ۱/۶ درصد بیشتر بوده و این حاکی از افزایش میانگین مصرف سرانه آبزیان در جهان بوده است. مصرف سرانه آبزیان از مقدار ۹/۹ کیلوگرم در دهه ۱۹۶۰ به بیش از ۱۹/۲ کیلوگرم در سال ۲۰۱۲ رسیده است که نمایانگر استقبال عمومی جهان از افزایش مصرف آبزیان است (FAO, 2014).

ماهی تیلاپیا سومین آبی‌پروری جهان است که به دلیل خصوصیات مثبت از جمله امکان تطابق با محیط جدید، تولیدمثل سریع و رشد مناسب در بیش از صد کشور جهان به‌عنوان ماهی پرورشی پذیرفته‌شده است. تیلاپیا در سال‌های ۱۹۵۰ و ۱۹۶۰ به‌عنوان یک ماهی شگفت‌انگیز به بسیاری از کشورها معرفی شد. اما به دلیل حصول تجربیات بد حاصل از تخم‌ریزی زیاد آن در استخرها و حاصل شدن ماهیان ریز و کم‌ارزش هنگام صید، بسیاری از پرورش‌دهندگان از پرورش آن منصرف شده و آن را یک ماهی هرز نامیدند.

ولی امروزه روش‌ها و تکنیک‌های آبی‌پروری در بیش از ۲۰ سال گذشته تحول عظیمی در پرورش تیلاپیا ایجاد کرده‌اند و آن را به یکی از



مهم‌ترین ماهیان استخوانی قابل پرورش در جهان تبدیل نموده‌اند (Deriggi et al., 2006).

مواد بی‌هوش کننده متفاوتی برای ماهی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Summerfelt and Smith, 1990). از مهم‌ترین مواد بی‌هوش کننده‌ای که در آبی‌پروری مورد استفاده قرار می‌گیرند می‌توان تریکائین متان سولفونات (MS 222)، بنزوکائین، پودر گل میخک و دو فنوکسی اتانول را نام برد (Veliseke et al., 2007). مواد بی‌هوشی مختلفی در مراحل تحقیقاتی بر روی ماهیانی که جنبه غذایی ندارند مورد ارزیابی قرار گرفته است (Coyle et al., 2004).

تریکائین متان سولفونات (MS 222) یک ایزومر از بنزوکائین است که دارای یک رادیکال سولفونات اضافه می‌باشد و باعث حلالیت بیشتر آن و همچنین افزایش میزان اسیدیته آن می‌گردد (Congleton et al., 2006). این ماده بی‌هوشی بیش از سایر مواد بی‌هوشی در آبی‌پروری مورد استفاده قرار می‌گیرد و میزان غلظت پیشنهاد شده برای بی‌هوشی قزل‌آلای رنگین کمان ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد (Kolanczyk et al., 2003). پودر گل میخک نیز از جوانه گیاه گل میخک با اسم علمی *Eugenia aromaticum* به دست می‌آید (Keene et al., 1998). میزان غلظت پیشنهادی برای بی‌هوشی قزل‌آلای رنگین کمان ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شده است (Kolarova et al., 2007). اتیلن گلیکول متانول اتر (2-phenoxyethanol) دارای کاربرد فراوانی در آبی‌پروری است و معمولاً در هنگام فعالیت‌های کوتاه‌مدت قبل از فرآیند تکثیر مصنوعی با غلظت پیشنهادی ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر مورد استفاده قرار می‌گیرد (Kolarova et al., 2007).

لیدوکائین که معمولاً بانام‌های لیگنوکائین یا کیزلوکائین نیز شناخته می‌شود در آب حل نمی‌شود اما در استون و اتانول به خوبی حل می‌گردد. لازم به ذکر است که از طریق آب‌شش ماهی به راحتی قابل جذب می‌باشد. معمولاً از این دارو برای بی‌حسی موضعی کوتاه‌مدت، کاهنده ریتم و ضربان قلب و بی‌حسی عمومی در انسان استفاده می‌شود. لیدوکائین نسبتاً ارزان است، به راحتی می‌توان آن را تهیه کرد و غلظت‌های مورد استفاده‌ی آن بر روی ماهی‌ها هیچ خطری برای انسان ندارند.

Houston و همکاران (۱۹۷۳) غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر این ماده را بر روی قزل‌آلای *Salvelinus fontinalis* و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) استفاده کرده‌اند. لیدوکائین به سرعت و بدون هرگونه اتفاق نامطلوب اثر خود را می‌گذارد (ظرف ۱ دقیقه یا کمتر) در زمانی برابر با ۳ یا ۴ برابر زمان اثرگذاری و القاء احیاء حاصل می‌شود. به علاوه این دارو از حاشیه‌ی امنیت خوبی برخوردار است (Ross and Ross, 1999).

شریف پور و همکاران (۱۳۸۱) اثر بی‌هوش‌کنندگی اسانس گل میخک در شرایط مختلف pH و درجه حرارت در بچه ماهی کپور معمولی را بررسی نمودند. نتایج نشان داد که اسانس میخک در تمامی آزمایش‌ها، بی‌هوشی موردنظر را در زمانی کمتر از سه دقیقه ایجاد می‌کند، ولی زمان‌های بازگشت تعادل و بازگشت واکنش به محرک خارجی در بیشتر موارد طولانی‌تر از پنج دقیقه بود. بهترین عملکرد اسانس گل میخک در غلظت ۱۰۰ قسمت در میلیون و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و پی‌اچ‌های ۷ و ۸ و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و پی‌اچ ۹ آب مشاهده گردید. در این تحقیق اسانس گل میخک به‌عنوان یک بی‌هوش‌کننده مناسب برای بچه ماهی کپور معمولی مورد تأیید قرار گرفت.

Rivera Lopes و همکاران (۱۹۹۱) با استفاده از ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از داروی لیدوکائین (که با ۱ گرم بر لیتر بیکربنات سدیم تقویت شده بود) توانستند کپور مکزیک *Algansea lacustris* را به خوبی بی‌حس کنند.

Rodriguez –Esquivel (۱۹۹۵) در تحقیقات خود نشان دادند که استفاده‌ی مکرر از داروی لیدوکائین برای بی‌حس کردن ماهی کپور معمولی هیچ‌گونه اثر مخربی روی این گونه ندارد.

Hseu و همکاران (۱۹۹۸) میزان اثربخشی چهار ماده بی‌هوشی را بر ماهی سی‌بریم گونه *Sparus sarba* بررسی نمودند. بر اساس نتایج به دست آمده از آن‌ها غلظت ماده بی‌هوشی مؤثر از نظر مدت‌زمان بی‌هوشی و احیاء مجدد برای ماده بی‌هوشی کوئین آلدوئین ۹ میکرو لیتر بر لیتر، کوئینات ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر، MS-222 میلی‌گرم بر لیتر ۱۰۰، بنزوکائین ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و دو فنوکسی اتانول ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر دست آمده است.

Weber و همکاران (۲۰۰۹) میزان اثربخشی چهار ماده بیهوشی را بر ماهی *Solea senegalensis* بررسی نمودند. در مطالعات آن‌ها مدت‌زمان بیهوشی و احیاء مجدد ماهیان در تیمارهای مختلف با مواد بیهوش‌کننده متفاوت اندازه‌گیری گردید که بر این اساس ماده بیهوش‌کننده دو فنوکسی اتانول دارای بیشترین تأثیر بر ماهیان بود اگرچه سایر مواد نیز در بیهوشی و دستکاری این‌گونه مناسب می‌باشد.

Mohammadizarejabad و همکاران (۲۰۰۹) تأثیر ماده بیهوشی پودر گل میخک را بر فاکتورهای خونی بچه ماهی‌های فیل ماهی (*Huso huso*) بررسی نمودند. برای این منظور فیل ماهیان را در معرض غلظت‌های مختلف پودر گل میخک به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده و فاکتورهای خونی را بلافاصله پس از بیهوشی کامل و بعد از ۲۴ ساعت اندازه‌گیری نمودند. بر اساس یافته‌های آن‌ها این میزان ماده بیهوشی موجب افزایش معنی‌داری در میزان هماتوکریت، هموگلوبین و تعداد کل اریتروسیت گردید. البته غلظت این فاکتورها پس از ۲۴ ساعت به حالت اولیه برگشت، بنابراین طبق نتایج آن‌ها غلظت‌های ۱۷۵ تا ۳۵۰ میلی‌گرم بر لیتر تأثیر مضر بر پارامترهای خونی فیل‌ماهی‌ها ندارد.

Perdikaris و همکاران (۲۰۱۰) تأثیرات ماده بیهوشی عصاره گل میخک و ارتباط آن با اندازه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و ماهی طلایی (*Carassius auratus*) را بررسی نمودند. بر اساس مطالعات آنان غلظت‌های مختلف عصاره گل میخک را بر تیمارهای مختلف این دو گونه بر اساس اندازه بررسی نمودند. طبق نتایج آن‌ها مدت‌زمان تأثیر ماده بیهوشی در ماهیان بزرگ‌تر بیشتر از ماهیان کوچک‌تر بود و مدت‌زمان احیاء در هر دو گروه از ماهیان بیشتر بود. عصاره گل میخک تغییرات قابل‌ملاحظه‌ای را در شاخص‌های فیزیولوژیک ماهی طلایی در مقایسه با تیمار شاهد از خود نشان نداد. در صورتی که تغییرات معنی‌داری در شاخص‌های خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به وجود آورد. نتیجه نهایی اینکه برای هر دو گونه عصاره گل میخک به‌عنوان یک داروی بیهوشی مؤثر بوده و کمترین میزان استرس را در ماهیان ایجاد و هیچ‌گونه مرگ‌ومیر را موجب نمی‌شود.

Velisek و همکاران (۲۰۰۹) تأثیرات چهار ماده بیهوشی را بر ترکیبات بیوشیمیایی خون و بیومارکرهای استرس را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی نمودند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات آن‌ها بافت‌ها و ارگان‌های داخلی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر تمام مواد بیهوشی مورد‌استفاده شده تحت تأثیر قرار می‌گیرند. ماده بیهوش‌کننده پروپیسکین (propiscin) با غلظت ۱ میلی‌لیتر بر لیتر کمترین تأثیر را بر قزل‌آلای رنگین‌کمان دارد و می‌تواند به‌عنوان ماده بیهوشی جایگزین MS 222 معرفی گردد.

Pawar و همکاران (۲۰۱۱) تأثیر چهار ماده بیهوشی را بر اسب دریایی گونه *Hippocampus kuda* بررسی نمودند. آن‌ها بیان داشتند که میزان تأثیر ماده بیهوشی و مدت‌زمان رسیدن به مرحله احیاء مجدد بستگی به میزان غلظت ماده بیهوشی مورد‌استفاده دارد. همچنین داروی بیهوشی MS 222 و عصاره گل میخک دارای بیشترین تأثیر بر گونه فوق دارد.

Afkhami و همکاران (۲۰۱۳) کمترین غلظت مؤثر ماده بیهوشی در مواد بیهوشی مورد‌استفاده به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر برای پودر گل میخک و ۲۰۰ میکرو لیتر برای دوفنوکسی اتانول را بر مولدین ماهی صیبتی (*Sparidentex hasta*) بیان نمودند. ضرایب همبستگی بین زمان‌های احیاء و غلظت‌ها به‌صورت  $(R^2 = 0.93)$   $RS^3 = 0.166$   $C0.57$  برای پودر گل میخک و  $(R^2 = 0.96)$   $RS^3 = 0.178$   $C0.68$  برای دوفنوکسی اتانول محاسبه نمودند.

تکثیر و پرورش ماهیان دریایی در تمام نقاط جهان در وضعیت مقدماتی قرار داشته و به همین رو دارای تنگناهای متعدد و دشواری است. در این میان نقش مولدین از جنبه‌های متعددی قابل‌توجه است. چراکه این ماهیان با توجه به ویژگی‌های غیر اهلی بودن بهنگام دست‌کاری، جابجایی و یا عملیات تکثیر دچار تلفات عدیده‌ای می‌گردند که جبران آن کار دشواری است. دستیابی به روش‌هایی که بتواند با داروهای آرام‌کننده شرایط فوق را تسهیل نماید می‌تواند به‌خوبی در این راه کمک نماید. نظر به اینکه ماهی تیلایا در شرایط کشور ما در فاز ابتدایی تکثیر و پرورش می‌باشد، بنابراین مطالعات کنونی می‌تواند تأثیر مواد بیهوش‌کننده را بر روی ماهی اقتصادی فوق به نحو مطلوبی بررسی و توجیه نماید، لذا کار مزبور از دیدگاه‌های مختلفی حاوی نوآوری در سطح کشور و یا حتی کشورهای منطقه خواهد بود.

این مطالعه به منظور دستیابی به اهداف تعیین غلظت‌های مناسب و مؤثر داروی بیهوشی لیدوکائین در ماهی تیلاپپای نیل به منظور بهبود امکانات تکثیر و پرورش ماهی فوق طراحی و اجرا گردید.

## مواد و روش‌ها

این پژوهش بر روی ۷۲ عدد مولد ماهی تیلاپپای نیل (*Oreochromis niloticus*) در مرکز تحقیقات آب‌های شور داخلی بافق واقع در استان یزد در سال ۹۴ اجرا گردید.

مولدین ضد عفونی شده با تراکم ۷-۵ کیلوگرم در مترمکعب (۲۷-۲۵ عدد) درون مخازن گرد ۱۰ تنی مخصوص نگهداری مولدین ذخیره‌سازی گردیدند. کلیه مخازن به سیستم هوادهی، تخلیه آب مرکزی، شیر تنظیمی ورودی آب چاه، نور سفید (مهتابی) به میزان ۳۰۰۰-۲۰۰۰ لوکس و سیستم آب جاری (Flow through) به میزان تعویض آب ۳ درصد روزانه مجهز بودند.

مولدین ماهی تیلاپپای نیل (*Oreochromis niloticus*) را با میانگین وزنی  $250 \pm 30$  گرم و میانگین طولی  $18/13 \pm 2/25$  سانتی‌متر جداسازی و بر اساس طرح آزمایشی کاملاً تصادفی (Completely Randomized Design) ذخیره‌سازی گردیدند. در این مدت فاکتورهای کیفی آب شامل اکسیژن محلول، pH، دما و شوری اندازه‌گیری می‌گردید. همچنین جهت جلوگیری از آلودگی آب دو بار در روز (صبح و عصر) کف مخازن نگهداری مولدین را سیفون نموده و غذاهای خورده نشده و فضولات ماهی‌ها خارج می‌گردیدند.

از آنجایی که ماده مذکور نقش آرام‌بخشی داشته و برخلاف سایر داروها و مواد شیمیایی با افزایش غلظت در ماهی‌ها کشندگی ایجاد نمی‌نماید و با توجه به حساسیت ماهیان مولد نسبت به رخ ندادن مرگ‌ومیر و تلفات جهت بررسی میزان اثربخشی مقادیر مختلف داروهای بیهوشی ۴ تیمار ماهی با استفاده از داروی بیهوشی لیدوکائین با غلظت‌های ۴۰، ۸۰، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در نظر گرفته شد (Hseu et al., 1998). با در نظر گرفتن ۳ تکرار برای هر تیمار، غلظت‌های تهیه‌شده را در ۱۲ مخزن شفاف آماده نموده و سپس از هر تکرار ۶ عدد ماهی مولد را انتخاب و به صورت انفرادی درون این مخازن شفاف قرار داده شد و با استفاده از زمان سنج دیجیتالی مدت‌زمان شاخص‌های بیهوشی را به ترتیب شامل: ۱- مدت‌زمان توقف حرکت سرپوش آبششی ۲- توقف شنا و عدم پاسخ نسبت به دستکاری ۳- شناور شدن و توقف ماهی روی سطح آب بطوریکه بخش شکمی رو به بالا قرار بگیرد، اندازه‌گیری و ثبت گردید.

بلافاصله پس از بیهوشی کامل ماهی‌ها را درون مخازن احیاء مجدد که شامل آب چاه فیلتر شده و مجهز به سیستم هوادهی است قرار داده و مجدداً مدت‌زمان احیاء و شاخص‌های احیاء مجدد ثبت گردید. این شاخص‌ها شامل: ۱- تحرک مجدد سرپوش آبششی ۲- وارونه شدن ماهی به حالت اولیه و پاسخ به دست‌کاری و نهایتاً ۳- شنای فعال و عادی بودند (Pawar et al., 2011).

آنگاه، داده‌های هر تیمار تحت آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) one way و دوطرفه (ANOVA) Two way - قرار گرفته، در مواردی که تفاوت‌های آماری بین داده‌ها معنی‌دار بودند ( $p < 0/05$ )، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین بین تیمارها استفاده شد. وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح اعتماد ۹۵ و ۹۹ درصد تعیین گردید و آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 تحت ویندوز انجام گرفت.

## نتایج

اختلاف معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) بین مراحل بیهوشی و احیاء در غلظت‌های مختلف لیدوکائین مشاهده گردید (جدول ۱). در تمام غلظت‌های مورد آزمایش که در بخش مواد و روش‌ها ذکر گردیده است مراحل بیهوشی به‌طور کامل اتفاق افتاد. این موضوع بیانگر این مطلب است که غلظت‌های مورد استفاده برای بیهوشی کامل کافی بوده‌اند.

#### جدول ۱: زمان (دقیقه) بیهوشی و احیاء برای مولدین گونه تیلایپای نیل (*Oreochromis niloticus*) تحت تأثیر ۴

غلظت ماده بیهوشی لیدوکائین (میانگین  $\pm$  انحراف معیار).

زمان احیاء			زمان بیهوشی (دقیقه)			غلظت (میلی گرم بر لیتر)
RS <sub>3</sub>	RS <sub>2</sub>	RS <sub>1</sub>	IS <sub>3</sub>	IS <sub>2</sub>	IS <sub>1</sub>	
۲/۳۸ $\pm$ ۰/۱۶ <sup>a</sup>	۱/۳۵ $\pm$ ۰/۰۱ <sup>a</sup>	۱/۶۰ $\pm$ ۰/۱۰ <sup>c</sup>	۲/۸۲ $\pm$ ۰/۱۰ <sup>a</sup>	۲/۱۶ $\pm$ ۰/۱۰ <sup>a</sup>	۱/۵۲ $\pm$ ۰/۱۲ <sup>a</sup>	۴۰
۳/۵۲ $\pm$ ۰/۰۶ <sup>b</sup>	۲/۹۲ $\pm$ ۰/۱۰ <sup>b</sup>	۲/۰۱ $\pm$ ۰/۰۷ <sup>b</sup>	۲/۰۹ $\pm$ ۰/۰۷ <sup>b</sup>	۱/۶۲ $\pm$ ۰/۰۶ <sup>b</sup>	۱/۰۸ $\pm$ ۰/۱۵ <sup>b</sup>	۶۰
۵/۱۵ $\pm$ ۰/۱۰ <sup>c</sup>	۴/۲۱ $\pm$ ۰/۱۰ <sup>c</sup>	۳/۱۷ $\pm$ ۰/۱۱ <sup>c</sup>	۱/۶۴ $\pm$ ۰/۱۰ <sup>c</sup>	۱/۱۱ $\pm$ ۰/۱۰ <sup>c</sup>	۰/۶۸ $\pm$ ۰/۰۶ <sup>c</sup>	۸۰
۶/۸۶ $\pm$ ۰/۰۸ <sup>d</sup>	۵/۴۲ $\pm$ ۰/۱۰ <sup>d</sup>	۳/۲۷ $\pm$ ۰/۰۷ <sup>d</sup>	۱/۰۰ $\pm$ ۰/۰۹ <sup>c</sup>	۰/۸۱ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>d</sup>	۰/۴۷ $\pm$ ۰/۰۳ <sup>c</sup>	۱۰۰

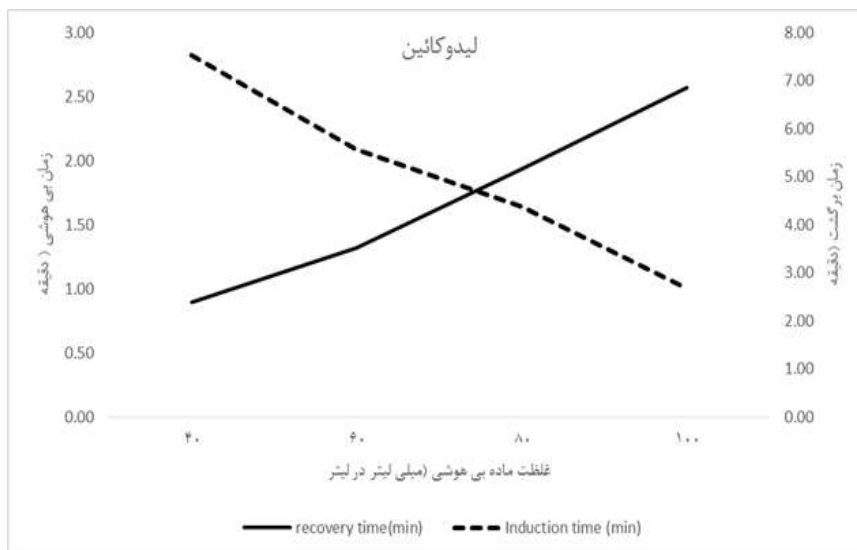
داده‌های ارائه شده در هر ستون که دارای حروف کوچک نامشابه هستند دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ( $P < 0.05$ ) می‌باشند.

زمان‌های بیهوشی به‌طور معنی‌داری با افزایش غلظت ماده بی‌هوش کننده در تمام تیمارها کاهش داشتند. زمان بیهوشی ( $IS_3$ ) از ۰/۴۷ $\pm$ ۰/۰۳ دقیقه برای غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر تا ۱/۵۲ $\pm$ ۰/۰۱۲ دقیقه برای غلظت ۴۰ میلی گرم در لیتر برای لیدوکائین محاسبه گردید (جدول ۱). زمان احیاء نیز با افزایش غلظت مواد بیهوشی افزایش نشان داد ( $P < 0.05$ ). زمان احیاء ( $RS_3$ ) در محدوده بین ۲/۳۸ $\pm$ ۰/۱۶ دقیقه برای غلظت ۴۰ میلی گرم بر لیتر تا ۶/۶۸ $\pm$ ۰/۰۸ دقیقه برای غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر برای لیدوکائین (جدول ۱).

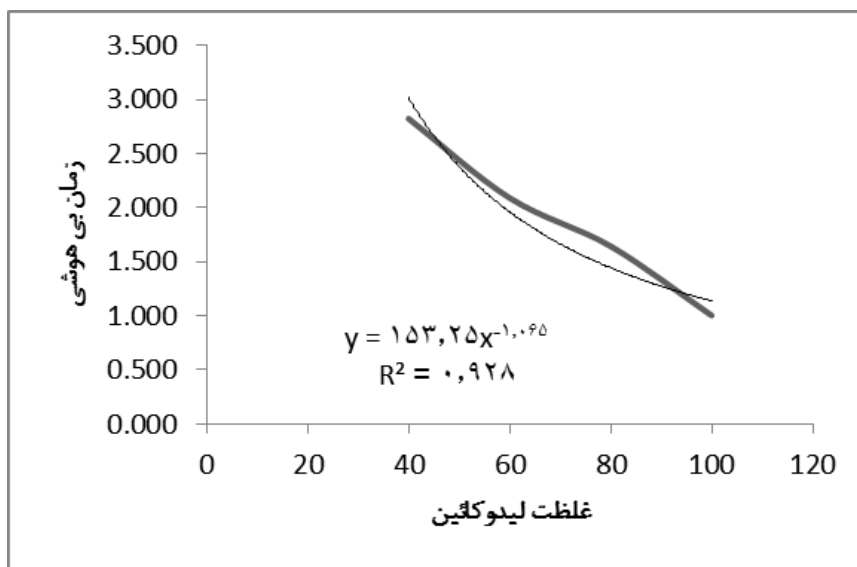
کمترین غلظت مؤثر ماده بیهوشی یا (LEC= Lowest Effective Concentration) در مواد بیهوشی مورد استفاده به میزان ۴۰ میلی گرم در لیتر برای لیدوکائین اندازه‌گیری گردید. کمترین غلظت ماده بیهوشی (LEC) برای لیدوکائین باعث تحریک سریع‌تر ماده بیهوشی در مدت ۲/۳۸ $\pm$ ۰/۱۰ دقیقه و زمان احیاء طولانی‌تر (۲/۸۲ $\pm$ ۰/۱۰ دقیقه) در ماهی تیلایپای نیل گردید. بنابراین، زمان‌های بیهوشی و احیاء توسط لیدوکائین در محدوده غلظت مؤثر ماده بیهوشی قرار داشت.

ارتباط معنی‌داری بین غلظت ماده بیهوشی و زمان بیهوشی و احیاء در تمام تیمارهای مورد بررسی مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ) که در شکل ۱ آورده شده است. ضریب همبستگی زمان‌ها برای رسیدن به مرحله بیهوشی کامل ( $IS_3$ ) و غلظت‌ها ( $X$ ) برای ماده بیهوشی در گونه تیلایپای نیل به صورت ( $R^2 = 0.93$ )  $R^2 = 153/25 \times X^{-1/0.65}$  برای لیدوکائین محاسبه گردید که در شکل ۲ آورده شده است. به‌طور مشابه ارتباط معنی‌دار مثبت ( $P < 0.05$ ) بین غلظت مواد بیهوشی و زمان رسیدن به احیاء کامل ( $RS_3$ ) در لیدوکائین مشاهده گردید.

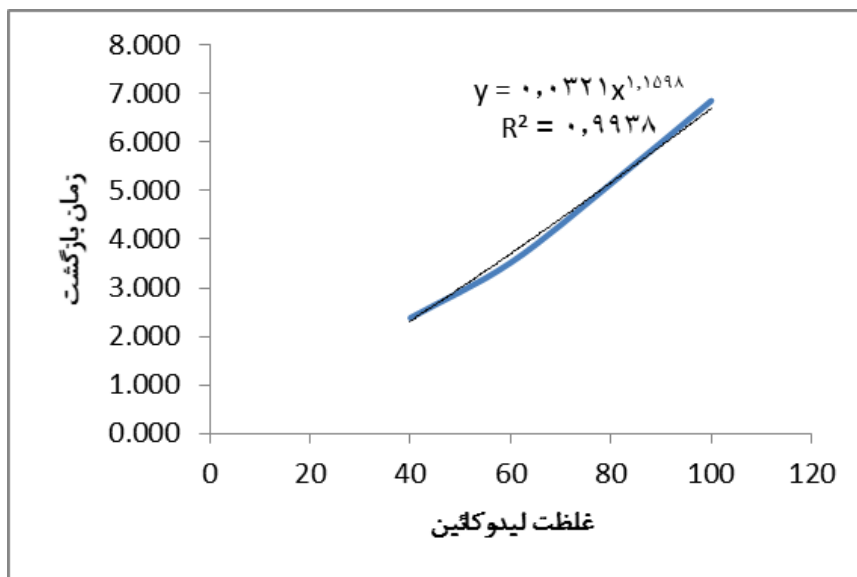
ضرایب همبستگی بین زمان‌های احیاء و غلظت‌ها به صورت ( $R^2 = 0.99$ )  $RS_3 = 0.321 \times X^{1/15.98}$  برای لیدوکائین محاسبه گردید که در شکل ۳ آمده است. لازم به توضیح است که هیچ‌گونه مرگ‌ومیری در طول فرایند آزمایش‌ها در بین تیمارها مشاهده نگردید.



شکل ۱: ارتباط بین غلظت‌های ماده بی‌هوشی لیدوکائین و زمان‌های بی‌هوشی ( $IS_3$ ) و احیاء ( $RS_3$ ) برای تیلایپای نیل (*Oreochromis niloticus*) (تعداد ۶ نمونه برای هر تکرار).



شکل ۲: ضریب همبستگی زمان‌ها (دقیقه) برای رسیدن به مرحله بی‌هوشی کامل ( $IS_3$ ) و غلظت‌ها (میلی لیتر بر لیتر) (C) برای ماده بی‌هوشی لیدوکائین در تیلایپای نیل (*Oreochromis niloticus*) ( $n=72$ ).



شکل ۳: ضریب همبستگی زمان‌ها (دقیقه) برای رسیدن به مرحله احیاء کامل ( $RS_3$ ) و غلظت‌ها (میلی لیتر بر لیتر) (C) برای ماده بیهوشی لیدوکائین در گونه تیلاپپای نیل (*Oreochromis niloticus*) ( $n=72$ ).

### بحث و نتیجه‌گیری

استرس ناشی از دست‌کاری و سایر فعالیت‌های انسانی در آبی‌پروری می‌تواند تأثیر منفی بر سلامت و رشد ماهیان داشته باشد (Hoskonen and Pirhonen, 2006). استفاده از مواد بیهوشی در آبی‌پروری مدرن بسیار متداول است و کاربرد عملی آن‌ها در موارد گوناگونی مثل انتخاب ماهی، زیست‌سنجی، نمونه‌برداری، نشانه‌گذاری، حمل‌ونقل، تکثیر مصنوعی و فرآیندهای جراحی ماهیان است (Roubach *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2009). استفاده از این‌گونه مواد ممکن است باعث کاهش استرس و آسیب رساندن به ماهی گردد، اما می‌تواند باعث تحریک پاسخ‌های ثانویه به عامل استرس‌زا گردند (Weber *et al.*, 2009). انتخاب یک ماده بیهوشی مؤثر اساساً وابسته به میزان تأثیر آن بر سیستم فیزیولوژی ماهی می‌باشد (Burka *et al.*, 1997). این میزان تأثیر وابسته به پارامترهای محیطی (دما، pH و شوری) و پارامترهای زیستی (طول، وزن، میزان چربی و گونه ماهی) می‌باشد (Ross and Ross, 1999). مشخص گردیده است که پاسخ به یک ماده بیهوشی در گونه‌های متفاوت ماهی‌ها متغیر می‌باشد. بنابراین، بررسی میزان غلظت مؤثر و نوع ماده بیهوشی در گونه‌های مختلف بسیار ضروری است (King *et al.*, 2005). مواد بیهوشی متفاوتی در ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرند (Summerfelt and Smith, 1990). در بین آن‌ها دو فنوکسی اتانول دارای چند تأثیر ثانویه منفی می‌باشد (Ortuno *et al.*, 2002) که مفید بودن کاربرد آن را زیر سؤال برده (Pickering, 1992) و ممکن است برای مصرف‌کنندگان مضر باشد (Morton, 1990)، اما بهر حال کاربرد آن در آبی‌پروری به دلایل ساده بودن کار با آن، قیمت پایین، تأثیر سریع و زمان احیاء کم در گونه مورد نظر، فراوان می‌باشد (Weyl *et al.*, 1996). بنابراین به‌عنوان یک ماده بیهوشی مناسب برای بسیاری از گونه‌ها پیشنهاد شده است (Ortuno *et al.*, 2002)، ولی با این حال استفاده از آن در ماهی‌هایی که مصرف خوراکی دارند توصیه نمی‌گردد (Hseu *et al.*, 1998). میزان تأثیر غلظت‌های مختلف ماده بیهوشی لیدوکائین در گونه‌های متعددی گزارش شده است و محدوده ۴۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر برای لیدوکائین گزارش شده است (Ross and Ross, 1999).

ماده بیهوشی ایده آل برای ماهی‌ها باید بتواند بیهوشی را در کمتر از ۳ تا ۵ دقیقه با شرط دادن کامل حالت تعادل و انقباضات ماهیچه‌ای، و احیاء مجدد در کمتر از ۱۰ دقیقه بدون هیچ‌گونه رویداد ناخوشایندی و به‌طور کاملاً سریع به‌طوری که کمترین آسیب را به بافت‌ها رسانده و علاوه بر اینکه برای مصرف‌کنندگان آن‌ها هیچ‌گونه ضرری نداشته، ارزان و قابل‌دسترس باشد، ایجاد نماید (Gilderhus and Marking, 1987; Hseu et al., 1998). اگرچه استفاده از داده‌های یک‌گونه در خصوص پذیرش ماده بیهوشی به‌طور مؤثر و ایمن در گونه دیگر، ممکن است منجر به بروز خطراتی برای گونه موردنظر گردد. تعیین دامنه حیاتی غلظت مؤثر ماده بیهوشی باید بر اساس پاسخ‌های رفتاری که در طی آزمایش‌ها و تکرارهای متعدد به دست می‌آید، تعیین گردد. در این مطالعه، از دست دادن کامل حالت تعادل و عدم انقباض ماهیچه‌ای با شرایط مرحله سوم بیهوشی در سیستم ۶ مرحله‌ای بیهوشی مطابقت داشت (Marking and Meyer, 1985; Summerfeild and Smith, 1990). به دلیل اینکه پاسخ‌های استرس در بین گونه‌ها بسیار متنوع می‌باشد، لذا اغلب بررسی غلظت‌ها و مواد بیهوشی مختلف بر گونه‌های پرورشی لازم و ضروری است (Ross and Ross, 1999). اگرچه استفاده از مواد بیهوشی در کاهش استرس به‌خوبی در مطالعات شیلاتی و آبی‌پروری موردبررسی و تأیید قرار گرفته است (Pawar et al., 2011).

در مطالعه حاضر لیدوکائین در غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر سریعاً<sup>۱۱</sup> بیهوشی را در گونه تیلایپای نیل بدون هیچ‌گونه مرگ‌ومیر و مشکل خاصی در کمتر از ۱۰ دقیقه ایجاد نمودند. اگرچه در غلظت‌های بیشتر ۸۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر برای لیدوکائین طولانی بودن زمان احیاء از نظر حفظ سلامت و بقاء ماهی تیلایپای نیل قابل‌پذیرش نبود. بنابراین هر دو غلظت ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر لیدوکائین بیهوشی مؤثر و ایمن را در این‌گونه ایجاد می‌نماید. ولی با این‌حال پیشنهاد می‌گردد ۴۰ میلی‌گرم در لیتر برای لیدوکائین استفاده گردد ولی در هنگام انجام فعالیت‌های استرس‌زا و دست‌کاری بیشتر ۶۰ میلی‌گرم در لیتر لیدوکائین ترجیح داده شود. اگرچه استفاده از حداقل غلظت ماده بیهوشی در هنگامی که ماهی موردنظر از نظر سلامت در خطر می‌باشد پرهیز گردد، زیرا همان‌طور که مشخص گردیده است موجوداتی که دارای عارضه می‌باشند در هنگام بیهوشی بیشتر در خطر مرگ‌ومیر قرار می‌گیرند (Flecknell, 1996). در چنین شرایطی می‌بایست مدت‌زمان بیهوشی به حداقل زمان ممکن تقلیل یابد و سریع ماهی به مخازن بزرگ احیاء جهت به حداقل رساندن تأثیر ماده بیهوشی بر بدن ماهی انتقال یابد (Jolly et al., 1972) و در نهایت غلظت‌های ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر برای لیدوکائین حتی برای فرآیندهای بسیار کوتاه‌مدت نیز توصیه نمی‌شود. بر اساس نتایج این مطالعات زمان‌های بیهوشی به‌طور معنی‌داری با افزایش غلظت ماده بیهوشی کاهش نشان دادند ( $P < 0.05$ ). این نتایج با سایر مطالعات گذشته مطابقت دارد که در آن‌ها ارتباط معکوسی بین غلظت ماده بیهوشی و زمان بیهوشی در ماهیان استخوانی اعلام شده است (Hseu et al., 1998; Mylonas et al., 2005; Gullian and Villanueva, 2009; Weber et al., 2009; Heo and Shin, 2010; Pawar et al., 2011).

از طرف دیگر زمان‌های احیاء به‌طور معنی‌داری با افزایش غلظت ماده بیهوشی در مولدین ماهی تیلایپای نیل افزایش نشان دادند. افزایش زمان احیاء با افزایش غلظت ماده بیهوشی در بسیاری از گونه‌های ماهیان استخوانی مناطق مرجانی گرمسیری (Cunha and Rosa, 2006). ماهی آزاد سوکی (Woody et al., 2002) و ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) (Gullian and Villanueva, 2009) گزارش شده است. اگرچه کاهش زمان احیاء با افزایش غلظت ماده بیهوشی پودر گل میخک و دو فنوکسی اتانول در ماهی سی باس اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) و ماهی سی بریم (*Sparus aurata*) توسط Mylonas و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش شده است. بنابراین به نظر می‌رسد دینامیک زمان‌های احیاء در ماهی‌های بی‌هوش شده فرآیند بسیار پیچیده‌ای است که نیازمند مطالعات بیشتر با استفاده از غلظت‌های متفاوت‌تر جهت درک هرچه بهتر فرآیند بیهوشی و احیاء در این‌گونه است.



گزارش شده است که ورود و نفوذ مواد بیهوشی در ماهیان ابتدا توسط آبشش‌ها صورت می‌گیرد. درحالی‌که سایر ارگان‌ها سهم کمتری را در جذب مواد بیهوشی دارند (Ross and Ross, 1999; Hoskonen and Pirhonen, 2006). بنابراین مطالعات بیشتر در خصوص ساختار جذب توسط آبشش‌ها در غلظت‌های متفاوت ماده بیهوشی در ماهی‌های استخوانی موردنیاز است.

اولین زمان رسیدن به مرحله بیهوشی کامل (IS3) و احیاء کامل (RS3) با مواد بیهوشی ذکرشده در گونه تیلاپای نیل به‌طور معنی‌دار با غلظت‌های مختلف مواد بیهوشی متفاوت بود ( $P < 0/05$ ). بیهوشی سریع کمتر از ۱۸۰ ثانیه و زمان احیاء کمتر از ۳۰۰ ثانیه برای ماهی‌ها بسیار ایده آل است (Marking and Meyer, 1985). ماده بیهوشی بررسی‌شده در این آزمایش حداقل زمان رسیدن به بیهوشی را ایجاد نمودند. بیهوشی نسبتاً سریع‌تر با لیدوکائین در ماهی تیلاپای نیل شاید به دلیل جذب سریع‌تر توسط آبشش‌ها باشد. از طرف دیگر تأخیر در میزان احیاء کامل شاید به دلیل طبیعت ماندگاری سطح آبشش‌ها می‌باشد که موجب افزایش مؤثر زمان احیاء می‌گردد. این‌گونه اختلاف‌ها در زمان احیاء ممکن است وابسته به گونه، اندازه، وضعیت فیزیولوژیک و شرایط زیست‌محیطی آن‌ها باشد (Burka et al., 1997; Ross and Weyl, 1999). به نظر می‌رسد در ارتباط با زمان احیاء، غلظت ماده بیهوشی نقش‌های مهم‌تری را نسبت به زمان بیهوشی ایفا کند (Weyl et al., 1996). این موضوع توسط Bonath در سال ۱۹۷۷ نیز مورد تأیید قرار گرفته است که بر اساس یافته‌های وی زمان احیاء حتی در صورت افزایش ۵ برابری زمان بیهوشی تغییری پیدا نکرد. اعتقاد بر این است که بازگشت به حالت احیاء پس از طی زمان بیهوشی به دلیل خروج ماده بیهوشی از طریق سطح آبشش‌ها است. بنابراین پس‌ازاینکه ماهی به حالت تعادل نسبی با محلول بیهوشی دست‌یافت این تعادل را حفظ می‌نماید. در طول زمان احیاء ماده بیهوشی از طریق این تبادل از دست‌رفته و بنابراین مدت‌زمان احیاء با افزایش غلظت ماده بیهوشی و زمان بیهوشی تغییر نیافته و بدون تأثیر باقی می‌ماند (Bonath, 1977; Weyl et al., 1996).

فاکتورهای متعددی شامل گونه، اندازه، وزن بدن، سطح آبشش‌ها به وزن بدن، میزان چربی، جنس، بلوغ جنسی، شرایط فیزیکی، شرایط سلامت و تراکم ذخیره‌سازی، همچنین درجه حرارت، pH، شوری و اکسیژن و محتوی مواد معدنی در آب ممکن است بر فرآیند بیهوشی در ماهی تأثیرگذار باشد (Josa et al., 1992; Weyl et al., 1996).

بنابراین با توجه به نتایج به‌دست‌آمده لیدوکائین در غلظت‌های پایین‌تر نیز بر میزان بیهوشی و احیاء مجدد در ماهی تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*) مؤثرتر می‌باشد. همچنین این ماده از نظر ایمن بودن و کم‌هزینه بودن نسبت به سایر بی‌هوش‌کننده‌ها ارجح می‌باشد.

## منابع

- شریف پور، ع.، سلطانی، م.، عبدالحی، م. و قیومی، ر.، ۱۳۸۱. اثر بیهوش‌کنندگی اسانس گل میخک (*Eugenia caryophyllata*) در شرایط مختلف pH و درجه حرارت در بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله علمی شیلات ایران، دوره ۱۱، شماره ۴، صفحات ۷۴-۵۹.
- Afkhami, M., Ahmadi, M. R., Salarzadeh A. R., and Ehsanpour, M., 2013. Comparative efficacy of two anesthetic agents in the Sobaity sea bream, *Sparidentex hasta* (Valenciennes 1830). Comparative Clinical Pathology. 22(1): 1-6.
- Bonath, K., 1977. Narkose der Reptilien, Amphibien und Fische. Paul Parey Verlag, Berlin.
- Burka, J. F., Hammell, K. L., Horsberg, T. E., Johnson, G. R., Rainnie, D.J., and Speare, D.J., 1997. Drugs in salmonid aquaculture—a review. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 20: 333-349.
- Congleton, J. L., LaVoie, W. J., Schreck, C. B. and Davis, L. E., 2006. Stress indices in migrating juvenile Chinook salmon and steelhead of wild and hatchery origin before and after barge transportation. Transactions of the American Fisheries Society, 129: 946-61.
- Coyle, S. D., Durborow, R. M. and Tidwell, H. J., 2004. Anesthetics in Aquaculture. : SRAC Publication, 3900.
- Cunha, F. E. A. and Rosa, I. L., 2006. Anaesthetic effects of clove oil on seven species of tropical reef teleost. Journal of Fish Biology. 69: 1504-1512.

- Deriggi, G. F., L., Inoue, A. K. A. and Moraes, G., 2006.** Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus): assessment of eugenol as an alternative anaesthetic. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 28: 269-274.
- FAO (Food and Agriculture Organization), 2014.** The state of World Fisheries and Aquaculture, FAO, Rome.
- Flecknell, P. A., 1996.** Laboratory Animal Anaesthesia, 2nd Ed. Academic Press, London.
- Gilderhus, P. A. and Marking, L. L., 1987.** The comparative efficacy of 16 anaesthetic chemicals on rainbow trout. *North American Journal of Fisheries Management*, 7: 288–292.
- Gullian, M. and Villanueva, J., 2009.** Efficacy of tricaine methanesulphonate and clove oil as anaesthetic for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture Research*, 40: 852–860.
- Heo, G. J. and Shin, G., 2010.** Efficacy of benzocaine as an anaesthetic for Crucian carp (*Carassius carassius*). *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*. 37: 132–135.
- Hoskonen, P. and Pirhonen, J., 2006.** The effects of repeated handling, with or without anaesthesia, on feed intake and growth in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research* 37: 409–415.
- Houston, A. H., Czerwinski, C. L. and Woods, R. J., 1973.** Cardiovascular and respiratory activity during recovery from anaesthesia and surgery in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and carp (*Cyprinus carpio*), *Journal of Fisheries Research*, 30: 1705–1712.
- Hseu, J. R., Yeh, S. L., Chu, Y. T. and Ting, Y. Y., 1998.** Comparison of efficacy of five anesthetics in goldlined sea bream, *Sparus sarba*. *Acta Zoologica Taiwanica*, 9(1), pp.00-00.
- Hseu, J. R., Yeh, S.L., Chu, Y. T. and Ting, Y.Y., 1998.** Comparison of efficacy of five anaesthetic gold lined sea bream. *Sparus sarba*. *Acta Zoologica Taiwanica*. 9: 35–41.
- Josa, E., Espinosa, J. I., Cruz, L., Gil, M., Falceto, V. and Lozano R., 1992.** Use of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic agent in goldfish (*Cyprinus carpio*). *The Veterinary Record*, 131, 468.
- Keene, J. L., Noakes, D. L. G., Moccia, R. D. and Soto, C. G., 1998.** The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 29:89–101.
- King, W. V., Hooper, B., Hillsgrove, S., Benton, C. and Berlinsky, D. L., 2005.** The use of clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate and 2-Phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L.). *Aquaculture Research*, 36: 1442–1449.
- Kolanczyk, R. C., Fitzsimmons, P. N., McKim, J. M., Erickson, R. J. and Schmieder, P. K., 2003.** Effects of anesthesia (tricaine methanesulfonate, MS222) on liver biotransformation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*. 64, 177–184.
- Kolarova, J., Velisek, J., Nepejchalova, L., Svobodova, Z., Kouril, J., Hamackova, J., Machova, J., Piackova, V., Hajslova, J., Holadova, K., Kocourek, V., Klimankova, E., Modra, H., Dobsikova, R., Groch, L. and Novotny, L., 2007.** Anaesthetics for Fish. : RIFCH Vodnany, Methods, 77. 19 pp. (In zech).Ortuno.
- Marking, L.L. and Meyer, F.P., 1985.** Are better anaesthetic needed in fisheries, *Fisheries*, 10: 2–5.
- Mohammadizarejabad, A., Darvish Bastami, K., Sudagar, M. and Pourali Motlagh, S., 2009.** Hematology of great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juvenile exposed to clove powder as an anaesthetic. *Comparative Clinical Pathology*, 19: 367-371.
- Morton, W. E., 1990.** Occupational Phenoxyethanol neurotoxicity: a report of three cases. *Journal of Occupational Med.* 32:42–45.
- Mylonas, C. C., Cardinaletti, G., Sigelaki, I. and Polzonetti-Magni, A., 2005.** Comparative efficacy of clove oil and 2-Phenoxyethanol as anaesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. *Aquaculture*, 246: 467–481.
- Ortunõ, J., Esteban, M. A. and Meseguer, J., 2002.** Effects of Phenoxyethanol on the innate immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) Exposed to crowding stress. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 89: 29–36.
- Pawar, H. B., Sanaye, S. V., Sreepada R.A., Harish, V., Suryavanshi, U. and Tanu Ansari, Z. A., 2011.** Comparative efficacy of four anaesthetic agents in the yellow seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker, 1852). *Aquaculture*, 311: 155-161.

**Perdikaris, C., Nathanailides, C., Gouva, E., Ujagwung Gabriel, U., Bitchava, K., Athanasopoulou, F., Paschou, A. and Paschos, I., 2010.** Size-relative Effectiveness of Clove Oil as an Anesthetic for Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum, 1792*) and Goldfish (*Carassius auratus Linnaeus, 1758*). *Acta Veterinaria Brno*, 79: 481-490.

**Pickering, A. D., 1992.** Rainbow trout husbandry-management of stress response. *Aquaculture*, 100: 125-39.

**Rivera-Lopez, H., Orbe-Mendoza, A. and Ross, L.G., 1991.** Use of xylocaine, potentiated with sodium bicarbonate, as an anaesthetic for fry and juveniles of Acumara, *Algansea lacustris Steindachner 1895*, from Lake Patzcuaro, Michoacan, Mexico, *Aquaculture Fish Management.*, 22: 15-18.

**Rodriguez-Gutierrez, M. and Esquivel-Herrera, A., 1995.** Evaluation of the repeated use of xylocaine as anaesthetic for the handling of breeding carp (*Cyprinus carpio*). in: The carp. Proceedings of 'Aquaculture' sponsored symposium, Budapest, Hungary, 1993, *Aquaculture*, 129(1-4): 431-436.

**Ross, L. G. and Ross, B., 1999.** *Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals.* Blackwell Science, Oxford. 159 p.

**Roubach, R., Gomes, L. C., Fonseca, F. A. L. and Val, A. L., 2005.** Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum (Cuvier)*. *Aquaculture Research*, 36: 1056-1061.

**Summerfelt, R. C. and Smith, L. S., 1990.** Anaesthesia, surgery and related techniques. In: Schreck, C.B., Moyle, P.B. (Eds.), *Methods for fish biology.* American Fisheries Society, Bethesda, MD, pp. 213-272.

**Velisek, J., Stejskal, V., Kouril, J. and Svobodova, Z., 2009.** Comparison of the effects of four anaesthetics on biochemical blood profiles of perch. *Aquaculture Research*, 40: 354-361.

**Velisek, J., Wlasow, T., Gomulka, P., Svobodova, Z. and Novotny, L., 2007.** Effects of 2-phenoxyethanol anesthesia on spearfish (*Silurus glanis L.*). *Veterinari Medicina*, 52:103-110.

**Weber, R. A., Peleteiro, J. B., García Martín, L. O. and Aldegunde, M., 2009.** The efficacy of 2-Phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis Kaup, 1858*). *Aquaculture*, 288: 147-150.

**Weyl, O., Kaiser, H. and Hecht, T., 1996.** On the efficacy and mode of action of 2-Phenoxyethanol as an anaesthetic for goldfish, *Carassius auratus (L.)*, at different temperatures and concentrations. *Aquaculture Research*, 27:757- 764.

**Yeo, I. K. and Mugiya, Y., 1997.** Effects of extracellular calcium concentrations and calcium antagonists on vitellogenin induction by estradiol-17 beta in primary hepatocyte culture in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 105: 294-301.

