بررسی میزان باقیمانده بافتی ناشی ازمصرف خوراکی مقادیر مختلف افلاتوکسین B_1 درفیل ماهی(*Huso huso*) پرورشی

ابوالفضل سپهداری[1*]، شاپور کاکولکی[1] ، حمید رضا پورعلی[2]، مهدی معصوم زاده[2] ،علی حلاجیان[2]
[1]موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
[2] موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

چکیده

تعداد ۵۰۰ عددفیل ماهی (*Huso huso*) باوزن متوسط ۱۰gr ± ۱۰۰ به مدت ۳۰ روز در وان‌های ۲۰۰۰ لیتری نگه‌داری و با غذای دستی ویژه فیل ماهی تغذیه و سازگاری آنان با محیط پرورشی و تغذیه دستی انجام پذیرفت . پس از انجام مراحل سازگاری، تعداد ۱۸۰عدد از ذخیره مذکور انتخاب ودر ۵ تیمار ازمایشی، با تراکم ۱۲ عدد ماهی در ۱۵ تانک ۲۰۰ لیتری ذخیره‌سازی گردید. آب تانک‌ها با درجه حرارت ۲°C ± ۱۸ ، میزان اکسیژن محلول ۷/۳ ppm و۲۰۰ درصد تعویض آب روزانه، تنظیم وتأمین گردید. -۹۶۳.آفلاتوکسین B_1 خالص با غلظتهای ۱۰۰ppb و ۷۵ppb و ۵۰ppb و۲۵ppb به جیره‌های آزمایشی اضافه گردید. غذادهی به مدت ۱۲۰ روز بر مبنای ۳ درصد وزن توده زنده ودر ۴ نوبت در طی شبانه روز انجام پذیرفت ثبت عوامل فیزیکی وشیمیایی آب از جمله: اکسیژن محلول، درجه حرارت pH به شکل هفتگی انجام گرفت. میزان باقی مانده بافتی آفلاتوکسین ب۱ در عضلات با تناوب ماهیانه و به مدت چهار ماه به روش HPLC انجام پذیرفت . بررسی علائم درمانگاهی و ثبت تلفات روزانه در دستور کار قرار داشت. بطور کلی حداکثر میزان باقیماندگی افلاتوکسین دربافت عضلانی درتحقیق حاضر۲/۹ ±./۳۶ppb است که مقدارنگران کننده ای باتوجه به استانداردهای جهانی برای مصارف انسانی نمی باشد.

کلمات کلیدی: فیل ماهی ، افلاتوکسین B_1 ، تغذیه ، باقی مانده بافتی ، مصارف انسانی

* نویسنده مسئول:asepahdari@yahoo.com

مقدمه

افزایش مصرف مواد اولیه با منشاء گیاهی در فرمولاسیون جیره غذایی آبزیان، منجر به افزایش ظرفیت ایجاد آفلاتوکسیکوزیس در سیستم‌های پرورشی گردیده است. به همین دلیل مسئله آلودگی با آفلاتوکسین‌ها در آبزی‌پروری از اهمیت بیشتری برخوردار گردیده است. (Tacon *et al*. 1995, Fegan 2005; Spring 2005).

بسیاری از مواد اولیه غذایی مورد استفاده در آبزی‌پروری از جمله: پنبه‌دانه، بادام زمینی، ذرت، لوبیای سویا، برنج، ماهی و میگوی خشک شده و پودر ماهی توسط قارچها آلوده می‌گردند.

(Ellise *et al*. 2000, Cagauan et al. 2004, Fegan 2005; Spring 2005).

جداسازی اولیه آفلاتوکسین‌ها پس از شیوع یک بیماری ناشناخته که منجر به مرگ ۱۰۰/۰۰۰ جوجه بوقلمون و ۲۰۰۰۰ جوجه اردک در سال ۱۹۶۰ در انگلستان گردید، اتفاق افتاد. (این بیماری به نام Turkey X disease معروف است) (Blout 1961) .

برای اولین بار در سال ۱۹۶۰ آفلاتوکسیکوز در آبزیان پرورشی به همراه وقوع هپاتوم در مراکز تکثر قزل‌آلای رنگین‌کمان در ایالت آیداهو واقع در آمریکا گزارش گردید. در آزمایشات بعد از مرگ حضور کبدی حاوی ندول‌های بسیار (مولتی ندولار) به همراه کارسینومای اولیه سلولهای کبدی مشاهده گردید. (Ashley , Halver 1963, Wales 1970)

تحقیق انجام شده در مورد مسمومیت ایجاد شده توسط AFB_1 در فیل ماهی‌های جوان بیانگر وقوع ۸/۶ درصد مرگ و میر پس از ۱۵ روز تغذیه با جیره‌های آلوده می‌باشد. به علاوه بعد از ۴۰ روز ماهیان تحت آزمایش ۷ درصد کاهش وزن داشته‌اند. از جمله علائم درمانگاهی مشاهده شده در این تحقیق شامل، خون‌ریزی در ناحیه سر، پلاک‌های استخوانی ردیف شکمی، ایجاد خمیدگی در ستون فقرات و همچنین ظهور نقاط زرد رنگ در ناحیه سینه‌ای بوده است. (Farabi *et al*. 2000).

موسسه بین‌المللی تحقیقات سرطان، آفلاتوکسین‌ها را به عنوان یک ترکیب سرطان‌زای درجه‌یک شناسایی نموده و لذا بر طبق مقررات باید مواد غذایی تجاری ،دارای حداقل میزان آلودگی به این سموم (۲۰ ppb در غلات و ۰/۵ در شیر در ایالات متحده آمریکا ، ۴ppb درغذا در برخی از کشورهای اروپایی باشند (Henry et al ,.1999).

هدف این تحقیق ارزیابی و تعیین میزان باقیمانده بافتی ناشی از مصرف خوراکی AFB1 درفیل ماهی پرورشی بوده است.

مواد و روش کار

اماده سازی کارگاه وذخیره سازی ماهیان

تعداد ۵۰۰ عددفیل ماهی (Huso huso) باوزن متوسط ۱۰gr ± ۱۰۰ به مدت ۳۰ روز در وان های ۲۰۰۰ لیتری نگهداری و با غذای دستی ویژه فیل ماهی تغذیه و سازگاری آنان با محیط پرورشی و تغذیه دستی انجام پذیرفت . پس از انجام مراحل سازگاری، تعداد ۱۸۰عدد از ذخیره مذکور انتخاب ودر ۵ تیمار ازمایشی، با تراکم ۱۲ عدد ماهی در ۱۵ تانک ۲۰۰ لیتری ذخیره سازی گردید. آب تانک ها با درجه حرارت $^{\circ c}$ ۲ ± ۱۸ ، میزان اکسیژن محلول ppm ۷/۳ و۲۰۰ درصد تعویض آب روزانه، تنظیم وتأمین گردید.

تهیه جیره‌های غذایی :

مواد اولیه مورد نیاز فرمولاسیون جیره‌های غذایی بر طبق مواد مصرفی معمول در جیره غذایی فیل ماهی، با کیفیت مطلوب تأمین و .جهت افزودن افلاتوکسین B_1 در غلظت-های موردنظر به جیره‌های آزمایشی به شرح ذیل اقدام گردید:

از آفلاتوکسین B_1 خالص با علامت تجاری SIGMA با متانول خالص (۹۷٪) رقیق شده و با غلظتهای مورد نظر (۱۰۰ppb و ۷۵ppb و ۵۰ppb و۲۵ppb) به جیره‌های آزمایشیاضافه گردید. جهت حصول اطمینان از وجود AFB_1 به مقادیر پیش‌بینی شده در جیره‌های آزمایشی، از جیره‌های تهیه شده ، نمونه برداری و جهت تعیین میزان AFB_1 از طریق HPLC و با دستگاههای با مشخصات ذیل ارزیابی و تعیین گردید.

- Waters 717 plus Auto sampler
- Waters 474 scanning fluorescence Detector
- Waters bus SAT/IN Module
- Soft ware: Millennium 32 ver.40.0

غذادهی و نمونه‌برداری

غذادهی به مدت۱۲۰ روز بر مبنای ۳ درصد وزن توده زنده ودر ۴ نوبت در طی روز انجام پذیرفت (Cui *et al* . 1997) . در صورت وجود غذای اضافی در ته تانک‌ها، روزانه مدفوع و باقیمانده‌های غذا از هر تانک سیفون وخارج گردید.

ثبت عوامل فیزیکوشیمیایی آب از جمله: اکسیژن محلول، درجه حرارت pH به شکل هفتگی انجام گرفت. بررسی و ارزیابی میزان باقیمانده عضلانی افلاتوکسین با تناوب ماهیانه انجام شد . علائم کلینیکی و ثبت تلفات روزانه به انجام رسید .

قبل از نمونه‌برداری تمامی ماهی‌ها توسط اسانس گل میخک با دز ۱۵۰ میلی گرم در لیتر بیهوش و ضایعات جلدی در تمامی ماهیان بررسی و از نظر کمی و کیفی مورد ارزیابی و ثبت قرار گرفت.

محاسبات

جهت محاسبه ومیزان زنده مانی ماهیان تحت ازمایش درهر تیمار از فرمول های ذیل بهره برداری گردید:

درصد زنده مانی = تعداد ماهیان زنده / تعداد اولیه ماهیان × ۱۰۰

جهت بررسی احتمالی تجمع AFB۱ در عضلات، در هر نوبت نمونه برداری از هر تیمار ، پس از جدا نمودن کامل امعاء و احشاء ۳ عدد ماهی و شستشو با آب تا مرحله ارزیابی باقیمانده های بافتی AFB۱ در فریزر ۱۸ ـ نگه داری گردید. جهت تعیین میزان باقیمانده های بافتی از روش HPLC استفاده شد.

نتایج

باقیمانده بافتی

اختلاف معنی داری بین باقیماندگی بافتی در گروهها ی مختلف در طول دوره حدوداً ۹۰ روزه تغذیه با جیره حاوی سم در وان های مختلف و در طی چهار بار نمونه برداری وجود دارد ($p<0.05$) و حداقل مقدار یک گروه با بقیه گروهها (در هر چهار بار نمونه برداری) در این امر متفاوت است.

با توجه به جدول ۱ مقایسه چند وجهی که از نتایج آنالیز واریانس داده های بیومتری در طی نمونه برداری های اول تا چهارم حاصل شده است، چنین بنظر می رسد :

جدول۱: تاثیر استفاده از سطوح مختلف AFB_1 در تغذیه فیل ماهی های پرورشی بر میانگین میزان باقیمانده بافتی (± خطای معیار از میانگین) درطی یک دوره ۱۲۰ روزه (مقایسه ها در هر نوبت نمونه برداری به صورت جداگانه بررسی گردیده است).

تیمارهای آزمایشی	میزان AFB_1 (ppb)درجیره	نوبت های نمونه برداری(ماه)			
		ماه اول	ماه دوم	ماه سوم	ماه چهارم
۱	۱۰۰	۰/۷۱۷ ±۰/۰۲^{a}	۲/۹۰ ±۰/۰۷ ^{a}	۲/۶۷ ±۰/۰۹ ^{a}	۰/۴۳ ±۰/۰۱ ^{a*}
۲	۷۵	۰/۵۴۱ ±۰/۰۲ ^{a}	۲/۴۲ ±۰/۰۶ ^{b}	۲/۲۴ ±۰/۱۱ ^{b}	۰/۳۲ ±۰/۰۱ ^{b}
۳	۵۰	۰/۰۵۲ ±۰/۰۱ ^{c}	۱/۰۵ ±۰/۰۳ ^{c}	۱/۵۴ ±۰/۰۷ ^{c}	۰/۰۲ ±۰/۰۰۹ ^{c}
۴	۲۵	. ^{c}	۰/۵۶ ±۰/۰۳ ^{d}	۱/۰۴ ±۰/۰۵ ^{d}	۰/۰۱ ±۰/۰۰۴ ^{c}
۵	۰	.^{c}	. ^{e}	. ^{e}	. ^{c}
P-Value		۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱

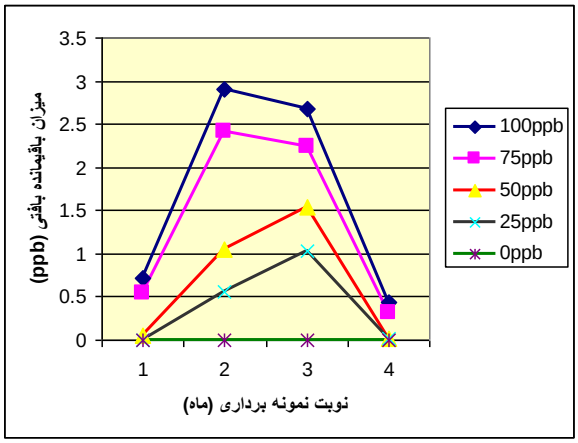
*درهر ستون میانگین هایی که با حروف مشترک نشان داده شده است،با یکدیگر از نظر اماری دارای اختلاف معنی دارنمی باشند ($p< 0.05$)

در نمونه برداری اول: اختلاف معنی داری از جهت باقیماندگی بافتی در بین گروهها وجود دارد بطوریکه اختلاف گروه ۱ نسبت به گروههای دیگر (از ۲ تا ۵) به ترتیب افزایش یافته و با گروه ۴ و ۵ این اختلاف در بیشترین حد خود (۰/۷۱) بوده که این امر خود موید آن است که میزان باقیماندگی بافتی سم در گروههای ۱ تا ۴ به ترتیب افزایش یافته است..این آزمون نشان می دهد ($p<0.05$).

در نمونه برداری دوم : اختلاف معنی داری از جهت باقیماندگی بافتی در بین تمام گروهها وجود دارد بطوریکه این اختلاف از گروه ۱ تا گروه ۵(شاهد) به تدریج افزایش یافته است($p<0.05$) .

در نمونه برداری سوم: در این نمونه برداری نیز همانند نمونه برداری دوم اختلاف معنی داری از جهت باقیماندگی بافتی در بین تمام گروهها وجود دارد ($p<0.05$) ، بطوریکه این اختلاف از گروه ۱ تا گروه ۵(شاهد) به تدریج افزایش یافته است.

در نمونه برداری چهارم : این نمونه برداری که پس از یک دوره تغذیه بدون سم انجام شده عدم اختلاف معنی داری بین گروههای ۳،۴ و ۵ را نشان می دهد .از مقادیر بافتی سم که در نمونه برداری سوم به اوج خود رسیده بودند ،به مقدار قابل توجهی کاسته شد. این موضوع به خوبی در شکل ۱ مشهود است.



شکل ۱ : میزان باقیماندگی AFB1 در بافت عضلانی فیل ماهی پرورشی تغذیه شده با مقادیرمختلف توکسین بمدت ۳ ماه دردرجه حرارت۲±۱۸ درجه سانتیگراد

میزان زنده مانی

درهیچیک از تیمارهای ازمایشی تلفاتی مشاهده نگردید.

بحث

آفلاتوکسیوزیس نوع حاد در ماهیان به مانند سایر حیوانات در مواقعی که مقادیر متوسط تا زیاد آفلاتوکسین بلعیده شود اتفاق می‌افتد علائم این نوع آفلاتوکسیوزیس در قزل‌آلای رنگین‌کمان شامل: کم خونی، رنگ پریدگی آبشش‌ها، کاهش میزان هماتوکریت، تورم، خون‌ریزی، اختلال در متابولیسم مواد مغذی و صدمات کبدی می‌باشد. بعلاوه وقوع تغییرات ریخت شناسی در تیلاپیای نیل تغذیه شده با غذاهای آلوده به آفلاتوکسین از جمله: کدورت قرنیه منتهی به کاتاراکت و کوری، ضایعاتی در روی سطح بدن از قبیل خوردگی باله‌ها و ناحیه دمی، زرد رنگ شدن سطح بدن که به نام تیلاپیای زرد (Yellowing Tilapia) نامیده می‌شود، شنای نامتعادل و بی‌اشتهایی نیز گزارش شده است (Cagauan *et al*. 2004).

از طرف دیگر در موارد وقوع شکل حاد بیماری‌ها معمولاً علائم کلینیکی مشخصی مشاهده نشده و مرگهای مرموز و ناگهانی اتفاق می افتد. در حیوانات مبتلا به مسمومیت تحت حاد با آفلاتوکسین‌ها علائمی از جمله: صدمات متوسط تا شدید کبدی، زرد رنگ شدن چشم‌ها، زردی مخاطات یا پوست و اشکال در لخته‌شدن خون مشاهده می‌گردد. از دیگر علائم می‌توان به افزایش ضریب تبدیل غذایی، کمخونی، افت تولید، تضعیف سیستم ایمنی،ضایعات کلیوی و مرگ زود هنگام اشاره نمود (Hamilton 1990).

مسمومیت ایجاد شده توسط AFB_1 در فیل ماهی‌های جوان بیانگر وقوع ۸/۶ درصد مرگ و میر پس از ۱۵ روز تغذیه با جیره‌های آلوده می‌باشد. به علاوه بعد از ۴۰ روز ماهیان تحت آزمایش ۷ درصد کاهش وزن داشته‌اند از جمله علائم کلینیکی مشاهده شده در این تحقیق شامل، خون‌ریزی در ناحیه سر، پلاک‌های استخوانی ردیف شکمی، ایجاد خمیدگی در ستون فقرات و همچنین ظهور نقاط زرد رنگ در ناحیه سینه‌ای بوده است (Farabi *et al*. 2000) .

طبعاً، رنگ زرد ایجاد شده ناشی از مسمومیت‌های مزمن آفلاتوکسین، B_1، در کنار حضور انواعی از تومورها در اندامهای مختلف ماهیان آلوده، سبب ایجاد ظاهر نامناسب، کیفیت پایین لاشه ، طعم نامطبوع و کاهش بازار پسندی ماهی می‌گردد.

به طور کلی، حساسیت موجود به مسمومیت با AFB۱ در ماهیان، مانند پستانداران، ناشی از الگوهای متفاوت آنزیمی مداخله گر در متابولیسم این ترکیب می باشد. چنین تفاوت هایی ممکن است به اختلافات ژنتیکی، قابلیت فعالیت آنزیم ها وهمچنین میزان هماهنگی و تنظیم واکنش ها در مرحله اول و دوم فعال سازی و سم زدایی AFB۱ نسبت داده شود (Bailey *et al*.1988). با توجه به نتایج حاصل از تحقیق اخیر بنظر میرسد ترکیبات ناشی از فعالیت های انزیمی و متابولیسم AFB۱ در فیل ماهی منجر به تولید متابولیت های پایدار آفلاتوکسین در فیل ماهی نمی گردد .

آفلاتوکسین‌ها به عنوان یکی از عوامل ایجاد سرطان‌های کبدی به خوبی شناخته شده‌اند ولی این ترکیبات دارای تأثیرات مسمومیت‌زای مهم دیگری نیز می‌باشند. تأثیراتی از جمله تضعیف سیستم ایمنی و تداخل در متابولیسم پروتئین‌ها و برخی از ترکیبات ریزمغذی در مسمومیت‌های مزمن ناشی از آفلاتوکسین‌ها در حیوانات مزرعه‌ای و آزمایشگاهی گزارش گردیده است. اگرچه عوارض فوق‌الذکر به شکل گسترده در انسان مورد بررسی قرار نگرفته است ولی اطلاعات موجود بیانگر این مطلب است که حداقل برخی از عوارض ذکر شده در انسان نیز قابلیت وقوع دارند. میزان وقوع و مواجهه انسان با آفلاتوکسین‌ها در یک مرور کلی موید این مسئله است که حدود ۴/۵ میلیارد جمعیت کشورهای در حال توسعه به شکل مزمن با مقادیر قابل توجهی از آلودگی‌های ناخواسته با این سم درگیر می‌باشند. اطلاعات محدود کسب شده از مناطق مورد اشاره بر تأثیر این مسمومیت بر تغذیه و سیستم ایمنی جمعیت مذکور دلالت می‌کند (Williams *et al*., 2004). میزان مجاز آفلاتوکسین موجود در مواد خوراکی، مصارف انسانی باتوجه به کشورهای مختلف درمحدودهppb ۳۰ ـ ۴ تعیین گردیده است (Henry. *et al*,. 1999; FDA. 1995).

دستاوردها و توصیه های ترویجی:

فیل ماهی از گونه های حساس نسبت به مسمومیت با آفلاتوکسین ب۱ محسوب نمی گردد .

مواد حاصل از متابولیسم آفلاتوکسین ب۱ در فیل ماهی ترکیباتی ناپایدار هستند که با قطع تغذیه از منابع آلوده ، از بدن دفع گردیده و باقیمانده بافتی آنان پس از یک ماه از بین خواهد رفت .

بطور کلی حداکثر میزان باقیماندگی آافلاتوکسین دربافت عضلانی فیل ماهی های تحت مطالعه درتحقیق حاضرppb۳۶/.± ۲/۹ است که از نظر مقدارنگران کننده ای باتوجه به استانداردهای جهانی برای مصارف انسانی محسوب نمی گردد.

نظر به زدوده شدن تقریبی بافت عضلانی از باقیمانده های بافتی توکسین درطی مدت یک ماه تغذیه تیمارهای آزمایشی با جیره های فاقد توکسین، میتوان توصیه نمود که در صورت تشخیص ایجاد مسمومیت مزمن وتعیین میزان باقیماندگی افلاتوکسین درعضلات،ازروش مذکور می توان به منظور سم زدایی استفاده گردد.

منابع

Ashley LM, Halver JE ,1963. Multiple metastasis of rainbow trout hepatoma. Trans Am Fish Soc 92:365–371

Bailey GS ,1994. Role of aflatoxin–DNA adducts in the cancer process. In: DL Eaton JD Groopman (eds) The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and, agricultural significance. Academic Press, San Diego, 12: 137–14

Bailey GS, Williams DE, Wilcox J, Loveland PM, Coulombe RA, Hendricks JD ,1988. Aflatoxin B1 carcinogenesis and its relation to DNA adduction formation and adduct persistence in sensitive and resistant Salmonid fish. Carcinogenesis 9:1919–1926

Blout WP ,1961. Turkey ‘‘X’’ disease. Turkeys 52:55–58, 61–77.-

Cagauan AG, Tayaban RH, Somga J, Bartolome RM ,2004.Effect of aflatoxin-contaminated feeds in Nile tilapia (Oreochromis niloticus L.). In: Abstract of the 6th International Symposium on Tilapia in Aquaculture (ISTA 6) Section: Health Management and Diseases Manila, Philippines. 12–16 September

Ellis RW, Clements M, Tibbetts A, Winfree R ,2000. Reduction of the bioavailability of 20 mg/kg aflatoxin in trout feed containing clay. Aquaculture 183:179–188

Fegan D ,2005.Mycotoxins: the hidden menace? http //:www.alltech.com /

Gallagher EP, Eaton DL ,1995. In vitro biotransformation of aflatoxin B1 in channel catfish liver. Toxicol Appl Pharmacol 132:82–90

Hamilton P,1990. Problems with mycotoxins persist, but can be lived with. Feedstuffs 62:22–23

Spring P and D.F.Fegan,2005. Mycotoxins – a rising threat to aquaculture .Feedmix 13:323-331.

Tacon AGJ, Phillips MJ, Barg UC ,1995. Aquaculture feeds and the environment: the Asian experience. Water Sci Technol 31:41–59

Wales JH ,1970. Hepatoma in rainbow trout. In: Snieszko SF(eds) A symposium on diseases of fishes and shellfishes .Am. Fish. Soc. no. 5, Washington, DC pp 351–365

Study of muscl residue in Beluga*(Huso huso)* fed different dietary levels of aflatoxin B_1.

Sepahdari A.[1*]; Kakulaki SH. [1]; Pourali H. [2];Masumzadeh M.[2];Halajian A.[2]

[1]Iranian Fisheries Science Research Institute, Agriculture Research Education and Extension Organization, (AREEO), Tehran, Iran

[2] International Sturgeon Research Organization of the Caspian Sea, Agriculture Research Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran,

Abstract

In this study 180 beluga(Huso huso) weighted 120 ± 10gr with stocking density of 12 fish/tank ,after adaptation with synthetic diet , fed different levels of AFB1(0,25,50,75 & 100ppb/kg of diets) under controlled conditions(T=18±2ºC,DO=7.3ppm). The fish were fed 3% of body weight four times a day for 120 days.Record of physical and chemichal water caracters include : DO , temprature , pH , did weekly . Residue of AFB1 in muscls in different exprements determined by HPLC method . The amount of AFB1 in mscle was between 0.36 -2.90 ppb .Based on international standards these amount is not harmfull for human consumption.

Keywords: Huso huso , AFB1 ,Oral administration, muscle residue , human consumption

*Corresponding author: sepidehkhatib@yahoo.com