

"مقاله پژوهشی"

تاثیر میکروپلاستیک پلی اتیلن و آنتی بیوتیک ارمتوکسین بر شاخص های استرس و پاسخ اکسیداتیو ماهی تیلاپیا (*Oreochromis sp.*)

محمد بهرامی^۱، رضا سلیقه زاده^{۱*}، محسن پورنیا^۲، محمدحسین خانجانی^۳، غلامرضا قاندری^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 تاثیر جداگانه و همزمان میکروپلاستیک پلی اتیلن و آنتی بیوتیک ارمتوکسین بر شاخص های 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 آبریان پژوهشکده آبرزی پروری آبهای جنوب کشور واقع در شیبان-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 شاخص های استرس و پاسخ آنتی اکسیدانی اندازه گیری و از طریق آنالیز واریانس دوطرفه بررسی شدند. نتایج نشان داد تفاوت معنی داری بین گروه های آزمایشی در میزان پروتئین کل، گلوکز و لاکتات خون ماهیان وجود داشت ($p < 0.05$). کمترین و بیشترین سطح پروتئین کل سرم به ترتیب در گروه های 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 آنزیم های SOD، CAT و GPX در مقایسه با گروه های کنترل شد ($p < 0.05$). بیشترین میزان فعالیت آنزیم های 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 معنی دار در شاخص های استرس و فعالیت آنتی اکسیدانی شد. به منظور کاهش این خطرات، پیشنهاد می شود راهکارهای عملی نظیر کاهش مصرف آنتی بیوتیک ها در صنعت آبرزی پروری، مدیریت صحیح زباله های پلاستیکی، و تقویت قوانین مرتبط با کنترل آلودگی های 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). ارموتوکسین 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).

MDA و آسیب بافتی نسبت به حضور آفت کش آبامکتین 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 ارموتوکسین در این مطالعه مورد ارزیابی قرارگرفت.

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 آبیان 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 قرارگرفت.

با توجه به نوظهور بودن آلاینده‌های میکروپلاستیکی در محیط زیست، پایداری بالای آن‌ها در محیط‌های خاکی و آبی و قرارگرفتن طولانی مدت آبیان 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 تأثیر 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 آبامکتین 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 آبامکتین تولید مالون دی آلدئید (MDA) نسبت به کنترل کاهش یافته است. همچنین حضور غلظت کم میکروپلاستیک به همراه آبامکتین باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و میزان

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 آکواریومها 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. میکروپلاستیکها 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 آماده‌سازی نمونه‌ها

پس از اتمام دوره آزمایش، نمونه‌گیری تصادفی از هر مخزن انجام شد و نمونه‌های خون و کبد تهیه گردید. برای این منظور، ماهیان با استفاده از بیهوش‌کننده MS-222 با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بیهوش شدند. خونگیری از ساقه دمی ماهیان با سرنگ‌های ۲ میلی‌لیتری بدون ماده ضد انعقاد صورت گرفت. به طوری که ماهیان یک شبانه‌روز قبل از نمونه‌گیری گرسنه نگه داشته شده بودند (Asadi *et al.*, 2021). برای تهیه سرم، نمونه‌های خونی بدون ماده ضد انعقاد به مدت ۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس سانتریفیوژ شدند (۱۱۰۰۰ دور در دقیقه، ۱۰ دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد). سرم جدا شده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی نگهداری شد. برای سنجش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی 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 میلی‌لیتر 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 یخچال‌دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره رویی (سوپرناتانت) استخراج و در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری تقسیم و تا زمان آنالیز در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سوپرناتانت جدا شده نیز در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد

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 اندازه‌گیری شد. سطوح کورتیزول با توجه به شیوه نامه‌های توصیه شده سازنده کیت Enzyme -Linked Immune Sorbent Assays; Nanjing, China اندازه‌گیری 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 *et al.*, 2020) سنجش شد. اندازه‌گیری لاکتات خون با استفاده از کیت‌های مخصوص آنزیمی ساخت شرکت پارس آزمون و دستگاه بیوشیمی آنالایزر Elan شرکت اپندرف آلمان انجام شد (Rifai *et al.*, 1991).

سنجش شاخص‌های استرس اکسیداتیو

برای ارزیابی وضعیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت گلوکاتایون پروکسیداز (GPx)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و غلظت مالون دی‌آلدئید (MDA) در محلول همگن بافت کبد اندازه‌گیری شد. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) براساس توانایی

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 II- 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

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 میکرولیتر مایع رویی جدا شده به همراه NADPH میلی مولاری، گلوکاتایون احیا شده ۱۵۰ میلی مولاری، گلوکاتایون ردوکتاز (30 U/ml)، سدیم آزید ۰/۰۱۲ مولاری، بافر فسفات پتاسیم 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 داده‌ها

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

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 علی‌رغم 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

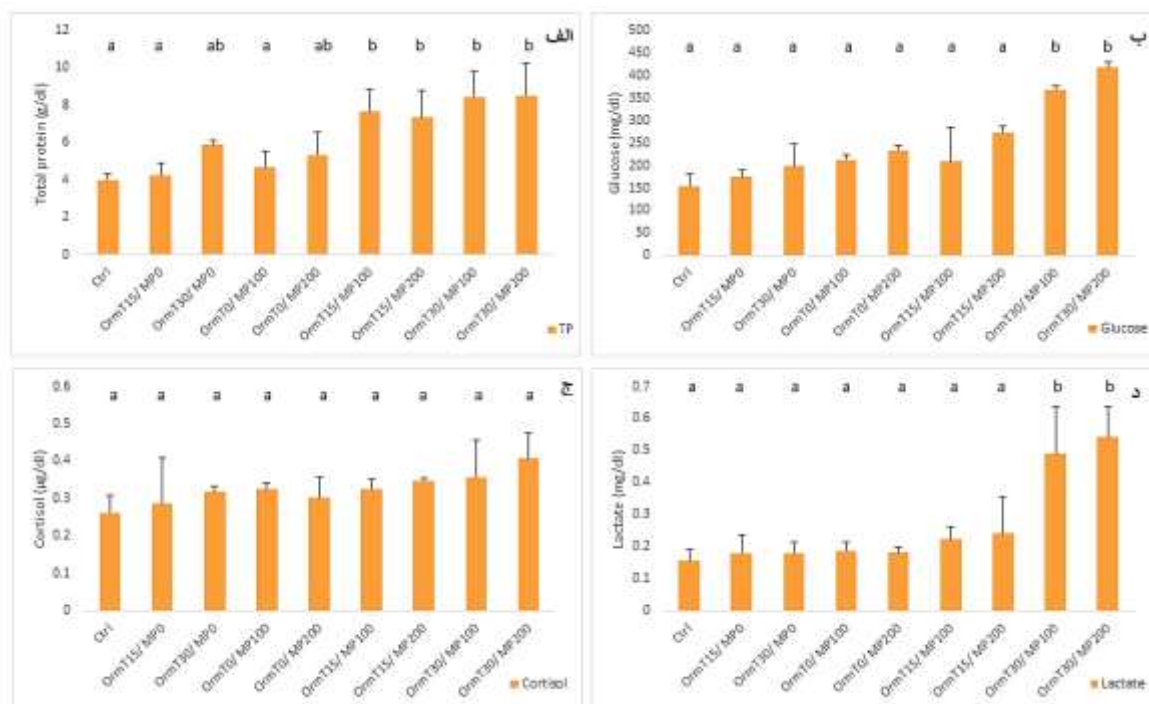
نتایج آزمون تحلیل واریانس شاخص‌های آنتی اکسیدانی تحت تاثیر تیمارهای مختلف در جدول ۳ ارائه شده است. طبق نتایج، با توجه به اینکه سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ است، فرض برابری میانگین تمامی شاخص‌های آنتی اکسیدانی در تیمارهای مختلف رد می‌شود. بنابراین تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های آزمایشی در میزان این پارامترها وجود داشته است. نتایج کلی شاخص‌های آنتی اکسیدانی شامل GPx، SOD، CAT، MDA در شکل ۲ ارائه شده است. بر اساس 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 کیلوگرم وزن خوراک) و اثرات توأمان این دو ماده شیمیایی افزودنی معنی دار بودند ($p < 0.05$).

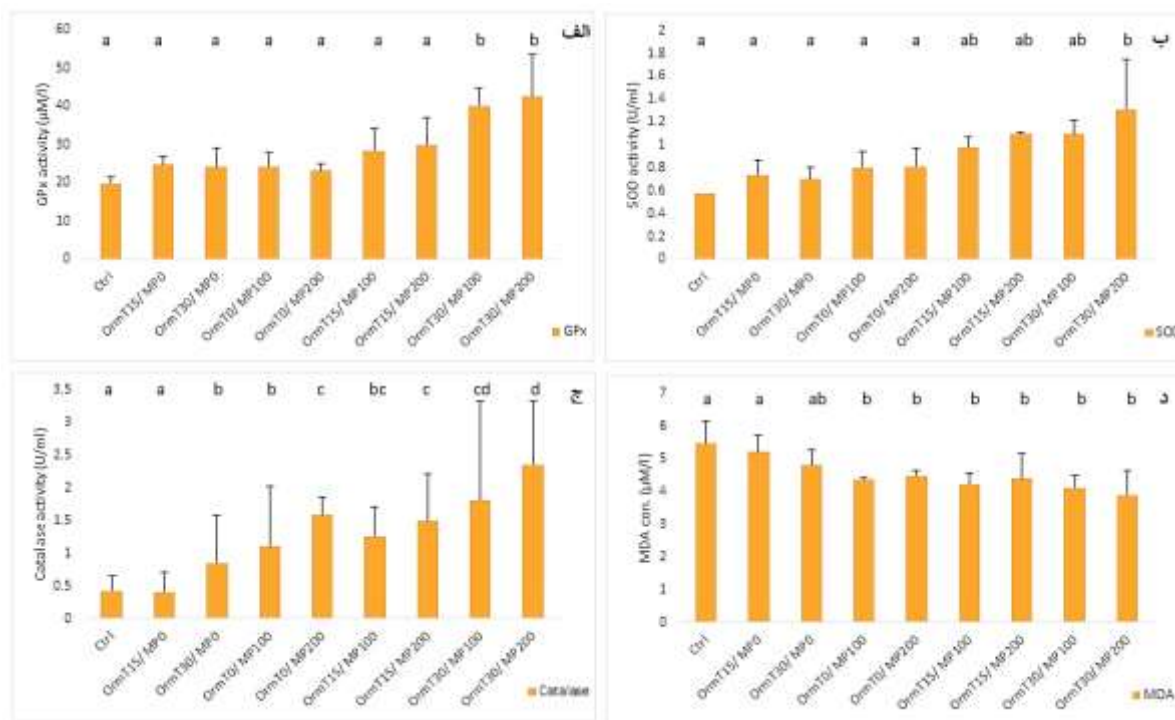
جدول ۲: نتایج آزمون تحلیل واریانس شاخص های استرس تحت تأثیر تیمارهای مختلف

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 آنتی‌اکسیدانی 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 آنتی‌اکسیدانی 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 شاخص‌های بیوشیمیایی دیگر مانند گلوکز، کورتیزول و لاکتات نیز مشاهده شد. همچنین، تفاوت معنی داری بین گروه‌های آزمایشی از نظر پارامترهای پروتئین کل، گلوکز و لاکتات خون ماهیان وجود داشت، اما در مورد کورتیزول تفاوت معنی داری مشاهده نشد. این یافته‌ها نشان داد که مصرف توأم میکروپلاستیک و آنتی بیوتیک اثر هم افزایی بر شاخص‌های استرس بیوشیمیایی مانند گلوکز و لاکتات دارد، به طوری که گروه‌هایی که هر دوی این مواد شیمیایی را دریافت کرده‌اند، در مقایسه با گروه‌های شاهد تغییرات آماری چشمگیری در این شاخص‌ها نشان دادند.

میکروپلاستیک‌ها زمانی که با آلاینده‌های دیگر ترکیب می‌شوند اثر هم افزایی بر سلامت موجودات زنده دارند، تعامل میکروپلاستیک‌ها با آلاینده‌های شیمیایی یافته‌های متناقضی را نشان داده است. به عنوان مثال در مطالعه Karbalaei و همکاران (۲۰۲۱)، گزارش شده که حضور میکروپلاستیک سمیت کلروپیریفوس را برای ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) افزایش می‌دهد. در مطالعه Guven و همکاران (۲۰۱۸) حضور میکروپلاستیک اثر سمیت حاد پیرن بر عملکرد شکارگری ماهی سی باس آسیایی (*Lates calcarifer*) را افزایش نمی‌دهد.

میکروپلاستیک‌ها از طریق تشکیل رادیکال‌های آزاد آسیب زننده به ماکرومولکول‌های سلولی و تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در حیوانات سمیت ایجاد می‌کنند (Kim et al., 2021). اطلاعات اندکی در مورد تاثیر میکروپلاستیک‌ها بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی ماهی وجود دارد. برخی از مطالعات افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را در ماهی گورخری (*D. rerio*) (Qiao et al., 2019) و تیلایپای 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 آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی، 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 Banaee و Mohammadzadeh در سال ۲۰۲۲ تأثیر میکروپلاستیک‌ها بر برخی از شاخص‌های استرس اکسیدانتیو در ماهی گامبوزیا (*G. holbrooki*) نشان دادند که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتیون پراکسیداز ماهیان در معرض میکروپلاستیک‌های رنگی قرار گرفته، به طور معنی داری افزایش یافت. این یافته‌ها با نتایج ما در زمینه افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی در گروه‌هایی در معرض هم زمان قرقر گزفانن میکروپلاستیک و آنتی بیوتیک‌ها مطابقت دارد. افزایش فعالیت SOD در واقع یک واکنش فیزیولوژیکی به افزایش سوپراکسیدآنیون‌ها در

افزایش فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانتی گلوکاتایون 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 آسیب‌های اکسیداتیو بازی می‌کند (Capó et al., 2021). این آنزیم از طریق احیاء هیدروپراکسیدهای لیپیدی به مشتقات الکلی و همچنین احیاء پراکسید هیدروژن به آب و مولکول اکسیژن، در حضور گلوکاتایون احیاء شده می‌تواند سطح ترکیبات واکنشگر فعال اکسیژن را کاهش دهد (Banaee and Mohammadzadeh., 2022).

افزایش فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز صدف سیاه مدیترانه‌ای (*M. galloprovincialis*) (Capó et al., 2021)، تیلایپای نیل (*O. niloticus*) (Dong et al., 2022)، ماهی گامبوزیا (*G. holbrooki*) (Banaee and Mohammadzadeh., 2022) و تیلایپای 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 گلوکاتایون 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 آلدئید (MDA) یک محصول تولیدی در مسیر پراکسیداسیون لیپیدها و جزئی از چرخه استرس اکسیداتیو است.

در مطالعه حاضر در گروه کنترل میزان MDA بالا بود و در تیمارهای ترکیبی بویژه بالاترین غلظت میکروپلاستیک و ارتموکسین 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)، تیلایپای 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 آنزیم‌های شناخته شده در پراکسیزوم سلولی است که پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند (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 دوکفه‌ای 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 مدیترانه‌ای (*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 گونه‌های مختلف ماهی در پاسخ به میکروپلاستیک گزارش شده است (Umamaheswari et al., 2021). در مطالعه حاضر

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 می‌توانند 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 آبی مورد توجه قرار گیرد. همچنین، مدیریت آلودگی‌های زیست‌محیطی و تنظیم قوانین مرتبط با مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و استفاده از پلاستیک‌ها در محیط‌های آبی باید 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

1. 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
2. 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.)

در مطالعه Zhang و همکاران (۲۰۱۹)، تاثیر میکروپلاستیک پلی‌استایرین 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 ارمتوکسین در مطالعه حاضر ممکن است به دلیل طول دوره آزمایش، نوع ماهی و نوع آلاینده باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

به‌طور کلی نتایج حاضر نشان داد که مصرف هم‌زمان میکروپلاستیک و آنتی‌بیوتیک در ماهی تیلاپایا، منجر به افزایش معنی‌دار در شاخص‌های بیوشیمیایی استرس (مانند گلوکز و لاکتات) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (SOD, CAT, GPX) 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

- 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., Solovyev, 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