بررسی امکان استفاده از استخوان پنجه پای قورباغه (*Rana ridibunda*) به‌عنوان شاخص زیستی پایش فلزات سنگین سرب، کادمیوم، نیکل و وانادیوم در آب رودخانه قره‌سو کرمانشاه

- **فاطمه طالب‌زاده**: گروه محیط‌زیست، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، همدان
- **سهیل سبحان‌اردکانی***: گروه محیط‌زیست، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد همدان، همدان
- **لیما طیبی**: گروه محیط‌زیست، دانشگاه ملایر، ملایر

تاریخ دریافت: آذر ١٣٩٤ تاریخ پذیرش: اسفند ١٣٩٤

چکیده

به‌دلیل ورود فاضلاب شهری، کشاورزی و صنعتی به رودخانه قره‌سو احتمال تجمع آلاینده‌های مختلف در آب، رسوبات و بدن آبزیان ساکن وجود دارد. این پژوهش با هدف بررسی امکان استفاده از استخوان پنجه پای گونه *Rana ridibunda* به‌عنوان شاخص زیستی برای پایش فلزات سنگین سرب، کادمیوم، نیکل و وانادیوم در آب رودخانه قره‌سو کرمانشاه در سال ١٣٩٣ انجام یافت. پس از انتخاب ٤ ایستگاه نمونه‌برداری در طول مسیر رودخانه، نسبت به تهیه نمونه آب و قورباغه اقدام شد. پس از انجام مراحل آماده‌سازی و هضم آزمایشگاهی نمونه‌ها، نسبت به قرائت غلظت عناصر در آن‌ها توسط دستگاه نشر اتمی اقدام شد. پردازش آماری داده‌ها نیز توسط نرم‌افزار SPSS انجام یافت. نتایج بیان‌گر وجود همبستگی معنی‌دار و قوی بین میانگین غلظت تجمع یافته عناصر در نمونه‌های آب با نمونه‌های استخوان پنجه پای قورباغه‌های بالغ و نابالغ می‌باشد. هم‌چنین بین میانگین غلظت تجمع‌یافته عناصر در نمونه‌های استخوان پنجه پای قورباغه‌های بالغ و نابالغ تفاوت معنی‌دار آماری وجود ندارد ($p>0/05$). مطالعه بافت‌های مختلف بدن گونه‌های شاخص زیستی می‌تواند بیان‌گر روند تغییرات غلظت آلاینده‌ها در یک بوم‌سازگان باشد. بنابراین امکان استفاده از بافت استخوان پنجه پا قورباغه به‌عنوان یک گونه شاخص زیستی به‌واسطه وجود همبستگی معنی‌دار و قوی بین میانگین غلظت تجمع‌یافته عناصر در آب و استخوان، عدم نیاز به کشتن حیوان برای برداشت بافت، نیاز به مقادیر اندک مواد شیمیایی به‌منظور هضم نمونه و نیاز به برداشت بخش کوچکی از بافت استخوان برای انجام آنالیزهای آزمایشگاهی، برای ارزیابی کیفی و سلامت سیستم‌های رودخانه‌ای تایید می‌شود.

کلمات کلیدی: شاخص زیستی، قورباغه، استخوان پنجه‌پا، کیفیت آب، رودخانه قره‌سو

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: s_sobhan@iauh.ac.ir

مقدمه

امروزه افزایش جمعیت و توسعه صنایع مختلف و گسترش مناطق کشاورزی باعث ورود حجم بالای آلاینده‌های مختلف به محیط‌های آبی شده است. ورود پساب‌های کشاورزی، شهری و صنعتی که حاوی آلاینده‌های گوناگون هستند، می‌تواند باعث بروز مشکلات زیادی برای محیط‌های آبی گردد (So و همکاران، ۱۹۹۹). آلودگی‌های انسان‌ساخت که عمدتاً توسط فاضلاب‌های شهری، صنعتی و پساب‌های کشاورزی وارد محیط شده و در نهایت منجر به افزایش میزان آلاینده‌های آلی و معدنی و به‌خصوص فلزات سنگین در آب و رسوبات و به‌تبع آن در آبزیان می‌شود (واعظزاده و همکاران، ۱۳۸۷). از میان مواد آلاینده وارد شده به بوم‌سازگان‌های آبی، فلزات سنگین به‌علت اثرات سمی و برخورداری از توان بالای تجمع‌زیستی در بسیاری از گونه‌های آبزی، غیرقابل تبخیر بودن و سرطان‌زایی قابل توجه هستند (Meche و همکاران، ۲۰۱۰). در سال‌های اخیر نگرانی در مورد آثار طولانی‌مدت فلزات سنگین به‌عنوان آلاینده‌های محیط زیستی افزایش یافته است (Phillips، ۱۹۸۰).

عموماً مطالعه بر روی فلزات سنگین از جنبه‌های سلامتی و بهداشت، تعیین محدوده مجاز این عناصر برای انسان و از نظر محیط‌زیست آبی و زوال آبزیان دارای اهمیت است (Ebrahimpour و همکاران، ۲۰۱۱). آلودگی بوم‌سازگان‌های آبی به انواع آلاینده‌ها می‌تواند از طریق بررسی آب، رسوبات و موجودات آبزی انجام شود. تجمع فلزات سنگین در هر یک از این اجزا می‌تواند منجر به تغییرات بوم‌شناختی جدی شود (Altindag و Yigit، ۲۰۰۵).

سرب هیچ‌گونه عملکرد مثبتی در بدن نداشته به‌طوری‌که در غلظت‌های بالا سبب عقب ماندگی ذهنی کودکان، کم‌خونی، اختلال در شنوایی، سیستم کلیوی-کبدی، سیستم ایمنی بدن، کاهش وزن و مرگ نوزاد هنگام تولد، سقط جنین و زایمان پیش از مورد می‌شود (Shahtaheri و همکاران، ۲۰۰۷). کادمیوم از آلاینده‌های مهم محیط‌زیستی است و از عوارض نامطلوب حضور آن در بدن می‌توان به اسهال، شکم درد و استفراغ شدید، شکستگی استخوان، عقیم شدن، آسیب به سیستم عصبی مرکزی، آسیب به سیستم ایمنی، ناهنجاری‌های روانی و آسیب احتمالی به DNA، برونشیت، آمفیزم، کم‌خونی، جهش ژنتیکی و سرطان اشاره کرد. نیکل در غلظت‌های کم برای ادامه حیات گیاهان و هم‌چنین بقا و پایداری بوم‌سازگان‌ها ضروری است. اما در غلظت‌های زیاد می‌تواند باعث بروز سرطان‌های ریه، مجاری تنفسی و استخوان شود (دهقانی، ۱۳۸۹). وانادیوم و ترکیباتش سمی هستند و معمولاً از منابع‌طبیعی و هم‌چنین سوخت‌های فسیلی به محیط‌زیست وارد شده و برای مدت طولانی باقی می‌ماند. این عنصر در محیط‌های آبی، پایدار بوده و در طولانی مدت اثر زیان‌آوری روی ارگانیسم‌های آبی به‌جای می‌گذارد (Sobhanardakani و همکاران، ۲۰۱۵).

شاخص‌های زیستی شامل فرایندهای زیستی، گونه یا اجتماعات هستند و برای ارزیابی کیفیت محیط‌زیست و این‌که چگونه محیط‌زیست در طول زمان تغییر می‌کند، استفاده می‌شوند. نتایج مطالعات نشان داده که استفاده از شاخص‌های زیستی بسیار بهتر، اقتصادی‌تر و دقیق‌تر از روش‌های سنتی است. در نهایت بدون استفاده از شاخص‌های زیستی ممکن است اثرات آشفتگی‌ها و تنش‌ها هنگامی تشخیص داده شود که دیر شده و نتوان جلوی آن را گرفت (Hopkins و همکاران، ۱۹۹۸؛ Welsh و Ollivier، ۱۹۹۸). قورباغه‌ها و وزغ‌ها در حدود ۹۰٪ کل دوزیستان را تشکیل می‌دهند (Blaustein و Johnson، ۲۰۰۳) بنابراین، به‌عنوان اجزای اصلی بوم‌سازگان‌های آبی و خشکی حساس به تغییرات این محیط‌ها، رابط مهم بین سلامت بوم‌سازگان و انسان هستند (Hayes و همکاران، ۲۰۰۲؛ Alford و Richards، ۱۹۹۹). اکثر قورباغه‌ها و وزغ‌های بالغ از بی‌مهرگان تغذیه می‌کنند. بنابراین به‌عنوان رابط مهم تغذیه‌ای و انرژی بین حشرات و سایر مهره‌داران محسوب می‌شوند (Blaustein و Johnson، ۲۰۰۳). از این‌رو چون قورباغه‌ها و وزغ‌ها به تغییرات محیط خود حساس هستند، می‌توانند به‌عنوان ارگانیسم‌های شاخص زیستی در بررسی‌های سم‌شناسی محیطی مورد مطالعه قرار گیرند (Henry، ۲۰۰۰).

تاکنون چند مطالعه در خصوص تاثیر تجمع فلزات سنگین در اندام‌های مختلف بدن دوزیستان در بروز اختلالات ریخت‌شناختی و هم‌چنین امکان‌سنجی معرفی آن‌ها به‌عنوان گونه شاخص‌های زیستی انجام یافته است. در پژوهشی به‌منظور بررسی تاثیر توسعه شهری بر تجمع فلزات سنگین در بدن دوزیستان، تعدادی نمونه وزغ معمولی (*Bufo bufo*) از برکه‌های شهری و روستایی صید و غلظت فلزات روی و منیزیوم در استخوان پنجه پای آن‌ها تعیین شد. نتایج نشان داد که به‌واسطه فعالیت‌های انسانی، از نظر میانگین غلظت تجمع‌یافته فلزات بین گونه‌های ساکن در محیط شهری و روستایی تفاوت معنی‌دار وجود دارد و از این‌رو می‌توان دوزیستان را به‌عنوان گونه‌های شاخص ارزیابی کیفی محیط مورد مطالعه قرار داد (Simon و همکاران، ۲۰۱۲). در پژوهشی که با هدف مقایسه تجمع فلزات سنگین در یک گونه دوزیست (*Rana catesbeiana*) با

سایر زیستمندان کوچک آبزی مهره‌دار و بی‌مهره ساکن یک تالاب آلوده انجام یافت، نتایج نشان داد که لارو دوزیست مورد مطالعه با توجه به بوم‌شناسی تغذیه خود از بیش‌ترین تجمع عناصر برخوردار می‌باشد و از این‌رو لارو دوزیستان همه‌چیزخوار می‌تواند به‌عنوان یک رابط بسیار مهم برای انتقال عناصر در سطوح تغذیه‌ای محسوب شود (Unrine و همکاران، ۲۰۰۷). در پژوهشی که طی ۵ سال در ۳ منطقه واقع در شرق اوکراین انجام یافت، محتوی فلزات سنگین آهن، روی، سرب، کادمیوم، مس، منگنز و نیکل در ۱۱ اندام از بدن قورباغه مردابی (*Rana ridibunda*) بررسی و عنوان شد که بین تواتر نقص‌های ریخت شناختی و سطوح آلودگی‌های محیط‌زیستی ارتباط معنی‌دار وجود دارد (Flyaks و Borkin، ۲۰۰۴). در پژوهشی پس از تعیین غلظت فلزات سنگین آرسنیک، جیوه، سلنیوم، سرب، کادمیوم، کروم و منگنز در اندام‌های مختلف بچه‌های غوک بزرگ آمریکایی (*Rana catesbeiana*) نتیجه گرفته شد که دستگاه گوارش به‌دلیل ورود ذرات رسوب حاوی فلزات سنگین در مقایسه با سایر اندام‌ها از غلظت قابل توجهی فلزات سنگین برخوردار می‌باشد (Burger و Snodgrass، ۱۹۹۸). در پژوهشی نسبت به بررسی تجمع فلزات روی، سرب، کادمیوم و مس در تخم و اندام‌های بدن ۳ گونه دوزیست (*Bufo bufo*، *Rana dalmatina* و *Rana ridibunda*) در ۲ منطقه استرالیا اقدام و نتیجه گرفته شد که اثرات سمی فلزات سنگین بر تخم و نوزاد دوزیستان بیش‌تر از سایر گونه‌های آبزی می‌باشد و در نتیجه می‌توان از دوزیستان به‌عنوان گونه شاخص‌های زیستی در مطالعات ارزیابی کیفی آب استفاده کرد (Grillitsch و Chovanec، ۱۹۹۵).

در رودخانه قره‌سو کرمانشاه به‌دلیل ورود فاضلاب شهری، صنعتی و زه‌آب‌های کشاورزی احتمال تجمع بالای انواع آلاینده‌ها ازجمله فلزات سنگین در آب و رسوب وجود دارد. بنابراین این پژوهش برای اولین‌بار در ایران با هدف بررسی امکان استفاده از استخوان پنجه پای قورباغه به‌عنوان شاخص زیستی پایش فلزات سنگین سرب، کادمیوم، نیکل و وانادیوم در آب رودخانه قره‌سو کرمانشاه در سال ۱۳۹۳ انجام یافت.

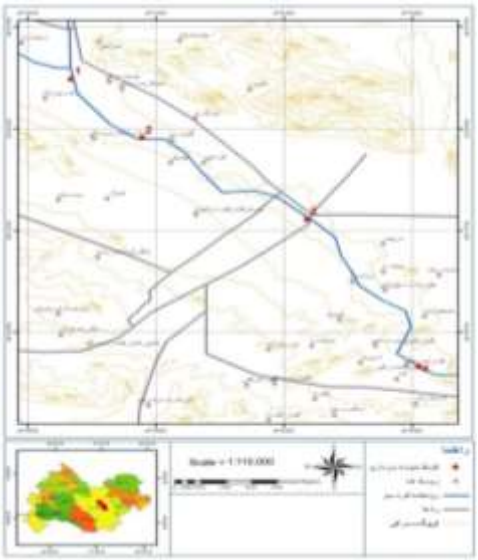
مواد و روش‌ها

رودخانه قره‌سو واقع در استان کرمانشاه بین طول‌های جغرافیایی "۱۲ '۲۲ °۴۶ تا "۱۲ '۲۲ °۴۷ و عرض جغرافیایی "۱۰ '۵۵ °۳۴ تا "۱۰ '۱۹ °۳۴ قرار گرفته است. سرچشمه اصلی این رودخانه سراب روانسر واقع در ۶۰ کیلومتری شمال‌غرب کرمانشاه می‌باشد. این رودخانه با جهت شمال‌غربی به جنوب شرقی جریان پیدا می‌کند و با یک شیب آرام از داخل شهر کرمانشاه عبور کرده و در نزدیکی فرامان به رودخانه گاماسیاب می پیوندد. یکی از کاربری‌های رودخانه قره‌سو تامین آب مورد نیاز برای کشاورزی شهرستان کرمانشاه است (کرکوتی و همکاران، ۱۳۸۹). پس از انتخاب ۴ ایستگاه نمونه‌برداری در طول مسیر رودخانه به‌ترتیب در بالادست، خروجی شهرک صنعتی کرمانشاه واقع در جاده کرمانشاه- سنندج، خروجی پالایشگاه کرمانشاه و پایین‌دست و پس از ثبت موقعیت جغرافیایی آن‌ها توسط دستگاه GPS، نسبت به برداشت نمونه آب به‌روش مرکب و قورباغه مردابی معمولی (*Rana ridibunda*) در فصل بهار سال ۱۳۹۳ اقدام شد. موقعیت جغرافیایی و نقشه استقرار ایستگاه‌های نمونه‌برداری به‌ترتیب در جدول ۱ و شکل ۱ ارایه شده است. بدین‌ترتیب که از هر ایستگاه ۴ نمونه ۲۵۰ میلی‌لیتری آب توسط ظروف پلی‌اتیلنی که از قبل توسط اسید نیتریک شسته شده بودند مطابق روش استاندارد (سبحان‌اردکانی و همکاران، ۱۳۹۳) و هم‌چنین ۴ نمونه قورباغه شامل ۲ نمونه بالغ واجد پاهای بلند عقبی هنگام خروج از آب و ورود به حاشیه رودخانه و ۲ نمونه نابالغ فاقد دم و پا توسط تور برداشت و در اسرع وقت به آزمایشگاه آلودگی‌های محیط‌زیست دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان منتقل شد (تعداد کل نمونه‌های آب و تعداد کل نمونه‌های قورباغه (بالغ و نابالغ) هر کدام ۱۶ عدد می‌باشد). در آزمایشگاه پس از اندازه‌گیری طول بدن و وزن نمونه‌های قورباغه، نسبت به خارج کردن استخوان پنجه پای هر یک از آن‌ها اقدام شد. نمونه‌های پنجه پا به یک صافی پلاستیکی منتقل و توسط آب دو بار تقطیر شسته شدند. برای جداکردن بافت‌های متصل به پنجه، استخوان پنجه به‌مدت ۲ روز در ۲ میلی‌لیتر پراکساید هیدروژن ۳۰٪ قرار داده شد (Simon و همکاران، ۲۰۱۲). نمونه‌ها مجدداً با آب دوبار تقطیر شسته شده و به‌مدت یک شب در آون ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. استخوان‌های خشک‌شده توسط ترازوی دیجیتال توزین شده و در ۲ میلی‌لیتر محلول اسیدنیتریک ۶۰٪ و دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت چهار ساعت هضم شدند. هم‌چنین به‌منظور تثبیت و جلوگیری از رسوب‌گذاری عناصر محلول در نمونه‌های آب، به ۲۵ میلی‌لیتر از نمونه یک میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ افزوده و به‌مدت ۱۰ دقیقه روی هیتر در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در زیر هود قرار داده شد. پس از قراردادن نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه روی شیکر با سرعت ۸۵ دور در دقیقه، محلول توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ صاف شد (Olías و همکاران، ۲۰۱۲). در نهایت پس از ساخت محلول استاندارد

فلزات برای نمونه‌های آب و استخوان پنجه پای قورباغه و کالیبره کردن دستگاه نشر اتمی Varian مدل ES-۷۱۰، غلظت تجمع یافته فلزات سنگین در نمونه‌های آب و استخوان پنجه پا در ۳ تکرار خوانده شد. برای پردازش آماری نتایج از ویرایش ۲۰ نرم‌افزار SPSS استفاده شد. بدین صورت که برای اطمینان از نرمال‌بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف- اسمیرنوف، برای مقایسه میانگین غلظت تجمع‌یافته عناصر مورد ارزیابی در نمونه‌ها (استخوان پنجه پا و آب) بین ایستگاه‌های نمونه‌برداری از آزمون آماری تحلیل واریانس بین آزمودنی یک‌طرفه (آزمون چنددامنه‌ای دانکن)، برای مقایسه میانگین غلظت تجمع‌یافته عناصر مورد ارزیابی در استخوان پنجه پا بین قورباغه‌های بالغ و نابالغ از آزمون تی مستقل و برای بررسی همبستگی بین میانگین غلظت تجمع یافته عناصر مورد مطالعه در آب با استخوان پنجه پای قورباغه‌های بالغ و نابالغ از آزمون همبستگی پیرسون استفاده شد.

جدول ۱: موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌های نمونه‌برداری

ایستگاه	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
۱	۴۷° ۰'۲۸/۶۷"E	۳۴°۲۵'۱۵/۱۱"N
۲	۴۷° ۲'۴۶/۴۵"E	۳۴°۲۳'۵۹/۶۴"N
۳	۴۷° ۶'۳۲/۳۲"E	۳۴°۲۱'۱۹/۲۰"N
۴	۴۷° ۹'۲۱/۹۶"E	۳۴°۱۷'۱۴/۶۱"N



شکل ۱: نقشه موقعیت استقرار ایستگاه‌های نمونه‌برداری

نتایج

غلظت تجمع‌یافته عناصر مورد مطالعه در نمونه‌های آب رودخانه قره‌سو، استخوان پنجه پای قورباغه بالغ و استخوان پنجه پای قورباغه نابالغ بر حسب ppb در جداول ۲ تا ۴ ارایه شده است.

جدول ۲: غلظت عناصر* سرب، کادمیوم، نیکل و وانادیوم در نمونه‌های آب رودخانه قره‌سو به تفکیک ایستگاه نمونه‌برداری بر حسب میکروگرم در لیتر

ایستگاه	انحراف معیار±میانگین غلظت			
	سرب	کادمیوم	نیکل	وانادیوم
۱	۳/۹۲±۰/۰۶^{a**}	۰/۵۱±۰/۰۸^{a}	۰/۰۱۴±۰/۰۰۱^{a}	۰/۰۷۶±۰/۰۰۸^{a}
۲	۶/۳۲±۰/۵۳^{b}	۰/۹۷±۰/۱۳^{b}	۵/۷۴±۰/۱۵^{b}	۷/۱۴±۰/۹۱^{b}
۳	۹/۱۱±۱/۱۶^{c}	۱/۱۷±۰/۲۸^{b}	۷/۲۰±۰/۷۹^{b}	۷/۹۴±۰/۷۵^{b}
۴	۶/۳۲±۰/۴۶^{b}	۱/۲۵±۰/۱۳^{b}	۹/۲۲±۱/۵۳^{c}	۹/۳۷±۰/۹۱^{c}

* داده‌ها مربوط به میانگین غلظت ۳ تکرار می‌باشد.

** حروف غیرمشترک (a، b، c و ...) در هر ستون، بیان‌گر تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین ایستگاه‌ها از نظر میانگین غلظت تجمع‌یافته عناصر در نمونه‌های آب براساس نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (آزمون دانکن) می‌باشد.

جدول ۳: غلظت عناصر* سرب، کادمیوم، نیکل و وانادیوم در نمونه‌های استخوان پنجه پای قورباغه بالغ رودخانه قره‌سو به تفکیک ایستگاه نمونه‌برداری بر حسب میکروگرم درکیلوگرم

ایستگاه	انحراف معیار±میانگین غلظت			
	سرب	کادمیوم	نیکل	وانادیوم
۱	۴/۲۴±۱/۲۲^{a**}	۰/۵۷±۰/۰۸^{a}	۲/۷۸±۰/۲۹^{a}	۲/۵۵±۰/۱۳^{a}
۲	۶/۰۴±۱/۲۳^{b}	۱/۱۷±۰/۱۷^{b}	۵/۱۲±۱/۰۱^{b}	۵/۶۶±۰/۷۹^{b}
۳	۱۱/۴۵±۰/۴۳^{c}	۱/۷۰±۰/۰۹^{c}	۱۰/۳۱±۳/۱۳^{c}	۱۰/۷۵±۱/۵۷^{c}
۴	۶/۳۰±۰/۳۶^{b}	۱/۲۴±۰/۲۷^{b}	۱۱/۱۵±۲/۴۸^{c}	۱۱/۳۷±۰/۳۵^{d}

* داده‌ها مربوط به میانگین غلظت ۳ تکرار می‌باشد.

** حروف غیر مشترک (a، b، c و ...) در هر ستون، بیان‌گر تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین ایستگاه‌ها از نظر میانگین غلظت تجمع‌یافته عناصر در نمونه‌های استخوان پنجه پای قورباغه بالغ براساس نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (آزمون دانکن) می‌باشد.

جدول ۴: غلظت عناصر* سرب، کادمیوم، نیکل و وانادیوم در نمونه‌های استخوان پنجه پای قورباغه نابالغ ساکن رودخانه قره‌سو به تفکیک ایستگاه نمونه‌برداری بر حسب میکروگرم درکیلوگرم

ایستگاه	انحراف معیار±میانگین غلظت			
	سرب	کادمیوم	نیکل	وانادیوم
۱	۷/۱۵±۱/۳۵^{a**}	۰/۷۱±۰/۰۹^{a}	۴/۸۵±۰/۷۶^{a}	۳/۷۳±۰/۷۱^{a}
۲	۱۰/۷۳±۱/۲۸^{b}	۱/۲۶±۰/۲۷^{b}	۸/۰۹±۱/۲۹^{b}	۹/۳۰±۱/۳۶^{b}
۳	۱۳/۴۲±۰/۹۱^{c}	۲/۱۱±۰/۱۹^{c}	۱۰/۲۳±۱/۹۲^{c}	۱۲/۵۲±۰/۵۸^{c}
۴	۹/۳۵±۲/۱۰^{b}	۱/۹۷±۰/۱۱^{c}	۱۲/۹۶±۰/۴۳^{d}	۱۴/۵۴±۰/۴۴^{d}

* داده‌ها مربوط به میانگین غلظت ۳ تکرار می‌باشد.

** حروف غیر مشترک (a، b، c و ...) در هر ستون، بیان‌گر تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین ایستگاه‌ها از نظر میانگین غلظت تجمع‌یافته عناصر در نمونه‌های استخوان پنجه پای قورباغه نابالغ براساس نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (آزمون دانکن) می‌باشد.

نتایج مقایسه میانگین غلظت قرائت شده عناصر مورد مطالعه در نمونه‌های آب رودخانه قره‌سو و استخوان پنجه پای قورباغه‌های بالغ و نابالغ بر حسب ppb بیان‌گر آنست که کمینه و بیشینه میانگین غلظت تجمع‌یافته عنصر سرب در نمونه‌های آب رودخانه با ۰/۰۶±۳/۹۲ و ۱/۱۶±۹/۱۱، در استخوان پنجه پای قورباغه بالغ با ۱/۲۲±۴/۲۴ و ۰/۴۳±۱۱/۴۵ و در استخوان پنجه پای قورباغه نابالغ با ۱/۳۵±۷/۱۵ و ۰/۹۱±۱۳/۴۲ در همه موارد به‌ترتیب مربوط به ایستگاه‌های ۱ و ۳ می‌باشد. کمینه و بیشینه میانگین غلظت تجمع‌یافته عنصر کادمیوم در نمونه‌های آب رودخانه با ۰/۰۸±۰/۵۱ و ۰/۱۳±۱/۲۵ به‌ترتیب مربوط به ایستگاه‌های ۱ و ۴، در استخوان پنجه پای قورباغه بالغ با ۰/۰۸±۰/۵۷ و ۰/۰۹±۱/۷۰ و در استخوان پنجه پای قورباغه نابالغ با ۰/۰۹±۰/۷۱ و ۰/۱۹±۲/۱۱ در هر دو مورد به‌ترتیب مربوط به ایستگاه‌های ۱ و ۳ می‌باشد. کمینه و بیشینه میانگین غلظت تجمع‌یافته عنصر نیکل در نمونه‌های آب رودخانه با ۰/۰۰۱±۰/۰۱۴ و ۱/۵۳±۹/۲۳، در استخوان پنجه پای قورباغه بالغ با ۰/۲۹±۲/۷۸ و ۲/۴۸±۱۱/۱۵ و در استخوان پنجه پای قورباغه نابالغ با ۰/۷۶±۴/۸۵ و ۰/۴۳±۱۲/۹۶ در همه موارد به‌ترتیب مربوط به ایستگاه‌های ۱ و ۴ می‌باشد. هم‌چنین کمینه و بیشینه میانگین غلظت تجمع‌یافته عنصر وانادیوم در نمونه‌های آب رودخانه با ۰/۰۰۸±۰/۰۷۶ و ۰/۹۱±۹/۳۷، در استخوان پنجه پای قورباغه بالغ با ۰/۱۳±۲/۵۵ و ۰/۳۵±۱۱/۳۷ و در استخوان پنجه پای قورباغه نابالغ با ۰/۷۱±۳/۷۳ و ۰/۴۴±۱۴/۵۴ در همه موارد به‌ترتیب مربوط به ایستگاه‌های ۱ و ۴ می‌باشد.

نتایج آزمون‌های کولموگروف-اسمیرنوف، تی مستقل و همبستگی پیرسون به‌ترتیب در جداول ۵ تا ۸ ارایه شده است. نتایج آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بیانگر این است با توجه به سطح معنی‌داری بیش‌تر از ۰/۰۵، تمام داده‌های مربوط به غلظت عناصر در نمونه‌های آب و استخوان پنجه پای قورباغه‌های بالغ و نابالغ دارای توزیع نرمال می‌باشند (جدول ۵).

جدول ۵: نتایج آزمون کولموگروف-اسمیرنوف برای غلظت عناصر در نمونه‌های آب و استخوان پنجه پای قورباغه

عنصر	سرب	کادمیوم	نیکل	وانادیوم
تعداد	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶
نمونه آب				
سطح معنی‌داری	۰/۳۷۸	۰/۸۰۸	۰/۳۵۹	۰/۱۲۱
استخوان پنجه پای قورباغه بالغ				
سطح معنی‌داری	۰/۱۳۴	۰/۸۰۴	۰/۲۸۹	۰/۲۵۴
استخوان پنجه پای قورباغه نابالغ				
سطح معنی‌داری	۰/۳۷۶	۰/۴۷۲	۰/۹۴۱	۰/۶۴۹

نتایج آزمون تی مستقل بیان‌گر آن است که بین میانگین غلظت تجمع‌یافته عناصر سرب، کادمیوم، نیکل و وانادیوم در نمونه‌های استخوان پنجه پای قورباغه‌های بالغ و نابالغ تفاوت معنی‌دار آماری وجود ندارد (p>۰/۰۵) (جدول ۶). نتایج آزمون همبستگی پیرسون بیان‌گر آن است که بین میانگین غلظت تجمع‌یافته عناصر سرب، کادمیوم، نیکل و وانادیوم در نمونه‌های آب با میانگین غلظت تجمع‌یافته همین عناصر در نمونه‌های استخوان پنجه پای قورباغه‌های بالغ با ضریب همبستگی (r) به‌ترتیب برابر با ۰/۹۶۴، ۰/۸۷۲، ۰/۹۱۱ و ۰/۸۸۸ و سطح معنی‌داری (P) کوچک‌تر از ۰/۰۵، همبستگی معنی‌دار و قابل توجه وجود دارد (جدول ۷).

جدول ۶: نتایج آزمون تی مستقل برای مقایسه بین میانگین غلظت عناصر در استخوان پای قورباغه بالغ با قورباغه نابالغ

عنصر	آماره t	درجه آزادی	اختلاف میانگین‌ها	انحراف استاندارد از میانگین	سطح معنی‌داری	فاصله اطمینان (۹۵٪)	
						حد پایینی	حد بالایی
سرب	-۲/۰۵۳	۱۴	-۲/۴۲	۱/۱۸	۰/۰۵۲	-۴/۸۶	۰/۰۲۵
کادمیوم	-۱/۶۳	۱۴	-۰/۳۴	۰/۲۱	۰/۱۱۸	-۰/۷۸	۰/۰۹
نیکل	-۱/۲۲	۱۴	-۱/۷۰	۱/۳۸	۰/۲۳۴	-۴/۵۷	۱/۱۸
وانادیوم	-۱/۴۸	۱۴	-۲/۴۴	۱/۶۵	۰/۱۵۴	-۵/۸۷	۰/۹۹

جدول ۷: نتایج بررسی همبستگی بین میانگین غلظت تجمع‌یافته عناصرسرب، کادمیوم، نیکل و وانادیوم بین نمونه‌های آب با نمونه‌های استخوان پای قورباغه بالغ

		سرب	کادمیوم	نیکل	وانادیوم
سرب	آماره پیرسون	۰/۹۶۴**	۰/۹۸۰**	۰/۷۴۸**	۰/۷۸۰**
	سطح معنی‌داری	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۵	۰/۰۰۳
کادمیوم	آماره پیرسون	۰/۶۳۳*	۰/۸۷۲**	۰/۹۲۹**	۰/۹۴۸**
	سطح معنی‌داری	۰/۰۲۷	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
نیکل	آماره پیرسون	۰/۵۴۰	۰/۸۰۵**	۰/۹۱۱**	۰/۹۳۱**
	سطح معنی‌داری	۰/۰۷	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
وانادیوم	آماره پیرسون	۰/۵۵۹	۰/۸۳۰**	۰/۸۵۸**	۰/۸۸۸**
	سطح معنی‌داری	۰/۰۵۹	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰

** همبستگی معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۹٪		* همبستگی معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪

جدول ۸: نتایج بررسی همبستگی بین میانگین غلظت تجمع‌یافته عناصرسرب، کادمیوم، نیکل و وانادیوم بین نمونه‌های آب با نمونه‌های استخوان پای قورباغه نابالغ

		سرب	کادمیوم	نیکل	وانادیوم
سرب	آماره پیرسون	۰/۷۹۷**	۰/۸۶۵**	۰/۶۱۵*	۰/۷۳۶**
	سطح معنی‌داری	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰	۰/۰۳۳	۰/۰۰۶
کادمیوم	آماره پیرسون	۰/۳۱۱	۰/۹۵۰**	۰/۹۵۱**	۰/۹۸۴**
	سطح معنی‌داری	۰/۳۲۵	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
نیکل	آماره پیرسون	۰/۲۱۵	۰/۹۱۱**	۰/۹۶۹**	۰/۹۹۰**
	سطح معنی‌داری	۰/۵۰۱	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰
وانادیوم	آماره پیرسون	۰/۳۰۹	۰/۸۸۲**	۰/۹۲۲**	۰/۹۶۴**
	سطح معنی‌داری	۰/۳۲۹	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰

** همبستگی معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۹٪		* همبستگی معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪

از طرفی بین میانگین غلظت تجمع‌یافته عناصر سرب، کادمیوم، نیکل و وانادیوم در نمونه‌های آب با نمونه‌های استخوان پنجه پای قورباغه‌های نابالغ با ضریب همبستگی به‌ترتیب برابر با ۰/۷۹۷، ۰/۹۵۰ و ۰/۹۶۹ و ۰/۹۶۴ و سطح معنی‌داری کوچک‌تر از ۰/۰۵، همبستگی معنی‌دار و قابل توجه وجود دارد (جدول ۸).

بحث

قورباغه‌ها و وزغ‌ها در حدود ۹۰٪ از گونه‌های دوزیستان را شامل می‌شوند و به‌عنوان اجزای اصلی بوم‌سازگان‌های آبی و خشکی با زیستگاهی کوچک که معمولاً در معرض بسیاری از عوامل تنش‌زای هر دو محیط آبی و خشکی هم‌چون اشعه ماورای بنفش، آفت‌کش‌ها، مواد شیمیایی صنعتی و خانگی سمی، توسعه شهری و تغییرات اقلیمی بوده و هم‌چنین به‌علت اکتوترم بودن، دارا بودن پوست نیمه‌تراوا و نفوذپذیر، فقدان فلس، پر و مو در سطح بدن، تخم فاقد پوسته که محتویات آن به‌طور مستقیم با محیط در تماس بوده و می‌تواند به‌راحتی ترکیبات آلاینده را جذب کند و چرخه زندگی پیچیده به تغییرات محیطی بسیار حساس بوده و به این دلیل شاخص مهمی برای بررسی سلامت انسان و بوم‌سازگان و کیفیت محیط محسوب و می‌توان از بافت‌های مختلف بدن آن‌ها هم‌چون کلیه، کبد، ماهیچه و استخوان به‌عنوان یک گونه بیواندیکاتور در ارزیابی آلاینده‌ها استفاده کرد (Simon و همکاران، ۲۰۱۱؛ Unrine و همکاران، ۲۰۰۷؛ Zhang و همکاران، ۲۰۰۷؛ Gendron و همکاران، ۲۰۰۶؛ Corn ، ۲۰۰۵؛ Cummins، ۲۰۰۳؛ Hayes و همکاران، ۲۰۰۲؛ Sower و همکاران، ۲۰۰۰؛ Alford و Richards، ۱۹۹۹؛ Puky و Oertel، ۱۹۹۷؛ Blaustein و همکاران، ۱۹۹۴). در این زمینه می‌توان به نتایج پژوهشی که با هدف بررسی تجمع فلزات سنگین در بدن گونه *Rana esculenta* انجام یافت و نتیجه گرفته شد که تجمع فلزات سنگین در بافت‌های بدن گونه مورد بررسی بر حسب دوره‌های مختلف از چرخه زندگی متفاوت است (Perez-Coll و Herkovits، ۱۹۹۶) اشاره کرد.

نتایج بیانگر آن است که میانگین غلظت تجمع‌یافته عناصر مورد مطالعه در نمونه‌های استخوان پنجه پای قورباغه‌های نابالغ بیش‌تر از قورباغه‌های بالغ است. این موضوع را می‌توان به‌مدت زمان کم‌تری که بالغین در محیط آب در مقایسه با نابالغین سپری می‌کنند، افزایش فعالیت آنزیم ATPase و هم‌چنین تفاوت در تغذیه در طی مراحل رشد و توسعه مرتبط دانست. قورباغه‌های نابالغ برخلاف بالغین که گوشت‌خوارند، گندخوار هستند و در رژیم غذایی گندخواری احتمال تجمع بیش‌تر فلزات در بافت‌های بدن وجود دارد (Simon و همکاران، ۲۰۱۱). نتایج پژوهشی که با هدف بررسی تجمع عناصر آرسنیک، جیوه، کادمیوم، کروم و منگنز در بدن قورباغه بزرگ آمریکایی انجام یافت، نشان داد که بیشینه غلظت فلزات مربوط به دستگاه گوارش نمونه‌های نابالغ می‌باشد (Burger و Snodgrass، ۱۹۹۸). هم‌چنین نتایج پژوهشی دیگر بیش‌تر بودن تجمع فلزات سنگین در بافت‌های بدن قورباغه‌های نابالغ در مقایسه با افراد بالغ را به تفاوت در تغذیه افراد بالغ و نابالغ در طی مراحل رشد و توسعه و به‌ویژه گندخوار بودن نابالغین مرتبط دانست (Baudo، ۱۹۷۶).

نتایج آزمون تی مستقل نشان داد که بین میانگین غلظت تجمع‌یافته عناصر سرب، کادمیوم، نیکل و وانادیوم در نمونه‌های استخوان پنجه پای قورباغه‌های بالغ و نابالغ تفاوت معنی‌دار آماری وجود ندارند ($p>0/05$). از طرفی نتایج آزمون همبستگی پیرسون نشان داد که بین میانگین غلظت تجمع‌یافته عناصر در نمونه‌های آب با میانگین غلظت تجمع‌یافته عناصر نمونه‌های استخوان پنجه پای قورباغه به‌ویژه نمونه‌های نابالغ همبستگی معنی‌دار و قابل توجه وجود دارد. بنابراین استفاده از بافت استخوان پنجه پا قورباغه‌های بالغ و نابالغ به‌عنوان یک گونه شاخص زیستی برای بررسی کیفی بوم‌سازگان‌های آبی تایید می‌شود.

نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه به‌منظور گروه‌بندی آماری ایستگاه‌های نمونه‌برداری از نظر میانگین غلظت تجمع یافته عناصر مورد ارزیابی در نمونه‌های آب و استخوان پنجه پا قورباغه‌های بالغ و نابالغ نیز بیانگر تشابه گروه‌بندی میانگین غلظت تجمع‌یافته عناصر بین نمونه‌های آب و استخوان پنجه پا در اکثر ایستگاه‌ها می‌باشد. این موضوع نیز می‌تواند موید امکان معرفی قورباغه به‌عنوان یک گونه شاخص زیستی برای بررسی کیفی بوم‌سازگان‌های آبی باشد.

نتایج این مطالعه نشان داد که نرخ فعالیت‌های بشری می‌تواند منجر به ایجاد اختلاف معنی‌دار آماری در محتوی عناصر در استخوان پنجه پا قورباغه‌های ساکن در نقاط مختلف یک بوم سازگان آبی شود. به‌طوری‌که می‌توان مشاهده کرد بیش‌ترین تجمع عناصر هم در نمونه‌های آب و هم در نمونه‌های استخوان پنجه پا قورباغه‌های بالغ و نابالغ غالباً مربوط به ایستگاه‌های ۳ و ۴ یعنی به‌ترتیب نقاط ورود پساب خروجی تصفیه‌خانه پالایشگاه و پساب خروجی تصفیه‌خانه فاضلاب شهری کرمانشاه به آب رودخانه قره‌سو کرمانشاه می‌باشد. این موضوع موید آن است که مطالعه بافت‌های مختلف بدن گونه‌های شاخص زیستی می‌تواند بیانگر روند تغییرات غلظت آلاینده‌ها در یک بوم‌سازگان باشد. بنابراین امکان استفاده از بافت استخوان پنجه پا قورباغه به‌عنوان یک گونه شاخص زیستی به‌واسطه مزایایی هم‌چون همبستگی معنی‌دار و قوی بین میانگین غلظت تجمع‌یافته عناصر در آب و استخوان، عدم نیاز به کشتن حیوان به‌منظور برداشت بافت، نیاز به مقادیر اندک از مواد شیمیایی به‌منظور هضم نمونه استخوان در آزمایشگاه و هم‌چنین نیاز به برداشت بخش کوچکی از بافت استخوان برای انجام آنالیزهای آزمایشگاهی، برای ارزیابی شرایط کیفی و سلامت محیط بوم‌سازگان رودخانه‌ها تایید می‌شود.

منابع

۱. **دهقانی، ر.ا.، ۱۳۸۹.** سم‌شناسی محیط. انتشارات تک‌درخت، تهران. ۵۳۶ صفحه.

۲. **سبحان‌اردکانی، س.؛ رزبان، س.ش. و معانی‌جو، م.، ۱۳۹۳.** ارزیابی غلظت برخی از فلزات سنگین در منابع آب زیرزمینی دشت قهاوند همدان (۱۳۹۱). مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه. دوره ۱۸، شماره ۶، صفحات ۳۳۹ تا ۳۴۸.

۳. **کرکوتی، ع.؛ نظری‌ها، م.؛ باغوند، ا.؛ جعفری‌سلیم، ب.؛کرباسی، ع. و وثوق، ع.، ۱۳۸۹.** برآورد مقدار سیلاب حداکثر به روش‌های مشاهده‌ای، کریگر و اس-سی-اس (مطالعهٔ موردی: رودخانهٔ قره‌سو در کرمانشاه). محیط‌شناسی. دوره ۳۶، شماره ۵۵، صفحات ۹۹ تا ۱۱۰.

۴. **واعظزاده، و.؛ ماشین‌چیان‌مرادی، ع.؛ اسماعیلی‌ساری، ع. و فاطمی، س.م.، ۱۳۸۷.** بررسی غلظت سموم کشاورزی ارگانوکلره در گوشت دو ماهی اقتصادی کپور و سفید در سواحل جنوب غربی دریای خزر. علوم محیطی. دوره ۵، شماره ۳، صفحات ۳۳ تا ۴۰.

۵. **Alford, R.A. and Richards, S.J., ۱۹۹۹.** Global amphibian declines: A problem in applied ecology. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. Vol. ۳۰, pp: ۱۳۳-۱۶۵.

۶. **Altindag, A. and Yigit, S., ۲۰۰۵.** Assessment of heavy metals concentrations in the food web of lake Beysehir Turkey. Chemosphere. Vol. ۶۰, No. ۴, pp: ۵۲۲-۵۲۶.

۷. **Barrett, K.; Guyer, C. and Watson, D., ۲۰۱۰.** Water from Urban Streams Slows Growth and Speeds Metamorphosis in

Fowler's Toad (*Bufo fowleri*) Larvae. Journal of Herpetology. Vol. ۴۴, pp: ۲۹۷-۳۰۰.

۸. **Baudo, R., ۱۹۷۶.** Heavy metals concentrations (chromium, copper, manganese, and lead) in tadpoles and adults of *Rana esculenta* L. Journal of limnology. Vol. ۳۳, pp: ۳۲۵-۳۴۴.

۹. **Blaustein, A.R. and Johnson, P.T.J., ۲۰۰۳.** The complexity of deformed amphibians. Frontiers in Ecology and the Environment. Vol. ۱, No. ۲, pp: ۸۷-۹۴.

۱۰. **Blaustein, A.R.; Wake, D.B. and Sousa, W.P., ۱۹۹۴.** Amphibian declines: judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. Conservation Biology. Vol. ۸, pp: ۶۰-۷۱.

۱۱. **Burger, J. and Snodgrass, J., ۱۹۹۸.** Heavy metals in bullfrog (*Rana catesbeiana*) tadpoles: effects of depuration before analysis. Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. ۱۷, No. ۱۱, pp: ۲۲۰۳-۲۲۰۹.

۱۲. **Corn, S.P., ۲۰۰۵.** Climate change and amphibians. Animal Biodiversity and Conservation. Vol. ۲۸, pp: ۵۹-۶۷.

۱۳. **Cummins, C.P., ۲۰۰۳.** UV-B radiation, climate change and frogs-the importance of phenology. Annales Zoologici Fennici. Vol. ۴۰, pp: ۶۱-۶۷.

۱۴. **Ebrahimpour, M.; Pourkhabbaz, A.; Baramaki, R.; Babaei, H. and Rezaei, M., ۲۰۱۱.** Bioaccumulation of heavy metals in freshwater fish species, Anzali, Iran. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. Vol. ۸۷, No. ۴, pp: ۳۸۶-۳۹۲.

۱۵. **Flyaks, N.L. and Borkin, L.J., ۲۰۰۴.** Morphological abnormalities and heavy metal concentrations in anurans of contaminated areas, eastern Ukraine. Applied Herpetology. Vol. ۱, No. ۳, pp: ۲۲۹-۲۶۴.

۱۶. **Gendron, A.D.; Marcogliese, D.J.; Barbeau, S.; Christin, M.S.; Brousseau, P.; Ruby, S.; Cyr, D. and Fournier, M., ۲۰۰۶.** Exposure of leopard frogs to a pesticide mixture affects life history characteristics of the lungworm *Rhabdias ranae*. Oecologia. Vol. ۱۳۵, pp: ۴۶۹-۴۷۶.

۱۷. **Grillitsch, B. and Chovanec, A., ۱۹۹۵.** Heavy metals and pesticides in anuran spawn and tadpoles, water, and sediment. Toxicological and Environmental Chemistry. Vol. ۵۰, pp: ۱۳۱-۱۵۵.

۱۸. **Hayes, T.; Haston, K.; Tsui, M.; Hoang, A.; Haeffele, C. and Vonk, A., ۲۰۰۲.** Herbicides: feminization of male frogs in the wild. Nature. Vol. ۴۱۹, pp: ۸۹۵-۸۹۶.

۱۹. **Henry, P.F.P., ۲۰۰۰.** Aspects of Amphibian Anatomy and Physiology. Society of Environmental Toxicology and Chemistry. ۳۰ p.

۲۰. **Hopkins, W.A.; Mendonc, M.T.; Rowe, C.L. and Congdon, J.D., ۱۹۹۸.** Elevated trace element concentrations in southern toads, *Bufo terrestris*, exposed to coal combustion waste. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. Vol. ۳۵, pp: ۳۲۵-۳۲۹.

۲۱. **Meche, A.; Martins, M.C.; Lofrano, B.E.S.N.; Hardaway, C.J.; Merchant, M. and Verdade, L., ۲۰۱۰.** Determination of heavy metals by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry in fish from the Piracicaba River in Southern Brazil. Microchemical Journal. Vol. ۹۴, No. ۲, pp: ۱۷۱-۱۷۴.

۲۲. **Olías, M.; Moral, F.; Galván, L. and Cerón, J.C., ۲۰۱۲.** Groundwater contamination evolution in the Guadiamar and Agrio aquifers after the Aznalcóllar spill: assessment and environmental implications. Environmental Monitoring and Assessment. Vol. ۱۸۴, pp: ۳۶۲۹-۳۶۴۱.

۲۳. **Perez-Coll, C.S. and Herkovits, J., ۱۹۹۶.** Stage-dependent uptake of cadmium by Bufo arenarum embryos. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. Vol. ۵۶, pp: ۶۶۳-۶۶۹.

۲۴. **Phillips, D.J.H., ۱۹۸۰.** Quantitative Aquatic Biological Indicators, Applied Science Publishers, California, USA. ۴۸۸ p.

۲۵. **Puky, M. and Oertel, N., ۱۹۹۷.** On the protective role of maternal organism in amphibians, Opuscula Zoologica. Vol. ۲۹-۳۰, pp: ۱۲۵-۱۳۲.

۲۶. **Shahtaheri, S.J.; Khadem, M.; Golbabaei, F.; Rahimi-Froushan, A.; Ganjali, M.R. and Norouzi, P., ۲۰۰۷**. Solid phase extraction for evaluation of occupational exposure to Pb (II) using XAD-۴ sorbent prior to atomic absorption spectroscopy. International Journal of Occupational Safety and Ergonomics. Vol. ۱۳, No. ۲, pp: ۱۳۷-۱۴۵.

۲۷. **Simon, E.; Puky, M.; Braun, M. and Tóthmérész, B., ۲۰۱۱.** Frogs and Toads as Biological Indicators in Environmental Assessment. Nova Science Publishers, New York, USA. ۱۰ p.

۲۸. **Simon, E.; Puky, M.; Braun, M. and Tóthmérész, B., ۲۰۱۲.** Assessment of the effects of urbanization on trace elements of toe bones. Environmental Monitoring and Assessment. Vol. ۱۸۴, pp: ۵۷۴۹-۵۷۵۴.

۲۹. **Sobhanardakani, S.; Zandipak, R.; Fili, Z.; Ghoochian, M.; Sahraei, R. and Farmany, A., ۲۰۱۵.** Removal of V(V) ions from aqueous solutions using oxidized multi-walled carbon nanotubes. Journal of Water Supply: Research and Technology. AQUA. Vol. ۶۴, No. ۴, pp: ۴۲۵-۴۳۳.

۳۰. **So, L.; Cheung, R. and Chan, K.M., ۱۹۹۹.** Metal concentrations in tissues of rabbitfish (*Siganus oramin*) collected from Tolo Harbour and Victoria Harbour in Hong Kong. Marine Pollution Bulletin. Vol. ۳۹, No. ۱, pp: ۲۳۴-۲۳۸.

۳۱. **Sower, S.A.; Reed, K.L. and Babbitt, K.J., ۲۰۰۰.** Limb malformations and abnormal sex hormone concentrations in frogs. Environmental Health Perspectives. Vol. ۱۰۸, pp: ۱۰۸۵-۱۰۹۰.

۳۲. **Unrine, J.M.; Hopkins, W.A.; Romanek, C.S. and Jackson, B.P., ۲۰۰۷.** Bioaccumulation of trace elements in omnivorous amphibian larvae: Implications for amphibian health and contaminant transport. Environmental Pollution. Vol. ۱۴۹, pp: ۱۸۲-۱۹۲.

۳۳. **Welsh, H.H. and Ollivier, L.M., ۱۹۹۸.** Stream amphibians as indicators of ecosystem stress: a case study from California's redwoods. Ecological Applications. Vol. ۸, pp: ۱۱۱۸-۱۱۳۲.

۳۴. **Zhang, Y.; Huang, D.; Zhao, D.; Long, J.; Song, G. and Li, A., ۲۰۰۷.** Long-term toxicity effects of cadmium and lead on *Bufo raddei* tadpoles. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. Vol. ۷۹, pp: ۱۷۸-۱۸۳.