بررسی وجود لوکومالاشیت گرین در گوشت ماهیان پرورشی قزل آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) در استان مازندران

پولین شهره*[1]، مریم عزیزخانی[2]، سارا مهدی زاده مود[3]

1- دکترای تخصصی، استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فن آوری های نوین آمل، آمل، ایران
2- دکترای تخصصی، استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فن آوری های نوین آمل، آمل، ایران
3- دکترای تخصصی، استادیار، گروه بهداشت و بیماری های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، ایران

(تاریخ دریافت: 98 /09/11 تاریخ پذیرش: 99/03/11)

چکیده

مالاشیت گرین به طورگسترده به عنوان داروی ضد انگل و ضدقارچ در حوزه آبزی پروری مورد استفاده قرار می گیرد. درمان با مالاشیت گرین منجر به باقی ماندن متابولیت این ترکیب (لوکومالاشیت گرین) در بافت آبزیان و تولید ترکیبات سرطانزا می گردد. **هدف:** هدف از انجام این مطالعه، بررسی وجود لوکومالاشیت گرین در گوشت ماهیان پرورشی قزل آلای رنگین کمان در استان مازندران بود. نمونه های ماهی با وزن تقریبی 0/5 و 1 کیلوگرم از 20 مزرعه پرورش ماهی در استان مازندران (منطقه هراز و تنکابن) طی سال 1397 جمع آوری گردید. میزان لوکومالاشیت گرین در نمونه ها با استفاده ازآزمون ELISA و کیت 96 خانه تولید شرکت Europroxima (هلند) اندازه گیری شد. در منطقه هراز کمترین و بیشترین میزان لوکومالاشیت گرین 0/0001 میلی گرم در کیلوگرم مربوط به نمونه های 0/5 کیلوگرمی 0/22 میلی گرم در کیلوگرم مربوط به نمونه های 1 کیلوگرمی بود. در برخی از نمونه های 0/5 و 1 کیلوگرمی جمع آوری شده از تنکابن میزان لوکومالاشیت گرین کمتر از حد جستجوی کیت بود و بیشترین مقدار آن برابر با 0/0047 میلی گرم در کیلوگرم در نمونه های 1 کیلوگرمی بود. مقایسه نتایج به دست آمده از کلیه نمونه های مورد مطالعه نشان داد که کمترین آلودگی به لوکومالاشیت گرین مربوط به نمونه های 0/5 و 1 کیلوگرمی منطقه تنکابن بود و بالاترین میزان لوکومالاشیت گرین در نمونه های 1 کیلوگرمی منطقه هراز مشاهده شد. پایین تر بودن و در محدوده مجاز قرار داشتن بیشتر نتایج این مطالعه نسبت به مطالعات پیشین نشان دهنده بهبود وضعیت بهداشتی آب ایستگاه های تکثیر و پرورش ماهی، نظارت و کنترل موثر، استفاده از راهکارهای جایگزین و بی خطر جهت کاهش آلودگی قارچی و در نتیجه مصرف کمتر مالاشیت گرین می باشد.

کلید واژگان: ایمنی مواد غذایی، قزل آلای رنگین کمان، لوکومالاشیت گرین، مالاشیت گرین، ماهی

*مسئول مکاتبات: p.shohreh@ausmt.ac.ir

1- مقدمه

مالاشیت گرین (MG) نوعی رنگ آنیلین محلول در آب مورد استفاده در صنعت نساجی است که به طورگسترده به عنوان داروی ضد انگل و ضدقارچ در حوزه آبزی پروری مورد استفاده قرار می گیرد. MG یک رنگ کاتیونی است و از کریستال های سبز با درخشش فلزی تشکیل شده است. فرمول و وزن مولکولی آن به ترتیب $C_{23}H_{25}N_2Cl$ و 364/91 می باشد و قابلیت انحلال بالایی در آب و الکل ها دارد. MG به سادگی به لوکومالاشیت گرین (LMG) تبدیل می شود. LMG ترکیبی به رنگ زرد کمرنگ تا قهوه ای روشن بوده، فرمول و وزن مولکولی آن به ترتیب $C_{23}H_{26}N_2$و 330/46 و محلول در حلال های آلی همچون اتانول، اتیل اتر، اتیلن گلیکول مونو متیل اتر و بنزن می باشد [1]. درمان با مالاشیت گرین منجر به باقی ماندن این ترکیب و متابولیت آن (LMG) در بافت آبزیان و تولید ترکیبات سرطانزا می گردد. کشف باقیمانده مالاشیت گرین در ماهی های وحشی نشان می دهد این ترکیب یک آلاینده زیست محیطی به شمار می رود. راه های احتمالی آلودگی محیط زیست به مالاشیت گرین می تواند شامل موارد زیر باشد: دفع آب حاوی مالاشیت گرین مورد استفاده برای درمان ماهیان و ورود فاضلاب صنعتی از واحدهای تولید رنگ به آب های سطحی. در ایران، مالاشیت گرین در فرآیند پرورش ماهیان سردابی از جمله قزل‌آلا به کار می رود. این ترکیب ضدقارچ برای پاکسازی استخر و محیط پرورش ماهی‌ها استفاده می‌شود. مالاشیت گرین و متابولیت آن در بافت ماهی باقی مانده و حتی طی طبخ نیز به کندی از بین می‌روند، در عین حال این ماده مدت‌های طولانی در منابع آبی باقی می‌ماند. از تاثیرات منفی مالاشیت گرین بر آبزیان مهار آنزیم های تنفسی واجد گروه تیول در میتوکندری و ایجاد اختلال تنفسی می باشد، این ترکیب پس از ورود به بدن ماهی و جذب در بافت ها به LMG احیا می گردد که بر خلاف مالاشیت گرین محلول در چربی بوده، به مدت طولانی تری در بافت باقی می ماند، به آهستگی دفع شده و دارای سمیت بسیار بالایی می باشد. مشتقات MG N-oxide و MG N-demethylated نیز در بافت های خوراکی ماهی یافت شده است [1]. وجود باقیمانده های MG و LMG در ماهیان به وزن و گونه ماهی، غلظت اولیه MG و مدت زمان تماس ماهی با آن، و شرایط محیطی همچون درجه حرارت و pH بستگی دارد. در ماهی MG تا حدود 2 ماه و LMG تا حدود 9 ماه بعد از اولین آزمایش، قابل شناسایی است. ورود این ماده به بدن انسان و حیوانات از طریق مصرف آبزیان تاثیرات نامطلوبی همچون مهار آنزیم های تیروئید پراکسیداز وگلوتاتیون ترانسفراز، سرطانزایی، جهش زایی، شکستگی و چسبندگی کروموزومی را در پی دارد [2].

Rauscher-Gabernig و همکاران (2007) نرخ خطر قرار گرفتن در معرض مالاشیت گرین و متابولیت های آن را در جمعیت اتریشی ارزیابی نمودند. درصد بالایی از نمونه های ماهی، به طور عمده ماهی تازه صید شده دراتریش، که طی سال های 2005-2003 جمع آوری شده بود، آلوده به مالاشیت گرین بودند [3]. میزان جذب تخمینی در افرادی که به مقدار زیاد ماهی مصرف می نمودند 0/83، 0/42 و 0/51 µg به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز، به ترتیب، برای کودکان (6-3ساله)، زنان بالغ و مردان بالغ بود. البته با توجه به نتایج بررسی تاثیر مالاشیت گرین بر ایجاد سرطان در موش آزمایشگاهی، این میزان آلودگی موجب بروز خطر در جمعیت اتریش نمی گردد. همچنین، با توجه به بیشینه غلظت متابولیت های مالاشیت گرین در مارماهی وحشی صید شده در آلمان و میزان مصرف آبزیان در این کشور، جذب 0/27 و 3/8 نانوگرم از این ترکیب به ازای کیلوگرم وزن بدن، به ترتیب، برای کودکان و بزرگسالان گزارش شده است [4]. روش های متعدد کاربردی جهت کنترل میزان ترکیبات آلوده کننده سرطانزا و جهش زا در مواد غذایی توسط محققان بین المللی مورد مطالعه قرار گرفته است و مالاشیت گرین یکی از 12 ترکیب مورد بررسی بوده است [5]. داده های منتشر شده موجود نشان می دهد که تنها 10 الی 15% نمونه های ماهی حاوی باقیمانده مالاشیت گرین و متابولیت آن بوده اند و لازم به ذکر است که در این مطالعات تمایزی میان ماهیان پرورشی و وحشی صورت نگرفته و متوسط میزان جذب روزانه در آنها 5 الی نانوگرم 50 به ازای کیلوگرم وزن بدن در روز بوده است. از سال 1991، استعمال مالاشیت گرین به عنوان دارو برای ماهیانی که به مصرف انسان می رسند، از سوی اداره نظارت بر دارو و غذای ایالات متحده (FDA) ممنوع اعلام گردیده است. از طرفی،

بسیاری از پرورش دهندگان ماهی از تاثیرات نامطلوب (سرطانزایی و جهش زایی) مالاشیت گرین بر سلامت مصرف کننده مطلع نمی باشند [6]. با توجه به ضرورت نظارت مداوم بر آبزی پروری و محصولات آبزیان، فراورده های ماهی و سخت پوستان، میزان باقیمانده مالاشیت گرین و متابولیت اولیه اش، LMG، در آبزی پروری جزو الزامات برنامه های نظارتی در کشورهای عضو اتحادیه اروپا تعیین گردیده است و در سال های اخیر جزو برنامه های نظارتی ایران نیز قرار گرفته است. در بانک اطلاعات اتحادیه اروپا داده هایی در مورد نظارت بر پسماندهای کلیه محصولات دامپزشکی و دیگر ترکیبات شیمیایی در ماهیان، فراورده های ماهی و سخت پوستان نظیر وجود MG/LMG موجود است و تهیه چنین ذخایر اطلاعاتی در کشور ما نیز ضروری به نظر می رسد. با توجه به مصرف نسبتا بالا و قابل توجه ماهی، به ویژه ماهیان پرورشی، در ایران بررسی و پایش وضعیت سلامت این دسته از محصولات عرضه شده در بازار مصرف از لحاظ عدم آلودگی به مالاشیت گرین و لوکومالاشیت گرین حائز اهمیت می باشد. لذا، هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی وجود لوکومالاشیت گرین به عنوان مهمترین متابولیت مالاشیت گرین در گوشت ماهیان پرورشی قزل آلای رنگین کمان در استان مازندران بود.

2- مواد و روش ها

2-1- جمع آوری و آماده سازی نمونه

نمونه های ماهی قزل آلای رنگین کمان با وزن تقریبی0/5 و 1 کیلوگرم از 20 مزرعه پرورش ماهی (از هر ایستگاه 10 نمونه) در استان مازندران (15 ایستگاه منطقه هراز و 5 ایستگاه منطقه تنکابن) طی سال 1397 به روش نمونه گیری تصادفی ساده جمع آوری و در ظرف نگهداری به آزمایشگاه منتقل گردیدند. جهت آماده سازی نمونه، 20 گرم از بافت زیر باله پشتی برداشت شد و داخل مخلوط کن آسیاب و یکنواخت گردید. 2 گرم از مخلوط هموژن شده، 2 میلی لیتر آب مقطر و 4 میلی لیتر محلول NaCl(2 مولار) و پپتون بافر سالین در یک لوله آزمایش مخلوط و به مدت 1 دقیقه ورتکس گردید. سپس، 2 میلی لیتر HCl یک مولار اضافه و به مدت 1 دقیقه ورتکس شد. محلول حاصله در دمای اتاق در 2000 دور در دقیقه به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ و دو فاز حاصل گردید. از فاز زیرین، 4 میلی لیتر به یک لوله آزمایش دیگر منتقل شده و 5 میلی لیتر دی کلرومتان به آن اضافه و به مدت 1 دقیقه تکان داده شد. سپس، در دمای اتاق در 2000 دور در دقیقه به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ گردید. لایه بالایی دور ریخته شد و 3 میلی لیتر از لایه زیرین (فاز دی کلرو متان) به یک لوله آزمایش دیگر منتقل شد و جهت تبخیر دی کلرومتان در 50 درجه سانتیگراد قرار داده شد. رسوب به دست آمده در 25 میکرولیتر اتانول خالص حل ورتکس شد. در مرحله بعد 575 میکرولیتر از بافر نمونه رقیق شده اضافه و به مدت 3 دقیقه ورتکس شد. محلول حاصله جهت انجام آزمون الایزا مورد استفاده قرار گرفت [7].

2-2- آزمون ELISA

آزمون الایزا با استفاده از کیت 96 خانه تولید شرکت Europroxima (هلند) انجام شد. حد جستجوی کیت (limit of detection:LOD) معادل 0/12 نانوگرم در گرم و قابلیت جستجو (CCB) برای مالاشیت گرین و لوکومالاشیت گرین برابر با 0/3 نانوگرم در گرم بود. جهت انجام آزمون، مقدار 100 میکرولیتر از بافر رقیق کننده نمونه به چاهک های A1 و A2 و بلانک 50 میکرولیتر از همان بافر در چاهک های B1 و B2، 50 میکرولیتر از محلول های استاندارد در چاهک های C1 و C2 تا H1 و H2 پیپت شد. سپس، 50 میکرولیتر از محلول آماده شده نمونه به هم همه چاهک ها افزوده شد و پس از آن 25 میکرولیتر از محلول کنژوگه و 25 میکرولیتر از محلول آنتی بادی در کلیه چاهک ها به جز A1 و A2 منتقل گردید. سطح میکروپلیت پوشانده و برای چند ثانیه تکان داده و در دمای 4 درجه سانتیگراد در تاریکی (یخچال) به مدت 30 دقیقه انکوباسیون شد. سپس، محتویات میکروپلیت تخلیه و چاهک ها سه مرتبه با محلول شستشویB موجود در کیت شستشو شدند. پس از این مرحله، 100 میکرولیتر از سوبسترا به هر چاهک اضافه شده و در دمای اتاق (20 الی 25 درجه سانتیگراد) به مدت 15 دقیقه نگهداری شد. 100 میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش به هر چاهک اضافه شد و جذب چاهک ها در طول موج 450 نانومتر در دستگاه الایزا ریدر قرائت گردید.

نمودار استاندارد با استفاده از میانگین جذب نوری محلول های استاندارد ترسیم شد. جذب نوری روی محور عمودی و غلظت محلول های استاندارد روی محور افقی درج گردید و منحنی استاندارد بر اساس نقطه تلاقی غلظت و جذب نوری برای هر محلول ترسیم شد. متوسط جذب نوری هر نمونه روی محور عمودی مشخص و توسط خطی به منحنی استاندارد متصل شد و از محل تلاقی خط و منحنی استاندارد خطی عمود بر محور افقی ترسیم گردید. نقطه تلاقی این خط با محور افقی، نشان دهنده مقدار غلظت بود.

3-2- تجزیه و تحلیل آماری

داده های مطالعه در نرم افزار SPSS نسخه 22.0 با استفاده از آزمون اسپیرمن مترادف ناپارامتریک ضریب همبستگی پیرسون مورد آنالیز قرار گرفتند. معنادار بودن اختلاف آماری بین داده ها در سطح اطمینان 99٪ تعیین گردید.

3- نتایج

کمترین و بیشترین مقدار لوکومالاشیت گرین در نمونه های بافت ماهی قزل آلای رنگین کمان بر اساس وزن و محل نمونه برداری در جدول 1 آورده شده است. در منطقه هراز کمترین و بیشترین میزان لوکومالاشیت گرین 0/0001 میلی گرم در کیلوگرم مربوط به نمونه های 0/5 کیلوگرمی و 0/22 میلی گرم در کیلوگرم مربوط به نمونه های 1 کیلوگرمی بود ($p< 0/01$). در برخی از نمونه های 0/5 و 1 کیلوگرمی جمع آوری شده از تنکابن میزان لوکومالاشیت گرین کمتر از حد جستجوی کیت بود و بیشترین مقدار لوکومالاشیت گرین برابر با 0/0047 میلی گرم در کیلوگرم در نمونه های 1 کیلوگرمی بود ($p< 0/01$). مقایسه نتایج به دست آمده از کلیه نمونه های مطالعه نشان داد که کمترین آلودگی به لوکومالاشیت گرین مربوط به نمونه های 0/5 و 1 میلی گرم در کیلوگرم منطقه تنکابن بود و بالاترین میزان لوکومالاشیت گرین در نمونه های 1 میلی گرم در کیلوگرم منطقه هراز مشاهده شد.

Table 1 Minimum and maximum of luecomalachite green content in Rainbow trout flesh

Sample group	Breeding area	Fish weight (kg)	Absorption of luecomalachite green (mg/kg)
1	Haraz	0.5	0.0001-0.14
2	Haraz	1	Trace-0.22
3	Tonekabon	0.5	Trace-0.0027
4	Tonekabon	1	Trace-0.0047
	Australian standard		0.03

نتایج حاصل از آزمون همبستگی در خصوص رابطه بین وزن و مقدار جذب لوکومالاشیت گرین نشان می دهد که ضریب همبستگی این دو متغیر مستقیم و پائین است (Spearman's rho =0.04 , Sig=.075)، بدین معنا که افزایش وزن ارتباطی با میزان جذب لوکومالاشیت گرین ندارد.

Table 2 Comparison of luecomalachite green content in Rainbow trout flesh of Haraz and Tonekabon region

Sample group	Breeding area	Fish weight (kg)	Average Absorption of luecomalachite green (mg/kg)
1	Haraz	0.5	0.0290 ± 0.005^{a}
2	Haraz	1	0.0449 ± 0.001^{b}
3	Tonekabon	0.5	0.001 ± 0.000^{c}
4	Tonekabon	1	0.0009 ± 0.000^{c}
	Australian standard		0.03

[a-c] Different lowercase superscripts in a column express significant difference between means ($p < 0.01$). Results are expressed as average of three independent replicate trials ± standard deviations.

4- بحث

مالاشیت گرین در اکثر نقاط دنیا به عنوان دارو در صنعت پرورش آبزیان به کار می رود، لیکن مطابق قوانین اتحادیه اروپا وجود این ماده در خوراک حیواناتی که جهت تغذیه انسان پرورش داده می شوند مجاز نمی باشد. با این وجود، باقیمانده مالاشیت گرین و لوکومالاشیت گرین، لوکومالاشیت گرین، در آبزیان پرورشی بر لزوم کنترل کیفی ماهی و فرآورده های شیلاتی از لحاظ وجود این ماده تاکید می نماید. غلظت باقیمانده مالاشیت گرین و لوکومالاشیت گرین در عضله ماهی طی فرآیند حرارتی مانند جوشاندن، پختن، مایکروویو و یا شرایط یخچالی و انجماد و نیز انجماد و رفع انجماد مکرر کاهش می یابد. اطلاعات چندانی در مورد سینتیک تغییرات مالاشیت گرین و لوکومالاشیت گرین در پستانداران وجود ندارد. در موش، مالاشیت گرین به سرعت جذب شده و از راه مدفوع دفع می گردد [8].

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میانگین میزان آلودگی به لوکومالاشیت گرین در نمونه های ماهی منطقه تنکابن با میانگین وزن 0/5 و 1 کیلوگرمی کمتر از میزان مجاز تعیین شده توسط استانداردهای بین المللی، به طور مثال استاندارد کشور استرالیا (0/03 میلی گرم در کیلوگرم)، می باشد [9]. نمونه های ماهی منطقه هراز آلودگی بالاتری نسبت به منطقه تنکابن نشان دادند و این تفاوت معنادار بود. حداکثر میزان آلودگی در یک نمونه از ماهیان 0/5 کیلوگرمی و یک نمونه از ماهیان 1 کیلوگرمی هراز با تجمع بافتی لوکومالاشیت گرین، به ترتیب، 0/14 و 0/22 میلی گرم در کیلوگرم مشاهده شد. در بین نمونه های ماهی مورد بررسی از منطقه هراز، بافت ماهیان با وزن تقریبی 0/5 کیلوگرم آلودگی کمتری (0/029 میلی گرم در کیلوگرم) نسبت به ماهیان 1 کیلوگرمی (0/044 میلی گرم در کیلوگرم) نشان داد اما در مورد نمونه های ارزیابی شده از منطقه تنکابن رابطه معناداری میان وزن ماهیان و میزان آلودگی به لوکومالاشیت گرین مشاهده نشد، به طوری که در ماهیان دارای وزن 1 کیلوگرم متوسط میزان تجمع مالاشیت گرین (0/0009 میلی گرم در کیلوگرم) کمتر از نمونه های 0/5 کیلوگرمی (0/001 میلی گرم در کیلوگرم) بود. چنانکه از جدول 2 برمی آید وزن ماهی نقشی در تجمع لوکومالاشیت گرین در بافت ندارد، بلکه به احتمال زیاد عوامل دیگری همچون غلظت مالاشیت گرین در آب و میزان مواجهه ماهی با آن، وجود ترکیبات موثر در تجزیه یا تغییر شکل مالاشیت گرین در آب یا بافت ماهی مانند انواع مختلف نمک ها و یون ها و مواد شیمیایی، فصل نمونه گیری و دمای آب و نیز پتانسیل اکسیداسیونو احیا و pH آب در میزان جذب این ترکیب توسط ماهی و همچنین تجمع آن در بافت تاثیرگذار می باشند [10].

در مطالعات قبلی سایر محققین، میزان آلودگی به مالاشیت گرین و لوکومالاشیت گرین در نمونه های ماهیان پرورشی بالاتر از نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر بوده است. به طور مثال در پژوهشی که توسط Motafeghi و همکاران (2018) انجام شد میزان مالاشیت گرین در گوشت ماهی قزل آلای رنگین کمان 0/5 و 1 کیلوگرمی در دو منطقه هراز و شهرکرد مورد بررسی قرار گرفت [11]. نتایج نشان داد که میزان مالاشیت گرین در بافت ماهی قزل آلای رنگین کمان 0/5 و 1 کیلوگرم منطقه هراز، به ترتیب، 0/391-0/139 میلی گرم در کیلوگرم و 0/477-0/367 میلی گرم در کیلوگرم بود. همچنین، میزان آلودگی به این ترکیب در نمونه های قزل آلای منطقه شهرکرد، 0/680-0/468 میلی گرم در کیلوگرم و 0/529-0/281 میلی گرم در کیلوگرم، به ترتیب، برای اوزان 0/5 1 کیلوگرم، به دست آمد که در همه موارد میزان آلودگی بسیار بالاتر از نتایج مطالعه ما بوده است. در مطالعه ایشان نیز تفاوت معناداری بین وزن ماهی و میزان آلودگی به مالاشیت گرین در نمونه های ماهی قزل آلای منطقه هراز مشاهده نشد که این نتایج با یافته های مطالعه حاضر مطابقت دارد. در مطالعه Safari و همکاران (2018)، میزان باقیمانده مالاشیت گرین در بافت عضلانی ماهی های قزل آلای رنگین کمان پرورشی عرضه شده در بازار مصرف در تهران 0/091-0/078 میلی گرم در کیلوگرم به دست آمد [12]. نتایج مطالعات Khodabakhshi و همکاران (2014) طی بررسی میزان آلودگی بافت ماهیان پرورشی مزارع پرورش ماهی استان چهارمحال و بختیاری به مالاشیت گرین نشان داد غلظت این ترکیب در بافت ماهیان 1/6-0/26 میلی گرم در کیلوگرم و بسیار بالاتر از معیارهای بین المللی می باشد[13].

درمطالعه Schuetze و همکاران (2008) باقیمانده هایMG (که بعنوان مجموع MG و LMG گزارش شد)، در غلظت

های 766 /0 - 0/053 میلی گرم در کیلوگرم در 25 نمونه (n=45)از مارماهی وحشی صید شده از دریاچه ها و رودخانه در برلین شناسایی شد. این محققین اعلام داشتند وجود MG و LMG در آبزیان منطقه ارتباط مستقیمی با تخلیه فاضلاب در آب های سطحی که ماهیان از آن صید می شوند دارد [14].

چنانکه از نتایج مطالعه حاضر بر می آید در نمونه های تنکابن و برخی از نمونه های منطقه هراز ماهی های دارای وزن پایین و کوچکتر آلودگی کمتری نسبت به ماهی های بزرگتر در واحد وزن نشان داده اند. Yang و همکاران (2010) تاثیر شوری آب و وزن ماهی را بر تجمع و دفع MG در ماهی تیلاپیا مورد بررسی قرار دادند. تحقیقات ایشان نشان داد که در ماهی بزرگ به علت بالاتر بودن سرعت سوخت و ساز نرخ تبدیل MG و LMG نسبت به ماهیان کوچک بالاتر بوده و باقیمانده این ترکیبات در بافت کمتر است [15]. مطابق داده های ارائه شده در جدول 1، مقدار باقیمانده لوکومالاشیت گرین در بعضی نمونه های ماهی قزل آلای رنگین کمان ناچیز و در برخی تا 0/14 میلی گرم در کیلوگرم در وزن یکسان به دست آمد که در مقایسه با مقدار مجاز استاندارد بالاتر می باشد، دلیل بالا بودن آلودگی به مالاشیت گرین در نمونه های تهیه شده از برخی ایستگاه های پرورش ماهی مصرف بی رویه این ترکیب به عنوان یک داروی ارزان قیمت و موثر ضدقارچ و ضدانگل با قابلیت دسترسی گسترده و نیز فاقد ممنوعیت قانونی ملی در مزارع پرورش ماهی می باشد.

مطابق گزارش Motafeghi و همکاران (2018)، با توجه به تفاوت ایستگاه های پرورش ماهی از لحاظ کیفیت آب رودخانه و حوضچه، شرایط آب و هوایی، کیفیت سلامت بچه ماهی، رعایت موازین بهداشتی طی دوره تکثیر و پرورش و در نتیجه میزان مصرف مالاشیت گرین در کنترل آلودگی قارچی میزان آلودگی به مالاشیت گرین در نمونه های ایستگاه های مختلف متفاوت است [11]. به طور مثال، در پژوهشی میزان مالاشیت گرین در آب رودخانه های پرورش ماهی در برخی ایستگاه ها فراتر از حد مجاز به دست آمده است [16].

مطالعات نشان می دهد که غلظت باقیمانده های MG در عضله ماهی هنگامی که تحت شرایط پخت عادی همچون جوشاندن، پختن و مایکروویو کردن قرار می گیرد، تا 50 درصد یا بیشتر کاهش می یابد. غلظت باقیمانده LMG نیز تحت شرایط پخت (تا حد کمتری نسبت به MG) کاهش می یابد. همچنین، کاهش غلظت باقیمانده های MG و LMG در بافت ماهی تحت شرایط سرما و انجماد و تکرار فرایند انجماد-یخ زدایی نیز مشاهده شده است و مجدداً کاهش باقیمانده MG نسبت به LMG بیشتر است [17].

5- نتیجه گیری

به طور کلی، پایین تر بودن و در محدوده مجاز قرار داشتن بیشتر نتایج این مطالعه نسبت به مطالعات پیشین نشان دهنده بهبود وضعیت بهداشتی آب ایستگاه های تکثیر و پرورش ماهی، نظارت و کنترل موثر، استفاده از راهکارهای جایگزین و بی خطر جهت کاهش آلودگی قارچی و در نتیجه مصرف کمتر مالاشیت گرین می باشد. با توجه به اینکه تنها قسمتی از باقیمانده های MG/LMG در بافت ماهی در اثر حرارت بالا از بین می رود تلاش در جهت کاهش و یا حذف این ترکیب در پرورش آبزیان ضروری به نظر می رسد.

6- سپاسگزاری

این مقاله حاصل پروژه تحقیقاتی با استفاده از اعتبارات ویژه پژوهشی دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل بوده است.

7- منابع

[1] Yousheng ,J., Li ,C., Kun ,H., Wenjuan ,Y., Xianle ,Y., Liqun, L. 2015. Development of a Fast ELISA for the Specific Detection of both Leucomalachite Green and Malachite Green. Journal of Ocean University of China, 14(2), 340-344. https://doi.org/10.1007/s11802-015-2407-5

[2] Hidayah, N., Abu Bakar, F., Mahyudin,N.A., Faridah, S., Nur-Azura, M.S., Zaman, M.Z. 2013. Detection ofmalachite green and leuco-malachite greenin fishery industry. International Food Research Journal, 20(4), 1511-1519.

[3] Rauscher-Gabernig, E., Bruller, W., Grossgut, R. 2007. Malachite green and

green and possibilities of its replacement in the treatment of fish egg and fish: a review. Veterinary Medicine, (12), 527-53.

[11] Motafeghi, F., Javadi, I., Allameh, S.K. 2018. Investigation of Malachite green existence in Rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*) and common Carp (*Cyprinuscarpio*) flesh in the area of North and South of Iran, Haraz and Shahr e Kord. Iranian Journal of Fishery Sciences, 27(1), 131-138. https://doi.org/10.22092 /ISFJ. 2018. 116454.

[12] Safari, S., Hashemian, F., Rastegar, H., Ghomi, M. 2018. Investigation of malachite green existence in Rainbow flesh by high performance liquid chromatography. Journal of Medical Sciences of Islamic Azad University, 28(4), 290-296.

[13] Khodabakhshi, A., Amin, M.M., VahidDastjerdi, M., Ghasemian, M., ebrahimi, A. 2014. Investigation of Malachite green existence in sewage and flesh of in Rainbow trout in Charmahal Bakhtiari province. Journal of Environmental Science and Technology, 16(4), 189-196.

[14] Schuetze, A., Heberer, T., Juergensen, S. 2008. Occurrence of residues of the veterinary drug malachite green in eels caught downstream from municipal sewage treatment plants. Chemosphere,
72(11), 1664-1670. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.05 .036

[15] Yang, X.Q., Sun, M.Y., Cen, J.W., Li, L.H., Wu, Y.Y.,Hao, S.X.,Qi B.,Shi H., Zhou, W.J. 2010. Elimination of malachite green and its metabolite in tilapia muscle. Journal of Tropical Oceanography, 29, 107-111.

[16] Bagheri, M., Foruzan, M., Talebi, M., Karami, M., Mansoori, p. 2017. Comparing parameters of Samsami and Dinaran rivers with quality standards of fish farming water. Iranian Journal of Fishery Sciences, 26(4), 25-35.

[17] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). 2016. Malachite green in food. Ej EFSA Journal, 14(7), 4530-4610.

leucomalachite green: risk assessment from exposure of contaminated animal foodstuffs for the Austrian population. Ernahrung, 31, 351–359.

[4] Schuetze, A., Heberer, T., Juergensen, S. 2008. Occurrence of residues of the veterinary drug malachite green in eels caught downstream from municipal sewage treatment plants. Chemosphere, 72, 1664–1670. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.05 .036

[5] Benford, D., Bolger, P.M., Carthew, P., Coulet, M., DiNovi, M., Leblanc, J.C., Renwick, A.G., Setzer, W., Schlatter, J., Smith, B., Slob, W., Williams, G., Wildemann, T. 2010. Application of the Margin of Exposure (MOE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic. Food Chemistry and Toxicology, 48, 2–24. https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.11.003

[6] Kwan, P.P., Banerjee, S., Shariff, M., SyahiraIshak, N., Yusoff, F. 2018. Quantitative analysis of malachite green and leucomalachite green residues in fish purchased from the markets in Malaysia. Food Control, 92, 101-106.
https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.031

[7] Gurmit, S., Terence, K., Jean-Marc, G.,Michael, A., Beth, B., Huet, A.H., Caroline, Ch., Philippe, D., Benrejeb Godefro, S. 2011. Design andcharacterization of a direct ELISA for the detection and quantification of leucomalachite green. Food Additives and Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, 28(6), 731–739. https://doi.org/10.1080/19440049.2011.567360

[8] EFSA (European Food Safety Authority). 2016. Malachite green in food. J EFSA. 14(7): 4530-4610.
https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4530

[9] Australia National Standard, Zealand N. 2005. Report on a Survey of Chemical Residues in Domestic and Imported Aquacultured Fish.

[10] Sudova, E., Machova, J., Svobodova, Z., Vesely, T. 2007. Negative effects of malachite

Investigation of luecomalachite green existence in Rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) flesh in Mazandaran province

Shohreh, P. [1*], Azizkhani, M. [2], Mehdizadeh Mood, S. [3]

1. Ph.D, Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran
2. Ph.D, Assistant Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran
3. Ph.D, Assistant Professor, Department of Health and Aquatic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Semnan, Semnan, Iran

(Received: 2019/12/02 Accepted: 2020/05/31)

Malachite Green is extensively used as an antiparasite and antifungal agent in aquaculture. Treatment with malachite green leads to the remaining of the metabolite of this compound (luecomalachite green) in aquatic animal tissues and the production of carcinogenic compounds. The aim of this study was to investigate the presence of luecomalachite green in the flesh of Rainbow trout in Mazandaran province. Fish specimens with approximate weight of 0.5 and 1 kg were collected from 20 farms in Mazandaran province (Haraz and Tonekabon) during 2018. Luecomalachite green was measured in samples using ELISA 96-well kit produced by Europroxima Co. (Netherlands). The highest and lowest levels of luecomalachite green (0.0001 mg/kg) were obtained from samples of 0.5 kg and 0.22 mg/kg in 1 kg samlpes, respectively. In some samples of 0.5 and 1 kg collected from Tonekabon, luecomalachite green content was less than the detection limit of the kit, and the highest amount of luecomalachite green was equal to 0.0047 mg/kg in 1 kg samples. Comparison of the results of all samples showed that the lowest contamination of luecomalachite green was observed in samples of 0.5 and 1 kg of Tonekabon region and the highest level of luecomalachite green were observed in samples of 1kg of Haraz area. The results of luecomalachite green contamination in this study were lower and also in the allowed standard range compared to previous studies, this indicates the improvement of sanitary condition of aquaculture stations, effective monitoring and control strategies, use of substitutes and safe alternatives to reduce fungal contamination and hence less malachite green consumption.

Keywords: Fish, Food safety, Luecomalachite green, Malachite green, Rainbow trout

[*] Corresponding Author E-Mail Address: p.shohreh@ausmt.ac.ir