شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۷۱، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷

صفحات ۱۰-۱

مقایسه شاخص‌های خون‌شناسی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پس از بیهوشی با میرسن و یوجینول

علی طاهری میرقائد[*۱]، *مهیار یساری*[۲]، *سید سعید میرزرگر*[۱]، *سید مرتضی حسینی*[۳]

۱. دانشیار گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۲. دانشجوی دکتری گروه بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۳. استادیار پژوهشی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی-گرگان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۳/۷

چکیده

میرسن ماده‌ای است که در ترکیب گیاهان مختلف وجود داشته و اثرات مثبتی بر سلامت دارد. خاصیت بیهوش کنندگی میرسن در ماهی‌ها تایید شده است ولی اثر آن بر شاخص‌های خون‌شناسی بررسی نشده است. هدف از این تحقیق، بررسی اثر بیهوشی با میرسن بر شاخص‌های خون‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در مقایسه با یوجینول است. در این مطالعه ۲۴۰ قطعه ماهی قزل آلای رنگین کمان ۳۰۰ گرمی مورد استفاده قرار گرفت. ماهی‌ها به مدت ۶۰، ۱۸۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ ثانیه با میرسن و یوجینول بیهوش شدند. برای بیهوشی در این زمان‌ها، غلظت‌های ۸۱، ۳۰، ۱۹ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر یوجینول و ۵۳۱، ۲۵۱، ۱۷۷ و ۱۱۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد. پس از بیهوشی از ماهی‌ها خون‌گیری به‌عمل آمد. شاخص‌های خون‌شناسی شامل تعداد گلبول‌های خون، شمارش افتراقی گلبول‌های سفید، هموگلوبین، هماتوکریت، MCV، MCH و MCHC محاسبه و بین تیمارها مقایسه شد. نتایج نشان داد که در هر دو تیمار یوجینول و میرسن، افزایش زمان بیهوشی باعث افزایش معنی‌دار در میزان هموگلوبین و تعداد گلبول‌های قرمز گردید. کمترین مقدار مربوط به زمان ۶۰ ثانیه بود. در تیمار میرسن با افزایش زمان بیهوشی، تعداد گلبول‌های سفید کاهش یافت و اختلاف معنی‌داری بین زمان ۶۰ و ۶۰۰ ثانیه وجود داشت. ولی اختلاف معنی‌داری در درصد لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و ائوزینوفیل‌ها و MCV، MCH و MCHC وجود نداشت. در نهایت نتیجه‌گیری می‌شود که افزایش زمان بیهوشی با یوجینول و میرسن باعث افزایش تعداد گلبول قرمز و هموگلوبین می‌شود که می‌تواند نشانه بروز استرس باشد. همچنین، به‌نظر می‌رسد که بیهوشی با میرسن و یوجینول در زمان ۶۰۰-۶۰ ثانیه آثار منفی خاصی در ماهی نداشته باشد.

واژگان کلیدی: ماهی، بیهوشی، خون‌شناسی، میرسن، یوجینول.

* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۹۸۹۱۲۱۹۵۲۴۴۰+ ایمیل: mirghaed@ut.ac.ir

۱. مقدمه

بیهوشی یک ابزار مناسب جهت سهولت دستکاری، جراحی، حمل و نقل و نمونه‌برداری در آبزیان است. طی فرآیند بیهوشی، ماهیان به‌صورت موقتی تحرک‌پذیری خود را از دست داده و بی‌حرکت می‌شوند و به همین دلیل، کار با آنها ساده‌تر می‌شود. رایج‌ترین روش بیهوشی آبزیان، غوطه‌وری در محلول بیهوش کننده است که طی آن مواد بیهوش کننده از آبشش و پوست ماهی جذب شده و وارد جریان خون می‌شوند. ماهیان پس از قرار گرفتن در معرض مواد بیهوش کننده، یکسری واکنش‌های رفتاری خاصی از خود نشان می‌دهند. این پاسخ‌های رفتاری در گونه‌های مختلف، اندکی با هم تفاوت دارند. به هر یک از این پاسخ‌های رفتاری، مرحله بیهوشی گفته می‌شود. تعداد این مراحل بین ۶-۵ متغیر است (Keene *et al.*, 1998; Hoseini *et al.*, 2015). مراحل بیهوشی مختلف، کاربردهای متفاوتی دارند. مثلا برای حمل و نقل ماهی به‌همراه مواد بیهوش کننده، ماهی باید در مرحله دو بیهوشی باشد که در این مرحله تحریک-پذیری ماهی کم می‌شود ولی ضربان آبششی نرمال است. برای دستکاری ماهی (مثل ثبت طول و وزن یا جابجایی تانک)، مرحله سه بیهوشی مناسب است که طی آن ماهی تعادل خود را از دست داده است. برای نمونه‌برداری، ماهی باید در مرحله ۴ بیهوشی (بیهوشی عمیق) باشد که در این مرحله رفلکس عضلانی نیز قطع می‌شود.

مواد بیهوش‌کننده زیادی جهت بیهوشی ماهیان وجود دارد که به دو دسته مواد شیمیایی و مواد طبیعی تقسیم می‌شوند. تری‌کائین متان سولفونات (MS222)، فنوکسی اتانول و بنزوکائین از جمله مواد بیهوش‌کننده شیمیایی پر مصرف در آبزیان هستند. مواد طبیعی در واقع عصاره گیاهان مختلف یا مواد موثره آنها هستند که رایج‌ترین آنها عصاره میخک است. ماده موثره عصاره میخک، یوجینول است. خاصیت بیهوش کنندگی عصاره میخک و یوجینول در گونه‌های مختلفی ثابت شده است. عصاره میخک محصول عصاره‌گیری غنچه درخت *Eugenia caryophyllata* می‌باشد (Guimarães *et al.*, 2013). این ماده یک بی‌حس کننده موضعی است و مکانیسم بیهوش‌کنندگی آن در ماهی چندان شناخته شده نیست ولی بیان شده است که این ماده باعث کاهش فعالیت سیستم عصبی مرکزی می‌شود (Stoskopf and Posner, 2008). غلظت ۶۰-۲۵ میلی گرم بر لیتر از این ماده شیمیایی جهت بیهوشی ماهی استفاده می‌شود، ولی وقتی بیهوشی سریع مدنظر باشد از غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر استفاده می‌شود (Stoskopf and Posner, 2008). قابلیت بیهوش‌کنندگی این ماده در گونه های زیادی مطالعه و تایید شده است (Velisek *et al.*, 2005a, b; Roubach *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2009; Hajek *et al.*, 2006).

اخیراً مطالعات زیادی در خصوص بررسی خاصیت بیهوش‌کنندگی عصاره گیاهان مختلف انجام شده است که بیشتر آنها روی گیاهانی مثل *Lippia alba* و *Aloysia triphylla* انجام شده و مشخص شده که این مواد علاوه بر خاصیت بیهوش‌کنندگی اثرات مثبتی بر سلامت ماهی (مثل کاهش استرس و بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی) دارند (Gressler *et al.*, 2014; Parodi *et al.*, 2012, 2014; Zeppenfeld *et al.*, 2014). از طرفی، ترکیب عصاره گیاهان با توجه به سن، موقعیت جغرافیایی، زمان برداشت و روش استخراج عصاره تغییر می‌کند که می-تواند به‌طور قابل توجهی خاصیت بیهوش‌کنندگی آن را تغییر دهد (Tondolo *et al.*, 2013). به همین دلیل، در مطالعات جدید از مواد موثره گیاهان مختلف به جای عصاره کامل آن در بیهوشی ماهی استفاده شده است. در همین راستا، خاصیت بیهوش کنندگی منتول (ماده موثره نعنا)، سینئول (ماده موثره اکالیپتوس)، لینالول (ماده موثره گیاه *L. alba*) در برخی گونه‌های ماهی مشخص شده است (Mazandarani and Hoseini, 2017; Taheri Mirghaed *et al.*, 2016).

میرسن یک مونوترپن غیرحلقوی است که در گیاهان مختلفی از جمله *Spilanthes acmella*، *Humulus lupulus*، *Cannabis sativa*، *Houttuynia cordata* و *Houttuynia emeiensis* یافت می‌شود (Sharpe and Laws, 1981; Baruah and Leclercq, 1993; Lu *et al.*, 2006). این ماده دارای خاصیت تسکین درد، آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی است (Rao et al., 1990; Souza *et al.*,

2003) و خاصیت بیهوش‌کنندگی آن در ماهی کپور معمولی (Taheri Mirghaed *et al*., 2016) و قزل-آلای رنگین کمان (Taheri Mirghaed *et al*., 2018) به اثبات رسیده است. بر این اساس، میرسن در غلظت ۱۲۰۰-۱۵۰ میکرولیتر بر لیتر باعث بیهوشی ماهی کپور انگشت قد در مدت زمان ۵۹۴-۴۲ ثانیه می‌شود. همچنین، ۵۳۱-۱۱۱ میکرولیتر بر لیتر میرسن باعث بیهوشی قزل‌آلای رنگین کمان (۳۰۰ گرمی) در زمان ۶۰۰-۶۰ ثانیه می‌شود.

مطالعات خون‌شناسی یکی از مهم‌ترین ابزارها در ارزیابی وضعیت سلامت ماهی هستند (Clauss *et al*., 2008). به همین دلیل، در تحقیقات مختلف از مطالعات خون‌شناسی جهت ارزیابی سلامت ماهی پس از بیهوشی با مواد مختلف استفاده شده است و نتایج این مطالعات نشان داده است که روش‌های مختلف بیهوشی و مواد بیهوش کننده مختلف اثرات متفاوتی بر شاخص‌های خون‌شناسی دارند (Hoseini and Ghelichpour, 2012; Velisek *et al*., 2005a, b; Velisek *et al*., 2007).

با توجه به این‌که هیچ اطلاعاتی از اثر بیهوشی با میرسن بر شاخص‌های خون‌شناسی ماهی‌ها وجود ندارد، هدف از این تحقیق بررسی اثر بیهوشی با میرسن و یوجینول در زمان‌های مختلف بر شاخص‌های خون‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان بود.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. تهیه ماهی و سازگاری با شرایط آزمایشگاهی

در این تحقیق از ۲۴۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان ۳۰۰ گرمی استفاده شد. ماهیان با تراکم ۲۰ قطعه در ۱۲ مخزن ۳۰۰ لیتری ذخیره سازی شدند. ابتدا ماهیان به مدت ۲ هفته با شرایط آزمایشگاهی سازگار شدند که در این مدت روزانه دوبار توسط غذای تجاری (فرادانه GFT2) تغذیه شدند. جریان آب ۱ لیتر بر ثانیه جهت نگهداری ماهیان برقرار بود. همچنین، برای هوادهی مداوم مخازن از سنگ هوا و پمپ هوا استفاده شد. در این دوره، دما، pH و اکسیژن محلول آب به ترتیب ۱۱/۵ درجه سانتی‌گراد، ۷/۸ و ۷/۸ میلی گرم بر لیتر بود. همچنین، برای حفظ کیفیت آب، هر روز بقایای غذا و فضولات ماهی سیفون شد.

۲.۲. تعیین اثر بیهوشی بر شاخص‌های خون-شناسی

به این منظور، ماهی‌ها به مدت ۶۰، ۱۸۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ ثانیه با میرسن و یوجینول بیهوش شدند. برای بیهوشی در این زمان‌ها، غلظت‌های ۸۱، ۳۰، ۱۹ و ۱۰ میلی گرم در لیتر یوجینول و ۵۳۱، ۲۵۱، ۱۷۷ و ۱۱۱ میلی گرم در لیتر استفاده شد (Taheri Mirghaed *et al*., 2018). برای بیهوشی از مخازن ۱۰۰ لیتری استفاده شد و تعداد ۶ ماهی برای هر غلظت از هر یک از مواد بیهوش کننده نمونه‌برداری شدند. این شش ماهی به‌صورت یک‌جا صید و به مخزن بیهوشی منتقل شدند و پس از گذشت مدت زمان مورد نظر (که طی آن ماهی به بیهوشی عمیق می‌رسید) با استفاده از سرنگ هپارینه و از ناحیه ورید دمی خون‌گیری از ماهیان انجام شد. نمونه‌های خون در تیوب‌های جداگانه ریخته شده و بلافاصله برای مطالعات خون-شناسی استفاده شدند.

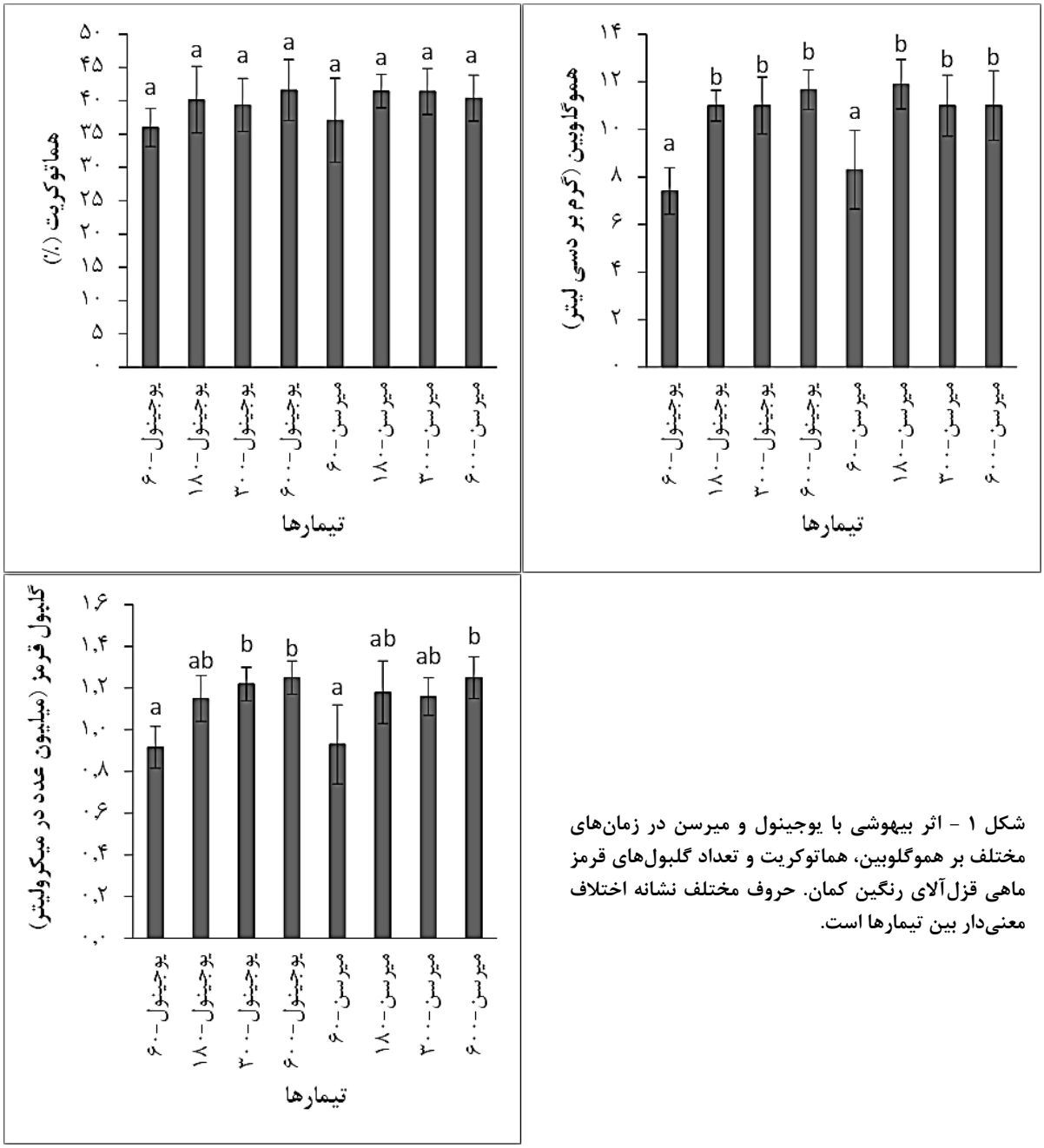
۳.۲. مطالعات خون‌شناسی

تعداد سلول‌های قرمز و سفید، هماتوکریت، هموگلوبین و شمارش افتراقی گلبول‌های سفید با استفاده از روش‌های استاندارد تعیین شد (Blaxhall, 1972; Bain *et al*., 2006). حجم متوسط گلبول قرمز (MCV)، هموگلوبین متوسط گلبول قرمز (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) براساس رابطه‌های زیر محاسبه شدند (Dacie and Lewis, 1996).

$$MCV = [Hct\ (\%) \times 10]/[RBC\ (10^6/mm^3)]$$
$$MCH = [Hb\ (g/L)]/[RBC\ (10^6/mm^3)]$$
$$MCHC = [Hb\ (g/100\ mL)]/[Hct(\%)]$$

۴.۲. تجزیه و تحلیل آماری

پراکنش نرمال داده‌ها توسط آزمون Shapiro-Wilk تائید شد. داده‌های مدت زمان بیهوشی و به-هوش آمدن با استفاده از روش آماری تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون LSD تجزیه و تحلیل شدند. معنی-داری در سطح $P<0.05$ بررسی گردید. داده‌ها به



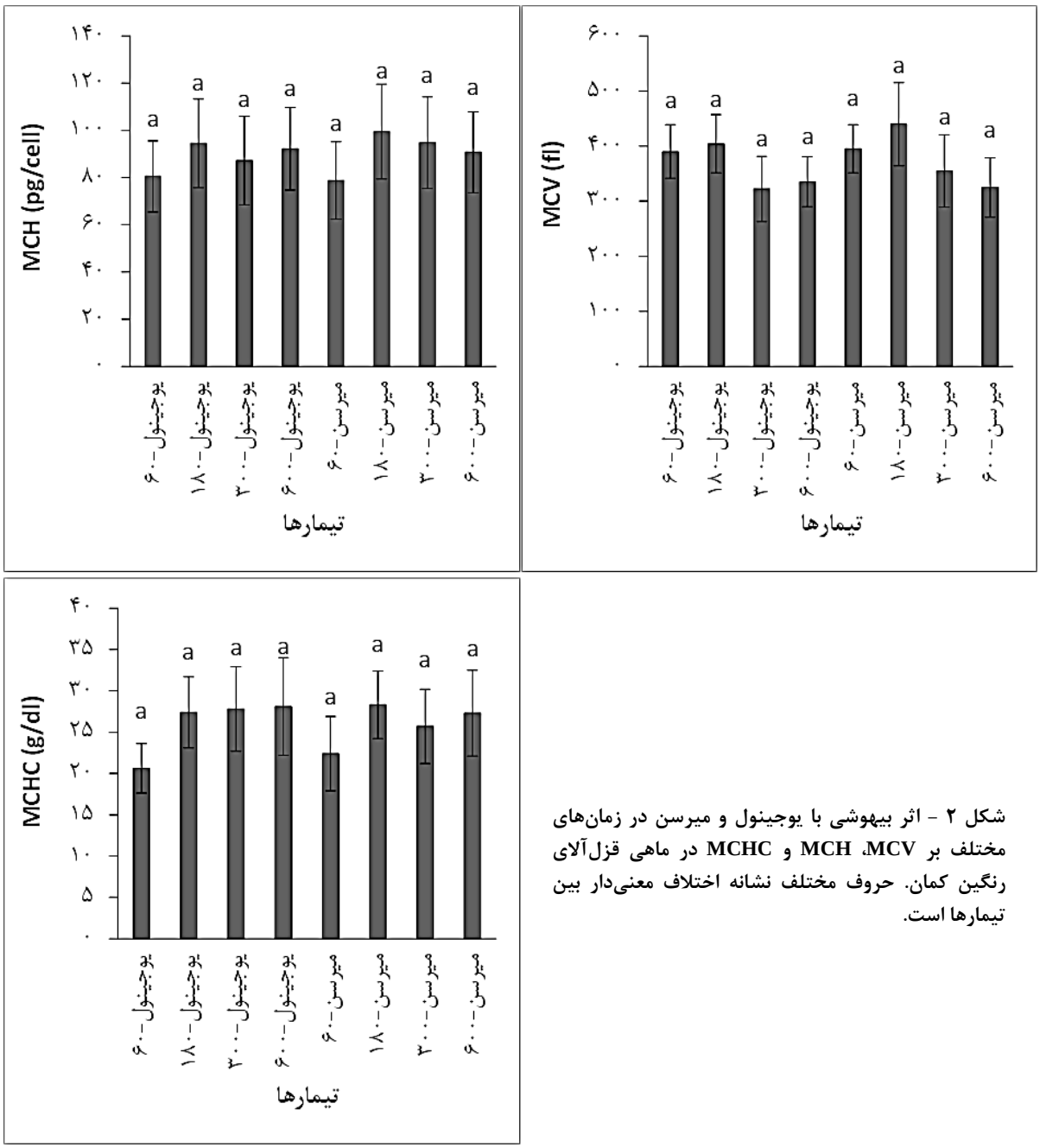
شکل ۱ - اثر بیهوشی با یوجینول و میرسن در زمان‌های مختلف بر هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول‌های قرمز ماهی قزل‌آلای رنگین کمان. حروف مختلف نشانه اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.

صورت میانگین±انحراف معیار ارائه شدند. کلیه تجزیه و تحلیل‌های آماری در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد.

۳. نتایج

اثر بیهوشی با یوجینول و میرسن در زمان‌های مختلف بر هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول قرمز در شکل ۱ ارائه شده است. در هر دو تیمار یوجینول و میرسن، افزایش زمان بیهوشی باعث افزایش معنی‌دار در میزان هموگلوبین و تعداد گلبول‌های قرمز شد و کمترین مقدار مربوط به زمان ۶۰ ثانیه بود. مواد بیهوشی مختلف و زمان بیهوشی اثری بر درصد هماتوکریت نداشتند.

نتایج مربوط به MCV، MCH و MCHC در شکل ۲ ارائه شده است. بر اساس نتایج، اختلاف معنی-داری در این معیارها بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد. نتایج مربوط به تعداد گلبول‌های سفید و شمارش افتراقی آنها در شکل ۳ ارائه شده است. در تیمار یوجینول اختلاف معنی‌داری بین زمان‌های مختلف مشاهده نشد ولی در تیمار میرسن با افزایش زمان بیهوشی، تعداد گلبول‌های سفید کاهش یافت و اختلاف معنی‌داری بین زمان ۶۰ و ۶۰۰ ثانیه وجود داشت. ولی اختلاف معنی‌داری در درصد لنفوسیت‌ها،



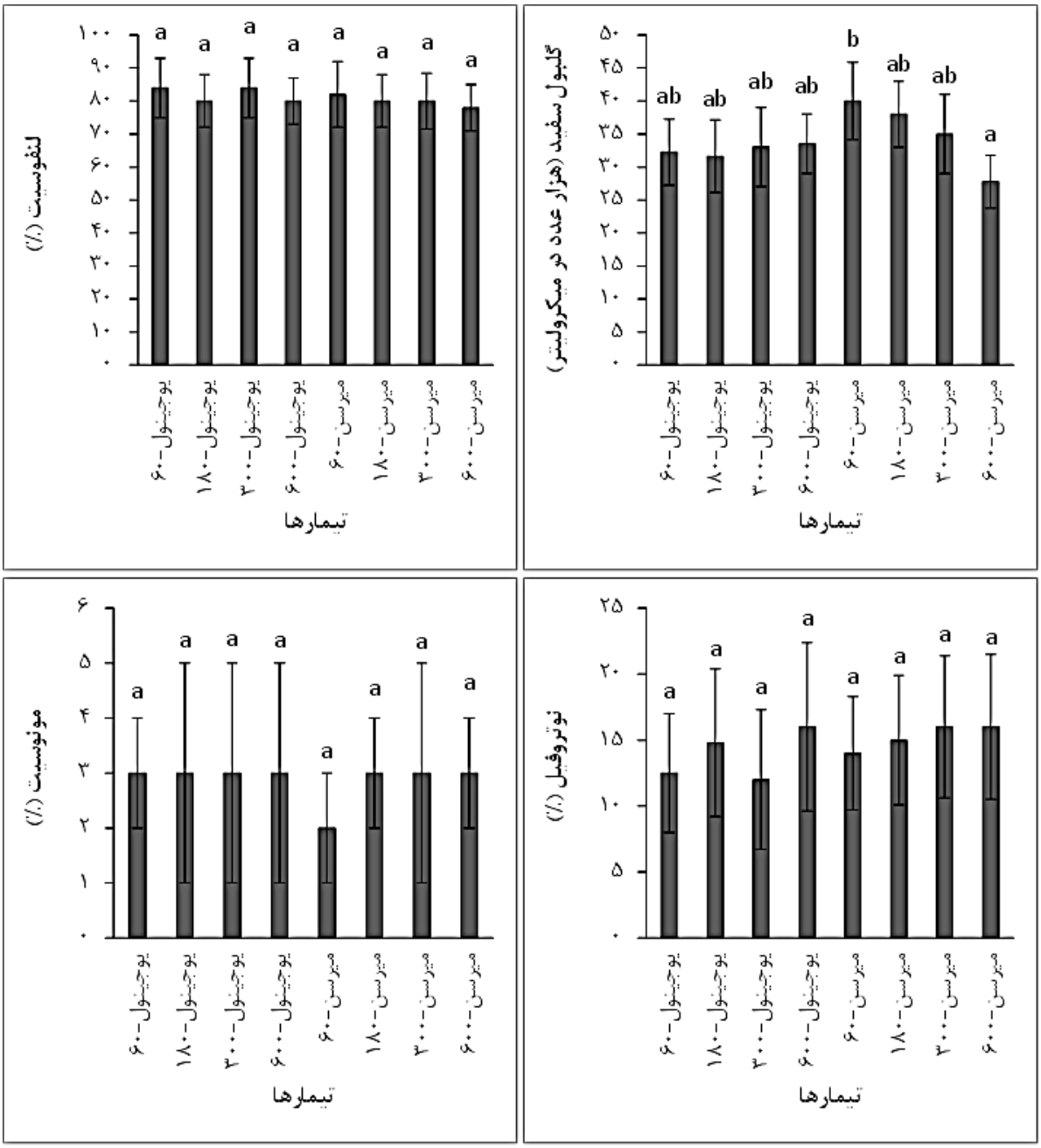
شکل ۲ - اثر بیهوشی با یوجینول و میرسن در زمان‌های مختلف بر MCV، MCH و MCHC در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان. حروف مختلف نشانه اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.

نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و ائوزینوفیل‌ها مشاهده نشد.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

اخیراً تمایل زیادی جهت یافتن مواد بیهوش-کننده گیاهی جهت بیهوشی ماهی به وجود آمده است که دلیل آن اثرات مثبت مواد گیاهی (خواص آنتی-اکسیدانی و ضد استرسی) در ماهی است (Gressler *et al.*, 2014). با این حال نیاز است که کارایی مواد جدید در مقایسه با مواد بیهوش‌کننده موجود مقایسه شود. در این تحقیق، یوجینول به‌عنوان یک بیهوش-کننده گیاهی پرمصرف انتخاب شد تا خاصیت بیهوش-کنندگی میرسن با آن مقایسه شود. همچنین، از آن‌جا که خاصیت بیهوش‌کنندگی مواد تحت تاثیر عوامل مختلفی مثل دمای آب، گونه ماهی و اندازه ماهی است (Taheri Mirghaed *et al.*, 2016)، ضروری است که مقایسه بین مواد مواد بیهوش‌کننده تحت شرایط یکسان صورت پذیرد. به همین دلیل در این تحقیق اثر میرسن و یوجینول در شرایط یکسان با یکدیگر مقایسه شد.

مطالعات خون‌شناسی ابزاری مناسب برای ارزیابی وضعیت سلامت، استرس و ایمنی ماهی هستند (Clauss *et al.*, 2008). گلبول‌های قرمز نقش اصلی در رساندن اکسیژن به بافت‌ها و خروج دی اکسیدکربن از طریق آبشش دارند و به همین دلیل هرگونه تغییر



شکل ۲ - اثر بیهوشی با یوجینول و میرسن در زمان‌های مختلف بر تعداد گلبولهای سفید، و درصد لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها، مونوسیت‌ها و ائوزینوفیل‌ها در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان. حروف مختلف نشانه اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.

در وضعیت اکسیژن‌رسانی و دفع دی‌اکسیدکربن باعث تغییراتی در میزان هموگلوبین و تعداد گلبول‌های قرمز خون می‌شود (Clauss *et al*., 2008). در این مطالعه افزایش زمان بیهوشی باعث افزایش مقدار هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول‌های قرمز خون شد. این تغییرات می‌تواند به دلیل استرس ناشی از بیهوشی و نیز افزایش نیاز به اکسیژن در شرایط بیهوشی باشد (Bonga, 1997). مواد بیهوش کننده باعث کاهش ضربان آبششی در ماهی می‌شوند به همین دلیل ماهی با کمبود اکسیژن روبرو شده و برای جبران آن ظرفیت حمل اکسیژنی را با افزایش تعداد گلبول قرمز و هموگلوبین افزایش می‌دهد (Hoseini and Ghelichpour, 2012). مطالعات مختلفی به بررسی اثر مواد بیهوش کننده و مدت زمان بیهوشی بر شاخص‌های خون‌شناسی و بیوشیمیایی ماهی پرداخته‌اند. Mohammadizarajabad و همکاران (۲۰۰۹) و Hoseini and Ghelichpour (۲۰۱۲) گزارش کردند که افزایش زمان بیهوشی توسط میخک در فیل‌ماهی باعث افزایش تعداد گلبول قرمز، هماتوکریت و هموگلوبین شد. همچنین، افزایش زمان بیهوشی با میخک باعث افزایش شاخص‌های استرس در خون فیل‌ماهی می‌شود (Hoseini *et al*., 2011). از طرفی، Velisek و همکاران (۲۰۰۵a) نشان دادند که بیهوشی اثر معنی‌داری بر شاخص‌های خون‌شناسی قزل‌آلای رنگین کمان ندارد.

شاخص‌های MCV، MCH و MCHC تابع تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت هستند و برای تشخیص انواع کم‌خونی استفاده می‌شوند (Clauss *et al*., 2008). در مطالعه حاضر، این شاخص‌ها در زمان‌های مختلف بیهوشی با میرسن و یوجینول تغییری نداشتند. نتایج مشابهی توسط Mohammadizarajabad و همکاران (۲۰۰۹) در فیل‌ماهی مشاهده شد و غلظت‌های مختلف میخک اثری بر این شاخص‌ها نداشت. در قزل‌آلای رنگین کمان و کپور معمولی نیز بیهوشی با روغن میخک اثری بر شاخص‌های MCV، MCH و MCHC نداشت (Velisek *et al*., 2005a, b). از طرفی، Hoseini و Ghelichpour (۲۰۱۲) نشان دادند که بیهوشی طولانی مدت با میخک باعث کاهش MCV، و افزایش MCH و MCHC می‌شود ولی بیهوشی سریع اثر معنی‌داری بر این شاخص‌ها نداشت.

گلبول‌های سفید خون نقش مهمی در دفاع از بدن در برابر عوامل بیماری‌زا دارند و تغییرات آنها نشان دهنده وضعیت سلامت و استرس در ماهی است (Barton, 2002). در این تحقیق یوجینول در زمان‌های مختلف اثری بر تعداد گلبول‌های سفید نداشت ولی افزایش زمان بیهوشی با میرسن باعث کاهش تعداد گلبول‌های سفید شد. این نتایج نشان می‌دهد که یوجینول در زمان‌های مختلف اثر خاصی بر استرس و سلامت قزل‌آلا ندارد ولی افزایش زمان بیهوشی با میرسن ممکن است باعث کاهش سلامت و بروز استرس در در ماهی شود. ولی گرچه تعداد گلبول‌های سفید در تیمار میرسن در زمان ۶۰۰ ثانیه کاهش یافت، ولی اختلافی با تیمار یوجینول نداشت. مطالعات پیشین نیز نشان داده‌اند که یوجینول در زمان‌های مختلف اثر معنی‌داری بر تعداد گلبول‌های سفید در ماهیان مختلف ندارد (Velisek *et al*., 2005a, b; Hoseini and Ghelichpour, 2012; Mohammadizarajabad *et al*., 2009). همچنین در این مطالعات اثر معنی‌داری روی شمارش افتراقی گلبول‌های سفید نیز مشاهده نشد که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد.

در نهایت نتیجه‌گیری می‌شود که افزایش زمان بیهوشی با یوجینول و میرسن باعث افزایش تعداد گلبول قرمز و هموگلوبین می‌شود که می‌تواند نشانه بروز استرس باشد. همچنین، به‌نظر می‌رسد که بیهوشی با میرسن و یوجینول در زمان ۶۰۰-۶۰ ثانیه آثار منفی خاصی در ماهی نداشته باشد.

References

Bain, B.J., Lewis, S.M., Bates, I., 2006. Basic haematological techniques. In: Bates, S.M.L.J.B. (Eds.), Dacie and lewis practical haematology (Tenth Edition). Churchill Livingstone, Philadelphia, pp. 25-27.

Barton, B.A., 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* 42, 517-525.

Baruah, R., Leclercq, P., 1993. Characterization of the essential oil from flower heads of *Spilanthes acmella*. *Journal of Essential Oil Research* 5, 693-695.

Blaxhall, P.C., 1972. The haematological assessment of the health of freshwater fish. *Journal of Fish Biology* 4, 593-604 .

Bonga, S.W., 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77, 591-625.

Clauss, T.M., Dove, A.D., Arnold, J.E., 2008. Hematologic disorders of fish. Veterinary clinics of North America. *Exotic Animal Practice* 11, 445-462.

Gressler, L.T., Riffel, A.P.K., Parodi, T.V., Saccol, E.M.H., Koakoski, G., Costa, S.T., Pavanato ,M.A., Heinzmann, B.M., Caron, B., Schmidt, D., Llesuy, S.F., Barcellos, L.J.G., Baldisserotto, B., 2014. Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. *Aquaculture Research* 45, 1061-1072.

Guimarães, A.G., Quintans, J.S., Quintans-Júnior, L.J., 2013. Monoterpenes with analgesic activity—a systematic review. *Phytotherapy Research* 27, 1-15.

Hajek, G., Klyszejko, B ,.Dziaman, R., 2006. The anaesthetic effects of clove oil on common carp, *Cyprinus carpio* L. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 2, 93-97.

Hoseini, S., Ghelichpour, M., 2012. Efficacy of clove solution on blood sampling and hematological study in Beluga, *Huso huso* (L.). *Fish Physiology and Biochemistry* 38, 493-498.

Hoseini, S., Hosseini, S., Nodeh, A., 2011. Serum biochemical characteristics of Beluga, *Huso huso* (L.), in response to blood sampling after clove powder solution exposure. *Fish Physiology and Biochemistry* 37, 567-572.

Hoseini, S.M., Rajabiesterabadi, H., Tarkhani, R., 2015. Anaesthetic efficacy of eugenol on iridescent shark, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878) in different size classes. *Aquaculture Research* 46, 405-412.

Keene, J., Noakes , D., Moccia, R., Soto, C., 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research* 29, 89-101.

Lu, H., Wu, X., Liang, Y., Zhang, J., 2006. Variation in chemical composition and antibacterial activities of essential oils from two species of *Houttuynia* THUNB. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 54, 936-940.

Mazandarani, M., Hoseini, S.M., 2017. Menthol and 1, 8-cineole as new anaesthetics in common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture Research* 48, 3041-3051.

Mohammadizarejabad, A., Bastami, K.D., Sudagar, M., Motlagh, S.P., 2010. Haematology of great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juvenile exposed to clove powder as an anaesthetic. *Comparative Clinical Pathology* 19, 465-468.

Park, M., Im, S.-Y., Seol, D.-W., Park, I.-S., 2009. Efficacy and physiological responses of rock bream, *Oplegnathus fasciatus* to anesthetization with clove oil. *Aquaculture* 287, 427-430.

Parodi, T.V., Cunha, M.A., Becker, A.G., Zeppenfeld, C.C ,.Martins, D.I., Koakoski, G., Barcellos, L.G., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B., 2014. Anesthetic activity of the essential oil of *Aloysia triphylla* and effectiveness in reducing stress during transport of albino and gray strains of silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Fish Physiology and Biochemistry* 40, 323-334.

Parodi, T.V., Cunha, M.A., Heldwein, C.G., de Souza, D.M., Martins, Á.C., Garcia, L.d.O., Junior, W.W., Monserrat, J.M., Schmidt, D., Caron, B.O., 2012. The anesthetic efficacy of eugenol and the essential oils of *Lippia alba* and *Aloysia triphylla* in post-larvae and sub-adults of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea, Penaeidae). *Comparative BIOCHEMISTRY and physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 155, 462-468.

Rao, V., Menezes, A., Viana, G., 1990 .Effect of myrcene on nociception in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 42, 877-878.

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

Sharpe, F., Laws, D., 1981. The essential oil of hops a review. *Journal of the Institute of Brewing* 87, 96-107.

Souza, M., Siani, A., Ramos, M., Menezes-de-Lima Jr, O., Henriques, M., 2003. Evaluation of anti-inflammatory activity of essential oils from two Asteraceae species. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences* 58, 582-586.

Stoskopf, M., Posner, L., 2008. Anesthesia and restraint of laboratory fish. In: Fish, R., Brown, M., Danneman, P., Karas, A. (Eds.), Anesthesia and analgesia in laboratory animals. Academic Press, London, UK, pp. 519-534.

Taheri Mirghaed, A., Ghelichpour, M., Hoseini, S.M., 2016. Myrcene and linalool as new anesthetic and sedative agents in common carp, *Cyprinus carpio*, comparison with eugenol. *Aquaculture* 464, 165-170.

Taheri Mirghaed, A., Yasari, M., Mirzargar, S.S., Hoseini, S.M., 2018. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) anesthesia with myrcene: efficacy and physiological responses in comparison with eugenol. *Fish Physiology and Biochemistry*, (In press).

Tondolo, J.S.M., Amaral, L.d.P., Simoes, L.N., Garlet, Q.I., Schindler, B., Oliveira, T.M., Silva, B.F.d., Gomes, L.d.C., Baldisserotto, B., Mallmann, C.A., Heinzmann, B.M., 2013. Anesthesia and transport of fat snook *Centropomus parallelus* with the essential oil of *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez. *Neotropical Ichthyology* 11, 667-674.

Velíšek, J., Svobodova, Z., Piačková, V., 2005. Effects of clove oil anaesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta veterinaria Brno* 74, 139-146.

Velíšek, J., Svobodova, Z., Piackova, V., Groch, L., Nepejchalova, L., 2005. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Veterinarni Medicina Czech* 50, 269-275.

Velíšek, J., Wlasow, T., Gomulka, P., Svobodova , Z., Novotny, L., 2007. Effects of 2-phenoxyethanol anaesthesia on sheatfish (*Silurus glanis* L.). *Veterinarni Medicina Czech* 52, 103-110.

Zeppenfeld, C.C., Toni, C., Becker, A.G., dos Santos Miron, D., Parodi, T.V., Heinzmann, B.M., Barcellos, L.J.G., Koakoski, G., da Rosa, J.G.S., Loro, V.L., da Cunha, M.A., Baldisserotto, B., 2014. Physiological and biochemical responses of silver catfish, *Rhamdia quelen*, after transport in water with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Herit) Britton. *Aquaculture* 418, 101-107.