وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات شیلات ایران- انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان

عنوان:

اثرات هیستوپاتولوژیک و باقیمانده بافتی ناشی از مصرف دوزهای مختلف آفلاتوکسین B_1 در فیل ماهی *(Huso huso)*

مجری:
ابوالفضل سپهداری

شماره ثبت
۸۹/۹۹۹

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

مـؤسسه تحـقیقـات شیـلات ایـران- انستیتو تحقیقات ماهیان خاویاری دکتر دادمان

- عنوان پروژه/ طرح : اثرات هیستوپاتولوژیک و باقیمانده بافتی ناشی از مصرف دوزهای مختلف آفلاتوکسین B_1 در فیل ماهی *(Huso huso)*

- شماره مصوب: ۸۶۰۳۰-۸۶۰۲-۰۵-۲۰۰۰۰۰-۰۲۵-۲

- نام و نام‌خانوادگی نگارنده/ نگارندگان: ابوالفضل سپهداری

- نام و نام‌خانوادگی مجری مسئول(اختصاص به پروژه‌ها و طرحهای ملی و مشترک دارد): عباسعلی مطلبی

- نام و نام‌خانوادگی مجری/ مجریان: ابوالفضل سپهداری

- نام و نام‌خانوادگی همکاران: محمود محسنی- حمیدرضا پورعلی- مریم قیاسی- علی حلاجیان- علیرضا شناورماسوله- حمید پوردهقانی- سلیمان غلامی‌پور- شاپور کاکولکی- مهدی معصوم‌زاده- محمد بینایی

نام و نام‌خانوادگی مشاور(ان): عیسی شریف‌پور- محمود بهمنی- همایون محمودزاده

- محل اجرا: انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری

- تاریخ شروع: ۸۵/۱۰/۱

- مدت اجرا: ۳ سال و ۳ ماه

- ناشر: مؤسسه تحقیقات شیلات ایران

- شمارگان(تیتراژ): ۲۰ نسخه

- تاریخ انتشار: سال ۱۳۸۹

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است- نقل مطالب تصاویر،جداول،منحنی‌ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است.

«سوابق طرح یا پروژه و مجری»

پروژه : اثرات هیستوپاتولوژیک و باقیمانده بافتی ناشی از مصرف دوزهای مختلف آفلاتوکسین B_1 در فیل ماهی (*Huso huso*)

کد مصوب : ۸۶۰۳۰-۸۶۰۲-۰۵-۲۰۰۰۰۰-۰۲۵-۲

شماره ثبت (فروست) : ۸۹/۹۹۹ تاریخ : ۱۳۸۹/۹/۱

با مسئولیت اجرایی جناب آقای ابوالفضل سپهداری دارای مدرک تحصیلی دکتری در رشته بهداشت و بیماریهای آبزیان می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت وبیماریهای آبزیان در تاریخ ۱۳۸۹/٤/۲۰ مورد ارزیابی و با نمره ۲۰ و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز □ ایستگاه □

با سمت مدیر گروه تحقیقات بیماری های ماهیان آب شیرین مشغول بوده است.

به نام خدا

عنوان	«فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱-مقدمه ۳
۱-۱- کلیات ۴
۱-۲- آفلاتوکسین‌ها در آبزیان ۲۳
۲- مواد وروش کار ۲۳
۲-۱- اماده سازی کارگاه وذخیره سازی ماهیان ۲۳
۲-۲- تهیه جیره‌های غذایی ۲۳
۲-۳- غذادهی و نمونه‌برداری ۲۵
۲-۴- بررسی فاکتورهای خونی ۲۷
۲-۵- بررسی باقیمانده های بافتی ۲۸
۲-۶- ارزیابی شاخص های رشد ۲۸
۲-۷- روش‌های آماری ۲۹
۳- نتایج ۳۰
۳-۱- جراحات پوستی ۳۰
۳-۲- مشاهدات کالبد گشایی ۳۷
۳-۳- تغییرات بافتی ۴۸
۳-۴- نتایج خون شناسی ۶۰
۳-۵- مشاهدات و نتایج شاخص های رشد ۶۳
۳-۶- باقیمانده های بافتی ۶۵
۴- بحث ۶۷
۴-۱- جراحات پوستی ۶۸
۴-۲- علایم کالبد گشایی ومشاهدات هیستوپاتولوژیک ۷۱
۴-۳- فاکتورهای خون شناسی ۸۰
۴-۴- شاخص های رشد ۸۲
۴-۵- باقیمانده های بافتی ۹۱

عنوان	«فهرست مندرجات »	صفحه

۶-۴- میزان زنده مانی ۹۲
۵- نتیجه گیری ۹۹
منابع ۱۰۱
چکیده انگلیسی ۱۰۹

چکیده

فیل ماهی (Huso huso) یکی از گونه های با ارزش ماهیان خاویاری در دریای خزر است . درتحقیق حاضر پس از انجام مراحل سازگاری با غذای دستی ، تعداد ۱۸۰عدد ماهی با میانگین وزنی ۱۰gr ± ۱۲۰ ودرپنج تیمار ازمایشی، با تراکم ۱۲ عدد ماهی در ۱۵ تانک ۵۰۰ لیتری ذخیره‌سازی گردیدند. آب تانک ها از طریق آب چاه با درجه حرارت c^o ۲ ±۱۸ و با میزان ۲۰۰درصد تعویض روزانه تنظیم و میزان اکسیژن محلول در آب به مقدار ۷/۳ ppm تنظیم وتأمین گردید.

آفلاتوکسین B_1 خالص با غلظتهای مورد نظر(۱۰۰ppb و ۷۵ppb و ۵۰ppb و۲۵ppb) به جیره‌های آزمایشی اضافه گردید. غذادهی بر مبنای ۳ درصد وزن توده زنده ودر ۴ نوبت در طی روز انجام پذیرفت . ثبت عوامل فیزیکی وشیمیایی آب از جمله: اکسیژن محلول، درجه حرارت وpH به شکل هفتگی انجام گرفت. بررسی علائم کلینیکی و ثبت تلفات روزانه در دستور کار قرار داشت. به منظور بررسی ضایعات پاتولوژیک از آبشش ها، کبد، طحال و کلیه‌ها (بخش میانی و قدامی) نمونه‌برداری و جهت تهیه نمونه های آسیب شناسی در محلول بوئن تثبیت و به روش هماتوکسیلین – ائوزین (H & E) رنگ امیزی گردید. . جهت تعیین میزان باقیمانده‌های بافتی از روش HPLC استفاده شد . تعیین ضریب تبدیل غذا (FCR) و سرعت رشد ویژه (SGR) انجام پذیرفت . در تیمارهای مختلف به تناسب غلظت سم مصرفی زخم هایی با حاشیه های زرد رنگ در نواحی شکمی،جانبی و ساقه دمی به همراه خون‌ریزی در پایه باله های سینه‌ای و شکمی و بروز زخم و جراحات در لبه های فوقانی و تحتانی باله دمی و در حاشیه های باله های سینه‌ای و شکمی و پشتی به همراه خوردگی باله در برخی از تیمارها مشاهده گردید. میزان شیوع جراحات پوستی درتیمارهای مختلف ودرطی تحقیق از ۸ الی ۵۳/۳ درصد متفاوت بود. مشاهدات کالبدگشایی وپاتولوژی بیانگربروز تغییرات حاد وروند مزمن وپیشرونده ضایعات در ابشش ها،کبد،کلیه وطحال است.ضایعات توموری مشاهده نگردید.

درضریب رشد ویژه درتیمارهای ازمایشی اختلاف معنی داری مشا هده نشد ولی در میانگین وزنی وضریب تبدیل غذایی درمقا طعی ازتحقیق،تغییرات معنی‌داری مابین تیمارهای ازمایشی بایکدیگروبا شاهدمشاهده گردید.

روند تجمع با قیمانده AFB_1 درعضلات پیشرونده است ولی از نظر مصارف انسانی در محدوده مخاطره آمیز قرار ندارد .درمیزان با قیمانده ها ،تغییرات معنی داری فی مابین تیمارهای ازمایشی بایکدیگروباشا هدمشا هده گردید.

کلیه داده‌ها در برنامه Excel ثبت و به روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون های تکمیلی توکی و چند دامنه دانکن بانرم افزار SPSS مورد ارزیابی قرار گرفتند.

کلید واژه ها : فیل ماهی ، شاخص های رشد، جراحات پوستی ، تغییرات هیستوپاتولوژی،تغییرات خونی، باقیمانده بافتی

۱ - مقدمه

روند توسعه آبزی‌پروری در کشور و پیش‌بینی میزان تولید آبزیان پرورشی در طی برنامه توسعه اقتصادی ـ اجتماعی چهارم بیانگر روند افزایشی تولید برای گروه‌های مختلف آبزیان پرورشی از جمله ماهی و میگو می‌باشد. هدف افزایش سرانه مصرف ماهی تا حد متوسط جهانی یعنی ۱۰ کیلوگرم به ازای هر نفر مبین افزایش تولید به میزان صد درصد در طی برنامه چهارم می‌باشد. سیاست‌های حمایتی دولت در توسعه آبزی پروری به همراه نگاه جهانی به محصولا ت شیلاتی به عنوان غذای سلامتی در کنار منابع و اقلیم‌های طبیعی متنوع و مستعد کشور از یک طرف و زیرساخت‌های ایجاد شده در این راستا از سوی دیگر ایجاب می‌نماید که در جهت توسعه پایدار فعالیت مذکور پشتیبانی‌ها و اقدامات لازم انجام گرفته و اشتغال ایجاد شده و سرمایه‌گذاری‌های صورت گرفته در این راستا را از حاشیه امنیت مطلوبی برخوردار نمود.

طبعا « مطالعه و ارزیابی اقتصادی و بهداشتی ناشی از آفلاتوکسین‌ها در آبزیان بومی پرورشی کشور » از زمره مباحثی است که در کنار سایر تحقیقات مورد نیاز می‌تواند با ایجاد اطلاعات کاربردی در راستای توسعه پایدار فعالیت آبزی پروری در کلیه زنجیره‌های « تولید خوراک آبزیان»، « تکثیر و پرورش » و « فرآورده‌های شیلاتی » اثرات ملموس و مطلوبی را در برداشته باشد و واحدهای تولیدی و نهادهای نظارتی را در راستای بهبود کیفیت تولید خوراک آبزیان، کاهش تلفات، افزایش راندمان تولید و ارائه فرآورده‌های سالم و بهداشتی یاری نماید.

نظر به نبود اطلا عات درارتباط با تاثیرات افلاتوکسین B_1 درمورد گونه های بومی تجاری کشور گونه فیل ماهی (Huso huso) برای تحقیق انتخاب گردید.

شایان توضیح است که احتیا جات غذایی گونه فوق در طی تحقیقات انجام شده در موسسه تحقیقات شیلات ایران (محسنی و همکاران،۱۳۸۲) تعیین گردیده است وتوسعه تولیدو پرورش ان در برنامه های توسعه شیلات پیش بینی شده است

تحریب زیستگاه های طبیعی بواسطه آلودگیهای محیطی و فعالیت های انسانی ، صید بی رویه و قاچاق توسط کشورهای حاشیه خزرو حضور شانه دار در دریای خزر از جمله عواملی هستند که منجر به کاهش جمعییت واحتمال خطر انقراض نسل گونه های منحصر به فرد و با ارزش ماهیان خاویاری در دریای خزر گردیده است. لزوم حفظ و حراست از این گونه های با ارزش از یک طرف و قابلیت های پرورشی آنان از نظر تولید گوشت و

خاویار ، در کنار خلا پاره ای از اطلاعات فنی و تخصصی در مورد پرورش آنان از سوی دیگر ایجاب می نماید که به تولید اطلاعات کاربردی جهت توسعه پایدار آبزی پروری گونه های مذکور اقدام نمود.

اهداف تحقیق:

- دستیابی به حد مجاز آفلاتوکسین‌ها در تغذیه فیل ماهی
- آگاهی از تغییرات هیستوپاتولوژیکی ناشی از مصرف آفلاتوکسین‌ها در فیل ماهی.
- تعیین میزان باقیمانده بافتی آفلاتوکسین‌ها درعضلات فیلماهی در اشکال حاد و مزمن مسمومیت.
- تعیین اثرات اقتصادی ناشی از مسمومیت با آفلاتوکسین B_1 در فیل ماهی.
- تعیین تاثیر دزهای مختلف افلاتوکسین B_1 بر شاخص های رشد درفیل ماهی.
- دستیابی به اطلاعات برای تدوین استانداردها و تعیین حدود مجاز آفلاتوکسین B_1 در فیل ماهی.

۱-۱- کلیات

۱-۱-۱- ماهیان خاویاری

جهت اشنایی بیشتر با وضعیت وجایگاه ماهیان خاویاری دربرنامه های توسعه شیلاتی کشور توضیحات بیشتری به شرح ذیل ارایه می گردد:

ماهیان خاویاری یا فسیل‌های زنده با قدمت ۲۰۰ میلیون سال بر روی کره زمین بعنوان گونه‌های با ارزشی محسوب می‌شوند که از لحاظ تنوع زیستی، اکولوژی، تکامل و بویژه اقتصادی بسیار با اهمیت هستند. از ۲۷ گونه ماهیان خاویاری و پاروپوزه ماهیان جهان، ۶ گونه «فیل ماهی، تاسماهی ایرانی، تاسماهی روسی، شیپ و ازون‌برون و استرلیاد» در دریای خزر و رودخانه های منتهی به آن زیست می‌کنند که بزرگترین ذخیره طبیعی تاسماهیان جهان را تشکیل می‌دهند. این گونه‌های با ارزش ذخیره منحصر بفرد ژنتیکی دریای خزر هستند که نه تنها از لحاظ علمی از جایگاه ویژه‌ای برخوردارند، بلکه در تولید گوشت و خاویار و کسب درآمدهای ارزی، ایجاد اشتغال و توسعه صنعت توریسم، سهم بسزایی را ایفاء می‌نمایند.

با توجه به اهمیت تنوع زیستی و حفظ ذخایر ژنتیکی، گروه تخصصی ماهیان خاویاری در **IUCN**، پیشنهاد الحاق کلیه ماهیان خاویاری را به ضمایم کنوانسیون نظارت بر تجارت گونه‌های در حال انقراض **(CITES)** نمود که با تصویب آن در دهمین اجلاس کشورهای عضو سایتس (حراره – ۱۹۹۷)، کلیه ماهیان خاویاری از آوریل ۱۹۹۸ به ضمایم کنوانسیون اضافه شدند و تجارت قانونی گوشت و خاویار در بازارهای جهانی توسط کنوانسیون مزبور نظارت و با توجه به واقعیات، مشکلات و معضلات بنیادی و فقر اجتماعی - اقتصادی جوامع صیادی حاشیه خزر در سر راه بهره‌برداری مسئولانه ذخایر مشترک تاسماهیان دریای خزر از یکطرف و د وره تولیدمثل طولانی و بلوغ جنسی دیرهنگام تاسماهیان (۱۰تا ۱۸ سال) از طرف دیگر، مطمئناً ذخایر تاسماهیان دریای خزر حتی در آبهای جمهوری اسلامی ایران طی برنامه چهارم توسعه، بهبود جدی نخواهد یافت

میزان صید فیلماهی در سال ۱۳۸۵ برابر ۳۱/۶۲۶ تن بود که نشان دهنده ۸۴٪ کاهش در مقایسه با سال ۱۳۷۱ می باشد .

در ارزیابی عملکرد تعداد پروژه های تحقیقاتی در زمینه های مختلف مربوط به تاسماهیان، طی ۴۰ سال گذشته تعداد ۴۱۴ پروژه تحقیقاتی و گزارشات علمی موجود است که بیشترین تعداد آن در طی ۱۰ سال گذشته (۱۹۲ مورد) انجام پذیرفته است. از این تعداد حدود ۳۹ پروژه در زمینه تکثیر و پرورش، ۴۱ پروژه در زمینه مدیریت ذخایر، ۵۲ پروژه در زمینه اکولوژی، ۲۵ پروژه در زمینه ژنتیک، ۱۵ پروژه در زمینه بهداشت و بیماریها و ۲۰ پروژه در زمینه تکنولوژی فرآورده های تاسماهیان بوده است.

۲-۱-۱- برنامه تحقیقات راهبردی

بمنظور بهره برداری پایدار از ذخایر و توسعه آبزی پروری ماهیان خاویاری، تعداد ۱۰ برنامه تحقیقات راهبردی مشتمل بر ۴۲ طرح جامع و ۲۲۸ پروژه ارائه گردیده است:

۳-۱-۱- برنامه توسعه پرورش ماهیان خاویاری

با توجه به کاهش چشمگیر ذخایر طبیعی ماهیان خاویاری در دریای خزر، دریای سیاه و رودخانه‌های دانوب و آمور و بمنظور پاسخ به تقاضای جهانی، پرورش ماهیان خاویاری رشد چشمگیری در دنیا داشته به نحویکه تخمین زده می‌شود که میزان تولید گوشت تاسماهیان حدود ۱۵ هزار تن و خاویار پرورشی در حد ۵۰ تن در

سال ۲۰۰۶ رسیده باشد. این در حالی است که اکثر مراکز پرورشی و تولید خاویار پرورشی در دو دهه قبل اقتصادی نبودند و علت اصلی آن بالا بودن تولید خاویار در دریای خزر و قیمت پائین آن بوده است. با توجه به اینکه واقعیت‌های تلخ حاکم بر دریای خزر و عدم اعمال مدیریت اصولی توسط شیلات ۵ کشور کاهش ذخایر طبیعی ماهیان خاویاری همچنان ادامه دارد و بنظر می‌رسد در صورت عدم اعمال مدیریت اصولی و پایدار بر ذخایر ماهیان خاویاری در دریای خزر، توسعه پرورش تاسماهیان یکی از راههای تأمین گوشت و خاویار حتی حفاظت ذخایر باشد. زیرا با تأمین گوشت و خاویار مورد نیاز جامعه و بازار جهانی، میزان فشار صید بر ذخایر طبیعی در دریاها کاهش خوهد یافت.

در چنین شرایطی به موازات حمایت از ذخایر ماهیان خاویاری حوضه دریای خزر، توجه به پرورش تجاری این ماهیان به منظور تولید گوشت و خاویار از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می باشد و استانهای شمالی و تعداد زیادی از مناطق کشور برای این امر بسیار مستعد می‌باشند.

با توجه به کاهش شدید ذخایر و کم بودن تعداد ماهیان صید شده و عدم عرضه به بازار ، مردم عادی به این محصول دسترسی نداشته و ماهیان صید شده عمدتاً بصورت سهمیه صید مصرف صیادان می شود و مصرف کنندگان در شمال کشور بعضاً با مراجعه مستقیم به مدیریت ماهیان خاویاری و یا عمدتاً از طریق بازار های محلی و ماهیان غیر مجاز ماهی خاویاری مورد نیاز خود را خریداری می کنند. اما با توجه به برنامه تولید ۴۰۰ تن از دریا و ۱۵۰۰ تن از طریق پرورش تقاضای کافی برای مصرف گوشت در داخل و خاویار برای بازار جهانی وجود داشته باشد.

در سال ۱۳۸۵ حدود ۱۵ تن گوشت ماهیان خاویاری پرورشی از طریق مراکز تولیدی (بخش خصوصی و دولتی) تولید گردید که بطور زنده به مبلغ ۶۰/۰۰۰ ریال به ازای هر کیلوگرم در بازار عرضه شد و استقبال خوبی هم در این خصوص وجود داشت. در عین حال تولید خاویار پرورشی محصول و هدف اصل توسعه آبزی پروری تاسماهیان است می تواند درآمد مضاعفی را نصیب پرورش دهندگان نماید.از سوی دیگر، فرآوری گوشت تاسماهیان از جمله محصول فیله، دودی، کنسرو و ... می‌تواند درآمد زیر بخش را افزایش دهد.

٤-۱-۱- مناطق مستعد برای پرورش ماهیان خاویاری

با توجه به شرایط آب و هوایی استانهای مختلف کشور مطالعات انجام شده در مکان یابی مناطق مساعد برای پرورش ماهیان خاویاری بیانگر آن است که بیش از ۲۰۰ هزار هکتار برای توسعه آبزی پروری تاسماهیان مناسب است (جدول۱) . نتایج بررسی های انجام شده به تفکیک هر استان در ذیل آمده است.

جدول ۱: مساحت کل مکانهای مناسب آبزی پروری برای پرورش ماهیان خاویاری در کشور

نام نقشه (شماره نقشه)	مجموع مساحت کد واحد ۱ (هکتار)	مجموع مساحت کد واحد ۲ (هکتار)	مجموع مساحت کد واحد ۳ (هکتار)
رشت	۹۰۹۳۷/۵	۱۵۶۲۵	۱۶۲۵۰
بندرانزلی	۵۴۶۸۷/۵	۸۲۵۰۰	-
اردبیل	-	۹۶۸۷/۵	-
ساری	۱۳۸۷۵۰	۴۷۸۱۲/۵	۱۱۴۶۸۷/۵
آمـل	۱۰۰۹۳۷/۵	۱۲۱۸۷/۵	-
قزوین	۱۶۵۶۲/۵	-	-
گنبد کاووس	۳۸۱۲۵	۴۷۱۲۵۰	-
گرگان	۶۶۸۷۵	۳۱۸۷۵	-

۲-۱-آفلاتوکسین ها در آبزیان

بر طبق تعریف ارائه شده توسط میلر (۱۹۹۵) آفلاتوکسین ها از سا لیان بسیار دور شناخته شده ودر کتاب old Testament از آنها یاد شده است. علیرغم این موضوع تا حال حاضر هنوز مسائل مبهم و حل نشده‌ای در ارتباط با آنان وجود دارد. آفلاتوکسین‌ها از جمله قوی‌ترین سموم طبیعی تولید شده توسط قارچها محسوب گردیده که از طریق آلوده نمودن غذاها، مواد اولیه غذایی و محصولات با منشاء حیوانی می‌توانند مسمومیت ایجاد نمایند(Schoental 1967) .

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)

در حال حاضر، 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) .

آلودگی غذاهای مصرفی در آبزیان با آفلاتوکسین‌ها امروزه از گسترش زیادی برخوردار است.

این موضوع علی‌الخصوص در کشورهایی با آب وهوای مرطوب گرمسیری بیشتر به چشم می‌خورد، در کنار شرایط آب و هوایی، روش‌های غیراستاندارد فراوری و نگهداری مواد اولیه و غذاهای مصرفی از دیگر عوامل بسترساز جهت رشد قارچ وتولید توکسین محسوب می‌گردند(Murjani , 2003) .

بسیاری از مطالعات اپیدمیولوژیکی بیانگر این مطلب است که حضور آفلاتوکسین در غذا علاوه بر صدماتی که به آبزیان پرورشی می‌رساند، می‌تواند جهت سلامت حیوانات پرورشی خاکزی نیز خطرناک باشد. بافت‌های حیوانی قادر به نگهداری آفلاتوکسین‌ها و مواد حاصل از متابولیسم آنها در خود می‌باشند طبعاً این موضوع از نظر مخاطراتی که برای انسان و بهداشت عمومی دارد حائز اهمیت خواهد بود(Puschner, 2003; Marjani 2003) .

از زمانیکه بشر به ماهیت آفلاتوکسین‌ها پی برد، بررسی آفلاتوکسیکوزیس در ماهیان آب شیرین بخصوص قزل‌آلای رنگین کمان (Onchorhynchus mykiss) مورد مطالعه قرار گرفت. (Halver 1969;Lavell 1989, Hendricks 1994; Challagher and Eaton 1995)

به علاوه تحقیقاتی در گربه‌ماهی آمریکایی روگاهی (Ictarulus punctatus)، (Lovel 1984, Jantrarotai and Lovell 1990; Jantuarotari *et al.*, 1990; Plakas *et al.*, 1991; Hendricks 1994; Gallagher and Eaton 1995).

تیلاپیای نیل (Oreochromis niloticus) (Chavez- Sanachez *et al.*, 1994; Tuan *et al.*, 2002).

کپور هندی (Labeo rohita)، (Sahoo *et al.*, 2001; Sahoo *et al* ., 2003; Murjani 2003)

ماهی گامبوزیا(Gambusia affimis)، (Mc.Kean *et al.*, 2006)

ماهی گوپی (*Lebistes reticulates*) (ساتو و همکاران ۱۹۷۳) و در تعدادی از میگوها از جمله میگوهای مونودن *(Penaeus monodon)* میگوی آبی *(Penaus stylirostris)* میگوی وانمی

(Wiseman *et al.*, 1982; Lightner *et al.*, 1982; Boonyaratpalin *et al.*, 2001) *(P. vannamei)*

آرتمیاسالینا (*A. salina*) (Reiss *et al.*, 1972a) . سیکلوپس (Cyclops fuscus) (Reiss, 1972b) به انجام رسیده است. اثرات عمومی توسط دانشمندانی از جمله (Cotty و همکاران ، ۱۹۹۴؛ Moss ، ۱۹۹۸ ،Bennett, و Klich در

سال ۲۰۰۳) مورد بازبینی قرار گرفت، حضور توکسین در خوراک مصرفی حیوانات توسط De Vries و همکاران در سال ۲۰۰۲ ، بیوسنتز و متابولیسم آن توسط Calvo و همکاران در سال ۲۰۰۲ ، سم شناسی و اثرات بیولوژیک آن توسط (Coulombe 1993, Coulombe 1994, Cullen and Newberne 1994, Eaton & Groop man, 1994) به انجام رسید، تا کنون جمع‌بندی اختصاصی در مورد اثرات افلاتوکسین با تأکید بر آبزیان به انجام نرسیده است.

تعداد زیادی از قارچهای رشته‌ای (کپک‌ها) فاسد کننده مواد غذایی وجود دارند که از طریق تولید ترکیبات سمی به نام توکسین‌های قارچی (مایکوتوکسین‌ها) می‌توانند منجر به ایجاد مسمومیت در انسان یا حیواناتی که مبادرت به خوردن آنها می‌نمایند، گردند (Coulombe 1993). اغلب قارچ‌هایی که قادر به تولید سموم قارچی بوده و بنام قارچهای سمی شناخته می‌شوند به جنس‌های آسپرژیلوس (Aspergillus)، پنی‌سیلیوم (Penicilluim) و فوزاریوم (Fusarium) تعلق دارند (Moss 1998) .

رشد قارچها و تولید توکسین، ۲ مرحله مجزا از زندگی قارچ‌ها، محسوب می‌گردد که هر یک نیازمند شرایط خاص خود است.

در مرحله انتهایی رشد فعال بر روی بسترهای مغذی و در مجاورت شرایط مساعد محیطی، قارچهای سم‌زا قادر به تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که جهت فعالیت‌های اصلی متابولیکی قارچ ضروری نبوده ولی می‌توانند جهت فراهم نمودن شرایط بهتر جهت بقای قارچ موثر باشند. این ترکیبات حاصل از متابولیسم ممکن است در اسپور یا در رشته‌های میسیلیوم قارچ تجمع پیدا کرده و یا مستقیماً بر روی بستر مغذی در زمان برداشت محصول یا در طی زمان ذخیره‌سازی آن، ترشح گردند (Moss, 1991) .

تولید این متابولیت‌های ثانویه معمولاً در طی مراحل اسپورزایی و قبل از ورود به مرحله استراحت و غیر فعال شدن قارچ به انجام رسیده و معمولاً نیازمند شرایط ویژه ای نسبت به شرایط رشد نباتی قارچ می‌باشد (Sekiguchi & Goucher 1977). پتانسیل سم‌زایی برای هر یک از گونه‌های تولید کننده سم از نقطه نظر کمی و کیفی، با یکدیگر متفاوت است. برای مثال برخی از سویه‌های سم‌زا که از یک جنس بوده و دارای سرعت رشد و فعالیتهای متابولیک مشابهی می‌باشند، قادرند که مقادیر مختلف سم و متابولیت‌های ثانویه متفاوتی تولید نمایند.

این طیف وسیع توانایی در بیوسنتز سموم وابسته به فراوانی و حضور قارچها بوده که می‌تواند منجر به افزایش آلودگی مواد مغذی به مایکوتوکسین گردد (Dragoni *et al.*, 2000) تمامی قارچها قادر به تولید مایکوتوکسین‌ها نبوده و این ویژگی مختص به گونه‌های خاصی در برخی از جنس‌ها می‌باشد.

در اکثر مواقع حضور قارچ به تنهایی در یک بستر مناسب مغذی نمی‌تواند دلیلی بر وجود سموم قارچی باشد. سم می‌تواند حتی در صورت مرگ قارچ به عنوان یک متابولیت فعال در محیط وجود داشته باشد. بنابراین تمام گونه‌های جدا شده اسپرژیلوس فلاووس قادر به تولید آفلاتوکسین‌ها نبوده و فقط گونه‌هایی که دارای ژن‌های مسئول تولید آفلاتوکسین می‌باشند این توانایی را دارند.

۱-۲-۱- طبقه بندی افلاتوکسین ها

آفلاتوکسین هاترکیباتی سمی هستند که توسط چهارگونه ازقارچها تولید می شوند.تمامی این گونه ها به جنس آسپرژیلوس تعلق دارند.تولید اولیه این سموم توسط سویه‌های خاصی از آسپرژیلوس فلاووس وآسپرژیلوس پارازیتیکوس بوده و ندرتاً توسط گونه‌های آسپرژیلوس نومیوس *(A. namius)* و آسپرژیلوس نیجر *(A.niger)* نیز تولید می‌گردند .(Eaton & Groopman, 1994)

تا کنون در حدود ۲۰ نوع آفلاتوکسین جداسازی گردیده در حالیکه فقط ۴ نوع از آنها در ارتباط با ویژگی‌های بیولوژیکی و تأثیر آنها بر سلامتی مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

آسپرژیلوس پارازیتیکوس قادر به تولید هر ۴ نوع سم قارچی اصلی می‌باشد. این سموم عبارتند از AFB_1 ، AFB_2 ، AFG_1، AFG_2. در حالیکه اسپرژیلوس فلاووس فقط به تولید AFB_1 و AFB_2 میباشد(D'Mello & MacDonald 1997).

بواسطه ساختار شیمیایی چند حلقه‌ای آفلاتوکسین‌های B و G این ترکیبات در زمانیکه در مجاورت اشعه ماوراء بنفش (UV) قرار بگیرند از خود خاصیت فلورسانس بروز می‌دهند. تمایز آفلاتوکسین‌های G وB از طریق رنگ فلورسانس ناشی از تابش پرتو فرابنفش به آنان امکان‌پذیر می‌گردد. آفلاتوکسین‌های B_1 و B_2 به رنگ آبی وآفلاتوکسین G_1 و G_2 به رنگ زرد مایل به سبز در می‌آیند .(Sargeant *et al.*, 1963, Roc 1992).

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) .

مطالعات بسیاری جهت تشخیص عامل مرگ و میرها انجام شد. در نهایت یک ترکیب فلورسانس از غذای بوقلمون‌ها جداسازی گردیده و توسط کروماتوگرافی لایه نازک به عنوان عامل مسمومیت و تلفات حادث شده تعیین گردید(Rustom, 1997) . متعاقباً غذای حاوی بادام زمینی برزیلی مورد بررسی قرار گرفته و مقادیر قابل توجهی آلودگی، با آسپرژیلوس فلاووس که می‌توانست عامل مرگ و میر باشد شناسایی گردید. لذا ترکیبات سمی جدا شده از طرق کروماتوگرافی لایه نازک بنام افلاتوکسین نامیده شدند که به معنای توکسین مشتق شده از آسپرژیلوس فلاووس می‌باشد(Sargeant *et a.,l* 1963) .

ویژگی شیمیایی آفلاتوکسین‌های B_2 و G_2 به عنوان مشتقات دی هیدروکسی آفلاتوکسین‌های B_1 و G_1 متعاقباً مورد شناسایی قرار گرفت. ساختمان شیمیایی آنها شامل یک حلقه بی‌فوران ملحق شده به یک هسته کومارین به همراه یک حلقه پنتونون در: AFB_1 ، AFB_2 ، AFB_{2a}، AFM_1 ،AFM_2 ، AFM_{2a} و آفلاتوکسیکول و یا یک حلقه لاکتون در: AFG_1 ، AFG_2 ، AFG_{2a}، $AFGM_1$ ،$AFGM_2$ ، $AFGM_{2a}$ و AFB_2 (Asao et al. 1963) .

دو آفلاتوکسین دیگر از جمله آفلاتوکسین M_1 و M_2 به عنوان متابولیت‌های هیدروکسید شده آفلاتوکسین B_1 و B_2 در پستانداران محسوب گردیده و این ترکیبات از شیر گاوهای شیری تغذیه شده با غذاهای آلوده با آفلاتوکسین جداسازی گردیده‌اند (Patterson *et al.,* 1978) .

۲-۲-۱- آفلاتوکسیوزیس در حیوانات پرورشی

آفلاتوکسین‌ها و محصولات ناشی از متابولیسم آنها در حیوانات به عنوان ترکیبات سرطان‌زای با منشاء غذایی شناخته شده‌اند. این ترکیبات دارای مخاطرات جدی برای سلامت انسان و حیوان می‌باشند (Hussein & Brast 2001 , Puschner 2002, Williams *et al.* 2004)

محدوده وسیعی از تأثیرات بیولوژیکی از جمله: مسمومیت‌زایی، سرطان‌زایی، تومورزایی، ضایعات ژنتیکی، تضعیف سیستم ایمنی و تولید مثلی از موارد گزارش و ثبت شده در بسیاری از گونه‌های جانوری می‌باشند

(Steyn 1995) .بر طبق گزارش Busby و Wogan در سال ۱۹۸۵ اگر آفلاتوکسین‌ها در دوزهای بالا به شکل خوراکی مصرف گردند منجر به مرگ شده و بیماری حاصل از این مسمومیت، آفلاتوکسیکوزیس نامیده می-شود. بعلاوه Wogen و New berne در سال ۱۹۶۷ مشاهده نمودند که مصرف مقادیر کم آفلاتوکسین برای مدت طولانی می‌تواند منجر به ایجاد سرطان اولیه در کبد تعدادی از جانوران از جمله مهره‌داران آبزی گردد. در میان آفلاتوکسین‌ها، آفلاتوکسین B_1 از همه سمی‌تر بوده و میزان سمیت سایر آفلاتوکسین‌ها به تدریج کاهش می‌یابد. این کاهش به ترتیب در AFG_1 و AFB_2 و AFG_2 قابل مشاهده است.AFB_1 در سلول‌های کبدی به متابولیت‌های متعددی تبدیل می‌گردد این ترکیبات می‌توانند به قسمتهای خوراکی محصولات دامی منتقل شوند(Puschner 2002). پاره-ای از مطالعات تجربی بیانگر این مطلب است که مصرف آفلاتوکسین‌ها در غذاهای جانوری آلوده از طریق انتقال AFB_1 و متابولیت‌های آن می‌تواند منجر به آلودگی محصولات غذایی دامی گردد. (CAST 1989; Moss 1998; De Vries *et al.*, 2002; Puschner 2002; Bennett & Klich 2003, Agag 2004).

متعاقباً ، متابولیت‌های آفلاتوکسین B_1 از محصولات دامی (AFM_1 و AFM_2 از شیر، محصولات لبنی و تخم مرغ) و همچنین از گوشت و مایعات بدنی انسان (ادرار و شیر) جداسازی گردید.

(Miraglia *et al,*. 1996; Moss 1998; Montagna *et al.*, 2002; Bennett & Klich 2003 ; Agag 2004).

تمامی متابولیت‌های جداسازی شده از AFB_1 فعالیت کمتری داشته و فعالیتهای متابولیکی متفاوتی را از خود بروز می‌دهند، میزان مسمومیت‌زایی و ظرفیت ایجاد تغییرات بافتی AFB_1 و متابولیت‌های آن به ترتیب زیر کاهش می‌یابد:

$AFG_{2k} < AFB_{2k} < AFG_2 < AFP_1 < AFB_2 < AFQ_1 < AFL–H_1 < AFM_1 < AFG_1 <$ Aflatoxicol (AFL) < AFB۱

(Wong & Hsieh 1976)-.

بنابراین بعد از AFB_1 و AFL ، آفلاتوکسین‌های G_1 و M_1 به عنوان آفلاتوکسین‌های که می‌توانند در مواد غذایی با منشاء حیوانی وجود داشته و برای سلامت مخاطره‌آمیز باشند مورد شناسایی و تأکید قرار گرفتند (Weiden borner 2001). از طرف دیگر این نکته حائز اهمیت است که بواسطه پایدار بالای متابولیت‌های آفلاتوکسین‌ها در مقابل فراوری [پایداری در حرارت بین ۲۳۷ درجه سانتی‌گراد (G_2) و ۲۹۹ درجه سانتی‌گراد (M_1)] عملاً پس از فراوری این ترکیبات در فرآورده نهایی قابل ردیابی می‌باشند(Roc 1992, IARC 1993) .

بطور کلی این پدیده مشخص می‌نماید که عامل آلوده اولیه از چه درجه اهمیتی برخوردار است . در اغلب موارد گزارش آفلاتوکسیکوزیس در حیوانات پرورشی که همراه با حضور مقادیر بالای توکسین در مواد غذایی مصرفی بوده است، عامل شرایط بد نگهداری مواد اولیه بیشترین تأثیر را داشته است (Smith *et al* ., 1976; Tacon 1992 ; Agag 2004)

۳-۲-۱- نقش آفلاتوکسین‌ها در آبزی‌پروری

حضور آفلاتوکسین‌ها در آبزیان پرورشی و نقش آنان در این رابطه هنوز به درستی ارزیابی نشده است. گزارش-های بسیار اندکی در ارتباط با آبزیان پرورشی که با غذای آلوده با آفلاتوکسین B_1 تغذیه شده‌اند، در دسترس می‌باشد. علیرغم اینکه آفلاتوکسیکوزیس می‌تواند در ایجاد صدمات جدی به ماهی‌ها و میگوهای پرورشی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار باشد. برای اولین بار در سال ۱۹۶۰ آفلاتوکسیکوز در آبزیان پرورشی به همراه وقوع هپاتوم در مراکز تکثیر قزل‌آلای رنگین‌کمان در ایالت آیداهو واقع در آمریکا گزارش گردید. در آزمایشات بعد از مرگ وجود کبدی حاوی ندول‌های بسیار (مولتی ندولار) به همراه کارسینومای اولیه سلولهای کبدی مشاهده گردید (Ashley & Halver 1963,Wales 1970) .

علت غایی تلفات، بواسطه کنجاله‌های پنبه‌دانه کپک‌زده، که آلوده به آفلاتوکسین‌ها بوده و به شکل خام جهت تغذیه ماهیان مورد استفاده قرار گرفته بودند، تشخیص داده شد.بواسطه این واقعه مهم، آفلاتوکسین‌ها برای اولین بار به عنوان ترکیبات سرطان‌زا مورد توجه قرار گرفتند. مطالعات تکمیلی انجام شده موید این مطلب بود که قزل‌آلای رنگین‌کمان از گونه‌های بسیار حساس از نظر ایجاد تومورهای کبدی بواسطه مصرف آفلاتوکسین B_1 می‌باشد. در تداوم تحقیقات انجام شده مشاهده گردید که شرایط مشابهی در اورپا و شرق وجود دارد. تلفات دسته جمعی ناشی از مصرف آفلاتوکسین‌ها سپس از آلمان گزارش گردید (Wunder & Korn 1982).

در مکزیکو توسط Ruizperez و همکاران در سال ۱۹۸۴ در دانمارک Rasmussen و همکاران در سال ۱۹۸۶ و در شیلی Tim Phillips در سال ۱۹۹۰ یک آلودگی تجربی ایجاد گردید. Cagauan و همکارانش در سال ۲۰۰۴ گزارش وقوع تلفات دسته‌جمعی در ماهیان تیلاپیای پرورشی در فیلیپین را که از طریق تغذیه با غذاهای کپک-زده اتفاق افتاده بود گزارش کردند.

٤-۲-۱- منابع آلوده کننده غذاهای مصرفی آفلاتوکسین‌ها در آبزیان پرورشی

محصولات شیلاتی بعنوان یک منبع مهم تأمین غذا برای انسان ومصارف حیوانی مطرح هستند. افزایش این تقاضا منجر به رشد سریع در آبزی‌پروری گردیده است(Myhr &. Dalmo 2005) .

در طی دهه گذشته تولید محصولات آبزی‌پروری به شکل قابل ملاحظه‌ای در آمریکا، اروپا و آسیا افزایش یافته است (EC 2001 , FAO 2002) .

بواسطه تقاضای سیستم‌های پرورشی آبزیان به غذا ومحدودیت‌های موجود در استفاده از ضایعات صیادی برای تغذیه ماهیان پرورشی، استفاده از غذاهای صنعتی به شکل اساسی در آبزی‌پروری گسترش یافته است(Nylor *et al.*, 2000) . گونه‌های اصلی پرورشی در کشورهای اروپایی ماهی آزاد آتلانتیک، قزل‌آلای رنگین‌کمان، باس دریایی، سیم دریایی (Sparus aurata) توبورت، مار ماهی و کپور معمولی می‌باشند(EC, 2001) . این گونه‌ها عمدتاًدر محیط طبیعی گوشتخوار بوده ودر شرایط پرورش به شکل متراکم نیازمند به مقادیر بالای پروتئین می‌باشند. اخیراً غذاهای تجاری آبزیان از ترکیباتی از جمله: ذرت به عنوان بخش اصلی و پودر ماهی و روغن نباتی به عنوان منابع تأمین پروتئین و چربی برای این ماهیان پرورشی و میگوهای گوشتخوار در سیستمهای متراکم بکار برده می‌شوند.(New *et al.*, 1995; Scottish Excutive Report 2002) .

اغلب پودرهای ماهی از ماهی کامل تهیه می‌گردند از جمله این ماهیان می‌تواند به ماهیان آنچوی وکاپلین و یا محصولات فرعی و ضایعات ماهی منهادن، هرینگ وآزاد ماهیان اشاره نمود (Hardy 1989). پودر ماهی پس از خشک کردن و آسیاب کردن ماهی تازه حاصل می‌شود و غذای ماهیان پرورشی از ترکیب پودر ماهی با کربوهیدرات‌ها، همبندها، آرد سویا، و گندم به علاوه ویتامین‌ها، مواد معدنی و رنگدانه‌ها و سایر مواد مغذی لازم شناخته می‌شود. از ضایعات ناشی از فراوری ماهی، از جمله کنسانتره‌های پروتئینی و هیدرولیز شده نیز در تغذیه آبزیان بهره‌برداری می‌گردد (EC, 2003).

بر اساس گزارش CAST در سال ۱۹۸۹ تقریباً ۲۵ درصد از محصولات غله‌ای برداشت شده از مزارع به مایکوتوکسین‌ها آلوده می‌باشند. محاسبات FAO بیانگر حضور قابل توجه آفلاتوکسین در غلات در منطقه آسیای جنوب شرقی می‌باشد. آسیا و آفریقا به عنوان بزرگترین تولید کنندگان جهانی ذرت و بادام زمینی به

شکل جدی از صدمات اقتصادی ناشی از آلودگی به آفلاتوکسین‌ها رنج می‌برند (Kpodo 1996; CGIAR 1997, Bankole & Adebanjo 2003) .

البته مشکل آفلاتوکسین‌ها در آمریکای جنوبی (Moss 1998) و هندوستان (Bhat *et al.*, 1997) از مسائل جاری محسوب می‌گردد

میزان و شدت مسمومیت در گونه‌های تحت مطالعه تحت تأثیر عواملی از جمله: نوع، جنس، وزن، جیره غذایی مصرفی و مجاورت با عوامل عفونی بیماری‌زا می‌باشد. ماهیان جوان‌تر و نوزاد نسبت به بالغین حساسیت بیشتری را نسبت به آفلاتوکسین‌ها نشان می‌دهند برخی از گونه‌ها نسبت به سایر گونه‌ها از حساسیت بیشتری برخوردار هستند. (Royes & Yanong 2002) .

قزل‌آلای رنگین‌کمان بعنوان حساس‌ترین گونه ماهی پرورشی به AFB_1 محسوب می‌گردد (CAST 1989) و پائین‌ترین LD_{50} در بین آبزیان تحت مطالعه برای اینگونه تعیین گردیده است (جدول ۲) . بنابراین ۵۰ درصد از قزل‌آلاهای رنگین‌کمان اگر با جیره غذایی حاوی ppb ۱۰۰۰ ـ ۵۰۰ (mg/kg ۱ ـ ۰/۵) تغذیه شوند سریعاًمی‌میرند. مطالعات تجربی نشان می‌دهد که آبزیان پرورشی بی‌مهره (میگوها و ...) از جمله میگوهای خانواده پنائیده *(P. monodon , P. stylirostris , P. vannemei)* را می‌توان به روشی مشابه ماهی‌ها با AFB_1 از طریق عضلانی یا خوراکی مورد آزمون قرار داد.

در میگوهای خانواده پنائیده که با دُزهای بالای آفلاتوکسین B_1 از طریق تزریق عضلانی تحت آزمایش قرار گرفتند ضایعات مشابهی در هپاتو پانکراس ایجاد گردید و علاوه بر آن میزان حساسیت آنان در مقابل عوامل عفونی بیماری‌زا افزایش یافت. آزمایشهای هیستوپاتولوژیک منجر به مشاهده ضایعاتی در هپاتوپانکراس، آرواره‌ها (Mandibular Organ) و بافت خون‌ساز گردید. در تغذیه این میگوها با غذای آلوده به آفلاتوکسین به شکل مکرر، علائم نکروز یا مرگ و میر مشاهده نگردید (Wiseman *et al.*, 1982). این یافته‌ها مشخص می‌نماید که میگوهای خانواده پنائیده در مقایسه با سایر آبزیان تحت مطالعه از حساسیت کمتری نسبت به مسمومیت حاد با AFB_1 برخوردار می‌باشند. (جدول ۲)

مطالعات بعدی نشان داد که میزان حساسیت گونه‌های میگوی آبی پاسیفیک*(P. stylirostris)* و میگوی سفید پاسفیک *(P. vannemei)* به مسمومیت با آفلاتوکسین؛ نسبت به سایر سخت‌پوستان وماهیان استخوانی تحت مطالعه

کمتر می‌باشد.

L_{D50} ۲۴ ساعته سم در میگوهای خانواده پنائیده نسبت به این شاخص در گربه ماهی روگاهی که یکی از مقاوم‌ترین مهره‌داران آبزی در این رابطه می‌باشد، به شکل قابل ملاحظه‌ای بالاتر است. (۱۶میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) (Gallagher & Eaton 1995). اگرچه تغییرات پاتولوژیک مشاهده شده در میگوهای خانواده پنائیده در اعضای مشابه با ماهیان شباهت دارد ولی تا کنون رشد تومور در این گونه‌ها گزارش نشده است (Lightner 1977 ; Lightner *et al.*, 1982) .

جدول ۲ ـ مقایسه مسمومیت حاد با آفلاتوکسین B_1 در گونه‌های مختلف آبزیان

گروه	گونه آبزی	LD50 mg AFB/kg	منبع
مهره‌داران آبزی	قزل‌آلای رنگین کمان *(Oncorhynchus mykiss)*	۰/۵	Lovell , 1989
		۰/۸۱ i.p.	Bauer *et al.*, 1969
	تیلاپیاسی‌نیل *(Oreochromis niloticus)*	۱۰۰	Tuan 2002
	گربه‌ماهی *(Ictalurus punetatus)*	۱۰ ـ ۱۵ i.p	Jantrarotai *et al.*, 1990 b
	ماهی آزاد *(Onconhynchus kisutch)*	۱۰	Schoental 1967
	ماهی روهو *(Labeo rohita)*	۱۲ـ ۱۳/۳ i.p	Sahoo *et al.*, 2003
	گامبوزیا *(Gambusia affinis)*	۰/۶۸۱	Mc Kean *et al.*, 2006
	آرتمیا *(Artemia salina)*	۱۴/۰ *	Reiss, 1972a
بی‌مهرگان آبزی	میگوهای خانواده پنائیده:		
	میگوی آبی *(P. stylirostris)*	۱۰۰/۵ i.p	Wiseman *et al.*, 1982
	میگوی سفید *(P. vannamei)*	۵۰ ـ ۳۰۰ d	Wiseman *et al.*, 1982
	سیکلوپس *(Cyclops fuscus)*	۱/۰ *	Reiss, 1972 b

* **(LC50)** طی ۲۴ ساعت (غلظت کشنده) **mg/liter**

i.p. تزریق داخل صفاقی

d : تجویز از طریق جیره غذایی

۵-۲-۱- مطالعات تجربی انجام شده در آبزیان پرورشی

در گونه‌های مختلف جانوری درجات متفاوتی از حساسیت به AFB_1 مشاهده می‌گردد. از مبانی ایجاد این تفاوت‌ها می‌توان به زمینه‌های مستعد ژنتیکی در این گونه‌ها اشاره نمود. این موضوع تا حد زیادی وابسته به الگوهای مختلف نشانه‌گذاری ژن‌های موثر و درگیر در مراحل انتقال بیولوژیکی آفلاتوکسین‌ها می‌باشد.AFB_1 یکی از رایج‌ترین ترکیبات مستعد کننده ایجاد سرطان می‌باشد و جهت فعال شدن بیولوژیکی بایستی به شکل ترکیب واسط AFBO درآید. (Eaton & Gallagher 1994, Roebeuck & Maxuitenko 1994).

تحقیق انجام شده توسط Farabi و همکاران درسال ۲۰۰۶ 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 کلینیکی مشاهده شده در این تحقیق ، خون‌ریزی در ناحیه سر، پلاک‌های استخوانی ردیف شکمی، ایجاد خمیدگی در ستون فقرات و همچنین ظهور نقاط زرد رنگ در ناحیه سینه‌ای بوده است. کاهش مرگ و میر و قطع آن پس از گذشت ۱۷ روز از تغذیه ماهیان با جیره‌های غذایی غیر آلوده مشاهده گردید.

نخستین فعالیت پرورش فیل ماهی در سالهای ۱۹۵۲ تا ۱۹۶۰ در کشور روسیه به انجام رسید (Kozlove, 1993) . پرورش این گونه با ارزش در آب شیرین و در ایران برای نخستین بار توسط شادروان دکتر یوسف پور در سال ۱۳۶۹ با موفقیت به انجام رسید (یوسف‌پور، ۱۳۷۳) . بر اساس تجربیات پرورش گونه فیل‌ماهی میزان غذادهی بر اساس وزن توده زنده تا ۳ درصد بیومس مقرون به صرفه است (کاکوزا ، ۱۳۸۰)

درتجربیات حاصل از مطالعه تعیین بهترین درصد غذادهی در پرورش فیل ماهی در مخازن فایبرگلاس در دمای ۲۶ تا ۲۷/۵ درجه سانتی‌گراد با غذادهی معادل ۴ درصد وزن بدن در اوزان ۳۵ تا ۱۵۰ گرم و تراکم ۲/۲ کیلوگرم در متر مربع ضریب تبدیل غذا،۱/۶ بدست آمد (محسنی و همکاران، ۱۳۸۲).

دردهه اخیر دانشمندان بسیاری به مطالعه الگوهای متابولیسم AFB_1 در آزاد ماهیانی از جمله قزل‌آلای رنگین-کمان و ماهی آزاد کوهو و همچنین ماهی گورخری (Zebra fish) و گربه ماهی روگاهی همت گماشته‌اند.

اگر آفلاتوکسین B_1 از طریق جیره غذایی به حیوانات خورانده شود این ترکیب به واسطه ویژگی قابلیت انحلال در چربی به راحتی از طریق دستگاه گوارش جذب و به جریان خون وارد می‌شود(Leeson et al 1995) .

Plakas و همکارانش در سال ۱۹۹۱ نشان دادند که حداکثر غلظت AFB_1 در پلاسما پس از خوراندن AFB_1 نشان دار شده با C^{14} و در گربه ماهی روگاهی پس از ۴ ساعت مشاهده گردیده وتقریباً ۹۵ درصد آن با لیپوپروتئین-های پلاسما باند می‌شود. پس از اتصال آن با لیپوپروتئین‌های پلاسما از طریق سیستم باب به کبد انتقال یافته و در هپاتوسیت‌ها به دام می‌افتد.

در قزل‌آلای رنگین‌کمان به مانند موش محل ترجیحی تجمع و دفع AFB_1 و متابولیت‌های آن سیستم کبدی ـ صفراوی می‌باشد ((Valsta *et al.*, 1988 ; Wogan & Newberne 1967)

همچنین سیستمهای صفراوی و ادراری به عنوان سیستم‌های اصلی دفعی در قزل‌آلا و گربه‌ماهی محسوب می-گردند (Plakas *et al.*, 1991) .

٦-٢-١- گونه‌های حساس

صاحبنظران بسیاری اظهارنظر نموده‌اند که تفاوت‌های بسیاری در حساسیت به AFB_1 به شکل داخل گونه‌ای و فراگونه‌ای در ارتباط با ایجاد سرطان‌های کبدی وجود دارد. (Eaton *et al.*, 1990.; Ramsdell & Eaton 1990; Hayes *et al.*, 1991, Eaton *et al*,. 1995) .

برای مثال در جوندگان حساسیت Rat بسیار زیاد بوده در حالیکه موش‌ها مقاوم می‌باشند (Ramsdell & Eaton 1990; Hayes *et al.*, 1991) .

همچنین در آزاد ماهیان، قزل‌آلای رنگین‌کمان گونه‌ای بسیار حساس و ماهی آزاد کوهوگونه‌ای مقاوم به شمار می‌رود(Hendrieks 1994). در ارتباط با جوندگان،عامل اصلی مقاومت در موش، سم‌زدایی از AFBO از طریق سیستم الحاق آن به GST می‌باشد(Neal *et al.*, 1981).

برخلاف جوندگان، مقاومت موجود در آزاد ماهیان مکانیزم متفاوتی داشته و از قابلیت سم‌زدایی AFBO توسط سیستم آنزیمی GST متابعت نمی‌نماید (Bailey *et al.*, 1988) .در واقع تفاوت حساسیت در آزادماهیان ناشی از پایین بودن راندمان متابولیسم AFB_1 به AFBO در ماهی آزاد کوهو نسبت به قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد. به طور کلی، حساسیت موجود به مسمومیت با AFB_1 در ماهیان، مانند پستانداران، ناشی از الگوهای متفاوت آنزیمی مداخله‌گر در متابولیسم این ترکیب می‌باشد. چنین تفاوت‌هایی ممکن است به اختلافات ژنتیکی، قابلیت فعالیت آنزیم‌ها وهمچنین میزان هماهنگی و تنظیم واکنش‌ها در مرحله اول و دوم فعال‌سازی و سم‌زدایی AFB_1 نسبت داده شود (Bailey *et al.*,1988).

مطالعات انجام شده بر روی شاخص اتصال DNA ـ AFB_1 به شکل مشخصی موید این مطلب است که این اتصال در قزل آلای رنگین‌کمان نسبت به ماهی آزاد کوهو بیشتر می‌باشد. این موضوع در طرق مختلف مصرف و تجویز آفلاتوکسین B_1 مورد آزمون قرار گرفت و نتایج آن نشان می‌دهد که در تجویز از طریق خوراکی میزان اتصال ۱۸ برابر و در روش تزریق داخل صفاقی ۵۶ برابر بیشتر بوده است. همچنین میزان اتصال DNA ـ AFB_1 در

جنین ۲۰ بار بیشتر از بالغین گزارش شده است. نظر به اینکه کبد به عنوان اولین عضو هدف مطرح می‌باشد لذا میزان DNA های باند شده با آفلاتوکسین B_1 در این عضو بیش از سایر اعضاء گزارش گردیده است. تعیین میزان بقایای DNA ـ AFB_1 در موجودات زنده تحت مطالعه بیانگر این مطلب است که این ترکیب در آزاد ماهیان پایداری بیشتری نسبت به پستانداران از خود نشان می‌دهد. این یافته‌ها دلالت بر این موضوع دارد که شستشوی آنزیمی این ترکیبات در آزاد ماهیان ضعیف بوده ومکانیزم‌های ترمیم DNA دارای بازده کافی جهت جلوگیری کردن از احتمال ایجاد جهش در DNA نمی‌باشند.

در ماهی آزاد کوهوو قزل آلای رنگین‌کمان، از نظر قدرت سم‌زدایی کبد ودفع متابولیت‌های AFB_1 توسط صفرا تفاوت چندانی به چشم نمی‌خورد. بنابراین به نظر می‌رسد که فاز II متابولیسم، و دفع متابولیت‌ها در این آبزیان شبیه به همدیگر می‌باشد (Bailey *et al.*, 1988) .

از طرف دیگر ، تفاوت‌هایی در این چرخه متابولیکی بین قزل‌آلای رنگین‌کمان با سایر آبزیان از جمله گربه ماهی روگاهی و ماهی گورخری مشاهده می‌گردد. یک بررسی گسترده توسط Gallagher و Eton در سال ۱۹۹۵ جهت ارزیابی تفاوت‌ها در متابولیسم کبدی و متابولیسم سیتوزولی AFB_1 در قزل‌آلای رنگین کمان و گربه‌ماهی روگاهی به عمل آمد.این مطالعات نشان داد که وجه مشخصه چرخه متابولیسم AFB_1 در قزل‌آلای رنگین‌کمان راندمان بالای فعالیت اپوکسیداسیون میکروزومی با واسطه CYP می‌باشد که منجر به تولید متابولیت‌های ناشی از هیدروکسیلاسیون از جمله : AFQ_1 یا AFP_1 نگردیده و فقط AFM_1 را تولید می‌کند . (Yang *et al.*, 2000)

تولید AFBO میکروزومی تحت تأثیر غلظت‌های پائین ($۱۶\mu m$) در آلودگی‌های طبیعی و همچنین غلظت‌های بالای AFB_1 (۱۲۸ μm) توأماً به چشم می‌خورد. Eaton & Gallagher (۱۹۹۵) دریافتند که تولید AFBO در قزل-آلای رنگین‌کمان منجر به افزایش فعالیت‌های اکسیداتیو به میزان ۶ برابر بیشتر از گربه ماهی روگاهی می‌گردد. همچنین گزارشات قبلی مبنی بر میزان بالای احیاء کننده‌های AFB_1 از جمله فعالیت AFL_1 دی هیدروژناز در قزل‌آلای رنگین‌کمان و سایر گونه‌های حساس مبین این مطلب است که رابطه تعادلی بین AFL_1 ـ AFB_1 به سمت تولید AFL_1 تمایل پیدا می‌کند (Salhab & Edwards, 1977, Eaton & Gallagher, 1994) .

۷-۲-۱- مسمومیتهای ژنتیکی (Genotoxicity)

آفلاتوکسین‌ها بر اساس گزارشهای IARC، از جمله مهمترین ترکیبات Genotoxic شناخته شده می‌باشند (IARC, 1993)[1]. اتصال AFB_1 به DNA در پستانداران منجر به ایجاد ضایعاتی از قبیل اختلالات کروموزمی ، ایجاد هستک ، تغییر در کروماتیدهای خواهر، سنتز ناخواسته DNA و شکست رشته‌های کروموزمی می‌گردد (IARC , 1993). جهت ایجاد تأثیرات ژنتیکی، AFB_1 نیازمند تبدیل شدن به یک ترکیب بیولوژیکی فعال الکتروفیل به نام epoxide 9 و 8 ـ AFB_1 می‌باشد. انجام واکنش اپوکسیداسیون در حلقه انتهایی فوران در AFB_1 منجر به افزایش تولید مخلوطی در ایزومرهای اپوکسیدی بنامهای .epoxide 9 و 8- endo ـ AFB_1 و epoxide 9 و 8ـ exo ـ AFB_1 می‌گردد محصول اصلی که می‌تواند در ایجاد و اختلالات ژنتیکی و سلولی موثرتر باشد ترکیب exo epoxide است(Raney *et al.*, 1993) .

۳ – ۸ - سرطان‌زایی (Carcinogenicity)

AFB_1 بعنوان توانمندترین ترکیب سرطان‌زای موجود در مواد غذایی محسوب می‌گردد. این ترکیب در سلولهای کبدی پستانداران و ماهیان منجر به ایجاد برخی تغییرات بیولوژیکی گردیده که زمینه‌ساز شروع مراحل سرطان-زایی است (Wogan 1992; Dragan & Pitot 1993). بواسطه حساسیت بالای قزل‌آلای رنگین‌کمان به مسمومیت با آفلاتوکسین، این گونه طی ۴۰ سال گذشته به عنوان یک مدل جهت مطالعه سرطان‌های کبدی ناشی از مصرف آفلاتوکسین B_1 در انسان و ماهیان بکار گرفته شده است .در طی این مدت بسیاری از مطالعات موید وجود شباهت‌های زیادی در مکانیزمهای سرطان‌زایی بین پستانداران و قزل‌آلای رنگین‌کمان بوده است (Bailey et al. 1987 ; Tilton et al. 2005). سرطان‌زایی آفلاتوکسین در قزل‌آلای رنگین کمان اولین بار در اوایل دهه ۱۹۶۰ گزارش گردید (Sinnhaber et al. 1968) . در این گونه آفلاتوکسین خوراکی با غلظت ۱۰۰ برابر کمتر از LD_{50} قادر به ایجاد تومورهای کبدی در ۶۰ درصد افراد تغذیه شده می‌باشد، سرطان کبدی نیز از طریق مصرف ppb ۲۰ آفلاتوکسین فقط برای مدت ۱ روز قابل القاء است(Sinnhuber et al 1977; Bailey et al. 1988). متقابلاً در

[1] International Agency for Research on Cancer*

گربه ماهی روگاهی تغذیه شده با بیش از ppb ۱۰/۰۰۰ آفلاتوکسین B_1 در طی مدت ۱۰ هفته هیچگونه علامتی از کارسینوهای سلول‌های کبدی مشاهده نگردید (Jantrarotai & Lovel 1990 a) .

مطالعات بعدی نشان داده است که میزان حساسیت قزل‌آلای رنگین‌کمان در ابتلا به سرطان کبدی ناشی از AFB_1 بسیار بیشتر از گربه ماهی کانالی می‌باشد (Baily *et a.,l* 1988).

۹-۲-۱- آفلاتوکسین‌ها و بهداشت عمومی

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 مذکور به شکل گسترده در انسان مورد بررسی قرار نگرفته است ولی اطلاعات موجود بیانگر این مطلب است که حداقل برخی از عوارض مذکور در انسان نیز قابلیت وقوع دارد.

میزان وقوع و مواجهه انسان با آفلاتوکسین‌ها در یک مرور کلی موید این مسئله است که حدود ۴/۵ بیلیون جمعیت کشورهای در حال توسعه به شکل مزمن با مقادیر قابل توجهی از آلودگی‌های ناخواسته با این سم درگیر می‌باشند. اطلاعات محدود کسب شده بر تأثیر این مسمومیت بر تغذیه و سیستم ایمنی جمعیت مذکور دلالت می‌کند (Williams *et al.*, 2004) .

آفلاتوکسین به عنوان یک آلاینده مرسوم مواد غذایی بخصوص در جیره غذایی مردم در کشورهای در حال توسعه مطرح می‌باشد. این سم توسط فعالیت برخی از قارچ‌ها در طی مراحل تولید، برداشت، ذخیره‌سازی و فرآوری مواد غذایی تولید می‌گردد و به عنوان یک آلایندگی اجتناب‌ناپذیر مواد غذایی توسط FDA مورد توجه قرار دارد. از جمله اهداف FDA تقلیل این آلودگی به حداقل می‌باشد و در این راستا تدوین مقررات به منظور مدیریت این شکل از توجه ویژه‌ای برخوردار گردیده است. نظر به اینکه روش‌های حصول اطمینان از به حداقل رسیدن میزان آلودگی در کشورهای توسعه یافته بواسطه ویژگی‌های سیستم تغذیه‌ای و زیرساخت‌های تکنولوژیکی در این مناطق , به کشورهای در حال توسعه قابل تعمیم نیست لذا مشکل آفلاتوکسین‌ها در این

مناطق در شرایط فعلی موضوعی غیر قابل کنترل محسوب می‌گردد و بایستی الگوهای متفاوتی جهت مدیریت آفلاتوکسیکوزیس مدنظر قرار گیرد.

از نظر سازمان بهداشت جهانی (WHO)، با توجه به آنالیز عوامل مخاطره آمیز بیماری‌ها در سطح جهانی موضوع مسمومیت با آفلاتوکسین‌ها از اولویت بالایی برخوردار نمی‌باشد (Rodgers . *et al.*,. 2002).

مطالعه انجام شده درآفریقای غربی بیانگر کاهش معنی‌داری بین کاهش میزان شنوایی درنوزادانی که در دوران جنینی درمعرض مسمومیت با آفلاتوکسین بوده‌اند، مشاهده می‌گردد(Gong *et al.*, 2002) .

علاوه بر آن، قابلیت آفلاتوکسین‌ها درانتقال ازطریق جفت، می‌تواند منجر به ایجاد اختلالات ژنتیکی در دوران جنینی شود (Maxwell *et al.*, 1998).

انسانهای بالغ معمولاً مقاومت بیشتری را در مقابل مسمومیت با آفلاتوکسین از خود نشان می‌دهند و در گزارش-های ارائه شده از مسمومیت‌های حاد، معمولاً مرگ و میردر بچه‌ها دیده می‌شود(Cullen jm ; Newberne 1993).

در بسیاری از گونه‌های جانوری، مسمومیت با آفلاتوکسین می‌تواند از طریق خوراندن ویتامین‌های آنتی اکسیدان مثل ویتامین‌های A و C و E کاهش داده شود(Aboobaker *et al.*, 1997; Nyandieka & Wakhisi .1993).

۲- مواد و روش کار

۲-۱- آماده سازی کارگاه وذخیره سازی ماهیان

تعداد ۵۰۰ عددفیل ماهی (Huso huso) باوزن متوسط ۱۰gr ± ۱۲۰ از مرکز تکثیر و پرورش شهید بهشتی شیلات تهیه گردید. ماهیان مذکور به مدت حدود یک ماه در وان‌های ۲۰۰۰ لیتری نگهداری و با غذای دستی ویژه فیل ماهی تغذیه و سازگاری آنان با محیط پرورشی و تغذیه دستی انجام پذیرفت.(تصویر ۱)

تصویر ۱ :آماده سازی کارگاه وتیمارهای ازمایشی درانستیتوبین المللی ماهیان خاویاری

پس از طی دو هفته سازگاری، تعداد ۱۸۰ عدد از ذخیره مذکور، انتخاب و پس از بیومتری و ثبت اطلاعات مربوط به طول و وزن، با تراکم ۱۲ عدد ماهی درهر تانک در ۱۵ تانک ۵۰۰ لیتری ذخیره‌سازی گردیدند.

میانگین وزنی ماهیان ذخیره‌سازی شده gr ۱۰ ± ۱۲۰ بود. تأمین آب تانک‌ها از طریق آب چاه با درجه حرارت ۲ ± ۱۸ سانتی گراد و با میزان ۲ بار تعویض آب در ۲۴ ساعت تنظیم گردید. هوادهی در هر تانک از طریق سنگ هوا و به شکل مستقل انجام پذیرفت. میزان اکسیژن محلول در آب به مقدار ppm ۷/۳ تنظیم وتأمین گردید.

۲ – ۲ - تهیه جیره‌های غذایی

مواد اولیه مورد نیاز فرمولاسیون جیره‌های غذایی بر طبق مواد مصرفی معمول در جیره غذایی فیل ماهی، با کیفیت مطلوب تأمین گردید.

جهت افزودن افلاتوکسین B_1 در غلظت‌های موردنظر به جیره‌های آزمایشی به شرح ذیل اقدام گردید:

از آفلاتوکسین B_1 خالص با علامت تجاری SIGMA برای تامین افلاتوکسین مورد نظر درجیره ها استفاده شد. جهت افزودن AFB_1 به جیره‌های آزمایشی، ابتدا محتوای ویال AFB_1 در ۱ml متانول خالص (۹۷٪) حل و سپس حجم محلول تدریجاً تا ۵۰۰ml افزایش یافت. با توجه به غلظتهای مورد نظرAFB_1 در جیره‌های آزمایشی (۱۰۰ppb و ۷۵ppb و ۵۰ppb و۲۵ppb) ، مقادیر لازم از محلول AFB_1 در متانول جهت افزودن به هر جیره تهیه گردید(تصویز ۲).

تصویر ۲ : آماده سازی AFB_1 جهت افزودن به جیره های آزمایشی.

در مرحله بعد اجزای اولیه تشکیل دهنده جیره‌های آزمایشی به روش معمول ، توزین و با یکدیگر مخلوط گردید. در طی مراحل مخلوط کردن اجزا برای هر جیره، مقدار AFB_1 مورد نظر به مدت ۵ دقیقه بر روی مواد اولیه در حال مخلوط شدن در مخلوط کن افقی، اسپری گردید. در مرحله بعد، پس از انجام مراحل کامل مخلوط کردن، مخلوط حاصله به دستگاه پلت زن انتقال یافت و در طی ۲ مرحله از پنجره با قطر ۳ میلی‌متر عبور داده شد. (تصویر ۳)

تصویر ۳ :مراحل افزودن سم وامادە سازی جیره های ازمایشی

پلت‌های حاصل در مرحله بعد به خشک کن منتقل و رطوبت آنان به حدود ۱۰ درصد رسید. غذاهای پلت آماده سپس در داخل کیسه‌های کاغذی بسته‌بندی و پس از ثبت مشخصات بر روی هر کیسه در حرارت $^{\circ c}$ ۱۵ تا زمان مصرف ذخیره سازی 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 به آزمایشگاه تحقیقاتی علوم حیاتی فاروق ارسال گردید. در آزمایشگاه مذکور میزان AFB_1 از طریق HPLC و با دستگاههای با مشخصات ذیل ارزیابی و تعیین گردید.

-Waters 1525 Binary HPLC Pump

- Waters 717 plus Auto sampler

- Waters 474 scanning fluorescence Detector

- Waters bus SAT/IN Module

- Software: Millennium 32 ver.40.0

۳-۲- غذادهی و نمونه‌برداری

غذادهی 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 و pH به شکل هفتگی انجام گرفت. بررسی علائم کلینیکی و ثبت تلفات روزانه در دستور کار قرار داشت.

انجام بیومتری از کلیه ماهان در تیمارها(تصویر ۴) هر ۱۴ روز یکبار انجام پذیرفت . به منظور کالبدگشایی، ماهیانه از هر تیمار سه نمونه (از هر تکرار یک نمونه) به شکل تصادفی نمونه‌برداری گردید(تصویر۶) . تهیه نمونه‌های پاتولوژی نیز به صورت ماهیانه انجام پذیرفت. قبل از نمونه‌برداری تمامی ماهی‌ها توسط اسانس گل میخک بیهوش گردیده(تصویر ۵) و به منظور انجام ارزیابی‌های موردنظر به شکل تصادفی از هر تیمار ۳ نمونه اخذ گردید.

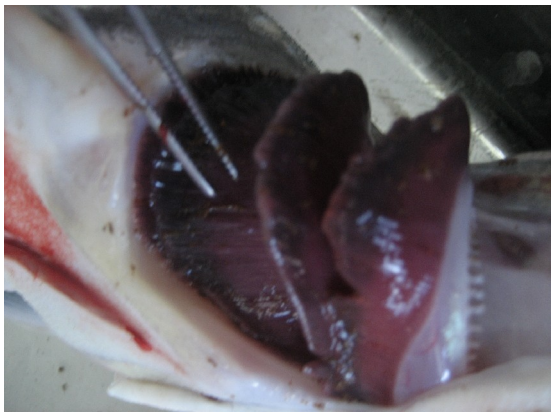
تصویر ٤ :تجهیزات بیومتری

تصویر ٥ :بیهوش سازی ماهی ها توسط عصاره گل میخک

(از هر تکرار ۱ نمونه) قبل از کالبدگشایی ضایعات جلدی در تمامی ماهیان بررسی و از نظر کمی و کیفی مورد ارزیابی و ثبت قرار گرفت.

تصویر ٦ :بررسی علایم ظاهری وایجاد برش شکمی جهت کالبدگشایی

پس از بررسی و ثبت ضایعات خارجی، کالبدگشایی انجام گرفت و ضایعات ایجاد شده در اندام‌های داخلی بررسی و ثبت گردید. از تمامی ضایعات جلدی و کالبدگشایی عکسبرداری گردید.



تصویر ۷ :بررسی علایم کالبدگشایی در نمونه های ازمایشی

به منظور بررسی ضایعات پاتولوژیک از آبشش‌ها، کبد، طحال و کلیه‌ها (بخش میانی و قدامی) نمونه برداری و جهت تهیه لام های پاتولوژی در محلول بوئن تثبیت گردید. در هر بار نمونه برداری از تمامی تکرارها، جهت بررسی های پاتولوژیک نمونه برداری به عمل آمده در مواردی که در بافت های غیرهدف. (قلب ، عضلات، ...) هم تغییراتی به چشم می خورد، نسبت به نمونه برداری و تهیه لام اقدام گردید. جهت تهیه لام و رنگ آمیزی انها از روش ائوزین ـ هماتوکسیلین استفاده شد.

٤-۲- بررسی فاکتورهای خونی

نمونه برداری از ۴ تیمار و یک شاهد انجام گرفت. هر تیمار و شاهد دارای ۳ تکرار و هر تکرار دارای ۱۲ عدد ماهی بودند.خون گیری در چهار مرحله با فاصله زمانی ۳۰ روز انجام گرفت.در مرحله سوم و چهارم نمونه برداری، دو تیمار دیگر به نمونه ها اضافه شد که هر کدام دارای یک تکرار بود.در هر مرحله، نمونه برداری از یک ماهی در هر تکرار انجام شد.در مرحله چهارم از هر تیمار یک ماهی بطور تصادفی نمونه برداری شد.

خونگیری ازسیاهرگ ساقه دمی با سرنگ ۲cc در شرایط بیهوشی ضعیف با عصاره گل میخک برای جلوگیری از استرس و کاهش یا افزایش پارامترهای خون،انجام شد.

- برای اندازه گیری پارامترهای خونی CBC (Complet blood cell) .

RBC با پیپت منانژور، ماده رقیق کننده ریس با رقت ۱/۲۰۰ ، تعداد RBC در ۵ خانه از ۲۵ خانه مرکزی لام نئوبار

شمارش و در عدد ۱۰۰۰۰ ضرب گردید.

WBC با پیپت منانژور، ماده رقیق کننده ریس با رقت ۱/۲۰۰، تعداد RBC در ۴ خانه کنج ۲۵ خانه مرکزی لام نئوبار شمارش و در عدد ثابت ۵۰۰ ضرب گردید.

HCtیا PCVبا پیپت میکروهماتوکریت سانتریفوژهماتوکریت با دور ۱۰۵۰۰ (Rpm)، مدت ۵ دقیقه و بر حسب درصد با خط کش مخصوص اندازه گیری گردید.

Hb به روش سیانو مت هموگلوبین با اسپکتروفوتومتری و طول موج ۵۴۰nm بر حسب Diff. gr/dl در یک قطره هپارین گسترش تهیه ، با گیمسای مرک رنگ آمیزی و گلبولهای سفید را بر حسب درصد شمارش افتراقی گردید.

*کتاب جامع تجهیزات و فرآورده های آزمایشگاهی جلد دوم صفحه ۲۱۹۴-۲۱۷۰

۵ – ۲ - بررسی باقیمانه های بافتی

جهت بررسی احتمالی تجمع AFB_1 در عضلات، در هر نوبت نمونه‌برداری از هر تیمار ، پس از جدا نمودن کامل امعاء و احشاء ۳ عدد ماهی و شستشو با آب تا مرحله ارزیابی باقیمانده‌های بافتی AFB_1 در فریزر $18^{\circ C}$ - نگه‌داری گردید. جهت تعیین میزان باقیمانده‌های بافتی از روش HPLC استفاده شد.

۲-٦- ارزیابی شاخص های رشد

جهت ارزیابی شاخص‌های مورد نظر رشد، علاوه بر اندازه‌گیری و ثبت طول و وزن کل ماهیان، نسبت به تعیین ضریب تبدیل غذا (FCR) و سرعت رشد ویژه (SGR) بر طبق فرمول های زیر اقدام گردید:

$$SGR = \frac{L_nW_t - L_nW_o}{t} \times 100$$

L_nW_t = لگاریتم نپرین وزن نهایی

L_nW_{to} = لگاریتم نپرین وزن اولیه

t = طول مدت پرورش

$$FCR = \frac{Food}{W_t - W_o}$$

Food = میزان غذای مصرفی

W_t = وزن نهایی

W_o = وزن اولیه

(Ronyal & Peter, 1990)

۷-۲- روش‌های آماری

جهت چیدمان تیمارها از روش بلوک های کاملا تصادفی استفاده گردید.روش نمونه برداری ازجمعیت نمونه ها در هر تیمار نیز به شکل غیر انتخابی دردستور کار قرارگرفت .کلیه داده‌ها در برنامه Excel ثبت و به روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) وجدول مقایسه چند وجهی Duncan یا Tukey بانرم افزار SPSS مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۳- نتایج

۳-۱- جراحات پوستی

در اولین نوبت نمونه‌برداری که یک ماه پس از تغذیه تیمارهای آزمایشی با دوزهای مختلف AFB_1انجام شد ، جراحاتی به شکل پرخونی در رأس پلاک‌های ردیف شکمی، جانبی و خون‌ریزی‌های نقطه‌ای در پوست ناحیه شکمی در حد فاصل ردیف‌های شکمی پلاک‌های استخوانی به ترتیب در تیمارهای مختلف مشاهده گردید.

در نوبت دوم نمونه‌برداری ً ۲ ماه پس از تغذیه با جیره‌های غذایی حاوی آفلاتوکسین توسعه جراحات در تیمارهای مختلف آزمایشی مشاهده شد، به طوری که جراحات از خون‌ریزی در رأس پلاک‌های ردیف شکمی، جانبی و بعضاً پشتی و همچنین پرخونی و خون‌ریزیهای نقطه‌ای در پوست سطح شکمی توسعه یافته و علاوه بر حضور جراحات در نواحی مذکور شاهد حضور خون‌ریزی و جراحات پوستی در نواحی شکمی، پشتی و ساقه دمی بوده و در کنار آن پرخونی در پایه باله‌های سینه‌ای و دمی و پشتی به همراه ایجاد زخم در برخی از تیمارها در نواحی مذکور، مشاهده گردید. در این مرحله در تیمارهای ppb۷۵ و ppb۱۰۰ نقاط خون‌ریزی در ناحیه سر در قسمت سرپوش برانشی در برخی از نمونه‌ها دیده شد .

در آخرین نمونه‌برداری، ۳ ماه پس از ذخیره‌سازی، جراحات پوستی از نظر کمی و کیفی در تیمارهای مختلف تحت آزمایش ، پیشرفت قابل توجهی را نشان داد. بطوریکه در تیمارهای مختلف به تناسب غلظت سم مصرفی بروز زخم‌هایی با حاشیه‌های زرد رنگ در نواحی شکمی،جانبی و ساقه دمی به همراه خون‌ریزی در پایه باله‌های سینه‌ای و شکمی به همراه بروز زخم و جراحات در لبه‌های فوقانی و تحتانی باله دمی و در حاشیه‌های باله‌های سینه‌ای و شکمی و پشتی به همراه خوردگی باله در برخی از تیمارها مشاهده گردید. بروز جراحات به همراه تورم و خون‌ریزی در اطراف مقعد و توسعه جراحات و زخم‌ها در ناحیه سر و سرپوش برانشی به همراه خون-ریزی و ترشحات با حاشیه‌های زرد رنگ به شکل قابل ملاحظه‌ای خودنمایی نمود. در برخی از نمونه‌ها لکه‌های سفید رنگی در حد فاصل صفحات استخوانی پشتی وجانبی مشاهده شد. در تصاویر شماره۱ الی۱۲ ضایعات و جراحات فوق‌الذکر نمایش و توضیح داده شده است. مجموعه مشاهدات ثبت شده در تیمارهای مختلف آزمایشی ،،در جدول شماره ۳ نمایش داده شده است :

جدول شماره۳ : ضایعات و جراحات پوستی مشاهده شده در فیل ماهی پرورشی تغذیه شده با دُزهای مختلف AFB_1 در طی مدت ۳ ماه و در درجه حرارت ^{O}C ۲ ± ۱۸ .

نوبت نمونه برداری◄ تیمارها ▼	ماه اول (روز۳۰)	ماه دوم (روز ٦٠)	ماه سوم (روز ۹۰)
تیمار ۱ (۲۵ ppb)	پرخونی در رأس پلاکهای ردیف شکمی	خون‌ریزی در رأس پلاک‌های ردیف شکمی، جانبی و پشتی ، خون‌ریزی‌های نقطه‌ای در پوست ناحیه شکمی	پرخونی در پایه باله‌های سینه‌ای.، توسعه جراحات در پلاک‌های ردیف پشتی ، مشاهده زخم در ناحیه شکمی و ساقه دمی
تیمار ۲ (۵۰ppb)	پرخونی در رأس پلاکهای ردیف شکمی و جانبی	پرخونی در رأس پلاک‌های ردیف شکمی وجانبی ، خون‌ریزی و جراحات پوستی در ناحیه شکمی و پشتی ، پرخونی در پایه باله-های سینه‌ای و ساقه دمی	خون‌ریزی در پایه باله‌های شکمی، سینه‌ای و دمی،بروز جراحات در اطراف مقعد ، زخم و جراحات در ناحیه سرپوش برانشی و سر .
تیمار ۳ (۷۵ppb)	پرخونی در رأس پلاک‌های دریف شکمی و جانبی	خون‌ریزی در پلاک‌های ردیف شکمی و پشتی، زخمهای پیشرفته در نواحی شکمی، جانبی و ساقه دمی. ، خون‌ریزی‌های نقطه‌ای در ناحیه سر و سرپوش برانشی	خوردگی باله‌های سینه ای و دمی و توسعه جراحات در ناحیه تنه و ساقه دمی. ، بروز جراحات و خوردگی باله در باله پشتی، توسعه جراحات و بروز زخم در ناحیه سر به همراه ترشحات زرد رنگ درزخمها ، مشاهده لکه‌های سفید در حد فاصل پلاکها در سطح جانبی
تیمار ۴ (۱۰۰ppb)	پرخونی در رأس پلاک‌های ردیف شکمی و جانبی ـ خون ریزی‌های نقطه‌ای در پوست ناحیه شکمی	خون‌ریزی در پلاک‌های ردیف شکمی و جانبی و پرخونی در رأس پلاک‌های ردیف پشتی، خون‌ریزی و ایجاد زخم در سطوح شکمی، جانبی و ساقه دمی و پرخونی در پایه باله‌های سینه‌ای و دمی	توسعه جراحات در سطوح شکمی، جانبی، ساقه دمی و پشتی،، مشاهده خوردگی در باله‌های پشتی دمی و سینه‌ای.، توسعه جراحات در زخم‌ها در ناحیه سر و سرپوش برانشی ، بروز حاشیه‌ها و ترشحات زرد رنگ به همراه خون‌ریزی در تمامی جراحات

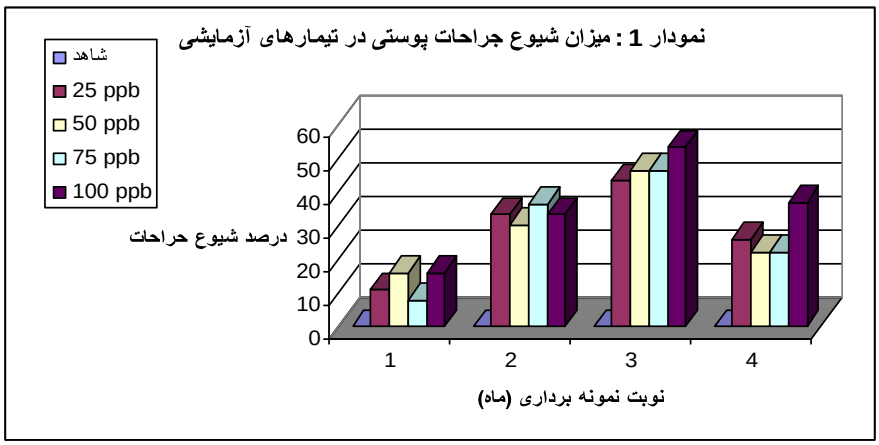
در بررسی کمی بروز علائم وجراحات پوستی از نظر تعداد ماهیانی که در تیمارهای مختلف با درجات متفاوتی ضایعات مذکور در آنان مشاهده گردید،

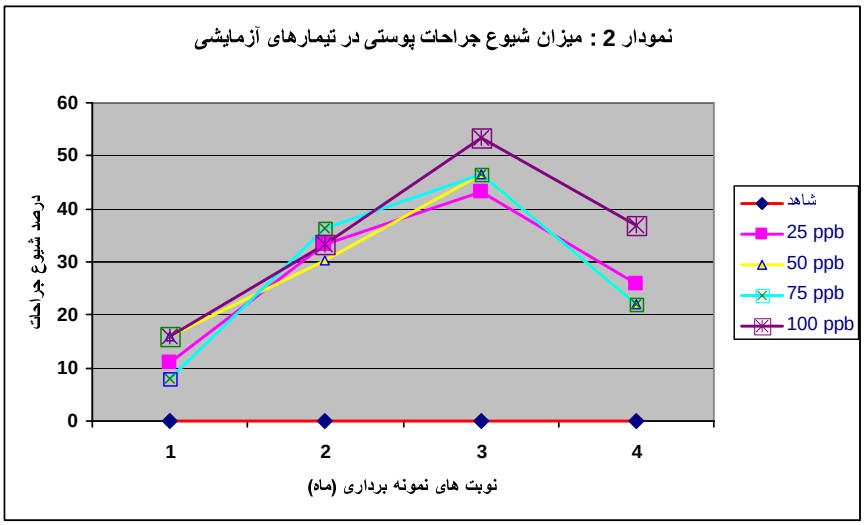
ارقام ثبت شده در جدول شماره ۴ بیانگر این مطلب است که میزان شیوع جراحات پوستی با درجات مختلف از ۸ الی ۱۶ درصد در نوبت اول نمونه‌برداری تا ۵۳/۳ درصد در آخرین نمونه‌برداری افزایش داشته است.این افزایش به همراه توسعه و پیشرفت جراحات مشاهده شده در نوبت‌های مختلف نمونه‌برداری موضوعی نگران کننده از نظر بازار پسندی فیل ماهی است که به آن پرداخته خواهد شد.

جدول ٤: درصد شیوع زخم های جلدی در اثر دوز های مختلف افلاتوکسین ب۱ در تیمار های تحت آزمایش

تیمارها (ppb)	ماه اول (٪)	ماه دوم (٪)	ماه سوم (٪)	ماه چهارم (٪)
شاهد (۰)	۰	۰	۰	۰
تیمار ۱ (۲۵)	۱۱	۳۳,۳	۴۳,۳	۲۶
تیمار ۲ (۵۰)	.۱۶	۳۰,۳	۴۶,۶	۲۲
تیمار ۳ (۷۵)	۸	۳۶,۳	۴۶,۶	۲۲
تیمار ۴ (۱۰۰)	۱۶	۳۳,۳	۵۳,۳	۳۷

در پایان مرحله ۳ ماهه آزمایش ماهیان تحت مطالعه به مدت یک ماه با جیره غذایی معمولی فاقد AFB_1 تغذیه گردیدند. در پایان مدت مذکور جراحات پوستی تیمارها از نظر کمی و کیفی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی‌ها موید این مطلب است که روند بهبود در جراحات مذکور در حدود ۱۶الی ۲۴٪.. در ماهیان تحت مطالعه مشاهده گردید. روند مذکور در نمودارهای شماره۲و۱ نشان داده شده است.





تصاویر

تصویر ۸ :نمونه شاهد درنوبت اول نمونه برداری ؛
هیچگونه ضایعات پوستی درتیمارهای ازمایشی مشا هده نمی شود.

تصویر ۹: پرخونی درراس پلاکهای ردیف شکمی و
جانبی درتیمار ۲ درنوبت اول نمونه برداری

تصویر ۱۰ : بروز جراحات خفیف درقسمت شکمی
باله دمی در تیمار۲ ؛نوبت دوم

تصویر۱۱: :خونریزی وایجاد زخم درسطوح شکمی؛جانبی وساقه دمی وتوسعه جراحات دربالله های سینه ای؛شکمی؛پشتی ودمی(تیمار۳ ؛ماه دوم)

تصویر۱۲ :توسعه جراحات وایجادزخم در باله دمی (تیمار ٤؛ماه دوم)

تصویر ۱۳ : خونریزی های نقطه ای درناحیه سر وسرپوش برانشی (تیمار ۳؛ ماه دوم)

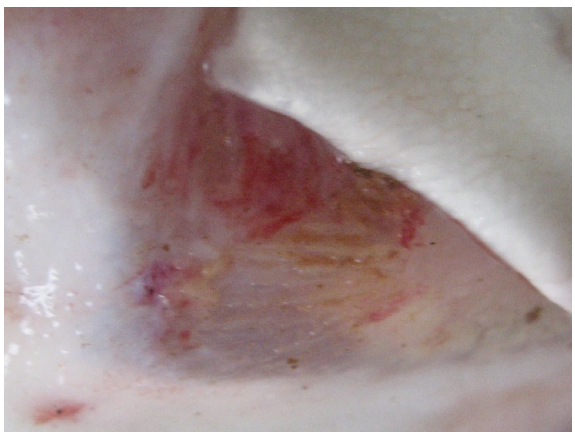
تصویر۱٤ : توسعه جراحات در پلاکهای ردیف پشتی (تیمار ۱ ؛ماه سوم)

تصویر ۱۵ : توسعه جراحات وایجاد زخم درناحیه سر
وسرپوش برانشی(تیمار ۳ ؛ماه سوم)

تصویر ١٦: توسعه جراحات درتمامی قسمت های بدن بهمراه خوردگی دربالله ها؛
ترشحات زرد و خونریزی (تیمار ٤ ؛ماه سوم)

تصویر ۱۷ : زخمها به همراه ترشحات زرد رنگ در ناحیه سر

تصویر ۱۸ :زخمهای پیشرفته به همراه ترشحات زردرنگ در ناحیه تنه



تصویر ۱۹ : زخمهای پیشرفته به همراه ترشحات زردرنگ در زیر سرپوش برانشی

۲-۳- مشاهدات کالبد گشایی

به منظور بررسی اثرات دزهای مختلف AFB_1 خوراکی بر برخی از اندام‌های داخلی از جمله آبشش، کبد، کلیه و طحال در نوبت‌های مختلف نمونه‌برداری، نسبت به کالبد گشایی و ثبت علائم و عوارض قابل مشاهده اقدام گردید. علاوه بر اندام‌های مذکور در پاره‌ای دیگر از اعضا و قسمتها نیز علائمی مشاهده و ثبت گردید. علائم کالبد گشایی مذکور به شکل مشروح و به تناسب دُز مصرفی AFB_1 در طول مدت مواجه شدن تیمارهای آزمایشی با آن در جدول شماره(۵)درج گردیده است. همانطور که از محتویات جدول استنباط می‌شود ضایعات مشاهده شده روندی پیش رونده از واکنش‌های حاد به سمت مزمن رابه شرح ذیل نشان می‌دهد.

۱-۲-۳- آبشش‌ها

بررسی ظاهری آبشش‌ها موید بروز پرخونی در نوبت‌های اول و دوم نمونه‌برداری در این اعضا می‌باشد در نوبت سوم آبشش‌ها به رنگ طبیعی در آمده و در برخی از تیمارها از جمله تیمارهای ۳ و ۴ (۷۵ ppb و ۱۰۰) پریده رنگ و کم خون به نظر می‌رسیدند.

۲-۲-۳- کبد

در نوبت اول نمونه‌برداری کبد نسبتاً پرخون به همراه اتساع نسبی کیسه صفرا وکم رنگ شدن صفرا مشاهده شد. شروع پریدگی رنگ و تمایل رنگ کبد به طرف کبد چرب محسوس است. قوام کبد و شکل لبه‌های آن تقریباً حالت طبیعی دارد.

در نوبت دوم نمونه‌برداری در تیمار اول شاهد پرخونی کبد و در تیمارهای ۲ و ۳ و ۴ ، بی‌رنگی کبد محسوس است.شروع تغییرات ظاهری از جمله تغییراتی در بافت ظاهری بخش شکمی کبد به شکل تقسیمات لانه زنبوری بخصوص در تیمارهای ۲ و ۳ مشهود است. کاهش قوام بافت کبد بخصوص در تیمارهای ۳ و ۴ به چشم می‌خورد.

در نوبت سوم نمونه‌برداری کبد در تمامی تیمارها عارضه کبد چرب را نشان می‌دهد. کیسه صفرا متسع و حاوی صفرای بی‌رنگ است. در برخی از نمونه‌ها رنگ سبز لجنی به همراه سستی بافت کبد به چشم می خورد.

تقسیمات ظاهری لانه زنبوری در قسمت شکمی کبد در تیمارهای ۲ و ۳ کماکان باقی مانده و مشهود است. در تیمارهای ۳ و ۴ حالت لجنی و سبز رنگ (سبز چرک) در برخی از قسمتهای کبد به چشم می‌خورد. به طورکلی بافت کبد شل و بی‌قوام بوده و لبه‌های آن حالت افتادگی داشت. در تیمارهای ۲ و ۳ رنگدانه‌های سیاه رنگ بر روی قسمت داخلی کبد مشاهده گردید.

۳-۲-۳- کلیه‌ها

شاخص‌ترین علامت کالبد گشایی در اولین نوبت نمونه‌برداری، مشاهده تورم و پرخونی در کلیه‌ها بود. در نوبت دوم میزان تورم و پرخونی به نسبت دزهای مختلف مصرف AFB_1 افزایش نشان داد به طوری که در برخی از تیمارها (۲ و۳) تورم و پرخونی ناشی از مسمومیت منجر به ایجاد ضایعات وبعضاً از هم گسیختگی پریتونبوم پوشا ننده کلیه‌ها گردید. ندول‌های سفید رنگی در طول کلیه‌ها و بخصوص در قسمت کلیه خلفی به چشم می‌خورد. در نمونه‌برداری سوم افزایش تعداد ندول‌های سفید رنگ در بخش خلفی کلیه مشاهده گردید. حالت پرخونی و تورم در کلیه‌ها کماکان بارز بود. در برخی از تیمارها رسوبات سفید رنگی در زیر پری‌تونیوم پوشاننده کلیه‌ها به چشم می‌خورد. در یکی از نمونه‌های تیمار ۳ (۷۵ppb) بروز رنگ پریدگی و تحلیل بافت کلیه مشاهده گردید.

٤-۲-۳- طحال

در نوبت اول نمونه‌برداری تغییرات خاصی در طحال مشاهده نگردید. در نوبت دوم نمونه‌برداری کم رنگ شدن طحال به همراه رگه‌های سفید رنگی در بافت آن در تیمارهای مختلف به چشم می‌خورد. در نمونه‌برداری نوبت سوم کماکان رگه های سفید رنگ به همراه کم خونی مشخص در تیمار ۳ ، در طحال نمایان بود.

۵-۲-۳- سایر اعضاء

بروز خون‌ریزی‌های پتشی در عضلات دیواره داخلی شکم در تیمار ۴ در نوبت اول نمونه‌برداری و تیمار ۲ در نوبت دوم نمونه‌برداری‌ها، پرخونی عروق مزانتر و عروق کیسه‌شنا در اغلب نمونه‌ها در نوبت دوم نمونه‌گیری قابل مشاهده بود.

بروز لکه‌های سفید رنگ و بعضاً رنگدانه‌های سیاه رنگ به همراه ناهمگونی بافت ظاهری قلب در تیمارهای ۳ و۴ در نوبت دوم نمونه‌برداری و در تیمارهای ۲ و ۳ و۴ در نوبت سوم نمونه‌برداری به شکل مشخص مشاهده گردید.

جدول ۵ : مشاهدات کالبد گشایی ناشی از مصرف دزهای مختلف AFB_1 در فیل ماهی پرورشی در طی ۳ ماه و در درجه حرارت ۲°C± ۱۸ .

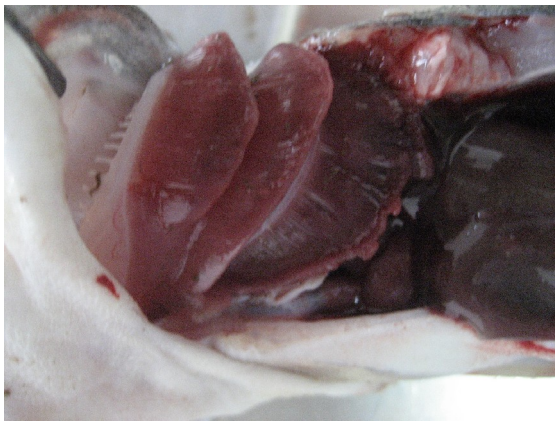
زمان ◄ / تیمار ▼	ماه اول (روز ۳۰)	ماه دوم (روز ٦٠)	ماه سوم (روز ۹۰)
تیمار ۱ (۲۵ ppb)	-آبشش‌ها تقریباً طبیعی -کبد کمی پرخون، کیسه صفرا متسع رنگ صفرا نسبتاً طبیعی -طحال در رنگ و اندازه طبیعی -کلیه‌ها متورم و کمی پرخون	ـ آبشش‌ها تقریباً طبیعی ـ کبد پرخون، کیسه صفرا متسع صفرا نسبتاً پر رنگ، تغییرات بافتی منظم لانه زنبوری در قسمت شکمی کبد - طحال نسبتاً کم رنگ و کوچکتر از اندازه طبیعی ـ کلیه‌ها متورم و پرخون به همراه ندول‌های سفید رنگ در کلیه خلفی	ـ آبشش‌ها نسبتاً طبیعی ـ کبد چرب و کم رنگ، کیسه صفرا حاوی صفرای بی-رنگ ـ کلیه‌ها متورم به همراه ندول‌های سفید و رسوبات سفید رنگ براق در زیر پری تونیوم روی کلیه‌ها. ـ طحال نسبتاً کوچک به همراه رگه‌های سفید رنگ
تیمار ۲ (۵۰ppb)	-پرخونی نسبی در آبشش‌ها -کبد کم رنگ، کیسه صفرا متسع -طحال در اندازه و رنگ طبیعی ـ کلیه‌ها متورم و پرخون -پرخونی عروق مزانتر و کیسه شنا	ـ پرخونی در آبشش‌ها -کبد چرب و کم رنگ، اتساع کیسه صفرا حاوی صفرای کم رنگ، تغییرات بافتی منظم لانه زنبوری شکل در قسمت شکمی کبد ـ طحال در اندازه طبیعی و کم رنگ ـ کلیه‌ها متورم به همراه ندولهای سفید رنگ ـ خون‌ریزی های نقطه‌ای در دیواره داخلی عضلات شکم	آبشش‌ها به رنگ طبیعی ـ کبد چرب و زرد رنگ با لکه‌های تیره رنگ در سطح داخلی کیسه صفرا متورم به همراه صفرای بی‌رنگ . -طحال با رنگ طبیعی به همراه رگه‌های سفید رنگ ـ تورم و پرخونی در کلیه‌ها به همراه ندول‌های سفید -لکه‌های سفید رنگ و عدم یکنواختی رنگ در بافت قلب
تیمار ۳ (۷۵ppb)	-پرخونی در آبشش‌ها -کبد کم رنگ، کیسه صفرا متسع حاوی صفرای کم رنگ. ـ طحال در رنگ و اندازه طبیعی ـ کلیه‌ها متورم و پرخون به همراه ندول-های سفید رنگ در کلیه خلفی ـ پرخونی در عروق مزانتر و عروق کیسه شنا	ـ پرخونی در آبشش‌ها ـ کبد چرب و کم رنگ، کیسه صفرا متسع حاوی صفرای بی‌رنگ، تغییرات ظاهری منظم لانه زنبوری شکل در بخش شکمی کبد، ـ طحال در اندازه طبیعی و کم رنگ ـ کلیه‌ها متورم و پرخون به همراه ندول‌های سفید رنگ در بخش خلفی ـ لکه‌های سفید رنگ بر روی قلب	ـ آبشش‌ها نسبتاً طبیعی و رنگ پریده ـ کبد کم رنگ، کیسه صفرا مستع به همراه تغییرات منظم لانه زنبوری در بخش شکمی کبد، بروز رنگ سبز لجنی در بخش‌هایی از کبد ـ طحال در اندازه طبیعی به همراه رگه‌های سفید رنگ ـ کم خونی به همراه تحلیل رفتن بافت کلیه‌ها -رنگدانه های سیاه درعضلات قلب

ادامه جدول ۵ :

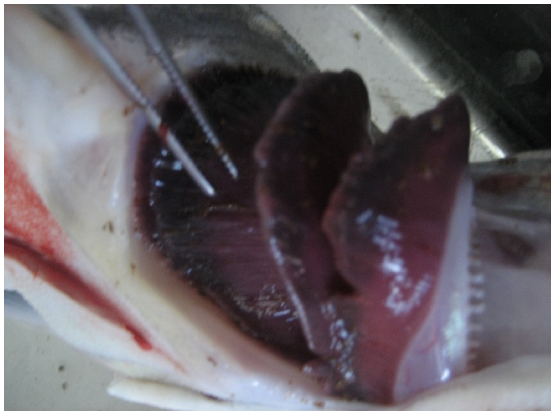
زمان ◄ تیمار ▼	ماه اول (روز ۳۰)	ماه دوم (روز ٦۰)	ماه سوم (روز ۹۰)
تیمار ۴ (۱۰۰ppb)	-پرخونی در آبشش‌ها ـ پرخونی در کبد ـ بزرگ بودن نسبی طحال با رنگ طبیعی ـ کلیه‌ها متورم به همراه ندول‌های سفید در بخش خلفی ـ پرخونی در عروق مرانتر و عروق کیسه شنا ـ خون‌ریزی‌های نقطه‌ای در عضلات دیواره داخلی شکم	-پرخونی در آبشش‌ها ـ کبد چرب و رنگ پریده با قوام سست اتساع کیسه صفرا به همراه صفرای بی‌رنگ، بروز رنگ سبز لجنی در برخی از قسمتهای کبد ـ طحال نسبتاً کوچک به همراه رگه‌های سفید رنگ در بافت آن ـ تورم و پرخونی در کلیه‌ها	کم خونی در آبشش‌ها ـ کبد چرب و پرخونی در برخی از قسمت‌ها، کیسه صفرا متسع حاوی صفراوی بی‌رنگ ـ طحال به رنگ تقریباً طبیعی به همراه رگه‌های سفید رنگ ـ کلیه‌ها متورم به همراه ندول‌های سفید رنگ در بخش خلفی ـ لکه‌های سفید رنگ به همراه عدم یکنواختی رنگ ، بافت قلب

تصاویر:

آبشش ها



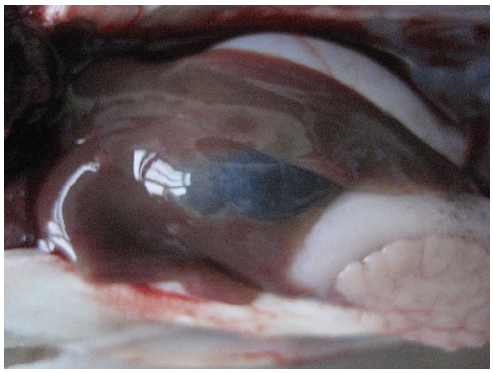
تصویر ۲۰ : ابشش بارنگ طبیعی در نمونه های شاهد



تصویر ۲۱ : پرخونی درابشش ها به همراه افزایش ترشحات مخاطی

تصویر ۲۲ : :کم خونی درابشش هادرتیمار ٤، ماه سوم

کبد



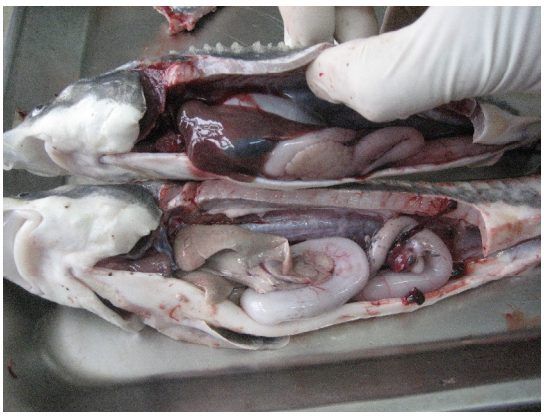
تصویر ۲۳: کبد با رنگ وقوام طبیعی درنمونه های شا هد

تصویر ٢٤ : کبدپرخون کیسه صفرا متسع ،رنگ صفرا تقریبا
طبیعی کبد چرب و رنگ پریده(تیمار ۲، ماه اول)

تصویر ۲۵ : کبد چرب و رنگ پریده ، کیسه صفرا متسع و حاوی صفرای بی رنگ تغییرات منظم لانه زنبوری دربخش شکمی (تیمار ۳، ماه دوم)

تصویر ۲٦ : کبد چرب و رنگ پریده ، لکه های سیاه دربخش داخلی کبد (تیمار ۲، ماه سوم)

تصویر ۲۷ : کبد چرب و رنگ پریده ، کیسه صفرا متسع حاوی صفرای بی رنگ، رنگ سبز لجنی به همراه قوام سست دربرخی از قسمت ها (تیمار ٤، ماه دوم)



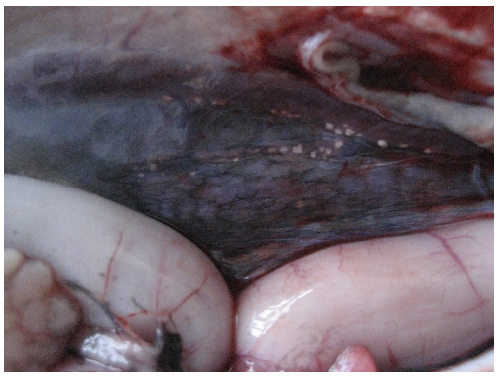
تصویر ۲۸ :مقایسه تیمار شاهد باتیمار تغذیه شده با افلاتوکسین ب۱.
به تفاوتهای مشخص رنگ وقوام بافت کبدوکیسه صفرا توجه گردد.

کلیه ها

تصویر۲۹ :بافت طبیعی کلیه در تیمارهای شاهد

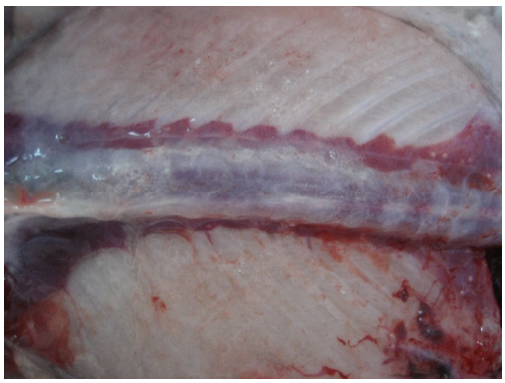
تصویر ۳۰ : کلیه هامتورم وپرخون به همراه ندولهای
سفید درکلیه خلفی (تیمار ۳، ماه اول)

تصویر ۳۱ : کلیه هامتورم وپرخون به همراه رسوبات سفیددر زیر پریتونیوم پوشاننده کلیه(تیمار ،۱ ماه سوم)



تصویر ۳۲ : کلیه هامتورم وپرخون به همراه افزایش ندولهای سفید درکلیه خلفی(تیمار ۳، ماه دوم)

تصویر ۳۳ : نما یشی از ندولهای سفید



تصویر ٣٤ : تحلیل شدید کلیه هابه همراه کم خونی(تیمار ۳، ماه سوم)

طحال

تصویر۳۵: طحال در نمونه های شا هد در رنگ و اندازه طبیعی

تصویر ٣٦: طحال کوچکتر از اندازه طبیعی به همراه
رگه های سفید در بافت آن(تیمار ٤، ماه دوم)

تصویر ۳۷ : طحال کم خون ورنگ پریده به همراه
رگه های سفید در بافت آن(تیمار ۳، ماه دوم)

سایرقسمت ها

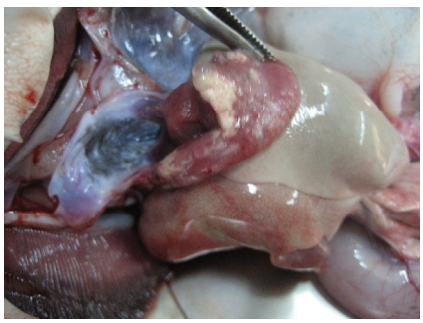
تصویر ۳۸ : خونریزی های نقطه ای دردیواره داخلی عضلات شکمی
(تیمار ٤، ماه اول وتیمار ۲، ماه دوم)

تصویر ۳۹ :اتساع کیسه شنا وپرخونی درعروق مزانتر وروده ها

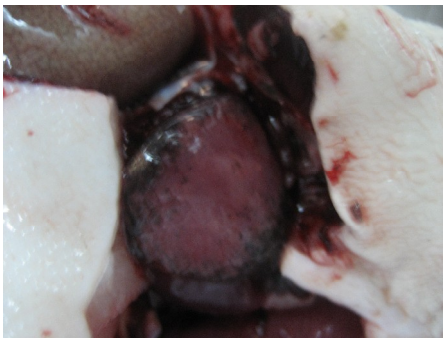
تصویر ٤٠ : لوبولاسیون پا نکراس

تصویر ٤١ : عدم یکنواختی دربافت قلب

تصویر٤٢ : لکه های سفید در روی قلب(تیمار ۳، ماه دوم)



تصویر٤٣ : :لکه های سفید به همراه ذخیره چربی دربا فت قلب



تصویر ٤٤ :مشا هده رنگدانه های سیاه درعضلات قلب(تیمار ۳، ماه سوم)

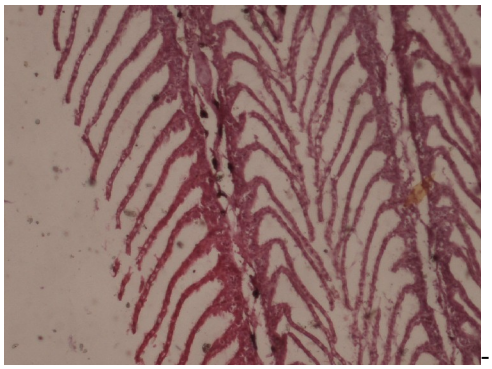
۳-۳- تغییرات بافتی

۱-۳-۳- آبششها

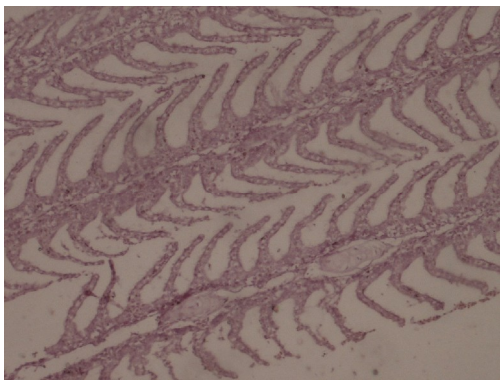
جدول٦: مشاهدات تغییرات بافتی در آبشش فیل ماهی پرورشی تغذیه شده با مقادیر مختلف افلاتوکسین ب۱ّ به مدت ۳ ماه در درجه حرارت ۲ ± ۱۸سانتی گراد

نوبت نمونه‌برداری ◄ / تیمارها ▼	ماه اول (روز ۳۰)	ماه دوم (روز٦۰)	ماه سوم (روز ۹۰)
تیمار ۱ (۲۵ ppb)	-بافت نسبتاً سالم - عارضه خاصی مشاهده نشد.	-افزایش ترشحات مخاطی -هایپرپلازی خفیف سلول های بافت پوششی در پایه لاملاهای ثانویه	-بافت نسبتاً سالم -هایپرپلازی خفیف سلول های بافت پوششی در پایه لاملاهای ثانویه
تیمار ۲ (۵۰ppb)	-بافت نسبتاً سالم -پرخونی خفیف در لاملاهای ثانویه	-پرخونی در لاملاهای ثانویه -تخریب بافت پوششی در لاملاهای ثانویه -هایپرپلازی خفیف سلول های بافت پوششی در پایه لاملاهای ثانویه	- هایپرپلازی خفیف سلول های بافت پوششی در پایه لاملاهای ثانویه
تیمار ۳ (۷۵ppb)	-بافت نسبتاً سالم -پرخونی در لاملاهای ثانویه	-هایپرپلازی لاملاهای ثانویه -تخریب بافت پوششی لاملاهای ثانویه -سلولهای التهابی در پایه لاملاهای اولیه -افزایش ترشحات مخاطی -پرخونی در لاملاهای ثانویه	-هایپرپلازی سلول ها در پایه لاملاهای ثانویه -تخریب بافت پوشی در برخی از لاملاهای ثانویه تلانژکتازی خفیف در برخی از لاملاهای ثانویه
تیمار ۴ (۱۰۰ppb)	- بافت نسبتاً سالم - پرخونی در لاملاهای ثانویه	-هایپرپلازی در پایه لاملاهای ثانویه -تلانژکتازی -تخریب بافت پوششی در لاملاهای ثانویه -خون ریزی در راس لاملاهای ثانویه	-هایپرپلازی خفیف در پایه لاملاهای ثانویه -تلانژکتازی در برخی از لاملاهای ثانویه -تخریب بافت پوششی در برخی از لاملاهای ثانویه

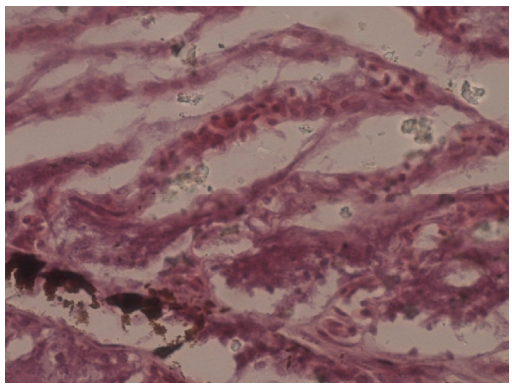
مقاطع هیستو پاتولوژیک آبشش



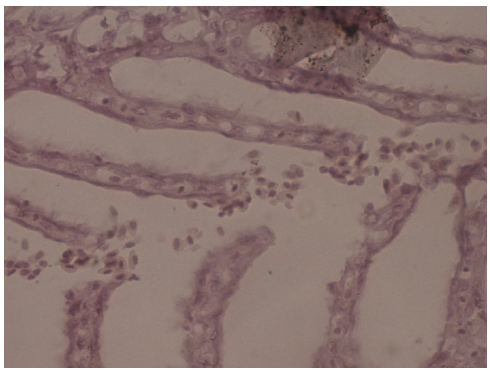
تصویر٤٥ : بافت طبیعی ابشش در نمونه های شا هد
(H&E × 10)



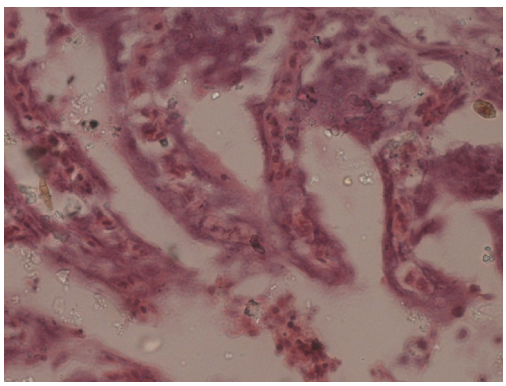
تصویر٤٦ : هایپر پلازی با فت پوششی در پایه لاملاهای ثانویه
(تیمار ۲، ماه دوم)(H&E × 20)



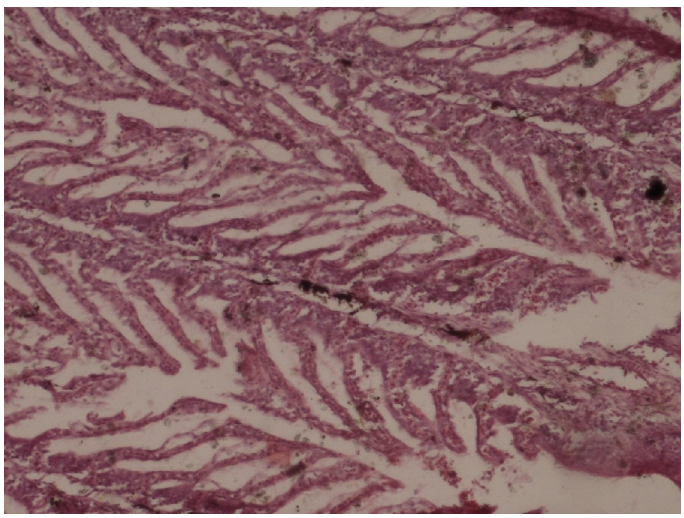
تصویر٤٧ : تخریب با فت پوششی لاملاهای ثانویه به همراه پرخونی
وحضور سلولهای التهابی(H&E × 40) تیمار ۳، ماه دوم



تصویر ٤٨: تخریب بافت پوششی به همراه پرخونی و خونریزی در لاملاهای ثانویه (H&E × 40) تیمار ٤، ماه دوم



تصویر ٤٩ : تلانِژکتازی، تخریب بافت پوششی به همراه پرخونی و خونریزی در لاملاهای ثانویه(H&E × 40) تیمار۳ ، ماه دوم



تصویر ٥٠ : پرخونی ،خونریزی،:چماقی شدن لاملاهای ثانویه، :تلانِژکتازی ، تخریب بافت پوششی(H&E × 20) تیمار ۱ ماه دوم

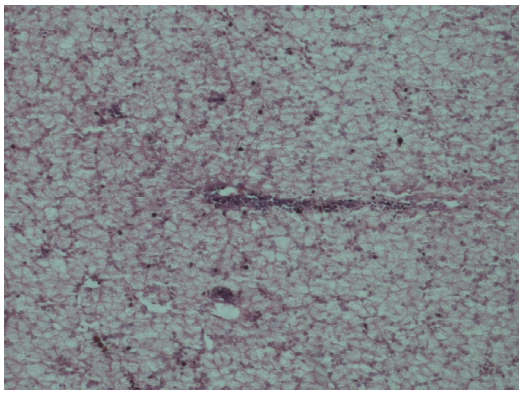
۲-۳-۳-کبد

جدول۷: مشاهدات ضایعات بافتی در کبد فیل ماهی پرورشی تغذیه شده با مقادیر مختلف افلاتوکسین ب۱ّ به مدت ۳ ماه در درجه حرارت ۲ ± ۱۸ درجه سانتیگراد

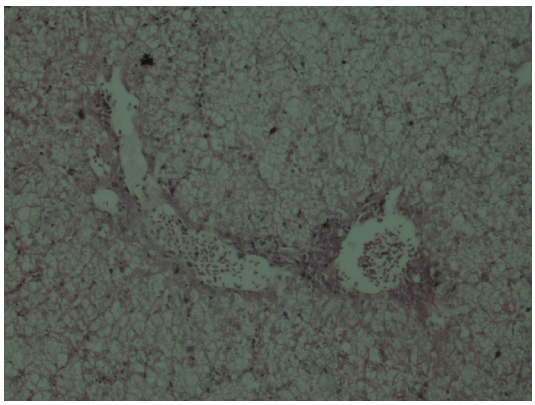
مونه برداری ◄ / تیمارها ▼	ماه اول	ماه دوم	ماه سوم
تیمار ۱ (۲۵ ppb)	-پرخونی عروق کبد-بزرگ شدن هپاتوسیت ها- انباشتگی چربی در سیتوپلاسم هماتوسیت ها- شروع تقسیمات و تغییرات در برخی از هسته های هپاتوسیت ها	- خون ریزی در بافت پارانشیم کبد- پرخونی عروق کبدی-دژنراسیون سیتوپلاسم هپاتوسیت ها- بروز تقسیمات سلولی و تغییرات در هسته ها- شروع نکروز در هپاتوسیت ها- حضور رنگدانه های ملانین در پارانشیم کبد – حضور ملانوماکروفاژها	-کاهش پرخونی ها و خون ریزی ها در کبد- افزایش سلول های ملانوماکروفاژ- انباشتگی چربی و دژنراسیون چربی در کبد- دژنرانس هپاتوسیت ها- از بین رفتن هسته ها و شروع نکروز در کبد
تیمار ۲ (۵۰ppb)	-انباشتگی چربی در سلول های کبدی- دژنراسیون سیتوپلاسم هپاتوسیت ها- حضور رنگدانه های ملانین در پارانشیسم کبد- شروع تقسیمات در هسته هپاتوسیت ها- شروع مراحل نکروز در برخی از سلول ها	- پرخونی نسبی عروق کبدی- دژنراسیون هپاتوسیت ها- دپوزیت چربی در هپاتوسیت ها- شرع مراحل نکروز در هپاتوسیت ها- تخریب دیواره عروق کبدی توام با هجوم سلول های آماسی به دیواره عروق	- دژنراسیون هپاتوسیت ها- انباشتگی چربی در سلول های کبدی- نکروز ناحیه ای در کبد- افزایش مراکز ملانوماکروفاژ
تیمار ۳ (۷۵ppb)	- پرخونی عروق کبدی- انباشتگی چربی در هپاتوسیت - شروع دژنرسانس هپاتوسیت ها- اتساع سینوزوئیدها- شروع تقسیمات سلولی و دژنرسانس هسته ها	- انباشتگی چربی در سلول های کبدی- نکروزناحیه ای در برخی از قسمت ها- نکروز هپاتوسیت ها- وجود مراکز ملانوماکروفاژ	- انباشتگی چربی در هپاتوسیت ها- نکروز هپاتوسیت ها- وجود مراکز متعدد ملانوماکروفاژ- نکروز بافت کبدی به همراه هجوم سلول های خونی در بافت کبد- تخریب دیواره عروق کبدی
تیمار ۴ (۱۰۰ppb)	- برخونی عروق کبدی- انباشتگی چربی در هپاتوسیت ها- شروع دژنراسیون در هپاتوسیت ها- اتساع سینوزوئیدها- تورم هپاتوسیت ها	- نکروز هپاتوسیت ها- مراکز متعدد ملانوماکروفاژ- پرخونی و اتساع سینوزوئیدها- حضور فیبروسیت ها در پارانشیم کبد	-نکروز هپاتوسیت ها- مراکز متعدد ملانوماکروفاژ- تخریب دیواره عروق کبدی- نکروز بافت کبد به شکل پیشرفته- تشکیل بافت فیبروزه در کبد

مقاطع هیستو پاتولوژیک کبد

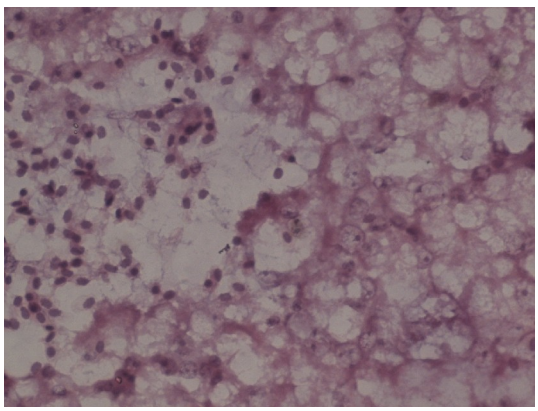
-



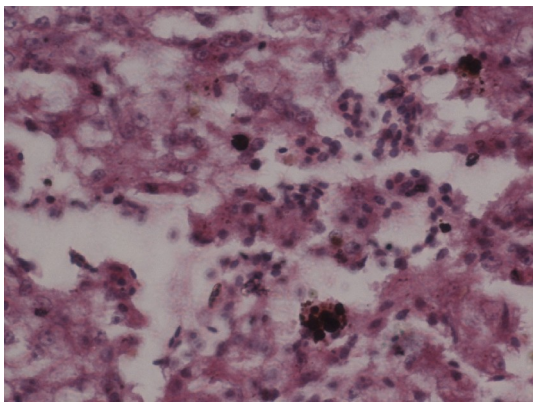
تصویر ۵۱ : :بافت طبیعی کبددرنمونه های شاهد
(H&E × 10)



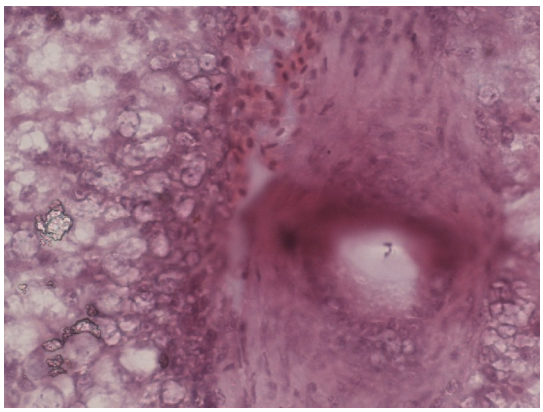
تصویر ۵۲ : انباشتگی چربی و شروع دِژنراسیون در هپاتوسیت ها ، پرخونی عروق کبد، رنگدانه (H&E × 10) های ملانین در پارانشیم کبد. تیمار ۲ ، ماه اول



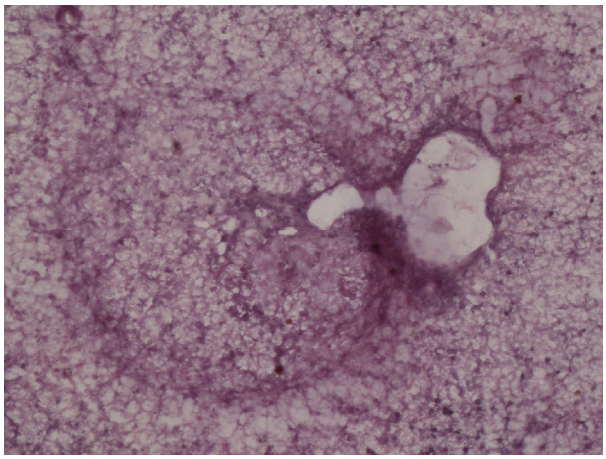
تصویر ۵۳ : خونریزی در پارانشیم کبد، دِژنرسانس سیتوپلاسم هپاتوسیتها، شروع تغییرات نکروتیک (H&E × 40) درهپاتوسیت ها .،تیمار ۱، ماه دوم



تصویر٥٤ : خونریزی در پارانشیم کبد به همراه حضورملانوماکروفاژها ، دِژنرسانس سیتوپلاسم هپاتوسیتها، وقوع تغییرات نکروتیک درهپا توسیت ها.(تیمار۲ ، ماه دوم)
(H&E × 40)



تصویر٥٥ : دِژنرسانس سیتوپلاسم و وقوع تغییرات نکروتیک درهپاتوسیت ها، خونریزی در پارانشیم کبد به همراه تخریب دیواره عروق، حضور فیبروبلاست هادرکبد. (،تیمار ٤، ماه دوم)
(H&E × 40)



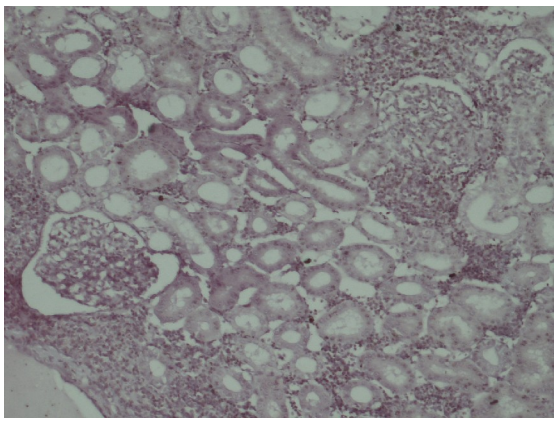
تصویر٥٦ : دِژنرسا نس سیتوپلاسم هپاتوسیت ها، وقوع تغییرات نکروتیک درهپاتوسیت ها ، تغییرات شبه گرانولومایی.(،تیمار ۳ ماه سوم)
(H&E × 20)

۳-۳-۳- کلیه

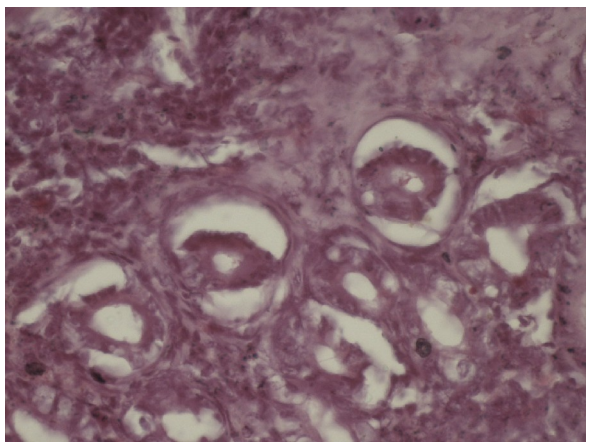
جدول ۸ : مشاهدات ضایعات بافتی در کلیه فیل ماهی پرورشی تغذیه شده با مقادیر مختلف افلاتوکسین ب۱ به مدت ۳ ماه در درجه حرارت ۲ ± ۱۸درجه سانتیگراد

نمونه برداری / تیمارها	ماه اول (روز ۳۰)	ماه دوم (روز ۶)	ماه سوم (روز ۹۰)
تیمار ۱ (۲۵ ppb)	- تحلیل رفتن کلافه گلومرویی - افزایش فضای کپسول بومن -افزایش ضخامت لایه بازال در کپسول بومن - پرخونی عروق کلیوی - تغییرات دژنراسیون در لوله های ادراری	- پرخونی عروق کلیوی - دژنراسیون لوله های ادراری - تحلیل کلافه های گلومرولی - افزایش ضخامت کپسول بومن - شروع واکنش های آماسی در بافت بینابینی	- تحلیل رفتن کلافه های گلومرولی -دژنراسیون لوله های ادراری - نکروز کلافه گلومرولی و حضور بافت های نکروزه در کپسول بومن - حضورسلول های فیبروسیت در بافت بینابینی
تیمار ۲ (۵۰ ppb)	-پرخونی عروق کلیوی - افزایش فضای کپسول بومن - پرخونی در بافت بینابینی کلیه - تغییرات دژنراسیون در لوله های ادراری - افزایش ضخامت لایه بازال در کپسول بومن	-پرخونی در بافت بینابینی کلیه - دژنراسیون لوله های ادراری - تحلیل کلافه های گلومرولی - هایپرپلازی بافت خون ساز بینابینی - افزایش سلول های ملانوماکروفاژ	-تحلیل رفتن کلافه گلومرولی -کنده شدن و حضور بافت نکروزه گلومرولی - دژنراسیون لوله های ادراری -واکنش های حادتورمی در لوله های پروکسیمال - هایپرپلازی بافت خون ساز بینابینی - افزایش سلول های آماسی وملانوماکروفاژها
تیمار ۳ (۷۵ ppb)	- پرخونی عروق کلیوی - افزایش فضای کپسول بومن - تحلیل نسبی کلافه گلومرولی - شروع تغییرات دژنراسیون در لوله های ادراری	-پرخونی عروق کلیوی -ازهم گسیختگی وقطعه قطعه شدن کلافه های گلومرولی - تخریب در دیواره کپسول بومن - تغییرات دژنرایتو در لوله های ادراری - نکروز لوله های ادراری - افزایش مراکز ملانوماکروفاژ و هجوم سلول های آماسی به بافت بینابینی	- دژنراسیون لوله های کلیوی - از بین رفتن پاره ای از کلافه های گلومرولی - نکروز لوله های ادراری - وجود cast در لوله های ادراری - افزایش مراکز ملانوماکروفاژ - تشکیل توده های شبه توموری - بروز واکنش های گرانولومانوژ در بافت بینابینی
تیمار ۴ (۱۰۰ ppb)	- پرخونی عروق کلیوی - تحلیل کلافه های گلومرولی - افزایش فضای کپسول بومن - شروع تغییرات دژنراسیون در لوله های ادراری	-پرخونی عروق کلیوی - تخریب دیواره های عروق کلیوی - خون ریزی در بافت کلیه - دژنراسیون و بعضاً نکروز لوله های ادراری - فیبروزه شدن بافت پارانشیسم کلیه به همراه کاهش بافت گلومرولی و لوله های ادراری	-دژنراسیون و نکروزلوله های ادراری -از بین رفتن کلافه های گلومرولی و نکروز آنها - افزایش مراکز ملانوماکروفاژ - افزایش بافت فیبروزه در پارانشیسم کلیه ها - مشاهده ساختمان های شبه توموری در بافت پرانشیسم کلیه

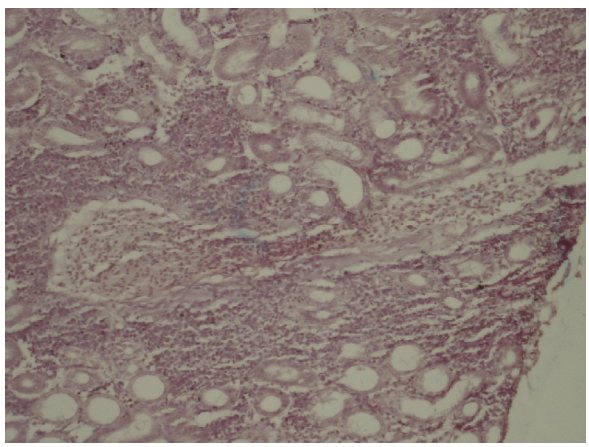
مقاطع هیستو پاتولوژیک کلیه



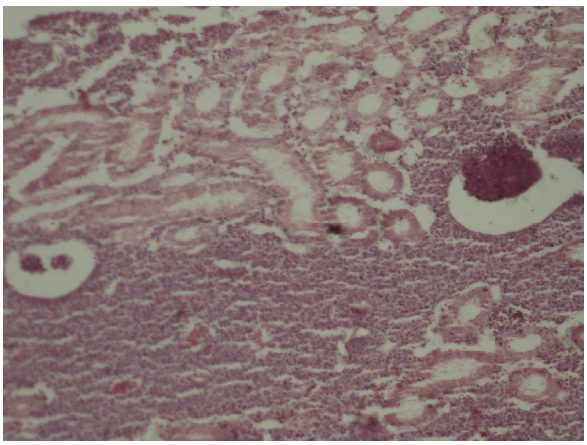
تصویر۵۷ : بافت کلیه درنمونه های شاهد:گلومرولها و لوله های ادراری درحالت طبیعی
(H&E × 10)



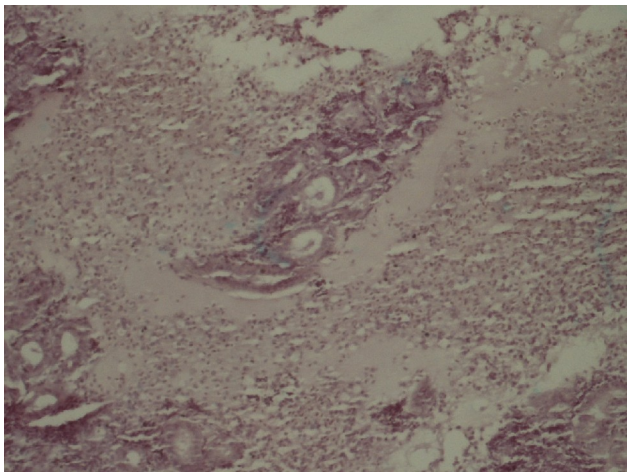
تصویر۵۸ : تحلیل گلومرول هاوافزایش فضای بومنبه همراه افزایش ضخامت لایه بازال کپسولبومن دژنرسانس درلوله های ادراری. ،تیمار ۲ ، ماه اول(H&E × 20)



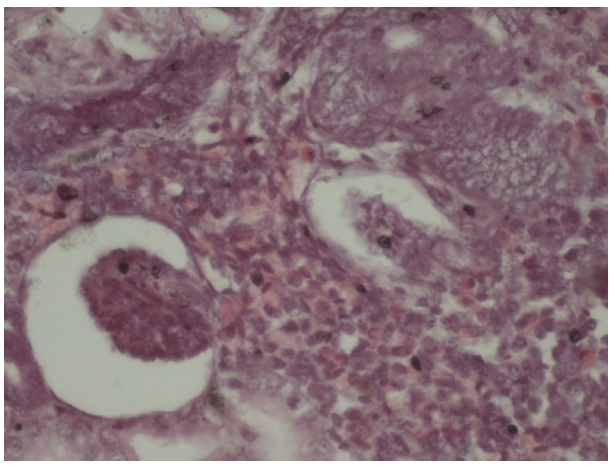
تصویر۵۹ : دژنرسانس لوله های ادراری، پرخونی عروق، حضور سلولهای اماسی وملانوماکروفاژها در پارانشیم کلیه. تیمار ۱، ماه دوم (H&E × 10)٠



تصویر ٦٠ : قطعه قطعه شدن گلومرولها ، دژنرسانس لوله های ادراری، حضور سلولهای اماسی وملانو (H&E × 20)ماکروفازهادرپارانشیم کلیه. تیمار ۳، ماه دوم



تصویر ٦١ : کاهش تعداد گلومرول ها، نکروزلوله های ادراری، افزا یش ملانو (H&E × 10) ماکروفاژها درپارانشیم کلیه ، فیبروزبا فت بینابینی. ،تیمار ٤، ماه دوم



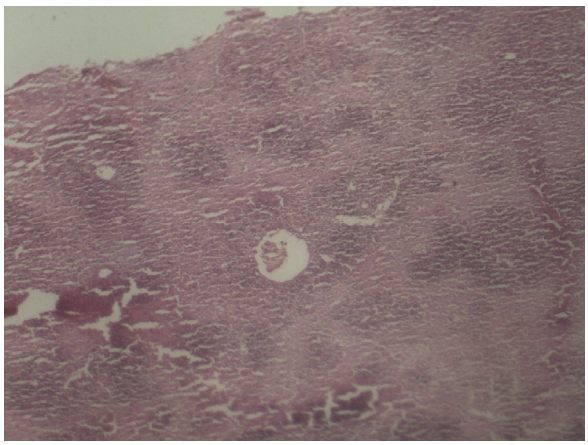
تصویر٦٢ : تحلیل ونکروز گلومرول ها ، نکروزلوله های ادراری، افزا یش ملانو ماکروفاژهادرپارانشیم (H&E × 40) تشکیل گرانولوم و توده های شبه توموری . تیمار ۳، ماه سوم ، ،کلیه

٤-۳-۳- طحال

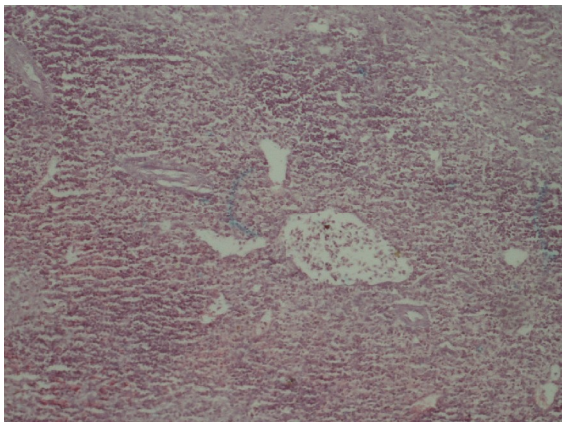
جدول ۹ : مشاهدات ضایعات بافتی در طحال فیل ماهی پرورشی تغذیه شده با مقادیر مختلف افلاتوکسین ب۱ّ به مدت ۳ ماه در درجه حرارت ۲ ± ۱۸ درجه سانتی گراد

نمونه برداری ◄ / تیمارها ▼	ماه اول (روز ۳۰)	ماه دوم (روز ۶۰)	ماه سوم (روز ۹۰)
تیمار ۱ (۲۵ ppb)	-بافت سالم - تغییرات پاتولوژیک مشخصی به چشم نمی خورد.	-بافت نسبتاً سالم -پرخونی در عروق -پرخونی در الیسوئیدها -افزایش اسپلینوسیت ها	-پرخونی در عروق و الیسوئیدها - صدماتی در دیواره عروق - خون ریزی خفیف در بافت - تجمع ماکروفاژها
تیمار ۲ (۵۰ ppb)	- تغییرات پاتولوژیک مشخصی به چشم نمی خورد.	-پرخونی عروق و الیسوئیدها -هجوم سلول های التهابی به بافت زمینه -صدمه به غلاف عروق -حضور ملانوماکروفاژها - تغییرات دژنراتیو دربرخی از قسمت ها	-پرخونی در عروق و الیسوئیدها - تغییرات دژنراتیو در سلول های بافت زمینه ای - پرخونی و خون ریزی در بافت زمینه ای - افزایش اسپلینوسیت ها - نکروز در برخی از قسمت ها -تجمع ماکروفاژها
تیمار ۳ (۷۵ ppb)	-بافت نسبتاً سالم -پرخونی در عروق	- پرخونی عروق - خون ریزی و هجوم گلبول های قرمز به بافت زمینه ای - تراید سلول های اسپلینوسیت - وجود سلول های ملانوماکروفاژ - صدمه به دیواره عروق	- افزایش نسبی عروق طحال -پرخونی در عروق و الیسوئیدها - تغییرات سلولی به سمت دژنراسیون - تشکیل گرانولوما و ساختارهای شبه توموری - تجمع ماکروفاژها
تیمار ۴ (۱۰۰ ppb)	- بافت نسبتاً سالم - پرخونی در عروق - پرخونی در الیسوئیدها	- صدماتی در دیواره عروق اصلی طحال - ضخیم شدن دیواره عروق - پرخونی در عروق و بافت پارانشیسم - شروع دژنراسیون سلول ها - ساختارهای شبیه به گرانولوما	- افزایش نسبی عروق - خون ریزی در بافت طحال - پرخونی در عروق به همراه صدمات شدید به دیواره عروق - دژنراسیون سلول های طحال - حضور ساختارهای شبه گرانولوما - شروع تغییرات نکرونیک در بافت طحال

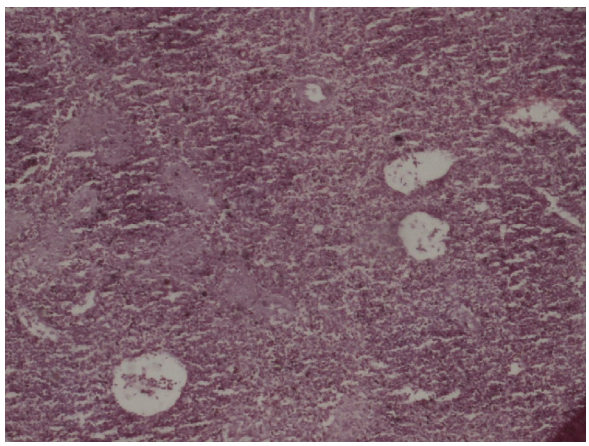
مقاطع هیستو پاتولوژیک طحال



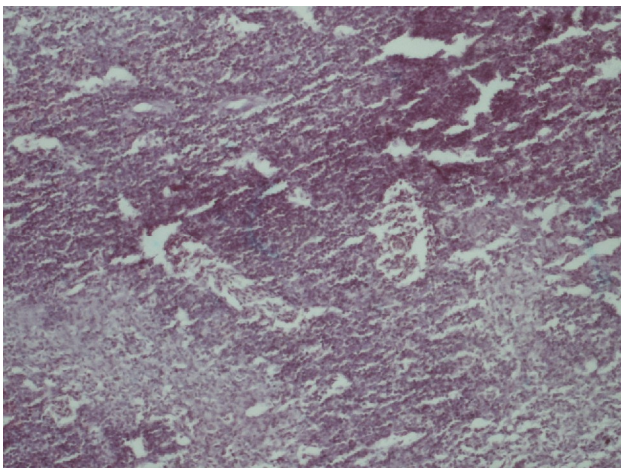
تصویر٦٣ : :بافت طحال درنمونه شاهد: :پولپ سفیدوقرمزبه همراه الیپسوییدها وعرو ق قابل تشخیص است.(H&E × 10)



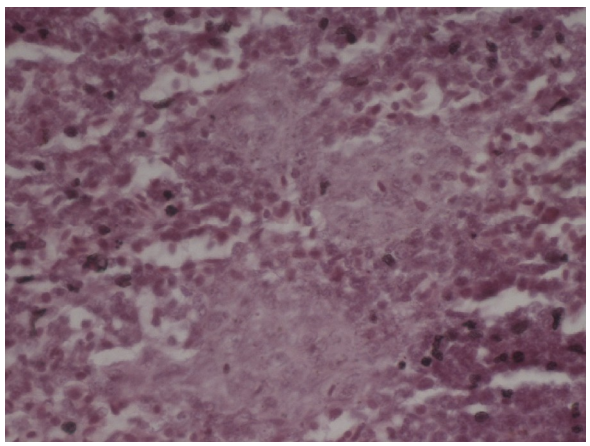
تصویر٦٤ : :پرخونی درعروق و الیپسوییدها، تخریب دیواره عروق، تهاجم سلولهای آماسی به بافت زمینه(H&E × 20) به همراه ملانوماکروفاژها. (تیمار ۳، ماه سوم)



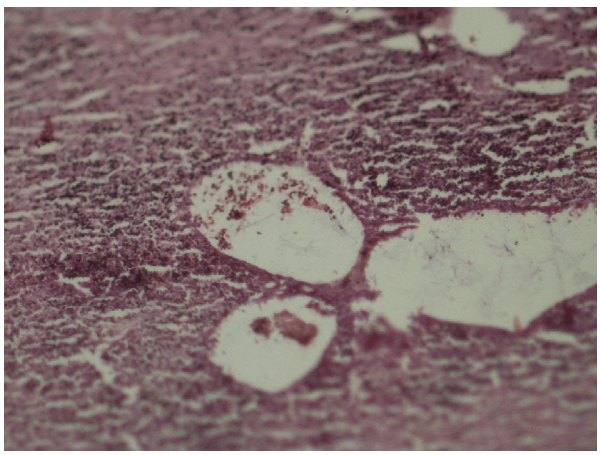
تصویر٦٥ : :پرخونی و تخریب دیواره عروق، تهاجم سلولهای خونی به بافت زمینه ای به همراه ملانوماکروفاژ(H&E × 20) ، تغییرات دژنراتیو در سلول ها. ،تیمار ٤، ماه دوم



تصویر ٦٦ : :پرخونی در الیپسوییدها ، تهاجم سلولهای خونی به بافت زمینه ای به همراه ملانوماکروفاژها. تیمار۳، ماه سوم (H&E × 20)



تصویر٦٧ : تهاجم سلولهای خونی به بافت زمینه ا ی به همراه ملانوماکروفاژها، تغییرات نکروتیک (H&E × 40)سلول ها. ،تیمار ٤، ماه دوم



تصویر٦٨ : پرخونی درعروق به همراه تخریب د یواره آنها ، تهاجم سلولهای آماسی به بافت زمینه ای (H&E × 40) ،تغییرات نکروتیک درسلول ها.،تیمار ٤، ماه سوم

٤-۳- نتایج خون شناسی

جدول ۱ : تغییرات فاکتورهای خونی اندازه گیری شده در تیمار شاهد(۰ppb) درمصرف خوراکی مقادیر مختلف آفلاتوکسین ب۱ طی مدت سه ماه درفیل ماهی پرورشی (SD±میانگین)

نوبت نمونه برداری ➢ / پارامتر ➢	ماه اول	ماه دوم	ماه سوم
$RBC\times10^5$	0.7±5.3	2.3±7.2	0.47±7.7
$WBC\times10^3$	4.2±18.3	17±54.7	14.9±51.5
HCT%	2.5±22.67	4.35±25	0.57±19.7
Hb(g/dl)	0.85±6.5	1.50±6.7	0.58±6.7
Lym%	13.5±53.7	13.9±62	9±69
Neu%	11.55±34.67	13.32±26.7	8.14±26.7
Mon%	0.58±0.67	1.7±5.0	1.53±1.67
Eos%	1.53±8.30	1.53±6.30	2.34±6.30

جدول ۲ : تغییرات فاکتورهای خونی اندازه گیری شده در تیمار یک (۲۵ppb) درمصرف خوراکی مقادیر مختلف آفلاتوکسین ب۱ طی مدت سه ماه درفیل ماهی پرورشی (SD±میانگین)

نوبت نمونه برداری ➢ / پارامتر ➢	ماه اول	ماه دوم	ماه سوم
$RBC\times10^5$	0.65±5.3	0.95±5.1	0.58±5.83
$WBC\times10^3$	1.61±18.7	8.40±36.33	9.70±44.40
HCT%	4.36±26	1.00±21	0.58±20.33
Hb(g/dl)	1.46±7.63	0.58±5.33	0.58±6.67
Lym%	11.10±68.33	5.86±67.33	5.30±67
Neu%	7.00±25.33	5.51±21.33	4.00±25.33
Mon%	0.58±0.33	2.1±3.67	1.15±2.67
Eos%	2.00±4.00	0.58±7.67	1.00±5.00

جدول ۳ : تغییرات فاکتورهای خونی اندازه گیری شده در تیمار یک (۵۰ppb) درمصرف خوراکی مقادیر مختلف آفلاتوکسین ب۱ طی مدت سه ماه درفیل ماهی پرورشی (SD±میانگین)

نوبت نمونه برداری ➢ / پارامتر ➢	ماه اول	ماه دوم	ماه سوم
$RBC\times10^5$	0.35±6.37	0.96±4.20	1.87±4.40
$WBC\times10^3$	6.82±27.83	5.00±41.33	11.30±71.43
HCT%	2.64±27.00	2.64±21.00	5.86±19.67
Hb(g/dl)	0.85±7.96	0.00±4.00	0.58±4.67
Lym%	11.37±49.33	7.10±56.33	6.56±53.00
Neu%	11.37±40.67	10.00±29.00	3.10±31.67
Mon%	0.58±0.33	1.15±3.67	1.15±3.33
Eos%	5.57±7.00	3.00±11.00	4.58±12.00

جدول ٤ : تغییرات فاکتورهای خونی اندازه گیری شده در تیمار دو (۷۵ppb) درمصرف خوراکی مقادیر مختلف آفلاتوکسین ب۱ طی مدت سه ماه درفیل ماهی پرورشی (SD±میانگین)

نوبت نمونه برداری ➢	ماه اول	ماه دوم	ماه سوم
پارامتر ➢			
$RBC\times10^5$	0.66±6.00	4.00±7.70	0.47±6.67
$WBC\times10^3$	3.75±22.33	37.00±58.63	10.10±46.46
HCT%	5.51±26.67	3.46±23.00	0.58±21.33
Hb(g/dl)	1.86±7.87	1.15±6.67	1.00±6.0
Lym%	11.90±58.67	8.72±75.00	5.51±55.33
Neu%	5.30±30.00	8.14±14.67	4.58±34.00
Mon%	0.00±0.00	2.64±3.00	0.58±3.33
Eos%	2.64±5.00	0.58±3.33	2.10±2.11

جدول ٥ : تغییرات فاکتورهای خونی اندازه گیری شده در تیمار چهار (۱۰۰ppb) درمصرف خوراکی مقادیر مختلف آفلاتوکسین ب۱ طی مدت سه ماه درفیل ماهی پرورشی(SD±میانگین)

نوبت نمونه برداری ➢	ماه اول	ماه دوم	ماه سوم
پارامتر ➢			
$RBC\times10^5$	1.00±5.00	0.84±6.43	0.40±7.13
$WBC\times10^3$	0.76±16.67	12.00±45.17	16.65±59.33
HCT%	3.00±23.33	4.73±22.67	1.53±25.33
Hb(g/dl)	1.00±6.73	1.00±7.00	0.58±6.33
Lym%	9.60±62.33	1.73±44.00	3.06±44.00
Neu%	2.90±26.33	2.52±48.67	5.30±43.00
Mon%	0.00±0.00	0.58±2.33	3.21±3.67
Eos%	1.53±4.33	1.53±4.67	6.00±9.33

جدول ٦ : تغییرات فاکتورهای خونی اندازه گیری شده در تیمارهای ازمایشی درمصرف خوراکی مقادیر مختلف آفلاتوکسین ب۱ طی مدت سه ماه درفیل ماهی پرورشی (SD±میانگین)

نوبت نمونه برداری	غلظت سم (ppb) ➢ پارامتر ➢	±100ppb	±75ppb	±50ppb	±25ppb	±0ppb
اول	$RBC\times10^5$	0.10±5.0	0.65±6.0	0.35±6.4	0.65±5.3	0.70±5.30.
دوم	$RBC\times10^5$	0.84±6.4	4.00±7.7	0.96±4.2	0.95±5.1	2.31±7.2
سوم	$RBC\times10^5$	0.40±7.1	0.47±6.7	1.87^b±4.4	0.58±5.8	0.46^a±7.7
اول	$WBC\times10^3$	0.76±16.7	3.75±22.3	6.82±27.8	1.60±18.7	4.16±18.3
دوم	$WBC\times10^3$	12.00±45.2	37.00±58.6	5.00±41.3	8.40±36.3	17.00±54.7
سوم	$WBC\times10^3$	16.65±59.3	10.1±46.5	11.30±71.4	9.70±44.4	14.88±51.5
اول	HCT%	3.00±23.3	5.51±26.7	2.64±27.0	4.36±26.0	2.52±22.7
دوم	HCT%	4.73±22.7	3.46±23.0	2.65±21.0	1.00±21.0	4.36±25.0
سوم	HCT%	1.53±25.3	0.58±21.3	5.86±19.7	0.58±20.3	0.58±19.7
اول	Hb(g/dl)	1.00±6.7	1.86±7.9	0.85±8.0	1.46±7.6	0.85±6.5

دوم	Hb(g/dl)	1.0[b]±7.0	1.15±6.7	0.58±5.3	1.53±6.7	
سوم	Hb(g/dl)	0.58±6.3	1.00±6.0	0.58[b]±4.7	0.58[a]±6.7	
اول	Lym%	9.60±62.3	11.90±58.7	11.40±49.3	11.10±68.3	13.57±53.7
دوم	Lym%	1.73[b]±44.0	8.72[a]±75.0	7.10±56.3	5.86±67.3	13.90±62.0
سوم	Lym%	3.60[b]±44.0	5.51±55.3	6.56±53.0	5.30[a]±67.0	8.89[a]±69.0
اول	Neu%	2.89±26.3	5.30±30.0	6.00±40.7	7.00±25.3	11.55±34.7
دوم	Neu%	2.50[b]±48.70	8.10[a]±14.0	10.00±29	5.51[a]±21.3	13.32±26.7
سوم	Neu%	5.30[b]±43	4.59±34	3.10±31.7	4.00[a]±25.3	8.14[a]±26.7
اول	Mon%	0.0±0.0	0.0±0.0	0.58±0.33	0.58±0.33	0.58±0.67
دوم	Mon%	0.58±2.3	2.64±3.0	1.15±3.7	2.10±3.7	1.73±5.0
سوم	Mon%	3.21±3.7	0.58±3.3	1.15±3.3	1.15±2.7	1.53±1.7
اول	Eos%	4.3±1.53[b]	2.64±5.0	5.57[a]±7.0	4.02±2.00	1.53±8.3
دوم	Eos%	1.53[b]±4.7	2.1±7.3	3.0[a]±11.0	0.58±7.7	1.53±6.3
سوم	Eos%	6.00±9.3	0.58±7.3	4.59±12.0	1.00±5.0	2.31±4.3

براساس نتایج به دست آمده میزان گلبول های قرمزبه جز درغلظت ppb۵۰درنوبت سوم نمونه برداری (ماه سوم) هیچ گونه تفاوت معنی داری رابا گروه کنترل نشان نمی دهند.این وضعیت درطول ۳ ماه مطالعه تکرار شده است. تفاوت های موجود در مورد هموگلوبین در تیمارهای مختلف با تفاوت های مشاهده شده در گلبول های قرمز همسویی دارد.

در مورد گلبول های سفید ، هماتوکریت ومونوسیت ها، درطی نمونه برداری های انجام شده اختلاف معنی داری بین برداری به ترتیب درغلظت های ppb۷۵(نوبت دوم) وppb۲۵و۱۰۰(نوبت سوم)، تیمارهای آزمایشی وشاهد مشاهده نشد..

درنتایج بدست آمده از اندازه گیری لمفوسیت ها درنوبت اول نمونه برداری تفاوتی مشاهده نشد ولی در نوبت های دوم وسوم نمونه تفاوت های معنی داری با شاهد مشاهده گردید.

داده های بدست آمده درموردائوزینوفیل ها مؤید وجود اختلاف معنی داردر غلظت های ppb۱۰۰و۵۰درنوبتهای اول ودوم نمونه برداری است.

۵-۳- مشاهدات ونتایج شاخص های رشد

۱-۵-۳- میانگین وزنی

جدول ۱۰ : تاثیر استفاده از سطوح مختلف AFB_1 در تغذیه فیل ماهی های پرورشی بر میانگین وزن بدن (± خطای معیار از میانگین) در بیومتری های مختلف

تیمارهای آزمایشی	میزان AFB_1 (ppb)درجیره	میانگین وزن(کیلوگرم)				
		بیومتری اول	بیومتری دوم	بیومتری سوم	بیومتری چهارم	بیومتری پنجم
۱	۱۰۰	۱۳۸/۳۰ ± ۳/۶	۱۵۰/۳۷±۴/۸۳	۳۲۳/۷± ۱۱/۶	^{b}۴۲۹/۳±۱۲/۷	^{b}۴۳۱/۶±۱۴/۸
۲	۷۵	۱۲۷/۴۹ ±۴/۰	۱۵۰/۷۰±۳/۷۳	۳۵۶/۳±۱۱/۲	^{b}۴۱۸/۴±۱۴/۵	^{b}۴۲۱/۹±۱۶/۷
۳	۵۰	۱۲۴/۳۰±۶/۰	۱۴۱/۷۵±۳/۴	۳۲۹/۱±۹/۹	^{b}۴۲۹/۲±۱۱/۱	^{b}۴۴۳/۴±۱۳/۴
۴	۲۵	۱۳۱/۲۷±۴/۳	۱۴۷/۷۳±۴/۰	۳۳۹/۲ ±۹/۰	^{ab}۴۵۴/۹±۸/۳	^{ab}۴۷۰/۰±۱۳/۴
۵	۰	۱۳۰/۵۸±۴/۱	۱۵۲/۵۶±۳/۷۵	۳۶۲/۳ ±۸/۳	^{a}۴۸۴/۴±۱۰/۵	^{a}۵۰۲/۵±۹/۹
P-Value		۰/۲۴۴	۰/۳۶۸	۰/۰۳	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱

اختلاف معنی داری بین میانگین وزنی ماهیها در تیمارهای مختلف در هنگام ذخیره سازی در وانها وجود ندارد ($p>0.05$). یک ماه پس از تغذیه تیمارها به منظور سازگاری با غذای دستی در تحت شرایط آزمایشی نیز اختلاف معنی داری بین میانگین وزنی ماهیها در گروههای مختلف مشاهده نگردید($p>0.05$).با توجه به جدول مقایسه چند وجهی که از نتایج آنالیز واریانس داده های بیومتری سوم حاصل شده است ،از نظر عملی (و نه آماری) گروه ۵ اختلاف مثبت وزنی با سایر گروهها را نشان می دهد که قابل تامل است.

چنین بنظر میرسد اختلاف معنی داری بین میانگین وزنی ماهیها در گروههای مختلف در طول دوره حدوداً دو ماه تغذیه با جیره حاوی سم در وان های مختلف وجود دارد ($p<0$ .001) .با توجه به جدول مقایسه چند وجهی که از نتایج آنالیز واریانس داده های بیومتری چهارم حاصل شده است، چنین بنظر می رسد که ماهی های تیمار پنجم (شاهد) که با سم مواجهه نشده اند از نظر میانگین وزنی با ماهیها ی سایر تیمار ها اختلاف معنی داری دارند. این آزمون اختلاف معنی داری را بین ماهی های سایر تیمار ها با هم نشان نداد.

اختلاف معنی داری بین میانگین وزنی ماهیها در گروههای مختلف در طول دوره حدوداً ۳ ماه تغذیه با جیره حاوی سم در وان های مختلف وجود دارد($p<0.001$) . چنین بنظر می رسد که ماهی های تیمار پنجم (شاهد) که با سم مواجهه نشده اند از نظر میانگین وزنی با ماهیها ی سایر تیمار ها اختلاف معنی داری دارند (به جز ماهی

های گروه چهارم که به دلیل کم بودن مقادیر سم اختلاف معنی داری با گروه کنترل ندارند) . این آزمون از نظر آماری اختلاف معنی داری را بین ماهی های سایر تیمار ها با هم نشان نمی دهد .

۲-۵-۳- رشد ویژه (SGR)

جدول۱۱ : : تاثیر استفاده از سطوح مختلف AFB_1 در تغذیه فیل ماهی های پرورشی بر میانگین میزان رشد ویژه (**SGR**)وضریب تبدیل غذایی (**FCR**) ،(± خطای معیار از میانگین) درطی یک دوره ۹۰ روزه

تیمارهای آزمایشی	میزان AFB_1 (ppb) درجیره	SGR ± SD	FCR ± SD
۱	۱۰۰	۰/۸۳±۰/۰۳	۲۲/۲± ۰/۱۶^{ab*}
۲	۷۵	۰/۸۰±۰/۰۴	۲/۵۶±۰/۳۰^{a}
۳	۵۰	۰/۸۹±۰/۰۴	۲/۰۲±۰/۲۰ ^{ab}
۴	۲۵	۰/۹۱±۰/۰۴	۱/۸۸±۰/۱۳ ^{ab}
۵	۰	۰/۹۴±۰/۰۲	۱/۷۰±۰/۰۷^{b}
P-Value		۰/۰۳۴	۰/۰۱۷

*: در هر ستون میانگین هایی که با حروف غیر مشترک نمایش داده شده اند دارای اختلاف معنی دار هستند (**P<0 .05**)

با توجه به جدول مقایسه چند وجهی که از نتایج آنالیز واریانس داده های بیومتری روز ۹۰ حاصل شده است، چنین بنظر می رسد که اختلاف معنی داری از جهت میزان رشد ویژه در بین گروهها وجود ندارد ولی تفاوت عملی بین گروهها و به ترتیب مقادیر سم داده شده کاملا مشهود است که در یک کار پرورشی با مقیاس بزرگ ، این امر تاثیر خود را بر روی رشد ماهیان خواهد گذاشت.

۳-۵-۳- ضریب تبدیل غذائی

چنین بنظر میرسد اختلاف معنی داری بین ضریب تبد یل غذائی در گروههای مختلف در طول دوره حدوداً ۹۰ روزه تغذیه با جیره حاوی سم در وان های مختلف وجود دارد($p<0.05$) و حداقل مقدار یک گروه با بقیه گروهها در این امر متفاوت است.با توجه به جدول مقایسه چند وجهی که از نتایج آنالیز واریانس داده های بیومتری روز ۹۰ حاصل شده است، چنین بنظر می رسد که اختلاف معنی داری از جهت ضریب تبدیل غذائی

در بین گروهها وجود دارد و فقط گروه دو است که نسبت به گروه کنترل از میانگین ضریب تبدیل غذائی بیشتری برخوردار است. البته گروههای دیگر از جمله ۳و ۴ نیز از نظر عملی (و نه آماری) با گروه کنترل اختلاف مثبتی دارند که به معنی بالاتر بودن این ضریب در این گروهها نسبت به گروه کنترل است.بدیهی است این اختلاف عملی میتواند در مقیاس های بزرگ پرورشی در بحث اقتصادی کاملا محسوس باشد.

٦-۳- باقیمانده بافتی

جدول۱۲: 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 درجیره (ppb)	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	۰ c	۰/۵۶ ±۰/۰۳ d	۱/۰۴ ±۰/۰۵ d	۰/۰۱ ±۰/۰۰۴ c
۵	۰	۰ c	۰ e	۰ e	۰ 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 ($p< 0.05$)

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 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 :

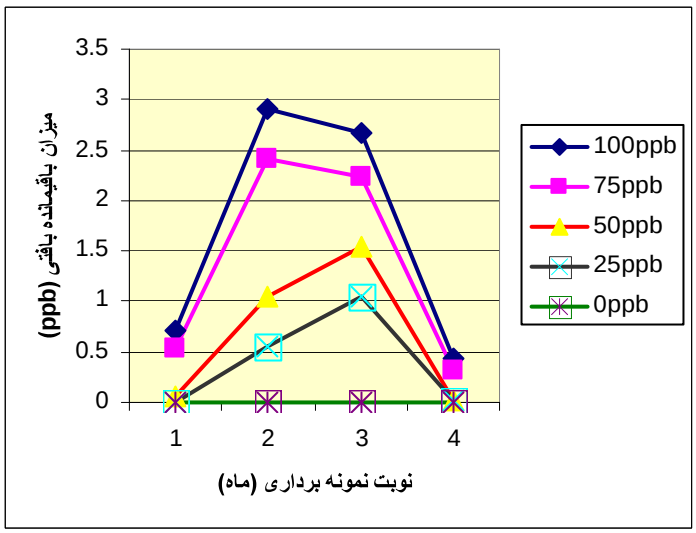
در نمونه برداری اول: اختلاف معنی داری از جهت باقیماندگی بافتی در بین گروهها وجود دارد بطوریکه اختلاف گروه ۱ نسبت به گروههای دیگر (از ۲ تا ۵) به ترتیب افزایش یافته و با گروه ۴ و ۵ این اختلاف در

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 نمودار شماره ۱ مشهود است.



نمودار۳ : میزان باقیماندگی بافتی افلاتوکسین دربافت عضلانی فیل ماهی پرورشی تغذیه شده با جیره های ازمایشی به مدت ٤ ماه دردرجه حرارت ۲±۱۸درجه سانتیگراد

٤- بحث

در حال حاضر، 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).

آلودگی غذاهای مصرفی در آبزیان با آفلاتوکسین‌ها امروزه از گسترش زیادی برخوردار است.این موضوع بویژه در کشورهایی با آب وهوای مرطوب گرمسیری بیشتر به چشم می‌خورد. در کنار شرایط آب و هوایی، روش‌های غیراستاندارد فراوری و نگهداری مواد اولیه و غذاهای مصرفی از دیگر عوامل بسترساز جهت رشد قارچ وتولید توکسین محسوب می‌گردند(Murjani , 2003) .

بسیاری از مطالعات اپیدمیولوژیکی بیانگر این مطلب است که حضور آفلاتوکسین در غذا علاوه بر صدماتی که به آبزیان پرورشی می‌رساند، می‌تواند جهت سلامت حیوانات پرورشی خاکزی نیز خطرناک باشد. بافت‌های حیوانی قادر به نگهداری آفلاتوکسین‌ها و مواد حاصل از متابولیسم آنها در خود می‌باشند. طبعاًاین موضوع از نظر مخاطراتی که برای انسان و بهداشت عمومی دارد حائز اهمیت خواهد بود(Puschner, 2002; Marjani, 2003) .

تولید آفلاتوکسین در طی مراحل نگهداری (انبارداری) و آسیاب‌کردن ادامه می‌یابد وغلظت آن در صورت فراهم بودن شرایط مستعد، افزایش پیدا می‌کند. بیشتر موارد گزارش از ابتلای به آفلاتوکسیوزیس در حیوانات مزرعه‌ای از جمله خوک، گاو و طیور بوده است (Smith *et al.*, 1976).

علائم کلینیکی گزارش شده عموماً شامل صدمات کبدی، خونریزی، تورم بافت‌ها، افزایش درجه حرارت بدن، آنورکسی و افزایش مرگ و میر می‌باشند. کبد به عنوان عضو هدف شناسایی شده وضایعات هیستوپاتولوژیک مشاهده شده در آن شامل خونریزی، نکروز و سیروز کبدی می‌باشند. از سایر علائم که به شکل معمول کمتر مشاهده می‌شود می‌توان به آنتریت به همراه پرولاپس رکتوم، نفریت توکسیک، لوکوسیتوز و علائم تنفسی اشاره نمود (Smith *et al.*, 1976) .

در بسیاری از موارد برقراری ارتباط بین آفلاتوکسین‌ها و سبب‌شناسی بیماری مشکل می‌باشد، بخصوص در مواقعی که مقادیر کم یا متوسط آفلاتوکسین خورده شده وعوارض ناشی از مسمومیت مزمن بروز می‌نماید. به همین دلیل، معمولاً گزارش آفلاتوکسیوزیس توسط پرورش دهندگان زمانی صورت می‌گیرد که آنان شاهد

بروز افزایش تلفات با منشاء ناشناخته بدون هیچگونه ضایعات پاتولوژیک یا شاخص‌های سبب‌شناسی در مزرعه می‌باشند. وقوع نابهنگام شیوع آفلاتوکسیوزیس در مراکز تکثیر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در اوایل سال ۱۹۶۰ از جمله مصادیق این مسئله است.

این موضوع مشخص می‌نماید که تأیید تشخیص آفلاتوکسیکوزیس در مزارع پرورشی بواسطه خلاء علائم کلینیکی مشخص که می‌توانند در تشخیص اولیه موثر باشند، عملاً مشکل است. اطلاعات موجود در ارتباط با وقوع آفلاتوکسین‌ها در حیوانات پرورشی عمدتاً در رابطه با پستانداران و طیور می‌باشد واطلاعات موجود در رابطه با آبزیان پرورشی بسیار اندک است. بر اساس گزارشهای موجود، این موضوع شاید بواسطه کمبود اطلاعات و ارتباط با وقوع آفلاتوکسیکوزیس در آبزیان پرورشی بوده که خود ناشی از مشکل بودن تشخیص این بیماری در آبزیان است .اگرچه مطالعات اپیدمیولوژیک قابل ملاحظه‌ای در ارتباط با اثرات متقابل آفلاتوکسین B_1 در انسان و حیوانات پرورشی خاکزی به عمل آمده است ولی این ضرورت اساسی احساس می-شود که اطلاعات مشابهی بخصوص در ارتباط با ماهیان پرورشی در آب لب شور تولید گردد. بدیهی است این تفکر که مسئله آفلاتوکسین‌ها، در آبزیان می‌تواند از اهمیت بیشتری برخوردار باشد بایستی به شکل جدی‌تر پیگیری گردد. این موضوع به منزله لزوم توجه بیشتر به انجام مطالعات و تحقیق در سرفصل مذکور خواهد بود.

باتوجه به مشاهدات ونتایج بدست آمده از تحقیق حاضرونظر به تنوع نتایج مذکور،جهت سهولت وشفافیت بیشتردربحث نتایج به ترتیب سرفصل های مذکور در بخش نتایج،به بحث پرداخته خواهدشد.

۱-٤- جراحات پوستی

آفلاتوکسیکوزیس 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 می‌باشند. بعلاوه وقوع تغییرات مرفولوژیکی 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 ما شاهد مرگهای مرموز و ناگهانی هستیم. 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 اختلال در لخته شدن خون مشاهده می‌گردد. از دیگر علائم می‌توان به افزایش ضریب تبدیل غذایی، کم خونی، افت تولید، تضعیف سیستم ایمنی،ضایعات کلیوی و مرگ زود هنگام اشاره نمود (Hamilton, 1990).

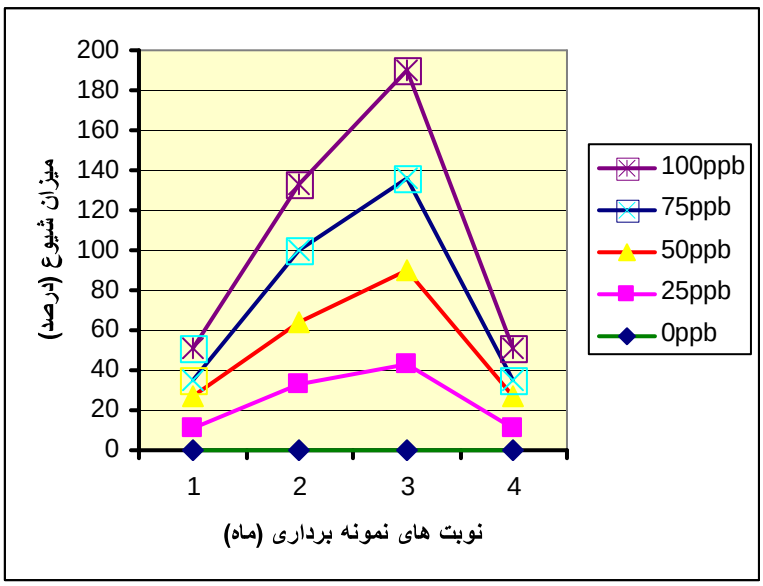
تحقیق انجام شده توسطFarabi. و همکاران در مورد مسمومیت ایجاد شده توسط AFB_1 در فیل ماهی‌های جوان بیانگر وقوع ۸/۶ درصد مرگ و میر پس از ۱۵ روز تغذیه با جیره‌های آلوده می‌باشد. به علاوه بعد از ۴۰ روز ماهیان تحت آزمایش ۷ درصد کاهش وزن داشته‌اند از جمله علائم کلینیکی مشاهده شده در این تحقیق شامل، خون‌ریزی 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) .

زردی رنگ به شکل گسترده در تیلاپیاهای پرورش درفیلیپین دراستانPampanga درفصول گرم ومرطوب در سالهای ۲۰۰۲و۲۰۰۳به همراه مرگ ومیر ناشی از این سندرم توسط مزرعه داران گزارش گردید.ماهیان زنده مانده بواسطه زردی رنگ با قیمت پایین تری از مزرعه داران خریداری گردید. علایم کلینیکی مشاهده شده درماهی تیلاپیای نیل تغذیه شده با غذای الوده به افلاتوکسین شامل کدورت قرنیه منجر به کوری، جراحات پوستی، خوردگی در باله ها وناحیه دمی، زرد رنگ شدن پوست بدن ، شنای نامتعادل ، کم تحرکی،و کاهش اشتها میباشند.این مطالعه تایید می نماید که زردی رنگ مشاهده شده در تیلاپیای پرورشی درCentral Lusan بواسطه غذای الوده به افلاتوکسین بوده است.(Cagauan *et al*.,.2003.) .

طبعاً، رنگ زرد ایجاد شده ناشی از مسمومیت‌های مزمن آفلاتوکسینB_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.

تحقیق حاضر برروی فیل ماهی موید این مطلب است که جراحات پوستی از نظر کمی و کیفی در تیمارهای مختلف تحت آزمایش پیشرفت قابل توجهی را نشان داده است. بطوریکه در تیمارهای مختلف به تناسب غلظت سم مصرفی بروز زخم‌هایی با حاشیه‌های زرد رنگ در نواحی شکمی،جانبی و ساقه دمی به همراه خون‌ریزی در پایه باله‌های سینه‌ای و شکمی به همراه بروز زخم و جراحات در لبه‌های فوقانی و تحتانی باله دمی و در حاشیه-های باله‌های سینه‌ای و شکمی و پشتی به همراه خوردگی باله در برخی از تیمارها مشاهده گردید. بروز جراحات به همراه تورم و خون‌ریزی در اطراف مقعد و توسعه جراحات و زخم‌ها در ناحیه سر و سرپوش برانشی به همراه خون‌ریزی و ترشحات با حاشیه‌های زرد رنگ ((Yellow Sores)به شکل قابل ملاحظه‌ای خودنمایی نمود. میزان شیوع علائم وجراحات پوستی در تیمارهای مختلف متفاوت بود.

در پایان مرحله سه ماهه آزمایش ماهیان تحت مطالعه به مدت یک ماه با جیره غذایی معمولی فاقد AFB_1 تغذیه گردیدند. در پایان مدت مذکور جراحات پوستی تیمارها از نظر کمی و کیفی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی‌ها موید روند بهبود در جراحات مذکور در حدود ۱۶الی ۲۴٪ در ماهیان تحت مطالعه بود. روند مذکور در نمودارهای شماره۲ نشان داده شده است.



نمودار ۲: درصد شیوع زخم های جلدی در اثر دوز های مختلف آفلاتوکسین ب۱ در تیمار های تحت آزمایش

بنظرمیرسد که تحقیق حاضر برروی فیل ماهی اولین تحقیقی است که به بررسی میزان شیوع جراحات پوستی درجمعیت مشخصی از ماهیان پرداخته است. ارقام ثبت شده در جدول شماره ۲ بیانگر این مطلب است که میزان شیوع جراحات پوستی با درجات مختلف از ۸ الی ۱۶ درصد در نوبت اول نمونه‌برداری تا ۵۳/۳ درصد در آخرین نمونه‌برداری افزایش داشته است.

این افزایش به همراه توسعه و پیشرفت جراحات مشاهده شده در نوبت‌های مختلف نمونه‌برداری موضوعی نگران کننده از نظر بازار پسندی فیل ماهی است.طبعا درشرایط پرورشی دراستخر، بواسطه وجودعوامل الوده کننده ثانوی این موضوع از اهمییت بیشتری برخوردار خواهد گردید.

درمقایسه با مشاهدات ومطالعات انجام گرفته برروی سایر آبزیان پرورشی به نظر می رسد که به رغم عدم بروز تلفات درتیمارهای آزمایشی، شدت وگستردگی جراحات ومنظره بد ناشی از جراحات پوستی درفیل ماهی از گستردگی بیشتری برخوردار است.

طبعادرصورت عدم بروز تلفات در استخرهای پرورشی در مسمومیت های مزمن با AFB_1،این نگرانی وجود خواهد داشت که درهنگام برداشت محصول با ماهیان بدمنظر که بازار پسندی مطلوبی ندارند مواجه باشیم.این موضوع توجه بیشتر به نظارت بهداشتی وکنترل کیفیت غذای مصرفی این گونه پرورشی را ایجاب می نماید.

روند بهبود جراحات مذکور در ماهیان تحت مطالعه که به مدت یک ماه با جیره غذایی معمولی فاقد AFB_1 تغذیه گردیدند ، مویداین مطلب است که درصورت تشخیص به موقع مسمومیت های مزمن وقطع تغذیه با جیره غذایی آلوده ، می توان به میزان قابل توجهی به بهبود جراحات وکاهش خسارات ناشی از عدم بازار پسندی امید داشت.

۲-٤- علایم کالبد گشایی ومشاهدات هیستوپاتولوژیک

میزان صدمات ناشی از آفلاتوکسین‌ها به عواملی از جمله غلظت سم موجود در غذا، مدت زمان مصرف غذای آلوده و همچنین حساسیت‌های گونه‌های تحت تغذیه بستگی دارد .(Stewart & Larson, 2002)

مسمومیت‌های حاد ناشی از آفلاتوکسین‌ها در شرایط فقر بهداشتی حاصل می‌شود و یافته‌های اصلی کلینیکی آن شامل کاهش تولید، کاهش وزن وکاهش قدرت باروری و همچنین تضعیف سیستم ایمنی است. از دیگر علائم

پاتولوژیکی شایع که بیشتر در مسمومیتهای مزمن به چشم می‌خورد می‌توان به مسمومیت‌های ژنتیکی، اثرات تومورزایی و سرطان‌زایی در انسان و حیوانات اشاره نمود. علائم مشابهی نیز در مراکز تکثیر پرورش آبزیان گزارش شده است.

Stewart و Larson در سال ۲۰۰۲ سه نوع از آفلاتوکسیوزیس را توصیف کرده‌اند: حاد، تحت حاد و مزمن. آفلاتوکسیکوز مزمن در هنگام خوردن دراز مدت مقادیر کم تا متوسط آفلاتوکسین به وقوع می‌پیوندد. لذا بواسطه بروز تدریجی و تحت کلینکی علائم ناشی از مسمومیت معمولاً شناسایی و تشخیص آن با مشکل مواجه است. از عمده‌ترین علائم کلینیکی در آفلاتوکسیکوزیس مزمن می‌توان به اختلالات کبدی از جمله کاهش راندمان تغذیه، کاهش وزن، افزایش حساسیت به بیماری‌های عفونی ثانویه، نکروز و ایجاد تومور در کبد و سایر اندامها و افزایش مرگ و میر اشاره داشت. در این شکل از بیماری اثرات سرطان‌زایی و اختلالات ژنتیکی ناشی از مسمومیت شایع بوده و متعاقب آن تغییرات تراتوژنیک هورمونی، نورتوکسیک و هماتولوژیک بروز می‌نماید (Pier *et al.*, 1980).

ایجاد ضایعات در DNA بواسطه مصرف آفلاتوکسین در کپور ماهی هندی روهو (Labeo rohita) از طریق تزریق داخلی صفاقی با استفاده از یک دُز منفرد (۱۰۰ میکروگرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن) گزارش گردیده است.در روزهای سوم و ششم پس از تزریق، روند افزایشی غلظت AFB_1 در سلول های کبدی به موازات افزایش DNA های متصل شده به آفلاتوکسین، مشاهده گردید. در بررسی‌های بعدی انجام شده بر روی رشته‌های DNA استخراج شده از بافت‌های مذکور، علائم مسمومیت‌های ژنتیکی، ناشی از AFB_1 از جمله افزایش قطعه قطعه شدن ژنوم و پاره‌گی منفرد در رشته‌های DNA، مشاهده گردید(Madhusudhanan *et al*,. 2006).

این موضوع باید مورد توجه باشد که در صورت تداوم مدت زمان مواجه شدن با سم ، تومورهای بدخیم ایجاد شده حالت مهاجم گرفته و به اندام‌های دیگر متاستاز می‌دهند. این پدیده در ماهیان ۲ـ ۱ ساله بیشتر اتفاق می‌افتد. در جهت تأیید یافته‌های فوق، تعداد زیادی از تومورهای کوچک غیر مهاجم خوش خیم نیز در قزل‌آلای رنگین‌کمان مشاهده گردیده است برای مثال آدنومای سلولهای کبدی که نماینده یک مرحله بینابینی (واسط) است ، می‌تواند پس از کارسینومای سلولهای کبدی در تقابل‌های طولانی مدت با سم، حادث شود(Bailey *et al.*, 1996) .

نظرات مشابهی توسط تعداد دیگری از صاحبنظران ارائه گردیده که موید خطر ایجاد سرطان از طریق مواجه شدن با آفلاتوکسین، بواسطه مدت زمان ماندگاری تجمع بافتی توکسین است(Gorelick *et al*,. 1993).

تغذیه طولانی با مقادیر کم AFB_1 منجر به ایجاد تومورهای کبدی در قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود (Lovell, 1992) .

میزان واکنش‌های تومورزایی در قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با مقدار ۲۰ppb از AFB_1 در طی مدت یک ماه بطور متوسط ۶۲ درصد گزارش گردیده است در حالیکه در ماهی آزاد کوهو تغذیه شده با ۵۰۰۰ ppb میزان وقوع سرطان‌های کبدی فقط ۵ درصد بوده است. نسبت مشابهی از اتصال AFB_1 با DNA در گونه‌های فوق‌الذکر قابل مشاهده است، بطوریکه در تزریق یک نوبتی AFB_1 نشاندار شده با $[^3H]$ ، بعد از ۲۴ ساعت، میزان AFB_1 باند شده با DNA در قزل‌آلای رنگین‌کمان، ۵۰ برابر بیشتر از ماهی آزاد کوهو بوده است. از طرفی سرعت ایجاد اتصال مذکور نیز در طی مدت ۲۴ ساعت در قزل‌آلای رنگین کمان نسبت به ماهی آزاد بیشتر بوده است. افزایش میزان ترکیب مذکور منجر به تجمع بافتی و بقای بیشتر آن گردیده و نتیجه آن امکان وقوع بیشتر ایجاد تومور در قزل‌آلای رنگین کمان خواهد بود. در آزمایش‌های انجام شده همچنین ایجاد انواع مختلفی از تومورها مشاهده گردید برای مثال وقوع کارسینومهای بدخیم سلو لهای کبدی در قزل‌آلای رنگین‌کمان در مقابل آدنومای خوش خیم ایجاد شده در ماهی آزاد کوهو (Bailley *et al.*,1988).

به اعتقاد اکثر محققین مراحل مختلف تکامل سلول های بدخیم سرطانی (شروع، توسعه و ترویج) با اتصال DNA با AFB_1 شروع می‌شود (Massey *et al.*, 1995; Bailley *et al.*, 1996).

شکل غالب کبدهای توموری شده در قزل‌آلای رنگین‌کمان، شامل ترکیبی از کارسینوهای کلانژیو- سلولار در سلول های کبدی است که متعاقباً ، تبدیل به کارسینومای کامل سلول های کبدی می‌گردد و معمولاً کارسینومای کلانژیوسلولار به تنهایی کمتر اتفاق می‌افتد (Nunez *et al.*, 1989 ; Kelly *et al.*, 1993, Bailey *et al.*, 1996) .

کارسینوmای ترکیبی در جنین ماهیانی که از طریق حمام دادن با ۰/۰۵ppm آفلاتوکسین B_1 برای مدت ۱ ساعت مواجه گردیدند، شروع گردید (Bailey *et al.*, 1996). همچنین به جز تومورهای بدخیم کبدی ، تعداد قابل توجهی تومور (نفروبلاستوم های کشنده) در کلیه های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و کپور معمولی مشاهده گردید (Bailey *et al.*, 1996; Murjani 2003) .

کپورهای هندی تغذیه شده با مقادیر ۲/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن از آفلاتوکسین B_1 بعد از ۹ ماه تغذیه علاوه بر تغییرات مشخص و قابل مشاهده در کبد در چندین عضو دیگر نیز عوارضی را نشان دادند. از جمله به ضایعات و نفریت در لوله های ادراری و بروز لمفوسارکوم در کلیه، ضایعات و تغییرات پاتولوژیک در دستگاه گوارش، قلب ومغز می‌توان اشاره نمود. از دیدگاه ماکروسکوپی، کبد بزرگ و متورم با ندول های زرد رنگ بر روی سطح آن قابل مشاهده بود (Murjani, 2003) .

در گونه‌های مختلف جانوری درجات متفاوتی از حساسیت به AFB_1 مشاهده می‌گردد. از مبانی ایجاد این تفاوت‌ها می‌توان به زمینه‌های مستعد ژنتیکی در این گونه‌ها اشاره نمود. این موضوع تا حد زیادی وابسته به الگوهای مختلف نشانه‌گذاری ژن‌های موثر و درگیر در مراحل انتقال بیولوژیکی آفلاتوکسین‌ها می‌باشد.AFB_1 یکی از رایج‌ترین ترکیبات مستعد کننده ایجاد سرطان می‌باشد و جهت فعال شدن بیولوژیکی باید به شکل ترکیب واسط AFBO در بیابد.(Eaton & Gallagher 1994, Robeuck & Maxuitenko 1994) .

AFB_1 در سلولهای کبدی بوسیله سیستم آنزیمی چند کاره میکروزمی (MFO) * و آنزیم‌های ویژه سلولی به چند نوع متابولیت تبدیل می‌شود.(Eaton & Groopman 1994 , Gallagher & Eaton 1995, Tulayakul *et al.*, 2005) .

در برخی از گونه‌های ماهیان به مانند پستانداران چرخه متابولیکی AFB_1 اساساً از دو مسیر و با سه سیستم اصلی تجزیه مشخص می گردد

۱ـ مرحله اول یا فاز فعال سازی که توسط سیستم آنزیمی ترکیبی سیتوکروم اکسیداز وابسته به پروتئین ۴۵۰ (P450) یا MFO به انجام می‌رسد.

۲ـ مرحله دوم یا مرحله سم زدایی که مشتمل بر دو سم‌زدای اصلی و مهم می‌باشد. این ترکیبات سم‌زدا عبارتنداز یوری دین دی فسفات گلوکورونیل ترانسفراز(UDPGT´s) و آنزیم دیگری که با شدت کمتری در این واکنش مشارکت می کند آنزیم گلوتاتیون اس ـ ترانسفراز(GST's) می‌باشد (Livingstone 1998) .

مرحله اول شامل اکسیداسیون میکروزومی AFB_1 می‌باشد که منتج به تولید متابولیت سمی AFBO از طریق اپوکسیداسیون و همچنین تولید متابولیت‌های با سمیت کمتر از جمله AFM_1 و AFQ_1 از طریق هیدروکسیلاسیون و AFP_1 به شیوه واکنش‌های دی متیلاسیون آنزیمی می گردد(Ramsdell *et al.*, 1991) .

* -MFO = Microsomal Mixed – function Oxidases

خانواده سیتوکروم P-450S شامل گروهی از هموپروتئین‌ها هستند که در مراحل فعال‌سازی بیولوژیکی و سم-زدایی متابولیسم ترکیبات خارجی مشارکت داشته و در داخل غشاء شبکه اندوپلاسمیک صاف تجمع یافته-اند(Stegeman & Lech 1991) . Loveland و همکارانش در سال ۱۹۸۷ گزارش کردند که تبدیل AFL_1 به AFB_1 پس از طی یک دوره یک ساعته در هپاتوسیت‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به طور قابل ملاحظه‌ای از تبدیل AFB_1 به AFL_1 بیشتر می‌باشد . در این مطالعه مشاهده گردید که تولید DAN- Adduct هم از طریق اپوکسیداسیون مستقیم AFB_1 و هم از طریق دی هیدروژناسیون AFL_1 به AFB_1 حادث گردیده و این واکنش‌ها با تشکیل CYP وابسته به AFBO ادامه می‌یابد (Gallagher & Eaton 1995) .

مطالعات انجام شده توسط Tulayakul و همکارانش در سال ۲۰۰۵ مشخص نمودکه میزان حساسیت قزل‌آلای رنگین کمان به مسمومیت‌های سلولی با AFB_1 بسیار زیاد بوده و فعالیت آنزیم‌های احیا کننده AFB_1 در سیتوزول‌های کبدی این ماهی در مقایسه با خوکچه هندی، موش ، Rat و خوک از V_{max} و K_m پایین‌تری برخوردار می‌باشد (Tulayakul *et al* ., 2005).

نهایتاً می‌توان اینگونه استنتاج نمود که راندمان بالاتر تولید AFBO از طریق CYP واسط در کنار مقادیر بالای تولید بدون واسطه ومستقیم از AFB_1 و تولید غیرمستقیم از طریق AFL_1 می‌تواند عامل تشکیل مقادیر بالای DAN – Adduct یافته شده در قزل‌آلای رنگین کمان باشد. این نتایج در کنار مقادیر کم فعالیت ترکیب الحاقی GST- AFBO بیانگر حساسیت بالای این ماهی به مسمومیت و سرطان‌زایی با AFB_1 می‌باشد.(Valsta *et al*.,1988, Bailey *et al* ,. 1996)

Sanchez و همکارانش (۱۹۹۴) گزارش کردند که مقدار ۳۰ میلی‌گرم AFB_1 به ازای هر کیلوگرم از جیره غذایی تیلاپیا برای این ماهی کشنده محسوب نمی‌شود.

زمانی که جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین (۱۱۵/۳۴ppb) به تیلاپیای نیل به مدت ۱۲۰ روز خورانده شد، فقط تورم‌های گرانولوماتوز مزمن در کبد مشاهده گردید بدون اینکه توموری تشکیل شود (Caguan *et al*., 2004).

بر طبق یافته‌های Tuan و همکاران در سال ۲۰۰۲ شدت ضایعات ایجاد شده در تیلاپیای نیل از طریق مصرف خوراکی AFB_1 در طی مدت ۸ هفته، با افزایش غلظت آفلاتوکسین خورده شده، افزایش نشان می‌دهد. در ماهی تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۲/۲۵ میلی‌گرم AFB_1 به ازای هر کیلوگرم، تغییراتی در نرخ رشد دیده نمی-

شود، در حالیکه میزان ۱۰ میلی‌گرم آفلاتوکسین به ازای هر کیلوگرم ، منجر به ایجاد ضایعات شده و در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم آفلاتوکسین B۱، نکروز حاد کبد و ۶۰ درصد مرگ و میر حادث می‌شود(Tuan *et al.*, 2002) .

بررسی‌های انجام شده توسط Gallagher & Eaton (1995) موید این مطلب است که چرخه متابولیسم AFB_1 در کبد گربه ماهی در غلظت‌های پایین (μM ۱۶) که شباهت زیادی به محدوده‌های طبیعی آلودگی‌های محیطی با آفلاتوکسین دارد، عملاً منجر به تشکیل AFBO با منشاء میکروزمی نمی شود.

متقابلاً ، مقادیر کم AFBO همانند AFM_1 فقط در شرایط تجربی مصرف مقادیر بالا و اشباع AFB_1 ($۱۲۸\mu m$) تولید می‌گردد، لذا در شرایط محیطی طبیعی بواسطه عدم وجود CYP به شکل اشباع، عملاً احتمال تولید AFBO وجود نخواهد داشت.

بعلاوه، تولید متابولیت‌های هیدروکسیله شده AFB_1 از جمله AFQ یا AFP_1 در هیچیک از غلظت‌های پایین یا بالا گزارش نشده است همچنین فعالیت آنزیم‌های احیا کننده AFB_1 بالا می‌باشد که این موضوع به احیای سریع AFB_1 به AFL_1 منجر می‌گردد. در واقع محققین نشان داده‌اند که تولید AFL در گربه ماهی حداقل ۴۰ برابر بیشتر از قزل‌آلا می‌باشد. در گربه ماهی روگاهی به مانند اغلب آبزیان، چرخه سم‌زدایی از طریق GST تا کنون گزارش نگردیده است (به جز در ماهی کفشک انگلیسی English sole و ماهی فلاندر).

در یک جمع بندی می‌توان گفت که اگرچه اکسیداسیون میکروزمی AFB_1 در گربه ماهی ضعیف بوده و این ترکیب سریعاً به AFL تبدیل می‌شود، در طی این تبدیل زمینه حذف سریع AFB_1 آزاد فراهم گردیده و مقاومت گربه ماهی به مسمومیت و سرطان‌های کبدی را توجیه می‌نماید. برخلاف گربه‌ماهی، در قزل‌آلای رنگین‌کمان فعالیت بالای اپوکسیداسیون AFB_1 به AFBO روی می دهد که این متابولیت یک ترکیب شدیداً سرطان‌زا در این گونه محسوب می‌گردد.

آفلاتوکسین‌ها بر اساس گزارشهای IARC، از جمله مهمترین ترکیبات Genotoxic شناخته شده می‌باشند. اتصال AFB_1 به DNA در پستانداران منجر به ایجاد ضایعاتی از قبیل اختلالات کروموزمی ، ایجاد هستک ، تغییر در کروماتیدهای خواهر، سنتز ناخواسته DNA و شکست رشته‌های کروموزمی می‌گردد (IARC , 1993).

جهت ایجاد تأثیرات ژنتیکی، AFB_1 نیازمند تبدیل شدن به یک ترکیب بیولوژیکی فعال الکتروفیل به نام epoxide 9 و 8 ـ AFB_1 می‌باشد. انجام واکنش اپوکسیداسیون در حلقه انتهایی فوران در AFB_1 منجر به افزایش تولید

مخلوطی در ایزومرهای اپوکسیدی بنامهای .AFB_1 8,9 endo – epoxide و AFB_1 ـ 8, 9 ـ exo – epoxide می‌گردد محصول اصلی که می‌تواند در ایجاد اختلالات ژنتیکی و سلولی موثرتر باشد ترکیب exo – epoxide است (Raney *et al.*, 1993) .

Exo –epoxide تولید شده در داخل سلول از پایداری خوبی جهت مهاجرت از شبکه اندوپلاسمیک به هستک ها برخوردار بوده و در این محل با مواد ژنتیکی ترکیبی، کووالانت تشکیل داده و بدین طریق قادر به ایجاد تغییرات ساختاری و ایجاد ضایعات در DNA می‌گردد (Bailey *et al*,. 1996 , Guengerich 2006).

اخیراً Ezz El - Arab و همکارانش (۲۰۰۶) در مطالعاتی که بر روی موش نر انجام دادند شاهد ایجاد تغییراتی در سلول های جنسی (اسپرماتوسیت‌ها) شامل تغییرات ساختاری و عددی کروموزم‌ها (پری دیپلوئیدی و پلی پلوئیدی) بودند.

اولین تلاشها در ارتقای بررسی مسمومیت‌های ژنتیکی حاصل از مصرف AFB_1 در ماهیان توسط Abd-Allah و همکارانش در سال ۱۹۹۹ به انجام رسید. کسانی که موفق به اندازه‌گیری میزان تخریب و صدمات رشته‌های DNA به روش Comet گردیدند. این محققین اثرات اولیه و بلند مدت AFB_1 در رابطه با صدمات وارد شده به DNA را درخون ، کبد و سلول‌های کلیوی در قزل‌آلای رنگین کمان ، به عنوان یک گونه حساس و همچنین گربه ماهی به عنوان یک گونه مقاوم‌تر بررسی ومقایسه نمودند. در قزل‌آلا صدمات اولیه و تأخیری ۴ ساعت پس از تزریق داخل صفاقی AFB_1 در خون و کلیه مشاهده گردید که پس از ۲۴ ساعت مقدار آن کاهش پیدا کرد. در سلولهای کبدی قزل‌آلا در طی مدت مذکور صدمات به شکل پیش رونده با میزان بالای ایجاد ضایعات در DNA ظهور پیدا کرد. بالعکس تحت شرایط مشابه هیچگونه صدمات سلولی یا تخریب DNA در گربه ماهی پرورشی مشاهده نشد. این یافته‌ها با چرخه‌های متابولیکی موجود در دو گونه مذکور همسویی و مطابقت دارد. راندمان پایین اپوکسیداسیون AFB_1 که قادر به تولید مقادیر کافی AFBO نبوده و تبدیل سریع AFB_1 به AFL ، از دلایل اصلی قابل اشاره جهت بالا بودن مقاومت ظاهری گربه ماهی به مسمومیت‌های ژنتیکی با AFB_1 محسوب می‌گردند (Gallagher & Eaton 1995; Abd- Allah *et al*.,1999) .

علاوه بر انسان وحیوانات مزرعه‌ای خشکی‌زی، تأثیرات تومورزایی AFB_1 در برخی از گونه‌های آبزیان نیز مشاهده گردیده است برای مثال : ماهی آزاد کوهو، قزل‌آلای رنگین‌کمان، گربه‌ماهی روگاهی، تیلاپیای نیل،

ماهی گوپی (Lebistes reticulates) ماهی گورخری و کپور هندی روهو. (Halver 1969, Lee *et al.*, 1971 , Sato *et al*,. 1973 , Jantrarotai *et al.*, 1990 b ; Lovel 1992; Bautista *et al*,. 1994, Chavez – Sannchez *et al* .,1994; Hendricks , 1994; Troxel *et al.*, 1997; Sahoo *et al.*, 2001 ; Murjani , 2003; Sahoo *et al.*, 2003).

در گونه‌های مختلف جانوران خشکی‌زی درجات متفاوتی از مقاومت و حساسیت نسبت به ویژگی تومورزایی AFB_1 مشاهده گردیده است. این موضوع در بین گونه‌های مختلف آبزیان نیز مصداق دارد برای مثال قزل‌آلای رنگین‌کمان همانند Rat، اردک و انسان حساسیت زیادی نسبت به ایجاد سرطان‌های کبدی ناشی از مصرف AFB_1 دارد. از طرف دیگر به نظر می‌رسد که AFB_1 یک ترکیب سرطان‌زای ضعیف در ماهی آزاد کوهو بوده و گونه‌هایی از قبیل ماهی گورخری و گربه ماهی همانند موش از حساسیت بسیار کمی برخوردار هستند (Hendricks , 1994; Tsai 1996, Bailey *et al.*, 1996).

به نظر می‌رسد حساسیت‌های متفاوت مشاهده شده در گونه‌های مختلف ماهیان نسبت به تأثیرات سرطان زایی AFB_1 ناشی از تفاوت در راندمان انتقال بیولوژیکی و چرخه‌های متابولیکی این ترکیب در بین گونه‌ها است (Eaton &, Gallagher 1994, Bailly *et al.*, 1996).

بر طبق اظهارات Bailly حساسیت بالای قزل‌آلای رنگین کمان به ایجاد سرطان ناشی از مصرف AFB_1 می‌تواند ناشی از راندمان پایین سیستم ترمیم DNA در پاکسازی DNA های باند شده با آفلاتوکسین B_1 باشد(Bailly *et al.*, 1988) . تحقیق انجام شده در طی ۸ هفته برروی تیلاپیای نیل ۲/۷ گرمی تغذیه شده با مقادیر ۰/۲۵، ۲/۵، ۱۰و۱۰۰ میلی گرم AFB_1/Kg نشانداده است که در تغذیه با تیمارحاویmg/Kg ۱۰ افزایش لیپوفوشین وتفاوت اندازه درهسته هپاتوسیت هاودرغلظت mg/Kg ۱۰۰،نکروز حاد هپاتوسیت هابه همراه ۶۰ درصدتلفات مشاهده شده است.هیچگونه ضایعات پاتولوژیک درطحال،معده،بخش پیلوریک روده،کلیه قدامی وقلب درتیمارهای ازمایشی مشاهده نگردید(Tuan *et al.*,2002,).

دربررسی های کتابخانه ای مدارکی که موید انجام تحقیقات کالبدگشایی به منظور دستیابی به اثرات ناشی از مصرف AFB_1 در ماهیان باشد. به دست نیامد.درارتباط بامطالعات هیستوپاتولوژی نیزعمدتا کبد به عنوان عضو هدف تاثیرAFB_1 مدنظر قرارداشته واثرات تومورزایی وتغییرات پاتولوژیک دراین عضو مد نظر بوده است. تاثیر پذیری این عضو وسایراندام های داخلی تاحدزیادی به روند متابولیسم AFB_1 درگونه تحت تغذیه بستگی

دارد.بعلاوه عواملی ازجمله:سن،مقدارسم،مدت زمان مواجهه و درجه حرارت محیط پرورش نیزدراین رابطه حایز اهمیت هستند. بنظر می رسدسیستم انزیمی متابولیسمAFB_1 درفیل ماهی مشابه با گربه ماهی روگاهی باشد.طبعا این فرضیه نیازمندتحقیق وبررسی است.

مشاهدات کالبدگشایی درابشش فیل ماهی های ازمایشی بیانگر وجود درجاتی از پرخونی،کم خونی وبعضا افزایش ترشحات مخاطی دراین عضو است وتغییرات پاتولوژیک ان شامل:پرخونی،تلانژکتازی،خونریزی،هاپرپلازی سلول ها درپایه لاملاهای ثانویه وتخریب بافت پوششی لاملاهای ثانویه دربرخی ازقسمت ها می باشدکه به تناسب میزان سم ومدت زمان مصرف ان شدت بروز ضایعات مذکور متفاوت است.

اگرچه این تغییرات برای اولین بار و در تحقیق حاضرگزارش گردیده است وتیمارهای شاهد فاقد علایم مذکور بوده اند،ولی به نظر می رسد که استفاده از یافته های مذکور بعنوان شاخص تایید پاتولوژی مسمومیت با AFB_1نیازمندمطالعات بیشتری است.

علایم کالبدگشایی درکبد شامل پرخونی، کبد چرب ، کیسه صفرای متسع و حاوی صفرای بی‌رنگ، تقسیمات ظاهری لانه زنبوری در قسمت شکمی کبد، رنگ سبز لجنی به همراه سستی بافت و رنگدانه‌های سیاه رنگ در قسمت داخلی است. علایم مذکور به تناسب میزان سم ومدت زمان مصرف آن بیانگر روندپیشرونده تغییرات ازشکل حاد به مزمن است. درارتباط باعلایم کالبدگشایی مسمومیت باAFB_1 درکبد آبزیان به شکل مشروح گزارشی دردسترس نمی باشد. نظربه اینکه علایم فوق الذکردرتیمارهای شاهد مشاهده نگردید لذا بنظرمی رسد ازعلایم مشاهده شده بتوان در تشخیص موارد مشکوک به مسمومیت با AFB_1 بهره برداری نمود.

روندپیشرونده ومزمن تغییرات پاتولوژیک درکبدبسیارروشن وجهت تایید تشخیص مسمومیت با AFB_1 درفیل ماهی قابل استناداست. بنظرنمی رسد AFB_1درکبدفیلماهی قابلیت تومورزایی داشته باشد.

علایم کالبدگشایی مسمومیت باAFB_1 درکلیه فیل ماهی بسیارمشهودوشامل علایمی ازجمله پرخونی وتورم حاد تا ایجادندول های سفید دربخش خلفی وتحلیل بافت کلیه دربرخی ازتیمارها درماه سوم نمونه برداری میباشد.

تغییرات پاتولوژیک نیز بسیار گسترده وشاخص بوده وشامل پرخونی،خونریزی،دژنرسانس ونکروز گلومرول ها ولوله های ادراری ، تغییرات فیبروتیک وتحلیل برنده بافت کلیه است.

موضوع حایزاهمیت این که کلیه به عنوان عضو هدف در مسمومیت با AFB_1 محسوب نمی گردد وضایعات ایجاد شده در کلیه بیشتر درمسمومیت با اکراتوکسین ها ایجاد می شود.

اکراتوکسین دردانه های روغنی وغلات یافت می شوند . این سموم درطی مراحل ذخیره سازی ودردرجه حرارت ورطوبت مناسب توسط Penicillium verrucosum تولید می گردد.عضو هدف اکراتوکسین کلیه بوده ومنجر به ایجاد نکروز در لوله های پروکسیمال کلیوی میگردد(Peter Spring & Daniel , 2005).

برخی از محققان از جمله(Murjani, 2003) و (Hamilton, 1990)به ایجاد تغییراتی ازقبیل نفریت در لوله ها و بروز لمفوسارکوم وبروزضایعات در کلیه ماهی قزل الای رنگین کمان اشاره داشته اند.

بروز تغییرات وسیع در کلیه بواسطه مسمومیت با AFB_1 درابزیان پرورشی به شکل مشاهده شده در تحقیق حاضر تاکنون گزارش نشده است.

نظربه اینکه علایم مذکور درتیمارهای شاهد مشاهده نگردید، لذابنظرمی رسد ازعلایم مشاهده شده بتوان در موارد مشکوک به مسمومیت با AFB_1 بهره برداری نمود.

علایم کالبدگشایی مسمومیت باAFB_1 درکلیه فیل ماهی های ازمایشی بیانگرایجاد تغییراتی دررنگ وبافت این عضو درمقایسه با تیمارهای شاهد است که دربخش نتایج مشروحا توضیح داده شده است.

روند بروز تغییرات پاتولوزیک درطحال حایز اهمیت است که باتغییرات حادشامل پرخونی وخونریزی شروع شده وتا بروز تغییرات گرانولوماتوزوشبه توموری ونهایتا نکروزپیش میرود. تاکنون گزارشی درارتباط علایم کالبدگشایی مرتبط باافلاتوکسیکوزیس درابزیان منتشرنشده است.بروز تغییرات پاتولوژیک به شرح فوق نیز برای اولین بار ودر فیل ماهی گزارش می شود.

بنظر می رسد با انجام مطالعات تکمیلی بتوان ازقابلیت تایید تشخیص علایم پاتولوژیک مذکور جهت موارد مشکوک به مسمومیت با AFB_1 بهره برداری نمود.

۳-٤- فاکتورهای خون شناسی

در مواجهه داد جنین قزل آلای رنگین کمان با AFB1 اختلال بلند مدت در سیستم ایمنی از طریق کاهش قابل ملاحظه در لمفوسیت های B مشاهده می گردد.(Arkoosh and Kaattari:, 1987; Ottinger and Kaattari;2000)

در تحقیق حاضر در ماه دوم و در غلظت ppb ۷۵ افزایش عملی تعداد لمفوسیت ها مشاهده گردید که با نتایج حاصل در مورد قزل آلای رنگین کمان مطابقت دارد. نتایج حاصل از تداوم تغذیه با غذای حاوی آفلاتوکسین منجر به کاهش میزان لنفوسیت ها به شکل معنی دار بخصوص در غلظت ppb ۱۰۰ در نوبت های دوم و سوم نمونه برداری گردید این وضعیت به احتمال زیاد بواسطه صدمات وارده به بافت های خون ساز (کلیه قدامی و طحال) می باشد. تغییرات پاتولوژیک حاصله نیز موید این مطلب است و تائیدی بر اثرات تضعیف سیستم ایمنی توسط آفلاتوکسین ب ۱ می باشد.

همچنین در مواجه لمفوسیت ها با AFB1 کاهش تولید ایمنوگلوبین و تزاید لمفوسیت ها گزارش گردیده است (Ottinger and Kattari; 1998).

تفاوت های مشاهده شده در مورد تونروفیل ها نیز از ماه دوم نمونه برداری شروع گردید. افزایش معنی دار نوتروفیل ها در نوبت های دوم و سوم نمونه برداری و در غلظت ppb ۱۰۰ مشاهده گردید. وسعت جراحات پوستی در تیمارهای مذکور و عفونت های جلدی ایجاد شده به همراه سایز صدمات بافتی در سایر اندام ها می تواند توجیه افزایش این گروه از گلبول های سفید باشد.

اثرات تخریبی AFB1 بر روی بافت های خون ساز (کلیه قدامی و طحال) منجر به کاهش لمفوسیت ها و کاهش تولید ایمنوگلوبین ها می گردد..(Sahoo *et al*,. Zoola; Sahoo and mukherjee, 2001b.)

مسمومیت های مزمن با آفلاتوکسین می تواند منجر به نقصان فاکتورهای ضد میکروبی (لیزوزیم ، آنتی پروتئاز و غیره) سرم و نهایتاً افزایش حساسیت ماهی به عفونت ها شود. بنابر این اگر چه دوزهای پائین آفلاتوکسین ب ۱ منجر به ایجاد مرگ و میر نمی شود ولی می تواند زمینه ساز ایجاد حساسیت بیشتر به بیماریهای عفونی از طریق تضعیف سیستم ایمنی باشد..(Sahoo and Murkherjee, 2001 b)

بطور کلی اثرات تخریبی آفلاتوکسین B1 بر روی بافت های خون ساز می تواند دلیلی بر کاهش تعداد گلبول های سفید باشد که در این رابطه کاهش معنی دار ائوزینوفیل ها در نوبت های اول و دوم نمونه برداری در غلظت ppb ۱۰۰ می تواند توجیه داشته باشد.

با افزایش غلظت آفلاتوکسین B1 در جیره ماهی تیلاپیا میزان هماتوکریت به شکل معنی داری کاهش نشان داد. (Nguyen Anh Tuan *et al*,. 2002)

بطور کلی کاهش میزان گلبول های قرمز و هموگلوبین در نوبت سوم نمونه برداری با یکدیگر همسویی داشته و مؤید ایجادکم خونی در ماهیان تحت تغذیه با آفلاتوکسین B1 می باشد. این مطلب با علائم کلینکی و مشاهدات پاتولوژیک همخوانی دارد.

٤-٤- شاخص های رشد (میانگین وزنی،ضریب تبدیل غذایی، رشدویژه)

نخستین فعالیت پرورش فیل ماهی در سالهای ۱۹۵۲ تا ۱۹۶۰ در کشور روسیه به انجام رسید (Kozlove 1993).

پرورش این گونه با ارزش در آب شیرین و در ایران برای نخستین بار توسط شادروان دکتر یوسف پور در سال ۱۳۶۹ با موفقیت به انجام رسید (یوسف‌پور، ۱۳۷۳) . بر اساس تجربیات پرورش گونه فیل‌ماهی، میزان غذادهی بر اساس وزن توده زنده تا ۳ درصد بیومس مقرون به صرفه است (کاکوزا ، ۱۳۸۰).

تجربیات حاصل از مطالعه تعیین بهترین درصد غذادهی در پرورش فیل ماهی در مخازن فایبرگلاس در دمای ۲۶ تا ۲۷/۵ درجه سانتی‌گراد با غذادهی معادل ۴ درصد وزن بدن در اوزان ۳۵ تا ۱۵۰ گرم و تراکم ۲/۲ کیلوگرم در متر مربع ضریب تبدیل غذا،۱/۶ بدست آمد (محسنی و همکاران، ۱۳۸۲).

محصولات شیلاتی بعنوان یک منبع مهم تأمین غذا برای انسان ومصارف حیوانی مطرح هستند، افزایش این تقاضا منجر به رشد سریع در آبزی‌پروری گردیده است (Myhr & Dalmo, 2005) .

در طی دهه گذشته تولید محصولات آبزی‌پروری به شکل قابل ملاحظه‌ای در آمریکا، اروپا و آسیا افزایش یافته است (EC, 2001 , FAO, 2002). بواسطه تقاضای سیستم‌های پرورشی آبزیان به غذا ومحدودیت‌های موجود در استفاده از ضایعات صیادی برای تغذیه ماهیان پرورشی، استفاده از غذاهای صنعتی به شکل اساسی در آبزی-پروری گسترش یافته است(Nylor *et al.*, 2000).

گونه‌های اصلی پرورشی در کشورهای اروپایی ماهی آزاد آتلانتیک، قزل‌آلای رنگین‌کمان، باس دریایی، سیم دریایی (*Sparus aurata*) توبورت، مار ماهی و کپور معمولی می‌باشند(EC 2001).این گونه‌ها عمدتاً در محیط طبیعی گوشتخوار بوده ودر شرایط پرورش به شکل متراکم نیازمند به مقادیر بالای پروتئین می‌باشند. اخیراً در ترکیب غذاهای تجاری آبزیان از ترکیباتی از جمله ذرت به عنوان بخش اصلی و پودر ماهی و روغن نباتی به

عنوان منابع تأمین پروتئین و چربی برای این ماهیان پرورشی و میگوهای گوشتخوار در سیستم های متراکم بکار برده می‌شوند.(New *et al.*, 1995; Scottish Executive Report 2002.)

اغلب پودرهای ماهی از ماهی کامل تهیه می‌گردند از جمله این ماهیان می‌توان به ماهیان آنچوی وکاپلین و یا محصولات فرعی و ضایعات ماهی منهادن، هرینگ وآزاد ماهیان اشاره نمود (Hardy, 1989).

پودر ماهی پس از خشک کردن و آسیاب کردن ماهی تازه حاصل می‌شود و غذای ماهیان پرورشی از ترکیب پودر ماهی با کربوهیدرات‌ها، همبندها، آرد سویا، و گندم به علاوه ویتامین‌ها، مواد معدنی و رنگدانه‌ها و سایر مواد مغذی لازم ساخته می‌شود. از ضایعات ناشی از فراوری ماهی، از جمله کنسانتره‌های پروتئینی و هیدرولیز شده نیز در تغذیه آبزیان بهره‌برداری می‌گردد . این موضوع باید مدنظر قرار داشته باشد که علیرغم اینکه استفاده از ضایعات ماهی در تغذیه آبزیان می‌تواند یک روش اقتصادی باشد ولی قادر است در صورت فراوری نامناسب مخاطراتی را نیز در بر داشته باشد. برای مثال احتمال معرفی عوامل بیماری‌زا و مایکو توکسین‌ها ازطریق آلوده کردن غذای مصرفی وجود دارد(EC 2003). اگرچه سنتز آفلاتوکسین معمولاً در سبزیجات و یا در طی ذخیره سازی غلاتی از جمله ذرت اتفاق می‌افتد ولی آلودگی پودر ماهی و ضایعات فراوری شده ماهی در طی مراحل آسیاب کردن و سیلو کردن و یا آلودگی مستقیم در مزرعه یا شرایط نامناسب نگهداری نیز اتفاق می‌افتد (Dragoni *et al.*, 2000).

بواسطه قیمت بالای پودر ماهی، جایگزینی آن با مواد اولیه با منشاء گیاهی از جمله غلات می‌تواند در کاهش هزینه‌های جاری آبزی پروری موثر باشد.توجه به استفاده از مواد اولیه گیاهی رو به رشد بوده و به طور معمول در تولید غذای آبزیان در دستور کار قرار دارد.(Scottish Executive Report 2002)

در مواد اولیه با منشاء گیاهی امکان آلودگی بیشتر با آفلاتوکسین‌ها وجود دارد که می‌تواند اثرات نامطلوبی را برای ماهیان پرورشی در بر داشته باشد (Fegan 2005 ; Spring 2005) .

طبعاً انتخاب مواد غذایی با کیفیت مناسب نقش به سزایی در تولید ماهیان پرورشی خواهد داشت. تغذیه آبزیان با غذاهای آلوده منجر به افزایش مخاطرات وقوع بیماری‌ها می‌گردد. این موضوع بخصوص در سیستمهای متراکم پرورشی که با غذاهای تازه و طبیعی جایگزین غذاهای پلت تغذیه می‌شوند از اهمیت بیشتری برخوردار است (Spring, 2005) .

موسسه ملی تغذیه هندوستان (ICMR) در مطالعات خود به این موضوع پی برد،که مقادیر آفلاتوکسین موجود در مواد اولیه خوراکی و غذاها بیش از مقادیر تعیین شده در استانداردهای مصرفی است (Balasubramanian 1985; Dhavan & Chaudary 1995; Bhat, *et al.*, 1997) .

خصوصاًدر حدود ۶۹ درصد از نمونه‌های اخذ شده از پودر ماهی به آفلاتوکسینB_1 آلودگی داشتند (Dutta & Das 2000). بطور کلی آلودگی به مایکوتوکسین‌ها در غذاهای مصرفی آبزیان پرورشی یک مشکل عمده در نواحی گرمسیری و کشورهای در حال توسعه بوده ، که علت اصلی آن استفاده از ضایعات آلوده به آفلاتوکسین وهمچنین فراوری و ذخیره سازی نامناسب است (Tacon 1992, Spring, 2005).

در این کشورها غذاهای مصرفی آبزیان عمدتاً توسط مزرعه‌داران ساخته می‌شود که غالباً با دستکاری‌های غیربهداشتی همراه است. در این نواحی در کنار آب و هوای مناسب جهت آبزی‌پروری، آلودگی شدید به آفلاتوکسینB_1 بواسطه توسعه نامناسب اقتصادی ـ اجتماعی، روش‌های عمل‌آوری غیربهداشتی و قدیمی، الگوهای غلط و غیرقابل قبول ذخیره‌سازی در فضاهای باز ، در مجاورت بارندگی، حشرات و جوندگان حادث می گردد(Fegan 2005, Spring 2005) .

این موضوع حائز اهمیت است که اغلب تولید کنندگان خوراک و طیف وسیعی از مزارع پرورش متراکم آبزیان در مناطق گرمسیری قرار دارند و بیش از ۸۵ درصد تولیدات جهانی آبزی پروری در کشورهای در حال توسعه، تولید می‌شود. همچنین اغلب مزارع پرورش متراکم میگو در تایلند، تایوان، اندونزی و فیلیپین واقع شده‌اند در این مناطق آلودگی شدید غذای مصرفی میگوها به آفلاتوکسین‌ها مشاهده گردیده است(Tacon *et al*,. 1995; Fegan 2005) .

اگرچه آلودگی به آفلاتوکسین‌ها معمولاً از طریق آلودگی‌های موجود در مواد اولیه حمل شده از مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری حادث می‌گردد ولی آلودگی‌های موجود در محصولات کشاورزی کشورهای اروپایی و آمریکایی نیز نباید نادیده گرفته شود (Russell *et al*,. 1991 , EFSA, 2004).

مشخصاً استفاده از مواد اولیه با منشاء گیاهی در فرمولاسیون جیره‌های غذایی آبزیان زمینه‌ساز بروز بیشتر آفلاتوکسیکوزیس در مزارع پرورشی می‌باشد بطور کلی مطالعات بیانگر این مطلب است که آلودگی غذاهای مصرفی آبزیان به آفلاتوکسین‌ها یک مسئله اساسی و گسترده در ابزی‌پروری محسوب گردیده که می‌تواند از نظر اقتصادی و بهداشتی در بسیاری از کشورهای آبزی‌پرور از جایگاه ویژه‌ای برخوردار باشد.

تیلاپیای نیل تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۰/۱mg به ازای هر کیلوگرم از جیره در طی مدت ۱۰ هفته فقط کاهش رشد را نشان می‌دهد و در ماهیانی که با mg ABF_1 /kg ۰/۲ از جیره غذایی تغذیه شدند، ۱۶/۷ درصد مرگ و میر مشاهده گردید (EL. Banna *et al*.,1992). گربه ماهی پرورشی به مانند دیگر ماهیان گرمابی پرورشی مثل ماهی کپور بواسطه نوع مواد غذایی مصرفی از احتمال بالایی در آلودگی با آفلاتوکسین B_1 از طریق خوراکی برخوردار است. آنها معمولاً از جیره‌های غذایی حاوی بیش از ۳۰ درصد ذرت و کنجاله پنبه دانه که غالباً غذاهایی آلوده محسوب می‌گردند ، جهت تغذیه استفاده می‌کنند. بر اساس مطالعات Lovell در سال ۱۹۸۴ حداقل میزان $\mu g/kg$ ۴۰۰ آفلاتوکسین به شکل باقیمانده بافتی از لاشه گربه ماهیان پرورشی آمریکایی بازیافت گردید. مطالعات تجربی انجام شده در مورد گربه ماهیان پرورشی موید این مطلب است که با خوراندن AFB_1 از طریق جیره غذایی (در محدوده ppb ۲۱۵۴ ـ ۱۰۰) کاهش معنی‌داری در اضافه وزن یا بروز ضایعات هیستوپاتولوژیک در آنان مشاهده نمی‌شود(Jantrarotai & Lovell 1990a) .

علائم اولیه کلینیکی مسمومیت حاد با آفلاتوکسین از جمله: کاهش سرعت رشد، کم خونی، نکروز کبد ودستگاه گوارش، زمانی در گربه‌ماهی پرورشی بروز می‌نماید که با مقادیر حدود ppb ۱۰/۰۰۰ از AFB_1 تغذیه می‌شود(Jantrarotai & Lovell 1990a) . دُز کشنده آفلاتوکسین B_1 (LD_{50}) در طی ۱۰ روز از طریق تجویز داخل صفاقی برای گربه ماهی روگاهی معادل ۱۱/۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن گزارش گردیده است (Jantrarotai *et al*,. 1990b).

این مقدار حدوداً ۱۴ برابر بیشتر از مقدار تعیین شده LD_{50} برای قزل‌آلای رنگین کمان می‌باشد. در تجویز خوراکی این عدد به ۲۰ برابر افزایش می‌یابد.

از دیگر گونه‌های ماهی که به مقدار کمتری نسبت به مسمومیت با AFB_1 مقاومت نشان می‌دهد تیلاپیای نیل است . اگرچه این گونه در مسمومیت‌های حاد در مقایسه با گربه ماهی پرورشی گونه حساس‌تری به شمار می-رود(Tuan *et al*., 2002).

Chavaz – Sanchez. و همکارانش (۱۹۹۴) گزارش کردند که مقدار ۳۰ میلی‌گرم AFB_1 به ازای هر کیلوگرم از جیره غذایی تیلاپیا برای این ماهی کشنده محسوب نمی‌شود . زمانی که جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین

(۱۱۵/۳۴ppb) به تیلاپیای نیل به مدت ۱۲۰ روز خورانده شد، فقط تورم‌های گرانولوماتوز مزمن در کبد مشاهده گردید بدون اینکه توموری تشکیل شود .(Cagauan *et al*,. 2004)

.مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که تیلاپیای نیل تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۱۰ میلی‌گرم AFB_1 به ازای هر کیلوگرم، در طی مدت ۸ هفته به میزان ۹۰ درصد کاهش در نرخ رشد را نشان می‌دهد در حالیکه این میزان در گربه‌ماهی روگاهی تغذیه شده با جیره غذایی مشابه حدود ۲۴ درصد گزارش گردیده است. (Jantrarotai & Lovell 1990a, Tuan *et al.*, 2002)

بعلاوه مقادیر بالاتر کاهش در هماتوکریت در تیلاپیای نیل نسبت به گربه‌ماهی گزارش شده است (Jantrarotai & Lovell 1990a).

نتایج بدست آمده از تحقیق انجام شده به منظور دستیابی به تاثیر مقادیرمختلف AFB_1 برشاخص های رشد در فیل ماهی پرورشی بیانگرمطالب زیراست:

۱-٤-٤- میانگین وزنی

اختلاف معنی داری بین میانگین وزنی ماهیها در گروههای مختلف در هنگام ذخیره سازی در وانهای مختلف وجود ندارد ($p>0.05$). در بیومتری اول نیز اختلاف معنی داری بین میانگین وزنی ماهیها در گروههای مختلف درطول یک ماه تغذیه با جیره نگهداری در وانهای مختلف مشاهده نمی شود ($p>0.05$) .دربیومتری سوم اختلاف معنی داری هر چند کوچک (sig. =0.03) بین میانگین وزنی ماهیها در گروههای مختلف در طول دوره حدوداً دو. ماه تغذیه با جیره حاوی سم در وان های مختلف وجود دارد ($p<0.05$) .با توجه به جدول مقایسه چند وجهی که از نتایج آنالیز واریانس داده های بیومتری سوم حاصل شده است .از نظر عملی (و نه آماری) گروه ۵ اختلاف مثبت وزنی با سایر گروهها را نشان می دهد که قابل تامل است.در بیومتری چهارم اختلاف بسیار معنی داری بین میانگین وزنی ماهیها در گروههای مختلف در طول دوره تغذیه با جیره حاوی سم در وان های مختلف وجود دارد ($p<0.001$) . با توجه به جدول مقایسه چند وجهی که از نتایج آنالیز واریانس داده های بیومتری چهارم حاصل شده است، چنین بنظر می رسد که ماهی های تیمار پنجم (شاهد) که با سم مواجهه نشده اند از نظر

میانگین وزنی با ماهیها ی سایر تیمار ها به جز تیمار چهارم(تغذیه شده با جیره حاوی ۲۵ ppb آفلاتوکسین) اختلاف معنی داری دارند. این آزمون اختلاف معنی داری را بین ماهی های سایر تیمار ها با هم نشان نمی دهد.

در بیومتری پنجم ا ختلاف بسیار معنی داری بین میانگین وزنی ماهیها در گروههای مختلف در طول دوره حدوداً ۳ ماه تغذیه با جیره حاوی سم در وان های مختلف وجود دارد ($p<0.001$) .با توجه به جدول مقایسه چند وجهی که از نتایج آنالیز واریانس داده های بیومتری پنجم حاصل شده است، چنین بنظر می رسد که ماهی های تیمار پنجم (شاهد) که با سم مواجهه نشده اند از نظر میانگین وزنی با ماهیها ی سایر تیمار ها (به جز ماهی های گروه چهارم که به دلیل کم بودن مقادیر سم اختلاف معنی داری با گروه کنترل ندارند) اختلاف معنی داری دارند. این آزمون از نظر آماری اختلاف معنی داری را بین ماهی های سایر تیمار ها با هم نشان نمی دهد .

از نتایج بدست آمده چنین استنباط می شود که طی یک ماه و نیم اول پس از مواجهه با سم، تغییرات محسوس وزنی بین ماهیهای تیمار های مختلف مشاهده نشده است .

در صورتی که پس از گذشت ۳ ماه از اولین مواجهه ، تغییرات معنی داری حداقل بین ماهیهای تیمارهای مواجهه داده شده با سم با گروه شاهد مشاهده شده است. همچنین با گذشت زمان این تغییرات وزنی با تغییرات هیستوپاتولوژیک نیز همراه بوده است.

تا بیومتری چهارم، علی رغم اینکه تغییرات هیستوپاتولوژیک متناسب با افزایش غلظت سم شدت یافته است ولیکن تغییرات وزنی محسوس نبوده است و صرفا این اختلاف بین تیمارها با گروه شاهد معنی دار بوده است.

در بیومتری پنجم و پس از قریب به چهار ماه ، آزمون ها از نظر آماری اختلاف معنی داری را بین میانگین وزنی ماهی ها را با هم نشان نمی دهد ، هر چند که اختلاف عملی میانگین وزنی بین ماهیهای تیمارهای مختلف به ترتیب از تیمار ۱ تا تیمار ۴ با یک روند وزنی نزولی نشان از تاثیر تدریجی غلظت سم بر میانگین وزنی بین ماهیهای تیمارهای مختلف در مواجهه با سم است.

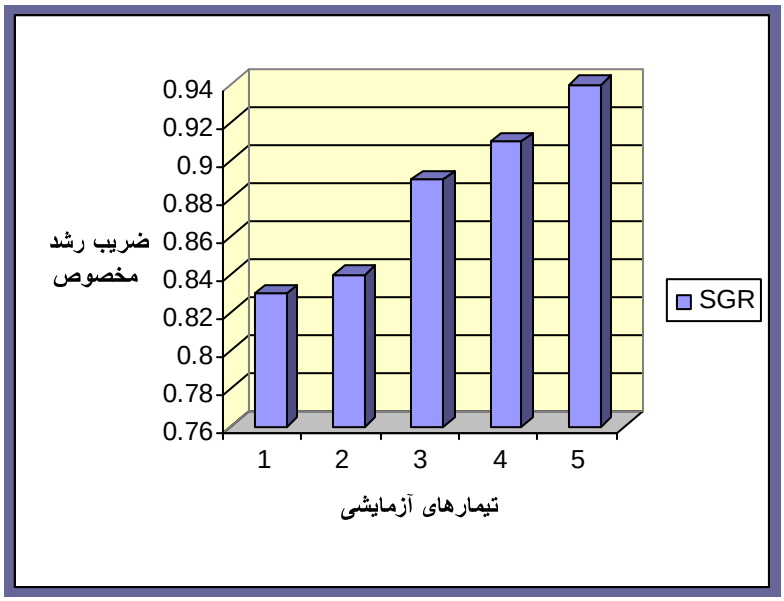
بدین ترتیب که ماهیهای تیمارهای۲ ،۴،۳و۵ نسبت به گروه۱ به ترتیب ۳۸،۱۱،۹و۷۰ گرم اختلاف منفی دارند که این سیر منفی منظم ، احتمالا از تاثیر تدریجی افزایش غلظت سم بر میانگین وزنی ماهی ها حکایت دارد.

آنچه که از روند میانگین وزنی در تیمار های مختلف هویدا است تا ثیر سم در ماهی های تیمار یک (100ppb)

در بیومتری چهارم و پنجم مشابه می باشد. بعبارتی دیگر تاثیر سم در این تیمار ، بعد از گذشت دو ماه از اولین مواجهه عملا منجر به توقف رشد ماهی ها گردیده است.

۲-٤-٤- ضریب رشد مخصوص: (SGR)

چنین بنظر میرسد اختلاف معنی داری بین میزان رشد ویژه در گروههای مختلف در طول دوره حدود ۹۰وزه تغذیه با جیره حاوی سم در وان های مختلف وجود ندارد($(p>0.05)$.



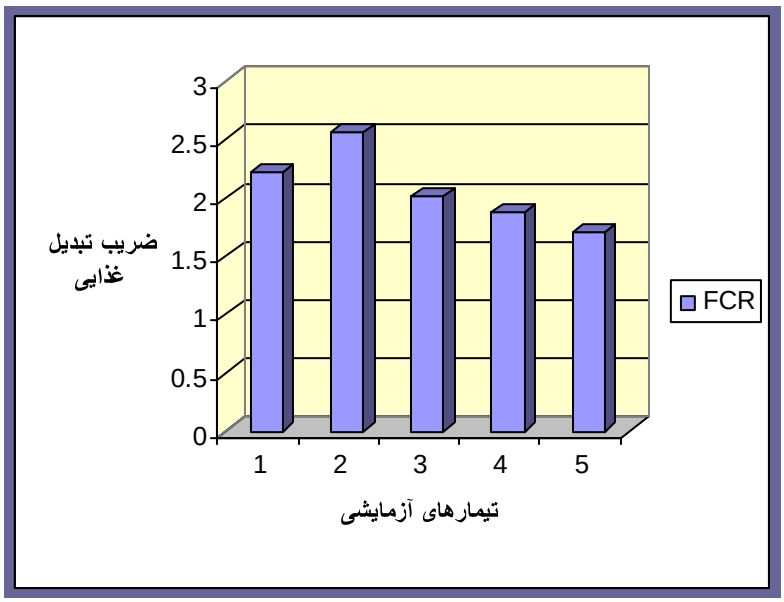
نمودار۳ :مقایسه ضریب رشد مخصوص درفیل ماهی های تغذیه شده با مقادیرمختلف AFB_1 به مدت ۳ ماه در درجه حرارت ۲± ۱۸درجه سانتیگراد

ولی تفاوت عملی بین گروهها و به ترتیب مقادیر سم داده شده کاملا مشهود است که در یک کار پرورشی با مقیاس بزرگ بر روی تولید ماهیان تاثیر خواهد گذاشت.

۳-٤-٤- ضریب تبدیل غذایی

اختلاف معنی داری بین ضریب تبد یل غذائی در گروههای مختلف در طول دوره حدوداً ۹۰ روزه تغذیه با جیره حاوی سم در وان های مختلف وجود دارد ($(p<0.05)$.

با توجه به جدول مقایسه چند وجهی که از نتایج آنالیز واریانس داده های بیومتری روز ۹۰ حاصل شده است، تاثیر مصرف خوراکی AFB_1 بر ضریب تبدیل غذایی معنی دار بوده بطوری که موجب افزایش معنی دار FCR در تیمار دوم در مقایسه با تیمار شاهد گردیده است. در سایر تیمارهانیز ضریب تبدیل غذایی در مقایسه با تیمار شاهد افزایش یافته است ولی تفاوت موجود معنی دار نمی باشد. این اختلاف عملی میتواند در مقیاس های بزرگ پرورشی در میزان تولیدتاثیر گذار باشد.



نمودار٤ : مقایسه ضریب تبدیل غذایی درفیل ماهی های تغذیه شده با مقادیرمختلف AFB_1 به مدت ۳ ماه در درجه حرارت ۲±۱۸ درجه سانتیگراد

در ادامه به نتایج پاره ای از مطالعات مشابه درمورد چگونگی تاثیر مقادیر مختلف AFB_1 بر شاخص های رشد دربرخی از گونه های پرورشی پرداخته شده است :

گزارش Chavez – Sanchez وهمکاران (۱۹۹۴) حاکی از این مطلب است که تغذیه تیلاپیای نیل با مقدار /kg ۱/۸۸ mg AFB_1 در جیره غذایی در طی مدت ۲۵ روز منجر به کاهش رشد ماهیان می گردد و همچنین اظهار می-نماید که میزان /kg ۳۰ mg AFB_1 در جیره برای این گونه کشنده محسوب نمی‌شود.

در تیلاپیای نیل تغذیه شده با /kg ۱۰۰mg AFB_1 در جیره غذایی برای مدت ۸ هفته افزایش مرگ و میر به چشم می‌خورد ولی میزان این مرگ و میر با مرگ و میر مشاهده شده در ماهیانی که با /kg ۱۰ mg AFB_1 در جیره تغذیه شده‌اند تفاوت معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. (Tuan *et al*,. 2002) . این مطالعات همانند مطالعات انجام شده

توسط Chaves – Sanchez در سال ۱۹۹۴ موید این مسئله است که بین میزان مرگ و میر و مقدار آفلاتوکسین B_1 موجود در جیره ارتباط ویژه‌ای وجود ندارد و تا حدی نتایج حاصل در مطالعات اولیه انجام شده در این رابطه را با شک روبرو می‌سازد.

نرخ رشد و ضریب تبدیل غذایی (FCR) در تیلاپیای نیل تغذیه شده با ۲/۵ mg AFB_1 /kgدر جیره به شکل معناداری متأثر می‌شود ولی این شاخص‌ها در مواجه با میزان ۰/۲۵ mg AFB_1 /kgدرجیره تغییر قابل ملاحظه‌ای را نشان نمی‌دهند. (Tuan *et al.*, 2002) .

مشاهدات مذکور با نتایج (Chavez – sanchez *et a.l*, 1994) در مطالعات انجام شده بر روی تیلاپیای نیل مطابقت دارد. در این مطالعات میزان رشد با مقدار ۰/۹۴mg آفلاتوکسین تغییری نمی‌نماید ولی در تغذیه با جیره حاوی ۱/۸۸mg AFB_1/kg و مقادیر بالاتر در جیره کاهش می‌یابد.

محققان فوق اظهار می‌دارند که میزان FCR با مصرف مقدار mg AFB_1 /kg ۳۰ در جیره، در تیلاپیای تحت آزمایش، تغییر معنی‌داری را نشان نمی‌دهد.

تیلاپیای نیل در مقایسه با گربه ماهی روگاهی ، گونه حساس‌تری در بروز تغییرات در شاخص‌های رشد می‌باشد (Tuan *et al.*, 2002).

در گربه ماهی روگاهی تغذیه شده با ۲/۱۵mg AFB_1 /kgدر جیره غذایی به مدت ۱۰ هفته هیچگونه تغییرات معنی‌داری در رشد مشاهده نگردید و در تغذیه با میزان mg AFB_1 /kg ۱۰ در جیره فقط در ۲۴ درصد از ماهیان تحت آزمایش کاهش رشد مشاهده شد(Jantrarotai & Lovell ,1990) .

بر طبق یافته‌های Tuan و همکاران در سال ۲۰۰۲ شدت ضایعات ایجاد شده در تیلاپیای نیل از طریق مصرف خوراکی AFB_1 در طی مدت ۸ هفته، با افزایش غلظت آفلاتوکسین خورده شده، افزایش نشان می‌دهد. در ماهی تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۲/۲۵ میلی‌گرم AFB_1 به ازای هر کیلوگرم، تغییراتی در نرخ رشد دیده نمی‌شود، در حالیکه وجود میزان ۱۰ میلی‌گرم آفلاتوکسین به ازای هر کیلوگرم ، منجر به ایجاد ضایعات شده و در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم آفلاتوکسینB_1، نکروز حاد کبد و ۶۰ درصد مرگ و میر حادث می‌شود(Tuan *et al.*, 2002) .

بررسی‌های انجام شده توسط Gallagher and Eaton (1995) موید این مطلب است که چرخه متابولیسم AFB_1 در کبد گربه ماهی در غلظت‌های پایین (۱۶μm) که شباهت زیادی به محدوده‌های طبیعی آلودگی‌های محیطی با

آفلاتوکسین دارد، عملاً منجر به تشکیل AFBO با منشاء میکروزمی نمی گردد. متقابلاً ، مقادیر کم AFBO همانند AFM_1 فقط در شرایط تجربی مصرف مقادیر بالا و اشباع AFB_1 (۱۲۸μm) تولید می‌گردد. لذا در شرایط محیطی طبیعی بواسطه عدم وجود CYP به شکل اشباع، عملاً احتمال تولید AFBO وجود نخواهد داشت.

بعلاوه، تولید متابولیت‌های هیدروکسیله شده AFB_1 از جمله AFQ یا AFP_1 در هیچیک از غلظت‌های پایین یا بالا گزارش نشده است . همچنین فعالیت آنزیم‌های احیا کننده AFB_1 بالا می‌باشد که این موضوع به احیای سریع AFB_1 به AFL_1 منجر می‌گردد. در واقع محققین نشان داده‌اند که تولید AFL در گربه ماهی حداقل ۴۰ برابر بیشتر از قزل‌آلا می‌باشد. در گربه ماهی روگاهی به مانند اغلب آبزیان (به جز در ماهی کفشک انگلیسی English Sole و ماهی فلاندر) ، چرخه سم‌زدایی از طریق GST تا کنون گزارش نگردیده است.

در یک جمع بندی می‌توان گفت که اگرچه اکسیداسیون میکروزمی AFB_1 در گربه ماهی ضعیف بوده و این ترکیب سریعاً به AFL تبدیل می‌شود ولی در طی این تبدیل زمینه حذف سریع AFB_1 آزاد فراهم گردیده و مقاومت گربه ماهی به مسمومیت و سرطان‌های کبدی را توجیه می‌نماید. برخلاف گربه‌ماهی، در قزل‌آلای رنگین‌کمان فعالیت بالای اپوکسیداسیون AFB_1 به AFBO صورت می گیرد که این متابولیت یک ترکیب شدت سرطان‌زا در این گونه محسوب می‌گردد.

همانگونه که مشاهده می شود عوامل متعددی ازجمله:میزان حساسیت گونه ای ،مقدار سم،مدت زمان مواجه باسم،روند متابولیسم سم درگونه های مختلف،سن وحتی شرایط مختلف پرورش و میتوانند درچگونگی تاثیر گذاری سم برروی ابزی تحت مطالعه موثر باشند.این گوناگونی به همراه خلاء اطلاعاتی موجودعملا عاملی در راستای ایجاد اشکال جهت مقایسه نتایج بدست امده در مورد گونه های مختلف است.بدیهی است انجام مطالعات تکمیلی ودستیابی به اطلاعات بیشتر، زمینه ساز بحث های شفاف تر دراین زمینه خواهد بود.

۵-٤- میزان زنده مانی(Survival rate)

میزان زنده مانی ماهیان در تمامی تیمارهای ازمایشی صد درصد بود و هیچگونه تلفاتی مشاهده نگردید.باتوجه به میزان وقوع وشدت جراحات پوستی ، تغییرات پاتولوزیک مشاهده شده وروند پیشرفت انها درتیمارهای

مختلف ودر طول ازمایش وهمچنین کاهش رشد وافزایش ضریب تبدیل غذایی بخصوص درتیمارهای ppb ۷۵و۱۰۰ درنوبت سوم نمونه برداری موضوع عدم وجودتلفات ازاهمیت خاصی برخوردارمی گردد.

طبعا وجود وروند بروز ضایعات وتغییرات مشاهده شده درتیمارهای ازمایشی ومقایسه نتایج بدست امده با تیمارهای شاهد بیانگرتاثیر پذیری تیمارها از مقادیر مختلف سم درجیره های ازمایشی است. درچنین شرایطی عدم وجود تلفات موضوعی است که تحقیقات بیشتری را طلب می نماید. شواهدی از جمله قدمت وتاریخچه زندگی ماهیان خاویاری ، طول عمر انان ، مقاومت انان نسبت به بیماریهای عفونی و...بیانگر سیستم ایمنی قدرتمندومقاومت بالای این ماهیان است. انجام تحقیقات درموضوعاتی از قبیل تاثیر مقادیر مختلف AFB_1 برسیستم ایمنی ، بررسی روند وچرخه متابولیسم AFB_1 ، بررسی میزان قابلیت اتصال AFB_1 به DNA ومسمومیت های ژنتیکی ناشی ازان، بررسی میزان سرطان زایی وتومورزایی و...از جمله اقداماتی است که می تواند درروشن تر نمودن چگونگی تاثیر AFB_1 درفیل ماهی موثر باشد.

٦-٤- باقیمانده های بافتی AFB_1 درعضلات فیل ماهی

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). فشارهای اقتصادی منجر به ایجاد استانداردهای مجزا برای مصرف آفلاتوکسین‌ها درانسان و حیوانات پرورشی گردیده است. میزان مجاز

آفلاتوکسین موجود در مواد خوراکی، مصارف انسانی باتوجه به کشورهای مختلف درمحدوده۳۰ ـ ۴ ppb تعیین گردیده است (Henry. *et al*,. 1999; FDA. 1995).

در مقابل میزان مجاز آلودگی با آفلاتوکسین در غلات مصرفی جهت تغذیه حیوانات پرورشی در ایالات متحده آمریکا،۳۰۰ppb تعیین گردیده است (FDA,1994).

مقدار یاد شده نه تنها از بروز مسمومیت حاد با آفلاتوکسین‌ها جلوگیری می‌نماید بلکه به اندازه کافی کم می-باشد که در تجارت اغلب غلات تولید شده مشکلی ایجاد ننماید. در ارتباط با تغذیه حیوانات موضوع مخاطرات سرطان‌زایی آفلاتوکسین، به جز در مورد گونه‌های بسیارحساس، در تعیین حد مجاز آن، مدنظر قرارنمی‌گیرد. متعاقباً تحقیقات دامپزشکی آلودگی با مقادیر بالاتر توکسین را برای دوره‌های کوتاه مدت تغذیه مورد آزمایش قرار داد. نتایج این تحقیقات اطلاعاتی را درموردمیزان مسمومیت ناشی از مصرف آفلاتوکسین در محدوده ۵۰۰ppb ـ ۱۰۰ ارائه می‌نماید و به عنوان موثق‌ترین اطلاعات اختصاصی درمورد جوامع انسانی کشورهای درحال توسعه که فاقد سیستم‌های کنترل آفلاتوکسین در مواد غذایی می‌باشند، قابل استناد است. تفاوت‌های بین گونه-های مختلف حیوانات مزرعه‌ای در واکنش نسبت به مسمومیت با آفلاتوکسین می‌تواند به عنوان معیاری در راستای تحقیق و ترویج یافته‌های مذکور برای انسان مدنظر قرار گیرد (Rodgers *et al*,.2002) .

مطالعات اپیدمیولوژیکی، کلینیکی و تجربی بیانگر این مسئله است که مواجه شدن با دُزهای بالای آفلاتوکسین (>۶۰۰۰mg) می‌تواند منجر به ایجاد مسمومیت حاد منجر به مرگ شود، در حالیکه مواجه شدن طولانی مدت با دزهای کم سرطان‌زااست .(Groopman *et al*., 1988) .

بروز آفلاتوکسیکوزیس در انسان در بسیاری از کشورها از جمله : هند، چین، تایلند و چندین کشور آفریقایی گزارش گردیده است. درآفریقا و آسیا، شرایط آب و هوایی مناسبی برای بروز آلودگی با آفلاتوکسین وجود داشته و لذا امکان ابتلای انسان‌ها به این مسمومیت بالا است. مطالعات انجام شده توسط Wild و Groopman (۲۰۰۱ ـ ۱۹۹۴) درچین و آفریقای غربی بیانگر مخاطره آمیز بودن شرایط ابتلا در مناطق مذکوراست (Aspen Cancer Conference 2001).

شرایط حاکم بر دوران‌های جنینی و کودکی ازجمله شرایط تغذیه‌ای مادران باردار و جنین به شکل قابل ملاحظه‌ای برای رشد و مخاطرات ناشی از مسمومیت حائز اهمیت هستند. (Ananths Bommakanti & Farid Waliar, 2008).

آفلاتوکسین درانسان به عنوان عامل زمینه‌ساز سرطان‌های کبدی شناخته شده است و کارگران حمل کننده غلات آلوده با خطر ایجاد سرطان ریه نیز مواجه می‌باشند(Kelly *et al.*, 1997) . مخاطرات ایجاد سرطان بواسطه مواجه شدن با آفلاتوکسین‌ها به خوبی مطالعه شده است . این مطالعات بر مبنای مدت زمان و میزان باقیماندگی بافتی آفلاتوکسین‌ها صورت پذیرفته است(Gorelick *et al.*, 1993) .

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).

جهت ارزیابی تأثیر آفلاتوکسین‌ها درانسان باید ملاحظاتی مدنظر قرار گیرد . اول اینکه تمامی آفلاتوکسین‌ها از نظر بیولوژیکی دارای تأثیرات یکسانی نمی‌باشند و مقادیرمتفاوتی از آفلاتوکسین‌های خورده شده، در بدن سم-زدایی می‌شوند و دیگراینکه سیستم‌های مختلف بیولوژیکی تأثیرپذیری متفاوتی نسبت به مسمومیت با آفلاتوکسین به تناسب متابولیت‌های ایجاد شده در چرخه‌های مختلف متابولیکی از خود نشان می‌دهند. این درحالی است که رابطه بین DNA های تحت تأثیر قرار گرفته و سرطان‌زایی کاملاً شناخته شده است و می‌تواند به عنوان یک شاخص جهت تعیین غلظت آفلاتوکسین‌ها در مواد غذایی جوامع انسانی در معرض خطر، مدنظر قرار داشته باشد (Henry *et al* ,.1999).

تأثیر متابولیت‌های ناشی از سایر چرخه‌های متابولیکی درانسان به خوبی مورد مطالعه قرار نگرفته است. AFM_1 یکی از محصولات ناشی از سم‌زدایی در بدن می‌باشد که سریعاً دفع می‌گردد ولی می‌تواند به عنوان یک عامل مؤثر در سیستم ایمنی و تغذیه‌ای کودکان مطرح باشد (Mocchegiani *et al.*, 2001). حساسیت نسبت به مسمومیت با آفلاتوکسین در اغلب گونه‌های جانوری عمدتاً تحت تأثیر عواملی از جمله سیستم‌های سم‌زدایی در کبد، ساختارژنتیکی، سن و عوامل تغذیه‌ای قرار دارد(Howard *et al.*,1990) .

هیچیک از گونه‌های جانوری در مقابل مسمومیت‌های حاد ناشی از آفلاتوکسین‌ها مصون نیستند. محدوده وسیعی از شاخص دُز کشنده (LD_{50}) در بین گونه‌های مختلف به چشم می‌خورد. دراغلب گونه‌ها محدوده LD_{50} فی ما بین ۱۰ mg/kg ـ ۰/۵ از وزن بدن می‌باشد. ، تفاوت‌هایی در این چرخه متابولیکی فی مابین قزل‌آلای رنگین‌کمان با سایر آبزیان از جمله گربه ماهی روگاهی و ماهی گورخری مشاهده می‌گردد. یک بررسی گسترده توسط Gallagher و

Eaton در سال ۱۹۹۵ جهت ارزیابی تفاوت‌ها در متابولیسم کبدی و متابولیسم سیتوزولی AFB_1 در قزل‌آلای رنگین کمان و گربه‌ماهی روگاهی به عمل آمد.این مطالعات نشان داد که وجه مشخصه چرخه متابولیسم AFB_1 در قزل‌آلای رنگین‌کمان راندمان بالای فعالیت اپوکسیداسیون میکروزومی با واسطه CYP می‌باشد که منجر به تولید متابولیت‌های ناشی از هیدروکسیلاسیون از جمله : AFQ_1 یا AFP_1 نگردیده و فقط AFM_1 را تولید می‌کند (Yang *et al.*, 2000).

.- نتایج بدست امده ازتحقیق حاضرذیلا تحلیل وبررسی گردیده است:

اگرفرضیه (برابری باقیماندگی بافتی در گروهها پس از یک دوره غذا دهی حاوی سم و در طی چهار بار نمونه برداری) صحیح باشد این انتظار میرود تا نسبت میانگین بین گروهی به میانگین درون گروهی (در هر بار نمونه برداری) نزدیک به عدد یک باشد که این نسبت در تیمارهای مختلف در نمونه برداری اول تا چهارم به ترتیب ۵۶۷/۴۲ ، ۷۴۰/۳۱، ۱۹۰/۹و ۶۱۱/۷ برآورد گردیده است. بدیهی است این امر نشاندهنده آنست که با احتمال بسیار کم ،(نزدیک به صفر ٪)انتظار داریم نسبتی برابر با مقدار مشاهده شده یا بزرگتر بدست آوریم. چون آزمون از حد معنی داری پائینی (۰,۰۰۱)برخوردار است لذا فرض صفر دال بر برابری باقیماندگی بافتی در گروهها پس از یک دوره غذا دهی حاوی سم و در طی چهار بار نمونه برداری با احتمال بسیار قوی مردود است ($p<0.005$). لذا چنین بنظر میرسد 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 (($p<0.005$) و حداقل مقدار یک گروه با بقیه گروهها (در هر چهار بار نمونه برداری) در این امر متفاوت است.

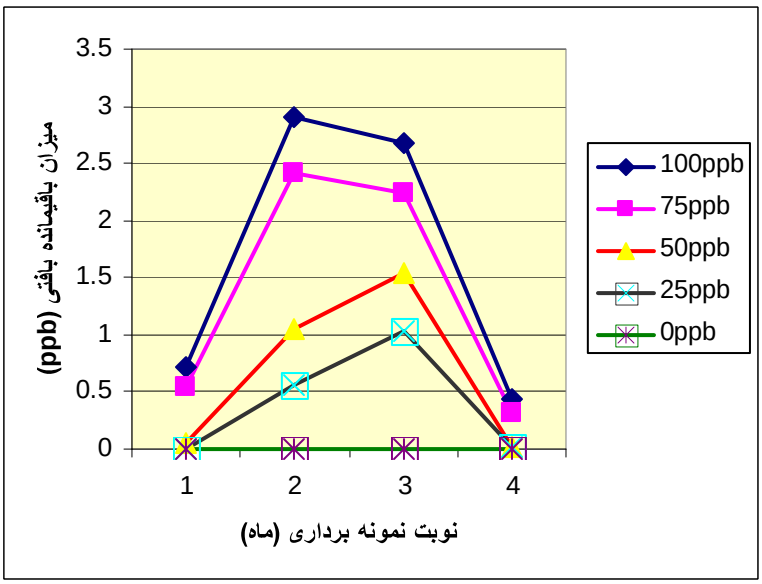
با توجه به جدول مقایسه چند وجهی که از نتایج آنالیز واریانس داده های بیومتری در طی نمونه برداری های اول تا چهارم حاصل شده است، چنین بنظر می رسد که در نمونه برداری اول:اختلاف معنی داری از جهت باقیماندگی بافتی در بین گروهها وجود دارد بطوریکه اختلاف گروه ۱ نسبت به گروههای دیگر (از ۲ تا ۵) به ترتیب افزایش 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.شایان ذکر است این میزان در نمونه برداری اول در گروه ۴ مقدار تقریبا صفر را نشان می دهد که موید آنست که در دز $_{ppb}$ ۲۵ سم امکان متابولیزه شدن سم توسط کبد فراهم بوده است.این آزمون نشان می دهد علیرغم اختلاف عملی بین گروههای

۳،۴و ۵ از نظر آماری اختلاف معنی داری بین این گروهها وجود ندارد ($p>0.05$). در نمونه برداری دوم اختلاف معنی داری از جهت باقیماندگی بافتی در بین تمام گروهها وجود دارد ($p<0.005$) بطوریکه این اختلاف از گروه ۱ تا گروه ۵(شاهد) به تدریج افزایش یافته است. مقایسه نمونه برداری اول و دوم نشان از حضورppb۵۶/. مقدار سم در گروه چهارم است.

در نمونه برداری سوم نیز همانند نمونه برداری دوم اختلاف معنی داری از جهت باقیماندگی بافتی در بین تمام گروهها وجود دارد (($p<0.005$) بطوریکه این اختلاف از گروه ۱ تا گروه ۵(شاهد) به تدریج افزایش یافته است درتیمارهای ppb ۷۵و۱۰۰علی رغم تداوم تغذیه با جیره های حاوی توکسین ،شاهد کاهش میزان ذخایر بافتی ان هستیم .همزمانی این مشاهدات با کاهش میانگین وزنی ، افزایش ضریب تبدیل غذایی و تغییرات وسیع وپیشرفته پاتولوژیک تا حد نکروز درکبد تیمارهای مذکور می تواند تا حدی بیانگرکاهش توانایی دستگاه گوارش در هضم وجذب جیره غذایی حاوی توکسین ودفع ان از طریق مدفوع باشد. طبعا انجام مطالعات بیشتر در جهت اندازه گیری وتعیین میزان توکسین دفع شده از طریق مدفوع میتواند درتبیین این نظریه موثر باشد.

در نمونه برداری چهارم که پس از یک دوره تغذیه بدون سم انجام شده فقدان اختلاف معنی دار بین گروههای ۳،۴ و ۵ مشاهده گردی($p>0.05$). این امر می تواند گواه بر این باشد که کبد می تواند در صورت عدم مواجه شدن با سم افلاتوکسین مجددا تا حدی خود را احیا نموده ودر متابولیسم وسم زدایی باقیمانده های بافتی مشارکت نماید.

مقادیر بافتی سم که در نمونه برداری سوم به اوج خود رسیده بودند بر خلاف روند طی شده طی سه نمونه برداری ،به مقدار قابل توجهی از آنها کاسته شد.این موضوع در نمودار شماره ۴ نشان داده شده است.



نمودار ۳ : میزان باقیماندگی AFB_1 در بافت عضلانی فیل ماهی پرورشی تغذیه شده با مقادیرمختلف توکسین بمدت ۳ ماه دردرجه حرارت۲±۱۸ درجه سانتیگراد

دریک تحلیل کلی از نتایج بدست امده می توان اینگونه اظهار نمود که در طی متابولیسمAFB_1 که از طریق خوراکی دراختیار فیل ماهی پرورشی قرارمی گیرد ،امکان ذخیره ان به شکل باقیمانده بافتی درعضلات وجود دارد.میزان ذخیره بافتی باتوجه به مقدار سم مصرفی ومدت زمان مصرف ان درتیمارهای مختلف ازمایشی متفاوت بوده وبعضا با توجه به توضیحات فوق الذکر این تفاوت معنی دار است.کاهش روند ذخیره سازی علیرغم تداوم تغذیه باجیره های غذایی حاوی مقادیر بالاتر توکسین (تیمارهای حاوی ppb ۷۵و۱۰۰)مطلبی جالب توجه است.بنظرمیرسدتغییرات پاتولوژیک ایجاد شده در کبد درتیمارهای مذکورمی تواند تاحد زیادی در روند متابولیسم وطبعاتداوم ذخیره سازی سم درعضلات موثر باشد.مشاهدات ونتایج حاصله درماه چهارم(تغذیه تیمارهای ازمایشی با جیره های غذایی فاقدتوکسین)میتواند موید این مطلب باشد که کبد بواسطه عدم مواجه باتوکسین فرصت ترمیم پیدا کرده ودر پروسه متابولیسم باقیمانده های بافتی سم و سم زدایی مشارکت نموده است.

در مطالعات فارماکوکینتیک انجام شده در مورد تجمع بافتی آفلاتوکسین B_1 در گربه ماهی مشاهده گردید که در تجویز خوراکی AFB_1 نشاندار شده با C^{14} در اولین نمونه‌برداری (پس از ۲ الی ۴ ساعت) بیشترین غلظت آفلاتوکسین در پلاسما دیده می‌شود که ۹۵ درصد آن با پروتئین‌های پلاسما باند شده است. دومین محل ترجیحی تجمع سم، سیستم کبدی ـ صفراوی است .

در این محل حضور متابولیت‌های AFB_1 موید غیر قابل برگشت بودن ترکیبات بافتی مذکور می‌باشد (پس از ۲۴ ـ ۹۶ ساعت). بعد از ۹۶ ساعت باقیمانده‌های بافتی AFB_1 در صفرا بیشترین مقدار را نشان می‌دهد (۱/۴۴۵ppb). این بقایا در کبد (۴۴ ppb)، در پلاسما (۶ ppb) و در بدنه کلیه (۱۵ppb) گزارش شده است.

این نتایج موید این مطلب است که AFB_1 و متابولیت‌های آن در گربه ماهی دارای توزیع سریعی بوده ولی جذب آنها کامل نیست، بطوریکه پس از ۴۸ ساعت حدود ۸۵ درصد از AFB_1 به شکل جذب نشده از طریق مدفوع، دفع می‌گردد.

حدود ۲۴ ساعت پس از تجویز خوراکی شاهد حذف نسبتاً سریع متابولیت‌ها از بافتها هستیم و باقیمانده‌ها را می‌توان در مبادی دفعی، بخصوص در سیستم صفراوی مشاهده نمود (٪ ۱/۷>) .(Plakas *et al.*, 1991)

جهت ارزیابی تأثیر آفلاتوکسین‌ها درانسان بایستی ملاحظاتی مدنظر قرار گیرد اول اینکه تمامی آفلاتوکسین‌ها از نظر بیولوژیکی دارای تأثیرات یکسانی نمی‌باشندو مقادیرمتفاوتی از آفلاتوکسین‌های خورده شده در بدن سم‌زدایی می‌شوند و دیگراینکه سیستم‌های مختلف بیولوژیکی تأثیرپذیری متفاوتی نسبت به مسمومیت با آفلاتوکسین به تناسب متابولیت‌های ایجاد شده در چرخه‌های مختلف متابولیک از خود نشان می‌دهند.

بطور کلی حداکثر میزان باقیماندگی افلاتوکسین دربافت عضلانی درتحقیق حاضر۳۶/. ppb± ۲/۹ است که مقدارنگران کننده ای باتوجه به استانداردهای جهانی نمی باشد.

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

۵- نتیجه گیری

AFB_1 مهمترین توکسین فعال شناخته شده است که قادر به ایجاد مسمومیت‌های کبدی ، سرطان‌زایی، ایجاد جهش تومورزایی و تضعیف سیستم ایمنی در آبزیان و حیوانات خاکزی می‌باشد. گونه‌های مختلف آبزیان حساسیت‌های متفاوتی را نسبت به ضایعات هپاتوتوکسیک و کارسینوژنیک آفلاتوکسین B_1 از خود نشان می-دهند. به نظر می‌رسد که این تفاوت‌ها ناشی از تفاوتهای بین گونه‌ای از نظر راندمان انتقال بیولوژیکی AFB_1 در آنان باشد.

اگرچه شکل مسمومیت با آفلاتوکسین‌ها قدمتی ۴۰ ساله دارد ولی تداوم گزارش‌های وقوع مرگ و میرهای ناگهانی ماهیان در این رابطه، بیانگر این مطلب است که این مسئله هنوز به اندازه کافی مطالعه نگردیده ونیازمند تحقیقات بیشتر می‌باشد. در حال حاضر وجود خلاء اطلاعاتی در ارتباط با اختلاف در میزان حساسیت گونه‌های مختلف آبزیان پرورشی به AFB_1 در کنار تأثیرات AFB_1 بر سلامت حیوانات، سلامت و کیفیت لاشه در از دیدگاه تجاری ،مطالعات بیشتری را طلب می‌نماید. برای مثال ، با کمبود منابع اطلاعاتی در مورد ماهی سیم ، ماهی باس دریایی وماهیان خاویاری در ارتباط با مسمومیت‌های ناشی از آفلاتوکسین B_1 در می‌یابیم که مطالعات و تحقیقات بیشتری بایستی در دستور کار قرار گیرد.

همچنین دستیابی به اطلاعات تخصصی در مورد تجمع زیستی آفلاتوکسین‌ها و متابولیت‌های آنان در آبزیان خوراکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بواسطه ایجاد زمینه‌های قوی پیشگیری از جنبه بهداشت عمومی انجام اقداماتی به شرح ذیل توصیه می گردد:

الف) شناسایی مواد اولیه غذایی که قادر هستند به عنوان منابع اصلی ایجاد آلودگی با توکسین در آبزیان مطرح باشند و ارزیابی سطوح آلودگی در آنان

ب) مطالعه رابطه همبستگی بین مقادیر مختلف آفلاتوکسین B_1 در غذاهای مصرفی و متابولیت‌های ناشی از آنان در آبزیان مورد استفاده در تغذیه انسان.

ج) تعیین میزان مسمومیت‌زایی آفلاتوکسین B_1 برای گونه‌های مختلف آبزیان پرورشی دریایی و آب شیرین با تأکید بر گونه‌های تجاری. بررسی اثرات اقتصادی و سلامتی ناشی از مسمومیت‌های مزمن با آفلاتوکسینها موضوع دیگری است که نیازمند تحقیقات ویژه‌ای است.

در حال حاضر خطر فزاینده جهش‌های ژنتیکی در گونه‌های حساس ماهیان از جمله قزل‌آلای رنگین‌کمان بواسطه مسمومیت با AFB_1، توجه بیشتری را طلب می‌نماید. بعلاوه این موضوع بایستی مورد توجه قرار گیرد که هدف اصلی آبزی پروری انتخاب مولدین اصلاح شده است که بتوانند باعث بهبود کیفیت ماهیان پرورشی گردیده و به عنوان ذخایر ژنتیکی ماهیان اصلاح شده مورد بهره‌برداری قرار گیرند. لذا انجام مطالعات در راستای دستیابی به گونه‌های مقاوم به مسمومیت با AFB_1 می‌تواند از جایگاه مطالعاتی ویژه‌ای برخوردار باشد.

شرایط مناسب پرورشی در مزرعه، زمینه‌ساز افزایش درصد بقا بوده و درکنار اقدامات اصلاح نژادی می‌تواند منجر به بهبود کمیت و کیفیت تولیدات گردد.

بدیهی است با وجود وقوع آلودگی‌های قابل توجه در خوراک‌های مصرفی آبزیان امکان بهره‌وری مناسب از آبزی‌پروری دور از انتظار خواهد بود.

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 و طعم نامطبوع و کاهش بازار پسندی ماهی می‌گردد.

بطور خلاصه یافته‌های علمی مذکور دریچه‌های جدیدی از مشکل مسمومیت با آفلاتوکسین در آبزیان و سلامت انسان را به روی ما باز می‌کند.

بررسی مجموع مطالعات انجام شده بیانگر این مطلب است که هنوز نقاط کور بسیاری در رابطه با مسمومیت با آفلاتوکسین‌ها در آبزی پروری وجوددارد. همچنین شباهت‌های موجود در واکنش‌های سرطان‌زایی بین قزل‌آلای رنگین کمان و انسان این موضوع را از دیدگاه بهداشت عمومی از ویژگی خاصی برخوردار می‌نماید.

منابع

۱. پورعلی.ح.ر.،محسنی م و،علیزاده م.۱۳۸۵.مطالعه مقایسه رشد فیل ماهی(Huso huso) در دومحیط پرورشی اب لب شور واب شیرین. مجله علمی شیلات ایران،سال پانزدهم ، شماره ۱ ، ص.۴۳-۴۹.

۲. پورکاظمی م . برنامه راهبردی ماهیان خاویاری،۱۳۸۶. موسسه تحقیقات شیلات ایران،ص.۲.-۱۴.

۳. کاکوزا الف.، ۱۳۸۰. روش های نوین تکثیروپرورش ماهیان خاویاری.دوره اموزشی کوتاه مدت ،انستیتو بین المللی ماهیان ماهیان خاویاری.ص.۲۶-۳۰.

۴. محسنی م ، پورعلی.ح.ر. ، اق تومان وتوکلی م. ۱۳۸۲. پرورش بچه فیل ماهیان بادرصدهای مختلف غذای کنسانتره فرموله شده . مجله علمی شیلات ایران ، ویژه نامه اولین سمپوزیوم ملی ماهیان خاویاری، ص .۳۷-۴۸.

۵. یوسف پور ح.،۱۳۷۳. پرورش بچه ماهیان خاویاری در اب شیرین . شرکت سهامی شیلات ایران . ص .۶۸- ۸۴.

6. Abd-Allah GA, El-Fayoumi RI, Smith MJ, Heckmann RA O'Neill KL (1999) A comparative evaluation of aflatoxin B1 genotoxicity in fish models using the Comet assay Mutat Res 446:181–188
7. Ananths. Bommakanti , and Farid Waliyar (2008).Importance of aflatoxins in human and livestock health
8. Aboobaker VS, Sarma N, Goswami UC, Bhattacharya RK. Inhibition of microsomal activation of aflatoxin B1 by 3-dehydroretinol and 3-dehydroretinyl palmitate. Indian J Exp Biol 1997; 35 :1125-7.
9. -Agag BI (2004) Mycotoxins in foods and feeds Ass. Univ Bull Environ Res 7:173–206,
10. -Asao T, Bushi G, Abdul Kader MM, Chang GB, Wich EL ,3-Asao T, Bushi G, Abdul Wogon GN (1963) The structure of aflatoxins B1 and G1.J Am Soc 882–886.
11. -Ashley LM, Halver JE (1963) Multiple metastasis of rainbow trout hepatoma. Trans Am Fish Soc 92:365–371
12. -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, pp 137–14
13. -Bailey GS, Dashwood R, Loveland PM, Pereira C, Hendricks JD (1998) Molecular dosimetry in fish: quantitative targetorgan DNA adduction and hepatocarcinogenicity for four aflatoxins by two exposure routes in rainbow trout. Mutat Res 20:233–244
14. -Bailey GS, Loveland PM, Pereira C, Pierce D, Hendricks JD ,Groopman JD (1994) Quantitative carcinogenesis and dosimetry in rainbow trout for aflatoxin B1 and aflatoxicol, two aflatoxins that form the same adduct. Mutat Res 38:313-325
15. -Bailey GS, Selivonchick D, Hendricks J (1987) Initiation ,promotion, and inhibition of carcinogenesis in rainbow trout. Environ Health Persp 71:147–153
16. -Bailey GS, Williams DE, Hendricks JD (1996) Fish models for environmental carcinogenesis: the rainbow trout. Environ Health Perspect 104:5–21 Review
17. -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
18. -Balasubramanian T (1985) Incidence of Aflatoxin B1 in animal feeds . Ind Vet J 62:982–988
19. -Bankole SA, Adebanjo A (2003) Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it .Afr J Biotech 2:254–263

20. -Bautista MN, Pitogo L, Subosa CR, Begino ET (1994) Aflatoxin B1 ontamination of shrimp feeds and its effect ongrowth and hepatopancreas and preadult Penaeus monodon. J Sci Food Agric 65:5–11
21. -Bennett JW, Klich M (2003) Mycotoxins. Clin Microbiol Rev16:497- 516
22. -Bhat RV, Vasanthi S, Rao BS, Rao RN, Rao VS, Nagaraja KV ,Bai RG, Prasad C, Vanchinathan S, Ray R, Saha S ,Mukherjee A, Hosh PK, Toteja GS, Saxena BW, Rao R ,Saha S (1997) Aflatoxin B1 contamination in maize samples collected from different geographical regions of India—a multi-centre study. Food Addit Contamin 14 : 497 – 516
23. -Blout WP (1961) Turkey ‘‘X’’ disease. Turkeys 52:55 – 58, 61 ─77
24. -Boonyaratpalin M , Supamattaya K, Verakunpiriya V, Suprasert D (2001). Effects of aflatoxin B1—on growth performance, blood components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimp (Penaeus monodon Fabricius). Aquacult Res 32:388–398
25. - Busby WF, Wogan GN (1985) Aflatoxins. In: Searle CE (ed) Chemical carcinogens, 2nd edn., American Chemical Society, Washington, DC, pp 945–1136
26. -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
27. -Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP (2002) Relationship between secondary metabolism and fungal development. Microbiol Molecul Biol Rev 66:447–459
28. -CAST. 1989. Mycotoxins: Economic and Health Risks.Council for Agriculture Science and Technology TaskForce Report 116. Ames, IA.
29. -CAST (1989) Mycotoxins: economic and health risks. CAST .Task force report No. 116, Ames, IA, 91
30. -CGIAR—Priorities and Strategies for Resource Allocation During 1998–2000; Annex III—Overview of Production Sectors and Commodities. FAO, April 1997
31. -Champ BR, Highley E, Hocking AD, Pitt J (eds) (1991) Fungi and mycotoxins in stored products: proceedings of an international conference, Bangkok, Thailand, 23–26 April 1991. ACIAR Proceedings No. 36, ACIAR, Canberra
32. -Cha`vez-Sa`nchez MC, Martinez Palacios CA, Osorio Moreno I(1994)Pathological effects of feeding young Oreochromis niloticus diets supplemented with different levels of aflatoxin B1. Aquaculture 127:49–60
33. -Cotty PJ, Bayman P, Egel DS, Elias KS (1994) Agriculture ,aflatoxins and Aspergillus. In: Powell KA, Renwick A ,Peberdy JF (eds) The genus Aspergillus. Plenum PressNew York, pp 1–27
34. 29 -Coulombe RA Jr, Bailey GS, Nixon JE (1984) Comparative activation of aflatoxin B1 to mutagens by isolated hepatocytes from rainbow trout (Salmo gairdneri) and coho salmon (Oncorhynchus kisutch). Carcinogenesis 5:29–33
35. -Coulombe RA Jr (1993) Symposium: biological action of mycotoxins. J Dairy Sci 76:880–891
36. -Coulombe RA Jr (1994) Nonhepatic disposition and effects of aflatoxin B_1. In: Eaton DL, Groopman JD (eds), The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance. Academic Press, San Diego, pp. 89 - 110
37. -Coulombe RA, Shelton DW, Sinnhuber R0., Nixon JE (1982) Comparative mutagenicity of aflatoxins using a Sulmnellaltrout hepatic enzyme activation system. Carcinogenesis 3:1261
38. -Cullen JM, Newberne PM(1993). Acute hepatotoxicity of aflatoxins. In: Eaton DL, Groopman JD, eds. The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance. London: Academic Press, pp:1-26.
39. -D’Mello JPF, MacDonald AMC (1997) Mycotoxins. Anim Feed Sci Technol 69:155–166
40. -De Vries JW, Trucksess MW, Jackson LS (2002) Mycotoxins and food safety. Kluwer Academic/Plenum Publications ,New York, NY
41. -Dhavan AS, Chaudary MR (1995) Incidence of aflatoxin in animal feed stuffs: a decades scenario in India. J Assoc Off Anal Chem 78:693–698
42. -Dragan YP, Pitot HC (1993) Aflatoxin carcinogenesis in the context of the multistage nature of cancer. In: Eaton DL ,Groopman JD (eds) The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance. Academic Press, London, pp 179–206
43. -Dragoni I, Cantoni C, Papa A, Vallone L (2000) Muffe ,alimenti e micotossicosi. Citta`StudiEdizioni. UTET Libreria srl, Milano, Italia. ISBN 88-251-7187-0

44. -Dutta TK, Das P (2000) Isolation of aflatoxigenic strains of Aspergillus and detection of aflatoxins B1 from feeds in India. Mycopathologia 151:29–33
45. -Eaton DL, Gallagher EP (1994) Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. Annu Rev Pharmacol Toxicol 34:135–172
46. -Eaton DL Groopman JD (1994) The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance. Academic Press, San Diego, pp 6–8
47. -Eaton DL, Gallagher EP, Bammler TK, Kunze KL (1995) Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis :implications for human variability in expression and enzyme activity. Pharmacogenetics 5:259–274
48. -Eaton DL, Ramsdell HR, Monroe DH (1990) Biotransformation as a determinant of species susceptibility to aflatoxin B1: in vitro studies in rat, mouse, monkey and human liver. In: Cellular and molecular mode of action of selected microbial toxins in foods and feeds (eds) Pergamon Press, New York, pp 275–288
49. -Eaton DL, Groopman JD, eds. The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance. London: Academic Press, 1993.
50. -Eaton DL, Ramsdell HS, Neal GE (1994) Biotransformation of aflatoxins. In: Eaton DL, Groopman JD (eds) The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance. Academic Press, San Diego, pp 45 –-47
51. -EC (2001) EU, Commission of the European Communities ,Facts and figures on the CFP (Common Fisheries Policy (
52. -EC (2003) European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General. The use of fish by-products in aquaculture Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare Adopted 26th February 2003
53. -EFSA (2004) Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed (Request No EFSA-Q-2003-035) EFSA J 39:1–27(adopted on 3 February 2004)
54. -EI-Banna, M.Teleb,M.M.Hadi and F.M, Fakhrt(1992).Performance and tissue residue of tilapias fed dietary aflatoxin.Vet.Med..J.40 (1992), pp.17-23,
55. -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
56. -Eaton DL ,Groopman JD (eds) The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance. Academic Press, San Diego, pp 27–43
57. – FAO , Web library (2002)
58. www,fao,org/impho/hilibrary/x0036E.htm.
59. 53 -Ezz El-Arab AM, Girgis SM, Hegazy EM, Abd El-Khalek AB(2006). Effect of dietary honey on intestinal microflora and toxicity of mycotoxins in mice. BMC Complement Altern Med 6:1–13
60. -FAO (2002) Fishery statistics: commodities, vol 21. FAO ,Rome
61. -Fegan D (2005) Mycotoxins: the hidden menace? http //:www.alltech.com/
62. -Farabi, S.M.V, M.Yousefian and A.Hajimoradloo(2006).Aflatoxiosis injevenile Huso huso fed a contamhnated diet.J.Appl.Ichthyol.,22(Suppl.),234-234
63. -Food and Drug Administration. 1994. Sec. 683.100—Action levels for aflatoxins in animal feeds (CPG 7126.33). Internet:
64. -Food and Drug Administration. 1995. Sec. 555.400 Foods—adulteration with aflatoxin (CPG 7120.26). Intern
65. -Gallagher EP, Eaton DL (1995) In vitro biotransformation of aflatoxin B1 in channel catfish liver. Toxicol Appl Pharmacol 132:82–90

60 -Gallagher EP, Kunze KL, Stapleton PL, Eaton DL (1996) The kinetics of aflatoxins B1 oxidation by human cDNA-expressed and human liver microsomal cytochromes P4501A2 and 3A4. Toxicol Appl Pharmacol 141:595–606

61 -Gallagher EP, Sheehy KM, Janssen PL, Eaton DL, Collier TK(1999)Isolation and cloning of homologous glutathione S-transferase cDNAs from English sole and starry flounder liver. Aquat Toxicol 44:171–182

62 -Gallagher EP, Wienkers LC, Kunze KL, Stapleton PJ, Eaton DL (1994) Role of CYP1A2 and 3A4 in the bioactivation of aflatoxin B1 in human liver microsomes. Cancer Res 54:101-108

63 - Gong YY, Cardwell K, Hounsa A, Egal S, Turner PC, Hall AJ and Wild CP. 2002. Dietary aflatoxin exposure and impaired growth in young children from Benin and Togo: cross sectional study; BMJ 2002; 325:20-21.

64 -Gorelick NJ, Bruce RD, Hoseyni MS (1993) Human risk assessment based on animal data: inconsistencies and alternatives. In: Eaton D., Groopman JD (eds) The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance. Academic Press, London, 508–511

64 -Groopman JE, Donahue PR, Zhe' J, Chen JS, Wogan GN(1985). Aflatoxin metabolism in humans: detection of metabolites and nucleic acid adducts in urine by affinity chromatography. Proc Natl Acad Sci USA 82:6492

65 -Groopmann JD and Thomas W Kensler. 1999. CRC Critical Reviews in Toxicology 1999 Chapter 19 113-124.

66 - Groopman JD and Kensler W. 1996. Temporal patterns of aflatoxin-albumin adducts in hepatitis B surface antigen-positive and antigen-negative residents of Daxin, Qidong County, People's Republic of China. CANCER EPIDEMIOLOGY BIOMARKERS & PREVENTION; 5 (4) . 1996. 253-261.

67 - Groopman JD. Molecular dosimetry methods for assessing human aflatoxin exposures . In: Eaton DL, Groopman JD, (1993).The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance. London: Academic Press, 259-79

68 -Guengerich FP (2006) Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. AAPS J 8:101–111

69 -Guengerich FP, Gillam EMJ, Martin MV, Baba T, Kim BR ,Shimada T, Raney KD, Yun CH (1994) The importance of cytochrome P450 3A enzymes in drug metabolism. In Waterman MR, Hildebrand M (eds) Schering Foundation Workshop 13, assessment of the use of single cytochrome P450 enzymes in drug research. Springer-Verlag, Berlin ,pp 161–186

66. -Halver JE (1969) Aflatoxicosis and trout hepatoma. In: Goldblatt LA (ed) Aflatoxin: scientific background, control ,and implications. Academic Press, New York, pp 265–306
67. -Halver JE . Aflatoxicosis and rainbow trout hepatoma . In: Wogan GN, ed. Mycotoxins in foodstuffs. Cambridge, MA: MIT Press, 1965:209-34.
68. 73 -Hamilton P (1990) Problems with mycotoxins persist, but can be lived with. Feedstuffs 62:22–23
69. –Hamilton, J. and Russel , T. (1992). Effects of water temperature and formulated diet on growth and survival of larval paddlefhsh .pp: 538 – 543
70. -Hamilton P (1990) Problems with mycotoxins persist, but can be lived with. Feedstuffs 62:22–23
71. -Hardy RW (1989) Diet preparation. In: Halver JE (ed) Fish nutrition, 2nd edn. Academic Press, London
72. -Hayes JD, Judah DJ, McLellan LI Kerr LA, Peacock SD, Neal GE (1991) Ethoxyquin-induced resistance to aflatoxin B ,in the ral is associated with the expression of a novel a-class glutlathione V-transferase subunit. Yc2 which possesses high catalytic activity for aflatoxin B,-8,9-epoxide .Biochem J 279:385–398
73. -Hendricks JD (1994) Carcinogenicity of aflatoxins in non mammalian organisms. In: Eaton DL, Groopman JD (eds) The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary ,and agricultural significance. Academic Press, New York ,pp 103–136
74. -Henry SH, Bosch FX, Troxell TC, Bolger PM.(1999). Reducing liver cancer—global control of aflatoxin. Science;286: 2453-4.
75. -Henry SH, Bosch FX, Bowers JC. Aflatoxin, hepatitis and worldwide liver cancer risks . Adv Exp Med Biol 2002;504: 229-33
76. -Howard S Ramdell and David L Eaton . 1990. Species susceptibility to Aflatoxin B_1 carcinogenesis. Cancer Research. 50 615-620 .
-Hussein HS, Brasel JM (2001) Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology 167:101–134
77. -IARC (1993) Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines, and mycotoxins. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, vol 56 .Lyon, France: International Agency for Research on Cancer World Health Organization, pp 489–521
78. -Jackson LS, Hlywka JJ, Senthil KR, Bullerman LB (1996)Effect of thermal processing on the stability of fumonisins. Adv Exp Med Biol 392:345–353
79. -Jantrarotai W, Lovell RT (1990a) Subchronic toxicity of dietary aflatoxin B1 to channel catfish. J Aquat Anim Health 2:248-254
80. -Jantrarotai W, Lovell RT, Grizzle JM (1990b) Acute toxicity of aflatoxin B1 to channel catfish. J Aquat Anim Health 2:237-247
81. -Kelly JD, Dutchuk M, Hendricks JD, Williams DE (1993)Hepatocarcinogenic potency of mixed and pure enantiomers of trans-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene-7,8-diol in trout .Cancer Lett 68:225–229

82. -Kelly JD, Eaton DL, Guengerich FP, Coulombe RJ. (1997).Aflatoxin B sub(1) activation in human lung. Toxicol Appl Pharmacol;144:88-95
83. - Kpodo KA (1996) Mycotoxins in maize and fermented maize products in Southern Ghana. In: Cardwell KF (eds) Proceedings of the workshop on mycotoxins in food in Africa. International Institute of Tropical Agriculture, Benin, p33
84. -Kozlove,V.I.,(1993).Sturgeon farming.Moscow.VNIRO.P 64.
85. -Leadon SA, Tyrrell RM, Cerutti PA (1981) Excision repair of aflatoxin B1-DNA adducts in human fibroblasts. Cancer Res 41:5125–5129
86. -Lee DJ, Wales JH, Sinnhuber RO (1971) Promotion of aflatoxin-induced hepatoma growth in trout by methyl malvalate and sterculate. Cancer Res 31:960–963
87. -Lee SJ, Hedstrom OR, Fischer K, Wang-Buhler JL, Sen A, Cok I, Buhler DR (2001) Immunohistochemical localizationand differential expression of cytochrome P450 3A27 in the gastrointestinal tract of rainbow trout. Toxicol Appl Pharmacol 177:94–102
88. -Lee SJ, Wang-Buhler JL, Ismet C, Yu TS, Yang YH, Miranda CL, Lech JJ, Buhler DR (1998) Cloning, sequencing and tissue expression of CYP3A27, a new member of the CYP3A subfamily from embryonic and adult rainbow trout livers. Arch Biochem Biophys 360:53–61
89. -Leeson S, Diaz GJ, Summers JD (1995) Poultry metabolic disorders and mycotoxins. University Books, Guelph ,Ontario, Canada, pp 249–298
90. -Lightner DV (1977) Shrimp diseases. In: Sindermann CJ (eds) Disease diagnosis and control in North American marineaquaculture. Elsevier/North-Holland Publishing Co., New York, pp 10–77
91. -Lightner DV, Redman RM, Price RL, Wiseman M0 (1982) Histopathology of aflatoxicosis in the marine shrimp Penaeus stylirostris and P. vannamei. J Invertebr Pathol 40:279-291
92. -Livingstone DR (1998) The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish
93. Comp Biochem Physiol Mol Integr Physiol 120:43–49
94. 100 -Loveland PM, Nixon JE, Pawlowski NE, Eisele TA, Libbey LM, Sinnhuber RO (1979) Aflatoxin B1 and aflatoxicol metabolism in rainbow trout (Salmo gairdneri) and the effects of dietary cyclopropene. J Environ Pathol Toxicol 2:707-718
95. -Loveland PM, Sinnhuber RO, Berggren KE, Libbey LM ,Nixon JE, Pawlowski NE (1977) Formation of aflatoxinB1, from aflatoxicol by rainbow trout (Salmo gairdneri) liver in vitro. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 6:167-170
96. -Loveland PM, Wilcox JS, Pawlowski NE, Bailey GS (1987) Metabolism and DNA binding of aflatoxicol and aflatoxin B1 in vivo and in isolated hepatocytes from rainbow trout(Salmo gairdneri). Carcinogenesis 8:1065–1070
97. -Lovell RT (1984) Use of soybean products in aquaculture diets .Animal nutrition research highlights. American Soybean Association, St. Louis, Mo
98. -Lovell RT (1989) Nutrition and feeding of fish. Van Nostrand Reinhold, New York
99. -Lovell RT (1992) Mycotoxins: hazardous to farmed fish. Feed Int 13:24–28
100. -Madhusudhanan N, Kavithalakshmi SN, Shanmugasundaram ERB, Shanmugasundaram KR (2006) Aflatoxin B1-induced DNA damage in labeo rohita: protective effect of an antioxidant supplement, Amrita Bindu. Basic Clin Pharm Toxicol 98:473–479
101. -Massey TE, Stewart RK, Daniels JM, Liu L (1995) Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B1 carcinogenicity. Proc Soc Exp Biol Med 208:213–227. Review
102. - Maxwell SM , Apeagyei F, de Vries HR , Mwanmut DD and Hendrickse RG. 1998. Aflatoxins in breast milk, neonatal cord blood and sera of pregnant women. J Toxicol Toxin Rev 1989; 8(1-2):19-29.
103. -McKean C, Tang L, Billam M, Tang M, Theodorakis CW ,Kendall RJ, Wang JS (2006) Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B1 and T-2 toxin in animals and immortalized human cell lines. J Appl Toxicol 26:139–147
104. -Miller JD (1995) Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. J Stored Prod Res 31:1–16
105. -Miraglia M, Brera C, Colatosti M (1996) Application of biomarkers to assessment of risk to human health from exposure to mycotoxins. Microchem J 54:472–477
106. -Mocchegiani E, Corradi A, Santarelli L, (2001) . Zinc, thymic endocrine activity and mitogen responsiveness (PHA) in piglets exposed to maternal aflatoxicosis B1 and G1. Vet Immunol Immunopathol; 62:245-60.
107. -Montagna MT, Minervini F, Santacroce MP, Napoli C, Barbuti S (2002) Aflatoxin M1 in dairy products: a public health program? Ann Ig 14:1–5
108. -Moss MO (1991) The environmental factors controlling mycotoxin formation. In: Smith JE, Anderson RA (eds) Mycotoxins and animal foods. CRC Press, Boca Raton ,

109.FL, pp 37–56
110.-Moss MO (1998) Recent studies on mycotoxins. J Appl Microbiol Symp Supplement 84:62–76
111.-Murjani G (2003) Chronic aflatoxicosis in fish and its relevance to human health. Central Institute of Freshwater Aquaculture, India
112.-Myhr AI, Dalmo RA (2005) Is there a need for risk governance of genetic engineering in aquaculture? Aquaculture 250:542-554
113.- Naylor RL, Goldburg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beverigde MCM, Clay J, Folke L, Lubchenco J, Mooney H, Yroell M (2000) Effect of aquaculture on world fish supplies .Nature 405:1017–1024
114.- Neal GE, Metcalfe SA, Legg RF, Judah DJ, Green JA (1981) Mechanism of resistance to cytotoxicity which precedes aflatoxin B1 hepatocarcinogenesis. Carcinogenesis 2:457 –-461
115.-New MB, Tacon AGJ, Csavas I (eds) (1995) Farm-made aquafeeds. FAO Fisheries Technical Paper No.343 . Rome ,
116.-Nunez O, Hendricks JD, Arbogast DN, Fong AT, Lee BC ,Bailey GS (1989) Promotion of aflatoxin B1 hepatocarcinogenesis in rainbow trout by 17.-estradiol. Aquat Toxicol 15:289–302
117.- Nyandieka HS, Wakhisi J.(1993). The impact of vitamins A, C, E, and selenium compound on prevention of liver cancer in rats . East Afr Med J; 70:151-3
118.-Patterson DS, Galaney EM, Roberts BA (1978) The estimation of AFM1 in milk using 2-dimensional TLC. Food Cosmetic Toxicol 16:49–50
119.-Pier AC (1992) Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. J Anim Sci 70:3964–3967. Review
120.- Pier AC, Richard JL, Cysewski SJ (1980) Implications of mycotoxins in animal disease. J Am Vet Med Assoc 176:719–724
121.-Plakas SM, Loveland PM, Bailey GS , Blazer VS, Wilson GL (1991) .Tissue deposition and excretion of 14C-labeled aflatoxin B1 after oral administration in channel catfish
122.- Puschner B (2002). Mycotoxins. Vet Clin Small Anim 32:409 –419
123.-Ramsdell HS, Eaton DL (1990) Species susceptibility to aflatoxin B1 carcinogenesis: comparative kinetics ofmicrosomal biotransformation. Cancer Res 50:615–620
124.-Ramsdell HS, Parkinson A, Eddy AC, Eaton DL (1991) Bioactivation of aflatoxin B1 by human liver microsomes :role of cytochrome P450 IIIA enzymes. Toxicol Appl Pharmacol 108:436–447
125.-Raney VM, Harris TM, Stone MP (1993) DNA conformation mediates aflatoxin B1-DNA binding and the formation of guanine N7 adducts by aflatoxin B1 8,9-exo-epoxide .Chem Res Toxicol 6:64–68
126.-Rasmussen HB, Larsen K, Hald B, Moeller B, Elling F (1986)Outbreak of liver-cell carcinoma among saltwater-reared rainbow trout(Salmo gairdneri)in Denmark. Dis Aquat Org 1:191–196
127.-Reiss J (1972a) Comparing investigations on the toxicity of some mycotoxins to the larvae of the brine shrimp (Artemia salina L.). Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg Abt 1 Orig Reihe B 155:531–534
128.-Reiss J (1972b) Toxic effects of mycotoxins aflatoxin B, rubratoxin B, patulin and diacetoxyscirpenol on the crustacean Cyclops fuscus. J Assoc Off Anal Chem 55:895–896
129.-ROC. Report on Carcinogens, 11th ROC (1992) Eleventh Edition: Aflatoxins CAS No. 1402-68-2
130.- Rogers AE. Nutritional modulation of aflatoxin carcinogenesis erinary , and agricultural significance. London: Academic Press, 1993:207-30.
131.-Rodgers A, Vaughan P, Prentice T, Edejer TT, Evans D, Lowe J(2002). Reducing risks, promoting healthy life . In: Campanini B, Haden A, eds. The World Health Report . Geneva: World Health Organization, 2002.
132.-Roebuck BD, Maxuitenko YY (1994). Biochemical mechanisms and biological implications of the toxicity of aflatoxins as related to aflatoxin carcinogenesis. In:
133.-Ronyal A.and Peteri A.,1990.comparison of growth rate of starlet Acipenser rutenus hybrid of starlet(Acipenser rutenus× Acipenser baeri stenorhynchus) raised in awater recycling system.Aquaculture,Vol.5 ,pp.185-192
134.-Royes JB, Yanong RPE (2002) Molds in fish and aflatoxicosis (http://edis.ifas.ufl.edu/FAO95)
135.-Rucker RR, Yasutake WT, Wolf H. Trout hepatoma -a preliminary report. Prog Fish Cult 2002;23:3-7.
136.-RuizPerez A, PaaschMartinez L, AdamedePaasch P, Rosiles-Martinez R (1984) Hepatic neoplasia in the rainbow trout (Salmo gairdneri) bred in El Zarco Fish Hatchery, Federal District. Veterinaria (Mex) 15:255–261
137.-Russell L, Cox DF, Larsen G, Bodwells K, Nelson CE (1991)Incidence of molds and mycotoxins in commercial animal feed mills in seven Midwestern states. J Anim Sci 69:5–12

138.-Rustom IYS (1997) Aflatoxin in food and feed. Occurrence , legislation and inactivation by physical methods. Food Chem 59:57–67
139.- Sahoo PK, Mukerjee SC, Nayak SK, Dey S (2001) Acute and subchronic toxicity of aflatoxin B1 to rohu, Labeo rohita)(Hamilton). Indian J Exp Biol 39:453–458
140.- Sahoo PK, Mukherjee SC, Jain AK, Mukherjee A (2003) Histopathological and electron microscopic studies of gills and opisthonephros of Rohu, Labeo rohita to acute and subchronic Aflatoxin B1 toxicity. Asian Fisheries Science 16:257–268 Asian Fisheries Society, Manila, Philippines
141.Salhab AS, Edwards GS (1977) Comparative in vitro metabolism of aflatoxicol by liver preparations from animals and humans. Cancer Res 37:1016–1021
142.-Sargeant K, Carraghan RB, Allcroft R (1963) Toxic products in groundnuts. Chemistry and origin origin of aflatoxins . Chem Ind (London) pp 53–55
143.Sato S, Matsushima T, Tanaka N, Sugimura T, Takashima F (1973) Hepatic tumours in the guppy (Lebistes reticulatus) induced by aflatoxin B1 dimethylnitrosamine and 2-acetyl aminofluorene. J Nat Cancer Inst 50:765─778
144.-Schoental R (1967) Aflatoxins. Ann Reve Pharmacol 7:343 ─356
145.-Scottish Executive Report (2002) Scottish Executive Report on Environmental Impacts of Aquaculture, the Scottish Association for Marine Science and Napier University .Scottish Executive Central Research Unit. Edinburgh
146.-Sekiguchi J, Gaucher GM (1977) Conidiogenesis and secondary metabolism in Penicillium urticae. Appl Environ Microbiol 33:147–١158
147.-Sharma RP, Salunkhe DK (eds) (1991) Mycotoxins and phytotoxins. CRC Press, Boca Raton, FL
148.-Sinnhuber RO, Hendricks JD, Wales JW, Putnam GB (1977) Neoplasms in rainbow trout, a sensitive animal for environmental carcinogenesis. Ann NY Acad Sci 298:389 ─408
149.-Sinnhuber RO, Wales JH, Ayres JL, Engebrecht RH, Amend DL (1968) Dietary factors and hepatoma in rainbow trout(Salmo gairdneri). 1. Aflatoxins in vegetable protein feedstuffs. J Natl Cancer Inst 41:711–718
150.155 -Smith RB, Griffin JM, Hamilton PB (1976) Survey of aflatoxicosis in farm animals. Appl Environ Microbiol 31:385-388
151.- Steyn PS (1995) Mycotoxins, general view, chemistry and structure. Toxicol Lett 82/83:843–851
152.-Spring P & Fegan D.F. (2005). Mycotoxins – a rising threat to aquaculture .Feedmix 13:5 Nutritional biotechnology in the feed and food industries. Proceedings of Alltech's 21st Annual Symposium, Lexington, Kentucky, USA, 22-25 May 2005
153.-Stegeman JJ (1989) Cytochrome P450 forms in fish: catalytic ,immunological and sequence similarities. Xenobiotica 19:1093-1110
154.-Stegeman JJ, Lech JJ (1991) Cytochrome P450 momooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolismand biomarkers for carcinogen and pollutant exposureEnviron Health Perspect 90:101–109
155.-Stewart D, Larson E (2002) Aflatoxicosis in wildlife. Information Sheet 1582 . Mississippi State Univ. Extension Service, Cooperating with U.S. Dept. of Agriculture Steyn PS (1995) Mycotoxins, general view, chemistry and structure. Toxicol Lett 82/83:843–851
156.-Tacon AGJ (1992) Nutritional fish pathology. Morphological signs of nutrient deficiency and toxicity in farmed fish .FAO Fish Technical Paper. No. 330. Rome, p 75
157.-Tacon AGJ, Phillips MJ, Barg UC (1995) Aquaculture feeds and the environment: the Asian experience. Water Sci Technol 31:41–59
158.-Takahashi Y, Nakatsuru Y, Zhang S (2002) Enhanced spontaneous and aflatoxin-induced liver tumorigenesis in xeroderma pigmentosum group A gene-deficient mice Carcinogenesis 23:627–633
159.- Tilton SC, Gerwick LG, Hendricks JD, Rosato CS, Corley-Smith G, Givan SA, Bailey GS, Bayne CJ, Williams DE (2005) Use of a Rainbow Trout oligonucleotide micro-array to determine transcriptional patterns in Aflatoxin B1induced hepatocellular carcinoma compared to adjacent liver. Toxicol Sci 88:319–330
160.-Tsai HW (1996) Evaluation of zebrafish (Brachydanio rerio)as a model for carcinogenesis. Ph.D. dissertation. Oregon State University, Corvallis
161.- Troxel CM, Reddy AP, O'Neal PE, Hendricks JD, Bailey GS (1997) In vivo aflatoxin B1 metabolism and hepatic DNA adduction in zebrafish (Brachydanio rerio). Toxicol Appl Pharmacol 143:213–220

162.-Tuan NA, Grizzle JM, Lovell RT, Manning BB, Rottinghaus GE (2002) Growth and hepatic lesions of Nile tilapia(Oreochromis niloticus) fed diets containing aflatoxin B1 .Aquaculture 212:311–319
163.-Tulayakul P, Sakuda S, Dong KS, Kumagai S (2005) Comparative activities of glutathione-S-transferase and dialdehyde reductase toward aflatoxin B1 in livers of experimental and farm animals. Toxicon 46:204–209
164.169 -Valsta LM, Hendricks JD, Bailey GS (1988) The significance of glutathione conjugation for aflatoxin B1 metabolism in rainbow trout and coho salmon. Food Chem Toxicol 26;129-135
165.-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
166.-Webster RP, Gawde MD, Bhattacharya RK. Effect of different vitamin A status on carcinogen-induced DNA damage and repair enzymes in rats. Toxicol In Vivo 1996;10:113-8.
167.- Weidenborner M (2001) Encyclopedia of food mycotoxins. Springer Publisher, Berlin
168.-Willett KL, Gardinali PR, Lienesch LA, Di Giulio RT (2000) Comparative metabolism and excretion of benzo(a)pyrene in 2 species of ictalurid catfish. Toxicol Sci 58:68–76
169.-Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM ,Aggarwal D (2004) Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. Rev Article Am J Clin Nutr 80:1106–1122
170.-Wiseman M0., Price RL, Lightner DV, Williams RR (1982) Toxicity of Aflatoxin B1 to Penaeid shrimp. Appl Environ Microbiol 44:1479–1481
171.-Wogan GN (1992) Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. Cancer Res 52:2114–2118
172.- Wogan GN, Newberne PM (1967) Dose–response characteristics of aflatoxin B1 carcinogenesis in rats. Cancer Res 27:2370–2376
173.-Wong JJ, Hsieh DPH (1976) Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcinogenic potential. Proc Natl Acad Sci USA 73:2241–2244
174.-Wunder W, Korn H (1982) Aflatoxin cancer hepatomas in the liver of the rainbow trout Salmo irideus. Zool Beitr 28:99 –109
175.-Yang YH, Miranda CL, Henderson MC, Wang-Buhler JL ,Buhler DR (2000) Heterologous expression of CYP2K1 and identification of the expressed protein (BV-CYP2K1) as lauric acid (v-1)-hydroxylase and Aflatoxin B1 exoepoxidase. Drug Metab Disposition 1279–1283

Abstract

In the present study, the impacts of various concentrations of Aflatoxin B_1 (AFB_1) on Beluga, *Huso huso*, under controlled conditions were investigated. Belugas (120±10 g) were fed diets containing 0, 25, 50, 75, and 100 ppb AFB_1/kg of diet for 3 months. Results showed that various levels of AFB_1 do not significantly affect the specific growth ratio (SGR) ($p< 0.05$) of fish in different treatments. However, weight gain and food conversion ratio (FCR) varied significantly ($p< 0.05$ between control and treatments with diets contaminated with 75 and 100ppb AFB_1/kg after 90 days). The increase in level of AFB_1 did not affect the percent of survival rate(SR) and no mortality was observed in treatments (SR=100%). Various levels of AFB_1 under experimental conditions of the present study affect some growth factors, such as, weight gain and FCR but have no significant impact on SGR. Histopathological studies showed that different level of AFB_1 can cause broad range of changes in liver,kidney,spleen and gills tissues, particularly at concentration of 75 and 100 ppb AFB_1/kg of diets after 60 days.No tumour formation observed. With regard to toxin concentration and time of exposure to AFB_1 in experimental fish, different degree of skin lesions (simple hemorrhage to progressive wounds) were observed in different parts of body especially in vent, caudal peduncle, fins, and head. "Yellow sores" on head and trunk regions are considerable and led to deterioration of appearance. Prevalence of skin lesion in different treatments was 8 -53.3 %, which after stop feeding with toxic diets, 16 – 24 % healing observed.Haematological chenges included chronic anemia and lymphocytopenia.Also nutrophilia observed with increasing of skin lesions. Meat accumulation of AFB_1 in different treatments is not so considerable and harmfull for human cunsumption, but is significantly different with control fishes($P<0.01$)

Key words: *Huso huso*, AFB_1, Growth, Skin lesions, Pathological changes, Haematological changes, Meat residue.

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION – International Sturgeon Research Institute

---

Title : Study and evaluation of economical and hygienic effects of aflatoxin B_1 in cultured *Huso huso.*
Apprpved Number: 2-025-200000-05-8602-86030
Author: Abolfazl Sepahdari
Responsible Executor: A. A. Motallebi
Executor *:* Abolfazl Sepahdari
Collaborator(s) *: :*M. Mohseni; H. R. Pourali; M. Ghiasi; A. Hallajian; A. R. Shenavar Massoleh; H. Pourdehghani; S. Gholamipour; S. Kakoulaki; M. Masoumzadeh; M. Binaei
Advisor(s): I, Sharifpour, M. Bahmani**,**H.Mahmoodzadeh
Location of execution : Guilan province
Date of Beginning : 2007
Period of execution : 3 years & 3 Months
Publisher : ***Iranian Fisheries Research Organization***
Circulation : 20
Date of publishing : ***2011***
All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE

AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENTION ORGANIZATION

IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION- International Sturgeon Research Institute

Title:

Study and evaluation of economical and hygienic effects of aflatoxin B_1 in cultured *Huso huso*

Executor :

Abolfazl Sepahdari

Registration Number

2010.999