

تعیین محدوده سمیت و غلظت نیمه کشندگی (LC₅₀) اوژنول در ماهی بنی (*Barbus sharpeyi*)

سید محمد موسوی^{۱*}، الهام مجدلی نسب^۲، وحید یآوری^۳، ابراهیم رجبزاده قطرمی^۴ و محمد راضی جلالی^۵

*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
پست الکترونیک: seied1356@yahoo.com

۲- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

۳- دانشیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

۴- استادیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

۵- دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

: : :

چکیده

امروزه استفاده از گیاهان دارویی و جایگزینی آنها با مواد شیمیایی پرخطر در صنعت آبی پروری رو به افزایش نهاده است. یکی از این داروهای گیاهی مورد استفاده عصاره گل میخک است که عمدتاً در صنعت آبی پروری برای کاهش تنش، بیهوشی و آرام بخشی استفاده می گردد. اوژنول یک داروی گیاهیست که از عصاره گل میخک تهیه می شود. در این مطالعه محدوده سمیت و غلظت نیمه کشندگی (LC₅₀) داروی بیهوشی اوژنول بر روی ماهی بنی *Barbus sharpeyi* مورد مطالعه قرار گرفته است. برای انجام این مطالعه، تعداد ۷۳۵ عدد بچه ماهی انگشت قد بنی با وزن متوسط 1 ± 5 گرم از مرکز تکثیر و پرورش شهید ملکی اهواز به طور تصادفی صید و به دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر (آزمایشگاه شیلات) منتقل گردید. بعد از سپری شدن دوره سازش پذیری، بچه ماهیان انگشت قد بنی در معرض غلظت های مختلف (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر قرار گرفتند و تغییرات رفتاری و تلفات در زمان های ۰، ۱، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از بیهوشی ثبت و محدوده سمیت و غلظت نیمه کشندگی (LC₅₀) تعیین گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که غلظت ۱ میلی گرم در لیتر، بهترین غلظت برای آرام بخشی و غلظت ۴۰ میلی گرم در لیتر، بهترین غلظت برای القای بیهوشی در این گونه می باشد. همچنین غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، غلظت بسیار سمی در این گونه مشخص گردید. براساس تحلیل های آماری، غلظت نیمه کشندگی ۴۸ ساعته اوژنول $1/76 \pm 22/61$ میلی گرم در لیتر می باشد که این مقدار نشان دهنده سمیت متوسط اوژنول در این گونه می باشد. نتایج حاصل از این تحقیق حکایت از آن دارد که اوژنول می تواند در صنعت آبی پروری ماهیان بومی به عنوان جایگزین مناسب داروی بیهوشی MS222 مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: ماهی بنی، اوژنول، سمیت حاد، غلظت نیمه کشندگی.

مقدمه

در دهه اخیر تمایل به استفاده از گیاهان دارویی در صنعت آبی‌پروری رو به افزایش نهاده است. یکی از دلایل این امر وجود باقی‌مانده‌های مواد دارویی شیمیایی در بافت آبزیان، امکان مقاومت دارویی و عدم تأثیر مناسب این داروها بر آبزیان از یک طرف و وجود اثرات سمی و سرطان‌زا بر روی اکوسیستم‌های زنده و انسان‌ها از طرف دیگر است (Mousavi et al., 2009). یکی از موارد استفاده از این گیاهان دارویی، بیهوشی و تسکین به‌منظور کاهش تنش در آبی‌پروری است. تنش در اثر اعمالی مانند حمل و نقل، اسارت، دستکاری و اعمال جراحی و ... ایجاد می‌شود و از مباحث جالب توجه در صنعت آبی‌پروری می‌باشد که امروزه در بیشتر کارهای تحقیقاتی به ارزیابی این موضوع می‌پردازند (Roberts, 2001). اقدامات مختلفی برای کاهش تنش می‌توان انجام داد که از آن جمله استفاده از داروهای بیهوش‌کننده است. به این منظور داروهای مختلفی نظیر MS222، بنزوکائین و کوئینالدین سولفات و ... وجود دارد که همه جزء مواد شیمیایی هستند و همانند سایر مواد شیمیایی دارای اثرات سوء بر سلامت آبزیان و گاهی مصرف‌کنندگان آبزیان می‌باشند (میرزرگر و صیدگر، ۱۳۸۴). داروی MS222 معروفترین داروی بیهوشی مورد استفاده در آبی‌پروری است که سالهاست توسط آبی‌پروران مورد استفاده قرار می‌گیرد. از معایب این دارو می‌توان به گران‌قیمت بودن، در دسترس نبودن و وارداتی بودن آن اشاره کرد. همچنین، داروی MS222 دارای آثار سوء فیزیولوژیک مانند افزایش هماتوکریت، ایجاد هیپوکسی، افزایش مقدار دی‌اکسید کربن، هیپرگلیسمی، تغییر در الکتروولت‌های خون، تغییر در مقادیر هورمون‌ها، کلسترول، اوره، لاکتات و

اسیدآسکوربیک نیز می‌باشد (میرزرگر و صیدگر، ۱۳۸۴). بنابراین نیاز به جایگزینی آن با دارویی که فاقد چنین معایبی بوده و مؤثر نیز باشد، وجود دارد. اوژنول یک ترکیب گیاهیست که از عصاره گل میخک بدست می‌آید (امیدبیگی، ۱۳۸۶). اما استفاده از هر داروی جدید و جایگزین کردن آن با داروهایی که به‌طور معمول در یک سیستم بیولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرند، باید بعد از انجام یک سری آزمایش‌ها و تعیین سمیت دارو، اثرات جانبی و غلظت قابل استفاده آن در گونه مورد نظر صورت گیرد (میرزرگر و صیدگر، ۱۳۸۴).

هدف از این مطالعه تعیین محدوده سمیت اوژنول و غلظت نیمه‌کشندگی اوژنول به‌منظور جایگزینی MS222 در گونه ماهی بومی بنی *Barbus sharpeyi* می‌باشد.

مواد و روشها

تهیه ماهی بنی انگشت قد

ماهی انگشت قد بنی با میانگین وزنی 1 ± 5 گرم و حدوداً ۸ ماه سن از مرکز تکثیر و پرورش شهید ملکی اهواز به‌طور تصادفی صید و توسط ظروف پلاستیکی ۱۰۰ لیتری در کنار هواده به آزمایشگاه شیلات دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر منتقل گردید.

تهیه داروی بیهوشی (اوژنول)

اوژنول یک روغن گیاهیست که ۹۰-۷۰٪ عصاره گل میخک را شامل می‌شود. این روغن گیاهی توسط شرکت داروهای گیاهی زردبند از عصاره گل میخک استخراج و خالص‌سازی شده و مورد استفاده قرار گرفت. مهمترین مواد مؤثره این روغن گیاهی شامل اوژنول ۷۸/۵٪، بتا-کاربوفیلین ۱۳/۸٪، اوژنول‌استات ۴/۳۷٪، آلفا-هومولن

۲/۷٪ و کاربوفیلین ۰/۲٪ (براساس تأیید شرکت تولیدکننده) می‌باشد.

مرحله سازش‌پذیری

بچه ماهیان بنی انگشت قد با میانگین وزنی 1 ± 5 گرم و حدوداً ۸ ماه سن بعد از انتقال به آزمایشگاه شیلات دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر به یک وان ۳۰۰ لیتری که از چند روز قبل از انتقال ماهی‌ها به آزمایشگاه آبگیری و هوادهی شده، منتقل شدند. آکواریوم‌های ۳۰ لیتری پلاستیکی نیز از قبل به میزان ۲۵ لیتر آبگیری و هوادهی شده بودند. بچه ماهیان بنی توسط تور به آکواریوم‌ها انتقال داده شده و در هر آکواریوم ۱۵ عدد ماهی توزیع شد، سپس دوره سازش‌پذیری در آکواریوم‌های ۳۰ لیتری به مدت ۳ روز طی گردید و در این ۳ روز فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب شامل آمونیاک، اکسیژن محلول، قلیائیت تام و سختی کل توسط کیت‌های شرکت کاریزاب اندازه‌گیری و ثبت گردید. pH آب نیز توسط pH متر الکتریکی و دما نیز توسط دماسنج جیوه‌ای روزانه ۲ مرتبه صبح و بعدازظهر اندازه‌گیری شد (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۳). در طول دوره سازش‌پذیری هیچ‌گونه تلفاتی مشاهده نگردید. اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب در طول دوره آزمایش نیز انجام شد.

آزمایش تعیین محدوده سمیت و کشندگی

این آزمایش برای تعیین محدوده سمیت داروی اوژنول انجام شد. به این ترتیب که بعد از سپری شدن دوره سازش‌پذیری، داروی اوژنول با غلظت‌های صعودی ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر توسط سمپلر به آکواریوم‌های حاوی ماهی بنی افزوده شد. تغییرات

رفتاری و میزان تلفات در زمان‌های ۰، ۱، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از افزودن دارو براساس جدول Mcfarland (۱۹۵۹) مشاهده و ثبت گردید. محدوده کشندگی اوژنول براساس اولین غلظتی که در مدت ۹۶ ساعت تلفات در آن مشاهده می‌شود و اولین غلظتی که حداکثر تلفات (۱۰۰٪) را در پی دارد، تعیین می‌گردد.

تعیین غلظت نیمه‌کشندگی (LC₅₀)

پس از تعیین محدوده کشندگی (۵۰-۱۰ میلی‌گرم در لیتر)، در مرحله دوم غلظت‌های صعودی داروی اوژنول (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر) توسط سمپلر به آکواریوم‌های حاوی ماهی (۱۵ عدد در هر آکواریوم) اضافه گردید (Hajek et al., 2006). تغییرات رفتاری و میزان تلفات در زمان‌های ۰، ۱، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از افزودن دارو براساس جدول Mcfarland (۱۹۵۹) مشاهده و ثبت گردید. در طی این دوره نیز فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب (اکسیژن محلول، سختی کل، قلیائیت تام، آمونیاک، pH و دما) اندازه‌گیری و ثبت گردید. میزان تلفات در هر غلظت تعیین و بعد با استفاده از نرم‌افزار Biostat (probit analysis) 2008 مقادیر LC₅₀ ۴۸ و ۹۶ ساعته اوژنول تعیین شد. به‌منظور تعیین سمیت داروی اوژنول بر روی ماهی بنی مقادیر LC₅₀ بدست‌آمده با جدول تقسیم‌بندی میزان سمیت مواد و فرآورده‌های دارویی (شریف روحانی، ۱۳۷۴) مقایسه گردید.

نتایج

آزمایش تعیین محدوده کشندگی اوژنول بر روی ماهی بنی براساس نتایج حاصل، در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر هیچ‌گونه تلفاتی بعد از ۹۶ ساعت مشاهده نگردید و

دچار تلفات ۱۰۰٪ شده و هیچ گونه برگشت از بیهوشی مشاهده نگردید. غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر به عنوان غلظت بسیار سمی و بحرانی برای این گونه تعیین گردید.

براساس نتایج بدست آمده محدوده غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر، که باعث هیچ گونه تلفاتی در طول دوره آزمایش نگردید و غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر که بعد از مدت یک ساعت تلفات در آن به ۱۰۰٪ رسید، به عنوان محدوده کشندگی داروی اوژنول بر روی ماهی بنی تعیین گردید.

نتایج آزمایش تعیین غلظت نیمه کشندگی (LC₅₀) اوژنول بر روی بچه ماهیان بنی

به منظور تعیین LC₅₀ بچه ماهیان بنی در معرض غلظت های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ میلی گرم در لیتر از داروی اوژنول قرار گرفتند و تغییرات رفتاری و تلفات در زمان های ۱، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از افزودن اوژنول ثبت گردید. میزان تلفات و تعداد ماهیان زنده با استفاده از نرم افزار Biostat 2008 (probit analysis) مورد تحلیل آماری قرار گرفته و مقادیر LC₅₀ (غلظت نیمه کشندگی) به همراه خطای معیار تعیین گردید که در جدول ۲ گزارش شده است. براساس نتایج حاصل از آزمایش، غلظت نیمه کشندگی ۴۸ و ۹۶ ساعته برابر $1/76 \pm 22/61$ میلی گرم در لیتر می باشد (جدول ۱).

ماهی ها از نظر رفتاری هیچ گونه عدم تعادل و یا رفتار غیرطبیعی نداشتند و تنها نسبت به نمونه شاهد (بدون تداخل دارویی) آرام تر شده و در برابر تنش های محیطی واکنش های کمتری را نشان دادند. غلظت ۱۰ میلی گرم در لیتر اوژنول، در زمان صفر موجب آرام بخشی شد، اما در زمان های ۱، ۱۲ و ۲۴ ساعت با کاهش حرکات تنفسی، تجمع ماهیان در سطح آب و بلع هوا از سطح آب همراه بود که این تغییرات رفتاری در ۷۲، ۴۸، ۹۶ ساعت پس از افزودن اوژنول از بین رفته و ماهیان شنای عادی پیدا نمودند.

در غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر، ماهیان در زمان اولیه پس از تجویز اوژنول وارد فاز عمیق بیهوشی شده و پس از مدت یک ساعت تلفات به ۱۰۰٪ رسیده و هیچ گونه برگشت از بیهوشی مشاهده نگردید. در غلظت های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر نیز ماهیان در زمان صفر پس از تجویز اوژنول وارد فازهای عمیق بیهوشی شده و ۱ ساعت پس از تجویز دارو ۱۰۰٪ تلفات مشاهده گردید. بیهوشی در ۱۵۰ میلی گرم در لیتر، عمیق تر از ۱۰۰ میلی گرم در لیتر و در ۱۰۰ میلی گرم در لیتر، عمیق تر و سریعتر از ۵۰ میلی گرم در لیتر بود. با افزایش غلظت اوژنول، ماهیان تیمار شده، وارد فازهای عمیق تر بیهوشی شدند.

در غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، در همان زمان اولیه پس از افزودن اوژنول به آکواریوم، تلفات به ۱۰۰٪ رسید و ماهیان انگشت قد بنی در حضور غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر اوژنول، در مدت کمتر از ۵ دقیقه

جدول ۱- میانگین \pm خطای معیار غلظت نیمه‌کشندگی (LC_{50}) اوژنول در فواصل زمانی

۱، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از مجاورت بچه ماهیان بنی ۵ گرمی

زمان بر حسب ساعت	(SE) خطای معیار \pm میانگین LC_{50} (میلی‌گرم در لیتر)
۱	$31/60 \pm 1/56$
۱۲	$27/73 \pm 2/07$
۲۴	$23/61 \pm 1/36$
۴۸	$22/61 \pm 1/76$
۷۲	$22/61 \pm 1/76$
۹۶	$22/61 \pm 1/76$

جدول ۲- تقسیم‌بندی میزان سمیت مواد و فرآورده‌های دارویی

براساس میزان ۰.۵٪ کشندگی یا LC_{50} بر حسب میلی‌گرم در لیتر پس از ۴۸ ساعت

ردیف	میزان سمیت	محدوده غلظت نیمه‌کشندگی (LC_{50})
۱	سمیت خیلی کم	$10000 > LC_{50} > 10000$
۲	سمیت کم	$1000 > LC_{50} > 100$
۳	سمیت متوسط	$100 > LC_{50} > 10$
۴	سمیت زیاد	$10 > LC_{50} > 1$
۵	سمیت خیلی زیاد	$1 > LC_{50} > 0.1$
۶	بی‌نهایت سمی	$LC_{50} < 0.1$

مدت زمان القای بیهوشی و برگشت از بیهوشی برای ماهی بنی در مجاورت با داروی بیهوشی اوژنول تعیین گردید که این مقادیر به ترتیب ۵ دقیقه و ۷ دقیقه بود. هرچه غلظت دارو بیشتر شود زمان القای بیهوشی کمتر و مدت زمان برگشت از بیهوشی بیشتر می‌شود، البته مدت زمان ریکاوری از ۷ دقیقه بیشتر نمی‌شد.

نتایج حاصل از مطالعه فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب در طول دوره آزمایش بشرح زیر می‌باشد: دمای آب: $17/5 \pm 0/5$ درجه سانتی‌گراد، میزان اکسیژن محلول: $7/8 \pm 0/04$ میلی‌گرم در لیتر، سختی کل: $70/220 \pm 863/3$ میلی‌گرم در لیتر، قلیائیت تام براساس میزان کربنات‌کلسیم: $1/5 \pm 19/75$ میلی‌گرم در لیتر، میزان آمونیاک: $0/25$ میلی‌گرم در لیتر و $pH: 8/25 \pm 0/005$. باعث کاهش میزان اکسیژن، سختی کل و قلیائیت تام در آب گردید. اما این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0/05$). سایر فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب در طول دوره آزمایش از مقادیر حدوداً ثابتی برخوردار بودند.

مدت زمان القای بیهوشی و برگشت از بیهوشی برای ماهی بنی در مجاورت با داروی بیهوشی اوژنول تعیین گردید که این مقادیر به ترتیب ۵ دقیقه و ۷ دقیقه بود. هرچه غلظت دارو بیشتر شود زمان القای بیهوشی کمتر و مدت زمان برگشت از بیهوشی بیشتر می‌شود، البته مدت زمان ریکاوری از ۷ دقیقه بیشتر نمی‌شد.

نتایج حاصل از مطالعه فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب در طول دوره آزمایش بشرح زیر می‌باشد: دمای آب: $17/5 \pm 0/5$ درجه سانتی‌گراد، میزان اکسیژن محلول: $7/8 \pm 0/04$ میلی‌گرم در لیتر، سختی کل: $70/220 \pm 863/3$ میلی‌گرم در لیتر، قلیائیت تام براساس میزان کربنات‌کلسیم: $1/5 \pm 19/75$ میلی‌گرم در لیتر، میزان آمونیاک: $0/25$ میلی‌گرم در لیتر و $pH: 8/25 \pm 0/005$. باعث کاهش میزان اکسیژن، سختی کل و قلیائیت تام در آب گردید. اما این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0/05$). سایر فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب در طول دوره آزمایش از مقادیر حدوداً ثابتی برخوردار بودند.

بحث

استفاده از هر داروی جدید و جایگزینی آن با داروهایی که به طور معمول در یک سیستم بیولوژیک مورد استفاده قرار می‌گیرند، باید بعد از انجام یک سری آزمایش‌ها و تعیین سمیت دارو، اثرات جانبی و دوز قابل استفاده آن در گونه مورد نظر صورت گیرد. در این مطالعه غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر به عنوان غلظت بسیار سمی و کشنده تعیین شد که در زمان اولیه افزودن دارو به آکواریوم باعث ۱۰۰٪ تلفات گردید. در مطالعات ابطحی و همکاران (۱۳۸۱) که روی ۳ گونه قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) انجام شد، دوز سمی برای عصاره گل میخک در گونه قزل‌آلای رنگین‌کمان بالای ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر و در ۲ گونه دیگر بالای ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشخص گردید. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان غلظت بسیار سمی برای بیهوشی با عصاره گل میخک در کپور معمولی بالاتر از مقادیر بدست‌آمده در بیهوشی با اوژنول در ماهی بنی می‌باشد؛ که این اختلاف می‌تواند به دلیل تفاوت گونه‌ای بین ماهی بنی و کپور معمولی و از طرفی استفاده از یک ماده فرآوری شده با اثرات بیهوش‌کنندگی قویتر در این تحقیق باشد.

همان‌طور که در قسمت نتایج ذکر شد اوژنول در بعضی از غلظت‌های مورد مطالعه (۱۰، ۲۰، ۳۰ میلی‌گرم در لیتر) باعث اختلالاتی در تنفس گردید که دلایل این امر می‌تواند اثرات اوژنول بر سیستم عصبی ماهی و کاهش فعالیت تنفسی ماهی باشد (Keene et al., 1998). در مطالعه دیگری که توسط Feng و Lipton در سال ۱۹۸۷ انجام شد احتمال داده شده که اوژنول اثری مشابه

استامینوفن بر سیستم عصبی مرکزی داشته باشد و بدون مهار کردن محور هیپوتالاموس هیپوفیز- بافت بینابینی کلیه موجب ایجاد بیهوشی در ماهی شود. بنابراین اوژنول باعث کاهش میزان تنفس، آمدن ماهی به سطح آب و بلعیدن هوا می‌شود (Feng & Lipton, 1987). همچنین تمام مواد بیهوش‌کننده هنگام افزوده شدن به آب تأثیراتی را بر خواص فیزیکی و شیمیایی آب می‌گذارند، از آن جمله می‌توان به اثرات MS222 و کوئینالدین‌سولفات اشاره نمود (میرزرگر و صیدگر، ۱۳۸۴؛ Smith et al., 1977). در تحقیق اخیر نیز اوژنول باعث کاهش اکسیژن، سختی کل و قلیائیت تام شد که البته کاهش در مقدار این پارامترها از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p \geq 0/05$).

بر اساس نتایج حاصل، غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر اوژنول می‌تواند به عنوان بهترین غلظت بیهوش‌کنندگی اوژنول در این گونه ماهی باشد. در مطالعه Anderson و همکاران (۱۹۹۷)، دوز ۳۳ میلی‌گرم در لیتر عصاره گل میخک را برای القای بیهوشی در گونه قزل‌آلای رنگین‌کمان توصیه نمودند. همچنین Keene و همکاران (۱۹۹۸) بهترین دوز برای انجام اعمال جراحی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را در بیهوشی با اوژنول ۶۰-۴۰ میلی‌گرم در لیتر تعیین کردند. Grush و همکاران (۲۰۰۴) دریافتند که دوز ۱۰۰-۶۰ میلی‌گرم در لیتر اوژنول باعث بیهوشی سریع در گونه Zebrafish (*Danio rerio*) می‌شود. Palic و همکاران (۲۰۰۵) نیز دوز ۳۰ میلی‌گرم در لیتر اوژنول را برای بیهوشی در گونه *Pimephales promelas* پیشنهاد نمودند. Deriggi و همکاران (۲۰۰۶) با مطالعه بر روی Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) دریافتند که دوز ۵۰ میلی‌گرم در لیتر اوژنول، دوز مناسب برای بیهوشی در این گونه است. همچنین در مطالعات دیگر، غلظت مورد

میخک را در قزل‌آلای رنگین‌کمان در غلظت ۶۰-۴۰ میلی‌گرم در لیتر، ۴-۳ دقیقه و مدت برگشت از بیهوشی را ۱۴-۱۲ دقیقه گزارش کردند. Griffiths (۲۰۰۰) و Mohammadi Arani (۲۰۰۶) نتایج مشابهی را در مطالعه روی عصاره گل میخک بدست آوردند و نتیجه گرفتند که هر چه غلظت و مدت قرارگیری ماهی در آب حاوی مواد بیهوش‌کننده بیشتر باشد، مراحل بیهوشی سریع‌تر و بازگشت از بیهوشی آهسته‌تر صورت می‌گیرد. Sattari و همکاران (۲۰۰۹) با مطالعه بر روی گونه قزل‌آلای رنگین‌کمان زمان القای بیهوشی و برگشت از بیهوشی را در عصاره گل میخک به ترتیب ۱۴۴ و ۵۴۶ ثانیه و برای MS222 ۷۲۰ و ۶۶۰ ثانیه تعیین نمودند. نکته دیگر در مورد اوزنول اینست که به دلیل اثربخشی بالای این دارو، مدت قرار گرفتن ماهی در معرض دارو نباید زیاد باشد و بلافاصله پس از ایجاد بیهوشی عمیق و رسیدن به مرحله بیهوشی مورد نظر، ماهی باید در آکواریوم ریکاوری قرار گیرد، زیرا در غیر این صورت باعث بروز تلفات می‌شود. در مطالعه اخیر مقدار LC₅₀ ۴۸ و ۹۶ ساعته، ۱/۷۶ ± ۲۲/۶۱ میلی‌گرم در لیتر تعیین گردید. در مطالعاتی که توسط Velisek و همکاران (۲۰۰۵b) انجام شد مقادیر LC₅₀ ۹۶ ساعته برای کپور معمولی در بیهوشی با عصاره گل میخک ۱۸/۱۰ میلی‌گرم در لیتر مشخص گردید که با مقادیر بدست‌آمده از این آزمایش همخوانی دارد. ابطحی و همکاران (۱۳۸۱) با مطالعه بر روی ۲ داروی بیهوشی عصاره گل میخک و MS222، مقادیر LC₅₀ را برای ۳ گونه قزل‌آلای رنگین‌کمان، تاس ماهی ایرانی (قره برون) و کپور معمولی تعیین نمودند که این مقادیر به ترتیب برای قزل‌آلای رنگین‌کمان، ۱۹۹ و ۲۰۷ میلی‌گرم در لیتر، قره‌برون، ۲۹۷ و ۲۹۱ میلی‌گرم در لیتر و

استفاده در ماهی کپور معمولی ۳۰-۵۰ میلی‌گرم در لیتر پیشنهاد شده‌است (Hajek et al., 2006; Velisek et al., 2005a)، که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر همخوانی دارد. اما در مطالعات دیگر، غلظت تا ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیز پیشنهاد شده‌است (ابطحی و همکاران، ۱۳۸۱؛ سلطانی و همکاران، ۱۳۸۳؛ Mohammadi Arani, 2006)، که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی ندارد. بنابراین به نظر می‌رسد که دلیل این اختلاف، اختلاف گونه‌ای، نوع عصاره گل میخک مورد استفاده، درصد خلوص و روش کاربرد عصاره می‌باشد.

در این مطالعه، مدت زمان القای بیهوشی و برگشت از بیهوشی نیز برای ماهی بنی در مجاورت با داروی بیهوشی اوزنول در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر مورد بررسی قرار گرفت که این مقادیر به ترتیب ۵ دقیقه و ۷ دقیقه می‌باشد. براساس مشاهدات صورت گرفته، هرچه غلظت داروی بیهوشی بیشتر شود زمان القای بیهوشی کمتر و مدت زمان برگشت از بیهوشی بیشتر می‌شود. Hajek و همکاران (۲۰۰۶) در مطالعات خود دریافتند که افزایش غلظت باعث کند شدن فرایند تنفسی توسط ماهی و طولانی‌تر شدن مدت زمان برگشت از بیهوشی می‌شود. همچنین مدت زمان القای بیهوشی در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر بر روی کپور معمولی در بیهوشی با عصاره گل میخک بیشتر از ۵ دقیقه و زمان بازگشت از بیهوشی زیر ۱۰ دقیقه بود. همچنین با افزایش غلظت دارو مدت زمان القای بیهوشی کمتر و مدت زمان برگشت از بیهوشی طولانی‌تر می‌شود (Hajek et al., 2006) که با نتایج حاصل از این مطالعه هم‌خوانی دارد. Inoue و همکاران (۲۰۰۳) نیز به نتایج مشابهی در گونه *Brycon cephalus* رسیدند. Keene و همکاران (۱۹۹۸) القای بیهوشی با عصاره گل

- امیدبیدی، ر.، ۱۳۸۶. تولید و فرآوری گیاهان دارویی (جلد دوم). انتشارات آستان قدس رضوی، مشهد، ۴۳۸ صفحه.
- سلطانی، م.، غفاری، م.، خضرائی‌نیا، پ. و بکایی، س.، ۱۳۸۳. مطالعه اثرات بیهوشی اسانس گل میخک هندی بر پارامترهای هماتولوژیک، برخی آنزیمهای خون و آسیب شناسی بافت‌های مختلف ماهی کپور معمولی (*Common carp*). دامپزشکی دانشگاه تهران، ۵۹(۳): ۲۹۹-۲۹۵.
- شریف روحانی، م.، ۱۳۷۴. تشخیص، پیشگیری و درمان بیماری‌ها و مسمومیت‌های ماهی (ترجمه). معاونت تکثیر و پرورش آبزیان اداره کل آموزش، پیشگیری و درمان بیماری‌ها و مسمومیت‌های ماهی، ۲۵۶ صفحه.
- میرزرگر، س. و صیدگر، م.، ۱۳۸۴. فنون بیهوشی و تسکین در آبزیان (ترجمه). انتشارات دانشگاه تهران تهران، ۲۲۷ صفحه.
- Anderson, W.G., McKinley, R.S. and Colavecchia, M., 1997. The use of clove oil as an anesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. *North American Journal of Fisheries Management*, 17(2): 301-307.
- Deriggi, G.F., Inoue, L.A.K.A. and Moraes, G., 2006. Stress responses to handling in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus): assessment of eugenol as an alternative anesthetic. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 28(3): 269-274.
- Feng, J. and Lipton, J.M., 1987. Eugenol: antipyretic activity in rabbits. *Neuropharmacology*, 26(12): 1775-1778.
- Griffiths, S.P., 2000. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. *Journal of Fish Biology*, 57(6), 1453-1464.
- 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.
- Hajek, G.J., Kfyszejko, B. and Dziaman, R., 2006. The anaesthetic effect of clove oil on common carp, *Cyprinus carpio* L. *Acta Ichthyologica Piscatoria*, 36(2): 93-97.
- Inoue, L.A.K.A., Neto, C.S. and Moraes, G., 2003. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxá *Brycon cephalus*. *Ciência Rural*, 33(5): 943-947.
- 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(2): 89-101.
- Mcfarland, W.I., 1959. A study of the effects of anaesthetics on the behavior and physiology of

کپور معمولی، ۲۷۱ و ۲۷۲ میلی‌گرم در لیتر بودند. در مطالعاتی که توسط Grush و همکاران (۲۰۰۴) انجام شد مقدار LC_{50} ۹۶ ساعته اوژنول برای گونه *Zebrafish* ۲۱ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد که با مقادیر بدست‌آمده در این مطالعه کاملاً مطابقت دارد. مقایسه مقادیر LC_{50} بدست‌آمده برای کپور معمولی در بیهوشی با عصاره گل میخک نشان می‌دهد که این مقدار بیشتر از مقدار LC_{50} در این مطالعه است و این مطلب گویای حساسیت گونه‌ای نسبت به اوژنول می‌باشد.

همچنین مقایسه مقادیر غلظت نیمه‌کشندگی اوژنول با جدول ۲ نشان می‌دهد که اوژنول یک دارو با سمیت متوسط می‌باشد و در مقایسه با MS222 به‌عنوان یک ماده با سمیت بسیار زیاد می‌تواند جایگزین مناسبی برای استفاده در بیهوشی ماهیان بومی خصوصاً ماهی بنی *Barbus sharpeyi* باشد.

سپاسگزاری

نتایج این تحقیق مستخرج از طرح پژوهشی شماره ۲۵ و تحت حمایت دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر انجام شده‌است. همچنین با یاد و خاطره مرحوم پروفیسور رضا امیدبیدی که کمک شایانی در انجام این پروژه داشتند.

منابع مورد استفاده

- ابیطی، ب.، شریف‌پور، ع.، آقاجانپور، م.، رسولی، ع.، فقیه‌زاده، س.، امیدبیدی، ر. و محمد نظری، ر.، ۱۳۸۱. مقایسه LC_{50} اسانس گل میخک و MS222 در بچه ماهیان تاسماهی ایرانی، قزل‌آلای رنگین‌کمان و کپور معمولی. علمی شیلات ایران، ۱۱(۳): ۱۲-۱.

- Sattari, A., Mirzargar, S.S., Abrishamifar, A., Lourakzadegan, R., Bahonar, A., Mousavi, H.E. and Niasari, A., 2009. Comparison of Electroanesthesia with chemical anesthesia (MS222 and clove oil) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using plasma cortisol and glucose responses as physiological stress indicator. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 4(6):306-313.
- Smith, G.L., Schoonbee, H.J. and Barham, W.T., 1977. Some effects of the anaesthetic MS222 on fresh water bream. *South African Journal of Science*, 73(11): 351-352.
- Velisek, J., Svobodova, Z. and Piackova, V., 2005a. Effect of clove oil anaesthesia on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Veterinaria Brno*, 74: 139-146.
- Velisek, J., Svobodova, Z., Piackova, V., Groch, L. and Nepejchalova, L., 2005b. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Veterinary Medicine*, 50(6): 269-275.
- fishes. Publication of the Institute of Marine Science, University of Texas, 6: 23-55.
- Mohammadi Arani, M., 2006. Study on anesthetization of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fingerlings using clove (*Eugenia caryophyllata*) oil. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 22(3): 188-192.
- Mousavi, S.M., Mirzargar, S.S., Ebrahim Zadeh Mousavi, H., Omid Baigi, R., Khosravi, A., Bahonar, A. and Ahmadi, M.R., 2009. Evaluation of antifungal activity of new combined essential oils in comparison with malachite green on hatching rate in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 4(2): 103-110.
- Palic, D., Andreasen, C.B., Frank, D.E., Menzel, B.W. and Roth, J.A., 2005. Gradient separation and cytochemical characterisation of neutrophils from kidney of fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Fish and Shellfish Immunology*, 18(3): 263-267.
- Roberts, R.J., 2001. *Fish Pathology*. W.B. Saunders, 472p.

Determination of toxicity and mean lethal concentration (LC₅₀) of Eugenol on *Barbus sharpeyi*

S.M. Mousavi^{1*}, E. Majdi Nasab², V. Yavari², E. Rajabzadeh Ghatarami²
and M. Razi Jalali³

1*- Corresponding author, Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran, E-mail: seied1356@yahoo.com

2- Department of Fisheries, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran

3- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: February 2011

Revised: January 2012

Accepted: February 2012

Abstract

Nowadays, the use of medicinal plants and their replacement with hazardous chemicals is increasing in aquaculture industry. One of these medicinal plants is Clove oil extract, mainly used for decreasing stress, anesthesia and sedation in aquaculture industry. Eugenol is a medicinal component derived from clove oil. The aim of the present study was to investigate toxicity effects and mean lethal concentration (LC₅₀) of eugenol on *Barbus sharpeyi*. *Barbus sharpeyi* fingerlings (average weight: 5±1 gr) were selected and transferred from Shahid Maleki hatchery to fisheries laboratory of Khorramshahr University of Marine Sciences and Technology. After adaptation, fish were exposed to different concentrations of eugenol (1, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150 and 200 ppm) and behavioural changes were recorded on 0, 1, 12, 24, 48, 72 and 96 hours after exposing to anaesthetic drug, and LC₅₀ was determined. According to the results, the concentrations of 1 ppm and 40 ppm eugenol were identified as the best concentrations for decreasing stress (sedation) and anaesthesia induction in *Barbus sharpeyi*, respectively. In addition, Eugenol at 200 ppm induced acute toxicity. Based on statistical analysis (Probit analysis), 48-hour LC₅₀ of Eugenol was 22.61±1.76 ppm. Based on the results, Eugenol is an anaesthetic drug with moderate toxicity on *Barbus sharpeyi*. Therefore, Eugenol appears to be a safe anaesthetic agent for substitution with MS222 for native fish aquaculture.

Key words: *Barbus sharpeyi*, eugenol, acute toxicity, LC₅₀.