

مقاله علمی - پژوهشی:

اثر زیر حد کشندگی سم دیازینون بر استروئیدزایی و وضعیت جنسی مولدین نر ماهی قرمز (*Carassius auratus*)

حنانه صمدی^۱، سید روح الله جوادیان^{۱*}، محمدرضا ایمانپور^۲

*Ro.javadian@gmail.com

۱- گروه شیلات، واحد قائم شهر دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، ایران

۲- گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۹

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۸

چکیده

تعیین اثرات زیر حد کشندگی سم دیازینون بر استروئیدزایی و وضعیت جنسی در مولدین نر ماهی قرمز در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. به منظور تعیین میزان LC₅₀ ماهیان در غلظت‌های ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲/۵، ۱۵ و ۲۰ میلی گرم در لیتر دیازینون، در آکواریوم قرار گرفتند. پس از تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از نرم افزار پروبیت، مقدار LC₅₀ در ۹۶ ساعت مشخص شد. مقادیر LC₅₀ طی ۹۶ ساعت (۱۱/۴۰ میلی گرم در لیتر) به دست آمد و ماهیان براساس غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵۰ و ۰/۷۵ درصد LC₅₀ در ۹۶ ساعت، و گروه شاهد (فاقد سم دیازینون) تیمار بندی شدند و به مدت ۲ ماه در غلظت‌های مذکور قرار گرفتند. در پایان دوره آزمایش، سطوح استروئیدهای جنسی (۱۷ بتا استرادیول و تستوسترون) و فاکتورهای کیفیت اسپرم از قبیل جمع اسپرم‌دهی، طول دوره تحرک، درصد اسپرم‌های متحرک، تراکم اسپرم، اسپرماتوکریت و شاخص گنادی در مولدین نر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که سم دیازینون سبب کاهش معنی‌دار تستوسترون و ۱۷ بتا- استرادیول در تیمارهای ۰/۵۰ و ۰/۷۵ درصد نسبت به شاهد (صفر درصد) شد ($p < 0.05$). اختلاف معنی‌داری در برخی از پارامترهای کیفی اسپرم مثل حجم اسپرم، تراکم اسپرم و اسپرماتوکریت بین تیمار شاهد و تیمار ۰/۲۵ مشاهده نشد، اما با افزایش میزان سم دیازینون (۰/۲۵-۰/۷۵ درصد) طول دوره تحرک اسپرم کاهش معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). درصد اسپرم‌های متحرک نیز در تیمار شاهد نسبت به تیمارهای دریافت کننده بالاتر بود و با افزایش غلظت سم دیازینون روند کاهشی داشت ($p < 0.05$). شاخص گنادوسوماتیک در تیمار شاهد نسبت به تیمارهای دریافت کننده به طور معنی‌داری بالاتر بود ($p < 0.05$) و با افزایش میزان سم روند کاهشی نشان داد. در مجموع، سم دیازینون در محیط‌های آبی حتی در غلظت‌های زیر حد کشنده سبب تغییرات منفی در سطوح استروئیدهای جنسی و کیفیت گناد نر در ماهی قرمز می‌شود.

لغات کلیدی: ماهی قرمز، دیازینون، استروئیدهای جنسی، کیفیت اسپرم

*نویسنده مسئول

مقدمه

امروزه آفت‌کش‌ها در کشاورزی و برای کنترل آفات در محیط‌های آبی و نیز برای حفظ سلامت بشر و حیوانات به کار می‌روند، اما کاربرد روزافزون و بیش از حد آفت‌کش‌ها سلامت بشر را نیز به مخاطره انداخته و اثرات معکوسی بر موجودات غیر هدف داشته و موجب آلودگی منابع آب، خاک و هوا گردیده است (پژند، ۱۳۷۸).

در حال حاضر، سموم و آفت‌کش‌ها از عمده‌ترین موارد مسمومیت ماهیان هستند که ممکن است در غلظت کم، تاثیر مستقیمی بر ماهی نداشته باشند ولی در طولانی مدت بر مراحل اولیه تکامل ماهی موثر خواهند بود (کشتکارلنگرودی و تهرانی‌فرد، ۱۳۹۷). به هر حال، آفت‌کش‌ها در بیشتر موارد منجر به آسیب به ماهیان می‌شوند. از این‌رو، تحقیقات اکولوژیک و بیولوژیک برای تعیین اثرات غیر طبیعی بر حیات محیط زیست در سال‌های اخیر افزایش یافته است (Tehranifard et al., 2007). استفاده از سموم آفت‌کش تا زمانی که شیوه‌های مبارزه بیولوژیک با آفات گیاهی مرسوم نشود، امری اجتناب‌ناپذیر است. بنابراین، توصیه بر این است که حداقل از آفت‌کش‌هایی با درجه سمیت و نیمه عمر کمتر استفاده شود (Vandergeest et al., 1997). از چند دهه قبل، ارگانوفسفرها به منزله دسته‌ای از آفت‌کش‌ها که پایداری کمتری در محیط زیست نسبت به ارگانوکلره‌ها دارند، جانشین آنها شدند (Giron-Perez et al., 2007). دیازینون یکی از آفت‌کش‌های گروه ارگانوفسفره است که مکانیزم آثار سمی آن مانند سایر سموم ارگانوفسفره، موجب مهار شدن کلیه آنزیم‌ها به‌ویژه استیل‌کولین‌استراز (آنزیمی که نقش حیاتی در عملکرد مناسب سیستم‌های عصبی در جانداران ایفاء می‌کند) می‌گردد. حساسیت ویژه جانداران به دیازینون تا حدود زیادی به قابلیت‌های جذب، مهار استیل‌کولین‌استراز و دفع مواد سمی از موجود بستگی دارد. دیازینون سمیت بسیار بالایی برای ماهیان آب شیرین، بی‌مهرگان آبی، ارگانسیم‌های مصب و دریایی دارد. اثر بازدارندگی کولین‌استراز در آزمایش‌های سمیت حاد ماهی در مواجهه با غلظت‌های بسیار پایین این حشره‌کش مشاهده شده است (Hayes and Laws, 1934).

1990). این سم می‌تواند در غلظت‌هایی که کشندگی ندارند، باعث سایر اختلالات بیولوژیک و اکولوژیک مثل عقیم کردن، کاهش همآوری و تولید مثل، عدم رشد کافی در موجودات یا بوجود آمدن نسل‌های مریض و ناسالم شود که از این طریق باعث نابودی نسل‌های جانداران می‌گردند (پژند، ۱۳۷۸).

ماهی قرمز (*Carassius auratus*) از خانواده کپور ماهیان می‌باشد. ماهی قرمز در ایران، در حوضه‌های دریای خزر، دریاچه ارومیه و هامون و رودخانه کارون پراکنش یافته است (وئوق و مستجیر، ۱۳۷۳). گونه بسیار مناسبی جهت مطالعات تولیدمثلی، مطالعات غدد درون ریز، سلولی، ایمنی شناسی، سم شناسی و مولکولی می‌باشد، زیرا از اندازه مناسبی جهت تحقیقات آزمایشگاهی برخوردار است و نیز در محیط‌های آزمایشگاهی سریع به بلوغ می‌رسد و تولیدمثل می‌نماید. در واقع، از این گونه به عنوان مدل جهت بررسی کپورماهیان استفاده می‌شود و به صورت گسترده در مطالعات تولید مثلی، کنترل هورمون و مطالعات بر سموم و سایر آلاینده‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Lee et al., 1997). در دهه‌های اخیر، به مواد شیمیایی که سیستم غدد درون ریز را به هم می‌ریزند، توجه زیادی شده است که از جمله این مطالعات می‌توان به مطالعه حنایی کاشانی و همکاران (۱۳۹۶) در مورد تعیین درجه سمیت سم دیازینون بر استروئیدزایی و شاخص‌های بیوشیمیایی مولدین ماهی قرمز اشاره کرد. نتایج این مطالعه نشان داد که سم دیازینون بر کبد مولدین ماهی قرمز اثر منفی می‌گذارد و ترشح آنزیم‌های کبدی را دچار اختلال می‌کند. همچنین میزان گلوکز و پروتئین کل در ماهیان تغییر می‌یابد که سبب اختلال در متابولیسم ماهی و در نتیجه کاهش رشد و بقاء ماهیان می‌شود (حنایی کاشانی و همکاران، ۱۳۹۶). کشتکارلنگرودی و تهرانی‌فرد (۱۳۹۷) به تاثیر زیر حد کشندگی سم دیازینون بر پارامترهای خونی و بافت‌های آبشش و عضله بچه ماهی قره‌برون (*Acipenser persicus*) پرداختند و نشان دادند که تغییرات آسیب‌شناسی بافتی و میزان مرگ و میر با افزایش غلظت سم به طور معنی‌داری افزایش یافت (کشتکارلنگرودی و تهرانی‌فرد، ۱۳۹۷). در مطالعه Banaee و همکاران

شهرستان بندرترکمن به مدت دو ماه انجام شد. برای این منظور ابتدا ۲۱۰ قطعه ماهی قرمز نر با میانگین وزنی 29.60 ± 2.76 گرم (میانگین $\pm$ انحراف معیار) تهیه شد. سپس مولدین در ۱۵ آکواریوم ۵۰ لیتری با تراکم ۱۴ قطعه ماهی در هر آکواریوم به صورت تصادفی توزیع شدند و ماهیان به مدت یک هفته به منظور سازگاری با محیط جدید نگهداری شدند. هر یک از آکواریوم‌ها به صورت جداگانه به سیستم هوادهی مجهز شدند تا سطح اکسیژن آب در سطح استاندارد قرار گیرد. طی دوره آزمایش ماهیان در این مدت روزانه به مقدار ۳ درصد وزن بدن در دو وعده غذایی (ساعت ۹ صبح و ۴ بعدازظهر) در روز با غذای مخصوص ماهی قرمز (انرژی- ساخت کشور تایلند) حاوی ۳۳/۷۱ درصد پروتئین خام، ۸/۴۱ درصد چربی خام، ۹/۲۱ درصد خاکستر و ۱/۹۲ درصد فیبر خام تغذیه شدند (Bagheri et al., 2013). عوامل فیزیکی و شیمیایی آب از قبیل درجه حرارت، pH و اکسیژن محلول با استفاده از دستگاه (Water checker-U10, HURIBA, Japan) اندازه‌گیری شد (جدول ۱). روزانه به میزان ۲۵ درصد حجم آب تعویض صورت می‌گرفت. تمامی آکواریوم‌ها به‌گونه‌ای هوادهی می‌شدند تا حداقل آشفته‌گی در آنها ایجاد شود. تنها در نوبت‌های غذایی، هوادهی به طور موقت قطع و سپس مجدداً برقرار می‌شد.

(۲۰۱۳) صدمات شدید به ساختمان سلول‌ها و بافت‌های کلیه و طحال و کبد در مواجهه با سم دیازینون در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mikiss*) مشاهده شد (Banaee et al., 2013). همچنین تحقیقات نشان داد که این مواد می‌توانند با تداخل در سیستم غدد درون‌ریز، تولیدمثل را تحت تأثیر قرار دهند. شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد این مواد شیمیایی می‌توانند فنوتیپ نرها را به‌واسطه دخالت در فعالیت طبیعی هورمون‌های جنسی تغییر دهند (Sofikitis et al., 2008).

مطالعه بر تأثیرات عواملی نظیر سموم و بسیاری از فاکتورهای متغیر دیگر بر فرایند تولیدمثل ماهیان یکی از بحث‌های بسیار مهم می‌باشد. با توجه به موارد مذکور، اغلب رودخانه‌های محل مهاجرت، تخم‌ریزی و پرورش ماهیان در مجاورت اراضی کشاورزی مصرف‌کننده سم دیازینون به عنوان آفت‌کش قرار دارند. بنابراین، این تحقیق به منظور اثر این سم بر هورمون‌های استروئیدی و برخی پارامترهای کیفی اسپرم در مولدین نر ماهی قرمز به عنوان یک مدل زیستی انجام شد.

مواد و روش کار

ماهی و شرایط پرورش

این تحقیق در سالن آبی‌پروری باران کوه استرآباد در

انحراف معیار) طی دوره پرورش ماهی قرمز $\pm$ جدول ۱: پارامترهای کیفی آب (میانگین
Table 1: Water quality parameters (mean $\pm$ SD) during goldfish rearing

متغیر	شاهد (صفر)	تیمار ۲ (۲۵ درصد)	تیمار ۳ (۵۰ درصد)	تیمار ۴ (۷۵ درصد)
دما (درجه سانتی‌گراد)	21.70 ± 0.14	21.70 ± 0.14	21.70 ± 0.14	21.70 ± 0.14
pH	8.02 ± 0.64	8.05 ± 0.78	8.12 ± 0.65	8.27 ± 0.24
اکسیژن محلول (mg/L)	8.71 ± 0.21	8.52 ± 0.31	8.32 ± 0.33	8.15 ± 0.52

سپس نتایج با استفاده از نرم‌افزار پروبیت آنالیز و میزان LC_{50} سم دیازینون در ۹۶ ساعت برابر با ۱۱/۴۰ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد. سپس برای بررسی اثر زیر حد کشندگی سم دیازینون بر استروئیدزایی و وضعیت جنسی مولدین نر ماهی قرمز تیمار بندی براساس غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵۰ و ۰/۷۵ درصد LC_{50} در ۹۶ ساعت سم

تعیین محدوده کشندگی غلظت سم دیازینون

ابتدا آزمایش مقدماتی تعیین محدوده کشندگی غلظت سم دیازینون آزمایش LC_{50} انجام شد. برای تعیین ۹۶h LC_{50} سم، ابتدا ماهیان در غلظت‌های ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲/۵، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر از سم دیازینون (کاوش، ایران) به مدت ۹۶ ساعت قرار گرفتند و میزان تلفات ثبت شد.

دیازینون برابر با ۲/۸۵ میلی گرم بر لیتر (تیمار دوم)، ۵/۷ میلی گرم بر لیتر (تیمار سوم)، ۸/۵۵ میلی گرم بر لیتر (تیمار چهارم) و گروه شاهد (فاقد سم دیازینون) انجام شد و به مدت ۶۰ روز در غلظت‌های فوق قرار گرفتند در هر تیمار (۳ تکرار) ۱۴ قطعه ماهی قرار داده شد.

تکثیر ماهیان

ماهیان تحت شرایط دمایی و تغذیه‌ای مناسب در آکواریوم‌های ۵۰ لیتری مجهز به سیستم تنظیم‌کننده نوری و دمایی به مدت دو ماه نگهداری شدند. بعد از یک ماه از شروع آزمایش به منظور تکثیر مولدین در ابتدا یک کمون سرمایی ۱۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از کاهش دمایی به صورت مرحله‌ای و به میزان حداکثر ۲ درجه سانتی‌گراد در روز اعمال گردید. همزمان با کاهش دما، نور نیز با دامنه ۸ ساعت روشنایی و ۱۶ ساعت تاریکی با استفاده از کاهش تدریجی ۱۵ دقیقه در روز، تنظیم گردید. ماهیان به مدت ۱۰ روز در شرایط ذکر شده نگهداری شدند. پس از پایان دوره کمون سرمایی، به منظور تحریک مولدین درجه حرارت آب با استفاده از افزایش تدریجی به میزان ۲ درجه سانتی‌گراد افزایش داده شد (Tan-Fermin *et al.*, 1977). همزمان با افزایش درجه حرارت دوره نوری نیز با استفاده از افزایش تدریجی ۱۵ دقیقه در روز، به دامنه ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی تغییر داده شد. ماهیان به مدت دو هفته در شرایط مذکور نگهداری شدند (ایمان‌پور و کمالی، ۱۳۸۵). تنظیم دوره نوری و درجه حرارت به ترتیب با لامپ‌های فلورسنت ۲۰ واتی متصل به یک زمان‌سنج دیجیتالی و یخچال مجهز به سیستم گرمایی هیتر صورت گرفت. پس از بروز رفتارهای تولیدمثلی و شناسایی مولدین، ماهیان نر و ماده هر تیمار جدا و در آکواریوم‌های جداگانه قرار داده شدند. برای تکثیر ماهیان از هورمون اوواپریم استفاده شد. تزریق هورمون در ماهیان نر طی یک مرحله صورت گرفت. پس از حصول اطمینان از رسیدگی کامل، مولدین نر به میزان ۰/۳ میلی‌لیتر به اِزاء کیلوگرم وزن بدن تزریق شدند. پس از تزریق به ماهیان و قرار گرفتن آنها در آکواریوم‌های جداگانه، ماهیان طی فواصل زمانی منظم

جهت رسیدگی بررسی شدند. پس از گذشت ۱۲ ساعت از تزریق دوم، منفذ تناسلی و بدن ماهیان نر با حوله خشک شد و با فشار ملایم به ناحیه شکمی، از ماهیان مولد نر اسپرم‌گیری به عمل آمد و این کار به گونه‌ای صورت گرفت که اسپرم فاقد هر گونه آلودگی با آب یا ادرار باشد. سپس مقداری از نمونه‌های اسپرم ماهیان جهت انجام آزمایش‌های لازم ذخیره شد (Olsen *et al.*, 2006).

اندازه‌گیری پارامترهای اسپرم‌شناختی

از تعداد ۵ قطعه ماهی مولد نر جهت تعیین پارامترهای اسپرم‌شناختی نمونه‌برداری صورت گرفت. برای جمع‌آوری اسپرم، پس از خشک‌کردن ناحیه شکمی مولدین نر با پارچه خشک، با فشار ملایم به ناحیه شکمی، اسپرم به وسیله لوله‌های موئینه میکروهماتوکریت ۷۷ میلی‌متر طول، ۱/۱-۲/۱ میلی‌متر قطر داخلی و ۶/۱ میلی‌متر قطر خارجی جمع‌آوری گردید. اسپرم‌های حاصله روی یخ یا داخل یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان آنالیز، نگهداری شدند (Perchec *et al.*, 1995). با استفاده از سرنگ‌های ۱ میلی‌لیتری انسولین، حجم اسپرم‌دهی ماهیان اندازه‌گیری شد (Tiersch *et al.*, 2001). برای شروع حرکت، اسپرم با محلول فعال‌کننده (آب مقطر به نسبت ۲۰۰۰:۱) رقیق شد و پارامترهای حرکتی اسپرم بلافاصله با تأخیر زمانی کمتر از ۷ ثانیه بعد از شروع فعالیت اسپرم تا زمانی که ۱۰۰ درصد اسپرم‌ها غیر متحرک شدند، با میکروسکوپ فازکنتراست، ثبت و روی صفحه مانیتور نشان داده شد. مشاهدات در دمای اتاق ۲۰-۲۲

سانتی‌گراد صورت گرفت (Turner and Montgomerie, 2002). در ادامه با استفاده از نرم‌افزار Adobe Premeier هر ثانیه به ۶ قاب تبدیل شد و با مقایسه دو قاب متوالی، درصد اسپرم‌های متحرک محاسبه شد. برای اندازه‌گیری مدت زمان حرکت اسپرم، زمان تحرک از لحظه فعال شدن تا زمانی که همه اسپرم‌ها از حرکت باز ایستادند، اندازه‌گیری گردید (Turner and Montgomerie, 2002). برای اندازه‌گیری اسپرماتوکریت، سمن جمع‌آوری شده از هر ماهی درون ۳ عدد لوله موئینه میکروهماتوکریت قرار داده شد. در حدود ۷۰ درصد هر لوله موئینه با اسپرم پر و

سنجش انجام شد (Guzman et al., 2008).

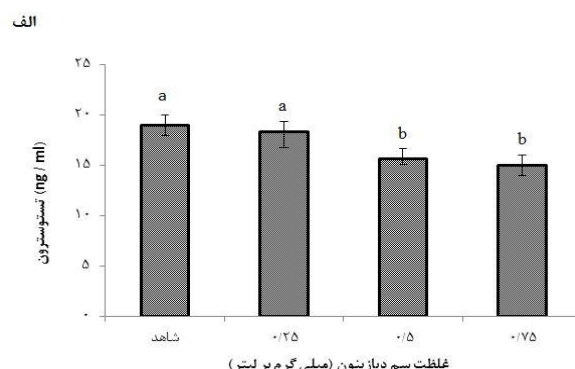
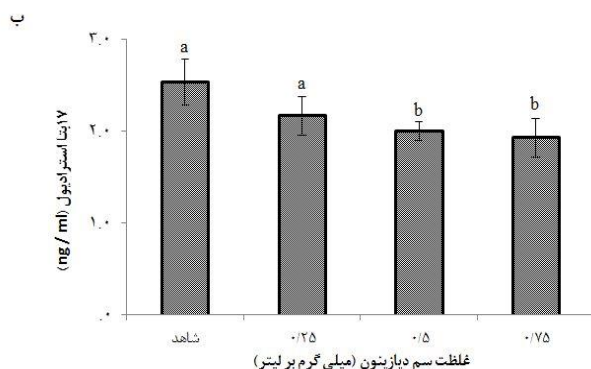
روش تجزیه و تحلیل آماری داده ها

شیوه نمونه برداری در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. داده های مربوط به هورمون های تستوسترون، ۱۷ بتا استرادیول، طول دوره تحرک اسپرم، اسپرماتوکریت، تراکم اسپرم، حجم اسپرم و شاخص گنادی توسط آنالیز واریانس یک طرفه به کمک آزمون دانت در سطح ۹۵ درصد با استفاده از نرم افزار SPSS با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج

هورمون های جنسی

سم دیازینون سبب کاهش معنی دار هورمون های تستوسترون و ۱۷ بتا- استرادیول پس از در معرض قرارگیری شد (شکل ۱، الف و ب) به گونه ای که بین تیمار شاهد و غلظت ۰/۲۵ درصد سم دیازینون اختلاف معنی داری وجود ندارد. اما در تیمارهای ۰/۵۰ و ۰/۷۵ درصد نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی داری وجود داشت ($p < 0/05$).



شکل ۱: تأثیر سم دیازینون بر هورمون های جنسی در ماهی مولد نر قرمز
Figure 1: The effect of diazinon toxin on sex hormones of goldfish

شده است. حجم اسپرم دهی و تراکم اسپرم و اسپرماتوکریت اختلاف معنی داری بین تیمار (شاهد) و تیمار ۰/۲۵ درصد مشاهده نشد. اما این دو تیمار اختلاف ۱۳۷

یکی از انتهای لوله با خمیر هماتوکریت مسدود گردید. سپس لوله های موئینه با دستگاه سانتریفوژ با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۸ دقیقه، سانتریفوژ شدند. در نهایت با استفاده از دستگاه هماتوکریت خوان، درصد اسپرم به پلاسمای سمینال اندازه گیری شد (Butts et al., 2010). محاسبه تراکم اسپرم با روش استاندارد هموسیتومتری صورت گرفت (Alavi et al., 2006).

اندازه گیری شاخص های گنادی

پس از توزین گناد ماهیان، شاخص گنادی به صورت درصد و با استفاده از فرمول ذیل برای ماهیان نر و ماده به صورت جداگانه محاسبه گردید:

شاخص گنادی = وزن گناد/وزن کل بدن $\times 100$

سنجش هورمون تستوسترون و ۱۷ بتا- استرادیول

هورمون تستوسترون با روش الایزا با دستگاه الایزا ریدر و سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر و رسم منحنی های مخصوص مقادیر هورمون ها سنجیده شد (Guzman et al., 2008). همچنین هورمون ۱۷ بتا - استرادیول با کیت تک باندی به روش الایزا اندازه گیری شد. در طول موج ۴۵۰ نانومتر و رسم منحنی های کالیبراسیون

پارامترهای اسپرم شناختی و شاخص گنادوسوماتیک نتایج حاصل از پارامترهای اسپرم شناختی و شاخص گنادوسوماتیک در جدول ۲ ارائه و شکل ۲ نشان داده

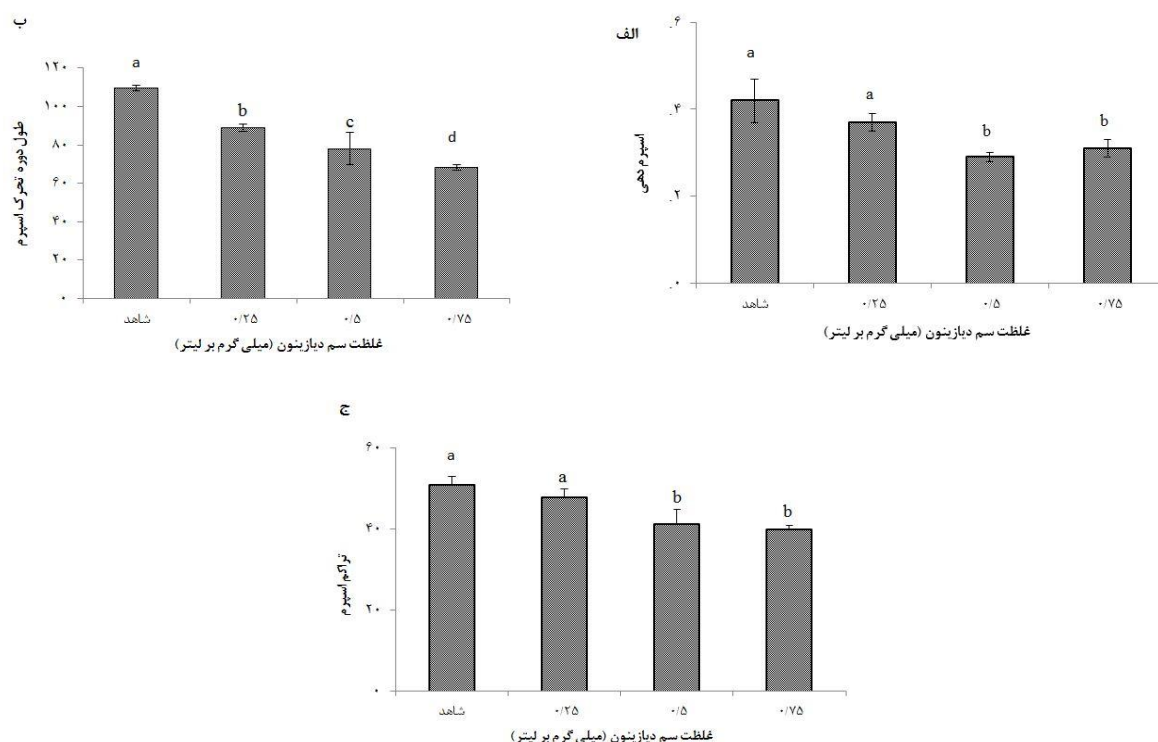
معنی‌داری با تیمارهای ۰/۵۰ و ۰/۷۵ درصد داشتند به‌طوری‌که با افزایش میزان سم در حجم اسپرم‌دهی، تراکم اسپرم و اسپرماتوکریت کاهش معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0.05$). طول دوره تحرک اسپرم تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت و با افزایش میزان سم دیازینون طول دوره تحرک اسپرم کاهش معنی‌داری

داشت ($p < 0.05$). درصد اسپرم‌های متحرک نیز در تیمار شاهد نسبت به تیمارهای دریافت کننده سم به طور معنی‌داری بالاتر بود ($p < 0.05$). شاخص گنادوسوماتیک در تیمار شاهد $4/1 \pm 0/53$ اندازه‌گیری شد و نسبت به تیمارهای دریافت کننده سم اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0.05$).

جدول ۳: مقایسه میانگین‌های پارامترهای اسپرم شناختی و شاخص گنادوسوماتیک در ماهی قرمز تحت تأثیر سم دیازینون
Table 3: Comparison of mean sperm parameters and gonadosomatic index in goldfish affected by diazinon toxin

متغیر	شاهد (صفر)	تیمار ۲ (۲۵ درصد)	تیمار ۳ (۵۰ درصد)	تیمار ۴ (۷۵ درصد)
درصد اسپرم‌های متحرک (/)	$90/00 \pm 1/00^a$	$84/00 \pm 5/29^b$	$72/33 \pm 1/15^c$	$69/00 \pm 1/73^c$
اسپرماتوکریت	$50/67 \pm 2/05^a$	$46/33 \pm 1/53^a$	$40/00 \pm 1/73^b$	$38/33 \pm 0/58^b$
گنادوسوماتیک (/)	$4/10 \pm 0/53^a$	$3/13 \pm 0/40^b$	$2/63 \pm 0/31^b$	$2/60 \pm 0/20^b$

حروف انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ در هر ردیف می‌باشد. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده‌است.



شکل ۲: مقایسه میانگین‌های پارامترهای اسپرم‌دهی (الف) طول دوره تحرک اسپرم (ب) و تراکم اسپرم (ج) در ماهی قرمز تحت تأثیر سم دیازینون

Figure 2: Comparison of mean sperm parameters in goldfish affected by diazinon toxin

تاثیرگذار است (Abadin et al., 2009). ترکیبات شیمیایی با اختلال در سنتز و ترشح هورمون‌ها، سبب اختلال در سیستم هورمونی بدن می‌شوند. بنابراین، اطلاع از مکانیسم اختلال هورمون‌ها می‌تواند به تعیین

دiazinon قادر به تجمع در بافت ماهیچه، کبد، گناد و آبشش می‌باشد (Sapozhnikova et al., 2004) و از این طریق بر هوموستازی، تولیدمثل، رشد و یا رفتار ماهیان

سبب تغییر فعالیت آنزیم‌ها و در برخی موارد سبب اختلال در روند استروئیدزایی و تولیدمثل شود. مطالعه تولید مثل ماهی شامل دو دسته شاخص‌های بلندمدت و کوتاه‌مدت است (Hedayati and Arsham, 2012). شاخص‌های بلندمدت شامل بررسی وضعیت گناد و گامت‌زایی و شاخص‌های کوتاه‌مدت بررسی استروئیدزایی و فعالیت هیپوفیز است (Matthiessen, 2003).

در مطالعه حاضر کیفیت تولیدات جنسی در ماهی قرمز تحت تأثیر غلظت زیر حد کشندگی سم دیازینون قرار گرفت. اختلاف معنی‌داری در پارامتر اسپرم‌دهی، طول دوره تحرک اسپرم و تراکم اسپرم بین تیمارها مشاهده شد و با افزایش غلظت سم دیازینون مقدار آنها کاهش یافت. نتایج این تحقیق با نتایج کردجری و ایمانپور (۱۳۸۷) هم‌خوانی داشت این محققین اثر سم بنومیل را بر خصوصیات اسپرم شناختی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده کردند که سم بنومیل اثر معنی‌داری بر این پارامترها داشت.

در مطالعه حاضر، شاخص‌های گنادوسوماتیک، درصد اسپرم‌های متحرک و اسپرماتوکریت تحت تأثیر سم دیازینون قرار گرفت و با افزایش غلظت این سم مقدار آنها کاهش یافت که از این نظر با مطالعه Eman و همکاران (۲۰۱۱) بر ماهیان تیلاپیا در معرض تماس با مالاتیون که پارامترهای اسپرم شناختی کاهش یافت، هم‌خوانی داشت. همچنین در مطالعه Fadakar و همکاران (۲۰۱۱) اثر سم دیازینون بر تحرک اسپرم در ماهی سفید نر در شرایط آزمایشگاهی بررسی گردید و نتایج نشان داد که با افزایش میزان سم دیازینون، درصد اسپرم‌های متحرک و مدت زمان تحرک اسپرم کاهش یافت. همچنین تأثیر مخرب سم دیازینون بر ماهی سالمون و کاهش تولید مایع اسپرمی در غلظت‌های مختلف این سم مشاهده شد (Cox, 2000). سموم ارگانوفسفره علاوه بر تأثیر مستقیم بر بافت تولیدمثلی (بافت بیضه) که سبب اختلال در روند اسپرماتوژنیز و تولید اسپرم می‌شود، قادر به ایجاد آسیب در مکانیزم‌های فیزیولوژیک تولیدمثل از طریق اختلال در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد و تولید هورمون‌های

نشانگرهای زیستی اختصاصی آلاینده‌های مختلف کمک کند. از این نشانگرهای زیستی می‌توان در برنامه‌های ارزیابی زیست محیطی و سلامت جمعیت ماهیان در محیط‌های آلوده استفاده کرد (Di Giulio and Hinton, 2008). نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش غلظت سم دیازینون سبب کاهش سطح هورمون‌های تستوسترون و ۱۷-بتا-استرادیول در ماهیان قرمز نر مولد شده است. بنابراین، یک رابطه بین غلظت سم دیازینون با سطح هورمون‌های استروئیدی دیده می‌شود. استروئیدهای جنسی (از قبیل اندروژن و پروژسترون) ترکیبات غیر آلی می‌باشند که نقش ضروری در کنترل هورمونی تولیدمثل در ماهیان ایفاء می‌کنند (Barannikova et al., 2004). در مطالعه Eman و همکاران (۲۰۱۱) در ماهیان تیلاپیا که تحت تماس با مالاتیون بودند، میزان تستوسترون و ۱۷-بتا-استرادیول در نرها نسبت به شاهد کاهش یافت. همچنین در مطالعه شموشکی و همکاران (۱۳۹۰) در بررسی تغییرات استروئیدهای جنسی مولدین نر ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) در غلظت‌های تحت کشنده سم دیازینون، میزان هورمون تستوسترون به طور معنی‌داری کاهش یافت.

هورمون‌های جنسی از جمله تستوسترون و ۱۷-بتا-استرادیول ممکن است به دلیل تأثیر سم دیازینون بر محور هیپوفیز-گناد باعث افزایش یا کاهش بعضی از آنها شود و سیستم تولیدمثل را دچار آسیب نمایند (Sarkar et al., 2000). از سوی دیگر، این نکته را نیز باید مد نظر داشت که سموم ارگانوفسفره نظیر دیازینون با ایجاد اختلال در عملکرد نوروترانسمیترها و نیز فعالیت غده هیپوفیزی به طور مستقیم فعالیت غدد جنسی را مهار می‌کنند (Sarkar et al., 2000) در واقع، دیازینون با تأثیر گذاشتن بر سلول‌های گنادوتروپ هیپوفیز، در سنتز و ترشح گنادوتروپین‌ها نیز اختلال ایجاد می‌کند که این امر نیز به نوبه خود می‌تواند فرایند گامتوژن و سنتز هورمون‌های جنسی را در ماهی‌ها مختل نمایند (Maxwell and Dutta, 2005). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که سطوح زیرکشنده این ترکیبات حتی در غلظت‌های کم که در محیط زیست وجود دارد، می‌تواند

حنانی کاشانی، ز.، ایمانپور، م.ح.، زادمجید، و. و مازندرانی، م.، ۱۳۹۶. تعیین درجه سمیت و تاثیر سم دیازینون بر شاخص‌های بیوشیمیایی خون مولدین نر ماهی قرمز (*Carassius auratus*). فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان. ۵(۱): ۶۶-۵۹.

شموشکی، م.، سلطانی، م.، شریف پور، ع. و ایمانپور، م.ر.، ۱۳۹۰. بررسی اثر سم دیازینون بر پارامترهای خونی مولدین نر ماهی سفید. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، ۵(۳): ۳۳-۲۳.

کردجی، م. و ایمانپور، م.ح.، ۱۳۸۷. اثر سم بنومیل روی برخی خصوصیات اسپرم شناختی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). اولین همایش ملی تالاب‌های ایران. اهواز.

کشتکارلنگرودی، ل. و تهرانی‌فرد، ا.، ۱۳۹۷. تاثیر زیر حد کشندگی سم دیازینون بر پارامترهای خونی و بافت‌های آبشش و غلظه بچه ماهی قره‌برون. نشریه توسعه آبی‌پروری، ۱۲(۳): ۱۲۹-۱۱۹.

وثوق، غ.ح. و مستجیر، ب.، ۱۳۷۳. ماهیان آب شیرین. انتشارات دانشگاه تهران، ۳۱۷ ص.

Abadin, H., Todd, D., Wohlers, D. and Hard, C.M., 2009. Priority data needs for Diazinon. Syracuse Research Corporation. 75 P.

Alavi, S.M.H., Cosson, J. and Kazemi, R., 2006. Semen characteristics in *Acipenser persicus* in relation to sequential stripping. *Journal of Applied Ichthyology*, 22: 400-405. DOI:10.1111/j.1439-0426.2007.00994.x.

Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, A.R. and Ahmadi, K., 2013. Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide bBiochemistry and*

گنادوتروپینی نیز می‌باشد به‌طوری‌که بر رشد و توسعه گنادها از طریق اثر بر روند سنتز، ذخیره‌سازی، رهاسازی، انتقال، متابولیسم، فعالیت یا حذف هورمون‌های داخلی دخالت دارند (Maxwell and Dutta, 2005).

از آنجایی که سلول‌های جنسی اجزاء اساسی در فرایند اسپرماتوزن می‌باشند، کاهش تعداد و کیفیت آنها در تولید اسپرم سالم و بی‌نقص تاثیرگذار خواهد بود. کاهش تولید اسپرم سالم و فعال در قابلیت باروری مولدین نر نیز تاثیر به‌سزایی خواهد داشت. در واقع، بروز چنین تغییراتی در هورمون‌های استروئیدی کیفیت و بازماندگی محصولات جنسی را کاهش می‌دهد و در مجموع، قابلیت باروری ماهیان نر کاهش خواهد یافت. کاهش همزمان کیفیت و کمیت گامت‌های تولیدی مولدین نر و ماده می‌تواند بر میزان تولیدمثل و بقاء بچه ماهیان آثار منفی بر جا گذارد و ادامه این روند بر نسل آینده ماهیان نیز تاثیرگذار خواهد بود.

بنابراین، این تاثیرات مستقیم یا غیر مستقیم آلاینده‌های محیط‌های آبی بر بیضه ماهیان، به کاهش یا توقف رشد و توسعه اسپرماتوزوئید خواهد انجامید. از این‌رو، تلاش برای جلوگیری از ایجاد آلودگی بیشتر در محیط آبی و مدیریت سازمان یافته در استفاده مناسب از سموم ارگانوفسفره در مزارع کشاورزی جهت کاهش حجم آلاینده‌های ورودی به اکوسیستم رودخانه‌ها و نهایتاً دریا امری ضروری در حفظ ذخایر ماهیان خواهد بود.

منابع

ایمانپور، م.ح. و کمالی، ا.، ۱۳۸۵. بررسی تکثیر مصنوعی و پرورش لاروهای ماهی قرمز (*Carassius carassius gibelio*) توسط HCG. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۱۳(۲): ۱۷۲-۱۶۵. پژند، ذ.، ۱۳۷۸. تعیین غلظت کشنده سموم حشره‌کش دیازینون و علف کش بوتاکلر بر روی دو گونه از ماهیان خاویاری قره‌برون و ازون برون. پایان نامه کارشناسی ارشد رشته شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان. صفحات ۱۲-۱۶.

- Physiology*, 99: 1-6.
DOI:10.1016/j.pestbp.2010.09.001.
- Bagheri, T., Imanpoorb, M.R., Jafarib, V. and Bennetau-Pelissero, C., 2013.** Reproductive impairment and endocrine disruption in goldfish by feeding diets containing soybean meal. *Animal Reproduction Science*, 139: 136-144.
DOI:10.1016/j.anireprosci.2013.02.003
- Barannikova, I.A., Bayunova, L. and Semenkov, T.B., 2004.** Serum levels of testosterone, 11-ketotestosterone and oestradiol-17 β in three species of sturgeon during gonadal development and final maturation induced by hormonal treatment. *Journal of Fish Biology*, 64: 1330-1338.
DOI:10.1111/j.0022-1112.2004.00395.x
- Butts, I.A.E., Litvak, M.K. and Trippel, E.A., 2010.** Seasonal variations in seminal plasma and sperm characteristics of wild-caught and cultivated Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Theriogenology*, 73: 873-885.
DOI:10.1016/j.theriogenology.2009.11.011
- Cox, J., 2000.** Diazinon use threatens Salmon survival, *Environmental science*.
<http://www.pesticide.org>.
- Di Giulio, R.T. and Hinton, D.E., 2008.** The toxicology of fishes. Taylor and Francis Group. 1101 P.
- Eman, A., Abd, E.G., Mohamed, M.M., Kandiel, A., Abbass Adel, A. and Shaheen, A., 2011.** Impact of some organophosphorus insecticides on growth performance, fecundity and semen characteristics in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Lucrari Stiintifice seria Medicina Veterinara*, 54:150-160.
- Fadakar, F., Majazi Amiri, B., Mirvaghefi, A.R. and Nematollahi, M.A., 2011.** In vitro effects of diazinon on male reproductive tissue and sperm motility of Caspian kutum (*Rutilus frissi kutum*). *Research Journal of Environmental Toxicology*, 5(2): 108-116.
DOI:0.3923/rjet.2011.108.116
- Giron-Perez, M.I., Santerre, A., Gonzalez-Jaime, F., Casas-Solis, J., Hernández-Coronado, M., Peregrina-Sandoval, J., Takemura, A. and Zaitseva, G., 2007.** Immunotoxicity and hepatic function evaluation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to diazinon. *Fish and Shellfish Immunology*, 23: 760-769.
DOI:10.1016/j.fsi.2007.02.004.
- Guzman, J.M., Norberg, B., Ramos, J., Mylonas, C.C. and Manano, E.L., 2008.** Vitellogenin, steroid plasma levels and spawning performance of cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *General and Comparative Endocrinology*, 156: 285-297.
DOI:10.1016/j.ygcen.2008.02.002.
- Hayes, W.J. and E.R. Laws (ed.). 1990.** Handbook of Pesticide Toxicology, Vol. 3, Classes of Pesticides. Academic Press, Inc., New York. USA.
- Hedayati, A. and Arsham A., 2012.** Endocrine Disruption Induced by Sub-Lethal Mercury Chloride on Hormone Indices of Sea bream. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 4: 125-130.

- Lee, L.E., Caldwell, S.J. and Gibbons, J., 1997.** Development of a cell line from skin of goldfish (*Carassius auratus*), and effects of ascorbic acid on collagen deposition. *Histochemistry and Cell Biology*, 29: 31–43. DOI:10.1023/A:1026412817431
- Matthiessen, P., 2003.** Endocrine disruption in marine fish. *Pure and Applied Chemistry*, 75: 2249-2261.
- Maxwell, L.B. and Dutta, H.M., 2005.** Diazinon-induced endocrine disruption in bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 60: 21-27. DOI:10.1016/j.ecoenv.2003.12.015.
- Olsen, K.H., Sawisky, G.R. and Stacey, N.E., 2006.** Endocrine and milt responses of male crucian carp (*Carassius carassius*) to periovulatory females under Weld conditions. *General and Comparative Endocrinology*, 149: 294-302
- Perchec, G., Cosson, J., Andre, F. and Billard, R., 1995.** Degradation of the quality of carp sperm by urine contamination during stripping. *Aquaculture*, 129: 135–136.
- Sapozhnikova, Y., Bawardi, O. and Schlenk, D., 2004.** Pesticides and PCBs in sediments and fish from the Salton Sea, California, USA. *Chemosphere*, 55: 797-809. DOI:10.1016/j.chemosphere.2003.12.009.
- Sarkar, R. and Mohanakumar, K.P., 2000.** Effects of an organophosphate pesticide, quinalphos, on the hypothalamo pituitary gonadal axis in adult male rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 118(1): 29-38. DOI: 10.1530/jrf.0.1180029.
- Sofikitis, N., Giotitsas, N., Tsounapi, P., Baltogiannis, D., Giannakis, D. and Pardalidis, N., 2008.** Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 109: 323–330. DOI:10.1016/j.jsbmb.2008.03.004.
- Tan-Fermin, J.D., Pagador, R.R. and Chavez, R.C., 1997.** LHRHa and pimozide- induced spawning of Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther) at different times during an annual reproductive. *Aquaculture*, 148: 323-331. DOI:10.1016/S0044-8486(96)01423-8.
- Tehraniard, A., Fazeli, M. S. and Piri, M., 2007.** Determine the LC 96 hours of mixed Linear anionic detergent and diazinon on *Rutilus frisii kutum*. *Marine Science and Technology*, 55-59. DOI:10.2495/WP100181
- Tiersch, T.R., 2001.** Cryopreservation in aquarium fishes. *Marine Biotechnology*, 3: 212–223. DOI: 10.1007/s10126001-0044-z.
- Turner, E. and Montgomerie, R., 2002.** Ovarian fluid enhances sperm movement in Arctic charr. *Journal of Fish Biology*, 63: 1570-1579. DOI:10.1111/j.1095-8649.2002.tb02449.x.
- Vandergeest, H.G., Studijfzand, S.C., Kraak, M.H.S. and Admiraal, W., 1997.** Impact of diazinon calamity in 1996 on the 142 quantac macroinvertebrates in the river mesue. The Netherlands. *Journal of Aquatic Ecology*, 30:327-330.

Effect of sub-lethal toxicity of diazinon on steroid detoxification and quality of sexual production in male goldfish breeders (*Carassius auratus*)

Samadi, H.¹; Javadian, S.R.^{1*}; Imanpour, M.R.²

*Ro.javadian@gmail.com

1- Department of Fisheries, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran

2-Fisheries Faculty, Gorgan University of Agricultural Resources and Natural Sciences, Gorgan, Iran

Abstract

Determination of the sub-lethal effects of diazinon toxin carried out on steroidogenesis and quality of sexual production in male goldfish breeders. For this purpose, fish were first exposed to different lethal concentrations of diazinon toxin (9, 10, 11, 12.5, 15 and 20 mg/L) and LC₅₀ values were analyzed for 96 h using probit software. The amount of LC₅₀ was 11.4 in 96 hours and fish were assorted according to 0, 0.25, 0.50 and 0.75 percent of LC₅₀ in 96 hours and were put there for 2 months. At the end of the experiment, the level of sex hormones and the quality of sexual production were studied in male broodstock. The results showed that diazinon toxin significantly reduced testosterone and 17- β -estradiol levels in the 0.50 and 0.75 mg/L treatments compared to the control ($p < 0.05$). There was no significant difference in some sperm quality parameters such as sperm volume, sperm density and spermatocrit between the control and 0.25 treatment. By increasing the concentration of diazinon toxin (from 0.25 to 0.75 %), the duration of sperm motility decreased significantly. The percentage of motile sperm in the control treatment was higher than other treatment and it was decreased with increasing diazinon toxin concentration. The Gonadosomatic Index in the control treatment was significantly higher than the other treatments ($p < 0.05$) and showed a decreasing trend with increasing toxicity. In conclusion, diazinon toxin in the aquatic environment, even at sub-lethal concentrations, causes undesirable changes in the sex steroid indices and quality of male gonads in goldfish.

Keywords: Goldfish, Diazinon, Sexual steroids, Sperm quality

*Corresponding author