مطالعه آسیب‌شناسی گناد اردک ماهی (*Esox lucius*) در تالاب انزلی و مقایسه آن با تالاب امیرکلایه

- **مرضیه عباسی***: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، صندوق‌پستی: ۱۱٤٤
- **علی بانی**: گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، صندوق‌پستی: ۱۹۱٤۱-٤۱۳۳٥
- **مهوش هادوی**: پژوهشگاه ملی و مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، کرج، صندوق‌پستی: ۱٦۱-۱٤۹٦٥
- **حامد موسوی ثابت**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، صندوق‌پستی: ۱۱٤٤

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹٤

چکیده

نگرانی حضور طیف وسیعی از آلاینده‌های زیست محیطی که تحت عنوان برهم زنندهای غدد درون ریز (EDCs) شناخته شده‌اند و می توانند فرایندهای تولیدمثل طبیعی موجودات آبزی را مختل کنند در حال افزایش است. در این پژوهش ناهنجاری احتمالی گناد اردک ماهی نر و ماده نابالغ و بالغ صید شده از تالاب انزلی (به‌عنوان یک محیط آلوده به ترکیبات EDCs) مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع تعداد ۳۸ قطعه اردک ماهی از تالاب انزلی و ۲۹ قطعه اردک ماهی از تالاب امیرکلایه (به‌عنوان محیط سالم) در مهرماه و آذر ماه سال ۱۳۹۱ نمونه‌برداری شد. پس از مشاهدات ماکروسکوپی گناد ماهیان صید شده، بررسی‌های میکروسکوپی با انجام مراحل مختلف بافت‌شناسی گنادی و مطالعه با میکروسکوپ نوری انجام شد. نتایج نشان داد که از دیدگاه ماکروسکوپی و میکروسکوپی در هیچ‌یک از ماهیان نمونه‌برداری شده شواهد و یا علایم ناهنجاری گنادی و حالت دو جنسیتی (حضور هم‌زمان بافت تخمدان و بیضه در همان گناد و یا تغییر در شکل ظاهری گناد) مشاهده نشد و تالاب انزلی علی‌رغم داشتن طیف وسیعی از مواد آلاینده تاثیری بر ساختار گناد اردک ماهی ندارد.

کلمات کلیدی: بافت‌شناسی، اردک ماهی، تالاب انزلی، تالاب امیرکلایه

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Marzieh.abbasi.ac@gmail.com

مقدمه

اخیراً آسیب‌های وارد شده بر گناد و فرایندهای تولیدمثلی ماهیان به‌علت قرارگیری طولانی مدت در معرض آلاینده‌های زیست‌محیطی موجود در محیط‌های آبی نگرانی‌های بزرگی در سراسر جهان به‌وجود آورده است (Lu و همکاران، ۲۰۱۰). این آلاینده‌ها که عمدتاً با تغییر در قسمتی یا تمام ساختار گناد موجب بروز ناهنجاری‌های تولیدمثلی و در موارد حاد ماده‌سازی یا نرسازی و نهایتاً فروپاشی جمعیت ماهیان می‌شوند تحت‌عنوان ترکیبات برهم زننده غدد درون‌ریز (EDCs یا Endocrine Disrupting Chemical) نامیده می‌شوند و گروهی از مواد طبیعی و مصنوعی مانند استروژن‌های گیاهی، آلکیل فنول‌ها، آفت‌کش‌های ارگانوکلره، سورفاکتانت‌ها و عناصر کمیاب (جیوه، سرب، کادمیم) هستند که به‌طور گسترده‌ای در صنعت، کشاورزی و کاربردهای خانگی به‌عنوان شوینده‌ها استفاده می‌شوند (Sumpter و Jobling، ۱۹۹۵). این ترکیبات با تاثیر بر سیستم غدد درون‌ریز موجودات موجب بروز ناهنجاری‌های گنادی از قبیل تغییرات بافتی گناد، ناهنجاری سلول‌های گنادی، تاخیر در بلوغ جنسی، اختلال در اسپرماتوژنزیز و وقوع افراد دوجنسی در ماهیان می‌شوند (Milnes و همکاران، ۲۰۰۶). موارد متعددی از چنین ناهنجاری‌هایی در بسیاری از گونه‌های ماهیان ساکن در محیط‌های آبی آلوده در کشور چین (Hu و همکاران، ۲۰۰۳)، هلند (Vethaak و همکاران، ۲۰۰۵)، آفریقای جنوبی (Wepener و همکاران، ۲۰۰۵) و جمهوری چک (Randak و همکاران، ۲۰۰۹) گزارش شده است. Sole و همکاران (۲۰۰۳) و Bjerregaard و همکاران (۲۰۰۶) توسعه هم‌زمان بافت نر و ماده در گنادهای ماهی کپور وحشی (*Cyprinus carpio*) نمونه‌برداری شده از شمال شرق اسپانیا و قزل‌آلای قهوه‌ای نر (*Salmo trutta*) صید شده از دانمارک که در محیط‌های آلوده به پساب فاضلاب زندگی می‌کردند را گزارش کرده‌اند. با این‌حال در ایران علی‌رغم وجود بسیاری از اکوسیستم‌های آبی آلوده، تاکنون چنین بررسی‌هایی صورت نگرفته است و طبیعتاً گزارشی نیز ارائه نشده است.

تالاب انزلی یک تالاب ساحلی بین‌المللی در دریای خزر و یک زیستگاه و پناهگاه مهم برای حیات وحش می‌باشد که علی‌رغم اهمیت بسیار آن، مقدار زیادی از پساب‌های کشاورزی و فاضلاب‌های تصفیه نشده شهری و صنعتی را از شهرهای رشت، انزلی و شهرهای دیگر منطقه دریافت می‌کند و همین امر موجب بروز سطح بالایی از آلودگی در این تالاب شده است تا آن‌جا که مطالعات Mortazavi و همکاران (۲۰۱۲ و ۲۰۱۳) نشان داد که تالاب انزلی حاوی مقادیر بالایی از ترکیبات EDCs (OP، 4-NP و BPA) می‌باشد که می‌توانند بر روی فرایندهای تولیدمثلی موجودات ساکن در این تالاب اثرات منفی برجای بگذارند. برخلاف تالاب انزلی، تالاب بین‌المللی امیرکلایه لاهیجان که در سال ۱۹۷۵ در کنوانسیون رامسر ثبت شد به‌علت فقدان هرگونه رودخانه ورودی و تامین آب تالاب از چشمه‌های آب زیرزمینی فاقد آلودگی ترکیبات شیمیایی بوده و از نظر شرایط کیفیتی آب در حد مطلوبی می‌باشد (بانی و بازقلعه، ۱۳۷۹).

اردک ماهی یک شکارچی حاضر در بالای هرم غذایی Carig (۲۰۰۸) و بومی تالاب انزلی می‌باشد (عباسی و همکاران، ۱۳۷۸). این گونه علاوه بر کنترل بیولوژیک، از اهمیت اقتصادی بالایی در زندگی ساکنان منطقه برخوردار است. از آن‌جایی‌که هر نوع تاثیر منفی بر فرایند تولیدمثلی یک گونه ماهی می‌تواند در دراز مدت موجب بروز تغییرات در جمعیت آن گونه شود، لذا تحقیق در زمینه بررسی ناهنجاری در دستگاه تولیدمثل می‌تواند به حفظ ذخایر کمک نماید. از آن‌جاکه بررسی بافت‌شناسی اندام‌های تولیدمثلی منعکس کننده پاسخ‌های عمومی موجودات زنده به مواد شیمیایی موجود در اکوسیستم هستند و می‌توانند اطلاعات مفیدی درباره سلامت موجودات و پتانسیل تولیدمثلی آن‌ها فراهم نمایند (Sanchez و همکاران، ۲۰۱۱)، لذا این مطالعه با هدف بررسی ساختار گنادی اردک ماهی نر و ماده در مراحل نابالغ و بالغ در تالاب انزلی و بررسی احتمالی ناهنجاری گنادی این گونه انجام شد و نتایج آن با ساختار گنادی اردک ماهی در تالاب امیر کلایه مقایسه گردید.

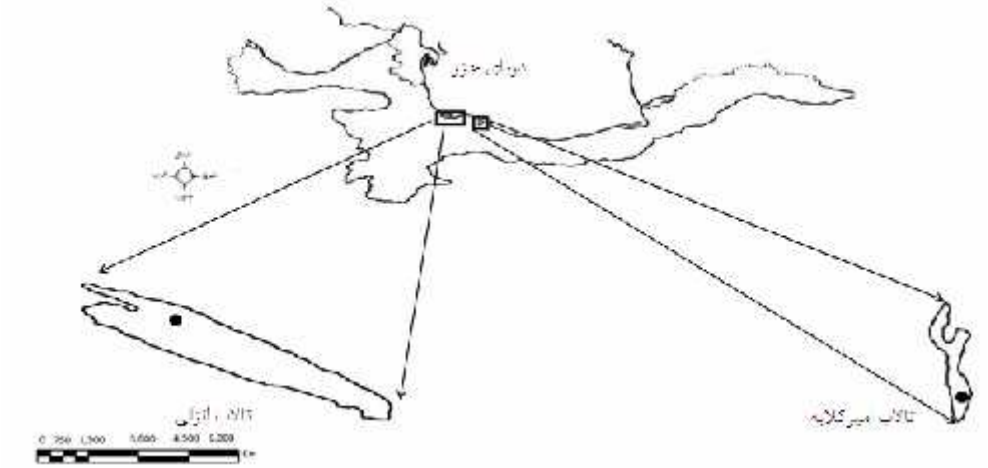
مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: نمونه‌برداری ماهی در غرب تالاب انزلی از منطقه آبکنار (′۲۸ °۳۷ شمالی، ′۲۵ °۴۹ شرقی) و تالاب امیرکلایه لاهیجان (′۱۷ °۳۷ شمالی، ′۱۲ °۵۰ شرقی) توسط تله مخروطی (تور گرگور با اندازه چشمه ۶۴-۴۸ میلی‌متر) در مهرماه و آذر ماه ۱۳۹۱ انجام شد. در مجموع تعداد ۱۵ قطعه اردک ماهی نابالغ (۷ نر، ۸ ماده) و ۲۳ قطعه بالغ (۱۲ نر، ۱۱ ماده) از تالاب انزلی و ۱۶ قطعه اردک ماهی نابالغ (۸ نر، ۸ ماده) و ۱۳ قطعه بالغ (۷ نر، ۶ ماده) از تالاب امیرکلایه صید گردید (شکل ۱). شکم ماهیان از مخرج به سمت سر شکافته، دستگاه گوارش از ناحیه حلق برش خورده و جنسیت تمام نمونه‌ها با کالبدشکافی ماهی و بررسی گناد تعیین و مرحله رسیدگی جنسی و سلامت گناد به‌صورت ماکروسکوپی بررسی

شد. سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شده و به‌منظور بررسی میکروسکوپی ساختار گناد، اندام‌های جنسی هر ماهی به‌مدت ۲۴ ساعت در محلول بوئن فیکس شدند و پس از آن انجام مراحل بافت‌شناسی نمونه‌ها و بررسی‌های میکروسکوپی آغاز گردید (Sanchez و همکاران، ۲۰۱۱).

مورفوهیستولوژی: پس از تشریح نمونه‌ها، مشاهدات مورفولوژیک (رنگ و شکل ظاهری) گناد نر و ماده در هر مرحله از نمونه‌برداری انجام شد و با عکس‌برداری ثبت گردید. سپس قطعاتی از قسمت‌های ابتدایی و میانی گناد سمت راست و انتهایی گناد سمت چپ هر ماهی، جهت بررسی‌های میکروسکوپی برداشته شد. برای تهیه اسلایدهای بافتی، مراحل آب‌گیری، شفاف سازی، پارافینه کردن، قالب‌گیری و برش طبق روش Avwioro (۲۰۱۱) و در درون دستگاه عمل‌آور بافت (Tissue Processor) (OPTI-wax SCILAB, Endland) انجام شد. از بافت‌های قالب گیری شده مقاطع بافتی به ضخامت ۵ میکرون توسط دستگاه میکروتوم دوار (ROTO-CUT ۴۰۰ ،England) تهیه و پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین، عکس‌برداری صورت گرفت.

رسیدگی جنسی تخمدان و بیضه توسط طبقه‌بندی ارائه شده توسط Brown-Peterson (۲۰۰۷) به ۲ مرحله نابالغ (اووسیت‌های اولیه در ماده، اسپرماتوگونیا در نر) و ویتلوژنزیز-اسپرماتوژنزیز (اووسیت‌های ویتلوژنیک در ماده، اسپرماتید در نر) طبقه‌بندی شدند.

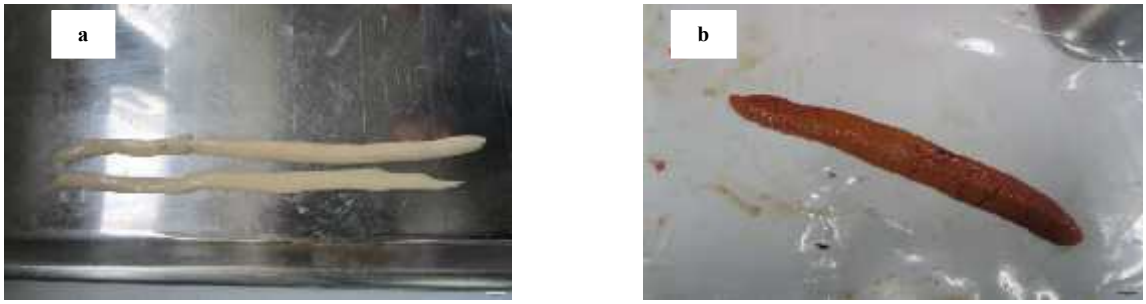


شکل ۱: نقشه تالاب انزلی و تالاب امیرکلایه. مناطق نمونه‌برداری اردک ماهی با علامت دایره (●) مشخص شده است.

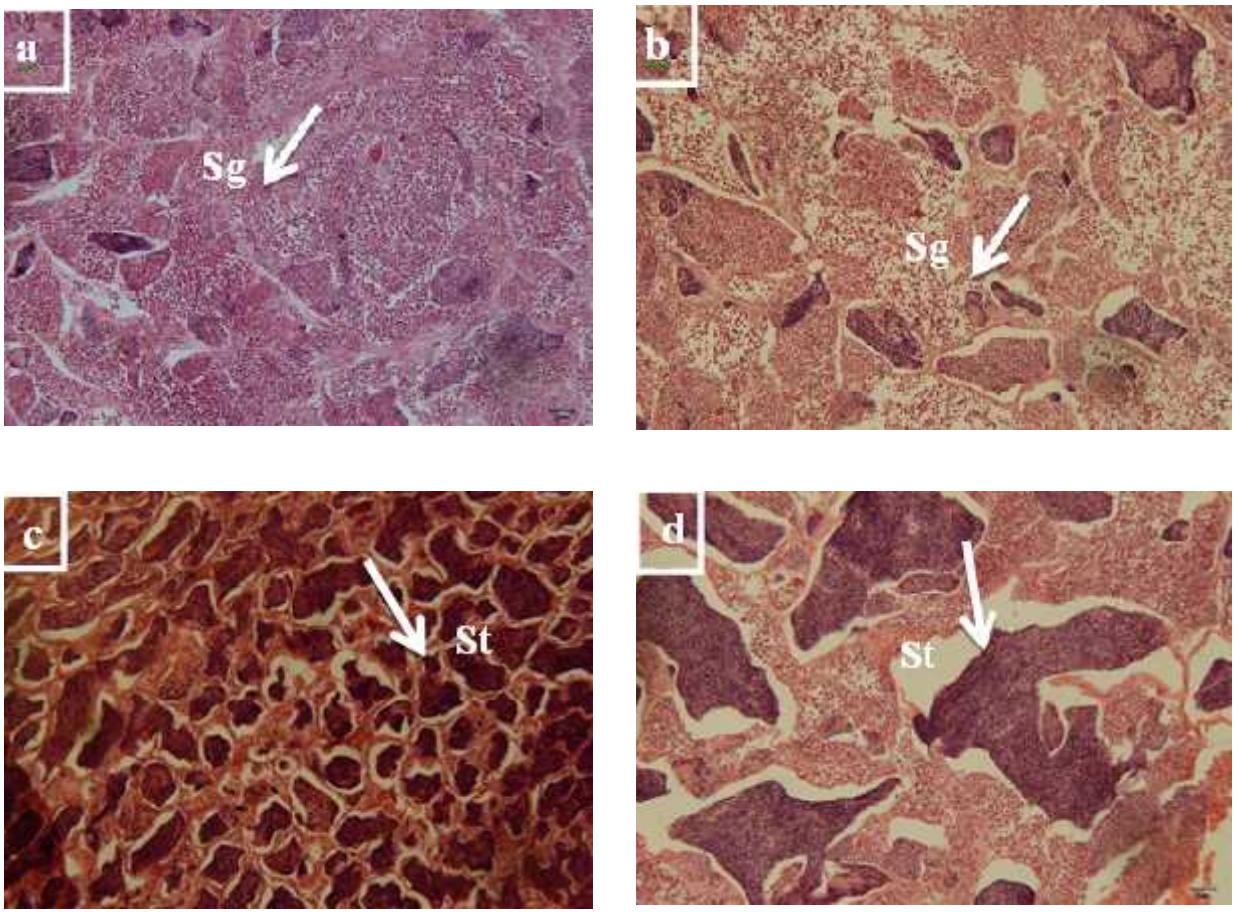
نتایج

مشاهدات مورفولوژیک گناد: آنالیزهای ماکروسکوپی گناد اردک ماهیان (*E. lucius*) صید شده از تالاب انزلی و تالاب امیرکلایه هیچ‌گونه تغییر جنسیت مورفولوژیکی در هیچ‌یک از جنس‌های نر و ماده و در مراحل مختلف تولیدمثلی نشان نداد. علاوه بر این در مقایسه با تخمدان و بیضه طبیعی ماهیان صید شده از تالاب امیرکلایه، تغییری در رنگ و شکل (ضخامت یا نازکی بیش از حد) گنادهای ماهیان صید شده از تالاب انزلی دیده نشد. علاوه براین هیچ‌گونه ناهنجاری گنادی مانند گنادهای دوجنسی (وجود قسمتی از بافت بیضه در گناد عمدتاً ماده و یا بافت تخمدان در گناد عمدتاً نر) مشاهده نگردید (شکل ۲).

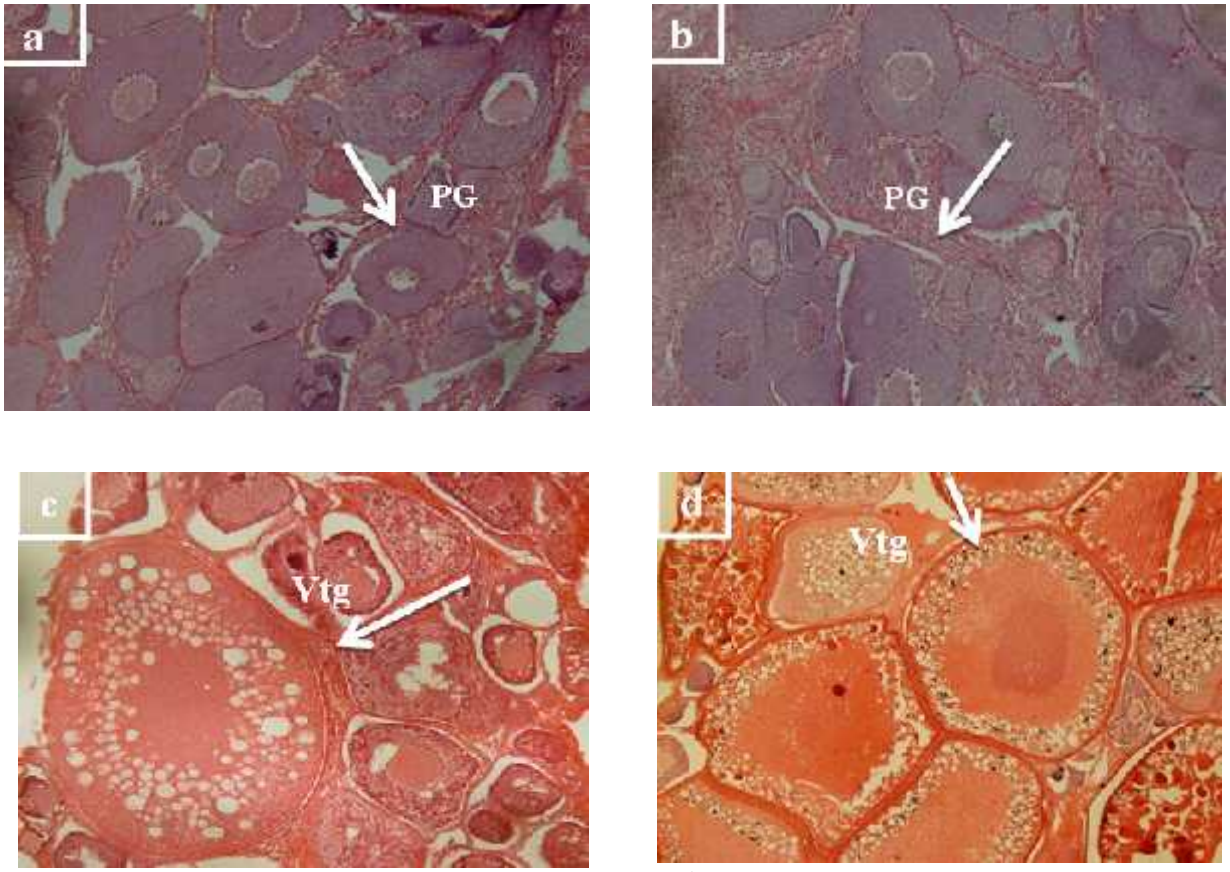
مشاهدات میکروسکوپی گناد: آنالیزهای میکروسکوپی گناد ماهیان صید شده از تالاب انزلی هیچ‌گونه ناهنجاری گنادی چه به‌صورت جزیی و چه در مقیاس وسیع و گسترده نشان ندادند و بیضه‌ها و تخمدان‌ها در شرایط طبیعی و نرمال همانند گنادهای ماهیان صید شده از محیط سالم (تالاب امیرکلایه) بودند. در بافت بیضه ماهیان نابالغ سلول‌های اسپرماتوگونیا و در ماهیان بالغ سلول‌های اسپرماتید (شکل ۳ a-d) و در بافت تخمدان ماهیان نابالغ صید شده سلول‌های اووسیت اولیه و در ماهیان بالغ سلول‌های ویتلوژنیک (شکل ۴ a-d) غالب بود. این شرایط برای ماهیان صید شده از تالاب امیرکلایه نیز صادق بود.



شکل ۲: ساختار ماکروسکوپی بیضه (a) و تخمدان (b) اردک ماهی بالغ صید شده از تالاب انزلی (مقیاس ۱۵۰ میکرومتر)



شکل ۳: a و b بافت بیضه اردک ماهیان نر نابالغ (عمدتاً شامل سلول‌های اسپرماتوگونیا (Sg=Spermatogonia) و شکل c و d بافت بیضه اردک ماهیان نر بالغ (عمده بافت بیضه شامل سلول‌های اسپرماتید (St=Spermatid) صید شده از تالاب انزلی و امیرکلایه. بزرگ‌نمایی شکل‌های a,b,d (۲۰X) و بزرگ‌نمایی شکل c (۱۰X). مقیاس تمام تصاویر ۱ میکرومتر می‌باشد.



شکل۴: a و b بافت تخمدان اردک ماهیان ماده نابالغ (عمدتاً شامل سلول‌های اووسیت اولیه (Pg=Perimary growth) و شکل c و d بافت تخمدان اردک ماهیان ماده بالغ (دارای سلول‌های ویتلوژنیک (Vtg=Vitellogenic) صید شده از تالاب انزلی و امیرکلایه. بزرگ‌نمایی تمامی شکل‌ها (۲۰X). مقیاس تمام تصاویر ۱ میکرومتر می‌باشد.

بحث

در مطالعه حاضر، هیچ‌گونه ناهنجاری گنادی در شکل، رنگ و ساختار ظاهری گناد اردک ماهیان نر و ماده نابالغ و بالغ صید شده از تالاب انزلی مشاهده نشد. بررسی ساختار گناد ابزار با ارزشی در درک تغییرات احتمالی ایجاد شده در غدد درون‌ریز کنترل‌کننده تولیدمثل به‌حساب می‌آید (Blazer، ۲۰۰۲). زیرا علاوه بر عوامل داخلی موثر بر ساختار گناد (فاکتورهای ژنتیکی، عوامل فیزیولوژیکی و فرایندهای مربوط به غدد درون‌ریز) فاکتورهای خارجی مانند pHآب، نوع ماده غذایی و مواد شیمیایی موجود در اکوسیستم آبی نیز می‌توانند موجب تغییر در ساختار گناد موجودات آبزی شده و بر فرایندهای تولیدمثل تاثیر بگذارند (Hoar و همکاران، ۱۹۸۳).

در بسیاری از موارد شرایط دوجنسیتی و ناهنجاری‌های گنادی دیده شده در یک موجود آبزی به‌شدت با حضور مواد شیمیایی برهم زننده غدد درون‌ریز در اکوسیستم‌های آبی مرتبط می‌باشد که به شکل بافت تخمدان در بیضه (Kleinkauf و همکاران ۲۰۰۴)، یا بافت بیضه در تخمدان (Folmar و همکاران، ۲۰۰۱) دیده می‌شود. Hashimoto و همکاران (۲۰۰۰) اووسیت‌هایی در بیضه کفشک ماهی (*Pleuronectes yokohamae*) نر صید شده از خلیج آلوده توکیو ژاپن مشاهده کردند. Sole و همکاران (۲۰۰۲) نمونه‌هایی از ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) را از رودخانه Llobregat در شمال‌شرق اسپانیا که پساب فاضلاب را دریافت می‌کرد، نمونه‌برداری کردند و مشاهده کردند که در برخی از این ماهیان، نمونه‌های دو جنسی مشاهده شد.

در مطالعه موجود از نظر میکروسکوپی نیز تغییری در بافت گناد ماهیان صید شده از محیط تالاب انزلی (حضور سلول‌های زایا نر در بافت گناد ماده و یا سلول‌های زایا ماده در بافت گناد نر) در هیچ‌یک از ماهیان در مراحل مختلف رسیدگی جنسی مشاهده نشد و علایم حاکی از تاثیر آلودگی‌های موجود در تالاب

انزلی بر بلوغ تخمدان یا بیضه اردک ماهیان صید شده از این تالاب مشاهده نشد. این درحالی است که Jobling و همکاران (۱۹۹۸) نشان دادند که در تمام ماهیان کلمه (*Rutilus rutilus*) نمونه‌برداری شده از تعدادی از رودخانه‌های آلوده به پساب انگلستان، به‌طور هم‌زمان گامت‌های نر و ماده در بیضه‌ها دیده شد. دلایلی وجود دارد که چرا چنین دوجنسیتی وسیعی در ماهی کلمه مشاهده شد درحالی‌که در تحقیق موجود در اردک ماهی صید شده از تالاب انزلی علایمی از اختلال گنادی مشاهده نشد. شاید یکی از این دلایل آن است که مقاومت اردک ماهی نسبت به آلودگی‌ها بیش‌تر از ماهی کلمه است و نسبت به کلمه حساسیت کم‌تری به آلودگی‌ها دارد (Vine و همکاران، ۲۰۰۵). هم‌چنین مشخص شده که قرارگیری ماهی کلمه در معرض پساب تصفیه فاضلاب موجب بروز اختلال گنادی در این ماهیان می‌شود (Rodgers-Gray و همکاران، ۲۰۰۱). هم‌چنین احتمال آن‌که کیفیت آبی دو منطقه و نوع ترکیبات غالب EDCs موجود در تالاب انزلی با رودخانه‌های انگلستان متفاوت باشد نیز وجود دارد.

گونه و سن ماهی می‌تواند در تاثیرپذیری موجود از محیط آلوده موثر باشد زیرا ماهیان در قبل از تمایز جنسیت مورفولوژیکی، مخصوصاً پس از تخم‌گشایی یا در مرحله نوجوانی، به اختلال در غدد درون‌ریز حساس‌تر هستند از این رو قرارگیری موجود در مراحل اولیه زندگی در معرض مقادیر بالای مواد شیمیایی بسته به نوع ترکیبات موجود در پساب می‌تواند باعث ماده‌سازی (Gray و Metcalf، ۱۹۹۷) و یا نرسازی (Larsson و Forlin، ۲۰۰۲) موجود شود زیرا القای شرایط دوجنسیتی در یک ماهی جدا جنس به‌ویژه در طول مراحل بحرانی توسعه گنادی ممکن است برگشت ناپذیر باشد و تاثیرات منفی بر روی فرایند تولیدمثلی یک گونه آبزی بگذارد به گونه‌ای که در برخی موارد جنسیت مورفولوژیکی گناد را در خلاف جنسیت ژنتیکی آن تغییر دهد (Gronen و همکاران، ۱۹۹۹).

نوع، مقدار و حجم ترکیبات موجود در پساب ورودی به یک اکوسیستم در بروز پاسخ‌های مختلف گناد تاثیرگذار است زیرا پساب‌های تصفیه فاضلاب محتوی مخلوط‌های پیچیده‌ای از مواد شیمیایی برهم زننده غدد درون‌ریز هستند که می‌توانند با فرایندهای تشکیل و بلوغ گنادهای تولیدمثلی مداخله کنند (Bizarro و همکاران، ۲۰۱۳) مشاهده کردند که از ۵ جمعیت کفال خاکستری لب کلفت (*Chelon labrosus*) جمع‌آوری شده از مصب Basque تنها در ۳ جمعیت که در معرض آلودگی بیش‌تری از ترکیبات EDCs قرار گرفته بودند گنادهای دوجنسیتی مشاهده شد. این نتیجه نشان داد که تغییر ایجاد شده در ساختار گناد ماهیان نمونه‌برداری شده همبستگی معنی‌داری با مقدار ترکیبات EDCs اندازه‌گیری شده در نمونه‌های آب و رسوب موجود در محیط دارد.

در بسیاری از موارد ماهی اگرچه از نظر ژنتیکی نر است اما از نظر فنوتیپی و ساختار گناد کاملاً ماده می‌باشد. بیان فنوتیپ نر و یا ماده بیش‌تر در نزدیک خروجی‌های فاضلاب یا در مناطق دریافت کننده مقادیر زیادی از فاضلاب‌های خانگی یا صنعتی دیده می‌شوند (Lu و همکاران، ۲۰۱۰)، که از طریق قرارگیری تخم‌های لقاح یافته یا جنین‌ها در معرض غلظت‌های مواد آلاینده ایجاد می‌شود (Baroiller و همکاران، ۱۹۹۹). این دسته از ناهنجاری‌ها در محیط‌های آبی به‌شدت آلوده و برای گونه‌هایی که مدت زمان زیادی در معرض آلودگی قرار می‌گیرند مشاهده می‌شود. شاید ماهیان بررسی شده در این تحقیق نیز در این گروه قرار گیرند زیرا اردک ماهی بومی تالاب انزلی بوده و از زمانی‌که تخم‌ها هچ می‌شوند تا زمانی‌که به ماهی بالغ تبدیل می‌شوند در محیط آلوده تالاب به‌سر می‌برند. به‌هرحال مطالعات بعدی جهت بررسی ساختار گنادی در طول مراحل اولیه زندگی و مشابهت‌سازی محیط آزمایشگاهی به شرایط طبیعی و انجام آنالیزهای آزمایشگاهی و هم‌چنین مطالعات ژنتیکی جهت روشن شدن جنسیت ژنتیکی ماهیان می‌تواند در درک هرچه بیش‌تر این واقعیت کمک نماید.

تشکر و قدردانی

از زحمات جناب آقایان درند، قانع، سرپناه و قربان‌زاده که در تهیه نمونه از تالاب‌های انزلی و امیرکلایه لاهیجان به محققین این پژوهش کمک نمودند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد. هم‌چنین از سرکار خانم طاری به جهت همکاری در انجام آنالیزهای بافت‌شناسی سپاس‌گزاری به‌عمل می‌آید.

منابع

۱. **ابراهیم‌نژاد بانی، ع. و بازقلعه، م.، ۱۳۷۸.** بررسی وضعیت آلودگی هیدروشیمیایی تالاب بین‌المللی امیرکلایه. کنفرانس بین‌المللی نظارت بر محیط زیست، دانشگاه خواجه نصیرالدین طوسی، تهران. صفحات ۱۸۰ تا ۱۹۰.

۲. **عباسی، ک.؛ ولی‌پور، ع.؛ طالبی‌حقیقی، د.؛ سرپناه، ع.ن. و نظامی، ش.ع.، ۱۳۷۸.** اطلس ماهیان ایران، آب‌های داخلی گیلان. انتشارات مرکز تحقیقات شیلاتی گیلان. ۱۱۳ صفحه.

3. **Avwioro, G., 2011.** Histochemical uses of haematoxylin. A review. Journal of Pharmacy and Clinical Sciences. Vol. 1, pp: 24-34.
4. **Baroiller, J.F.; Guigen, Y. and Fostier, A. 1999.** Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. Cellular and Molecular Life Sciences. Vol. 55, pp: 910-931.
5. **Bizarro, C.; Ros, O.; Vallejo, A.; Etxebarria, N.; Cajaraville, M.P. and Ortiz Zarragoitia, M., 2013.** Intersex condirion and molecular markers of endocrine disruption in relation with burdens of emerging pollutants in thicklip grey mullets (*Chelon labrosus*) from Basque estuaries (South-East Bay of Biscay). Marine Environmental Research. Vol. 3, pp: 1-10.
6. **Bjerregaard, L.B.; Madsen, A.H.; Korsgaard, B. and Bjerregaard, P., 2006.** Gonad histology and vitellogenin concentrations in brown trout (*Salmo trutta*) from Danish streams impacted by sewage effluent. Ecotoxicology. Vol. 15, pp: 315-327.
7. **Brown-Peterson, N.; Lowerre-Barbieri, S.; Macewicz, B.J.; Saborido-Rey, F.; Tomkiewicz, J. and Wyanski, D.M., 2007.** An improved and simplified terminology for reproductive classification in fishes. pp: 1-3.
8. **Craig, J.F., 2008.** A short review of pike ecology. Hydrobiologia. Vol. 601, pp: 5-16.
9. **Folmar, L.C.; Gardner, G.R.; Schreibman, M.P.; Magliulo-Cepriano, L.; Mills, L.J.; Zaroogian, G.; Gutjahr-Gobell, R.; Haebler, R.; Horowitz, D.B., and Denslow, N.D., 2001.** Vitellogenin-induced pathology in male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). Aquatic Toxicology. Vol. 51, pp: 431-441.
10. **Gray, M.A. and Metcalfe, C.D., 1997.** Induction of testis- ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4- nonylphenol. Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 16, pp: 1082-1086.
11. **Gronen, S.; Denslow, N.; Manning, S.; Barnes, S.; Barnes, D. and Brouwer, M., 1999.** Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. Environmental Health Perspectives. Vol. 107, pp: 385-390.
12. **Hashimoto, S.; Bessho, H.; Hara, A.; Nakamura, M.; Iguchi, T. and Fujita, K., 2000.** Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. Marine Environmental Research. Vol. 49, pp: 37-53.
13. **Hoar, W.S.; Randoll, D.J. and Donaldson, E.M., 1983.** Fish physiology. Vol. IX. Reproduction. Part B, Behavior and Fertility control. Academic Press. 477 P.
14. **Hu, J.Y.; An, L.H.; Sun, X.H.; Zhang, H.F. and Deng, B.S., 2003.** Investigation of vitellogenin in wild crucian (*Carassius auratus*) Tianjin. China Environmental Science. Vol. 23, pp: 281-284.
15. **Jobling, S.; Nolan, M.; Tyler, C.R.; Brighty, G. and Sumpter, J.P., 1998.** Widespread sexual disruption in wild fish. Environmental Science and Technology. Vol. 32, pp: 2498-2506.
16. **Kleinkauf, A.; Scott, A.P.; Stewart, C.; Simpson, M.G. and Leah, R.T., 2004.** Abnormally elevated VTG concentrations in flounder (*Platichthys flesus*) from the Mersey estuary (UK)-a continuing problem. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 58, pp: 356-364.
17. **Larsson, D.J. and Förlin, L., 2002.** Male-biased sex ratios of fish embryos near a pulp mill: Temporary recovery after a short-term shutdown. Environmental Health Perspectives. Vol. 110, pp: 739-742.
18. **Lu, G.H.; Song, W.T.; Wang, C. and Yan, Z.H., 2010.** Assessment of in vivo estrogenic response and the identification of environmental estrogens in the Yangtze River (Nanjing section). Chemosphere. Vol. 80, pp: 982-990.
19. **Milnes, M.R.; Bermudez, D.S.; Bryan, T.A.; Edwards, T.M.; Gunderson, M.P.; Larkin, I.L.V.; Moore, B.C. and Guillette Jr., L.J., 2006.** Contaminant-induced feminization and demasculinization of nonmammalian vertebrate males in aquatic environments. Environmental Research. Vol. 100, pp: 3-17.
20. **Mortazavi, S.; Bakhtiari, A.R.; Sari, A.E.; Bahramifar, N. and Rahbarizadeh, F., 2013.** Occurrence of endocrine disruption chemicals (bisphenol A, 4-nonylphenol, and octylphenol) in muscle and liver of, *Cyprinus Carpino* common, from Anzali Wetland, Iran. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. Vol. 90, pp: 578-584.
21. **Mortazavi, S.; Riyahi Bakhtiari, A.; Sari, A.E.; Bahramifar, N. and Rahbarizade, F., 2012.** Phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) in Anzali Wetland, Iran: Elevated concentrations of 4 nonylphenol, octhylphenol and bisphenol A. Marine Pollution Bulletin. Vol. 64, pp: 1067-1073.
22. **Randak, T.; Zlabek, V.; Pulkrabova, J.; Kolarova, J.; Kroupova, H.; Siroka, Z.; Velisek, J.; Svobodova, Z. and Hajslova, J., 2009.** Effects of pollution on chub in the River Elbe, Czech Republic. Ecotoxicol. Environ. Safety. Vol. 72, pp: 737-746.
23. **Rodgers-Gray ,T.P.; Jobling, S.; Kelly, C.; Morris, S.; Brighty, G.; Waldock, M.J.; Sumpter, J.P. and Tyler, C.R., 2001.**Exposure of juvenile roach (*Rutilus rutilus*) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development .Environmental Science and Technology. Vol. 35, pp: 462-470.
24. **Sanchez, W.; Sremski, W.; Piccini, B.; Palluel, O.; Maillot-Maréchal, E.; Betoulle, S.; Jaffal, A.; Aït Aïssa, S.; Brion, F.; Thybaud, E.; Hinfray, N. and Porcher, J.M., 2011.** Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. Environment International. Vol. 37, pp: 1342-1348.
25. **Solé, M.; Barceló, D. and Porte, C., 2002.** Seasonal variation of plasmatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp (*Cyprinus carpio*), in relation to sewage treatment plants. Aquatic Toxicology. Vol. 60, pp: 233-248.
26. **Solé, M.; Raldua, D.; Piferrer, F.; Barceló, D. and Porte, C., 2003.** Feminization of wild carp (*Cyprinus carpio*), in a polluted environment: plasma steroid hormones, gonadal morphology and xenobiotic metabolizing system. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology. Vol. 136, pp: 145-156.
27. **Sumpter, J.P. and Jobling, S., 1995.** Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives. Vol. 103, pp: 173-178.
28. **Blazer, V.S., 2002.** Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. Fish Physiology and Biochmistry. Vol. 26, pp: 85-101.

29. **Vethaak, A.D.; Lahr, J.; Schrap, S.M.; Belfroid, A.C.; Rijs, G.B.J.; Gerritsen, A.; De Boer, J.; Bulder, A.S.; Grinwis, G.C.M.; Kuiper, R.V.; Legler, J.; Murk, T.A.J.; Peijnenburg, W.; Verhaar, H.J.M. and De Voogt, P., 2005.** An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. Chemosphere. Vol. 59, pp: 511-524.

30. **Vine, E.; Shears, J.; Van Aerle, R.; Tyler, C.R. and Sumpter, J.P., 2005.** Endocrine (sexual) disruption is not a prominent feature in the pike (*Esox lucius*), a top predator, living in English waters. Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 24, pp: 1436-1443.

31. **Wepener, V.; van Vuren, J.H.J.; Chatiza, F.P.; Mbizi, Z.; Slabbert, L. and Masola, B., 2005.** Active biomonitoring in freshwater environments: early warning signals from biomarkers in assessing biological effects of diffuse sources of pollutants. Physics and Chemistry of the Earth. Vol. 30, pp: 751-761.