

ผลของอะฟลาทอกซินบี 1 ต่อปลานิลแดงแปลงเพศ (*Oreochromis niloticus* Linn. x *O. mossambicus* Peters)

อรอุษา อุสันโน¹ สุธาสินี ไชยศิลป์สังข์¹ นพดล สุกระกาญจน์²
และ กิจการ สุภมาตย์³

Abstract

Usanno, O.¹, Chaisilapasung, S.¹, Sukrakanchana, N.² and Supamattaya, K.³
Effects of aflatoxin B₁ on sex reversed red tilapia
(*Oreochromis niloticus* Linn. x *O. mossambicus* Peters)
Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005, 27(Suppl. 1) : 187-197

In the present study an 8-week feeding trial was conducted on sex-reversed red tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*) to assess the effects of diets containing various levels (i.e. 0, 50, 100, 500, 1,000 and 2,500 ppb) of aflatoxin B₁ (AFB₁) on growth performance, blood parameters and histopathology of fish. Results showed that experimental fish fed AFB₁ with 2,500 ppb showed significant reduced weight gain and hepatosomatic index. However, feed supplemented with AFB₁ caused no effect on survival rate of the fish in each group. Feeding high level of AFB₁ (1,000 and 2,500 ppb) also affected some blood parameters i.e. hemoglobin and plasma protein. Some histopathological changes (i.e. cloudy swelling, inflammation and cell necrosis) were observed in liver and pancreas of fish fed AFB₁ with 1,000 and 2,500 ppb. The severity of

^{1,3}Aquatic Animal Health Research Center, Department of Aquatic Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112 Thailand. ²Department of Biology, Faculty of Science, Thaksin University, Songkhla, 90000 Thailand.

¹วท.ม.(วาริชศาสตร์) ³Dr. rer. nat. (Aquatic Animal Diseases) รองศาสตราจารย์ ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112 ²วท.ม.(วิทยาศาสตร์การประมง) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000

Corresponding e-mail : kidchakan.s@psu.ac.th

รับต้นฉบับ 4 ตุลาคม 2547 รับลงพิมพ์ 26 พฤศจิกายน 2547

symptoms was related with concentration of AFB₁. This indicated that AFB₁ may impair the functioning of fish hepatocytes. However, no residue of AFB₁ was detected in fish tissues at completion of the feeding period. It can be concluded that fish feeds occasionally contaminated with AFB₁ directly affected fish health but may have no negative impact on fish consumers.

Key words : aflatoxin B₁, sex reversed red tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*, histopathology

บทคัดย่อ

อรุษา อุดันโน สุธาสิณี ไชยศิลป์สังข์ นพดล สุกระกาญจน์ และ กิจการ สุภมาตย์
ผลของอะฟลาทอกซินบี 1 ต่อปลานิลแดงแปลงเพศ
(*Oreochromis niloticus* Linn. x *O. mossambicus* Peters)
ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2548 27(ฉบับพิเศษ 1) : 187-197

ศึกษาผลของระดับอะฟลาทอกซินบี 1 ในอาหารปลานิลแดงแปลงเพศ โดยผลิตอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการเท่ากันทุกสูตร แต่มีระดับอะฟลาทอกซินบี 1 ต่างกัน 6 ระดับ คือ 0 50 100 500 1,000 และ 2,500 ppb ตามลำดับ นำไปทดลองเลี้ยงปลานิลแดงแปลงเพศเป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยศึกษาผลต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอด ผลของอะฟลาทอกซินต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือด พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน และการตกค้างของสารพิษในอาหาร เนื้อปลา ตับปลาและมูลปลา ผลการศึกษาพบว่าอะฟลาทอกซินบี 1 ทุกความเข้มข้นไม่มีผลต่ออัตราการรอด แต่ทำให้ปลามีพฤติกรรมเฉื่อยชา ยอมรับอาหารน้อยลง การเจริญเติบโตต่ำ ค่าองค์ประกอบเลือด ได้แก่ ปริมาณฮีโมโกลบินและโปรตีนในพลาสมา มีค่าต่ำ โดยเฉพาะปลานิลในกลุ่มที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับ 2,500 ppb พบการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของปลาหลังจากได้รับอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 และ 2,500 พบการอักเสบ เซลล์บวมพอง นิวเคลียสขยายขนาด และเกิดเซลล์ตาย ความรุนแรงของพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นสัมพันธ์กับความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน อย่างไรก็ดีตาม ไม่พบอะฟลาทอกซินบี 1 ตกค้างในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อและตับปลาตลอดการทดลอง 8 สัปดาห์ จึงสรุปได้ว่าอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ปนเปื้อนในอาหารจะส่งผลโดยตรงต่อสุขภาพของปลานิล แต่กลไกในการกำจัดสารพิษของปลาสามารถที่จะลดความเป็นพิษ และสามารถกำจัดออกนอกร่างกายได้ การบริโภคเนื้อปลาจึงอาจไม่ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค

การปนเปื้อนของสารพิษที่ผลิตจากเชื้อรา (Mycotoxins) ในอาหาร นับเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลต่อสุขภาพของคนและสัตว์ สารพิษจากเชื้อราเหล่านี้มีหลายชนิด ได้แก่ aflatoxins, cyclopiazonic acid, ochratoxin A, patulin, t-2 toxin, fumonisins, ergopeptine alkaloids, deoxynivalinol, diacetoxyscirpenol, zearalenone, lolitrem alkaloids, phomopsins และ sporidesmins (D' Mello and Macdonald, 1997) และในกลุ่มของสารพิษที่ผลิตจากเชื้อราทั้งหมด พบว่า อะฟลาทอกซิน ซึ่งเป็นสารพิษที่ผลิตจากเชื้อราสกุล *Aspergillus* เป็นสารพิษที่มีโอกาสปนเปื้อนได้บ่อยในอาหาร มีความเป็นพิษสูง จัดเป็นสารก่อมะเร็ง และเป็นพิษต่อตับ (อมรา และคณะ, 2537;

Jantrarotai et al., 1990) นอกจากนี้ พบว่าอะฟลาทอกซินยังเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เนื่องจากอาหารสัตว์น้ำมีส่วนผสมของวัตถุดิบอาหาร เช่น ข้าวโพด ถั่วเหลืองป่น ถั่วลิสงป่น รำและปลายข้าว ที่มักพบการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินอยู่ในระดับสูง มีรายงานการวิจัยพบว่า อะฟลาทอกซิน มีผลต่อการกินอาหาร อัตราการรอด การเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด และระบบภูมิคุ้มกัน รวมทั้งพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อในระบบต่างๆ ในปลา Tuan และคณะ (2002) รายงานว่าปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่ได้รับอาหารปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับ 100,000 ส่วนในพันล้านส่วน (ppb) มีการตายสูงถึง 60%

ภายใน 8 สัปดาห์ หรือในปลา rohu (*Labeo rohita*) พบว่าปลาที่ได้รับการฉีดอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ระดับความเข้มข้น 1,250 ppb มีค่าดัชนีของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ได้แก่ serum bactericidal, lysozyme level, neutrophil oxidative activity และ albumin/globulin และการต้านทานต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ลดลง (Sahoo and Mukherjee, 2001) จากการวิจัยต่างๆ พบว่าระดับเป็นอวัยวะที่ตอบสนองต่ออะฟลาทอกซินมากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในอาหารยังเป็นสาเหตุของการเกิดเนื้องอก และมะเร็งของเซลล์ตับในปลา rainbow trout (Wunder and Korn, 1982; Ruiz-Perez et al., 1984; Rasmussen et al., 1986)

อย่างไรก็ตาม ข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของสารพิษจากเชื้อราแต่ละชนิดต่อการเจริญเติบโต และสุขภาพของปลายังมีอยู่ค่อนข้างจำกัด การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอะฟลาทอกซินบี 1 ต่อการเจริญเติบโต อัตราการรอด องค์ประกอบเลือด และพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลานิลแดงแปลงเพศ รวมถึงการตกค้างของอะฟลาทอกซินในกล้ามเนื้อและมุลปลา เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปใช้ป้องกันความเสียหายที่อาจจะเกิดขึ้น และเป็นแนวทางในการศึกษาด้านโรคที่เกิดจากสารพิษจากเชื้อราในสัตว์น้ำต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สัตว์ทดลอง

ใช้ปลานิลแดงแปลงเพศ (*Oreochromis niloticus* Linn. x *O. mossambicus* Peters) ขนาดความยาวประมาณ 1 ซม. จำนวน 3,000 ตัว อนุบาลในถังไฟเบอร์ทรงกลมขนาดความจุ 2 ลบ.เมตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ก่อนที่จะคัดปลาใส่ตู้กระจกขนาด 120x60x30 ซม. ที่ติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศและเติมน้ำประปาที่ปราศจากคลอรีนปริมาตร 165 ลิตร ในอัตราความหนาแน่น 20 ตัว/ตู้ เพื่อปรับสภาพให้ปลาคู่คุ้นเคยกับสภาพการทดลอง ให้อาหารปกติเป็นเวลา 7 วัน ก่อนชั่งน้ำหนัก และเริ่มต้นการทดลอง

2. อาหารทดลอง

เตรียมอาหารทดลอง 6 สูตร โดยวิเคราะห์วัตถุดิบ

อาหาร และคำนวณสูตรอาหารให้มีระดับคุณค่าทางโภชนาการเท่ากันทุกสูตร โดยมีระดับโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันโดยประมาณ 35, 37 และ 10% ตามลำดับ แต่มีระดับอะฟลาทอกซินบี 1 แตกต่างกัน 6 ระดับ คือ 0 50 100 500 1,000 และ 2,500 ppb (Table 1) นำส่วนผสมมาคลุกเคล้าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Hobart mixer เติมน้ำประมาณ 30% และอัดเม็ดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ให้มีความชื้นในเม็ดอาหารน้อยกว่า 10% ทิ้งให้เย็น และเก็บในถุงพลาสติกสองชั้นแช่ในตู้เย็นสำหรับทดลองต่อไป

3. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) โดยแบ่งการทดลองเป็น 6 ชุดการทดลอง (treatments) โดยแต่ละชุดการทดลองมี 5 ซ้ำ ให้ปลากินอาหารทดลองวันละ 3 มื้อ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยให้ปลากินอาหารตามสัดส่วนน้ำหนักตัวคือ 10% ในสัปดาห์แรก 7% ในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 และ 5% ในสัปดาห์ที่ 4 ถึง 8 (ดัดแปลงจาก กรมประมง, 2541)

4. การศึกษาผลของอะฟลาทอกซินบี 1

4.1 การวัดการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของปลา

ชั่งน้ำหนักปลาทุกสัปดาห์ โดยชั่งน้ำหนักรวมของปลาแต่ละซ้ำและนับจำนวนปลาที่เหลืออยู่ บันทึกพฤติกรรมของปลาตลอดการทดลอง นำข้อมูลที่ได้มาหาคำนวณที่เพิ่มขึ้น อัตราการแลกเนื้อ (feed conversion ratio, FCR) ดัชนีตับ/น้ำหนักตัว (hepatosomatic index) และอัตราการรอด

4.2 การศึกษาองค์ประกอบเลือด

สุ่มปลาจากทุกชุดการทดลอง ชุดละ 15 ตัว สลบปลาด้วย 2-phenoxyethanol แล้วเจาะเลือดจากบริเวณโคนหาง โดยใช้สารละลาย 1.0% ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA) เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด วิเคราะห์องค์ประกอบเลือด ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว และค่าฮีมาโตคริต (haematocrit) ตามวิธีการของ Blaxhall และ Daisley (1973) ปริมาณ

Table 1. Composition of experimental diets.

Ingredient (g/100 g feed)	Diet					
	1	2	3	4	5	6
Fish meal	22	22	22	22	22	22
Soybean meal	30	30	30	30	30	30
Rice brand	28	28	28	28	28	28
Wheat flour	15	14.739	14.478	12.39	9.78	1.95
Vitamin mix	1	1	1	1	1	1
Mineral mix	4	4	4	4	4	4
Standard AFB ₁ *	0 (0 ppb)	0.261 (50 ppb)	0.522 (100 ppb)	2.61 (500 ppb)	5.22 (1,000 ppb)	13.05 (2,500 ppb)

* Standard AFB₁ = 19.157 ppm

ฮีโมโกลบินรวม โดยวิธี cyanmet-haemoglobin (Larsen and Snieszko, 1961) โปรตีนในพลาสมา โดยวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Lowry และคณะ (1951)

4.3 การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตับจากตัวอย่างปลาชุดการทดลองละ 15 ตัว มารักษาสภาพในฟอร์มาลิน 10% นาน 2 วัน แล้วเปลี่ยนน้ำยาต้องเป็นแอลกอฮอล์ 70% ก่อนนำไปผ่านกรรมวิธีการเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีการของ Humason (1979) เนื้อเยื่อตัดให้มีความหนา 3-4 ไมโครเมตร แล้วย้อมด้วยสี haematoxylin & eosin (H&E) (Bancroft, 1967) จากนั้นนำตัวอย่างเนื้อเยื่อไปศึกษาพยาธิสภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์และบันทึกภาพ

4.4 การวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ตกค้าง

เก็บมูลปลาสามสัปดาห์สุดท้ายของการทดลอง โดยดูดเก็บมูลผ่านสายยางและถุงกรอง หลังจากให้อาหาร 1 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเนื้อปลาและตับปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลองสัปดาห์ที่ 5 และ 8 นำมาทำให้แห้งด้วยวิธีแช่แข็งแห้ง (freeze dry) นำตัวอย่างส่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินโดยวิธี contamination branch method (CB) และหาปริมาณโดยใช้ thin layer chromatography (TLC) (AOAC, 1988)

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) แบบ CRD (Steel and Torrie, 1980)

ผลการศึกษา

1. พฤติกรรมของปลา

ผลการศึกษาพบว่าปลาชนิดที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินบี 1 ระดับสูงสุด (2,500 ppb) มีพฤติกรรมเฉื่อยชา หลบตามมุ้ง ผ่นปิดเหงือกเปิด-ปิดถี่ขึ้น ยอมรับอาหารน้อยลง แต่ไม่พบความผิดปกติของลักษณะภายนอกของปลาในชุดการทดลองอื่นๆ

2. การเจริญเติบโต

2.1 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลาชนิดที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 ชุดตลอดระยะเวลาการทดลอง 5 สัปดาห์ พบว่าปลาที่มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาของการทดลอง โดยที่น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวในสัปดาห์แรก ของปลาในแต่ละชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (อยู่ในช่วง 6.76±0.09 ถึง 6.44±0.20 กรัม) แต่หลังจากสัปดาห์ที่ 2 จนถึงสัปดาห์ที่ 5 ปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับ 2,500 ppb มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวต่ำสุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มอื่นๆ ในขณะที่

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลาที่ได้รับอาหารผสมอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับ 0 ถึง 1,000 ppb ไม่มีความแตกต่างกัน (Table 2)

สำคัญ ส่วนอัตราการรอดของปลาที่ได้รับอาหารทั้ง 6 สูตร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยไม่พบการตายตลอดการทดลอง

2.2 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการแลกเนื้อ ดัชนี ตับต่อน้ำหนักตัว และอัตราการรอด

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวตลอดการทดลอง 5 สัปดาห์ เปรียบเทียบน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการแลกเนื้อ ดัชนี ตับต่อน้ำหนักตัว และอัตราการรอดของปลานิลที่ได้รับอาหารทั้ง 6 สูตรแสดงไว้ใน Table 3 โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นมีค่าอยู่ในช่วง 363.38±15.66 ถึง 448.07±18.59 โดยปลาที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินบี 1 ระดับ 2,500 ppb มีค่าต่ำสุดและแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนอัตราการแลกเนื้อสัมพันธ์กับน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลา กล่าวคือ ปลาที่ได้รับอาหารผสมอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับ 0 ถึง 1,000 ppb ไม่มีความแตกต่างกันของอัตราการแลกเนื้อ ในขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีอะฟลาทอกซินบี 1 ระดับ 2,500 ppb มีค่าอัตราการแลกเนื้อสูงที่สุดแตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ (1.21±0.05)

ค่าดัชนี ตับต่อน้ำหนักตัวของปลานิลที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับต่างๆ กัน มีค่าอยู่ในช่วง 1.08±0.05 ถึง 1.65±0.18 โดยปลากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินบี 1 ระดับ 2,500 ppb มีค่าต่ำสุดและแตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารสูตรควบคุมอย่างมีนัย

3. ค่าองค์ประกอบเลือด

การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดปลานิลในสัปดาห์ที่ 8 พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ย 2.70±0.10 x 10⁶ เซลล์/ลบ.มม. และ 5.85±0.47 x 10⁵ เซลล์/ลบ.มม. ตามลำดับ แต่พบว่าค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน และโปรตีนในพลาสมาของปลาแต่ละชุดการทดลองมีค่าแตกต่างกัน โดยปลาที่ได้รับอาหารผสมอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับ 0-1,000 ppb มีค่าฮีมาโตคริตไม่แตกต่างกัน คืออยู่ในช่วง 35.50±1.76 ถึง 38.85±5.19% ต่างจากชุดที่ได้รับอาหารผสมอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับ 2,500 ppb ที่มีค่าต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ (32.10±2.84%) ส่วนปริมาณฮีโมโกลบินในอาหารสูตรที่ 1-4 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (อยู่ระหว่าง 9.34±0.70 ถึง 9.79±0.32 กรัม/เดซิลิตร) ต่างจากอาหารสูตรที่ 5 และ 6 ซึ่งมีค่าต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าเฉลี่ย 8.42±0.80 และ 8.03±0.30 กรัม/เดซิลิตร ตามลำดับ สำหรับค่าโปรตีนในพลาสมาพบว่าปลากลุ่มควบคุมมีค่าสูงสุด (14.45±0.45 กรัม %) แตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าปลากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับ 2,500 ppb มีค่าโปรตีนในพลาสมาต่ำกว่าทุกกลุ่มอย่างมี

Table 2 Average body weight of sex-reversed red tilapia during feeding trial with diets containing various levels of AFB₁ for 5 weeks. Results are shown as mean with standard deviation.

Diet (AFB ₁ level)	Week					
	0	1	2	3	4	5
1 (0 ppb)	4.15±0.05 ^a	6.76±0.09 ^a	9.48±0.12 ^a	13.45±0.37 ^a	17.81±0.49 ^a	23.53±0.64 ^a
2 (50 ppb)	4.16±0.02 ^a	6.56±0.16 ^a	9.36±0.29 ^a	10.30±0.43 ^a	17.27±0.53 ^a	22.79±0.72 ^a
3 (100 ppb)	4.13±0.03 ^a	6.61±0.11 ^a	9.37±0.31 ^a	10.33±0.85 ^a	17.70±0.95 ^a	23.48±1.00 ^a
4 (500 ppb)	4.16±0.02 ^a	6.67±0.20 ^a	9.37±0.29 ^a	13.51±0.44 ^a	17.64±0.61 ^a	23.39±0.60 ^a
5 (1,000 ppb)	4.14±0.05 ^a	6.64±0.10 ^a	9.33±0.27 ^a	13.24±0.43 ^a	17.31±0.54 ^a	23.05±0.57 ^a
6 (2,500 ppb)	4.12±0.04 ^a	6.44±0.20 ^a	8.82±0.28 ^b	12.04±0.48 ^b	15.29±0.72 ^b	19.11±0.76 ^b

Values followed by the same letter in a column do not differ significantly at $P = 0.05$

Table 3. Growth performance, hepatosomatic index and survival rate of sex-reversed red tilapia fed diets containing various levels of AFB₁ for 5 weeks. Results are shown as mean with standard deviation.

Diet (AFB ₁ level)	Initial weight (g/fish)	Final weight (g/fish)	Weight gain (%)	FCR	Hepatosomatic index (%)	Percentage Survival
1 (0 ppb)	4.15±0.05 ^a	23.53±0.64 ^a	466.37±10.50 ^a	1.02±0.02 ^a	1.48±0.05 ^{ab}	100
2 (50 ppb)	4.16±0.02 ^a	22.79±0.72 ^a	448.07±18.59 ^a	1.05±0.04 ^a	1.65±0.18 ^a	100
3 (100 ppb)	4.13±0.03 ^a	23.48±1.00 ^a	468.48±23.43 ^a	1.02±0.02 ^a	1.27±0.19 ^{bc}	100
4 (500 ppb)	4.16±0.02 ^a	23.39±0.60 ^a	462.79±14.47 ^a	1.02±0.02 ^a	1.31±0.12 ^{bc}	100
5 (1,000 ppb)	4.14±0.05 ^a	23.05±0.57 ^a	457.20±20.11 ^a	1.02±0.02 ^a	1.38±0.05 ^b	100
6 (2,500 ppb)	4.12±0.04 ^a	19.11±0.76 ^b	363.38±15.66 ^b	1.21±0.05 ^b	1.08±0.05 ^c	100

Values followed by the same letter in a column do not differ significantly at P=0.05

Table 4. Blood parameters of sex-reversed red tilapia fed with diets containing various levels of AFB₁ for 8 weeks. Results are shown as mean with standard deviation.

AFB ₁ level (ppb)	Percent hematocrit	Red blood cells (x10 ⁶ cells/mm ³)	White blood cells (x10 ⁵ cells/mm ³)	Hemoglobin (g/dl)	Plasma protein (g%)
0	37.01±3.75 ^a	2.75±0.20 ^a	5.60±0.78 ^a	9.78±0.66 ^a	14.45±0.45 ^a
50	38.85±5.19 ^a	2.73±0.23 ^a	5.39±0.29 ^a	9.79±0.32 ^a	12.75±1.31 ^{bc}
100	35.50±1.76 ^a	2.58±0.46 ^a	6.56±0.86 ^a	9.58±0.53 ^a	13.01±0.73 ^b
500	38.13±0.68 ^a	2.80±0.41 ^a	6.19±0.84 ^a	9.34±0.70 ^a	11.63±0.69 ^c
1000	37.34±1.49 ^a	2.77±0.31 ^a	5.99±0.72 ^a	8.42±0.80 ^b	11.47±1.47 ^c
2500	32.10±2.84 ^b	2.56±0.14 ^a	5.39±0.78 ^a	8.03±0.30 ^b	9.89±0.99 ^d

Values followed by the same letter in a column do not differ significantly at P=0.05

นัยสำคัญ (9.89±0.99 กรัม %) (Table 4)

4. พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

จากการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลาที่ได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทั้งขนาดและรูปร่างของเซลล์ตับ ในปลาชุดที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับ 0 50 และ 100 ppb (Figure 1) พบความผิดปกติรุนแรงที่สุดในตับปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับ 2,500 ppb รองลงมาคือ 1,000 และ 500 ppb ตามลำดับ พบการบวมของเซลล์ (cloudy swelling) การโตเกินของเซลล์ตับ (hypertrophy) พบการติดสีแดงอย่างผิดปกติของไซโตพลาสซึม (accumulation of eosinophilic materials in cytoplasm) และมีการตายเฉพาะส่วนของเซลล์ตับ (necrosis of hepatocytes) ใน

ปลากลุ่มที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับ 1,000 และ 2,500 ppb (Figure 2, 3, 4)

พบความผิดปกติในตับอ่อนรุนแรงที่สุดในปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับ 2,500 ppb โดยพบเซลล์ตายและเกิดการอักเสบ มีการเพิ่มจำนวนของเมลานอมาโครฟาจ (melanomacrophage) พบเซลล์สีส้มและนิวเคลียสรวมพอง ปริมาณ zymogen granules ลดลง (Figure 5) แต่ไม่พบความผิดปกติในเนื้อเยื่อกระเพาะลำไส้ และหัวใจของปลาทุกชุดการทดลองที่เลี้ยงนาน 8 สัปดาห์

5. การวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินตกค้างในกล้ามเนื้อตับ และมูลปลา

ผลการศึกษาปริมาณการตกค้างของอะฟลาทอกซิน

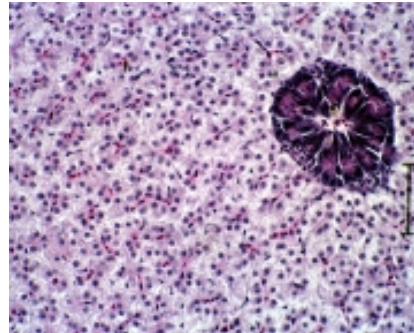


Figure 1. Liver of tilapia fed no AFB₁ (control) showing normal arrangement of hepatic cords and sinusoids, pancreatic acinar cells filled with zymogen granules (H & E stained, bar = 50 μm).

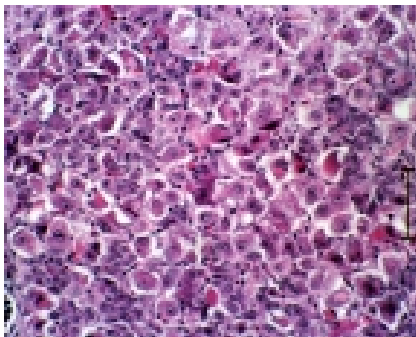


Figure 2. Liver of tilapia fed 1,000 ppb AFB₁ for 8 weeks showing hypertrophy of hepatocytes with accumulation of eosinophilic materials in cytoplasm (H&E stained, bar = 50 μm).

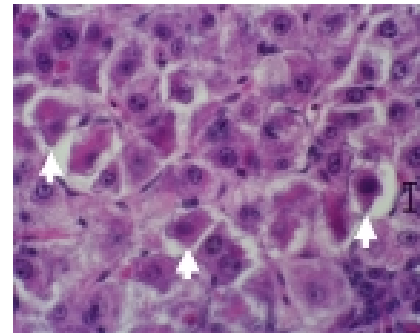


Figure 3. High magnification of the liver of tilapia fed 1,000 ppb AFB₁ for 8 weeks, showing hepatocytes with cloudy swelling and necrosis (arrow). (H&E stained, bar = 10 μm)

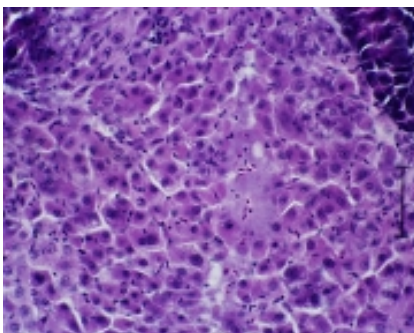


Figure 4. Liver of tilapia fed 2,500 ppb AFB₁ for 8 weeks showing cloudy swelling and necrosis of hepatocytes (H&E stained, bar = 50 μm).

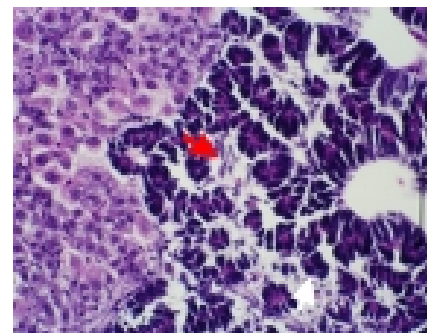


Figure 5. Liver of tilapia fed 2,500 ppb AFB₁ for 8 weeks showing pancreatic tissue exhibited lose contact (red arrow) and reduction of zymogen granule in pancreatic acinar (white arrow) (H&E stained, bar = 50 μm).

บี 1 ในกล้ามเนื้อและตับปลา หลังการเลี้ยงด้วยอาหารทดลองเป็นเวลา 5 และ 8 สัปดาห์ และการตกค้างของอะฟลาทอกซินบี 1 ในมูปลปลาเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารทดลอง 3 สัปดาห์สุดท้าย ไม่พบการตกค้างของอะฟลาทอกซินบี 1 ในกล้ามเนื้อและตับปลาที่ได้รับอาหารทุกสูตร แต่พบการตกค้างในมูปลปลาที่ได้รับอาหารที่ผสมอะฟลาทอกซินบี 1 ตั้งแต่ระดับ 500 ถึง 2,500 ppb ในปริมาณ 15.13 ถึง 27.53 ppb (Table 5)

วิจารณ์ผลการทดลอง

มีรายงานการปนเปื้อนของสารพิษที่ผลิตจากเชื้อรา โดยเฉพาะอะฟลาทอกซินในวัตถุดิบอาหารสัตว์ทั่วโลก ซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพของสัตว์และมนุษย์ และก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นมูลค่ามหาศาล (Hussein and Brasel, 2001) การศึกษาครั้งนี้ได้นำเสนอผลกระทบที่เกิดขึ้นต่อสุขภาพของปลานิลแดงแปลงเพศ เนื่องจากการได้รับอาหารที่ปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับต่างๆ กัน ซึ่งผลการศึกษาพบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารผสมอะฟลาทอกซินในระดับสูง (2,500 ppb) จะมีพฤติกรรมผิดปกติ และอัตราการเจริญเติบโตลดลง แต่สารพิษไม่ได้ส่งผลให้ปลาเกิดการตายตลอดการทดลอง อย่างไรก็ตามผลของสารพิษที่ผลิตจากเชื้อราอาจแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระดับของสารพิษและความไวต่อสารพิษในปลาแต่ละชนิด รายงานการศึกษาของ Chavez-Sanchez และคณะ (1994) พบว่าปลานิลที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี 1 ใน

ระดับ 940 ถึง 30,000 ppb เป็นเวลา 25 วัน จะปฏิเสธอาหารและกินอาหารน้อยลง มีพฤติกรรมเชื่องซึม คล้ายคลึงกับในปลากดอเมริกัันที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับ 7,520 ถึง 30,000 ppb (Jantrarotai *et al.*, 1990) El-Banna และคณะ (1992) (อ้างโดย Tuan *et al.*, 2002) พบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินเพียง 200 ppb มีการตาย 16.7%

มีรายงานพบว่าปลานิลมีความไวต่ออะฟลาทอกซินต่ำกว่าปลาเรนโบว์เทราท์ (rainbow trout) เนื่องจากไม่พบการเกิดเนื้องอกในปลาที่ได้รับสารพิษ (Halver, 1969) อย่างไรก็ตาม พบว่าปลานิลมีความไวต่ออะฟลาทอกซินสูงกว่าปลากดอเมริกััน จากการศึกษาพบว่าปลากดอเมริกัันที่ได้รับอาหารปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับ 2,150 ppb เป็นเวลา 10 สัปดาห์ มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากชุดควบคุม และปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับ 10,000 ppb มีอัตราการเจริญเติบโตลดลงเพียง 24% (Jantrarotai and Lovell, 1990) ทั้งนี้ Bailey และ Hendricks (1988) (อ้างโดย Chavez-Sanchez *et al.*, 1994) พบว่าปลากลุ่ม salmonid โดยเฉพาะปลาเรนโบว์เทราท์ มีความไวต่ออะฟลาทอกซินมากกว่าปลากดอเมริกััน ปลานิล และปลาโคไฮแซลมอน โดยการตอบสนองต่อสารพิษอะฟลาทอกซินทั้งแบบเรื้อรังและเฉียบพลัน สัมพันธ์โดยตรงกับความสามารถในการเปลี่ยนอะฟลาทอกซินบี 1 ไปเป็น aflatoxicol (AFL) ซึ่งเป็น metabolite โดย cytoplasmic NADPH-dependent enzyme (Hsieh and Wong, 1982) (อ้างโดย Jantrarotai and Lovell, 1991)

Table 5 Aflatoxin B₁ residues in muscle, liver and faeces of experimental fish after 5- and 8-week feeding trial

Diet (AFB ₁ level)	AFB ₁ residue (ppb)				
	Muscle		Liver		Feces
	wk 5	wk 8	wk 5	wk 8	wk 8
1 (0 ppb)	0	0	0	0	0
2 (50 ppb)	0	0	0	0	0
3 (100 ppb)	0	0	0	0	0
4 (500 ppb)	0	0	0	0	15.13
5 (1,000 ppb)	0	0	0	0	15.95
6 (2,500 ppb)	0	0	0	0	27.53

ดังนั้นสัตว์ที่มีกิจกรรมของ cytoplasmic NADPH-dependent enzyme ค่อนข้างสูง เช่น เบ็ด หนู กระต่าย และปลาเรนโบว์เทราท์ จึงมักไวต่ออะฟลาทอกซินบี 1 (Jantrarotai and Lovell, 1991) เซลล์ตับของปลาเรนโบว์เทราท์ ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพสูง จึงสามารถเปลี่ยนอะฟลาทอกซินบี 1 ไปเป็น AFL ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปลากดอเมริกัน และปลาแซลมอน

จากผลการศึกษาพบว่าอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับ 1,000 และ 2,500 ppb ในอาหารมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดในปลาทดลอง โดยเฉพาะปริมาณฮีโมโกลบิน และพลาสมาโปรตีน แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเม็ดเลือด สอดคล้องกับรายงานของ Sahoo และ Mukherjee (2001) ซึ่งพบว่าการฉีดอะฟลาทอกซินบี 1 ในปลา rohu ระดับความเข้มข้น 1,250 และ 5,000 ppb ทำให้ปริมาณโปรตีนรวมในเลือดลดลง ซึ่งเห็นว่าอะฟลาทอกซินบี 1 มีผลโดยตรงต่อการทำงานของตับ ซึ่งทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรตีนในพลาสมาเกือบทุกชนิด ยกเว้นแกมมาโกลบูลิน (วิจิตรา, 2528) สอดคล้องกับการพบพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของปลานิลที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับ 1,000 และ 2,500 ppb ได้แก่ เซลล์ตับบวมพอง (cloudy swelling) ซึ่ง Hibiya (1982) อธิบายว่าลักษณะ cloudy swelling นั้น เซลล์จะบวมพองและขุ่น โดยมีหยดของเหลวติดสีชมพูของ eosin (eosinophilic hyaline droplets) ในไซโตพลาสซึม เนื่องจาก endoplasmic reticulum (ER) และไมโทคอนเดรียบวมพอง และเนื้อเยื่อตับที่ได้รับสารพิษมักจะพบเซลล์ตาย โดยพบว่าไซโตพลาสซึมจะติดสีชมพู eosin เพิ่มขึ้น เนื่องจากการสูญเสีย basophilic RNA ไมโทคอนเดรียบวมพอง และมีการเพิ่มจำนวนของ acidophilic group เนื่องจากการแตกหักของโครงสร้างโปรตีน เมื่อเทียบกับเซลล์ปกติ เซลล์ตายจะมีนิวเคลียสหดเล็กลง และติดสีเข้มที่บของ haematoxylin โครมาตินมักชิดขอบนิวเคลียส ระยะเวลาจะพบนิวเคลียสหดตัวมาก และแตกสลาย (Wheater *et al.*, 1985; Hibiya, 1982) นอกจากนี้ในการศึกษารังนี้ยังพบ melanomacrophage จำนวนมากในเนื้อเยื่อตับอ่อนของปลากลุ่มที่ได้รับสารพิษในระดับสูง เนื่องจากการตอบสนองต่อความเป็นพิษของตัวปลาสอดคล้องกับรายงาน

ของ Domitrovic (2000) ซึ่งพบว่าตับปลา *Cichlasoma dimerus* ที่เป็นโรค จะมีจำนวน melanomacrophage เพิ่มขึ้น และมีขนาดใหญ่กว่าปลาที่ไม่เป็นโรค นอกจากนั้น melanomacrophage ในตับอาจชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์กับการได้รับการปนเปื้อนสารพิษจากสิ่งแวดล้อมด้วย (Elston *et al.*, 1997) อย่างไรก็ตาม การศึกษารังนี้ยังไม่ได้ตรวจสอบปัจจัยที่บ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของการทำงานของเซลล์ตับโดยตรง

จากการวิเคราะห์ปริมาณของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างเนื้อเยื่อปลา ไม่พบการตกค้างของสารพิษในกล้ามเนื้อปลานิลทุกกลุ่ม ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าอาจจะมี การเปลี่ยนแปลงของอะฟลาทอกซินบี 1 ไปอยู่ในรูปของ เมแทบอลิต์ (metabolites) อื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับ Hussain และคณะ (1993) ซึ่งไม่พบอะฟลาทอกซินบี 1 จี 1 และจี 2 เหลือตกค้างในกล้ามเนื้อปลาวอลอาย (walleye) ที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับ 50 และ 500 ppb เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และไม่พบอะฟลาทอกซินตกค้างในกล้ามเนื้อปลาคาร์พที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับ 2 ppb ตลอดการเลี้ยง (Svobodova and Piskac, 1980) จึงอาจสรุปได้ว่าอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ปนเปื้อนในอาหารในระดับ 1,000-2,500 ppb จะส่งผลต่อสุขภาพของปลานิลได้โดยตรง แต่กลไกในการกำจัดสารพิษของปลาสามารถที่จะลดความเป็นพิษ และสามารถกำจัดออกจากร่างกายได้ การบริโภคเนื้อปลาจึงอาจไม่ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภค องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) กำหนดให้มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในอาหารได้ไม่เกิน 30 ppb (ปราโมทย์ และคณะ, มปป.) ส่วนในประเทศไทยกำหนดให้มีในอาหารได้ไม่เกิน 20 ppb (อรุณศรี, 2540) ผลจากการศึกษารังนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการจัดการสุขภาพปลาเพื่อลดผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นในกรณีที่มีการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราในอาหารสัตว์น้ำ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเภททั่วไป ประจำปี 2547

เอกสารอ้างอิง

- กรมประมง. 2541. คู่มือการเพาะเลี้ยงปลานิลเพศผู้ สายพันธุ์จิตรลดา 2. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ปราโมทย์ วีรานูวัตต์, พันธุ์ทิพย์ สงวนเชื้อ, พิเศษพงษ์ ปัทมสุคนธ์, ดุษฎี อุดมลิน, พิเศษภู ทรัพย์ขจร, วิไล ราตรีสวัสดิ์ และสุนทร กังสะวิน. มปป. คู่มือโรคติดเชื้อและแบคทีเรีย. สงขลา: คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 273 หน้า.
- วิจิตรา จูดีดำรงพันธ์. 2528. ชื่อเคมีของตับ. สงขลา: ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 264 หน้า.
- อมรา วงศ์พุทธพิทักษ์, กนกพร อธิสุข และจวีร์รัตน์ รุ่งโรจนารักษ์. 2537. สิ่งปนเปื้อนในอาหาร: ผลกระทบต่อสุขภาพคนไทย. กรุงเทพฯ: คณะกรรมการระบดวิทยาแห่งชาติ สถาบันวิจัยสาธารณสุขไทย มูลนิธิสาธารณสุขแห่งชาติ. 147 หน้า
- อรุณศรี วงษ์อุไร. 2540. อะฟลาทอกซิน. ใน คู่มือวิชาการเรื่องอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง. (สัญญา กองเงิน, นันทวรรณ สโรบล, ชูทิพย์ ชนะเสนีย์ และสมศักดิ์ สุริโย) กรุงเทพฯ: กลุ่มพีชน้ำมัน กองส่งเสริมพืชไร่ นา กรมส่งเสริมการเกษตร. 248 หน้า.
- AOAC (Official Method 968.22). 1988. "Aflatoxin in Peanuts and Peanut Product" CB Method. Washington, D.C. :AOAC.
- Bancroft, J.D. 1967. Histochemical Techniques. London: Butterworth.
- Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W. 1973. Routine hematological methods for use with fish blood. J. Fish. Biol. 5: 771-781.
- Chavez-Sanchez, Ma.C., Martinez Palacios, C.A. and Osorio Moreno, I. 1994. Pathological effects of feeding young *Oreochromis niloticus* diets supplemented with different levels of aflatoxin B₁. Aquacult. 127: 49-60.
- D'Mello, J.P.E. and Macdonald, A.M.C. 1997. Mycotoxins. Anim. Feed. Sci. Tech. 69: 155-166.
- Domitrovic, H.A. 2000. Melanomacrophage centers in liver, spleen and kidney of *Cichlasoma dimerus* (Pisces, Cichlidae): histology and modifications in relation to sanitary and environmental conditions. Rev. Ichthyol. 8: 9-18.
- Elston, R.A., Drum, A.S., Pearson, W.H. and Parker, K. 1997. Health and condition of Pacific herring *Clupea pallasii* from Prince William Sound, Alaska, 1994. Dis. Aquat. Org. 31: 109-126.
- Halver, J.E. 1969. Aflatoxicosis and Trout Hepatoma. In Aflatoxin; scientific background, control and implications. (ed. L.A. Goldblatt.) pp. 265-306, New York: Academic Press.
- Hibiya, T. 1982. An Atlas of Fish Histology Normal and Pathological Features. New York: Kodansha Ltd. 143p.
- Humason, G.L. 1979. Animal Tissue Technique (4th edition). San Francisco: W.H. Freeman and Company. 661 p.
- Hussain, M., Gabal, M.A., Wilson, T. and Summerfelt, R.C. 1993. Effect of aflatoxin-contaminate feed and residues in walleye fish. Vet. Human. Toxicol. 35: 396-398.
- Hussein, H.S. and Brasel, J.M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicol. 167: 101-134.
- Jantrarotai, W. and Lovell, R.T. 1990. Subchronic toxicity of dietary aflatoxin B₁ to channel catfish. J. Aquat. Anim. Health. 2: 248-254.
- Jantrarotai, W. and Lovell, R.T. 1991. Aflatoxin in fish feed and its control. Thai Fisheries Gazette. 44: 70-74.
- Jantrarotai, W., Lovell, R.T. and Grizzle, J.M. 1990. Acute toxicity of aflatoxin B₁ to channel catfish. J. Aquat. Anim. Health. 1: 237-247.
- Larsen, H.M. and Snieszko, S.F. 1961. Modification of the microhematocrit technique with trout blood. Trans. Amer. Fish. Soc. 90: 139-142.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Rasmussen, H.B., Larsen, K., Hald, B., Moeller, B. and Elling, F. 1986. Outbreak of liver cell carcinoma among saltwater-reared rainbow trout *Salmo gairdneri* in Denmark. Dis. Aquat. Org. 3: 19-196.
- Ruiz-Perez, A., Paasch-Martinez, L., Adame-de-Paasch, P. and Rosiles-Martinez, R. 1984. Hepatic neoplasia in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) bred in El Zarco Fish Hatchery, Federal District. Veterinaria. Mex. 15: 255-261.

- Sahoo, P.K. and Mukherjee, S.C. 2001. Dietary intake of levamisole improves non-specific immunity and disease resistance of healthy and aflatoxin-induced immuno-compromised of rohu, *Labeo rohita*. J. Appl. Aquacult. 11: 15-25.
- Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. 1980. Principle and Procedures of Statistics. 2nd edition. New York: McGraw Hill. 633p.
- Svobodova, Z. and Piskac, A. 1980. Effect of feeds with a low content of aflatoxin B₁ on the health condition of carp (*Cyprinus carpio* L.). Zivocisna. Vyroba. 25: 809-814.
- Tuan, N.A., Grizzle, J.M. Lovell, R.T. Manning, B.B., and Rottinghaus, G.E. 2002. Growth and hepatic lesion of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing aflatoxin B₁. Aquacult. 212: 311-319.
- Wheater, P.R., Burkitt, H.G., Stevens, A. and Lowe, J.S. 1985. Basic Histopatology. New York: Churchill Livingstone. 217 p.
- Wunder, W. and Korn, H. 1982. Aflatoxin Cancer (hepatoma) in the liver of the rainbow trout (*Salmo irideus*). Zool. Beitr. 28: 99-109.