

نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران  
دوره ۶۶، شماره ۸، زمستان ۱۳۹۲

۴۹۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۲۷

## تأثیر سطوح مختلف دیازینون (سم ارگانوفسفره) در شاخص‌های تحرک و ساختار ریخت‌شناسی اسپرم مارماهی دهان‌گرد خزری (*Caspiomyzon wagneri*)

- ❖ نیما نعمتی مبین: کارشناس ارشد گروه شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران.
- ❖ سهیل ایگدری\*: استادیار گروه شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران
- ❖ باقر مجازی امیری: استاد گروه شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران
- ❖ هادی پورباقر: استادیار گروه شیلات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

### چکیده

مارماهی دهان‌گرد خزری (*Caspiomyzon wagneri*) از ماهیان بومی دریای خزر است که برای تخم‌ریزی وارد رودخانه‌های منتهی به این دریا می‌شود؛ در حالی که، با عوامل تهدیدکننده فراوانی از جمله سموم ارگانوفسفره مواجه است. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر سم دیازینون، که از عوامل مهم آلاینده‌های رودخانه‌های محل تکثیر طبیعی این گونه است، در شاخص‌های تحرک و ریخت‌شناسی اسپرم این گونه تا زمان رسیدن اسپرم به سطح تخمک صورت گرفت. بدین منظور اسپرم ماهیان تحت تأثیر غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۵ میلی‌گرم در لیتر دیازینون تا زمان پایان تحرک قرار گرفتند. نتایج این آزمایش نشان داد که با افزایش غلظت دیازینون پارامترهای حرکتی اسپرم‌ها به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد ( $P < 0.05$ ). همچنین مشخص شد، تخریب ساختار اسپرم تحت تأثیر دیازینون در زمان ۳ دقیقه مواجهه نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری دارد ( $P < 0.05$ ) که شامل افزایش طول و عرض و سطح سر، تخریب تاژک، کاهش طول تاژک و قطع تاژک است. درصد تخریب اسپرم نیز، با توجه به شاخص‌های مختلف، با افزایش غلظت دیازینون به طور معنی‌داری افزایش یافت ( $P < 0.05$ ) و حداکثر میزان تخریب در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد که برای قطع تاژک ۴/۴ درصد، کلافی شکل‌شدن و کوتاه‌شدن تاژک ۲۶/۶ درصد، بدشکلی سر، خمیدگی، پارگی غشا و تخریب دیواره سر اسپرم ۱۵/۳ درصد و تخریب کل اسپرم ۳۱ درصد اندازه‌گیری شد. بنابراین، دیازینون به طور محتمل می‌تواند با ایجاد تأثیرات تخریبی در فاکتورهای تحرک و ریخت‌شناسی اسپرم، در قابلیت لقاح اسپرم‌ها تأثیرات نامطلوبی بگذارد و میزان لقاح را به صورت محسوسی کاهش دهد و تهدید جدی برای بقای این گونه نادر به حساب آید.

واژگان کلیدی: تحرک، دیازینون، ریخت‌شناسی اسپرم، مارماهی دهان‌گرد خزری.

## ۱. مقدمه

آفت‌کش‌های ارگانوفسفره در دهه ۱۹۷۰ و اوایل دهه ۱۹۸۰ به طور کامل جانشین آفت‌کش‌های کلره شدند (Burkepile et al., 2000). از مزایای سموم ارگانوفسفره نسبت به سموم کلره قابلیت جمععی کم در بافت‌ها و عمر کوتاه‌مدت در طبیعت است (Svodova et al., 2001). دیازینون از جمله سموم ارگانوفسفره است که در سطح گسترده‌ای در کشاورزی و حتی امور خانگی برای کنترل حشرات استفاده می‌شود. با اینکه بوم‌سازگان‌های آبی محل و هدف استفاده سم دیازینون نیستند، مطالعات پایشی نشان‌دهنده شواهدی از حضور این سم و متابولیت‌های آن در محیط‌های آبی به ویژه آب‌های سطحی است (Vander Geest et al., 1997). دیازینون مورد استفاده در زمین‌های کشاورزی به راحتی می‌تواند شسته شود و وارد آب‌های زیرزمینی، سطحی و در نهایت محیط زیست آبریان شود و در گستره وسیعی از آبریان غیرهدف از جمله ماهیان، پستانداران و بی‌مهرگان آبرزی تأثیرات سویی بگذارد (Kuivila and Foe, 1995).

بیشتر مناطق دشتی استان مازندران در شمال ایران کشت فشرده برنج دارند و از کودها و آفت‌کش‌ها برای افزایش عملکرد و تولید استفاده می‌کنند. دیازینون از آفت‌کش‌های غالب مورد استفاده در این مناطق است که برای مبارزه با کرم ساقه‌خوار برنج به کار می‌رود (Khazaei et al., 2005). از جمله عوامل افزایش بیش از حد دیازینون در آب‌های سطحی و زیرزمینی شمال کشور می‌توان به آبیاری زیاد، بالابودن حلالیت دیازینون در آب همچنین، نوع خاک و بالابودن مقدار مواد آلی در خاک‌های منطقه اشاره کرد (Riazi et al., 2001).

مارماهی دهان‌گرد خزری (*Caspiomyzon wagneri* Kessler, 1870) گونه بومی دریای خزر است که در حوزه‌های آبریز شمالی، غربی و جنوبی آن زیست می‌کند (Sattari, 2000). این ماهی پس از رسیدن به سن بلوغ برای تخم‌ریزی به رودخانه‌ها از جمله رودخانه‌های حوزه جنوبی دریای خزر وارد می‌شود (Abdoli, 2000). رودکوچی مارماهی دهان‌گرد خزری در دو فصل پاییز و بهار صورت می‌گیرد (همان). این ماهی برای تولیدمثل به بالادست رودخانه‌ها مهاجرت می‌کند و در این دوره، در نزدیکی سطح بستر، جایی که شدت جریان آب بین ۰/۴ - ۰/۶ متر بر ثانیه باشد، حرکت می‌کند. مکان تخم‌ریزی مناطق کم‌عمق رودخانه‌ها با بستر شنی و سنگلاخی است و مولدین پس از تخم‌ریزی می‌میرند (همان). 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).

آگاهی از زیست‌شناسی اسپرم و نگهداری آن فاکتور مهمی در کنترل روش‌های لقاح مصنوعی در پرورش ماهی و محافظت از گونه‌های در حال انقراض تلقی می‌شود (Alavi et al., 2004). با این حال، مطالعات روی تحرک و ساختار اسپرم به تعداد اندکی از ماهیان، به ویژه گونه‌های اقتصادی از دیدگاه آبرزی‌پروری و گونه‌های مهم در زیست‌شناسی حفاظت، محدود شده است (Ciereszko et al., 2000). نسبت تحرک، الگوهای رفتاری تحرک، مدت زمان تحرک، خصوصیات ساختاری و فراساختاری اسپرم از مهم‌ترین فاکتورهای مورد مطالعه در تحقیقات اسپرم‌شناسی ماهیان است (Billard and Cosson, 1992). با توجه به اینکه بیشتر رودخانه‌های محل

نمونه برداری و خشک کردن مولدین با حوله تمیز، اسپرم‌کشی از آنها از طریق فشار دادن ناحیه شکمی بدون بی‌هوشی انجام پذیرفت (Linhart et al., 1995a). به منظور حذف تأثیر کیفیت مولدین و در نتیجه اسپرم آنها، اسپرم‌های جمع‌آوری شده از ۱۵ نمونه برای ایجاد ذخیره اولیه با یکدیگر مخلوط شدند (Alavi et al., 2004). پس از استحصال، اسپرم مولدین زیست‌سنجی شده و مشخصات طولی و وزنی آنها ثبت شد.

## ۲.۲. تهیه غلظت‌های سم دیازینون

حشره‌کش دیازینون به صورت محلول در زایلون با خلوص ۶۰ درصد از شرکت پرتونار تهیه شد. برای تهیه غلظت‌های مختلف، نخست یک محلول ذخیره تهیه (Koprucu et al., 2006) و محلول ذخیره با مخلوط کردن ۱۰ میلی‌لیتر سم دیازینون با ۹۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه شد (غلظت ۱۰۰۰ ppm): سپس، با رقیق کردن محلول ذخیره با آب مقطر، غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر تهیه شد (Banaee et al., 2011; Fadakar Masouleh et al., 2011).

## ۳.۲. سنجش شاخص‌های تحرک اسپرم

شاخص‌های مورد بررسی در این تحقیق شامل مدت کل تحرک اسپرم‌ها و درصد اسپرم‌های متحرک‌اند که با کمک میکروسکوپ نوری و دوربین دیجیتال ۱۴ مگاپیکسل (Canon, IXUS 210) به روش نیمه‌کمی ارزیابی شدند (Alavi et al., 2004). برای تعیین مدت زمان تحرک، یک میکرولیتر از نمونه اسپرمی روی لام مستقر در زیر میکروسکوپ ریخته شد و هم‌زمان ۴۹ میکرولیتر آب مقطر (برای تیمار شاهد) و غلظت‌های مختلف سم دیازینون به آن افزوده شد. زمان

مهاجرت مارماهی دهان‌گرد خزری برای تکثیر طبیعی در حوزه جنوبی دریای خزر در مجاورت اراضی کشاورزی قرار دارند، این نکته مطرح می‌شود که در صورتی که منابع آبی محل تکثیر طبیعی مارماهی دهان‌گرد خزری به سم دیازینون آلوده شوند، چه تأثیری در اسپرم‌های آزاد شده در آب و به دنبال آن تولیدمثل طبیعی این ماهی خواهد گذاشت. از این رو، این تحقیق با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف سم ارگانوفسفره دیازینون در شاخص‌های تحرک و ساختار مورفولوژیک اسپرم مارماهی دهان‌گرد خزری طی دوره تحرک صورت پذیرفت؛ چرا که شناخت تأثیر سطوح مختلف سم مذکور، در شاخص‌های تحرک و ریخت‌شناسی اسپرم، می‌تواند به درک بهتر تأثیر آلاینده‌های موجود در جایگاه تخم‌ریزی کمک کند و داده‌های لازم را برای برنامه‌های مدیریتی احتمالی فراهم خواهد کرد.

## ۲. مواد و روش کار

مطالعه حاضر در فصل تولیدمثل طبیعی مارماهی دهان‌گرد خزری در اردیبهشت ۱۳۹۰ انجام پذیرفت. مطالعات مربوط به تأثیر دیازینون در تحرک اسپرم در محل نمونه‌برداری و مطالعات مربوط به ریخت‌شناسی اسپرم در آزمایشگاه بیولوژی آبزیان دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران و آزمایشگاه میکروسکوپ الکترونی دانشکده مهندسی معدن و متالورژی دانشگاه امیرکبیر انجام پذیرفت.

## ۱.۲. نمونه برداری

از تعداد ۱۵ مارماهی دهان‌گرد خزری نر کاملاً رسیده، که در حال مهاجرت به سمت بالادست رودخانه شیرود (واقع در شهرستان تنکابن) برای تولیدمثل طبیعی بودند، نمونه‌برداری صورت گرفت. بلافاصله پس از

تهیه شد. برای آماده‌سازی نمونه‌ها برای میکروسکوپ الکترونی، در مرحله نخست اسپریم‌ها و مواد تثبیت‌کننده با فیلترهای کاغذی صاف شدند و کاغذ صافی، با فسفات بافر ۰/۱ مولار حاوی ۱۰ درصد سوکوروز، ۳ مرتبه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با فواصل زمانی ۱ ساعت شسته شد. در مرحله بعد، نمونه‌ها با محلول اسمیوم تتراکساید ۴ درصد به مدت ۲ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد شسته شدند. سپس، با استفاده از غلظت‌های مختلف محلول استون (۳۰، ۵۰، ۷۰، ۹۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد) به مدت ۱۵ دقیقه آگیری شدند. پس از قراردادن اسپریم‌ها در یک قطعه فویل آلومینیومی صیقل داده‌شده به ابعاد ۱×۱ سانتی‌متر، با دستگاه اسپوترکوتر به مدت ۷۰ ثانیه با حدود ۳۰ نانومتر طلا پوشانده شدند (Psenicka et al., 2007; Ebrahimi, 2005). از همه تیمارها با میکروسکوپ الکترونی SEM فیلیپس (مدل XL-30، ساخت هلند) با بزرگ‌نمایی‌های مختلف از حالت‌های طبیعی و غیرطبیعی اسپریم عکس تهیه شد.

#### ۵.۲. تجزیه و تحلیل ریخت‌شناختی اسپریم‌ها

تصاویر اسپریم‌های تهیه‌شده با میکروسکوپ‌های نوری و الکترونی با کمک نرم‌افزار ImageJ بررسی شدند و شاخص‌هایی که در توان بارورکنندگی اسپریم نقش بیشتری ایفا می‌کنند، سنجش شدند. این شاخص‌ها به علت نیاز به تطابق اسپریم با میکروپیل و ارتباط مستقیم با تحرک اسپریم انتخاب شدند که عبارت بودند از: طول سر (L)، عرض سر (W)، سطح سر (A)، شاخص کشیدگی سر  $Elongation = 100 \times (L - W)$ ، شاخص بیضی‌واری سر  $Ellipticity = (W/L) / ((L+W)/2)$ ، طول تاژک (Lt)، درصد قطع تاژک، درصد تخریب سر، درصد تخریب تاژک و درصد تخریب سر کل (Hidialgo et al., 2005). شاخص‌های تخریب سر

بلافاصله، و تا زمانی که ۹۵ - ۹۹ درصد اسپریم‌ها متوقف شدند، با زمان‌سنج دیجیتال ثبت شد و به‌منزله طول دوره تحرک اسپریم‌ها در نظر گرفته شد (Alavi et al., 2004; Cosson et al., 1999; Linhart et al., 1995b). در سنجش درصد اسپریم‌های متحرک، مطابق دستورالعمل‌های liley و همکاران (۲۰۰۲) و Fadakar Masouleh و همکاران (۲۰۱۱)، برای بررسی کیفیت اسپریم‌ها مدت زمانی که ۸۰ درصد، ۵۰ درصد و ۲۰ درصد اسپریم‌ها، در تیمارهای مختلف، تحرک خود را حفظ کرده بودند نیز ثبت شد. در این روش، با استفاده از لام هموسیتومتر، درصد اسپریم‌های متحرک با توجه به مدت زمان سپری شده ثبت و نسبت اسپریم‌های متحرک به غیرمتحرک محاسبه شد.

#### ۴.۲. بررسی ریخت‌شناسی اسپریم

هدف از انجام‌دادن این آزمایش بررسی تغییراتی است که سم دیازینون در ساختار اسپریم، از زمان اسپریم‌ریزی ماهی تا رسیدن اسپریم به سطح تخمک، در محیط رودخانه ایجاد می‌کند. اسپریم‌ها به مدت ۳ دقیقه تحت تأثیر غلظت‌های مختلف دیازینون (صفر، ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵ و ۵ میلی‌گرم در لیتر) قرار گرفتند. سپس، اسپریم‌ها در محلول گلوکار آلدهید ۲/۵ درصد در ۰/۱ مولار فسفات بافر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت تثبیت شدند تا برای بررسی با میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی SEM آماده شوند (Psenicka et al., 2007a). برای بررسی نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری، گسترش‌های اسپریمی روی لام تهیه و با تولوئیدن بلو ۵ درصد رنگ‌آمیزی شدند. با میکروسکوپ نوری مجهز به لنز چشمی میکرومتردار و دوربین دیجیتال ۱۴ مگاپیکسل (Canon, IXUS 210) از گسترش‌های اسپریمی عکس‌هایی با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ - ۳۰۰۰ برابر

درصد اسپرم‌ها متحرک‌اند، بین تیمارهای ۰/۱ - ۱ میلی‌گرم در لیتر همچنین، بین تیمارهای ۰/۰۵ - ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ( $P>0.05$ ). در مدت زمانی که همه اسپرم‌ها متوقف می‌شوند (۰-۵ درصد تحرک)، اختلاف معنی‌داری بین تمامی تیمارها مشاهده شد ( $P<0.05$ ). به علاوه، در زمانی که ۵۰ درصد اسپرم‌ها متحرک‌اند، بین تیمارهای ۰/۰۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر همچنین، بین تیمارهای ۰/۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر و بین تیمارهای ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌دار وجود نداشت ( $P>0.05$ ). فواصل زمانی که اسپرم‌ها از ۸۰ درصد تحرک به ۰-۵ درصد تحرک می‌رسند، با افزایش غلظت دیازینون کاهش یافت؛ به طوری که، در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر فاصله بین درصدهای مختلف تحرک به حداقل مقدار خود رسید. تحلیل هم‌بستگی پیرسون، بین غلظت‌های مختلف دیازینون و مدت زمان تحرک اسپرم، یک رابطه معنی‌دار و منفی در سطح ۱ درصد در ۸۰ درصد ( $r=-0.747^{**}$ )، ۵۰ درصد ( $r=-0.658^{**}$ )، ۲۰ درصد ( $r=-0.690^{**}$ )، ۰-۵ درصد ( $r=-0.653^{**}$ ) از اسپرم‌های متحرک نشان می‌دهد.

میانگین طول سر اسپرم در تیمار شاهد  $7/01 \pm 0/63$  میکرون ثبت شد. نتایج نشان داد که با در معرض قرار گرفتن اسپرم‌ها به مدت ۳ دقیقه تحت تأثیر سم دیازینون تغییراتی در طول سر اسپرم‌ها ایجاد می‌شود (شکل ۲A). آزمون دانکن نشان می‌دهد افزایش غلظت دیازینون از ۰ به ۵ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش طول سر اسپرم می‌شود، ولی در غلظت‌های ۰/۰۱ - ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر دیازینون این تغییرات در طول سر اسپرم‌ها معنی‌دار نبود ( $P>0.05$ ). با افزایش غلظت به ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر طول سر اسپرم نسبت به تیمار شاهد افزایش

شامل بزرگ‌شدن سر، کوچک‌شدن سر، بدشکلی در سر (سر شلاقی، سوزنی، گریزی‌شکل)، وجود دو سر، پارگی غشای سر و شاخص‌های تخریب تاژک شامل قطع تاژک، کوتاه‌شدن و پیچ‌خوردگی تاژک و شاخص‌های تخریب کل شامل درصد تخریب سر + درصد تخریب تاژک بودند (Brito, 2007).

### ۶.۲. تجزیه و تحلیل آماری

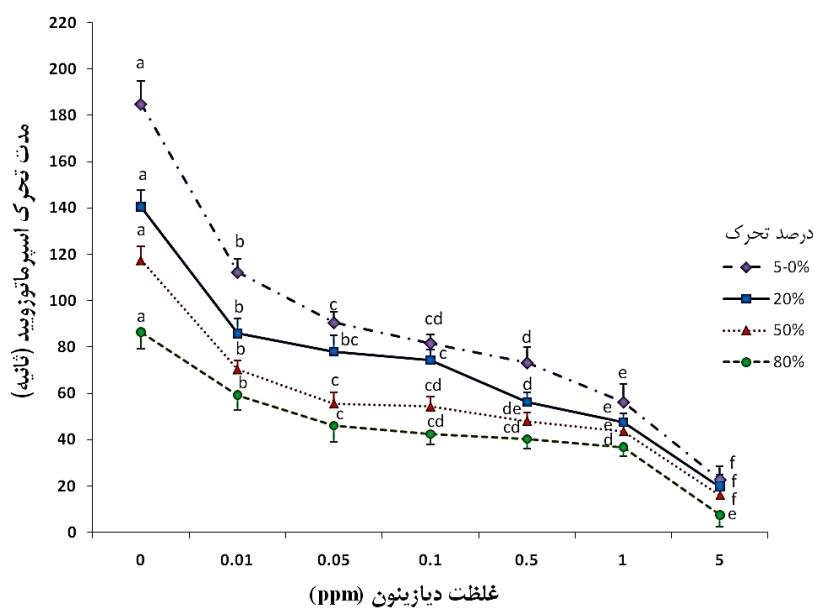
داده‌ها با نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند. نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. پس از آزمون همگن بودن واریانس‌ها، برای مشخص کردن تفاوت معنی‌داری در تیمارهای مورد بررسی از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و، در صورت معنی‌دار بودن تفاوت‌ها، از آزمون چنددامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین‌ها در تیمارهای مختلف استفاده شد. معنی‌دار بودن اختلافات آماری در سطح ۵ درصد تعیین شد. نمودارها با نرم‌افزار EXCEL و SPSS رسم شدند.

### ۳. نتایج

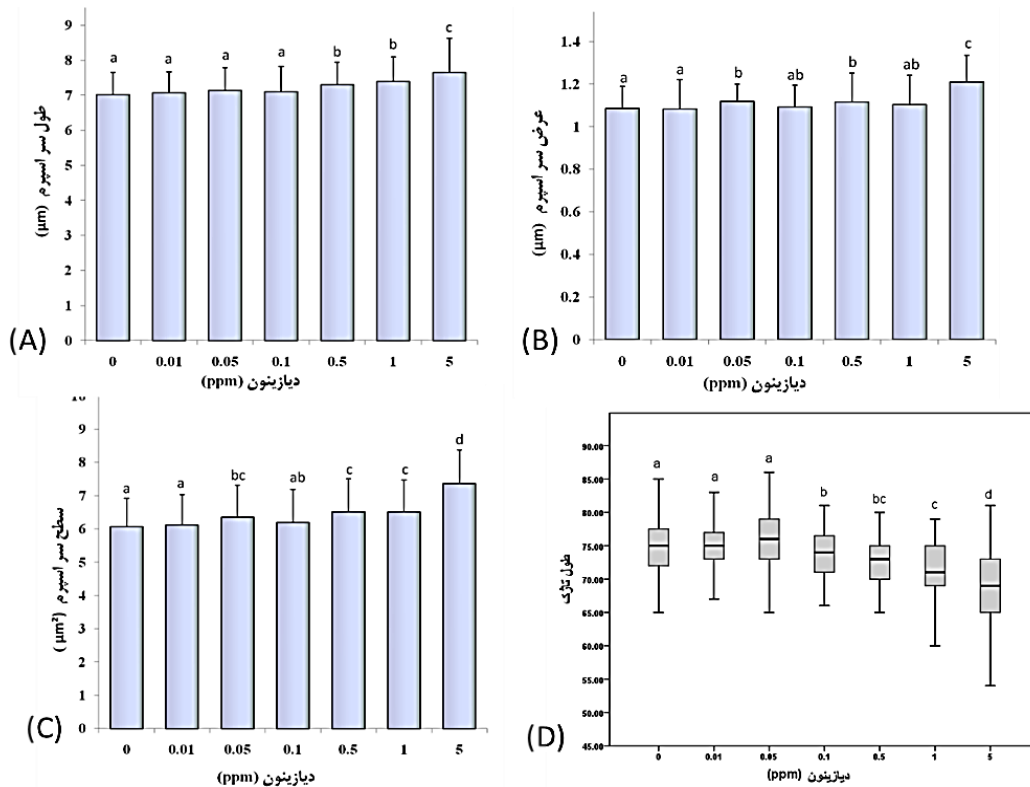
میانگین وزنی ماهیان نر  $98/13 \pm 17/52$  گرم و میانگین طولی آنها  $37/98 \pm 2/61$  سانتی‌متر بود. میانگین مدت زمانی که ۰، ۲۰، ۵۰، ۸۰ و ۵-۰ درصد اسپرم‌ها در معرض آب مقطر و سطوح مختلف دیازینون قدرت تحرک داشتند، در شکل ۱ نشان داده شده است. این زمان برای گروه شاهد به ترتیب برابر با  $86/4 \pm 4/3$ ،  $117/4 \pm 5/1$ ،  $140/4 \pm 7/1$  و  $184/8 \pm 4/9$  ثبت شد. به عبارت دیگر، در زمان ۱۸۵ ثانیه تحرک اسپرم‌ها کاملاً متوقف شد. مقایسه زمان‌هایی که ۰، ۲۰، ۵۰، ۸۰ و ۵-۰ درصد از اسپرم‌ها در تیمارهای مختلف قدرت تحرک داشتند، نشان‌دهنده افزایش سطوح معنی‌داری بین تیمارها از ۸۰ درصد به ۰-۵ درصد است (شکل ۱). در زمانی که ۸۰

عرض سر در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نداشت ( $P>0.05$ ). همچنین، بین غلظت‌های ۰/۰۵ - ۱ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P>0.05$ )، اما در غلظت‌های انتهایی نسبت به تیمار شاهد و سایر غلظت‌ها افزایش معنی‌داری در عرض سر اسپرم مشاهده شد ( $P<0.05$ ). تحلیل هم‌بستگی پیرسون بین عرض سر اسپرم و غلظت‌های مختلف دیازینون، در زمان ۳ دقیقه مواجهه، رابطه مثبت و معنی‌داری را در سطح ۱ درصد ( $r=0.274^{**}$ ) نشان داد.

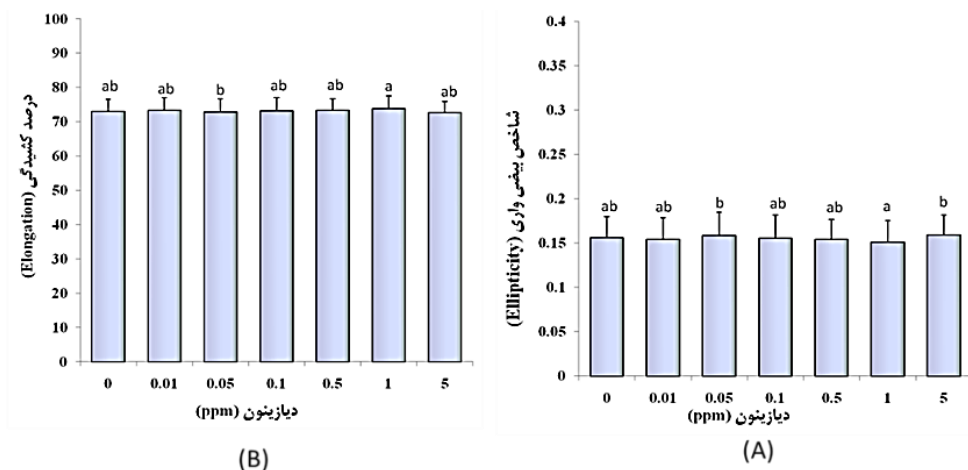
معنی‌داری نشان داد ( $P<0.05$ ) و در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر طول سر اسپرم نسبت به غلظت‌های کمتر به طور معنی‌داری افزایش پیدا کرد ( $P<0.05$ ). تحلیل هم‌بستگی پیرسون بین طول سر اسپرم و غلظت‌های مختلف دیازینون، در زمان ۳ دقیقه مواجهه، رابطه مثبت و معنی‌داری را در سطح ۱ درصد ( $r=0.274^{**}$ ) نشان می‌دهد. میانگین عرض سر اسپرم در نمونه‌های شاهد  $1/0.8 \pm 0.12$  سنجش شد. سم دیازینون در غلظت‌های مختلف، در زمان ۳ دقیقه مواجهه، سبب ایجاد تغییرات نامنظمی در عرض سر اسپرم شد (شکل ۲B).



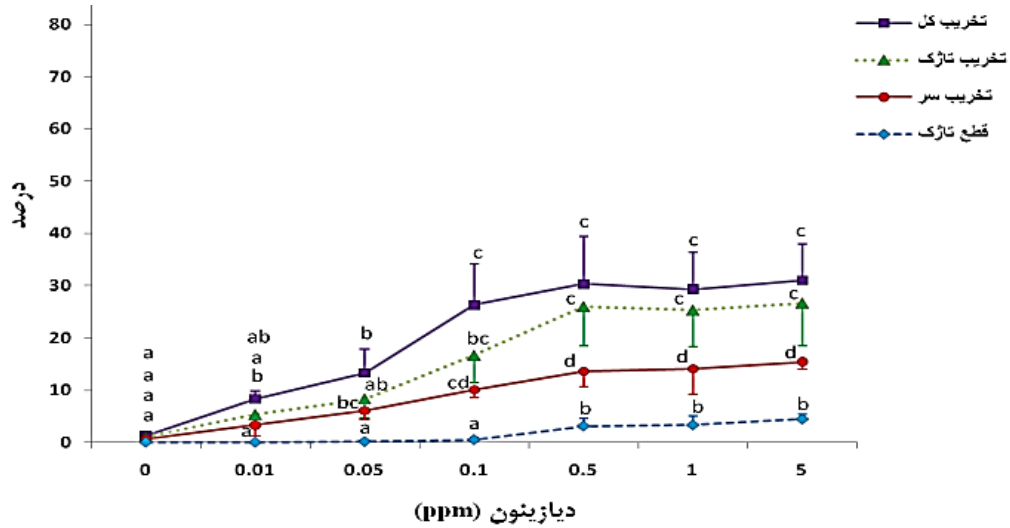
شکل ۱. درصد اسپرم‌های متحرک و زمان کل تحرک اسپرم مارماهی دهان‌گرد خزری تحت تماس با غلظت‌های مختلف دیازینون



شکل ۲. (A) میانگین طول سر اسپرم، (B) میانگین عرض سر اسپرم، (C) میانگین سطح سر اسپرم، و (D) میانگین طول تازک اسپرم تحت تأثیر غلظت‌های مختلف دیازینون در زمان ۳ دقیقه مواجهه (n=۱۲۷۵).



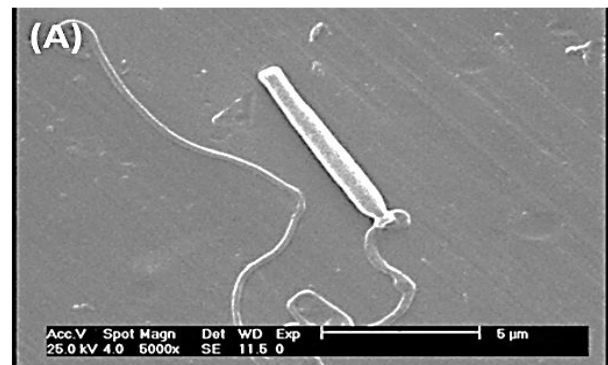
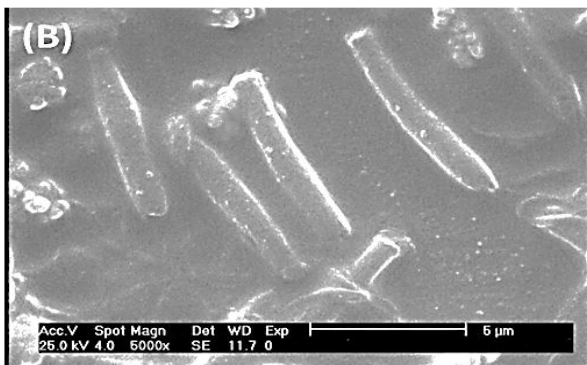
شکل ۳. (A) شاخص بیضی‌واری سر اسپرم ( $\text{Ellipticity} = W/L$ ) و (B) میانگین درصد کشیدگی سر اسپرم ( $\text{Elongation} = 100 \times (L - W) / (L + W\%)$ ) تحت تأثیر غلظت‌های مختلف دیازینون



شکل ۴. درصد تخریب اسپرم در تماس با غلظت‌های مختلف دیازینون به مدت ۳ دقیقه.

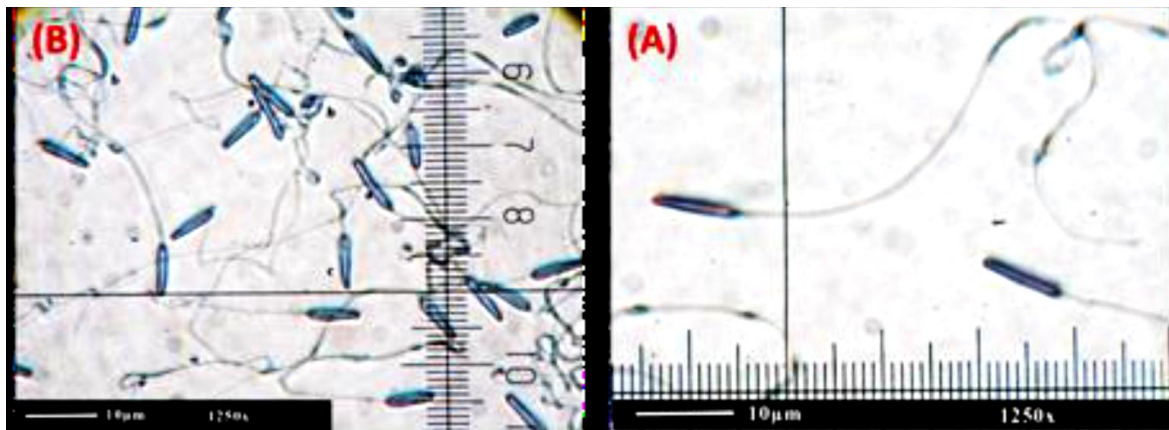
همچنین، ۰/۵ و ۱ معنی‌دار نبود ( $P > 0.05$ ). در غلظت‌های انتهایی سم دیازینون، سطح سر نسبت به تیمار شاهد و سایر غلظت‌ها افزایش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۲C). تحلیل هم‌بستگی پیرسون بین سطح سر اسپرم و غلظت‌های مختلف دیازینون، در زمان ۳ دقیقه مواجهه، رابطه مثبت و معنی‌داری را در سطح ۱ درصد ( $r = 0.380^{**}$ ) نشان می‌دهد.

میانگین سطح سر اسپرم در تیمار شاهد  $6/02 \pm 0/84$  ثبت شد. آزمون دانکن نشان داد که قرارگرفتن در معرض غلظت‌های مختلف دیازینون، در زمان ۳ دقیقه مواجهه، سبب افزایش سطح سر اسپرم می‌شود (شکل ۲C). این افزایش در تیمارهای ۰/۵، ۰/۵، ۱ و ۵ نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ )، اما اختلاف بین غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۱



شکل ۵. (A) شکل طبیعی اسپرم در مارماهی دهان‌گرد خزری. میکروسکوپ الکترونی ( $5000 \times$ )، (B) افزایش طول سر در اسپرم‌های قرارگرفته در معرض ۵ میلی‌گرم در لیتر دیازینون به مدت ۳ دقیقه ( $5000 \times$ ).





شکل ۶. (A) شکل طبیعی اسپرم در مارماهی دهان گرد خزری. میکروسکوپ نوری (1250X) و (B) اسپرم‌های قرار گرفته در معرض ۵ میلی گرم در لیتر دیازینون در زمان ۳ دقیقه (a) افزایش طول سر، (b) پیچ‌خوردگی خفیف تاژک، (c) گریزی شکل شدن انتهای سر اسپرم. میکروسکوپ نوری (1250X) و رنگ‌آمیزی تولوئیدن بلو

۷۵/۳±۴/۵ میکرومتر ثبت شد. با قرار گرفتن اسپرم‌ها تحت تأثیر غلظت‌های مختلف دیازینون طول تاژک کاهش می‌یابد (شکل ۲D). این کاهش در غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۰۵ میلی گرم در لیتر نسبت به تیمار شاهد معنی دار نبود ( $P>0.05$ )، اما در غلظت‌های بیش از ۰/۱ میلی گرم در لیتر نسبت به تیمار شاهد دارای اختلاف معنی دار بود ( $P<0.05$ ) (شکل ۲D). کمترین طول تاژک در غلظت‌های ۱ و ۵ میلی گرم در لیتر مشاهده شد.

در مقایسه بین میزان تخریب سر (خمیدگی، گریزی شکل شدن، ایجاد موج در دیواره، پارگی غشا و سایر بدشکلی‌ها) و تاژک (پیچ‌خوردگی و قطع کامل)، تاژک نسبت به سر از مقاومت بیشتری برخوردار است و درصد تخریب در سر اسپرم بیشتر است (شکل‌های ۴ و ۶). شکل ۴ درصد تخریب اسپرم مارماهی دهان گرد را در مواجهه با غلظت‌های مختلف دیازینون در زمان ۳ دقیقه مواجهه نشان می‌دهد. درصد قطع تاژک تا غلظت ۰/۱ میلی گرم در لیتر صفر است و با افزایش غلظت تا ۵ میلی گرم در لیتر درصد قطع تاژک به طور معنی‌داری افزایش

شاخص‌های کشیدگی سر (شاخص بیضی‌واری و درصد کشیدگی) در زمان ۳ دقیقه مواجهه تحت تأثیر غلظت‌های مختلف دیازینون تغییرات نامنظمی را نشان می‌دهد (شکل ۳). هیچ یک از غلظت‌ها با تیمار شاهد، از نظر درصد کشیدگی و شاخص بیضی‌واری، اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند ( $P<0.05$ )؛ به عبارت دیگر، تحت تأثیر غلظت‌های مختلف دیازینون در طول و عرض سر اسپرم‌ها به یک نسبت تغییر ایجاد شده است، اما در بین غلظت‌های مختلف، درصد کشیدگی در تیمار ۱ میلی گرم در لیتر نسبت به تیمار ۰/۰۵ و ۵ میلی گرم در لیتر به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. بنابراین، در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر، نسبت به غلظت‌های ۰/۰۵ و ۵ میلی گرم در لیتر، نرخ افزایش طول بیشتر از افزایش عرض است. تحلیل هم‌بستگی پیرسون، در زمان ۳ دقیقه مواجهه، بین غلظت‌های مختلف دیازینون و درصد کشیدگی ( $r=-0.49$ ) و شاخص بیضی‌واری ( $r=-0.47$ ) رابطه معنی‌داری نشان نمی‌دهد.

میانگین طول تاژک اسپرم‌ها در تیمار شاهد

آلاینده‌ها قرار گیرد (Kime et al., 1996). آلودگی منابع آبی، به خصوص برای آن دسته از ماهیانی که برای افزایش نسل خود فقط به تولیدمثل طبیعی در زیستگاه‌های طبیعی خویش وابسته‌اند، نقش بسزایی در کاهش جمعیت و در معرض خطر قراردادن بقای گونه‌ای بازی می‌کند (Abdelmeguid et al., 2007). از این‌رو، تحقیقاتی که به بررسی تأثیر آلاینده‌ها در تولیدمثل طبیعی این گونه ماهیان می‌پردازد، می‌تواند نقش بسزایی در شناسایی عوامل تهدیدکننده و پیشگیری از خطر انقراض آنها داشته باشد.

دیازینون از جمله سمومی است که به علت کاربرد بالای آن به فراوانی به محیط‌های آبی راه پیدا کرده و تأثیرات تخریبی زیادی روی تولیدمثل ماهیان داشته است. برای مثال، Moorow در سال ۲۰۰۴ بیان کرد که با فرارگرفتن اسپرم و تخمک ماهی قزل‌آلا (*Oncorhynchus mykiss*) در معرض ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر دیازینون، به مدت ۲ دقیقه، میزان بقا از لقاح تا چشم‌زدگی به میزان ۲۷ درصد کاهش می‌یابد. کاهش وزن بیضه، از بین رفتن مجاری اسپرم‌بر و بافت بینابینی، دژنره‌شدن سلول‌های لایدیگ، آتروفی سلول‌های بافت بیضه، کوچک‌شدن قطر سلول‌های ژرمینال و کاهش تحرک، افزایش ناهنجاری و مرگ اسپرم از تأثیرات منفی دیازینون در ماهی‌ها گزارش شده است (Larkin and Tjeerdema, 2000). از آنجا که سموم ارگانوفسفره عوامل آلکیله‌کننده دارند، بنابراین، بعضی از مطالعات حاکی از آن است که عامل‌های آلکیله‌کننده در فرآیند اسپرماتوزنریز اثر دارند و ساختار کروماتین اسپرم را از طریق بانده شدن با پروتامین و DNA تغییر می‌دهند و نهایتاً باعث دژنره‌شدن آن می‌شوند (Evenson and Jost, 2000).

نتایج این تحقیق نشان داد که سم دیازینون در

می‌یابد ( $P < 0.05$ ). به طوری که، در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر، درصد قطع تاژک به ۴/۴۶ درصد می‌رسد. سم دیازینون در سر اسپرم تأثیرات تخریبی بیشتری نسبت به قطع تاژک نشان داد. به طوری که، در غلظت ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر تخریب سر به ۶/۱ درصد می‌رسد که نسبت به تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ). حداکثر تخریب سر (۱۵/۴ درصد) در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد، اما بین غلظت‌های ۵، ۱ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر از نظر تخریب سر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). همچنین، بین تیمار ۰/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر درصد تخریب سر به صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد ( $P < 0.05$ ). درصد تخریب کل از تیمار ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ( $P < 0.05$ ), اما بین غلظت‌های ۰/۱ تا ۵ اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). حداکثر مقدار درصد تخریب کل ۳۱ درصد در تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. تحلیل هم‌بستگی پیرسون در زمان ۳ دقیقه مواجهه با سم دیازینون رابطه مثبت و معنی‌داری را در سطح ۱ درصد بین غلظت‌های مختلف با درصد تخریب سر ( $r = 0.578^{**}$ ) و درصد قطع تاژک ( $r = 0.713^{**}$ ) نشان می‌دهد. همچنین، رابطه مثبت و معنی‌داری را در سطح ۵ درصد بین غلظت‌های مختلف دیازینون با درصد تخریب تاژک ( $r = 0.539^*$ ) و درصد تخریب کل ( $r = 0.480^*$ ) نشان می‌دهد.

#### ۴. بحث و نتیجه‌گیری

آلودگی منابع آبی سبب بروز مشکلات فزاینده‌ای در تولیدمثل ماهیان شده است، زیرا بازده لقاح که وابسته به کیفیت تخمک و اسپرم است، می‌تواند تحت تأثیر

کاهش محسوسی می‌تواند تا حد زیادی در میزان کاهش لقاح مؤثر باشد. در مطالعات انجام‌شده در مورد تأثیرات سم دیازینون در اسپرم ماهیان اشاره مستقیمی به چنین تأثیری نشده است؛ در این مطالعات گزارش‌ها به طور کلی مبنی بر کاهش تولید و کیفیت اسپرم (کاهش مدت زمان تحرک و درصد اسپرم‌های متحرک) بوده است (Burkepile et al., 2000; Ducolomb et al., 2009; Dutta and Meijer, 2003; El-Aziz et al., 1994; Fadakar Masouleh et al., 2011; Larkin and Tjeerdema, 2000).

مطابق نتایج این تحقیق، افزایش غلظت دیازینون در زمان ۳ دقیقه سبب افزایش اندازه سر (طول، عرض و سطح) اسپرم به جز شاخص‌های کشیدگی سر می‌شود. به خصوص در تیمار ۵ میلی‌گرم در لیتر این افزایش محسوس‌تر است. در زمان ۳ دقیقه مواجهه با غلظت‌های مختلف سم دیازینون قطع تاژک در اسپرم‌ها، حتی در بیشترین غلظت، کمتر از ۵ درصد مشاهده شد و در غلظت‌های کمتر از ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر، به جز چند مورد، قطع تاژک مشاهده نشد، اما عمده تخریب تاژک در این زمان به صورت پیچ‌خوردگی و کوتاه‌شدن مشاهده شد. به طوری که، از غلظت ۰/۵ - ۵ میلی‌گرم در لیتر ۲۵ درصد اسپرم‌ها دارای تاژک تخریب‌یافته بودند. همچنین، خمیدگی سر و از بین رفتن غشا در غلظت‌های بیش از ۱ میلی‌گرم در لیتر دیازینون در زمان ۳ دقیقه مواجهه با غلظت‌های مختلف سم دیازینون به طور معنی‌داری افزایش یافته بود. تحقیقات دیگر نیز نشان داد که در معرض قرار گرفتن اسپرم تحت تأثیر آلاینده‌های مختلف از جمله دیازینون سبب ایجاد تغییر در طول، عرض و سطح سر اسپرم می‌شود (Larkin and Tjeerdema, 2000). محققان ترکیبات ارگانوفسفره را در حالت

غلظت‌های مختلف سبب کاهش درصد و مدت تحرک اسپرم مارماهی دهان‌گرد خزری می‌شود و با افزایش غلظت، این کاهش با شدت بیشتری صورت می‌پذیرد. به طوری که، اسپرم‌های تحت تماس با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر دیازینون کمتر از ۵ ثانیه دارای تحرک بودند که این حرکت نیز به صورت پاندولی بود و تحرک پیش‌رونده‌ای در آن مشاهده نمی‌شد. پس از مدت کوتاهی، اسپرم‌های تحت تماس با ۵ میلی‌گرم در لیتر دیازینون به توده‌ای لخته‌مانند تبدیل شدند. Fadakar Masouleh و همکاران، در سال ۲۰۱۱، نیز به بررسی تأثیر دیازینون در تحرک اسپرم ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) پرداختند و نشان دادند که افزایش غلظت دیازینون تا غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر سبب کاهش مدت زمان تحرک و درصد اسپرم‌های متحرک ماهی سفید می‌شود.

همچنین، نتایج این آزمایش نشان داد که با افزایش غلظت دیازینون در زمانی که فقط ۲۰ درصد اسپرم‌ها متحرک‌اند، نسبت به زمانی که ۸۰ درصد اسپرم‌ها متحرک‌اند، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها بیشتر است. این امر نشان می‌دهد که دیازینون، در زمان‌های ابتدایی مواجهه با اسپرم، تأثیر کمتری در طول دوره تحرک آن دارد، اما با گذشت زمانی اندک اثر دیازینون در کاهش طول دوره تحرک بیشتر می‌شود؛ به طوری که، در زمان‌هایی که ۲۰ درصد و کمتر از ۵ درصد اسپرم‌ها متحرک می‌مانند، اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف دیازینون شدیدتر می‌شود. چنین تأثیر کاهش‌دهنده‌ای حتی در کمترین غلظت روی فعالیت جنبشی اسپرم چشمگیر است، به طوری که، در غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر از دیازینون فعالیت ۸۰ درصد از اسپرم‌ها از ۱۴۵ ثانیه به ۸۵ ثانیه تقلیل می‌یابد؛ بدیهی است که چنین

اسپرم کپورماهی شامل پارگی دیواره سلولی در ناحیه سر اسپرم، قطع کامل دم و حالت ابری یا کلاف پنبه‌ای سر اسپرم مشاهده می‌شود. Van Look and Kime در سال ۲۰۰۳ گزارش دادند که غلظت‌های مختلف جیوه سبب افزایش طول و عرض اسپرم گلدفیش (*Carrasius auratus*)، همانند تأثیر دیازینون در این تحقیق، شده است.

نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت سم دیازینون تحرک اسپرم با شدت بیشتری کاهش و میزان تأثیر در مورفولوژی افزایش می‌یابد. حتی اگر این تغییر اندازه و ریخت اسپرم در تحرک آن تأثیرگذار نباشد و اسپرم بتواند خود را به سطح تخمک برساند، شکل تغییر یافته اسپرم و منطبق نبودن آن با میکروپیل تخمک می‌تواند تأثیر بسزایی در کاهش لقاح داشته باشد.

in-vivo و in-vitro به‌منزله یک موتازن می‌شناسند و بر آن‌اند که دیازینون موجب کاهش بقا و تحرک اسپرم و افزایش ناهنجاری‌های مورفولوژیکی در اسپرم می‌شود (El-Aziz et al., 1994). همچنین، گزارش شده است که دیازینون از طریق کاهش ترکیبات پروتئینی و تغییر در ساختار کروماتین سلول‌ها سبب ایجاد ناهنجاری در اسپرم می‌شود (Psenicka et al., 2007b).

تغییر در اندازه‌های سر اسپرم تحت تأثیر آلاینده‌های دیگر نیز گزارش شده است. Ebrahimi در سال ۲۰۰۴ نشان داد که در معرض قرار گرفتن اسپرم ماهی کپور (*Cyprinus carpio*) در معرض ۵۰ میلی‌گرم در لیتر فلز مس سبب تغییرات شدید ریخت‌شناختی شامل بزرگ شدن سر اسپرم تا چهار برابر اندازه طبیعی، قطع ارتباط دم با ناحیه سر و تغییر شکل سر اسپرم خواهد شد؛ همچنین، بیان کرد که در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر فلز مس تغییرات ریختی حادتر در

## References

- [1]. Abdelmeguid, N. E., Kheirallah, A. M., Matta, C. A., Abdel-Moneim, A., 2007. Environmental contaminant-induced spermatozoa anomalies in fish inhabiting Lake Mariut, Alexandria, Egypt. *International Journal of Applied Environmental*, 2, 1-18.
- [2]. Abdoli, A., 2000. The inland water fishes of Iran. *Iranian Museum of Nature and Wildlife*, Tehran, 378 p.
- [3]. Alavi, S.M.H., Cosson, J., Karami, M., Mojazi- Amiri, B., Akhoundzadeh, M., 2004. Spermatozoa motility in the Persian Sturgeon, *Acipenser persicus*: Effect of pH, dilution rate, ions and osmolality. *Reproduction Research*, 128, 819-828.
- [4]. Banaee, M., Sureda, A., Mirvaghefi, R., Ahmadi, K., 2011. Effects of diazinon on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99, 1-6.
- [5]. Brito, L.F.C., 2007. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 6, 249-264.
- [6]. Burkepille, D.E., Moore, M.T., Holland, M.M., 2000. The susceptibility of five nontarget organisms to aqueous diazinon exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64, 114-121.
- [7]. Close, D.A., Fitzpatrick, M.S., Li, H.W., 2002. The ecological and cultural importance of a species of extinction, Pacific lamprey. *Fisheries*, 27, 19-25.

- [8]. Cosson, J., Billard, R., Gibert, C., Dreanno, C., Suquet, M., 1999. The male gamete: from basic to clinical applications. In: Gagnon C (Ed.). Ionic factors regulating the motility of fish sperm. In the male gamete. From basic to clinical application. Cache Rive Press. pp. 161-185.
- [9]. Ducolomb, Y., Casas, E., Valdez, A., Gonzalez, G., Altamirano-Lozano, M., Betancourt, M., 2009. In vitro effect of malathion and diazinon on oocytes fertilization and embryo development in porcine. Cellular and Biological Toxicology, 25, 623-633.
- [10]. Dutta, H.M., Meijer, H.J., 2003. Sublethal effects of diazinon on the structure of the testis of bluegill, *Lepomis macrochirus*: a microscopic analysis. Environmental Pollution, 125, 355-360.
- [11]. Ebrahimi, M., 2004. Ultramorphologic effects of heavy metal (Cd, Cu and Hg) on sperm using electron microscopy. Journal of Yazd University, 31, 7-13.
- [12]. Ebrahimi, M., 2005. Effect of in vivo and in vitro zinc and cadmium treatment on sperm steroidogenesis of the African catfish (*Clarias gariepinus*). Iranian Journal of Veterinary Research, 6, 54-61.
- [13]. El-Aziz, M.I., Sahlab, A.M., El-Khalik, M., 1994. Influence of diazinon and deltamethrin on reproductive organs and fertility of male rats. Dtsch Tieraerztl Wochenschr, 101, 230-232.
- [14]. Evenson, D.P., Jost, L., 2000. Sperm chromatin structure assay for fertility assessment. Methods Cell Science, 22, 169-189.
- [15]. Fadakar Masouleh, F. 2009. Physiological disorders of testis structure and spermatozoa motility in Caspian Kutum (*Rutilus frisii kutum*) in exposure of Endocrine Disrupter Chemicals (EDC). MSc thesis, University of Tehran, 106 p.
- [16]. Fadakar Masouleh, F., Mojazi Amiri, B., Mirvaghefi, A.R., Nemtollahi, M.A., 2011. In vitro effects of Diazinon on male reproductive tissue and sperm motility of Caspian Kutum (*Rutilus frisii kutum*). Journal of Environmental Toxicology, 5, 108-116.
- [17]. Hidialgo, M., Rodrigue, I., Dorado, J., Sanz, J., Soler, C., 2005. Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. Veterinarni Medicina Czech, 50: 24-32.
- [18]. Kessler, K., 1870. Volzhskaya minoga (*Petromyzon wagneri* n. sp.). Trudy Sankt-Peterburgskogo obshchestvaestetvoznaniya, 1, 207-214.
- [19]. Kime, D.E., Ebrahimi, M., Nysten, K., Roelants, I., Rurangwa, E., Moore, H.D.M., Ollevier, F., 1996. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish. Application to the effects of heavy metals. Aquatic Toxicology, 36, 223-237.
- [20]. Khazaei, S.H., Talebi Jahromi, K., Khorasani, N., 2005. Amount of Diazinon in underwater resources of Mahmood Abad (Mazandaran Province: North of Iran). First Congress of Environmental Science. University of Tehran.
- [21]. Koprucu, S.S. K., Koprucu, M.S., Ural, U., Pala, M., 2006. Acute toxicity of organophosphorous pesticide diazinon and its effects on behavior and some hematological parameters of fingerling European catfish (*Silurus glanis* L). Pesticide Biochemistry and Physiology, 86, 99-105.
- [22]. Kuivila, K.M., Foe, C.G., 1995. Concentrations, transport and biological effects of dormant spray pesticides in the San Francisco Estuary California. Environmental Toxicology and Chemistry, 14, 1141-1150.
- [23]. Larkin, D., Tjeerdema, R.S., 2000. Fate and effects of diazinon. Review in Environmental Contamination and Toxicology, 166, 69-82.

- [24]. Linhart, O., Mims, S.D., Shelton, W.L., 1995a. Motility of spermatozoa from shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platoryneclus* Rafinesque 1820) and paddlefish (*Polyodon spathulla* Walbaum, 1797). *Journal of Fish Biology*, 97, 902-909.
- [25]. Linhart, O., Mims, S.D., Shelton, W.L., 1995b. Motility of spermatozoa from shovelnose sturgeon (*Scaphirhynchus platoryneclus* Rafinesque 1820) and paddlefish (*Polyodon spathulla* Walbaum, 1797). *Journal of Fish Biology*, 97, 902-909.
- [26]. Morrow, E.H., 2004. How the sperm lost its tail: the evolution of aflagellate sperm. *Biological Reviews*, 79, 795-814.
- [27]. Psenicka, M., Hadi Alavi, S.M., Rodina, M., Gela, D., Nebesarova, J., 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.
- [28]. Riazi, Z., Yadegarian, L., Marvati, M. 2001. Amount of remined organophosphate pesticides on apple and its effects of human. Third national congress of application of Biological substances and improving of fertilizers and pesticides use in Agriculture. Ministry of Jahad Keshavarzi, 734 p.
- [29]. Sattari, M., 2000. Ichthyology. Naghsh Mehr, Iran, Tehran, 659 p.
- [30]. Sattari, M., Shahsavani, D., Shafiei, S. 2002. Fish systematics. Hagh Shenas, 503 p.
- [31]. Svodova, M., Luskova, V., Drastichova, J., Zlabek, V., 2001. The effect of Diazinon on hematological indices of common carp (*Cyprinus carpio*. L). *Acta Veterinaria Brno*, 70, 457-465.
- [32]. Vander Geest, H.G., Stuijzand, S.C., Krak, M.H.S., Admiral, W., 1997. Impact of diazinon calamity in 1996 on the aquatic macroinvertebrates in the river Mesue. *The Netherlands Journal of Aquatic Ecology*, 30, 327-330.
- [33]. Van Look, K.J.W., Kime, E., 2003. Automated sperm morphology analysis in fishes: the effect of mercury on goldfish sperm. *Journal of Fish Biology*, 63, 1020-1033.