



University of Guilan

University of Guilan with collaboration of Iranian
Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 9, No. 3, 2023, pages: 1-14
DOI: 10.22124/janb.2023.25441.1216



RESEARCH PAPER

OPEN ACCESS

The effect of ethanol extract of *Aloysia triphylla* on anesthesia and improve the physiological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after transfer

Ali Hajibeglou*, Masoumeh Machanlou, Mohammd Sudagar, Mohammad Mazandarani
Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan
University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Received 18 June 2023

Revised 17 September 2023

Accepted 22 September 2023

KEYWORDS ABSTRACT

Aloysia

triphylla

Anesthesia

Hematology

Rainbow trout

Introduction: Due to the side effects of chemical drugs, in recent years, the use of herbal medicines and their compounds in fish has been widely considered. The use of medicinal plants and their derivatives can stimulate feed consumption, increase daily weight, feed conversion ratio, increase shelf life, improve the health and function of the digestive system, minimize or mitigate the effects of stress on fish. Lemon herbena (*Aloysia triphylla*) is a member of Verbenaceae family. This plant is endemic to South America and can growth in other areas, such as Iran. This study was performed to evaluate the effect of *Aloysia triphylla* extract on anaesthesia, some water quality parameters, and haematology in juveniles rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* with average weight of 7 ± 0.42 g after transport.

Materials and methods: The experiment was divided in three steps: 1: the anesthesia induction with *Aloysia triphylla*: 0 (control), 25, 50, 100, 200, and 400 $\mu\text{L/L}$; 2: transport for 4 h with the fish separated into three groups: control and two concentrations of *A. triphylla*: 12.5 and 25 $\mu\text{L/L}$; and, 3: determination of the ventilatory frequency in fish exposed to *A. triphylla* at 12.5 or 25 $\mu\text{L/L}$.

Results and discussion: The results showed that the elevated concentration of *A. triphylla* proportionally decreased the time required for sedation and anesthesia induction and upraised the recovery time. After transport, lower blood serum glucose and cortisol and higher total protein, albumin, non-ionized ammonia, and dissolved oxygen levels in water were observed in fish exposed to 12.5 and 25 $\mu\text{L/L}$ of the extract ($p < 0.05$). By increasing the exposure time to *A. triphylla*, lower ventilatory frequency was found in fish exposed to 25 $\mu\text{L/L}$ of extract ($p < 0.05$).

Conclusions: In general, these results indicated that *A. triphylla* may have sedative and anesthetic effects on rainbow trout. Finally, it can be used to reduce the negative effects of stress caused by fish manipulation and transportation.

Conflicts of interest: Authors have no conflict of interest to declare for the publication of the present work

Funding: Authors have no sources of funding for the present work.

Acknowledgments: The authors would like to express their support offered by the University of Agricultural Sciences and Natural Resources of Gorgan, Iran.

*Corresponding author: alihajibeglou@gmail.com





"مقاله پژوهشی"

اثر عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو (*Aloysia triphylla*) بر بیهوشی و بهبود فاکتورهای فیزیولوژی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بعد از انتقال

علی حاجی بگلو*، معصومه ماچانلو، محمد سوداگر، محمد مازندرانی
گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، گلستان

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۳۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۶/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۲۸

کلمات کلیدی

چکیده

این مطالعه برای بررسی اثر عصاره گیاه به‌لیمو (*Aloysia triphylla*) بر بیهوشی و تأثیر آن بر فراسنجه‌های کیفی آب و شاخص‌های خون‌شناسی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با میانگین وزن اولیه 0.42 ± 0.07 گرم بعد از حمل و نقل انجام شد. آزمایش به سه بخش تقسیم شد: (۱) القای بیهوشی بچه‌ماهیان با عصاره به‌لیمو: صفر (شاهد)، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و $400 \mu\text{L/L}$ ؛ (۲) جابه‌جایی بچه‌ماهیان به مدت ۴ ساعت در ۳ گروه: شاهد و دو غلظت عصاره به‌لیمو: $12/5$ و $25 \mu\text{L/L}$ ؛ (۳) تعیین نرخ تهویه‌ای ماهیان در مواجهه با غلظت‌های $12/5 \mu\text{L/L}$ و $25 \mu\text{L/L}$. نتایج نشان داد که افزایش غلظت عصاره به‌لیمو باعث کاهش مدت زمان لازم برای بیهوشی و افزایش مدت زمان لازم برای برگشت از بیهوشی شد. پس از حمل و نقل، کمترین میزان گلوکز و کورتیزول سرم خون و بیشترین میزان پروتئین کل، آلبومین، آمونیاک غیر یونیزه و اکسیژن محلول در آب در ماهیان تحت تیمار $12/5 \mu\text{L/L}$ و $25 \mu\text{L/L}$ عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو مشاهده شد ($p < 0.05$). با افزایش زمان مواجهه با عصاره به‌لیمو، نرخ تهویه‌ای در تیمار $\mu\text{L/L}$ ۲۵ عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو کمتر از دیگر گروه‌ها بود ($p < 0.05$). در مجموع، نتایج نشان داد که عصاره به‌لیمو می‌تواند اثرات آرام‌بخشی و بیهوشی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان داشته باشد. در نهایت، می‌توان از آن برای کاستن اثرات منفی استرس ناشی از حمل و نقل ماهیان استفاده کرد.

مقدمه

در طی دهه گذشته، مطالعات قابل توجهی در زمینه استفاده از مکمل‌های گیاهی در آبی پروری انجام شده است. برخی از این مطالعات روی بیهوشی و ارزیابی پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در آبزیان انجام شده است (Velisek et al. 2011; Parodi et al. 2014; Toni et al. 2014; Zeppenfeld et al. 2014; Saccol et al. 2017a, b; Park et al. 2017; Salbego et al. 2015, 2017). ازم به ذکر است که پاسخ به یک ماده بی‌هوشی می‌تواند در بین گونه‌های مختلف متفاوت باشد. بنابراین، توصیه می‌شود که عملکرد و کارایی هر ماده بیهوشی در هر گونه از آبزیان به صورت جداگانه بررسی شود (King et al. 2005).

حمل و نقل ماهی به ویژه جابه‌جایی ماهی زنده یک فرایند بسیار مهم در آبی پروری محسوب می‌شود. حفظ خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب در محدوده مناسب و رفاه ماهیان چالش همیشگی محققان بوده است (Park et al. 2009; Becker et al. 2016; Becker et al. 2017). افزودن عصاره به‌لیمو (*Aloysia triphylla*) به آب هنگام حمل و نقل ماهی باعث نتایج مختلفی در رابطه با اثر آرام‌کنندگی یا بیهوشی، خواص ضداسکایسی، توانایی جلوگیری از کاهش اکسیژن و افزایش دی‌اکسیدکربن و مقدار آمونیاک و یا از دست دادن یون‌ها شده است (Becker et al. 2012, 2013; Parodi et al. 2014; Zeppenfeld et al. 2014). همچنین در آزمایشی که اثر عصاره ریشه گیاه سنبل‌الطیب (*Valeriana officinalis*) روی ماهی قزل‌آلای رنگین-کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در زمان حمل و نقل انجام شد، اختلاف معنی‌داری از نظر pH، اکسیژن محلول، میزان آمونیاک و دمای آب بین گروه‌های A (گروه شاهد) و B (دارای عصاره) مشاهده نشد، ولی کمترین سطح گلوکز و کورتیزول سرم خون و بیشترین درصد بقا در گروه B روی داد (Hajibeglou and Sudagar, 2018).

گیاه به‌لیمو (*Lemon verbena*) با نام علمی A. *triphylla* درختچه‌ای از خانواده شاه‌پسند (*Verbenaceae*) با ارزش دارویی بالاست (Becker et al. 2017). برگ‌ها و اندام‌های رویشی این گیاه دارای اسانس و موادی هستند که خاصیت آرام‌بخشی و تسکین-دهنده اعصاب و کمک‌کننده به هضم غذا را دارند و در

درمان بی‌خوابی و تنش و به‌عنوان مسکن نیز استفاده می‌شود (Becker et al. 2017; Gholipourkhani et al. 2017). ترکیبات اسانس برگ‌های به‌لیمو تهیه شده از مناطق ایران شامل ژرانیول، نرول، نرال، ژرانیال، ۱ و ۸-سینتول، لیمون و آلفا کورکومن هستند (Arman and Alinaghizadeh, 2023).

با توجه به اینکه کشور ایران یکی از بزرگترین تولیدکنندگان ماهی قزل‌آلا در جهان است و نیز با توجه به اهمیت حمل و نقل و جابه‌جایی ماهی در آبی پروری و اینکه فرآیند حمل‌ونقل یکی از مراحل بحرانی در طی مراحل مختلف پرورش ماهی است و همچنین، از آنجا که یکی از تأثیرات داروهای بیهوشی اثر بر شاخص‌های خونی است (Becker et al. 2017; Chaharborji et al. 2019) و از این شاخص‌ها به‌عنوان شاخص پاسخ به تنش در ماهی استفاده می‌شود (Rahdari et al. 2017)، می‌توان از آن به‌عنوان معیاری برای سنجش مناسب بودن دارو استفاده کرد (Chaharborji et al. 2019). لذا هدف مطالعه حاضر تعیین اثر بیهوش‌کنندگی گیاه به‌لیمو و نیز تأثیر آن بر شاخص‌های فیزیولوژیک ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از جابه‌جایی و حمل و نقل بود.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو

این طرح در کارگاه تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین-کمان (گلستان، علی‌آباد کتول، زرین‌گل) انجام شد. بچه-ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تهیه شده از شرکت آکوالند فرانسه با میانگین وزن اولیه 0.42 ± 7 گرم در مخازن فایبرگلاس ۱۰۰۰ لیتری با تراکم ۴۰۰ قطعه ماهی نگهداری شدند. برگ گیاه به‌لیمو از شرکت گیاه اسانس (گرگان، گلستان) تهیه شد. سپس، شسته شده و به مدت ۳ شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خشک و آسیاب شد. پودر به‌دست آمده در اتانول ۷۰٪ (با نسبت حجمی ۱:۱) به مدت ۴۸ ساعت خیسانده شد. سپس، مخلوط حاصل از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شد. محلول صاف شده حاصل با استفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخشی (Rotary evaporator, IKA® HB10 basic, China) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به نصف حجم اولیه تغلیظ شد. در نهایت، عصاره حاصل با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی

دو لایه (هر کیسه حاوی ۱۰ لیتر آب و تعداد ۲۰ قطعه بچه‌ماهی) حاوی یک سوم آب و دو سوم اکسیژن حمل و نقل شدند و به ۳ گروه با غلظت‌های صفر (شاهد)، $12/5$ و $25 \mu\text{L/L}$ عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو (هر یک با ۴ تکرار) تقسیم شدند. پس از جابه‌جایی ۴ ساعته ماهیان، نمونه‌گیری خون، از سیاهرگ ساقه دمی انجام شد و شاخص‌هایی مانند هماتوکریت، هموگلوبین، پروتئین کل، آلبومین، گلوکز و کورتیزول خون اندازه‌گیری شد.

۲۴ ساعت قبل از خون‌گیری، غذادهی ماهیان قطع شد و پس از بیهوشی توسط 200 mg/L پودر گل میخک (Gioacchini et al. 2011)، خون‌گیری از سیاهرگ ساقه دمی بچه‌ماهیان انجام شد. مقدار ۱ میلی لیتر خون برای اندازه‌گیری شاخص‌های خونی به ظروف حاوی ماده ضدانعقاد هپارین و ۱ میلی لیتر خون نیز به ظروف فاقد ماده ضدانعقاد هپارین منتقل شد. سپس با استفاده از سانتریفیوژ نمونه‌های سرم جدا و تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در دمای 80°C - نگهداری شدند (Feldman et al. 2000; Sladky et al. 2001; Hanley et al. 2010). سپس، درصد هماتوکریت با استفاده از لوله‌های مویینه و سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه با سرعت 3000 در دقیقه و به کمک خط‌کش مخصوص هماتوکریت اندازه‌گیری شد (Klontz, 1994). تعیین میزان هموگلوبین با استفاده از کیت تجاری (زیست شیمی، ایران) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 546 نانومتر انجام شد (Klontz, 1994). میزان کورتیزول با روش سنجش ایمنی رادیواکتیو (Radioimmunoassay) و میزان گلوکز با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری (با کیت پارس آزمون) اندازه‌گیری شد (Warren et al. 2004). میزان آلبومین و پروتئین کل سرم خون با استفاده از کیت‌های تجاری گلوکز، آلبومین و توتال پروتئین (شرکت پارس آزمون) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده به روش فتومتری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 546 نانومتر اندازه‌گیری شدند (Ameri Mahabadi, 1999).

پس از جابه‌جایی ۴ ساعته، برای ثبت تلفات و میزان بازماندگی، ماهیان هر گروه پس از خروج از کیسه‌های پلاستیکی، به مدت ۲۴ ساعت در مخازن 1000 لیتری

(Freeze Drier, Operon: FDB-5503, Korea) به‌طور کامل خشک، و به پودر تبدیل شد. عصاره به‌دست آمده تا زمان استفاده در دمای 4°C درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Hajibeglou and Sudagar, 2018).

منبع آب و خصوصیات کیفی آب

از آب چشمه برای انجام آزمایش استفاده شد. در طی دوره سازگاری، شاخص‌های کیفی آب به‌طور روزانه کنترل شد (دما $12/3 \pm 0/4^\circ\text{C}$ ، اکسیژن محلول $8/6 \pm 0/34$ میلی گرم در لیتر، $7/07 \pm 0/12 \text{ pH}$). طی این مدت و تا ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش‌ها، تغذیه با جیره پایه (شرکت ۲۱ بیضا، شیراز) انجام شد.

آزمایش ۱: القای بیهوشی و بازگشت از بیهوشی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در معرض عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو

در بخش اول ماهی با میانگین وزن اولیه $7 \pm 0/42$ گرم مورد آزمایش در معرض غلظت‌های صفر، 25 ، 50 ، 100 ، 200 و $400 \mu\text{L/L}$ عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو قرار گرفتند (Becker et al. 2017). برای این منظور، جهت هر یک از غلظت‌های مذکور، ۱۰ قطعه ماهی در نظر گرفته شد که در هر بار یک قطعه ماهی در داخل مخزن بیهوشی (حدود ۱۰ لیتر) قرار داده شد و ضمن مشاهده و ثبت مراحل بیهوشی، مدت زمان القای بیهوشی، بازگشت از بیهوشی و تلفات ثبت شد. پس از حمل و نقل هر یک از ماهیان به مخزن حاوی ماده بیهوشی، زمان القای بیهوشی و بازگشت از آن در هر یک از تیمارها در مدت حداکثر ۳۰ دقیقه با استفاده از زمان سنج دیجیتالی ثبت شد. برای بازگشت از بیهوشی، هر یک از ماهیان پس از بیهوشی در داخل مخزن حاوی آب فاقد عصاره قرار داده شدند. برای هر ۵ بار آزمایش و همچنین، برای هر یک از غلظت‌های جدید، آب مخزن ویژه بازگشت از بیهوشی (آب فاقد عصاره) تعویض شد.

آزمایش ۲: جابه‌جایی بچه‌ماهیان قزل‌آلای

رنگین‌کمان با آب حاوی عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو در بخش دوم آزمایش، بچه‌ماهیان با میانگین وزن اولیه $7 \pm 0/42$ گرم به مدت ۴ ساعت در ۱۲ کیسه پلاستیکی

ماهی شمارش شد. برای این منظور از زمان سنج دیجیتال استفاده شد.

تجربه و تحلیل آماری

داده‌ها به کمک آزمون واریانس یک‌طرفه و با SPSS 16 تجزیه و تحلیل شدند و برای ارزیابی نرم‌آل بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده شد. همچنین برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه دانکن استفاده شد.

نتایج

القای بیهوشی و برگشت از بیهوشی

نتایج نشان داد که افزایش غلظت عصاره به‌لیمو موجب کاهش مدت زمان لازم برای بیهوشی و افزایش زمان لازم برای برگشت از بیهوشی شد. در این آزمایش غلظت $\mu\text{L/L}$ ۲۵ عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو، اثر بیهوش‌کنندگی نداشت. مقایسه میانگین زمان القای بیهوشی در ماهیان نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی (غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و $400 \mu\text{L/L}$ عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو) با گروه شاهد و غلظت $25 \mu\text{L/L}$ عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو وجود داشت ($p < 0.05$). در طول دوره آزمایش هیچ‌یک از غلظت‌های مورد آزمایش سبب تلفات در ماهیان نشد. بر اساس نتایج به‌دست آمده، بین زمان بیهوشی و زمان بازگشت از بیهوشی رابطه عکس وجود داشت، به طوری که هر چقدر غلظت ماده بیهوش‌کننده بیشتر می‌شد، بیهوشی سریع‌تر و بازگشت از بیهوشی کندتر انجام می‌شد (جدول ۱).

(فاقد عصاره) قرار داده شدند. همچنین، قبل و بعد از جابه‌جایی ماهیان، برای بررسی فراسنجه‌های کیفی آب شامل اکسیژن محلول، دما، pH، آمونیاک غیریونیزه، نیتروژن آمونیاکی کل، قلیابیت و دی‌اکسیدکربن نمونه‌برداری از آب انجام شد. میانگین دما، اکسیژن محلول و pH با استفاده از دستگاه دیجیتالی (Horiba U10, Japan) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری قلیابیت آب از روش Tucker و Boyd (۱۹۹۲) استفاده شد. میزان دی‌اکسیدکربن مطابق روش Wurts و Durborow (۱۹۹۲) و میزان آمونیاک غیریونیزه و همچنین نیتروژن آمونیاکی کل با استفاده از روش رنگ‌سنجی و کیت تجاری (پارس آزمون) اندازه‌گیری شد.

آزمایش ۳: نرخ تهویه‌ای بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در بازه‌های زمانی مختلف مواجهه با غلظت‌های مختلف عصاره به‌لیمو

علاوه بر این، در گروه دیگری از بچه‌ماهیان با میانگین وزن اولیه 7 ± 0.42 گرم نرخ تهویه‌ای (تعداد دفعات باز و بسته شدن سرپوش آبششی یا دهان در دقیقه) بررسی شد. بچه‌ماهیان به طور جداگانه در معرض غلظت‌های صفر (شاهد)، $12/5 \mu\text{L/L}$ و $25 \mu\text{L/L}$ عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو (۸ قطعه برای هر غلظت) قرار گرفتند. نرخ تهویه‌ای در زمان‌های صفر، ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲۴۰ دقیقه مواجهه با هر یک از غلظت‌های مذکور (صفر، $12/5 \mu\text{L/L}$ و $25 \mu\text{L/L}$ عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو) اندازه‌گیری شد. نرخ تهویه‌ای در ماهیان با استفاده از دستور Alvarenga و Volpato (۱۹۹۵) انجام شد؛ به این صورت که تعداد دفعات باز و بسته شدن سرپوش آبششی یا دهان در دقیقه برای هر

جدول ۱ مدت زمان القای بیهوشی و بازگشت از بیهوشی در مواجهه با غلظت‌های مختلف عصاره به‌لیمو در بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان

Table 1. Duration of induction of anesthesia and recovery from anesthesia in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to different concentrations of *Aloysia triphylla* extract

Concentrations ($\mu\text{L/L}$)	Anesthesia induction (s)	Recovery time (s)	Survival (%)
0	0.00 ± 0.00^e	0.00 ± 0.00^e	100
25	0.00 ± 0.00^e	0.00 ± 0.00^e	100
50	825 ± 32.70^a	117 ± 15.71^d	100
100	483 ± 21.03^b	273 ± 19.67^c	100
200	253 ± 13.52^c	317 ± 20.00^b	100
400	209 ± 14.74^d	470 ± 25.00^a	100

Means with the different letters in each column are significantly different ($p < 0.05$).

نیتروژن آمونیاکی کل در تیمارهای ۱۲/۵ و ۲۵ $\mu\text{L/L}$ عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو، به‌طور معنی‌دار ($p < 0.05$) کمتر از گروه شاهد بود، اما نسبت به قبل از جابه‌جایی اختلاف معنی‌دار نداشتند ($p > 0.05$). بیشترین میزان آمونیاک غیریونیزه در تیمار ۲۵ $\mu\text{L/L}$ عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو، پس از جابه‌جایی گزارش شد و در تمامی گروه‌ها پس از جابه‌جایی به‌طور معنی‌دار بیش از قبل از جابه‌جایی بود ($p < 0.05$). مقدار pH اگرچه در تیمارهای ۱۲/۵ و ۲۵ $\mu\text{L/L}$ عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو پس از جابه‌جایی، اندکی کاهش یافت، ولی در مجموع اختلاف معنی‌دار در گروه‌های مختلف دیده نشد ($p > 0.05$). در مورد میانگین دمای آب و قلیائیت در گروه‌های مختلف، قبل و بعد از جابه‌جایی اختلاف معنی‌دار ($p > 0.05$) مشاهده نشد (جدول ۲).

فراسنجه‌های کیفی آب قبل و بعد از جابه‌جایی ۴ ساعته

مرگ و میر ۲۴ ساعت پس از جابه‌جایی ماهیان در هیچ گروهی مشاهده نشد. میزان اکسیژن محلول در هر دو غلظت عصاره به‌لیمو (۱۲/۵ و ۲۵ $\mu\text{L/L}$) عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو) به‌طور معنی‌دار نسبت به قبل از جابه‌جایی و گروه شاهد بیشتر بود ($p < 0.05$). میزان دی‌اکسید کربن در تمام گروه‌ها پس از جابه‌جایی اختلاف معنی‌دار با یکدیگر نداشتند ($p > 0.05$), اما در تمام گروه‌های آزمایشی میزان دی‌اکسید کربن به‌طور معنی‌دار بیش از قبل از جابه‌جایی (تقریباً افزایش ۳ برابری) گزارش شد ($p < 0.05$). میزان

جدول ۲ فراسنجه‌های کیفی آب قبل و بعد از جابه‌جایی ۴ ساعته ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با غلظت‌های مختلف عصاره گیاه به‌لیمو

Table 2. Water parameters before and after transport (4 h) in juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* with different concentrations of *Aloisia triphylla* extract

Water parameter	Before transport	After transport (groups)		
		Control	12.5 $\mu\text{L/L}$	25 $\mu\text{L/L}$
Dissolved oxygen (mg/L)	8.56 \pm 0.32	9.60 \pm 0.65 ^c	11.86 \pm 0.77 ^{*b}	14.66 \pm 0.98 ^{*a}
Alkalinity (mg CaCO ₃ /L)	62.33 \pm 2.08	69.00 \pm 2.64	67.00 \pm 2.00	64.00 \pm 4.35
Carbon dioxide (mg/L)	13.66 \pm 2.08	25.66 \pm 2.51 [*]	26.00 \pm 3.00 [*]	32.00 \pm 6.08 [*]
Total ammonia nitrogen (mg CaCO ₃ /L N/L)	0.027 \pm 0.002	0.43 \pm 0.02 ^a	0.24 \pm 0.01 ^{*b}	0.21 \pm 0.01 ^{*b}
Temperature (°C)	12.40 \pm 0.36	12.63 \pm 0.32	12.53 \pm 0.50	12.70 \pm 0.30
Un-ionized ammonia ($\mu\text{g N/L}$)	0.37 \pm 0.002	0.28 \pm 0.004 ^{*b}	0.30 \pm 0.05 ^{*b}	0.65 \pm 0.05 ^{*a}
pH	7.60 \pm 0.20	7.03 \pm 0.15	6.86 \pm 0.15	6.96 \pm 0.28

In each row, the averages (mean \pm standard error) that have different letters have a significant difference with each other ($p < 0.05$). In each row, the values marked with an asterisk (*) indicate a significant difference with the value before transportation ($p < 0.05$).

عصاره به‌لیمو، نرخ تهویه‌ای در ماهیانی که تحت تیمار ۲۵ $\mu\text{L/L}$ عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو بودند، به‌طور معنی‌دار کمتر از دیگر گروه‌ها بود ($p < 0.05$)؛ جدول ۳).

نرخ تهویه‌ای

نرخ تهویه‌ای در همه گروه‌های آزمایشی در ابتدا (زمان صفر) برابر بود. با وجود این، به تدریج با افزایش زمان مواجهه با

جدول ۳ نرخ تهویه‌ای بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در بازه‌های زمانی مختلف مواجهه با غلظت‌های مختلف عصاره به‌لیمو

Table 3. Ventilatory frequency of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* at different time intervals exposed to different concentrations of *Aloysia triphylla* extract

Time of exposure (min)	Groups		
	Control	12.5 $\mu\text{L/L}$	25 $\mu\text{L/L}$
0	116 \pm 5.56 ^{Aa}	125 \pm 4.58 ^{Aa}	122 \pm 7.21 ^{Aa}
30	121 \pm 6.55 ^{Aa}	118 \pm 6.24 ^{Aa}	110 \pm 6.08 ^{Ba}
60	120 \pm 4.25 ^{Aa}	120 \pm 5.29 ^{Aa}	104 \pm 4.35 ^{ABb}
120	125 \pm 7.21 ^{Aa}	123 \pm 7.54 ^{Aa}	95 \pm 8.88 ^{Bb}
180	123 \pm 3.60 ^{Aa}	127 \pm 7.00 ^{Aa}	102 \pm 6.00 ^{ABb}
240	126 \pm 7.21 ^{Aa}	123 \pm 5.56 ^{Aa}	100 \pm 6.02 ^{ABb}

In each column, the averages (mean \pm standard error) that have different capital letters have a significant difference with each other ($p < 0.05$). In each row, the averages (mean \pm standard error) that have different lowercase letters have a significant difference with each other ($p < 0.05$).

جابه‌جایی مشاهده شد ($p > 0.05$). در مورد میزان گلوکز، در تمام گروه‌ها پس از جابه‌جایی نسبت به قبل از آن اختلاف معنی‌دار ثبت شد و در گروه‌های ۱۲/۵ و ۲۵ $\mu\text{L/L}$ عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو به طور معنی‌دار کمتر از گروه شاهد بود ($p > 0.05$). میزان پروتئین کل و آلبومین در ماهیان تحت تیمار ۱۲/۵ و ۲۵ $\mu\text{L/L}$ عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو به‌طور معنی‌دار بیش از گروه شاهد بود و گروه شاهد در این فراسنجه‌ها پس از جابه‌جایی نسبت به قبل از آن کمتر بود ($p > 0.05$; جدول ۴).

فراسنجه‌های خون‌شناسی قبل و بعد از جابه‌جایی ۴ ساعته

میانگین درصد هماتوکریت و میزان هموگلوبین در گروه‌های مختلف آزمایشی اختلاف معنی‌دار در قبل و بعد از جابه‌جایی نداشتند ($p > 0.05$). میزان کورتیزول و گلوکز سرم خون در گروه‌های ۱۲/۵ و ۲۵ $\mu\text{L/L}$ عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو به‌طور معنی‌دار کمتر از گروه شاهد بود ($p < 0.05$). کمترین میزان کورتیزول در گروه ۲۵ $\mu\text{L/L}$ عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو و بیشترین در گروه شاهد پس از

جدول ۴ فراسنجه‌های خون‌شناسی قبل و بعد از جابه‌جایی ۴ ساعته ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با غلظت‌های مختلف عصاره گیاه به‌لیمو

Table 4. Blood parameters before and after transport (4 h) of juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* with different concentrations of *Aloysia triphylla* extract

Blood parameter	Before transport	After transport (groups)		
		Control	12.5 $\mu\text{L/L}$	25 $\mu\text{L/L}$
Hematocrit (%)	51.50 \pm 1.50	52.26 \pm 1.61	54.41 \pm 2.12	53.53 \pm 2.20
Hemoglobin (g/dL)	4.86 \pm 0.47	4.92 \pm 0.21	4.87 \pm 0.37	4.79 \pm 0.17
Cortisol ($\mu\text{g/dL}$)	5.07 \pm 0.16	9.38 \pm 0.99 ^a	4.16 \pm 0.36 ^b	3.90 \pm 0.27 ^b
Glucose (mg/dL)	61.50 \pm 2.17	73.50 \pm 4.09 ^a	54.06 \pm 2.68 ^b	51.97 \pm 1.89 ^b
Total protein (mg/dL)	2.32 \pm 0.21	1.93 \pm 0.16 ^b	2.44 \pm 0.12 ^a	2.33 \pm 0.86 ^a
Albumin (mg/dL)	1.74 \pm 0.12	0.7 \pm 0.12 ^b	1.65 \pm 0.02 ^a	1.68 \pm 0.05 ^a

In each row, the averages (mean \pm standard error) that have different lowercase letters have a significant difference with each other ($p < 0.05$). In each row, the values marked with an asterisk (*) indicate a significant difference with the value before displacement ($p < 0.05$).

آرام‌بخش و یا بی‌هوش‌کننده در خلال دستکاری یا جابه‌جایی آبزیان ضروری است (Sneddon, 2012). از آنجا که غلظت ۴۰۰ $\mu\text{L/L}$ عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو، موجب بی‌هوشی ماهیان در زمان حدود ۱۹۵ ثانیه (کمی بیشتر از

بحث

به‌طور کلی یکی از مواردی که در حمل و نقل ماهیان به آن توجه می‌شود، به حداقل رساندن تنش جابه‌جایی است (Sajjadi et al. 2013). بنابراین استفاده از ترکیبات

شاهد افزایش مصرف اکسیژن متناسب با افزایش دفع دی-اکسید کربن خواهیم بود (King, 2009). افزایش سطح دی‌اکسید کربن مسئول کاهش pH در پایان حمل و نقل است (Becker؛ Golombieski et al., 2003) و نقل است (et al., 2012, 2013, 2016) که با مطالعه حاضر مطابقت دارد.

میانگین درصد هماتوکریت و میزان هموگلوبین در گروه‌های مختلف آزمایشی اختلاف معنی‌داری در قبل و بعد از جابه‌جایی ۴ ساعته نداشتند. Becker و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که در گربه‌ماهی *Lophiosilurus alexandri* ضمن جابه‌جایی و مواجهه با اسانس به‌لیمو، درصد هماتوکریت در زمان قبل و بعد از جابه‌جایی تغییر معنی‌داری ندارد.

کورتیزول معمول‌ترین هورمون شاخص تنش است، به‌نحوی که غالباً میزان آن می‌تواند تا حدود زیادی نشان‌دهنده شدت تنش در ماهی باشد (Barton, 2002). از آنجا که در شرایط تنش‌زا، نیاز به صرف انرژی بیشتری توسط ماهی وجود دارد، بنابراین برای تأمین انرژی مورد نظر، میزان گلوکز سرم خون افزایش می‌یابد (Tojar et al. 2011). مشابه نتایج تحقیق حاضر، Sajjadi و همکاران (۲۰۱۳) نیز گزارش کردند که استفاده از اسانس گل میخک در زمان حمل و نقل ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، سبب کاهش میزان کورتیزول و گلوکز سرم شده و در مجموع می‌تواند در کاهش تنش نقش مثبتی ایفا کند. گفته می‌شود که بالا رفتن سطوح کورتیزول از علائم پاسخ اولیه، و بالا رفتن غلظت گلوکز خون، پاسخ ثانویه به تنش است که در صورت ادامه حضور عامل تنش‌زا بروز خواهد کرد (Tojar et al. 2011). بر اساس نتایج حاصل به نظر می‌رسد عصاره به‌لیمو به‌عنوان یک ماده بیهوش‌کننده ویژگی آرام‌بخشی داشته و توانسته ضمن کاستن میزان فعالیت‌های سوخت و سازی ماهی، گلوکز و کورتیزول را در زمان استرس ناشی از حمل و نقل پایین نگه دارد (Kumar et al. 2005).

پروتئین‌ها نقش کلیدی در دستگاه ایمنی و تأمین انرژی در ماهیان دارند و تغییر یا نوسان در میزان آن می‌تواند در ارتباط با مصرف آن‌ها برای تأمین انرژی لازم برای فعالیت‌های سوخت و سازی و حیاتی بدن باشد (Shakoori and Abdali, 2017). تحقیقات نشان داده که میزان پروتئین کل در تنش‌های حاد افزایش می‌یابد، درحالی‌که

۳ دقیقه) و برگشت از بیهوشی در زمان ۴۷۰ ثانیه (کمتر از ۱۰ دقیقه) شد، بنابراین، ویژگی‌های مناسب به‌عنوان یک ماده بیهوش‌کننده را داراست (Gilderhus and Marking, 1987; Keene et al. 1998; Tsantilas et al. 2006). زمان مورد نیاز برای القای بیهوشی در ماهی *Centropomus parallelus* با اسانس به‌لیمو، با غلظت $200 \mu\text{L/L}$ ، حدود ۴ دقیقه گزارش شد (Parodi et al. 2016). علاوه بر این، متوسط زمان برگشت از بیهوشی با افزایش غلظت ماده بیهوشی افزایش یافت که این نتایج با مطالعه Zargham و همکاران (۲۰۱۳) بر روی قزل‌آلای رنگین‌کمان بیهوش شده با تنباکو مطابقت دارد. Sharifpour و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، و $200 \mu\text{L/L}$ اسانس گل میخک بر ماهی کپور معمولی نشان دادند که در تمام غلظت‌ها، بیهوشی مورد نظر در زمان کمتر از ۳ دقیقه ایجاد شد ولی زمان‌های بازگشت تعادل و بازگشت واکنش به محرک خارجی در بیشتر موارد طولانی‌تر از ۵ دقیقه بود. زمان برگشت از بیهوشی با عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو در بین این مطالعات، با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

در این تحقیق، بالا بودن میزان اکسیژن محلول در آب از یک‌سو و از سوی دیگر پایین بودن میزان نیتروژن آمونیاکی کل در تیمارهای عصاره به‌لیمو در آب، نشان‌دهنده نقش این عصاره در کاهش فعالیت‌های سوخت و سازی در بچه‌ماهیان قزل‌آلاست. کاهش میزان نرخ تهویه‌ای (دفعات باز و بسته شدن سرپوش آبششی یا باز و بسته شدن دهان در دقیقه) در ماهیانی که تحت تیمار $25 \mu\text{L/L}$ عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو بودند، نشان‌دهنده کاهش میزان فعالیت‌های سوخت و سازی در این ماهیان است. در تأیید نتایج تحقیق حاضر، در تحقیقات دیگری نیز برای کاهش فعالیت‌های سوخت و سازی و نیز کاهش میزان نیتروژن آمونیاکی آب ضمن جابه‌جایی و حمل و نقل ماهی، ترکیبات طبیعی مانند اسانس نعناع، عصاره میخک و اوژنول و همچنین ترکیبات سنتتیک مانند بنزوکائین هیدروکلرید، ۲-فنوکسی اتانول و لیدوکائین هیدروکلرید استفاده شده است (Parodi et al. 2014; Zeppenfeld et al. 2014; Salbego et al. 2015; Becker et al. 2012, 2016). گزارش شده است زمانی که موجود زنده در شرایط تنش‌زا مانند جابه‌جایی قرار می‌گیرد، نیاز بیشتری به حفظ و برقراری هموستازی بدن دارد. بنابراین

کل و گلبولین شاخص‌های خوبی برای تخمین فعالیت دستگاه ایمنی و سلامت در ماهیان هستند (Mohammadi et al. 2016). به طوری که می‌توان گفت افزایش پروتئین‌های سرم نشان‌دهنده افزایش توان قدرت پاسخ دفاعی ماهی است. بنابراین می‌توان بیان داشت که عصاره به‌لیمو می‌تواند با افزایش پروتئین‌های سرم، نقش مثبتی در کنترل شرایط تنش جابه‌جایی و تقویت دستگاه ایمنی بدن ماهی داشته باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره به‌لیمو می‌تواند اثرات آرام‌بخشی و بیهوشی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان داشته باشد. بنابراین، می‌توان از آن برای کاستن اثرات منفی تنش ناشی از جابه‌جایی و حمل و نقل ماهیان استفاده کرد. در این تحقیق عصاره به‌لیمو توانست سطح کورتیزول و گلوکز سرم خون را پایین نگه داشته و با افزایش پروتئین‌های سرم خون و همچنین افزایش سطح اکسیژن و پایین آوردن میزان نیتروژن آمونیاکی کل، موجب بهبود وضعیت عمومی ماهیان شود. بنابراین بر اساس نتایج این تحقیق، استفاده از غلظت $25 \mu\text{L/L}$ عصاره اتانولی گیاه به‌لیمو، در پرورش ماهی قزل‌آلا پیشنهاد می‌شود.

منابع

- Alvarenga, C.M.D., Volpato, G.L. 1995. Agonistic profile and metabolism in alevins of the Nile tilapia. *Physiology & Behavior* 57: 75-80. doi: [10.1016/0031-9384\(94\)00206-K](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)00206-K).
- Ameri Mahabadi, M. 1999. Laboratory Methods of Veterinary Haematology. Tehran University Press, 126 p.
- Arman, M., Alinaghizadeh, M. 2023. The effect of lemon plant extract (*Aloysia citrodora*) on growth performance and liver enzyme activities of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture Sciences* 11: 52-58. doi: [20.1001.1.23225351.1402.11.1.6.7](https://doi.org/20.1001.1.23225351.1402.11.1.6.7).
- Barton, B.C. 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* 42: 517-525. doi: [10.1093/icb/42.3.517](https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517)
- Becker, A.G., Cunha, M.A.D., Garcia, L.D.O., Zeppenfeld, C.C., Parodi, T.V., Maldaner, G., Morel, A.F. Baldisserotto, B. 2013. Efficacy of eugenol and the methanolic extract of *Condalia buxifolia* during the transport of the silver catfish *Rhamdia quelen*. *Neotropical Ichthyology* 11: 675-681. doi: [10.1590/S1679-62252013000300021](https://doi.org/10.1590/S1679-62252013000300021).
- Becker, A.G., Luz, R.K., Mattioli, C.C., Nakayama, C.L., Silva, W.D.S., Leme, F.D.O.P., de Mendonça Mendes, H.C.P., Heinzmann, B.M. Baldisserotto, B. 2017. Can the essential oil of *Aloysia triphylla* have anesthetic effect and improve the physiological parameters of the carnivorous freshwater catfish *Lophosilurus alexandri* after transport? *Aquaculture* 481: 184-190. doi: [10.1016/j.aquaculture.2017.09.007](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.007).
- Becker, A.G., Parodi, T.V., Heldwein, C.G., Zeppenfeld, C.C., Heinzmann, B.M. Baldisserotto, B. 2012. Transportation of

تنش مزمن موجب کاهش آن می‌شود (Grutter and Pankhurst, 2000). در مطالعه حاضر، میزان پروتئین کل و آلومین سرم در گروه شاهد در مقایسه با ماهیانی که در مواجهه با عصاره به‌لیمو بودند، کاهش یافت. نتایج مشابه این مطالعه در گزارش‌های ارائه شده در خصوص اثر استرس بر میزان پروتئین خون ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در مطالعات Chaharborji و همکاران (۲۰۱۹) نیز به دست آمده است. در بروز تنش مزمن به دلیل تجمع ترکیبات اکسیداتیو در کبد و کلیه به عنوان اصلی‌ترین اندام‌های سازنده آلومین و گلوبولین‌ها، آسیب‌های ایجاد شده در این دو اندام موجب کاهش میزان پروتئین کل سرم می‌شود (Parodi et al. 2014). شاید به همین دلیل است که میزان این شاخص در ماهیان گروه شاهد هنگامی که برای مدت نسبتاً طولانی در شرایط تنش‌زا حمل می‌شوند، کاهش می‌یابد. به‌طور کلی، کاهش پروتئین کل نشان‌دهنده شرایط نامساعد محیطی است (Kavitha et al. 2010). وارد شدن تنش به ماهی موجب کاهش گلوکز و پدیده گلوکونئوز در ماهی شده و در نتیجه، باعث می‌شود مقدار آمونیاک افزایش و مقدار پروتئین کل کاهش یابد (Gomulka et al. 2014). بیشترین تأثیر ایمنی پروتئین‌های سرم به عهده ایمونوگلوبولین‌هاست. پروتئین

- silver catfish, *Rhamdia quelen*, in water with eugenol and the essential oil of *Lippia alba*. *Fish Physiology and Biochemistry* 38: 789-796. doi: [10.1007/s10695-011-9562-4](https://doi.org/10.1007/s10695-011-9562-4).
- Becker, A.G., Parodi, T.V., Zeppenfeld, C.C., Salbego, J., Cunha, M.A., Heldwein, C.G., Loro, V.L., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B. 2016. Pre-sedation and transport of *Rhamdia quelen* in water containing essential oil of *Lippia alba*: metabolic and physiological responses. *Fish Physiology and Biochemistry* 42: 73-81. doi: [10.1007/s10695-015-0118-x](https://doi.org/10.1007/s10695-015-0118-x)
- Boyd, C.E., Tucker, C.S. 1992. *Water Quality and Pond Soil Analyses for Aquaculture*. Auburn University, Alabama, USA, Alabama Agricultural Experiment Station, 183 p.
- Chaharborji, M., Imanpour, M., Safari, R., Jafar, A. 2019. Effect of spearmint essential on reducing stress during transportation of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Animal Research* 32: 96-102. doi: [20.1001.1.23832614.1398.32.2.6.1](https://doi.org/20.1001.1.23832614.1398.32.2.6.1).
- Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jian, N.C. 2000. *Schalm's Veterinary Hematology*. 3th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, USA, 32-36.
- Gholipourkanani, H., Jamali, F., Jafaryan, H., Gholamalipour Alamdari, E. 2017. Dietary effect of *Lippia citrodora* essential oil on some hematological, biochemical, growth performance and body composition of *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758. *Sustainable Aquaculture and Health Management Journal* 3: 1-15. doi: [10.18869/acadpub.ijaah.3.1.1](https://doi.org/10.18869/acadpub.ijaah.3.1.1).
- Gilderhus, P.A., Marking, L.L. 1987. Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. *North American Journal of Fisheries Management* 7: 288-292. doi: [10.1577/1548-8659\(1987\)7<288:CEOACO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1987)7<288:CEOACO>2.0.CO;2)
- Gioacchini, G., Carnevali, O., Giorgini, E., Vaccari, L., Bianchi, V., Borini, A. 2011. Evaluation of human oocytes ageing by focal plane array (FPA) fourier transform infrared (FT-IR) imaging spectroscopy. *Fertility and Sterility* 96: 238-239. doi: [10.1016/j.fertnstert.2011.07.915](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.07.915).
- Golombieski, J.I., Silva, L.V.F., Baldisserotto, B., Da Silva, J.H.S. 2003. Transport of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings at different times, load densities, and temperatures. *Aquaculture* 216: 95-102. doi: [10.1016/S0044-8486\(02\)00256-9](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00256-9)
- Gomułka, P., Wlasow, T., Szczepkowski, M., Misiewicz, L., Ziomek, E. 2014. The effect of propofol anaesthesia on haematological and biochemical blood profile of European whitefish. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 14: 331-337. doi: [10.4194/1303-2712-v14_2_04](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v14_2_04).
- Grutter, A.S., Pankhurst, N.W. 2000. The effects of capture, handling, confinement and ectoparasite load on plasma levels of cortisol, glucose and lactate in the coral reef fish (*Hemigymnus melapterus*). *Journal of Fish Biology* 57: 391-401. doi: [10.1111/j.1095-8649.2000.tb02179.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2000.tb02179.x).
- Hajibeglou, A., Sudagar, M. 2018. The effects of *Valeriana officinalis* root extract on survival rates and biochemical factors of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* during transportation. *Journal of Applied Ichthyological Research* 6: 91-102.
- Hanley, C.S., Clyde, V.L., Wallace, R.S., Paul-Murphy, J., Patterson, T.A., Keuler, N.S., Sladky, K.K. 2010. Effects of anesthesia and surgery on serial blood gas values and lactate concentrations in yellow perch (*Perca flavescens*), walleye pike (*Sander vitreus*), and koi (*Cyprinus carpio*). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 236: 1104-1108. doi: [10.2460/javma.236.10.1104](https://doi.org/10.2460/javma.236.10.1104)
- Kavitha, C., Malarvizhi, A., Kumaran, S.S., Ramesh, M. 2010. Toxicological effects of arsenate exposure on hematological, biochemical and liver transaminases

- activity in an Indian major carp, *Catla catla*. Food and Chemical Toxicology 48: 2848-2854. doi: [10.1016/j.fct.2010.07.017](https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.017)
- Keene, J.L., Noakes, D.L.G., Moccia, R.D., Soto, C.G. 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Agricultural Research 29: 89-101. doi: [10.1046/j.1365-2109.1998.00927.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1998.00927.x).
- King, H.R. 2009. Fish transport in the aquaculture sector: An overview of the road transport of Atlantic salmon in Tasmania. Journal of Veterinary Behavior 4: 163-168. doi: [10.1016/j.jveb.2008.09.034](https://doi.org/10.1016/j.jveb.2008.09.034).
- King, W., Hooper, B., Hillsgrove, S., Benton, C., 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. doi: [10.1111/j.1365-2109.2005.01365.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01365.x).
- Klontz G.W. 1994. Fish hematology. In: Techniques in Fish Immunology. Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Rowley, A.F., Kelikoff, T.C., Kaatari, S.L., Smith, S.A. (Eds). SOS Publishing, 121-132.
- Mohammadi, M.J., Alishahi, M., Aramoon, A. 2016. Effects of Plantago ovata extract on none specific immune parameters of the juvenile *Oncorhynchus mykiss*. Veterinary Research & Biological Products 29: 97-105. doi: [10.22034/vj.2016.106066](https://doi.org/10.22034/vj.2016.106066).
- Park, I.S., Gil, H.W., Lee, T.H., Nam, Y.K., Lim, S.G., Kim, D.S. 2017. Effects of clove oil and lidocaine-HCl anesthesia on water parameter during simulated transportation in the marine medaka, *Oryzias dancena*. Development & Reproduction 21: 19-25. doi: [10.12717/DR.2017.21.1.019](https://doi.org/10.12717/DR.2017.21.1.019)
- Park, I.S., Park, M.O., Hur, J.W., Kim, D.S., Chang, Y.J., Kim, Y.J., Park, J.Y., Johnson, S.C. 2009. Anesthetic effects of lidocaine-hydrochloride on water parameters in simulated transport experiment of juvenile winter flounder, *Pleuronectes americanus*. Aquaculture 294: 76-79. doi: [10.1016/j.aquaculture.2009.05.011](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.05.011)
- 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. doi: [10.1007/s10695-013-9845-z](https://doi.org/10.1007/s10695-013-9845-z).
- Parodi, T.V., dos Santos, C.A., Veronez, A., Gomes, L.C., Heinzmann, B. M., Baldisserotto, B. 2016. Anesthetic induction and recovery time of *Centropomus parallelus* exposed to the essential oil of *Aloysia triphylla*. Ciência Rural 46: 2142-2147. doi: [10.1590/0103-8478cr20160039](https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160039).
- Rahdari, A., Khosravanizadeh, A., Dahmardeh, H., Gharaei, A., Mirdar Harijani, J. 2017. Anesthetic effects and biochemical changes of peppermint essence (*Mentha spicata*) in snow trout (*Schizothorax zarudnyi*). Aquatic Animals Nutrition 3: 35-46.
- Saccol, E.M., Londero, É.P., Bressan, C.A., Salbego, J., Gressler, L.T., Silva, L.V., Mourão, R.H., Oliveira, R.B., Llesuy, S.F., Baldisserotto, B., Pavanato, M.A. 2017a. Oxidative and biochemical responses in *Brycon amazonicus* anesthetized and sedated with *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) and *Curcuma longa* L. essential oils. Veterinary Anaesthesia and Analgesia 44: 555-566. doi: [10.1016/j.vaa.2016.08.005](https://doi.org/10.1016/j.vaa.2016.08.005).
- Saccol, E.M., Toni, C., Pês, T.S., Ourique, G.M., Gressler, L.T., Silva, L.V., Mourão, R.H., Oliveira, R.B., Baldisserotto, B., Pavanato, M.A. 2017b. Anaesthetic and antioxidant effects of *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. and *Curcuma longa* L. essential oils on tambaqui (*Colossoma macropomum*).

- Aquaculture Research 48: 2012-2031. doi: [10.1111/are.13034](https://doi.org/10.1111/are.13034).
- Sajjadi, M.M., Saaedi, M., Vesali, S.A. 2013. The effect of zeolite (Clinoptilolite) and clove oil (*Eugenia caryophyllata*) on survival rate and reduction of stress during transportation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fisheries Science and Technology 1: 63-75. doi: [20.1001.1.23225513.1391.1.1.2.9](https://doi.org/20.1001.1.23225513.1391.1.1.2.9).
- Salbego, J., Becker, A.G., Parodi, T.V., Zeppenfeld, C.C., Goncalves, J.F., Loro, V.L., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C., Maldaner, G., Morel, A.F., Baldisserotto, B. 2015. Methanolic extract of *Condalia buxifolia* added to transport water alters biochemical parameters of the silver catfish *Rhamdia quelen*. Aquaculture 437: 46-50. doi: [10.1016/j.aquaculture.2014.11.022](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.11.022).
- Salbego, J., Toni, C., Becker, A.G., Zeppenfeld, C.C., Menezes, C.C., Loro, V.L., Heinzmann, B.M., Baldisserotto, B. 2017. Biochemical parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) after transport with eugenol or essential oil of *Lippia alba* added to the water. Brazilian Journal of Biology 77: 696-702. doi: [10.1590/1519-6984.16515](https://doi.org/10.1590/1519-6984.16515).
- Shakoori, M., Abdali, A. 2017. Effect of lead on some biochemical indices of farmed silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Journal of Marine Science and Technology Research 12: 1-12.
- Sharifpour, I., Soltani, M., Abdolhai, H., Ghayomi, R. 2003. Study of anaesthetic effects of clove oil (*Eugenia caryophyllata*) in common carp (*Cyprinus carpio*) under various pH and temperature condition. Iranian Scientific Fisheries Journal 11: 59-74. doi: [10.22092/isfj.2003.115665](https://doi.org/10.22092/isfj.2003.115665).
- Sladky, K.K., Swanson, C.R., Stoskopf, M.K., Loomis, M.R., Lewbart, G. 2001. Comparative efficacy of tricaine methanesulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachypomus*). American Journal of Veterinary Research 62: 337-342. doi: [10.2460/ajvr.2001.62.337](https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.337).
- Sneddon, L.U. 2012. Clinical anesthesia and analgesia in fish. Journal of Exotic Pet Medicine 21: 32-43. doi: [10.1053/j.jepm.2011.11.009](https://doi.org/10.1053/j.jepm.2011.11.009).
- Tojar, S., Khodadadi, M., Javaheri, M. 2011. Comparison of efficacy of 2-phenoxyethanol, clove oil and PI₂₂₂ as anesthetics on the Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Journal of Marine Science and Technology Research 10: 11-23.
- Toni, C., Becker, A.G., Simões, L.N., Pinheiro, C.G., de Lima Silva, L., Heinzmann, B.M., Caron, B.O., Baldisserotto, B. 2014. Fish anesthesia: effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). Fish Physiology and Biochemistry 40: 701-714. doi: [10.1007/s10695-013-9877-4](https://doi.org/10.1007/s10695-013-9877-4).
- Tsantilas, H., Galatos, A.D., Athanassopoulou, F., Prassinou, N.N., Kousoulaki, K. 2006. Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for two size classes of white sea bream, *Diplodus sargus* L., and sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo* C. Aquaculture 253: 64-70. doi: [10.1016/j.aquaculture.2005.07.034](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.07.034).
- Velisek, J., Stara, A., Li, Z.H., Silovska, S., Turek, J. 2011. Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout. Aquaculture 310: 369-375. doi: [10.1016/j.aquaculture.2010.11.010](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.010).
- Warren, D.E., Matsumoto, Sh., Roessig, J. M., Cech, J.J. 2004. Cortisol response of green sturgeon to acid-infusion stress. Comparative Biochemistry and Physiology 137: 611-618. doi: [10.1016/j.cbpb.2003.12.002](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2003.12.002).
- Wurts, W.A., Durborow, R.M. 1992. Interactions of pH, carbon dioxide, alkalinity and hardness in fishponds. No. 464. Starkville, Mississippi, Southern Regional Aquaculture Center, 4 p.
- Zargham, D., Sharifrohani, M., Falahat Naserabad, I., Bashti, T. 2013.

Investigation of anesthetizing effect of tobacco (*Nicotiana tabacum*) aqueous and alcoholic extract on Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian Scientific Fisheries Journal 21: 33-40.

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. 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. doi: [10.1016/j.aquaculture.2013.10.013](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.10.013).