شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹
صفحات ۳۸۲-۳۷۳

تاثیر میکروپلاستیک پلی اتیلن ترفتالات وآفت کش آبامکتین بر فعالیت آنزیم GPx و پراکسیداسیون لیپیدها در ماهی زبرا

پریچهر حناچی[۱]* سمیه کاظمی[۲]، سارا زیوری[۲] ، سمانه کربلائی[۳]

۱. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۲. دانشجوی ارشد،گروه بیوتکنولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۳. محقق پسا دکتری، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده زیست شناسی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹ /۰۴/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۲۴

چکیده

جذب آلاینده ها توسط میکروپلاستیک ها در مطالعات متعددی گزارش شده است ولی هنوز مطالعات کمی در زمینه اثر ترکیبی آنها روی موجودات زنده وجود دارد. میکروپلاستیک ها می توانند به عنوان حامل آلاینده های شیمیایی محیط زیست و آفت کش ها عمل کنند. جذب این ذرات توسط موجودات زنده بخصوص آبزیان باعث ایجاد تغییراتی در فعالیت آنزیم های مسیر آنتی اکسیداتیو و پر اکسیداسیون لیپیدهای غشا می شود. هدف از انجام این پژوهش، بررسی تاثیر میکروپلاستیک پلی اتیلن ترفتالات و آفت کش آبامکتین به تنهایی و در ترکیب باهم بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و پراکسیداسیون لیپید ماهی زبرا بود. در این تحقیق ماهی های زبرا در معرض یک غلظت آبامکتین ABM (mg L^{-1} ۰/۰۰۶) و دو غلظت میکروپلاستیک پلی اتیلن ترفتالات PET (mg L^{-1} ۵ و ۱۰) و ترکیب آنها با یکدیگر (ABM mg L^{-1} ۰/۰۰۶ و PET mg L^{-1} ۵) و (ABM mg L^{-1} ۰/۰۰۶ و PET mg L^{-1} ۱۰) قرار گرفتند. در پژوهش، فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز و میزان مالون دی آلدهید (MDA)، به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها مورد بررسی قرار گرفت. تحلیل نتایج به روش (One-way ANOVA) وسطح معنی دار ۰/۰۵ > Pvalue نشان داد که میزان مالون دی آلدهید در تیمار ABM mg L^{-1} ۰/۰۰۶ نسبت به کنترل کاهش معنی دار و فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در تیمار ABM mg L^{-1} + PET mg L^{-1} ۵ و تیمار ABM mg L^{-1} ۰/۰۰۶ + PET mg L^{-1} ۱۰، نسبت به کنترل افزایش معنی دار یافته است و نیز تحلیل نتایج به روش (Two-way ANOVA) نشان داد که فقط تیمار ABM mg L^{-1} ۰/۰۰۶ + PET mg L^{-1} ۱۰، در آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز دارای اثر متقابل (هم افزایی) است و در بقیه تیمارهای ترکیبی چنین اثری مشاهده نشد.

واژگان کلیدی: میکروپلاستیک، آبامکتین، پلی اتیلن ترفتالات، گلوتاتیون پراکسیداز، لیپید پراکسیداسیون.

* نویسنده مسئول: پریچهر حناچی
Email: p.hanachi@alzahra.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 73, No. 3, Autumn 2020
pp. 361-372

Effect of polyethylene terephthalate microplastics and abampectin pesticides on glutathione peroxidase enzyme activity and lipid peroxidation in Zebra fish

Parichehr Hanachi[1]*, Somayeh Kazemi [2],Sara Zivary[2], Samaneh Karbalaei[3]

1. Associate Professor, Biotechnology Dept., Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
1. M.Sc. Graduated student, Biotechnology Dept., Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
1. Post Doc Researcher, Biotechnology Dept., Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

Received: 16-Jun-2020 **Accepted: 15-Sep-2020**

Abstract

Microplastic (MP) sorption and transfer of chemical contaminants has been widely reported, yet few studies have investigated combined effects of contaminant-loaded MPs on organisms. Microplastics can act as carriers of environmental chemical pollutants and pesticides. Absorption of these particles by living organisms, especially aquatic organisms, causes changes in the activity of enzymes in the antioxidant pathway and peroxidation of membrane lipids. The aim of this study was to investigate the microplastic effect of polyethylene terephthalate and abamectin pesticide alone and in combination on glutathione peroxidase (GPX) activity and lipid peroxidation of zebrafish. In this study, zebrafish were exposed to a concentration of abamectin (0.006 $mg\ L^{-1}$) and two microplastic concentrations of polyethylene terephthalate (5 and 10 $mg\ L^{-1}$) and Their combination (0.006 mg L^{-1} ABM +5 mg L^{-1} PET) and (0.006 mg L^{-1} ABM +10 mg L^{-1} PET). In this study, the activity of glutathione peroxidase and malondialdehyde (MDA) were evaluated as indicators of lipid peroxidation. Analysis of results by one-way ANOVA method and significance of Pvalue <0.05 showed that the amount of malondialdehyde in treatment (0.006 $mg\ L^{-1}$ ABM) was significantly decreased compared to the control and glutathione peroxidase activity in treatment 0.006 $mg\ L^{-1}$ ABM +5 $mg\ L^{-1}$PET *and* treatment 0.006 $mg\ L^{-1}$ ABM +10 $mg\ L^{-1}$PET was significantly increased compared to the control group. Also, analysis of the results by Two-way ANOVA method showed interaction in 0.006 $mg\ L^{-1}$ ABM +10 $mg\ L^{-1}$PET treatment in glutathione peroxidase enzyme and this effect was not observed in other combination treatments.

Key words: Microplastic, Abamactin, Polyethylene Terephthalate, Glutathione Peroxidase, Lipid, Peroxidation.

Corresponding author: Parichehr Hanachi Email: p.hanachi@alzahra.ac.ir

۱. مقدمه

افزایش فراوانی و توزیع گسترده میکروپلاستیکها، یکی از مهمترین نگرانیهای جوامع زیستی است که محیط دریایی به علت بیشترین اثرپذیری، بسیار مورد توجه اند (Clark *et al.*, 2016). اگر چه اولین گزارش آلودگی پلاستیکی دریایی مربوط به سال ۱۹۷۰ است اما تا اوایل قرن ۲۱ نگرانی خاصی در مورد این آلاینده ها وجود نداشت (Frias *et al.*, 2016).

پلاستیکها یا پلیمرهای آلی سنتزی ازمواد طبیعی، آلی و موادی مانند زغال سنگ، گازطبیعی ونفت خام با استفاده از فرآیند پلیمریزاسیون سنتز می شوند (Phuong *et al.*, 2016). دوام، هزینه پایین وکاربرد گسترده پلاستیک، آن را به یک محصول پرطرفدار در سراسر جهان تبدیل کرده است (Cole *et al.*, 2011).

روند تولیدجهانی، الگوهای مصرف و دفع نامناسب زباله های پلاستیکی نشان می دهد که تقاضای مصرف پلاستیک به صورت نمایی درحال رشد است و رشد قابل توجهی در تولید جهانی پلاستیک در۵۰ سال گذشته گزارش شده است واز ۱/۷میلیون تن در سال ۱۹۷۰ به ۳۳۵ میلیون تن در سال ۲۰۱۶ رسیده است (Europe, 2016) تخمین زده می شود که سالانه بین ۴/۸ تا ۱۲/۷ میلیون تن پلاستیک وارد محیط دریایی می شود ۱۸/۱۰/۲۰۲۰. اگر چه مزایای مصرف پلاستیک بسیار گسترده است اما به علت دفع دشوار آن، این کالای با ارزش به یک نگرانی زیست محیطی قابل توجه برای بخش های دولتی وخصوصی و دانشمندان وعموم مردم تبدیل شده است (Seltenrich, 2015).

پلاستیک ها به علت وزن سبک به همراه باد و آب جا به جا شده و وارد منابع آبی می شوند. این مواد پس از ورود به محیط زیست دریایی، وارد زنجیره غذایی جانوران دریایی می شوند. پلاستیک های بلعیده شده حتی پس از مرگ جانوران و تجزیه آنها سالم باقی می مانند. بنابراین، دوباره پراکنده شده و به از بین بردن حیاتی دیگر ادامه می دهند، اگرچه امروزه تولید پلاستیک های زیست تخریب پذیر بسیار مطرح می شود، اما تولید این مواد هنوز در مرحله جایگزینی قرار نگرفته است (North andHalden, 2013). پلاستیک ها مراحل مختلف تخریب را در محیط طی می کنند و تبدیل به میکروپلاستیک می شوند (Andrady, 2015).

میکروپلاستیک ها قطعات و ذرات پلاستیک هستند که سایز کوچکتر از ۵ میلی متر دارند و از نظر منبع تولید به دوگروه تقسیم می شوند (Hanachi *et al.*, 2019). که عبارتند از میکروپلاستیک های اولیه که به اندازه میکروسکوپی تولید شده اند و در صنایع مختلف همچون صنایع آرایشی و بهداشتی استفاده می شوند (Andrady, 2015). و همچنین استفاده از آنها به عنوان ماتریکس داروها نیز گزارش شده است (Patel *et al.*, 2009). میکروپلاستیک های ثانویه از تجزیه قطعات بقایای پلاستیکی بزرگتر در سطح دریا و یا روی زمین به وجود می آیند. درطی زمان انواعی از روش های تجزیه نوری، شیمیایی، زیستی و فیزیکی می توانند یکپارچگی ساختاری زباله های پلاستیکی را به اندازه ای کاهش دهند که در نهایت برای انسان قابل تشخیص نباشند و میکروپلاستیک های ثانویه ایجاد شود (Prokić *et al.*, 2019).

میکروپلاستیک ها چون اندازه ای شبیه پلانکتون ها دارند توسط موجودات آبزی مانند ماهی و بی مهرگان بلعیده می شوند و از طریق زنجیره غذایی سرانجام تهدید بالقوه ای را برای انسان ایجاد می کنند (Van Cauwenberghe andJanssen, 2014). این موضوع نگرانی های کلی را در مورد تاثیرات زیست محیطی و بهداشتی میکروپلاستیک ها روی زنجیره غذایی ایجاد می کند. بلعیدن میکروپلاستیک توسط موجودات دریایی می توانند باعث انسداد دستگاه گوارش ،پاسخ های التهابی ،کاهش ذخیره انرژی، کاهش تولیدمثل، کاهش رشد، آسیب اکسیداتیو واختلال در متابولیسم و فعالیت سلولی شود (Duis andCoors, 2016). گزارش شده است که حدود ۸۰۰ گونه ی دریایی تحت تاثیر پلاستیک قرار می گیرد و با ادامه سوء مدیریت احتمالا تعداد گونه های در گیر نشت پلاستیک به محیط دریایی افزایش می یابد (Karbalaei *et al.*, 2019).

پلی اتیلن ترفتالات (Polyethylene terephthalate) یا PET ، پرکاربردترین ترموپلاستیک جهان است. پلاستیک PET به علت شفافیت بالا، مقاومت در برابر سایش، دما، نفوذگازها، دارا بودن وزن کم و ارزان بودن

قیمت به طور گسترده در صنایع نساجی، لاستیک سازی، پزشکی و تولید بطری های نوشیدنی و بسته های مواد غذایی مورد استفاده قرار می گیرد. به علت تولید انبوه PET و تجزیه ناپذیری ضایعات آن توسط طبیعت تهدیدی بسیار جدی برای محیط زیست محسوب می شود (Song *et al.*, 2019).

آلاینده های شیمیایی در سطح یا درون پلاستیک قرار می گیرند زیرا پلاستیک ها از مواد آبگریز ساخته شده اند بنابراین میکروپلاستیک می توانند به عنوان حامل آلاینده های آبگریز عمل کنند(Cole *et al.*, 2011). یکی از آلاینده های شیمیایی که ممکن است توسط میکروپلاستیک ها حمل شود آفت کش ها هستند. آفت کش ها برای از بین بردن آفات و افزایش محصول وبهره وری در صنعت کشاورزی تولید شده اند. با این حال، استفاده گسترده از آفت کش ها خطراتی را برای موجودات غیرهدف و محیط زیست ایجاد می کند. در بین آفت کش ها، آبامکتین رایج ترین ترکیب مورد استفاده در چند دهه اخیر است که به طور موثر برای حفاظت از محصولات کشاورزی واهداف دارویی به کار می رود (Bai and Ogbourne, 2016).

آبامکتین از گروه آورمکتین ها با منشا میکروبی است که از تخمیر یک اکتینومیست به نام Streptomyses avermectilis بدست می آید. اکتینومیست ها یک سرده از باکتریها، رده اکتینو باکترها می باشند که شباهت زیادی به قارچ ها دارند ولی به علت عدم وجود هسته و ترکیبات پپتیدوگلیکان در دیواره، پروکاریوت محسوب می شوند. هدف اصلی آبامکتین اثر برکانال های کلر حاوی گاما آمینوبوتیریک اسید (GABA) است و با تاثیر آبامکتین به گیرنده های گابا، یون کلر وارد سلول عصبی می شود و پتانسیل غشا را منفی تر کرده ودرنتیجه مانع ایجاد پتانسیل عمل جدید می شود (Bai andOgbourne, 2016).

استفاده مداوم از آبامکتین (ABM) خطراتی زیست محیطی بالقوه را به ویژه در اکوسیستم های آبی ایجاد می کند(Hong *et al.*, 2020). آبامکتین به عنوان عامل ضدعفونی کننده و یک حشره کش کارآمد به طور گسترده در کشاورزی و درمان بیماری ها در دام ها به کار می رود. اطلاعات کمی در مورد اثرات باقی مانده آبامکتین در محیط زیست وجود دارد. بنابراین، تحقیقات در مورد اثرات اکوتوکسیکولوژیک ABM روی موجودات آبزی ضروری است (Hong *et al.*, 2020). مطالعات متعددی نشان داده اند که ABM برای گونه های آبزی بسیار سمی است (Tišler andEržen, 2006). آبامکتین سمیت کمتری در پستانداران دارد ولی می تواند از سدخونی ومغزی ماهی عبور و متعاقبا اثرات سمی را اعمال کند (Wislocki *et al.*, 1989).

قرار گرفتن در معرض برخی زنوبیوتیک ها می تواند غلظت رادیکال های آزاد را افزایش و یا متعاقبا دفاع آنتی اکسیدانی را کاهش دهد(Bartoskova *et al.*, 2013). برای محافظت در برابر رادیکال های آزاد، ارگانیسم های هوازی یک سیستم آنتی اکسیدانی سلول بیو شیمیایی ایجاد می کند و این سیستم شامل آنتی اکسیدان های آنزیمی، غیر آنزیمی و مسیرهایی است که برای جلوگیری از آسیب سلولی طراحی شده اند (Browne *et al.*, 2013). اجزای آنزیمی عبارتنداز : سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX)،گلوتاتیون S -ترانسفراز (GST) ،گلوتاتیون ردوکتاز (GR) و از اجزای غیر آنزیمی گلوتاتیون را نام برد. آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز به عنوان یکی از آنزیم های اولین خط دفاعی در نظر گرفته می شود که مستقیما رادیکال های آزاد اکسیژن را از بین می برند. این آنزیم در طی کاهش هیدروپراکسیدهای چربی به الکل یا پراکسید هیدروژن به آب، گلوتاتیون کاهشی (GSH) را به گلوتاتیون اکسید شده (GSSG) تبدیل می کند (Hanachi andShemshaki, 2010).

پراکسیدا سیون لیپیدها یک واکنش زنجیره ای در سطح مولکولی است که منجر به آسیب اکسیداتیو غشای سلولی، لیپوپروتئین ها و سایر ساختارهای حاوی لیپید می شود. پراکسیدا سیون لیپیدهای غشایی باعث تغییر ساختار وعملکرد دولایه لیپیدی، تغییر در نفوذ پذیری غشا وافزایش نفوذ سلول ها نسبت به عوامل سمی می شود. بنابراین، اندازه گیری مالون دی آلدهید به عنوان محصول پراکسیداسیون لیپیدی، یک بیومارکر مهم برای بررسی میزان اثر آلاینده های زیست محیطی است (Ayala *et al.*, 2014).

ماهی زبرا با نام علمی *Danio rerio* که در این پژوهش از آن استفاده شده است متعلق به خانواده Cyprindeai

است. استفاده از این ماهی اولین بار در دهه ۱۹۷۰ توسط Streisingerو همکارانش به عنوان مدل ژنتیکی به اثبات رسیده است(Streisinger *et al.*, 1981). ازآن زمان به بعد، به علت شباهت بالای ژنتیکی، فیزیولوژیکی و فارموکولوژی ماهی زبرا با انسان و همچنین به جهت سهولت و هزینه نگهداری پایین، باروری بالا و دسترس بودن کامل توالی ژنوم به یک گونه محبوب برای تحقیقات سم شناسی، پزشکی، ژنتیکی تبدیل شده است (Gerlai *et al.*, 2000).

لذا، هدف از این پژوهش، تاثیر آفت کش آبامکتین (ABM) و میکروپلاستیک پلی اتلیلن ترفتالات (PET) به صورت جداگانه ودر ترکیب با یکدیگر بر فعالیت آنزیم گلوتاتیون پر اکسیداز و پراکسیدا سیون لیپیدها در ماهی زبرا بررسی شد.

۲. مواد و روش

۱.۲. تهیه ماهی

چهارصد قطعه ماهی زبرای ۴۰ تا ۴۵ روزه، با وزن تقریبی ۰/۰۱ گرم از یک مزرعه پرورش ماهی در چالوس، خریداری و به آزمایشگاه بیوشیمی واقع در دانشکده علوم زیستی دانشگاه الزهرا منتقل شد. ماهی ها برای سازگاری با شرایط محیط آزمایش به مدت دو هفته در ۱۴ آکواریوم ۱۲ لیتری حاوی آب بدون کلر، سنگ هوادهی و در دمای ۲۶-۲۲ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و دو بار در روز تغذیه شدند.

۲.۲. آماده سازی میکروپلاستیک

گلوله های پلی اتیلن ترفتالات (PET) خالص به وسیله مخلوط کن صنعتی در پژوهشگاه پلیمر ورد آور کرج و با استفاده از ا لک Ultra Centrifugal Mill ZM 200 (Germany) به اندازه کوچکتر از ۵۰۰ میکرومتر جداسازی شد.

۳,۲ .تهیه آفت کش

آ فت کش آ بامکتین با(CAS – No. 71751-41-2) از شرکت تولید فراورده های شیمیایی ایران خریداری شد و غلظت انتخاب شده برای سم آبامکتین کمتر از میزان LC_{50} آبامکتین (۰/۰۵۵ mgL^{-1}) برای ماهی زبرا آماده سازی شد (Tišler and Eržen, 2006).

۴.۲. طراحی آزمایش

غلظت های میکروپلاستیک بر اساس مطالعه گذشته (LeMoine *et al.*, 2018) انتخاب شد و غلظت آفت کش با توجه به غلظت LC_{50} گزارش شده ماهی بالغ برای آبامکتین که ۰/۰۵۵ mgL^{-1} در نظر گرفته شد. با توجه به حساسیت بیشترماهی زبرای نوجوان نسبت به سم آبامکتین نسبت به ماهی بالغ و تعیین LC_{50} ۰/۰۱۷ mgL^{-1}میلی گرم در لیتر برای ماهی نوجوان زبرا نسبت به سم ایورمکتین که هم خانواده آبامکتین ا ست که ۰/۰۱۷ mgL^{-1}میلی گرم در لیتر است، در نهایت مقدارغلظت ۰/۰۰۶ mgL^{-1} برای غلظت سم مورد استفاده انتخاب شد (Sanches *et al.*, 2018). ماهی ها به صورت تصادفی در۱۴ آکواریوم تقسیم شدند. برای هر تیمار دو آکواریوم در نظر گرفته شد و در هر آکواریوم ۱۵ عدد ماهی قرار گرفت. ماهی ها به مدت ۹۶ ساعت در معرض تیمارهای که در جدول ۱ شرح داده شده قرار گرفتند.

جدول ۱- تیمارهای مختلف مبتنی بر بکار گیری غلظت مختلف سم آبامکتین و میکرو پلاستیک

نوع تیمار	غلظت mgL^{-1}		
کنترل	۰	۰	۰
کنترل استون	۰/۰۰۶	۰	۰
آبامکتین	۰/۰۰۶	۰	۰
میکروپلاستیک	۰	۰	۵
میکروپلاستیک	۰	۰	۱۰
ترکیب آبامکتین و میکروپلاستیک	۰	۰/۰۰۶	۵
ترکیب آبامکتین و میکروپلاستیک	۰	۰/۰۰۶	۱۰

به علت جلوگیری از انباشته شدن آفت کش ومیکروپلاستیک در آکواریوم و ایجاد خطا در آزمایش و سیفون غذاهای باقی مانده از کف آکواریوم، آب آنها هر روز به میزان ۵۰ در صد تعویض شد و ماهی یکبار در روز تغذیه شدند. بعد از ۹۶ ساعت نمونه ها با ا ستفاده از یخ کشته شدند و بلافاصله به یخچال ۸۰- منتقل شدند.

۵.۲. فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPX)

اندازه گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز توسط کیت نوند سلامت و بر اساس روش (Hafeman *et al.*, 1974) انجام گرفت. ۱۰۰میلی گرم از نمونه های ماهی زبرا وزن شده و با بافر فسفات سالین (PBS) شسته شد. سپس نمونه ها با اضافه کردن ۲۰۰میکرولیتر Assay buffer هموژن شدند. نمونه های هموژن شده به لوله های سانتریفیوژ منتقل و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد و با دور ۹۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. محلول رویی به لوله های جدید منتقل و رسوب باقی مانده دور ریخته شد. محلول استاندارد NADPH با غلظت های ۰و۲۰ و۴۰و۶۰ و۸۰ و۱۰۰ نانومول در میکرولیتر تهیه و برای رسم منحنی استاندارد مورد استفاده قرار گرفت. سپس ۵۰ میکرولیتر از نمونه های محلول وهمچنین غلظت های مختلف استاندارد به چاهک های پلیت الایزا اضافه شده و۴۰ میکرولیتر از Reagent1 حاوی(GR، GSH، NADPH) اضافه شد. بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق با اضافه کردن ۱۰ میکرولیتر Reagent 2 که حاوی Cumene (hydroperoxide) واکنش آغاز شد. جذب نوری نمونه ها واستانداردها در زمان صفردر طول موج ۳۴۰ نانومتر خوانده شد و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و برای بار دوم جذب نوری نمونه ها و استانداردها در طول موج ۳۴۰ نانومتر خوانده شد.

۶.۲. فعالیت پراکسیداسیون لیپیدها

سطح پراکسیداسیون لیپیدها با استفاده از شاخص مالون دی آلدهید اندازه گیری شد (Ohkawa *et al.*, 1979). سنجش مذکور بر اساس میزان مهار تیوباربیتوریک اسید توسط MDA موجود بافت صورت می گیرد. به طوریکه هر چقدر سطح MDA افزایش یابد میزان مهار بیشتر شده در نتیجه رنگ کمتری در محلول تولید می شود در نتیجه جذب نوری نیز کاهش می یابد. ۱۰۰ میلی گرم از نمونه های ماهی وزن شده و با بافر فسفات سالین (PBS) ۰/۰۵مولار و pH=۷/۵ شسته شدند. نمونه ها با اضافه کردن ۲ میلی لیترکلرید پتاسیم 1.15% KCl درصد هموژن شدند. در یک لوله آزمایش یک حجم از بافت هموژن شده با ۲ حجم از assay buffer (15%TCA و 0.37% TBA 0.25 mol L^{-1} HCL) مخلوط شد و ۱۵ دقیقه در حمام آب با دمای ۹۰-۱۰۰ قرارگرفت. نمونه ها در دمای اتاق سرد شد و سپس در دمای ۴ درجه با دور g ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرنانت حاصل جدا شد و جذب در طول موج ۵۳۵ نانومتر خوانده شد و با استفاده از معادله بیرلامبرت میزان مالون دی آلدهید در نمونه ها با در نظر گرفتن ثابت جذب 1.56×10^5 محاسبه شد.

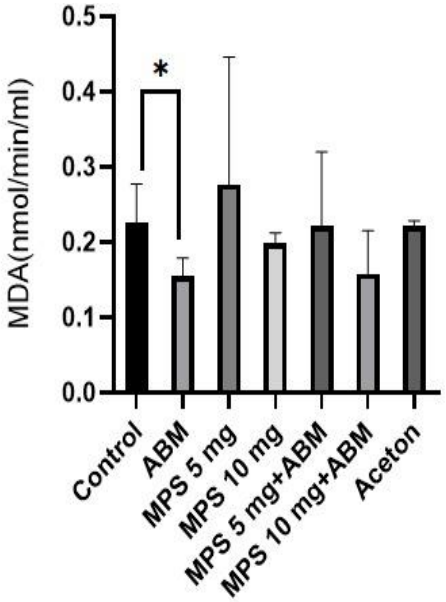
۷.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده ها

در این مطالعه برای تجزیه آماری داده ها و رسم نمودار از نرم افزار Graphpad prism مدل 8.4.0 استفاده شد و تحلیل نتایج به روش آزمون واریانس یک طرفه-One way ANOVA) برای شاخص های آنزیمی و Two-way ANOVA) برای بررسی اثر هم افزایی با سطح معناداری $P<0.05$ انجام شد.

۳. نتایج

نمودار شکل۱میزان مالون دی آلدهید را در ماهی زبرا نمایش می دهد. نتایج نشان داد که میزان مالون دی آلدهید در تیمارهای آبامکتین (ABM)، MPS 10 mg، (MPS 10 mg+ ABM) نسبت به کنترل کاهش و در تیمار MPS 5 mg، نسبت به کنترل افزایش می یابد و در تیمار(MPS 5 mg+ ABM) مشابه کنترل است. همچنین بررسی آماری پراکسیداسیون لیپیدها توسط نرم افزار Graphpap prism و با Pvalue<0.05 نشان دهنده کاهش معنادار این شاخص در تیمار ABM ۰/۱۵۴±۰/۰۲۴ نسبت به گروه کنترل بود. نمودارشکل۲ میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در ماهی زبرا را نشان می دهد. همانطورکه در نمودار مشاهده می شود درتمام تیمارها فعالیت آنزیم نسبت به کنترل افزایش می یابد. همچنین بررسی آماری فعالیت آنزیمی توسط نرم افزار Graphpap prism و با Pvalue<0.05 نشان می دهد که تیمار MPS 10 mg+ ABM۰/۲۱۶±۰/۰۰۶ و MPS 5 mg+ ABM۰/۲۴۹±۰/۰۱۶ نسبت به کنترل افزایش معنادار ($p<0.05$) داشته است. و تحلیل نتایج با (Two-way ANOVA) نشان داد که ترکیب میکروپلاستیک و سم فقط در تیمار MPS 5 + ABM

۰/۲۴۹±۰/۰۱۶mg آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز دارای اثر متقابل (هم افزایی) اســـت و در بقیه تیمارهای ترکیبی چنین اثری مشاهده نشد.

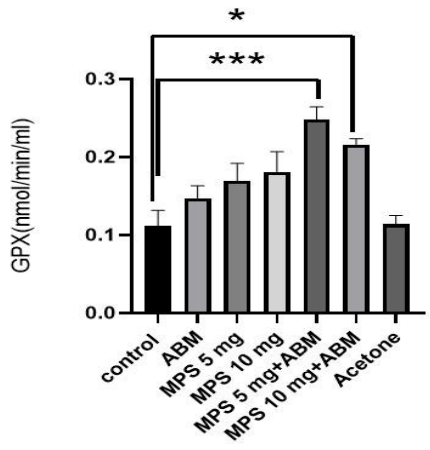


شکل۱- نمودار مقایسه ای میزان مالون دی آلدهید (ABM)، در تیمار های مختلف میکرو پلاستیک پلی اتیلن ترفتالات (PET) و آفت کش آبامکتین(ABM) در پایان آزمایش.

۴. بحث و نتیجه گیری

آنزیم گلوتاتیون پراکسـیداز (GPx) که یکی از آنزیم های مهم مســیر آنتی اکســیداتیو اســت و مالون دی آلدهید (MDA) که یک محصول تولیدی در مسیر پراکسیداسیون لیپید ها و جزیی از چرخه اسـترس اکسـیداتیو اسـت، در این پژوهش به عنوان بیو مارکر انتخاب شـــدند. وجود آلاینده های زیسـتی در محل زندگی و تغذیه موجودات و تجمع زیستی این مواد باعث افزایش تولید گونه های فعال اکســیژن و یا نیتروژن و یا به طور کلی رادیکال های آزاد شده ، که مسیر آنتی اکسیداتیو وظیفه حذف و یا سمیت زدایی از این مواد تولیدی را دارد (Afifi *et al.*, 2017). مطالعات گذشـته نشـان داده اسـت که حضـور میکروپلاسـتیک ها می تواند به عنوان بسـتری برای انباشـتگی سـموم عمل کرده و جذب این ذرات می تواند برای سلامتی موجود زنده خطرناک با شد (Lohmann, 2017).

در این مطالعه با قرار دادن ماهی در غلظت های متفاوت میکروپلاســتیک و آفت کش به تنهایی و در ترکیب با هم



شکل۲- نمودار فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) در تیمار های مختلف میکرو پلاستیک پلی اتیلن ترفتالات (PET) و سم آبامکتین (ABM) در ماهی زبرا در پایان آزمایش (* نمایانگر تفاوت های قابل ملاحظه($P<0.05$) گروه ها و***نمایانگر تفاوت قابل ملاحظه در سطح $P<0.0005$ است).

به بررســی تغییرات ســطح مالون دی آلدهید به عنوان شــاخص پراکســیداســیون لیپیدها و تغییر فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز به عنوان یک بیومارکر آنزیمی مسیر آنتی اکسیداتیو پرداخته شد. آفت کش آبامکتین از سموم پر ا ستفاده و کاربردی در صنعت بسیاری از کشور ها از جمله ایران است و همچنین پلاستیک پلی اتیلن ترفتالات پر کاربرد ترین پلاستیک در صنایع امروزی جهان است.

در مطالعه حاضــر تنها آفت کش آبامکتین باعث کاهش قابل توجه بر فعالیت مالون دی آلدئید (MDA) در طول ۹۶ ســاعت دوره آزمایش شــد و در تیمارهای ترکیبی آبامکتین و میکروپلاســتیک تغییر معناداری در فعالیت MDA مشــاهده نشــد. مطالعه ای در ســال ۲۰۱۲ روی ماهی کپور *Cyprusinus carpio* L درراســتای ارزیابی القای اسـترس اکسـیداتیو توسـط سـموم دفع آفات نباتی مانند کاربامات ها صورت گرفت با توجه با اینکه این سم ها به طور گسترده به عنوان حشره کش ها استفاده می شــوند و اکوســیســتم های آبزیان را آلوده می کنند. این ماهی ها تحت تاثیر ۴ غلظت از کربوفوران قرار گرفتند و در ۳ بازه زمانی با نمونه برداری اثر این ســم مورد ارزیابی قرار گرفت. دربافت کبد این ماهی ها پس از ۳۰ روز قرار

گرفتن در معرض سم کاهش میزان MDA را در تیمار حاوی بیشترین غلظت کاربوفوران مشاهده کردند (Ensibi *et al.*, 2012).که نتایج کاهشی درMDA با نتایج بدست آمده در این مطالعه مطابقت دارد. در پژوهشی دیگر تاثیر حضور میکروپلاستیک پلی استایرن به همراه نوعی آلاینده به نام روکسیترومایسین در ماهی تیلاپیای قرمز *Oreochromis niloticus* در مدت ۱۴ روز تیمار نشان دادکه میزان مالون دی آلدهید در حضور فلورانتین به تنهایی افزایش می یابد اما در مرحله بعد در دوره ۷ روزه پاکسازی کاهش غلظت مالون دی آلدهید در ماهی های تحت تیمار میکروپلاستیک به صورت ترکیبی با روکسیترومایسین را مشاهده کردند (Zhang *et al.*, 2019). در مطالعه ای دیگر تاثیر سم سولفونامید بعد از ۷۲ ساعت روی ماهی زبرا بررسی شد و مالون دی آلدهید به عنوام یک بیومارکر حساس به زمان مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان مالون دی آلدهید بعد از ۲۴ ساعت به میزان حداکثری رسیده و سپس با گذشت زمان به حد کنترل کاهش می یابد (Lin *et al.*, 2014)،در این ارتباط، معنی دار نبودن میزان فعالیت MDA در تیمارهای ترکیبی آفت کش و میکروپلاستیک در مطالعه حاضر ممکن است به دلیل طول دوره آزمایش، نوع ماهی و نوع آلاینده باشد.

در مطالعه حاضر در غلظت ترکیب آفت کش آبامکتین و میکروپلاستیک، شاهد افزایش آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز بودیم. در پژوهشی روی ماهی *Symphysodon aequifasciatus* که تحت تاثیر سه غلظت مختلف میکروپلاستیک پلی استایرن و دو غلظت متفاوت کادمیوم قرار گرفت مشخص شد که فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در حالت ترکیبی کادمیوم و میکروپلاستیک افزایش می یابد و این افزایش در غلظت پایین تر میکروپلاستیک بیشتر می شود (Wen *et al.*, 2018). که با نتایج به دست آمده در این پژوهش مطابقت دارد و در تیمار با میکروپلاستیک ۵ میلی گرم و ۱۰ میلی گرم به همراه آفت کش آبامکتین روند افزایشی این آنزیم وکاهش سمیت آبامکتین ثبت شد. در مطالعه ای دیگر که بر روی صدف آب شور انجام شد، مشاهده شد که فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز پس از ۳ و ۶ روز قرار گرفتن در معرض ترکیب میکروپلاستیک پلی استایرن و پلی اتیلن با پیرن کاهش پیدا کرد (Avio *et al.*, 2015). در پژوهشی صدف *Scrobicularia plana* تحت تیمار میکروپلاستیک پلی استایرن دریک غلظت و دوره تیمار ۱۴ روزه و پاکسازی ۷ روزه قرار گرفت. نتایج برر سی ها حاکی از این بود که بعد از دوره تیمار افزایش GPX نسبت به کنترل دیده می شود که این روند افزایشی تا انتهای زمان پاکسازی ادامه دارد (Ribeiro *et al.*, 2017). مطالعات بیشتر در زمینه اثر ترکیبی آفت کش آبامکتین و انواع پلیمر های دیگرمیکروپلاستیک روی آنزیم GPX روی انواع دیگر ماهی و طول دوره بیشتر پیشنهاد می شود.

در این مطالعه میکروپلاستیک به تنهایی تاثیری در میزان فعالیت MDA و GPX نشان نداد. تعدادی از مطالعات گذشته هم نشان داده بود که میکروپلاستیک ها به تنهایی تاثیر قابل توجه بر موجودات ندارد(Karami *et al.*, 2017; Jovanović *et al.*, 2018). بر عکس مطالعات متعددی تاثیر میکروپلاستیک ها را به تنهایی بر تعدادی از موجودات نشان داده است (Karbalaei *et al.*, 2020). برای مثال تاثیر میکروپلاستیک پلی استایرن به تنهایی روی شاخص های هیستوپاتولوژی در آبشش ماهی قزل آلا مشاهده شده است (Karbalaei *et al.*, 2020) که این تفاوت ها در مطالعات مختلف ممکن است به دلیل تفاوت در نوع پلیمر میکروپلاستیک و نوع موجود زنده باشد.

در مطالعه انجام شده در این پژوهش مشخص شد که در حضور آفت کش آبامکتین تولید مالون دی آلدهید نسبت به کنترل کاهش یافته است. همچنین حضور غلظت کم میکروپلاستیک به همراه سم باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و میزان مالون دی آلدهید و آسیب بافتی نسبت به حضور آفت کش آبامکتین به تنهایی می شودکه این تفاوت در نتایج را می توان به علت تفاوت موجود زنده، نوع بافت مورد بررسی، بازه زمانی متفاوت وغلظت های متفاوت آفت کش مورد بررسی قلمداد کرد. همچنین در این پژوهش مشخص شدکه میکروپلاستیک و سم به تنهایی می تواند باعث افزایش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز شود و فعالیت آنزیمی GPX در حالت ترکیبی سم آبامکتین و میکروپلاستیک افزایش یافته و این افزایش در غلظت پایین تر میکروپلاستیک بیشتر است .

نتـایج این پژوهش و پژوهش هـای پیشـــین توانـایی میکروپلا ستیک ها را در ایجاد تغییر در سمیت آفت کش ها را نمایان می کند و در این مطالعه نشـان داده شـد که میکروپلا ستیک می تواند باعث افزایش سمیت آفت کش در موجودات زنده شود.

سپاس گزاری

از دانشگاه الزهرا به لحاظ فراهم نمودن امکانات و همکاری تمام دســـت اندرکاران در انجام این پژوهش، قدردانی می گردد.

۵. منابع

References

Afifi, M., Alkaladi, A., Zinada, O.A.A., Couderchet, M., 2017. Alteration in antioxidant genes expression in some fish caught from Jeddah and Yanbu coast as a bio-indicator of oil hydrocarbons pollution. Saudi Journal of Biological Sciences 24(7), 1580-1587.

Andrady, A.L., 2015. Persistence of plastic litter in the oceans. In: (Eds.), Marine anthropogenic litter. Springer, Cham, 57-72.

Avio, C.G., Gorbi, S., Milan, M., Benedetti, M., Fattorini, D., d'Errico, G., Pauletto, M., Bargelloni, L., Regoli, F., 2015. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. Environmental Pollution 198(1), 211-222.

Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S., 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxidative medicine and cellular longevity 2014, 31.

Bai, S.H., Ogbourne, S., 2016. Eco-toxicological effects of the avermectin family with a focus on abamectin and ivermectin. Chemosphere 154(1), 204-214.

Bartoskova, M., Dobsikova, R., Stancova, V., Zivna, D., Blahova, J., Marsalek, P., Zelnickova, L., Bartos, M., Di Tocco, F.C., Faggio, C., 2013. Evaluation of ibuprofen toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) targeting on selected biomarkers of oxidative stress. Neuroendocrinology Letters 34(1), 102-108.

Browne, M.A., Niven, S.J., Galloway, T.S., Rowland, S.J., Thompson, R.C., 2013. Microplastic moves pollutants and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. Current biology 23(2), 2388-2392.

Clark, J.R., Cole, M., Lindeque, P.K., Fileman, E., Blackford, J., Lewis, C., Lenton, T.M., Galloway, T.S., 2016. Marine microplastic debris: a targeted plan for understanding and quantifying interactions with marine life. Frontiers in Ecology and the Environment 14(6), 317-324.

Cole, M., Lindeque, P., Halsband, C., Galloway, T.S., 2011. Microplastics as contaminants in the marine environment: a review. Marine pollution bulletin 62(12), 2588-2597.

Duis, K., Coors, A., 2016. Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. Environmental Sciences Europe 28(1), 2.

Ensibi, C., Moreno, D.H., Rodríguez, F.S., Yahya, M.D., Míguez-Santiyán, M., Pérez-López, M., 2012. Effects of subchronic exposure to carbofuran on antioxidant defence system and malondialdehyde levels in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Toxicological & Environmental Chemistry 94(-), 748-759.

Europe, P., 2016. Plastics—The Facts 2016. An analysis of European plastics production, demand and waste data, 1-38.

Frias, J., Gago, J., Otero, V., Sobral, P., 2016. Microplastics in coastal sediments from Southern Portuguese shelf waters. Marine environmental research 114(1), 24-30.

Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., Rosenthal, A., 2000. Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. Pharmacology biochemistry and behavior 67, 773-782.

Geyer, R., Jambeck, J.R., Law, K.L., 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. Science advances 3(7), 1700782.

Hafeman, D., Sunde, R., Hoekstra, W., 1974. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. The Journal of nutrition 104(5), 580-587.

Hanachi, P., Karbalaei, S., Walker, T.R., Cole, M., Hosseini, S.V., 2019. Abundance and properties of microplastics found in commercial fish meal and cultured common carp (*Cyprinus carpio*). Environmental Science and Pollution Research 26(23), 23777-23787.

Hanachi, P., Shemshaki, A., 2010. The antioxidant enzymes activities in blood of physical education students after eccentric and concentric training activities. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science 7(4), 501-504.

Hong, Y., Yin, H., Huang, Y., Huang, Q., Yang, X., 2020. Immune response to abamectin-induced oxidative stress in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. Ecotoxicology and environmental safety 188(30), 109889.

Karbalaei, S., Golieskardi, A., Hamzah, H.B., Abdulwahid, S., Hanachi, P., Walker, T.R., Karami, A., 2019. Abundance and characteristics of microplastics in commercial marine fish from Malaysia. Marine pollution bulletin 148(1), 5-15.

LeMoine, C.M., Kelleher, B.M., Lagarde, R., Northam, C., Elebute, O.O., Cassone, B.J., 2018. Transcriptional effects of polyethylene microplastics ingestion in developing zebrafish (*Danio rerio*). Environmental pollution 243(1A), 591-600.

Lin, T., Yu, S., Chen, Y., Chen, W., 2014. Integrated biomarker responses in zebrafish exposed to sulfonamides. Environmental Toxicology and Pharmacology 38(2), 444-452.

Lohmann, R., 2017. Microplastics are not important for the cycling and bioaccumulation of organic pollutants in the

oceans—but should microplastics be considered POPs themselves? Integrated environmental assessment and management 13(3), 460-465.
North, E.J., Halden, R.U., 2013. Plastics and environmental health: the road ahead. Reviews on environmental health 28(1), 1-8.
Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical biochemistry 95(2), 351-358.
Patel, M.M., Goyal, B.R., Bhadada, S.V., Bhatt, J.S., Amin, A.F., 2009. Getting into the brain. CNS drugs 23(1), 35-58.
Phuong, N.N., Zalouk-Vergnoux, A., Poirier, L., Kamari, A., Châtel, A., Mouneyrac, C., Lagarde, F., 2016. Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in laboratory experiments? Environmental Pollution 211(1), 111-123.
Prokić, M.D., Radovanović, T.B., Gavrić, J.P., Faggio, C., 2019. Ecotoxicological effects of microplastics: Examination of biomarkers, current state and future perspectives. TrAC Trends in Analytical Chemistry 111(1), 37-46.
Ribeiro, F., Garcia, A.R., Pereira, B.P., Fonseca, M., Mestre, N.C., Fonseca, T.G., Ilharco, L.M., Bebianno, M.J., 2017. Microplastics effects in *Scrobicularia plana*. Marine pollution bulletin 122(1), 379-391.
Sanches, A.L.M., Daam, M.A., Freitas, E.C., Godoy, A.A., Meireles, G., Almeida, A.R., Domingues, I., Espíndola, E.L.G., 2018. Lethal and sublethal toxicity of abamectin and difenoconazole (individually and in mixture) to early life stages of zebrafish. Chemosphere 210(7), 531-538.
Song, Y., Cao, C., Qiu, R., Hu, J., Liu, M., Lu, S., Shi, H., Raley-Susman, K.M., He, D., 2019. Uptake and adverse effects of polyethylene terephthalate microplastics fibers on terrestrial snails (*Achatina fulica*) after soil exposure. Environmental Pollution 250(8), 447-455.
Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., Singer, F., 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (Brachydanio rerio). Nature 291(5), 293-296.
Tišler, T., Eržen, N.K., 2006. Abamectin in the aquatic environment. Ecotoxicology 15(6), 495-502.
Van Cauwenberghe, L., Janssen, C.R., 2014. Microplastics in bivalves cultured for human consumption. Environmental pollution 193(1), 65-70.
Wen, B., Jin, S.-R., Chen, Z.-Z., Gao, J.-Z., Liu, Y.-N., Liu, J.-H., Feng, X.-S., 2018. Single and combined effects of microplastics and cadmium on the cadmium accumulation, antioxidant defence and innate immunity of the discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*). Environmental Pollution 243(1), 462-471.
Wislocki, P., Grosso, L., Dybas, R., 1989. Environmental aspects of abamectin use in crop protection. In: (Eds.), Ivermectin and abamectin. Springer, 2(-),182-200.