

بررسی تجمع‌زیستی و عوارض بافت آبشش ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus*) در مواجهه با میکروپلاستیک پلی‌استایرنصفورا ابرقویی<sup>۱</sup>، سید علی اکبر هدایتی<sup>۲\*</sup>، مجتبی رئیس<sup>۳</sup>، بهزاد شیرکوند هداوند<sup>۴</sup>، حسن رضایی<sup>۵</sup>، امیررضا عابد علم دوست<sup>۶</sup><sup>۱</sup> دکتری، گروه تولید و بهره برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران<sup>۲</sup> دانشیار، گروه تولید و بهره برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران<sup>۳</sup> استادیار، مرکز تحقیقات سلامت فرآورده های غذایی دارویی و طبیعی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران<sup>۴</sup> دانشیار، گروه رزین و مواد افزودنی، پژوهشکده ی علوم رنگ و تکنولوژی، تهران، ایران<sup>۵</sup> دانشیار، گروه محیط زیست، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران<sup>۶</sup> استادیار، گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

## چکیده

میکروپلاستیک‌ها به‌عنوان آلاینده‌های نوظهور شناخته شده‌اند و نگرانی‌های گسترده‌ای در مورد اثرات سمی بالقوه آن‌ها وجود دارد. بررسی عوارض آسیب‌شناسی بافتی یکی از روش‌های مناسب در تشخیص تأثیرات آلاینده‌های محیطی بر آبزیان است. در این تحقیق تجمع و جذب میکروپلاستیک‌های پلی‌استایرن (PS-MPs) در آبشش ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus*) شناسایی و اثرات سمی آن بر بافت‌شناسی کلاسیک آبشش بررسی شد. تعداد ۲۳۲ عدد ماهی مولد سالم با متوسط وزنی  $18/55 \pm 2/41$  گرم، جهت انجام آزمایش‌ها انتخاب شد. میکروپلاستیک‌ها در دو محدوده اندازه  $0/25$  و  $8$  با دو عملکرد متفاوت (فلئورسنت و غیر فلئورسنت) سنتز شدند. آزمایش‌ها در دو مرحله انجام شد. در ابتدا بعد از دوره سازگاری، ۶۴ عدد ماهی در غلظت ثابت (PS-MPs)  $300 \text{ mg/L}$  از هر دو اندازه  $0/25$  و  $8$  (PS-MPs) فلئورسنت، قرار گرفتند. نمونه-برداری از بافت آبشش در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۱۶۸ ساعت صورت گرفت و از نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلئورسنت تصویربرداری شد. سپس جهت تعیین عوارض هیستوپاتولوژیک ۱۶۸ عدد ماهی به مدت ۲۸ روز در معرض میکروپلاستیک‌های غیر فلئورسنت در غلظت‌های متفاوت (۵، ۰/۵، ۰/۰۵، ۰) قرار گرفته و به روش بافت‌شناسی کلاسیک آنالیز شدند. پس از ۱۶۸ ساعت مواجهه ماهیان در غلظت ثابت  $300 \text{ mg/L}$  از ذرات فلئورسنت، مشخص شد هر دو ابعاد  $0/25$  و  $8$  در بافت آبشش تجمع پیدا کرد. بالاترین غلظت ذرات MPs تجمع یافته در بافت آبشش به‌طور متوسط در ذرات با ابعاد  $8$  ( $0/98 \pm 0/701$ ) و  $0/25$  ( $0/46 \pm 0/272$ )، میکرو گرم به‌ازای هر میلی‌گرم وزن خشک آبشش تعیین شد. با بررسی آسیب‌شناسی بافت آبشش عوارضی مانند آنوریسم لاملائی، برآمدگی اپیتلیوم تیغه‌ی ثانویه، انحراف لاملائی، اتصال تیغه‌های ثانویه، کوتاه شدگی لاملا و سنگفرشی شدن در هر دو گروه اندازه نسبت به گروه شاهد مشاهده شد، اما شدت بروز عوارض، در غلظت‌های مختلف متفاوت بود. می‌توان نتیجه گرفت اگرچه میکروپلاستیک‌ها در آبشش ماهیان تجمع پیدا کرده‌اند و بر روی بافت تأثیر داشته‌اند ولی اثرات سمی بالقوه آن‌ها تا حدود زیادی نامشخص است و نیاز به مطالعات تکمیلی در این زمینه وجود دارد.

واژه‌های کلیدی:

آلودگی، بافت آبشش، سم‌شناسی، ماهی قرمز، میکروپلاستیک.

## نوع مقاله:

پژوهشی اصیل

## تاریخچه مقاله:

دریافت: ۹۹/۰۵/۱۱

پذیرش: ۹۹/۰۸/۰۵

## نویسنده مسئول مکاتبه:

سیدعلی اکبر هدایتی، دانشیار، گروه تولید و بهره-برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

ایمیل: Hedayati@gau.ac.ir

## ۱ | مقدمه

را شامل می‌شود (PlasticsEurope, 2018). پلاستیک‌ها باعث آلودگی هوا (در اثر سوزاندن)، سیستم‌های آب شیرین، اکوسیستم دریایی و زیستگاه‌های زمینی می‌شوند. افزایش جمعیت، گسترش صنعت ماهی‌گیری، گسترش فعالیت‌های تفریحی مرتبط با دریاها،

در دهه‌های اخیر تولید پلاستیک‌ها در جهان افزایش چشم‌گیری داشته به‌طوری که در سال ۲۰۱۷ به ۳۵۰ میلیون تن رسیده است. کاربرد پلاستیک‌ها تقریباً تمام جنبه‌های زندگی مدرن، شامل بسته‌بندی، ساخت و ساز، خودروسازی، لوازم الکترونیک و برقی، کشاورزی و غیره

فعالیت‌های صنعتی، کشتی‌های تجاری و افزایش مهاجرت به نواحی ساحلی، اثر قابل توجهی در ورود پسماندهای پلاستیکی به دریاها و اقیانوس‌ها داشته است (Geyer *et al.*, 2017). پیش‌بینی می‌گردد ورود پلاستیک به اکوسیستم دریایی تا چند دهه آینده به اندازه‌ای افزایش خواهد یافت که جرم پلاستیک در اقیانوس‌ها بیشتر از جرم ماهی‌ها خواهد بود (Simon and Schulte, 2017). طی چند مطالعه‌ای که توسط محققین مختلف در سایر کشورها انجام شده است، نتایج نشان داده است که ورود پلاستیک‌ها به اکوسیستم دریایی و آلودگی‌های ناشی از وجود آن، باعث تخریب زیستگاه‌ها، مهاجرت بعضی گونه‌ها به زیستگاه‌های جدید، از بین رفتن برخی گونه‌های مختلف جانداران دریایی، مشکلات در حمل‌ونقل دریایی، کاهش جذابیت و زیبایی مناطق ساحلی، صدمه بر صنعت گردش‌گری، صنعت ماهی‌گیری و صنایع غذایی دریایی می‌شوند (Simon and Schulte, 2017; Gregory, 2009). پلاستیک‌های وارد شده به اقیانوس‌ها و دریاها بر اثر عوامل مختلف تخریب شده و به تکه‌هایی بنام میکروپلاستیک، مزوپلاستیک و میکروپلاستیک (MP, Microplastic) (ریزپلاستیک) تبدیل می‌شوند. از جمله عوامل تخریب پلاستیک می‌توان ۱- تخریب زیستی؛ تکه شدن توسط ارگانیسم‌های زنده مانند میکروبوها ۲- تخریب نوری؛ به وسیله نور خورشید ۳- اکسیداسیون حرارتی؛ شکست اکسایشی کند در دمای متوسط محیط ۴- تخریب گرمایی؛ تخریب در دماهای زیاد ۵- هیدرولیز؛ واکنش با آب، اشاره کرد (Jambeck *et al.*, 2017; Al-Oufi H *et al.*, 2004). میکروپلاستیک‌ها و مزوپلاستیک‌ها وارد زنجیره غذایی جانوران دریایی شده و سالانه موجب آسیب و مرگ هزاران گونه از جانداران مثل پرندگان دریایی، پستانداران، ماهی‌ها و خزندگان می‌شوند، زیرا این جانداران در اثر قورت دادن پلاستیک‌ها خفه شده و دچار مرگ می‌شوند. پلاستیک‌های بلعیده شده حتی پس از مرگ جانداران و تجزیه آن‌ها نیز سالم باقی می‌مانند و دوباره در محیط پراکنده می‌شوند و باعث از بین بردن دیگر جانداران می‌گردند (Eriksen *et al.*, 2013; Castañeda *et al.*, 2014). تا سال ۲۰۱۲، بیش از ۶۶۰ گونه دریایی در سراسر جهان شناخته شده‌اند که تحت تاثیر ضایعات پلاستیکی قرار گرفته‌اند (Thompson and Gall, 2014).

میکروپلاستیک‌ها به‌عنوان آلاینده‌های نوظهور و کمتر شناخته شده، طی چند دهه اخیر مورد توجه محققین قرار گرفته است. این آلاینده‌ها به ذرات پلاستیکی با قطر کمتر از ۴/۷۵ mm گفته می‌شود که می‌تواند از راه‌های مختلفی به محیط‌های دریایی وارد شده و سلامت محیط و جانداران را به‌خطر اندازد (Chen *et al.*, 2015).

به‌سبب وجود میکروپلاستیک‌ها، ممکن است آلاینده‌های آلی مثل آلاینده‌های نفتی، (PAHs, Polycyclic aromatic hydrocarbons)، (PCBs, Polychlorinated biphenyls) و فلزات سنگین نظیر سرب، کادمیوم و غیره در آب تجمع پیدا کنند. هم‌چنین میکروپلاستیک‌ها می‌توانند وارد زنجیره غذایی شده و از طریق تجمع زیستی مقادیر آن‌ها در بافت بدن موجودات بزرگ‌تر، بیشتر شده و باعث از بین رفتن بسیاری از جانداران و گونه‌های دریایی و آلودگی مواد غذایی گردند (Teuten *et al.*, 2010; Ashton *et al.*, 2009). هم‌چنین آلاینده‌های آلی پایدار

مصرف میکروپلاستیک‌ها هم‌چنین می‌تواند موجب پاسخ‌های التهابی (Lu *et al.*, 2016)، تغییرات متابولومیک (Lu *et al.*, 2016; Mattsson *et al.*, 2014) و یا حتی تخریب سیستم ایمنی ماهیان شود (Greven *et al.*, 2016). علاوه بر این بسیاری از پلاستیک‌های بسیار ریز، قادر به جابه‌جایی به اندام‌های دیگر مانند آبشش و کبد هستند و در نتیجه باعث آسیب به این اندام‌ها می‌شوند (Lu *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2018).

هنگامی که این مواد در بدن موجودات زنده تجمع پیدا کنند توانایی بالایی در ایجاد عوارض جانبی مانند مرگ‌ومیر، کاهش تغذیه، مهار رشد، اختلال در انرژی و غدد درون ریز، استرس اکسیداتیو، اختلال در ایمنی و عملکرد عصبی و حتی سمیت ژن دارند (Besseling *et al.*, 2014; Rochman *et al.*, 2014). مطالعات بسیاری به بررسی سمیت میکروپلاستیک‌ها پرداخته است و مشخص شده میکروپلاستیک‌ها می‌توانند موجب شکل‌گیری انواع واکنش‌های اکسیژنی (ROS) و استرس اکسیداتیو در دوکفه‌ای‌ها (Avio *et al.*, 2015) و کرم‌ها (Browne *et al.*, 2013) شوند. میکروپلاستیک می‌تواند موجب کاهش فعالیت فاگوسیتوز سلول‌های ایمنی در کرم‌ها شوند (Browne *et al.*, 2013). برخی مطالعات نشان داده که میکروپلاستیک‌ها می‌توانند موجب سمیت عصبی در موجودات زنده شوند. مثلاً میکروپلاستیک پلی‌اتیلن می‌تواند موجب اختلال در سیستم عصبی موجودات کوچک دریایی شود و میکروپلاستیک پلی‌استایرن (PS-MPs, Polystyrene micro plastics) می‌تواند اثرات مشابهی را در دوکفه‌ای‌ها به‌وسیله کاهش فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (AChE) ایجاد کند (Avio *et al.*, 2015).

ماهی کاراس‌طلایی به‌عنوان گونه مدل زیستی جهت مطالعه حاضر انتخاب شد زیرا نگهداری آن در شرایط آزمایشگاهی آسان است، تحمل بالایی نسبت به طیف وسیعی از شرایط مختلف محیطی دارد و رژیم

(Besseling *et al.*, 2014; Della Torre *et al.*, 2014)، و غلظت-های سازگار با محیط‌زیست (Lu *et al.*, 2016) و برحسب اندازه ماهیان مولد گلد فیش و با هدف بررسی اثرات غلظت‌های بالاتر، انتخاب شد، هر چند که غلظت‌های محیطی مربوط به میکروپلاستیک‌ها تاکنون به‌طور دقیق مشخص نیست (Ding *et al.*, 2018) پس از دوره آداپتاسیون، ماهی‌ها به‌صورت تصادفی در مخازن شیشه‌ای، که هر مخزن شامل ۷ ماهی بود قرار گرفتند (۶۳ عدد ماهی) آب مورد استفاده محلول آزمایش، آب استریل در محدوده پی‌اچ خنثی بود. محلول نهایی آزمایش از طریق اضافه کردن ذرات پلی-استایرن فلئورسنت در دو اندازه مختلف به غلظت نهایی ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر ساخته شد و ماهیان در حجم ثابتی از این غلظت قرار گرفتند. طول دوره این مرحله از آزمایش، ۱۶۸ ساعت مواجهه با غلظت‌ها در زمان‌های ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۱۶۸ ساعت بود. در هر بار نمونه‌برداری به‌منظور حذف ذرات از پوست، ماهی‌ها شسته و سپس ۳ ماهی از هر تیمار برای جداسازی بافت انتخاب شدند. نمونه‌های بافتی درون محلول تثبیت کننده (فرمالین ۱۰ درصد) قرار گرفته و پس از ۲۴ ساعت به الکل ۸۰ درصد منتقل شد. سپس آنگیری با سری افزایشی اتانل (۸۰، ۹۰، ۹۷ و ۱۰۰ درصد) انجام و در ادامه در گزبلول و سپس پارافین وارد شدند. تمامی این مراحل توسط دستگاه پاساژ بافت (Tissue processor, Triangle biomedical sciences USA) تحت برنامه تعریف شده برای این کار انجام شد. بافت‌ها سپس با پارافین (دمای ذوب °C ۵۸-۵۶) بر روی قالب‌های Tissue tech قالب‌گیری شد. از قالب‌های پارافینه با استفاده از دستگاه میکروتوم (Olympus CUT 4055E, USA) برش‌هایی با ضخامت ۵ μm تهیه و پس از قرار دادن بر روی لام، به‌مدت ۰/۵ ساعت در آون (°C ۶۰) قرار داده شد تا پارافین اضافه از روی بافت حذف شود. نمونه‌ها پس از پارافین‌زدایی و جایگزینی آن با گزبلول، به‌وسیله سری‌های کاهشی اتانول (۱۰۰، ۹۰ و ۷۰ درصد) آبدهی مجدد و با استفاده از محلول‌های هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شدند. بافت‌ها مجدداً به آون منتقل شدند تا خشک شوند. تمامی مواد استفاده شده در این مراحل (اتانل، گزبلول، پارافین، هماتوکسیلین و اتوزین) محصول کمپانی Merck بود. در نهایت لامل با استفاده از چسب کاندای بالزام روی لام‌ها چسبانده شد (Abarghohi *et al.*, 2016). هدف از این مرحله اثبات تجمع این ذرات در بافت آبشش، در اندازه‌های متفاوت در زمان‌های مختلف بود. جهت اندازه‌گیری غلظت میکروپلاستیک‌های فلئورسنت شده، بافت آبشش جدا و به‌مدت ۷۲ ساعت در خشک‌کن انجمادی لیوفیلیز شد و سپس جهت هضم، در نیتریک اسید یک مولار در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، به‌مدت ۲ ساعت نگهداری شد و در نهایت توسط آب دیونیزه به حجم نهایی ۵ cc رسید (Lu *et al.*, 2016). غلظت میکروپلاستیک در آبشش ماهیان به‌وسیله اسپکتوفتومتر فلئورسنت با تحریک در طول موج ۵۵۰ nm و انتشار در ۵۸۰ nm اندازه‌گیری شد. پس از این مرحله، آزمایش‌های سمیت تحت‌حدا انجام شد. ۱۶۸ عدد ماهی برای انجام این مرحله از آزمایشات انتخاب شد. ماهیان در غلظت‌های ppm ۵، ۰/۵، ۰/۰۵، از هر دو اندازه پلی‌استایرن قرار گرفتند (در مجموع دو گروه

غذایی گسترده‌ای را می‌پذیرد. علاوه بر این معمولاً از این ماهی جهت بررسی اثرات نامطلوب سموم استفاده می‌شود (Atamaniuk *et al.*, 2017; Ghosha *et al.*, 2017; Grigorakis *et al.*, 2017) پلی‌استایرن یکی از پنج نوع اصلی ذرات میکروپلاستیکی یافت شده در محیط‌زیست آبی است (Rochman *et al.*, 2015) از آنجایی که در بین موجودات آبی، ماهیان به‌دلیل رنگ‌آمیزی جذاب، شناور بودن و تشابه غذایی میکروپلاستیک‌ها با مواد غذایی، بیشتر مستعد بلعیدن این ذرات هستند، هدف از این مطالعه بررسی میزان تجمع و جذب و تعیین اندازه‌های مخرب‌تر (PS-MPs) بر ماهی کاراس طلائی به‌عنوان یک مدل زیستی می‌باشد.

## ۲ | مواد و روش‌ها

در بهار ۱۳۹۸، تعداد ۲۳۲ عدد ماهی مولد سالم با متوسط وزنی ۱۸/۵۵±۲/۴۱ گرم، از مرکز تکثیر و پرورش ماهی قرمز استان گیلان تهیه و توسط کیسه‌های حاوی یک سوم آب و مابقی اکسیژن به مرکز آبی‌پروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. ماهیان برای سازش با موقعیت جدید به‌مدت دو هفته در شرایط آزمایشگاهی نگهداری و دو بار در روز به اندازه دو درصد وزن بدن، با غذای تجاری گلد فیش و در حد سیری غذایی شدند (Hedayati *et al.*, 2013).

استایرن به‌عنوان مونومر، پلی‌وینیل‌الکل (PVA) با جرم مولکولی ۱۲۸۰۰۰ گرم بر مول به‌عنوان تثبیت‌کننده و ماده رنگزای رودامین b از شرکت مرک آلمان و بنزوئیل‌پراکسید به‌عنوان آغازگر از شرکت آلفا آریزر (آمریکا) خریداری شدند. استایرن قبل از استفاده تقطیر شد و سایر مواد شیمیایی به‌همان صورت مورد استفاده قرار گرفت. هم‌چنین در تمام آزمایشات آب دیونیزه به‌کار برده شد. ذرات پلی‌استایرن با اندازه‌های (μm) ۰/۲۵ و ۸ با پلی‌میریزاسیون امولسیون و تعلیقی، مطابق با تحقیقات قبلی ساخته شد (TahamiVakili *et al.*, 2016. Shohani *et al.*, 2017). برطبق این روش‌ها، ۳-۱ درصد وزنی آغازگر (بنزوئیل‌پراکسید)، ۴-۱ درصد وزنی تثبیت‌کننده (پلی‌وینیل‌الکل) انتخاب و سرعت هم‌زدن ۷۵۰-۵۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پلی‌میریزاسیون در یک راکتور یک لیتری سده‌دانه، مجهز به قیف اضافه‌کننده (اضافه کردن قطرای مونومر استایرن)، خنک‌کننده و دماسنج انجام شد. در ظرف واکنش ۴۰۰ میلی لیتر آب مقطر، آغازگر و تثبیت‌کننده اضافه شد و گاز نیتروژن به‌مدت ۲۰ دقیقه برای خارج کردن اکسیژن محلول از آن عبور داده شد. سپس دما را به ۹۰ درجه سانتی‌گراد رسانده و ضمن هم‌زدن به‌تدریج طی مدت نیم‌ساعت استایرن قطره قطره اضافه شد و واکنش پلی‌میریزاسیون به‌مدت ۸ ساعت ادامه یافت. تمامی این مراحل برای تهیه پلی‌استایرن فلورسنت با اضافه کردن رودامین b به محلول آبی تکرار شد (TahamiVakili *et al.*, 2016. Shohani *et al.*, 2017).

جهت تعیین محدوده LC<sub>50</sub> در ابتدا غلظت‌های بسیاری اعمال شد. پیش‌تست‌های ما نشان داد؛ حتی غلظت‌های بالا در محدوده ۲۰۰-۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر هم باعث مرگ و میر در مدت زمان ۹۶ ساعت نخواهد شد. از این‌رو غلظت‌های این مطالعه براساس مطالعات پیشین

موجود در پلی‌استایرن است. با استفاده از میکروسکوپ فلئورسنت از نمونه‌های آبشش در مدت زمان ۱۶۸ ساعت تصویربرداری شد. فلش‌ها نشان‌دهنده وجود ذرات میکروپلاستیک فلئورسنت شده در بافت آبشش هستند (شکل ۱).

غلظت میکروپلاستیک‌های فلئورسنت شده در مدت زمان ۱۶۸ ساعت، برای هر دو ابعاد ۰/۲۵ و ۸ میکرومتر، اندازه‌گیری و مشخص شد با افزایش زمان مواجهه، غلظت این ماده در بافت آبشش افزایش پیدا می‌کند، اما شدت افزایش میکروپلاستیک‌ها در ابعاد ۸ میکرون بیشتر از ۰/۲۵ میکرومتر می‌باشد. بالاترین غلظت ذرات میکروپلاستیک تجمع یافته در بافت آبشش به‌طور متوسط برای ذرات با اندازه ۸ میکرومتر،  $0.098 \pm 0.0701$  و برای ذرات با ابعاد ۰/۲۵ میکرومتر  $0.046 \pm 0.0272$  میکروگرم به ازای هر میلی‌گرم وزن خشک آبشش تعیین شد.

با بررسی تغییرات آسیب‌شناسی بافت آبشش ماهی کاراس طلایی در گروه‌های تحت مواجهه با غلظت‌های مختلف از دو اندازه متفاوت میکرو-پلاستیک پلی‌استایرن نسبت به گروه شاهد عوارض متفاوتی مانند (شکل ۲) آنوریسم لاملائی، برآمدگی اپیتلیوم تیغه ثانویه، انحراف لاملائی، اتصال تیغه‌های ثانویه، کوتاه شدگی لاملا و سنگفرشی شدن نسبت به گروه شاهد مشاهده شد (نتایج در جدول ۱ و ۲) اما شدت عوارض در ۸ میکرومتر نسبت به ۰/۲۵ میکرومتر بیشتر بود و با افزایش غلظت عوارض با شدت بیشتری بروز کرد.

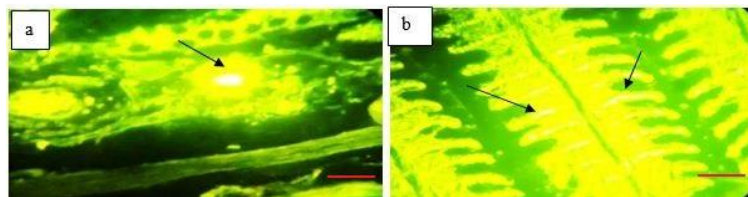
چهار تیمار و هر تیمار با ۲۱ ماهی شامل سه تکرار ۷ تایی). بعد از مواجهه به مدت ۲۸ روز، نمونه‌های آبشش جهت بررسی عوارض هیستوپاتولوژیک جداسازی و به روش بافت‌شناسی کلاسیک آنالیز شدند (Abarghoei et al, 2016).

جهت توصیف شدت تغییرات آسیب‌شناسی از روش ذیل استفاده شد، عدم مشاهده عارضه (-)، ۱ تا ۳ عارضه مشاهده شده (+)، ۳ تا ۵ عارضه مشاهده شده (++)، ۵ تا ۱۱ عارضه مشاهده شده (+++) و بیشتر از ۱۱ (++++) که این علامت‌ها نشان‌دهنده شدت عارضه می‌باشند (Riba et al., 2005).

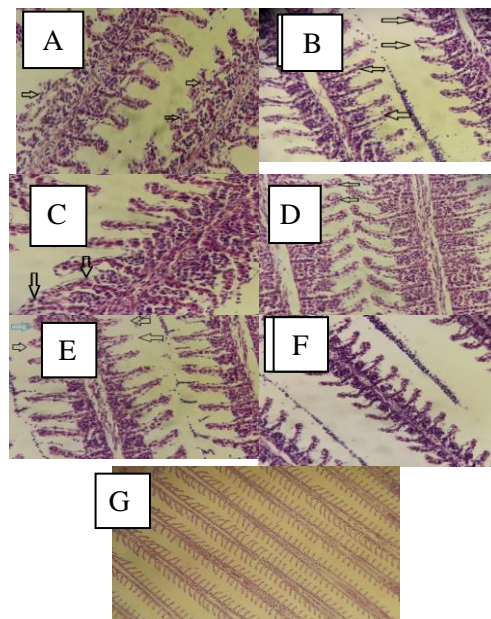
تصاویر بافت‌های در معرض ذرات فلئورسنت، توسط میکروسکوپ فلئورسنت Labo Med مدل (Lx 400) ساخت کشور آمریکا و تصویر تصاویر بافت‌شناسی کلاسیک توسط میکروسکوپ نوری (Olympus) ساخت کشور ژاپن تصویربرداری شد. غلظت میکروپلاستیک توسط دستگاه اسپکتروفتومتر فلئورسنت هیتاچی مدل (F-7000) ساخت کشور ژاپن اندازه‌گیری شد.

### ۳ | نتایج

طیف FTIR پلی‌استایرن سنتز شده نشان داد (دستگاه Perkin Elmer Spectrum 1 ساخت آمریکا)، پیک‌های جذب در شدت‌های ۳۰۲۶، ۱۶۰۱، ۱۴۹۲، ۱۴۵۰، ۷۵۷ و  $698 \text{ cm}^{-1}$  همگی مربوط به حلقه بنزنی



شکل ۱- ذرات فلئورسنت جذب شده در آبشش ماهی کاراس طلایی در دو اندازه مختلف ۰/۲۵ و ۸ μm (a: ۸ میکرومتر، b: ۰/۲۵ میکرومتر) مقیاس (۳۰ μm)



شکل ۲ - میکروفوتوگرافی تغییرات بافت‌شناسی آبشش کاراس طلایی تحت مواجهه با میکروپلاستیک پلی‌استایرن در غلظت و اندازه‌های مختلف (A: آنوریسم لاملائی، B: برآمدگی اپیتلیوم، C: اتصال تیغه ی ثانویه، D: هایپرپلازی ثانویه، E: کوتاه شدگی لاملا، F: سنگفرشی شدن سلول‌ها، بزرگمایی  $40 \times$ ) (G: آبشش سالم بزرگمایی  $100 \times$ )

جدول ۱- تغییرات هیستوپاتولوژی بافت آبشش در مواجهه با غلظت‌های مختلف میکروپلاستیک پلی‌استایرن در ابعاد ۰/۲۵ میکرومتر

عارضه‌های آبشش	غلظت‌های تحت‌کشنده میکروپلاستیک ppm			
	۰	۰/۰۵	۰/۵	۵
آنورسم لاملائی	-	-	++	++
برآمدگی اپیتلیوم	-	+	+++	+++
اتصال تیغه‌ی ثانویه	-	-	++	++
هایپرپلازی ثانویه	-	++	++	++++
کوتاه‌شدگی لاملا	-	-	-	++
سنگفرشی شدن سلول‌ها	-	-	-	+

- عدم مشاهده عارضه (-)، ۱ تا ۳ عارضه (+)، ۳ تا ۵ عارضه (++)، ۵ تا ۱۱ عارضه (+++) و بیشتر از ۱۱ (++++). (Riba et al., 2005).

جدول ۲- تغییرات هیستوپاتولوژی بافت آبشش در مواجهه با غلظت‌های مختلف میکروپلاستیک پلی‌استایرن در ابعاد ۸ میکرومتر

عارضه‌های آبشش	غلظت‌های تحت‌کشنده میکروپلاستیک ppm			
	۰	۰/۰۵	۰/۵	۵
آنورسم لاملائی	-	+	++	++
برآمدگی اپیتلیوم	-	+	++	++++
اتصال تیغه‌ی ثانویه	-	++	+++	++++
هایپرپلازی ثانویه	-	+	+++	+++
کوتاه‌شدگی لاملا	-	+	+	++
سنگفرشی شدن سلول‌ها	-	-	+	++

- عدم مشاهده عارضه (-)، ۱ تا ۳ عارضه (+)، ۳ تا ۵ عارضه (++)، ۵ تا ۱۱ عارضه (+++) و بیشتر از ۱۱ (++++). (Riba et al., 2005).

#### ۴ | بحث و نتیجه‌گیری

عمدتاً در بافت آبشش تجمع می‌یابند. به‌عنوان مثال پلاستیک‌هایی تا اندازه ۱۰ میکرومتر می‌توانند به سیستم گردش خون صدف‌ها وارد شوند (Browne et al., 2008). درحالی‌که ذرات ۱۰-۸ میکرومتر در روده و آبشش خرچنگ‌ها تجمع پیدا می‌کنند (Watts et al., 2014). به‌نظر می‌رسد ماهیان ذرات پلاستیکی را به‌عنوان مواد غذایی، برحسب مورفولوژی این مواد انتخاب می‌کنند و ذرات کوچک‌تر به‌صورت منفعلانه توسط ماهی خورده می‌شوند و می‌توانند به اندام‌های دیگر منتقل شوند درحالی‌که ذرات با لبه‌های سخت و تیز توسط ماهیان مصرف نمی‌شوند (Jabeen et al., 2018). برای مثال ذرات میکرو-پلاستیک با قطر ۵ میکرون در آبشش، روده و کبد ماهی گورخری مشاهده شدند درحالی‌که ذرات بزرگ‌تر با قطر ۲۰ میکرون فقط در آبشش و روده مشاهده شدند و در کبد تجمع پیدا نکردند (Lu et al., 2016). با وجود این‌که، حضور میکروپلاستیک‌ها در آب‌های سراسر جهان تشخیص داده‌شده است، دانش مربوط به اثرات بیولوژیکی این ذرات بر روی موجودات آب شیرین بسیار محدودتر از موجودات دریایی است. جذب وابسته به اندازه ذرات میکروپلاستیک، در گونه‌های دریایی مطالعه شده و نتایج نشان‌دهنده که بلعیدن میکروپلاستیک‌ها به‌طور معنی‌داری با اندازه ذرات مرتبط (Wright et al., 2013) و به‌طور قابل ملاحظه‌ای به همسان بودن این ذرات با اندازه طعمه غذایی و اندام‌های مخصوص فیلتر مرتبط است. به‌عنوان مثال پلاستیک‌ها با اندازه ۷۰۰-۱۱ میکرومتر به آسانی به‌وسیله آمفی پودها بلعیده می‌شوند (Chua et al., 2014) درحالی‌که ۱ میکرومتر، اندازه رایجی است که از فیلترهای معده سخت پوستان جدا شده است (Hamer et al., 2014). از نظر

آبشش ماهی اندامی چندمنظوره بوده که اعمال تنفس، تنظیم اسمزی، تنظیم تعادل اسید-بازی و دفع ترکیبات نیتروژنی را به‌عهده دارد. این اندام دارای سطح تماس گسترده‌ای با آب اطراف است و به‌همین جهت نسبت به حضور مواد شیمیایی و آلاینده‌ها بسیار حساس است (Wilson and Laurent, 2002). هدف از این مطالعه بررسی تجمع، جذب و آسیب‌شناسی بافت آبشش ماهی کاراس طلائی تحت‌تأثیر ذرات میکرو-پلاستیک پلی‌استایرن در ابعاد و غلظت‌های متفاوت بود. در طول زمان آزمایش، هیچ مرگ و میری در گروه‌های تحت بررسی مشاهده نشد. تجمع و آسیب‌شناسی بافتی ذرات میکروپلاستیک در آبشش ماهی کاراس طلائی در مطالعات پیشین انجام نشده است. در این مطالعه تجمع ذرات در محدوده اندازه ۰/۲۵ و ۸ (µm) در آبشش ماهیان تحت سم، مشاهده و غلظت این ذرات در بافت آبشش اندازه‌گیری شد و مشخص گردید در مدت زمان ۱۶۸ ساعت، با افزایش زمان مواجهه، غلظت میکروپلاستیک‌ها در بافت افزایش پیدا می‌کند. بالاترین غلظت ذرات میکروپلاستیک تجمع یافته در بافت آبشش، به‌طور متوسط برای ذرات با اندازه‌ی ۸ میکرومتر،  $0/098 \pm 0/701$  و برای ذرات با ابعاد ۰/۲۵ میکرومتر  $0/046 \pm 0/272$  میکروگرم به ازای هر میلی‌گرم وزن خشک آبشش تعیین شد. با وجود آن‌که انتظار می‌رفت ذرات با اندازه‌ی کوچک‌تر، به‌دلیل افزایش سطح به حجم سمی‌تر باشند، اما تجمع ذرات ۸ میکرون نسبت به ۰/۲۵ میکرون در بافت آبشش بالاتر بود. این امر به دلیل تأثیر گذاری اندازه‌ی ذرات بر توزیع و پراکنش آن‌ها در فرایندهای بیولوژیک است، به نحوی‌که ذرات با سایز کوچک‌تر بیشتر وارد جریان خون شده ولی ذرات با سایز بزرگ‌تر به‌دلیل عدم عبور از مسیر مویرگی

- and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. *Current Biology*, 23(23): 2388-2392.
- Castañeda R.A., Avlijas S., Simard M.A., Ricciardi A. 2014. Microplastic pollution in St. Lawrence River sediments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 71(12): 1767-1771.
- Chen H., Jiang W., Yang Y., Yang Y., Man X. 2015. Global trends of municipal solid waste research from 1997 to 2014 using bibliometric analysis. *Journal of the Air and Waste Management Association*, 65(10): 1161-1170.
- Chua E.M., Shimeta J., Nugegoda D., Morrison P.D., Clarke B.O. 2014. Assimilation of polybrominated diphenyl ethers from microplastics by the marine amphipod, *Allorchestes compressa*. *Environmental Science and Technology*, 48(14): 8127-8134.
- Della Torre C., Bergami E., Salvati A., Faleri C., Cirino P., Dawson K.A., Corsi I. 2014. Accumulation and embryotoxicity of polystyrene nanoparticles at early stage of development of sea urchin embryos *Paracentrotus lividus*. *Environmental Science and Technology*, 48(20): 12302-12311.
- Ding J., Zhang S., Razanajatovo R.M., Zou H., Zhu W., 2018. Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish redtilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Pollution*, 238: 1-9.
- Eriksen M, Mason S, Wilson S, Box C, Zellers A, Edwards W. 2013. Microplastic pollution in the surface waters of the Laurentian Great Lakes. *Marine Pollution Bulletin*, 77(1-2):177-82.
- Gall S.C., Thompson R.C. 2015. The impact of debris on marine life. *Marine pollution bulletin*, 92(1-2):170-179.
- Geyer R., Jambeck J.R., Law K.L. 2017. Production, use and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7): 759-782.
- Ghosha P., Thakurb I.S., Kaushik A. 2017. Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 141: 259-270.
- 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: Biological Sciences*, 364(1526): 2013-2025.
- Greven A.C., Merk T., Karagöz F., Mohr K., Klapper M., Jovanović B., Palić D. 2016. Polycarbonate and polystyrene nanoplastic particles act as stressors to the innate immune system of fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental toxicology and chemistry*, 35(12): 3093-3100.
- Grigorakis S., Mason S.A., Drouillard K.G. 2017. Determination of gut retention of plastic microbeads and microfibers in goldfish (*Carrasius auratus*). *Chemosphere*, 169, 233-238.
- Hämer J., Gutow L., Köhler A., Saborowski R. 2014. Fate of microplastics in the marine isopod *Idotea emarginata*. *Environmental science & technology*, 48(22): 13451-13458.
- Hedayati A. 2013. *Aquatic Toxicology*, University of Gorgan, and additives to worms, reducing functions linked to health and biodiversity. *Current Biology*, 23(23): 2388-2392.
- شدت روند یکسانی را نشان نداد. عوارضی مانند آنوریسم لاملایی، برآمدگی اپیتلیوم تیغه ثانویه، انحراف لاملایی، اتصال تیغه‌های ثانویه، کوتاه شدگی لاملا و سنگ‌فرشی شدن در هر دو گروه اندازه نسبت به گروه شاهد، مشاهده شد اما شدت عوارض در ۸ میکرومتر نسبت به ۰/۲۵ میکرومتر بیشتر بود و با افزایش غلظت عوارض با شدت بیشتری بروز کرد. نتیجه‌گیری کلی بیان می‌کند اگرچه میکروپلاستیک‌ها در آبشش ماهیان تجمع پیدا کرده‌اند و موجب آسیب بافتی شده‌اند، ولی اثرات سمی بالقوه آن‌ها تا حدود زیادی نامشخص است. هم‌چنین از آنجایی‌که نتایج مشابه در مطالعات پیشین بر ماهی کاراس‌طلایی وجود ندارد، نیاز به مطالعات تکمیلی بیشتر در این زمینه وجود دارد.
- ۵ | تشکر و قدردانی:**
- این تحقیق در قالب رساله دکتری با حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان صورت گرفت.
- پست الکترونیک نویسندگان**
- |                          |                        |
|--------------------------|------------------------|
| sabarghoei67@gmail.com   | صفورا ابرقویی:         |
| marinebiology1@gmail.com | سیدعلی اکبر هدایتی:    |
| marinebiology1@gmail.com | مجتبی رئیس:            |
| raeisi.mojtaba@yahoo.com | بهزاد شیرکوند هداوند:  |
| b.shirkavand@gmail.com   | حسن رضایی:             |
| amirabed@ut.ac.ir        | امیررضا عابد علم‌دوست: |
- REFERENCES**
- Abarghohi S., Hedayati A., Miandareh H.K., Ghorbani R., Bagheri T. 2016. Histopathological effects of waterborne silver nanoparticles and silver salt on the gills and liver of Goldfish. *Carassius auratus*. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13(7): 11-18.
- Al-Oufi H., McLean E., Kumar A. S., Claereboudt M., Al-Habsi M. 2004. The effects of solar radiation upon breaking strength and elongation of fishing nets. *Fisheries Research*, 66(1): 115-119.
- Ashton K, Holmes L, Turner A. 2010. Association of metals with plastic production pellets in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 60(11):205-205.
- Atamaniuk T.M., Kubrak O.I., Storey K.B., Lushchak V.I. 2013. Oxidative stress as mechanism for toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D): studies with goldfish gills. *Ecotoxicology*, 22: 1498-1508.
- Avio C.G., Gorbi S., Milan M., Benedetti M., Fattorini D., d'Errico G., Regoli F. 2015. Pollutants bioavailability and toxicological risk from microplastics to marine mussels. *Environmental Pollution*, 198: 211-222.
- Besseling E., Wang B., Lüring M., Koelmans A.A. 2014. Nanoplastic affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna*. *Environmental Science and Technology*, 48(20): 12336-12343.
- Browne M.A., Niven S.J., Galloway T.S., Rowland, S.J., Thompson R.C. 2013. Microplastic moves pollutants

- first edition. Iran. pp: 70-76. (In Persian).
- Jabeen K., Li B., Chen Q., Su L., Wu C., Hollert H., Shi H. 2018. Effects of virgin microplastics on Goldfish (*Carassius auratus*). *Chemosphere*, 213: 323-332.
- Jambeck J.R., Geyer R., Wilcox C., Siegler T.R., Perryman M., Andrady A., Law K.L. 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347(6223): 768-771.
- Lu Y., Zhang Y., Deng Y., Jiang W., Zhao Y., Geng J., 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
- Lusher A.L., McHugh M., Thompson R.C. 2013. Occurrence of microplastics in the gastrointestinal tract of pelagic and demersal fish from the English Channel. *Marine Pollution Bulletin*, 67: 94-99.
- Mattsson K., Ekvall M.T., Hansson L.A., Linse S., Malmendal A., Cedervall T. 2015. Altered behavior, physiology, and metabolism in fish exposed to polystyrene nanoparticles. *Environmental science & technology*, 49(1): 553-561.
- Peda C., Caccamo L., Fossi M.C., Gai F., Andaloro F., Genovese L., Maricchiolo G. 2016. Intestinal alterations in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) exposed to microplastics: preliminary results. *Environmental pollution*, 212: 251-256.
- PlasticsEurope. 2018. *Plastics—the Facts 2018: an Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data*. Available from: <https://www.wwww.plastics-europe.org/en>.
- Riba I., Blasco J., Jiménez-Tenorio N., DelValls T.Á. 2005. Heavy metal bioavailability and effects: I. Bioaccumulation caused by mining activities in the Gulf of Cádiz (SW, Spain). *Chemosphere*, 58(5): 659-669.
- Rochman C.M., Kurobe T., Flores I., Teh S.J. 2014. Early warning signs of endocrine disruption in adult fish from the ingestion of polyethylene with and without sorbed chemical pollutants from the marine environment. *Science of the Total Environment*, 493:656-661.
- Shohani N., Pourmahdian S., Shirkavand Hadavand B. 2017. Response Surface Methodology for Design of Porous Hollow Sphere Thermal Insulator. *Management Science and Engineering (MS&E)*, 269(1): 012-073.
- Simon N., Schulte M.L. 2017. Stopping global plastic pollution: The case for an international convention. *Ecology Publication Series*, 43:1-56.
- Tahami S.V., Pourmahdian S., Hadavand B.S., Azizi Z. S., Tehranchi M.M. 2016. Thermal tuning the reversible optical band gap of self-assembled polystyrene photonic crystals. *Photonics and Nanostructures-Fundamentals and Applications*, 22: 40-45.
- Teuten E.L., Saquing J.M., Knappe D.R., Barlaz M.A., Jonsson S., Björn A., Ochi D. 2009. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526): 2027-2045.
- Watts A.J.R. 2014. Uptake and retention of microplastics by the shore crab *Carcinus maenas*. *Environmental Science and Technology*, 48: 8823-8830.
- Wilson J.M., Laurent P. 2002. Fish gill morphology: inside out. *Journal of Experimental Zoology*, 293(3): 192-213.
- Wright S.L., Thompson R.C., Galloway T.S. 2013. The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environmental Pollution*, 178: 483-492.
- Yin L., Chen B., Xia B., Shi X., Qu K. 2018. Polystyrene microplastics alter the behavior, energy reserve and nutritional composition of marine jacobever (*Sebastes schlegelii*). *Journal of hazardous materials*, 360: 97-105.

#### نحوه استناد به این مقاله:

ابرقویی ص.، هدایتی س.ع.، رئیسی م.، شیرکوند هداوند ب.، ح ر.، عابد علم‌دوست ا. بررسی تجمع‌زیستی و عوارض بافت آیشش ماهی کاراس‌طلایی (*Carassius auratus*) در مواجهه با میکروپلاستیک پلی‌استایرن. نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی دانشگاه گنبدکاووس. ۱۴۰۰، ۵۲-۴۵: ۹(۲).

Abarghouei S., Hedayati S.A., Raeisi M., Shikavand Hadavand B., Rezaei H., Abed-Elmdoust A. Study on gill bioaccumulation and histological lesions of Goldfish (*Carassius auratus*) in exposure to microplastic polystyrene. *Journal of Applied Ichthyological Research, University of Gonbad Kavous*. 2021, 9(2): 45-52.

# Study on gill bioaccumulation and histological lesions of Goldfish (*Carassius auratus*) in exposure to microplastic polystyrene

Safoura Abarghouei<sup>1</sup>, Seyed Aliakbar Hedayati<sup>2\*</sup>, Mojtaba Raeisi<sup>3</sup>, Behzad Shirkavand Hadavand<sup>4</sup>, Hasan Rezaei<sup>5</sup> Amirreza Abed-Elmdoust<sup>6</sup>

<sup>1</sup> PhD, Dept. of Fisheries and Aquatic Sciences, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

<sup>2</sup> Associate Prof., Dept. of Fisheries and Aquatic Sciences, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

<sup>3</sup> Assistant Prof., Food Drug and Natural Products Health Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

<sup>4</sup> Associate Prof., Dept. of Resin and Additives, Institute for Color Science and Technology, Tehran, Iran

<sup>5</sup> Associate Prof., Dept. of Environmental Sciences, Faculty of Fishery and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

<sup>6</sup> Assistant Prof., Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

## Type:

Original Research Paper

## Paper History:

Received: 01-08-2020

Accepted: 26-10- 2020

## Corresponding author:

Hedayati S.A. Associate Prof., Dept. of Fisheries and Aquatic Sciences, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Email: Hedayati@gau.ac.ir

## Abstract

Microplastics are known to be emerging contaminants and there are widespread concerns about their potential toxic effects. Histopathological study is one of the appropriate methods in diagnosing the effects of environmental pollutants on aquatics. In this study, the accumulation and adsorption of polystyrene microplastics (PS-MPs) in the gills of Goldfish were identified and its toxic effects on gill histology were investigated. A total of 232 healthy, productive fish, with an average weight of  $18.55 \pm 2.41$  g, were selected. Microplastics were synthesized in two size ranges (0.25 and 8  $\mu\text{m}$ ) with two different functions (fluorescent and non-fluorescent). The experiments were performed in two stages. Initially, after the adaptation period, 64 fish were exposed to a constant concentration (PS-MPs) of 300 mg/L of both sizes (0.25  $\mu\text{m}$ ) and 8 (PS-MPs) fluorescent. Gill tissue was sampled at 24, 48 and 168 hours and samples were taken using a fluorescent microscope. Then, to determine the histopathological lesions, 168 fish were exposed to non-fluorescent microplastics at different concentrations (0.005, 0.5 and 5 ppm) for 28 days and were analyzed for histological lesions. After 168 hours of exposure at 300 mg/L of fluorescent particles, it was found that both dimensions (0.25 and 8  $\mu\text{m}$ ) were accumulated in gill tissue. The highest concentration of MP particles accumulated in gill tissue averaged in particles with dimensions of 8 ( $0.71 \pm 0.098$ )  $\mu\text{m}$  and 0.25 ( $0.272 \pm 0.046$ )  $\mu\text{m}$ , was determined as  $\mu\text{g}$  of gill dry weight per milligram. Examination of gill pathology revealed complications such as lamellar aneurysm, secondary blade epithelium protrusion, lamellar deviation, secondary blade connection, lamella shortening and paving in both size groups compared to the control group, but the severity of complications was different in each concentration. It can be concluded that although microplastics have accumulated in the gills of fish and have affected tissues, their potential toxic effects are largely unknown and further studies are needed.

**Keywords:** Gill tissue, Goldfish, Microplastic, Pollution, Toxicology.