

مقاله پژوهشی

تاثیر نانوذرات پلی استایرن بر عملکرد رشد، میزان بازماندگی، فعالیت آنزیم‌های کبدی و بیان ژن‌های *IL1* و *IL8* در ماهی گورخری (*Danio rerio*)

احسان احمدی فر^{۱*}، پولین شهره^۲، ناصر کلهر^۳، محسن شهریاری مقدم^۴، سودان بیلماز^۵، صدیقه محمدزاده^۶، مصطفی خواجه^۷، صفورا ابرقویی^۸

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۲ DOI: 10.22124/japb.2023.24905.1504 تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۲

چکیده

نگرانی‌های گسترده‌ای در مورد اثرات سمی بالقوه میکروپلاستیک‌ها به عنوان آلاینده‌های نوظهور وجود دارد. مطالعه حاضر به منظور بررسی تاثیر نانوذرات پلی استایرن بر شاخص‌های رشد، بازماندگی، فعالیت آنزیم‌های کبدی و بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی *IL1* و *IL8* در ماهی گورخری (*Danio rerio*) انجام گرفت. ماهیان به چهار تیمار تغذیه‌ای تقسیم و به مدت یک ماه با جیره‌های حاوی صفر (شاهد)، ۱۰۰ (تیمار ۱)، ۵۰۰ (تیمار ۲) و ۱۰۰۰ (تیمار ۳) میلی گرم نانوپلی استایرن در کیلوگرم جیره تغذیه شدند. نتیجه این مطالعه نشان داد که افزایش وزن و نرخ رشد ویژه تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفتند و با افزایش غلظت نانوپلاستیک پلی استایرن کاهش معناداری داشتند ($P < 0.05$). بهترین ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای شاهد و ۱ مشاهده شد ($P < 0.05$). تلفاتی در تیمارهای مختلف مشاهده نشد. بیشترین غلظت آنزیم‌های ALT، ALP و AST در تیمار ۳ بود ($P < 0.05$). بیشترین میزان بیان ژن‌های *IL1* و *IL8* در تیمار ۳ و کمترین میزان بیان آن در تیمار شاهد بود ($P < 0.05$). به طور کلی، نتایج مطالعه حاضر نشان داد تغذیه ماهی گورخری با جیره حاوی نانوذرات پلی استایرن تاثیر منفی بر رشد (افزایش وزن و نرخ رشد ویژه) و شاخص‌های سلامتی ماهیان داشت و بیشترین اختلال در رشد و سلامت در غلظت‌های بالا مشاهده شد.

واژگان کلیدی: ماهی گورخری، پلی استایرن، رشد، بیان ژن، بازماندگی.

- ۱- دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
- ۲- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.
- ۳- مربی مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی مزانشیمی، جهاد دانشگاهی واحد استان قم، قم، ایران.
- ۴- دانشیار گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
- ۵- دانشیار گروه آبی پروری، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه چاناکاله ترکیه، چاناکاله، ترکیه.
- ۶- پسادکتری دانشکده دامپزشکی دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.
- ۷- استاد گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
- ۸- دکتری دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

* نویسنده مسئول: Ehsan.Ahmadifar@uoz.ac.ir

مقدمه

در مقیاس جهانی، بیش از نیمی از زباله‌های موجود در اقیانوس‌ها را پلاستیک‌ها تشکیل می‌دهند (Nobre et al., 2015). زمان نسبتاً طولانی مورد نیاز برای تجزیه، دوام آنها برای سال‌ها و انتشار به کمک باد و جریان‌های آبی در سراسر جهان، سبب شده است که پلاستیک‌ها برای محیط‌های دریایی یک تهدید جدی به شمار روند. اثرات مستقیم و غیرمستقیم این زباله‌ها بر انسان شامل مواردی مانند آسیب به بهداشت و ایمنی، تهدیدات ناوربی، کاهش درآمد حاصل از ماهیگیری پایدار، گردشگری و قایقرانی تفریحی در اثر از دست رفتن زیبایی محل، آسیب به موجودات دیگر و ظهور پلاستیک‌ها در سطوح تغذیه‌ای است (Gregory, 2009).

میکروپلاستیک‌ها و نانوپلاستیک‌ها به عنوان آلاینده‌های نوظهور و کمتر شناخته شده، طی چند دهه اخیر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند. در حال حاضر، میکروپلاستیک‌ها عموماً برای توصیف ذرات ریز پلاستیک یافت شده در سراسر اقیانوس‌ها که اندازه ۱ میکرومتر ۵ تا میلی‌متر دارند گفته می‌شود، در حالی که در اندازه کمتر از ۱ میکرومتر به عنوان نانوپلاستیک‌ها تعریف شده‌اند (Besseling et al., 2013).

میکروپلاستیک‌ها می‌توانند موجب تجمع آلاینده‌های آلی مثل آلاینده‌های نفتی، PCBs، PAHs و فلزات سنگین مانند سرب و کادمیوم در آب شوند. میکروپلاستیک‌ها از طریق زنجیره غذایی وارد بدن موجودات می‌شوند، به تدریج تجمع زیستی آنها در بافت‌ها افزایش می‌یابد و در نهایت باعث از بین رفتن بسیاری از گونه‌های دریایی و آلودگی مواد غذایی می‌شوند (Ashton et al., 2010).

همچنین آلاینده‌های آلی پایدار که در آب‌های سراسر دنیا با غلظت بسیار کم وجود دارند، به وسیله میکروپلاستیک‌ها حمل می‌شوند. آلودگی آلاینده‌های آلی پایدار موجب می‌شود تا غلظت این دسته از مواد در میکرو و نانوپلاستیک‌ها چند برابر غلظت این مواد در آب دریا باشد. وقتی این پلاستیک‌های آلوده توسط گونه‌های مختلف دریایی بلعیده شوند، وارد زنجیره غذایی می‌شوند (Teuten et al., 2009). پلی‌استایرن نه تنها یکی از پلاستیک‌های با تولید بالا است، بلکه یکی از اجزای عمده پلاستیک باقی مانده در محیط زیست است (Sadri and Thompson, 2014; Hu et al., 2015). تا کنون مطالعات زیادی برای ارزیابی پیامدهای فیزیولوژیکی،

در مقیاس جهانی، بیش از نیمی از زباله‌های موجود در اقیانوس‌ها را پلاستیک‌ها تشکیل می‌دهند (Nobre et al., 2015). زمان نسبتاً طولانی مورد نیاز برای تجزیه، دوام آنها برای سال‌ها و انتشار به کمک باد و جریان‌های آبی در سراسر جهان، سبب شده است که پلاستیک‌ها برای محیط‌های دریایی یک تهدید جدی به شمار روند. اثرات مستقیم و غیرمستقیم این زباله‌ها بر انسان شامل مواردی مانند آسیب به بهداشت و ایمنی، تهدیدات ناوربی، کاهش درآمد حاصل از ماهیگیری پایدار، گردشگری و قایقرانی تفریحی در اثر از دست رفتن زیبایی محل، آسیب به موجودات دیگر و ظهور پلاستیک‌ها در سطوح تغذیه‌ای است (Gregory, 2009).

میکروپلاستیک‌ها و نانوپلاستیک‌ها به عنوان آلاینده‌های نوظهور و کمتر شناخته شده، طی چند دهه اخیر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند. در حال حاضر، میکروپلاستیک‌ها عموماً برای توصیف ذرات ریز پلاستیک یافت شده در سراسر اقیانوس‌ها که اندازه ۱ میکرومتر ۵ تا میلی‌متر دارند گفته می‌شود، در حالی که در اندازه کمتر از ۱ میکرومتر به عنوان نانوپلاستیک‌ها تعریف شده‌اند (Besseling et al., 2013).

انسان، این ماهی برای تشخیص مواد طبیعی با پتانسیل‌های درمانی مختلف، بسیار مناسب به نظر می‌رسد. در حال حاضر ماهی گورخری به دلیل اندازه کوچک، هزینه کم غذا، چرخه آزمون کوتاه و تکثیر آسان، برای آزمایش سمیت حاد و مزمن (Ali et al., 2011) و ارزیابی کیفیت آب به عنوان گونه مدل استفاده می‌شود. در دسترس بودن توالی کامل ژنوم، مطالعات بیشتری را در مورد مکانیزم‌های سم‌شناسی در سطح مولکولی برای گونه‌های ماهیان آسان می‌کند (Hallare et al., 2005).

در این مطالعه، پاسخ ماهی گورخری به قرار گرفتن در معرض جیره غذایی با نانوپلاستیک پلی‌استایرن در شرایط آزمایشگاهی بر عملکرد رشد و وضعیت سلامت آنها بررسی شده است. مطالعه حاضر یک مدل‌سازی در محیط کنترل شده آزمایشگاهی است که ماهی گورخری در شرایط آزمایشگاهی برای تاثیر سمیت نانوپلاستیک پلی‌استایرن در غلظت‌های مختلف مطابق استاندارد بین‌المللی (OECD) در مواجهه با این ماده قرار گرفت و در پایان دوره آزمایش بررسی اثرات این ماده با بررسی شاخص‌های مختلف مطالعه شد.

اکولوژیکی و زیست‌محیطی ذرات پلاستیک انجام شده است (Enyoh et al., 2022; Atamanalp et al., 2023). اگرچه بیشتر این مطالعات بر میکروپلاستیک‌ها متمرکز بوده و مطالعات کمتری روی نانوپلاستیک‌ها انجام گرفته است. نانوپلاستیک‌ها هم مانند میکروپلاستیک‌ها توسط میکروارگانیزم‌هایی که در پایه زنجیره غذایی قرار دارند جذب و در مصرف کنندگان ثانویه تجمع می‌یابند، بنابراین به طور بالقوه بر زنجیره غذایی اکوسیستم‌ها تاثیر می‌گذارند (Cedervall et al., 2012). اگرچه اطلاعات کمی در مورد اثرات نانوپلاستیک‌ها بر موجودات آبی وجود دارد، اما این ترکیبات باعث تغییر در سطوح هورمونی، فعالیت آنزیمی، تغییرات در سیستم ایمنی و اختلال در فرآیند تولیدمثل می‌شوند (De Sa et al., 2018).

ماهی گورخری (Zebrafish) با نام علمی *Danio rerio* متعلق به خانواده کپورماهیان (Cyprinidae) است. ماهی گورخری در سال‌های اخیر به عنوان مدلی برای بررسی سریع عملکرد ژن‌ها و فعالیت‌های زیستی مولکول‌های آلی مطرح شده است. به علت شباهت‌های بسیار بالای ژنتیکی، فیزیولوژیکی و فارماکولوژیکی با

مواد و روش‌ها

تهیه نانوذرات پلی‌استایرن و فرمولاسیون جیره غذایی

تولید نانوذرات پلی‌استایرن (PS-NPs) با روش پلیمریزاسیون امولسیون انجام شد. فرآیند پلیمریزاسیون در یک فلاسک ته گرد ۵۰۰ میلی‌لیتری دارای سه لوله با سرعت ۲۵۰ دور در دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت استیرر شد. استایرن (۷/۶۳ گرم)، دی‌وینیل بنزن (۱/۱۲ گرم) و سدیم دودسیل سولفات (۱/۲۴ گرم) به ۷۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و دما ثابت نگه داشته شد. روش پلیمریزاسیون با افزودن پرسولفات پتاسیم (۰/۰۵ گرم) تحت تصفیه نیتروژن آغاز شد. فرآیند پلیمریزاسیون تحت شرایط پاکسازی نیتروژن به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. پس از آن، کاهش دمای مخلوط تا رسیدن به دمای محیط انجام شد و به مدت ۲۰ دقیقه با فراصوت روشن شد. رنگ رودامین (۰/۱ گرم) و نانوذرات پلی‌استایرن از قبل آماده شده (۰/۳ گرم) در مقدار کمی تتراهیدروفوران (THF) اضافه شدند. سپس مخلوط را در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در ۲۵۰ دور در دقیقه حرارت داده شد. در نهایت، مخلوط رنگی خارج شد و اجازه داده شد تا در دمای محیط خنک شود. در

نهایت، چهار جیره ایزونیتروژنی (۳۸/۹ درصد پروتئین خام) و ایزولیپیدی (۱۵/۱ درصد چربی خام) تهیه و سوسپانسیون‌های نانوذرات پلی‌استایرن با مقادیر ۰ (شاهد)، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم با غذای نرم شده مخلوط شد و سپس با استفاده از دستگاه اکسترودر به صورت پلت‌هایی به قطر ۰/۵ میلی‌متر فشرده و در نهایت در دمای محیط خشک شد (Jabeen et al., 2018; Ahmadifar et al., 2019).

تیمار بندی

تعداد ۲۴۰ قطعه ماهی گورخری (*Danio rerio*) با میانگین وزنی $53/2 \pm 2/3$ میلی‌گرم از یک مرکز پرورش ماهیان زینتی (گیلان، ایران) تهیه شد و به آزمایشگاه وت در شمال کشور (گرگان، ایران) منتقل شد. ماهیان با محیط آزمایشی به مدت دو هفته سازگار شدند و در طول این مدت با جیره تجاری (BioMar، فرانسه) تغذیه شدند. پس از دو هفته، ماهیان به ۱۲ مخزن (هر مخزن ۲۰ قطعه ماهی) تقسیم شدند و به مدت ۳۰ روز با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند. این آزمایش در چهار تیمار با سه تکرار به صورت زیر انجام گرفت که شامل تیمار شاهد: فاقد پلی‌استایرن تولید شده،

رابطه ۱: تیمار ۱: ۱۰۰ میلی گرم پلی استایرن تولید شده

$$WG(g) = W_f - W_i$$

W_i : وزن اولیه (گرم)؛ W_f : وزن نهایی (گرم).

رابطه ۲: تیمار ۲: ۵۰۰ میلی گرم پلی استایرن تولید شده در کیلوگرم جیره، تیمار ۳: ۱۰۰۰ میلی گرم پلی استایرن تولید شده در کیلوگرم جیره بود. در طول دوره آزمایش، آب به صورت پیوسته هوادهی و ماهیان دو بار در روز با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند. دمای آب، مقدار pH و اکسیژن محلول روزانه ثبت و در محدوده‌های $25 \pm 1/1$ درجه سانتی‌گراد، $7/2 \pm 0/3$ و $7/6 \pm 0/43$ میلی‌گرم در لیتر کنترل شد.

$$SGR(\%/day) = [(LnW_f - LnW_i) / t] \times 100$$

W_i : وزن اولیه (گرم)؛ W_f : وزن نهایی (گرم)؛ t: طول دوره (روز).

رابطه ۳:

$$FCR = F / (WG)$$

F: غذای دریافتی (گرم)؛ WG: وزن به دست آمده (گرم).

رابطه ۴:

$$SR(\%) = (N_i / N_f) \times 100$$

N_i : تعداد ماهیان در ابتدای آزمایش؛ N_f : تعداد ماهیان در انتهای آزمایش.

نمونه‌گیری برای بیان ژن

پانزده قطعه ماهی از هر مخزن به صورت تصادفی انتخاب و سپس با کاغذ جذب کننده، آب اضافی روی آنها خشک شد. پس از برداشتن سر و باله‌ها، نمونه‌های ماهی در نیتروژن مایع منجمد شدن و به صورت جداگانه هموژنیزه و برای Real Time PCR استفاده شدند.

بیان ژن

RNA نمونه‌های تهیه شده از بافت پس از هموژن شدن با ازت مایع با بافر استخراج

سنجش شاخص‌های رشد

پس از گذشت ۳۰ روز از شروع آزمایش، از اسانس گل میخک (۵۰ میکرولیتر در لیتر) برای بیهوش کردن ماهی‌ها استفاده شد و سپس ماهی‌ها مورد زیست‌سنجی قرار گرفتند (Ahmadifar et al., 2019). برای اندازه‌گیری وزن ماهی‌ها از ترازوی دیجیتالی با دقت اندازه‌گیری ۰/۰۰۱ گرم استفاده شد. سپس شاخص‌های افزایش وزن (WG)، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذا (FCR) و نرخ بقا (SR) از رابطه‌های ۱ تا ۴ محاسبه شد (Ahmadifar et al., 2019).

داخلی و آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *IL-1* و *IL-8* به عنوان ژن‌های هدف با مخلوط آماده 2X Real Time PCR که حاوی رنگ سایبرگرین برای ردیابی محصولات تکثیر طی واکنش PCR است، صورت گرفت. لازم به ذکر است در بررسی هر نمونه، واکنش برای هر یک از ژن‌ها به صورت دوتایی بود.

مراحل اجرا

مواد واکنش مطابق جدول ۲ در میکروتیوب ۰/۱ میلی‌لیتر (استریپ) مخصوص دستگاه Real Time PCR برای حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر ریخته شد. پس از فیوژ کردن مختصر نمونه‌ها، استریپ‌های آماده برای انجام واکنش PCR درون جایگاه نمونه در دستگاه Real Time PCR (Bio Rad, Step-One Plus) قرار داده شد و واکنش طبق برنامه دمایی جدول ۳ که از قبل به دستگاه داده شده بود، انجام شد.

RNAxPLUS (سیناکلون، ایران) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شدند. کیفیت RNA استخراج شده به دو روش کیفی و کمی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای ارزیابی کیفی از دستگاه الکتروفورز (دناژن تجهیز، ایران) و ژل آگارز ۱/۵ درصد و برای ارزیابی کمی از دستگاه نانودراپ (Thermo Fisher، آمریکا) استفاده شد. سپس حذف DNA ژنومی از نمونه RNA با استفاده از کیت (Fermentas, Fisher Thermo) آمریکا انجام شد. تولید cDNA با کیت تولید cDNA (GENET) آمریکا انجام شد. پس از تولید cDNA، کره جنوبی) انجام شد. پس از تولید cDNA، به منظور سنجش میزان بیان ژن‌های مورد نظر در این مطالعه، تکثیر ژن‌ها توسط واکنش Real Time PCR بر اساس روش استاندارد به صورت نسبی انجام گرفت. این واکنش با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن (جدول ۱) و GAPDH به عنوان ژن کنترل

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده در Real Time PCR

NCBI کد	دما (°C)	آغازگر	ژن
NM_212844.2	۵۸	F: 5' CGGGCAATATGAAGTCACC 3' R: 5' GTCCACATCTCCAGCCTGA 3'	Interleukin 1, beta
AY641443.2	۵۸	F: 5' ACTTAGGCAAAAATGACCAGC 3' R: 5' TATGTGTTTTCCAATGCGTC 3'	Interleukin 8a
AY641443.1	۵۸	F: 5' TCACAAAACGAGGACACAACC 3' R: 5' GCCACGATCTCCACTTTCTT 3'	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase

جدول ۲: ترکیبات و مقادیر استفاده شده در واکنش Real Time PCR

مقادیر مورد نیاز برای هر ژن	ترکیبات
۱۰ میکرولیتر	T2X Real Time PCR Master Mix
۰/۵ میکرولیتر	آغازگر رفت (۵ پیکومول)
۰/۵ میکرولیتر	آغازگر برگشت (۵ پیکومول)
۲ میکرولیتر	الگو (cDNA)
تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر	آب دوبار تقطیر

جدول ۳: چرخه دمایی- زمانی Real Time PCR برای ژن‌ها

مرحله	دما (°C)	زمان	چرخه
واسرشت اولیه	۹۵	۱۵ دقیقه	۱
واسرشت	۹۵	۱۵ ثانیه	
اتصال	۵۸	۴۰ ثانیه	۴۰
گسترش	۷۲	۲۰ ثانیه	
منحنی ذوب	۵۵-۹۵	۱۰ ثانیه	۱

محاسبه میزان بیان ژن

$\Delta\Delta CT = \Delta CT_0 - \Delta CT_C$ ؛ ژن هدف؛ CT_0 ؛ CT ژن هدف؛
 CT_R ؛ CT رفرنس.

رابطه ۷:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_0 - \Delta CT_C$$

ΔCT_0 ؛ ΔCT ژن هدف؛ ΔCT_C ؛ ΔCT کنترل.

رابطه ۸:

$$GE = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

منحنی تکثیر

ابتدا نمودار منحنی تکثیر ژن‌های هدف و

ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی توسط

پس از اتمام واکنش و به دست آوردن -

CT ‌های ژن رفرنس و ژن‌های مورد نظر با کمک

نرم افزار REST میزان بیان ژن‌ها (GE) از

رابطه‌های ۵ تا ۸ محاسبه شد.

رابطه ۵:

$$\Delta CT_C = CT_C - CT_R$$

ΔCT_C ؛ ΔCT کنترل؛ CT_C ؛ CT کنترل؛ CT_R ؛ CT رفرنس.

رابطه ۶:

$$\Delta CT_0 = CT_0 - CT_R$$

اندازه‌گیری تغییرات میزان فلورسنت رسم شد. در این نمودار محور عمودی (Y) نشان دهنده میزان سیگنال فلورسنت و محور افقی (X) نشان دهنده شماره واکنش است. در نمودار منحنی تکثیر ناحیه‌ای که برای اولین سیگنال فلورسنت قابل تشخیص است Threshold نام دارد. به عبارت دیگر این ناحیه نشان دهنده میزانی از محصول است که در همه نمونه‌ها به صورت تصاعدی تکثیر می‌شود و نمودار از مرحله زمینه‌ای خارج شده و شروع به بالا آمدن می‌کند. چرخه‌ای که در آن فلورسنت تولید شده و خط Threshold را قطع می‌کند CT نام دارد. هرچه این نقطه پایین‌تر باشد تعداد نسخه‌های ژن مورد نظر بیشتر است.

منحنی ذوب

به دلیل اختصاصی نبودن رنگ فلورسنت سایبرگرین و به منظور اختصاصی بودن آغازگر و اطمینان از تکثیر قطعات اختصاصی و بررسی عدم وجود قطعات غیراختصاصی مثل دیمر آغازگر در محصول، منحنی ذوب رسم شد. رنگ سایبرگرین به تمام DNAهای دو رشته‌ای متصل می‌شود و پس از اتصال نور فلورسنت توسط شناساگر دستگاه آشکار می‌شود. فلورسنت در طی واکنش PCR با افزایش تعداد

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کبدی

فعالیت آسپارات آمینوترانسفراز (AST) بر اساس روش توصیف شده توسط Moss و Henderson (۱۹۹۹) بر اساس کمیت اگزالواستات تولید شده توسط AST اندازه‌گیری شد. در این روش، اگزالواستات و NADH توسط مالات دهیدروژناز به مالات و NAD تبدیل می‌شوند و کاهش جذب NADH در طول موج ۳۴۰ نانومتر متناسب با فعالیت AST است. فعالیت آلانین آمینوترانسفراز (ALT) بر اساس روش توصیف شده توسط Moss و Henderson (۱۹۹۹) بر اساس کمیت پیرووات تولید شده توسط ALT اندازه‌گیری شد. پیرووات و NADH توسط لاکتات دهیدروژناز به L-لاکتات و NAD تبدیل می‌شوند. کاهش

جذب NADH در ۳۴۰ نانومتر متناسب با فعالیت ALT است. فعالیت آلکالین فسفاتاز (ALP) بر اساس روش توصیف شده توسط Moss و Henderson (۱۹۹۹) با استفاده از p- نیتروفنیل فسفات (pNPP) به عنوان یک سوبسترای فسفاتاز در ۴۰۵ نانومتر اندازه گیری شد.

استفاده از آزمون لون (Levene's Test) بررسی شدند. با برقراری شرایط فوق، تفاوت معنی داری بین تیمارها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) مقایسه و تفاوت بین تیمارها با آزمون Tukey's HSD بررسی شد. تمامی داده ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج

شاخص های رشد

نتایج به دست آمده از بررسی شاخص های رشد نشان داد که وزن نهایی ماهیان در تیمارهای مختلف تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشت ($P > 0.05$)، اما بالاترین وزن نهایی در تیمار شاهد مشاهده شد (جدول ۴).

تمامی داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ و در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) تحلیل شدند. ابتدا، نرمال بودن داده ها (Normality) با استفاده از آزمون کولموگوروف- اسمیرنوف (-Kolmogorov) و همگنی واریانس ها با (Smirnov Test) و همگنی واریانس ها با

جدول ۴: شاخص های رشد ماهی گورخری (میانگین \pm انحراف معیار)

شاخص	تیمارها			
	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
وزن اولیه (میلی گرم)	۵۳/۷۸ \pm ۳/۲۹ ^a	۵۳/۰۰ \pm ۲/۳۳ ^a	۵۲/۴۴ \pm ۲/۳۰ ^a	۵۳/۳۳ \pm ۲/۸۴ ^a
وزن نهایی (میلی گرم)	۱۰۰/۷۸ \pm ۳/۶۲ ^a	۹۵/۱۱ \pm ۳/۶۶ ^a	۸۹/۳۳ \pm ۵/۱۷ ^a	۸۶/۳۳ \pm ۴/۷۳ ^a
افزایش وزن (میلی گرم)	۴۷/۰۰ \pm ۱/۱۷ ^b	۴۲/۱۱ \pm ۱/۴۲ ^{ab}	۳۶/۸۹ \pm ۲/۸۹ ^a	۳۳/۰۰ \pm ۲/۶۵ ^a
نرخ رشد ویژه (درصد در روز)	۲/۱۱ \pm ۰/۱۱ ^b	۱/۹۵ \pm ۰/۰۴ ^{ab}	۱/۷۷ \pm ۰/۰۵ ^{ab}	۱/۶۱ \pm ۰/۰۹ ^a
ضریب تبدیل غذایی	۱/۹۲ \pm ۰/۰۵ ^a	۲/۱۴ \pm ۰/۰۷ ^a	۲/۴۷ \pm ۰/۱۹ ^{ab}	۲/۶۷ \pm ۰/۲۳ ^b
نرخ بازماندگی (درصد)	۱۰۰/۰۰ \pm ۰/۰۰ ^a	۱۰۰/۰۰ \pm ۰/۰۰ ^a	۹۶/۶۷ \pm ۱/۹۳ ^a	۹۴/۴۴ \pm ۲/۹۴ ^a

در هر ردیف حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها است ($P < 0.05$).

افزایش وزن و نرخ رشد ویژه تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت و با افزایش غلظت نانوپلاستیک پلی‌استایرن افزایش وزن و نرخ رشد ویژه کاهش معناداری داشت ($P < 0.05$). بهترین ضریب تبدیل غذایی به ترتیب در تیمار شاهد و تیمار تغذیه شده با جیره حاوی کمترین غلظت پلی‌استایرن مشاهده شد ($P < 0.05$). اختلاف آماری معناداری در میزان بازماندگی بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد ($P > 0.05$; جدول ۴).

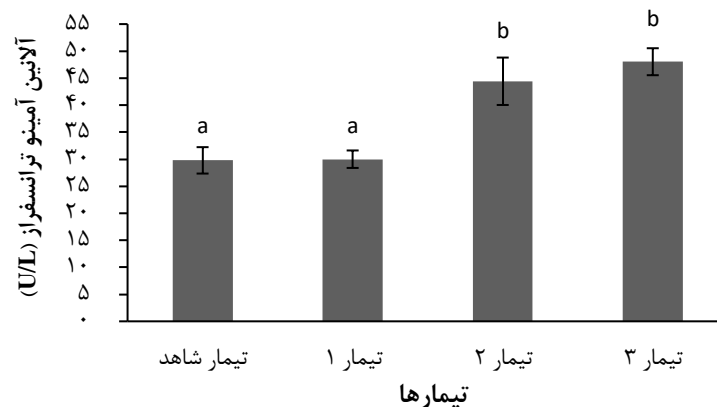
افزایش وزن و نرخ رشد ویژه تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت و با افزایش غلظت نانوپلاستیک پلی‌استایرن افزایش وزن و نرخ رشد ویژه کاهش معناداری داشت ($P < 0.05$). بهترین ضریب تبدیل غذایی به ترتیب در تیمار شاهد و تیمار تغذیه شده با جیره حاوی کمترین غلظت پلی‌استایرن مشاهده شد ($P < 0.05$). اختلاف آماری معناداری در میزان بازماندگی بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد ($P > 0.05$).

افزایش وزن و نرخ رشد ویژه تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت و با افزایش غلظت نانوپلاستیک پلی‌استایرن افزایش وزن و نرخ رشد ویژه کاهش معناداری داشت ($P < 0.05$). بهترین ضریب تبدیل غذایی به ترتیب در تیمار شاهد و تیمار تغذیه شده با جیره حاوی کمترین غلظت پلی‌استایرن مشاهده شد ($P < 0.05$). اختلاف آماری معناداری در میزان بازماندگی بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد ($P > 0.05$).

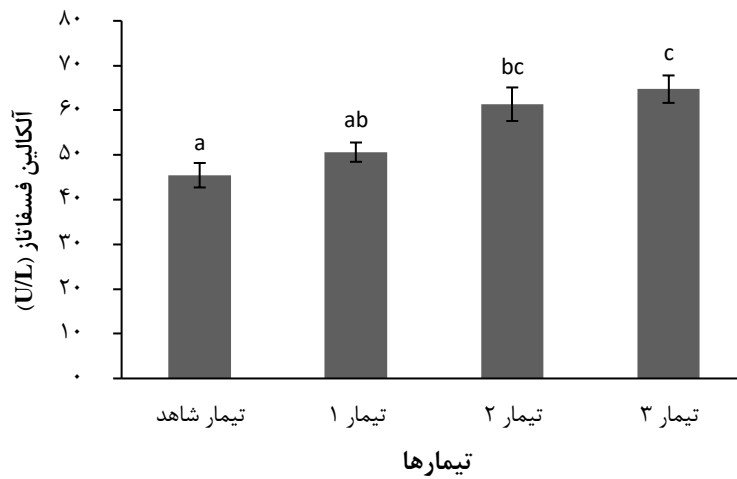
افزایش وزن و نرخ رشد ویژه تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت و با افزایش غلظت نانوپلاستیک پلی‌استایرن افزایش وزن و نرخ رشد ویژه کاهش معناداری داشت ($P < 0.05$). بهترین ضریب تبدیل غذایی به ترتیب در تیمار شاهد و تیمار تغذیه شده با جیره حاوی کمترین غلظت پلی‌استایرن مشاهده شد ($P < 0.05$). اختلاف آماری معناداری در میزان بازماندگی بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد ($P > 0.05$).

فعالیت آنزیم‌های کبدی

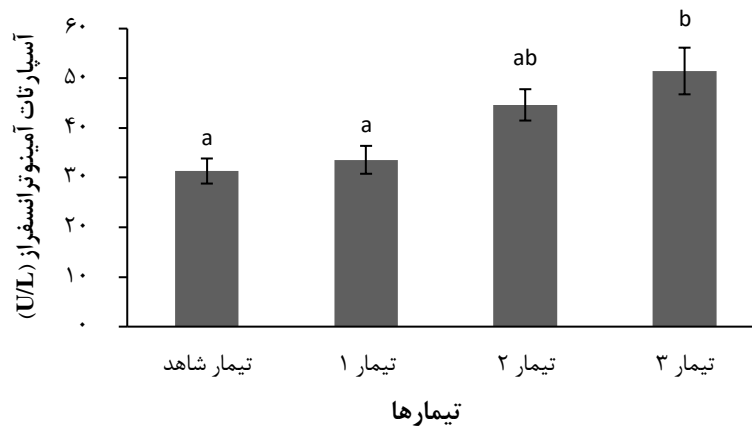
بر طبق نتایج مطالعه حاضر میزان ALT در بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری داشت



شکل ۱: مقدار آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در تیمارهای مختلف (میانگین \pm انحراف معیار). تیمارهای شاهد، ۱، ۲ و ۳ به ترتیب دارای ۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم نانوپلی‌استایرن در کیلوگرم جیره. حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0.05$).



شکل ۲: مقدار آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) در تیمارهای مختلف (میانگین \pm انحراف معیار). تیمارهای شاهد، ۱، ۲ و ۳ به ترتیب دارای ۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم نانوپلی استایرن در کیلوگرم جیره. حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها است ($P < 0.05$).



شکل ۳: مقدار آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز (AST) در تیمارهای مختلف (میانگین \pm انحراف معیار). تیمارهای شاهد، ۱، ۲ و ۳ به ترتیب دارای ۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم نانوپلی استایرن در کیلوگرم جیره. حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها است ($P < 0.05$).

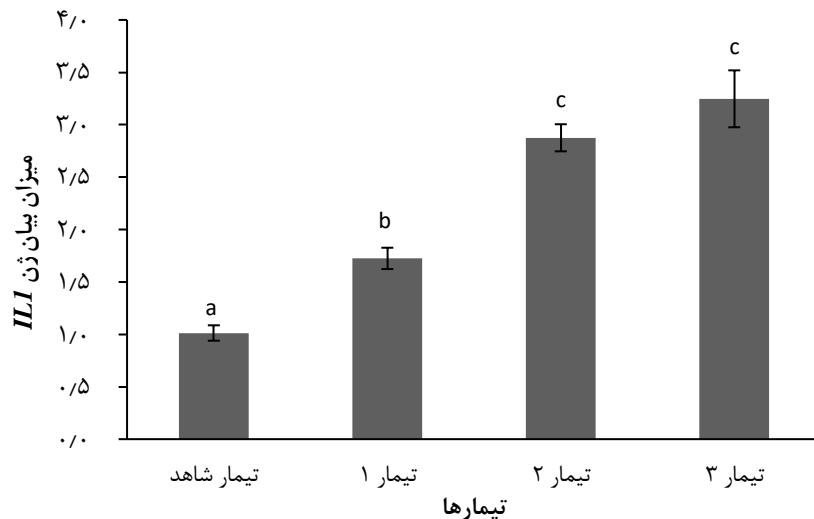
بیان ژن

نتایج پژوهش حاضر نشان داد میزان بیان ژن *IL1* در بین تیمارهای مورد بررسی تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0/05$)، به طوری که بیشترین میزان بیان آن در تیمار ۳ و کمترین میزان آن در تیمار شاهد اندازه‌گیری شد ($P < 0/05$; شکل ۴). همچنین میزان بیان ژن *IL8* در بین تیمارهای مورد بررسی تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$). در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی دارای بیشترین میزان نانوذرات پلی‌استایرن (تیمار ۳) بیشترین میزان

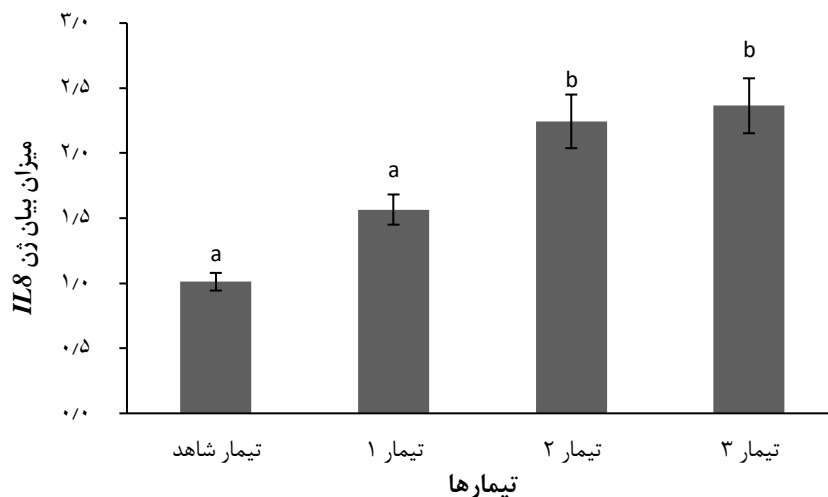
بیان ژن *IL8* و در تیمار شاهد کمترین میزان بیان این ژن مشاهده شد ($P < 0/05$; شکل ۵).

بحث

مطالعات زیادی برای ارزیابی پیامدهای فیزیولوژیکی، اکولوژیکی و زیست‌محیطی ذرات پلاستیک انجام شده است، با این وجود بیشتر این مطالعات بر میکروپلاستیک‌ها متمرکز است و اطلاعات کمی روی نانوپلاستیک‌ها وجود دارد. بنابراین امکان مقایسه نتایج در برخی موارد وجود نداشت.



شکل ۴: میزان بیان ژن *IL1* در تیمارهای مختلف (میانگین \pm انحراف معیار). تیمارهای شاهد، ۱، ۲ و ۳ به ترتیب دارای ۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم نانوپلی‌استایرن در کیلوگرم جیره. حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0/05$).



شکل ۵: میزان بیان ژن *IL8* در تیمارهای مختلف (میانگین \pm انحراف معیار). تیمارهای شاهد، ۱، ۲ و ۳ به ترتیب دارای ۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم نانوپلی استایرن در کیلوگرم جیره. حروف متفاوت روی ستون‌ها نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها است ($P < 0.05$).

مطالعه حاضر، نرخ رشد در بچه ماهیان *Larimichthys* و *Epinephelus coioides* که با جیره‌های حاوی غلظت‌های بالای نانوپلاستیک تغذیه شده بودند، کاهش یافت (Lai et al., 2021; Wang et al., 2022). کاهش رشد ممکن است ناشی از جذب نانوپلاستیک‌ها توسط ماهیان گورخری در طول تغذیه باشد که منجر به انسداد روده‌ای، از دست دادن اشتها و کاهش رشد می‌شود (Wright et al., 2013). کارآیی رشد با وضعیت فیزیولوژیکی موجودات زنده مرتبط است. کاهش رشد در جانورانی که نانوپلاستیک‌ها را مصرف

نتایج مطالعه حاضر بر روی ماهی گورخری، نشان داد وجود نانوپلاستیک در جیره غذایی در محدوده غلظت‌های استفاده شده تاثیر قابل توجهی بر بقای ماهی‌ها نداشت. مشابه با نتایج این مطالعه، مرگ و میری در بچه‌ماهی‌های *Oryzias* و *Epinephelus coioides* گزارش نشده است (Assas et al., 2020; Peda et al., 2016). همچنین در مطالعه حاضر، افزایش وزن و نرخ رشد ویژه در تیمارهایی که با جیره حاوی نانوذرات پلی استایرن تغذیه شدند در مقایسه با ماهیان تیمار شاهد کاهش یافت. هم‌راستا با نتایج

آنزیم ALP یکی از آنزیم‌های موجود در کبد، روده بزرگ، کلیه و استخوان است که در فرایند هضم و جذب کلسیم و فسفر استفاده می‌شود. برخی مطالعات نشان داده‌اند که میکروپلاستیک‌ها ممکن است باعث تحریک سیستم ایمنی بدن و تولید یون‌های رادیکالی آزاد شوند که به طور غیرمستقیم باعث تغییر در فعالیت آنزیم ALP در کبد می‌شوند (Hamed et al., 2019). در مطالعه حاضر، مقدار آنزیم ALP ماهیان گورخری در تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی نانوذرات پلی‌استایرن نسبت به تیمار شاهد بیشتر شده بود که بیانگر تغییر در غلظت این آنزیم در مواجهه با نانوذرات پلی‌استایرن است. بنابراین، با توجه به مطالعات مختلف، می‌توان نتیجه گرفت که میکروپلاستیک‌ها و نانوپلاستیک‌ها می‌توانند به طور مستقیم یا غیرمستقیم به فعالیت آنزیم ALP در کبد آسیب بزنند.

Wu و همکاران (۲۰۲۲) بیان کردند افزایش غلظت میکروپلاستیک‌ها باعث افزایش فعالیت آنزیم AST در پلاسماهای ماهی کپور معمولی می‌شود. در مطالعه دیگری نیز نشان داده شده است که افزایش غلظت میکروپلاستیک‌ها باعث افزایش فعالیت آنزیم AST در پلاسماهای ماهی *Pseudobagrus fulvidraco* شد (Lee et

کرده‌اند می‌تواند مرتبط با افزایش استرس اکسیداتیو، التهاب و کاهش فعالیت‌های تغذیه‌ای و ظرفیت گوارشی باشد (Yu et al., 2018; Sendra et al., 2021).

آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) یک آنزیم بیوشیمیایی است که در کبد، قلب و ماهیچه‌ها وجود دارد و نشانگری برای سلامتی کبد است. بررسی‌ها نشان داده‌اند که میکروپلاستیک‌ها می‌توانند بر فعالیت ALT در موجودات زنده تاثیر بگذارند. برای مثال، در مطالعه انجام شده بر روی ماهی *Pseudobagrus fulvidraco* نتایج نشان داده است قرار گرفتن در معرض میکروپلاستیک پلی‌اتیلن می‌تواند باعث افزایش فعالیت آنزیم ALT در کبد ماهی شود (Lee et al., 2023). همچنین، در مطالعه‌ای دیگر بر روی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) نتایج نشان داد که مواجهه با میکروپلاستیک‌های پلی‌اتیلن باعث افزایش فعالیت آنزیم ALT در ماهی شد (Banaei et al., 2022). در مطالعه حاضر نیز در ماهیان گورخری تغذیه شده با نانوذرات پلی‌استایرن میزان آنزیم ALT نسبت به ماهیان شاهد بیشتر بود که هم‌راستا با دیگر مطالعات انجام شده است.

ناکامی سیتوکین‌های التهابی در مقابل سمیت نانوپلاستیک منجر به اختلال در ایمنی ماهیان می‌شود. نتایج مطالعه انجام شده بر روی ماهی تیلاپپای نیل (*Oreochromis niloticus*) نشان داد بیان ژن‌های *TNF-α*، *IL-1β*، *IFN-γ* و *IL8* پس از قرار گرفتن در معرض میکروپلاستیک‌ها افزایش می‌یابد و انتظار می‌رود که آپوپتوز و پاسخ ایمنی را تنظیم کنند. مشابه نتایج مطالعه حاضر، بیان ژن‌های *IL1β* در ماهی گورخری، لارو ماهی باس دریایی اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پس از قرار گرفتن در معرض میکروپلاستیک‌ها افزایش یافت (Mazurais et al., 2015; Lu et al., 2016; Hollerova et al., 2023). افزایش بیان ژن‌های التهابی در پاسخ به میکروپلاستیک‌ها و نانوپلاستیک‌ها با سطوح MDA و استرس اکسیداتیو ارتباط دارد (Choi et al., 2018) که انتظار می‌رود در تنظیم آپوپتوز و پاسخ ایمنی نقش داشته باشد. به طور کلی، مطالعه حاضر نشان داد قرار گرفتن در معرض نانوذرات پلی‌استایرن تاثیر منفی بر رشد و شاخص‌های سلامتی ماهی گورخری داشت و ممکن است باعث آسیب کبد شود. این تاثیر در غلظت‌های پایین‌تر (۱۰۰

al., 2023). در مطالعه حاضر نیز در ماهیان گورخری تغذیه شده با جیره‌های حاوی نانوذرات پلی‌استایرن فعالیت آنزیم AST در مقایسه با تیمار شاهد بیشتر شده بود که هم‌راستا با نتایج دیگر مطالعات است.

ایمنی، سازوکار مهم فیزیولوژیکی جانوران برای محافظت در برابر عفونت‌ها و تامین تعادل و هومئوستاز داخلی است که ممکن است به صورت غیراختصاصی و یا اکتسابی باشد. مهم‌ترین بخش در سیستم دفاع ماهی، سیستم ایمنی ذاتی است. این سیستم از دو بخش مهم ایمنی همورال و سلولی تشکیل شده است و پاسخ التهابی صورت گرفته به وسیله سیتوکین‌ها، بخش مهمی از پاسخ ایمنی سلولی در ماهی است. سیتوکین‌های التهابی و پیش‌التهابی (*TNF-α*، *IL-1β*، *IFN-γ* و *IL8*) در شرایط بروز بیماری و استرس از سلول‌های ایمنی (ماکروفاژ) ترشح می‌شوند تا پاسخ ایمنی و التهاب در بدن را تنظیم کنند. در مطالعه حاضر میزان بیان ژن‌های *IL1* و *IL8* در ماهیان گورخری تغذیه شده با جیره حاوی نانوذرات پلی‌استایرن افزایش نشان داد، به طوری که با افزایش میزان این نانوذرات در جیره بر میزان بیان ژن‌های *IL1* و *IL8* نیز افزوده شد. بر اساس مطالعات Choi و همکاران در سال ۲۰۱۸،

میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) کمتر بود، اما بیشترین آسیب و اختلال در رشد و سلامت ماهی در غلظت‌های بالا (۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) مشاهده شد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر با حمایت مالی (گرنٹ شماره: ۹۸۰۲۶۶۴۲) صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور انجام شده است.

منابع

- Ahmadifar E., Dawood M.A., Moghadam M.S., Sheikhzadeh N., Hoseinifar S.H. and Musthafa M.S. 2019.** Modulation of immune parameters and antioxidant defense in zebrafish (*Danio rerio*) using dietary apple cider vinegar. *Aquaculture*, 513: 1–7 (734412). doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734412
- Ali S., Mil H.G.V. and Richardson M.K. 2011.** Large-scale assessment of the zebrafish embryo as a possible predictive model in toxicity testing. *PloS One*, 6(6): 1–11 (e21076). doi: 10.1371/journal.pone.0021076
- Ashton K., Holmes L. and Turner A. 2010.** Association of metals with plastic production pellets in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 60(11): 2050–2055. doi: 10.1016/j.marpolbul.2010.07.014
- Assas M., Qiu X., Chen K., Ogawa H., Xu H., Shimasaki Y. and Oshima Y. 2020.** Bioaccumulation and reproductive effects of fluorescent microplastics in medaka fish. *Marine Pollution Bulletin*, 158: 1–10 (111446). doi: 10.1016/j.marpolbul.2020.111446
- Atamanalp M., Kirici M., Kokturk M., Kirici M., Kocaman E.M., Ucar A., Parlak V., Ozcan S., Yanik T. and Alak G. 2023.** Polyethylene exposure in rainbow trout, suppresses growth and may act as a promoting agent in tissue-based oxidative response, DNA damage and apoptosis. *Process Safety and Environmental Protection*, 174: 960–970. doi: 10.1016/j.psep.2023.05.005
- Banaei M., Forouzanfar M. and Jafarinia M. 2022.** Toxic effects of polyethylene microplastics on transcriptional changes, biochemical response, and oxidative stress in common carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part (C)*, 261: 1–10 (109423). doi: 10.1016/j.cbpc.2022.109423
- Besseling E., Wegner A., Foekema E.M., Van Den Heuvel-Greve M.J. and Koelmans A.A. 2013.** Effects of microplastic on fitness and PCB bioaccumulation by the lugworm *Arenicola marina* (L.). *Environmental Science and Technology*, 47(1): 593–600. doi: 10.1021/es302763x
- Cedervall T., Hansson L.A., Lard M., Frohm B. and Linse S. 2012.** Food chain transport of nanoparticles affects behaviour and fat metabolism in fish. *PloS One*, 7(2): 1–11 (e32254). doi: 10.1371/journal.pone.0032254
- Choi J.S., Jung Y.J., Hong N.H., Hong S.H. and Park J.W. 2018.** Toxicological effects of irregularly shaped and spherical microplastics

- in a marine teleost, the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Marine Pollution Bulletin*, 129(1): 231–240. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.02.039
- De Sa L.C., Oliveira M., Ribeiro F., Rocha T.L. and Futter M.N. 2018.** Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: What do we know and where should we focus our efforts in the future? *Science of the Total Environment*, 645: 1029–1039. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.07.207
- Enyoh C.E., Wang Q. and Ovuoraye P.E. 2022.** Response surface methodology for modeling the adsorptive uptake of phenol from aqueous solution using adsorbent polyethylene terephthalate microplastics. *Chemical Engineering Journal Advances*, 12: 1–10 (100370). doi: 10.1016/j.ceja.2022.100370
- Gregory M.R. 2009.** Environmental implications of plastic debris in marine settings-entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. *Philosophical Transactions of the Royal Society (B)*, 364(1526): 2013–2025. doi: 10.1098/rstb.2008.0265
- Hallare A.V., Pagulayan R., Lacdan N., Kohler H.R. and Tribskorn R. 2005.** Assessing water quality in a tropical lake using biomarkers in zebrafish embryos: Developmental toxicity and stress protein responses. *Environmental Monitoring and Assessment*, 104: 171–187. doi: 10.1007/s10661-005-1610-z
- Hamed M., Soliman H.A., Osman A.G. and Sayed A.E.D.H. 2019.** Assessment the effect of exposure to microplastics in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) early juvenile: I. Blood biomarkers. *Chemosphere*, 228: 345–350. doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.04.153
- Hollerova A., Hodkovicova N., Blahova J., Faldyna M., Franc A., Pavlova S., Tichy F., Postulkova E., Mares J., Medkova D. and Kyllar M. 2023.** Polystyrene microparticles can affect the health status of freshwater fish- Threat of oral microplastics intake. *Science of the Total Environment*, 858: 1–10 (159976). doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.159976
- Hu X., Ouyang S., Mu L., An J. and Zhou Q. 2015.** Effects of graphene oxide and oxidized carbon nanotubes on the cellular division, microstructure, uptake, oxidative stress, and metabolic profiles. *Environmental Science and Technology*, 49(18): 10825–10833. doi: 10.1021/acs.est.5b02102
- Jabeen K., Li B., Chen Q., Su L., Wu C., Hollert H. and Shi H. 2018.** Effects of virgin microplastics on goldfish (*Carassius auratus*). *Chemosphere*, 213: 323–332. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.09.031

- Lai W., Xu D., Li J., Wang Z., Ding Y., Wang X., Li X., Xu N., Mai K. and Ai Q. 2021.** Dietary polystyrene nanoplastics exposure alters liver lipid metabolism and muscle nutritional quality in carnivorous marine fish large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Journal of Hazardous Materials*, 419: 1–15 (126454). doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.126454
- Lee J.H., Kang J.C. and Kim J.H. 2023.** Toxic effects of microplastic (Polyethylene) on fish: Accumulation, hematological parameters and antioxidant responses in Korean bullhead, *Pseudobagrus fulvidraco*. *Science of the Total Environment*, 877: 162874. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.162874
- Lu Y., Zhang Y., Deng Y., Jiang W., Zhao Y., Geng J., Ding L. and Ren H. 2016.** Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver. *Environmental Science and Technology*, 50(7): 4054–4060. doi: 10.1021/acs.est.6b00183
- Mazurais D., Ernande B., Quazuguel P., Severe A., Huelvan C., Madec L., Mouchel O., Soudant P., Robbens J., Huvet A. and Zambonino-Infante J. 2015.** Evaluation of the impact of polyethylene microbeads ingestion in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Marine Environmental Research*, 112: 78–85. doi: 10.1016/j.marenvres.2015.09.009
- Moss D.V. and Henderson A.R. 1999.** Clinical enzymology. P: 617–677. In: Burtis C.A. and Ashwood E.R. (Eds.). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. W.B. Saunders Company, USA.
- Nobre C.R., Santana M.F.M., Maluf A., Cortez F.S., Cesar A., Pereira C.D.S. and Turra A. 2015.** Assessment of microplastic toxicity to embryonic development of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea). *Marine Pollution Bulletin*, 92(1-2): 99–104. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.12.050
- Peda C., Caccamo L., Fossi M.C., Gai F., Andaloro F., Genovese L., Perdichizzi A., Romeo T. and Maricchiolo G. 2016.** Intestinal alterations in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) exposed to microplastics: Preliminary results. *Environmental Pollution*, 212: 251–256. doi: 10.1016/j.envpol.2016.01.083
- Sadri S.S. and Thompson R.C. 2014.** On the quantity and composition of floating plastic debris entering and leaving the Tamar Estuary, Southwest England. *Marine Pollution Bulletin*, 81(1): 55–60. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.02.020
- Sendra M., Sparaventi E., Novoa B. and Figueras A. 2021.** An overview of the internalization and

- effects of microplastics and nanoplastics as pollutants of emerging concern in bivalves. *Science of the Total Environment*, 753: 1–12 (142024). doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142024
- Teuten E.L., Saquing J.M., Knappe D.R., Barlaz M.A., Jonsson S., Bjorn A., Rowland S.J., Thompson R.C., Galloway T.S., Yamashita R. and Ochi D. 2009.** Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society (B)*: 364(1526): 2027–2045. doi: 10.1098/rstb.2008.0284
- Wang Q., Huang F., Liang K., Niu W., Duan X., Jia X., Wu X., Xu P. and Zhou L. 2022.** Polystyrene nanoplastics affect digestive function and growth in juvenile groupers. *Science of the Total Environment*, 808: 1–11 (152098). doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.152098
- Wright S.L., Rowe D., Thompson R.C. and Galloway T.S. 2013.** Microplastic ingestion decreases energy reserves in marine worms. *Current Biology*, 23(23): 1031–1033. doi: 10.1016/j.cub.2013.10.068
- Wu F., Wang J., Jiang S., Zeng H., Wu Q., Chen Q. and Chen J. 2022.** Effect of cascade damming on microplastics transport in rivers: A large-scale investigation in Wujiang River, Southwest China. *Chemosphere*, 299: 1–11 (134455). doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.134455
- Yu Y., Zhou D., Li Z. and Zhu C. 2018.** Advancement and challenges of microplastic pollution in the aquatic environment: A review. *Water, Air and Soil Pollution*, 229: 1–18. doi: 10.1007/s11270-018-3788-z



Research Paper

The effect of polystyrene nanoplastics on the growth performance, survival rate, liver enzyme activity and the expression of the *IL1* and *IL8* genes in zebrafish (*Danio rerio*)

Ehsan Ahmadifar^{1*}, Poulin Shohreh², Naser Kalhor³, Mohsen Shahriari Moghadam⁴, Sedvan Yilmaz⁵, Sedigheh Mohammadzadeh⁶, Mostafa Khajeh⁷, Safoura Abarghouei⁸

Received: July 2023 DOI: 10.22124/japb.2023.24905.1504 Accepted: December 2023

Abstract

There are widespread concerns about the potential toxic effects of microplastics as emerging pollutants. The current research investigated the impact of polystyrene nanoplastics on the growth performance, survival rate, liver enzymes activity and the immune gene expression of *IL1* and *IL8* genes in zebrafish (*Danio rerio*). Fish were divided into four treatments and fed with diets containing 0 (control), 100 (treatment 1), 500 (treatment 2) and 1000 (treatment 3) mg/kg diet for one month. The present study results showed that weight gain (WG) and specific growth rate (SGR) were affected by the experimental treatments, and with increasing concentration of polystyrene nanoplastic, they decreased significantly ($P<0.05$). The best food conversion ratio (FCR) was obtained in control and treatment 1 ($P<0.05$). No mortality was observed through different treatments. The highest activity of alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), and aspartate aminotransferase (AST) was observed in treatment 3 ($P<0.05$). The highest level of *IL1* and *IL8* gene expression were measured in treatment 3 and the lowest level was seen in control ($P<0.05$). In conclusion, the results of this research showed that a diet containing polystyrene nanoplastics had a negative effect on the growth (WG and SGR) and health indicators of the fish and the greatest disturbance in the growth and health of fish were observed in high concentrations.

Key words: Zebrafish, Polystyrene, Growth, Gene Expression, Survival.

1- Associate Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran.

2- Assistance Professor in Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

3- Scientific Member in Department of Mesenchymal Stem Cell, Academic Center for Education, Culture and Research, Qom Branch, Qom, Iran.

4- Associate Professor in Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Zabol, Zabol, Iran.

5- Associate Professor in Department of Aquaculture, Faculty of Marine Sciences and Technology, Çanakkale Onsekiz Mart University, Çanakkale, Turkey.

6- Postdoc in Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

7- Professor in Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zabol, Zabol, Iran.

8- Ph.D. in Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

*Corresponding Author: Ehsan.Ahmadifar@uoz.ac.ir

