

ЕКОЛОГІЧНА ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ ВОДНИХ ТВАРИН

УДК 661.744:[602.4 : [582.263+595.324]]

І.М. КОНОВЕЦЬ, к. б. н., ст. наук. співроб., зав. лаб.,
Інститут гідробіології НАН України,
просп. Героїв Сталінграда, 12, Київ, 04210, Україна,
e-mail: i.m.konovets@gmail.com
ORCID 0000-0003-4234-5026

О.М. УСЕНКО, к. б. н., ст. наук. співроб., ст. наук. співроб.,
Інститут гідробіології НАН України,
просп. Героїв Сталінграда, 12, Київ, 04210, Україна,
e-mail: oleg.mikh.usenko@gmail.com
ORCID 0000-0002-0782-7292

М.Г. МАРДАРЕВИЧ, к. б. н., наук. співроб.,
Інститут гідробіології НАН України,
просп. Героїв Сталінграда, 12, Київ, 04210, Україна,
e-mail: m_miroslaw@yahoo.com
ORCID 0000-0002-1553-5468

Д.О. КУДРЯВЦЕВА, аспірант,
Інститут гідробіології НАН України,
просп. Героїв Сталінграда, 12, Київ, 04210, Україна,
e-mail: kudryashkadarina@gmail.com

ВПЛИВ ФЕНОЛКАРБОНОВИХ КИСЛОТ НА ПЛОДЮЧІСТЬ *DAPHNIA MAGNA*

Встановлено, що пригнічуюча або стимулююча дія фенолкарбонних кислот на гіллястовусих ракоподібних *Daphnia magna* при культивуванні у штучних умовах не залежить від їх приналежності до оксикоричної (кумарова, кавова), або оксibenзойної (саліцилова, галова) групи.

Найбільші показники плодючості *D. magna* відмічені за концентрацій кавової кислоти 0,4—0,8 мг/дм³, галова кислота за концентрації 0,8 мг/дм³ чинила помірний стимулюючий вплив. Дія кумарової та саліцилової кислот у діапазоні концентрацій 0,1—3,2 мг/дм³ на самиць, посаджених у експеримент, не проявлялася або була пригнічуючою. Проте для їх нащадків негативні ефекти за показником виживання виявлені не були, що може свідчити про наявність у гіллястовусих ракоподібних специфічних ефективних механізмів адаптації до підвищеного вмісту фенолкарбонних кислот у середовищі існування.

Отримані результати можуть бути використані для підвищення продуктивності систем вирощування гіллястовусих ракоподібних шляхом спрямованого впливу на їхні метаболічні процеси.

Ключові слова: фенолкарбонні кислоти (кавова, кумарова, саліцилова, галова), *Daphnia magna*, плодючість.

Ц и т у в а н н я: Коновець І.М., Усенко О.М., Мардаревич М.Г., Кудрявцева Д.О. Вплив фенолкарбонних кислот на плодючість *Daphnia magna*. Гідробіол. журн. 2021. Т. 57. № 3. С. 83—92.

Присутність багатьох біологічно активних речовин (феноли, терпени, індоли, алкалоїди, гідроароматичні сполуки, вуглеводні та інші) у водному середовищі гальмує або ж стимулює фізіологічну активність гідробіонтів [14, 18]. Фенольні сполуки рослинного походження різноманітні за структурою та властивостями. Вони беруть участь в процесах дихання, фотосинтезу, передачі енергії світла, адаптації і захисту рослин від багатьох стресових впливів з високою ріст-регуляторною активністю [5].

Різні види водних рослин виділяють специфічні метаболіти, які у сукупності створюють у водоймах хімічне середовище, що може бути сприятливим або несприятливим для тих чи інших безхребетних [1]. Їхня дія є неспецифічною, тобто високі дози або тривалий вплив пригнічують, а малі концентрації та короточасний вплив стимулюють життєдіяльність гідробіонтів. Направленість дії фенолкарбонових кислот (ФК) пов'язана насамперед зі зміною структурно-функціональних характеристик, здатних впливати на клітинному рівні на процеси захисту рослин від зовнішніх несприятливих абіотичних та біотичних чинників [6, 8]. Тому використання їх для підвищення продуктивності гідробіонтів може розглядатись як новий напрямок біотехнологічних досліджень.

Відомо, що серед ФК високу активність проявляють оксикоричні і оксibenзойні кислоти — кавова, кумарова, ферулова, галова [4, 17], як алохімічні агенти вони викликають чисельні фізіологічні ефекти. На різних рослинних організмах встановлено їх вплив на проникність плазматичних мембран, інтенсивність перекисного окислення ліпідів [10], ферментативних процесів і дихання [16].

При вирощуванні гідробіонтів різних трофічних рівнів у штучних умовах актуальним залишається встановлення особливостей фізіологічної адаптації та екологічного потенціалу за рахунок використання біологічно активних речовин, що у кінцевому рахунку може лягти в основу розробки нових прийомів підвищення їхньої продуктивності [7]. ФК можуть чинити поліфункціональну біорегуляторну дію, яка проявляється у регуляції клітинного сигналіngu і ростових процесів, формуванні адаптивних реакцій рослин. Показано, що вони є стимулятором росту рослин та модулятором про- та антиоксидантної рівноваги у результаті активації пероксидаз, що відповідають за стрес-індукуюче утворення активних форм кисню [3]. Але слід зазначити, що єдиної думки щодо механізмів стимулюючої дії ФК на гідробіонтів не існує.

Метою цієї роботи було з'ясування направленості впливу ФК на плодючість гіллястовусих ракоподібних *Daphnia magna* і пошук можливої гормезисної дії цих речовин.

Матеріал і методика досліджень

Досліджували вплив кумарової і кавової (оксикоричні), саліцилової і галової (оксibenзойні) кислот кваліфікації «х. ч.» за концентрацій 0,1, 0,4, 0,8 і 3,2 мг/дм³. Як контроль та середовище для приготування розчинів ФК використовували підготовлену водопровідну воду. Перед початком

експериментів проводили лагідну аерацію середовища протягом 12 год для насичення його киснем.

Плодючість *D. magna* досліджували за рекомендаціями [2] протягом 21 доби за температури 22 ± 2 °C і світлового режиму 16 : 8 (світло : темрява). Для цього у десять склянок об'ємом 100 см³ з дослідним розчином розміщували по одній самиці віком до 24 годин. Молодь відсаджували не пізніше ніж через 12 годин після народження. Визначали кількість і стать нащадків, спостереження за якими проводили у дослідних розчинах до настання статевої зрілості (утворення гонад). Показник плодючості розраховували як середню кількість нащадків на одну самицю, що була посаджена у дослід, а також на одну самицю, що давала нащадків (у разі загибелі піддослідних особин до моменту формування гонад).

Як корм використовували суміш пекарських дріжджів і хлорели (1 : 1) у сумарній концентрації 10 мг/дм³ (суха маса), який вносили у дослідні ємності один раз на добу. Для запобігання негативного впливу екзометаболітів і підтримки концентрації дослідних речовин середовище змінювали тричі на тиждень.

Статистичну обробку результатів досліджень виконували загальноприйнятими методами варіаційної статистики, відхилення від середнього значення на рисунках є стандартними відхиленнями. Порівняння статистичної значущості різниці середніх виконувалось за критерієм Стьюдента.

Результати досліджень та їх обговорення

Доступна література містить вкрай обмежену кількість робіт стосовно дії кумарової кислоти на водних тварин. Концентрацію 13,1 мг/дм³ наводять як середньомедіанну для *D. magna* (експозиція не вказана) [19], проте це значення не є експериментально отриманим, воно визначено за допомогою симуляційних алгоритмів програмного забезпечення Discovery Studio ADMET Software і виглядає значно заниженим.

Розрахунок середньої кількості нащадків на одну самицю показує, що кумарова кислота чинить негативний вплив на плодючість *D. magna* (рис. 1). За дії концентрацій 0,1, 0,4, 0,8 і 3,2 мг/дм³ цей показник зменшувався відповідно на 26, 23, 84 ($p < 0,01$) і 65 % ($p < 0,05$). За максимальної концентрації їх середня кількість була дещо вищою, ніж при 0,8 мг/дм³, проте ця різниця не є статистично значущою.

Негативна дія кумарової кислоти у діапазоні 0,1—3,2 мг/дм³ проявлялась також і у виживанні самиць (див. рис. 1, б). Всі особини *D. magna* вижили впродовж 21 доби експерименту лише за мінімальної дослідженої концентрації. За дії 0,4 мг/дм³ за перші сім діб загинуло 30 % особин, за вищих концентрацій смертність зростала, що свідчить про класичний прояв токсичної дії.

Перерахунок кількості нащадків на одну самицю, що вижила та розмножувалась за дії різних концентрацій кумарової кислоти, підтверджує припущення про переважно токсичний вплив цієї речовини на *D. magna* (див. рис. 1). За концентрацій 0,1, 0,8 і 3,2 мг/дм³ середня кількість на-

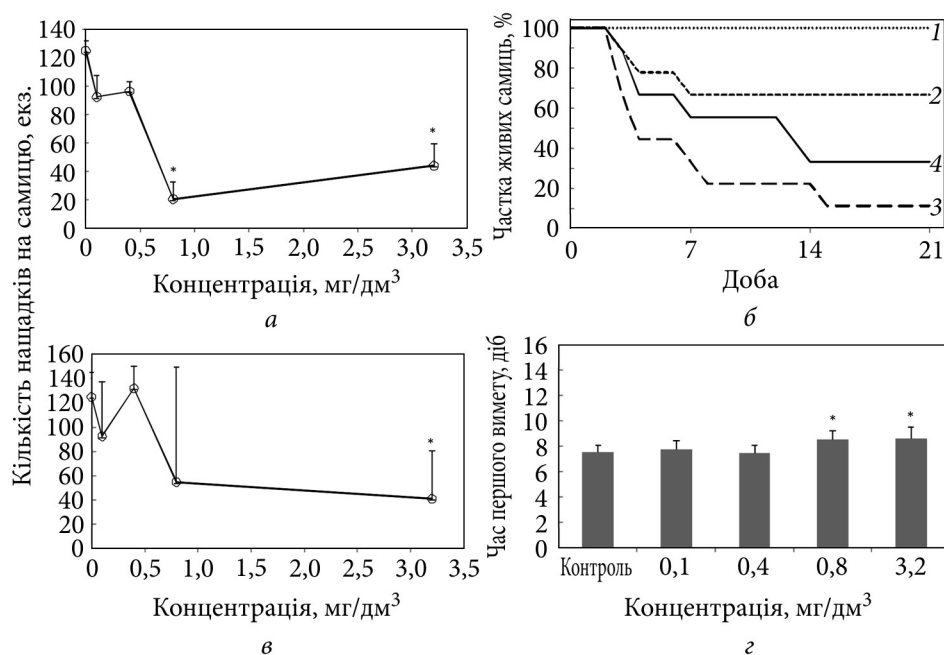
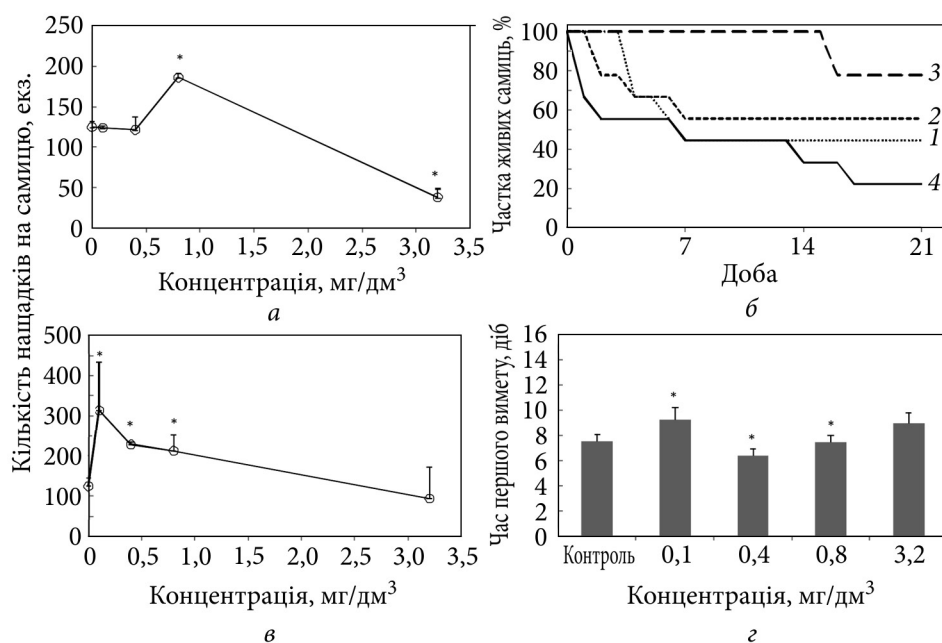


Рис. 1. Вплив кумарової кислоти на *D. magna*. Тут і на рис. 2—4: середня кількість нащадків на самицю, що була посаджена у дослід (а); динаміка виживання самиць (б); середня кількість нащадків на самицю, що досягла фертильної стадії (в); час першого вимету (г)

щадків у перерахунку на самицю, що вижила, знизилась відповідно на 26, 56 і 67 %. У той же час за концентрації 0,4 мг/дм³ цей показник перевищував контрольне значення на 5 % ($p > 0,05$), проте цю концентрацію не можна вважати стимулюючою через виявлену смертність піддослідних особин.

Дані щодо впливу кавової кислоти на водних тварин також обмежені. За результатами гострих дослідів з *Daphnia magna*, у діапазоні концентрацій 0,01—1000 мг/дм³ вона не чинила токсичної дії, а LC_{50} перевищувала 100 мг/дм³ [11]. Оскільки завданням цієї роботи було дослідження можливості використання кавової кислоти для флоатації іонів Cr (III) і Pb (II) з водних розчинів, то автори були певною мірою зацікавлені у зниженні ступеню токсичності цієї речовини для гідробіонтів. Так, за результатами наведених досліджень вона виявилась «практично нетоксичною» (за класифікацією ВООЗ) також для зеленої мікроводорості *Selenastrum capricornutum* і коропа *Cyprinus carpio* з показниками гостротоксичної дії $ErC_{50}^{72 \text{ год}} > 100$ мг/дм³ і $LC_{50} > 100$ мг/дм³.

На нашу думку, більш вірогідні дані були отримані авторами роботи [15] при дослідженні впливу менших концентрацій кавової кислоти (9—90 мг/дм³) на нематод *Caenorhabditis elegans* та гіллястовусих ракоподібних *Moina macroscopa*. У дослідженому діапазоні вона чинила стати-

Рис. 2. Вплив кавової кислоти на *D. magna*

стично значущо стимулюючу дію на плодючість *M. macroscopa*, максимальне зростання показника (близько 40 % відносно контрольних значень) відмічене за концентрацій 36 і 54 мг/дм³. У той же час тривалість життя за концентрацій 54 та 90 мг/дм³ статистично вірогідно знижувалась. Водночас у роботі [19] наведено симуляційно-прогнозоване значення LC₅₀ для *D. magna* (експозиція не вказана), яке становить 41,0 мг/дм³, що значно контрастує з наведеними вище літературними даними.

Розрахунок кількості нащадків на одну посажену в експериментальні умови самицю (рис. 2, а) свідчить про стимулюючий вплив кавової кислоти у концентрації 0,8 мг/дм³, цей показник перевищував контрольний на 49,1 % ($p < 0,01$). За концентрацій 0,1 і 0,4 мг/дм³ її дія не відрізнялась від контролю, а за максимальної (3,2 мг/дм³) сумарна кількість нащадків на піддослідну самицю становила близько 30 % ($p < 0,01$) контрольного показника, що свідчить про виражену токсичну дію.

Привертає увагу значний вплив кавової кислоти на смертність самиць *D. magna* (див. рис. 2, б). За концентрації 0,8 мг/дм³ негативний ефект майже не виявлявся, проте у нижчих концентраціях (0,1 та 0,4 мг/дм³) протягом перших 7 діб загинуло майже 50 % самиць. Особини, що вижили, відзначалися підвищеною плодючістю порівняно з контролем — за концентрацій 0,1, 0,4 і 0,8 мг/дм³ відповідно на 151, 83 і 70 % ($p < 0,05$, 0,01 і 0,05). За концентрації 3,2 мг/дм³ вона чинить, ймовірно, суто токсичну дію. Про це свідчить як поступове наростання смертності

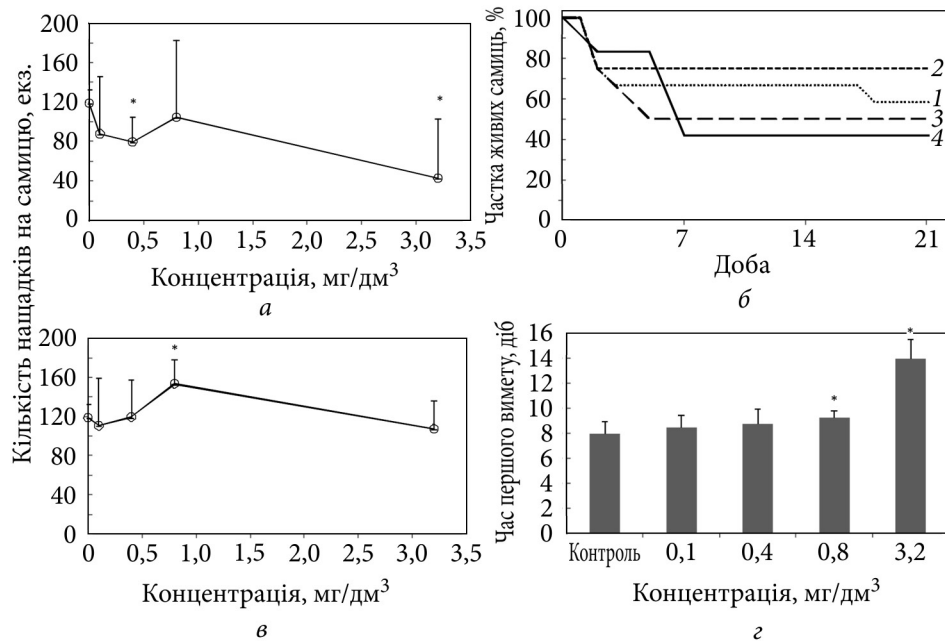


Рис. 3. Вплив галової кислоти на *D. magna*

піддослідних особин *D. magna*, так і зменшення середньої кількості нащадків.

Дослідження впливу галової кислоти у дослідженому діапазоні концентрацій на плодючість *Daphnia magna* не виявило дозо-залежних закономірностей (рис. 3). У той же час у концентрації 0,8 мг/дм³ вона чинила помірну стимулюючу дію, що проявилось у збільшенні середньої кількості нащадків на 21,9 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем (рис. 3).

Дані щодо дії саліцилової кислоти на *Daphnia magna* також обмежені. Отримане у роботі [20] значення LC_{50}^{24} становило 230 мг/дм³, що згідно Директиви 67/548/ЕС дозволяє віднести її до категорії нетоксичних для дафній. Проте ці дослідження були проведені без коригування рН, значення якого за цієї концентрації саліцилової кислоти становило 6,5. За рН 7,45 LC_{50}^{48} була значно вищою — 870 мг/дм³ [13]. У хронічних (21 доба) дослідках за показником плодючості середньоєфективна концентрація (EC_{50}) за умов нескоригованого рН становила 120 мг/дм³, за концентрації 20 мг/дм³ питома плодючість знизилась на 38 % без урахування смертності піддослідних самиць на початку експерименту [20]. В іншому дослідженні [12] недіяльна концентрація саліцилової кислоти у хронічному досліді (NOEC) була встановлена на рівні 10 мг/дм³.

Наші експерименти показали, що саліцилова кислота (як і галова, але більш виражено) у дослідженому діапазоні концентрацій чинить неспецифічну дію на *Daphnia magna*, що проявляється у дозо-незалежному підвищенні смертності ювенільних самиць у перші п'ять діб (рис. 4).

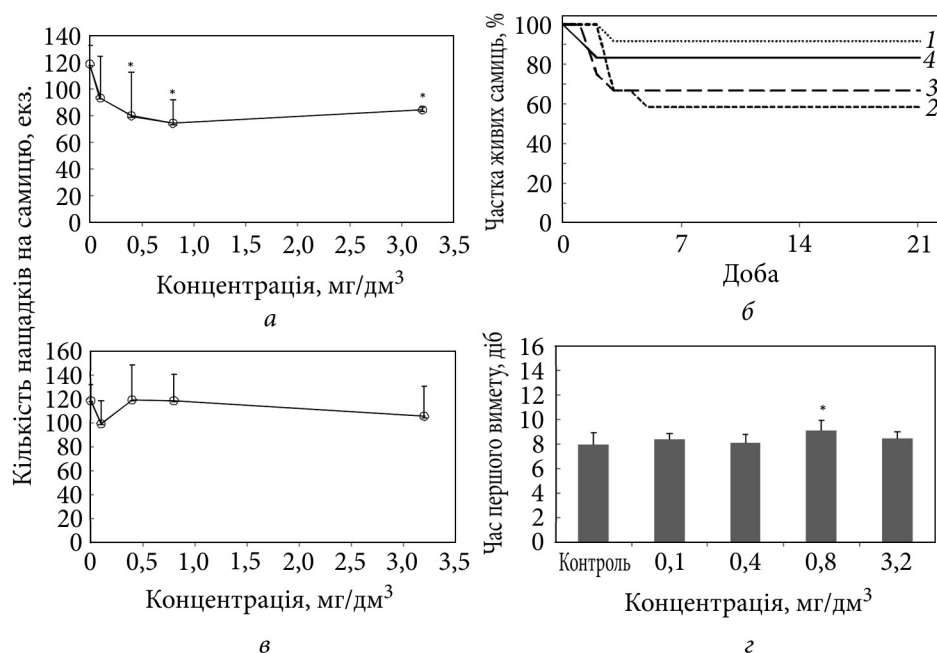


Рис. 4. Вплив саліцилової кислоти на *D. magna*

За дії саліцилової кислоти у концентраціях 0,1, 0,4, 0,8 і 3,2 мг/дм³ смертність піддослідних особин становила відповідно 8, 42, 33 та 17 %. При цьому за концентрації 0,8 мг/дм³ час першого вимету незначно зріс (див. рис. 4, г). Це призводило до статистично вірогідного зниження плодючості у перерахунку на кількість посаджених у дослід самиць у діапазоні 0,4—3,2 мг/дм³. Слід зауважити, що протягом подальшого експерименту загибелі піддослідних самиць і їх партеногенетичних нащадків не відбувалось, що є дещо неочікуваним зважаючи на підтримку постійної концентрації досліджуваної речовини. При перерахунку сумарної плодючості на кількість самиць, що вижили протягом перших діб експозиції, різниці з контрольними показниками не виявлено. За дії саліцилової кислоти у концентрації 3,2 мг/дм³ самиці достроково переходили у постфертильний період.

Висновки

Кумарова і меншою мірою саліцилова кислота чинять негативний вплив на *D. magna*, що проявляється у зниженні середньої кількості нащадків і загибелі піддослідних особин. У дослідженому діапазоні концентрацій стимулюючої дії цих речовин на *D. magna* не виявлено.

Дія кавової кислоти на плодючість *D. magna* є різноспрямованою. З одного боку, відмічена висока смертність піддослідних особин до досягнення ними фертильного віку (перші сім діб експозиції). При цьому залежність між смертністю і концентрацією має обернений характер, що

свідчить про відсутність токсичної дії у її класичному прояві. Найвища плодючість *D. magna* відмічена за концентрацій 0,4—0,8 мг/дм³, що проявлялось у закладці більшої кількості яєць у виводковій камері порівняно з контролем при однаковому часі ембріонального розвитку.

Галова кислота чинила помірний стимулюючий вплив на плодючість *D. magna* за концентрації 0,8 мг/дм³.

Таким чином, направленість дії фенолкарбонових кислот не залежить від їхньої приналежності до оксикоричної або оксibenзойної групи. За концентрацій 0,1 та 0,4 мг/дм³ (приблизно на два порядки нижче медіанних летальних концентрацій, наведених у літературі) виявлено тенденцію до помірної негативної дії на ювенільну стадію розвитку *D. magna*, що проявляється у відповідно 10 і 30 %-вій смертності, а також у ряді випадків — у затримці настання статевої зрілості і закладки гонад. Протягом подальшої експозиції смертності піддослідних самиць і їхніх партеногенетичних нащадків не спостерігається. Останнє може пояснюватись явищем «батьківського ефекту» — адаптації нащадків до несприятливої дії чинника завдяки позагенетичним змінам, зумовленим умовами життя батьків [9]. Це свідчить про наявність у *D. magna* специфічних ефективних механізмів адаптації до підвищеного вмісту фенолкарбонових кислот у середовищі існування. У дослідженому діапазоні концентрацій (0,1—3,2 мг/дм³) появи новонароджених самців не виявлено. Особливий інтерес мають подальші дослідження генотипічної і фенотипічної адаптації *D. magna* до впливу низьких концентрацій кавової та галової кислот з метою підвищення продуктивності систем їх масового вирощування.

Список використаної літератури

1. Гуревич Ф.А. Фитонциды водных и прибрежных растений, их роль в гидробиоценозах: автореф. дис. ...докт. биол. наук. Иркутск, 1973. 59 с.
2. ДСТУ 4174:2003. Якість води. Визначення хронічної токсичності хімічних речовин та води на *Daphnia magna* Straus і *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg (Cladocera, Crustacea). Київ : Держспоживстандарт України, 2003. 26 с.
3. Калупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Салициловая кислота и устойчивость растений к абиотическим стрессорам. *Вісн. Харків. агр. ун-ту. Сер. Біологія*. 2009. Вип. 2. С. 19—39.
4. Сакевич О.Й., Усенко О.М. Алелопатія в гідроекосистемах. Київ : Логос, 2008. 344 с.
5. Усенко О.М., Баланда О.В. Терпенові сполуки вищих водяних рослин і їх вплив на функціональну активність гідробіонтів. *Вісн. Львів. у-ту. Сер. біологічна*. 2013. Вип. 62. С. 216—226.
6. Усенко О.М., Гусейнова В.П., Сакевич А.И. Особенности влияния полифенолов на водоросли в условиях изменения активной реакции среды. *Гидробиол. журн.* 2008. Т. 44, № 3. С. 39—47.
7. Усенко О.М., Коновець І.М., Кіпніс Л.С. та ін. Вплив саліцилової кислоти на гідробіонтів різних трофічних рівнів при їх вирощуванні в штучних умовах: зб. матеріалів VIII з'їзду Гідроекол. тов-ва України, присвячений 110-річчю заснування Дніпровської біологічної станції «Перспективи гідроекологічних досліджень в контексті проблем довкілля та соціальних викликів». Київ, 2019. С. 166—169.

8. Усенко О.М., Сакевич О.Й., Баланда О.В. Резистентність водоростей до біологічно активних речовин. Київ : Логос, 2010. 192 с.
9. Alekseev V., Lampert W. Maternal control of resting-egg production in *Daphnia*. *Nature*. 2001. Vol. 414. P. 899—901.
10. Baziramakenga R., Leroux G.D., Simard R.R. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. *J. Chem. Ecol.* 1995. Vol. 21. P. 1271—1285.
11. Craioveanu M.G., Stefania Gh., Lucaciu I. et al. Assessment of aquatic toxicity of the caffeic acid complexed with Cr(III) and Pb(II) in the flotation process. *Revista de Chimie*. 2014. Vol. 65. P. 339—343.
12. Kalbfus W., Kopf W. Erste Ansätze zur ökologischen Bewertung von Pharmaka in Oberflächengewässern. *Münch. Beitr. Abwasser-, Fisch.- Flussbiol.* 1998. Vol. 51. P. 628—652.
13. Kamaya Y., Fukaya Y., Suzuki K. Acute toxicity of benzoic acids to the crustacean *Daphnia magna*. *Chemosphere*. 2005. Vol. 59. P. 255—261.
14. Kirpenko N.I., Usenko O.M. Influence of higher aquatic plants on microalgae (a review). *Hydrobiol. J.* 2013. Vol. 49, N 2. P. 57—74.
15. Pietsch K., Hofmann S., Henkel R. et al. The plant polyphenol caffeic acid affects life traits differently in the nematode *Caenorhabditis elegans* and the cladoceran *Moina macrocopa*. *Fresenius Environ. Bull.* 2010. Vol. 19. P. 1238—1244.
16. Souto C., Pellissier F., Chiapusio G. Allelopathic effects of humus phenolics on growth and respiration of mycorrhizal fungi. *J. Chem. Ecol.* 2000. Vol. 26. P. 2015—2023.
17. Usenko O.M., Konovets I.N. Analysis of phenolcarbonic acids content in phyto-mass of higher aquatic plants. *Hydrobiol. J.* 2014. Vol. 50, N 5. P. 47—60.
18. Usenko O.M., Konovets I.N., Tarashchuk O.S., Gorbunova Z.N. Phenolcarbonic acids of the submerged aquatic plants and their effect on phytoepiphyton structure. *Ibid.* 2019. Vol. 55, N 6. P. 55—64.
19. Usha T., Goyal A.K., Narzary D. et al. Identification of bioactive glucose-lowering compounds of methanolic extract of *Hodgsonia heteroclita* fruit pulp. *Front Biosci. (Landmark Ed.)*. 2018. Vol. 23. P. 875—888.
20. Wang W.H., Lay J.P. Fate and effects of salicylic acid compounds in freshwater systems. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 1989. Vol. 17, Iss. 3. P. 308—316.

Надійшла 02.07.2020

I.M. Konovets, PhD (Biol.), Senior Researcher, Head of Lab.,
Institute of Hydrobiology of the NAS of Ukraine,
12 Geroyiv Stalingrada Ave, Kyiv, 04210, Ukraine,
e-mail: i.m.konovets@gmail.com
ORCID 0000-0003-4234-5026

O.M. Usenko, PhD (Biol.), Senior Researcher,
Institute of Hydrobiology of the NAS of Ukraine,
12 Geroyiv Stalingrada Ave, Kyiv, 04210, Ukraine,
e-mail: oleg.mikh.usenko@gmail.com
ORCID 0000-0002-0782-7292

M.G. Mardarevich, PhD (Biol.), Researcher,
Institute of Hydrobiology of the NAS of Ukraine,
12 Geroyiv Stalingrada Ave, Kyiv, 04210, Ukraine,
e-mail: m_miroslaw@yahoo.com
ORCID 0000-0002-1553-5468

D.O. Kudryavtseva, PhD Student,
Institute of Hydrobiology of the NAS of Ukraine,
12 Geroyiv Stalingrada Ave, Kyiv, 04210, Ukraine,
e-mail: kudryashkadaria@gmail.com

EFFECTS OF PHENOLCARBOXYLIC ACIDS ON *DAPHNIA MAGNA* FERTILITY

Experiments with cladoceran *Daphnia magna* in the artificial cultivation system showed that the inhibitory or stimulating effect of phenolcarboxylic acids does not depend on their chemical group (hydroxycinnamic or hydroxybenzoic).

Maximal fertility rates were registered under the caffeic acid concentrations 0,4—0,8 mg/l, and gallic acid concentration 0,8 mg/l, demonstrating moderate stimulating effect on *D. magna* fertility. Coumaric and salicylic acids in the studied concentration range (0,1—3,2 mg/l) did not affect the test-organisms. However, the survival of their offspring was not impacted, which can indicate that *D. magna* possesses specific and effective mechanisms of adaptation to elevated contents of phenolcarboxylic acids in an aquatic environment.

Obtained results can be applied for increasing cladocerans cultivation systems productivity by means of targeted impact on their metabolic processes.

Keywords: phenolcarboxylic acids (caffeic, coumaric, salicylic, gallic), *Daphnia magna*, fertility rate.