

"مقاله پژوهشی"

تأثیر میکروپلاستیک پلی اتیلن و آنتی بیوتیک ارمتوکسین بر شاخص‌های استرس و پاسخ اکسیداتیو ماهی تیلاپیا (*Oreochromis sp.*)

محمد بهرامی^۱، رضا سلیقه زاده^{۱*}، محسن پورنیا^۲، محمدحسین خانجانی^۳، غلامرضا قانیدی^۴

۱- گروه دامپزشکی، واحد شوشتر، دانشگاه آزاد اسلامی، شوشتر، ایران

۲- گروه میکروبیولوژی، واحد مسجدسلیمان، دانشگاه آزاد اسلامی، مسجدسلیمان، ایران

۳- گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران

۴- گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۳/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۲/۲۱

چکیده

هدف از این تحقیق، ارزیابی تأثیر جداگانه و هم‌زمان میکروپلاستیک پلی اتیلن و آنتی بیوتیک ارمتوکسین بر شاخص‌های استرس و پاسخ اکسیداتیو ماهی تیلاپیا بود. ۳۶۰ قطعه ماهی تیلاپیا (*Oreochromis sp.*) با میانگین وزنی $10/5 \pm 240/5$ گرم از یک مرکز پرورش ماهیان گرمابی خصوصی در شمال شهرستان کارون خریداری و به سالن آبیان پژوهشکده آبی‌پروری آب‌های جنوب کشور واقع در شیپان-اهواز انتقال داده شدند. ماهیان با تراکم ۱۰ قطعه در واحدهای آزمایشی (تانک فایبر گلاس ۳۰۰ لیتری) رهاسازی شدند. ماهیان به مدت ۲۱ روز در معرض دوزهای مختلف میکروپلاستیک پلی اتیلن (۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم خوراک) و آنتی بیوتیک ارمتوکسین (۱۵ و ۳۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن توده زنده) و ترکیب آنها (۱۰۰ میلی گرم میکروپلاستیک با ۱۵ و ۳۰ میلی گرم ارمتوکسین، ۲۰۰ میلی گرم میکروپلاستیک با ۱۵ و ۳۰ میلی گرم ارمتوکسین به ازای هر کیلوگرم وزن توده زنده) قرار گرفتند. در پایان دوره، سطوح شاخص‌های استرس و پاسخ آنتی اکسیدانی اندازه‌گیری و از طریق آنالیز واریانس دوطرفه بررسی شدند. نتایج نشان داد تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی در میزان پروتئین کل، گلوکز و لاکتات خون ماهیان وجود داشت ($p < 0.05$). کمترین بیشترین سطح پروتئین کل سرم به ترتیب در گروه‌های شاهد (۳/۹۹ گرم بر دسی لیتر) و گروه دریافت کننده بالاترین دوزهای آنتی بیوتیک (۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و میکروپلاستیک در جیره (۲۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم خوراک) (۸/۴۹ گرم بر دسی لیتر) دیده شد ($p < 0.05$). مواجهه هم‌زمان با میکروپلاستیک پلی اتیلن و آنتی بیوتیک ارمتوکسین باعث افزایش قابل توجهی در سطح MDA و کاهش فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و GPX در مقایسه با گروه‌های کنترل شد ($p < 0.05$). بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی شامل GPX (۴۲/۴۵ میکرومول بر لیتر)، SOD (۱/۳۰۹ واحد بین المللی بر لیتر) و کاتالاز (۲/۳۴ واحد بین المللی بر لیتر) در گروه دریافت کننده بالاترین دوزهای آنتی بیوتیک و میکروپلاستیک در جیره مشاهده گردید. به طور کلی نتایج نشان داد که مصرف هم‌زمان میکروپلاستیک و آنتی بیوتیک در ماهی تیلاپیا، منجر به افزایش معنی‌دار در شاخص‌های استرس و فعالیت آنتی اکسیدانی شد. به‌منظور کاهش این خطرات، پیشنهاد می‌شود راهکارهای عملی نظیر کاهش مصرف آنتی بیوتیک‌ها در صنعت آبی‌پروری، مدیریت صحیح زباله‌های پلاستیکی، و تقویت قوانین مرتبط با کنترل آلودگی‌های میکروپلاستیکی مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: آلودگی میکروپلاستیک، آنتی بیوتیک، استرس اکسیداتیو، تیلاپیا، میکروپلاستیک

مقدمه

پلاستیک‌ها جز اصلی زباله‌ها هستند و حدود ۹۵ درصد از زباله‌های تجمع یافته در سواحل، سطح و بستر دریا را به خود اختصاص داده‌اند (Banaee *et al.*, 2023). میکروپلاستیک یک آلاینده نوظهور است که به عنوان ذرات پلاستیکی مصنوعی با قطر کمتر از ۵ میلی‌متر و بزرگتر از ۱ میکرومتر تعریف می‌شود (Khanjani *et al.*, 2023). میکروپلاستیک‌ها دارای خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاصی از جمله اندازه کوچک، تراکم زیاد و دارای رنگ هستند که این ویژگی‌ها باعث می‌شود آلاینده‌های دیگر را جذب نمایند و هم باعث افزایش دسترسی موجودات زنده به این نوع از آلاینده‌ها می‌شود (Khanjani and Mohammadi, 2025). به عنوان مثال مصرف میکروپلاستیک‌ها توسط آبرسانی نظیر روغن ماهی *Gadus morhua* (Haave *et al.*, 2021)، کپور کفزی *Gobio gobio* (Sanchez *et al.*, 2014)، صدف سیاه گورخری *Dreissena polymorpha* (Pastorino *et al.*, 2021)، میگوی قرمز غول پیکر *Aristaeomorpha foliacea* (Leila *et al.*, 2023)، میگوی قرمز آرژانتینی *Pleoticus muelleri* (Colombo *et al.*, 2023)، میگوی هندی *Penaeus indicus* (Lawan *et al.*, 2024) گزارش شده‌است. آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان بیماری‌ها و بهبود تولید در آبرزی پروری استفاده می‌شوند، در حالی که بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها پس از مصرف نمی‌توانند به طور کامل متابولیزه شوند و در نهایت وارد محیط طبیعی می‌شوند (Zhang *et al.*, 2022). آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل ورودی مداوم و شبه پایدار به عنوان آلاینده‌های نوظهور در نظر گرفته می‌شوند (Ni, 2022). ارمتوکسین با بهره بردن از اثر

هم‌یاری دو آنتی بیوتیک در ساختار خود ترکیبی فوق العاده قوی برای درمان عفونت‌های ناشی از فعالیت بیش از یک باکتری که با توجه به محیط زیست آبریان بسیار مرسوم است به شمار می‌رود. سولفامتوکسازول و به طور کلی سولفونامیدها ترکیبات سنتتیکی هستند که به عنوان ترکیبات ضد میکروب مورد شناسایی قرار گرفته‌اند. سولفونامیدها به دلیل شباهت ساختمانی با پارا آمینوبنزوئیک اسید، با این ماده در سنتز اسیدفولیک به رقابت پرداخته و تمایل بالاتری برای اتصال به گیرنده از خود نشان می‌دهند (Ovung and Bhattacharyya, 2021). میکروپلاستیک‌های غیر قطبی تمایل زیادی به ترکیبات آلی آبگریز از خود نشان می‌دهند که منجر به تجمع آلاینده‌های آلی در سطوح پلاستیکی می‌شود که می‌تواند چندین مرتبه بیشتر از بدنه‌های آبی اطراف باشد (Atugoda *et al.*, 2020). ظرفیت جذب میکروپلاستیک‌ها برای آنتی‌بیوتیک‌ها تحت تأثیر ویژگی‌های آنتی‌بیوتیک، خواص میکروپلاستیک‌ها و اثرات ماتریکس (مانند pH و شوری) است (Zhang *et al.*, 2024). برای محافظت در برابر رادیکال‌های آزاد، موجودات هوازی یک سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول بیوشیمیایی ایجاد می‌کند. این سیستم شامل آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی، غیر آنزیمی و مسیرهایی است که برای جلوگیری از آسیب سلول طراحی شده‌اند. اجزای آنزیمی عبارتند از: سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوکاتایون پراکسیداز (GPx)، گلوکاتایون اس-ترانسفراز (GST)، گلوکاتایون ردوکتاز (GR) و از اجزای غیر آنزیمی گلوکاتایون را نام برد (Mohamadi Dehcheshmeh *et al.*, 2024).

با توجه به نوظهور بودن آلاینده‌های میکروپلاستیکی در محیط زیست، پایداری بالای آن‌ها در محیط‌های خاکی و آبی و قرارگرفتن طولانی مدت آبریان در معرض این نوع از آلاینده‌ها و همچنین کمبود اطلاعات در مورد آن‌ها و اهمیت میکروپلاستیک‌ها از بعد سلامت انسان‌ها، حیوانات و محیط زیست، بررسی چگونگی تاثیر میکروپلاستیک‌ها بر موجودات آبی از جمله ماهیان باعث نگرانی بسیاری از محققان و مصرف کنندگان محصولات آبی است. مصرف میکروپلاستیک‌ها و سایر آلاینده‌ها توسط ماهیان بر سلامت‌شان از قبیل میزان مصرف مواد غذایی، وزن، رشد و به طور کلی بر جمعیت و زندگی آنها اثرات نامطلوبی داشته و این اثرات نامطلوب نیز در اثر مصرف ماهی به انسان منتقل می‌گردد. Banaee و Mohammadzadeh در سال ۲۰۲۲ تاثیر میکروپلاستیک‌ها با رنگ‌های مختلف بر برخی از شاخص‌های استرس اکسیداتیو در ماهی گامبوزیا (*Gambusia holbrooki*) را مورد مطالعه قرار دادند، فعالیت SOD در کبد ماهیان در معرض میکروپلاستیک‌های سیاه، زرد و قرمز به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل است. Hanachi و همکاران در سال ۲۰۲۰ تاثیر میکروپلاستیک پلی‌اتیلن ترفتالات و آفت کش آدامکتین بر فعالیت آنزیم GPx و پراکسیداسیون لیپیدها در گورخر ماهی (*Danio rerio*) را مورد مطالعه قرار دادند. در مطالعه آنها مشخص شد که در حضور آفت‌کش آدامکتین تولید مالون دی آلدید (MDA) نسبت به کنترل کاهش یافته است. همچنین حضور غلظت کم میکروپلاستیک به همراه آدامکتین باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و میزان

MDA و آسیب بافتی نسبت به حضور آفت کش آدامکتین به تنهایی گردید. ماهی تیلپیا یکی از مهمترین ماهیان پرورشی در سراسر جهان و منبع غذایی مهمی برای انسان است (Khanjani et al., 2022). تیلپیا (*Oreochromis sp.*) به دلیل اینکه گونه مهم آبی‌پروری و سومین گونه ماهی پرورشی در سطح جهانی است (FAO, 2022) و همچنین تیلپای نوجوان نسبت به قرارگرفتن در معرض آلودگی‌ها نظیر میکروپلاستیک‌ها حساس است (Hamed et al., 2021)، به عنوان گونه مورد مطالعه انتخاب گردید. بنابراین با توجه به اهمیت موضوع، تغییرات در شاخص‌های استرس و بیومارکرهای آنتی‌اکسیدانی کبدی در ماهی تیلپیا به عنوان یک گونه‌ی بازارپسند در معرض میکروپلاستیک پلی اتیلن و آنتی‌بیوتیک ارمتوکسین در این مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ذخیره سازی ماهیان

جهت انجام این آزمایش ۳۶۰ قطعه ماهی تیلپیا (*Oreochromis sp.*) با میانگین وزنی $10/5 \pm 240/5$ گرم از یک مرکز پرورش ماهیان گرمابی خصوصی در شمال شهرستان کارون خریداری و به سالن آبریان پژوهشکده آبی‌پروری آبهای جنوب کشور واقع در شیپان-اهواز انتقال داده شدند. ماهیان با تراکم ۱۰ قطعه در واحدهای آزمایشی (مخزن فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری) رهاسازی شدند. در طول این مدت سلامت ماهیان از طریق مشاهدات ظاهری مورد ارزیابی قرار گرفت.

شرایط اجرای آزمایش

پارامترهای کیفی آب شامل (دما، اکسیژن محلول، pH) در تمامی مخازن تا پایان مطالعه به طور کامل با کمک دستگاه (HACH HQ30D Multi Meter) کنترل شدند و هوادهی از طریق سنگ هوا متصل به پمپ هواده مرکزی صورت می گرفت. برای جلوگیری از بروز آلودگی و کاهش کیفیت آب، هر روز صبح مخازن به طور کامل نظافت می شدند. علاوه بر این، برای خروج فضولات، روزانه آب آکواریوم ها سیفون می شد. دمای آب در طول مدت مطالعه ۲۷ درجه سانتی گراد، pH آب معادل ۷ و اکسیژن محلول در حد اشباع بود. در طول مطالعه، نظارت بر فاکتورهای ذکر شده به طور روزانه انجام می گرفت.

طرح آزمایشی

در این مطالعه از غذای تجاری ماهیان گرمابی شرکت پیشرو دانه دز (دزفول، ایران) بعنوان جیره پایه استفاده شد، و سطوح مختلف میکروپلاستیک پلی اتیلنی و داروی خوراکی ارمتوکسین (Ormothoxine®) ((Sulfadimethoxine 25% + Ormetoprim 5% (رویان دارو، سمنان) به آن اضافه شد. این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی، با ۹ تیمار (۸ تیمار آزمایشی و یک تیمار شاهد) و با ۳ تکرار در هر تیمار در نظر گرفته شد (جدول ۱). پس از زیست سنجی و تعیین زی توده، ماهیان جوان هر تیمار به مدت ۲۱ روز با جیره های غذایی بصورت دستی و بر اساس حداکثر ۲ درصد وزن توده زنده، ۲ نوبت در روز تغذیه شدند. میکروپلاستیک ها از یک نوع شامپو بدن واجد اسکراب صورت و بدن (گروه تولیدی گلرنگ، تهران) جدا شد.

جدول ۱: مشخصات تیمارهای مورد استفاده در مطالعه

Table 1: Characteristics of treatments used in the study

Treatment abbreviation	Microplastic dose	Antibiotic dose	Treatments
Ctrl	0	0	Control group
OrmT15/MP0	0	15 mg / kg of live weight	Group 1
OrmT30/MP0	0	30 mg / kg of live weight	Group 2
OrmT0/MP100	100 mg/ kg of feed	0	Group 3
OrmT0/MP200	200 mg/ kg of feed	0	Group 4
OrmT15/MP100	100 mg/ kg of feed	15 mg / kg of live weight	Group5
OrmT15/MP200	200 mg/ kg of feed	15 mg / kg of live weight	Group 6
OrmT30/MP100	100 mg/ kg of feed	30 mg / kg of live weight	Group 7
OrmT30/MP200	200 mg/ kg of feed	30 mg / kg of live weight	Group 8

نمونه برداری و آماده سازی نمونه ها

پس از اتمام دوره آزمایش، نمونه گیری تصادفی از هر مخزن انجام شد و نمونه های خون و کبد تهیه گردید. برای این منظور، ماهیان با استفاده از بیهوش کننده MS-222 با غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر بیهوش شدند. خونگیری از ساقه دمی ماهیان با سرنگ های ۲ میلی لیتری بدون ماده ضد انعقاد صورت گرفت. به طوری که ماهیان یک شبانه روز قبل از نمونه گیری گرسنه نگه داشته شده بودند (Asadi et al., 2021). برای تهیه سرم، نمونه های خونی بدون ماده ضد انعقاد به مدت ۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس سانتریفیوژ شدند (۱۱۰۰۰ دور در دقیقه، ۱۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی گراد). سرم جدا شده در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایش های بیوشیمیایی نگهداری شد. برای سنجش فعالیت های آنژی اکسیدانی در بافت کبد، ابتدا ۱۰ عدد قرص بافر فسفات سالین در ۱ لیتر آب مقطر حل شد و pH آن روی ۷/۲ تنظیم گردید. سپس نیم گرم از بافت کبد جدا و با ۴/۵ میلی لیتر محلول بافر فسفات سالین (به نسبت ۱ به ۹) در مجاورت یخ با استفاده از دستگاه هموژنایزر مدل T18 basic شرکت IKA (ساخت آلمان) همگن شد. عصاره بافتی به دست آمده با دستگاه سانتریفیوژ یخچال دار در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره رویی (سوپرناتانت) استخراج و در میکروتیوب های ۱/۵ میلی لیتری تقسیم و تا زمان آنالیز در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. سوپرناتانت جدا شده نیز در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد

برای استفاده در مراحل بعدی فریز گردید. این عصاره به عنوان منبع بیومارکرهای استرس اکسیداتیو مورد استفاده قرار گرفت (Asadi et al., 2021).

سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی سرم

برای تعیین غلظت پروتئین تام سرم از روش (Lowry et al., 1951) استفاده شد. میزان گلوکز با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون (کرج، ایران) بر اساس شیوه نامه شرکت سازنده و به روش فتومتریک اندازه گیری شد. سطوح کورتیزول با توجه به شیوه نامه های توصیه شده سازنده کیت Enzyme -Linked Immune Sorbent Assays; Nanjing, China اندازه گیری شد. تغییرات رنگ به روش اسپکتروفتومتری با دستگاه الیزاریدر (۴۵۰ نانومتر) شناسایی شد. سطوح کورتیزول سرم با استفاده از کیت آزمایشگاهی به روش ELISA (IBL- Co., Gesellschaft für Immunchemie und Immunbiologie Adineh et al., 2020) سنجش شد. اندازه یری لاکتات خون با استفاده از کیت های مخصوص آنزیمی ساخت شرکت پارس آزمون و دستگاه بیوشیمی آنالایزر Elan شرکت اپندرف آلمان انجام شد (Rifai et al., 1991).

سنجش شاخص های استرس اکسیداتیو

برای ارزیابی وضعیت آنژی اکسیدانی، فعالیت گلوکاتایون پروکسیداز (GPx)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و غلظت مالون دی آلدئید (MDA) در محلول همگن بافت کبد اندازه گیری شد. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) براساس توانایی

۱,۱,۳,۳-تترا اتوکسی پروپان به عنوان استاندارد تعیین گردید.

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم GPx از روش (1967) Paglia and Valentine استفاده شد. در این روش، ۵۰ میلی مولیتر مایع رویی جدا شده به همراه NADPH، ۱۵۰ میلی مولاری، گلوکاتایون احیا شده ۰/۰۱۲ سدیم آزید ۳۰ U/ml)، ۵۰ میلی مولاری و EDTA ۵ میلی مولاری (pH=7) داخل لوله آزمایش ریخته شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول H_2O_2 ۲ میلی مولاری به این محلول اضافه شد. سپس جذب نوری در بازه زمانی ۵ دقیقه و در طول موج ۳۴۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت آنزیم به صورت کاهش جذب نوری محلول در بازه زمانی دومین و چهارمین دقیقه تعریف شد.

روش تحلیل داده ها

ابتدا نرمال بودن داده ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس، تأثیر دو متغیر مستقل آنتی بیوتیک ارمتوکسین و میکروپلاستیک پلی اتیلن بر روی شاخص های استرس و نشانگرهای زیستی اکسیداتیو از طریق آنالیز واریانس دوطرفه بررسی شد. تمامی تجزیه و تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزارهای SPSS و GraphPad Prism انجام شد.

آن در جلوگیری از اکسیداسیون خودبخودی پیروگالول توسط رادیکال سوپراکسید تعیین شد. در این روش، ۳۰ میکرولیتر مایع رویی جدا و به همراه ۳ میلی لیتر بافر تریس-هیدروکلراید 50 (Tris-HCl) میلی مولار با pH برابر ۸/۲ در لوله آزمایش ریخته شد. سپس محلول پیروگالول (pH=4.7) به این مخلوط اضافه شد. اکسیداسیون خودبخودی پیروگالول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر قرائت شد. هر واحد فعالیت آنزیم SOD به صورت مقدار آنزیم مورد نیاز برای ممانعت از اکسیداسیون پیروگالول تا ۵۰ درصد در یک دقیقه تعریف شد (Marklund and Marklund, 1974).

اندازه گیری فعالیت کاتالاز براساس روش (1991) Goth صورت گرفت. در این روش، ۴۰ میکرولیتر از مایع رویی جدا شده با ۳ میلی لیتر بافر فسفات مخلوط و به مدت ۶۰ ثانیه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس جذب نوری محلول در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت گردید. هر ۰/۰۵ کاهش در جذب نوری محلول به عنوان یک واحد فعالیت آنزیم کاتالاز بیان شد. اندازه گیری MDA برای تعیین محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها از روش (1978) Satho استفاده شد. به ۵۰۰ میکرولیتر از بافت هموزنه، تری کلرو استیک اسید (TCA) ده درصد اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. به ۱/۵ میلی لیتر از مایع رویی، ۲ میلی لیتر تیوباریتوریک اسید ۰/۶۷ درصد اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری قرار گرفت. سپس ۲ میلی لیتر n-بوتیل به محلول اضافه و بعد از ورتکس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. جذب محلول رویی صورتی رنگ در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد. غلظت MDA با استفاده از

نتایج

شاخص‌های بیوشیمیایی سرم

نتایج آزمون تحلیل واریانس به منظور بررسی پارامترهای استرس تحت تاثیر تیمارهای مختلف در جدول ۱ ارائه شده است. طبق نتایج مندرج در جدول ۲، با توجه به اینکه سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ است. بنابراین تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی در میزان پارامترهای پروتئین کل، گلوکز و لاکتات خون ماهیان وجود داشته است. نتایج کلی سطح پروتئین کل، گلوکز، لاکتات و کورتیزول در شکل ۱ ارائه شده است. بر طبق نتایج بدست آمده، کمترین و بیشترین سطح پروتئین کل سرم به ترتیب در گروه‌های شاهد (۳/۹۹ گرم بر دسی لیتر) و گروه دریافت کننده بالاترین دوزهای آنتی بیوتیک (۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و میکروپلاستیک در جیره (۲۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم خوراک) (۸/۴۹ گرم بر دسی لیتر) دیده شد. روند مشابهی در دیگر شاخص‌ها شامل گلوکز (۱۵۴/۶ در مقابل ۴۱۸/۴ میلی گرم بر دسی لیتر)، کورتیزول (۰/۲۶۲ در مقابل ۰/۴۰۶ میکروگرم بر دسی لیتر) و لاکتات (۰/۱۵۶ در مقابل ۰/۵۴۲ میلی گرم بر دسی لیتر سرم) وجود داشت (گروه کنترل در مقابل گروه OrmT30/MP200). طبق این یافته‌ها، تمامی گروه‌ها از نظر سطوح پروتئین کل، گلوکز و لاکتات سرم واجد تفاوت معنی‌دار بودند ($p < 0.05$). این در حالی است که ماهیان آزمایشی از نظر سطح کورتیزول سرم تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ($p > 0.05$). همانطور که در شکل دیده می‌شود، مصرف توام میکروپلاستیک و آنتی بیوتیک بر روی سطوح گلوکز و لاکتات اثر هم‌افزایی داشته است. به طوری که علی رغم عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین

گروه‌های دریافت کننده دوزهای میکروپلاستیک و آنتی بیوتیک به طور جداگانه با گروه شاهد ($p > 0.05$)، گروه‌هایی که هر دوی این مواد شیمیایی به طور همزمان به جیره آنها افزوده شد، در این دو شاخص استرسی یک تغییر چشمگیر آماری ایجاد کردند ($p < 0.05$).

شاخص‌های آنتی اکسیدانی

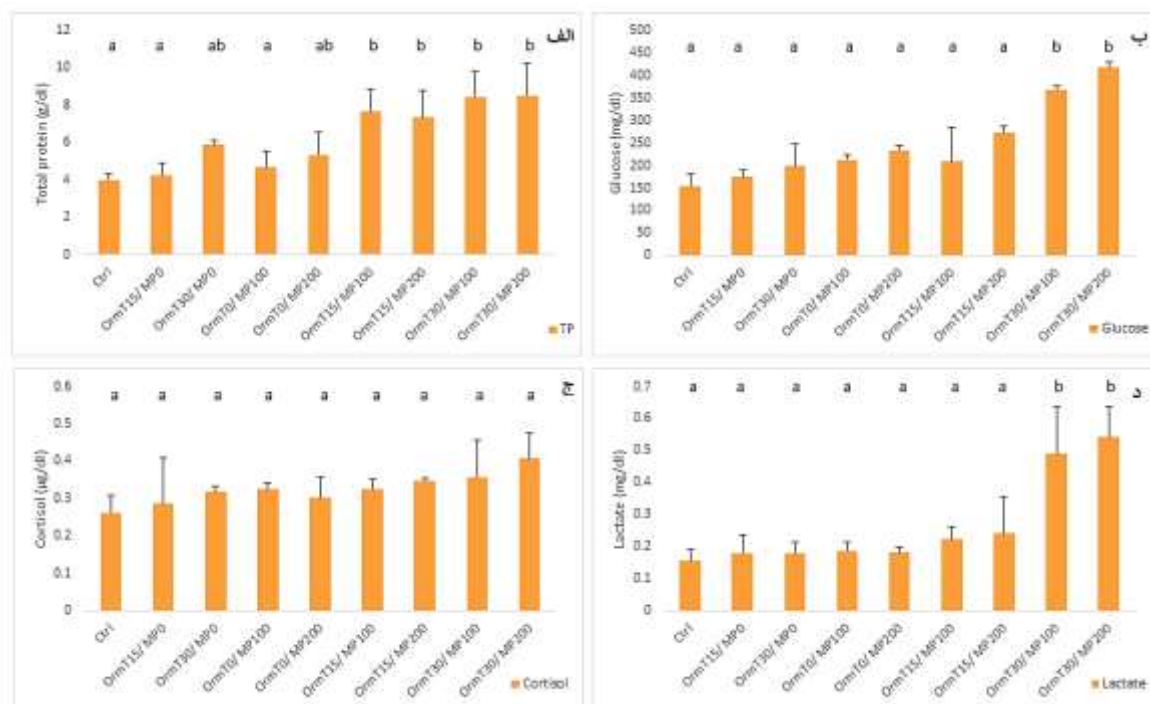
نتایج آزمون تحلیل واریانس شاخص‌های آنتی اکسیدانی تحت تاثیر تیمارهای مختلف در جدول ۳ ارائه شده است. طبق نتایج، با توجه به اینکه سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ است، فرض برابری میانگین تمامی شاخص‌های آنتی اکسیدانی در تیمارهای مختلف رد می‌شود. بنابراین تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی در میزان این پارامترها وجود داشته است. نتایج کلی شاخص‌های آنتی اکسیدانی شامل GPx، SOD، CAT، MDA در شکل ۲ ارائه شده است. براساس نتایج، بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی شامل GPx (۴۲/۴۵ میکرومول بر لیتر)، SOD (۱/۳۰۹ واحد بین المللی بر لیتر) و کاتالاز (۲/۳۴ واحد بین المللی بر لیتر) در گروه دریافت کننده بالاترین دوزهای آنتی بیوتیک (OrmT30) و میکروپلاستیک در جیره (MP200) مشاهده گردید. این در حالی است که بیشینه غلظت محصول پراکسیداسیون چربی در سرم (MDA) در گروه کنترل برابر ۵/۴۷ میکرومول بر لیتر دیده شد. از نظر فعالیت شاخص‌های آنزیمی GPx و SOD، تنها اثر توامان دوزهای آنتی بیوتیک و میکروپلاستیک معنی‌دار بوده است ($p < 0.05$). در حالی که از نظر فعالیت کاتالازی و شاخص پراکسیداسیون، اثرات جداگانه آنتی بیوتیک (دوز ۳۰ mg/kg BW) و

میکروپلاستیک (۲۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن خوراک) و اثرات توأمان این دو ماده شیمیایی افزودنی معنی دار بودند ($p < 0.05$).

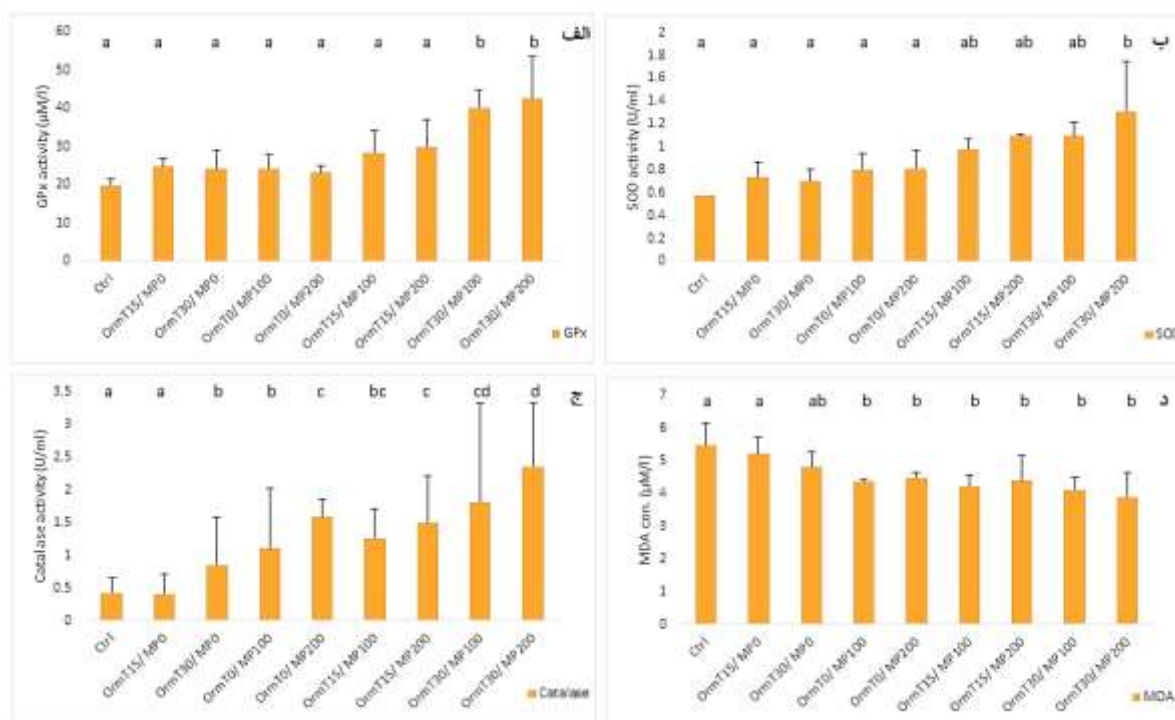
جدول ۲: نتایج آزمون تحلیل واریانس شاخص های استرس تحت تأثیر تیمارهای مختلف

Table 2: Results of analysis of variance test to investigate estres indices under the influence of different treatments

TP					
Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F statistic	Significant level
Intergroup	0.142	9	0.047	92.198	0.000
Intragroup	0.004	8	0.001		
Total	0.146	17			
Glucose					
Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F statistic	Significant level
Intergroup	8.380	9	2.793	65.729	0.000
Intragroup	0.340	8	0.042		
Total	8.720	17			
Cortisol					
Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F statistic	Significant level
Intergroup	5.219	3	1.740	0.946	0.463
Intragroup	14.709	8	1.839		
Total	19.928	11			
Lactate					
Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F statistic	Significant level
Intergroup	0.068	9	0.023	34.885	0.000
Intragroup	0.005	8	0.001		
Total	0.073	17			



شکل ۱: شاخص‌های استرس سرم تحت تاثیر تیمارهای مختلف (الف: پروتئین کل؛ ب: گلوکز؛ ج: کورتیزول؛ د: لاکتات)
Figure 1: Serum estres indices affected by different treatments (A: total protein; B: glucose; C: cortisol; D: lactate)



شکل ۲: شاخص‌های آنتی اکسیدانی سرم تحت تاثیر تیمارهای مختلف (الف: فعالیت GPx؛ ب: فعالیت SOD؛ ج: فعالیت کاتالاز؛ د: غلظت MDA)

Figure 2: Serum antioxidant indices affected by different treatments (A: GPx activity; B: SOD activity; C: Catalase activity; D: MDA concentration)

جدول ۳: نتایج آزمون تحلیل واریانس شاخص‌های آنتی اکسیدانی تحت تأثیر تیمارهای مختلف
 Table 3: Results of analysis of variance test to investigate antioxidant indices under the influence of different treatments

GPx					
Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F statistic	Significant level
Intergroup	13.296	3	4.432	2.715	0.035
Intragroup	13.057	8	1.632		
Total	26.352	11			
SOD					
Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F statistic	Significant level
Intergroup	85.403	3	28.468	3.880	0.046
Intragroup	58.700	8	7.338		
Total	144.103	11			
Catalase					
Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F statistic	Significant level
Intergroup	30169.482	9	10056.494	65.729	0.000
Intragroup	1223.995	8	152.999		
Total	31393.477	17			
MDA					
Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F statistic	Significant level
Intergroup	7.255	3	2.418	8.852	0.006
Intragroup	2.186	8	0.273		
Total	9.441	11			

بحث

براساس نتایج حاصل از این مطالعه، کمترین سطح پروتئین کل سرم در گروه شاهد و بیشترین میزان آن در گروه دریافت کننده بالاترین دوزهای آنتی بیوتیک ارمتوکسین (۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و میکروپلاستیک (۲۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم خوراک) مشاهده شد. این روند مشابه در شاخص های بیوشیمیایی دیگر مانند گلوکز، کورتیزول و لاکتات نیز مشاهده شد. همچنین، تفاوت معنی داری بین گروه های آزمایشی از نظر پارامترهای پروتئین کل، گلوکز و لاکتات خون ماهیان وجود داشت، اما در مورد کورتیزول تفاوت معنی داری مشاهده نشد. این یافته ها نشان داد که مصرف توأم میکروپلاستیک و آنتی بیوتیک اثر هم افزایی بر شاخص های استرس بیوشیمیایی مانند گلوکز و لاکتات دارد، به طوری که گروه هایی که هر دوی این مواد شیمیایی را دریافت کرده اند، در مقایسه با گروه های شاهد تغییرات آماری چشمگیری در این شاخص ها نشان دادند.

میکروپلاستیک ها زمانی که با آلاینده های دیگر ترکیب می شوند اثر هم افزایی بر سلامت موجودات زنده دارند، تعامل میکروپلاستیک ها با آلاینده های شیمیایی یافته های متناقضی را نشان داده است. به عنوان مثال در مطالعه Karbalaei و همکاران (۲۰۲۱)، گزارش شده که حضور میکروپلاستیک سمیت کلروپیریفوس را برای ماهی قزل آلا ی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) افزایش می دهد. در مطالعه Guven و همکاران (۲۰۱۸) حضور میکروپلاستیک اثر سمیت حاد پیرن بر عملکرد شکارگری ماهی سی باس آسیایی (*Lates calcarifer*) را افزایش نمی دهد.

میکروپلاستیک ها از طریق تشکیل رادیکال های آزاد آسیب زننده به ماکرومولکول های سلولی و تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در حیوانات سمیت ایجاد می کنند (Kim et al., 2021). اطلاعات اندکی در مورد تاثیر میکروپلاستیک ها بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی ماهی وجود دارد. برخی از مطالعات افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را در ماهی گورخری (*D. rerio*) (Qiao et al., 2019) و تیلپای موزامبیک (*Oreochromis mossambicus*) (Jeyavani et al., 2023) در معرض میکروپلاستیک نشان دادند. در حالی که در مطالعه Xiao و همکاران (۲۰۲۳) کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را در ماهی آب شیرین *Nothobranchius guentheri* در معرض میکروپلاستیک گزارش کردند. در زمینه فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی، بیشترین میزان فعالیت در گروه دریافت کننده بالاترین دوزهای آنتی بیوتیک و میکروپلاستیک مشاهده شد، در حالی که بیشینه غلظت محصول پراکسیداسیون لیپیدی در گروه کنترل دیده شد. در مطالعه Banace و Mohammadzadeh در سال ۲۰۲۲ تأثیر میکروپلاستیک ها بر برخی از شاخص های استرس اکسیداتیو در ماهی گامبوزیا (*G. holbrooki*) نشان دادند که فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتیون پراکسیداز ماهیان در معرض میکروپلاستیک های رنگی قرار گرفته، به طور معنی داری افزایش یافت. این یافته ها با نتایج ما در زمینه افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در گروه هایی در معرض هم زمان قرقر گزافتن میکروپلاستیک و آنتی بیوتیک ها مطابقت دارد. افزایش فعالیت SOD در واقع یک واکنش فیزیولوژیکی به افزایش سوپراکسید آنیون ها در

افزایش فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانتی گلو تاتیون پراکسیداز تحت تاثیر میکروپلاستیک افزایش نشان داد. این آنزیم، متعلق به خانواده بزرگ پراکسیدازها است که نقش زیستی مهمی در حفاظت از موجودات زنده در برابر آسیب های اکسیداتیو بازی می کند (Capó et al., 2021). این آنزیم از طریق احیاء هیدروپراکسیدهای لیپیدی به مشتقات الکلی و همچنین احیای پراکسید هیدروژن به آب و مولکول اکسیژن، در حضور گلو تاتیون احیاء شده می تواند سطح ترکیبات واکنشگر فعال اکسیژن را کاهش دهد (Banaee and Mohammadzadeh., 2022).

افزایش فعالیت گلو تاتیون پراکسیداز صدف سیاه مدیترانه ای (*M. galloprovincialis*) (Capó et al., 2021)، تیلاپیای نیل (*O. niloticus*) (Dong et al., 2022)، ماهی گامبوزیا (*G. holbrooki*) (Banaee and Mohammadzadeh., 2022) و تیلاپیای موزامبیک (*O. mossambicus*) (Jeyavani et al., 2023) تحت تاثیر میکروپلاستیک گزارش شده است. با این حال، نتایج متناقضی برای فعالیت خاص GPx در برخی ماهیان گزارش شده است، در مطالعه Xia و همکاران (۲۰۲۰) کاهش فعالیت گلو تاتیون پراکسیداز در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (Xia et al., 2020) و ماهی گورخری (*D. rerio*) (Umamaheswari et al., 2021) تحت تاثیر میکروپلاستیک گزارش شده است. مالون دی آلدهید (MDA) یک محصول تولیدی در مسیر پراکسیداسیون لیپیدها و جزیی از چرخه استرس اکسیداتیو است.

در مطالعه حاضر در گروه کنترل میزان MDA بالا بود و در تیمارهای ترکیبی بویژه بالاترین غلظت میکروپلاستیک و ارمتوکسین به کمترین مقدار رسید.

سلولهای کبدی ماهیان در معرض میکروپلاستیکها است. افزایش معنی دار در فعالیت SOD در اسکالوپ خلیجی (*Argopecten irradians*) (Song et al., 2020)، تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) (Ding et al., 2018)، ماهی گورخری (*D. rerio*) (Lu et al., 2016)، ماهی دیسکاس (*Symphysodon aequifasciatus*) (Wen et al., 2018) و لارو سفید ماهی (*Coregonus peled*) (Frank et al., 2023) در معرض میکروپلاستیکها گزارش شده است. کاتالاز یکی از آنزیم های شناخته شده در پراکسیزوم سلولی است که پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تجزیه می کند (Félix et al., 2022). افزایش معنی دار در فعالیت آنزیم کاتالاز نشان از بالا بودن نرخ تولید پراکسید هیدروژن در سلولهای کبدی ماهیان در معرض میکروپلاستیکها است. علاوه بر این، افزایش نرخ پراکسید هیدروژن ممکن است با افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و تسریع روند دیسموته شدن سوپراکسید آنیونها مرتبط است. افزایش معنی دار در فعالیت کاتالاز در صدف دوکفه ای آب شیرین (*Corbicula javanicus*) (Esterhuizen et al., 2022)، ماهی گورخری (*D. rerio*) (Félix et al., 2022)، ماهی دیسکاس (*Symphysodon aequifasciatus*) (Wen et al., 2018)، صدف سیاه مدیترانه ای (*Mytilus galloprovincialis*) (Capó et al., 2021)، ماهی گامبوزیا (*G. holbrooki*) (Banaee and Mohammadzadeh., 2022) تحت تاثیر میکروپلاستیک گزارش شده است. در برخی از مطالعات کاهش فعالیت کاتالاز در گونه های مختلف ماهی در پاسخ به میکروپلاستیک گزارش شده است (Umamaheswari et al., 2021). در مطالعه حاضر

در مطالعه Zhang و همکاران (۲۰۱۹)، تاثیر میکروپلاستیک پلی استایرین به همراه نوعی آلاینده به نام روکسترومایسین در ماهی تیلاپای نیل در مدت ۱۴ روز تیمار نشان داد که میزان MDA در حضور فلورانتین به تنهایی افزایش می‌یابد اما در مرحله بعد در دوره ۷ روزه پاکسازی غلظت MDA در ماهیان تحت تیمار میکروپلاستیک به صورت ترکیبی با روکسترومایسین را مشاهده کردند. در مطالعه Lin و همکاران (۲۰۱۴)، تاثیر سم سولفونامید بعد از ۷۲ ساعت روی ماهی گورخری بررسی شد و MDA به عنوان یک نشانگر زیستی حساس به زمان مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد که میزان MDA بعد از ۲۴ ساعت به میزان حداکثر رسیده و سپس با گذشت زمان به حد کنترل کاهش یافت. در این ارتباط، معنی‌دار نبودن میزان فعالیت MDA در تیمارهای ترکیبی میکروپلاستیک و ارماتوکسین در مطالعه حاضر ممکن است به دلیل طول دوره آزمایش، نوع ماهی و نوع آلاینده باشد.

نتیجه گیری نهایی

به طور کلی نتایج حاضر نشان داد که مصرف هم‌زمان میکروپلاستیک و آنتی‌بیوتیک در ماهی تیلاپیا، منجر به افزایش معنی‌دار در شاخص‌های بیوشیمیایی استرس (مانند گلوکز و لاکتات) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (SOD, CAT, GP_x) شد. این اثرات هم‌افزایی نشان‌دهنده افزایش سطح استرس اکسیداتیو و احتمال آسیب بافتی در ماهیان است که می‌تواند به تغییرات قابل‌توجهی در سلامت عمومی و کارایی سیستم ایمنی آن‌ها منجر شود. به‌منظور کاهش این خطرات، پیشنهاد می‌شود راهکارهای عملی نظیر

کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت آبی‌پروری، مدیریت صحیح زباله‌های پلاستیکی، و تقویت قوانین مرتبط با کنترل آلودگی‌های میکروپلاستیکی به‌طور جدی مورد توجه قرار گیرد. این اقدامات می‌تواند به حفظ سلامت اکوسیستم‌های آبی و کاهش اثرات زیان‌بار این آلاینده‌ها کمک کنند. در نهایت، بررسی اثرات توأمان میکروپلاستیک‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها باید به‌عنوان یک اولویت تحقیقاتی در مطالعات آتی مورد توجه قرار گیرد. همچنین، مدیریت آلودگی‌های زیست‌محیطی و تنظیم قوانین مرتبط با مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و استفاده از پلاستیک‌ها در محیط‌های آبی باید با در نظر گرفتن اثرات هم‌افزایی این مواد انجام شود تا از خطرات آن‌ها بر سلامت موجودات آبی و به دنبال آن، بر زنجیره غذایی و سلامت انسانی جلوگیری شود.

سپاسگزاری

در اینجا برخورد لازم می‌دانیم از حمایت‌های دوستان گرامی تشکر نماییم.

منابع

- Adineh, H., Naderi, M., Yousefi, M., Khademi Hamidi, M., Ahmadifar, E. and Hoseini, S.M., 2020. Dietary licorice (*Glycyrrhiza glabra*) improves growth, lipid metabolism, antioxidant and immune responses, and resistance to crowding stress in common carp. *Cyprinus carpio. Aquaculture Nutrition*, 27(2), pp.417-426. DOI:10.1111/anu.13194
- Asadi, M., Harsij, M., Adineh, H., Gholizadeh, M. and Moazami, N., 2021. Evaluation of growth performance, digestive enzyme activity, immune and antioxidant parameters of Common carp (*Cyprinus carpio* L.)

- and Jiang, Q., 2022. Probiotics ameliorate polyethylene microplastics-induced liver injury by inhibition of oxidative stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 130, pp.261-272. DOI:10.1016/j.fsi.2022.09.022
9. Esterhuizen, M., Buchenhorst, L., Kim, Y.J. and Pflugmacher, S. 2022. In vivo oxidative stress responses of the freshwater basket clam *Corbicula javanicus* to microplastic fibres and particles. *Chemosphere*, 296, 134037. DOI:10.1016/j.chemosphere.2022.134037
 10. FAO, The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation, FAO, Rome, 2022, DOI:10.4060/cc0461en.
 11. Félix, L., Carreira, P. and Peixoto, F., 2022. Effects of chronic exposure of naturally weathered microplastics on oxidative stress level, behaviour, and mitochondrial function of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 310, 136895. DOI:10.1016/j.chemosphere.2022.136895
 12. Frank, Y.A., Interesova, E.A., Solov'yev, M.M., Xu, J. and Vorobiev, D.S., 2023. Effect of Microplastics on the Activity of Digestive and Oxidative-Stress-Related Enzymes in Peled Whitefish (*Coregonus peled* Gmelin) Larvae. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 10998. DOI:10.3390/ijms241310998
 13. Goth, L., 1991. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*, 196(2-3), pp.143 -151. Doi: 10.1016/0009-8981(91)90067-m
 14. Guven, O., Bach, L., Munk, P., Dinh, K.V., Mariani, P. and Nielsen, T.G., 2018. Microplastic does not magnify the acute effect of PAH pyrene on predatory performance of a tropical fish (*Lates calcarifer*). *Aquatic Toxicology*, 198, pp.287–293. DOI:10.1016/j.aquatox.2018.03.011
 15. Haave, M., Gomiero, A., Schönheit, J., juveniles reared in aquaponic system. *Journal of Applied Ichthyological Research*, 9 (3), pp.30-37. DOI: 10.22034/jair.9.3.31 [In Persian]
 3. Atugoda, T., Wijesekara, H. and Werellagama, D.R.I.B., Jinadasa, K.B.S.N., Bolan, N.S., Vithanage, M., 2020. Adsorptive interaction of antibiotic ciprofloxacin on polyethylene microplastics: implications for vector transport in water. *Environmental Technology and Innovation*, 19, 100971. DOI:10.1016/j.eti.2020.100971
 4. Banaee, M. and Mohammadzadeh, M., 2022. The effect of microplastics with different colors on some oxidative stress biomarkers in *Gambusia holbrooki* Girard, 1859. *Journal of Aquaculture Sciences*, 10(19), pp.73-82. Doi 20.1001.1.23225351.1401.10.19.7.7 [In Persian]
 5. Banaee, M., Badr, A.A., Multisani, C.R., Haghi, B.N. and Faggio, C. 2023. The toxicity effects of the individual and combined exposure of methyl tert-butyl ether (MTBE) and tire rubber powder (RP) on Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 274, 109759. DOI:10.1016/j.cbpc.2023.109759
 6. Colombo, C.V., Fernandez-Severini, M.D., Forero-Lopez, A.D., Arduoso, M.G., Rimondino, G.N., Malanca, F.E. and Buzzi, N.S., 2023. Microplastics in commercial seafood: *Pleoticus muelleri* as a case study in an estuarine environment highly affected by human pressure (Southwestern Atlantic). *Environmental Research*, 216, 114738. DOI:10.1016/j.envres.2022.114738
 7. Ding, J., Zhang, S., Razanajatovo, M.R., Zou, H. and Zhu, W., 2018. Accumulation, tissue distribution, and biochemical effects of polystyrene microplastics in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Pollution*, 238, pp.1-9. DOI:10.1016/j.envpol.2018.03.001
 8. Dong, R., Zhou, C., Wang, S., Yan, Y.

- microplastics on bivalve mollusks: A bibliometric and scientific review. *Marine Pollution Bulletin, Part A*, 194, 115271.
DOI:10.1016/j.marpolbul.2023.115271
22. Khanjani, M.H. and Mohammadi, A., 2025. Microplastic pollution in aquatic ecosystems: A comprehensive review of impacts on aquatic animals. *Annals of Animal Science*, pp.1-32. DOI: 10.2478/aoas-2025-0051
 23. Kim, J.H., Yu, Y.B. and Choi, J.H., 2021. Toxic effects on bioaccumulation, hematological parameters, oxidative stress, immune responses and neurotoxicity in fish exposed to microplastics: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 413, 125423.
DOI:10.1016/j.jhazmat.2021.125423
 24. Lawan, P.L.M.J.H., De Silva, D.S.M., Amarathunga, A.A.D., McGoran, A., Bakir, A., Sivyer, D.B. and Reeve, C., 2024. Microplastic Contamination in Shrimps from the Negombo Lagoon—Sri Lanka. *Water*, 16, 447.
DOI:10.3390/w16030447
 25. Leila, B., Sedláček, P. and Anastasopoulou, A., 2023. Plastic pollution in the deep-sea Giant red shrimp, *Aristaeomorpha foliacea*, in the Eastern Ionian Sea, an alarm point on stock and human health safety. *Science of the Total Environment*, 877, 162783.
DOI:10.1016/j.scitotenv.2023.162783
 26. Lin, T., Yu, S., Chen, Y. and Chen, W., 2014. Integrated biomarker responses in zebrafish exposed to sulfonamides. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38(2), pp.444-452.
DOI:10.1016/j.etap.2014.07.020
 27. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, pp.265-275.
DOI:10.1016/S0021-9258(19)52451-6
 28. Lu, Y., Zhang, Y., Deng, Y., Jiang, W., Zhao, Y., Geng, J., Ding, L. and Ren, H., 2016. Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish Nilsen, H. and Olsen, A.B., 2021. Documentation of Microplastics in Tissues of Wild Coastal Animals. *Frontiers in Environmental Science*, 9, 575058.
DOI:10.3389/fenvs.2021.575058
 16. Hamed, M., Soliman, H.A.M., Badrey, A.E.A. and Osman, A.G.M., 2021. Microplastics induced histopathological lesions in some tissues of tilapia (*Oreochromis niloticus*) early juveniles, *Tissue and Cell*, 71, 101512.
DOI:10.1016/j.tice.2021.101512
 17. Hanachi, P., Kazemi, S., Zivary, S. and Karbalaeei, S., 2020. Effect of polyethylene terephthalate microplastics and abamectin pesticides on glutathione peroxidase enzyme activity and lipid peroxidation in Zebra fish. *Journal of Fisheries*, 73(3), pp.361-372.
DOI:10.22059/jfisheries.2020.306230.1185 [In Persian]
 18. Jeyavani, J., Sibiya, A., Stalin, T., Vigneshkumar, G., Al-Ghanim, K.A., Riaz, M.N., Govindarajan, M. and Vaseeharan, B., 2023. Biochemical, genotoxic and histological implications of polypropylene microplastics on freshwater fish *Oreochromis mossambicus*: An aquatic ecotoxicological assessment. *Toxics*, 11, 282. DOI:10.3390/toxics11030282
 19. Karbalaeei, S., Hanachi, P., Rafiee, G., Seifori, P. and Walker, T.R., 2021. Toxicity of polystyrene microplastics on juvenile *Oncorhynchus mykiss* (rainbow trout) after individual and combined exposure with chlorpyrifos. *Journal of Hazardous Materials*, 403, 123980.
DOI:10.1016/j.jhazmat.2020.123980
 20. Khanjani, M.H., Sharifinia, M. and Hajirezaee, S., 2022. Recent progress towards the application of biofloc technology for tilapia farming. *Aquaculture*, 552, 738021.
DOI:10.1016/j.aquaculture.2022.738021
 21. Khanjani, M.H., Mohammadi, A. and Sharifinia, M., 2023. The impact of

35. Qiao, R., Sheng, C., Lu, Y., Zhang, Y., Ren, H. and Lemos, B., 2019. Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish. *Science of the Total Environment*, 662, pp.246–253. DOI:10.1016/j.scitotenv.2019.01.245
36. Rifai, N., Bachorik, P.S. and Albers, J.J., 1999. Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 809 P.
37. Sanchez, W., Bender, C. and Porcher, J.M., 2014. Wild gudgeons (*Gobio gobio*) from French rivers are contaminated by microplastics: preliminary study and first evidence. *Environmental Research*, 128, pp.98–100. DOI:10.1016/j.envres.2013.11.004
38. Satho, K., 1978. Serum lipid peroxidation in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clinica Chimica Acta*, 90, pp.37–43. DOI: 10.1016/0009-8981(78)90081-5
39. Song, J.A., Choi, C.Y. and Park, H.S., 2020. Exposure of bay scallop *Argopecten irradians* to micro-polystyrene: bioaccumulation and toxicity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 236, 108801. DOI: 10.1016/j.cbpc.2020.108801
40. Umamaheswari, S., Priyadarshinee, S., Bhattacharjee, M., Kadirvelu, K. and Ramesh, M., 2021. Exposure to polystyrene microplastics induced gene modulated biological responses in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 281, 128592. DOI:10.1016/j.chemosphere.2020.128592
41. Wen, B., Jin, S., Chen, Z., Gao, J., Liu, Y., Liu, J. and Feng, X., 2018. Single and combined effects of microplastics and cadmium on the cadmium accumulation, antioxidant defense and innate immunity of the discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*). (*Danio rerio*) and toxic effects in liver. *Environmental Science and Microplastic intake and enzymatic responses in Mytilus galloprovincialis* reared at the vicinities of an aquaculture station. *Chemosphere*, 280, 130575. DOI: 10.1021/acs.est.6b00183
29. Marklund, S. and Marklund, G., 1974. Involvement of the superoxyde anion radical in the auto oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxyde dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47, pp.469 - 474. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x
30. Mohamadi Dehcheshmeh, A., Khosravizadeh, M., Mousavi, S. M., Babadi, S. and Shiry, N., 2024. Electro-immobilisation and Fish Welfare: An Investigation into Stress, Consciousness, and Physiological Aspects during Slaughter. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 2, pp.1-16. DOI: 10.1080/10888705.2024.2348460
31. Ni, J., 2022. Emerging pollution and emerging pollutants. *National Science Open*, 1 (2), 20220030. DOI:10.1360/nso/20220030
32. Ovung, A. and Bhattacharyya, J., 2021. Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. *Biophysical Reviews*, 13(2), pp.259-272. DOI: 10.1007/s12551-021-00795-9.
33. Paglia, D.E. and Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70(1), pp.158-169.
34. Pastorino, P., Prearo, M., Anselmi, S., Menconi, V., Bertoli, M., Dondo, A., Pizzul, E. and Renzi, M., 2021. Use of the Zebra Mussel *Dreissena polymorpha* (Mollusca, Bivalvia) as a Bioindicator of Microplastics Pollution in Freshwater Ecosystems: A Case Study from Lake Iseo (North Italy). *Water*, 13, 434. DOI:10.3390/w13040434

- Environmental Pollution*, 243, pp.462-471. DOI:10.1016/j.envpol.2018.09.029
42. Xia, X., Sun, M., Zhou, M., Chang, Z. and Li, L., 2020. Polyvinyl chloride microplastics induce growth inhibition and oxidative stress in *Cyprinus carpio* var. larvae. *Science of the Total Environment*, 716, 136479. DOI:10.1016/j.scitotenv.2019.136479
43. Xiao, K., Song, L., Li, Y., Li, C. and Zhang, S., 2023. Dietary intake of microplastics impairs digestive performance, induces hepatic dysfunction, and shortens lifespan in the annual fish *Nothobranchius guentheri*. *Biogerontology*, 24, pp.207–223. DOI: 10.1007/s10522-022-10007-w
44. Zhang, S., Ding, J., Razanajatovo, R.M., Jiang, H., Zou, H. and Zhu, W., 2019. Interactive effects of polystyrene microplastics and roxithromycin on bioaccumulation and biochemical status in the freshwater fish red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Science of the Total Environment*, 648, pp.1431–1439. DOI:10.1016/j.scitotenv.2018.08.266
45. Zhang, Y., Li, M., Chang, F., Yi, M., Ge, H., Fu, J. and Dang, C., 2022. The distinct resistance mechanisms of cyanobacteria and green algae to sulfamethoxazole and its implications for environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*, 854, 158723. DOI:10.1016/j.scitotenv.2022.158723
46. Zhang, Y., Xu, X., Xu, J., Li, Z., Cheng, L., Fu, J., Sun, W. and Dang, C., 2024. When antibiotics encounter microplastics in aquatic environments: Interaction, combined toxicity, and risk assessments, *Science of the Total Environment*, 929, 172455. DOI:10.1016/j.scitotenv.2024.172455