

УДК 001.891.53:[504.054(665.61 + 543.383.2)](591.05:597.551.2)

*М. О. Миронюк, О. М. Арсан, В. О. Хоменчук***ВПЛИВ СИРОЇ НАФТИ І ДИЗПАЛИВА НА АКТИВНІСТЬ СУКЦИНАТДЕГІДРОГЕНАЗИ ТА ЦИТОХРОМОКСИДАЗИ В ОРГАНІЗМІ КОРОПА (CYPRINUS CARPIO L.)**

Досліджено вплив сирої нафти і дизпалива на активність сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази в тканинах риб. Встановлено, що під впливом дизпалива активність цих ферментів зростає, а за дії сирої нафти — знижується. Відмічено, що за однакової концентрації сира нафта є більш токсичною для енергетичного обміну риб.

Ключові слова: нафта, дизпаливо, сукцинатдегідрогеназа, цитохромоксидаза, цикл трикарбонових кислот, гліколіз, окисне фосфорилування, печінка, зябра, м'язи, риба.

Забруднення водних екосистем нафтою та її похідними (наприклад, дизпаливом) [1] зумовлює необхідність пошуку інформативних тестів для оцінки їх токсичності у природних водоймах. Слід зазначити, що основним компонентом нафти є вуглеводні, які поділяють на чотири класи (алкани, алкени, нафтени та ароматичні сполуки), а також їх похідні, що містять кисень, сірку та азот. Дизпаливо є продуктом переробки нафти, основними складовими якого є алкани та нафтени. Аналіз вітчизняної та зарубіжної літератури свідчить про відсутність єдиного погляду на токсичність різних фракцій нафти стосовно водяних організмів. Однак все ж переважає думка, що найтоксичнішою фракцією для організму тварин є ароматичні вуглеводні [9].

Кількісне визначення складових нафти у воді часто утруднене і дає можливість лише опосередковано встановити їх негативну дію на біоту, бо нафтові вуглеводні у водному середовищі зазнають хімічного перетворення та біодеградації, внаслідок чого утворюється широкий спектр речовин, токсичність яких залежить від низки зовнішніх чинників [5]. Разом з тим, дія нафтопродуктів впливає на метаболічні процеси в організмі водяних тварин, що може бути використано при моніторингу довкілля. Суттєву роль в адаптації організмів, включно і риб, до екстремальних умов відіграють ферменти енергетичного обміну [11, 12]. Регуляторними ферментами цього процесу є сукцинатдегідрогеназа (СДГ) і цитохромоксидаза (ЦО). У літературі [7, 8] наводяться результати дослідження впливу сирої нафти та дизпалива

© Миронюк М. О., Арсан О. М., Хоменчук В. О., 2011

на активність ферментів у тканинах риб. Метою роботи було порівняти особливості впливу цих речовин на активність СДГ і ЦО в організмі коропа.

Матеріал і методика досліджень. Об'єктом досліджень були дволітки коропа (*Cyprinus carpio* L.) масою 250—300 г, вирощені на Білоцерківській експериментальній гідробіологічній станції Інституту гідробіології НАН України.

До початку дослідів риб протягом місяця утримували у басейні об'ємом 1 м³ при температурі води 18—20°C. Вміст кисню у воді підтримували на рівні 5,8—6,4 мг/л. У цей період їх годували гранульованим рибним кормом К-III-10.

Для проведення дослідів риб поміщали в акваріуми з відстояною водопровідною водою з розрахунку 5 екз. на 100 л води, обладнані термо- та газорегуляторами для підтримання рівня гідрохімічних показників (вміст кисню — 5,8—6,4 мг/дм³, СО₂ — 2,2—2,8 мг/дм³, рН 7,7—7,9, температура — 20—22°C).

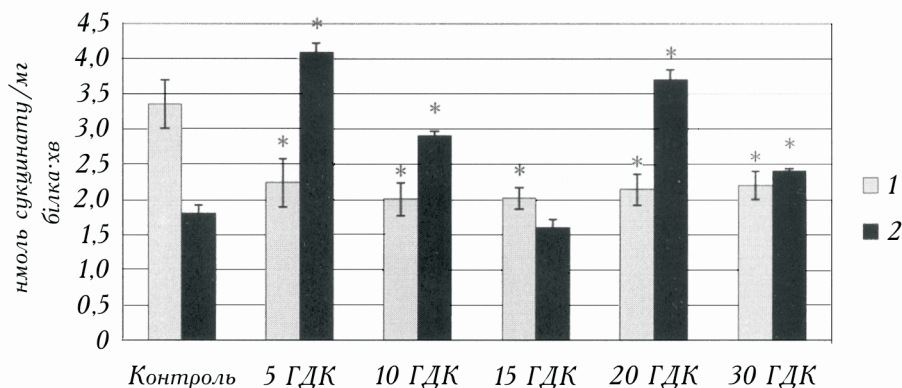
Було проведено дві серії дослідів. У першій вивчали вплив на коропа сирової нафти в концентрації 0,25, 0,50, 0,75, 1,00 та 1,5 мг/дм³, у другій — вплив дизпалива в такій же концентрації, що відповідало 5, 10, 15, 20 та 30 рибогосподарським ГДК [2]. Нафтопродукти вносили безпосередньо у воду, інтенсивно перемішуючи. Як контроль використовували досліджувані показники у тканинах риб, що перебували у воді акваріумів без додавання нафтопродуктів.

Тривалість дослідів становила 14 діб, що є достатнім для формування адаптивних механізмів до дії абіотичних чинників водного середовища [13]. З метою запобігання впливу на риб екзометаболітів і підтримання постійної концентрації нафтопродуктів, воду в акваріумах змінювали що два дні з додаванням відповідної кількості нафтопродуктів.

Активність СДГ визначали фероціанатним методом [10] та виражали у нмоль сукцинату/мг білка·хв. Активність ЦО визначали за методом У. Штрауса [14] і виражали в мкг індофенолу синього/мг білка·20 хв. Результати досліджень оброблено статистично з використанням t-критерію Стьюдента [6].

Результати досліджень та їх обговорення

Динаміка активності СДГ в печінці риб під впливом сирової нафти та дизпалива представлена на рис. 1. Отримані дані показали, що в печінці риб за дії сирової нафти в концентрації 5, 10, 15, 20 та 30 ГДК спостерігається значне зниження (відповідно на 33, 40, 40, 36 та 34%) активності СДГ, що свідчить про порушення окиснення сукцинату. Оскільки СДГ є ферментом циклу трикарбонових кислот (ЦТК), що окиснює бурштинову кислоту до фумарату, то можна стверджувати, що за дії вказаних величин концентрації сирової нафти відбувається зниження ролі ЦТК в обміні речовин та, можливо, активування гліколізу [3].



1. Активність сукцинатдегідрогенази в печінці коропа за дії сирої нафти (1) та дизпалива (2). Тут і на рис. 2—4: * зміни порівняно з контролем вірогідні ($P < 0,05$) ($M \pm m, n = 5$).

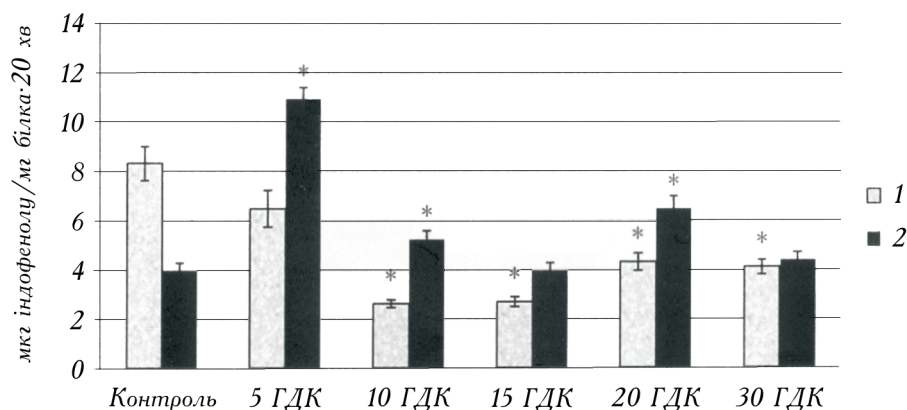
На відміну від СДГ, активність ЦО в печінці коропа під впливом 5 ГДК сирої нафти у воді не відрізняється від величини цього показника у контролі (рис. 2). Тому можна припустити, що ця концентрація сирої нафти не впливає на функціонування дихального ланцюга мітохондрій в печінці риб. Слід відзначити, що під впливом сирої нафти в концентрації 10, 15, 20 та 30 ГДК активність ЦО в печінці коропа зменшується відповідно на 69, 68, 52 та 49% порівняно з контролем (див. рис. 2). Це свідчить про пригнічення функціонування дихального ланцюга мітохондрій печінки риб.

Отже, в печінці риб під впливом досліджених концентрацій сирої нафти у воді активність СДГ та ЦО знижується, що вказує на пригнічення функціонування аеробного дихання. Тому за таких умов генерування енергії відбувається, ймовірно, за рахунок гліколізу [3].

На відміну від зазначених змін активності СДГ та ЦО за дії сирої нафти, їх активність за дії дизпалива вірогідно підвищується (див. рис. 1—2). Так, при концентрації дизпалива у воді 5, 10, 20 та 30 ГДК активність СДГ в печінці риб зростає відповідно на 128, 61, 106 та 33% порівняно контролем. Це свідчить про активування окиснення сукцинату до фумарату. Водночас концентрація 15 ГДК дизпалива не викликає вірогідних відхилень величини активності цього ферменту. Слід зазначити, що зростання інтенсивності окиснення сукцинату в печінці риб за таких умов відбувається, очевидно, за рахунок активування додаткових шляхів його утворення [4].

Поряд зі зростанням активності СДГ в печінці коропа за дії 5, 10 та 20 ГДК дизпалива активність ЦО зростає на 176, 31 і 64%. Це вказує на високу інтенсивність окиснювального фосфорильовання в печінці коропа за цієї концентрації. В той же час, дизпаливо в концентрації 15 та 30 ГДК вірогідних відхилень активності ЦО в печінці риб не викликає.

Слід зазначити певні відмінності у функціонуванні ферментів енергетичного обміну в зябрах риб за дії сирої нафти та дизпалива у водному середовищі. За дії сирої нафти в концентрації 5, 10, 20 та 30 ГДК активність СДГ в



2. Активність цитохромоксидази в печінці коропа за дії сирі нафти (1) та дизпалива (2).

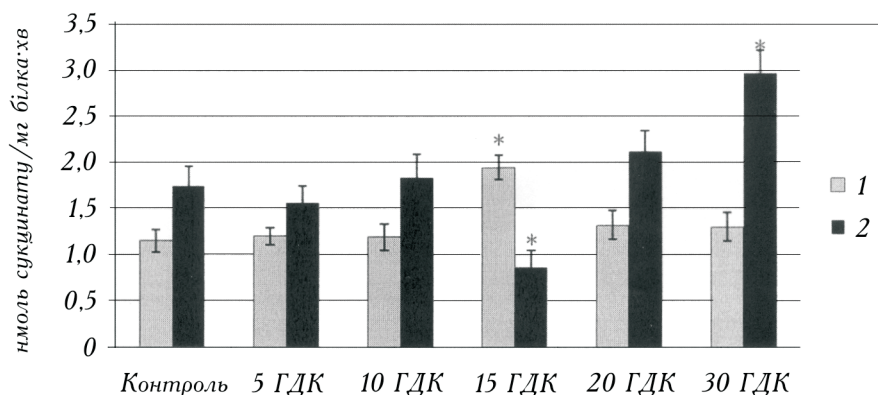
з'ябрах коропа не відрізняється від показників контрольної групи риб, тоді як активність ЦО знижується відповідно на 44, 39, 40 та 50% (рис. 3—4).

Цитохромоксидаза знаходиться на внутрішній мембрані мітохондрій та каталізує кінцеву стадію біологічного окиснення — відновлення електронами молекулярного кисню і є основною частиною протонного насоса, що створює на мембрані електрохімічний потенціал, який трансформується в енергію аденозитрифосфату (АТФ). У зв'язку з цим пригнічення її активності свідчить про зниження акцептування кисню. Отже, сира нафта в концентрації 5, 10, 20 та 30 ГДК негативно впливає на роботу дихального ланцюга в з'ябрах риб.

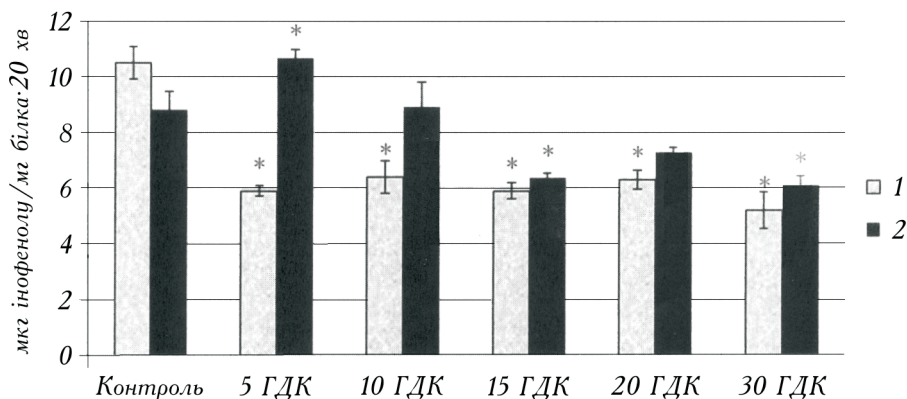
Дослідження активності СДГ та ЦО в з'ябрах риб за дії сирі нафти в концентрації 15 ГДК показало цілком характерну реакцію дихального ланцюга, яка виникає у гідробіонтів в умовах гіпоксії [3, 4]. За цієї концентрації в з'ябрах риб відзначено вірогідне зростання активності СДГ на 69% і зниження активності ЦО на 22% порівняно з контролем. Це свідчить про роз'єднання окиснення та фосфорилування в з'ябрах риб і є, очевидно, ефективним механізмом адаптації на ферментативному рівні до дії сирі нафти у водному середовищі.

На відміну від впливу сирі нафти, під впливом дизпалива в концентрації 15 ГДК робота дихального ланцюга та ЦТК в з'ябрах риб пригнічується. Про це свідчить зниження в цій тканині активності СДГ на 47% та ЦО на 28% відносно контролю. В той же час, за дії нижчих концентрацій дизпалива (5 та 10 ГДК) порушень в роботі дихального ланцюга та ЦТК в з'ябрах риб не відмічено, оскільки активність СДГ та ЦО за цих умов не змінюється, а за дії 5 ГДК активність ЦО зростає на 21%.

З внесенням у воду дизпалива в концентрації 20 ГДК активність СДГ та ЦО в з'ябрах риб не змінюється. Звертає на себе увагу той факт, що за дії 30 ГДК дизпалива активність СДГ зростає на 22%, а активність ЦО знижується на 31% порівняно з контролем. Це свідчить про роз'єднання окиснення та



3. Активність сукцинатдегідрогенази в зябрах коропа за дії сирової нафти (1) та дизпалива (2).



4. Активність цитохромоксидази в зябрах коропа за дії сирової нафти (1) та дизпалива (2).

фосфорилування в цій тканині за даної концентрації дизпалива у воді. Отже, вплив дизпалива на активність СДГ та ЦО залежить від його концентрації у водному середовищі.

З огляду на отримані результати досліджень можна стверджувати, що при наявності дизпалива у воді в печінці риб активується ЦТК, додаткові шляхи утворення сукцинату та функціонування дихального ланцюга, тоді як за дії сирової нафти ці реакції пригнічуються.

Висновки

На рівні функціонування ферментів енергетичного обміну, а саме СДГ та ЦО, сира нафта є більш токсичною для організму риб, ніж дизпаливо. Дія різних величин концентрації дизпалива та сирової нафти на систему енергозабезпечення в риб проявляється:

- у збільшенні енерговитрат та використанні функціональних резервів, спрямованих на підтримання енергозабезпечення систем детоксикації за рахунок зростання активності СДГ та ЦО в печінці та зябрах риб залежно від концентрації дизпалива у воді;
- у зниженні активності аеробних ланок енергозабезпечення за дії сирової нафти, про що свідчить пригнічення активності СДГ в печінці та ЦО в печінці та зябрах риб.

**

Исследовали особенности влияния нефти и дизтоплива на функционирование сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы в печени и жабрах карпа. Установлено преимущественное активирование сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы в тканях рыб под влиянием дизтоплива и некоторое ингибирование их активности под влиянием нефти.

**

The specifics of influence of the row oil and diesel fuel on activity of succinate dehydrogenase and cytochrome-c-oxidase in the gills and liver of fish was investigated. It has been found that under the impact of diesel fuel activity of succinate dehydrogenase and cytochrome-c-oxidase was increased whereas under the impact of the row oil their activity was inhibited. Conclusion can be made that row oil is more toxic than diesel fuel for the fish.

**

1. Агаменко Я.О. Оцінка впливів техногенно небезпечних об'єктів на навколишнє середовище: науково-теоретичні основи, практична реалізація: Автореф. дис. ... докт. техн. наук. — Івано-Франківськ, 2006. — 39 с.
2. Беспамятнов Г.П., Кротов Ю.А. Предельно допустимые концентрации химических веществ в окружающей среде: справочник. — Л.: Химия, 1985. — 304 с.
3. Енергозабезпечення адаптації коропа до змін концентрації нафтопродуктів у водному середовищі / О. М. Арсан, М. О. Миронюк, Л. М. Кіх, В. О. Хоменчук // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біологія. — 2009. — Вип. 1—2 (39). — С. 137—142.
4. Кондрашова М.Н. Структурно-кинетическая организация цикла трикарбоновых кислот при активном функционировании митохондрий // Биофизика. — 1989. — Т. 34, вып. 3. — С. 121—130.
5. Коронелли Т.В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводов в окружающей среде (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. — 1996. — Т. 32, № 6. — С. 579—585.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1990. — 351 с.
7. Миронюк М.О., Арсан О.М. Влияние нефтепродуктов на активность сукцинатдегидрогеназы тканей карпа // Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов: Материалы 2-й науч. конф. с участием стран СНГ, Петрозаводск, 11—14 сент. 2007 г. — Петрозаводск, 2007. — С. 98—99.

8. *Миронюк М.О., Хоменчук В.О.* Вплив дизельного палива на активність сукцинатдегідрогенази коропа // «Pontus Euxinus»: Тез. V Междунар. научно-практ. конф. молодых ученых по проблемам водных экосистем, Севастополь, 24—27 сент. 2007 г. — Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2007. — С. 133—134.
9. *Нельсон-Смит А.* Нефть и экология моря. — М.: Прогресс, 1977. — 302 с.
10. *Определение активности сукцинатдегидрогеназы // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича.* — М.: Медицина, 1977. — С. 44—46.
11. *Основы биохимии: В 3 т. / Под ред. Ю.А.Овчинникова.*— М.: Мир, 1981. — Т. 2. — 617 с.
12. *Хлебович В.В.* Акклимация животных организмов. — Л.: Наука, 1981. — 135 с.
13. *Хочачка П.В., Сомеро Д.Н.* Биохимическая адаптация. — М.: Мир, 1988. — 568 с.
14. *Straus W.* Colorimetric microdetermination of cytochrome C oxydase // *J. Biol. Chem.* — 1954. — Vol. 207, N 2. — P. 733—743.

Інститут гідробіології НАН України, Київ

Надійшла 21.09.10