

תוכן העניינים

2	דף פתיחה
3	תקציר
4	מבוא
5	פרוט הניסויים והתוצאות העיקריות
11	דיון הכולל מסקנות והשלכותיהן
13	סיכום עם שאלות מנחות
14	רשימת ספרות

דו"ח מסכם לתכנית מחקר מספר 356-0559-09

ניקוי ומניעת הצטברות מתכות כבדות בדגי מאכל

Prevention and clean up of heavy metal contaminations from edible fish

מוגש לקרן המדען הראשי של משרד החקלאות ופיתוח הכפר

ע"י

דר' אבנר כנעני - המכון לחקר בע"ח, מנהל המחקר החקלאי
פרופ' שנאן הרפז - המכון לחקר בע"ח, מנהל המחקר החקלאי
דר' שמעון בראל - המכון הוטרינרי קמרון, השרותים הוטרינריים
דר' דניז זילברמן - המכון הוטרינרי קמרון, השרותים הוטרינריים

Avner Cnaani, Institute of Animal Science, Agricultural Research Organization. E-Mail: avnerc@agri.gov.il

Sheenan Harpaz, Institute of Animal Science, Agricultural Research Organization. E-Mail: harpaz@agri.gov.il

Shimon Barel, Kimron Veterinary Institute. E-Mail: shimonba@moag.gov.il

Deniz Zilberman, Kimron Veterinary Institute. E-Mail: zide80@gmail.com

פברואר 2013

שבט תשע"ג

**הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים
הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא**

חתימת החוקר: _____ אבנר כנעני

תקציר

מחקר זה נעשה כבדיקת התכנות לשימוש בחומצה היומית כתוסף מזון על מנת לנקות זיהומי מתכות כבדות מגוף הדג, זאת כבחינה ראשונית של דרכי התמודדות עם בעיות עתידיות. בשלב הראשון נערך אפיון של הצטברות מתכות כבדות ברקמות שונות, כאשר מקורן הוא במזון מזוהם. נמצא שהמתכת העיקרית המצטברת בכבד היא קדמיום, בשומן נמצאו כמויות דומות של קדמיום ועופרת, וברקמות השריר והעצם הייתה הצטברות גבוהה של עופרת. בשלב השני נבחנה היכולת של תוספת חומצה היומית למזון לנקות את זיהום המתכות הכבדות. נמצא שחומצה היומית יעילה בעיקר בניקוי של קדמיום, במידה פחותה בניקוי כספית, והיא חסרת השפעה על ריכוזי העופרת. כמו כן נמצא שניקוי המתכות הכבדות יעיל יותר ברקמות הכבד והשומן, ופחות בעצם ובשריר.

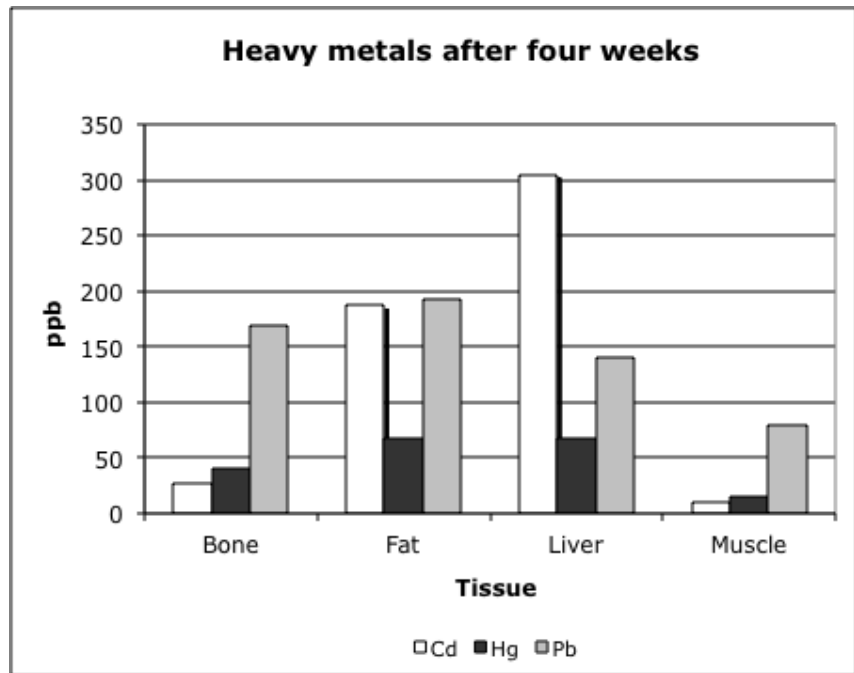
בהצטברות של כספית, ירידה של 23% בהצטברות אבץ וירידה של 20% בהצטברות קדמיום, בעוברי הדגים (Hammock et al. 2003). בעבודה שבחנה את ההשפעה של חומר אורגני מומס במים על צבירת קדמיום בעוברי דג זברה (*Danio rerio*) נמצאה ירידה של 52-60% בריכוז המתכת בגוף העובר לעומת הביקורת (Burnison et al. 2006). עד כה לא נעשתה ולא נבדקה כילאציה של מתכות כבדות בדגים מזוהמים על ידי טיפול תזונתי, ומחקר זה הוגדר כבחינת התכנות של אפשרות זו.

פרוט הניסויים והתוצאות העיקריות

בשלב הראשון היה צורך לקבל תמונה ברורה של הזיהום המצטבר בגוף הדג כאשר מקור הזיהום הוא תזונתי, ולא בספיחה מהסביבה כפי שנעשה במרבית העבודות עד כה. על מנת להעריך את קצב צבירת המתכות הכבדות בגוף הדג ואת פיזור הזיהום בין הרקמות השונות הובאו דגי קרפיון למערכת המדגה במכון וולקני ואוכלסו במערכת מיכלים המחברים לפילטר משותף. דגים שעברו טיפול הואכלו במזון קרפיונים מסחרי (צמח תערובות) שלו הוספו כספית, עופרת, קדמיום וארסן במינון של 10 מ"ג מכל מתכת לק"ג מזון, ודגי ביקורת הואכלו במזון המסחרי ללא המתכות הכבדות. דגים נדגמו עם תחילת הניסוי ולאחר מכן מידי מידי שבוע, לאורך תקופה של חודש, ונעשתה אנליזה למדידת רמות של ארבעת המתכות ברקמות כבד, שריר, שומן ועצם.

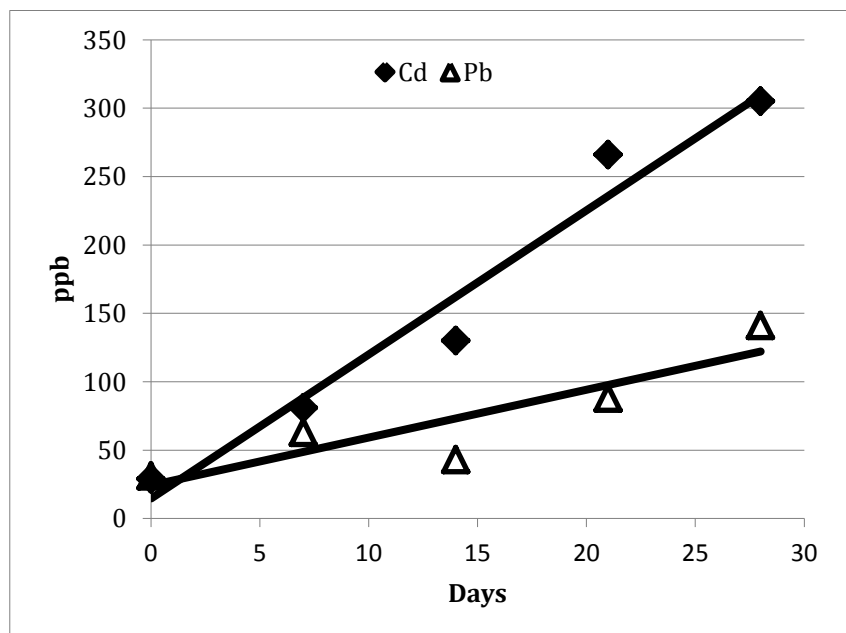
התוצאות הראו דפוס הצטברות שונה של כל אחת מהמתכות, הן בקצב ההצטברות והן בשונות בין הרקמות הנבדקות. ההצטברות הרבה ביותר של מתכות נמצאה בכבד, לאחר מכן ברקמת שומן, בעצם, ולבסוף בשריר. אל אף שהדגים הואכלו בכמויות שוות של המתכות השונות, ההצטברות הרבה ביותר הייתה של קדמיום ועופרת, לאחר מכן כספית, ולבסוף ארסן שרמתו בכל הרקמות הייתה מזערית ולא שונה מקבוצת הביקורת. המתכת העיקרית שהצטברה בכבד הייתה קדמיום, ולאחריה עופרת וכספית. ברקמת השומן קדמיום ועופרת הן הדומיננטיות וכספית הצטברה המידה פחותה. ברקמות עצם ושריר העופרת היא המתכת העיקרית שהצטברה, כאשר קדמיום וכספית היו ברמות דומות (גרף 1).

גרף 1. ריכוז המתכות הכבדות שהצטברו ברקמות השונות לאחר חודש של הזנה במזון עם תוספת של מתכות כבדות, כל אחת בריכוז של 10 מ"ג מתכת/לק"ג מזון דגים.

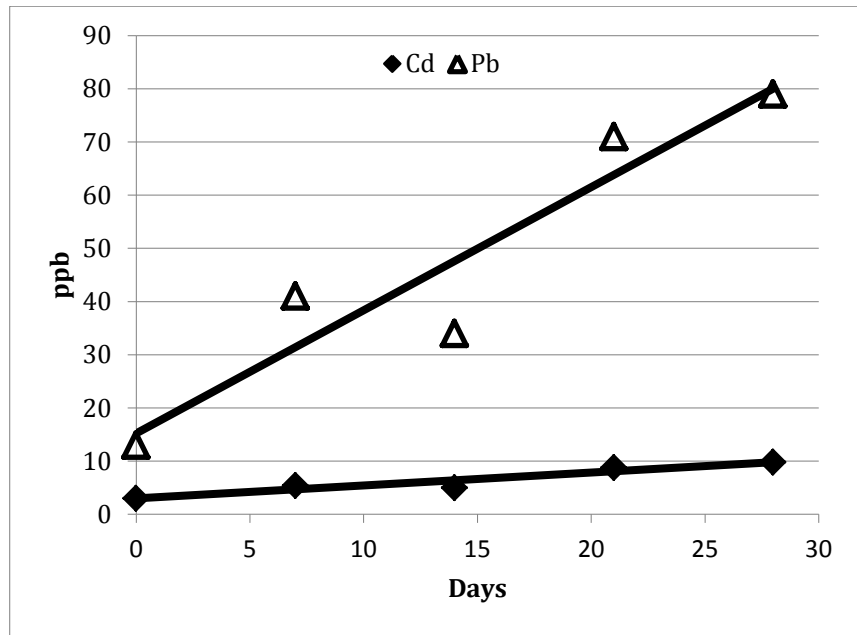


כאשר נבחן קצב הצטברות של המתכות הכבדות ברקמות השונות נמצא שברקמות הכבד, השריר והעצם העלייה בריכוזי קדמיום ועופרת הייתה לינארית (גרפים 2-4), בעוד שברקמת השומן במתכות אלה, וברמות הכספית בכל הרקמות, היו שונות גדולות מאד ולא ניתן היה לקבל תמונה אמינה של קצב הצטברות המתכות. כמו שצפוי היה מבחינת הריכוזים הסופיים של המתכות הכבדות, קצב הצטברות של קדמיום היה גבוה משל עופרת בכבד (גרף 2), בעוד שקצב הצטברות של העופרת היה גבוה יותר בשריר ובעצם (גרפים 2,3).

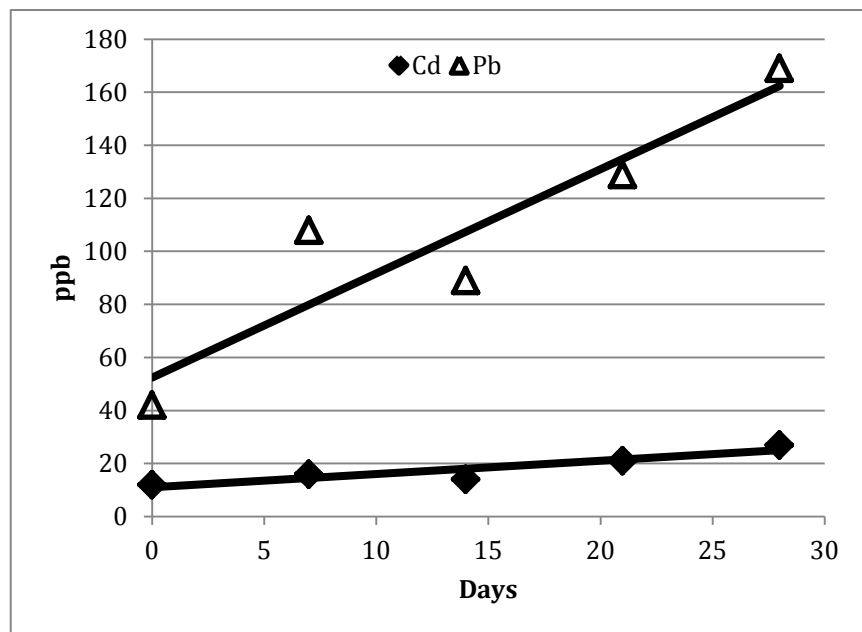
גרף 2. הצטברות קדמיום ועופרת בכבד.



גרף 3. הצטברות קדמיום ועופרת בשריר.



גרף 4. הצטברות קדמיום ועופרת בעצם.



למרות שנצפתה הצטברות של המתכות הכבדות בכל הרקמות, הרמות שהתקבלו לאחר חודש בפרוטוקול ההזנה שבו השתמשנו היו ברוב המקרים נמוכות מערך הסף שנקבע על ידי האיחוד האירופאי כמסוכן לשימוש (טבלה 1). כאשר רק רמות הקדמיום בכבד ובשומן היו מעבר למותר למאכל אדם.

טבלה 1. ערכי סף לריכוז מתכות כבדות בדגי מאכל כפי שנקבע על ידי האיחוד האירופאי.

מתכת	ערך סף (MRL)
קדמיום	50 ppb
עופרת	300 ppb
כספית	500 ppb

מאחר ומטרת העבודה הייתה להעריך את היכולת לנקות מתכות כבדות מדגים המזוהמים ברמה שאינה מותרת לשיווק ומאכל, הועלה ריכוז המתכות הכבדות במזון פי 10, ומשך ההזנה הושאר על ארבעה שבועות. התוצאות שהתקבלו הראו שעם העלייה בריכוז המתכות הכבדות התקבלה עלייה גם בריכוז הקדמיום והכספית ברקמות השונות. עם זאת רמות העופרת בכבד, בשומן ובשריר היו דווקא נמוכות יותר. אין לנו הסבר לתופעה זו, אך יש לציין שההשוואה אינה בין דגים שהיו באותו ניסוי, אלא בין דגים משני ניסויים שונים שנערכו בהפרש של כמה חודשים, ויכול להיות שהיו גורמים שונים במערך הניסוי שהשפיעו על ספיגת העופרת. ניתן לראות שהעלייה הרבה ביותר הייתה בריכוזי הקדמיום והכספית בכבד, עלייה שהייתה באופן יחסי דומה לעלייה בריכוז המתכות במזון, בעוד שבשאר הרקמות העליות בריכוזים היו מתונות יותר (טבלה 2).

טבלה 2. השוואה בין רמות המתכות הכבדות (ביחידות ppb) שהצטברו ברקמות השונות בשני ניסויים, האחד בו הייתה תוספת של מתכות כבדות ברמה של 10 מ"ג מכל מתכת לק"ג מזון, והשני בו הייתה תוספת של מתכות כבדות ברמה של 100 מ"ג מכל מתכת לק"ג מזון.

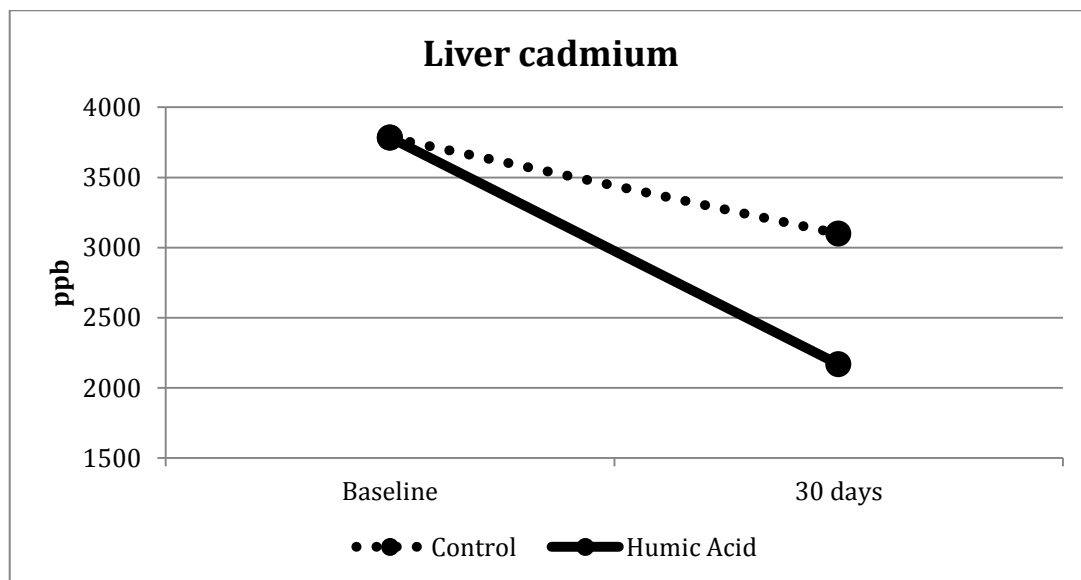
ריכוז מתכות במזון	10 מ"ג/ק"ג	100 מ"ג/ק"ג	10 מ"ג/ק"ג	100 מ"ג/ק"ג	10 מ"ג/ק"ג	100 מ"ג/ק"ג	10 מ"ג/ק"ג
	כבד		שומן		שריר		עצם
קדמיום	305	3782	187	474	10	24	57
עופרת	141	66	192	62	79	27	236
כספית	67	901	67	251	15	100	161

לאחר שהדגים הוזנו במזון שבו הייתה תוספת של מתכות כבדות ברמה של 100 מ"ג מכל מתכת לק"ג מזון, נלקח מדגם על מנת לקבוע רמת זיהום התחלתית, ולאחר מכן מחצית מהדגים קיבלו מזון עם תוספת של 5% חומצה היומית (Humic acid sodium salt, סיגמא אולדריץ', H16752) מחצית מהדגים קיבלו מזון ביקורת ללא תוספים (מזון קרפיון מסחרי מחברת צמח תערובות). לאחר חודש הוקרבו כל הדגים ונלקחו דוגמאות רקמה, למדידת רמת המתכות הכבדות בארבעת הרקמות שנבדקו בניסוי הראשוני.

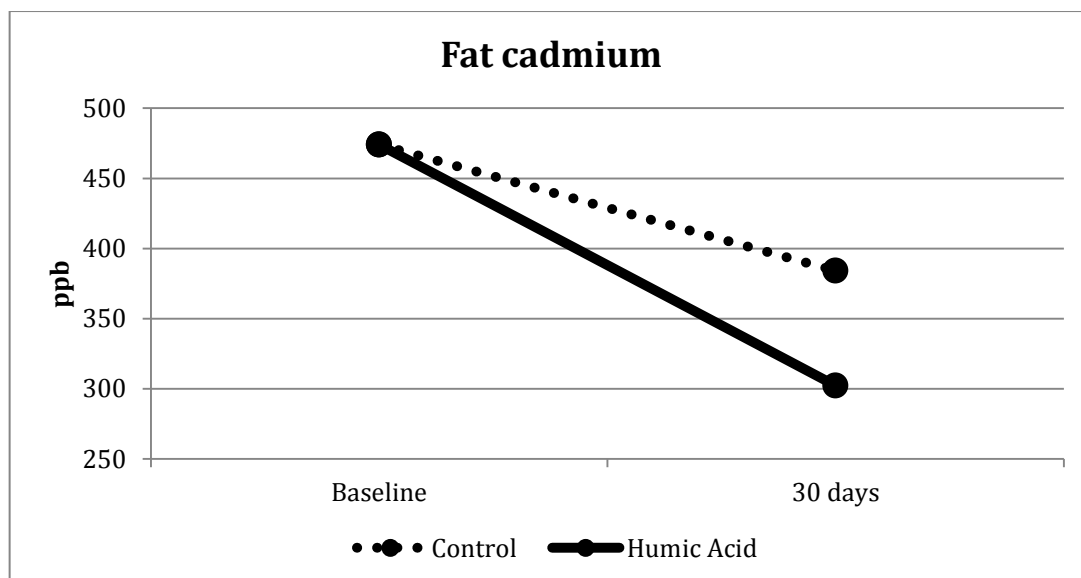
באנליזה של הדוגמאות מניסוי זה נמצא שעם הפסקת החשיפה למקור הזיהום ישנה ירידה ברמת המתכות הכבדות ברקמות השונות. בהשוואה בין הדגים שקיבלו תוספת של חומצה היומית

למזון ודגים מקבוצת הביקורת נמצא שבכל הרקמות ובכל הירידה בריכוזים הייתה גבוהה יותר בדגים שקיבלו תוספת של חומצה היומית למזון. מבין שלושת המתכות, האפקט החזק ביותר היה בריכוזי הקדמיום. הירידה בריכוזי הקדמיום הייתה בשיעור של 40-70%, בתלות ברקמה. בכל הרקמות קצב הניקוי המתכות היה כפול ממה שנצפה בקבוצת הביקורת (גרפים 5-7).

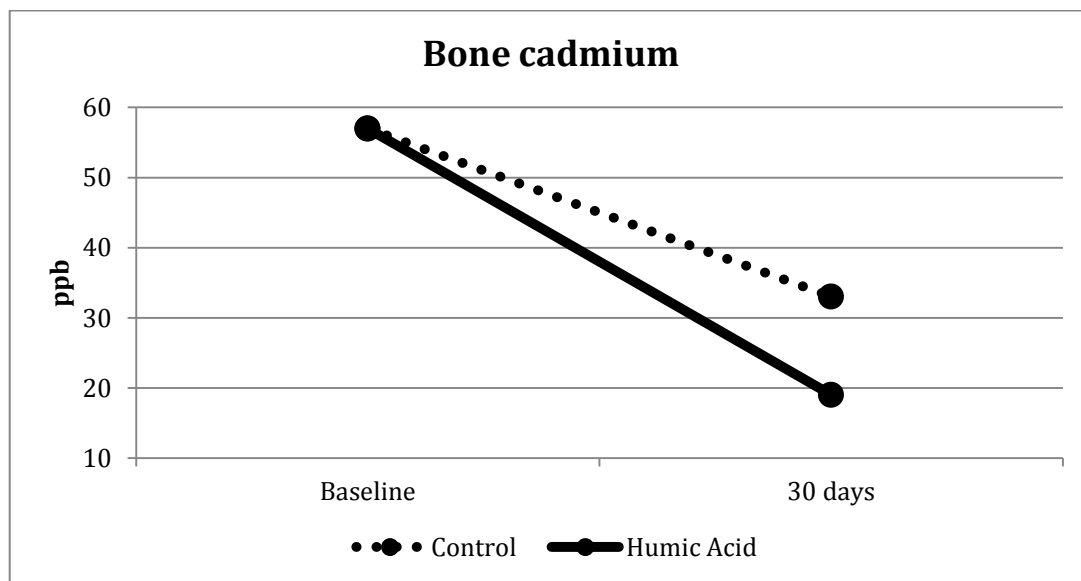
גרף 5. הירידה בריכוז הקדמיום בכבד לאחר 30 יום של טיפול במזון עם תוספת חומצה היומית לעומת קבוצת ביקורת שקיבלה מזון רגיל (n=12).



גרף 6. הירידה בריכוז הקדמיום בשומן לאחר 30 יום של טיפול במזון עם תוספת חומצה היומית לעומת קבוצת ביקורת שקיבלה מזון רגיל (n=12).

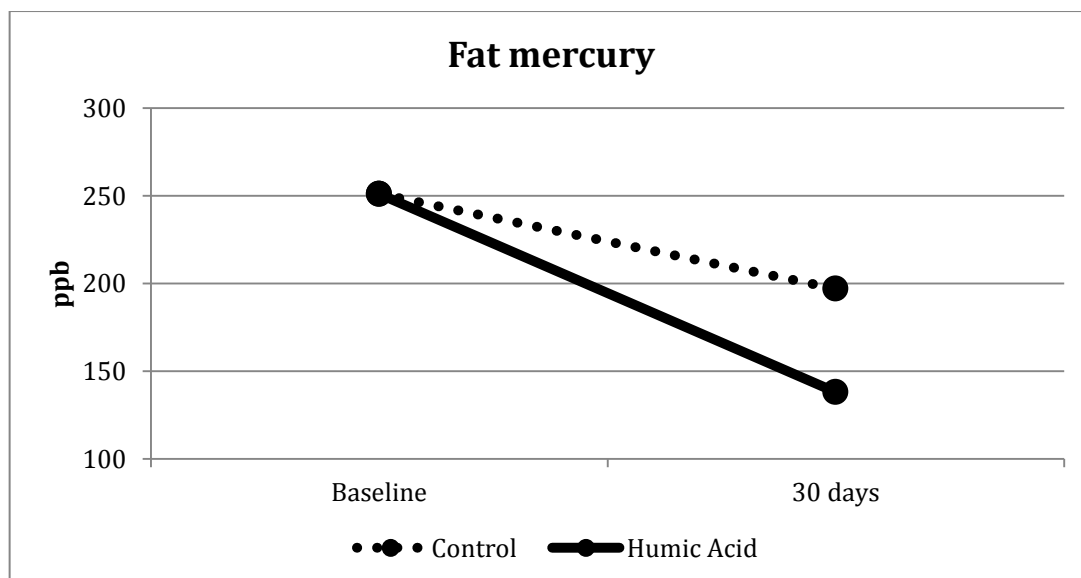


גרף 7. הירידה בריכוז הקדמיום בעצם לאחר 30 יום של טיפול במזון עם תוספת חומצה היומית לעומת קבוצת ביקורת שקיבלה מזון רגיל (n=12).



באנליזה של ריכוזי הכספית בטיפולים השונים התקבלו תוצאות דומות, הן בקצב ניקוי הקדמיום והן בשיפור לעומת קבוצת הביקורת (גרף 8). עם זאת, השונות בתוך הקבוצות הייתה גבוהה יותר וההבדלים שנצפו בין קבוצות הטיפול וקבוצות הביקורת לא הגיעו לסף המובהקות הסטטיסטית.

גרף 8. הירידה בריכוז הכספית בשומן לאחר 30 יום של טיפול במזון עם תוספת חומצה היומית לעומת קבוצת ביקורת שקיבלה מזון רגיל (n=12).



דין הכולל מסקנות והשלכותיהן

תוצאות השלב הראשון הראו שזיהום מתכות כבדות במזון הדגים גורם לספיגת המזהמים בגוף הדג ולהצטברותם ברקמות השונות. זוהי עבודה ראשונה בה מוצגת ההתפזרות השונה והייחודית לכל מתכת כבדה בין הרקמות השונות בגוף הדג. הרקמות הנאכלות על ידי הצרכנים הן בעיקר שריר ושומן, ולפחות מבין המתכות שנבדקו בעבודה זו נמצא שלפחות ברמת וצורת החשיפה שבהן השתמשו בניסוי זה, עופרת היא היחידה שמצטברת בשיעורים משמעותיים ברקמת שריר. ברקמת שומן נמצאו ריכוזים גבוהים יותר של מתכות כבדות בהשוואה לשריר, כשבנוסף לעופרת נמצאה גם רמה גבוהה של קדמיום. כאשר העלנו את ריכוז המתכות הכבדות במזון הדגים, התקבלו גם רמות משמעותיות של כספית בשריר ובשומן, אם כי עדין מתחת לסף המותר למאכל. תוצאות שלב זה צריכות להוות סמן לקביעת ריכוזי מתכות כבדות במזון בעת תכנון ניסויים עתידיים.

התוצאות שהתקבלו בעקבות התוספת של חומצה היומית למזון מהוות אינדיקציה ראשונית לאפשרות של טיפול בזיהומי מתכות כבדות על ידי שימוש בתוסף מזון של חומצה היומית ככילאטור. למעשה, מחקר זה הוגדר כבדיקת התכנות, מאחר וטיפול כזה טרם נוסה בדגים. תוצאות העבודה, שהראו ירידה של 40-70% ברמות של קדמיום, כספית ועופרת, מראות אמנם פוטנציאל בשימוש בחומצה היומית, אך יש צורך בייעול התהליך מאחר ובמקרים רבים ירידה כזו אינה מספקת על מנת להגיע לרמות המותרות למאכל. בנוסף, יש צורך לפתח את הטיפול, הן מבחינת סוג ומינון החומרים והן מבחינת משך ההזנה, על מנת שיתאים וישתלב בממשק גידול הדגים. מעניין לציין ששיעור הירידה ברמת המתכות הכבדות כתוצאה מתוספת של חומצה היומית שהתקבל בעבודה זו היה באותו סדר גודל למה שנצפה בעבודות קודמות שנעשו בדגים, בהן נבחן טיפול חיצוני (השרייה במים עם חומצה היומית). בביצי סלמון התקבלה ירידה של 44% בהצטברות של כספית, ו 20% בהצטברות קדמיום בעקבות הטיפול בחומצה היומית (Hammock et al. 2003), ובעוברי דג זברה התקבלה ירידה של 52-60% בריכוז הקדמיום (Burnison et al. 2006).

חומצה היומית זהו שם כולל למגוון רחב של חומרים, כל אחד מהם בעל תכונות ייחודיות, אפניויות שונה למגוון חומרים, ורמות מחיר שונות. מאחר והמחקר בוצע בתנאי מעבדה, בהיקף של כמה עשרות דגים וכמה קילוגרמים של מזון, נעשה שימוש בחומר בדרגת ניקיון מעבדתית שנרכש מחברת סיגמא. יש צורך בבחינת מגוון של חומצות היומיות שונות, על מנת להגיע לאופטימיזציה הן מבחינת היכולת והיעילות של הכילאציה והן מבחינת תוספת העלות למזון והערכת הכדאיות הכלכלית של הטיפול.

תופעה מעניינת שהתקבלה בעבודה היא העובדה שהייתה ירידה משמעותית בריכוזי המתכות הכבדות גם בקבוצות הביקורת, שלא קיבלו תוספת חומצה היומית במזון. הסבר אפשרי לתופעה זו יכול להיות מהשפעה של חומצה היומית הנמצאת במי מערכת הגידול. מיכלי הדגים שקיבלו טיפול ומיכלי הביקורת היו מחוברים לפילטר משותף, במערכת מסוחררת, וחלקו את אותם המים. קיימת אפשרות שחומצה היומית ממזון שלא נאכל, או מהפרשות הדגים, הומסה במים והגיעה גם אל דגי הביקורת. בצורה זו דגי ביקורת יכולים להיחשף לחומצה היומית, במינונים נמוכים יותר

מדגי הטיפול, מה שיגרום גם בהם לרמה מסוימת של כילאציית מתכות כבדות. אפשרות נוספת היא היווצרות של חומצה היומית בחלקים אנארוביים של הפילטר, ושחרורם באופן מתמיד למי המערכת. עבודה שלא פורסמה הראתה את ההצטברות של חומצה היומית במערכת מסוחררת לגידול דגים (פרופ' יאפ ואן ריין, האוניברסיטה העברית, תקשורת אישית). לאור זאת כדאי לתכנן מחקרים עתידיים בנושא במערכות מים נפרדות, עם תחלופת מים גבוהה, על מנת לבחון אם אכן יש ניקוי מתמיד של מתכות כבדות מגוף הדג, גם לא נוכחות של חומרים היומיים.

סיכום עם שאלות מנחות

נא להתייחס לכל השאלות בקצרה ולעניין, ב-3 עד 4 שורות לכל שאלה (לא תובא בחשבון חריגה מגבולות המסגרת המודפסת).
שיתוף הפעולה שלך יסייע לתהליך ההערכה של תוצאות המחקר.
הערה: נא לציין הפנייה לדו"ח אם נכללו בו נקודות נוספות לאלה שבסיכום.

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
מטרת המחקר הייתה לבצע בדיקת התכנות לשימוש בחומצה היומית ככילאטור לזיהום מתכות כבדות בדגים. בהתאם לתוכנית המחקר נערכו ניסויים שמטרתם לבחון את מידת ההצטברות של מתכות כבדות ברקמות השונות של הדג, כאשר מקור הזיהום הוא במזון. בהמשך נבדק טיפול תזונתי, עם תוספת של חומצה היומית, והשפעתו על קצב הניקוי של מתכות כבדות מגוף הדג.
עיקרי הניסויים והתוצאות.
צבירת מתכות כבדות בעקבות זיהום תזונתי נבחנה במספר רקמות. נמצא שמתכות שונות מצטברות בצורה לא אחידה בגוף הדג, ולכל אחת מהמתכות יכולה להיות רקמה אחרת בה יש הצטברות מקסימלית. נמצא שהוספת חומצה היומית למזון יכולה להוריד את רמות המתכות הכבדות שהצטברו ברקמות הדג. מידת היעילות של תוספת תזונתית של חומצה היומית ככילאטור למתכות כבדות משתנה בהתאם לרקמה ובהתאם למתכת, כאשר הניקוי של קדמיום הוא יעיל יותר משל כספית ועופרת, כשהכבד הוא הרקמה בה יש לחומצה היומית את ההשפעה הרבה ביותר בכילאציה של מתכות כבדות.
מסקנות מדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת הדוח?
ממחקר זה ניתן לאפיין את דגם ההצטברות של כמה מתכות כבדות, המהוות מזהמים עיקריים, ברקמות השונות של הדג. כמו כן, המחקר הראה שלחומצה היומית יש אפקט של כילאציה בדגים. במקרה זה האפקט מושג בטיפול תזונתי. על מנת ליישם את המחקר יש לאפיין את סוג החומצה ההיומית שיהיה היעיל ביותר, ולכייל את המינון האופטימלי לצורך הטיפול.
בעיות שנתרו לפתרון ואו שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתרה לביצוע תוכנית המחקר?
הבעיה העיקרית שעלתה במחקר היא השונות הגבוהה שנמצאה בין הדגים. במחקרים עתידיים בנושא חשוב יהיה להקפיד על מספר רב של חזרות (אנליזה של דגים רבים) על מנת לקבל תוצאות ברורות.
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר מדעי; פנטטים - יש לציין שם ומס' פנטט; הוצאות וימי עיון - יש לפרט מקום, תאריך, ציטוט ביבליוגרפי של התקציר כמקובל בפרסום מאמר מדעי.
תוצאות המחקר עדיין לא פורסמו
פרסום הדוח: אני ממליץ לפרסם את הדוח: (סמן אחת מהאופציות)
<input type="checkbox"/> ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)
<input type="checkbox"/> חסוי - לא לפרסם
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן* - לא -

*יש לענות על שאלה זו רק בדוח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדוח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש שנים

1. Berntssen MHG, Hylland K, Julshamn K, Lundebye AK, Waagbo R (2004) Maximum limits of organic and inorganic mercury in fish feed. *Aquacult Nutr*, 10:83-97.
2. Burnison BK, Meinelt T, Playle R, Pietrock M, Wienke A, Steinberg CE (2006) Cadmium accumulation in zebrafish (*Danio rerio*) eggs is modulated by dissolved organic matter (DOM). *Aquat Toxicol*, 79:185-191.
3. Hammock D, Huang CC, Mort G, Swinehart JH (2003) The effect of humic acid on the uptake of mercury(II), cadmium(II), and zinc(II) by Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) eggs. *Arch Environ Contam Toxicol*, 44:83-88.
4. Hastein T, Hjeltne B, Lillehaug A, Utne Skare J, Berntssen M, Lundebye AK (2006) Food safety hazards that occur during the production stage: challenges for fish farming and the fishing industry. *Rev Sci Tech*, 25:607-625.
5. Herzig I, Navratilova M, Suchy P, Vecerek V, Totusek J (2007) Model trial investigating retention in selected tissues using broiler chicken fed cadmium and humic acid. *Veterinarni Medicina*, 52:162-168.
6. Hites RA, Foran JA, Carpenter DO, Hamilton MC, Knuth BA, Schwager SJ (2004) Global assessment of organic contaminants in farmed salmon. *Science*, 303:226-229.
7. Ikem A, Egilla J (2008) Trace element content of fish feed and bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) from aquaculture and wild source in Missouri. *Food Chem*, 110:301-309.
8. Klavins M, Potapovics O, Rodinov V (2009) Heavy metals in fish from lakes in Latvia: Concentrations and trends of changes. *Bull Environ Contam Toxicol*, 82:96-100.
9. Li Y, McCrory DF, Powell JM, Saam H, Jackson-Smith D (2005) A Survey of selected heavy metal concentrations in Wisconsin dairy feeds. *J Dairy Sci*, 88:2911-2922.
10. Sapkota A, Sapkota AR, Kucharski M, Burke J, McKenzie S, Walker P, Lawrence R (2008) Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities. *Environ Int*, 34:1215-1226.
11. Sullivan TW, Douglas JH, Gonzalez NJ (1994) Levels of various elements of concern in feed phosphates of domestic and foreign origin. *Poult Sci*, 73:520-528.

12. Tacon AGJ, Metian M (2008) Aquaculture feed and food safety: The role of the Food and Agricultural Organization and the Codex Alimentarius. *Ann NY Acad Sci*, 1140:50-59.
13. von Wandruszka R (2000) Humic acids: Their detergent qualities and potential uses in pollution remediation. *Geochem Trans*, 1:10.
14. Zraly Z, Pisarikova B, Navratilova M (2008a) The effect of humic acid on mercury accumulation in chicken broiler tissues. *Czech J Anim Sci*, 53:472-478.
15. Zraly Z, Pisarikova B, Trckova M, Navratilova M (2008b) The effect of humic acid on lead accumulation in chicken organs and muscles. *Acta Vet Brno*, 77:439-445.