

تأثیر ریزپلاستیک‌ها با رنگ‌های مختلف بر برخی از شاخص‌های استرس اکسیداتیو در ماهی *Gambusia holbrooki* Girard, 1859

مهدی بنایی*، مرضیه محمدزاده

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی خاتم الانبیا (ص) بهبهان، ایران.

*نویسنده مسئول mahdibanaee@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۸/۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۷/۲

چکیده

هدف از انجام این آزمایش ارزیابی تأثیر ریزپلاستیک‌های رنگی بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو در ماهی گامبوزیا (*Gambusia holbrooki*) بوده است. فرضیه این مطالعه این بود که ریسک بروز استرس اکسیداتیو در ماهیان ممکن است براساس رنگ ریزپلاستیک‌ها متفاوت باشد. ماهیان در ۷ تیمار آزمایشی شامل گروه کنترل و ۶ گروه آزمایشی در معرض ۱۵۰ میکروگرم در لیتر ریزپلاستیک‌های رنگی شامل رنگ‌های سفید، سبز، زرد، قرمز، آبی و سیاه برای ۱۴ روز قرار گرفتند. در پایان قابلیت تجمع زیستی ریزپلاستیک‌ها با دستگاه FTIR و برخی از شاخص‌های استرس اکسیداتیو اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در کبد ماهیان در معرض ریزپلاستیک‌های سیاه، زرد و قرمز به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل است ($P < 0.05$). علاوه بر این، قرار گرفتن ماهیان در معرض ریزپلاستیک‌های سیاه، سبز و قرمز منجر به افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیم کاتالاز، گلوکوتاتیون پراکسیداز و گلوکوتاتیون رودکتاز در سلول‌های کبدی شد ($P < 0.05$). این نتایج نشان می‌دهد که احتمال بروز آسیب‌های اکسیداتیو در ماهیان در معرض ریزپلاستیک‌های سیاه، سبز و قرمز به‌طور معنی‌داری بیشتر از دیگر ریزپلاستیک‌های رنگی بوده است.

واژگان کلیدی: ریزپلاستیک‌های رنگی، ماهی گامبوزیا، FTIR، شاخص‌های استرس اکسیداتیو.

مقدمه

تجزیه شیمیایی به قطعات ریزتر شکسته شوند و در نهایت به‌صورت ذرات ریزپلاستیک وارد اکوسیستم‌های آبی شوند. از آنجا که منابع زیرپلاستیک‌ها بسیار متنوع‌اند، به اشکال و انواع رنگ‌های مختلف در اکوسیستم‌های آبی یافت می‌شوند. از این رو، آبیان از جمله ماهیان ممکن است به اشتباه ریزپلاستیک‌های رنگی را به جای طعمه ببلعند. بنابراین، ریزپلاستیک‌ها از طریق آبشش‌ها و سیستم گوارشی وارد بدن ماهیان می‌شوند (Pannetier et al., 2020) و موجب انسداد مجاری تنفسی و گوارشی ماهیان شوند. در آبیان، جذب ریزپلاستیک‌ها در روده، ممکن است به بافت‌های غیرهوازی روده نفوذ کنند و در بافت چربی تجمع یابند (Kim et al., 2021). با این حال، بخش قابل توجهی از ریزپلاستیک‌ها نیز به درون خون نفوذ می‌کند و از طریق جریان خون به کبد و دیگر بافت‌های حیاتی

براساس آمار و ارقام موجود، میزان تولید محصولات پلاستیکی در سال ۲۰۱۸ بیش از ۴۰۰ میلیون تن برآورد شده است که این سطح تولید تا سال ۲۰۲۵ به بیش از ۸۰۰ میلیون تن خواهد رسید (Cunha et al., 2020). این در حالی است که کمتر از ۵۰ درصد از پلاستیک تولیدی در جهان بازیافت و یا سوزانده می‌شوند و بخش قابل توجهی از آن‌ها به‌صورت پسمانده و نخاله‌های پلاستیکی در اکوسیستم‌های مختلف رها می‌شوند که تقریباً ۱۰ درصد آن در جهان به‌صورت زباله‌های پلاستیکی ممکن است به‌طور مستقیم و یا غیر مستقیم از طریق رواناب‌های سطحی وارد اکوسیستم‌های دریایی و اقیانوسی شوند (Iheanacho et al., 2020; Zhang et al., 2021). پسماندها و زباله‌های پلاستیکی ممکن است تحت فرسایش و فرآیندهای فیزیکی، اشعه فرابنفش و

انتقال داده می‌شوند و از طریق فاگوسیتوز و به کمک گیرنده‌های آریل‌هیدروکربنی (Ahr) به داخل سلول‌ها نفوذ می‌کنند. اگرچه ریزپلاستیک‌ها ممکن است توسط ماکروفاژها و سلول‌های فاگوسیتوزکننده بلعیده شوند، اما این سلول‌ها قادر به هضم ریزپلاستیک‌ها نیستند و ممکن است در این سلول‌ها تجمع یابند. افزایش نرخ تولید ترکیبات واکنشگر اکسیژنی (ROS) ناشی از واکنش‌های انفجار تنفسی در ماکروفاژها و همچنین فعالیت آنزیم‌های دخیل در سم‌زدایی می‌تواند زمینه بروز استرس اکسیداتیو را فراهم کند که این امر می‌تواند سرآغاز یک‌سری واکنش‌های بیوشیمیایی پی‌درپی و آبشاری باشد که در نهایت به مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی منجر شود (Umamaheswari et al., 2021; Zhao et al., 2022). پیامدهای ناشی از قرار گرفتن ماهیان در معرض ریزپلاستیک‌ها شامل تجمع زیستی این ترکیبات (Ding et al., 2018; Ding et al., 2020)، بروز سمیت ژنتیکی، تغییر در بیان ژن آنزیم‌های دخیل در سم‌زدایی (Sun et al., 2021)، تغییرات در شاخص‌های بیوشیمیایی و خون‌شناسی (Nematdoost Haghi and Banaee, 2017; Banaee et al., 2021)، استرس اکسیداتیو سلولی (Banaee et al., 2019)، سمیت سلولی، نارسایی در عملکرد سیستم گوارشی (Weber et al., 2021)، آسیب‌های بافت‌شناسی (Hamed et al., 2021; Varó et al., 2019)، اختلال در فعالیت غدد ترشحی درون‌ریز، سرکوب سیستم ایمنی (Banihashemi et al., 2022)، کاهش اشتها ماهیان، نارسایی در متابولیسم سلولی (Critchell and Hoogenboom, 2018)، اختلال در عملکرد میانجی‌گرهای عصبی و حتی مرگ نکته قابل تأمل این است که، غالب این آسیب‌های فیزیولوژیک مربوط به ترکیبات مختلف شیمیایی نظیر نرم‌کننده‌ها، رنگدانه‌ها، فیلترهای اشعه ماوراء بنفش، مواد ضد احتراقی است که در حین فرآوری به پلیمرهای پلاستیکی افزوده می‌شوند (Kim et al.,

2021). با این حال، هنوز ابهامات زیادی در رابطه با تأثیر ریزپلاستیک‌ها بر آیزیان وجود دارد که باید پاسخ داده شوند. این فرضیه وجود دارد که پاسخ ماهیان به ریزپلاستیک‌ها تنها به اندازه آن‌ها بستگی ندارد؛ بلکه تفاوت رنگ نیز می‌تواند در این امر دخیل باشد. با توجه به اهمیت موارد فوق، این مطالعه به منظور ارزیابی قابلیت تجمع زیستی ریزپلاستیک‌های رنگی و بررسی احتمال بروز استرس اکسیداتیو در ماهی گامبوزیا (*Gambusia holbrooki*) به اجرا درآمد. با توجه به اینکه ماهی گامبوزیا یک گونه سطح‌زی است، و از لارو حشرات و هر طعمه‌ای که متناسب با اندازه دهانش باشد تغذیه می‌کند کاندیدای مناسبی برای ارزیابی ریزپلاستیک‌ها در آب‌های شیرین سطحی است. از این‌رو، به‌عنوان مدل آزمایشگاهی در این مطالعه انتخاب شد.

مواد و روش‌ها

ماهیان گامبوزیای (*Gambusia holbrooki*) بالغ با میانگین وزنی $2/7 \pm 0/1$ گرم و طول متوسط $4/20 \pm 0/35$ سانتی‌متر از آب‌بندهای منطقه زرقان استان فارس صید و به آزمایشگاه منتقل شدند. پیش از شروع آزمایش، ماهی‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در حمام آب نمک ۱٪ حمام داده و سپس جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاهی (دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۶ میلی‌گرم در لیتر، اسیدیتته $7/4 \pm 0/2$ ، دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی و نرخ تعویض آب ۵۰ درصدی به‌طور روزانه) به آکواریوم‌های مجهز به هواده با حجم آبی ۸۰ لیتر انتقال داده شدند. پس از گذشت ۱۰ روز از سازگاری ماهی‌ها با شرایط آزمایشگاهی، ۴۲۰ ماهی در قالب ۷ تیمار آزمایشی با ۲ تکرار شامل گروه کنترل، و ۶ گروه آزمایشی در معرض ۱۵۰ میکروگرم در لیتر (Xiong et al., 2019; Huang et al., 2020) ریزپلاستیک‌های رنگی شامل رنگ‌های سفید، سبز، زرد، قرمز، آبی و سیاه، در ۱۴ آکواریوم مجهز به هواده با حجم آبی ۸۰

فارس اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیمی گلوتاتیون ردوکتاز با کاهش جذب نوری در طول موج ۳۴۰ نانومتر، براساس اکسیداسیون NADPH در ازای تبدیل یک مولکول گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) به دو مولکول گلوتاتیون احیاء شده (G-S)، سنجش شد. برای سنجش سوپراکسید دیسموتاز از گزانتین و گزانتین اکسیداز (XOD) جهت تولید رادیکال‌های سوپراکسید استفاده گردید. فعالیت SOD در طول موج ۵۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نیز براساس اکسیداسیون گلوتاتیون (GSH) توسط کومن هیدروپراکسید (Cumene Hydroperoxide)، در حضور آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز و NADPH، و جذب نوری در طول موج ۳۴۰ نانومتر انجام شد. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در نهایت براساس گرم پروتئین بافت کبدی بیان شد.

پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها بر اساس آزمون Kolmogorov-Smirnov، تجزیه و تحلیل آماری به روش تجزیه واریانس یک‌طرفه (One Way-ANOVA) و در سطح اطمینان ۹۵٪ ($P < 0.05$) انجام شد. مقایسه میانگین‌ها نیز با آزمون توکی صورت گرفت. نتایج به‌صورت میانگین به همراه انحراف معیار نشان داده شد. تحلیل‌های آماری در این مطالعه در محیط نرم‌افزارهای Excel (نسخه ۲۰۱۶) و SPSS IBM (نسخه ۲۴) انجام شد.

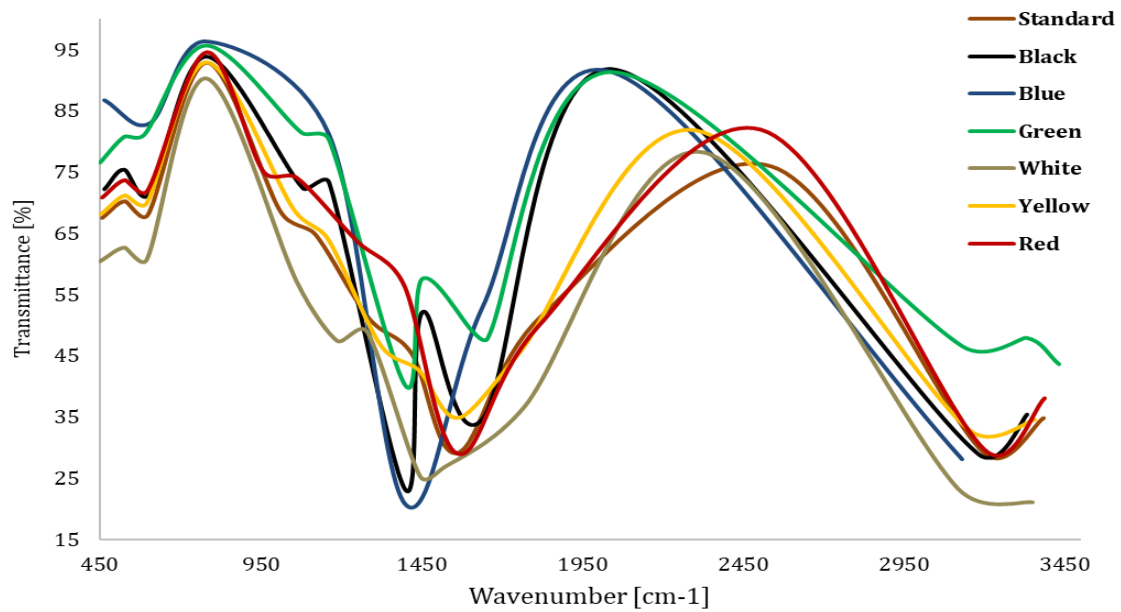
نتایج

نتایج مربوط به سنجش کیفی تجمع ریزپلاستیک‌ها در شکل ۱ ارائه شده است. با توجه به مقایسه تجمع ریزپلاستیک‌های رنگی با نمودار استاندارد ریزپلاستیک‌ها، می‌توان نتیجه گرفت که ریزپلاستیک‌ها در رنگ‌های مختلف کم و بیش در بدن ماهیان گامبوزیا قابل تشخیص است (شکل ۱). تغییر در دامنه طول موج ۷۹۰-۶۰۰، ۱۳۰۰-۹۵۰، ۱۶۵۰-۱۴۰۰، ۲۰۰۰-۲۲۵۰، ۱۸۰۰-۲۰۰۰، ۲۶۰۰-۳۲۰۰ و ۳۵۰۰-۴۰۰۰ (cm^{-1}) نشان‌دهنده ریزپلاستیک‌های

لیتر توزیع شدند. در این مطالعه ماهیان به مدت ۱۴ روز با ریزپلاستیک‌های رنگی، تیمار شدند. در طول دوره سازگاری و دوره آزمایش ماهیان با کرم خونی مختص ماهیان آکواریومی تغذیه شدند (محمدنژادشموشکی و همکاران، ۱۳۹۰؛ جعفری‌کناری و ادهمی، ۱۳۹۴).

پس از نمونه‌برداری، تعدادی از ماهیان جهت ردیابی ریزپلاستیک‌ها درون تانک ازت قرار داده شد. سپس نمونه‌ها در فریزدراپر خشک گردید. در مرحله بعد وجود ریزپلاستیک‌ها در نمونه‌ها با اسپکترومتر FTIR-IR 4600 (JASCO) آنالیز و نمودار مربوطه برحسب درصد عبور نور و موقعیت طول موج ساطع شده، در نرم‌افزار Excel نسخه رسم شد. ماهی‌ها بر روی یخ قرار داده شدند؛ و پس از آسان‌کشی تشریح و بافت کبد جداسازی گردید. سپس نمونه‌ها با سرم فیزیولوژی شسته و در نیتروژن مایع منجمد گردید. در مرحله بعد، ۱ گرم از نمونه بافت به نسبت ۱ به ۱۰ با محلول بافر فسفات ۰/۱ مولار حاوی ۳۰۰ میلی‌مولار ساکارز و ۰/۱ میلی‌مولار اتیلن‌دی‌آمین تترا استیک اسید با اسیدیته ۷/۸ مخلوط و با هموژنایزر همگن گردید. سپس محلول حاصل در دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و در نهایت محلول روپی جمع‌آوری و در دمای ۲۶- درجه‌سانتی‌گراد (حداکثر تا یک هفته) به‌منظور اندازه‌گیری و سنجش شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و استرس اکسیداتیو نگهداری شد.

آنزیم کاتالاز بر اساس روش Góth (۱۹۹۱) با اندکی تغییرات سنجیده شد. فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس فرآیند تجزیه پراکسید هیدروژن و تشکیل کمپلکس با ثبات با مولیبدات آمونیوم اندازه‌گیری گردید. سنجش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPx)، و گلوتاتیون ردوکتاز (GR)، در بافت کبد ماهیان گامبوزیا به‌منظور ارزیابی اثرات استرس اکسیداتیو، با استفاده از کیت‌های بیوشیمیایی شرکت بایرکس



شکل ۱- منحنی FTIR مربوط به تجمع ریزپلاستیک‌های رنگی در بدن گامبوزیا (*Gambusia holbrooki*).

جدول ۱- محصولات احتمالی و بنیان شیمیایی براساس فراوانی گروهی طول موج FTIR

| فراوانی طول موج | بنیان شیمیایی | محصولات احتمالی |
|-----------------|-----------------------|--|
| ۷۹۰-۶۰۰ | C-H | گروه‌های آروماتیکی و متیلن |
| ۱۳۰۰-۹۵۰ | C-H; C-O | گروه‌های فنولی، الکلی، اتری و آروماتیک |
| ۱۶۵۰-۱۴۰۰ | CH ₂ ; C=C | حلقه‌های آروماتیک |
| ۲۰۰۰-۱۸۰۰ | C=O | گروه‌های کتونی، آلدهیدی، استری، کربوکسیلیک اسید و آمیدها |
| ۲۲۵۰-۲۰۰۰ | C=O; C-O | ترکیبات اکسیژن‌دار |
| ۳۲۰۰-۲۶۰۰ | C=H | هیدروکربن |
| ۴۰۰۰-۳۵۰۰ | H=O; H-O | گروه‌های فنولی، الکل |

ماهیان در معرض ریزپلاستیک‌های سیاه، سبز و قرمز منجر به افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیم کاتالاز در سلول‌های کبدی شد ($P < 0/05$). علاوه بر این، نتایج به‌دست آمده بیانگر این است که تیمار ماهیان با ریزپلاستیک‌های سیاه، سبز و قرمز موجب افزایش معنی‌داری در فعالیت گلوکوتاتیون پراکسیداز در مقایسه با گروه کنترل گردید ($P < 0/05$). افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون رودکتاز در سلول‌های کبدی ماهیان تحت تیمار ریزپلاستیک‌های سیاه، سبز و قرمز در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد (جدول ۲، $P < 0/05$).

بحث

نتایج به‌دست آمده از آنالیز کیفی FIRT نشان داد که

پلی‌اتیلن و تثبیت‌کننده‌ها یا پلاستیک‌های بکار رفته در ساختار پلیمرهای پلاستیکی است. براساس اطلاعات ارائه شده در جدول ۱ نوع بنیان‌های شیمیایی قابل تشخیص براساس فراوانی گروه طول موج FTIR می‌توان وجود پلیمرهای پلاستیکی و گروه‌های آروماتیک منتسب به تثبیت‌کننده‌ها را تأیید کرد.

نتایج مربوط به تغییر در شاخص‌های استرس اکسیداتیو در کبد ماهیان گامبوزیا (*G. holbrooki*) در معرض ریزپلاستیک‌های رنگی در جدول ۲ ارائه شده است. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در کبد ماهیان در معرض ریزپلاستیک‌های سیاه، زرد و قرمز به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل است ($P < 0/05$). نتایج نشان می‌دهد که فرار گرفتن

جدول ۲- تغییرات شاخص‌های استرس اکسیداتیو در کبد ماهیان گامبوزیا (*G. holbrooki*) در معرض ریزپلاستیک‌های رنگی.

| ریزپلاستیک | سوپراکسید دیسموتاز | کاتالاز | گلوکاتایون رودکتاز | گلوکاتایون پراکسیداز | تیماز |
|------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------|
| گروه کنترل | ۵/۵۸ ± ۱/۰۷ ^a | ۳/۷۵ ± ۰/۷۷ ^a | ۲/۹۲ ± ۱/۰۷ ^a | ۱۲/۲۸ ± ۱/۵۲ ^a | |
| سفید | ۷/۲۵ ± ۱/۸۱ ^{ab} | ۴/۳۳ ± ۱/۲۱ ^{ab} | ۳/۲۰ ± ۱/۸۱ ^{ab} | ۱۴/۱۷ ± ۱/۷۵ ^{abc} | |
| سیاه | ۸/۶۵ ± ۱/۶۷ ^b | ۴/۹۲ ± ۱/۰۲ ^{bc} | ۳/۵۰ ± ۱/۶۷ ^{bc} | ۱۵/۷۰ ± ۱/۲۷ ^{cd} | |
| سبز | ۷/۲۵ ± ۱/۹۲ ^{ab} | ۵/۰۸ ± ۱/۰۷ ^{bc} | ۳/۵۳ ± ۱/۹۲ ^{bc} | ۱۴/۶۷ ± ۰/۸۸ ^{bc} | |
| زرد | ۷/۲۵ ± ۱/۷۵ ^b | ۴/۲۲ ± ۰/۶۶ ^{ab} | ۳/۱۵ ± ۰/۳۵ ^{ab} | ۱۳/۶۰ ± ۰/۷۹ ^{ab} | |
| قرمز | ۸/۷۵ ± ۱/۶۴ ^b | ۵/۸۷ ± ۰/۸۰ ^{bc} | ۳/۹۲ ± ۰/۴۲ ^c | ۱۶/۵۳ ± ۲/۶۷ ^d | |
| آبی | ۶/۷۵ ± ۰/۹۴ ^{ab} | ۴/۲۵ ± ۰/۵۲ ^{ab} | ۳/۱۵ ± ۰/۲۷ ^{ab} | ۱۴/۱۵ ± ۱/۵۱ ^{abc} | |

در فعالیت آنزیم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی و دیگر شاخص‌های استرس اکسیداتیو، می‌تواند از بارزترین نشانه‌های بروز استرس اکسیداتیو در آبزیان در معرض ریزپلاستیک‌ها باشد (Buwono *et al.*, 2022).

سوپراکسید دیسموتاز (SOD) یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی است که فرآیند دیسموته شدن سوپراکسید آنیون‌ها (O_2^-) را به مولکول اکسیژن و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) کاتالیز می‌کند (Barboza and Guilhermino, 2018). آنیون‌های سوپراکسید ممکن است به‌عنوان محصول متابولیسمی در طی فرآیند سم‌زدایی از ریزپلاستیک‌ها و مواد تثبیت‌کننده پلیمرهای پلاستیکی تولید شود که می‌تواند به سلول‌ها و ماکرومولکول‌های حیاتی آسیب جدی وارد کند (Han *et al.*, 2022). بنابراین، افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در واقع یک واکنش فیزیولوژیکی به افزایش سوپراکسید آنیون‌ها در سلول‌های کبدی ماهیان در معرض ریزپلاستیک‌های سیاه، زرد و قرمز است. افزایش معنی‌دار در فعالیت SOD در اسکالوپ خلیجی (*Argopecten irradians*) (Song *et al.*, 2020)، ماهی تیلایای قرمز (*Oreochromis niloticus*) (Ding *et al.*, 2018)، ماهی زبرا (*Danio rerio*) (Lu *et al.*, 2016)، و ماهی دیسکاس (*Symphysodon aequifasciatus*) (Wen *et al.*, 2018) در معرض ریزپلاستیک‌ها نیز گزارش شده است. کاتالاز یکی از آنزیم‌های شناخته شده در

ریزپلاستیک‌ها توسط ماهیان گامبوزیا بلعیده شده و در سیستم گوارشی و بدن ماهیان قابل تشخیص است. مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد که تجمع ریزپلاستیک‌ها می‌تواند بر فیزیولوژی آبزیان تأثیر منفی داشته باشد (Zhang *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022). تجمع ریزپلاستیک‌ها و اختلالات فیزیولوژیکی در خرچنگ دراز آب شیرینی (*Procambarus clarkii*) (Zhang *et al.*, 2022)، میگوی آب شیرین (*Neocaridina palmate*) (Pisani *et al.*, 2022)، اویستر اقیانوس آرام (*Crasostrea gigas*) (Bringer *et al.*, 2022)، اویستر شرقی (*Crassostrea virginica*) (Weinstein *et al.*, 2022)، ماهی سوف حاجی طرخان (*Perca fluviatilis*) (Bobori *et al.*, 2022) و سفید ماهی (*Coregonus albula*) (Uurasjärvi *et al.*, 2021) بیانگر این امر است.

پژوهش‌های صورت گرفته نشان می‌دهد که ریزپلاستیک‌ها می‌توانند در خارج از سلول‌ها در طی فرآیند هوازدگی، واکنش‌های حرارتی یا فتواکسیداسیون و در داخل سلول‌ها از طریق القای انفجار تنفسی زمینه را برای افزایش نرخ تولید ترکیبات واکنشگر اکسیژنی (ROS) مهیا سازند (Hu and Palić, 2020). از این رو، ریزپلاستیک‌ها به‌عنوان زئوبیوتیکی‌هایی شناخته می‌شوند که قابلیت ایجاد آسیب‌های اکسیداتیو در گونه‌های مختلف آبزیان، از جمله ماهیان را دارا هستند (Banaee and Shakeri, 2021; Capó *et al.*, 2021). بنابراین، هر گونه تغییر

ریزپلاستیک‌های سیاه، سبز و قرمز در مقایسه با گروه کنترل نیز یک مکانیسم دفاعی برای احیای مجدد گلوتاتیون سلولی است. گلوتاتیون به‌عنوان یک دهنده الکترون، می‌تواند از طریق گونژوگه شده با رادیکال‌های آزاد، به‌عنوان یک خورنده رادیکالی عمل کرده و مانع از پراکسیداسیون ماکرومولکول‌های حیاتی می‌شود (Lombardo et al., 2022). بنابراین، افزایش گلوتاتیون‌رودکتاز می‌تواند نقش مهمی در حفظ ذخیره گلوتاتیون احیاء شده سلولی بازی کند. مطالعات بیان داشته‌اند که قرار گرفتن ماهیان سیم دریایی (*S. aurata*) در معرض ریزپلاستیک‌های پلی‌اتیلن به‌صورت خوراکی منجر به افزایش فعالیت گلوتاتیون‌رودکتاز، گلوتاتیون‌پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در سلول‌های کبدی شد (Capó et al., 2021). افزایش فعالیت گلوتاتیون‌رودکتاز در خیار دریایی (*Holothuria tubulosa*) تحت تیمار ریزپلاستیک‌ها نیز گزارش شده است (Lombardo et al., 2022).

نتایج نشان می‌دهد که ماهیان ممکن است ریزپلاستیک‌ها را به‌همراه غذا و یا به اشتباه به جای غذا بلعند. علاوه بر این، برآیند نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که احتمال بروز استرس اکسیداتیو در ماهیان در معرض ذرات ریزپلاستیکی سیاه، قرمز و سبز در مقایسه با دیگر ریزپلاستیک‌های رنگی بیشتر بوده است. زیرا، تغییر در شاخص‌های استرس اکسیداتیو در سلول‌های کبدی ماهیان در معرض ریزپلاستیک‌های رنگی می‌تواند بیانگر برهم خوردن تعادل بین اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها در سطح سلولی باشد. بروز استرس اکسیداتیو در آبزیان در معرض ریزپلاستیک‌های پلی‌اتیلن گزارش شده است (Zhang et al., 2022). مشابه این نتایج در دیگر گونه‌های آبزیان از جمله در صدف‌ها (*M. galloprovincialis*) (Provenza et al., 2022) و کلم‌ها (*Scrobicularia plana*) (Bebiano et al., 2022)، ماهی گوبی (*Pomatoschistus microps*) (de Sa et al., 2016) و ماهی *Decapterus*

پراکسی‌زوم سلولی است که پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند (Félix et al., 2022). افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیم کاتالاز نشان از بالا بودن نرخ تولید پراکسید هیدروژن در سلول‌های کبدی ماهیان در معرض ریزپلاستیک‌های سیاه، سبز و قرمز است. علاوه بر این، افزایش نرخ پراکسید هیدروژن ممکن است با افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و تسریع روند دیسموته شدن سوپراکسید آنیون‌ها مرتبط است. افزایش معنی‌دار در فعالیت کاتالاز در کلم‌های آب‌شیرین (*Corbicula javanicus*) (Esterhuizen et al., 2022)، ماهی زبرا (*D. rerio*) (Félix et al., 2022) و صدف سیاه مدیترانه (*Mytilus galloprovincialis*) (Capó et al., 2021) تحت تیمار ریزپلاستیک‌ها نیز گزارش شده است.

نتایج این مطالعه حاکی از افزایش معنی‌داری در فعالیت گلوتاتیون‌پراکسیداز در سلول‌های کبدی ماهیان در معرض ریزپلاستیک‌های سیاه، سبز و قرمز است. گلوتاتیون‌پراکسیداز، متعلق به خانواده بزرگ پراکسیدازها است که نقش زیستی مهمی در حفاظت از ارگانسیم‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو بازی می‌کند (Capó et al., 2021). این آنزیم از طریق احیاء هیدروپراکسیدهای لیپیدی به مشتقات الکلی و همچنین احیای پراکسید هیدروژن به آب و مولکول اکسیژن، در حضور گلوتاتیون احیاء شده (GSH) می‌تواند سطح ترکیبات واکنشگر فعال اکسیژنی (ROS) را کاهش دهد. در این میان گلوتاتیون احیاء شده، اکسید (GSSG) می‌شود و برای احیای مجدد آن بایستی آنزیم گلوتاتیون‌رودکتاز وارد عمل شود (Dong et al., 2022). افزایش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز در صدف سیاه مدیترانه (*M. galloprovincialis*) (Capó et al., 2021) و تیلاپیای نیل (*O. niloticus*) (Dong et al., 2022) در معرض ریزپلاستیک‌ها مشاهده شده است.

افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم گلوتاتیون‌رودکتاز در سلول‌های کبدی ماهیان تحت تیمار

Xiong *et al.*,) ریزپلاستیک‌های بلعید شده بود (2019). بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه و اطلاعات به دست آمده از بررسی‌های مشابه می‌توان چنان بیان کرد که رنگ ریزپلاستیک‌ها می‌تواند تأثیر معنی‌داری بر نرخ بلع و تغییرات فیزیولوژیکی ماهیان در معرض داشته باشد.

- oxidative damage and energy-related changes and interact with the bioaccumulation of mercury in the European seabass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquatic Toxicology* 195, 49-57.
- Bebianno M.J., Mendes V.M., O'Donovan S., Carteny C.C., Keiter S., Manadas B. 2022. Effects of microplastics alone and with adsorbed benzo (a) pyrene on the gills proteome of *Scrobicularia plana*. *Science of the Total Environment* 842, 156895.
- Bobori D.C., Dimitriadi A., Feidantsis K., Samiotaki A., Fafouti D., Sampsonidis I., Kalogiannis S., Kastrinaki G., Lambropoulo D.A., Kyzas G.Z., Koumoundouros G., Bikiaris D.N., Kaloyianni M. 2022. Differentiation in the expression of toxic effects of polyethylene-microplastics on two freshwater fish species: Size matters. *Science of the Total Environment* 830, 154603.
- Bringer A., Cachot J., Dubillot E., Prunier G., Huet V., Clérandeau C., Evin L., Thomas H. 2022. Intergenerational effects of environmentally-aged microplastics on the *Crassostrea gigas*. *Environmental Pollution* 294, 118600.
- Buwono N.R., Risjani Y., Soegianto A. 2022. Oxidative stress responses of microplastic-contaminated *Gambusia affinis* obtained from the Brantas River in East Java, Indonesia. *Chemosphere* 293, 133543.
- Capó X., Company J. J., Alomar C., Compa M., Sureda A., Grau A., Hansjosten B., Lopez-Vazque J., Quintana J. B., Rodil R., Deudero S. 2021. Long-term exposure to virgin and seawater exposed microplastic enriched-diet causes liver oxidative stress and inflammation in gilthead seabream *Sparus aurata*, Linnaeus 1758. *Science of the Total Environment* 767, 144976.
- Capo X., Rubio M., Solomando A., Alomar C., Compa M., Sureda A., Deudero S. 2021.

muroadsi در معرض ریزپلاستیک‌های رنگی مشابه با طعمه طبیعی، گزارش شده است (Ory *et al.*, 2017). در مطالعه صورت گرفته روی ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus*) در معرض ریزپلاستیک‌های رنگی، مشخص شد که تعداد ریزپلاستیک‌ها سبز، سیاه، قرمز، سفید و آبی به ترتیب بالاترین نرخ

منابع

- جعفری کناری س.س، ادهمی ب. ۱۳۹۴. مقایسه تغذیه‌ای جیره بیومار، میگو، کرم خونی بر پارامترهای رشد، بازماندگی و فراسنجه‌های خونی در بچه ماهی آکواریومی جونل (*Hemichromis bimaculatus*). علوم تکثیر و آبی‌پروری. ۳(۷): ۵۲-۴۳.
- محمدنژادشموشکی م، حیدری س، موسوی ثابت س.ح. ۱۳۹۰. مقایسه تغذیه‌ای جیره بیومار، دل گوساله، کرم فشرده، کرم خونی، گاماروس و آرتمیا بر روی شاخص های رشد و بازماندگی ماهی سوروم (*Heros* *severus*). زیست‌شناسی جانوری. ۳(۳): ۴۹-۴۱.
- Banaee M., Gholamhosseini A., Sureda A., Soltanian S., Fereidouni, M.S., Ibrahim, A.T. 2021. Effects of microplastic exposure on the blood biochemical parameters in the pond turtle (*Emys orbicularis*). *Environmental Science and Pollution Research* 28(8), 9221-9234.
- Banaee M., Shakeri, R. 2021. The effect of microplastics on hematological and biochemical parameters in aquatic animals. *Journal of Aquaculture Sciences* 8(15), 141-160.
- Banaee M., Soltanian S., Sureda A., Gholamhosseini A., Hagi B N., Akhlaghi M., Derikvandy A. 2019. Evaluation of single and combined effects of cadmium and micro-plastic particles on biochemical and immunological parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere* 236, 124335.
- Banihashemi E A., Soltanian S., Gholamhosseini A., Banaee M. 2022. Effect of microplastics on yersinia ruckeri infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Science and Pollution Research* 29(8), 11939-11950.
- Barboza L.G., Guilhermino L. 2018. Microplastics cause neurotoxicity,

- Determination of Serum Catalase Activity and Revision of Reference Range. *Clinica Chimica Acta* 196, 143-152.
- Hamed M., Soliman H. A., Badrey A. E., Osman A. G. 2021. Microplastics induced histopathological lesions in some tissues of tilapia (*Oreochromis niloticus*) early juveniles. *Tissue and Cell* 71, 101512.
- Han M., Gao T., Liu G., Zhu C., Zhang T., Sun M., Li J., Ji F., Si Q., Jiang Q. 2022. The effect of a polystyrene nanoplastic on the intestinal microbes and oxidative stress defense of the freshwater crayfish, *Procambarus clarkii*. *Science of the Total Environment* 833, 155722.
- Hu M., Palić D. 2020. Micro- and nano-plastics activation of oxidative and inflammatory adverse outcome pathways. *Redox Biology* 37, 101620.
- Huang J.N., Wen B., Zhu J.G., Zhang Y.S., Gao J.Z., Chen Z.Z. 2020. Exposure to microplastics impairs digestive performance, stimulates immune response and induces microbiota dysbiosis in the gut of juvenile guppy (*Poecilia reticulata*). *Science of the Total Environment* 733:138929.
- Iheanacho S. C., Igberi C., Amadi-Eke A., Chinonyerem D., Iheanacho A., Avwemoya F. 2020. Biomarkers of neurotoxicity, oxidative stress, hepatotoxicity and lipid peroxidation in *Clarias gariepinus* exposed to melamine and polyvinyl chloride. *Biomarkers* 25(7), 603-610.
- Kim J.H., Yu Y.B., Choi J.H. 2021. Toxic effects on bioaccumulation, hematological parameters, oxidative stress, immune responses and neurotoxicity in fish exposed to microplastics: A review. *Journal of Hazardous Materials* 413, 125423.
- Lombardo J., Solomando A., Cohen-Sánchez A., Pinya S., Tejada S., Ferriol P., Mateu-Vicens G., Box A., Faggio C., Sureda A. 2022. Effects of Human Activity on Markers of Oxidative Stress in the Intestine of *Holothuria tubulosa*, with Special Reference to the Presence of Microplastics. *International Journal of Molecular Sciences* 23(16), 9018.
- Lu Y., Zhang Y., Deng Y., Jiang W., Zhao Y., Geng J., Ding L., Ren H. 2016. Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver. *Environmental Science and Microplastic intake and enzymatic responses in *Mytilus galloprovincialis* reared at the vicinities of an aquaculture station. *Chemosphere* 280, 130575.*
- Critchell K., Hoogenboom M.O. 2018. Effects of microplastic exposure on the body condition and behaviour of planktivorous reef fish (*Acanthochromis polyacanthus*). *PLoS One* 13(3), e0193308.
- Cunha C., Lopes J., Paulo J., Faria M., Kaufmann M., Nogueira N., Ferreira A., Cordeiro N. 2020. The effect of microplastics pollution in microalgal biomass production: A biochemical study. *Water Research* 186, 116370.
- de Sá L C., Luís L. G., Guilhermino L. 2015. Effects of microplastics on juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): Confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions. *Environmental Pollution* 196, 359-362.
- Ding J., Huang Y., Liu S., Zhang S., Zou H., Wang Z., Zhu W., Geng J. 2020. Toxicological effects of nano- and micro-polystyrene plastics on red tilapia: Are larger plastic particles more harmless? *Journal of Hazardous Materials* 396, 122693.
- Ding J., Zhang S., Razanajatovo M.R., Zou H., Zhu W. 2018. Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Pollution* 238, 1-9.
- Dong R., Zhou C., Wang S., Yan Y., Jiang Q. 2022. Probiotics ameliorate polyethylene microplastics-induced liver injury by inhibition of oxidative stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology* 130, 261-272.
- Esterhuizen M., Buchenhorst L., Kim Y.J., Pflugmacher S. 2022. In vivo oxidative stress responses of the freshwater basket clam *Corbicula javanicus* to microplastic fibres and particles. *Chemosphere* 296, 134037.
- Félix L., Carreira P., Peixoto F. 2022. Effects of chronic exposure of naturally weathered microplastics on oxidative stress level, behaviour, and mitochondrial function of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 310, 136895.
- Góth L. 1991. A Simple Method for

- imaging FTIR spectroscopic method for analyzing microplastics ingestion by Finnish lake fish (*Perca fluviatilis* and *Coregonus albula*). *Environmental Pollution* 288, 117780.
- Varó I., Perini A., Torreblanca A., Garcia Y., Bergami E., Vannuccini M. L., Corsi I. 2019. Time-dependent effects of polystyrene nanoparticles in brine shrimp *Artemia franciscana* at physiological, biochemical and molecular levels. *Science of the Total Environment* 675, 570-580.
- Weinstein J.E., Ertel B.M., Gray, A.D. 2022. Accumulation and depuration of microplastic fibers, fragments, and tire particles in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*: A toxicokinetic approach. *Environmental Pollution* 308, 119681.
- Wen B., Jin S., Chen Z., Gao J., Liu Y., Liu J., Feng X. 2018. Single and combined effects of microplastics and cadmium on the cadmium accumulation, antioxidant defense and innate immunity of the discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*). *Environmental Pollution* 243, 462-471.
- Xiong X., Tu Y., Chen X., Jiang X., Shi H., Wu C., Elser J. J. 2019. Ingestion and egestion of polyethylene microplastics by goldfish (*Carassius auratus*): influence of color and morphological features. *Heliyon* 5(12), e03063.
- Zhang C., Wang J., Zhou A., Ye Q., Feng Y., Wang Z., Wang S., Xu G., Zou J. 2021. Species-specific effect of microplastics on fish embryos and observation of toxicity kinetics in larvae. *Journal of Hazardous Materials* 403, 123948.
- Zhang X., Jin Z., Shen M., Chang Z., Yu G., Wang L., Xia X. 2022. Accumulation of polyethylene microplastics induces oxidative stress, microbiome dysbiosis and immunoregulation in crayfish. *Fish and Shellfish Immunology* 125, 276-284.
- Zhao T., Tan L., Han X., Wang X., Zhang Y., Ma X., Lin K., Wang R., Ni Z., Wang J., Wang J. 2022. Microplastic-induced apoptosis and metabolism responses in marine Dinoflagellate, *Karenia mikimotoi*. *Science of the Total Environment* 804, 150252.
- Technology* 50(7), 4054-4060.
- Nematdoost Haghi B., Banaee M. 2017. Effects of micro-plastic particles on paraquat toxicity to common carp (*Cyprinus carpio*): Biochemical changes. *International Journal of Environmental Science and Technology* 14(3), 521-530.
- Ory N. C., Gallardo C., Lenz M., Thiel M. 2018. Capture, swallowing, and egestion of microplastics by a planktivorous juvenile fish. *Environmental Pollution* 240, 566-573.
- Pannetier P., Morin B., Bihanic F.L., Dubreil L., Clérandeau C., Chouvellon F., Arkel K.V., Danion M., Cachot J. 2020. Environmental samples of microplastics induce significant toxic effects in fish larvae. *Environment International* 134, 105047.
- Pisani X. G., Lompré J. S., Pires A., Greco L. L. 2022. Plastics in scene: A review of the effect of plastics in aquatic crustaceans. *Environmental Research* 212, 113484.
- Provenza F., Rampih D., Pignattelli S., Pastorino P., Barceló D., Prearo M., Specchiulli A., Renzi M. 2022. Mussel watch program for microplastics in the Mediterranean Sea: Identification of biomarkers of exposure using *Mytilus galloprovincialis*. *Ecological Indicators* 142, 109212.
- Song J A., Choi C. Y., Park H. S. 2020. Exposure of bay scallop *Argopecten irradians* to micro-polystyrene: bioaccumulation and toxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 236, 108801.
- Sun T., Zhan J., Li F., Ji C., Wu H. 2021. Evidence-based meta-analysis of the genotoxicity induced by microplastics in aquatic organisms at environmentally relevant concentrations. *Science of the Total Environment* 783, 147076.
- Umamaheswari S., Priyadarshinee S., Kadirvelu K., Ramesh M. 2021. Polystyrene microplastics induce apoptosis via ROS-mediated p53 signaling pathway in zebrafish. *Chemico-Biological Interactions* 345, 109550.
- Uurasjärvi E., Sainio E., Setälä O., Lehtiniemi M., Koistinen A. 2021. Validation of an

The effect of microplastics with different colors on some oxidative stress biomarkers in *Gambusia holbrooki* Girard, 1859

Mahdi Banaee*, Marzieh Mohammadzadeh

Department of Aquaculture, Faculty of Natural Resources, Khatam Al-Anbia University of Technology, Behbahan, Iran.

*Corresponding author: mahdibanaee@yahoo.com

Received: 2022/9/24

Accepted: 2022/10/26

Abstract

This experiment aims to evaluate the effect of colored microplastics (MPs) on oxidative stress indicators in *Gambusia holbrooki*. This study hypothesized that the risk of oxidative stress in fish may be different based on MPs' color. In this study, fish in 7 experimental treatments with two replications, including the control group and six experimental groups, were exposed to 150 micrograms per liter of colored MPs (white, green, yellow, red, blue, and black colors) for 14 days. In the end, some oxidative stress indicators were assayed. Furthermore, the bioaccumulation potential of MPs was measured with an FTIR instrument. The results showed that the activity of superoxide dismutase in the liver of fish exposed to black, yellow, and red MPs is significantly higher than in the control group ($P<0.05$). In addition, exposure of fish to black, green, and red MPs led to a significant increase in the activity of catalase, glutathione-peroxidase, and glutathione-reductase in liver cells ($P<0.05$). These results showed that the risk of oxidative stress in fish exposed to black, green, and red MPs was significantly higher than other colored MPs.

Keywords: Colored microplastics, *Gambusia*, FTIR, Oxidative stress indicators.