

اثرات افزودن سطوح مختلف از لوونورژسترل (Levonorgestrel) در جیره غذایی بر شاخص‌های رشد ماهی گورامی سه‌خال (*Trichopodus trichopterus*)

ژیلا محمدیان^۱، ابوالقاسم اسماعیلی فریدونی^{۱*} و آسیه محمدیان رزکناری^۲

^۱ ایران، ساری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دانشکده علوم دامی و شیلات، گروه شیلات



^۲ ایران، گرایش تکثیر و پرورش آبزیان، دکترای شیلات

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۱

چکیده

لوونورژسترل بعنوان یک ترکیب موثر در داورهای ضدبارداری و یک ماده چربی‌دوست-آب‌گریز با توانایی اتصال به ذرات آلی معلق در آب بشمار می‌رود. در این مطالعه، اثرات افزودن لوونورژسترل در سطوح صفر (شاهد)، ۰/۷، ۰/۷، ۰/۷، ۱۰۰ و ۱۵۰ نانوگرم بر گرم جیره و یک تیمار کنترل-حلال بر شاخص‌های رشد ماهی گورامی سه‌خال (*Trichopodus trichopterus*) در مدت ۴۵ روز بررسی شد. ابتدا ۲۱۰ قطعه ماهی ماده (میانگین وزن و طول اولیه به ترتیب ۴/۶ گرم و ۶۳/۲ میلی‌متر) بصورت کاملاً تصادفی در ۲۱ آکواریوم ۶۰ لیتری با تراکم ۱۰ قطعه در هر آکواریوم توزیع و روزانه به میزان ۳ درصد از وزن تر بدن تغذیه شدند. نتایج نشان داد که ارتفاع بدن، فاکتور وضعیت و میزان بازماندگی ماده‌ها متأثر از سطوح لوونورژسترل قرار نگرفت ($P > 0.05$). ماده‌های تغذیه شده با لوونورژسترل از نظر وزن و طول نهایی، درصد افزایش وزن و طول بدن، نرخ رشد ویژه وزنی و طولی در مقایسه با ماهیان شاهد (و کنترل-حلال) اختلافات معنادار کاهشی نشان دادند ($P < 0.05$). با این وجود، شاخص‌های رشد و بیشترین قطر شکم ماده‌های تغذیه شده با ۱۵۰ نانوگرم بر گرم اختلاف معناداری با سطوح پایین‌تر (تا ۷ نانوگرم بر گرم) نداشتند ($P > 0.05$). بر اساس نتایج می‌توان گفت که افزودن لوونورژسترل در جیره ماده‌های گورامی منجر به اختلالات رشدی در کلیه سطوح به خصوص در سطح بالاتر از ۷ نانوگرم بر گرم گردید. با توجه به قابلیت اتصال لوونورژسترل به مواد آلی آب و احتمال تغذیه اتفاقی ماهیان از این ذرات در رژیم غذایی طبیعی ماهیان، اختلالات رشد و تغییر دینامیک جمعیت این گونه و احتمالاً سایر گروه‌های آبزیان در محیط‌های طبیعی انتظار می‌رود.

واژه‌های کلیدی: لوونورژسترل، مختل‌کننده غدد درون‌ریز، گورامی سه‌خال، رشد.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۲۵۸۵۰۸۱، پست الکترونیکی: a.esmaeili@sanru.ac.ir

مقدمه

استروئیدی حتی در غلظت‌های خیلی کم به واسطه پتانسیل بالا در ایجاد اختلال سیستم‌های درون‌ریز در مقایسه با سایر مختل‌کننده‌ها از اهمیت به مراتب بیشتری برخوردار می‌باشند (۱،۲۲).

قرص کتراتسپتیو ال-دی (داروی ضدبارداری ال-دی با نام تجاری Ovustop L) از داروهای بر پایه ترکیبات استروئیدی و پروژستینی در پیشگیری از بارداری در انسان به کار می-

در دهه‌های اخیر ترکیبات شیمیایی مختل‌کننده غدد درون-ریز (Endocrine-disrupting chemicals; EDCs) به دلیل اثرات مضر و نامطلوب بر موجودات زنده به شدت مورد توجه قرار گرفته‌اند. این ترکیبات آلاینده زیستی از طریق تداخل در سنتز، رهاسازی، متابولیسم و عملکرد هورمون‌های درون‌ریز بر هموستازی، رشد، رفتار و تولیدمثل آبزیان تأثیر می‌گذارند (۹،۱۱،۱۶). در این میان، هورمون‌های

ناحیه حد واسطی آب- رسوبات پیوندهای محکم با انواع مواد آلی، ذرات کلوئیدی و مواد معلق دتریتوسی ایجاد نماید (۱۰،۱۱،۱۹). بنابراین، لوونورژسترل علاوه بر وجود و پایداری خود در آب و تاثیر بر آبزیان می‌تواند از طریق غذا در زنجیره‌های غذایی موجودات پلاژیکی و کفزی وارد شده و توسط انواع آبزیان (با تغذیه پلاژیکی، دتریتوس‌خواری، همه‌چیزخواری و کفزی‌خواری) مصرف گردد (۱۰،۱۹).

اثرات غلظت‌های محیطی لوونورژسترل در آب در گروه-های مختلف آبزیان اعم از نرم‌تنان، سخت‌پوستان و ماهیان نشان از تاثیر مخرب آن بر بسیاری از شاخص‌های رشدی، فیزیولوژیک، ژنتیکی و تولیدمثلی دارد (۳۴). نتایج این مطالعات نشان داد که لوونورژسترل به گیرنده‌های آندروژنی در ماهی متصل شده و با فعال کردن آنها عوارضی مانند کاهش هم‌آوری و میزان باروری (۱۳،۲۶)، نرسازی جمعیت (تغییر جنسیت از ماده به نر) (۴،۳۳)، اختلال در چرخه طبیعی تولیدمثل و تغییر در بیان ژن‌های استروئیدی (۲)، افزایش بیان mRNA گیرنده‌های استروژنی و ویتلوژن در کبد (۲۰)، کاهش و حتی توقف تخمک-گذاری در ماهیان (۱۴،۳۸) را باعث می‌شوند.

اگرچه اکثر مطالعات قبلی در زمینه تاثیر لوونورژسترل (و EE2) در آب و ورود به درون بدن آبزیان در قالب مطالعات سمیت حاد، نیمه-مزمن و مزمن به همراه قابلیت تجمع زیستی آن بر روی آبزیان انجام شده است ولی احتمال ورود لوونورژسترل به درون بدن از طریق رژیم-های غذایی هم به عنوان یکی دیگر از مسیرهای مهم ردیابی اثرات آنها در آبزیان به شمار رفته که این مسیر تاکنون کمتر بررسی شده است (۵۸،۲۵،۲۸). نظر به قابلیت اتصال لوونورژسترل به ذرات آلی و احتمال ورود آن از طریق جیره‌های غذایی، در مطالعه حاضر اثرات سطوح مختلف از افزودن لوونورژسترل به جیره بر شاخص‌های رشد مولدین ماده گورامی سه‌خال

رود. این قرص عمدتاً محتوی مخلوطی از دو ترکیب حاوی ۰/۰۳ میلی‌گرم ۱۷-آلفا اتینیل استرادیول (17α - Ethinylestradiol; EE2) و ۰/۱۵ میلی‌گرم لوونورژسترل (Levonorgestrel; LNG) می‌باشد. لوونورژسترل با فرمول شیمیایی $C_{21}H_{28}O_2$ و وزن مولکولی ۳۱۲/۴۵ گرم بر مول یک پروژسترون مصنوعی نسل سوم مشتق شده از ۱۹-نورتستوسترون بوده که حلالیت پایینی در آب (۲/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) دارد ولی در اتانول، کلروفرم، دی‌اتیل‌اتر و دی‌اکسان محلول می‌باشد (۲۰). ترکیبات موثره داروهای ضدبارداری بعد از مصرف از راه خوراکی جذب بدن بانوان شده و پس از متابولیزه شدن در کبد نهایتاً از طریق ادرار و مدفوع خارج می‌شوند. بنابراین، فاضلاب‌های خانگی، شهری و بیمارستانی محل اصلی و مستقیم ورود لوونورژسترل (و EE2) به منابع آبی سطحی و زیرزمینی می‌باشند. با این حال حتی در صورت ورود فاضلاب به تصفیه‌خانه‌ها، بخش زیادی از این ترکیبات در طی فرآیندهای تصفیه از درون فاضلاب حذف نشده (معمولاً در محدوده بین ۱۰ تا ۶۶ درصد) و نهایتاً به صورت دست‌نخورده و یا در ترکیب با سایر اشکال خود وارد محیط‌های آبی می‌شوند (۱۰،۱۵). بررسی‌ها نشان می‌دهند که میزان لوونورژسترل در آب خارج شده از سیستم-های تصفیه فاضلاب در کشورهای مختلف بسته به نوع روش تصفیه و تکنولوژی‌های به کار رفته در محدوده بین ۳۰-۰/۰۰۸۱-۱۱ نانوگرم بر لیتر می‌باشد (۲۴). این مقادیر در آب‌های سطحی و زیرزمینی هم ارقام بالایی به خود اختصاص داد به طوری که غلظت‌های ۱۱-۴ نانوگرم بر لیتر در آب‌های زیرزمینی (۳۵) و غلظت‌های تا ۳۸ نانوگرم بر لیتر در رسوبات رودخانه و دریاچه‌های کشورهای مختلف دنیا گزارش گردید (۲۴،۳۶).

لوونورژسترل بمانند سایر ترکیبات مشابه داروئی به واسطه مقاومت شدید در برابر تجزیه‌های زیستی، قابلیت بالای اتصال به ذرات آلی آب و خاصیت چربی‌دوست-آب-گریزی می‌تواند در بخش‌های پلاژیکی، بنتیکی و حتی در

جیره‌های ساخته شده در کیسه‌های پلاستیکی زیپ‌کیپ در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد نگهداری و به صورت روزانه به تغذیه ماهیان رسیدند (۵،۸). ساخت جیره‌ها با توجه به نیمه عمر لوونورژسترل به صورت هفتگی انجام شد.

تیمارها: برای این تحقیق، ماهیان مجموعاً در ۷ تیمار (هر سطح به عنوان یک تیمار و هر تیمار در سه تکرار) بررسی شدند. انتخاب سطوح در این مطالعه بر اساس غلظت‌های محیطی گزارش شده از آن در آب و همچنین احتمال قابلیت تجمع زیستی آن با سطوح بالاتر در محدوده‌ای بین ۰/۷ تا ۱۵۰ نانو گرم بر گرم از جیره در نظر گرفته شد (۲۴). بدین منظور، ۶ سطح از لوونورژسترل با غلظت‌های صفر (شاهد، فاقد دارو و روغن)، ۰/۷، ۷، ۷۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ نانوگرم بر گرم از جیره غذایی در نظر گرفته شد (۸،۲۴). به دلیل استفاده از روغن و اتانول در تیمارهای دارویی، یک تیمار کنترل-حلال (حاصل از ترکیب اتانول و روغن-۱۳۱۰ میکرولیتر بر گرم اتانول به ازای ۲۰۰ میکرولیتر روغن در جیره - فاقد دارو) نیز جهت بررسی افزودن روغن و اتانول در نظر گرفته شد.

تغذیه ماهیان با لوونورژسترل: ابتدا، ۲۱۰ قطعه ماهی ماده (میانگین وزن و طول اولیه به ترتیب $1/3 \pm 4/6$ گرم و $0/3 \pm 64/2$ میلی‌متر) به طور کاملاً تصادفی در ۲۱ آکواریوم ۸۰ لیتری (با ظرفیت مفید آبیگری ۶۰ لیتر) با تراکم ۱۰ قطعه ماهی در هر آکواریوم توزیع شدند. ماهیان به مدت ۴۵ روز و روزانه به میزان ۳ درصد از وزن تر بدن در سه وعده (ساعات ۸، ۱۱ و ۱۹) در تیمارهای مختلف تغذیه شدند. میزان تعویض آب به مقدار ۳۵ درصد از حجم مفید آکواریوم و در هر سه روز یکبار در کلیه آکواریوم‌ها انجام گرفت. سایر شرایط لازم جهت پرورش ماهیان در آکواریوم‌ها (مجهز به فیلتر مکانیکی) به صورت کاملاً یکسان اعمال گردید. ماهیان در دمای ۲۶-۲۸ درجه سانتی‌گراد، طول دوره نوری ۱۲:۱۲ (روشنایی: تاریکی)، pH آب ۷-۷/۲ همراه با هوادهی دائمی در هر آکواریوم

(*Trichopodus trichopterus*) (به عنوان یک ماهی مدل با رژیم همه‌چیزخواری در مطالعات بیولوژیک و اکوتوکسیکولوژیک) متمرکز گردید.

مواد و روشها

تهیه و سازگاری ماهی گورامی سه‌خال: ابتدا تعداد ۵۵۰ قطعه ماهی گورامی سه‌خال (*T. trichopterus*) از مرکز خصوصی دکتر شهریار (استان گلستان) تهیه و به مدت دو هفته در ۵ تانک با ظرفیت مفید آبیگری ۲۰۰ لیتر و دمای ۲۶-۲۸ درجه سانتی‌گراد، طول دوره نوری ۱۲:۱۲ (روشنایی: تاریکی)، pH آب ۷-۷/۲ همراه با هوادهی ملایم جهت سازگاری نگهداری شدند. در هر سه روز یکبار، به میزان ۵۰ درصد از حجم آب تانک تعویض شد و ماهیان سه بار در روز و به میزان سه درصد از وزن تر بدن با غذای تجاری CP9910 (۳۰ درصد پروتئین و ۶ درصد چربی) تغذیه شدند. به منظور تشخیص جنسیت، ماهیان نر و ماده بر اساس وضعیت باله پشتی (باله پشتی نرها بلندتر، کشیده‌تر و نوک تیز ولی ماده‌ها دارای باله پشتی کوتاه‌تر با نوک مدور) جدا شدند به طوری که برای این تحقیق فقط از ماهیان ماده استفاده گردید. نهایتاً، تعداد ۲۱۰ قطعه ماهی ماده در تیمارهای مختلف این تحقیق استفاده شد.

تهیه و آماده‌سازی داروی لوونورژسترل: ترکیب خالص لوونورژسترل از شرکت داروسازی آتی فارمد (استان البرز-کرج) تهیه شد. برای افزودن دارو به جیره‌های غذایی و با توجه به ویژگی آب‌گریزی آن، ابتدا لوونورژسترل در حلال اتانول (۹۷ درصد) حل و استوک لازم تهیه شد. مقادیر در نظر گرفته شده برای هر تیمار از استوک (حاوی دارو و الکل) با میکروسپلر برداشت و با مخلوط کردن آن با روغن اویلا (۲۰۰ میکرولیتر در هر تیمار) توسط سرنگ ۳ میلی‌لیتری به غذای تجاری (که قبلاً کاملاً خردشده بود) اسپری شد. بعد از بخار شدن الکل و آغشته شدن جیره با دارو، کل جیره از دستگاه غذاساز عبور کرده و به اندازه ۱/۵ میلی‌متری درآمده و در درون آون خشک شدند. نهایتاً

از آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) و مقایسه میانگین‌های آنها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) با سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام گرفت. برای آنالیز آماری داده‌ها و ترسیم نمودارها به ترتیب از نرم‌افزارهای SPSS و Excel استفاده شد.

نتایج

شاخص‌های رشد ماده‌های گورامی سه‌خال در تیمارهای مختلف حاوی افزودن لوونورژسترون در جیره طی یک دوره ۴۵ روزه نشان داد که بیشترین میانگین وزن و طول نهایی بدن در تیمارهای شاهد (و کنترل-حلال) همراه با اختلاف معنادار با تیمارهای حاوی دارو به ثبت رسید ($P < 0.05$). وزن و طول نهایی بدن در ماده‌های تغذیه شده با دارو با افزایش غلظت تا ۱۰۰ نانوگرم بر گرم روند کاهشی ولی در غلظت ۱۵۰ نانوگرم بر گرم مجدداً افزایش یافت ولی این غلظت با غلظت‌های کمتر (۷/۰ و ۷ نانوگرم بر گرم جیره) معنادار نبود ($P > 0.05$). فاکتور وضعیت و میانگین ارتفاع نهایی بدن اختلاف معناداری بین تیمارها نشان نداد ($P > 0.05$); با این وجود ارتفاع بدن ماده‌ها با افزایش غلظت دارو تا ۱۰۰ نانوگرم بر گرم روند کاهشی ولی در غلظت ۱۵۰ نانوگرم بر گرم مجدداً افزایش یافت. از طرف دیگر هیچ‌گونه تلفاتی در ماهیان حتی در تیمارهای حاوی سطوح مختلف از افزودن دارو مشاهده نشد (جدول ۱).

بیشترین درصد افزایش وزن و رشد ویژه وزنی بدن در ماهیان تیمارهای شاهد (و کنترل-حلال) همراه با اختلاف معنادار با سایر تیمارها مشاهده شد ($P < 0.05$). همچنین، شاخص‌های درصد افزایش طول بدن و رشد ویژه طولی بدنی در ماهیان تیمارهای شاهد (و کنترل-حلال) با سایر تیمارها اختلاف معناداری داشت ($P < 0.05$). کمترین مقادیر افزایش وزن و سرعت رشد روزانه وزنی بدن در ماهیان تغذیه شده با غلظت‌های ۷۰ و ۱۰۰ نانوگرم بر گرم جیره دیده شد ($P < 0.05$); در حالی که کمترین میزان

(متصل به هواده مرکزی) پرورش یافتند. جهت تامین آب برای آکواریوم‌ها از آب چاه استفاده شد که خود قبلاً به مدت ۷۲ ساعت در تانک‌های ۲۵۰ لیتر ذخیره‌ای هواده‌ای شده و نهایتاً از فیلتر مکانیکی نیز عبور کردند.

شاخص‌های رشدی ماهیان: در انتهای دوره، ابتدا ماهیان به مدت ۲۴ ساعت گرسنگه نگه داشته شدند. پس از نمونه‌برداری تصادفی (۶ ماهی از هر تکرار)، ماهیان ابتدا با عصاره پودر گل میخک بیهوش و بعد از خشک کردن بدن (با دستمال کاغذی)، زیست‌سنجی طولی و وزنی آنها به ترتیب با استفاده از کولیس دیجیتالی و ترازوی یک‌هزارم گرم انجام گرفت. برخی از شاخص‌های زیست‌سنجی شامل ارتفاع بدن، وزن و طول نهایی بدن، درصد افزایش وزن و طول بدن، نرخ رشد ویژه وزنی و طولی، فاکتور وضعیت، بیشترین قطر شکم و میزان بازماندگی ماهیان در انتهای دوره پرورش بر اساس روابط زیر تعیین شد:

$$\text{درصد افزایش وزن بدن} = \frac{(\text{وزن نهایی} - \text{وزن اولیه})}{\text{وزن اولیه}} \times 100$$

$$\text{درصد افزایش طول بدن} = \frac{(\text{طول نهایی} - \text{طول اولیه})}{\text{طول اولیه}} \times 100$$

$$\text{نرخ رشد ویژه وزنی} = \frac{(\text{لگاریتم نپرین وزن نهایی} - \text{لگاریتم نپرین وزن اولیه})}{\text{طول دوره پرورش}} \times 100$$

$$\text{نرخ رشد ویژه طولی} = \frac{(\text{لگاریتم نپرین طول نهایی} - \text{لگاریتم نپرین طول اولیه})}{\text{طول دوره پرورش}} \times 100$$

$$\text{فاکتور وضعیت} = \frac{(\text{وزن نهایی})^3}{(\text{طول نهایی})^3} \times 100$$

$$\text{میزان بازماندگی (درصد)} = \frac{(\text{تعداد کل ماهیان سالم باقیمانده})}{\text{تعداد کل ماهیان ذخیره‌سازی شده اولیه}} \times 100$$

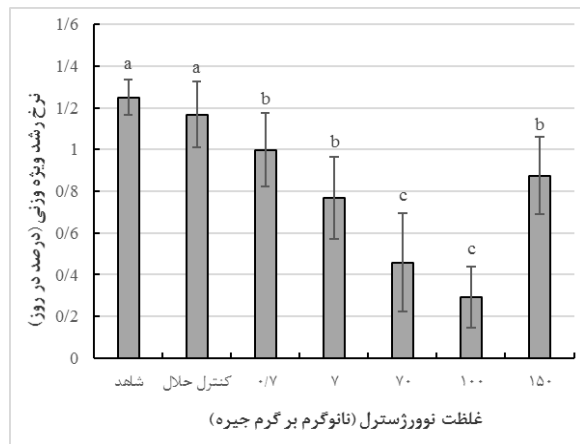
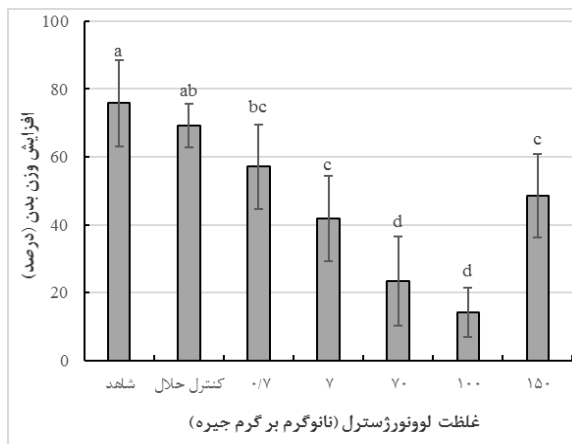
تجزیه و تحلیل آماری: این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. ابتدا نرمال بودن داده‌ها از طریق آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. پس از اطمینان از نرمال بودن، برای مقایسه متغیرهای محاسبه شده

افزایش طول و سرعت رشد روزانه طولی بدن در ماهیان
تغذیه شده با غلظت‌های ۷ تا ۱۰۰ نانوگرم بر گرم جیره به
ثابت رسید (اشکال ۱ و ۲).

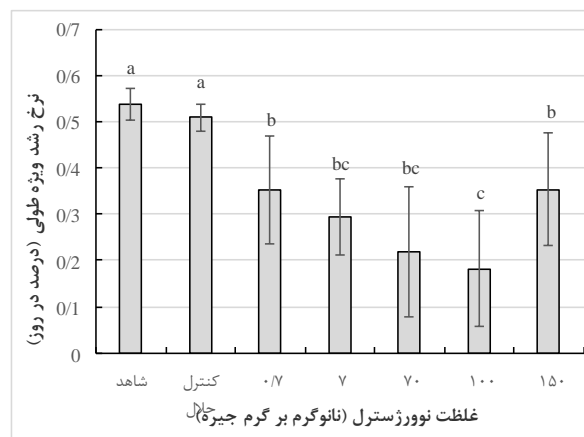
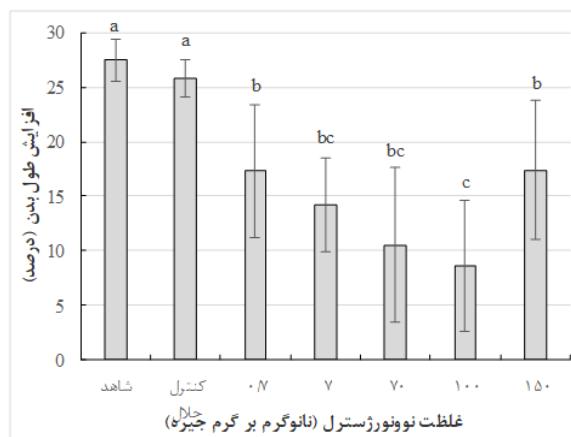
جدول ۱- شاخص‌های رشد ماده‌های گورامی سه‌خال (*Trichopodus trichopterus*) در افزودن سطوح مختلف از لوونورژسترل (نانوگرم بر گرم جیره) در طول دوره پرورش (۴۵ روز)

شاخص	کنترل-حلال	شاهد (صفر)	۰/۷	۷	۷۰	۱۰۰	۱۵۰
وزن اولیه (گرم)	۴/۵۶ ± ۰/۱	۴/۶ ± ۰/۱	۴/۵۷ ± ۰/۱	۴/۶ ± ۰/۱	۴/۵۳ ± ۰/۱	۴/۵ ± ۰/۱	۴/۶۷ ± ۰/۱۳
وزن نهایی (گرم)	۷/۷۸ ± ۰/۳ ^{ab}	۸/۱ ± ۰/۵۸ ^a	۷/۲ ± ۰/۵۷ ^{bc}	۶/۵ ± ۰/۵۸ ^c	۵/۶۸ ± ۰/۶ ^d	۵/۲۶ ± ۰/۳ ^d	۶/۸۴ ± ۰/۵۷ ^c
طول اولیه (میلی‌متر)	۶۴/۱۸ ± ۰/۲	۶۴/۱۱ ± ۰/۲	۶۴/۲ ± ۰/۴	۶۴/۱ ± ۰/۵	۶۴/۱۵ ± ۰/۵	۶۴/۲ ± ۰/۲	۶۴/۲۵ ± ۰/۳
طول نهایی (میلی‌متر)	۸۰/۷۵ ± ۱/۳ ^a	۸۱/۸۵ ± ۱/۱ ^a	۷۵/۳ ± ۳/۹ ^b	۷۳/۳۵ ± ۲/۷۵ ^{bc}	۷۱/۱ ± ۴/۵ ^{bc}	۶۹/۷ ± ۳/۸ ^c	۷۵/۳۸ ± ۴/۱ ^b
ارتفاع بدن (میلی‌متر)	۲۵/۵ ± ۰/۶	۲۵/۵۵ ± ۱/۲	۲۵/۹۶ ± ۱/۴۵	۲۵/۲۹ ± ۲/۱	۲۲/۷۴ ± ۰/۸	۲۲/۵۵ ± ۱/۳	۲۴/۷۵ ± ۳/۶
فاکتور وضعیت	۱/۴۸ ± ۰/۱	۱/۵ ± ۰/۱	۱/۳۵ ± ۰/۹	۱/۶۵ ± ۰/۰۷	۱/۶ ± ۰/۳	۱/۵۷ ± ۰/۳	۱/۶۲ ± ۰/۳

* حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنادار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون آماری دانکن می‌باشد ($P < 0.05$).



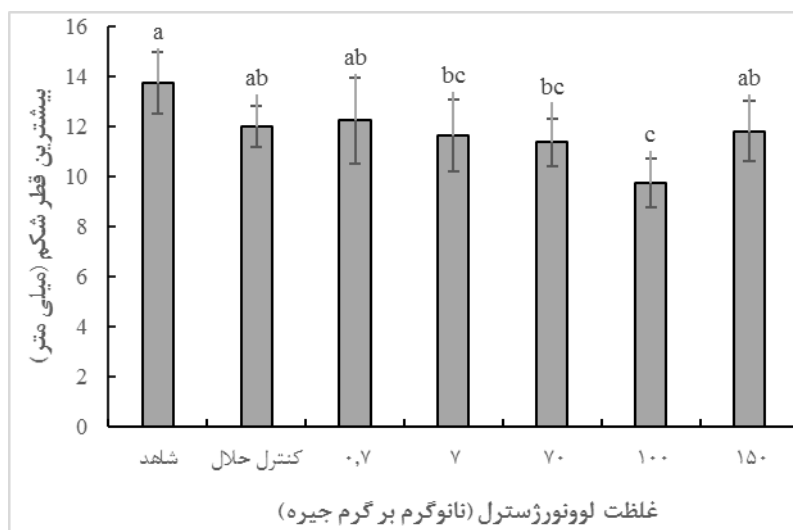
شکل ۱- درصد افزایش وزن بدن و نرخ رشد ویژه وزنی (درصد در روز) در ماده‌های گورامی سه‌خال (*Trichopodus trichopterus*) تغذیه شده با سطوح مختلف از لوونورژسترل (نانوگرم بر گرم جیره) در طول دوره پرورش (۴۵ روز)



شکل ۲- درصد افزایش طول بدن و نرخ رشد ویژه طولی (درصد در روز) در ماده‌های گورامی سه‌خال (*Trichopodus trichopterus*) تغذیه شده با سطوح مختلف از لوونورژسترل (نانوگرم بر گرم جیره) در طول دوره پرورش (۴۵ روز)

گرم جیره ولی این شاخص در بالاترین غلظت مجدداً روند افزایشی غیرمعنادار ($P > 0.05$) با تیمارهای شاهد و کمترین غلظت دارو (۰/۷ نانوگرم بر گرم) نشان داد.

بیشترین قطر شکم در ماده‌های تغذیه شده در گروه‌های مختلف اختلاف معناداری را نشان داد ($P < 0.05$); به طوری که کمترین مقدار در ماهیان با غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر



شکل ۳- بیشترین قطر شکم در ماده‌های گورامی سه‌خال (*Trichopodus trichopterus*) تغذیه شده با سطوح مختلف از لوونورژسترل (نانوگرم بر گرم جیره) در طول دوره پرورش (۴۵ روز)

بررسی نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که افزودن لوونورژسترل در جیره در یک دوره ۴۵ روزه هیچ‌گونه تلفات، علائم نامطلوب و بدشکلی ظاهری بدن در ماهی گورامی ایجاد نکرد و بازماندگی ۱۰۰ درصدی در کلیه ماهیان تغذیه شده با دارو و گروه شاهد (و کنترل-حلال) دیده شد. با توجه به این که داده‌های چندانی در زمینه تاثیر افزودن لوونورژسترل در جیره غذایی آبزیان وجود ندارد؛ لذا بایست نتایج مطالعه حاضر را با محدود مطالعات در زمینه تاثیر این دارو در درون آب مقایسه نمود. به عنوان مثال و در مطابقت با سایر مطالعات، نتایجی مبنی بر عدم تفاوت معنادار در میزان تلفات ماهی کلمه (*Rutilus rutilus*) (تلفات کمتر از ۱۰ درصد) در غلظت‌های مختلف لوونورژسترل در آب (صفر، ۳، ۳۱، ۳۱۲، ۳۱۲۴ نانوگرم بر لیتر) گزارش شد (۲۱). چنین روندی در سایر مطالعات از جمله در مواجهه زبری گورخری (*Danio rerio*) با غلظت‌های لوونورژسترل در آب (۱۰۰-۱ نانوگرم بر لیتر) (۱۷) و در مواجهه کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با غلظت‌های مختلف لوونورژسترل در آب (۳۱۰-۳۱ نانوگرم

بحث و نتیجه‌گیری

لوونورژسترل به واسطه مصرف بالا و داشتن مقدار بالاتر در داروهای ضدبارداری (تقریباً ۵ برابر در مقایسه با ۱۷-آلفا اتینیل استرادیول) می‌تواند از مسیرهای گوناگون وارد آب شده و به صورت مستقیم و یا غیرمستقیم بر حیات آبزیان تاثیر بگذارد. اگرچه غلظت‌های محیطی لوونورژسترل در آبها مقادیر پایینی را نشان می‌دهد ولی تجمع زیستی این ترکیبات در بدن آبزیان نشان از وجود مقادیر به مراتب بالاتر از غلظت‌های محیطی گزارش شده برای ترکیبات پروژسترونی دارد (۲۴). غلظت‌های محیطی گزارش شده از لوونورژسترل سطوح کمتر از یک تا حداکثر ۴۰ نانوگرم بر لیتر را در درون آب نشان داد؛ ولی بدلیل قابلیت اتصال به ترکیبات آلی و توان تجمع زیستی، این دارو به جیره غذایی ماهی افزوده و سطوح بالاتر از این مقدار (۷۰ تا ۱۵۰ نانوگرم بر گرم جیره) در مطالعه حاضر بررسی گردید.

بر لیتر) در یک دوره ۴۷ روزه گزارش شد (۳۱). این در حالی است که مواجهه با غلظت‌های پایین لوونورژسترول در آب (۳، ۱۶/۳، ۸۶/۹ نانوگرم بر لیتر) تاثیر چندانی بر میزان بازماندگی ماهی قنات سرچرب (*Pimephales promelas*) نداشت ولی مواجهه با غلظت‌های بالا (۴۶۲ و ۲۳۹۴ نانوگرم بر لیتر) سبب کاهش قابل توجه در میزان بازماندگی ماهی گردید (۲۵). بر این اساس می‌توان بیان کرد که اثرات این دارو بر بازماندگی ماهیان به عوامل متعددی از جمله نوع گونه، سطح غلظتی دارو، روش استفاده از دارو (آب یا غذا) و مدت زمان دوره آزمایش بستگی دارد.

نتایج مطالعه حاضر نشان از اثرات واضح در افزودن لوونورژسترول در جیره بر عملکرد رشد ماده‌های گورامی سه‌خال دارد. شاخص‌های رشد ماهی از نظر میانگین وزن و طول نهایی بدن، درصد افزایش وزن و طول، همراه با سرعت رشد ویژه وزنی و طولی بدن در کلیه سطوح دارویی با افزایش میزان دارو در جیره کاهش معنادار داشت. همچنین، نتایج نشان از کاهش وزن حدود ۳۵-۴۰ درصدی ماده‌های گورامی در سطح دارویی ۱۰۰ نانوگرم بر گرم جیره در مقایسه با گروه شاهد داشت. چنین روندی نشان از تاثیر واضح در ایجاد اختلالات رشدی در ماهیان تغذیه شده و یا مواجهه شده با لوونورژسترول دارد. وضعیت ایجاد اختلالات رشدی و دلایل احتمالی چنین روندی قبلا در سایر مطالعات در آبزیان (بخصوص در مطالعات درازمدت مواجهه ماهی با دارو در آب) با ترکیبات موثره دارویی موجود در قرص‌های ضدبارداری نیز ارائه گردید. از این نظر یافته‌های این مطالعه در برخی از موارد با سایر مطالعات فارغ از نوع روش استفاده از دارو (مواجهه در آب و یا گنجاندن در غذا)، انتخاب سطوح غلظتی متفاوت، نوع و سن گونه آبی و شرایط متفاوت آزمایشی مطابقت دارد. به عنوان مثال، کاهش قابل ملاحظه‌ای در رشد لارو ماهی قنات سرچرب پس از یک دوره مواجهه ۲۸ روزه با لوونورژسترول گزارش گردید (۲۵). مشابه با عملکرد

لوونورژسترول، مواجهه ماهی زنده‌زای کیلی فیش (*Heterandria formosa*) با داروی ۱۷-آلفا اتینیل استرادیول در آب سبب کاهش رشد ماده‌ها در سطوح غلظتی ۵ و ۲۵ نانوگرم بر لیتر گردید (۱۸). همچنین، در ماهیان نوجوان تیلاپپای نیل (*Oreochromis niloticus*) تغذیه شده با غلظت‌های بالای ۱۷-آلفا اتینیل استرادیول گزارش شد که افزودن ۱۲۵ میکروگرم از این دارو در هر گرم غذا به مدت یک ماه سبب اختلالات شدید رشد (طول و وزن) در هر دو جنس نر و ماده گردید؛ بطوری‌که حتی بعد از ۱۲۵ روز پس از قطع دارو در غذا، وزن و طول نهایی بدن ماده‌ها به ترتیب ۴۰ و ۱۵ درصد نسبت به گروه کنترل کاهش داشته که نشان از ماندگاری درازمدت تاثیر این نوع از ترکیبات دارویی در ماهیان دارد (۲۹). برخلاف یافته‌های مطالعه حاضر، در ماهی کلمه (*R. rutilus*) (۲۰) و زبرای گورخری (*D. rerio*) (۱۷) تفاوت فاحشی در میانگین وزن بدن و طول استاندارد در غلظت-های محیطی لوونورژسترول در آب گزارش نشد. همچنین، اختلاف معناداری در طول و وزن بدن در ماهی سه‌خاره (*Gasterosteus aculeatus*) مواجهه شده با غلظت‌های لوونورژسترول در آب (۵/۵، ۴۰ و ۳۵۸ نانوگرم بر لیتر) در یک مقطع ۲۱ روزه مشاهده نشد (۳۳).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اثرگذاری دارو بر شاخص‌های رشد بدن ماده‌ها بشدت به میزان غلظت دارو در غذا وابسته است؛ به طوری‌که وزن و طول بدن در مولدین تغذیه شده تا سطح ۱۰۰ نانوگرم بر گرم جیره روندی کاهشی ولی در بالاترین سطح (۱۵۰ نانوگرم بر گرم جیره) مجدداً افزایش یافته ولی به میزان رشد ماهیان گروه شاهد نرسید. بنابراین بایست در آینده روند رشدی مولدین در غلظت‌های گنجاندن بالاتر از این سطح (۱۵۰ نانوگرم بر گرم جیره) مورد بررسی قرار گرفته تا بتوان قضاوت بهتری از تاثیر غلظت دارو در غذا در مطالعات درازمدت داشت. از این نظر نتایج این مطالعه با یافته‌های برخی از مطالعات همخوانی دارد به طوری‌که در ماهیان

رشد در هیپوفیز ماهی تیلاپیای نیل تغذیه شده با ۱۷-آلفا اتینیل استرادیول بشدت کاهش یافت که علت احتمالی آن به اثرات داور بر سلول‌های ترشح‌کننده GH در هیپوفیز و یا مهار رهاسازی GH در سطح هیپوتالاموس نسبت داده شد (۲۹). همچنین، هورمون استروژن توانسته بیان سوماتوستاتین (هورمون مهارکننده هورمون رشد) در مغز ماهیان گلدفیش (*Carassius auratus*) مواجه شده با استروژن را افزایش دهد (۶). سایر دلایل اختلال رشدی در آبزیان ناشی از وجود لوونورژسترل (در آب و یا غذا) را می‌توان به اختلال در تولید استروئیدها نسبت داد به طوری که اهمیت تولید استروئیدهای جنسی و تاثیر آنها بر رشد ماهی در مطالعات قبلی هم به اثبات رسید (۳،۲۵). هورمون‌های استروئیدی علاوه بر نقش کلیدی در تولیدمثل، واسطه‌های مهمی برای متابولیسم گلوکز و چربی‌زایی نیز هستند. در این میان نقش پروژستین‌ها به عنوان تنظیم‌کننده‌های متابولیک مورد توجه قرار گرفته است به طوری که بررسی‌ها نشان داد که پروژسترون با القای سطح mRNA لپتین (هورمون سرکوب‌کننده اشتها) در موش‌های صحرایی ماده، واسطه هموستاز (تعادل) انرژی هستند (۳۲). لوونورژسترل به عنوان یک ترکیب پروژسترونی از ویژگی آندروژنیک بالایی برخوردار بوده و سبب کاهش سرعت رسیدگی جنسی در ماهیان می‌گردد (۷،۳۳). علاوه بر این، پروژسترون می‌تواند موجب اختلال در متابولیسم گلوکز و افزایش فرآیندهای گلوکونئوزن (فرآیند تشکیل گلوکز از آمینواسیدها و چربی‌ها) و لیپولیز (تجزیه چربی‌ها) گردد (۳۰). تاکنون، اکثر مطالعات متابولیکی در این زمینه به مدل‌های جوندگان محدود شده و اطلاعات خیلی کمی در مورد مکانیسم اثرات این مواد بر متابولیسم ماهیان وجود دارد. با این حال نتایج Overturf و همکاران (۲۰۱۴) توانایی لوونورژسترل در تغییر حساسیت گیرنده استروژن و پروژسترون در ماهی قنات را نمایان می‌کند؛ به طوری که لوونورژسترل موجب کاهش سطح بیان mRNA گیرنده استروژنی بتا ($ER\beta$) در ماهیان مواجه شده

امپراطور قطب (*Hypseleotris compressa*) مواجه شده با محلول‌های ۵۰ و ۱۰۰ درصد آب فاضلابی حاوی مقادیر بالای EDCs (endocrine-disrupting compounds)، روند افزایشی معنادار در وزن بدن نسبت به سایر تیمارها (صفر، ۱۲/۵ و ۲۵ درصد از آب فاضلاب) گزارش شد (۲۳). همچنین، افزایش قابل توجهی در رشد آنها فقط در بالاترین غلظت لوونورژسترل در آب (۲۵ نانوگرم بر لیتر) از مواجهه ماهی قنات سرچرب در مقایسه با مواجهه با سطوح پایین‌تر (۰/۵ و ۵ نانوگرم بر لیتر) گزارش گردید (۲۷).

در مطالعه حاضر، بیشترین قطر شکم ماده‌های گورامی در کلیه سطوح افزودن داور در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت؛ به طوری که کاهش ۲۵-۳۰ درصدی در قطر شکم ماده‌های تغذیه شده با ۱۰۰ نانوگرم بر گرم جیره در مقایسه با گروه شاهد دیده شد که بیانگر لاغرتر شدن بدن ماده‌ها می‌باشد. این روند را احتمالاً بتوان به کاهش وزن تخمدان نسبت داد که تأیید آن به مطالعات آینده نیاز دارد.

از نظر فیزیولوژیک، محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد برای رشد بدن و توسعه گنادها در آبزیان به عنوان یک محور کلیدی محسوب شده و هر گونه اختلال در این مسیر می‌تواند سبب اختلال در رشد بدن، عملکرد گنادی و شاخص‌های تولیدمثلی در آبزیان گردد. کلیه داروهای پروژستینی از جمله لوونورژسترل باعث فعالیت گیرنده‌های پروژسترونی (progesterone receptors; PRs) می‌گردند ولی بسته به نوع مشتقاتشان (پروژسترون، تستوسترون و یا اسپیرونولاکتون) ممکن است تداخل عملکردی با سایر گیرنده‌های هورمونی ایجاد نمایند؛ با این وجود مکانیسم‌های دقیق عملکردی آنها کاملاً مشخص نشده است (۱۲). ایجاد اختلالات رشدی و دلایل آن از نظر فیزیولوژیک ممکن است ارتباط واضح با اختلال در سنتز و میزان ترشح هورمون رشد (Growth hormone; GH) داشته باشد. مطالعات قبلی نشان داد که میزان بیان mRNA هورمون

معلق در آب و احتمال تغذیه اتفاقی ماهیان از این ذرات در رژیم غذایی طبیعی ماهیان، وجود اختلالات رشدی در این گونه و احتمالاً سایر گروه‌های آبزیان و تغییر در دینامیک جمعیت آنها در محیط‌های طبیعی را می‌توان از اثرات مخرب این ترکیب دارویی در آبهای آلوده دانست. بنابراین طبیعتاً تا حد امکان از ورود این ترکیبات به منابع آبی طبیعی جلوگیری نمود و یا از تکنولوژی‌های بهتری جهت حذف و تصفیه آبهای آلوده به مواد دارویی بهره برد.

سیاسگزار

بدین وسیله از مسئولین محترم شرکت داروسازی آتی‌فارمد جهت تهیه داروی لوونورژسترل و همچنین سرکار خانم مهندس ظاهری که در انجام بخش‌های آزمایشگاهی این پژوهش همکاری نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

گردید. کاهش قابل توجه سطح $ER\beta$ با افزایش سطح لپتین (هورمون سرکوب‌کننده اشتها) مرتبط است (۳۷). بیان لپتین به طور قابل توجهی توسط استروژن از طریق $ER\alpha$ و $ER\beta$ در سلول‌های چربی تنظیم می‌شود؛ به طوریکه $ER\alpha$ و $ER\beta$ به ترتیب اثرات تحریک‌کننده و بازدارنده بر تولید لپتین در سلول‌های چربی دارند. بر این اساس لازم است تا در آینده مطالعات بیشتری در زمینه مکانیسم‌های موثر که توسط آن پروژستین‌های مصنوعی باعث مهار رشد بسته به سطح غلظتی دارو در گونه‌های ماهیان می‌شود انجام گیرند.

در نتیجه‌گیری نهایی می‌توان بیان کرد که افزودن لوونورژسترل در کلیه سطوح غلظتی مطالعه حاضر سبب تغییرات و نوسانات رشدی در وزن و طول بدن مولدین ماده ماهی گورامی گشته و این اختلال به خصوص در سطوح بالاتر از ۷ نانوگرم بر گرم شدت بیشتری داشت. با توجه به قابلیت بالای اتصال لوونورژسترل به مواد آلی

منابع

- 1- Aris AZ, Shamsuddin AS., Praveena SM (2014). Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: A review. *Environ Int*, 69: 104-119.
- 2- Bain PA, Kumar A, Ogino Y, Iguchi, T (2015). Nortestosterone-derived synthetic progestogens do not activate the progestogen receptor of Murray-Darling rainbow fish (*Melanotaenia fluviatilis*) but are potent agonists of androgen receptors alpha and beta. *Aquat Toxicol*, 163: 97-101.
- 3- Bhatt S, Iwai T, Miura C, Higuchi M, Shimizu-Yamaguchi S, Fukada H, Miura T (2012). Gonads directly regulate growth in teleost. *P Nat Acad Sci (PNAS)*, 109: 11408-11412.
- 4- Brockmeier EK, Scott PD, Denslow ND, Leusch FDL (2016). Transcriptomic and physiological changes in Eastern Mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) after exposure to progestins and anti-progestagens. *Aquat Toxicol*, 179: 8-17.
- 5- Cabas I, Chaves-Pozo E, Alcázar AG, Meseguer J, Mulero V, García-Ayala A (2011). Dietary intake of 17 α -ethynylestradiol promotes leukocytes infiltration in the gonad of the hermaphrodite gilthead seabream. *Mol Immunol*, 48 (15-16): 2079-2086.
- 6- Canosa LF, Lin X, Peter RE (2002). Regulation of expression of somatostatin genes by sex steroid hormones in goldfish forebrain. *Neuroendocrinol*, 76: 8-17.
- 7- Cardoso PG, Rodrigues D, Madureira TV, Oliveira N, Rocha MJ, Rocha E (2017). Warming modulates the effects of the endocrine disruptor progestin levonorgestrel on the zebrafish fitness, ovary maturation kinetics and reproduction success. *Environ Pollut*, 229: 300-311.
- 8- Colli-Dula RC, Martyniuk CJ, Kroll KJ, Prucha MS, Kozuch M, Barber DS, Denslow ND (2014). Dietary exposure of 17-alpha ethynylestradiol modulates physiological endpoints and gene signaling pathways in female largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquat Toxicol*, 156: 148-160.
- 9- DeCourten BM, Forbes JP, Poark HK, Burns NP, Major KM, White JW, Li J, Mehinto AC, Connon RE, Brander SM (2020). Multigenerational and transgenerational effects of environmentally relevant concentrations of endocrine disruptors in an estuarine fish model. *Environ Sci Technol*, 54 (21): 13849-13860.

- 10- Dussault EB, Balakrishnan VK, Borgmann U, Solomon KR, Sibley PK (2009). Bioaccumulation of the synthetic hormone 17 alpha-ethinylestradiol in the benthic invertebrates *Chironomus tentans* and *Hyaella azteca*. *Ecotox Environ Safe*, 72: 1635-1641.
- 11- Fent K (2015). Progestins as endocrine disrupters in aquatic ecosystems Concentrations, effects and risk assessment. *Environ Int*, 84: 115-130.
- 12- Fick J, Lindberg RH, Parkkonen J, Arvidsson B, Tysklind M, Larsson DG (2010). Therapeutic levels of levonorgestrel detected in blood plasma of fish: results from screening rainbow trout exposed to treated sewage effluents. *Environ Sci Technol*, 44 (7): 2661-2666.
- 13- Frankel TE, Meyer AT, Orlando EF (2016). Aqueous exposure to the progestin, levonorgestrel, alters anal fin development and reproductive behavior in the eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *Gen Comparat Endocrinol*, 234: 161-169.
- 14- Frankel T, Yonkos L, Ampy F, Frankel J (2018). Exposure to levonorgestrel increases nest acquisition success and decreases sperm motility in the male fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem*, 37 (4): 1131-1137.
- 15- Huang Y, Wang XL, Zhang JW, Wu KS (2014). Impact of endocrine disrupting chemicals on reproductive function in zebrafish (*Danio rerio*). *Reprod Domest Anim*, 50 (1): 1-6.
- 16- Hou L, Chen H, Tian C, Liang Y, Wu R, Zhang X, Fang X, Zhang C, Hu J, Song L, Laing Y, Schlenk D, Xie L (2018). Alterations of secondary sex characteristics, reproductive histology and behaviors by norgestrel in the western mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Aquat Toxicol*, 198: 224-230.
- 17- Hua J, Han J, Guo Y, Zhou B (2015). The progestin levonorgestrel affects sex differentiation in zebrafish at environmentally relevant concentrations. *Aquat Toxicol*, 166: 1-9.
- 18- Jackson LM, Klerks PL (2019). Impact of long-term exposure to 17 α -ethinylestradiol in the live-bearing fish *Heterandria formosa*. *Arch Environ Contam Toxicol*, 77 (1): 51-61.
- 19- Johnson AC, Williams RJ (2004). A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone, and ethinyl estradiol at sewage treatment works. *Environ Sci Technol*, 38 (13): 3649-3658.
- 20- Kroupova HK, Trubiroha A, Lorenz C, Contardo-Jara V, Lutz I, Grabic R, Kocour M, Kloas M (2014). The progestin levonorgestrel disrupts gonadotropin expression and sex steroid levels in pubertal roach (*Rutilus rutilus*). *Aquat Toxicol*, 154: 154-162.
- 21- Kroupova H (2015). The challenge presented by progestins in ecotoxicological research: A critical review. *Environ Sci Technol*, 49 (50): 2625-2638.
- 22- Kumar V, Johnson AC, Trubiroha A, Tumova J, Ihara M, Grabic R, Kloas W, Tanaka H, Kroupova H (2015). The challenge presented by progestins in ecotoxicological research: A critical review. *Environ Sci Technol*, 49 (50): 2625-2638.
- 23- Melvin SD (2016). Short-term exposure to municipal wastewater influences energy, growth, and swimming performance in juvenile Empire Gudgeons (*Hypseleotris compressa*). *Aquat Toxicol*, 170: 271-278.
- 24- Oropesa AL, Guimarães L (2021). Occurrence of levonorgestrel in water systems and its effects on aquatic organisms: A review. *Rev Environ Con Tox*, 254: 57-84.
- 25- Overturf MD, Overturf CL, Carty DR, Hala D, Huggett DB (2014). Levonorgestrel exposure to fathead minnows (*Pimephales promelas*) alters survival, growth, steroidogenic gene expression and hormone production. *Aquat Toxicol*, 148: 152-161.
- 26- Runnalls TJ, Beresford N, Losty E, Scott AP, Sumpter JP (2013). Several synthetic progestins with different potencies adversely affect reproduction of fish. *Environ Sci Technol*, 47(4): 2077-2084.
- 27- Runnalls TJ, Beresford N, Kugathas S, Margiotta-Casaluci L, Scholze M, Scott AP, Sumpter JP (2015). From single chemicals to mixtures- Reproductive effects of levonorgestrel and ethinylestradiol on the fathead minnow. *Aquat Toxicol*, 169: 152-167.
- 28- Segner H, Caroll K, Fenske M, Janssen CR, Maack G, Pascie D, Schafers C, Vandebreghe GF, Watts M, Wenzel A (2003). Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotox Environ Safe*, 54: 302-314.
- 29- Shved N, Berishvili G, D'Cotta H, Baroiller JF, Segner H, Eppler E, Reinecke M (2007). Ethinylestradiol (EE2) differentially interferes with insulin-like growth factor-I (IGF-I) in liver

- and extrahepatic sites during development of male and female bony fish. *Endocrinol*, 195, 513-523.
- 30- Shirling D, Ashby JP, Baird JD (1981). Effect of progesterone on lipid metabolism in the intact rat. *J Endocrinol*, 90: 285-294.
- 31- Steinbach C, Lutz I, Sandova M, Pech M, Salkova E, Borík A, Valentova O, Kroupov HK (2023). Effects of the synthetic progestin levonorgestrel on some aspects of thyroid physiology in common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 310: 136860.
- 32- Stelmanska E, Kmiec Z, Swierczynski J (2012). The gender- and fat depot-specific regulation of leptin, resistin and adiponectin genes expression by progesterone in rat. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 132: 160-167.
- 33- Svensson J, Fick J, Brandt I, Brunström B (2013). The synthetic progestin levonorgestrel is a potent androgen in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Environ Sci Technol*, 47: 2043-2051.
- 34- Teigeler M, Schaudien D, Bohmer W, Lange R, Schafers C (2022). Effects of the gestagen levonorgestrel in a life cycle test with zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Chem*, 41(3): 580-591.
- 35- Vulliet E, Cren-Olivé C (2011). Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environ Pollut*, 159: 2929-2934.
- 36- Yarahmadi H, Duy SV, Hachad M, Dorner S, Sauvé S, Prévost M (2018). Seasonal variations of steroid hormones released by wastewater treatment plants to river water and sediments: Distribution between particulate and dissolved phases. *Sci Total Environ*, 635: 144-155.
- 37- Yi KW, Shin JH, Seo HS, Lee JK, Oh MJ, Kim T, Saw HS, Kim SH, Hur JY (2008). Role of estrogen receptor-alpha and -beta in regulating leptin expression in 3T3-L1 adipocytes. *Obesity*, 16: 2393-2399.
- 38- Zeilinger J, Steger-Hartmann T, Maser E, Goller S, Vonk R, Lange R (2009). Effects of synthetic gestagens on fish reproduction. *Environ Toxicol Chem*, 28 (12): 2663-2670.

Inclusion effects of different levels of levonorgestrel in the diet on the growth indices of three-spotted gourami (*Trichopodus trichopterus*)

Mohammadian Zh.¹, Esmaeili Fereidouni A.^{1*} and Mohammadian Razekenari A.²

¹ Dept. of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, I.R. of Iran.

² Ph.D. in Fisheries, Culture and Breeding in Aquatic Sciences, Iran.

Abstract

Levonorgestrel is considered as an effective compound in contraceptive pills and a lipophilic-hydrophobic substance with the ability to bind to suspended organic matters in water. In this study, the inclusion effects of levels of levonorgestrel at 0 (control), 0.7, 7, 70, 100 and 150 ng/g of the diet and a control-solvent treatment were evaluated on the growth indices of three-spotted gourami (*Trichopodus trichopterus*) during 45 days. First, females ($n = 210$; average initial weight and length of 4.6 g and 63.2 mm, respectively) were randomly distributed in 21 aquariums (60-L) with a density of ten fish in each aquarium; and fed daily at the rate of 3% of the wet body weight. Results showed that the body height, condition factor, and survival rate of the females were not affected by levonorgestrel levels ($P > 0.05$). Females fed with levonorgestrel showed significant differences in terms of final weight and length, increment percentage in weight and body length, weight and length specific growth rate compared to the control group (and control-solvent treatment) ($P < 0.05$). Nevertheless, the growth indices and maximum abdominal diameter of females fed with 150 ng/g showed no significant differences with lower levels (up to 7 ng/g) ($P > 0.05$). Based on the results, it can be concluded that the addition of levonorgestrel in the diet of gourami females led to developmental disorders at all levels, especially at > 7 ng/g. Due to the binding ability of levonorgestrel to organic substances and the possibility of accidental feeding of these particles in the natural diet of fish, growth disorders and changes in the population dynamic of this species and probably other groups of aquatic animals can be expected in natural environments.

Key words: Levonorgestrel, Endocrine disruptor, Three-spotted gourami, Growth.