

اثر سطوح مختلف زئولیت نانو ساختار بر مسمومیت مزمن تجربی با آفلاتوکسین B1 موجود در جیره غذایی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و ارزیابی شاخصهای رشد و فیزیولوژی

مهدی فریدی کلورزی^۱، بهرام فلاحتکار^{۲*}، سهیل علی نژاد^۳، داریوش داودی^۴

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران

۲. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران

۳. استادیار مؤسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی، تهران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی،

ایران

۴. استادیار بخش تحقیقات نانو تکنولوژی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج

تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۶/۳۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۸

چکیده

به منظور بررسی میزان کاهش آفلاتوکسین B1 (AFB1) به واسطه کاربرد زئولیت نانو ساختار (NZ) در جیره غذایی بچه ماهیان قزل‌آلا (*Oncorhynchus mykiss*)، یک آزمایش تغذیه‌ای طراحی و به مدت ۵۶ روز اجرا شد. ۲۷۰ ماهی با وزن میانگین $23 \pm 3/7$ گرم در ۶ گروه شامل C (شاهد)، NZ0.5 (جیره پایه + ۰/۵ درصد NZ)، NZ1 (جیره پایه + ۱ درصد NZ)، AF5 (جیره پایه + ۵ میلی‌گرم AFB1)، AF5 NZ0.5 (جیره پایه + ۵ میلی‌گرم AFB1 + ۰/۵ درصد NZ)، AF5 NZ1 (جیره پایه + ۵ میلی‌گرم AFB1 + ۱ درصد NZ) و با ۳ تکرار تیمار بندی و در ۴ نوبت در شبانه روز بر حسب اشتها ماهی‌های غذایی شدند. در پایان دوره آزمایش، اختلاف معنی‌داری در شاخصهای رشد مشاهده نشد. در تیمار AF5 NZ0.5 نسبت به تیمار NZ0.5 شاخص کبدی، میزان گلبول‌های سفید و نوتروفیل بطور معنی‌داری کاهش و میزان لنفوسیت افزایش یافت. از سوی دیگر، سطح آئوزینوفیل در تیمار NZ0.5 نسبت به تیمار AF5 از افزایش معنی‌دار برخوردار بود. در سایر فاکتورهای هماتولوژیک اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. مقدار پروتئین کل و آلبومین در تمام تیمارهای حاوی آفلاتوکسین نسبت به تیمارهای فاقد آفلاتوکسین و نیز مقدار گلوبولین در تیمار AF5 نسبت به تیمار شاهد بطور معنی‌دار کاهش یافت. افزایش معنی‌دار مقدار فسفر در تیمار NZ0.5 نسبت به تیمار C مشاهده شد. میزان سدیم، کلسیم و کلسترول در تیمارهای مختلف، اختلاف معنی‌داری نداشت. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از زئولیت نانو ساختار به میزان ۰/۵ درصد جیره پایه در غذای بچه ماهیان قزل‌آلا، می‌تواند تا حد زیادی موجب کاهش اثرات منفی ناشی از آفلاتوکسین B1 شود.

واژگان کلیدی: آفلاتوکسین، زئولیت، رشد، هماتولوژی، قزل‌آلای رنگین کمان

۱. مقدمه

کمان، حساسترین ماهی به آفلاتوکسین B1 محسوب می‌شود (Alinezhad et al., 2011).

مؤثرترین راه مقابله با ورود سموم قارچی به خوراک آبزیان، پیشگیری از رشد قارچهای مولد این سموم در مزارع تولید کننده محصولات کشاورزی است. با این وجود ممکن است علیرغم تمام تمهیدات اندیشیده شده، غذای آبزیان به طریقی آلوده به این سموم شده باشند. بنابراین لازم است برای دفع آنها از موادی استفاده کرد که قادر به اتصال به این سموم و خنثی کردن آنها باشند. برای مقابله با سم آفلاتوکسین، مواد مختلف شیمیایی مورد آزمایش قرار گرفته‌اند. برخی از این مواد که به جاذب‌های شیمیایی معروف هستند، به جیره غذایی حیوانات اضافه می‌شوند. یکی از این مواد آلومینوسیلیکات هیدراته سدیم کلسیم* است که نوعی زئولیت بوده و می‌تواند با اتصال محکم به مولکول‌های آفلاتوکسین، از جذب آنها جلوگیری کند (Phillips et al., 1988). برخی از مطالعات نشان می‌دهد که موادی مانند سیلیکات‌های سدیم آلومینیوم و بنتونیت‌ها می‌توانند به بخش قابل توجهی از آفلاتوکسین موجود در غذاها متصل و مانع جذب آنها شوند (Waldneer and Lalman, 1998). زئولیت در غذا و بدن آبزیان نقش‌های متعددی دارد که از جمله می‌توان به خواص ضد میکروبی و قارچی در دستگاه گوارش و خاصیت ضد آفلاتوکسینی در جیره غذایی آبزیان اشاره کرد. به همین دلیل، زئولیت با افزایش جذب مواد غذایی در دستگاه گوارش و افزایش راندمان مصرف مواد مغذی، می‌تواند به‌طور غیر مستقیم، سبب افزایش رشد و بقای جاندار آبی شود (Nikawa et al., 1997). در یک آزمایش میزان توانایی چند زئولیت مصنوعی (NaX، NaY، NaA، CaA) در جذب آفلاتوکسین B1 مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن نشان داد که زئولیت قادر به جذب ۹۰ درصد از آفلاتوکسین در شرایط *In vitro* می‌باشد (Miazzo et al., 2000). از آنجا که توان اتصال زئولیت‌ها با سموم قارچی سبب استفاده از آنها به عنوان جاذب این سموم شده است (Kubena et al., 1990; Goodarzi and Modiri, 2008). با کاربرد این ماده

با گسترش روزافزون مراکز پرورش دام، طیور و آبزیان در سطح جهان، تقاضا برای دریافت نهاده‌های غذایی به منظور ساخت خوراک در چنین مراکزی نیز افزایش چشمگیری یافته است. تهیه غذا مهمترین فرایند در آبی‌پروری به شمار می‌آید و به عنوان مثال در پرورش ماهی قزل‌آلا تقریباً نیمی از هزینه‌های تولید را به خود اختصاص می‌دهد (Higgs et al., 1995). از اینرو صاحبان مزارع پرورش ماهی و نیز کارخانجات تولید کننده غذای آبزیان درصدد برآمده‌اند که از منابع ارزانتر برای ساخت غذا بهره بگیرند. یکی از راهکارهای مورد استفاده در این زمینه، جایگزینی آرد ماهی با پروتئین‌هایی است که منشاء گیاهی داشته و بنابراین کم هزینه‌تر هستند.

کاربرد مواد اولیه کشاورزی مانند غلات برای ساخت جیره غذایی آبزیان، همواره با این خطر اساسی همراه است که می‌تواند قارچ‌ها و سموم تولیدی توسط آنها را به غذای آبزیان وارد نماید. این سموم و از جمله آفلاتوکسین‌ها ممکن است هنگام تولید، برداشت، ذخیره‌سازی و یا عمل‌آوری، باعث آلودگی محصولات کشاورزی شوند (Ahsan et al., 2001; Williams et al., 2004). سالانه حدود ۲۰ درصد از محصولات غذایی تولید شده در جهان توسط سموم قارچی آلوده می‌شوند که در این میان آلودگی ناشی از آفلاتوکسین‌ها سهم بیشتری نسبت به آلودگی با سایر سموم دارد (Razzaghi et al., 2011). آفلاتوکسین‌ها برای انسان و حیوانات، سمی و سرطان‌زا می‌باشند (Wild et al., 1990). بر طبق اظهارات Wogan (۱۹۹۲) آفلاتوکسین B1 باعث ایجاد سرطان کبد در بسیاری از جانوران، از جمله ماهی‌هایی مثل قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، ماهی آزاد sockeye (*Oncorhynchus nerka*) و گوپی (*Poecilia reticulata*)، همچنین سبب کاهش رشد، کاهش قدرت تولید مثل و کم‌خونی می‌شود. مطالعات Jiang و همکاران (۲۰۰۸) نشان داده است که آفلاتوکسین‌ها سبب سرکوب سیستم ایمنی، به ویژه پاسخ‌های ایمنی سلولی در بسیاری از جانوران می‌شوند. در میان ماهیان پرورشی، قزل‌آلای رنگین

* Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate

در ابعاد نزدیک به نانو، تأثیر آن را در کنترل این سموم و نیز میکروارگانیسم‌های تولید کننده آنها مورد ارزیابی قرار داد.

طبق تعریف مصوب توسط کمیسیون اروپا در سال ۲۰۱۱، نانو مواد به مواد طبیعی یا مصنوعی گفته می‌شود که از لحاظ توزیع اندازه، حداقل ۵۰ درصد ذرات آن، حداقل در یک بُعد دارای اندازه‌ای بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر باشند. در موارد ویژه و هر جا که نگرانی‌هایی در مورد محیط زیست، سلامتی و ایمنی وجود داشته باشد، حتی ماده‌ای که ۱ تا ۵۰ درصد آن، ابعادی بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر داشته باشد نیز در زمره ی نانو مواد قرار می‌گیرد ([http://ec.europa.eu/environment/chemical\(s/nanotech/faq/definition_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemical(s/nanotech/faq/definition_en.htm)).

با توجه به مخاطراتی که ماهی قزل‌آلا با آن روبروست، ضرورت دارد که تولید و کیفیت غذای این آبی استراتژیک، مورد توجه ویژه قرار گیرد. در پژوهش حاضر به مطالعه شاخصهای خونی و رشد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف پرداخته شده است تا با بررسی تغییرات متابولیک و میزان رشد ماهی، اثر بازدارندگی زئولیت‌های نانو ساختار بر فعالیت آفلاتوکسین B1 به صورت تجربی مورد ارزیابی قرار گیرد.

۲. مواد و روشها

۱.۲. طراحی آزمایش و سیستم پرورشی

این آزمایش در کارگاه تکثیر و پرورش ماهی واقع در دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان به مدت ۸ هفته انجام شد. پس از تهیه بچه ماهیان از شرکت تولیدی قزل‌آلای درناب قلعه رودخان (فومن، گیلان) و انتقال آنها به محل اجرای آزمایش، ماهیان به منظور سازگاری با شرایط محیط پرورش، به مدت دوازده روز در دو تانک فایبرگلاس ۲۰۰۰ لیتری نگهداری شدند. بعد از این مدت، تعداد ۲۷۰ عدد بچه ماهی با میانگین وزن $3/7 \pm 23$ گرم و طول کل $0/8 \pm 13/09$ سانتیمتر در ۱۸ تانک فایبرگلاس به ابعاد

۲.۲. جیره های آزمایشی

در این مطالعه از ۶ تیمار و ۳ تکرار برای هر تیمار استفاده شد (جدول ۱). تیمارها شامل C (شاهد)، NZ0.5 (جیره پایه + ۰/۵ درصد زئولیت نانو ساختار)، NZ1 (جیره پایه + ۱ درصد زئولیت نانو ساختار)، AF5 (جیره پایه + ۵ میلی‌گرم آفلاتوکسین B1)، AF5 NZ0.5 (جیره پایه + ۵ میلی‌گرم آفلاتوکسین B1 + ۰/۵ درصد زئولیت نانو ساختار)، AF5 NZ1 (جیره پایه + ۵ میلی‌گرم آفلاتوکسین B1 + ۱ درصد زئولیت نانو ساختار) بود.

جدول ۱: مقادیر آفلاتوکسین B₁ و زئولیت نانو ساختار در جیره بچه ماهیان قزل آلا رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

مقدار زئولیت	مقدار آفلاتوکسین	تیمار
نانو ساختار در جیره	B ₁ در جیره	
(درصد)	(میلی گرم/کیلوگرم)	
۰	۰	C
۰/۵	۰	NZ _{0.5}
۱	۰	NZ ₁
۰	۵	AF ₅
۰/۵	۵	AF ₅ NZ _{0.5}
۱	۵	AF ₅ NZ ₁

بصورت یکنواخت و در یک لایه بر روی صفحاتی پلاستیکی پخش شد. با توجه به مقادیر در نظر گرفته شده برای هر تیمار، زئولیت نانو ساختار و آفلاتوکسین، در ۱۰۰ میلی لیتر الکل اتانول ۹۶ درصد به ازای هر کیلوگرم جیره، مخلوط و کاملاً هم زده شد تا محلول یکنواختی بدست آید. سپس با استفاده از افشانه‌ای که دارای روزه‌هایی با قطر مناسب بود، این مخلوط بر روی غذا اسپری شد. جیره غذایی همه تیمارها و از جمله تیمار شاهد تحت اسپری قرار گرفتند و برای تبخیر الکل از سطح غذا، سه ساعت در معرض هوای آزاد قرار داده شدند.

۴.۲. شاخصهای رشد و تغذیه

هر دو هفته یکبار، کلیه ماهیان مورد زیست سنجی قرار گرفتند. برای این منظور ۲۴ ساعت پس از قطع غذاهای، ماهیان از مخازن صید و در ۲۵۰ میلی گرم در لیتر پودر گل میخک به روش غوطه‌وری بیهوش شدند. سپس بصورت انفرادی، طول (با دقت میلی متری) و وزن (با دقت ۰/۰۱ گرم) مورد اندازه گیری قرار گرفت. شاخصهای مورد بررسی در این آزمایش شامل شاخصهای زیستی و تغذیه‌ای، از جمله وزن نهایی (FW)، وزن کسب شده (WG)، درصد افزایش وزن بدن (BWI)، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR) و شاخص وضعیت (CF) مورد بررسی قرار گرفت (Ricker, 1979; Wing et al., 2008; Singh et al., 2009; Li et al., 2012). در انتهای دوره از هر تانک، ۵ عدد ماهی بصورت تصادفی صید و نمونه‌های کبد آنها جدا گردید و شاخص کبدی (HSI) اندازه‌گیری شد. شاخصهای

۳.۲. تهیه آفلاتوکسین B₁ و زئولیت نانو ساختار

آفلاتوکسین B₁ در انستیتو پاستور ایران و با خلوص ۹۹٪ تولید و در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. میزان آفلاتوکسین مورد نیاز در این تحقیق بر اساس غلظت کشنده این سم برای ماهی قزل آلا رنگین کمان و نیز با توجه به مطالعات قبلی در این زمینه محاسبه شد. زئولیت نانو ساختار از شرکت nanoscape (Munich, Germany) تهیه گردید. برای بررسی توپوگرافی سطح نانو ذره، از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM یا Atomic Force Microscope) استفاده شد. مطابق نتایج AFM، اندازه ذرات به طور متوسط ۳۰۰ نانومتر بود که ذرات کوچکتر بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانومتر نیز وجود داشتند. آنالیز اندازه ذره (PSA یا Particle-size analysis) نیز برای ارزیابی اندازه پودر زئولیت به کار گرفته شد. نتایج PSA نیز نشان داد که ذرات دارای توزیعی بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر می‌باشند و بیشترین جمعیت را ذرات دارای قطر ۳۰۰ نانومتر تشکیل می‌دهند. بررسی ترکیب شیمیایی، شناسایی فازها و میزان بلورینگی با استفاده از پراش اشعه ایکس (XRD یا X-Ray Diffraction) انجام گرفت. آنالیز XRD نشان داد که ماده مورد استفاده، زئولیت از نوع کلینوپتیلولیت می‌باشد. با انجام آزمایشات HPLC در انستیتو پاستور ایران بر روی نمونه غذای مورد استفاده در این مطالعه، فقدان آلودگی به آفلاتوکسین مورد تأیید قرار گرفت. برای مخلوط کردن آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار با جیره غذایی، ابتدا پلت‌های غذای مربوط به هر تیمار،

رشد با استفاده از روابط زیر محاسبه گردید:

وزن اولیه - وزن نهایی = WG (گرم)

$BWI (\%) = WG / \text{وزن اولیه} \times 100$

تعداد روزهای آزمایش / $100 \times \ln - \ln$ (وزن نهایی (گرم) / روز) = SGR
[وزن اولیه (گرم)]

مقدار غذای خورده شده / مقدار افزایش وزن = FCR

$CF = \frac{2}{\text{طول کل (سانتیمتر)}} \times 100 \times \text{وزن نهایی (گرم)}$

$HSI (\%) = 100 \times \frac{\text{وزن بدن}}{\text{وزن کبد}}$

۵.۲. شاخصهای خون‌شناسی و بیوشیمیایی پلاسما

در پایان دوره، به منظور بررسی پارامترهای هماتولوژیک اهماتوکریت (Hct)، میزان گلبول‌های سفید (WBC)، میزان گلبول‌های قرمز (RBC)، مقدار هموگلوبین (Hb)، میانگین حجم یک گلبول قرمز (MCV)، میانگین هموگلوبین یک گلبول قرمز (MCH) و میانگین درصد غلظت هموگلوبین در یک گلبول قرمز (MCHC) و پارامترهای بیوشیمیایی خون (پروتئین کل، سدیم، آلومین، فسفر، کلسیم و کلسترول)، ۳ ماهی از هر تانک بطور تصادفی صید شد و پس از بیهوش کردن به وسیله پودر گل میخک با دُز ۱۰۰ ppm، خونگیری با استفاده از سرنگ پلاستیکی ۲ میلی‌لیتری هپارینه از سیاهرگ وریدی در انتهای باله مخرجی ماهیان به عمل آمد. ۰/۵ میلی‌لیتر خون جهت بررسی‌های هماتولوژیک و ۱/۵ میلی‌لیتر خون جهت بررسی شاخصهای بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های خون در نظر گرفته شده برای بررسی‌های بیوشیمیایی به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۶۰۰ g سانتریفیوژ (Hettich, Tuttlngen, Germany) شدند. پلاسما پس از جداسازی، تا زمان اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی، در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. برای تعیین میزان Hct از روش میکروهماتوکریت استفاده شد. لوله هماتوکریت پس از پر شدن از نمونه خون تا حدود دوسوم، از انتهای حاوی خون با خمیر هماتوکریت مسدود شد و به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ (Hettich, Tuttlngen, Germany) با دور ۳۵۰۰ g قرار گرفت. در پایان با استفاده از خط کش هماتوکریت، حجم سلول‌های خونی بصورت

درصد تعیین شد (Rehülka, 2000). برای تعیین مقدار Hb از روش سیانومت هموگلوبین و دستگاه Sysmexlys (Sysmex, Kobe, Japan) استفاده شد. پس از تعیین میزان جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر، این مقدار با منحنی استاندارد مورد مقایسه قرار گرفت (Drabkin, 1954). برای شمارش گلبول‌های قرمز از لام هموسیتومتر استفاده شد. برای این منظور بعد از رقیق سازی خون منعقد نشده با محلول ریس (رقت ۱:۲۰۰) تعداد گلبول‌های قرمز در مربع میانی (شامل ۵ خانه وسط) لام هموسیتومتر شمارش و عدد بدست آمده در ۱۰۰۰۰ ضرب شد. در نهایت، تعداد گلبول‌های قرمز در یک میلی‌متر مکعب خون محاسبه گردید (Houston, 1990). مقادیر MCH، MCV و MCHC با توجه به روابط زیر محاسبه شد (Klinger et al., 1996).

تعداد گلبول‌های قرمز (میلیون در میلی‌متر مکعب) / اهماتوکریت (درصد) $\times 10^6$ = MCV (فمتولیت)

تعداد گلبول‌های قرمز (میلیون در میلی‌متر مکعب) / هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر) $\times 10^6$ = MCH (پیکوگرم در سلول)

اهماتوکریت (درصد) / هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر) $\times 10^6$ = MCHC (گرم بر دسی‌لیتر)

تعداد گلبول‌های سفید با استفاده از لام هموسیتومتر بعد از رقیق سازی خون منعقد نشده با محلول ریس (رقت ۱:۵۰) شمارش شد. از ۴ مربع کناری لام هموسیتومتر برای شمارش گلبول سفید استفاده و عدد بدست آمده در ۵۰ ضرب شد. در پایان، تعداد گلبول‌های سفید در یک میلی‌متر مکعب خون محاسبه گردید (Houston, 1990). برای تعیین درصد افتراقی گلبول‌های سفید (نوتروفیل، لنفوسیت، مونوسیت و ائوزینوفیل) پس از تهیه گسترش خونی و رنگ آمیزی آن با محلول گیمسا، شمارش هر یک از گلبول‌های سفید با استفاده از میکروسکوپ نوری با عدسی ۱۰۰ و روغن ایمرسیون انجام شد. شمارش به صورت ماریپیچی تا رسیدن تعداد سلول‌ها به عدد ۲۰۰ صورت گرفت. سرانجام درصد هر یک از گلبول‌های سفید خون محاسبه گردید (Blaxhall and Daisley, 1973). سنجش مقدار کلسیم بر حسب $mg \text{ dL}^{-1}$ به روش رنگ سنجی و با استفاده از کیت زیست شیمی (تهران، ایران) صورت گرفت و برای اندازه‌گیری میزان جذب نوری از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Unico UV-2100, New Jersey,)

۳. نتایج

۳.۱. ارزیابی شاخصهای رشد

در جدول ۲ نتایج حاصل از ارزیابی شاخصهای رشد بچه ماهیان قزل آلا در جیره‌های حاوی سطوح مختلف آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار در یک دوره ۵۶ روزه نشان داده شده است. بر این اساس در تیمارهای مختلف، اختلاف معنی داری در شاخصهای CF و FCR ، SGR ، BWI ، WG ، FW و بچه ماهیان قزل آلا مشاهده نشد ($P > 0.05$). در پایان دوره پرورش، میزان HSI متأثر از اثر متقابل سطوح آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار نبود ($P > 0.05$)، اما مقدار آن در تیمار حاوی آفلاتوکسین نسبت به تیمار فاقد آفلاتوکسین، به طور معنی داری در سطح نیم درصد زئولیت نانو ساختار کاهش نشان داد ($P < 0.05$). در سایر سطوح زئولیت نانو ساختار و آفلاتوکسین، اختلاف معنی داری در میزان HSI مشاهده نشد ($P > 0.05$).

۳.۲. ارزیابی شاخصهای خون‌شناسی و

بیوشیمیایی پلاسما

نتایج مربوط به شاخصهای هماتولوژیک در بچه ماهیان قزل آلا پرورش یافته با جیره‌های حاوی سطوح مختلف آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار در یک دوره ۵۶ روزه در جدول ۳ نشان داده شده است. با توجه به نتایج حاصله، اختلاف معنی دار در فاکتورهای Hct ، Hb ، RBC ، MCV ، MCH و $MCHC$ و مونوسیت مشاهده نشد ($P > 0.05$). میزان WBC و نوتروفیل در تیمار $NZ0.5$ AF5 به طور معنی داری نسبت به تیمار $NZ0.5$ کاهش و میزان لنفوسیت افزایش یافت ($P < 0.05$). اثر متقابل سطوح آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار، بر این سه فاکتور، تأثیر معنی دار نداشت ($P > 0.05$). همچنین مقدار آنها در سایر سطوح زئولیت نانو ساختار و آفلاتوکسین، دارای اختلاف معنی دار نبود ($P > 0.05$). سطح ائوزینوفیل در تیمار $NZ0.5$

(USA) با طول موج ۵۰۰ نانومتر استفاده شد. فسفر با استفاده از کیت من (تهران، ایران) به روش فتومتریک و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Unico UV-2100, New Jersey, USA) با طول موج ۳۴۰ نانومتر و با واحد $mg\ dL^{-1}$ اندازه‌گیری شد. میزان کلسترول با استفاده از کیت من با واحد $mg\ dL^{-1}$ به روش رنگ سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Unico UV-2100, New Jersey, USA) با طول موج ۵۰۰ نانومتر محاسبه شد. مقدار پروتئین و آلبومین با واحد $g\ dL^{-1}$ به روش رنگ سنجی و با استفاده از کیت زیست شیمی و دستگاه اسپکتروفتومتر (Unico UV-2100, New Jersey, USA) به ترتیب با طول موج ۵۴۶ نانومتر و ۵۸۵ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت. یون سدیم با واحد $mmol\ L^{-1}$ به روش شعله‌سنجی اندازه‌گیری شد.

۳.۳. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS v18.0 انجام شد. برای کنترل نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگوروف-اسمیرنوف^۱ و همگن بودن واریانسها از آزمون لون^۲ استفاده شد. جهت مشخص نمودن اثر اختلاف میانگین بین سطوح مختلف نانوزئولیت و آفلاتوکسین بر سایر پارامترها، تجزیه واریانس دو طرفه^۳ به کار گرفته شد. پس از معنی دار شدن اختلافات در این آزمون به منظور مقایسه شاخصهای خونی و رشد بین تیمارهای حاوی و فاقد آفلاتوکسین $B1$ در سطوح مختلف زئولیت نانو ساختار از آزمون تی با نمونه‌های جفت شده^۴ و بین تیمارهای مختلف حاوی زئولیت نانو ساختار در سطوح مختلف آفلاتوکسین $B1$ از تجزیه واریانس یک طرفه^۵ استفاده شد. اختلاف بین میانگینها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای توکی^۶ مورد ارزیابی قرار گرفت. سطح معنی داری در این آنالیز، $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. همه مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند.

^۴ Paired-Samples T-Test

^۵ One-way ANOVA

^۶ Tukey

^۱ Kolmogorov-Smirnov

^۲ Levene

^۳ Two-way ANOVA

معنی دار نبود ($P > 0.05$). همچنین تقابل سطوح آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار بر این فاکتور، تأثیر معنی دار نداشت ($P > 0.05$).

نسبت به تیمار AF5 از افزایش معنی دار برخوردار بود ($P < 0.05$). مقدار آئوزینوفیل در سایر سطوح آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار، دارای اختلاف

جدول ۲: اثر جیره‌های حاوی سطوح مختلف آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار بر شاخصهای رشد (میانگین \pm انحراف معیار) بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پس از ۵۶ روز پرورش

تیمارهای آزمایشی						شاخصهای رشد
AF ₅ NZ ₁	AF ₅ NZ _{0.5}	AF ₅	NZ ₁	NZ _{0.5}	C(شاهد)	
۲۲/۸۸ \pm ۰/۱۶	۲۲/۷۷ \pm ۰/۷۳	۲۳/۱۵ \pm ۰/۲۹	۲۲/۹۵ \pm ۰/۴۵	۲۳/۲۸ \pm ۰/۱۶	۲۳/۲۳ \pm ۰/۱۶	وزن اولیه (گرم)
۶۷/۲ \pm ۷/۸۷	۵۸/۶ \pm ۷/۶۲	۵۸/۹ \pm ۸/۰۱	۷۰/۲ \pm ۱۰/۲۸	۷۱/۶ \pm ۱۰/۱۲	۶۳/۷ \pm ۹/۷۳	وزن نهایی (گرم)
۱۳ \pm ۰/۷۶	۱۳/۱ \pm ۰/۴۹	۱۳/۲ \pm ۰/۰۷	۱۳ \pm ۰/۸۳	۱۳/۱ \pm ۰/۹۷	۱۳/۱ \pm ۰/۸۱	طول کل اولیه (سانتیمتر)
۱۷/۸۶ \pm ۰/۶۹	۱۷/۳۵ \pm ۰/۰۸	۱۷/۳۳ \pm ۰/۷۲	۱۸/۲۲ \pm ۰/۷۶	۱۸/۲۹ \pm ۱/۰۶	۱۷/۶۴ \pm ۱/۰۴	طول کل نهایی (سانتیمتر)
۴۴/۳ \pm ۷/۴۲	۳۵/۸ \pm ۶/۹۷	۳۵/۷ \pm ۷/۹۴	۴۷/۳ \pm ۱۰/۴۵	۴۸/۳ \pm ۱۰/۲۳	۴۰/۵ \pm ۹/۸۹	وزن کسب شده (گرم)
۱۹۳/۴ \pm ۲۸/۸۸	۱۵۷/۴ \pm ۸/۲۴	۱۵۴/۳ \pm ۳۳/۷۷	۲۰۵/۶ \pm ۴۳/۲۷	۲۰۷/۵ \pm ۵۷/۴۹	۱۷۴/۵ \pm ۴۷/۰۹	درصد افزایش وزن (درصد)
۱/۹۲ \pm ۰/۱۷	۱/۶۹ \pm ۰/۰۶	۱/۶۶ \pm ۰/۲۵	۱/۹۸ \pm ۰/۲۶	۱/۹۹ \pm ۰/۳۳	۱/۷۸ \pm ۰/۳۲	نرخ رشد ویژه (درصد/روز)
۱/۰۳ \pm ۰/۱۰	۱/۱۸ \pm ۰/۰۷	۱/۱۵ \pm ۰/۱۱	۰/۹۷ \pm ۰/۱۸	۰/۹۷ \pm ۰/۰۸	۱/۱۲ \pm ۰/۲۰	ضریب تبدیل غذایی
۱/۱۸ \pm ۰/۰۰	۱/۱۴ \pm ۰/۰۲	۱/۱۳ \pm ۰/۰۲	۱/۱۶ \pm ۰/۰۴	۱/۱۷ \pm ۰/۰۳	۱/۱۶ \pm ۰/۰۳	شاخص وضعیت
۰/۷۳ \pm ۰/۱۱ ^{ab}	۰/۶۱ \pm ۰/۰۵ ^b	۰/۷۳ \pm ۰/۱۵ ^{ab}	۱/۰۱ \pm ۰/۲۳ ^{ab}	۱/۰۲ \pm ۰/۰۶ ^a	۱/۰۱ \pm ۰/۱۳ ^{ab}	شاخص کبدی (درصد)

داده‌هایی که با حروف غیر مشابه مشخص شده‌اند، دارای اختلاف معنی دار آماری هستند ($P < 0.05$) - AF₅ NZ_{0.5} (جیره پایه + ۵ میلی گرم آفلاتوکسین B₁ + ۰/۵ درصد زئولیت نانو ساختار) - AF₅ NZ₁ (جیره پایه + ۵ میلی گرم آفلاتوکسین B₁ + ۱ درصد زئولیت نانو ساختار)

جدول ۳: اثر جیره‌های حاوی سطوح مختلف آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار بر شاخصهای هماتولوژیک (میانگین \pm انحراف معیار) بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پس از ۵۶ روز پرورش (n = ۱۵)

تیمارهای آزمایشی						شاخصهای هماتولوژیک
AF ₅ NZ ₁	AF ₅ NZ _{0.5}	AF ₅	NZ ₁	NZ _{0.5}	C(شاهد)	
۵۸/۶ \pm ۵/۵	۵۴ \pm ۵/۶	۵۴/۲ \pm ۶/۶	۵۵/۳ \pm ۷/۲	۶۱ \pm ۶/۷	۵۹/۲ \pm ۶/۱	Hct (درصد)
۹/۴ \pm ۰/۸	۸/۷ \pm ۰/۸	۸/۷ \pm ۰/۹	۸/۹ \pm ۱	۹/۶ \pm ۱	۹/۳ \pm ۰/۹	Hb (گرم/دسی‌لیتر)
۱۰۱۴/۱۱ \pm ۱۱۴/۱	۹۳۴/۵۶ \pm ۱۰۵/۷	۹۲۷/۳۳ \pm ۱۰۰/۹	۹۵۸/۸۹ \pm ۱۳۳/۱	۱۰۴۰/۳۳ \pm ۱۰۱	۹۹۷/۸۹ \pm ۱۰۷/۷	RBC (میلی متر مکعب/ $\times 10^3$)
۵۷۷/۸ \pm ۲۱/۷	۵۷۸/۲ \pm ۲۱/۹	۵۸۳/۸ \pm ۱۷/۳	۵۷۷/۴ \pm ۱۹/۱	۵۸۵/۶ \pm ۱۹/۷	۵۹۶/۸ \pm ۱۷/۲	MCV (فمتولیت)
۹۲/۴ \pm ۳/۳	۹۲/۸ \pm ۲/۴	۹۳/۴ \pm ۱/۲	۹۲/۹ \pm ۲/۶	۹۲/۴ \pm ۱/۸	۹۳/۹ \pm ۱/۹	MCH (پیکوگرم/سلول)
۱۶/۱ \pm ۰/۳	۱۶ \pm ۰/۷	۱۶ \pm ۰/۷	۱۶ \pm ۰/۵	۱۵/۸ \pm ۰/۷	۱۵/۶ \pm ۰/۵	MCHC (گرم/دسی‌لیتر)
۸/۳۶ \pm ۰/۹۷ ^{ab}	۸/۳۳ \pm ۱/۳ ^{ab}	۸/۷۸ \pm ۱/۲۳ ^{ab}	۹/۲۰ \pm ۱/۵۵ ^{ab}	۱۰/۵۸ \pm ۲/۹۶ ^a	۹/۹۱ \pm ۲/۶۳ ^{ab}	WBC (میلی متر مکعب/ $\times 10^3$)
۶۷/۱ \pm ۱/۵ ^{ab}	۶۸ \pm ۳ ^a	۶۷/۸ \pm ۲/۶ ^{ab}	۶۵/۸ \pm ۳/۳ ^{ab}	۶۳/۲ \pm ۲/۸ ^b	۶۵/۲ \pm ۳/۳ ^{ab}	لنفوسیت (درصد)
۲۸/۴ \pm ۱/۳ ^{ab}	۲۸ \pm ۲/۱ ^b	۲۹/۳ \pm ۲/۶ ^{ab}	۳۰/۱ \pm ۲/۹ ^{ab}	۳۱/۳ \pm ۳ ^a	۳۱/۱ \pm ۳/۲ ^{ab}	نوتروفیل (درصد)
۳/۴ \pm ۰/۷	۲/۸ \pm ۰/۸	۲/۷ \pm ۰/۹	۳ \pm ۰/۹	۳ \pm ۱	۳/۱ \pm ۰/۸	مونوسیت (درصد)
۱ \pm ۰/۹ ^{ab}	۱/۲ \pm ۰/۸ ^{ab}	۰/۴ \pm ۰/۵ ^b	۱/۱ \pm ۰/۸ ^{ab}	۱/۴ \pm ۰/۷ ^a	۰/۷ \pm ۰/۷ ^{ab}	آئوزینوفیل (درصد)

داده‌هایی که با حروف غیر مشابه مشخص شده‌اند، دارای اختلاف معنی دار آماری هستند ($P < 0.05$) - AF₅ NZ_{0.5} (جیره پایه + ۵ میلی گرم آفلاتوکسین B₁ + ۰/۵ درصد زئولیت نانو ساختار) - AF₅ NZ₁ (جیره پایه + ۵ میلی گرم آفلاتوکسین B₁ + ۱ درصد زئولیت نانو ساختار)

قزل‌آلای پرورش یافته با جیره‌های حاوی سطوح مختلف آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار در یک

در جدول ۴ روند تغییرات در برخی از شاخصهای بیوشیمیایی پلاسما در بچه ماهیان

دوره ۵۶ روزه نشان داده شده است. نتایج بدست آمده حاکی از آن است که میزان سدیم، کلسیم و کلسترول در بین بچه ماهیان قزل آلائی تغذیه شده با جیره‌های مختلف، اختلاف معنی داری نداشته است ($P > 0.05$).

مقدار فسفر در تیمار NZ0.5 نسبت به تیمار C (شاهد) بطور معنی داری افزایش نشان داد ($P < 0.05$). در سایر سطوح آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار، اختلاف معنی دار در میزان فسفر مشاهده نشد ($P > 0.05$). همچنین اثر متقابل سطوح آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار، بر این فاکتور تأثیر معنی دار نبود ($P > 0.05$).
 سطح گلوبولین در تیمار AF5 نسبت به تیمار شاهد به طور معنی دار کاهش یافت ($P < 0.05$). مقدار گلوبولین در سایر سطوح آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار، دارای اختلاف معنی دار نبود ($P > 0.05$). همچنین تقابل سطوح آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار، بر این فاکتور تأثیر معنی دار نداشت ($P > 0.05$).

جدول ۴: اثر جیره‌های حاوی سطوح مختلف آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار بر شاخصهای بیوشیمیایی پلاسما (میانگین \pm انحراف معیار) بچه ماهیان قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پس از ۵۶ روز پرورش ($n = 15$)

تیمارهای آزمایشی						شاخصهای بیوشیمیایی پلاسما
AF ₅ NZ ₁	AF ₅ NZ _{0.5}	AF ₅	NZ ₁	NZ _{0.5}	C(شاهد)	
۱۶۱/۳۳ \pm ۳/۲	۱۶۲/۲۲ \pm ۵	۱۶۳/۳۳ \pm ۵/۵	۱۵۹/۱۱ \pm ۴/۴	۱۶۳/۳۳ \pm ۴/۶	۱۶۱/۷۸ \pm ۴/۱	سدیم (میلی مول/لیتر)
۱۰/۹۳ \pm ۱/۸ ^{ab}	۱۱/۷۰ \pm ۰/۹ ^{ab}	۱۰/۵۶ \pm ۱/۱ ^{ab}	۱۱/۲۰ \pm ۱/۳ ^{ab}	۱۱/۷۳ \pm ۱/۳ ^a	۱۰/۰۶ \pm ۱ ^b	فسفر (میلی گرم/دسی لیتر)
۱۰/۰۳ \pm ۰/۸	۹/۷۸ \pm ۰/۷۱	۹/۳۱ \pm ۰/۴	۹/۹۹ \pm ۰/۷۶	۱۰/۳۹ \pm ۱/۱۲	۹/۸۱ \pm ۰/۶۱	کلسیم (میلی گرم/دسی لیتر)
۲۷۲/۳۳ \pm ۵۰/۵۵	۲۴۵/۲۲ \pm ۳۱/۵۷	۲۶۸/۶۷ \pm ۵۷/۱۹	۲۷۰/۱۱ \pm ۶۴/۳۰	۲۷۴/۴۴ \pm ۴۸/۱۳	۲۵۹/۶۷ \pm ۴۵/۱۰	کلسترول (میلی گرم/دسی لیتر)
۳/۳۶ \pm ۰/۲	۳/۳۲ \pm ۰/۳	۳/۲۱ \pm ۰/۳	۴/۴۴ \pm ۰/۵*	۴/۴۱ \pm ۰/۷ ⁺	۴/۲ \pm ۰/۴*	پروتئین کل (گرم/دسی لیتر)
۱/۳۴ \pm ۰/۱	۱/۳۷ \pm ۰/۲	۱/۲۷ \pm ۰/۲	۱/۹۷ \pm ۰/۳*	۱/۹۳ \pm ۰/۳ ⁺	۱/۹ \pm ۰/۳*	آلبومین (گرم/دسی لیتر)
۲/۰۱ \pm ۰/۲	۱/۹۶ \pm ۰/۲	۱/۹۴ \pm ۰/۱	۲/۴۸ \pm ۰/۳	۲/۴۸ \pm ۰/۴	۲/۳ \pm ۰/۳*	گلوبولین (گرم/دسی لیتر)

داده‌هایی که با حروف غیر مشابه مشخص شده‌اند، دارای اختلاف معنی دار آماری هستند ($P < 0.05$) - داده‌هایی که با علامت * مشخص شده‌اند، دارای اختلاف معنی دار با تیمار AF₅ هستند ($P < 0.05$) - داده‌هایی که با علامت + مشخص شده‌اند، دارای اختلاف معنی دار با تیمار AF₅ NZ_{0.5} هستند ($P < 0.05$) - داده‌هایی که با علامت * مشخص شده‌اند، دارای اختلاف معنی دار با تیمار AF₅ NZ₁ هستند ($P < 0.05$).

AF₅ NZ_{0.5} (جیره پایه + ۵ میلی گرم آفلاتوکسین B₁ + ۱ درصد زئولیت نانو ساختار) - AF₅ NZ₁ (جیره پایه + ۵ میلی گرم آفلاتوکسین B₁ + ۱ درصد زئولیت نانو ساختار)

درصد زئولیت در جیره غذایی ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) سبب بهبود وزن، نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی در این ماهی شده است. در مطالعه Smith (۱۹۸۰) نیز افزودن سدیم بنتونیت تا ۱۰ درصد در جیره قزل آلائی رنگین کمان سبب افزایش رشد و بهبود ضریب تبدیل غذایی شد. Lanari (۱۹۹۴) با استفاده از ۲/۵ تا ۵ درصد زئولیت در جیره غذایی قزل آلائی رنگین کمان، افزایش وزن در این ماهی را گزارش کرد. گفته شده است زئولیت موجود در جیره با افزایش زمان ماندگاری غذا در روده سبب افزایش جذب مواد غذایی می‌شود و از این

۴. بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر شاخصهای رشد در تیمارهای AF₅ NZ₁، NZ_{0.5} و NZ₁، نسبت به تیمار شاهد، AF₅ NZ_{0.5} و AF₅ از وضعیت مطلوب تری برخوردار بودند. با این حال، اختلاف معنی داری در بین تیمارها مشاهده نشد. می‌توان چنین استنباط نمود که وجود آفلاتوکسین تا حد ۵ میلی گرم در کیلوگرم از جیره غذایی، مانع رشد بچه ماهیان قزل آلا در یک دوره کوتاه ۸ هفته‌ای نمی‌شود. Navirian و همکاران (۲۰۱۱) اظهار داشتند که استفاده از ۴

(Venkitasubramanian, 1975). در مطالعه حاضر، اختلاف معنی داری در میزان HSI سایر تیمارها مشاهده نشد که مشابه نتایج Raghazan و همکاران (۲۰۱۱) و نیز Huang و همکاران (۲۰۱۴) و در تعارض با آزمایش Katherine و همکاران (۲۰۱۲) و Sherif و همکاران (۲۰۱۳) می باشد.

با استفاده از شاخص های هماتولوژیک می توان به ارزیابی بهتری در مورد میزان سلامت ماهی و عکس العمل آن در برابر آلودگی هایی که با آن مواجه می شود دست پیدا کرد. یافته های این مطالعه نشان می دهد که مقادیر Hb، Hct، RBC، MCV، MCH و MCHC در تیمارهای مختلف، تغییر معنی داری نداشت. این امر می تواند حاکی از آن باشد که وجود آفاتوکسین تا حد ۵ میلی گرم در کیلوگرم غذای ماهی سبب افزایش نیاز ماهی به اکسیژن و در نتیجه تغییر در ظرفیت خون سازی ماهی نمی شود. در مورد تأثیر نانو ذرات بر شاخص های خونی و پلاسمای ماهیان، مطالعات چندانی صورت نگرفته است ولی Federici و همکاران (۲۰۰۷) اظهار داشتند که نانو ذرات اکسید تیتانیوم در یک دوره دو هفته ای، تأثیر قابل توجهی بر فاکتورهای خونی ماهی قزل آلا ندارد. Kececi و همکاران (۱۹۹۸) نیز با افزودن چند ماده و از جمله زئولیت در جیره غذایی جوجه های گوشتی، اثر آنها را در کاهش میزان آفاتوکسین مورد بررسی قرار دادند. آنها اظهار داشتند که مواد جاذب افزودنی به جیره های حاوی آفاتوکسین تأثیر چندانی بر فاکتورهای هماتولوژیک و بیوشیمیایی خون ندارد. در بررسی تأثیر چند جاذب در آزمایش Ayyat و همکاران (۲۰۱۳)، اثر متقابل بنتونیت و آفاتوکسین در ماهی تیلاپیا تغییری در میزان Hb، Hct، RBC و WBC ایجاد نکرد. از سوی دیگر، Oguze و همکاران (۲۰۰۰) اظهار داشتند که آفاتوکسین سبب کاهش Hb، Hct، RBC و مونوسیت در جوجه های گوشتی شده است. Sherif و همکاران (۲۰۱۳) نیز گزارش کردند که آفاتوکسین سبب تغییر در Hb، Hct، RBC، MCV، MCH و MCHC و مونوسیت می شود. در مطالعه حاضر، اختلاف معنی داری در میزان مونوسیت مشاهده نشد. گزارش مشابهی از اثر متقابل بنتونیت و آفاتوکسین در مطالعه Farrag و همکاران (۲۰۰۹) ارائه شده است. همچنین در بررسی

طریق نقش مثبت خود را در رشد ماهی ایفا می کند (Dias et al., 1998)؛ با این وجود، مطالعات انجام شده توسط Edsall و Smith (۱۹۸۹) بر روی ماهی آزاد کوهو، Saad و Rafiee (۲۰۰۵) بر روی ماهی تیلاپیا، Zamani Kyasajmahaleh و همکاران (۲۰۰۷) بر روی خرچنگ دراز آب شیرین (*Astacus leptodactylus*) نشان داد که زئولیت اثر معنی داری بر رشد ندارد. در مورد تأثیر آفاتوکسین بر میزان رشد، Raghazan و همکاران (۲۰۱۱) و Huang و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که آفاتوکسین B1 اثری بر نرخ رشد ویژه ماهیان مورد آزمایش نداشته است اما یافته های Ayyat و همکاران (۲۰۱۳) و Jalilpour و همکاران (۲۰۱۴) حاکی از کاهش میزان فاکتورهای رشد تحت تأثیر آفاتوکسین می باشد.

کبد از مهمترین مراکز ذخیره انرژی در بدن است و به همین علت می توان از شاخص کبدی برای ارزیابی وضعیت انرژی ماهیان استفاده کرد (Chellappa et al., 1995). یکی دیگر از کارکردهای کبد، نقش آن در مسمومیت زدایی از بدن می باشد. کبد ماهی با اعمال مجموعه ای از تغییر و تبدیلات در سموم بدن، پلاسمای خون را تصفیه و مواد حاصل را از راه صفرا خارج می کند (Ferguson, 1995). ورود عوامل سمی به بدن می تواند سبب افزایش فعالیت کبد و حجیم شدن سلول های آن شود (Tung et al., 1975). در مطالعه حاضر، شاخص کبدی در تیمار AF5 NZ0.5 در مقایسه با تیمار NZ0.5 بطور معنی داری کاهش یافت که منطبق بر مطالعات Usanno و همکاران (۲۰۰۵) و Deng و همکاران (۲۰۱۰) در مورد اثر آفاتوکسین B1 بر ماهی تیلاپیا می باشد. کاهش میزان شاخص کبدی علیرغم وجود آفاتوکسین می تواند به علت کاهش تغذیه ماهی در طول دوره آزمایش و به تبع آن، استفاده از انرژی ذخیره شده در کبد ماهی باشد (Vijayan et al., 1990; Barton et al., 2002). از سوی دیگر، وزن کبد کاملاً وابسته به میزان چربی موجود در کبد است. اما در جانورانی که در معرض آفاتوکسین قرار می گیرند، ترکیب اسیدهای چرب آزاد برای سنتز تری گلیسرید بطور واضحی کاهش یافته و از انتقال چربی موجود در بافت های چربی به سمت پلازما ممانعت به عمل می آید (Singh and

استرسها می‌توانند سبب افزایش کلسیم خون شوند (Pierson *et al.*, 2004). با توجه به وجود سدیم و کلسیم در فرمول ساختمانی زئولیت و جذب این ماده توسط دستگاه گوارش، می‌توان انتظار داشت که استفاده از زئولیت در جیره غذایی بر میزان این عناصر در خون تأثیر بگذارد اما از سوی دیگر بدن جانور قادر است از طریق ساز و کارهایی همچون کلیه (Nazifi *et al.*, 2008) و آبشش‌ها در ماهی مقدار این یون‌ها را در خون تنظیم کند (Stoskopf, 1993; Heath, 1987) و این می‌تواند دلیلی بر عدم تغییر در میزان سدیم و کلسیم سرم در مدت مصرف زئولیت باشد. در تحقیقات به عمل آمده توسط Ward و همکاران (۱۹۹۱) بر روی خوک و نیز Chestnut و همکاران (۱۹۹۲) بر روی گوسفند مشاهده شد که زئولیت بر میزان سدیم سرم تأثیر ندارد. Leach و همکاران (۱۹۹۰) و Nazifi و همکاران (۲۰۰۸) با تحقیق بر روی ماکیان اظهار داشتند که زئولیت قادر است میزان کلسیم سرم را افزایش دهد. یافته‌های Khodanazary و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که افزودن زئولیت به جیره غذایی ماهی کپور معمولی سبب کاهش میزان سدیم و افزایش مقدار کلسیم در سرم خون می‌شود. در مطالعه حاضر، میزان فسفر در تیمار حاوی ۰/۵ درصد زئولیت نسبت به تیمار شاهد از افزایش معنی‌داری برخوردار بود. این در حالی است که طبق نظر Leach و همکاران (۱۹۹۰) زئولیت سبب کاهش جذب فسفر از روده و در نتیجه کاهش میزان آن در سرم می‌شود. در آزمایش Khodanazary و همکاران (۲۰۱۳) مشخص شد که زئولیت افزوده شده به جیره، تأثیری در مقدار فسفر خون ندارد. مقدار کلسترول در مطالعه حاضر، فاقد اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها بود. Oguze و همکاران (۲۰۰۰) اظهار داشتند که آفلاتوکسین سبب کاهش کلسترول خون می‌شود. در آزمایش Kececi و همکاران (۱۹۹۸) افزودن بنتونیت به تیمار حاوی آفلاتوکسین، سبب افزایش میزان کلسترول شد. مطالعه Farrag و همکاران (۲۰۰۹) بر روی ماهی تیلاپیا نشان داد که اثر متقابل بنتونیت و ماده سمی اکسید سرب، تأثیری در مقدار کلسترول ندارد. مقدار

اثر زئولیت بر فاکتورهای هماتولوژیک قزل‌آلای رنگین کمان توسط Paritova و همکاران (۲۰۱۳) مقدار مونوسیت تغییری نداشت. بر اساس نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر، میزان نوتروفیل‌ها در تیمار حاوی ترکیبی از آفلاتوکسین و ۰/۵ درصد زئولیت نانو ساختار در مقایسه با تیمار حاوی ۰/۵ درصد زئولیت نانو ساختار کاهش یافت. از سوی دیگر سطح ائوزینوفیل در جیره حاوی فقط آفلاتوکسین در مقایسه با تیمار حاوی فقط ۰/۵ درصد زئولیت نانو ساختار با کاهش مواجه شد. می‌توان اظهار داشت که آفلاتوکسین سبب آپوپتوزیس^۱ و مرگ گسترده سلول‌های ائوزینوفیل شده است؛ در حالی که حضور زئولیت نانو ساختار همراه با آفلاتوکسین، از عمل تخریبی آفلاتوکسین بر سلول‌های فاگوسیتیک جلوگیری کرده، سبب افزایش میزان ائوزینوفیل می‌شود. مطالعه Donmez و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که در گوسفند مریوس میزان ائوزینوفیل تحت تأثیر آفلاتوکسین قرار نگرفت در حالی که در تیمار حاوی آفلاتوکسین در مقایسه با تیمار شاهد، مقدار نوتروفیل افزایش یافت. یافته‌های Farrag و همکاران (۲۰۰۹) بر روی ماهی تیلاپیا حاکی از عدم تغییر در میزان این دو فاکتور در برهم‌کنش بنتونیت و ماده سمی اکسید سرب است. در مطالعه حاضر، سطح لنفوسیت در تیمار حاوی آفلاتوکسین و زئولیت ۰/۵ درصد بیشتر از تیمار حاوی ۰/۵ درصد زئولیت بود. به نظر می‌رسد که علت این امر، تحریک سیستم ایمنی بدن و در نتیجه، افزایش میزان لنفوسیت در خون می‌باشد. در آزمایش Donmez و همکاران (۲۰۱۲) میزان لنفوسیت با اثر آفلاتوکسین کاهش یافت و در مطالعه Farrag و همکاران (۲۰۰۹) تحت اثر متقابل بنتونیت و آفلاتوکسین، سطح لنفوسیت ثابت ماند.

با ارزیابی شاخصهای بیوشیمیایی پلاسما مشخص شد که در میزان سدیم و کلسیم در تیمارهای مختلف، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. در اثر استرس‌های ناشی از آلودگی، اختلالاتی در تنظیم یونی سطح آبشش رخ می‌دهد و این امر سبب کاهش برخی از یون‌های پلاسما از جمله سدیم می‌شود (Galvez *et al.*, 1998). از سوی دیگر، برخی از

^۱ Apoptosis

آفلاتوکسین تغییر نمی‌یابد (Abdelhamid, 2007). طبق گزارش Ayyat و همکاران (۲۰۱۳) میزان پروتئین کل و آلبومین در اثر آفلاتوکسین افزایش یافت.

در مطالعه حاضر، توان زئولیت برای اتصال به آفلاتوکسین و خنثی کردن اثر آن در برخی جنبه‌ها مورد تأیید قرار گرفت. بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده، می‌توان اظهار داشت که زئولیت نانو ساختار دارای اثرات مثبتی بر کارایی فیزیولوژیک بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان است؛ به گونه‌ای که می‌توان با افزودن ۰/۵ درصد زئولیت نانو ساختار به جیره، موجبات ارتقاء ایمنی و بهبود برخی از شاخصهای فیزیولوژیک را در این ماهی فراهم آورد.

۵. تشکر و قدردانی

از مسئولین و کارکنان دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان، ستاد ویژه توسعه فناوری نانو، موسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی و همچنین از آقای دکتر مهدی رزاقی ابیانه ریاست بخش قارچ‌شناسی انستیتو پاستور ایران که امکان اجرای این طرح را فراهم نمودند، کمال تشکر به عمل می‌آید. لازم است از همکاری آقایان مهندس محمدی برسری، موسی پور، حبیبی، دلفکار و خانم‌ها مهندس تاری، شیروان، جعفری و باقرپور که در طول اجرای این پروژه و در شرایط سخت، همواره از مساعدت و حمایت‌هایشان برخوردار بوده‌ایم، صمیمانه سپاسگزاری گردد.

کلسترول در آزمایش Khodanazary و همکاران (۲۰۱۳) تحت تأثیر افزودن زئولیت به جیره غذایی کپور قرار نگرفت. در مطالعه حاضر مشاهده شد که در تمام تیمارهای حاوی آفلاتوکسین، میزان پروتئین کل و آلبومین پلاسمای خون ماهیان به طور معنی‌داری کاهش یافته است. همچنین میزان گلوبولین در تیمار AF5 نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌دار یافت. بجز ایمونوگلوبولین‌ها سایر پروتئین‌های پلاسما در کبد ساخته می‌شوند. آلبومین، فراوان‌ترین پروتئین پلاسما محسوب می‌شود و محل اصلی تولید آن کبد است (Di Giulio and Hinton, 2008). با توجه به اثر تخریبی سموم بر بافت کبد، ساخت پروتئین‌های پلاسما و به ویژه آلبومین کاهش می‌یابد. علاوه بر این، استرس ناشی از مسمومیت نیز سبب کاهش تغذیه در ماهی و به تبع آن کاهش پروتئین کل در سرم می‌شود (Casillas *et al.*, 1985; Stoskopf *et al.*, 1993). کاهش آلبومین در تیمارهای حاوی آفلاتوکسین احتمالاً در اثر آسیب‌های کبدی و کلیوی ناشی از ورود این سم در جیره غذایی ماهیان می‌باشد. از جمله عواملی که سبب کاهش میزان پروتئین کل می‌شود، می‌توان به افزایش سوخت و ساز پروتئین‌ها در جریان تنش‌های حاد، کاهش سنتز پروتئین به دلیل آسیب‌های وارده به کبد و همچنین کاهش بازجذب پروتئین‌ها در اثر صدمات کلیوی اشاره کرد (Rehülka *et al.*, 2005). گزارشات متعدد حاکی از کاهش میزان پروتئین کل و آلبومین سرم در جانورانی است که در مواجهه با آفلاتوکسین قرار گرفته‌اند (Van Soest, 1994; Curtui, 2000; Oguze *et al.*, 2000; Selim *et al.*, 2014). با این حال، برخی از مطالعات نشان می‌دهد که میزان این فاکتورها و گلوبولین در اثر

References

- Abdelhamid, A.M., Salem, M.F.I., Mehrim, A.I., El-Sharawy, M.A.M., 2007. Nutritious attempts to detoxify aflatoxin diets of tilapia fish: 1. fish performance, feed and nutrients utilization, organs indices, residues and blood parameters. *Egyptian Journal of Nutrition and Feeds*, 10, 205-223.
- Ahsan, H., Wang, L.Y., Chen, C.J., Tsai, W.Y., Santella, R.M., 2001. Variability in aflatoxin-albumin adduct levels and effects of hepatitis B and C virus infection and glutathione S-transferase M1 and T1 genotype. *Environmental Health Perspectives*, 109, 833-837.
- Alinezhad S., Tolouee M., Kamalzadeh A., Motalebi A. A., Nazeri M., Yasemi M., Shams-Ghahfarokhi M., Tolouei R.,

- Razzaghi-Abyaneh M., 2011. Mycobiota and aflatoxin B1 contamination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) feed with emphasis to *Aspergillus section Flavi*. *Iranian Journal of Fisheries*, 10, 363-374.
- Ayyat, M.S., Abd Rhman, G.A., El-Marakby, H.I., Mahmoud, H.K., Hesan, A.A.A., 2013. Reduction the aflatoxin toxicity in Nile tilapia fish. *Egyptian Journal of Nutrition and Feeds*, 16, 469-479.
- Barton, B.A., Morgan, J.D., Vijayan, M.M., 2002. Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish. In: Adams, S.M. (Ed.), *Biological indicators of aquatic ecosystem stress*. American Fisheries Society, Bethesda, USA, pp. 111-148.
- Blaxhall, P.C., Daisley, K.W., 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, 5, 771-781.
- Casillas, E., Myers, M. S., Rhodes, L.D., McCain, B.B., 1985. Serum chemistry of diseased English sole, *Parophrys vetulus* Girard, from polluted areas of Puget Sound, Washington. *Journal of Fish Diseases*, 8, 437-449.
- Chellappa, S., Huntingford, F.A., Strang, R.H.C., Thomson, R.Y., 1995. Condition factor and hepatosomatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback. *Journal of Fish Biology*, 47, 775-787.
- Chestnut, A.B., Anderson, P.D., Cochran, M.A., Fribourg, H.A., Twinn, K.D., 1992. Effects of hydrated sodium calcium aluminosilicate on fescue toxicosis and mineral absorption. *Journal of Animal Science*, 70, 2838-2846.
- Curtui, V.G., 2000. Effects of feeding a fusarium poae extract and a natural zeolite to broiler chickens. *Mycotoxin Research*, 16, 43-52.
- Dias, J., Huelvan, C., Dinis, M.T., Metailler, R., 1998. Influence of dietary bulk Agent (silica, cellulose and a natural zeolite) on protein digestibility, growth, feed intake and feed transit time in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquatic Living Resources*, 11, 219-226.
- Di Giulio, R.T., Hinton, D.E., 2008. *The Toxicology of Fishes*. CRC Press, Florida, USA, 1096 p.
- Donmez, N., Donmez, H.H., Keskin, E., Kısadere, I., 2012. Effects of aflatoxin on some haematological parameters and protective effectiveness of esterified Glucomannan in Merino Rams. *The Scientific World Journal* 2012, 1-4.
- Drabkin, D.R., 1954. Crystallographic and optical properties of human hemoglobin: a proposal for the standardization of hemoglobin. *The American Journal of the Medical Sciences*, 209, 268-270.
- Edsall, D.A., Smith, C.E., 1989. Effect of dietary clinoptilolite on levels of effluent ammonia from hatchery Coho Salmon. *The Progressive Fish-Culturist*, 51, 98-100.
- Farrag, F.H., Khalil, F. F., Mehrim, A.I., 2009. Reduction of lead oxide toxicity by using bentonite in mono-sex Nile tilapia *Oreochromis niloticus* diets. *Abbassa International Journal for Aquaculture*, Special Issue for Global Fisheries and Aquaculture Research Conference, Cairo International Convention Center, Zagazig, Egypt, pp. 429-451.
- Federici, G., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 84, 415-430.
- Ferguson, H.W., 1995. *Systemic Pathology of Fish: A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts*. Iowa State University Press, 146 p.
- Galvez, F., Hogstrand, C., Wood, C.M., 1998. Physiological responses of juvenile rainbow trout to chronic low level exposures of waterborne silver. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 119, 131-137.
- Goodarzi, M., Moridi, D., 2008. The use clinoptilolite in broiler diet to decrease of aflatoxin effects. *The Scientific Journal of Agriculture*, 30, 109-121.
- Heath, A.G., 1987. *Water Pollution and Fish Physiology*. CRC Press, Florida, USA, 245 p.
- Higgs, D.A., Dosanj, B.S., Prendergast, A.F., Beams, R.M., Hardy, R.W., Riley, W., Deacon, G., 1995. Use of rapeseed/canola protein products in finfish diets. In: Sessa, D. J. and Lim. C. (Eds.), *Nutrition and Utilization technology in Aquaculture*. AOCS Press, Illinois, USA, pp. 130-156.
- Houston, A.H., 1990. Blood and circulation. In: Schreck, C.B. and Moyle, P.B., (Eds.), *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda, MD. pp. 273-334.
- Huang, Y., Han, D., Xiao, X., Zhu, X., Yang, Y., Jin, J., Chen, Y., Xie, S., 2014. Effect of dietary aflatoxin B1 on growth, fecundity and tissue accumulation in gibel carp during the stage of gonad development. *Aquaculture*, 428-429: 236-242.
- Jalilpour, J., Vahabzadeh, H., Sepahdari, A., Pajand, Z., 2014. Effect of toxicity contaminated food by aflatoxin B1 on growth and some liver enzymes of starred sturgeon (*Acipenser stellatus*) juveniles. *Journal of Aquaculture Development*, 7, 1-11.
- Jiang, Y., Jolly, P.E., Preko, P., Wang, J.S., Ellis, W.O., Phillips, T.D., Williams, J.H., 2008. Aflatoxin-related immune dysfunction in health and in human immunodeficiency virus disease. In: *Clinical and Developmental Immunology*. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2496958/>. Accessed 5th August 2008. 12 p.
- Kececi, T., Oguz, H., Kurtoglu, V., Demet, O., 1998. Effects of polyvinyl pyrrolidone, synthetic zeolite and bentonite on serum biochemical and haematological characters of broiler chickens during aflatoxicosis. *British Poultry Science*, 39, 452-458.
- Khodanazary, A., Boldaji, F., Tatar, A., Dastar, B., 2013. Effects of dietary zeolite and perlite

- supplementations on growth and nutrient utilization performance and some serum variables in common carp, (*Cyprinus carpio*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13, 495-501.
- Klinger, R.C., Blazer, V.S., Echevarria, C., 1996. Effects of dietary lipid on the haematology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 147, 225-233.
- Kubena, L.F., Harvey, R.B., Huff, W.E., Elissalde, H., Yersin, A.G., Phillips, T.D., Rottinghaus, G.E., 1993. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and diacetoxystyrene. *Poultry Science*, 72, 51-59.
- Kubena, L.F., Harvey, R.B., Phillips, T.D., Corrier, D.E., Huff, W.E., 1990. Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by dietary addition of a hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Poultry Science*, 69, 727-735.
- Lanari, D., 1994. Rapporto tra alimentazione de qualita dei reflui in acquacoltura. Atti Convegno Intemazionale "Parliamo di Acquacoltura", Dipartimento di Scienze Zootecniche, Universita di Torino, Fossano, 13-14 October.
- Leach, R.M., Heinrichs, B.S., Burdette, J., 1990. Broiler chicks fed low-calcium diets. Influence of zeolite on growth rate and parameters of bone metabolism. *Poultry Science*, 69, 1539-1543.
- Li, D., Liu, Z., Xie, C., 2012. Effect of stocking density on growth and serum concentrations of thyroid hormones and cortisol in Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38, 511-520.
- Miazzo, R., Rossa, C.A.R., Queiroz Carvalho, E.C.D., Magnoli, C., Chiacchiera, S.M., 2000. Efficacy of synthetic zeolite to reduce the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Poultry Science*, 79, 1-6.
- Navirian, H., Sotohan, F., Mostafazadeh, S., 2011. The Effect of different levels of natural zeolite on growth indices of juvenile Caspian frisia Kutum (*Rutilus frisii kutum*, Kamenskii, 1901). *Iranian Journal of Biology*, 24, 155-161.
- Nazifi, S., Dadras, H., Koosha, A., 2008. The effect of zeolite on serum electrolytes of broiler chickens. *Iranian Veterinary Journal*, 4, 85-93.
- Nikawa, H., Yamamoto, T., Hamada, T., Rahardjo, M.B., Murata, H., Nakanoda, S., 1997. Antifungal effect of zeolite-incorporated tissue conditioner against *Candida albicans* growth and / or acid production. *Journal of Oral Rehabilitation*, 24, 350-357.
- Oguze, H., Kurtoglu, V., Coskum, B., 2000. Prevention efficacy of clinoptilolite in broilers during chronic aflatoxin (50, 100 ppb) exposure. *Research in Veterinary Science*, 69, 197-201.
- Paritova, A., Sarsembayeva, N., Łozowicka, B., Maulanov, A., Kuzembekova, G., Abzhalieva, A., Kaczyński, P., 2013. The influence of Chankanay zeolites as feed additives on the chemical, biochemical and histological profile of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Aquaculture Research and Development*, 5, 1-8.
- Phillips, T.D., Clement, B.A., Kubena, L.F., Harvey, R.B., 1988. Detection and detoxification of aflatoxins. Prevention of aflatoxicosis and aflatoxin residues with hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Veterinary and Human Toxicology*, 32, 15-19.
- Rafiee, Gh.R and Saad, Ch.R., 2005. Effect of dietary zeolite on the growth of red tilapia (*Oreochromis* sp.) and lettuce (*Lactuca sativa*) in an aquaponic system. *Iranian Journal Natural Resources*, 58, 363-371.
- Raghavan, P.R., Zhu, X., Lei, W., Han, D., Yang, Y., Xie, S., 2011. Low levels of aflatoxin B1 could cause mortalities in juvenile hybrid sturgeon, *Acipenser ruthenus* ♂ × *A. baeri* ♀. *Aquaculture Nutrition*, 17, 39-47.
- Razzaghi Abyaneh, M., Pilehvar Soltanahmadi, Y., Shams Ghahfarokhi, M., Alinezhad, S., 2011. Aflatoxins: Public Health and Agricultural Significance. Publication of Research, Education and Agricultural Extension, Tehran, Iran, 148 p.
- Rehülka, J., Minarik, B., Adamec, V., Rehulkova, E., 2005. Investigations of physiological and pathological levels of total plasma protein in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 36, 22-32.
- Rehülka, J., 2000. Influence of astaxanthin on growth rate, condition and some blood indices of rainbow trout. *Aquaculture*, 190, 27-47.
- Ricker W.E., 1979. Growth rates and models. In: Hoar W.S. and Brett J.R. (Eds.), *Fish Physiology*, Vol. 8. Academic Press, New York, USA. pp 677-743.
- Selim, K.M., El-hofy, H., Khalil, R.H., 2014. The efficacy of three mycotoxin adsorbents to alleviate aflatoxin B1-induced toxicity in *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture International*, 22, 523-540.
- Sherif, A.H., Abdel-Maksoud, S.A., Shukry, M.M., 2013. Study on toxicity of *Oreochromis niloticus* with aflatoxin B1. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 17, 107-119.
- Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J., Griffiths, S.M., Williams P.M, Maffeis, T.G., Wright, C.J., Doak, S.H., 2009. Nano Genotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30, 3891-3914.
- Singh, N., Venkatasubramanian, T.A., 1975. Effect of aflatoxin B1 on lipids of rat tissues. *Environmental Physiology and Biochemistry*, 5, 147-157.
- Smith, R.R., 1980. Nutritional Bioenergetics in Fish, In: *Fish Feed Technology*. UNDP, FAO, Rome, Italy. 11, 21-27.
- Stoskopf, M.K., 1993. *Fish Medicine*. Phelps, T.H. and Bauer, B.A. (Eds.), Philadelphia: W.B. Saunders Company, 882 p.

- Tung, H.T., Cook, F.W., Wyatt, R.D., Hamilton, P.B., 1975. The anemia caused by aflatoxin. *Poultry Science*, 54, 1962-1969.
- Usanno, O., Chaisilapasung, S., Sukrakanchana, N., Supamattaya, K., 2005. Effects of aflatoxin B1 on sex reversed red tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn. × *O. mossambicus* Peters). Songklanakarin. *Journal of Science and Technology*, 27, 187-197.
- Van Soest, P.J., 1994. Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University Press, Ithaca, NY. Available from <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/aflatoxin/aflatoxin.html>. Accessed 22th May 2014.
- Vijayan, M.M., Ballantyne, J.S., Leatherland, J.F., 1990. High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture*, 88, 371-381.
- Waldneer, D.N., Lalman, D., 1998. Drought brings concern of aflatoxin contamination of livestock foods to Oklahoma dairy and beef producers. Available from <http://www.okstate.edu/ag/oces/timely/aflatoxi.htm>. Accessed 2014.
- Ward, T.L., Watkins, K.L., Southern, L.L., French, D.D., Hoyt, P.G., 1991. Interactive effects of sodium zeolite A and copper in growing swine: growth and bone tissue mineral. *Journal Animal Science*, 69, 726-733.
- Wild, C., Jiang, Y., Sabbioni, G., Chapot, B., Montesano, R., 1990. Evaluation of methods for quantitation of aflatoxin-albumin adducts and their application to human exposure assessment. *Cancer Research*, 50, 245-251.
- Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M., Aggarwal, D., 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 1106-1122.
- Wing, K.N., Norfauziah, A., Sena, D.S., 2008. The dietary protein requirement of the Malaysian mahseer, *Tor tambroides* (Bleeker), and the lack of protein-sparing action by dietary lipid. *Aquaculture*, 284: 201-206.
- Wogan, G.N., 1992. Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer Research*, 52, 2114-2118.
- Zamani Kyasajmahaleh, H.A., Hadavi, M., Khoshkholgh, M.R., 2007. Effects of zeolite levels on growth indexes of juvenile freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 16, 81-90.
- Zychowski, K.E., Pohlenz, C., Mays, T., Romoser, A., Hume, M., Buentello, A., Gatlin III, D.M., Phillips, T.D., 2013. The effect of NovaSil dietary supplementation on the growth and health performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed aflatoxin-B1 contaminated feed. *Aquaculture*, 376-379, 117-123.