مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۷، دوره ۷۳، شماره ۳، ۳۰۷-۲۹۹
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2018.210111.2494

تعیین غلظت نیمه‌کشنده (LC_{50}) و بررسی اثر بی‌هوش‌کنندگی اسانس اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*) در بچه‌ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

نرگس بهشتی[1] سکینه یگانه[1*] میلاد عادل[2]

۱) گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۲) گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۱۷ اردیبهشت ماه ۱۳۹۷، پذیرش نهایی: ۲۶ تیر ماه ۱۳۹۷)

چکیده

زمینه مطالعه: در دهه اخیر تمایل به استفاده از گیاهان دارویی در صنعت آبزی‌پروری رو به افزایش نهاده است. **هدف:** این مطالعه، به‌منظور تعیین غلظت نیمه‌کشندگی (LC_{50}) اسانس اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*) در طی مدت زمان ۹۶ h و بررسی اثر بی‌هوشی آن در بچه‌ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) انجام شد. **روش کار:** تعیین غلظت نیمه‌کشنده اسانس بر اساس استاندارد OECD و بصورت ساکن انجام شد. برای تعیین LC_{50}، ۱۵۰ قطعه بچه‌ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی ۱/۹۸ g ± ۲۶/۹۶ در ۶ گروه تیماربندی شدند. بعد از سپری‌شدن دوره سازش‌پذیری (دو هفته)، بچه‌ماهی‌ها در معرض غلظت‌های مختلف ۷۱/۱۲، ۷۲/۱۱، ۷۳/۱۱، ۷۴/۱۳ و ۷۵/۱۶ mg/l که به روش لگاریتمی محاسبه شدند قرار گرفتند و تغییرات رفتاری و تلفات در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ h پس از در معرض قرار گرفتن با اسانس اسطوخودوس ثبت شد. برای تعیین اثر بی‌هوشی، بچه‌ماهیان کپور معمولی در ۵ گروه ۱۰ تایی در معرض غلظت‌های صعودی (۱۶۰، ۱۶۵، ۱۷۰، ۱۷۵ و ۱۸۰ mg/l) اسانس قرار گرفتند و یک گروه بعنوان شاهد در نظر گرفته شد. **نتایج:** غلظت نیمه‌کشندگی (LC_{50}) ۹۶ h اسانس اسطوخودوس ۷۰/۹۹ mg/l تعیین گردید. کوتاه‌ترین زمان برای بی‌هوشی کامل (مرحله ۳ بی‌هوشی) در غلظت ۱۷۰ mg/l با زمان بی‌هوشی ۳/۷۴ ± ۰/۳۵ min و زمان احیا کامل ۳/۹۱ ± ۰/۵۵ min بدست آمد که بهترین غلظت بی‌هوشی اسانس اسطوخودس در این آزمایش تعیین شد. **نتیجه‌گیری نهایی:** بر اساس نتایج این تحقیق اسانس اسطوخودوس می‌تواند بعنوان بی هوش‌کننده بکار برده شود.

واژه‌های کلیدی: اسطوخودوس، بی‌هوشی، تعیین LC۵۰، کپور معمولی

مقدمه

استفاده از مواد بی‌هوش‌کننده در آبزی‌پروری به منظور رقم‌بندی، وزن‌کشی، خون‌گیری، تکثیر مصنوعی و تزریقات هورمونی، حمل و نقل از اهمیت قابل ملاحظه‌ای برخوردار است (۳۲). انتخاب یک ماده بی‌هوشی مؤثر اساسا وابسته به میزان تأثیر آن بر سیستم فیزیولوژی ماهی می‌باشد (۴). این میزان تأثیر وابسته به شاخص‌های محیطی (دما، pH، شوری، سختی) و شاخص‌های بیولوژیک (طول، وزن و گونه ماهی) می‌باشد (۱۸،۲۱). در دهه اخیر تمایل به استفاده از گیاهان دارویی در صنعت آبزی‌پروری رو به افزایش نهاده است. یکی از دلایل این امر وجود باقی‌مانده‌های مواد دارویی شیمیایی در بافت آبزیان، امکان مقاومت دارویی و عدم تأثیر مناسب این مواد بر آبزیان از یک سو و وجود اثرات سمی و سرطان‌زا بر روی اکوسیستم زنده و انسان‌ها از سوی دیگر است (۱۶). از جمله معیارهای مورد نظر جهت انتخاب یک ماده بی‌هوش‌کننده می‌توان به: عدم تحرک و شلی عضلات، ایجاد بی‌هوشی کمتر از ۵ min و ترجیحاً کمتر از ۳ min، زمان بازگشت از بی‌هوشی کوتاه (حدود ۵ min یا کمتر) و بدون عوارض جانبی (مشتقات آن به آسانی از بدن خارج شود و بر روی ایمنی و فیزیولوژی ماهی تأثیر منفی نداشته باشد)، دسترسی آسان و سالم‌بودن برای انسان اشاره کرد (۲۵).

اسطوخودوس با نام علمی *Lavandula angustifolia* از خانواده نعنایئان Labiatea است. گیاهی چندساله به ارتفاع حدود ۰/۵ m می‌رسد، خیلی پرشاخه، ساقه‌های آن ۴ گوش، با برگ‌های متقابل سبز رنگ و پوشیده از کرک‌های سفید پنبه‌ای است و برگ‌های آن در بهار ظاهر می‌شود (۱۷). ترکیبات شیمیایی عمده اسانس اسطوخودوس شامل لینالول (۲۷/۸۹٪)، کامفور (۱۰/۸۲٪)، ۱ و ۸ سینئول (۹/۰۵٪)، آلفا ترپینئول (۵/۰۴٪)، بورنئول (۷/۲۹٪) و استات لینالول (۸/۸۶٪) می‌باشد (۲۹). Santos و Rao در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که ۱ و ۸ سینئول در تست رایزینگ (Writhing) اثر ضد درد در موش سوری دارد. بنابراین با توجه به حضور درصد بالایی از این ماده در اسانس این گیاه ممکن است اثر بیهوشی‌کنندگی داشته باشد (۱۱). همچنین یکی از موارد مهم در انتخاب ماده بی‌هوشی فاصله غلظت مؤثر در بی‌هوشی و غلظت سمیت می‌باشد (۶). در حال حاضر بهترین و متداول‌ترین داروی بی‌هوشی در صنعت تکثیر و پرورش ماهی، تریکایین‌متان‌سولفانات با نام تجاری MS۲۲۲ است. ولی این دارو نسبتاً گران‌قیمت است و امکان دسترسی آسان به آن در تمام کشورها وجود ندارد (۱۹). پودر گل میخک در آب قابل حل بوده، و به دلیل دسترسی آسان در آبزی‌پروری به صورت

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۱-۳۳۶۸۷۵۷۴ نمابر: ۰۱۱-۳۳۶۸۷۷۱۵ Email: s.yeganeh@sanru.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

متداول اســتفاده می‌شــود (۱۸). با این وجود، گل میخک معایبی نیز دارد. از جمله اینکه شــاخص درمانی یا نســبت غلظت درمانی به غلظت سمی آن نســبتاً پایین است به‌طوری‌که در مطالعه Velisek و همکاران در سال ۲۰۰۵ این نســبت برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ۲/۷: ۱ تعیین شــد. علاوه بر این اســانس میخک روی حس بویایــی ماهیان به‌خصوص آزاد ماهیان اثر منفی دارد (۳۱). مطالعاتی در ارتباط با بی‌هوشی ماهیان با استفاده از گیاهان دارویی انجام شــده اســت که اگرچه بیشــتر مطالعات مربوط به میخک می‌باشد، اما تعدادی مطالعه در مورد استفاده از سایر گیاهان دارویی برای بی‌هوشــی ماهی وجــود دارد، از جمله مطالعات انجام‌شــده می‌توان بــه مطالعــه Shariphpoor و همکاران در ســال ۲۰۰۲ در بررســی اثر درجه‌حرارت و pH بر بی‌هوش‌کنندگی اسانس گل میخک در بچه‌ماهیان کپور معمولی (۲۵)، Abtahi و همکاران در سال ۲۰۰۲ در بررسی مقایسه غلظت کشــنده (LC۵۰) اســانس میخک و تری‌کایین‌متان‌ســولفانات در بچه‌ماهــی تاس‌ماهــی ایرانــی (*Acipenser persicus*)، قــزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (۱)، Mohammadi Arani در سال ۲۰۰۶ در بررسی غلظت بهینه بی‌هوشــی تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) با اســانس میخــک (*Eugenia caryophyllata*) (۱۴)، Shariph Rohani و همکاران در ســال ۲۰۱۱ در استفاده از اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) در بی‌هوشــی ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (۲۶)، Akhlaghi و Mirab Brojerdi در ســال ۱۹۹۹ در بررســی اثــر بی‌هوش‌کنندگی و تعیین غلظت کشــنده پودر گل میخک در ماهی قــزل‌آلای رنگین‌کمان (۲)، Sadigh Eteghad و همــکاران در ســال ۲۰۰۸ اثــرات بیهوشــی عصاره گیاهــان ســنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis*)، بادرنجبویه (*Melissa officinalis*)، خشــخاش (*Papaver samniferum*) و شــقایق (*Papaver bracteatum*) بر ماهی قرمز حوض (Carassius auratus) (۲۲)، Yeganeh و Maleki در ســال ۲۰۱۲ در بررســی اثر بیهــوش کنندگــی عصــاره ســنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis*)، بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) و مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) بر روی بچه‌ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (۳۴)، Mousavi و همــکاران در ســال ۲۰۱۲ در بررســی تعیین محدوده ســمیت و غلظت نیمه‌کشندگی اوژنول در ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*) (۱۵)، Velisek و همکاران در سال ۲۰۰۵ در بررسی سمیت حاد اسانس گل میخک در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (۳۱) و Cunha و همکاران در سال ۲۰۱۰ در بررسی اســانس *Lippia alba* در بی‌هوشی گربه‌ماهی نقره‌ای (*Rhamdia quelen*) (۵) اشــاره داشــت. با توجه به مطالب عنوان شده و امکان استفاده از اســانس اسطوخودوس به‌عنوان بی‌هوش‌کننده، هدف از این تحقیق، بررســی اثرات بی‌هوشی‌کنندگی اسانس اسطوخودوس در بچه‌ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و تعیین ترکیب شیمیایی و غلظت نیمه‌کشنده (LC۵۰) ۹۶ h اسانس این گیاه می‌باشد.

مواد و روش‌کار

برای انجام این آزمایش ۳۲۰ قطعه بچه‌ماهی کپور معمولی با میانگین وزنــی ۱/۹۸ g ± ۲۶/۹۶ از کارگاه پرورش نصر ماهیان شهرســتان ســاری خریداری و به ســالن ونیرو دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری منتقل گردیدند. ماهی‌ها به ظاهر ســالم بوده و بــه مدت ۱۰ روز به منظور ســازش‌پذیری با شرایط در مخازن، با پلت اکسترود ماهی کپور معمولی با قطــر ۲/۵±۰/۲ mm (کارخانه خوراک دام و آبزیان مازندران) دو بار در روز به میزان ۳٪ وزن بدن در دو نوبت صبح و عصر تغذیه شــدند. در این مدت فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب شامل: اکسیژن محلول بوسیله اکسیژن‌متر CMD ۲۰۰ ساخت انگلیس، pH بوسیله pH متر مدل Sartorius, PB-۱۱، دما بوسیله دماسنج، سختی (TDS) و هدایت الکتریکی (EC) بوسیله EC ســنج مدل Senciun Hach، ساخت آمریکا اندازه‌گیری شد. در این مدت به منظور حفظ کیفیت آب، تعویض روزانه آب به میزان ۳۰٪ از حجم مخازن انجام می‌گرفت.

تهیه و سنجش ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس اسطوخودوس: اسانس اســطوخودوس از شرکت دارویی باریج اسانس کاشان تهیه شد. جداسازی و شناســایی ترکیبات اسانس با استفاده از دســتگاه‌های گازکروماتوگرافی (GC) و گاز کروماتوگرافی متصل به طیف‌ســنج جرمی (GC/MS) انجام شد. کروماتوگراف گازی مدل (Agilent (USA ۷۸۹۰N مجهز به دتکتور FID (یونیزاســیون شعله هیدروژن)، ســتون HP-۵M۵ به طول m ۳۰، و قطــر داخلی mm ۰/۲۵ بــود. ضخامت لایه فاز ســاکن µ ۰/۲۵ بود؛ گاز حامل هلیوم و ســرعت جریان گاز حامــل ml/min ۱ بود. برنامه حرارتی °C ۴۰ تا ۲۵۰ با سرعت °C/min ۳ و دمای محفظه تزریق °C ۲۶۰ بود. کروماتوگراف گازی متصل به طیف‌ســنج جرمی مدل Agilent ۵۹۷۵C، با سیســتم تله یونی و ستون HP-۵M۵ به‌طول m ۳۰، قطر داخلی mm ۰/۲۵ و ضخامت لایه فاز ساکن µ ۰/۲۵ بود. برنامه حرارتی °C ۴۰ تا ۲۴۰ با ســرعت °C/min ۴ بود. گاز حامل هلیوم، سرعت جریان گاز حامل C/ min° ۱ و انرژی یونیزاسیون در طیف‌سنج جرمی معادل EV ۷۰ بود. درجه حرارت محفظه تزریق °C ۲۶۰ و دمای ترانســفر لاین °C ۲۶۰ تنظیم شد (۲۳).

آزمایــش تعیین محدوده ســمیت و غلظــت کشــنده (LC۵۰): برای تعییــن غلظــت نیمه‌کشــنده (LC۵۰) اســانس اســطوخودوس از روش اســتانداردOrganization Economic Cooperation and Development (OECD) بصــورت ســاکن اســتفاده شــد کــه در آن غلظت‌های اسانس اسطوخودوس در طول دوره آزمایش در محیط آزمایشی ثابت بود. ابتدا در آزمایش پایه از غلظت‌های mg/l ۷۵ و ۱۰۰ استفاده شد

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱. آنالیز مواد تشکیل‌دهنده و میزان (٪) آن‌ها در اسانس اسطوخودوس با استفاده از GC/MS.

ترکیبات	(٪)	ترکیبات	(٪)
methyl-۲ ,Pentene-۱	۰/۰۸	۳-Cyclohexen-۱-ol, ۴-methyl	۲/۴۸
Tricyclene	۰/۰۷	Alpha,Terpineol	۲/۴۱
Alpha,pinene	۲/۳۸	۱, ۶-Octadien-۳-ol, ۳, ۷-dimethyl	۱/۹۳
Camphene	۰/۸۸	Trans- Anethole	۰/۵
Bicyclo	۲/۷	Lavandulyl Acetate	۰/۹۱
beta.-Myrcene	۱/۲۶	trans-Caryophyllene	۰/۷۵
Delta.۳-Carene	۱/۴	trans-.beta.-Farnesene	۱/۴۶
۱, ۸-Cineole	۲۵/۱۴	Butanoic acid,۳, ۷-dimethyl	۰/۱۴
cis-Ocimene	۳/۶۴	gamma.-Terpinene	۰/۶۶
Alpha,Terpinolene	۰/۷۴	Caryophyllene oxide	۰/۲۷
Linalol	۱۸/۲۶	Alpha-Cadinol	۰/۲۸
Camphor	۷/۲۶	Alpha-Bisabolol	۰/۶۱
Borneol	۱۰/۵۲		

کـه موجب تلفات ۱۰۰٪ ماهیان عرض ۱۲ h گردید. سـپس غلظت‌های ۷۱/۱۲، ۷۲/۱۱، ۷۳/۱۱، ۷۴/۱۳ و ۷۵/۱۶ کـه بـه روش لگاریتمی (رابطه ۱) بین غلظتی که در آن تلفاتی مشاهده نشد (۷۰ mg/l) و غلظتی که صد در صد تلفات طی ۲۴ h (۷۵ mg/l) مشـاهده شد، استفاده گردید. در طول دوره آزمایش با هر یک از غلظت‌های ذکر شده تعداد تلفات در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ h پس از مجاورت ماهی با اسانس اسطوخودوس ثبت شد.

رابطه ۱:

$X= (\text{Log } Cn- \text{Log } C۱)/ n-۱$

$C_۱$ = غلظت تیمار اول

C_n = غلظت در تیمار آخر

X = قدر نسبت لگاریتمی

$C_۲$ = غلظت در تیمار دوم (($C_۲=\text{Anti log } (\log C_۱ + X)$))

$C_۳$ = غلظت در تیمار سوم(($C_۳=\text{Anti log } (\log C_۲ + X)$))

آزمایش تعیین غلظت بی‌هوشـی: بی‌هوش کـردن ماهیان به روش غوطه‌وری صورت گرفت. ابتدا یک آزمایش پایه به منظور تعیین غلظت‌های مناسـب اسـانس صورت گرفت، که در غلظت‌های کمتـر از ۱۶۰ mg/l بی‌حسی را در ماهیان ایجاد نکرد. غلظت‌های تعیین‌شده، ابتدا به نسبت ۱ به ۱۰ در اتانول ۹۵٪ حل شد. سپس ماهیان (۱۰ قطعه بچه‌ماهی) هر تیمار بطور مجزا به تانک محتوای غلظت مشخص اسانس منتقل شدند. هوادهی در تانک‌ها توسـط سنگ هوا انجام می‌شد. بچه‌ماهیان ۲۴ h قبل از انجام شـروع آزمایش غذادهی نشدند. آزمایش در ۶ تیمار با غلظت‌های مختلف ۰، ۱۶۰، ۱۶۵، ۱۷۰، ۱۷۵ و ۱۸۰ mg/l اسانس اسطوخودوس با سه تکرار انجام شد. زمان شروع بی‌هوشی (توقف حرکت سرپوش آبششی و رفتن به کناره‌های ظرف)، زمان بی‌هوشـی کامل (مرحله ۳ بی‌هوشی: شناور شدن و توقف ماهی در کف تانک) و زمان بازگشـت از بی‌هوشی (تحرک مجدد سرپوش آبششی و شنای فعال) ثبت شد (۳۱). سپس ماهیان بی‌هوش شده به تانک‌های دیگری که محتوی آب تازه بدون اسانس همراه با هواده بود منتقل شدند و زمان بازگشت از حالت بی‌هوشی و برگشت به حالت طبیعی توسط کرنومتر دیجیتال ثبت شد.

تجزیـه و تحلیـل آمـاری: داده‌های مربوط به غلظت نیمه‌کشـندگی ($LC_{۵۰}$) اسطوخودوس در طی مدت زمان ۹۶ h با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۱ پردازش و با استفاده از روش آماری Probit Analysis مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. آزمایش تعیین غلظت بی‌هوشی در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد و آنالیز داده‌ها پس از اطمینان از نرمال‌بودن داده‌ها با آزمون Kolmogorov-Smirnov با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسـخه ۲۱ و بـا روش آنالیـز واریانـس یک‌طرفـه (One-Way ANOVA) انجام گرفت و مقایسه میانگین‌ها با کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) و در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد.

نتایج

تعیین ترکیب شـیمیایی اسانس اسـطوخودوس: در آنالیز شیمیایی اسانس اسطوخودوس بکار رفته در این تحقیق که به روش کروماتوگرافی گاز مایع متصل به طیف‌سـنج جرمی (GC/MS) انجام شد، بیشترین مواد تشـکیل دهنده آن را ۱و ۸ سـینئول (Cineole-۱,۸) به میزان ۲۵/۱۴٪، لینالول (Linalool) به میـزان ۱۸/۲۶٪، کامفور (Camphor) به میزان ۷/۲۶٪، بورنئول (Borneol) به میزان ۱۰/۵۲٪ تشکیل می‌دادند. ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس به صورت کامل در جدول ۱ آمده است.

تعییـن غلظت نیمه‌کشـنده اسـانس اسـطوخودوس: پـس از انجام آزمایش‌هـای ابتدایـی بـه منظـور یافتـن محدوده کشـندگی اسـانس اسـطوخودوس بر روی ماهی کپور معمولـی غلظت‌های ۷۰-۷۵ mg/l بر اساس روش لگاریتمی به عنوان محدوده کشندگی اسانس اسطوخودوس

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲. غلظت‌های ایجادکننده ۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۹۹ ٪ تلفات پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ h مجاورت با اسانس اسطوخودوس در بچه‌ماهی کپور معمولی.

غلظت‌کشنده	غلظت کشنده ± خطای معیار (mg/l) (SE) (سطح اطمینان ۹۵٪)			
	۲۴ساعت	۴۸ساعت	۷۲ساعت	۹۶ساعت
LC۱۰	۷۲/۳۵±۰/۱۳۹	۷۱/۹۵±۰/۱۴۴	۷۰/۹۹±۰/۴۳۶	۶۹/۹۰±۰/۲۳۵
LC۳۰	۷۳/۲۳±۰/۱۳۹	۷۲/۷۸±۰/۱۴۴	۷۱/۳۸±۰/۴۳۶	۷۰/۵۴±۰/۲۳۵
LC۵۰	۷۳/۸۵±۰/۱۳۹	۷۳/۳۶±۰/۱۴۴	۷۱/۶۵±۰/۴۳۶	۷۰/۹۹±۰/۲۳۵
LC۷۰	۷۴/۴۷±۰/۱۳۹	۷۳/۹۳±۰/۱۴۴	۷۱/۹۲±۰/۴۳۶	۷۱/۴۳±۰/۲۳۵
LC۹۰	۷۵/۳۶±۰/۱۳۹	۷۴/۷۷±۰/۱۴۴	۷۲/۳۱±۰/۴۳۶	۷۲/۰۷±۰/۲۳۵
LC۹۹	۷۶/۵۶±۰/۱۳۹	۷۵/۹۲±۰/۱۴۴	۷۲/۸۴±۰/۴۳۶	۷۲/۹۶±۰/۲۳۵

جدول ۳. میانگین (± انحراف معیار) زمان شروع بی‌هوشی، بی‌هوشی کامل (مرحله ۳ بی‌هوشی) و بازگشت از بی‌هوشی در طی مجاورت ماهی کپور معمولی با غلظت‌های مختلف اسانس اسطوخودوس. حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵).

تیمارها (mg/l)	متوسط زمان شروع بی‌هوشی (min)	متوسط زمان بی‌هوشی کامل (min)	متوسط زمان برگشت از بی‌هوشی (min)
صفر (شاهد)	------	------	------
۱۶۰	۲/۴۳±۰/۲۸ a	۴/۳۷±۰/۵۰ a	۴/۵۱±۰/۳۵ b
۱۶۵	۲/۵۱±۰/۲۹ a	۴/۴۱±۰/۵۷ a	۲/۹۲±۰/۷۸ c
۱۷۰	۲/۲۳±۰/۴۷ a	۳/۷۴±۰/۳۵ b	۳/۹۱±۰/۵۵ b
۱۷۵	۲/۲۱±۰/۳۱ a	۴/۰۱±۰/۴۳ ab	۵/۳۱±۰/۶۵ a
۱۸۰	۲/۲۶±۰/۱۲ a	۳/۷۶±۰/۴۷ b	۵/۵۴±۰/۸۲ a

در زمان‌های ۲۴ h، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ تعیین گردید. غلظت ۷۰ mg/l اسانس اسطوخودوس تا ۹۶ h، هیچگونه تلفاتی را به همراه نداشت. در غلظت ۷۵ mg/l تمام ماهیان در ۲۴ h اول تلف شدند. علایم رفتاری مشاهده‌شده در بچه‌ماهیان در معرض اسانس شامل تیره‌شدن پوست، افزایش موکوس سطح بدن و تیغه‌های آبششی، افزایش تعداد دفعات باز و بسته‌شدن سرپوش آبششی بود. غلظت ۷۱/۱۲ mg/l تا ۷۲ h هیچ تلفاتی نداشت. غلظت ۷۵/۱۶ mg/l در ۲۴ h اول و ۷۴/۱۳ mg/l در ۴۸ h اول همه ماهی‌ها تلف شدند. غلظت نیمه‌کشنده (LC۵۰) ۹۶ h اسانس اسطوخودوس برای بچه‌ماهی کپور معمولی ۷۰/۹۹ mg/l تعیین شد (جدول ۲).

تعیین غلظت بی‌هوشی: بر اساس نتایج حاصله (جدول ۳) هیچ مرگ و میر یا عوارض جانبی تا ۲۴ h بعد از بازگشت از بی‌هوشی مشاهده نشد. میانگین زمان بی هوشی کامل و بازگشت از بی‌هوشی در بین غلظت‌های مختلف اسانس اسطوخودوس، اختلاف معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). میانگین زمان بی‌هوشی کامل در کمترین غلظت مورد استفاده (۱۶۰ mg/l) ۴/۳۷±۰/۵۰ min و در بیشترین غلظت مورد استفاده (۱۸۰ mg/l) min ۳/۷۶±۰/۴۷ بود (P<۰/۰۵). کمترین میانگین مدت زمان بی‌هوشی کامل در غلظت ۱۷۰ mg/l (۳/۷۴±۰/۳۵ min) که با غلظت‌های ۱۷۵ و ۱۸۰ mg/l تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). بیشترین میانگین مدت زمان بی‌هوشی کامل در غلظت ۱۶۵ mg/l، ۴/۴۱±۰/۵۷ min به دست آمد که با غلظت‌های ۱۶۰ و ۱۷۵ mg/l تفاوت معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵). در کمترین غلظت استفاده شده از اسانس اسطوخودوس (۱۶۰ mg/l) میانگین زمان بازگشت از بی‌هوشی ۴/۵۱±۰/۳۳ min و در بیشترین غلظت مورد استفاده (۱۸۰ mg/l) ۵/۵۴±۰/۸۲ min بود (P<۰/۰۵). در غلظت mg/l ۱۶۵ کمترین میانگین زمان بازگشت از بی‌هوشی ۲/۹۲±۰/۷۸ min و در غلظت ۱۸۰ mg/l بیشترین میانگین زمان بازگشت از بی‌هوشی مشاهده شد (P<۰/۰۵). میانگین مدت زمان بازگشت از بی‌هوشی در غلظت mg/l ۱۷۰، ۳/۹۱±۰/۵۵ min بود که با غلظت ۱۶۰ mg/l تفاوت معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵). میانگین زمان بازگشت از بی‌هوشی در غلظت‌های ۱۷۵ و ۱۸۰ mg/l با هم تفاوت آماری معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵)، اما با سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان دادند (P<۰/۰۵).

بحث

استفاده از هر ماده بیهوش کننده جدید و جایگزینی آن برای استفاده در سیستم بیولوژیک نیاز به تعیین میزان سمیت آن ماده دارد. در تحقیق حاضر غلظت نیمه‌کشنده (LC۵۰) ۹۶ h اسانس اسطوخودوس در ماهی کپور معمولی ۷۰/۹۹ mg/l بدست آمد. برای تقسیم‌بندی مواد و فراورده‌های دارویی از نظر سمیت از LC۵۰ ۴۸ h استفاده می‌شود (۱۶). LC۵۰ ۴۸ h اسانس اسطوخودوس در بچه‌ماهی کپور معمولی در این مطالعه (mg/l ۷۳/۳۶) نشان داد که اسانس اسطوخودوس از سمیت متوسط برخوردار است (جدول ۴). در بچه‌ماهیان در معرض اسانس اسطخودوس، تیره‌شدن پوست، افزایش موکوس سطح بدن و تیغه‌های آبششی، افزایش تعداد دفعات باز و بسته شدن سرپوش آبششی مشاهده شد. افزایش ترشح موکوس در سطح آبشش مانع انتقال اکسیژن به مویرگ‌های آبششی گردیده و با ایجاد اختلال تنفسی، موجب تلفات بچه‌ماهی‌ها می‌شود (۲۶). در مطالعه Abtahi و همکاران در سال روی سه گونه قزل‌آلای

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴. تقسیم‌بندی میزان سمیت مواد و فرآورده‌های دارویی بر اساس LC۵۰ بر حسب mg/l پس از ۴۸ h (۱۵).

میزان سمیت mg/l	محدوده غلظت نیمه‌کشندگی (LC۵۰)
سمیت خیلی کم	۱۰۰۰ >LC۵۰ <۱۰۰۰۰
سمیت کم	۱۰۰ >LC۵۰ <۱۰۰۰
سمیت متوسط	۱۰ >LC۵۰ <۱۰۰
سمیت زیاد	۱>LC۵۰ <۱۰
سمیت خیلی زیاد	۰/۱>LC۵۰ <۱
بی‌نهایت سمی	LC۵۰ <۰/۱

رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با میانگین وزن g ۴/۱، تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) با میانگین وزنی g ۴/۳ و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با میانگین وزنی g ۳/۸، غلظت سمی برای اسانس گل میخک در گونه قزل‌آلای رنگین‌کمان mg/l ۱۹۹، برای کپور معمولی mg/l ۲۷۱ و برای تاس‌ماهی ایرانی mg/l ۲۹۷ مشخص گردید (۱). در مطالعه Velisek و همکاران در سال ۲۰۰۵ مقادیر h LC۵۰ ۹۶ اسانس میخک برای ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی g ۱۵، mg/l ۱۸/۱۰ تعیین گردید (۳۱)، که اختلاف در غلظت کشنده مشاهده‌شده در مطالعات انجام‌شده ممکن است به دلیل عواملی چون گونه، اندازه و سن ماهی، درجه‌حرارت و کیفیت آب متفاوت باشد (۱۳). Shariph Rohani و همکاران در سال ۲۰۱۱، در بررسی غلظت نیمه‌کشنده اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) روی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با میانگین وزنی g ۵، مقدار h LC۵۰، ۹۶ اسانس آویشن شیرازی را mg/l ۱۳/۶ تعیین کردند (۲۶). Macova و همکاران در سال ۲۰۱۱، در بررسی غلظت نیمه‌کشنده (LC۵۰) h ۹۶ اسانس گل میخک روی ماهی گورخری (*Danio rerio*) mg/l ۱۸/۲ و در ماهی گوپی (*Poecilia reticulata*)، mg/l ۲۱/۷ تعیین کردند (۱۳). در مطالعه حاضر غلظت نیمه‌کشنده (LC۵۰) h ۹۶ اسانس اسطوخودوس mg/l ۷۰/۹۹ بدست آمد.

ترکیب شیمیایی اسانس اسطوخودوس و تأثیر آن در بی‌هوشی:

در این مطالعه ترکیب تشکیل‌دهنده اسانس اسطوخودوس شامل ۱ و ۸ سینئول (۱،۸-Cineole) به میزان ۲۵/۱۴٪، لینالول (Linalol) به میزان ۱۸/۲۶٪، کامفور (Camphor) به میزان ۷/۲۶٪، بورنئول (Borneol) به میزان ۱۰/۵۲٪ می‌باشد. طبق گزارش Taha Nejad در سال ۲۰۱۲، ترکیبات شیمیایی عمده اسانس اسطوخودوس شامل لینالول (۲۷/۸۹٪)، کامفور (۱۰/۸۲٪)، ۱ و ۸ سینئول (۹/۰۵٪) آلفا ترپینئول (۵/۰۴٪)، بورنئول (۷/۲۹٪) و استات‌لینالول (۸/۸۶٪) می‌باشد. فاکتورهای مختلف محیطی از قبیل میزان مواد غذایی موجود در خاک، شرایط اقلیمی منطقه کاشت (ارتفاع، دما و بارندگی) و زمان برداشت از عوامل مهم تأثیرگذار روی میزان ترکیبات شیمیایی تشکیل‌دهنده گیاه می‌باشند (۳۳). بی‌هوشی معمولاً با غوطه‌وری ماهی، درمحلول بی‌هوشی انجام می‌شود و ماده بی‌هوش‌کننده از طریق رشته‌های آبششی جذب شده و وارد شریان می‌شود، سپس روی سیستم عصبی مرکزی تأثیر گذاشته و ماهی را بی‌هوش می‌کند (۱۸،۲۱). بی‌هوش‌کننده‌های مختلف اثرات متفاوتی بر گونه‌های ماهی با شرایط متفاوتی از نظر سن، اندازه و جنس دارند، شرایط محیطی مانند شوری، دمای آب، مقدار اکسیژن محلول و pH در واکنش ماهی نسبت به ماده بی‌هوش‌کننده مؤثر می‌باشد (۳۵). اسانس اسطوخودوس رسپتور-هایی که در پیاز بویایی قرار دارند را تحریک کرده و پیام بویایی را به دستگاه لیمبیک منتقل می‌کند. سیستم لیمبیک مرکز احساس مغز است که می‌تواند در پاسخ به استرس انکفالین، اندورفین و سروتونین ترشح شود و در ایجاد حس آرامش مؤثر باشد (۳۳). با توجه به نتایج بدست‌آمده از این آزمایش، اسانس اسطوخودوس در غلظت‌های مختلف مورد استفاده، بی‌هوشی را درکمتر از min ۵ در بچه‌ماهی کپور معمولی القا کرده و زمان بازگشت از بی‌هوشی در غلظت‌های mg/l ۱۶۰، ۱۶۵ و ۱۷۰ اسانس در کمتر از min ۵ اتفاق افتاد، بنابراین می‌توان گفت که اسانس اسطوخودوس می‌تواند بعنوان یک ماده بی‌هوشی جدید مورد استفاده قرار بگیرد. اثر بی‌هوش‌کنندگی اسانس اسطوخودوس ممکن است به حضور مقدار زیاد ۱ و ۸ سینئول در آن مرتبط باشد (۱۱). در این مطالعه، غلظت مؤثر بی‌هوشی اسانس اسطوخودوس mg/l ۱۷۰ بدست آمد که بی‌هوشی را در مدت زمان min ۳/۷۴ ± ۰/۳۵ و زمان بازگشت از بی‌هوشی را در مدت زمان min ۳/۹۱ ± ۰/۵۵ در بچه‌ماهی کپور معمولی القا کرد. این در حالی است که در غلظت پایین‌تر با غلظت mg/l ۱۶۵، بیشترین میانگین زمان min ۴/۴۱±۰/۵۷ برای رسیدن به بی‌هوشی کامل بدست آمد. کم‌ترین زمان بی‌هوشی و احیا در این تحقیق، به‌ترتیب از غلظت‌های mg/l ۱۷۰ و ۱۶۵ با میانگین زمان min ۳/۷۴±۰/۳۵ و ۲/۹۲±۰/۷۸ به‌دست آمد. همچنین بیشترین زمان بی‌هوشی و احیا به‌ترتیب از غلظت‌های mg/l ۱۶۵ و ۱۸۰ با میانگین زمان min ۴/۴۱±۰/۵۷ و ۵/۵۴±۰/۸۲ به‌دست آمد. با افزایش مقدار اسانس، مدت زمان بازگشت از بی‌هوشی نیز افزایش یافت. در این راستا، Shariphpoor و همکاران در سال ۲۰۰۲ با بررسی غلظت‌های mg/l ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ اسانس گل میخک روی ماهی کپور معمولی نشان دادند که در تمام غلظت‌های اسانس گل میخک، بی‌هوشی در کمتر از min ۳ ایجاد شد، ولی زمان بازگشت تعادل و بازگشت به محرک خارجی در بیشتر موارد طولانی‌تر و بیشتر از min ۵ بود که دلیل آن را در تأثیر بازدارندگی اسانس گل میخک بر سیستم تنفسی ماهی و کاهش میزان تنفس و به‌تبع آن کاهش توانایی دفع ماده بی‌هوشی از سیستم آبشش ماهی دانستند (۲۵). Soltani و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان دادند که استفاده از غلظت‌های mg/l ۵۰ و ۱۰۰ اسانس و عصاره میخک پس از ۲۱۰-۱۶۶ و s ۹۹-۷۷ به‌ترتیب موجب بی‌هوشی کامل ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دمای ۱۵°C و pH برابر ۷ گردید (۱۹). Roohi و Imanpoor در سال ۲۰۱۴ با بررسی اثر بی‌هوش‌کنندگی

Archive of SID

www.SID.ir

اسانس نعناع و متیل سالیسیلات (methyl salicylate) روی ماهی کپور معمولی غلظت مناسب بی‌هوشی را به‌ترتیب ml/l ۵ و ۳ بیان کردند (۲۰). در مطالعه Mousavi و همکاران در سال ۲۰۱۲ غلظت‌های مورد مطالعه (mg/l ۱۰، ۲۰ و ۳۰) باعث اختلالاتی در تنفس گردید که می‌تواند بدلیل اثرات اوژنول بر سیستم عصبی ماهی و کاهش فعالیت تنفسی ماهی باشد. در ایـن مطالعه غلظت mg/l ۴۰ اوژنول بهترین غلظت برای بی‌هوشـی ماهی بنی (*Barbus sharpei*) تعیین شـد (۱۶). Tamaru و همکاران در سال ۱۹۹۵ بیان کردند که با افزایش غلظت دارو مدت زمان رسیدن به مرحله بی‌هوشـی عمیق کاهش می‌یابد که نتایج مطالعه حاضر نیز همسو با نتایج این محققین می‌باشد (۲۸). همچنین Hajek و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مطالعات خود دریافتند که افزایش غلظت باعث کند شدن فرایند تنفسـی توسط ماهی و طولانی‌تر شـدن مدت زمان برگشت از بی‌هوشی می‌شود (۱۰). Keene و همکاران در سال ۱۹۹۸ القای بی‌هوشی با عصاره گل میخـک را در قزل‌آلای رنگین‌کمان در غلظت mg/l ۶۰- ۴۰، min ۴-۳ و مدت زمان برگشـت از بی‌هوشـی را min ۱۴- ۱۲ گزارش کردند (۱۲). Griffiths در سـال۲۰۰۰ و Mohammadi Arani در سـال ۲۰۰۶ نتایج مشـابهی را در مطالعه روی عصاره میخک به‌دسـت آوردند و به این نتیجه رسـیدند که هر چه غلظت و مدت زمان قرارگیری ماهی در آب حاوی مواد بی‌هوش‌کننده بیشتر باشد، مرحله شروع بی‌هوشی سریع‌تر و مرحله بازگشـت از بی‌هوشی آهسته‌تر اتفاق می‌افتد (۸،۱۴). Grush و همکاران در سـال ۲۰۰۴ دریافتند که غلظت mg/l ۶۰-۴۰ اوژنول باعث بی‌هوشـی سـریع در گونه Zebra fish (*Danio rerio*) می‌شـود (۹). مطالعـات Gomes و همکاران در سـال۲۰۰۱ روی ماهی Tambaqui (*Colossoma macropomum*) نشـان داد که مدت زمان بازگشت از بی‌هوشی در ماهیانی که تحت تأثیر مقدار بالایی از ماده بی‌هوشی بنزوکائین قرار گرفتند، بالاتر اسـت (min ۸/۹)، امـا در مقادیر پایین‌تر از mg/l ۵۰ ایـن میزان min ۱/۰۲±۲/۶ بود (۷). در مطالعـه Velisek و همکاران در سال ۲۰۰۵ بیان شد که زمان بازگشت از بی‌هوشی ماهی کپور معمولی در غلظت‌های پایین mg/l ۳۰ در مدت زمان حدود min ۱۵ و در غلظت‌های بالا بتدریج با افزایش میزان غلظت تا mg/l ۹۰ این میزان افزایش یافته و به min ۳۰ رسید و با افزایش غلظت به mg/l ۱۰۰، بازگشت از بی‌هوشی اتفاق نیفتاد و گزارش شـد که زمان بازگشـت از بی‌هوشی در ماهیانی که بیشـتر از min ۱۵ در معرض ماده بی‌هوشـی قرار گیرند، زمان بازگشـت از بی هوشـی طولانی شـده و مرگ افزایش می‌یابد (۳۱)، که با نتایج این پژوهش هم‌خوانی (با افزایش غلظت اسانس، زمان احیا افزایش یافت) دارد. در مطالعهGrush و همکاران در سـال ۲۰۰۴، با افزایش غلظت اسـانس میخک (در محدوده ppm ۶۰ تا ۱۰۰)، زمان بازگشت از بی هوشی افزایش یافت. به نظر می‌رسد افزایش مدت زمان بازگشت از بی‌هوشی به دلیل تأثیر ماده بی‌هوشـی بر سیستم تنفسی و عروقی و در نتیجه کاهش نرخ تنفس و ضربان قلب می‌باشد که منجر به تأثیر سیستمیک آن و ماندگاری بیشتر اوژنول در سیستم عروقی می‌گردد (۹).

نتیجه‌گیری نهایی: نتایج این تحقیق نشان داد که غلظت mg/l ۱۷۰ اسانس اسطوخودوس می‌تواند برای بی‌هوشی بچه‌ماهی کپور معمولی به‌کار رود و به عنوان ماده بی‌هوشـی جدید معرفی شـود. شرایط متفاوت از نظر گونه، جنس و شرایط محیطی بر غلظت مؤثر در بی‌هوشی مؤثر می‌باشد، لذا تعیین آن برای هر گونه نیاز به بررسـی دارد. با توجه به نتایج به‌دسـت آمده در این پژوهش بررسـی اثرات این اسانس روی شاخص‌های خونی، استرس و بیوشیمیایی سرم و نیز باقیمانده بافتی اسانس اسطوخودوس به لحاظ بهداشت گوشت ماهی به طریقه کروماتوگرافی گازی و بررسی اثرات احتمالی پاتولوژیک این اسانس بر روی بافت‌های آبشش و پوست می‌تواند توصیه شود.

تشکر و قدردانی

از آقای مهندس خسـرو جانی خلیلی به جهت کمک‌های ایشـان در انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Abtahi, B., Shariph poor, A., Aghajanpoor, M., Rasooli, A., Faghih Zadeh, S., Omid Baigi, R., Mohammad Nazari, R. (2002) Compared LC50 clove oil (*Eugenia caryophyllata*) and MS222 in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (Cyprimus carpio). Iran Sci Fish. J. 11(3): 1-12.
2. Akhlaghi, M., Mirab Brojerdi, M. (1999) Anesthetic effect of clove tree and LC50 determination in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Vet Res. 54 (2): 49-52.
3. Bagheri, M., Soltani, R., Haj Hashemi, R., Sohailipoor, S., and Asghari, GH. (2013) Effect of Lavender Essential Oil on Pain Using Aromatherapy. J Islamic and Iran Traditional Med. 3(4): 483-488.
4. Burka, J. F., Hammell, K. L., Horsberg, T. E., Johnson, G. R., Rainnie, D. J., Speare, D. J. (1997) Drugs in salmonid aquaculture - a review. J Vet Pharmacol Ther. 20: 333-349.
5. Cunha, M. A., Barros, F. M., Lima Veek, P., Heinzmann, B. M., Loro, V. L. (2010) Essential oil of *Lippia alba*: A new anesthetic for silver catfish, *Rhamdia quelen*. Short communication.

Archive of SID
www.SID.ir

Aquaculture. 306: 403-406.
6. Ghaffari, M., Khosravani Zadeh, A. (2012) Effect of clove oil (*Eugenia cairyophillata*) essence loaded on iron nanoparticles on amino-transferase enzymes and some tissues in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Comp Pathol. 9 (4): 827-836.
7. Gomes, L. C., Chiparri-Gomes, A. R., Lopes, N. P., Roubach, R., Araujo-Lima, C. A. R. M. (2001) Efficacy of benzocaine as an anaesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. J World Aquac Soc. 32: 426-431.
8. Griffiths, S. P. (2000) The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. J Fish Biol. 57(6): 1453-1464.
9. Grush, J., Noakes, D. L. G., Moccia, R. D. (2004) The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). Zebrafish. 1(1): 46-53.
10. Hajek, G. J., Keyszejko, B., Dziaman R. (2006) The anaesthetic effect of clove oil on common carp,*Cyprinus carpio* L. Acta Ichthyol. Piscat. 36(2): 93-97.
11. Juergens, U. R., Stober, M., Kleuver, T., Vetter, H. (1998) Antiinflammatory effects of euclyptol (1,8-cineole) in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes exvivo. European J Med Res. 3: 407-412.
12. Keene, J. L., Noakes, D. L. G., Moccia, R. D., Soto, C. G. (1998) The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquac Res. 29(2): 89-101.
13. Macova, S., Dolezelova, P., Plhalova, L., Pistekova, V., Svobodova, Z. (2011) The acute toxicity of clove oil to fish *Danio rerio* and *Poecilia reticulate*. Acta Vet Brno. 80: 305-308.
14. Mohammadi Arani, M. (2006) Study on anesthetization of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fingerlings using clove (*Eugenia caryophyllata*) oil. Iran J Med Aromat Plants. 22(3): 188-192.
15. Mousavi, S. M., Majdi Nasab, E., Yavari, V., Rajabzadeh Ghatarami, E., Razi Jalali, M. (2012) Determination of toxicity and mean lethal concentration (LC50) of Eugenol on *Barbus sharpey* Iran. J Med Aromat Plants. 29 (3): 551-560.
16. Mousavi, S. M., Mirzargar, S. S., Ebrahim Zadeh, H., Khosravi, A., Bahonar, A., Ahmadi, M. R. (2009) Evaluation of antifungal activity of new combined essential oils in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. J Fish Aquat Sci. 4(2): 103-110.
17. Nasiri moghaddam, H., Bidar, N., Hassanabadi. (2012) The effect of the effect of lavender (*Lavandula angustifolia*) essential oil on performance and blood metabolites of broiler chicks. Iran. J Animal Sci Res. 4 (2): 115-121.
18. Okey, I. B., Keremah, R. I., Gabriel, U. U. (2018) The effcacy of clove (*Eugenia caryophyllata*) powder as anaesthesia on African catfshes (*Clarias gariepinus* and *Heterobranchus bidorsalis*) fingerlings. J Aquac Mar Biol. 7(4): 182-188.
19. Pirhonen, J., Schreck, C. B. (2003) Effects of anaesthesia with MS-222, clove oil and CO2 on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture. 220: 507-514.
20. Roohi, Z., Imanpoor, M. (2014) The efficacy of the oils of spearmint and methyl salicylate as new anesthetics and their effect on glucose levels in common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758) juveniles. Aquaculture. 437: 327-332.
21. Ross, L.G., Ross, B. (2008) Anesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals. (3rd ed.) Blackwell Publishing Editorial Office, London, UK. 221 p.
22. Sadigh Eteghad, S., Ghavami, S., Mortazavi, J., Mirzaei, H. (2008) Comparative survey on anesthetizing effects of medicinal herbs *Valerian officinalis*, *Melissa officinalis*, *Papaver somniferum* and *Papaver bracteatum* on gold fish (*Carassius auratus*). Iran Sci Fish J. 17 (1): 91-98.
23. Saeedi, K. A., Sayedi, F. S., Kiani, M. (2016) Evaluation of essential oil content and composition of some improved cultivars of chamomile, moldavian dragonhead and fennel in Shahrekord climate condition. Agric Crop Manage. 17(4): 1101-1109.
24. Santos, F. A., Rao, V. S. (2000) Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of 1.8-cineole a

Archive of SID

www.SID.ir

terpenoid oxide present in many plant essential oils. J Phytother Res. 4:240-244.
25. Sharifphpoor, A., Soltani, M., Abdolhay, H., Ghaumi, R. (2002) Effect of clove oil (*Eugenia caryophyllata*) at different pH and ºC in comoon carp (*Cyprinus carpio*) finger lings. Iran Sci Fish J. 11(4): 59-74.
26. Sharif Rohani, M., Haghighi, M., Assaeian, H. (2011) The lethal concentration (LC50) of *Zataria multiflora* essential oil in fries of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iran Sci Fish J. 20(2): 89-96.
27. Soltani, M., Omidbeigi, R., Rezvani, S., Mehrabi, M. R., Chitsaz, H. (2001) Study of Anesthetic effects induced by clove flower (*Eugenia caryophillata*) on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under various water quality conditions. J Fac Vet Med. 56 (4): 85-89.
28. Tamaru, C. S. C. C., Trickand, W. J., Gerald, F. (1995) Clove oil, minyak cengkeh, a natural fish anesthices sustainable aquaculture. Voail. Proceeding of the pacon conference on sustainable Aquaculture. 955: 265-371.
29. Taha Nejad, M., Barzegar, M., Sahari,. M. A., Naghdi badi, H. A. (2012) Evaluation of antioxidant of essential oil (*Lavandula angustifolia*) in crude Soybean oil system. J Med Aromat Plants. 11 (1): 127-140.
30. Vakilian, K., Karamat, A., Mousavi, A., Shariati, M., Ajami, M.E., and Atarha, M. (2011) The effect of Lavender essence via inhalation method on labor pain. Shahrekord. J Uni Med Sci. 14(1): 34-40.
31. Velisek, J., Svobodova, Z., Piackova, V., Groch, L., Nepej CHalova, L. (2005) Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). Vet Med-Czech. 50(6): 269- 275.
32. Weber, R. A., Peleteiro, J. B., García Martín, L. O., 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.
33. Yazdani, D., Jamshidi, A. H., Mojab, F. (2002) Comparison amount of menthol and essential oil in peppermint (*Mentha piperita*) plant in different parts of the country. J Med Plants. 3: 73-78.
34. Yeganeh, S., Maleki, P. (2012) Comparison of anesthetic effects produced by extracts of *Valeriana officinalis*, *Melissa officinalis* and *Salvia officinalis* on common carp (*Cyprinus carpio*). J Aquat exploit Cultiv. 2(2): 65-77.
35. Zahl, I. H., Kiesling, A., Smuelsen, O. B., Hensen, M. K. (2009) Anaesthesia of Atlantic cod (*Gadus morhua*)-Effect of pre-anaesthetic sedation, and importance of body weight, temperature and stress. Aquaculture. 295: 52-59.

Archive of SID

www.SID.ir

Determination of Mean Lethal Concentration (LC_{50}) and Anaesthetic Effect of Topped Lavender Essential Oil (*Lavandula angustifolia*) on Common Carp (*Cyprinus carpio*) Juvenile

Beheshti, N.[1], Yeganeh, S.[1*], Adel, M.[2]

[1]*Department of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran*

[2]*Department of Aquatic Animal Health and Diseases, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran*

(Received 7 May 2018, Accepted 17 July 2018)

Abstract:

BACKGROUND: In recent years, medicinal plants have become an important option for use in aquaculture industry. **OBJECTIVES:** This study was conducted to determine mean lethal concentration (LC_{50}) and investigated the anesthetic effect of Topped lavender essential oil (*Lavandula angustifolia*) on common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles. **METHODS:** Mean lethal concentration of essential oil was calculated based on the OECD (Organization Economic Cooperation and Development) standard in static system. For determining LC_{50}, 150 common carp juveniles with mean body weight of 26.96 ± 1.98 g were used in 6 groups and one control group and each group with three replications (7 juveniles were used for each replication). After Compatibility period (about 2 weeks), juveniles were exposed to different concentrations including 71.12, 72.11, 73.11, 74.13, 75.16 mg/l that were calculated by logarithmic formula. Juvenile behavioral changes and mortality were recorded in the time period at 24, 48, 72 and 96 hours after exposed to Topped lavender essential oil. Determination of Topped lavender essential oil anesthetic effect was done in 6 groups (with 3 replicates), as 10 fish exposed to increasing concentrations including 0 (control), 160, 165, 170, 175 and 180 mg/l. **RESULTS:** Mean lethal concentration (LC50) after 96 hours was obtained 99.70 mg/l. The lowest time for completion of anesthesia (stage 3 anesthesia) was obtained at a concentration of 170 mg/l with 3.74± 0.35 min and the full recovery of this concentration was obtained at 3.91±0.55 min. The results showed that the best anaesthetic concentration of Topped lavender essential oil was 170 mg/l. **CONCLUSIONS:** It seems that Topped lavender essential oil could be used as anesthetic agent.

Keyword: Topped lavender, Essential oil, Anaesthetic, LC_{50} , *Cyprinus carpio*

Archive of SID

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Ingredient analysis and their amount (%) in Topped Lavender essential oil using GC/MS.

Table 2. The dosage for 10, 30, 50, 70, 90 and 99 % mortality after 24, 48, 72 and 96 h exposure to Topped Lavender essential oil in Common carp Juvenile.

Table 3. Mean (± STD) time to start of anesthesia, completion (step 3 of anesthesia) of anesthesia and recovery time during exposure to different levels of Lavender essential oil in Common Carp Juvenile. Different letters in each column show significant difference ($P< 0.05$).

Table 4. Toxicity classification of materials and medicinal products based on LC50 (mg/l) after 48h (17).

***Corresponding author's email: s.yeganeh@sanru.ac.ir, Tel: 011-33687574, Fax: 011-33687715**

www.SID.ir