نشریه فن‌آوری‌های نوین در توسعه آبزی‌پروری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر/ ISSN: 2008-0026 سال دوازدهم، شماره سوم، پاییز ۹۷ / صفحات: ۱۱-۱

تأثیر فلز سنگین جیوه بر تحرک اسپرم و ساختار بیضه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) با استفاده از تکنیک کشت بافت (*In vitro*)

*فاطمه فداکارماسوله[۱]، باقر مجازی‌امیری[۲]، علیرضا میرواقفی[۲] و محمدعلی نعمت‌اللهی[۲]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد شیلات، دانشگاه تهران، دانشکده منابع طبیعی، کرج، ایران

[۲]دانشگاه تهران، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۵/۱

چکیده

جیوه از عناصر سمی وارد شده به اکوسیستم دریای خزر بوده که قابلیت تجمع در بدن آبزیان را نیز دارا می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی تغییرات بافت بیضه و ارزیابی تحرک اسپرم ماهیان نر سفید تحت‌تأثیر این فلز سنگین می‌باشد. در ابتدا بافت بیضه با 10^{-5}، 10^{-6} و 10^{-7} مولار کلرید جیوه، به‌مدت ۳ و ٦ روز در شرایط آزمایشگاهی کشت شد و در آزمایش دوم تحرک اسپرماتوزوآی ماهیان تحت تماس با غلظت‌های ۰، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلریدجیوه مورد سنجش قرار گرفت. نتایج بیانگر افزایش بروز ضایعات بافت بیضه و کاهش روند اسپرماتوژنز با افزایش غلظت و مدت زمان تماس بود، به‌طوری‌که در غلظت 10^{-5} مولار در روز ششم، تعداد بسیار زیادی از سلول‌های جنسی نکروز یافت. همچنین با افزایش غلظت جیوه، پارامترهای تحرک اسپرماتوزوئیدها به‌صورت معنی‌داری کاهش یافت ($P<0/05$) و در غلظت ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسپرماتوزوئیدها کاملاً از حرکت بازایستادند. براساس نتایج به‌دست آمده از این پژوهش میزان بروز آسیب در بافت بیضه و اسپرماتوزآهای ماهی سفید با مدت زمان تماس و غلظت جیوه رابطه مستقیم دارد و ادامه پیشرفت آلودگی در محیط زیست این ماهیان می‌تواند در درازمدت صدمات جبران‌ناپذیری را در پی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: دریای خزر، جیوه، ماهی سفید، اسپرماتوزوآ

مقدمه

رودخانه‌های حوزه جنوبی دریای خزر یکی از منابع مهم ورود آلاینده‌های خانگی، صنعتی و کشاورزی به این اکوسیستم محسوب می‌شوند. تعداد بسیار زیادی از این مواد شیمیایی قابلیت ایجاد اختلال در سیستم درون ریز جانوران را داشته و تحت عنوان EDC[1]ها مطرح می‌شوند (McLachlan، ۲۰۰۱). از این ترکیبات می‌توان به فلزات سنگین، حشره‌کش‌ها، فتالات، آلکیل فنول، اتینیل استرادیول، هیدروکربن‌های آروماتیک و... اشاره کرد (Douxfils و همکاران، ۲۰۰۷؛ Pait و Nelson، ۲۰۰۲) که تهدیدی جدی بر سلامتی، رشد و تولیدمثل جانداران می‌باشند. ماهیان نسبت به سایر مهره‌داران، به سبب گذراندن همه طول عمرشان در محیط آبی تحت مواجهه دائم با گستره عظیمی از این مواد آلاینده می‌باشند (Yanga و همکاران، ۲۰۰۸). بیش‌تر فلزات سنگین ترکیباتی پایدار و غیرقابل تجزیه در محیط زیست بوده و از طریق پوست قابلیت جذب و تجمع در اندام‌های آبزیان را دارند. جیوه از جمله این فلزات سنگین پرخطر بوده که تاکنون موجب پیدایش آثار زیان‌بار و غیرقابل جبرانی مانند ضایعات تولیدمثلی، عصبی، تشنج و تغییرات رفتاری در جانداران شده است (Liao و

* مسئول مکاتبه: sh.fadakar@gmail.com

1- Endocrine Disrupter Chemicals

همکاران، ۲۰۰۵).

منبع اصلی آلاینده‌های دریای خزر فرآورده‌های نفتی و ضایعات حاصل از فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی است (Bashkin، ۲۰۰۶). فلز سنگین جیوه نیز به همراه آلاینده‌های مختلف صنعتی به این دریا وارد می‌شود (Zolfaghari و همکاران، ۲۰۰۷). گزارش‌های مدونی در ارتباط با غلظت فلزات سنگین در آب‌های دریای خزر در دست نیست. برخی مطالعات، از طریق اندازه‌گیری فلز جیوه در بافت ماهیچه‌ای ماهیان مختلف (Agusa و همکاران، ۲۰۰٤؛ Anan و همکاران، ۲۰۰۵)، منبع اصلی آلودگی دریای خزر با فلزات سنگین را سواحل ایران ذکر کردند و غلظت جیوه اندازه‌گیری شده در بافت ماهیچه‌ای ماهیان سواحل شرقی ایران نیز نسبت به سواحل غربی بیش‌تر بود (Anan و همکاران، ۲۰۰۵)، در حالی‌که غلظت جیوه در رسوبات سواحل ایران یکنواخت گزارش شده است (De Mora و همکاران، ۲۰۰٤). از این‌رو توجه به آثار مخرب این آلاینده بر عملکرد اندام‌های مختلف به‌ویژه بافت تولیدمثلی به سبب تأثیر مستقیم آن بر جمعیت ماهیان، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

امروزه در مطالعات آسیب‌شناسی، برای اجتناب از تماس مستقیم ماهیان با آلاینده‌ها، با استفاده از تکنیک کشت بافت، به‌عنوان ابزاری کارآمد در ارزیابی تأثیر آلاینده‌ها بر بافت‌های مختلف (Castano و همکاران، ۲۰۰۳؛ Magwood و George، ۱۹۹٦)، بافت گناد ماهی قطع شده و تحت شرایط آزمایشگاهی (*In Vitro*) انکوبه می‌شود (Song و Gutzeit، ۲۰۰۳؛ Yazawa و همکاران، ۲۰۰۲؛ Miura و همکاران، ۱۹۹۱).

ماهی سفید دریای خزر از جمله ماهیانی است که در معرض تهدید انواع آلاینده‌ها قرار داشته و مولدین بیش‌تر اواخر زمستان مهاجرت خود را برای تخم‌ریزی به رودخانه‌های حوزه جنوبی این دریا آغاز می‌کنند و پس از گذراندن مدتی به بلوغ جنسی می‌رسند و قابلیت تخم‌ریزی خواهند یافت. از آنجایی‌که فلز سنگین جیوه از جمله آلاینده‌های انکارناپذیر وارد شده به محیط‌های آبی تحت تماس با این ماهیان می‌باشند و با توجه به اثرات نامطلوب آن در فرآیند تولیدمثلی جانوران به‌ویژه ماهیان، توجه به فیزیولوژی تولیدمثلی این ماهیان مهم اقتصادی نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از این‌رو، هدف از این پژوهش بررسی تأثیر مستقیم فلز سنگین جیوه در مراحل انتهایی فرآیند رشد و رسیدگی اسپرم (اسپرماتوژنز) با استفاده از تکنیک کشت بافت بیضه این ماهی در شرایط آزمایشگاهی و سنجش حساسیت سلول‌های جنسی این بافت طی روزهای پایانی بلوغ جنسی و سپس سنجش مدت زمان تحرک و درصد اسپرماتوزوییدهای متحرک تحت تماس مستقیم با فلز سنگین جیوه در آزمایشگاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آزمایش اول: دو ماهی سفید نری که به رسیدگی کامل جنسی نرسیده بودند، در بدو ورودشان به رودخانه شیرود تنکابن در زمستان سال ۱۳۸۷ صید شده و پس از انتقال به آزمایشگاه شیلات دانشگاه تهران و سپری شدن استرس حمل و نقل به‌مدت یک هفته، برای کشت بافت با پودر گل میخک با نسبت ۱ به ۵۰۰۰ بیهوش شدند.

به‌منظور کشت بافت در شرایط *In Vitro*، بیضه ماهی به قطعات ۲۰-٦ میلی‌گرمی برش داده شد و داخل ظرف‌های ۲٤ چاهکه مخصوص کشت بافت (NUNCE, Denmark) که هر کدام از چاهک‌ها شامل ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت L-15 (Gibco, USA) و بافر HEPES (Merck, Germany) با غلظت ۱۰ میلی‌مولار (pH:7.5) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین UL^{-1} ۱۰۰۰۰ و استرپتومایسین ۱۰۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (Gibco, USA) بود، منتقل شدند (Yamaguchi و همکاران، ۲۰۰۷؛ Mojazi Amiri و

همکاران، ۱۹۹۹).

در آزمایشگاه با استفاده از نمک کلریدجیوه $HgCl_2$ (Merck, Germany) محلول‌هایی با غلظت‌های 10^{-5}، 10^{-6} و 10^{-7} مولار تهیه و پس از فیلتر کردن با فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرون (Wattman, USA) به چاهک‌های ظروف کشت اضافه شد. گروه‌های شاهد در این آزمایش، بافت‌های بیضه کشت داده شده در L-15 بدون هیچ‌گونه تماس با فلز سنگین بود. نمونه‌ها در انکوباتور مرطوب ۱۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٦ روز انکوبه شدند.

به‌منظور مقایسه تغییرات بافت‌شناسی و بررسی اثرات مدت زمان تماس با فلز سنگین در قطعات بیضه، هر کدام از تیمارهای موردنظر با ۳ تکرار، به ۲ دسته تقسیم شده و دسته اول پس از گذشت ۳ روز، دسته دوم پس از ٦ روز، جهت مطالعات بافت‌شناسی با میکروسکوپ نوری، در محلول بوئن فیکس شدند. پس از انجام مراحل تهیه اسلایدهای بافت‌شناسی، لام‌های تهیه شده با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ نوری به بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک پرداخته شد.

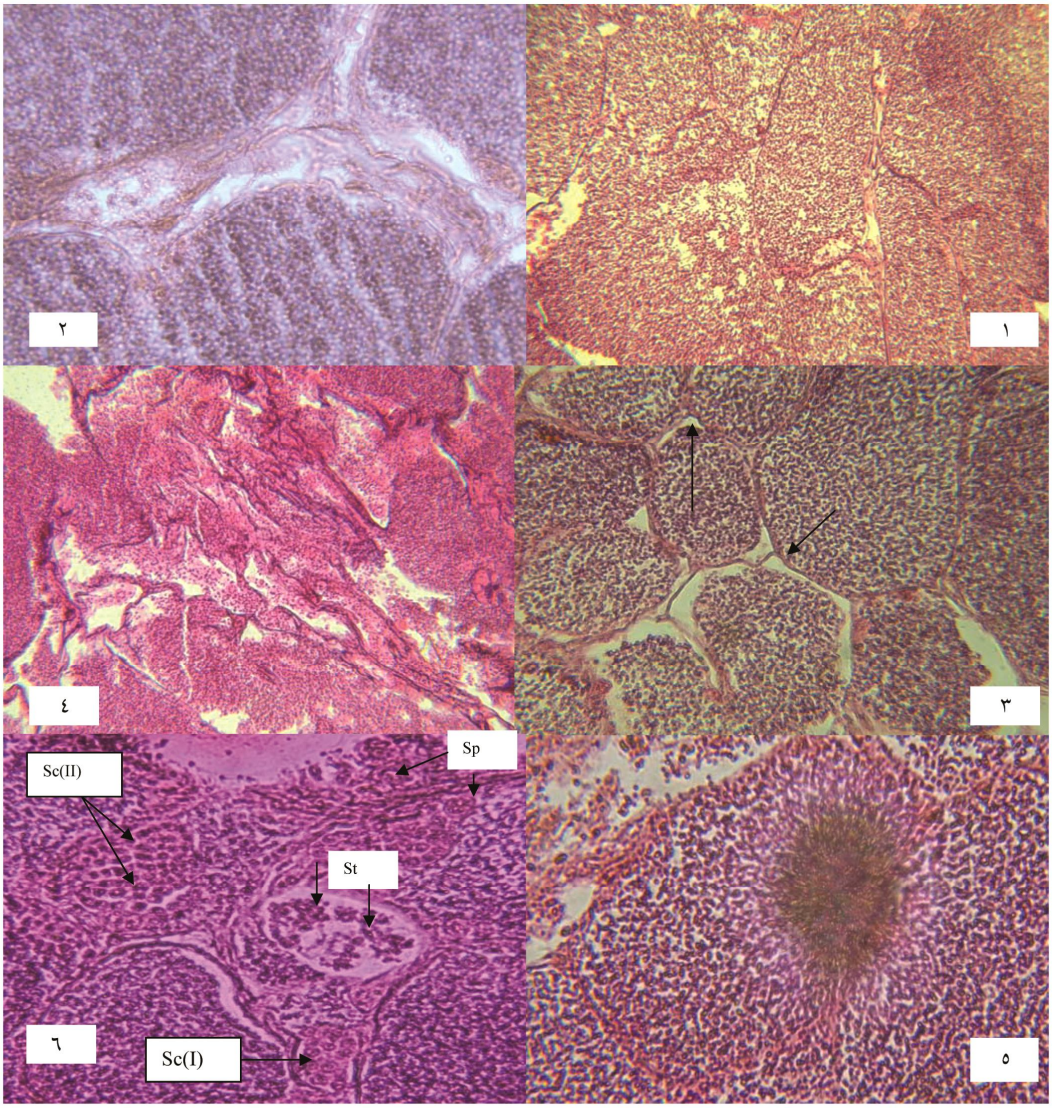
آزمایش دوم: از ٤ مولد نر ماهی سفید که از رودخانه حویق واقع در شمال‌غربی استان گیلان صید شدند، بدون این‌که بیهوشی صورت گیرد، پس از خشک نمودن بدن‌شان، با فشار به ناحیه شکمی اسپرم‌کشی صورت گرفت. نمونه‌ها به‌صورت جداگانه، به‌وسیله فلاسک همراه با یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه با استفاده از نمک‌های کلریدجیوه محلول‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه شد.

برای سنجش میزان مدت زمان تحرک و درصد اسپرماتوزوآی متحرک، ۰/۵ میکرولیتر اسپرم را بر روی لام در زیر میکروسکوپ ریخته و بلافاصله با اضافه کردن ۱ میکرولیتر از محلول آلاینده (Alavi و همکاران، ۲۰۰٤) شروع به ضبط ویدئویی تحرک اسپرماتوزوآی ماهیان با بزرگ‌نمایی ٤۰۰X گردید و تحرک اسپرماتوزوییدها با بازبینی مجدد فیلم‌ها بررسی شد. در این آزمایش‌ها تا زمانی‌که ۹۹ درصد از اسپرم‌ها متوقف شوند، به‌عنوان طول دوره تحرک اسپرماتوزوئیدها در نظر گرفته شد (Billard و همکاران، ۱۹۹۵). برای آزمایش گروه شاهد نیز از آب مقطر استفاده شد. هر آزمایش با ١٦ تکرار انجام پذیرفت.

تجزیه و تحلیل آماری: آزمایش سنجش تحرک در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شده و جدول‌های تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار SPSS 15 رسم شدند. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج

آزمایش اول: فرآیند اسپرماتوژنز در قطعات بیضه ماهی سفید پس از سپری شدن طول مدت انکوباسیون، در تیمار شاهد به‌طور مطلوبی سپری شده و سلول‌های جنسی در حفرات لوبولی بدون هیچ‌گونه آسیب سلولی مشاهده گردید (شکل ۱).



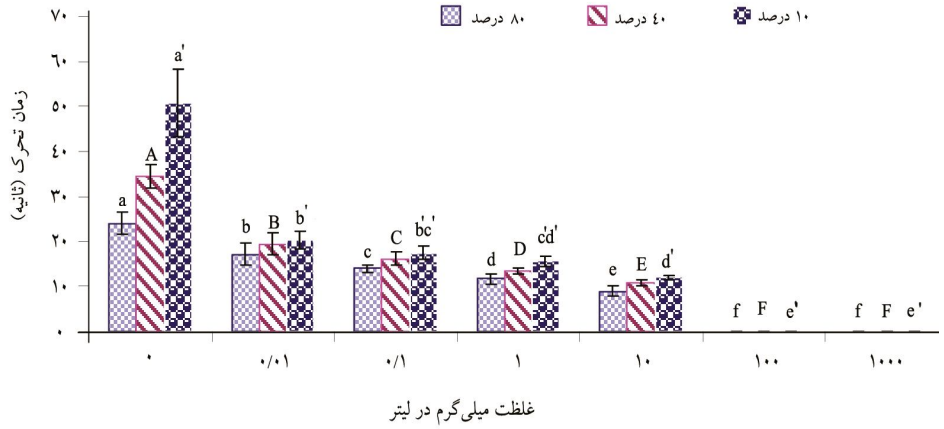
شکل ۱- ۱؛ حفرات لوبولی مملو از اسپرماتوزوآها در تیمار شاهد، ۲؛ تخریب و اضمحلال سلول‌های دیواره روز سوم غلظت 10^{-7}، ۳؛ حرکت دیواره لوبولی، ٤؛ از بین رفتن ساختمان لوبول‌ها، روز ششم غلظت 10^{-6}، ۵؛ تجمع اسپرماتوزوئیدها روز ششم غلظت 10^{-6}، ٦؛ افزایش تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت در بافت‌های تیمار شده با جیوه و توقف تقسیم سلولی و نکروز در سلول‌های اسپرماتوسیت و اسپرماتید روز ششم غلظت 10^{-5}؛ Sp اسپرماتوگونی؛ Sc(I) اسپرماتوسیت اولیه؛ Sc(II) اسپرماتوسیت ثانویه؛ St اسپرماتید

از نظر آسیب‌شناسی بافتی بین قطعات کشت‌یافته در تیمارهای مختلف فلز جیوه در روز سوم تفاوت چندانی مشاهده نشد، اما میزان اضمحلال سلولی مشاهده شده در غلظت 10^{-5} مولار به مراتب بیش‌تر از سایر تیمارها بود و با گذشت زمان در روز ششم میزان ضایعات مشاهده شده نسبت به روز سوم شایع‌تر گردید، به‌طوری‌که مرگ (نکروز) سلولی (تیرگی مشخص هسته سلول) در غلظت 10^{-5} مولار در نقاط مختلف از سطح لام به‌طور کاملاً مشخص پدیدار و با کاهش غلظت فلز سنگین جیوه در سایر تیمارها از بروز مرگ سلولی کاسته شد. تخریب و اضمحلال سلولی و توسعه بافت بینابینی در فضای لوبول‌ها از جمله آثار برجا مانده در اثر تماس جیوه با بافت بیضه بود.

پیشرفت اسپرماتوژنز در بافت‌های تحت تماس جیوه با اختلال روبرو شد و تراکم سلول‌های اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت مشاهده شده نسبت به بافت شاهد به سبب کاهش و یا توقف فرآیند تقسیم سلولی و تبدیل نشدن به سلول‌های اسپرماتید افزایش یافت.

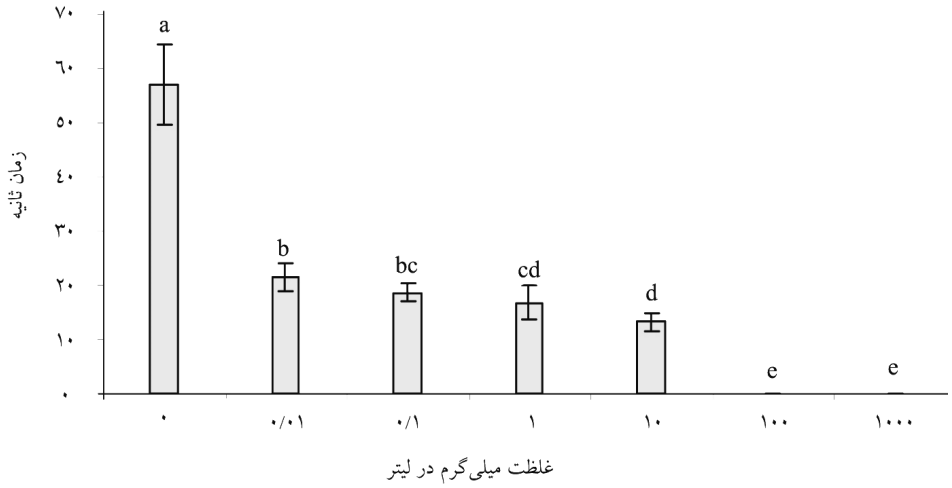
مرگ سلولی در بین سلول‌های اسپرماتید و اسپرماتوزوآها در غلظت 10^{-6} و 10^{-7} مولار در روز سوم به نسبت سایر تیمارها کم‌تر بوده و فشردگی در کلاسترهای اسپرمازوآها نیز از تراکم کم‌تری برخوردار بود. از هم‌گسیختگی، ساختارهای لوبولی نامنظم و حرکت دیواره لوبولی نیز تحت‌تأثیر فلز سنگین جیوه، صرف نظر از میزان غلظت آن، در برخی نقاط مشاهده شد.

آزمایش دوم: مقایسه مقادیر میانگین مدت زمانی‌که ۸۰، ٤٠ و ۱۰ درصد از اسپرم‌های متحرک تحت غلظت‌های مختلف جیوه به خود اختصاص می‌دهند، نشان داد که بین سطوح مختلف زمانی که ۸۰ و ٤٠ از اسپرم‌ها متحرکند، اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P<۰/۰۵$)، اما زمانی‌که از درصد اسپرم‌های متحرک کاسته شده و تنها ۱۰ درصد از اسپرم‌ها متحرکند، بین سطوح ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر و همچنین سطوح ۱ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌داری از نظر آماری وجود ندارد ($P>۰/۰۵$) (شکل ۲).



شکل ۲- درصد اسپرم‌های متحرک تحت تماس با غلظت‌های مختلف جیوه

تحلیل همبستگی پیرسون بین مدت زمان تحرک اسپرماتوزوئیدها و دوزهای مختلف از فلز جیوه در درصدهای مختلف از اسپرم‌های متحرک نشان داد که رابطه معنی‌دار و منفی در سطح ۱ درصد بین غلظت‌های مختلف از فلز جیوه و مدت زمان تحرک در ۸۰ درصد ($r= -۰/۹٦٦^{**}$)، ٤٠ درصد ($r= -۰/۹٤۷^{**}$) و ۱۰ درصد ($r= -۰/۸۸۲^{**}$) از اسپرم‌های متحرک وجود دارد. طول مدت زمان تحرک اسپرماتوزوئیدها نیز با افزایش غلظت آلاینده‌ها کاهش یافت و وجود اختلاف‌های معنی‌دار در غلظت‌های بالای جیوه نمایان‌تر شد (شکل ۳).



شکل ۳- مقایسه مدت زمان تحرک اسپرم در مواجهه با غلظت‌های مختلف جیوه

بحث و نتیجه‌گیری

جیوه از عناصر بسیار سمی در محیط می‌باشد که می‌تواند در غلظت‌های مختلف تحت مکانیسم‌های کاملاً ناشناخته آثار مخربی روی موجودات زنده داشته باشد. جیوه پس از ورود به بدنه آبی محیط، به‌وسیله جذب از طریق آبشش یا مصرف غذاهای پلانکتونی وارد بدن جانداران آبزی شده (اسماعیلی‌ساری، ۱۳۸۲) و به‌علت خاصیت سمی عصبی و قابلیت تجمع زیستی در بدن جانداران از اهمیت بالایی برخوردار است (Crump و همکاران، ۲۰۰۹). جیوه تجمع‌یافته در بافت ماهیان نیز بستگی به فاکتورهایی مانند گونه، موقعیت جغرافیایی، اندازه، جنسیت و طول دوره دریافت این ماده از محیط دارد (Jahed khani و همکاران، ۲۰۰۵).

پژوهش‌های متعددی مبنی بر میزان تأثیرگذاری فلز سنگین بر وضعیت تولیدمثلی ماهیان گزارش شده است و همگی تأثیرات سوء فلز سنگین جیوه را در پیشرفت فرآیند تولیدمثلی تأکید کرده‌اند. بازده تولیدمثلی در ماهیان قناتی (*Pimephales promelas*) که با جیره‌های غذایی شامل متیل جیوه تغذیه شدند نیز کاهش پیدا کرد و در برخی موارد توقف تولیدمثلی نیز گزارش شده است (Hammerschmidt و همکاران، ۲۰۰۲). جیوه حتی در کاهش رشد و توسعه گنادی در ماهیانی که به بلوغ جنسی نرسیده‌اند نیز تأثیرات به‌سزایی دارد (Friedmann و همکاران، ۱۹۹۶)، به‌طوری‌که این عنصر با تجمع در بافت گنادی ماهیان نر خاویاری (*Acipenser transmontanus*) باعث کاهش شاخص گنادوسوماتیک و کاهش سطح هورمون‌های جنسی تستوسترون و ۱۱ کتوتستوسترون شده است (Webb و همکاران، ۲۰۰۶).

بررسی‌های انجام شده روی بیضه ماهی سفید نر تحت اثر غلظت‌های مختلف از فلز سنگین جیوه نشان‌دهنده بروز ضایعات هیستوپاتولوژیکی است که با افزایش غلظت و مدت زمان تماس در بافت بیش‌تر شده است. به‌طوری‌که با افزایش میزان غلظت و مدت زمان تماس تغییرات ساختاری حفرات لوبولی، اضمحلال و نکروز سلول‌های جنسی تشدید و در نهایت به کاهش و یا توقف اسپرماتوژنز انجامیده است. تجمع اسپرماتوگونی‌ها در بافت‌های کشت‌یافته با غلظت 10^{-5} و 10^{-6} مولار جیوه به مراتب نسبت به تیمارهای شاهد بیش‌تر بوده که نشانه پیشرفت نکردن فرآیند تقسیم سلولی و تشکیل سلول‌های اسپرماتید و اسپرماتوزوآ بوده است.

اختلافات درون‌گونه‌ای ماهیان نیز در چگونگی اثر مواجهه با جیوه می‌تواند مهم باشند و به‌نظر می‌رسد که

کپورماهیان نسبت به آلودگی به این فلز مقاوم‌ترند (Kime و همکاران، ۲۰۰۱). تماس ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر جیوه با گربه‌ماهی (*Clarias batrachus*) موجب کاهش اندازه لوله‌های سمینیفروس[1] در مقایسه با گروه‌های شاهد، که محتوی اسپرماتوزوآ بودند، شده و به جهت توقف در اسپرماتوژنز اکثراً از اسپرماتیدها پر شده است. همچنین مرگ سلولی در سلول‌های لایدیگ نیز گزارش شده است (Kirubagaran و Joy، ۱۹۹۲).

نکروز در هسته سلول‌های اسپرماتوسیت و اسپرماتید در بافت‌های تحت تماس با 10^{-5} مولار در روز ششم به‌نحو وسیعی پیشرفت داشته و گاهی در بیش‌تر نقاط بافت کشت داده شده نمایان بود. این ضایعه به مراتب در بافت‌های تحت تماس با فلز سنگین جیوه در روز سوم کم‌تر مشاهد شد. توقف در رشد گنادی و اسپرماتوژنز در ماهی مورل (*Channa punctatus*) (Ram و Sathyannesan، ۱۹۸۳؛ Ram و Sathyannesan، ۱۹۸٦)، کاهش شاخص GSI[2] و نکروز سلول‌های اسپرمی در ماهیان گوپی (*Poecili reticulate*) (Wester و Canton، ۱۹۹۲)، آتروفی[3] (کاهش اندازه سلول‌ها) در بافت بیضه، توقف در مرحله انتهایی اسپرماتوژنز[4] در ماهی مداکا (*Oryzias latipes*) (Liao و همکاران، ۲۰۰۵) و آتروفی در لوله‌های سمینیفروس در تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) (Arnold، ۲۰۰۰) نیز از جمله تأثیرات مخرب تولیدمثلی تحت اثر فلز سنگین جیوه عنوان شده است.

مکانیسم‌های ایجاد آتروفی در بافت بیضه تاکنون شناخته نشده اما امکان بروز این آسیب‌ها به‌وسیله تغییر در فعالیت‌های میتوزی وجود دارد (Crump و همکاران، ۲۰۰۹؛ Their و همکاران، ۲۰۰۳).

میزان غلظت جیوه‌ای که در کاهش تحرک اسپرماتوزوئیدها مؤثر است، بسته به گونه ماهی متفاوت است به‌طوری‌که تأثیر آلودگی روی پارامترهای تحرک اسپرم ۱۰ ثانیه پس از فعال‌سازی در گربه‌ماهی آفریقایی (*Clarias gariepinus*)، ۲۵ میلی‌گرم در لیتر و در ماهیان *Salmo trutta fario*، *Lota lota* و *Leuciscus cephalus* به‌ترتیب ۰/۵، ۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر عنوان شده است (Lahnsteiner و همکاران، ۲۰۰٤).

در این مطالعه، با افزایش غلظت فلز سنگین جیوه، مدت زمانی‌که درصدهای مختلف از اسپرم‌های متحرک پس از آغاز فعال‌سازی به خود اختصاص می‌دهند، کاهش یافت و مدت زمانی‌که هر یک از گروه‌های اسپرماتوزوئیدهای متحرک (۸۰، ٤۰ و ۱۰ درصد) در حداکثر فعالیت خود قرار داشته‌اند، نسبت به گروه شاهد کاهش چشم‌گیری داشته است.

همچنین هنگامی‌که بر غلظت فلز جیوه افزوده شد از میزان اسپرم‌های متحرک کاسته گردید و به‌جز گروه شاهد، هیچ‌گاه تحرک ۸۰ درصد از اسپرم‌ها بیش‌تر از ۲۰ ثانیه پس از آغاز تحرک به طول نیانجامید و با افزایش غلظت آلاینده‌ها شاهد کاهش بیش‌تری از درصد اسپرم‌های متحرک طی مدت زمان بسیار کوتاه از آغاز فعال‌سازی اسپرماتوزوئیدها بود. این‌چنین روندی در ارتباط با زمانی‌که ٤۰ و یا ۱۰ درصد از اسپرم‌ها متحرک بودند نیز صادق بود و این روند کاهشی به‌طور معنی‌داری با افزایش غلظت آلاینده ادامه یافت و تا رسیدن به غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیز موجب توقف کامل حرکت اسپرماتوزوئیدها شده بود.

تأثیر نامطلوب ۱ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر جیوه بر کاهش درصد اسپرماتوزوآهای متحرک در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز مشاهده شده است و غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر موجب توقف کامل تحرک

1- Seminiferous Tubules
2- Gonadosomatic Index
3- Atrophy
4- Spermiation

اسپرماتوزوئیدها شده است. همچنین عنوان شده که جیوه بر مراحل انتهایی تولیدمثلی، قابلیت زنده‌مانی و تحرک اسپرم نیز مؤثر است. بنابراین بر میزان تولیدمثل ماهی نیز تأثیرگذار خواهد بود (Dietrich و همکاران، ۲۰۰۹). در ماهی Sea bass حتی غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر از نمک $HgCl_2$ نیز موجب توقف تحرک اسپرماتوزوآها شده است (Abascal و همکاران، ۲۰۰۷). فلزات سنگین از طرق مختلفی قادر به تأثیرگذاری بر آغاز جنبش و تحرک اسپرم می‌باشند این فلزات از یک طرف قادر به اتصال به پروتئین‌های موجود در تاژک اسپرماتوزوئیدها که در جنبش اسپرم نقش دارند بوده و از طرفی دیگر امکان اتصال به آنزیم‌هایی که بر متابولیسم سلول مؤثرند را نیز دارا می‌باشند که در نهایت موجب تغییر ساختار تاژک، تخریب پروتئین‌ها و توقف تحرک خواهند شد (Lahnsteiner و همکاران، ۱۹۹۹؛ Dietrich و همکاران، ۲۰۰۹).

کل مدت زمان تحرک اسپرماتوزوئیدها در ماهی سفید در کم‌تر از ٦٠ ثانیه به اتمام می‌رسد، بنابراین در مدت زمان به نسبت اندکی که برای لقاح‌پذیری تخمک‌ها مطلوب شمرده می‌شود (۱۵ ثانیه) (Gage و همکاران، ۲۰۰٤)، هر گونه عاملی که موجب تأثیرات نامطلوب بر فاکتورهای کیفیت اسپرم از جمله مورفولوژی و فاکتورهای حرکتی آن شود، می‌تواند احتمال کاهش یا توقف کامل موفقیت لقاح‌دهی در ماهی را افزایش دهد (Crump و همکاران، ۲۰۰۹).

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، فلز سنگین جیوه، صرف‌نظر از تأثیرگذاری مخرب آن بر محور تنظیم هورمونی دخیل در تولیدمثل (HPG) قادر است با ورود به بافت بیضه ماهی موجب نزول کیفیت سلول‌های بافت و اسپرماتوزوآها شده و در نهایت از قابلیت لقاح و بازدهی تولیدمثلی بکاهد. از این‌رو ورود کنترل‌نشده این دست از فلزات به اکوسیستم دریای خزر و رودخانه‌های منتهی به آن در درازمدت از تولید بچه‌ماهیان سالم و ماندگاری آن‌ها کاسته و ادامه این روند می‌تواند موجب اثرات جبران‌ناپذیری بر جمعیت و ذخایر این ماهیان با ارزش دریای خزر شود.

منابع

اسماعیلی‌ساری، ع.، ۱۳۸۲. آلاینده‌ها بهداشت و استاندارد در محیط زیست. انشارات نقش مهر تهران، ۷۹۸ صفحه.

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. *J. fish Biol.* 70, 509-522.

Agusa, T., Kunito, T., Tanabe, Sh., Pourkazemi, M., and Aubrey, D.G. 2004. Concentrations of trace elements in muscle of sturgeons in the Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletin* 49, 789-800.

Alavi, S.M., Cosson, J., Karami, M., Mojazi Amiri, B., and Akhoundzadeh, M.A. 2004. Spermatozoa motility in the Persian Sturgeon, Acipenser persicus: Effect of pH, dilution rate, ions and osmolality. *Reproduction Research* 128, 819-828.

Anan, A., Kunito, T., Tanabe, Sh., Mitrofanov, I., and Aubrey, D.G. 2005. Trace element accumulation in fishes collected from coastal waters of the Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletin* 51, 882-888.

Arnold, B.S. 2000. Disruption of mercury within different trophic levels of the Okefenokee Swamp, within tissues of top level predators, and reproductive effects of methylmercury in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Ph.D. Thesis. University of Georgia, Athens, 187 p.

Bashkin, V.N. 2006. Caspian Sea environments, modern biogeochemistry: second edition. Environmental Risk Assessment, pp. 291-322.

Billard, R., Cosson, J., Perchec, G., and Linhart, O. 1995. Biology of sperm and artificial

reproduction in carp. *Aquaculture* 129, 95-112.
Castano, A., Bols, N., Braunbeck, T., Dierickx, P., Halder, M., Isomaa, B., Kawahara, K., Lee, L.E., Mothersill, C., Pärt, P., Repetto, G., Sintes, J.R., Rufli, H., Smith, R., Wood, C., and Segner, H. 2003. The use of fish cells in ecotoxicology. The report and recommendations of ECVAM Workshop 47. *Altern. Lab. Anim*. 31, 317-351.
Crump, K.L., and Trudeau, V.L. 2009. Mercury induced reproductive impairment in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 895-907.
De Mora, S., Sheikholeslami, M.R., Wyse, E., Azemard, S., and Cassi, R. 2004. An assessment of metal contamination in coastal sediments of the Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletin* 48, 61-77.
Douxfils, J., Mandiki, R., Silvestre, F., Bertrand, A., Leroy, D., Thomé, J., Pierreb, C., and Kestemont, P. 2007. Do sewage treatment plant discharges substantially impair fish reproduction in polluted rivers? *Science of the Total Environment* 372, 497-514.
Friedmann, A.S., Watzin, M.C., Brinck-Johnsen, T., and Leiter, J.C. 1996. Low levels of dietary methyl mercury inhibit growth and gonadal development in juvenile walleye (*Stizostedionvitreum*). *Aquatic Toxicology* 35, 265-278.
Gage, M.J.G., Macfarlane, C.P., Yeates, S., Ward, R.G., Searle, J.B., and Parker, G.A. 2004. Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success. *Current Biology* 14, 44-47.
Hammerschmidt, Ch.R., Sandheinrich, M.B., Wiener, G.W., Ronald G., and Rada, W.R. 2002. Effects of Dietary Methyl mercury on Reproduction of Fathead Minnows. *Environmental Science and Technoogy* 36, 877-883.
Jahed khani, Gh., Yunesian, M., Mahdavi, A.H., and Nazmara, Sh. 2005. Trace Metal Contaminants in Iranian Flat Breads. *J. Agric. and Soc. Sci*. 4, 301-303.
Jezierska, B., and Słomin´ska, I. 1997. The effect of copper on common carp (*Cyprinus carpio*) during embryonic and postembryonic development. *Pollution Archive of Hydrobiology* 44, 261-272.
Kime, D.E., Vanlook, K.J.W., McAllister, B.G., Huyskens, G., Rurangwa, E., and Olliver, F. 2001. Computer –assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Pphysiology* 130, 425-433.
Kirubagaran, R., and Joy, K.P. 1992. Toxic effects of mercury on testicular activity in the freshwater teleost, *Clarias batrachus*. *J. fish boil.* 41, 305-315.
Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., 1999. Sperm metabolism of the teleost fishes *Chalcalburnus chalcoides* and *Oncorhynchus mykiss* and its relation to motility and viability. *Journal of Experimental Zoology* 284, 454-465.
Lahsteiner, F., Mansour, N., Berger, B., 2004. The effect of inorganic and organic pollutants on sperm motility of some freshwater teleosts. *J. Fish Biol*. 65, 1283-1297.
Liao, C.Y., Zhou, Q.F., Shi, J.B., Fu, J.J., and Jiang, G.B. 2005. Mercury accumulation and distribution in medaka after the exposure to sublethal levels of methylmercury. *Bulletin of Environmental Contamination of Toxicology* 75, 584-591.
Magwood, S., and George, S. 1996. In vitro alternatives to whole animal testing, comparative cytotoxicity studies of divalent metals in established cell lines derive from tropical and temperate water fish species in a neutral red assay. Marine Environmental Research, pp. 37-40.
McLachlan, J.A. 2001. Environmental signaling: What embryos and evolution teach us 14? About endocrine disrupting chemicals. *Endocrine Reviews* 22, 319-341.
Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., and Nagahama, Y. 1991. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *National Academic Science.* USA 88, 5774-5778.
Mojazi Amiri, B., Maebayashi, M., Adachi, S., Moberg, G.P., Doroshov, S.I., and Yamauchi, K. 1999. In vitro steroidogenesis by testicular fragments and ovarian follicles in a hybrid sturgeon (Bester). *Fish Physiology and Biochemistry* 21, 1-14.
Pait, A.S., and Nelson, J.O. 2002. Endocrine disruption in fish: An assessment of recent

research and results. NOAA technical memo. NOS NCCOS CCMA 149. Silver Spring, MD: NOAA, NOS, Center for Coastal Monitoring and Assessment, 55 p.

Ram, R.N., and Sathyanesan, A.G. 1983. Effect of mercuric chloride on the reproductive cycle of the teleostean fish *Channa punctatus*. *Bulletin of Environmental and Contamamination Toxicology* 30, 24-27.

Ram, R.N., and Sathyanesan, A.G. 1986. Effect of a mercurial fungicide on the gonadal development of the teleostean fish *Channa punctatus* (Bloch). *Ecotoxicological Environment Safety* 11, 352-360.

Song, M., and Gutzeit, H.O. 2003. Primary culture of medaka (*Oryzias latipes*) testis: a test system for the analysis of cell proliferation and differentiation. *Cell Tissue Research* 313, 107-115.

Their, R., Bonacker, D., Stoiber, T., Bohm, K.J., Wang, M., Unger, E., Bolt, H.M., and Degen, G. 2003. Interaction of metal salts with cytoskeleton motor protein systems. *Toxicology Letter* 140, 75-81.

Webb, M.A.H., Feist, G.W., Fitzpatrick, M.S., Foster, E.P., Schreck, C.B., Plumlee, M., Wong, C., and Gundersen, D.T. 2006. Mercury Concentrations in Gonad, Liver and Muscle of White Sturgeon *Acipenser transmontanus* in the Lower Columbia River. *Archives of Environmental Contamination Toxicology* 50, 443-451.

Wester, P.W., and Canton, J.H. 1992. Histopathological effects in *Poecilia reticulate* (guppy) exposed to methyl mercury chloride. *Toxicol. Pathol*. 20, 81-92.

Yamauchi, S., Miura, C., Ito, A., Agusa, T., Iwata, H., Tanabe, S., Tuyen, B.C., and Miura, T. 2007. Effect of lead, molybdenum, rubidium, arsenic and organ chlorines on spermatogenesis in fish: Monitoring at Mekong Delta area and in vitro experiment. *Aquatic Toxicology* 83, 43-51.

Yanga, L., Yua, L.E., and Rayb, M.B. 2008. Degradation of paracetamol in aqueous solutions by TiO_2 Photocatalysis. *Water Research* 42, 3480-3488.

Yazawa, T., Yamamoto, T., Jin, Y., and Abe, S. 2002. Follicle-stimulating hormone is indispensable for the last spermatogonial mitosis preceding meiosis initiation in newts (*Cynops pyrrhogaster*). *Biological Reproduction* 66, 14-20.

Zolfaghari, G., Esmaili-sari, A., Ghasempouri, M., and Hassanzade Kiabi, B. 2007. Examination of mercury concentration in the feather of 18 species of birds in southwest Iran. *Environmental Research* 104, 258-265.

New Technologies in Aquaculture Development, Islamic Azad University, Azadshahr Branch
Vol. 12, No. 3, Autumn 2018

E Effects of mercury on sperm motility and testis structure of Caspian kutum (*Rutilus frisii kutum*) by using *in vitro* experiments

***F. Fadakar Masouleh[1], B. Mojazi Amiri[2], A.R. Mir Vaghefi[2] and M.A. Nemtollahi[2]**

[1]M.Sc. Graduated in Fisheries, Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran, [2]Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

Abstract

Mercury is a toxic element enters into the Caspian Sea that can accumulate in aquatic animals' organ. The aim of this study was to evaluate the testis tissue changes and estimating spermatozoa motility of kutums. At first, by using *in vitro* culture, testis with 10^{-5}, 10^{-6} and 10^{-7} M of $Hgcl_2$ solution, incubated for 3 and 6 days and in second experiment, kutums spermatozoa motility evaluated, after exposing with 0, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 and 1000 mg/l of $Hgcl_2$ solutions. The harmful effects of mercury on spermatogenesis and testis structure, with the increasing of concentration and exposed time, increased. As the inhibition of spermatogenesis and necrotic germ cells were more visible in 10^{-5} M in 6^{th} day. Sperm motility parameters decreased significantly ($P<0.05$), with the increasing of mercury concentration and spermatozoa stopped in 100 and 1000 mg/l. According to these results, amounts of injurious effects on testis and spermatozoa motility had direct relationship with time and mercury concentration, and continuous pollution in fish environment would have irreparable injuries in future.

Keywords: Caspian Sea; Mmercury; Kutum; Spermatozoa

*- Corresponding authors; sh.fadakar@gmail.com