

Odessa bay. During the year, the conditionally clean water area of the Odessa coastal zone was the area of the cape Maly Fontan, and in the autumn - the beach "Arcadia" (most probably due to the absence of influence of significant recreation in this season of observations). Some improvement of ecological situation was observed in autumn in the waters of Oil Terminal. In the area of Dutcha Kovalevskogo environmental condition of the marine environment during the year has not changed significantly. The most eutrophic were water area which adjacent to the sanatorium named after Chkalov (located in Odessa) and Grigorievsky estuary.

Key words: bioindication, quality, marine environment, Odessa coastal zone, Grigorievsky estuary, microphytobentos

Рекомендує до друку

Надійшла 17.02.2017

В. В. Грубінко

УДК 597.2/.5:632.951

М. О. САВЛУЧИНСЬКА, І. М. КОНОВЕЦЬ, О. М. АРСАН, М. Г. МАРДАРЕВИЧ

Інститут гідробіології НАН України,
пр-т Героїв Сталінграда, 12, Київ, 04210

ОСОБЛИВОСТІ ЕНЕРГОЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ПРОЦЕСІВ АДАПТАЦІЇ РИБ ДО РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ФІПРОНІЛУ ТА ДИМЕТОАТУ У ВОДНОМУ СЕРЕДОВИЩІ

Викладено результати досліджень щодо впливу диметоату в концентраціях 0,15; 0,3 і 0,45 мг/дм³ та фіпронілу 0,05; 0,075 і 0,1 мг/дм³ у водному середовищі на коропа *Cyprinus carpio* L. при експозиції 14 діб. Встановлено, що фіпроніл має більшу здатність до накопичення тканинами риб, ніж диметоат. Зі збільшенням концентрації фіпронілу у воді від 0,05 до 0,1 мг/дм³ його вміст у печінці становив 0,9 і 2,0 мкг/г сирової маси відповідно. У значно меншій кількості він накопичувався в зябрах (0,6 і 1,0 сирової маси). Найменше фіпронілу депонувалося у м'язах від (0,3 і 0,45 мкг/г). Зі зростанням концентрації диметоату у воді від 0,15 до 0,45 мг/дм³ він накопичувався в тканинах риб у порівняно меншій кількості, зокрема від <0,1 (границя кількісного визначення) до 1,0 мкг/г у печінці та від <0,1 до 0,20 мкг/г – у зябрах, і не знайдений у м'язах. Зі зміною концентрації диметоату та фіпронілу у водному середовищі змінюються шляхи генерування енергії у тканинах риб. При цьому у печінці знижувався рівень пірувату з 8,6 (контроль) до 6,2 та 8,6 до 3,3 мкмоль/100 г відповідно, та зростав вміст лактату з 2,4 (контроль) до 5,9 і 3,3 мкмоль/г відповідно. Разом з цим знижувалося співвідношення вільних НАД-пар з 400 (контроль) до 120 та 51 відповідно. Отримані результати свідчать, що енергозабезпечення адаптації риб до таких умов здійснюються за рахунок гліколізу. На відміну від печінки, у зябрах активуються як аеробні, так і анаеробні процеси. При адаптації риб до диметоату і фіпронілу в зябрах збільшується вміст пірувату на 22 і 83%, та лактату на 126 і 153% відповідно.

Ключові слова: диметоат, фіпроніл, накопичення, піруват, лактат, співвідношення вільних НАД-пар, печінка, зябра, м'язи, короп

Диметоат і фіпроніл належать до високоефективних інсектицидів з широким спектром дії, які використовуються для боротьби зі шкідниками сільськогосподарських культур. Механізм їх дії має дещо спільні риси і полягає в порушенні функціонування центральної нервової системи організмів-мішеней. Однак, диметоат належить до групи фосфорорганічних речовин, для яких характерна висока початкова токсичність та мала стійкість. Тоді як фіпроніл – хлорорганічна речовина з високою токсичністю та стійкістю у оточуючому середовищі. Широке

використання цих речовин у сільському господарстві обумовлене, з одного боку, їх високою ефективністю, а з іншого – низькою токсичністю для ссавців та птахів. До значних недоліків цих речовин слід віднести високу токсичність для водяних організмів, включно риб [2]. Величина LC_{50} фіпронілу для риб (радужна форель) становить $0,25 \text{ мг/дм}^3$, а диметоату – $30,2 \text{ мг/дм}^3$ [12]. Потрапляючи у воду, вони швидко перерозподіляються між водою та донними відкладами. На відміну від наземних тварин, для яких основним шляхом надходження хлор- та фосфорорганічних речовин є трофічний, для гідробіонтів важливе значення має постійний контакт з забрудненою водою.

Метою нашої роботи було дослідження особливостей накопичення диметоату і фіпронілу та їх впливу на процеси енергозабезпечення в тканинах коропа (зябра, печінка, м'язи).

Матеріал і методи досліджень

Для вирішення поставлених завдань проводили модельні дослідження. Об'єктом досліджень слугували дволітки коропа (*Cyprinus carpio* L.) масою 250–300 г, вирощені на Білоцерківській експериментальній гідробіологічній станції Інституту гідробіології НАН України.

Риб протягом місяця утримували у басейні об'ємом 1 м^3 і годували гранульованим комбікормом К-III-10. При постановці експерименту 5 екземплярів риб поміщали у 100-літрові акваріуми з відстояною водопровідною водою, концентрацію розчиненого кисню підтримували на рівні $5,8\text{--}6,4 \text{ мг/дм}^3$, температура води складала $21 \pm 1^\circ\text{C}$, рН – $7,4\text{--}7,7$ од.

Вплив на риб фіпронілу досліджували в концентраціях $0,050$; $0,075$ та $0,100 \text{ мг/дм}^3$, диметоату – $0,15$; $0,30$ та $0,45 \text{ мг/дм}^3$. Період експозиції становив 14 діб. З метою запобігання впливу на риб власних екзометаболітів і для підтримки постійної концентрації фіпронілу та диметоату воду в акваріумах змінювали що два дні з додаванням відповідної кількості цих речовин.

Визначення вмісту пірувату та лактату в тканинах риб проводили згідно методу [10]. Величину $[\text{НАД}^+] / [\text{НАДН}]$ в цитоплазмі клітин тканин розраховували за формулою

$$[\text{НАД}^+] / [\text{НАДН}] = 1 / K_{\text{лдг}} * [\text{піруват}] / [\text{лактат}],$$

де $K_{\text{лдг}}$ – константа лактатдегідрогеназної системи, яка становить $0,9 \times 10^{-4}$ [1].

Вміст фіпронілу та диметоату в тканинах риб визначали методом високоефективної рідинної хроматографії–мас-спектрометрії (Agilent 1200 MSD 6130). Екстракцію фіпронілу та диметоату з тканин риб проводили етилацетатом, після його випаровування під током азоту твердий залишок перерозчиняли в $0,1 \text{ см}^3$ метанолу. Хроматографічне розділення проводили на колонці Zorb Eclipse C18 у градієнті вода-ацетонітрил з додаванням $0,1\%$ мурашиної кислоти. Мас-спектрометричну детекцію проводили у режимі SIM, іонізація ESI. Реєстрували йони $-434,7$ та $+230,1$ а.о.м. для фіпронілу та диметоату відповідно.

Отримані результати досліджень оброблено статистично з використанням t-критерію Стьюдента [5].

Результати досліджень та їх обговорення

Встановлено, що залежно від типу тканин накопичення досліджуваних речовин та енергозабезпечення процесів адаптації риб здійснюються по-різному. Однак, зміни величин показників, які характеризують той чи інший шлях генерування енергії в тканинах риб, залежить, в першу чергу, від накопичення в них даних речовин.

Відомо, що фосфорорганічні речовини в організмі повністю, або в значній мірі зазнають метаболічних перетворень [13], що відзначається на складній динаміці їх вмісту у тканинах. При дослідженні накопичення диметоату в тканинах кларієвого сому *Clarias batrachus* у модельних дослідженнях встановлено, що найбільш інтенсивне його накопичення характерне для печінки [8].

У наших дослідженнях кількість диметоату в тканинах зростала пропорційно його кількості у воді у ряді м'язи < зябра < печінка (табл. 1).

Накопичення диметоату (мкг/г сирової ваги) в тканинах коропа ($\bar{X} \pm \sigma$, n=3)

Концентрація у воді, мг/дм ³	Печінка	Зябра	М'язи
Контроль	<0,10	<0,10	<0,10
0,15	<0,10	<0,10	<0,10
0,30	0,39±0,06	<0,10	<0,10
0,45	0,99±0,26	0,20±0,04	<0,10

Аналіз вмісту фіпронілу в тканинах показав, що він володіє високою кумулятивною здатністю і у значних кількостях накопичується в досліджуваних тканинах риб (табл. 2). При цьому зі збільшенням концентрації фіпронілу у воді від 0,050 до 0,100 мг/дм³ зростає його накопичення в організмі коропа, а найбільшою кумулятивною здатністю володіє печінка. Крім того, про значне і швидке накопичення фіпронілу молоддю райдужної форелі вказано в роботі [11].

Таблиця 2

Накопичення фіпронілу (мкг/г сирової ваги) в тканинах коропа ($\bar{X} \pm \sigma$, n=3)

Концентрація у воді, мг/дм ³	Печінка	Зябра	М'язи
Контроль	<0,05	<0,05	<0,05
0,050	0,90±0,19	0,56±0,06	0,26±0,02
0,075	1,01±0,07	0,71±0,09	0,32±0,02
0,100	1,99±0,27	1,03±0,09	0,45±0,01

Результати наших досліджень підтверджують дані фахової літератури про те, що здатність до матеріальної кумуляції фосфоорганічних речовин виражена менше, ніж у хлорорганічних. Однак, перші володіють функціональною кумуляцією і тому можуть викликати хронічні отруєння риб.

Вплив диметоату та фіпронілу на тканини різних органів риб має певні особливості. Спостерігаються зміни у проникності біомембран, що полягають у зниженні їх стійкості до дії цих речовин. Це відбувається внаслідок зменшення кількості субстратів енергетичного обміну, таких як АТФ, АДФ і АМФ, особливо в печінці риб [4].

Встановлено, що з підвищенням концентрації диметоату та фіпронілу у воді змінюється вміст пірувату та лактату в тканинах риб. Так, з підвищенням концентрації диметоату у воді в печінці риб значно знижувався рівень пірувату, а вміст лактату зростав (табл. 3).

Таблиця 3

Вплив диметоату на вміст пірувату (мкмоль/100 г), лактату (мкмоль/г) та співвідношення вільних НАД-пар в тканинах коропа ($\bar{X} \pm \sigma$, n=3)

Концентрація у воді, мг/дм ³	Піруват	Лактат	[НАД ⁺]/[НАДН]
печінка			
Контроль	8,63±0,23	2,43±0,23	400±0,31
0,15	7,37±0,22*	3,23±0,23	257±0,16*
0,30	6,82±0,19*	4,64±0,11*	163±0,09*
0,45	6,17±0,19*	5,87±0,12*	120±0,06*
зябра			
Контроль	3,68±0,22	2,29±0,14	178±0,002
0,15	4,85±0,17*	3,02±0,11*	188±0,08
0,30	5,20±0,30*	4,21±0,19*	141±0,05*
0,45	4,50±0,35	5,18±0,18*	99±0,12*

тут і далі: * – різниця середніх величин дослідів і контролю статистично вірогідна, $p \leq 0,05$.

При цьому за дії 0,15, 0,30 та 0,45 мг/дм³ диметоату вміст пірувату знижувався відповідно на 15, 21 та 29% відносно контролю, тоді як вміст лактату в печінці риб за дії 0,30 мг/дм³ диметоату підвищувався на 92% порівняно з контролем, а за дії 0,45 мг/дм³ – на 143%. Співвідношення вільних НАД-пар в цій тканині з підвищенням концентрації вірогідно зменшувався на 36, 59 та 70%. Цей факт дає підставу стверджувати, що в печінці риб з підвищенням концентрації диметоату у воді головним шляхом генерування енергії в його організмі стає гліколіз.

Про перехід організму риб на анаеробний шлях енергозабезпечення свідчать дані [9]. В роботах [3, 6, 7] також відмічено зростання вмісту лактату та активності лактатдегідрогенази в умовах дії фосфорорганічних сполук.

Виникнення лактатного ацидозу та активація процесів гліколізу спостерігалась і в зябрах риб (табл. 3). Концентрація лактату в зябрах коропа зростала на 32% вже при найнижчій з досліджуваних концентрацій диметоату у воді (0,15 мг/дм³). Дія решти концентрацій призводила до ще більших змін, зумовлюючи збільшення лактату на 84 та 126%. Незважаючи на те, що вміст пірувату у цій тканині зростав на 32, 41 та 22%, співвідношення вільних НАД-пар знизилось на 21 та 57% при дії 0,30 та 0,45 мг/дм³ диметоату. Це свідчить про активування як аеробних, так і анаеробних процесів в зябрах коропа, та зниження окиснювальної здатності цитоплазми клітин в цій тканині риб.

Вплив хлорорганічної речовини фіпронілу на організм риб та шляхи генерування енергії в тканинах за цих умов мають свої особливості. Енергозабезпечення роботи печінки за дії вказаних концентрацій фіпронілу, в основному, відбувається за рахунок гліколітичних процесів. Відбувалося зростання вмісту лактату (на 86, 153, 34%) та зниження вмісту пірувату (на 24, 46, 62%) в печінці коропа за дії досліджуваних концентрацій (табл. 4).

Таблиця 4

Вплив фіпронілу на вміст пірувату (мкмоль/100 г), лактату (мкмоль/г) та співвідношення вільних НАД-пар в тканинах коропа ($\bar{X} \pm \sigma, n=3$)

Концентрація у воді, мг/дм ³	Піруват	Лактат	[НАД ⁺]/[НАДН]
печінка			
Контроль	8,63±0,23	2,43±0,23	401±0,31
0,050	6,59±0,17*	4,53±0,19*	162±0,08*
0,075	4,68±0,30*	6,15±0,19*	84±0,03*
0,100	3,29±0,17*	3,29±0,17*	51±0,02*
зябра			
Контроль	3,68±0,22	2,29±0,14	178±0,002
0,050	5,42±0,22*	3,91±0,14*	155±0,12
0,075	6,72±0,22*	5,80±0,13*	128±0,01*

Ці зміни зумовлюють зниження співвідношення вільних НАД-пар, що вказує на зменшення енергозабезпечення процесу адаптації риб за дії фіпронілу у воді. Відмічений факт дає підставу стверджувати, що головним шляхом генерування енергії в організмі коропа стає гліколіз. Можливість генерування енергії гліколітичним шляхом забезпечує умови для підтримання життєдіяльності водяних тварин до змін екологічних умов середовища, коли окремі ферментативні ланки тканинного дихання пригнічені.

Натомість в зябрах риб за дії фіпронілу в концентрації 0,050 мг/дм³ вміст як лактату, так і пірувату зростав відповідно на 7 та 47% відносно контролю (табл. 4). При цьому співвідношення вільних НАД-пар не змінювалось. Подібна картина в зябрах риб виявлена і за дії 0,075 мг/дм³ фіпронілу у воді. Вміст пірувату та лактату зростав на 83% та 153% від контролю. В той же час, співвідношення вільних НАД-пар вірогідно знижувалось на 28%. Це вказує, на одночасне активування як аеробних процесів, так і процесів гліколізу в зябрах риб. При цьому процеси гліколізу протікають інтенсивніше.

Висновки

Фіпроніл володіє значною органоспецифічною кумулятивною здатністю. Він накопичується в усіх органах риб і цей процес знаходиться в прямій залежності від його концентрації у воді. Натомість диметоат в тканинах риб накопичується у меншій мірі.

За дії досліджуваних концентрацій у воді диметоату та фіпронілу змінюється кількість субстратів енергетичного обміну, таких як піруват і лактат. Зменшення їх вмісту в печінці риб, вказує на переважання гліколітичних процесів, тоді як в зябрах відбувається активація як аеробних процесів, так і гліколізу.

Найдужче негативна дія фіпронілу і диметоату проявилась саме у печінці риб, органі який забезпечує процес детоксикації. Зміни субстратів енергетичного обміну спостерігаються як за дії диметоату, так і фіпронілу у воді. Однак саме за дії фіпронілу ці зміни носять глибший характер, що можна пояснити здатністю до накопичення в тканинах риб.

1. *Великий Н. Н.* Роль окислительно-восстановительного состояния никотинамидных коферментов в регуляции клеточного метаболизма / Н.Н. Великий, П.К. Пархомец // *Витамины.* — 1976. — № 9. — С. 3—15.
2. *Гдовский П. А.* Физиолого-биохимические механизмы действия хлорорганических соединений у водных животных (обзор) / П.А. Гдовский, Б.А. Флеров // *Гидробиол. журн.* — 1979. — Т. 15, № 6. — С. 76—85.
3. *Горбатюк Л. О.* Енергозабезпечення організму риб за дії пестицидів (огляд) / Л.О. Горбатюк // *Гидробиол. журн.* — 2012. — Т. 48, № 5. — С. 82—96.
4. *Миронюк М. О.* Особливості енергозабезпечення організму коропа в умовах забруднення водного середовища хлор- та фосфорорганічними речовинами / М.О. Миронюк, О.М. Арсан. *Водні біоресурси та аквакультура* [За ред. І. І. Грициняка, М. В. Гринжевського, О. М. Третьяка.] — К.: ДІА, 2010. — С. 303—305.
5. *Лакин Г. Ф.* Биометрия / Г.Ф. Лакин. — М.: Высшая школа, 1990. — 351 с.
6. *Begum G.* Carbohydrate metabolism in hepatic tissue of freshwater catfish *Clarias batrachus* L. during dimethoate exposure / G. Begum, S. Vijayaraghavan // *Food and Chem. Toxicol.* — 1995. — Vol. 33, No 5. — P. 423—426.
7. *Begum G.* Effect of acute exposure of the organophosphate in insecticide Rogor on some biochemical aspects of *Clarias batrachus* (Linnaeus) / G. Begum, S. Vijayaraghavan // *Environ. Res.* — 1999. Vol. 80, No 1. — P. 80—83.
8. *Begum G.* Study of dimethoate bioaccumulation in liver and muscle tissues of *Clarias batrachus* and its elimination following cessation of exposure / [G. Begum, S. Vijayaraghavan, N. Sarma, S. Husain.] // *Pesticide Science.* — 1994. — Vol. 40, No 3. — P. 201—205.
9. *Borah S.* Effect of rogor (30% w/w dimethoate) on the activity of lactate dehydrogenase, acid and alkaline phosphatase in muscle and gill of a fresh water fish, *Heteropneustes fossilis* / S. Borah, R. N. S. Yadav // *J. of Environ. Biol.* — 1996. Vol. 17, No 4. — P. 279—283.
10. *Hohorst H. J.* Determination with lactic dehydrogenase and DPN / H.J. Hohorst // *Methods of enzymatic analysis.* — Weinheim: Chemie, 1963. — P. 266—270.
11. *Konwick B. J.* Acute enantioselective toxicity of *fipronil* and its desulfinyl photoproduct to *Ceriodaphnia dubia* / [B.J. Konwick, A.T. Fisk, A.W. Garrison et al.] // *Environ. Toxicol. Chem.* — 2005. — Vol. 24, No 9. — P. 2350—2355.
12. *Pesticide Properties Data Base* [Електронний ресурс] — Режим доступу до бази: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb>
13. *The pesticides Manuel.* 10-th Edition. — Crop Protection publ., 1994. — 1341 p.

О. М. Савлущинская, И. Н. Коновец, О. М. Арсан, М. Г. Мардаревич

Институт гидробиологии НАН Украины

ОСОБЕННОСТИ ЭНЕРГООБЕСПЕЧЕНИЯ ПРОЦЕССОВ АДАПТАЦИИ РЫБ К РАЗНЫМ КОНЦЕНТРАЦИЯМ ФИПРОНИЛА И ДИМЕТОАТА В ВОДНОЙ СРЕДЕ

Представлены результаты исследований влияния диметоата в концентрациях 0,15; 0,3 и 0,45 мг/дм³ и фипронила 0,05; 0,075 и 0,1 мг/дм³ в водной среде на карпа *Syrpinus carpio* L. при экспозиции 14 суток. Установлено, что фипронил имеет большую способность к накоплению тканями рыб, чем диметоат. С увеличением концентрации фипронила в воде от 0,05 до 0,1 мг/дм³ его содержание в печени составило 0,9 и 2,0 мкг/г сырой массы соответственно. В

значительно меньшем количестве он накапливался в жабрах (0,6 и 1,0 сырой массы). Меньше всего фипронила депонировалось в мышцах от (0,3 и 0,45 мкг/г). С ростом концентрации диметоата в воде от 0,15 до 0,45 мг/дм³ он накапливался в тканях рыб в сравнительно меньшем количестве, в частности от <0,1 (предел количественного определения) до 1,0 мкг/г в печени и от <0,1 до 0,20 мкг/г – в жабрах, и не найден в мышцах. С изменением концентрации диметоата и фипронила в водной среде меняются пути генерирования энергии в тканях рыб. При этом в печени уменьшался уровень пирувата с 8,6 (контроль) до 6,2 и 8,6 до 3,3 мкмоль/100 г соответственно, и возрастало количество лактата с 2,4 (контроль) до 5,9 и 3,3 мкмоль/г соответственно. Вместе с этим уменьшалось соотношение свободных НАД-пар с 400 (контроль) до 120 та 51 соответственно. Полученные результаты свидетельствуют, что энергообеспечение адаптации рыб в таких условиях осуществляются за счет гликолиза. В отличие от печени, в жабрах активируются как аэробные, так и анаэробные процессы. При адаптации рыб к диметоату и фипронилу в жабрах увеличивается содержание пирувата на 22 и 83%, и лактата на 126 и 153% соответственно.

Ключевые слова: диметоат, фипронил, накопление, пируват, лактат, соотношение свободных НАД-пар, печень, жабры, мышцы, карп

M. O. Savluchynska, I. M. Konovets, O. M. Arsan, M. G. Mardarevych
Institute of Hydrobiology of NAS Ukraine

FEATURES OF ENERGY SUPPLY OF FISH ADAPTATION TO FIPRONIL AND DIMETHOATE

Results of the study of carp *Cyprinus carpio* L. 14-d exposure to dimethoate (0.15; 0.3 and 0.45 mg/L in water) and fipronil (0.05; 0.075 and 0.1 mg/L) are presented. Fipronil showed greater ability for accumulation in fish tissues in comparison with dimethoate. Increasing of fipronil concentration in water from 0.05 to 0.1 mg/L caused growing of its contents in a liver tissue from 0.9 to 2.0 mg/g (wet weight) respectively. Accumulation of fipronil in gill and muscle tissues was lower: 0.6–1.0 and 0.3–0.45 mg/g of wet weight respectively. At dimethoate concentration 0.15 and 0.45 mg/L in water its contents in liver tissue was <0.1 (LOQ) and 1.0 mg/g, in gill tissue – <0.1 and 0.2 mg/g, in muscle tissue – <0.1 mg/g.

Increasing of fipronil and dimethoate concentration in water altered energy metabolism pathways in the fish tissues. Under fipronil and dimethoate impact contents of pyruvate in the liver decreased from 8.6 (control) to 6.2 and 3.3 mM/100 g respectively, and lactate contents increased from 2.4 (control) to 5.9 and 2.4 to 3.3 mM/g respectively. Ratio of free NAD-pairs contents ([NAD]/[NADH]) decreased from 400 (control) to 120 (fipronil) and 51 units (dimethoate) at highest investigated concentrations in water. The results show that the glycolysis provides an energy required for fish adaptation to fipronil and dimethoate impact. In contrast to liver tissue, both aerobic and anaerobic processes were activated in the gill tissue. Pyruvate content in gill tissue during exposure of fish to dimethoate and fipronil increased on 22% and 83%, and lactate – on 126% and 153% respectively.

Keywords: dimethoate, fipronil, accumulation, pyruvate, lactate, free NAD-pairs ratio, liver, gills, muscle, carp

Рекомендує до друку
В. В. Грубінко

Надійшла 09.02.2017