

ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. І. МЕЧНИКОВА

Факультет гідрометеорології і екології

Кафедра водних біоресурсів та аквакультури

Кваліфікаційна робота

на здобуття ступеня вищої освіти «бакалавр»

ВПЛИВ НАФТОГАЗОВИХ РОЗРОБОК НА ІХТІОФАУНУ THE IMPACT OF OIL AND GAS PRODUCTION ON ICHTHYOFAUNA

Виконав: здобувач денної форми навчання
спеціальності 207 Водні біоресурси та аквакультура
Освітньо-професійна програма Охорона, відтворення
та раціональне використання гідробіоресурсів

Терлецький Максим Валерійович
(прізвище, ім'я, по-батькові здобувача)

Керівник к.г.н., доц., Соборова О.М.
(науковий ступінь, вчене звання, прізвище, ініціали) (підпис)

Рецензент Рудей О.М.
(науковий ступінь, вчене звання, прізвище, ініціали)

Рекомендовано до захисту:
Протокол засідання кафедри
водних біоресурсів та аквакультури
№ ____ від ____ . ____ . 2025 р.

Завідувачка кафедри

(підпис) Марина БУРГАЗ
(прізвище, ім'я)

Захищено на засіданні ЕК № 7
протокол № ____ від ____ . ____ . 2025 р.

Оцінка _____ / _____ / _____
(за національною шкалою/шкалою ECTS/ бали)

Голова ЕК

(підпис) ГАЙДАШЕНКО Ірина
(прізвище, ім'я)

Одеса 2025

АНОТАЦІЯ

ВПЛИВ НАФТОГАЗОВИХ РОЗРОБОК НА ІХТІОФАУНУ

Терлецький М.В., бакалавр кафедри водних біоресурсів та аквакультури

У сучасних умовах інтенсивного розвитку нафтогазової промисловості зростає ризик забруднення навколишнього природного середовища, зокрема водних екосистем. Водойми, що розташовані поблизу зон видобутку, транспортування або переробки нафти і газу, зазнають значного антропогенного навантаження. Одними з найбільш вразливих до таких впливів компонентів водних екосистем є іхтіофауна, як важлива частина трофічного ланцюга і джерело біоресурсів для людини. Порушення умов існування риб, зумовлені токсичними речовинами, можуть призводити до скорочення популяцій, зменшення біорізноманіття та загального погіршення екологічного стану водойм.

Мета кваліфікаційної роботи бакалавра полягає у аналізі екологічних наслідків діяльності нафтогазової промисловості на іхтіофауну водойм, аналіз основних шляхів негативного впливу та обґрунтування заходів щодо мінімізації шкоди водним біоресурсам.

У кваліфікаційній роботі бакалавра розглянуто питання про вплив нафтогазових розробок на іхтіофауну прісноводних та морських екосистем, моніторингу стану іхтіофауни та запропоновано екологічні заходи з мінімізації негативного впливу нафтогазової діяльності на водні біоресурси. Розкрито основні шляхи забруднення водойм продуктами нафтовидобутку, зокрема нафтовими викидами. Проаналізовано зміни у видовому складі, чисельності та фізіологічному стані риб в умовах техногенного навантаження. Особливу увагу приділено механізмам токсичного впливу вуглеводнів на організм риб, включаючи порушення обміну речовин, репродуктивної функції та імунної системи.

Кваліфікаційна робота бакалавра представлена на 68 сторінках і включає в себе 8 таблиць, 6 рисунків, 35 літературних джерел посилань.

Ключові слова: нафтогазові розробки, забруднення водойм, іхтіофауна, токсичний вплив, нафтові викиди, водні біоресурси.

ЗМІСТ

ВСТУП	3
1 СУЧАСНИЙ ЕКОЛОГО-ТОКСИКОЛОГІЧНИЙ СТАН ІХТІОФАУНИ.....	5
1.1 Характеристика токсичних властивостей бурового розчину, бурового шламу, газоконденсату та нафти.....	5
1.2 Фізіологічна роль реакції перекисного окислення ліпідів у живих організмах у процесі формування патології.....	20
1.3 Джерела забруднення акваторій нафтопродуктами та механізм впливу вуглеводнів на життєдіяльність риб.....	25
2 ЗАЛЕЖНІСТЬ СТУПЕНЯ ВПЛИВУ НАФТИ НА ГІДРОБІОНТІВ ВІД КІЛЬКІСНОГО СКЛАДУ ЇЇ КОМПОНЕНТІВ У ВОДНОМУ СЕРЕДОВИЩІ.....	30
2.1 Вплив нафти на монооксигеназну систему морських риб та моллюсків.....	32
2.2 Вплив нафти на антиоксидантну систему морських риб та моллюсків.....	38
2.3 Антирадикальна система тканини риб при впливі фенолу і нафталіну.....	43
3 ОЦІНКА ВПЛИВУ НАФТИ НА БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ РИБ.....	48
3.1 Вплив нафтових вуглеводнів на біохімічні показники риб.....	48
3.2 Дія бурового розчину на деякі показники ліпідного обміну риб.....	53
3.3 Токсична дія бурового шламу на обмін ліпідів у риб.....	56
ВИСНОВКИ	63
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАНЬ.....	65

ВСТУП

У загальній проблемі забруднення рибогосподарських водойм нафта займає одне з перших місць і до теперішнього часу вплив її на біоту продовжує залишатися предметом серйозних наукових досліджень. Вплив нафти залежить від її складу (природи нафтових вуглеводнів - НВ), умов середовища існування водних організмів, включаючи риб, у кожному конкретному субрегіоні біосфери.

Екологічні наслідки забруднення довкілля продуктами нафтогазової промисловості, мають хімічно складну структуру, не піддається визначенню хімічного складу, і проблеми, пов'язані з впливом на біосферу.

При оцінці ступеня небезпеки впливу нафтових вуглеводнів, бурових розчинів і бурових відходів на біотичні та абіотичні компоненти екосистеми моря найбільш значущими стають методи інтегральної оцінки токсикологічних характеристик цих токсикантів. При дії нафти, газового конденсату, бурового розчину та бурового шламу у риб відбувається зміна вмісту загальних ліпідів та продуктів реакцій ПОВ.

Особливу увагу привертає стан гідросфери, де за певних умов можуть бути присутніми, накопичуватися та циркулювати значні кількості мутагенних та канцерогенних сполук, які становлять найбільшу небезпеку для риб.

Завдяки ліпофільним властивостям нафтові вуглеводні накопичуються в органах і тканинах з підвищеним вмістом ліпідів, у тому числі і в мембранних структурах. Високі рівні вмісту ПАВ у риб найчастіше виявляються в їх печінці, жовчі, а також зябрах, гонадах, жирових відкладеннях і тканинах.

Ліпіди риб, будучи найважливішими структурними компонентами клітинних мембран, поряд з білками, визначають їх властивості та

структурну цілісність. Зміни у молекулах ліпідів порушують проникність клітинних мембран. Нейтральні ліпіди виконують енергетичну та теплорегулюючу функції в організмі риб.

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи є аналіз впливу нафти, газового конденсату, бурового розчину та бурового шламу на біохімічні показники риб.

Для досягнення мети вирішувалися такі завдання:

- проаналізувати вплив нафти, газоконденсату, бурового розчину та бурового шламу на рівень загальних ліпідів риб;
- проаналізувати дію токсикантів на перекисного окислення ліпідів риб;
- проаналізувати генотоксичність нафтових вуглеводнів, бурового розчину та бурового шламу, які можуть бути потенційними забруднюючими речовинами морського середовища при нафтогазовидобутку;
- проаналізувати еколого-токсикологічні наслідки при попаданні зазначених токсикантів у морське середовище.

Об'єктом дослідження є вплив нафти, газоконденсату, бурового розчину та бурового шламу на рівень загальних ліпідів риб.

Предмет дослідження полягає в оцінці функціонального стану різних гідробіонтів, включаючи риб, під впливом нафтогазових розробок.

1 СУЧАСНИЙ ЕКОЛОГО-ТОКСИКОЛОГІЧНИЙ СТАН ІХТІОФАУНИ

1.1 Характеристика токсичних властивостей бурового розчину, бурового шламу, газоконденсату та нафти

Бурові розчини. Переважна більшість відомих робіт у галузі токсикології бурових розчинів ґрунтується на їхньому тестуванні тривалістю 48-96 годин із використанням як тест-об'єктів найпоширеніших видів риб і безхребетних.

Представлені у вигляді величини LK_{50} (летальних концентрацій, за яких гинуть 50% дослідних організмів за певний час експонування), дають змогу зіставляти токсичні властивості різних розчинів і їхніх компонентів, виявляти видові особливості та механізми реагування гідробіонтів, судити про можливі екологічні наслідки тощо. У низці країн розроблено та прийнято уніфіковані стандартні процедури еколого-токсикологічних випробувань бурових розчинів та їхніх компонентів [2].

Величини LK_{50} для різних типів бурових розчинів, що використовуються в США і Канаді, лежать у межах 10-100 г/кг, що відповідає їхньому розведенню 1-10%. Виняток становлять бурові розчини на основі дизельного пального, для яких величини LK_{50} набагато нижчі та можуть досягати порога 0,1 г/кг.

Набір речовин і препаратів, що входять до складу бурових розчинів, дуже широкий і налічує кілька сотень найменувань. Складність аналізу цієї вкрай розмитої і багатофакторної картини полягає також у тому, що більшість речовин і компонентів, у свою чергу, складаються з інших компонентів змінного і часто невизначеного складу [8].

Крім того, існують різні класифікації речовин і препаратів залежно від їхніх токсичних властивостей. Окремі з них прийняті міжнародними

організаціями та угодами. Вони наведені в таблиці 4 і можуть бути використані для порівняльних оцінок токсичності бурових розчинів та їхніх компонентів.

Таблиця 1.1 – Класифікація речовин і препаратів залежно від їхніх токсичних властивостей

Групи речовин за ступенем токсичності	ЛК ₅₀ (96 год), мг/л	
	UNEP	ІМО
Не небезпечні	-	≥1000(0)
Практично нетоксичні	≥1000(0)	100-1000(1)
Слаботоксичні	1000-10000(1)	10-100(2)
Помірно токсичні	100-1000(2)	1-10(3)
Середньо токсичні	1-100(3)	-
Високотоксичні	0,01-1(4)	≤1(4)

Бурові розчини на нафтовій основі та просочені ними бурові шлами доволі стійкі в морському середовищі. В умовах, близьких до природних, показали, що через 180 діб після скидання нафто основних бурових відходів їхня біодеградація не перевищувала 5%, тоді як бурові відходи на основі ефірів жирних кислот практично повністю (на 99%) втратили свою органічну фракцію завдяки мікробному і фізико-хімічному розпаду [12].

Так, змішані з донними опадами низько токсичні бурові розчини на основі парафінів лише у 2 рази знижували початковий вміст нафтової фракції (з 200 до 100 мг/кг) у верхньому шарі донних осадів завтовшки 1 см за 70 діб експонування в контакті з морською водою, тоді як у розташованих нижче шарах вміст нафтових вуглеводнів залишався сталим і навіть дещо наростав.

Водо основні рецептури також далекі від відповідності суворим екологічним вимогам через підвищений вміст біоцидів і важких металів,

більшої міграційної здатності відпрацьованих водо основних бурових розчинів у морському середовищі та частішого їхнього скидання порівняно з розчинами на нафтовій (органічній) основі [16].

Токсичність останніх зазвичай пов'язують із присутністю в їхньому складі емульгаторів і поверхнево-активних речовин. Токсичні властивості бурових розчинів наведено в таблиці 1.2.

Таблиця 1.2 – Зведені дані токсикологічних властивостей деяких бурових розчинів

Тип	Концентрація, тривалість	Реєстровані ефекти та показники, що реєструються
Водоосновні глинисті розчини	2-1,5 мг/л 1-2 хв. сьомга (молодь)	Зміна ритміки дихання та серцевих скорочень
	5 мг/л 10-30 доби, тріска, камбала	Зниження виживання
Водоосновні глинисто- бентонітні розчини	15-40 мг/л, 2-5 хв. тріска, сайда, сьомга, скат	Порогові порушення процесів дихання та серцевої діяльності
Лігносульфанатні бурові розчини	30-100 мг/л, молодь тріски, камбали, сьомга	Стійкі порушення фізіологічних функцій і поведінкових реакцій
Водоосновні лігносульфанатні та амонійні бурові розчини	5-22 г/л, 48-96 год. сьомга (молодь), амфіподи	Загибель 50% особин
Буровий розчин полімерний	45-93 г/л, 48-96 год. сьомга (молодь),	Загибель 50% особин

Тип	Концентрація, тривалість	Реєстровані ефекти та показники, що реєструються
	амфіподи	
Буровий розчин полімерглинистий	10-25 г/л 48-96 год. сьомга (молодь), амфіподи	Загибель 50% особин
Бурові розчини різного типу	100-200 г/л, гострі досліди, риби, безхребетні	Загибель 100% особин

Застосування еколого-фізіологічних методів оцінки стану організмів різко (на 2-3 порядки) знижують рівні вмісту бурових розчинів, за яких починають проявлятися летальні ефекти або ті чи інші порушення життєдіяльності гідробіонтів [2-6]. Подібні результати, що виходять за межі звичайних реєстрацій ЛК50 у стандартних умовах, наводяться і в низці інших публікацій. У деяких із них зазначено:

- ✓ біохімічні та гематологічні зміни в організмі молоді риб під час дії розбавлених бурових розчинів;
- ✓ сильне (від 3 до 20 разів) підвищення чутливості реагування деяких морських ракоподібних (креветки, мізиди, омари) на ранніх, личинкових стадіях їхнього розвитку;
- ✓ накопичення нафтових вуглеводнів в органах і тканинах риб і безхребетних у зонах скидання відпрацьованих бурових розчинів;
- ✓ зміна інтенсивності осідання на тверді субстрати планктонних личинок безхребетних і порушення розвитку біоти в умовах хронічного забруднення морського середовища буровими розчинами на нафтовій основі, а також виникнення за таких умов анаеробних явищ у донних осадах;

- ✓ відсутність прямого зв'язку між токсичністю нафто основних бурових розчинів і вмістом у них ароматичних вуглеводнів.

Відносно високі величини LK_{50} для більшості відомих складів бурових розчинів (десятки і сотні г/л) не можуть бути підставою для віднесення цих розчинів до категорій нетоксичних або нешкідливих відходів. У природних умовах і за хронічного впливу вони здатні викликати ефекти, які практично неможливо передбачити за результатами короткострокового токсикологічного тестування [6-8].

Умовно найбільш відомі компоненти, які використовують у бурових роботах, можна розбити на 3 основні групи залежно від їхнього відносного вмісту в бурових композиціях і ступеня прояву токсичних властивостей. До першої групи включають базові компоненти, які домінують у кількісному відношенні та визначають тип бурових розчинів.

До них належать бурові глинисті сполуки (бентоніт та інші органофільні глини), ефіри целюлози (КМЦ), конденсована сульфід спиртова барда (КССБ), обважнювачі (барій і кальцій та ін.) та деякі інші компоненти, які регулюють головні хімічні та фізико-хімічні параметри бурових сумішей та формують основний склад цих сумішей, де кожна з них присутня в кількостях від 1 до 10%.

Характерною відмітною ознакою більшості цих бурових компонентів є їхня відносно низька токсичність: величини LK_{50} у гострих дослідах, як правило, не опускаються нижче за 100-1000 мг/л, а рибогосподарські ГДК укладаються в межах 1-100 мг/л [9-11].

Інша група, що різко контрастує на тлі щойно зазначеної, об'єднує речовини і препарати з відносно невеликою часткою вмісту в загальному складі бурових розчинів (зазвичай не вище за кілька відсотків), але зате з дуже істотним внеском у їхню сумарну токсичність.

До цієї групи належать найбільш токсичні біоциди (карбонат - МН, катапин, сульфід натрію та ін.), інгібітори корозії металів і відкладень (ІКБ-2-2, ІКБ-6-2, фосфоксит-7 та ін.), флот реагенти (Т-66, Т-80 тощо),

піноутворювачі та піноутворювачі (ПЕО), піноутворювачі та пінопласт (ПЕП), флот реагенти (Т-66, Т-80 та ін.), піноутворювачі та піногасники (ПО-А, КЕ-10-12, триксан) та інші речовини і реагенти, для яких ГДК становлять величини $10^{-4} - 10^{-2}$, а LK_{50} лежать у межах або нижче 0,1-1,0 мг/л. До цієї ж групи входить більшість важких металів (ртуть, свинець, кадмій, хром, цинк), які потрапляють у бурові розчини та скиди як з деяких компонентів самих розчинів (наприклад, з бариту та інших обважнювачів), так і з бурових виробок гірських порід [11-13].

Окремі інгібітори, наприклад: фосфоксит-7, ІКБ-2-2 та ІКБ-6-2, вирізняються не тільки високою токсичністю ГДК на рівні 10^{-3} - 10^{-4} мг/л, а й здатністю спричиняти генетичні та тератогенні ураження.

Нарешті, проміжна і найчисельніша за компонентним складом група охоплює широкий набір препаратів і реагентів найрізноманітнішого складу та призначення: мастила та анти функціональні добавки, мийні суміші, емульгатори, диспергенти, регулятори в'язкості та водовіддачі, поліелектроліти, розчинники, стабілізатори, детергенти, неоноли, полімерні смоли, сульфоноли, поверхнево-активні речовини, а також нафту, нафтопродукти та різні склади на їхній основі [12-14].

ГДК більшості цих інгредієнтів групуються в діапазоні 10^{-2} -1 мг/л і часто близькі або збігаються з ГДК для розчинених і емульгованих фракцій нафти, яка дорівнює 0,05 мг/л.

Здатність спричиняти генетичні та тератогенні ураження виявлено і для низки поверхнево-активних речовин із групи неонолів - АФ-9-6, АФ-9-10 та ін.

За біотестування бурового розчину в концентрації 2,0 г/л (максимальна) в гострій експозиції спостерігалось зниження життєстійкості каляніпед на 50%, а за 1,0 г/л - на 10%, за мінімальної концентрації та в контролі загибель була відсутня.

Таким чином, токсичний вплив бурового розчину на фітопланктон проявлявся влітку і восени показник чистої продукції за концентрації 2,0 г/л

був на 50% нижчим за контроль, а взимку за тієї самої концентрації на 20-ту добу досліду він становив 40%) від контролю.

За концентрації бурового розчину 0,5 г/л на 20-ту добу вміст гемоглобіну знижується на 34%. За концентрації 1,0 г/л зниження рівня гемоглобіну відбувається вже на 5-ту добу експозиції. До кінця вміст дихального пігменту знизився на 30% щодо контролю. За концентрації 2,0 г/л виявлено зниження рівня гемоглобіну на 34-36% [8-12].

Буровий шлам. Токсичні властивості бурового шламу визначаються насамперед його хімічним складом, який, своєю чергою, залежить від дисперсності та сорбційної місткості подрібнених гірських порід і від цілої низки чинників та обставин технологічного характеру - рецептури бурового розчину, фізико-хімічних умов у зоні буріння, умов контакту з видобувними вуглеводнями і методів очищення (промивання) шламу перед його скиданням у море. Зрозуміло, що цей склад буде вельми мінливим навіть під час проходки однієї свердловини, і цим, можливо, пояснюється відсутність будь-якої узагальненої інформації щодо цього.

Головним токсичним агентом у складі бурових шламів, на думку більшості дослідників, вважають нафту та її фракції, що накопичуються у твердій фазі бурових виробок під час їхнього контакту з пластовою (сирою) нафтою в процесі буріння та за рахунок акумуляції нафтопродуктів із бурових розчинів [10].

Вміст нафтових вуглеводнів у розчині бурового шламу знижується залежно від терміну експозиції.

Згідно з деякими національними та міжнародними стандартами, допустимий вміст нафти в скиданих бурових шламах після їх очищення не повинен перевищувати 100 г/кг. Навіть якщо вважати, що цей норматив витримується в реальних виробничих умовах, він набагато (у 100-1000 разів) вищий за пороги гострої та сублетальної токсичної дії забруднених нафтою донних субстратів [12].

Можливо, саме ця обставина стала однією з причин посилення останніми роками в низці країн і на міжнародному рівні екологічних вимог до скидання нафтовмісних твердих відходів бурових робіт, аж до повної заборони таких скидів або обмеження допустимого рівня їхнього нафтового забруднення до 10 г/кг [13-14].

Останніми роками в рамках національних і міжнародних програм моніторингу екологічної ситуації в районах освоєння морських нафтогазових родовищ дедалі більшого поширення набувають методи біотестування донних осадів, забруднених скидами бурових шламів з морських платформ. Одну з таких програм було здійснено в Мексиканській затоці на шельфі США, де за допомогою біотестів на ембріонах морських їжаків виявлено значну токсичність донних опадів біля платформ і показано кореляцію цієї токсичності з рівнями забруднення завдяки промисловим операціям на платформах.

Характерно, що підвищена токсичність опадів, що містять бурові шлами, була пов'язана з присутністю в них не тільки нафтових осадів, а й важких металів.

Можливу токсичність визначають за зміною фотосинтетичної активності фітопланктону за 24-годинної експозиції. Показником слугує чиста продукція фітопланктону.

Показник чистої продукції фітопланктону у воді контролю становить 1,6/1,5 мг/л, а у витяжці ґрунту 1,4 мг/л O₂. Аналіз проб води і ґрунтів показує відсутність токсичності проб. Показник чистої продукції фітопланктону як у пробах води, так і у витяжці ґрунтів на рівні контролю. Таким чином, обстановка в районі відбору проб сприятлива для фітопланктону [16].

Газовий конденсат. На відміну від вуглеводнів нафти, які давно є об'єктом широких і детальних еколого-токсикологічних досліджень в усьому світі, природний газ і його компоненти в цьому відношенні практично залишилися поза сферою екологічного аналізу, контролю і регламентації.

Наукові публікації на цю тему рідкісні, і сучасні знання про поведінку вуглеводневих газів у природних водах і особливо про їхню дію на водні організми, співтовариства та екосистеми вельми обмежені, що, своєю чергою, обмежує можливості прогнозування, оцінювання й запобігання наслідкам викидів і витоків газу в навколишнє середовище. Тим часом надходження природного газу і продуктів його згоряння в біосферу належить до числа характерних і повсюдних чинників антропогенного впливу на природу і має місце на всіх етапах функціонування нафтогазового комплексу, починаючи з бурових робіт, транспортування газу і аж до його переробки та енергетичного використання в різних галузях [20].

Газовий конденсат, що є рідкою сумішшю вуглеводнів різної будови (з числом атомів вуглеводню 5 і більше) і розчинених газів метан-бутанової фракції, у токсикологічному плані не вивчений. Основним хімічним складом газоконденсату є фракції парафінів і нафтенів: високо леткі - 32,4%, високомолекулярні - 54,3%, моно- і поліциклічні ароматичні сполуки - 6,5%, похідні вуглеводнів (гетероатомні сполуки - 6,8%), похідні вуглеводнів (гетероатомні сполуки - 6,8%) і похідні вуглеводнів (гетероатомні сполуки - 6,8%) [15].

Під час контакту з атмосферою і водним середовищем відбувається швидко (протягом кількох годин і діб) випаровування легколетких фракцій газоконденсату і відповідне зниження його токсичності. Парафіни, нафтени й ароматичні сполуки, що залишилися, частково розчиняються у воді та піддаються процесам фізико-хімічної та мікробної деструкції. Розчинність газоконденсату в морській воді за температури 5-6[^]С і атмосферного тиску дорівнює приблизно 1 г/л.

Забруднення морських вод газоконденсатом може призвести до погіршення умов проживання промислових гідробіонтів і, як наслідок, зменшення їхньої чисельності та біомаси [22].

Про токсичність газоконденсату для морських організмів можна судити за даними, наведеними в таблиці 1.3.

Таблиця 1.3 – Токсикологічний газовий конденсат для морських організмів

Група і вид морських організмів	Критерій токсичності	Концентрація (мг/л)		
		Летальна	Мінімально діюча	Максимально не діюча
Фітопланктон (<i>Halospaera viridis</i> <i>Rizosolenia Sp.</i>)	Інтенсивність фотосинтезу	-	0,1	0,01
	Приріст чисельності	100	10	1
Ракоподібні (<i>Acartia longiremis</i> , <i>Gammarus fimarchicus</i>)	Вживання	-	0,1	-
Личинки	Вживання	1-100	0,05	0,01
Дорослі	Вживання	5-50	-	-
Черевоні молюски (<i>Littorina obtusata</i>)	Вживання	-	2,5	-
Риби, молодь (<i>Gadus morhua</i>)	Вживаність 12 год.	2500	-	-
	Вживаність 30	-	-	0,1-500
	Склад крові 30	-	2,5	-
	Інтенсивність дихання 30	-	10,0	0,1-0,5
	Гістологічні порушення в зябрах	-	2,5-5,0	-
	Органолептичні	-	500	-

Група і вид морських організмів	Критерій токсичності	Концентрація (мг/л)		
		Летальна	Мінімально діюча	Максимально не діюча
	показники			

З таблиці 1.3 випливає, що найбільшою чутливістю реагування в даному випадку вирізняються планктонні ракоподібні, тоді як червононогі молюски та риби більш стійкі до дії газоконденсату. Швидкість прояву більшості реакцій, а також їхню схожість із реагуванням деяких організмів (особливо риб) на дію легких сортів нафти і нафтопродуктів. Це цілком зрозуміло, якщо врахувати, що за своїм складом газовий конденсат приблизно відповідає бензиновій або гасовій фракції нафти або їх суміші. Мінімальні діючі концентрації газоконденсату для більшості організмів, особливо на стадіях личинкового розвитку зоопланктону, можна оцінити величиною порядку 0,01 мг/л [18].

У найближчому майбутньому зниження видобутку нафтопродуктів і газу у світі не прогнозується. Газовий конденсат концентрації 0,01-0,1 мл/л чинить токсичну дію на первинну продукцію фітопланктону та деструкцію органічних речовин. Газоконденсат концентрацією 0,1 і 0,5 мл/л призводить до порушення рослинних компонентів: хлорофілу «а», «с». Спостерігається зниження вмісту хлорофілу «а» зі збільшенням концентрації газоконденсату і термінів експозиції, тобто інтенсивність фотосинтетичної діяльності фітопланктону знижується [15].

Відомо, що феофітин є більш стійкою сполукою порівняно з хлорофілом і він присутній у всіх пробах морської води. Однак у більш забруднених акваторіях можна очікувати підвищений вміст феофітину, що було виявлено за дії газоконденсату концентрацією 0,1-0,5 мл/л.

Газоконденсат спричиняє зміни в периферичній крові риб. Спостерігається зниження вмісту гемоглобіну на 20% порівняно з

показниками у контрольних особин обох видів. У вобли за концентрацій 0,1-0,2 мл/л на початку досліду (5-10-та доба експозиції) виявлено зниження на 15% кількості еритроцитів.

Нафта. Присутність нафти в морі (у вигляді нафтових плівок на поверхні води, мазутних відкладень на дні бухт і вздовж узбережжя, нафтових запасів і присмаків морської води та її мешканців, нафтових грудочок і кульок, які дрейфують у відкритому морі) вже давно стала звичним атрибутом практично у всіх морських регіонах. Однак походження і передісторія кожного з цих проявів нафтового забруднення доволі складні й не завжди очевидні, по-перше, через існування природного фону нафтових вуглеводнів (на відміну від речовин на кшталт ДДТ, ПХБ, стронцію-90 та інших ксенобіотиків, які завдячують своєю появою в природі лише людині) і, по-друге, через різноманіття джерел надходження нафти і нафтопродуктів у морське середовище [16].

З хімічного погляду нафта є складною сумішшю кількох тисяч вуглеводнів (переважно рідких, що становлять 80-90% за масою) з домішкою похідних, які містять сірку (меркаптани, тіофени, дисульфіди, тіофани тощо), азот (гомологи піридину, акридину, гідрохіноліну тощо) та кисень (нафтенові кислоти, асфальтени, смоли та ін.). Сира нафта містить також деяку кількість води (до 10%), розчинених вуглеводневих газів (до 4%), мінеральних солей (головним чином хлориди - до 4 г/л) і багато мікроелементів [18].

Нафта і нафтопродукти, що потрапляють у водне середовище природних водойм, дуже скоро перестають існувати як вихідні субстрати. Їхня доля і біологічна дія у водних екосистемах визначаються зрештою фізичними і фізико-хімічними властивостями, насамперед летючістю (пружністю парів), густиною і розчинністю у воді. Розчинність нафтових вуглеводнів залежить насамперед від їхньої молекулярної структури.

З наведеної нижче таблиці 1.4 стає зрозумілим, наскільки широка і практично невичерпна гама можливих відгуків морської біоти на шкідливі впливи нафти на неї.

Таблиця 1.4 – Зведені дані про дію на морські організми низьких рівнів нафтового забруднення водного середовища

Група і вид організмів	Концентрація (мкг/л), речовина, тривалість впливу	Реєстровані ефекти показники
Одноклітинні водорості культури масових видів і природних фітопланктон (Чорне море)	50-500 РНВ 1-5	Інгібування фотосинтезу, фотолюмінісценції, швидкості поділу
Природний фітопланктон (Чорне море)	100 РНВ	Зниження первичної продукції, маси чисельності клітин
Природний фітопланктон	100 РНВ	Зміна видового складу, зниження первичної продукції
Макрофіти <i>Polysiphonia breviartacula</i>	Сира нафта, 5	Відмирання проростків
Ракоподібні <i>Acartia tonsa</i> (наупліуси)	100-400 РНВ 1-7	Зниження виживаності
<i>Niphargoides maeotcus</i>	100-400 РНВ 8-40	Зниження виживаності
<i>Homarus americanus</i>	100-1000 сира нафта, 15	Фізіолого-морфологічні порушення
Бентосні угруповання безхребетних	30-40 РНВ Хронічна дія	Пригнічення здатності личинок до осідання на донні субстрати
Риби <i>Salmo trutta</i>	10-20 РНВ 60-70	Зниження виживаності,

Група і вид організмів	Концентрація (мкг/л), речовина, тривалість впливу	Реєстровані ефекти показники
<i>caspicus</i> (ікра та личинки, що розвиваються)		аномалії розвитку
Оселедець (личинки)	25 РНВ	Зниження виживаності

Примітка: РНВ - розчинені нафтові вуглеводні; ПАВ - поліциклічні ароматичні вуглеводні; БАП-(бенз-(а)-пірен).

Нафта у водоймах може існувати у вигляді кількох агрегатних станів, головні з яких включають у себе:

- ✓ поверхневі плівки,
- ✓ розчинені форми,
- ✓ емульсії (типу «нафта у воді» і «вода в нафті»),
- ✓ зважені форми (плаваючі на поверхні і в товщі води мазутно-нафтові агрегати, сорбовані на суспензіях нафтові фракції),
- ✓ осаджені на дні тверді та в'язкі компоненти,
- ✓ акумульовані у водних організмах сполуки.

В умовах хронічного забруднення моря нафтою її домінантною формою часто є емульгована нафта, що зумовлено як тривалою дією гідродинамічних чинників (вітрове перемішування тощо), так і переважним надходженням нафти в морське середовище у вигляді емульсій та присутністю у складі нафтових забруднень високомолекулярних сполук, що сприяють само емульгуванню.

Токсичні концентрації (такі, що спричиняють загибель організму або незворотні порушення його життєво важливих функцій) для ікри (ембріонів), личинок і молодняка морських тварин зазвичай значно нижчі, ніж для дорослих, і досягають мінімальних рівнів порядку 10^{-2} - 10^{-1} мг/л [22-24].

До критичних, тобто особливо вразливих до нафтової інтоксикації стадій розвитку морських організмів, крім етапів раннього онтогенезу, відносяться також деякі періоди життя дорослих особин і особин, що розвиваються, які супроводжуються морфологічними і фізіологічними перебудовами в організмі. Наприклад, на деяких стадіях формування екзоскелета копепод та інших ракоподібних їхня чутливість до дії нафти зростає в кілька разів [26].

Серед факторів зовнішнього середовища, від яких сильно залежать характер і наслідки інтоксикації гідробіонтів, провідна роль належить температурним умовам. При підвищенні температури посилюється загальна інтенсивність фізіолого-біохімічних процесів в організмі і, як правило, різко зростає вражаюча дія більшості токсикантів.

Серед великої групи ПАВ слід особливо виділити високомолекулярні вуглеводні типу бенз-(а)-пірену, бенз-(а)-антроцену та інші аналогічні речовини, мутагенні та канцерогенні властивості яких досить добре вивчені на теплокровних тваринах. На жаль, водна токсикологія таких речовин розвинена вкрай слабо, хоча є відомості про прояв їхніх мутагенних і канцерогенних властивостей щодо низки представників водної біоти [28].

Останніми роками методологія морських еколого-токсикологічних досліджень поповнилася групою відносно нових, чутливих і вибіркових методів оцінки стану гідробіонтів за біохімічними реакціями їхніх ферментних та імунних систем. Найбільшого поширення набули методи ранньої реєстрації індукованої активності оксидаз змішаної дії в мікросомальних фракціях печінки риб, де депонуються і метаболізуються накопичення із зовнішнього середовища ПАУ.

Біохімічна індикація (особливо ензим діагностика) нафтового забруднення як спосіб раннього виявлення несприятливих змін у середовищі та біоті стає важливим елементом низки національних і міжнародних програм морського моніторингу і, можливо, дасть нові матеріали й ідеї

вирішення дискусійної проблеми біологічних наслідків хронічного нафтового забруднення моря [12-18].

1.2 Фізіологічна роль реакції перекисного окислення ліпідів у живих організмах у процесі формування патології

Найважливішими складовими метаболічних процесів і гомеостазу біологічного організму є окислювальні та антиоксидантні системи. Співвідношення цих процесів в організмі риб вивчено дуже слабо, хоча відомо, що під час напруженої діяльності організму (міграція, нерест) і низки неспецифічних для риб впливів спостерігається посилення окисних процесів, унаслідок чого накопичуються продукти переокиснення ліпідів, що виступають у ролі первинного медіатора стресу. Найрізноманітніші екологічні чинники не спричиняють якихось невластивих для організму риб нових процесів, а активують ланцюгові реакції окислення, які протікають у клітинах за нормальних фізіологічних умов з малою швидкістю [2-5].

Негативні впливи призводять до зміни стану та функціональної активності мембран клітини, тісно пов'язаних із балансом про- та антиоксидантних систем клітини. Порушення структури та складу ліпідного підшару мембран, спричинені активізацією вільно радикального окиснення, впливають на зміну функціонування мембран клітин, а отже систем, органів, тканин і організму риб у цілому. Стійкість мембран до вільно радикального окислення залежить від стану антиоксидантної системи [8].

Наявність перекисів у тканинах свідчить про те, що в них протікають реакції перекисного окислення НЖК. Однак одне лише вимірювання вмісту ліпідних перекисів у біологічному матеріалі не дає змоги судити про швидкість процесу, тому що стаціонарна концентрація будь-якого метаболіту залежить від співвідношення інтенсивності його утворення і розпаду. За ефективного розпаду гідроперекисів концентрація їх у тканині буде низькою,

навіть якщо перекисне окислення йде з великою швидкістю. Надмірне окислення ліпідів призводить до різкого порушення фізико-хімічної структури мембран, аж до повного їхнього розриву. Приклади такого роду відомі як стосовно різних клітинних структур, так і для цілих клітин [14].

Роз'єднання окислення і фосфорилювання при утворенні перекисів, набрякання і вихід ферментів - усі ці явища свідчать про те, що утворення ліпідних перекисів у мембрані супроводжується підвищенням її проникності. Конкретний механізм цього збільшення проникності може бути різним: зміна конформації мембранного ліпопротеїнового комплексу, утворення молекул-переносників іонів або, нарешті, поява гідрофільних включень у суцільному гідрофобному шарі мембрани [16-18].

Ненасичені жирні кислоти визначають ступінь еластичності внутрішньої гідрофобної зони мембран, відповідальної за малу проникність їх щодо полярних сполук. Поява в цій гідрофобній ділянці гідроксилів і полярних продуктів перекисного окислення ненасичених жирних кислот може призвести до утворення водних пір, різко порушити стабільність цього шару мембрани аж до повного її розриву. У цьому разі ефект процесів перекисного окислення на біологічні мембрани дуже нагадує дію детергенту [15-16].

Біологічна дія ліпідних перекисів на білки пов'язана з їхньою високою ефективністю як окисників, з одного боку, та зі здатністю деяких продуктів перекисного окиснення (альдегідів і кетонів) утворювати стабільні ковалентні зв'язки з окремими функціональними групами білків - з другого.

Окиснювальна активність перекисних продуктів може реалізовуватися насамперед під час взаємодії з SH-групами білкових молекул, хоча ці сполуки здатні окислювати цистеїн, глутатіон, ліпоєву кислоту (так звані «малі тіоли»), вітаміни А і Д, а також нуклеотиди.

Зміни в білкових молекулах, спричинені окисленими ліпідами, полягають в утворенні комплексу окислений ліпід-білок, полімеризації

білкових молекул і руйнуванні амінокислот, особливо тих, що містять SH-групи [18-20].

Крім утворення білок-ліпідних комплексів, реакція між білками й окисленими ліпідами може призвести до появи полімерних продуктів, не розчинних у воді. Утворення таких полімерів пояснюється формуванням поперечних зв'язків у білкових молекулах. У цьому процесі беруть участь N-кінцеві залишки амінокислот поліпептидних ланцюгів. З продуктів перекисного окиснення найбільшу роль в утворенні таких зв'язків відіграє малоновий діальдегід (МДА).

Перекиси ліпідів чинять свою ушкоджувальну дію на білкові молекули здебільшого завдяки взаємодії з SH-групами цистеїну, 8CH₃-групами метіоніну, γ-аміногрупами лізину та N-кінцевими аміногрупами, C-кінцеві карбоксильні групи та карбоксильні групи дикарбонових амінокислот не відіграють ролі в цьому процесі. Ефективне окиснення SH-груп здійснюється, найімовірніше, проміжними продуктами перекисного окиснення (вільними радикалами), тоді як в утвореннях поперечних зв'язків, реакціях полімеризації провідну роль відіграють кінцеві продукти окиснення ліпідів - на кшталт малонового діальдегіду [14-19].

Значення процесів перекисного окиснення під час ушкодження еритроцитарних мембран стане зрозумілим, якщо врахувати, що еритроцити містять потужний каталізатор перекисного окиснення - гемоглобін, а в омивальній їхній плазмі є негумінове залізо, яке транспортується, та ліпіди, що містять перекиси. Система антиоксидантів, що гальмують перекисне окиснення, глутатіонпероксидаза, що знешкоджує гідроперекиси, а також сироватковий альбумін, що зв'язує перекиси ліпідів, у нормі успішно справляються з «перекисною небезпекою», але порушення якоїсь ланки в цих захисних системах призводить до пошкодження мембран червоних кров'яних клітин.

Порушення кисневого режиму в тканинах також може мати наслідком посилення перекисного окиснення. Найочевиднішою є дія підвищеної

концентрації кисню, яка призводить до збільшення вмісту перекисів, наприклад в еритроцитах [15].

Цікаво, що в плазмі крові при пропущенні кисню *in vitro* також відбувається збільшення вмісту гідроперекисів і малонового діальдегіду, проте *in vivo* тимчасове посилення перекисного окислення змінюється його пригніченням за рахунок збільшення вмісту антиоксидантів [14-16].

Підсумовуючи наявні в літературі дані щодо ушкоджувальної дії окислених препаратів НЖК на субклітинні структури, штучні мембрани і білкові молекули, а також відомості про участь реакцій перекисного окиснення НЖК ліпідів біологічних мембран у виникненні різноманітних патологічних станів, можна висунути таке загальне уявлення про механізм загибелі клітини [5-7].

Згідно з цим уявленням процес вмирання клітини на якомусь етапі обов'язково містить у собі перекисне окислення НЖК ліпідів мембран. В одних випадках накопичення перекисів у тканинах у часі наближене до шкідливого впливу, в інших - значно відтерміноване.

Відмінності в цих двох типах реакцій зумовлені способом дії шкідливого агента: у першій групі він або сам по собі, або його метаболіти виступають прооксидантами; у другій - ефект дії безпосередньо призводить лише до зниження природних антиоксидантів, і тому токсична дія проявляється не відразу [6-8].

Пошкодження мембран - найімовірніша причина незворотних порушень у клітині, що призводять до її біологічної загибелі. В умовах аноксії органа воно є, вочевидь, наслідком дії на мембрани фосфоліпаз, що активуються іонами Са, жирними кислотами або низьким рН. За наявності в середовищі кисню на перше місце виступає, мабуть, інший, перекисний, механізм пошкодження мембран. Чому серед можливих токсичних продуктів, що накопичуються в клітинах під дією несприятливих чинників, ставляться на одне з перших місць саме продукти перекисного окиснення

ліпідів, існують три причини, які говорять на користь правильності такого уявлення [4-5].

По-перше, у клітині в біологічних мембранах або в їхньому безпосередньому оточенні містяться субстрати перекисного окиснення - ненасичені жирні кислоти і головний каталізатор процесу - негумінове залізо, а також речовини, здатні регенерувати активну двовалентну форму заліза (аскорбінова кислота, SH-з'єднання) або, навпаки, каталізувати його окиснення з утворенням вільних радикалів. У клітині, яка нормально функціонує, швидкість перекисного окиснення обмежена структурним фактором і природними антиоксидантами [5-6].

Порушення молекулярної організації мембран або руйнування антиоксидантів, так само як і низка інших, не до кінця ще вивчених чинників, можуть призводити до посилення реакцій перекисного окиснення.

По-друге, процес перекисного окиснення має автокатолітичний, самоприскорювальний характер. Причини такого механізму, вочевидь, різні в модельних системах і в клітині: у першому випадку він зумовлений ланцюговою природою процесу з виродженим розгалуженням ланцюгів, у другому до цього додається руйнування антиоксидантів та ушкодження мембран, яке спричиняється утворенням ліпідних перекисів та, своєю чергою, прискорює їх накопичення. Так чи інакше процес перекисного окиснення ліпідів, раз розпочавшись, іде з дедалі зростаючою швидкістю, і зупинити його надзвичайно важко [6-8].

Дуже суттєвою є висока токсичність продуктів перекисного окиснення. Спричиняючи полімеризацію білків, руйнування сульфгідрильних груп ферментів і зміну проникності ліпідного шару в біологічних мембранах, ці продукти призводять насамперед до ураження функцій і до руйнування тих самих структур, у яких відбувається цей процес, тобто мембран клітини.

Є припущення про роль перекисного окиснення ліпідів у окремих випадках: під час дії отрут, радіації, Е-авітамінозу. Безперечно, ці випадки, а також і багато інших розрізняються як щодо механізму процесу, що

призводить до активації утворення перекисів, так і щодо тих тканин або органів, де така активація має найбільше значення, але безпосередня причина цього [6-10].

Молекули з двома сполученими подвійними зв'язками (дієнові кон'юганти) можуть бути виявлені знектрофотометрично, за появою нового максимуму в спектрі поглинання при 233 нм. У біологічних мембранах окисненню піддаються переважно поліненасичені жирні кислоти, і виявлення дієнової кон'югації може бути чутливим тестом на появу гідроперекисів, серед яких дієнові кон'югати неминуче утворюватимуться в певному відсотковому відношенні [11].

Оскільки дієнова кон'югація з'являється по суті на стадії утворення вільних радикалів, то її наявність у продуктах перекисного окиснення свідчить про утворення продуктів у вільних радикалів, а отже, підтверджує вільно радикальний механізм перекисного окиснення полі ненасичених жирних кислот. Вимірювання стехіометричного відношення числа дієнових кон'югантів до числа утворених гідроперекисів (або до числа молекул поглиненого кисню) дає кількісне підтвердження цього висновку.

Вільні реакції є активними учасниками великої кількості хімічних реакцій, що протікають у клітині. Вони необхідні для підтримання гомеостазу аеробних організмів [12].

1.3 Джерела забруднення акваторій нафтопродуктами та механізм впливу вуглеводнів на життєдіяльність риб

Основними шляхами забруднення акваторій є робота транспорту і підприємств нафтопереробної та нафтохімічної промисловості, що розташовуються на узбережжі заток, газоподібні викиди і стічні води промислових підприємств, які не пройшли відповідного очищення, буріння експлуатаційних свердловин, численні розливи нафти і нафтопродуктів,

внаслідок аварій трубопроводів і нафтоналивних суден (танкерів) тощо. Значні кількості сирої нафти і продуктів її переробки створюють серйозну загрозу екологічній обстановці обох водойм [8].

Загальновідомо, що одиниця об'єму нафти здатна забруднити об'єм води, що в тисячу разів перевершує її. Причиною тому є вміст у ній ПАР (поверхнево-активних речовин). Вони сприяють утворенню стабільних нафтовідних емульсій. Завдяки цій здатності нафта вражає великі площі водойм [9]. Тонка нафтова плівка (слік), що утворюється під час розтікання нафтопродуктів, перешкоджає повітрообміну, у такий спосіб чинячи негативний вплив на рослинний і тваринний світ басейну [9-10].

Поліциклічні ароматичні вуглеводні (ПАВ), отримані з сирої нафти з різних джерел у всьому світі, спричиняють стійке ураження серця фенотипу у різних видів риб. На рисунку 1.1 наведені личинки на стадії вилуплення, які зазнали впливу сирої нафти незабаром після запліднення, з репрезентативним контролем (ліва колонка) і зразками, що зазнали впливу нафти (права колонка).

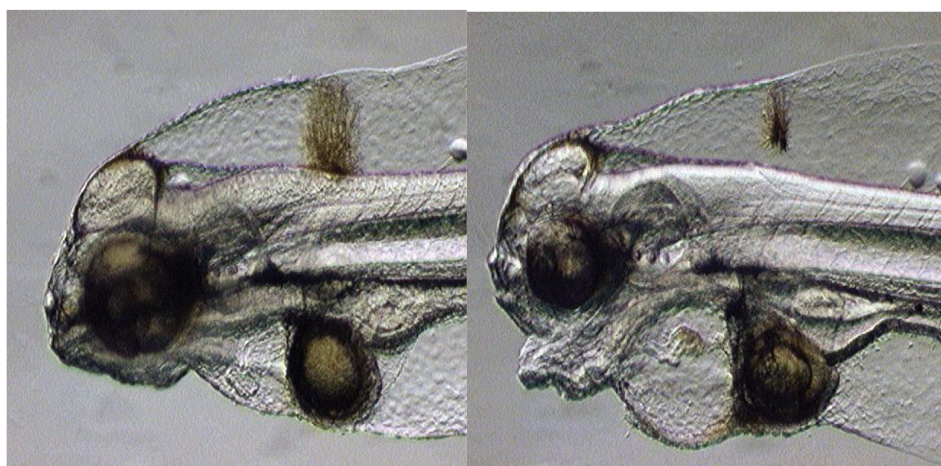


Рис. 1.1 – Личинки на стадії вилуплення, які зазнали впливу сирої нафти незабаром після запліднення

Розчинність нафти у воді незначна, тому накопичення нафтопродуктів відбувається насамперед на поверхні та на дні водойм. За товщини нафтової

плівки понад 0,1 мм сповільнюються процеси як проникнення атмосферного кисню у воду, так і видалення з води вуглекислоти. Так, більша частина кисню витрачається на окислення нафтопродуктів, а вже після на забезпечення життєдіяльності живих організмів [10].

Важкі залишки, що опустилися на дно, також пригнічують життя живих організмів: частина їх розкладається на дні, забруднюючи воду розчинними продуктами розпаду, а частина знову виноситься на поверхню з газами, що виділяються з дна [10-11].

Таким чином, утворення донного осаду призводить до отруєння ним зоо- і фітопланктону, що слугує кормовою базою для риб. Вплив нафтопродуктів на риб проявляється в порушеннях фізіологічної активності, хворобах, спричинених упровадженням вуглеводнів в організм, змінах у біологічних особливостях середовища проживання тощо.

Частина фракцій, що містяться в нафті, є токсичними. Необхідно зазначити, що чим вища концентрація цих фракцій під час поглинання або розчинення їх у воді, тим вища їхня токсичність. Нафта утворює токсичні емульсії, які спричиняють задуху в живих організмів.

Для риб найбільш токсичні легкі фракції нафти, особливо ароматичні вуглеводні. Вони здатні накопичуватися в їхніх тканинах і викликати в жирових клітинах утворення канцерогенно-білкового комплексу. Мальки, що вилупилися з ікри забрудненої риби, мають мутагенні порушення (відсутність зябер, дві голови тощо). Заражена риба не годиться для вживання в їжу, а також для господарського промислу [12].

На нафтопроводах, кушових майданчиках та ін. об'єктах нафтовидобувних підприємств щорічно відзначаються аварійні розливи нафти. Забруднення розчинними й емульгованими нафтопродуктами та іншими компонентами антропогенного походження охоплюють територію басейну, що супроводжується перебудовою біоценозів усього басейну.

Зміна екологічних параметрів середовища призвела до скорочення відтворення біологічної продукції на всіх рівнях трофічного ланцюга, що

безпосередньо спричинило скорочення запасів і уловів промислових видів риби.

У зв'язку з цим важливим завданням є не тільки ефективне використання промислових запасів, а й збереження унікальних водних екосистем, а також охорона і відновлення втрачених біоресурсів. Особлива роль у цьому процесі має бути відведена створенню рибогосподарської заповідної зони [13].

Фенантрен і дибензотіофен викликають сильний набряк перикарда і жовткового мішка, а пірен і флуорен - подібні, але менш виражені ефекти. Аритмія, яка виникає в результаті впливу трикільцевих ПАВ, є характерною для атріовентрикулярної блокади провідності (рис. 1.2). Крім того, виявлені деформації, які були пов'язані з набряком перикарда, очевидно, є наслідком аномальної серцевої функції. Це визначено за допомогою серця (sih), який має знижену експресію серцевого тропоніну Т; ці мутанти демонструють дефекти, ідентичні тим, що спостерігаються при впливі трикільцевих ПАВ.

Крім того, цілеспрямоване вимкнення (ін'єкція морфолінону sih ембріонам) експресії серцевого тропоніну Т має майже такий самий ефект, як і sih-мутант або ПАВ. Ці серцеві ефекти окремих ПАА на риби, таких як оселедець, для ембріонів тихоокеанського оселедця, що зазнають впливу креозоту, і пізніше підтверджені на ембріонах оселедця, що зазнають впливу сирої нафти з північного схилу [1-8].

Крім того, у ембріонів оселедця, які зазнають впливу протягом короткого проміжку часу (<24 год) між 7 і 8 днями розвитку (після завершення розвитку серця, але за кілька днів до вилуплення), спостерігається зниження частоти серцевих скорочень, що свідчить про прямий фізіологічний ефект ПАВ на додаток до впливу на формування серця.

Різні структури ПАВ по-різному відповідають за різні аспекти цього синдрому розвитку. Трикільцеві ПАВ виявляються більш тісно пов'язаними з фенотипами розвитку серцево-судинної системи, ніж дво- або чотирікільцеві структури. Відповідно до цього, вивітрювання нафти зміщує хімічний склад

від дво- до трикільцевих структур, що супроводжується зростанням токсичності.

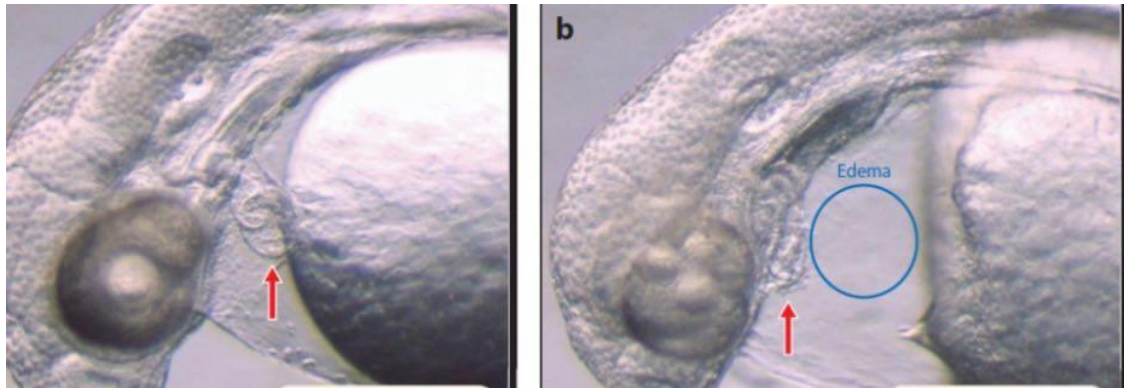


Рис. 1.2 – Ембріони тихоокеанського оселедця (*Clupea pallasii*), які піддаються впливу води (від запліднення до 7 днів після запліднення), що протікала по (а) ненафтованому гравію або (б) гравію, вкритому сирою нафтою з північного схилу (1,5 г нафти на кілограм гравію).

Серця чітко відрізняються за розміром і нормальною формою шлуночків. Набряк перикарду (синє коло) є очевидним у ембріона, що зазнав впливу нафти. Вміст поліциклічних ароматичних вуглеводнів у тканинах ембріонів, що зазнали впливу нафти, становив 3 000 мг/г сирої ваги.

Нафтопродукти, що потрапляють у водне середовище, руйнуються мікроорганізмами. На жаль, цей процес іде досить повільно. Особливу небезпеку становлять донні відкладення, здатні призвести до вторинного забруднення навколишнього середовища [14].

2 ЗАЛЕЖНІСТЬ СТУПЕНЯ ВПЛИВУ НАФТИ НА ГІДРОБІОНТІВ ВІД КІЛЬКІСНОГО СКЛАДУ ЇЇ КОМПОНЕНТІВ У ВОДНОМУ СЕРЕДОВИЩІ

Нафта надходить у довкілля за її видобутку, транспортуванні, аварійних розливах, і навіть у результаті природних просочувань з нафтоносних пластів. Забруднення нафтовими вуглеводнями природних і штучних водойм в даний час є серйозною екологічною проблемою. Період збереження нафти у водному середовищі варіює від кількох днів до 10 років і більше. Практично всі компоненти нафти більшою чи меншою мірою є токсичними для гідробіонтів.

Сира нафта та продукти її переробки надають отруйну дію на водні організми, окремі речовини можуть акумулюватися в органах та тканинах гідробіонтів, передаватися по харчових ланцюгах [8-10].

За хімічним складом нафта є складним природним продуктом, основою якого (до 98 %) є насичені і ненасичені вуглеводні (УВ) аліфатичної та циклічної структури. Незважаючи на те, що взаємна розчинність нафти і води мізерно мала (не перевищує соті частки відсотка), основу токсичних продуктів нафти складають саме розчинені речовини [3-4].

Водорозчинна фракція нафти містить граничні УВ, нафтенові кислоти, феноли, а також бі-і поліциклічні УВ. Найбільш високою розчинністю мають низькомолекулярні ароматичні УВ, які, отже, є максимально біодоступними для водних організмів. Вони здатні проникати через клітинні мембрани та викликати структурні та функціональні порушення.

УВ змінюється вже після приготування емульсії. Наприклад, якщо у вихідному зразку нафти домінували моноароматичні УВ (алкілбензоли, індани), то через певний період після змішування її з морською водою переважали сполуки з двома та трьома бензольними кільцями (аценафтени, фенантрени). З сіркоорганічних сполук у значних кількостях утримувалися

бензтіюфени. Склад продуктів трансформації нафти насамперед визначається хімічною природою вихідних ароматичних сполук.

Різноманітність структур та властивостей сполук нафти визначає різні механізми їх взаємодії з біологічними системами.

Біологічні ефекти нафти у водних організмів вивчаються вже понад століття. Залежно від тривалості та масштабу забруднення нафтою може спостерігатися широкий діапазон реакцій у відповідь – від фізіолого-біохімічних, морфологічних та поведінкових аномалій на рівні організмів до структурних та функціональних перебудов у популяціях та спільнотах.

За оцінками, діапазони діючих концентрацій розчиненої нафти для морських організмів змінюються у широких межах (до 5-6 порядків величин). Існують видові та групові особливості реагування організмів на присутність нафти у воді. Більшість видів морської фауни виявляють підвищену чутливість (уразливість) до дії нафти на ранніх (ембріональних та постембріональних) стадіях розвитку [7-9].

Однак такі параметри, як патологічні процеси в тканинах, біоенергетичний статус, зміна швидкості зростання, порушення репродуктивних функцій, проявляються подібним чином за різних видів антропогенного впливу. Реакції на вищих біологічних рівнях менш специфічні, ніж на молекулярному.

Важливим аспектом проблеми є вплив нафтовуглеводнів (НВ) на організм на субклітинному рівні, оскільки молекулярні ефекти можуть бути пов'язані з несприятливими наслідками для організмів у майбутньому.

Хімічний стрес у біологічних системах в даний час визначають за допомогою так званих молекулярних біомаркерів - кількісних показників, що вимірюються в порожнинних рідинах, клітинах або тканинах, які на біохімічній або клітинній шкоді вказують на присутність забруднювача та (або) величину реакції організму [10-11].

Зміна біо-маркерів який завжди передбачає погіршення стану особин, як вважалося раніше. У сучасних дослідженнях біомаркери є насамперед

інструментом прогнозування стану біоти під впливом тих чи інших факторів середовища. Риби та молюски визнані зручними та репрезентативними об'єктами для біомоніторингу з використанням молекулярних біомаркерів. Крім того, багато видів є об'єктами промислу і використовуються в їжу людиною, і вивчення впливу забруднення на їхній метаболізм має практичне значення. Тому в цьому огляді ми розглянемо молекулярні ефекти НВ у представників цих двох груп морських організмів. В основі біохімічної адаптації тварин до дії більшості органічних полютантів лежать реакції трансформації останніх у мембранних структурах клітини. Похідні НВ, які потрапили в організм, зазнають двох фаз метаболізму.

Перша - монооксигеназне окислення, у ході якого вихідні речовини набувають реакційно-здатних груп (гідроксильні, епоксидні та ін.). У другій фазі біотрансформації відбуваються реакції, пов'язані з кон'югацією окислених хімічних речовин. В результаті утворюються високомолекулярні гідрофільні сполуки, що видаляються з організму з продуктами системи виділення [12-14].

Однак деякі реакції призводять до утворення продуктів, токсичніших, ніж вихідні. Цей процес відомий як біоактивація. Даний шлях перетворення проміжних метаболітів, як показано в багатьох дослідженнях, викликає канцерогенні, мутагенні та тератогенні ефекти.

2.1 Вплив нафти на монооксигеназну систему морських риб та молюсків

Ферменти сімейства цитохрому Р450, локалізовані в мітохондріях і гладкому ендоплазматичному ретикуліні, беруть участь у найважливіших фізіологічних процесах, включаючи біосинтез і метаболізм стероїдів, жирних кислот і простагландинів. В даний час відомо, що цитохроми Р450 є структурно і функціонально різні ізоферменти [15].

Вони кодуються великою супер сімейством генів, яка розділена на сімейства, підродини та індивідуальні гени. Специфічна індукція певних форм при експозиції організмів тією чи іншою хімічною речовиною.

Одна з найважливіших властивостей цитохрому P450, набутих у процесі еволюції. Сімейство цитохромів P4501A має особливе значення, оскільки метаболізує найпоширеніші класи канцерогенів. Так, крім метаболізму ендогенних сполук, мікросомальні ферменти цитохрому P450 каталізують реакції біотрансформації та детоксикації багатьох органічних поллютантів, включаючи НУ, діоксини та пестициди. Специфічні цитохром P450-залежні моно-оксигенази, такі як етоксирезорифін-О-діетилаза (ЕРОД, одиниці виміру активності - пмоль резорифіну/хв/мг білка) і бенз(а)пірен-гідрокси-лаза (БПГ, одиниці виміру - пмоль бенз/а присутності у середовищі подібних речовин.

Вимірювання реакції цитохрому P450 у відповідь через індуковану каталітичну активність цих ферментів або імунохімічними методами широко використовується як специфічний біомаркер на цей тип забруднення у риб і двостулкових молюсків [12-15].

УВ сирової нафти різною мірою впливають на монооксигеназну активність. Найбільшу індукцію викликають високомолекулярні речовини з 4-6 ароматичними кільцями, такі як бенз(а)пірен, бенз(к)флюорантрен, дибенз (а, h) антрацен, що мають канцерогенні властивості. Однак ці сполуки, як більш адекватні результати, дають речовини з 2-3 ароматичними кільцями, такі як фенантрен, флюорантрен і нафталін. Представники цього класу поліароматичних вуглеводнів (ПАВ), що містяться в нафті, в більшій кількості викликають збільшення кількості цитохрому P450 1A, але не індукують ЕРОД. Однак продукти їх фотоокислення, такі як хінони, надають подібну дію і часто є більш токсичними, ніж вихідні речовини, легко піддаються деградації в навколишньому середовищі. Таким чином, продукти фотоокислення НВ роблять свій внесок у вплив нафти на гідробіонтів на молекулярному рівні [2].

Активність ЕРОД і БПГ у риб збільшується протягом кількох діб після надходження нафти до водоймища і досягає максимуму через 2-3 міс.

У деяких видів риб активність ЕРОД у забрудненому нафтою районі збільшується до 16 разів. Активність знижується до вихідного рівня протягом одного року або менше за відсутності хронічної дії. Так, активність ЕРОД у печінці лосося, виловленого через 11 та 51 день після розливу нафти, варіюється від 200 до 275 од [16]. До 66-го дня активність знижується до 150, а через 114 днів – до 50 од. Активність БПГ у *Salmo*, яка була забруднена на нафтою в 1989 р., знизилася з 240 до 90 од. відповідно через 120 та 460 днів після розливу. Однак активність цього ферменту у камбали *Pleuronectes bilineatus* з того ж району не знижувалася протягом 120, 460 та 769 днів після розливу та залишалася на рівні 200-250 од.

Це, пов'язано з тим, що в зоні проживання цього виду нафта зберігалася більш тривалий час. Активність ЕРОД у печінці камбал *Limanda limanda* та *P. platessa* з району розливу залишається підвищеною протягом 3 місяців. Активність системи цитохрому Р450 у риб з районів Аляски, забруднених нафтою при розливі з танкера *Exxon Valdez* була підвищена навіть через 10 років після інциденту. Високі концентрації метаболітів ПАВ в жовчі цих риб підтверджували вплив на них залишкової кількості нафти [8-10].

Як правило, у риб із районів нафтових розливів спостерігається збільшення монооксигеназної активності порівняно з рибами із фонових акваторій. У риб із різних районів зал. Галвестон (Техас, США), забрудненого ПАВ, визначали активність окремих біомаркерів.

У соміка *Arius felis* індукція Р450-залежних ферментів варіює в широких межах, проте спостерігалось достовірне збільшення концентрацій вуглеводневих метаболітів у жовчі у риб із забруднених акваторій порівняно з більш чистими.

Водночас не відзначають суттєвих відмінностей у активності системи цитохрому Р450 у риб із забруднених нафтою та чистих районів. Так, після аварійного розливу нафти біля берегів Фінляндії проводили моніторинг

забруднення активності системи біотрансформації в печінці окуня *Perca fluviatilis* із цього району порівняно з фоновими. Була зафіксована лише невелика індукція монооксигеназної активності у риб із забрудненої акваторії через 4 місяці після розливу. У впливі нафтопродуктів на риб цього виду реакція у відповідь виявлялася швидко і була добре виражена. Відсутність реакції з боку ферментів першої фази біотрансформації, може бути пов'язана з переважанням нафти ПАУ з 2-3 кільцями [18].

Як зазначалося вище, низькомолекулярні ПАВ практично не індукують монооксигеназну систему, а, за деякими даними, навіть інгібують активність ферментів. У камбал *Pseudopleuronectes americanus* із забрудненого нафтопродуктами не було виявлено підвищення монооксигеназної активності в печінці, проте значна індукція ферментів спостерігалася у нирках.

Отже, використання печінки як єдиного органу-мішені в біомаркерних дослідженнях може призвести до помилкового висновку про відсутність ефектів та недооцінку токсичності.

Після надходження нафти в довкілля гідробіонтів НВ можуть потрапляти в організм з води шляхом пасивної дифузії через напівпроникні мембрани зябер або через шкіру. Вплив через частинки їжі пов'язаний з абсорбцією ліпофільних компонентів мембранами травного тракту. Існує думка, що вплив через воду робить більш істотний вплив на організми, ніж надходження нафтопродуктів з їжею. Очевидно, це зумовлено більшою біодоступністю розчиненої фракції нафти. Для вивчення впливу нафти на організми через воду в умовах застосовують водорозчинні фракції нафти або емульсію нафти у воді [19-22].

Концентрації нафтопродуктів 30-300 мкг/л зазвичай викликають індукцію монооксигеназної активності. При цьому за збільшенням слід досить швидко зниження до початкового рівня після поміщення риб у чисту воду, що свідчить про оборотність змін метаболізму. Так, у лосося *Salmo salar*, поміщеного в емульсію НВ із концентрацією 250 мкг/л, значне збільшення активності ЕРОД спостерігається через два дні.

Після перенесення риб у чисту морську воду активність знижується до контрольних значень через 4 дні. Активність БПГ у кижуча *Oncorhynchus kisutch* після дії 350 мкг/л сирої нафти протягом 10 днів була такою ж, як у риб. Очевидно, це зумовлено розбіжністю у порогових концентраціях, викликають ефект цього виду, і особливостями метаболізму тест-організмів.

При надходженні нафти до організму риб з їжею також спостерігається підвищення монооксигеназної активності, причому у клітинах як печінки, і кишкового епітелію.

Взаємозв'язок між змістом ПАВ в донних відкладеннях і активністю Р450-залежних ферментів. Камбал *P. americanus* на 4 міс поміщають до ґрунтів, що містять свіжу та вивірену венесуельську сиру нафту (2,6 мг/г). Активність БПГ у печінці риб збільшується у 12 разів у порівнянні з контролем [18-22].

Однак у камбал, яких тримають на ґрунтах, що містять 1 мг/г сирої нафти, не виявлено збільшення активності ЕРОД у печінці. Камбал *Pleuronichthys verticalis* протягом 7 днів піддають впливу ґрунтів з району природного виходу нафти, що містять до 105 мкг/г.

Збільшення вмісту цитохрому Р450 1А у печінці риб спостерігається тільки при цій максимальній концентрації. Однак у риб відзначено зменшення вмісту естрадіолу в плазмі.

У мідій *Mytilus edulis* під впливом північноморської нафти відбувалося збільшення сульфатації естрадіолу в гепатопанкреасі.

Таким чином, у риб система біотрансформації розвинена дуже добре, і за активністю ферментів І фази монооксигеназного окислення в їх органах можна отримати достовірну інформацію про присутність в середовищі НВ. Саме тому більшість подібних робіт виконано на рибах завдяки активному метаболізму відбувається досить швидка деградація в ЕРОД практично немає.

Однак риби можуть служити індикаторами нафтового забруднення на відносно великій акваторії проживання.

Молекулярні біомаркери нафтового впливу вивчаються на прикладі прикріплених і двостулкових молюсків, що зариваються, із забруднених акваторій. Концентрація полютантів у їх м'яких тканинах корелюють з індукцією цитохрому P450 та антиоксидантних ферментів у гепатопанкреасі. Аналогічна закономірність спостерігається і для мідій *Mytilus edulis*, зібраних на 5 станціях біля узбережжя Іспанії через 6 місяців після розливу нафти. В органах молюсків, зібраних ближче до місця розливу, виявлено підвищений вміст ПАВ, а їх специфічні хімічні співвідношення відображають переважання продуктів деградації нафти [15-19].

Відомо, що двостулкові молюски-фільтратори відрізняються здатністю накопичувати ПАВ без їх помітного метаболічного розкладання. Для з'ясування можливості біотрансформації нафти в процесі метаболізму молюсками порівнюють склад ароматичних УВ нафтової емульсії та продуктів виведення мідій. Для цього мідій *Mytilus* поміщають в емульсію із вмістом нафти 30-40 мл/л на 6 діб. За складом ароматичних УВ досить подібні, переважають речовини з 2-3 ароматичними кільцями. Це дозволяє припускати, що самі мідії беруть участь у значному перетворенні ароматичних УВ.

У молюсків низька в порівнянні з хребетними активність гідроксильюючих ферментів, що сприяють окисленню ПВ. Недостатня швидкість метаболізму аренів веде до того, що єдиним способом захисту від антропогенних ПВ є повільне виведення їх із організму [25].

Таким чином, інтенсивність окисних реакцій метаболізму органічних молекул залежить як від виду тварин, так і від особливостей складу та стану нафтопродуктів, а також від шляхів їх надходження до організму, концентрації та ступеня біодоступності. Крім того, на дію НВ значний вплив мають такі фактори середовища, як температурний режим, сонячна радіація, гідрологічні умови, тому ефекти впливу можуть значно відрізнятися в одних і тих же видів у різних кліматичних зонах [2-6].

2.2 Вплив нафти на антиоксидантну систему морських риб та молюсків

Крім ферментів моноксигеназної системи, в детоксикації полютантів беруть участь і ферменти так званої II фази окисного метаболізму, що здійснюють реакції кон'югації. Електрофільні інтермедіати, що продукуються в ході монооксигеназних реакцій, є субстратами глутатіон-S-трансферази (Г-S-T) та інших ферментів і в ході реакції з глутатіоном перетворюються на нешкідливі продукти [8-10].

Г-S-T також здатна незворотно зв'язувати різні ксенобіотики, будучи, таким чином, білком-нейтралізатором або транспортним білком. Крім того, фермент має антиоксидантні властивості та регулює процеси утворення вільних радикалів та перекисного окислення ліпідів мембран. Відомо безліч форм Г-S-T, що кодуються різними генами, причому різні форми мають різні субстрати.

Специфічність субстратів обумовлена підсумовуванням активностей різних форм за умови, що самі форми значно субстрат специфічні. Як правило, найбільш високі значення активності Г-S-T відзначаються в печінці (гепатопанкреасі), як ключовому органі біо трансформації ксенобіотиків у молюсків і риб [11-15].

Достовірне підвищення активності даного ферменту було виявлено в зябрах мідій *Bathymodiolus* і *Modiolus* з Мексиканської затоки, забрудненого НВ, а також у печінці із найбільш забруднених ділянок, де загальний вміст ПАВ вуглеводнів у донних опадах перевищує 1000 нг/г.

Вплив сублетальних концентрацій водорозчинних фракцій нафти на захисну ферментну систему двостулкових молюсків досліджували на прикладі устриць *Pinctada imbricata*. Після короточасного впливу (7 днів) активність Г-S-T у гепатопанкреасі значно підвищена, тоді як у минтаї знижена.

Одне з найважливіших місць реакції організму на вплив токсичних сполук, у тому числі НУ, займають вільно радикальні процеси, що включають утворення активних форм кисню, інтенсифікацію перекисного окислення ліпідів, деструкцію мембран, пошкодження ДНК і білків. Активність антиоксидантної системи та процесів біо трансформації поллютантів є досить чутливим індикатором функціонального стану організмів і до певної міри – довкілля їхнього існування [14].

Одним з основних компонентів антиоксидантної системи є три пептид глутатіон (GSH), що має у своєму складі одну сульфгідрильну групу. Поряд із сірковмісними амінокислотами він захищає клітини від гідроксилу ВІН. Кон'югація ксенобіотиків та продуктів їх трансформації з GSH – безумовний шлях детоксикації.

Крім того, GSH входить до складу глутатіон-залежних ферментів, що утворюють глутамінову систему, яка є потужним механізмом захисту організму від окислювального стресу. Ця система включає, крім Г-S-T, глутатіонредуктазу і глутатіонпероксидазу [18].

Глутатіонредуктаза (GR) каталізує реакцію відновлення дисульфідові форми GSH в сульфгідрильну за рахунок НАДФН. Для двостулкових молюсків із забруднених районів характерно знижений вміст GSH у зябрах та гепатопанкреасі при високій активності GR, що свідчить про витрачання субстрату та напружене функціонування ферментної системи.

Глутатіонпероксидаза (G-Px), що має у складі активного центру різні мікроелементи, інактивує перекису ліпідів. Припускають також, що цей фермент захищає організм від H_2O_2 та органічних перекисів, які у великих кількостях утворюються в аеробних клітинах під час окислювально-відновних реакцій [3-6].

У клітинах гідробіонтів присутні й інші антиоксидантні ферменти, дія яких спрямована на видалення потенційно небезпечних з'єднань, що мають високий деструктивний окисний потенціал. Серед них основними є каталаза.

Каталаза присутня в клітинах усіх аеробних організмів, з максимальним вмістом в еритроцитах та печінці.

Цей фермент каталізує розкладання перекису водню до молекулярного кисню та води. Зміна активності даного ферменту у двостулкових молюсків, а також риб, при впливі різних забруднювачів: НУ, полі хлорованих пестицидів, металів, а також комплексного забруднення морського середовища.

Супероксиддисмутаза (СОД) захищає організм від дії супер оксидних аніон-радикалів (O_2^-), каналізуючи реакцію їх дисмутації: $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O$. Перекис водню, що утворюється, інактивує СОД. Якщо ж в інкубаційному середовищі є каталаза, що розкладає АЛЕ, то СОД не втрачає своєї активності навіть після дисмутування більше 1000 супероксидних радикалів, що припадають на 1 М ферменту. Узгоджена робота цих ферментів пригнічує ініціацію утворення перекисів, підтримуючи концентрацію су пероксиду на мінімальному рівні [6-7].

Реакція у відповідь будь-якого з біомаркерів на різні дози токсикантів повинна бути оцінена протягом оптимального проміжку часу.

Зміна активності антиоксидантних ферментів та виникаючі окисні пошкодження у антарктичного черевоногого молюска *Nacella concinna* при дії дизельного палива (ДП). Активність Г-S-T і каталази за час достовірно не відрізняється від контролю, однак у середньому показники в експериментальних групах були вищими, особливо після 168 годин впливу.

Активність G-Px протягом 48 год не відрізняється від контролю, а після 168 год достовірно підвищена у тварин, що піддаються дії 0,1% розчину ДП. Активність СОД в гепато-панкреасі молюсків, що містилися у воді з 0,05% ДТ, не змінювалася і не відрізнялася від контролю, тоді як у воді з 0,1% ДТ вона збільшилася багаторазово через 48 год, але знизилася до початкового рівня через 168 год. Також зафіксовано достовірне збільшення перекисного окиснення ліпідів та окиснення білків після 168 год експерименту, причому більш значне за мінімальної концентрації ДТ [12].

Відсутність ефекту при низьких концентраціях автори пов'язують із існуванням порога утворення активних форм кисню, після досягнення якого організму потрібно більш активне функціонування компенсаторних механізмів для виживання в стресових умовах. Припускають, що цей поріг досягається за тривалішого впливу. При більш високих дозах токсиканту первинна реакція організму може виразитися у зниженні активності ферментів, за яким слідує активація антиоксидантної системи.

При впливі низьких концентрацій ДП (від 0,005 до 1,0 мг/л) на антиоксидантну систему личинок *Carassius* протягом 40 днів показано, що при мінімальній концентрації ДП активність ферментів не збільшується, тоді як при концентрації 0,01 мг/л вона помітно підвищується і підвищується на рівні і тривало. При вищих концентраціях активність знижується. Така закономірність спостерігається для каталази, СОД, селен-залежної G-Px, концентрації відновленого GSH. При цьому величина двох останніх показників залишається вище значень, тоді як інших - нижче. При підвищеному вмісті нафтопродуктів у середовищі GSH і G-Px відіграють ключову роль у детоксикації [14-16].

Активність Г-S-T при 0,005 мг/л достовірно не відрізняється від такої у контрольних тварин, а при більш високих концентраціях дещо нижча.

Активність цього ферменту не змінюється й у печінці за впливом важких фракцій нафти. Таким чином, реакція у відповідь на НУ з боку Г-S-T може бути різною у різних видів при неоднакових умовах впливу.

Вплив північноморської нафти на ювенільних особин атлантичної тріски *Gadus morhua* було відзначено збільшення вмісту окисленого глутаміну, а також активності ГР та каталази. У цьому немає інтенсифікації перекисного окислення ліпідів. При вивченні активності каталази у личинок осетра достовірно показано, що активність каталази може служити характеристикою стану риб в умовах з різним ступенем антропогенного навантаження. Найбільш високою активністю каталази відрізнялися личинки,

виловлені в районі нафтогавані, де часто траплялися розливи нафтопродуктів [23-25].

У Камбалі *Paralichthys olivaceus* вивчають зміну активності захисних ферментних систем при впливі фенатрену в концентраціях 0,5, 1,0 і 2,0 мк. Активність Г-S-T, каталази, GR та G-Px достовірно підвищена в печінці, нирках та зябрах після 2 та 4 тижнів.

Після перенесення мідій *Perna viridis* з відносно чистої акваторії в забруднену нафтопродуктами на 30 днів спостерігається підвищення активності більшості вивчених антиоксидантних параметрів (каталаза, G-Px, GR, GSH) в зябрах і гепатопанкреасі і позитивна кореляція з вмістом в тканині поліароматичних вуглеводнів [18].

Отже, ПАВ, зокрема бенз(а)пірен, належать до забруднювачів, здатних викликати збільшення продукції свобод окислення ліпідів, що свідчить про ефективний захист організму від окислювального стресу. Найбільш чутливими до забруднення виявляються ті тварини, антиоксидантна система яких недостатньо розвинена через будь-які індивідуальні особливості організму або її реакція запізнюється. У мідій *M. edulis* з акваторій біля узбережжя Іспанії не було зафіксовано достовірних відмінностей в активності Г-S-T та СОД між забрудненими нафтою та чистішими районами. При цьому у молюсків, зібраних ближче до місця розливу, відмічено достовірно підвищений рівень перекисного окислення ліпідів, що свідчить про прооксидантні ефекти нафти [22-33].

Таким чином, вплив вуглеводнів нафти змінює баланс в організмі у бік окислювального стресу, проте при помірному забрудненні індукція антиоксидантної системи сприяє підтримці цього на відносно безпечному рівні. Молекулярні ефекти нафти виявляються і лише на рівні нуклеїнових кислот. Так було відзначено порушення цілісності ДНК у риб із забрудненого нафтою району.

Мідій *M. galloprovincialis* протягом 12 днів утримують у воді, що містить сиру нафту. Концентрація ПАВ становить 55,142 мкг/л. У молюсків

спостерігається достовірне збільшення частоти ушкоджень ДНК. Частота подібних порушень у камбали знаходиться в прямій залежності від концентрації високомолекулярних ПАУ в ґрунтах. Рівень аддуктів (зшивок) ДНК у печінці риб та гепатопанкреасі ракоподібних корелював із присутністю у середовищі ПАУ, у тому числі канцерогенних.

Таким чином, універсальність механізму дії нафтопродуктів на різні види гідробіонтів. При дії вуглеводнів нафти у тварин часто відзначається збільшення активності цитохрому Р450-залежних монооксигеназ та інших ферментних систем [16]. У багатьох випадках після нафтових розливів підвищення цих параметрів є тимчасовим. Високі рівні зберігаються протягом кількох місяців, потім відбувається зниження до вихідних величин не більше одного року. При хронічному забрудненні підвищена активність біомаркерів зберігається протягом період перебування нафти серед.

Ці показники дозволяють виявляти наявність хімічного стресу у живих організмів у морських екосистемах, компоненти біологічних систем, можна більш ефективно прогнозувати та регулювати стан морських екосистем, щоб покращити та зберегти якість навколишнього середовища.

2.3 Антирадикальна система тканини риб при впливі фенолу і нафталіну

Використовують годовиків карася середньою вагою $93 \pm 8,5$ г і довжиною 17 ± 6 см. Поміщають у плексигласові акваріуми об'ємом 150 л, де створюють умови постійного газового та температурного режиму води. Середня температура води становила 17-19 °С, вміст кисню 4-5 мг/л, рН 7-7,4. В якості забруднювачів використовують фенол і нафталін, концентрації яких склали 3 і 10 мг/л, що відповідало діючої речовини 0,1 від встановленої 96-години CL50. Розчини токсикантів готують безпосередньо перед додаванням до акваріуму на дистильованій воді та замінюють щодня.

Риб містять у розчинах токсичних речовин, а контрольних – в аналогічних умовах у чистій воді. Годували риб сухим гранульованим кормом 1 раз на добу, виходячи з маси тіла та температури води за прийнятими у ставковому рибництві нормами згідно з інструкцією з проведення токсикологічних дослідів [22].

Відбір проб проводять через 1, 4, 7 та 21 добу від початку. Число проаналізованих риб у кожній точці становить 10 особин. Про інтенсивність ПОВ у тканинах риб судять за накопиченням малонового діальдегіду (МДА) – одного з кінцевих продуктів перекисного окислення.

Концентрацію МДА визначають на основі обліку кількості продуктів перекисного окиснення ліпідів, що реагують з ті барбітурової кислоти та дають з нею пофарбований комплекс. Загальну антиокислювальну активність біологічного матеріалу (ОАА), що відображає вміст антиоксидантів, встановлюють по кінетиці окислення відновленої форми 2,6-дихлорфеноліндофенолу киснем повітря в присутності та відсутності тканинних екстрактів [20].

За період у всіх випадках загибелі риб не спостерігаються, не змінювалося їх поведінка, при розтині відзначалося гарне наповнення кишечника їжею, патологічних змін внутрішніх органів не зафіксовано. Можна стверджувати, що введення використаних токсикантів у воду у зазначеній дозі не викликало у риб візуальних зовнішніх та внутрішніх проявів ознак отруєння.

У той же час, встановлено, що тривале перебування риб у воді з низькими концентраціями використаних забруднювачів призводить до зміни інтенсивності перебігу біохімічних процесів у організм риб.

При експозиції риб у воді, що містить фенол і нафталін, рівень МДА у всіх тканинах через 1 добу впливу токсикантом не змінювався, але потім у наступні терміни спостереження цей показник став підвищуватися. При забрудненні води фенолом спостерігаються збільшення вмісту МДА у 1,2 рази порівняно з контролем лише у нирці на 4 добу, але на 7 добу показник

став вищим за контроль у печінці риб у 2,1 рази, у нирках – у 1,39 рази, селезінці – 1,2 рази; на 21 добу експозиції рівень МДА залишався підвищеним у всіх досліджених тканинах у 1,8–2 рази. При вмісті риб у воді з нафталіном на 4 добу відбулося збільшення вмісту МДА у 1,3 рази у нирках та селезінці; на 7 добу – у селезінці показник залишився на колишньому підвищеному рівні, а в нирках ще більше збільшився, перевищивши норму у 1,65 рази; до кінця експозиції вміст МДА був вищим за контроль у селезінці у 3,1 рази, у нирках – у 2,2 рази, у печінці – у 1,7 рази. Вплив нафталіну на рибу у порівнянні з фенолом до кінця відбилося сильнішим посиленням перекисних процесів у нирках і селезінці, а в печінці риби більший ефект спостерігається при впливі фенолу [15-16].

Накопичення в тканинах продуктів ПОВ є показником активації процесів вільно радикального окислення. Підвищений вміст продуктів перекислення ліпідів у тканинах риби показує, що тривалий вплив токсикантів у низьких концентраціях призводить до посилення ПОВ, порушення регуляції процесів ПОВ та розвитку стану, що дістала назву «перекисний стрес». ПОВ, відбиваючи накопичення проміжних і кінцевих метаболітів і фізіологічно активних інтер медіаторів, свідчить про захисну реакцію організму у відповідь на фізіолого-біохімічному рівні на дію стресорних неспецифічних для організму факторів [10-11].

Розвиток ПОВ каталізується переважно різними формами активного кисню: супероксидним і гідроксильним радикалами, синглетним киснем, пероксидами. Причиною інтенсифікації ПОВ може бути також зниження активності антиоксидантних ферментів (глутатіонпероксидази, глутатіонтрансферази, супероксиддисмутази та ін.), що руйнують перекису або запобігають їх утворенню, так і посилення активності неферментних сполук, відповідальних за утворення перекисів і низькомолекулярних сполук, що утворюють при взаємодії з радикалом β -каротину, глутатіону крові та ін).

Посилення перекисовитних процесів у риби, що свідчить про порушення окисно-відновного балансу, супроводжувалося зміною

інтегрального показника ОАА [15-18]. При вмісті риб у розчинах фенолу і нафталіну зміна ОАА у печінці мала фазовий характер: спочатку показник не змінювався, потім знижувався в середньому на 18%, а до кінця досвіду показник ОАА у фенолі перевищив норму на 11,6%, у нафталіні – на 12,2%.

Нирки риб на перебування у воді з фенолом відреагували зниженням інтегрального показника щодо контролю на 18,8% вже з 1-ї доби, на 4 добу ОАА прийшла в норму, на 21 добу спостереження показник став на 24,6% нижче за норму. При експозиції карасів у розчині нафталіну у нирках риб спостерігають знижений рівень показника на 1, 4 та 7 добу, але до кінця експерименту ОАА перевищують контроль на 7,3%. У селезінці риб вплив фенолу на 1 та 4 добу не вплинув на показник ОАА, на 7 добу відбулося зниження на 18,3%, а на 21 добу показник відповідав контролю. У селезінці показник ОАА в нафталіні на 4 та 7 добу був нижчим за контроль, а на 21 добу перевищив такий на 13,9% [8-10].

Зниження ОАА показує, що вміст антиоксидантів збільшується і, навпаки, у разі підвищення показника рівень антиоксидантів падає. Нафталін порівняно з фенолом справив сильніший вплив на антирадикальний захист тканин риб. Достовірна зміна інтегрального показника антиокислювальної активності у риб свідчить про коливання в процесі перебування риб у токсикантах рівня речовин, що мають властивості антиоксидантів, як у тканинах, так і в організмі риб. У цілому нині виявлена картина коливань ОАА характеризує порушення рівноваги у системі ПОЛ-АЗ убік активації окислювального стресу [12-16].

Перекисний окислювальний стрес – це процес, що складається з фази активізації функції ферментів антирадикального захисту (внаслідок накопичення органічних гідроперексидів) та фази пригнічення активності антиперекисних ферментів, обумовлену прямим пошкодженням молекул ферментів вільними радикалами, виснаженням запасів відновленого глутатіону та накопиченням продуктів пероксидації.

Динаміка зміни загальної антиокислювальної активності та відповідно рівня антиоксидантів. Характерну зміну активності антиперекисного захисту можна простежити, наприклад, печінки при нафталіновому забрудненні.

Загалом, в пізніші терміни в тканинах риб, підданих впливу токсичними речовинами, на тлі зниження речовин антиоксидантного захисту відбулося накопичення продуктів ПОВ, що розглядатися як перехід перекисного стресу в кінцеву, декомпенсовану стадію, пов'язаних із зміною рівня доставки кисню до тканин. В тканинах нирок, печінки та селезінки, свідчить про різне функціональне значення таких, що є імунокомпетентними та гемопоетичними органами риб [15-18].

Нирки у риб виконують різноманітні функції: імунологічні та екскреторні. У нирках відбувається лімфо- і мієлопоез, вони багаті на клітини лімфоїдно-мієлоїдної тканини ретикулоендотеліальної системи, які відповідальні за реалізацію функцій розпізнавання «чужого», руйнування антигену, синтезу антитіл та утворення різних типів лейкоцитів: лімфоцитів, нейтрофід. Нейтрофілам і макрофагам належить важлива роль в індукуванні окислювального стресу та руйнуванні тканин власного організму при стресі.

Сечовидільна функція нирок тісно пов'язана зі станом клітинної мембрани, контрольованої антиоксидантною системою. Печінка – один із найважливіших поліфункціональних органів риб, роль якого дуже важлива у багатьох процесах життєдіяльності. Печінка є масивною залозою, що є одночасно екзокринною та ендокринною залозою. Як ендокринна, вона секретує в плазму крові цукру, альбуміни, фактори зсідання крові, бере участь у регуляції рівня ліпідів у крові; як екзокринна – за системою жовчних проток виділяє жовч у травний тракт. Печінка бере участь у руйнуванні та нейтралізації чужорідних речовин, синтезі медіаторів імунної відповіді, очищення крові від імунних комплексів, токсичних сполук тощо. Селезінка риб - це заліза, пов'язана з кровообігом, в якій відбувається утворення еритроцитів та лейкоцитів [11-13].

3 ОЦІНКА ВПЛИВУ НАФТИ НА БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ РИБ

3.1 Вплив нафтових вуглеводнів на біохімічні показники риб

Досить небезпечним і постійно присутнім забруднюючим води токсикантом є нафта. З метою виявлення ПОВ у механізмі нафтової інтоксикації при ранній діагностиці токсичної дії нафтових вуглеводнів на організм риб. Випробовуються такі концентрації нафти зі структури: 0,5 мг/л (50 ГДК); 1,25 мг/л (125 ГДК) і 2,5 мг/л (250 ГДК), Об'єктами впливу НВ слугують вобла і бичок-кругляк [4-6].

Зміни біохімічних показників ліпідного обміну у вобли за впливу НУ показано на рисунку 3.1.

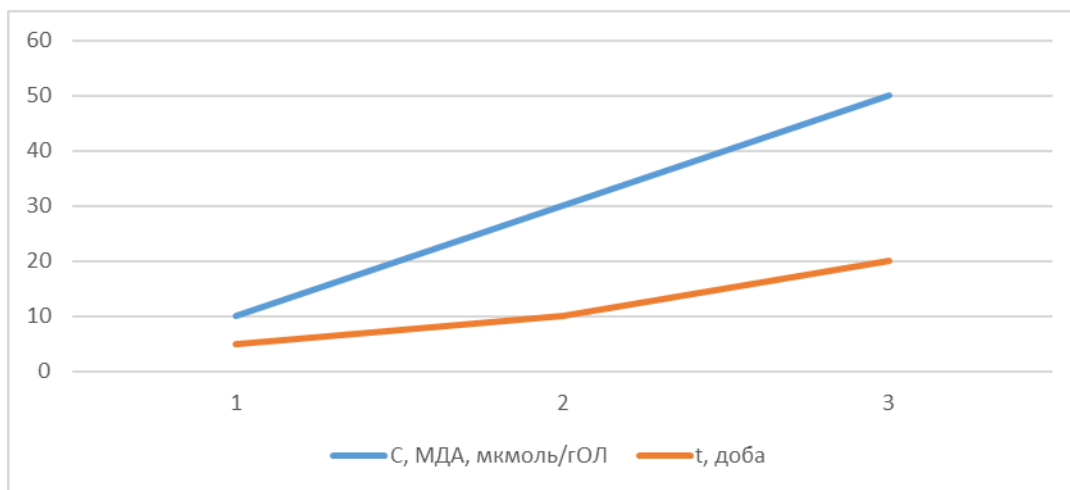


Рис. 3.1 – Вміст загальних ліпідів у м'язовій тканині вобли (г/л) при дії нафти

За дії нафто вуглеводнів на вміст загальних ліпідів у м'язовій тканині вобли спостерігається зниження їхнього рівня пропорційно до концентрації токсиканту та часу експозиції. На рисунку 3.1 показано, що на 5-ту добу

показник перебуває на однаковому рівні з контрольною групою. За дії нафти концентрацією 0,5; 1,25 і 2,5 мг/л вміст загальних ліпідів у риб знижується на 27%, 32% і 47% відносно контролю.

У риб, які зазнали впливу нафто вуглеводнів, на 20-ту добу спостерігається падіння кількості загальних ліпідів порівняно з контролем за концентрації токсиканта 0,5, 1,25 і 2,5 мг/л на 45, 58 і 67% відповідно.

Риби здебільшого разом з їжею отримують велику кількість ліпідів і мало вуглеводів, унаслідок чого ліпіди в них слугують основним джерелом енергії. Крім того, вони є найважливішими складовими клітинних мембран і низки біологічно активних сполук [10-12].

За впливу НУ на показники реакції перекисного окиснення ліпідів простежується тенденція до зростання їхнього вмісту в м'язовій тканині вобли (рис. 3.2).

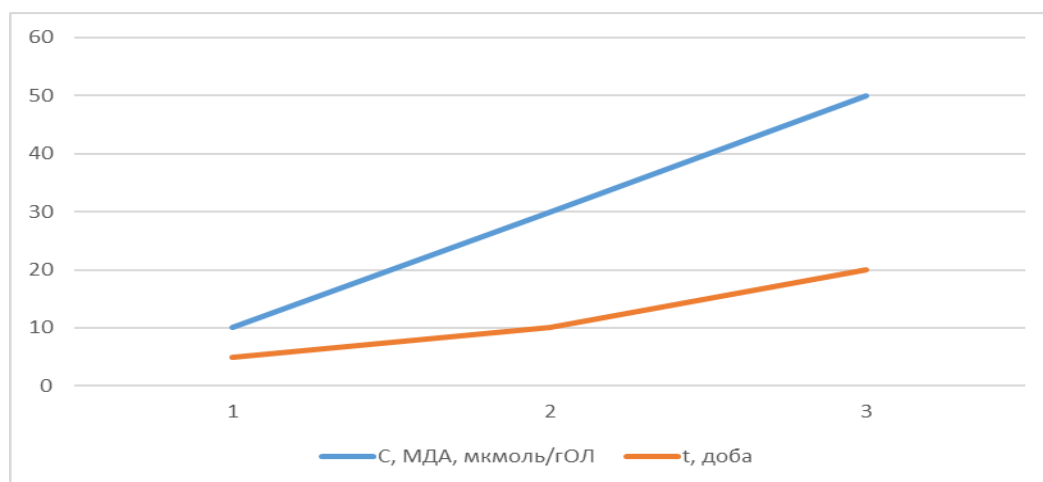


Рис. 3.2 – Динаміка вмісту дієнових кон'югантів у м'язовій тканині вобли при дії нафти

Основа процесу адаптації тварин до мінливих протягом річного циклу умов проживання полягає в підтримці енергетичного балансу, і найважливіша роль у цьому належить резервним ліпідам. Вони слугують

основним джерелом енергії під час генеративного синтезу, нересту, міграцій, зимівлі тощо.

Як і в більшості тварин, запаси енергії в тілі риб акумулюються у формі нейтральних жирів - триацилгліцеридів, які становлять до 75% усієї маси резервного жиру, тому під час хронічної інтоксикації нафтою в риб відбувається порушення ліпідного обміну, що може призвести до порушення важливих життєвих етапів (нерест, міграція, зимівля і т.п.) [8-9].

Під впливом нафти на 5-ту добу експозиції вміст МДА порівняно з контролем зростає на 12 і 59% за концентрації НУ 0,5 і 1,25 мг/л відповідно, а за концентрації токсиканта 2,5 мг/л кількість збільшується в 3,4 рази (рис. 3.3), така сама закономірність простежується в утриманні дієнових кон'югантів (рис. 3.2).

На 10-ту добу у риб кількість МДА (рис. 3.3) зростає на тлі контролю в 2,5; 3,0 і 3,2 рази в концентрації НУ 0,5; 1,25 і 2,5 мг/л відповідно. У цих же концентраціях токсиканта рівень ДК (рис. 3.2) теж підвищується в 1,7; 2,6 і 2,7 рази відповідно.

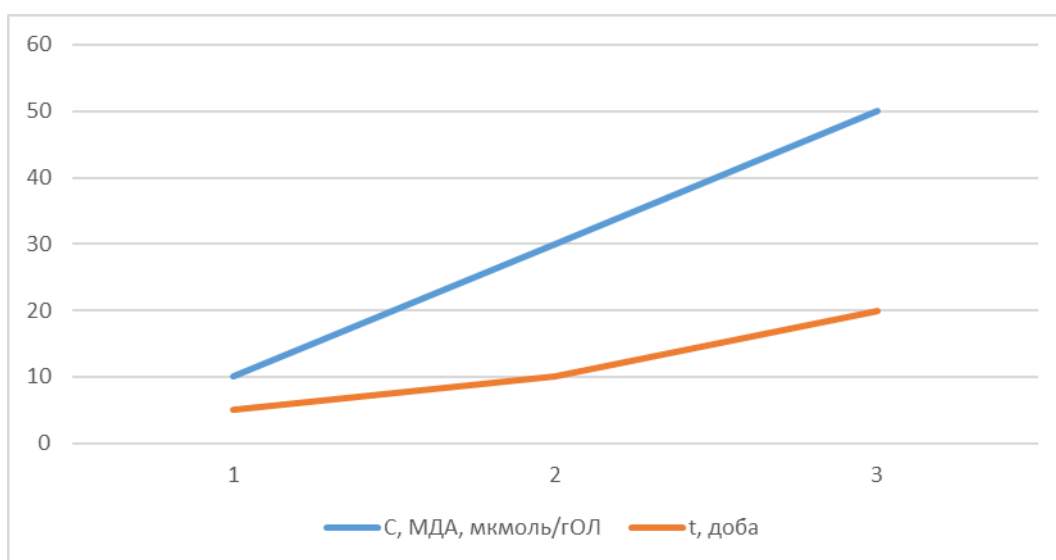


Рис. 3.3 – Динаміка вмісту МДА у м'язовій тканині вобли при дії нафти

У риб, які зазнали впливу НУ, на 20-ту добу спостерігається збільшення МДА майже в 3,4 рази, а на тлі 10-ї доби їхня кількість зростає незначно. Це свідчить про те, що нафта спричиняє посилення активності реакцій ПОЛ; простежується деяка залежність в утворенні дієнових кон'югантів і МДА та в зниженні загальних ліпідів. Найбільш токсичною (рис. 3.2, 3.3) є нафта в концентрації 1,25 і 2,5 мг/л, особливо за значних термінів експозиції.

Жир активних риб має більший ступінь ненасиченості і, отже, реакційною здатністю. Найбільш лабільні компоненти ліпідів - це жирні кислоти та продукти їх розпаду. Чим більша ненасиченість жирних кислот, що входять до складу ліпідів, тим легше вони можуть бути окислені [12].

Окислення жирних кислот, з одного боку, спричиняє зміну функції тих структурних компонентів, до складу яких вони входять, а з іншого - накопичення продуктів розпаду жирних кислот може впливати на морфо-функціональні елементи клітини і тканини та лежати в основі формування низки патологічних змін. Особливо інтенсивне накопичення продуктів реакцій ПОВ в організмі риб може стати пусковим механізмом для патологічних процесів. ПОВ саме по собі може впливати на ендокринний статус організму, оскільки підвищує в'язкість біомембран, що тягне за собою погіршення зв'язування мембранними рецепторами пептидних гормонів та призводить до гемолізу і руйнування ліпідного шару [25-30].

При перекисному окисленні ліпідів відбувається модифікація мембранних білків, що виявляється небайдужим для проникності мембран. Під впливом нафти у вобли відбувається активація вільно-радикальних процесів (рис. 3.2 і 3.3), що може бути спричинено порушенням захисних систем клітини і появою вільних іонів. Вільно-радикальне окиснення ліпідів спричиняє окиснення тіолівських груп і зростання проникності мембран для низки іонів: K^+ , H^+ , Ca^{2+} .

Судячи з накопичення первинних і кінцевих продуктів реакції ПОВ і динаміки вмісту загальних ліпідів, нафта в концентраціях 0,5; 1,25 і 2,5 мг/л

проявляє виражену токсичну дію на організм вобли. Дії вуглеводнів нафти нижчих концентрацій ПОВ більше залежить від тривалості контакту риб із токсикантом, ніж за більш високих концентрацій нафто вуглеводнів [25-28].

За дії нафти концентрації 2,5 мг/л на 5-ту добу експозиції МДА утворюється 98,3 нмоль/ГОЛ; на 10-ту добу - 104,3 нмоль/ГОЛ та на 20-ту добу 119,8 нмоль/ГОЛ, тобто різниця між експозиціями на 5-ту, 10-ту та 20-ту добу коливається в 2-3 рази.

Під впливом нафти у бичків відбувається порушення ліпідного обміну (табл. 3.1).

Таблиця 3.1 – Вплив нафти на показники ліпідного обміну бичків

Доба	Контроль	Концентрація НУ, мг/л		
		0,5	1,25	2,5
Загальні ліпіди, г/л				
5	1,98±0,01	1,0±0,02	1,70±0,03	1,09±0,05
10	1,33±0,09	1,21±0,02	1,40±0,04	0,96±0,01
20	0,98±0,01	1,03±0,04	0,93±0,05	0,83±0,01
30	0,87±0,02	0,83±0,04	0,63±0,05	0,77±0,01
ДК, мкмоль/ГОЛ				
5	3,65±0,07	6,39±0,09	6,86±0,02	7,30±0,07
10	3,70±0,06	6,37±0,04	7,51±0,01	7,94±0,02
10	3,71±0,07	5,68±0,06	6,02±0,09	6,60±0,03
30	3,77±0,04	6,18±0,02	5,73±0,08	6,86±0,04
МДА, мкмоль/ГОЛ				
5	40±1,0	70±1,0	75±0,5	80±0,5
10	51±1,0	93±5,0	104±7,0	110±9,0
10	64±3,0	98±6,0	107±7,0	114±10,0
30	73±4,0	120±7,0	111±4,0	133±11,0

На 5-ту добу експозиції за дії нафто вуглеводнів концентрацією 2,5 мг/л МДА збільшується рівно в 2 рази, а кількість загальних ліпідів зберігається приблизно на одному рівні. У міру збільшення концентрації та часу експозиції МДА і ДК збільшуються в 1,8-2 рази [8-12].

За інтоксикації бичків нафтою концентрацією 0,5 мг/л спостерігається деяка тенденція до підвищення рівня загальних ліпідів відносно контролю на 20-ту добу експозиції, що характерно і для вобли.

Найбільш пригніченими є риби, які зазнають впливу НУ 2,5 мг/л, на 20-ту та 30-ту добу. За концентрації нафти 1,25 мг/л між 10-ю і 20-ю добою досліду у вмісті МДА спостерігаються дуже незначні зміни, але виявляється незначна різниця в утриманні дієнових кон'югантів. Це можна пояснити тим, що у бичків активніше включаються антиоксидантні системи захисту клітини від накопичення токсичного продукту ПОВ-МДА, ніж у вобли [16].

При вивченні впливу нафти на риб різних систематичних груп, а саме на воблу та бичка-кругляка у порівняльному аспекті, спостерігається приблизно однаковий характер їх реагування на хімічний стрес, викликаний дією токсиканту.

3.2 Дія бурового розчину на деякі показники ліпідного обміну риб

Вплив бурових розчинів у концентраціях 0,025-25,0 г/л на розвиток ікри та на розвиток та виживання личинок риб показує токсичну дію бурових розчинів на ранній онтогенез риб. При дії БР концентрацією 250 мг/л на личинок оселедця кількість фосфоліпідів на 20 добу виявляє стійку тенденцію до зростання до 30%. Вміст загальних ліпідів різко падає на 20-ту добу у всіх концентраціях бурового розчину [13]. Як показують, чим вища концентрація бурового розчину та час експозиції, тим нижчий вміст загальних ліпідів. У перші 5 діб рівень загальних ліпідів порівняно з

контролем знижується на 28, 38 та 46% у концентраціях БР 0,5; 1,0 та 2,0 г/л відповідно.

На 10-ту добу вміст ОЛ зменшується при концентрації токсиканту 0,5 г/л незначно, а при концентрації 1,0 та 2,0 г/л на 45 та 53% відповідно.

При дії бурового розчину в концентраціях 1,0 та 2,0 г/л кількість загальних ліпідів у груп риб у м'язовій тканині падає щодо контрольних у 4-7 разів, що може свідчити про вплив бурового розчину на їхній рівень. Таке значне зменшення ліпідів у риб, що зазнали впливу БР, може призвести до різноманітних патологічних змін, зниження загального енергетичного балансу, до порушення функцій всіх органів з підвищеним вмістом жирів (печінки, гонад, зябер) [12-15].

На тлі зниження кількості загальних ліпідів у дослідних груп риб спостерігається накопичення продуктів розпаду фосфоліпідів клітинних мембран-дієнових кон'югантів та малонового діальдегіду. З рисунку 16 видно, що найбільш інтенсивно утворення первинних продуктів розпаду ненасичених жирних кислот дієнових кон'югантів відбувається в буровому розчині концентрацією 2,0 г/л.

На 5 добу експозиції при концентрації бурового розчину 0,5; 1,0 та 2,0 г/л кількість дієнових кон'югантів на фоні контролю зростає на 17; 42 та 175% відповідно. У всіх концентраціях токсиканту утворення ДК та МДА на 10-ту добу експозиції більше, ніж у порівнянні з контролем у 1,5-2,8 рази. Кількість ДК і МДА на 20 добу у груп риб при концентрації БР 2,0 г/л вище контрольних у 2,5 рази.

Якщо зіставити вміст ліпідів і продуктів реакції ПОВ, отриманих при дії на них бурового розчину, то видно, що БР впливає не тільки на метаболізм фосфоліпідів, але і на інші ліпідні компоненти (нейтральні жири, гліколіпіди). ПОВ знижуються у риб у 2,5-2,8 рази, а загальні ліпіди у 4-7 разів. За літературними джерелами, субстратами реакції ПОВ є полієнові жирні кислоти, що входять до складу лише фосфоліпідів клітинних мембран [11-13].

Утворення первинних продуктів ПОВ-ДК приблизно відповідає накопиченню кінцевого продукту реакцій перекисного окиснення ліпідів - МДА. Щодо контролю особливо інтенсивно процес ПОВ протікає на 10-ту та 20-ту добу при концентрації БР 1,0 та 2,0 г/л (табл. 3.2).

Таблиця 3.2 – Вплив бурового розчину на біохімічні показники бичка-кругляка

Доба	Контроль	Концентрація НУ, мг/л		
		0,5	1,0	2,0
Загальні ліпіди, г/л				
5	1,10±0,01	1,00±0,03	1,10±0,01	0,90±0,03
10	0,93±0,01	0,90±0,05	0,81±0,03	0,60±0,04
20	0,84±0,03	0,80±0,06	0,79±0,01	0,40±0,01
30	0,66±0,04	0,70±0,05	0,61±0,1	0,55±0,01
МДА, мкмоль/ГОЛ				
5	55±0,3	80±0,7	83±0,2	99±0,4
10	61±0,7	88±0,5	101±0,1	104±0,3
10	72±0,3	91±0,7	109±0,1	115±0,4
30	75±0,4	100±0,3	119±0,4	135±0,4
ДК, мкмоль/ГОЛ				
5	1,10±0,07	1,65±0,09	1,76±0,08	1,98±0,03
10	1,20±0,03	1,73±0,02	1,98±0,05	2,04±0,01
10	1,40±0,01	1,76±0,01	2,11±0,04	2,24±0,07
30	1,45±0,01	1,93±0,03	2,31±0,06	2,61±0,04

Вплив бурового розчину на біохімічні показники бичка-кругляка (табл. 3.2) показують, що буровий розчин негативно діє на процес ПОЛ та на рівень ліпідного обміну. У концентраціях 1,0 та 2,0 г/л при експозиції 20, 30 діб

відбувається зростання вмісту ДК та МДА на 51-80% порівняно з контролем, а рівень загальних ліпідів у стільки ж разів падає. Це дозволяє вважати, що БР активує процеси вільно радикального розпаду полієнових жирних кислот, що входять до складу фосфоліпідів клітинних мембран, що свідчить про накопичення кінцевого токсичного продукту ПОВ-МДА. Посилено відбувається зниження ліпідів, особливо в концентраціях 1,0 і 2,0 г/л на 20-30 добу експозиції, що може бути відповіддю на хімічний стрес [26-27].

Вільно радикальні процеси у нормі відбуваються постійно, але з низькою активністю, оскільки клітини мають різні системи захисту від активних форм кисню (антиоксидантні системи). Один із кінцевих продуктів деградації ненасичених жирних кислот при ПОВ – малоновий діальдегід. Це хімічно дуже активна речовина, яка своїми альдегідними групами взаємодіє з NH_2 - групами білків, викликаючи їх незворотну денатурацію [24-26].

Результатом перекисного пошкодження мембран клітин є збільшення їх проникності, Ca^{2+} , Na^{2+} і вода входять у клітини та субклітинні частки, викликаючи їх набухання та руйнування. Вільні радикали проникають у ядро та мітохондрії, окислюючи ДНК, що призводить до розриву ланцюгів ДНК та інших ушкоджень. Пошкодження клітин внаслідок активації ПОВ може спричинити ішемію міокарда, дистрофію м'язів, гемолітичну анемію тощо.

Всі перелічені вище явища можуть протікати у риб, що зазнали хронічного впливу бурового розчину, особливо при високих концентраціях.

3.3 Токсична дія бурового шламу на обмін ліпідів у риб

Більшість токсикологічних оцінок бурових шламів відрізняється сильною мінливістю результатів і складністю їх зіставлення через невизначеність хімічного складу рідких і твердих відходів, які змінюються в широких межах навіть при бурінні однієї свердловини і тим більше при бурових роботах в різних районах і на різних етапах освоєння нафтегазу.

Дані про токсикологічні дослідження впливу бурових шламів на процеси вільнорадикального окислення ліпідів у літературі взагалі відсутні. Продукти реакцій ПОВ є первинними медіаторами хімічного стресу, що визначає їх інформативність при моніторингу водних екосистем [8-12].

Виявлення ролі ПОВ у механізмі інтоксикації організму риб буровими шламами проводяться у хронічних модельних експериментах. Випробовано вплив бурових шламів у концентраціях 0,5; 1,0 та 2,0 г/л.

Ще більш виражене зменшення показника відбувається у концентраціях 0,5 та 1,0 г/л на 10-ту добу експозиції, майже в 2,1-2,5 рази, а при дії БШ у концентрації 2,0 г/л спостерігається тенденція до зростання вмісту загальних ліпідів порівняно з контролем на 3%. При більш тривалому контакті риб із буровим шламом концентрацією 0,5 і 1,0 г/л простежується тенденція до збільшення кількості загальних ліпідів на 10 добу до 28-33% відповідно, а на 20 добу експозиції рівень показника знижується на 6% порівняно з 10-ю добою (рис. 3.4).

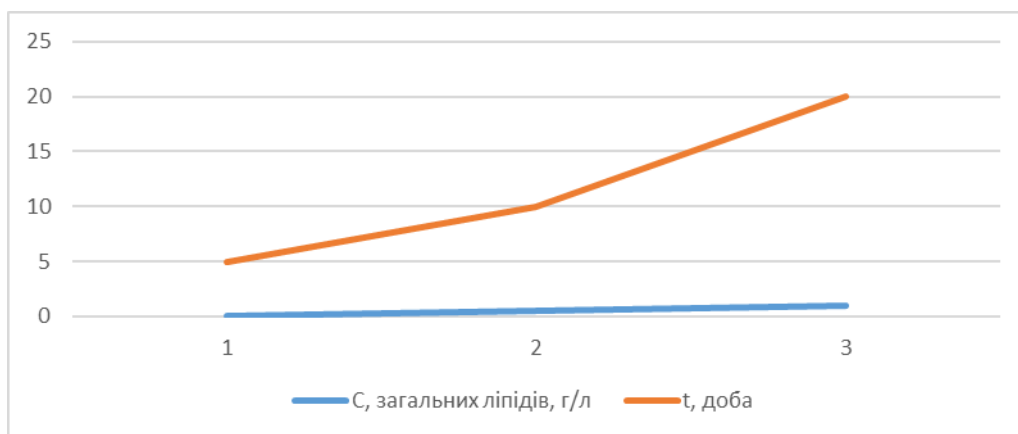


Рис. 3.4 – Кількість загальних ліпідів (г/л) у м'язовій тканині вобли при дії бурового шламу

Дія бурового шламу на ліпідний обмін риб призводить до значної динаміки їхнього вмісту. При вивченні дії БШ на рівень загальних ліпідів у тканині вобли при концентрації 0,5 і 1,0 г/л на 5 добу відбувається різке

зниження їх кількості, а концентрація 2,0 г/л викликає незначне падіння загальних ліпідів [14].

Продукти реакції ПОВ на 5-ту та 10-ту добу показують, що на тлі контролю при дії БШ в концентраціях 0,5 і 1,0 г/л відбувається різка активація утворення початкових і кінцевих продуктів ПОВ. У цей період експозиції продукти реакції ПОВ збільшуються у дослідних риб, що зазнають впливу бурового шламу 0,5 і 1,0 г/л, в 1,7-2,1 рази.

При більш низьких концентраціях БШ у початкову добу експозиції відбуваються активація перекисного окислення ліпідів і зниження кількості загальних ліпідів, особливо на 5 і 10-у добу експозиції в концентраціях токсиканту 0,5 г/л і 1,0 зниження рівня ПОВ та проявляється тенденція загальних ліпідів до зростання як проти контролю, так і щодо інших концентрацій бурового шламу [20-31].

Найбільш інформативним показником ПОВ-МДА є показник як деструктивної зміни у клітині, і інтенсивності окислення жирних кислот, які забезпечують нормальне функціонування клітини та організму загалом, т.п. перекиси не є марними та шкідливими продуктами окислення, а використовуються організмом для синтезу простагландинів, стероїдних гормонів та є алостеричними ефекторами в деяких ферментативних реакціях.

Будучи кінцевим продуктом розпаду цілого ряду речовин, утворення яких проходить через стадію перекисів ненасичених жирних кислот, утворених у фосфоліпідах клітинних мембран, МДА може свідчити про кількість відповідних біологічно активних речовин, що забезпечують функцію клітини [15].

Продукти перекисного окислення ліпідів беруть участь у метаболізмі арахідонової кислоти, сприяючи нагромадженню її дериватів. Серед останніх - простагландини, тромбосани, гідроперекиси, лейкотрієни, ейкозаноїди та інші сполуки, які виконують найважливіші функції для нормального життєзабезпечення клітини, такі, як: імунітет, ріст та поділ клітини, фаго- та піноцитоз. У зв'язку з цим негативним показником

метаболізму може бути як надмірне накопичення, і його зниження, що свідчить про зміну функціональних можливостей клітини. Дієнові кон'юганти сприяють появі гідроперекисів та вільних радикалів, що призводять до пошкодження ліпідів клітинних мембран.

У риб, які зазнали впливу БШ у концентраціях 0,5; 1,0 і 2,0 г/л, порівняно з рибами, що містяться в морській воді без внесення токсикантів, спостерігається як надмірне накопичення продуктів ПОВ, так і зниження їх кількості, що може свідчити про токсичну дію бурового шламу на показники ліпідного обміну в показники ліпідного обміну на реакції ПОВ вобли проявляється приблизно такий же характер, як і при дії газового конденсату на ті ж показники ліпідного обміну (активація утворення ДК і МДА у більш низьких концентраціях) і зниження [14].

Актуальним стає вивчення впливу того самого токсиканту на риб різних систематичних груп. Продукти реакції ПОВ зростають пропорційно концентрації токсиканту та часу експозиції.

З огляду на різко зростаючого змісту ДК і МДА рівень загальних ліпідів залишається приблизно однаковим переважають у всіх випадках. Загальні ліпіди незначно знижуються в усіх досвідчених риб проти контролем (на 5-12%). У риб, які зазнали впливу БШ концентрацією 0,5; 1,0 і 2,0 г/л, на 5-ту добу досвіду відбувається збільшення ДК і МДА в 1,5-1,9 рази, а на 10-у та 20-ту добу експозиції в 2-3 рази.

Таке інтенсивне протікання ПОВ із накопиченням малонового діальдегіду та вільних радикалів не може не викликати пошкодження клітинних мембран, окислення тіолових груп білків, оскільки вони є активними центрами багатьох ферментів, що забезпечують антиоксидантну функцію [11].

Бички, будучи бентофагами, можуть заковтувати частинки БШ, що містять вуглеводні та інші токсичні компоненти, за рахунок чого вони зберігають більш-менш однаковий рівень загальних ліпідів (табл. 3.3).

Таблиця 3.3 – Вплив бурового шламу на біохімічні показники бичка-кругляка

Доба	Контроль	Концентрація НУ, мг/л		
		0,5	1,0	2,0
Загальні ліпіди, г/л				
5	1,10±0,01	1,00±0,03	1,10±0,01	0,90±0,03
10	0,93±0,01	0,90±0,05	0,81±0,03	0,60±0,04
20	0,84±0,03	0,80±0,06	0,79±0,01	0,40±0,01
30	0,66±0,04	0,70±0,05	0,61±0,1	0,55±0,01
ДК, мкмоль/ГОЛ				
5	1,5±0,01	2,2±0,07	2,6±0,08	3,0±0,05
10	1,6±0,03	3,4±0,06	3,9±0,05	4,3±0,04
20	2,2±0,03	6,1±0,04	6,4±0,04	6,6±0,06
30	2,7±0,01	7,1±0,07	7,6±0,03	8,0±0,01
МДА, мкмоль/ГОЛ				
5	54,0±0,9	88,0±1,5	93,3±2,2	107,0±3,3
10	60,0±1,2	127,0±1,7	148,0±2,5	160,0±3,1
20	63,0±2,0	175±2,2	184,0±2,3	188,0±2,4
30	68,0±2,0	180±3,0	191,0±9,1	201,0±3,5

Активний розпад полієнових жирних кислот з утворенням продуктів ПОВ-МДА та ДК, що входять до складу фосфоліпідів, може спричинити пошкодження біомембран клітини та порушити її функціональну цілісність. При активації ПОВ може бути порушена структура мітохондрії, рибосом, функції мембранно-пов'язаних ферментів, може бути викликана хромосомна аберація, тобто розвиваються ураження, що формують глибоку патологію [7].

Однією з причин такої сталості вмісту ліпідів у м'язовій тканині бичків може бути компенсаторне збільшення інтенсивності обмінних процесів та

депонування ліпідів, обумовлене необхідністю локалізації у тканинах деяких ліпорозчинних сполук, присутні у токсикантів. Таке явище було виявлено у риб, відловлених у водоймах, які зазнали інтенсивного забруднення [6].

Вплив БШ із різних родовищ на реакції ПОВ та вміст загальних ліпідів у м'язовій тканині риб. Так, зокрема, вивчено дію бурового шламу зі структури на біохімічні показники риб (табл. 3.4).

Таблиця 3.4 – Динаміка бурового шламу на біохімічні показники бичка

Доба	Контроль	Концентрація БШ, мг/л		
		0,5	1,0	2,0
Загальні ліпіди, г/л				
5	0,80±0,01	0,78±0,01	1,83±0,01	0,63±0,02
10	0,78±0,03	0,76±0,03	0,60±0,01	0,61±0,01
20	0,60±0,03	0,74±0,01	0,60±0,01	0,57±0,04
ДК, мкмоль/ГОЛ				
5	1,6±0,01	3,2±0,02	4,01±0,04	4,7±0,02
10	1,9±0,09	4,2±0,04	5,6±0,03	6,0±0,02
20	1,3±0,06	3,1±0,03	6,3±0,04	7,1±0,04
МДА, мкмоль/ГОЛ				
5	60±3,0	88±6,0	93±3,0	100±5,0
10	68±3,0	99±4,0	104±6,0	110±3,0
20	72±4,0	111±4,0	117±6,0	125±3,0

З даних видно (табл. 3.4), що бички при дії БШ теж перебувають у пригнобленому стані. У риб відносно високий вміст первинних та кінцевих продуктів ПОВ-ДК та МДА. Кількість загальних ліпідів практично знаходиться на рівні з контрольними рибами. Це може бути пов'язано з високими енерговитратами риб для адаптації до несприятливих умов водного

середовища, в якому відбувається активний транспорт ліпідів з тканин, що депонують, в кров у вигляді жирних кислот, що служить критерієм мобілізації ліпідів [12-14].

Вплив БШ на воблу і бичка показує, що у них проявляється своєрідність у характері реагування та неоднакова чутливість до дії одного й того ж токсиканту. У вобли процес ПОВ найбільш активний на початкових етапах, при нижчих концентраціях БШ, а у бичка-кругляка інтенсивність протікання реакції ПОВ прямо пропорційна концентрації та експозиції токсиканту.

Особливо це помітно на 20-ту добу при вищих вмістах БШ у морській воді. Вплив бурового шламу з різних структур на продукти реакції ПОВ, то риби, що зазнали впливу токсиканту зі структури, перебувають у більш пригніченому стані, ніж риби, що випробували дію БШ [12-14].

В останні роки, поряд із біохімічними, особливо актуальними стали генетичні методи тестування хімічних речовин. У водній токсикології проблема інтегральної оцінки забруднення різними хімічними сполуками стає найважливішою частиною екологічних досліджень. Вивчення генетичної безпеки компонентів нафтогазової індустрії стало особливо гостро, оскільки дія речовин - генотоксинів підвищує частоту мутацій чи інших генетичних ушкоджень, призводить до зростання кількості спадкових захворювань, уроджених каліцтв, розвитку злоякісних пухлин у різних біологічних об'єктів. Попадання бурового розчину та бурового шламу у водні екосистеми може бути фактором ризику в плані розвитку негативних віддалених наслідків впливу нафтовидобутку на генетичний апарат гідробіонтів. Відсутність генотоксичності нафти та газоконденсату в системі SOS-lux тестом не може бути доказом їхньої генетичної безпеки; для підтвердження такої потрібні додаткові натурні та лабораторні дослідження, що враховують метаболічні перетворення цих речовин у трофічних ланцюгах екосистем [18].

ВИСНОВКИ

Вплив токсикантів, а саме нафти, газового конденсату, бурового розчину та бурового шламу на біохімічні показники риб різних систематичних груп та генотоксичну активність має різноспрямований характер. Токсична дія газоконденсату інтенсивно проявляється на початку експозиції, потім відбувається його деструкція.

За кількістю накопичення первинних і кінцевих продуктів реакції ПОВ та зниження загальних ліпідів при газоконденсатної інтоксикації найбільш чутливою є кефаль, що мешкає в поверхневих шарах води.

При токсичній дії нафти інтенсивність реакції ПОВ у клітинах м'язової тканини риб (вобли та бичка) зростає прямо-пропорційно залежно від концентрації та часу експозиції, а при більш високих вмістах (2,5 мг/л) нафти активність перекисного окислення ліпідів від терміну експозиції збільшується незначно. Накопичення токсичного продукту реакції ПОВ-МДА більшою мірою проявляється у вобли при дії бурового розчину, причому найактивніше при максимальних концентраціях - 2,0 г/л.

За максимальної концентрації бурового шламу (2,0 г/л) відбувається зниження інтенсивності реакції перекисного окислення ліпідів, що свідчить про зміну функціональних можливостей клітини.

Адаптація риб до нафтового забруднення забезпечуються широким спектром неспецифічних фізіолого-біохімічних механізмів, що сприяють їх виживанню в умовах, що постійно змінюються. При дії доз нафти, на риб у них спостерігається прогресивне ослаблення рухово-харчових реакцій, зміна активності амілази і лужної фосфатази, зміна ліпідного обміну, підвищення рівня глюкози, збільшення кількості креатиніну, зниження проникності нейтрального червоного через ГГБ печінки, ГГБ печінки.

Гострий ефект дії нафти на коропових риб виникає при концентрації понад 200 мг/л у воді. Для осетрових риб сублетальний поріг впливу нафти

дорівнює 1 мг/л. Збитки від впливу нафти зазнають і види риб, що постійно живуть, у т.ч., бички, що є донним і малорухомим видом і важливим кормовим об'єктом цінних хижих видів риб.

Незалежно від концентрації нафти у воді рівень сироваткових білків у риб знижується порівняно з контролем, але характер їхньої кількісної динаміки залежить від дози та часу впливу стрес-фактора. Аналіз кінетики рівня білка та сечовини показує накопичення сечовини та збільшення КСБ та погіршуючий стан риб у результаті вмісту їх в умовах безперервної дії 50 та 100 мг/л нафти. Динаміка гліколізу та витрати загального білка в організмі коропа під впливом 50 та 100 мг/л нафти розвивається у бік зниження резервів протеїдів та глікогену в організмі гідробіонтів. Швидкість всіх видів ПОВ у м'язах та печінці (за винятком МДА) помітно знижується, що свідчить про високий рівень АОА в організмі риб під впливом нафти, що забезпечує реакцію процесу ПОВ, що зумовлює захист клітин від деструкції.

Вплив нафти призводить до зміни у співвідношенні базисних, вторинних та появи атипових текстур морфотипів. Відмінною особливістю морфологічної картини сироватки крові є наявність кольорових структур, спектр фарб яких залежить від рівня та часу дії стрес-фактора. Зміни морфоструктур у вигляді атипових кристалів співвідносяться з відхиленнями фізіолого-біохімічних показників і є наслідком конформації різних білків, що може бути використане як маркерні показники.

Токсична дія нафти, газоконденсату, бурового розчину та бурового шламу на показники ліпідного обміну та генетичний апарат гідробіонтів, становить певну екологічну небезпеку при їх потраплянні в морське середовище.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАНЬ

1. Водяніцький О.М., Гриневич Н.Є., Хом'як О.А., Присяжнюк Н.М. Вплив фізичних показників води на кількість мікроядер у клітинах ембріонів хижих видів риб. *Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва: збірник наукових праць*. Біла Церква. 2020. Вип. 1 (156). С. 142-149.
2. Дудник С. В., Євтушенко М. Ю. Водна токсикологія: основні теоретичні положення та їхнє практичне застосування: монографія. Київ: Вид-во Українського фітосоціологічного центру. 2013. 297 с.
3. Гринжевський М.В., Шерман І.І., Грициняк І.І., Василець С.В., Третяк О.М., Томіленко В.Г. Організація селекційно-племінної роботи в рибництві. Київ: «Рибка моя». 2016. 352 с.
4. Андрющенко А.І., Алімова С.І. Ставові рибництво: підручник. Київ: Видавничий центр НАУ. 2018. 636 с.
5. Кононенко Р. В., Шевченко П. Г., Кондратюк В. М., Кононенко І. С. Інтенсивні технології в аквакультури: навчальний посібник. Київ, 2016. 410 с.
6. Водяніцький О.М., Потрохов О.С., Зіньковський О.Г., Худіяш Ю.М. Вплив коливань температурного та кисневого режимів водойми на вміст білків та глікогену в ембріонах корошових риб. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол.* 2016. Вип. 3-4 (67). С. 48-55.
7. Водяніцький О.М., Потрохов О.С., Зіньковський О.Г., Причепа М.В. Зміна активності Na^+/K^+ -АТФази в ембріонах корошових риб за дії різного температурного та кисневого режиму водойм. *Вісник Львівського університету. Серія біологічна*. 2017. Вип. 75. С. 14-22.
8. Водяніцький О.М., Потрохов О.С., Гриневич Н.Є. Зміна активності ферментів енергетичного обміну ембріонів коропа за дії абіотичних

- чинників 5 водного середовища. *Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва. БНАУ*. 2016. Вип. 1. С. 9-16.
9. Щербак В.І. Інтегроване управління водними ресурсами: навчальний посібник. Київ. 2015. 379 с.
 10. Трофимчук А.М. Розвиток органічної аквакультури в Європі. Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту: матеріали міжнародної науково-практичної конференції. *Інноваційні технології в агрономії, агрохімії та екології*. II Міжнар. наук. конф., 27-28 вересня 2018 р. Біла Церква, 2018. С. 12-14.
 11. Чемерис В.А., Душка В.І., Максим В.Л. Стан та перспективи розвитку аквакультури в Україні. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. Економічні науки*. 2016. Т. 18. № 2. С. 169-175.
 12. Боярин М.В, Нетробчук І. М. Основи гідроекології: теорія й практика: навчальний посібник. Луцьк: Вежа-Друк. 2016. 364 с.
 13. Гандзюра В.П., Грубінко В.В. Концепція шкодочинності в екології. Київ: Тернопіль. 2018. 144 с.
 14. Беспалова Л.Е. Водна токсикологія: навчальний посібник. Херсон, 2015. 131 с.
 15. Глєбова Ю. А., Шкарупа О. В. Розвиток реформ у рибній галузі України. *Рибогосподарська наука України*. 2017. Вип.4. С. 7-18.
 16. Данильчук Г. А. Вплив технологічних параметрів на рибогосподарські показники цьоголіток. *Рибогосподарська наука України*. 2019. Вип. 2. С. 70-73.
 17. Шекк, П. В. Вплив абіотичних і біотичних чинників на ранній онтогенез кефалевих і камбалових риб при штучному відтворенні. *Вісник Національного університету водного господарства та природокористування. Сер.: Сільськогосподарські науки*. 2014. Вип. 2. С. 170-182.

18. Ohmen A., Lemos P.C., Carvalho G., Yuan Z., Keller J., Blackall L.L. Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale. *Water Res.* 2015. Vol. 41. P. 2271–2300.
19. Pattusamy V., Nandini N., Bheemappa K. Detergent and sewage phosphates entering into lake ecosystem and its impact on aquatic environment. *Int J Adv Res.* 2013. Vol. 1 (3). P. 129–133.
20. Pretty J. N. Environmental costs of freshwater eutrophication in England and Wales. *Environmental Science & Technology.* 2018. Vol. 37. P. 201-208.
21. Rytwinski T., Taylor J.J., Donaldson L.A., Britton J.R., Browne D. R. The effectiveness of non-native fish removal techniques in freshwater ecosystems: A systematic review. *Environmental Reviews.* 2018. Vol. 27 (1). P. 71–94.
22. Sievers M., Brown C. J., Tulloch V. J. D., Pearson R. M., Haig J.A. The Role of Vegetated Coastal Wetlands for Marine Megafauna Conservation. *Trends in Ecology & Evolution.* 2019. Vol. 34 (9). P. 807–817.
23. Stokol V. Transboundary rivers of Ukraine: perspectives for sustainable development and clean water. *Journal of Integrative Environmental Sciences.* 2021. Vol. 18. P. 67–87.
24. Triple Threat. How disease, climate risks, and unsafe water, sanitation and hygiene create a deadly combination for children. New York: United Nations Children’s Fund (UNICEF). 2023.
25. Yancey P. H., Gerringer M. E., Drazen J. C., Rowden A. A., Jamieson A. Marine fish may be biochemically constrained from inhabiting the deepest ocean depths. *PNAS.* 2014. Vol. 111 (12). P. 4461–4465.
26. Janaauer G.A. Aquatic Vegetation in River Flood plains: Climate Change Effects, River Restoration and Eco-Hydrology Aspects. *Climate Change. Inferences from Paleoclimate and Regional Aspects.* New York: Springer. 2012. P. 149-156.

27. Yoshiaki Y., Akihiro O., Noriyuki H. Effect of water temperature on embryonic development and hatching time of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquaculture*. 2012. Vol. 17. P.100-105.
28. Cheung W., Sarmiento J., Dunne J. Shrinking of fishes exacerbates impacts of global ocean changes on marine ecosystems. *Nature Clim Change*. 2013. Vol. 3. P. 254-258.
29. Barange M., Bahri T., Beveridge M., Cochrane K.L., Poulain, F. Impacts of climate change on fisheries and aquaculture: synthesis of current knowledge, adaptation and mitigation options. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*. 2018. No. 627. Rome. FAO. 628 p.
30. Marshall B. *Aquaculture and fish farming*. New York: Library Press. 2017. 233 p.
31. Palomares M.L. Fishery biomass trends of exploited fish populations in marine ecoregions, climatic zones and ocean basins. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 2020, Vol. 243. P.222-240
32. Pretty J. N. Environmental costs of freshwater eutrophication in England and Wales. *Environmental Science & Technology*. 2018. Vol. 37. P. 201-208.
33. Rytwinski T., Taylor J.J., Donaldson L.A., Britton J.R., Browne D. R. The effectiveness of non-native fish removal techniques in freshwater ecosystems: A systematic review. *Environmental Reviews*. 2018. Vol. 27 (1). P. 71-94.
34. Sievers M., Brown C. J., Tulloch V. J. D., Pearson R. M., Haig J.A. The Role of Vegetated Coastal Wetlands for Marine Megafauna Conservation. *Trends in Ecology & Evolution*. 2019. Vol. 34 (9). P. 807-817.
35. Stokol V. Transboundary rivers of Ukraine: perspectives for sustainable development and clean water. *Journal of Integrative Environmental Sciences*. 2021. Vol. 18. P. 67-87.