



## Original Research Paper

## Biological Monitoring of Gamasiab River using Biomarkers of Acetylcholinesterase Enzyme and Metallothionein Protein in two Species of *Onchorhynchus mykiss* and *Cyprinus carpio*

Issac Shokrisafa<sup>1</sup>, Nasrin Hassanzadeh<sup>1\*</sup>, Hassan Malvandi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Environment, Faculty of Environment and Natural Resources, Malayer University, Malayer, Iran

<sup>2</sup>Department of Environment, Faculty of Geography and Environmental Sciences, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran

### Key Words

Biomarker  
Biological Response  
Cholinesterase  
Pollutant  
Aquatic ecosystems

### Abstract

**Introduction:** Metallothionein protein and acetylcholinesterase enzyme are among the most important biomarkers in evaluating the health of aquatic ecosystems and have been introduced as one of the defense mechanisms of aquatic organisms in the face of various pollutants. Therefore, the aim of this study was to evaluate and biologically monitor the organic and mineral pollution of Gamasiab River using the biomarkers of acetylcholinesterase enzyme and metallothionein protein in two species of rainbow (*Onchorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*).

**Materials & methods:** Sampling was done from five rainbow trout farms and eight common carp farms along the Gamasiab River, and the samples were quickly frozen in liquid nitrogen and transported to the laboratory. The amount of metallothionein (MT) was measured based on spectrophotometric method and the analysis of cholinesterase enzyme (AChE) in fish brain was performed based on Elman's method.

**Results:** The findings showed that there was a statistically significant difference between different sampling locations in terms of the average values and effects of AChE and MT in two fish species ( $P < 0.05$ ). In addition, the average values of total AChE and MT in carp fish are equal to  $3.42 \mu\text{m}/\text{min}/\text{g}$  and  $707.75 \mu\text{g}/\text{g}$ , respectively, and in rainbow trout it is equal to  $1.33 \mu\text{m}/\text{min}/\text{g}$  and  $\mu\text{g}$ , respectively.  $/\text{g}$  was 3105.7 and the comparison of the average amount of AChE and MT between two species of carp and rainbow trout showed that the amount of MT in rainbow salmon is higher than that of carp, And the amount of AChE activity in carp was higher than that of rainbow trout.

**Conclusion:** The differences in the level of MT and AChE biomarkers can be caused by exposure of fish species exposed to different levels of pollutants due to differences in their feeding habits and behavior as well as differences in sampling points with environmental conditions and the entry of polluting sources are different. In this study, the application of 2 specific biomarkers to investigate the presence and effects of two groups of organic and inorganic pollutants in the Gamasiab River were determined without conducting any type of chemical analysis. In other words, Gamasiab River is directly exposed to the simultaneous entry of organic and mineral pollutants due to the extent and dispersion of different human uses on its margins, which can be detected by tracking specific biomarkers in indicator species (including rainbow trout and carp) to be a basis for monitoring the pollution of ecosystems.

\* Corresponding Author's email: [nasrinhassanzadeh@gmail.com](mailto:nasrinhassanzadeh@gmail.com)

Received: 7 July 2022; Reviewed: 9 August 2022; Revised: 12 October 2022; Accepted: 12 November 2022

(DOI): [10.22034/AEJ.2022.357769.2869](https://doi.org/10.22034/AEJ.2022.357769.2869)

## مقاله پژوهشی

## پایش زیستی رودخانه گاماسیاب با استفاده از بیومارکرهای آنزیم استیل کولین استراز و پروتئین متالوتیونین در دو گونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و کپور معمولی

اسحاق شکری صفا<sup>۱</sup>، نسرين حسن‌زاده<sup>۱\*</sup>، حسن ملوندي<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه محیط زیست، دانشکده محیط زیست و منابع طبیعی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

<sup>۲</sup> گروه محیط زیست، دانشکده جغرافیا و علوم محیطی، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

## کلمات کلیدی

## چکیده

زیست‌نشانگر  
پاسخ زیستی  
کولین استراز  
آلاینده  
بوم‌سازگان آبی

**مقدمه:** پروتئین متالوتیونین و آنزیم استیل کولین استراز از مهم‌ترین زیست‌نشانگرها در ارزیابی سلامت بوم‌سازگان‌های آبی هستند و به‌عنوان یکی از سازوکارهای دفاعی آبزیان در مواجهه با انواع آلاینده‌ها معرفی شده‌اند. لذا هدف از این مطالعه ارزیابی و پایش زیستی آلودگی‌های آلی و معدنی رودخانه گاماسیاب با استفاده از بیومارکرهای آنزیم استیل کولین استراز و پروتئین متالوتیونین در دو گونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بود.

**مواد و روش‌ها:** نمونه‌برداری از پنج مزرعه پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و هشت مزرعه ماهی کپور در طول رودخانه گاماسیاب انجام شد و نمونه‌ها سریعاً در ازلت مایع منجمد و به آزمایشگاه منتقل شدند. اندازه‌گیری میزان متالوتیونین (MT) براساس روش اسپکتروفتومتری و آنالیز آنزیم کولین استراز (AChE) در مغز ماهی براساس روش المان انجام شد.

**نتایج:** یافته‌ها نشان داد که بین مکان‌های مختلف نمونه‌برداری از حیث میانگین مقادیر و اثرات AChE و MT در دو گونه ماهی اختلاف معنی‌دار آماری وجود داشت ( $P < 0/05$ ). به‌علاوه، میانگین مقادیر کل AChE و MT در ماهی کپور به‌ترتیب برابر با  $3/42 \mu\text{m}/\text{min}/\text{g}$  و  $707/75 \mu\text{g}/\text{g}$  و در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز به‌ترتیب برابر با  $1/33 \mu\text{m}/\text{min}/\text{g}$  و  $3105/7 \mu\text{g}/\text{g}$  بودند که مقایسه میانگین میزان AChE و MT بین دو گونه ماهی کپور و قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد میزان MT در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بیش‌تر از کپور، و میزان فعالیت AChE در ماهی کپور بیش‌تر از گونه قزل‌آلای رنگین‌کمان بوده است.

**بحث و نتیجه‌گیری:** این تفاوت بین گونه‌ای در میزان زیست‌نشانگرهای MT و AChE می‌تواند ناشی از مواجهه گونه‌های ماهی در معرض سطوح متفاوت آلاینده به‌دلیل اختلاف در عادت تغذیه و رفتار آن‌ها و نیز تفاوت در نقاط نمونه‌برداری با شرایط محیطی و همچنین ورود منابع آلاینده متفاوت باشد. در مطالعه حاضر کاربرد و ادغام ۲ مورد از نشانگرهای زیستی اختصاصی برای بررسی حضور و تاثیرات دو گروه از آلاینده‌های آلی و معدنی در رودخانه گاماسیاب بدون انجام هیچ نوع سنجش شیمیایی مشخص شد. به‌عبارتی رودخانه گاماسیاب به دلیل وسعت و پراکندگی کاربری‌های مختلف انسانی در حاشیه آن در معرض مستقیم ورود هم‌زمان آلاینده‌های آلی و معدنی است که این موضوع می‌تواند با ردیابی بیومارکرهای اختصاصی در گونه‌های شاخص (از جمله گونه‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان و کپور) مبنایی برای پایش آلودگی بوم‌سازگان باشد.

## مقدمه

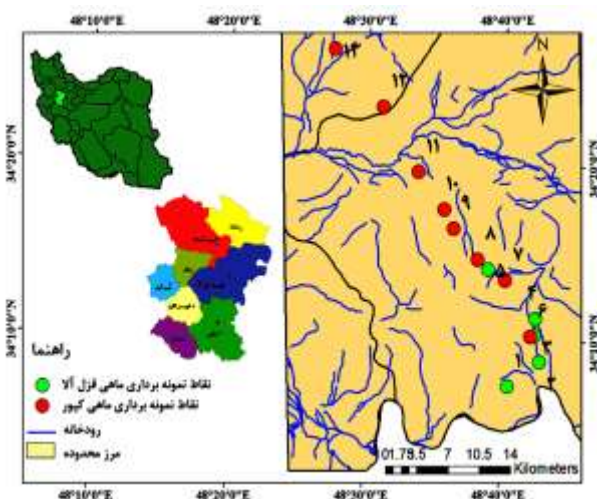
برای ارزیابی اثرات مواجهه با ترکیبات نورووتوکسیک، مانند آفت‌کش‌های آلی فسفره (OP) و کاربامات در برخی گونه‌ها، از جمله گونه‌های آبی استفاده می‌شود (۱۱). هنگامی که در یک بوم‌سازگان‌های آبی، ماهی‌ها در معرض مواجهه با آفت‌کش‌های آلی فسفره و کاربامات قرار می‌گیرند، سموم به محل فعال AChE متصل می‌شوند و آنزیم را فسفریله می‌کنند، بنابراین، از اتصال بستر جلوگیری می‌کنند (۱۰، ۱۲). مطالعات متعدد در این زمینه نشان می‌دهد که فعالیت AChE در ماهی به‌عنوان ابزاری برای ارزیابی و پایش زیستی بوم‌سازگان‌های آبی کاربرد فراوانی دارد (۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶). از طرف دیگر، متالوتیونین‌ها (MT: metallothionein) امروزه کاربرد گسترده‌ای به‌عنوان ابزار اختصاصی پایش زیستی فلزات سمی در محیط‌زیست دارد (۸). از آنجایی که تغییرات مقدار MT در نتیجه مواجهه با فلزات سنگین در ماهی‌ها رابطه‌ای مستقیم دارد، بسیاری از محققان از پروتئین MT به‌عنوان نشانگر زیستی برای ارزیابی آلودگی محیط‌های آبی به انواع فلزات سنگین در گونه‌های ماهی استفاده کرده‌اند (۱۷، ۱۸، ۱۹). رودخانه گاماسیاب یکی از بزرگ‌ترین رودخانه‌های ایران و شاخه عمده و اصلی کرخه بوده که تا محل تلاقی با رودخانه قره‌سو به این نام خوانده می‌شود. رودخانه گاماسیاب علی‌رغم ارائه خدمات بوم‌سازگان متنوع، ترکیب پیچیده‌ای از آلاینده‌ها را از منابع متعدد دریافت می‌کند (۲۰). اگرچه کیفیت آب رودخانه گاماسیاب به‌طور گسترده با استفاده از روش‌های پایش مرسوم ارزیابی شده است (۲۱، ۲۲)، گزارش‌های علمی در مورد اثرات آلودگی رودخانه بر موجودات زنده و استفاده از رویکرد پاسخ نشانگرهای زیستی محدود است. بنابراین، استفاده از پاسخ نشانگرهای زیستی در ماهیان بومی ساکن رودخانه گاماسیاب، می‌تواند یک راهبرد مؤثر برای ارزیابی اثرات بیولوژیکی در نظر گرفته شود. این مطالعه برای اولین بار با هدف بررسی امکان‌سنجی استفاده از پاسخ نشانگرهای زیستی در دو گونه ماهی مهم با رژیم غذایی متفاوت (قزل‌آلا گوشت‌خوار و کپور گیاه‌خوار) برای ارزیابی اثرات بیولوژیکی بالقوه آلودگی در رودخانه گاماسیاب در سال ۱۴۰۰ انجام شد. بیومارکرهای مورد بررسی، فعالیت کولین استراز مغز برای سمیت عصبی و محتوای متالوتیونین هستند که به ترتیب نشان‌دهنده وجود ترکیبات آنتی کولین استرازیک (مانند آفت‌کش‌های آلی فسفره و کاربامات) و فلزات سنگین در محیط‌زیست بودند.

## مواد و روش‌ها

**محدوده مورد مطالعه:** رودخانه گاماسیاب یکی از بزرگ‌ترین رودخانه‌های ایران و شاخه عمده و اصلی کرخه بوده که تا محل

بوم‌سازگان‌های آبی پذیرنده اصلی آلاینده‌ها هستند، که آلودگی آن‌ها در بلندمدت منجر به وقوع اثرات فراوانی بر جوامع آبیان و انسان‌ها می‌شود (۱). پایش آلودگی بوم‌سازگان‌های آبی اساساً براساس رویکرد پایش مرسوم با تمرکز بر مجموعه‌ای از پارامترهای فیزیکی شیمیایی و سطوح آلاینده، اطلاعات کاملی در مورد شرایط بوم‌شناختی که در آن موجودات زنده در بوم‌سازگان‌ها زندگی می‌کنند، ارائه نمی‌کند (۲)، و این رویکرد تنها وضعیت آلودگی را در زمان نمونه‌برداری ارزیابی می‌کند (۳). بنابراین، توجه به رویکردهای جایگزین مانند کاربرد نشانگرهای زیستی که می‌تواند اثرات متقابل تمام آلاینده‌ها را بر روی فرآیندهای زیستی در موجودات منعکس کند، یک رویکرد مؤثر و مقرون به‌صرفه برای ارزیابی اثرات بیولوژیکی آلودگی بوم‌سازگان‌های آبی است (۴). در این خصوص، شناسایی و ارزیابی تاثیر آلاینده‌ها بر کیفیت محیطی، به‌ویژه در غلظت‌های پایین و غیرکشنده، منجر به توسعه طیف وسیعی از پاسخ‌های بیولوژیکی شده است که در گونه‌های مختلف اندازه‌گیری می‌شوند (۵). در واقع، قبل از مرگ یا بیماری آشکار، موجودات زنده ممکن است با تغییر پاسخ‌های مولکولی، فیزیولوژیکی یا رفتاری به تنش محیطی پاسخ دهند، که توانایی تشخیص و اندازه‌گیری این تغییرات، ممکن است هشدار اولیه در مورد عواقب بعدی و بسیار جدی‌تر ارائه دهد (۶، ۷). به‌عبارتی، اندازه‌گیری اثرات در سطوح مختلف سازمان بیولوژیکی (سطوح مولکولی/ بیوشیمیایی، سلولی، بافت و غیره) حضور ترکیبات سمی را سریع‌تر تشخیص می‌دهد، که این امر امکان شناسایی و تشخیص سریع‌تر تاثیرات را تا قبل از رسیدن به سطوح عالی جوامع زیستی فراهم می‌کند. در حال حاضر، کاربرد نشانگرهای زیستی در تشخیص اثرات آلاینده‌ها بر آبیان به‌منظور نظارت بر کیفیت بوم‌سازگان‌های مختلف توسعه‌یادی یافته است (۸). در این خصوص، توسعه فنون پایش زیستی با استفاده از بیومارکرها در ماهیان برای مطالعه اثرات مختلف آلاینده‌های موجود در بوم‌سازگان‌های آبی افزایش یافته است. ماهی‌ها تقریباً در همه بوم‌سازگان‌های آبی یافت می‌شوند و به‌دلیل عملکرد و نقش اکولوژیکی ویژه در شبکه‌های غذایی در دریا از اهمیت ویژه‌تری نسبت به سایر آبیان برخوردار هستند (۹). امروزه انواع نشانگرهای زیستی به‌طور اختصاصی برای ارزیابی حضور یا عدم حضور انواع آلاینده‌های آلی و معدنی در بوم‌سازگان‌های آبی معرفی و پیشنهاد شده‌اند (۸، ۱۰)، که استفاده هم‌زمان برخی از این نشانگرهای زیستی برای به‌حداقل رساندن تفسیر نادرست در موارد شرایط پیچیده آلودگی بسیار مهم است. در بین نشانگرهای زیستی، اندازه‌گیری فعالیت استیل کولین استراز (Acetylcholinesterase: AChE)، به‌طور گسترده

گرفت. ماهیان صید شده به دلیل اندازه کوچک، قابلیت تشریح و نمونه برداری از کبد، مغز و عضله را نداشتند. به همین دلیل از روش Whole Body Homogenate (WBH) عصاره گیری از مایعات بدنی استفاده شد (۲۵). پس از صید نمونه‌ها در کاغذ فویل بسته بندی و شماره گذاری گردیده و در تانک ازت سریع منجمد و برای انجام آنالیز به آزمایشگاه منتقل شدند. موقعیت و مختصات جغرافیایی نقاط نمونه برداری ماهی قزل آلابی رنگین کمان و کپور در رودخانه گاماسیاب در شکل ۱ و جدول ۱ ارائه شده است. این مطالعه براساس اخذ کد اخلاق پژوهشی به شماره IR.MALAYERU.REC.1300.011 و رعایت کلیه موازین مربوط به مطالعه بر موجودات زنده انجام شده است.



شکل ۱: موقعیت نقاط نمونه برداری ماهی قزل آلابی رنگین کمان و کپور در رودخانه گاماسیاب

تلاقی با رودخانه قره سو به این نام خوانده می شود. حوضه آبریز عمدتاً در استان های کرمانشاه و همدان قرار دارد. این حوضه ۱۱۴۵۹ کیلومتر مربع وسعت داشته و در محدوده طول جغرافیایی ۴۷ درجه و ۴ دقیقه تا ۴۹ درجه و ۱۵ دقیقه و عرض جغرافیایی ۳۳ درجه و ۴۵ دقیقه تا ۳۵ درجه قرار دارد. بیشترین سطح حوضه آبخیز گاماسیاب در استان کرمانشاه و بخش هایی از آن در استان همدان قرار دارد. متوسط نزولات جوی دریافت شده در این حوضه ۳۰۰ تا ۴۵۰ میلی متر و تغییرات درجه حرارت در این حوضه نیز بین ۲۹/۵- تا ۴۷ درجه سانتی گراد می باشد (۲۳).

### نمونه برداری میدانی

#### نمونه برداری ماهی قزل آلابی رنگین کمان و کپور معمولی:

نمونه برداری در طول ۴۵ کیلومتر از مسیر رودخانه گاماسیاب و به تعداد ۱۵ قطعه از پنج مزرعه پرورش ماهی قزل آلابی در منطقه سراب گاماسیاب و در حوزه شهرستان نهاوند انجام شد. پس از بیومتری دقیق نمونه ها شامل وزن و طول بدن، نمونه ها تشریح شد و در محل از بافت کبد و عضله برای سنجش متالوتیونین نمونه برداری و در کاغذ فویل بسته بندی و در تانک ازت سریعاً منجمد و به آزمایشگاه منتقل شد. هم چنین نمونه مغز نیز برای سنجش استیل کولین استراز جدا شده و در ظروف پلی اتیلنی در تانک ازت سریعاً منجمد و پس از انتقال به آزمایشگاه تازمان آنالیز نمونه در فریزر ۸۰- نگه داری شد (۲۴). در خصوص برداشت ۲۴ قطعه ماهی کپور، با توجه به این که مزارع پرورش این گونه در قسمت های پایین دست رودخانه به دلیل کم آبی و عدم صرفه اقتصادی تعطیل شده بود از هشت ایستگاه در طول رودخانه و از طریق صید از ماهیان وحشی نمونه برداری صورت

جدول ۱: موقعیت و مختصات جغرافیایی نقاط نمونه برداری ماهی قزل آلابی رنگین کمان و کپور در رودخانه گاماسیاب

گونه ماهی	شماره مزرعه	موقعیت ایستگاه	طول جغرافیایی (E)	عرض جغرافیایی (N)
ماهی قزل آلابی رنگین کمان	۱	کیلومتر ۱۷ جاده نورآباد	۴۸°۴۰'۲۸"	۳۴°۰۶'۸۷"
	۲	کیلومتر ۱۳ جاده نورآباد	۴۸°۴۲'۴۷"	۳۴°۰۸'۵۱"
	۳	کیلومتر ۱۰ جاده نورآباد	۴۸°۴۲'۲۳"	۳۴°۰۹'۸۲"
	۴	روستای قلعه قباد	۴۸°۴۱'۸۷"	۳۴°۱۰'۷۹"
	۵	روستای فیازمان	۴۸°۳۸'۵۵"	۳۴°۱۴'۰۶"
ماهی کپور	۱	پل روستای قلعه قباد	۴۸°۴۲'۰۷"	۳۴°۱۰'۱۷"
	۲	پل روستای فیازمان	۴۸°۴۰'۱۲"	۳۴°۱۲'۸۹"
	۳	خروجی روستای رستم آباد	۴۸°۳۷'۷۰"	۳۴°۱۴'۳۸"
	۴	ورودی روستای دهنو	۴۸°۳۶'۲۱"	۳۴°۱۵'۸۲"
	۵	نهاوند	۴۸°۳۵'۳۸"	۳۴°۱۶'۸۸"
	۶	انتهای نهاوند	۴۸°۳۳'۴۱"	۳۴°۱۸'۹۴"
	۷	دهفول	۴۸°۳۱'۰۳"	۳۴°۲۲'۷۵"
	۸	لوشان	۴۸°۲۶'۸۶"	۳۴°۲۵'۸۹"

(۲۰ میلی گرم بافت مغزی در هر میلی لیتر بافر)، لذا فرمول المن به صورت زیر ساده می شود (۲۶):

$$R = A \times \Delta \times 7.28$$

که واحد R به صورت  $\mu\text{M ASCh/hydrolyzed/ min/g}$  به دست می آید.

**تجزیه و تحلیل آماری:** تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS22 و Excel2016 انجام شد. برای بررسی نرمال بودن داده ها از آزمون شاپیرو-ویلک استفاده شد. سپس با توجه به نرمال بودن داده ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و به دنبال آن آزمون تعقیبی دانکن جهت مقایسه میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (AChE) و میزان پروتئین متالوتیونین (MT) بین ایستگاه های پایش استفاده شد. آزمون تی مستقل نیز جهت مقایسه میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز و میزان پروتئین متالوتیونین بین دو گونه ماهی کپور و قزل آلاهی رنگین کمان در رودخانه گاماسیاب به کار برده شد.

## نتایج

**آمار توصیفی آنزیم کولین استراز و پروتئین متالوتیونین در گونه های ماهی مورد مطالعه**  
**آمار توصیفی و مقایسه میزان فعالیت آنزیم کولین استراز و پروتئین متالوتیونین در ماهی کپور**

**فعالیت آنزیم کولین استراز (AChE):** آمار توصیفی مربوط به آنزیم کولین استراز (AChE) در ماهی کپور در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج ارائه شده در جدول ۲ بیانگر آن است که میزان فعالیت آنزیم کولین استراز در مغز ماهی کپور در ایستگاه های مورد مطالعه در محدوده  $1/38-5/01 \mu\text{mol}^{-1} \text{min}^{-1} \text{g protein}$  بود. کمترین فعالیت AChE در مغز ماهی کپور در ایستگاه ۴ ( $2/01 \pm 0/63$ ) و بیشترین فعالیت مربوط به ایستگاه ۲ ( $4/12 \pm 0/11$ ) و ایستگاه ۷ ( $4/11 \pm 0/9$ ) به دست آمده است. مقایسه میانگین فعالیت آنزیم کولین استراز در مغز ماهی کپور در بین ایستگاه های مختلف براساس آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) نیز در شکل ۲ ارائه شده است. براساس نتایج آزمون ANOVA با توجه به سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵، تفاوت معنی داری بین میزان AChE مغز ماهی کپور در ایستگاه ها وجود داشت ( $P < 0/05$ ). نتایج حاصل از آزمون دانکن برای تفکیک و گروه بندی ایستگاه ها براساس میزات فعالیت AChE در ماهی کپور در شکل ۲ نشان داده شده است. در این شکل تفاوت معنی دار بین ایستگاه ها براساس حروف متفاوت لاتین مشخص شده است.

**سنجش متالوتیونین (MT):** اندازه گیری میزان متالوتیونین براساس روش اسپکتروفتومتری Viaregno و همکاران (۸) انجام شد. ابتدا نمونه های کبد ماهی با استفاده از دستگاه هموژنایزر هموژن شده و سپس نمونه هموژن شده با نسبت ثابت یک گرم بافت، ۹ میلی لیتر بافر به عنوان عوامل جلوگیری کننده از تجزیه پروتئین و بتامرکاپتواتانول (سیگما ۵/۵۲ درصد) به عنوان یک عامل احیاء کننده اضافه شده و محلول هموژن شده در دور ۳۰۰۰ g برای ۱۵ دقیقه به سانتریفیوژ یخچال دار منتقل و سانتریفیوژ شد. بعد از اضافه کردن کلروفورم و سانتریفیوژ فاز پروتئین، رسوب باقی مانده حاوی پروتئین متالوتیونین با بافر هموژن کننده شسته شده که این امر سبب خارج ساختن تیول های سولفید می گردد. مجدداً سانتریفیوژ انجام و در مرحله پایانی، نمونه ها در دمای اتاق برای مدت ۵ دقیقه در دور ۵۰۰۰ g برای سانتریفیوژ و سپس توسط دستگاه اسپکتروفتومتری مدل UV-2100 در طول موج ۴۲۱ نانومتر سنجیده شدند. برای تعیین غلظت متالوتیونین از منحنی استاندارد گلو تاتیون (GSH) استفاده شد.

**سنجش استیل کولین استراز:** آنالیز آنزیم کولین استراز در مغز ماهی براساس روش المن انجام شد (۲۶). بعد از نمونه برداری از ماهی ها، نمونه گرفته شده از مغز ماهی در داخل بشر کوچک از پیش وزن شده ای ریخته و سپس وزن شد. نمونه مغز ابتدا در ۲ میلی لیتر بافر فسفات هموژنیزه گردیده و سپس با مقدار مناسبی بافر فسفات رقیق شده تا مجموعه ای شامل ۲۰ میلی گرم بافت مغزی در هر میلی لیتر بافر تهیه گردید. مخلوط مجدداً هموژنیزه و در نهایت از کاغذ صافی عبور داده شد. این مجموعه بلافاصله به ترتیب زیر در عملیات سنجش به کار برده و به  $2/6$  میلی لیتر بافر فسفات،  $0/4$  میلی لیتر نمونه تهیه شده در بالا اضافه شده و جذب نمونه در دستگاه صفر گردید.  $100$  میکرولیتر واکنشگر DTNB اضافه و جذب نمونه مجدداً در دستگاه صفر و  $60$  میکرولیتر محلول سوپسترا (محلول استیل تیوکولین یداید) اضافه شده و مجموعه به خوبی هم زده شد. بعد از گذشت  $10$  ثانیه، هر  $15$  ثانیه جذب مجموعه در طول موج  $412$  نانومتر قرائت شد. سپس جذب برای تمامی نمونه ها انجام و سرعت واکنش (تغییر در جذب در دقیقه) براساس واحد تغییر در جذب در دقیقه با نقطه گذاری جذب خوانده شده در مقابل زمان محاسبه شد. بر این اساس فعالیت آنزیم با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد (۲۶):

$$R = C/\Delta A \times 574$$

رابطه ۱  
R فعالیت آنزیم (سرعت هیدرولیز سوپسترا)، C غلظت اولیه بافت مغزی مورد استفاده و  $\Delta A$  سرعت واکنش (تغییر در جذب در دقیقه) می باشد و از آن جاکه غلظت اولیه در تمامی طول مطالعه ثابت نگه داشته می شود

جدول ۳: آمار توصیفی پروتئین متالوتیونین در ماهی کپور (میکروگرم بر گرم)

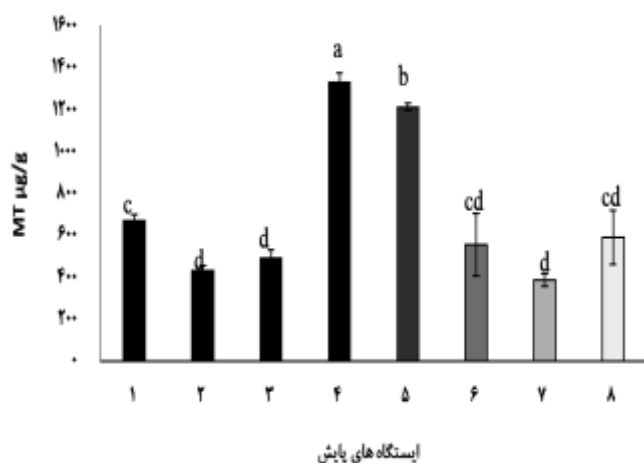
ایستگاه	کمینه	بیشینه	میانگین±انحراف معیار
۱	۶۴۰	۷۰۰	۶۷۰±۳۰
۲	۴۰۵	۴۵۳	۴۲۹±۲۴
۳	۴۵۲	۵۳۰	۴۹۱±۳۹
۴	۱۲۹۰	۱۳۷۴	۱۳۳۲±۴۲
۵	۱۱۹۳	۱۲۳۰	۱۲۱۱/۵±۱۸/۵
۶	۴۰۵	۷۰۴	۵۵۴/۵±۱۴۹/۵
۷	۳۴۹	۴۰۵	۳۸۴/۵±۳۰/۸۷
۸	۴۵۹	۷۲۰	۵۸۹/۵±۱۳۰/۵
میانگین کل			۷۰۷/۷۵±۵۸/۰۵

جدول ۴: آمار توصیفی آنزیم کولین استراز در مغز ماهی کپور (بر حسب میکرومول استیل تیوکولین استراز هیدرولیز شده در دقیقه در هر گرم مغز ماهی)

ایستگاه	کمینه	بیشینه	میانگین±انحراف معیار
۱	۳/۴۵	۳/۶۴	۳/۵۴±۰/۱
۲	۴/۰۲	۴/۲۳	۴/۱۲±۰/۱۱
۳	۳/۱۲	۴/۰۹	۳/۶±۰/۴۹
۴	۱/۳۸	۲/۶۴	۲/۰۱±۰/۶۳
۵	۳/۴۵	۳/۷۱	۳/۵۸±۰/۱۳
۶	۲/۴۲	۴/۱۲	۳/۲۷±۰/۸۵
۷	۳/۲۱	۵/۰۱	۴/۱۱±۰/۹
۸	۲/۳۱	۳/۹۵	۳/۱۳±۰/۸۲
میانگین کل			۳/۴۲±۰/۵

### آمار توصیفی و مقایسه میزان فعالیت آنزیم کولین استراز و پروتئین متالوتیونین در ماهی قزل آلی رنگین کمان

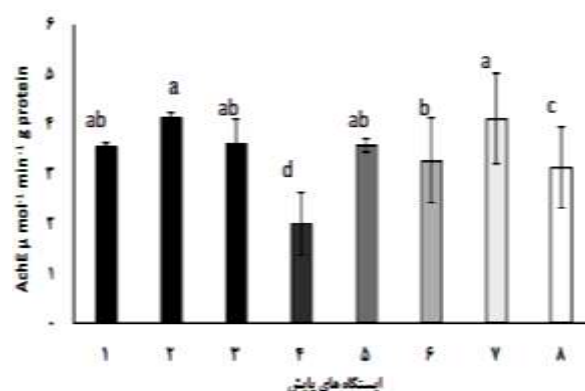
فعالیت آنزیم کولین استراز (AChE): آمار توصیفی مربوط به میزان فعالیت آنزیم کولین استراز (AChE) در مغز ماهی قزل آلی رنگین کمان در جدول ۴ ارائه شده است. براساس نتایج قید شده در جدول ۴، میزان فعالیت آنزیم کولین استراز در مغز ماهی قزل آلی رنگین کمان در محدوده  $0.23-2.74 \mu\text{mol}^{-1} \text{min}^{-1} \text{g protein}$  به دست آمده است. براساس آزمون آماری، میزان فعالیت آنزیم کولین استراز در مغز ماهی قزل آلی رنگین کمان در بین ایستگاه‌های مطالعاتی اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ). بیش‌ترین میزان فعالیت کولین استراز مغز ماهی قزل آلی رنگین کمان با مقدار  $2.54 \pm 0.26$  مربوط به ایستگاه ۴ و کم‌ترین میزان در ایستگاه ۳ به میزان  $0.27 \pm 0.04$  بود.



شکل ۳: سطوح MT مغزی در ماهی کپور در ایستگاه‌های مختلف پایش مقادیر میانگین  $\pm$  SE هستند. حروف متفاوت (a-d) نشان‌دهنده میانگین‌هایی برای هر ایستگاه است که به‌طور قابل توجهی متفاوت است ( $P < 0.05$ )

### میزان پروتئین متالوتیونین (MT): در جدول ۳ آمار توصیفی

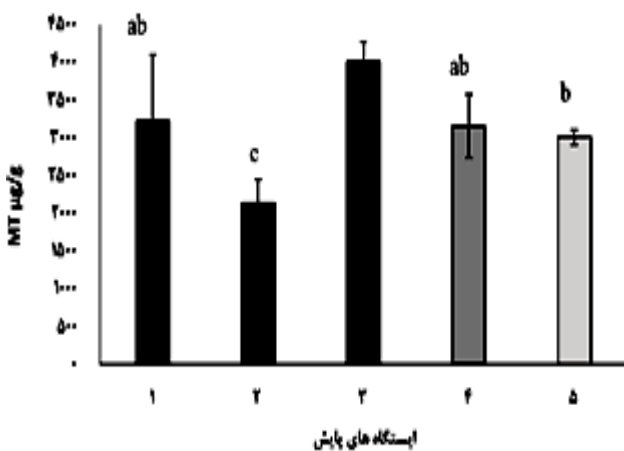
مربوط به میزان پروتئین متالوتیونین (MT) در ماهی کپور ارائه شده است. نتایج ذکر شده بیانگر این است که میزان متالوتیونین ماهی کپور در ایستگاه‌های مورد مطالعه در طول رودخانه گاماسیاب در محدوده ۳۴۹ تا  $1374 \mu\text{g/g}$  متغیر بود. براساس آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA)، میانگین پروتئین متالوتیونین در ماهی کپور در بین ایستگاه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ) (شکل ۳). تفکیک و گروه‌بندی آماری ایستگاه‌ها براساس سطوح پروتئین متالوتیونین در ماهی کپور در شکل ۳ قابل مشاهده است. براساس نتایج ارائه شده ایستگاه‌های ۲، ۳، ۶ و ۸ در گروه مشترک و ایستگاه‌های ۱، ۴، ۵ و ۷ هر یک در گروه‌های مجزا قرار گرفته‌اند. بیش‌ترین غلظت پروتئین متالوتیونین با مقدار  $(\mu\text{g/g})$   $1332 \pm 42$  مربوط به ایستگاه ۴ و کم‌ترین غلظت با مقدار  $(\mu\text{g/g})$   $384.5 \pm 30.87$  مربوط به ایستگاه ۷ بود.



شکل ۴: فعالیت AChE در مغز ماهی کپور در ایستگاه‌های مختلف مقادیر میانگین  $\pm$  SE هستند (حروف متفاوت (a-d) نشان‌دهنده میانگین‌هایی برای هر ایستگاه است که به‌طور قابل توجهی متفاوت است ( $P < 0.05$ ))

جدول ۵: آمار توصیفی پروتئین متالوتیونین در ماهی قزل آلی رنگین کمان (میکروگرم بر گرم)

ایستگاه	کمینه	بیشینه	میانگین $\pm$ انحراف معیار
۱	۲۲۳۴	۳۹۴۷	۳۲۱۸ $\pm$ ۸۸۴/۵
۲	۱۸۳۴	۲۴۵۸	۲۱۳۴/۶۷ $\pm$ ۳۱۲/۶۲
۳	۳۷۲۰	۴۲۳۹	۴۰۰۴/۳ $\pm$ ۲۶۳/۰۴
۴	۲۶۹۰	۳۴۹۵	۳۱۵۸/۳ $\pm$ ۴۱۸/۳۴
۵	۳۰۰۰	۳۰۲۰	۳۰۱۰ $\pm$ ۱۰۰
میانگین کل			۲۵۵۷/۰۶ $\pm$ ۳۰۰/۸۳



شکل ۵: سطوح MT در ماهی قزل آلی رنگین کمان در ایستگاه‌های مختلف پایش

مقادیر میانگین  $\pm$  SE هستند. حروف مختلف (a-c) نشان‌دهنده میانگین‌هایی برای هر ایستگاه است که به‌طور قابل توجهی متفاوت است ( $P < 0.05$ )

#### مقایسه میانگین آنزیم کولین استراز و پروتئین متالوتیونین

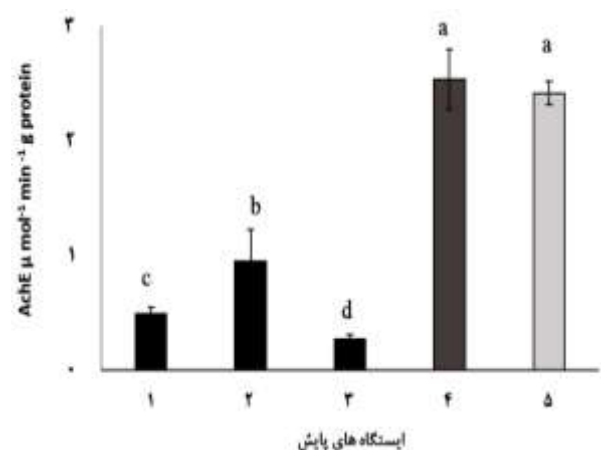
بین دو گونه ماهی کپور و قزل آلی رنگین کمان: مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم کولین استراز و پروتئین متالوتیونین بین دو گونه ماهی کپور و قزل آلی رنگین کمان براساس آزمون تی مستقل نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین ماهی قزل آلی رنگین کمان و ماهی کپور از نظر پارامترهای ذکر شده وجود داشت. نتایج تجزیه و تحلیل آماری حاصل از آزمون تی مستقل جهت مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم کولین استراز و پروتئین متالوتیونین بین دو گونه ماهی در جدول ۶ قابل مشاهده است. هم‌چنین به تفکیک، مقایسه میانگین فعالیت آنزیم کولین استراز (AChE) در بین دو گونه ماهی کپور و قزل آلی رنگین کمان در شکل ۶ و مقایسه میانگین پروتئین متالوتیونین (MT) در بین دو گونه در شکل ۷ ارائه شده است. نتایج حاصل بیانگر این است که اگرچه میزان فعالیت AChE در ماهی کپور بیش‌تر از گونه قزل آلی رنگین کمان بود ولی میزان MT در ماهی قزل آلی رنگین کمان بیش‌تر از کپور بود.

جدول ۴: آمار توصیفی آنزیم کولین استراز در مغز ماهی قزل آلی رنگین کمان (بر حسب میکرومول استیل تیوکولین استراز هیدرولیز شده در دقیقه در هر گرم مغز ماهی)

ایستگاه	کمینه	بیشینه	میانگین $\pm$ انحراف معیار
۱	۰/۴۳	۰/۵۳	۰/۴۹ $\pm$ ۰/۰۶
۲	۰/۶۷	۱/۲۳	۰/۹۵ $\pm$ ۰/۲۸
۳	۰/۲۳	۰/۳۱	۰/۲۷ $\pm$ ۰/۰۴
۴	۲/۲۵	۲/۷۴	۲/۵۴ $\pm$ ۰/۲۶
۵	۲/۳	۲/۵	۲/۴۲ $\pm$ ۰/۱۰۵
میانگین کل			۱/۳۳۴ $\pm$ ۰/۱۴۹

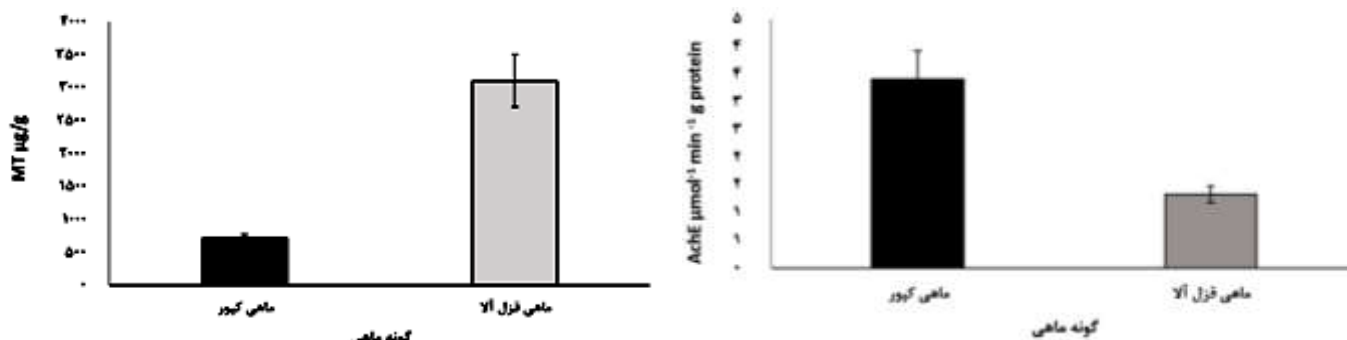
#### میزان پروتئین متالوتیونین (MT): نتایج سنجش میزان

پروتئین متالوتیونین (MT) در ماهی قزل آلی رنگین کمان در جدول ۵ آورده شده است. نتایج ارائه شده در جدول ۵ بیانگر این است که میزان متالوتیونین ماهی قزل آلی رنگین کمان در ایستگاه‌های مورد مطالعه در محدوده ۱۸۳۴ تا ۴۲۳۹  $\mu\text{g/g}$  بود. مقایسه میانگین پروتئین متالوتیونین ماهی قزل آلی رنگین کمان در بین ایستگاه‌های مختلف براساس آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA)، اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ). نتایج حاصل از با استفاده از آزمون تعقیبی دانکن در شکل ۵ قابل مشاهده است که بر اساس نتایج ارائه شده ایستگاه ۲ با تمام ایستگاه‌ها و ایستگاه ۳ با ۵ اختلاف معنی‌داری داشتند، درحالی‌که ایستگاه‌های ۱ و ۴ فقط با ایستگاه ۲ اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. بیش‌ترین میزان پروتئین متالوتیونین با مقدار  $4004 \pm 263$  ( $\mu\text{g/g}$ ) در ایستگاه ۳ و کم‌ترین میزان با مقدار  $2134 \pm 312$  ( $\mu\text{g/g}$ ) مربوط به ایستگاه ۲ بود.



شکل ۴: مقایسه فعالیت AChE در مغز ماهی قزل آلی رنگین کمان در ایستگاه‌های مختلف

مقادیر میانگین  $\pm$  SE هستند. حروف مختلف (a-d) نشان‌دهنده میانگین‌هایی برای هر ایستگاه است که به‌طور قابل توجهی متفاوت است ( $P < 0.05$ )



شکل ۷: مقایسه میانگین پروتئین متالوتیونین (MT) براساس آزمون تی مستقل در بین دو گونه ماهی کپور و قزل آلاب رنگین کمان در رودخانه گاماسیاب

شکل ۶: مقایسه میانگین فعالیت آنزیم کولین استراز (AChE) براساس آزمون تی مستقل در بین دو گونه ماهی کپور و قزل آلاب رنگین کمان در رودخانه گاماسیاب

جدول ۶: مقایسه میانگین فعالیت آنزیم کولین استراز (AChE) و پروتئین متالوتیونین (MT) بین دو گونه ماهی کپور و قزل آلاب رنگین کمان با استفاده از آزمون تی مستقل

پارامتر	فرض	آزمون لون		آزمون برابری میانگین‌ها			
		آماره F	Sig.	اختلاف میانگین	اشتباه استاندارد	حد پایین	فاصله اطمینان حد بالا
AChE	برابری واریانس‌ها	۴/۱۴	۰/۰۴۹	۲/۰۹	۰/۲۹۳	۱/۴۹	۲/۶۸
	نابرابری واریانس‌ها	۶/۷۷	۰/۰۰۲	۲/۰۹	۰/۳۰۸	۱/۴۵	۲/۷۲
MT	برابری واریانس‌ها	۱۰/۸۴	۰/۰۰۲	-۲۳۹۷/۳	۱۷۴/۵	-۲۷۵۰/۹	-۲۰۴۳/۷۵
	نابرابری واریانس‌ها	-۱۱/۸۱	۰/۰۰۲	-۲۳۹۷/۳	۲۰۲/۹	-۲۸۲۳/۶	-۱۹۷۱/۰۱

## بحث

مورد بررسی در طول رودخانه گاماسیاب نتایج نشان داد که ماهی‌های کپور صید شده از ایستگاه ۴ در طول رودخانه در موقعیت ورودی روستای دهنوبه‌طور قابل توجهی کم‌ترین فعالیت AChE ( $2/0 \pm 0/63$ ) را داشتند، که می‌تواند نشان‌دهنده اثراتی باشد که استفاده زیاد از آفت‌کش‌ها بر روی کیفیت رودخانه در این نقطه ایجاد می‌کند. از سوی دیگر این گونه ماهی در دو ایستگاه ۲ و ۷ در موقعیت‌های پل روستای فیازمان و دهفول بیش‌ترین میزان فعالیت AChE را نشان داد (به ترتیب  $4/12 \pm 0/11$ ) و  $4/11 \pm 0/9$ ، که با در نظر گرفتن اثرات این گروه از آلاینده‌ها، می‌توان احتمال داد کم‌ترین میزان ورودی آفت‌کش‌ها در این دو ایستگاه وجود دارد. در خصوص میزان MT نیز که جهت ارزیابی اثرات یون‌های فلزی در بدنه آبی رودخانه استفاده شد، نتایج بررسی میزان MT در گونه کپور در ایستگاه‌های مختلف مورد مطالعه در طول رودخانه نشان داد که بیش‌ترین غلظت پروتئین متالوتیونین با مقدار  $1332 \pm 42$  ( $\mu\text{g/g}$ ) مربوط به ایستگاه ۴ و کم‌ترین غلظت با مقدار  $384/5 \pm 30/87$  ( $\mu\text{g/g}$ ) مربوط به ایستگاه ۷ است. یافته‌های این بخش بیانگر این است که بررسی اثرات آلودگی بر گونه ماهی کپور در ایستگاه‌های مورد مطالعه در هنگام استفاده از

رودخانه گاماسیاب از مهم‌ترین منابع آبی کشور به‌طور بالقوه به دلیل آلودگی و تخریب محیط‌زیست در معرض خطر است که ورود فاضلاب‌های صنعتی و شهری تصفیه نشده و رواناب‌های کشاورزی اثرات منفی روی کیفیت آن دارند و می‌توانند منجر به کاهش تنوع زیستی و مرگ تصادفی آبزیان از قبیل ماهی‌ها گردند. در این مطالعه از رویکرد دو بیومارکر شامل فعالیت AChE و میزان MT استفاده گردید، که با استفاده از پاسخ‌های بیولوژیکی بتوان اثرات انواع مختلف آلاینده‌ها را در محل‌های نمونه‌برداری متمایز کرد. مهار فعالیت AChE به‌عنوان یک نشانگر زیستی از اثر ترکیبات آلی فسفره و کاربامات، آفت‌کش‌هایی که به‌طور گسترده در کشاورزی استفاده می‌شوند، انتخاب گردید (۲۷) که بسته به شرایط محیطی، سهم آفت‌کش‌ها به رودخانه‌ها توسط روان‌آب‌های سطحی ممکن است مرتبط باشد. متالوتیونین (MT) نیز از پروتئین‌های متصل شونده به فلزات هستند که در سم‌زدایی فلزات سنگین نقش دارند و القای آن‌ها به‌عنوان نشانگر زیستی قرار گرفتن در معرض زیاد فلزات سمی، در نظر گرفته شد (۲۸، ۲۹). در خصوص بررسی زیست‌نشانگرها در گونه ماهی کپور در ۸ ایستگاه



که کم‌ترین سطوح در منطقه کشاورزی Paty dos Alferes و در سایت مرجع Silva Jardim یافت شده است. به‌طور کلی در این پژوهش مشابه یافته‌های مطالعه حاضر، نمایه اثرات آلودگی هنگام استفاده از زیست نشانگر MT با آن‌چه در هنگام استفاده از فعالیت AChE به دست آمد متفاوت مشاهده شده است و این مطالعه سودمندی ادغام مجموعه‌ای از نشانگرهای زیستی را برای تعریف اثرات ورودی‌های انسانی در بدنه‌های آبی در شرایط آلودگی پیچیده نشان داده است. در پژوهش دیگری توسط Gabriel و همکاران، غلظت فلزات کمیاب و پروتئین (متالوتیونین و گلوکوتیون کاهش یافته) در بافت کبد و عضله ۵ گونه ماهی از خور Rio Doce، در برزیل، تحت تأثیر رسوب باطله‌های معدن آهن، ناشی از ریزش یک سد در سال ۲۰۱۵، که معمولاً به‌عنوان منابع غذایی توسط جوامع بومی استفاده می‌شوند، بررسی گردیده است (۱۹). نتایج نشان داده است که انباشت زیستی فلزات کمیاب در ماهی با بیوسنتز متالوتیونین و کاهش گلوکوتیون در هر دو بافت کبد و عضله مرتبط بوده است، که بیانگر پاسخ‌های فیزیولوژیکی فعال به منابع آلودگی است. در واقع در این مطالعه، عملکرد آنتی‌اکسیدانی MTs و GSH و همبستگی مثبت آن‌ها با فلزات کمیاب ثابت می‌کند که این زیست نشانگرها می‌توانند برای ارزیابی تأثیر مصب Rio Doce مناسب باشد و بنابراین در طول برنامه‌های پایش از آن‌ها استفاده کرد. Caliani و همکاران، نیز در مطالعه‌ای از نشانگرهای زیستی در گونه ماهی کلیدی *Atherina boyeri* برای آشکار کردن آلودگی بالقوه در بوم‌سازگان آبی شامل دریاچه‌های "Capo Peloro" (جنوب ایتالیا) استفاده نمودند. در این پژوهش با توجه به این‌که هدف شناسایی تغییراتی که پس از فصل تابستان، زمانی که جمعیت انسانی اطراف به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد، بود، دلیل کاهش فعالیت AChE اندازه‌گیری شده در ماه اکتبر را به این صورت عنوان کردند که چون دریاچه فارو در مرکز دهکده فارو که مقصد گردشگری تفریحی در تابستان است، پس افزایش آلودگی دریاچه و در نتیجه کاهش فعالیت AChE را در پی دارد (۱۳). علاوه بر این، وجود گلخانه‌ها برای پرورش گیاهان، گل‌ها، سبزیجات و تاکستان‌هایی که اطراف دریاچه را احاطه کرده‌اند و افزایش کلی فعالیت‌های کشاورزی در طول فصل تابستان می‌تواند عامل این فعالیت بازدارنده باشد که در طول این فصل افزایش می‌یابد. در واقع، در این دوره و با شروع دوره بارانی در اوایل پاییز، حجم فاضلاب و رواناب افزایش می‌یابد و در نتیجه غلظت آفت‌کش‌ها در آب دریاچه افزایش می‌یابد (۳۲). به‌علاوه، در این مطالعه عنوان شد که مهار ۸/۷۶٪ از فعالیت AChE مشاهده شده در نمونه‌های نمونه‌برداری شده در دریاچه Trasimeno در مقایسه با دریاچه Ganzirri، می‌تواند به حضور PAH نیز با توجه به ترافیک قایق‌های توریستی نسبت داده شود، چرا که

به‌عنوان نشانگر زیستی خاص با آن‌چه در هنگام استفاده از فعالیت AChE به‌دست آمد متفاوت بوده است. بررسی دو زیست نشانگر AChE و MT در گونه ماهی دیگر مورد مطالعه (قزل‌آلای رنگین‌کمان) در ۵ ایستگاه نمونه‌برداری در طول رودخانه گاماسیاب نیز نشان داد که بیش‌ترین میزان فعالیت کولین استراز مغز ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با مقدار  $2/54 \pm 0/26$  مربوط به ایستگاه ۴ در موقعیت روستای قلعه قباد و کم‌ترین میزان در ایستگاه ۳ (کیلومتر ۱۰ جاده نورآباد) به‌میزان  $0/04 \pm 0/27$  مشاهده شد. درخصوص بررسی میزان زیست‌نشانگر پروتئین متالوتیونین در این گونه ماهی بیش‌ترین میزان MT با مقدار  $4/04 \pm 2/63$  (μg/g) در ایستگاه ۳ و کم‌ترین میزان با مقدار  $6/62 \pm 1/34$  (μg/g) مربوط به ایستگاه ۲ واقع در کیلومتر ۱۳ جاده نورآباد مشاهده شد. متفاوت بودن میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز و پروتئین متالوتیونین در گونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بین ایستگاه‌های بررسی شده در رودخانه گاماسیاب می‌تواند ناشی از وجود منابع و غلظت‌های متفاوت آلودگی در هر ایستگاه عنوان نمود. مهار قابل توجه فعالیت AChE و افزایش میزان MT در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در ایستگاه ۳ می‌تواند بیانگر این باشد که در این موقعیت با توجه به این‌که طول رودخانه از باغ‌ها و زمین‌های کشاورزی از پایین‌دست شهرنهاد و چندین روستا عبور کرده و فاضلاب‌های خانگی و دامی نیز به آب رودخانه وارد می‌شود، بنابراین با سایر ایستگاه‌ها تفاوت قابل توجهی دارد. مطالعات متعدد صورت گرفته در استفاده از زیست نشانگرها در ماهی جهت پایش زیستی و تأثیر آلودگی در نقاط مختلف بوم‌سازگان‌های آبی یافته‌های مشابه و تأییدکننده را نشان داده‌اند (۳۰، ۳۱). در مطالعه‌ای توسط Linde-Arias و همکاران، از رویکرد چندبیومارکدر ماهی برای ارزیابی تأثیر آلودگی در رودخانه بزرگ برزیل، Paraiba do Sul استفاده کرده‌اند (۱۷). نتایج مطالعه اثرات متفاوتی را در ماهی‌ها از مکان‌های مختلف با درجات مختلف آلودگی نشان داده است. به‌عنوان مثال در محل نمونه‌برداری واقع در Paty dos Alferes، منطقه‌ای با فعالیت‌های کشاورزی قابل توجه و مهم، نتایج مطالعه نشان داده که ماهی‌های صید شده در آن منطقه به‌طور قابل توجهی کم‌ترین فعالیت AChE را داشتند، که نشان‌دهنده اثراتی بوده است که استفاده زیاد از آفت‌کش‌ها بر روی رودخانه ایجاد می‌کند. نتایج قابل توجه دیگر فعالیت کم AChE موجود در ماهی از Barra Mansa، منطقه‌ای که از نظر زیست‌محیطی تخریب شده بود، مشاهده گردیده است. از سوی دیگر، Silva Jardim که در این مطالعه به‌عنوان سایت مرجع و کنترل انتخاب شده، بالاترین میزان فعالیت AChE را نشان داده است. در این پژوهش، سطوح MT ماهی نیز در صنعتی‌ترین و مخرب‌ترین منطقه، یعنی Barra Mansa، بالاترین میزان را داشته است، در حالی

Mukuvisi، زیمبابوه تایید شده است (۳۷). این رودخانه مانند رودخانه‌های Blood و Sand، مخزن پساب فاضلاب است. هم‌چنین گونه *Clarias gariepinus* از رودخانه Mukuvisi در مقایسه با رودخانه Gwebi که هیچ‌گونه پساب فاضلاب دریافت نمی‌کرد، فعالیت AChE پایینی را نشان داده است. Gerber و همکاران، هم‌چنین مهار فعالیت AChE را در *Hydrocynus vittatus* در رودخانه Olifants در آفریقای جنوبی پس از قرار گرفتن در معرض آفت‌کش‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و فلزات سنگین گزارش کرده‌اند (۳۸). در مطالعه حاضر، مقایسه میانگین میزان فعالیت آنزیم کولین استراز و پروتئین متالوتیونین بین دو گونه ماهی کپور و قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی کپور از نظر پارامترهای ذکر شده وجود داشت ( $P < 0.05$ )، که براساس یافته‌ها میزان MT در ماهی قزل‌آلا بیش‌تر از کپور، و میزان فعالیت AChE در ماهی کپور بیش‌تر از گونه قزل‌آلا بود. تفاوت‌های بین گونه‌ای در میزان زیست‌نشانه‌های MT و AChE می‌تواند بیانگر این باشد که گونه‌های ماهی نمونه‌گیری شده در معرض سطوح آلاینده متغیر بوده‌اند. به‌علاوه، بالا بودن میزان MT در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و میزان AChE در ماهی کپور را می‌توان به دلیل اختلاف در منبع تغذیه آن‌ها نسبت داد، مثلاً ماهی قزل‌آلا که یک گونه پرورشی است و به‌صورت دستی تغذیه می‌گردد، پس احتمال آلوده بودن جیره غذایی به فلزات سنگین و در نتیجه افزایش میزان MT را می‌تواند بیان کند، ولی چون ماهی کپور مورد بررسی در مطالعه حاضر غیرپرورشی بوده و رژیم غذایی گیاه‌خواری دارد پس این گونه ماهی می‌تواند تحت تأثیر سموم مورد استفاده در کشاورزی قرار گرفته و با جذب سموم از این طریق منجر به مهار فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در مغز گونه گردد. مطالعاتی در این خصوص انجام شده است که تفاوت این پارامترها بین گونه‌ها به عوامل متعددی نسبت داده شده است. به‌عنوان مثال، در پژوهش Gabriel و همکاران، در خصوص استفاده از زیست‌نشانه‌ها و استرس اکسیداتیو در ۵ گونه ماهی از خور Rio Doce، در برزیل، تحت تأثیر رسوب باطله‌های معدن آهن، تفاوت‌های بین گونه‌های ماهی به واکنش‌های فیزیولوژیکی مختلف و قرار گرفتن در معرض سطوح مختلف آلاینده‌ها نسبت داده شده است. در این مطالعه عنوان گردیده که ماهی‌هایی که در مصب Rio Doce نمونه‌برداری شده‌اند کفزی هستند و از بی‌مهرگان کفزی و سایر منابع غذایی تغذیه می‌کنند، که امکان بلع مستقیم رسوبات آلوده و سایر آلاینده‌ها را فراهم می‌کنند (۳۹). هم‌چنین در این مطالعه بیان گردید که رفتار ماهی ممکن است قرار گرفتن در معرض آلاینده‌های موجود در رسوبات را در طول جستجوی فعال برای غذا در کف افزایش دهد، که منجر به تعلیق مجدد آلاینده‌ها و جذب آن‌ها از طریق آبشش‌ها می‌شود (۴۱، ۴۲).

در مقالات انجام شده نشان داده شده است که PAH هم‌چنین مسئول مهار AChE می‌تواند باشد (۳۳، ۳۴). پژوهش دیگری در این زمینه توسط Pathiratne انجام شده است که از پاسخ‌های نشانگر زیستی ماهی *Oreochromis niloticus* برای شناسایی اثرات بالقوه بیولوژیکی آلودگی در رودخانه Kelani، سریلانکا استفاده کرد (۲). نتایج مطالعه وی نشان داد مهار فعالیت‌های AChE مغز *O. niloticus* در سایت A حوضه رودخانه Kelani، در مقایسه با ماهی‌هایی که در معرض شیر آب قدیمی قرار داشتند به‌طور قابل توجهی بیش‌تر بود. در واقع، در این مطالعه نتایج حاکی از در دسترس بودن عوامل بازدارنده AChE مغز ماهی در سایت A واقع در Maha Ela است که در حال عبور از زمین‌های کشاورزی در این منطقه می‌باشد. در این مطالعه عنوان شد که کاهش سطح AChE در ماهی در معرض ممکن است به‌عنوان سیگنال‌های هشدار دهنده اولیه برای اثرات عصبی احتمالی ناشی از آلاینده‌ها بر روی جمعیت ماهی‌های بومی ساکن در این منطقه در نظر گرفته شود. در مطالعه دیگری، پایش زیستی آلودگی دریایی با استفاده از تعیین فلز و وضعیت بیوشیمیایی ماهیان دریایی توسط Kumar و همکاران، نیز مورد بررسی قرار گرفته است که نتایج مهار قابل توجه آنزیم‌های انتقال‌دهنده عصبی شامل استیل کولین استراز در بافت ماهیچه‌ای و مغز ماهی‌های جمع‌آوری شده از بندرگاه‌های ماهیگیری را نشان داده که به دلیل اختلال در عملکرد سلولی نسبت داده شده است (۱۶). هم‌چنین، این مطالعه نشان داد که ویژگی‌های بیوشیمیایی مانند آنزیم‌های انتقال‌دهنده عصبی و آلودگی فلزی و متالوتیونیدی می‌توانند با موفقیت، حتی در غلظت‌های پایین، به‌عنوان نشانگرهای زیستی قابل اعتماد برای پایش زیستی بوم‌سازگان‌های دریایی آلوده مورد استفاده قرار گیرند. Nephale و همکاران، نیز از زیست‌نشانه‌ها در پایش و ارزیابی وضعیت آلودگی رودخانه‌های شهری Blood و Sand در استان Limpopo، در آفریقای جنوبی استفاده کردند (۱۵). یافته‌ها حاکی از این بود که فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (AChE) در مغز *Clarias gariepinus* از سایت‌های پایین‌دست کم‌تر از سایت‌های بالادست نقاط تخلیه پساب بود و فعالیت AChE به‌طور قابل توجهی در سایت‌های پایین‌دست تصفیه‌خانه‌های فاضلاب مهار شده است. پساب فاضلاب مخلوط پیچیده‌ای از ترکیب ناشناخته است. فرض بر این است که این مخلوط پیچیده حاوی آلاینده‌هایی مانند مواد شوینده، هیدروکربن‌ها و فلزات سنگین است که باعث مهار فعالیت AChE می‌شوند (۳۵). سایر مطالعات مشابه نیز بیانگر این واقعیت هستند. برای نمونه، مهار فعالیت AChE در گونه *Clarias gariepinus* در پاسخ به افزایش آلاینده‌های آلی و فلزات در رودخانه Vaal، آفریقای جنوبی ثبت شده است (۳۶)، یا اثر بخشی AChE به‌عنوان یک نشانگر زیستی هشداردهنده اولیه نیز در رودخانه

ماهی‌های غیرشکارگر دارند که در این جانماینده خانواده‌های Esocidae، Percidae و Lotidae گوشت‌خوار هستند، در حالی که نمایندگان Cyprinidae احتمالاً از بنتوس یا پلانکتون تغذیه می‌کنند (۴۹). هم‌چنین بیان شد که چنین تفاوتی دلایل دیگری غیر از نوع تغذیه را نشان می‌دهد که ممکن است باعث ایجاد فعالیت‌های مختلف AChE مغز شود. فعالیت‌های AChE مغز در گروه‌های مختلف فیلوژنتیکی مهره‌داران از جمله سه گونه ماهی با توانایی حرکتی و تعداد سلول‌های عصبی در بافت مغز مرتبط بود (۵۰، ۵۱). علاوه بر این، Pavan و همکاران، داده‌هایی را ارائه کرد که فعالیت‌های AChE مغز به‌طور مستقیم با ریتم شبانه‌روزی و فعالیت عمومی در مهره‌داران مرتبط است. با این حال، ماهی‌های شکارچی که مورد بررسی قرار گرفت، ماهی‌های کریپسکولار (percsids و pike) یا شبزی (burbot) هستند، در حالی که ماهی‌های کف‌خوار و پلانکتون‌خوار عمدتاً به‌صورت روزانه فعالیت دارند (cyprinids از خانواده کپور). چنین رژیم فعالیت عمومی بیش‌تر با تغذیه و رفتار دفاعی آن‌ها مرتبط است (۵۳). این داده‌ها از این فرضیه حمایت می‌کنند که تفاوت‌های بین گونه‌ای و بین خانواده‌ای در فعالیت AChE مغز در میان ماهی‌ها نیز ممکن است با فعالیت عمومی و توانایی حرکتی آن‌ها مرتبط باشد. با این حال، برای روشن شدن دلایل این تفاوت‌ها، مطالعات ویژه بیش‌تری مورد نیاز است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کاهش سطح فعالیت کولین استراز (AChE) یا افزایش میزان پروتئین متالوتیونین (MT) در گونه‌های ماهی در معرض آلودگی می‌تواند به‌عنوان سیگنال‌های هشدار دهنده اولیه برای پایش اثرات احتمالی ناشی از حضور بلندمدت و هم‌زمان آلاینده‌های آلی و معدنی بر روی جمعیت ماهی‌های بومی ساکن در این رودخانه در نظر گرفته شود. در واقع، سنجش دو بیومارکر مورد استفاده در مطالعه حاضر به‌وضوح تفاوت در بروز تاثیرات فیزیولوژیکی القاء شده و موثر بر سلامت ماهیان در طول رودخانه را بدون سنجش هر نوع آلاینده آلی یا معدنی نشان داد و هم‌چنین اثرات فعالیت‌های انسانی در این بدنه آبی را مشخص کرد. پیشنهاد استفاده از بیومارکرهای اختصاصی در پایش زیستی زیست‌بوم‌های آبی که در معرض ورود طولانی‌مدت و هم‌زمان آلاینده‌های مختلف قرار دارند مهم‌ترین نتیجه حاصل از این مطالعه است. به‌عبارتی رودخانه گاماسیاب به‌دلیل وسعت و پراکندگی کاربری‌های مختلف انسانی در حاشیه آن در معرض مستقیم ورود هم‌زمان آلاینده‌های آلی و معدنی است که این موضوع می‌تواند با ردیابی بیومارکرهای اختصاصی در گونه‌های مناسب (ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و کپور) مدیریت شود و هشدار برای مقامات بهداشت عمومی باشد. این مطالعه در غالب یک پایان‌نامه کارشناسی ارشد انجام شده است و از جمله مهم‌ترین محدودیت‌های این مطالعه هزینه زیاد سنجش زیست‌نشانه‌های اختصاصی است که به‌همین دلیل این مطالعه

در مطالعه مشابهی توسط Pourang و Dennis، در مورد توزیع فلزات در دو گونه ماهی در خلیج فارس نشان داد تفاوت معنی‌دار ( $P < 0.001$ ) بین گونه‌ها در مورد غلظت آلاینده‌ها وجود داشت که در گونه *P. semisulcatus* در مقایسه با *P. merguensis* به‌طور قابل توجهی بالاتر بود و این امر به تنوع ژنتیکی بین دو گونه به‌طور احتمالی ارتباط داده شده است (۴۳). هم‌چنین اشاره گردیده است که تفاوت‌های بین گونه‌ای در تجمع فلزات ممکن است ناشی از عادات تغذیه گونه‌ای خاص باشد زیرا جذب فلزات از طریق غذا نقش مهمی ایفا می‌کند (۴۴). تفاوت در عادات تغذیه ممکن است منجر به این شود که *P. semisulcatus* در معرض مقادیر بیش‌تری از آلاینده‌ها از طریق رژیم غذایی نسبت به *P. merguensis* قرار گیرد (۴۵). به‌علاوه با توجه به این که این دو گونه از دو منطقه مختلف جمع‌آوری شده بودند و بین مناطق نمونه‌برداری از نظر شرایط محیطی از جمله پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب و رسوبات و هم‌چنین منابع آلاینده تفاوت‌های مشخصی وجود دارد (۴۶)، بنابراین این امر می‌تواند منجر به تفاوت در جذب آلاینده‌ها و در نتیجه بیان نشانگرهای زیستی متفاوت گردد. هم‌چنین در این مطالعه اشاره گردیده است که حیوانات کوچک‌تر متابولیسم بالاتری دارند و ممکن است نسبت به حیوانات بزرگ‌تر غذای بیش‌تری به ازای هر گرم وزن بدن بخورند و در نتیجه افزایش جذب آلاینده از غذا در حیوانات کوچک‌تر بیش‌تر گردد. در مطالعه دیگری، Karami و همکاران، در مطالعه‌ای میزان فعالیت AChE در مغز ماهی کپور در انواع دریایی و پرورشی را به‌عنوان شاخصی از سلامت این ماهی‌ها بررسی کرده‌اند. نتایج مطالعه آن‌ها اختلاف قابل توجهی را در میزان فعالیت AChE مغزی در گونه‌های دریایی و پرورشی نشان داد و فعالیت AChE مغزی در ماهی کپور پرورشی با آب رودخانه ۱۲ برابر کم‌تر از نوع دریایی محاسبه شد و آلودگی آب رودخانه با سموم کشاورزی، پساب صنایع و فاضلاب‌های خانگی از عوامل مهار فعالیت آنزیم AChE بیان گردید (۴۷). در پژوهش دیگری در این زمینه توسط Chuiiko و همکاران، فعالیت‌های اختصاصی استیل کولین استراز (AChE) و بوتیریل کولین استراز پلاسما (BChE) مغز و پلاسما در ۱۶ ماهی متعلق به تلوست‌های آب‌شیرین (Freshwater teleosts) متعلق به چهار خانواده Esocidae، Percidae، Cyprinidae و Lotidae مورد سنجش و بررسی قرار گرفته است (۴۸). نتایج مطالعه حاکی از آن است که تفاوت بین خانواده‌ها معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ) و فعالیت AChE به‌طور متوسط به‌شرح زیر کاهش یافته است: Esocidae > Percidae > Cyprinidae > Esocidae > Percidae > Lotidae و خانواده Cyprinidae. فعالیت AChE مغزی بالاتری نسبت به سایر خانواده‌های ماهی داشتند. در این مطالعه عنوان گردید که برخلاف پرندگان، ماهی‌های شکارچی در مطالعه حاضر فعالیت AChE مغز و پلاسما کم‌تری نسبت به

12. **Pundir, C.S. and Malik, A., 2019.** Bio-sensing of organophosphorus pesticides: A review. *Biosensors and Bioelectronics*. 140: 111348.
13. **Caliani, I., Rodríguez, L.P., Casini, S., Granata, A., Zagami, G., Pansera, M., Querci, G. and Minutoli, R., 2019.** Biochemical and genotoxic biomarkers in *Atherina boyeri* to evaluate the status of aquatic ecosystems. *Regional Studies in Marine Science*. 28: 100566.
14. **Severo, E.S., Marins, A.T., Cerezer, C., Costa, D., Nunes, M., Prestes, O.D., Zanella, R. and Loro, V.L., 2020.** Ecological risk of pesticide contamination in a Brazilian river located near a rural area: a study of biomarkers using zebrafish embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 190: 110071.
15. **Nephale, L.E., Moyo, N.A. and Rapatsa, M.M., 2021.** Use of biomarkers in monitoring pollution status of urban rivers, Limpopo, South Africa. *Environmental Science and Pollution Research*. 28(39): 55116-55128.
16. **Kumar, N., Bhushan, S., Gupta, S.K., Kumar, P., Chandan, N.K., Singh, D.K. and Kumar, P., 2021.** Metal determination and biochemical status of marine fishes facilitate the biomonitoring of marine pollution. *Marine Pollution Bulletin*. 170: 112682.
17. **Linde-Arias, A.R., Inácio, A.F., Novo, L.A., de Albuquerque, C. and Moreira, J.C., 2008.** Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. *Environmental Pollution*. 156(3): 974-979.
18. **Jebali, J., Sabbagh, M., Banni, M., Kamel, N., Ben Khedher, S., M'hamdi, N. and Boussetta, H., 2013.** Multiple biomarkers of pollution effects in *Solea solea* fish on the Tunisia coastline. *Environmental Science and Pollution Research*. 20(6): 3812-3821.
19. **Gabriel, F.Â., Hauser-Davis, R.A., Soares, L., Mazzuco, A.C.A., Rocha, R.C.C., Saint Pierre, T.D., Saggiaro, E., Correia, F.V., Ferreira, T.O. and Bernardino, A.F., 2020.** Contamination and oxidative stress biomarkers in estuarine fish following a mine tailing disaster. *Peer J*. 8: e10266.
20. **Tayebi, L. and Sobhan Ardakani, S., 2012.** Measurement of water quality parameters and factors Gamasiab. *Journal of Environmental Science and Technology*. 14(2): 37-49. (In Persian)
21. **Bioukani, S., Amini, Sh. and Sarkhosh, J., 2011.** The Study of Fishes in Gamasiab River of the Kermanshah Province and the Effect of Pollution on Their Dispersion. *Journal of Animal Biology*. 3(4): 15-28. (In Persian)
22. **Karami, M., Mirdar Harijani, J., Gharaei, A. and Pouria, M., 2017.** Assessment of water quality of Gamasiab River using BMWP and ASPT Indices. *Journal of Aquatic Ecology*. 7 (1) :29-38. (In Persian)
23. **Jafari, N., Hafezparast, M. and Farhadi, B., 2022.** Qualitative evaluation of water resources for drinking and agricultural uses (Case study: Gamasiab catchment, Kermanshah province). *Journal of Environmental Science Studies*. 6(2): 3525-3532. (In Persian)
24. **Azimi, A., Safahieh, A., Dadollahi Sohrab, A., Zolgharnein, H., Saffar, B. and Savari, A., 2012.** Assessment of Metallothionein as a Biomarker of Heavy Metal (Hg, Cd, Pb and Cu) in Oyster *Crassostrea gigas* in Imam Khomeini Port. *Journal of Oceanography*. 3(9): 27-39. (In Persian)
25. **Correia, M.I.T.D. and Campos, A.C.L., 2003.** ELAN Cooperative Study. Prevalence of hospital malnutrition in Latin America the multicenter ELAN study. *Nutrition*. 19: 823-825.
26. **Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr, V. and Featherstone, R.M., 1961.** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.

با حداقل تعداد قابل قبول انجام شده است. همچنین عدم بررسی مقادیر متالوتیونین و استیل کولین استراز در سایر گونه‌های شاخص در این رودخانه است و عدم بررسی سایز پاسخ‌های مرتبط آنزیمی در دو گونه مورد مطالعه از جمله محدودیت‌های این مطالعه به‌شمار می‌رود.

## منابع

1. **Pan, B., Yuan, J., Zhang, X., Wang, Z., Chen, J., Lu, J., Yang, W., Li, Z., Zhao, N. and Xu, M., 2016.** A review of ecological restoration techniques in fluvial rivers. *International Journal of Sediment Research*. 31(2): 110-119.
2. **Pathiratne, K.S.R.A., 2018.** Biomarker responses of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to polluted water from Kelani River basin, Sri Lanka: Implications for biomonitoring river pollution. *Sri Lanka J. Aquat. Sci*. 23(1): 105-117.
3. **Dalu, T. and Froneman, P.W., 2016.** Diatom-based water quality monitoring in southern Africa: challenges and future prospects. *Water SA*. 42(4): 551-559.
4. **Colin, N., Porte, C., Fernandes, D., Barata, C., Padrós, F., Carrassón, M., Monroy, M., Cano-Rocabayera, O., De Sostoa, A., Piña, B. and Maceda-Veiga, A., 2016.** Ecological relevance of biomarkers in monitoring studies of macro-invertebrates and fish in Mediterranean rivers. *Science of the Total Environment*. 540: 307-323.
5. **Fent, K., 2004.** Pharmaceuticals in the Environment. *Effects of Pharmaceuticals on Aquatic Organisms*. 175-203.
6. **Ballesteros, M.L., Rivetti, N.G., Morillo, D.O., Bertrand, L., Amé, M.V. and Bistoni, M.A., 2017.** Multi-biomarker responses in fish (*Jenynsia multidentata*) to assess the impact of pollution in rivers with mixtures of environmental contaminants. *Science of the Total Environment*. 595: 711-722.
7. **Vieira, C.E.D., Costa, P.G., Cabrera, L.C., Primel, E.G., Fillmann, G., Bianchini, A. and dos Reis Martinez, C.B., 2017.** A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: Implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. *Science of the Total Environment*. 586: 598-609.
8. **Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E. and Koehler, A., 2007.** The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 146(3): 281-300.
9. **Van der Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, N.P., 2003.** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*. 13(2): 57-149.
10. **Hook, S.E., Gallagher, E.P. and Batley, G.E., 2014.** The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. *Integrated environmental assessment and management*. 10(3): 327-341.
11. **Da Cuna, R.H., Vazquez, G.R., Piol, M.N., Guerrero, N.V., Muggese, M.C. and Nostro, F.L.L., 2011.** Assessment of the acute toxicity of the organochlorine pesticide endosulfan in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74(4): 1065-1073.

- plastic fragments by the Guri Sea catfish *Genidens genidens* (Cuvier, 1829) in a subtropical coastal estuarine system. *Environmental Science and Pollution Research*. 26(8): 8344-8351.
40. **Andrades, R., Guabiroba, H.C., Hora, M.S., Martins, R.F., Rodrigues, V.L., Vilar, C.C., Giarrizzo, T. and Joyeux, J.C., 2020.** Early evidences of niche shifts in estuarine fishes following one of the T world's largest mining dam disasters. *Marine pollution bulletin*. 154: 111073.
  41. **Cline, J.M., East, T.L. and Threlkeld, S.T., 1994.** Fish interactions with the sediment-water interface. In *Nutrient dynamics and biological structure in shallow freshwater and brackish lakes*. Springer, Dordrecht. 301-311.
  42. **Bustamante, P., Bocher, P., Cherel, Y., Miramand, P. and Caurant, F., 2003.** Distribution of trace elements in the tissues of benthic and pelagic fish from the Kerguelen Islands. *Science of the total environment*. 313(1-3): 25-39
  43. **Pourang, N. and Dennis, J.H., 2005.** Distribution of trace elements in tissues of two shrimp species from the Persian Gulf and roles of metallothionein in their redistribution. *Environment International*. 31(3): 325-341.
  44. **Coetzee, L., Du Preez, H.H. and Van Vuren, J.H.J., 2002.** Metal Concentration in *Clarias gariepinus* and *Labeo umbratus* from the Olifants and Klein Olifant River, Mpumalanga, South Africa: Zinc, copper manganese, lead, chromium, nickel, aluminium and iron. Rand Afrikaans University, South Africa. 16 p.
  45. **Mormede, S. and Davies, I.M., 2001.** Trace elements in deep-water fish species from the Rockall Trough. *Fisheries Research*. 51(2-3): 197-206.
  46. **Nikouyan, A., 2003.** Hydrology and hydrobiology of northern part of the Persian Gulf. Iranian Fisheries Research Institute Publication. 128 p.
  47. **Karmi, M., Ebrahimzadeh, M.A. and Masrouf, Y., 2004.** Measurement of cholinesterase enzyme activity in the brain of carp fish in marine and cultured types as an indicator of the health of these fish. *Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences*. 6(3): 23-38. (In Persian)
  48. **Chuiko, G.M., Podgornaya, V.A. and Zhelnin, Y.Y., 2003.** Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in brain and plasma of freshwater teleosts: cross-species and cross-family differences. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 135(1): 55-61.
  49. **Hart, G.J., 1975.** Organophosphorus pesticides: Organic and biological chemistry: M. Eto, CRC Press, Cleveland, OH. 387 p.
  50. **Lindeman, V.F., 1945.** A comparative study of the cholinesterase activity of the vertebrate nervous system, with especial reference to its relationship to motor ability. *American Journal of Physiology-Legacy Content*. 143(5): 687-691.
  51. **Leibson, N.L., 1963.** Brain acetylcholinesterase in phylogenesis of vertebrates. *Doklady Akademii Nauk Sssr*. 153(6): 1435.
  52. **Pavan, K.I., Rajarami, R.G., Vilayakshmi, S. and Sasora, B.K., 1979.** Cyclical acetylcholinesterase activity in diurnal *Calotes memoricola* and nocturnal *Mus boodua*. *Journal of Interdisciplinary Cycle Research*. 10(2): 139-144.
  53. **Manteifel, B.P., 1980.** Ecological Behavior of Animals. Nauka, Moscow. (In Russian)
  27. **Fulton, M.H. and Key, P.B., 2001.** Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. 20(1): 37-45.
  28. **Jebali, J., Banni, M., Gerbej, H., Boussetta, H., López Barea, J. and Alhama, J., 2008.** Metallothionein induction by Cu, Cd and Hg in *Dicentrarchus labrax* liver: assessment by RP-HPLC with fluorescence detection and spectrophotometry. *Marine Environmental Research*. 65(4): 358-363.
  29. **Ghedira, J., Jebali, J., Bouraoui, Z., Banni, M., Chouba, L. and Boussetta, H., 2009.** Acute effects of chlorpyrifos-ethyl and secondary treated effluents on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in *Carcinus maenas*. *Journal of Environmental Sciences*. 21(10): 1467-1472.
  30. **Sayed Hassani, M.H., Sajjadi, M.M., Falahatkar, B., Ayoub, Y.j., Monsef Shokri, M., Alipour Jprshari, A.R. and Yganeh, H., 2022.** The effect of replacing fish meal with plant and animal composition on growth indices, hematology and hepatic enzymes of *Huso huso*. *Journal of Animal Environment*. 14(1): 169-178. (In Persian)
  31. **Aliyazdi, M., Sadeghi, P. and Attaran Fariman, G., 2022.** Investigation of the relationship between heavy metals (Lead, Nickel, Cadmium) bioaccumulation and levels of catalase and superoxide dismutase enzymes in the tissue of rocky oyster (*Saccostrea cucullata*) of the Oman Sea. *Journal of Animal Environment*. 14(1): 311-320. (In Persian)
  32. **Rodriguez-Cea, A., Arias, A.L., de la Campa, M.F., Moreira, J.C. and Sanz-Medel, A., 2006.** Metal speciation of metallothionein in White Sea catfish, *Netuma barba*, and pearl cichlid, *Geophagus brasiliensis*, by orthogonal liquid chromatography coupled to ICP-MS detection. *Talanta*. 69(4): 963-969.
  33. **Lionetto, M.G., Caricato, R., Calisi, A., Giordano, M.E. and Schettino, T., 2013.** Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. *BioMed research international*. 321213.
  34. **Froment, J., Langford, K., Tollefsen, K.E., Bråte, I.L.N., Brooks, S.J. and Thomas, K.V., 2016.** Identification of petrogenic produced water components as acetylcholine esterase inhibitors. *Environmental Pollution*. 215: 18-26.
  35. **Lionetto, M.G., Caricato, R. and Giordano, M.E., 2019.** Pollution biomarkers in environmental and human biomonitoring. *The Open Biomarkers Journal*. 9(1).
  36. **Connell, L.J., Jansen van Rensburg, G.R., Avenant Oldewage, A. and Greenfield, R., 2020.** Biomarker responses in African sharp-tooth catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), as indicators of potential metal and organic pollution along the Vaal River system, South Africa. *African Journal of Aquatic Science*. 45(3): 317-328.
  37. **Moyo, N.A.G. and Rapatsa, M.M., 2016.** Impact of urbanization on the ecology of Mukuvisi River, Harare, Zimbabwe. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*. 92: 14-19.
  38. **Gerber, R., Smit, N.J., van Vuren, J.H., Ikenaka, Y. and Wepener, V., 2018.** Biomarkers in tigerfish (*Hydrocynus vittatus*) as indicators of metal and organic pollution in ecologically sensitive subtropical rivers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 157: 307-317.
  39. **Dantas, D.V., Ribeiro, C.L., Frischknecht, C.D.C., Machado, R. and Farias, E.G., 2019.** Ingestion of