



دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
دانشکده شیلات و محیط زیست
پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات

بررسی تاثیر سولفات مس بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی (تریپسین، کیموتریپسین و لیپاز)
ماهی کپور معمولی، *Cyprinus carpio*

نگارش

گل سونا رئوفی نیا

استاد راهنما

دکتر عبدالمجید حاجی مرادلو

استاد مشاور

دکتر رسول قربانی

زمستان ۹۰

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
دانشکده شیلات و محیط زیست
پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات

بررسی تاثیر سولفات مس بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی (تریپسین، کیموتریپسین و لیپاز)
ماهی کپور معمولی، *Cyprinus carpio*

نگارش

گل سونا رئوفی نیا

استاد راهنما

دکتر عبدالمجید حاجی مرادلو

استاد مشاور

دکتر رسول قربانی

زمستان ۹۰

تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیتهای علمی- پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می‌شود، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

۱) قبل از چاپ پایان‌نامه (رساله) خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع و کسب اجازه نمایند.

۲) در انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد، ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.

۳) انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب گل سونا رثوفی نیا دانشجوی رشته تکثیر و پرورش آبزیان مقطع کارشناسی ارشد تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی و

امضا گل سونا رثوفی نیا

تقدیم به:
صاحبان برترین مقام پدر و مادر عزیزم

و همسرم:

که سایه مهربانیش سایه سار زندگیم می باشد،
او که اسوه صبر و تحمل بوده و مشکلات
مسیر را برایم تسهیل نمود

سپاسگزاری

سپاس بی کران پروردگار یکتا را که هستی مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت.

سپاس ویژه خود را تقدیم می نمایم به خانواده ارجمندم، که همواره چراغ وجودشان روشنگر راهم بوده است.

در انجام پروژه و نگاشتن این پایان نامه در خدمت استاد گرانقدرم جناب آقای **دکتر عبدالمجید حاجی مرادلو** کسب فیض نمودم که از صمیم قلب کمال سپاس و تشکر را از لطف و محبت بی شائبه شان دارم.

از جناب آقای **دکتر قربانی** که مسئولیت مشاوره این پایان نامه را به عهده داشتند و با راهنمایی های ارزنده شان در تمام مراحل انجام این تحقیق مرا یاری نموده اند بسیار سپاسگزارم. با تشکر از داوران محترم آقای **دکتر جعفری** و **دکتر ایمان پور** که با حضورشان بر کار من ارج نهادند، یاری و بزرگواریشان را ارج می نهم.

از جناب آقای **دکتر شیخ** نماینده محترم تحصیلات تکمیلی کمال قدردانی و سپاس را دارم. با سپاس فراوان از مساعدت سرکار خانم **مهندس ابوالفتحی**، جناب آقای **مهندس نعیمی** کارشناس آزمایشگاه شیمی، جناب آقای **مهندس چمنی** کارشناس آموزش و آقای **مهندس جعفر** مسئول مرکز آبی پروری دانشگاه.

تشکر و سپاس ویژه از دوستان عزیزم که بهترین خاطرات را به من ارزانی داشتند: خانم‌ها **جمشیدی**، **فرجی**، **گوهر دوست**، **گوگ**، **مرتضوی**، **حبیبی**، **نادری**، **سپیده کردجری** و **مهدی نژاد**.

چکیده

سولفات مس یکی از پرکاربردترین جلبک‌کش‌ها برای کنترل فیتوپلانکتون‌ها در دریاچه‌ها، مخازن آبی و استخرها می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر سولفات مس بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی کپور معمولی، *Cyprinus carpio* (میانگین وزنی هر ماهی 13 ± 0.357 گرم) در پنج زمان مختلف طی دو هفته بود. بدین منظور ۴ تیمار در نظر گرفته شد. تیمارهای آزمایشی به ترتیب در معرض صفر، نیم، یک و دو میلی گرم در لیتر سولفات مس قرار گرفتند. مدت زمان آزمایش چهارده روز بود که در زمان‌های یک، دو، چهار، هفت و چهارده روز بعد از افزودن سولفات مس از هر تیمار نمونه‌برداری انجام شد. نتایج نشان داد که فعالیت اختصاصی آنزیم تریپسین در مقایسه با گروه شاهد در تیمارهای دوم و سوم طی دوره اختلاف معنی‌داری نداشت ($P > 0.05$). اما سطح فعالیت آن با غلظت دو میلی گرم در لیتر در روز هفتم افزایش معنی‌دار نشان داد ($P < 0.05$). فعالیت کیموتریپسین در تیمارهای آزمایشی یکسری نوساناتی داشت که در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). آنزیم لیپاز در هر سه تیمار آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت ($P > 0.05$). بنابراین می‌توان گفت، انتقال فلز از طریق آب به ماهی تاثیر چندانی روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی ندارد.

کلمات کلیدی: سولفات مس، ماهی کپور معمولی، آنزیم‌های گوارشی

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول	۱
۱-۱ کلیات	۲
۲-۱ فرضیات	۷
۳-۱ هدف	۷
فصل دوم	۸
۱-۲ مطالعه آنزیم‌های گوارشی	۹
۱-۱-۲ تحقیقات داخل کشور	۹
۲-۱-۲ تحقیقات خارج از کشور	۱۰
۲-۲ بررسی سایر تاثیرات سولفات مس	۱۴
۱-۲-۲ تحقیقات داخل کشور	۱۴
۲-۲-۲ تحقیقات خارج از کشور	۱۵
فصل سوم	۱۸
مواد و روش‌ها	۱۸
۱-۳ تهیه ماهی و سازگاری به شرایط آزمایشگاهی	۱۹
۲-۳ طرح و مدیریت آزمایش	۱۹
۳-۳ نمونه‌برداری	۱۹
۴-۳ آماده سازی نمونه‌ها	۲۰
۵-۳ سنجش فعالیت آنزیمهای گوارشی	۲۰
۱-۵-۳ سنجش فعالیت آنزیم تریپسین	۲۱
۲-۵-۳ سنجش فعالیت آنزیم کیموتریپسین	۲۲

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۲۳	۳-۵-۳ سنجش فعالیت آنزیم لیپاز
۲۵	۳-۵-۴ سنجش پروتئین محلول
۲۷	۳-۶ روش تجزیه و تحلیل آماری
۲۸	فصل چهارم
۲۸	نتایج
۲۹	فعالیت آنزیم‌های گوارشی
۲۹	۴-۱ فعالیت اختصاصی آنزیم تریپسین
۳۱	۴-۲ فعالیت کلی آنزیم تریپسین
۳۳	۴-۳ روند فعالیت آنزیم تریپسین در معرض غلظت‌هایی از سولفات مس طی دو هفته
۳۵	۴-۴ فعالیت اختصاصی آنزیم کیموتریپسین
۳۸	۴-۵ فعالیت کلی آنزیم کیموتریپسین
۴۰	۴-۶ روند فعالیت آنزیم کیموتریپسین در معرض غلظت‌هایی از سولفات مس طی دو هفته
۴۲	۴-۷ فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز
۴۵	۴-۸ فعالیت کلی آنزیم لیپاز
۴۸	۴-۹ روند تغییر فعالیت آنزیم لیپاز در معرض غلظت‌هایی از سولفات مس در طول دو هفته
۵۰	۴-۱۰ پروتئین محلول بافت روده
۵۲	فصل پنجم
۵۲	بحث
۵۳	فعالیت آنزیم‌های گوارشی
۵۵	۵-۱ پروتئین محلول بافت روده

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۵۷.....	۲-۵ فعالیت اختصاصی آنزیم‌های تریپسین و کیموتریپسین
۶۰.....	۳-۵ فعالیت آنزیم لیپاز
۶۰.....	۴-۵ فعالیت کلی آنزیم‌های گوارشی
۶۱.....	۵-۵ نتیجه‌گیری کلی
۶۱.....	۶-۵ پیشنهادات
۶۲.....	منابع

فهرست شکل‌ها

صفحه	عنوان
شکل ۳-۱	نمودار منحنی استاندارد پروتئین محلول..... ۲۷
شکل ۴-۱	نمودار تغییر فعالیت اختصاصی آنزیم تریپسین در معرض غلظت‌هایی از سولفات مس در طی دو هفته. ۳۰
شکل ۴-۲	نمودار تغییر فعالیت اختصاصی آنزیم تریپسین در ۴ غلظت سولفات مس..... ۳۱
شکل ۴-۳	نمودار تغییر فعالیت کلی آنزیم تریپسین در غلظت‌هایی از سولفات مس در طی دو هفته. ۳۲
شکل ۴-۴	نمودار تغییر فعالیت کلی آنزیم تریپسین در ۵ زمان نمونه‌برداری. ۳۳
شکل ۴-۵	نمودار روند فعالیت آنزیم تریپسین در غلظت نیم میلی گرم در لیتر در طول دو هفته ۳۴
شکل ۴-۶	نمودار روند فعالیت آنزیم تریپسین در معرض یک میلی گرم در لیتر سولفات مس در طول دو هفته ۳۴
شکل ۴-۷	نمودار روند فعالیت آنزیم تریپسین در معرض غلظت دو میلی گرم در لیتر در طول دو هفته ۳۵
شکل ۴-۸	نمودار تغییر فعالیت اختصاصی آنزیم کیموتریپسین در معرض غلظت‌هایی از سولفات مس در طول دو هفته. ۳۷
شکل ۴-۹	نمودار تغییر فعالیت اختصاصی آنزیم کیموتریپسین در ۵ زمان نمونه‌برداری ۳۸
شکل ۴-۱۰	نمودار تغییر فعالیت کلی آنزیم کیموتریپسین در معرض غلظت‌هایی از سولفات مس در طول دو هفته ۴۰
شکل ۴-۱۱	نمودار روند فعالیت آنزیم کیموتریپسین در معرض نیم میلی گرم در لیتر سولفات مس در طول دو هفته ۴۱
شکل ۴-۱۲	نمودار فعالیت آنزیم کیموتریپسین در معرض یک میلی گرم در لیتر در طول دو هفته .. ۴۱
شکل ۴-۱۳	نمودار تغییر فعالیت آنزیم کیموتریپسین در معرض غلظت دو میلی گرم در لیتر در طول دو هفته. ۴۲

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
شکل ۴-۱۴ نمودار تغییر فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز در غلظت‌هایی از سولفات مس در طول دو هفته. ۴۴.....	۴۴
شکل ۴-۱۵ نمودار تغییر فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز در ۵ زمان نمونه‌برداری ۴۵.....	۴۵
شکل ۴-۱۶ نمودار تغییر فعالیت کلی آنزیم لیپاز در معرض غلظت‌هایی از سولفات مس در طول دو هفته. ۴۷.....	۴۷
شکل ۴-۱۷ نمودار تغییر فعالیت اختصاصی آنزیم لیپاز در ۵ زمان نمونه‌برداری ۴۸.....	۴۸
شکل ۴-۱۸ نمودار روند تغییر فعالیت آنزیم لیپاز در معرض نیم میلی گرم در لیتر سولفات مس در طول دو هفته ۴۹.....	۴۹
شکل ۴-۱۹ نمودار تغییر فعالیت آنزیم لیپاز در معرض غلظت یک میلی گرم در لیتر در طول دو هفته ۴۹.....	۴۹
شکل ۴-۲۰ نمودار تغییر فعالیت آنزیم لیپاز در معرض دو میلی گرم در لیتر سولفات مس در طول دو هفته ۵۰.....	۵۰
شکل ۴-۲۱ نمودار تغییر پروتئین محلول در غلظت‌هایی از سولفات مس در طول دو هفته. ۵۱.....	۵۱

فهرست جدول‌ها

صفحه	عنوان
۱-۴	جدول ۱- آنالیز واریانس فعالیت آنزیم تریپسین (میلی واحد بر میلی گرم پروتئین) ۲۹
۲-۴	جدول ۲- آنالیز واریانس فعالیت آنزیم تریپسین (میلی واحد بر گرم وزن تر بافت) ۳۱
۳-۴	جدول ۳- آنالیز واریانس فعالیت آنزیم کیموتریپسین (میلی واحد بر میلی گرم پروتئین محلول) ۳۶
۴-۴	جدول ۴- آنالیز واریانس فعالیت آنزیم کیموتریپسین (میلی واحد بر میلی گرم وزن تر بافت) ۳۹
۵-۴	جدول ۵- آنالیز واریانس آنزیم لیپاز (میلی واحد بر میلی گرم پروتئین محلول) ۴۳
۶-۴	جدول ۶- آنالیز واریانس آنزیم لیپاز (میلی واحد بر میلی گرم بافت تر روده) ۴۶

فصل اول

مقدمه

۱-۱ کلیات

فلزات سنگین از آلوده کننده‌های آب هستند که می‌توانند به دلیل سمیت و تجمع در بافت‌های بدن آبریان مشکلات زیادی ایجاد کنند (کاران^۱ و همکاران، ۱۹۹۸). منشا فلزات آلوده کننده در اکوسیستم‌های آبی از فاضلاب‌های صنعتی حاصل از صنایع و فاضلاب‌های خانگی می‌باشد. برخی ترکیبات مورد استفاده به عنوان جلبک کش نیز در صنایع پرورش ماهی دارای این فلزات می‌باشند. بیشتر مشکلات مربوط به سمیت فلزات در آبرزی پروری در نتیجه‌ی استفاده از سولفات مس و دیگر مواد شیمیایی حاوی مس می‌باشد که برای کنترل جلبک‌ها یا درمان انگل‌های خارجی کاربرد دارد (کلاود^۲ و همکاران، ۱۹۹۸). علاوه بر آن از سولفات مس به عنوان علف کش، قارچ کش و برای نابودی حلزون‌های موجود در استخر نیز استفاده می‌شود.

اهمیت ویژه مس در موجودات زنده، نقش فیزیولوژیکی آن در ترکیب برخی از آنزیم‌ها می‌باشد. مس دارای عملکردهای متعددی در بیوشیمی سلول مانند داشتن نقش حیاتی در تنفس سلولی و به عنوان یک کوفاکتور برای بیش از ۳۰ آنزیم مختلف به شمار می‌آید (لیندر^۳، ۱۹۹۱؛ آجانی^۴ و آکپولی^۵، ۲۰۱۰). اتم‌های مس، در ترکیب آنزیم‌های حاوی مس، به شکل‌های مختلف وارد می‌شوند. در بیشتر موارد، حمل الکترون‌ها را به عهده دارند و در تشکیل کمپلکس‌های آنزیم-سوپسترا نقش ایفا می‌نمایند (واروبو^۶، ۱۹۹۳). مس یک فلز سنگین با تراکم بالای ۵ گرم در متر مکعب و غیر قابل تجزیه است. و به سهولت قابل جذب بوده و قابلیت تجمع بافتی بالایی دارد (اکویی^۷ و همکاران، ۱۹۹۱؛ آجانی و آکپولی، ۲۰۱۰). یون مس به میزان کمی در همه‌ی سلول‌ها یافت می‌شود، اما در غلظت‌های بالاتر به عنوان یک عامل سمی برای بیشتر موجودات از جمله ماهی محسوب می‌شود. زمانیکه مس به شکل سولفات مس به آب اضافه می‌شود، ترکیبات آن به صورت یون‌های Cu^{2+} و SO_4^{2-} جدا می‌شود.

-
- 1- Karan
 - 2- Claude
 - 3- Linder
 - 4- Ajani
 - 5- Akpoilih
 - 6- Warobev
 - 7- Okoye

يون‌هاي مس سرپيچا^۱ به شکل مالاشيت^۱ يا تنتوريت^۲ و يا ديگر ترکيبات آلي و غير آلي محلول تبديل مي‌شود. به طور کل پذيرفته شده است که Cu^{2+} شکل سمی مس می‌باشد.

ماهی معمولاً^۳ به عنوان یک شاخص ارزیابی برای سلامت اکوسیستم‌های آبی محسوب می‌شود. مطالعات مختلف انجام شده نشان می‌دهد که فلزات سنگین ممکن است فعاليت‌هاي فیزیولوژیکی و پارامترهای بیوشیمیایی بافت‌ها و خون را تغییر بدهند (ویندهینی^۴ و نارایانان^۵، ۲۰۰۸).

يون‌هاي مس از آبشش جذب شده و به طور مستقیم اثرات سمی خود را گذاشته و يا اینکه از آبشش‌ها عبور کرده و در بخش‌هاي داخلی سمیت خود را اعمال می‌کنند. مکانیسم سمیت مس برای ماهیان و سخت پوستان با اختلال در عملکرد تنظیم اسمزی آبشش همراه می‌باشد که از طریق ممانعت در جذب سدیم و کلراید از سطح آبشش می‌باشد. عدم جذب يون‌هاي فعال در نتیجه‌ی بازدارندگی فعاليت آنزيم‌ها می‌باشد که در طی اتصال مس به گروه‌هاي سولفیدريل^۶ پروتئين‌ها رخ می‌دهد. از جمله اختلالات دیگری که گزارش شده شامل آسیب آبشش، اسیدی شدن خون و کم خونی می‌باشد که کاهش کارایی تنفسی را دنبال دارد. سطح گلوکز خون برای سوخت و ساز و بر اثر وارد شدن استرس افزایش می‌یابد (ودمري^۶، ۱۹۷۰). غلظت‌هاي تحت کشندگی مس برای ماهی استرس آور می‌باشد، رشد را ضعیف و عملکرد بدن را مختل می‌کند اما در غلظت‌هاي بالاتر که وضعیت بحرانی خواهد بود، اثرات مزمن مس شامل کاهش رشد، طول عمر کوتاه‌تر، مشکلات باروری، کاهش باروری و تغییرات رفتاری را به دنبال دارد. البته زمانیکه به مدت طولانی‌تری در معرض آن غلظت‌ها باشند آسیب به تنظیم اسمزی افزایش یافته و منجر به کما و در نهایت مرگ ماهی خواهد شد. کمبود مس نیز خود باعث اختلالات فیزیولوژیکی می‌شود که از علائم آن کاهش رشد، کم خونی، اختلالات قلبی و عروقی، کاهش رنگدانه پوست، کاهش در وزن و باروری خصوصاً^۷ کاهش در تولید تخمک می‌باشد (لیندر، ۱۹۹۱).

-
- 1- Malachit
 - 2- Tentorit
 - 3- Vinodhini
 - 4- Narayanan
 - 5- Sulphydryl
 - 6- Wedemeyer

مطالعات زیادی در مورد سمیت مس روی موجودات آبی انجام شده، اما تعیین سطوح بی خطر مس از مقادیر سمی آن برای ماهی دشوار می‌باشد زیرا که تحت تاثیر متغیرهای گوناگونی می‌باشد. سمیت بر اساس گونه‌ی ماهی (ماهی‌های گرمابی تحمل بیشتری نسبت به ماهی‌های سردآبی دارند)، مرحله‌ی زندگی (با افزایش رشد ماهی تحمل آن نسبت به سمیت افزایش می‌یابد)، دما (سمیت با افزایش دما بیشتر می‌شود) و دیگر متغیرهای محیطی مثل شوری، سختی، مواد آلی محلول و pH متفاوت می‌باشد.

معیار خاصی برای تعیین میزان تحمل ماهی در برابر مس در دسترس نمی‌باشد، پرورش دهنده‌ها باید نسبت به عواملی که سمیت را تحت تاثیر می‌گذارند آشنا باشند تا بتوانند مشکلات را پیش بینی نمایند. pH محیط از جمله این عوامل می‌باشد که روی سمیت تاثیر می‌گذارد، pH غلظت یون مس محلول را از طریق تاثیر روی حلالیت CuO افزایش می‌دهد. بنابراین سمیت مس با کاهش pH افزایش می‌یابد.

قلیائیت کل از طریق ترکیب کربنات مس و تاثیر روی pH محیط تاثیر می‌گذارد. کربنات مس غیرسمی می‌باشد، پس تاثیر قلیائیت روی سمیت مس غیرمستقیم خواهد بود. همانطور که می‌دانیم pH آب با افزایش قلیائیت کل افزایش می‌یابد. بنابراین طبق یک قانون کلی می‌توان گفت که سمیت مس با افزایش قلیائیت کل کاهش می‌یابد.

تاثیر سختی بر سمیت بدین گونه می‌باشد که، کلسیم موجود در آب (و احتمالاً منیزیم) با یون مس روی باند شدن و جذب از سطح آبشش رقابت دارند در نتیجه جذب مس از آبشش تا حدودی در غلظت‌های بالای کلسیم صورت نمی‌گیرد بنابراین سمیت کاهش می‌یابد، از طرفی کلسیم در اختلالات تنظیم اسمزی نقش مهمی بازی می‌کند چون که کلسیم یک تعدیل کننده‌ی مهم می‌باشد و از این نظر روی سمیت مس تاثیر می‌گذارد (کلاود^۱ و همکاران، ۱۹۹۸).

به طور کل میزان رشد، یک شاخص قابل اعتماد در تحقیقات مربوط به تاثیر سمیت روی موجودات محسوب می‌شود. سطوح تحت کشندگی سبب کاهش رشد در ماهی‌های جوان و لاروها خواهد شد. دلیل آن می‌تواند کاهش جذب غذا در نتیجه‌ی افزایش فعالیت متابولیسمی برای دفع سموم جهت حفظ کارکرد طبیعی بدن باشد. قرار گرفتن در معرض غلظت‌های تحت کشندگی مس