Determination of malachite green and leucomalachite green residues in rainbow trout in Sanandaj City

Reza Rezaee[1], Afshin Maleki[2], Mahdi Safari[3], Behzad Shahmoradi[4], Ali Jafari[5], Omid Giaghi[6], Shiva Zandi[7], Nikoo Khaledyan[8], Shima Sharifi[9], Shadieh Mohammadi[10]

1.Assistant Professor, Environmental Health Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0003-2314-6697
2.Professor, Environmental Health Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0001-8261-8717
3.Assistant Professor, Environmental Health Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0003-0347-9283
4.Associate Professor, Environmental Health Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0002-2120-4518
5.Assistant Professor, Department of environmental health engineering, faculty of health and nutrition, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran. ORCID ID: 0000-0001-8761-6323
6.Associate Professor, Environmental Health Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0001-9256-3115
7.Laboratory expert, Environmental Health Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0001-8349-5595
8.Student Research Committee, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0003-1227-4407
9.Student Research Committee, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0001-9427-8297
10.Assistant Professor, Environmental Health Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran., (Corresponding Author), Tel: 087-33664658, Email: Shadiehmohammadi@yahoo.com, ORCID ID: 0000-0002-0711-4305

ABSTRACT

Background and Aim: Malachite green (MG) is an organic compound which his used as a dye in textile industry. This compound is applied incorrectly and illegally in aquiculture as an antimicrobial agent. This compound has mutagenic and carcinogenic effects.

Materials and Methods: In this study we determined the concentrations of MG and leucomalachite green (LMG) in the muscle tissue of 90 rainbow trouts (Oncorhynchus mykiss) collected from the local markets in Sanandaj City within a period of six months in 2018. In order to measure the residues of MG and LMG, we used enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the European Union Decision 2002/657/EC.

Results: The results showed presence of MG and LMG in all 90 samples: The residues of MG in the samples were as follows: 1-2 µg/Kg in 41 (6.45%), more than 2 µg/Kg in 45 (50%) and less than 1 µg/Kg in 4 samples (4.4%). Furthermore, the residues of LMG in the samples were as follows: more than 2 µg/Kg in 13 (45.14%), 1-2 µg/Kg in 67 (44.74%) and less than 1 µg/Kg in 10 samples (11.11%) . Moreover, the limit of detection (LOD) in the method was 0.43 µg/Kg.

Conclusions: It is concluded that MG is illegally applied in fish farms, which can be a threat to human health and the environment.

Keywords: Malachite green, Leucomalachite green, Rainbow trout, ELISA, Sanandaj
Received: Jan 18, 2020 **Accepted:** Mar 10, 2020

How to cite the article: Reza Rezaee, Afshin Maleki, Mahdi Safari, Behzad Shahmoradi, Ali Jafari, Omid Giaghi, Shiva Zandi, Nikoo Khaledyan, Shima Sharifi, Shadieh Mohammadi**.** Determination of Malachite Green and Leucomalachite Green Residues in Rainbow Trout Offered in the City of Sanandaj**.** SJKU. 2020; 25 (3): 61-71.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CBYNC), where it is .permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و پنجم مرداد و شهریور ۱۳۹۹/۷۱-۶۱

تعیین میزان باقیمانده مالاشیت‌گرین و لکومالاشیت‌گرین در ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان عرضه‌شده در سطح شهر سنندج

رضا رضایی[۱]، افشین ملکی[۲]، مهدی صفری[۳]، بهزاد شاهمرادی[۴]، علی جعفری[۵]، امید گیاهی[۶]، شیوا زندی[۷]، نیکو خالدیان[۸]، شیما شریفی[۹]، شادیه محمدی[۱۰]

۱. استادیار، مرکز تحقیقات بهداشت محیط، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۲۳۱۴-۶۶۹۷

۲. استاد، مرکز تحقیقات بهداشت محیط، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱- ۸۲۶۱-۸۷۱۷

۳. استادیار، مرکز تحقیقات بهداشت محیط، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۰۳۴۷-۹۲۸۳

۴.دانشیار، مرکز تحقیقات بهداشت محیط، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۲۱۲۰-۴۵۱۸

۵. استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۸۷۶۱-۶۳۲۳

۶. دانشیار، مرکز تحقیقات بهداشت محیط، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۹۲۵۶-۳۱۱۵

۷. کارشناس آزمایشگاه، مرکز تحقیقات بهداشت محیط، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۱-۰۰۰۰-۵۵۹۵-۸۳۴۹

۸. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۱۲۲۷-۴۴۰۷

۹. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۱-۹۴۲۷-۸۲۹۷

۱۰. استادیار، مرکز تحقیقات بهداشت محیط، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران (نویسنده مسئول)، تلفن: ۰۸۷-۳۳۶۶۴۶۵۸ ، پست الکترونیک: Shadiehmohammadi@yahoo.com ، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۰۷۱۱-۴۳۰۵

چکیده

زمینه و هدف: مالاشیت‌گرین یک ترکیب آلی رنگ‌زا در صنعت نساجی است و به‌صورت نادرست و غیرمجاز به‌عنوان یک داروی ضد میکروبی در آبزی‌پروری مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ماده دارای اثرات سوء موتاژنی و کارسینوژنی است. هدف از این مطالعه بررسی میزان باقیمانده مالاشیت‌گرین و لکومالاشیت‌گرین در ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان عرضه‌شده در سطح شهر سنندج می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه غلظت مالاشیت‌گرین(MG) و لکومالاشیت‌گرین (LMG) در بافت عضلانی ۹۰ نمونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) جمع‌آوری‌شده از بازار محلی در شهر سنندج در طول ۶ ماه در سال ۱۳۹۷ اندازه‌گیری شد. برای تعیین باقیمانده MG و LMG، از روش الایزا بر اساس معیارهای کمیسیون اروپا (EC / ۶۵۷/۲۰۰۲) استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که MG و LMG در تمامی ۹۰ نمونه ماهی وجود داشته به‌نحوی‌که در ۴۱ نمونه (۴۵/۶ درصد) حاوی باقیمانده MG در سطح ۱تا ۲ میکروگرم بر کیلوگرم، ۴۵ نمونه (۵۰ درصد) حاوی باقیمانده MG بالاتر از ۲ میکروگرم بر کیلوگرم بودند و تنها ۴ نمونه (۴/۴ درصد) حاوی MG کمتر از ۱ میکروگرم بر کیلوگرم بودند. علاوه بر این LMG در ۱۳ نمونه (۱۴/۴۵ درصد) بیشتر از ۲ میکروگرم برکیلوگرم، در ۶۷ نمونه (۷۴/۴۴ درصد) بین ۱ تا ۲ میکروگرم بر کیلوگرم و در ۱۰ نمونه دیگر (۱۱/۱۱ درصد) کمتر از ۱ میکروگرم بر کیلوگرم تعیین شد. همچنین، کمترین حد تشخیص (LOD) روش مورد استفاده برابر با ۰/۴۳ میکروگرم بر کیلوگرم تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق حاکی از آن است که همچنان در مزارع پرورش ماهی از مالاشیت‌گرین به‌صورت غیرمجاز استفاده می‌شود که این مسئله می‌تواند به‌عنوان خطری برای سلامت عمومی و تهدیدی برای محیط‌زیست مطرح باشد.

کلمات کلیدی: مالاشیت‌گرین، لکومالاشیت‌گرین، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، الایزا، سنندج

وصول مقاله۹۸/۱۰/۲۸ اصلاحیه نهایی: ۹۸/۱۲/۱۸ پذیرش: ۹۸/۱۲/۲۰

مقدمه

تکثیر و پرورش آبزیان، به‌ویژه ماهی‌های سرد آبی در اکثر نقاط ایران درحال‌توسعه بوده و ازجمله موانع و مشکلات اساسی در این زمینه، تلفات بالا بخصوص در دوران انکوباسیون تخم در مراکز تکثیر است. برخی از میکروارگانیسم‌ها همانند باکتری‌ها، قارچ‌ها و تک‌یاخته‌ها ازجمله عوامل بیماری‌زایی هستند که معمولاً در مراکز تکثیر و پرورش آبزیان باعث ایجاد تلفات و کاهش تولید می‌گردند. به همین دلیل نیاز به استعمال و مصرف دارو برای پرورش آبزیان همواره امری ضروری و غیرقابل‌اجتناب است(۲, ۱).

ازجمله داروهای پرمصرف در آبزی‌پروری مالاشیت‌گرین (MG; Malachite green) است. MG در اصل یک رنگ کاتیونی تری‌فنیل‌متان از فرآورده‌های رنگی آنیلین است که به‌عنوان عامل رنگ‌زا در صنعت نساجی استفاده می‌گردد(۳).

MG به دلیل خواص ویژه، از سال ۱۹۳۶ در صنعت شیلات و آبزی‌پروری مورداستفاده قرارگرفته؛ اما به دلیل کشف اثرات زیان‌بار آن، بیش از دو دهه است که استفاده از آن در بسیاری از نقاط دنیا ممنوع گردیده است. باوجود ممنوعیت، MG به دلیل هزینه پایین و کارایی بالا همچنان به‌صورت غیرمجاز در صنعت آبزی‌پروری برای کنترل انگل‌های خارجی و عفونت‌های قارچی در تخم ماهی، لارو ماهی و ماهی بالغ مورد استفاده قرار می‌گیرد. بیشترین مورد مصرف این ماده، مقابله با نوعی قارچ از خانواده *ساپرولگنیا* است(۴). قارچ *ساپرولگنیا* یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در پرورش ماهیان آب شیرین محسوب می‌شود که به‌صورت طبیعی در منابع تأمین‌کننده‌ی آب مراکز تکثیر ماهی وجود داشته و موجب تلفات بالا به‌ویژه در مرحله جنینی و لاروی می‌گردد(۵). تاکنون مطالعات متعددی در ارتباط با اثرات سوء بهداشتی استفاده از MG در ماهی انجام گردیده که نتایج آن‌ها نشان داده این ماده اثرات مخربی در کلیه‌ها، کبد و طحال ایجاد می‌نماید، بعلاوه از این ماده به‌عنوان یک ترکیب شیمیایی که احتمالاً اثرات موتاژنی (جهش‌زایی) و کارسینوژینی (سرطان‌زایی) نیز دارد، یاد شده است(۱). همچنین ثابت شده این ماده می‌تواند با ایجاد اختلالاتی نظیر شکستگی و به هم چسبیدن کروموزوم‌ها، به‌عنوان یک عامل تراتوژن (اثر منفی بر جنین) عمل نماید و لذا وجود آن در هر سطحی در ماهی می‌تواند اثرات سوء بهداشتی ایجاد نماید(۳). شاید عینی‌ترین اثر MG در آبزی‌پروری اثرات این ماده در مهار آنزیم‌های تنفسی میتوکندری باشد که به همین علت در برخی منابع از آن به‌عنوان سم تنفسی یادشده که می‌تواند باعث بروز اختلالات تنفسی و خفگی در ماهیان گردد. این ماده شیمیایی پس از جذب در بافت‌های بدن به لکو-مالاشیت‌گرین (LMG; Leucomalachite green) احیاء می‌شود که یک ماده چربی‌دوست بوده و دارای خاصیت ماندگاری طولانی به‌ویژه در عضلات است. عمده خواص سمی مالاشیت‌گرین را به این متابولیت احیاشده نسبت می‌دهند و به همین دلیل همواره نگرانی‌های انتقال آن به مصرف‌کنندگان وجود دارد(۷, ۶) و مشخص شده که تا ۹۰ درصد از MG جذب‌شده توسط بافت‌های عضلانی به‌صورت LMG انباشته می‌گردد. باقیمانده MG و LMG در سرم، کبد، کلیه، عضلات و سایر بافت‌های ماهی گزارش شده است(۸). با توجه به اثرات جهش‌زایی و سرطان‌زایی MG ، استفاده از این ماده در سراسر جهان هرگز به‌عنوان یک دارو در دامپزشکی در حیواناتی که به مصرف غذایی

انسان می‌رسند، تائید نمی‌گردد و حضور MG و LMG در مواد غذایی، حتی در سطوح پایین، منجر به رد محصول می‌شود(۹). بر اساس استاندارد کمیسیون اتحادیه اروپا (EC; European Commission)، سازمان جهانی بهداشت (WHO; World Health Organization) و سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO; Food Agriculture Organization) حداکثر میزان مجاز MG و LMG در بافت عضلانی انواع ماهی، ۲ میکروگرم بر کیلوگرم در نظر گرفته شده است(۱۰،۱۱).

در کشور ایران نیز استفاده از MG در صنعت آبزی‌پروری ممنوع اعلام شده و سازمان استاندارد ایران نیز همان ۲ میکروگرم بر کیلوگرم در عضلات ماهی را به‌عنوان حداکثر دوز مجاز اعلام نموده است و در پی ممنوعیت استفاده از MG و به‌منظور تأمین جایگزین مناسب برای آن تاکنون تحقیقات زیادی در ایران و جهان انجام شده و اثرات مفید استفاده از موادی چون آب‌اکسیژنه، آلویتا، سولفات مس، پرمنگنات پتاسیم، آویشن، فرمالین و غیره اثبات گردیده است(۹). یکی از جایگزین‌های شناخته‌شده برای MG، پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) است، به‌طوری‌که اداره نظارت بر غذا و داروی ایالات متحده آمریکا (FDA; Food and Drug Administration) آن را در زمره داروهای کم‌خطر دسته‌بندی نموده است(۱۲). از دیگر مواد جایگزین MG، آلوتنا است. آلوتنا (دی استات سدیم)، به‌عنوان یک ماده ضد قارچ و ضد باکتری مورد تائید مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، سازمان دامپزشکی کشور و اداره نظارت بر مواد غذایی، قرار گرفته است. مطالعات انجام‌شده نشان می‌دهد آلویتا با غلظت یک گرم در لیتر می‌تواند جایگزین مناسبی برای MG باشد(۱۳). نتایج مطالعات در این زمینه می‌تواند، در تدوین یک برنامه هدفمند در راستای آگاه ساختن فعالان این صنعت و تأکید بر آثار زیان‌بار MG بسیار مؤثر و مفید باشد، همچنین زمینه حذف این ماده را از فهرست داروهای مصرفی در مراکز پرورش ماهی ایجاد نماید و شرایط را برای جایگزینی داروهای بی‌خطر فراهم سازد. هدف از این مطالعه تعیین میزان MG و LMG در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان توزیع‌شده در بازارهای سنندج طی یک دوره ۶ ماهه در سال ۱۳۹۷ بوده است.

مواد و روش‌ها

روش‌های مختلفی برای تشخیص MG و LMG در مواد غذایی ازجمله فرآورده‌های دریایی وجود دارد که ازجمله آن‌ها روش کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC; High Pressure Liquid Chromatography)(۱۴)، اسپکتروفتومتری جرمی(۱۵)، آشکارسازهای فلوروسن(۱۶) و الایزا(۱۷) است. در این میان روش الایزا به دلیل سرعت بالا و قیمت مناسب، یکی از بهترین روش‌های پیشنهادی برای اندازه‌گیری MG و LMG باقیمانده در ماهیان پرورشی است(۱۸). در این مطالعه از روش الایزا و بر اساس معیارهای کمیسیون اروپا (EC/ ۶۵۷/۲۰۰۲) برای تشخیص MG و LMG استفاده گردید(۱۹) و محلول‌های استخراج و کیت الایزا مخصوص از شرکت طب سینا نماینده Europroxima هلند در ایران تهیه شد.

حجم نمونه و روش نمونه‌برداری

در این مطالعه تعداد نمونه‌های مورد آزمایش با توجه به مطالعات مشابه قبلی تعیین گردید(۱،۲۰). بر این اساس تعداد ۹۰ نمونه تصادفی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان عرضه‌شده در سطح شهر سنندج انتخاب شد که با دو بار تکرار انجام

آزمایش‌ها، درمجموع ۱۸۰ نمونه مورد آزمایش و ارزیابی قرار گرفت. جهت انتخاب نمونه‌ها، کل مراکز توزیع ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در سطح شهر سنندج شناسایی و از بین آن‌ها ۱۰ مرکز به‌صورت تصادفی انتخاب و از هر مرکز ۹ نمونه در طی ۶ ماه در سال ۱۳۹۷ برداشت گردید. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش‌ها در شرایط دمایی مناسب نگهداری شد.

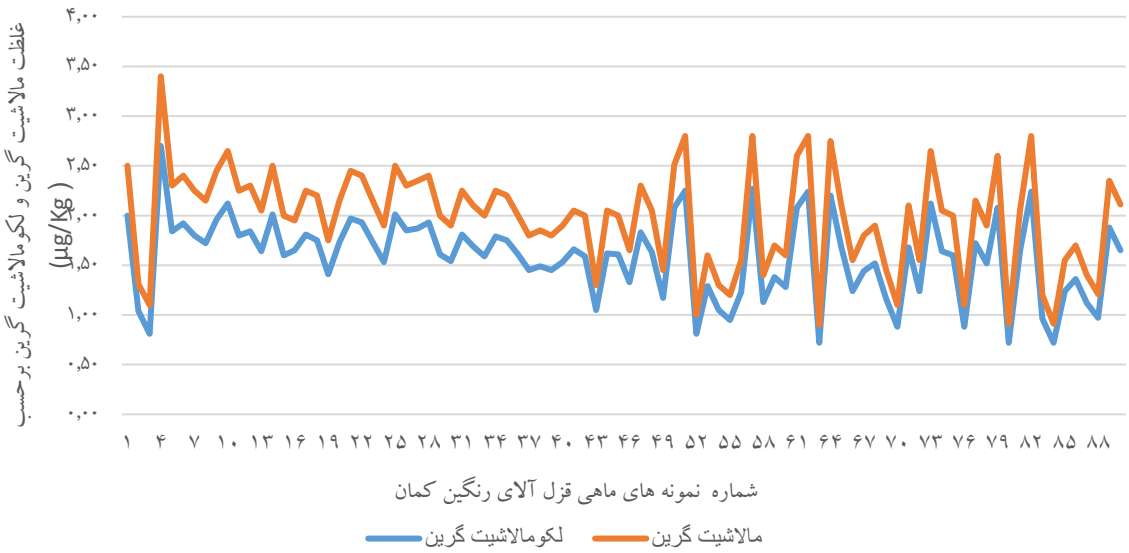
روش انجام آزمایش‌ها

در ابتدا نمونه‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان کاملاً شسته و پوست‌گیری شده و عضلات آن‌ها به‌صورت مجزا هموژن گردید. استخراج نمونه‌ها مطابق دستورالعمل کیت شرکت Europroxima هلند (5161MG/LMG) انجام گردید.

برای این منظور ۲ گرم از نمونه عضله ماهی، وزن و توسط دستگاه هموژنیزاتور، کاملاً هموژن گردید. سپس ۴ میلی‌لیتر محلول ۲ مولار نمک NaCl در بافر PBS به آن اضافه و به مدت یک دقیقه با ورتکس هم زده شد. در ادامه ۲ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۱ مولار به آن اضافه و یک دقیقه با ورتکس مخلوط گردید. نمونه‌های حاصل در دمای اتاق با دور ۲۰۰ RPM به مدت ۵دقیقه سانتریفوژ شد و سپس ۴ میلی‌لیتر محلول زیر لایه چربی را برداشته و ۵ میلی‌لیتر دی کلرومتان به آن اضافه شد. در ادامه کار محلول به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ RPM سانتریفوژ گردید. لایه بالایی این محلول را جدا نموده و به باقیمانده آن ۳ میلی‌لیتر دی کلرومتان اضافه و سپس در جریان ملایم نیتروژن در دمای ۵۰ درجه سلسیوس خشک گردید. در مرحله بعد به باقیمانده خشک‌شده ۲۵ میکرولیتر متانول با درجه خلوص ۱۰۰ درصد اضافه و ماده خشک‌شده در آن حل گردید. به مخلوط حاصل، ۵۷۵ میکرولیتر بافر رقیق‌سازی اضافه و محلول چند دقیقه ورتکس شد و درنهایت ۵۰ میکرولیتر از این محلول در اندازه‌گیری با کیت الایزا استفاده گردید.

غلظت MG و LMG نمونه‌ها با استفاده از دستگاه Multi-mode reader مدل Synergy-HTX در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر تعیین گردید.

کمترین حد تشخیصی(LOD; Limit of Detection) روش برابر با ۰/۴۳ میکروگرم بر کیلوگرم بود. حد تشخیص روش با تعیین میانگین ۲۰ نمونه شاهد که هر نمونه ۲ بار آنالیز و انحراف معیار داده‌ها اندازه‌گیری شد، مشخص گردید. در شکل ۱ توانایی تشخیص MG و LMG در روش الایزا ارائه گردیده است. بر این اساس حد تشخیصی روش به‌کاربرده شده در این مطالعه با استفاده از کیت الایزا در مورد وجود MG، ۱۰۰ درصد و برای متابولیت اصلی آن یعنی LMG ۷۰ درصد تعیین گردید(۱۱).



شکل ۱. توانایی تشخیص مالاشیت‌گرین و لکومالاشیت‌گرین به روش الایزا

روش تجزیه وتحلیل داده‌ها

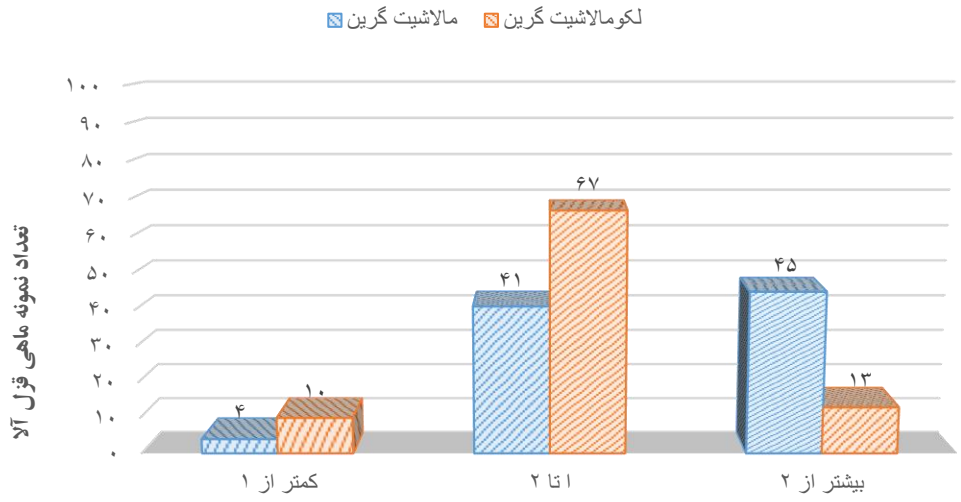
به‌منظور آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS v.21 و روش ضریب همبستگی پیرسون و تی یک نمونه استفاده شد.

یافته‌ها

مطابق یافته‌های حاصل از این مطالعه، جدول ۱ و شکل ۲ نشان داد که میانگین و انحراف معیار غلظت MG و LMG به ترتیب؛ ۱/۹۷±۰/۵۱ و ۱/۵۸±۰/۴۱ میکروگرم برکیلوگرم بود. همچنین مطابق این نتایج ۴۱ نمونه (۴۵/۶ درصد) حاوی باقیمانده MG در سطح ۲-۱ میکروگرم بر کیلوگرم، ۴۵ نمونه (۵۰ درصد) حاوی باقیمانده MG بالاتر از ۲ میکروگرم بر کیلوگرم بودند و تنها ۴ نمونه (۴/۴ درصد) حاوی MG کمتر از ۱ میکروگرم بر کیلوگرم بودند. علاوه بر این LMGدر ۱۳ نمونه (۱۴/۴۵ درصد) بیشتر از ۲ میکروگرم بر کیلوگرم، در ۶۷ نمونه (۷۴/۴۴ درصد) بین ۱ تا ۲ میکروگرم بر کیلوگرم و در ۱۰ نمونه دیگر (۱۱/۱۱ درصد) کمتر از ۱ میکروگرم بر کیلوگرم بوده است. بعلاوه مطابق جدول ۲، میانگین وزن ماهی‌ها ۳۴۲/۵۰±۵۶۰/۵۷ گرم بود و بین وزن ماهی‌ها و مقادیر غلظت MG و LMG رابطه معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در مقایسه مقادیر غلظت MG و LMG با حد استاندارد ۲ میکروگرم بر کیلوگرم، نتایج نشان داد غلظت MG تفاوت معنی‌داری با استاندارد نداشته (P>۰/۰۵) درحالی‌که با LMG به‌طور معنی‌داری تفاوت مشاهده شد و مقادیر به‌دست‌آمده کمتر از حد استاندارد بود (P<۰/۰۰۱).

جدول ۱. غلظت مالاشیت‌گرین و لکومالاشیت‌گرین در ۹۰ نمونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان توزیع‌شده در شهر سنندج

نوع آلاینده	توزیع نمونه‌های مثبت (µg/kg)	تعداد نمونه‌ها	درصد	میانگین (µg/kg)	بیشترین غلظت (µg/kg)	کمترین غلظت (µg/kg)	٪RSD
مالاشیت‌گرین	<۱	۴	۴/۴	۰/۹۰۵	۰/۹۱	۰/۹	۳/۱۹
	۱-۲	۴۱	۴۵/۶	۱/۶۲	۲	۱	۳/۸۰۴
	۲<	۴۵	۵۰	۲/۳۷۵	۳/۴	۲/۰۵	۳/۶۴۲
لکومالاشیت‌گرین	<۱	۱۰	۱۱/۱۱	۰/۸۵	۰/۹۷	۰/۷۲	۳/۴۳
	۱-۲	۶۷	۷۴/۴۴	۱/۵۸	۲	۱/۰۴	۳/۵۱
	۲<	۱۳	۱۴/۴۵	۲/۱۸	۲/۷	۲/۰۱	۳/۶



شکل ۲. غلظت مالاشیت‌گرین و لکومالاشیت‌گرین در ۹۰ نمونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان توزیع‌شده در شهر سنندج

جدول۲. مقایسه مقادیر غلظت مالاشیت‌گرین و لکومالاشیت‌گرین در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استاندارد

متغیر	میانگین (µg/kg)	انحراف معیار	استاندارد (µg/kg)	تفاوت میانگین	t	p
مالاشیت‌گرین	۱/۹۷	۰/۵۱	۲	-۰/۰۲۷	۰/۵۱۴	۰/۶۰۸
لکومالاشیت‌گرین	۱/۵۸	۰/۴۱	۲	-۰/۴۱۵	۹/۶۲	۰/۰۰۰

بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تمامی نمونه‌های آزمایش شده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، دارای MG در محدوده ۰/۹ تا ۳/۴ میکروگرم بر کیلوگرم بوده و ۵۰ درصد از این نمونه‌ها دارای مقادیر بیشتر از حد مجاز تعیین‌شده (۲ میکروگرم برکیلوگرم) بودند. نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج اکثر مطالعاتی که در این زمینه در سایر نقاط ایران انجام شده همخوانی دارد و حاکی از آن است که پرورش‌دهندگان ماهی به دلایلی ازجمله قیمت ارزان، مؤثر و در دسترس بودن، همچنان از MG در بحث کنترل بیماری‌های ماهی‌ها در مزارع پرورشی استفاده می‌نمایند(۱,۲۰). با این وجود میزان حداکثر MG در مطالعه حاضر (۳/۴ میکروگرم بر کیلوگرم) در مقایسه با بسیاری مطالعات انجام شده داخلی و خارجی(۱,۲۱,۲۲) و در بازه‌ی زمانی قبل از این پژوهش به مراتب کمتر می‌باشد که این امر نشان از ملزم کردن مراکز پرورش ماهی به رعایت استانداردها و پایش دوره‌ای سازمان-های ذی ربط می‌باشد، البته در مقایسه با نتایج این مطالعه و مطالعات مشابه در برخی مطالعات، سختگیری و الزامات قانونی بسیار بیشتر بوده و میانگین وجود MG بسیار کمتر از این مقادیر گزارش شده است(۲۳). در مطالعه Adel و همکاران (۲۰۱۷) مشخص شد که ۷۰ نمونه از ۱۲۰ نمونه (۵۸/۴ درصد) ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان که از بازارهای ماهی ایران جمع‌آوری شدند، حاوی باقیمانده بیش از حد استاندارد MG بودند(۲۴). در مطالعه Motafeghi و همکاران (۲۰۱۸) هم از ماهی‌های با میانگین وزنی ۰/۵ کیلوگرمی استفاده شد که بین وزن ماهی‌ها و مقادیر غلظت MG و LMG رابطه معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵) و این در مقایسه با مطالعاتی که از سایر وزن‌ها نیز استفاده کرده بودند(۲۵) باز دارای تفاوت معنی داری با غلظت MG نبود، بنابراین وزن نمی‌تواند عامل تعیین کننده‌ای از نظر غلظت MG در گوشت ماهی باشد. در نتایج بدست آمده از این مطالعه میانگین میزان MG بیشتر از LMG گزارش گردید که دلیل آن به فرآیند متابولیکی حضور این آلاینده در بدن ماهی مربوط می‌شود، بطوریکه مشخص شده که تا ۹۰ درصد از MG جذب‌شده توسط بافت‌های عضلانی به‌صورت LMG انباشته می‌گردد(۸) البته عوامل مختلفی می‌تواند بر تجمع این ماده در بافت تبدیل آن به LMG تاثیرگذار باشد. از جمله این عوامل می‌توان به غلظت MG در آب، مدت زمان در معرض قرارگیری ماهی با آن، دما و pH آب، مواد آلی و یون‌های موجود در آب و یون‌ها اشاره کرد(۲۷-۲۵).

در مطالعه حاضر نوسانات مقادیر MG و LMG پایین بوده و مهمترین علت آن می‌تواند برداشت نمونه‌ها از نقاط متمرکز باشد بطوریکه در مطالعاتی که تفاوت در نقاط نمونه‌برداری

وجود داشت اختلافات مقادیر اندازه‌گیری بیشتر بود(۲۵). این نتیجه مرتبط با کیفیت متفاوت آب مراکز پرورش ماهی می‌باشد، زیرا اگر شرایط برای رشد قارچ‌ها بخصوص قارچ *ساپرولگنیا* زیاد باشد استفاده از MG نیز بیشتر خواهد شد. یعنی بطور کلی در نمونه‌هایی که میزان MG بیشتر بوده بیانگر وجود آلودگی قارچی بیشتر می‌باشد. در نتایج این پژوهش نشان داده شد در بیش از ۵۰ درصد نمونه‌های مورد بررسی غلظت MG اندازه‌گیری شده بیش از مقادیر استاندارد (۲ میکروگرم بر کیلوگرم) می‌باشد یعنی با وجود ممنوعیت استفاده از آن توسط سازمان‌های مربوطه، بعلت ارزان بودن وخواص قارچ‌کشی هنوز استفاده زیادی دارد که با ارائه جایگزینی مناسب این روند قابل حل می‌باشد؛ تاکنون تلاش‌های زیادی هم در این زمینه انجام شده بطوریکه Keykha و همکاران (۲۰۱۵) از سماق(۲۸) Sari و همکاران (۲۰۱۰) از آب اکسیژنه و آویشن(۲۹) بعنوان جایگزین MG استفاده کرده‌اند، هرچند که در این مطالعه نیز مقایسه مطالعات انجام شده حاکی از آن است که در سال‌های اخیر استفاده از MG در مزارع پرورشی ماهی کاهش یافته است، اما باید حذف کامل و جایگزینی این ماده با مواد کم خطرتر مورد توجه باشد و برای این منظور پایش‌های منظم و برنامه‌های نظارتی بیشتری بر مزارع پرورشی آبزیان انجام شود.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه، باقیمانده MG و LMG را در ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان توزیع‌شده در شهر سنندج نشان داد و اثبات نمود که علی‌رغم ممنوعیت این ماده، متأسفانه همچنان در مزارع پرورش ماهی ایران استفاده می‌گردد. MG و متابولیت‌های آن علاوه بر اثرات ژنوتوکسیک و سرطان‌زایی برای انسان، می‌توانند به‌عنوان خطر و تهدیدی برای محیط‌زیست مطرح باشند، لذا ضروری است برنامه‌های نظارتی سخت‌گیرانه‌تری بر مزارع پرورش ماهی صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر در قالب طرح پژوهشی مصوب در مرکز تحقیقات بهداشت محیط دانشگاه علوم پزشکی کردستان در مورخ ۱۳۹۵/۱۲/۰۲ به شماره ۱۳۹۵/۳۱۵ و کد ۱۴/۷۲۷۹۳ انجام شده است. کلیه نویسندگان این مقاله از حمایت‌های مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کردستان کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

1.Fallah AA, Barani A. Determination of malachite green residues in farmed rainbow trout in Iran. J. Food Cont. 2014;40:100-5.
2. Jennings S, Stentiford G , Leocadio A, Jeffery KR , Metcalfe JD , Katsiadaki I , et al. Aquatic food security: insights into challenges and solutions from an analysis of interactions between fisheries, aquaculture, food safety, human health, fish and human welfare, economy and environment. FISH FISH.2016; 17(1): 893–938
3.Rohani Sh KM, Shokri A, Ebrahimzadeh Mousavi H, Soltani A, , Rostamibeshman M. A study of the effect of some Iranian herbal essences against *saprolegin* Spp. Mycophathologia. 2009;25(3).62-9.
4.Salehi M, Soltani M, Hosseini SP. Effects of antifungal activity of Daenensis thyme (*Thymus daenensis*) and Mentha (*Mentha longifolia*) essential oils on rainbow trout) eggs hatchability. IJAAH. 2016; 2(2) 97-107
5.Shin S, Kulatunga D, Dananjaya SH , Nikapitiya C, Lee J, Zoysa M. Saprolegnia parasitica Isolated from Rainbow Trout in Korea: Characterization, Anti-Saprolegnia Activity
and Host Pathogen Interaction in Zebrafish Disease Model. Mycobiology. 2017 ; 45(4): 297-311
6.Srivastava S, Ranjana S, Roy D. Toxicological effects of malachite green. AQUAT TOXICOL. 2004; 66(3): 319-329.
7.Andersen WC, Turnipseed SB, Roybal JE. Quantitative and confirmatory analyses of malachite green and leucomalachite green residues in fish and shrimp. J. Agric. Food Chem. 2006;54(13):4517-23.
8.Srivastava Sh SR, Roy D,. Toxicological effects of malachite green. AQUAT TOXICOL. 2004;66(3):319–29.
9.Šafařík, I, Šafaříková, M. Detection of low concentrations of malachite green and crystal violet.Water Res. 2002;36(1).196-200.
10.VRC. Veterinary Residues Committee's annual report on surveillance for
veterinary residues in food in UK for 2001 to 2011. Available from http://www.vmd.defra.gov.uk/VRC/reports/annual.html
11.Singha G, Koernera T, Gelinasa J , Abbotta M, Bradya B , Huetb A and etal. Design and characterization of a direct ELISA for the detection and quantification of leucomalachite green. J Food Addit Contam. 2011; 28(6): 731–739
12.EPA. Rules and Regulations Hydrogen Peroxide; Exemption from the Requirement of a Tolerance, 2000, 65(23).
13.Shykhi mqdm L EM, Hosseini E,. Aluyta substitute malachite green in hatcheries and cold water fish .Environ Sci. 2004;53(2):30-44.
14.Nebot C, Iglesias A, Barreiro R, Miranda JM, Vázquez B, Franco CM, et al. A simple and rapid method for the identification and quantification of malachite green and its metabolite in hake by HPLC–MS/MS.Food Cont. 2013;(1)31:102-7.
15.Van de Riet JM, Murphy CJ, Pearce JN, Potter RA, Burns BGJJoAI. Determination of malachite green and leucomalachite green in a variety of aquacultured products by liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection. J. AOAC Int. 2005;88(3):744-9.
16.Mitrowska K, Posyniak A, Zmudzki JJJoCA. Determination of malachite green and leucomalachite green in carp muscle by liquid chromatography with visible and fluorescence detection. n. J. Chromatogr. A. 2005;1089(1-2):187-92.
17.Xing W, He L, Yang H, Sun C, Li D, Yang X, et al. Development of a sensitive and group-specific polyclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of malachite green and leucomalachite green in water and fish samples. J. Sci. Food Agric. 2009;89(13):2165-73.
18.Singh G, Koerner T ,Gelinas J-M, Abbott M, Brady B, Huet A-C, et al. Design and characterization of a direct ELISA for the detection and quantification of leucomalachite green. J Food Addit Contam. 2011;28(6):731-9.

19.European Communities. Commission Decision 2004/25/EC, Official. Amending Decision 2002/657/EC as Regards the Setting of Minimum Required Performance Limits (MRPLs) for Certain Residues in Food of Animal Origin. J. EC. 2004, L6, 38–39.
20.Barani A, Tajik H. JIjofp. Malachite green residue in farmed fish in north-west part of Iran. Int. J. Food Prop. 2017; 20(1): 580-585.
21. Tripathi M, Khanna SK, Das MJFC. Surveillance on use of synthetic colours in eatables vis a vis Prevention of Food Adulteration Act of India. J. Food Cont. 2007;18(3):211-19.
22. Fu WS, Zheng KC, Qiu WQ, Wang QL, Fang QM. Investigation and traceability of residual malachite green and its metabolite in freshwater fish. J. Food Saf Food Qual. 2013;11(4):176-182.
23. Bilandzic N, Varenina IK, Kollanovic BS. Oraic D. Zrncic S. Malachite green residues in farmed fish in Croatia. J. Food Cont. 2012; 26:393–396.
24. Adel M, Dadar M, Oliveri Conti G. Antibiotics and malachite green residues in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from the Iranian markets: a risk assessment. Int. J. Food Prop. 2017;20(2):402-408.
25. Motafeghi F, Javadi I, Allameh S K. Investigation of Malachite green existence in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common Carp (*Cyprinus carpio*) flesh in the area of North and South of Iran, Haraz and Shahr e Kord. isfj. 2018; 27 (1) :131-137.
26. Sudova E, Machova J, Svobodova Z, Vesely T. Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: a review. J.Vet. Med 2007;52:527–53.
27. Safari S, Hashemian F, Rastegar H, Qomi M. Exploring malachite green residues in farmed rainbow trout muscle tissue using high performance liquid chromatography. J. Med. Sci. 2018; 28 (4) :290-296.
28. Keykha S, Gharaei A, Mirdar Harijani j, Ghaffari M, Rahdari A. Antifungal effects of metalonic sumac (rhus coriaria l.) essential oil on schizothorax zarudnyi eggs. s. Vet. J. 2015; 70 (2): 131-7
29. Sari A, Akhondzadeh Basti A, Rokni N, Ebrahimzadeh Mousavi H, Soltani M, Gandomi H, et al . Effect of Zataria multiflora Boiss. Essential oil on the Behavior of Vibrio parahaemolyticus in Salted Fish. J. Med. Plants. 2010; 4 (36) :136-144