ت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کن
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بررسی برخی تغییرات ریخت‌شناسی ناشی از اثرات سمی فلز مس بر اسپرم ماهی کپور و قزل آلا با استفاده از میکروسکوپ الکترونی اسکن (SEM)

منصور ابراهیمی

ebrahimi@qom.ac.ir

گروه فیزیولوژی دانشگاه قم

تاریخ ورود: شهریور ۱۳۸۱ تاریخ پذیرش : اردیبهشت ۱۳۸۳

چکیده

این تحقیق جهت بررسی تاثیرات ریخت‌شناسی اسپرم دو گونه ماهیان استخوانی در اثر تماس مزمن با فلز مس انجام شده است.آلودگی منابع آبی به فلزات سنگین به دلائل گوناگون می‌تواند باعث بروز اختلالات و ضایعاتی در فعالیت‌های تولید مثلی آبزیان گردد. فلزات سنگین قابلیت تجمع بافتی (Bioaccumulation) دارند. بنابراین در اثر تجمع فلزات سنگین در بیضه‌ها، اسپرم از همان ابتدا و در بافت بیضه با فلزات سنگین در تماس بوده و روند اسپرماتوژنز و شکل اسپرماتوزونید تحت تاثیر این مواد قرار می‌گیرند. اسپرم کپور و قزل‌آلا به مدت سه ساعت تحت اثر غلظتهای مختلف مس (۰، ۱، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ قسمت در میلیون – ppm) قرار گرفتند. سپس اسپرمها با گلوترالدهید تثبیت شده و با محلول حاوی سوکروز شستشو داده شده و پس از تثبیت مجدد توسط اسمیوم تترااکسید و آبگیری در محلولهای مختلف استون، نمونه‌ها خشک شده و با میکروسکوپ الکترونی اسکن(Scanning Electro Microscopy (SEM مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج حاصله نشان داد که مس در غلظتهای بیش از ۱۰ پی‌پی‌ام می‌تواند تغییرات مرفولوژیک گسترده‌ای را در ساختمان سر اسپرم ایجاد نموده و در نتیجه اسپرمهای صدمه دیده به دلیل عدم تحرک و بزرگ شدن بیش از حد سر، قادر به حرکت، ورود به تخمک و بارور کردن آن نخواهند بود. میانگین درصد تعداد اسپرمهای غیرطبیعی در غلظتهای ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام بترتیب ۷۵ درصد، ۱۰۰ درصد و ۱۰۰ درصد تعیین گردید.

لغات کلیدی: اسپرم، فلزات سنگین، مس، کپور، قزل‌آلا

ت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کن
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

یکی از عواقب ناخوشایند صنعتی شدن و تمایل به کسب درآمدهای بیشتر در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه، افزایش الودگیهای محیطی و در نتیجه بروز فجایع زیست محیطی است. الودگی محیطهای ابی به فلزات سنگین در نتیجه فرآیندهای ذوب و ریخته‌گری فلزات، استفاده بی‌رویه از سوختهای فسیلی و عملیات اکتشاف و استخراج معادن حاصل شده و با گسترش روزافزون صنایع، آلودگیهای فوق رو به افزایش است. در صورتیکه آلودگی منابع آبی در اثر ورود مقادیر زیاد و ناگهانی فلزات سنگین ایجاد گردد، به دلیل آلودگی حاد، بیشتر جانوران و گیاهان آبزی از بین می‌روند (Kime, 1995 ; Kime *et al.*, 1996). اما اگر آلودگی فوق با مقادیر کم فلزات سنگین و برای مدت طولانی ایجاد گردد، به مرور فلزات سنگین وارد بدن جانوران شده و در بافتهای مختلف از جمله بیضه و تخمدان تجمع حاصل نموده که به این پدیده تجمع زیستی (bioaccumulation) اطلاق شده و به دلیل انتقال فلزات سنگین تجمع یافته در گیاهان و حیوانات آبزی از طریق زنجیره غذایی، برای جانوران راس هرم غذایی از جمله انسان باعث بروز مشکلات بهداشتی می‌گردند (Ebrahimi *et al.*, 1995 ; Rurangwa *et al.*, 1998 ; Kime, 1995). یکی از محل‌های تجمع فلزات سنگین در بیضه بوده که بنابراین تمامی اسپرمهای تولیدی در معرض تماس با فلزات سنگین در درون بیضه و در طی تکامل خود می‌باشند (Kime *et al.*, 1996 ; Rurangwa *et al.*, 1998). اثرات سوء حاصل از تجمع فلزات سنگین و در نتیجه تماس اسپرم ماهیان با آنها بررسی شده است (Kime, 1995). در مطالعات قبلی مشخص گردید که تماس ماهیان استخوانی با فلزات سنگین (از جمله مس) باعث کاهش شدید در پارامترهای حرکتی اسپرم شده و در کمتر از یک دقیقه در غلظتهای زیاد فلزات سنگین باعث توقف کامل حرکات اسپرم می‌شود (Ebrahimi *et al.*, 1995 ; Kime *et al.*, 1996 ; Rurangwa *et al.*, 1998). ذکر این نکته لازم است که اسپرم بیشتر ماهیان برای لقاح تخمک باید ابتدا وارد آب شده و پس از فعال شدن در اثر جذب آب عمل لقاح را شروع نماید. واضح است که در صورت وجود مقادیر زیاد فلزات سنگین در آب، به علت آلودگی حاد و فوق حاد، بسرعت اسپرم غیرفعال شده و قادر به لقاح تخمک نمی‌باشد. ولی در صورتیکه اسپرم در تماس مزمن با فلزات سنگین و در درون بیضه قرار گرفته باشد، ممکن است اثرات سوء حاصله متفاوت باشد. برای مشخص نمودن دقیق‌تر علل بروز ضایعات در سطح سلولی و برای بررسی دقیق تغییرات مرفولوژیک حاصله در اثر تماس اسپرم با فلز سنگین مس بر روی اسپرم ماهیان استخوانی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی، این مطالعه طراحی و انجام گردید.

مواد و روش کار

شش عدد ماهی کپور نر (*Cyprinus carpio*) با میانگین وزن ۱۲۳۰±۴۲۵ گرم از یک استخر پرورش ماهیان گرم آبی تهیه شده و پس از تزریق عصاره هیپوفیز کپور، از طریق فشار بر روی ناحیه شکمی، اسپرم انها جمع‌آوری شد. شش عدد قزل‌الای رنگین کمان نر (*Oncorhynchus mykiss*)

ت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کن
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

رسیده نیز از یک مزرعه پرورش تهیه شده و بوسیله فشار دست بر روی ناحیه شکمی اسپرم آنها تهیه گردیدند.

اسپرم ماهی کپور با غلظتهای ۰، ۱، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ قسمت در میلیون (ppm) مس تماس داده شد و قزل‌آلا نیز با همان غلظتهای مس که برای اسپرم ماهی کپور استفاده شد، تماس داده شده ولی غلظت ۰/۱ قسمت در میلیون نیز به آنها اضافه شد. برای فراهم کردن شرایط طبیعی تماس اسپرم با فلز سنگین مس در بیضه، ویالهای حاوی اسپرمها و غلظتهای مختلف فلز مس در شرایط دمای معمول بدن (۲۰ درجه سانتیگراد برای ماهی کپور و ۱۰ درجه سانتیگراد برای نمونه‌های قزل‌آلا) برای سه ساعت نگهداری شدند. برای اطمینان از تماس مداوم اسپرم با فلز مس در طی مدت تماس با استفاده از دستگاه شیکر، ویالها تکان داده شدند. پس از آن نمونه‌ها از انکوباتورها خارج شده و براساس روش ذیل برای مطالعه با میکروسکوپ الکترونی اسکن آماده گردیدند.

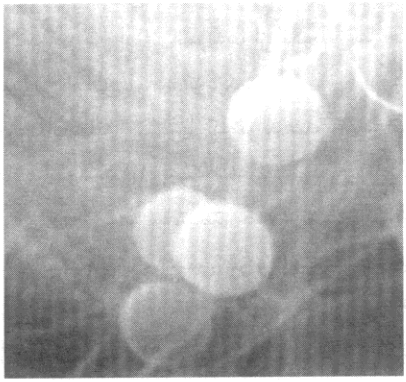
اسپرمهای موجود در ویالهای انکوباته شده با گلوترالدهید ۳ درصد در ۰/۱ مولار فسفات بافر مخلوط شده و در دمای ۴ درجه سانتیگراد برای سه ساعت نگهداری شدند. سپس اسپرم و مواد تثبیت کننده از طریق فیلترهای کاغذی با قطر۵/۵ سانتیمتر صاف شدند. لبه‌های کاغذ صافی به پایین خم شده و بوسیله گیره کاغذی نگه داشته شده و سپس در ویال شیشه‌ای برای انجام قسمتهای بعد قرار داده شدند. فیلترهای کاغذی سه مرتبه با فسفات بافر ۰/۱ مولار حاوی۱۰درصد سوکروز به فواصل یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد شستشو داده شدند. سپس نمونه‌ها برای مرتبه دوم برای یک ساعت در محلول۲ درصد اسمیوم تترااکسید در دمای اتاق تثبیت شده و آبگیری برای مدت ۱۵ دقیق در محلولهای استون (۳۰، ۵۰، ۷۵، ۹۵، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد خشک شده) و بر روی یک غربال مولکولی (molecular sieve) انجام گرفت. سپس در دستگاه خشک کننده نقطه بحرانی (critical point drier) با استفاده از دی‌اکسید کربن به عنوان مایع انتقالی نمونه‌ها خشک شدند. پس از خشک کردن نمونه‌ها آنها را بر روی انتهای یک چوب کوچک چسبانده و در اسپوتر کوتر (sputter coater) با حدود ۲۵ تا ۳۰ نانومتر طلا پوشانده شده و با میکروسکوپ الکترونی اسکن (فیلیپس، ۵۰۱ ب، ایندهون، هلند) و با بزرگنمایی ۵۰۰۰ برابر مورد بررسی قرار گرفتند.

همه نمونه‌ها با میکروسکوپ الکترونی اسکن مورد مطالعه قرار گرفته و از حالتهای طبیعی و غیرطبیعی بعضی از اسپرمها عکس تهیه شد. تعداد کل اسپرمهای غیرطبیعی به روش زیگزاگ مورد استفاده در آزمایشگاههای خون‌شناسی جهت شمارش گلبولهای سفید خون، تعیین گردید و درصد اسپرمهای غیرطبیعی محاسبه شد. برای تعیین اندازه‌گیریهای ریخت‌شناسی اسپرمها از نگاتیو عکسهای میکروسکوپی گرفته شده استفاده گردید. در این روش نگاتیو عکسها بر روی یک اورهد مدرج قرار داده شده و سپس بزرگترین قطر سر اسپرم با استفاده از صفحه مدرج اندازه‌گیری شده و میانگین قطر سر اسپرم (۱۰ عدد) در هر غلظت برای بیان تغییرات ریخت‌شناسی و تغییر اندازه سر اسپرمها مورد استفاده قرار گرفت. تحلیل آماری با استفاده از مقایسه میانگین اعداد حاصل از اندازه‌گیری قطر سر

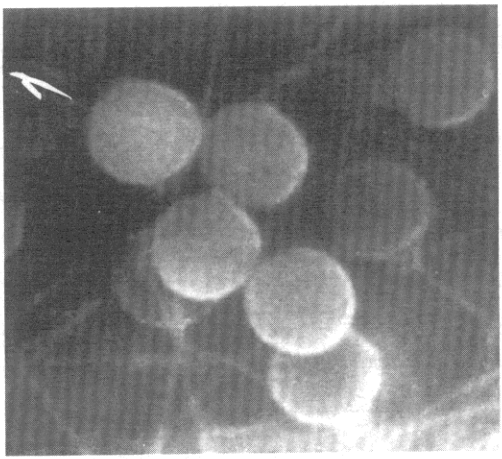
اسپرمها در اثر تماس با غلظتهای مختلف فلز مس با غلظت صفر قسمت در میلیون مس (بعنوان گروه کنترل) بوسیله تست independent t-test توسط برنامه SPSS انجام گرفت.

نتایج

ساختار اسپرم در نمونه‌های طبیعی در هر دو گونه ماهیان که بوسیله میکروسکوپ الکترونی اسکن مورد بررسی قرار گرفته از نظر شکل کاملا مشابه بوده و هیچگونه برآمدگی آکروزمی در آنها مشاهده نشد (شکل ۱ و شکل ۲).



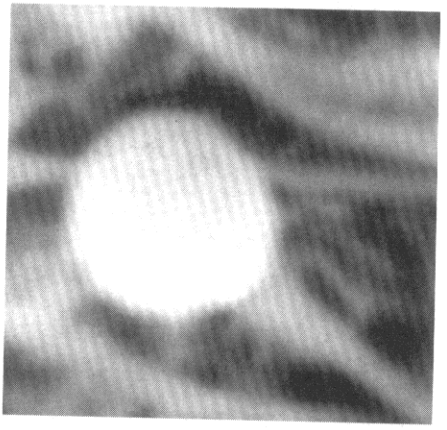
شکل ۱: ساختار طبیعی اسپرم در کپور ماهیان مشاهده شده توسط میکروسکوپ الکترونی اسکن (بزرگنمایی ۵۰۰۰)



شکل ۲: ساختار طبیعی اسپرم در ماهیان قزل‌آلا مشاهده شده توسط میکروسکوپ الکترونی اسکن (بزرگنمایی ۵۰۰۰)

میکروسکوپ الکترونی اسکن نشان دهنده تغییرات مرفولوژیک واضح و مشخصی در اثر تماس اسپرم با مس بود که با استفاده از میکروسکوپ نوری معمولی قابل مشاهده نبودند. غلظتهای ۰/۱ (در قزل‌آلا) و ۱ قسمت در میلیون هیچگونه تغییرات مرفولوژیک قابل مشاهده و معنی‌دار ($P < 0.05$) را در اسپرم ایجاد نکردند.

با افزایش غلظت فلز مس به ۱۰ قسمت در میلیون تغییرات مرفولوژیک در اسپرم شروع گردیده و سر اسپرم بزرگ شده و میانگین قطر آن به بیش از دو برابر ($P < 0.05$) حد طبیعی بالغ گردید (شکل ۳). این افزایش حجم به طور یکسان و در تمامی ابعاد انجام شده و قطعه میانی اسپرم را نیز شامل شده است. هیچگونه شکستگی و یا بریدگی در ناحیه دم مشاهده نگردید.

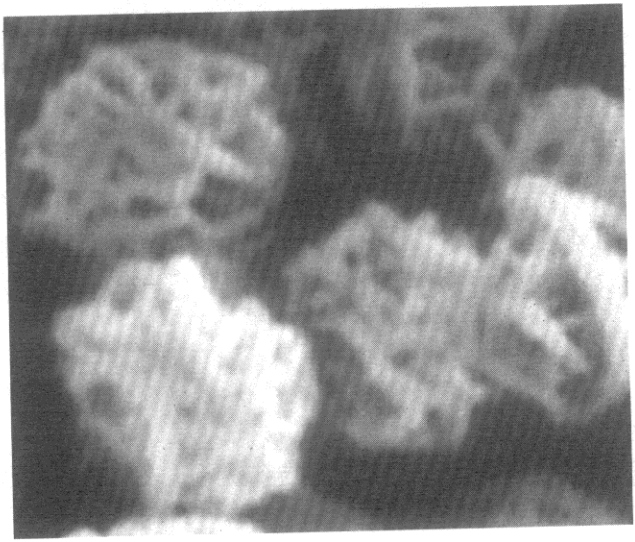


شکل ۳: بزرگ شدن سر اسپرم ماهی کپور (بیش از دو برابر) در اثر تماس اسپرم با غلظت ۱۰ پی‌پی‌ام مس مشاهده شده توسط میکروسکوپ الکترونی اسکن (بزرگنمایی ۵۰۰۰)

در اثر تماس اسپرم با غلظت ۵۰ قسمت در میلیون مس تغییرات مرفولوژیک در اسپرم شدیدتر گردیده و قوام آن بخصوص در ناحیه سر از بین رفته و دیواره سلولی متلاشی گردید (شکل ۴). اندازه سر اسپرم تا چهار برابر حد طبیعی بزرگتر شده ($P < 0.05$) و محتویات هسته به صورت رشته‌های به هم پیچیده نمایان گردیدند. ارتباط دم با ناحیه سری نیز قطع گردیده و شکل طبیعی اسپرم کاملا به هم ریخته شد.

شکل ۴ : از بین رفتن قوام سر اسپرم و متلاشی شدن دیواره سلولی و ایجاد رشته‌های به هم پیچیده و بزرگ شدن بیش از ٤ برابر سر اسپرم در اثر تماس اسپرم با غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام مس مشاهده شده توسط میکروسکوپ الکترونی اسکن (بزرگنمایی ۵۰۰۰)

تغییرات مرفولوژیک حادتر در اثر تماس اسپرم با غلظت ۱۰۰ قسمت در میلیون مشاهده گردید. مشخص‌ترین تغییر مرفولوژیک بزرگ شدن سر اسپرم (بیش از چهار برابر اندازه طبیعی ($P < 0.05$) بود 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 در این نمونه‌ها مشاهده گردید وجود حفرات فراوان در ناحیه سر اسپرم نشاندهنده از بین رفتن کامل قوام و ساختار اسپرم می‌باشد (شکل ۵).



شکل ۵ : از بین رفتن شکل طبیعی سر اسپرم و بزرگ شدن بیش از حد سر اسپرم در اثر تماس اسپرم با غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام مس مشاهده شده توسط میکروسکوپ الکترونی اسکن (بزرگنمایی ۵۰۰۰)

در غلظت ۱۰ قسمت در میلیون میانگین تعداد اسپرمهای غیرطبیعی ۷۵ درصد بوده که در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ قسمت در میلیون به ۱۰۰ درصد رسید. هیچگونه تفاوت و اختلافی آماری در میزان حساسیت اسپرمهای دو گونه کپور و قزل‌آلا نسبت به فلز مس مشاهده نگردید.

بحث

تغییرات مرفولوژیک مشاهده شده توسط میکروسکوپ الکترونی اسکن در اثر تماس فلز سنگین مس بسیار مشخص و واضح بوده و نشاندهنده این نکته است که فلزات سنگین علاوه بر تغییر در ساختارهای فیزیولوژیک اسپرمها همانند اختلال در فاکتورهای حرکتی اسپرم (Ebrahimi *et al.*, 1995 Rurangwa *et al.*, 1998; Kime *et al.*, 1996) می‌توانند باعث ایجاد نواقص ساختاری و آناتومیکی نیز شوند.

افزایش اندازه سر اسپرم در اثر تماس با مس در این مطالعه ممکن است در اثر از دست دادن قوام (decondensation) سر اسپرم به دلیل تماس با فلز مس باشد. این پدیده به دلیل از هم باز شدن رشته‌های پیچیده دی‌ان‌آ (DNA uncoil) و خروج محتویات از هسته که معمولا به علت قطع ارتباط در پلهای گوگردی (S-S bridges) حاصل می‌شود (Kime, 1995) ایجاد می‌گردد. گزارش نموده‌اند که از دست دادن قوام کروماتینها می‌تواند یکی از اصلی‌ترین عوامل در بروز نازایی باشد. افزایش بدشکلی (deformity) سر اسپرم در اسپرم موشها در اثر تماس با کلرید روی و کلرید کادمیم نیز گزارش شده است (Mukherjee *et al.*, 1988 ;Gupta *et al.*, 1991). حتی در غلظت کمتر از ۰/۰۲ میلی‌مولار مس، بزرگ شدن سر اسپرمها در قوچ مشاهده شده است (White & Aitken, 1995).

اثر سمی مس بر روی اسپرم، تاکنون در حیوانات متعددی از جمله ماهیان گزارش شده است (Billard & Cosson, 1992 ; Cope *et al.*, 1994 ; Badsha & Goldspink, 1982 ; Anderson *et al.*, 1991 ; Dinnel *et al.*, 1989 ; Gümgüm *et al.*, 1994). در انسان گزارش شده است که مس می‌تواند باعث جلوگیری از حرکات اسپرم گردیده و بنابر این به عنوان وسیله جلوگیری از بارداری استفاده می‌گردد (Volpi-Ghirardini & ; Saito *et al.*, 1967 ; White & Aitken, 1995 ; Wong *et al.* , 2001 ; Bellas *et al.*, 2001; Arizzi-Novelli, 2001). یک رابطه معنی‌دار بین غلظت بالای مس در پلاسما و ناباروری در مردان گزارش شده و نشان داده شده است که کیفیت اسپرم انزال شده در مردانی که به دلیل تماس شغلی غلظت پلاسمای مس آنها بیشتر از میزان طبیعی بوده است شدیداً کاهش یافته است (Telisman *et al.*, 2000). در مطالعه تاثیر فلز مس بر روی کیفیت اسپرم در حیوان ایمپالا در آفریقای جنوبی، نشانداده شده است که افزایش غلظت پلاسمای مس می‌تواند باعث اختلال در اسپرماتوژنز و بروز واکوئلهایی در ناحیه گردنی اسپرم در این حیوانات گردد (Ackerman *et al.*, 1999).

در مطالعه دیگری که توسط نگارنده انجام گرفته است نشان داده شده است که حتی غلظت ۵ قسمت در میلیون مس می‌تواند باعث توقف تعدادی از پارامترهای حرکتی اسپرم گردد (Ebrahimi *et al.*, 1995

(Rurangwa *et al.*, 1998 ; Kime *et al.*, 1996) در این مطالعه کلیه فاکتورهای حرکتی اسپرم توسط دستگاه ردیاب کامپیوتری مورد بررسی قرار گرفته و مشاهده شد که در غلظتهای بیش از ۵ قسمت در میلیون این فاکتورها دچار نقصان شده و در غلظت ۵۰ قسمت در میلیون کلیه اسپرمها بی‌حرکت گردیدند. بروز تاثیرات سمی مشابه با فلز مس و متوقف شدن پارامترهای حرکتی در اثر تماس اسپرم کربه‌ماهی و کپور در مطالعات قبلی نیز گزارش شده (Ebrahimi *et al.*, 1995 ; Kime *et al.*, 1996 ; Rurangwa *et al.*, 1998) که یافته‌های جدید در این مقاله تغییرات مرفولوژیک را به عنوان یکی از راههای ممکن در بروز اختلال در فعالیت طبیعی اسپرمها تائید می‌کند.

اگر چه این مطالعه تنها بروز تغییرات مرفولوژیک و پاتولوژیک حاصله در اثر تماس اسپرم ماهیان با فلز سنگین مس را نشان می‌دهد، با کنار هم گذاشتن یافته‌ها و مطالعات قبلی ما با این یافته‌های جدید، می‌توان اذعان کرد که حداقل بخشی از عدم توانایی حرکتی اسپرم ماهیان در ابهای آلوده به مس می‌تواند به دلیل تغییرات مرفولوژیک و ساختاری آناتومیک به علت تماس مستقیم اسپرم با فلزات سنگین پس از خروج اسپرم از ماهیان و آزاد شدن آنها در آب باشد. علاوه بر آن فلزات سنگین می‌توانند در ماهیانی که در آبهای آلوده زندگی می‌کنند در بافتهای آنها تجمع نمایند (Kime, 1995). یکی از بافتهایی که مس می‌تواند در آن ذخیره شود بافت بیضه بوده و بنابراین به دلیل ارتباط نزدیک اسپرم با فلز مس در طی پدیده اسپرماتوژنز و بعد از آن تغییرات مرفولوژیک در اسپرم حاصل می‌شود.

منابع

Ackerman, D. J. ; Reinecke, A. J. ; Els, H. J. ; Grobler, D. G.; Reinecke, S. A. , 1999. Sperm abnormalities associated with high copper levels in impala (*Aepyceros melampus*) in the Kruger National Park, South Africa. Ecotoxicol-Environ-Saf. Vol. 43, No. 3, pp.261-266.

Anderson, B. S. ; Middaugh, D.P. ; Hunt, J.W. and Turpen, S.L. , 1991. Copper toxicity to sperm, embryos and larvae of topsmelt *Atherinops affinis*, with notes on induced spawning. Mar. Environ. Res. Vol. 31, pp.17-35.

Badsha, K. S. and Goldspink, C.R. , 1982. Preliminary observations on the heavy metal content of four species of freshwater fish in NW England. Journal Fish Biol. 21, 251-267.

Bellas, J. ; Vazquez, E. and Beiras, R. , 2001. Toxicity of Hg, Cu, Cd, and Cr on early developmental stages of *Ciona intestinalis* (Chordata, Ascidiacea) with potential application in marine water quality assessment. Water-Res. Vol. 35, No. 12, pp.2905-2912.

Billard, R. and Cosson, M.P. , 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in freshwater fish. J. Exp. Zool. Vol. 261, pp.122-131.

Cope , W.G. ; Wiener, J.G. and Atchison, G.J. , 1994. Hepatic cadmium, metal binding proteins and bioaccumulation in bluegills exposed to aqueous cadmium. Environ. Toxicol and Chem. Vol. 13, pp.553-562.

Dinnel, P.A. ; Link, J.M. ; Stober, Q.J. ; Letourneau, M.W. and Roberts, W.E. , 1989. Comparative sensitivity of sea urchin sperm bioassays to metals and pesticides. Arch. Environ. Contam. Toxicol. Vol. 18, pp.748-755.

Ebrahimi, M. ; Nysten, K. ; Roelants, I. ; Ollevier, F. and Kime, D.E. , 1995. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring sperm quality: application for determining effects of heavy metal pollutants. Book of Short Communications. Larvi 95, Ghent, Belgium, Sept. 1995.

Gümgüm, B. ; Ünlü, Tez, Z. and Gülsün, Z. , 1994. Heavy metal pollution in water, sediment and fish from the Tigris river in Turkey. Chemosphere 29, pp.111-116.

Gupta, T. ; Talukder, G. and Sharma, A. , 1991. Cytotoxicity of zinc chloride in mice *in vivo*. Biological Trace Element Research 30, pp.95-102.

Kime, D.E. ; Ebrahimi, M. ; Nysten, K. ; Roelants, I. ; Moore, H.D.M. and Ollevier, F. , 1996. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to effects of heavy metals. Aquatic toxicology, Vol. 36, pp.223-237.

Kime, D.E. , 1995. The effects of pollution on reproduction in fish. Rev. Fish Biol. Fisheries. Vol. 5, pp.52-96.

Mukherjee, A. ; Giri, A.K. ; Sharma, A. and Talukder, G. , 1988. Relative efficacy of short-term tests in detecting genotoxic effects of cadmium chloride in mice *in vivo*. Mutation Research. Vol. 206, pp.285-296.

Rurangwa, E.; Roelants, I.; Huyskens, G.; Ebrahimi, M.; Kime, D. E. and Ollevier, F., 1998. The minimum acceptable spermatozoa to egg ratio for artificial insemination and the effects of heavy metal pollutants on sperm motility and fertilization ability.in the African catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822); J. Fish Biol. Vol. 53, pp.402-413.

Saito, S. ; Bush, I.M. and Whitmore, W.F. , 1967. Effects of certain metals and chelating agents on rat and dog epididymal spermatozoan motility. Fertility and Sterility. Vol. 18, pp.517-521.

Telisman, S ; Cvitkovic, P. ; Jurasovic, J. ; Pizent, A. ; Gavella, M. and Rocic, B. , 2000. Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc, and copper in men. Environ-Health-Perspect. Vol. 108, No. 1, pp.45-53.

Volpi-Ghirardini, A. and Arizzi-Novelli, A. , 2001. A sperm cell toxicity test procedure for the Mediterranean species Paracentrotus lividus (*Echinodermata: Echinoidea*). Environ-Technol. Vol. 22, No. 4, pp.439-45.

White, D.R. and Aitken, R.J. , 1995. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. Gamete Research, Vol. 22, pp.163-178.

Wong, W.Y. ; Flik, G. ; Groenen, P.M. ; Swinkels, D.W. ; Thomas, C.M. ; Copius-Peereboom, J.H. ; Merkus, H.M. and Steegers-Theunissen, R.P. , 2001. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. Reprod-Toxicol. Vol. 15, No. 2, pp. 131-6.