



УДК 639:574.64:57.04

## ІНТЕНСИВНІСТЬ ДИХАННЯ *AMATITLANIA NIGROFASCIATA* ЗА РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ ТОКСИКАНТІВ У МОДЕЛЬНИХ ЕКСПЕРИМЕНТАХ

**М. О. Клименко<sup>1</sup>, Ю. В. Пилипенко<sup>2</sup>, О. О. Бєдункова<sup>1</sup>, В. О. Конончук<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Національний університет водного господарства та природокористування  
вул. Соборна, 11, Рівне 33028, Україна  
e-mail: bedunkovaolga@mail.ru

<sup>2</sup>Херсонський державний аграрний університет  
вул. Рози Люксембург, 23, Херсон 73006, Україна

Експерименти проводили з метою відстеження часової динаміки інтенсивності дихання акваріумних риб (ІДР) цихлазома-зебра (*Amatitlania nigrofasciata*) за різних концентрацій токсикантів у модельних експериментах для з'ясування орієнтовних рівнів оцінки ступеня токсичності водного середовища.

Для цього відповідно до рибогосподарських нормативів (ГДК) моделювали різні концентрації речовин, які є найбільш розповсюдженими забруднювачами водного середовища. ІДР оцінювали за різницею вмісту розчиненого у воді кисню кожні 0,5 год, упродовж експозиції особин у відповідних розчинах токсикантів. Концентрацію кисню визначали інструментальним методом. Як тест-параметр було використано коефіцієнт дихання риб (КДР), який розраховували як співвідношення тест-реакцій у варіанті досліджу та в контролі. Точність проведених вимірювань оцінювали за тісністю апроксимації між експериментальними даними. Достовірність рівнів відхилення від контролю ІДР за кожний часовий інтервал експозиції перевіряли за критерієм Фішера. Статистичне ранжування експериментальних даних проводили в межах п'яти груп, згідно з рекомендаціями Водної рамкової директиви ЄС щодо розробок оцінкових шкал екологічного стану водного середовища.

У результаті експерименту було помічено, що коефіцієнти дихання риб, менші 50,8 %, фіксували у варіантах досліджу з концентраціями більшості хімічних речовин на рівні 10 ГДК і окремих речовин на рівні 5 ГДК, що розцінювалось як прояв критичної токсичності водного середовища для риб. КДР у межах 51,1–101,6 % відмічали в окремих варіантах досліджу з концентраціями хімічних речовин на рівні 2 ГДК, 3 ГДК та 5 ГДК, що свідчило про високу токсичність. КДР у межах 101,7–52,4 % відмічали у варіантах з концентраціями окремих речовин на рівні 2 ГДК, 3 ГДК та 1 ГДК, що може свідчити про помірну або середню токсичність. Значення в межах 152,5–203,2 % – у варіантах з концентраціями окремих речовин на рівні 0,5 ГДК, 1 ГДК та 2 ГДК, що розцінювалось як доказ слабкої токсичності середовища для риб. КДР  $\geq 203,2$  % відмічали для концентрацій речовин 0,5 ГДК та 1 ГДК, що розцінювалось як відсутність прояву токсичності.

У такий спосіб було вдосконалено методологію біотестування токсичності водного середовища за показником інтенсивності дихання риб, а саме: визначено оптимальний час експозиції акваріумних риб *A. nigrofasciata* у дослідних зразках води; уточнено формули розрахунків при проведенні експериментів; запропоновано орієнтовну шкалу інтегральної оцінки ступеня токсичності водного середовища. Зазначене забезпечує оперативність отримання інтегральної відповіді про ступінь токсичності водного середовища з можливістю багаторазового використання тест-об'єктів.

**Ключові слова:** інтенсивність дихання риб, експозиція, токсичність.

## ВСТУП

Відомо, що під дією хімічних речовин у риб через інгібування ферментативних систем можлива зміна інтенсивності дихання, що є результатом токсичного прояву діючої речовини [9, 13]. Під час переходу в чисту воду або за умови зниження концентрації речовини нижче токсичної можливе швидке відновлення ферментативних процесів, унаслідок чого токсичний вплив на процеси дихання може бути зворотним [11].

Показники інтенсивності дихання риб (ІДР) часто використовують під час оцінювання умов штучного вирощування риби [6, 16]. Цю фізіологічну ознаку рекомендовано використовувати як тест-функції і під час оцінювання природного середовища існування риб [2, 4, 5, 15].

Токсикологічні тести, засновані на оцінках тест-функцій риб, у тому числі й ІДР, рекомендовані також рядом національних [3] і міжнародних стандартів: ISO (The International Organization for Standardization) [9], CEN (The European Committee for Standardization) [19], OECD's (The Organization for Economic Cooperation and Development) [14].

Методологія біотестування (*ex situ*) пропонує судити про наявність токсичної дії досліджуваних зразків води за зміною інтенсивності дихання акваріумних видів риб, яку розраховують у міліграмах спожитого рибою кисню на 1 г ваги (сухої чи сирої) протягом години. При цьому результати дослідних серій порівнюються з контрольною. Зміна інтенсивності дихання в дослідній серії свідчить про токсичну дію речовин, що містяться у воді. ІДР оцінюють за різницею концентрацій кисню у дослідних зразках води на початку та в кінці експозиції [2, 5, 15]. У відповідних документах і публікаціях чітко окреслено вимоги до умов проведення експерименту і підбору тест-об'єктів, але не вказується, яка саме величина відхилення від контролю може прийматись як достовірне свідчення токсичної дії досліджуваних зразків води.

Метою досліджень було відстежити часову динаміку інтенсивності дихання акваріумних риб цихлазома-зебра (*Amatitlania nigrofasciata* Günther, 1867) за різних концентрацій токсикантів у модельних експериментах для з'ясування орієнтовних рівнів оцінки ступеня токсичності водного середовища.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проведення досліджень базувалося на способі виявлення токсичності водного середовища, що запропонований В.М. Чернишовою [5].

Серія модельних експериментів передбачала визначення інтенсивності дихання риб у зразках води з різними концентраціями речовин відповідно до рибогосподарських нормативів [17]. Обрані для досліджень речовини являють собою типові та широко розповсюджені забруднення водного середовища і характеризуються вираженою біологічною активністю [4]. Під час моделювання концентрацій токсикантів брали до уваги їх лімітуючий показник шкідливості (ЛПШ) і клас небезпеки (табл. 1).

**Таблиця 1. Нормативні показники речовин, які використовували для моделювання різних концентрацій токсикантів**

**Table 1. Regulatory indicators substances that were used for modeling various concentrations of toxicants**

№ з/п	Речовина*	Рибогосподарські нормативи [16]		
		лімітуючий показник шкідливості	клас небезпеки	гранично допустима концентрація, мг/дм <sup>3</sup>
1	Мідь ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ )	токс.	3	0,001
2	Хром ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )	токс.	3	0,02
3	Тиосечовина ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$ )	сан.-токс.	3	0,1
4	Залізо ( $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ )	токс.	0,1	4
5	Кобальт ( $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ )	токс.	0,01	3
6	Фосфор ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ )	токс.	0,01	4е
7	Марганець ( $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ )	токс.	0,01	4
8	Гербіцид ( $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{C}_{12}\text{NO}_3$ )	сан.-токс.	3	0,1

**Примітка:** \* – у дужках вказано формулу хімічного реактиву, який було використано для моделювання різних концентрацій діючої речовини

**Comment:** \* – the parentheses indicate the formula of a chemical reagent, used for modeling of various concentrations of the active substance

Досліди, згідно з поставленою метою, проводили за сталої температури при-міщення (20–21 °C) в лабораторії кафедри екології НУВГП (м. Рівне). Як тест-об'єкт використовували самців і самок лабораторних акваріумних риб *A. nigrofasciata* з вагою від 3,0 до 9,0 г, що не мали ознак настання нерестового періоду та яких не годували протягом останньої доби. Вибір тест-об'єкта зумовлено зручністю роботи із даним видом риб, що полягає у простоті їхнього культивування в акваріумних умовах (комфортна температура 20–28 °C; реакція середовища pH 6,8–8,0; твердість води dH 8–30°). Крім того, особини мають відносно крупні розміри, що спрощує процедуру вилову і зважування, та чіткі нерестові ознаки (під час нересту черевце самок набуває яскраво-оранжевого забарвлення).

Риб висаджували по 1 екз. до експериментальної ємності об'ємом 0,5 л. Кожна експериментальна ємність містила певну хімічну речовину із розведеною концентрацією у відстояній водопровідній воді. Як контроль також використовували відстояну водопровідну воду. До висадки риб воду попередньо насичували повітрям за допомогою мікрокомпресора. На початку експозиції та після кожного вимірювання ємності обережно закривали корком, щоб не лишилося бульбашок повітря. Кожен експеримент повторювали тричі.

Визначення вмісту розчиненого у воді кисню проводили інструментальним методом за допомогою оксиметра "Ezodo" ("Dial Electronics Ltd", Тайвань), що пройшов державну атестацію та повірку у "Всеукраїнському державному науково-виробничому центрі стандартизації, метрології, сертифікації та захисту прав споживачів" (свідоцтво про повірку законодавчо регульованого засобу вимірювальної техніки № 36-1/1363).

Визначення проводили з інтервалом 0,5 год у воді контрольної та дослідних ємностей. Об'єм води ( $V_0$ ) уточнювали приведенням до нормальних умов (з точністю 0,01 дм<sup>3</sup>):

$$V_0 = \frac{V_t \cdot 273 \cdot P}{(273 + t) \cdot 760}, \quad (1)$$

де:  $V_t$  – об'єм проби води, дм<sup>3</sup>;  $P$  – атмосферний тиск у приміщенні, де проводиться експеримент, мм рт. ст.;  $t$  – температура повітря під час проведення експерименту, °C.

На завершення експозиції піддослідну рибу обтирали фільтрувальним папером і зважували (з точністю 0,01 г).

За різницею концентрацій кисню на початку і в кінці досліду (з урахуванням об'єму колби) визначали інтенсивність дихання риб, що розраховували в міліграмах спожитого нею кисню на 1 г сирої ваги протягом 1 год:

$$I = \frac{(C_i - C_0) \cdot V}{m \cdot t}, \quad (2)$$

де:  $I$  – інтенсивність дихання риб (споживання кисню), мгО<sub>2</sub>/г/год;  $C_i$  – вміст кисню на початку експозиції, мгО<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>;  $C_0$  – вміст кисню на завершення експозиції, мгО<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>;  $V$  – об'єм колби, дм<sup>3</sup>;  $m$  – вага риби, г;  $t$  – тривалість експозиції, год.

Як тест-параметр було використано коефіцієнт дихання риб, який розраховували як співвідношення тест-реакцій у варіанті досліду та в контролі:

$$\text{КДР} = \frac{I_b \cdot 100}{I_k}, \quad (3)$$

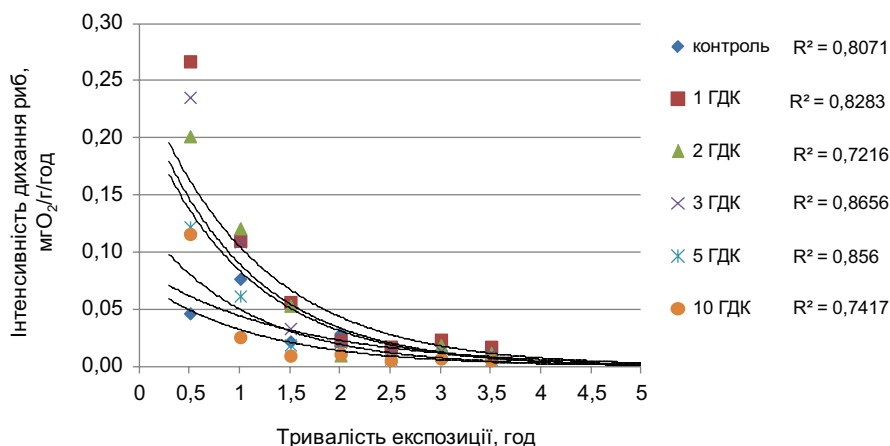
де: КДР – коефіцієнт дихання риб;  $I_b$  – інтенсивність дихання риб у варіанті досліду, мгО<sub>2</sub>/г/год;  $I_k$  – інтенсивність дихання риб у контролі, мгО<sub>2</sub>/г/год.

Загальна тривалість експериментів становила 3,5 год. Підтвердження точності проведених вимірювань здійснювали за коефіцієнтом детермінації ( $R^2$ ) у рамках програмного пакету Microsoft Excel 2010. При цьому апроксимаційні трендові моделі даних передбачали прогноз їхніх змін до часового інтервалу 5,0 год, з метою передбачення повного пригнічення споживання рибою розчиненого у воді кисню в умовах експерименту. Статистичну обробку експериментальних даних виконували за допомогою програмного забезпечення Statistica 8.0.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Модельні експерименти з різними концентраціями CuSO<sub>4</sub> × 5H<sub>2</sub>O, закладали у перерахунку на мідь з 1 ГДК, 2 ГДК, 3 ГДК, 5 ГДК та 10 ГДК діючої речовини. Інтенсивність дихання риб у відповідних водних розчинах найбільш різко знижувалась до 1,5–2 год від початку експозиції, при експоненціальному наближенні даних у всіх варіантах досліду (рис. 1).

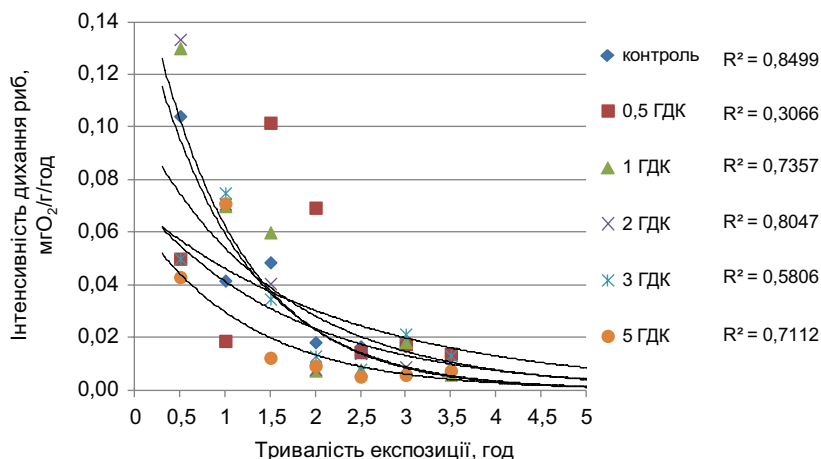
При цьому точність апроксимації мала достатньо високі значення (від  $R^2 = 0,72$  у варіанті з 2 ГДК до  $R^2 = 0,86$  у варіанті з 3 ГДК), що може розглядатись як підтвердження точності проведених вимірювань.



**Рис. 1.** Динаміка інтенсивності дихання риб у водних розчинах із різними концентраціями  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (у перерахунку на мідь)

**Fig. 1.** Dynamics of intensity of respiration of fish in aqueous solutions of different concentrations of  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (in terms of copper)

Модельні експерименти з різними концентраціями  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  закладали у перерахунку на хром з 0,5 ГДК, 1 ГДК, 2 ГДК, 3 ГДК та 5 ГДК діючої речовини. У цьому експерименті інтенсивність дихання риб найбільш різко знижувалася за перші 2 год від початку експозиції, з аналогічним попередньому дослідженню експоненціальним наближенням даних (рис. 2).

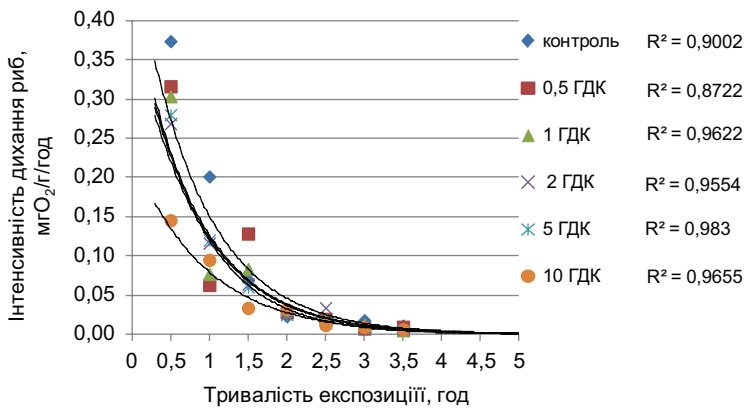


**Рис. 2.** Динаміка інтенсивності дихання риб у водних розчинах із різними концентраціями  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (у перерахунку на хром)

**Fig. 2.** Dynamics of intensity of respiration of fish in aqueous solutions of different concentrations  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  (in terms of chromium)

Точність апроксимації не підтвердилася тільки у варіанті з 0,5 ГДК по хрому ( $R^2 = 0,31$ ). В інших варіантах точність проведених вимірювань описували значеннями від  $R^2 = 0,58$  у варіанті з 3ГДК до  $R^2 = 0,85$  у контролі.

Інтенсивність дихання риб у модельних експериментах з різними концентраціями тіосечовини різко спадала впродовж 1,5–2 год як у контролі, так і у варіантах досліді (рис. 3).

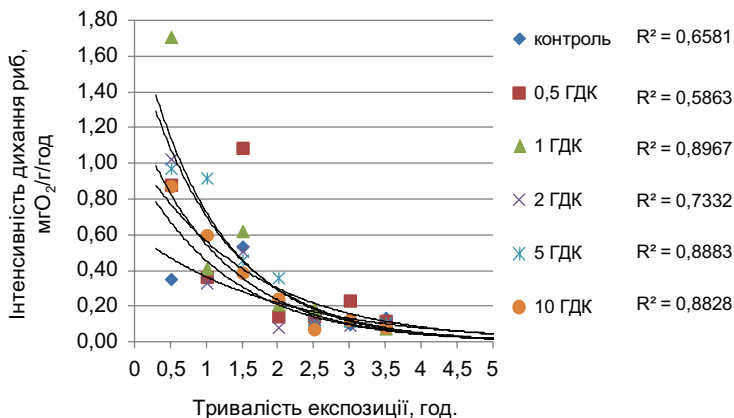


**Рис. 3.** Динаміка інтенсивності дихання риб у водних розчинах із різними концентраціями  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$  (тіосечовина)

**Fig. 3.** Dynamics of intensity of respiration of fish in aqueous solutions of different concentrations  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$  (thiosemicholine)

При цьому експоненціальний розподіл даних мав високу апроксимаційну точність: від  $R^2 = 0,87$  у варіанті з 0,5 ГДК до  $R^2 = 0,98$  у варіанті з 5 ГДК.

Модельні експерименти з різними концентраціями  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , закладали у перерахунку на залізо з 0,5 ГДК, 1 ГДК, 2 ГДК, 5 ГДК та 10 ГДК діючої речовини. Інтенсивність дихання риб у відповідних водних розчинах різко знижувалася до 2 год від початку експозиції у разі експоненціального наближення даних у всіх варіантах досліді та в контролі (рис. 4).

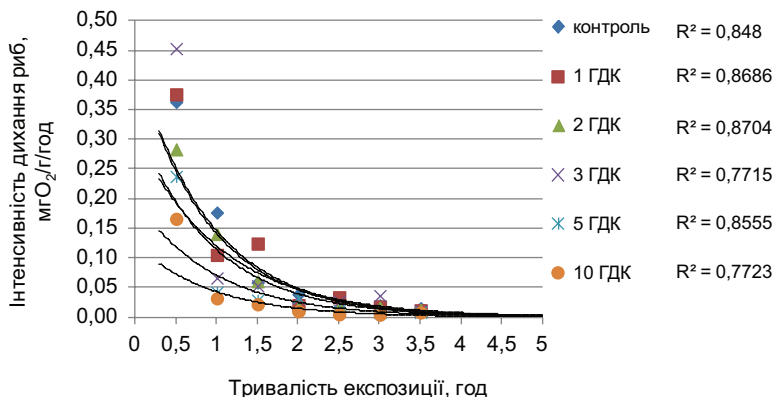


**Рис. 4.** Динаміка інтенсивності дихання риб у водних розчинах із різними концентраціями  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  (у перерахунку на залізо)

**Fig. 4.** Dynamics intensity of respiration of fish in aqueous solutions of different concentrations of  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  (in terms of iron)

Точність апроксимації експериментальних даних коливалась від  $R^2 = 0,59$  у варіанті з 0,5 ГДК до  $R^2 = 0,88$  у варіантах 1 ГДК та 5 ГДК.

Концентрації  $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  моделювали у перерахунку на кобальт на рівні 1 ГДК, 2 ГДК, 3 ГДК, 5 ГДК та 10 ГДК (рис. 5).

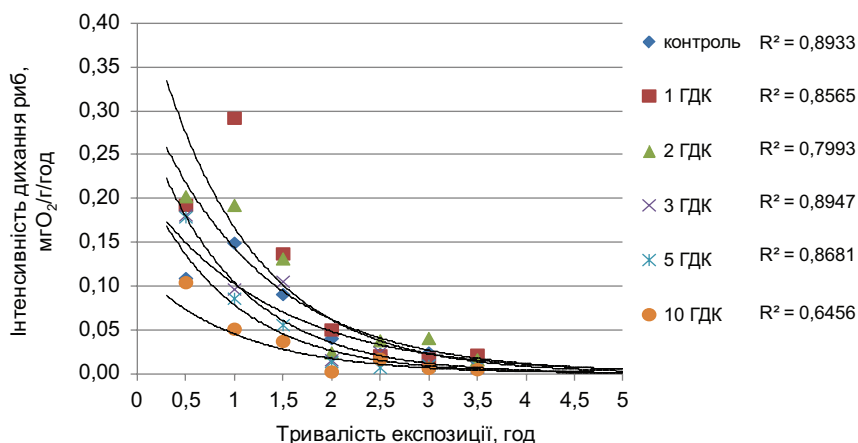


**Рис. 5.** Динаміка інтенсивності дихання риб у водних розчинах із різними концентраціями  $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (у перерахунку на кобальт)

**Fig. 5.** Dynamics of intensity of respiration of fish in aqueous solutions of different concentrations  $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (in terms of cobalt)

Інтенсивність дихання риб різко спадала за 1,5–2 год від початку експозиції. Точність апроксимації експоненціального розподілу експериментальних даних мала доволі високі значення: від  $R^2 = 0,77$  у варіантах із 3 ГДК і 10 ГДК до  $R^2 = 0,87$  у варіантах з 1 ГДК та 2 ГДК.

У водних розчинах із різними концентраціями  $\text{H}_3\text{PO}_4$  були змодельовані значення 1 ГДК, 2 ГДК, 3 ГДК, 5 ГДК та 10 ГДК у перерахунку на фосфор (рис. 6).



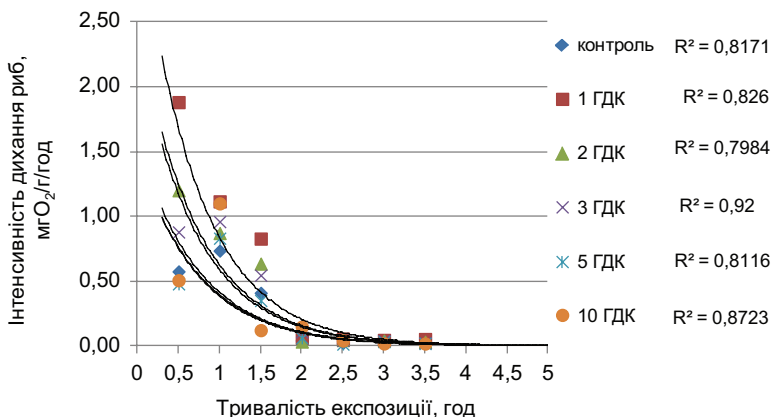
**Рис. 6.** Динаміка інтенсивності дихання риб у водних розчинах із різними концентраціями  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (у перерахунку на фосфор)

**Fig. 6.** Dynamics of intensity of respiration of fish in aqueous solutions of different concentrations of  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (in terms of phosphorus)

Активне спадання інтенсивності дихання риб спостерігалось у перші 2 год від початку експозиції. Розподіл експериментальних даних мав експоненціальну

залежність з точністю апроксимації від  $R^2 = 0,65$  у варіанті з 10 ГДК до  $R^2 = 0,89$  у варіантах з 1 ГДК та 3 ГДК.

Модельні експерименти з різними концентраціями  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  закладали у перерахунку на марганець з 1 ГДК, 2 ГДК, 3 ГДК, 5 ГДК та 10 ГДК діючої речовини. Інтенсивність дихання риб у відповідних водних розчинах різко знижувалася упродовж 1,5–2,0 год від початку експозиції, при експоненціальному наближенні даних у всіх варіантах досліджу та в контролі (рис. 7).

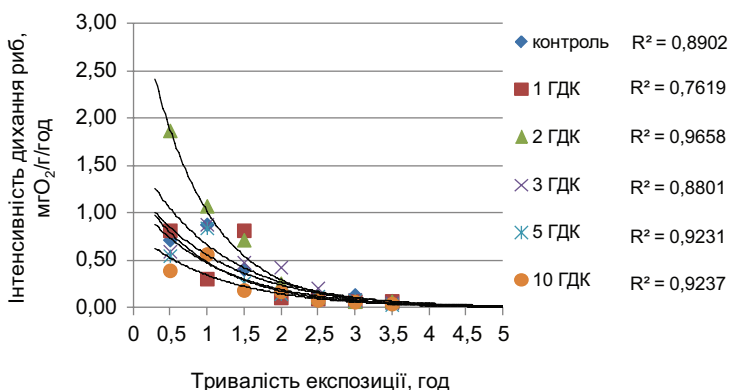


**Рис. 7.** Динаміка інтенсивності дихання риб у водних розчинах із різними концентраціями  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (у перерахунку на марганець)

**Fig. 7.** Dynamics of fish respiration intensity in aqueous solutions of different concentrations  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  (in terms of manganese)

Точність апроксимації експериментальних даних коливалась від  $R^2 = 0,79$  у варіанті з 2 ГДК до  $R^2 = 0,92$  у варіанті з 3 ГДК.

Заключною серією модельних експериментів було визначення інтенсивності дихання риб у водних розчинах з препаратом “Діален” (гербіцид), що має хімічну формулу  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{NO}_3$  (рис. 8).



**Рис. 8.** Динаміка інтенсивності дихання риб у водних розчинах із різними концентраціями  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{NO}_3$  (гербіцид)

**Fig. 8.** Dynamics of intensity of respiration of fish in aqueous solutions of different concentrations  $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{Cl}_2\text{NO}_3$  (herbicide)



У варіантах дослідів використовували таку концентрацію препарату: 1 ГДК, 2 ГДК, 3 ГДК, 5 ГДК та 10 ГДК. Аналогічно попереднім експериментам, розподіл даних мав експоненціальну залежність із апроксимаційною точністю від  $R^2 = 0,76$  у варіанті з 1 ГДК до  $R^2 = 0,96$  у варіанті з 2 ГДК.

Таким чином, серія модельних експериментів з оцінки впливу на інтенсивність дихання акваріумних риб різних концентрацій хімічних речовин дала змогу помітити певні закономірності. По-перше, різке спадання ІДР відмічалось у перші 1,5–2 год від початку експозиції, що в середньому по варіантах відрізнялося майже в 6 разів. По-друге, розподіл значень ІДР мав експоненціальну залежність за високої апроксимаційної точності як у дослідних варіантах, так і в контролі.

Однак самі величини ІДР у різних варіантах експерименту були як вищими, так і нижчими за величини ІДР у контролі. Зокрема, після 0,5-годинної експозиції в гербіциді, ІДР у контролі було нижчим ніж у варіантах з 1 і 2 ГДК, а через годину – значення ІДР було вищим у досліді з 1 ГДК порівняно з контролем (рис. 8). В експериментах з марганцем через 0,5 год експозиції ІДР у контролі було нижчим ніж у досліді з 1, 2 і 3 ГДК, а через годину – в досліді з 1, 2, 3 і 10 ГДК значення ІДР було вищим ніж у контролі (рис. 7). Подібна ситуація простежується і в експериментах із фосфором та залізом. В останньому – після 0,5-годинної експозиції ІДР у контролі було взагалі найнижчим (рис. 4).

Загалом, на тлі загального зниження ІДР у період експозиції можна виділити певні етапи у характері її зміни.

Найвищі значення ІДР у перші 0,5 год від початку експозиції (у всіх дослідних і контрольних варіантах експерименту) пояснюються тим, що, опинившись у незвичних умовах, риба проявляє короткотерміновий неспокій.

Цей стан риби ще не можна приймати за початок токсичної дії, однак енергетичні затрати організму зумовлюють посилення ІДР. Спостереження за поведінковими реакціями риб допомогло помітити, що неспокій особин минав ще до настання 0,5-годинного періоду експозиції і риба спокійно розміщувалась на дні на 15–20-й хвилині від початку експериментів. Стрімке спадання значень ІДР тривало від 0,5 до 1,5–2,0 год. Ймовірно, тут мало місце як зниження рухової активності, так і початкова реакція організму на дію хімічної речовини.

У період від 1,5–2,0 до 3,5 год ІДР ставав зовсім незначним (у середньому по дослідних варіантах  $0,03 \text{ мг O}_2/\text{г/год}$ ), при цьому риба зберігала спокій. На цьому етапі, порівняно з початком експозиції, відбулося загальне зниження вмісту розчиненого у воді кисню, що є одним із чинників уповільнення ІДР. У свою чергу, це загострювало реакцію організму риб на токсичну дію середовища. Цілком припустимо, що згасання дихальної активності спричинювала дія хімічної речовини, яка чинила токсичну дію на організм риб.

Необхідно зазначити, що в експериментах з 5 ГДК  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  та 10 ГДК  $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  у період 3–3,5 год спостерігали залягання риби на бік та на спину відповідно. У решті дослідних варіантів за найвищих значень ГДК речовин втрата рівноваги риб не відбувалась. Ймовірно, така поведінка риб була зумовлена природою діючої речовини у відповідних варіантах дослідів.

Тіснота апроксимації трендових моделей ( $R^2 = 0,58\text{--}0,94$ ) підтверджує точність експериментальних даних, а також дає можливість спрогнозувати час повного пригнічення ІДР. Так, у різних дослідних варіантах його настання могло відбутися через 4,0–5,0 год експозиції, що призвело б до неминучої загибелі тест-об'єктів.

Таблиця 2. Значення коефіцієнтів дихання риб у дослідних варіантах із різними концентраціями хімічних речовин

Table 2. The coefficients of fish respiration in the experimental variants with different concentrations of chemicals

Речовина	Концентрація	Тривалість експозиції, год						
		0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5
CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O	1ГДК	569	143	254	79	116	285	168
	2ГДК	430	157	240	35	59	229	117
	3ГДК	502	142	151	74	95	167	118
	5ГДК	261	80	87	50	45	122	64
	10ГДК	248	34	45	39	40	89	56
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	0,5ГДК	48	45	209	381	87	103	106
	1ГДК	125	168	123	41	46	108	45
	2ГДК	128	170	83	43	84	52	69
	3ГДК	48	180	71	71	48	125	100
	5 ГДК	41	170	25	51	31	34	57
CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> S	0,5 ГДК	85	31	184	121	124	43	87
	1 ГДК	81	38	120	138	126	72	49
	2 ГДК	72	58	92	125	213	46	62
	5ГДК	75	60	87	109	96	42	53
	10ГДК	39	47	49	138	75	52	58
FeCl <sub>3</sub> ×6H <sub>2</sub> O	0,5ГДК	248	97	203	62	148	229	88
	1ГДК	481	110	116	90	190	124	57
	2ГДК	289	88	95	36	121	95	72
	5ГДК	274	243	86	153	100	116	80
	10ГДК	246	158	73	104	75	124	61
CoSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	1ГДК	103	59	213	51	166	90	76
	2ГДК	78	80	104	43	175	82	80
	3ГДК	125	37	90	84	251	182	70
	5ГДК	65	24	49	85	103	39	53
	10ГДК	46	18	37	25	43	20	51
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1ГДК	176	195	151	124	92	72	130
	2ГДК	185	129	144	60	166	167	100
	3ГДК	166	65	116	40	109	44	47
	5ГДК	164	58	62	35	33	41	51
	10ГДК	96	35	41	8	75	29	33
MnSO <sub>4</sub> ×H <sub>2</sub> O	1ГДК	326	152	202	145	224	163	199
	2ГДК	209	118	155	80	184	147	123
	3ГДК	153	130	133	250	172	148	94
	5ГДК	83	113	86	145	63	118	75
	10ГДК	88	149	30	341	168	70	72
C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> C <sub>12</sub> NO <sub>3</sub>	1ГДК	114	35	201	71	80	51	96
	2ГДК	261	122	176	169	99	52	91
	3ГДК	83	100	118	280	176	64	71
	5ГДК	76	96	65	96	102	59	44
	10ГДК	55	64	46	113	69	47	57

Таким чином, зміни ІДР під час експерименту відповідали загальноновідомій картині поведінки риб у стресових умовах [11–13].

Розрахунок коефіцієнта дихання риб (КДР) проводили для кожного часового інтервалу експозиції, за який оцінювали інтенсивність дихання *A. nigrofasciata* (табл. 2).

При цьому, отримані значення у період 1,0 год значно відрізнялись від значень за 1,5 і 2,0 год. Тому для з'ясування часу прояву реакції організму риб *A. nigrofasciata* на дію речовини, за яким можна отримати об'єктивне уявлення про токсичність водного середовища, було проведено статистичний аналіз отриманих КДР за критерієм Фішера. При цьому як незалежні змінні були прийняті величини КДР у всіх дослідних варіантах за період 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 год. Як залежна змінна – величини КДР за період 0,5 год (табл. 3).

Таблиця 3. Результати проведення статистичного аналізу значень коефіцієнтів дихання риб у модельних експериментах за критерієм Фішера

Table 3. Results of statistical analysis of means of the coefficients of fish respiration in model experiments according to Fisher criterion

Час експозиції	Статистичні параметри							
	Beta	Std.Err. of Beta	B	Std.Err. of B	t	F	df	p-level
1 год	0,38	0,15	0,92	0,36	2,55	6,49	1,38	0,0150
1,5 год	0,49	0,14	1,06	0,31	3,46	11,95	1,38	0,0014
2,0 год	-0,19	0,16	-0,33	0,26	-1,25	1,55	1,38	0,2201
2,5 год	0,11	0,16	0,25	0,38	0,66	0,43	1,38	0,5153
3,0 год	0,69	0,12	1,53	0,25	6,02	36,22	1,38	0,0000
3,5 год	0,52	0,14	2,07	0,55	3,76	14,10	1,38	0,0006

Результати проведення статистичного аналізу виявляють достовірність регресійної залежності показників за 0,5 год експозиції з показниками за 1,0; 1,5; 3,0 та 3,5 год ( $p \leq 0,05$ ). Отже, з огляду на бажану оперативність методу можна передбачити, що значення КДР за 1,0 та за 1,5 год експозиції будуть найбільш об'єктивно відображати токсичну дію водного середовища на риб.

Оскільки модельні експерименти проводили з різними концентраціями хімічних речовин, була передбачена можливість оцінки ступеня токсичності дослідного водного середовища. З цією метою весь масив отриманих експериментальних значень КДР (за 1,0 та за 1,5 год експозиції) було ранжовано в рамках програмного пакету Statistica 8.0. При цьому кількість бажаних груп ранжування була прийнята на рівні п'яти, згідно з рекомендаціями Водної рамкової директиви ЄС [7] щодо розробок оцінкових шкал екологічного стану водного середовища. Межі коливання показників задавали від 0 % (мінімально можливе значення коефіцієнта дихання риб) до 243 та 254 %, що відповідало максимальним значенням КДР у експериментах за 1,0 год та 1,5 год відповідно.

Так, для масиву даних за період 1,0 год програмою були визначені такі верхні межі запропонованих груп:  $\leq 48,6$ ; 97,2; 145,8; 194,4;  $> 194,4$  ( $p = 0,14$ ). Для масиву даних за період 1,5 год:  $\leq 50,8$ ; 101,6; 152,4; 203,2;  $> 203,2$  ( $p = 0,039$ ). Таким чином, статистичну значимість ( $p \leq 0,05$ ) мало ранжування за даними періоду експозиції тривалістю 1,5 год.

Зокрема, значення КДР, що були менші 50,8 %, відмічали у варіантах досліді з концентраціями більшості хімічних речовин на рівні 10 ГДК та окремих речовин на рівні 5 ГДК ( $K_2Cr_2O_7$ ), що може бути свідченням критичної токсичності середовища для *A. nigrofasciata*.

КДР в межах 51,1–101,6 % відмічали в окремих варіантах досліді з концентраціями хімічних речовин на рівні 2 ГДК ( $FeCl_3 \times 6H_2O$ ,  $K_2Cr_2O_7$ ,  $CH_4N_2S$ ), 3 ГДК ( $CoSO_4 \times 7H_2O$ ) та 5 ГДК ( $H_3PO_4$ ,  $CuSO_4 \times 5H_2O$ ,  $MnSO_4 \times H_2O$ ,  $C_{10}H_{13}C_{12}NO_3$ ). Це дає підстави розглядати наведені значення КДР як доказ високої токсичності середовища для риб.

КДР у межах 101,7–152,4 % відмічались у варіантах досліді з концентраціями окремих речовин на рівні 2 ГДК ( $CoSO_4 \times 7H_2O$ ,  $FeCl_3 \times 6H_2O$ ,  $H_3PO_4$ ), окремих речовин на рівні 3 ГДК ( $CuSO_4 \times 5H_2O$ ,  $MnSO_4 \times H_2O$ ) та 1 ГДК ( $K_2Cr_2O_7$ ), що може свідчити про помірну або середню токсичність водного середовища.

Значення коефіцієнта дихання риб у межах 152,5–203,2 % відмічали у варіантах досліді з концентраціями окремих речовин на рівні 0,5 ГДК ( $CH_4N_2S$ ,  $FeCl_3 \times 6H_2O$ ), 1 ГДК ( $H_3PO_4$ ,  $C_{10}H_{13}C_{12}NO_3$ ) і 2 ГДК ( $MnSO_4 \times H_2O$ ). Це дає підстави розглядати наведені значення КДР як доказ слабкої токсичності середовища для риб.

КДР більше 203,2 % були характерними у варіантах досліді з концентраціями речовин на рівні 0,5 ГДК ( $K_2Cr_2O_7$ ,  $FeCl_3 \times 6H_2O$ ) та більшості модельних токсикантів на рівні 1 ГДК ( $CuSO_4 \times 5H_2O$ ,  $CoSO_4 \times 7H_2O$ ,  $MnSO_4 \times H_2O$ ,  $C_{10}H_{13}C_{12}NO_3$ ). Це дає підстави розглядати такі значення КДР як доказ того, що прояву токсичності середовища для *A. nigrofasciata* за експозиції протягом 1,5 год немає.

## ВИСНОВКИ

Проведено серію модельних експериментів з визначення інтенсивності дихання акваріумних риб *Amatitlania nigrofasciata*, що перебували у водних розчинах із різними концентраціями токсикантів, дала змогу запропонувати певні уточнення з ведення процедури біотестування:

1. Оптимальний час експозиції тест-об'єктів у дослідних зразках води, за якого відбувається реакція цього виду риб на токсичну дію середовища, становить 1,5 год.
2. Значення коефіцієнта дихання риб може свідчити про ступінь токсичності водного середовища, з подальшим ранжуванням:  $\geq 203,2$  % – токсичності немає; 152,5–203,2 % – токсичність слабка; 101,7–152,4 % – токсичність помірна; 51,1–101,6 % – токсичність висока;  $\leq 50,8$  % – токсичність критична.
3. Тісна апроксимаційна залежність ( $R^2 = 0,58–0,94$ ) експериментальних даних свідчить про чутливість запропонованого тест-об'єкта і точність проведення інструментального аналізу вмісту розчиненого у воді кисню, що забезпечує достовірність результатів контролю стану водного середовища в режимі реального часу.

1. Ajvazjan S.A. Applied Statistics: Research dependencies. Moscow: Finance and Statistics, 1985. 487 p. (In Russian).
2. Amosova A.A., Amosov E.A., Kozulina A.S. Experiential evaluation test systems for the study of the acute toxicity of various pollutants in the laboratory. **Scientific Journal of „Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences”**, 2014; 5(2): 1042–1044. (In Russian).

3. **Bioretesting in environmental practice**. Kyiv: Technical Committee for Standardization TC 82 "Environmental protection and rational use of resources of Ukraine. 1997. 240 p. (In Ukrainian).
4. Branco P., Santos J.M., Amaral S. et al. Potamodromous fish movements under multiple stressors: Connectivity reduction and oxygen depletion. **Sci. Total Environ**, 2016; 572: 520–525.
5. Chernyshova V.M. **Techniques for biological aquatic toxicology studies**. Moscow: Nauka, 1971. 229 p. (In Russian).
6. Duarte J.G., Silva L.L.S., Freire D.M.G., Cammarota M.C. Enzymatic hydrolysis and anaerobic biological treatment of fish industry effluent: Evaluation of the mesophilic and thermophilic conditions. **Renewable Energy**, 2015; 83: 455–462.
7. **European Communities WFD CIS Common Implementation Strategy for Water Framework Directive (2000/60/EC)** / Guidance document N 6 Towards a guidance on establishment of the intercalibration network and the process on the intercalibration exercise. Luxembourg, 2003. 47 p.
8. Hefne E. River Water Quality Preliminary Rapid Assessment Using Pollution Index. **Procedia Environ. Sci**, 2016; 33: 562–567.
9. **ISO 7346-2:1996. Water quality**. Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei*, *Cyprinidae*)] – Part 2: Semi-static method. P. 11.
10. Janovych D.O., Grycynjak I.I., Shvec T.M. Use of salmon (*Salmonidae*) in biomonitoring the quality of the water environment. **Fisheries Science of Ukraine**, 2016; 1(35): 5–30. (In Ukrainian).
11. Kljashtorin L.B. **Water breathing and oxygen needs of fish**. Moscow: Light & Food Industry, 1982. 168 p. (In Russian).
12. Kolesnyk N.L. The toxic effects of pesticides on biota freshwater Ukraine. **Fisheries Science of Ukraine**, 2015; 4(34): 31–53. (In Ukrainian).
13. Lukjanenko V.I. **Total fish toxicology**. Moscow: Light & Food Industry, 1983. 320 p. (In Russian).
14. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**. Effects on Biotic Systems Test No. 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test. 26 July 2013. P. 24.
15. Taju G., Abdul Majeed S., Nambi K.S.N. et al. *In vitro* cytotoxic, genotoxic and oxidative stress of cypermethrin on five fish cell lines. **Pestic. Biochem. Physiol**, 2014; 113: 15–24.
16. Tetdoev V.V. Need Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in oxygen at extreme environmental factors. **RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries**, 2007; 3: 10–15. (In Russian).
17. **The list of fishery regulations**: maximum permissible concentration and the estimated safe exposure levels of pollutants to the water of water bodies of fishery importance: <http://docs.cntd.ru/document/1200044750>. (In Russian).
18. Tyagi S., Sharma B., Singh P., Dobhal R. Water quality assessment in terms of water quality index. **American Journal of Water Resources**, 2013; 1(3): 34–38.
19. **UNE-EN ISO 7346-3:1998**. Water quality. Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei*, *Cyprinidae*)]. Flow-through method. P. 16.

## RESPIRATION OF *AMATITLANIA NIGROFASCIATA* AT THE ACTION OF TOXICANTS USED AT DIFFERENT CONCENTRATIONS IN MODEL EXPERIMENTS

M. O. Klymenko<sup>1</sup>, Yu. V. Pylypenko<sup>2</sup>, O. O. Biedunkova<sup>1</sup>, V. O. Kononchuk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National University of Water Management and Nature Resources Use  
11, Soborna St., Rivne 33028, Ukraine  
e-mail: bedunkovaolga@mail.ru

<sup>2</sup>Kherson State Agricultural University, 23, Roza Liuksemburg St., Kherson 73006 Ukraine

The aim of model experiments were tracking temporal dynamics of breathing intensity tsyhlazoma aquarium fish-zebra (*Amatitlania nigrofasciata*) at the action of toxi-

cants in different concentrations to determine the approximate levels of assess and the degree of toxicity of the aquatic environment.

Fisheries regulations (maximum allowed concentration), caused using various concentrations of substances which are the most common contaminants of the aquatic environment. Fish respiration was assessed by difference in content of dissolved oxygen every 0.5 hrs during the exposure of individuals in the corresponding solution toxicants. The oxygen concentration was measured using instrumental method. As a test parameter coefficient of respiration fish was used. The rate was calculated as the ratio of test reactions version of the experiment and the control. The accuracy of the measurements was assessed by the closeness of approximation between the experimental data. The reliability levels of control deviation for each time interval of exposure was tested by Fisher criterion. Statistical rankings of experimental data was carried out within five groups, as recommended by the EU Water Framework Directive regarding the development of the rating scales of ecological state of the aquatic environment.

The level of coefficient of fish respiration was  $\leq 50.8\%$  as recorded in variants of experiment with concentrations of most chemicals at 10 MAC and certain substances at 5 MAC, which was seen as a manifestation of critical toxicity of the aquatic environment for fish. The coefficient of fish respiration within 51.1–101.6% were recorded in some embodiments experiment with concentrations of chemicals at 2 maximum allowed concentration, 3 maximum allowed concentration and 5 maximum allowed concentration, indicating high toxicity. The coefficient of fish respiration 101.7–152.4 % were recorded in variants with concentrations of certain substances at 2, 3 and 1 concentration, which may indicate a moderate or high toxicity. Indicators within 152.5–203.2 % – variations in the concentrations of certain substances at 0.5 concentration, 1 concentration and 2 concentration which was seen as evidence of a weak environment of toxicity to fish. The coefficient of fish respiration  $\geq 203.2\%$  were recorded 0.5 maximum allowed concentration and 1 concentrations of substances, that was seen as a lack of toxicity.

Thus, the methodology of toxicity bioassay of water environment in terms of the intensity of fish respiration, was improved namely: optimal exposure *A. nigrofasciata* aquarium fish in the experimental samples of water; specified formula of fish respiration intensity during the experiments; proposed indicative scale integrated assessment of the toxicity degree in the aquatic environment. This speeds to obtaining of the integrated response of the toxicity of water environment with the ability to reuse test objects.

**Keywords:** respiration of fish, toxicity, exposure.

Одержано: 03.03.2017