RESEARCH ARTICLE

Efficacy of Bentonite on Reducing Toxicity of Aflatoxin B1 in Diet of Nile Tilapia Fish

Panchompoo Muanglai[1], Bundit Tengjaroenkul[2*], Peerapol Sukon[3],
Komkrich Pimpukdee[4], Urai Tengjaroenkul[5]

Abstract

Objective — To investigate efficacy of bentonite on reducing toxicity of aflatoxin B1 (AFB_1) in diet of the Nile tilapia fish.

Materials and Methods — Juvenile tilapia (weighed about 25 g) were randomly divided into 7 groups of 18 fish each. Fish in group 1 were the control group. Fish in group 2-4 were fed with diets containing AFB_1 at 30, 60 or 120 mg/kg (ppm), respectively. Fish in group 5-7 were fed diets containing 1% bentonite (BN) mixing with AFB_1 at 30, 60 or 120 ppm, respectively. After 6 weeks of experiment, body weight, and mortality were determined. Histopathological lesions of liver, gill, intestine, kidney, and spleen of the fish were evaluated with light and electron microscopes.

Results — Diets containing AFB_1 at 30 ppm or higher significantly reduced weight gain ($p<0.05$), and induced cellular lesions in liver, gill, and spleen, but not affected mortality. No lesion was observed in the pyloric intestine or kidney of fish in all treatments. Inclusion 1% bentonite in the AFB_1 contaminated diet reduced growth inhibitory effect as well as tissue lesions from the toxin, particularly at toxin not greater than 60 mg/kg.

Conclusion Inclusion of 1% bentonite in AFB_1 contaminated diets can reduce the aflatoxicosis effects in the Nile tilapia fish.

KKU Vet J. 2010; 20(1):21-33 *http://vet.kku.ac.th/journal/*

Keywords : Aflatoxin; Bentonite; Tilapia; Feed

[1]Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand
[2]Department of Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand
[3]Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand
[4]Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Khon Kaen University Khon Kaen 40002, Thailand
[5]Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand
***Corresponding author** E-mail: btengjar@kku.ac.th

ประสิทธิภาพเบนโทไนท์ในการลดความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินบี 1 ในอาหารปลานิล

พรรณชมพู ม่วงลาย[1], บัณฑิตย์ เต็งเจริญกุล[2*], พีระพล สุขอ้วน[3],
คมกริช พิมพ์ภักดี[4], อุไร เต็งเจริญกุล[5]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารดูดซับเบนโทไนท์ในการลดความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินในปลานิลในด้านการเจริญเติบโต อัตราตาย และพยาธิสภาพ

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 น้ำหนักเฉลี่ย 25 กรัม แบ่งเป็น 7 กลุ่มๆ ละ 18 ตัว โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2-4 ได้รับอาหารผสมอะฟลาทอกซินที่ระดับ 30, 60 และ 120 พีพีเอ็ม ตามลำดับ กลุ่มที่ 5-7 ได้รับอาหารผสมเบนโทไนท์ 1% ร่วมกับสารพิษที่ระดับ 30, 60 และ 120 พีพีเอ็ม ตามลำดับ เป็นเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกและวิเคราะห์ข้อมูลด้านการเจริญเติบโต อัตราตาย รวมทั้งศึกษาลักษณะรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของตับ เหงือก ลำไส้ ไต และม้าม ทั้งในระดับกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ผลการศึกษา สารพิษอะฟลาทอกซินในอาหารที่ระดับ 30 พีพีเอ็ม หรือสูงกว่ามีผลทำให้การเจริญเติบโตและกินอาหารลดลง แต่ไม่มีผลต่ออัตราตาย นอกจากนี้ยังพบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในระดับเซลล์ของตับ ม้าม และซี่เหงือก แต่ไม่พบรอยโรคดังกล่าวที่ลำไส้ส่วนต้นและไตในทุกกลุ่มทดลอง

ข้อสรุป สารดูดซับเบนโทไนท์ที่ระดับ 1% สามารถลดความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินในอาหารปลานิลทั้งในด้านการเจริญเติบโต และรอยโรคที่ตับ เหงือกและม้าม โดยเฉพาะเมื่อได้รับสารพิษอะฟลาทอกซินไม่เกิน 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2553; 20(1):21-33 *http://vet.kku.ac.th/journal/*

คำสำคัญ : อะฟลาทอกซิน เบนโทไนท์ อาหาร ปลานิล

[1]คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002
[2]ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002
[3]ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002
[4]ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002
[5]ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200
***ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ** E-mail: btengjar@kku.ac.th

บทนำ

ปลานิล (Nile tilapia, *Oreochlomis niloticus* (Linn.)) เป็นปลาน้ำจืดที่นิยมเลี้ยงเพื่อบริโภคกันมากที่สุด โดยเฉพาะปลานิลสายพันธุ์จิตรดา 3 เนื่องจากสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี กินอาหารได้เกือบทุกชนิด การเจริญเติบโตและขยายพันธุ์รวดเร็ว ให้ผลผลิตสูง ทนทานต่อโรค และเป็นอาหารโปรตีนที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง [1] ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิลมีการขยายตัวเพิ่มขึ้น เพื่อตอบสนองการบริโภคภายในประเทศและการส่งออก โดยในปี พ.ศ. 2549 ปลานิลที่ผลิตได้ในประเทศไทยมีปริมาณ 688,300 ตัน คิดเป็นมูลค่า 26,750 ล้านบาท คิดเป็นสัดส่วน 30.6 % ของปริมาณผลผลิตรวมของปลาน้ำจืดของไทย [2] และยังมีการคาดการณ์ถึงการเพิ่มปริมาณการผลิตปลานิลเพื่อการบริโภคและการส่งออกทั้งของไทยและของโลก

อะฟลาทอกซิน(Aflatoxin) เป็นสารพิษที่สร้างจากเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* โดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน บี1 และ บี2 ส่วนเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* นอกจากจะสร้างอะฟลาทอกซิน บี1 และบี2 แล้วยังสามารถสร้างอะฟลาทอกซินจี1 และจี2 [3] การปนเปื้อนสารพิษอะฟลาทอกซินในอาหารสัตว์ เกิดขึ้นได้ทุกขั้นตอนของการผลิต ความเป็นพิษของสารอะฟลาทอกซินสามารถส่งผลกระทบต่อสุขภาพคนและสัตว์ รวมทั้งสัตว์น้ำ พิษเฉียบพลันทำให้ปลามีอัตราตายสูงขึ้น [4] ส่วนพิษเรื้อรังทำให้อัตราการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลง [5,6] กดภูมิคุ้มกัน [7] และมีอัตราตายเพิ่มขึ้น [8] อะฟลาทอกซินมีผลต่อตับและเป็นสาเหตุของมะเร็งที่ตับ [9,10]

ปัจจุบันวิธีกำจัดสารพิษอะฟลาทอกซินในอาหารสัตว์ที่นำมาใช้มาก คือ การใช้สารดูดซับ เช่น อะลูมิโนซิลิเกต และเบนโทไนท์ [11] เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายต่อการปฏิบัติ ราคาถูกและมีประสิทธิภาพสูง เบนโทไนท์เป็นสารดูดซับในกลุ่มสารอนินทรีย์ เป็นผงดินเหนียว (clay) ชนิดหนึ่ง ในกลุ่มของอะมิโนซิลิเกต [12] พบได้ตามธรรมชาติ มีธาตุที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ Montmorilonite [13] รองลงมาคือซิลิกอนไดออกไซด์ จากองค์ประกอบนี้เองทำให้เบนโทไนท์เป็นสารดูดซับที่ดี เพราะสามารถเกิดการแลกเปลี่ยนอิออนได้ การเกาะจับกันระหว่างสารกลุ่มเบนโทไนท์และสารพิษสามารถเกิดขึ้นได้ 2 กลไก กลไกแรกคือ เกิดจากการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างกันของสารทั้งสองในตำแหน่งเกาะจับ และกลไกที่สองคือ เกิดจากการเกิดโครงสร้างเชิงซ้อนขึ้นกับหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, OH-) [14] มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับศักยภาพในการดูดซับของเบนโทไนท์ [15-17] โซเดียมเบนโทไนท์สามารถป้องกันการดูดซึมของอะฟลาทอกซินบี 1 ที่บริเวณลำไส้เล็กได้ [15] ซึ่ง ยังพบอีกว่าเบนโทไนท์มีประสิทธิภาพดีทั้งในการเข้าจับสารพิษ และการลดความเป็นพิษของสารพิษ [16] อรประพันธ์ [17] รายงานว่าการใช้ 0.5 % โซเดียมเบนโทไนท์ในสูตรอาหารสุกรที่มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน 150 พีพีบี มีแนวโน้มลดพิษได้มากที่สุด โดยดูจากสมรรถภาพการผลิต จากการศึกษาเบื้องต้นของผู้วิจัยพบว่าประสิทธิภาพของเบนโทไนท์ในการดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซินในปลานิลขนาดนิ้ว (fingerlings) ที่ระดับ 1% สูงกว่าที่ระดับ 0.5% อย่างไรก็ตามข้อมูลเกี่ยวกับ

การศึกษาการใช้เบนโทไนท์ในปลานิลยังมีน้อย การวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาประสิทธิภาพของเบนโทไนท์ในการลดความเป็นพิษจากสารพิษอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในอาหารในปลานิล

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินเตรียมจากเชื้อราชนิด *Aspergillus parasiticus* สายพันธุ์ NRRL 2999 โดยใส่สปอร์เชื้อราในข้าวที่อบฆ่าเชื้อ ก่อนนำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินด้วยเครื่อง UV spectrophotometer [18,19]

การออกแบบการทดลองและสัตว์ทดลอง

การศึกษานี้ออกแบบการทดลองโดยวิธีการสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design) ใช้ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 น้ำหนักเฉลี่ย 25 กรัม จำนวน 126 ตัว ปลาแบ่งเป็น 7 กลุ่มๆ ละ 3 ตู้ๆ ละ 6 ตัว และใช้ตู้ขนาด 60 ลิตร โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปกติไม่ผสมสารพิษอะฟลาทอกซินและสารดูดซับเบนโทไนท์ กลุ่มที่ 2-4 ได้รับอาหารผสมอะฟลาทอกซินที่ระดับ 30, 60 และ 120 พีพีเอ็ม ตามลำดับ กลุ่มที่ 5-7 ได้รับอาหารผสมเบนโทไนท์ 1% ร่วมกับสารพิษที่ระดับ 30, 60 และ 120 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ทดลองนาน 6 สัปดาห์ เลี้ยงปรับสภาพปลาก่อนการทดลอง 2 สัปดาห์ ให้อาหารวันละ 3 ครั้ง มีการตรวจวัดคุณภาพน้ำและเปลี่ยนน้ำทุกสัปดาห์ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ การใช้สัตว์ในการทดลองสำหรับการศึกษานี้ได้ปฏิบัติตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองของสภาวิจัยแห่งชาติอย่างเคร่งครัด

การศึกษาพฤติกรรมปลาและรอยโรคภายนอก

สังเกตลักษณะผิดปกติภายนอก ดูสีของลำตัว การตกเลือด การเกิดบาดแผลที่ครีบ ผิวหนัง และอวัยวะภายนอกอื่นๆ สังเกตพฤติกรรมเช่น การว่ายน้ำ การกินอาหารที่ผิดปกติในปลาแต่ละกลุ่ม

การศึกษาการเจริญเติบโตและอัตราตาย

เมื่อครบสัปดาห์ที่ 6 ชั่งน้ำหนักปลา หาน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น โดยการชั่งน้ำหนักรวมแต่ละซ้ำด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง นับจำนวนปลาที่เหลืออยู่

การศึกษารอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

สุ่มปลานิลจำนวน 20% ของปลาทดลองทั้งหมด ทำให้สลบด้วย phenoxy-ethanol (Fluka, Germany) ความเข้มข้น 2 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร ตรวจดูรอยโรคภายนอกแล้วผ่าเปิดช่องท้องปลาเพื่อดูรอยโรคและเก็บ ไต ตับ ม้าม และลำไส้ แช่ใน 10% บัพเฟอร์ฟอร์มาลิน ก่อนนำไปผ่านกรรมวิธีเตรียมเนื้อเยื่อ ตัดให้หนา 4-6 ไมโครเมตร แล้วทำการย้อมสีฮีมาท็อกซิลิน และอีโอซิน และไตรโครม [20] และส่องตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง สำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์

อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน นำเนื้อเยื่อตับแช่ในน้ำยาตรึงเนื้อเยื่อคาร์นอฟสกี นาน 3 ชั่วโมง ล้างด้วยฟอสเฟตบัพเฟอร์ แล้วคงสภาพซ้ำด้วย 1% ออสเมียมเททรอกไซด์ ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีมาตรฐาน [21] ก่อนบันทึกภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 กิโลโวลต์ (Jeol-1200ExII, Tokyo, Japan)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการศึกษามาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติ โดยวิเคราะห์หาความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan Multiple Range test ที่ความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรม SPSS 11.5 for Window เพื่อศึกษาค่าน้ำหนักเฉลี่ยและอัตราตาย ส่วนการรายงานผลด้านพยาธิวิทยาใช้การบรรยายเชิงพรรณนา

ผลการศึกษา

พฤติกรรมปลาและรอยโรคภายนอก

จากผลการศึกษา พบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารที่มีสารพิษความเข้มข้นสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ 60 และ 120 พีพีเอ็ม มีอาการซึมและกินอาหารลดลงตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลอง ปลาที่ได้รับสารพิษที่ระดับ 120 พีพีเอ็ม พบว่าสีของลำตัวค่อนข้างเข้ม ลำตัวมีเมือกมาก เกล็ดหลุด ตาโปนและมีจุดเลือดออกที่ตา สำหรับปลานิลกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมอะฟลาทอกซินร่วมกับเบนโทไนท์ เมื่อพิจารณาจากปริมาณอาหารที่กินพบว่าน้อยกว่าเมื่อเทียบกับปลานิลในกลุ่มควบคุม แต่มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปลานิลกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมอะฟลาทอกซิน

Table 1. Mean Final Weight of Nile Tilapia After Fed AFB_1 and Bentonite for 6 Weeks

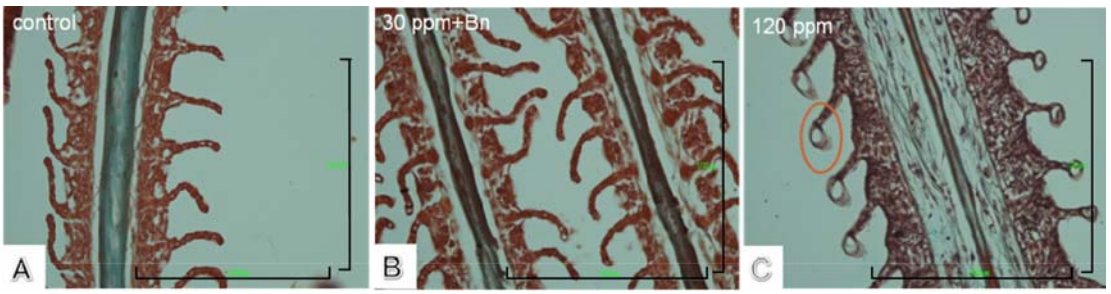
AFB_1 (ppm) + 1% Bentonite (BN)	Mean Final Weight (g)(±S.D.)
0	97.50 ± 3.53^{a}
30	87.50 ± 3.53^{ab}
60	62.50 ± 17.67^{c}
120	55.00 ± 7.07^{c}
30+BN	90.50 ± 3.53^{ab}
60+BN	66.50 ± 16.26^{bc}
120+BN	58.00 ± 7.07^{c}

^{a,b,c}Different Superscripts indicate a significant difference at $p<0.05$.

การเจริญเติบโตและอัตราตาย

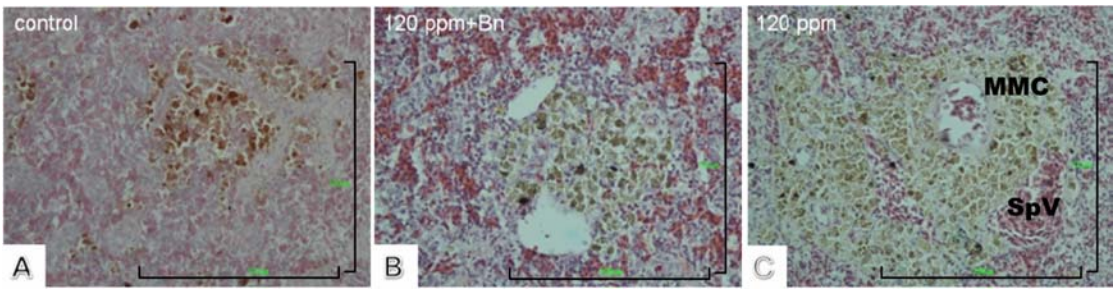
จากผลการทดลองพบว่า น้ำหนักตัวเฉลี่ยของปลานิลมีแนวโน้มลดลงเมื่อปลาได้รับสารพิษความเข้มข้นสูงขึ้น น้ำหนักตัวเฉลี่ยของปลาในกลุ่มควบคุมมีค่าสูงสุดที่ 97.50 กรัม และกลุ่มที่ได้รับสารพิษความเข้มข้น 120 พีพีเอ็ม มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยต่ำสุดที่ 58.00 กรัม นอกจากนี้พบว่าอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับสารพิษระดับ 30 พีพีเอ็มและกลุ่มที่ได้รับสารพิษระดับ 30 พีพีเอ็มผสมเบนโทไนท์ ($p>0.05$) และแม้พบว่าอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยของกลุ่มที่ได้รับสารพิษ 60 พีพีเอ็มและกลุ่มที่ได้รับสารพิษ 60 พีพีเอ็มผสมเบนโทไนท์ ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับสารพิษที่ 120 พีพีเอ็มและกลุ่มที่ได้รับสารพิษ 120 พีพีเอ็ม ผสมเบนโทไนท์ ($p>0.05$) แต่พบว่ามีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (**Table 1**) นอกจากนี้ยังไม่พบการตายในปลาทุกกลุ่มตลอดการทดลอง

Figure 1. Histological Images of Gill Lamellar



A: the control fish, B: the fish fed AFB_1 + 1% BN, C: the fish fed AFB_1 without BN showing ballooning lesion at the tip (Circle). (Masson's trichrome, Scale bar = 100 micrometers)

Figure 2. Histological Images of Spleen



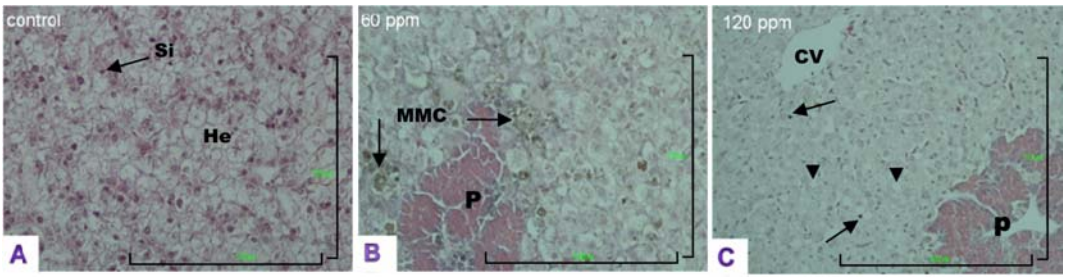
A: the control fish, B: the fish fed AFB_1 + 1% BN, C: the fish fed AFB_1 without BN showing an increment of melano-macrophage. (H&E, Scale bar = 100 micrometers)

Abbreviations: SpV, splenic vein; MMC, Melano-macrophage center.

การศึกษารอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา

จากการตรวจหารอยโรคภายนอกของอวัยวะภายในของปลานิลเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบเพียงรอยโรคที่ตับมีสีซีดกว่าปกติ ส่วนความผิดปกติของเนื้อเยื่อในทางจุลพยาธิวิทยาพบในปลาทุกกลุ่มที่ได้รับสารพิษอะฟลาทอกซิน โดยพบการโป่งพอง (ballooning) ที่ปลายซี่เหงือก (lamellae) ความรุนแรงของรอยโรคพบมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารพิษที่เพิ่มขึ้น (**Figure 1C**) แต่ปลากลุ่มที่ได้รับสารพิษผสมเบนโทไนท์ พบการโป่งพองที่ปลายซี่เหงือกลดน้อยลงกว่ากลุ่มที่ได้รับสารพิษอย่างเดียว (**Figure 1B**) ผลการศึกษาเซลล์ตับของปลานิลในกลุ่มควบคุมจะเห็นการจัดเรียงเซลล์ ขนาดเซลล์ และลักษณะนิวเคลียสเป็นปกติ (**Figure 3A**) แต่ตับปลากลุ่มได้รับสารพิษระดับ 60 พีพีเอ็มพบไซโตพลาสมติดสีย้อมอีโอซินน้อยกว่าปกติและพบการเพิ่มขึ้นของเมลาโนมาโครฟาจ (Melanomacrophage) (**Figure 3B**) เช่นเดียวกับที่ม้าม (**Figure 2**) ตับปลากลุ่มได้รับสารพิษที่ 120 พีพีเอ็ม พบว่าไซนูซอยด์ขยายขนาดมากขึ้น เกิดช่องว่างในเซลล์ (Vacuolization) นิวเคลียสหด (Pyknosis) และพบเซลล์ตาย (**Figure 3C**) ส่วนตับปลากลุ่มที่ได้รับสารพิษร่วมกับสารเบนโทไนท์ พบลักษณะเซลล์บวมพองขยายขนาด (Swollen cell)

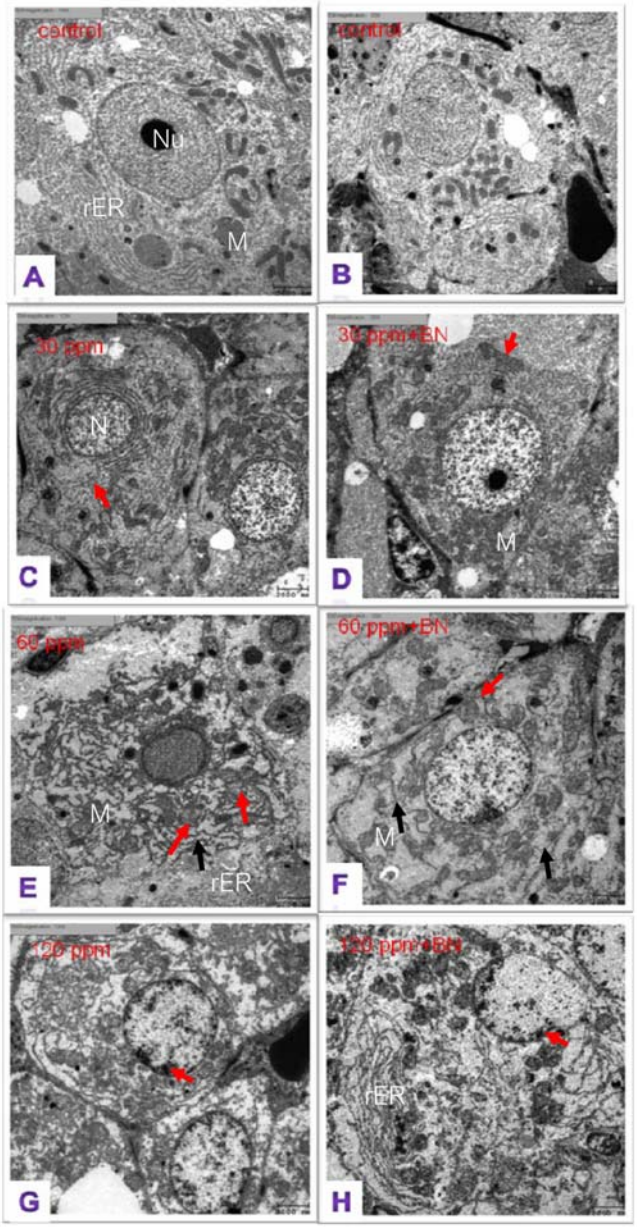
Figure 3. Histological Images of Liver



A: the control fish, B: Fish fed AFB_1 60 ppm showing an increment of melano-macrophage. C: Fish fed AFB_1 120 ppm showing pyknotic nuclei (arrow) and vacuolation (arrowhead). (H&E, Scale bar = 100 micrometers)
Abbreviations: He, hepatocytes; Si, Sinusoids; CV, central vein; P, pancreas; MMC, Melano-macrophage center.

จากผลการศึกษาจุลพยาธิสภาพเนื้อเยื่อด้วยด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในปลานิลที่ได้รับสารพิษความเข้มข้นสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ระดับ 120 พีพีเอ็ม พบนิวเคลียสมีขนาดใหญ่ โครมาตินในนิวเคลียสมีการเกาะกันอย่างหลวมๆ แต่อัดแน่นบริเวณขอบของนิวเคลียสเป็นกระจุกสีดำ (**Figure 4G**) ส่วนเยื่อหุ้มนิวเคลียส (Nuclear envelope) เห็นขอบเขตไม่ชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนคริสตีของไมโทคอนเดรีย (Cristae) จัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบโดยเฉพาะสารพิษที่ระดับ 60 และ 120 พีพีเอ็ม (**Figure 4E, 4G**) ไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับของปลากลุ่มที่ได้รับสารพิษพบว่ามีออร์แกแนลอยู่น้อยกว่าปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับปลากลุ่มที่ได้รับสารพิษร่วมกับสารดูดซับเบนโทไนท์ (**Figure 4D, 4F**)

Figure 4. Ultrastructure Images of Fish Hepatocytes



A, B: The normal cell structures of fish in the control treatments. C: Irregular arrangement of rER (arrow) of fish fed AFB_1 30 ppm. D: Regular arrangement of rER (arrow) of fish fed AFB_1 30 ppm mixed with BN. E, F: Irregular arrangement of rER (black arrow), and changes of alignments of mitochondrial cristae (red arrow) of fish fed AFB_1 60 ppm with/ without BN. G, H: Condensed chromatins (arrow) presented along the nuclear membrane of fish fed 120 ppm with/ without BN.

วิจารณ์

จากผลการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้นของสารพิษอะฟลาทอกซินตั้งแต่ 30 พีพีเอ็ม ทำให้ปลานิลวัยรุ่นมีอัตราการการเจริญเติบโตลดต่ำลง แต่จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อปลาได้รับสารพิษอะฟลาทอกซินตั้งแต่ 60 พีพีเอ็ม ขึ้นไป สำหรับในปลานิลขนาดนิ้ว Tuan และคณะ [8] พบว่าสารพิษอะฟลาทอกซินที่ระดับ 2.5 พีพีเอ็ม จะเริ่มมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตและอัตราแลกเนื้อเช่นเดียวกัน Chávez-Sánchez และคณะ [22] ที่รายงานว่าไม่พบผลของสารพิษต่อการเจริญเติบโตที่ระดับ 0.94 พีพีเอ็ม แต่จะพบที่ระดับ 1.88 พีพีเอ็ม หรือที่ระดับสูงกว่า สำหรับในปลากดหลวงที่ได้รับสารพิษอะฟลาทอกซิน 2.15 พีพีเอ็ม นาน 10 สัปดาห์ พบว่าสารพิษไม่ทำให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อน้ำหนักปลา แต่สารพิษที่ระดับ 10 พีพีเอ็ม ทำให้ปลากดหลวงมีน้ำหนักลดลงประมาณ 24% [4] เมื่อเปรียบเทียบสารพิษที่ระดับเดียวกันที่ 10 พีพีเอ็ม ในปลานิลขนาดนิ้ว Tuan และคณะพบว่า สารพิษระดับนี้ ทำให้ปลามีการเจริญเติบโตลดลงถึง 90% แม้ได้รับในระยะเวลาที่สั้นกว่าคือ 6 สัปดาห์ [8] ส่วนในปลานิลแดง Tengjaroenkul และคณะ [23] รายงานว่าปลาน้ำหนัก 10 กรัม เมื่อได้รับสารพิษที่ระดับ 10 พีพีเอ็ม นาน 2 เดือน มีการเจริญเติบโตลดลง 57 %

สำหรับอัตราตายจากการศึกษานี้พบว่า สารพิษอะฟลาทอกซินที่ระดับตั้งแต่ 30 ถึง 120 พีพีเอ็ม ไม่ทำให้ปลานิลวัยรุ่นตาย ข้อมูลนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Chávez-Sánchez และคณะ [22] ที่รายงานว่าไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างอัตราตายของปลานิลเล็ก น้ำหนักประมาณ 2.7 กรัมที่ได้สารพิษที่ 30 พีพีเอ็มในอาหาร นาน 25 วัน อย่างไรก็ตาม El-Banna และคณะ [24] รายงานว่าปลานิลที่ได้รับสารพิษที่ 0.2 พีพีเอ็ม นาน 10 สัปดาห์ มีอัตราตายตายสูงถึง 16.7% และ Tengjaroenkul และคณะ [23] รายงานว่าปลานิลแดงน้ำหนักประมาณ 10 กรัม เมื่อได้รับสารพิษที่ระดับ 1, 10 และ 50 พีพีเอ็ม นาน 2 เดือน จะมีอัตราตายแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ซึ่งอัตราตายจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อปลาได้รับสารพิษในระดับที่สูงขึ้น ปลานิลแดงเมื่อได้รับสารพิษที่ 50 พีพีเอ็ม มีอัตราตายสูงที่สุดที่ 6.58 % แตกต่างจากปลาที่ไม่ได้รับสารพิษหรือได้รับสารพิษระดับต่ำกว่า 1 พีพีเอ็ม ความแตกต่างต่ออัตราการเจริญเติบโตดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับระดับและปริมาณสารพิษที่ได้รับ รวมถึงชนิดน้ำหนักและขนาดของปลา แต่เมื่อเปรียบเทียบความไวต่อความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินระหว่างปลาแซลมอนน้ำหนัก 50 กรัม ปลาเทราท์สายรุ้งหนัก 50 กรัมและปลากดหลวงหนัก 35 กรัมพบว่าระดับสารพิษที่ทำให้ปลาเหล่านี้ตายครึ่งหนึ่งคือ 1-3, 3-5 และ10-15 พีพีเอ็ม ตามลำดับ แต่จากการศึกษาของ Tuan และคณะ [8] พบว่าปลานิลนิ้วที่ได้รับสารพิษสูงถึงระดับ 100 พีพีเอ็ม นาน 6 สัปดาห์ มีอัตราตายประมาณ 55 % ข้อมูลในข้างต้นบ่งชี้ได้ว่าปลานิลน่าจะมีความไวต่อสารพิษน้อยกว่าปลาชนิดอื่นทั้งนี้อาจเนื่องจากปลานิลมีความสามารถในการขจัดสารพิษได้ดีกว่า

จากผลการศึกษานี้พบว่า อะฟลาทอกซินทำให้เกิดรอยโรคได้ในหลายอวัยวะ แต่รอยโรคจะเด่นชัดที่ตับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Hendricks [25] และ Tuan และคณะ [8] ที่รายงานว่าตับปลาที่ได้รับสารพิษระดับ 10 พีพีเอ็ม มีรูปร่างของเซลล์และนิวเคลียสเปลี่ยนไป และพบไลโป

ฟัสซินซึ่งเกิดจากการย่อยของไลโซโซมและเกี่ยวข้องกับการเสื่อมของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงนี้จะพบมากขึ้นเมื่อปลาได้รับสารพิษตั้งแต่ 60 พีพีเอ็มขึ้นไป นอกจากนี้เซลล์ตับปลาที่ได้รับสารพิษที่ระดับ 120 พีพีเอ็ม พบว่ามีภาวะเซลล์เสื่อม เช่นนิวเคลียสมีขนาดเล็กลงติดสีม่วงน้ำเงิน มีการเกาะกลุ่มของโครมาตินตามผนังเยื่อหุ้มนิวเคลียส ในไซโตพลาสซึมติดลดน้อยลง ซึ่งอาจบ่งชี้ถึงการเปลี่ยนแปลงของภาวะกรดด่างที่ผิดปกติไป [26] และยังพบการสะสมไขมันมากกว่าปกติ สำหรับการเกิดเนื้อตายของตับ El-Banna และคณะ [24] รายงานว่าพบได้ในปลานิลเล็กที่ได้รับสารพิษ 0.05-0.2 พีพีเอ็ม แต่ในปลาขนาดใกล้เคียงกัน Tuan และคณะ [8] กลับตรวจไม่พบการเกิดเนื้อตายหรือการเสื่อมของเซลล์ตับ

อย่างไรก็ตาม Gayatri [27] พบว่า ปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินร่วมกับ 2% เบนโทไนท์ จะขัดขวางไม่ให้อะฟลาทอกซินดูดซึมเข้าเข้าสู่ตัวปลาได้ประมาณ 80% และพบอะฟลาทอกซินเป็นจำนวนมากในของเสียที่ขับออกมาประมาณ 4 เท่าของปลาที่ไม่ได้รับสารเบนโทไนท์ ส่วนตับและม้ามของปลานิลที่ได้รับสารพิษระดับสูงจะพบเมลาโนมาโครฟาจมากกว่าปลากลุ่มที่ได้รับสารพิษระดับต่ำกว่า ผลที่ตรวจพบนี้น่าจะเกิดจากพิษของอะฟลาทอกซินที่ปลาได้รับ นอกจากนี้ที่ปลายซี่เหงือกของปลาที่ได้รับสารพิษโดยพบการโป่งพองที่ปลายซี่เหงือก โดยความรุนแรงของรอยโรคมีมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสารพิษ ส่วนในกลุ่มที่ได้รับผสมสารพิษและเบนโทไนท์ จะพบโป่งพองลดน้อยลง Ferguson และคณะ [28] รายงานว่าการโป่งพองของซี่เหงือกอาจมีสาเหตุจากปลาได้รับสารพิษกลุ่มโลหะหนักหรือจากภาวะความเครียด ในปี ค.ศ. 1991 Ellis และคณะ [30] ได้ทำการศึกษาผลของสารดูดซับและการขับถ่ายอะฟลาทอกซินบี 1 ในปลาเทราท์สายรุ้ง (rainblow trout) พบว่า การเติมโซเดียมเบนโทไนท์ 2% ในอาหารที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 ให้ปลากินนาน 7 วัน พบว่าโซเดียมเบนโทไนท์ จะขัดขวางไม่ให้อะฟลาทอกซินในอาหารถูกดูดซึมเข้าสู่ผนังลำไส้ ตับ และไตได้ 80% อะฟลาทอกซินในปริมาณมากถูกขับออกมากับของเสียประมาณ 470+20 % เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้เติมโซเดียมเบนโทไนท์ 2%

Lindemann และคณะ [29] ได้ทำการศึกษาผลของโซเดียมเบนโทไนท์ที่ระดับ 0.25%, 0.5% และ 0.75% ผสมในอาหารสุกรที่ปนเปื้อนด้วยอะฟลาทอกซิน 800 พีพีบีพบว่าที่ระดับ 0.5% ขึ้นไปสามารถลดพิษของอะฟลาทอกซินได้ องค์ประกอบทางชีวเคมีของเลือดในสุกรใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมและสารดูดซับโซเดียมเบนโทไนท์ไม่มีผลกระทบต่อสัตว์ซึ่งสอดคล้องกับอรประพันธ์ [17] รายงานว่าการเสริม 0.5% เบนโทไนท์ในสูตรอาหารสุกรระยะเจริญเติบโตที่มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน 150 พีพีบี พบว่ามีแนวโน้มในการลดความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับการเสริมสารประเภทอะลูมิโนซิลิเกตในระดับ 0.5% โดยช่วยลดต้นทุนอาหารในการเพิ่มน้ำหนักสุกร 1 กิโลกรัม ได้มากที่สุด และ Chung [12] ได้ทำการศึกษาการเสริมโซเดียมแคลเซียมอะลูมิโนซิลิเกต (Novasil) และโซเดียมเบนโทไนท์ที่ระดับ 0.5% และ 1% ในอาหาร ร่วมกับอาหารที่มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินที่ระดับ 800 และ 922 ppb จากผลการทดสอบพบว่า สาร Novasil สามารถลดพิษของอะฟลาทอกซินในสุกรหย่านม นอกจากนี้ Santurio และคณะ [31] ได้ทำการศึกษาการเสริมโซเดียมเบนโทไนท์ ที่ระดับ 0.5 % ในอาหาร ร่วมกับอาหารที่มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินที่ระดับ 3

มิลลิกรัม/กิโลกรัมอาหารในไก่เนื้อเพศผู้ นาน 42 วัน ผลจากการทดลองพบว่าโซเดียมเบนโทไนท์มีผลทำให้อัตราการเพิ่มน้ำหนัก ปริมาณอาหารที่กิน และประสิทธิภาพการใช้อาหารเพิ่มขึ้น 31.3, 23.8 และ 40.1% ตามลำดับ ส่วนน้ำหนักของตับ หัวใจ ตับอ่อนและกระเพาะบดนั้นไม่มีผลกระทบจากการเสริมโซเดียมเบนโทไนท์ซึ่งสอดคล้องกับ Schell และคณะ [32] ได้ทำการศึกษาเติมสารดูดซับ Clay และ โซเดียมเบนโทไนท์ที่ระดับ 0.5% ในอาหาร ร่วมกับอาหารที่มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินที่ระดับ 500 และ 800 ppb อาหารในสุกรหย่านม พบว่าสารดูดซับทั้งสองไม่มีผลต่อส่วนประกอบทางชีวเคมีของเลือดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมไม่แตกต่าง ในขณะที่สุกรหย่านมที่ได้รับอะฟลาทอกซินพบว่า ค่าเคมีในซีรั่มมีการเปลี่ยนแปลงไป และ Pasha และคณะ [33] รายงานว่าโซเดียมเบนโทไทน์ที่ระดับ 0.5% และ 1% ในอาหารไก่ที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน 100 พีพีบีมีแนวโน้มอัตราการเจริญเติบโตดีขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารพิษ และสามารถลดอัตราตายได้

ผลการศึกษานี้สรุปได้ว่า สารดูดซับเบนโทไนท์ที่ระดับ 1% สามารถลดความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินในปลานิลได้ ทั้งในด้านการเจริญเติบโต และรอยโรคที่ตับ เหงือกและม้าม โดยเฉพาะเมื่อได้รับสารพิษอะฟลาทอกซินไม่เกิน 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

เอกสารอ้างอิง

1. Sangjan P, Tengjaroenkul B. Development of Aminopeptidase and Non-specific Esterases in the intestine of Tilapia Strain *Jitrarhada. KKU Vet J.* 2004;14:81-86.
2. Fishery Statistics 2004. Information Technology Center. Department of Fisheries. Ministry of Agriculture and *Cooperatives.* 2549;(4):9-27.
3. Ellis WO, Smith JP, Simpson BK, Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organism, detection, and method of control. *Cri Rev Food sci Nutri.* 1991;30(3):403-439.
4. Jantrarotai W, Lovell RT, Grizzle JM. Subchronic toxicity of aflatoxin B1 to Channel catfish. *J Aqua Anim Health.* 1990;2:248-254.
5. Harvey RB, Kubena LF, Phillips TD, Huff WE. Preventive of aflatoxicosis by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to Diets of growing barrows. *Am J Vet Res.* 1989;50(3):416-420.
6. Beaver RW, Wilson DM, James MA, Haydon KD. Distribution of of aflatoxins in tissue of growing pigs fed an aflatoxin-contaminated with a high affinity aluminosilicate sorbent. *Vet Human Toxicol.* 1990;32(1):16-18.
7. Harvey RB, Kubena LF, Elissalde MH, Corrier DE, Phillips TD. Comparison of two hydrated sodium calcium aluminosilicate compounds to experimentally protect growing barrows from aflatoxicosis. *J Vet Diagn Invest.* 1994; 6(1):88-92.
8. Tuan AN, Grizzle JM, Loverll RT, Manning BB, Rottingghaus GE. Growth and hepatic lesions of Nile tilapia. *Aquaculture.* 2002;212:311-319.
9. RuizPerez A, PaaschMartinez L, AdamedePaasch P, RosilesMartinez R. Hepatic neoplasia in therainbow trout *(Salmo gairdneri)* bred in El Zarco Fish Hatchery, Federal District. *Veterinaria.* 1984;15:255-261.

10. Wunder W, Korn H. Aflatoxin cancer (hepatoma) in the liver of the rainbow trout *(Salmo irideus). Zool Beitr.* 1982;28: 99-109.
11. Phillips TD, Sarr AB, Grant PG. Selective chemisorption and detoxification of aflatoxins by phyllosilicate clay. *Natural Toxins.* 1995;3(1): 204-213.
12. Chung TK. Use of Aluminosilicate in Animal Diet. Archer Daniels Midland Technical Data. Haw Par Center, Singapore. 1994.
13. Eren E, B Afsin, Y Onal. Removal of lead ions by acid activated and manganese oxide-coated bentonite. *J Hazardous Mater.* 2009;161:677-685.
14. Abollino O, Aceto M, Malandrino M, Sarzanini C, Mentasti E. Adsorption of heavy metals on Na-montmorillonite, Effect of pH and organic substances. *Water Res.* 2003;37:1619-1627.
15. Rosa CAR, Miazzo RD, Carvalho QEC, Dalcero AM, Chiacchiera SM, Magnoli C, et al. Efficacy of synthetic zeolites to reduce toxicity of aflatoxin B1 in broyler chicks. *Poultry Sci.* 2000;79:1-6.
16. Miazzo R, Peralta F, Magnoli C, Salvano M, Ferrero S, Chiacchiera SM, et al. Sodium bentonite from south Argentina on the bioavailability of aflatoxin and fumonisina in broilers chickens. *Poultry* Sci. 2005;84:1-8.
17 Poom-in O. Effects of dietary aflatoxins detoxication by supplementation of aluminosilicates performances of growing pigs. Thesis for the master of Science degree. Kasetsart University. Bangkok. 2536.
18. Kubena LF, Harvey RB, Phillips TD, Corrier DE, Huff WE. Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of a hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Poultry Sci.* 1990;69(1):727-735.
19. Phillips TD. Dietary clay in chemoprevention of aflatoxin-induced disease. *Toxicol Sci.* 1999;52(1):118-126.
20. Roomratanapun S. Animal Tissue Technique. Kasetsart University Press. Bangkok. 2545.
21. Nopanitaya W. Practical TEM for Biological Scientists. The scientific and Technological Research Equipment Center. Chulalongkorn University. Bangkok. 2528.
22. Chavez-Sanchez M, C Martinez Palacios, CA Osorio, I Moreno. Pathological effect of feeding young *(Oreochromis niloticus)* diet supplemented with differect lavel of Aflatoxin B1. *Aquaculture.* 1994;127: 49-60.
23. TengjaroenKul B, Pimpukdee K, TengjaroenKul U. Efficacy of yeast cell wall on detoxification of aflatoxin in diet of Tilapian fish, *Oreochromis sp.* New strategies for mycotoxin reaserch in ASIA proceeding of the international Symposium on Mycotoxincology in Bangkok. 2006. p. 213-234.
24. El-Banna HM, Teleb MM, Hadi, FM Fakhry. Performance and tissue residue of tilapias fed dietary aflatoxin. *Vet Med J.* 1992;40: p.17-23.
25. Hendricks JD, Carcinogenicity of aflatoxins in nonmammalian organisms. In: DL Eaton, JD Groopman, Editors, *Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance,* Academic Press, San Diego (1994), p. 103-136.

26. Kierszenbaum AL. *Histology and cell biology : an introduction to pathology.* St. Louis: Mosby ; 2002.
27. Gayatri M. Chronic aflatoxicosis in Fish an dits Relevance to Human Health. Central Instutute of Freshwater Aquaculture, Kausalyaganga, Bhubaneswar, Orissa, India. 1978.
28. Ferguson HW. Systemic Pathology of Fish. I S U Press, Ames, USA 1989. p. 263.
29. Lindermann MD, Blodgett DJ, Kornegay ET, Schurig GG. Potential Ameliorators of Aflatoxicosis in Weanling/growing Swine. *J Anim Sci.* 1993;71(1):171-178.
30. Ellis RW, M Clement, A Tibbetts and A Winfree. Reduction of a bioavailability of 20 ug/kg alflatoxin in trout fish containing clay. *Aquaculture.* 2000;(183):179-188.
31. Santurio JM, Mallmann CA, Rosa AP, Appel G, Heer A, Dageford S, Bottcher M. Effect of sodium bentonite on the performance and blood variables of boiler chickens intoxicated with alflatoxin. *Br Poultry Sci.* 1999;40:115-119.
32. Schell TC, Lindemann MD, Kornegay ET, Blodgett DJ. Effect of Feeding Aflatoxin- Contaminated Diets With and Without Clay to Weanling and Growing Pigs on Performance, Liver Function, and Mineral Metabolism. *J Anim Sci.* 1993;71:1209-1218.
33. Pasha TN, Farooq MU, khattak FM, Jabbar MA, Khan AD. Effectiveness of sodium bentonite and two commercial products as aflatoxin absorbents in diets for broiler chickens. *Anim Feed Sci Tech.* 2007;132:103-110.