

丁香油不同使用方式对克氏原螯虾麻醉效果的影响

姜京京¹, 张成锋², 韩财安³, 田灿⁴, 张平⁵, 徐增洪²,
高杨¹, 苏胜彦^{1,2*}, 唐永凯^{1,2*}

(1. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部稻渔综合种养生态重点实验室, 江苏 无锡 214081; 3. 江西生物科技职业学院, 江西 南昌 330220; 4. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306; 5. 睢宁县农业农村局, 江苏 徐州 221200)

摘要:为减少克氏原螯虾 *Procambarus clarkii* 在实际生产和科学研究过程中人为操作造成的应激损伤, 选择丁香油-乙醇溶液作为麻醉剂, 将丁香油和乙醇溶液按体积比为 1 : 1.5 混合溶解后再溶于水, 配制成不同浓度的麻醉剂 (1~8 g/L, 8~20 g/L), 使用喷洒和浸浴方式麻醉不同规格 (6.17 g±0.20 g、29.54 g±0.30 g) 的克氏原螯虾, 通过观察麻醉时间、行为学特征, 以及测定耗氧率和氧化应激指标等, 分析了丁香油-乙醇溶液的麻醉效果。结果表明: 随着麻醉剂浓度的升高, 克氏原螯虾麻醉时间缩短, 复苏时间延长, 小规格和大规格克氏原螯虾浸浴麻醉的丁香油-乙醇适宜浓度分别为 8、20 g/L, 喷洒麻醉的适宜浓度分别为 4、16 g/L; 喷洒麻醉效果显示, 螯足的行为和形态特征可作为评判标准, 将麻醉分为 4 个阶段; 两种麻醉方式均显著降低了虾的耗氧率 ($P<0.05$), 麻醉效果显著, 且喷洒麻醉的虾耗氧率及 SOD、CAT 酶活性均显著低于浸浴麻醉 ($P<0.05$)。研究表明, 喷洒和浸浴两种方式均可用于克氏原螯虾麻醉, 与浸浴麻醉相比, 体表喷洒麻醉显著降低了克氏原螯虾的耗氧率, 对个体鳃组织应激损伤较小, 麻醉效果更好。

关键词:克氏原螯虾; 丁香油; 浸浴麻醉; 喷洒麻醉; 耗氧率

中图分类号: S 948

文献标志码: A

克氏原螯虾 *Procambarus clarkii* 俗称小龙虾, 因其肉质紧实、味道鲜美, 深受消费者喜爱, 随着市场需求量不断增加, 克氏原螯虾已然成为淡水养殖重要经济品种之一^[1]。在克氏原螯虾的实际生产和科学研究过程中, 经常需要离水操作, 不可避免地造成虾体损伤, 从而影响研究结果和后期存活率。为减少人为操作引起克氏原螯虾应激而造成虾体损伤, 需要科学合理地使用麻醉剂。

目前, 常见的渔用麻醉剂主要包括 MS-222、丁香油、2-苯氧乙醇和二氧化碳等^[2]。丁香油由多种天然植物提取, 为淡黄色或无色的透明状液体, 不溶于水, 易溶于醇、醚或冰醋酸, 带有特殊的香气^[3], 作为典型的温和麻醉剂, 因其安全廉价, 被广泛应用于生物、医学等领域的研究中^[4]。研究表明, 丁香油和乙醇混合制成溶液具有较强的麻醉效果, 丁香油和乙醇按体积比为 1 : 1.5 混合溶

解是达到饱和浓度的最小体积^[5], 同时减少了乙醇用量。麻醉的方式有多种, 不同方式的麻醉使用效果存在明显差异^[6-7]。对鱼类的研究显示, 鱼鳃部喷洒麻醉诱导时间较浸浴法短^[8], 说明喷洒麻醉可以提供满意的麻醉效果。因水产动物生活在水中, 麻醉多采用浸浴的传统方式, 以最大程度地减轻对个体的伤害^[9], 如徐滨等^[10]采用浸浴麻醉的方式, 将 MS-222、丁香油等麻醉剂应用于克氏原螯虾的生产和选育过程的研究中。但克氏原螯虾在生产和科研过程中多为脱水状态, 体表喷洒麻醉能够有效降低其新陈代谢, 同时方便操作。本试验中, 研究了丁香油-乙醇溶液不同浓度和不同使用方式对克氏原螯虾的麻醉效果的影响, 以期确定克氏原螯虾适宜的麻醉方式和浓度, 为减少克氏原螯虾在实际生产和科学研究中人为操作的损伤、提高存活率提供科学参考。

收稿日期: 2021-10-14

基金项目: 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心基本科研业务费资助 (2021JBFM21); 中国水产科学研究院基本科研业务费资助 (2022XT0101); 江苏省种业振兴揭榜挂帅项目 (JBGS [2021] 123)

作者简介: 姜京京 (1996—), 女, 硕士研究生。E-mail: 1256052154@qq.com

通信作者: 苏胜彦 (1982—), 男, 博士, 副研究员。E-mail: ouhaicourse@hotmail.com

唐永凯 (1978—), 男, 博士, 研究员。E-mail: tangyk@frc.cn

1 材料与方法

1.1 材料

克氏原螯虾购自湖南省岳阳市水产研究所和江苏盱眙龙虾产业发展股份有限公司。用曝气自来水将虾刚好浸没, 暂养在透明玻璃缸(30 cm×15 cm×15 cm)内。挑选体表完整、反应敏捷的2种规格健康虾为试验用虾, 各100只, 体质量分别为(6.17±0.20)、(29.54±0.30) g。

丁香油和乙醇购自国药集团化学试剂有限公司。采用 Loligo®·Systems 鱼类及水生无脊椎动物呼吸代谢测量系统和 FireSting O₂ 装置进行溶氧量测定。

1.2 方法

1.2.1 浸浴麻醉试验 丁香油和乙醇按体积比为1:1.5混合溶解后再溶于曝气的自来水, 水温为(20±1)℃, pH为7.5±0.1。设置质量浓度为4、6、8、10 g/L的4组丁香油-乙醇溶液对小规格虾进行麻醉, 设置质量浓度为10、16、20、24 g/L的4组丁香油-乙醇溶液对大规格虾进行麻醉。将克氏原螯虾放入麻醉溶液中, 溶液刚好浸没虾体。每个浓度设置3个平行, 每个平行放6只虾, 并设置空白对照。待完全麻醉后, 将虾反复冲洗几次后放入曝气水中, 观察虾的行为, 克氏原螯虾麻醉和复苏阶段的行为特征判断参考Takahashi等^[11]的方法, 记录麻醉、复苏时间, 24 h后记录存活率。

1.2.2 喷洒麻醉试验 设置质量浓度为1、2、4、8 g/L的4组丁香油-乙醇溶液对小规格虾进行麻醉, 设置质量浓度为8、10、16、20 g/L的4组丁香油-乙醇溶液对大规格虾进行麻醉, 丁香油-乙醇的配比、平行组和对照的设置同浸浴麻醉试验。将虾放入干燥的塑料盒中, 使用装有混合麻醉溶液的喷壶, 对克氏原螯虾体表均匀喷洒1 min, 观察虾的行为, 记录麻醉、复苏时间, 24 h后记录存活率。

1.2.3 耗氧率的测定 分别采用8、4 g/L丁香油-乙醇溶液浸浴和喷洒麻醉小规格克氏原螯虾, 待完全麻醉, 将虾反复冲洗后快速放入呼吸室中, 实时监测溶氧量, 计算耗氧率, 同时对未进行麻醉操作的克氏原螯虾进行耗氧率测定, 作为空白对照。耗氧率计算公式为

$$R = (DO_0 - DO_t) \times V / (W \times t)$$

其中: R 为耗氧率(mg/(kg·h)); DO_0 、 DO_t 分别为试验开始和结束时水中溶解氧的含量(mg/L); W 为试验动物湿质量(kg); V 为呼吸室水体积(L); t 为试验用时(h)。

1.2.4 氧化应激指标的测定 分别采用20、16 g/L丁香油-乙醇溶液浸浴和喷洒麻醉大规格克氏原螯虾, 待完全麻醉, 将虾反复冲洗后转移至曝气水中复苏, 分别于0、1、3、6、12、24 h后取血液和鳃组织样品。将血液于4℃下静置24 h, 离心取上清液; 取鳃样本约0.1 g, 在900 μL体积分数为0.85%的生理盐水中均质, 4℃下匀浆, 以2 500 r/min离心10 min, 弃上脂层, 收集上清。采用南京建成生物科技有限公司的试剂盒测定血清和鳃组织中的超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性。

1.3 数据处理

采用SPSS 26.0软件进行单因素方差分析, 用 t 检验法分析组间差异, 显著性水平设为0.05。

2 结果与分析

2.1 不同浓度麻醉剂对克氏原螯虾的麻醉效果

2.1.1 浸浴麻醉效果 在水温为(20±1)℃下, 以不同浓度的丁香油-乙醇溶液对克氏原螯虾进行浸浴麻醉。结果显示, 丁香油-乙醇质量浓度为8、20 g/L时, 分别在7.8、4.5 h能够快速麻醉小规格和大规格的克氏原螯虾, 复苏时间均达到30 min以上, 2种虾的存活率均为100%(表1)。

表1 浸浴麻醉克氏原螯虾的麻醉与复苏时间及存活率

Tab.1 Anesthesia, recovery time and survival rate of the red swamp crayfish *Procambarus clarkia* with immersion bath

克氏原螯虾 <i>P. clarkia</i>	麻醉剂质量浓度/(g·L ⁻¹) anesthetic concentration	完全麻醉时间/ min total anesthesia time	复苏时间/ min recovery time	存活率/ % survival rate
小规格 small	4	14.2	18.4	100
	6	11.3	24.6	100
	8	7.8	>30	100
	10	5.9	>30	33
大规格 large	10	12.3	18.1	100
	16	8.1	26.5	100
	20	4.5	>30	100
	24	3.6	>30	50

2.1.2 喷洒麻醉效果 在室温和水温为(20±1)℃下, 以不同浓度的丁香油-乙醇溶液对克氏原螯虾进行喷洒麻醉。结果显示, 随着浓度升高, 完全麻醉时间逐渐缩短, 丁香油-乙醇质量浓度为4、16 g/L时, 分别在6.4、5.4 h时能够快速麻醉小规格和大规格克氏原螯虾, 且复苏时间均达到

30 min以上, 2 种虾的存活率均为 100% (表 2)。

表 2 喷洒麻醉克氏原螯虾的麻醉与复苏时间及存活率

Tab. 2 Anesthesia, recovery time and survival rate of the red swamp crayfish *Procambarus clarkia* with sprinkling anesthesia

克氏原螯虾 <i>P. clarkia</i>	麻醉剂质量浓度/ (g · L ⁻¹) anesthesia concentration	完全麻醉时间/ min total anesthesia time	复苏时间/ min recovery time	存活率/ % survival rate
	1	10.6	14.7	100
小规格 small	2	8.2	21.8	100
	4	6.4	>30	100
	8	5.8	>30	50
大规格 large	8	11.3	13.2	100
	10	8.4	20.5	100
	16	5.4	>30	100
	20	4.6	>30	33

2.2 克氏原螯虾麻醉后的行为特征

克氏原螯虾的浸浴麻醉行为特征同对虾^[12]。而在对克氏原螯虾进行喷洒麻醉过程中, 开始虾反应剧烈, 倒退或立螯; 随后缓慢爬行, 并左右失去平衡, 螯足弯曲且左右不对称; 然后缩在角落, 用玻璃棒拨动, 对机械刺激反应迟钝, 螯足平直并张开一定角度; 最后静止不动, 对机械刺激无反应, 螯足平直无力与身体平行, 螯足两指闭合 (图 1)。

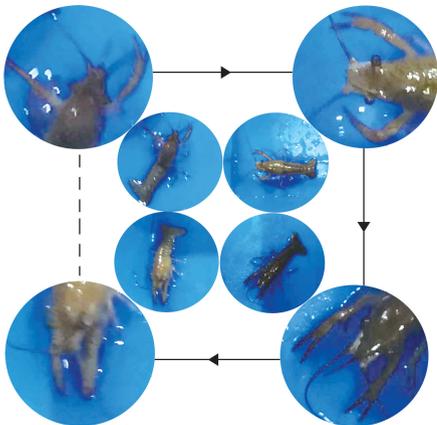
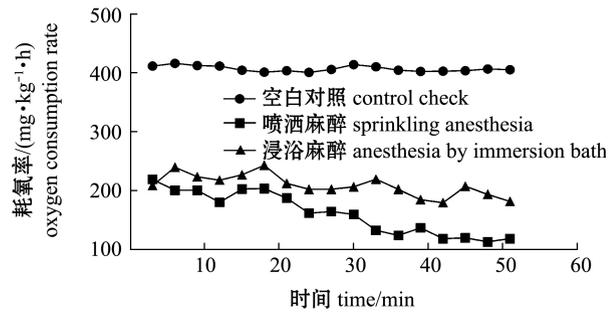


图 1 喷洒麻醉后克氏原螯虾的形态特征

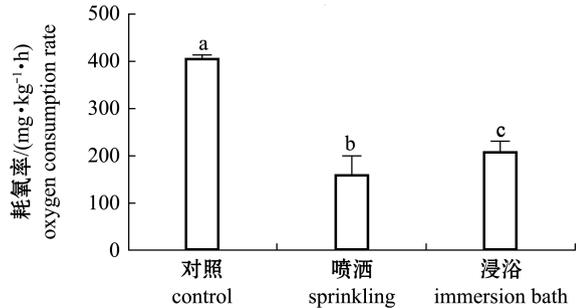
Fig. 1 Morphological characteristics of red swamp crayfish *Procambarus clarkii* after sprinkling anesthesia

2.3 不同麻醉方式下的耗氧率

从图 2 可见: 与对照组相比, 2 种麻醉处理显著降低了克氏原螯虾的耗氧率 ($P < 0.05$), 且喷洒麻醉的耗氧率显著低于浸浴麻醉 ($P < 0.05$); 随着麻醉时间的延长, 浸浴麻醉组的耗氧率变化不大, 而喷洒麻醉组耗氧率则不断降低。



(a) 耗氧率变化 change in oxygen consumption rate



(b) 耗氧率平均值 average of oxygen consumption rate

标有不同字母者表示组间有显著性差异 ($P < 0.05$)。

The means with different letters are significantly different in the groups at the 0.05 probability level.

图 2 浸浴、喷洒麻醉对克氏原螯虾耗氧率的影响

Fig. 2 Effects of anesthesia of immersion bath and spraying on oxygen consumption rate of red swamp crayfish *Procambarus clarkia*

2.4 不同麻醉方式下的氧化应激

从表 3 可见: 与对照组相比, 2 种麻醉处理显著升高了克氏原螯虾体的 SOD 和 CAT 活性 ($P < 0.05$); 2 种方式的麻醉处理组间 SOD 和 CAT 活性无显著性差异 ($P > 0.05$), 而鳃组织中, 喷洒麻醉

表 3 不同麻醉处理组间 SOD、CAT 酶活力差异

Tab. 3 Difference in SOD and CAT activities between different anesthesia treatment groups

麻醉方式 anesthesia	超氧化物歧化酶 SOD/ (U · mL ⁻¹) or (U · mg ⁻¹ prot)		过氧化氢酶 CAT/ (U · mL ⁻¹) or (U · mg ⁻¹ prot)	
	血清 serum	鳃 gill	血清 serum	鳃 gill
喷洒麻醉 sprinkling	28.44 ± 3.62 ^a	2.90 ± 1.32 ^a	13.40 ± 4.04 ^a	3.78 ± 1.13 ^a
浸浴麻醉 immersion bath	30.68 ± 1.55 ^a	7.86 ± 2.74 ^b	14.50 ± 4.05 ^a	8.93 ± 4.17 ^b
对照 control	18.24 ± 3.35 ^b	1.21 ± 2.93 ^c	5.87 ± 1.21 ^b	1.62 ± 1.03 ^c

注: 同列中标有不同字母者表示组间有显著性差异 ($P < 0.05$), 标有相同字母者表示组间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

Note: The means with different letters within the same column are significantly different in the groups at the 0.05 probability level, and the means with the same letter within the same column are not significant differences.

处理组的 SOD、CAT 酶活性显著低于浸浴麻醉组 ($P < 0.05$)。

从图 3 可见, 麻醉处理后 0~3 h 时, 浸浴和喷洒麻醉组血清 CAT 活性增强, 随后被抑制, 而 SOD 活性则在 0~6 h 时增强, 随后被抑制。

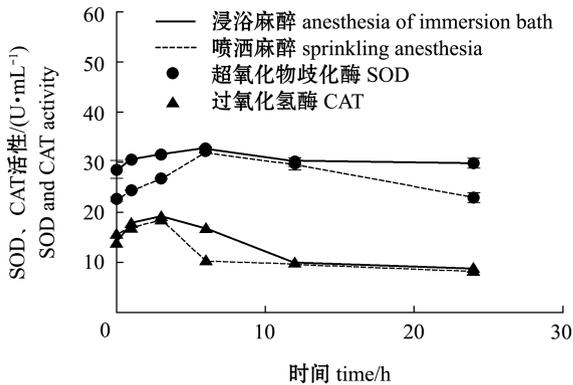


图 3 不同麻醉处理组血清酶活力的变化

Fig. 3 Changes in serum enzyme activity between different anesthesia treatment groups

3 讨论

3.1 喷洒麻醉阶段行为特征判断标准——螯足

甲壳类动物的螯足虽在形态上笨重, 但执行着防御、威胁和获取食物等多种功能^[11]。甲壳类行为由神经调控。研究显示, 神经细胞的数量与附肢的活动量成正比, 而在附肢中螯足的神经细胞数量最多, 排列也最紧密^[13-14], 因此, 通过螯足的活动状态可相对准确地反映神经系统活跃强度。麻醉剂主要是通过影响中枢神经系统麻痹个体, 使行动减缓、耗氧降低^[15], 理论上可通过螯足的形态来判断麻醉效果。本研究的喷洒麻醉过程中, 不同麻醉阶段克氏原螯虾的螯足表现出不同的形态特征, 表明螯足的行为特征可作为判断麻醉效果的标准。

3.2 呼吸方式的转变对麻醉效果的影响

理论上, 丁香油-乙醇溶液浓度越高, 完全麻醉时间越短^[16-17], 当个体接触麻醉溶液后, 细胞膜受到氧化应激, SOD 和 CAT 酶将超氧阴离子 ($\cdot O_2^-$) 转化为 H_2O 和 O_2 , 消除了自由基的不利影响, 从而达到保护机体作用, 因此, 其酶活性的变化也可反映出细胞氧化损伤的程度^[18]。本试验中, 浸浴麻醉和喷洒麻醉处理组血清中的 SOD 和 CAT 活性无显著性差异, 但鳃组织中两组间酶活性差异显著, 而鳃是呼吸的重要组织, 这说明两种麻醉方式作用路径不同。两栖动物幼体在水中用鳃呼吸, 成体可在陆地生存, 依靠肺和皮肤呼吸, 实

现了呼吸方式的转变。Morris^[19] 研究发现, 圣诞岛红蟹 *Gecarcoidea natalis* 通过肺或鳃双重循环, 两者间的分流可能取决于呼吸介质或运动状态。许多物种, 包括一些擅长呼吸空气的物种, 通过增厚甲壳素层, 有效地硬化鳃, 并在鳃上增加专门增厚的区域, 以帮助防止板层黏附来改变鳃, 这种鳃的改变在蟹中均发生过^[20]。而克氏原螯虾可长时间脱水生存, 鳃可能已发生改变以适应呼吸空气及通过体表辅助呼吸。因此, 浸浴麻醉和喷洒麻醉效果的差异, 可能来源于呼吸方式的转变。

3.3 麻醉方式的选择

鳃是鱼体重要的多功能组织, 参与呼吸、酸碱平衡、离子平衡、含氮废物排泄和渗透压调节等过程。鳃与环境直接接触, 具有表面积大、化学物质吸收率高的特点, 因此, 鳃是水生污染物和药物的主要靶器官之一, 并且鳃较易受损伤, 常会导致水生动物生长速度降低或大量死亡。本试验中, 浸浴麻醉达到适宜麻醉效果所需的麻醉剂浓度较高, 且鳃组织中 2 种应激酶活性较喷洒麻醉显著升高, 表明浸浴麻醉处理组克氏原螯虾鳃组织氧化损伤较严重。丁香油降低耗氧率的方式主要是通过减缓体内代谢和鳃运动输氧能力, 麻醉处理后, 水产动物行动减缓, 耗氧率降低, 且麻醉程度越深, 耗氧率就越低^[21]。本试验中, 喷洒麻醉的克氏原螯虾耗氧率在麻醉过程中明显低于浸浴麻醉的虾, 这说明喷洒麻醉程度较深。丁香油不溶于水而溶于乙醇, 将丁香油-乙醇混合溶液溶于水后浸浴麻醉克氏原螯虾, 随着时间延长, 乙醇挥发, 丁香油与水分离, 漂浮在水表面并挥发, 麻醉效果逐渐减弱^[22], 而喷洒可使丁香油和乙醇附在克氏原螯虾体表, 而乙醇能够加速外用药物的吸收^[23], 通过作用于神经、脊髓, 使之进入深度镇静, 呼吸减弱。温度影响丁香油的麻醉诱导效果及恢复时间^[24], 本试验中, 喷洒麻醉的克氏原螯虾暴露在空气中, 而浸浴麻醉在水中, 两者存在温差, 麻醉效果也有所不同, 但本实验室室温与水温均在 20 °C 左右。因此, 作为可长时间暴露于空气的甲壳类, 喷洒麻醉相对于浸浴麻醉效果更好, 具体机理还有待进一步研究。

3.4 耗氧率与抗氧化应激指标的相关性

活性氧的产生来源于氧化代谢和 ATP 的合成, 是氧正常代谢产生的副产物。庄平等^[25] 研究发现, 中华鲟幼鱼经不同浓度丁香酚麻醉后, 耗氧率均呈先升高后降低的趋势, 其原因是低浓度的麻醉剂对

鱼体产生胁迫作用,活动能力增强,呼吸频率加快,而后在麻醉剂持续作用下进入麻醉的各个时期,随麻醉程度加深,耗氧率变低。与此结果一致,本研究中,不同麻醉处理方式均能显著降低克氏原螯虾的耗氧率,且麻醉程度越深,耗氧率越低。由于细胞内活性氧主要在线粒体中产生,同时线粒体为氧化应激损伤的主要细胞器,进而导致细胞氧供不足,有研究显示,缺氧条件下鱼类降低代谢率以适应环境,表现为耗氧率降低^[26]。同时,当细胞受到氧化应激时,SOD和CAT活性增强,以消除自由基的不利影响,从而达到保护机体作用,可见耗氧率与氧化应激指标存在线性关联。本试验中,麻醉处理后0~1h时,SOD和CAT活性均增强,耗氧率下降,验证了这一说法。

4 结论

1) 随着丁香油-乙醇麻醉溶液浓度升高,克氏原螯虾个体麻醉时间缩短,复苏时间延长。

2) 喷洒和浸浴两种麻醉方式均显著降低了克氏原螯虾的耗氧率,表明两种方式均可用于克氏原螯虾的麻醉,但与浸浴麻醉相比,体表喷洒麻醉可显著降低克氏原螯虾耗氧率,且对个体鳃组织应激损伤也较小,表明麻醉效果相对更好。

参考文献:

- [1] XU Z Q,GAO T H,XU Y,et al.A chromosome-level reference genome of red swamp crayfish *Procambarus clarkii* provides insights into the gene families regarding growth or development in crustaceans[J].Genomics,2021,113(5):3274-3284.
- [2] VELÍŠEK J,STEJSKAL V,KOŮŘIL J,et al.Comparison of the effects of four anaesthetics on biochemical blood profiles of perch[J].Aquaculture Research,2009,40(3):354-361.
- [3] 梁政远,安丽娜,缪凌鸿,等.丁香油对鲤鱼和罗非鱼的麻醉作用[J].水产学杂志,2009,22(1):42-46.
LIANG Z Y,AN L N,MIAO L H,et al.The anaesthesia effect of clove oil on common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus) and tilapia (*Oreochromis* spp.) [J]. Chinese Journal of Fisheries, 2009, 22 (1): 42-46. (in Chinese)
- [4] TAYLOR P W,ROBERTS S D.Clove oil:an alternative anaesthetic for aquaculture[J].North American Journal of Aquaculture,1999,61(2):150-155.
- [5] 张宁,马庆男,苏胜彦,等.丁香油和乙醇混合液对福瑞鲤的麻醉效果[J].广东海洋大学学报,2012,32(1):92-96.
ZHANG N,MA Q N,SU S Y,et al.Anesthetic effect of clove oil and alcohol mixture on furui carp[J].Journal of Guangdong Ocean University,2012,32(1):92-96.(in Chinese)
- [6] FIRDAUS R,SUKMONO B,MELATI A C,et al.Comparison between vapocoolant spray and eutectic mixture of local anesthetics cream in reducing pain during spinal injections[J].Anesthesiology

- Research and Practice,2018,2018:5050273.
- [7] CHAN C K O,FOK K L,POON C M.Flavored anesthetic lozenge versus Xylocaine spray used as topical pharyngeal anesthesia for unsedated esophagogastroduodenoscopy;a randomized placebo-controlled trial[J].Surgical Endoscopy,2010,24(4):897-901.
- [8] BOIJINK C L,MACIEL P O,TAVARES-DIAS M,et al.Anesthesia by sprinkling method in the gills of tambaqui *Colossoma macropomum* does not influence intensity and morphology of monogeneans [J].Brazilian Journal of Biology,2017,77(2):367-371.
- [9] 徐滨,魏开金,朱祥云,等.MS-222和丁香酚对克氏原螯虾幼虾耗氧率、排氨率及窒息点的影响[J].大连海洋大学学报,2018,33(4):455-459.
XU B,WEI K J,ZHU X Y,et al.Effects of MS-222 and clove oil on oxygen consumption rate, ammonia excretion rate and asphyxial point of red swamp crayfish *Procambarus clarkii* [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2018, 33(4): 455-459. (in Chinese)
- [10] 罗晶晶,韩典峰,孙玉增,等.丁香酚对罗非鱼的麻醉效果[J].河北渔业,2018(3):5-8,42.
LUO J J,HAN D F,SUN Y Z,et al.Anaesthetic effect of eugenol on tilapia[J].Hebei Fisheries,2018(3):5-8,42.(in Chinese)
- [11] TAKAHASHI N,TAKAHATA M.Food-rewarded conditioning and neurophysiological analysis of cheliped gripping behavior in crayfish[J].Physiology & Behavior,2017,180:159-169.
- [12] 平洪领,史会来,余方平,等.MS-222对日本对虾麻醉效果的研究[J].水产养殖,2018,39(4):1-4,8.
PING H L,SHI H L,YU F P,et al.The anaesthesia effects of MS-222 for *Penaeus japonicus* [J]. Journal of Aquaculture, 2018, 39 (4): 1-4, 8. (in Chinese)
- [13] 赵云龙,李红,王群,等.中华绒螯蟹神经细胞和胶质细胞的光镜及电镜观察[J].动物学研究,1999,20(6):411-414.
ZHAO Y L,LI H,WANG Q,et al.An optical and transmission electron microscope study on neuron and glial cells of ganglion in crab, *Eriocheir sinensis* [J]. Zoological Research, 1999, 20 (6): 411-414. (in Chinese)
- [14] 叶海辉,李少菁,金朱兴,等.锯缘青蟹胸神经团的组织学研究[J].厦门大学学报(自然科学版),2002,41(4):502-505.
YE H H,LI S J,JIN Z X,et al.Histological study on the thoracic ganglion mass of the mud crab, *Scylla serrata* [J]. Journal of Xiamen University (Natural Science Edition), 2002, 41 (4): 502-505. (in Chinese)
- [15] 李博岩,陆曼,焦亚琴,等.常用鱼类麻醉剂及其作用机理研究进展[J].生物学教学,2017,42(2):7-10.
LI B Y,LU M,JIAO Y Q,et al. Research progress on common fish anesthetics and their mechanism of action [J]. Biology Teaching, 2017, 42(2): 7-10. (in Chinese)
- [16] MCCORD C L,WHITELEY E,LIANG J,et al. Concentration effects of three common fish anesthetics on Pacific hagfish (*Eptatretus stoutii*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2020, 46 (3): 931-943.
- [17] HUR J W,GIL H W,CHOI S H,et al.Anesthetic efficacy of clove oil and the associated physiological responses in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Aquaculture Reports, 2019, 15: 100227.

- [18] 徐滨,庄平,章龙珍,等.电麻醉与化学麻醉对施氏鲟幼鱼麻醉效果的比较[J].上海水产大学学报,2008,17(5):539-546.
XU B,ZHUANG P,ZHANG L Z, et al.Comparison of anaesthetic effects of the electroanesthesia and chemical anesthesia to juvenile *Acipenser schrenckii*[J].Journal of Shanghai Fisheries University, 2008,17(5):539-546.(in Chinese)
- [19] MORRIS S.The ecophysiology of air-breathing in crabs with special reference to *Gecarcoidea natalis*[J].Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2002,131(4):559-570.
- [20] VAN AARDT W J.Aerial and aquatic respiration in the river crab *Potamonautes warreni* calman with notes on gill structure [J].Southern African Journal of Aquatic Sciences, 1990,16(1/2):16-36.
- [21] 刘春花,赵长臣,陈总会,等.丁香油麻醉剂在水产养殖上的应用研究进展[J].江西水产科技,2016(6):48-52.
LIU C H,ZHAO C C,CHEN Z H, et al.Research progress on application of clove oil anesthetic in aquaculture[J].Jiangxi Fishery Science and Technology,2016(6):48-52.(in Chinese)
- [22] 刘长琳,何力,陈四清,等.鱼类麻醉研究综述[J].渔业现代化,2007,34(5):21-25.
LIU C L,HE L,CHEN S Q, et al.Review of fish anesthesia research[J].Fishery Modernization,2007,34(5):21-25.(in Chinese)
- [23] KANAI A,SUZUKI A,OKAMOTO H.Comparison of cutaneous anesthetic effect of 8% lidocaine spray with lidocaine patch using current perception threshold test [J].Pain Medicine, 2010,11(3):472-475.
- [24] WOOLSEY J,HOLCOMB M,INGERMANN R L.Effect of temperature on clove oil anesthesia in steelhead fry[J].North American Journal of Aquaculture,2004,66(1):35-41.
- [25] 庄平,徐滨,章龙珍,等.MS-222 和丁香酚对中华鲟幼鱼耗氧率与排氨率的影响[J].中国水产科学,2009,16(4):612-618.
ZHUANG P,XU B,ZHANG L Z, et al.Effects of MS-222 and clove oil on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of juvenile Chinese sturgeon, *Acipenser sinensis* [J].Journal of Fishery Sciences of China,2009,16(4):612-618.(in Chinese)
- [26] 许德芳.麻醉药物对氧化应激的影响[J].医学信息,2021,34(18):56-59.
XU D F.The effect of anesthetics on oxidative stress[J].Journal of Medical Information,2021,34(18):56-59.(in Chinese)

Effects of different application methods of clove oil on anesthetic effect of red swamp crayfish *Procambarus clarkii*

JIANG Jingjing¹, ZHANG Chengfeng², HAN Caian³, TIAN Can⁴, ZHANG Ping⁵,
XU Zenghong², GAO Yang¹, SU Shengyan^{1,2*}, TANG Yongkai^{1,2*}

(1. College of Wuxi Fisheries, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China; 2. Key Laboratory of Integrated Rice-Fish Farming Ecology, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 3. Jiangxi Vocational College of Biotechnology, Nanchang 330220, China; 4. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 5. Suining Agricultural and Rural Bureau, Xuzhou 221200, China)

Abstract: In order to reduce the stress damage of red swamp crayfish *Procambarus clarkii* caused by human operation during the actual production and scientific research, small red swamp crayfish with body weight of (6.17±0.20)g were bathed in and sprayed with the mixture of clove oil and ethanol solution at a volume ratio of 1:1.5 at a dose of 1, 2, 4, and 8 g/L and 8, 10, 16, and 20 g/L, respectively. Large red swamp crayfish with body weight of (29.54±0.30)g were bathed in and sprayed with the same mixture of clove oil and ethanol solution at a dose of 10, 16, 20, and 24 g/L and 8, 10, 16, and 20 g/L, respectively for anesthesia. The results showed that with the increase in anesthetic agent concentration, the anesthetic time was found to be shortened and the recovery time to be prolonged, with the appropriate concentrations of 8 g/L in small size crayfish and 20 g/L in large size ones, and the appropriate concentrations of 4 g/L for spray anesthesia and 16 g/L for bath. The red swamp crayfish with spraying anesthesia showed cheliped behavior that was used as a criterion to divide anesthesia into four stages. Significant decrease in oxygen consumption and anesthetic effect was observed in both methods of anesthesia ($P<0.05$). There were significantly lower oxygen consumption rate and SOD and CAT enzyme activities in the red swamp crayfish with spraying anesthesia than those in the crayfish with immersion anesthesia ($P<0.05$). The findings indicated that both spraying and immersion anesthesia were used for red swamp crayfish anesthesia, especially surface spraying anesthesia being featured by significant decrease in the oxygen consumption rate and less stress damage to individual gill tissue, and better anesthesia effect compared with the immersion anesthesia.

Key words: *Procambarus clarkii*; clove oil; immersion anesthesia; spraying anesthesia; oxygen consumption rate