

## بررسی اثر آلودگی کلرید سرب بر مراحل تکوین جنین گونه‌ی زینتی آنجل ماهی (*Pterophyllum scalar*)

سارا شکری<sup>۱</sup>، مهر انگیز صدوقی<sup>۲</sup>، همایون حسین زاده<sup>۳</sup>

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی، تهران، ایران.

۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، استاد دانشکده علوم زیستی، تهران، ایران. mehrengizsadooghi@yahoo.com

۳- عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات شیلات ایران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۱۵

### چکیده

زمینه و هدف: امروزه با دخالت صنعتی بشر میزان فلزات سنگین در محیط افزایش یافته و موجبات صدمه به محیط زیست را فراهم می کند. هدف از این تحقیق بررسی اثر آلودگی کلرید سرب بر مراحل تکوین جنین گونه‌ی زینتی آنجل ماهی (*Pterophyllum scalar*) است.

روش کار: بدین منظور پس از انتخاب ۵ جفت ماهی آنجل و لقاح و تهیه تخم ماهی، در مرحله اول پژوهش برای تعیین غلظت سمیت حاد  $LC_{50}$  کلرید سرب، ۴ غلظت  $6, 10, 20$  و  $40 \mu g/L$  و شاهد انتخاب و برای هر غلظت در ۳ تکرار نمونه برداری انجام شد. مدت نمونه برداری برای هر غلظت در هر تکرار ۹۶ ساعت در نظر گرفته شد و در نهایت در هر تکرار تعداد جنین های تلف شده (سفید شده) شمارش گردید. در مرحله دوم پژوهش اثر تغییرات حاصل از سمیت کلرید سرب بر مراحل تکوین جنین ماهی آنجل بر اساس طول جنین مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور ۴ غلظت کمتر از  $LC_{50}$  انتخاب و در ۳ تکرار نمونه برداری صورت گرفت. یافته ها: نتایج نشان داد که غلظت سمیت حاد در مطالعه حاضر برابر  $6 \mu g/L$  بود. هم چنین افزایش غلظت کلرید سرب سبب تاخیر در طول رشد جنین به نسبت نمونه شاهد گردید. در واقع کلرید سرب، باعث تاخیر در زمان رشد در جنین ماهی شد. این تاخیر با افزایش غلظت های تحت تیمار، افزایش یافت. نتایج نشان داد که در ساعت ۲۰ بعد از لقاح بین تیمارها اختلاف معنی داری وجود دارد. واژه های کلیدی: سرب، جنین ماهی، ماهی آنجل.

### مقدمه

پایین دست بر جا می گذارد، به گونه ای که کلیه مصرف کنندگان اعم از انسان، حیوانات و صنایع، در معرض خطر زیست محیطی قرار می گیرند (۶). هم چنین تأمین آب سالم و بهداشتی و حفاظت منابع از آلودگی، یکی از دغدغه های کنونی دولت و مراکز تصمیم گیری است. لذا لزوم جلوگیری از تخریب منابع آبی و آب های روان سطحی، با شناسایی، اندازه گیری آلاینده ها و وضع و اجرای قوانین بیش از پیش اهمیت پیدا می کند (۹). فاکتورهای متعددی وجود دارند که در جذب سرب و هم چنین میزان سمیت آن در ماهی ها تاثیرگذار هستند. بعضی از این عوامل عبارتند از اشکال آزاد، آلی و غیر آلی سرب، درجه حرارت آب، سختی آب و شوری آب

در ابتدای رشد جوامع کوچک، پسماندها و پساب های شهری، صنعتی، تولیدی و خدماتی به داخل رودخانه ها تخلیه می شد و حتی تصور بر این بود که این پسماندها غذای ماهیان و موجودات آبی شده و موجب رشد و نمو می گردد (۳). در کشورهای در حال توسعه، عدم اجرای درست و نظارت صحیح قوانین و رشد نامتمرکز صنعت، باعث شده است که منابع آبی به ویژه رودخانه ها، هر روز آلوده تر از گذشته گردند (۷). آب های روان سطحی و آب های زیر زمینی به دلیل استفاده های گسترده انسانی و صنعتی از آن ها، از اهمیت زیست محیطی بالایی برخوردارند. هر گونه آلودگی آب های روان سطحی در بالادست، تأثیرات نامطلوب زیادی در

می باشد (۱۵). آبخش‌ها، پوست و لوله‌ی گوارشی محل- های جذب سرب می‌باشند (۵). سرب می‌تواند در اندام- های داخلی پخش شود و برای دفع، مجدداً به کبد و کلیه بازگشته و با مکانیسم ترشح دفع گردد. برای نقل و انتقال فلزات ضروری راه‌های اختصاصی و حامل‌های مخصوص وجود دارد. در حالی که جذب فلزات مسمومیت‌زا و غیر ضروری مانند سرب راه اختصاصی نداشته و مشابه فلزات ضروری صورت می‌گیرد (۱۳). این انتقال در ماهی از طریق کانال‌های کلسیمی آبخش در سایر اندام‌های داخلی و پخش آن در اندام‌ها توسط دستگاه گردش خون صورت می‌گیرد. سلول‌های خونی و پروتئین‌های پلاسما در انتقال سرب نقش اساسی دارند (۲۰، ۱۷). ماهیانی که به طور مکرر در معرض غلظت- های سمی سرب قرار می‌گیرند نشانه‌هایی متنوع از مسمومیت با سرب را نشان می‌دهند. این نشانه‌ها عبارتند از انحنای ستون مهره‌ها، کاهش قدرت و توانایی شنا کردن، آتروفی عضلات، کاهش رشد و افزایش غلظت سرب در خون، استخوان، کبد، کلیه و کاهش میزان گلیکوژن در کبد، کلیه، مغز و عضلات. (۱۱، ۸، ۱). با توجه به اهمیت سلامتی در رشد ماهیان، مخصوصاً ماهیان زینتی، از جمله گونه زینتی ماهی انجل ( *Pterophyllum scalare* ) که به زبان عامه آنجل خوانده می‌شود، مراحل تکوین جنینی به سرعت انجام می‌شود، بنابراین در این تحقیق تاثیر آلاینده بر روند اندام زایی و درصد ناهنجاری در دوره‌های مختلف مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

### مواد و روش‌ها

تخم ماهی از کارگاه پرورش ماهی واقع در ۱۰ کیلومتری اطراف مشهد از چند جفت ماهی بالغ که به صورت تصادفی جفت‌گیری کرده بودند تهیه گردید. نمونه‌های اخذ شده برای انجام کار آزمایشگاهی به آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران-شمال منتقل و

مطالعات میکروسکوپی به منظور بررسی اثرات زیر صورت پذیرفت. جهت تعیین غلظت سمیت حاد (LC50)، چهار غلظت ۶، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر لیتر و شاهد انتخاب گردید (۱۶). سپس از ۵ جفت ماهی آنجل تعداد ۱۵۰ عدد تخم گرفته شد که به ۱۵ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند و برای هر غلظت، ۳ تکرار در نظر گرفته و در نهایت تعداد جنین‌های تلف شده شمارش گردید (۴).

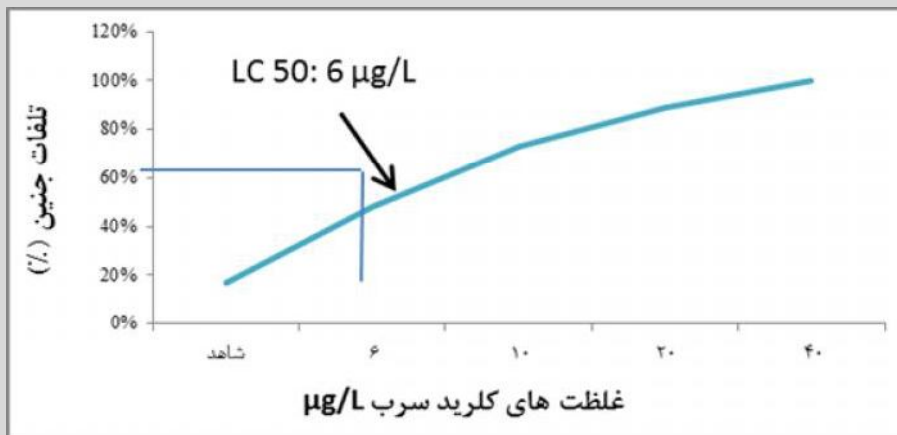
بعد از تعیین غلظت سمیت حاد برای تعیین اثر کلرید سرب بر مراحل ارگانوژنز و روند رشد جنین و مقایسه طول جنین در ساعت‌های مشخص شده و تمایز کلیه اقدام شد. بدین منظور ابتدا ۴ غلظت که کمتر از غلظت سمیت حاد بود با مقادیر ۰/۵، ۱/۵، ۳ و ۴/۵ میکروگرم بر لیتر تهیه و از ۵ جفت ماهی تعداد ۱۲۰ عدد تخم گرفته شد. تخم‌ها در ۱۲ ظرف شیشه‌ای به تعداد ۱۰ تخم (برای هر غلظت سه تکرار) در هر ظرف تقسیم شدند. فواصل زمانی برداشت نمونه از ساعت ۲۰ بعد از لقاح به فواصل زمانی هر ۶ ساعت یک بار انجام گردید. برای انجام تحقیق در تمامی طول مطالعه هوادهی و ضدعفونی محیط انجام آزمایش صورت گرفت. هم‌چنین در هر نمونه‌گیری تخم‌ها به صورت تصادفی انتخاب شدند.

### تحلیل آماری

برای تعیین تاثیر غلظت‌های مختلف بر طول رشد جنین از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه و برای تعیین میزان تفاوت بین غلظت‌های مختلف از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. برای مقایسه هر غلظت در ساعت‌های مختلف نمونه‌برداری و تاثیر آن بر تغییرات طول رشد نیز از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه استفاده شد. کلیه تجزیه و تحلیل‌ها توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ صورت گرفت. جهت تعیین تاثیر سمیت کلرید سرب بر مراحل تکوین جنین، طول جنین از نرم افزار Axio vision استفاده شد.

**نتایج**

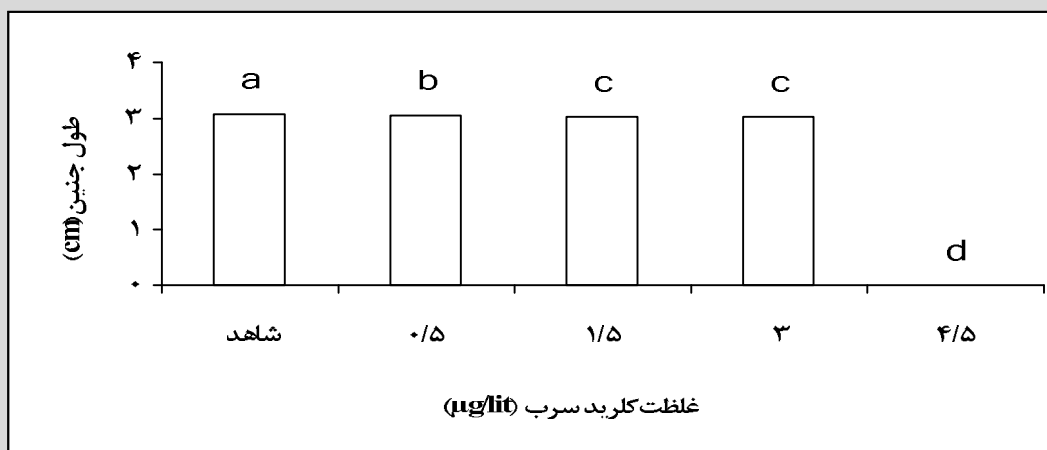
غلظت کشنده کلرید سرب برای ماهی آنجل حدود غلظت ۶ میکرو گرم بر لیتر محاسبه گردید (نمودار ۱).



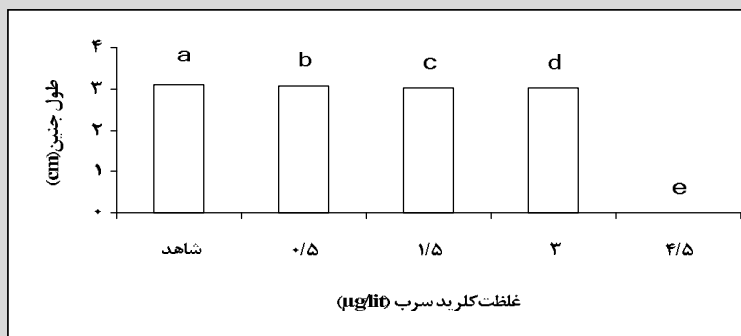
نمودار ۱- تعیین غلظت سمیت حاد کلرید سرب بر جنین ماهی آنجل

اختلاف معنی داری وجود داشت. نتایج آزمون دانکن نیز این مهم را تایید می کند (نمودار ۲-۱۰). در ساعت ۳۲ در غلظت ۴/۵ میکروگرم بر لیتر در جنین رشد مشاهده شد. در ساعت ۴۸ در تیمار غلظت ۴/۵ تمامی جنین ها در اثر غلظت بالای کلرید سرب تلف شدند. تمامی جنین ها از ساعت ۵۶ تا ۶۸ در تیمار غلظت های ۴/۵ و ۳ در اثر غلظت بالای کلرید سرب تلف شدند.

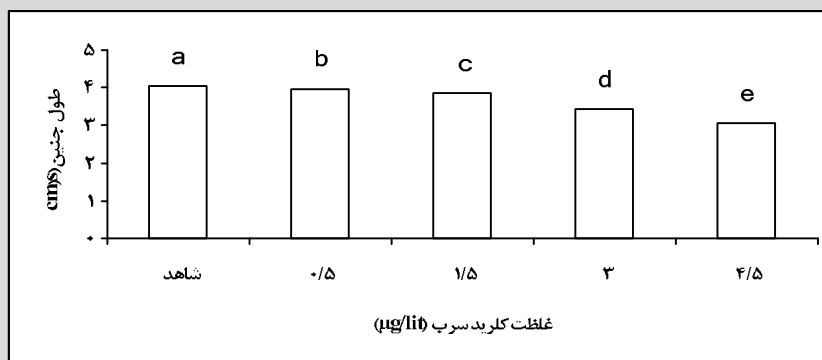
نتایج این تحقیق نشان داد که کلرید سرب، باعث تاخیر در زمان رشد در جنین ماهی مذکور گردیده است. این تاخیر با افزایش غلظت های تحت تیمار، افزایش یافت. تاخیر ایجاد شده در زمان رشد را می توان با کمک شکل های که بر اساس اندازه ی طول جنین رسم شده اند نیز مقایسه نمود. نتایج نشان داد که در ساعت ۲۰، ۲۶، ۳۲، ۳۸، ۴۴، ۵۰، ۵۶، ۶۲، ۶۸ بعد از لقاح بین تیمارها



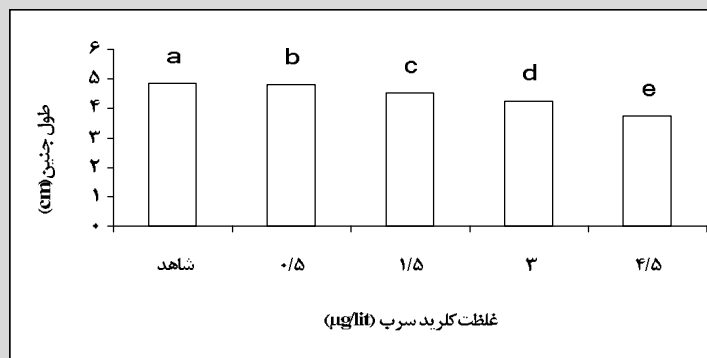
نمودار ۲- تغییرات طول جنین در غلظت های مختلف کلرید سرب در ۲۰ ساعت بعد از لقاح (اعداد لاتین نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف است)



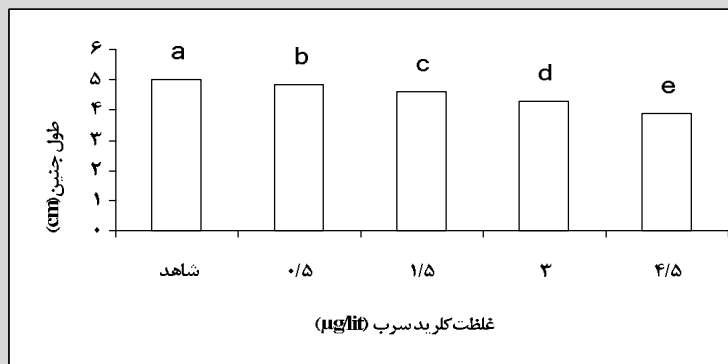
نمودار ۳ - تغییرات طول جنین در غلظت‌های مختلف کلرید سرب در ساعت ۲۶ بعد از لقاح (اعداد لاتین نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف است)



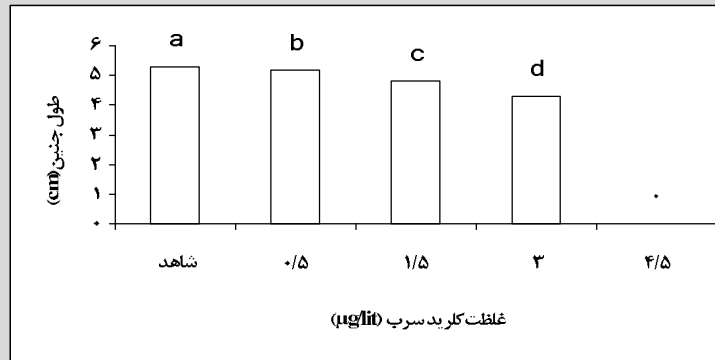
نمودار ۴ - تغییرات طول جنین در غلظت‌های مختلف کلرید سرب در ساعت ۳۲ بعد از لقاح (اعداد لاتین نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف است)



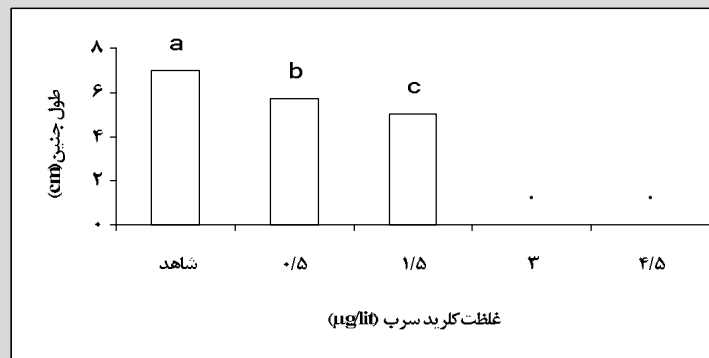
نمودار ۵ - تغییرات طول جنین در غلظت‌های مختلف کلرید سرب در ساعت ۳۸ بعد از لقاح (اعداد لاتین نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف است)



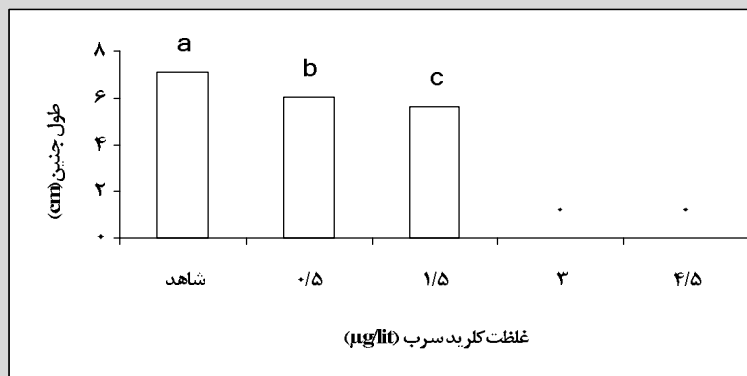
نمودار ۶ - تغییرات طول جنین در غلظت‌های مختلف کلرید سرب در ساعت ۴۴ بعد از لقاح (اعداد لاتین نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف است)



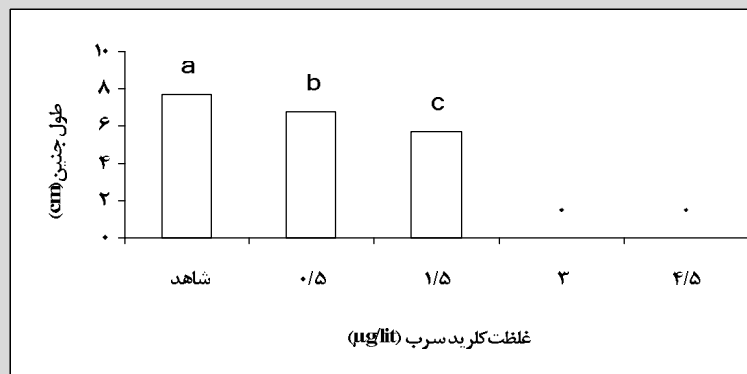
نمودار ۷- تغییرات طول جنین در غلظت های مختلف کلرید سرب در ساعت ۵۰ بعد از لقاح (اعداد لاتین نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف است).



نمودار ۸- تغییرات طول جنین در غلظت های مختلف کلرید سرب در ساعت ۵۶ بعد از لقاح (اعداد لاتین نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف است)



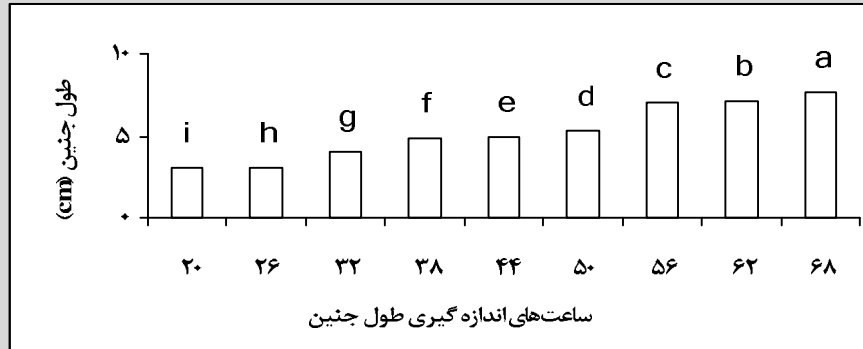
نمودار ۹- تغییرات طول جنین در غلظت های مختلف کلرید سرب در ساعت ۶۲ بعد از لقاح (اعداد لاتین نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف است)



نمودار ۱۰- تغییرات طول جنین در غلظت های مختلف کلرید سرب در ساعت ۶۸ بعد از لقاح (اعداد لاتین نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف است)

شود اندازه جنین نیز بیشتر شد و نتایج آزمون دانکن هم نشان دهنده اختلاف طول جنین بین ساعات اندازه گیری شده است (نمودار ۱۱).

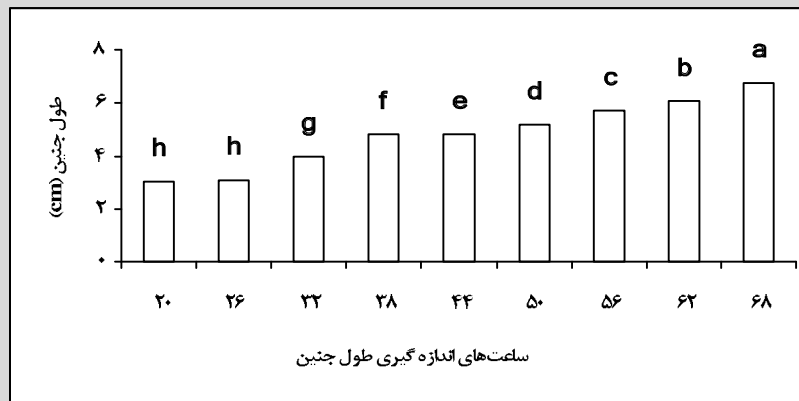
هم چنین نتایج نشان داد که طول اندازه گیری جنین در ساعات مختلف در تیمار شاهد نیز دارای اختلاف معنی- دار بود به طوری که هر چه طول دوره جنینی بیشتر می-



نمودار ۱۱- نمودار تغییرات طول جنین در ساعات مختلف اندازه گیری شده برای تیمار شاهد (اعداد لاتین نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف است).

نداشت اما در ادامه هر چه طول دوره جنینی بیشتر می- شود اندازه جنین نیز بیشتر شد و نتایج آزمون دانکن هم نشان دهنده اختلاف طول جنین بین ساعات اندازه گیری شده است (نمودار ۱۲).

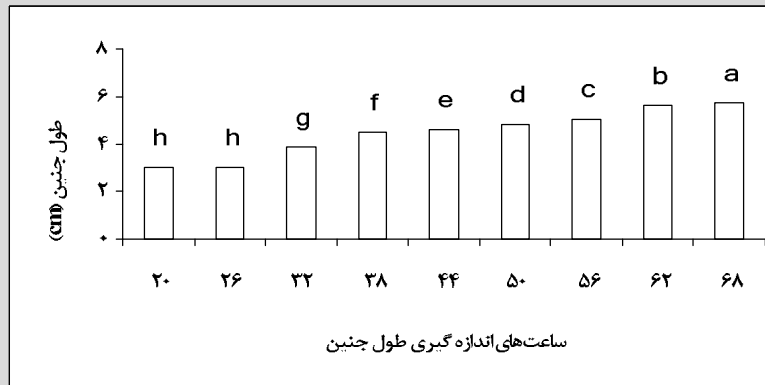
هم چنین طول اندازه گیری جنین در ساعات مختلف در تیمار غلظت ۰/۵ میکروگرم بر لیتر کلرید سرب دارای اختلاف معنی دار است به طوری که در ساعات اولیه یعنی بین ۲۰ و ۲۶ ساعت اختلاف معنی داری وجود



نمودار ۱۲- نمودار تغییرات طول جنین در ساعات مختلف اندازه گیری شده برای غلظت ۰/۵ میکروگرم بر لیتر کلرید سرب (اعداد لاتین نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف است).

اما در ادامه هر چه طول دوره جنینی بیشتر می شود اندازه جنین نیز بیشتر شد و نتایج آزمون دانکن هم نشان دهنده اختلاف طول جنین بین ساعات اندازه گیری شده است (نمودار ۱۳).

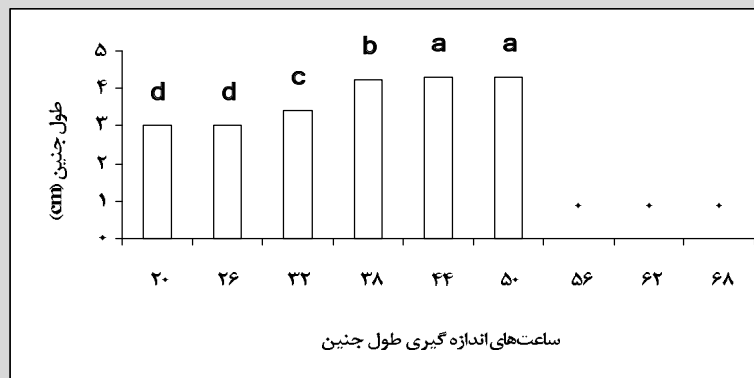
نتایج طول اندازه گیری جنین در ساعات مختلف در تیمار غلظت ۱/۵ میکروگرم بر لیتر کلرید سرب دارای اختلاف معنی دار است به طوری که در ساعات اولیه یعنی بین ۲۰ و ۲۶ ساعت اختلاف معنی داری وجود نداشت



نمودار ۱۳- نمودار تغییرات طول جنین در ساعات مختلف اندازه گیری شده برای غلظت ۱/۵ میکروگرم بر لیتر کلرید سرب (اعداد لاتین نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف است).

تدریج مشاهده شد که جنین‌ها توانایی زنده ماندن خود را از دست داده و نهایتاً در ساعات بالاتر تلافات ۱۰۰ درصد در این غلظت را داشتیم که نشان دهنده سمیت بالای این غلظت است (نمودار ۱۴).

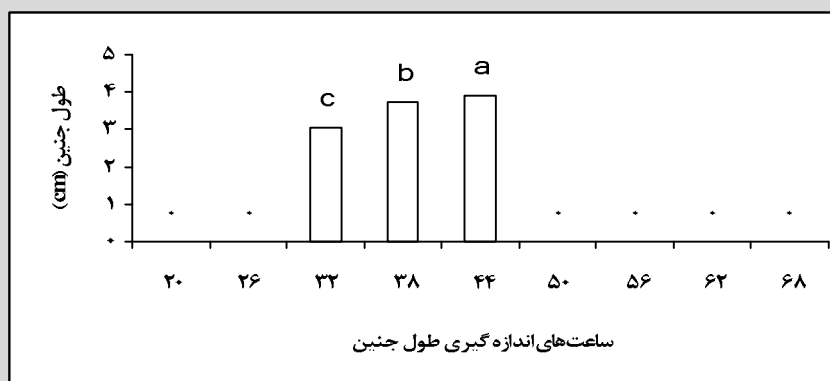
نتایج بررسی طول جنین در طی ساعات مختلف در غلظت ۳ میکروگرم بر لیتر کلرید سرب نشان داد که بین ساعت ۲۰ و ۲۶ اختلاف معنی دار نیست از طرفی بین ساعت ۴۰ و ۵۵ نیز اختلاف و معنی دار نبوده و به



نمودار ۱۴- نمودار تغییرات طول جنین در ساعات مختلف اندازه گیری شده برای غلظت ۳ میکروگرم بر لیتر کلرید سرب (اعداد لاتین نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف است).

ساعت ۳۲ شروع به رشد کند و از طرفی میزان سمیت به حدی بالا بود که سبب شد تا جنین نتواند طول دوره رشد خود را کامل کند و تمامی نمونه‌ها از بین رفتند (نمودار ۱۵).

هم چنین نتایج بررسی طول جنین در طی ساعات مختلف در غلظت ۴/۵ میکروگرم بر لیتر کلرید سرب نشان داد که سمیت بالای این غلظت سبب به تاخیر افتادن رشد جنین شود بطوری که رشد جنین بر خلاف تیمار شاهد از



نمودار ۱۵- نمودار تغییرات طول جنین در ساعات مختلف اندازه‌گیری شده برای غلظت ۴/۵ میکروگرم بر لیتر کلرید سرب (اعداد لاتین نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف است).

### بحث و نتیجه گیری

است که کبالت به صورت محلول در آب و در دسترس موجودات زنده قرار دارد. حداکثر غلظت مجاز کبالت برای جنین‌های ذکر شده بعد از تعیین  $LC_{50}$  ۱۰۰ در نظر گرفته شد (۲). به طور کلی بررسی مقایسه غلظت‌های مختلف کلرید سرب در ساعات مشخص باهم نشان داد که در تمامی ساعات مورد مطالعه با افزایش غلظت از میزان رشد طولی جنین به طور معنی داری کاسته شد و تمامی تیمارها نیز با تیمار شاهد دارای اختلاف معنی دار بودند. هرچند در غلظت‌های پایین مرحله رشد جنینی به پایان رسید اما سرعت و میزان رشد جنین در مقایسه با تیمار شاهد کمتر بوده و در واقع ما شاهد تاخیر در زمان رشد جنین ماهی آنجل شده که می‌تواند در اثر تغییرات غلظت کلرید سرب باشد. محققانی مانند Dave و Xios (۲۰۰۶) نیز به نتایج مشابهی دست یافته و افزایش فلزات سنگین را از عوامل تاخیر در زمان رشد جنین ماهی معرفی کرده‌اند (۱۰). بررسی نتایج نشان داد که به طور کلی افزایش غلظت کلرید سرب سبب کاهش رشد جنین خواهد شد. مقایسه تیمارهای مختلف کلرید سرب در ساعات مختلف اندازه‌گیری طول جنین نیز موید این مطلب است به طوری که مشاهده می‌شود در غلظت‌های بالای کلرید سرب به طور کلی رشد جنین بعد از گذشت ساعات مشخص متوقف و سمیت در حدی بالا بوده که در نهایت سبب مرگ تمامی جنین‌ها می‌شود. این مهم را به راحتی می‌توان در مقایسه‌ی نمودار ساعات مختلف

مقدار  $LC_{50}$  معیار مفیدی برای سمیت حاد بوده، لیکن بیانگر مقادیری که در زیستگاه‌های آبی، بی‌خطر یا کم‌خطر وجود دارد، نیست. مقدار مواد زائدی که تا ۹۶ ساعت سمی نیستند، ممکن است در دوره‌های زمانی بیشتر که در داخل آب بمانند، سمی شوند. بنابراین،  $LC_{50}$  ۹۶ ساعته ممکن است فقط دربخشی از سمی بودن طولانی مدت دیده شود (۱۹). Schmitt (۲۰۰۵) گزارش داد که سرب در غلظت ۱ میلی‌گرم بر لیتر بر روی طول عمر جنین در مقایسه با شاهد تاثیر به‌سزایی دارد (۱۸). گزارش‌های دیگر حاکی از آن است که در غلظت ۰/۴۸ میلی‌گرم بر لیتر از سرب موفقیت در هیچ‌شدن *Brachydnio rerio* کاهش یافته و در غلظت ۰/۹۸ میلی‌گرم بر لیتر تمام جنین‌ها در این گونه‌ی ماهی مردند (۱۰). داده‌های حاصل از بررسی تحقیقات دیگر دانشمندان نشان داد آلودگی با فلزات سنگین از جمله سرب بر بقای عمر جنین تاثیر گذار بوده است (۱۴). بررسی مقدار سمی بودن کبالت به دو صورت حاد و مزمن با استفاده از دو گونه *Eriodaphnia dubia* و *Pimephales scalare* و چهارنوع آب با سختی ۲۰۰، ۵۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر کربنات کلسیم صورت گرفت. سختی کم آب تأثیری بر روی غلظت اندازه‌گیری شده کبالت نداشت. مقدار کبالت محلول در آب، در نمونه‌های مورد بررسی در حقیقت بیانگر این مطلب



مورد تیمار قرار دادن جنین *Fondulus heteroclitus* به میزان ۱ میلی گرم برلیتر از سرب تنها ۲۰٪ جنین ها به صورت نرمال هچ شده اند، در صورتی که ۴۰٪ از آن ها تاخیر در رشد را نشان داده و ۴۰٪ دیگر هنوز بر روی تخم خوابیده اند. موارد ذکر شده نشان می دهد سرب تاثیری تاخیری بر رویه ی رشد در جنین ماهی ذکر شده داشته و هچ شدن را به تاخیر می اندازد (۲۱). این میزان ناهنجاری در جنین ماهی *Fondulus heteroclitus* در مقایسه با ماهی مورد آزمایش در این پژوهش *Pterophyllum scalare* خاطر نشان می کند که به علت اختلافات بین گونه ای حاضر بین ۲ گونه ی ذکر شده و تفاوت سمیت بین سرب و کلرید سرب، ناهنجاری های ذکر شده برای ماهی *Fondulus heteroclitus* در ماهی آنجل مشاهده نگردید. تنها می توان به تاخیر در زمان رشد بر اثر کلرید سرب بر ماهی *Pterophyllum scalare* اشاره کرد که همانند تاثیر سرب بر ماهی *Fondulus heteroclitus* بوده است.

غلظت های ۳ و ۴/۵ میکروگرم بر لیتر مشاهده نمود. فلاور و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۱ اثری مشابه از سرب بر روی کلیه ی ماهی مشاهده نمودند (۱۱). بررسی تغییرات غلظت کلرید سرب در غلظت ۴/۵ میکروگرم بر لیتر نشان داد که میزان سمیت در این مرحله تا حدی بالا بود که سبب شد تا مراحل تکوین جنین سلولی به تعویق بیفتد به طوری که افزایش طول جنین در غلظت ذکر شده از ساعت ۳۲ بعد از لقاح شروع شد. از طرفی میزان بالای سمیت کلرید سرب سبب آسیب به جنین ها شد به طوری که بعد از ۴۴ ساعت بعد از لقاح جنین ها از بین رفتند. تحقیقات Dave در سال ۲۰۰۶ نیز نشان داده که زمان هچ شدن تخم های ماهی زبرا (*Zebra fish*) در غلظت کمتر از ۲/۳ میکروگرم بر لیتر سرب تاخیر بسیار کمی را نشان می دهد. البته مورد یاد آوری شده دلیل واضحی را از اثر سرب بر تاخیر در زمان تکامل جنینی بیان نمی کند (۱۰). این تاخیر را می توان به تاثیر سرب بر روی کاهش فعالیت آنزیم هضم کننده پوسته ی تخم نیز نسبت داد (۱۲). گزارش دیگر حاکی از آن است که

### منابع

- ۱- اسماعیلی، س. (۱۳۸۱). آلاینده ها، بهداشت و استاندارد در محیط زیست. انتشارات نقش مهر. ۲۳-۲۷.
- ۲- بدرافشان، ا.، امین نژاد، بیژن،، حاجی پور فرد، حسن. (۱۳۸۷). بررسی فلزات سنگین در آب. ۱(۴۰): ۱۴۶-۱۴۹.
- ۳- زاهد محمد علی (مترجم)، دشتکی زینب (مترجم). (۱۳۷۹). آلودگی دریا. رابرت بی کلارک (نویسنده). انتشارات فسق و نقش. ۱(۲): ۳۵.
- ۴- واریدی، س. (۱۳۷۶). بررسی و تعیین میزان فلزات سنگین در رودخانه چالوس. مرکز تحقیقات شیلاتی استان مازندران. ۱(۳): ۶۰.
۵. Ashraf, W. (2006). Levels of selected heavy metals in tuna fish. *Arabian Journal of Science Technology*, 31(1A); 89-92.
6. Agrawal, KC. (1996). Therapeutic action of garlic constituents. *Medicinal Research reviews*, 16(1); 110-111.
7. Al-Weher, S. M. (2008). Levels of heavy metal Cd, Cu and Zn in three fish species collected from the northern Jordan Valley, Jordan. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 1(1); 41 – 46.
8. Antilla, A., Heikila, P., Nykyri, E. (1996). Risk of nervous system cancer among workers exposed to lead. *Occupational and Environmental Medicine*, 38; 131-136.
9. Chul-whan Cha, MD. (1987). A study on the effect of garlic to the heavy metal poisoning of rat. *Journal of Korean Medical Science*, 2(4); 213-223.
10. Dave, G., Xiu, R. (2006). *Biochimica in Biophysica Acta*. 1001; 316-324.
11. Flawor, B.A., Dural, G. (2001). Effect of lead on the kidney of fish, role of high-affinity lead-binding proteins. *Enviro Health prespects*, 91; 77-80.
12. Hagenmaier, G. (2006). Exposed to experimental lead intoxication. *Bulletin of Zoology*, 61; 29-37.

13. Hazel, CR., Meith, SJ . (1970). The International Journal of Applied and Basic Nutritional Sciences, 21(4); 530-536.

14. Heisinger, JF., Green, W. (2001). Pharmacological Reports, 60; 163-170.

15. Kjorsvik, K. (1995). Studies on the biological variability of enzyme activities in blood plasma of carp (*caprinus carpio*) as a basis for reference data deremination. Fortsch Fisch Wis, 9; 69-91.

16. Nelson, Bk., Moorman, Wj., Schrader, Sm., Shaw, PB., Kreig, EF. (1997). Paternal exposure of rabbits to lead. Neurotoxicology Teratology, 191(3); 198.

17. Sastry, KV., Gupta, PK. (2003). Alteration in the activities for three peptidases and lipase in the digestive system of the fish *channa punctatus* exposed to lead nitrate. Bull Environ Contam Toxicol, 21; 190-195.

18. Schmitt, CJ., Whyte, JJ., Brumbaugh, WG., Tillitt, DE. (2005). Biochemical effects of lead, zinc, and cadmium from mining on fish in the Tri-States District of northeastern Oklahoma, USA. Environ Toxicol Chem, 24(6); 1483-1495.

19. Standard methods of Americas public health. (2005) Freshwater mollusks as indicators of bioavailability and toxicity of metals in surface systems. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 122(2); 37-43.

20. Topuzoglu, G., Erbay, AR., Karul, AB., Yensel, N. ( 2003). Concentrations of copper, zinc, and magnesium in sera from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. Biological Trace Element Research, 95(1); 7-11.

21. Weis, JS., Weis, P. (1977). Effects of heavy metals on development. 123(4); 123.

