

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

عنوان:

**مطالعه و ارزیابی اثرات اقتصاد و بهداشتی
ناشی از آفلاتوکسین ها در برخی
از آبزیان پرورشی ایران**

مجری مسئول :

عباسعلی مطلبی مغانجوقی

شماره ثبت

۴۷۴۷۲

وزارت جهاد سازندگی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

عنوان طرح : مطالعه و ارزیابی اثرات اقتصاد و بهداشتی ناشی از آفلاتوکسین ها در برخی از آبزیان پرورشی
ایران

شماره مصوب طرح : ۰۰۰۰۰-۸۶۰۲-۰۵-۲۰۰۰۰-۰۱۹-۱

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : عباسعلی مطلبی مغانجوقی

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرح های ملی و مشترک دارد) : عباسعلی مطلبی

نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : عباسعلی مطلبی مغانجوقی

نام و نام خانوادگی همکار(ان) : ابوالفضل سپهداری، محمد رضا مهرابی

نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : همایون محمودزاده- عبدالمحمد طباطبایی- قباد آذری تاکامی

نام و نام خانوادگی ناظر(ان) :

محل اجرا : استان تهران

تاریخ شروع : ۸۵/۱/۱

مدت اجرا : ۶ سال و ۹ ماه

ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار : سال ۱۳۹۵

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

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسؤل / مجری»

طرح : مطالعه و ارزیابی اثرات اقتصاد و بهداشتی ناشی از آفلاتوکسین ها در

برخی از آبریان پرورشی ایران

کد مصوب : ۰۵-۸۶۰۲-۰۰۰۰۰-۲۰۰۰۰-۰۱۹-۱

شماره ثبت (فروست) : ۴۷۴۷۲ تاریخ : ۹۴/۵/۱۴

با مسؤلیت اجرایی جناب آقای عباسعلی مطلبی مغانجویی دارای مدرک

تحصیلی دکتری تخصصی در رشته بهداشت مواد غذایی می باشد.

طرح توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماریهای آبریان در تاریخ

۹۴/۴/۹ مورد ارزیابی و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای طرح مجری در :

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز □ ایستگاه □

با سمت رئیس موسسه در موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور مشغول بوده

است.

		چکیده ۱
		فصل اول: اثرات هیستوپاتولوژیک و باقیمانده بافتی ناشی از مصرف دوزهای مختلف آفلاتوکسین B ₁ در فیل
		ماهی (<i>Huso huso</i>) ۴
		چکیده ۵
		۱-۱- مقدمه ۶
		۱-۲- کلیات ۷
		۱-۳- مواد و روش کار ۲۲
		۱-۳-۱- آماده سازی کارگاه و ذخیره سازی ماهیان ۲۲
		۱-۳-۲- تهیه جیره‌های غذایی ۲۲
		۱-۳-۳- غذادهی و نمونه برداری ۲۴
		۱-۳-۴- بررسی فاکتورهای خونی ۲۶
		۱-۳-۵- بررسی باقیمانده های بافتی ۲۶
		۱-۳-۶- ارزیابی شاخص های رشد ۲۶
		۱-۳-۷- روش های آماری ۲۷
		۱-۴- نتایج ۲۸
		۱-۴-۱- جراحات پوستی ۲۸
		۱-۴-۲- مشاهدات کالبد گشایی ۳۶
		۱-۴-۳- تغییرات بافتی ۴۸
		۱-۴-۴- نتایج خون شناسی ۶۰
		۱-۴-۵- مشاهدات و نتایج شاخص های رشد ۶۳
		۱-۴-۶- باقیمانده بافتی ۶۵
		۱-۵- بحث ۶۷
		۱-۵-۱- جراحات پوستی ۶۸
		۱-۵-۲- علایم کالبد گشایی و مشاهدات هیستوپاتولوژیک ۷۱
		۱-۵-۳- فاکتورهای خون شناسی ۷۸
		۱-۵-۴- شاخص های رشد (میانگین وزنی، ضریب تبدیل غذایی، رشد ویژه) ۷۹
		۱-۵-۵- میانگین وزنی ۸۲

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه
۶-۵-۱- ضریب رشد مخصوص (SGR)	۸۴
۷-۵-۱- ضریب تبدیل غذایی	۸۴
۸-۵-۱- میزان زنده مانی (Survival rate)	۸۷
۹-۵-۱- باقیمانده های بافتی AFB ₁ در عضلات فیل ماهی	۸۷
۶-۱- نتیجه گیری	۹۳
منابع	۹۵
فصل دوم: بررسی تاثیر مقادیر مختلف آفلاتوکسین B₁ جیره غذایی، برپاره ای از شاخصهای رشد، تغییرات بافتی، فاکتورهای خونی و سرمی و باقیمانده بافتی آن در ماهی ازون برون پرورشی (A. Persicus)	۱۰۳
چکیده	۱۰۴
۱-۲- مقدمه	۱۰۵
۲-۲- کلیات	۱۰۶
۳-۲- مواد و روش کار	۱۱۸
۱-۳-۲- آماده سازی کارگاه و ذخیره سازی ماهیان	۱۱۸
۲-۳-۲- تهیه جیره های غذایی	۱۱۸
۳-۳-۲- غذایی و نمونه برداری	۱۲۲
۴-۳-۲- مطالعات خون شناسی	۱۲۶
۴-۲- نتایج	۱۳۱
۱-۴-۲- جراحات پوستی	۱۳۱
۲-۴-۲- مشاهدات کالبد گشایی	۱۳۷
۳-۴-۲- تغییرات بافتی	۱۴۸
۴-۴-۲- خون شناسی	۱۶۶
۵-۴-۲- نتایج رشد	۱۹۳
۵-۲- بحث	۲۰۲
۱-۵-۲- جراحات پوستی	۲۰۲
۲-۵-۲- علایم کالبد گشایی و مشاهدات هیستوپاتولوژیک	۲۰۳
۳-۵-۲- فاکتورهای خون شناسی	۲۰۹
۴-۵-۲- شاخص های رشد (میانگین وزنی، ضریب تبدیل غذایی، رشد ویژه)	۲۱۱

صفحه	عنوان
۲۱۷	۲-۶- نتیجه گیری
۲۱۸	پیشنهادها
۲۲۱	منابع
	فصل ۳: بررسی تأثیر آفلاتوکسین B₁ بر فاکتورهای خونی، تغییرات بافتی، میزان باقیمانده بافتی، رشد و بازماندگی میگوی سفید هندی (<i>Fenneropenaeus indicus</i>)
۲۲۸	بازماندگی میگوی سفید هندی (<i>Fenneropenaeus indicus</i>)
۲۲۹	چکیده
۲۳۰	۳-۱- کلیات
۲۳۳	۳-۲- پرورش میگو در ایران
۲۳۴	۳-۳- مواد و روش کار
۲۳۴	۳-۳-۱- میگوهای مورد استفاده در مطالعه
۲۳۵	۳-۳-۲- تهیه جیره های حاوی مقادیر مورد نظر از آفلاتوکسین B ₁
۲۳۷	۳-۳-۳- تعیین مقدار نهایی AFB ₁ موجود در جیره های تهیه شده
۲۳۷	۳-۳-۴- بررسی تأثیر تغذیه با جیره های حاوی مقادیر مختلف AFB ₁ بر میزان رشد میگوهای سفید هندی
۲۳۹	۳-۳-۵- بررسی تأثیر تغذیه با جیره های حاوی مقادیر مختلف AFB ₁ بر شاخص های سلامتی (THC & TPP)
۲۴۱	۳-۳-۶- بررسی تأثیر تغذیه با جیره های حاوی مقادیر مختلف AFB ₁ بر فعالیت فاگوسیتی (PA)
۲۴۲	۳-۳-۷- بررسی تغییرات بافتی ناشی از تغذیه با جیره های حاوی مقادیر مختلف AFB ₁ در میگوی سفید هندی
۲۴۳	۳-۳-۸- بررسی باقیمانده بافتی ناشی از تغذیه با جیره های حاوی مقادیر مختلف AFB ₁ در میگوی سفید هندی
۲۴۴	۳-۴- نتایج
۲۴۴	۳-۴-۱- نتایج مربوط به تغذیه با مقادیر متفاوت AFB ₁ به مدت ۸ هفته
۲۵۱	۳-۴-۲- بررسی های هیستوپاتولوژی
۲۷۱	۳-۵- بحث
۲۷۵	۳-۵-۱- قرمز شدن و تغییر حالت هپاتوپانکراس در میگوهای دریافت کننده AFB ₁
۲۷۶	۳-۵-۲- تأثیر تغذیه با جیره های مختلف AFB ₁ بر رشد میگوهای سفید هندی
۲۷۹	۳-۵-۳- تأثیر تغذیه با جیره های مختلف AFB ₁ بر شاخص های سلامتی و ایمنی میگوی سفید هندی
۲۸۲	۳-۵-۴- تأثیر تغذیه با جیره های مختلف AFB ₁ بر باقی مانده های بافتی در میگوی سفید هندی
۲۸۳	۳-۵-۵- تأثیر تغذیه با جیره های مختلف AFB ₁ بر تغییرات بافتی میگوی سفید هندی
۲۸۵	پیشنهادها
۲۸۶	منابع
۲۹۰	چکیده انگلیسی

چکیده

فیل ماهی (*Huso huso*) و ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) یکی از گونه های با ارزش ماهیان خاویاری در دریای خزر میباشند. استان بوشهر نیز با در اختیار داشتن حدوداً ۶۰ درصد از اراضی زیر کشت میگو در کشور و همچنین تولید بیش از ۶۰ درصد از میگوی پرورشی کشور، بعنوان قطب صنعت تکثیر و پرورش میگو و پیشتاز در صنعت میگو در کشور شناخته می شود. تحقیق حاضر در قالب سه بخش تحت عنوانهای اثرات هیستوپاتولوژیک و باقیمانده بافتی ناشی از مصرف دوزهای مختلف آفاتوکسین B1 در فیل ماهی (*Huso huso*)، بررسی تاثیر مقادیر مختلف آفاتوکسین B1 جیره غذایی، برپاره ای از شاخصهای رشد، تغییرات بافتی، فاکتورهای خونی و سرمی و باقیمانده بافتی آن در ماهی ازون برون پرورشی (*A. persicus*) و بررسی تاثیر آفاتوکسین B1 بر فاکتورهای خونی، تغییرات بافتی، میزان باقیمانده بافتی، رشد و بازماندگی میگوی سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*) انجام گردید که نتایج آن به طور خلاصه بیان شده است.

بخش اول: پس از انجام مراحل سازگاری فیل ماهیان با غذای دستی، تعداد ۱۸۰ عدد ماهی با میانگین وزنی 10 ± 120 gr و در پنج تیمار آزمایشی، با تراکم ۱۲ عدد ماهی در ۱۵ تانک ۵۰۰ لیتری ذخیره سازی گردیدند. آب تانک ها از طریق آب چاه با درجه حرارت 2 ± 18 °C و با میزان ۲۰۰ درصد تعویض روزانه تنظیم و میزان اکسیژن محلول در آب به مقدار ۷/۳ ppm تنظیم و تأمین گردید. آفاتوکسین B1 خالص با غلظتهای مورد نظر (۱۰۰ ppb و ۷۵ ppb و ۵۰ ppb و ۲۵ ppb) به جیره های آزمایشی اضافه گردید. غذادهی بر مبنای ۳ درصد وزن توده زنده و در ۴ نوبت در طی روز انجام پذیرفت. ثبت عوامل فیزیکی و شیمیایی 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. به منظور بررسی ضایعات پاتولوژیک از آبشش ها، کبد، طحال و کلیه ها (بخش میانی و قدامی) نمونه برداری و جهت تهیه نمونه های آسیب شناسی در محلول بوئن تثبیت و به روش هماتوکسیلین - اتوزین (H & E) رنگ آمیزی گردید. جهت تعیین میزان باقیمانده های 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 سینه ای و شکمی و بروز زخم و جراحات در لبه های فوقانی و تحتانی باله دمی و در حاشیه های باله های سینه ای و شکمی و پستی به همراه خوردگی باله در برخی از تیمارها مشاهده گردید. میزان شیوع جراحات پوستی در تیمارهای مختلف و در طی تحقیق از ۸ الی ۳/۵۳ درصد متفاوت بود. مشاهدات کالبدگشایی و پاتولوژی بیانگر بروز تغییرات حاد و روند مزمن و پیشرونده ضایعات در آبشش ها، کبد، کلیه و طحال است. ضایعات توموری مشاهده نگردید.

بخش دوم: آفاتوکسین B1 خالص با غلظتهای مورد نظر (۲۵ ppb، ۵۰ ppb، ۷۵ ppb، ۱۰۰ ppb) به جیره های آزمایشی ماهیان ازون برون اضافه گردید. غذادهی بر مبنای ۳ درصد وزن توده زنده و در ۳ نوبت طی روز انجام

پذیرفت. پس از ثبت عوامل فیزیکی و شیمیایی آب، بررسی علایم کلینیکی و ثبت تلفات روزانه در دستور کار قرار داشت. در تیمارهای مختلف به تناسب غلظت سم مصرفی زخم‌هایی در نواحی شکمی، جانبی و ساقه‌دهمی به همراه خونریزی در برخی تیمارها مشاهده گردید. میزان شیوع جراحات پوستی در تیمارهای مختلف و طی تحقیق از ۴ الی ۱۷/۹ درصد متفاوت بود. مشاهدات کالبد گشایی و پاتولوژی نشان دهنده بروز تغییرات مزمن و پیشرونده ضایعات در آبشش‌ها، کبد و کلیه و طحال بود. خونریزی، هایپرپلازی و تخریب بافت پوششی تیغه‌های ثانویه در آبشش‌ها، پرخونی، دژنراسیون و نکروز هپاتوسیت‌ها در کبد، دژنراسیون و نکروز لوله‌های ادراری و تغییرات نکروتیک در بافت طحال از جمله تغییرات پاتولوژیک مشاهده شده بود. تغییرات مشاهده شده در برخی از فاکتورهای خونی، ایمنی و آنزیم‌های کبدی طی تحقیق مورد ارزیابی و تحلیل قرار گرفت. در ضریب رشد ویژه در تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ولی در میانگین وزنی و ضریب تبدیل غذایی درمقا طعی از تحقیق، تغییرات معنی‌داری مابین تیمارهای آزمایشی با یکدیگر و با شاهد مشاهده گردید.

بخش سوم: میگوهای سفید هندی (*Fennero penaeusindicus*) با میانگین وزنی $11/79 \pm 1/76$ گرم به مدت ۸ هفته با جیره‌های غذایی حاوی صفر، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb آفلاتوکسین B₁ تغذیه شدند. وزن نهایی، میزان باقی‌مانده‌های بافتی (هر دو هفته یک بار)، تعداد هموسیت کل (THC)، پروتئین پلاسمای کل (TPP)، فعالیت فاگوسیتی (PA) و درصد بازماندگی (هر چهار هفته یک بار) تعیین گردید. علاوه بر این در پایان هفته‌های چهارم و هشتم، تغییرات هیستوپاتولوژیک در بافت‌های هپاتوپانکراس، روده میانی و عضلات مورد بررسی قرار گرفت. به منظور بررسی امکان بهبود، میگوهای شاهد و تیمار، پس از سپری شدن هشت هفته، به مدت چهار هفته با جیره غذایی فاقد AFB₁ تغذیه شدند و هر دو هفته یک بار فاکتورهای THC، TPP، PA و درصد بازماندگی و در پایان هفته دوازدهم تغییرات هیستوپاتولوژیک و باقیمانده‌های بافتی، اندازه‌گیری و تعیین گردید. مقادیر مختلف آفلاتوکسین B₁ موجود در جیره‌های غذایی بر روی پارامترهای رشد، درصد بازماندگی و شاخص‌های سلامتی (THC و TPP) میگوهای سفید هندی، موثر بود و موجب کاهش آنها گردید. در پایان هفته هشتم میزان آفلاتوکسین B₁ موجود در جیره‌های غذایی، همبستگی منفی با وزن نهایی، درصد بازماندگی، THC و TPP (به ترتیب با r برابر با ۰/۳۱۲، -، ۰/۶۰۳، -، ۰/۲۳۷، -، ۰/۶۴۹، -، در $p < 0.001$) نشان دادند. افزون بر این تغییرات هیستوپاتولوژیک قابل ملاحظه‌ای در هپاتوپانکراس، روده میانی و عضلات، شامل تغییر شکل مقطع ستاره‌ای توپول‌های هپاتوپانکراس و کاهش سلول‌های پوششی و تغییرات دژنراتیو و آتروفی سلول‌های ترشحی پوششی این توپول‌ها، نکروزه شدن بافت هپاتوپانکراس، تجمع سلول‌های فیروبلاست در دیواره‌توبول‌های هپاتوپانکراس، جدا شدن دستجات عضلانی از یکدیگر و ایجاد فاصله بین آنها در بافت عضله و نکروزه و کنده شدن مخاط روده در میگوهای تغذیه شده با مقادیر مختلف آفلاتوکسین B₁ مشاهده شد. در میگوهای تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی ۱۶۰۰، ۸۰۰ و ۴۰۰ ppb آفلاتوکسین B₁ در پایان هفته چهارم، کاهش رشد و تغییر

رنگ و قرمز شدگی بیشتری مشاهده شد این تغییرات بافتی با تغییرات مشاهده شده در THC و TPP همخوانی داشت. در تیمارهای ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ ppb امکان بهبود در تمامی فاکتورها مشاهده شد. کلیه داده‌ها در برنامه Excel ثبت و به روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون‌های تکمیلی توکی و چند دامنه دانکن بانرم افزار SPSS مورد ارزیابی قرار گرفتند.

کلید واژه‌ها: ماهی ازون برون ، AFB1 ، FCR ، SGR ، هماتولوژی، جراحات پوستی ، هیستوپاتولوژی، فیل ماهی ، شاخص‌های رشد، جراحات پوستی ، تغییرات هیستوپاتولوژی، تغییرات خونی، باقیمانده بافتی و میگوی سفید هندی

فصل اول:

اثرات هیستوپاتولوژیک و باقیمانده بافتی ناشی
از مصرف دوزهای مختلف آفلاتوکسین B₁
در فیل ماهی (*Huso huso*)

چکیده

فیل ماهی (*Huso huso*) یکی از گونه های با ارزش ماهیان خاویاری در دریای خزر است. در تحقیق حاضر پس از انجام مراحل سازگاری با غذای دستی، تعداد ۱۸۰ عدد ماهی با میانگین وزنی 10 ± 120 gr و درپنج تیمار آزمایشی، با تراکم ۱۲ عدد ماهی در ۱۵ تانک ۵۰۰ لیتری ذخیره سازی گردیدند. آب تانک ها از طریق آب چاه با درجه حرارت 18 ± 2 °C و با میزان ۲۰۰ درصد تعویض روزانه تنظیم و میزان اکسیژن محلول در آب به مقدار ۷/۳ ppm تنظیم و تأمین گردید.

آفاتوکسین B₁ خالص با غلظتهای مورد نظر (۱۰۰ppb و ۷۵ppb و ۵۰ppb و ۲۵ppb) به جیره های آزمایشی اضافه گردید. غذادهی بر مبنای ۳ درصد وزن توده زنده و در ۴ نوبت در طی روز انجام پذیرفت. ثبت عوامل فیزیکی و شیمیایی 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. به منظور بررسی ضایعات پاتولوژیک از آبشش ها، کبد، طحال و کلیه ها (بخش میانی و قدامی) نمونه برداری و جهت تهیه نمونه های آسیب شناسی در محلول بوئن تثبیت و به روش هماتوکسیلین-ائوزین (H & E) رنگ آمیزی گردید. جهت تعیین میزان باقیمانده های 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 دم به همراه خونریزی در پایه باله های سینه ای و شکمی و بروز زخم و جراحات در لبه های فوقانی و تحتانی باله دم و در حاشیه های باله های سینه ای و شکمی و پشتی به همراه خوردگی باله در برخی از تیمارها مشاهده گردید. میزان شیوع جراحات پوستی در تیمارهای مختلف و در طی تحقیق از ۸ الی ۵۳/۳ درصد متفاوت بود. مشاهدات کالبدگشایی و پاتولوژی بیانگر بروز تغییرات حاد و روند مزمن و پیشرونده ضایعات در آبشش ها، کبد، کلیه و طحال است. ضایعات توموری مشاهده نگردید.

در ضریب رشد ویژه در تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی داری مشاهده نشد ولی در میانگین وزنی و ضریب تبدیل غذایی در مقاطعی از تحقیق، تغییرات معنی داری مابین تیمارهای آزمایشی بایکدیگر و با شاهد مشاهده گردید.

روند تجمع باقیمانده AFB₁ در عضلات پیشرونده است ولی از نظر مصارف انسانی در محدوده مخاطره آمیز قرار ندارد. در میزان باقیمانده ها، تغییرات معنی داری فی مابین تیمارهای آزمایشی بایکدیگر و با شاهد مشاهده گردید. کلیه داده ها 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

۱-۱- مقدمه

روند توسعه آبی پروری در کشور و پیش‌بینی میزان تولید آبزیان پرورشی در طی برنامه توسعه اقتصادی - 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 آبی پروری به همراه نگاه جهانی به محصولات 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.

طبعاً «مطالعه و ارزیابی اقتصادی و بهداشتی ناشی از آفاتوکسین‌ها 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 آبی 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 اطلاعات در ارتباط با تاثیرات آفاتوکسین B₁ در مورد گونه‌های بومی تجاری کشور گونه فیل ماهی (Huso huso) برای تحقیق انتخاب گردید.

لازم به توضیح است که احتیاجات غذایی گونه فوق در طی تحقیقات انجام شده در موسسه تحقیقات شیلات ایران (محسنی و همکاران، ۱۳۸۲) تعیین گردیده است و توسعه تولید و پرورش آن در برنامه‌های توسعه شیلات پیش‌بینی شده است.

تخریب زیستگاه‌های طبیعی بواسطه الودگی‌های محیطی و فعالیت‌های انسانی، صید بی‌رویه و قاچاق توسط کشورهای حاشیه خزر و حضور شانه دار در دریای خزر از جمله عواملی هستند که منجر به کاهش جمعیت و احتمال خطر انقراض نسل گونه‌های منحصر به فرد و با ارزش ماهیان خاویاری در دریای خزر گردیده است. لزوم حفظ و حراست از این گونه‌های با ارزش از یک طرف و قابلیت‌های پرورشی آنان از نظر تولید گوشت و خاویار، در کنار خلا پاره‌ای از اطلاعات فنی و تخصصی در مورد پرورش آنان از سویی دیگر ایجاب می‌نماید که به تولید اطلاعات کاربردی جهت توسعه پایدار آبی پروری گونه‌های مذکور اقدام نمود.

اهداف تحقیق

- دستیابی به حد مجاز آفاتوکسین ها در تغذیه فیل ماهی
- آگاهی از تغییرات هیستوپاتولوژیکی ناشی از مصرف آفاتوکسین ها در فیل ماهی.
- تعیین میزان باقیمانده بافتی آفاتوکسین ها در عضلات فیله ماهی در اشکال حاد و مزمن مسمومیت.
- تعیین اثرات اقتصادی ناشی از مسمومیت با آفاتوکسین B₁ در فیل ماهی.
- تعیین تاثیر دزهای مختلف آفاتوکسین B₁ بر شاخص های رشد در فیل ماهی.
- دستیابی به اطلاعات برای تدوین استانداردها و تعیین حدود مجاز آفاتوکسین B₁ در فیل ماهی.

۱-۲- کلیات

۱-۲-۱- ماهیان خاویاری

جهت آشنایی بیشتر با وضعیت و جایگاه ماهیان خاویاری در برنامه های توسعه شیلاتی کشور توضیحات بیشتری به شرح ذیل ارائه می گردد:

ماهیان خاویاری یا فسیل های زنده با قدمت ۲۰۰ میلیون سال بر روی کره زمین بعنوان گونه های با ارزشی محسوب می شوند 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 ازون برون و استرلیاد» در دریای خزر و رودخانه های منتهی به آن زیست می کنند که بزرگترین ذخیره طبیعی تاسماهیان جهان را تشکیل می دهند. این گونه های با ارزش ذخیره منحصر بفرد ژنتیکی دریای خزر هستند که نه تنها از لحاظ علمی از جایگاه ویژه ای برخوردارند، بلکه در تولید گوشت و خاویار و کسب درآمدهای ارزی، ایجاد اشتغال و توسعه صنعت توریسم، سهم بسزایی را ایفاء می نمایند.

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 گونه های 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 بهره برداری مسئولانه ذخایر مشترک تاسماهیان دریای خزر از یکطرف و دوره تولیدمثل طولانی و بلوغ جنسی دیر هنگام تاسماهیان (۱۰ تا 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 فیله ماهی 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.

۲-۲-۱- برنامه تحقیقات راهبردی

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

۳-۲-۱- برنامه توسعه پرورش ماهیان خاویاری

با توجه به کاهش چشمگیر ذخایر طبیعی ماهیان خاویاری در دریای خزر، دریای سیاه و رودخانه های دانوب و آمو و بمنظور پاسخ به تقاضای جهانی، پرورش ماهیان خاویاری رشد چشمگیری در دنیا داشته به نحویکه تخمین زده می شود 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 واقعیت های تلخ حاکم بر دریای خزر و عدم اعمال مدیریت اصولی توسط شیلات ۵ کشور کاهش ذخایر طبیعی ماهیان خاویاری همچنان ادامه دارد و بنظر می رسد در صورت عدم مدیریت اصولی و پایدار بر روی 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 خواهد 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 ویژه ای برخوردار می باشد و استانهای شمالی و تعداد زیادی از مناطق کشور برای این امر بسیار مستعد می باشند.

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 بازارهای 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 آبیزی پروری تاسماهیان است می تواند درآمد مضاعفی را نصیب پرورش دهندگان نماید. از طرف دیگر فرآوری گوشت تاسماهیان از جمله محصول فیله، دودی، کنسرو و ... می تواند در آمد زیر بخش را افزایش دهد.

۴-۲-۱- 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 آبیزی پروری تاسماهیان مناسب است (جدول ۱). نتایج بررسی های انجام شده به تفکیک هر استان در ذیل آمده است.

جدول ۱: مساحت کل مکانهای مناسب آبیزی 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
آمل	۱۰۰۹۳۷/۵	۱۲۱۸۷/۵	-
قزوین	۱۶۵۶۲/۵	-	-
گنبد کاووس	۳۸۱۲۵	۴۷۱۲۵۰	-
گرگان	۶۶۸۷۵	۳۱۸۷۵	-

۵-۲-۱- آفاتوکسین ها در آبزیان

بر طبق تعریف ارائه شده توسط میلر (۱۹۹۵) آفاتوکسین ها از سا لیان بسیار دور شناخته شده و در کتاب old Testament از آنها یاد شده است. علیرغم این موضوع تا حال حاضر هنوز مسائل مبهم و حل نشده ای در ارتباط با آنان وجود دارد. آفاتوکسین ها از جمله قوی ترین 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 آبی پروری از جمله: پنبه‌دانه، بادام زمینی، ذرت، لویای 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 آفاتو کسینکوزیس در سیستم‌های پرورشی گردیده است. به همین دلیل مسئله آلودگی با آفاتو کسین‌ها در آبی پروری از اهمیت بیشتری برخوردار گردیده است (Tacon et al. 1995, Fegan 2005; Spring 2005).

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

این موضوع علی‌الخصوص در کشورهایی با آب و هوای 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 و تولید توکسین محسوب می‌گردند (Murjani, 2003).

بسیاری از مطالعات اپیدمیولوژیکی بیانگر این مطلب است که حضور آفاتو کسین در غذا علاوه بر صدماتی که به آبزیان پرورشی می‌رساند، می‌تواند جهت سلامت حیوانات پرورشی خاکزی نیز خطرناک باشد. بافت‌های حیوانی قادر به نگهداری آفاتو کسین‌ها 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 آفاتو کسین‌ها پی برد، بررسی آفاتو کسینکوزیس در ماهیان آب شیرین بخصوص قزل‌آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) مورد مطالعه قرار گرفت. (Halver 1969; Lovell 1989, Hendricks 1994; Challagher and Eaton 1995)

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

تیلاپای 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 affinis*)، (Mc.Kean et al. 2006)

ماهی گوپی (*Lebistes reticulates*) (ساتو و همکاران ۱۹۷۳) و در تعدادی از میگوها از جمله میگوهای موندون

(*Penaeus monodon*) میگوی آبی (*Penaeus stylirostris*) میگوی وانمی

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

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 اکنون جمع‌بندی اختصاصی در مورد اثرات آفلاتوکسین با تأکید بر آبریان 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 (*Penicillium*) 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 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 ویژه‌ای 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 متابولیکی 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.

طبقه بندی افلاتوکسین ها

آفلاتوکسین ها ترکیباتی سمی هستند که توسط چهار گونه از قارچها تولید می شوند. تمامی این گونه ها به جنس آسپرژیلوس تعلق دارند. تولید اولیه این سموم توسط سویه های خاصی از آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس بوده و ندرتاً توسط گونه های آسپرژیلوس نومیوس (*A. namius*) و آسپرژیلوس نیجر (*A. niger*) نیز تولید می گردند. (Eaton & Groopman 1994)

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

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

بواسطه ساختار شیمیایی چند حلقه ای آفلاتوکسین های B و G این ترکیبات در زمانیکه در مجاورت اشعه ماوراء بنفش (UV) قرار بگیرند از خود خاصیت فلورسانس بروز می دهند. تمایز آفلاتوکسین های G و B از طریق رنگ فلورسانس ناشی از تابش پرتو فرابنفش به آنان امکان پذیر می گردد. آفلاتوکسین های B_1 و B_2 به رنگ آبی و آفلاتوکسین G_1 و G_2 به رنگ زرد مایل به سبز در می آیند. (Sargeant et al. 1963, Roc 1992).

جداسازی اولیه آفلاتوکسین ها 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 بوقلمون ها 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 می توانست 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 می باشد (Sargeant et al 1963).

ویژگی شیمیایی آفلاتوکسین های B_2 و G_2 به عنوان مشتقات دی هیدروکسی آفلاتوکسین های B_1 و G_1 متعاقباً مورد شناسایی قرار گرفت. ساختمان شیمیایی آنها شامل یک حلقه بی فوران 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).

۶-۲-۱- آفلاتوکسیوزیس در حیوانات پرورشی

آفلاتوکسین‌ها و محصولات ناشی از متابولیسم آنها در حیوانات به عنوان ترکیبات سرطان‌زای با منشأ 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 میشود. 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 آبی‌گری 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). پاره‌ای 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:

$AFB_1 < Aflatoxicol (AFL) < AFG_1 < AFM_1 < H_1 - AFL < AFQ_1 < AFB_2 < AFP_1 < AFG_2 < AFB_{2k} < AFG_{2k}$ - (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 منشأ 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).

۷-۲-۱- نقش آفلاتوکسین‌ها در آبرزی پروری

حضور آفلاتوکسین‌ها در آبریان پرورشی و نقش آنان در این رابطه هنوز به درستی ارزیابی نشده است. گزارش‌های بسیار اندکی در ارتباط با آبریان 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 آبریان 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 کارسینوماهای 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 تیلاپایا پرورشی در فیلیپین را که از طریق تغذیه با غذاهای کپک‌زده اتفاق افتاده بود گزارش کردند.

۸-۲-۱- منابع آلوده کننده غذاهای مصرفی آفلاتوکسین ها در آبزیان پرورشی

محصولات شیلاتی بعنوان یک منبع مهم تأمین غذا برای انسان و مصارف حیوانی مطرح هستند. افزایش این تقاضا منجر به رشد سریع در آبی پروری گردیده است (Myhr & Dalmo 2005). در طی دهه گذشته تولید محصولات آبی پروری به شکل قابل ملاحظه‌ای در آمریکا، اروپا و آسیا افزایش یافته است (EC 2001, FAO 2002).

بواسطه تقاضای سیستم‌های پرورشی آبزیان به غذا و محدودیت‌های موجود در استفاده از ضایعات صیادی برای تغذیه ماهیان پرورشی، استفاده از غذاهای صنعتی به شکل اساسی در آبی پروری گسترش یافته است (Nylor et al. 2000). گونه‌های اصلی پرورشی در کشورهای اروپایی ماهی آزاد آتلانتیک، قزل‌آلای رنگین کمان، باس دریایی، سیم دریایی (*Sparus aurata*) توبورت، مار ماهی و کپور معمولی می‌باشند (EC 2001). این گونه‌ها عمدتاً در محیط طبیعی گوشتخوار بوده و در 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 Executive Report 2002).

اغلب پودرهای ماهی از ماهی کامل تهیه می‌گردند از جمله این ماهیان می‌تواند به ماهیان آنچوی و کاپلین و یا محصولات فرعی و ضایعات ماهی منهدن، هرینگ و آزاد 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 & Adebajo 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 قزل‌آلای رنگین‌کمان اگر با جیره غذایی حاوی ۱۰۰۰ - ۵۰۰ ppb ($1 \text{ mg/kg} - 0.5$) تغذیه شوند سریع‌آمی‌میرند. 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 هیاتو پانکراس ایجاد گردید و علاوه بر آن میزان حساسیت آنان در مقابل عوامل عفونی بیماری‌زا افزایش یافت. آزمایشهای هیستوپاتولوژیک منجر به مشاهده ضایعاتی در هیاتوپانکراس، 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 پاسیفیک (P. vannemei) به مسمومیت با آفلاتوکسین؛ نسبت به سایر سخت‌پوستان و ماهیان استخوانی تحت مطالعه کمتر می‌باشد.

LD_{50} ۲۴ ساعته سم در میگوهای خانواده پنائیده نسبت به این شاخص در گربه ماهی روگامی که یکی از مقاومترین مهره‌داران آبی در این رابطه می‌باشد، به شکل قابل ملاحظه‌ای بالاتر است. (۱۶ میلی‌گرم 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).

۹-۲-۱- 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 رایج ترین ترکیبات مستعد کننده ایجاد سرطان می باشد و جهت فعال شدن بیولوژیک بایستی به شکل ترکیب واسط AFBO در آید. (Eaton & Gallagher 1994, Roebeuck & Maxuitenko 1994)

جدول ۲ - مقایسه مسمومیت حاد با آفلاتوکسین B₁ در گونه های مختلف آبزیان

منبع	LD50 mg AFB/kg	گونه آبی	گروه
Lovell , 1989	۰/۵	قزل آلای رنگین کمان (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	مهره داران آبی
Bauer <i>et al.</i> 1969	۰/۸۱ i.p.		
Tuan 2002	۱۰۰	تیلاپیا نیل (<i>Oreochromis niloticus</i>)	
Jantrarotai <i>et al.</i> 1990 b	۱۰ - ۱۵ i.p	گره ماهی (<i>Ictalurus punctatus</i>)	
Schoental 1967	۱۰	ماهی آزاد (<i>Onconhynchus kisutch</i>)	
Sahoo <i>et al.</i> 2003	۱۲ - ۱۳/۳ i.p	ماهی رو هو (<i>Labeo rohita</i>)	
Mc Kean <i>et al.</i> 2006	۰/۶۸۱	گامبوزیا (<i>Gambusia affinis</i>)	
Reiss, 1972a	۱۴/۰ *	آرتمیا (<i>Artemia salina</i>)	
		میگوهای خانواده پنائیده:	بی مهرگان آبی
Wiseman <i>et al.</i> 1982	۱۰۰/۵ i.p	میگوی آبی (<i>P. stylirostris</i>)	
Wiseman <i>et al.</i> 1982	۵۰ - ۳۰۰ d	میگوی سفید (<i>P. vannamei</i>)	
Reiss, 1972 b	۱/۰ *	سیکلوپس (<i>Cyclops fuscus</i>)	

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

i.p. تزریق داخل صفاقی

d: تجویز از طریق جیره غذایی

تحقیق انجام شده توسط Farabi و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مورد مسمومیت ایجاد شده توسط AFB₁ در فیل ماهی های جوان بیانگر وقوع ۸/۶ درصد مرگ و میر پس از ۱۵ روز تغذیه با جیره های آلوده می باشد. به علاوه بعد از ۴۰ روز ماهیان تحت آزمایش ۷ درصد کاهش وزن داشته اند. از جمله علائم کلینیکی مشاهده شده در این تحقیق ، خونریزی در ناحیه سر، پلاک های استخوانی ردیف شکمی، ایجاد خمیدگی در ستون فقرات و همچنین ظهور نقاط زرد رنگ در ناحیه سینه ای بوده است. کاهش مرگ و میر و قطع آن پس از گذشت ۱۷ روز از تغذیه ماهیان با جیره های 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 نستین بار توسط شادروان دکتر یوسف پور در سال ۱۳۶۹ با موفقیت به انجام رسید (یوسف پور، ۱۳۷۳). بر اساس تجربیات پرورش گونه فیل ماهی میزان غذادهی بر اساس وزن توده زنده تا ۳ درصد بیومس مقرون به صرفه است (کاکوزا، ۱۳۸۰)

در تجربیات حاصل از مطالعه تعیین بهترین درصد غذادهی در پرورش فیل ماهی در مخازن فایبرگلاس در دمای ۲۶ تا ۲۷/۵ درجه سانتی گراد 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 AFB₁ در آزاد ماهیانی از جمله قزل آلاهی رنگین-کمان و ماهی آزاد کوهو و همچنین ماهی گورخری (Zebra fish) و گربه ماهی روگاهی همت گماشته‌اند. اگر آفلاتوکسین B₁ از طریق جیره غذایی به حیوانات خورنده 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 AFB₁ در پلاسما پس از خوراندن AFB₁ نشان دار شده با C¹⁴ و در گربه ماهی روگاهی پس از ۴ ساعت مشاهده گردیده و تقریباً ۹۵ درصد آن با لیپوپروتئینهای پلاسما باند می‌شود. پس از اتصال آن با لیپوپروتئینهای پلاسما از طریق سیستم باب به کبد انتقال یافته و در هیپاتوسیت‌ها به دام می‌افتد.

در قزل آلاهی رنگین کمان به مانند موش محل ترجیحی تجمع و دفع AFB₁ و متابولیت‌های آن سیستم کبدی - صفراوی می‌باشد (Valsta *et al.* 1988 ; Wogan & Newberne 1967)

همچنین سیستمهای صفراوی و ادراری به عنوان سیستم‌های اصلی دفعی در قزل آلا و گربه‌ماهی محسوب میگردند (Plakas *et al.* 1991).

۱۰-۲-۱- گونه‌های حساس

صاحب نظران بسیاری اظهار نظر نموده‌اند که تفاوت‌های بسیاری در حساسیت به AFB₁ 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، قزل آلاهی رنگین کمان گونه‌ای بسیار حساس و ماهی آزاد کوهو گونه‌ای 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 آزاد ماهیان ناشی از پایین بودن راندمان متابولیسم AFB₁ به AFBO در ماهی آزاد کوهو نسبت به قزل آلاهی رنگین کمان می‌باشد. به طور کلی، حساسیت موجود به مسمومیت با AFB₁ در ماهیان، مانند پستانداران، ناشی از الگوهای متفاوت آنزیمی

مداخله گر در متابولیسم این ترکیب می باشد. چنین تفاوت هایی ممکن است به اختلافات ژنتیکی، قابلیت فعالیت آنزیم ها و همچنین میزان هماهنگی و تنظیم واکنش ها در مرحله اول و دوم فعال سازی و سم زدایی AFB₁ نسبت داده شود (Bailey et al. 1988).

مطالعات انجام شده بر روی شاخص اتصال DNA - AFB₁ به شکل مشخصی موید این مطلب است که این اتصال در قزل آلاهی رنگین کمان نسبت به ماهی آزاد کوهو بیشتر می باشد. این موضوع در طرق مختلف مصرف و تجویز آفلاتوکسین B₁ مورد آزمون قرار گرفت و نتایج آن نشان می دهد 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 - AFB₁ در جنین ۲۰ بار بیشتر از بالغین گزارش شده است. نظر به اینکه کبد به عنوان اولین عضو هدف مطرح می باشد لذا میزان DNA های باند شده با آفلاتوکسین B₁ در این عضو بیش از سایر اعضا گزارش گردیده است. تعیین میزان بقایای DNA - AFB₁ در موجودات زنده تحت مطالعه بیانگر این مطلب است که این ترکیب در آزاد ماهیان پایداری بیشتری نسبت به پستانداران از خود نشان می دهد. این یافته ها دلالت بر این موضوع دارد که شستشوی آنزیمی این ترکیبات در آزاد ماهیان ضعیف بوده و مکانیزم های ترمیم DNA دارای بازده کافی جهت جلوگیری کردن از احتمال ایجاد جهش در DNA نمی باشند.

در ماهی آزاد کوهو و قزل آلاهی رنگین کمان، از نظر قدرت سم زدایی کبد و دفع متابولیت های AFB₁ توسط صفرا تفاوت چندانی به چشم نمی خورد. بنابراین به نظر می رسد که فاز II متابولیسم، و دفع متابولیت ها در این آبزیان شبیه به همدیگر می باشد (Bailey et al. 1988).

از طرف دیگر، تفاوت هایی در این چرخه متابولیکی بین قزل آلاهی رنگین کمان با سایر آبزیان از جمله گربه ماهی روگامی و ماهی گورخری مشاهده می گردد. یک بررسی گسترده توسط Eton و Gallagher در سال ۱۹۹۵ جهت ارزیابی تفاوت ها در متابولیسم کبدی و متابولیسم سیتوزولی AFB₁ در قزل آلاهی رنگین کمان و گربه ماهی روگامی به عمل آمد. این مطالعات نشان داد که وجه مشخصه چرخه متابولیسم AFB₁ در قزل آلاهی رنگین کمان راندمان بالای فعالیت اپوکسیداسیون میکروزومی با واسطه CYP می باشد که منجر به تولید متابولیت های ناشی از هیدروکسیلاسیون از جمله: AFQ₁ یا AFP₁ نگر دیده و فقط AFM₁ را تولید می کند (Yang et al. 2000).

تولید AFBO میکروزومی تحت تأثیر غلظت های پائین (۱۶ μm) در آلودگی های طبیعی و همچنین غلظت های بالای AFB₁ (۱۲۸ μm) توأمأ به چشم می خورد. Eaton & Gallagher (۱۹۹۵) دریافتند که تولید AFBO در قزل-آلاهی رنگین کمان منجر به افزایش فعالیت های اکسیداتیو به میزان ۶ برابر بیشتر از گربه ماهی روگامی می گردد. همچنین گزارشات قبلی مبنی بر میزان بالای احیاء کننده های AFB₁ از جمله فعالیت AFL₁ دی هیدروژناز در قزل آلاهی رنگین کمان و سایر گونه های حساس مبین این مطلب است که رابطه تعادلی بین AFL₁ - AFB₁ به سمت تولید AFL₁ تمایل پیدا می کند (Salhab & Edwards 1977, Eaton & Gallagher 1994).

۱-۲-۱۱ - مسمومیت‌های ژنتیکی (Genotoxicity)

آفاتوکسین‌ها بر اساس گزارش‌های IARC، از جمله مهمترین ترکیبات Genotoxic شناخته شده می‌باشند (IARC) (1993) (International Agency for Research on Cancer). اتصال AFB₁ به DNA در پستانداران منجر به ایجاد ضایعاتی از قبیل اختلالات کروموزومی، ایجاد هستک، تغییر در کروماتیدهای خواهر، سنتز ناخواسته DNA و شکست رشته‌های کروموزومی می‌گردد (IARC, 1993). جهت ایجاد تأثیرات ژنتیکی، AFB₁ نیازمند تبدیل شدن به یک ترکیب بیولوژیکی فعال الکتروفیل به نام epoxide 9 و 8 - AFB₁ می‌باشد. انجام واکنش اپوکسیداسیون در حلقه انتهایی فوران در AFB₁ منجر به افزایش تولید مخلوطی در ایزومرهای اپوکسیدی بنامهای epoxide 9 و 8 - AFB₁ - endo و epoxide 9 و 8 - AFB₁ - exo می‌گردد محصول اصلی که می‌تواند در ایجاد و اختلالات ژنتیکی و سلولی موثرتر باشد ترکیب exo epoxide است (Raney et al. 1993).

۱-۲-۱۲ - سرطان‌زایی (Carcinogenicity)

AFB₁ 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 سرطان‌زایی است (Wogan 1992; Dragan & Pitot 1993). بواسطه حساسیت بالای قزل‌آلای رنگین کمان به مسمومیت با آفاتوکسین، این گونه در طی ۴۰ سال گذشته به عنوان یک مدل جهت مطالعه سرطان‌های کبدی ناشی از مصرف آفاتوکسین B₁ در انسان و ماهیان بکار گرفته شده است. در طی این مدت بسیاری از مطالعات مویید وجود شباهت‌های زیادی در مکانیزم‌های سرطان‌زایی بین پستانداران و قزل‌آلای رنگین کمان بوده است (Bailey et al. 2005; Tilton et al. 1987). سرطان‌زایی آفاتوکسین در قزل‌آلای رنگین کمان اولین بار در اوایل دهه ۱۹۶۰ گزارش گردید (Sinnhaber et al. 1968). در این گونه آفاتوکسین خوراکی با غلظت ۱۰۰ برابر کمتر از LD₅₀ قادر به ایجاد تومورهای کبدی در ۶۰ درصد افراد تغذیه شده می‌باشد، سرطان کبدی نیز از طریق مصرف ۲۰ ppb آفاتوکسین فقط برای مدت ۱ روز قابل‌القاء است (Sinnhuber et al 1977; Bailey et al. 1988). متقابلاً در گربه ماهی روگامی تغذیه شده با بیش از ۱۰/۰۰۰ ppb آفاتوکسین B₁ 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 رنگین کمان در ابتلا به سرطان کبدی ناشی از AFB₁ بسیار بیشتر از گربه ماهی کانالی می‌باشد (Baily et al 1988).

۱-۲-۱۳ - آفاتوکسین‌ها و بهداشت عمومی

آفاتوکسین‌ها 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 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 آلاینده 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 در آفریقای غربی بیانگر کاهش معنی‌داری بین کاهش میزان شنوایی در نوزادانی که در دوران جنینی در معرض مسمومیت با آفلاتوکسین بوده‌اند، مشاهده می‌گردد (Gong et al 2002).

علاوه بر آن، قابلیت آفلاتوکسین‌ها در انتقال از طریق 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 گزارش‌های ارائه شده از مسمومیت‌های حاد، معمولاً مرگ و میر در 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).

۱-۳- مواد و روش کار

۱-۳-۱- آماده سازی کارگاه و ذخیره سازی ماهیان

تعداد ۵۰۰ عدد فیل ماهی (*Huso huso*) با وزن متوسط 10 ± 120 gr 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 و تیمارهای آزمایشی در انستیتو بین 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 در هر تانک در ۱۵ تانک ۵۰۰ لیتری ذخیره‌سازی گردیدند. میانگین وزنی ماهیان ذخیره‌سازی شده 10 ± 120 gr بود. تأمین آب تانک‌ها از طریق آب چاه با درجه حرارت 18 ± 2 °C 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 $7/3$ ppm تنظیم و تأمین گردید.

۱-۳-۲- 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 B₁ در غلظت‌های مورد نظر به جیره‌های آزمایشی به شرح ذیل اقدام گردید: از افلاتوکسین B₁ خالص با علامت تجاری SIGMA برای تأمین افلاتوکسین مورد نظر در جیره‌ها استفاده شد. جهت افزودن AFB₁ به جیره‌های آزمایشی، ابتدا محتوای ویال AFB₁ در ۱ ml متانول خالص (۹۷٪) حل و سپس حجم محلول تدریجاً تا ۵۰۰ ml افزایش یافت. با توجه به غلظت‌های مورد نظر AFB₁ در جیره‌های آزمایشی (۱۰۰ ppb و ۷۵ ppb و ۵۰ ppb و ۲۵ ppb)، مقادیر لازم از محلول AFB₁ در متانول جهت افزودن به هر جیره تهیه گردید (تصویر ۲).



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

در مرحله بعد اجزای اولیه تشکیل دهنده جیره های 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 میلی متر عبور داده شد. (تصویر ۳)



تصویر ۳: مراحل افزودن سم و آماده سازی جیره های آزمایشی

پلت های حاصل در مرحله بعد به خشک کن منتقل و رطوبت آنان به حدود ۱۰ درصد رسید. غذاهای پلت آماده سپس در داخل کیسه های کاغذی بسته بندی و پس از ثبت مشخصات بر روی هر کیسه در حرارت $15^{\circ}C$ تا زمان مصرف ذخیره سازی گردید. جهت حصول اطمینان از وجود AFB_1 به مقادیر پیش بینی شده در جیره های آزمایشی، از جیره های تهیه شده، نمونه برداری و جهت تعیین میزان AFB_1 به آزمایشگاه تحقیقاتی علوم حیاتی فاروق ارسال گردید.

در آزمایشگاه مذکور میزان AFB₁ 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

۳-۳-۱- غذادهی و نمونه برداری

غذادهی بر مبنای ۳ درصد وزن توده زنده و در 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 و خارج 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 کالبد گشایی، ماهیانه از هر تیمار سه نمونه (از هر تکرار یک نمونه) به شکل تصادفی نمونه برداری گردید (تصویر ۶). تهیه نمونههای پاتولوژی نیز به صورت ماهیانه انجام پذیرفت. قبل از نمونه برداری تمامی ماهیها توسط اسانس گل میخک بیهوش گردیده (تصویر ۵) و به منظور انجام ارزیابیهای مورد نظر به شکل تصادفی از هر تیمار ۳ نمونه اخذ گردید.



تصویر ۴: تجهیزات بیومتری



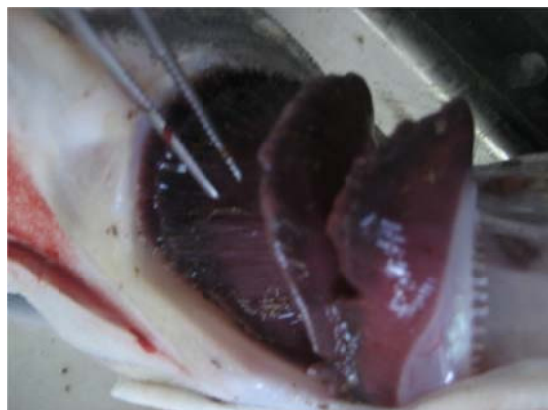
تصویر ۵: بیهوش سازی ماهی ها توسط عصاره گل میخک

(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 ۶: بررسی علایم ظاهری و ایجاد 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 آزمایشی

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 آنها از روش اتوزین - هماتوکسیلین استفاده شد.

۴-۳-۱- 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 از سیاهرگ 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 (Compleat blood cell) .

RBC با پیت منازور، ماده رقیق کننده ریس با رقت ۱/۲۰۰، تعداد RBC در ۵ خانه از ۲۵ خانه مرکزی لام ثوبار شمارش و در عدد ۱۰۰۰۰ ضرب گردید.

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

Hct یا PCV با پیت 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 اسپکتروفوتومتر و طول موج ۵۴۰nm بر حسب gr/dl.

Diff 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

۵-۳-۱- بررسی باقیمانده های بافتی

جهت بررسی احتمالی تجمع AFB₁ در عضلات، در هر نوبت نمونه برداری از هر تیمار، پس از جدا نمودن کامل امعاء و احشاء ۳ عدد ماهی و شستشو با آب تا مرحله ارزیابی باقیمانده های بافتی AFB₁ در فریزر ۱۸ °C - نگهداری گردید. جهت تعیین میزان باقیمانده های بافتی از روش HPLC استفاده شد.

۶-۳-۱- ارزیابی شاخص های رشد

جهت ارزیابی شاخص های مورد نظر رشد، علاوه بر اندازه گیری 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:

$$SGR = \frac{L_n W_t - L_n W_o}{t} \times 100$$

$L_n W_t$ = لگاریتم نپیرین وزن نهایی

$L_n W_{to}$ = لگاریتم نپیرین وزن اولیه

t = طول مدت پرورش

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

Food = میزان غذای مصرفی

W_t = وزن نهایی

W_o = وزن اولیه

(Ronyal & Peter, 1990)

۷-۳-۱- روش های آماری

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

۴-۱- نتایج

۴-۱-۱- جراحات پوستی

در اولین نوبت نمونه برداری که یک ماه پس از تغذیه تیمارهای آزمایشی با دوزهای مختلف AFB₁ انجام 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 نمونه برداری 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 ۷۵ppb و ۱۰۰ppb نقاط خون‌ریزی در ناحیه سر در قسمت سرپوش برانشی در برخی از نمونه‌ها دیده شد.

در آخرین نمونه برداری، 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 خون‌ریزی 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 و جانبی مشاهده شد. در تصاویر شماره ۱ الی ۱۲ 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 شماره ۳ : ضایعات و جراحات پوستی مشاهده شده در فیل ماهی پرورشی تغذیه شده با دزهای مختلف AFB₁ در طی مدت ۳ ماه و در درجه حرارت C 2 ± 18 .

نوبت نمونه بوداری تیمارها ▼	ماه اول (روز ۳۰)	ماه دوم (روز ۶۰)	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 دم
تیمار ۲ (۵۰ ppb)	پرخونی در رأس پلاکهای ردیف شکمی و جانبی	پرخونی در رأس پلاک‌های ردیف شکمی و جانبی، خونریزی و جراحات پوستی در ناحیه شکمی و پشتی، پرخونی در پایه باله‌های سینه‌ای و ساقه دمی	خونریزی در پایه باله‌های شکمی، سینه‌ای و دم، بروز جراحات در اطراف مقعد، زخم و جراحات در ناحیه سرپوش برانشی و سر.
تیمار ۳ (۷۵ ppb)	پرخونی در رأس پلاک‌های ردیف شکمی و جانبی	خونریزی در پلاک‌های ردیف شکمی و پشتی، زخمهای پیشرفته در نواحی شکمی، جانبی و ساقه دم، خون- ریزیهای نقطه‌ای در ناحیه سر و سرپوش برانشی	خوردگی باله‌های سینه‌ای و دم و توسعه جراحات در ناحیه تنه و ساقه دم، بروز جراحات و خوردگی باله در باله پشتی، توسعه جراحات و بروز زخم در ناحیه سر به همراه ترشحات زرد رنگ در زخمها، مشاهده لکه- های سفید در حد فاصل پلاکها در سطح جانبی
تیمار ۴ (۱۰۰ ppb)	پرخونی در رأس پلاک‌های ردیف شکمی و جانبی - خونریزیهای 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 دم و پرخونی در پایه باله‌های سینه‌ای و دم	توسعه جراحات در سطوح شکمی، جانبی، ساقه دم و پشتی، مشاهده خوردگی در باله‌های پشتی دم و سینه‌ای، توسعه جراحات در زخم‌ها در ناحیه سر و سرپوش برانشی، بروز حاشیه‌ها و ترشحات زرد رنگ به همراه خونریزی در تمامی جراحات

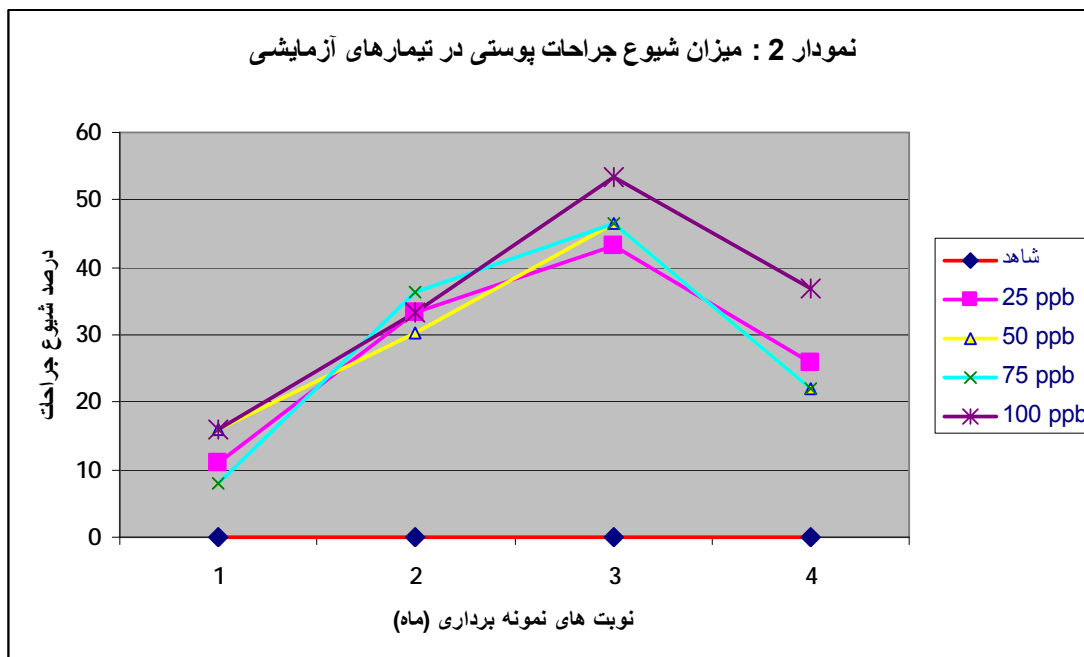
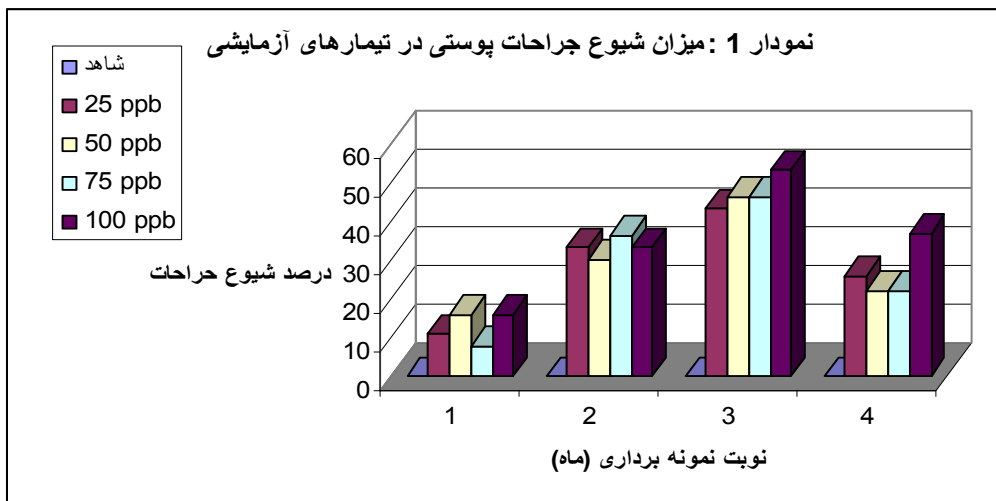
در بررسی کمی بروز علائم و جراحات پوستی از نظر تعداد ماهیانی که در تیمارهای مختلف با درجات متفاوتی ضایعات مذکور در آنان مشاهده گردید،

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 نمونه برداری تا ۳/۵۳ درصد در آخرین نمونه برداری افزایش داشته است. این افزایش به همراه توسعه و پیشرفت جراحات مشاهده شده در نوبت‌های مختلف نمونه برداری موضوعی نگران کننده از نظر بازار پسندهی فیل ماهی است که به آن پرداخته خواهد شد.

جدول ۴: درصد شیوع زخم‌های جلدی در اثر دوزهای مختلف افلاتوکسین ب ۱ در تیمارهای 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 AFB₁ 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 ۱۶ الی ۲۴٪ در ماهیان تحت مطالعه مشاهده گردید. روند مذکور در نمودارهای شماره ۲ و ۱ نشان داده شده است.



تصاویر:



تصویر ۸: نمونه شاهد در نوبت اول نمونه برداری؛ هیچگونه ضایعات پوستی در تیمارهای آزمایشی مشاهده نمی شود.



تصویر ۹: پر خونی در راس پلاکهای ردیف شکمی و جانبی در تیمار ۲ در نوبت اول نمونه برداری



تصویر ۱۰: بروز جراحات خفیف در قسمت شکمی باله دمی در تیمار ۲؛ نوبت دوم



تصویر ۱۱: خونریزی و ایجاد زخم در سطوح شکمی؛ جانبی و ساقه دم و توسعه جراحات در باله های سینه ای؛ شکمی؛ پشتی و دم (تیمار ۳؛ ماه دوم)



تصویر ۱۲: توسعه جراحات و ایجاد زخم در باله دم (تیمار ۴؛ ماه دوم)



تصویر ۱۳: خونریزی های نقطه ای در ناحیه سر و سرپوش برانشی (تیمار ۳؛ ماه دوم)



تصویر ۱۴: توسعه جراحات در پلاکهای ردیف پشتی (تیمار ۱؛ ماه سوم)



تصویر ۱۵: توسعه جراحات و ایجاد زخم در ناحیه سر و سرپوش برانشی (تیمار ۳؛ ماه سوم)



تصویر ۱۶: توسعه جراحات در تمامی قسمت های بدن به همراه خوردگی درباله ها؛
ترشحات زرد و خونریزی (تیمار ۴؛ ماه سوم)



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



تصویر ۱۸: زخمهای پیشرفته به همراه ترشحات زرد رنگ در ناحیه تنه



تصویر ۱۹: زخمهای پیشرفته به همراه ترشحات زرد رنگ در زیر سرپوش برانسی

۲-۴-۱- مشاهدات کالبد گشایی

به منظور بررسی اثرات دزهای مختلف AFB₁ 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 AFB₁ 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.

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 و ۱۰۰ ppb) پریده رنگ و کم خون به نظر می‌رسیدند.

کبد:

در نوبت اول نمونه‌برداری کبد نسبتاً پرخون به همراه اتساع نسبی کیسه صفرا و کم 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 می‌خورد. 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 طور کلی 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.

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 AFB₁ افزایش نشان داد به طوری که در برخی از تیمارها (۲ و ۳) تورم و پرخونی ناشی از مسمومیت منجر به ایجاد ضایعات و بعضاً از هم گسیختگی پريتونوم 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 پری تونیوم پوشاننده کلیه‌ها به چشم می‌خورد. در یکی از نمونه‌های تیمار ۳ (۷۵ppb) بروز رنگ پریدگی و تحلیل بافت کلیه مشاهده گردید.

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 رگه‌های سفید رنگ به همراه کم خونی مشخص در تیمار ۳، در طحال نمایان بود.

سایر اعضا:

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 و ۴ در نوبت دوم نمونه‌برداری و در تیمارهای ۲ و ۳ و ۴ در نوبت سوم نمونه‌برداری به شکل مشخص مشاهده گردید.

جدول ۵: مشاهدات کالبد گشایی ناشی از مصرف دزهای مختلف AFB₁ در فیل ماهی پرورشی طی ۳ ماه و در درجه حرارت ۱۸±۲°C.

زمان ▲ تیمار ▼	ماه اول (روز ۳۰)	ماه دوم (روز ۶۰)	ماه سوم (روز ۹۰)
تیمار ۱ (۲۵ ppb)	- آبخش‌ها تقریباً طبیعی - کبد کمی پرخون، کیسه صفرا متسع رنگ صفرا نسبتاً طبیعی - طحال در رنگ و اندازه طبیعی - کلیه‌ها متورم و کمی پرخون	- آبخش‌ها تقریباً طبیعی - 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 - کلیه‌ها متورم و پرخون به همراه ندول‌های سفید رنگ در کلیه خلفی	- آبخش‌ها نسبتاً طبیعی - کبد چرب و کم رنگ، کیسه صفرا حاوی صفرای بی‌رنگ - کلیه‌ها متورم به همراه ندول‌های سفید و رسوبات سفید رنگ براق در زیر پری تونیوم روی کلیه‌ها. - طحال نسبتاً کوچک به همراه رگه‌های سفید رنگ
تیمار ۲ (۵۰ ppb)	- پرخونی نسبی در آبخش‌ها - کبد کم رنگ، کیسه صفرا متسع - طحال در اندازه و رنگ طبیعی - کلیه‌ها متورم و پرخون - پرخونی عروق مزانتر و کیسه شنا	- پرخونی در آبخش‌ها - کبد چرب و کم رنگ، اتساع کیسه صفرا حاوی صفرای کم رنگ، تغییرات بافتی منظم لانه زنبوری شکل در قسمت شکمی کبد - طحال در اندازه طبیعی و کم رنگ - کلیه‌ها متورم به همراه ندول‌های سفید رنگ - خون‌ریزی‌های نقطه‌ای در دیواره داخلی عضلات شکم	- آبخش‌ها به رنگ طبیعی - 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 - تورم و پرخونی در کلیه‌ها به همراه ندول‌های سفید - لکه‌های سفید رنگ و عدم یکنواختی رنگ در بافت قلب
تیمار ۳ (۷۵ ppb)	- پرخونی در آبخش‌ها - کبد کم رنگ، کیسه صفرا متسع حاوی صفرای کم رنگ. - طحال در رنگ و اندازه طبیعی - کلیه‌ها متورم و پرخون به همراه ندول‌های سفید رنگ در کلیه خلفی - پرخونی در عروق مزانتر و عروق کیسه شنا	- پرخونی در آبخش‌ها - کبد چرب و کم رنگ، کیسه صفرا متسع حاوی صفرای بی‌رنگ، تغییرات ظاهری منظم لانه زنبوری شکل در بخش شکمی کبد، - طحال در اندازه طبیعی و کم رنگ - کلیه‌ها متورم و پرخون به همراه ندول‌های سفید رنگ در بخش خلفی - لکه‌های سفید رنگ بر روی قلب	- آبخش‌ها نسبتاً طبیعی و رنگ پریده - کبد کم رنگ، کیسه صفرا متسع به همراه تغییرات منظم لانه زنبوری در بخش شکمی کبد، بروز رنگ سبز لجنی در بخش‌هایی از کبد - طحال در اندازه طبیعی به همراه رگه‌های سفید رنگ - کم خونی به همراه تحلیل رفتن بافت کلیه‌ها - رنگدانه‌های سیاه در عضلات قلب

ادامه جدول ۵:

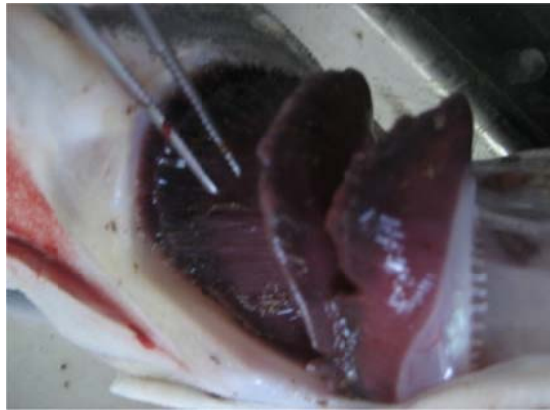
زمان ◀ تیمار ▼	ماه اول (روز ۳۰)	ماه دوم (روز ۶۰)	ماه سوم (روز ۹۰)
تیمار ۴ (۱۰۰ppb)	<p>- پرخونی در آبشش‌ها</p> <p>- پرخونی در کبد</p> <p>- بزرگ بودن نسبی طحال با رنگ طبیعی</p> <p>- کلیه‌ها متورم به همراه ندول‌های سفید در بخش خلفی</p> <p>- پرخونی در عروق مرانتر و عروق کیسه شنا</p> <p>- خون‌ریزی‌های نقطه‌ای در عضلات دیواره داخلی شکم</p>	<p>- پرخونی در آبشش‌ها</p> <p>- کبد چرب و رنگ پریده با قوام سست اتساع کیسه صفرا به همراه صفرای بی‌رنگ، بروز رنگ سبز لجنی در برخی از قسمت‌های کبد</p> <p>- طحال نسبتاً کوچک به همراه رگ‌های سفید رنگ در بافت آن</p> <p>- تورم و پرخونی در کلیه‌ها</p>	<p>کم خونی در آبشش‌ها</p> <p>- کبد چرب و پرخونی در برخی از قسمت‌ها، کیسه صفرا متسع حاوی صفرای بی‌رنگ</p> <p>- طحال به رنگ تقریباً طبیعی به همراه رگ‌های سفید رنگ</p> <p>- کلیه‌ها متورم به همراه ندول‌های سفید رنگ در بخش خلفی</p> <p>- لکه‌های سفید رنگ به همراه عدم یکنواختی رنگ ، بافت قلب</p>

تصاویر

آبشش ها :



تصویر ۲۰: آبشش بارنگ طبیعی در نمونه های شاهد



تصویر ۲۱: پرخونی در آبشش ها به همراه افزایش ترشحات مخاطی



تصویر ۲۲: کم خونی در آبشش هادر تیمار ۴، ماه سوم

کبد :



تصویر ۲۳: کبد با رنگ و قوام طبیعی در نمونه های شاهد



تصویر ۲۴: کبد پر خون کیسه صفرا متسع، رنگ صفرا تقریباً 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 در بخش شکمی (تیمار ۳، ماه دوم)



تصویر ۲۶: 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 ۴، ماه دوم)



تصویر ۲۸: مقایسه تیمار شاهد با تیمار تغذیه شده با افلاتوکسین ب ۱. به تفاوت های مشخص رنگ و قوام بافت کبد و کیسه صفرا توجه گردد.

کلیه ها :



تصویر ۲۹: بافت طبیعی کلیه در تیمارهای شاهد



تصویر ۳۰: کلیه هامتورم و پر خون به همراه ندولهای سفید در کلیه خلفی (تیمار ۳، ماه اول)



تصویر ۳۱: کلیه هامتورم و پر خون به همراه رسوبات سفید در زیر پریتونیم پوشاننده کلیه (تیمار ۱، ماه سوم)



تصویر ۳۲: کلیه هامتورم و پر خون به همراه افزایش ندولهای سفید در کلیه خلفی (تیمار ۳، ماه دوم)



تصویر ۳۳: نمایشی از ندولهای سفید



تصویر ۳۴: تحلیل شدید کلیه ها به همراه کم خونی (تیمار ۳، ماه سوم)

طحال:



تصویر ۳۵: طحال در نمونه های شا هد در رنگ و اندازه طبیعی



تصویر ۳۶: طحال کوچکتر از اندازه طبیعی به همراه رگه های سفید در بافت آن (تیمار ۴، ماه دوم)



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

سایر قسمت ها:



تصویر ۳۸: خونریزی های نقطه ای در دیواره داخلی عضلات شکمی
(تیمار ۴، ماه اول و تیمار ۲، ماه دوم)



تصویر ۳۹: اتساع کیسه شنا و پر خونی در عروق مزانتر ورودی ها



تصویر ۴۰: لوبولاسیون پا نکراس



تصویر ۴۱: عدم یکنواختی در بافت قلب



تصویر ۴۲: لکه های سفید در روی قلب (تیمار ۳، ماه دوم)



تصویر ۴۳: لکه های سفید به همراه ذخیره چربی در بافت قلب



تصویر ۴۴: مشاهده رنگدانه های سیاه در عضلات قلب (تیمار ۳، ماه سوم)

۳-۴-۱- تغییرات بافتی

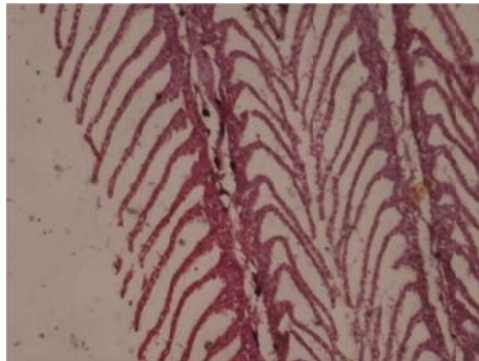
آبشها:

جدول ۶: مشاهدات تغییرات بافتی در آبشش فیل ماهی پرورشی تغذیه شده با مقادیر مختلف افلاتوکسین

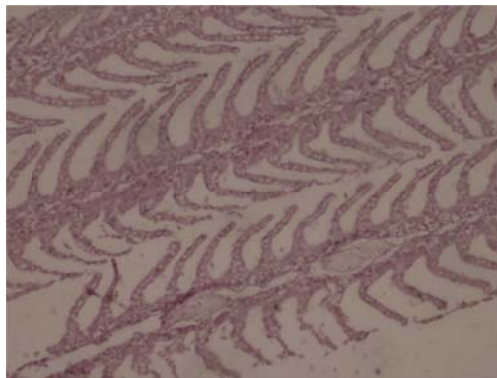
ب ۱ به مدت ۳ ماه در درجه حرارت $20 \pm 18^{\circ}\text{C}$

ماه سوم (روز ۹۰)	ماه دوم (روز ۶۰)	ماه اول (روز ۳۰)	نوبت نمونه برداری ◀ تیمارها ▼
-بافت نسبتاً سالم -هایپرپلازی خفیف سلول های بافت پوششی در پایه لاملاهای ثانویه	-افزایش ترشحات مخاطی -هایپرپلازی خفیف سلول های بافت پوششی در پایه لاملاهای ثانویه	-بافت نسبتاً سالم - عارضه خاصی مشاهده نشد.	تیمار ۱ (۲۵ ppb)
- هایپرپلازی خفیف سلول های بافت پوششی در پایه لاملاهای ثانویه	-پرخونی در لاملاهای ثانویه -تخریب بافت پوششی در لاملاهای ثانویه -هایپرپلازی خفیف سلول های بافت پوششی در پایه لاملاهای ثانویه	-بافت نسبتاً سالم -پرخونی خفیف در لاملاهای ثانویه	تیمار ۲ (۵۰ ppb)
-هایپرپلازی سلول ها در پایه لاملاهای ثانویه -تخریب بافت پوششی در برخی از لاملاهای ثانویه تلائزکتازی خفیف در برخی از لاملاهای ثانویه	-هایپرپلازی لاملاهای ثانویه -تخریب بافت پوششی لاملاهای ثانویه -سلولهای التهابی در پایه لاملاهای اولیه -افزایش ترشحات مخاطی -پرخونی در لاملاهای ثانویه	-بافت نسبتاً سالم -پرخونی در لاملاهای ثانویه	تیمار ۳ (۷۵ppb)
-هایپرپلازی خفیف در پایه لاملاهای ثانویه -تلائزکتازی در برخی از لاملاهای ثانویه -تخریب بافت پوششی در برخی از لاملاهای ثانویه	-هایپرپلازی در پایه لاملاهای ثانویه -تلائزکتازی -تخریب بافت پوششی در لاملاهای ثانویه -خون ریزی در راس لاملاهای ثانویه	- بافت نسبتاً سالم - پرخونی در لاملاهای ثانویه	تیمار ۴ (۱۰۰ ppb)

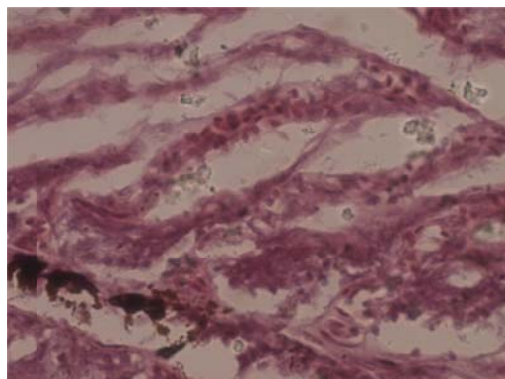
مقاطع هیستوپاتولوژیک آبش:



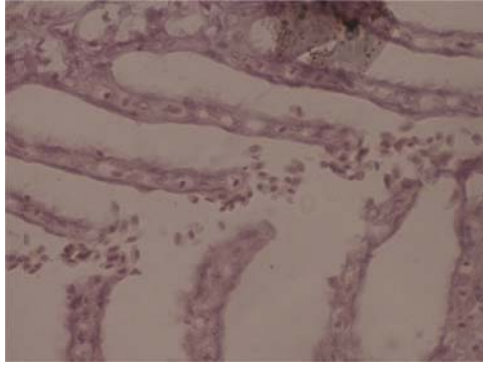
تصویر ۴۵: بافت طبیعی آبش در نمونه های شاهد
(H&E × 10)



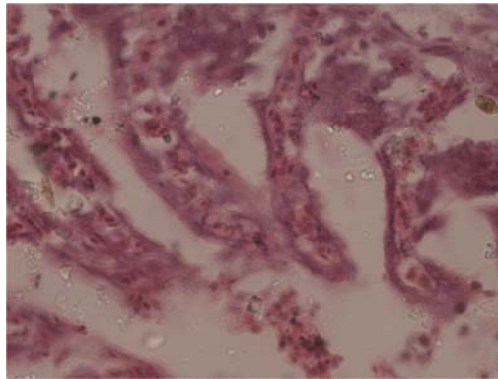
تصویر ۴۶: هایپر پلازی بافت پوششی در پایه لاملاهای ثانویه (تیمار ۲، ماه دوم)
(H&E × 20)



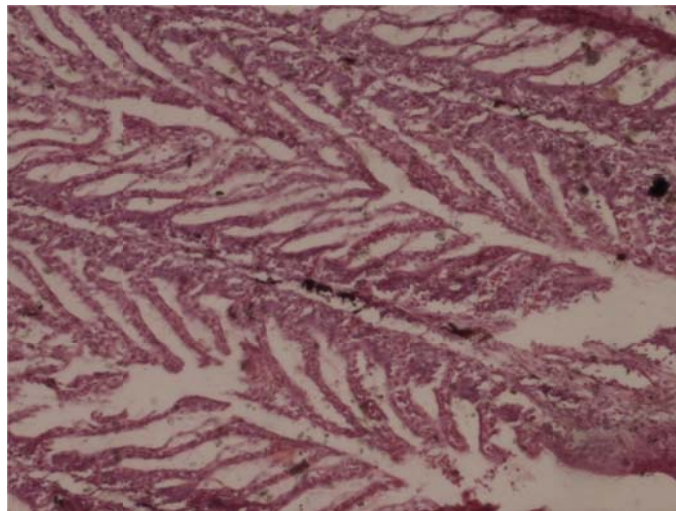
تصویر ۴۷: تخریب بافت پوششی لاملاهای ثانویه به همراه پرخونی و حضور سلولهای التهابی
(H&E × 40) تیمار ۳، ماه دوم



تصویر ۴۸: تخریب بافت پوششی به همراه پرخونی و خونریزی در لاملاهای ثانویه
(H&E × 40) بیمار ۴، ماه دوم



تصویر ۴۹: تالانژکتازی، تخریب بافت پوششی به همراه پرخونی و خونریزی در لاملاهای ثانویه
(H&E × 40) بیمار ۳، ماه دوم



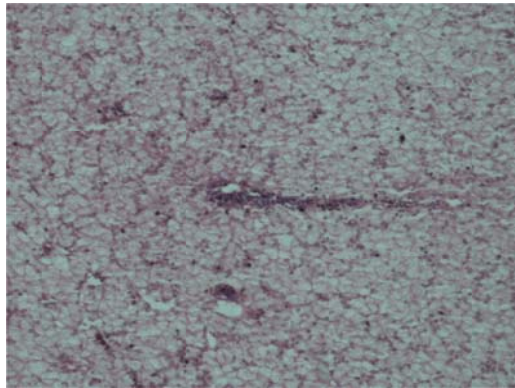
تصویر ۵۰: پرخونی، خونریزی، چماقی شدن لاملاهای ثانویه، تالانژکتازی، تخریب بافت پوششی
(H&E × 20) بیمار ۱ ماه دوم

کبد :

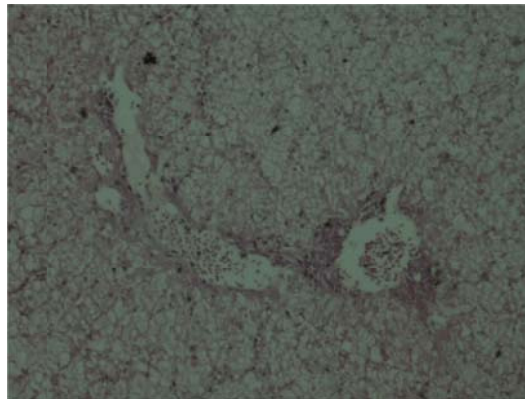
جدول ۷: مشاهدات ضایعات بافتی در کبد فیل ماهی پرورشی تغذیه شده با مقادیر مختلف افلاتوکسین ب^۱ به مدت ۳ ماه در درجه حرارت $18 \pm 2^{\circ}C$.

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

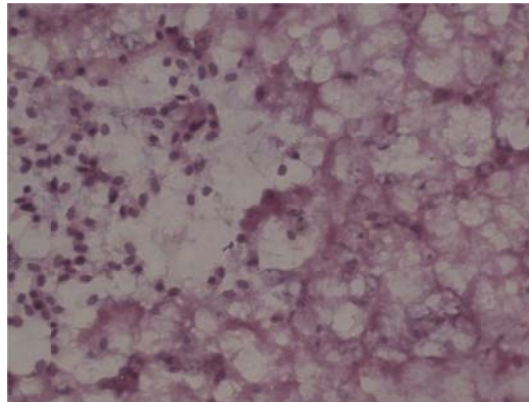
مقاطع هیستوپاتولوژیک کبد:



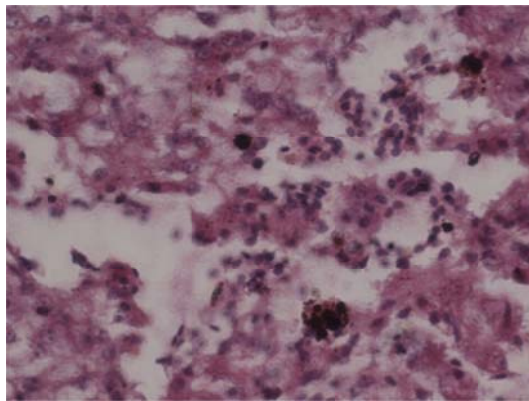
تصویر ۵۱: بافت طبیعی کبد در نمونه های شاهد
(H&E × 10)



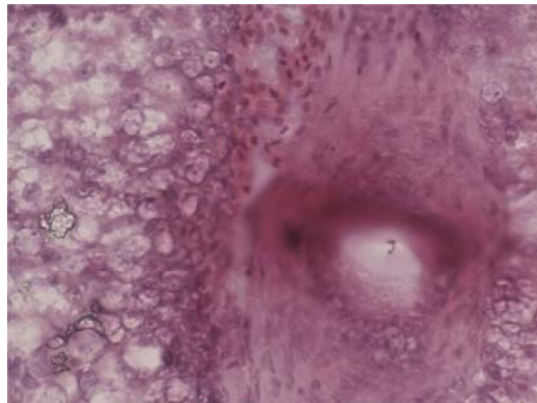
تصویر ۵۲: انباشتگی چربی و شروع دژنراسیون در هپاتوسیت ها، پر خونی عروق کبد، رنگدانه (H&E × 10) های ملانین در پارانشیم کبد. بیمار ۲، ماه اول



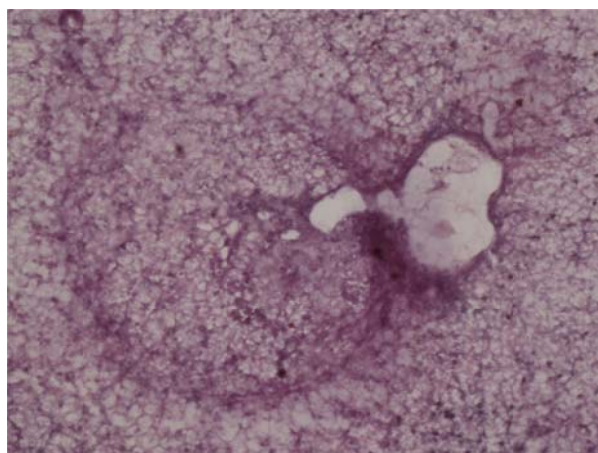
تصویر ۵۳: خونریزی در پارانشیم کبد، دژنراسیون سیتوپلاسم هپاتوسیتها، شروع تغییرات نکروتیک (H&E × 40) در هپاتوسیت ها. بیمار ۱، ماه دوم



تصویر ۵۴ : خونریزی در پارانشیم کبد به همراه حضور ملانوما کروفازها ، دژنراسی سیتوپلاسم هپاتوسیتها، وقوع تغییرات نکروتیک در هپاتوسیت ها. (تیمار ۲ ، ماه دوم)
(H&E × 40)



تصویر ۵۵ : دژنراسی سیتوپلاسم و وقوع تغییرات نکروتیک در هپاتوسیت ها، خونریزی در پارانشیم کبد به همراه تخریب دیواره عروق، حضور فیرو بلاست هادر کبد. (، تیمار ۴ ، ماه دوم)
(H&E × 40)



تصویر ۵۶ : دژنراسی سیتوپلاسم هپاتوسیت ها، وقوع تغییرات نکروتیک در هپاتوسیت ها ، تغییرات شبه گرانولومایی. (، تیمار ۳ ماه سوم)
(H&E × 20)

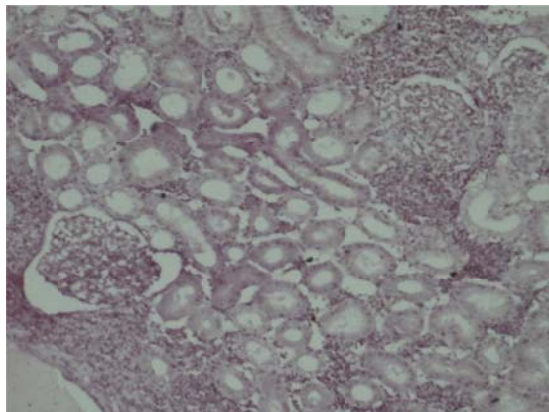
کلیه :

جدول ۸ : مشاهدات ضایعات بافتی در کلیه فیل ماهی پرورشی تغذیه شده با مقادیر مختلف افلاتوکسین ب ۱ به مدت ۳ ماه در درجه حرارت $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$

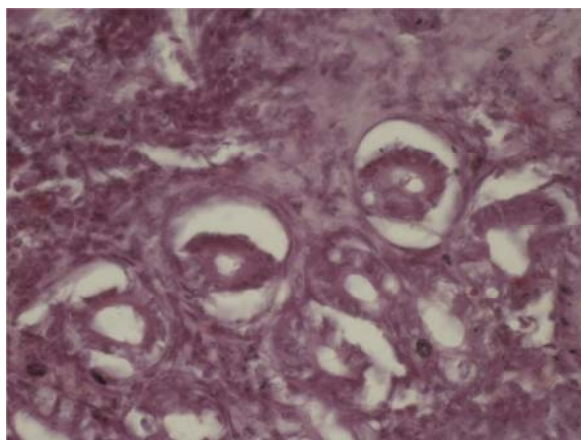
ماه سوم (روز ۹۰)	ماه دوم (روز ۶۰)	ماه اول (روز ۳۰)	نمونه برداری تیمارها
<ul style="list-style-type: none"> - تحلیل رفتن کلافه های گلومرولی - دژنراسیون لوله های ادراری - نکروز کلافه گلومرولی و حضور بافت های نکروزه در کپسول بومن - حضور سلول های فیبروسیت در بافت بینابینی 	<ul style="list-style-type: none"> - پرخونی عروق کلیوی - دژنراسیون لوله های ادراری - تحلیل کلافه های گلومرولی - افزایش ضخامت کپسول بومن - شروع واکنش های آماسی در بافت بینابینی 	<ul style="list-style-type: none"> - تحلیل رفتن کلافه گلومروبی - افزایش فضای کپسول بومن - افزایش ضخامت لایه بازال در کپسول بومن - پرخونی عروق کلیوی - تغییرات دژنراسیون در لوله های ادراری 	<p>تیمار ۱ (۲۵ ppb)</p>
<ul style="list-style-type: none"> - تحلیل رفتن کلافه گلومرولی - کنده شدن و حضور بافت نکروزه گلومرولی - دژنراسیون لوله های ادراری - واکنش های حاد تورمی در لوله های پروکسیمال - هایپرپلازی بافت خون ساز بینابینی - افزایش سلول های ملانوما کروفاژها 	<ul style="list-style-type: none"> - پرخونی در بافت بینابینی کلیه - دژنراسیون لوله های ادراری - تحلیل کلافه های گلومرولی - هایپرپلازی بافت خون ساز بینابینی - افزایش سلول های ملانوما کروفاژ 	<ul style="list-style-type: none"> - 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 	<p>تیمار ۲ (۵۰ ppb)</p>
<ul style="list-style-type: none"> - 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 ملانوما کروفاژ - تشکیل توده های شبه توموری - بروز واکنش های گرانولومانوژ در بافت بینابینی 	<ul style="list-style-type: none"> - پرخونی عروق کلیوی - از هم گسیختگی و قطعه قطعه شدن کلافه های گلومرولی - تخریب در دیواره کپسول بومن - تغییرات دژنراتو در لوله های ادراری - نکروز لوله های ادراری - افزایش مراکز ملانوما کروفاژ و هجوم سلول های آماسی به بافت بینابینی 	<ul style="list-style-type: none"> - پرخونی عروق کلیوی - افزایش فضای کپسول بومن - تحلیل نسبی کلافه گلومرولی - شروع تغییرات دژنراسیون در لوله های ادراری 	<p>تیمار ۳ (۷۵ ppb)</p>

<p>-دژنراسیون و نکروز لوله های ادراری -از بین رفتن کلافه های گلومرولی و نکروز آنها -افزایش مراکز ملانوماکروفاژ -افزایش بافت فیروزه در پارانشیسم کلیه ها -مشاهده ساختمان های شبه توموری در بافت پارانشیسم کلیه</p>	<p>-پر خونی عروق کلیوی -تخریب دیواره های عروق کلیوی -خون ریزی در بافت کلیه -دژنراسیون و بعضاً نکروز لوله های ادراری -فیروزه شدن بافت پارانشیسم کلیه به همراه کاهش بافت گلومرولی و لوله های ادراری</p>	<p>- پر خونی عروق کلیوی - تحلیل کلافه های گلومرولی - افزایش فضای کپسول بومن - شروع تغییرات دژنراسیون در لوله های ادراری</p>	<p>تیمار ۴ (۱۰۰ ppb)</p>
---	---	---	------------------------------

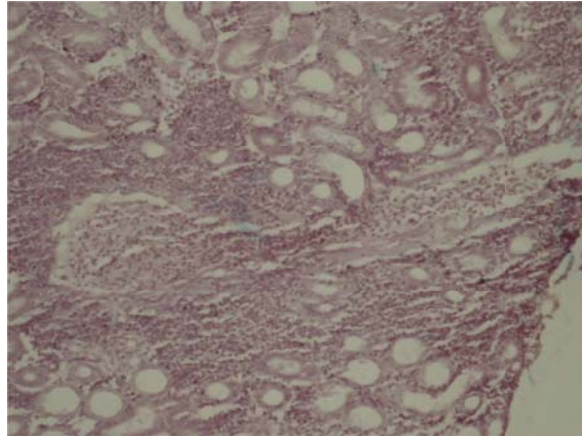
مقاطع هیستوپاتولوژیک کلیه:-



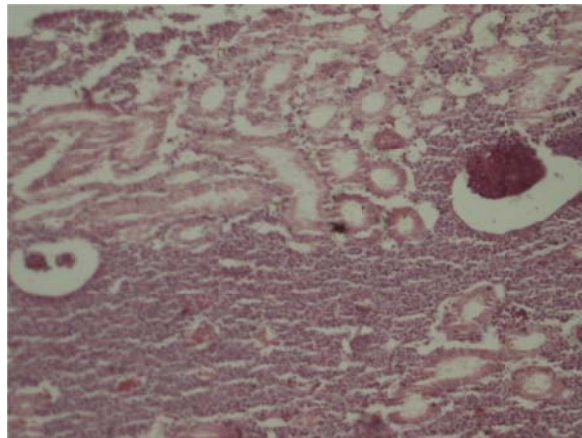
تصویر ۵۷: بافت کلیه در نمونه های شاهد: گلومرولها و لوله های ادراری در حالت طبیعی (H&E × 10)



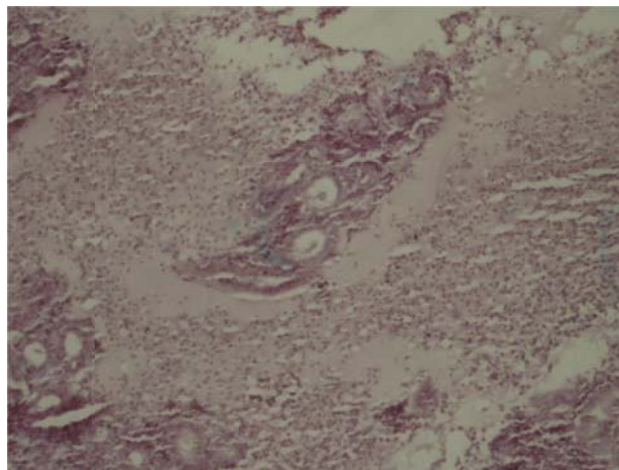
تصویر ۵۸: تحلیل گلومرول ها و افزایش فضای بومنبه همراه افزایش ضخامت لایه بازال کپسول بومن (H&E × 20) دژنراسیون در لوله های ادراری. ، تیمار ۲، ماه اول



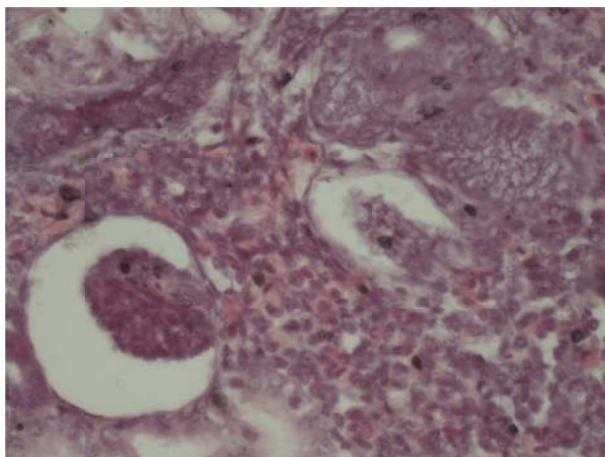
تصویر ۵۹ : دژنرسانس لوله های ادراری، پرخونی عروق، حضور سلولهای اماسی و ملانوماکروفاژها
(H&E × 10) در پارانشیم کلیه. تیمار ۱، ماه دوم



تصویر ۶۰ : قطعه قطعه شدن گلومرولها، دژنرسانس لوله های ادراری، حضور سلولهای اماسی و ملانو (H&E ×
20) ماکروفاژها در پارانشیم کلیه. تیمار ۳، ماه دوم



تصویر ۶۱ : کاهش تعداد گلومرول ها، نکروز لوله های ادراری، افزایش ملانو
(H&E × 10) ماکروفاژها در پارانشیم کلیه، فیبروز بافت بینابینی. تیمار ۴، ماه دوم



تصویر ۶۲ : تحلیل و نکروز گلو مریول ها ، نکروز لوله های ادراری ، افزایش ملانو ماکروفاژها در پارانشیم (H&E × 40) تشکیل گرانولوم و توده های شبه توموری . تیمار ۳، ماه سوم ، ، کلیه

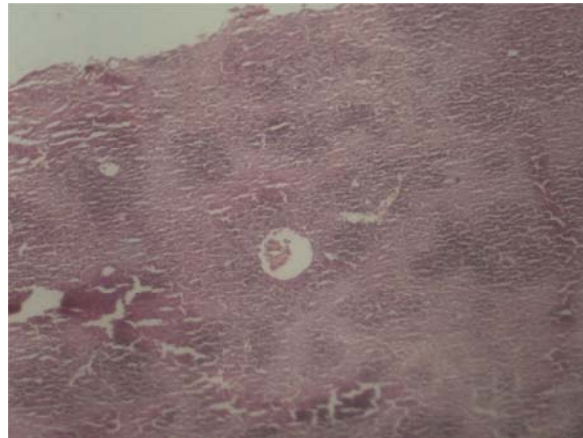
طحال :

جدول ۹ : مشاهدات ضایعات بافتی در طحال فیل ماهی پرورشی تغذیه شده با مقادیر مختلف افلاتوکسین ب ۱ به مدت ۳ ماه در درجه حرارت $20 \pm 1.8^{\circ}\text{C}$.

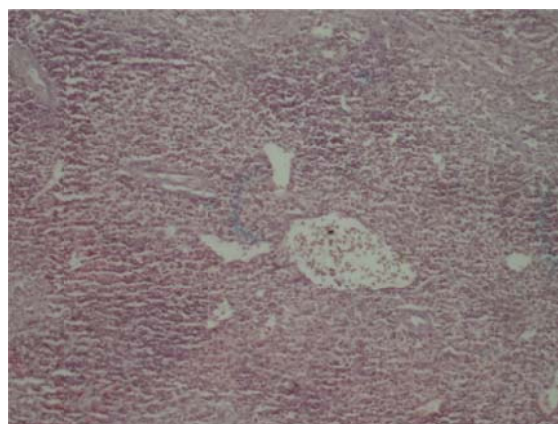
ماه سوم (روز ۹۰)	ماه دوم (روز ۶۰)	ماه اول (روز ۳۰)	نمونه برداری تیمارها ▼
<ul style="list-style-type: none"> - پرخونی در عروق و الیپسویدها - صدماتی در دیواره عروق - خون ریزی خفیف در بافت - تجمع ماکروفاژها 	<ul style="list-style-type: none"> - بافت نسبتاً سالم - پرخونی در عروق - پرخونی در الیپسویدها - افزایش اسپلینوسیت ها 	<ul style="list-style-type: none"> - بافت سالم - تغییرات پاتولوژیک - مشخصی به چشم نمی خورد. 	تیمار ۱ (۲۵ ppb)
<ul style="list-style-type: none"> - پرخونی در عروق و الیپسویدها - 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 	<ul style="list-style-type: none"> - پرخونی عروق و الیپسویدها - هجوم سلول های التهابی به بافت زمینه - صدمه به غلاف عروق - حضور ملانوماکروفاژها - تغییرات دژنراتیو در برخی از قسمت ها 	<ul style="list-style-type: none"> - تغییرات پاتولوژیک - مشخصی به چشم نمی خورد. 	تیمار ۲ (۵۰ ppb)
<ul style="list-style-type: none"> - افزایش نسبی عروق طحال - پرخونی در عروق و الیپسویدها - تغییرات سلولی به سمت دژنراسیون - تشکیل گرانولوما و ساختارهای 	<ul style="list-style-type: none"> - پرخونی عروق - خون ریزی و هجوم گلبول های قرمز به بافت زمینه ای - تراید سلول های اسپلینوسیت - وجود سلول های 	<ul style="list-style-type: none"> - بافت نسبتاً سالم - پرخونی در عروق 	تیمار ۳ (۷۵ ppb)

شبه توموری - تجمع ماکروفاژها	ملانوما کروفاز - صدمه به دیواره عروق		
- 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 نکروتیک در بافت طحال	- صدماتی در دیواره عروق اصلی طحال - ضخیم شدن دیواره عروق - پرخونی در عروق و بافت پارانشیم - شروع دژنراسیون سلول ها - ساختارهای شبه به گرانولوما	- بافت نسبتاً سالم - پرخونی در عروق - پرخونی در الیسوئیدها	تیمار ۴ (۱۰۰ ppb)

مقاطع هیستوپاتولوژیک طحال :

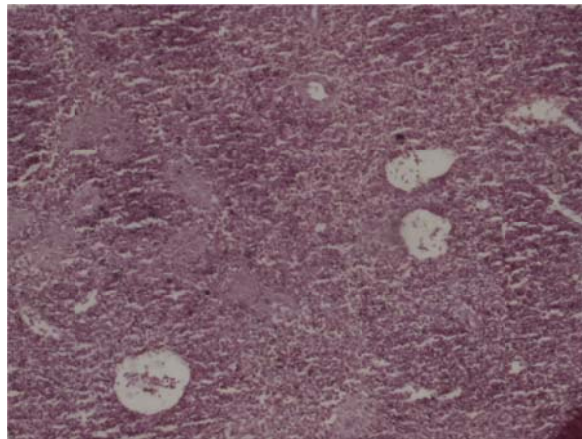


تصویر ۶۳ : : بافت طحال در نمونه شاهد: پولپ سفید و قرمز به همراه الیسوئیدها و عروق قابل تشخیص است.
(H&E × 10)

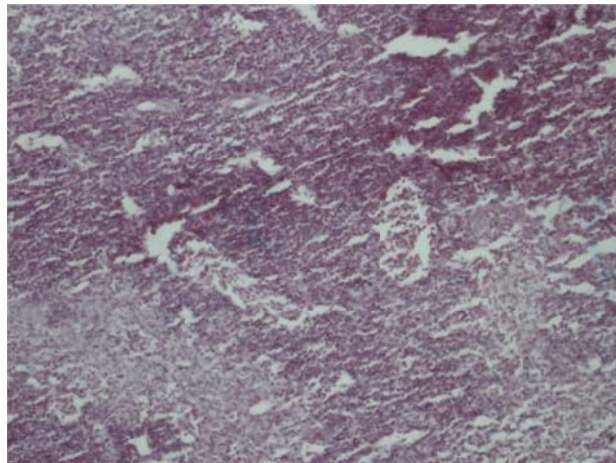


تصویر ۶۴ : : پرخونی در عروق و الیسوئیدها، تخریب دیواره عروق، تهاجم سلولهای آماسی به بافت زمینه

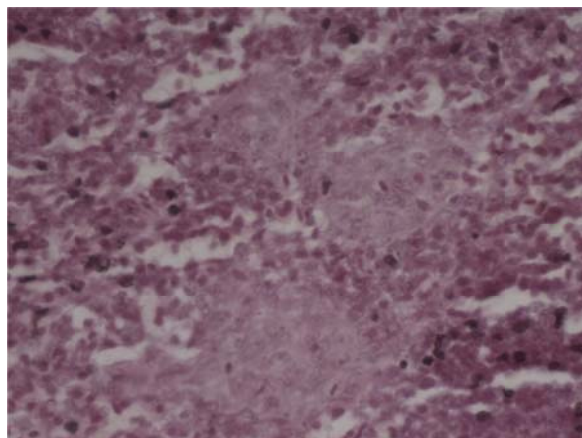
(H&E × 20) به همراه ملانوما کروفازها. (تیمار ۳، ماه سوم)



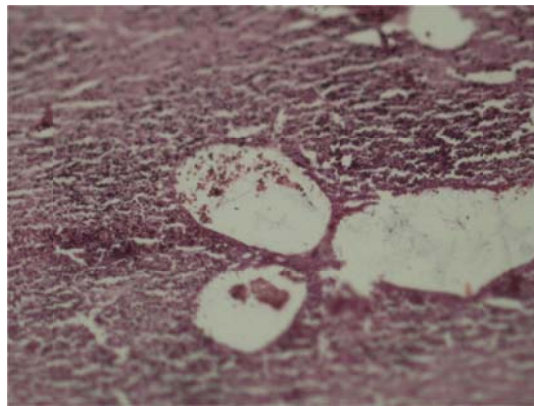
تصویر ۶۵ : پرخونی و تخریب دیواره عروق، تهاجم سلولهای خونی به بافت زمینه ای به همراه ملانوما کروفاز، تغییرات دژنراتیو در سلول ها. ، تیمار ۴، ماه دوم (H&E × 20)



تصویر ۶۶ : پرخونی در الیپسوییدها ، تهاجم سلولهای خونی به بافت زمینه ای به همراه ملانوما کروفازها. تیمار ۳، ماه سوم (H&E × 20)



تصویر ۶۷ : تهاجم سلولهای خونی به بافت زمینه ای به همراه ملانوما کروفازها، تغییرات نکروتیک (H&E × 40) تیمار ۴، ماه دوم



تصویر ۶۸: پرخونی درعروق به همراه تخریب دیواره آنها، تهاجم سلولهای آماسی به بافت زمینه ای (H&E × 40)، تغییرات نکروتیک در سلول ها، تیمار ۴، ماه سوم

۴-۴-۱- نتایج خون شناسی

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

ماه سوم	ماه دوم	ماه اول	نوبت نمونه برداری <
			پارامتر >
0.47±7.7	2.3±7.2	0.7±5.3	RBC×10 ⁵
14.9±51.5	17±54.7	4.2±18.3	WBC×10 ³
0.57±19.7	4.35±25	2.5±22.67	HCT%
0.58±6.7	1.50±6.7	0.85±6.5	Hb(g/dl)
9±69	13.9±62	13.5±53.7	Lym%
8.14±26.7	13.32±26.7	11.55±34.67	Neu%
1.53±1.67	1.7±5.0	0.58±0.67	Mon%
2.34±6.30	1.53±6.30	1.53±8.30	Eos%

جدول ۲: تغییرات فاکتورهای خونی اندازه گیری شده در تیمار یک (۲۵ppb) در مصرف خوراکی مقادیر مختلف آفلاتوکسین ب ۱ در طی مدت سه ماه در فیل ماهی پرورشی (SD± میانگین)

ماه سوم	ماه دوم	ماه اول	نوبت نمونه برداری <
			پارامتر >
0.58±5.83	0.95±5.1	0.65±5.3	RBC×10 ⁵
9.70±44.40	8.40±36.33	1.61±18.7	WBC×10 ³
0.58±20.33	1.00±21	4.36±26	HCT%
0.58±6.67	0.58±5.33	1.46±7.63	Hb(g/dl)
5.30±67	5.86±67.33	11.10±68.33	Lym%
4.00±25.33	5.51±21.33	7.00±25.33	Neu%
1.15±2.67	2.1±3.67	0.58±0.33	Mon%
1.00±5.00	0.58±7.67	2.00±4.00	Eos%

جدول ۳: تغییرات فاکتورهای خونی اندازه گیری شده در تیمار یک (۵۰ppb) در مصرف خوراکی مقادیر مختلف آفاتوکسین ب ۱ در طی مدت سه ماه در فیل ماهی پرورشی (SD± میانگین)

ماه سوم	ماه دوم	ماه اول	نوبت نمونه برداری <
			پارامتر >
1.87±4.40	0.96±4.20	0.35±6.37	RBC×10 ⁵
11.30±71.43	5.00±41.33	6.82±27.83	WBC×10 ³
5.86±19.67	2.64±21.00	2.64±27.00	HCT%
0.58±4.67	0.00±4.00	0.85±7.96	Hb(g/dl)
6.56±53.00	7.10±56.33	11.37±49.33	Lym%
3.10±31.67	10.00±29.00	11.37±40.67	Neu%
1.15±3.33	1.15±3.67	0.58±0.33	Mon%
4.58±12.00	3.00±11.00	5.57±7.00	Eos%

جدول ۴: تغییرات فاکتورهای خونی اندازه گیری شده در تیمار دو (۷۵ppb) در مصرف خوراکی مقادیر مختلف آفاتوکسین ب ۱ در طی مدت سه ماه در فیل ماهی پرورشی (SD± میانگین)

ماه سوم	ماه دوم	ماه اول	نوبت نمونه برداری <
			پارامتر >
0.47±6.67	4.00±7.70	0.66±6.00	RBC×10 ⁵
10.10±46.46	37.00±58.63	3.75±22.33	WBC×10 ³
0.58±21.33	3.46±23.00	5.51±26.67	HCT%
1.00±6.0	1.15±6.67	1.86±7.87	Hb(g/dl)
5.51±55.33	8.72±75.00	11.90±58.67	Lym%
4.58±34.00	8.14±14.67	5.30±30.00	Neu%
0.58±3.33	2.64±3.00	0.00±0.00	Mon%
2.10±2.11	0.58±3.33	2.64±5.00	Eos%

جدول ۵: تغییرات فاکتورهای خونی اندازه گیری شده در تیمار چهار (۱۰۰ppb) در مصرف خوراکی مقادیر مختلف آفاتوکسین ب ۱ در طی مدت سه ماه در فیل ماهی پرورشی (SD± میانگین)

ماه سوم	ماه دوم	ماه اول	نوبت نمونه برداری <
			پارامتر >
0.40±7.13	0.84±6.43	1.00±5.00	RBC×10 ⁵
16.65±59.33	12.00±45.17	0.76±16.67	WBC×10 ³
1.53±25.33	4.73±22.67	3.00±23.33	HCT%
0.58±6.33	1.00±7.00	1.00±6.73	Hb(g/dl)
3.06±44.00	1.73±44.00	9.60±62.33	Lym%
5.30±43.00	2.52±48.67	2.90±26.33	Neu%
3.21±3.67	0.58±2.33	0.00±0.00	Mon%
6.00±9.33	1.53±4.67	1.53±4.33	Eos%

جدول ۶: تغییرات فاکتورهای خونی اندازه گیری شده در تیمارهای آزمایشی در مصرف خوراکی مقادیر مختلف آفلاتوکسین ب ۱ در طی مدت سه ماه در فیل ماهی پرورشی (SD± میانگین)

نوبت نمونه برداری	غلظت سم (ppb)	±100ppb	±75ppb	±50ppb	±25ppb	±0ppb
اول	RBC×10 ⁵	0.10±5.0	0.65±6.0	0.35±6.4	0.65±5.3	0.70±5.30
دوم	RBC×10 ⁵	0.84±6.4	4.00±7.7	0.96±4.2	0.95±5.1	2.31±7.2
سوم	RBC×10 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×10 ³	0.76±16.7	3.75±22.3	6.82±27.8	1.60±18.7	4.16±18.3
دوم	WBC×10 ³	12.00±45.2	37.00±58.6	5.00±41.3	8.40±36.3	17.00±54.7
سوم	WBC×10 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	0.0 ^a ±4.0	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±5.7	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

بر اساس نتایج به دست آمده میزان گلبول های قرمز به جز در غلظت ۵۰ ppb در نوبت سوم نمونه برداری (ماه سوم) هیچ گونه تفاوت معنی داری را با گروه کنترل نشان نمی دهند. این وضعیت در طول 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 و مونوسیت ها، در طی نمونه برداری های انجام شده اختلاف معنی داری بین برداری به ترتیب در غلظت های ۷۵ppb (نوبت دوم) و ۲۵ppb و ۱۰۰ (نوبت سوم)، تیمارهای آزمایشی و شاهد مشاهده نشد..

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

داده های بدست آمده در مورد دئوزینوفیل ها مؤید وجود اختلاف معنی دار در غلظت های ۱۰۰ppb و ۵۰ در نوبتهای اول و دوم نمونه برداری است.

۵-۴-۱- مشاهدات و نتایج شاخص های رشد

میانگین وزنی

جدول ۱۰: تاثیر استفاده از سطوح مختلف AFB₁ در تغذیه فیل ماهی های پرورشی بر میانگین وزن بدن (± خطای معیار از میانگین) در بیومتری های مختلف

میانگین وزن (کیلوگرم)					میزان AFB ₁ (ppb) در جیره	تیمارهای آزمایشی
بیومتری پنجم	بیومتری چهارم	بیومتری سوم	بیومتری دوم	بیومتری اول		
^b ۴۳۱/۶±۱۴/۸	^b ۴۲۹/۳±۱۲/۷	۳۲۳/۷±۱۱/۶	۱۵۰/۳۷±۴/۸۳	۱۳۸/۳۰ ± ۳/۶	۱۰۰	۱
^b ۴۲۱/۹±۱۶/۷	^b ۴۱۸/۴±۱۴/۵	۳۵۶/۳±۱۱/۲	۱۵۰/۷۰±۳/۷۳	۱۲۷/۴۹±۴/۰	۷۵	۲
^b ۴۴۳/۴±۱۳/۴	^b ۴۲۹/۲±۱۱/۱	۳۲۹/۱±۹/۹	۱۴۱/۷۵±۳/۴	۱۲۴/۳۰±۶/۰	۵۰	۳
^{ab} ۴۷۰/۰±۱۳/۴	^{ab} ۴۵۴/۹±۸/۳	۳۳۹/۲±۹/۰	۱۴۷/۷۳±۴/۰	۱۳۱/۲۷±۴/۳	۲۵	۴
^a ۵۰۲/۵±۹/۹	^a ۴۸۴/۴±۱۰/۵	۳۶۲/۳±۸/۳	۱۵۲/۵۶±۳/۷۵	۱۳۰/۵۸±۴/۱	۰	۵
۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۳	۰/۳۶۸	۰/۲۴۴		P-Value

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 ماهیهای سایر تیمارها اختلاف معنی داری دارند. این آزمون اختلاف معنی داری را بین ماهی های سایر تیمارها 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 ماهیهای سایر تیمارها 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 تیمارها با هم نشان نمی دهد.

رشد ویژه (SGR):

جدول ۱۱: تاثیر استفاده از سطوح مختلف AFB_1 در تغذیه فیل ماهی های پرورشی بر میانگین میزان رشد ویژه (SGR) و ضریب تبدیل غذایی (FCR)، (\pm خطای معیار از میانگین) در طی یک دوره ۹۰ روزه

تیمارهای آزمایشی	میزان AFB_1 (در جیره ppb)	SGR \pm SD	FCR \pm SD
۱	۱۰۰	۰/۸۳ \pm ۰/۰۳	۲۲/۲ \pm ۰/۱۶ ^{ab*}
۲	۷۵	۰/۸۰ \pm ۰/۰۴	۲/۵۶ \pm ۰/۳۰ ^a
۳	۵۰	۰/۸۹ \pm ۰/۰۴	۲/۰۲ \pm ۰/۲۰ ^{ab}
۴	۲۵	۰/۹۱ \pm ۰/۰۴	۱/۸۸ \pm ۰/۱۳ ^{ab}
۵	۰	۰/۹۴ \pm ۰/۰۲	۱/۷۰ \pm 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 کاملاً مشهود است که در یک کار پرورشی با مقیاس بزرگ، این امر تاثیر خود را بر روی رشد ماهیان خواهد گذاشت.

ضریب تبدیل غذائی:

چنین بنظر میرسد اختلاف معنی داری بین ضریب تبدیل 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 ۳ و 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 کاملاً محسوس باشد.

۶-۴-۱- باقیمانده بافتی

جدول ۱۲: تاثیر استفاده از سطوح مختلف AFB_1 در تغذیه فیل ماهی های پرورشی بر میانگین میزان باقیمانده بافتی (\pm خطای معیار از میانگین) در طی یک دوره ۱۲۰ روزه (مقایسه ها در هر نوبت نمونه برداری به صورت جداگانه بررسی گردیده است).

نوبت های نمونه برداری (ماه)				میزان AFB_1 (در جیره (ppb))	تیمارهای آزمایشی
ماه چهارم	ماه سوم	ماه دوم	ماه اول		
0.43 ± 0.1^a	2.67 ± 0.9^a	2.90 ± 0.7^a	0.717 ± 0.2^a	۱۰۰	۱
0.32 ± 0.1^b	2.24 ± 0.11^b	2.42 ± 0.6^b	0.541 ± 0.2^a	۷۵	۲
0.2 ± 0.09^c	1.54 ± 0.07^c	1.05 ± 0.03^c	0.52 ± 0.1^c	۵۰	۳
0.1 ± 0.04^c	1.04 ± 0.05^d	0.56 ± 0.03^d	0^c	۲۵	۴
0^c	0^e	0^e	0^c	۰	۵
۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱		P-Value

*در هر ستون میانگین هایی که با حروف مشترک نشان داده شده است، با یکدیگر از نظر آماری دارای اختلاف معنی دار نمی باشند ($p < 0.05$)

اختلاف معنی داری بین باقیمانده گی بافتی در گروههای مختلف در طول دوره حدوداً ۹۰ روزه تغذیه با جیره حاوی سم در وان های مختلف و 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.

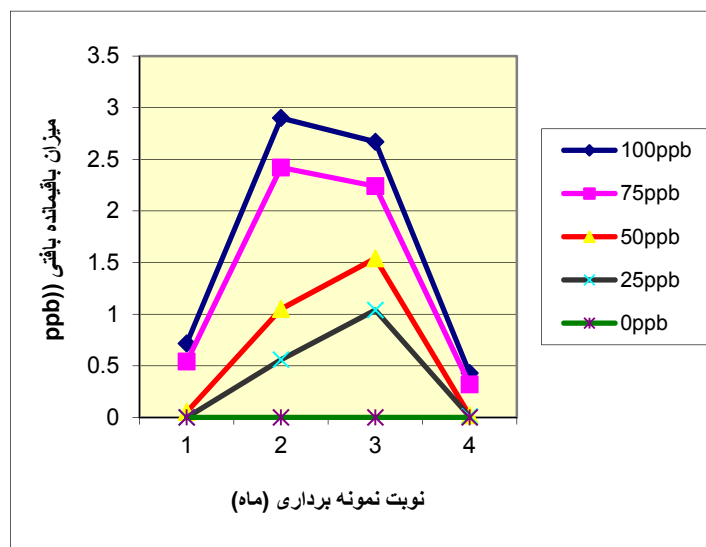
با توجه به جدول مقایسه چند وجهی که از نتایج آنالیز واریانس داده های بیومتری طی نمونه برداری های اول تا چهارم حاصل شده است، چنین بنظر می رسد:

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.



نمودار ۳: میزان باقیماندگی بافتی افلاتوکسین در بافت عضلانی فیل ماهی پرورشی تغذیه شده با جیره های آزمایشی به مدت ۴ ماه در درجه حرارت $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$

۵-۱- 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 کشورهای با آب و هوای 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 و تولید 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, 2002; Marjani, 2003). تولید آفلاتوکسین در طی مراحل نگهداری (انبارداری) و آسیاب کردن ادامه می‌یابد و غلظت 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 ضایعات 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 و عوارض 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 آفاتوکسین ها در حیوانات پرورشی عمدتاً در رابطه با پستانداران و طیور می باشد و اطلاعات موجود در رابطه با آبزینان پرورشی بسیار اندک است. بر اساس گزارشهای موجود، این موضوع شاید بواسطه کمبود اطلاعات و ارتباط با وقوع آفاتوکسیکوزیس در آبزینان پرورشی بوده که خود ناشی از مشکل بودن تشخیص این بیماری در آبزینان است. اگرچه مطالعات اپیدمیولوژیکی قابل ملاحظه ای در ارتباط با اثرات متقابل آفاتوکسین B₁ 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 آفاتوکسین ها، در آبزینان می تواند از اهمیت بیشتری برخوردار باشد بایستی به شکل جدی تر پیگیری گردد. این موضوع به منزله لزوم توجه بیشتر به انجام مطالعات و تحقیق در سرفصل مذکور خواهد بود. باتوجه به مشاهدات و نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر و نظر به تنوع نتایج مذکور، جهت سهولت و شفافیت بیشتر در بحث نتایج به ترتیب سرفصل های ذکر شده در بخش نتایج، به بحث پرداخته خواهد شد.

۱-۵-۱- جراحات پوستی

آفاتوکسیکوزیس نوع حاد در ماهیان به مانند سایر حیوانات در مواقعی که مقادیر متوسط تا زیاد آفاتوکسین بلعیده شود اتفاق می افتد. علائم این نوع آفاتوکسیوزیس در قزل آلاهی رنگین کمان شامل کم خونی، رنگ - پریدگی آبشش ها، کاهش میزان هماتوکریت، تورم، خونریزی، اختلال در متابولیسم مواد مغذی و صدمات کبدی می باشند. بعلاوه وقوع تغییرات مرفولوژیکی در تیلاپای نیل تغذیه شده با غذاهای آلوده به آفاتوکسین از جمله: کدورت قرینه منتهی به کاتاراکت و کوری، ضایعاتی در روی سطح بدن از قبیل خوردگی باله ها و ناحیه دم، زرد رنگ شدن سطح بدن که به نام تیلاپای زرد (Yellowing Tilapia) نامیده می شود، شنای نامتعادل و بی اشتهایی نیز گزارش شده است (Cagauan et al. 2004).

از طرف دیگر در موارد وقوع شکل حاد بیماری ها معمولاً علائم کلینیکی مشخصی مشاهده نشده و ما شاهد مرگهای مرموز و ناگهانی هستیم. در حیوانات مبتلا به مسمومیت تحت حاد با آفاتوکسین ها علائمی از جمله صدمات متوسط تا شدید کبدی، زرد رنگ شدن چشم ها، زردی مخاطات یا پوست و اختلال در لخته شدن خون مشاهده می گردد. از دیگر علائم می توان به افزایش ضریب تبدیل غذایی، کم خونی، افت تولید، تضعیف سیستم ایمنی، ضایعات کلیوی و مرگ زود هنگام اشاره نمود (Hamilton 1990).

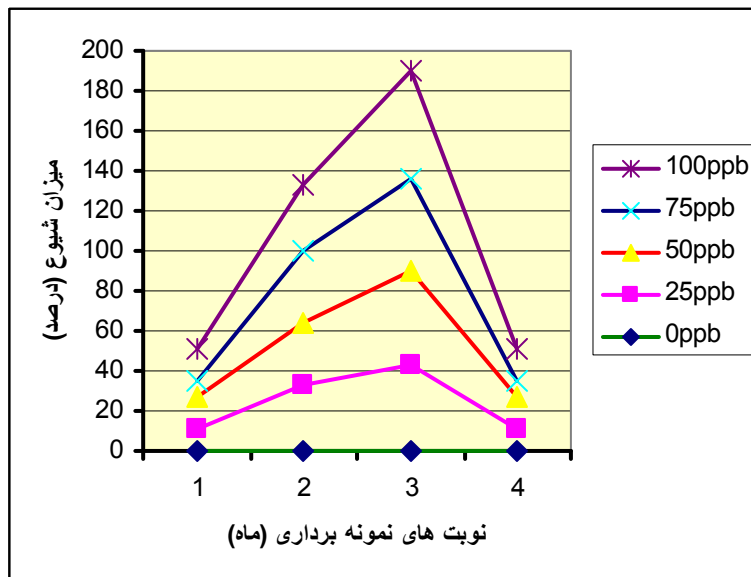
تحقیق انجام شده توسط Farabi و همکاران در مورد مسمومیت ایجاد شده توسط AFB₁ در فیل ماهی های جوان بیانگر وقوع ۸/۶ درصد مرگ و میر پس از ۱۵ روز تغذیه با جیره های آلوده می باشد. به علاوه بعد از ۴۰ روز ماهیان تحت آزمایش ۷ درصد کاهش وزن داشته اند از جمله علائم کلینیکی مشاهده شده در این تحقیق شامل، خونریزی در ناحیه سر، پلاک های استخوانی ردیف شکمی، ایجاد خمیدگی در ستون فقرات و همچنین ظهور نقاط زرد رنگ در ناحیه سینه ای بوده است (Farabi et al. 2000).

زردی رنگ به شکل گسترده در تیلایهای پرورش در فیلیپین در استان Pampanga در فصول گرم و مرطوب در سالهای ۲۰۰۲ و ۲۰۰۳ به همراه مرگ و میر 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 در ماهی تیلای نیل تغذیه شده با غذای الوده به آفلاتوکسین شامل کدورت قرنیه منجر به کوری، جراحات پوستی، خوردگی در باله ها و ناحیه دم، زرد رنگ شدن پوست بدن، شنای نامتعادل، کم تحرکی، و کاهش اشتها میباشند. این مطالعه تایید می نماید که زردی رنگ مشاهده شده در تیلای پرورشی در Central Lusan بواسطه غذای الوده به آفلاتوکسین بوده است. (Cagauan; et al. 2003).

طبعاً، رنگ زرد ایجاد شده ناشی از مسمومیت های مزمن آفلاتوکسین B₁، 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 می گردد.

تحقیق حاضر بر روی 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 زخم هایی با حاشیه های زرد رنگ در نواحی شکمی، جانبی و ساقه دم به همراه خونریزی در پایه باله های سینه ای و شکمی به همراه بروز زخم و جراحات در لبه های فوقانی و تحتانی باله دم و در حاشیه های باله های سینه ای 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 زخم ها در ناحیه سر و سرپوش برانشی به همراه خونریزی و ترشحات با حاشیه های زرد رنگ (Yellow Sores) به شکل قابل ملاحظه ای خودنمایی نمود. میزان شیوع علائم و جراحات پوستی در تیمارهای مختلف متفاوت بود.

در پایان مرحله سه ماهه آزمایش ماهیان تحت مطالعه به مدت یک ماه با جیره غذایی معمولی فاقد AFB₁ تغذیه گردیدند. در پایان مدت مذکور جراحات پوستی تیمارها از نظر کمی و کیفی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی ها موید روند بهبود در جراحات مذکور در حدود ۱۶ الی ۲۴٪ در ماهیان تحت مطالعه بود. روند مذکور در نمودارهای شماره ۲ نشان داده شده است.



نمودار ۲: درصد شیوع زخم های جلدی در اثر دوز های مختلف آفلاتوکسین ب ۱ در تیمار های تحت آزمایش

بنظر میرسد که تحقیق حاضر بر روی فیل ماهی اولین تحقیقی است که به بررسی میزان شیوع جراحات پوستی در جمعیت 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 نمونه برداری تا ۵۳/۳ درصد در آخرین نمونه برداری افزایش داشته است.

این افزایش به همراه توسعه و پیشرفت جراحات مشاهده شده در نوبت های مختلف نمونه برداری موضوعی نگران کننده از نظر بازار پسندی فیل ماهی است. طبعاً در شرایط پرورشی دراستخر، بواسطه وجود عوامل الوده کننده ثانوی این موضوع از اهمیت بیشتری برخوردار خواهد گردید.

در مقایسه با مشاهدات و مطالعات انجام گرفته بر روی سایر آبزیان پرورشی به نظر می رسد که علی رغم عدم بروز تلفات در تیمارهای آزمایشی، شدت و گستردگی جراحات و منظره بد ناشی از جراحات پوستی در فیل ماهی از گستردگی بیشتری برخوردار است.

طبعاً در صورت عدم بروز تلفات در استخرهای پرورشی در مسمومیت های مزمن با AFB_1 ، این نگرانی وجود خواهد داشت که در هنگام برداشت محصول با ماهیان بد منظر که بازار پسندی مطلوبی ندارند مواجه باشیم. این موضوع توجه بیشتر به نظارت بهداشتی و کنترل 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، مویدان مطلب است که در صورت تشخیص به موقع مسمومیت های مزمن و قطع تغذیه با جیره

غذایی آلوده، می توان به میزان قابل توجهی به بهبود جراحات و کاهش خسارات ناشی از عدم بازار پسنندی امید داشت.

۲-۵-۱- علایم کالبد گشایی و مشاهدات هیستوپاتولوژیک

میزان صدمات ناشی از آفلاتوکسین ها به عواملی از جمله غلظت سم موجود در غذا، مدت زمان مصرف غذای آلوده و همچنین حساسیت های گونه های تحت تغذیه بستگی دارد. (Stewart & Larson 2002)

مسمومیت های حاد ناشی از آفلاتوکسین ها در شرایط فقر بهداشتی حاصل می شود و یافته های اصلی کلینیکی آن شامل کاهش تولید، کاهش وزن و کاهش قدرت باروری و همچنین تضعیف سیستم ایمنی است. از دیگر علائم پاتولوژیکی شایع که بیشتر در مسمومیتهای مزمن به چشم می خورد می توان به مسمومیت های ژنتیکی، اثرات تومورزایی و سرطان زایی در انسان و حیوانات اشاره نمود. علائم مشابهی نیز در مراکز تکثیر پرورش آبزیان گزارش شده است.

Larson و Stewart در سال ۲۰۰۲ سه نوع از آفلاتوکسیوزیس را توصیف کرده اند: حاد، تحت حاد و مزمن. آفلاتوکسیکوز مزمن در هنگام خوردن دراز مدت مقادیر کم تا متوسط آفلاتوکسین به وقوع می پیوندد. لذا بواسطه بروز تدریجی و تحت کلینیکی علائم ناشی از مسمومیت معمولاً شناسایی و تشخیص آن با مشکل مواجه است. از عمده ترین علائم کلینیکی در آفلاتوکسیکوزیس مزمن می توان به اختلالات کبدی از جمله کاهش راندمان تغذیه، کاهش وزن، افزایش حساسیت به بیماری های عفونی ثانویه، نکروز و ایجاد تومور در کبد و سایر اندامها و افزایش مرگ و میر اشاره داشت. در این شکل از بیماری اثرات سرطان زایی و اختلالات ژنتیکی ناشی از مسمومیت شایع بوده و متعاقب آن تغییرات تراژژنیک هورمونی، نورتوکسیک و هماتولوژیک بروز می نماید (Pier et al. 1980).

ایجاد ضایعات در DNA بواسطه مصرف آفلاتوکسین در کپور ماهی هندی رو هو (Labeo rohita) از طریق تزریق داخلی صفافی 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 AFB₁ در سلول های کبدی به موازات افزایش DNA های متصل شده به آفلاتوکسین، مشاهده گردید. در بررسی های بعدی انجام شده بر روی رشته های DNA استخراج شده از بافت های مذکور، علائم مسمومیت های ژنتیکی، ناشی از AFB₁ از جمله افزایش قطعه قطعه شدن ژنوم و پاره گی منفرد در رشته های 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 اندام های دیگر متاستاز می دهند. این پدیده در ماهیان ۲-۱ ساله بیشتر اتفاق می افتد. در جهت تأیید یافته های فوق، تعداد زیادی از تومورهای کوچک غیر مهاجم خوش خیم نیز در قزل آلابی رنگین کمان 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 مویید 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 AFB₁ منجر به ایجاد تومورهای کبدی در قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود (Lovell 1992).

میزان واکنش‌های تومورزایی در قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با مقدار ۲۰ ppb از AFB₁ 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 AFB₁ با DNA در گونه‌های فوق‌الذکر قابل مشاهده است، بطوریکه در تزریق یک نوبتی AFB₁ نشاندار شده با [³H]، بعد از ۲۴ ساعت، میزان AFB₁ 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 رنگین‌کمان 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 رنگین‌کمان خواهد بود. در آزمایش‌های انجام شده همچنین ایجاد انواع مختلفی از تومورها مشاهده گردید برای مثال وقوع کارسینومهای بدخیم سلول‌های کبدی در قزل‌آلای رنگین‌کمان در مقابل آدنومای خوش خیم ایجاد شده در ماهی آزاد کوهو (Bailey et al. 1988).

به اعتقاد اکثر محققین مراحل مختلف تکامل سلول‌های بدخیم سرطانی (شروع، توسعه و ترویج) با اتصال DNA با AFB₁ شروع می‌شود (Massey et al. 1995; Bailey et al 1996).

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

کارسینومای ترکیبی در جنین ماهیانی که از طریق حمام دادن با ۰/۰۵ ppm آفلاتوکسین B₁ برای مدت ۱ ساعت مواجه گردیدند، شروع گردید (Bailey et al. 1996). همچنین به جز تومورهای بدخیم کبدی، تعداد قابل توجهی تومور (نفروبلاستوم‌های کشنده) در کلیه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و کپور معمولی مشاهده گردید (Bailey et al. 1996; Murjani 2003).

کپورهای هندی تغذیه شده با مقادیر ۲/۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن از آفلاتوکسین B₁ 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 نفرت در لوله‌های ادراری و بروز لمفوسارکوم در کلیه، ضایعات و تغییرات پاتولوژیک در

دستگاه گوارش، قلب و مغز می توان اشاره نمود. از دیدگاه ماکروسکوپی، کبد بزرگ و متورم با ندول های زرد رنگ بر روی سطح آن قابل مشاهده بود (Murjani 2003).

در گونه های مختلف جانوری درجات متفاوتی از حساسیت به AFB_1 مشاهده می گردد. از مبانی ایجاد این تفاوت ها می توان به زمینه های مستعد ژنتیکی در این گونه ها اشاره نمود. این موضوع تا حد زیادی وابسته به الگوهای مختلف نشانه گذاری ژن های موثر و درگیر در مراحل انتقال بیولوژیکی آفلاتوکسین ها می باشد. AFB_1 یکی از رایج ترین ترکیبات مستعد کننده ایجاد سرطان می باشد 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 آنزیم های ویژه سلولی به چند نوع متابولیت تبدیل می شود. (Eaton & Groopman 1994, Gallagher & Eaton 1995, Tulayakul et al. 2005). در برخی از گونه های ماهیان به مانند پستانداران چرخه متابولیکی AFB_1 اساساً از دو مسیر و با سه سیستم اصلی تجزیه مشخص می گردد

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

۲- مرحله دوم یا مرحله سم زدایی که مشتمل بر دو سم زدای اصلی و مهم می باشد. این ترکیبات سم زدا عبارتند از یوری دین دی فسفات گلوکورونیل ترانسفراز (UDPGT's) و آنزیم دیگری که با شدت کمتری در این واکنش مشارکت می کند آنزیم گلو تاتیون اس - ترانسفراز (GST's) می باشد (Livingstone 1998).

مرحله اول شامل اکسیداسیون میکروزمی AFB_1 می باشد که منتج به تولید متابولیت سمی $AFBO$ از طریق اپوکسیداسیون و همچنین تولید متابولیت های با سمیت کمتر از جمله AFM_1 و AFQ_1 از طریق هیدروکسیلاسیون و AFP_1 به شیوه واکنش های دی متیلاسیون آنزیمی می گردد (Ramsdell et al. 1991).

خانواده سیتوکروم P-450S شامل گروهی از هموپروتئین ها هستند که در مراحل فعال سازی 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 هیپاتوسیت های ماهی قزل آلابی رنگین کمان به طور قابل ملاحظه ای از تبدیل AFB_1 به AFL_1 بیشتر می باشد. 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 واکنش ها با تشکیل CYP وابسته به $AFBO$ ادامه می یابد (Gallagher & Eaton 1995).

مطالعات انجام شده توسط Tulayakul و همکارانش در سال ۲۰۰۵ مشخص نمود که میزان حساسیت قزل آلابی رنگین کمان به مسمومیت های سلولی با AFB_1 بسیار زیاد بوده و فعالیت آنزیم های احیا کننده AFB_1 در

* -MFO = Microsomal Mixed - function Oxidases

سیتوزول‌های کبدی این ماهی در مقایسه با خوکیچه هندی، موش، Rat و خوگ 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 و مستقیم از AFB₁ و تولید غیرمستقیم از طریق AFL₁ 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 AFB₁ می‌باشد (Valsta et al. 1988, Bailey et al. 1996).

Sanchez و همکارانش (۱۹۹۴) گزارش کردند که مقدار ۳۰ میلی‌گرم AFB₁ به ازای هر کیلوگرم از جیره غذایی تیلاپیا برای این ماهی کشنده محسوب نمی‌شود.

زمانی که جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین (۱۱۵/۳۴ppb) به تیلاپای 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 تیلاپای نیل از طریق مصرف خوراکی AFB₁ 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 AFB₁ به ازای هر کیلوگرم، تغییراتی در نرخ رشد دیده نمی‌شود، در حالیکه میزان ۱۰ میلی‌گرم آفلاتوکسین به ازای هر کیلوگرم، منجر به ایجاد ضایعات شده و در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم آفلاتوکسین B₁، نکرروز حاد کبد و ۶۰ درصد مرگ و میر حادث می‌شود (Tuan et al. 2002).

بررسی‌های انجام شده توسط Gallagher & Eaton (1995) مویید این مطلب است که چرخه متابولیسم AFB₁ در کبد گربه ماهی در غلظت‌های پایین (۱۶ μM) که شباهت زیادی به محدوده‌های طبیعی آلودگی‌های محیطی با آفلاتوکسین دارد، عملاً منجر به تشکیل AFBO با منشاء میکروزمی نمی‌شود.

متقابلاً، مقادیر کم AFBO همانند AFM₁ فقط در شرایط تجربی مصرف مقادیر بالا و اشباع AFB₁ (۱۲۸ μm) 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 AFB₁ از جمله AFQ یا AFP₁ در هیپچیک از غلظت‌های پایین یا بالا گزارش نشده است همچنین فعالیت آنزیم‌های احیا کننده AFB₁ بالا می‌باشد که این موضوع به احیای سریع AFB₁ به AFL₁ 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 AFB₁ در گربه ماهی ضعیف بوده و این ترکیب سریعاً به AFL تبدیل می‌شود، در طی این تبدیل زمینه حذف سریع AFB₁ آزاد فراهم گردیده و مقاومت

گره ماهی به مسمومیت و سرطان‌های کبدی را توجیه می‌نماید. برخلاف گره ماهی، در قزل‌آلای رنگین کمان فعالیت بالای اپوکسیداسیون AFB_1 به $AFBO$ روی می‌دهد 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 کروموزومی، ایجاد هستک، تغییر در کروماتیدهای خواهر، سنتز ناخواسته DNA و شکست رشته‌های کروموزومی می‌گردد (IARC, 1993).

جهت ایجاد تأثیرات ژنتیکی، AFB_1 نیازمند تبدیل شدن به یک ترکیب بیولوژیکی فعال الکتروفیل به نام epoxide 9 و 8 - AFB_1 می‌باشد. انجام واکنش اپوکسیداسیون در حلقه انتهایی فوران در AFB_1 منجر به افزایش تولید مخلوطی در ایزومرهای اپوکسیدی بنامهای $AFB_1 - 8,9 \text{ endo} - \text{epoxide}$ و $AFB_1 - 8,9 \text{ exo} - \text{epoxide}$ می‌گردد محصول اصلی که می‌تواند در ایجاد اختلالات ژنتیکی و سلولی موثرتر باشد ترکیب $exo - \text{epoxide}$ است (Raney et al. 1993).

$Exo - \text{epoxide}$ تولید شده در داخل سلول از پایداری خوبی جهت مهاجرت از شبکه اندوپلاسمیک به هستک‌ها 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 سلول‌های جنسی (اسپرماتوسیت‌ها) شامل تغییرات ساختاری و عددی کروموزوم‌ها (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 در خون، کبد و سلول‌های کلیوی در قزل‌آلای رنگین کمان، به عنوان یک گونه حساس و همچنین گره ماهی به عنوان یک گونه مقاوم‌تر بررسی و مقایسه 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 گره 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 گره ماهی به مسمومیت‌های ژنتیکی با AFB_1 محسوب می‌گردند (Gallagher & Eaton 1995; Abd-Allah et al. 1999).

علاوه بر انسان و حیوانات مزرعه‌ای خشکی‌زی، تأثیرات تومورزایی AFB₁ در برخی از گونه‌های آبزیان نیز مشاهده گردیده است برای مثال: ماهی آزاد کوهو، قزل‌آلای رنگین‌کمان، گربه‌ماهی، تیلاپپای نیل، ماهی گوپی (Lebistes reticulates) ماهی گورخری و کپور هندی روهو. (Halver 1969, Lee et al. 1971, Sato et al. 1973, Jantraratat 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 AFB₁ 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 AFB₁ دارد. از طرف دیگر به نظر می‌رسد که AFB₁ یک ترکیب سرطان‌زای ضعیف در ماهی آزاد کوهو بوده و گونه‌هایی از قبیل ماهی گورخری و گربه‌ماهی 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 سرطان‌زایی AFB₁ 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 رنگین‌کمان به ایجاد سرطان ناشی از مصرف AFB₁ می‌تواند ناشی از راندمان پایین سیستم ترمیم DNA در پاکسازی DNA های باند شده با آفلاتوکسین B₁ باشد (Bailly et al. 1988). تحقیق انجام شده طی ۸ هفته بر روی تیلاپپای نیل ۲/۷ گرمی تغذیه شده با مقادیر ۰/۲۵، ۰/۵، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم AFB₁/Kg نشان داده است که در تغذیه با تیمار حاوی ۱۰ mg/Kg افزایش لیپوفوشین و تفاوت اندازه درسته هیاتوسیت ها و در غلظت ۱۰۰ mg/Kg، نکروز حاد هیاتوسیت هابه همراه ۶۰ درصد تلفات مشاهده شده است. هیچگونه ضایعات پاتولوژیک در طحال، معده، بخش پیلوریک روده، کلیه قدامی و قلب در تیمارهای آزمایشی مشاهده نگردید (Tuan et al. 2002).

در بررسی های کتابخانه ای مدارکی که موید انجام تحقیقات کالبدگشایی به منظور دستیابی به اثرات ناشی از مصرف AFB₁ در ماهیان باشد. به دست نیامد. در ارتباط با مطالعات هیستوپاتولوژی نیز عمدتاً کبد به عنوان عضو هدف تاثیر AFB₁ مدنظر قرار داشته و اثرات تومورزایی و تغییرات پاتولوژیک در این عضو مد نظر بوده است. تاثیر پذیری این عضو و سایر اندام های داخلی تا حد زیادی به روند متابولیسم AFB₁ در گونه تحت تغذیه بستگی دارد. بعلاوه عواملی از جمله: سن، مقدار سم، مدت زمان مواجهه و درجه حرارت محیط پرورش نیز در این رابطه حایز اهمیت هستند. بنظر می‌رسد سیستم انزیمی متابولیسم AFB₁ در فیل ماهی مشابه با گربه‌ماهی روگامی باشد. طبعاً این فرضیه نیازمند تحقیق و بررسی است.

مشاهدات کالبدگشایی در ابشش فیل ماهی های آزمایشی بیانگر وجود درجاتی از پرخونی، کم خونی و بعضاً افزایش ترشحات مخاطی در این عضو است و تغییرات پاتولوژیک آن شامل: پرخونی، تلانژکتازی،

خونریزی، هاپرپلازی سلول ها در پایه لاملاهای ثانویه و تخریب بافت پوششی لاملاهای ثانویه در برخی از قسمت ها می باشد که به تناسب میزان سم و مدت زمان مصرف ان شدت بروز ضایعات مذکور متفاوت است. اگرچه این تغییرات برای اولین بار و در تحقیق حاضر گزارش گردیده است و تیمارهای شاهد فاقد علائم مذکور بوده اند، ولی به نظر می رسد که استفاده از یافته های مذکور بعنوان شاخص تایید پاتولوژی مسمومیت با AFB₁ نیازمند مطالعات بیشتری است.

علائم کالبد گشایی در کبد شامل پرخونی، کبد چرب، کیسه صفراي متسع و حاوی صفراي بی رنگ، تقسیمات ظاهری لانه زنبوری در قسمت شکمی کبد، رنگ سبز لجنی به همراه سستی بافت و رنگدانه های سیاه رنگ در قسمت داخلی است. علائم مذکور به تناسب میزان سم و مدت زمان مصرف آن بیانگر روند پیشرونده تغییرات از شکل حاد به مزمن است. در ارتباط با علائم کالبد گشایی مسمومیت با AFB₁ در کبد آبزیان به شکل مشروح گزارشی در دسترس نمی باشد. نظریه اینکه علائم فوق الذکر در تیمارهای شاهد مشاهده نگردید لذا بنظرمی رسد از علائم مشاهده شده بتوان در تشخیص موارد مشکوک به مسمومیت با AFB₁ بهره برداری نمود.

روند پیشرونده و مزمن تغییرات پاتولوژیک در کبد بسیار روشن و جهت تایید تشخیص مسمومیت با AFB₁ در فیل ماهی قابل استناد است. بنظر نمی رسد AFB₁ در کبد فیله ماهی قابلیت تومورزایی داشته باشد.

علائم کالبد گشایی مسمومیت با AFB₁ در کلیه فیل ماهی بسیار مشهود و شامل علائمی از جمله پرخونی و تورم حاد تا ایجاد ندول های سفید در بخش خلفی و تحلیل بافت کلیه در برخی از تیمارها در ماه سوم نمونه برداری می باشد. تغییرات پاتولوژیک نیز بسیار گسترده و شاخص بوده و شامل پرخونی، خونریزی، دژنراسانس و نکروز گلوبول ها و لوله های ادراری، تغییرات فیروتیک و تحلیل برنده بافت کلیه است.

موضوع حایز اهمیت این که کلیه به عنوان عضو هدف در مسمومیت با AFB₁ محسوب نمی گردد و ضایعات ایجاد شده در کلیه بیشتر در مسمومیت با اکراتوکسین ها ایجاد می شود.

اکراتوکسین در دانه های روغنی و غلات یافت می شوند. این سموم در طی مراحل ذخیره سازی و در درجه حرارت و رطوبت مناسب توسط *Penicillium verrucosum* تولید می گردد. عضو هدف اکراتوکسین کلیه بوده و منجر 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 از قبیل نفریت در لوله ها و بروز لمفوسارکوم و بروز ضایعات در کلیه ماهی قزل الای رنگین کمان اشاره داشته اند.

بروز تغییرات وسیع در کلیه بواسطه مسمومیت با AFB₁ در آبزیان پرورشی به شکل مشاهده شده در تحقیق حاضر تاکنون گزارش نشده است.

نظریه اینکه علائم مذکور در تیمارهای شاهد مشاهده نگردید، لذا بنظرمی رسد از علائم مشاهده شده بتوان در موارد مشکوک به مسمومیت با AFB₁ بهره برداری نمود.

علائم کالبدگشایی مسمومیت با AFB₁ در کلیه فیل ماهی های آزمایشی بیانگر ایجاد تغییراتی در رنگ و بافت این عضو در مقایسه با تیمارهای شاهد است که در بخش نتایج مشروحا توضیح داده شده است. روند بروز تغییرات پاتولوژیک در طحال حایز اهمیت است که با تغییرات حاد شامل پرخونی و خونریزی شروع شده و تا بروز تغییرات گرانولوماتوز و شبه توموری و نهایتاً نکروز پیش میرود. تاکنون گزارشی در ارتباط علائم کالبدگشایی مرتبط با آفات توکسیکوزیس در ابریزان منتشر نشده است. بروز تغییرات پاتولوژیک به شرح فوق نیز برای اولین بار و در فیل ماهی گزارش می شود. بنظر می رسد با انجام مطالعات تکمیلی بتوان از قابلیت تایید تشخیص علائم پاتولوژیک مذکور جهت موارد مشکوک به مسمومیت با AFB₁ بهره برداری نمود.

۳-۵-۱- فاکتورهای خون شناسی

در مواجهه داد جنین قزل آلاهی 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 ۷۵ ppb افزایش عملی تعداد لمفوسیت ها مشاهده گردید که با نتایج حاصل در مورد قزل آلاهی رنگین کمان مطابقت دارد. نتایج حاصل از تداوم تغذیه با غذای حاوی آفات توکسین منجر به کاهش میزان لنفوسیت ها به شکل معنی دار بخصوص در غلظت ۱۰۰ ppb 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 آفات توکسین ب ۱ می باشد.

همچنین در مواجهه لمفوسیت ها با AFB₁ کاهش تولید ایمنوگلوبین و تزاید لمفوسیت ها گزارش گردیده است (Ottinger and Kattari, 1998). تفاوت های مشاهده شده در مورد نوتروفیل 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 ۱۰۰ ppb مشاهده گردید. وسعت جراحات پوستی در تیمارهای مذکور و عفونت های جلدی ایجاد شده به همراه سائز 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 آفات توکسین می تواند منجر به نقصان فاکتورهای ضد میکروبی (لیزوزیم، آنتی پروتاز و غیره) سرم و نهایتاً افزایش حساسیت ماهی به عفونت ها شود. بنابر این اگر چه دوزهای پائین آفات توکسین 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 ۱۰۰ ppb می تواند توجیه داشته باشد.

با افزایش غلظت آفلاتوکسین B1 در جیره ماهی تیلپیا 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 ایجاد کم خونی در ماهیان تحت تغذیه با آفلاتوکسین B1 می باشد. این مطلب با علائم کلینیکی و مشاهدات پاتولوژیک همخوانی دارد.

۴-۵-۱- 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 (یوسف پور، ۱۳۷۳). بر اساس تجربیات پرورش گونه فیل ماهی، 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 سانتی گراد 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 و مصارف حیوانی مطرح هستند، افزایش این تقاضا منجر به رشد سریع در آبی پروری گردیده است (Myhr & Dalmo 2005).

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

گونه های اصلی پرورشی در کشورهای اروپایی ماهی آزاد آتلانتیک، قزل آلائی رنگین کمان، باس دریایی، سیم دریایی (Sparus aurata) توبورت، مار ماهی و کپور معمولی می باشند (EC 2001). این گونه ها عمدتاً در محیط طبیعی گوشتخوار بوده و در شرایط پرورش به شکل متراکم نیازمند به مقادیر بالای پروتئین می باشند. 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 می شوند. (New et al. 1995; Scottish Executive Report 2002).

اغلب پودرهای ماهی از ماهی کامل تهیه می گردند از جمله این ماهیان می توان به ماهیان آنچوی و کاپلین و یا محصولات فرعی و ضایعات ماهی منهادن، هرینگ و آزاد ماهیان اشاره نمود (Hardy 1989).

پودر ماهی پس از خشک کردن و آسیاب کردن ماهی تازه حاصل می شود و غذای ماهیان پرورشی از ترکیب پودر ماهی با کربوهیدرات ها، همبندها، آرد سویا، و گندم به علاوه ویتامین ها، مواد معدنی و رنگدانه ها و سایر مواد مغذی لازم ساخته می شود. از ضایعات ناشی از فراوری ماهی، از جمله کنساتره های پروتئینی و هیدرولیز شده نیز در تغذیه آبزیان بهره برداری می گردد. این موضوع باید مدنظر قرار داشته باشد که علیرغم اینکه استفاده از ضایعات ماهی در تغذیه آبزیان می تواند یک روش اقتصادی باشد ولی قادر است در صورت فراوری نامناسب مخاطراتی را نیز در بر داشته باشد. برای مثال احتمال معرفی عوامل بیماری زا و مایکو توکسین ها از طریق 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 می افتد 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 می افتد (Dragoni et al. 2000).

بواسطه قیمت بالای پودر ماهی، جایگزینی آن با مواد اولیه با منشاء گیاهی از جمله غلات می تواند در کاهش هزینه های جاری آبرزی 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 آفلاتوکسین ها وجود دارد که می تواند 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 بیماری ها می گردد. این موضوع بخصوص در سیستم های متراکم پرورشی که با غذاهای تازه و طبیعی جایگزین غذاهای پلت تغذیه می شوند 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).

خصوصاً در حدود ۶۹ درصد از نمونه های اخذ شده از پودر ماهی به آفلاتوکسین B₁ آلودگی داشتند (Dutta & Das 2000). بطور کلی آلودگی به مایکو توکسین ها 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 و همچنین فراوری و ذخیره سازی نامناسب است (Tacon 1992, Spring 2005).

در این کشورها غذاهای مصرفی آبیان عمدتاً توسط مزرعه داران ساخته می شود که غالباً با دستکاری های غیربهداشتی همراه است. در این نواحی در کنار آب و هوای مناسب جهت آبیاری پروری، آلودگی شدید به آفلاتوکسین B₁ بواسطه توسعه نامناسب اقتصادی - اجتماعی، روش های عمل آوری غیربهداشتی و قدیمی، الگوهای غلط و غیرقابل قبول ذخیره سازی 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 آبیان در مناطق گرمسیری قرار دارند و بیش از ۸۵ درصد تولیدات جهانی آبیاری پروری در کشورهای در حال توسعه، تولید می شود. همچنین اغلب مزارع پرورش متراکم میگو در تایلند، تایوان، اندونزی و فیلیپین واقع شده اند در این مناطق آلودگی شدید غذای مصرفی میگوها به آفلاتوکسین ها مشاهده گردیده است (Tacon et al. 1995; Fegan 2005).

اگرچه آلودگی به آفلاتوکسین ها معمولاً از طریق آلودگی های موجود در مواد اولیه حمل شده از مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری حادث می گردد ولی آلودگی های 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 جیره های غذایی آبیان زمینه ساز بروز بیشتر آفلاتوکسیکوزیس در مزارع پرورشی می باشد بطور کلی مطالعات بیانگر این مطلب است که آلودگی غذاهای مصرفی آبیان به آفلاتوکسین ها یک مسئله اساسی و گسترده در آبیاری پروری محسوب گردیده که می تواند از نظر اقتصادی و بهداشتی در بسیاری از کشورهای آبیاری پرور از جایگاه ویژه ای برخوردار باشد.

تیلاپای نیل تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۰/۱ mg به ازای هر کیلوگرم از جیره در طی مدت ۱۰ هفته فقط کاهش رشد را نشان می دهد و در ماهیانی که با ۰/۲ mg AFB₁ /kg 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 B₁ از طریق خوراکی برخوردار است. آنها معمولاً از جیره های غذایی حاوی بیش از ۳۰ درصد ذرت و کنجاله پنبه دانه که غالباً غذاهایی آلوده محسوب می گردند، جهت تغذیه استفاده می کنند. بر اساس مطالعات Lovell در سال ۱۹۸۴ حداقل میزان ۴۰۰ μg/kg 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 AFB₁ از طریق جیره غذایی (در محدوده ۲۱۵۴ - ۱۰۰ ppb) کاهش معنی داری در اضافه وزن یا بروز ضایعات هیستوپاتولوژیک در آنان مشاهده نمی شود (Jantrarotai & Lovell 1990a).

علائم اولیه کلینیکی مسمومیت حاد با آفلاتوکسین از جمله: کاهش سرعت رشد، کم خونی، نکروز کبد و دستگاه گوارش، زمانی در گربه ماهی پرورشی بروز می نماید که با مقادیر حدود $10/000$ ppb از AFB_1 تغذیه می شود (Jantrarotai & Lovell 1990a). دُز کشنده آفلاتوکسین B_1 (LD_{50}) در طی ۱۰ روز از طریق تجویز داخل صفاقی برای گربه ماهی روگامی معادل ۱۱/۵ میلی گرم 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 قزل آلابی رنگین کمان می باشد. در تجویز خوراکی این عدد به ۲۰ برابر افزایش می یابد.

از دیگر گونه های ماهی که به مقدار کمتری نسبت به مسمومیت با AFB_1 مقاومت نشان می دهد تیلایپای نیل است. اگرچه این گونه در مسمومیت های حاد در مقایسه با گربه ماهی پرورشی گونه حساس تری به شمار می رود (Tuan et al. 2002).

Chavaz – Sanchez و همکارانش (۱۹۹۴) گزارش کردند که مقدار ۳۰ میلی گرم AFB_1 به ازای هر کیلوگرم از جیره غذایی تیلایپای برای این ماهی کشنده محسوب نمی شود. زمانی که جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین ($115/34$ ppb) به تیلایپای نیل به مدت ۱۲۰ روز خوراند شد، فقط تورم های گرانولوماتوز مزمن در کبد مشاهده گردید بدون اینکه توموری تشکیل شود (Cagauan et al. 2004).

مطالعات انجام شده نشان می دهد که تیلایپای نیل تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۱۰ میلی گرم AFB_1 به ازای هر کیلوگرم، در طی مدت ۸ هفته به میزان ۹۰ درصد کاهش در نرخ رشد را نشان می دهد در حالیکه این میزان در گربه ماهی روگامی 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 تیلایپای نیل نسبت به گربه ماهی گزارش شده است (Jantrarotai & Lovell 1990a).

نتایج بدست آمده از تحقیق انجام شده به منظور دستیابی به تاثیر مقادیر مختلف AFB_1 بر شاخص های رشد در فیل ماهی پرورشی بیانگر مطالب زیر است:

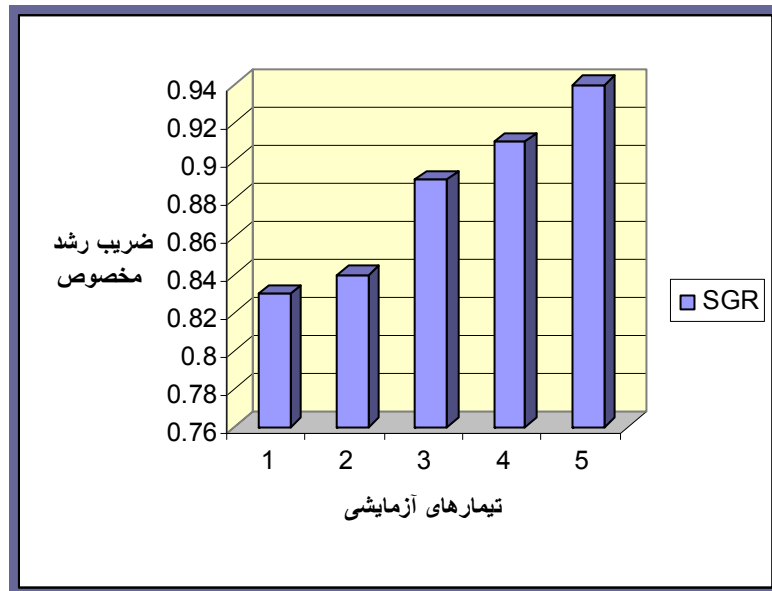
۵-۵-۱- میانگین وزنی

اختلاف معنی داری بین میانگین وزنی ماهیها در گروه های مختلف در هنگام ذخیره سازی در وان های مختلف وجود ندارد ($p > 0.05$). در بیومتری اول نیز اختلاف معنی داری بین میانگین وزنی ماهیها در گروه های مختلف در طول یک ماه تغذیه با جیره نگهداری در وان های مختلف مشاهده نمی شود ($p > 0.05$). در بیومتری سوم اختلاف معنی داری هر چند کوچک ($sig. = 0.03$) بین میانگین وزنی ماهیها در گروه های 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 ماهیهای سایر تیمارها 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 تیمارها با هم نشان نمی دهد. در بیومتری پنجم اختلاف 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 ماهیهای سایر تیمارها (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 تیمارها 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 تیمارهای 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، به رغم اینکه تغییرات هیستوپاتولوژیک متناسب با افزایش غلظت سم شدت یافته است ولیکن تغییرات وزنی محسوس نبوده است و صرفاً 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 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 تیمارهای ۲، ۳، ۴ و ۵ نسبت به گروه ۱ به ترتیب ۹، ۱۱، ۳۸ و ۷۰ گرم اختلاف منفی دارند که این سیر منفی منظم، احتمالاً از تاثیر تدریجی افزایش غلظت سم بر میانگین وزنی ماهی ها حکایت دارد. آنچه که از روند میانگین وزنی در تیمارهای مختلف هویدا است تا اثر سم در ماهی های تیمار یک (100ppb) در بیومتری چهارم و پنجم مشابه می باشد. عبارتی دیگر تاثیر سم در این تیمار، بعد از گذشت دو ماه از اولین مواجهه عملاً منجر به توقف رشد ماهی ها گردیده است.

۶-۵-۱- ضریب رشد مخصوص (SGR)

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



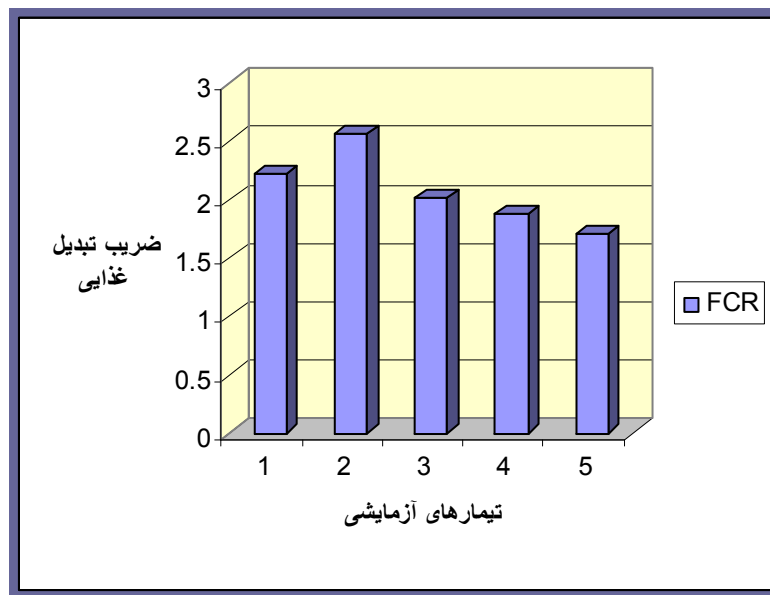
نمودار ۳: مقایسه ضریب رشد مخصوص در فیل ماهی های تغذیه شده با مقادیر مختلف AFB_1 به مدت ۳ ماه در درجه حرارت $20 \pm 1.8^{\circ}C$.

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

۷-۵-۱- ضریب تبدیل غذایی

اختلاف معنی داری بین ضریب تبدیل غذایی 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 تیمارها نیز 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 تولید تاثیر گذار باشد.



نمودار ۴: مقایسه ضریب تبدیل غذایی در فیل ماهی های تغذیه شده با مقادیر مختلف AFB_1 به مدت ۳ ماه در درجه حرارت $18 \pm 2^{\circ}C$.

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

گزارش Chavez – Sanchez و همکاران (۱۹۹۴) حاکی از این مطلب است که تغذیه تیلایپای نیل با مقدار $1/88 \text{ mg } AFB_1 / \text{kg}$ در جیره غذایی در طی مدت ۲۵ روز منجر به کاهش رشد ماهیان می گردد و همچنین اظهار می نماید که میزان $30 \text{ mg } AFB_1 / \text{kg}$ در جیره برای این گونه کشنده محسوب نمی شود.

در تیلایپای نیل تغذیه شده با $100 \text{ mg } AFB_1 / \text{kg}$ در جیره غذایی برای مدت ۸ هفته افزایش مرگ و میر به چشم می خورد ولی میزان این مرگ و میر با مرگ و میر مشاهده شده در ماهیانی که با $10 \text{ mg } AFB_1 / \text{kg}$ در جیره تغذیه شده اند تفاوت معنی داری را نشان نمی دهد. (Tuan et al. 2002). این مطالعات همانند مطالعات انجام شده توسط Chavez – Sanchez در سال ۱۹۹۴ مویید این مسئله است که بین میزان مرگ و میر و مقدار آفلاتوکسین B_1 موجود در جیره ارتباط ویژه ای وجود ندارد و تا حدی نتایج حاصل در مطالعات اولیه انجام شده در این رابطه را با شک روبرو می سازد.

نرخ رشد و ضریب تبدیل غذایی (FCR) در تیلایپای نیل تغذیه شده با $2/5 \text{ mg } AFB_1 / \text{kg}$ در جیره به شکل معناداری متأثر می شود ولی این شاخص ها در مواجهه با میزان $0/25 \text{ mg } AFB_1 / \text{kg}$ در جیره تغییر قابل ملاحظه ای را نشان نمی دهند. (Tuan et al. 2002).

مشاهدات مذکور با نتایج (Chavez – sanchez et al. 1994) در مطالعات انجام شده بر روی تیلاپییای نیل مطابقت دارد. در این مطالعات میزان رشد با مقدار $0/94 \text{ mg}$ آفلاتوکسین تغییری نمی‌نماید ولی در تغذیه با جیره حاوی $1/88 \text{ mg AFB}_1/\text{kg}$ و مقادیر بالاتر در جیره کاهش می‌یابد.

محققان فوق اظهار می‌دارند که میزان FCR با مصرف مقدار $30 \text{ mg AFB}_1/\text{kg}$ در جیره، در تیلاپییای تحت آزمایش، تغییر معنی‌داری را نشان نمی‌دهد.

تیلاپییای نیل در مقایسه با گربه ماهی روگامی، گونه حساس‌تری در بروز تغییرات در شاخص‌های رشد می‌باشد (Tuan et al. 2002).

در گربه ماهی روگامی تغذیه شده با $2/15 \text{ mg AFB}_1/\text{kg}$ در جیره غذایی به مدت ۱۰ هفته هیچگونه تغییرات معنی‌داری در رشد مشاهده نگردید و در تغذیه با میزان $10 \text{ mg AFB}_1/\text{kg}$ در جیره فقط در ۲۴ درصد از ماهیان تحت آزمایش کاهش رشد مشاهده شد (Jantraratotai & Lovell, 1990).

بر طبق یافته‌های Tuan و همکاران در سال ۲۰۰۲ شدت ضایعات ایجاد شده در تیلاپییای 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 $2/25$ 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 آفلاتوکسین B_1 ، نکرروز 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 ($16 \mu\text{M}$) که شباهت زیادی به محدوده‌های طبیعی آلودگی‌های محیطی با آفلاتوکسین دارد، عملاً منجر به تشکیل AFBO با منشاء میکروزمی نمی‌گردد. متقابلاً، مقادیر کم AFBO همانند AFM_1 فقط در شرایط تجربی مصرف مقادیر بالا و اشباع AFB_1 ($128 \mu\text{M}$) 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 روگامی 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 جمع‌بندی 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

رنگین کمان فعالیت بالای اپوکسیداسیون AFB_1 به $AFBO$ صورت می گیرد که این متابولیت یک ترکیب شدیداً سرطانزا در این گونه محسوب می گردد.

همانگونه که مشاهده می شود عوامل متعددی از جمله: میزان حساسیت گونه ای، مقدار سم، مدت زمان مواجهه با سم، روند متابولیسم سم در گونه های مختلف، سن و حتی شرایط مختلف پرورش و... میتواند در چگونگی تاثیر گذاری سم بر روی ابزی تحت مطالعه موثر باشند. این گوناگونی به همراه خلاء اطلاعاتی موجود عملاً عاملی در راستای ایجاد اشکال جهت مقایسه نتایج بدست آمده در مورد گونه های مختلف است. بدیهی است انجام مطالعات تکمیلی و دستیابی به اطلاعات بیشتر، زمینه ساز بحث های شفاف تر در این زمینه خواهد بود.

۸-۵-۱- میزان زنده مانی (Survival rate)

میزان زنده مانی ماهیان در تمامی تیمارهای آزمایشی صد درصد بود و هیچگونه تلفاتی مشاهده نگردید. با توجه به میزان وقوع و شدت جراحات پوستی، تغییرات پاتولوژیک مشاهده شده و روند پیشرفت آنها در تیمارهای مختلف و در طول آزمایش و همچنین کاهش رشد و افزایش ضریب تبدیل غذایی بخصوص در تیمارهای ppb ۷۵ و ۱۰۰ در نوبت سوم نمونه برداری موضوع عدم وجود تلفات از اهمیت خاصی برخوردار می گردد.

طبعاً وجود و روند بروز ضایعات و تغییرات مشاهده شده در تیمارهای آزمایشی و مقایسه نتایج بدست آمده با تیمارهای شاهد بیانگر تاثیر پذیری تیمارها از مقادیر مختلف سم در جیره های آزمایشی است. در چنین شرایطی عدم وجود تلفات موضوعی است که تحقیقات بیشتری را طلب می نماید. شواهدی از جمله قدمت و تاریخچه زندگی ماهیان خاویاری، طول عمر آنان، مقاومت آنان نسبت به بیماریهای عفونی و... بیانگر سیستم ایمنی قدرتمند و مقاومت بالای این ماهیان است. انجام تحقیقات در موضوعاتی از قبیل تاثیر مقادیر مختلف AFB_1 بر سیستم ایمنی، بررسی روند و چرخه متابولیسم AFB_1 ، بررسی میزان قابلیت اتصال AFB_1 به DNA و مسمومیت های ژنتیکی ناشی از آن، بررسی میزان سرطان زایی و تومورزایی و... از جمله اقداماتی است که می تواند در روشن تر نمودن چگونگی تاثیر AFB_1 در فیل ماهی موثر باشد.

۹-۵-۱- باقیمانده های بافتی AFB_1 در عضلات فیل ماهی

آفلاتوکسین ها به عنوان یکی از عوامل ایجاد سرطان های کبدی به خوبی شناخته شده اند ولی این ترکیبات دارای تأثیرات مسمومیت زای مهم دیگری نیز می باشند. تأثیراتی از جمله تضعیف سیستم ایمنی و تداخل در متابولیسم پروتئین ها و برخی از ترکیبات ریز مغذی در مسمومیت های مزمن ناشی از آفلاتوکسین ها در حیوانات مزرعه ای و آزمایشگاهی گزارش گردیده است. اگرچه عوارض فوق الذکر 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 آفلاتوکسین ها 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 در انسان و حیوانات پرورشی گردیده است. میزان مجاز آفلاتوکسین موجود در مواد خوراکی، مصارف انسانی با توجه به کشورهای مختلف در محدوده ۳۰ - ۴۰ 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، ۳۰۰ ppb تعیین گردیده است (FDA, 1994).

مقدار یاد شده نه تنها از بروز مسمومیت حاد با آفلاتوکسین‌ها جلوگیری می‌نماید بلکه به اندازه کافی کم می‌باشد که در تجارت اغلب غلات تولید شده مشکلی ایجاد ننماید. در ارتباط با تغذیه حیوانات موضوع مخاطرات سرطان‌زایی آفلاتوکسین، به جز در مورد گونه‌های بسیار حساس، در تعیین حد مجاز آن، مدنظر قرار نمی‌گیرد. متعاقباً تحقیقات دامپزشکی آلودگی با مقادیر بالاتر توکسین را برای دوره‌های کوتاه مدت تغذیه مورد آزمایش قرار داد. نتایج این تحقیقات اطلاعاتی را در مورد میزان مسمومیت ناشی از مصرف آفلاتوکسین در محدوده ۵۰۰ - ۱۰۰۰ ppb ارائه می‌نماید و به عنوان موثق‌ترین اطلاعات اختصاصی در مورد جوامع انسانی کشورهای در حال توسعه که فاقد سیستم‌های کنترل آفلاتوکسین در مواد غذایی می‌باشند، قابل استناد است. تفاوت‌های بین گونه‌های 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 ($> 6000 \text{ mg}$) می‌تواند منجر به ایجاد مسمومیت حاد منجر به مرگ شود، در حالیکه مواجه شدن طولانی مدت با دزهای کم سرطان‌زا است (Groopman et al. 1988).

بروز آفلاتوکسیکوزیس در انسان در بسیاری از کشورها از جمله: هند، چین، تایلند و چندین کشور آفریقایی گزارش گردیده است. در آفریقا 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 - ۱۹۹۴) در چین و آفریقای غربی بیانگر مخاطره آمیز بودن شرایط ابتلا در مناطق مذکور است (Aspen Cancer Conference 2001).

شرایط حاکم بر دوران‌های جنینی و کودکی از جمله 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 در انسان به عنوان عامل زمینه‌ساز سرطان‌های کبدی شناخته شده است و کارگران حمل‌کننده 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 درجه یک 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 در غذا در برخی از کشورهای اروپایی باشند) (Henry et al. 1999).

جهت ارزیابی تأثیر آفلاتوکسین‌ها در انسان باید ملاحظات مدنظر قرار گیرد. اول اینکه تمامی آفلاتوکسین‌ها از نظر بیولوژیکی دارای تأثیرات یکسانی نمی‌باشند و مقادیر متفاوتی از آفلاتوکسین‌های خورده شده، در بدن سم‌زدایی می‌شوند و دیگر اینکه 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 در انسان به خوبی مورد مطالعه قرار نگرفته است. AFM₁ 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، ساختار ژنتیکی، 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 (LD₅₀) در بین گونه‌های مختلف به چشم می‌خورد. در اغلب گونه‌ها محدوده LD₅₀ فی ما بین ۱۰ - ۰/۵ mg/kg از وزن بدن می‌باشد.

تفاوت‌هایی در این چرخه متابولیکی فی مابین قزل‌آلای رنگین‌کمان با سایر آبزیان از جمله گربه ماهی، روگامی و ماهی گورخری مشاهده می‌گردد. یک بررسی گسترده توسط Eaton و Gallagher در سال ۱۹۹۵ جهت ارزیابی تفاوت‌ها در متابولیسم کبدی و متابولیسم سیتوزولی AFB₁ در قزل‌آلای رنگین‌کمان و گربه-ماهی روگامی به عمل آمد. این مطالعات نشان داد که وجه مشخصه چرخه متابولیسم AFB₁ در قزل‌آلای رنگین-کمان راندمان بالای فعالیت اپوکسیداسیون میکروزومی با واسطه CYP می‌باشد که منجر به تولید متابولیت‌های ناشی از هیدروکسیلاسیون از جمله: AFQ₁ یا AFP₁ نگردیده و فقط AFM₁ را تولید می‌کند (Yang et al. 2000).

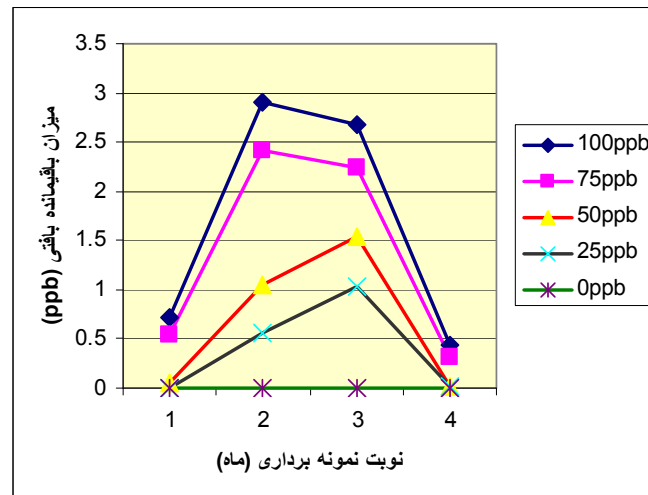
-نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر ذیلاً تحلیل و بررسی گردیده است:

اگر فرضیه (برابری باقیماندگی بافتی در گروهها پس از یک دوره غذا دهی حاوی سم و 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، ۱۹۰/۹ و 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 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 گروههای مختلف در طول دوره حدوداً ۹۰ روزه تغذیه با جیره حاوی سم در وان‌های مختلف و 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 داده‌های بیومتری طی نمونه برداری‌های اول تا چهارم حاصل شده است، چنین بنظر می‌رسد 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 آنست 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 تقریباً صفر را نشان می‌دهد که موید آنست که در ۲۵ ppm سم امکان متابولیزه شدن سم توسط کبد فراهم بوده است. این آزمون نشان می‌دهد که به رغم اختلاف عملی بین گروههای ۳، ۴ و 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 حضور ۵۶ ppm 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 در تیمارهای ۷۵ و ۱۰۰ ppm علی‌رغم تداوم تغذیه با جیره‌های حاوی توکسین، شاهد کاهش میزان ذخایر بافتی آن هستیم. همزمانی این مشاهدات با کاهش میانگین وزنی، افزایش ضریب تبدیل غذایی و تغییرات وسیع و پیشرفته پاتولوژیک تا حد نکروز در کبد تیمارهای مذکور می‌تواند تا حدی بیانگر کاهش توانایی دستگاه گوارش در هضم و جذب جیره غذایی حاوی توکسین و دفع آن از طریق مدفوع باشد. طبعاً انجام مطالعات بیشتر در جهت اندازه‌گیری و تعیین میزان توکسین دفع شده از طریق مدفوع میتواند در تبیین این نظریه موثر باشد.

در نمونه برداری چهارم که پس از یک دوره تغذیه بدون سم انجام شده عدم وجود 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 و در متابولیسم و سم 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 باقیمانده آفلاتوکسین در بافت عضلانی فیل ماهی پرورشی تغذیه شده با مقادیر مختلف توکسین بمدت ۳ ماه در درجه حرارت 20 ± 1 °C.

در یک تحلیل کلی از نتایج بدست آمده می توان اینگونه اظهار نمود که طی متابولیسم AFB_1 که از طریق خوراکی در اختیار فیل ماهی پرورشی قرار می گیرد، امکان ذخیره ان به شکل باقیمانده بافتی در عضلات وجود دارد. میزان ذخیره بافتی با توجه به مقدار سم مصرفی و مدت زمان مصرف ان در تیمارهای مختلف آزمایشی متفاوت بوده و بعضا با توجه به توضیحات فوق الذکر این تفاوت معنی دار است. کاهش روند ذخیره سازی به رغم تداوم تغذیه با جیره های غذایی حاوی مقادیر بالاتر توکسین (تیمارهای حاوی ۷۵ و ۱۰۰ ppb) مطلبی جالب توجه است. بنظر میرسد تغییرات پاتولوژیک ایجاد شده در کبد در تیمارهای مذکور می تواند تا حد زیادی در روند متابولیسم و طبعاً تداوم ذخیره سازی سم در عضلات موثر باشد. مشاهدات و نتایج حاصله در ماه چهارم (تغذیه تیمارهای آزمایشی با جیره های غذایی فاقد توکسین) میتواند موید این مطلب باشد که کبد بواسطه عدم مواجه با توکسین فرصت ترمیم پیدا کرده و در پروسه متابولیسم باقیمانده های بافتی سم و سم زدایی مشارکت نموده است.

در مطالعات فارماکو کینتیک 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 نمونه برداری (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 - صفراوی است.

در این محل حضور متابولیت‌های AFB₁ موید غیر قابل برگشت بودن ترکیبات بافتی مذکور می‌باشد (پس از ۲۴ - ۹۶ ساعت). بعد از ۹۶ ساعت باقیمانده‌های بافتی AFB₁ 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 AFB₁ و متابولیت‌های آن در گربه ماهی دارای توزیع سریعی بوده ولی جذب آنها کامل نیست، بطوریکه پس از ۴۸ ساعت حدود ۸۵ درصد از AFB₁ 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 ($< 1/7$). (Plakas et al . 1991). جهت ارزیابی تأثیر آفلاتوکسین‌ها در انسان بایستی ملاحظات مدنظر قرار گیرد اول اینکه تمامی آفلاتوکسین‌ها از نظر بیولوژیکی دارای تأثیرات یکسانی نمی‌باشند و مقادیر متفاوتی از آفلاتوکسین‌های خورده شده در بدن سم‌زدایی می‌شوند و دیگر اینکه سیستم‌های مختلف بیولوژیکی تأثیرپذیری متفاوتی نسبت به مسمومیت با آفلاتوکسین به تناسب متابولیت‌های ایجاد شده در چرخه‌های مختلف متابولیکی از خود نشان می‌دهند. بطور کلی حداکثر میزان باقیماندگی افلاتوکسین در بافت عضلانی در تحقیق حاضر $2/9 \pm 36$ ppb است که مقدار نگران کننده ای با توجه به استانداردهای جهانی نمی‌باشد.

نظر به زدوده شدن تقریبی بافت عضلانی از باقیمانده‌های بافتی توکسین در طی مدت یک ماه تغذیه تیمارهای آزمایشی با جیره‌های فاقد توکسین، میتوان توصیه نمود که در صورت ایجاد مسمومیت مزمن و تعیین میزان باقیماندگی افلاتوکسین در عضلات، از روش مذکور به منظور سم‌زدایی استفاده گردد.

۶-۱- نتیجه گیری

AFB₁ 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 B₁ از خود نشان می‌دهند. به نظر می‌رسد که این تفاوت‌ها ناشی از تفاوت‌های بین گونه‌ای از نظر راندمان انتقال بیولوژیکی AFB₁ 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 و نیازمند تحقیقات بیشتر می‌باشد. در حال حاضر وجود خلاء اطلاعاتی در ارتباط با اختلاف در میزان حساسیت گونه‌های مختلف آبزیان پرورشی به AFB₁ در کنار تأثیرات AFB₁ 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 و ماهیان خاویاری در ارتباط با مسمومیت‌های ناشی از آفلاتوکسین B₁ 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 می‌گردد:

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 B₁ در غذاهای مصرفی و متابولیت‌های ناشی از آنان در آبزیان مورد استفاده در تغذیه انسان.

ج) تعیین میزان مسمومیت‌زایی آفلاتوکسین B₁ 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 رنگین کمان بواسطه مسمومیت با AFB₁، توجه بیشتری را طلب می‌نماید. بعلاوه این موضوع بایستی مورد توجه قرار گیرد که هدف اصلی آبرزی 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 AFB₁ می‌تواند از جایگاه مطالعاتی ویژه‌ای برخوردار باشد.

شرایط مناسب پرورشی در مزرعه، زمینه‌ساز افزایش درصد بقا بوده و در کنار 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 آبی‌پروری دور از انتظار خواهد بود.

طبعاً، رنگ زرد ایجاد شده ناشی از مسمومیت‌های مزمن آفلاتوکسین، B₁، 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 فوق‌الذکر 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 آبی‌پروری وجود دارد. همچنین شباهت‌های موجود در واکنش‌های سرطان‌زایی قزل‌آلای رنگین کمان و انسان این موضوع را از دیدگاه بهداشت عمومی از ویژگی خاصی برخوردار می‌نماید.

منابع

- پورعلی.ح.ر.، محسنی م و، علیزاده م. ۱۳۸۵. مطالعه مقایسه رشد فیل ماهی (*Huso huso*) در دو محیط پرورشی آب لب شور و آب شیرین. مجله علمی شیلات ایران، سال پانزدهم، شماره ۱، ص. ۴۳-۴۹.
- پور کاظمی م. برنامه راهبردی ماهیان خاویاری، ۱۳۸۶. موسسه تحقیقات شیلات ایران، ص. ۲-۱۴.
- کاکوزا الف.، ۱۳۸۰. روش های نوین تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری. دوره آموزشی کوتاه مدت، انستیتو بین المللی ماهیان خاویاری. ص. ۲۶-۳۰.
- محسنی م، پورعلی.ح.ر.، اق تومان و توکلی م. ۱۳۸۲. پرورش بچه فیل ماهیان با درصد های مختلف غذای کنسانتره فرموله شده. مجله علمی شیلات ایران، ویژه نامه اولین سمپوزیوم ملی ماهیان خاویاری، ص. ۳۷-۴۸.
- یوسف پور ح.، ۱۳۷۳. پرورش بچه ماهیان خاویاری در آب شیرین. شرکت سهامی شیلات ایران. ص. ۶۸-۸۴.

- 1-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
- 2-Ananth. Bommakanti, and Farid Waliyar (2008). Importance of aflatoxins in human and livestock health
- 3-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.
- 4-Agag BI (2004) Mycotoxins in foods and feeds *Ass. Univ Bull Environ Res* 7:173-206,
- 5-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.
- 6 -Ashley LM, Halver JE (1963) Multiple metastasis of rainbow trout hepatoma. *Trans Am Fish Soc* 92:365-371
- 7-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
- 8-Bailey GS, Dashwood R, Loveland PM, Pereira C, Hendricks JD (1998) Molecular dosimetry in fish: quantitative target organ DNA adduction and hepatocarcinogenicity for four aflatoxins by two exposure routes in rainbow trout. *Mutat Res* 20:233-244
- 9-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
- 10 -Bailey GS, Selivonchick D, Hendricks J (1987) Initiation, promotion, and inhibition of carcinogenesis in rainbow trout. *Environ Health Persp* 71:147-153
- 11-Bailey GS, Williams DE, Hendricks JD (1996) Fish models for environmental carcinogenesis: the rainbow trout. *Environ Health Perspect* 104:5-21 Review
- 12-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
- 13-Balasubramanian T (1985) Incidence of Aflatoxin B1 in animal feeds. *Ind Vet J* 62:982-988
- 14-Bankole SA, Adebajo A (2003) Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it. *Afr J Biotech* 2:254-263
- 15-Bautista MN, Pitogo L, Subosa CR, Begino ET (1994) Aflatoxin B1 contamination of shrimp feeds and its effect on growth and hepatopancreas and preadult *Penaeus monodon*. *J Sci Food Agric* 65:5-11
- 16-Bennett JW, Klich M (2003) Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 16:497-516
- 17-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
- 18-Blout WP (1961) Turkey “X” disease. *Turkeys* 52:55 – 58, 61 –77
- 19 -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
- 20 - Busby WF, Wogan GN (1985) Aflatoxins. In: Searle CE (ed) *Chemical carcinogens*, 2nd edn., American Chemical Society, Washington, DC, pp 945–1136
- 21 -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
- 22 -Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP (2002) Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Molecul Biol Rev* 66:447–459
- 23 -CAST. 1989. *Mycotoxins: Economic and Health Risks*. Council for Agriculture Science and Technology TaskForce Report 116. Ames, IA.
- 24 -CAST (1989) *Mycotoxins: economic and health risks*. CAST .Task force report No. 116, Ames, IA, 91
- 25-CGIAR—Priorities and Strategies for Resource Allocation During 1998–2000; Annex III—Overview of Production Sectors and Commodities. FAO, April 1997
- 26 -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
- 27 -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
- 28 -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
- 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
- 30 -Coulombe RA Jr (1993) Symposium: biological action of mycotoxins. *J Dairy Sci* 76:880–891
- 31-Coulombe RA Jr (1994) Nonhepatic disposition and effects of aflatoxin B₁. In: Eaton DL, Groopman JD (eds), *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. Academic Press, San Diego, pp. 89 - 110
- 32 -Coulombe RA, Shelton DW, Sinnhuber R0., Nixon JE (1982) Comparative mutagenicity of aflatoxins using a Sulmnellaltrout hepatic enzyme activation system. *Carcinogenesis* 3:1261
- 33-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.
- 34 -D’Mello JPF, MacDonald AMC (1997) *Mycotoxins*. *Anim Feed Sci Technol* 69:155–166
- 35 -De Vries JW, Trucksess MW, Jackson LS (2002) *Mycotoxins and food safety*. Kluwer Academic/Plenum Publications ,New York, NY
- 36 -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
- 37 -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
- 38 -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
- 39 -Dutta TK, Das P (2000) Isolation of aflatoxigenic strains of *Aspergillus* and detection of aflatoxins B1 from feeds in India. *Mycopathologia* 151:29–33
- 40 -Eaton DL, Gallagher EP (1994) Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 34:135–172
- 41 -Eaton DL Groopman JD (1994) *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. Academic Press, San Diego, pp 6–8

- 42 -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
- 43 -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
- 44 -Eaton DL, Groopman JD, eds. The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance. London: Academic Press, 1993.
- 45 -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
- 46 -EC (2001) EU, Commission of the European Communities ,Facts and figures on the CFP (Common Fisheries Policy (
- 47 -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
- 48 -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)
- 49 -El-Banna, M.Teleb,M.M.Hadi and F.M, Fakhr(1992).Performance and tissue residue of tilapias fed dietary aflatoxin. *Vet.Med..J.40* (1992), pp.17-23,
- 50 -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
- 51 -Eaton DL ,Groopman JD (eds) The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance. Academic Press, San Diego, pp 27–43
- 52 – FAO , Web library (2002) www.fao.org/impho/hilibrary/x0036E.htm.
- 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
- 54 -FAO (2002) Fishery statistics: commodities, vol 21. FAO ,Rome
- 55 -Fegan D (2005) Mycotoxins: the hidden menace? [http //:www.alltech.com/](http://www.alltech.com/)
- 56 -Farabi, S.M.V, M.Yousefian and A.Hajimoradloo(2006).Aflatoxiosis in juvenile Huso huso fed a contaminated diet. *J.Appl.Ichthyol.,22(Suppl.)*,234-234
- 57 -Food and Drug Administration. 1994. Sec. 683.100—Action levels for aflatoxins in animal feeds (CPG 7126.33). Internet:
- 58 -Food and Drug Administration. 1995. Sec. 555.400 Foods—adulteration with aflatoxin (CPG 7120.26). Intern
- 59 -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
- 65 -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
- 66 -Groopmann JD and Thomas W Kensler. 1999. *CRC Critical Reviews in Toxicology* 1999 Chapter 19 113-124.

- 67 - 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.
- 68 - 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
- 69 -Guengerich FP (2006) Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J* 8:101–111
- 70 -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
- 71-Halver JE (1969) Aflatoxicosis and trout hepatoma. In: Goldblatt LA (ed) *Aflatoxin: scientific background, control ,and implications*. Academic Press, New York, pp 265–306
- 72 -Halver JE . Aflatoxicosis and rainbow trout hepatoma . In: Wogan GN, ed. *Mycotoxins in foodstuffs*. Cambridge, MA: MIT Press, 1965:209-34.
- 73 -Hamilton P (1990) Problems with mycotoxins persist, but can be lived with. *Feedstuffs* 62:22–23
- 74 –Hamilton, J. and Russel , T. (1992). Effects of water temperature and formulated diet on growth and survival of larval paddlefish .pp: 538 – 543
- 75 -Hamilton P (1990) Problems with mycotoxins persist, but can be lived with. *Feedstuffs* 62:22–23
- 76 -Hardy RW (1989) Diet preparation. In: Halver JE (ed) *Fish nutrition*, 2nd edn. Academic Press, London
- 77 -Hayes JD, Judah DJ, McLellan LI Kerr LA, Peacock SD, Neal GE (1991) Ethoxyquin-induced resistance to aflatoxin B₁ in the rat is associated with the expression of a novel a-class glutathione V-transferase subunit. Yc2 which possesses high catalytic activity for aflatoxin B₁-8,9-epoxide .*Biochem J* 279:385–398
- 78 -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
- 79 -Henry SH, Bosch FX, Troxell TC, Bolger PM.(1999). Reducing liver cancer—global control of aflatoxin. *Science*;286: 2453-4.
- 80 -Henry SH, Bosch FX, Bowers JC. Aflatoxin, hepatitis and worldwide liver cancer risks . *Adv Exp Med Biol* 2002;504: 229-33
- 81 -Howard S Randell and David L Eaton . 1990. Species susceptibility to Aflatoxin B₁ carcinogenesis. *Cancer Research*. 50 615-620 .
- 82 -Hussein HS, Brasel JM (2001) Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167:101–134
- 83 -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
- 84 -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
- 85 -Jantrarotai W, Lovell RT (1990a) Subchronic toxicity of dietary aflatoxin B₁ to channel catfish. *J Aquat Anim Health* 2:248-254
- 86 -Jantrarotai W, Lovell RT, Grizzle JM (1990b) Acute toxicity of aflatoxin B₁ to channel catfish. *J Aquat Anim Health* 2:237-247
- 87 -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
- 89 -Kelly JD, Eaton DL, Guengerich FP, Coulombe RJ. (1997).Aflatoxin B sub(1) activation in human lung. *Toxicol Appl Pharmacol*;144:88-95
- 90 - 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
- 91 -Kozlove, V.I.,(1993).Sturgeon farming.Moscow.VNIRO.P 64.
- 92 -Leadon SA, Tyrrell RM, Cerutti PA (1981) Excision repair of aflatoxin B₁-DNA adducts in human fibroblasts. *Cancer Res* 41:5125–5129
- 93 -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

- 94 -Lee SJ, Hedstrom OR, Fischer K, Wang-Buhler JL, Sen A, Cok I, Buhler DR (2001) Immunohistochemical localization and differential expression of cytochrome P450 3A27 in the gastrointestinal tract of rainbow trout. *Toxicol Appl Pharmacol* 177:94-102
- 95 -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
- 96 -Leeson S, Diaz GJ, Summers JD (1995) Poultry metabolic disorders and mycotoxins. University Books, Guelph, Ontario, Canada, pp 249-298
- 97 -Lightner DV (1977) Shrimp diseases. In: Sindermann CJ (eds) Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture. Elsevier/North-Holland Publishing Co., New York, pp 10-77
- 98 -Lightner DV, Redman RM, Price RL, Wiseman MO (1982) Histopathology of aflatoxicosis in the marine shrimp *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei*. *J Invertebr Pathol* 40:279-291
- 99 -Livingstone DR (1998) The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish *Comp Biochem Physiol Mol Integr Physiol* 120:43-49
- 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
- 101 -Loveland PM, Sinnhuber RO, Berggren KE, Libbey LM, Nixon JE, Pawlowski NE (1977) Formation of aflatoxin B1, from aflatoxicol by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) liver in vitro. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 6:167-170
- 102 -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
- 103 -Lovell RT (1984) Use of soybean products in aquaculture diets. Animal nutrition research highlights. American Soybean Association, St. Louis, Mo
- 104 -Lovell RT (1989) Nutrition and feeding of fish. Van Nostrand Reinhold, New York
- 105 -Lovell RT (1992) Mycotoxins: hazardous to farmed fish. *Feed Int* 13:24-28
- 106 -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
- 107 -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
- 108 -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.
- 109 -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
- 110 -Miller JD (1995) Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. *J Stored Prod Res* 31:1-16
- 111 -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
- 112 -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.
- 113 -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
- 114 -Moss MO (1991) The environmental factors controlling mycotoxin formation. In: Smith JE, Anderson RA (eds) *Mycotoxins and animal foods*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 37-56
- 115 -Moss MO (1998) Recent studies on mycotoxins. *J Appl Microbiol Symp Supplement* 84:62-76
- 116 -Murjani G (2003) Chronic aflatoxicosis in fish and its relevance to human health. Central Institute of Freshwater Aquaculture, India
- 117 -Myhr AI, Dalmo RA (2005) Is there a need for risk governance of genetic engineering in aquaculture? *Aquaculture* 250:542-554
- 118 -Naylor RL, Goldberg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MCM, Clay J, Folke L, Lubchenco J, Mooney H, Yroell M (2000) Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405:1017-1024

- 119 - 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
- 120 -New MB, Tacon AGJ, Csavas I (eds) (1995) Farm-made aquafeeds. FAO Fisheries Technical Paper No.343 . Rome.
- 121 -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
- 122 - 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
- 123 -Patterson DS, Galaney EM, Roberts BA (1978) The estimation of AFM1 in milk using 2-dimensional TLC. *Food Cosmetic Toxicol* 16:49–50
- 124 -Pier AC (1992) Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. *J Anim Sci* 70:3964–3967. Review
- 125 - Pier AC, Richard JL, Cysewski SJ (1980) Implications of mycotoxins in animal disease. *J Am Vet Med Assoc* 176:719–724
- 126 -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
- 127 - Puschner B (2002). Mycotoxins. *Vet Clin Small Anim* 32:409—419
- 128 -Ramsdell HS, Eaton DL (1990) Species susceptibility to aflatoxin B1 carcinogenesis: comparative kinetics of microsomal biotransformation. *Cancer Res* 50:615–620
- 129 -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
- 130 -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
- 131 -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
- 132 -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
- 133 -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
- 134 -ROC. Report on Carcinogens, 11th ROC (1992) Eleventh Edition: Aflatoxins CAS No. 1402-68-2
- 135 - Rogers AE. Nutritional modulation of aflatoxin carcinogenesis erinary , and agricultural significance. London: Academic Press, 1993:207-30.
- 136 -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.
- 137 -Roebuck BD, Maxuitenko YY (1994). Biochemical mechanisms and biological implications of the toxicity of aflatoxins as related to aflatoxin carcinogenesis. In:
- 138 -Ronyal A. and Peteri A.,1990.comparison of growth rate of starlet *Acipenser ruthenus* hybrid of starlet(*Acipenser ruthenus*× *Acipenser baeri stenorrhynchus*) raised in a water recycling system.*Aquaculture*, Vol.5 ,pp.185-192
- 139 -Royes JB, Yanong RPE (2002) Molds in fish and aflatoxicosis (<http://edis.ifas.ufl.edu/FAO95>)
- 140 -Rucker RR, Yasutake WT, Wolf H. Trout hepatoma -a preliminary report. *Prog Fish Cult* 2002;23:3-7.
- 141 -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
- 142 -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
- 143 -Rustom IYS (1997) Aflatoxin in food and feed. Occurrence , legislation and inactivation by physical methods. *Food Chem* 59:57–67
- 144 - 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
- 145 - 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
- 146 -Salhab AS, Edwards GS (1977) Comparative in vitro metabolism of aflatoxicol by liver preparations from animals and humans. *Cancer Res* 37:1016–1021

- 147 -Sargeant K, Carraghan RB, Allcroft R (1963) Toxic products in groundnuts. Chemistry and origin origin of aflatoxins . Chem Ind (London) pp 53-55
- 148 -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
- 149 -Schoental R (1967) Aflatoxins. Ann Reve Pharmacol 7:343 -356
- 150 -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
- 151 -Sekiguchi J, Gaucher GM (1977) Conidiogenesis and secondary metabolism in *Penicillium urticae*. Appl Environ Microbiol 33:147-158
- 152 -Sharma RP, Salunkhe DK (eds) (1991) Mycotoxins and phytotoxins. CRC Press, Boca Raton, FL
- 153 -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
- 154 -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
- 155 -Smith RB, Griffin JM, Hamilton PB (1976) Survey of aflatoxicosis in farm animals. Appl Environ Microbiol 31:385-388
- 156 - Steyn PS (1995) Mycotoxins, general view, chemistry and structure. Toxicol Lett 82/83:843-851
- 157 -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
- 158 -Stegeman JJ (1989) Cytochrome P450 forms in fish: catalytic ,immunological and sequence similarities. Xenobiotica 19:1093-1110
- 159 -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
- 160 -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
- 161 -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
- 162 -Tacon AGJ, Phillips MJ, Barg UC (1995) Aquaculture feeds and the environment: the Asian experience. Water Sci Technol 31:41-59
- 163 -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
- 164 - Tilton SC, Gerwick LG, Hendricks JD, Rosato CS, Corley-Smith G, Givan SA, Bailey GS, Bayne CJ, Williams DE (۲۰۰۵) Use of a Rainbow Trout oligonucleotide micro-array to determine transcriptional patterns in Aflatoxin B1 induced hepatocellular carcinoma compared to adjacent liver. Toxicol Sci 88:319-330
- 165 -Tsai HW (1996) Evaluation of zebrafish (*Brachydanio rerio*)as a model for carcinogenesis. Ph.D. dissertation. Oregon State University, Corvallis
- 166 - 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
- 167 -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
- 168 -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. Toxicol 46:204-209
- 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
- 170 -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
- 171 -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.
- 172 - Weidenborner M (2001) Encyclopedia of food mycotoxins. Springer Publisher, Berlin
- 173 -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

- 174 -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
- 175 -Wiseman M0., Price RL, Lightner DV, Williams RR (1982) Toxicity of Aflatoxin B1 to Penaeid shrimp. Appl Environ Microbiol 44:1479–1481
- 176 -Wogan GN (1992) Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. Cancer Res 52:2114–2118
- 177 - Wogan GN, Newberne PM (1967) Dose–response characteristics of aflatoxin B1 carcinogenesis in rats. Cancer Res 27:2370–2376
- 178 -Wong JJ, Hsieh DPH (1976) Mutagenicity of aflatoxins related to their metabolism and carcinogenic potential. Proc Natl Acad Sci USA 73:2241–2244
- 179 -Wunder W, Korn H (1982) Aflatoxin cancer hepatomas in the liver of the rainbow trout *Salmo irideus*. Zool Beitr 28:99 –109
- 180 -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

فصل ۲:

بررسی تاثیر مقادیر مختلف آفلاتوکسین B₁ جیره غذایی، برپاره ای از شاخصهای رشد، تغییرات بافتی، فاکتورهای خونی و سرمی و باقیمانده بافتی آن در ماهی ازون

برون پرورشی (*A. Persicus*)

چکیده

ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) یکی از گونه های با ارزش ماهیان خاویاری در دریای خزر است. در تحقیق حاضر پس از انجام مراحل سازگاری با غذای دستی، تعداد ۱۸۰ عدد ماهی با میانگین وزنی ۱۰gr در پنج تیمار آزمایشی، با تراکم ۱۲ عدد ماهی در ۱۵ تانک ۵۰۰ لیتری ذخیره گردیدند. آب تانک ها از طریق آب چاه با درجه حرارت $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ و با میزان ۲۰۰ درصد تعویض روزانه تنظیم و میزان اکسیژن محلول در آب به مقدار $7/3\text{ppm}$ تنظیم و تأمین گردید. آفلاتوکسین B₁ خالص با غلظتهای مورد نظر (۲۵ppb، ۵۰ppb، ۷۵ppb، ۱۰۰ppb) به جیره های آزمایشی اضافه گردید. غذادهی بر مبنای ۳ درصد وزن توده زنده و در ۳ نوبت طی روز انجام پذیرفت. ثبت عوامل فیزیکی و شیمیایی آب از جمله: اکسیژن محلول، درجه حرارت و pH به شکل هفتگی انجام گرفت. بررسی علایم کلینیکی و ثبت تلفات روزانه در دستور کار قرار داشت. به منظور بررسی ضایعات پاتولوژیک از آبشش ها، کبد و طحال و کلیه ها نمونه برداری و جهت تهیه لام های پاتولوژی در محلول بوئن فیکس و به روش هماتوکسیلین - ائوزین (H & E) رنگ آمیزی گردید. در تیمارهای مختلف به تناسب غلظت سم مصرفی زخم هایی در نواحی شکمی، جانبی و ساقه دمی به همراه خونریزی در برخی تیمارها مشاهده گردید. میزان شیوع جراحات پوستی در تیمارهای مختلف و طی تحقیق از ۴ الی ۱۷/۹ درصد متفاوت بود. مشاهدات کالبد گشایی و پاتولوژی نشان دهنده بروز تغییرات مزمن و پیشرونده ضایعات در آبشش ها، کبد و کلیه و طحال بود. خونریزی، هایپرپلازی و تخریب بافت پوششی تیغه های ثانویه در آبشش ها، پرخونی، دژنراسیون و نکروز هیپاتوسیتها در کبد، دژنراسیون و نکروز لوله های ادراری و تغییرات نکروتیک در بافت طحال از جمله تغییرات پاتولوژیک مشاهده شده بود. تغییرات مشاهده شده در برخی از فاکتورهای خونی، ایمنی و آنزیم های کبدی طی تحقیق مورد ارزیابی و تحلیل قرار گرفت. در ضریب رشد ویژه در تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی داری مشاهده نشد ولی در میانگین وزنی و ضریب تبدیل غذایی درمقا طعی از تحقیق، تغییرات معنی داری مابین تیمارهای آزمایشی بایکدیگرو با شاهد مشاهده گردید. کلیه داده ها 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: ماهی ازون برون، AFB1، FCR، SGR، هماتولوژی، جراحات پوستی، هیستوپاتولوژی

۱-۲- مقدمه

روند توسعه آبی‌پروری در کشور و پیش‌بینی میزان تولید آبزیان پرورشی در طی برنامه توسعه اقتصادی - اجتماعی پنجم 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 پنجم می‌باشد. سیاست‌های حمایتی دولت در توسعه آبی‌پروری به همراه نگاه جهانی به محصولات 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.

طبعاً « 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 آبی‌پروری 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 عدم وجود اطلاعات در ارتباط با تاثیرات آفلاتوکسین B₁ در مورد برخی از گونه‌های بومی تجاری کشور گونه ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) برای تحقیق انتخاب گردید.

لازم به توضیح است که احتیاجات غذایی گونه فوق در طی تحقیقات انجام شده در موسسه تحقیقات شیلات ایران (محسنی و همکاران، ۱۳۸۲) تعیین گردیده است و توسعه تولید و پرورش آن در برنامه‌های توسعه شیلات پیش‌بینی شده است

تخریب زیستگاه‌های طبیعی بواسطه آلودگی‌های محیطی و فعالیت‌های انسانی، صید بی‌رویه و قاچاق توسط کشورهای حاشیه خزر و حضور شانه دارمزاحم در دریای خزر از جمله عواملی هستند که منجر به کاهش جمعیت و احتمال خطر انقراض نسل گونه‌های منحصر به فرد و با ارزش ماهیان خاویاری در دریای خزر گردیده است. لزوم حفظ و حراست از این گونه‌های با ارزش از یک طرف و قابلیت‌های پرورشی آنان از نظر تولید گوشت و خاویار، در کنار خلا پاره‌ای از اطلاعات فنی و تخصصی در مورد پرورش آنان از سویی دیگر ایجاب می‌نماید که به تولید اطلاعات کاربردی جهت توسعه پایدار آبی‌پروری گونه‌های مذکور اقدام نمود.

اهداف تحقیق:

۱. دستیابی به حد مجاز آفلاتوکسین B₁ در تغذیه ماهی ازون برون
۲. آگاهی از تغییرات هیستوپاتولوژیکی ناشی از مصرف آفلاتوکسین B₁ در اشکال حاد و مزمن مسمومیت در ماهی ازون برون.
۳. تعیین اثرات اقتصادی ناشی از مسمومیت با آفلاتوکسین B₁ در ازون برون.
۴. تعیین تاثیر دزهای مختلف افلاتوکسین B₁ بر شاخص های رشد ماهی اوزون برون.
۵. دستیابی به اطلاعات مورد نیاز برای تدوین استانداردها و تعیین حدود مجاز آفلاتوکسین B₁ در ماهی ازون برون.

۲-۲- کلیات**۲-۲-۱- ماهیان خاویاری**

چهارصد و پنجاه سال قبل از میلاد مسیح هرودت از وجود ماهی خاویاری دنیپر^۱ سخنی گفته است. ارسطو در سه قرن قبل از میلاد گوشت ماهی خاویاری را خیلی لذیذ توصیف می کند و از چسب بسیار قوی که از کیسه شنای آن بدست می آید سخن به میان می آورد. در روسیه از زمانهای خیلی دور طناب پستی ماهیهای خاویاری را به داخل غذاهای خود اضافه می نمودند. هنوز صیادان خشک کرده این طنابها را در بازار به نام ویزیکا عرضه می کنند. براساس مدارک موجود، ماهیهای خاویاری در زمان روم مترقی جزء ماهیان شناخته شده و مقبول عامه بوده است. اووید^۲ از مصرف اشرافی این ماهیها سخن می گوید و آتنی^۳ گوشت آن را مطبوع و مقبول برای میهمانیهای بزرگ توصیف می نماید. مارکوپولو نیز در بازدید خود از مناطقی از دریای خزر از فراوانی وجود ماهیان خاویاری در این دریا سخن میگوید.

ماهیان خاویاری که استروژن^۴ نامیده می شوند و از خانواده تاس ماهیان^۵، از جمله گونه های آبی کم نظیری هستند که از قدمتی چند صد میلیون ساله که به عصر ژوراسیک باز می گردد برخوردارند و از این رو ماهیان خاویاری را فسیل های زنده جهان می نامند که همراه با تکاملی فیلوژنی تا به امروز بازمانده اند.

از منظر تعدد گونه ها به ۲۷ گونه و زیر گونه در جهان تقسیم می شوند که از این تعداد ۵ گونه در دریای خزر زندگی می کنند که به ترتیب کیفیت عبارتند از فیل ماهی^۶، قره برون^۷ یا ماهی خاویاری ایران، ماهی خاویاری

^۱. Deniépre

^۲. Ovide

^۳. Athenée

^۴. Sturgeon

^۵. Acipenseriformes

گلد^۶ (چالباش)، شیب^۷ و ماهی ازون برون. این گونه های با ارزش ذخیره منحصر به فرد ژنتیکی دریای خزر هستند که نه تنها از لحاظ علمی از جایگاه ویژه ای برخوردارند، بلکه در تولید گوشت و خاویار و کسب درآمدهای ارزی، ایجاد اشتغال و توسعه صنعت توریسم، سهم بسزایی را ایفا می نمایند.

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 گونه های در حال انقراض (CITES) نمود که با تصویب آن در دهمین اجلاس کشورهای عضو سایتس (حارره-۱۹۹۷) کلیه ماهیان خاویاری از آوریل ۱۹۹۸ به ضمایم کنوانسیون اضافه شدند و تجارت قانونی گوشت 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 بهره برداری مسئولانه ذخایر مشترک تاسماهیان دریای خزر از یک طرف و دوره تولید مثل طولانی و بلوغ جنسی دیر هنگام تاسماهیان از طرف دیگر، مطمئناً ذخایر تاسماهیان دریای خزر در آبهای جمهوری اسلامی ایران بهبود جدی نخواهد یافت. (کیوان، ۱۳۸۲)

در ارزیابی عملکرد تعداد پروژه های تحقیقاتی در زمینه های مختلف مربوط به تاسماهیان و به منظور بهره برداری از ذخایر و توسعه آبرزی پروری ماهیان خاویاری، تعداد ۱۰ برنامه تحقیقات راهبردی مشتمل بر ۴۲ طرح جامع و ۲۲۸ پروژه ارائه گردیده است.

تاس ماهی ستاره ای یا دراکول :

ازون برون (ایرانی)، سوروگا (روسی)، پاشروگا (رومانی)، یکی از گونه های مهم تجاری است که در حوزه های دریای سیاه، آزوف و خزر زیست می کند. وزن این ماهی ممکن است به ۶۸ کیلوگرم برسد. جنس ماده این ماهی در دریای آزوف در سن ۱۳-۱۲ سالگی و در رودخانه کورا در ۱۴ تا ۱۷ سالگی بالغ می شود. غذای عمده ماهیهای بالغ بی مهرگان، لاروهای شیرونومیدها و سخت پوستان می باشد. به عقیده برخی از کارشناسان، جنوب دریای خزر حوزه خوبی برای پرورش دوره گاه حاصل از اینگونه با شیب می باشد (کیوان، ۱۳۸۱).

طی تحقیقاتی که با اجرای یک برنامه پنجساله (از ۱۳۷۰ تا ۱۳۷۴) توسط یک گروه تحقیقاتی موسسه تحقیقات شیلات ایران روی بیولوژی و ذخایر ماهیان خاویاری در سواحل در جنوب دریای خزر به عمل آمده در سال ۱۳۷۴ دراکولهای ماده ۸۱/۶ درصد و دراکولهای نر ۱۸/۴ درصد صید را تشکیل می دادند.

⁶. *Huso huso*

⁷. *Acipenser persicus*

⁸. *Acipenser gueldenstaedtii*

⁹. *Acipenser nudiiventris*

بررسیهای بعدی نشان داد که صید دراکولهای ماده نسبت به سال ۱۳۷۴ کاهش یافته و در سال ۱۳۷۷ به ۷۵/۸ درصد رسیده ولی برعکس صید دراکولهای نر افزایش یافته و به ۲۴/۲ درصد بالغ گردیده است (مقیم و غنی نژاد، ۱۳۷۷؛ کیوان ۱۳۸۲).

ماهی ازون برون (دراکول) کوچکترین ماهی خاویار دریای خزر می باشد. از نظر تکثیر با مشکلاتی مواجه است و تعداد آن نیز در شرایط طبیعی روبه کاهش می رود، در ترجمه نام وی بینی دراز است. قامتی معادل ۱ تا ۱/۵ متر و وزنی سبک تر در قیاس با دیگر ماهیان این خانواده در دریای خزر دارد. گوشت و خاویار آن ارزش اقتصادی و غذایی دارد، از کیسه شنای آن در تهیه چسب استفاده می شود. حدود ۶۰ درصد از صید ماهیان خاویاری کشور ایران را شامل می شود. صید بیش از حد، ساختن سد، تخریب بیشتر رودخانه ها از عوامل عمده کاهش نسل این ماهی در سالهای اخیر است.

۲-۲-۲- آفلاتوکسین ها

طبقه بندی آفلاتوکسینها

آفلاتوکسین ها متابولیت های سمی هستند که توسط چهار گونه از قارچها تولید می شوند. تمامی این گونه ها به جنس آسپرژیلوس تعلق دارند. تولید اولیه این سموم توسط سویه های خاصی از آسپرژیلوس فلاووس^{۱۰} و آسپرژیلوس پارازیتیکوس^{۱۱} بوده و به ندرت به وسیله گونه های آسپرژیلوس نومیوس^{۱۲} و آسپرژیلوس نیجر^{۱۳} نیز تولید می گردند. (Groopman, 1994)

آسپرژیلوس پارازیتیکوس قادر به تولید هر ۴ نوع سم اصلی قارچ می باشد. این سموم عبارتند از AFB_۱، AFB_۲ و AFG_۱ و AFG_۲. در حالیکه آسپرژیلوس فلاووس فقط قادر به تولید AFB_۱ و AFB_۲ می باشد. (D'mello & Mac Donald 1997)

آفلاتوکسینها از مسیر پلی کناید تشکیل می شوند. هر کدام از اعضای مایکوتوکسینهای بیزفورانوئید چند هسته ای که به وسیله گونه های سم زای قارچ آسپرژیلوس می باشد، همه اینها حاوی حلقه کومارین و یک لاکتون غیر اشباع است (Lewis, 1998).

این توکسینها از لحاظ فرمول ساختمانی بسته شبیه به هم می باشند.



تاکنون در حدود ۲۰ نوع آفلاتوکسین جداسازی شده در حالیکه فقط ۴ نوع آن در ارتباط با ویژگیهای بیولوژیکی و تأثیر آنها بر سلامتی موجودات مورد بررسی قرار گرفته اند. (Eaton et al., 1994)

¹⁰. *Aspergillus Flavus*

¹¹. *Asp. Parasiticus*

¹². *Asp. Nomius*

¹³. *Asp. Niger*

بواسطه ساختار شیمیایی چند حلقه ای آفاتوکسین های B و G این ترکیبات وقتی در مجاورت اشعه ماورابنفش (UV) قرار بگیرند از خود خاصیت فلورسانس بروز می دهند. تمایز آفاتوکسین های B و G از طریق رنگ فلورسانس ناشی از تابش پرتو فرابنفش به آنان امکان پذیر می گردد. آفاتوکسین های B₁ و B₂ به رنگ آبی (Blue) و آفاتوکسین G₁ و G₂ به رنگ سبز (Green) در می آیند. (ROC, 1992)

جداسازی اولیه آفاتوکسین ها در سال ۱۹۶۱ انجام پذیرفت. در سال ۱۹۶۰ بیشتر از ۱۰۰/۰۰۰ جوجه بوقلمون و ۲۰۰۰۰ جوجه اردک در انگلستان در اثر یک بیماری مجهول به نام «بیماری x^{۱۴}» تلف شدند. (Blout 1961)

مطالعات بعدی نشان داد که مشکل محدود به بوقلمونها نبوده بلکه در ارتباط با غذای این حیوانات است.

مطالعات بسیاری جهت تشخیص عامل مرگ و میرها انجام شد. در نهایت یک ترکیب فلورسانس از غذای بوقلمون ها جداسازی شد و توسط کروماتوگرافی لایه نازک^{۱۵} (TLC) عامل مسمومیت و تلفات ایجاد شده تعیین گردید (Rustom 1997) و متعاقباً غذای حاوی بادام زمینی برزیلی مورد بررسی قرار گرفته و مقادیر قابل توجهی آلودگی با اسپرژیلوس فلاووس که می توانست عامل مرگ و میر باشد شناسایی گردید. لذا ترکیبات سمی جدا شده از طریق کروماتوگرافی لایه نازک، « آفاتوکسین» نامیده شد. که به معنای توکسین مشتق شده از اسپرژیلوس فلاووس می باشد. (Sargeant et al 1963).

ساختمان شیمیایی این توکسین ها شامل یک حلقه بی فوران که به یک هسته کومارین اتصال یافته و همراه با یک حلقه پنتونون در : AFB₁ ، AFB₂ ، AFB_{2a} ، AFM₁ ، AFM₂ ، AFM_{2a} و آفاتوکسیکول^{۱۶} و یا یک حلقه لاکتون در : AFG₁ ، AFG₂ ، AFG_{2a} ، AFGM₁ ، AFGM₂ ، AFGM_{2a} و AFB₂ (Asao et al. 1963, Reddy et al., 2007)

دو آفاتوکسین دیگر از جمله آفاتوکسین M₁ و M₂ به عنوان متابولیت های هیدروکسید شده آفاتوکسین B₁ و B₂ در پستانداران محسوب می شود.

M₁ در واقع ۴- هیدروکسی آفاتوکسین B₁ و M₂ ۴- دی هیدروکسی آفاتوکسین B₂ می باشد. این ترکیبات از شیر گاوهای شیری تغذیه شده با غذای آلوده با آفاتوکسین جداسازی شده است. (Patterson et al. 1978, Eaton et al., 1994)

۳-۲-۲- آفاتوکسین ها در آبزیان

آفاتوکسینها از جمله قوی ترین سموم تولید شده توسط قارچها محسوب می شوند که از طریق آلوده نمودن غذاها، مواد اولیه غذایی و محصولات با منشاء حیوانی می توانند مسمومیت ایجاد نمایند. (Schoental 1976).

¹⁴ . Turkey x disease

¹⁵ . TLC : Thin Layer Chromatography

¹⁶ . Aflatoxicol

بسیاری از مواد اولیه غذایی مورد استفاده در آبرزی پروری از جمله: پنبه دانه، بادام زمینی، ذرت، سویا، برنج، ماهی و میگوی خشک شده و پودر ماهی توسط قارچها آلوده می شوند. (Ellise et al. 2000; Cagauan et al., 2004; Fegan 2005 ; Spring 2005)

در حال حاضر، افزایش مصرف مواد اولیه با منشأ گیاهی در فرمولاسیون جیره غذایی آبزیان، منجر به افزایش ظرفیت ایجاد آفلاتوکسیکوزیس در سیستم های پرورشی گردیده است. به همین دلیل مسئله آلودگی با آفلاتوکسین ها در آبرزی پروری از اهمیت بیشتری برخوردار گردیده است. (Tacou et al. 1995; Fegan 2005 ; Spring 2005)

آلودگی غذاهای مصرفی در آبزیان با آفلاتوکسین ها امروزه از گسترش زیادی برخوردار است. این موضوع بخصوص در کشورهایی با آب و هوای مرطوب گرمسیری بیشتر به چشم می خورد. در کنار شرایط آب و هوایی، روشهای غیر استاندارد فرآوری و نگهداری مواد اولیه و غذاهای مصرفی از دیگر عوامل بستر ساز جهت رشد قارچ و تولید توکسین محسوب می گردند. (Murjani, 2003). آسیب حشرات به مواد غذایی نیز اغلب در روند رشد قارچ و تولید توکسین دخالت دارد. (Williams et al., 2004)

بسیاری از مطالعات اپیدمیولوژیکی بیانگر این مطلب است که حضور آفلاتوکسین در غذا علاوه بر صدماتی که به آبزیان پرورشی می رساند، می تواند جهت سلامت حیوانات پرورشی خاکزی نیز خطرناک باشد. بافت های حیوانی قادر به نگهداری آفلاتوکسین ها و مواد حاصل از متابولیسم آنها در خود می باشند. طبعاً این موضوع از نظر مخاطراتی که برای انسان و بهداشت عمومی دارد حائز اهمیت خواهد بود.

(puschner , 2003 ; Murjai 2003)

آفلاتوکسیکوزیس^{۱۷} بیماری است که می تواند در تعدادی از گونه های ماهی ایجاد شود، وقتی که غذای ماهی آلوده به توکسین این قارچ باشد. (Ashley , 1970)

آفلاتوکسیکوزیس در ماهیان آب شیرین بخصوص قزل آلالی رنگین کمان^{۱۸} مورد مطالعه قرار گرفته است. (Halver 1969, Lavell 1989 , Hendricks 1994, Challagher and Eaton 1995)

به علاوه تحقیقاتی در گربه ماهی آمریکایی روگاهی^{۱۹}. (Lovel 1984; Jantuartari and Lovell 1990; Jantuartari et al. 1990 ; plakas et al. 1991 ; Hendricks 1994 ; Gallagher and Eaton 1995).

کپورهندی^{۲۰} (Sahoo et al 2001 ; Sahoo et al . 2003 ; Murjani 2003) .

ماهی گامبوزیا^{۲۱} ، (MC.kean et al. 2006) .

تیلاپای نیل^{۲۲} (Chavez-Sanachez et al.1994; Tuan et al. 2002) .

ماهی گوپی^{۲۳} (ساتو و همکاران ۱۹۷۳) و در تعدادی از میگوها از جمله میگوهای مونودن^{۲۴} و میگوی آبی^{۲۵} و میگوی وانامی^{۲۶} (Wiseman et al . 1982; Lightner et al. 1982 ; Boonyaratpalin et al . 2001) .

¹⁷ .Aflatoxicosis

¹⁸ . *Onchorhynchus mykiss*

¹⁹ . *Ictarulus punctatus*

²⁰ . *Labeo rohita*

²¹ . *Gambusia affinis*

²² . *Oreochromis niloticus (Nile tilapia)*

آرتمیا سالینا^{۲۷} (Reiss et al. 1972) ، سیکلوپس^{۲۸} (Reiss 1972) به انجام رسیده است. اثرات عمومی توسط دانشمندانی از جمله (Cotty و همکاران ، ۱۹۹۴ ؛ MOSS ؛ ۱۹۹۸ ؛ Bennett و Klich در سال ۲۰۰۳) مورد بازمینی قرار گرفت. حضور توکسین در خوراک مصرفی حیوانات توسط Devries و همکاران در سال ۲۰۰۲، بیوسنتز و متابولیسم آن توسط Calvo و همکاران در سال ۲۰۰۲، سم شناسی و اثرات بیولوژیک آن توسط (Coulombe (Russo et. 1993; Coulombe 1994 ; Cullen and Newberne 1994; Eaton & Groopman 1994) به انجام نرسیده است. (al.2006)

۴-۲-۲- آفاتوکسیکوزیس در حیوانات پرورشی

آفاتوکسینها قویترین سموم قارچی هستند که دارای خاصیت کارسینوژن^{۲۹} (سرطانزایی) می باشند. مطالعات نشان داده که این سموم سبب هپاتوما^{۳۰} در حیوانات آزمایشگاهی می شود. (Deacon 1997)

آفاتوکسینها متابولیتهایی هستند که با بیماریهای گوناگون در حیوانات اهلی و انسان در جهان در ارتباط اند. آفاتوکسین ها از هر توکسینی بیشتر مورد توجه اند. به دلیل اینکه اثرات کارسینوژنیک یا سرطانزایی در موجودات آزمایشگاهی حساس و اثرات توکسیکولوژی^{۳۱} حاد در انسان ایجاد می کند.

آفاتوکسیکوزیس یک بیماری کبدی است. حساسیت حیوانات به این توکسین به گونه، سن، جنس (نر و ماده) و غذای آنها بستگی دارد. آفاتوکسینها سبب آسیب به کبد ، کاهش شیر و کاهش تولید تخم مرغ را می نماید. آفاتوکسین یک سرکوب کننده ایمنی^{۳۲} می باشد.

آفاتوکسین B₁ ، پتانسیل سرطانزایی در بعضی حیوانات دارد. در سال ۱۹۸۸، مرکز بین المللی تحقیقات کانسر (IARC) آفاتوکسین B₁ را جزء لیست سرطانزای انسانی معرفی نموده است. مطالعات در آسیا و آفریقا نشان داده که ارتباط معنی داری بین آفاتوکسین ها و سرطان سلولهای کبدی وجود دارد. (Eaton et al. 1994)

محدوده وسیعی از تأثیرات بیولوژیک از جمله : مسمومیت زایی^{۳۳}، سرطانزایی، تومورزایی، جهش زایی^{۳۴}، ضایعات ژنتیکی^{۳۵}، تضعیف سیستم ایمنی و تولید مثلی از موارد گزارش و ثبت شده در بسیاری از گونه های جانوری می باشند. (Steyn 1995; Williams et al. 2004)

²³ . *Lebistes reticulatus*

²⁴ . *Penaeus monodon*

²⁵ . *Penaeus stylirostris*

²⁶ . *Penaeus Vannamei*

²⁷ . *A. Salina*

²⁸ . *Cyclopos Fuscus*

²⁹ . Carcinogenic

³⁰ . Hepatoma

³¹ . Toxicology

³² . ImmunoSuppressive

³³ . Toxigenic

³⁴ . Mutagenic

³⁵ . Teratogenic

در میان آفلاتوکسین ها، آفلاتوکسین B₁ از همه سمی تر بوده و میزان سمیت سایر آفلاتوکسین ها به تدریج کاهش می یابد. پتانسیل سمیت، سرطانزایی، جهش زایی به ترتیب شامل:

$AFB_1 > AFL^{36} > AFG_1 > AFM_1 > AFB_2 > AFG_2$ (Reddy et al. 2007) می باشد.

آفلاتوکسین B₁، M₁ و G₁ سبب ایجاد انواع سرطانها در گونه های مختلف حیوانات می شود. (Eaton et al. 1994) در سلولهای کبدی به متابولیت های متعددی تبدیل می گردد. این ترکیبات می توانند به قسمتهای خوراکی محصولات دامی منتقل شوند (Puschner 2002).

تمامی متابولیت های جداسازی شده از AFB₁ فعالیت کمتری داشته و فعالیتهای متابولیکی متفاوتی را از خود بروز می دهند. بنابراین بعد از AFB₁ و AFL، آفلاتوکسین های G₁ و M₁ به عنوان آفلاتوکسین هایی که می توانند در مواد غذایی با منشاء حیوانی وجود داشته و برای سلامت انسان مخاطره آمیز باشند مورد شناسایی قرار گرفتند (weiden borner 2001).

از طرف دیگر به واسطه پایداری بالای متابولیت های آفلاتوکسین در مقابل فرآوری (پایداری در حرارت بین ۲۳۷ درجه سانتی گراد "G₂" و ۲۹۹ درجه سانتیگراد "M₁" عملاً بعد از فرآوری این ترکیبات در فرآورده مربوطه قابل تشخیص می باشد. (ROC1992, LARC 1993) این نشان میدهد که عامل آلوده اولیه از چه درجه اهمیتی برخوردار است.

در اغلب موارد گزارشات 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. (Tacon 1992, Agag 2004)

۵-۲-۲- آفلاتوکسینها در آبی پروری

آفلاتوکسیکوزیس بیماری است که می تواند در تعدادی از گونه های ماهی ایجاد گردد وقتی با غذای آلوده به آفلاتوکسین تغذیه می شوند. اولین بار در سال ۱۹۶۰ آفلاتوکسیکوز در آبزیان پرورشی به همراه وقوع هپاتوم در مراکز تکثیر قزل آلائی رنگین کمان در ایالت آیداهو واقع در آمریکا گزارش شد. در آزمایشات بعد از مرگ وجود کبدی حاوی ندولهای بسیار (Multi nodular) به همراه کارسینومای اولیه سلولهای کبدی مشاهده شد. (Ashley 1970)

علت مرگ کنجاله های پنبه دانه کپک زده که آلوده به آفلاتوکسین بوده و به شکل خام جهت تغذیه ماهیان مورد استفاده قرار گرفته است، تشخیص داده شد. به واسطه این واقعه مهم، آفلاتوکسین ها برای اولین بار به عنوان ترکیبات سرطانزا مورد توجه قرار گرفتند.

مطالعات بعدی نشان داد که قزل آلائی رنگین کمان از گونه های بسیار حساس از نظر ایجاد تومورهای کبدی در ارتباط با مصرف آفلاتوکسین B₁ می باشد. در ادامه با مطالعات و تحقیقات گسترده تر مشاهده گردید که

³⁶.Aflatoxicol

شرایط مشابهی در اروپا و شرق وجود دارد. تلفات دسته جمعی ناشی از مصرف آفلاتوکسین ها 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 Philips در سال ۱۹۹۰ یک آلودگی تجربی ایجاد گردید. Cagauan و همکارانش در سال ۲۰۰۴ وقوع تلفات دسته جمعی در ماهیان تیلایپای پرورشی در فیلیپین را که از طریق تغذیه با غذاهای کپک زده ایجاد شده بود گزارش نمودند.

حضور آفلاتوکسین ها در آبزیان پرورشی و نقش آنان در این رابطه هنوز به درستی ارزیابی نشده است. گزارش بسیار کمی در ارتباط با آبزیان پرورشی که با غذای آلوده به آفلاتوکسین B₁ تغذیه شده باشند، در دسترس می باشد. به رغم این موضوع، آفلاتوکسیکوزیس می تواند در ایجاد صدمات جدی به ماهی ها و میگوهای پرورشی از اهمیت ویژه ای برخوردار باشد.

۶-۲-۲- منابع آلودگی غذا به آفلاتوکسین در آبزیان پرورشی

فرآورده های شیلاتی به عنوان منبع مهم تأمین غذا برای انسان و حیوان حائز اهمیت است. روند توسعه آبی پروری در کشور و میزان تولید آبزیان پرورشی بیانگر روند افزایشی تولید برای گروههای مختلف آبزیان پرورشی از جمله ماهی و میگو می باشد.

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

گونه های اصلی پرورشی در کشورهای اروپایی ماهی آزاد آتلانتیک، قزل آلائی رنگین کمان، باس دریایی، سیم دریایی، مارماهی و کپور معمولی می باشند (EC 2001). این گونه ها عمدتاً در محیط طبیعی گوشتخوار بوده و در شرایط پرورشی به شکل متراکم نیازمند به مقادیر بالای پروتئینی می باشند.

اخیراً غذاهای تجاری آبزیان از ترکیباتی مثل ذرت به عنوان بخش اصلی و پودر ماهی و روغن نباتی به عنوان منابع تأمین پروتئین و چربی برای ماهیان پرورشی و میگوهای گوشتخوار در سیستمهای متراکم بکار برده می شوند (New et al 1995 ; Scottish Executive Report 2002).

اغلب پودرهای ماهی از ماهی کامل تهیه می گردند از جمله این ماهیان می تواند به ماهیان آنچوی و کاپلین و یا محصولات فرعی و ضایعات ماهی منهادن هرینگ (Atlantic menhaden) و آزاد ماهیان اشاره نمود (Hardy 1989) پودر ماهی پس از خشک کردن و آسیاب کردن ماهی تازه حاصل می شود و غذای ماهیان پرورشی از ترکیب پودر ماهی با کربوهیدراتها، آرد سویا و گندم به علاوه ویتامین ها، مواد معدنی و رنگدانه ها و سایر مواد مغذی لازم شناخته می شود. از ضایعات ناشی از فرآوری ماهی، از جمله کنسانتره های پرورشی و هیدرولیز شده نیز در تغذیه آبزیان پرورشی استفاده می گردد. (EC 2003)

براساس گزارش CAST در سال ۱۹۸۹ تقریباً ۲۵ درصد از محصولات غله ای برداشت شده از مزارع به مایکوتوکسین ها آلوده می باشند. محاسبات FAO بیانگر حضور قابل توجه آفلاتوکسین در غلات در منطقه آسیای جنوب شرقی می باشد.

آسیا و آفریقا به عنوان بزرگترین تولید کنندگان جهانی ذرت و بادام زمینی به شکل جدی از صدمات اقتصادی ناشی از آلودگی به آفلاتوکسین ها رنج می برند. (Bankole & Adebajo 2003 ، CGIAR 1997 ، Kpodo 1996) .
رطوبت ، حرارت و ترکیب بستر مهمترین عامل ایجاد رشد قارچی و تولید توکسین می باشد. آسیب حشرات نیز بسیار دخیل است. (Williams et al. 2004)

طبق گزارش FAO³⁷ (سازمان غذا و خواربار) ۲۵ درصد غذاها آلوده به مایکوتوکسین ها مخصوصاً آفلاتوکسین می باشد. (Eaton et al. 1994)

غذای ماهیها باید در محلی ذخیره شوند که گردش هوا در ساختمان به اندازه کافی باشد. برای کنترل حرارت و رطوبت غذا باید در محیط سرد نگهداری شود و برای بیشتر از سه ماه غذا تهیه نشود.

زمانی که غذاها برای مدت طولانی ذخیره می شود، سلامت ماهیها دچار مشکل می شود. نه تنها سلامت، بلکه باعث از دست رفتن ویتامینها و فساد روغن ها در جیره غذایی می شود. کنترل جوندگان و حشرات می تواند مانع تولید آفلاتوکسین گردد. (Russo et al. 2006)

۷-۲-۲- مطالعات تجربی انجام شده در آبزبان پرورشی

میزان و شدت مسمومیت در گونه های تحت مطالعه تحت تأثیر عواملی از جمله : نوع، جنس، وزن، جیره غذایی مصرفی و مجاورت با عوامل عفونی بیماری زا می باشد.

در گونه های مختلف جانوری درجات متفاوتی از حساسیت به AFB₁ وجود دارد. AFB₁ یکی از رایج ترین ترکیبات مستعد کننده ایجاد سرطان می باشد و جهت فعال شدن بیولوژیکی بایستی به شکل ترکیب حد واسط AFBO در آید. (Eaton & Gallagher 1994; Roebeuck & Maxuitenko 1994)

ماهی قزل آلائی رنگین کمان که با غذای حاوی دانه کتان آلوده به آفلاتوکسین تغذیه شد، قادر بود که تومور پیشرفته در کبد ایجاد نماید. (Ashley , 1970) ، به طوریکه ۸۵ درصد ماهیها در این تحقیق تلف شدند.

در ماهیهای آب گرم مثل Nile tilapia و گربه ماهی (Ictalurus sp.) نیز آفلاتوکسیکوزیس مشاهده شده است. مطالعه بر روی Nile tilapia نشان میدهد که وقتی در معرض ۱/۸mg آفلاتوکسین B₁ در یک کیلوگرم غذای ماهی در مدت زمان ۷۵ روز قرار می گیرد، میزان رشد کاهش می یابد. بعلاوه ناهنجاریهای بافتی یا کبدی در Nile tilapia آغاز سرطان پیشرفته را نشان میدهد.

³⁷.The Food and Agriculture Organization (FAO)

مطالعه دیگر (Tuan et al, 2002) با غلظت ۲/۷ گرم آفاتوکسین B₁ روی Nile tilapia انجام شده است. ماهی با غلظتهای ۲/۵، ۱۰ یا ۱۰۰mg آفاتوکسین در غذای روزانه برای ۸ هفته تغذیه شد که باعث کاهش وزن و کاهش مقدار گلبولهای قرمز گردید. ماهی که غذای حاوی ۱۰mg AFB₁ دریافت داشته دارای کبد غیرطبیعی بود. آنهایی که غلظتهای بالایی را دریافت نموده اند وزنشان کاهش یافته و آسیب به این ماهیها باعث مرگشان می گردد. در مزارع پرورشی آفاتوکسینهای بالای 5ppb در آب باعث افزایش مرگ و میر می شود. (Russo et al, 2006)

گرچه ماهی با غذای حاوی آفاتوکسین B₁ خالص شده با غلظت ۱۰mg/kg برای ۱۰ هفته تغذیه شده که باعث کاهش رشد و ضایعات داخلی شده است. (Jantrarotai and Lovell, 1990)

تحقیق انجام شده توسط Farabi و همکاران در سال ۲۰۰۶ در مورد مسمومیت ایجاد شده توسط آفاتوکسین B₁ در فیل ماهی جوان بیانگر وقوع ۸/۶ درصد مرگ و میر پس از ۱۵ روز تغذیه با جیره های

آلوده می باشد. به علاوه بعد از ۴۰ روز ماهیان تحت آزمایش ۷ درصد کاهش وزن داشته اند. از جمله علایم کلینیکی مشاهده شده در این تحقیق، خونریزی در ناحیه سر، پلاک های استخوانی ردیف شکمی، ایجاد خمیدگی در ستون فقرات و همچنین ظهور نقاط زردرنگ در ناحیه سینه ای بوده است. کاهش مرگ و میر و قطع آن پس از گذشت ۱۷ روز از تغذیه ماهیان با جیره های غذایی غیر آلوده مشاهده گردید. (Farabi et al 2000)

در دهه اخیر دانشمندان بسیاری به مطالعه الگوهای متابولیسم AFB₁ در آزاد ماهیانی از جمله قزل آلائی رنگین کمان و ماهی آزاد کوه و همچنین ماهی گورخری^{۳۸} و گرچه ماهی روگامی همت گماشته اند.

اگر آفاتوکسین B₁ از طریق جیره غذایی به حیوانات خورنده شود این ترکیب به واسطه ویژگی قابلیت انحلال در چربی به راحتی از طریق دستگاه گوارش جذب و به جریان خون راه می یابد. (Lesson et al 1995)

در مطالعه ای در سال ۱۳۸۸، سپهداری و همکاران، آفاتوکسین B₁ با غلظتهای ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ppb به جیره های غذایی اضافه شد. غذاهای بر مبنای ۳ درصد وزن توده زنده و در ۳ نوبت طی شبانه روز انجام پذیرفت. در تیمارهای مختلف به تناسب غلظت سم مصرفی بروز زخمهایی با حاشیه زرد رنگ در نواحی شکمی، جانبی و ساقه دم به همراه خونریزی در پایه باله های پشتی به همراه خوردگی باله در برخی از تیمارها مشاهده شد.

در یک مطالعه در سال ۲۰۰۳، علایم درمانگاهی مشاهده شده در ماهی تیلایپای نیل تغذیه شده با غذای آلوده به آفاتوکسین عبارتند از: کدورت قرینه منجر به کوری، جراحات پوستی، خوردگی باله ها و ناحیه دم، زرد رنگ شدن پوست بدن، شنای نامتعادل، کم تحرکی و کاهش اشتها. این مطالعه تأیید می نماید که زردی رنگ

مشاهده شده در تیلایپای پرورشی در Central lusan بواسطه غذای آلوده به آفاتوکسین بوده است. (Caguan et al, 2003)

Plakas و همکارانش در سال ۱۹۹۱ نشان دادند که حداکثر غلظت AFB₁ در پلاسما پس از خوردن AFB₁ نشان دار شده با C₁₄ و در گرچه ماهی روگامی پس از ۴ ساعت مشاهده گردیده و تقریباً ۹۵ درصد آن با لیپوپروتئین

³⁸. Zebra fish

های پلاسما باند می شود. پس از اتصال آن با لیوپروتئین های پلاسما از طریق سیستم باب به کبد انتقال یافته و در هیاتوسیت ها به دام می افتد.

در قزل آلاهی رنگین کمان به مانند موش محل ترجیحی تجمع و دفع AFB_1 و متابولیت های آن سیستم کبدی - صفراوی می باشد. (plaksa etal, 1991)

یافته های اولیه در ماهیها در ارتباط با آفلاتوکسیکوزیس شامل رنگ پریدگی آبشش ها، خونریزی زیرپوستی، آنمی، کاهش رشد و کاهش وزن بوده است.

تغذیه با غلظتهای کم آفلاتوکسین B_1 سبب تومورهای کبدی می گردد که به صورت زخمها (ضایعات) بروز میکند و می تواند به کلیه ها هم منتشر شود. همچنین در میزان مرگ و میر هم افزایش ایجاد می شود.

آفلاتوکسینها باعث کاهش سیستم ایمنی و ماهیها را نسبت به بیماریهای انگلی حساس تر می نماید. باعث رشد کند ماهیها، کاهش وزن و افزایش زمان برای رسیدن ماهیها به وزن بازار می گردد که این مسئله از لحاظ اقتصادی صدمه می زند. (Russo etal.2006)

۸-۲-۲- گونه های حساس

حساسیت حیوانات به آفلاتوکسین به گونه، سن، جنس و غذای آنها بستگی دارد. حیوانات جوان حساس ترند (Eaton etal.1994).

در جوندگان حساسیت Rat بسیار زیاد بوده در حالیکه موشها مقاوم می باشند. (Ramsdell & Eaton,1990;Hayes etal.1991)

در آزاد ماهیان، قزل آلاهی رنگین کمان گونه ای بسیار حساس و ماهی آزاد کوهو گونه ای مقاوم به شمار می رود (Hendrieks 1994) همچنین گربه ماهی نسبت به قزل آلاهی رنگین کمان کمتر حساس است. (Russo etal.2006)

تفاوت حساسیت در آزاد ماهیان ناشی از پایین بودن راندمان متابولیسم AFB_1 به $AFBO$ در ماهی آزاد کوهو نسبت به قزل آلاهی رنگین کمان می باشد.

به طور کلی، حساسیت موجود به مسمومیت با AFB_1 در ماهیان، مانند پستانداران، ناشی از الگوهای متفاوت آنزیمی مداخله گر در متابولیسم این ترکیب می باشد. چنین تفاوت هایی ممکن است به اختلافات ژنتیکی، قابلیت فعالیت آنزیم ها و همچنین میزان هماهنگی و تنظیم واکنش ها در مرحله اول و دوم فعال سازی و سم زدایی AFB_1 نسبت داده شود.

در ماهی آزاد کوهو و قزل آلاهی رنگین کمان، از نظر قدرت سم زدایی کبد و متابولیت های AFB_1 توسط صفرا تفاوت چندانی به چشم نمی خورد. بنابراین به نظر می رسد که فاز II متابولیسم و دفع متابولیت ها در این آبزیان شبیه به همدیگر است. (Bailey etal.1988)

یک مطالعه توسط Eaton و Gallagher در سال ۱۹۹۵، روی تفاوت ها در متابولیسم کبدی و متابولیسم سیتوزولی AFB₁ در قزل آلابی رنگین کمان و گربه ماهی روگامی نشان داد که وجه مشخصه چرخه متابولیسم AFB₁ در قزل آلابی رنگین کمان راندمان بالای فعالیت اپوکسیداسیون میکروزومی با واسطه CYP (سیتوکروم P) می باشد که فقط AFM₁ را تولید می کند. (yang et al.2000)

در انسان مقدار زیاد آفاتوکسین تولید نکروز کبدی حاد را می نماید که منجر به اسیدوز و یا کارسینومای کبد می گردد. ناتوانی کبدی حاد که به صورت خونریزی، ادم (خیز)، تغییر در هضم و جذب و یا متابولیسم مواد غذایی و بالاخره کما بروز می کند. هیچ موجودی مثل انسان سیستم ایمنی اش حساس به اثرات سمی حاد آفاتوکسین ها نیست. انسان به طور کلی تحمل فراوانی برای آفاتوکسین دارد و به ندرت در انسان ایجاد آفاتوکسیکوزیس حاد می نماید. کودکان نسبت به آفاتوکسین حساس ترند که باعث کاهش رشد و نموشان می شود. (Machida et al.2010)

میزان وقوع و مواجهه شدن انسان با آفاتوکسین ها در یک مرور کلی موید این مسئله است که حدود ۴/۵ بلیون جمعیت کشورهای در حال توسعه به شکل مزمن با مقادیر قابل توجهی از آلودگی های ناخواسته با این سم درگیر می باشند. اطلاعات محدود کسب شده بر تأثیر این مسمومیت بر تغذیه و سیستم ایمنی جمعیت مذکور دلالت می کند. (Williams et al.2004)

آفاتوکسین به عنوان یک آلاینده مرسوم مواد غذایی بخصوص جیره های غذایی مردم در کشورهای در حال توسعه مطرح می باشد. این سم توسط فعالیت برخی از فارچها طی مراحل تولید، برداشت، ذخیره سازی و فرآوری مواد غذایی تولید می گردد و به عنوان یک آلاینده نا پذیر مواد غذایی مطرح می باشد. هدف تقلیل این آلودگی به حداقل است و نظر به اینکه روشهای حصول اطمینان از به حداقل رسیدن میزان آلودگی در کشورهای توسعه یافته بواسطه ویژگیهای سیستم تغذیه ای و زیر ساخت های فناوری در این مناطق، به کشورهای در حال توسعه قابل تعمیم نیست. لذا مشکل آفاتوکسین ها در این مناطق در شرایط فعلی موضوعی غیرقابل کنترل محسوب می گردد و بایستی الگوهای متفاوتی جهت مدیریت آفاتوکسیکوزیس مدنظر قرار گیرد. (Rodgers et al. 2002). قابلیت آفاتوکسین ها در انتقال از طریق جفت، می تواند منجر به ایجاد اختلالات ژنتیکی در دوران جنینی شود (Maxwell et al.1998). انسانهای بالغ معمولاً مقاومت بیشتری را در مقابل مسمومیت با آفاتوکسین از خود نشان می دهند و در گزارش های ارائه شده از مسمومیت های حاد، معمولاً مرگ و میر در کودکان دیده می شود. (Cullen and New berne 1993)

تحقیقات پزشکی نشان میدهد که سبزیجاتی مثل هویج، زردک، کرفس و جعفری اثرات کارسینوژنیک آفاتوکسین را کاهش میدهد. (Machida et al.2010) و همچنین خوراندن ویتامین های آنتی اکسیدان مثل ویتامین های A، C، E و ویتامینهای محلول در آب اثرات مسمومیت آفاتوکسین ها را کاهش می دهند (Russo; Aboobaker et al.1997; Nyandieka & Wakhisi 1993 et al.2006)

۳-۲- مواد و روش کار

۳-۲-۱- آماده سازی کارگاه و ذخیره سازی ماهیان

تعداد ۵۰۰ عدد ماهی ازون برون (*Acipenser Stellatus*) با وزن متوسط 1 ± 10 gr از مرکز تکثیر و پرورش شهید بهشتی تهیه شد. ماهیان مذکور به مدت یک ماه در وانهای ۲۰۰۰ لیتری نگهداری و با غذای دستی تغذیه و عمل سازگاری آنها با محیط پرورشی انجام پذیرفت. (تصویر ۱)



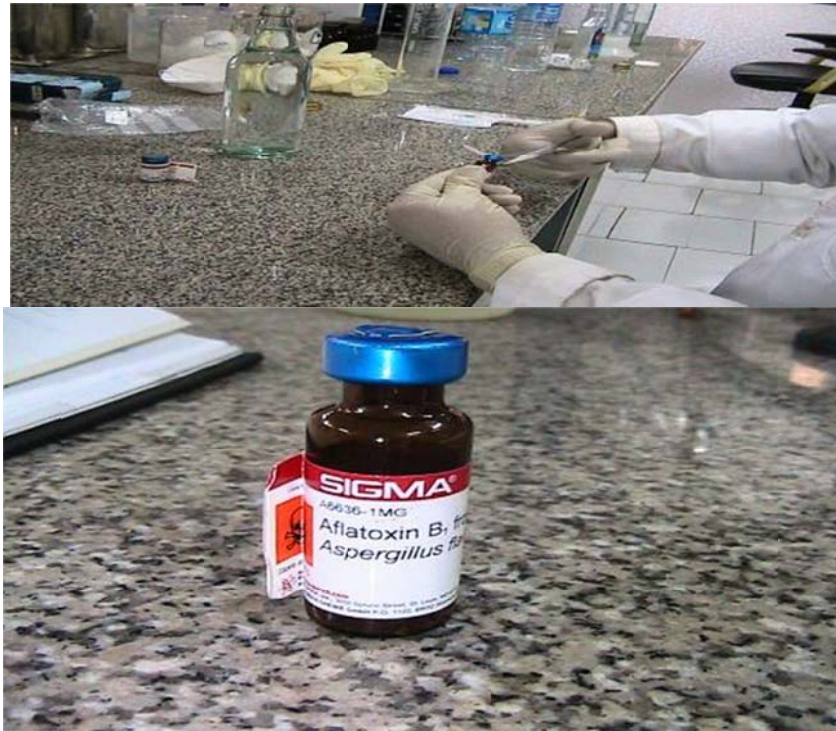
تصویر ۱- آماده سازی کارگاه و تیمارهای آزمایشی در انستیتو بین المللی ماهیان خاویاری شهید دادمان

پس از انجام مراحل سازگاری، تعداد ۱۸۰ عدد از ذخیره ماهیان را انتخاب و پس از بیومتری و ثبت اطلاعات مربوط به طول، وزن، با تراکم ۱۲ عدد ماهی در هر تانک در ۱۵ تانک ۵۰۰ لیتری ذخیره سازی شد. میانگین وزنی ماهیان ذخیره سازی شده 1 ± 15 gr است. تأمین منابع آبی تانک ها از طریق آب چاه با درجه حرارت 20°C ± 18 و با میزان ۲ بار تعویض آب در ۲۴ ساعت تنظیم گردید. هوادهی در هر تانک از طریق سنگ هوا و به شکل مستقل صورت پذیرفت. میزان اکسیژن محلول در آب به مقدار $7/2$ ppm تنظیم و تأمین شد.

۳-۲-۲- تهیه جیره های غذایی

مواد اولیه مورد نیاز فرمولاسیون جیره های غذایی بر طبق مواد مصرفی معمول در جیره غذایی ماهی ازون برون، با کیفیت مطلوب تأمین گردید. جهت افزودن آفلاتوکسین B₁ در غلظتهای مورد نظر به جیره های آزمایشی به شرح ذیل اقدام شد: از آفلاتوکسین B₁ خالص با علامت تجاری SIGMA برای تأمین آفلاتوکسین مورد نظر در جیره ها استفاده شد.

جهت افزودن آفاتوکسین B₁ به جیره های آزمایشی، ابتدا محتوای ویال آفاتوکسین B₁ را در ۱ml متانول خالص (۹۷٪) حل و سپس حجم محلول را تدریجاً تا ۵۰۰ml رسانیده شد. با توجه به غلظتهای مورد نظر آفاتوکسین B₁ در جیره های آزمایشی ۲۵ppb، ۵۰ppb، ۷۵ppb و ۱۰۰ppb، مقادیر لازم از محلول آفاتوکسین B₁ در متانول جهت افزودن به هر جیره تهیه گردید (تصویر ۲)



تصویر ۲: آماده سازی آفاتوکسین B₁ جهت افزودن به جیره های آزمایشی

در مرحله بعد اجزای اولیه تشکیل دهنده جیره های آزمایشی به روش معمول، توزین و با یکدیگر مخلوط گردید. طی مراحل مخلوط کردن اجزا برای هر جیره، مقدار آفاتوکسین به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه بر روی مواد غذایی در حال مخلوط شدن در مخلوط کن افقی، اسپری شد. در مرحله بعد، پس از انجام مراحل کامل مخلوط کردن، مخلوط حاصله به دستگاه پلت زن انتقال یافت و طی ۲ مرحله از پنجره با قطر ۳mm عبور داده شد.



تصویر ۳- مراحل افزودن آفلاتوکسین B₁ و آماده نمودن جیره های غذایی آزمایشی

پلت های حاصل در مرحله بعد به خشک کن انتقال یافته و رطوبت آنان به حدود ۲۰-۱۰ درصد رسید. غذاهای پلت آماده سپس در داخل کیسه های نایلونی بسته بندی و پس از ثبت مشخصات بر روی کیسه در حرارت °C ۱۵ تا زمان مصرف ذخیره سازی شد. (تصویر ۶ تا ۸) جهت حصول اطمینان از وجود AFB₁ به مقادیر پیش بینی شده در جیره های آزمایشی، از جیره های تهیه شده، نمونه برداری و جهت تعیین میزان آفلاتوکسین B₁ به آزمایشگاه تحقیقاتی علوم حیاتی فاروق ارسال شد. در آزمایشگاه مذکور میزان آفلاتوکسین B₁ از طریق HPLC با دستگاههایی با مشخصات ذیل ارزیابی و تعیین گردید.

- waters 1525 Binary HPLC pump
- waters 717 plus Auto sampler
- waters 424 scanning fluorescence Detector
- waters bus SAT/IN Module
- software : millenium32 Ver.40.0



تصویر ۴: مراحل افزودن سم و آماده سازی جیره های آزمایشی



تصویر ۵: پلت زنی جیره های آزمایشی



تصویر ۶: پلت های غذایی



تصویر ۷: خشک کردن پلت ها در دستگاه خشک کن

۳-۳-۲- غذادهی و نمونه برداری

غذادهی بر مبنای ۳ درصد وزن توده زنده و در ۳ نوبت در روز انجام شد. (Cui et al. 1997)



تصویر ۸: بسته بندی جیره های پلت شده بر حسب وزن ماهی

در صورت وجود غذای اضافه در ته تانک ها، روزانه مدفوع و باقیمانده های غذا از هر تانک سیفون و خارج شد. ثبت عوامل فیزیکی و شیمیایی آب از جمله: اکسیژن محلول، درجه حرارت و pH به شکل هفتگی انجام پذیرفت. بررسی علائم کلینیکی به صورت هفتگی و ثبت تلفات روزانه صورت گرفت.

انجام بیومتری از کلیه ماهیان در تیمارها هر ۱۵ روز یکبار انجام پذیرفت. به منظور کالبدگشایی، ماهیانه از هر تیمار دو نمونه به شکل تصادفی نمونه برداری انجام شد.

تهیه نمونه های پاتولوژی نیز به صورت ماهانه انجام گرفت. قبل از نمونه برداری تمامی ماهی ها توسط اسانس گل میخک بیهوش شده و به منظور انجام ارزیابی های مورد نظر به شکل تصادفی از هر تیمار ۲ نمونه اخذ گردید. (تصویر ۹)



تصویر ۹: بیهوش سازی ماهی ها توسط عصاره گل میخک



تصویر ۱۰: بررسی علایم ظاهری

قبل از کالبد گشایی ضایعات جلدی در تمامی ماهیان بررسی و از نظر کمی و کیفی مورد ارزشیابی و ثبت گردید. (تصویر ۱۰)

پس از بررسی و ثبت ضایعات خارجی ، کالبد گشایی صورت گرفته و ضایعات ایجاد شده در اندام های داخلی بررسی و ثبت گردید. (تصویر ۱۱)



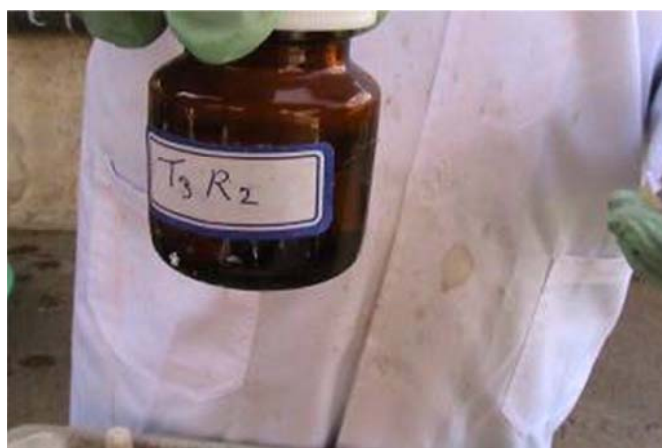
تصویر ۱۱: بررسی علایم کالبد گشایی در نمونه های آزمایشی

به منظور بررسی ضایعات پاتولوژیک از آبشش ها، کبد، طحال و کلیه ها (بخش میانی و قدامی) نمونه برداری و نمونه هادر فرمالین ده درصد فیکس و تا ارسال به آزمایشگاه در یخچال نگهداری گردید . بافت فیکس شده پس از آبگیری توسط الکل در زایلن یا کلروفرم قرار گرفته و پس از پاک شدن، توسط پارافین قالب گیری شد. مقاطع بافتی تهیه شده با روش هماتوکسیلین-ئوزین رنگ آمیزی شده و جهت مقایسه مورد مطالعه قرار گرفت

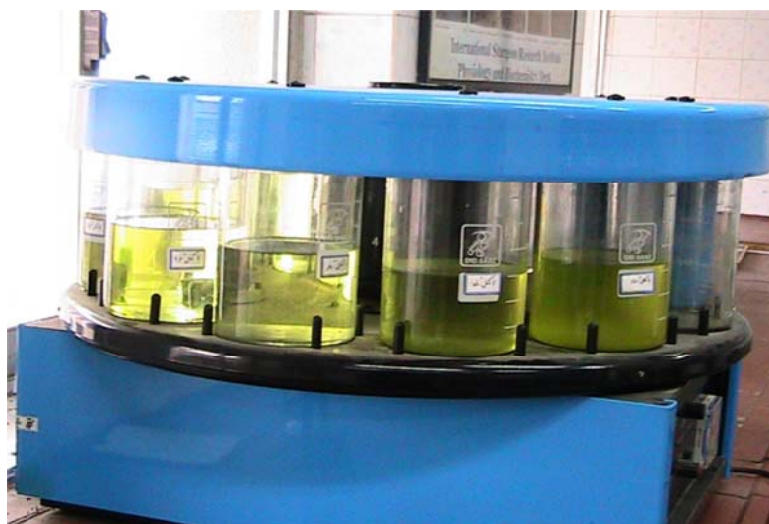
تصاویر آماده سازی بافت:



تصویر ۴۹: قراردادن اندامهای جدا شده در محلول بوئن



تصویر ۵۰: ظرف حاوی بافت و محلول بوئن



تصویر ۵۱: دستگاه پروسس بافت



تصویر ۵۲: قالب های پارافین حاوی بافت



تصویر ۵۳: دستگاه میکروتوم جهت برشهای بافتی



تصویر ۵۴: محلولهای رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اُوزین (H&E)

۴-۳-۲- مطالعات خون شناسی

در روز ششم پس از مشاهده اولین تلفات و در انتهای دوره (روز ۵۲) از هر گروه تیماری ۱۲ عدد ماهی (از هر تکرار ۴ عدد) به صورت تصادفی خون گیری از سیاهرگ ساقه دمی به وسیله سرنگ های ۱ و ۲ سی سی بعمل آمد. هر نمونه خون به دو ویال مجزا (یکی جهت بررسی سلول های خونی و دیگری جهت بررسی فاکتور های سرمی خون) منتقل گردید. قبل از خون گیری یک قطره هپارین برای جلوگیری از انعقاد خون به سرنگ ها اضافه شد (اشکال ۳-۱۶ و ۳-۱۷). برای جلوگیری از فساد خون های گرفته شده تا رسیدن به آزمایشگاه نمونه ها را در یخچال نگهداری شدند (کاظمی، ۱۳۸۹).



شکل ۳-۱۶: روش خون گیری از ساقه دمی بچه ماهی ازون برون



شکل ۳-۱۷: انتقال نمونه های خون به ویال های ۲ سی سی جهت ارسال به آزمایشگاه

اندازه گیری پارامتر های خونی (CBC (Compleat blood cell):

برای شمارش یاخته های قرمز و سفید، نمونه خون ها پس از همگن سازی به کمک پیپت ملانژور و محلول رقیق کننده رنگی ریس، رقیق می شوند (به علت تراکم بالای یاخته های خونی ماهیان) و روی لام هموسیتمتر نئوبار دو حجره ای تعداد یاخته های قرمز و یاخته های سفید در میلی متر مکعب خون برای هر نمونه در دو حجره محاسبه خواهند شد. رقت انجام شده برای یاخته های قرمز خون ۱:۲۰۰ و برای یاخته های سفید خون ۱:۲۰

خواهد بود. یاخته های قرمز با لنز ۴۰ و یاخته های سفید با لنز ۲۰ برابر میکروسکوپ نوری نیکون مدل E600 شمارش می شوند..(Gao et al., 2007, Klontz, 1994).

تعداد گلبولهای قرمز Red Blood Cell

$$RBC (N/mm^3) = (R1 + R2 + R3 + R4 + R5) \times 5 \times 10 \times 200 = R \times 10000$$

تعداد گلبولهای سفید White Blood Cell

$$WBC(N/mm^3) = \frac{(W_1 + W_2 + W_3 + W_4) \times 20 \times 10}{4} = (W_1 + W_2 + W_3 + W_4) \times 50$$

تشخیص افتراقی گلبول سفید:

جهت شمارش افتراقی یاخته های سفید خون بلافاصله پس از خون گیری قطره کوچکی از خون روی لام آزمایشگاهی قرار داده می شود و با روش دو لامی با زاویه ۴۵ درجه گسترش خونی تهیه می گردد. پس از خشک و تثبیت گسترش خونی با الکل متانول در هوای آزاد، گسترش ها به کمک محلول رقیق شده گیمسا با غلظت ۱۰ درصد رنگ آمیزی خواهند شد. پس از رنگ آمیزی، برای هر نمونه خون از سه گسترش خونی برای شمارش افتراقی گلبول های سفید و محاسبه درصد فراوانی هر گروه از آنها (یاخته های نوتروفیل، بازوفیل، ائوزینوفیل، لنفوسیت و مونوسیت) استفاده می گردد. از روش زیگزاگ جهت شمارش اسلاید ها استفاده شده و برای دقت بیشتر در محاسبات، از خون هر ماهی دو اسلاید تهیه و از هر اسلاید ۲۰۰ سلول شمارش خواهد شد (Gao et al., 2007).

حجم فشرده گلبولی یا هماتوکریت

برای محاسبه درصد هماتوکریت خون، بلافاصله پس از خون گیری و پیش از لخته شدن خون، ۲/۳ حجم لوله های موئینه هپارینه با خون همگن شده پر می شوند. پس از سانتریفیوژ لوله های موئینه با میکروههماتوکریت (مدل D-78532 Tuttlngen شرکت Hettich آلمان) با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۷ دقیقه (Houston, 1990)، درصد هماتوکریت هر نمونه خون روی خط کش مخصوص محاسبه می گردد.

غلظت هموگلوبین

مقدار هموگلوبین هر نمونه خون به روش کالریمتریکی سیانو هموگلوبین و بوسیله محلول معرف با طول موج ۵۴۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV/VIS – ۶۵۰۵، شرکت Jenway، ساخت انگلیس) و با استفاده از کیت پارس آزمون ساخت ایران، غلظت هموگلوبین بر حسب گرم در دسی لیتر محاسبه می شود. شاخص های گلبول قرمز

حجم متوسط گلبول قرمز با تقسیم درصد هماتوکریت خون بر تعداد گلبول های قرمز بر حسب میلیون در میلی متر مکعب ضربدر عدد ۱۰ و بر حسب واحد فمتولیترا (fl) از رابطه ۱، غلظت متوسط هموگلوبین در یاخته قرمز با تقسیم مقدار هموگلوبین بر حسب گرم در دسی لیتر تقسیم بر تعداد یاخته های قرمز خون و بر حسب میلیون در میلی متر مکعب ضربدر عدد ۱۰ بر حسب پیکو گرم (pg) از رابطه ۲ و میانگین غلظت متوسط هموگلوبین گلبول های قرمز با تقسیم مقدار هموگلوبین بر حسب گرم در دسی لیتر تقسیم بر درصد هماتوکریت ضربدر عدد ۱۰۰ بر حسب درصد از رابطه ۳ محاسبه خواهد گردید. (Anderson and Klontz 1965) و (Klontz, 1994)

حجم متوسط گلبولی Mean Corpuscular volume

$$MCV = \frac{\text{Hematocrit}}{RBC(\text{million} / \text{mm}^3)} \times 10$$

غلظت متوسط هموگلوبین در گلبول قرمز Mean Corpuscular Hemoglobin

$$MCH = \frac{\text{Hemoglobin (g / dcl)}}{RBC (\text{million} / \text{mm}^3)}$$

غلظت متوسط هموگلوبین گلبولهای قرمز Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration

$$MCHC = \frac{\text{Hemoglobin(g / dcl)}}{\text{Hematocrit}} \times 100$$

تست های بیوشیمیایی بر اساس واکنش رنگ سنجی با آنزیماتیک با اتوآنالایزر Technicon ساخت آمریکا و با واحد میلی گرم در دسی لیتر یا IU/L سنجش شده است. از کالیبراتور و کنترل های تجارتي بری صحت و دقت روش فوق استفاده شده است (Lewis, 1991).

توتال پروتئین به روش modi-Biuret با استفاده از کیت زیست شیمی تعیین گردید در این روش در شرایط قلیایی یون های کوپریک با اتمهای کربونیل اکسیژن و آمید نیتروژن یک کمپلکس آبی مایل به بنفش ایجاد می کنند. شدت رنگ حاصل متناسب با مقدار پروتئین در نمونه است که در ۵۶۰ - ۵۲۰ نانومتر اندازه گیری می شود..

تعیین میزان کلسترول با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون و به روش آنزیمی، کالریمتری (CHOD-PAD) جهت اندازه گیری تک نقطه ای با روش فتومتریک انجام شد. در این آزمایش پراکسید هیدروژن تولید شده در نتیجه هیدرولیز و اکسیداسیون کلسترول بهمراه فنل و ۴- آمینو آنتی پیرین در مجاورت آنزیم پراکسیداز تشکیل کیتونمین می دهد. میزان کیتونمین تشکیل شده که به صورت فتومتریک قابل اندازه گیری است با کلسترول رابطه مستقیم دارد.

جهت تعیین آلکالین فسفاتاز (ALP) از کیت شرکت پارس آزمون و با روش DGKC (استاندارد انجمن بیوشیمی آلمان) و بر اساس آزمایش

ALP

استفاده شد. $P\text{-Nnitrophenylphosphate} + H_2O \rightarrow \text{Phosphate} + p\text{-nitrophenol}$

جهت اندازه گیری آنزیم های اختصاصی کبدی، آلانین آمینو ترانسفراز (ALAT) که قبلا با نام گلوتامیک پیروئیک ترانس آمیناز (GPT) نامیده می شد و آسپرتات آمینو ترانسفراز (ASAT) که قبلا با نام گلوتامیک اگزال استیک ترانس آمیناز نامیده می شد با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون از روش IFCC (فدراسیون بین المللی شیمی بالین و طب آزمایشگاهی) بدون افزودن Pyndoxal-5- phosphate و بر اساس آزمایش

ALAT

$L\text{-Alanin} + 2\text{Oxoglutarat} \leftarrow \rightarrow L\text{-Glutamate} + p\text{-nitrophenol}$

LDH

$\text{Pyruvate} + \text{NADH} + H^- \leftarrow \rightarrow L\text{-Lactate} + \text{NAD} +$

ASAT

$L\text{-Asparate} + 2\text{Oxoglutarat} \leftarrow \rightarrow L\text{-Glutamate} + p\text{-nitrophenol}$

MDH

$\text{Oxoglutarate} + \text{NADH} + H^- \leftarrow \rightarrow L\text{-Malate} + \text{NAD} +$ استفاده گردید.

تعیین میزان آلبومین در سرم با استفاده از کیت شرکت زیست شیمی و از روش BCG Clolorimetric

pH 4.2

و بر اساس آزمایش

انجام شد. $\text{Albumin} + \text{BCG} \rightarrow \text{Albumin} - \text{BCG (Complex)}$

میزان اوره با استفاده از کیت شرکت زیست شیمی و با روش GLDH و بر اساس آزمایش

$\text{Urea} + 2H_2O - \text{UREASE} \rightarrow 2NH_4^+ + 2HCO_3^-$

انجام شد. $2\text{-Oxoglutarate} + 2NH_4^+ + \text{NADH} - \text{GLDH} \rightarrow L\text{-GLUTAMATE} + \text{NAD} + H_2O$

در اندازه گیری توتال لیپید و با استفاده از روش فتومتری سرم را با اسید غلیظ می جوشانند سپس با معرف فسفوالینیک مجاور نموده، در واکنش سولفوسفووانیلین لیپید ها رنگ صورتی می دهند که با استاندارد مقایسه می نمایند.

شاخص های رشد:

سنجش دقیق وزن ماهیان بوسیله ترازوی دیجیتال با حساسیت ۰/۱ انجام گرفت. شاخص های رشد و تغذیه مانند وزن و طول کل نهایی، بیوماس، تولید، درصد افزایش وزن بدن (BW%)، ضریب تبدیل غذا (FCR)، شاخص رشد ویژه (SGR)، رشد روزانه (GR) و شاخص ضریب چاقی یا عامل وضعیت (CF) و درصد بازماندگی بر اساس فرمولهای زیر محاسبه گردید.

درصد بازماندگی = $100 \times$ نسبت تعداد لارو اولیه / نسبت لارو زنده مانده در پایان دوره (Hung et al., 1989)

$F.C.R = F / (W_f - W_i)$ (Ronyai et al., 1990)

F : مقدار غذای مصرف شده توسط ماهی

W_f و W_i : میانگین بیوماس اولیه و نهایی

$F.E = 1 / (FCR)$ (Ronyai et al., 1990)

$S.G.R = (\ln W_f - \ln W_i) / t \times 100$ (Ronyai et al., 1990 ; Wahli et al., 2003)

W_f و W_i : میانگین بیوماس اولیه و نهایی

t : مدت زمان پرورش

$\% BWI = 100 \times (BW_f - BW_i) / BW_i$ (Hung et al., 1989)

BW_f و BW_i : متوسط وزن اولیه و وزن نهایی در هر حوضچه

$G.R = (BW_f - BW_i) / n$ (Hung et al., 1989)

n : تعداد روزهای پرورش

$CF = 100 \times (BW / TL^3)$ (Hung & Deng, 2002 ; Akbulut et al., 2002)

BW : وزن (g)

TL : طول کل (cm)

روشهای آماری :

جهت چیدمان تیمارها از روش بلوک های تصادفی استفاده شد. روش نمونه برداری از جمعیت نمونه ها در هر تیمار نیز به شکل انتخابی انجام پذیرفت. کلیه داده ها در برنامه Excel ثبت و به روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و جدول مقایسه چند وجهی Duncan یا Tukey با نرم افزار SPSS مورد ارزیابی قرار گرفت.

۴-۲- نتایج

۴-۲-۱- جراحات پوستی

در اولین نوبت نمونه برداری که یک ماه پس از تغذیه تیمارهای آزمایشی با دوزهای مختلف آفلاتوکسین B₁ انجام شد، جراحاتی به شکل پرخونی خفیف در رأس پلاکهای ردیف شکمی و خونریزیهای نقطه ای در پوست ناحیه شکمی در حد فاصل ردیف های شکمی پلاکهای استخوانی به ترتیب در تیمارهای مختلف مشاهده گردید.

در نوبت دوم نمونه برداری یعنی ۲ ماه بعد از تغذیه با جیره های غذایی حاوی آفلاتوکسین B₁ توسعه جراحات در تیمارهای مختلف آزمایشی مشاهده شد. به طوری که جراحات از خونریزی در راس پلاکهای ردیف شکمی و جانبی و همچنین پرخونی و خونریزیهای نقطه ای در پوست سطح شکمی توسعه یافته بوده و در کنار آن پرخونی در پایه باله های سینه ای و به همراه ایجاد زخم در برخی از تیمارها در نواحی مذکور مشاهده گردید. در آخرین نمونه برداری که ۳ ماه پس از ذخیره سازی صورت پذیرفت، 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 ضایعات شدید خونریزی در نواحی شکمی ، جانبی و ساقه دمی مشاهده گردید. بروز جراحات خونریزی در اطراف مقعد و ناحیه سرپوش برانشی به شکل قابل ملاحظه ای دارای پیشرفت بوده و ضایعات شدیدتر بروز نموده در تصاویر شماره ۱۲ الی ۲۴ ضایعات و جراحات فوق الذکر نمایش و توضیح داده شده است. مجموعه مشاهدات ثبت شده در تیمارهای مختلف آزمایشی در جدول ۱ نمایش داده شده است :

جدول شماره ۱: ضایعات و جراحات پوستی مشاهده شده در اوزون برون پرورشی تغذیه شده با دزهای مختلف آفلاتوکسین B₁ طی مدت ۳ ماه و در درجه حرارت ۱۸±۲°C

ماه سوم	ماه دوم	ماه اول	نوبت نمونه برداری ◀ تیمارها ▼
-پرخونی و توسعه جراحات در پلاکهای ردیف شکمی و جانبی -مشاهده پرخونی در ناحیه شکمی و ساقه دمی	-خونریزی در رأس پلاکهای ردیف شکمی و جانبی -خونریزی های نقطه ای در پوست ناحیه شکمی	-پرخونی خفیف در رأس پلاکهای ردیف شکمی	تیمار ۱ (۲۵ppb)
-خونریزی در پایه باله های شکمی، بروز پرخونی در اطراف مقعد و جراحات ناحیه سرپوشی برانشی	-پرخونی در رأس پلاکهای ردیف شکمی و جانبی - پرخونی در پایه باله های سینه ای	-پرخونی در رأس پلاکهای ردیف شکمی	تیمار ۲ (۵۰ ppb)
-بروز جراحات و خونریزی شدید در نواحی شکمی و جانبی و ساقه دمی -بروز ضایعات در ناحیه سر و سرپوش برانشی	-خونریزی در پلاکهای ردیف شکمی و خونریزی نقطه ای در ناحیه سر و سرپوش برانشی	-پرخونی در رأس پلاکهای ردیف شکمی	تیمار ۳ (۷۵ppb)
-توسعه جراحات خونریزی در سطوح شکمی جانبی، ساقه دمی و پشتی، ضایعات خونریزی و پرخونی در سرپوش برانشی و سر	-خونریزی در پلاکهای ردیف شکمی و پرخونی درسطوح شکمی و جانبی و ساقه دمی - پرخونی در پایه باله های سینه ای	-پرخونی در راس پلاکهای ردیف شکمی و جانبی - خونریزی نقطه ای در پوست ناحیه شکمی	تیمار ۴ (۱۰۰ppb)

افزایش و پیشرفت جراحات مشاهده شده در نوبت های مختلف نمونه برداری موضوعی نگران کننده از نظر بازار پسندی اوزون برون است که به آن پرداخته خواهد شد.

تصاویر ضایعات پوستی:



تصویر ۱۲: نمونه شاهد



تصویر ۱۳: خون ریزی های نقطه ای در پلاکهای ردیف شکمی در نوبت اول نمونه برداری



تصویر ۱۴ خون ریزی در پلاکهای ردیف شکمی، تیمار ۳، نوبت اول نمونه برداری



تصویر ۱۵: خون ریزی در پلاکهای ردیف شکمی نزدیک به باله دمی، تیمار ۴، نمونه برداری اول



تصویر ۱۶: خون ریزی در نزدیک باله های شکمی نمونه برداری اول



تصویر ۱۷: بروز جراحات نسبتا شدیدتر در پلاکهای ردیف شکمی، نمونه برداری دوم



تصویر ۱۸: بروز ضایعات عمیق تر در پلاکهای ردیف شکمی، نمونه برداری دوم



تصویر ۱۹: ایجاد پیگمانتاسیون خفیف در سطح شکمی، نمونه برداری دوم



تصویر ۲۰: بروز جراحات در ناحیه ساقه دم، نمونه برداری سوم



تصویر ۲۱: بروز پیگمانتاسیون نسبتاً شدید در سطح شکمی، نمونه برداری سوم



تصویر ۲۲: ایجاد ضایعات در نواحی شکمی، جانبی و باله‌ها، نمونه برداری سوم



تصویر ۲۳: بروز پیگمانتاسیون شدید در سطوح جانبی همراه با ضایعات شکمی، نمونه برداری سوم



تصویر ۲۴: ایجاد پیگمانتاسیون توام با ایجاد ضایعات در سطوح جانبی و شکمی، نمونه برداری سوم

۲-۴-۲- مشاهدات کالبد گشایی

برای بررسی اثرات دزهای مختلف آفلاتوکسین B₁ خوراکی بر برخی از اندامهای داخلی ماهی ازون برون از جمله آبشش، کبد، کلیه و طحال در نوبت های مختلف نمونه برداری و نسبت به کالبد گشایی و ثبت علایم و عوارض قابل مشاهده اقدام گردید. علایم کالبد گشایی مذکور به شکل مشروح و به تناسب دز مصرفی آفلاتوکسین B₁ در طول مدت مواجه شدن تیمارهای آزمایشی با آن سم در جدول شماره (۲) درج گردیده است.

آبشش ها :

بررسی ظاهری آبشش ها در نوبت اول و نمونه برداری موید سلامت و طبیعی بودن ظاهر آبشش می باشد. فقط در تیمار ۲ ملانیزه شدن آبشش ها مشاهده شد. در نوبت سوم آبشش ها کمی پر خون بخصوص در تیمارهای ۲ و ۳ و ۴ (۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ppb) مشاهده می شود. (تصاویر ۲۵ تا ۲۸)

کبد :

در نوبت اول نمونه برداری کبد تقریباً نرمال و طبیعی است و فقط در تیمار (۲) کبد کم رنگ و رنگ پریده مشاهده شد. قوام کبد و شکل آن حالت طبیعی دارد. در نوبت دوم نمونه برداری کبد کم رنگ و رنگ پریده و علایم کبد چرب دیده می شود. کبد در قوام و اندازه طبیعی مشاهده شده است. در تیمار ۳ کبد به صورت کمی پرخونی مشهود است.

در نوبت سوم نمونه برداری رنگ کبد، کاملاً بی رنگ و در تمامی تیمارها عارضه کبد چرب نشان داده شد. در این نوبت نمونه برداری، در تیمار ۲، کبد تقریباً طبیعی و پیگمانته و در تیمار ۴، تجمع لکه های خونی در کبد مشاهده شد. در نوبت اول و دوم نمونه برداری کیسه صفرا دارای رنگ و اندازه طبیعی مشاهده گردید. در نوبت سوم نمونه برداری، در تیمارهای ۳ و ۴ کیسه صفرا غیر طبیعی و تقریباً هم رنگ کبد مشاهده شد. (تصاویر ۲۹ تا ۳۴)

کلیه ها :

در اولین نوبت نمونه برداری، از تیمار ۲ به بعد پرخونی و تورم کلیه و رسوبات فیبرینی در زیر صفاق پوشاننده کلیه ها مشاهده گردید. در نوبت دوم نمونه برداری نیز رسوبات سفیدرنگ در زیر صفاق پوشاننده کلیه مشاهده شده و همچنین کلیه ها پر خون و متورم و تحلیل نسبی بافت کلیه مشهود است. در نوبت سوم، کلیه ها پر خونتر از دو نوبت قبلی اند، مخصوصاً از تیمار ۱ تا ۴ به نسبت دز آفلاتوکسین B₁ کلیه ها پر خون تر به نظر می رسد. (تصاویر ۳۵ تا ۴۳)

طحال :

در نوبت اول و دوم نمونه برداری، طحال در رنگ و اندازه طبیعی است. در نوبت سوم نمونه برداری فقط در تیمار ۳ و ۴ طحال نسبتاً بزرگ و پر خون مشاهده شد. (تصاویر ۴۴ تا ۴۸)

سایر اعضا :

در نوبت اول نمونه برداری در تیمارها، پرخونی عروق مزانتر روده و مشاهده رنگدانه ملانین در دیواره روده صورت پذیرفت. در نوبت دوم نمونه برداری، در روی پانکراس رنگدانه های ملانین به چشم می خورد. در تیمار ۳ روده ها کمی پر خون ولی در تیمار ۴، پر خونی در عروق مزانتر روده ها مشاهده شد. در نوبت سوم نمونه برداری، در تیمار ۲ و ۳ و ۴ دستگاه گوارش پیگمانته است، مری پر خون مشاهده گردید.

جدول (۲): مشاهدات کالبد گشایی ناشی از مصرف دزهای مختلف آفاتوکسین B₁ در ماهی اوزون برون طی ۳ ماه و در درجه حرارت ۱۸±۲°C

ماهی سوم	ماهی دوم	ماهی اول	زمان / تیمار
<ul style="list-style-type: none"> - آبشش ها تقریباً طبیعی - کبد کم رنگ و چرب و کیسه صفرا طبیعی - روده ها کمی پر خون - طحال در رنگ و اندازه طبیعی - کلیه قدامی پر خون 	<ul style="list-style-type: none"> - آبشش ها تقریباً طبیعی - کبد کم رنگ، مشاهده علایم کبد چرب و با قوام طبیعی - طحال در رنگ و اندازه طبیعی - روده ها فاقد پر خونی - کلیه ها نسبتاً پر خون - مشاهده رسوبات سفید رنگ در زیر صفاق کلیه 	<ul style="list-style-type: none"> - آبشش ها تقریباً طبیعی - کبد تقریباً غیرطبیعی، کیسه صفرا حالت معمولی - طحال در رنگ و اندازه طبیعی - کلیه ها متورم و کمی پر خون 	<p>تیمار ۱ (۲۵ppb)</p>
<ul style="list-style-type: none"> - آبشش ها کمی پر خون - کبد کم رنگ و دارای پیمگانتاسیون، کیسه صفرا طبیعی - طحال در رنگ و اندازه طبیعی - پیمگانتاسیون و رگه های خون روی دستگاه گوارش - کلیه قدامی پر خون و متورم 	<ul style="list-style-type: none"> - آبشش ها تقریباً طبیعی - کبد کم رنگ - رنگدانه های ملانین بر روی پانکراس - طحال در رنگ و اندازه طبیعی - پر خونی کلیه و مشاهده رسوبات سفید زیر صفاق کلیه ها 	<ul style="list-style-type: none"> - آبشش ها کمی پر خون، ملانیزه شدن آبشش ها - کبد کم رنگ - عروق مزانتر نسبتاً پر خون - مایع درون کیسه صفرا شفاف - طحال در رنگ و اندازه طبیعی - پر خونی و تورم کلیه ها 	<p>تیمار ۲ (۵۰ppb)</p>
<ul style="list-style-type: none"> - آبشش ها کمی پر خون - کبد کم رنگ و چرب، کیسه صفرا غیرطبیعی هم رنگ کبد - طحال به رنگ طبیعی ولی بزرگ - روده ها پر خون - کلیه ها متورم و پر خون 	<ul style="list-style-type: none"> - آبشش ها کمی پر خون - کبد در حالت کم رنگ، کیسه صفرا کم رنگ در اندازه طبیعی - لوزالمعده دارای رنگدانه های ملانین - روده ها کمی پر خون - طحال در رنگ و اندازه طبیعی - کلیه ها کمی پر خون و متورم 	<ul style="list-style-type: none"> - آبشش ها کمی پر خون - کبد کم رنگ - عروق مزانتر روده نسبتاً پر خون - طحال در رنگ و اندازه طبیعی - رسوبات فیبرینی در زیر صفاق پوشاننده کلیه 	<p>تیمار ۳ (۷۵ppb)</p>
<ul style="list-style-type: none"> - آبشش ها نسبتاً پر خون - کبد رنگ پریده و چرب، کیسه صفرا طبیعی - طحال پر خون و بزرگ - پر خونی مری - پر خونی و تورم کلیه ها 	<ul style="list-style-type: none"> - آبشش ها نسبتاً پر خون - کبد کم رنگ و چرب صفرا بی رنگ - پر خونی در عروق مزانتر روده وجود رنگدانه های ملانین بر روی جدار روده - رسوباتی در زیر پ صفاق کلیه ها، تحلیل نسبی بافت کلیه در قسمت قدامی - رسوبات با تلالو نقره ای در قسمت خلفی 	<ul style="list-style-type: none"> - آبشش ها نسبتاً پر خون - کبد کم رنگ، سفید و پر چرب - مشاهده رنگدانه ملانینی در دیواره روده و کیسه شنا - پر خونی عروق مزانتر روده - رسوبات در زیر صفاق کلیه و پر خونی و تورم کلیه ها 	<p>تیمار ۴ (۱۰۰ppb)</p>

تصاویر کالبدگشایی:

آبشش ها:



تصویر ۲۵: آبشش نمونه شاهد در ماهی ازون برون



تصویر ۲۶: پر خونی در آبشش ها ، نمونه برداری اول



تصویر ۲۷: پر خونی و افزایش ترشحات مخاطی در آبشش ها ، نمونه برداری دوم



تصویر ۲۸: پر خونی آبشش ها ، نوبت سوم نمونه برداری کبد:



تصویر ۲۹: کبد با قوام و رنگ طبیعی در نمونه شاهد



تصویر ۳۰: کبد چرب و رنگ پریده، نمونه برداری اول



تصویر ۳۱: کبد چرب و کیسه صفرای متسع، نمونه برداری دوم



تصویر ۳۲: کبد چرب و لوزالمعده پیگمانته، نوبت دوم نمونه برداری



تصویر ۳۳: کبد چرب و پیگماتناسیون اعضاء داخلی، نمونه برداری سوم



تصویر ۳۴: کبد چرب همراه با تجمع لکه های خون، نمونه برداری سوم

کلیه ها:



تصویر ۳۵: بافت طبیعی کلیه در نمونه شاهد



تصویر ۳۶: پر خونی خفیف کلیه ها، نمونه برداری اول



تصویر ۳۷: پر خونی کلیه ها ، نمونه برداری اول



تصویر ۳۸: پر خونی کلیه ها همراه با پیگمانتاسیون خفیف، نمونه برداری اول



تصویر ۳۹: پر خونی کلیه ها و پیگمانتاسیون آن، نمونه برداری دوم



تصویر ۴۰: پر خونی کلیه ها ، نمونه برداری دوم



تصویر ۴۱: پر خونی کلیه با جلای نقره ای رنگ ، نمونه برداری دوم



تصویر ۴۲: پر خونی شدید کلیه ها همراه با تالو نقره ای و پیگمانتاسیون ، نمونه برداری سوم



تصویر ۴۳: پر خونی شدید کلیه ها توام با پیگماتتاسیون شدید، نوبت سوم نمونه برداری

طحال :



تصویر ۴۴: طحال شاهد در ماهی ازون برون



تصویر ۴۵: کم خونی ورتنگ پریدگی درطحال ، نمونه برداری اول



تصویر ۴۶: طحال غیر طبیعی ، نمونه برداری دوم



تصویر ۴۷: طحال نسبتاً پر خون، نمونه برداری سوم



تصویر ۴۸: طحال غیر طبیعی ، نمونه برداری سوم

۳-۴-۲- تغییرات بافتی

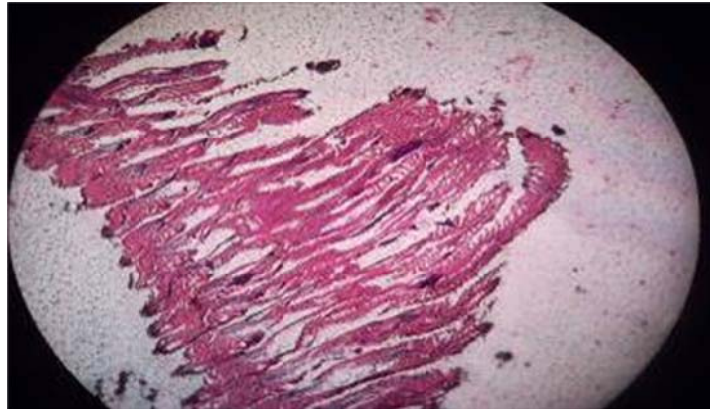
آبشها :

جدول ۳: مشاهدات تغییرات بافتی در آبش اوزون برون پرورشی تغذیه شده با مقادیر مختلف آفلاتوکسین B₁

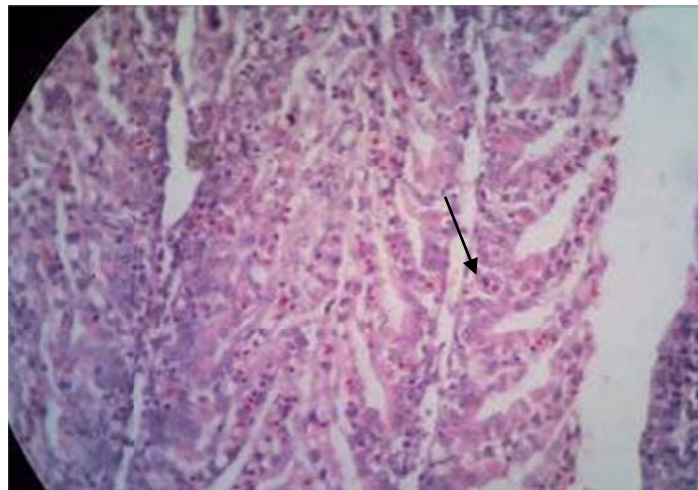
به مدت ۳ ماه و در درجه حرارت $18 \pm 2^{\circ}C$

نوبت نمونه برداری تیمارها ▼	ماه اول (روز ۳۰)	ماه دوم (روز ۶۰)	ماه سوم (روز ۹۰)
تیمار ۱ (۲۵ppb)	- تورم سلولی خفیف در برخی از سلولهای پوششی تیغه های آبششی - هایپرپلازی سلولهای پوششی برخی از تیغه های آبششی و پیوستگی تیغه ها	- به هم چسبندگی تیغه های آبششی - تورم سلولی خفیف - هایپرپلازی سلولهای پوششی	- ادم داخل سلولی - به هم چسبیدن تیغه های آبششی - هایپرپلازی سلولهای پوششی
تیمار ۲ (۵۰ppb)	- تورم سلولی برخی از سلولهای پوششی تیغه های آبشش - هایپر پلازی سلولهای پوشش	- تورم سلولی - به هم چسبیدن تیغه های آبششی - تخریب بافت پوششی	- تورم سلولی - به هم چسبیدن تیغه های آبششی - هایپرپلازی بافت پوششی
تیمار ۳ (۷۵ppb)	- تورم خفیف در برخی از سلولهای پوشش آبشش ها - به هم چسبیدن تیغه های ثانویه آبششی	- ادم داخل سلولی سلولهای پوششی - به هم چسبندگی تیغه های آبششی - تخریب بافت پوششی	- تورم سلولی - به هم چسبیدن تیغه های آبششی - هایپرپلازی خفیف
تیمار ۴ (۱۰۰ppb)	- ادم داخل سلولی سلولهای بافت پوششی تیغه های آبششی - چسبیدن تیغه ها به یکدیگر	- هایپرپلازی سلولهای پوششی - به هم چسبیدن تیغه های آبششی - تخریب بافت پوششی	- هایپرپلازی سلولهای پوششی - به هم چسبندگی تیغه های آبششی - تخریب بافت پوششی

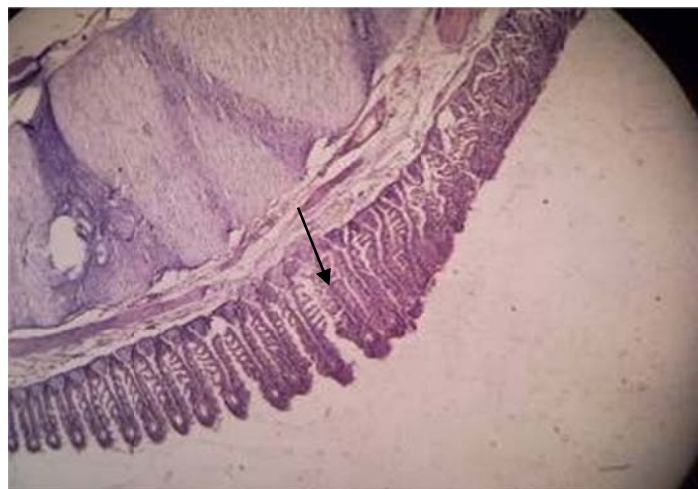
مقاطع هیستوپاتولوژیک آبشش :



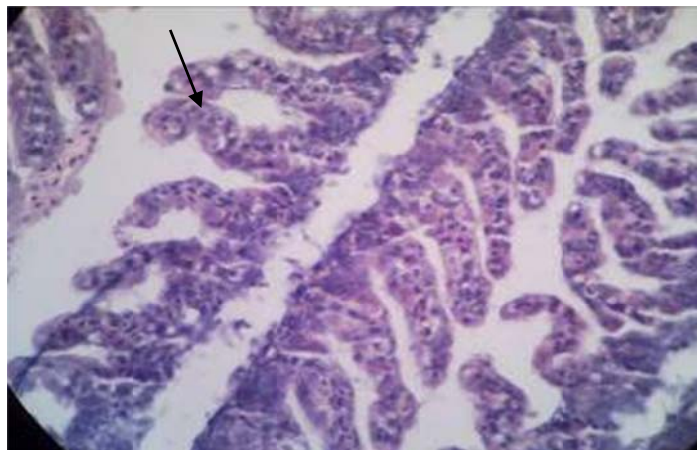
تصویر ۵۵: بافت آبشش شاهد ماهی از زون برون



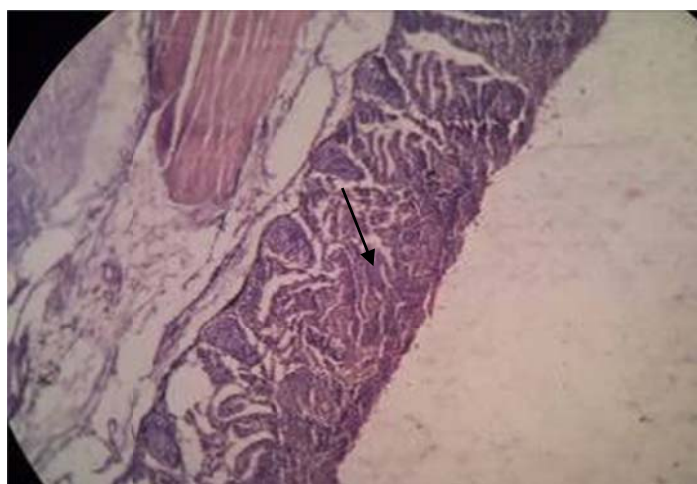
تصویر ۵۶: تورم سلولی برخی از سلولهای پوششی تیغه های آبششی ، تیمار دوم ، ماه اول



تصویر ۵۷: تورم خفیف در برخی سلولهای پوششی آبشش ها ، به هم چسبیدن تیغه های ثانویه آبششی تیمار سوم، ماه اول



تصویر ۵۸: تورم، به هم چسبیدن تیغه های آبششی، تیمار سوم، ماه اول



تصویر ۵۹: بافت آبشش، تیمار ۳، ماه اول، تورم سلولهای پوششی و به هم چسبیدگی تیغه های آبششی



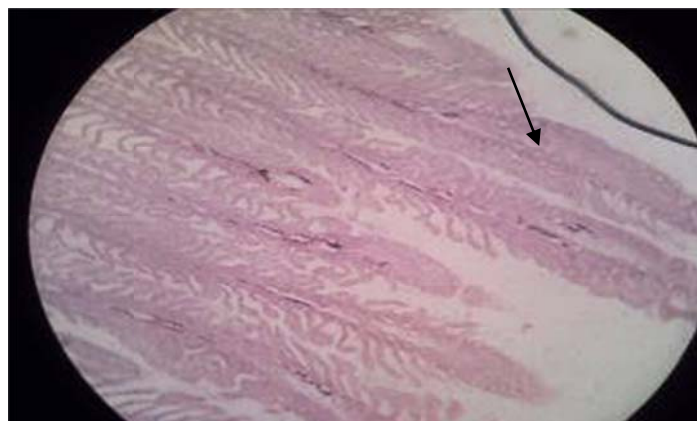
تصویر ۶۰: ادم داخل سلولی، به هم چسبیدن تیغه های آبششی به همدیگر، تیمار چهارم، ماه اول



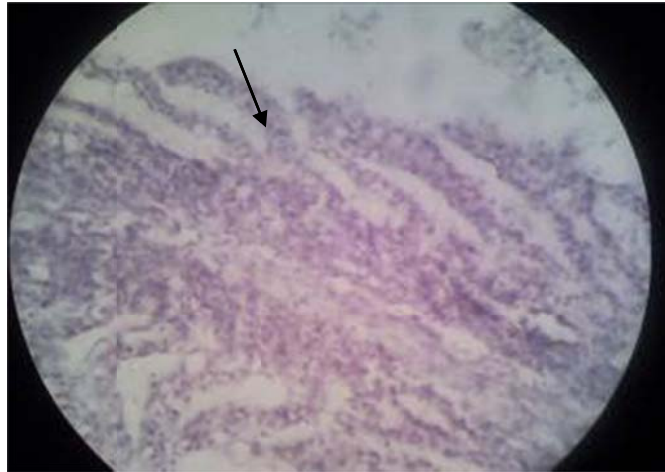
تصویر ۶۱: آبشش شاهد ماه دوم نمونه برداری



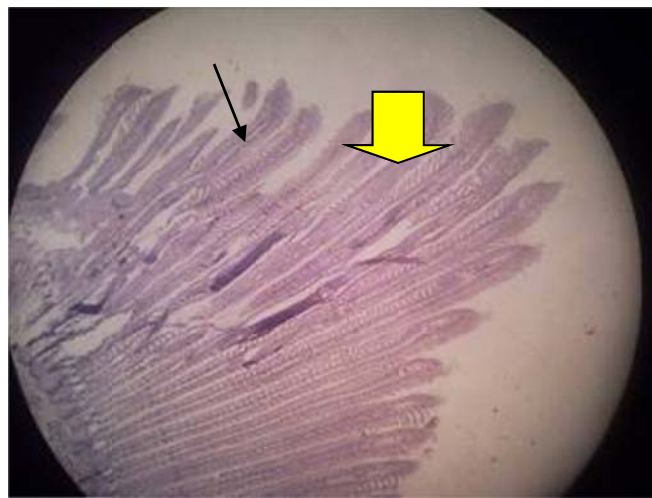
تصویر ۶۲: به هم چسبیدگی تیغه های آبششی، تیمار اول، ماه دوم



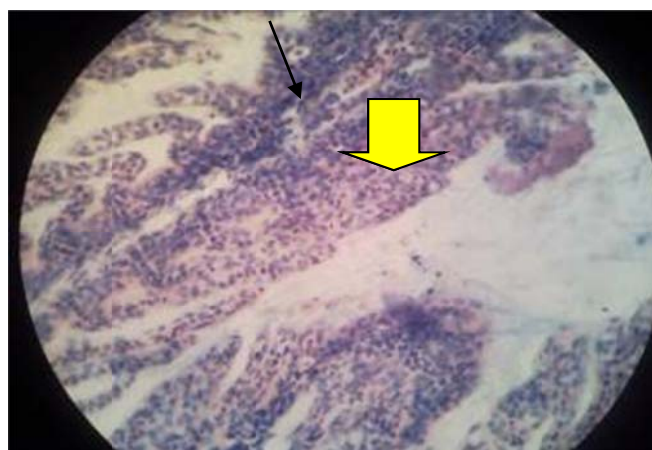
تصویر ۶۳: به هم چسبیدگی تیغه های
آبششی، تیمار دوم، ماه دوم



تصویر ۶۴: ادم داخل سلولی و به هم چسبیدن تیغه های آبشی، تیمار سوم، ماه دوم



تصویر ۶۵: به هم چسبیدن تیغه های آبشی و ادم داخل سلولی سلولهای پوششی، تیمار سوم، ماه دوم



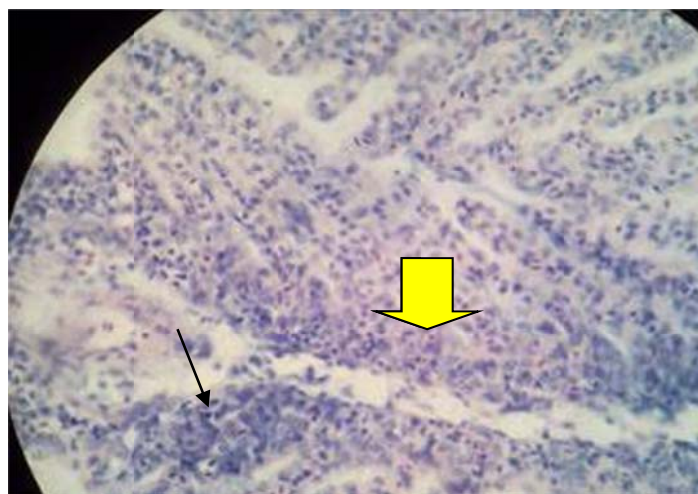
تصویر ۶۶: هایپرپلازی و به هم چسبیدن تیغه های آبشی، تیمار ۴، ماه دوم



تصویر ۶۷: دم داخل سلولی سلولهای پوششی تیغه های آبخشی، تیمار ۱، ماه سوم



تصویر ۶۸: تورم داخل سلولی، تیمار دوم، ماه سوم



تصویر ۶۹: به هم چسبندگی تیغه های آبخشی، تیمار ۳، ماه سوم



تصویر ۷۰: تورم سلولی بافت پوششی ابشش، تیمار ۴، ماه سوم

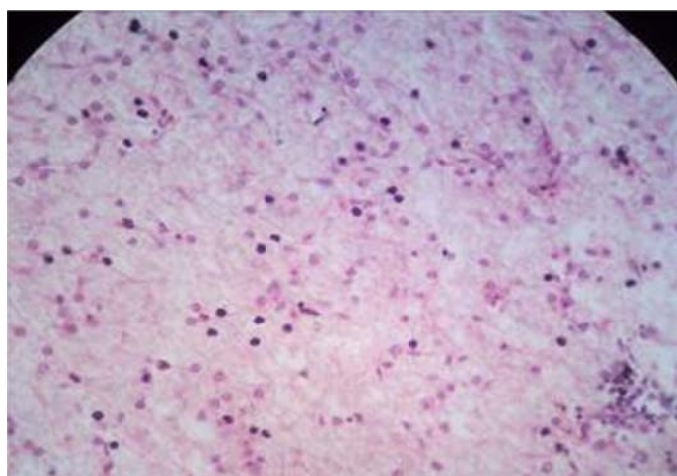
کبد :

جدول ۴: مشاهدات ضایعات بافتی در کبد ازون برون پرورشی تغذیه شده با مقادیر مختلف آفلاتوکسین B₁ به مدت ۳ ماه و در درجه حرارت ۱۸ ± ۲°C

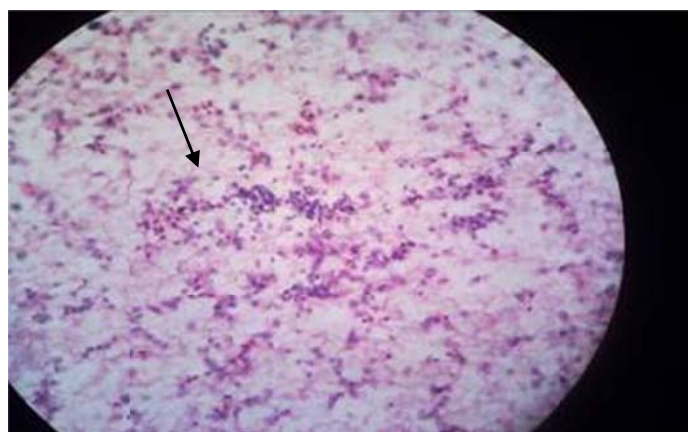
ماه سوم	ماه دوم	ماه اول	نوبت نمونه برداری تیمارها ▼
<ul style="list-style-type: none"> - دژنراسانس چربی هپاتوسیتها - نکروز برخی از هپاتوسیتها - نفوذ سلولهای التهابی تک هسته ای - پرخونی سینوزوئیدهای خونی 	<ul style="list-style-type: none"> - دژنراسانس چربی هپاتوسیتها - نفوذ سلولهای التهابی تک هسته ای به صورت کانونی - پرخونی سینوزوئیدهای خونی - نکروز هپاتوسیتها 	<ul style="list-style-type: none"> - دژنراسانس چربی و نکروز هپاتوسیتها به صورت خفیف - التهاب خفیف هپاتوسیتها 	<p>تیمار ۱ (۲۵ppb)</p>
<ul style="list-style-type: none"> - دژترسانس چربی هپاتوسیتها - پرخونی سینوزوئیدهای خونی - التهاب خفیف هپاتوسیتها - نکروز هپاتوسیتها 	<ul style="list-style-type: none"> - دژنراسانس چربی هپاتوسیتها - پرخونی سینوزوئیدهای خونی - التهاب خفیف هپاتوسیتها 	<ul style="list-style-type: none"> - دژنراسانس چربی و نکروز هپاتوسیتها - التهاب خفیف هپاتوسیتها 	<p>تیمار ۲ (۵۰ppb)</p>
<ul style="list-style-type: none"> - دژنراسیون چربی هپاتوسیتها - نکروز برخی هپاتوسیتها - نفوذ سلولهای التهابی تک هسته ای در فضای پورتال و به صورت کانونی - پرخونی سینوزوئیدهای خونی 	<ul style="list-style-type: none"> - دژنراسانس چربی هپاتوسیتها - پرخونی سینوزوئیدهای خونی همراه با نفوذ سلولهای التهابی تک هسته ای به صورت کانونی - به خصوص اطراف سیاهرگ مرکزی 	<ul style="list-style-type: none"> - دژنراسیون چربی - پیکنوز هسته برخی هپاتوسیتها - نفوذ سلولهای التهابی اطراف سیاهرگ مرکزی و داخل لوبولها - نکروز هپاتوسیتها و از بین رفتن آنها 	<p>تیمار ۳ (۷۵ppb)</p>

<p>- دژنراسانس چربی - هیپاتوسیتها همراه با پرخونی - نفوذ سلولهای التهابی تک هسته ای - انباشتگی چربی در هیپاتوسیتها - نفوذ سلولهای التهابی تک هسته ای به صورت کانونی</p>	<p>- دژنراسانس چربی - هیپاتوسیتها همراه با پرخونی - انباشتگی چربی در هیپاتوسیتها - نفوذ سلولهای التهابی تک هسته ای به صورت کانونی</p>	<p>- دژنراسیون چربی - هیپاتوسیتها - نفوذ سلولهای التهابی - تکه هسته ای به صورت کانونی - انباشتگی چربی در هیپاتوسیتها</p>	<p>تیمار ۴ (۱۰۰ppb)</p>
---	---	--	-----------------------------

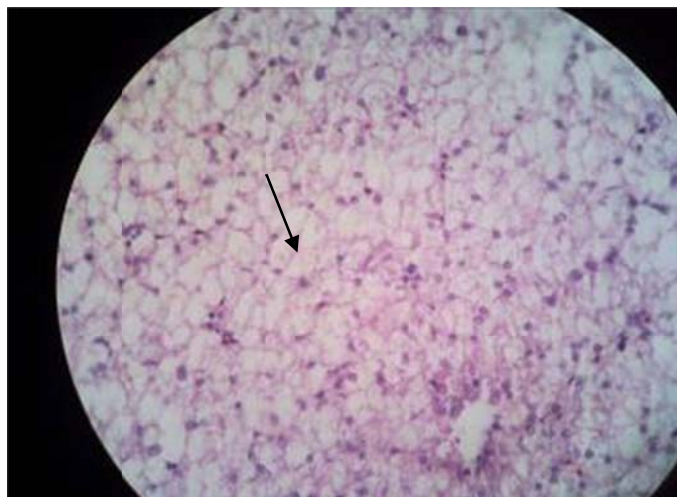
مقاطع هیستوپاتولوژیک کبد :



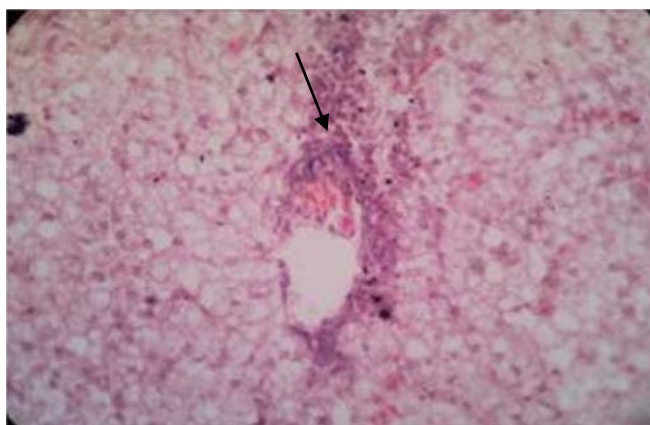
تصویر ۷۱: بافت کبد شاهد در ماهی ازون برون



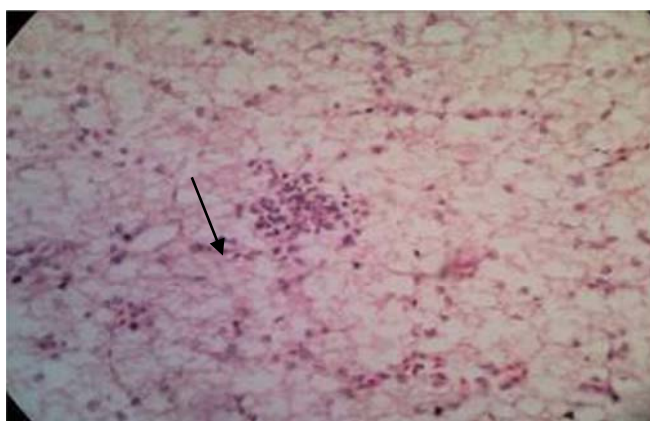
تصویر ۷۲: دژنراسانس چربی و نکروز هیپاتوسیتها و التهاب خفیف، تیمار ۱، ماه اول



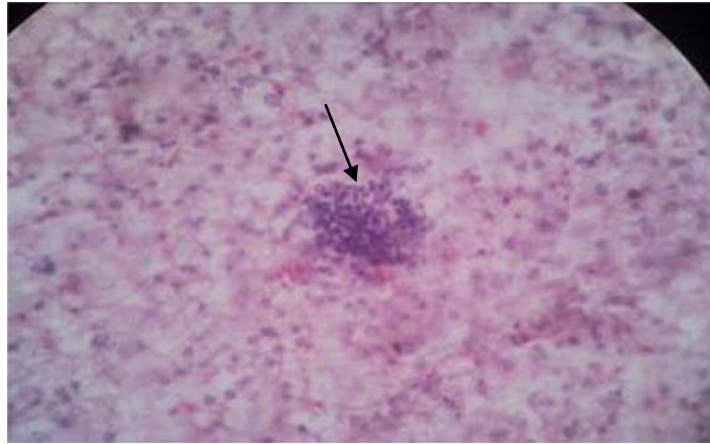
تصویر ۷۳: دژنراسانس چربی،
التهاب و نکروز هپاتوسیتها، تیمار ۲، ماه اول



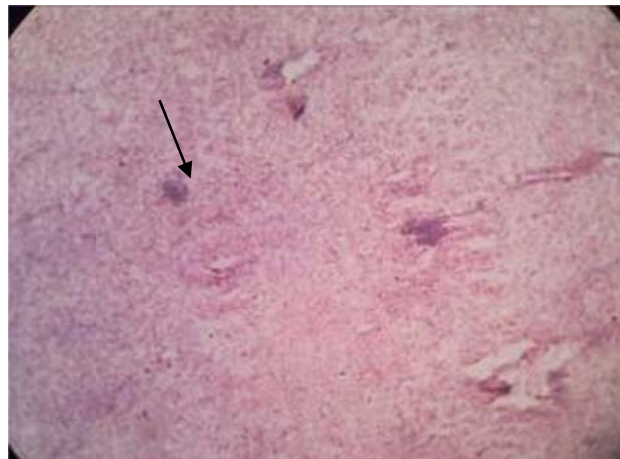
تصویر ۷۴: پیکنوز هسته برخی هپاتوسیتها،
نفوذ سلولهای التهابی اطراف سیاهرگ
مرکزی و نکروز هپاتوسیتها



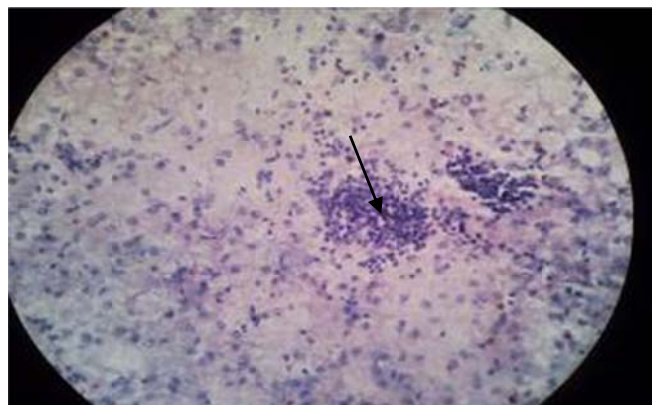
تصویر ۷۵: دژنراسیون چربی، نکروز،
پیکنوز هسته، تیمار ۳، ماه اول



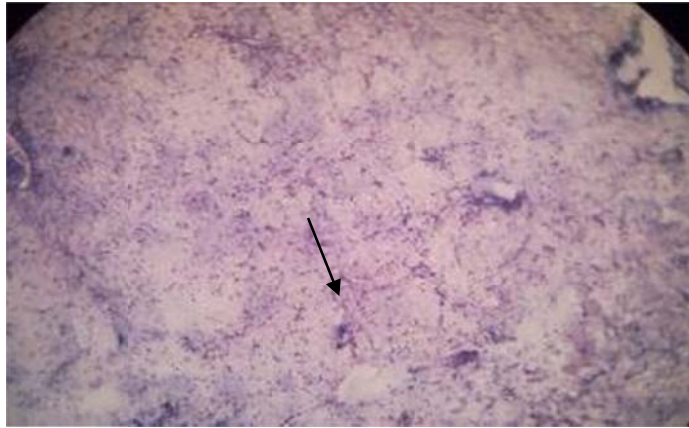
تصویر ۷۶: دژنرسانس چربی، نفوذ سلولهای التهابی تک هسته ای به صورت کانونی، تیمار ۴، ماه اول



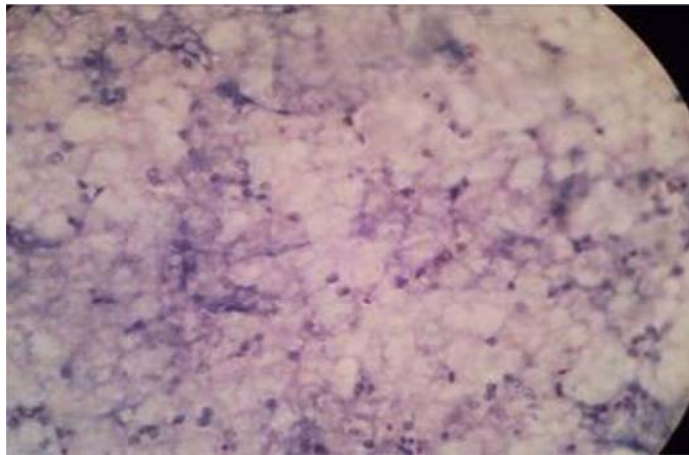
تصویر ۷۷: دژنراسیون چربی همراه با نفوذ سلولهای تک هسته ای، تیمار ۴، ماه اول



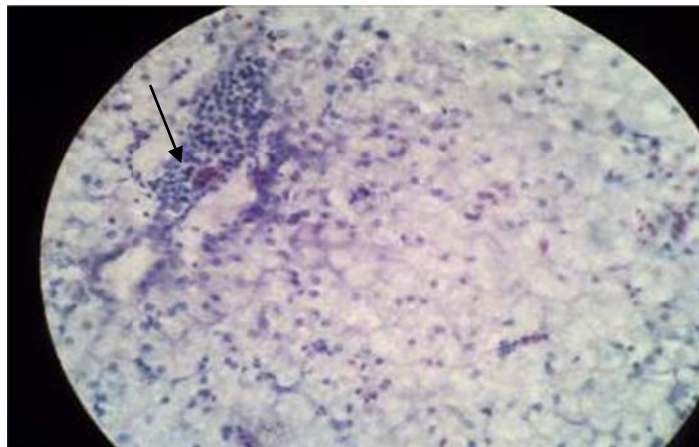
تصویر ۷۸: دژنرسانس چربی، نفوذ سلولهای التهابی تک هسته ای به صورت کانونی، پر خونی سینوزوئید های خونی و تکروز هیپاتوسیتها، تیمار ۱، ماه دوم



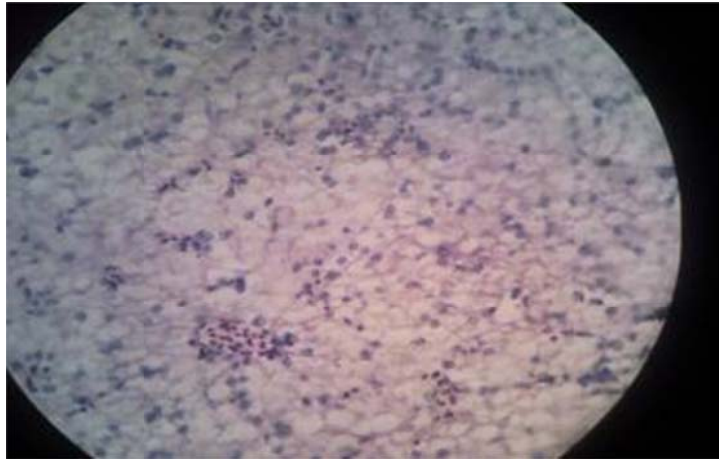
تصویر ۷۹: دژنراسانس چربی هپاتوسیتها و پرخونی سینوزوئید های خونی، تیمار ۲، ماه دوم



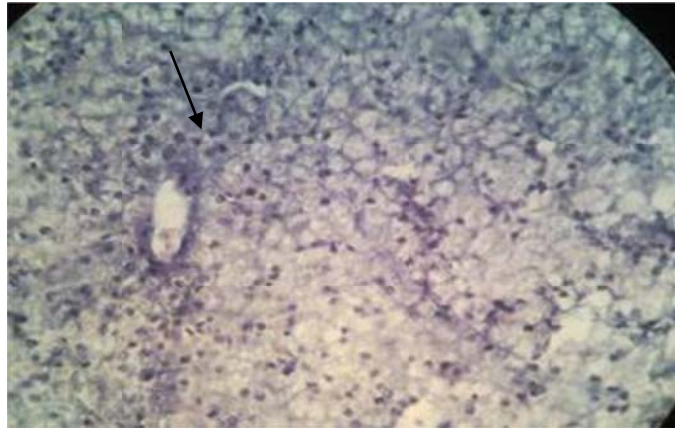
تصویر ۸۰: دژنراسیون چربی و پر خونی سینوزوئید ها، تیمار ۲، ماه دوم



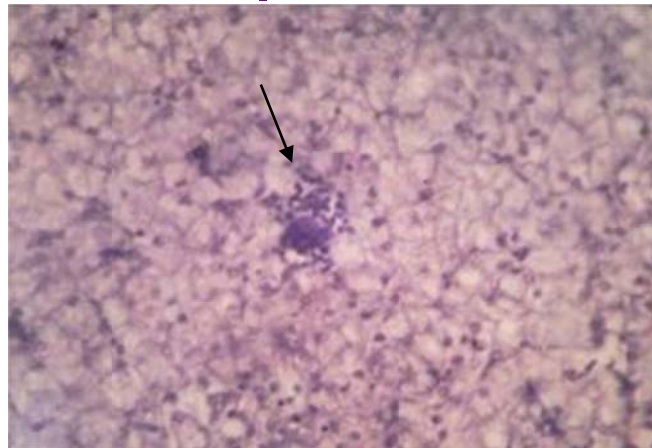
تصویر ۸۱: دژنراسانس چربی، پر خونی سینوزوئیدها همراه با نفوذ سلولهای التهابی تک هسته ای به صورت کانونی به خصوص اطراف سیاهرگ مرکزی، تیمار ۳، ماه دوم



تصویر ۸۲: دژنرسانس چربی هیپاتوسیتها همراه با پرخونی، تیمار ۴، ماه دوم



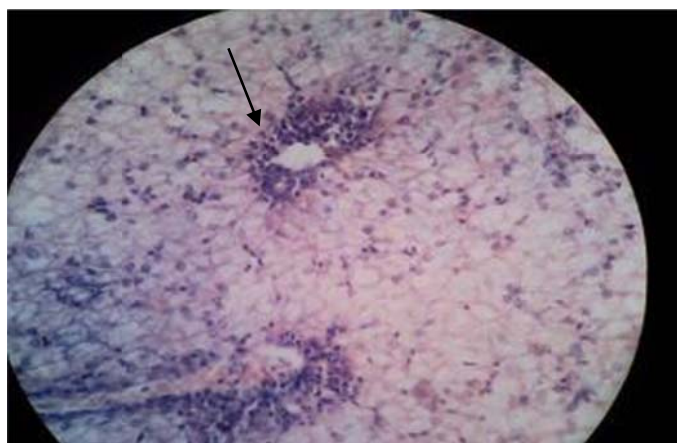
تصویر ۸۳: دژنرسانس چربی هیپاتوسیتها
، نکروز برخی از هیپاتوسیتها و نفوذ سلولهای التهابی
تک هسته ای، تیمار ۱، ماه سوم



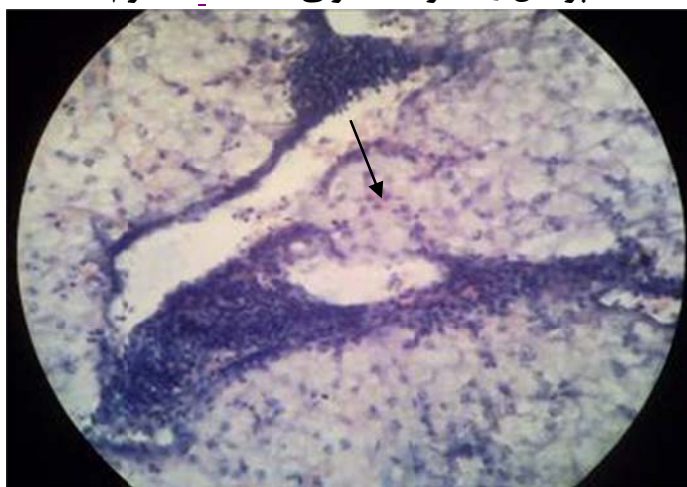
تصویر ۸۴: دژنرسانس چربی ،
نکروز و نفوذ سلولهای التهابی، تیمار ۱، ماه سوم



تصویر ۸۵: دژنراسانس چربی هپاتوسیتها،
تیمار ۲، ماه سوم



تصویر ۸۶: دژنراسیون چربی، نکروز برخی
هپاتوسیتها و نفوذ سلولهای التهابی تک هسته ای در فضای
پورتال و به صورت کانونی، تیمار ۳، ماه سوم



تصویر ۸۷: دژنراسانس چربی و نفوذ سلولهای
التهابی تک هسته ای، تیمار ۴، ماه سوم



تصویر ۸۸: دژنراسیون چربی و نفوذ سلولهای التهابی تک هسته ای، تیمار ۴، ماه سوم

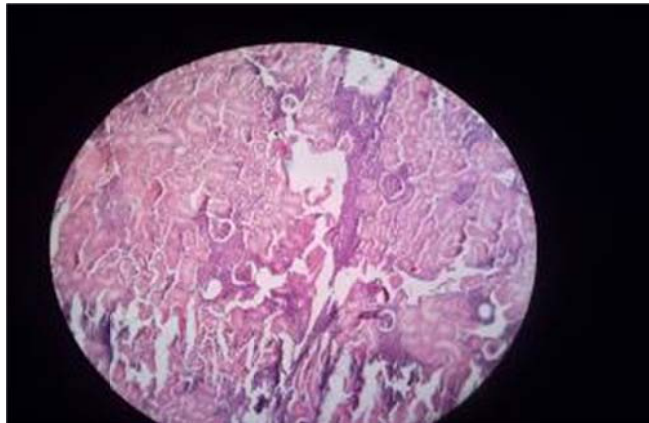
کلیه :

جدول ۵: مشاهدات ضایعات بافتی در کلیه اوزون برون پرورشی تغذیه شده با مقادیر مختلف آفلاتوکسین B₁ به مدت ۳ ماه و در درجه حرارت ۱۸ ± ۲°C

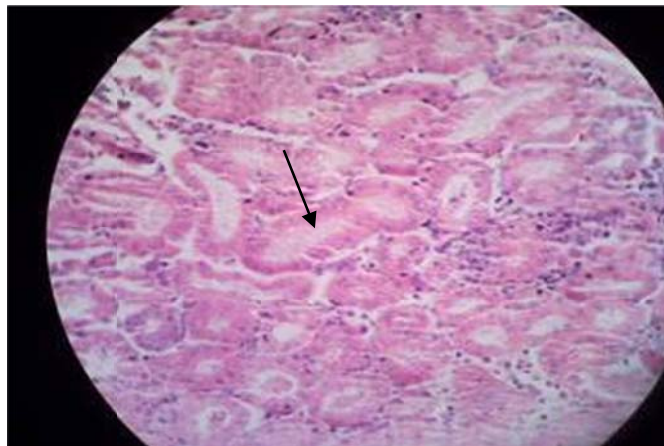
ماه سوم (روز ۹۰)	ماه دوم (روز ۶۰)	ماه اول (روز ۳۰)	نمونه برداری تیمارها
<ul style="list-style-type: none"> - تورم سلولی در برخی از سلولهای پوششی لوله های ادراری - وجود کستهای هیالین در برخی از لوله های ادراری 	<ul style="list-style-type: none"> - تورم سلولی در برخی از سلولهای پوششی لوله های ادراری - وجود کستهای هیالین در برخی از لوله های ادراری 	<ul style="list-style-type: none"> - وجود کستهای هیالین در برخی لوله های ادراری - تورم سلولی در سلولهای پوششی لوله های ادراری 	<p>تیمار ۱ (۲۵ppb)</p>
<ul style="list-style-type: none"> - وجود کستهای هیالین در برخی از لوله های ادراری - پیکنوز هسته سلولهای ادراری 	<ul style="list-style-type: none"> - تورم سلولی در برخی از سلولهای پوششی لوله های ادراری - پیکنوز شدن هسته در برخی از سلولهای لوله های ادراری - تورم سلولی 	<ul style="list-style-type: none"> - وجود کستهای هیالین در برخی لوله های ادراری - پیکنوز شدن هسته برخی از سلولهای لوله ادراری - تورم سلولی 	<p>تیمار ۲ (۵۰ppb)</p>
<ul style="list-style-type: none"> - تورم سلولی در سلولهای ادراری - پیکنوز هسته سلولهای ادراری - وجود کستهای هیالین 	<ul style="list-style-type: none"> - کستهای هیالین در برخی از لوله های ادراری - تورم سلولی در سلولهای پوششی لوله های ادراری - پیکنوز شدن هسته در برخی از سلولهای ادراری 	<ul style="list-style-type: none"> - وجود کستهای هیالین در برخی از لوله های ادراری - پیکنوز شدن هسته در بعضی از سلولهای ادراری - تورم سلولی در سلولهای لوله ادراری 	<p>تیمار ۳ (۷۵ppb)</p>

<p>- پیکنوز پراکنده در هسته برخی از سلولهای لوله های ادراری</p> <p>- تورم سلولی توبولهای کلیوی</p> <p>- وجود کستهای هیالین در لوله های ادراری</p>	<p>- وجود کستهای هیالین در برخی از لوله های ادراری</p> <p>- پیکنوز شدن هسته در بعضی از سلولهای ادراری</p> <p>- تورم داخل سلولی توبولهای کلیوی</p>	<p>- تورم مختصر داخل سلولی توبولهای کلیوی</p> <p>- پیکنوز شدن هسته در بعضی از سلولهای ادراری</p> <p>- وجود کستهای هیالین در برخی از لوله های ادراری</p>	<p>تیمار ۴ (۱۰۰ppb)</p>
---	---	---	-----------------------------

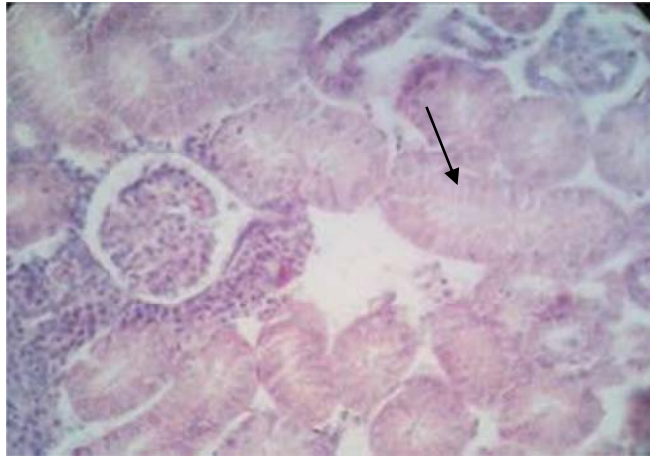
مقاطع هیستوپاتولوژیک کلیه :



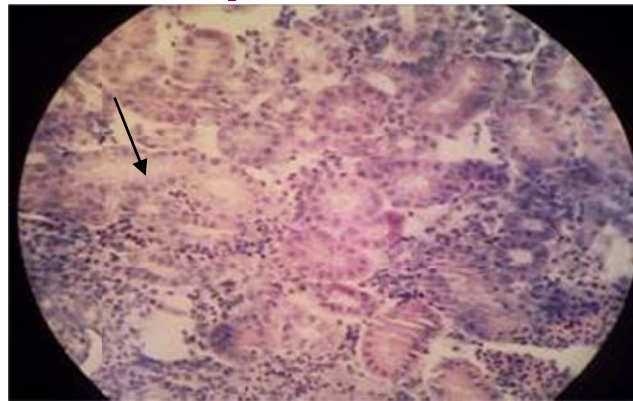
تصویر ۸۹: بافت کلیه شاهد ماهی ازون برون



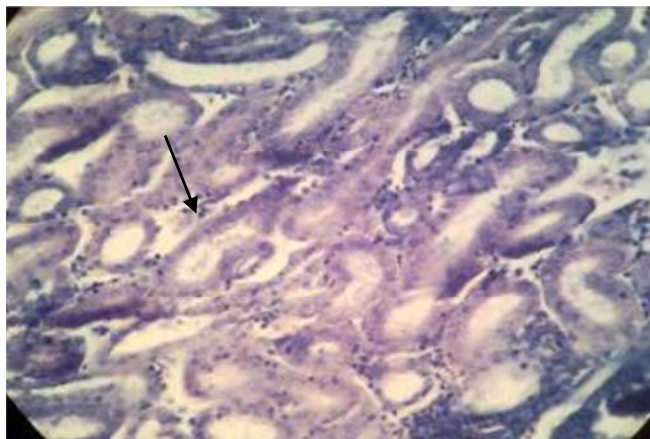
تصویر ۹۰: وجود کستهای هیالین در برخی لوله های ادراری و پیکنوز شدن هسته برخی از سلولهای لوله های ادراری، تیمار ۲، ماه اول



تصویر ۹۱: تورم مختصر داخل سلولی
توبولهای کلیوی، تیمار ۴، ماه اول



تصویر ۹۲: وجود کستهای هیالین در
برخی از سلولهای لوله های ادراری،
تیمار ۳، ماه دوم



تصویر ۹۳: پیکنوز پراکنده در هسته
برخی سلولهای لوله های ادراری،
تیمار ۴، ماه سوم

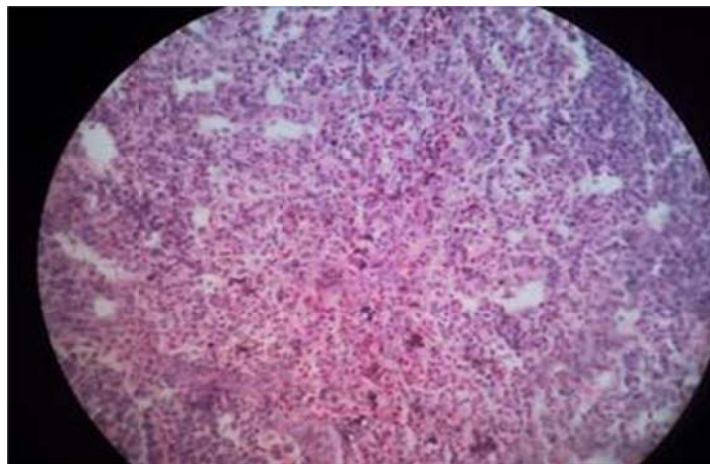
طحال :

جدول ۶: مشاهدات ضایعات بافتی در طحال ماهی اوزون برون پرورشی تغذیه شده با مقادیر مختلف

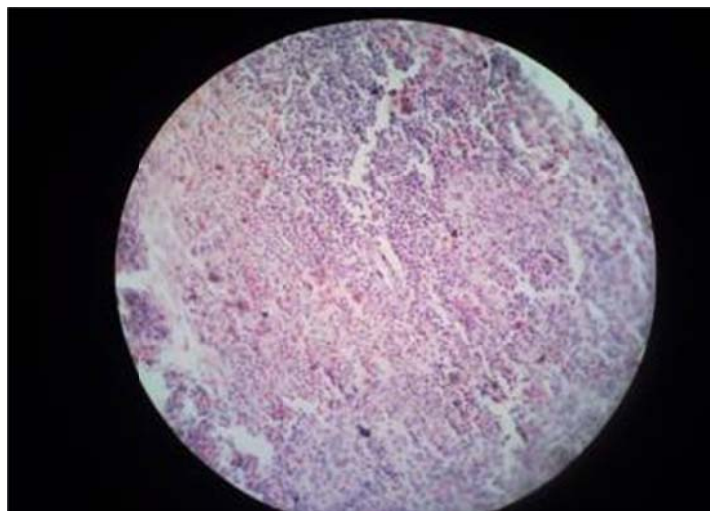
آفلاتوکسین B₁ به مدت ۳ ماه و در درجه حرارت ۱۸ ± ۲°C

ماه سوم (روز ۹۰)	ماه دوم (روز ۶۰)	ماه اول (روز ۳۰)	نمونه برداری تیمارها
- بافت نسبتاً سالم - فاقد تغییرات پاتولوژیک	- بافت سالم - فاقد تغییرات پاتولوژیک	- بافت سالم - تغییرات پاتولوژیک مشخصی به چشم نمی خورد.	تیمار ۱ (۲۵ppb)
- بافت نسبتاً سالم	- بافت سالم - تغییرات پاتولوژیک مشخصی به چشم نمی خورد	- بافت سالم و نرمال	تیمار ۲ (۵۰ppb)
- نکروز خفیف سلولهای لنفوی طحال	- نکروز خفیف سلولهای لنفوی طحال	- نکروز خفیف سلولهای لنفوی طحال	تیمار ۳ (۷۵ppb)
- نکروز سلولهای لنفوی طحال	- نکروز سلولهای لنفوی طحال	- بافت سالم - فاقد تغییرات پاتولوژی	تیمار ۴ (۱۰۰ppb)

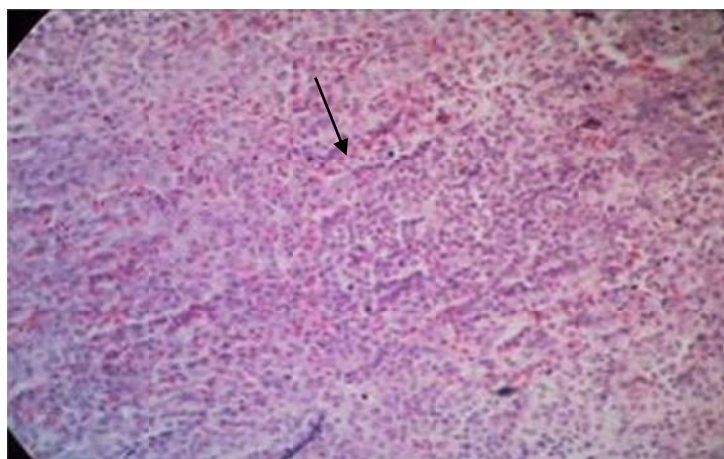
قاطع هیستوپاتولوژیک طحال :



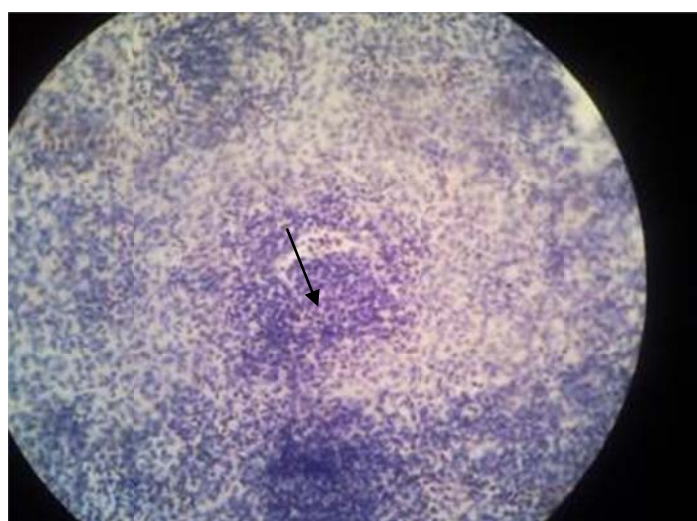
تصویر ۹۴: بافت طحال شاهد ماهی اوزون برون



تصویر ۹۵: بافت نرمال طحال، تیمار ۱، ماه اول



تصویر ۹۶: نکروز خفیف سلولهای لنفاوی طحال، تیمار ۳، ماه اول



تصویر ۹۷: نکروز خفیف سلولهای لنفاوی، تیمار ۴، ماه سوم

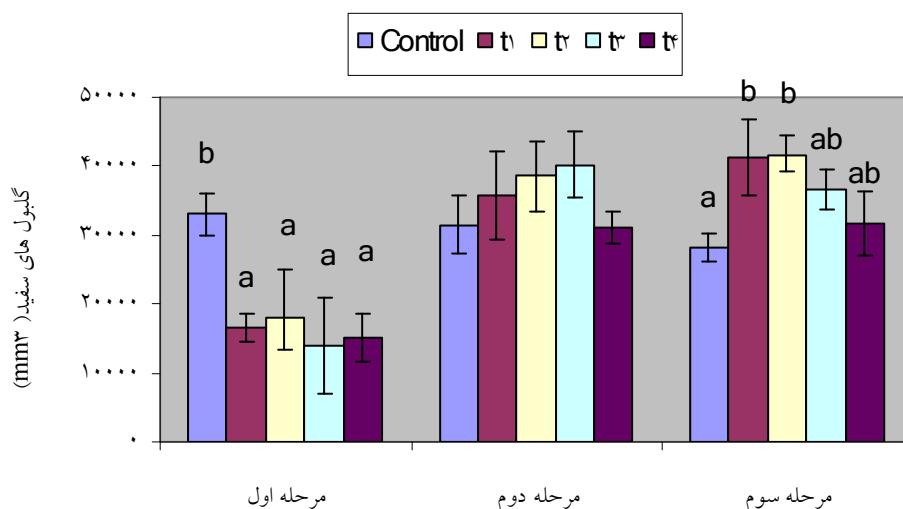
۴-۴-۲- خون شناسی

- بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان تعداد گلبول های سفید در خون بچه ماهیان بین دز های مختلف سم آفلاتوکسین با شاهد اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncan) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان گلبول های سفید خون ماهیان در تیمار های مختلف در مرحله اول نسبت به شاهد کاهش یافته اند اما در مرحله ۳ تعداد گلبول های سفید در تیمار ها نسبت به شاهد افزایش مشاهده گردیده و این افزایش در تیمار ۱ و ۲ بیش از سایر تیمار ها بوده است. ($P < 0.05$). (نمودار ۱).

جدول ۱: مقایسه میانگین تعداد گلبول های سفید در خون بچه ماهیان در دز های مختلف سم آفلاتوکسین

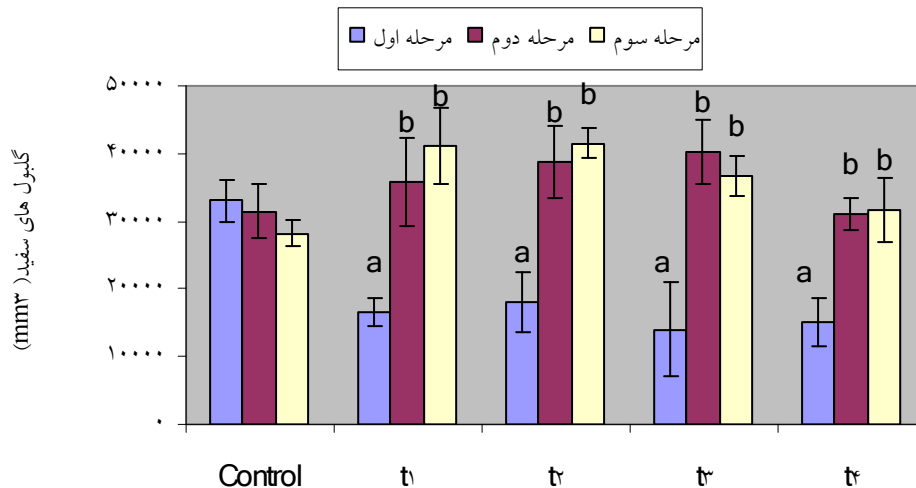
نوع	تیمار	مرحله ۱	مرحله ۲	مرحله ۳
گلبول های سفید	شاهد	۳۳۰۰۰ ± ۳۰۰۰ b	۳۱۵۰۰ ± ۴۱۱۵/۰۰۶	۲۸۱۶۶/۶۷ ± ۱۹۲۲/۰۹ a
	تیمار ۱	۱۶۵۰۰ ± ۲۰۰۰ a	۳۵۸۳۳/۳۳ ± ۶۴۰۵/۲۹	۴۱۱۶۶/۶۷ ± ۵۵۲۵/۱۹ b
	تیمار ۲	۱۸۰۰۰ ± ۴۵۰۰ a	۳۸۶۶۶/۶۸ ± ۵۳۲۸/۱۲	۴۱۵۰۰ ± ۲۲۹۱/۲۸ b
سفيد	تیمار ۳	۱۴۰۰۰ ± ۷۰۰۰ a	۴۰/۱۶۶ ± ۴۸۰۷/۴۰	۳۶۶۶۶/۶۷ ± ۲۸۹۱/۵۵ ab
	تیمار ۴	۱۵۰۰۰ ± ۳۵۰۰ a	۳۱۱۶۶/۶۸ ± ۱/۱۵	۳۱۶۶۶/۶۷ ± ۴۶۹۳/۳۷ ab

حروف غیر همنام در ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد



نمودار ۱: مقایسه میانگین تعداد گلبول های سفید در خون بچه ماهیان در دز های مختلف سم آفلاتوکسین

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان گلبول های سفید در خون بچه ماهیان بین هر یک از مراحل در هر یک از دز های مورد استفاده سم آفلاتوکسین اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و براساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه دو به دو گروه ها با یکدیگر میزان گلبول های سفید خون ماهیان به غیر از کنترل در کلیه تیمار ها در مراحل ۲ و ۳ از افزایش برخوردار بود... ($P < 0.05$).



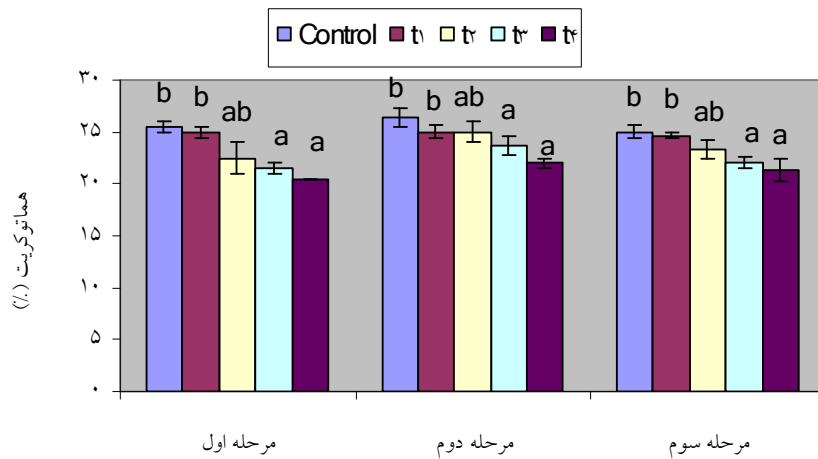
نمودار ۲: مقایسه میانگین تعداد گلبول های سفید در خون بچه ماهیان در نوبت های مختلف نمونه برداری

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان هماتوکریت در خون بچه ماهیان بین دز های مختلف سم آفلاتوکسین با شاهد اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه دو به دو گروه ها با یکدیگر میزان هماتوکریت خون ماهیان در تیمار های مختلف کاهش یافته است و این کاهش در هر سه مرحله به ترتیب در تیمار ۴، ۳ و ۲ بیش از تیمار ۱ و شاهد بوده است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار آماری مشاهده گردید. ($P < 0.05$).

جدول ۲: مقایسه میانگین هماتوکریت در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفلاتوکسین

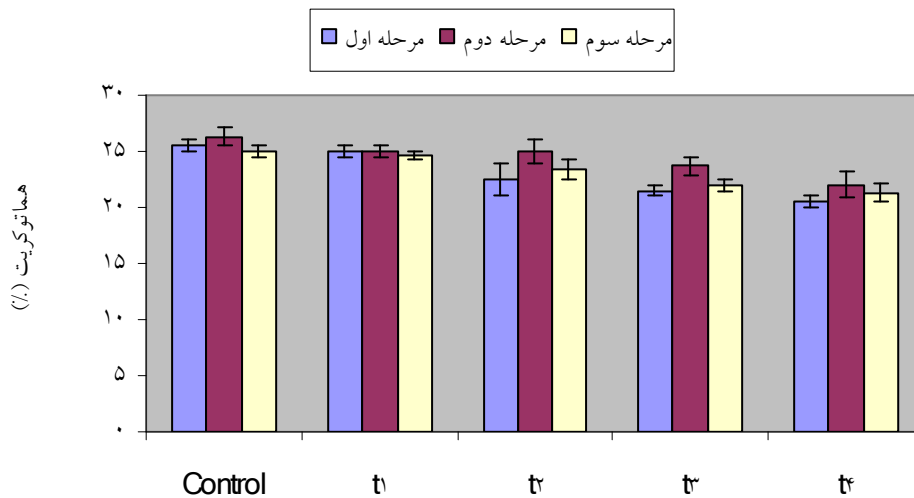
مرحله ۳	مرحله ۲	مرحله ۱	تیمار	نوع
۲۵ ± ۰/۵۷ b	۲۶/۳۳ ± ۰/۸۸ b	۲۵/۵ ± ۰/۵ b	شاهد	هماتوکریت
۲۴/۶۶ ± ۰/۳۳ b	۲۵ ± ۰/۵۷ b	۲۵ ± ۰/۵۴ b	تیمار ۱	
۲۳/۳۳ ± ۰/۸۸ ab	۲۵ ± ۱ ab	۲۲/۵ ± ۱/۵ ab	تیمار ۲	
۲۲ ± ۰/۵۷ a	۲۳/۶۶ ± ۰/۸۸ a	۲۱/۵ ± ۰/۵ a	تیمار ۳	
۲۱/۳۳ ± ۰/۸۸ a	۲۲ ± ۱/۱۵ a	۲۰/۵ ± ۰/۵ a	تیمار ۴	

حروف غیر همنام در ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد



نمودار ۳ - مقایسه میانگین هماتوکریت در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفلاتوکسین

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان هماتوکریت در خون بچه ماهیان بین هر یک از مراحل در هر یک از دز های مورد استفاده سم آفلاتوکسین اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد ($P>0.05$).



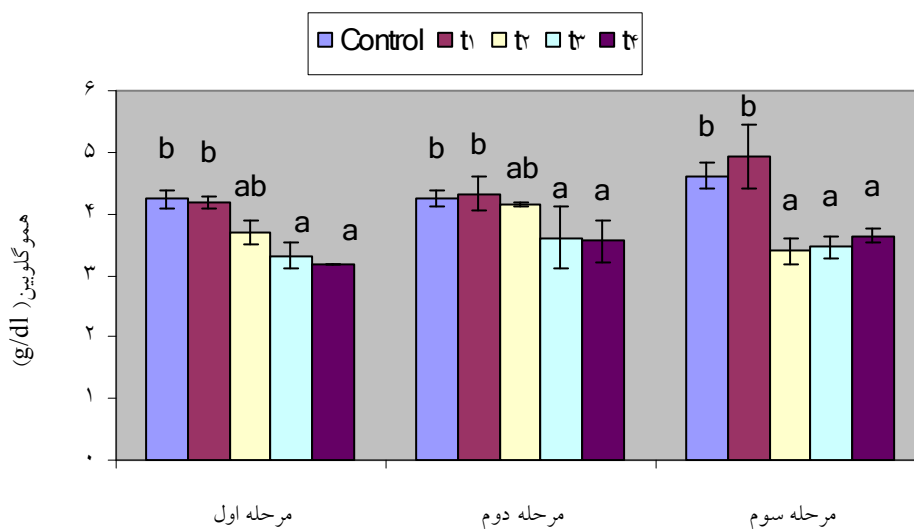
نمودار ۴ - مقایسه میانگین هماتوکریت در خون ماهیان در نوبت های مختلف نمونه برداری

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان هموگلوبین در خون بچه ماهیان بین دز های مختلف سم آفلاتوکسین با شاهد اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P<0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncan) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان هموگلوبین خون ماهیان در تیمارهای مختلف کاهش یافته است و این کاهش در هر سه مرحله به ترتیب در تیمار ۴، ۳ و ۲ بیش از تیمار ۱ و شاهد بوده است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار آماری مشاهده گردید ($P<0.05$).

جدول ۳: مقایسه میانگین هموگلوبین (g/dl) در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفاتوکسین

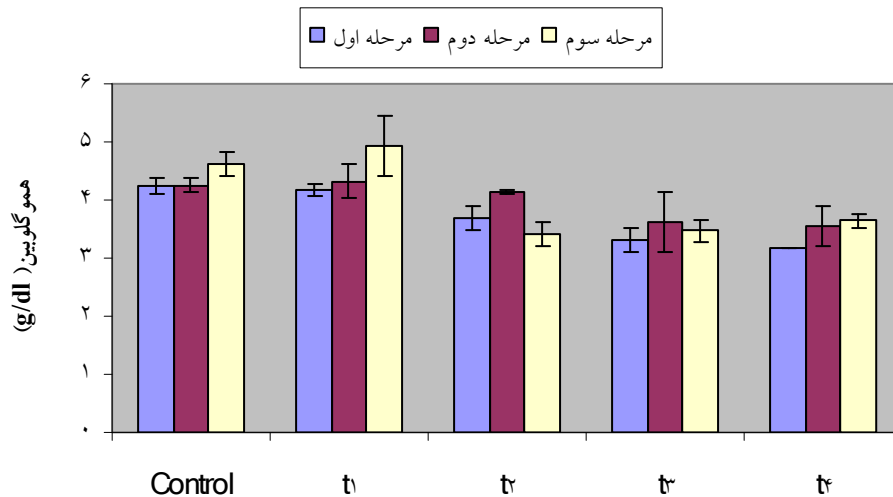
مرحله ۳	مرحله ۲	مرحله ۱	تیمار	نوع
۴/۶۱ ± ۰/۲۰ b	۴/۲۵ ± ۰/۸۸ b	۴/۲۴ ± ۰/۱۴ b	شاهد	هموگلوبین
۴/۹۲ ± ۰/۵۲ b	۴/۳۲ ± ۰/۲۸ b	۴/۱۷ ± ۰/۰۹۷ b	تیمار ۱	
۳/۴ ± ۰/۲۰ a	۴/۱۴ ± ۰/۰۳۴ ab	۳/۶۹ ± ۰/۲۰ ab	تیمار ۲	
۳/۴۶ ± ۰/۱۷ a	۳/۶۱ ± ۰/۵۱ a	۳/۳۱ ± ۰/۲۱ a	تیمار ۳	
۳/۱۷ ± ۰/۱۲ a	۳/۵۵ ± ۱/۱۵ a	۳/۱۷ ± ۰/۰۱۰ a	تیمار ۴	

حروف غیر همنام در ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد



نمودار ۵ - مقایسه میانگین هموگلوبین در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفاتوکسین

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان هموگلوبین در خون بچه ماهیان بین هر یک از مراحل در هر یک از دز های مورد استفاده سم آفاتوکسین اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد ($P > 0.05$).



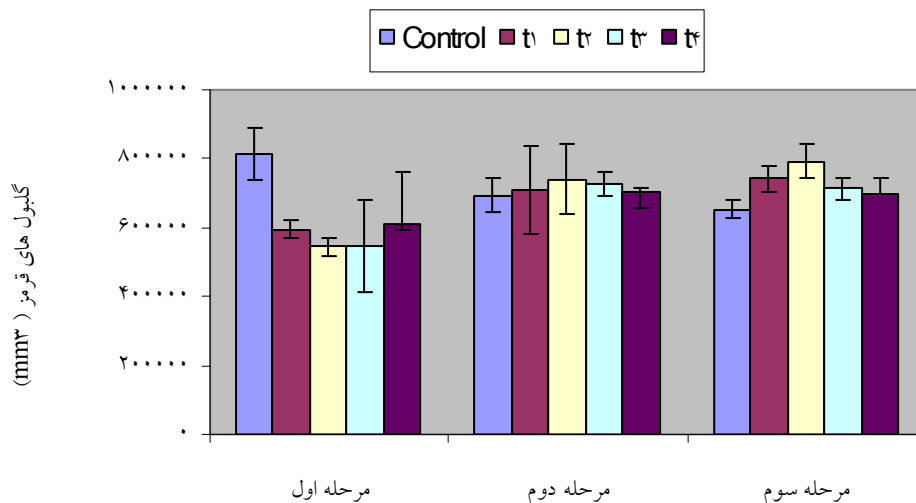
نمودار ۶ - مقایسه میانگین هموگلوبین در خون ماهیان در نوبت های مختلف نمونه برداری

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان گلبول قرمز در خون بچه ماهیان بین دز های مختلف سم آفلاتوکسین با شاهد اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد ($P > 0.05$).

جدول ۴: مقایسه میانگین گلبول های قرمز در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفلاتوکسین

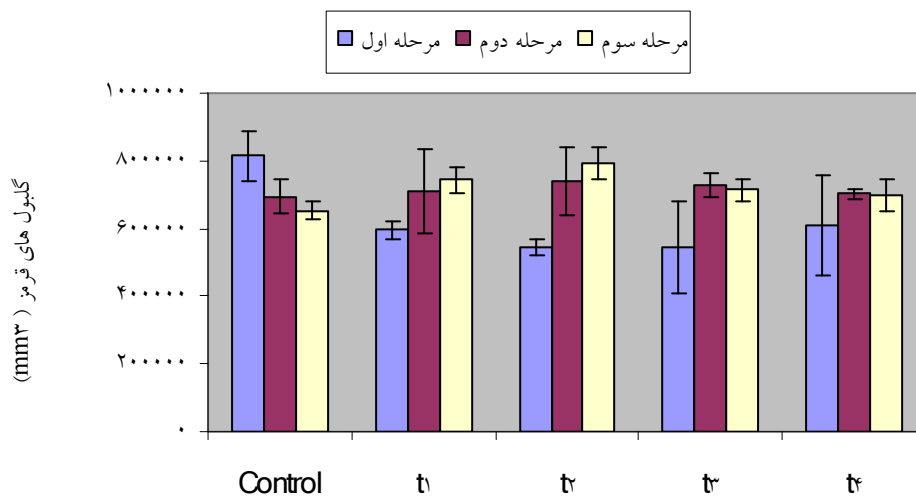
مرحله ۳	مرحله ۲	مرحله ۱	تیمار	نوع
۶۵۳۳۳۳/۳ ± ۲۷۲۸۴/۵۱	۶۹۳۳۳۳/۳۳ ± ۴۹۷۷۷/۲۸	۸۱۵۰۰۰ ± ۷۵۰۰۰	شاهد	گلبول قرمز
۷۴۳۳۳۳/۳ ± ۳۸۴۴۱/۸۸	۷۱۰۰۰۰ ± ۱۲۶۶۲۲/۵	۵۹۵۰۰۰ ± ۲۵۰۰۰	تیمار ۱	
۷۹۳۳۳۳/۳ ± ۴۹۷۷۷۷/۲۸	۷۴۰۰۰۰ ± ۷۹۳۳۳۳/۳	۵۴۵۰۰۰ ± ۰/۰۶۹	تیمار ۲	
۷۱۳۳۳۳/۳ ± ۳۱۷۹۷/۹۷	۷۲۶۶۶۶/۷ ± ۳۳۸۲۹/۶۴	۵۴۵۰۰۰ ± ۲۵۰۰۰	تیمار ۳	
۶۹۶۶۶۶/۷ ± ۴۸۴۱۹/۴۶	۷۰۳۳۳۳/۳ ± ۶۹۶۶۶۶/۷	۶۱۰۰۰۰ ± ۶۹۶۶۶۶/۷	تیمار ۴	

حروف غیر همنام در ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد.



نمودار ۷ - مقایسه میانگین تعداد گلبول های قرمز در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفاتوکسین

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان گلبول های قرمز در خون بچه ماهیان بین هر یک از مراحل در هر یک از دز های مورد استفاده سم آفاتوکسین اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد ($P > 0.05$).



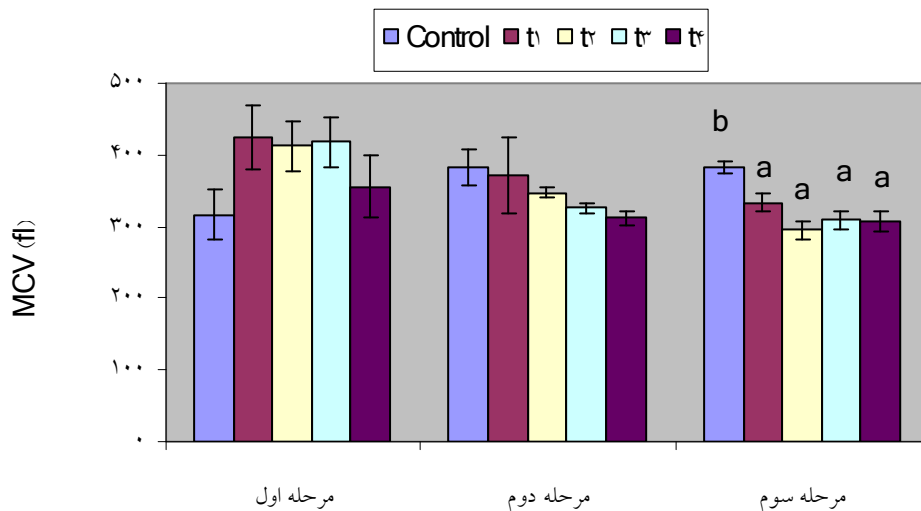
نمودار ۸ - مقایسه میانگین تعداد گلبول های قرمز در خون ماهیان در نوبت های مختلف نمونه برداری

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان MCV در خون بچه ماهیان بین دز های مختلف سم آفاتوکسین با شاهد فقط در مرحله سوم اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncan) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان MCV خون ماهیان در تیمار های مختلف کاهش یافته است و با شاهد اختلاف معنی دار آماری مشاهده گردید ($P < 0.05$).

جدول ۵: مقایسه میانگین میزان MCV در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفلاتوکسین

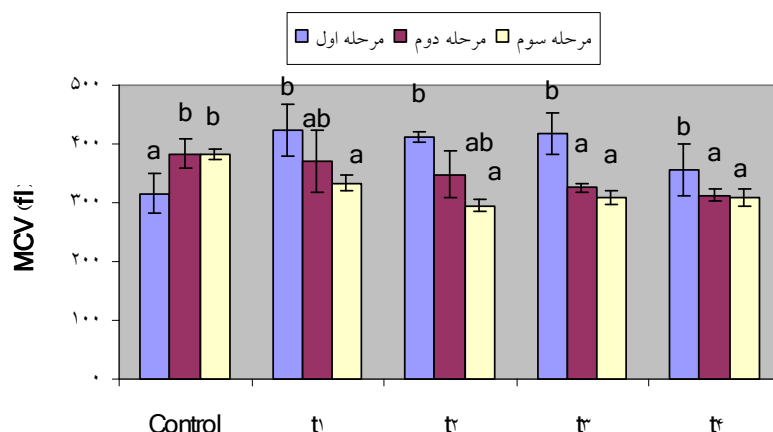
فاکتور	تیمار	مرحله ۱	مرحله ۲	مرحله ۳
MCV	شاهد	۳۱۶/۱۵ ± ۳۲/۲۵	۳۸۳ ± ۲۵/۳۶	۳۸۳/۳ ± ۸/۴۱ b
	تیمار ۱	۴۲۳/۷۵ ± ۴۵/۰۵	۳۷۰/۸۲ ± ۵۳/۶۵	۳۳۳/۲۱ ± ۱۳/۳۶ a
	تیمار ۲	۴۱۲/۴۵ ± ۸/۶۵	۳۴۷/۷۱ ± ۳۹/۴۰	۲۹۵/۱۹ ± ۹/۵۹ a
	تیمار ۳	۴۱۷/۸۵ ± ۳۴/۳۵	۳۲۶/۱۱ ± ۷/۲۱	۳۰۹/۲۷ ± ۱۱/۸۹ a
	تیمار ۴	۳۵۵/۵۵ ± ۴۳/۲۵	۳۱۲/۳۹ ± ۱۰/۰۴	۳۰۷/۹۲ ± ۱۴/۳۱ a

حروف غیر همنام در ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد.



نمودار ۹: مقایسه میانگین میزان MCV در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفلاتوکسین

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان MCV در خون بچه ماهیان بین هر یک از مراحل در هر یک از دز های مورد استفاده سم آفلاتوکسین اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و براساس آزمون دانکن (Duncan) به منظور مقایسه دو به دو گروه ها با یکدیگر میزان MCV خون ماهیان در گروه کنترل در مراحل ۲ و ۳ از افزایش برخوردار بوده و در سایر تیمار ها در مراحل ۲ و ۳ کاهش یافته است. اختلاف معنی دار آماری مشاهده گردید. ($P < 0.05$).



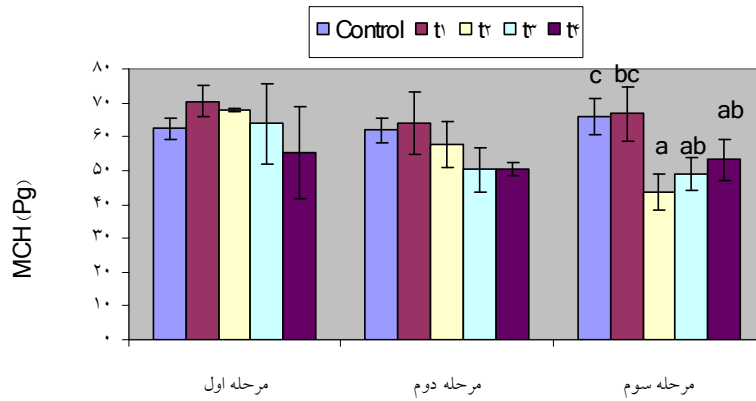
نمودار ۱۰ - مقایسه میانگین میزان MCV در خون ماهیان در نوبت های مختلف نمونه برداری

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان MCH در خون بچه ماهیان بین دز های مختلف سم آفاتوکسین با شاهد فقط در مرحله سوم اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncan) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان MCH خون ماهیان در تیمار های مختلف کاهش یافته است و با شاهد اختلاف معنی دار آماری مشاهده گردید ($P < 0.05$).

جدول ۶: مقایسه میانگین میزان MCH در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفاتوکسین

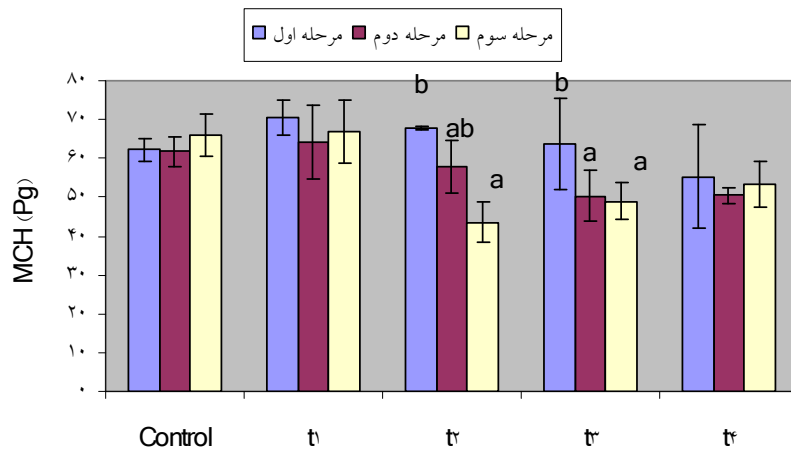
مرحله ۳	مرحله ۲	مرحله ۱	تیمار	فاکتور
۶۵/۹۵ ± ۵/۴۸ c	۶۱/۸۴ ± ۳/۷۷	۶۲/۳۱ ± ۲/۹۸	شاهد	MCH
۶۶/۷۵ ± ۸/۰۶۶ bc	۶۴/۰۷ ± ۹/۳۷	۷۰/۴۴ ± ۴/۵۶	تیمار ۱	
۴۳/۵۱ ± ۵/۳۰ a	۵۷/۷۸ ± ۶/۷۰	۶۷/۸۳ ± ۱۱/۳۸	تیمار ۲	
۴۹/۰۰۷ ± ۴/۶۵ ab	۵۰/۳۳ ± ۶/۶۱	۶۳/۷۸ ± ۱۱/۸۳	تیمار ۳	
۵۳/۱۶ ± ۵/۹۲ ab	۵۰/۵۲ ± ۰/۰۵	۵۵/۳۶ ± ۱۳/۴۴	تیمار ۴	

حروف غیر همنام در ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد.



نمودار ۱۱: مقایسه میانگین میزان MCH در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفلاتوکسین

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان MCH خون بچه ماهیان بین هر یک از مراحل در هر یک از دز های مورد استفاده سم آفلاتوکسین اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان MCH خون ماهیان در تیمار های ۲ و ۳ در مراحل دوم و سوم کاهش یافته است و اختلاف معنی دار آماری مشاهده گردید. ($P < 0.05$).



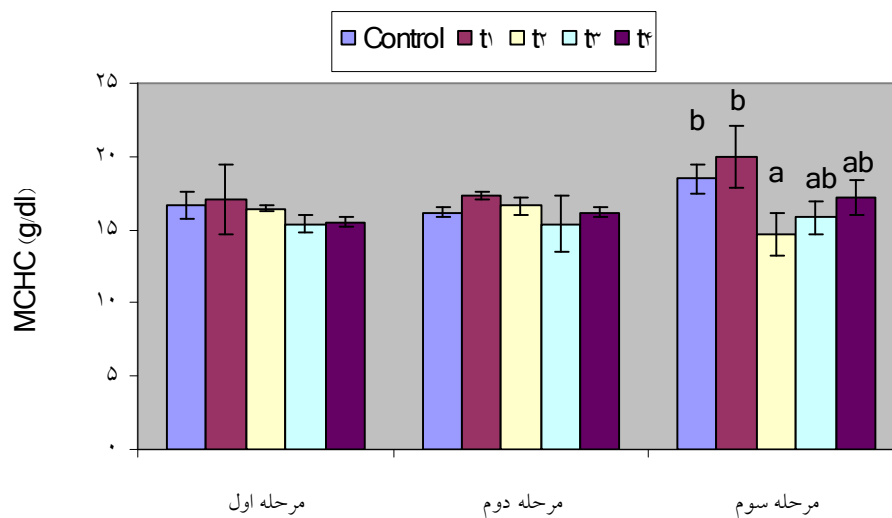
نمودار ۱۲ - مقایسه میانگین میزان MCH در خون ماهیان در نوبت های مختلف نمونه برداری

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان MCHC در خون بچه ماهیان بین دز های مختلف سم آفلاتوکسین با شاهد فقط در مرحله سوم اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان MCHC خون ماهیان در تیمار های مختلف مرحله سوم کاهش یافته است و با شاهد اختلاف معنی دار آماری مشاهده گردید. ($P < 0.05$).

جدول ۷: مقایسه میانگین میزان MCHC در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفاتوکسین

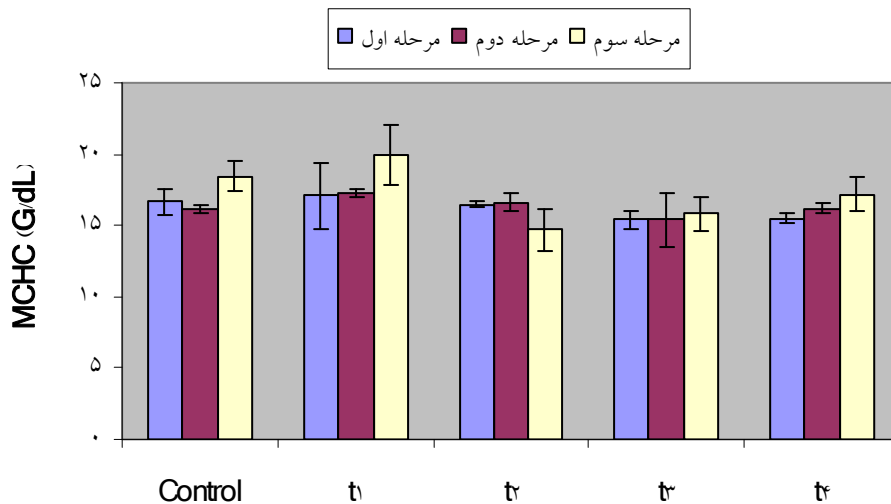
فاکتور	تیمار	مرحله ۱	مرحله ۲	مرحله ۳
MCHC	شاهد	۱۶/۶۵ ± ۰/۹۱	۱۶/۱۶ ± ۰/۳۲	۱۸/۴۶ ± ۱/۰۲ b
	تیمار ۱	۱۷/۰۹ ± ۲/۳۵	۱۷/۲۸ ± ۰/۲۸	۱۹/۹۷ ± ۲/۱۰ b
	تیمار ۲	۱۶/۴۵ ± ۰/۲۰	۱۶/۶۱ ± ۰/۶۲	۱۴/۶۷ ± ۱/۴۱ a
	تیمار ۳	۱۵/۴۱ ± ۰/۶۵	۱۵/۴۰ ± ۱/۸۶	۱۵/۸۰ ± ۱/۱۴ ab
	تیمار ۴	۱۵/۹۴ ± ۰/۳۲	۱۶/۱۶ ± ۰/۳۴	۱۷/۱۹ ± ۱/۲۴ab

حروف غیر همنام در ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد.



نمودار ۸: مقایسه میانگین میزان MCHC در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفاتوکسین

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه MCHC در خون بچه ماهیان بین هر یک از مراحل در هر یک از دز های مورد استفاده سم آفاتوکسین اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد (P>0.05).



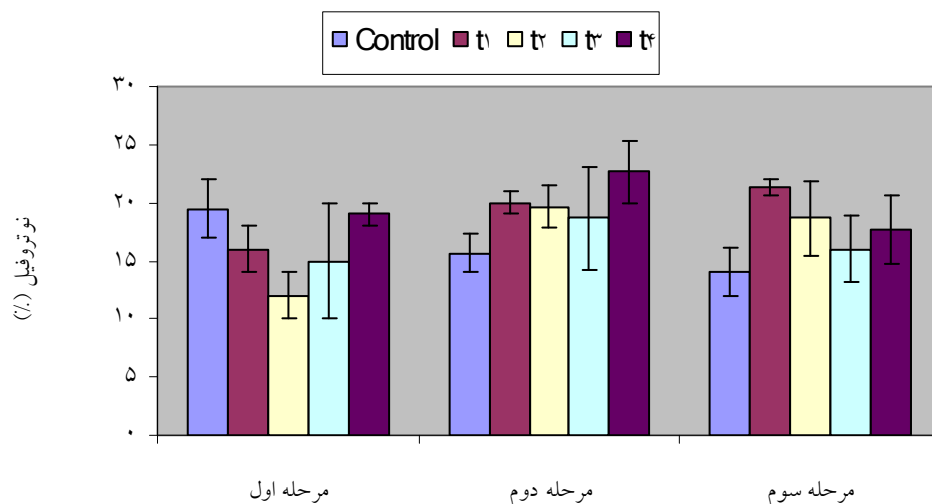
نمودار ۱۴ - مقایسه میانگین میزان MCHC در خون ماهیان در نوبت های مختلف نمونه برداری

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان نوتروفیل در خون بچه ماهیان بین دز های مختلف سم آفلاتوکسین با شاهد اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد ($P>0.05$).

جدول ۸: مقایسه میانگین تعداد نوتروفیل در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفلاتوکسین

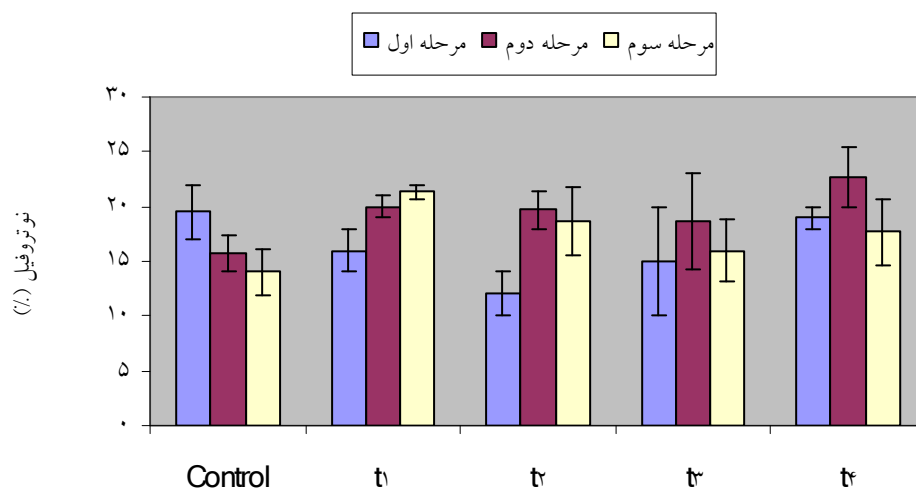
مرحله ۳	مرحله ۲	مرحله ۱	تیمار	فاکتور
۱۴ ± ۲/۰۸	۱۵/۶۶ ± ۱/۶۶	۱۹/۵ ± ۲/۵	شاهد	نوتروفیل
۲۱/۳۳ ± ۰/۶۶	۲۰ ± ۱	۱۶ ± ۲	تیمار ۱	
۱۸/۶۶ ± ۳/۱۷	۱۹/۶۶ ± ۱/۷۶	۱۲ ± ۲	تیمار ۲	
۱۶ ± ۲/ ۸۸	۱۸/۶۶ ± ۴/۳۷	۱۵ ± ۱/ ۲۲	تیمار ۳	
۱۷/۶۶ ± ۲/ ۹۶	۲۲/۶۶ ± ۲/۷۲	۱۹ ± ۱/ ۲۲	تیمار ۴	

حروف غیر همنام در ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد.



نمودار ۱۵: مقایسه میانگین تعداد نوتروفیل در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفاتوکسین

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه نوتروفیل در خون بچه ماهیان بین هر یک از مراحل در هر یک از دز های مورد استفاده سم آفاتوکسین اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد $(P>0.05)$.



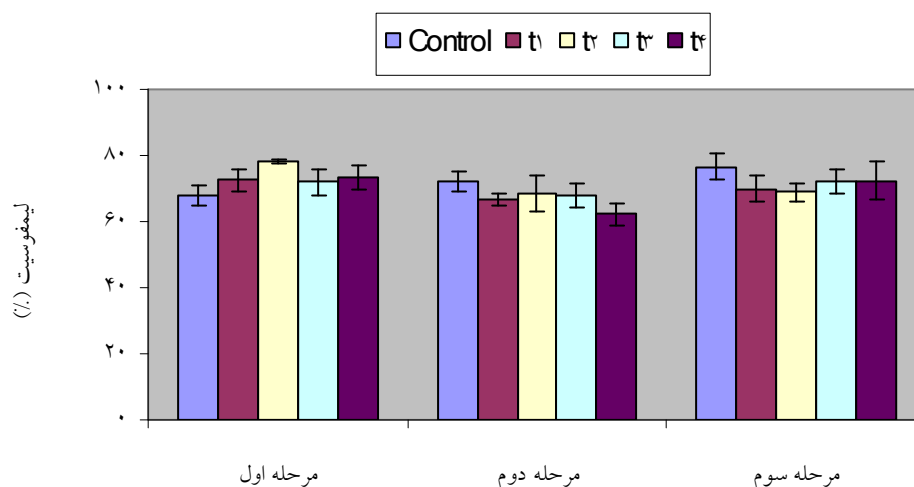
نمودار ۱۶: مقایسه میانگین تعداد نوتروفیل در خون ماهیان در نوبت های مختلف نمونه برداری

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان لنفوسیت در خون بچه ماهیان بین دز های مختلف سم آفاتوکسین با شاهد اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد $(P>0.05)$. (نمودار ۱۶).

جدول ۹: مقایسه میانگین تعداد لنفوسیت در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفلاتوکسین

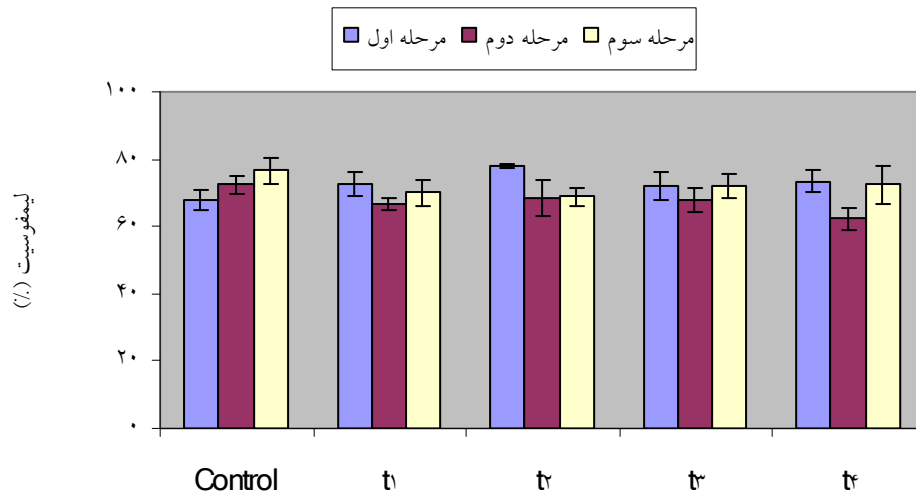
مرحله ۳	مرحله ۲	مرحله ۱	تیمار	فاکتور
۷۶/۶۶ ± ۳/۸۴	۷۲/۳۳ ± ۲/۹۶	۶۸ ± ۳	شاهد	لنفوسیت
۷۰ ± ۴/۰۴	۶۶/۶۶ ± ۱/۷۶	۷۲/۵ ± ۳/۵	تیمار ۱	
۶۹ ± ۲/۶۴	۶۸/۳۳ ± ۵/۴۵	۸۰/۵ ± ۰/۵	تیمار ۲	
۷۲ ± ۳/۷۸	۶۸ ± ۳/۵۵	۷۲ ± ۴	تیمار ۳	
۷۲/۳۳ ± ۵/۷۸	۶۲/۳۳ ± ۳/۳۸	۷۳/۵ ± ۳/۵	تیمار ۴	

حروف غیر همنام در ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد.



نمودار ۱۰: مقایسه میانگین تعداد لنفوسیت در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفلاتوکسین

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه لنفوسیت در خون بچه ماهیان بین هر یک از مراحل در هر یک از دز های مورد استفاده سم آفلاتوکسین اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد (P>0.05).



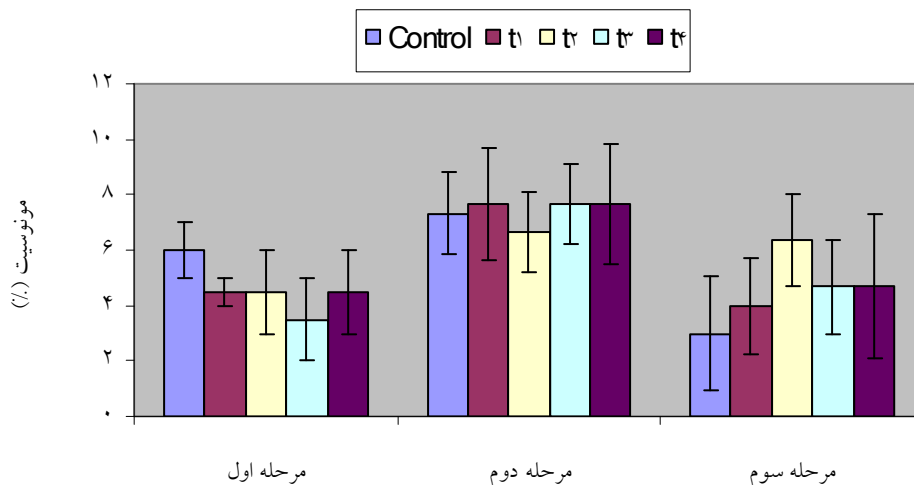
نمودار ۱۸: مقایسه میانگین تعداد لنفوسیت در خون ماهیان در نوبت های مختلف نمونه برداری

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان مونوسیت در خون بچه ماهیان بین دز های مختلف سم آفاتوکسین با شاهد اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد ($P > 0.05$). (نمودار ۱۹).

جدول ۱۰: مقایسه میانگین تعداد مونوسیت در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفاتوکسین

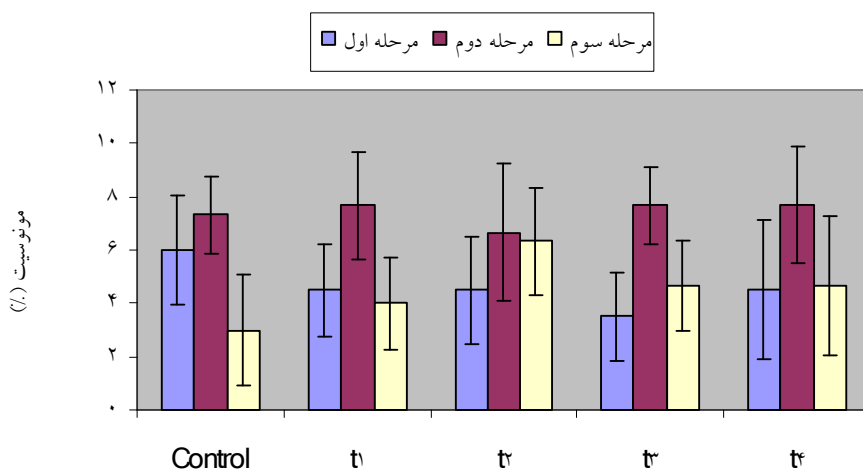
مرحله ۳	مرحله ۲	مرحله ۱	تیمار	فاکتور
۳ ± ۲/۰۸	۷/۳۳ ± ۱/۴۵	۶ ± ۱	شاهد	مونوسیت
۴ ± ۱/۷۳	۷/۶۶ ± ۲/۰۲	۴/۵ ± ۰/۵	تیمار ۱	
۶/۳۳ ± ۲/۰۲	۶/۶۶ ± ۲/۶۰	۴/۵ ± ۰/۵	تیمار ۲	
۴/۶۶ ± ۱/۶۶	۷/۶۶ ± ۱/۴۵	۳/۵ ± ۱/۵	تیمار ۳	
۴/۶۶ ± ۲/۶۰	۷/۶۶ ± ۲/۱۸	۴/۵ ± ۱/۵	تیمار ۴	

حروف غیر همنام در ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد.



نمودار ۱۹: مقایسه میانگین تعداد مونوسیت در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفلاتوکسین

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه مونوسیت در خون بچه ماهیان بین هر یک از مراحل در هر یک از دز های مورد استفاده سم آفلاتوکسین اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد ($P > 0.05$).



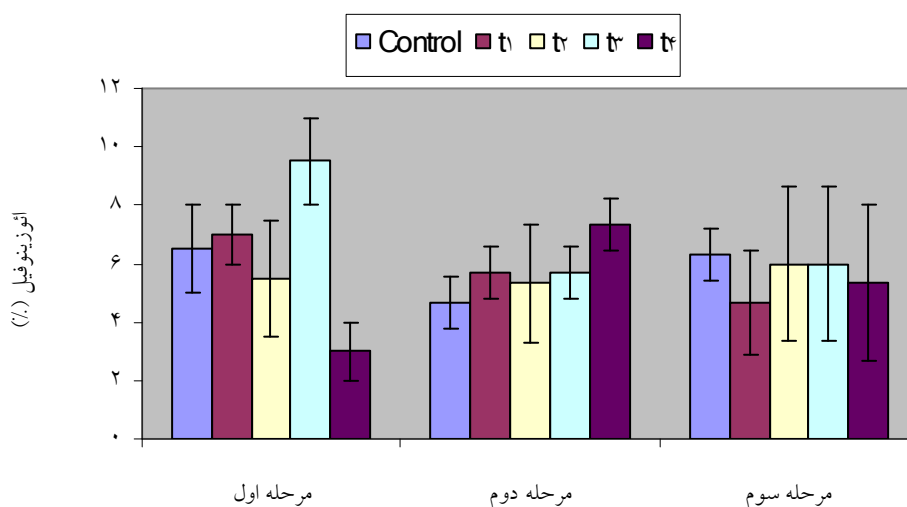
نمودار ۲۰: مقایسه میانگین تعداد مونوسیت در خون ماهیان در نوبت های مختلف نمونه برداری

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان ائوزینوفیل در خون بچه ماهیان بین دز های مختلف سم آفلاتوکسین با شاهد اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد ($P > 0.05$). (نمودار ۱۹).

جدول ۱۱: مقایسه میانگین تعداد ائوزینوفیل در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفاتوکسین

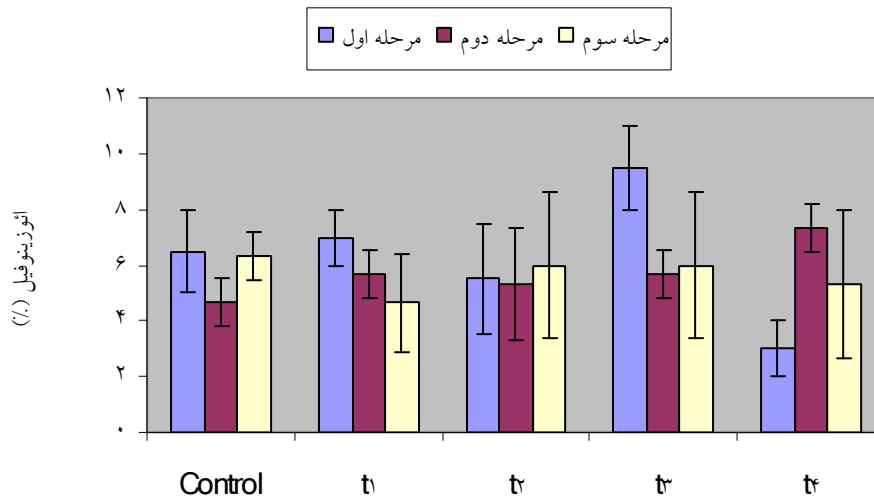
فاکتور	تیمار	مرحله ۱	مرحله ۲	مرحله ۳
ائوزینوفیل	شاهد	۶/۵ ± ۱/۵	۴/۶۶ ± ۰/۸۸	۶/۳۳ ± ۰/۸۸
	تیمار ۱	۷ ± ۱	۵/۶۶ ± ۰/۸۸	۴/۶۶ ± ۱/۷۶
	تیمار ۲	۵/۵ ± ۲	۵/۳۳ ± ۲/۰۲	۶ ± ۲/۶۴
	تیمار ۳	۹/۵ ± ۴/۵	۵/۶۶ ± ۰/۸۸	۶ ± ۲/۶۴
	تیمار ۴	۳ ± ۱	۷/۳۳ ± ۰/۸۸	۵/۳۳ ± ۲/۶۶

حروف غیر همنام در ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد.



نمودار ۲۱: مقایسه میانگین تعداد ائوزینوفیل در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفاتوکسین

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه ائوزینوفیل در خون بچه ماهیان بین هر یک از مراحل در هر یک از دز های مورد استفاده سم آفاتوکسین اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد $(P>0.05)$.



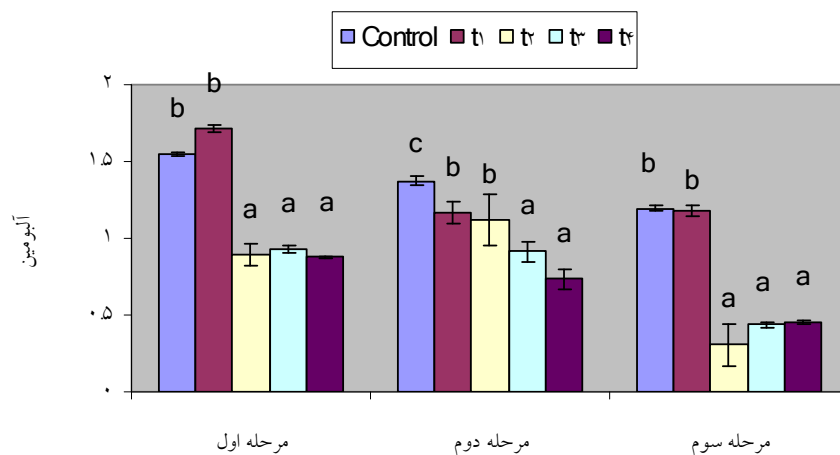
نمودار ۲۲: مقایسه میانگین تعداد ائوزینوفیل در خون ماهیان در نوبت های مختلف نمونه برداری

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان آلبومین در خون بچه ماهیان بین دز های مختلف سم آفلاتوکسین با شاهد اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncan) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان آلبومین خون بچه ماهیان در تیمارها در تمامی مراحل با افزایش میزان دز، کاهش یافته است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار آماری با شاهد داشته اند. ($P < 0.05$).

جدول ۱۴: مقایسه میانگین میزان آلبومین (g/dl) در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفلاتوکسین

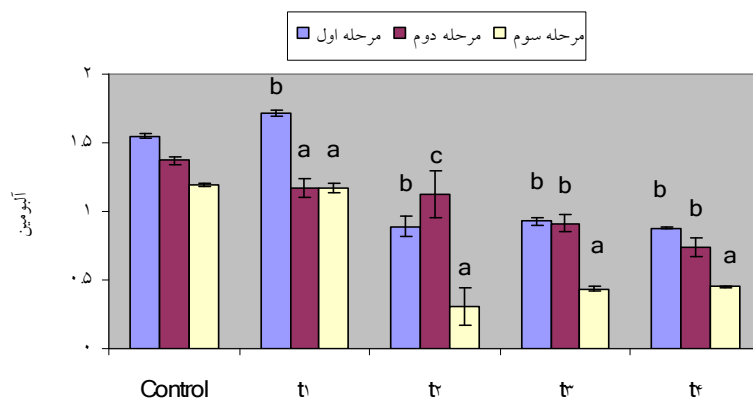
فاکتور	تیمار	مرحله ۱	مرحله ۲	مرحله ۳
آلبومین	شاهد	۱/۵۵ ± ۰/۰۱۵ b	۱/۳۷ ± ۰/۰۲۸ c	۱/۱۹۵ ± ۰/۰۱۵ b
	تیمار ۱	۱/۷۱ ± ۰/۰۲۰ b	۱/۱۶۸ ± ۰/۰۷ b	۱/۱۷۵ ± ۰/۰۳۵ b
	تیمار ۲	۰/۸۹ ± ۰/۰۷ a	۱/۱۲ ± ۰/۱۷ b	۰/۳۰۵ ± ۰/۱۳۵ a
	تیمار ۳	۰/۹۲ ± ۰/۰۲۷ a	۰/۹۱۲ ± ۰/۰۶۱ a	۰/۴۳۵ ± ۰/۰۱۵ a
	تیمار ۴	۰/۸۸ ± ۰/۰۰۵ a	۰/۷۳ ± ۰/۰۶۵ a	۰/۴۵۵ ± ۰/۰۱ a

حروف غیر همنام در ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد.



نمودار ۳۱: مقایسه میانگین میزان آلبومین در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفلاتوکسین

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان آلبومین در خون بچه ماهیان بین هر یک از مراحل در هر یک از دز های مورد استفاده سم آفلاتوکسین اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان آلبومین خون ماهیان به غیر از کنترل در کلیه تیمارها در مرحله ۳ از کاهش برخوردار بوده و اختلاف معنی دار آماری با مرحله اول مشاهده گردید ($P < 0.05$).



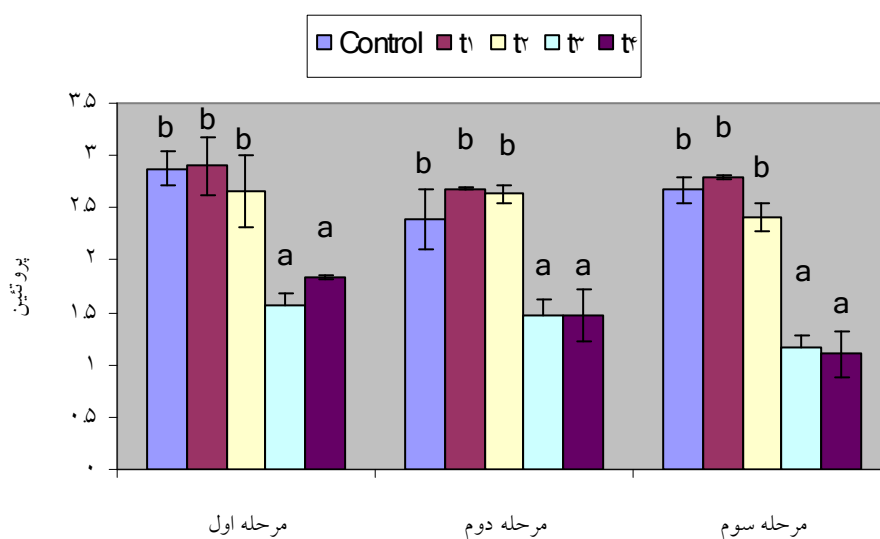
نمودار ۳۳: مقایسه میانگین میزان آلبومین در خون ماهیان در نوبت های مختلف نمونه برداری

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان توتال پروتئین (g/dl) در خون بچه ماهیان بین دز های مختلف سم آفلاتوکسین با شاهد اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان توتال پروتئین خون بچه ماهیان در تیمار ۳ و ۴ در هر سه مرحله کاهش یافته است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار آماری با سایر دزها و شاهد داشته است ($P < 0.05$).

جدول ۱۲: مقایسه میانگین میزان توتال پروتئین (g/dl) در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفلاتوکسین

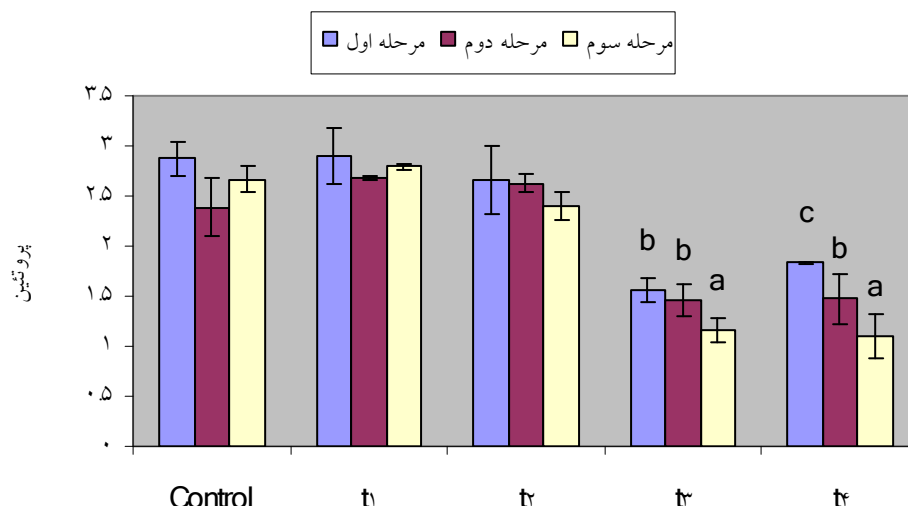
فاکتور	تیمار	مرحله ۱	مرحله ۲	مرحله ۳
توتال پروتئین	شاهد	۲/۸۵ ± ۰/۱۶۵ b	۲/۳۹ ± ۰/۲۸ b	۲/۶۷ ± ۰/۱۲ b
	تیمار ۱	۲/۸۹ ± ۰/۲۸ b	۲/۶۸ ± ۰/۰۱ b	۲/۷۹ ± ۰/۰۲۶ b
	تیمار ۲	۲/۶۶ ± ۰/۳۴ b	۲/۶۳ ± ۰/۰۹ b	۲/۴۰ ± ۰/۱۳ b
	تیمار ۳	۱/۵۶ ± ۰/۱۳ a	۱/۴۶ ± ۰/۱۶ a	۱/۱۶ ± ۰/۰۵۲ a
	تیمار ۴	۱/۸۳ ± ۰/۰۱۵ a	۱/۴۷ ± ۰/۲۵ a	۱/۱ ± ۰/۰۲۱ a

حروف غیر همنام در ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد.



نمودار ۲۳: مقایسه میانگین میزان توتال پروتئین در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفلاتوکسین

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان پروتئین خون بچه ماهیان بین هر یک از مراحل در تیمار های ۳ و ۴ اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و براساس آزمون دانکن (Duncan) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان پروتئین خون ماهیان در تیمار های ۳ و ۴ در مراحل دوم و سوم کاهش یافته است و اختلاف معنی دار آماری بین مراحل مشاهده گردید ($P < 0.05$).



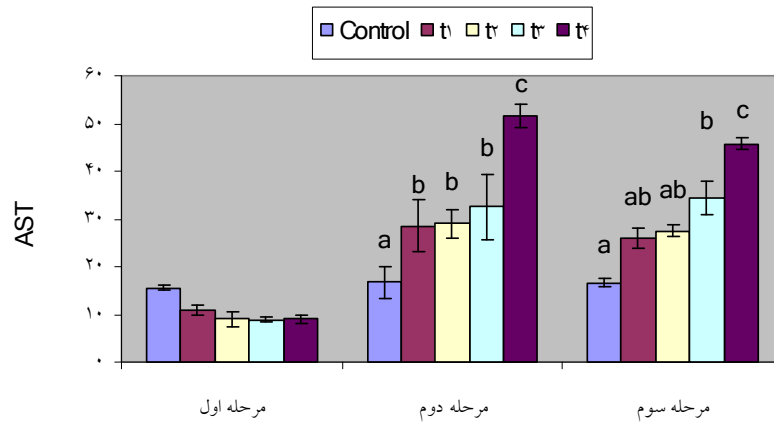
نمودار ۲۴: مقایسه میانگین میزان توتال پروتئین در خون ماهیان در نوبت های مختلف نمونه برداری

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان AST در خون بچه ماهیان بین دز های مختلف سم آفاتوکسین با شاهد اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان AST (U/l) خون بچه ماهیان در تیمارها در مرحله ۲ و ۳ با افزایش میزان دز افزایش یافته است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار آماری با شاهد داشته اند ($P < 0.05$).

جدول ۱۲: مقایسه میانگین میزان AST (u/l) در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفاتوکسین

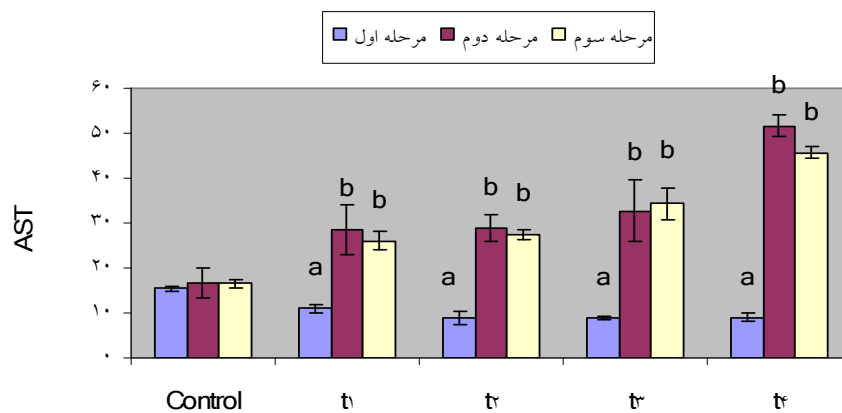
فاکتور	تیمار	مرحله ۱	مرحله ۲	مرحله ۳
AST	شاهد	۱۵/۵ ± ۰/۵	۱۶/۶۶ ± ۳/۲۳ a	۱۶/۶۵ ± ۰/۸۸ a
	تیمار ۱	۱۱ ± ۱	۲۸/۵ ± ۵/۵ b	۲۶ ± ۲/۰۰۹ ab
	تیمار ۲	۸/۹۵ ± ۱/۵	۲۹ ± ۳ b	۲۷/۵ ± ۱/۱۵ ab
	تیمار ۳	۸/۹ ± ۰/۵	۳۲/۶ ± ۶/۸۴ b	۳۴/۳۳ ± ۳/۴۶ b
	تیمار ۴	۹ ± ۱	۵۱/۶۶ ± ۲/۴۰ c	۴۵/۶۶ ± ۱/۲۰ c

حروف غیر همنام در ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد.



نمودار ۲۵: مقایسه میانگین میزان AST (u/l) در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفلاتوکسین

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان AST در خون بچه ماهیان بین هر یک از مراحل در هر یک از دز های مورد استفاده سم آفلاتوکسین اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و براساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان AST خون ماهیان به غیر از کنترل در کلیه تیمارها در مراحل ۲ و ۳ از افزایش برخوردار بوده و اختلاف معنی دار آماری با مرحله اول مشاهده گردید. ($P < 0.05$).



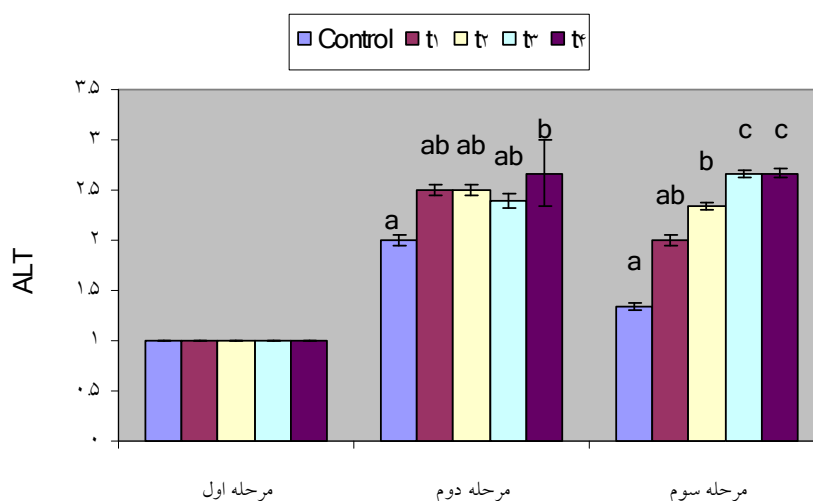
نمودار ۲۶: مقایسه میانگین میزان AST در خون ماهیان در نوبت های مختلف نمونه برداری

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان ALT در خون بچه ماهیان بین دز های مختلف سم آفلاتوکسین با شاهد اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان ALT(u/l) خون بچه ماهیان در تیمارها در مرحله ۲ و ۳ با افزایش میزان دز افزایش یافته است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار آماری با شاهد داشته اند. ($P < 0.05$). (نمودار ۱۹).

جدول ۱۳: مقایسه میانگین میزان ALT در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفاتوکسین (u/l)

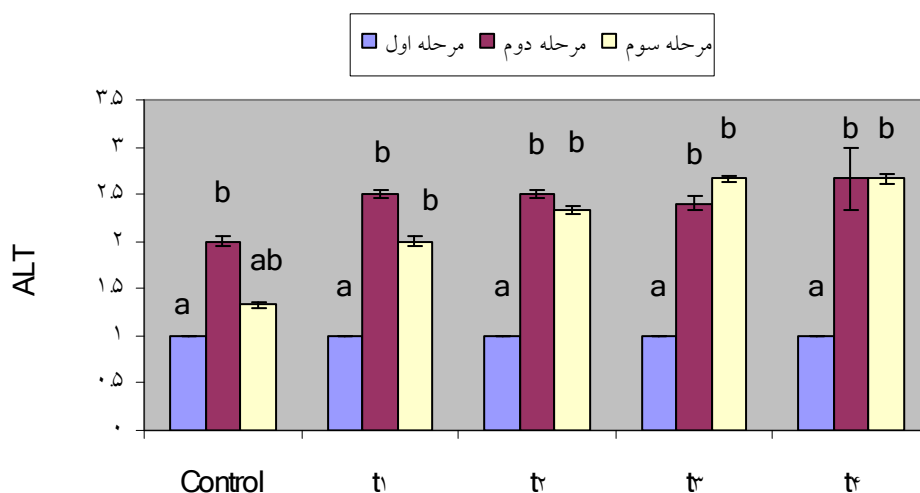
مرحله ۳	مرحله ۲	مرحله ۱	تیمار	فاکتور
$1/33 \pm 0/033$ a	$2 \pm 0/05$ a	<1	شاهد	ALT
$2 \pm 0/05$ ab	$2/5 \pm 0/05$ ab	<1	تیمار ۱	
$2/33 \pm 0/033$ b	$2/5 \pm 0/05$ ab	<1	تیمار ۲	
$2/66 \pm 0/033$ c	$2/4 \pm 2/66$ ab	<1	تیمار ۳	
$2/66 \pm 0/05$ c	$2/66 \pm 0/33$ b	<1	تیمار ۴	

حروف غیر همنام در ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد.



نمودار ۲۷: مقایسه میانگین میزان ALT (u/l) در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفاتوکسین

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان ALT در خون بچه ماهیان بین هر یک از مراحل در هر یک از دز های مورد استفاده سم آفاتوکسین اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و براساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان ALT خون ماهیان در کلیه تیمارها در مراحل ۲ و ۳ از افزایش برخوردار بوده و اختلاف معنی دار آماری با مرحله اول مشاهده گردید. ($P < 0.05$).



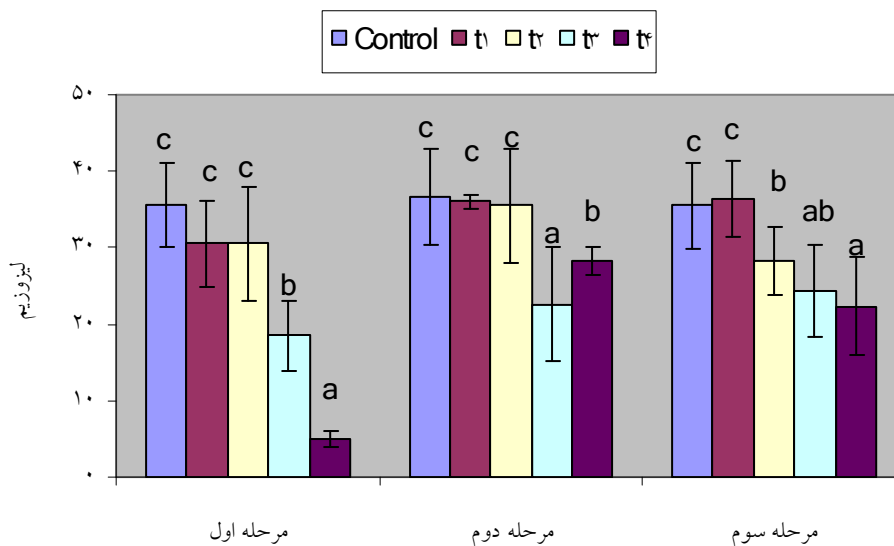
نمودار ۲۸: مقایسه میانگین میزان AST (u/l) در خون ماهیان در نوبت های مختلف نمونه برداری

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان لیزوزیم در خون بچه ماهیان بین دز های مختلف سم آفلاتوکسین با شاهد اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه دو به دو گروه ها با یکدیگر میزان لیزوزیم خون بچه ماهیان در تیمار ها در هر سه مرحله با افزایش میزان دز، کاهش یافته است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار آماری با شاهد داشته اند ($P < 0.05$).

جدول ۱۳: مقایسه میانگین میزان لیزوزیم (mg/l) در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفلاتوکسین

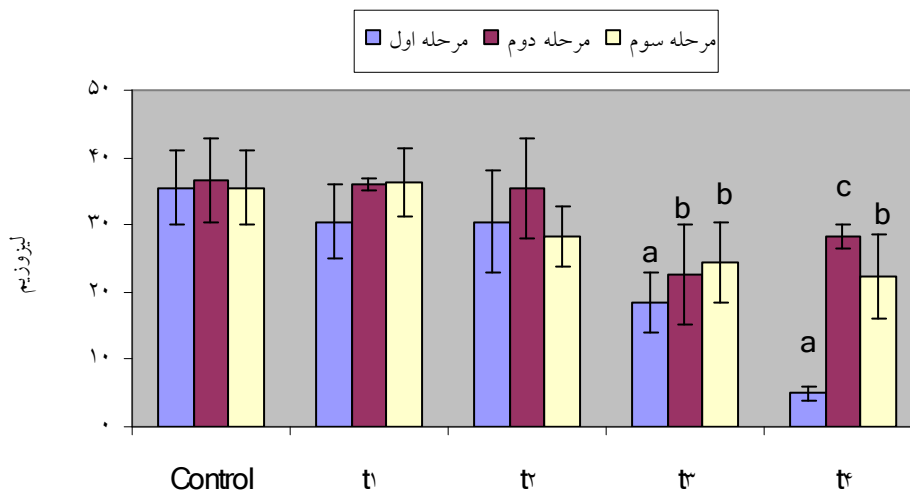
مرحله ۳	مرحله ۲	مرحله ۱	تیمار	فاکتور
۳۵/۵ ± ۵/۵۳ c	۳۶/۶۶ ± ۶/۱۷ c	۳۵/۵ ± ۵/۵ c	شاهد	لیزوزیم
۳۶/۳۳ ± ۴/۹۵ c	۳۶ ± ۱ c	۳۰/۵ ± ۵/۵ c	تیمار ۱	
۲۸/۳۳ ± ۴/۴۴ b	۳۵/۵ ± ۷/۵ c	۳۰/۵ ± ۱۰/۶۸ c	تیمار ۲	
۲۴/۳۳ ± ۵/۹۳ ab	۲۲/۶ ± ۷/۴۳ a	۱۸/۵ ± ۱۰/۶۸ a	تیمار ۳	
۲۲/۳۳ ± ۵/۲۳ a	۲۸/۳۳ ± ۱/۶۷ b	۵ ± ۱ b	تیمار ۴	

حروف غیر همنام در ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد.



نمودار ۲۹: مقایسه میانگین میزان لیزوزیم در خون ماهیان در دزهای مختلف سم آفاتوکسین (mg/l)

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان لیزوزیم خون بچه ماهیان بین هر یک از مراحل در هر یک از دزهای مورد استفاده سم آفاتوکسین اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و براساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان لیزوزیم خون ماهیان در تیمارهای ۳ و ۴ در مراحل دوم و سوم کاهش یافته است و اختلاف معنی دار آماری با مرحله اول مشاهده گردید. ($P < 0.05$).



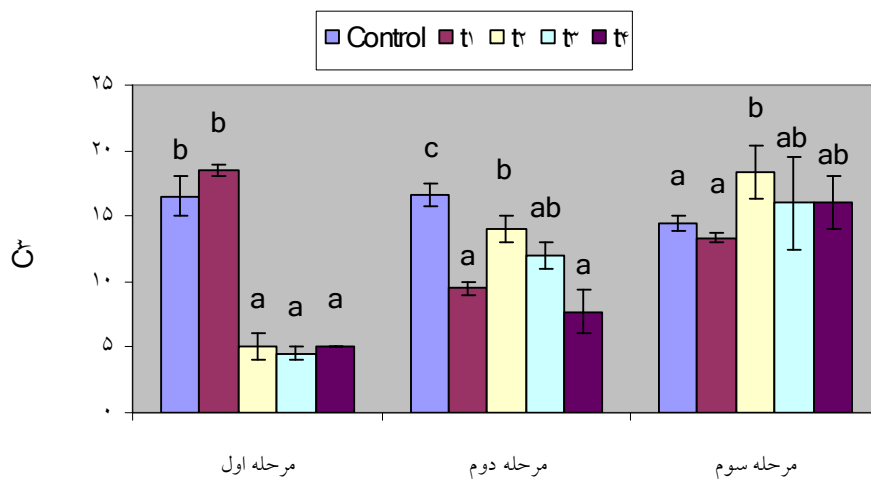
نمودار ۳۰: مقایسه میانگین میزان لیزوزیم در خون ماهیان در نوبت های مختلف نمونه برداری

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان C_3 (mg/dl) در خون بچه ماهیان بین دز های مختلف سم آفلاتوکسین با شاهد اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncan) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان C_3 خون بچه ماهیان در تیمارها در مرحله ۱ و ۲ با افزایش میزان دز، کاهش یافته است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار آماری با شاهد داشته اند ($P < 0.05$). و در مرحله ۳ بیشترین میزان C_3 در تیمار ۳ مشاهده گردید و در سایر تیمارها افزایش نسبی میزان C_3 مشاهده شد.

جدول ۱۵: مقایسه میانگین میزان C_3 در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفلاتوکسین (mg/dl)

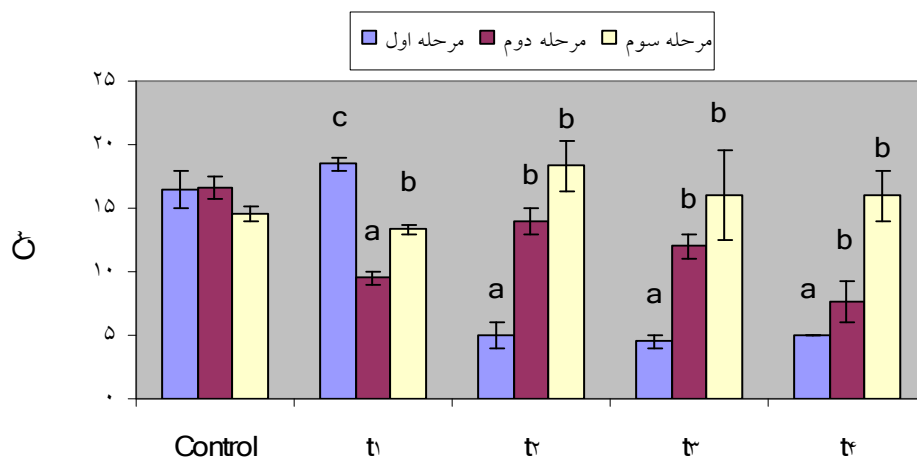
فاکتور	تیمار	مرحله ۱	مرحله ۲	مرحله ۳
C3	شاهد	$16/50 \pm 1/5$ b	$16/66 \pm 0/88$ c	$14/5 \pm 0/57$ a
	تیمار ۱	$18/5 \pm 0/50$ b	$9/5 \pm 0/5$ a	$13/33 \pm 0/33$ a
	تیمار ۲	5 ± 1 a	14 ± 1 b	$18/33 \pm 2/02$ b
	تیمار ۳	$4/5 \pm 0/5$ a	12 ± 1 ab	$16 \pm 3/56$ ab
	تیمار ۴	5 ± 0 a	$7/66 \pm 1/66$ a	16 ± 2 ab

حروف غیر همنام در ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد.



نمودار ۳۴: مقایسه میانگین میزان C_3 در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفلاتوکسین (mg/dl)

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان C_3 در خون بچه ماهیان بین هر یک از مراحل در هر یک از دز های مورد استفاده سم آفلاتوکسین اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncan) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان C_3 خون ماهیان به غیر از کنترل در تیمار ۱ در مرحله سوم و دوم نسبت به مرحله نخست کاهش و سایر تیمارها در مراحل ۲ و ۳ از افزایش برخوردار بوده و اختلاف معنی دار آماری با مرحله اول مشاهده گردید ($P < 0.05$).



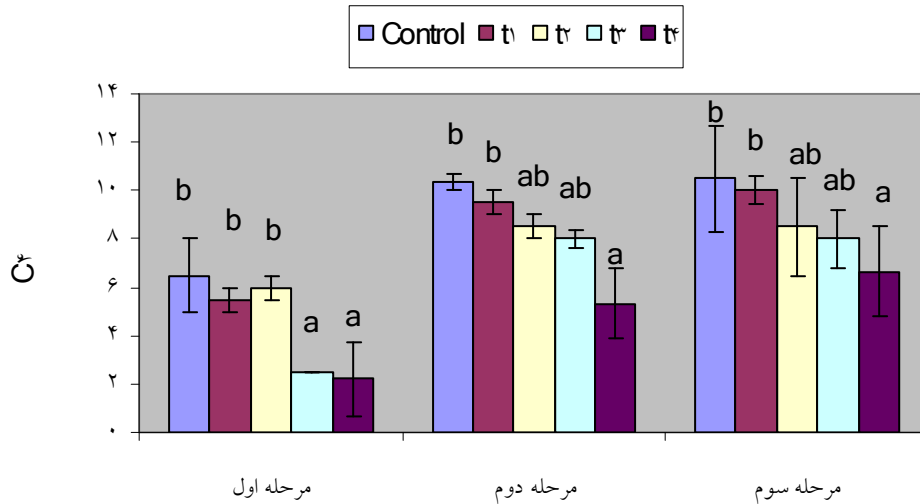
نمودار ۳۲: مقایسه میانگین میزان C3 در خون ماهیان در نوبت های مختلف نمونه برداری

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان C4 در خون بچه ماهیان بین دز های مختلف سم آفاتوکسین با شاهد اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان C4 خون بچه ماهیان در تیمارها در هر ۳ مرحله با افزایش میزان دز، کاهش یافته است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار آماری با شاهد داشته اند ($P < 0.05$). (نمودار ۱۹).

جدول ۱۵: مقایسه میانگین میزان C4 در خون ماهیان در دز های مختلف سم آفاتوکسین (mg/dl)

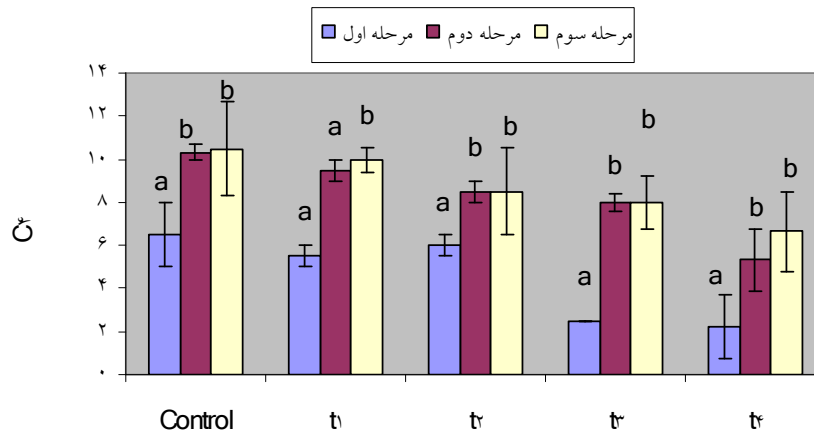
مرحله ۳	مرحله ۲	مرحله ۱	تیمار	فاکتور
10.5 ± 0.57 a	10.33 ± 0.33 b	6.50 ± 1.5 b	شاهد	C4
10 ± 0.57 b	9.5 ± 0.5 b	5.5 ± 0.50 b	تیمار ۱	
8.5 ± 2.02 ab	8.5 ± 0.5 ab	6 ± 0.5 b	تیمار ۲	
8 ± 1.21 a	8 ± 1 ab	2.5 ± 0.25 a	تیمار ۳	
6.66 ± 1.85 ab	5.33 ± 1.66 a	2.2 ± 1.5 a	تیمار ۴	

حروف غیر همنام در ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد.



نمودار ۳۵: مقایسه میانگین میزان C4 در خون ماهیان در دزهای مختلف سم آفلاتوکسین (mg/dl)

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میزان C4 در خون بچه ماهیان بین هر یک از مراحل در هر یک از دزهای مورد استفاده سم آفلاتوکسین اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان C4 خون ماهیان در کلیه تیمارها در مراحل ۲ و ۳ از افزایش برخوردار بوده و اختلاف معنی دار آماری با مرحله اول مشاهده گردید. ($P < 0.05$).



نمودار ۳۶: مقایسه میانگین میزان C4 در خون ماهیان در نوبت های مختلف نمونه برداری (mg/dl)

۵-۴-۲- نتایج رشد

نتایج اندازه گیری برخی از فاکتورهای مهم بررسی شده در این مطالعه نشان داد که نوسانات دمایی آب از ۱۶ تا ۱۹ درجه سانتیگراد با میانگین $18 \pm 1/1$ درجه سانتیگراد، نوسانات میزان اکسیژن محلول در آب از ۶/۸ تا ۹ میلی گرم در لیتر با میانگین $7/9 \pm 1/4$ و همچنین تغییرات pH، از ۷/۸ تا ۸/۲ با میانگین $7/9 \pm 0/2$ متغیر بود. در این بررسی نتایج پارامترهای کیفی آب اختلاف معنی دار آماری را در مدت بررسی نشان نداد ($P < 0.05$).

ازون برون ها در ابتدای دوره از نظر وزنی دارای توزیع نرمال بوده و بررسی نتایج تجزیه واریانس یکطرفه، اختلاف معنی دار در وزن و طول کل اولیه نشان نداد ($P < 0.05$).

نتایج حاصل از زیست سنجی ازون برون های تغذیه شده با مقادیر مختلف آفلاتوکسین B1 و اثرات آن توده زنده و درصد افزایش وزن در جدول شماره یک آورده شده است.

بررسی آماری وزن نهایی ازون برون های پرورشی در تیمارهای مختلف مورد بررسی نشان می دهد که تیمار ۷۵ ppb با تیمار شاهد اختلاف معنی دار آماری دارد ($p \leq 0.05$) و اختلاف معنی داری با سایر تیمارها مشاهده نشد ($P < 0.05$) (جدول شماره ۱).

تجزیه واریانس یکطرفه طول کل بچه تاسماهیان حاکی از عدم اختلاف معنی دار آماری بین تیمارها می باشد ($P < 0.05$). حداکثر طول کل ($28/2 \pm 2/3$ سانتی متر) مربوط به تیمار ۷۵ ppb می باشد.

بررسی نتایج میزان بیوماس و تولید در تیمارهای مورد بررسی بیانگر اختلاف معنی دار تیمار ۷۵ ppb با تیمار شاهد می باشد ($p \leq 0.05$) و دو تیمار شاهد و ۷۵ ppb با تیمارهای ۲۵ ppb، ۵۰ ppb و ۱۰۰ ppb اختلاف معنی دار آماری ندارند ($p \geq 0/05$). تجزیه واریانس یکطرفه درصد افزایش وزن بدن نسبت به وزن اولیه تاسماهیان نشان داد که تیمار ۷۵ ppb با تیمار شاهد اختلاف دارد ($P < 0.05$) و در مقایسه با سایر تیمارها اختلاف معنی دار آماری ندارد ($P < 0.05$) (جدول شماره ۱).

جدول ۱: نتایج زیست سنجی ازون برون های تغذیه شده با مقادیر مختلف آفلاتوکسین B1 طی مدت سه ماه و در دمای $18 \pm 1/1$ درجه سانتیگراد

تیمارها	وزن نهایی (g)	طول کل نهایی (cm)	بیوماس (g)	تولید (g)	افزایش وزن بدن (%)
تیمار شاهد	$40/9 \pm 3/6^b$	$27/2 \pm 1/4^a$	$40/9 \pm 35/6^b$	$312/3 \pm 35^b$	$322/6 \pm 38/7^b$
تیمار (۲۵ppb)	$50/9 \pm 5/5^{ab}$	$27/4 \pm 0/9^a$	$50/9 \pm 55^{ab}$	$418/3 \pm 56/8^{ab}$	$461/4 \pm 77/2^{ab}$
تیمار (۵۰ppb)	$53/2 \pm 4/6^{ab}$	$27/4 \pm 0/6^a$	$532 \pm 45/9^{ab}$	$443/3 \pm 52/5^{ab}$	$505 \pm 101/8^{ab}$
تیمار (۷۵ppb)	$55/7 \pm 13/6^a$	$28/2 \pm 2/3^a$	$557/3 \pm 135/7^a$	$468/3 \pm 136/9^a$	$527/8 \pm 161/5^a$
تیمار (۱۰۰ppb)	$50/9 \pm 3/6^{ab}$	$27/1 \pm 1/2^a$	$50/9 \pm 36/4^{ab}$	$421 \pm 35/5^{ab}$	$478/3 \pm 37/1^{ab}$

اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار می باشند ($p \leq 0.05$)

نتایج حاصل از اثرات مقادیر مختلف آفلاتوکسین B₁ بر شاخص های تغذیه (ضریب تبدیل غذا و کارایی غذا)، رشد (سرعت رشد ویژه، نرخ رشد روزانه)، شاخص چاقی و بازماندگی بر ازون برون های پرورشی در جدول شماره ۲ آورده شده است.

بررسی آماری شاخص تغذیه در خصوص ضریب تبدیل غذا مشخص نمود که تمامی تیمارهای غذایی حاوی آفلاتوکسین با گروه شاهد اختلاف معنی دار آماری دارند ($p \leq 0.05$) و بین تیمارهای مورد بررسی محتوی مقادیر مختلف آفلاتوکسین اختلاف معنی داری وجود ندارد ($p \geq 0.05$) (جدول شماره ۲).

بررسی آماری کارایی جیره های غذایی (FE) مورد استفاده برای تغذیه ازون برون های پرورشی نشان می دهد که تیمار ۷۵ ppb با تیمار شاهد اختلاف معنی دار آماری دارد ($p \leq 0.05$) و با سایر تیمارها تفاوت معنی دار آماری ندارد ($p \geq 0.05$) (جدول شماره ۲). تجزیه واریانی یکطرفه بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار تیمارهای ۲۵ ppb، ۵۰ ppb و ۱۰۰ ppb با تیمار شاهد می باشد ($p \geq 0.05$).

تجزیه واریانس یکطرفه نتایج شاخص رشد ویژه (SGR) نشان می دهد که تیمارهای ۵۰ ppb و ۷۵ ppb با گروه شاهد اختلاف معنی دار آماری دارد ($P \leq 0.05$) و دو تیمار فوق با تیمارهای ۲۵ ppb و ۱۰۰ ppb اختلاف آماری ندارند ($P \leq 0.05$) (جدول شماره ۲).

تجزیه واریانس یکطرفه نتایج نرخ رشد روزانه (Gr) نشان داد که تیمارهای مورد بررسی و گروه شاهد اختلاف معنی دار آماری ندارند ($P \leq 0.05$). حداکثر نرخ رشد روزانه در تیمارهای ۵۰ ppb و ۷۵ ppb با مقدار 0.1 ± 0.05 گرم بدست آمد.

بررسی نتایج شاخص وضعیت یا ضریب چاقی بیانگر وجود اختلاف معنی دار آماری در تیمار ۵۰ ppb با گروه شاهد می باشد ($P \leq 0.05$) و تیمار ۵۰ ppb با سایر تیمارهای مورد بررسی اختلاف معنی دار آماری ندارد ($P \leq 0.05$) (جدول شماره ۲).

بررسی آماری در خصوص درصد بازماندگی مشخص نمود که بین تیمارهای غذایی اختلاف معنی دار آماری وجود ندارد ($P \leq 0.05$). حداقل بازماندگی مربوط به تیمار ۲۵ ppb 86.7 ± 15.3 (%) و حداکثر آن مربوط به تیمار ۵۰ ppb 96.7 ± 5.8 (%) می باشد. میزان بازماندگی در تیمارهای ۷۵ ppb 93.3 ± 5.8 (%)، ۱۰۰ ppb 93.3 ± 5.8 (%) و در گروه شاهد 100 ± 0 (%) می باشد.

جدول ۲: نتایج بررسی مقادیر مختلف آفاتوکسین B1 بر شاخص های تغذیه، رشد و بازماندگی ازون برون های پرورشی

بازماندگی (%)	ضریب چاقی (%)	نرخ رشد (گرم)	سرعت رشد ویژه (%)	کارایی غذا	ضریب تبدیل غذا	تیمارها
۱۰۰±۰/۰ ^a	۰/۲±۰/۰ ^b	۰/۳±۰/۰ ^a	۱/۵±۰/۱ ^b	۴۷/۴±۵/۷ ^b	۲/۱±۰/۳ ^b	تیمار شاهد
۸۶/۷±۱۵/۳ ^a	۰/۲±۰/۰ ^{ab}	۰/۴±۰/۱ ^a	۱/۸±۰/۱ ^{ab}	۶۷/۹±۱۱/۳ ^{ab}	۱/۵±۰/۲ ^a	تیمار (۲۵ppb)
۹۶/۷±۵/۸ ^a	۰/۳±۰/۰ ^a	۰/۵±۰/۱ ^a	۱/۹±۰/۲ ^a	۷۴/۳±۱۵ ^{ab}	۱/۴±۰/۳ ^a	تیمار (۵۰ppb)
۹۳/۳±۵/۸ ^a	۰/۲±۰/۰ ^{ab}	۰/۵±۰/۱ ^a	۱/۹±۰/۳ ^a	۷۷/۶±۲۳/۸ ^a	۱/۴±۰/۵ ^a	تیمار (۷۵ppb)
۹۳/۳±۵/۸ ^a	۰/۳±۰/۰ ^{ab}	۰/۴±۰/۰ ^a	۱/۹±۰/۱ ^{ab}	۷۰/۳±۵/۴ ^{ab}	۱/۴±۰/۱ ^a	تیمار (۱۰۰ppb)

اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار می باشند (p≤0.05).

بررسی نتایج ضرایب تغییرات وزن و طول کل حاکی از عدم اختلاف معنی دار آماری بین تیمارهای مورد بررسی می باشد (P≤0.05). بیشترین مقدار ضریب تغییرات وزن مربوط به تیمار ۱۰۰ (۴۱/۸±۱۰/۶) و کمترین مربوط به تیمار ۷۵ ppb (۲۹±۱۷/۶) و مقدار این شاخص در گروه شاهد (۳۷/۹±۵/۶) می باشد. بیشترین مقدار ضریب تغییرات طول کل در گروه شاهد (۱۷/۴±۸/۷) بدست آمد. مشابه نتایج ضرایب تغییرات وزنی و طولی برای شاخص نسبت وزن به طول کل بدست آمد و تمامی تیمارها مشابه بودند (P≤0.05)

• نتایج فاکتورهای رشد

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میانگین وزن نهایی بچه ماهیان در تیمارها و شاهد اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد (P≤0.05). اما بر اساس نتایج حاصل میزان وزن نهایی در تیمارها نسبت به شاهد از روند کاهشی برخوردار بوده اند، به طوریکه تیمار ۵ که حاوی بالاترین میزان سم بوده است دارای کمترین میانگین وزنی بوده است.

جدول ۱: مقایسه میانگین وزن در شاهد و تیمار های مختلف

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد \pm میانگین
وزن نهایی	کنترل +	۱۲/۰۴ \pm ۰/۰۶
	کنترل -	۱۲/۱۴ \pm ۰/۳۱
	تیمار ۱	۱۱/۴۴ \pm ۰/۲۵
	تیمار ۲	۱۰/۹۸ \pm ۰/۱۸
	تیمار ۳	۱۱/۳۲ \pm ۰/۰۶
	تیمار ۴	۱۰/۶۵ \pm ۰/۱۸
	تیمار ۵	۱۰/۲۹ \pm ۰/۵۹

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میانگین طول نهایی بچه ماهیان بین تیمار ها و شاهد اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد ($P > 0.05$).

جدول ۲: مقایسه میانگین طول نهایی در تیمار های مختلف

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد \pm میانگین
وزن نهایی	کنترل +	۱۷/۶ \pm ۰/۱
	کنترل -	۱۷/۸۲ \pm ۰/۱۷
	تیمار ۱	۱۷/۵۱ \pm ۰/۵۱
	تیمار ۲	۱۷/۸۳ \pm ۰/۱۶
	تیمار ۳	۱۷/۸۳ \pm ۰/۰۳۵
	تیمار ۴	۱۷/۸۶ \pm ۰/۰۸۵
	تیمار ۵	۱۷/۸۷ \pm ۰/۰۲

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میانگین بیومس اولیه بچه ماهیان بین تیمار ها و شاهد اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد ($P > 0.05$).

جدول ۳: مقایسه میانگین بیومس اولیه در تیمار های مختلف

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد \pm میانگین
بیومس اولیه	کنترل +	۷۵/۱۵ \pm ۱/۳۵
	کنترل -	۷۷/۳۵ \pm ۱/۵۰
	تیمار ۱	۷۷/۸۸ \pm ۴/۷۸
	تیمار ۲	۸۰/۷ \pm ۰/۵
	تیمار ۳	۸۵/۲۹ \pm ۱/۲۳
	تیمار ۴	۸۰/۵۹ \pm ۱/۶۴
	تیمار ۵	۷۶/۵ \pm ۰/۵

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میانگین بیومس نهایی بچه ماهیان بین تیمارها و شاهد اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P > 0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان بیومس نهایی بچه ماهیان در شاهدها بیش از سایر تیمارها بوده و در تیمار ۴ و ۵ کمتر از سایر تیمارها و شاهد بوده است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار مشاهده گردید ($P > 0.05$).

جدول ۴: مقایسه میانگین بیومس نهایی در تیمارهای مختلف

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد \pm میانگین
بیومس نهایی	کنترل +	۱۲۰/۴ \pm ۰/۶ d
	کنترل -	۱۲۱/۴ \pm ۳/۱ d
	تیمار ۱	۱۱۴/۴۵ \pm ۱۰/۹ cd
	تیمار ۲	۱۰۹/۸ \pm ۱/۸ cd
	تیمار ۳	۱۰۱/۸۸ \pm ۰/۵۴ bc
	تیمار ۴	۸۵/۲۴ \pm ۱/۴۸ ab
	تیمار ۵	۷۶/۹۱ \pm ۰/۶۸ a

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میانگین درصد افزایش وزن بدن بچه ماهیان بین تیمارها و دو شاهد در پایان دوره اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان درصد افزایش وزن بدن بچه ماهیان در شاهدها بیش از سایر تیمارها بوده و در تیمار ۴ و ۵ کمتر از سایر تیمارها و شاهد بوده است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار مشاهده گردید ($P < 0.05$).

جدول ۵: مقایسه میانگین درصد افزایش وزن بدن شاهد با تیمارها در پایان دوره

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد \pm میانگین
درصد افزایش وزن بدن	کنترل +	۶۰/۲۵ \pm ۲/۰۸ b
	کنترل -	۵۶/۹۲ \pm ۰/۹۵ b
	تیمار ۱	۴۶/۸۰ \pm ۱/۴۳ ab
	تیمار ۲	۳۶/۰۷ \pm ۳/۰۷ a
	تیمار ۳	۳۲/۷۶ \pm ۲/۶۱ a
	تیمار ۴	۳۲/۲۱ \pm ۰/۴۰ a
	تیمار ۵	۳۴/۶۳ \pm ۲/۶۵ a

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میانگین ضریب تبدیل غذایی بچه ماهیان بین تیمارها و شاهد در پایان دوره اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncan) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان ضریب تبدیل غذایی بچه ماهیان در تیمار ۵ بیشتر از سایر تیمارها و شاهد بوده است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار مشاهده گردید ($P < 0.05$). (نمودار ۱).

جدول ۶: مقایسه میانگین ضریب چاقی شاهد با تیمارها در پایان دوره

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد \pm میانگین
ضریب تبدیل غذایی	کنترل +	۱/۳۲ \pm ۰/۰۲۱ a
	کنترل -	۱/۳۶ \pm ۰/۰۴۹ a
	تیمار ۱	۱/۷۹ \pm ۰/۰۹۶ a
	تیمار ۲	۲/۵۱ \pm ۰/۰۲۸ a
	تیمار ۳	۳/۸۶ \pm ۰/۰۳۲ a
	تیمار ۴	۱۲/۵۰ \pm ۰/۰۴۴ a
	تیمار ۵	۱۰۶/۸۸ \pm ۲۳/۵۵ b

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه FE بین تیمارها و شاهدها در پایان دوره اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$) و بر اساس آزمون دانکن (Duncan) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان FE در شاهدها بیش از سایر تیمارها بوده است. نتایج نشان می دهد که میزان نرخ رشد ویژه در تیمارها با افزایش میزان دز سم کاهش یافته و در تیمار ۳ از کمترین میزان برخوردار بوده است.

جدول ۷: مقایسه میانگین میزان FE شاهد با تیمارها در پایان دوره

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد \pm میانگین
FE	کنترل +	۷۳/۰۸ \pm ۳/۵۸ b
	کنترل -	۷۳/۴۰ \pm ۲/۶۵ b
	تیمار ۱	۵۶/۰۲ \pm ۳/۰۲ ab
	تیمار ۲	۴۰/۲۹ \pm ۴/۵۶ a
	تیمار ۳	۳۹/۵۱ \pm ۱/۶۶ a
	تیمار ۴	۴۰/۵۵ \pm ۴/۴۷ a
	تیمار ۵	۶۲/۴۶ \pm ۳/۸۳ ab

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میانگین ضریب چاقی بچه ماهیان بین تیمارها و شاهد در پایان دوره اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان ضریب چاقی بچه ماهیان در تیمار ۴ و ۵ کمتر از سایر تیمارها و شاهد بوده است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار مشاهده گردید ($P < 0.05$).

جدول ۸: مقایسه میانگین ضریب چاقی شاهد با تیمارها در پایان دوره

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد \pm میانگین
وزن نهایی	کنترل +	0.22 ± 0.04 c
	کنترل -	0.22 ± 0.007 c
	تیمار ۱	0.21 ± 0.0097 bc
	تیمار ۲	0.19 ± 0.0021 ab
	تیمار ۳	0.19 ± 0.0001 ab
	تیمار ۴	0.18 ± 0.0005 a
	تیمار ۵	0.18 ± 0.011 a

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه نرخ رشد ویژه (SGR) بین تیمارها و شاهدها در پایان دوره اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$) و بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان SGR در شاهدها بیش از سایر تیمارها بوده است. نتایج نشان می دهد که میزان نرخ رشد ویژه در تیمارها با افزایش میزان دز سم کاهش یافته و در تیمار ۵ از کمترین میزان برخوردار بوده است.

جدول ۹: مقایسه میانگین میزان نرخ رشد ویژه شاهد با تیمارها در پایان دوره

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد \pm میانگین
نرخ رشد ویژه	کنترل +	0.90 ± 0.24 f
	کنترل -	0.86 ± 0.11 f
	تیمار ۱	0.73 ± 0.18 e
	تیمار ۲	0.59 ± 0.43 d
	تیمار ۳	0.34 ± 0.37 c
	تیمار ۴	0.10 ± 0.058 b
	تیمار ۵	0.01 ± 0.045 a

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه میانگین رشد روزانه بین تیمارها و شاهد ، در پایان دوره اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان GR در شاهد ها بیش از سایر تیمار ها بوده است. نتایج نشان می دهد که میزان نرخ رشد ویژه در تیمار ها با افزایش میزان دز سم کاهش یافته است.

جدول ۱۰: مقایسه میانگین میزان رشد روزانه شاهد با تیمار ها در پایان دوره

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد \pm میانگین
رشد روزانه	کنترل +	0.087 ± 0.014 b
	کنترل -	0.084 ± 0.002 b
	تیمار ۱	0.07 ± 0.004 ab
	تیمار ۲	0.055 ± 0.0044 a
	تیمار ۳	0.053 ± 0.0035 a
	تیمار ۴	0.049 ± 0.0003 a
	تیمار ۵	0.05 ± 0.0024 a

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه شاخص هپاتوسوماتیک (شاخص کبدی) بین تیمارها و شاهد در پایان دوره اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد ($P < 0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان شاخص هپاتوسوماتیک بچه ماهیان در در شاهد ها بیش از سایر تیمار ها بوده است. نتایج نشان می دهد که میزان شاخص هپاتوسوماتیک در تیمار ها با افزایش میزان دز سم کاهش یافته به لحاظ آماری اختلاف معنی دار با شاهد ها مشاهده گردید. ($P < 0.05$).

جدول ۱۱: مقایسه میانگین میزان شاخص هپاتوسوماتیک شاهد با تیمار ها در پایان دوره

فاکتور	تیمار	خطای استاندارد \pm میانگین
شاخص هپاتوسوماتیک	کنترل +	3.08 ± 0.11 b
	کنترل -	2.63 ± 0.25 b
	تیمار ۱	1.36 ± 0.20 ab
	تیمار ۲	1.65 ± 0.14 a
	تیمار ۳	1.16 ± 0.12 a
	تیمار ۴	1.18 ± 0.04 a
	تیمار ۵	1.24 ± 0.12 a

بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (Oneway Anova) به منظور مقایسه بازماندگی بین تیمارها و شاهد در پایان دوره اختلاف معنی دار مشاهده شد ($P < 0.05$). و بر اساس آزمون دانکن (Duncana) به منظور مقایسه دو به دو گروهها با یکدیگر میزان بازماندگی بچه ماهیان در در شاهد ها بیش از سایر تیمارها بوده است. نتایج نشان می دهد که میزان بازماندگی در تیمارها با افزایش میزان دز سم کاهش یافته و کمترین میزان بازماندگی در تیمار ۵ مشاهده شده که به لحاظ آماری اختلاف معنی دار با شاهد ها و سایر تیمارها داشته است. ($P < 0.05$).

۵-۲- بحث

آلودگی غذاهای مصرفی در آبزیان با آفلاتوکسینها امروزه از گسترش زیادی برخوردار است. این موضوع بویژه در کشورهای با آب و هوای مرطوب گرمسیری بیشتر به چشم می خورد. در کنار شرایط آب و هوایی، روشهای غیر استاندارد فرآوری و نگهداری مواد اولیه و غذاهای مصرفی از دیگر عوامل بستر ساز جهت رشد قارچ و تولید توکسین محسوب می گردند. (Murjani, 2003)

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

علائم کلینیکی گزارش شده عموماً شامل صدمات کبدی، خونریزی، تورم بافتها، افزایش درجه حرارت بدن، آنورکسی و افزایش مرگ و میر می باشند. کبد به عنوان عضو هدف شناسایی شده و ضایعات هیستوپاتولوژیک مشاهده شده در آن شامل خونریزی، نکروز و سیروز کبدی می باشد. (Smith et al. 1976)

تشخیص آفلاتوکسیکوزیس در مزارع پرورشی بواسطه خلاء علایم کلینیکی مشخص که می توانند در تشخیص اولیه موثر باشند، عمدتاً مشکل است. اطلاعات موجود در ارتباط با وقوع آفلاتوکسیکوزیس در حیوانات پرورشی عمدتاً مشکل است. اطلاعات موجود در ارتباط با وقوع آفلاتوکسیکوزیس در حیوانات پرورشی عمدتاً در رابطه با پستانداران و طیور می باشد. اطلاعات در رابطه با آبزیان پرورشی بسیار اندک است. بر اساس گزارش های 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.

با توجه به مشاهدات و نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر جهت سهولت بیشتر در بحث نتایج به ترتیب سرفصلهای ذکر شده در بخش نتایج مورد بحث قرار می گیرد.

۱-۵-۲- جراحات پوستی

آفلاتوکسیکوزیس نوع حاد در ماهیان به مانند سایر حیوانات در مواقعی که مقادیر متوسط تا زیاد آفلاتوکسین بلعیده شود اتفاق می افتد.

تغییرات مرفولوژیکی در تیلاپیای نیل تغذیه شده با غذاهای آلوده به آفلاتوکسین ضایعاتی در روی سطح بدن از قبیل خوردگی باله ها و ناحیه دم، زردرنگ شدن سطح بدن که به نام تیلاپیای زرد (yellowing Tilapia) نامیده می شود. (Cagauan, et al. 2004)

رنگ زرد ایجاد شده ناشی از مسمومیت های مزمن آفلاتوکسین B₁، سبب ایجاد ظاهر نامناسب به کیفیت پایین لاشه و طعم نامطبوع و کاهش بازار پسندی ماهی می گردد.

تحقیق انجام شده توسط Farabi و همکاران در مورد مسمومیت ایجاد شده توسط آفلاتوکسین B₁ در فیل ماهی جوان پس از ۴۰ روز تغذیه با جیره های آلوده علائم کلینیکی شامل خونریزی در ناحیه سر، پلاکهای استخوانی ردیف شکمی و ظهور نقاط زرد رنگ در ناحیه سینه ای می باشد. (Farabi,etal.2000)

تحقیق حاضر بر روی ماهی اوزون برون نشان می دهد که جراحات پوستی از نظر کمی و کیفی در تیمارهای مختلف تحت آزمایش دارای کمی پیشرفت بوده به طوریکه در تیمارهای مختلف به تناسب غلظت سم مصرفی بروز خونریزی در نواحی شکمی، جانبی و ساقه دم مشاهده گردید.

تحقیق بر روی فیل ماهی (سپهداری و همکاران، ۱۳۸۸) مویید 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 دم به همراه خونریزی در پایه باله های سینه ای و شکمی به همراه بروز زخم و جراحات در لبه های فوقانی و تحتانی باله دم و در حاشیه های باله های سینه ای 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 حاشیه های زرد رنگ (Yellow Sores) به شکل قابل ملاحظه ای خودنمایی نمود.

افزایش و توسعه جراحات در نوبتهای مختلف نمونه برداری موضوعی نگران کننده از نظر بازارپسندی ماهی اوزون برون است. در شرایط پرورشی در استخر، بواسطه وجود عوامل آلوده کننده ثانوی این موضوع از اهمیت بیشتر برخوردار است.

در مقایسه با مشاهدات و مطالعات انجام گرفته بر روی سایر آبزیان پرورشی به نظر می رسد که علاوه بر بروز تلفات در تیمارهای آزمایشی، شدت و گستردگی جراحات و منظره بد ناشی از جراحات پوستی در ماهی اوزون برون بسیار کمتر از فیل ماهی می باشد. این تفاوت به احتمال زیاد بواسطه وزن پایین تر اوزون برون های تحت مطالعه بوده که طبعاً مقدار غذای کمتر و طبعاً مقدار کمتری توکسین از طریق غذا دریافت داشته اند.

۲-۵-۲- علایم کالبد گشایی و مشاهدات هیستوپاتولوژیک

مسمومیت های حاد ناشی از آفلاتوکسین ها در شرایط فقر بهداشتی حاصل می شود و یافته های کلینیکی شامل کاهش تولید، کاهش وزن و کاهش قدرت باروری و همچنین تضعیف سیستم ایمنی است. از علایم شایع دیگر که در مسمومیت های مزمن مشاهده می شود و شامل اثرات تومورزایی، سرطان زایی، جهش زایی و ناهنجاریهای ژنتیکی و سرکوب سیستم ایمنی در انسان و حیوان اشاره نمود. (Martin etal.2007) علایم مشابهی نیز در مراکز تکثیر پرورش آبزیان گزارش شده است.

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

Stewart و Larson در سال ۲۰۰۲، سه نوع از آفلاتوکسیکوزیس را توصیف کرده اند: حاد، تحت حاد و مزمن، آفلاتوکسیکوز مزمن در هنگام خوردن دراز مدت مقادیر کم تا متوسط آفلاتوکسین به وقوع می پیوندد. لذا بواسطه بروز تدریجی و تحت کلینیکی علایم ناشی از مسمومیت معمولاً شناسایی و تشخیص آن با مشکل مواجه است. از عمده ترین علایم کلینیکی در آفلاتوکسیکوزیس مزمن می توان به اختلالات کبدی از جمله کاهش راندمان تغذیه، کاهش وزن، افزایش حساسیت به بیماری های عفونی ثانویه، نکروز و ایجاد تومور در کبد و سایر اندامها و افزایش مرگ و میر اشاره داشت. (Pier et al. 1980)

فعالیت متابولیکی پیش سرطانزایی به وسیله P450 وابسته به آنزیم ها در تعدادی از گونه های ماهی توسط انواع آفلاتوکسینها به چشم می خورد. (Lovell et al. 1988)

هر یک از این ترکیبات دارای خاصیت ایجاد ضایعات نئوپلازمیک در ماهی می باشند. یک تفاوت عمده بین پستانداران و ماهی این است که سیستم متابولیزه کننده P-450 شبیه فنل باریتال در ماهی فعال نمی شود. (Elskus and Stegman, 1989)

ضایعات نئوپلازم به وسیله تغییرات ماده ژنتیکی و تغییر در مکانیسم های کنترل رشد ایجاد می شود. آفلاتوکسین B₁ به وسیله باندهای کووالانت به DNA متصل می شوند و باعث آسیب به DNA و سبب تغییر در بیان بعضی از ژنها می شوند، این تغییرات ژنتیکی منجر به ضایعات نئوپلازمیک می گردد. (Dunn, 1991; Gary et al. 1995)

ایجاد ضایعات در DNA به واسطه مصرف آفلاتوکسین در کپور ماهی هندی روهو (Labeo rohita) از طریق تزریق داخل صفاتی با استفاده از یک دز منفرد (۱۰۰ میکروگرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن ماهی) گزارش گردیده است.

در روزهای سوم و ششم پس از تزریق، روند افزایش غلظت آفلاتوکسین B₁ در سلولهای کبدی به موازات افزایش DNA های متصل شده به آفلاتوکسین، 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 اندام های دیگر متاستاز می دهند. این پدیده در ماهیان ۱-۲ ساله بیشتر اتفاق می افتد.

تغذیه طولانی با مقادیر کم آفلاتوکسین B₁ منجر به ایجاد تومورهای کبدی در قزل آلاهی رنگین کمان می شود. (Lovell. 1992)

تعداد دیگری از محققین معتقدند که خطر ایجاد سرطان از طریق مواجه شدن با آفلاتوکسین به واسطه مدت زمان ماندگاری تجمع بافتی توکسین می باشد. (Gorelick et al. 1993)

به اعتقاد اکثر محققین مراحل مختلف تکامل سلولهای بدخیم سرطانی با اتصال DNA با آفلاتوکسین B₁ شروع می شود. (Massey et al. 1995; Bailey et al. 1996)

شکل غالب کبد‌های توموری شده در قزل آرای رنگین کمان، شامل ترکیبی از کارسینومای کلانژیوسلولار در سلولهای کبدی است که متعاقباً، تبدیل به کارسینومای کامل سلولهای کبدی می‌گردد و معمولاً کارسینومای کلانژیوسلولار به تنهایی کمتر اتفاق می‌افتد.

(Nunez et al.1989, Kelly et al.1993, Bailey et al.1996)

کارسینومای ترکیبی در جنین ماهیانی که از طریق حمام دادن با ۰/۰۵ppm آفاتوکسین B₁ برای مدت یک ساعت مواجه گردیدند، شروع گردید (Bailey et al.1996). همچنین به جز تومورهای بدخیم کبدی تعداد قابل توجهی تومور (نوروبلاستوم‌های کشنده) در کلیه‌های ماهی قزل آرای رنگین کمان و کپور معمولی مشاهده گردید (Bailey et al.1996; Murjani.2003).

در گونه‌های مختلف جانوری درجات متفاوتی از حساسیت به آفاتوکسین B₁ 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 آفاتوکسین‌ها می‌باشد. آفاتوکسین B₁ یکی از رایج‌ترین ترکیبات مستعد کننده ایجاد سرطان می‌باشد و جهت فعال شدن بیولوژیکی باید به شکل ترکیب واسط آفاتوکسین B₀ در بیابد. (Eaton & Gallagher.1994, Robeuck & Maxuitenko.1994)

در برخی از گونه‌های ماهیان به مانند پستانداران چرخه متابولیکی آفاتوکسین B₁ اساساً از دو مسیر و با سه سیستم اصلی تجزیه مشخص می‌گردد.

۱- مرحله اول یا فاز فعال سازی که توسط سیستم آنزیمی ترکیبی سیتوکروم اکسیداز وابسته به پروتئین ۴۵۰ (P450) یا MFO^{۳۹} به انجام می‌رسد.

۲- مرحله دوم یا مرحله سم زدایی که شامل دو سم زدای اصلی و مهم می‌باشد. این ترکیبات سم زدا عبارتند از یوری دین دی فسفات گلوکورونیل ترانسفراز (UDPGT'S) و آنزیم دیگری که با شدت کمتری در این واکنش مشارکت می‌کند آنزیم گلوکوتاتیون اس- ترانسفراز (GST'S) می‌باشد. (Livingstone . 1998)

خانواده سیتوکروم P-450S شامل گروهی از هموپروتئین‌ها هستند که در مراحل فعال سازی بیولوژیکی و سم زدایی متابولیسم ترکیبات خارجی مشارکت داشته و در داخل غشاء شبکه آندوپلاسمیک صاف تجمع یافته‌اند. (Stegeman & Lech.1991)

مطالعات انجام شده توسط Tulayakul و همکارانش در سال ۲۰۰۵ مشخص نمود که میزان حساسیت قزل آرای رنگین کمان به مسمومیت‌های سلولی با آفاتوکسین B₁ بسیار زیاد بوده است. (Tulayakul,etal,2005)

Sanchez و همکارانش در سال ۱۹۹۴ گزارش کردند که مقدار ۳۰ میلی گرم آفاتوکسین B₁ به ازای هر کیلوگرم از جیره غذایی تیلاپیا برای این ماهی کشنده محسوب نمی‌شود.

Tuan و همکاران در سال ۲۰۰۲ با تغذیه ماهی Nile tilapia از غذای حاوی غلظتهای آفاتوکسین B₁ با مقادیر ۲/۵، ۱۰ و ۱۰۰mg برای ۸ هفته که باعث کاهش وزن و کاهش مقدار گلبولهای قرمز شده است. ماهی که غذای

³⁹. MFO = Microsomal Mixed - Function Oxidases

حاوی ۱۰ mg آفلاتوکسین B₁ را دریافت نموده دارای کبد غیر طبیعی است. آنهایی که غذای حاوی ۱۰۰ mg/kg آفلاتوکسین B₁ را دریافت می نمایند وزنشان کاهش یافته و آسیب به این ماهیها باعث مرگشان می گردد. به هر حال در مزارع پرورشی غلظت آفلاتوکسین B₁ به میزان بالای ۵ppb در آب باعث افزایش میزان مرگ و میر می شود (رفرانس ۷)

ماهی قزل آلاهی رنگین کمان بسیار حساس به آفلاتوکسین B₁ هستند در حالی که گربه ماهی کمتر حساس است. ماهی قزل آلاهی رنگین کمان به وسیله آفلاتوکسین B₁ با غلظت 0.4ppb برای ۱۵ ماه تغذیه شد که ۱۴ درصد شانس ایجاد تومور و زمانی که با غذای حاوی آفلاتوکسین B₁ با غلظت ۲۰ppb برای هشت ماه تغذیه شود ۵۸ درصد شانس ایجاد تومور افزایش می یابد و این روال تغذیه اگر برای ۱۲ ماه ادامه یابد منجر به افزایش ۸۳ درصدی شانس بروز تومور می گردد. (Russo et al. 2006)

گربه ماهی با غذای حاوی آفلاتوکسین B₁ خالص شده با غلظت ۱۰/۱۰۰۰ppb برای ۱۰ هفته تغذیه شده که باعث کاهش رشد و ضایعات داخلی گردید. (Jantraratouai and Lovell. 1990)

بررسی های انجام شده توسط Gallagher & Eaton در سال ۱۹۹۵ نشان میدهد که چرخه متابولیسم آفلاتوکسین B₁ در کبد گربه ماهی در غلظتهای پایین ۱۶mg که شباهت زیادی به محدوده های طبیعی آلودگی های محیطی با آفلاتوکسین دارد. تولید متابولیت های هیدروکسیله شده آفلاتوکسین B₁ از جمله آفلاتوکسین Q یا P₁ در هیچیک از غلظتهای پایین یا بالا گزارش نشده است همچنین فعالیت آنزیم های احیاء کننده آفلاتوکسین B₁ بالا می باشد که این موضوع به احیای سریع آفلاتوکسین B₁ به آفلاتوکسیکول L₁ منجر می گردد. در واقع محققین نشان داده اند که تولید AFL در گربه ماهی حداقل ۴۰ برابر بیشتر از قزل آلا می باشد. در گربه ماهی روگاهی به مانند اغلب آبزیان، چرخه سم زدایی از طریق GST تاکنون گزارش نگردیده است.

به صورت کلی می توان گفت که اگرچه اکسیداسیون میکروزومی آفلاتوکسین B₁ در گربه ماهی ضعیف بوده و این ترکیب سریعاً به آفلاتوکسین L تبدیل می شود، طی این تبدیل زمینه حذف سریع آفلاتوکسین B₁ آزاد فراهم گردیده و مقاومت گربه ماهی به مسمومیت و سرطان های کبدی را توجیه می نماید. برخلاف گربه ماهی، در قزل آلاهی رنگین کمان فعالیت بالای اپوکسیداسیون آفلاتوکسین B₁ به آفلاتوکسین B₀ روی می دهد که این متابولیست یک ترکیب شدیداً سرطان زا در این گونه محسوب می گردد.

مقدار زیاد آفلاتوکسین تولید نکروز کبدی حاد را می نماید که منجر به سیروز و یا کارسینومای کبد می گردد. ناتوانی کبدی حاد که به صورت خونریزی، ادم، تناوب در هضم و جذب و یا متابولیسم مواد غذایی و کما بروز می کند.

هیچ گونه جانوری مثل انسان سیستم ایمنی اش حساس به اثرات سمی حاد آفلاتوکسین ها نیست. آفلاتوکسین ها در کبد متابولیزه شده تولید آفلاتوکسین M₁ و اپوکساید می نماید. متابولیت M₁ آفلاتوکسین می تواند خود را در ساختمان DNA جا دهد و بازها را قلیایی نماید و ایجاد اپوکساید کند.

این ملکول می تواند سبب موتاسیون در ژن P_{53} گردد و می دانیم که این ژن، یک ژن مهم در حفاظت از چرخه سلولی است، زمانی که موتاسیونهای DNA بوجود می آید یا در پروسه آپوپتوزیس (Signaling apoptosis) آفاتوکسین به عنوان یک عامل جهش زای DNA عمل می کند. نه تنها جهش DNA به صورت تصادفی، بلکه اختصاصی برای جهش ژن P_{53} عمل می کند. به طور اختصاصی در باز ۲۴۹ که سبب تومورهای کبد می گردد. باز ۲۴۹ یک واحد آرژنین است و به طور گسترده این مسئله برای واکنش با DNA بسیار مهم است. (Machida et al. 2010)

اولین تلاشها در ارتقای بررسی اختلالات ژنتیکی حاصل از مصرف آفاتوکسین B_1 در ماهیان توسط Abd-Allah و همکارانش در سال ۱۹۹۹ به انجام رسید. کسانی که موفق به اندازه گیری میزان تخریب و صدمات رشته های DNA به روش Comet گردیدند. این محققین اثرات اولیه و بلند مدت آفاتوکسین B_1 در رابطه با صدمات وارد شده به DNA را در خون، کبد و سلولهای کلیوی در قزل آلاهی رنگین کمان، به عنوان یک گونه حساس و همچنین گربه ماهی به عنوان یک گونه مقاوم تر بررسی و مقایسه نمودند.

در قزل آلا صدمات اولیه و تأخیری ۴ ساعت پس از تزریق داخل صفاتی آفاتوکسین B_1 در خون و کلیه مشاهده گردید که پس از ۲۴ ساعت مقدار آن کاهش پیدا کرد.

در سلولهای کبدی قزل آلا 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 پرورش مشاهده نشد. این یافته ها با چرخه های متابولیکی موجود در دو گونه مذکور همسویی و مطابقت دارد. راندمان پایین اپوکسیداسیون آفاتوکسین B_1 که قادر به تولید مقادیر کافی آفاتوکسین 0 نبوده و تبدیل سریع آفاتوکسین B_1 به AFL، از دلایل اصلی قابل اشاره جهت بالا بودن مقاومت ظاهری گربه ماهی به اختلالات ژنتیکی با آفاتوکسین B_1 محسوب می گردند. (Gallagher. 1995; Abd-Allah et al. 1999) به نظر می رسد حساسیت های متفاوت مشاهده شده در گونه های مختلف ماهیان نسبت به تأثیرات سرطانزایی آفاتوکسین B_1 ناشی از تفاوت در راندمان انتقال بیولوژیکی و چرخه های متابولیکی این ترکیب در بین گونه ها است. (Gallagher. 1994; Baily et al 1996)

در گونه های مختلف جانوران خشکی زی درجات متفاوتی از مقاومت و حساسیت نسبت به ویژگی تومورزایی آفاتوکسین B_1 مشاهده گردیده است. این موضوع در بین گونه های مختلف آبزیان نیز مصداق دارد برای مثال قزل آلاهی رنگین کمان همانند Rat، اردک و انسان حساسیت زیادی نسبت به ایجاد سرطان های کبدی ناشی از مصرف آفاتوکسین B_1 دارد. از طرف دیگر به نظر می رسد که آفاتوکسین B_1 یک ترکیب سرطان زای ضعیف در ماهی آزاد کوهو بوده و گونه هایی از قبیل ماهی گورخری و گربه ماهی همانند موش از حساسیت بسیار کمی برخوردار هستند. (Hendricks, 1996؛ Tsai, 1994؛ Baily et al. 1996)

در ارتباط با مطالعات هیستوپاتولوژیک عمدتاً کبد به عنوان عضو هدف تأثیر آفاتوکسین B_1 مدنظر بوده و اثرات تومورزایی و تغییرات پاتولوژیک در این عضو مشاهده شده است. تأثیرپذیری این عضو و سایر اندامهای

داخلی تا حد زیادی به روند متابولیسم آفلاتوکسین B₁ در گونه تحت تغذیه بستگی دارد. بعلاوه عواملی از جمله سن، مقدار سم، مدت زمان مواجهه و درجه حرارت محیط پرورش نیز در این رابطه حائز اهمیت است. سپهداری و همکاران در سال ۱۳۸۷، مطالعه ای روی گونه فیل ماهی داشته اند و مشاهدات کالبدگشایی در آبشش فیل ماهی آزمایش بیانگر وجود درجاتی از پرخونی، کم خونی و بعضاً افزایش ترشحات مخاطی در این عضو است. تغییرات پاتولوژیک آن شامل پرخونی، تلانژکتازی، خونریزی، هایپرپلازی سلولها در پایه تیغه های ثانویه و تخریب بافت پوشش تیغه های ثانویه در برخی از قسمت ها می باشد که به تناسب میزان سم و مدت زمان مصرف آن شدت بروز ضایعات مذکور متفاوت است.

علائم کالبدگشایی در کبد شامل پرخونی، کبد چرب، کیسه صفرا متسع و حاوی صفرا بی رنگ، تقسیمات ظاهری لانه زنبوری در قسمت شکمی کبد، رنگ سبز لجنی به همراه سستی بافت و رنگدانه های سیاه رنگ در قسمت داخلی است. علائم مذکور به تناسب میزان سم و مدت زمان مصرف آن بیانگر روند پیشرونده تغییرات از شکل حاد به مزمن است.

همچنین مشاهده شد که آفلاتوکسین B₁ به نظر می رسد که نمی تواند در کبد فیل ماهی دارای قابلیت تومورزایی باشد.

در کلیه ها علائم به صورت پرخونی و تورم حاد تا ایجاد ندول های سفید در بخش خلفی و تحلیل بافت کلیه در برخی از تیمارها در ماه سوم نمونه برداری می باشد. علاوه بر این تغییرات وسیع در کلیه بواسطه مسمومیت با آفلاتوکسین در آبزبان پرورشی مشاهده شده که این موضوع را Murjani, 2003 و Hamilton, 1990 در کلیه ماهی قزل آلائی رنگین کمان نیز اشاره داشته اند.

روند بروز تغییرات پاتولوژیک در طحال فیل ماهی نیز حائز اهمیت است که با تغییرات حاد شامل پرخونی و خونریزی شروع شده و تا بروز تغییرات گرانولوماتوز و شبه توموری و نهایتاً نکروز پیش می رود. در تحقیق حاضر، مشاهدات کالبدگشایی در آبشش ماهی ازون برون در دامنه تغییرات از آبشش نسبتاً طبیعی تا کمی پر خون و نسبتاً پر خون دیده شد و تغییرات پاتولوژیک آن شامل تورم سلولی در برخی از سلولهای پوششی تیغه های آبششی، هایپرپلازی سلولهای پوششی برخی از تیغه های آبششی و پیوستگی تیغه ها، تخریب بافت پوششی می باشد که به تناسب میزان سم و مدت زمان مصرف آن در تیمارهای مختلف شدت بروز ضایعات مذکور متفاوت می باشد.

علائم کالبدگشایی در کبد ماهی ازون برون شامل کبد رنگ پریده و دارای پیگمانتاسیون، علائم کبد چرب، رنگ کیسه صفرا در بعضی حالات کم رنگ ولی در اندازه طبیعی، در بعضی موارد تجمع لکه های خون بر روی کبد و همراه با دانه های سیاه رنگ در قسمت داخلی آن مشاهده می شود و تغییرات پاتولوژیک آن عبارتند از: دژنراسانس چربی و نکروز هپاتوسیتها، التهاب خفیف هپاتوسیتها، پیکنوز هسته برخی هپاتوسیتها، نفوذ

سلولهای التهابی اطراف سیاهرگ مرکزی، پرخونی سینوزوئیدهای خونی همراه با نفوذ سلولهای التهابی تک هسته ای به صورت کانونی می باشد.

روال پیشرونده و مزمن تغییرات پاتولوژیک در کبد ماهی ازوزون برون نشانگر مسمومیت با آفلاتوکسین B₁ در این ماهی می باشد و در کبد ازوزون برون اثری از تومورزایی مشاهده نشده است.

علائم کالبد گشایی در کلیه ماهی ازوزون برون شامل علایمی از جمله پرخونی و تورم کلیه، مشاهده رسوبات سفید رنگ در زیر صفاق کلیه ها، پرخونی کلیه قدامی در برخی موارد، تحلیل نسبی بافت کلیه در قسمت قدامی و ایجاد رسوبات با تلالو نقره ای در قسمت خلفی می باشد.

تغییرات پاتولوژیک در بافت کلیه ماهی ازوزون برون نیز به صورت وجود کستهای (Cast) هیالین در برخی از لوله های ادراری، پیکنوز شدن هسته در برخی از سلولهای لوله های ادراری و تورم سلولی مشاهده شده است.

در مورد کالبد گشایی طحال در ماهی ازوزون برون علایم خاصی مشاهده نشده و طحال در رنگ و اندازه طبیعی دیده شد ولی در تغییرات پاتولوژیک در بعضی از غلظتها نکروز خفیف سلولهای لنفاوی طحال به چشم می خورد.

از مقایسه تحقیق حاضر با مواردی که گزارش شده نشان میدهد که ماهی ازوزون برون یک گونه نسبتاً مقاوم به آفلاتوکسین B₁ است. و شبیه به گونه های فیل ماهی، گربه ماهی روگامی و ماهی گورخری می باشد که طبعاً این فرضیه نیازمند تحقیق و بررسی بیشتر می باشد. به نظر می رسد با انجام مطالعات تکمیلی بتوان از قابلیت تأیید تشخیص علایم پاتولوژیک مشاهده شده در گونه مذکور جهت موارد مشکوک به مسمومیت با آفلاتوکسین B₁ بهره جست.

۳-۵-۲- فاکتورهای خون شناسی

در مواجهه داد جنین قزل آلالی 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 انجام شده توسط سپهداری و همکاران در سال ۱۳۸۸ بر روی فیله ماهی در غلظت ۷۵ ppb افزایش عملی تعداد لمفوسیت ها مشاهده گردید. نتایج حاصل از تداوم تغذیه با غذای حاوی آفلاتوکسین منجر به کاهش میزان لنفوسیت ها به شکل معنی دار بخصوص در غلظت ۱۰۰ ppb 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 تأییدی بر اثرات تضعیف سیستم ایمنی توسط آفلاتوکسین ب ۱ می باشد.

همچنین در مواجهه لمفوسیت ها با AFB₁ کاهش تولید ایمنوگلوبین و تزايد لمفوسیت ها گزارش گردیده است. (Ottinger and Kattari, 1998).

اثرات تخریبی AFB₁ بر روی بافت های خون ساز (کلیه قدما و طحال) منجر به کاهش لمفوسیت ها و کاهش تولید ایمنوگلوبین ها می گردد. (Sahoo et al. Zoola; Sahoo and mukherjee, 2001b). در مطالعه حاضر به رغم کاهش نسبی تعداد لنفوسیت ها با افزایش دز و مدت زمان مصرف توکسین در تیمارهای مختلف آزمایشی، تفاوت معنی داری در اختلاف ها به چشم نمی خورد. بنظر می رسد عواملی از جمله: سن، گونه و میزان غذای مصرفی می تواند در بروز شدت تغییرات مشاهده شده موثر باشد.

افزایش معنی دار نوتروفیل ها در نوبت های دوم و سوم نمونه برداری و در غلظت ۱۰۰ ppb در مطالعات انجام شده بر روی فیل ماهی مشاهده گردید. (سپهداری و همکاران، ۱۳۸۸). وسعت جراحات پوستی در تیمارهای مذکور و عفونت های جلدی ایجاد شده به همراه سایر صدمات بافتی در سایر اندام ها می تواند توجیه افزایش این گروه از گلبول های سفید باشد. در مطالعه حاضر به رغم کاهش نسبی تعداد نوتروفیل ها با افزایش دز و مدت زمان مصرف توکسین در تیمارهای مختلف آزمایشی، تفاوت معنی داری در اختلاف ها به چشم نمی خورد.

مسمومیت های مزمن با آفلاتوکسین می تواند منجر به نقصان فاکتورهای ضد میکروبی (لیزوزیم، آنتی پروتاز 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).

با افزایش غلظت آفلاتوکسین B1 در جیره ماهی تیلاپیا میزان هماتوکریت به شکل معنی داری کاهش نشان داد. (Nguyen Anh Tuan et al. 2002) کاهش میزان گلبول های قرمز و هموگلوبین در نوبت سوم نمونه برداری مؤید ایجاد کم خونی در فیل ماهیان تحت تغذیه با آفلاتوکسین B1 می باشد. این مطلب با علائم کلینکی و مشاهدات پاتولوژیک همخوانی دارد. (سپهداری و همکاران، ۱۳۸۸)

در مطالعه حاضر به رغم کاهش نسبی تعداد گلبولهای قرمز با افزایش دز و مدت زمان مصرف توکسین در تیمارهای مختلف آزمایشی، تفاوت معنی داری در تیمارهای آزمایشی به چشم نمی خورد ولی میزان هماتوکریت در تمامی تیمارهای آزمایشی با شاهد دارای اختلاف معنی دار بوده و کاهش آن مشاهده می شود. این نتایج با مطالعات مشابه انجام شده همخوانی دارد.

در مواجهه کپور معمولی با کادمیوم کاهش میزان MCH, MCHC و MCV مشاهده گردید که دلیل آن کاهش تولید سلول های خونی بواسطه صدمات بافتی ناشی از مسمومیت در کلیه و طحال ذکر شده است. (Koyama, Ozaki. 1984) نتایج مشابهی در تحقیقات انجام شده در موضوع ارزیابی تاثیر غلظت های مختلف آفلاتوکسین ب ۱ بر روی فیل ماهی حاصل گردید. (سپهداری و همکاران، ۱۳۸۸)

نتایج فوق با نتایج حاصل در تحقیق حاضر همخوانی دارد. بطور کلی اثرات تخریبی آفلاتوکسین B1 بر روی بافت های خون ساز می تواند دلیلی بر کاهش تعداد گلبول های خونی و شاخص های مرتبط باشد. - تغییرات مشاهده شده در میزان ALT, AST, سرم به شکل مشخص به فعالیت های کبدی وابسته است و می تواند به عنوان ابزاری جهت ارزیابی سلامت سلول ها و تغییرات نفوذ پذیری غشاهای سلولی مد نظر باشد. افزایش ALT, AST سرم در مسمومیت با آفلاتوکسین B1 نه تنها میتواند ناشی از اختلال در متابولیسم بافتی پروتئین ها بواسطه استرس های شیمیایی باشد، بلکه انعکاسی از مسمومیت ایجاد شده در کلیه ها است. Abdelhamid و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند که برخی از مشاهدات در تیلاپای نیل مواجهه داده شده با آفلاتوکسین B1، بیانگر افزایش فعالیت آنزیم های فسفاتاز و ترانس آمیناز در خون بوده که میتواند بواسطه نکرورز کبد، کلیه و قلب باشد. مضافاً کاهش توتال پروتئین و آلبومین میتواند تحت تاثیر اثرات تخریبی آفلاتوکسین B1 بر هپاتوسیت ها قرار بگیرد (Sahoo and Mukherjee, 2001) که با افزایش ALT, AST و ALP سرم همراه است (Abdelhamid et al, 2004). اثرات مشابه مشاهده شده در افزایش ALT, AST سرم در تحقیق حاضر به همراه تغییرات پاتولوژیک در کبد و کلیه ماهیان ازون برون تحت آزمایش با نتایج مطالعات ذکر شده مطابقت دارد. کاهش توتال پروتئین و آلبومین نیز با مطالعات مذکور همسویی دارد.

۴-۵-۲- شاخص های رشد (میانگین وزنی، ضریب تبدیل غذایی، رشد ویژه)

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

گونه های اصلی پرورشی در کشورهای اروپایی ماهی آزاد آتلانتیک، قزل آلائی رنگین کمان، باس دریایی، سیم دریایی (Sparus aurata) توبورت، مار ماهی و کپور معمولی می باشند (EC 2001). این گونه ها عمدتاً در محیط طبیعی گوشتخوار بوده و در شرایط پرورش به شکل متراکم نیازمند به مقادیر بالای پروتئین می باشند. 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 می شوند. (New et al. 1995; Scottish Executive Report 2002).

بواسطه قیمت بالای پودر ماهی، جایگزینی آن با مواد اولیه با منشاء گیاهی از جمله غلات می تواند در کاهش هزینه های جاری آبی 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 به‌سزایی 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).

خصوصاً در حدود ۶۹ درصد از نمونه‌های اخذ شده از پودر ماهی به آفلاتوکسین B₁ 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 و همچنین فراوری و ذخیره‌سازی 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 آبی‌پروری، آلودگی شدید به آفلاتوکسین B₁ بواسطه توسعه نامناسب اقتصادی - اجتماعی، روش‌های عمل‌آوری غیربهداشتی و قدیمی، الگوهای غلط و غیرقابل قبول ذخیره‌سازی در فضاهای باز، در مجاورت بارندگی، حشرات و جوندگان حادث می‌گردد (Fegan 2005, Spring 2005).

این موضوع حائز اهمیت است که اغلب تولیدکنندگان خوراک و طیف وسیعی از مزارع پرورش متراکم آبزیان در مناطق گرمسیری قرار دارند و بیش از ۸۵ درصد تولیدات جهانی آبی‌پروری 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 آبریان به آفلاتوکسین ها یک مسئله اساسی و گسترده در آبرزی پروری محسوب گردیده که می تواند از نظر اقتصادی و بهداشتی در بسیاری از کشورهای آبرزی پرور از جایگاه ویژه ای برخوردار باشد.

تیلای نیل تغذیه شده با جیره غذایی حاوی 0.1 mg آفلاتوکسین به ازای هر کیلوگرم از جیره در طی مدت ۱۰ هفته فقط کاهش رشد را نشان می دهد و در ماهیانی که با $0.2 \text{ mg AFB}_1 / \text{kg}$ از جیره غذایی تغذیه شدند، $16/7$ 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 بالای در آلودگی با آفلاتوکسین B_1 از طریق خوراکی برخوردار است. آنها معمولاً از جیره های غذایی حاوی بیش از ۳۰ درصد ذرت و کنجاله پنبه دانه که غالباً غذاهایی آلوده محسوب می گردند، جهت تغذیه استفاده می کنند. بر اساس مطالعات Lovell در سال ۱۹۸۴ حداقل میزان $400 \mu\text{g} / \text{kg}$ آفلاتوکسین به شکل باقیمانده بافتی از لاشه گربه ماهیان پرورشی آمریکایی باز یافت 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 $2154 - 100 \text{ ppb}$) کاهش معنی داری در اضافه وزن یا بروز ضایعات هیستوپاتولوژیک در آنان مشاهده نمی شود (Jantrarotai & Lovell 1990a).

علائم اولیه کلینیکی مسمومیت حاد با آفلاتوکسین از جمله: کاهش سرعت رشد، کم خونی، نکروز کبد و دستگاه گوارش، زمانی در گربه ماهی پرورشی بروز می نماید که با مقادیر حدود $10/000 \text{ ppb}$ از AFB_1 تغذیه می شود (Jantrarotai & Lovell 1990a). دُز کشنده آفلاتوکسین B_1 (LD_{50}) در طی ۱۰ روز از طریق تجویز داخل صفاقی برای گربه ماهی روگامی معادل $11/5$ میلی گرم 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 قزل آلا ی رنگین کمان می باشد. در تجویز خوراکی این عدد به ۲۰ برابر افزایش می یابد. از دیگر گونه های ماهی که به مقدار کمتری نسبت به مسمومیت با AFB_1 مقاومت نشان می دهد تیلای نیل است. اگرچه این گونه در مسمومیت های حاد در مقایسه با گربه ماهی پرورشی گونه حساس تری به شمار می رود (Tuan et al. 2002).

Chavaz – Sanchez و همکارانش (۱۹۹۴) گزارش کردند که مقدار ۳۰ میلی گرم AFB_1 به ازای هر کیلوگرم از جیره غذایی تیلای نیل برای این ماهی کشنده محسوب نمی شود. زمانی که جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین ($115/34 \text{ ppb}$) به تیلای نیل به مدت ۱۲۰ روز خوراندن شد، فقط تورم های گرانولوماتوز مزمن در کبد مشاهده گردید بدون اینکه توموری تشکیل شود (Caguan et al. 2004).

مطالعات انجام شده نشان می دهد که تیلای نیل تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ۱۰ میلی گرم AFB_1 به ازای هر کیلوگرم، در طی مدت ۸ هفته به میزان ۹۰ درصد کاهش در نرخ رشد را نشان می دهد در حالیکه این میزان

در گربه ماهی روگامی تغذیه شده با جیره غذایی مشابه حدود ۲۴ درصد گزارش گردیده است. (Jantrarotai & Lovell 1990a, Tuan et al. 2002)
 علاوه مقادیر بالاتر کاهش در هماتوکریت در تیلاپای نیل نسبت به گربه ماهی گزارش شده است (Jantrarotai & Lovell 1990a).
 نتایج بدست آمده از تحقیق انجام شده به منظور دستیابی به تاثیر مقادیر مختلف AFB₁ بر شاخص های رشد در ماهی ازون برون بیانگر مطالب زیر است:

میانگین وزنی :

اختلاف معنی داری بین میانگین وزنی ماهیها در گروههای مختلف در هنگام ذخیره سازی در وانهای مختلف وجود نداشت ($p > 0.05$). در بیومتری های بعدی نیز اختلاف معنی داری بین میانگین وزنی ماهیها در گروههای مختلف در طول یک ماه تغذیه با جیره نگهداری در وانهای مختلف مشاهده نگردید ($p < 0.05$).

ضریب رشد مخصوص (SGR):

چنین بنظر میرسد اختلاف معنی داری بین میزان رشد ویژه در گروههای مختلف در طول دوره تغذیه با جیره حاوی سم در وان های مختلف وجود نداشت ($p \leq 0.05$). ولی تفاوت عملی بین گروهها و به ترتیب مقادیر سم داده شده کاملاً مشهود بود که در یک کار پرورشی با مقیاس بزرگ بر روی تولید ماهیان تاثیر خواهد گذاشت.

ضریب تبدیل غذایی :

اختلاف معنی داری بین ضریب تبدیل غذایی در گروههای مختلف در طول دوره تغذیه با جیره حاوی سم در وان های مختلف وجود نداشت ($p \leq 0.05$). ولی در تحقیقات انجام شده بر روی فیل ماهی در سال ۱۳۸۸ توسط سپهداری و همکاران تاثیر مصرف خوراکی AFB₁ 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 تیمارهای نیز ضریب تبدیل غذایی در مقایسه با تیمار شاهد افزایش یافته است ولی تفاوت موجود معنی دار نبوده است. این اختلاف عملی میتواند در مقیاس های بزرگ پرورشی در میزان تولید تاثیر گذار باشد.

گزارش Chavez – Sanchez و همکاران (۱۹۹۴) حاکی از این مطلب است که تغذیه تیلاپای نیل با مقدار ۱/۸ mg AFB₁ /kg در جیره غذایی در طی مدت ۲۵ روز منجر به کاهش رشد ماهیان می گردد و همچنین اظهار می نماید که میزان ۳۰ mg AFB₁ /kg در جیره برای این گونه کشنده محسوب نمی شود.

در تیلاپای نیل تغذیه شده با ۱۰۰ mg AFB₁ /kg در جیره غذایی برای مدت ۸ هفته افزایش مرگ و میر به چشم می خورد ولی میزان این مرگ و میر با مرگ و میر مشاهده شده در ماهیانی که با ۱۰ mg AFB₁ /kg در جیره

تغذیه شده‌اند تفاوت معنی داری 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 آفاتوکسین B₁ موجود در جیره ارتباط ویژه‌ای وجود ندارد و تا حدی نتایج حاصل در مطالعات اولیه انجام شده در این رابطه را با تردید روبرو می‌سازد.

نرخ رشد و ضریب تبدیل غذایی (FCR) در تیلایپای نیل تغذیه شده با $2/5 \text{ mg AFB}_1 / \text{kg}$ در جیره به شکل معناداری متأثر می‌شود ولی این شاخص‌ها در مواجهه با میزان $0/25 \text{ mg AFB}_1 / \text{kg}$ در جیره تغییر قابل ملاحظه‌ای را نشان نمی‌دهند. (Tuan et al. 2002).

مشاهدات مذکور با نتایج (Chavez – sanchez et al. 1994) در مطالعات انجام شده بر روی تیلایپای نیل مطابقت دارد. در این مطالعات میزان رشد با مقدار $0/94 \text{ mg AFB}_1 / \text{kg}$ آفاتوکسین تغییری نمی‌نماید ولی در تغذیه با جیره حاوی $1/88 \text{ mg AFB}_1 / \text{kg}$ و مقادیر بالاتر در جیره کاهش می‌یابد.

محققان فوق اظهار می‌دارند که میزان FCR با مصرف مقدار $30 \text{ mg AFB}_1 / \text{kg}$ در جیره، در تیلایپای تحت آزمایش، تغییر معنی داری را نشان نمی‌دهد.

تیلایپای نیل در مقایسه با گربه ماهی روگامی، گونه حساس تری در بروز تغییرات در شاخص‌های رشد می‌باشد (Tuan et al. 2002).

در گربه ماهی روگامی تغذیه شده با $2/15 \text{ mg AFB}_1 / \text{kg}$ در جیره غذایی به مدت ۱۰ هفته هیچگونه تغییرات معنی داری در رشد مشاهده نگردید و در تغذیه با میزان $10 \text{ mg AFB}_1 / \text{kg}$ در جیره فقط در ۲۴ درصد از ماهیان تحت آزمایش کاهش رشد مشاهده شد (Jantrarotai & Lovell, 1990).

همانگونه که مشاهده می‌شود عوامل متعددی از جمله: میزان حساسیت گونه ای، مقدار سم، مدت زمان مواجهه با سم، روند متابولیسم سم در گونه های مختلف، سن و حتی شرایط مختلف پرورش و... می‌توانند در چگونگی تاثیر گذاری سم بر روی آبرزی تحت مطالعه موثر باشند. این گوناگونی به همراه اطلاعاتی موجود عملاً عاملی در راستای ایجاد اشکال جهت مقایسه نتایج بدست آمده در مورد گونه های مختلف است. بدیهی است انجام مطالعات تکمیلی و دستیابی به اطلاعات بیشتر، زمینه ساز بحث های شفاف تر در این زمینه خواهد بود.

میزان زنده مانی (Survival rate) :

اختلاف معنی داری بین میزان زنده مانی ماهیان در گروههای مختلف در طول دوره تغذیه با جیره حاوی سم در وان های مختلف مشاهده نگردید ($p < 0.05$) که با تحقیقات انجام شده بر روی فیل ماهی در سال ۱۳۸۸ توسط سپهداری و همکاران همسویی دارد. در مطالعات مذکور میزان زنده مانی ماهیان در تمامی تیمارهای آزمایشی صد درصد بود و هیچگونه تلفاتی مشاهده نگردید. با توجه به میزان وقوع و شدت جراحات پوستی، تغییرات پاتولوژیک مشاهده شده و روند پیشرفت آنها در تیمارهای مختلف و در طول آزمایش و همچنین کاهش نسبی

رشد و افزایش ضریب تبدیل غذایی بخصوص در تیمارهای ۱۰۰ و ۷۵ ppb موضوع عدم وجود تلفات از اهمیت خاصی برخوردار می گردد.

طبعاً وجود و روند بروز ضایعات و تغییرات مشاهده شده در تیمارهای آزمایشی و مقایسه نتایج بدست آمده با تیمارهای شاهد بیانگر تاثیر پذیری تیمارها از مقادیر مختلف سم در جیره های آزمایشی است. در چنین شرایطی پایین بودن تلفات موضوعی است که تحقیقات بیشتری را طلب می نماید. شواهدی از جمله قدمت و تاریخچه زندگی ماهیان خاویاری، طول عمر آنان، مقاومت آنان نسبت به بیماریهای عفونی و... بیانگر سیستم ایمنی قدرتمند و مقاومت بالای این ماهیان است. انجام تحقیقات در موضوعاتی از قبیل تاثیر مقادیر مختلف AFB_1 بر سیستم ایمنی، بررسی روند و چرخه متابولیسم AFB_1 ، بررسی میزان قابلیت اتصال AFB_1 به DNA و مسمومیت های ژنتیکی ناشی از آن، بررسی میزان سرطان زایی و تومورزایی و... از جمله اقداماتی است که می تواند در روشن تر نمودن چگونگی تاثیر AFB_1 در ماهیان خاویاری موثر باشد.

۶-۲- نتیجه گیری

AFB₁ مهمترین توکسین فعال شناخته شده است که قادر به ایجاد مسمومیت‌های کبدی، سرطان‌زایی، ایجاد جهش تومورزایی و تضعیف سیستم ایمنی در آبزیان و حیوانات خاکی می‌باشد. گونه‌های مختلف آبزیان حساسیت‌های متفاوتی را نسبت به ضایعات هپاتوتوکسیک و کارسینوژنیک آفلاتوکسین B₁ از خود نشان می‌دهند. به نظر می‌رسد که این تفاوت‌ها ناشی از تفاوت‌های بین گونه‌ای از نظر راندمان انتقال بیولوژیکی AFB₁ 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 و نیازمند تحقیقات بیشتر می‌باشد. در حال حاضر وجود خلاء اطلاعاتی در ارتباط با اختلاف در میزان حساسیت گونه‌های مختلف آبزیان پرورشی به AFB₁ در کنار تأثیرات AFB₁ 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 و ماهیان خاویاری در ارتباط با مسمومیت‌های ناشی از آفلاتوکسین B₁ در می‌یابیم که مطالعات و تحقیقات بیشتری بایستی در دستور کار قرار گیرد.

پیشنهادها

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 می‌گردد:

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 B₁ در غذاهای مصرفی و متابولیت‌های ناشی از آنان در آبزیان مورد استفاده در تغذیه انسان.

ج) تعیین میزان مسمومیت‌زایی آفلاتوکسین B₁ 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 فراینده جهش‌های ژنتیکی در گونه‌های حساس ماهیان از جمله قزل‌آلای رنگین‌کمان بواسطه مسمومیت با AFB₁، توجه بیشتری را طلب می‌نماید. بعلاوه این موضوع بایستی مورد توجه قرار گیرد که هدف اصلی آبرزی 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 AFB₁ می‌تواند از جایگاه مطالعاتی ویژه‌ای برخوردار باشد.

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

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

طبعاً، رنگ زرد ایجاد شده ناشی از مسمومیت‌های مزمن آفلاتوکسین، B₁، 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 فوق‌الذکر دریچه‌های جدیدی از مشکل مسمومیت با آفلاتوکسین در آبزیان و سلامت انسان را به روی ما باز می‌کند.

متأسفانه نمونه‌های اخذ شده جهت تعیین میزان باقی ماندگی بافتی آفلاتوکسین در لاشه تیمارهای آزمایشی به علت قطع برق دچار تخریب گردید و عملاً امکان انجام ارزیابی‌های مورد نظر در این رابطه فراهم نگردید که توصیه می‌گردد در تحقیقات آتی در دستور کار قرار گیرد.

بررسی مجموع مطالعات انجام شده بیانگر این مطلب است که هنوز نقاط کور بسیاری در رابطه با مسمومیت با آفاتوکسین ها در آبرزی پروری وجود دارد. همچنین شباهت های موجود در واکنش های سرطان زایی بین قزل-آلای رنگین کمان و انسان این موضوع را از دیدگاه بهداشت عمومی از ویژگی خاصی برخوردار می نماید.

تشکر و قدردانی

از کلیه مسئولان مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، مدیران و همکاران پروژه در انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری شهید دامن، مدیران و همکاران پروژه در پژوهشکده اکولوژی دریای مازندران و همکاران و مشاوران ستادی پروژه که بدون مشارکت ایشان اجرای موفق پروژه امکان‌پذیر نبود، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- پورکاظمی، م؛ ۱۳۸۶؛ برنامه راهبردی ماهیان خاویاری؛ موسسه تحقیقات ایران؛ ص ۲-۱۴.
- تاکاشیما وتی؛ ه؛ پوستی، ا؛ ۱۳۷۸؛ اطلس بافت شناسی ماهی (اشکال طبیعی و آسیب شناسی)؛ موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران؛ چاپ اول، صفحات ۳-۱۸۳.
- سپهداری، ابوالفضل؛ حسینعلی، ابراهیم زاده موسوی؛ ۱۳۸۸؛ بررسی کمی و کیفی جراحات های پوستی ناشی از مصرف خوراکی مقادیر مختلف آفلاتوکسین B₁ در فیل ماهی پرورشی (Huso huso)؛ سال هجدهم؛ شماره ۲؛ مجله علمی شیلات ایران، صفحات ۴۳-۵۱.
- کیوان، ا؛ ۱۳۸۲؛ ماهیان خاویاری ایران؛ چاپ اول؛ انتشارات نقش مهر؛ شرکت سهامی شیلات ایران، صفحات ۷-۲۳.
- کیوان، ا؛ ۱۳۸۱، مقدمه ای بر بیوتکنولوژی پرورش ماهیان خاویاری؛ چاپ اول، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان؛ صفحات ۲۳، ۳۱، ۲۲۰، ۲۴۹، ۲۵۰ و ۲۵۱.
- 1-Abd-Allah GA. EI-Fayoumi RI, Smith MJ, Heckmann RA O Neill (1999) A comparative evaluation of aflatoxin B1 genotoxicity in fish models using the Comet assay Mutat Res 446:181-188
- 2- Akbulut, B., Sahin, T., Aksungur, N., and Aksungur, M., 2002. Effect of initial size on growth rate of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, reared in cages on the Turkish Black Sea coast. Turkish journal of fisheries and aquatic sciences 2: pp: 133-1
- 2- "Acipenseriforms" (<http://www.fishbase.org>) summary/orders summary. CFM ? fish Base. Ed. Ranier froese and Daniel panly12 2007 version .N.P.
- 3-Aboobaker VS, .Sarma N.Goswami. UC.Bhattacharya RK. Inhibition of microsomal activation of aflatoxin B1 by 3-dehydroretinol palmitate Indian J Exp Biol 1997; 35:1125-7.
- 4-AsaoT, Bushi G, Abdul Kader MM. Chang GB, Wick. EL, 3-Asap T, Bushi G, Abdul Wogon GN (1963) The structure of aflatoxins B1 and-G1.J Am Soc 882-886.
- 5-Ashley LM, Halver JE (1963) multiple metastasis of rainbow trout hepatoma Trans Am Fish Soc 92:365-371.
- 6- Ashley ,L.M. ; 1970 ; Pathology of fish fed aflatoxins and other antimetabolites in : symposium on diseases of fishes and American fisheries society special publication 5 : 366 – 379.
- 7-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
- 8-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
- 9-Bailey GS. Selivonchick D.Hendricks J(1987) Initiation, promotion. and inhibition of carcinogenesis in rainbow trout Environ Health Persp 71:147-1-53
- 10-Bailey GS, Williams DE, Hendricks JD (1996) Fish models for environmental carcinogenesis the rainbow trout Environ Health Perspect 104:5-21:Review
- 11-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 Salmouid fish. Carcinogenesis 9:1919-1926 .
- 12-Bankole SA, Adebajo A (2003) Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it Afr J Biotech 2:254-263.
- 13- Bemis, L. ; 1997 ; An over view of Acipenser forms .Environmental Biology of fishes 48 : 25 – 71 .
- 17-Bennett TW, Klich M (2003) Mycotoxins. Clin Microbiol Rev16:497- 516
- 14-Blout WP (1961) Turkey "X" disease. Turkeys 52:55- 58,61-77

- 15 -Boonyaratpalin M, Supamattaya K, Verakuupiriya V, Suprasert D (2001). Effects of aflatoxin B1—on growth performance, blood components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimp (*Peuaeus monodon* Fabricius). *Aquacult Res* 32:388-398
- 16- 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
- 17 -Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP (2002) Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Molecul Biol Rev* 66:447-459
- 18 -CAST (1989) Mycotoxins: economic and health risks. CAST Task force report No. 116, Ames, IA.91.
- 19 -CAST. 1989. Mycotoxins: Economic and Health Risks. Council for Agriculture Science and Technology Task Force Report 116. Ames, IA.
- 20- Celik , T.H ; Sarimehmetoglu , B . ; 2005; Aflatoxin M₁ contamination in pasteurised Milk; *Vet* , archive . ; 75 : 57 – 65 .
- 21-CGIAR—Priorities and Strategies for Resource Allocation During 1998-2000; Annex III—Overview of Production Sectors and Commodities. FAO, April 1997
- 22 -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.
- 23- 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 Press New York, pp 1-27
- 24 -Coulombe RA Jr (1993) Symposium: biological action of mycotoxins. *J. Dairy Sci* 76:880-891
- 25-Coulombe RA Jr (1994) Nonhepatic disposition and effects of aflatoxin B1. In: Eaton DL, Groopman JD (eds). *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. Academic Press, San Diego, pp. 89 - 110
- 26-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.
- 27 -D'Mello JPF, MacDonald AMC. (1997) Mycotoxins. *Anim Feed Sci Technol*-69:155-166.
- 28- Deacon ,J.W.; 1997 ; *Modern Mycology* ; third Edition ; black well science : 113, 114, 118, 119 , 120.
- 29-Dettlaff , T.A.; Ginsburg, A.S.;1993; *Sturgeon Fishes* ; springer – verlay:197-214.
- 30-De Vries JW, Trucksess MW, Jackson LS (2002) *Mycotoxins and food safety*, Kluwer Academic/Plenum Publications ,New York, NY
- 31 -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, Loudon, pp 179-206
- 32 -Dutta TK, Das P (2000) Isolation of aflatoxigenic strains of *Aspergillus* and detection of aflatoxins B1 from feeds in India, *Mycopathologia* 151:29-33
- 33 -Eaton DL, Gallagher EP (1994) Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Amin Rev Pharmacol Toxicol* 34:135-172
- 34 -Eaton DL Groopman JD (1994) *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. Academic Press, San Diego, pp 6-8
- 35 -Eaton DL, Gallagher EP, Banunler TK, Kunze KL (1995) Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis implications for human variability in expression and enzyme activity. *Pharmacogenetics* 5:259-274
- 36-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
- 37-Eaton DL, Groopman JD. eds. *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. London: Academic Press, 1993.
- 38-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
- 39-EC (2001) EU, Commission of the European Communities, Facts and figures on the CFP (Common Fisheries Policy)

- 40-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
- 41-Ellis RW, Clements M, Tibbetts A, Winfree R (2000) Reduction of the bioavailability of 20 ingikg aflatoxin in trout feed containing clay. *Aquaculture* 183:179-188
- 42-Eaton DL, Groopman JD (eds) The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary and agricultural significance. Academic Press, San Diego, pp 27-43
- 43- FAO, Web library (2002) www.fao.org/impho/b.library/x0036E.htm.
- 44-FAO (2002) Fishery statistics: commodities, vol 21. FAO, Rome
- 45-Fegan D (2005) Mycotoxins: the hidden menace? <http://www.alltech.com>
- 46-Farabi. S.M.V, M.Yousefian and A.Hajimoradloo (2006). Aflatoxiosis in juvenile *Huso huso* fed a contaminated diet. *J.Appl. Ichthyol.*, 22(Suppl.), 234-234
- 47-Food and Drug Administration. 1994. Sec. 683.100—Action levels for aflatoxins in animal feeds (CPG 7126.33). Internet.
- 48-Gallagher EP, Eaton DL (1995) In vitro biotransformation of aflatoxin B1 in channel catfish liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 132:82-90
- 49 -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
- 50 -Gallagher EP, Sheehy K.M, 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
- 51 -Gallagher EP, Wienkers LC, Kunze KL, Stapleton O, Eaton DL (1994) Role of CYP1A2 and 3A4 in the bioactivation of aflatoxin B1. in human liver microsomes. *Cancer Res* 54:101-108
- 52-Gorelick NJ, Bruce RD, Hoseyni MS (1993) Human risk assessment based on animal data: inconsistencies and alternatives. In: Eaton Groopman JD (eds) The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary: and agricultural significance. Academic Press, London, 508-511
- 53-Groopmann JD and Thomas W Kensler. 1999. CRC Critical Reviews in Toxicology 1999 Chapter 19 113-124.
- 54- 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.
- 55 - 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
- 56 -Guengerich FP (2006) Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J.* 8:101-111
- 57 -Guengerich- FP, Gillam EMJ, Martin MV, Baba T, Kim BR, Shimada T, Raney K.D, 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.
- 58- Gupta, S.R.; Viswanathan; L. and Venkita Subramanian; 1971; A comparative study of Toxicogenic strains of *Aspergillus flavus*; *Journal of General Microbiology*; vol.65:243-27.
- 59-Halver JE (1969) Aflatoxicosis and trout hepatoma. In: Goldblatt LA (ed) Aflatoxin: scientific background, control, and implications. Academic Press, New York, pp 265– 306
- 60 -Hamilton P (1990) Problems with mycotoxin persist, but can be lived with. *Feedstuffs* 62:22-23
- 61 -Hamilton, J. and Russel T. (1992). Effects of water temperature and formulated diet on growth and survival of larval paddlefish pp: 538-543
- 62 -Hamilton P (1990) Problems with mycotoxins persist. but can be lived with. *Feedstuffs* 62:22-23
- 63 -Hardy RW (1989) Diet preparation. In: Halver JE (ed) Fish nutrition. 2nd edn. Academic Press, London
- 64 -Hayes JD, Judah DJ, McLellan LI, Kerr- LA, Peacock SD, Neal GE (1991) Ethoxyquin- induced resistance to aflatoxin B, in the rat is associated with the expression of a novel a-class glutathione S-transferase subunit: Yc2 which possesses high catalytic activity for aflatoxin B, -8,9-epoxide. *Biochem J* 279:385-398
- 65 -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
- 66 -Henry SH, Bosch FX, Troxell TC, Bolger PM.(1999). Reducing liver cancer-global control of aflatoxin. Science;286: 2453-4.
- 67 -Henry SH, Bosch FX, Bowers JC. Aflatoxin, hepatitis and worldwide liver cancer risks . Adv Exp Med Biol 2002;504: 229-33
- 68- Hodgson , E. & smart , R.C. ;2001; Introduction to Biochemical Toxicology; Thrid Edition ; wiley Inter science (A Jhon wily & sons ,Inc., Publication) 506,:270-271.
- 69 -Howard S Ramdell and David L Eaton. 1990. Species susceptibility to Aflatoxin B1 carcinogenesis. Cancer Research. 50 615-620
- 70- <http://www.edis.ifas.ufl.edu/fao95>
- 71- Hung, S.S.O, ; Lutes, P., Cote, F., and Storebakken, T., 1989. Growth and feed efficiency of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) sub-yearling at different feeding rates. Published in *Aquaculture*, Vol. 80, pp.147-153.
- 72- Hung, S. S. O. ; Deng, D. F., 2002: Sturgeon *Acipenser* spp. In Lim, C. and Webster, C.D. (eds). Nutrient requirements and feeding of finfish for Aquaculture. CAB Inter. Pub. Wallingford, UK, 418 pp.
- 73-Hussein HS, Brasel TiVI (2001) Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167:101-134
- 74 -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
- 75 -Jantrarotai W, Lovell RT (1990a) Subchronic oxicity of dietary aflatoxin B1 to channel catfish. *J.Aquat Anim.Health.* 2:248-254
- 76 -Jantrarotai W, Lovell RT, Grizzle JM (1990b) Acute toxicity of aflatoxin B1 to channel catfish. *J Aquat Anim Health* 2:237-247
- 77- 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
- 78- Kelly JD, Eaton DL, Gueugeric FP, Coulombe RJ (1997). Aflatoxin B sub(1) activation in human lung. *Toxicol Appl Pharrnacol* 144:88-95
- 79- 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
- 80-Leadon SA, Tyrrell RIM, Cerutti PA (1981) Excision repair of aflatoxin B1-DNA adducts in human fibroblasts. *Cancer Res* 41:5125-5129
- 81-Leeson S, Diaz GJ, Summers JD (1995) Poultry metabolic disorders and mycotoxins. University Books, Guelph ,Ontario, Canada, pp 249-298
- 82-Lightner DV (1977) Shrimp diseases. hi: Sindermann CJ (eds) Disease diagnosis and control in North American marineaquaculture. Elsevier/North-Holland Publishing Co.. New York. pp 10-77
- 83- Lewis , R.A. ;1998 : Lewis' Dictionary of Toxicology ; by CRC press LLC : 34-35.
- 84 -Lightner DV, Redman RM, Price RL, Wiseman :-M0 (1982) Histopathology o aflatoxicosis in the marine shrimp *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei*. *J Invertebr Pathol* 40:279-291
- 85 -Livingstone DR (1998) The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransforthation by invertebrates and fish *Comp Biochem Physiol Mol Integr Physiol* 120:43-49
- 86-Lovell RT (1984) Use of soybean products in aquaculture diets Animal nutritiony research highlights. American Soybean Association, St. Louis, Mo
- 87 -Lovell RT (1989) Nutrition and feeding of fish. Van Nostrand Reinhold, New York
- 88 -Lovell RT (1992) Mycotoxins: hazardous to farmed fish. *Feed Int* 13:24-28.
- 89- Machida ,M. ; Gomi ,k ; 2010 ; *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics* ; Caister Academic press.
- 90-Madhusudhanan N, Kavithalakshmi SN, Shamnugasundaram ERB, Shanmugasundaram KR (2006) Aflatoxin B 1-induced DNA damage in *labeo rohita*: protective effect of an antioxidant supplement. *Amrita Bindu. Basic Clin Pharm Toxicol* 98:473-479
- 91-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
- 92 -McKean C, Tang L, Billam M, Tang_ M, Theodorakis CW ,Kendall RI, 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
- 93-Miller JD (1995) Fungi and mycotoxins in grain: iMplcations for stored product research. *J Stored*

- Prod Res 31:1-16
- 94 -Montagna MT, Minervini F, Santacroce MP, Napoli Barbuti S (2002) Aflatoxin M1 in dairy products:--a public health-program? Ann Ig 14:1-5
- 95 -Moss MO (1991) The environmental factors controlling mycotoxin formation. In: Smith SE, Anderson RA (eds) Mycotoxins and animal foods. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 37-56
- 96 -Moss MO (1998) Recent studies on mycotoxins. J Appl Microbiol Symp Supplement 84:62-76
- 97 -Murjani G (2003) Chronic aflatoxicosis in fish and its relevance to human health. Central Institute of Freshwater Aquaculture. India
- 98- Naylor RL, Goldberg RJ, Primavera JH, Kautsky N, Beveridge MCM, Clay J., Folke L, Lubchenco J, Mooney H, Yroell M (2000) Effect of aquaculture on world fish supplies Nature 405:1017-1024
- 99 -New MB, Tacon AGJ, Csavas I (eds) (1995) Farm-made aquafeeds. FAO Fisheries Technical Paper No.343. Rome,
- 100-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
- 101-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
- 102-Ostry, V.; Ruprich, J and et al; 2009; occurrence of the toxigenic fungi in food stuffs; Mycotoxin Research: 188- 192.
- 103 -Patterson DS, Galaney EM, Roberts BA (1978) The estimation of AFM1 in milk using 2-dimensional TLC. Food Cosmetic Toxicol 16:49-50
- 104 -Pier AC (1992) Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. J Anim Sci 70:3964-3967. Review
- 105 - Pier AC, Richard JL, Cysewski SJ (1980) Implications of mycotoxins in animal disease. J Am Vet Med Assoc 176:719-724
- 106 -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
- 107 - Puschner B (2002). Mycotoxins. Vet Clin Small, Anim 32:409 -419
- 110 -Ramsdell HS, Eaton DL (1990) Species susceptibility to aflatoxin B1 667) 50:615-620
- 108 -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.
- 109- Rand, G.M.; 1995; Fundamentals of aquatic Toxicology; second Edition; Taylor & Francis publishers: 426.
- 110-Raney VM, Harris TM, Stone MP (1993) DNA-protein adduct formation mediates aflatoxin B1-DNA binding and the formation of guanine N7 adducts by aflatoxin B1 8,9-epoxide. Chem Res Toxicol 6:64-68
- 111 -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
- 112-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
- 113 -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.
- 114-Roberts, R.J.; 2001; Fish pathology; third edition; published by W.B. Saunders; 158.
- 115 -ROC. Report on Carcinogens, 11th ROC (1992) Eleventh Edition: Aflatoxins CAS 11 5 No. 1402-68-2
- 116- Rogers AE. Nutritional modulation of aflatoxin B1 carcinogenesis: dietary and agricultural significance. Loudon: Academic Press. 1993: 17-30.
- 117 -Rodgers A, Vaughan P, Prentice T, Edejer TT, Evans D, Lowe J(2002). Reducing risks, promoting healthy life. In Campanini B, A, eds. The World Health Report. Geneva: World Health Organization, 2002
- 118 -Roebuck BD, Maxuitenko YY (1994). Biochemical mechanisms and biological implications of the toxicity of aflatoxins as related to carcinogenesis.
- 119- Ronyai, A., Peteri A., Radics, F. 1990. Cross breeding of sterlet and Lena River's sturgeon. Aquaculture, Vol. 6, pp.13-18.
- 120 -Royer JD, Yanong RPE (2002) Molds in fish and aflatoxicosis (<http://edis.ifas.ufl.edu/FA095>)
- 121-RuizPerez A, PaaschMartinez L, AdamePaasch P, Rosiles-Martinez R (1984) 20 Hepatic neoplasia in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) bred in El Zarco Fish Hatchery, Federal District. Veterinaria (Mex) 15:255-261

- 122-Russell L. Cox DF. Larsen G.nBodwells K, Nelson CE (1991) Incidence of molds and mycotoxins in commercial animal feed mills in seven Midwestern states. *J Anim Sci* 69:5-12
- 123- Rustom IYS (1997) Aflatoxin in food and feed: Occurrence , legislation an inactivation by physical methods. *Food Chem* 59:57-67
- 124 - Sahoo PK. Muldtedee 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
- 125 - 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 .
- 126-Shantha, T.; 2000 ; Fungal degradation of Aflatoxin B₁ ; *Natural Toxins*; Vol.7:175 – 178.
- 127-Sahoo ,P.K. . ; Mukherjee, S.C ; 2002; *Aquaculture Nutrition* ; Vol.8:159-165.
- 128 -Sargeaut K, Carraghan RB, Allcroft R (1963)-Toxic products in groundnuts Chemistry and origin origin of aflatoxius . *Chem hid (LonclOn)* pp 53-55
- 129-Schoental R (1967) Aflatoxins. *Ann Reve Pharnia6OL* 7:343
- 130-Scottish Executive Report (2002) Scottish EXedUti'Ve'Report on Environmental Impacts of Aquaculture, the Scottish Association for Marine Science and Napier University Scottish Executive Central Research Unit, Edinburgh
- 131-Sharma RP, Saluukhe DK (eds) (1991) *Mycotoxins aud phytotoxins*. CRC Press Boca Raton, FL
- 132- Singllton , P. ; 2008 ; *Dictionary of DNA & Genome Technology*; First Edition ; Blak well publishing.
- 133 -Sinuhuber 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
- 134- Sinnhuber RO, Wales JH, Ayres IL, Engebrecht RH. Amend DL (1968) Dietary factors and hepatoma in rainbow trout(*Salmo gairdri en*). 1. Aflatoxins in vegetable protein feedstuffs. *J Natl Cancer Inst* 41:711-718
- 135 -Smith RB. Griffin JM, Hamilton PB (1976) Survey of aflatoxicosis in farm animals. *Appl Environ Microbiol* 31:385-388
- 136- Steyn PS (1995) Mycotoxins. general view. chemistry and structure. *Toxicol Lett* 82/83:843-851
- 137 -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 Alltechs 21st Annual Symposium. Lexington. Kentucky, USA, 22-25 May 2005
- 138 -Stegeman JJ (1989) Cytochrome P450 forms in fish: catalytic ,immunological and sequence similarities. *Xenobiotica* 19:1093-1110
- 139-Stegeman JJ, Lech JJ (1991) Cytochrome P450 momooxygeuase systems in aquatic species: carcinogen metabolismaud biomarkers. for carcinogen and pollutant exposure *Environ Health Perspect* 90:101-109
- 140-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
- 141-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
- 142 -Tacon AGJ. Phillips KJ, Barg UC (1995) *Aquacultur. Food and the environment: the Asian experience*. *Water Sci Technol* 31:41-59
- 143 -Takahashi Y. Nakatsuru Y. Zhang S (2002) Enhanced spohtaneous and aflatoxin induced liver tumorigenesis in xeroderma pigmentosu in group A gene-deficient mice *Carcinogenesis* 23:627-633
- 144- Tilton SC, Gerwick LG, Hendricks ID, Rosato CS. Corley-Smith G. Givan SA. Bailey GS, Bayne CZ Williams DE (2005) Use of a Rainbow Trout oligonucleotide microarray to determine transcriptional patterns in Aflatoxin B1 induced hepatocellular carcinoma compared to adjacent liver. *Toxicol Sci* 88:319-330
- 145 -Tsai HW (1996) Evaluation of zebrafish (*Brachydanio rerio*) as a model for carcinogenesis. Ph.D. dissertation. Oregon State University. Corvallis
- 146- 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
- 147 -Tuan NA. Grizzle JM, Lovell RT, Manning BB. Rottinghaus GE (2002) Growth and hepatic lesions of Nile tilapia(*Oreochromis aloticus*) fed diets containing aflatoxin B1 .*Aquaculture* 212:311-319

- 148 -Tulayakul P, Sakuda S, Doug KS, Kumagai S (2005) Comparative activities of f glutathione-S-transferase and dialdehyde reductase toward aflatoxin B1 in livers of experimental and farm animals. *Toxicon* 46:204-209
- 149-Weidenborner M (2001) *Encyclopedia of food Mycotoxins*. Springer Publisher, Berlin.
- 150 -Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles J-K, Jolly CM, Aggarwal D (2004) Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Rev ArtickAm J Clin Nutr* 80:1106-1122
- 151 -Wiseman MO., Price RL, Lightner DV, Williams RR (1982) Toxicity of Aflatoxin B1 to Penaeid shrimp. *Appl Environ Microbiol* 44:1479-1481
- 152 -Wogan GN (1992) Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma humans. *Cancer Res* 52:2114-2118
- 153 - Wogan GN, Newberne PM (1967) Dose—response characteristics of aflatoxin B1 carcinogenesis in rats. *Cancer Res* 27:2370-2376
- 154-Wunder W, Korn H (1982) Aflatoxin cancer hepatomas in the liver of the rainbow trout *Salmo irideus*. *Zool Beitr* 28:99 -109
- 155- Yang YH, Miranda CL, Henderson MC, Wang-Buhler JL, Buhler DR (2000) Heterologous expression of CYP2K1 and identification of the expressed protein (BVCYP2K1) as lauric acid (α -1)-hydroxylase and Aflatoxin B1 exoepoxidase. *Drug Metab Disposition* 1279-1283

فصل ۳

بررسی تأثیر آفلاتوکسین B₁ بر فاکتورهای خونی، تغییرات بافتی،
میزان باقیمانده بافتی، رشد و بازماندگی
میگوی سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*)

چکیده

در میگوهای پرورشی کشور موارد متعددی از علائم بالینی مشابه مسمومیت‌های مزمن با آفلاتوکسینها گزارش شده است. در این تحقیق اثرات مقادیر ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb آفلاتوکسین B₁ خالص افزوده شده به جیره غذایی، بر شاخصهای رشد، درصد بازماندگی، میزان باقیمانده آن در عضله و سر - سینه میگو، آسیب های بافتی هپاتوپانکراس، روده و عضله، همچنین تغییرات فاکتورهای خونی در میگوهای پرورشی سفید هندی جوان با میانگین وزنی $11/79 \pm 1/76$ گرم پس از ۴ و ۸ هفته مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسیها در تیمارهای آزمایشی نشان داد پس از ۸ هفته تغذیه میگوها با مقادیر ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ ppb آفلاتوکسین B₁، بر میزان رشد نهایی آنها تاثیر ندارد ولی با افزایش مقادیر آفلاتوکسین B₁ در جیره‌ها، میزان رشد کاهش می یابد و همبستگی (r) منفی با وزن نهایی برابر با $0/312 (-)$ وجود دارد. در پایان هفته هشتم، درصد بازماندگی، تعداد کل هموسیتها، مقدار پروتئین تام سرم خون با مقادیر آفلاتوکسین B₁ جیره دارای همبستگی (r) منفی به ترتیب $0/649 (-)$ ، $0/237 (-)$ ، $0/603 (-)$ بود. آسیبهای بافتی شامل تغییرات دژنراتیو و آتروفی سلولهای ترشحی و پوششی توبولها و نکروز بافتی هپاتوپانکراس، جدا شدن دستجات عضلانی از یکدیگر در بافت عضله، نکروزه و کنده شدن مخاط روده با شدت های مختلف در میگوهای تغذیه شده با مقادیر مختلف آفلاتوکسین B₁ بود. در تیمارهای ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ ppb، یک ماه پس از تغذیه با جیره فاقد آفلاتوکسین B₁، بهبودی و طبیعی شدن اکثر شاخصها پدیدار گشت ولی در تیمارهای ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb قرمزی رنگ میگوها و کاهش قوام هپاتوپانکراس تا پایان هفته دوازدهم همچنان وجود داشت. در پایان هفته هشتم، بیشترین میزان باقیمانده آفلاتوکسین B₁ در عضلات میگوها در تیمار ۱۰۰ ppb مشاهده شد که مقدار آن $1/55$ ppb بود ولی در سر و سینه حداکثر مقدار تجمع آفلاتوکسین B₁ در تیمار ۱۶۰۰ ppb و به مقدار $7/1$ تعیین گردید. از منظر بهداشت عمومی، مقادیر مذکور کمتر از حد مجاز آفلاتوکسین ها در مواد خوراکی با مصرف انسانی قرار دارند.

لغات کلیدی: قارچ، مایکوتوکسین، آفلاتوکسین، میگو، آسیبهای بافتی، باقیمانده بافتی، شاخصهای خونی

۳-۱- کلیات

۳-۱-۱- مقدمه

با توجه به خصوصیات زیستی میگو، امکان تکثیر و پرورش آن در مناطقی وجود دارد که شرایط آب و هوایی از نظر رطوبت و دما برای رشد گونه های آسپرژیلوس تولید کننده آفلاتوکسین نظیر آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس، بسیار مطلوب می باشد (۸). با توجه به مشکلات این صنعت در ایران از جمله دور بودن اکثر مزارع از مناطق شهری و عدم دسترسی به برق جهت احداث سردخانه، مواد غذایی مورد استفاده برای تغذیه میگوهای پرورشی، در شرایطی نگهداری و انبار می شوند که برای رشد قارچ های توکسین زا مناسب بوده و امکان مسمومیت های مزمن و بروز علایمی همچون کاهش میزان رشد، کاهش شاخص های سلامتی، افزایش ضایعات بافتی در آبشش و هیپاتوپانکراس و در نتیجه کاهش تولید وجود دارد. آفلاتوکسین ها از مهمترین سموم طبیعی محسوب می شوند و مطالعات بسیار گسترده ای بر روی آنها بویژه آفلاتوکسین B1 و متابولیت های آن، در انسان و حیوانات انجام شده است. مهمترین عاملی که موجب توجه ویژه پژوهشگران به این توکسین و متابولیت های آن شده است، سمیت حاد و مزمن و همچنین سرطان زایی آنها در انسان و حیوانات است. آلودگی به مایکوتوکسین ها از مشکلات موجود در صنعت تولید غذای دام و تهیه مواد اولیه لازم برای این صنعت، به ویژه در مناطق گرم و مرطوب است.

از عوامل مؤثر در بروز مسمومیت با آفلاتوکسینها می توان به عواملی مانند گونه میگوی پرورشی، دما، رطوبت و شرایط نگهداری مواد غذایی، میزان آفلاتوکسین موجود در جیره، فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب استخرهای پرورش میگو و سایر شاخص های مدیریت استخرها نام برد. یکی از تاثیرات اثبات شده آفلاتوکسین، تاثیر بر شاخص های سلامتی آبزیان، تعداد هموسیت کل (THC) و میزان پروتئین پلاسما کل (TPP) می باشد. این دو، شاخص مناسبی جهت ارزیابی کمی وضعیت سلامتی میگوها می باشند. علاوه بر این تأثیرپذیری بافت خونساز می تواند بر توانایی سیستم ایمنی میگو در مواجهه با عوامل بیماریزا مؤثر باشد (۸). بسیاری از سموم قارچی مهم، نسبت به حرارت مقاوم هستند، در نتیجه در اثر حرارت وارده هنگام تهیه پلت و یا سایر روشهای تهیه خوراک، خاصیت سمی خود را از دست نمی دهند. ذرت، جو، پودر ماهی و غیره، هنگام حمل، نگهداری و توزیع به سموم قارچی آلوده می شوند (۷). متأسفانه با قرار گرفتن بنادر مهم وارداتی کشور ما در مناطق گرم و مرطوب احتمال آلوده شده این مواد غذایی به قارچ های توکسین زا، چند برابر می شوند.

امروزه با توجه به هزینه های بالای انجام شده جهت تأمین خوراک دام، طیور و آبزیان انتظار می رود که این حیوانات با تولیدات خود پاسخگوی هزینه های مصرفی باشند. مواد اولیه ای که جهت تهیه جیره غذایی این حیوانات از منابع و مکان های مختلف تأمین می گردد، امکان انتقال آلودگی و مشکلات مختلفی را به همراه دارد که با مدیریت صحیح باید این مشکلات را به حداقل ممکن رسانید. در اغلب موارد حیوانات جوان نسبت به حیوانات مسن تر، حساسیت بیشتری به سموم قارچی نشان می دهند. با توجه به این نکته که ممکن است سموم

قارچی به میزان قابل توجهی در مواد غذایی انبار شده تولید گردد، از این رو حیوانات پرورشی در صورت مصرف این غذاهای آلوده در معرض ابتلا به مسمومیت‌های قارچی قرار خواهند گرفت .. مشکلات ناشی از مایکوتوکسین‌ها یک مشکل جهانی محسوب می شود و بر اساس آمار سازمان کشاورزی و غذای ملل متحد (FAO) در حدود یک چهارم از دانه های زراعی جهان به مایکوتوکسین‌ها آلوده هستند. تاکنون بیش از ۵۰۰ نوع مختلف از سموم قارچی شناسایی شده که با توجه به ساختارهای غیر مشابه و اثرات نامطلوب و متفاوت آنها بر روی بافت ها و اندامهای مختلف بدن، حساسیت موضوع و اهمیت مبارزه با آنها آشکار می شود. اهمیت یافتن مایکوتوکسین در دامپروری و آبی‌پروری به اوایل ۱۹۶۰ با شیوع آفاتوکسیکوزیس در بوقلمون های جوان در بریتانیا و محل تخم ریزی ماهی قزل آالی رنگین کمان پرورشی در ایالات متحده باز می گردد. در هر دو مورد منشاء بروز علائم بالینی، غذای آلوده (کنجاله بادام زمینی برای بوقلمون و کنجاله پنبه دانه برای ماهی قزل آالی رنگین کمان) به آفاتوکسین تشخیص داده شد (۶۸).

مایکوتوکسین‌ها متابولیت های ثانویه ای هستند که از چهار مسیر متفاوت توسط میکرومایست‌ها تولید می شوند. قارچ ها توانایی تبدیل مواد گیاهی (دی کومارین) به کومسترول را دارند. متابولیت‌های ایجاد شده بر حسب سوش تولید کننده، ترکیبات اولیه و شرایط محیط متفاوت خواهد بود. برخلاف متابولیت‌های اولیه که در تمامی متابولیت های قارچی مشابه بوده و در مسیرهای عمومی متابولیکی در سنتز و کاتابولیسم هیدرات کربن، چربی و پروتئین ها شرکت می کنند، متابولیت‌های ثانویه ممکن است که مختص یک گونه و حتی یک سوش خاص باشند (۱۸).

۲-۱-۳- توکسیکو کینتیک آفاتوکسین‌ها

جذب از طریق انتشار غیرفعال در روده انجام می‌شود. آفاتوکسین B_1 با وزن مولکولی کم و خواص لیپوفیلیک به سرعت و بطور کامل جذب می‌گردد. خاصیت لیپوفیلیک AFB_1 از آفاتوکسین G_1 بیشتر بوده و این قابلیت در جذب بیشتر AFB_1 مؤثر است زیرا این قابلیت موجب می‌شود AFB_1 با آلبومین و دیگر پروتئین‌های موجود در جریان خون به صورت برگشت پذیر اتصال یافته و تعادلی بین مولکول‌های اتصال یافته و غیر متصل برقرار شود. آفاتوکسین B_1 آزاد، از طریق رگ‌های خونی به درون بافت‌ها انتشار می‌یابد. در مطالعات انجام شده بر روی طیف وسیعی از موجودات، مشخص شده است که AFB_1 بیشتر در کبد، کلیه، مغز استخوان و ریه‌ها و به میزان کمتری در مغز، عضلات و چربی بدن ذخیره می‌شود. در اغلب بررسی‌های انجام شده بیشترین میزان ذخیره شدن توکسین در کبد مشاهده شده است. آفاتوکسین‌ها در بافت‌ها ذخیره شده و مصرف طولانی مدت آنها ممکن است اثرات زیانباری بر بافت‌های مختلف بدن وارد نماید (۶۸).

تغییر شکل زیستی^{۴۰} آفلاتوکسین‌ها در کبد، کلیه و روده انجام می‌شود. بخش‌هایی از آفلاتوکسین‌ها به متابولیت‌هایی تبدیل شده که به مولکول‌های درشت سلول‌های حیاتی متصل شده و همین فاکتور است که میزان سمیت و سرطان‌زایی را تعیین می‌کند. آفلاتوکسین B₁ توانایی اتصال به DNA، RNA و پروتئین‌ها را دارد و آسیب‌های جدی به عملکرد طبیعی سلول وارد می‌کنند. طی فرآیند تغییر شکل زیستی، آفلاتوکسین‌ها به ترکیبات قطبی‌تری تبدیل می‌شوند که قادر به کونژوگه شدن و ایجاد ترکیباتی با سمیت کمتر و قابلیت دفع بیشتر می‌باشند (۵۶).

۳-۱-۳- مکانسیم اثر

متابولیت‌های فعال به ویژه اپوکسید AFB₁ با اجزای سلولی از جمله اسیدهای نوکلئیک، ارگانل‌های سلولی و پروتئین‌های شرکت کننده در فرآیندهای انابولیک و کاتابولیک اتصال یافته و علاوه بر اختلال در عملکردهای معمول سلول موجب سرطان‌زایی، سرکوب سیستم ایمنی، جهش‌زایی و ناقص‌الخلقه‌زایی می‌شوند (۵۶).

در موارد وقوع مسمومیت طبیعی ناشی از آفلاتوکسین‌ها، تعیین دوز مصرفی، به دلیل مشخص نبودن میزان جیره مصرف شده، میزان توکسین موجود در جیره و مدت زمان دقیق مصرف، با مشکلاتی همراه است. معمولاً در برخورد با بیماری، منبع غذایی مشکوک به آلودگی موجود نبوده و علاوه بر این فاکتورهای دیگری نیز در بروز علائم بالینی دخالت دارند. از این رو در گزارش‌های موردی، باید اطلاعات مربوط به دوز سم و مدت زمان مواجهه با سم، که براساس شواهد موجود محاسبه می‌شود را با احتیاط بیان کرد. میزان تغذیه حیوانات، کیفیت جیره غذایی و آلودگی جیره با سایر توکسین‌های قارچی و غیرقارچی در شدت بروز علائم بالینی مؤثر است. جیره‌های غذایی با پروتئین کم، مسمومیت کبدی و نکروز را تشدید می‌کنند گرچه ممکن است کبد را از بروز کارسینومای سلول‌های کبدی حفاظت نمایند. در صورتی که جیره واجد فقر پروتئینی باشد، ضایعات کبدی شدیدتر است. در بسیاری از مطالعات مشخص شده است که افزودن مقادیر اندکی از اسیدهای آمینه‌ای همچون آرژنین و لیزین به جیره غذایی، موجب افزایش حساسیت میزبان به AFB₁ می‌شود (۵۶). در مطالعات دیگر مشخص شده است که کاهش کولین و متیونین در جیره غذایی، با افزایش سرطان‌زایی کبد و کمتر شدن زمان تشکیل اولین تومور کبدی همراه است (۵۶). وجود ویتامین A و کاروتن، متابولیسم AFB₁ را اصلاح کرده و سمیت آن را کاهش می‌دهد ولی در کمبود ویتامین A، ترمیم DNA آسیب دیده نیز ممکن است با مشکل مواجه شود (۶۸). اگر چه کمبود ویتامین A، زمان تشکیل تومور را کاهش می‌دهد ولی در سرطان‌زایی بی‌تأثیر شناخته شده است. بررسی‌ها نشان می‌دهد که استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در جیره غذایی، سمیت AFB₁ را کاهش داده و ترمیم یافتن ارگانل‌ها و DNA آسیب دیده را سرعت می‌بخشد (۵۶).

⁴⁰Biotransformation

۴-۱-۳- علایم بالینی در آزیان

لیا و در سال ۱۹۷۷ تغییر رنگ قرمز یا بیماری قرمز (red disease) را برای اولین بار در میگوهای پرورشی ببری سیاه^{۴۱} در تایلند گزارش کرد. او این بیماری را تحت حاد یا مزمن توصیف کرد و اعلام نمود که این بیماری با عوامل اتیولوژیک عفونی مرتبط نبوده و آن را با تغذیه کردن میگوها از جیره های کنسانتره مربوط دانست. این بیماری در میگوهای وحشی بالغ ببری سیاه و همچنین در میگوهای جوان و بالغ این گونه در مزارع پرورش میگوی فیلیپین و پس از آن در مزارع پرورش *Penaeus stylirostris* در هاوایی توسط لیا و گزارش گردید (۵۱). در ضایعات تیپیک بافت شناسی این بیماری، آتروفی و نکروز در هیاتوپانکراس به همراه پاسخ التهابی سلولی شدید در این اندام توصیف گردید. اگرچه تاکنون عامل اتیولوژیک معین برای این بیماری تعیین نشده است ولی با توجه به شباهت بافتی ایجاد شده در این بیماری با ضایعات ناشی از تغذیه کردن میگوها با جیره حاوی AFB₁ (آفاتوکسیکوزیس) اعتقاد بر این است که مصرف غذاهای حاوی AFB₁ عامل ایجاد این بیماری است (۵۳).

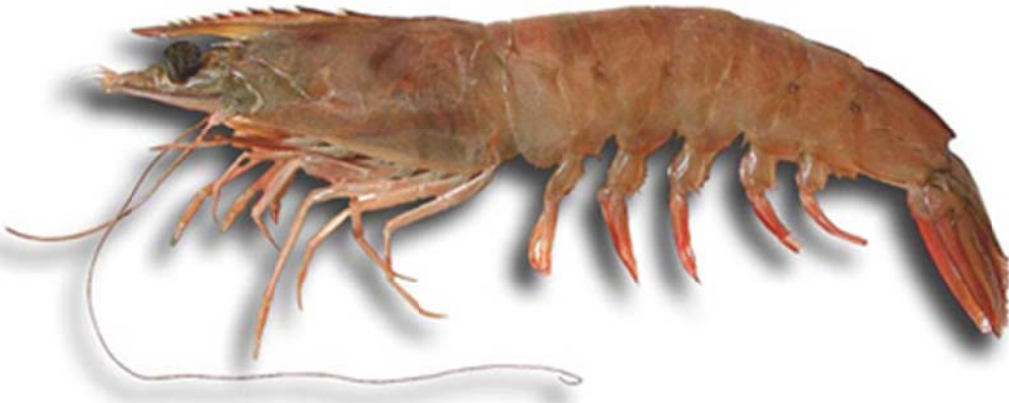
۲-۳- پرورش میگو در ایران

۱-۲-۳- مطالعات اولیه

پرورش میگو در استان بوشهر

استان بوشهر با در اختیار داشتن حدوداً ۶۰ درصد از اراضی زیر کشت میگو در کشور و همچنین تولید ۶۴ درصد از میگوی پرورشی کشور، بعنوان پیشتاز و قطب صنعت تکثیر و پرورش میگو در کشور شناخته می شود. تحقیقات پیرامون امکان تکثیر و پرورش میگو برای اولین بار در کشور سال ۱۳۶۳ در بوشهر و در پژوهشکده میگوی کشور با تخم کشی از میگوی ببری سبز آغاز گردید. در سال ۱۳۷۴ برای نخستین بار میگوی پرورشی در منطقه حله بوشهر توسط بخش غیر دولتی به مرحله تولید انبوه رسید تولید میگو از سال سوم پرورش میگو در استان، سیر صعودی نشان داد بطوریکه که در سال ۷۸ از مرز هزار تن فراتر رفت. این موفقیت را باید مدیون دانش و تجربه تکثیر کنندگان، پرورش دهندگان و کارشناسان دانست (۷۷). از سال ۱۳۷۷ تا سال ۱۳۸۴ تنها گونه مورد استفاده در این صنعت، میگوی سفید هندی (تصویر ۱) بود. و از سال ۱۳۸۵ و پس از همه گیری بیماری لکه سفید (۱)، میگوی سفید غربی، که واجد مقاومت نسبی به این بیماری بود، نیز توسط مؤسسه تحقیقات شیلات ایران و پژوهشکده میگوی کشور به صنعت میگوی کشور معرفی گردید (۷۷).

⁴¹*Penaeus monodon*



تصویر ۱: میگوی سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*, H. Milne Edwards, 1837)

۳-۳- مواد و روش کار

۳-۳-۱- میگوهای مورد استفاده در مطالعه

در این مطالعه ۲۰۰۰ عدد میگوی سفید هندی ۱۰-۱۱ گرمی از مزارع پرورش میگوی تیاب در استان هرمزگان به ایستگاه تحقیقاتی بندرگاه در استان بوشهر انتقال یافت و به مدت ۲ هفته به منظور آدپتاسیون و استرس زدایی در تانک های ۴ متر مکعبی نگهداری شدند.



تصویر ۲: جمع آوری میگوهای سفید هندی از استخرهای پرورشی در استان هرمزگان به کمک تور پرتابی

جدول ۱: الگوی تیمار بندی جهت بررسی تاثیرات تغذیه میگوهای سفید هندی جوان با جیره های حاوی مقادیر مختلفی از آفاتوکسین B₁ به مدت ۸ هفته.

ردیف	تغذیه با غذای حاوی آفاتوکسین B ₁ (µg/Kg, ppb)	تعداد
۱	۰ (شاهد)	۳×۳۲
۲	۲۰	۳×۳۲
۳	۵۰	۳×۳۲
۴	۱۰۰	۳×۳۲
۵	۲۰۰	۳×۳۲
۶	۴۰۰	۳×۳۲
۷	۸۰۰	۳×۳۲
۸	۱۶۰۰	۳×۳۲

از این میگوها برای انجام تمامی تیمارهای این پروژه استفاده شد. در تمامی تیمارها، میگوهای مورد مطالعه، در تانک های ۳۰۰ لیتری حاوی ۱۵۰ لیتر آب دریا، نگهداری شدند (جدول ۱). در طول دوره تیمار بندی، فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی شامل دما، شوری، pH و اکسیژن محلول بطور روزانه اندازه گیری و ثبت گردید. میگوها پس از استرس زدایی و بصورت تصادفی در تانک های ۳۰۰ لیتری توزیع شدند.

۲-۳-۳- تهیه جیره های حاوی مقادیر مورد نظر از آفاتوکسین B₁

برای تهیه جیره های غذایی در ابتدا غذای کنسانتره تجاری خریداری شده از شرکت تولید غذای آبیان پرورشی هووراش به کمک دستگاه های آسیاب پودر شد و با استفاده از الک های ۴۰۰ میکرونی الک شدند. به دنبال آن، آفاتوکسین B₁ کریستالی تهیه شده از شرکت Sigma (A-6636) در اتانل ۹۶ درصد حل شد. برای حل شدن کامل کریستال های موجود در ویال ها، این کار باید با دقت، به آرامی و به کمک یک دستگاه شیکر مناسب انجام شود. پس از محاسبه میزان جیره مورد نیاز هر کدام از تیمار براساس وزن میگوهای هر تیمار و مدت زمان مورد مطالعه (جدول ۳، تصویر ۳)، مقادیر مورد نظر از محلول آفاتوکسین B₁ تهیه شده بر روی غذای کنسانتره پودر شده اسپری شد و همزمان با این کار به کمک یک دستگاه همزن برقی کوچک به آرامی یکنواخت می شود. این بخش از فرآیند تهیه جیره بسیار مهم است زیرا باید محلول آفاتوکسین B₁ باید به آرامی و یکنواخت بر روی غذای پودر شده اسپری شده و هم زده شود تا غلظت نهایی موجود در جیره تهیه شده یکنواخت باشد. در نهایت خمیر حاصل با محتوای تقریبی ۳۰ درصد رطوبت توسط یک دستگاه چرخ گوشت، به صورت رشته ای درآمد و به مدت ۶ ساعت در سینی های استیل و درون آون °C ۶۰ خشک شد.



تصویر ۳- تهیه محلول‌های آفلاتوکسین B₁ با غلظت‌های مورد نظر برای اسپری کردن بر روی غذای کنسانتره میگو

جیره‌های تهیه شده با توجه به اندازه مناسب پلت برای میگوهای مورد مطالعه (جدول ۳). به قطعات کوچک تر خرد گردید و درون کیسه‌های پلاستیکی در یخچال و دمای ۴ °C تا زمان استفاده نگهداری شد (تصویر ۴-تصویر ۴).

جدول ۳- میزان جیره مورد استفاده در تغذیه میگوها در طول دوره مطالعه بر حسب وزن بدن (Clifford 1992).

وزن بدن میگو (g)	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸
در صد وزن بدن (%)	۳.۹	۳.۶	۳.۳	۳.۰	۲.۸	۲.۶	۲.۵	۲.۳	۲.۲	۲.۱	۲.۰	۲.۰	۱.۹



تصویر ۴-- تهیه جیره‌های حاوی مقادیر مختلف آفلاتوکسین B₁ جهت تغذیه میگوهای جوان سفید هندی

۳-۳-۳- تعیین مقدار نهایی AFB₁ موجود در جیره‌های تهیه شده

برای تعیین غلظت نهایی آفاتوکسین B₁ نهایی موجود در جیره های غذایی تهیه شده، از تمامی جیره‌ها، نمونه برداری شد و نمونه های جمع آوری شده در ظروف استریل درب دار به آزمایشگاه فاروق در تهران منتقل گردید (تصویر ۴). پس از تأیید آزمایشگاه مبنی بر اینکه جیره های غذایی تهیه شده دارای غلظت‌های مورد نظر از AFB₁ هستند از این جیره ها برای تیمار بندی و تغذیه میگوها استفاده شد (جدول ۳).

جدول ۳- میزان نهایی آفاتوکسین B₁ موجود در جیره های غذایی تهیه شده

برای تغذیه میگوهای سفید هندی جوان

میزان AFB ₁ موجود در جیره (ppb)		تیمارها	
۰	۲۰	۵۰	۱۰۰
۲۰۰	۴۲۵	۲۱۲	۴۲۵
۷۹۳	۱۳۸۰	۲۰	۴۲۵
۲۰۰	۲۰۰	۲۰	۴۲۵



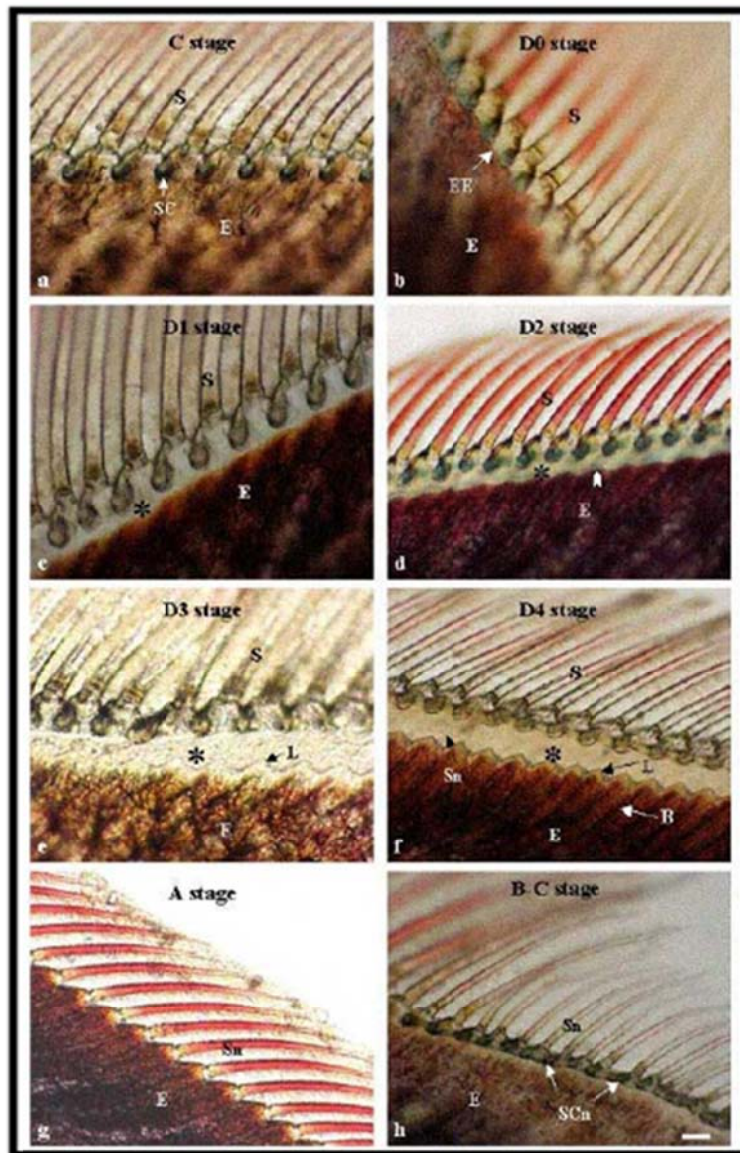
تصویر ۴- نمونه برداری از جیره‌های غذایی حاوی آفاتوکسین B₁

برای تعیین میزان نهایی این توکسین در جیره‌ها

۳-۳-۴- بررسی تأثیر تغذیه با جیره های حاوی مقادیر مختلف AFB₁ بر میزان رشد میگوهای سفید هندی

میگوهای سفید هندی پس از استرس زدایی بصورت تصادفی در تانک های ۳۰۰ لیتری پلاستیکی و گرد که از قبل در ایستگاه تحقیقاتی بندرگاه آماده شده بود انتقال یافتند. میگوهای هر تکرار بطور جداگانه و هر دو هفته یکبار مورد زیست سنجی قرار گرفتند. برای زیست سنجی تمامی میگوهای هر تکرار زیست سنجی شد. برای

اینکه استرس ناشی از زیست سنجی اختلالی در اندازه گیری شاخص های سلامتی و فعالی فاگوسیتی ایجاد نکند، زیست سنجی پس از نمونه گیری همولمف انجام می گرفت. با توجه به تغییرات فیزیولوژیک در هنگام پوست اندازی و تأثیرپذیری سیستم ایمنی از این تغییرات، در این بخش از مطالعه، میگوهای که در مرحله بین دو پوست اندازی، مرحله C، بودند طبق روش Promwikorn و همکاران، (۲۰۰۴) مورد نمونه گیری همولمف قرار می گرفتند (۶۹).



تصویر ۵: کلید شناسایی تصویری مراحل پوست اندازی میگوهای پنائیده

۵-۳-۳- بررسی تأثیر تغذیه با جیره های حاوی مقادیر مختلف AFB_1 بر شاخص های سلامتی (THC & TPP) تعیین تعداد هموسیت کل (THC)

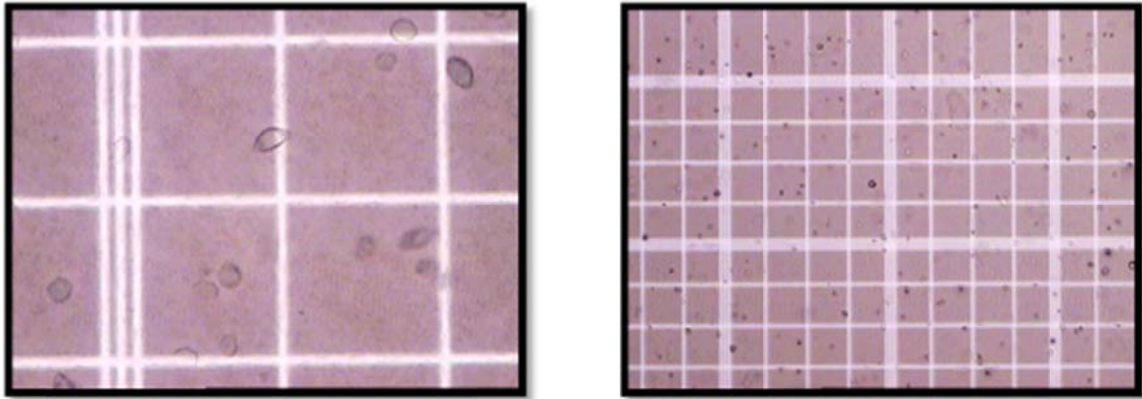
برای تعیین تعداد هموسیت کل (THC) و پروتئین پلاسما کل، همولف، از سطح شکمی و از زیر آخرین پای شنا آسپیره شد. برای این منظور از سرنگ 1 ml که حاوی 0.4 ml ماده ضد انعقاد (محلول Alsever) با دمای 4 درجه سانتیگراد و pH 7/2 می باشد (تصویر تصویر ۶) استفاده گردید (۴۰). پس از نمونه برداری محتویات سرنگ به لوله های اپندورف استریل مخصوص سانتریفیوژ که از قبل حاوی 0.4 ml ضد انعقاد می باشد انتقال یافت و برای هر میگو دو اسمیر از هر نمونه همولف آسپیره شده تهیه شد و در مجاورت هوا خشک گردید. همولف باقی مانده در اپندورف ها تا ۱ ساعت پس از نمونه برداری در یخ قابل نگهداری می باشد.



تصویر ۶- آسپیراسیون همولف از سینوس شکمی به کمک سرنگ 1 میلی لیتری حاوی محلول ضد انعقاد



تصویر ۷- محلول ها و معرف های مورد استفاده برای تهیه ضد انعقاد و رنگ آمیزی اسلایدهای همولف



تصویر ۸- نمای قابل مشاهده از هموسیت‌های میگوی سفید هندی بر روی لام هموسیتومتر توسط میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰× (سمت راست) و ۴۰× (سمت چپ).

اندازه‌گیری میزان کل پروتئین پلازما (TPP)

برای اندازه‌گیری TPP نیز از روش لوری استفاده شد (۵۷). این روش بر اساس تبدیل Cu^{2+} به Cu^+ در شرایط قلیایی و واکنش مس قلیایی با پروتئین‌ها و احیای فسفومولیدات (معرف فولین) توسط تیروزین و تریپتوفان پروتئین‌ها استوار می‌باشد. در اثر ایجاد کمپلکس پروتئین‌ها با معرف فولین (ترکیبات آن عبارتند از: تنگستات سدیم و مولیدات سدیم در اسیدفسفریک و اسید کلریدریک) رنگ آبی ایجاد می‌شود (تصویر ۹) که شدت رنگ حاصله به مقدار اسید آمینه‌های حلقوی فوق‌بستگی دارد. سپس با استفاده از اسپکتروفوتومتر، میزان جذب نوری نمونه‌ها اندازه‌گیری و با منحنی استاندارد مقایسه شده و میزان پروتئین محلول نمونه تعیین می‌شود.

محلول‌های مورد نیاز:

محلول ۱٪ سولفات مس ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)، محلول ۲٪ سدیم پتاسیم تارتارات ($Na_2 Tartrate \cdot 2H_2O$)، محلول ۰/۲ مولار سدیم هیدروکساید (NaOH)، محلول ۴٪ سدیم کربنات (Na_2CO_3)، معرف فولین (Folin-ciocalteea). کلیه محلول‌ها با آب دیونیزه تهیه شد.

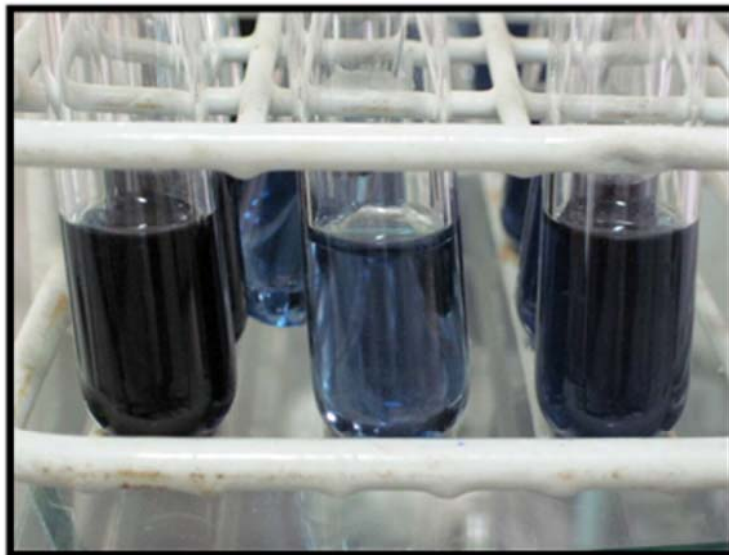
رقت‌های استاندارد از آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin fraction v) شامل رقت‌های: ۰/۱۰۰ mg/ml، ۰/۰۲ mg/ml، ۰/۰۴ mg/ml، ۰/۰۶ mg/ml، ۰/۰۸ mg/ml و ۰/۱ mg/ml و همچنین رقت‌های ۰/۲۰ mg/ml، ۰/۴۰ mg/ml، ۰/۶۰ mg/ml، ۰/۸۰ mg/ml و ۱۰۰ mg/ml.

نمونه شاهد شامل ۱ ml - ۰/۵ آب دیونیزه

آزمونه شامل عصاره محیط کشت پس از سانتریفیوژ، سوپرناتانت حاصل از ترسیب پروتئین با سولفات آمونیوم، رسوب حاصل از ترسیب پروتئین با سولفات آمونیوم و مایع حاصل از دیالیز نمونه

مراحل آزمایش:

به ۵۰ ml از محلول ۳، ۵۰ ml محلول ۴ اضافه کرده سپس ۱ ml از محلول ۱ و ۱ ml از محلول ۲ به آن اضافه شد و نام آن محلول A گذاشته شد (این محلول باید قبل از هر آزمون به صورت تازه آماده شود). سپس به ۱-۰/۵ ml از نمونه مورد آزمایش (که ممکن است رقت‌های استاندارد BSA یا نمونه های حاصل از دیالیز و یا هر آزمونه دیگری باشد) ۲ ml از محلول A را اضافه کرده و خوب مخلوط گردید و ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. در این فاصله زمانی به ۱۰ ml از محلول فولین، ۱۰ ml آب دیونیزه اضافه کرده تا محلول ۱ نرمال فولین تهیه شود و نام آن را محلول B گذاشته پس از طی مدت زمان ذکر شده به نمونه مورد آزمایش ۰/۲۵ ml از محلول B را افزوده و خوب مخلوط گردید و میزان جذب نوری نمونه ها پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه و تاریکی توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر Jenway 6800 UV/VIS، برنامه اندازه گیری پروتئین توسط تست لوری خوانده شد و با قرار دادن عدد مربوطه در منحنی استاندارد، میزان پروتئین نمونه ها برحسب mg/ml تعیین گردید. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد.



تصویر ۹- اندازه گیری میزان پروتئین تام پلازما به روش لوری بر اساس شدت رنگ آبی ایجاد شده

۳-۳-۶- بررسی تأثیر تغذیه با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف AFB_1 بر فعالیت فاگوسیتی (PA) بمنظور اندازه گیری فعالیت فاگوسیتی، ۲۵ میکرولیتر از همولمف بر روی اسلاید شیشه ای تمیز انتقال یافت و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس ۲۵ میکرولیتر باکتری *Staphylococcus aureus* به غلظت $10^8 \times$ اسلول در میلی لیتر به اسلاید اضافه شد و مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. پس از آن اسلاید ها با ماده ضد انعقاد شستشو شد و با گلو تار آلدئید ۴٪ در محلول ضد انعقاد به مدت ۱ دقیقه تثبیت شد. در مرحله بعد اسلاید ها به مدت ۱ دقیقه با آب مقطر شستشو داده شد و با اتانل به مدت ۱ دقیقه تثبیت گردید. اسلاید ها در مجاورت هوا خشک شد و سپس با تولوئیدن بلو به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شده و رنگ اضافه

با آب جاری حذف گردید (تصویرتصویر ۷). پس از این مراحل اسلاید ها با کمک میکروسکوپ نوری و با بزرگ نمایی $100 \times$ مورد مطالعه قرار گرفته و ۲۰۰ هموسیت شمارش و تعداد هموسیت هایی که باکتری را هضم کرده اند، ثبت گردد (۴۰).

درصد فاگوسیتوز = (تعداد هموسیت هایی که باکتریها را هضم کرده اند / تعداد کل هموسیت های مشاهده شده) $\times 100$



تصویر ۱۰- تعیین درصد فعالیت فاگوسیتی هموسیت های میگوی سفید هندی پس از دریافت جیره های حاوی مقادیر مختلف AFB_1 هر دو هفته یکبار به مدت ۱۲ هفته.

۷-۳-۳- بررسی تغییرات بافتی ناشی از تغذیه با جیره های حاوی مقادیر مختلف AFB_1 در میگوی سفید هندی

به منظور جلوگیری از تغییرات بافتی پس از مرگ و آسیب های وارد شده به بافتهای مورد نظر، لازم است که میگوهای زنده بلافاصله بعد از خارج شدن از آب تثبیت شوند. محلول تثبیت کننده دیویدسون (جدول ۴) به دلیل دارا بودن اسید استیک، می تواند کلسیم را از پوسته خارجی میگو جدا نموده و به عمل برش دادن بافتها کمک نماید، از این رو یک تثبیت کننده مناسب برای مطالعات بافت شناسی در میگو می باشد (۵۲). این تثبیت کننده را می توان به مدت طولانی در آزمایشگاه نگهداری نمود.

پس از تزریق کردن محلول تثبیت کننده دیویدسون به درون بخش های مورد نظر مانند هیپاتوپانکراس سینوس شکمی و عضلات، میگوها به مدت ۷۲ ساعت در دیویدسون نگهداری شدند. پس از این مدت، به الکل ۷۰ درصد منتقل شده و تا زمان قالب گیری و تهیه مقاطع بافتی در محیط آزمایشگاه نگهداری شدند (۵۲).

جدول ۴- میزان لازم از هر یک از توکیبات مورد نیاز برای تهیه محلول فیکس کننده دیویدسون

۳۳۰ ml	الکل اتیلیک ۹۵٪
۲۲۰ ml	فرمالین ۱۰٪ (فرمالدهید ۳۷ تا ۳۹٪)
۱۱۵ ml	استیک اسید خالص (گلاسیال)
۳۳۵ ml	آب مقطر

برای آماده کردن بافت ها و آبنگیری طبق روش رایج آزمایشگاه هیستوپاتولوژی عمل شد و پس از جاگذاری قطعات مورد مطالعه در قالب های پارافین و تهیه مقاطع بافتی، رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین و ائوزین انجام گرفت (۳۵) (تصویر تصویر ۱۱) و به کمک میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت و براساس واژه شناسی بیان شده توسط گوپینات (۳۰) و بل و لایتتر (۵) تغییرات بافت شناسی توصیف گردید.



تصویر ۱۱- آماده کردن بافت های مورد نظر از میگوی سفید هندی و و رنگ آمیزی مقاطع بافتی با روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین

۸-۳-۳- بررسی باقیمانده بافتی ناشی از تغذیه با جیره های حاوی مقادیر مختلف AFB₁ در میگوی سفید هندی

برای این منظور هر چهار هفته یکبار نسبت به نمونه برداری از تمامی تکرارها اقدام گردید و تا زمان ارسال به آزمایشگاه، در ظروف پلاستیکی استریل و در دمای °C ۱۸- نگهداری شد (۶۰).

۳-۴-نتایج

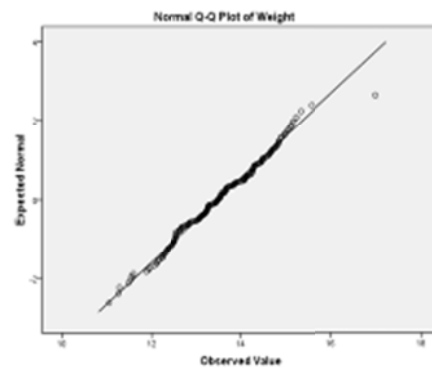
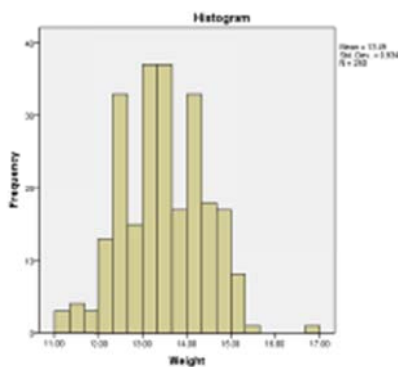
۳-۴-۱-نتایج مربوط به تغذیه با مقادیر متفاوت AFB₁ به مدت ۸ هفته

در ابتدا جمعیت میگوهای جمع آوری شده از نظر نرمال بودن توزیع وزن مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به حجم نمونه (تعداد میگوها بیش از ۵۰ عدد)، از آزمون Kolmogorov-Smirnov استفاده شد.

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Weight	.054	240	.091	.989	240	.078

a. Lilliefors Significance Correction



پس از توزیع میگوها، در تیمارهای مورد نظر، نرمال بودن توزیع وزن در هر یک از تیمارها مجدداً مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۵).

جدول ۵- جدول نتایج مربوط به بررسی توزیع نرمال وزن میگوها در تیمارهای مورد بررسی بر اساس آنالیز

Kolmogorov-Smirnov

Tests of Normality

Dose	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
0 ppb AFB ₁	.090	30	.200*	.976	30	.707
20 ppb AFB ₁	.076	30	.200*	.966	30	.429
50 ppb AFB ₁	.113	30	.200*	.963	30	.367
100 ppb AFB ₁	.128	30	.200*	.959	30	.292
200 ppb AFB ₁	.123	30	.200*	.962	30	.352
400 ppb AFB ₁	.079	30	.200*	.975	30	.675
800 ppb AFB ₁	.122	30	.200*	.975	30	.676
1600 ppb AFB ₁	.106	30	.200*	.976	30	.715

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

علایم بالینی

میگوهای تغذیه شده با جیره های غذایی حاوی ۸۰۰ ppb و ۱۶۰۰ ppb AFB₁، پس از سپری شدن ۴ هفته از آغاز تیمار بندی، رشد و درصد بازماندگی کمتری را نشان دادند و روند کاهشی در پایان هفته هشتم پس از تیمار بندی شدت بیشتری گرفت. کاهش رفتارهای تغذیه ای و تمایل به دریافت غذا در تیمارهای ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb قابل مشاهده بود. در ۶۰ درصد از میگوهای تیمار ۱۶۰۰ ppb که در پایان هفته چهارم زنده مانده بودند، تغییر رنگ و التهاب در بخش انتهایی دم (تلسون) مشاهده شد. در بخشهای سرسینه (سفالوتراکس) و شکمی تغییر رنگ و قرمز شدن رنگ بدن در قسمت هیپاتوپانکراس مشهود بود. مواد دفعی نیز در تیمارهای بیش از ۸۰۰ ppb اندکی قرمز رنگ شده بود. هیپاتوپانکراس میگوها در تیمار ۱۶۰۰ ppb به رنگ قرمز و در پایان هفته هشتم به رنگ کرم-زرد دیده می شدند. این تغییر رنگ در تیمار ۸۰۰ ppb نیز به با شدت کمتری قابل مشاهده بود. اندازه ظاهری هیپاتوپانکراس نیز در مقایسه با میگوهای شاهد کوچک تر بود.

رشد و درصد بازماندگی

در تیمارهای ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb پس از گذشت ۴ هفته از آغاز تیمار بندی، کمترین میزان رشد نهایی و رشد ویژه مشاهده شد. درصد بازماندگی نیز در تیمارهای ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb به ترتیب برابر با $1/52 \pm 68/89$ درصد و $3/05 \pm 58/89$ درصد تعیین گردید (جدول ۶) که کمترین میزان در بین تمام تیمارها بود.

جدول ۶- رشد نهایی (گرم)، درصد رشد ویژه و درصد بقاء میگوهای سفید هندی تغذیه شده با جیره های حاوی مقادیر مختلف آفلاتوکسین B₁ به مدت ۴ هفته.

Parameters*	B ₁ concentration (ppb) Aflatoxin							
	0	20	50	100	200	400	800	1600
final weight (g)	13.50±1.22 ^b	13.75±0.95 ^b	97±0.82 ^{b,13}	13.63±1.02 ^b	13.53±0.92 ^{ab}	13.06±1.23 ^{ab}	13.07±1.05 ^{ab}	12.42±1.36 ^a
Specific Growth Rate (%)	0.10±0.062 ^{cd}	0.06±0.009 ^{cd}	0.14±0.058 ^d	0.02±0.009 ^{cd}	0.01±0.009 ^c	-0.11±0.025 ^b	-0.11±0.039 ^b	0.30±0.068 ^a
Survival (%)	98.89±0.57 ^d	95.56±1.15 ^{cd}	100.00 ^d	97.78±1.15 ^{cd}	94.44±0.57 ^{cd}	88.89±0.57 ^c	68.89±1.52 ^b	58.89±3.05 ^a

* مقادیر در این جدول بصورت (mean ± SD) ارائه شده است. مقادیر نشان گذاری شده با حروف یکسان فاقد اختلاف معنی دار می باشند ($p < 0.05$).

آنالیز واریانس دو طرفه اختلاف معنی داری را بین شاهد و تیمار ۱۶۰۰ ppb پس از ۴ هفته و تیمارهای بیش از ۴۰۰ در پایان هفته هشتم نشان داد. آنالیز داده ها اثرات دوز ($F(7, 696) = 16.226, p < 0.001$) و دوز × مدت زمان مواجهه ($F(2, 696) = 0.948, p = 0.388$) را بر میزان رشد نهایی در پایان هفته هشتم، موثر نشان داد در حالیکه مدت زمان مواجهه اثر معنی دار را نشان نداد ($F(14, 696) = 5.298, p < 0.001$) (جدول ۷).

جدول ۷- نتایج آنالیز واریانس دو طرفه مربوط به میزان رشد نهایی در میگوهای سفید هندی تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف آفلاتوکسین B₁ به مدت ۸ هفته.

Tests of Between-Subjects Effects
Dependent Variable: Weight

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	229.695 ^a	23	9.987	8.246	.000
	129680.144	1	129680.144	107074.067	.000
Dose	137.564	7	19.652	16.226	.000
Duration	2.296	2	1.148	.948	.388
Dose * Duration	89.835	14	6.417	5.298	.000
Error	842.943	696	1.211		
Total	130752.782	720			
Corrected Total	1072.638	719			

a. R Squared = .214 (Adjusted R Squared = .188)

درصد بازماندگی در پایان هفته چهارم در تیمارهای کمتر از ۲۰ ppb ($p=0.812$)، ۵۰ ppb ($P=1.000$)، ۱۰۰ ppb ($p=0.998$)، ۲۰۰ ppb ($p=0.905$) اختلاف معنی‌داری را با شاهد نشان نداد. در پایان هفته هشتم در صد بازماندگی در تیمارهای ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نشان داد و علاوه بر این درصد بازماندگی در تیمار ۲۰۰ ppb نیز کاهش یافت اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد در مقایسه با هفته چهارم نشان داد (جدول ۸).

جدول ۸- رشد نهایی (گرم)، درصد رشد ویژه و درصد بقاء در میگوهای سفید هندی تغذیه شده با جیره های حاوی مقادیر مختلف آفلاتوکسین B₁ به مدت ۸ هفته.

Parameters [*]	Aflatoxin B ₁ concentration (ppb)							
	0	20	50	100	200	400	800	1600
final weight (g)	14.15±1.19 ^c	14.22±1.01 ^c	14.12±1.09 ^c	13.80±1.03 ^c	13.42±1.15 ^{bc}	12.86±1.17 ^b	12.49±1.27 ^{ab}	11.78±1.14 ^a
Specific Growth Rate (%)	0.03±0.002 ^d	0.05±0.005 ^d	0.01±0.025 ^d	0.02±0.005 ^{cd}	-0.01±0.001 ^c	-0.02±0.019 ^b	-0.08±0.005 ^b	-0.09±0.033 ^a
Survival (%)	98.89±0.57 ^e	93.33±0.00 ^{de}	91.11±0.57 ^{de}	94.44±1.15 ^{de}	83.33±1.00 ^{cd}	76.67±1.73 ^c	54.44±3.21 ^b	38.89±2.88 ^a

* مقادیر در این جدول بصورت (mean ± SD) ارائه شده است. مقادیر نشان‌گذاری شده با حروف یکسان فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($p<0.05$).

آنالیز واریانس دو طرفه اختلاف معنی‌داری را بین شاهد و تیمارهای بیش از ۴۰۰ ppb پس از ۴ هفته و تیمارهای بیش از ۲۰۰ ppb پس از ۸ هفته نشان داد. آنالیز داده‌ها اثرات دوز ($F(7, 80) = 125.893, p<0.001$)، مدت زمان مواجهه ($F(4, 80) = 83.960, p<0.001$) و دوز * مدت زمان مواجهه ($F(28, 80) = 11.932, p<0.001$) را بر درصد بازماندگی نهایی در پایان هفته هشتم، موثر نشان داد (جدول ۹).

جدول ۹- نتایج آنالیز واریانس دو طرفه مربوط به درصد بازماندگی در میگوهای سفید هندی تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف آفاتوکسین B₁ به مدت ۸ هفته.

Tests of Between-Subjects Effects
Dependent Variable: Survival Rate

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2714.592 ^a	39	69.605	39.774	.000
	84960.408	1	84960.408	48548.805	.000
Dose	1542.192	7	220.313	125.893	.000
Duration	587.717	4	146.929	83.960	.000
Dose * Duration	584.683	28	20.882	11.932	.000
Error	140.000	80	1.750		
Total	87815.000	120			
Corrected Total	2854.592	119			

a. R Squared = .951 (Adjusted R Squared = .927)

بر اساس آنالیز spearman's rho در پایان هفته چهارم همبستگی منفی ضعیف بین وزن نهایی و دوز ($r = -0.186^{**}$) مشاهده شد و در پایان هفته هشتم این میزان به ($r = -0.318^{**}$) رسید.

تعداد هموسیت کل (THC)

با افزایش غلظت AFB₁ در جیره‌های مورد استفاده جهت تغذیه تیمارها، تعداد هموسیت کل طی ۲ هفته نخست، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. تعداد هموسیت کل در تیمارهای دریافت کننده بیش از ۵۰ ppb در هفته‌های ۴ تا ۸ بتدریج کاهش یافت. تعداد هموسیت کل در میگوهای شاهد در پایان هفته دوم، چهارم و هشتم به ترتیب $76.15 \pm 8.62 \times 10^5$ cell/ml، $74.48 \pm 5.36 \times 10^5$ cell/ml، $75.81 \pm 10.95 \times 10^5$ cell/ml، $70.40 \pm 8.96 \times 10^5$ cell/ml، $70.40 \pm 18.07 \times 10^5$ cell/ml، $58.70 \pm 5.50 \times 10^5$ cell/ml، $82.20 \pm 25.22 \times 10^5$ cell/ml، $98.76 \pm 11.96 \times 10^5$ cell/ml، $97.39 \pm 3.87 \times 10^5$ cell/ml، $93.28 \pm 17.55 \times 10^5$ cell/ml، $74.48 \pm 5.36 \times 10^5$ cell/ml، $71.32 \pm 5.61 \times 10^5$ cell/ml، $53.41 \pm 3.73 \times 10^5$ cell/ml، $49.84 \pm 3.85 \times 10^5$ cell/ml، $80.06 \pm 16.09 \times 10^5$ cell/ml، $47.14 \pm 11.80 \times 10^5$ cell/ml، $69.92 \pm 3.87 \times 10^5$ cell/ml، $51.04 \pm 22.50 \times 10^5$ cell/ml، $75.81 \pm 10.95 \times 10^5$ cell/ml، $60.74 \pm 24.94 \times 10^5$ cell/ml، $55.19 \pm 25.51 \times 10^5$ cell/ml، $51.86 \pm 32.00 \times 10^5$ cell/ml، $39.77 \pm 18.97 \times 10^5$ cell/ml، $40.08 \pm 17.31 \times 10^5$ cell/ml، $30.61 \pm 15.82 \times 10^5$ cell/ml، $31.56 \pm 10.16 \times 10^5$ cell/ml و $31.56 \pm 10.16 \times 10^5$ cell/ml محاسبه گردید (جدول ۱۰).

جدول ۱۰- تعداد هموسیت کل (THC) ($\times 10^5$ cells/ml) میگوهای سفید هندی تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف آفاتوکسین B₁ پس از گذشت ۲، ۴ و ۸ هفته.

Total Hemocyte Count ($\times 10^5$ cells/ml) ^a	Aflatoxin concentration (ppb)							
	0	20	50	100	200	400	800	1600
2 nd week	76.15±8.62 ^a	70.40±8.96 ^a	70.40±18.07 ^a	58.70±5.50 ^a	82.20±25.22 ^a	98.76±11.96 ^a	97.39±3.87 ^a	93.28±17.55 ^a
4 th week	74.48±5.36 ^{ab}	71.32±5.61 ^{ab}	53.41±3.73 ^{ab}	49.84±3.85 ^a	80.06±16.09 ^b	47.14±11.80 ^{ab}	69.92±3.87 ^b	51.04±22.50 ^{ab}
8 th week	75.81±10.95 ^a	60.74±24.94 ^{ab}	55.19±25.51 ^{ab}	51.86±32.00 ^b	39.77±18.97 ^{ab}	40.08±17.31 ^b	30.61±15.82 ^{ab}	31.56±10.16 ^b

* مقادیر در این جدول بصورت (mean ± SD) ارائه شده است. مقادیر نشان‌گذاری شده با حروف یکسان فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($p < 0.05$).

آنالیز Tukey HSD نشان داد که غلظت ۲۰ppb ($p=0.796$) و ۵۰ ppb ($p=0.204$) اختلاف معنی داری با گروه شاهد ندارند (جدول ۱۱). علاوه بر این، بر اساس نتایج حاصل از این آزمون می توان بیان کرد که در پایان هفته هشتم، تیمار ۵۰ ppb با هیچکدام از تیمارها اختلاف معنی داری ندارد. آنالیز داده‌ها اثرات دوز (= $F(7, 80)$) و مدت زمان مواجهه ($F(4, 80)=24.770, p=0.004$) و دوز \times مدت زمان مواجهه (= $F(28, 80)$) را بر میزان THC در پایان هفته هشتم، موثر نشان داد. ($p < 0.001, 3.334$) ، مدت زمان مواجهه ($F(4, 80)=24.770, p=0.004$) و دوز \times مدت زمان مواجهه (= $F(28, 80)$) بر اساس آنالیز spearman's rho در پایان هفته چهارم همبستگی منفی ضعیف بین THC و مدت زمان مواجهه ($r = -0.251^*$) و در پایان هفته هشتم همبستگی منفی بین THC و دوز ($r = -0.237^{**}$) و همچنین همبستگی منفی بین THC و مدت زمان مواجهه ($r = -0.524^{**}$) مشاهده شد.

جدول ۱۱- نتایج آنالیز واریانس دو طرفه مربوط به تعداد هموسیت کل (THC) در میگوهای سفید هندی تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف آفلاتوکسین B₁ به مدت ۸ هفته.

Tests of Between-Subjects Effects
Dependent Variable: Total Hemocyte Count

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	36351.904 ^a	39	932.100	5.108	.000
	477541.969	1	477541.969	2616.834	.000
Dose	4258.485	7	608.355	3.334	.004
Duration	18081.202	4	4520.301	24.770	.000
Dose * Duration	14012.217	28	500.436	2.742	.000
Error	14599.076	80	182.488		
Total	528492.949	120			
Corrected Total	50950.980	119			

a. R Squared = .713 (Adjusted R Squared = .574)

پروتئین تام پلاسما (TPP)

میزان پروتئین تام پلاسما در میگوهای شاهد در پایان هفته دوم، چهارم و هشتم به ترتیب 13.36 ± 77.10 mg/ml ، 9.73 ± 80.99 mg/ml و 78.52 ± 580 mg/ml اندازه گیری شد. در تیمارهای ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb در پایان هفته دوم و در تیمار ۴۰۰ ppb در پایان هفته چهارم، کاهش شدید در میزان TPP مشاهده شد (جدول ۱۲). در تیمار ۴۰۰ ppb این روند کاهشی در هفته چهارم به بعد مشاهده نشد و در ماه دوم مواجهه، تغییرات TPP بسیار اندک بود. در تیمارهای ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb پس از هفته چهارم میزان TPP به پایین ترین سطح خود و به ترتیب به میزان 15.16 ± 11.50 mg/ml و 15.16 ± 5.33 mg/ml رسید. مقادیر TPP در پایان هفته هشتم در دو تیمار ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb اختلاف معنی داری را نشان ندادند.

جدول ۱۲- میزان پروتئین کل پلاسما (TPP) (mg/ml) در میگوهای سفید هندی تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف آفاتوکسین B₁ پس از گذشت ۲، ۴ و ۸ هفته.

Total Plasma Protein (mg/ml)*	AFB ₁ concentration (ppb)							
	0	20	50	100	200	400	800	1600
2 nd week	77.10±13.36 ^{ab}	85.06±21.01 ^b	82.24±19.80 ^b	76.08±15.19 ^b	84.01±13.04 ^b	71.12±25.02 ^{ab}	36.21±6.25 ^{ab}	17.49±3.44 ^a
4 th week	80.99±9.73 ^c	79.43±17.86 ^c	83.43±12.26 ^c	79.86±23.35 ^c	70.89±17.86 ^c	48.15±5.85 ^{bc}	34.99±6.25 ^{ab}	20.55±12.71 ^a
8 th week	78.52±5.80 ^{bc}	81.14±12.19 ^c	82.10±12.17 ^c	79.36±8.57 ^c	71.54±26.05 ^{bc}	56.47±16.70 ^b	30.37±11.50 ^a	15.16±5.33 ^a

* مقادیر در این جدول بصورت (mean ± SD) ارائه شده است. مقادیر نشان‌گذاری شده با حروف یکسان فاقد اختلاف معنی دار می‌باشند (p<0.05).

در پایان هفته هشتم، هم دوز AFB₁ موجود در جیره‌ها (F(7, 80) = 28.339, p < 0.001) و هم مدت زمان مواجهه (F(4, 80) = 6.286, p < 0.001) و دوز × مدت زمان مواجهه (F(28, 80) = 2.017, p < 0.001) بر تغییرات میزان TPP موثر بود (جدول جدول ۱۳).

در پایان هفته چهارم، میزان TPP با دوز AFB₁ موجود در جیره‌ها، همبستگی منفی (r = - 0.455**) و با مدت زمان مواجهه میگوها با این جیره‌ها همبستگی منفی (r = - 0.250*) مشاهده شد. در پایان هفته هشتم نیز همبستگی منفی قوی تری بین میزان TPP و دوز AFB₁ موجود در جیره‌ها (r = - 0.565**) و همبستگی منفی بین میزان مدت زمان مواجهه (r = - 0.210*) مشاهده گردید.

جدول ۱۳- نتایج آنالیز واریانس دو طرفه مربوط به مقدار پروتئین تام پلاسما (TPP) در میگوهای سفید هندی تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف آفاتوکسین B₁ به مدت ۸ هفته.

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	58878.868 ^a	39	1509.715	7.179	.000
	526157.633	1	526157.633	2502.080	.000
Dose	41715.103	7	5959.300	28.339	.000
Duration	5287.448	4	1321.862	6.286	.000
Dose * Duration	11876.316	28	424.154	2.017	.008
Error	16823.045	80	210.288		
Total	601859.546	120			
Corrected Total	75701.913	119			

a. R Squared = .778 (Adjusted R Squared = .669)

فعالیت فاگوسیتی (PA)

فعالیت فاگوسیتی در تمامی تیمارها، به غیر از تیمارهای ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb، در پایان هفته دوم افزایش یافت که البته آنالیز آماری اختلاف معنی داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان نداد. در تیمارهای ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb از

هفته دوم تا پایان دوره آزمایش، کاهش تدریجی نشان داد. درصد فعالیت فاگوسیتی در تیمار ۴۰۰ ppb در پایان هفته چهارم شدیداً کاهش یافت. تغییرات فعالیت فاگوسیتی در پایان هفته دوم، چهارم و هشتم در گروه شاهد به ترتیب ۳۵.۸۶ ± ۸.۴۴ درصد، ۳۷.۱۶ ± ۱۸.۴۱ درصد و ۳۶.۷۰ ± ۱۴.۹۷ درصد اندازه گیری شد. میزان فعالیت فاگوسیتی برای تیمارهای ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb در پایان هفته چهارم به ترتیب ۳۰.۹۸ ± ۱۳.۵۸ درصد و ۱۲.۷۸ ± ۳۰.۹۷ درصد تعیین گردید (جدول ۱۴) که در پایان هفته هشتم به ۳۰.۷۵ ± ۱۲.۴۰ درصد و ۲۸.۵۷ ± ۸.۶۶ درصد رسید.

جدول ۱۴- درصد فعالیت فاگوسیتی (PA) میگوهای سفید هندی تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف آفلاتوکسین B₁ پس از ۴ و ۸ هفته.

Phagocytic activity (%) [*]	AFB1 concentration (ppb)							
	0	20	50	100	200	400	800	1600
2 nd week	35.86±8.44	41.41±17.73	43.76±4.54	42.14±9.28	40.32±6.56	39.09±8.04	35.01±16.29	34.43±12.55
4 th week	37.16±18.41	37.22±17.73	35.98±7.18	36.47±9.28	37.04±11.63	32.48±13.10	30.98±13.58	30.97±12.78
8 th week	36.70±14.97	35.22±12.93	36.28±7.79	36.73±9.25	36.67±8.61	32.08±8.49	30.75±12.40	28.57±8.66

* مقادیر در این جدول بصورت (mean ± SD) ارائه شده است.

با توجه به نتایج آزمون Tukey HSD در هیچکدام از تیمارها، تغییرات میزان فعالیت فاگوسیتی در پایان هفته چهارم و هشتم با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. در پایان هفته هشتم، دوز $F(7, 80) = 0.479, p = 0.847$ ، مدت زمان مواجهه $F(4, 80) = 0.744, p = 0.565$ و دوز × مدت زمان مواجهه $F(28, 80) = 0.092, p = 1.000$ بر تغییرات میزان PA موثر بود (جدول ۱۵).

جدول ۱۵- نتایج آنالیز واریانس دو طرفه مربوط درصد فعالیت فاگوسیتی در میگوهای سفید هندی تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف آفلاتوکسین B₁ به مدت ۸ هفته.

Tests of Between-Subjects Effects
Dependent Variable: Phagocytic Activity

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1217.896 ^a	39	31.228	.228	1.000
	151808.492	1	151808.492	1110.742	.000
Dose	458.668	7	65.524	.479	.847
Duration	406.562	4	101.641	.744	.565
Dose * Duration	352.666	28	12.595	.092	1.000
Error	10933.848	80	136.673		
Total	163960.236	120			
Corrected Total	12151.744	119			

a. R Squared = .100 (Adjusted R Squared = -.338)

باقیمانده های بافتی

در بررسی های انجام شده در لاشه های گروه شاهد (سرسینه و عضله)، AFB₁ تشخیص داده نشد. پس از تیمار بندی به مدت ۸ هفته و تغذیه میگوها با جیره های حاوی مقادیر متفاوتی از AFB₁، بیشترین میزان آفلاتوکسین B₁ در عضله تیمارهای ۵۰ تا ۴۰۰ ppb و به میزان ۱۳.۶۵ - ۱۱.۶۰ ppb اندازه گیری شد. این میزان از باقیمانده های بافتی در پایان هفته هشتم، کاهش یافت و به ۱.۵۵ - ۰.۳۰ ppb رسید. در پایان هفته هشتم، میزان باقیمانده های بافتی AFB₁ در سرسینه کمتر از میزان اندازه گیری شده در عضله بود و افزون بر این نوسانات کمتری نیز در مقادیر مربوط به باقی مانده بافتی در سرسینه مشاهده گردید (جدول ۱۶).

در پایان هفته هشتم، همبستگی بین دوز AFB₁ موجود در جیره های غذایی و مدت زمان مواجهه با میزان باقیمانده های بافتی در سطح معنی داری ۰.۰۱ مثبت محاسبه شد ($r = 0.300^{**}$ and 0.512^{**}). در حالیکه در پایان هفته چهارم، صرفاً بین مدت زمان مواجهه و میزان باقیمانده های بافتی در عضله همبستگی مثبت قوی مشاهده گردید ($r = 0.836^{**}$). آزمون t دو نمونه اختلاف معنی داری را بین میزان باقیمانده های بافتی در سرسینه و عضله نشان داد ($df = 47, t = -3.753$ and $p < 0.01$).

جدول ۱۶- میزان باقی مانده های بافتی در سرسینه و عضله در میگوهای سفید هندی تغذیه شده با جیره های حاوی مقادیر متفاوت از آفلاتوکسین B₁ پس از ۴ و ۸ هفته.

AFB ₁ in diet (ppb)	AFB ₁ residue (ppb)			
	Head		Muscle	
	4 weeks	8 weeks	4 weeks	8 weeks
0	0.00 ^{a*}	0.00 ^a	0.00 ^a	0.00 ^a
20	1.00 ^a	0.85 ^{ab}	2.25 ^a	1.30 ^b
50	2.55 ^b	0.75 ^b	12.75 ^c	0.85 ^{de}
100	3.80 ^{bc}	1.75 ^c	13.65 ^c	1.55 ^c
200	6.55 ^d	4.90 ^c	12.15 ^c	0.30 ^{de}
400	8.80 ^e	6.40 ^f	11.60 ^c	0.35 ^d
800	3.15 ^{bc}	5.85 ^d	7.95 ^b	0.65 ^c
1600	4.35 ^c	7.10 ^e	7.50 ^b	0.15 ^c

* مقادیر نشان گذاری شده با حروف یکسان در هر ستون، فاقد اختلاف معنی دار می باشند ($p < 0.05$).

۲-۴-۳- بررسی های هیستوپاتولوژی

هیپاتوپانکراس در سطح فوقانی قسمت ابتدایی روده میانی و در سطح خلفی کیسه پشتی معده پیلوریک، قرار دارد. ساختار هیپاتوپانکراس لوله ای مرکب و متشکل از لوله هایی با انتهای مسدود شده و چهار نوع سلول می باشد. اساس دسته بندی این سلول ها بر معیارهای ارائه شده توسط Jacobs (۳۹) و Hirsch (۳۴) استوار می باشد. هیپاتوپانکراس در میگوی سفید هندی از دو لوب تشکیل شده است که سطح پشتی مدور و گرد و سطح شکمی مسطح می باشد. سطح خارجی هیپاتوپانکراس توسط یک کپسول از جنس بافت همبند پوشیده شده است. علاوه بر این پوشش، عضلات حلقوی و طولی صاف نیز این غده را در بر گرفته اند. بافت همبند به درون هیپاتوپانکراس

نفوذ کرده و اطراف واحدهای ترشچی را فرا می‌گیرند. هپاتوپانکراس واجد واحدهای ترشچی متعددی از نوع لوله‌ای ساده بوده که در قاعده به کپسول متصل بوده و بطور شعاعی به طرف مرکز غده کشیده می‌شوند. دهانه های واحدهای ترشچی به طرف رأس وسعت یافته و پس از به هم پیوستن، به دهانه مرکز لوب می‌ریزند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که ۲۴ ساعت پس از دریافت جیره غذایی، سلولهای E در قاعده واحدهای ترشچی تقسیمات میتوزی متعددی را انجام می‌دهند. ایتلیوم پوشاننده واحدهای ترشچی از نوع استوانه‌ای ساده بوده و به چهار گروه دسته‌بندی می‌شوند. این سلول‌ها از قاعده به سمت رأس عبارتند از:

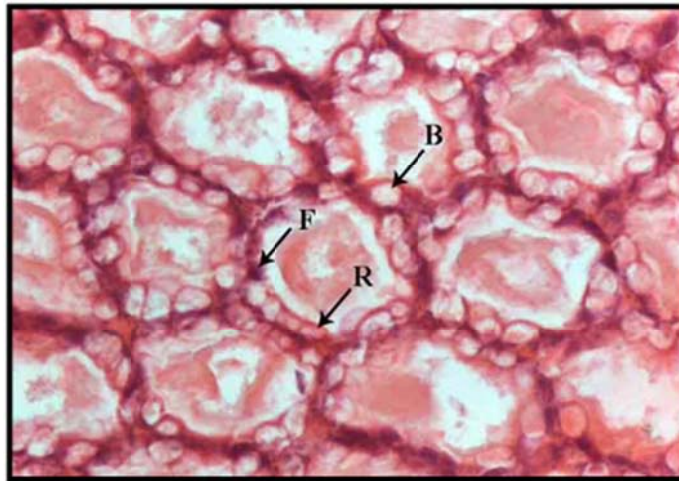
سلول‌های پایه یا رویانی (Stem cells/Embryo cells/ E cells)، این سلول‌ها در قاعده واحدهای ترشچی و در منطقه محدودی مشاهده می‌شوند. قطر واحدهای ترشچی در این منطقه کمتر از سایر مناطق بوده و این سلول‌ها به شکل استوانه‌های باریک و بلند، سطح داخلی واحدهای ترشچی را می‌پوشانند. این سلول‌ها فاقد هرگونه واکوئل یا دانه ترشچی هستند. عدم وجود واکوئل و ریزمژه‌ها در این سلول‌ها می‌تواند دلیلی برای تمایز نیافتگی و عدم مداخله آنها در هضم و جذب مواد غذایی، تلقی گردد.

سلول‌های رشته‌ای (Fibrillar cells/ F cells)، این سلول‌ها به تعداد بسیار کم نزدیک به قاعده واحدهای ترشچی و در زیر سلول‌های پایه دیده شده‌اند. این سلول‌ها دارای ریزمژه‌های رأسی می‌باشند.

سلول‌های تاولی یا سلول‌های ترشچی کیسه‌ای (Blister-like cells/B cells)، این گروه از سلول‌ها بیش از سایر سلول‌ها در واحد ترشچی مشاهده می‌شوند و آنها را به چهار گروه اولیه، در حال رشد، بالغ و بیرون ریخته گروه‌بندی می‌کنند. حضور واکوئل‌های سفید رنگ در سیتوپلاسم، می‌تواند نشان دهنده تجمع ذرات چربی در سیتوپلاسم باشد.

سلول‌های جذبی - ذخیره‌ای R (Resorbive cells)، این سلول‌ها به تعداد کمتر از سلول‌های تاولی و در بین آنها قرار دارند. سطح رأسی این سلول‌ها مقعر شکل بوده و واجد ریزمژه می‌باشد. سیتوپلاسم در این سلول‌ها فاقد هرگونه واکوئل می‌باشد. این سلول‌ها فعالیت جذبی - ذخیره‌ای دارند.

با توجه به این که سلول‌های تاولی بلند و به شکل استوانه‌ای یا هرمی شکل بوده و سلول‌های جذبی کوتاه و مکعبی شکل هستند، دهانه داخلی واحدهای ترشچی، ستاره‌ای شکل دیده می‌شوند (تصویر ۱۳ تصویر).



تصویر ۱۲- انواع سلول‌های اپیتلیوم واحدهای پوشاننده در بافت هپاتوپانکراس میگوی سفید هندی تغذیه شده با جیره حاوی ۵۰ ppb به مدت هشت هفته. رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) درشت نمایی × ۴۰. (F, Fibrillar cells/ F cells; B, Blister-like cells/B cells; R, Resorbitive cells)

در میگوهای گروه شاهد و تیمار ۱۰ ppb، ساختار هپاتوپانکراس نرمال بود و مناطق موجود در امتداد بخش پروکسیمال تا بخش رأسی و ترکیبات مربوط به معده و معده میانی و همچنین الک معدی^{۴۲} و آویزها^{۴۳} دارای ساختار نرمال و طبیعی بودند و لومن حاوی ترکیبات دانه‌ای و سطح جلوی لومن مربوط به توبوبول‌ها توسط ریز مژک مرزبندی شده بود. راس تیوبولار واجد سلولهای E یکسانی بود سلولهای رویانی از رأس شروع به تغییر کرده اند که سلولهای تمایز یافته و کار آمد R را بوجود می‌آورند. در بخش میانی، سلول های R و سلول‌های F مشاهده شد. سلولهای F در دورترین نقطه نسبت به رأس قرار داشتند و بازوفیل تر و بزرگ‌تر از سایر سلولها بودند. سلولهای F نسبت به سایر سلولها واجد هسته بزرگ‌تری بودند و سیتوپلاسم سلول‌های R بطور مشخص، واجد تعداد بسیاری هسته بود. بخش قدامی لوله ها واجد سلولهای بزرگ و مشخص B بودند که این سلولها بواسطه داشتن یک واکوئل بزرگ و همچنین سطح محدب درخشان، از سایر سلولها متمایز می‌شوند. در تیمار ۱۰ و ۲۰ ppb صرفاً تغییر جزئی در ساختار هپاتوپانکراس به شکل کاهش واکوئل‌ها در سلولهای R مشاهده گردید. بر اساس نظر Voget سلولهای R موجود در دیواره ساختار لوله‌ای هپاتوپانکراس، حساس‌ترین سلول‌های بخش اپیتلیال لوله‌های هپاتوپانکراس می‌باشند (۹۴)

تغییرات قابل ملاحظه هیستوپاتولوژیک در میگوهایی که به مدت ۸ هفته با جیره‌های حاوی بیش از ۲۰ ppb میکروگرم AFB₁ تغذیه شده‌اند مشاهده نشد و صرفاً، درجات متفاوتی از اینفیلتراسیون قابل مشاهده بود. اینفیلتراسیون ملایم و خفیف در تیمار ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ ppb دیده شد.

⁴² gastric sieve

⁴³ lappets

در تیمارهای دیگر با توجه به میزان توکسین موجود در جیره و همچنین مدت زمان تیمار کردن میگوها با جیره‌ها، علاوه بر آتروفی سلولهای اپیتلیال، پاسخ آماسی نیز مشاهده شد. اولین علامت آماسی مشاهده شده نفوذ هموسیتی در فضای بینابینی موجود در بین لوله‌های هیاتوپانکراس بود. ضایعات پیشرفته‌تر به شکل نکروزه شدن، ملانیزه شدن و فیروزه خفیف، درون ساختار لوله‌ها یا در سینوس پیرامون آنها دیده شد. این ضایعات بیشتر در بخش پیشین هیاتوپانکراس و مانند مشاهدات Lightner و همکاران مشاهده گردید. با توجه به اینکه در این مطالعه از غلظت‌های کمتری از AFB₁ در جیره غذایی، نسبت به مطالعه Lightner و همکاران استفاده شده بود، مشاهده ضایعاتی مانند ضایعات توصیف شده توسط Lightner و همکاران نیز دور از انتظار بود. تغییرات ایجاد شده در ساختار هیاتوپانکراس بر عملکرد جذب کنندگی، ذخیره نمودن و ترشح کردن این اندام اثر گذاشته و علائمی چون التهاب و آتروفی شدن دیده شد (۵۵)

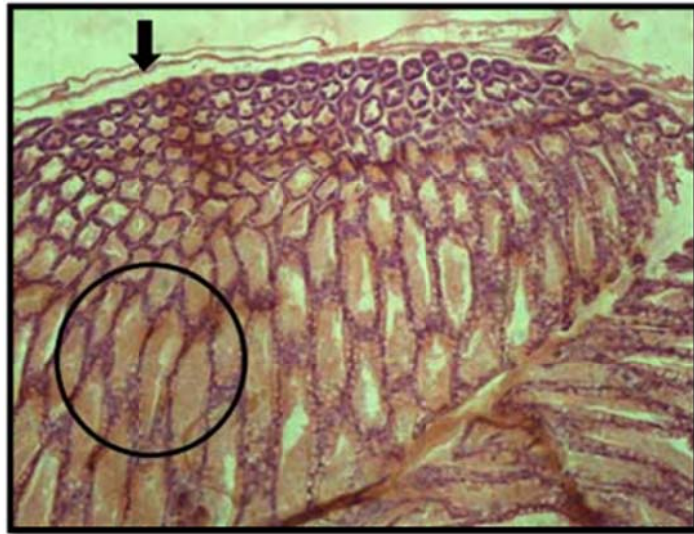


تصویر ۱۳- مقطع عرضی هیاتوپانکراس میگوی سفید هندی جوان (در ناحیه دیستال) تغذیه شده با جیره حاوی AFB₁ ۵۰ ppb بمدت ۸ هفته، نوع و تعداد سلولهای پوششی توپولها طبیعی هستند، ساختار ستاره‌ای شکل دهانه اکثر مجاری حفظ شده و مقداری مواد ترشحاتی داخل مجاری قابل مشاهده می‌باشند (نوک پیکان). تنها مورد غیر طبیعی، فاصله گرفتن اندک توپولها از غشاء پایه است (پیکان دو سر). رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) درشت نمایی $\times 40$.

با تغذیه کردن میگوهای با جیره حاوی AFB₁ ۵۰ ppb به مدت ۴ هفته در برخی از مناطق هیاتوپانکراس تغییرات جزئی مشاهده شد. در مناطق رأسی و میانی هیاتوپانکراس، تغییرات بافتی بیشتری نسبت به سایر مناطق دیده شد (تصویر تصویر ۱۳).

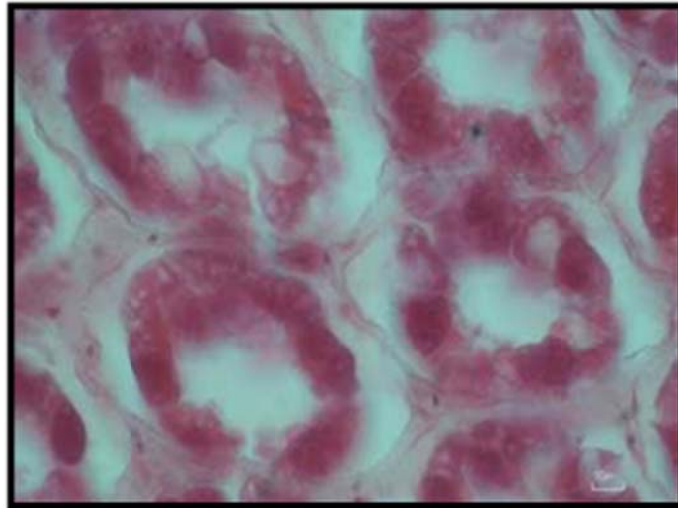
میگوهای تیمار ۱۰۰ ppb در مقایسه با میگوهای تیمار ۵۰ ppb پس از گذشت ۴ هفته، تغییرات بافتی بیشتری را در پیرامون لوله‌ها و همچنین نفوذ سلولی در هیاتوپانکراس نشان دادند. پس از گذشت چهار هفته پوسته پوسته

شدن، ضخیم شدن بافت بین توبولی دیده می‌شد. در پایان هفته هشتم، نکته مهم آغاز فاصله گرفتن کپسول همبندی از بافت غده‌ای هپاتوپانکراس بود که در (تصویر ۱۴) در محل پیکان تیره رنگ قابل مشاهده می‌باشد.

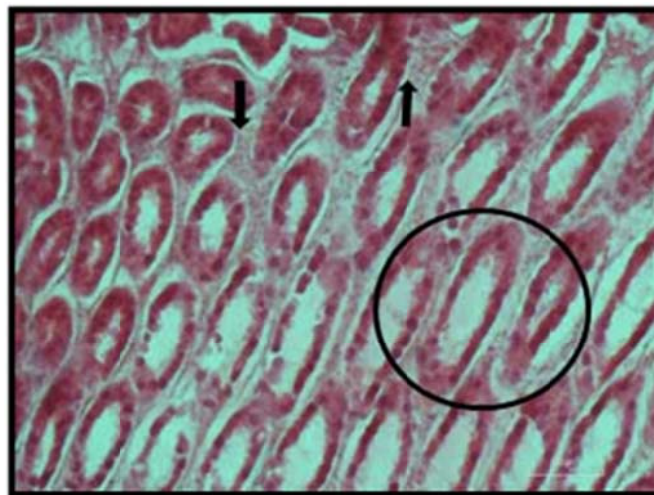


تصویر ۱۴- نمای هپاتوپانکراس میگوی سفید هندی تغذیه شده با جیره حاوی 100 ppb AFB_1 بمدت ۸ هفته، ساختار توبولها طبیعی هستند، حالت ستاره ای شکل دهانه مجاری در ناحیه دیستال طبیعی است. فعالیت ترشحی طبیعی توبولها در ناحیه پروکسیمال قابل مشاهده هستند (۱۵ پره). فاصله گرفتن مختصر کپسول همبندی از بافت غده‌ای هپاتوپانکراس با پیکان نمایش داده شده است. رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) بزرگ‌نمایی $\times 40$.

در بافت هپاتوپانکراس میگوهای تغذیه شده با جیره‌های 200 ppb AFB_1 پس از گذشت ۴ هفته، سلولهای نکروتیک در لومن و تشکیل کامل سلولی مشاهده می‌شد و در اغلب توبولها، مناطق مرکزی و کانونی بطور کلی تغییر شکل داده و رشد بافت فیروز آغاز شده بود (تصویر ۱۵). تعداد سلولها در پایان هفته هشتم کاهش بیشتری را نشان می‌دهد (تصویر ۱۶).

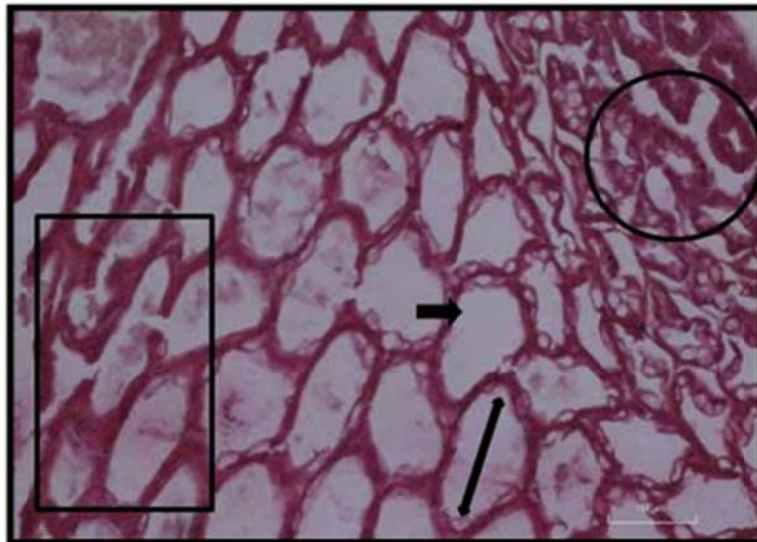


تصویر ۱۵- مقطع عرضی هیپاتوپانکراس میگوی سفید هندی تغذیه شده با جیره حاوی ۲۰۰ ppb آفلاتوکسین B₁ بمدت ۴ هفته، کاهش تعداد سلول‌های ترشحی کیسه‌ای (B-cells) و جذب- ذخیره‌ای (R-cells) در توبول‌ها قابل مشاهده می‌باشد. رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) درشت نمایی × ۴۰.

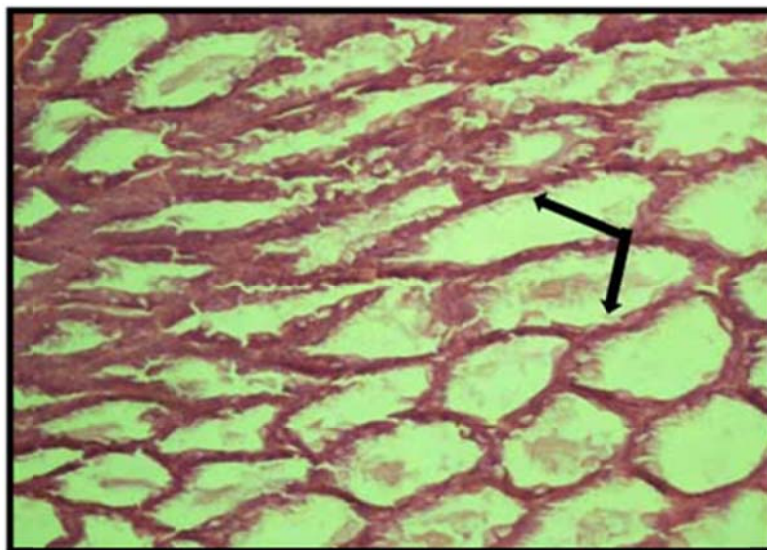


تصویر ۱۶- نمای هیپاتوپانکراس میگوی سفید هندی تغذیه شده با جیره حاوی ۲۰۰ ppb آفلاتوکسین B₁ بمدت ۸ هفته، افزایش تعداد هموسیتها در بافت بینابینی توبول‌ها (اینفیلتراسیون هموسیتی) (پیکان‌ها)، کاهش تعداد سلول‌های ترشحی کیسه‌ای (B-cells) و جذب- ذخیره‌ای (R-cells) در توبول‌های ناحیه پروکسیمال قابل مشاهده هستند (دایره) رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) درشت نمایی × ۱۰.

در مقاطع تهیه شده از یافت هیپاتوپانکراس میگوهای تغذیه شده با جیره‌های ۴۰۰ ppb AFB₁، پس از گذشت ۴ هفته، تغییر شکل (کشیده شدن سلول‌ها) و از بین رفتن سلول‌های بخش پیشین قابل مشاهده بود (تصویر ۱۷). در پایان هفته هشتم، تخریب ساختار لوله‌ای در بخش پیشین، تغییرات دژنراتیو و آتروفی سلول‌های پوششی ترشحی دیده شد (تصویر ۱۸ و تصویر ۱۹).



تصویر ۱۷- مقطع عرضی هپاتوپانکراس میگوی سفید هندی تغذیه شده با جیره حاوی ۴۰۰ ppb آفاتوکسین B₁ بمدت ۴ هفته، در توبول‌ها، تغییر ساختار سلولهای پوششی ترشعی از استوانه ای به مکعبی و اتساع دهانه مجاری ترشعی (پیکان دو سر) و کاهش مواد ترشعی درون مجاری دیده می شود (پیکان). از تعداد سلولهای زایا (E-cells) در توبولهای ناحیه دیستال کاسته شده است (دایره). در ناحیه پروکسیمال بتدریج از تعداد سلولهای ترشعی کیسه‌ای (B-cells) و جذب- ذخیره‌ای (R-cells) کاسته شده و شروع تغییرات دژنراتیو قابل مشاهده است (مستطیل). رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) بزرگ‌نمایی ۱۰×.

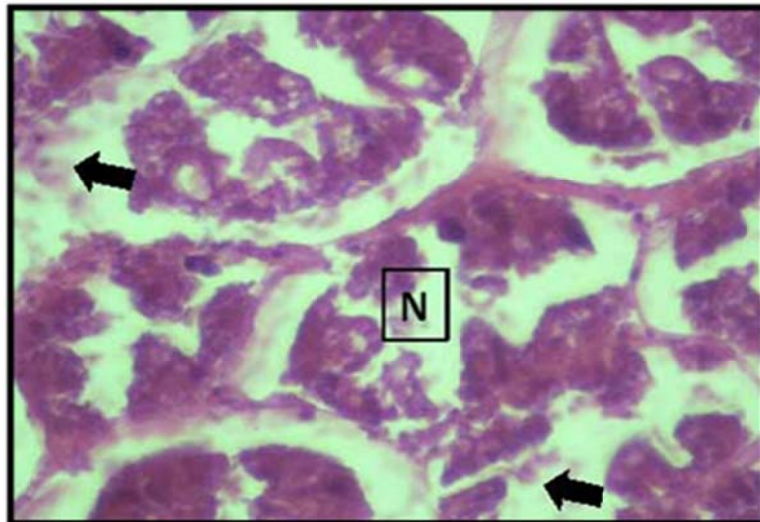


تصویر ۱۸- نمای ریزیینی از هپاتوپانکراس میگوی سفید هندی تغذیه شده با جیره حاوی ۴۰۰ ppb آفاتوکسین B₁ بمدت ۸ هفته، اکثر سلولهای پوششی ترشعی آتروفی شده‌اند. تغییرات دژنراتیو توبول‌ها قابل مشاهده است (پیکانها). رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) بزرگ‌نمایی ۱۰×.

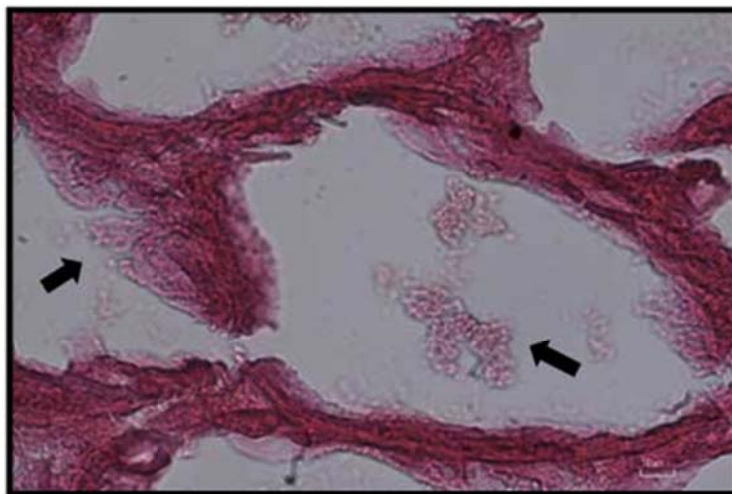


تصویر ۱۹- (نمایی نزدیکتر از تصویر ۱۸) بافت هپاتوپانکراس میگوی سفید هندی تغذیه شده با جیره حاوی ۴۰۰ ppb آفلاتوکسین B₁ بمدت ۸ هفته، مجاری توبول‌ها عاری از مواد ترش‌چی هستند. تغییرات دژنراتیو شروع شده و اکثر سلول‌های پوششی ترش‌چی آتروفی و هسته‌ها پیکنوزه و یا ناپدید شده‌اند (پیکان). رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E). بزرگ‌نمایی ۴۰×.

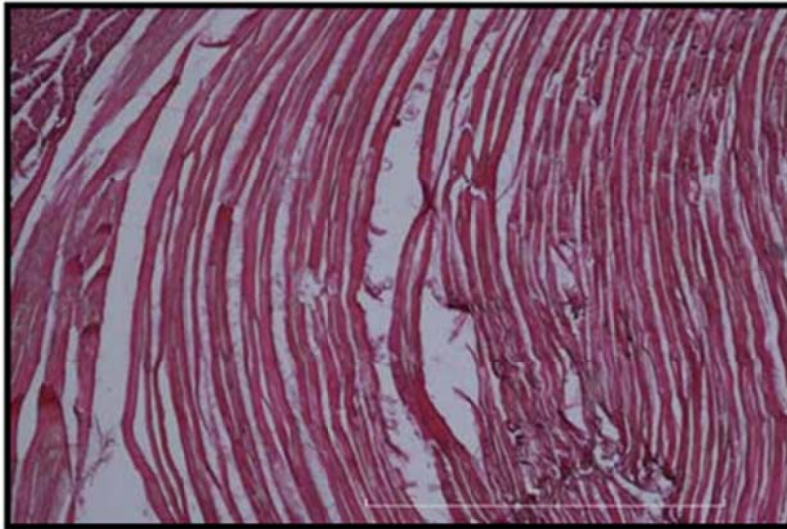
در پایان هفته چهارم، در میگوهای تغذیه شده با جیره‌های ۸۰۰ ppb AFB₁، علائمی مانند نکروز وسیع و تغییر شکل شدید در دیواره توبول‌ها و فضای توبولی دیده شد. تقریباً تمامی سلول‌های پوششی ترش‌چی در دیواره توبول‌ها، از بین رفته بودند (تصویر ۲۰). علاوه بر این در برش طولی بافت عضله این میگوها، افزایش فاصله بین رشته‌ها و دستجات عضلانی دیده شد که نشان دهنده لاغری و کاهش وزن در میگوها می‌باشد (تصویر ۲۲). این علائم با شدت بیشتری در پایان هفته هشتم نیز مشاهده شد (تصویر ۲۳). افزون بر این در پایان هفته هشتم، تمامی سلول‌های پوششی ترش‌چی در دیواره توبول‌ها متلاشی شده و صرفاً تعدادی سلول‌های فیروبلاست در این مناطق قابل مشاهده است. همین تعداد اندک از سلول‌های فیروبلاستی در دیواره توبول‌ها، ساختار توبولی هپاتوپانکراس را حفظ کرده و از متلاشی شدن این ساختارها در بافت هپاتوپانکراس جلوگیری نموده است. به دلیل بالا بودن میزان تخریب بافتی، ریزبافت‌های متلاشی شد در فضای بین توبولی دیده می‌شوند (تصویر ۲۱).



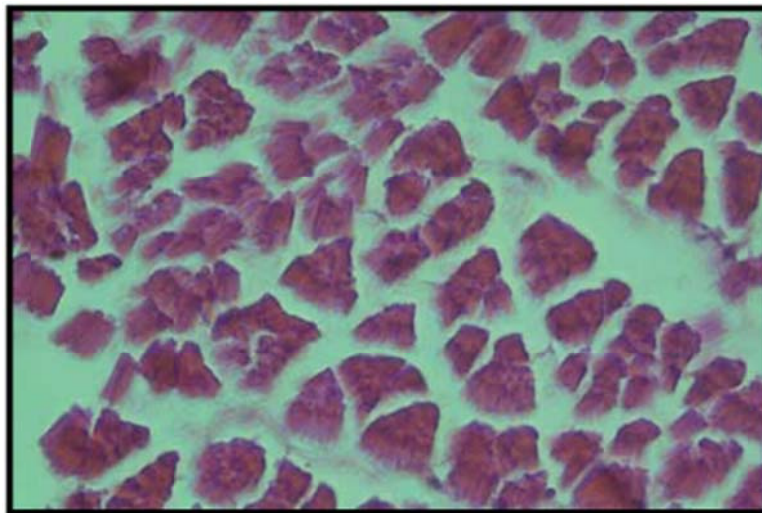
تصویر ۲۰- نمای ریزی از هیپاتوپانکراس میگوی سفید هندی تغذیه شده با جیره حاوی ۸۰۰ ppb آفاتوکسین B₁ بمدت ۴ هفته، توبول‌ها چروکیده و نکروزه شده و اکثر سلولهای پوششی ترش‌ی آنها از بین رفته است. محتویات خارج شده سیتوپلاسم سلولهای نکروزه و هسته‌های پیکنوزه درون مجرای توبول قابل مشاهده هستند (N). مناطق نکروزه بافت‌های بین توبولی و دیواره توبول‌ها با پیکان نمایش داده شده است. رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) بزرگ‌نمایی ۱۰ ×.



تصویر ۲۱- نمای ریزی از هیپاتوپانکراس میگوی سفید هندی تغذیه شده با جیره حاوی ۸۰۰ ppb آفاتوکسین B₁ بمدت ۸ هفته، سلولهای پوششی ترش‌ی توبول‌ها نکروزه شده و متلاشی شده اند و فقط تعدادی از سلولهای فیبروبلاستیک در برخی نواحی جدار توبول‌ها موجب عدم از همپاشی کامل توبول‌ها شده اند. درون مجرای توبول‌ها، ریزه بافت‌های حاصل از تخریب و نکروز سلولها قابل مشاهده هستند (پیکان). رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) بزرگ‌نمایی ۴۰ ×.



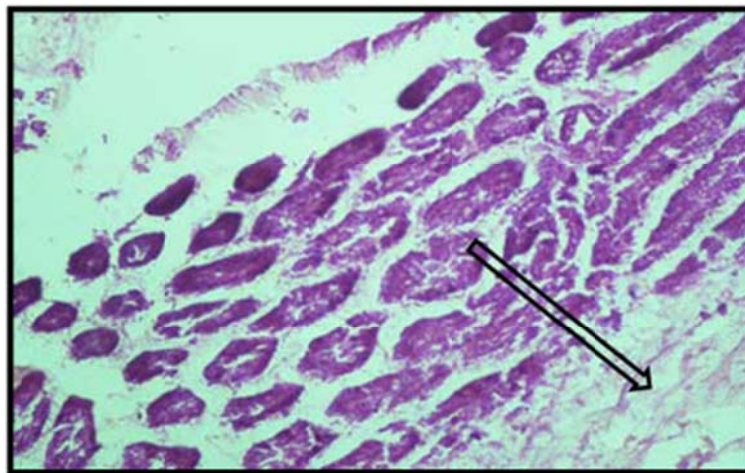
تصویر ۲۲- برش طولی عضله میگوی سفید هندی تغذیه شده با جیره حاوی ۸۰۰ ppb آفلاتوکسین B₁ بمدت ۴ هفته، جدا شدن دستجات عضلانی از یکدیگر و ایجاد فاصله بین آنها دیده می‌شود. این تغییرات می‌تواند به علت کاهش تغذیه در اثر مسمومیت با آفلاتوکسین B₁ و لاغری باشد. رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) بزرگ‌نمایی × ۴.



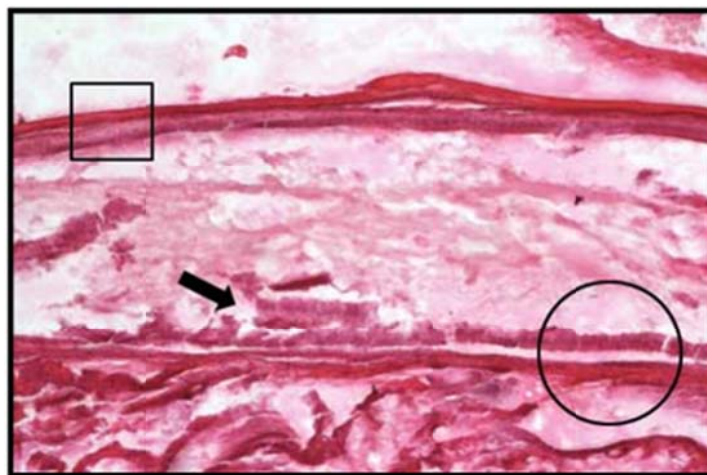
تصویر ۲۳- برش عرضی عضله میگوی سفید هندی تغذیه شده با جیره حاوی ۸۰۰ ppb آفلاتوکسین B₁ بمدت ۸ هفته، افزایش فاصله و جدا شدن دستجات عضلانی از یکدیگر قابل مشاهده است. رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E). درشت‌نمایی ۴۰ برابر.

در پایان هفته چهارم، در میگوهای تغذیه شده با جیره‌های ۱۶۰۰ ppb AFB₁، نکروز شدید، حضور سلولهای فیروپلاست و آغاز شکل‌گیری بافت فیروز، جدا شدن کامل و از هم گسیختگی کپسول همبندی در پیرامون بافت غده‌ای هیپوتوپانکراس، آتروفی شدن کامل سلول‌ها و تمامی ساختار توبولی قابل مشاهده بود (تصویر ۲۴).

پس از گذشت ۸ هفته، در مقاطع بافت شناسی تهیه شده از بافت روده، نشان داد که در برخی از مناطق لایه های چهارگانه دیواره روده هنوز ساختار خود را حفظ کرده است ولی در برخی مناطق، بافت مخاطی در دیواره روده از لایه زیر مخاطی جدا شده بود. در مواردی حتی نکروزه شدن مخاط روده و کنده شدن آن قابل مشاهده بود (تصویر ۲۵).



تصویر ۲۴- نمای ریزینی از هپاتوپانکراس میگوی سفید هندی تغذیه شده با جیره حاوی ۱۶۰۰ ppb آفلاتوکسین B₁ بمدت ۴ هفته، ضایعات و آسیب‌های بافتی از نواحی محیطی (دیستال) غده هپاتوپانکراس به سمت نواحی مرکزی (پروکسیمال) گسترش یافته و شدت می یابند (جهت پیکان). جدا و کنده شدن کپسول همبندی اطراف هپاتوپانکراس و آتروفی شدن سلولها و در نهایت توبولهای ناحیه دیستال، ایجاد تغییرات دژنراتیو در توبولهای نزدیک به ناحیه پروکسیمال، نکروز ساختارهای مرکزی قابل مشاهده است. رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E). درشت نمایی × ۴.



تصویر ۲۵- نمای ریزینی از روده میگوی سفید هندی تغذیه شده با جیره حاوی ۱۶۰۰ ppb آفلاتوکسین B₁ بمدت ۸ هفته، چهار لایه مخاط، زیر مخاط، عضله و سروز (از داخل به خارج) در ناحیه سالم روده قابل مشاهده است (مربع). ضایعات بافتی شامل جدا شدن لایه مخاطی از زیر مخاط (دایره)، نکروزه و کنده شدن مخاط روده (پیکان) نیز دیده می شود. رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) بزرگ نمایی × ۴۰.

دوران بهبود (Amelioration or Detoxification)

میگوهای شاهد و تیمار پس از هشت هفته تیمار بندی طبق جدول ۳-۱۰ به مدت چهار هفته با جیره غذایی فاقد AFB₁ که جهت تغذیه میگوهای شاهد مورد استفاده قرار می گرفت تغذیه شده و هر دو هفته یک بار فاکتورهای PA، TPP، THC و درصد بازماندگی و در پایان هفته دوازدهم تغییرات بافتی و باقیمانده های بافتی، اندازه گیری و تعیین گردید.

علائم بالینی

در هفته دهم پس از آغاز تیمار بندی میگوهای مربوط به تیمارهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ ppb اندک تغییر رنگ و قرمز شدگی جزئی خود را از دست دادند و به رنگ میگوهای شاهد درآمدند. در تیمارهای ۲۰۰، ۴۰۰ ppb تغییر حالت بلغمی هپاتوپانکراس و قوام یافتگی بیشتر این عضو مشهود بود. در تیمارهای ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb تغییر رنگ میگوها و قرمز شدن آنها همچنان مشاهده می شد. بافت هپاتوپانکراس در این دو تیمار تا پایان هفته دوازدهم همچنان بلغمی بوده و قوام خود را بطور کامل از دست داده بود.

تعداد هموسیت کل (THC)

تعداد هموسیت کل در میگوهای شاهد، پس از گذشت ۱۰ و ۱۲ هفته به ترتیب 21.08 ± 71.05 و 25.23 ± 74.59 (10^5 cell/ml) تعیین گردید (جدول ۱۷). طی چهار هفته پایانی تیمار بندی (دوره بهبود)، میزان THC در تمامی تیمارها غیر از سه تیمار آخر (تیمار ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb) بهبود نسبی نشان داد ولی میزان THC در تیمارهای ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb در هفته های هشتم و دوازدهم کاهش یافته و اختلاف معنی داری را نشان داد (نمودار ۱).

در پایان هفته دوازدهم، دوز $(F(7, 112) = 7.192, p < 0.001)$ ، مدت زمان مواجهه $(F(6, 112) = 28.339, p < 0.001)$ و دوز \times مدت زمان مواجهه $(F(42, 112) = 1.987, p = 0.002)$ بر تغییرات THC موثر تشخیص داده شد (جدول ۱۸).

جدول ۱۷- تعداد هموسیت کل (THC) (10^5 cell/ml) میگوهای سفید هندی در دوران بهبود، پس از ۸ هفته تغذیه شدن با جیره‌های حاوی مقادیر مختلفی از آفاتوکسین B_1 و ۴ هفته تغذیه شدن با جیره عاری از آفاتوکسین B_1 .

Total Hemocyte Count ($\times 10^5 \text{ cell/ml}$) [*]	Aflatoxin B_1 concentration (ppb)							
	0	20	50	100	200	400	800	1600
After 10 weeks	71.05±21.80 ^b	63.80±13.41 ^{ab}	57.32±17.52 ^{ab}	45.56±26.34 ^a	35.69±24.47 ^a	38.69±20.06 ^a	31.57±15.82 ^a	34.61±13.18 ^a
After 12 weeks	74.59±25.23 ^c	65.15±17.71 ^{bc}	59.70±22.65 ^{abc}	48.39±6.15 ^{ab}	37.54±18.52 ^{ab}	34.10±20.14 ^{ab}	25.45±8.50 ^a	23.49±7.84 ^a

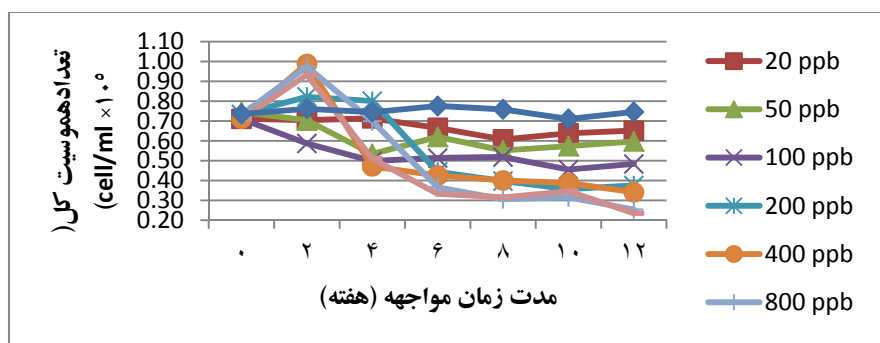
* مقادیر در این جدول بصورت (mean ± SD) ارائه شده است. مقادیر نشان‌گذاری شده با حروف یکسان فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($p < 0.05$).

جدول ۱۸- نتایج آنالیز واریانس دو طرفه مربوط به تعداد هموسیت کل (THC) در میگوهای سفید هندی تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف آفاتوکسین B_1 به مدت ۸ هفته و ۴ هفته تغذیه شدن با جیره عاری از آفاتوکسین B_1 .

Tests of Between-Subjects Effects
Dependent Variable: Total Hemocyte Count

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	57840.293 ^a	55	1051.642	4.613	.000
	572843.155	1	572843.155	2512.756	.000
Dose	11477.790	7	1639.684	7.192	.000
Duration	27338.149	6	4556.358	19.986	.000
Dose * Duration	19024.354	42	452.961	1.987	.002
Error	25533.096	112	227.974		
Total	656216.544	168			
Corrected Total	83373.389	167			

a. R Squared = .694 (Adjusted R Squared = .543)



نمودار ۱- تعداد هموسیت کل (THC) (10^5 cell/ml) میگوهای سفید هندی در دوران بهبود، پس از ۸ هفته تغذیه شدن با جیره‌های حاوی مقادیر مختلفی از آفاتوکسین B_1 و ۴ هفته تغذیه شدن با جیره فاقد آفاتوکسین B_1 .

پروتئین کل پلاسما (TPP)

در تیمار ۱۶۰۰ ppb، از هفته دوم به بعد، میزان TPP کاهش یافت و تا پایان هفته دوازدهم این روند کاهشی ادامه یافت ولی در تیمار ۸۰۰ ppb در دوران بهبود، روند کاهشی TPP متوقف گردید و میزان TPP در تیمار ۸۰۰ ppb از مقدار 30.37 ± 11.05 mg/ml در پایان هفته هشتم به میزان 38.68 ± 13.69 mg/ml در هفته دوازدهم رسید. درحالیکه در همین زمان، در تیمارهای ۲۰۰ و ۴۰۰ ppb مقدار TPP افزایش یافت و به سطح میگوهای شاهد رسید. میزان TPP در تیمار ۱۶۰۰ ppb از هفته دوم کاهش شدید نشان داد و از میزان 17.33 ± 77.20 mg/ml در زمان آغاز آزمایش به مقدار 3.44 ± 17.49 mg/ml در هفته دوم رسید و تا پایان هفته دوازدهم کاهش تدریجی نشان داد. میزان TPP در تیمار ۸۰۰ ppb در هفته دوم کاهش نسبتاً شدیدی را نشان داد و از میزان 17.99 ± 79.94 به 6.25 ± 36.21 mg/ml در هفته دوم رسید و در هفته ششم و هشتم نیز کاهش یافت و به ترتیب به مقدار 6.69 ± 28.92 و 30.37 ± 11.05 mg/ml رسید و تا پایان هفته دوازدهم تقریباً در همین سطح باقی ماند و اختلاف معنی داری مشاهده نشد (نمودار ۲).

آنالیز TukeyHSD نشان داد که در پایان هفته دوازدهم، دوز $(F(7, 112) = 38.842, p < 0.001)$ ، مدت زمان مواجهه $(F(6, 112) = 4.016, p = 0.001)$ بر روی TPP موثر است ولی دوز \times مدت زمان مواجهه $(F(42, 112) = 1.316, p = 0.129)$ بر میزان TPP مؤثر نیست (جدول ۳-۲۰). آزمون Spearman's rho در پایان هفته دوازدهم همبستگی منفی نسبتاً قوی بین TPP و دوز AFB₁ در جیره نشان داد $(r = -0.586^{**})$.

جدول ۱۹- مقدار پروتئین تام پلاسما (TPP) میگوهای سفید هندی در دوران بهبود، پس از ۸ هفته تغذیه شدن با جیره‌های حاوی مقادیر مختلفی از آفلاتوکسین B₁ و ۴ هفته تغذیه شدن با جیره عاری از آفلاتوکسین B₁.

Total Plasma Protein (mg/ml)	Aflatoxin B ₁ concentration (ppb)							
	0	20	50	100	200	400	800	1600
After 10 weeks	74.22±10.93 ^c	94.17±7.19 ^c	94.05±25.07 ^c	82.36±29.53 ^c	73.16±16.83 ^{bc}	60.95±16.83 ^b	43.33±22.04 ^a	14.01±4.40 ^a
After 12 weeks	75.50±16.63 ^{cd}	93.48±5.59 ^d	95.53±5.43 ^d	87.78±30.99 ^d	71.94±24.34 ^{cd}	76.74±25.66 ^c	48.31±29.53 ^b	14.07±3.17 ^a

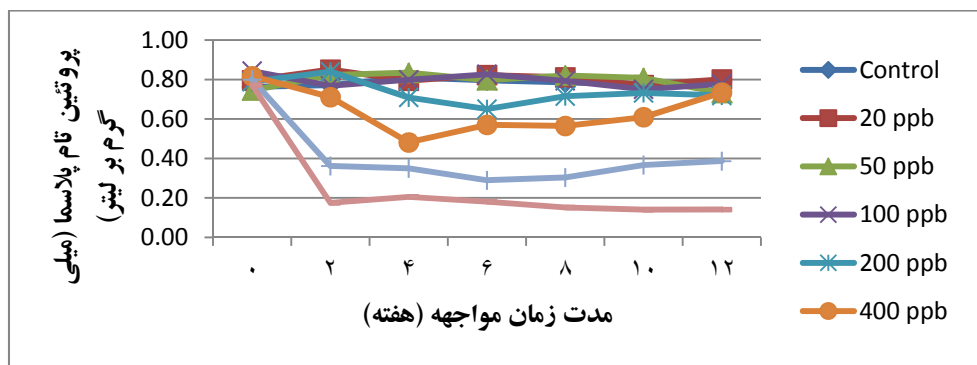
* مقادیر در این جدول بصورت (mean ± SD) ارائه شده است. مقادیر نشان‌گذاری شده با حروف یکسان فاقد اختلاف معنی دار می‌باشند ($p < 0.05$).

جدول ۲۰۰- نتایج آنالیز واریانس دو طرفه مربوط به مقدار پروتئین تام پلاسما (TPP) در میگوهای سفید هندی تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف آفاتوکسین B₁ به مدت ۸ هفته و در ادامه تغذیه شده با جیره عاری از آفاتوکسین B₁ به مدت ۴ هفته.

Tests of Between-Subjects Effects
Dependent Variable: Total Plasma Protein

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	83646.837 ^a	55	1520.852	6.386	.000
	714522.930	1	714522.930	3000.483	.000
Dose	64747.697	7	9249.671	38.842	.000
Duration	5737.630	6	956.272	4.016	.001
Dose * Duration	13161.510	42	313.369	1.316	.129
Error	26671.231	112	238.136		
Total	824840.998	168			
Corrected Total	110318.068	167			

a. R Squared = .758 (Adjusted R Squared = .640)



نمودار ۲- مقدار پروتئین تام پلاسما (TPP) میگوهای سفید هندی در دوران بهبود، پس از ۸ هفته تغذیه شدن با جیره‌های حاوی مقادیر مختلفی از آفاتوکسین B₁ و ۴ هفته تغذیه شدن با جیره عاری از آفاتوکسین B₁.

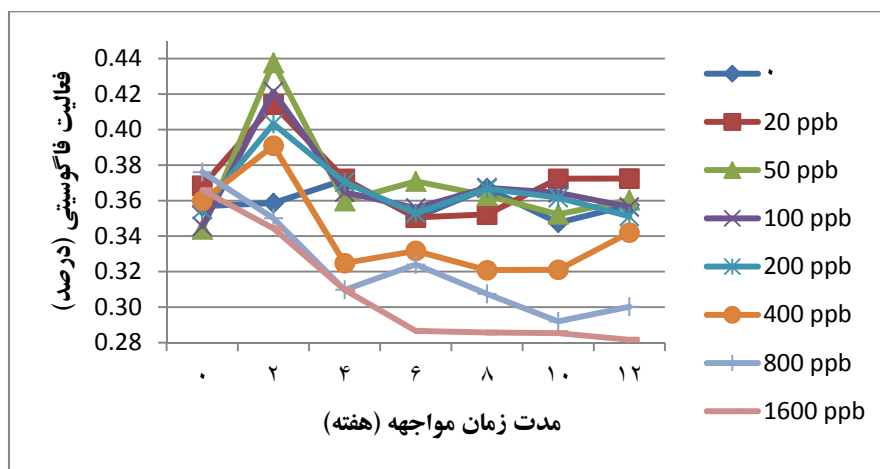
فعالیت فاگوسیتی (PA)

فعالیت فاگوسیتی در تیمارهای ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb، در هفته ششم به کمترین مقدار خود طی ۶ هفته نخست رسید و به ترتیب برابر 32.40 ± 7.68 درصد و 28.66 ± 6.26 درصد تعیین شد و علی رغم افزایش نسبی مشاهده شده در میزان فعالیت فاگوسیتی در سایر تیمارها در این دو تیمار کاهش مشاهده شده در پایان هفته ششم، تا پایان هفته دوازدهم ادامه یافت و در پایان دوره آزمون به ترتیب به 30.02 ± 11.05 درصد و 28.17 ± 10.08 درصد رسید (نمودار ۳). با تغذیه نمودن میگوهای تیمار ۴۰۰ ppb با جیره غذایی میگوهای شاهد، در طول دوره بهبود، از هفته هشتم به بعد درصد PA بهبود یافت و در پایان هفته دهم به 32.11 ± 8.69 درصد افزایش یافت و در نهایت در پایان هفته دوازدهم به مقدار 34.20 ± 13.36 درصد رسید. علی رغم این نوسانات، آنالیز ANOVA دوطرفه (تک متغیره) اختلاف معنی داری را بین تیمارها و شاهد نشان نداد (جدول ۲۱).

جدول ۲۱۰- درصد فعالیت فاگوسیتی (PA) میگوهای سفید هندی در دوران بهبود، پس از ۸ هفته تغذیه شدن با جیره‌های حاوی مقادیر مختلفی از آفلاتوکسین B₁.

Phagocytic Activity (%) [*]	Aflatoxin B ₁ concentration (ppb)							
	0	20	50	100	200	400	800	1600
After 10 weeks	34.76 ± 19.88	37.23 ± 13.68	38.56 ± 3.81	38.78 ± 10.25	33.17 ± 14.30	38.66 ± 3.75	31.86 ± 18.80	28.53 ± 12.92
After 12 weeks	38.41 ± 13.62	37.24 ± 14.89	34.03 ± 7.71	35.64 ± 29.35	35.11 ± 16.71	34.20 ± 22.10	32.36 ± 10.66	29.50 ± 8.20

* مقادیر در این جدول بصورت (mean ± SD) ارائه شده است.



نمودار ۳۰- فعالیت فاگوسیتی (درصد) هموسیت های میگوی سفید هندی تغذیه شده با جیره های حاوی مقادیر متفاوت آفلاتوکسین B₁.

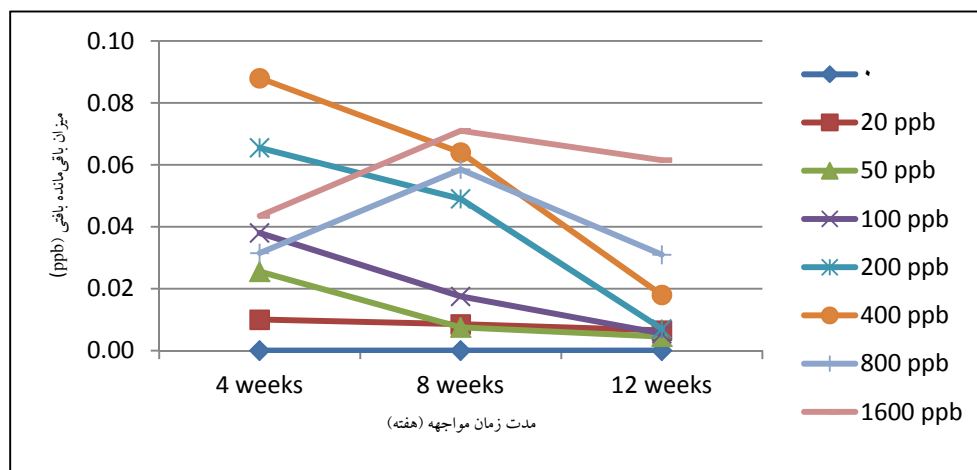
باقی مانده بافتی

روند کاهش در میزان باقی مانده های بافتی در تمامی تیمارها در پایان هفته دوازدهم نیز مشاهده شد و میزان باقی مانده های بافتی در پایان هفته های دهم و دوازدهم به کمترین میزان خود در سرسینه و عضله رسید. روند کاهش باقی مانده های بافتی در سرسینه به غیر از تیمار ۱۶۰۰ ppb، در تمامی تیمارها در پایان هفته هشتم، نسبت به پایان هفته چهارم، روند کاهش نشان داد و این روند کاهش در پایان هفته دوازدهم در تمامی تیمارها حتی در تیمارهای ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb، ادامه یافت. در پایان هفته دوازدهم، میزان باقیمانده های بافتی در عضله، در تمامی تیمارها در مقایسه با باقی مانده بافتی در سرسینه در همان تیمار مقدار کمتری را نشان داد و در پایان هفته دوازدهم اختلاف معنی داری بین باقی مانده های بافتی در پایان هفته دوازدهم و زمان آغاز آزمایش مشاهده نشد (جدول ۲۲).

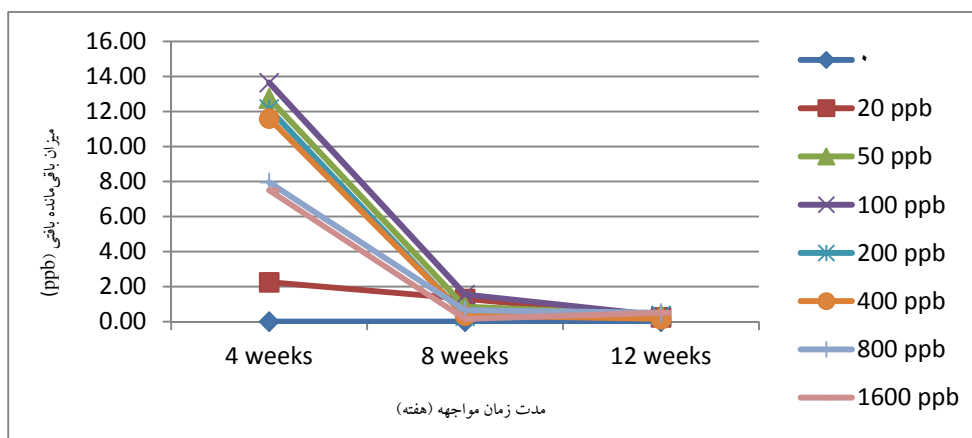
جدول ۲۲۰- میزان باقیمانده بافتی در میگوهای سفید هندی در دوران بهبود (هفته دوازدهم)، پس از ۸ هفته تغذیه شدن با جیره های حاوی مقادیر مختلفی از آفاتوکسین B₁ به تفکیک سر سینه و عضله.

AFB ₁ in diet (ppb)	AFB ₁ residue (ppb)	
	Head	Muscle
0	0 ^a	0 ^a
20	0.65 ^b	0.25 ^b
50	0.45 ^b	0.40 ^{de}
100	0.55 ^c	0.35 ^d
200	0.70 ^d	0.35 ^{de}
400	1.80 ^e	0.15 ^d
800	3.10 ^d	0.50 ^c
1600	6.15 ^e	0.50 ^c

* مقادیر نشان گذاری شده با حروف یکسان در هر ستون، فاقد اختلاف معنی دار می باشند ($p < 0.05$).



نمودار ۴- تغییر میزان باقیمانده های بافتی (ppb) در سر سینه میگوهای شاهد و میگوهای سفید هندی تغذیه شده با جیره های حاوی مقادیر متفاوت از آفاتوکسین B₁ به مدت ۱۲ هفته.



نمودار ۵- تغییر میزان باقیمانده های بافتی (ppb) در عضله میگوهای شاهد و میگوهای سفید هندی تغذیه شده با جیره های حاوی مقادیر متفاوت از آفاتوکسین B₁ به مدت ۱۲ هفته.

بر اساس آزمون Tukey HSD میزان باقی مانده بافتی (مجموع مقادیر مربوط به سرسینه و عضله برای هر نمونه) در تیمارهای ۵۰ ppb تا ۱۶۰۰ ppb در پایان هفته دوازدهم اختلاف معنی داری را نشان نمی‌داد و هم چنین اختلاف معنی داری بین تیمار ۲۰ ppb و شاهد دیده نشد. این در حالی بود که در پایان هفته هشتم تیمارهای ۲۰۰ و ۴۰۰ ppb در یک زیر گروه و تیمارهای ۱۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb نیز در یک زیر گروه قرار گرفتند.

میانگین وزن نهایی، درصد بازماندگی و ضریب تبدیل غذایی

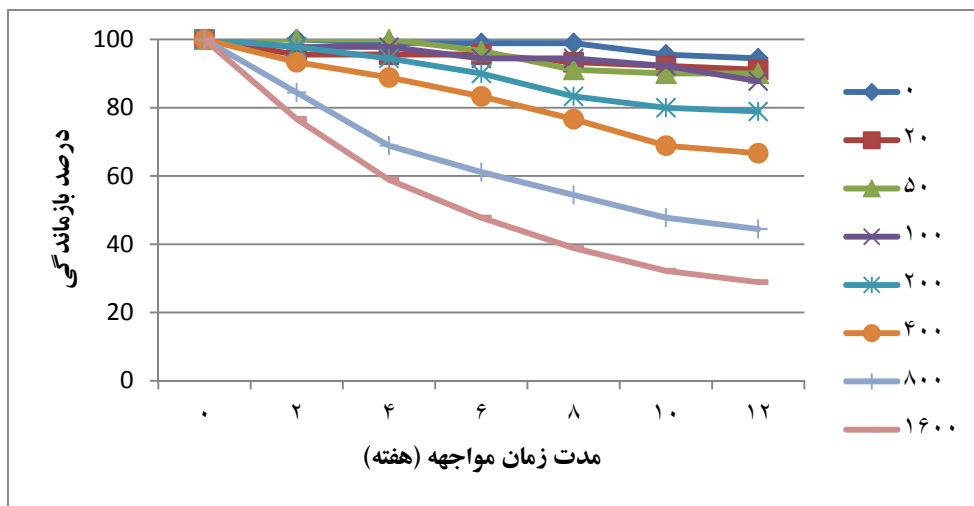
بررسی نتایج پایان هفته دوازدهم نشان داد که اختلاف معنی داری بین وزن در تیمارهای ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ ppb با گروه شاهد مشاهده نمی‌شود (جدول ۲۳) (نمودار ۶). آزمون Tukey HSD نشان داد که تیمار ۴۰۰ و ۸۰۰ ppb با هم اختلاف معنی داری در میزان وزن میگوها نشان نمی‌دهند ولی در پایان هفته دوازدهم، تیمار ۱۶۰۰ ppb با تمامی تیمارها و گروه شاهد، اختلاف معنی داری را نشان داد. در پایان هفته دوازدهم اختلاف معنی داری بین تیمارهای ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ ppb با گروه شاهد مشاهده نشد ولی بین میزان بازماندگی در تیمارهای ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb، اختلاف معنی داری مشاهده گردید. تست Tukey HSD اختلاف معنی داری را بین میزان بازماندگی در پایان هفته دوازدهم با سایر زمان‌ها، غیر از پایان هفته دهم، نشان داد. این آزمون نشان داد که در پایان هفته‌های دوم، چهارم، ششم، و هشتم اختلاف معنی داری در میزان بازماندگی تمامی تیمارها در مقایسه با شاهد مشاهده می‌شود.

جدول ۲۳- میانگین وزن نهایی (گرم) و درصد بازماندگی در میگوهای سفید هندی در دوران بهبود (هفته دوازدهم)، پس از ۸ هفته تغذیه شدن با جیره‌های حاوی مقادیر مختلفی از آفلاتوکسین B₁.

Parameters	Aflatoxin B ₁ concentration (ppb)							
	0	20	50	100	200	400	800	1600
final weight (g)	14.47±1.42 ^c	14.76±1.55 ^c	14.53 ± 1.26 ^c	14.27±1.03 ^c	14.02±1.17 ^c	12.78±1.53 ^b	12.42±1.23 ^b	11.57±0.96 ^a
Survival (%)	94.44±0.57 ^e	91.11±0.57 ^e	90.00 ± 0.00 ^e	87.78±1.15 ^e	78.89±0.57 ^d	66.67±1.00 ^c	44.44±2.30 ^b	28.89±1.59 ^a

* مقادیر در این جدول بصورت (mean ± SD) ارائه شده است. مقادیر نشان‌گذاری شده با حروف یکسان فاقد اختلاف معنی دار می‌باشند ($p < 0.05$).

آنالیز داده‌ها اثرات دوز ($F(7, 928) = 26.257, p < 0.001$)، مدت زمان مواجهه ($F(3, 696) = 5.885, p = 0.001$) و دوز × مدت زمان مواجهه ($F(21, 928) = 3.836, p < 0.001$) و را بر میزان رشد نهایی در پایان هفته هشتم، موثر نشان داد در پایان هفته دوازدهم بین دوز AFB₁ موجود در جیره و وزن نهایی میگوها همبستگی منفی ($r = -0.360^{**}$) و همچنین بین دوز AFB₁ موجود در جیره و مدت زمان مواجهه با درصد بازماندگی همبستگی قوی (بترتیب $r = -0.635^{**}$ و $r = -0.603^{**}$) در سطح ۰.۰۰۱ (دوطرفه) مشاهده شد.



نمودار ۱- درصد بازماندگی میگوی سفید هندی پس از ۸ هفته تغذیه شدن با جیره‌های غذایی حاوی مقادیر مختلف از آفاتوکسین B₁ و در ادامه چهار هفته تغذیه شدن با جیره فاقد آفاتوکسین B₁.

در پایان دوره بهبود، میزان ضریب تبدیل غذایی در تمامی تیمارها تعیین شد (جدول ۲۴).

جدول ۲۴- میزان ضریب تبدیل غذایی در میگوهای سفید هندی در دوران بهبود، پس از ۸ هفته تغذیه شدن با جیره‌های حاوی مقادیر مختلفی از آفاتوکسین B₁ و ۴ هفته تغذیه شدن با جیره فاقد آفاتوکسین B₁.

Parameters	B ₁ concentration (ppb) Aflatoxin							
	0	20	50	100	200	400	800	1600
Food Conversion Ratio	2.22±0.14 ^a	2.18±0.18 ^a	2.31±0.20 ^a	2.40±0.51 ^a	2.66±0.74 ^b	3.14±0.21 ^b	3.66±0.70 ^c	5.04±0.41 ^c

* مقادیر در این جدول بصورت (mean ± SD) ارائه شده است. مقادیر نشان‌گذاری شده با حروف یکسان فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($p < 0.05$).

۵-۳- بحث

بیشتر مطالعات انجام شده بر روی اثرات ناخواسته AFB1، بر روی گونه‌های میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) و میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vanammei*) و همچنین (*Penaeus stylirostris*) می باشد. میگوهای ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) گونه بومی ایران محسوب می‌شود که دارای بازارپسندی بالایی بوده و علاوه بر بازار داخلی در بازارهای جهانی نیز مورد درخواست قرار می‌گیرد. متأسفانه این گونه در صنعت آبی‌پروری ایران، به دلیل عدم تراکم پذیری مناسب، چندان مورد توجه قرار نگرفت و تکثیر کنندگان و پرورش دهندگان میگو در استان بوشهر، که از پیش گامان این صنعت بوده و در حال حاضر نیز بیش از ۶۰ درصد از میگوی پرورشی کشور را در این استان تولید می‌کنند، از گونه سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*) در صنعت میگو استفاده کردند. با ورود این گونه به صنعت تکثیر و پرورش میگوی کشور روند صعودی نسبتاً مناسبی بوجود آمد که با بروز بیماری لکه سفید در مزارع پرورش میگو در استان بوشهر در سال ۱۳۸۴ و لزوم معدوم‌سازی میگوهای پرورشی برای جلوگیری از سرایت بیماری ویروسی لکه سفید، به سایر سایت‌های تکثیر و پرورش کشور، این صنعت نوپا دچار مشکل جدی گردید و به اجبار از میگوی سفید غربی، که علاوه بر بازار پسندی، از مقاومت نسبی در برابر بیماری لکه سفید برخوردار بود، در این صنعت استفاده شد. علی‌رغم محاسن میگوی سفید غربی، به دلیل تمایل پرورش دهندگان و تکثیر کنندگان به استفاده از میگوی سفید هندی، پژوهش‌های گوناگون همچنان بر روی این گونه ادامه دارد؛ زیرا بیونرماتیوهای تکثیر و پرورش آن در کشور کاملاً شناخته شده و تکثیر و پرورش آن بازده بالایی دارد.

منطقه مورد استفاده در جنوب کشور برای تکثیر و پرورش میگو، دارای آب و هوای گرم و مرطوب بوده و شرایط آب و هوایی آن برای رشد قارچ‌ها بسیار مساعد می‌باشد. به دلیل دراختیار نبودن اطلاعات مربوط به حساسیت میگوی سفید هندی به آفلاتوکسین‌ها، همواره این مسأله مطرح شده است که آیا با توجه به عدم دسترسی بسیاری از سایت‌های تکثیر و پرورش به شبکه توزیع برق و لزوم تأمین برق لازم از طریق ژنراتورهای صنعتی، باید پرورش دهندگان را مجبور نمود جیره‌های غذایی کنسانتره مورد استفاده در تغذیه میگوهای پرورشی را در سردخانه نگهداری کنند؟ چرا که این کار هزینه زیادی را به پرورش دهنده تحمیل می‌کند. علاوه بر این، وجود آفلاتوکسین‌ها در غذای کنسانتره تا چه میزان مجاز بوده و توانایی میگوها در متابولیزه کردن این توکسین به گونه‌ای که سلامت مصرف کنندگان را به خطر نیاندازد، چقدر است؟ متأسفانه درباره حساسیت میگوی سفید هندی مطالعه‌ای در داخل یا خارج کشور انجام نشده است. با مطالعه استانداردهای ملی ارائه شده توسط مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (۳۶) یا اصلاحیه‌های موجود (۳۷)، درمی‌یابیم که در استانداردهای تهیه شده، در خصوص حد مجاز مایکوتوکسین‌ها در جیره‌های غذایی آبزیان، مطلبی ارائه نشده و میزان تحمل این جانوران و همچنین از احتمال ورود مایکوتوکسین‌ها به جیره غذایی انسان توسط مصرف غذایی آبزیان، سخنی به میان نیامده است. اختلاف نظر در این خصوص بین اداره کل شیلات، اداره کل

دامپزشکی و پژوهشکده میگوی کشور از یک سو و تکثیر کننده و پرورش دهنده از سوی دیگر، ضرورت این تحقیق را ایجاب نمود.

مطالعات انجام شده در کشورهای مختلف نشان داده است که در جیره‌های غذای مورد استفاده در تغذیه دام، طیور و آبزیان و همچنین نهاده‌های مورد استفاده جهت تولید این جیره‌ها، در صورتی که در شرایط مناسب نگهداری شده و دستورالعمل‌های موجود رعایت شود، میزان توکسین‌های قارچی در آنها کمتر از میزان مجاز برای این توکسین‌ها می‌باشد (۳۶). بسیاری از مطالعات انجام شده مؤید این مطلب است که افزایش زمان نگهداری مواد غذایی در شرایط غیر استاندارد موجب افزایش باقی‌مانده سموم قارچی شده و علاوه بر این میزان قارچ‌های توکسین‌زا نیز افزایش می‌یابد. در مواردی میزان AFB1 در جیره‌های دامی در حدود 2000 ppm (۲۲). در جدول ۱۵ مقادیر آفاتوکسین B1 موجود در مواد غذایی مورد استفاده در تغذیه میگوهای پرورشی در کشورهای مختلف جهان ارائه شده است. در مطالعه حاضر میزان AFB1 موجود در غذای کنسانتره میگوهای پرورشی، 0 - 80/62 ppb اندازه‌گیری شد.

جدول ۱۵ - مقادیر آفاتوکسین B1 موجود در جیره‌های مورد استفاده در تغذیه میگوهای پرورشی در کشورهای مختلف

مکان	میزان آفاتوکسین (ppb) (B1)	منبع
ایالات متحده آمریکا	تا ۷۰	(۹۶)
هندوستان	۱۰-۱۳۰	(۴۳)
تایلند	تا ۴۸	(۱۰)
تایلند	۳-۶۵۰	(۸)
هندوستان	تا ۲۵۰	(۳۰)

زیاد بودن میزان AFB1 در جیره‌های غذایی مورد استفاده در تغذیه دام و طیور و آبزیان از دو منظر مورد توجه قرار می‌گیرد، یکی از نظر بهداشت مواد غذایی، که در سلامت جوامع انسانی بسیار مهم می‌باشد و دیگری از دید بهداشت و سلامت دام، که افزون بر سلامت مواد غذایی تولید شده برای مصارف انسانی، بر میزان تولید نهایی در فعالیت‌های دامپروری و پرورش طیور و آبزیان حائز اهمیت می‌باشد و عدم توجه به این مهم، با توجه به اثرات شناخته شده AFB1، از جمله کاهش اشتها و تخریب بافت‌های دستگاه گوارش و همچنین سرکوب سیستم ایمنی، می‌تواند منجر به کاهش تولید و افزایش احتمال بروز بیماری‌های عفونی و غیرعفونی در دام‌های پرورشی گردد.

فراوانی مایکوتوکسین ها و گونه‌های آسپرژیلوس و فوزاریوم در غذای کنسانتره میگوهای

پرورشی

کیفیت و کمیت جیره‌های غذایی مورد استفاده برای تغذیه میگوهای پرورشی، علاوه بر این که بر میزان تولید نهایی مؤثر خواهد بود، بر فیزیولوژی، شاخص‌های سلامتی و کارکرد سیستم ایمنی میگوهای پرورشی نیز مؤثر است. از راه‌کارهای رایج برای مقرون به صرفه کردن تولید در سیستم‌های پرورشی، افزایش تراکم یا افزایش تعداد جانور در واحد سطح یا حجم می‌باشد. میگوهای پرورشی نیز گرچه آیزی هستند ولی به دلیل کفزی بودن و استقرار در بستر استخرهای پرورشی، با واحد میگو در واحد سطح در استخرهای پرورش میگو ذخیره‌سازی می‌شوند. میگوهای پرورشی، که مانند سایر آبزیان در سوسپانسیونی از میکروارگانیسم‌های بیماریزا، فرصت‌طلب و ساپروفیت پرورش می‌یابند، باید علاوه بر رقابت غذایی با یکدیگر، با تعداد فراوانی از میکروارگانیسم‌های موجود در محیط پیرامونی خود نیز مقابله نمایند. افزایش تعداد میگو در واحد سطح، به عنوان یک استرس مهم برای میگوها مطرح می‌گردد. در صورت مناسب نبودن کمیت و کیفیت جیره‌های غذایی مورد استفاده در تغذیه میگوها، میزان تولید نهایی کاهش یافته و همچنین به واسطه تضعیف عملکرد سیستم ایمنی، بقاء میگوهای پرورشی به خطر خواهد افتاد.

افزایش روز افزون تقاضا برای خرید میگو در بازارهای داخلی و جهانی، منجر به وارد شدن فشار بیش از پیش به صنعت پرورش میگو شده است. از این رو شرکت‌های متعددی در داخل و خارج از کشور برای تولید جیره‌های غذایی تأسیس شده‌اند. تعدد این شرکت‌ها و نوسانات موجود در بازار، درخصوص دستیابی به مواد اولیه لازم برای تولید جیره‌های غذایی، باعث شده است که تکثیرکنندگان و پرورش دهندگان میگو در معرض تغییرات مداوم، در کیفیت و بهای جیره‌های غذایی موجود در این صنعت، قرار گیرند. یکی از روشهایی که پرورش دهندگان برای مقابله با نوسانات موجود در بازار انجام می‌دهند، خریداری کردن و انبار نمودن مواد غذایی مورد نیاز برای یک دوره پرورش (حدوداً ۱۲۰ روز) می‌باشد. جیره‌های دارای رطوبت بالا (با فعالیت آبی، aw، بیش از ۰/۸) و دمای بالا (بیش از ۲۰ درجه سانتیگراد) مستعد آلودگی به مایکوتوکسین‌ها می‌باشند (۷۳). انبار کردن مواد غذایی در شرایط آب و هوایی مرطوب (با رطوبت بیش از ۶۵ درصد) بویژه در حضور حشرات و تخریب پوشش سطحی دانه‌های گیاهی، احتمال آلوده شدن مواد غذایی به قارچ‌های تولید کننده آفلاتوکسین‌ها را افزایش می‌دهد (۹۲).

در بررسی انجام شده توسط Khosravi و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی فراوانی قارچ‌های موجود در غذای دام آماده شده یا نهاده‌های آنها در استان قم، گونه‌های آسپرژیلوس ۵۶ درصد و گونه‌های فوزاریوم صرفاً ۶ درصد از قارچ‌های جدا شده را به خود اختصاص داده‌اند. از بین گونه‌های مربوط به جنس آسپرژیلوس، *A. flavus* با ۴۸ درصد موارد بیشترین فراوانی را داشته است (۴۵).

از سوی دیگر نهاده‌های مورد استفاده در صنعت تولید مواد غذایی دام، طیور و آبزیان، از کیفیت پایین‌تری برخوردار بوده و احتمال اینکه واجد توکسین‌های قارچی و ترکیبات شیمیایی ناخواسته باشند، بیشتر است (۹۸). غلات بطور طبیعی، قبل، در هنگام و پس از برداشت و همچنین در هنگام انتقال و انبار کردن با اسپورهای قارچی مواجهه دارند. از این رو غلات را می‌توان از مهمترین منابع آلوده کننده غذای انسان و دام به مایکوتوکسین‌ها دانست (۹۲). مطالعات متعدد در مناطق جغرافیایی مختلف، نشان می‌دهد که ۲۴ تا ۴۰ درصد از غلات مورد استفاده در تهیه مواد غذایی دام و انسان، به آفلاتوکسین‌ها آلوده می‌باشد. با جهانی شدن داد و ستد محصولات کشاورزی، توجه به ضررهای ناشی از مایکوتوکسین‌ها اهمیت بیشتری یافته است. در مطالعه‌ای که به مدت ۲ سال، بر روی ۱۵۰۲ نمونه از مواد غذایی کامل یا نهاده‌های مورد استفاده در فرمولاسیون غذای دامی، از بازارهای اروپا و مدیترانه و ۱۲۹۱ نمونه از مناطق آسیای جنوب شرقی انجام شده است، مشخص گردید که بیش از نیمی از مواد غذایی نمونه‌برداری شده از اروپا و در حدود یک سوم از نمونه‌های مربوط به آسیا حاوی مقادیری بیش از حد مجاز سموم فوزاریومی (دی اکسی نیوالنول، T-2، زیرالنون، فومونیزین B1، FB2، FB3) و اکراتوکسین و آفلاتوکسین B1 می‌باشد (۷).

در مطالعه انجام شده توسط یوسفی و همکاران در ۱۳۸۸ که بر روی سوش‌های آسپرژیلوس فلاووس‌های جدا شده از میگوهای ببری سبز استان بوشهر (۴۳ سوش مربوط به مطالعه‌ای که قبلاً در بررسی فلور قارچی میگوهای ببری سبز استان بوشهر (۲۷)، جداسازی و شناسایی شده بود) انجام گرفته است، مشخص کرد که از ۴۳ سوش مورد بررسی ۹ سوش (تقریباً ۲۰ درصد) توانایی تولید آفلاتوکسین‌های B1 و B2 را داشته‌اند (۹۹).

با توجه به راه‌های ورود مایکوتوکسین‌ها به زنجیره غذایی و ماندگاری این متابولیت‌های ثانویه قارچی در زنجیره غذایی، مشکلات بسیاری برای تولید کنندگان مواد غذایی برای مصارف انسانی و دامی بوجود می‌آید. برای مثال ذرت به دلیل داشتن رنگدانه زانتوفیل (Xanthophyll) و ایجاد رنگ زرد در بافت ماهی و میگو (۸۱)، بطور مستقیم در تهیه غذای کنسانتره میگو مورد استفاده قرار نمی‌گیرد، ولی با توجه به این که ذرت بخش اعظمی از جیره مرغذاری‌ها را تأمین می‌کند، ضایعات حاصل از کارخانه‌های فرآوری و بسته بندی مرغ، در صورت استفاده به عنوان منبع پروتئین جانوری برای تهیه غذای میگو، می‌تواند راه ورودی برای توکسین‌های وابسته به ذرت مانند فومونیزین‌ها به مواد غذایی کنسانتره میگو باشد.

مهمترین هزینه پرورش میگو و سایر آبزیان مربوط به تأمین و نگهداری جیره‌های غذایی بوده و در بین نهاده‌های لازم برای تولید این جیره‌ها، پروتئین بیشترین هزینه را به خود اختصاص می‌دهد (۶۱). در حال حاضر تلاش بسیار زیادی برای جایگزین کردن پروتئین‌های گیاهی به جای پروتئین‌های جانوری در فرمولاسیون جیره‌های غذایی مورد استفاده در پرورش میگو انجام شده است. چند مطالعه نیز در داخل کشور و در پژوهشکده میگوی انجام شده یا در دست انجام می‌باشد. همانطور که پیش‌تر نیز بیان گردید، استفاده از پروتئین‌های گیاهی به دلیل

آلودگی بیشتر نهاده‌های گیاهی به مایکوتوکسین‌ها، احتمال ورود مایکوتوکسین‌ها به جیره‌های غذایی را افزایش می‌دهد (۱۰۰).

در خصوص تأثیر مایکوتوکسین‌های مختلف بر روی میگوها، مطالعات اندکی انجام شده است. به غیر از آفلاتوکسین‌ها، که بیشتر بر روی AFB1 نیز مطالعه شده است، مطالعات اندکی بر روی سایر سموم قارچی مانند دی‌اکسی‌نیوالنول (91) (deoxynivalenol)، اُکراتوکسین (87) (ochratoxin)، زیرالنون (zearelenone) و T-2 توکسین (۸۶) و فومونیزین (۵۹) بر روی میگوها صورت پذیرفته است و تمامی این توکسین‌ها به عنوان عوامل ایجاد کننده ضایعات بافت‌شناسی، سرکوب کننده یا تضعیف کننده سیستم ایمنی معرفی شده‌اند. اما همانطور که مطالعات انجام شده بر روی انسان، دام و طیور نشان داده، امکان هم‌افزایی این توکسین‌ها در بسیاری از موارد به اثبات رسیده است. همراه شدن مقادیر اندکی از چند مایکوتوکسین، در یک جیره غذایی، منجر به هم‌افزایی یا سینرژسم این توکسین‌ها شده و ضایعات بافتی و آسیب‌های ایجاد شده توسط مجموعه‌ای از این توکسین‌ها در مقایسه با استفاده خوراکی از دوزهای منفرد هر کدام از این توکسین‌ها، افزایش می‌یابد (۶). این مسأله می‌تواند نشان دهنده اهمیت حضور توآمان توکسین‌های قارچی، به میزان اندک، در مواد غذایی دام یا انسان باشد و بسیاری از عوارض نسبت داده شده به این توکسین‌ها در دوزهای کم را توجیه می‌کند (۱۸).

۱-۵-۳- قرمز شدن و تغییر حالت هپاتوپانکراس در میگوهای دریافت کننده AFB1

تغییر رنگ هپاتوپانکراس و تغییر حالت ظاهری آن در میگوهای دریافت کننده جیره‌های غذایی حاوی مقادیر بیش از 400 ppb را می‌توان به دلیل تغییرات بافت‌شناسی و بیوشیمیایی هپاتوپانکراس دانست. همانطور که Lightner و همکارانش در سال ۱۹۸۲ گزارش نمودند، سخت‌پوستان واجد نوعی رنگدانه کاروتنوئیدی می‌باشند و در میگوها، بخش عمده این رنگدانه بتاکاروتنی، در بافت هپاتوپانکراس تجمع یافته است (۵۵). آتروفی و نکروز بافت هپاتوپانکراس، موجب آزاد شدن محتوای بتاکاروتنی و سایر کاروتنوئیدهای بافت هپاتوپانکراس و وارد شدن آنها به جریان همولف می‌شود. از سوی دیگر با آسیب دیدن بافت هپاتوپانکراس، امکان بازجذب کاروتن‌های آزاد شده در همولف، وجود نداشته و موجب تغییر رنگ و قرمز شدن بدن و حتی مدفوع میگوهای آسیب دیده می‌گردد. در مطالعه انجام شده توسط Cruz و Tendencia تغییر رنگ و قرمز شدن بدن در میگوهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی AFB1 150-200 ppb با میزان بروز زیاد گزارش شده است (۱۷). در توضیح دلیل مشاهده هپاتوپانکراس به رنگ زرد-کرم در تیمارهای ۸۰۰ و 1600 ppb می‌توان گفت، تخریب ساختار هپاتوپانکراس و آزاد شدن رنگدانه در ابتدا موجب قرمز شدن این اندام شده و با ادامه یافتن این روند و از دست دادن رنگدانه و همچنین ناتوانی جانور در جذب محتوای کاروتنی موجود در جیره غذایی، موجب تغییر رنگ بافت هپاتوپانکراس به رنگ زرد-کرم رنگ می‌شود.

در این مطالعه لکه‌های منتشره قرمز رنگ در سطح بدن میگوها که در برخی از مطالعات (۵۴) از آن به عنوان علائم نکروز هپاتوپانکراسی سپتیک نام برده شده است حتی در تیمارهای ۸۰۰ ppb و ۱۶۰۰ ppb مشاهده نشد. بیماری قرمز شدن بدن، اولین بار در میگوی ببری سیاه دیده شد و دو دلیل برای عفونی نبودن آن مورد تاکید قرار گرفت، اول، عدم پاسخ‌گویی به درمانهای آنتی‌بیوتیکی، دوم، عدم انتقال بیماری به سایر میگوهای ببری سیاه در صورت نگهداری میگوهای قرمز رنگ شده و سالم در یک محیط. دلیل مشاهده نشدن بیماری علائم نکروز هپاتوپانکراسی سپتیک در میگوهای سفید هندی در این مطالعه را شاید بتوان به محتوای کاروتنوئیدی این گونه نسبت داد. در یک بررسی میزان کاروتنوئید موجود در بدن چهار گونه *F.indicus*، *P.monodon*، *Metapenaeus dobsonii* و *Parapenaeopsis stylifera* به تفکیک اعضاء سرسبته و عضله مورد بررسی قرار گرفته است (۷۵). نتایج این بررسی نشان داده است که میگوی سفید هندی دارای کمترین میزان کاروتنوئید در سرسینه و عضله خود در مقایسه با سه گونه دیگر بوده و میگوی ببری سیاه بیشترین میزان کاروتنوئید موجود در عضله را در بین این چهار گونه دارا می‌باشد. در سال ۱۳۸۱ نیز در استان بوشهر مشکل مشابهی دیده شد. میگوهای پرورشی در این استان، که در آن سال میگوی سفید هندی بود، پس از برداشت از نظر ظاهری سالم بودند ولی در حین فرآیند فرآوری در مجتمع‌های فرآوری استان، بخش هپاتوپانکراس میگوها، به رنگ نارنجی - قرمز دیده می‌شد که موجب کاهش بازارپسندی میگوها گردید و فرآوران مجبور شدند بخش عمده این میگوها را بصورت میگوهای فاقد سر به بازار عرضه کنند. بررسی‌های اولیه، وجود عوامل عفونی را رد کرد و در نهایت، مطالعات اپیدمیولوژیک مشکل را مربوط به تغذیه میگوها دانست. در این خصوص صرفاً یک مورد گزارش داخلی در پژوهشکده میگوی کشور موجود است.

۲-۵-۳- تأثیر تغذیه با جیره‌های مختلف AFB1 بر رشد میگوهای سفید هندی

در این مطالعه مشاهده شد که تغذیه نمودن میگوهای سفید هندی جوان با جیره‌های حاوی مقادیر بیش از ۴۰۰ ppb موجب کاهش میزان رشد در میگوها شده است. میزان رشد با افزایش پیشروند میزان AFB1 در جیره‌ها، کاهش یافته و در نهایت در جیره حاوی ۱۶۰۰ ppb AFB1 کاهش رشد به بیشترین میزان خود در این مطالعه رسید. پس از پایان یافتن ۸ هفته تیمار بندی بلافاصله تغذیه میگوها با جیره‌های فاقد AFB1 به مدت ۴ هفته، برای بررسی امکان بهبود در میگوهای آسیب دیده، انجام شد. نتایج نشان داد که همچنان روند کاهشی در میزان رشد و وزن نهایی میگوها دیده می‌شود. مطالعات بافت‌شناسی نیز این امر را تأیید کرد و نشان داد که رشته‌های عضلانی، تحلیل رفته و جانور دچار لاغر می‌شود. بررسی‌های بافت‌شناسی روده نیز این مطلب را تأیید کرده و آشکار ساخت که تغذیه میگوها با جیره‌های حاوی مقادیر بیش از ۸۰۰ ppb، موجب تخریب دیواره روده و بافت‌های دستگاه گوارش شده که این تخریب بافتی در تیمارهای ۱۶۰۰ ppb بسیار شدید می‌باشد به گونه‌ای که، تمامی لایه‌های بافتی روده آسیب دیده و بافت هپاتوپانکراس نیز به شدت تخریب شده است و این کاهش

وزن باید به دلیل اختلال در جذب مواد غذایی توسط روده و ناتوانی سلولهای هپاتوپانکراس در ترشح آنزیمهای گوارشی و ایفای نقش خود در متابولیسم مواد غذایی باشد. پس از آسیب رسیدن به بافتها، علاوه بر این که جذب مواد غذایی مختل می‌شود، مواد پروتئینی موجود نیز برای ترمیم بافت‌های آسیب دیده و همچنین بازسازی ساختارهای دفاعی و جلوگیری از تلف شدن جانور صرف می‌شود. این فرآیند، موجب می‌گردد که پروتئین‌ها به جای اینکه در بافت عضله و در نهایت در تولید نهایی وارد شوند، برای بقاء جانور هزینه شده و در نتیجه ضریب تبدیل غذایی (FCR) افزایش می‌باید (جدول ۲۲۴). کاهش میزان رشد نهایی در میگوهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی بیش از 50 ppb گرچه اختلاف معنی‌داری را با میگوهای شاهد نشان نمی‌دهد ولی کاهش اندک در مقدار وزن نهایی، موجب افزایش ضریب تبدیل غذایی و کاهش میزان تولید نهایی می‌شود. این یافته‌ها با نتایج ارائه شده توسط Ostrowski-Meissner مطابقت دارد. کاهش وزن نیز به دلیل اختلال در جذب مواد غذایی و آسیب رسیدن به دستگاه گوارش اتفاق می‌افتد. در اغلب مطالعه‌های انجام شده، شاخص‌های رشد صرفاً در پست لاروهای میگوهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی AFB1 مورد بررسی قرار می‌گیرد و در صورتی که میگوهای مورد مطالعه میگوهای جوان و بالغ باشند، شاخص‌های سلامتی مورد ارزیابی واقع می‌شوند. بر اساس گزارش ارائه شده توسط Bautista و همکاران در سال ۱۹۹۴، تغذیه نمودن میگوهای ببری سیاه با جیره‌های حاوی بیش از 50 ppb آفلاتوکسین B1 به مدت ۶۲ روز، بر میزان رشد میگوها تأثیر ندارد. بر اساس اطلاعات بدست آمده از مطالعه جاری نیز می‌توان اعلام کرد که تغذیه نمودن میگوهای سفید هندی جوان به مدت ۸ هفته (۵۶ روز) با جیره‌های حاوی ۵۰ و 100 ppb، بر میزان رشد نهایی میگوها تأثیر نداشته و آنالیز آماری اختلاف معنی‌داری را در این خصوص با میگوهای شاهد نشان نمی‌دهد (۴). در مطالعه‌ای که توسط Ostrowski-Meissner و همکاران (۱۹۹۵) بر روی میگوهای سفید غربی با میانگین وزنی ۱/۶۱ و ۱/۵۱ گرم انجام شده است، نشان داد که در تیمارهای بیش از 3 ppm، میزان رشد منفی شده است. در این مطالعه، در تیمار ppm 15، پس از دو هفته، ۱۰۰ درصد تلفات (درصد بازماندگی صفر درصد) گزارش شده است. میزان ضریب تبدیل غذایی در این مطالعه در تیمارهای بیش از 400 ppb، اختلاف معنی‌داری را با شاهد نشان داده اند (۶۲). افزایش میزان FCR در مطالعه پیش رو (جدول ۲۲۴) با مطالعه‌های مشابه، هم‌خوانی دارد. مطالعه مقاطع بافت‌شناسی بافت عضله، در میگوهای سفید هندی که با جیره‌های بیش از 800 ppb AFB1 تغذیه شده بودند و مشاهد تغییر ساختار این بافت و آتروفی و تحلیل رفتن بافت عضلانی (تصویر ۱۳۴ و تصویر ۱۴۴)، کاهش وزن مشاهده شده در تیمارهای بیش از 800 ppb در پایان هفته‌های چهارم و هشتم را توجیه می‌کند. مطالعه Bautista و همکاران نیز نشان داد که پس از گذشت ۴۵ روز از تغذیه نمودن میگوهای ببری سیاه ($6/0 \pm 5/17$ g) از جیره حاوی بیش از 200 ppb AFB1، در میگوها کاهش وزن مشاهده می‌شود (۴). این مطلب با یافته‌های مطالعه پیش رو هم‌خوانی دارد.

در خصوص دلایل محتوای پروتئین بافتی، Penning بیان نموده است که تاثیر AFB1 می تواند به دلیل ایجاد اختلال در متابولیسم پروتئین، چربی و کربوهیدرات باشد که اثرات خود را با کاهش وزن نهایی (تولید) و تقلیل یافتن فعالیت متابولیسم سلول ها بارز می نماید (۶۳). کاهش اشتها را می توان یک واکنش طبیعی از سوی ساختار فیزیولوژیک جانور محسوب کرد تا بتواند از ورود مجدد توکسین و تخریب بیشتر دستگاه گوارش جلوگیری نماید. همانطور که Lightner و همکارانش اشاره کرده اند، به نظر می رسد پس از آسیب رسیدن به بافت هپاتوپانکراس، میگو برای اجتناب از دریافت بیشتر AFB1 به گرسنگی متوسل می شود که احتمالاً به دلیل تغییر در کنش های فیزیولوژیک و از بین رفتن اشتها می باشد (۵۵). بر اساس مشاهدات Ostrowski-Meissner و همکارانش نیز میگوها بیشتر ترجیح می دهند با گرسنگی درگیر باشند تا اینکه با مصرف جیره آلوده، توکسین بیشتری را وارد بدن نمایند (۶۲).

این نکته را نیز باید در نظر داشت یکی از وظایف مهم هپاتوپانکراس سم زدایی می باشد (۲۰). در جانوران تکامل یافته تر، این وظیفه بر عهد کبد است. بافت هدف AFB1 نیز هپاتوپانکراس بوده و با پیشرفت مسمومیت و تخریب بیشتر بافت هپاتوپانکراس، فرآیند سم زدایی نیز مختل شده که این امر موجب تشدید علائم بالینی و هیستوپاتولوژیک مسمومیت می گردد (۹۸). یافته های این مطالعه و مطالعات مشابه نشان می دهد که بافت عضلانی نیز توانایی بالایی در خشی کردن آفلاتوکسین B1 دارد، زیرا حتی در تیمارهایی ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb نیز که با توجه به یافته های هیستوپاتولوژی، آسیب جدی به بافت هپاتوپانکراس وارد شده است (تصویر ۴۴)، میزان باقی مانده های AFB1 در عضله میگوهای این تیمارها، در سطح بسیار پایینی قرار دارد (جدول ۱۴۴).

کاهش بازده رشد در میگوهای ببری سیاه تغذیه شده با جیره های حاوی بیش از ۱۰۰۰ ppb توسط Boonyaratpalin و همکاران در سال ۲۰۰۱ نیز گزارش شده است. اختلاف بین غلظت AFB1 در جیره ها شاید علاوه بر تفاوت در گونه ها، به دلیل تفاوت در وزن میگوهای مورد بررسی باشد. در مطالعه Boonyaratpalin و همکاران از پست لاروهای ۱۵ با وزن تقریبی ۷/۰ g استفاده شده است ولی میانگین وزنی میگوهای مورد استفاده در مطالعه حاضر 11.79 ± 1.76 گرم بود. در این صورت این نکته که میگوهای جوان تر به آفلاتوکسین ها حساسترند، باید با احتیاط بیان شود.

در مطالعه انجام شده توسط Ostrowski-Meissner و همکارانش در ۱۹۹۵ تأثیر تغذیه با جیره های حاوی ppb AFB1 1500-0 به مدت ۲۱ روز بر میگوهای سفید غربی با میانگین وزنی بیش از ۱/۵ گرم را مورد بررسی قرار دادند. میزان FCR در تیمار ۱۵۰۰ ppb، بیش از ۵ برابر میزان این شاخص در میگوهای شاهد تعیین شد که نشان دهنده کاهش توانایی میگوهای تیمار شده در جذب و هضم مواد غذایی می باشد. میگوهای دریافت کننده جیره حاوی ۳۰۰۰ ppb، در پایان دوره ۲۱ روزه، رشد منفی نشان دادند و میزان رشد هفتگی آنها ۰/۰۷ گرم گزارش شده است. در مطالعه حاضر نیز کاهش وزن در تیمارهای بیش از ۴۰۰ ppb پس از ۴ هفته تیمار بندی مشاهده شد. در تیمارهای کمتر از ۴۰۰ ppb پس از سپری شدن ۸ هفته و پایان یافتن دوره تیمار نمودن میگوها با جیره های

حاوی AFB1 و بدنبال آن آغاز دوره بهبود و استفاده از جیره های فاقد AFB1 به مدت ۴ هفته، همراه با پیدایش علائم بهبود در میگوها و توقف یافتن روند کاهش وزن در آنها بود. گرچه در دوره بهبود، روند کاهش وزن در تیمارهای 400 ppb و 800 ppb کاهش یافت، ولی متوقف نگردید.

۳-۵-۳- تأثیر تغذیه با جیره های مختلف AFB1 بر شاخص های سلامتی و ایمنی میگوی سفید

هندی

تأثیر بر THC

همانطور که نتایج این مطالعه نشان می دهد، تغذیه نمودن میگوی سفید هندی بر شاخص های سیستم ایمنی مؤثر است. توانایی میگوها در از بین بردن ترکیبات غیرخودی به عملکرد هموسیت ها مربوط است. آفلاتوکسین ها موجب کاهش کارایی سلولهای ایمنی در میگوها شده و در نتیجه پاسخ های ایمنی را در این جانور تقلیل می دهند (۱۰). همانطور که پیش تر اشاره شد، سیستم دفاعی سخت پوستان بر اساس عملکرد هموسیت ها و فاکتورهای همولمفی بنا شده است (۸۳). هموسیت ها در سیستم دفاعی سخت پوستان دارای نقش محوری بوده و عملکردهای چندگانه ای مانند ترمیم جراحات، لخته شدن همولمف، فاگوسیتوز و کپسوله کردن اجرام غیرخودی، تحکیم و سخت کردن کوتیکول (۸۴) و جابجایی کربوهیدرات ها و شرکت نمودن در فرآیند متابولیسم (۴۲)، برای آنها تعریف شده است. در این مطالعه، میزان THC در تیمارهای ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb افزایش یافته و اختلاف معنی داری با شاهد نشان می دهند. روند کاهشی THC در هفته چهارم و ششم در تیمارهای 50 ppb تا 1600 ppb قابل مشاهده است. نکته ای که باید مورد توجه قرار گیرد، کاهش THC در تیمار 100 ppb از هفته دوم می باشد. این روند کاهشی تا پایان هفته چهارم، مشابه تیمارهای دیگر است ولی این روند کاهش از هفته چهارم به بعد متوقف می شود و تا پایان هفته هشتم در همین سطح باقی می ماند و حتی در دوران بهبود نیز افزایش در میزان THC در تیمار 100 ppb مشاهده نمی شود. کاهش میزان THC در تیمارهای بیش از 100 ppb نیز با الگوی مشابه قابل مشاهده است (نمودار ۴ ۳). این نوسانات در میزان THC با مطالعه های مشابه هم خوانی دارد. برای مثال، Gopinath و همکاران بیان کرده اند در یک بررسی، میزان THC در پایان هفته چهارم در تمامی تیمارها افزایش یافته و در پایان هفته هشتم روند کاهشی نشان داده است (۳۰). افزون بر این در این مطالعه باید به عدم بهبود روند کاهشی در میزان THC در تیمارهای ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb در دوره بهبود، که به مدت چهار هفته پس از سپری شدن دوره ۸ هفته ای تیمار بندی اولیه انجام شده است، اشاره کرد. طی چهار هفته مربوط به دوره بهبود به غیر از تیمار 50 ppb، میزان THC بهبود نیافت و به میزان THC در میگوهای شاهد نزدیک نشد. استرس های گوناگونی را می توان عامل نوسان های تعداد هموسیت های موجود در جریان همولمفی در میگوها دانست. به عنوان مثال Johnson عقیده دارد، هرگونه استرسی که بر بافت خونساز اثر گذارد، می تواند نوساناتی را در روند تولید هموسیت های موجود در همولمف ایجاد نماید (۴۱). وارد شدن هر ترکیب

غیرخودی و ناشناخته به جریان همولمف، بدن را برای حذف کردن آن تحریک کرده و بدن جانور با افزایش تعداد هموسیت ها به این تحریک جواب می دهد. این امر می تواند توجه کننده افزایش میزان THC در پایان هفته دوم باشد. عدم توانایی جانور در حذف AFB1 در هفته های بعد با کاهش میزان THC نشان داده می شود. همراه شدن این تغییرات با نوسانات TPP در هفته دوم و چهارم و کاهش میزان TPP (جدول ۴ و نمودار ۴) و با توجه به اهمیت این دو شاخص به عنوان شاخص سلامتی در میگوها، می توان بیان داشت که در تیمارهای بیش از 400 ppb، از هفته دوم، سلامتی جانور تهدید شده و پایان هفته چهارم، عملاً آفلاتوکسیکوزیس اتفاق افتاده است.

در مطالعه ای که توسط Boonyaratpalin و همکاران بر روی میگوی ببری سیاه صورت گرفته اشاره شده است که در میگوهای تغذیه شده با جیره های حاوی 0-1000 ppb اختلاف معنی داری در تعداد هموسیت ها، مشاهده نشده و صرفاً در تیمار 5/2 ppm (2500 ppb)، در پایان هفته چهارم افزایش میزان THC دیده شده است. از این رو با توجه به تفاوت نتایج بین مطالعه حاضر و مطالعه Boonyaratpalin و همکاران می توان به این نتیجه رسید که میگوی سفید هندی (F.indicus) در مقایسه با میگوی ببری سیاه (P.monodon) به AFB1 حساسیت بیشتری نشان می دهد و در واقع افزایش تعداد هموسیت ها در هفته دوم در تیمارهای بیش از 400 ppb واکنش جانور برای حذف ترکیب غیرخودی وارد شده به همولمف می باشد. مسأله ای این روند کاهش در مقادیر THC، و TPP را توجه می کند یافته های هیستوپاتولوژی است که نشان دهنده آسیب های شدید دستگاه گوارش بویژه در بافت هپاتوپانکراس و بافت روده، جانور می باشد و موجب ضعف شدید و کاهش پاسخ های خوپذیری می گردد.

تأثیر بر TPP

پروتئین تام پلاسما و سرم بطور عمده در فعالیت هایی مانند تغذیه، توزیع آب در بدن، برقراری تعادل اسید-باز، سیستم ایمنی و متابولیسم شرکت می کنند (۴۹). در تمامی جانوران با بررسی میزان پروتئین پلاسما و ترکیبات آن می توان در خصوص سلامت جانور نظر داد و به بیان دقیق تر، با بررسی TPP می توان وضعیت سلامتی جانور یا پیشرفت بیماری را کمی کرد. طبیعی است که با کاهش میزان TPP، میزان رشد و فعالیت متابولیکی سلول ها کاهش می یابد. کاهش میزان TPP با آسیب وارده به هپاتوپانکراس همسو و مرتبط می باشد. یکی از مکانیسم های AFB1 در آسیب رساندن به سلول های جانوران، ایجاد اختلال در سنتز پروتئین می باشد. برای این منظور AFB1 یا بطور مستقیم، با غیر فعال کردن آنزیم های بیوسنتز کننده یا به طور غیرمستقیم و از طریق تغییر در DNA الگو، جلوگیری از سنتز RNA، جلوگیری از ترجمه RNA یا دخالت در انتقال اسیدهای آمینه، در سنتز پروتئین اختلال ایجاد می کند (۱۵). در مطالعات دیگر به نقش بازدارنده AFB1 در جلوگیری از اتصال ریبوزوم ها به شبکه اندوپلاسمیک در سلول ها، اشاره شده است (۸۹).

در تیمارهای ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb، میزان پروتئین تام پلاسما، در پایان هفته دوم کاهش شدید دیده می‌شود. این روند کاهشی در تیمار ۴۰۰ ppb در پایان هفته چهارم و در تیمار ۲۰۰ ppb در پایان هفته ششم قابل مشاهده است (نمودار ۴). در پایان هفته چهارم، میزان TPP در تیمارهای ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb به شدت کاهش یافته و اختلاف معنی‌داری را با شاهد و تیمارهای ۲۰ و ۵۰ ppb نشان می‌دهد. این مطلب باید مورد توجه قرار گیرد که میزان TPP در پایان هفته هشتم در تیمارهای ۲۰۰ و ۴۰۰ ppb به یکدیگر نزدیک شده و اختلاف معنی‌داری را با شاهد، تیمار ۲۰ و ۵۰ ppb نشان نمی‌دهند ولی در تیمار ۱۶۰۰ ppb روند کاهشی شدید که در پایان هفته دوم مشاهده شده است تا پایان هفته دوازدهم ادامه یافته و در دوره بهبود نیز این روند کاهش متوقف نمی‌شود. در تیمار ۸۰۰ ppb گرچه در دوران بهبود اندک افزایش در میزان TPP دیده می‌شود و آنالیز Tukey HSD گرچه این افزایش را در مقایسه با هفته هشتم معنی‌دار نشان می‌دهد ولی همچنان اختلاف معنی‌داری بین میزان TPP در تیمارهای ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb در پایان هفته دوازدهم قابل مشاهده است. در تفسیر این یافته‌ها می‌توان به موارد ذکر شده در خصوص آسیب‌های بافتی و عدم امکان دسترسی به منابع پروتئینی برای جایگزینی آن در بافت‌های مورد نیاز، که پیش‌تر بیان شده است، اشاره کرد.

در مطالعه انجام شده توسط Boonyaratpalin و همکاران، اشاره شده است که در میگوهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی AFB1 علی‌رغم کاهش میزان TPP، میزان آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز و ترانس‌آمیناز که دو آنزیم هپاتوپانکراس هستند افزایش یافته است و این مورد بر اهمیت این آنزیم‌ها در سم‌زدایی تأکید می‌کند و نشان می‌دهد که فیزیولوژی جانور، با وجود مشکل در عملکرد هپاتوپانکراس، سنتز و ترشح این دو آنزیم را متوقف نمی‌کند (۱۰).

تأثیر بر PA

فعالیت فاگوسیتی که با واحد درصد بیان می‌شود، در واقع معرف درصدی از هموسیت‌ها است که سلول‌های باکتری یا مخمر را فاگوسیت کرده و از بین می‌برند (۸۳). در سخت‌پوستان، پاسخ‌های سلولی از مهمترین مکانیسم‌های حذف ذرات و عوامل غیرخودی از جریان همولف می‌باشد (۱۱). مطالعه انجام شده توسط Paul Raj و Gopinath، نشان داد که درصد فعالیت فاگوسیتی در میگوهای ببری سیاه دریافت‌کننده جیره‌های حاوی AFB1، در پایان هفته چهارم افزایش می‌یابد (۳۰). این افزایش همزمان با افزایش THC در تمامی تیمارها می‌باشد. در مطالعه حاضر گرچه فعالیت فاگوسیتی در تیمارهای ۸۰۰ و ۱۶۰۰ ppb در پایان هفته دوم و در تیمار ۴۰۰ ppb در پایان هفته چهارم کاهش و در تیمارهای کمتر از ۴۰۰ ppb در پایان هفته دوم افزایش ظاهری دیده شد (جدول ۴-۱۲)، ولی آزمون آماری، اختلاف معنی‌داری را بین تیمارهای مورد مطالعه نشان نداد. این تفاوت را باید با توجه به اختلاف موجود در THC تعیین شده در این دو مطالعه تفسیر کرد. همانطور که در بخش ۵-۳-۱ نیز اشاره شد، در این مطالعه، نوسانات THC و تغییرات PA در طول دوره مطالعه، هم‌زمانی و مشابهت نشان می‌دهد.

دهند. این درحالی است که در مطالعه انجام شده توسط Paul Raj و Gopinath، THC در پایان هفته چهارم در تمامی تیمارها، افزایش و در پایان هفته هشتم، روند کاهشی نشان داده است. با توجه به این که سلولهای هیالین، بیشترین سهم را در فعالیت فاگوسیتی ایفاء می کنند (۸۳)، می توان استدلال کرد که، با کاهش یافتن THC، تعداد سلولهای شفاف که فعالیت فاگوسیتی جانور را به عهده دارند، کاهش یافته و به دنبال آن PA کاهش می یابد. برای بیان دقیق تر این نکته باید در مطالعات مشابه، تابلو خونی میگوهای سفید هندی را مورد بررسی قرار داد. در مطالعات مختلف برای بررسی عملکرد فاگوسیتی هموسیت های میگو، بیان ژن های مختلف مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفته است. در مطالعه ای که توسط Han و همکاران انجام شده است، مشخص گردیده که بیان ژن مربوط به پروتئین زنجیره سبک میوزین، که یکی از اجزاء مهم در اسکلت سلولی هموسیت ها محسوب می شود، با افزایش درصد فعالیت فاگوسیتی افزایش یافته و همچنین میزان این پروتئین در میگوهای آلوده به بیماری لکه سفید، که سیستم ایمنی آنها تحریک شده و فعالیت فاگوسیتی در آنها افزایش یافته است، به میزان معنی داری در مقایسه با میگوهای سالم افزایش نشان می دهد (۳۳). نتیجه بدست آمده از این تحقیق نشان می دهد که پروتئین زنجیره سبک میوزین در تنظیم فاگوسیتوز در هموسیت های میگو شرکت می کند. این مطلب کاهش درصد PA همزمان با کاهش یافتن TPP را توجیه می کند.

۴-۵-۳- تأثیر تغذیه با جیره های مختلف AFB1 بر باقی مانده های بافتی در میگوی سفید هندی

در مورد وجود AFB1 در جیره غذایی، نگرانی ها به کاهش تولید نهایی و یا تضعیف سیستم ایمنی و افزایش احتمال بروز بیماریها در میگوهای پرورشی، ختم نشده و مواردی در خصوص باقی ماندن این توکسین در عضله و ارگان های احشایی و بروز مشکلاتی در زمینه بهداشت انسانی، به عنوان مصرف کننده میگوهای پرورشی مطرح می گردد. میزان باقی مانده های بافتی، در عضلات و ارگانهای احشایی، اغلب به دلیل فرآیند سم زدایی که در بدن جانور اتفاق می افتد کمتر از میزان موجود در جیره غذایی بوده و ایجاد عوارض در انسان با توجه به مقادیر اندازه گیری شده باقی مانده های بافتی، بسیار بعید می نماید.

با توجه به مطالعه ای که توسط مطلبی و رضوی بر روی ۴۷ عدد میگوی پرورشی جمع آوری شده از استانهای جنوبی کشور (سیستان و بلوچستان، هرمزگان و بوشهر) برای اندازه گیری میزان آفلاتوکسین های B و G در سال ۱۳۸۳ انجام داده است، برای اولین بار در ایران، در یک میگو AFB1 به میزان 21/0 ppb و آفلاتوکسین B2 به میزان 71/1 ppb گزارش شده است (۶۰).

در مطالعه پیش رو، میزان باقی مانده های بافتی در سرسینه و عضله و با فاصله های زمانی چهار هفته از آغاز تیمار بندی، بطور جداگانه اندازه گیری شد. دلیل این تفکیک، الگوی مصرف میگو در ایران بود. در کشور ما، معمولاً میگو بصورت فاقد سر طبخ و مصرف می شود، درحالی که در بسیاری از مناطق جهان، میگو بصورت کامل و آب پز مورد استفاده قرار می گیرد. آزمون آنالیز واریانس دوطرفه نشان داد که میزان باقیمانده بافتی با

دوز و مدت زمان تیمار بندی، ارتباط داشته و به غیر از میگوهای شاهد، تمامی میگوهای دریافت کننده AFB1 در جیره غذایی، در بافت عضله و سرسینه خود، واجد باقی مانده های بافتی می باشند. باقی مانده های بافتی، در بافت عضله، در پایان هفته هشتم، به شدت کاهش یافت و حدوداً به میزان 5/1 ppb رسید. این کاهش طی دوره بهبود، در عضله با شدت بیشتری در تمامی تیمارها مشهود بود. کاهش باقی مانده های بافتی در بافت سرسینه نیز در تمامی تیمارها به غیر از تیمارهای 800 و 1600 ppb در پایان هفته هشتم دیده شد. باقی مانده های بافتی در بافت سرسینه، در تمامی تیمارها، پس از سپری شدن دوره بهبود، در پایان هفته دوازدهم، کاهش یافت. در تیمار 1600 ppb، با وجود کاهش میزان باقی مانده های بافتی با سپری شدن دوره بهبود، میزان نهایی باقی مانده های بافتی AFB1 در بافت سرسینه 15/6 ppb رسید که با سایر تیمارها اختلاف زیادی نشان می داد.

در مطالعه Bautista و همکاران در سال 1994، مشخص گردید که میزان باقی مانده بافتی در میگوهای ببری سیاه که به مدت 62 روز با جیره های حاوی مقادیر کمتر از 200 ppb آفلاتوکسین B1 تغذیه شده اند، غیر قابل ردیابی است. آنها در توجیه این موضوع دو احتمال را بیان نموده اند. اول اینکه دوز مورد بررسی بسیار اندک تر از مقداری بوده که در بدن جانور باقی بماند و دوم، توان متابولیزه کردن و حذف نمودن فیزیولوژی میگوها، بیش از مقادیر AFB1 افزوده شده به جیره ها می باشد (4). یافته های Bautista گزارش Divakaran و همکاران را تأیید می کند (23). در مطالعه ای که توسط Boonyaratpalin و همکاران انجام شده، نشان داده شده است که در میگوهای ببری سیاه که با جیره های حاوی 0-220 ppb آفلاتوکسین B1، به مدت 60 روز، تغذیه شده اند، باقی مانده های بافتی این توکسین در هیچ کدام از میگوها، ردیابی نشده است (9). در مطالعه دیگری به این نتیجه رسیده اند با تغذیه کردن میگوهای ببری سیاه با جیره های حاوی 0-5/2 ppm آفلاتوکسین B1، به مدت 60 روز، باقی مانده های بافتی در این میگوها قابل ردیابی بوده و در پایان هفته چهارم، بیشترین میزان AFB1 در عضلات میگوهای تیمار شده اندازه گیری شده است (بیش از 10) (5/7 ppb). یافته های این سه مطالعه با مطالعه حاضر همخوانی دارد. در مطالعه انجام شده توسط Gopinath و Paul Raj میزان باقیمانده های بافتی در تیمارهای کمتر از 500 ppb قابل ردیابی نبوده و صفر گزارش شده است (30).

۵-۵-۳- تأثیر تغذیه با جیره های مختلف AFB1 بر تغییرات بافتی میگوی سفید هندی

مطالعه هیستوپاتولوژی ناحیه سرسینه در میگوهای شاهد، مشاهدات و توصیفات Bell و Lightner را تأیید نمود (5) و در میگوهای تغذیه شده با جیره های حاوی مقادیر مختلفی از AFB1، آسیب های پیش رونده ای در هپاتوپانکراس، روده و عضلات مشاهده شد. میزان آسیب های مشاهده شده، با افزایش یافتن میزان AFB1 موجود در جیره ها، افزایش یافته و آسیب های بیشتری دیده شد. با در نظر گرفتن اهمیت روده میانی و هپاتوپانکراس در عملکرد گوارشی میگوها و آسیب های وارد شده به این اندام ها، این نکته تأیید می شود که دستگاه گوارش یکی از مهمترین اندام های مورد تهاجم این توکسین می باشد. بر اساس گزارش Bautista و همکاران، اولین علائم

آماسی در مطالعه مقاطع بافتی هپاتوپانکراس میگوهای ببری سیاه دریافت کننده دوزهای کمتر از 200 ppb، نفوذ هموسیتی در فضای بینابینی است (تصویر ۵۴ مربوط به مطالعه حاضر) ضایعات پیشرفته تر را به شکل ملانیزاسیون بافت نکروزه توصیف می کنند که با یافته های پژوهش پیش رو مشابهت دارد (۴). البته آنها میزان توسعه یافتن بافت فیروز را بسیار بیش از آنچه که در این مطالعه مشاهده گردید گزارش نموده اند.

در پژوهش انجام شده توسط Paul Raj و Gopinath در سال ۲۰۰۹، گزارش شده است که در میگوهای ببری سبز دریافت کننده جیره حاوی 50 AFB1 ppb به مدت ۴ هفته، صرفاً در برخی از قسمت های هپاتوپانکراس تغییرات جزئی در ساختار این اندام قابل مشاهده است. در پایان هفته هشتم، تخریب بافتی، نکروز و فیروز در بافت هپاتوپانکراس این میگوها توصیف شده است. میگوهای دریافت کننده جیره حاوی 100 AFB1 ppb به مدت ۴ هفته، ساختار سلولی و توبولی خود را از دست داده و در درون لومن سلول های نکروزه قابل تشخیص می باشد. او شدت یافتن نکروزه شدن بافت ها و توسعه یافتن بافت فیروز را در پایان هفته هشتم توصیف کرده است. با افزایش یافتن دوز AFB1 در جیره تا 500 ppb، تغییر شکل سلول ها و کشیده شدن آنها در پایان هفته چهارم و تخریب ساختار لوله ای در بخش پیشین در پایان هفته هشتم قابل مشاهده است. در تیمارهای مورد بررسی به مطالعه تغییرات بافت هپاتوپانکراس در میگوهای دریافت کننده جیره حاوی 2000 AFB1 (ppb) 2 ppm به مدت ۴ هفته پرداخته و بیان می کند، نکروز بسیار شدید و بافت فیروز بسیار توسعه یافته و همچنین رشد پاپیلوماتوز شدید در هپاتوپانکراس مشاهده می شود. در پایان هفته هشتم، ساختار لوله ای در این ارگان به طور کامل از بین رفته و در نقاطی مرگ برنامه ریزی شده (Apoptosis) دیده می شود (۳۰). توصیفات او با یافته های پژوهش حاضر به غیر از تیمار 20 ppm، مشابهت نشان می دهد. در مطالعه ای دیگر که نتایج در سال ۲۰۱۲ ارائه شده است، Gopinath و همکاران به توصیف دقیق تغییرات بافتی با مشاهدات انجام شده به کمک میکروسکوپ الکترونیکی پرداخته اند (۳۱).

پیشنهادها

آلوده بودن جیره‌های غذایی به مایکوتوکسین‌ها، نه تنها یک واقعیت مسلم بوده بلکه با توجه به شرایط داد و ستد جهانی در بازارهای منفعت طلب کنونی، یک واقعیت رو به رشد محسوب می‌شود. با توجه به نتایج مطالعات انجام شده بهترین راه مقابله با این بحران، توسعه کارخانه‌های استاندارد تولید غذای دام و طیور آذربایان، تدوین دستورالعمل‌های جامع مدیریت بهداشتی و استفاده از روش‌های نوین جمع‌آوری محصولات کشاورزی می‌باشد. با توجه به یافته‌های این پژوهش، موارد زیر پیشنهاد می‌شود.

۱. با توجه به توسعه تجارت مواد غذایی و امکان تامین مواد اولیه مورد نیاز در صنایع تولید مواد غذایی کنسانتره دام و طیور و آذربایان، از منابع مختلف ضروری می‌رسد که اثرهای توکسین‌های مختلف قارچی بر تمامی حیوانات پرورشی مورد ارزیابی قرار گیرد. نکته ای که در این خصوص مهم می‌نماید، امکان هم افزایی چند توکسین یا امکان افزایش سمیت ناشی از یک توکسین در شرایط مختلف پرورش است.
۲. با توجه به مطالعات مختلف انجام شده در مورد میزان توکسین‌های قارچی موجود در غذای کنسانتره میگوهای پرورشی و با در نظر گرفتن میزان AFB₁ و فومونیزین‌های اندازه‌گیری شده در این مطالعه، انجام مطالعات دقیق در خصوص تاثیر استفاده طولانی مدت از جیره‌های حاوی مقادیر اندک توکسین‌های قارچی بر شاخص‌های رشد و سلامتی و همچنین تعیین اثرات ناشی از مواجهه با دوزهای اندک توکسین‌های قارچی در غذای کنسانتره بر میزان زادآوری میگوهای مولد می‌تواند به بسیاری از پرسش‌های موجود پاسخ دهد.
۳. بر اساس یافته‌های این پژوهش می‌توان استانداردهای لازم جهت میزان آفلاتوکسین مجاز در غذای کنسانتره میگوهای سفید هندی تدوین نمود. با توجه به استاندارد‌های تدوین شده از سوی موسسه تحقیقات صنعتی و استاندارد ایران (ISIRI)، و عدم ارائه موارد مجاز AFB₁ در جیره‌های غذایی آذربایان و میگو، می‌توان در این خصوص اقدام نمود.
۴. با توجه به این مطلب که بافت هدف آفلاتوکسین‌ها در میگوها، بافت هپاتوپانکراس می‌باشد، برای ارزیابی‌های دقیق ارتباط بین مقادیر مختلف AFB₁ و بروز اختلالات عملکردی در بافت هپاتوپانکراس، بهتر است که تغییرات آنزیمی این بافت نیز مورد بررسی قرار گیرد.

1. Afsharnasab M. and Akbari S. 2005. Identification of white spot syndrome disease (WSSD) by electron microscopy in *Penaeus indicus*. PAJOUHESH-VA-SAZANDEGI, 17(1): 8-13.
2. Alinezhad S., Tolouee M., Kamalzadeh A., Motalebi A.A., Nazeri M., M. Y., et al. 2011. Mycobiota and aflatoxin B1 contamination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) feed with emphasis to *Aspergillus* section *Flavi*. Iranian Journal of Fisheries, 10(3): 363-374.
3. Bang F.B. 1971. A factor in crab amebocytes which stimulates in vitro clotting of crab blood. Journal of Invertebrate Pathology, 18(2): 280-283.
4. Bautista M.N., Lavilla-Pitogo C.R., Subosa P.F. and Begino E.T. 1994. Aflatoxin B1 contamination of shrimp feeds and its effect on growth and hepatopancreas of pre-adult *Penaeus monodon*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 65(1): 5-11.
5. Bell T.A. and Lightner D.V. 1988. A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. LA, USA: World Aquaculture Society, Baton Rouge.
6. Binder E.M. 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. Animal Feed Science and Technology, 133(1-2): 149-166.
7. Binder E.M., Tan L.M., Chin L.J., Handl J. and Richard J. 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. Animal Feed Science and Technology, 137(3-4): 265-282.
8. Bintvihok A., Ponpornpisit A., Tangtrongpiros J., Panichkriangkrai W., Rattanapanee R., Doi K., et al. 2003. Aflatoxin contamination in shrimp feed and effects of aflatoxin addition to feed on shrimp production. Journal of food protection, 66(5): 882-885.
9. Boonyaratpalin M., Supamattaya K., Suprasert D.N. and Borisuth C. 2000. The immune system in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* Fabricius: Effects of aflatoxin B₁ on growth performances, blood components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). Songklanakarin Journal Science and Technology, 22: 641-652.
10. Boonyaratpalin M., Supamattaya K., V Verakunpiriya V. and Suprasert D. 2001. Effects of aflatoxin B1 on growth performance, blood components, immune function and histopathological changes in black tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). Aquaculture Research, 32(SUPPL. 1): 388-398.
11. Brehélin M. and Arcier J.M. 1986. Immunity in invertebrates: cells, molecules, and defense reactions: Springer-Verlag.
12. Burgos-Hernández A., Farias S.I., Torres-Arreola W. and Ezquerro-Brauer J.M. 2005. In vitro studies of the effects of aflatoxin B1 and fumonisin B1 on trypsin-like and collagenase-like activity from the hepatopancreas of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture, 250(1-2): 399-410.
13. Cary J.W., Ehrlich K.C., Beltz S.B., Harris-Coward P. and Klich M.A. 2009. Characterization of the *Aspergillus ochraceoroseus* aflatoxin/sterigmatocystin biosynthetic gene cluster. Mycologia, 10(3): 352-362.
14. Chehri K., Jahromi S.T., Reddy K.R.N., Abbasi S. and Salleh B. 2010. Occurrence of *Fusarium* spp. and Fumonisin in Stored Wheat Grains Marketed in Iran. Toxins, 2: 2816-2823.
15. Chu F.S. 1977. Mode of Action of Mycotoxins and Related Compounds. In Perlman D. (Ed.), Advances in Applied Microbiology (Vol. Volume 22, pp. 83-143): Academic Press.
16. Cotty P.J. 1994. Comparison of four media for the isolation of *Aspergillus flavus* group fungi. Mycopathologia, 125: 157-162.
17. Cruz D.L. and Tendencia E.A. 1989. Aflatoxin in commercial prawn feeds. SEAFDEC Asian Aquaculture, 11(2): 4-11.
18. D'Mello J.P.F. and Macdonald A.M.C. 1997. Mycotoxins. Animal Feed Science and Technology, 69(1-3): 155-166.
19. Daie Ghazvini R., Mirhendi H., Ghiasian S.A., Masoudi-Nejad A., Shokri H., Soltani M., et al. 2011. Genotyping of *Fusarium verticillioides* strains producing fumonisin B1 in feed associated with animal health problems. Iranian Journal of Veterinary Research, 12(4): 309-316.
20. Dall W. 1990. The Biology of the Penaeidae (Vol. 27). Cornwall, Great Britain: Academic Press.
21. Diaz G.J., Lozano M.C. and Acuña A. 2009. Prevalence of *Aspergillus* species on selected Colombian animal feedstuffs and ability of *Aspergillus* section *Flavi* to produce aflatoxins. World Mycotoxin Journal, 2: 31-34.
22. Diener U.L., Davis N.D. and Danilson D.A. 1985. Detoxification of aflatoxin-contaminated corn makes grain safe for feeding. Highlights of agricultural research - Alabama, Agricultural Experiment Station, 32(2): 9.
23. Divakaran S. 2000. Studies on the toxicity of shrimp (*Penaeus vannamei*) fed diets dosed with aflatoxin B1 to humans. Journal of Aquatic Food Product Technology, 9(3): 115-120.
24. Evans E.G.V. and Richardson D. 1989. Medical mycology: a practical approach: IRL Press at Oxford University Press.

25. Fandohan P., K. Hell K., Marasas W.F.O. and Wingfield M.J. 2003. Infection of maize by *Fusarium* species and contamination with fumonisin in africa. *African Journal of Biotechnology*, 2(12): 570-579.
26. Gelderblom W.C., Jaskiewicz K., Marasas W.F., Thiel P.G., Horak R.M., Vleggaar R., et al. 1988. Fumonisin--novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 54(7): 1806-1811.
27. Ghaednia B., Zaini F., Mehrabi M.R., Hashemi J., Dadgar S. and Mirbakhsh M. 2004. Fungal flora of cultured green- tiger shrimp (*Penaeus semisulcatus*) in Bushehr Province. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 12(4): 97-110.
28. Ghiasian S., Kord-Bacheh P., Rezayat S., Maghsood A. and Taherkhani H. 2004. Mycoflora of Iranian Maize Harvested in the Main Production Areas in 2000. *Mycopathologia*, 158(1): 113-121.
29. Ghiasian S.A., Rezayat S.M., Kord-Bacheh P., Maghsood A.H., Yazdanpanah H., Shephard G.S., et al. 2005. Fumonisin production by *Fusarium* species isolated from freshly harvested corn in Iran. *Mycopathologia*, 159(1): 31-40.
30. Gopinath R. and Paul Raj R. 2009. Histological alterations in the hepatopancreas of *Penaeus monodon* Fabricius (1798) given aflatoxin B1-incorporated diets. *Aquaculture Research*, 40(11): 1235-1242.
31. Gopinath R., Paul Raj R., George K.C. and Sanil N.K. 2012. Ultrastructural changes in the hepatopancreas of *Penaeus monodon* Fabricius 1798 given aflatoxin B1 diets. *Aquaculture Research*, 43(1): 32-43.
32. Griessler K. and Encarnacao P. 2009. Fumonisin - mycotoxins of increasing importance in fish! *Aquaculture Asia Magazine*.
33. Han F., Wang Z. and Wang X. 2010. Characterization of myosin light chain in shrimp hemocytic phagocytosis. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(5): 875-883.
34. Hirsch G.C. and Jacobs W. 1930. Der Arbeitsrhythmus der Mitteldarm druse von *Astacus leptodactylus*. *vergel Physiology*, 12: 524-558.
35. Humason G.L. 2003. *Animal Tissue Techniques* (3rd ed.). San Francisco, CA, USA: Textbook Publishers.
36. ISIRI. 2000. Maximum tolerated limits of mycotoxins in foods and feeds. National standard (Vol. 5929): Institute of Standard and Industrial Research of Iran.
37. ISIRI. 2010. Maximum tolerated limits of mycotoxins in foods and feeds (Amendment No.1). National standard (Vol. 5929): Institute of Standard and Industrial Research of Iran.
38. Ito Y., Peterson S.W., Wicklow D.T. and Goto T. 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new a⁻atoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycology Research*, 105(2): 233-239.
39. Jacobs W. 1928. Untersuchungen Über die Cytologie der Sekretbildung in der Mitteldarm druse von *Astacus leptodactylus*. *Zellforsch*, 8: 1-68.
40. Jiang G., Yu R. and Zhou M. 2004. Modulatory effects of ammonia-N on the immune system of *Penaeus japonicus* to virulence of white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 241(1-4): 61-75.
41. Johnson P.T. 1980. *Histology of the Blue Crab, Callinectes sapidus: A model for the decapoda* (1 ed.). New York: Praeger.
42. Johnston M.A., Elder H.Y. and Davies P.S. 1973. Cytology of *carcinus* haemocytes and their function in carbohydrate metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 46(3): 569-581.
43. Kalaimani N., Ali S.A., Shanmugasundaram K.R. and Sarathchandra G. 1998. Quality of shrimp feed with special reference to aflatoxin. *Advances and priorities in fisheries technology*: 284-288.
44. Karami-Osboo R., Mirabolfathy M., Kamran R., Shetab-Boushehri M. and Sarkari S. 2012. Aflatoxin B1 in maize harvested over 3 years in Iran. *Food Control*, 23(1): 271-274.
45. Khosravi A.R., Dakhili M. and Shokri H. 2008. A Mycological Survey on Feed Ingredients and Mixed Animal Feeds in Ghom Province, Iran. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7(1): 31-34.
46. Khosravi A.R., Mansouri M., Bahonar A.R. and Shokr H. 2007. Mycoflora of Maize Harvested from Iran and Imported Maize. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10: 4432-4437.
47. Laxmilatha P. and Laxminarayana A. 2004. Fine structure of the haemocytes of the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus* (H. Milne Edwards, 1837). *Crustaceana*, 77(7): 14.
48. Lebars-Bailly S., Bailly J.D. and Brugere H. 1999. Accidents de fabrication dus aux moisissures en fromagerie. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 150: 413-430.
49. Lehninger A.L., Nelson D.L. and Cox M.M. 1993. *Principles of Biochemistry*: Worth Publishers.
50. Leslie J.F., Summerell B.A. and Bullock S. 2008. *The Fusarium Laboratory Manual*: John Wiley & Sons.
51. Liao I.C., Yang F.R. and Lou S.W. 1977. Preliminary report on some diseases of cultured prawn and their control method. *JcRR Fisheries series*, 29: 28-33.
52. Lightner D.V. 1996. *A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp*: World Aquaculture Society.
53. Lightner D.V. and Redman R.M. 1985. Necrosis of the hepatopancreas in *Penaeus monodon* and *P. stylirostris* (Arthropoda, Decapoda) with red disease. *Journal of Fish Diseases*, 8(2): 181-188.

54. Lightner D.V. and Redman R.M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164(1-4): 201-220.
55. Lightner D.V., Redman R.M., Price R.L. and Wiseman M.O. 1982. Histopathology of aflatoxicosis in the marine shrimp *Penaeus stylirostris* and *P. vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 40(2): 279-291.
56. Lorgue G., Lechenet J., Rivière A. and Chapman J. 1996. *Clinical Veterinary Toxicology*: Blackwell Science.
57. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
58. Meerdink G.L. 2002. Mycotoxins. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 1(2): 89-93.
59. Mexia-Salazar A.L., Hernández-López J., Burgos-Hernández A., Cortez-Rocha M.O., Castro-Longoria R. and Ezquerro-Brauer J.M. 2008. Role of fumonisin B1 on the immune system, histopathology, and muscle proteins of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Chemistry*, 110(2): 471-479.
60. Motallebi A.A. and Razavilar V. 2004. High performance liquid chromatographic determination of aflatoxins in Iranian shrimp. *Pajouhesh And Sazandegi*, 16(4): 65-70.
61. Neiland A.E., Soley N., Varley J.B. and Whitmarsh D.J. 2001. Shrimp aquaculture: economic perspectives for policy development. *Marine Policy*, 25(4): 265-279.
62. Ostrowski-Meissner H.T., LeaMaster B.R., Duerr E.O. and Walsh W.A. 1995. Sensitivity of the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, to aflatoxin B1. *Aquaculture*, 131(3-4): 155-164.
63. Penning T.M. 2011. *Chemical Carcinogenesis (illustrated ed.)*: Humana Press, Springer, 2011.
64. Peterson S.W., Ito Y., Horn B.W. and Goto T. 2001. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia*, 93(4): 689-703.
65. Pitt J.I. 2000. Toxigenic fungi: which are important? *Medical Mycology*, 138: 17-22.
66. Pitt J.I. and Hocking A.D. 2009. *Fungi and Food Spoilage (3rd ed.)*. New York: Springer.
67. Pitt J.I., Hocking A.D. and Glenn D.R. 1983. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Journal of Applied Microbiology*, 54: 109-114.
68. Plumlee K.H. 2007. *Clinical Veterinary Toxicology*: Elsevier Health Sciences.
69. Promwikorn W., Kirirat P. and Thaweethamseewee P. 2004. Index of molt staging in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). 26: 765-772.
70. Rahjoo V., Zad J.J.-N., M., Mirzadi Gohari A., Okhovvat2 S.M., Bihamta M.R., Razzaghian J., et al. 2008. Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 90(3): 463-468.
71. Rheeder J., Marasas W. and Vismar F. 2002. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 68(5): 2101-2105.
72. Rheeder J.P., Marasas W.F.O., Thiel P.G., Sydenham E.W., Shephard G.S. and Van Schalkwyk D.J. 1992. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology*, 82(353-357).
73. Richard J.L. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1-2): 3-10.
74. Rodrigues P., Soares C., Kozakiewicz Z., Paterson R.R.M., Lima N. and Venâncio A. 2007. Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Méndez-Vila: FORMATEX.
75. Sachindra N.M., Bhaskar N. and Mahendrakar N.S. 2005. Carotenoids in different body components of Indian shrimps. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 167-172.
76. Sadek S., Rafael R., Shakouri M., Rafomanana G., Loforte Ribeiro F. and Clay J. *SHRIMP AQUACULTURE IN AFRICA AND THE MIDDLE EAST: THE CURRENT REALITY AND TRENDS FOR THE FUTURE 2002*.
77. Salehi H. 2010. The economic impacts of WSSV on shrimp farming production and export in Iran. *Aquaculture Asia Magazine*, 14(2): 12-18.
78. Sepahdari A., Ebrahimzadeh Mosavi H.A., Sharifpour I., Khosravi A., Motallebi A.A., Mohseni M., et al. 2010. Effects of different dietary levels of AFB1 on survival rate and growth factors of Beluga (*Huso huso*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 9(1): 141-150.
79. Shephard G.S., Marasas W.F., Leggott N.L., Yazdanpanah H., Rahimian H. and Safavi N. 2000. Natural occurrence of fumonisins in corn from Iran. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48(5): 1860-1864.
80. Shephard G.S., Thiel P.G., Stockenstrom S. and Sydenham E.W. 1996. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 79(3): 671-687.
81. Skonberg D.I., Hardy R.W., Barrows F.T. and Dong F.M. 1998. Color and flavor analyses of fillets from farm-raised rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed low-phosphorus feeds containing corn or wheat gluten. *Aquaculture*, 166(3-4): 269-277.
82. Smith T.K. 2009. The Significance Of Feed-Borne Mycotoxins In Aquaculture. 24, 4(13-19).

83. Soderhall K. and Cerenius L. 1992. Crustacean immunity. Annual Review of Fish Diseases, 2: 2-23.
84. Soderhall K. and Unestam T. 1979. Activation of serum prophenoloxidase in arthropod immunity: the specificity of cell wall glucan activation and activation by purified fungal glycoproteins of crayfish phenoloxidase. Canadian Journal of Microbiology, 25: 406-414.
85. Stang-Voss C. 1971. Studies on the ultrastructure of invertebrate haemocytes. IV. On the haemocytes of *Eisenia foetida* L. (Sav.) (Annelidae). Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria) : 1948, 117(3): 451-462.
86. Supamattaya K., Bundit O., Boonyarapatlin M. and Schatzmayr G. 2006. Effects of Mycotoxins T-2 and Zearalenone on growth performance immuno-physiological parameters and histological changes in Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Songklanakarin Journal Science and Technology, 5(2): 114-127.
87. Supamattaya K., Bundit O., Boonyarapatlin M., Schatzmayr G. and Chittivan V. 2005. Effects of ochratoxin A and deoxynivalenol on growth performance and immuno-physiological parameters in black tiger shrimp (*Panaeus monodon*). Songklanakarin Journal Science and Technology, 27(1): 91-99.
88. Sydenham E.W., Shephard G.S. and Thiel P.G. 1992. Liquid chromatographic determination of fumonisin B1, B2 and B3 in foods and feeds. Journal of AOAC INTERNATIONAL, 75: 313-318.
89. Terao K. and Ueno Y. 1978. Morphological and functional damage to cells and tissues. In Uruguchi K. & Yamazaki M. (Eds.), Toxicology (pp. 187-238). Tokyo: Kodansha Press.
90. Thiel P.G., Marasas W.F.O., Sydenham E.W., Sheperd G.S., Gelderblom W.C.A. and Niewenhuis J.J. 1991. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. Applied Environmental Microbiology, 57: 1089-1093.
91. Trigo-Stockli D.M., Obaldo L.G., Gominy W.G. and Behnke K.C. 2000. Utilization of deoxynivalenol-contaminated hard red winter wheat for shrimp feeds. Journal of the World Aquaculture Society, 31: 247-254.
92. Trucksess M.W. and Diaz-Amigo C. 2011. Mycotoxins in Foods. In Editor-in-Chief: Jerome O.N. (Ed.), Encyclopedia of Environmental Health (pp. 888-897). Burlington: Elsevier.
93. Vainio H. and Wilbourn J. 1993. Cancer Etiology: Agents Causally Associated with Human Cancer. Pharmacology & Toxicology, 72: 4-11.
94. Vogt G. 1987. Monitoring of environmental pollutants such as pesticides in prawn aquaculture by histological diagnosis. Aquaculture, 67(1-2): 157-164.
95. Voss K.A., Smith G.W. and W.M. H. 2007. Fumonisins: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. Animal Feed Science and Technology, 137: 299-325.
96. Wiseman M.O., Price R.L., Lightner D.V. and Williams R.R. 1983. Toxicity of aflatoxin B1 to penaeid shrimp. environ Microbiol, 44(6): 1479-1481.
97. Wood P.J., Podlewski J. and Shenk T.E. 1971. Cytochemical observations of hemolymph cells during coagulation in the crayfish, *orconectes virilis*. Journal of Morphology, 134(4): 479-487.
98. Yiannikouris A. and Jouany J.-P. 2002. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. Anim Res, 51(2): 81-99.
99. Yousefi S., S. D., Safara M. and Zaini F. 2009. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* isolates from green-tiger shrimps (*Penaeus semisulcatus*). Iranian Journal of Microbiology, 1(4): 18-22.
100. Zain M.E. 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. Journal of Saudi Chemical Society, 15(2): 129-144.

Abstract

Acipenser stellatus and *Huso huso* are the most important native sturgeon species in Caspian Sea.

In the present study, the impacts of various concentrations of Aflatoxin B₁ (AFB₁) on Beluga, *Huso huso*, under controlled conditions were investigated. Belugas (120±10 g) were fed diets containing 0, 25, 50, 75, and 100 ppb AFB₁/kg of diet for 3 months. Results showed that various levels of AFB₁ 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 AFB₁/kg after 90 days). The increase in level of AFB₁ did not affect the percent of survival rate (SR) and no mortality was observed in treatments (SR=100%). Various levels of AFB₁ 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 AFB₁ can cause broad range of changes in liver, kidney, spleen and gills tissues, particularly at concentration of 75 and 100 ppb AFB₁/kg of diets after 60 days. No tumour formation observed. With regard to toxin concentration and time of exposure to AFB₁ 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 changes included chronic anemia and lymphocytopenia. Also neutrophilia observed with increasing of skin lesions. Meat accumulation of AFB₁ in different treatments is not so considerable and harmful for human consumption, but is significantly different with control fishes ($P < 0.01$)

Responses of experimental fishes to varying concentrations of aflatoxin were investigated under controlled conditions. Fishes were fed diet containing 0, 25, 50, 75 and 100ppb AFB₁/kg of diet for 3 months. Skin lesions evaluated through clinical observations.

With regard to toxin concentration and time of exposure to AFB₁ in experimental fish, different degree of skin lesions were observed in different parts of body. Histopathological changes in liver, kidney, spleen and gills of fish fed different level AFB₁ and very wide range from congestion to necrosis. Progressive fat deposition, hepatocyte degeneration and necrosis in liver, especially in concentration 75 and 100 AFB₁/kg of diets after 40 days of feeding, emphasize the mentioned results. At the end of the 30 days exposure period, blood samples were taken from the control and experimental fish. Blood was assayed for selected haematological parameters (haematocrit, hemoglobin, red blood cell count, white blood cell count, total albumin, ALT and AST). The derived haematological indices of MCH, MCV and MCHC were calculated. Alterations in serum levels of ALT and AST are liver specified and the significant reduction in total protein and albumin content observed in some experiments. There was no significant difference in SGR between experimental treatments but some differences observed in GR and FCR.

Key words: *Huso huso*, AFB₁, Growth, Skin lesions, Pathological changes, Haematological changes, Meat residue, *Acipenser stellatus*, AFB₁, Skin lesions, Histopathological changes, haematological parameters, SGR, FCR,

**Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute**

Project Title : Assesses the economic and hygienic effects of aflatoxins in some of farmed fish and shrimp

Approved Number: 1-019-20000-05-8602-00000

Author: Abbas ali motalebi moghanjoughi

Project leader Researcher : Abbas ali motalebi moghanjoughi

Collaborator(s) : A. Sepahdari, M.R. Mehrabi

Advisor(s): H. Mahmodzadeh. A.M. Tabatabaei. Gh. Azaritakami

Supervisor: -

Location of execution : Tehran province

Date of Beginning : 2006

Period of execution : 6 Years & 9 Months

Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute

Date of publishing : 2016

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 & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute**

Project Title :

**Assesses the economic and hygienic effects of aflatoxins in
some of farmed fish and shrimp**

Project leader Researcher :

Abbas Ali Motalebi moghanjoughi

Register NO.

47472