## تاییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

**خانم ثمر مرتضوی** رساله ۲۲ واحدی خود را با عنوان: **ارزیابی غلظت ترکیبات شبه استروژنی ٤-نونیل فنل و بیس فنل آ در کبد، عضله ماهی و رسوبات تالاب انزلی وبررسی اثرات آنها درماهی کپور معمولی(*Cyprinus carpio*)با استفاده از بیومارکر ویتلوژنین(Vtg)**

در تاریخ ۹۱/٤/۲۱ ارائه کردند.

اعضای هیأت داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آن را برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می‌کنند./ی

| اعضای هیات داوران | نام و نام خانوادگی | رتبه علمی | امضاء |
|---|---|---|---|
| ۱- استاد راهنمای اصلی | دکتر عباس اسماعیلی | استاد | |
| ۲- استاد راهنمای دوم | دکتر علیرضا ریاحی | استادیار | |
| ۳- استاد مشاور اول | دکتر نادر بهرامی فر | استادیار | |
| ٤- استاد مشاور دوم | --------- | -------- | --------- |
| ٥- استاد ناظر | دکتر محمدرضا کلباسی | دانشیار | |
| ٦- استاد ناظر | دکتر حبیب الله یونسی | دانشیار | |
| ۷- استاد ناظر | دکتر نادر شعبانی پور | دانشیار | |
| ۸- استاد ناظر | دکترزهره رمضانپور | استادیار | |
| ۹- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی | دکتر حبیب الله یونسی | دانشیار | |

## آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

**مقدمه:** با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب ثمر مرتضوی دانشجوی رشته محیط زیست - آلودگی ورودی سال تحصیلی ۸۸-۱۳۸۷ مقطع دکتری دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آئین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

امضا:

تاریخ:۱۳۹۱/۴/۲۱

## آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه،دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل رساله دکتری نگارنده در رشته مهندسی منابع طبیعی- آلودگی محیط زیست است که در سال ۱۳۹۱ در دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر عباس اسماعیلی ساری و دکتر علیرضا ریاحی بختیاری و مشاوره جناب آقای دکتر نادر بهرامی‌فر و سرکار خانم دکتر فاطمه رهبری‌زاده از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

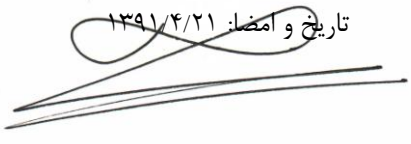
ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب ثمر مرتضوی دانشجوی رشته محیط زیست مقطع دکتری تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: ثمر مرتضوی

تاریخ و امضا: ۱۳۹۱/۴/۲۱



**دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی**
**گروه محیط‌زیست**

**رساله دکتری رشته محیط‌زیست – آلودگی**

# تعیین غلظت ترکیبات شبه استروژنی ۴- نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ در کبد و عضله ماهی و رسوبات تالاب انزلی و بررسی اثرات مخلوط آنها در ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*) بااستفاده از بیومارکر ویتلوژنین (Vtg)

**ثمر مرتضوی**

**استادان راهنما:**

**دکتر عباس اسماعیلی ساری**

**دکتر علیرضا ریاحی بختیاری**

**استادان مشاور:**

**دکتر نادر بهرامی فر**

**دکتر فاطمه رهبری‌زاده**

تیر ۱۳۹۱

**تقدیر و تشکر**

سپاس شایسته یگانه ایست که با اتکا و یاد آن توانستم پس از سال‌ها تلاش این راه پر فراز و نشیب را طی نمایم، او که مرا یاری داد تا بتوانم هم اکنون علاوه بر رسیدن به هدفم، در راه اعتلای علمی وطنم ایران عزیز، در حد دانش پژوهی کوچک گام بردارم و از دریای بیکران استادانی گرانقدر بهره برم.

در این راستا از اساتید بزرگوار راهنما جناب آقای دکتر عباس اسماعیلی و جناب آقای دکتر علیرضا ریاحی به‌خاطر راهنمایی‌ها مساعدت‌های بی‌دریغ ایشان بسیار سپاسگزارم. همچنین از استادان محترم جناب آقای دکتر نادر بهرامی‌فر و سرکار خانم دکتر فاطمه رهبری زاده که با مشاوره و نظرات ارزشمند خود در این راه مرا یاری دادند کمال تشکر را دارم.

از استادان ارجمند سرکار خانم دکتر رمضان‌پور، جناب آقایان دکتر نادر شعبانی‌پور، دکتر محمدرضا کلباسی و دکتر حبیب‌الله یونسی که زحمت داوری این رساله را بر عهده گرفته و با پیشنهادات ارزنده‌شان سبب بهبود کیفی این پژوهش شدند صمیمیانه سپاسگزاری می‌نمایم.

از همکاری‌ها و مساعدت‌های سرکار خانم مهندس منظر حقدوست کارشناس محترم آزمایشگاه محیط‌زیست، جناب آقای مهندس حسینی کارشناس محترم آزمایشگاه صنایع چوب، جناب آقای مهندس کمالی کارشناس محترم آزمایشگاه شیلات و همچنین جناب آقای مهندس بور سرپرست محترم آزمایشگاه‌های دانشکده در انجام مراحل آزمایشگاهی این تحقیق صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایم.

از دوستان بزرگوارم خانم‌ها زهره حسن‌آبادی‌زاده، آذین کاظمی، نسرین حسن‌زاده، شاهده عبدالعزیز، آناهیتا فرهودی، ساناز غفاری، زهره ابراهیمی، پریسا احمدی، شیرین جمشیدی، عالیه دریانورد و آقایان محسن محمدی، مهدی غلامعلی فرد، محمدرضا محیط‌خواه و سیامک بختیاری در همراهی و مساعدت‌های گوناگون خالصانه تشکر می‌نمایم.

در پایان از پدر و مادر دلسوز و مهربانم به خاطر حمایت‌ها و دلگرمی‌های بی‌دریغشان در تمانی مراحل زندگی و این پژوهش از صمیم قلب تشکر می‌نمایم و امیدوارم شایسته به‌جا آوردن محبت‌هایشان باشم.

از همسرم جناب آقای دکتر فرزاد ویسانلو که در کلیه مراحل این تحقیق مرا یاری رساندند و با صبوری خود پیوسته مرا یاری نمودند، بسیار سپاسگزارم.

## چکیده:

با افزایش روز افزون کاربرد شوینده‌ها در منازل و بخش‌های گوناگون صنعتی و همچنین مواد پلاستیکی و بسته بندی‌های آن، ترکیبات شبه استروژنی ۴- نونیل فنل و بیس فنلآ در محیط‌های آبی وارد شده‌اند این ترکیبات با اثرات آسیب رساننده خود بر سیستم غدد درون ریز (EDCs) باعث افزایش مرگ و میر، کاهش باروری و اختلال در فعالیت‌های هورمونی در آبزیان می‌گردند، لذا پژوهش حاضر سعی در تعیین میزان این ترکیبات در رسوبات سطحی و کپور ماهی تالاب انزلی به‌عنوان یکی از مهمترین اکوسیستم‌های آبی کشور و نیز بررسی اثر آن‌ها بر کپور ماهی (*Cyprinus carpio*) دارد. در این راستا ابتدا میزان این ترکیبات در رسوبات سطحی، عضله و کبد کپور ماهی تالاب با دستگاه‌های GC-MS و HPLC تعیین گردید. سپس، کپور ماهی نابالغ در محیط آزمایشگاه در معرض غلظت بدست آمده این آلاینده‌ها در رسوبات قرار گرفت و اثرات حاصل با نشانگر زیستی ویتلوژنین با روش الایزا بررسی گردید.

نتایج تحقیق نشان داد، میزان ۴- نونیل‌فنل و بیس فنلآ در رسوبات به ترتیب در محدوده ۰/۰۶ µg/g dw- ۲۹ و ۰/۰۱ µg/ g dw-۷ می‌باشد. همچنین به‌طور میانگین غلظت ترکیبات شبه استروژنی در عضله و کبد کپور ماهی تالاب انزلی به ترتیب ۱/۶۵ µg/gو۳/۲۰ برای ۴-نونیل‌فنل و نیز ۱/۵۸ µg/gو ۲/۱۵ برای بیس‌فنلآ اندازه‌گیری گردید. مقایسه نتایج حاصل با سایر مطالعات انجام شده در دنیا نشان دهنده غلظت بالای این آلاینده‌ها در رسوبات و کپور ماهی تالاب انزلی می‌باشند. از طرفی بین غلظت این ترکیبات در رسوبات با میزان کربن کل آلی و همچنین در کپور ماهی نیز بین میزان چربی و غلظت ۴- نونیل فنل و بیس فنلآ نیز همبستگی مثبت و معناداری وجود داشت. بررسی میزان ویتلوژنین در خون کپور ماهی نابالغ در معرض غلظت‌های بدست آمده از این ترکیبات در رسوبات تالابی نشان داد با افزایش غلظت آلاینده‌ها میزان ویتلوژنین افزایش می‌یابد. همچنین بیشترین میزان ویتلوژنین در نتیجه تاثیر همزمان و افزایشی غلظت اندک ترکیبات شبه استروژنی ۴- نونیل فنل و بیس فنلآ در رسوبات مشاهده‌گردید.بنابراین نتیجه‌گیری کلی از این پژوهش نشان می‌دهد که، بسیاری از ایستگاه‌های مورد مطالعه در این تحقیق به لحاظ غلظت توأم این ترکیبات حائز شرایط لازم در ترشح ویتلوژنین در گونه‌های آبزی مشابه با کپور ماهی می‌باشند و می‌توانند سبب کاهش جمعیت‌های طبیعی آبزیان شوند. از سوی دیگر با توجه به تجربیات علمی بدست آمده از احتمال بزرگنمایی زیستی ۴- نونیل‌فنل و بیس‌فنلآ، امکان انتقال این ترکیبات به بدن انسان‌های حاشیه این تالاب که به لحاظ غذایی وابسته به ماهی و پرندگان آن می‌باشند، وجود دارد.



**کلمات کلیدی**: تالاب انزلی، کپور معمولی، شبه استروژنی، ۴-نونیل فنل، بیس فنلآ، نشانگر زیستی، ویتلوژنین.

# فهرست مطالب


| عنوان | صفحه |
|---|---|
| فصل اول- مقدمه | |
| ۱-۱- مقدمه | ۲ |
| ۱-۲- ضرورت تحقیق | ۸ |
| ۱-۳- ا هداف پژوهش | ۹ |
| ۱-۴- سوالات پژوهش | ۹ |
| ۱-۵- فرضیه‌ها | ۱۰ |
| فصل دوم- مرور منابع | |
| ۲-۱- سابقه تحقیق درخارج از ایران | ۱۲ |
| ۲-۱-۱- آب و رسوبات در اکوسیستم‌های طبیعی | ۱۲ |
| ۲-۱-۲-آبزیان در اکوسیستم‌های طبیعی | ۱۵ |
| ۲-۱-۳- مطالعات مربوط به تاثیر غلظت‌های مختلف در محیط‌های آزمایشگاهی | ۲۱ |
| ۲-۲- سابقه تحقیق در ایران | ۲۵ |
| ۲-۳- جنبه جدید بودن و نوآوری | ۲۵ |
| فصل سوم- مواد وروش‌ها | |
| ۳-۱- منطقه مطالعاتی | ۲۷ |
| ۳-۱-۱-معرفی منطقه مورد مطالعه | ۲۷ |
| ۳-۲- روش‌ها | ۲۸ |
| ۳-۲-۱- جمع‌آوری نمونه‌های رسوبات سطحی | ۲۸ |
| ۳-۲-۲- آماده‌سازی نمونه‌های رسوبات سطحی و آنالیز دستگاهی جهت بررسی ۴-نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ | ۲۹ |
| ۳-۲-۲- ۱-آماده‌سازی نمونه‌ها | ۲۹ |
| ۳-۲-۲-۲- اندازه‌گیری میزان ۴-نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ نمونه‌های رسوب | ۳۳ |
| ۳-۲-۲-۳- اندازه‌گیری کربن آلی کل در رسوبات سطحی | ۳۳ |
| ۳-۳-۲- آماده‌سازی عضله نمونه‌های ماهی (*Cyprinus carpio*) و آنالیز دستگاهی جهت بررسی ۴-نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ | ۳۳ |
| ۳-۳-۲-۱-اندازه‌گیری چربی نمونه‌های عضله | ۳۵ |
| ۳-۳-۲-۲- پاک سازی نمونه‌های استخراج شده عضله | ۳۵ |
| ۳-۳-۳- آماده‌سازی کبد نمونه‌های ماهی (*Cyprinus carpio*) | ۳۶ |
| ۳-۳-۳-۱- اندازه‌گیری ۴-نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ نمونه‌های کبد با HPLC | ۳۷ |
| ۳-۳-۴- در معرض قرار دادن کپور ماهیان نابالغ در معرض غلظت ترکیبات ۴-نونیل‌فنل وبیس‌فنل‌آ | ۳۸ |
| ۳-۳-۴-۱- اندازه‌گیری میزان ویلوژنین خون نمونه‌های ماهی در معرض با ۴-نونیل‌فنل | ۴۰ |

وبیس‌فنل‌آ با روش ELISA
۳-۳-۵- روش تجزیه و تحلیل اطلاعات ۴۲

فصل چهارم- نتایج
۴-۱- نتایج آنالیز ترکیبات وبیس‌فنل‌آ در رسوبات تالاب انزلی ۴۵
۴-۱-۱- ۴- نونیل‌فنل درسوبات تالاب انزلی ۴۵
۴-۱-۲- بیس‌فنل درسوبات تالاب انزلی ۴۶
۴-۱-۳- همبستگی غلظت نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ در رسوبات با کربن آلی کل (TOC) در رسوبات سطحی منطقه مطالعاتی ۵۰
۴-۱-۴- تجزیه خوشه‌ای غلظت کربن کل آلی، ۴- نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ رسوبات ۵۱
۴-۲- نتایج آنالیز ترکیبات وبیس‌فنل‌آ درکپور ماهی تالاب انزلی ۵۳
۴-۲-۱- ۴- نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ در عضله کپور ماهی ۵۳
۴-۲-۲- ۴- نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ در کبد ماهی کپور ۵۳
۴-۲-۳- همبستگی غلظت نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ در عضله با میزان چربی در کپور ماهی منطقه مطالعاتی ۵۶
۴-۳- نتایج آنالیز میزان ویتلوژنین موجود در پلاسمای خون کپور ماهی نابالغ در معرض ترکیبات ۱۷بتا استرادیول، ۴ - نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ ۵۷
۴-۳-۱- نتایج حاصل از میزان ویتلوژنین در معرض ۱۷بتا استرادیول ۵۸
۴-۳-۲- نتایج حاصل از میزان ویتلوژنین در معرض۴- نونیل‌فنل ۵۹
۴-۳-۳- نتایج حاصل از میزان ویتلوژنین در معرض بیس‌فنل‌آ ۵۹

فصل پنجم- بحث و نتیجه‌گیری
۵-۱-بررسی‌های میزان ۴-نونیل‌فنل وبیس‌فنل‌آ در رسوبات تالاب انزلی ۶۴
۵-۱-۱- بررسی ۴- نونیل‌فنل در رسوبات تالاب انزلی ۶۹ ۶۴
۵-۱-۲- بررسی بیس‌فنل‌آ در رسوبات تالاب انزلی ۶۵
۵-۱-۳- بررسی همبستگی بین غلظت ۴- نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ با کربن کل آلی در رسوبات سطحی تالاب انزلی ۶۶
۵-۲-بررسی‌های میزان ۴-نونیل‌فنل وبیس‌فنل‌آ در کپور ماهی تالاب انزلی ۶۷
۵-۲-۱- بررسی ۴- نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ در عضله ۶۷
۵-۲-۲- بررسی ۴- نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ در کبد ۶۹
۵-۲-۳- بررسی همبستگی میزان چربی با غلظت ۴- نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ در ماهی ۶۹
۵-۳- بررسی میزان ویتلوژنین موجود در پلاسمای خون کپور ماهی نابالغ در معرض ترکیبات ۱۷بتا استرادیول، ۴- نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ ۷۰
۵-۳-۱- بررسی میزان ویتلوژنین موجود در پلاسمای خون کپور ماهی نابالغ در معرض همزمان ترکیبات ۴- نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ ۷۱
۵-۴- نتیجه‌گیری ۷۳

**۵-۵- آزمون فرضیات** **۷۴**
**۵-۶- پیشنهادات** **۷۵**
**۵-۶-۱- پیشنهادات مستخرج از رساله** **۷۵**
**۵-۶-۲-پیشنهادات پژوهشی** **۷۵**
**منابع مورد استفاده** **۷۶**

# فهرست جداول

**عنوان** **صفحه**


جدول۳-۱- موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌های نمونه برداری در تالاب انزلی ۳۰

جدول۳-۲- غلظت‌های ۴-نونیل‌فنل، بیس‌فنل‌آ و مخلوط آنها جهت در معرض قرار دادن کپور ماهیان نابالغ ۳۹

جدول۴-۱- معرفی علایم اختصاری ۴۴

جدول۴-۲- مقایسه بین میزان نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ (µg/gdw)در رسوبات ایستگاه‌های مختلف تالاب ۴۹

جدول ۴-۳- همبستگی بین غلظت ۴- نونیل‌فنل، بیس‌فنل آ وTOC ۴۹

جدول۴-۴- میانگین کل کربن آلی و تاثیر آن بر میزان نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ رسوبات ۵۱

جدول۴-۵- میزان نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آموجود در رسوبات تالاب انزلی و سایر مطالعات ۵۲

جدول۴-۶- همبستگی بین غلظت ۴- نونیل‌فنل و بیس‌فنل آ در کبد و عضله ۵۵

جدول ۴-۷- بررسی همبستگی بین غلظت ۴- نونیل‌فنل و بیس‌فنل آ با پارامترهای زیست‌سنجی کپور ماهی ۵۷

جدول۴-۸- میزان جذب استانداردها در روش الایزا ۵۸

جدول۴-۹- همبستگی بین میزان تزریق ۴- نونیل‌فنل و بیس‌فنل آ با ترشح ویتلوژنتن ۶۱

# فهرست شکل‌ها


| عنوان | صفحه |
|---|---|
| شکل۳-۱- نقشه منطقه مورد مطالعه و ایستگاه های نمونه برداری رسوبات سطحی در تالاب انزلی | ۲۹ |
| شکل۳-۲- مراحل آماده سازی نمونه‌های رسوب برای آنالیز ۴-نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ | ۳۲ |
| شکل۳-۴- مراحل آماده سازی نمونه‌های ماهی برای آنالیز ۴-نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ | ۳۴ |
| شکل۳-۵- روش اندازه‌گیری چربی در بافت | ۳۵ |
| شکل۳-۵- پاک‌سازی نمونه‌های عضله | ۳۶ |
| شکل۳-۶- آماده‌سازی نمونه‌های کبد جهت اندازه‌گیری ۴-نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ | ۳۷ |
| شکل ۳-۷- دیاگرام شماتیک تیمارهای کپور ماهی | ۴۰ |
| شکل۳-۸- مراحل کار براساس پروتکل الایزا | ۴۱ |
| شکل ۴-۱- کروماتوگرام ۴- نونیل‌فنل نمونه‌های رسوبات سطحی تالاب انزلی | ۴۵ |
| شکل۴-۲- میانگین میزان ۴- نونیل‌فنل در رسوبات تالاب انزلی | ۴۶ |
| شکل۴-۳- کروماتوگرام بیس‌فنل‌آ نمونه‌های رسوبات سطحی تالاب انزلی | ۴۷ |
| شکل ۴-۴- میانگین میزان بیس‌فنل‌آ در رسوبات تالاب انزلی | ۴۸ |
| شکل ۴-۵- مقایسه بین میزان ۴- نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ در ایستگاه‌های نمونه‌برداری | ۴۸ |
| شکل۴-۶- همبستگی بین غلظت، الف) نونیل‌فنل و ب) بیس‌فنل‌آ و کربن آلی کل(TOC) در نمونه‌های رسوبات سطحی تالاب انزلی | ۵۰ |
| شکل۴-۷- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای میزان کل کربن آلی ، میزان نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ در رسوبات تالاب انزلی | ۵۲ |
| شکل۴-۸- میانگین غلظت ۴- نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ در عضله کپور ماهی | ۵۳ |
| شکل ۴-۹- کروماتوگرام مایع نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ در کبد ماهی کپور | ۵۴ |
| شکل۴-۱۰- میانگین غلظت ۴- نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ در کبد کپور ماهی | ۵۴ |
| شکل۴-۱۱- مقایسه میانگین غلظت ۴- نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ در کبد و عضله کپور ماهی | ۵۵ |
| شکل ۴-۱۲- همبستگی بین غلظت، الف) ۴-نونیل‌فنل و ب) بیس‌فنل‌آ باچربی، درعضله نمونه‌های کپور ماهی تالاب انزلی | ۵۶ |
| شکل ۴-۱۳- میانگین غلظت ویتلوژنین در کپور ماهی در معرض ۱۷بتا استرادیول | ۵۸ |

| عنوان | صفحه |
|---|---|
| شکل ۴-۱۴- میانگین غلظت ویتلوژنین در کپور ماهی در معرض مقادیر مختف ۴- نونیل‌فنل | ۵۹ |
| شکل ۴-۱۵- میانگین غلظت ویتلوژنین در کپور ماهی در معرض مقادیر مختف ۴- نونیل‌فنل | ۶۰ |
| شکل ۴-۱۶- مقایسه تیمارهای مختلف تزریق۴- نونیل‌فنل، بیس‌فنل‌آ و مخلوط دو ترکیب اخیر | ۶۰ |
| شکل ۴-۱۷- مقایسه میزان ترشح ویتلوژنین در تیمارهای مختلف نسبت به گروه کنترل منفی | ۶۱ |
| شکل ۴-۱۸- رابطه بین میزان تزریق الف) ۴- نونیل‌فنل و ب) بیس‌فنل‌آ با ترشح ویتلوژنین | ۶۲ |

# پیوست‌ها

**عنوان** **صفحه**


**شکل ۱- کروماتوگرام و اسپکتروم استاندارد ppm۱ ترکیب ۴- نونیل‌فنل** **۸۶**

**شکل ۲- کروماتوگرام و اسپکتروم استاندارد ppm۱ ترکیب ۴- نونیل‌فنل، استاندارد داخلی و استاندارد جانشینی** **۸۷**

**شکل ۳- کروماتوگرام و اسپکتروم استاندارد ppm۱ ترکیب بیس‌فنل‌آ** **۸۸**

**شکل ۴- کروماتوگرام و اسپکتروم استاندارد ppm۱ ترکیب بیس‌فنل‌آ، استاندارد داخلی و استاندارد جانشینی** **۸۹**

**مراحل محاسبه غلظت ترکیبات ۴-نونیل‌فنل وبیس فنل آ در GC-MS و میزان بازیابی آنها** **۹۰**

**نحوه محاسبه LOD برای ترکیب بیس‌فنل‌آ** **۹۱**

**جدول ۱- همبستگی غلظت نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ در رسوبات با کربن آلی کل (TOC) در رسوبات سطحی** **۹۲**

**جدول ۲- همبستگی غلظت نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ در عضله با میزان لیپید (Lipid) در کپور ماهی** **۹۳**

**جدول ۳- همبستگی ترکیبات ۴- نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ در عضله و کبد کپور ماهی (*Cyprinus carpio*) تالاب انزلی** **۹۴**

**جدول ۴- همبستگی بین میزان تزریق ۴- نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ و ترشح ویتلوژنتن** **۹۵**

# فصل اول

## مقدمه

**۱-۱- مقدمه**

در جهان امروز انسان مهمترین عامل در حفاظت و تخریب محیط زیست محسوب می‌شود، چرا که اکثر آلاینده‌ها در اثر فعالیت انسان‌ها پدید می‌آیند و از همراهان دائمی جوامع بشری می‌باشند. گروه مهمی از این آلاینده‌ها، مواد شیمیایی هستند که توانایی ایجاد اثرات منفی در سیستم غدد درون ریز انسان‌ها و حیات وحش را دارند و تحت عنوان (EDCs)[1] به میزان زیاد وارد محیط زیست می‌شوند. سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا[2] این دسته از مواد را عوامل بیرونی می‌داند که در سنتز، دفع، جابجایی، اتصال، فعالیت یا حذف هورمون‌های طبیعی موجود زنده که مسئول حفظ و نگهداری، هموستازی، تولید مثل، رشد و رفتارهای آنها می‌باشند، دخالت می‌کنند (USEPA p.1، ۱۹۹۷).

با افزایش جمعیت و پیشرفت تکنولوژی، (EDCs) بطور گسترده‌ای درطبیعت، به ویژه در اکوسیستم‌های آبی وارد شده‌اند. این در حالی است که بسیاری از آنها در محیط زیست، پایدار وغیر قابل تجزیه می‌باشند (Porte و همکاران، ۲۰۰۶). این مواد که به طور طبیعی و مصنوعی ساخته می‌شوند (Neubert و همکاران، ۲۰۰۵)، اکثراً در بدن موجوداتی که در معرض آلودگی هستند، شبیه هورمون‌های استروژنی عمل می‌کنند، بهمین دلیل نام دیگر آنها، ترکیبات شبه استروژنی[3] می‌باشد. مطابق با مطالعات Soto و همکاران در سال ۱۹۹۵، EDCs می‌توانند عملکردهای زیر را در بدن موجود زنده داشته باشند:

- با تقلید عملکرد هورمون‌های استروئیدی جنسی استروژن و آندروژن، به گیرنده‌های آنها متصل شوند.
- با وصل شدن به گیرنده هورمون‌ها، اتصال هورمون‌ها را بلوکه کرده و باعث تغییر یا مانع اتصال هورمون‌ها می‌شوند.

[1] Endocrine Disrupting Chemical
[2] EPA (Environment Protection Agency)
[3] Xenoestrogens and Pseudoestrogens

- تولید و تفکیک هورمون های طبیعی را تغییر می‌دهند.

در حالت کلی با توجه به عملکرد EDCs ، محققین ترکیبات استروژنیک را در گروه‌های زیر طبقه بندی می‌نمایند (Matozzo و همکاران، ۲۰۰۸):

**استروژن های استروئیدی**: که شامل استروژن های طبیعی (استرون (E1[۱])، استرادیول (E2[۲])، و استریول (E3[۳])) و استروئید های مصنوعی (اتینیل استرادیول (EE2[۴])، مزترانول (MES[۵])) می‌باشند.

**ترکیبات مصنوعی استروژنی غیر استروئیدی**: که شامل نونیل‌فنل (NP [۶])، نونیل‌فنل اتوکسیلات‌ها (NPEs[۷])، اکتیل‌فنل‌ها (OP [۸])، اکتیل‌فنل اتوکسیلات‌ها (OPEs[۹])، بنزوفنون (BP [۱۰])، بیس‌فنل‌آ (BPA[۱۱]) می‌باشند.

**فیتو استروژن‌ها**: جنیستئین، فلاونوئید و کومسترول

**حشره کش‌ها:** اندوسولفان، د.د.ت، دیلدرین، آلاکلر، آترازین، نیتروفن، توکسافون

**ترکیبات پلی‌کلره بی‌فنیل** (PCBs[۱۲])

**پلاستیسیزرها:** فتالات‌ها

**فلزات:** جیوه، کادمیم و سرب.

[1] Estron
[2] Esteradiol
[3] Estriol
[4] Ethinyl Estradiol
[5] Mesteranol
[6] Nonylphenol
[7] Nonylphenol Ethoxylates
[8] Octhylphenol
[9] Octhylphenol Ethoxylates
[10] Benzo Phenone
[11] Bisphenol A
[12] Poly Chlorinated BiphenylS

در این میان نونیل‌فنل از مشتقات آلکیل‌فنل‌ها و بیس‌فنل از ترکیبات آلی می‌باشند که با توجه به عملکرد شبه استروژنی خود در گروه ترکیبات مصنوعی استروژنی غیر استروئیدی جای دارند و جزء ترکیبات زنوبیوتیک[1] می‌باشند.

نونیل‌فنل بصورت مایعی زرد رنگ و چسبناک است که دارای وزن مولکولی ۲۲۰g/mol و وزن مخصوص ۰/۹۳۵ g/ml در ۲۰°C می‌باشد، این ترکیب آب‌گریز ($\log K_{ow}$ بین ۳/۸ تا ۴/۸) بوده و حلالیت آن وابسته به دما و PH است (Vazquez-Duhalt و همکاران، ۲۰۰۵). بیشترین میزان الکیل‌فنل‌ها در کارخانجات غیر یونی سورفکتانت‌ها[2] مورد استفاده قرار می‌گیرند، بطوریکه ۸۰٪ نونیل‌فنل‌ها، ناشی از شوینده‌هایی است که در همه جا از خانه‌ها تا کارخانجات مورد استفاده قرار می‌گیرند. کاربردهای دیگر نونیل‌فنل در اپوکسی رزین‌ها، ماده حد واسط پلی وینیل کلرایدها، صنایع پلیمری، داروسازی، مواد رنگی، حشره کش‌ها، باکتری کش‌ها، تثبیت کننده‌های شیمیایی، صنایع چرم، بازدارنده‌های خورندگی، شناور سازی کانه، و همراه کلسیم در روغن‌های موتور و پراکنده کننده‌های جریان هیدرولیک می‌باشد (Vazquez-Duhalt و همکاران، ۲۰۰۵).

اولین بار نونیل‌فنل در سال ۱۹۴۰ ساخته شد (Manzano و همکاران، ۱۹۹۸) اما در طی زمان کاربرد این ترکیب به صورت نمایی افزایش یافت به طوریکه امروزه تولید سالانه آن در آمریکا ۱۵۴۰۰۰ تن (Ahel،۱۹۹۳)، در اروپا ۷۳۵۰۰ تن ( Helcom، ۲۰۰۲)، در ژاپن ۱۶۵۰۰ تن (JME، ۲۰۰۱) و در چین ۱۶۰۰۰ تن (Ahel، ۱۹۹۳) می‌باشد. اولین نگرانی‌ها در مورد این ترکیب در سال ۱۹۸۳-۱۹۸۴ پدیدار شد؛ هنگامی که Giger و همکارانش در سوئیس متوجه شدند نونیل‌فنل اتوکسیلات‌ها در محیط‌های آبی به مواد سمی‌تری تبدیل و قادر به تحریک و تکثیر سلول‌های تومور سینه می‌شوند. به‌عنوان یک نکته مهم، نونیل‌فنل اتوکسیلات به منومر سازنده خود یعنی نونیل‌فنل تبدیل شده و شباهت ساختاری آن با ۱۷ بتا استرادیول باعث شده تا این ترکیب در بدن موجود

[1] Xenobiotic
[2] Surfactant

مانند استروژن عمل نموده و حتی در اتصال به گیرنده‌های آن با ۱۷ بتا استرادیول[1] رقابت نماید (White و همکاران، ۱۹۹۴; Lee و Lee، ۱۹۹۶). به‌علاوه از میان ایزومرهای نونیل‌فنل، آستانه خطرسازی پارانونیل‌فنل (۴- نونیل‌فنل) در بیشـــترین سطح قرار دارد (۵ µg/l). مطالعات نشان می‌دهد این ترکیب در برگیرنده ۸۵٪ ایزومرهای نونیل‌فنل است که به علت ساختار شیمیایی خود بیشترین اثرات سمی و آسیب رسانندگی در غدد داخلی نیز از آن گزارش شده است (Servos و همکاران، ۱۹۹۹).

بیس‌فنل‌آ نیز محصول واکنش تراکمی دو مول فنل و یک مول استون در مجاورت اسید سولفوریک غلیظ می‌باشـــد. این ترکیب دارای وزن مولکولی ۲۲۸/۲۹ g/mol و وزن مخصوص ۱/۲۰ $g/cm^3$ در ۲۰°C است، حلالیت این ترکیب در آب ۱۲۰ ppm-۳۰۰ است. بیس‌فنل‌آ، غالبا" به عنوان مونومر حد واسط و یا افزودنی در پلاستیک‌ها (پلی کربنات‌ها) ورزین‌های اپوکسی (برای مثال در مواد پوشاننده دندان در دندانپزشکی و لاک الکل کنسروهای غذا، بسته بندی‌های مواد غذایی و نوشیدنی‌ها) مورد استفاده قرار می‌گیرد ( Benjonathan و Steinmetz، ۱۹۹۸). تحقیقات نشان می‌دهد در سال ۱۹۹۳ تولید جهانی بیس‌فنل‌آ به ۶۴۰۰۰۰ تن رسیده که از این مقدار۰/۰۱۷ درصد (تقریبا ۱۰۹ تن) در محیط آزاد شده است (Hohenblum و همکاران،۲۰۰۴).

اولین بار در ۱۹۳۶ لاوسون و دوبا متوجه شدند ترکیبات دو حلقه‌ای بیس‌فنل‌آ رشد رحم را در موش تحریک می‌نماید، اما تا سال ۱۹۹۸ بیس‌فنل‌آ بعنوان یک ماده شیمیائی کم خطر با سمیتی به مراتب کمتر از فنل ارزیابی می‌شد. در این سال با تحقیقات وسیعی که صورت گرفت، مشخص گردید این ترکیب بر هورمون‌های تولید مثلی اثرات نامطلوبی دارد و باعث از کار افتادگی، تکثیر بی رویه و یا تغییرات غیر قابل پیش‌بینی دیگری در آنها می‌گردد، لذا از اواخر سال ۱۹۹۸ این ترکیب در فهرست مواد شیمیائی خطر آفرین طبقه بندی شد. بیس‌فنل‌آ یکی از اولین مواد شیمیایی کشف شده است که خاصیت شبیه سازی استروژنی دارد.

[1] 17β- Estradiol

از آنجا که امروزه مهمترین منشاء رهایی ترکیبات نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ در محیط زیست، فاضلاب‌های خانگی و کارخانجات، جریان‌های نهایی حاصل از تصفیه خانه‌های آب و ظروف پلاستیکی می‌باشد، این ترکیبات اکثرا" وارد اکوسیستم‌های آبی شده و حیات آبزیان و تغذیه کنندگان از آنها را در طول زنجیره غذایی در معرض خطر قرار می‌دهند.

غلظت های مختلف شناسایی شده این مواد در رودخانه‌های آلوده باعث افزایش مرگ ومیر، کاهش باروری، افزایش تولید تخم‌های ناتوان، رفتارهای استرسی، کاهش وزن، شیوع دو جنسیتی، تغییرات ظاهری، رشد غیر نرمال گنادها، کاهش بقا لاروها، تاخیر در ساکن شدن و تغییر نسبت جنسی به سمت جنس ماده (مؤنث سازی) می گردد (Vazquez-Duhalt و همکاران، ۲۰۰۵). همچنین بیشترین اثرات مخرب نونیل‌فنل و بیس‌فنل‌آ در سیستم غدد درون ریز حیات وحش مهره‌دار شامل: تحریک و اثرات آنتاگونیستی بر هورمون‌های استروئیدی جنسی، تغییر عملکرد آنزیم C -P450، اثر بر عملکرد هورمون تیرویید و مکانیزم کنترل سیستم عصبی در پاسخگویی به استرس می‌باشد ( Dawson و Pottinger، ۱۹۹۹).

در سالهای اخیر روش‌های سلولی و مولکولی جدید محققین را قادر ساخته تا بتوانند نحوه عملکرد هورمون‌های طبیعی تولید مثلی و عوامل مخرب غدد درون ریز مثل استروژن‌های سنتزی و استروژن‌های آنتروپوژنیک را مورد مطالعه قرار دهند ( Huggett و همکاران، ۱۹۹۲). جهت بررسی اثرات نونیل‌فنل روش های ارزیابی بیولوژیک (BBAs[1]) و کاربرد زیست نشانگرها از جمله روش‌های کارا و مناسب می‌باشند (Chris و همکاران، ۲۰۰۶).

زیست نشانگر در واقع یک پاسخ بیولوژیکی است که در موجود زنده بعلت در معرض بودن با مواد آلاینده و تاثیرات آن ایجاد می‌شود (Henderson و همکاران، ۱۹۹۸; Timbrell و همکاران، ۱۹۹۴; Stevens و همکاران، ۱۹۹۱). زیست نشانگر، اطلاعات کیفی و شبه‌کیفی درمورد طبیعت ماده شیمیایی و دانستنی‌هایی در مورد ارتباط تاثیرات بیولوژیک ومیزان آلودگی‌های محیطی فراهم

[1] Biologically Based Assay