

## بررسی اثرات بیهوش کننده اسانس زیره (*Cuminum cyminum*) و ۲-فنوکسی اتانول در ماهی گورخری (*Danio rario*)

علی خسروانی زاده<sup>۱\*</sup>، عبدالعلی راهداری<sup>۱</sup>، احمد قرایی<sup>۱</sup>

\*Khosravani.ali@uoz.ac.ir

۱-گروه شیلات، پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون دانشگاه زابل، زابل

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۸

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۸

### چکیده

در این پژوهش اثرات بیهوش کننده غلظت‌های مختلف دو داروی بیهوشی اسانس زیره (*Cuminum cyminum*) و ۲-فنوکسی اتانول در ماهی گورخری (*Danio rario*) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ماهیان (با میانگین وزن  $1/3 \pm 0/2$  گرم) به شیوه غوطه‌وری و با غلظت‌های مختلف اسانس زیره ( $0/12$ ،  $0/16$ ،  $0/20$ ،  $0/24$ ،  $0/32$  و  $0/40$  میلی‌لیتر در لیتر) و ۲-فنوکسی اتانول ( $0/35$ ،  $0/40$ ،  $0/45$ ،  $0/50$  و  $0/60$  میلی‌لیتر در لیتر) بیهوش شدند. پس از القا بیهوشی و زیست‌سنجی، ماهیان برای احیا به آکواریومی حاوی آب فاقد ماده بیهوشی منتقل شدند. حداقل غلظت بیهوش کننده (مطابق با معیاری که در آن زمان القا بیهوشی کمتر از ۱۸۰ ثانیه و زمان احیا کمتر از ۳۶۰ ثانیه باشد) برای اسانس زیره  $0/24$  میلی‌لیتر در لیتر (با زمان القا بیهوشی:  $157/6 \pm 55/3$  ثانیه و زمان احیا کامل:  $133/3 \pm 14/2$  ثانیه) و برای ۲-فنوکسی اتانول  $0/35$  میلی‌لیتر در لیتر (با زمان القا بیهوشی:  $126/6 \pm 23/6$  ثانیه و زمان احیا کامل:  $124/6 \pm 31/5$  ثانیه) تعیین شد. بین غلظت داروهای بیهوشی (اسانس زیره و ۲-فنوکسی اتانول) و زمان مورد نیاز برای القا بیهوشی رابطه عکس مشاهده شد. نتایج این بررسی نشان داد اسانس زیره از پتانسیل مطلوبی برای معرفی به عنوان یک داروی بیهوشی برخوردار است و غلظت‌های مختلف آن ( $0/24$  تا  $0/40$  میلی‌لیتر در لیتر) برای بیهوش کننده ماهی گورخری مناسب تشخیص داده شد.

**کلمات کلیدی:** ماهی گورخری، بیهوشی، اسانس زیره، ۲-فنوکسی اتانول.

## مقدمه

تولید ماهی در کوتاه‌ترین زمان با کم‌ترین هزینه را می‌توان مهمترین هدف آبی‌پروران به شمار آورد. تحقق این مهم جز با افزایش حداکثری سرعت و بازده رشد به صورت همزمان محقق نخواهد شد و لازمه آن ممانعت از مواجهه‌ی حیوان با تنش‌های محیطی است. یکی از کاراترین ابزارهای آبی‌پروری در این زمینه بیهوشی است، از بیهوشی در زمینه آرام بخشی و کاهش استرس در هنگام حمل و نقل، عملیات تشخیصی، تکثیر مصنوعی، معاینات بهداشتی و هر عملیاتی که توأم با استرس و ایجاد درد باشد استفاده می‌گردد. القا بیهوشی در ماهیان به شیوه‌های گوناگونی صورت می‌پذیرد یکی از روش‌های مهم ایجاد بیهوشی و آرام بخشی در ماهیان غوطه‌وری است (خسروانی‌زاده و همکاران، ۱۳۹۰).

داروهای بیهوشی ایده‌آل بایستی بتوانند بیهوشی را به سرعت و با کمترین استرس القا کنند، استفاده از آن‌ها به سهولت ممکن باشد، استفاده از آن‌ها بی‌حرکی مناسبی را سبب شود، ضمن موثر و مطمئن بودن عوارضی همچون عدم تعادل بلند مدت نداشته باشند، در غلظت‌های کم برای القا بیهوشی موثر باشند و دوز بیهوش‌کننده آن‌ها با دوز سمیتشان فاصله قابل اطمینانی داشته باشد، برای محقق و کارگری که از آن استفاده می‌کند محرک و سمی نباشند، انحلال مناسبی در آب در دماهای کارگاهی داشته باشند و یا لافل حلال‌های آنها به میزان کافی ارزان و در دسترس باشند، به لحاظ شیمیایی پایداری کافی را دارا بوده و سریع فاسد نشوند، در کنار بیهوشی بی‌دردی خوبی را نیز در ماهیان ایجاد کنند، قیمت مناسبی را دارا باشند و احیا ماهیان بیهوش شده آسان و ایمن باشد، خطری برای مصرف‌کنندگان گوشت ماهیان بیهوش شده نداشته باشند، به سرعت در محیط تجزیه شوند و برای سایر موجودات زنده اکوسیستم غیر سمی باشد، اثرات تجمعی در اثر کاربرد مکرر آن ایجاد نگردد و سوخت و ساز سریعی در بدن ماهی داشته باشد (Ross and Ross, 2008).

سال‌های متمادی ترکیاتین متان سولفانات یا همان ام‌اس ۲۲۲ متداولترین داروی بیهوشی در صنعت تکثیر و پرورش ماهی بود (پاپهن و همکاران، ۱۳۸۴)، اما دلایلی همچون قیمت بالای این ماده، انحصاری بودن و ۲۱ روز زمان منع مصرف (توصیه شده توسط سازمان غذا و داروی آمریکا،

FDA) گوشت ماهی بیهوش شده با این دارو (Harper, 2003) سبب گردیده در سال‌های اخیر تحقیق در زمینه یافتن داروهای بیهوشی جدید با قیمت کمتر و عوارض جانبی محدودتر به عنوان جایگزین این دارو به شکل گسترده‌ای صورت پذیرد (میرزرگر و فاطمی، ۱۳۸۶). یکی از داروهایی که در این بین به‌شدت مورد توجه بوده و تحقیقات گسترده‌ای در خصوص بررسی اثرات بیهوش‌کننده آن در گونه‌های مختلف ماهیان صورت گرفته ۲- فنوکسی اتانول است (Ibarra-Zatarain et al., 2013; Barata et al., 2016; Cardenas et al., 2016; Bahrekazemi and Yousefi, 2017; Matsche, 2017). ۲- فنوکسی اتانول یک مایع معطر روغنی بی‌رنگ با بو و طعم سوختگی است و قابلیت انحلال آن در آب در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد ۲۱ گرم برلیتر است و اغلب به عنوان یک بیهوش‌کننده موضعی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Priborsky and Velisek, 2018). ۲- فنوکسی اتانول معمولاً در آبی‌پروری مورد استفاده قرار می‌گیرد (Javadi Moosavi et al., 2014) و اثرات بیهوش‌کننده و ریکاروی سریعی را نشان می‌دهد (Shalvei et al., 2012). این ماده معمولاً برای ماهیان غیرخوراکی و تحقیقات آبی‌پروری در آمریکا و اتحادیه اروپا (Coyle et al., 2004; Ogretmen and Gokcek, 2013)، همچنین برای تسکین و آرام‌سازی ماهیان غیرخوراکی و زینتی در طول حمل و نقل (Brown, 2011) بکار می‌رود. با این وجود ۲- فنوکسی اتانول به دلایلی همچون فاصله‌ی نسبتاً کم بین دوز القای بیهوشی و کشندگی، بروز عوارض جانبی بر واکنش‌های فیزیولوژیک ماهی، القا استرس در ماهی در هنگام القا بیهوشی شدید و ایجاد آسیب‌های کبدی و کلیوی در انسان بعد از بیهوشی با آن (Iwama et al., 1989; Summerfelt and Smith, 1990; Thomas and Robertson, 1991; Ortuno et al., 2002)، بیهوش‌کننده صد درصد ایده‌آلی برای ماهیان نبوده و پژوهش‌های محققین را به سمت استفاده از داروهای بیهوشی گیاهی سوق داده است. در سال‌های اخیر از ترکیبات گیاهی مختلفی مانند میخک، نعنا، آویشن، اسطوخودوس و... برای القا بیهوشی در ماهیان استفاده شده است (خسروانی‌زاده و همکاران، ۱۳۹۰). زیره سبز (*Cuminum cyminum*) گیاهی دارویی با ارتفاع ۱۵ تا ۵۰ سانتی‌متر از خانواده آپیاسه (Apiaceae) است که

۰/۲۴، ۰/۳۲ و ۰/۴۰ میلی‌لیتر در لیتر اسانس زیره و گروه‌های ۶ تا ۱۲ با غلظت‌های ۰/۳۵، ۰/۴۰، ۰/۴۵، ۰/۵۰، ۰/۵۵ و ۰/۶۰ میلی‌لیتر در لیتر ۲- فنوکسی اتانول به شیوه حمام بیهوش شدند. بیهوشی در آکواریوم ۱۰ لیتری محتوی ۵ لیتر محلول بیهوشی که از ترکیب آب و ماده بیهوشی در غلظت‌های ذکر شده به‌دست آمده بود صورت گرفت. پس از انتقال هر یک از ماهیان به آکواریوم حاوی ماده بیهوشی زمان رسیدن به مرحله بیهوشی سبک (با علائم: از دست رفتن کامل تونسیسته عضلات، عدم پاسخ‌گویی به محرک‌های خارجی، ضربان قلب آهسته) با دقت صدم ثانیه توسط کرنومتر ثبت شد.

### بازگشت از بیهوشی

با رسیدن ماهی به مرحله بیهوشی سبک ماهیان بیهوش شده برای بازگشت از بیهوشی با استفاده از ساچوک به آکواریومی دیگر حاوی ۵ لیتر آب فاقد ماده بیهوشی که به‌خوبی هوادهی می‌شد منتقل شدند. و زمان احیاء کامل ماهیان از بیهوشی (با علائم: بازگشت کامل تعادل، افزایش تعداد تنفس، شنا عادی، واکنش پذیر نسبت به انواع محرک‌های خارجی) با دقت ثانیه ثبت گردید. ماهیان احیاء شده به مدت ۹۶ ساعت برای رویت هر نوع اثر سوء ناشی از بیهوشی مانند شنای غیر طبیعی و مرگ و میر به دقت تحت نظر قرار گرفتند.

### تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های بدست آمده به کمک نرم افزار SPSS (ویرایش ۲۲) با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One Way-ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت و برای مقایسه میانگین بین تیمارها، از آزمون چند دامنه دانکن (Duncan) در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ استفاده شد.

### نتایج

اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکی‌وشیمیایی آب در طول مدت سازگاری و انجام آزمایش تغییرات بسیار ناچیزی را نشان داد و فاکتورهای مذکور در حد توصیه شده بودند (دمای آب، اسیدیته آب، میزان اکسیژن محلول و سختی آب). نتایج به‌دست آمده از معرض قرار دهی ماهیان گورخری در غلظت‌های مختلف اسانس زیره و ۲-فنوکسی اتانول و

میوه‌هایی با خواص آروماتیک دارد. سابقه استفاده از این گیاه در طب سنتی ایران افزون بر ۲۰۰ سال است. موارد استفاده از میوه‌های این گیاه متعدد و شامل مواردی همچون درمان اسهال، دندان درد، درمان صرع، استفاده به عنوان آنتی‌اکسیدانت و آنتی‌ترومبوتیک می‌گردد (سلیمانی و همکاران، ۱۳۸۹). با توجه به اثرات ضد درد و تسکین‌دهنده زیره در انسان در این پژوهش اثرات بیهوش‌کننده اسانس این گیاه در ماهی گورخری (*Danio rario*) به عنوان یکی از مهمترین گونه‌های زینتی مورد بررسی قرار خواهد گرفت و با ۲-فنوکسی اتانول به‌عنوان یک بیهوش‌کننده متداول در صنعت آبزی‌پروری مقایسه می‌گردد.

### مواد و روش‌ها

#### تهیه ماهی و شرایط نگهداری

تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی گورخری (*Danio rario*) با میانگین وزن  $1/3 \pm 0/2$  گرم برای انجام پژوهش از تهیه و به پژوهشکده تالاب بین‌المللی هامون منتقل گردیدند. جهت سازش یافتن با شرایط آزمایشگاه، ماهی‌ها به مدت دو هفته پیش از شروع کار در محیط آزمایشگاه در مخازن ۵۰ لیتری پلاستیکی نگهداری شدند. نور سالن نور طبیعی شبانه روز بود. در طول مدت سازگاری و انجام آزمایش فاکتورهای فیزیکی‌وشیمیایی آب شامل درجه حرارت، pH، اکسیژن محلول در آب و سختی آب اندازه‌گیری و ثبت می‌گردید. به منظور تامین اکسیژن در حد اشباع هوادهی توسط پمپ هواده و سنگ هوا صورت می‌گرفت. در مدت سازگاری و انجام آزمایش ماهیان تغذیه نمی‌شدند، همچنین تانک‌ها روزانه سیفون می‌شدند و ۲۰ درصد آب آن‌ها با آب تانک ذخیره تعویض می‌شد.

#### داروهای بیهوشی

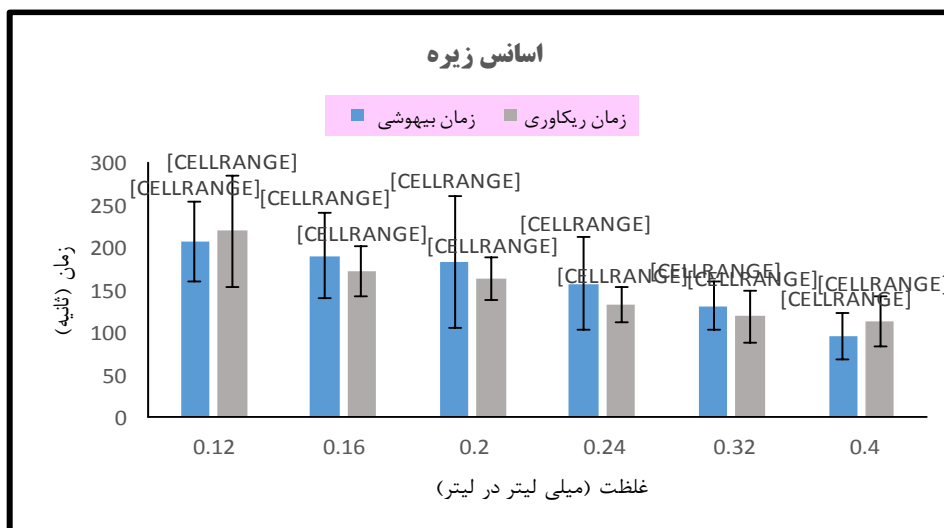
داروی بیهوشی ۲-فنوکسی اتانول با فرمول شیمیایی  $C_8H_{10}O_2$  از شرکت مرک آلمان و اسانس زیره از شرکت ایده آرای پیشگام ایران خریداری گردید.

#### گروه‌های آزمایش و بیهوشی

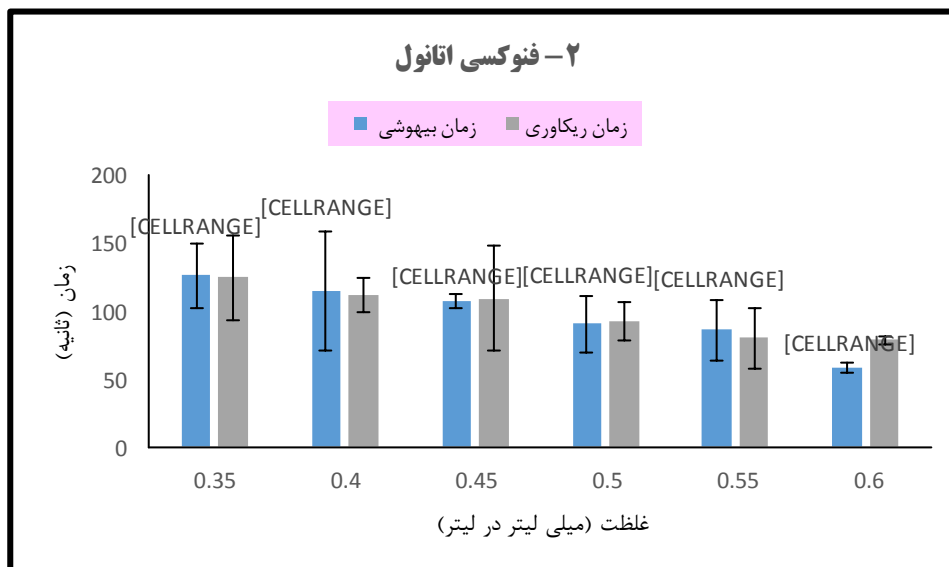
تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی گورخری به صورت تصادفی در ۱۲ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند و به تانک‌های جداگانه منتقل شدند و گروه‌های ۱ تا ۶ با غلظت‌های ۰/۱۲، ۰/۱۶، ۰/۲۰،

محرك‌های خارجی مانند ضربه زدن به شیشه آکواریوم (احیا کامل) به ترتیب در نمودارهای ۱ و ۲ آمده است.

پارامترهای زمانی مختلف شامل مدت زمان ایجاد بیهوشی سبک و مدت زمان بازگشت واکنش‌پذیری نسبت به



نمودار ۱: اثرات بیهوش کننده اسانس زیره در ماهی گورخری



نمودار ۲: اثرات بیهوش کننده ۲-فنوکسی اتانول در ماهی گورخری

نسبت به محرك‌های خارجی (احیا کامل) در این غلظت اسانس زیره با زمان مورد نیاز برای القا بیهوشی و مدت زمان لازم جهت بازگشت ماهیان گورخری بیهوش شده رابطه عکس داشت. به نحوی که با افزایش غلظت اسانس زیره از ۰/۱۲

با توجه به نتایج به دست آمده (نمودار ۱) کمترین غلظت اسانس زیره برای ایجاد بیهوشی در ماهی گورخری ۰/۲۴ میلی لیتر در لیتر تعیین شد، که به طور میانگین طی مدت زمان  $157/6 \pm 55/3$  ثانیه موجبات بیهوشی ماهیان را فراهم کرد، متوسط زمان لازم برای و بازگشت واکنش‌پذیری ماهی

گونه‌های مختلف ماهی در برابر عوامل استرس‌زا و عوامل بازدارنده استرس (نظیر بیهوش کننده‌ها) متفاوت است، بررسی تاثیر این داروها در گونه‌های مختلف ضروری می‌نماید. نبود یک داروی بیهوشی کاملاً ایده‌آل در صنعت آبی پروری محققین را به آزمودن ترکیبات مختلف برای حصول بهترین نتیجه در این خصوص وا داشته است. چندین دهه تحقیق در خصوص یافتن یک بیهوش کننده استاندارد برای ماهیان، همچنان ادامه دارد اما در این میان یکی از داروهای همواره پرکاربرد ۲- فنوکسی اتانول بوده است. ۲- فنوکسی اتانول از طریق آبشش و پوست جذب و به وسیله خون شریانی به سیستم اعصاب مرکزی انتقال داده می‌شود. ۲- فنوکسی اتانول به سرعت و عمدتاً از طریق آبشش از بدن دفع می‌شود، نیمه عمر زیستی آن در قزل‌آلای رنگین‌کمان حدود ۳۰ دقیقه برآورد شده است (Imamura-Kojima et al., 1987). ساز و کار دقیق اثر بیهوش کننده ۲-فنوکسی اتانول در ماهی توصیف نشده است، اما پیشنهاد شده که این ماده یک انبساط در دیواره سلول‌های عصبی ایجاد می‌کند (Burka et al., 1997). یافته‌های به دست آمده توسط محققین نشان داده است که ۲-فنوکسی اتانول فعالیت هیجانی گیرنده‌های ان-متیل-دی-آسپاراتات<sup>۱</sup> (NMDA) در تخمک‌های قورباغه پنجه‌دار آفریقایی<sup>۲</sup> (*Xenopus laevis*) را مهار می‌کند (Musshoff et al., 1999)؛ از این رو اثرات بیهوش کننده آن ممکن است با سرکوب فعالیت عصبی در نواحی بالای سیستم عصبی مرتبط باشد. فعال‌سازی گیرنده‌های NMDA تحریک‌پذیری سلول‌های عصبی را از طریق پایین آوردن آستانه تحریک پتانسیل عمل بواسطه باز شدن کانال‌های یونی که سبب نفوذ یون‌های دارای بار مثبت به‌ویژه  $Ca^{2+}$ ،  $Na^+$  و  $K^+$  می‌شود، افزایش می‌دهد. همچنین مهار گیرنده NMDA به ایجاد اثر بی‌حسی ارتباط داده شده است (Grasshoff et al., 2006).

در مطالعه حاضر کمترین غلظت ۲-فنوکسی اتانول برای القا بیهوشی در ماهی گورخری در زمان ایده‌آل (کمتر از ۳ دقیقه) ۰/۳۵ میلی‌لیتر در لیتر تعیین شد. غلظت بهینه ۲-فنوکسی اتانول به گونه و اندازه ماهی، دمای آب و سطح تکسین یا بیهوشی مورد نیاز بستگی دارد. غلظت بیهوش کننده موثر ۲-

میلی‌لیتر در لیتر به ۰/۴ میلی‌لیتر در لیتر مدت زمان لازم جهت القا بیهوشی در ماهیان به‌طور متوسط ۱۱۲/۳۴ ثانیه کاهش یافت. در مورد زمان بازگشت ماهیان از بیهوشی نیز تفاوت این پارامتر برای حداقل و حداکثر غلظت اسانس زیر بکار برده شده در این تحقیق، به طور متوسط ۱۰۷ ثانیه بود. کمترین غلظت ۲-فنوکسی اتانول برای القا بیهوشی در ماهی گورخری ۰/۳۵ میلی‌لیتر در لیتر تعیین شد. متوسط زمان لازم برای از دست القا بیهوشی در این غلظت ۱۲۶/۶±۲۳/۶ ثانیه بود؛ همچنین زمان لازم برای بازگشت واکنش‌پذیری ماهیان نسبت به محرک‌های خارجی در دوز ۰/۳۵ میلی‌لیتر در لیتر ۱۲۴/۶±۳۱/۵ ثانیه بود (نمودار ۲). با افزایش غلظت ۲-فنوکسی اتانول در محلول بیهوشی زمان لازم برای رسیدن به مرحله بیهوشی در ماهیان کاهش یافت؛ به نحوی که مدت زمان مورد نیاز برای القا بیهوشی در ماهی گورخری در غلظت ۰/۳۵ میلی‌لیتر در لیتر (کمترین غلظت مورد استفاده) به‌طور متوسط ۶۸/۳۳ ثانیه بیشتر از مدت زمان مورد نیاز برای القا بیهوشی در ماهی در غلظت ۰/۶ میلی‌لیتر در لیتر (بیشترین غلظت مورد استفاده) بود و این اختلاف معنی‌دار بود. در خصوص زمان مورد نیاز برای بازگشت از بیهوشی نیز با افزایش غلظت داروی بیهوشی (۲-فنوکسی اتانول) مدت زمان لازم برای بازگشت ماهیان از بیهوشی کمتر شد.

مشاهده رفتار ماهیان بیهوش شده در مدت ۹۶ ساعت پس از بیهوشی بیانگر بی‌خطر بودن اسانس زیره و ۲-فنوکسی اتانول در غلظت‌های به‌کار گرفته شده در این پژوهش برای ماهی گورخری می‌باشد، زیرا هیچ گونه اثر جانبی شامل تغییرات ظاهری مانند تغییر رنگ، تغییرات رفتاری مانند مشکل در شنا و مشکلات تنفسی در ماهیان قرار گرفته در معرض داروی بیهوشی مشاهده نشد. همچنین در طول مدت مذکور هیچ گونه تلفاتی در ماهیان رخ نداد.

## بحث

داروهای بیهوشی در بسیاری از عملیات‌هایی که در فرآیند تکثیر و پرورش ماهیان انجام می‌پذیرند، مورد استفاده قرار می‌گیرند. به‌کارگیری این داروها عمدتاً با هدف کاهش استرس در ماهیان صورت می‌گیرد، از آنجایی که عکس‌العمل

<sup>1</sup> N-methyl-D-aspartate

<sup>2</sup> African clawed frog

پژوهش صورت گرفته توسط Grush و همکاران (۲۰۰۴) حداقل غلظت بیهوش کننده اسانس گل میخک در ماهی گورخری ۶۰ قسمت در میلیون تعیین شد؛ همچنین محققین حداقل غلظت مورد نیاز برای القاء بیهوشی در مدت زمان کمتر از ۳ دقیقه توسط ام اس ۲۲۲ در این گونه را ۱۲۰ قسمت در میلیون تعیین کردند. مطالعه انجام شده توسط Huang و همکاران (۲۰۱۰) غلظت ۱۴۰ قسمت در میلیون ام اس ۲۲۲ به عنوان حداقل دوز بیهوش کننده برای ماهی گورخری تعیین شد در حالی که حداقل دوز بیهوش کننده برای ترکیب ام اس ۲۲۲ و Isoflurane غلظت ۱۲۰ قسمت در میلیون (با نسب ۶۰ قسمت در میلیون ام اس ۲۲۲ و ۶۰ قسمت در میلیون Isoflurane) بود. در مطالعه Collymore و همکاران (۲۰۱۴) حداقل غلظت بیهوش کننده لیدوکائین هیدروکلراید برای بیهوشی ماهی گورخری ۳۲۵ میلی گرم در لیتر تعیین شد، در حالی که حداقل غلظت بیهوش کننده برای ام اس ۲۲۲ غلظت ۱۵۰ میلی گرم در لیتر برای متومیدات هیدروکلراید ۲ میلی گرم در لیتر و برای Isoflurane ۰/۵ میلی لیتر در لیتر بود.

در سال‌های اخیر صنعت ماهیان زینتی به شکل قابل توجهی در کشور رشد و گسترش داشته، آرام سازی، تسکین و بیهوشی برای ماهیان زینتی در کارگاه‌های پرورش، در زمان حمل و نقل، در مراکز عرضه و حتی در منازل ضرورت دارد. با توجه به در دسترس نبودن بیهوش کننده‌های شیمیایی برای همگان و نیز اثرات جانبی محتمل و همچنین به دلیل تحمیل هزینه‌های اضافی به کاربران برای خرید این داروها، معرفی ترکیبات گیاهی که معمولاً در دسترس، ارزان و بی خطر هستند می‌تواند راهگشا باشد. با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه و همچنین با عنایت به در دسترس بودن اسانس زیره در داروخانه‌ها و عطاری‌ها می‌توان اسانس زیره را به عنوان یک ماده بیهوش کننده برای ماهیان زینتی به کار گرفت، هرچند برای اطمینان از عدم بروز اثرات جانبی در ماهیان لازم است تحقیقات تکمیلی در خصوص این ماده و اثرات آن بر ماهیان در معرض صورت پذیرد.

## منابع

پاپهن، ا.، پیغان، ر. و مدرسی، ش.، ۱۳۸۴. بررسی تغییرات الکتروکاردیوگرافیک بیهوشی با کتامین در ماهی

فنوکسی اتانول برای گونه‌های مختلف ماهی در دامنه ۰/۰۶ تا ۱/۲ میلی لیتر در لیتر قرار دارد. غلظت‌های ۰/۳ تا ۰/۴ میلی لیتر در لیتر برای عملیات‌های کوتاه مفید هستند، و غلظت‌های ۰/۱ تا ۰/۲ میلی لیتر برای تکسین طولانی مدت مانند زمان حمل و انتقال گزارش شده‌اند (Coyle et al., 2004). به عنوان مثال King و همکاران (۲۰۰۵) دریافتند ۲- فنوکسی اتانول در غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر برای تسکین به منظور وزن کشی و اندازه گیری‌های متداول در ماهیان جوان موثر است، و غلظت ۳۰۰ میلی گرم در لیتر برای انجام بیوپسی تخمدان یا کاشت<sup>۱</sup> (ایمپلنت) علامت<sup>۲</sup> در سی باس‌های سیاه بالغ کافی بود. Kaminski و همکاران (۲۰۰۱) بیان کردند که ۲- فنوکسی اتانول در غلظت ۰/۴۰ میلی لیتر در لیتر می‌تواند برای بیهوشی موثر و ایمن لای ماهیان جوان *Vimba vimba* در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد بکار رود. غلظت‌های ۰/۸، ۱ و ۱/۲ میلی لیتر در لیتر از ۲- فنوکسی اتانول رقیق شده در اتیل الکل (۱:۱) در دمای آب ۲۲-۲۳ درجه سانتی-گراد برای دستکاری کوتاه مدت و حمل و نقل کپور ماهیان انگشت قد مناسب هستند، در حالی که غلظت‌های ۰/۴ و ۰/۶ میلی لیتر در لیتر برای تسکین عمیق یا از دست رفتن تعادل به منظور حمل و نقل طولانی مدت ارجحیت دارند (Altun and Danabas, 2006). Williams (۲۰۱۷) یک محلول ۱ میلی لیتر از ۲- فنوکسی اتانول در ۵ لیتر آب را برای حمل و نقل ماهی سرگنده (*Hypophthalmichthys nobilis*) در کیسه‌های پلی اتیلنی پیشنهاد کرد. اثرات طولانی مدت استرس ۲- فنوکسی اتانول در غلظت ۰/۳ میلی لیتر در لیتر به کمک ارزیابی آنزیم‌های خون در ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) مورد بررسی قرار گرفت، و محققین دریافتند این اثرات کمتر از MS222 یا اسانس گل میخک است و آن را برای استفاده در آبی‌پروری ایمن تشخیص دادند (Bahrekazemi and Yousefi, 2017). غلظت‌های توصیه شده در مطالعات ذکر شده در بالا عمدتاً با نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر همسو هستند.

در مطالعه حاضر کمترین غلظت اسانس زیره برای ایجاد بیهوشی در ماهی گورخری ۰/۲۴ میلی لیتر در لیتر تعیین شد. که در مقایسه با ۲- فنوکسی اتانول غلظت کمتری بود. در

<sup>1</sup> Implantation

<sup>2</sup> Tag

- Burka, J.F., Hammel, K.L., Horsberg, T.E., Johnson, G.R., Rainnie, D.J. and Spears, D.J., 1997. Drugs in salmonid aquaculture: a review. *J. Vet. Pharmacology. Theraphy.*, 20: 333–349.
- Cardenas, C., Toni, C., Martos-Sitcha, J.A., Cardenas, S., de las Heras, V., Baldisserotto, B., Heinzmann, B.M., Vazquez, R. and Mancera. J.M., 2016. Effects of clove oil, essential oil of *Lippia alba* and 2-phe anaesthesia on juvenile meagre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801). *J. Appl. Ichthyol.*, 32: 693–700.
- Collymore, C., Tolwani, A., Lieggi, C. and Rasmussen, S., 2014. Efficacy and safety of 5 anesthetics in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 53(2): 198–203.
- Coyle, S.D., Durborow, R.M. and Tidwell, J.H., 2004. Anesthetics in Aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center Publication no. 3900, 6 P.
- Grasshoff, C., Drexler, B., Rudolph, U. and Antkowiak, B., 2006. Anaesthetic drugs: linking molecular actions to clinical effects. *Curr. Pharmaceut. Des.*, 12: 3665–3679.
- Grush, J., Noakes, D.L.G. and Moccia, R.D., 2004. The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). *Zebrafish*, 1(1): 46–53.
- Harper, C., 2003. Status of clove oil and eugenol for anesthesia of fish. *Aquaculture Magazine*, 29(6): 41–42.
- Huang, W.C., Hsieh, Y.S., Chen, I.H., Wang, C.H., Chang, H.W., Yang, C.C., Ku, T.H., Yeh, S.R. and Chuang, Y.J., 2010. کیپور غلفخوار. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. دوره ۶۰، شماره ۱، صص ۵۹ تا ۶۴.
- خسروانی زاده، ع.، غفاری، م.، خواجه م.، ابطحی، ب.، صالحی، ح.، زکی پور رحیم آبادی، ا. و احمدی پور نظام آبادی، خ.، ۱۳۹۰. استفاده از اسانس گل میخک (*Eugenia caryophyllata*) بارگذاری شده بر نانوذرات آهن جهت القا بیهوشی در ماهی قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، مجله علمی شیلات ایران. سال ۲۰، شماره ۴، صص ۴۳ تا ۵۲.
- سلیمانی، ن.، دانشمندی، س.، ستاری، م. و پورفتح اله، ع.، ۱۳۸۹. اثرات ایمنومدولاتوری و ضد توموری اسانس زیره سبز. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران. سال ۱۳، شماره ۱۴، صص ۲۲–۲۹.
- میرزرگر، س. و فاطمی، ا.، ۱۳۸۶. کتاب فارماکولوژی کاربردی ماهیان. انتشارات دانشگاه تهران. صص ۱۱۲–۱۱۷.
- Altun, T. and Danabas. D., 2006. Effects of short and long exposure to the anesthetic 2-phenoxyethanol mixed with ethyl alcohol on common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758) fingerlings. *Isr. J. Aquacult.*, 58: 178–182.
- Bahrekazemi, M. and Yousefi, N., 2017. Plasma enzymatic, biochemical and hormonal responses to clove oil, 2-phenoxy ethanol, and MS-222 exposed to Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*, kessleri). *Iran. J. Aquat Anim. Health*, 3: 47–60.
- 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* (Pisces: Sciaenidae). *J. World Aquacult. Soc.*, 47: 82–92.
- Brown, L.A., 2011. Anaesthesia for fish. *Viet. Fish.*, 8: 68–70.

- Combined use of MS-222 (tricaine) and isoflurane extends anesthesia time and minimizes cardiac rhythm side effects in adult zebrafish. *Zebrafish*, 7(3): 297-304.
- Ibarra-Zatarain, Z., Ibarra-Castro, L., Aguilar, N.G., Sanchez-Tellez, J.L. and Alvarez-Lajonchere, L., 2013.** The use of three anaesthetics for handling spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Pisces, Lutjanidae) broodstock. *Rev. Biol. Mar. Oceanograf.*, 46: 71-476.
- Imamura-Kojima, H., Takashima, F. and Yoshida, T., 1987.** Absorption, distribution and excretion of 2-phenoxyethanol in rainbow trout. *Nippon Suisan Gakk.*, 53: 1339-1342.
- Iwama, G.K., McGeer, J.C. and Pawluk, M.P., 1989.** The effects of five fish anaesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. *Canadian Journal of Zoology*, 67: 2065-2073.
- Javadi Moosavi, M., Salahi Ardekani, M., Pirbeigi, A. and Ghazi, S., 2014.** The effects of exposure duration to optimal concentration of 2-phenoxyethanol on primary and secondary stress responses in kutum (*Rutilus frisii kutum*). *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 99: 661-667.
- Priborsky, J. and Velisek, J., 2018.** A Review of Three Commonly Used Fish Anesthetics, *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*, 26(4): 417-442.
- Kaminski, R., Myszkowski, L. and Wolnicki, J., 2001.** Response to 2-phenoxyethanol in juvenile *Vimba vimba* (L.). *Arch. Pol. Fish.*, 9: 71-78.
- King, W., Hooper, B., Hills Grove, 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.). *Aquacult. Res.*, 36: 1442-1449.
- Matsche, M.A., 2017.** Efficacy and physiological response to chemical anesthesia in wild Hickory shad (*Alosa Mediocris*) during spawning season. *Mar. Coast. Fisher.: Dyn. Manag. Ecosyst. Sci.*, 9: 296-304.
- Musshoff, U., Madeja, M., Binding, N., Witting, U. and Speckmann, E.J., 1999.** Effects of 2-phenoxyethanol on N-methyl-Daspartate (NMDA) receptor-mediated ion currents. *Arch. Toxicol.*, 73: 55-59.
- Ogretmen, F. and Gokcek, K., 2013.** Comparative efficacy of three anesthetic agents on juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Turk. J. Fisher. Aquat. Sci.*, 13: 51-56.
- Ortuno, J., Esteban, M.A. and Meseguer, J., 2002.** Effects of four anaesthetics on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 12(1): 49-59.
- Ross, L.G. and Ross, B., 2008.** *Anaesthetic & Sedative techniques for aquatic animals.* Wiley-Blackwell. 326 P.
- Shaluei, F., Hedayati, A., Jahanbakhshi, A. and Baghfalaki, M., 2012.** Physiological responses of great sturgeon (*Huso huso*) to different concentrations of 2-phenoxyethanol as an anesthetic. *Fish Physiol. Biochem.*, 38: 1627-1634.
- Summerfelt, R.C. and Smith, L.S., 1990.** *Anaesthesia, surgery and related techniques.*

- In: Methods for fish Biology. (eds. C.B. Schreck & P.B. Moyle) Bethesda MD: American Fisheries Society, pp. 213-272.
- 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*, 96: 69-86.
- Williams, E.S., 2017.** Water Quality Variation while Transporting *Hypselobarbus Kurali* Anesthetized with 2- Phenoxy Ethanol. *IRA-Int. J. Appl. Sci.*, 7: 1-5.

## Anesthetic effects of *Cuminum cyminum* essential oil and 2-phenoxyethanol on zebrafish (*Danio rario*)

Khosravanizadeh A.<sup>1\*</sup>; Rahdari A.<sup>1</sup>; Gharaei A.<sup>1</sup>

\* Khosravani.ali@uoz.ac.ir

1- Department of Fisheries, Hamoun International Wetland Research Institute, University of Zabol, Iran, P.O.Box: 98615-538

### Abstract

In this investigation, the efficacy of two anesthetic agents *Cuminum cyminum* essential oils (EOs) and 2-phenoxyethanol in different dosages were compared in zebrafish, *Danio rario*. Fish ( $1.3 \pm 0.2$  g) were anesthetized with different concentration of *C. cyminum* EOs (0.12, 0.16, 0.20, 0.24, 0.32 and 0.40 ml/l) and 2-phenoxyethanol (0.35, 0.40, 0.45, 0.50, 0.55 and 0.60 ml/l) by immersion method. After that, the anesthesia was induced and the biometric measurements were completed, fish were transferred to anesthetic-free aquaria to allow for recovery. The lowest effective concentrations based on the efficacy criteria of complete anesthesia induction within 180s and recovery within 300s were determined to be 0.24 ml/l (induction:  $157.6 \pm 55.3$ s and recovery time:  $133.3 \pm 14.2$ s) for *C. cyminum* EOs and 0.35 ml/l (induction:  $126.6 \pm 23.6$ s and recovery time:  $124.6 \pm 31.5$ s) for 2-phenoxyethanol. An inverse exponential relationship was observed between concentrations of anesthetics (*C. cyminum* EOs and 2-phenoxyethanol) and induction time. This study shows the high potential of *C. cyminum* EOs for fish anesthesia, and the *C. cyminum* EOs different concentrations (0.24-0.40 ml/l) seem to be suitable for anesthetization of zebrafish.

**Keywords:** Zebrafish, Anesthesia, *Cuminum cyminum* essential oils, 2-phenoxyethanol.