

# مقایسه $LC_{50}$ اسانس گل میخک و $MS_{222}$ در بچه ماهیان

## تاسماهی ایرانی، قزل آلائی رنگین کمان و کپور معمولی

بهروز ابطی<sup>(۱)</sup> - عیسی شریف پور<sup>(۲)</sup> - محمود آقاجانیور<sup>(۳)</sup> - علی رسولی<sup>(۴)</sup> -

سقراط فقیه زاده<sup>(۵)</sup> - رضا امید بیگی<sup>(۶)</sup> و رجب محمد نظری<sup>(۷)</sup>

abtahibm@modares.ac.ir

۱، ۳، ۵ و ۶ - دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس،

تهران صندوق پستی: ۴۸۳۸-۱۴۱۵۵

۲ - موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ۶۱۱۶-۱۴۱۵۵

۴ - دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران صندوق پستی: ۶۴۴۳-۱۴۱۵۵

۷ - کارگاه تکثیر و پرورش شهید رجایی، سمسکنده صندوق پستی: ۸۳۳۰

تاریخ دریافت: خرداد ۱۳۸۱ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۸۱

### چکیده

میزان  $LC_{50}$  در مدت دو دقیقه بعنوان شاخص اصلی برای دو داروی اسانس گل میخک و  $MS_{222}$  در سه گونه از سه گروه مهم ماهیان پرورشی ایران: کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، قره برون (*Acipenser persicus*) و قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) ارزیابی و بررسی شد. به این منظور ۶۴۰ عدد بچه ماهی از گونه های مذکور را در غلظت های مختلف بین غلظت غیرکشنده و غلظت کشنده قرار داده و با استفاده از نرم افزار تخصصی محاسبات عددی داروشناسی،  $LC_{50}$  داروهای مورد مطالعه بدست آمدند. میزان  $LC_{50}$  اسانس گل میخک و  $MS_{222}$  بترتیب در ماهی قره برون ۲۹۷ و ۲۹۱، در ماهی کپور ۲۷۱ و ۲۷۲، و در ماهی قزل آلا ۱۹۹ و ۲۰۷ قسمت در میلیون محاسبه گردید. نتایج حاصله بیانگر تفاوت معنی دار بین  $LC_{50}$  داروی  $MS_{222}$  در ماهی قزل آلا با داروها در دو گونه دیگر هستند. همچنین نتایج این بررسی مشخص می نماید که سمیت دو دارو در گونه های مذکور، تفاوت معنی داری ندارند ولی طبق ارقام بدست آمده با ۹۵ درصد اطمینان می توان گفت ماهی قزل آلائی رنگین کمان قابلیت کمتری در تحمل اثرات سمی داروهای بیحس کننده دارد.

**کلمات کلیدی:**  $LC_{50}$ ،  $MS_{222}$ ، اسانس گل میخک، کپور معمولی، قره برون، قزل آلائی رنگین کمان

استفاده از داروهای بیهوشی و بیحسی در پزشکی، دامپزشکی و سایر رشته‌های علوم زیستی دارای کاربردهای وسیع و متعددی است. در مراکز تکثیر و پرورش آبزیان، بخصوص ماهیان پرورشی نیز در عملیاتی مانند: تکثیر مصنوعی، کاهش استرس، کاهش فعالیت‌های فیزیولوژیک در زمان حمل و نقل، انجام مطالعات تحقیقاتی و نمونه برداری از ماهیان، واکسیناسیون بروش تزریق، دستکاری مولدین هنگام تخم‌کشی، جراحی و... استفاده از داروهای بیهوشی اجتناب‌ناپذیر است. در مجموع می‌توان گفت که استفاده از بیهوش‌کننده‌ها در آبرزی پروری و مدیریت آن، کاهش استرس و کاهش تأثیر بر رفتار و فرایندهای فیزیولوژی ماهی را به همراه دارد. لذا سالهاس که از بیهوش‌کننده‌هایی مانند زوله تیل ان دی (Zoletil N D)، متومیدات (Metomidate)، میداترن ان دی (Midatrene N D)، تری کائین متان سولفونات (MS222)، بنزوکائین ۲ - فنوکسی اتانول، کینالیدین، هیدرات کلرال (مخیر، ۱۳۷۲)،... و اخیراً عصاره طبیعی برخی گیاهان مانند اسانس گل میخک استفاده می‌گردد (Soto & Burhanuddin, 1994). با این وجود، محققان همواره در تلاش برای دستیابی به بیهوش‌کننده‌هایی هستند که ضمن مؤثر بودن، دارای کمترین اثرات سمی جانبی بوده و در عین حال ارزان و به سهولت در دسترس و قابل تهیه باشند. امروزه ماده بیهوش‌کننده MS222 در صنعت آبرزی پروری ایران مصرف وسیعی دارد که به علت وارداتی و گران قیمت بودن آن همواره مشکلاتی را در زمان تکثیر به همراه داشته است. از طرفی مدتی است که اسانس گل میخک به دلیل سهولت تهیه، اقتصادی بودن و داشتن کارایی بالا و نداشتن آثار سوء برای انسان و ماهی و همچنین داشتن خاصیت بیهوش‌کنندگی قوی بعنوان جایگزینی مناسب برای MS222 مورد توجه واقع شده است (چیت ساز، ۱۳۷۹؛ محمدی آرانی، ۱۳۷۹؛ قیومی، ۱۳۷۹؛ Munday & Wilson, 1997؛ Keene *et al.*, 1998). از اینرو ارزیابی اثرات دو داروی مذکور بر سلامتی و مرگ و میر گونه‌های مهم پرورشی و نهایتاً معرفی داروی جایگزینی به منظور استفاده در مراکز مختلف تکثیر و پرورش کاملاً لازم و ضروری است.

با توجه به مطرح بودن بحث جایگزینی اسانس گل میخک با MS222 لازم بود در کنار

بررسی اثرات بیهوشی اسانس گل میخک و MS222، بعنوان یکی از مهمترین ملاکهای فضاوت، سمیت این دو دارو در گونه‌های مهم شیلاتی مورد ارزیابی قرار گیرد. لذا این تحقیق به منظور دستیابی به هدف مذکور با محاسبه  $LC_{50}$  در مدت زمان جذب دارو بعنوان شاخص اصلی سم‌شناسی دارویی، روی سه نماینده از سه گروه مهم ماهیان پرورشی ایران انجام گردید.

## مواد و روشها

این تحقیق طی سالهای ۱۳۷۹ و ۱۳۸۰ در شرایط کارگاههای تکثیر ماهیان خاویاری، ماهیان گرم‌آبی شهید رجایی ساری و ماهیان سردآبی شهید باهنر کلاردشت واقع در استان مازندران صورت گرفت.

اسانس گل میخک بکار گرفته شده در این تحقیق با استفاده از فرایند تقطیر بوسیله دستگاه کلونجر مطابق با فارماکوپه مجارستان در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهیه گردید (محمدی آرانی، ۱۳۷۹).

ماده MS222 از معروف‌ترین داروهای بیهوشی در عملیات آبرزی پروی است که با نامهای متعددی از جمله تری کائین و متان سولفونات در بازار یافت می‌شود. MS222 مصرفی در این پژوهش محصول شرکت ساندوز سوئیس بود.

در این تحقیق ۶۴۰ عدد بچه ماهی از سه گونه شامل کپور معمولی، قره‌برون و قزل‌آلا مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱).

جدول ۱: تعداد و میانگین وزنی ماهیان بکار رفته در آزمایشها

| تعداد | میانگین وزنی (گرم) | ماهی        |
|-------|--------------------|-------------|
| ۲۰۰   | ۴/۳                | قره‌برون    |
| ۲۴۰   | ۳/۸                | کپور معمولی |
| ۲۰۰   | ۴/۱                | قزل‌آلا     |

Archive of SID  
در این آزمایشها برای نگهداری موقت ماهی‌ها از تشت‌های ۲۰ لیتری بیضوی که قطر بزرگ آن ۸۰ سانتیمتر و قطر کوچک آن ۶۰ سانتیمتر بود استفاده گردید. در دو سر قطر کوچک تشتها با ۱۰ سانتیمتر فاصله از لبه، خروجی مستطیلی شکل به ابعاد ۸×۱۵ سانتیمتر که بر روی آن توری قرار داشت، تعبیه شد تا آب بدون سرریز شدن همواره در این ظروف جریان داشته باشد.

در این آزمایش ابتدا غلظت غیرکشنده دارو بعنوان شروع با استفاده از منابع و کارهای انجام شده روی دو دارو تعیین و برای غلظتهای بعدی ۵۰ ppm بصورت تصاعد حسابی به غلظت دارو افزوده می‌شد تا تلفات نزدیک ۱۰۰ درصد حاصل شود. به این ترتیب سری غلظتهای با کشنده‌گی صفر تا ۱۰۰ درصد تهیه گردید.

بچه ماهیان قره‌برون، قزل‌آلا و کپور معمولی در اوزان حدود ۲ تا ۵ گرمی در گروه‌های ۵ تایی و در ۴ تکرار در معرض غلظتهای مختلف اسانس گل میخک و MS222 به مدت دو دقیقه قرار گرفتند. سپس به ظروف ۲۰ لیتری فاقد ماده بیهوشی با آب جریان‌دار منتقل شدند. ماهیان بیهوش شده معمولاً پس از ۵ تا ۱۵ دقیقه بتدریج به حالت عادی برمی‌گردند. در این تحقیق ماهیان فاقد حرکت پس از دو ساعت مرده تلقی شدند. ماهیان مورد آزمایش تا حدود ۲۴ ساعت پس از تأثیر ماده دارویی جهت مشاهده تغییرات حرکتی و رفتاری تحت نظر بوده و پس از آن از محل خارج می‌شدند.

دمای آب کارگاه شهید رجایی در جریان آزمایشات روی قره‌برون و کپور معمولی ۲۱/۵ تا ۲۲/۵ درجه سانتیگراد با pH ۷/۵ تا ۸/۵ سانتیگراد و دمای آب کارگاه شهید باهنر در جریان آزمایشات روی قزل‌آلا ۱۳ تا ۱۵ درجه با pH ۷/۲ تا ۷/۴ بود.

برای محاسبه LC<sub>50</sub> از نرم‌افزار تخصصی محاسبات عددی داروشناسی (Pharmacologic Calculation System, Version 4.0) استفاده شد. LC<sub>50</sub> در برنامه یاد شده از روابط Wilcoxon و Litchfield به روش محاسبه Probit value با استفاده از رگرسیون دوز دارو و لگاریتم غلظت انجام می‌گیرد. برنامه مذکور با دریافت تعداد ماهیان مورد آزمایش، حد بالا و حد پائین LC<sub>50</sub> را با سطح اعتماد ۹۵ درصد ارائه می‌دهد. برای مقایسه مقادیر و تعیین معنی دار

بودن اختلافها هم پوشانی حدود مذکور بررسی شد (فینی، ۱۹۶۴). ترسیم نمودار در فضای نرم افزار Excel انجام شد.

## نتایج

بچه ماهیان قره برون در معرض پنج غلظت اسانس گل میخک و MS222 (۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰ و ۴۰۰ میلی گرم در لیتر) قرار گرفتند. مدت زمان القاء بیهوشی برای هر گروه دو دقیقه در نظر گرفته شد. سپس بازماندگی و تلفات بعد از دو ساعت ثبت گردید (جدول ۲).

جدول ۲: اثر کشنده غلظتهای مختلف اسانس گل میخک و MS222 در ماهی قره برون

| غلظت (قسمت در میلیون) | دارو          | تعداد ماهی | بازماندگی | درصد تلفات |
|-----------------------|---------------|------------|-----------|------------|
| ۲۰۰                   | اسانس گل میخک | ۲۰         | ۱۹        | ۵          |
|                       | MS222         | ۲۰         | ۲۰        | ۰          |
| ۲۵۰                   | اسانس گل میخک | ۲۰         | ۱۶        | ۲۰         |
|                       | MS222         | ۲۰         | ۱۴        | ۳۰         |
| ۳۰۰                   | اسانس گل میخک | ۲۰         | ۱۱        | ۴۵         |
|                       | MS222         | ۲۰         | ۱۰        | ۵۰         |
| ۳۵۰                   | اسانس گل میخک | ۲۰         | ۶         | ۷۰         |
|                       | MS222         | ۲۰         | ۵         | ۷۵         |
| ۴۰۰                   | اسانس گل میخک | ۲۰         | ۱۹        | ۹۵         |
|                       | MS222         | ۲۰         | ۰         | ۱۰۰        |

LC<sub>50</sub> برای جدول ۲ در مورد اسانس گل ۲۹۷/۱۰۹ با حد بالای ۳۱۷۱/۳۲۱ و حد پایین ۲۷۴/۷۲۴۸ قسمت در میلیون و در مورد MS222 ۲۹۱/۸۴۳۴ با حد بالای ۳۱۳/۹۹۲۱ و حد پایین ۲۷۱/۲۵۷۱ قسمت در میلیون محاسبه گردید (جدول ۵).  
بچه ماهیان کپور معمولی در معرض شش غلظت اسانس گل میخک و MS222 (۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰ و ۴۰۰ میلی گرم در لیتر) قرار گرفتند (جدول ۳).

## Archive of SID

جدول ۳: اثر کشنده غلظت‌های مختلف اسانس گل میخک و MS222 در ماهی کپور معمولی

| غلظت (قسمت در میلیون) | دارو          | تعداد ماهی | بازماندگی | درصد تلفات |
|-----------------------|---------------|------------|-----------|------------|
| ۱۵۰                   | اسانس گل میخک | ۲۰         | ۲۰        | ۰          |
|                       | MS222         | ۲۰         | ۲۰        | ۰          |
| ۲۰۰                   | اسانس گل میخک | ۲۰         | ۱۶        | ۲۰         |
|                       | MS222         | ۲۰         | ۱۵        | ۲۵         |
| ۲۵۰                   | اسانس گل میخک | ۲۰         | ۱۲        | ۴۰         |
|                       | MS222         | ۲۰         | ۱۲        | ۴۰         |
| ۳۰۰                   | اسانس گل میخک | ۲۰         | ۱۱        | ۴۵         |
|                       | MS222         | ۲۰         | ۱۰        | ۵۰         |
| ۳۵۰                   | اسانس گل میخک | ۲۰         | ۳         | ۸۵         |
|                       | MS222         | ۲۰         | ۶         | ۷۰         |
| ۴۰۰                   | اسانس گل میخک | ۲۰         | ۱         | ۹۵         |
|                       | MS222         | ۲۰         | ۰         | ۱۰۰        |

مقدار LC50 برای جدول ۳ در مورد اسانس گل میخک ۰/۲۸۲/۲۷۱ با حد بالای ۲۹۷/۸۷۹۸ و حد پایین ۲۴۶/۵۹۷۱ قسمت در میلیون و در مورد MS222 ۲۷۲/۴۰۴۱ با حد بالای ۳۰۱/۸۸۵۹ و حد پایین ۲۴۵/۸۰۱۴ قسمت در میلیون محاسبه گردید (جدول ۵).

بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان در معرض پنج غلظت اسانس گل میخک و MS222 (۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) قرار داده شدند (جدول ۴).

## Archive of SID

جدول ۴: اثر کشنده غلظتهای مختلف اسانس گل میخک و MS222 در قزل آلای رنگین کمان

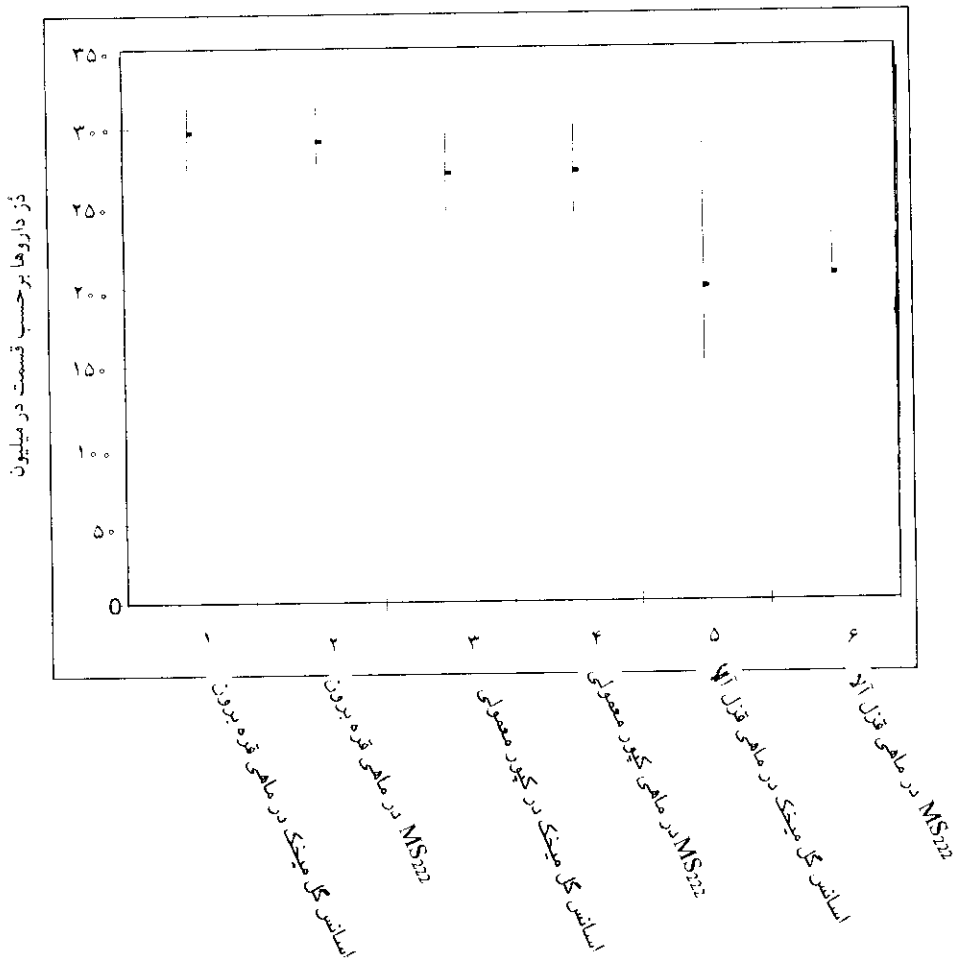
| غلظت (قسمت در میلیون) | دارو          | تعداد ماهی | بازماندگی | درصد تلفات |
|-----------------------|---------------|------------|-----------|------------|
| ۱۰۰                   | اسانس گل میخک | ۲۰         | ۲۰        | ۰          |
|                       | MS222         | ۲۰         | ۲۰        | ۰          |
| ۱۵۰                   | اسانس گل میخک | ۲۰         | ۱۹        | ۵          |
|                       | MS222         | ۲۰         | ۱۶        | ۲۰         |
| ۲۰۰                   | اسانس گل میخک | ۲۰         | ۹         | ۵۵         |
|                       | MS222         | ۲۰         | ۱۲        | ۴۰         |
| ۲۵۰                   | اسانس گل میخک | ۲۰         | ۸         | ۶۰         |
|                       | MS222         | ۲۰         | ۸         | ۶۰         |
| ۳۰۰                   | اسانس گل میخک | ۲۰         | ۱         | ۹۵         |
|                       | MS222         | ۲۰         | ۰         | ۱۰۰        |

مقدار LC50 برای جدول ۴ در مورد اسانس گل میخک ۱۹۹/۴۸۷۹ با حد بالای ۲۹۰/۶۷۱۸ و حد پایین ۱۳۶/۹۰۴۸ قسمت در میلیون و در مورد MS222 ۲۰۷/۱۲۳ با حد بالای ۲۳۲/۵۱۶۸ و حد پایین ۱۸۴/۵۰۲۶ قسمت در میلیون محاسبه گردید (جدول ۵).

جدول ۵: LC50 و حدود بالا و پایین آن با حذف ارقام قابل اغماض اعشاری

| ردیف | موضوع                          | LC50 | حد بالا | حد پایین |
|------|--------------------------------|------|---------|----------|
| ۱    | اسانس گل میخک در ماهی قره برون | ۲۹۷  | ۳۲۱     | ۲۷۴      |
| ۲    | MS222 در ماهی قره برون         | ۲۹۱  | ۳۱۳     | ۲۷۱      |
| ۳    | اسانس گل میخک در کپور معمولی   | ۲۷۱  | ۲۹۷     | ۲۴۶      |
| ۴    | MS222 در ماهی کپور معمولی      | ۲۷۲  | ۳۰۱     | ۲۴۵      |
| ۵    | اسانس گل میخک در ماهی قزل آلا  | ۱۹۹  | ۲۹۰     | ۱۳۶      |
| ۶    | MS222 در ماهی قزل آلا          | ۲۰۷  | ۲۳۲     | ۱۸۴      |

همانگونه که در نمودار ۱ مشاهده می شود با در نظر گرفتن هم پوشانی هر سری از مقادیر LC<sub>50</sub> با سری ها دیگر، تنها بین مقادیر LC<sub>50</sub> داروی MS<sub>222</sub> در ماهی قزل آلا با LC<sub>50</sub> داروها در دو گونه دیگر اختلاف معنی دار مشاهده می گردد.



نمودار ۱: مقایسه مقادیر و حدود LC<sub>50</sub> در ماهیان مورد آزمایش

## بحث

در مقایسه و تعیین ارجحیت داروها لازمست کیفیت اثر، اثرات سمی و جانبی، پایداری دارو در شرایط محیط نگهداری، سهولت تهیه و کاربرد و خصوصاً در مصارف دام و آبزیان قیمت آنها را مورد توجه قرار داد. در مطالعه سمیت دارو با استفاده از روشهای محاسبه کمی داروشناسی می توان معیارهایی برای مقایسه بدست آورد. این معیارها بسته به هدف پژوهش، علائم و اثرات معینی از دارو را مد نظر قرار می دهند که می تواند شامل فعالیت قلب و دستگاه گردش خون، حرکات تنفسی، واکنشهای عصبی و رفتاری، عملکرد دستگاه دفعی یا سایر اعمال فیزیولوژیک موجود زنده باشد. در مطالعات جانوری و خصوصاً آبزیان، میان اثرات محتمل دارو یا سم، اثرکشندگی بلحاظ قطعی بودن و دقت آن کاربرد وسیع تری دارد (Gary, 1995).

در تحقیق حاضر بمنظور تکمیل اطلاعات و ارزیابی مقایسه‌ای دو داروی بیهوشی MS222 که کاربرد وسیعی در عملیات آبی پروری ایران و جهان دارد و اسانس گل میخک که در سالهای اخیر کاربرد آن در برخی کشورها مطرح و در ایران مطالعاتی برای تولید و معرفی آن انجام شده، LC50 زمان القای بیهوشی در شرایط یکسان و همزمان در سه نماینده گروههای اصلی ماهیان پرورشی ایران محاسبه گردید.

ارقام بدست آمده را از دو دیدگاه می توان مورد تجزیه و تحلیل قرار داد. دیدگاه اول جستجوی اختلافات کاربردی در دوز کشنده دو داروست. در این حالت با توجه به اختلاف ناچیز اسانس گل میخک و MS222 در هر گونه که در هیچیک از موارد از ۱۰ ppm فراتر نمی رود، تفاوت عملی در سمیت دو داروی مورد مطالعه مشاهده نمی گردد. در عین حال اختلاف محسوسی در حساسیت کپور معمولی به داروهای بیهوشی نسبت به قه‌برون و اختلاف قابل توجهی بین ماهی قزل آلا و دو گونه دیگر دیده می شود.

از دید آماری و ریاضی با دخالت دادن حدود بالا و پائین مقادیر LC50 با سطح اعتماد ۹۵

درصد که در محاسبه آنها تعداد ماهیان مورد آزمایش منظور شده است، با توجه به هم پوشانی سریهای ارقام مربوط به دو دارو در هر گونه، اختلاف معنی داری در سمیت داروهای مورد مقایسه مشاهده نشد. MS<sub>222</sub> LC<sub>50</sub> در ماهی قزل آلا (۲۰۷ ppm) اختلاف معنی داری با LC<sub>50</sub> دو دارو در کپور و قره برون (۲۷۲ و ۲۷۱، ۲۹۱ و ۲۹۷) نشان می دهد.

یافته دیگر این تحقیق که می تواند دارای ارزش و اهمیت باشد، مقایسه آسیب پذیری گروههای مختلف ماهیان در معرض دو داروی اصلی بیهوشی است. طبق ارقام بدست آمده می توان گفت ماهی قزل آلا ی رنگین کمان قابلیت کمتری در معارضا با اثرات سمی داروهای بیحس کننده دارد.

نکته قابل توجه در مبحث حاضر آنست که LC<sub>50</sub> جنبه های کمی اثر دارو را مورد توجه قرار می دهد، حال آنکه کیفیت اثر داروهای بیهوشی و روند ایجاد بیهوشی باید در کنار اثرات سمی ملاک قضاوت در مورد دارو قرار گیرد. آنچنانکه در *Pomacentrus amboinensis* مشاهده شده، القای بیهوشی با اسانس گل میخک آرامتر و سرعت بازگشت از بیهوشی طولانی تر از چند ترکیب شیمیائی نظیر کینالدین، بنزوکائین و ... است (Mudy & Wilson, 1997).

## تشکر و قدردانی

از آقای دکتر سلطانی بواسطه کمکهای علمی و فنی، نهایت تشکر و قدردانی بعمل می آید. این تحقیق با استفاده از امکانات کارگاههای شهید رجایی و شهید باهنر انجام شده است. نگارندگان نهایت امتنان خود را از همکاران و کارشناسان مراکز فوق ابراز می دارند.

- چیت ساز، ح.، ۱۳۷۹. مطالعه اثرات بیهوشی گل میخک (عصاره و اسانس) در ماهی قزل آلاي رنگین کمان. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس. ۷۴ صفحه.
- فینی، دی. جی، ۱۹۶۴. روشهای آماری در عیارگیری زیستی. ترجمه: و نهاپتیان و ح. ملک افصلی. چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران. صفحات ۴۳۹ تا ۴۵۰.
- قیومی، ر.، ۱۳۷۹. مطالعه اثرات بیهوشی گل میخک (عصاره و اسانس) در ماهی کپور. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس. ۷۲ صفحه.
- محمدی آرانی، م.، ۱۳۷۹. مطالعه اثرات بیهوشی گل میخک (عصاره و اسانس) در ماهی قره برون. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس. ۸۲ صفحه.
- مخیر، ب.، ۱۳۷۲. بیهوشی و جراحی در تاسماهیان. مجله علمی شیلات ایران، شماره ۱۴، صفحات ۲ تا ۸.
- Gray, M. Rand, 1995. Fundamentals of aquatic toxicology, Taylor & Francis Pub. Washington, USA. pp.28-29.
- Keene, J.S. ; Noakes, O.L.G. ; Moccia, R.D. and Soto, C.G. , 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture Research. Vol. 29, pp.89-101.
- Munday, P.L. and Wilson, S.K. , 1997. Comparative efficiency of clove oil and other chemicals in anesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. Journal of fish Biology. Vol. 51, pp.931-938.

Soto, C.G. and Burhanuddin, 1994. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbit fish (*Siganus lineaceus*). Aquaculture. Vol. 135, pp.149-152.