Archive of SID

[DOI: 10.29252/JOC.2019.9.1275]

Downloaded from joc.inio.ac.ir at 10:55 IRDT on Wednesday April 10th 2019

اقیانوس‌شناسی/ سال نهم/ شماره ۳۶/ زمستان ۱۳۹۷/۹/۲۱-۱۳
DOI: 10.29252/JOC.2019.9.1275

اثر ستیهندگی سطوح مختلف آفلاتوکسین ب۱ و زیرالنون جیره غذایی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

بهروز داغستانی[۱]، احمد ایمانی[۲*]، فرزانه نوری[۳]، محسن فرزانه[۴]، کوروش سروی مغانلو[۵]

۱- کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات و آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، پست الکترونیکی: behrooz.dakhestani@gmail.com
۲- دانشیار گروه شیلات و آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، پست الکترونیکی: a.imani@urmia.ac.ir
۳- استادیار، پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری، دانشگاه ارومیه، پست الکترونیکی: f.noori@urmia.ac.ir
۴- استادیار، پژوهشکده گیاهان دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، پست الکترونیکی: m_farzaneh@sbu.ac.ir
۵- دانشیار گروه شیلات و آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، پست الکترونیکی: k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۵/۲۷ * نویسنده مسوول تاریخ پذیرش: ۹۷/۹/۲۵

چکیده

هدف از این مقاله، بررسی اثر ستیهندگی سطوح مختلف آفلاتوکسین ب۱ و زیرالنون جیره غذایی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) است. بدین منظور، تعداد ۵۴۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (± خطای استاندارد) ۰/۲±۳ گرمی در ۹ تیمار با سطوح مختلف سموم آفلاتوکسین ب۱ (۰، ۲۵ و ppb ۵۰) و زیرالنون (۰، ۲۰۰ و ppb ۴۰۰) در جیره غذایی به مدت ۴ هفته پرورش یافتند و در انتها، نمونه‌های زوائد پیلوریک جهت سنجش فعالیت آلکالین پروتئاز، لیپاز و آمیلاز تهیه شدند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تغذیه با جیره‌های غذایی آلوده به آفلاتوکسین و زیرالنون حداقل به مدت ۴ هفته، اثری روی میزان فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز ندارد ($P>0/05$)، اما موجب تغییر معنی‌دار فعالیت آنزیم-های لیپاز و آمیلاز در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان می‌شود ($P<0/05$). بیشترین میزان فعالیت آنزیم لیپاز در تیمار شاهد (آفلاتوکسین صفر، زیرالنون صفر) و تیمار حاوی ppb ۲۵ آفلاتوکسین- ppb ۲۰۰ زیرالنون مشاهده شد. همچنین کمترین میزان فعالیت آنزیم لیپاز در تیمار آلوده به زیرالنون ۴۰۰ یا آفلاتوکسین ۲۵ مشاهده گردید ($P<0/05$). بیشترین میزان فعالیت آنزیم آمیلاز در گروه تغذیه شده با جیره غذایی فاقد آفلاتوکسین مشاهده گردید، که اختلاف معنی‌داری با ماهیان تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی آفلاتوکسین ppb ۲۵ یا آفلاتوکسین ppb ۵۰ داشت ($P<0/05$). نتایج این مطالعه نشان دادند که در حضور همزمان دو سم، اثر کاهندگی آن‌ها بر میزان فعالیت آنزیم لیپاز تعدیل می‌شود.

کلمات کلیدی: *زوائد پیلوریک، سموم قارچی، آنزیم‌های گوارشی، جیره غذایی، ماهی قزل‌آلای رنگین کمان.*

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/JOC.2019.9.1275]
Downloaded from joc.inio.ac.ir at 10:55 IRDT on Wednesday April 10th 2019

۱. مقدمه

سرعت رشد سالیانه مصرف آبزیان در دنیا با نرخی معادل ۳/۲ درصد طی سال‌های ۲۰۱۳-۱۹۶۱ بیش از نرخ رشد جمعیت جهان با نرخ رشدی معادل ۱/۶ درصد بوده است. به شکلی که متوسط مصرف سرانه طی این مدت از ۹/۹ کیلوگرم به ۱۹/۷ کیلوگرم رسیده است. تولیدات آبزی پروری تقریبا نیمی از سهم مواد غذایی دریایی را به خود اختصاص داده است (Moffitt and Cajas-Cano, 2014). بنابراین کنترل تغذیه ماهی پرورشی می‌تواند روی کیفیت و همچنین کارآیی آن موثر باشد. از میان مهمترین مخاطرات موجود در مواد غذایی مورد استفاده در تغذیه دام، طیور و آبزیان می‌توان به حضور متابولیت‌های ثانویه قارچی معروف به مایکوتوکسین‌ها[1] اشاره داشت (Imani et al., 2018). شناخت اثرات این سموم و به حداقل رساندن مخاطرات آن‌ها یک ضرورت محسوب می‌شود (Cavaliere et al., 2005; Barbosa et al., 2013).

آفلاتوکسین B1 (AFB1)، شایع ترین و قوی‌ترین متابولیت سمی برای انسان، حیوانات و موجودات آبزی تلقی می‌شود (Hussein and Brasel, 2001)، که کبد را تحت تاثیر قرار داده و باعث بروز سرطان می گردد (Han et al., 2008). سمیت آفلاتوکسین‌ها روی گونه‌های مختلف آبزیان از جمله قزل‌آلای رنگین کمان، گربه ماهی روگاهی، ماهی تیلاپیای نیل، میگوی موزی سیاه و... شناخته شده است (Santacroce and Zizzadoro, 2008). حساسیت گونه‌های مختلف آبزیان به آفلاتوکسین B1 بسیار متفاوت است. ماهی قزل‌آلا از حساس‌ترین گونه‌ها به AFB1 است (Imani et al., 2018). آفلاتوکسین آثار قابل توجهی بر آبزیان می‌گذارد؛ به طور مثال موجب کم خونی، خون‌ریزی، آسیب کبدی، افزایش استعداد ابتلا به بیماری‌های عفونی، سرکوب سیستم ایمنی و در نهایت افزایش میزان مرگ و میر می‌گردد (Santacroce and Zizzadoro, 2008).

سم زیرالنون نوعی مایکوتوکسین استروژنی غیر استروئیدی است که در ذرت، گندم، جو، یولاف و چاودار به فراوانی دیده می‌شود. در ایران نیز سم زیرالنون در غذاها و خوراک دام گزارش شده است. زیرالنون سبب تغییر عملکرد تولیدمثلی حیوانات اهلی و آبزیان مختلف می‌شود (Zinedine et al., 2007). کاهش پاسخ‌های ایمنی در غلظت‌های بالای زیرالنون در ماهی کپور معمولی (Pietsch et al., 2015)، آسیب‌های کبدی در ماهی قزل-آلای رنگین کمان (Woźny et al., 2012)، آسیب‌های تولیدمثلی در ماهی گورخری و کاهش مقدار جذب و کارآیی تغذیه‌ای و کاهش نرخ رشد در ماهی تیلاپیای قرمز مشاهده شده است (Santacroce et al., 2008).

در مقایسه با آفلاتوکسین، اطلاعات محدودی در مورد اثر سایر مایکوتوکسین‌ها در آبزیان و صنعت آبزی پروری وجود دارد. در مطالعه Hooft و همکاران (۲۰۱۱) تغذیه ماهی قزل آلای رنگین کمان با جیره غذایی آلوده به دی‌اکسی‌نی والنول موجب کاهش شاخص‌های رشد و کارایی تغذیه شد. همچنین Pietsch و همکاران (۲۰۱۵) دریافتند که تغذیه با جیره غذایی آلوده به زیرالنون سبب تغییر فراسنجه‌های خونی ماهی کپور معمولی گشت.

Meredith و همکاران (۱۹۹۸) در ارتباط با سمیت فومونیزین در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان حاکی از افزایش محتوای اسفنگانین در کبد و کلیه (اختلال در متابولیسم اسفنگولیپید) بود. متاسفانه در منابع علمی سمیت همزمان سموم قارچی مختلف کمتر مورد توجه بوده است و گزارش‌های اندکی در این زمینه وجود دارد. برای مثال مطالعه Carlson (2001) نشان داد که مصرف جیره غذایی آلوده به اوکراتوکسین و آفلاتوکسین موجب افزایش میزان بروز تومور کبدی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان می‌گردد. از آنجاییکه احتمال حضور همزمان بیش از یک نوع مایکوتوکسین در نهاده‌های اولیه جیره‌های غذایی آبزیان بالا است، مطالعه حاضر جهت بررسی سمیت همزمان دو مایکوتوکسین مهم (آفلاتوکسین B1 و زیرالنون) در مهمترین ماهی سردآبی پرورشی کشور (ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)) طراحی و اجرا گردید. در این پژوهش میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی شامل آلکالین پروتئاز، لیپاز و آمیلاز به عنوان شاخص‌های فیزیولوژی تغذیه ماهیان، مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

نخست تعداد ۵۴۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی (± خطای استاندارد) ۳±۰/۲ گرم از یکی از مراکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی کشور خریداری شد و پس از

[1] Mycotoxins

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/JOC.2019.9.1275]
Downloaded from joc.inio.ac.ir at 10:55 IRDT on Wednesday April 10th 2019

توزین به صورت تصادفی در مخازن ۳۰۰ لیتری حاوی ۲۰۰ لیتر آب با تراکم ۲۰ قطعه در هر مخزن ذخیره سازی شدند. این آزمایش در سالن تکثیر و پرورش آبزیان دانشگاه ارومیه انجام شد. همچنین شایان ذکر است که در این مطالعه، هر تیمار شامل سه تکرار بود و در کل ۱۸ مخزن مورد استفاده قرار گرفت.

بدین منظور اقلام غذایی شامل پودر ماهی کیلکا (آسیاب و الک شده)، روغن ماهی، نشاسته ژلاتینه، مکمل‌های معدنی و ویتامینی تهیه شدند و بر اساس نیازهای غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۴۵ درصد پروتئین خام، ۲۰ درصد چربی خام و ۱۵ کربوهیدرات درصد و ۲ درصد از هر کدام از مکمل‌های ویتامینی و معدنی) جیره مورد نظر تنظیم شد. سپس سموم آفلاتوکسین و زیرالنون در غلظت‌های مورد نظر و با توجه به تیمارهای غذایی به جیره‌های غذایی آزمایشی افزوده شدند (جدول ۱). در مرحله بعد با افزودن رطوبت به میزان مورد نیاز، خمیر به دست آمده به کمک چرخ گوشت صنعتی به صورت رشته‌های نازک (قطر تقریبی ۲ mm) درآمد. سپس رشته‌های حاصل در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد در آون به طور کامل خشک گردیدند. در نهایت دان‌های[1] تهیه شده در کیسه‌های فریزر یک کیلوگرمی به همراه مقداری ژل نم‌گیر با ثبت تاریخ ساخت، میزان آفلاتوکسین و زیرالنون در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند (Imani et al., 2018).

ماهیان به مدت ۳۰ روز با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند. مقدار غذادهی ماهیان با توجه به جدول استاندارد غذادهی برای ماهی قزل‌آلای رنگین کمان و بر اساس درجه حرارت بود (Lovell, 2003). میزان غذا بر اساس وزن ماهیان هر ۲ هفته تصحیح شد.

جدول ۱: تیمارهای غذایی مورد استفاده در پژوهش حاضر

تیمار	غلظت آفلاتوکسین جیره غذایی (ppb)	غلظت زیرالنون جیره غذایی (ppb)
۱	۰	۰
۲	۰	۲۰۰
۳	۰	۴۰۰
۴	۲۵	۰
۵	۲۵	۲۰۰
۶	۲۵	۴۰۰
۷	۵۰	۰
۸	۵۰	۲۰۰
۹	۵۰	۴۰۰

جهت تهیه عصاره آنزیمی، بافت زوائد پیلوریک ۳ قطعه ماهی از هر تیمار به صورت جداگانه و به نسبت وزنی ۵:۱ در بافر Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار، توسط هموژنایزر (مدل Polytron PT1300Δ) به مدت ۱/۵ دقیقه همگن شده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار (مدل Z36HK) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۰۰۰۰g، سانتریفیوژ گردید. محلول رویی، جهت سنجش پروتئین محلول و فعالیت آنزیمی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Chong et al., 2002). میزان پروتئین محلول نمونه‌ها به روش Bradford (1976) تعیین شد. جهت تعیین فعالیت آنزیم پروتئاز کل، ابتدا ۲۰ میکرولیتر از عصاره خام آنزیمی با ۰/۵ میلی‌لیتر محلول Azocasein دو درصد در Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار و pH= ۷/۵ مخلوط شدند و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۰/۵ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک به آن اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت g ۶۵۰۰ سانتریفیوژ شدند. فعالیت ویژه آلکالین پروتئاز به ازای مدت انکوباسیون (۱۰ دقیقه) و میزان پروتئین عصاره آنزیمی (میلی گرم) محاسبه شدند (Garcia-Carreno et al., 1993). هر سنجش لیپازی شامل ۷ میکرولیتر عصاره خام آنزیمی به همراه ۸۶ میکرولیتر محلول سدیم کولیت[2] و ۲/۵ میکرولیتر محلول متوکسی اتانول بود. پس از افزودن ۵/۵ میکرولیتر پارانیتروفنیل مریستات به مجموعه فوق و انکوباسیون نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شدند (Iijima, 1998). جهت سنجش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر نشاسته یک درصد به ۲۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه شد. پس از ۳ دقیقه، ۰/۵ میلی‌لیتر از معرف رنگی دنیتروسالیسیلیک اسید به آن اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد و جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید. میزان فعالیت آلفا آمیلاز، بر حسب میکرومول مالتوز آزاد شده، در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (Bernfeld, 1955).

بررسی آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS، نسخه ۲۱ و به کمک آنالیز واریانس دو طرفه و آزمون مقایسه میانگین توکی انجام شد. همچنین برای تعیین ارتباط رگرسیونی

[1] Pellets

[2] Sodium cholate

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/JOC.2019.9.1275]
Downloaded from joc.inio.ac.ir at 10:55 IRDT on Wednesday April 10th 2019

میان غلظت سموم قارچی موجود در جیره غذایی و میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی مورد مطالعه از رگرسیون چند متغیره استفاده گردید (Tarkhani et al., 2017; Imani et al., 2018). لازم به ذکر است، تمامی مفروضات آنالیز واریانس و همچنین رگرسیون پیش از انجام تحلیل‌های آماری، مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین تمامی آزمون‌ها در سطح معنی‌داری کمتر از ۵ درصد تفسیر شدند و نتایج نهایی به صورت میانگین ± خطای استاندارد گزارش شدند.

۳. نتایج و بحث

نتایج مربوط به تجزیه و تحلیل سمیت همزمان سطوح مختلف دو سم آفلاتوکسین و زیرالنون بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی در جدول ۲ آمده است. همان‌طورکه در جدول ۲ قابل مشاهده است، فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز ماهیان تیمارهای مختلف تحت تاثیر سمیت سموم قارچی موجود در جیره های غذایی قرار نگرفت (P>۰/۰۵)، در حالی‌که میزان فعالیت آنزیم لیپاز تحت تاثیر اثر متقابل سموم آفلاتوکسین و زیرالنون جیره‌های غذایی قرار گرفت (P<۰/۰۵) و در پایان آزمایش میزان فعالیت آنزیم آمیلاز صرفا تحت تاثیر سم آفلاتوکسین موجود در جیره‌های غذایی قرار گرفت (P<۰/۰۵).

جدول ۲: نتایج آنالیز واریانس فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهیان گروه‌های مختلف آزمایشی در پایان دوره

آنزیم	منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	P-value
آلکالین پروتئاز	آفلاتوکسین	۲/۸۸۱	۲	۱/۴۴۰	۱/۷۵۵	۰/۲۰۱
	زیرالنون	۲/۶۱۴	۲	۱/۳۰۷	۱/۵۹۲	۰/۲۳۱
	آفلاتوکسین زیرالنون	۱/۷۶۲	۴	۰/۴۴۰	۰/۵۳۷	۰/۷۱۱
	خطا	۱۴/۷۷۶	۱۸	۰/۸۲۱		
لیپاز	آفلاتوکسین	۰/۱۵۴	۲	۰/۰۷۷	۰/۴۱۷	۰/۶۶۵
	زیرالنون	۱/۳۳۴	۲	۰/۶۶۷	۳/۶۱۷	۰/۰۴۸
	آفلاتوکسین زیرالنون	۲/۷۱۹	۴	۰/۶۸۰	۳/۶۸۵	۰/۰۲۳
	خطا	۳/۳۲۰	۱۸	۰/۱۸۴		
آمیلاز	آفلاتوکسین	۲۶۴/۲۵۳	۲	۱۳۲/۱۲۶	۱۰/۰۶۵	۰/۰۰۱
	زیرالنون	۱۴/۳۳۰	۲	۷/۱۶۵	۰/۵۴۶	۰/۵۸۹
	آفلاتوکسین زیرالنون	۱۵۳/۳۰۰	۴	۳۸/۰۷۵	۲/۹۰۰	۰/۰۵۱
	خطا	۲۳۶/۳۰۲	۱۸	۱۳/۱۲۸		

با توجه به جدول ۳، بیشترین میزان فعالیت آنزیم لیپاز در تیمار شاهد (آفلاتوکسین صفر، زیرالنون صفر) و تیمار آفلاتوکسین۲۵-زیرالنون ۲۰۰ مشاهده شد. کمترین میزان فعالیت آنزیم لیپاز در تیمار زیرالنون ۴۰۰ و آفلاتوکسین ۲۵ مشاهده گردید (P<۰/۰۵). در حضور زیرالنون یا آفلاتوکسین (هر کدام به تنهایی)، از میزان فعالیت آنزیم لیپاز در مقایسه با گروه شاهد (جیره غذایی فاقد زیرالنون و آفلاتوکسین) به طور معنی‌داری کاسته شد (P<۰/۰۵). اما نکته جالب توجه این بود که در تیمارهای تلفیقی یا به عبارتی در حضور همزمان هر دو سم، اثر کاهندگی آن‌ها بر میزان فعالیت آنزیم لیپاز تعدیل گردید.

جدول ۳: میانگین (± خطای استاندارد) فعالیت آنزیم لیپاز ماهیان تیمارهای مختلف در پایان دوره

غلظت آفلاتوکسین جیره غذایی (ppb)	غلظت زیرالنون جیره غذایی (ppb)	فعالیت آنزیم لیپاز
۰	۰	۲/۲۹±۰/۱۱^{a}*
۰	۲۰۰	۲/۱۲±۰/۳۷^{a}
۰	۴۰۰	۱/۱۸±۰/۷۸^{c}
۲۵	۰	۱/۲۵±۰/۴۷^{c}
۵۰	۰	۱/۶۹±۰/۲۸^{b}
۲۵	۲۰۰	۲/۲۸±۰/۳۶^{a}
۲۵	۴۰۰	۱/۷۴±۰/۶۱^{b}
۵۰	۲۰۰	۲/۰۹±۰/۲۹^{a}
۵۰	۴۰۰	۲/۰۴±۰/۵۳^{a}

* حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت آماری هستند (P<۰/۰۵).

در ارتباط با میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز ماهیان تیمارهای مختلف آزمایشی (جدول ۴)، بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در گروه تغذیه شده با جیره‌های غذایی فاقد آفلاتوکسین (بدون توجه به حضور و عدم حضور سم زیرالنون) مشاهده شد، که اختلاف معنی‌داری با ماهیان تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی ۲۵ ppb و ۵۰ ppb آفلاتوکسین بود (P<۰/۰۵).

جدول ۴: میانگین (± خطای استاندارد) فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز ماهیان تیمارهای مختلف آزمایشی در پایان دوره

غلظت آفلاتوکسین جیره غذایی (ppb)	فعالیت آنزیم آمیلاز
۰	۳۲/۰۱±۳/۷۲^{a}
۲۵	۲۵/۳۹±۴/۶۱^{b}
۵۰	۲۵/۳۴±۳/۹۱^{b}

* حروف غیر مشابه نشان‌دهنده وجود تفاوت آماری هستند (P<۰/۰۵).

در تجزیه و تحلیل رگرسیونی چند جمله‌ای داده‌های حاصل از فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهیان تیمارهای مختلف در پایان آزمایش مشخص شد که در فعالیت آنزیم لیپاز عبارت‌های اثر متقابل آفلاتوکسین-زیرالنون (Afla×Zea) و درجه دوم زیرالنون (Zea^2) دارای اثر منفی معنی‌دار بودند (رابطه ۱). همچنین در این بررسی‌ها مشخص شد که تنها عبارت آفلاتوکسین در میزان

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/JOC.2019.9.1275]
Downloaded from joc.inio.ac.ir at 10:55 IRDT on Wednesday April 10th 2019

فعالیت آنزیم آمیلاز موثر است و دارای اثر منفی می‌باشد (رابطه ۲). همچنین در بررسی رگرسیونی داده‌های مربوط به میزان فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز تیمارهای مختلف، هیچ کدام از عبارت‌های آفلاتوکسین و زیرالنون و یا ترکیب آن‌ها دارای اثر معنی‌دار نبود و به همین دلیل هیچ عبارتی مجوز ورود به رابطه رگرسیونی را دریافت نکرد.

رابطه ۱ $F(۲و۲۴)=۷/۵۷,\ p\text{-}valae=۰/۰۰۳\ R^2=۰/۳۹$

$۲/۱۶۸ -۰/۰۰۰۰۷۳\times(Afla\times Zea) - ۰/۰۰۰۰۱۲\times(Zea)^2$

رابطه ۲ $F(۱و۲۵)=۱۰/۶۹,\ p\text{-}valae=۰/۰۰۳\ R^2=۰/۳۰$

$۲۷/۵۸۴-۰/۱۳۳\times(Afla)$

بر اساس نتایج بدست آمده، هر دو سم آفلاتوکسین و زیرالنون باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های گوارشی آمیلاز و لیپاز در ماهی قزل‌آلا شدند. به نحوی که ضریب رگرسیونی اثر متقابل زیرالنون و آفلاتوکسین بر میزان فعالیت آنزیم لیپاز، منفی (۰/۰۰۰۰۷۳-) بود. بدین معنی که به ازای هر واحد افزایش در میزان غلظت سم زیرالنون از میزان تاثیر آفلاتوکسین بر فعالیت آنزیم لیپاز ۰/۰۰۰۰۷۳ کم می‌شود. با این حال، وجود این سموم در جیره‌های غذایی ماهیان قزل‌آلا موجب اختلال در ساخت/ترشح آنزیم لیپاز می‌گردد. همچنین میزان فعالیت آنزیم آمیلاز ماهیان گروه‌های مختلف آزمایشی نیز تحت تاثیر حضور سم آفلاتوکسین در جیره‌ها قرار گرفت، در حالی‌که سم زیرالنون اثری بر میزان فعالیت این آنزیم نداشت. در مطالعه Nazdar و همکاران (۲۰۱۸) مشخص گردید که در ماهیان، تغذیه با سطوح مختلف نانو ذره[1] اکسید نیکل به مدت یکماه از میزان فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز کاسته شد. آن‌ها دلیل افت فعالیت آنزیمی را به تغییرات آسیب‌شناختی سلول‌های آسینار[2] لوزالمعده نسبت دادند، که البته در بررسی‌های بافت شناسی کلاسیک (H&E) مشهود بود. همچنین در مطالعه Sahoo (2000) تزریق درون صفاقی آفلاتوکسین به ماهی روهو[3] موجب نکروز سلول‌های آسینی لوزالمعده و کاهش گرانول‌های سیتوپلاسمی گردید که به مفهوم کاهش ساخت/ترشح آنزیم‌های گوارشی و متعاقب آن کاهش اشتهای ماهی بود. که به نتایج بدست آمده توسط Jantrarotai و همکاران (۱۹۹۰) در گربه ماهی روگاهی مشابه است. همچنین Osborne و Hamilton (۱۹۸۱) مشاهده کردند که در جوجه‌های تغذیه با آفلاتوکسین سطح فعالیت آنزیم‌های لیپاز، تریپسین و آمیلاز کاهش یافت. این یافته‌ها با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مطابقت دارد. همچنین Burgos-Hernandez و همکاران (۲۰۰۵) در یک بررسی برون تنی[4] مشاهده کردند که آفلاتوکسین B1 موجب کاهش فعالیت شبه آنزیم تریپسین در عصاره هپاتوپانکراس میگوی سفید اقیانوس آرام (*Litopenaeus vannamei*) می‌شود، در حالی‌که سم فومینیسین B1 موجب افزایش فعالیت آن می‌گردد. با این وجود، در گزارش Imani و همکاران (۲۰۱۸) روی ماهیان قزل آلای تغذیه با سطوح مشابه آفلاتوکسین، میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی (آلکالین پروتئاز، لیپاز و آمیلاز) افزایش یافت که مغایر نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر است. همچنین، پانکراتیتیس و هیپرتروفی سلول-های آسینی در ماهی تیلاپیای نیل در اثر مواجهه با مقادیر بالای آفلاتوکسین B1 گزارش شده است (Chavez-Sanchez et al., 1994). در مطالعه Han و همکاران (۲۰۰۸) گزارش نمودند که تغذیه اردک‌ها با سطوح ۲۰ و ۴۰ ppb آفلاتوکسین موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی (پروتئاز، تریپسین، کیموتریپسین و آمیلاز) می‌گردید، اما سرعت رشد و قابلیت هضم مواد مغذی به ویژه پروتئین کاهش قابل توجهی دارد. محققین بر این باور هستند که پانکراتیتیس از عوامل اصلی کاهش جذب روده‌ای مواد مغذی به ویژه چربی‌ها و پروتئین است (Bliss and Wolfe, 2010). نتایج پژوهش‌های مختلف می‌تواند با توجه به مدت زمان مواجهه با سم/سموم، ماتریس غذا، اندازه و گونه ماهی/آبزی بسیار متفاوت باشند. برای مثال Applegate و همکاران (۲۰۰۹) بیان کردند که موجود از یک واکنش جبرانی به دلیل آفلاتوکسیکوزیس و کاهش قابلیت جذب مواد مغذی استفاده می‌کند که این فرآیند مستلزم زمان است. برای مثال Nazdar و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که علی‌رغم کاهش فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف نانوذره اکسید نیکل در ماه اول، یک افزایش فعالیتی در ماه دوم مطالعه مشاهده گردید. نتایج مشابهی را Marchioro و همکاران (۲۰۱۳) در جوجه‌ها گزارش نمودند، به شکلی که در روز

[1] Nanoparticles
[2] Acinar
[3] Rohu
[4] *In vitro*

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/JOC.2019.9.1275]
Downloaded from joc.inio.ac.ir at 10:55 IRDT on Wednesday April 10th 2019

چهاردم تغذیه با سطوح مختلف آفلاتوکسین، سطح فعالیت آنزیم‌های لیپاز، آمیلاز و تریپسین نسبت به گروه شاهد (فاقد سم آفلاتوکسین در جیره غذایی) کاهش یافت. اما در پایان آزمایش سطح فعالیت آنزیم‌های فوق در گروه‌های دریافت کننده سم افزایش معنی‌داری داشت. بنابراین، با توجه به اینکه مطالعه حاضر تنها به مدت یک‌ماه انجام شد، می‌توان چنین استنباط نمود که اگر آزمایش به مدت طولانی ادامه می‌یافت امکان بروز چنین واکنشی در ماهیان گروه‌های مختلف آزمایشی قابل مشاهده بود. تفاوت دیگر مطالعه حاضر با پژوهش Imani و همکاران (۲۰۱۸) در ارتباط با اثر سم آفلاتوکسین B1 جیره غذایی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان، این است که در مطالعه مذکور ماهیان بزرگتر بودند (ده گرم که در پایان آزمایش نزدیک به ۹۰ گرم گزارش شدند) و از جیره غذایی تجاری با ماتریسی کاملا متفاوت استفاده شد. با این حال برای مشخص‌تر شدن دلایل اصلی چنین تفاوت‌هایی، آزمایش‌های دیگری با جزئیات بیشتر نیاز است. در مورد دلیل تفاوت فعالیت آنزیم‌های گوارشی مختلف در ماهیان یک گروه آزمایشی نسبت به حضور یک آلاینده، اطلاعاتی در دست نیست که چنین تفاوت‌هایی ممکن است به رفتار این آنزیم‌ها باز گردد (Applebaum et al., 2001; Marchioro et al., 2013). علاوه براین، وجود رابطه درجه دو میان فعالیت آنزیم لیپاز و مقدار زیرالنون جیره غذایی در این پژوهش (البته با ضریب منفی) مشابه یافته‌های Applegate و همکاران (۲۰۰۹) در ارتباط با فعالیت آنزیم مالتاز روده مرغ‌های تخمگذار بود. برای بهتر مشخص شدن چنین ارتباطی پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی سطوح بیشتری از سم زیرالنون به جیره‌های غذایی افزوده گردد.

حضور همزمان آفلاتوکسین و زیرالنون در غذای انسان و دام گزارش شده است (Yip et al., 2017). بنابراین مطالعه سمیت همزمان ترکیب مایکوتوکسین‌ها از اهمیت زیادی برخوردار هستند. زیرا در تعیین اثر هم‌افزایی یا آنتاگونیستی آن‌ها کمک می‌کند. علاوه بر این نوع بر هم‌کنش میان آن‌ها در تعیین آثار زیبانبار سلامتی آن‌ها قابل استفاده خواهد بود (Wang et al., 2014). اثر متقابل آفلاتوکسین و زیرالنون به ویژه بر فعالیت آنزیم لیپاز برای نخستین بار در این مطالعه مشاهده شد. در منابع مورد بررسی چنین اثری بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی گزارش نشده است. البته در بررسی اثر سمیت همزمان آفلاتوکسین و زیرالنون بصورت برون تنی و روی سلول‌های سرطان پستان MCF-7 توسط Yip و همکاران (۲۰۱۷) مشخص شد که رشد سلولی، ساخت DNA و همچنین ادامه چرخه سلولی تحت تاثیر اثر متقابل این دو مایکوتوکسین قرار گرفتند. با آنکه زیرالنون موجب بهبود رشد سلولی، ساخت DNA و ادامه چرخه سلولی گردید، سم آفلاتوکسین برای سلول‌ها سمی بود. این سم برخلاف زیرالنون عمل نمود و به ویژه در غلظت‌های بالا موجب توقف اثر افزایشی زیرالنون بر شاخص‌های مورد مطالعه روی سلول‌ها گردید. در مطالعه دیگری که توسط Wang و همکاران (۲۰۱۴) روی سلول Hep G2 انسانی انجام شد، مشخص گردید که ترکیب دو سم اکراتوکسین A و زیرالنون، ترکیب اکراتوکسین A و آلفا زیرالنول و همچنین آلفا زیرالنول و زیرالنون از اثر ستیهندگی برخوردار بودند. علاوه براین در بررسی اثر سمیت همزمان غلظت‌های مختلف آفلاتوکسین و زیرالنون بر تیره سلولی کلیه خوک[1]، Lei و همکاران (۲۰۱۳) گزارش نمودند که غلظت‌های پایین آفلاتوکسین با زیرالنون اثر ستیهندگی دارند، اما غلظت‌های بالای آن موجب افزایش آسیب‌های اکسیداتیو می‌گردند. همچنین، زیرالنون میزان مرگ سلولی ناشی از آفلاتوکسین را کاهش داد. این یافته مشابه کاهش افت فعالیت آنزیم لیپاز در حضور همزمان هر دو سم زیرالنون و آفلاتوکسین در جیره‌های غذایی آزمایشی است. البته باید توجه داشت که سمیت مایکوتوکسین‌ها یا هر سم دیگری بر انواع سلول‌ها ممکن است از الگوی متفاوتی پیروی نمایند، زیرا که منشا و کارکرد سلول‌ها با یکدیگر متفاوت است (Lei et al., 2013). علاوه براین، شرایط آزمایش در مطالعات درون تنی[2] و برون تنی مانند اثرات متابولیک ارتباطات بافتی با یکدیگر تفاوت قابل ملاحظه‌ای دارند (Sun et al., 2014). سموم آفلاتوکسین B1، زیرالنون و داکسی‌نی‌والنول بصورت انفرادی موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آسپارتات-آمینوترانسفراز، آلانین‌آمینوترانسفراز و همچنین کاهش آلبومین و محتوای پروتئین تام سرمی موش‌ها (علائم آسیب‌های کبدی) شدند. در حالی‌که، ترکیب دو سم آفلاتوکسین و زیرالنون موجب کاهش آسیب‌های کبدی گردید. با این حال، ترکیب سموم آفلاتوکسین و داکسی‌نی‌والنول موجب تشدید آسیب‌های کبدی موش‌ها شد (Sun et al., 2014). اثر ستیهندگی حضور آفلاتوکسین B1 و زیرالنون در جیره‌های غذایی می‌تواند به فعالیت شبه استروژنی زیرالنون و بهبود ساخت DNA و در نتیجه کاهش سمیت سلولی آفلاتوکسین B1 نسبت داده شود. البته ساز

[1] Porcine kidney
[2] *In vivo*

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/JOC.2019.9.1275]
Downloaded from joc.inio.ac.ir at 10:55 IRDT on Wednesday April 10th 2019

و کار دقیق چنین تاثیری باید با دقت بیشتر و با تاکید بر مطالعات مولکولی مورد بررسی قرار گیرد (Sun et al., 2014; Yip et al., 2017). با این وجود مایکوتوکسین‌ها و به ویژه آفلاتوکسین موجب کاهش کارآیی استفاده از انرژی شده و سبب افزایش انرژی نگهداری دام می‌گردد، که گاهی اوقات در حضور سایر سموم و با اثر هم‌افزایی مانند اکراتوکسین A در مرغ‌ها، موجب تشدید آثار زیانبار سموم دیگر می‌شود (Verma et al., 2007).

۴. نتیجه‌گیری

در این پژوهش مشخص گردید که میزان افت فعالیت آنزیم لیپاز زوائد پیلوریک ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی آلوده با هر کدام از سموم قارچی، به ویژه در سطح ۲۰۰ppb زیرالنون به میزان قابل توجهی کاهش یافت، که حاکی از اثر ستیهندگی این دو سم است و شناسایی مکانیسم دقیق آن مستلزم مطالعات بیشتری می‌باشد.

منابع

Applebaum, S.L.; Perez, R.; Lazo, G.P.; Holt, G.L., 2001. Characterization of chymotrypsin activity during ontogeny of larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). Fish Physiology and Biochemistry, 25: 291-300.

Applegate, T.J.; Schatzmayr, G.; Pricket, K.; Troche, C.; Jiang, Z., 2009. Effect of aflatoxin culture on intestinal function and nutrient loss in laying hens. Poultry Science, 88(6): 1235-1241.

Barbosa, B.T.S.; Pereyra, C.M.; Soleiro, C.A.; Dias, E.O.; Oliveira, A.A.; Keller, K.A.; Silva, P.P.O.; Cavaglieri, L.R.; Rosa, C.A.R., 2013. Mycobiota and mycotoxins present in finished fish feeds from farms in the Rio de Janeiro State, International Aquatic Research, 5(3): 2-9.

Bernfeld, P., 1955. Amylase. In: Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (Eds.), Methods in Enzymology. Academic Press, New York, 149-158PP.

Bliss, M.C.; Wolfe, M.M., 2010. Common clinical manifestations of gastrointestinal disease. In: Andreoli and Carpenter's Cecil essentials of medicine, Benjamin, I.J., Griggs, R.C., Wing, E.J. (Eds.), Saunders Elsevier, Philadelphia, 382-400PP.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

Burgos-Hernández, A.; Farias, S.I.; Torres-Arreola, W.; Ezquerra-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): 399-410.

Carlson, D.B.; Williams, D.E.; Spitsbergen, J.M.; Ross, P.; Bacon, F.C.W.; Meredith, F.I.; Riley, R.T., 2001. Fumonisin B1 promotes aflatoxin B and N-methyl-N'-nitronitrosoguanidine-initiated liver tumors in rainbow trout. Toxicology and Applied Pharmacology, 172(1): 29-36.

Cavaliere, C.; D'Ascenzo, G.; Foglia, P.; Pastorini, E.; Samperi, R.; Lagana, A., 2005. Determination of type B trichothecenes and macrocyclic lactone mycotoxins in field contaminated maize. Food Chemistry, 92: 559-568.

Chavez-Sanchez, M.C.; Palacios, C.M.; Moreno, I.O., 1994. Pathological effects of feeding young *Oreochromis niloticus* diets supplemented with different levels of aflatoxin B1. Aquaculture, 127(1): 49-60.

Chong, A.S.C.; Hashim, R.; Lee, C.Y.; Ali, B.A., 2002. Partial characterization and activities of proteases form the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). Aquaculture, 203: 321-333.

Garcia-Carreno, F.L.; Haard, N.F., 1993. Characterization of proteinase classes in *Langostilla pleuroncodesplanipes* and Crayfish *Pacifastacus astacus* extracts. Journal of Food Biochemistry, 17: 97-

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/JOC.2019.9.1275]
Downloaded from joc.inio.ac.ir at 10:55 IRDT on Wednesday April 10th 2019

Rauber, R.H.; Blazquez, F.J.H.; Oliveira, M.G.A.; Mallmann, C.A., 2013. Effects of aflatoxins on performance and exocrine pancreas of broiler chickens. Avian Disease, 57(2): 280-284.

Meredith, F.I.; Riley, R.T.; Bacon, C.W.; Williams, D.E.; Carlson, D.B., 1998. Extraction, quantification, and biological availability of fumonisin B1 incorporated into the Oregon test diet and fed to rainbow trout. Journal of Food Protection, 61(8): 1034-1038.

Moffitt, C.M.; Cajas-Cano, L., 2014. Blue growth: the 2014 FAO state of world fisheries and aquaculture. Fisheries, 39(11): 552-553.

Nazdar, N.; Imani, A.; Noori, F.; Moghanlou, K.S., 2018. Effect of silymarin supplementation on nickel oxide nanoparticle toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fingerlings: Pancreas Tissue Histopathology and Alkaline Protease Activity. Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science, 42 (2): 353-361.

Osborne, D.J.; Hamilton, P.B., 1981. Decreased pancreatic digestive enzymes during aflatoxicosis. Poultry Science, 60: 1818-1821.

Pietsch, C.; Kersten, S.; Valenta, H.; Dänicke, S.; Schulz, C.; Burkhardt-Holm, P.; Junge, R., 2015. Effects of dietary exposure to zearalenone (ZEN) on carp (*Cyprinus carpio* L.). Toxins, 7(9): 3465-3480.

Sahoo, P.K., 2000. Histological distribution and ultrastructure of exocrine pancreas in Indian major carp (*Labeo rohita* Ham.) and its alteration in aflatoxicosis. Bangladesh Journal of Fisheries Research, 4(1): 1-6.

Santacroce, M.P.; Zizzadoro, C., 2008. Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 18: 99-130.

Santacroce, M.P.; Conversano, M.C.; Casalino, E.; Lai, O.; Zizzadoro, C.; Centoducati, G.; Crescenzo, G., 2008. Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. Reviews in Fish Biology and 113.

Han, X.Y.; Huang, Q.C.; Li, W.F.; Jiang, J.F.; Xu, Z.R., 2008. Changes in growth performance, digestive enzymes activity and nutrient digestibility of cherry valley ducks in response to aflatoxin B1 levels. Livestock Science, 119(1): 216-220.

Hooft, J.M.; Elmor, A.E.H.I.; Encarnação, P.; Bureau, D.P., 2011. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is extremely sensitive to the feed-borne Fusarium mycotoxin deoxynivalenol (DON). Aquaculture, 311(1): 224-232.

Hussein, H.S.; Brasel, J.M., 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology, 167(2): 101-134.

Iijima, N.; Tanaka, S.; Ota, Y., 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from hepatopancreas of red sea bream *Pagrus major*. Fish Physiology and Biochemistry, 18: 59-69.

Imani, A.; Bani, M.S.; Noori, F.; Farzaneh, M.; Moghanlou, K.S., 2018. The effect of bentonite and yeast cell wall along with cinnamon oil on aflatoxicosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Digestive enzymes, growth indices, nutritional performance and proximate body composition. Aquaculture, 476: 160-167.

Jantrarotai, W.; Lovell, R.T.; Grizzle, J.M., 1990. Acute toxicity of aflatoxin B1 to channel catfish. Journal of Aquatic Animal Health, 2(4): 237-247.

Lei, M.; Zhang, N.; Qi, D., 2013. In vitro investigation of individual and combined cytotoxic effects of aflatoxin B1 and other selected mycotoxins on the cell line porcine kidney 15. Experimental and Toxicologic Pathology, 65(7): 1149-1157.

Lovell, R.T., 2003. Diet and fish husbandry, In: Halver, JE Hardy, RW (eds) Fish Nutrition, 3rd edn. Academic Press Inc., New York, USA., 703-754PP.

Marchioro, A.; Mallmann, A.O.; Diel, A.; Dilkin, P.;

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.29252/JOC.2019.9.1275]

Downloaded from joc.inio.ac.ir at 10:55 IRDT on Wednesday April 10th 2019

of individual and combined treatment. Food and Chemical Toxicology, 71: 217-224.

Woźny, M.; Brzuzan, P.; Gusiatin, M.; Jakimiuk, E.; Dobosz, S.; Kuźmiński, H., 2012. Influence of zearalenone on selected biochemical parameters in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Polish Journal of Veterinary Sciences, 15(2): 221-225.

Yip, K.Y.; Wan, M.L.Y.; Wong, A.S.T.; Korach, K.S.; El-Nezami, H., 2017. Combined low-dose zearalenone and aflatoxin B1 on cell growth and cell-cycle progression in breast cancer MCF-7 cells. Toxicology Letters, 281: 139-151.

Zinedine, A.; Soriano, J.M.; Molto, J.C.; Manes, J., 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an estrogenic mycotoxin. Food and Chemical Toxicology, 45(1): 1-18.

Fisheries, 18(1): 99-130.

Sun, L.H.; Lei, M.Y.; Zhang, N.Y.; Zhao, L.; Krumm, C.S.; Qi, D.S., 2014. Hepatotoxic effects of mycotoxin combinations in mice. Food and Chemical Toxicology, 74: 289-293.

Tarkhani, R.; Imani, A.; Jamali, H.; Farsani, H.G., 2017. Anaesthetic efficacy of eugenol on various size classes of angelfish (*Pterophyllum scalare* Schultze, 1823). Aquaculture Research, 48(10): 5263-5270.

Verma, J.; Johri, T. S.; Swain, B.K., 2007. Effect of aflatoxin, ochratoxin and their combination on protein and energy utilisation in white leghorn laying hens. Journal of the Science of Food and Agriculture, 87: 760-764.

Wang, H.W.; Wang, J.Q.; Zheng, B.Q.; Li, S.L.; Zhang, Y.D.; Li, F.D.; Zheng, N., 2014. Cytotoxicity induced by ochratoxin A, zearalenone, and α-zearalenol: effects

www.SID.ir