بررسی دو روش بیهوشی با یخ و گل میخک و کشتار خارج از آب بر پاسخ استرس و برخی شاخص‌های کیفی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

سهراب معینی[۱]، زینب مولودی*[۲]، بهاره شعبانپور[۳] و کاوه رحمانی‌فرح[۴]

[۱] دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، ایران

[۲] دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه آزاد واحد تهران شمال، ایران

[۳] دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

[۴] دانشجوی دکتری شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

(تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۱۳، تاریخ تصویب: ۸۹/۱۲/۱۷)

چکیده

در این تحقیق اثر دو روش بیهوشی ۱) بیهوشی ماهیان با قرار دادن آنها در یخ ۲) بیهوشی ماهیان با غوطه‌وری در عصاره‌ی گل میخک و مرگ با ضربه در سر، در مقایسه با روش معمول کشتن ماهی (مرگ خارج از آب) بر شاخص‌های کیفی و میزان استرس وارده در ماهی کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که روش بیهوشی قبل از مرگ، بر کیفیت گوشت ماهی اثر معنی‌داری دارد. ارزیابی شاخص جمود نعشی و میانگین pH عضله در طول زمان پس از کشتار و بین تیمارهای آزمایشی مختلف، تغییرات معنی داری را نشان دادند. جمود نعشی در ماهیانی که خارج از آب مردند، ۳ ساعت پس از مرگ، به بیشترین مقدار خود (۷۷/۶ درصد) رسید. جمود نعشی ماهیان بیهوش شده در یخ و عصاره گل میخک به ترتیب در ۲۴ ساعت پس از مرگ (۴۴/۲ درصد) و ۶۰ ساعت پس از مرگ (۵۵/۱ درصد) به حداکثر رسید. ماهیان بیهوش شده با گل میخک، جمودی با تاخیر نسبت به دو تیمار دیگر داشتند. میزان pH بلافاصله پس از مرگ برای ماهیان مرگ خارج از آب ۶/۳۴ ، برای تیمار یخ گذاری ۶/۵۳ و برای تیمار گل میخک ۶/۹۹ بود. در ماهیان بیهوش شده با عصاره گل میخک، میزان آبچک عضله پایین تر از سایر تیمارها بود. غلظت فاکتورهای خونی وابسته به استرس (کورتیزول، گلوکز و لاکتات پلاسما) در تیمار مرگ خارج از آب، بطور معنی داری از تیمارهای یخ گذاری، گل میخک و تیمار شاهد پلاسما، شامل ۸ ماهی زنده درون حوضچه نگهداری که تحت استرس بیهوشی و کشتار نبودند، بالاتر بود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ماهی‌هایی که با عصاره گل میخک بیهوش و سپس با ضربه در سر کشته شدند، کیفیت به مراتب بالاتر داشته و استرس وارده به آنها نسبت به تیمارهای یخ گذاری و مرگ خارج از آب، به طور معنی داری پایین تر بود.

واژه‌های کلیدی: کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، کیفیت گوشت، استرس، گل میخک، مرگ خارج از آب

* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۹۱۱-۳۷۱۲۷۲۹ فاکس: ۰۱۷۱-۲۲۳۹٤۲٤ E-mail: Znmouloodi@yahoo.com

مقدمه

امروزه در صنعت آبزی پروری بسیاری از کشورها، توجه خاصی به تکنیک‌های بیهوشی و کشتار ماهیان که موجب مرگ سریعتر به منظور کاهش استرس‌ها و فعالیت‌های ماهی قبل از مرگ و همچنین حصول گوشت با کیفیت بالاتر می گردد، مبذول شده است. در ایران تنها روش متداول کشتار ماهیان، خفگی و مرگ خارج از آب است که جزء قدیمی‌ترین روش‌های کشتن آبزیان می باشد. استرس‌های قبل از مرگ شاخص‌های خونی و بافتی را تحت تاثیر قرار می‌دهند. عوامل استرس زا سیستم عصبی مرکزی را تحریک و در نتیجه محور هیپوتالاموس- هیپوفیز- اینتررنال فعال شده و کورتیزول و کتکول آمین‌ها را به درون خون آزاد می‌کند. کورتیزول باعث بروز حالت هایپر گلایسمیا (افزایش گلوکز پلاسما) در زمان بروز استرس می‌شود. از طرفی تجمع انرژی بیشتر و مصرف آن، باعث افزایش فعالیت عضلانی، گلیکولیز بی هوازی و افزایش لاکتات پلاسما می‌شود (Askarian and Kousha, 2006).

در اثر استرس‌ها و فعالیت‌های پیش از کشتار و زمان کشتار و پاسخ اندوکرینی مرتبط، فرآیندهای بیوشیمیایی پس از مرگ ماهی نیز تحت تاثیر قرار می گیرد که شامل گلیکولیز بی هوازی، مصرف ATP و کاهش سریع pH عضله به دلیل متابولیسم بی هوازی عضلات و افزایش اسید لاکتیک است. بعبارت دیگر، زمانی‌که ذخایر گلیکوژن عضله در طول فعالیت بی هوازی قبل از کشتار، مصرف می‌شود، در اثر تولید اسید لاکتیک، pH عضله قبل از مرگ نسبت به زمانی‌که ماهی فعالیت وتقلای زیادی قبل از مرگ ندارد، کاهش بیشتری می‌یابد وحداقل pH عضله بعد از مرگ، زودتر رخ می‌دهد (Kristoffersen *et al*, 2006). کاهش pH اغلب سبب افزایش تکه تکه شدن (Gaping) (Lavety *et al*,1988; Martini *et al*, 1996) و افزایش آبچک عضله و کاهش کیفیت گوشت می‌شود(Einen *et al*, 1999; Ingolfsdottir *et al*, 2004). همچنین در اثر استرس و فعالیت شدید عضلانی قبل از مرگ، پدیده جمود نعشی سریعتر آغاز و سریعتر نیز از بین می‌رود (Bremmer, 1992). استفاده از روشهای مناسب بیهوشی و کشتار سریع ماهیان می تواند تاثیر مثبت معنی‌داری بر کیفیت گوشت حاصله گذاشته (Kiessling *et al*, 2004; Marx *et al*, 1997; Roth *et al*, 2009) واز دیدگاه اخلاقی و علمی نیز مناسبتر باشند.

یکی از روش های بیهوشی قبل از مرگ ماهیان، ذخیره‌سازی آنها در یخ (یخ‌گذاری) است که باعث کاهش فعالیت پیش از مرگ می‌شود. روش دیگر استفاده از عصاره گل میخک است که برای بیهوشی و مرگ سریع ماهیان کاربرد دارد (Robb *et al*, 2000). ولی اثرات فیزیولوژیک آن هنوز بطور کامل شناسایی نشده است (Ribas *et al,* 2007). Ribas *et al* (2007) در ماهی سول سنگال (*Solea Senegalensis*) دریافتند کشتن ماهی با استفاده ازعصاره گل میخک روش مناسب تری نسبت به روش های کشتن با محلول آب و یخ وکشتار معمولی در هواست به طوریکه هم ضامن کیفیت خوب گوشت بوده و هم برای ماهی استرس زا نیست. Bagni *et al.* (2007) در ماهی باس دریایی *Dicentrarchus* (*Labrax*) و سیم دریایی (*Sparus aurata*) گزارش کردند مرگ ماهی در خشکی نسبت به استفاده از محلول آب و یخ، استرس بالایی برای ماهی به همراه دارد که این استرس سبب کاهش سریع pH گوشت، جمود نعشی شدیدتر و کیفیت نامناسب گوشت حاصله می‌شود. Wilkinson *et al*. (2008) در ماهی باس دریایی آسیایی (*Lates calcarifer*) عنوان کردند ماهیان تحت استرس، pH پایین‌تر، جمود نعشی سریعتر و شاخص‌های فیزیولوژیک خون بالاتری نسبت به گروه ماهیان بیهوش شده با گل میخک داشتند.

کپور معمولی یکی از مهمترین گونه‌های پرورشی و از جمله ماهیان پرطرفدار در ایران می باشد. این ماهی به دلیل مقاومت بالا به شرایط خفگی خارج از آب، استرس و تقلای فراوانی قبل از مرگ متحمل می‌شود. مرگ طولانی هم از نظر اخلاقی و هم از لحاظ تجاری (مدیریت زمان وکیفیت گوشت) مناسب نمی باشد. در نتیجه می‌بایست

یک روش کارآمد بیهوشی قبل از مرگ به منظور کاهش فعالیت‌ها در کپور اتخاذ گردد. در این بررسی اثرات بیهوشی ماهی به روش یخ‌گذاری و استفاده از گل میخک و مرگ با ضربه در سر، در مقایسه با خفگی خارج از آب بر پاسخ استرس و شاخص های کیفی کپور معمولی مورد ارزیابی قرار گرفته و جهت تعیین بهترین روش کشتن ماهی تیمارها با هم مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی و کشتار ماهیان

جهت بررسی تاثیر روش‌های بیهوشی و کشتن ماهی بر میزان استرس وکیفیت نهایی گوشت حاصله، در پاییز ۱۳۸۸، تعداد ۳۲ ماهی کپور معمولی زنده با وزن بازاری حدود ۱ کیلوگرم از استخرهای پرورشی ماهیان گرمابی منطقه اینچه برون استان گلستان تهیه و به مرکز تحقیقات آبزی‌پروری گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی ومنابع طبیعی گرگان، منتقل گردید. ماهی‌ها درون مخازن فایبرگلاس دایره‌ای که دارای حجمی برابر با $4m^3$ و حجم مفید آب $3\ m^3$ بودند، با تراکم ۸ ماهی در هر مخزن به مدت یک ماه نگهداری شدند تا با شرایط جدید سازگار گشته و در شرایط فیزیولوژیک عادی قرار گیرند. مخازن نگهداری ماهی‌ها در شرایط کاملاً یکسانی قرار داشتند و بطور مداوم هوادهی شده و هر ۴۸ ساعت یک بار، حدود نیمی ازآب آنها تعویض می‌شد. دمای آب مخازن در طول دوره، ۱±۲۳ درجه سانتی گراد، pH برابر با ۸/۱۸±۰/۲ و میزان اکسیژن محلول ۱±۷ میلی گرم بر لیتر بود. غذادهی دستی ماهیان یک بار در روز، در ساعت ۱۲ ظهر و با پلت‌های تجاری بیومار به میزان ۲ درصد وزن بدن انجام گرفت. سپس ۲۴ ماهی با میانگین وزن و طول به ترتیب ۴۰±۱۰۰۵ و ۰/۶±۳۹/۶ سانتی متر بطور تصادفی جهت اعمال روش‌های بیهوشی وکشتار انتخاب شدند. بیومتری ماهیان پس از کشتار، بوسیله ترازوی دیجیتالی با دقت ۱ گرم و تخته بیومتری با دقت ۱ میلی متر انجام شد. ۴۸ ساعت قبل از اعمال روش‌های بیهوشی و کشتن، غذادهی ماهیان قطع شد.

در این بررسی ماهی‌ها با دو روش بیهوش و سپس با ضربه در سر کشته شده و مورد آزمایش قرار گرفتند. تعداد ماهی در هر تیمار آزمایشی ۸ عدد بود. تیمار اول قرار دادن ماهیان در یخ خرد شده بود. ماهیان، به مخزن‌هایی که در آن یخ خردشده (بدون آب) با نسبت وزنی ۱:۱ ماهی و یخ، ریخته شده بود، منتقل شدند و پس از بیهوشی کامل، با ضربه به سر کشتار شدند. میانگین زمان بیهوشی ماهیان دراین روش ۶۲ دقیقه و ۲۵ ثانیه بود. زمان بیهوشی کامل ماهی‌ها هنگام توقف حرکات سرپوش آبششی بود (Bagni *et al*, 2007). در تیمار دوم ماهیان باعصاره گل میخک بیهوش گردیدند. ماهی‌ها به مخزن‌های حاوی محلول ۱ میلی لیتر عصاره گل میخک خالص درهر لیتر آب منتقل شدند(Grzegorz *et al,* 2006). گل میخک مورد استفاده ٪۱۰۰ خالص واز تقطیر ساقه، برگ وگل گیاه میخک بدست آمده بود و از شرکت باریج اسانس کاشان تهیه گردید. در این تیمار نیز، پس از بیهوشی کامل ماهیان با ضربه به سر کشته شدند. میانگین زمان اعمال بیهوشی برای تیمار عصاره گل میخک ۳ دقیقه و ۴۵ ثانیه ثبت شد. برای مقایسه روش‌های ذکر شده با روش رایج کشتار کپور ماهیان، ماهی‌ها بدون اعمال هیچ گونه تیمار بیهوشی از آب خارج شدند و در خشکی در دمای °C ۲۷-۲۵ پس از مدت زمان طولانی، میانگین ۲۹۳ دقیقه مردند (تیمار سوم). بعد از مرگ، کلیه ماهیان در جعبه‌های استیروفرم حاوی یخ نگهداری شدند.

نمونه برداری از ماهیان در دوره‌های زمانی ۰، ۳، ۹، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰ و ۷۲ ساعت پس از مرگ انجام گرفت (Acerete *et al,* 2009; Roth *et al*, 2006). نمونه برداری ساعت ۰، بلافاصله پس از مرگ ماهی‌ها صورت گرفت. خونگیری از ماهیان نیز به منظور سنجش غلظت فاکتورهای خونی مرتبط با استرس، در ساعت صفر پس از مرگ انجام شد. همچنین برای مقایسه شاخص‌های فیزیولوژیک استرس در سه تیمار با گروه شاهد پلاسما، از ۸ ماهی زنده درون حوضچه‌های نگه داری، بدون اعمال هیچگونه روش بیهوشی یا کشتار، خونگیری به عمل آمد.

روش‌های آزمایشات فیزیولوژیک خون (آنالیز استرس)

خون گیری توسط سرنگ هپارینه از ناحیه ساقه دمی ماهیان تیمارهای مختلف انجام گرفت. نمونه‌های خونی دردستگاه سانتریفوژ که لوله‌های آن آغشته به هپارین شدند، در ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتیریفوژ و پلاسمای خون جدا شده و در ۲۰- درجه سانتی گراد فریز شدند. غلظت کورتیزول پلاسما بر اساس دستورالعمل شرح داده شده توسط Rotllant *et al*. (2001) به روش Radioimmunoassay (R.I.A) اندازه‌گیری شد. سطوح گلوکز ولاکتات پلاسما نیز به روش رنگ‌سنجی آنزیمی در پلیت‌های ELISA با استفاده از کیت‌های تجاری به ترتیب شرکت پارس آزمون و شرکت شیم آنزیم مورد بررسی قرار گرفتند.

شاخص جمودنعشی

اندازه‌گیری جمود نعشی میزان خمیدگی بدن وساقه دمی بر اساس روش Bito *et al*. (1983) محاسبه شد. به این صورت که ماهی طوری روی لبه میز ثابت می‌شود که نصف طول ماهی بصورت افقی روی میز، و نصف دیگر از لبه میز آویزان باشد. سپس فاصله عمودی لبه سطح میز تا انتهای دم ماهی را اندازه گرفته و اعداد را به منظور تعیین شاخص جمود، که بر اساس درصد ارائه گردید، در فرمول زیر قرار دادیم:

(۱)

$$\text{شاخص جمود (درصد)} = \frac{\text{ارتفاع کنونی بدن در زمان t -ارتفاع بدن قبل از ورود به مرحله جمود نعشی بلافاصله پس از مرگ}}{\text{ارتفا ع بدن قبل از ورود به مرحله جمود نعشی بلافاصله پس از مرگ}} \times ۱۰۰$$

درصد، بیانگر جمود کامل است(Ribas *et al*, 2007).

اندازه‌گیری pH عضلات

pH عضلات با وارد کردن الکترود نفوذی pH متر مدل Testo 206pH_2) آلمان) درعضلات بالای خط جانبی، زیر باله پشتی ماهیان اندازه‌گیری شد.

آب‌چک گوشت

از عضلات سمت چپ بدن در ناحیه بالای خط جانبی، زیر باله پشتی ماهی به وسیله پنس یک فیله به اندازه‌های حدود ۱×۲×۲۰ سانتی متر از هر ماهی تهیه وتوسط ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ وزن شد و در فویل‌های آلومینومی پیچیده شده و در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. بعد از ۹۶ ساعت (چهار شبانه روز) نگه‌داری، فویل‌ها باز شده و فیله‌ها مجدداً توزین شد (Roth *et al,* 2006). در صد آب‌چک از رابطه زیر محاسبه شد.

(۲)

$$\text{آب‌چک (درصد)} = \frac{\text{وزن فیله بعد از ۹۶ ساعت} - \text{وزن اولیه فیله}}{\text{وزن اولیه فیله}} \times ۱۰۰$$

آنالیز آماری

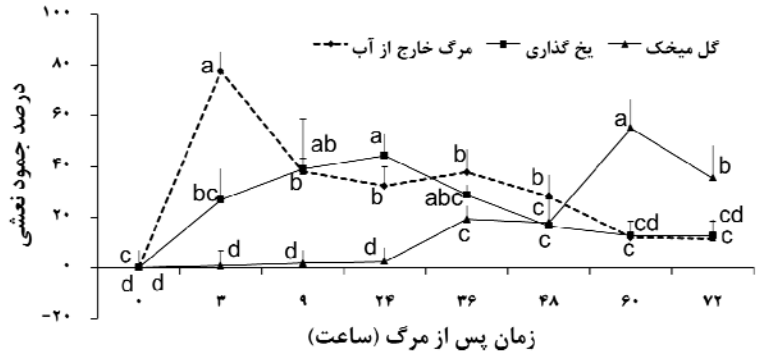
همگنی واریانس داده‌ها، ابتدا با آزمون Levense انجام و سپس مورد آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) قرار گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها در زمان‌های مختلف نمونه گیری و در بین تیمارهای مختلف ازآزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ استفاده گردید. رسم نمودار ها با نرم افزار SPSSانجام شد.

نتایج

شاخص جمود نعشی

ماهیانی که در خشکی مردند، ۳ ساعت پس از مرگ، جمود نعشی قوی داشتند که با گذشت زمان اندک، در۲۴ ساعت پس از مرگ به ۳۲/۲ درصد رسید که بیانگر حل شدن جمود نعشی است. ماهیان تیمار یخ‌گذاری پس از

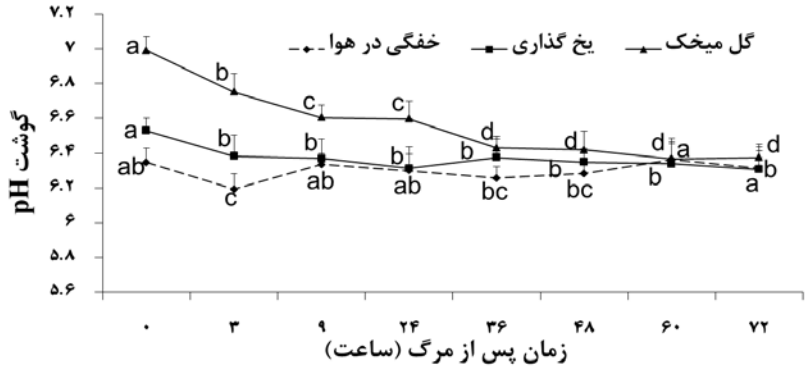
گذشت ۲۴ ساعت بالاترین حد جمود نعشی در این تیمار را نشان دادند. جمود نعشی دراین ماهیان در مقایسه با تیمار مرگ خارج از آب، شدت پایین تری داشت. در ماهیان بیهوش شده با گل میخک، شروع جمود نعشی بطور مشخصی درمقایسه با دو تیمار دیگر، با تاخیر بوده و پس از ۶۰ ساعت پس از مرگ، بدن نسبتاً نرم و انعطاف پذیری داشتند. جمودنعشی دراین ماهیان شدت کمتری را نشان داد (شکل ۱).



شکل ۱- تغییرات شاخص جمود نعشی ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بیهوش وکشته شده با روش‌های مختلف. (a-d) حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی دار شاخص جمود در طی زمان در تیمارهای مختلف میباشد (p<۰/۰۵). اعداد میانگین ۸ تکرار با خطای معیار است.

pH عضله

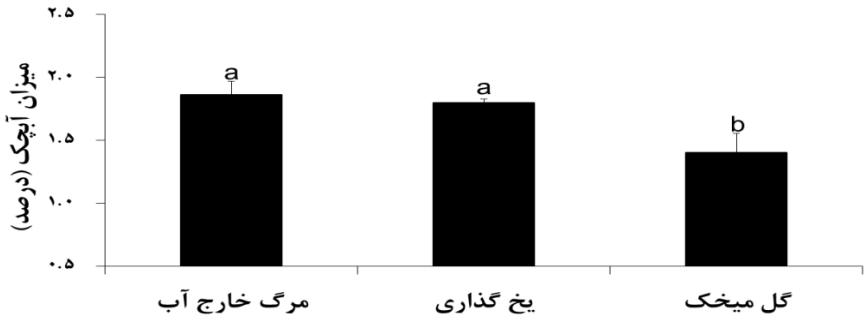
نتایج نشان دادند که بیهوشی و روش کشتن کپور معمولی بر pH عضله ماهی اثر معنی‌داری دارد (p<۰/۰۵). میانگین میزان pH عضله ماهیانی که با گل میخک بیهوش شدند، بیشتر از ماهیان تیمارهای یخ گذاری و مرگ خارج از آب بود. میانگین pH عضله ماهیان تیمار گل میخک روند کاهشی اما کندی را در ساعات پس از مرگ نشان داد. در حالیکه میانگین pH عضله تیمار مرگ خارج از آب دارای روند تقریباً یکنواخت با تغییرات سریع بود. عضله ماهیان تیمار گل میخک در تمام ساعات بررسی به جز ساعت ۶۰پس از مرگ، بطوری معنی‌دار pH بالاتری نسبت به سایر تیمارها داشتند. pH عضله تیمارهای مرگ خارج ازآب و یخ-گذاری به ترتیب ۳ و ۲۴ ساعت پس از مرگ به کمترین حد خود رسید. اما تیمار گل میخک روند کاهشی pH را در مدت ۷۲ ساعت نمونه‌گیری بعداز مرگ داشتند (شکل ۲).



شکل ۲- تغییرات pH عضله ماهیان کپور معمولی(*Cyprinus carpio*) بیهوش وکشته شده با روش‌های مختلف (a-d) حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دارpH گوشت در طی زمان در تیمارهای مختلف می‌باشد. (p<۰/۰۵) (اعداد میانگین ۸ تکرار باخطای معیار می باشد)

درصد آبچک

میزان آبچک عضله در ۹۶ ساعت پس از مرگ، درتیمار گل میخک بطور معنی‌داری کمتر از تیمارهای دیگر بود. میزان آبچک تولیدی در تیمارهـای مـرگ خـارج از آب و یخ‌گذاری از نظر آماری اختلافی با هم نداشتند (شکل ۳).



شکل ۳- میانگین میزان آبچک گوشت (به درصد) در ۹۶ ساعت پس از مرگ در ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بیهوش و کشته شده با روش‌های مختلف (a-b) حروف متفاوت نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار میزان آبچک بین تیمارهای مختلف می‌باشد (p <۰/۰۵) (اعداد میانگین ۸ تکرار با خطای معیار می باشد)

شاخص‌های فیزیولوژیک خون (آنالیز استرس)

نتایج بررسی‌های فیزیولوژیک خون ماهیان اختلاف معنی‌داری را بین تیمارهای مختلف نشان داد. میانگین غلظت کورتیزول در پلاسمای خون ماهیان مرگ خارج از آب تقریباً ۶ برابر و در یخ گذاری ۴ برابر تیمار شاهد بود. در میزان کورتیزول تیمار گل میخک با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.روش‌های بیهوشی وکشتار مختلف همچنین بر میزان گلوکز و لاکتات پلاسما تاثیر معنی‌داری داشت. میانگین غلظت گلوکز پلاسما در ماهیان مرگ خارج ازآب تقریباً ۵ برابر و در تیمار یخ‌گذاری ۳ برابر تیمارشاهد بود. گلوکز پلاسمای ماهیان بیهوش شده با گل میخک فاقد تفاوت معنی‌دار با تیمار شاهد بود. میزان لاکتات در تیمار مرگ خارج از آب تقریباً ۱۶ برابر تیمار شاهد بود. همچنین میزان لاکتات در تیمار یخ‌گذاری تقریباً ۸ برابر و در تیمار گل میخک ۲/۵ برابرتیمارشاهد ثبت شد (جدول ۱).

جدول ۱- میانگین غلظت شاخص‌های فیزیولوژیک وابسته به استرس (کورتیزول، گلوکز ولاکتات پلاسما)در ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بیهوش و کشته شده با روش‌های مختلف و در تیمار شاهد. (a-d) حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی‌دار فاکتورهای مورد بررسی بین تیمارهای مختلف می باشند (p<۰/۰۵). اعداد میانگین ۸ تکرار با خطای معیار می باشند

تیمارها	فاکتورهای مورد بررسی		
	کورتیزول	گلوکز	لاکتات پلاسما
مرگ خارج آب	۱۸۸ ± ۷/۱ [a]	۲۲۵/۱ ± ۱۸/۰ [a]	۱۸۵/۷ ± ۴/۷ [a]
یخ گذاری	۱۰۸ ± ۹/۵ [b]	۱۱۳ ± ۹/۶ [b]	۹۲/۵ ± ۶/۷ [b]
گل میخک	۳۵/۹ ± ۳/۸ [c]	۵۰/۴ ± ۴/۶ [c]	۲۹/۸ ± ۳/۹ [c]
شاهد(ماهی زنده)	۲۸/۴ ± ۲/۲ [c]	۴۲/۹ ± ۶/۴ [c]	۱۲/۰ ± ۴/۳ [d]

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج بدست آمده در این بررسی، تفاوت‌های معنی‌داری را در میزان استرس وارده و برخی شاخص‌های کیفی گوشت در ماهی کپور معمولی، در سه تیمار مختلف وهمچنین زمان‌های متفاوت نشان دادند. جمود نعشی در ماهیان تیمارهای مرگ خارج از آب و یخ‌گذاری، زودتر از ماهیان بیهوش شده با گل میخک شروع شد. جمود نعشی زودرس در نتیجه‌ی افزایش استرس و فعالیت و جنبش ماهی قبل از مرگ می‌باشد که با نتایج Kristoffersen *et al.*(2006) درماهی کاد اقیانوس اطلس (*Gadus morhua*) و Ribas *et al.* (2007) در ماهی سول سنگال (*Solea senegalensis*) همسویی دارد. دراین بررسی، ماهیان تیمارهای مرگ خارج ازآب و یخ‌گذاری به ترتیب بعد از گذشت زمانی معادل ۴۸ و ۳۶ ساعت پس از مرگ، از جمود خارج شدند. در حالیکه ماهیان بیهوش شده با عصاره گل میخک، ۷۲ ساعت پس از مرگ، بدن با جمود ضعیف داشتند.

همچنین مشاهده شد که ماهیان تیمار مرگ خارج ازآب جمود نعشی بسیار شدید و سخت داشتند، اما در ماهیانی که با گل میخک بیهوش شدند، جمودنعشی از شدت کمتری برخوردار بود. در واقع در ماهیانی که تحت استرس نبوده‌اند فرآیند جمود نعشی در طی زمان بهتر توزیع شده و نیز خفیف تر بود. که این مکانیسم می‌تواند بدلیل توزیع ناهمگن فسفات‌های پرانرژی و اینوزین‌منوفسفات‌ها در بافت عضله این ماهیان که فعالیت کمتری قبل از مرگ داشتند، باشد(Bagni *et al*, 2007).

طبق بررسی انجام شده توسط Sbastio *et al.* (1996) حل شدن جمود نعشی ونرم‌شدگی مجدد عضلات، درنتیجه‌ی فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک عضله (کاتپسین) می‌باشد که در نهایت منجر به تخریب پروتئین‌های میوفیبریل می‌شوند. Morzel *et al.* (2006) نیز نشان دادند که فعالیت و جنبش قبل از مرگ، پروتئولیز را در زمان نگهداری ماهی افزایش می‌دهد که نتایج این تحقیق را تصدیق می‌کند.

از دیگر اثرات استرس و فعالیتهای قبل از مرگ ماهیان، کاهش شدید pH عضله پس از مرگ در نتیجه تجمع اسید لاکتیک حاصله در عضلات وخارج نشدن آن بعلت متوقف شدن جریان خون در بدن ماهی است. Poli *et al.* (2005) عنوان کردند که کاهش pH عضله در اثر تولید یون H^+ که مربوط به تولید اسید لاکتیک وهمچنین ذخایر ATP است، می‌باشد. سنجش pH گوشت یکی از رایج‌ترین روش‌های بررسی کیفیت گوشت می‌باشد (Skjervoldt *et al,* 2001). تغییرات pH دراین آزمایش در تمام تیمارها الگوی یکسانی را نشان داد. pH عضله در ماهیان بلافاصله پس از مرگ اختلاف معنی‌داری با هم داشتند. در تیمارهای مرگ خارج از آب و یخ‌گذاری، فعالیت بیشتر ماهیان احتمالا سبب تولید اسیدلاکتیک بیشتر و کاهش pH در زمان بلافاصله پس از مرگ شد. همچنین حداقل pH در تیمار مرگ خارج از آب زودتر رخ داد. حداقل میزان pH بعد از مرگ بین تیمار مرگ خارج از آب با دیگر تیمار ها اختلاف معنی‌داری داشت که بر خلاف نتایج Korhonen *et al.*(1990) و در تایید نتایج Sigholt *et al.* (1997) در ماهی آزاداقیانوس اطلس (*Salmo salar*) و Ruff *et al.*(2002) بر روی ماهی کفشک (*Scophthalmus maximu*) در رابطه با فعالیت‌های قبل از مرگ می‌باشد.

در این بررسی، میزان آبچک گوشت طی ۹۶ ساعت پس از مرگ در تیمار مرگ خارج از آب و یخ‌گذاری بطور معنی‌داری بیشتر از تیمار گل میخک بود. Roth *et al.* (2006) نشان دادند که استرس و فعالیت ماهی به هنگام مرگ میتواند میزان آبچک را در ماهی آزاد اطلس به میزان قابل توجهی افزایش دهد که با نتایج این تحقیق همسویی دارد. همچنین Morkore *et al.*(2002) عنوان نمودند که ظرفیت نگهداری آب گوشت مانند بسیاری از پارامترهای دیگر، متاثر از تغییرات pH عضله و اثر آن بر ترکیبات پروتئینی می باشد. کاهش سریع pH عضله بعد از مرگ و pH نهایی پایین منجر به نرم شدن گوشت، تغییرات نامطلوب در ساختار پروتئین‌ها و افزایش پروتئولیز می‌شود (Ang and Haard, 1985; Einen *et al*

(al, 1999 طبق نتایج بدست آمده از بررسی شاخص‌های فیزیولوژیک خون، میزان استرس وارده به ماهیان تیمار مرگ خارج از آب نسبت به سایر تیمارها به میزان قابل‌توجهی بیشتر بود. Ribas *et al.*(2007) و Acerete *et al.* (2009) تاثیر روش‌های کشتار مرگ خارج از آب و غوطه‌وری درآب یخ را در ماهیان به ترتیب سول سنگال (*Solea senegalensis*) و باس دریایی اروپایی(*Dicentrarchus labrax*) مطالعه کردند و بیشترین میزان کورتیزول، گلوکز و لاکتات پلاسما را در ماهی‌های خفه شده خارج از آب مشاهده کردند که با نتایج بدست آمده در این تحقیق همسو بود. تیمار گل میخک اختلافی در شاخص‌های فیزیولوژیک با تیمار شاهد پلاسما نداشت. اما تیمار یخ‌گذاری از نظر شاخص‌های فیزیولوژیک خون اختلاف معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد که به دلیل شوک سرمایی است که سبب بروز پاسخ‌های فیزیولوژیک اولیه در نتیجه تحریک محور هیپوتالاموس و ترشح کتکول‌آمین‌ها و پاسخ‌های ثانویه استرس شامل اختلالات در تنظیمات اسمزی و یونی می‌گردد (Ross and Ross, 1999).

به عنوان یک جمع‌بندی کلی می‌توان گفت که مرگ ماهی کپور خارج از آب و همچنین بیهوشی به روش یخ گذاری به دلیل ایجاد استرس شدید و فعالیت فراوان روش‌های مناسبی هم از نظر اخلاقی و هم از نظر کیفیت گوشت نمی‌باشند. در حالیکه در روش بیهوشی با گل میخک ماهیان تحت استرس نبوده و کیفیت گوشت به نحو مطلوب حفظ گردید و به دلیل ناچیز بودن پتانسیل ریسک این ماده برای مصرف انسانی در مقایسه با مواد شیمیایی(Ribas *et al,* 2007) می‌توان از آن جهت بیهوشی و کشتار ماهیان به منظور بهبود کیفی گوشت حاصله استفاده نمود.

References

- Askarian, F., Kousha, A. 2006. Collection of Fish and Aquatic Animals' Physiology (First Issue) Stress. Aquaculture Sciences Public. 446 p.
- Acerete, L., Reig, L. Alvarez, D. Flos, R.and TortL. 2009. Comparision of two stunning/slaughtering methods on stress response and quality indicators of European sea bass (*Dicentrarchus labrax).* Aquaculture, 287: 139144.
- Ang, J., Haard, N. F. 1985. Chemical composition and post-mortem changes in soft textured muscle from intensively feeding cod, *Gadus morhua*. J. Food Biochemistry, 9, 49– 64.
- Bagni, M., Civitareale, C., Priori, A., Ballerini, A., Finoia, M., Brambilla, G., Marino, G. 2007. Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture, 263: 52–60.
- Bito, M., Yamada, K., Mikumo, Y., Amano, K. 1983. Studies on rigor mortis of fish: differences in the mode of rigor mortis among some varieties of fish by modified Cutting's methods. Bulletin of Tokai Regional Fisheries Research laboratory, 109: 89–96.
- Bremmer, H. A. 1992. Fish flesh structure and the role of collagen- its post-mortem aspects and implications for fish processing. In: Huss, H.H., et al. (Eds.), Quality Assurance in the Fish Industry. Elsevier Science, Amsterdam. Pp: 39–62.
- Einen, O., Mørkøre, T., Røra°, A.M.B., Thomassen, M.S. 1999. Feed ration prior to slaughter-a potential tool for managing product quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture, 178: 149-169.
-Grzegorz, J., Bernard, K., Robert, D. 2006. The anaesthetic effect of clove oil on Common Carp *(Cyprinus carpio)*. Acta Ichtyol. Pisc. 36: 93-97.
- Ingolfsdottir, S., Stefansson, G. & Kristbergsson, K. 1998. Seasonal variations in physiochemical and textural properties of North Atlantic cod (*Gadus morhua*) mince. Journal of Aquatic Product Technology, 7: 39-61.
- Kiessling, A., Espe, M., Ruohonen, K., Morkore, T. 2004. Texture, gaping and colour of fresh and frozen Atlantic salmon flesh as affected by pre-slaughter iso-eugenol or CO_2 anaesthesia. Aquaculture, 236: 645–657.
- Korhonen, R. W., Lanier, T. C., Giesbrecht, F. 1990. An evaluation of simple methods for following rigor development in fish. Journal of Food Science. 55: 346–348. .

- Kristoffersen, T. Tobiassen, M. Esaiassen, G. B. Olsson, L. A. Godvik, M. A. Seppola and Olsen, R. L. 2006. Effects of pre-rigor filleting on quality aspects of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). Aquaculture Research. 37: 1556–1564.

- Lavéty, J., Afolabi, O. A., Love, R. M. 1988. The connective tissues of fish. IX. Gaping in farmed species. International Journal of Food Science Technology. 23: 23-30.

- Martini, H., Weidenbörner, M., Adams, S., Kunz, B. 1996. Eugenol and carvacol: the main fungicidal compounds in clove. Italian Journal of Food Science, 1: 63-67.

- Marx, H., Brunner, B., Weinzierl, W., Hoffman, R., Stolle, A. 1997. Methods of stunning freshwater fish: impact on meat quality and aspects of animal welfare. Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und - Forschung. 204: 282–286.

- Morkore, T., Hansen, A. A., Unander, E., Einen, O. 2002. Composition, liquid leakage, and mechanical properties of farmed rainbow trout: variation between fillet sections and the impact of ice and frozen storage. Journal of Food Science. 67: 1933–1938.

- Morzel, M., Chambon, C., Lefevre, F., Paboeuf, G., Laville, E. 2006. Modifications of trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle proteins by preslaughter activity. Journal of Agricultural Food Chemistry. 54: 2997-3001.

- Poli, B.M., Parisi, G., Scappini, F., Zampacavallo, G., 2005. Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. Aquaculture International. 13: 29–49.

- Ribas, L., Flos, R., Reig, L., MacKenzie, S., Barton, B. A., Tort, L. 2007. Comparison of methods for anaesthetizing Senegal sole (*Solea senegalensis*) before slaughter: stress responses and final product quality. Aquaculture, 269: 250–258.

- Robb, D.H.F., Kestin, S.C., Warriss, P. D. 2000. Muscle activity at slaughter: I. Changes in flesh colour and gaping in rainbow trout. Aquaculture, 182: 261–269.

- Ross L.G., Ross B. 1999. Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals. 2nd ed. Blackwell Science Ltd., Oxford. 159 p.

- Roth, B. Birkeland, S., Oyarzun, F. 2009. Stunning, pre slaughter and filleting conditions of Atlantic salmon and subsequent effect on flesh quality on fresh and smoked fillets. Aquaculture, 289: 350-356.

- Roth, B., Slinde, E., Arildsen, J. 2006. Pre or post mortem muscle activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). The effect on rigor mortis and the physical properties of flesh. Aquaculture, 257: 504–510.

- Rotllant, J., Balm, P.H., Perez-Sanchez, J., Wendelaar-Bonga, S.E. 2001. Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream(*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinementstress. General and Comparative Endocrinology, 121: 333-342.

- Ruff, N., Fitzgerald, R. D., Cross, T. F., Teurtrie, G., Kerry, J. P. 2002. Slaughtering method and dietary alpha-tocopheryl acetate supplementation affect rigor mortis and fillet shelf-life of turbot (*Scophthalmus maximus*) L. Aquaculture Research., 33: 703–714.

- Sebastio, P., Ambroggi, F., Baldrati, G. 1996. Influence of slaughtering method on rainbow trout bred in captivity. Biochemical considerations. Ind. Conserve., 71: 37-49.

- Sigholt, T., Erikson, U., Rustad, T., Johansen, T. S. 1997. Handling stress and storage temperature affect meat quality of farm-raised Atlantic salmon. J. Food Sci., 62: 898-906.

- Skjervoldt, P. O., Fjaera, S. O., Ostby, P. B., Einen, O. 2001. Live chilling and crowding stress before slaughter of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture, 192: 265–280.

-Wilkinson, Rayan J., Paton, N., Porter, J.R. 2008. The effects of pre-harvest stress and harvest method on the stress response, rigor onset, muscle pHand driploss in barramundi*(Lates calcarifer)*. Aquaculture.282: 26-32.

Effects of Stunning by Ice and Clove Oil, and Asphyxia on Stress Responses and Quality Indicators in Common Carp (*Cyprinus Carpio*)

S. Moini[1], Z. Mouloodi*[2], B. Shabanpour[3] and K. Rahmanifarah[4]

[1] Associate Prof., Food Technology Faculty. Agriculture Department of Tehran University, Tehran, I.R. Iran

[2] M. Sc Student, Fisheries Faculty, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, I.R. Iran

[3] Associate Prof., Fisheries Faculty, Gorgan University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R. Iran

[4] Ph. D. Student, Fisheries Faculty, Gorgan University of Agriculture Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R. Iran

(Received: 04 July 2010, Accepted: 08 March 2011)

Abstract

In this investigation effects of two stunning methods 1) ice asphyxia, 2) direct immersion of fish into bath containing previous water dilution of clove oil that were killed by blow on the head were compared with common fish slaughtering method: removing fish from water and exposed to the air (asphyxia). Effects of these two methods on meat quality and stress responses in common carp were evaluated. Results revealed that anaesthetizing and killing procedures significantly affected the meat quality in common carp. Both rigor index and pH varied significantly during the trail post-mortem between the experimental groups. Maximal rigor index (77.6%) was observed after 3 hours post mortem in the asphyxia group. Rigor index reached maximum at 24(44.2%) and 60 h (55.1%) post mortem for the ice and clove oil group. Fish subjected to clove oil showed a less intense than those in the other group although they had a longer lasting rigor state. Mean muscle pH of fish was 6.34 for asphyxia, 6.53 for ice group and 6.99 for clove oil immediately after death. Fish of the group clove oil had the lowest driploss at 96h postmortem. Stress blood indicators in asphyxia group were significantly higher than other two groups and the control group (unstressed fish). The data presented in the experiment expressed that fish of the group received clove oil had significantly higher quality and less stress response than other groups.

Keywords: Common carp (*Cyprinus carpio*), Stress, Meat quality, Clove oil, Asphyxia

*Corresponding author: Tel: +98 911 3712729 ,Fax: +98 171 2239424 , E-mail: Znmouloodi@yahoo.com