بررسی کارایی آرام بخشی لیدوکائین بر مولدین ماهی تیلاپیای نیل *Oreochromis niloticus*

امیرهوشنگ بحری[1*]
اسماعیل رشیدی[2]

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

***مسئول مکاتبات:**
amirbahri52@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۶/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۷/۱۳
کد مقاله: ۱۳۹۴۰۴۰۳۳۶

چکیده

در این مطالعه تأثیر آرام بخشی لیدوکائین بر مولدین گونه تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) در مرکز تحقیقات آبزی‌پروری آب‌های شور داخلی – ایستگاه تحقیقاتی بافق در شرایط آزمایشگاهی باهدف تعیین غلظت‌های مناسب و مؤثر داروی فوق بررسی گردید. برای این منظور از ۴ غلظت متفاوت در ۴ تیمار (۴۰،۶۰، ۸۰ ، ۱۰۰میلی‌گرم بر لیتر) استفاده شد. میزان اثربخشی این غلظت‌ها با اندازه‌گیری زمان‌های بیهوشی و احیا در تیمارهای مختلف بررسی گردید. زمان‌های بیهوشی به‌طور معنی‌داری با افزایش غلظت ماده بیهوشی برای تمام تیمارها کاهش نشان داد. زمان احیاء نیز با افزایش غلظت مواد بیهوشی افزایش نشان داد ($P< ۰/۰۵$). ضرایب همبستگی بین زمان‌های احیاء و غلظت‌ها به‌صورت($R^۲=۰/۹۳$) $IS_۳ =۱۵۳/۲۵x^{-۱/۰۶۵}$ برای لیدوکائین محاسبه گردید. به‌طور مشابه ارتباط معنی‌دار مثبت ($P <۰/۰۵$) بین غلظت مواد بیهوشی و زمان رسیدن به احیاء کامل($RS_۳$) مشاهده گردید. ضرایب همبستگی بین زمان‌های احیاء و غلظت‌ها به‌صورت ($R^۲ = ۰/۹۹$)$RS_۳ = ۰/۰۳۲۱x^{۱/۱۵۹۸}$ برای لیدوکائین محاسبه گردید. بنابراین با توجه به نتایج به‌دست‌آمده لیدوکائین در غلظت‌های پایین‌تر بر میزان بیهوشی و احیاء مجدد در ماهی تیلاپیای نیل مؤثرتر هست. همچنین این ماده ازنظر ایمن بودن و کم‌هزینه بودن نسبت به سایر مواد بی‌هوش کننده ، ارجح هست.

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

مقدمه

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

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

ولی امروزه روش‌ها و تکنیک‌های آبزی‌پروری در بیش از ۲۰ سال گذشته تحول عظیمی در پرورش تیلاپیا ایجاد کرده‌اند و آن را به یکی از مهم‌ترین ماهیان استخوانی قابل پرورش در جهان تبدیل نموده‌اند (Deriggi *et al*., 2006).

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

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

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

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

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

Rivera Lopes و همکاران (۱۹۹۱) با استفاده از ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از داروی لیدوکائین (که با ۱ گرم بر لیتر بیکربنات سدیم تقویت‌شده بود) توانستند کپور مکزیکی *Algansea lacustris* را به‌خوبی بی‌حس کنند.

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

Hseu و همکاران (۱۹۹۸) میزان اثربخشی چهار ماده بیهوشی را بر ماهی سی‌بریم گونه *Sparus sarba* بررسی نمودند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از آن‌ها غلظت ماده بیهوشی مؤثر ازنظر مدت‌زمان بیهوشی و احیاء مجدد برای ماده بیهوشی کوئین آلدوئین ۹ میکرو لیتر بر لیتر،

کوئینات ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر ، MS-222 میلی‌گرم بر لیتر ۱۰۰، بنزوکائین ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و دو فنوکسی اتانول ۴۰۰ میلی-گرم بر لیتر دست آمده است.

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

Mohammadizarejabad و همکاران (۲۰۰۹) تأثیر ماده بیهوشی پودر گل میخک را بر فاکتورهای خونی بچه ماهی‌های فیل ماهی (*Huso huso*) بررسی نمودند. برای این منظور فیل ماهیان را در معرض غلظت‌های مختلف پودر گل میخک به مدت۱۰دقیقه قرار داده و فاکتورهای خونی را بلافاصله پس از بیهوشی کامل و بعد از ۲۴ ساعت اندازه‌گیری نمودند. بر اساس یافته‌های آن‌ها این میزان ماده بیهوشی موجب افزایش معنی‌داری در میزان هماتوکریت، هموگلوبین و تعداد کل اریتروسیت گردید. البته غلظت این فاکتورها پس از ۲۴ ساعت به حالت اولیه برگشت، بنابراین طبق نتایج آن‌ها غلظت‌های ۱۷۵ تا ۳۵۰ میلی‌گرم بر لیتر تأثیر مضری بر پارامترهای خونی فیل‌ماهی‌ها ندارد.

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

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

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

Afkhami و همکاران (۲۰۱۳) کمترین غلظت مؤثر ماده بیهوشی در مواد بیهوشی مورداستفاده به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر برای پودر گل میخک و ۲۰۰ میکرو لیتر برای دوفنوکسی اتانول را بر مولدین ماهی صبیتی (*Sparidentex hasta*) بیان نمودند. ضرایب همبستگی بین زمان‌های احیاء و غلظت‌ها به‌صورت ($R^۲$ = ۰/۹۳) RS۳ =۰/۱۶۶ c۰/۵۷ برای پودر گل میخک و

($R^۲$ = ۰/۹۶) RS۳ =۰/۱۷۸ c۰/۶۸ برای دوفنوکسی اتانول محاسبه نمودند.

تکثیر و پرورش ماهیان دریایی در تمام نقاط جهان در وضعیت مقدماتی قرار داشته و به همین رو دارای تنگناهای متعدد و دشواری است. در این میان نقش مولدین از جنبه‌های متعددی قابل‌توجه است. چراکه این ماهیان با توجه به ویژگی‌های غیر اهلی بودن بهنگام دست‌کاری، جابجایی و یا عملیات تکثیر دچار تلفات عدیده‌ای می‌گردند که جبران آن کار دشواری است. دستیابی به روش‌هایی که بتواند با داروهای آرام‌کننده شرایط فوق را تسهیل نماید می‌تواند به‌خوبی در این راه کمک نماید. نظر به اینکه ماهی تیلاپیا در شرایط کشور ما در فاز ابتدایی تکثیر و پرورش می‌باشد،

بنابراین مطالعات کنونی می‌تواند تأثیر مواد بیهوش کننده را بر روی ماهی اقتصادی فوق به نحو مطلوبی بررسی و توجیه نماید، لذا کار مزبور از دیدگاه‌های مختلفی حاوی نوآوری در سطح کشور و یا حتی کشورهای منطقه خواهد بود.

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

مواد و روش‌ها

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

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

مولدین ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) را با میانگین وزنی۳۰±۲۵۰ گرم و میانگین طولی ۲/۲۵±۱۸/۱۳ سانتی‌متر جداسازی و بر اساس طرح آزمایشی کاملاً تصادفی (Completely Randomized Design) ذخیره‌سازی گردیدند. در این مدت فاکتورهای کیفی آب شامل اکسیژن محلول ،pH ، دما و شوری اندازه‌گیری می‌گردید. همچنین جهت جلوگیری از آلودگی آب دو بار در روز (صبح و عصر) کف مخازن نگهداری مولدین را سیفون نموده و غذاهای خورده نشده و فضولات ماهی‌ها خارج می‌گردیدند.

ازآنجایی‌که ماده مذکور نقش آرام‌بخشی داشته و برخلاف سایر داروها و مواد شیمیایی با افزایش غلظت در ماهی‌ها کشندگی ایجاد نمی‌نماید و با توجه به حساسیت ماهیان مولد نسبت به رخ ندادن مرگ‌ومیر و تلفات جهت بررسی میزان اثربخشی مقادیر مختلف داروهای بیهوشی۴ تیمار ماهی با استفاده از داروی بیهوشی لیدوکائین با غلظت‌های ۴۰ ، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در نظر گرفته شد (Hseu *et al.*, 1998). با در نظر گرفتن ۳ تکرار برای هر تیمار، غلظت‌های تهیه‌شده را در ۱۲مخزن شفاف آماده نموده و سپس از هر تکرار ۶ عدد ماهی مولد را انتخاب و به‌صورت انفرادی درون این مخازن شفاف قرار داده شد و با استفاده از زمان‌سنج دیجیتالی مدت‌زمان شاخص‌های بیهوشی را به ترتیب شامل: ۱- مدت‌زمان توقف حرکت سرپوش آبششی ۲- توقف شنا و عدم پاسخ نسبت به دستکاری ۳- شناور شدن و توقف ماهی روی سطح آب بطوریکه بخش شکمی رو به بالا قرار بگیرد، اندازه‌گیری و ثبت گردید.

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

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

نتایج

اختلاف معنی‌داری (P <۰/۰۵) بین مراحل بیهوشی و احیاء در غلظت‌های مختلف لیدوکائین مشاهده گردید (جدول ۱). در تمام غلظت‌های مورد آزمایش که در بخش مواد و روش‌ها ذکر گردیده است مراحل بیهوشی به‌طور کامل اتفاق افتاد. این موضوع بیانگر این مطلب است که غلظت‌های مورداستفاده برای بیهوشی کامل کافی بوده‌اند.

جدول۱: زمان(دقیقه) بیهوشی و احیاء برای مولدین گونه تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) تحت تأثیر ٤ غلظت ماده بیهوشی لیدوکائین(میانگین ± انحراف معیار).

غلظت (میلی‌گرم بر لیتر)	زمان بیهوشی (دقیقه)			زمان احیاء		
	IS_1	IS_2	IS_3	RS_1	RS_2	RS_3
۴۰	۱/۵۲±۰/۱۲^{a}	۲/۱۶±۰/۱۰^{a}	۲/۸۲±۰/۱۰^{a}	۱/۶۰±۰/۱۰^{c}	۱/۳۵±۰/۰۱^{a}	۲/۳۸±۰/۱۶^{a}
۶۰	۱/۰۸±۰/۱۵^{b}	۱/۶۲±۰/۰۶^{b}	۲/۰۹±۰/۰۷^{b}	۲/۰۱±۰/۰۷^{b}	۲/۹۲±۰/۱۰^{b}	۳/۵۲±۰/۰۶^{b}
۸۰	۰/۶۸±۰/۰۶^{c}	۱/۱۱±۰/۱۰^{c}	۱/۶۴±۰/۱۰^{c}	۳/۱۷±۰/۱۱^{c}	۴/۲۱±۰/۱۰^{c}	۵/۱۵±۰/۱۰^{c}
۱۰۰	۰/۴۷±۰/۰۳^{c}	۰/۸۱±۰/۰۵^{d}	۱/۰۰±۰/۰۹ ^{c}	۳/۲۷±۰/۰۷^{d}	۵/۴۲±۰/۱۰^{d}	۶/۸۶±۰/۰۸^{d}

داده‌های ارائه‌شده در هر ستون که دارای حروف کوچک نامشابه هستند دارای اختلاف معنی‌دار در سطح (P <۰/۰۵) می‌باشند.

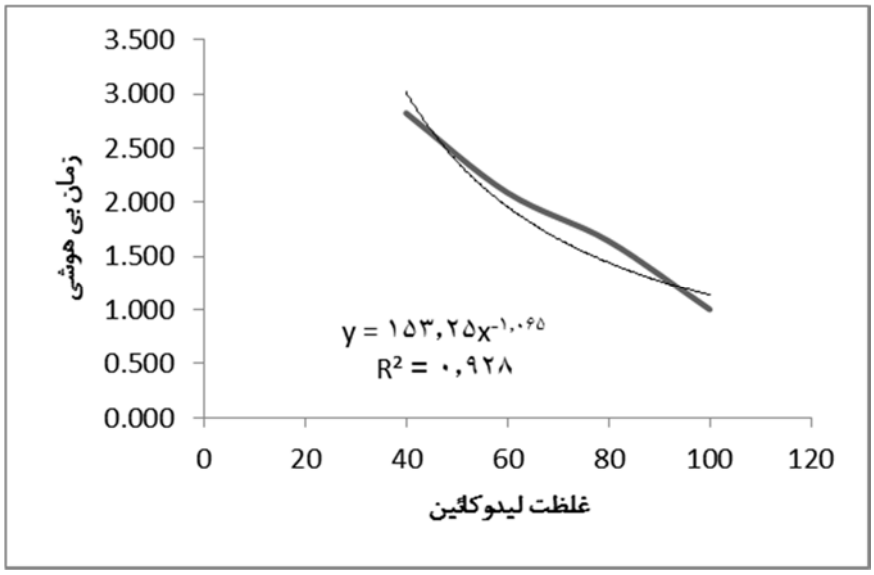
زمان‌های بیهوشی به‌طور معنی‌داری با افزایش غلظت ماده بی‌هوش کننده در تمام تیمارها کاهش داشتند. زمان بیهوشی (IS_3) از ۰/۴۷±۰/۰۳ دقیقه برای غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تا ۱/۵۲±۰/۰۱۲ دقیقه برای غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر برای لیدوکائین محاسبه گردید (جدول۱). زمان احیاء نیز با افزایش غلظت مواد بیهوشی افزایش نشان داد (P <۰/۰۵). زمان احیاء (RS۳) در محدوده بین ۲/۳۸±۰/۱۶ دقیقه برای غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر تا ۶/۶۸±۰/۰۸ دقیقه برای غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر برای لیدوکائین (جدول ۱).

کمترین غلظت مؤثر ماده بیهوشی یا (LEC= Lowest Effective Concenteration) در مواد بیهوشی مورداستفاده به میزان ۴۰ میلی‌گرم در لیتر برای لیدوکائین اندازه‌گیری گردید. کمترین غلظت ماده بیهوشی (LEC) برای لیدوکائین باعث تحریک سریع‌تر ماده بیهوشی در مدت ۲/۳۸±۰/۱۰ دقیقه و زمان احیاء طولانی‌تر (۲/۸۲±۰/۱۰ دقیقه) در ماهی تیلاپیای نیل گردید. بنابراین، زمان‌های بیهوشی و احیاء توسط لیدوکائین در محدوده غلظت مؤثر ماده بیهوشی قرار داشت.

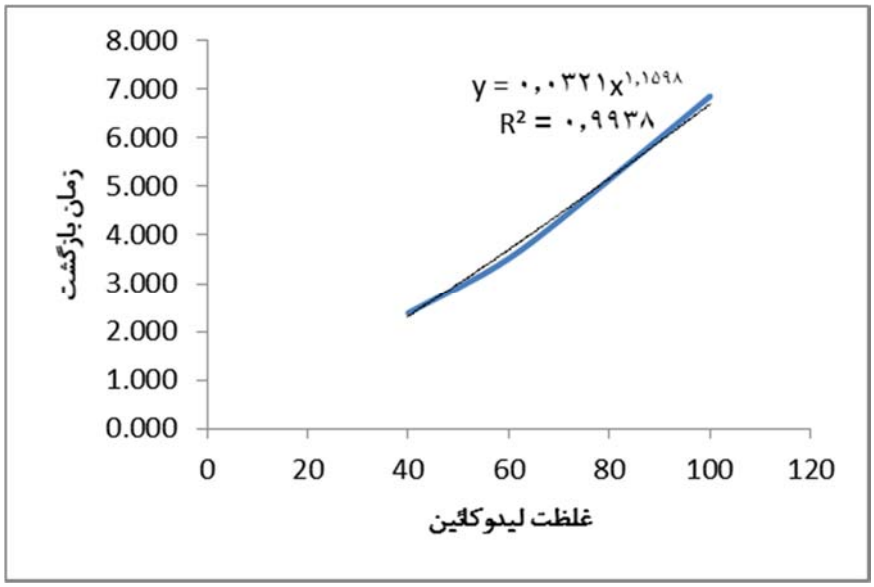
ارتباط معنی‌داری بین غلظت ماده بیهوشی و زمان بیهوشی و احیاء در تمام تیمارهای موردبررسی مشاهده گردید (P <۰/۰۵) که در شکل ۱ آورده شده است . ضریب همبستگی زمان‌ها برای رسیدن به مرحله بیهوشی کامل (IS۳) و غلظت‌ها (X) برای ماده بیهوشی در گونه تیلاپیای نیل به‌صورت ($R^{۲}$=۰/۹۳) $IS۳ = ۱۵۳/۲۵ \times^{-۱/۰۶۵}$ برای لیدوکائین محاسبه گردید که در شکل ۲ آورده شده است. به‌طور مشابه ارتباط معنی‌دار مثبت (P <۰/۰۵) بین غلظت مواد بیهوشی و زمان رسیدن به احیاء کامل (RS۳)در لیدوکائین مشاهده گردید.

ضرایب همبستگی بین زمان‌های احیاء و غلظت‌ها به‌صورت ($R^{۲}$ = ۰/۹۹) $RS_{۳} = ۰/۰۳۲۱x^{۱/۱۵۹۸}$ برای لیدوکائین محاسبه گردید که در شکل ۳ آمده است. لازم به توضیح است که هیچ‌گونه مرگ‌ومیری در طول فرایند آزمایش‌ها در بین تیمارها مشاهده نگردید.

شکل ۱: ارتباط بین غلظت‌های ماده بیهوشی لیدوکائین و زمان‌های بیهوشی (IS_3) و احیاء (RS_3) برای تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) (تعداد ٦ نمونه برای هر تکرار).



شکل ۲: ضریب همبستگی زمان‌ها (دقیقه) برای رسیدن به مرحله بیهوشی کامل (IS_3) و غلظت‌ها (میلی‌لیتر بر لیتر)(C) برای ماده بیهوشی لیدوکائین در تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) (n=۷۲).



شکل۳: ضریب همبستگی زمان‌ها (دقیقه) برای رسیدن به مرحله احیاء کامل (RS_3) و غلظت‌ها (میلی‌لیتر بر لیتر)(C) برای ماده بیهوشی لیدوکائین در گونه تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) (n=۷۲).

بحث و نتیجه‌گیری

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

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

در مطالعه حاضر لیدوکائین در غلظت‌های ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم در لیتر سریعاً" بیهوشی را در گونه تیلاپیای نیل بدون هیچ‌گونه مرگ‌ومیر و مشکل خاصی در کمتر از ۱۰ دقیقه ایجاد نمودند. اگرچه در غلظت‌های بیشتر ۸۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر برای لیدوکائین) طولانی بودن زمان احیاء ازنظر حفظ سلامت و بقاء ماهی تیلاپیای نیل قابل‌پذیرش نبود. بنابراین هر دو غلظت ۴۰ و۶۰ میلی‌گرم در لیتر لیدوکائین بیهوشی مؤثر و ایمن را در این‌گونه ایجاد می‌نماید. ولی بااین‌حال پیشنهاد می‌گردد ۴۰ میلی‌گرم در لیتر برای لیدوکائین استفاده گردد ولی در هنگام انجام فعالیت‌های استرس‌زا و دست‌کاری بیشتر ۶۰ میلی‌گرم در لیتر لیدوکائین ترجیح داده شود. اگرچه استفاده از حداقل غلظت ماده بیهوشی در هنگامی‌که ماهی موردنظر ازنظر سلامت درخطر می‌باشد پرهیز گردد، زیرا همان‌طور که مشخص گردیده است موجوداتی که دارای عارضه می‌باشند در هنگام بیهوشی بیشتر درخطر مرگ‌ومیر قرار می‌گیرند (Flecknell, 1996). در چنین شرایطی می‌بایست مدت‌زمان بیهوشی به حداقل زمان ممکن تقلیل یابد و سریع ماهی به مخازن بزرگ احیاء جهت به حداقل رساندن تأثیر ماده بیهوشی بر بدن ماهی انتقال یابد (Jolly *et al*., 1972) و درنهایت غلظت‌های ۸۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر برای لیدوکائین حتی برای فرآیندهای بسیار کوتاه‌مدت نیز توصیه نمی‌شود. بر اساس نتایج این مطالعات زمان‌های بیهوشی به‌طور معنی‌داری با افزایش غلظت ماده بیهوشی کاهش نشان دادند ($P < ۰/۰۵$). این نتایج با سایر مطالعات گذشته مطابقت دارد که در آن‌ها ارتباط معکوسی بین غلظت ماده بیهوشی و زمان بیهوشی در ماهیان استخوانی اعلام‌شده است (Hseu *et al*., 1998; Mylonas *et al*., 2005; Gullian and Villanueva, 2009; Weber *et al*., 2009; Heo and Shin, 2010, Pawar *et al*., 2011).

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

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

اولین زمان رسیدن به مرحله بیهوشی کامل (IS3) و احیاء کامل (RS3) با مواد بیهوشی ذکرشده در گونه تیلاپیای نیل به‌طور معنی‌دار با غلظت‌های مختلف مواد بیهوشی متفاوت بود ($P < ۰/۰۵$). بیهوشی سریع کمتر از ۱۸۰ ثانیه و زمان احیاء کمتر از ۳۰۰ ثانیه برای ماهی‌ها بسیار ایده آل است (Marking and Meyer, 1985). ماده بیهوشی بررسی‌شده در این آزمایش حداقل زمان رسیدن به بیهوشی را ایجاد نمودند. بیهوشی نسبتاً سریع‌تر با لیدوکائین در ماهی تیلاپیای نیل شاید به دلیل جذب سریع‌تر توسط آب‌شش‌ها باشد. از طرف دیگر تأخیر در میزان احیاء کامل شاید به دلیل طبیعت ماندگاری سطح آب‌شش‌ها می‌باشد که موجب افزایش مؤثر زمان احیاء می‌گردد. این‌گونه اختلاف‌ها در زمان احیاء ممکن است وابسته به گونه، اندازه، وضعیت فیزیولوژیک و شرایط زیست‌محیطی آن‌ها باشد(Burka *et al*., 1997; Ross and Ross, 1999). به نظر می‌رسد در ارتباط بازمان احیاء، غلظت ماده بیهوشی نقش‌های مهم‌تری را نسبت به زمان بیهوشی ایفا کند (Weyl *et al*., 1996). این موضوع توسط Bonath در سال ۱۹۷۷ نیز مورد تائید قرارگرفته است که بر اساس یافته‌های وی زمان احیاء حتی در صورت افزایش ۵ برابری زمان بیهوشی تغییری پیدا نکرد. اعتقاد بر این است که بازگشت به حالت احیاء پس از طی زمان بیهوشی به دلیل خروج ماده بیهوشی از طریق سطح آب‌شش‌ها است. بنابراین پس‌ازاینکه ماهی به حالت تعادل نسبی با محلول بیهوشی دست‌یافت این تعادل را حفظ می‌نماید.در طول زمان احیاء ماده بیهوشی از طریق این تبادل ازدست‌رفته و بنابراین مدت‌زمان احیاء با افزایش غلظت ماده بیهوشی و زمان بیهوشی تغییرنیافته و بدون تأثیر باقی می‌ماند (Bonath, 1977; Weyl *et al*., 1996).

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

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

منابع

شریف پور، ع.، سلطانی، م.، عبدالحی، م. و قیومی، ر.، ۱۳۸۱. اثر بیهوش‌کنندگی اسانس گل میخک (*Eugenia caryophyllata*) در شرایط مختلف pH و درجه حرارت در بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله علمی شیلات ایران ، دوره ۱۱ ، شماره۴. صفحات ۷۴-۵۹.

Afkhami, M., Ahmadi, M. R., Salarzadeh A. R., and Ehsanpour, M., 2013. Comparative efficacy of two anesthetic agents in the Sobaity sea bream, *Sparidentex hasta* (Valenciennes 1830). Comparative Clinical Pathology. 22(1): 1-6.

Bonath, K., 1977. Narkose der Reptilien, Amphibien und Fische. Paul Parey Verlag, Berlin.

Burka, J. F., Hammell, K. L., Horsberg, T. E., Johnson, G. R., Rainnie, D.J., and Speare, D.J., 1997. Drugs in salmonid aquaculture—a review. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 20: 333–349.

Congleton, J. L., LaVoie, W. J., Schreck, C. B. and Davis, L. E., 2006. Stress indices in migrating juvenile Chinook salmon and steelhead of wild andhatchery origin before and after barge transportation. Transactions of the American Fisheries Society, 129: 946-61.

Coyle, S. D., Durborow, R. M. and Tidwell, H. J., 2004. Anesthetics in Aquaculture. : SRAC Publication, 3900.

Cunha, F. E. A. and Rosa, I. L., 2006. Anaesthetic effects of clove oil on seven species of tropical reef teleost. Journal of Fish Biology. 69: 1504–1512.

Deriggi, G. F., L., Inoue, A. K. A. and Moraes, G., 2006. Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus Linnaeus*): assessment of eugenol as an alternative anaesthetic. Acta Scientiarum Biological Sciences, 28: 269-274.

FAO (Food and Agriculture Organization), 2014. The state of World Fisheries and Aquaculture, FAO, Rome.

Flecknell, P. A., 1996. Laboratory Animal Anaesthesia, 2nd Ed. Academic Press, London.

Gilderhus, P. A. and Marking, L. L., 1987. The comparative efficacy of 16 anaesthetic chemicals on rainbow trout. North American Journal of Fisheries Management, 7: 288–292.

Gullian, M. and Villanueva, J., 2009. Efficacy of tricaine methanesulphonate and clove oil as anaesthetic for juvenile cobia *Rachycentron canadum*. Aquaculture Research, 40: 852–860.

Heo, G. J. and Shin, G., 2010. Efficacy of benzocaine as an anaesthetic for Crucian carp (*Carassius carassius*). Veterinary Anaesthesia and Analgesia. 37: 132–135.

Hoskonen, P. and Pirhonen, J., 2006. The effects of repeated handling, with or without anaesthesia, on feed intake and growth in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Research 37: 409–415.

Houston, A. H., Czerwinski, C. L. and Woods, R. J., 1973. Cardiovascular and respiratory activity during recovery from anaesthesia and surgery in brook trout (Salvelinus fontinalis) and carp (Cyprinus carpio), Journal of Fisheries Research, 30: 1705–1712.

Hseu, J. R., Yeh, S. L., Chu, Y. T. and Ting, Y. Y., 1998. Comparison of efficacy of five anesthetics in goldlined sea bream, Sparus sarba. Acta Zoologica Taiwanica, 9(1), pp.00-00.

Hseu, J. R., Yeh, S.L., Chu, Y. T. and Ting, Y.Y., 1998. Comparison of efficacy of five anaesthetic gold lined sea bream. *Sparus sarba*. Acta Zoologica Taiwanica. 9: 35–41.

Josa, E., Espinosa, J. I., Cruz, L., Gil, M., Falceto, V. and Lozano R., 1992. Use of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic agent in goldfish (Cyprinus carpio). The Veterinary Record, 131, 468.

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

King, W. V., Hooper, B., Hillsgrove, S., Benton, C. and Berlinsky, D. L., 2005. The use of clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate and 2-Phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata L.*). Aquaculture Research, 36: 1442–1449.

Kolanczyk, R. C., Fitzsimmons, P. N., McKim, J. M., Erickson, R. J. and Schmieder, P. K., 2003. Effects of anesthesia (tricaine methanesulfonate, MS222) on liver biotransformation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology. 64, 177–184.

Kolarova, J., Velisek, J., Nepejchalova, L., Svobodova, Z., Kouril, J., Hamackova, J.,Machova, J., Piackova, V., Hajslova, J., Holadova, K., Kocourek, V., Klimankova, E., Modra, H., Dobsikova, R., Groch, L. and Novotny, L., 2007. Anaesthetics for Fish. : RIFCH Vodnany, Methods, 77. 19 pp. (In zech).Ortuno.

Marking, L.L. and Meyer, F.P., 1985. Are better anaesthetic needed in fisheries, Fisheries, 10: 2–5.

Mohammadizarejabad, A., Darvish Bastami, K., Sudagar,M. and Pourali Motlagh, S., **2009.** Hematology of great sturgeon (*Huso huso Linnaeus, 1758*) juvenile exposed to clove powder as an anaesthetic. Comparative Clinical Pathology, 19: 367-371.

Morton, W. E., 1990. Occupational Phenoxyethanol neurotoxicity: a report of three cases. Journal of Occupational Med. 32:42– 45.

Mylonas, C. C., Cardinaletti, G., Sigelaki, I. and Polzonetti-Magni, A., 2005. Comparative efficacy of clove oil and 2-Phenoxyethanol as anaesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. Aquaculture, 246: 467–481.

Ortun˜o, J., Esteban, M. A. and Meseguer, J., 2002. Effects of Phenoxyethanol on the innate immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata L.*) Exposed to crowding stress. Veterinary Immunology and Immunopathology, 89: 29–36.

Pawar, H. B., Sanaye, S. V., Sreepada R.A., Harish, V., Suryavanshi, U. and Tanu Ansari, Z. A., 2011. Comparative efficacy of four anaesthetic agents in the yellow seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker, 1852). Aquaculture, 311: 155-161.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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