

## تأثیر سطوح مختلف مس و منگنز بر ساختار ریخت‌شناسی اسپرم مارماهی دهان گرد خزری

*Caspiomyzon wagneri* (Kessler, 1870)

## چکیده

مطالعه‌ی حاضر، باهدف تعیین اثر فلزات سنگین مس و منگنز بر شاخص‌های ریخت‌شناسی اسپرم مارماهی دهان گرد خزری (*Caspiomyzon wagneri*) شامل طول سر، عرض سر، سطح سر، شاخص کشیدگی سر، شاخص بیضی‌واری سر، طول تاژک، درصد قطع تاژک، درصد تخریب سر، درصد تخریب تاژک و درصد تخریب کل صورت پذیرفت. برای این منظور، اسپرم‌ها در سه زمان سه دقیقه، سه ساعت و ۳۶ ساعت، در شرایط آزمایشگاه تحت تأثیر غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر از فلزات سنگین قرار گرفتند. نتایج نشان داد، تخریب ساختار اسپرم تحت تأثیر فلزات مذکور، شامل افزایش طول، عرض و سطح سر، تخریب تاژک و تا حدودی قطع تاژک بودند که با افزایش غلظت و یا افزایش زمان مواجهه اثرات تخریبی شدیدتری نمایان شد ( $P < 0/05$ ). زمانی که مواجهه با آلاینده از زمان مشخصی، به‌منظور شبیه‌سازی تجمع هر دو فلز مس و منگنز در بافت گناده، فراتر رفت، اثرات تخریبی سبب تغییر ساختار اسپرم به‌صورت کاهش طول و افزایش عرض سر و کاهش سطح سر، قطع کامل تاژک در تمام نمونه‌ها و تغییر شکل سر اسپرم از بیضی‌شکل به دایره‌ای شکل شد. در این بین، فلز مس تأثیر شدیدتری در ایجاد نواقص ریختی در ساختار اسپرم نسبت به فلز منگنز داشت. بنابراین ورود فلزات مس و منگنز به محل تکثیر و حتی زیستگاه طبیعی این ماهی، می‌تواند با ایجاد اثرات تخریبی در فاکتورهای ریخت‌شناسی اسپرم، در قابلیت لقاح اسپرم‌ها اثرات نامطلوبی گذاشته و نرخ لقاح را به‌صورت محسوسی کاهش داده، و تهدیدی جدی برای بقای نسل این‌گونه‌ی بومی به‌حساب آیند.

واژگان کلیدی: تولیدمثل، مارماهی، شاخص‌های ریخت‌شناسی، آلودگی.

## مقدمه

در دهه‌ی گذشته ورود آلاینده‌ها با منشأ انسانی به‌خصوص فلزات سنگین به اکوسیستم‌های آبی، به مقدار زیادی افزایش یافته است که به‌عنوان یک خطر جدی برای این اکوسیستم‌ها به شمار می‌آید (آبادی و همکاران، ۱۳۹۷؛ تبارکی و همکاران، ۱۳۹۷؛ عبیدی و همکاران، ۱۳۹۸؛ کوهرانی و چمنی، ۱۳۹۸). میزان ورود این فلزات سنگین به اکوسیستم‌های آبی بسیار فراتر از میزانی است که به‌وسیله فرآیندهای طبیعی انجام می‌گردد (Gore, 2008؛ محمدصالحی و ولایت‌زاده، ۱۳۹۷؛ شهری و ولایت‌زاده، ۱۳۹۷؛ دولاح و عبیدی، ۱۳۹۸). مطالعات نشان داده است که فلزات سنگین با تأثیر بر سیستم تناسلی ماهیان ماده، در سنتز هورمون‌های جنسی اختلال ایجاد کرده و باعث تأخیر در بلوغ جنسی می‌گردند و همچنین در ماهیان نر بر غلظت هورمون‌های جنسی، کیفیت منی، روند اسپرماتوزن، تعداد سلول‌های اسپرماتوزنیک و ساختار اسپرم اثر می‌گذارند (Hela *et al.*, 2005).

فلز سنگین مس به مقدار اندک به‌عنوان یک عنصر ضروری در متابولیسم جانداران محسوب می‌شود و در ساختمان بسیاری از آنزیم‌ها یافت می‌گردد. اما در غلظت‌های بیش از ۲۰ میکروگرم بر گرم می‌تواند اثرات سمی قابل‌توجهی داشته باشد (Bradl, 2005). ماهیان و آبزیان نسبت

سهیل ایگدري<sup>۱\*</sup>

مریم نصرالله پورمقدم<sup>۲</sup>

باقر مجازی امیری<sup>۳</sup>

هادی پورباقر<sup>۴</sup>

نیما نعمتی مبین<sup>۵</sup>

۱، ۲، ۳، ۴ و ۵. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

\*مسئول مکاتبات:

soheil.eagderi@ut.ac.ir

کد مقاله: ۱۳۹۸۰۳۰۶۳۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۳۱

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی

ارشد است.

به پستانداران، ۱۰ تا ۱۰۰ بار به سمیت مس حساس تر می‌باشند (Othman et al., 2010). فلز منگنز نیز در بدن جانوران از اهمیت زیادی برخوردار است، زیرا بیش از ۳۶ آنزیم که برای متابولیسم کربوهیدرات، پروتئین و چربی در بدن جانوران به کار می‌رود، به منگنز نیاز دارند. باین حال منگنز سومین عنصر شیمیایی از لحاظ سمیت می‌باشد و زمانی که غلظت آن از حد معمول بالاتر رود، برای موجودات بسیار سمی است (Javed and Mahmood, 2001). در بررسی اثر فلزات سنگین بر روی تحرک اسپرم ماهیان آب شیرین *Salmo trutta*، *Clarias gariepinus*، *Leuciscus cephalus* و *fario* مشخص شد که فلز مس به میزان ۵ میلی‌گرم در لیتر تأثیر بسزایی در کاهش زمان تحرک و درصد اسپرم‌های متحرک ماهیان دارد و سبب کاهش معنی‌دار در تحرک اسپرماتوزوآهای ماهیان می‌گردد (Lahsteiner et al., 2004). Abascal و همکاران (۲۰۰۷) نیز گزارش دادند که  $Cu^{2+}$  در ماهی باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) در غلظت‌های بالای ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر قادر به تأثیرگذاری بر میزان تحرک اسپرماتوزوآ می‌باشند. همچنین نابه‌هنجاری‌های ریختی و آسیب‌های تولیدمثلی در ماهی *Oreochromis niloticus* که در مناطق آلوده به مس و کادمیوم زیست می‌کنند نیز توسط Abdelmeguid و همکاران (۲۰۰۷) گزارش شده است.

مارماهی دهان گرد خزری (*Caspiomyzon wagneri* (Kessler, 1870) از ماهیان بومی دریای خزر و حوضه‌ی آبریز آن می‌باشد. این ماهی پس از رسیدن به سن بلوغ، برای تولیدمثل به بالادست رودخانه‌ها مهاجرت کرده و در مناطق کم‌عمق با بستر شنی و سنگلاخی تخم‌ریزی و سپس می‌میرد (Sattari, 2002). در سال‌های اخیر میزان ذخایر این ماهی به دلایل مختلف از جمله ساخت سد، تخریب زیستگاه و آلودگی رودخانه‌ها کاهش چشم‌گیری پیدا کرده است (Close et al., 2002). خراط صادقی و کرباسی (۱۳۸۵) به بررسی غلظت فلزات سنگین در رودخانه‌ی شیروود، که یکی از رودخانه‌های اصلی جهت مهاجرت و تولیدمثل دهان گرد خزری است، پرداختند و مشخص کردند که این رودخانه از نظر غلظت فلزات سنگین از جمله مس و منگنز در مرحله‌ی آلودگی متوسط تا شدید قرار دارد (خراط صادقی و کرباسی، ۱۳۸۵)، از این رو با توجه به ضرورت حفظ ذخایر ژنتیکی ماهیان، حفاظت ماهیان دهان گرد از اهمیت بالایی برخوردار است.

با توجه به شرایط رودخانه‌های محل مهاجرت مارماهی دهان گرد خزری برای تکثیر طبیعی در حوضه‌ی جنوبی دریای خزر به دلیل ورود آلاینده‌های صنعتی، کشاورزی و انسانی از جمله فلزات سنگینی مثل مس و منگنز این سؤال مطرح می‌شود که در صورتی که منابع آبی محل تکثیر طبیعی مارماهی دهان گرد خزری به چنین آلاینده‌هایی آلوده باشند چه تأثیری بر اسپرم‌های آزاد شده در آب و به دنبال آن بر تولیدمثل طبیعی این ماهی خواهند گذاشت. از این رو، این تحقیق با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف مس و منگنز بر پارامترهای ریخت‌شناسی اسپرم مارماهی دهان گرد خزری در طول دوره‌ی تحرک پس از رهاسازی و در بافت بیضه قبل از رهاسازی با شبیه‌سازی تجمع آن در این بافت صورت پذیرفت.

## مواد و روش‌ها

در آبان ماه سال ۱۳۹۰، از تعداد ۱۵ مارماهی دهان گرد خزری نر کاملاً رسیده که در حال مهاجرت به سمت بالادست رودخانه شیروود (واقع در شهرستان تنکابن) جهت تولیدمثل طبیعی بودند، از زیر پل جاده ساحلی توسط تور ساچوک نمونه‌برداری صورت گرفت. بلافاصله پس از نمونه‌برداری و خشک نمودن مولدین با حوله تمیز، اسپرم‌کشی از آن‌ها از طریق ماساژ ناحیه شکمی انجام پذیرفت (Linhart et al., 1995). به منظور حذف تأثیر کیفیت مولدین و در نتیجه اسپرم آن‌ها، اسپرم‌های جمع‌آوری شده از تمامی ۱۵ نمونه، جهت ایجاد ذخیره‌ی اولیه با یکدیگر مخلوط گردید. مراحل اولیه افزودن فلزات سنگین مس و منگنز در محل رودخانه شیروود و سایر مراحل آزمایشگاهی در آزمایشگاه تکوین و بیوسیستماتیک گروه شیلات دانشگاه تهران، کرج اجرا گردید.

به منظور بررسی تأثیر فلزات سنگین مس و منگنز (به عنوان EDC=Endocrine Disrupter Chemical) بر پارامترهای ریخت‌شناسی اسپرم مارماهی دهان گرد خزری با استفاده از سولفات مس ( $CuSO_4$ -Merck) و کلرید منگنز ( $MnCl_2$ -Merck) محلول‌هایی با غلظت ۰/۰۱،

۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه گردید. آزمایش سه دقیقه‌ه‌ه‌ه جهت شبیه‌سازی تأثیر این فلزات سنگین بر ساختار اسپرم از زمان رهاسازی در آب رودخانه تا رسیدن به سطح تخمک انجام شد. آزمایش‌های ۳ و ۳۶ ساعت مواجهه نیز به‌منظور بررسی تأثیر فلزات مس و منگنز تجمع یافته در بافت بیضه ماهی بر ساختار اسپرماتوزوئید صورت گرفت. در آزمایش‌های ۳ و ۳۶ ساعت، برای جلوگیری از ایجاد تحرک اسپرم‌ها، در هنگام اضافه کردن EDC به آن‌ها، اسپرم‌ها در محلول نگهدارنده (Extender) به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق شدند. محلول نگهدارنده مورد استفاده شامل ۱۳۷ mM NaCl، ۱۲ mM KCl، ۱ mM CaCl<sub>2</sub>، ۱۰ mM HEPES (۴-۲-۱-hydroxyethyl)-۱ بود که در pH ۷/۴ توسط NaOH تعدیل گردید (Kobayashi, 1993).

هر مرحله از آزمایش (سه دقیقه، سه ساعت و ۳۶ ساعت مواجهه) شامل یک تیمار شاهد با سه تکرار و شش تیمار (غلظت‌های ۰ (شاهد)، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) با سه تکرار برای هر یک از فلزات بود. برای این منظور در هر مرحله تعداد ۲۱ میکروتیوب استریل آماده گردید و در هر یک از آن‌ها مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف فلزات سنگین ریخته شد و برای تیمار شاهد نیز از آب مقطر استفاده شد. برای آزمایش سه دقیقه، در داخل هر میکروتیوب، ۱۰ میکرولیتر از مایع اسپرمی ریخته و به آهستگی محتویات آن‌ها باهم مخلوط گردید. پس از سه دقیقه زمان مواجهه، اسپرم‌ها پس از جدا نمودن محلول حاوی فلز جهت بررسی میکروسکوپی در محلول گلوکارآلدئید ۲/۵ درصد در ۰/۱ مولار فسفات بافری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تثبیت شدند (Psenicka et al., 2007). در آزمایش‌های ۳ و ۳۶ ساعت مواجهه، اسپرم و مواد نگهدارنده، با نسبت ۱:۱ در تماس با فلزات سنگین قرار گرفتند. سپس میکروتیوب‌های حاوی اسپرم و فلز سنگین، در داخل انکوباتور در دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از سپری شدن ۳ و ۳۶ ساعت، اسپرم‌ها از انکوباتور خارج شده و پس از جدا نمودن فلزات سنگین و مواد نگهدارنده از آن‌ها، جهت بررسی میکروسکوپی همانند روش قبلی تثبیت گردیدند.

در مرحله‌ی بعد اسپرماتوزوئیدها توسط میکروسکوپ‌های الکترونی SEM و نوری مورد بررسی قرار گرفتند. در بررسی با میکروسکوپ نوری، نمونه‌های اسپرم تثبیت شده پس از رنگ‌آمیزی با محلول تولوئیدین بلو ۵ درصد، با میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین دیجیتال Dino بررسی و مورد عکس‌برداری قرار گرفتند (Hela et al., 2005). جهت آماده‌سازی نمونه‌ها برای میکروسکوپ الکترونی، در مرحله نخست اسپرم‌ها و مواد تثبیت‌کننده توسط فیلترهای کاغذی صاف شده و کاغذ صافی توسط فسفات بافر ۰/۱ مولار حاوی ۱۰ درصد سوکوروز سه مرتبه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با فواصل زمانی یک ساعت شسته شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها توسط محلول اسمیوم تتراکساید ۴ درصد به مدت ۲ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد شسته شده و سپس با استفاده از غلظت‌های مختلف محلول استون (۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد) به مدت ۱۵ دقیقه آب‌گیری شدند. پس از قرار دادن اسپرم‌ها در یک قطعه فویل آلومینیومی صیقل داده شده به ابعاد ۱×۱ سانتی‌متر، توسط دستگاه اسپوترکوتر به مدت ۷۰ ثانیه با حدود ۳۰ نانومتر طلا پوشانده شدند (Psenicka et al., 2007). از نمونه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی SEM فیلیپس (مدل XL-30، ساخت کشور هلند) با بزرگ‌نمایی‌های مختلف از حالت‌های طبیعی و غیرطبیعی اسپرم عکس تهیه شد.

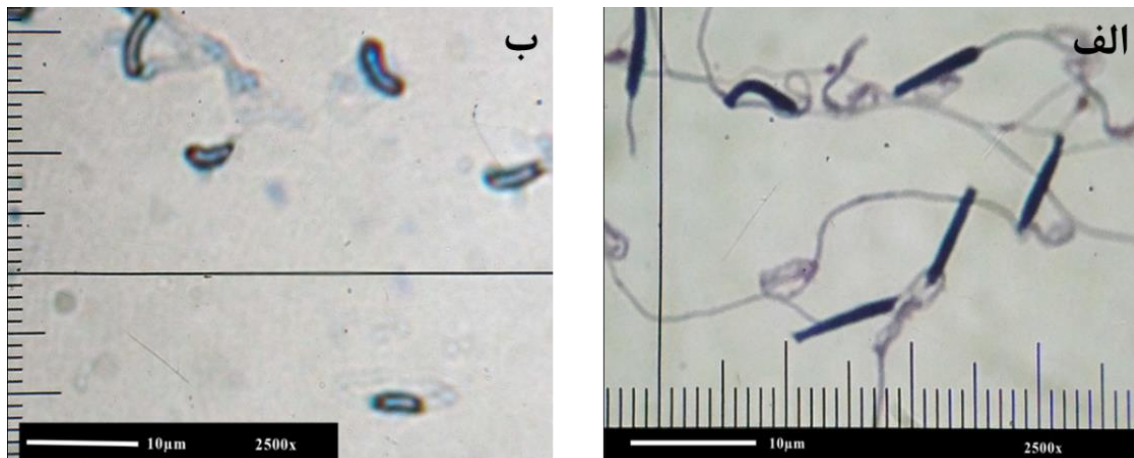
تصاویر اسپرم‌های تهیه شده توسط میکروسکوپ‌های نوری و الکترونی با استفاده از نرم‌افزار ImageJ مورد بررسی و شاخص‌هایی که در توان بارور کنندگی اسپرم نقش بیشتری ایفا می‌کنند، مورد سنجش قرار گرفتند. این شاخص‌ها به دلیل نیاز به تطابق اسپرم با میکروبیول و ارتباط مستقیم با تحرک اسپرم انتخاب شدند. این شاخص‌ها عبارت بودند از: طول سر (L)، عرض سر (W)، سطح سر (A)، شاخص کشیدگی سر  $(Elongation=100 \times (L-w)/(L+W))$ ، شاخص بیضی‌واری سر  $(Elongation=W/L)$ ، طول تاژک (L<sub>t</sub>)، درصد قطع تاژک، درصد تخریب سر، درصد تخریب تاژک و درصد تخریب کل (Brito, 2007). شاخص‌های تخریب سر شامل بزرگ شدن سر، کوچک شدن سر، ایجاد بدشکلی در سر (سر شلاقی، سوزنی، گریزی شکل)، وجود دو سر، پارگی غشاء سر، شاخص‌های تخریب تاژک شامل قطع تاژک، کوتاه شدن و پیچ‌خوردگی تاژک و شاخص‌های تخریب کل شامل درصد تخریب سر و درصد تخریب تاژک بودند (Brito, 2007).

داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS (ویرایش ۱۸) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی گردید. پس از آزمون همگن بودن واریانس‌ها، جهت مشخص نمودن تفاوت معنی‌داری در تیمارهای مورد بررسی از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و در صورت معنی‌دار بودن تفاوت‌ها، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین‌ها در تیمارهای مختلف استفاده گردید. معنی‌دار بودن اختلافات آماری در سطح ۵ درصد تعیین گردید. جهت رسم نمودارها از نرم‌افزارهای EXCEL 2013 و SPSS (ویرایش ۱۸) استفاده گردید.

## نتایج

طول سر اسپرم در تیمار زمانی سه دقیقه، در بیشتر از غلظت ۱ میلی گرم در لیتر فلز مس به صورت معنی‌داری افزایش یافت ( $P < 0.05$ )، اما میانگین طول سر اسپرم در هیچ‌یک از تیمارهای منگنز تغییر معنی‌داری پیدا نکرد ( $P < 0.05$ ). در زمان سه ساعت مواجهه با فلز مس، طول سر اسپرم نسبت به گروه شاهد و همچنین نسبت به زمان سه دقیقه در غلظت‌های مشابه، به صورت معنی‌داری افزایش یافت ( $P < 0.05$ )، اما طول سر اسپرم تحت تأثیر غلظت‌های مختلف منگنز در زمان سه ساعت مواجهه، تنها در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر، نسبت به تیمار شاهد و سایر تیمارها به طور معنی‌دار افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). در زمان ۳۶ ساعت مواجهه اسپرم با فلز مس، میانگین طول سر اسپرم در غلظت‌های مشابه نسبت به زمان‌های سه ساعت و سه دقیقه به طور معنی‌داری کاهش یافت ( $P < 0.05$ ) (شکل ۱)، در حالی که در این زمان در مواجهه با فلز منگنز، طول سر اسپرم با افزایش غلظت افزایش یافت ( $P < 0.05$ ).

عرض سر اسپرم در زمان سه دقیقه مواجهه با فلز مس، در غلظت بیشتر از ۱۰ میلی گرم در لیتر نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد ( $P < 0.05$ )، اما تحت تأثیر غلظت‌های مختلف منگنز در هیچ‌یک از زمان‌های سه دقیقه و سه ساعت، با افزایش غلظت، تغییر معنی‌داری نشان نداد. در زمان سه ساعت مواجهه با فلز مس، افزایش عرض سر از غلظت ۱۰ به ۱۰۰ میلی گرم در لیتر معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). در مدت زمان ۳۶ ساعت مواجهه با فلز مس، میانگین عرض سر اسپرم نسبت به گروه شاهد و همچنین نسبت به غلظت‌های مشابه در زمان‌های سه دقیقه و سه ساعت به صورت معنی‌داری افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). همچنین به طور مشابه، در زمان ۳۶ ساعت مواجهه، با افزایش غلظت منگنز، عرض سر اسپرم افزایش یافت ( $P < 0.05$ ).



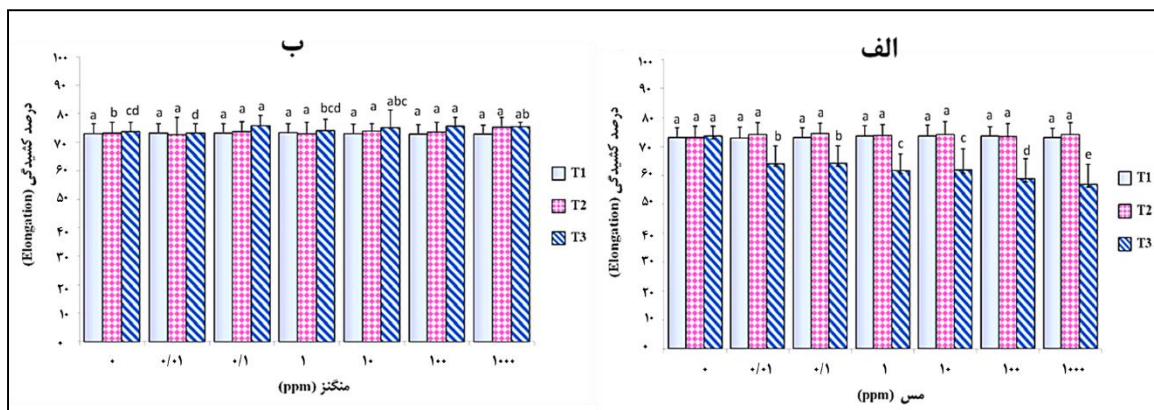
شکل ۱. مقایسه بین طول و عرض سر اسپرم مارماهی دهان گرد خزری (*Caspiomyzon wagneri*).

در زمان‌های (الف) سه ساعت و (ب) ۳۶ ساعت مواجهه با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر فلز مس. میکروسکوپ نوری (۲۵۰۰X).

میانگین سطح سر اسپرم با افزایش غلظت مس در زمان سه دقیقه مواجهه، افزایش یافت و در زمان سه ساعت مواجهه نیز، به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد و نسبت به زمان سه دقیقه مواجهه افزایش پیدا کرد ( $P < 0.05$ ). این در حالی است که در زمان سه دقیقه و سه ساعت مواجهه با فلز منگنز، سطح سر اسپرم در هیچ‌یک از تیمارها تغییر معنی‌داری نشان نداد ( $P < 0.05$ ). در زمان ۳۶ ساعت مواجهه اسپرم‌ها با فلز مس، سطح سر به‌صورت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد و زمان‌های کمتر کاهش یافت ( $P < 0.05$ ). اما سطح سر اسپرم تحت تماس با غلظت‌های مختلف منگنز در زمان ۳۶ ساعت مواجهه به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت ( $P < 0.05$ ).

شاخص‌های کشیدگی سر و بیضی‌واری در زمان‌های سه دقیقه و سه ساعت مواجهه با فلز مس، در غلظت‌های متفاوت نسبت به تیمار شاهد، اختلاف معنی‌داری نشان نداد ( $P < 0.05$ ). به‌عبارت‌دیگر در این غلظت‌ها نرخ افزایش طول و عرض به یک نسبت بود و اسپرم‌ها بدون تغییر شکل تنها دچار تغییر اندازه شده بودند. اما در زمان ۳۶ ساعت مواجهه تحت تأثیر غلظت‌های مختلف فلز مس، نسبت به تیمار شاهد و همچنین نسبت به زمان‌های سه دقیقه و سه ساعت درصد کشیدگی کاهش و شاخص بیضی‌واری، به‌طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد (شکل ۲-الف).

شاخص‌های کشیدگی سر و بیضی‌واری اسپرم تحت تماس با غلظت‌های مختلف منگنز در زمان‌های سه دقیقه و سه ساعت مواجهه، اختلاف معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد و یکدیگر غلظت‌ها نشان نداد ( $P < 0.05$ ). در زمان ۳۶ ساعت مواجهه، این شاخص‌های بین غلظت‌های مختلف منگنز، تغییرات منظمی را نشان داد. به‌طوری‌که در غلظت‌های ۰/۱ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، اسپرم‌ها بیشترین مقدار کشیدگی، و در غلظت‌های صفر و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، اسپرم‌ها کمترین مقدار کشیدگی را نشان دادند (شکل ۲-ب).

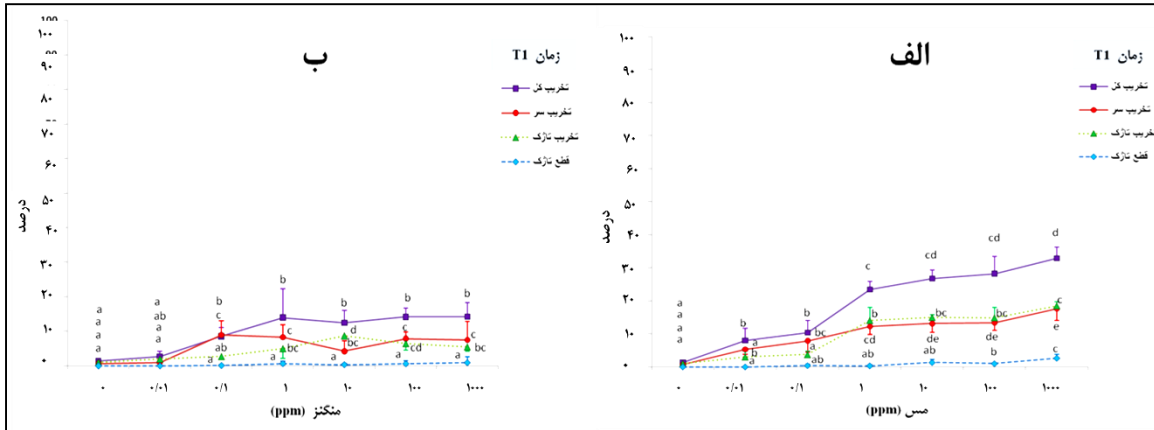


شکل ۲: نمودار میانگین درصد کشیدگی سر اسپرم مارماهی دهان‌گرد خزری (*Caspiomyzon wagneri*)

تحت تأثیر غلظت‌های مختلف (الف) مس و (ب) منگنز (T1: زمان سه دقیقه مواجهه (n=۱۳۲۷, ۱۲۶۰); T2: زمان سه ساعت مواجهه (n=۱۴۳۳, ۱۲۹۴); T3: زمان ۳۶ ساعت مواجهه (n=۱۲۶۷, ۱۱۸۶). حروف غیر همسان در هر ستون نشانه اختلاف معنی‌دار است ( $P < 0.05$ ).

میانگین درصد قطع تاژک در زمان سه دقیقه مواجهه با فلز مس، تنها در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به تیمار شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). بیشترین درصد قطع تاژک به‌میزان ۲/۶ درصد، در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. در غلظت بیش از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، تخریب سر نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ). اما تخریب کل در این زمان، حتی در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نیز نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان داد (شکل ۳-الف). در زمان سه دقیقه مواجهه اسپرم‌ها با فلز منگنز قطع تاژک در تمامی تیمارهای کمتر از یک درصد مشاهده شد. اما پیچ‌خوردگی و تابیدگی تاژک با افزایش غلظت افزایش پیدا کرد. بدشکلی سر و تخریب آن در این زمان نسبت به غلظت‌های مختلف تغییرات نامنظمی را نشان داد، به‌طوری‌که درصد تخریب سر در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر

نسبت به غلظت ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی گرم در لیتر کاهش یافت. تخریب کل با افزایش غلظت تا ۱ میلی گرم در لیتر افزایش پیدا کرد، اما از غلظت ۱ تا ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر تغییر معنی‌داری نشان نداد ( $P < 0/05$ ) (شکل ۳-ب).

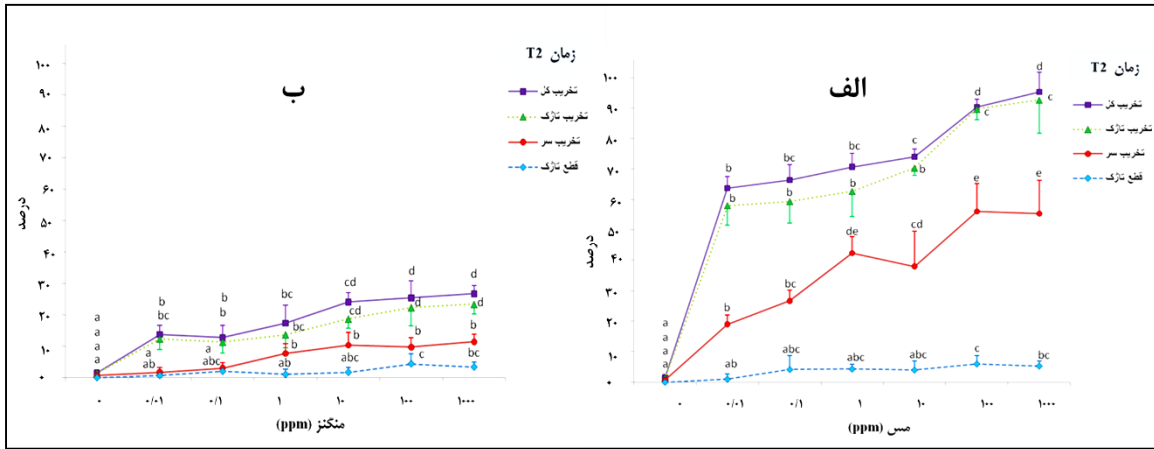


شکل ۳: نمودار درصد تخریب اسپرم مارماهی دهان گرد خزری (*Caspiomyzon wagneri*).

تحت تأثیر غلظت‌های مختلف (الف) مس و (ب) منگنز در زمان سه دقیقه مواجهه، حروف غیر همسان در هر ستون نشانه اختلاف معنی‌دار است ( $P < 0/05$ ).

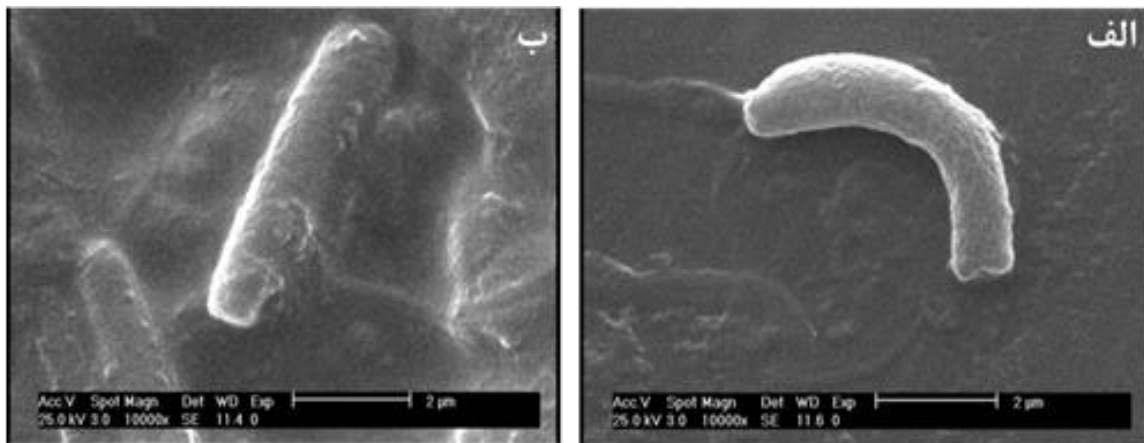
در زمان سه ساعت مواجهه با فلز مس حداکثر قطع تاژک، ۶ درصد و مربوط به غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر بود و اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد تنها در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). تخریب سر از غلظت ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر نسبت به تیمار شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بود ( $P < 0/05$ ). شباهت نمودار تخریب تاژک به نمودار تخریب کل نشان می‌دهد که بیشترین درصد تخریب کل، در این زمان به دلیل تخریب تاژک بود (شکل ۴-الف). با توجه به نتایج (شکل ۴-ب)، در زمان سه ساعت مواجهه اسپرم‌ها با منگنز، نسبت به زمان سه دقیقه، قطع تاژک افزایش پیدا نمود به طوری که در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر تا ۴ درصد قطع تاژک مشاهده شد (شکل ۵-الف). پیچ‌خوردگی و کوتاه شدن تاژک نیز نسبت به تیمار شاهد و همچنین زمان سه دقیقه افزایش پیدا نمود. اما تخریب سر نسبت به زمان سه دقیقه مواجهه، تغییر معنی‌داری نشان نداد ( $P < 0/05$ ). تخریب کل نیز به خصوص در غلظت‌های انتهایی نسبت به زمان سه دقیقه مواجهه، تا حدودی افزایش پیدا نمود.

با توجه به نتایج (شکل ۶-الف)، در زمان ۳۶ ساعت مواجهه با فلز مس، تخریب کل در غلظت ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر، ۹۷ درصد بود که در غلظت ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر به ۱۰۰ درصد رسید. در این زمان تخریب کل متأثر از تخریب سر و تاژک به طور همزمان بود، بدین معنا که تمامی اسپرم‌ها در این زمان هم دارای سر تغییر شکل یافته و هم دارای تاژک تخریب یافته بودند. در غلظت‌های بیش از ۱۰ میلی گرم در لیتر، دیواره‌ی سلولی متلاشی گشت و پارگی دیواره‌ی سلولی و وجود حفرات فراوان در آن، به وضوح قابل مشاهده بود (شکل ۵-ب). با توجه به نتایج (شکل ۶-ب)، در زمان ۳۶ ساعت مواجهه اسپرم‌ها با فلز منگنز، افزایش معنی‌داری در تمامی فاکتورهای تخریب نسبت به زمان‌های گذشته مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). تخریب کل در این زمان متأثر از تخریب تاژک بود و اسپرم‌های دارای سر تخریب یافته و تاژک سالم، به تعداد اندک مشاهده شدند.



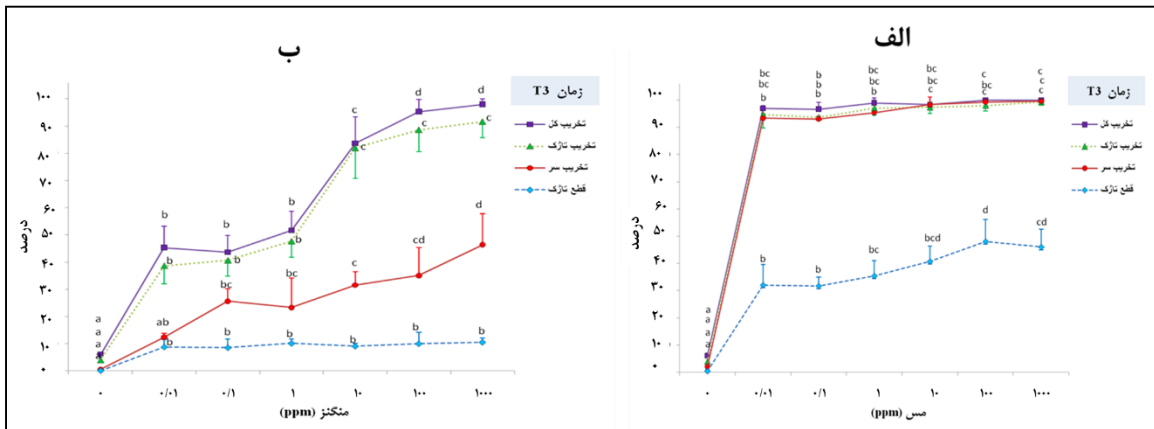
شکل ۴: نمودار درصد تخریب اسپرم مارماهی دهان گرد خزری (*Caspiomyzon wagneri*).

تحت تأثیر غلظت‌های مختلف (الف) مس و (ب) مگننز در زمان سه ساعت مواجهه. حروف غیر همسان در هر ستون نشانه اختلاف معنی‌دار است ( $P < 0.05$ ).



شکل ۵: (الف) تخریب دیواره‌ی سلولی در اسپرم مارماهی دهان گرد خزری (*Caspiomyzon wagneri*).

تحت تأثیر ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر مگننز به مدت سه ساعت (ب) اسپرم مارماهی دهان گرد خزری در تماس با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر مس در زمان ۳۶ ساعت. میکروسکوپ الکترونی (۱۰۰۰۰X).



شکل ۶: نمودار درصد تخریب اسپرم مارماهی دهان گرد خزری (*Caspiomyzon wagneri*).

تحت تأثیر غلظت‌های مختلف (الف) مس و (ب) منگنز در زمان ۳۶ ساعت مواجهه. حروف غیر همسان در هر ستون نشانه اختلاف معنی‌دار است ( $P < 0.05$ ).

### بحث و نتیجه‌گیری

تولیدمثل جنسی در ماهیان وابسته به تولید اسپرم‌هایی با کیفیت بالا می‌باشد. خسارات وارد شده به ساختار اسپرم توسط مواد شیمیایی و آلاینده‌ها می‌تواند موجب بزرگ یا کوچک شدن سر اسپرم، کوتاه شدن یا قطع تاژک، پیچ خوردگی سر اسپرم و یا پارگی غشاء شود که قابلیت تحرک و لقاح اسپرم را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Van Look and Kime, 2003). فلزات سنگین قادر به تجمع در بافت‌های جانوران بوده (Kardel and Torabi, 2019) و در فرآیند تکوین اسپرم نیز تأثیرات منفی بر جا خواهند گذاشت. سمی بودن فلزات سنگین از جمله روی، کادمیوم، مس و جیوه بر روی فاکتورهای حرکتی اسپرم و نقش آن‌ها در کاهش حرکات اسپرم مورد تأیید قرار گرفته است (Van Look and Kime, 2003; Hayati et al., 2019; Gautam and Chaube, 2018). تجمع مواد سمی در بیضه ماهیان علاوه بر آتروفی سلول‌های لاپدید، می‌تواند موجب کاهش سطح سنتز هورمون‌های جنسی در ماهیان گردد. کاهش اندازه و تعداد سلول‌های زایا و ژرمینال فعال و کاهش قطر مجاری اسپرم ساز از دیگر تأثیرات سموم بر بیضه ماهیان می‌باشد (Dutta and Arends, 2003).

بر اساس نتایج این تحقیق، در زمان سه دقیقه مواجهه اسپرم‌ها با فلز سنگین مس افزایش اندازه‌ی طول، عرض و سر اسپرم مشاهده شد و همچنین افزایش غلظت اثر معنی‌داری برافزایش اندازه‌ی اسپرم نشان داد. اما در فلز منگنز در هیچ‌یک از غلظت‌ها تغییری معنی‌داری در اندازه‌ی اسپرم به جز مساحت اسپرم مشاهده نگردید. در زمان سه دقیقه مواجهه اسپرم با فلزات فوق، قطع تاژک حداکثر یک درصد گزارش گردید. بنابراین در این زمان فلزات فوق حتی در بیشترین غلظت نیز قدرت قطع تاژک را نشان ندادند. اما پیچ خوردگی، بدشکلی و کوتاه شدن تاژک از جمله موارد تخریبی مشاهده شده بود. حداکثر تخریب کل برای هر دو فلز سنگین، بیشتر متأثر از تخریب تاژک بود. فلزات سنگین مانند مس، کادمیوم و روی با اتصال به پروتئین و یا آنزیم‌های مؤثر بر متابولیسم تاژک اسپرماتوزوئیدها موجب تغییر ساختار تاژک، دژنره شدن پروتئین‌ها و توقف تحرک می‌شوند (Dietricha et al., 2010). Van Look و Kime (۲۰۰۳) اسپرم‌های ماهی گلدفیش را تحت تماس آنی با غلظت‌های مختلف جیوه قرار داده و گزارش نمودند که اندازه‌ی سر اسپرم تغییر معنی‌داری نشان نداد، اما تاژک اسپرم‌های مورد مطالعه همانند نتایج تحقیق حاضر، نسبت به اسپرم‌های طبیعی کوتاه‌تر گشته و شکستگی و تابیدگی در آن‌ها مشاهده شد. همچنین در تحقیقی دیگر انکوواسیون اسپرم باس دریایی به مدت ۱ تا ۲ دقیقه تحت تأثیر جیوه، سبب شکستگی، کوتاه شدن و ایجاد حالت حبابی شکل در تاژک گردیده بود (Abascal et al., 2007).



فلزات سنگین می‌توانند در بافت‌های جانوران تجمع پیدا کنند، این تجمع می‌تواند در بافت بیضه نیز اتفاق بیافتد، و در طی فرآیند تکوین اسپرم، تأثیرات سوء خود را اعمال کرده (Kime, 1995) و باعث بروز تغییرات ریختی در آن‌ها گردد و به‌مرور در فرایندهای اسپرماتوزن و تکامل اسپرم و شکل طبیعی آن‌ها اختلال ایجاد نماید. بر اساس نتایج شبیه‌سازی تجمع فلزات مس و منگنز در بافت بیضه، در زمان سه ساعت مواجهه اسپرم، در هر دو فلز مس و منگنز با افزایش غلظت، افزایش طول سر اسپرم مشاهده شد، به‌خصوص در فلز مس این افزایش بیشتر بود. مساحت سر اسپرم در زمان سه ساعت مواجهه با فلزات مس و منگنز، با افزایش غلظت افزایش معنی‌داری را نشان داد. افزایش اندازه سر اسپرم در اثر تماس با فلزات سنگین در این مطالعه ممکن است در اثر از دست دادن قوام سر اسپرم به‌وسیله فلزات باشد. این پدیده به دلیل از هم باز شدن رشته‌های پیچیده‌ی DNA (Uncoil) و خروج محتویات از هسته که معمولاً به علت قطع ارتباط در پل‌های گوگردی حاصل می‌شود، ایجاد می‌گردد (Leno et al., 1996).

در زمان سه ساعت مواجهه‌ی اسپرم مارماهی دهان‌گرد خزری با فلزات سنگین قطع تاژک نسبت به زمان سه دقیقه افزایش پیدا کرد، اما با این حال در بیشترین حالت خود از ۵ درصد فراتر نرفت؛ اما پیچ‌خوردگی و کوتاهی تاژک که نسبت به قطع تاژک به‌طور چشم‌گیری افزایش پیدا کرد. به‌خصوص در فلز مس، تخریب تاژک نسبت به فلز منگنز افزایش محسوسی را نشان داد. تاییده شدن و پیچ‌خوردگی تاژک احتمالاً به سبب فشردگی و کشش محوری در میکروتوبول و در نتیجه جدا شدن آن‌ها می‌باشد که در نهایت سبب شکستن تاژک می‌شود (Au et al., 2001). تغییرات ریختی مشاهده‌شده توسط میکروسکوپ الکترونی اسکن در اثر تماس فلزات سنگین مس و منگنز بسیار واضح بود و نشان‌دهنده‌ی این نکته می‌باشد که فلزات سنگین علاوه بر تغییر در ساختارهای فیزیولوژیک اسپرم‌ها (مانند اختلال در فاکتورهای حرکتی اسپرم و اختلال در سیستم تنفسی) (Bradl, 2005; Kim et al., 2001)، می‌توانند باعث ایجاد نواقص ساختاری و آناتومیکی نیز شوند. ابراهیمی (۱۳۸۳) گزارش کرد که در غلظت‌های ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر فلز سنگین مس در زمان سه ساعت، هیچ‌گونه تغییرات ریختی در ساختار اسپرم ماهیان کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مشاهده نگردید و با افزایش غلظت مس به ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تغییرات ریختی در اسپرم آغاز شد، سر اسپرم بزرگ‌شده و قطر آن به بیش از دو برابر حد طبیعی گردید. همچنین گزارش شد که غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر مس در زمان سه ساعت مواجهه با اسپرم‌های ماهیان کپور معمولی و قزل‌آلای رنگین‌کمان، سبب افزایش اندازه‌ی سر تا ۴ برابر اندازه‌ی طبیعی گردید (ابراهیمی، ۱۳۸۳)، درحالی‌که در این آزمایش در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر از فلز مس، حداکثر ۳۰ درصد افزایش طول را نشان داد. دلیل این اختلاف با نتایج تحقیق حاضر می‌تواند تفاوت در نوع اسپرم این گونه‌ها باشد، زیرا اسپرم ماهی‌های کپور و قزل‌آلای کروی و اسپرم مارماهی دهان‌گرد خزری استوانه‌ای شکل می‌باشد (مجازی امیری و همکاران، ۱۳۹۵). همچنین ابراهیمی (۱۳۸۳) پارگی دیواره سلولی در ناحیه سر اسپرم‌ها، از بین رفتن شکل طبیعی اسپرم، قطع کامل دم و حالت ابری و یا مشابه کلاف پنبه به دلیل خروج محتویات هسته را تحت تأثیر فلز مس گزارش نمود. ابراهیمی (۱۳۸۳) گزارش نمود در زمان سه ساعت، در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر میانگین تعداد اسپرم‌های دارای سر غیرطبیعی در اثر تماس با مس ۶۵ درصد بوده که در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به ۱۰۰ درصد رسید. درحالی‌که در آزمایش حاضر اسپرم‌های دارای تخریب سر در زمان سه ساعت در غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر از فلز مس به ترتیب ۳۸ و ۵۶ درصد مشاهده شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت اسپرم مارماهی دهان‌گرد خزری، از نظر تخریب سر تحت غلظت‌های یکسان از فلز مس، نسبت به اسپرم ماهیان قزل‌آلای و کپور مقاوم‌تر می‌باشد.

هنگامی که اسپرم‌ها به مدت ۳۶ ساعت تحت تأثیر فلزات سنگین مس و منگنز انکوبه شدند، نتایج متفاوتی از نظر اندازه‌ی اسپرم در فلزات مختلف مشاهده گردید، اما از نظر درصد تخریب نتایج تقریباً مشابه بود. فلز مس، سبب کاهش اندازه‌ی طول اسپرم گردید. به‌طوری‌که اسپرم‌ها در بسیاری از موارد حالت استوانه‌ای شکلی خود را از دست‌داده و کروی شکل گردیدند. اسپرم‌های تحت تماس با فلز منگنز، با افزایش غلظت افزایش طول و عرض را نشان دادند. در غلظت ۱۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر منگنز در زمان ۳۶ ساعت، بیشترین اندازه‌ی طول سر اسپرم نسبت به تیمارها و

زمان‌های دیگر مواجهه با این فلز مشاهده گردید که ۲۱/۴ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش پیدا کرده بود. نتایج نشان داد که اگر شدت تخریب اسپرم از حد خاصی فراتر رود، روند افزایشی اندازه‌ی سر اسپرم متوقف گشته و روند کاهشی آغاز می‌گردد. بنابراین فلز مس که قدرت تخریب بیشتری را نشان داد، موجب کاهش اندازه‌ی سر اسپرم شد. همچنین به نظر می‌رسد فلز منگنز شدت تخریب کمتری نسبت به فلز مس ایجاد می‌کند، زیرا حتی در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در زمان ۳۶ ساعت هنوز روند کاهشی اندازه‌ی اسپرم آغاز نشد. در مطالعه‌ای که به بررسی اثر فلز جیوه در مدت ۲۴ ساعت بر روی اسپرم گلدفیش پرداخته بود، گزارش شد تا غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر، طول، عرض و مساحت سر اسپرم افزایش یافت، اما با افزایش غلظت به ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، طول، عرض و مساحت سر اسپرم روند کاهشی پیدا نمود (Van Look and Kime, 2003).

با توجه به نتایج مشخص گردید فلزات سنگین مس و منگنز، می‌توانند از طریق ایجاد نواقص ریختی در ساختار اسپرم، موفقیت تولیدمثلی مارماهی دهان گرد خزری را در محیط‌های آلوده به‌شدت تحت تأثیر قرار دهند. نتایج آزمایش سه دقیقه مواجهه اسپرم‌ها با مس و منگنز به‌منظور شبیه‌سازی تأثیر آن‌ها بر ساختار اسپرم در زمان رهاسازی در آب نشان داد که بیشترین تأثیر مربوط به تخریب تاژک بود که بر تحرک اسپرم تأثیر زیادی دارد. در آزمایش‌های ۳ و ۳۶ ساعت مواجهه نیز به‌منظور بررسی تأثیر تجمع این فلزات در بافت بیضه ماهی بر ساختار اسپرماتوزوئید، نتایج نشان داد مواجهه با فلزات فوق باعث از بین رفتن شکل طبیعی اسپرم به‌ویژه تغییر طول سر و همچنین پیچ‌خوردگی، کوتاهی و قطع تاژک می‌گردد. در این بین، فلز مس تأثیر شدیدتری در ایجاد نواقص ریختی در ساختار اسپرم نسبت به فلز منگنز در هر دو نوع آزمایش کوتاه‌مدت و درازمدت داشت. بنابراین تماس با هر گونه آلودگی در تمامی مراحل زندگی، به‌خصوص در فصل تولیدمثل، حتی در غلظت‌های اندک نیز، می‌تواند موفقیت تولیدمثلی این گونه را تحت تأثیر قرار داده و از بقای گونه‌ای این ماهی در معرض خطر، بکاهد.

## سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه تهران به اجرا درآمد.

## منابع

- آبادی، م.، زمانی، ع.، پری زنگنه، ع.، خسروی، ی. و بدیعی، ح.، ۱۳۹۷. اندازه‌گیری غلظت فلزات سنگین (Pb و Cd، Co، Ni، Cu، Zn) در آب و جلبک اسپروژیر (*Spirogyra sp.*) در امتداد سواحل جنوبی ایرانی دریای خزر. زیست‌شناسی دریا، ۱۰(۳)، ۵۲-۳۹.
- ابراهیمی، م.، ۱۳۸۳. بررسی برخی تغییرات ریخت‌شناسی ناشی از اثرات سمی فلز مس بر اسپرم ماهی کپور و قزل‌آلا با استفاده از میکروسکوپ الکترونی اسکن (SEM). مجله علمی شیلات ایران، ۲، صفحات ۱-۱۰.
- تبارکی، ر.، عبدی سرتنگ، ع.، عابدینی، ز. و یوسفی، س.، ۱۳۹۷. جذب زیستی تیتان زرد و متیل رد توسط *Sargassum glaucescens*: مطالعه سینتیک، ایزوترم و ترمودینامیک. زیست‌شناسی دریا، ۱۰(۳)، صفحات ۱۰-۱.
- خراط صادقی، م. و عبدالرضا کرباسی، ع. ۱۳۸۵. بررسی غلظت و منشأ عناصر سنگین در رسوبات بستر رودخانه شیروود. فصلنامه علوم و تکنولوژی محیط‌زیست. ۸(۳)، صفحات ۵۲-۴۳.
- دولاح، ع.، عبیدی، ر.، ۱۳۹۸. تعیین سطح غلظت فلزات سنگین مس، روی و آهن در بافت عضله ماهی صیبتی (*Acanthopagrus cuvieri*) در بندر بوشهر. زیست‌شناسی دریا، ۱۱(۱)، صفحات ۴۲-۳۵.
- شهری، ا. و ولایت زاده، م.، ۱۳۹۷. تجمع نیکل، کادمیوم و سرب در عضله میش ماهی (*Argyrosomus hololepidotus*) و ماهی سوکلا (*Rachycentron canadum*) در دریای عمان (خلیج چابهار). زیست‌شناسی دریا، ۱۰(۱)، صفحات ۸۶-۷۷.

عبیدی، ر.، دولاح، ع.، ضیائیان نوریخش، ه.، راوردشیری، م. و فقیه نژاد، ا.، ۱۳۹۸. غلظت مس، روی و آهن در عضله و کبد ماهیان شیر *(Scomberomorus commerson)* و قباد *(Scomberomorus guttatus)* در شمال خلیج فارس. زیست‌شناسی دریا، ۱۱(۲)، صفحات ۸۶-۷۵.

کوهرائی، پ. و چمنی، ع.، ۱۳۹۸. میزان آلودگی دو فلز سرب و نیکل در رسوبات و ریشه و برگ گیاه چنندل در تالاب بین‌المللی خور آذینی در ایران. زیست‌شناسی دریا، ۱۱(۲)، صفحات ۳۲-۲۱.

محمدصالحی، ا. و ولایت‌زاده، م.، ۱۳۹۷. میزان آهن، روی و مس در بافت عضله، کبد و خاویار تاسماهی سبیری پرورشی (*Acipenser baerii*) در استان خوزستان. زیست‌شناسی دریا، ۱۰(۲)، صفحات ۷۶-۶۵.

مجازی امیری، ب.، ایگدری، س.، پورباقر، ه.، پورمقدم، م. و نعمتی مبین، ن.، ۱۳۹۵. ریخت‌شناسی بافت بیضه و ساختار اسپرماتوزوئید مارماهی دهان‌گرد خزری (*Caspiomyzon wagneri*). نشریه توسعه آبی‌پروری، ۱۰(۳)، صفحات ۱۵۹-۱۵۱.

**Abascal, F. J., Cosson, J. and Fauvel. C., 2007.** Characterization of sperm motility in sea bass: the effect of heavy metals and physicochemical variables on sperm motility. *Journal of fish Biology*, 70:509-522.

**Abdelmeguid, N. E., Kheirallah, A. M., Matta, C. A. and Abdel-Moneim, A., 2007.** Environmental contaminant-induced spermatozoa anomalies in fish inhabiting Lake Mariut, Alexandria, Egypt. *International Journal of Applied Environmental*, 2:1-18.

**Au, D. W. T., Reunov, A. A. and Wu, R. S. S., 2001.** Reproductive impairment of sea urchin upon chronic exposure to cadmium. Part II: effects on sperm development. *Environmental Pollution*, 111:11-20.

**Bradl, H. B., 2005.** Heavy Metals in The Environment. Academic Press, 269 pp.

**Brito, L. F. C., 2007.** Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 6:249-264.

**Close, D. A., Fitzpatrick, M. S. and Li, H. W., 2002.** The ecological and cultural importance of a species of extinction Pacific lamprey. *Fisheries*, 27:19-25.

**Dietricha, G. J., Dietricha, M., Kowalskia, R. K., Doboszb, S., Karola, H., Demianowicza, W. and Glogowskia, J., 2010.** Exposure of rainbow trout milt to mercury and cadmium alters sperm motility parameters and reproductive success. *Aquatic Toxicology*, 97:277-284.

**Dutta, H. M. and Arends, D., 2003.** Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environmental Research*, 91:157-162.

**Gautam, G. J. and Chaube, R., 2018.** Differential effects of heavy metals (cadmium, cobalt, lead and mercury) on oocyte maturation and ovulation of the catfish *Heteropneustes fossilis*: an in vitro study. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18: 1205-1214.

**Gore, A.C., 2008.** Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrinology. *Frontiers Neuroendocrinology*, 29:358-374.

**Hayati, A., Wulansari, E., Armando D.S., Sofiyanti, A., Fu'adil Amin, M. H. and Pramudya, M., 2019.** Effects of in vitro exposure of mercury on sperm quality and fertility of tropical fish *Cyprinus carpio* L., *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 45(2): 189-195,

**Hela, D. G., Lambropoulou, D. A., Konstantinou, I. K. and Albanis, T. A., 2005.** Environmental monitoring and ecological risk assessment for pesticide contamination and effects in Lake Pamvotis, northwestern Greece. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24:1548-1556.

**Javed, M. and Mahmood, G., 2001.** Metal toxicity of water in a stretch of river Ravi from Shahdera to Baloki headworks. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 38:37-42.

**Kardel, F. and Torabi, N., 2019.** Biosorption of nickel by *Halobacillus* sp. KN57 isolated from the Miankaleh Wetland, Iran. *International Journal of Aquatic Biology*, 7(5): 280-290.

**Kim, D. E., Van look, K. J. W., McAllister, B. G., Huyskens, G., Rurangüa, E. and Olleveir, F., 2001.** Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C. Toxicology and Pharmacology*, 130:425-432.

**Kime, D. E., 1995.** The effects of pollution on reproduction in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 5:52-96.

- Kobayashi, W., 1993.** Effect of osmolality on the motility of sperm from lamprey, *Lampetra japonica*. *Zoological Science*, 10:281-285.
- Lahsteiner, F., Mansour, N. and Berger B. 2004.** The effect of inorganic and organic pollutants on sperm motility of some freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology*, 65:1283–1297.
- Leno, G. H., Mills, A. D., Philpott, A. and Laskey L. A. 1996.** Hyperphosphorylation of uncleoplasmin facilitates *Xenopus* sperm decondensation at fertilization. *The Journal of Biological Chemistry*, 271: 7253-7256.
- Linhart, O., Mims, S. D. and Shelton, W.L., 1995.** Motility of spermatozoa from shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platoryneclus* Rafinesque 1820) and paddlefish (*Polyodon spathulla* Walbaum, 1797). *Journal of Fish Biology*, 97:902-909.
- Othman, M. S., Nadzifah, Y. and Ahmad, A. K., 2010.** Toxicity of copper and cadmium to freshwater fishes. *World Academy of Science*, 65:869-871.
- Psenicka, M., Hadi Alavi, S. M., Rodina, M., Gela, D., Nebesarova, J. and Linhart, O., 2007.** Morphology and ultrastructure of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) spermatozoa using scanning and transmission electron microscopy. *Biology of the Cell*, 99:103-115.
- Satari, M., Shahsavani, D. and Shafiei, S. H., 2002.** Systematic Ichthyology. Hagh Shenas, 220 pp. (In Farsi)
- Van Look, K. J. W. and Kime, E., 2003.** Automated sperm morphology analysis in fishes: the effect of mercury on goldfish sperm. *Journal of Fish Biology*, 63:1020-1033.