University of Tehran Press

Journal of Natural Environment

Online ISSN: 2423-7817

Homepage: https://jne.ut.ac.ir/

The effects of polystyrene microplastics on embryo development in Zebra danio (*Danio rerio* Hamilton, 1822)

Jamal Rahimi[1] | Kamran Rezaei Tavabeh[2]✉ | Bagher Mojazi Amiri[3] | Arash Javanshir Khoei[4]

1. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: jamalrahimi@ut.ac.ir
2. Corresponding Author, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: krtavabe@ut.ac.ir
3. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: bmamairi@ut.ac.ir
4. Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: arashjavanshir@ut.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received 01 January 2024

Received in revised form 13 April 2024

Accepted 07 May 2024

Published online 22 July 2024

Keywords:

Aquatic ecosystems,

Embryo development,

Microplastics,

Polystyrene,

Zebrafish.

ABSTRACT

The pollution of microplastics is increasing worldwide, and they have the potential to have negative effects on aquatic ecosystems and aquatic organisms. Although there are many scientific reports on the presence of microplastics in aquatic ecosystems, little is known about their toxicity during the early stages of aquatic life. This study was conducted to evaluate the effects of polystyrene microplastics on embryo development in Zebra danio (*Danio rerio*). In this study, zebrafish broodstock was exposed to different concentrations (0 (control), 20, 200, 2000 µg/l) of polystyrene microplastics in two periods of 21 and 60 days. After each period and fish spawning, time changes, and the development process of embryos were investigated. According to the findings, after 21 days in the treatments of 20 and 200 µg/l, this particular type of microplastic did not have any significant impact on the duration of egg hatching and embryo development. However, in the treatment of 2000 µg/l, there was a significant difference (P<0.05) compared to the control treatment. Specifically, it was observed that the hatching time was delayed by 8 hours. After 60 days, significant differences were observed in the treatments of 200 and 2000 µg/l when compared to the control treatment. The hatching time of the embryos was delayed by 10 and 6 hours, respectively. Overall, it can be inferred that the embryos exposed to higher concentrations and longer durations of polystyrene microplastics exhibited slower growth stages and later hatching compared to the control treatment. Therefore, to prevent long-term consequences for aquatic populations, more research and monitoring of microplastic pollution in aquatic ecosystems will be necessary.

Cite this article: Rahimi, J., Rezaei Tavabeh, K., Mojazi Amiri, B., & Javanshir Khoei, A. (2024). The effects of polystyrene microplastics on embryo development in Zebra danio (*Danio rerio* Hamilton, 1822). *Journal of Natural Environment*, 77 (Special Issue), 153-161. DOI: http//doi.org/10.22059/jne.2024.370483.2635

© The Author(s).

Publisher: University of Tehran Press.

DOI: http//doi.org/10.22059/jne.2024.370483.2635

محیط زیست طبیعی
شاپای الکترونیکی: ۷۸۱۷-۲۴۲۳
Homepage: https://jne.ut.ac.ir/
انتشارات دانشگاه تهران

اثرات میکروپلاستیک پلی‌استایرن بر تکامل جنین ماهی زبرا (*Danio rerio* Hamilton, 1822)

جمال رحیمی[۱] | کامران رضایی توابع[۲]✉ | باقر مجازی امیری[۳] | آرش جوانشیر خویی[۴]

۱. گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران،کرج، ایران. رایانامه: jamalrahimi@ut.ac.ir
۲. نویسنده مسئول، گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران،کرج، ایران. رایانامه: krtavabe@ut.ac.ir
۳. گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران،کرج، ایران. رایانامه: bmamairi@ut.ac.ir
۴. گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران،کرج، ایران. رایانامه: arashjavanshir@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۱۱
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۱/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۸
تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۵/۰۱

کلیدواژه‌ها:
اکوسیستم‌های آبی، پلی‌استایرن، تکامل جنین، ماهی زبرا، میکروپلاستیک.

چکیده

آلودگی میکروپلاستیک‌ها در سراسر جهان روزبه‌روز در حال افزایش است و این پتانسیل را دارد که اثرات منفی بر اکوسیستم‌های آبی و آبزیان بگذارند. با وجود گزارش‌های علمی زیاد در خصوص وجود میکروپلاستیک‌ها در اکوسیستم‌های آبی اطلاعات کمی در مورد سمیت آن‌ها در مراحل اولیهٔ زندگی آبزیان وجود دارد. این مطالعه با هدف ارزیابی اثرات میکروپلاستیک پلی‌استایرن بر تکامل جنین در ماهی زبرا (*Danio rerio*) انجام گردید. در این مطالعه مولدین ماهی زبرا در دو دورهٔ ۲۱ و ۶۰ روز در معرض غلظت‌های مختلف (صفر (شاهد)، ۲۰، ۲۰۰، ۲۰۰۰ میکروگرم بر لیتر) میکروپلاستیک پلی‌استایرن قرار گرفتند. بعد از پایان هر دوره و تخمریزی ماهیان، تغییرات زمانی و روند رشد جنین بررسی شد. نتایج نشان داد که این میکروپلاستیک بعد از ۲۱ روز در تیمارهای ۲۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر نسبت به تیمار شاهد اثر معنی‌داری بر مدت زمان تخم‌گشایی و تکامل جنین نداشت، اما در تیمار ۲۰۰۰ میکروگرم بر لیتر اختلاف معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) با تیمار شاهد مشاهده شد و مدت زمان تخم‌گشایی ۸ ساعت به تعویق افتاد. بعد از ۶۰ روز در تیمارهای ۲۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر لیتر اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد مشاهده شد و مدت زمان تخم‌گشایی به‌ترتیب ۱۰ و ۶ ساعت به تعویق افتاده و مراحل رشد جنین دیرتر طی شد. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که تیمارهایی که مدت زمان بیشتر و با غلظت بالاتری در معرض میکروپلاستیک پلی‌استایرن قرار گرفتند مراحل رشد جنین را آهسته‌تر طی کرده و نسبت به تیمار شاهد دیرتر تفریخ می‌شوند. بنابراین، بررسی‌های بیشتر و نظارت بر آلودگی میکروپلاستیک‌ها در اکوسیستم‌های آبی برای جلوگیری از عواقب بلند مدت آن‌ها بر جمعیت آبزیان مورد نیاز خواهد بود.

استناد: رحیمی، جمال؛ رضایی توابع، کامران؛ مجازی امیری، باقر؛ پروانه؛ و جوانشیر خویی، آرش (۱۴۰۳). اثرات میکروپلاستیک پلی‌استایرن بر تکامل جنین ماهی زبرا (*Danio rerio* Hamilton, 1822). *محیط زیست طبیعی*، ۷۷ (ویژه نامه)، ۱۶۱-۱۵۳.
DOI: http//doi.org/10.22059/jne.2024.370483.2635

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.
© نویسندگان.

مقدمه

میکروپلاستیک‌ها پلیمرهای مصنوعی کوچک (کمتر از ۵ میلی‌متر) هستند که به‌طور خاص برای فرآیندهای صنعتی و استفاده مصرف‌کننده تولید می‌شوند، یا از شکست فیزیکی پلاستیک‌های بزرگ‌تر مانند ماکروپلاستیک‌ها (بیشتر از ۲/۵ سانتی‌متر) و مزوپلاستیک‌ها (۵ میلی‌متر تا ۵/۵ سانتی‌متر) ناشی می‌شوند (Cheshire *et al.*, 2009; Hidalgo-Ruz *et al.*, 2012). آلودگی میکروپلاستیک‌ها در سراسر جهان روزبه‌روز در حال افزایش است و این پتانسیل را دارند که تأثیر منفی بر بیشتر اکوسیستم‌ها به‌ویژه اکوسیستم‌های آبی بگذارند (Barnes *et al.*, 2009). میکروپلاستیک‌ها از راه‌های مختلفی از جمله فاضلاب‌های صنعتی، فاضلاب‌های خانگی، فعالیت کشتی‌ها در اقیانوس‌ها و فعالیت کارگاه‌های صنعتی درمجاورت رودخانه‌ها وارد محیط‌های آبی می‌شوند (Karbalaei *et al.*, 2018). زمانی که این ذرات پلاستیکی در اکوسیستم‌های آبی رها می‌شوند، به‌دلیل کند بودن فرآیند تخریب، برای دوره‌های زمانی بسیار طولانی در محیط‌های آبی باقی می‌مانند و می‌توانند تبدیل به یک خطر زیست‌محیطی شوند و امنیت اکولوژیک اکوسیستم را تهدید کنند (Moore, 2008; Hopewell *et al.*, 2009). میکروپلاستیک‌ها می‌توانند از طریق دهان، تنفس و جذب پوستی وارد بدن موجودات زنده شده و اثرات فیزیکی و شیمیایی ایجاد کنند (Prokić *et al.*, 2019; Garrido *et al.*, 2019). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که این ذرات پلاستیکی توسط بسیاری از موجودات آبزی مانند پاروپایان، نماتودها، میگوها، خرچنگ‌ها، صدف‌ها و ماهی‌ها مصرف می‌شوند و در بافت‌هایی مانند کبد، ماهیچه و مغز تجمع می‌یابند و ممکن است باعث سرکوب سیستم ایمنی و ایجاد عوارض جانبی زیادی از جمله مرگ‌ومیر، کاهش فعالیت تغذیه، مهار رشد و نمو، اختلال غدد درون‌ریز، اختلال انرژی، استرس اکسیداتیو، نقص ایمنی و حتی اختلال ژنتیکی شوند (Besseling *et al.*, 2014; Galloway, 2015; Peters *et al.*, 2016; Foley *et al.*, 2018; Ding *et al.*, 2018). همچنین میکروپلاستیک‌ها می‌توانند باعث اختلال در محور هیپوتالاموس–هیپوفیز–گناد با کاهش رونویسی هورمون آزادکننده گنادوتروپین (GnRH) شوند و در مسیر استروئیدوژنز و گامتوژنز و در نهایت تولیدمثل اختلال ایجاد کنند (Rochman *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015). علاوه بر این، قرار گرفتن در معرض میکروپلاستیک‌ها با القای استرس اکسیداتیو می‌تواند بر رشد و تولیدمثل ماهیان تأثیر منفی داشته باشد و باعث بروز تأثیرات قابل ملاحظه از جمله اختلالات تکاملی و کاهش نرخ بقا در جنین ماهیان گردد (Prokić *et al.*, 2019). مرحلهٔ رشد جنینی مرحلهٔ مهمی در چرخهٔ زندگی ماهی است. هر گونه تغییر در مراحل اولیهٔ رشد جنین منجر به شکل‌گیری تغییرات بزرگتری در بافت‌ها و اندام‌های مختلف می‌گردد که ممکن است باعث تغییر شکل جنین و اختلالات تکاملی شود (Scholz *et al.*, 2008; Luís *et al.*, 2015). میکروپلاستیک‌هایی که توسط ماهی مصرف می‌شوند، ممکن است اثرات زیان‌باری بر تکامل جنین ماهی‌ها داشته باشند. یکی از اثرات مهم میکروپلاستیک‌ها بر آبزیان از جمله ماهی، تغییر میزان ترشح و عملکرد هورمون‌های جنسی است. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که تغییر در عملکرد هورمون‌های جنسی منجر به اختلال در رشد و توسعهٔ جنین می‌شود (Zhang *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2012). همچنین، در مطالعه‌ای که De Marco و همکاران (۲۰۲۲) اثر میکروپلاستیک پلی‌استایرن بر جنین ماهی زبرا را بررسی کردند و نشان دادند که قرار گرفتن در معرض این ذرات باعث تغییر در مدت زمان و نرخ تفریخ می‌گردد. علاوه بر این، مصرف میکروپلاستیک‌ها توسط مولدین ممکن است منجر به انتقال مواد شیمیایی مضر به جنین شود. Wang و همکاران (۲۰۱۹) در مطالعه‌ای به بررسی اثرات میکروپلاستیک پلی‌استایرن در ماهی مداکا (*Oryzias melastigma*) پرداختند. نتایج مطالعهٔ آنها نشان داد که این ذرات اثرات بین‌نسلی در ماهی مداکا دارند و میکروپلاستیک‌های مصرف شده توسط مولدین ممکن است باعث اختلال در رشد و تکامل جنین گردند.

در این مطالعه از میکروپلاستیک پلی‌استایرن استفاده شد، زیرا این پلیمر یکی از پنج پلیمر پلاستیکی اصلی با تولید بالا و یک ذره مدل برای مطالعات زیستی در میکرواگانیسم‌ها است و به‌طور گسترده در فعالیت‌های آبزی‌پروری و ماهیگیری استفاده می‌شود (Andrady and Neal, 2009; Besseling *et al.*, 2015). ذرات پلی‌استایرن در محیط‌های دریایی و رودخانه‌ای با درصدهای بالا یافت می‌شوند، و به‌دلیل چگالی مشابه با آب به‌طور مساوی در ستون آب پراکنده شده و تعامل بین میکروپلاستیک‌ها و موجودات زنده را به حداکثر می‌رساند (Sadri and Thompson, 2014).

در مطالعهٔ حاضر از ماهی زبرا (*Danio rerio*) به‌عنوان ماهی مدل استفاده گردید. علت استفاده از این ماهی داشتن دورهٔ تولیدمثلی کوتاه، قدرت باروری بالای ماهی‌های بالغ، تولید تعداد زیادی گامت توسط هر دو جنس و شفافیت جنین و لارو آن

می‌باشد. همچنین، این ماهی به‌عنوان یک گونهٔ مدل جهت آنالیز سریع عملکرد ژن‌ها و فعالیت‌های زیستی مولکول‌های آلی مطرح شده است (Zon, 2005). بیشتر مطالعات موجود، ماهیان را بعد از انکوباسیون مورد بررسی قرار داده‌اند و اطلاعات کمی در مورد اثرات میکروپلاستیک‌ها بر روی تغییرات زمانی و تکامل جنین وجود دارد. بنابراین، هدف از مطالعهٔ حاضر بررسی اثرات میکروپلاستیک پلی‌استایرن بر تغییرات زمانی و تکامل جنین در ماهی زبرا (*Danio rerio*) می‌باشد.

روش‌شناسی پژوهش

تهیهٔ ماهی و شرایط نگهداری: تعداد ۵۰۰ قطعه ماهی زبرا از یک مرکز توزیع ماهیان زینتی در کرج خریداری شده و به کارگاه فیزیولوژی گروه شیلات دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه تهران انتقال داده شدند. بعد از جداسازی نر و ماده‌ها، جهت سازگاری بیشتر با شرایط محیطی ماهی‌ها به‌مدت دو هفته در دو مخزن ۱۰۰ لیتری به‌صورت جداگانه در دمای ۲۸-۲۶ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. طی دورهٔ سازگاری، ماهی‌ها دو بار در روز با غذای بیومار فرانسه و آرتمیا تغذیه شدند و ۳۰ تا ۴۰ درصد آب به‌صورت روزانه تعویض گردید.

آماده‌سازی میکروپلاستیک: گلوله‌های پلی‌استایرن خریداری شده از شرکت پتروشیمی تبریز در ازت مایع قرار گرفته و توسط خردکن صنعتی واقع در پژوهشگاه پلیمر وردآورد کرج پودر شدند و با الک در اندازه‌های بین ۲۰ تا ۴۰ میکرومتر جداسازی شدند. سپس سوسپانسیون میکروپلاستیک در آب مقطر تهیه و تحت فراصوت قرار گرفت.

طراحی آزمایش: در مطالعهٔ حاضر، ماهی‌ها با سه تکرار در معرض سه غلظت ۲۰ (T_1)، ۲۰۰ (T_2) و ۲۰۰۰ (T_3) میکروگرم بر لیتر از میکروپلاستیک پلی‌استایرن همراه با یک تیمار شاهد در دو دورهٔ زمانی ۲۱ و ۶۰ روز قرار گرفتند (Wang *et al.*, 2019; Qiang and Cheng, 2021). به‌صورت روزانه ۳۰ تا ۴۰ درصد آب تعویض شده و با همان غلظت مشخص میکروپلاستیک اضافه گردید. دو بار در روز به میزان ۳ درصد وزن بدن با غذای بیومار فرانسه تغذیه شدند. بعد از پایان هر دوره، مولدین با نسبت ۲ نر و ۳ ماده به آکواریوم‌های تخمریزی انتقال داده شدند. از آنجا که ماهی زبرا علاقهٔ خاصی به خوردن تخم‌های خود دارد جهت جلوگیری از خورده شدن تخم‌ها از توری استفاده شد. بعد از تخمریزی مولدین جدا شده و به مخزن اصلی منتقل شدند.

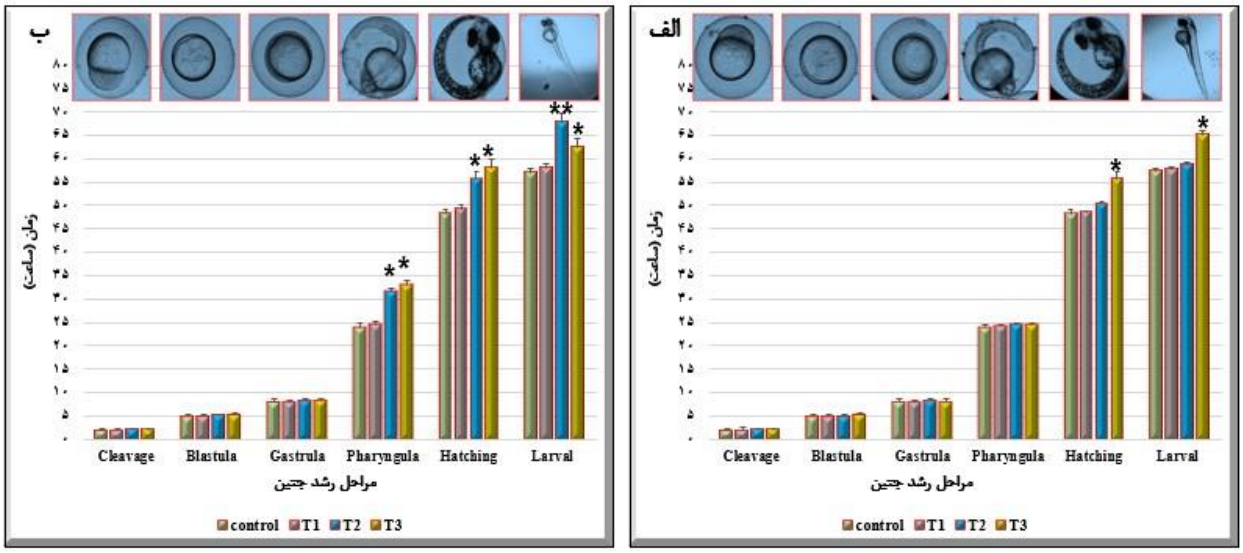
بررسی تغییرات زمانی و روند رشد جنین: جهت بررسی تغییرات زمانی و روند رشد جنین، پس از تخمریزی، در شش مرحله؛ ۱- Cleavage، ۲- Blastula، ۳- Gastrula، ۴ – Pharyngula، ۵- Hatching و ۶- Larval و در زمان‌های مختلف از رشد جنین نمونه‌برداری شد. سپس نمونه‌ها در زیر میکروسکوپ نوری عکس‌برداری شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: جهت تجزیه و تحیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 26 استفاده شد. آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و تست دانکن برای ارزیابی تفاوت‌های آماری در سطح احتمال ۵ درصد مورد استفاده قرارگرفت. رسم نمودارها با Exell 2019 صورت گرفت.

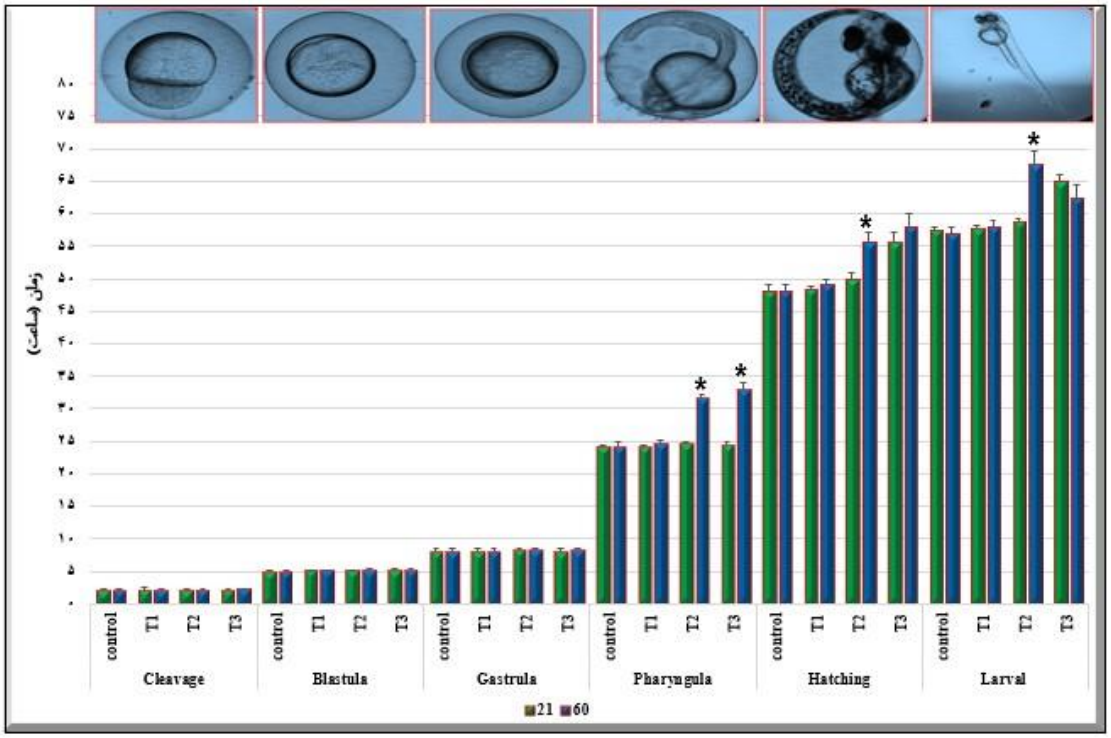
یافته‌های پژوهش

بررسی تغییرات زمانی مراحل مختلف رشد جنین: همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، در روز ۲۱ از لحاظ تغییرات زمانی از مرحله Cleavage تا مرحلهٔ Pharyngula اختلاف معنی‌داری ($P>0/05$) بین تیمارها مشاهده نشد اما در مرحلهٔ Hatching و Larval بین تیمار ۳ و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری ($P<0/05$) وجود دارد که نشان می‌دهد تیمار ۳ مراحل رشد جنین را دیرتر طی کرده و تفریخ شده است. در روز ۶۰، از مرحلهٔ Cleavage تا مرحلهٔ Gastrula اختلاف معنی‌داری بین تیمارها از لحاظ تغییرات زمانی مشاهده نشد اما از مرحلهٔ Pharyngula تا Larval اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود داشت که نشان می‌دهد تیمار ۲ و ۳ نسبت به تیمار شاهد مراحل رشد جنین را دیرتر طی کرده و تفریخ شده‌اند که در مرحلهٔ Larval برای تیمار ۲ مدت زمان بیشتری طول کشیده است. علاوه بر این، در شکل ۲ مقایسهٔ مراحل مختلف رشد جنین در روزهای ۲۱ و ۶۰ در تیمار شاهد و تیمارهایی که در معرض میکروپلاستیک پلی‌استایرن بوده‌اند، نشان داده شده است. بر اساس نتایج، در مراحل اولیهٔ رشد جنین اختلاف زمانی معنی‌داری در روزهای ۲۱ و ۶۰ مشاهده نشد. اما با نزدیک شدن به مراحل بالاتر رشدی جنین، اختلاف

مشهودتر می‌شود به‌طوری که در روز ۶۰ در تیمار ۲ و ۳ مدت زمان رسیدن به مرحلهٔ Pharyngula به‌طور معنی‌داری بالاتر از روز ۲۱ است. همچنین در روز ۶۰ در تیمار ۲ زمان رسیدن به مرحلهٔ Hatching و Larval با روز ۲۱ اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. اما در تیمار ۳ زمان رسیدن به مرحلهٔ Larval در روز ۶۰ پایین‌تر از روز ۲۱ بود. به طور کلی نتایج به‌دست آمده در مورد دامنهٔ زمانی مراحل مختلف رشد جنین حاکی از آن است که تیمارهایی که مدت زمان بیشتر و با غلظت بالاتری در معرض میکروپلاستیک پلی‌استایرن قرار گرفتند مراحل رشد جنین را دیرتر طی کرده و نسبت به تیمار شاهد دیرتر تفریخ می‌شوند.



شکل ۱- دامنهٔ زمانی رشد جنین در تیمارهای مختلف بر حسب ساعت (میانگین±انحراف معیار). الف: روز ۲۱ و ب: روز ۶۰

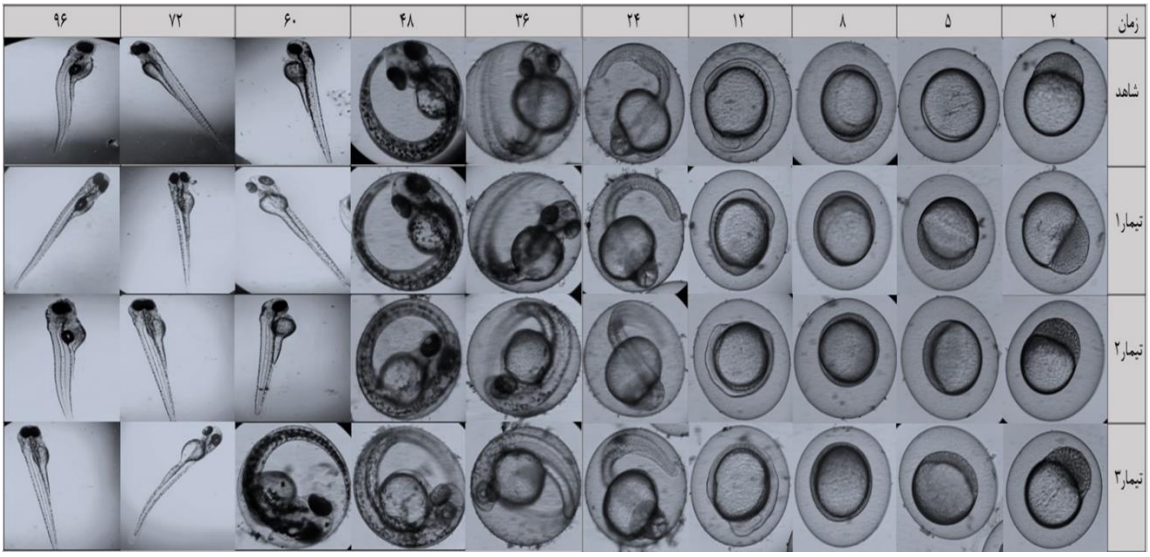


شکل ۲- مقایسهٔ مراحل مختلف رشد جنین تیمارهای مختلف در روزهای ۲۱ و ۶۰ (میانگین±انحراف معیار).

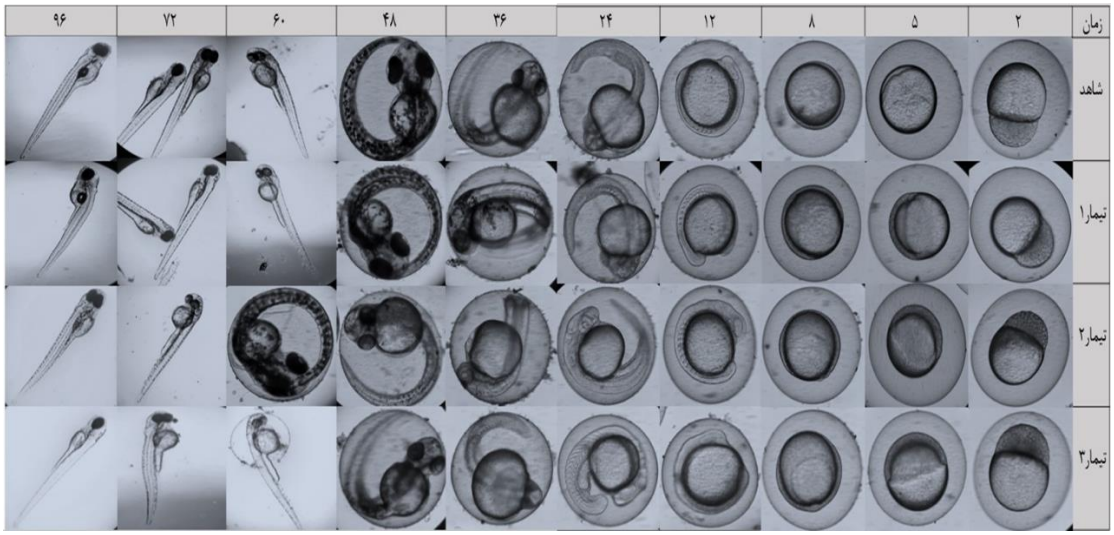
بررسی روند رشد جنین در زمان‌های مختلف: همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود در روز ۲۱ تفاوتی بین مراحل رشد جنین تا ۲۴ ساعت بعد از لقاح در هیچکدام از تیمارها وجود ندارد و تفاوت‌ها از ساعت ۳۶ به بعد مشهودتر می‌گردد. در ساعت ۳۶ در تیمار شاهد و تیمارهای ۱ و ۲ شبکیهٔ چشم تشکیل‌شده و رنگدانه‌های ریزی روی پوست مشاهده می‌شود در صورتی که در

تیمار ۳ شبکیهٔ چشم هنوز تشکیل نشده و رنگدانهٔ روی پوست به‌ندرت قابل مشاهده است. در ساعت ۴۸ در تیمار شاهد و تیمارهای ۱ و ۲ چشم کامل شده و رنگدانه‌های واضحی روی دم ظاهر شدند در صورتی که در تیمار ۳ چشم کامل نشده و رنگدانه‌های روی دم واضح نیستند. در ساعت ۶۰ که تیمار شاهد و تیمارهای ۱ و ۲ از کوریون خارج شده‌اند تیمار ۳ چشم کامل شده و رنگدانه‌ها به‌صورت واضح روی دم قابل مشاهده هستند. در ساعت ۷۲ در تیمار شاهد و تیمارهای ۱ و ۲ زرده کاهش پیدا می‌کند در صورتی که تیمار ۳ که به‌تازگی از کوریون خارج شده، زردهٔ بیشتری نسبت به سایر تیمارها دارد. در ساعت ۹۶ در تیمار شاهد و تیمارهای ۱ و ۲ لارو شکل کامل به خود گرفته است، کیسهٔ زرده به اتمام رسیده، اندام‌ها تشکیل شده و کیسهٔ شنا قابل مشاهده است. همچنین نوار پشتی و شکمی در قسمت دم یکدیگر را قطع کرده‌اند. در صورتی که در تیمار ۳ کیسهٔ زرده هنوز تمام نشده، اندام‌ها به‌طور کامل شکل نگرفته و کیسهٔ شنا قابل مشاهده نیست.

براساس نتایج در روز ۶۰ (شکل ۴) تا ۱۲ ساعت بعد از لقاح تفاوتی بین مراحل رشد جنین در هیچکدام از تیمارها مشاهده نمی‌شود. در ساعت ۲۴ در تیمار شاهد و تیمار ۱ دم از کیسهٔ زرده جدا شده و دارای حرکت خودبه‌خودی است در صورتی که در تیمارهای ۲ و ۳ دم از کیسهٔ زرده جدا نشده و هیچ گونه حرکتی ندارد. در ساعت ۳۶ در تیمار شاهد و تیمار ۱ شبکیهٔ چشم تشکیل شده و رنگدانه‌های ریزی روی پوست مشاهده می‌شود در صورتی که در تیمارهای ۲ و ۳ دم از کیسهٔ زرده جدا شده و دارای حرکت خودبه‌خودی است. در ساعت ۴۸ در تیمار شاهد و تیمار ۱ چشم کامل شده و رنگدانه‌های واضحی روی دم ظاهر شدند اما در تیمار ۲ و ۳ شبکیهٔ چشم تشکیل شده و رنگدانه‌های ریزی روی پوست قابل مشاهده است اما رنگدانه‌های روی دم واضح نیستند. در ساعت ۶۰ که تیمار شاهد و تیمار ۱ و ۲ از کوریون خارج شده‌اند در تیمار ۲ چشم کامل شده و رنگدانه‌ها به‌صورت واضح روی دم قابل مشاهده هستند. اما تیمار ۳ به‌صورت نارس از کوریون خارج شده است. در ساعت ۷۲ در تیمار شاهد و تیمار ۱ زرده کاهش پیدا می‌کند در صورتی که تیمار ۲ که به تازگی از کوریون خارج شده و تیمار ۳ زرده بیشتری نسبت به سایر تیمارها دارند. در ساعت ۹۶ در تیمار شاهد و تیمار ۱ لارو شکل کامل به‌خود گرفته، کیسهٔ زرده به اتمام رسیده، اندام‌ها تشکیل شده و کیسهٔ شنا قابل مشاهده است. همچنین نوار پشتی و شکمی در قسمت دم یکدیگر را قطع کرده‌اند. در صورتی که در تیمار ۲ و ۳ کیسهٔ زرده هنوز تمام نشده، اندام‌ها به‌طور کامل شکل نگرفته و کیسهٔ شنا قابل مشاهده نیست.



شکل ۳- روند رشد و ساختار جنین (بر حسب ساعت) در تیمارهای مختلف در روز ۲۱



شکل ٤- روند رشد و ساختار جنین (بر حسب ساعت) در تیمارهای مختلف در روز ٦٠

بحث

میکروپلاستیک‌ها به یک آلایندهٔ نوظهور تبدیل شده‌اند و به‌دلیل فراوانی آن‌ها در محیط‌های آبی موجب نگرانی گسترده‌ای در مورد اثرات سمی بالقوهٔ آن‌ها بر روی آبزیان شده است. در سال‌های اخیر، این ذرات پلاستیکی به‌طور مکرر در اقیانوس‌ها، رسوبات، رودخانه‌ها و فاضلاب مشاهده شده‌اند و این می‌تواند تهدید بزرگی برای گونه‌های آبزی باشد که ممکن است تولیدمثل آن‌ها را تحت تأثیر قرار داده و منجر به عواقب محیط‌زیستی شوند (Sharma and Chatterjee, 2017). نتایج مطالعهٔ حاضر نشان داد که قرار گرفتن طولانی‌مدت در معرض میکروپلاستیک‌ها باعث اثرات منفی بر روی مراحل اولیهٔ رشد و تکامل جنین می‌گردد. افزایش رو به رشد استفاده از محصولات پلاستیکی و دفع غیر منطقی آن‌ها باعث شده است که میزان میکروپلاستیک‌ها در محیط‌های آبی روزبه‌روز افزایش پیدا کند (Geyer *et al.*, 2017). بنابراین در مطالعهٔ حاضر ذرات پلی‌استایرن به‌عنوان یک میکروپلاستیک مدل مورد استفاده قرار گرفت. مطالعات قبلی نشان دادند که این ذرات پلاستیکی در بدن ماهی زبرا تجمع پیدا می‌کنند و ممکن است باعث اختلال در تولیدمثل و کاهش نرخ بقا در جنین شوند (He *et al.*, 2018; Lei *et al.*, 2018).

تفریخ یک مرحلهٔ ضروری در رشد و نمو ماهی زبرا است و تأخیر در تفریخ باعث می‌شود که ماهی زبرا در برابر شکارچیان حساس‌تر شود. مهار کامل تفریخ نیز ممکن است منجر به مرگ شود (Ong *et al.*, 2014). در این مطالعه، قرار گرفتن طولانی‌مدت مولدین در معرض میکروپلاستیک پلی‌استایرن باعث تأخیر در زمان تخم‌گشایی شد، که نشان می‌دهد میکروپلاستیک‌ها اثرات بین‌نسلی بر روی ماهی زبرا دارند. در مطالعه‌ای Wang و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که میکروپلاستیک پلی‌استایرن اثرات بین‌نسلی در ماهی مداکا (Oryzias melastigma) دارد و میکروپلاستیک‌های مصرف شده توسط مولدین باعث اختلال در رشد و تکامل جنین، تأخیر در زمان تخم‌گشایی و کاهش نرخ تفریخ و میزان بقا در لارو می‌گردند. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که زمان تخم‌گشایی تحت تأثیر مدت زمان و میزان غلظت میکروپلاستیک است. مطالعات قبلی نشان دادند که قرار گرفتن در معرض میکروپلاستیک‌ها باعث کاهش ضربان قلب، تأخیر در مدت زمان تخم‌گشایی و کاهش نرخ تفریخ در ماهی می‌گردند (Wang *et al.*, 2019; Duan *et al.*, 2020; De Marco *et al.*, 2022). اولین مرحله، آزاد شدن آنزیم تخم‌گشایی توسط غدهٔ تخم‌گشایی است که پوشش ویتلین داخلی کوریون سلولی را می‌شکند، مرحلهٔ دوم حرکت خود به خودی جنین است که در حدود ۱۹ ساعت بعد از لقاح آغاز می‌شود (Sano *et al.*, 2008). تأخیر در مدت زمان تخم‌گشایی در مطالعهٔ حاضر ممکن است به‌دلیل تأخیر در آزاد شدن آنزیم تخم‌گشایی و یا تأخیر در فعالیت حرکتی خودبه‌خودی باشد. توضیح دیگر در ماهی، قلب، اولین اندامی است که به یک اندام عملکردی تبدیل می‌شود و اکسیژن را برای رشد و نمو بافت‌های دیگر منتقل می‌کند (Huang *et al.*, 2010). مطالعات قبلی نشان دادند که آلاینده‌ها اثرات منفی بر رشد قلب دارند (Chen *et al.*, 2013; Incardona and Scholz, 2016). همچنین در مطالعه‌ای He و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که میکروپلاستیک پلی‌استایرن باعث کاهش ضربان قلب در

ماهی زبرا می‌شود. بنابراین یکی دیگر از دلایل تأخیر در تفریخ می‌تواند کاهش ضربان قلب به دلیل قرار گرفتن در معرض میکروپلاستیک پلی‌استایرن باشد.

نتیجه‌گیری

مطالعهٔ حاضر نشان داد که آلودگی میکروپلاستیک پلی‌استایرن در محیط‌های آبی و قرار گرفتن طولانی‌مدت ماهی در معرض غلظت‌های مختلف این میکروپلاستیک باعث اختلال در تولیدمثل و اثرات منفی بر روی مراحل اولیهٔ رشد و تکامل جنین می‌شود. به‌طور کلی، قرار گرفتن طولانی‌مدت در معرض غلظت‌های بالای میکروپلاستیک پلی‌استایرن سرعت رشد جنین را کند کرده و تفریخ را به تعویق می‌اندازد. بنابراین، تحقیقات بیشتر و نظارت بر آلودگی میکروپلاستیک‌ها در اکوسیستم‌های آبی برای جلوگیری از عواقب بلندمدت برای جمعیت آبزیان مورد نیاز خواهد بود.

References

Andrady, A.L., Neal, M.A., 2009. Applications and societal benefits of plastics. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 364(1526), 1977-1984.

Barnes, D. K., Galgani, F., Thompson, R.C., Barlaz, M., 2009. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 364(1526), 1985-1998.

Besseling, E., Foekema, E.M., Van Franeker, J.A., Leopold, M.F., Kühn, S., Rebolledo, E.B., Koelmans, A. A., 2015. Microplastic in a macro filter feeder: humpback whale Megaptera novaeangliae. Marine Pollution Bulletin 95(1), 248-252.

Besseling, E., Wang, B., Lürling, M., Koelmans, A.A., 2014. Nanoplastic affects growth of S. obliquus and reproduction of *D. magna*. Environmental Dcience & Technology 48(20), 12336-12343.

Chen, P. J., Wu, W. L., Wu, K. C. W., 2013. The zerovalent iron nanoparticle causes higher developmental toxicity than its oxidation products in the early life stages of medaka fish. Water Research, 47(12), 3899-3909.

Cheshire, A. C., Adler, E., Barbière, J., Cohen, Y., Evans, S., Jarayabhand, S., Westphalen, G., 2009. UNEP/IOC Guidelines on Survey and Monitoring of Marine Debris. UNEP Regional Seas Reports and Studies, (186).

De Marco, G., Conti, G.O., Giannetto, A., Cappello, T., Galati, M., Iaria, C., Maisano, M., 2022. Embryotoxicity of polystyrene microplastics in zebrafish *Danio rerio*. Environmental Research 208, 112552.

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.

Duan, Z., Duan, X., Zhao, S., Wang, X., Wang, J., Liu, Y., Wang, L., 2020. Barrier function of zebrafish embryonic chorions against microplastics and nanoplastics and its impact on embryo development. Journal of Hazardous Materials 395, 122621.

Foley, C.J., Feiner, Z.S., Malinich, T.D., Höök, T.O., 2018. A meta-analysis of the effects of exposure to microplastics on fish and aquatic invertebrates. Science of the Total Environment 631, 550-559.

Galloway, T.S., 2015. Micro-and nanoplastics and human health. In Marine anthropogenic litter (pp. 343-366). Springer, Cham.

Garrido, S., Linares, M., Campillo, J.A., Albentosa, M., 2019. Effect of microplastics on the toxicity of chlorpyrifos to the microalgae *Isochrysis galbana*, clone t-ISO. Ecotoxicology and Environmental Safety 173, 103-109.

Geyer, R., Jambeck, J.R., Law, K.L., 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. Science Advances 3(7), e1700782.

He, L., Zhang, Y., Wang, Y., Wu, Y., Chen, L., Fu, R., Tang, T., 2018. Toxic Effects of Micro-plastics on Zebrafish Embryos. *Agricultural Biotechnology*, *7*(5), 112-115.

Hidalgo-Ruz, V., Gutow, L., Thompson, R.C., Thiel, M., 2012. Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. Environmental Science & Technology 46(6), 3060-3075.

Hopewell, J., Dvorak, R., Kosior, E., 2009. Plastics recycling: challenges and opportunities. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 364(1526), 2115-2126.

Huang, H., Huang, C., Wang, L., Ye, X., Bai, C., Simonich, M.T., Dong, Q., 2010. Toxicity, uptake kinetics, and behavior assessment in zebrafish embryos following exposure to perfluorooctanesulphonic acid (PFOS). Aquatic Toxicology 98(2), 139-147.

Incardona, J. P., Scholz, N. L., 2016. The influence of heart developmental anatomy on cardiotoxicity-based adverse outcome pathways in fish. Aquatic Toxicology 177, 515-525.

Karbalaei, S., Hanachi, P., Walker, T.R., Cole, M., 2018. Occurrence, sources, human health impacts, and mitigation of microplastic pollution. Environmental Science and Pollution Research 25(36), 36046-36063.

Lei, L., Wu, S., Lu, S., Liu, M., Song, Y., Fu, Z., He, D., 2018. Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode Caenorhabditis elegans. Science of the Total Environment 619, 1-8.

Luís, L. G., Ferreira, P., Fonte, E., Oliveira, M., Guilhermino, L., 2015. Does the presence of microplastics influence the acute toxicity of chromium (VI) to early juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*)? A study with juveniles from two wild estuarine populations. Aquatic Toxicology 164, 163-174.

Ma, Y., Han, J., Guo, Y., Lam, P. K., Wu, R. S., Giesy, J. P., Zhou, B., 2012. Disruption of endocrine function in in vitro H295R cell-based and in in vivo assay in zebrafish by 2, 4-dichlorophenol. *Aquatic Toxicology*, *106*, 173-181.

Moore, C. J., 2008. Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long-term threat. Environmental Research 108(2), 131-139.

Ong, K. J., Zhao, X., Thistle, M. E., MacCormack, T. J., Clark, R. J., Ma, G., Goss, G.G., 2014. Mechanistic insights into the effect of nanoparticles on zebrafish hatch. Nanotoxicology 8(3), 295-304.

Peters, C.A., Bratton, S.P., 2016. Urbanization is a major influence on microplastic ingestion by sunfish in the Brazos River Basin, Central Texas, USA. Environmental Pollution 210, 380-387.

Prokić, M.D., Radovanović, T.B., Gavrić, J.P., Faggio, C., 2019. Ecotoxicological effects of microplastics: Examination of biomarkers, current state, and future perspectives. TrAC Trends in Analytical Chemistry 111, 37-46.

Qiang, L., Cheng, J., 2021. Exposure to polystyrene microplastics impairs the gonads of zebrafish (*Danio rerio*). Chemosphere 263, 128161.

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.

Sadri, S.S., 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.

Sano, K., Inohaya, K., Kawaguchi, M., Yoshizaki, N., Iuchi, I., Yasumasu, S., 2008. Purification and characterization of zebrafish hatching enzyme–an evolutionary aspect of the mechanism of egg envelope digestion. The FEBS Journal 275(23), 5934-5946.

Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T., Voelker, D., 2008. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment—applications beyond acute toxicity testing. Environmental Science and Pollution Research 15(5), 394-404.

Sharma, S., Chatterjee, S., 2017. Microplastic pollution, a threat to marine ecosystem and human health: a short review. Environmental Science and Pollution Research 24, 21530-21547.

Sun, L., Zuo, Z., Chen, M., Chen, Y., Wang, C., 2015. Reproductive and transgenerational toxicities of phenanthrene on female marine medaka (*Oryzias melastigma*). Aquatic Toxicology 162, 109-116.

Wang, J., Li, Y., Lu, L., Zheng, M., Zhang, X., Tian, H., Ru, S., 2019. Polystyrene microplastics cause tissue damages, sex-specific reproductive disruption and transgenerational effects in marine medaka (*Oryzias melastigma*). Environmental Pollution 254, 113024.

Zhang, X., Hecker, M., Jones, P.D., Newsted, J., Au, D., Kong, R., Giesy, J.P., 2008. Responses of the medaka HPG axis PCR array and reproduction to prochloraz and ketoconazole. *Environmental Science & Technology*, *42*(17), 6762-6769.

Zon, L.I., Peterson, R.T., 2005. In vivo drug discovery in the zebrafish. Nature Reviews Drug Discovery 4(1), 35-44.