

تأثیر اندازه و غلظت‌های متفاوت میکروپلاستیک پلی‌استایرن بر هیستوپاتولوژی ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus*)

صفورا ابرقویی^۱، سید علی اکبر هدایتی^{۲*}، مجتبی رئیس^۳، بهزاد شیرکوند هداوند^۳، حسن رضایی^۴، امیررضا عابد علم دوست^۵

^۱گروه تولید و بهره برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

^۲مرکز تحقیقات بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

^۳گروه رزین و افزودنی‌ها، پژوهشگاه رنگ، تهران، ایران.

^۴گروه محیط زیست، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

^۵گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

*نویسنده مسئول: hedayati@gau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۹/۸/۲۱

تاریخ دریافت: ۹۹/۶/۲۲

چکیده

امروزه حضور میکروپلاستیک‌ها در اکوسیستم‌های آبی به عنوان چالش جدی آبزیان مطرح می‌باشد. در این تحقیق تجمع میکروپلاستیک‌های پلی‌استایرن (PS-MPs) در کبد و روده‌ی ماهی کاراس طلایی محاسبه و اثرات سمی آن بر عوارض بافتی این اندام‌ها بررسی شد. تعداد ۲۳۱ 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 دوره‌ی آدآپتاسیون، ۶۳ عدد ماهی در غلظت ثابت (PS-MPs) $300 \mu\text{g/L}$ از هر دو اندازه‌ی $0/25$ و 8 (PS-MPs) فلئورسنت، قرار گرفتند. نمونه‌برداری از بافت کبد و روده در مدت زمان ۷ روز صورت گرفت و از نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلئورسنت تصویر برداری شد. سپس ۱۶۸ عدد ماهی به مدت ۲۸ روز در معرض میکروپلاستیک‌های غیر فلئورسنت با غلظت‌های متفاوت (۵، ۰/۵، ۰/۰۵، ۰ ppm) جهت تعیین عوارض هیستوپاتولوژیک، قرار گرفته و به روش بافت‌شناسی روتین بررسی شدند. نتایج نشان داد هر دو اندازه از این ذرات قابلیت تجمع در بافت کبد و روده را دارند. با بررسی آسیب‌شناسی بافت کبد عوارض متفاوتی مانند خونریزش، نکروز، تورم سلولی، رکودصفرا، رقیق شدن فضای سینوزوئید و تجمع خونی نسبت به گروه شاهد مشاهده شد، شدت افزایش عوارض با افزایش غلظت‌ها در یک گروه از اندازه؛ روند قابل پیش‌بینی‌ای نداشت اما شدت تخریب در اندازه‌ی $0/25$ میکرومتر بیشتر بود. با بررسی آسیب‌شناسی بافت روده عوارض متفاوتی مانند نکروز، از بین رفتن پرز روده، واکوئله شدن، فساد پرزها و دژنره شدن اپیتلیوم نسبت به گروه شاهد در هر دو گروه اندازه نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. در مجموع میکروپلاستیک اثرات مخرب بافتی بر ماهی کاراس طلایی دارد. بیشترین عوارض بافتی در بالاترین غلظت (۵ میلی گرم بر لیتر) مشاهده شد. شدت عوارض ذرات با اندازه‌ی $0/25$ میکرومتر نسبت به اندازه ۸ میکرومتر بیشتر بود که تأثیرات مخرب ابتدا در روده و سپس کبد مشاهده شد.

واژگان کلیدی: آلودگی، بافت‌شناسی، میکروپلاستیک، ماهی قرمز.

مقدمه

تقریباً در تمام جنبه‌های زندگی مدرن، شامل بسته‌بندی، ساخت‌وساز، خودروسازی، لوازم الکترونیک و برقی، کشاورزی و غیره، شامل می‌شود. قطعه قطعه شدن مداوم وسایل پلاستیکی به دلیل تخریب در اثر هوازدگی می‌تواند میکروپلاستیک‌های ثانویه بی-شماری تولید کند (قطر > 5 میلی‌متر) (Thompson

وجود میکروپلاستیک‌ها در اکوسیستم‌های دریایی سراسر دنیا گزارش شده است (Collignon et al., 2012). در دهه‌های اخیر تولید پلاستیک‌ها در جهان افزایش چشم‌گیری داشته به طوری که در سال ۲۰۱۷ به ۳۵۰ میلیون تن رسیده است. کاربرد پلاستیک‌ها

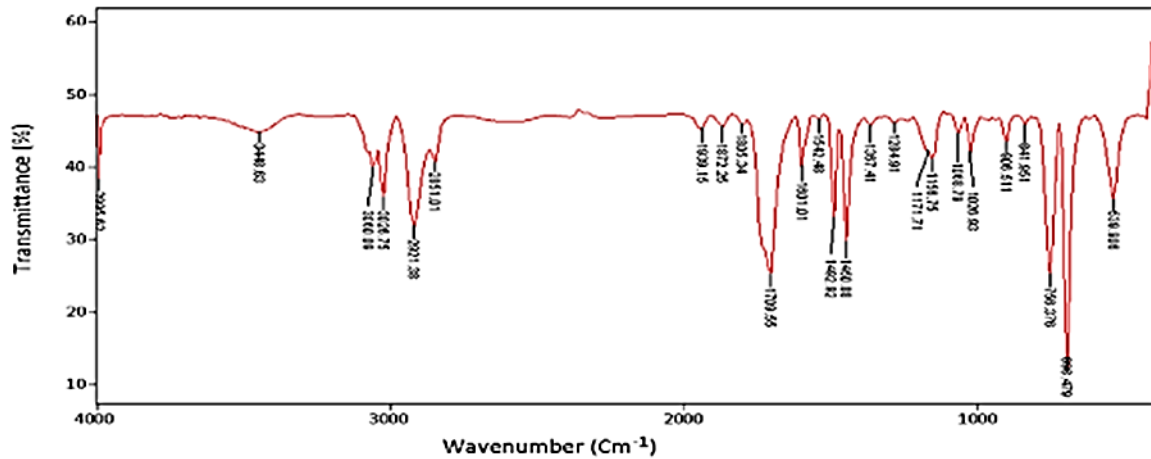
داد، میکروپلاستیک‌های بلعیده شده موجب تجمع و انسداد کل دستگاه گوارش ماهی و کاهش تغذیه به دلیل اشباع شدن از این مواد می‌شود (Lusher *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2013). مصرف میکروپلاستیک‌ها می‌تواند موجب تضعیف عملکرد و ساختار دستگاه گوارش شود که به نوبه‌ی خود موجب مشکلات تغذیه‌ای و رشدی در ماهیان می‌شود (Peda *et al.*, 2016; Jabeen *et al.*, 2018). مطالعه‌ای که بر روی گونه *Sebastes schlegelii* انجام شد، گزارش شده است که پس از قرار گرفتن در معرض 10^6 ذره میکروپلاستیک پلی‌استایرن بر لیتر، نرخ افزایش وزن، رشد ویژه و انرژی ناخالص ماهی به ترتیب $65/4$ ، $65/9$ و $9/5$ درصد می‌باشد که نسبت به گروه شاهد کاهش یافته است (Yin *et al.*, 2018).

مصرف میکروپلاستیک همچنین می‌تواند موجب پاسخ‌های التهابی (Lu *et al.*, 2016)، تغییرات متابولومیک (Mattsson *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2016) 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 (Yin *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2018). میکروپلاستیک‌ها می‌توانند بر فیزیولوژی جانوران تاثیر بگذارند، موجب انسداد روده، تغییر در رشد، تغییر در پارامترهای بیوشیمیایی خون، سرکوب سیستم ایمنی و استرس اکسیداتیو (Banaee *et al.*, 2019; Haghi and Banaee, 2019). افزایش مرگ‌ومیر و تغییر در رفتارهای اکولوژی مانند تعاملات اجتماعی، شنا، فرار از شکارچی و تولید مثل شوند (Jovanovic *et al.*, 2017; Choi *et al.*, 2018). هدف از این مطالعه تعیین اندازه‌های مخرب‌تر میکروپلاستیک پلی‌استایرن در آسیب‌شناسی بافت ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus*) به‌عنوان مدل‌زیستی می‌باشد.

پلاستیک‌ها، هنگامی که در ابعاد کوچک جهت مصارف خانگی و صنعتی تولید می‌شوند (میکروبیدهای پلاستیکی موجود در محصولات مراقبی و آرایشی شخصی، لایه-بردار در اسکراب‌ها و مواد خام جهت تولید پلاستیک-ها) به‌عنوان میکروپلاستیک‌های اولیه شناخته می‌شوند (Cole *et al.*, 2011). تخمین زده شده که حدود ۲۴۵ تن ذرات میکروپلاستیک در هر سال تولید و سرانجام به آب‌های جهان وارد می‌شوند (Auta *et al.*, 2017). میکروپلاستیک‌ها تقریباً در انواع مختلف زیستگاه‌های آبی توزیع شده‌اند و دسترسی این مواد برای طیف گسترده‌ای از موجودات آبی مانند ماهی فراهم شده است (Baldwin *et al.*, 2016; Dai *et al.*, 2018).

عوامل متعددی می‌تواند بر فراهم‌آوری زیستی میکروپلاستیک در ماهی تاثیر بگذارد. به دلیل اندازه-ی کوچک و شباهت به مواد غذایی این ذرات به صورت عمدی و یا اتفاقی توسط ماهیان مصرف می‌شوند (Crawford and Quinn, 2017). شواهد، بلعیده شدن ذرات میکروپلاستیک در بیش از ۱۵۰ گونه‌ی دریایی و آب شیرین را نشان می‌دهد (Jabeen *et al.*, 2017). مصرف میکروپلاستیک‌ها نه تنها موجب اثرات فیزیکی در ماهی می‌شود (آسیب مکانیکی و انسداد دستگاه گوارش) بلکه مسیر بالقوه-ای برای حضور برخی از مواد خطرناک فراهم می‌کند (افزودنی‌های موجود در پلاستیک، مواد شیمیایی سمی و میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا که از محیط جذب این ذرات می‌شوند) وارد شبکه‌ی غذایی آبزیان می‌شوند (Wright and Kelly, 2017). از آنجایی که ماهی منبع مهمی جهت تامین پروتئین‌های مورد نیاز انسان می‌باشد، وجود و اثرات سمی میکرو-پلاستیک‌ها بر ماهیان موجب تاثیر بر ایمنی غذای آبی می‌شود (Wright and Kelly, 2017; Barboza *et al.*, 2018a).

در مطالعات آزمایشگاهی که بر روی اثرات میکروپلاستیک بر ماهی انجام شده است نتایج نشان



شکل ۱ - طیف سنجی FTIR میکروپلاستیک پلی استایرن.

مواد و روش‌ها

در بهار ۱۳۹۸، تعداد ۲۳۱ عدد ماهی مولد سالم با متوسط وزنی $18/41 \pm 2/55$ گرم، از مرکز تکثیر و پرورش ماهی قرمز بخش خصوصی 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 به مدت دو هفته در شرایط آزمایشگاهی نگهداری و دو بار در روز به اندازه دو درصد وزن بدن، با غذای تجاری ماهی قرمز و در حد سیری غذایی شدند.

استایرن به عنوان مونومر، پلی‌وینیل‌الکل (PVA) با جرم مولکولی ۱۲۸۰۰۰ گرم بر مول به عنوان تثبیت‌کننده و ماده رنگزای رودامین b از شرکت مرک آلمان و بنزوئیل‌پراکسید از شرکت آلفا آریزر (آمریکا) خریداری شدند (پیک پلی‌استایرن سنتز شد (شکل ۱). استایرن قبل از استفاده تقطیر شد و سایر مواد شیمیایی به همان صورت مورد استفاده قرار گرفت. همچنین در تمام آزمایشات آب دیونیزه به کار برده شد.

ذرات پلی‌استایرن با اندازه‌های $0/25$ و 8 μm پلیمریزاسیون امولسیون و تعلیقی، مطابق با تحقیقات قبلی ساخته شد (TahamiVakili et al., 2016; Shohani et al., 2017). بر طبق این روش-ها، ۳-۱ درصد وزنی آغازگر (بنزوئیل پراکسید)، ۴-۱

درصد وزنی تثبیت‌کننده (پلی‌وینیل‌الکل) انتخاب و سرعت هم‌زدن $750-550$ دور در دقیقه قرار داده شد. پلیمریزاسیون در یک راکتور یک لیتری سه دهانه، مجهز به قیف اضافه‌کننده (اضافه کردن قطر-ای مونومر استایرن)، خنک‌کننده و دماسنج انجام شد. در ظرف واکنش 400 میلی لیتر آب مقطر، آغازگر و تثبیت‌کننده اضافه شد و گاز نیتروژن به مدت 20 دقیقه برای خارج کردن اکسیژن محلول از آن عبور داده شد. سپس دما را به 90 درجه سانتی‌گراد رسانده و ضمن هم‌زدن به تدریج طی مدت نیم ساعت استایرن قطره قطره اضافه شد و واکنش پلیمریزاسیون به مدت 8 ساعت ادامه یافت. تمامی این مراحل برای تهیه پلی‌استایرن کلورسنت با اضافه کردن رودامین b به محلول آبی تکرار شد (TahamiVakili et al., 2016; Shohani et al., 2017).

جهت تعیین محدوده LC_{50} در ابتدا غلظت‌های بسیاری اعمال شد. پیش‌تست‌های ما نشان داد؛ حتی غلظت‌های بالا در محدوده $200-2000$ میلی‌گرم در لیتر هم باعث مرگ و میر در مدت زمان 96 ساعت نخواهد شد. از این‌رو غلظت‌های این مطالعه بر اساس مطالعات پیشین (Besseling et al., 2014; Della Torre et al., 2014)، و غلظت‌های سازگار با محیط‌زیست (Lu et al., 2016) و برحسب اندازه ماهیان مولد و با هدف بررسی اثرات غلظت‌های بالاتر،

جدول ۱ - غلظت‌های مختلف میکروپلی‌استایرن در ماهی کاراس طلایی.

غلظت‌های مورد استفاده	تعداد تیمارها	نوع ماده
۵ ppm، ۰/۵، ۰/۰۵، ۰	۴	پلی‌استایرن (۸ μm)
۵ ppm، ۰/۵، ۰/۰۵، ۰	۴	پلی‌استایرن (۰/۲۵ μm)
۳۰۰ μg/L	۱	پلی‌استایرن فلئورسنت (۸ μm)
۳۰۰ μg/L	۱	پلی‌استایرن فلئورسنت (۰/۲۵ μm)

قرار دادن بر روی لام، به مدت ۰/۵ ساعت در آن (۶۰°C) قرار داده شد تا پارافین اضافه از روی بافت حذف شود. نمونه‌ها پس از پارافین زدایی و جایگزینی آن با گزیلول، به وسیله سری‌های کاهشی اتانول (۱۰۰، ۹۰ و ۷۰ درصد) آبدهی مجدد و با استفاده از محلول‌های هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند. تمامی مواد استفاده شده در این مراحل (اتانل، گزیلول، پارافین، هماتوکسیلین و ائوزین) محصول کمپانی Merck بود. در نهایت لامل با استفاده از چسب کاندایا بالزام روی لام‌ها چسبانده شد (Abarghoei et al., 2016). هدف از این مرحله اثبات تجمع این ذرات در بافت کبد و روده، در اندازه‌های متفاوت در زمان‌های مختلف بود.

پس از این مرحله، آزمایش‌های سمیت تحت‌حاد انجام شد. ۱۶۸ عدد ماهی برای انجام این مرحله از آزمایشات انتخاب شد. ماهیان در غلظت‌های ۵ ppm، ۰/۵، ۰/۰۵، ۰ (جدول ۱) از هر دو اندازه پلی‌استایرن قرار گرفتند (در مجموع دو گروه چهار تیمار و هر تیمار با ۲۱ ماهی شامل سه تکرار ۷ تایی). بعد از مواجهه به مدت ۲۸ روز، نمونه‌های روده و کبد، جهت بررسی عوارض هیستوپاتولوژی جداسازی و به روش بافت‌شناسی روتین 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

انتخاب شد، هر چند که غلظت‌های محیطی مربوط به میکروپلاستیک‌ها تاکنون به طور دقیق مشخص نشده است (Ding et al., 2018).

پس از دوره سازگاری، ماهی‌ها به صورت تصادفی در مخازن شیشه‌ای، که هر مخزن شامل ۷ ماهی بود قرار گرفتند (در مجموع ۶۳ عدد ماهی) آب مورد استفاده محلول آزمایش، آب استریل در محدوده‌ی پی‌اچ خنثی بود. محلول نهایی آزمایش از طریق اضافه کردن ذرات پلی‌استایرن فلئورسنت در دو اندازه مختلف به غلظت نهایی ۳۰۰ میکروگرم در لیتر ساخته شد و ماهیان در حجم ثابتی از این غلظت قرار گرفتند. طول دوره این مرحله از آزمایش، ۱۶۸ ساعت مواجهه در غلظت ثابت ۳۰۰ میکروگرم در لیتر بود. در هر بار نمونه‌برداری ماهیان با استفاده از عصاره گل میخک در غلظت ۳۰ ppm بیهوش شدند و به‌منظور حذف ذرات از پوست، ماهیان با استفاده از آب مقطر شسته شده و سپس ۳ ماهی از هر تیمار برای جدا-سازی بافت انتخاب شدند. نمونه‌های بافتی درون محلول تثبیت‌کننده (فرمالین ۱۰ درصد) قرار گرفته و پس از ۲۴ ساعت به الکل ۸۰ درصد منتقل شد. سپس آبیگری با سری افزایشی اتانل (۸۰، ۹۰، ۹۷ و ۱۰۰ درصد) انجام و در ادامه در گزیلول 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 ۵۶-۵۸°C) 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

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

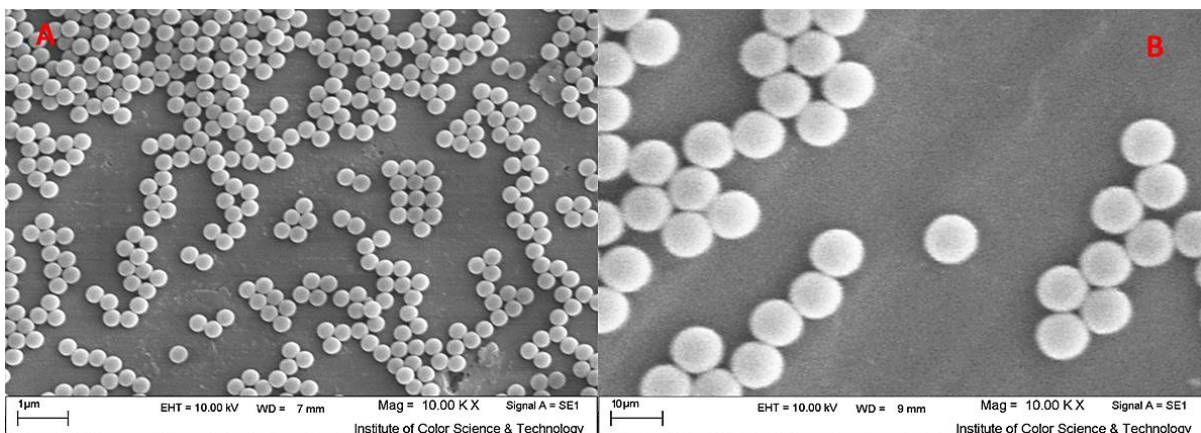
غلظت‌های مختلف ذرات ۸ میکرومتر				عارضه‌های کبد
۵	۰/۵	۰/۰۵	۰	
++++	++++	++	-	نکروز
++	++++	+	-	تورم سلولی
++	++	++++	-	رکودصفرا
++	+	++	-	تجمع خونی
+++	+	+	-	خونریزش
+++	++	++++	-	رقیق شدن سینوزوئید

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

جدول ۳ - تغییرات هیستوپاتولوژی بافت کبد در مواجهه با غلظت‌های مختلف میکروپلاستیک پلی‌استایرن در ابعاد ۰/۲۵ میکرومتر.

غلظت‌های مختلف ذرات ۰/۲۵ میکرون				عارضه‌های کبد
۵	۰/۵	۰/۰۵	۰	
+++++	++	+++	-	نکروز
+++++	++	++	-	تورم سلولی
++	+++	+	-	رکودصفرا
++++	+++	++	-	تجمع خونی
+++	++	++	-	خونریزش
++++	++	+	-	رقیق شدن سینوزوئید

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



شکل ۲ - تصاویر SEM ذرات پلی‌استایرن آمولسیون در دو بزرگنمایی مختلف (A) ۰/۲۵ میکرومتر و (B) ۸ میکرومتر،

شدت‌های ۳۰۲۶، ۱۶۰۱، ۱۴۹۲، ۱۴۵۰، ۷۵۷ و ۶۹۸ cm^{-1} همگی مربوط به حلقه بنزنی موجود در پلی-استایرن است. پیک جذب در 1601 cm^{-1} مربوط به $C=C$ حلقه آروماتیکی و پیک‌های جذب در شدت‌های ۲۹۲۱ و 2851 cm^{-1} نیز به ترتیب مربوط به گروه‌های CH_2 -کشی آروماتیک و آلیفاتیک و پیک 1367 cm^{-1} مربوط به گروه‌های CH_2 -خمشی است (شکل ۱). همان طور که از تصاویر SEM مشخص می‌باشد (ZEISS آلمان مدل

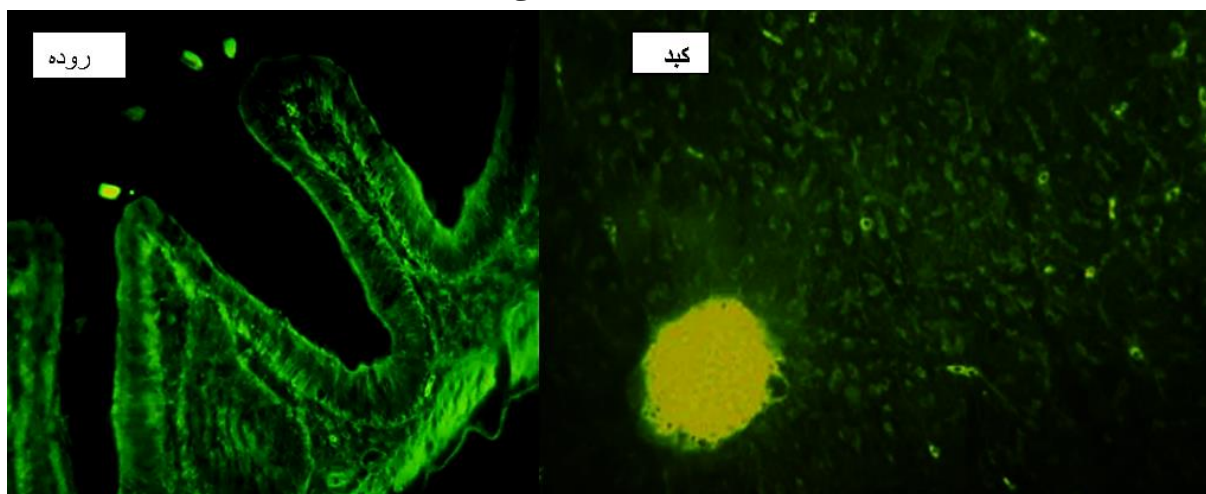
میکروسکوپ فلئورسنت Labo Med (Lx 400) ساخت کشور آمریکا و تصاویر بافتی توسط میکروسکوپ نوری (Olympus) ساخت کشور ژاپن تصویربرداری شد.

نتایج

همان‌طور که در طیف FTIR پلی‌استایرن سنتز شده مشاهده می‌شود (دستگاه Perkin Elmer مدل Spectrum 1 ساخت آمریکا)، پیک‌های جذب در

رکودصفراء، رقیق شدن فضای سینوزوئید و تجمع خونی (شکل ۴) نسبت به گروه شاهد مشاهده شد

SIGMA VP ذرات امولسیون در دو ابعاد مختلف و به صورت کروی سنتز شده اند (شکل ۲).



شکل ۳ - تصاویر تجمع ذرات میکروپلاستیک در بافت کبد و روده، بعد از مواجهه‌ی ۷ روزه در غلظت ثابت ۳۰۰ µg/L.

جدول ۴ - تغییرات هیستوپاتولوژی بافت روده در مواجهه با غلظت‌های مختلف میکروپلاستیک پلی استایرن در ابعاد ۸ میکرومتر.

غلظت‌های مختلف ذرات ۸ میکرومتر				عارضه‌های روده
۵	۰/۵	۰/۰۵	۰	
+	-	+	-	دژنره شدن اپیتلیوم
+	+	-	-	فساد پرزها
++	++	++++	-	واکوتله شدن
++++	++	+	-	از بین رفتن پرز روده
+++	+	+	-	نکروز

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

جدول ۵ - تغییرات هیستوپاتولوژی بافت روده در مواجهه با غلظت‌های مختلف میکروپلاستیک پلی استایرن در ابعاد ۰/۲۵ میکرومتر.

غلظت‌های مختلف ذرات ۰/۲۵ میکرومتر				عارضه‌های روده
۵	۰/۵	۰/۰۵	۰	
+++	+++	++	-	دژنره شدن اپیتلیوم
++++	++	+	-	فساد پرزها
+++	++	++	-	واکوتله شدن
++	++	+	-	از بین رفتن پرز روده
+++++	+++	+++	-	نکروز

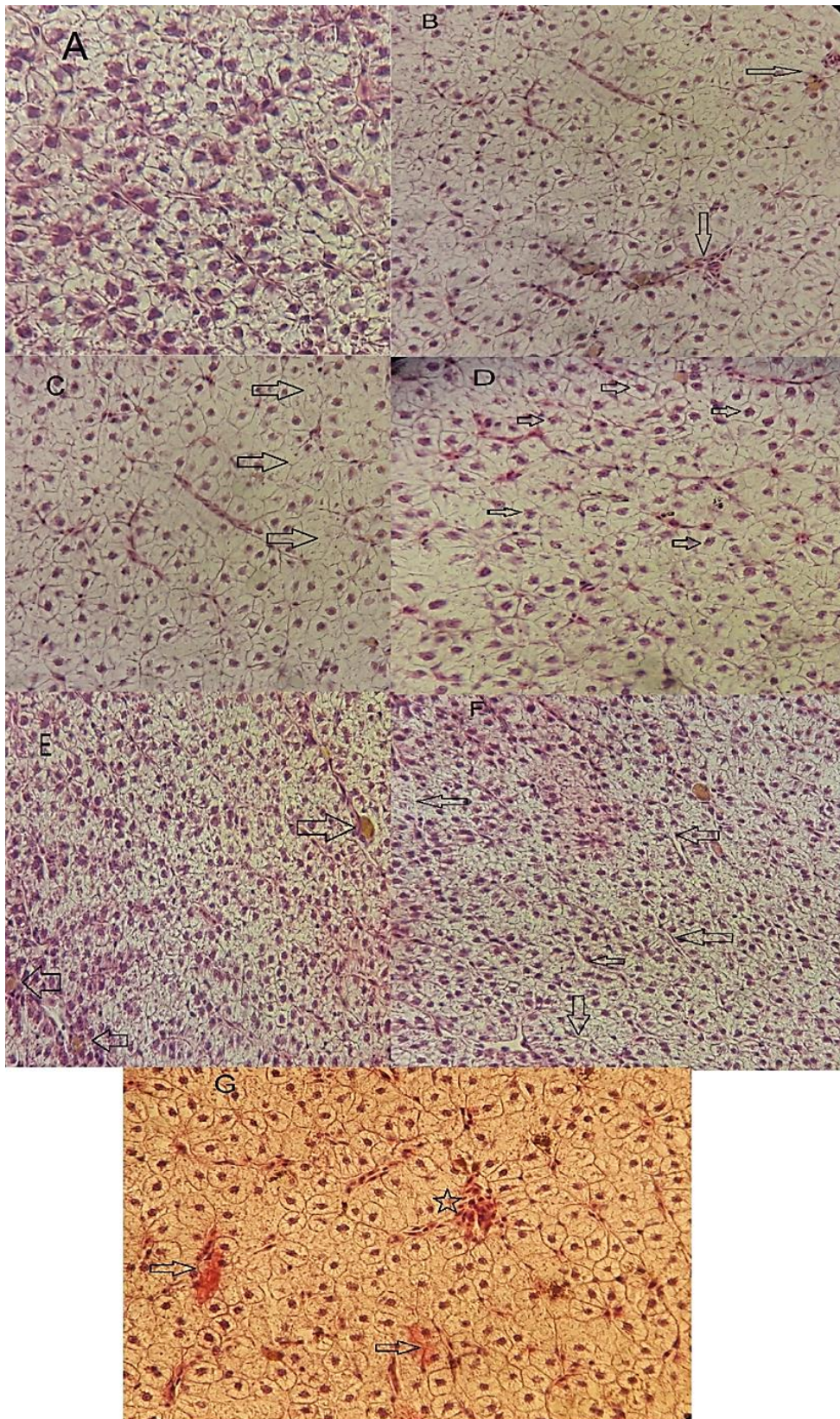
عدم مشاهده عارضه (-)، ۱ تا ۳ عارضه (+)، ۳ تا ۵ عارضه (++)، ۵ تا ۱۱ عارضه (+++) و بیشتر از ۱۱ (++++). (Riba et al., 2005).

(جدول‌های ۲ و ۳). شدت افزایش عوارض با افزایش غلظت‌ها در یک گروه اندازه؛ روند قابل پیش‌بینی‌ای نداشت اما شدت تخریب در اندازه ۰/۲۵ میکرومتر بیشتر بود.

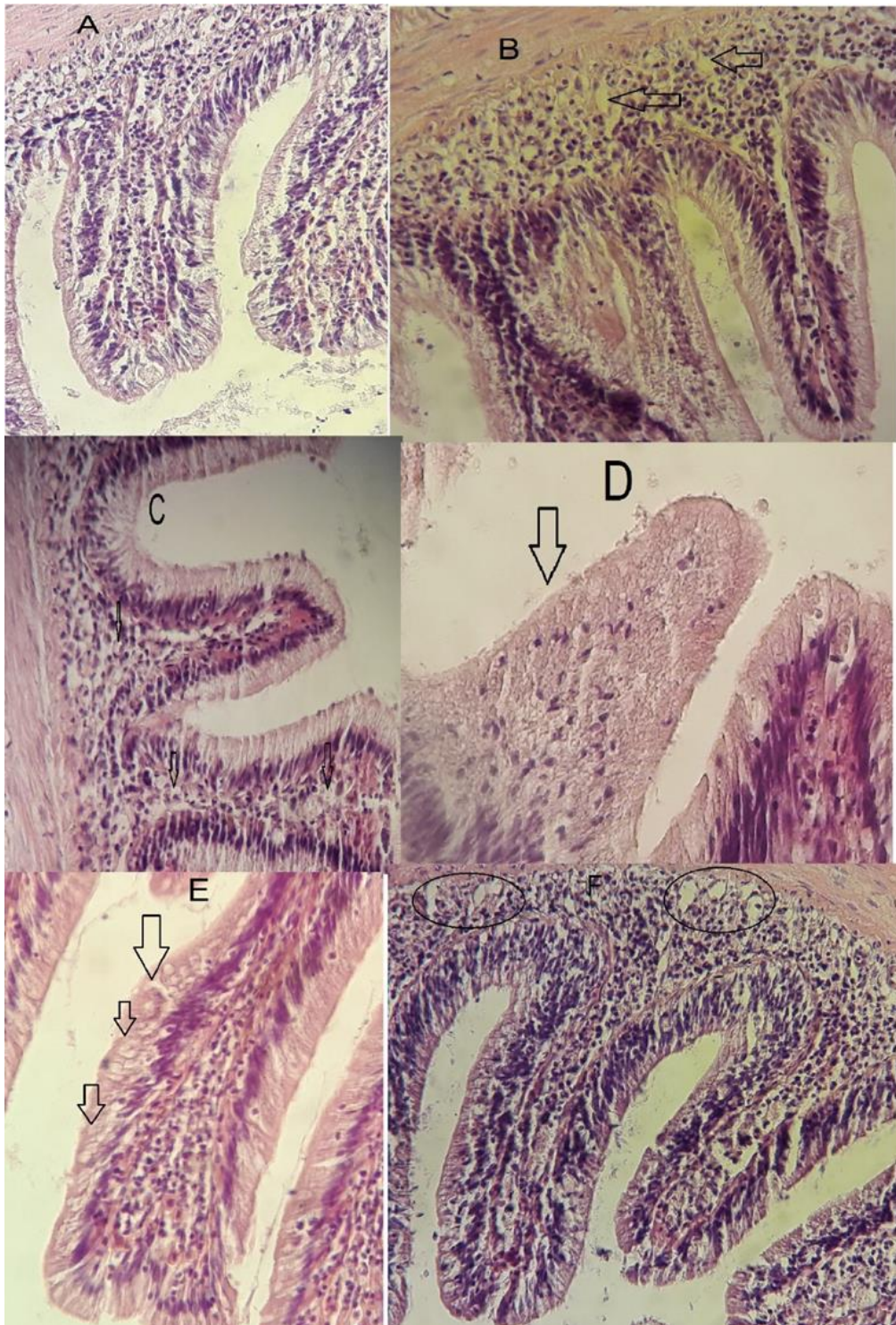
با بررسی آسیب‌های بافت روده ماهی کاراس-طلائی در گروه‌های تحت مواجهه با غلظت‌های مختلف از دو اندازه متفاوت میکروپلاستیک پلی-استایرن نسبت به گروه شاهد عوارض متفاوتی مانند

با استفاده از میکروسکوپ فلئورسنت از نمونه‌های آبشش، کبد و روده بعد از ۷ روز مواجهه تصویر برداری شد. نتایج وجود این ذرات در بافت‌های مختلف را نشان داد (شکل ۳). با بررسی آسیب‌شناسی بافت کبد ماهی کاراس طلائی در گروه‌های تحت مواجهه با غلظت‌های مختلف از دو اندازه‌ی متفاوت میکرو-پلاستیک پلی‌استایرن نسبت به گروه شاهد عوارض متفاوتی مانند خونریزش، نکروز، تورم سلولی،

نکروز، از بین رفتن پرز روده، واکوئله شدن، فساد پرز-ها و دژنره شدن اپیتلیوم نسبت به گروه شاهد



شکل ۴ - میکروفوتوگرافی تغییرات بافت‌شناسی کبد ماهی کاراس طلایی تحت مواجهه با میکروپلاستیک پلی‌استایرن در غلظت و اندازه‌های مختلف (A): گروه شاهد، B: خونریزش، C: نکروز، D: تورم سلولی، E: رکود صفرا، F: رقیق شدن فضای سینوزوئید، G: خونریزش با علامت فلش و تجمع خونی با علامت ستاره (بزرگنمایی $\times 40$).



شکل ۵ - میکروفوتوگرافی تغییرات بافت‌شناسی روده ماهی کاراس طلایی تحت مواجهه با میکروپلاستیک پلی‌استایرن در غلظت و اندازه‌های مختلف A شاهد، B دژنه شدن اپیتلیوم، C واکنش شدن، D از بین رفتن پرز روده، E فساد پرزها، F نکروز (بزرگنمایی $\times 40$)

عوارض $0/25$ میکرومتر نسبت به 8 میکرومتر بیشتر بود (جدول‌های ۴ و ۵).

بحث

هدف از مطالعات بافت‌شناسی در شرایط آزمایشگاهی

مشاهده شد (شکل ۵) شدت بروز عوارض در غلظت‌های مختلف $0/25$ میکرومتر، با افزایش غلظت افزایش پیدا کرد ولی در 8 میکرومتر شدت بروز عوارض نسبت به افزایش غلظت‌ها روند مشخصی نداشت، در بالاترین غلظت از هر دو گروه شدت

لیتر بود مشاهده شد (Erkmen *et al.*, 2017). واکوئوله شدن (Vacuolization) در زمان کاهش انرژی و استرس شیمیایی، جهت جلوگیری از سنتز پروتئین ایجاد می‌شود (Liao *et al.*, 2006). در مطالعه‌ای که توسط Rochman (۲۰۱۳) بر ماهی مداکای ژاپنی (*Oryzias latipes*) صورت گرفت نتایج نشان داد حضور میکروپلاستیک پلی‌اتیلن، موجب افزایش چند برابری هیدورکربن‌های چندحلقه‌ای آروماتیک و آسیب‌های کبدی ماهی، از جمله کاهش گلیکوژن، واکوئل شدن چربی و نکروز سلول می‌شود (Rochman *et al.*, 2013).

با بررسی آسیب‌شناسی بافت روده ماهی کاراس-طلایی در گروه‌های تحت مواجهه با غلظت‌های مختلف از دو اندازه‌ی متفاوت میکروپلاستیک پلی-استایرن نسبت به گروه شاهد، عوارض متفاوتی مانند نکروز، ازبین رفتن پرز روده، واکوئله شدن، فساد پرز-ها و دژنره شدن اپیتلیوم نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. شدت بروز عوارض در غلظت‌های مختلف ۰/۲۵ میکرومتر، با افزایش غلظت افزایش پیدا کرد ولی در ۸ میکرومتر شدت بروز عوارض نسبت به افزایش غلظت‌ها روند مشخصی نداشت، در بالاترین غلظت از هر دو گروه (۵ میلی‌گرم برلیتر) شدت عوارض ذرات با اندازه ۰/۲۵ میکرومتر نسبت به ۸ میکرومتر بیشتر بود. در مطالعه‌ای که توسط Jabeen (۲۰۱۸) بر روی میکروپلاستیک‌های غیر فلئورسنت در سه نوع فرگمنت پلت و فیبر انجام شد، نتایج نشان داد میکروپلاستیک‌ها موجب صدمات ساختاری به اندام‌ها و بافت‌های مختلف ماهی کاراس طلایی می‌شود. این آسیب همچنین به شکل و اندازه ذرات پلاستیکی بستگی دارد (Jabeen *et al.*, 2018). نتایج مشابه توسط Karami و همکاران (۲۰۱۶) و Erkmen و همکاران (۲۰۱۷) گزارش شده است (Karami *et al.*, 2016a; Erkmen *et al.*, 2017).

در این مطالعه با بررسی آسیب‌شناسی بافت کبد و روده، نتایج نشان داد ذرات با قطر ۰/۲۵ میکرون

نشان دادن اثرات منفی میکروپلاستیک‌ها بر ماهیان می‌باشد (Rochman *et al.*, 2013; Peda *et al.*, 2016). در این مطالعه، هیچ مرگ‌ومیری مشاهده نشد. تصاویر فلئورسنت از روده و کبد ماهی کاراس طلایی، پس از ۷ روز مواجهه در غلظت ثابت از میکروپلاستیک فلئورسنت نشان داد که این ذرات قابلیت تجمع زیستی در بافت‌های روده و کبد را دارند. این گزارش با مطالعات (Lu *et al.*, 2016; Deng *et al.*, 2017) که نشان دادند میکروپلاستیک‌های فلئورسنت شده قابلیت تجمع در بافت را دارند جذب این ذرات می‌باشد (Wright *et al.*, 2013; Grigorakis *et al.*, 2017; Romano *et al.*, 2018). اثرات سمی میکروپلاستیک‌ها زمانی اتفاق می‌افتد که این ذرات از طریق بلعیدن وارد محیط بیولوژیک شوند (Cole *et al.*, 2011). کبد یکی از حیاتی‌ترین اندام‌ها جهت دفع سموم بدن است (Van der Oost *et al.*, 2003).

با بررسی آسیب‌شناسی بافت کبد ماهی کاراس طلایی در گروه‌های تحت مواجهه با غلظت‌های مختلف از دو اندازه متفاوت میکروپلاستیک پلی-استایرن نسبت به گروه شاهد، عوارض متفاوتی مانند خونریزش، نکروز، تورم سلولی، رکود صفرا، رقیق شدن فضای سینوزوئید و تجمع خونی نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. شدت افزایش عوارض با افزایش غلظت‌ها در یک گروه از اندازه؛ روند قابل پیش‌بینی-ای نداشت اما شدت تخریب در اندازه ۰/۲۵ میکرومتر بیشتر بود. در مطالعات مشابه، هایپرآمیا غیرفعال (Passive hyperaemia)، رقیق شدن فضای سینوزوئیدها (Dilated sinusoids) و واکوئل آبی (Hydrophic vacuolization) عوارضی بودند که در گروه در معرض غذاهای حاوی میکروپلاستیک نسبت به گروه شاهد مشاهده شد (Jabeen *et al.*, 2018). نتایج مشابه در کبد ماهی تیلاپیانیل (*Oreochromis niloticus*) که در معرض ماده پلاستیکی di-n-butyl فتالات به مقدار ۱۰mg بر

و معنوی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان با شماره گرنت دانشجویی ۹۴۲۱۰۷۴۱۸۰ و در قالب طرح مشترک با دانشگاه علوم پزشکی گلستان با شماره طرح ۱۱۰۲۶۸ و حمایت‌های صندوق پژوهشگران و فناوران کشور با شماره طرح ۹۷۰۰۳۴۳۲ انجام پذیرفت.

منابع

- Affonso E., Polez V., Correa C., Mazon A., Araujo M., Moraes G., Rantin F. 2002. Blood parameters and metabolites in the teleost
- Abarghoei 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.
- Arthur C., Baker J., Bamford H. 2008. International research workshop on the occurrence, effects, and fate of microplastic marine debris. *Conference Proceedings* 9-11.
- Auta H.S., Emenike C.U., Fauziah S.H. 2017. Distribution and importance of microplastics in the marine environment: a review of the sources, fate, effects, and potential solutions. *Environment International* 102, 165-176.
- Baldwin A.K., Corsi S.R., Mason S.A. 2016. Plastic debris in 29 Great Lakes tributaries: relations to watershed attributes and hydrology. *Environmental Science and Technology* 50(19), 10377-10385.
- Banaee M., Soltanian S., Sureda A., Gholamhosseini A., Haghi B.N., Akhlaghi M., Derikvandy A. 2019. Evaluation of single and combined effects of cadmium and micro-plastic particles on biochemical and immunological parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere* 236, p.124335.
- Barboza L.G.A., Vethaak A.D., Lavorante B.R., Lundebye A.K., Guilhermino L. 2018. Marine microplastic debris: An emerging issue for food security, food safety and human health. *Marine Pollution Bulletin* 133, 336-348.

قابلیت تخریب بافتی بیشتری نسبت به ذرات با قطر ۸ میکرون دارند، این امر احتمالاً به این دلیل است که ذرات کوچکتر نسبت به ذرات بزرگتر، تمایل بیشتری به باقی ماندن در بدن موجودات زنده دارند، همچنین، تخریب یا متابولیسم این ذرات به دلیل آبریز بودن و وزن مولکولی بالا دشوار است (Rist et al., 2017). همچنین به نظر 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 در حالی که 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 در حالی که ذرات بزرگتر با قطر ۲۰ میکرون فقط در آبشش و روده مشاهده شدند و در کبد تجمع پیدا نکردند (Lu et al., 2016).

در مجموع نتایج نشان داد که میکروپلاستیک پلی‌استایرن اثرات مخرب بافتی بر ماهی کاراس طلائی دارد. بیشترین عوارض بافتی در بالاترین غلظت (۵ میلی گرم بر لیتر) مشاهده شد. شدت عوارض ذرات با اندازه‌ی ۰/۲۵ میکرومتر نسبت به اندازه ۸ میکرومتر بیشتر بود که تاثیرات مخرب ابتدا در روده و سپس کبد مشاهده شد. آسیب‌های بافتی کبد و روده می‌توانند بیومارکر مناسب میکروپلاستیک باشد. نتیجه کلی نشان داد ذرات با قطر ۰/۲۵ میکرون احتمالاً قابلیت تخریب بافتی بیشتری نسبت به ذرات با قطر ۸ میکرون دارند، با اینحال اثرات دقیق این ذرات بر موجودات زنده به خوبی شناخته نشده است و نیاز به مطالعات تکمیلی در این زمینه وجود دارد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب رساله دکتری و تحت شرایط و ضوابط پژوهشی و اخلاق علمی و با حمایت‌های مادی

- and oxidative stress assessment. *Aquaculture Research* 48, 675-685
- Gall S.C., Thompson R.C. 2015. The impact of debris on marine life. *Marine Pollution Bulletin* 92(1-2), 170-179.
- 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.
- 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.
- Haghi B.N., Banaee M. 2017. Effects of micro-plastic particles on paraquat toxicity to common carp (*Cyprinus carpio*): biochemical changes. *International Journal of Environmental Science and Technology* 14(3), 521-530.
- Hedayati A. 2013. *Aquatic Toxicology*, University of Gorgan, first edition. 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.
- Jabeen K., Su L., Li J., Yang D., Tong C., Mu J., Shi H. 2017. Microplastics and mesoplastics in fish from coastal and fresh waters of China. *Environmental Pollution* 221, 141-149.
- Jovanovic B. 2017. Ingestion of microplastics by fish and its potential consequences from a physical perspective. *Integrated Environmental Assessment and Management* 13, 510-515
- Karami A., Goh Y.M., Jahromi M.F., Lazorchak J.M., Abdullah M., Courtenay S.C. 2016a. Diploid and triploid African catfish (*Clarias gariepinus*) differ in biomarker responses to the pesticide chlorpyrifos. *Science of the Total Environment* 557-558, 204-211
- Liao C.Y., Fu J.J., Shi J.B., Zhou Q.F., Yuan C.G., Jiang G.B. 2006. Methylmercury 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.
- 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.
- Collignon A., Hecq J., Glagani F., Voisin P., Collard F., Goffart A. 2012. Neustonic microplastic and zooplankton in the North Western Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin* 64, 861-864.
- Choi J.S., Jung U.J., Hong N.H., Hong S.H., 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, 231-240
- Crawford C.B., Quinn B. 2017. *Microplastics, standardisation and spatial distribution, Microplastic Pollutants*. Elsevier, pp. 101-130.
- Dai Z., Zhang H., Zhou Q., Tian Y., Chen T., Tu C., Luo Y. 2018. Occurrence of microplastics in the water column and sediment in an inland sea affected by intensive anthropogenic activities. *Environmental Pollution* 242, 1557-1565.
- 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.
- Deng Y., Zhang Y., Lemos B., Ren H. 2017. Tissue accumulation of microplastics in mice and biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Scientific Reports* 7, 46687
- 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 red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Pollution* 238, 1-9.
- Erkmen B., Benli A.C.K., Agus H.H., Yildirim Z., Mert R., Erkoç F. 2017. Impact of sublethal di-n-butyl phthalate on the aquaculture fish species Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): histopathology

- Shohani N., Pourmahdian S., Shirkavand Hadavand B. 2017. Response Surface Methodology for Design of Porous Hollow Sphere Thermal Insulator. *MS&E* 269(1), 012-073.
- Van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.
- Wright S.L., Kelly F.J. 2017. Plastic and human health: a micro issue? *Environmental Science and Technology* 51, 6634-6647.
- accumulation, histopathology effects, and cholinesterase activity alterations in medaka (*Oryzias latipes*) following sublethal exposure to methylmercury chloride. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 22, 225-233.
- 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.
- 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.
- Rist S., Baun A., Hartmann N.B. 2017. Ingestion of micro- and nanoplastics in *Daphnia magna*-quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction. *Environmental Pollution* 228, 398-407.
- 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.
- Romano N., Ashikin M., TheM J.C., Syukri F., Karami A. 2018. Effects of pristine polyvinyl chloride fragments on whole body histology and protease activity in silver barb (*Barbodes gonionotus*). *Environmental Pollution* 223, 154-163.

Effect of different sizes and concentrations of polystyrene microplastic on the histopathology of Goldfish (*Carassius auratus*)

Safoura Abarghouei¹, Seyed Aliakbar Hedayati*¹, Mojtaba Raeisi², Behzad Shirkavand Hadavand³, Hasan Rezaei⁴, Amirreza Abed-Elmdoust⁵

¹Department of Fisheries and Aquatic Sciences, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

²Environmental Health Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

³Department of Resin and Additives, Color Institute, Tehran, Iran.

⁴Department of Environment, Faculty of Fishery and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

⁵Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

*Corresponding author: hedayati@gau.ac.ir

Received: 2020/9/12

Accepted: 2020/11/11

Abstract

Nowadays, the presence of microplastics in aquatic ecosystems is a serious challenge for aquatic animals. In this study, the accumulation of polystyrene microplastic (PS-MPs) and its toxic effects on histology of liver and intestines of goldfish was investigated. A total of 231 healthy fish with an average weight of 18.55 ± 2.41 g was selected in the spring of 2019. Microplastic were synthesized in two size ranges (0.25 and 8 μm) with two different functions (fluorescent and non-fluorescent). The experiments were performed in two stages. Initially, after the adaptation period, 63 fish were exposed to a constant concentration (PS-MPs) of 300 $\mu\text{g/L}$ of both 0.25 and 8 μm PS-MPs. Liver and intestinal tissue were sampled for 7 days and the samples were imaged using a fluorescent microscope. Then, 168 fish were exposed to non-fluorescent microplastics with different concentrations (0, 5, 0.5, 0.05 ppm) for 28 days to determine histopathological lesions. The results showed that both sizes can accumulate in liver and intestinal tissues. Examination of liver histopathology showed different complications such as bleeding, necrosis, cell swelling, bile stasis, thinning of the sinusoidal space and accumulation of blood compared to the control group, the severity of lesions increased with increasing concentrations in a group of size. There was no predictable trend, but the intensity of destruction was greater at 0.25 μm . Examination of intestinal tissue lesions showed different complications such as necrosis, loss of intestinal villi, vacuolation, villi decay and degeneration of epithelium in both size groups compared to the control group. In general, microplastics have destructive tissue effects on goldfish. Most tissue lesions were observed at the highest concentration (5 mg/l). The severity of particles with a size of 0.25 μm was higher than the size of 8 μm , with destructive effects observed first in the intestine and then in the liver.

Keywords: Microplastic, Pollution, Goldfish, Histology.