**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**

**НАУКОВА РОБОТА**

для участі у Всеукраїнському конкурсі студентських наукових робіт

з природничих, технічних і гуманітарних наук

у галузі «Екологія»

Тема: ВПЛИВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ КСЕНОБІОТИКІВ ГОРМОНАЛЬНОЇ ДІЇ НА РЕПРОДУКЦІЮ ПРІСНОВОДНИХ БЕЗХРЕБЕТНИХ *Daphnia magna* Straus

Шифр роботи: «Прісноводні безхребетні»

2020

АНОТАЦІЯ

Конкурсна наукова робота: 32 с., 6 рис., 3 табл., 22 джерела.

Об’єкт дослідження – забруднення води біологічно активними ксенобіотиками гормональної дії.

Предмет дослідження – вплив біологічно активних ксенобіотиків гормональної дії на репродукцію прісноводних безхребетних *Daphnia magna.*

Метою роботи було виявлення впливу біологічно активних ксенобіотиків гормональної дії триклозану та нонілфенолу, а також екзогенних стероїдних гормонів тестостерону та естрону – сполук, що можуть викликати порушення репродуктивної функції у прісноводних безхребетних при забрудненні водойм.

Методи дослідження - аналітичний, біотестування, методи високоефективної рідинної хроматографії та мас-спектрометрії, статистичні методи обробки даних.

Наукова новизна: на основі експериментальних даних зроблено аналіз впливу біологічно активних ксенобіотиків гормональної дії на процеси репродукції прісноводних безхребетних-фільтраторів, що має значення для збереження здатності водойм до самоочищення в сучасних умовах.

Практичне значення: результати дослідження рекомендовані для розробки та реалізації комплексних програм, спрямованих на захист водних екосистем, охорону безхребетних гідробіонтів та зниження вмісту біологічно активних ксенобіотиків у водних об’єктах України.

Особистий внесок авторів: аналіз наукової літератури за темою наукової роботи, проведення експериментальних досліджень на базі Інституту гідробіології НАН України, обробка отриманих результатів, підготовка до впровадження результатів дослідження.

ЗАБРУДНЕННЯ ВОДИ, БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ КСЕНОБІОТИКИ, ПРІСНОВОДНІ БЕЗХРЕБЕТНІ, РЕПРОДУКЦІЯ, БІОТЕСТУВАННЯ

ЗМІСТ

ВСТУП……………………………………………………………………………...5

1. НЕБЕЗПЕКА ЗАБРУДНЕННЯ ВОДОЙМ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИМИ КСЕНОБІОТИКАМИ……………………………………………7
   1. Джерела надходження біологічно активних сполук ксенобіотичного походження у водне середовище …………………………………………………7
   2. Вплив біологічно активних сполук гормональної дії на прісноводних безхребетних………………………………………………………………………10
   3. Зниження здатності водних екосистем до самоочищення внаслідок забруднення води біологічно активними ксенобіотиками……………………13

2.МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ КСЕНОБІОТИКІВ НА БЕЗХРЕБЕТНИХ ГІДРОБІОНТІВ………………………………………….16

2.1. Характеристика біологічно активних ксенобіотиківтриклозану та нонілфенолу……………………………………………………………………… 16

2.2.Характеристика природних гормонів тестостерону та естрону…………………………………………………………………………….18

2.3. Дослідження токсикологічних і репродукційних показників *Daphnia magna*........................................................................................................................19

2.4. Методика визначення біологічно активних речовин у воді………………21

3.ВПЛИВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК ГОРМОНАЛЬНОЇ ДІЇ НА ПРОЦЕСИ РЕПРОДУКЦІЇ У ГІЛЛЯСТОВУСИХ

РАКОПОДІБНИХ*Daphniamagna……………………………………………………..*22

3.1.Вміст біологічно активних ксенобіотиків у стічних і поверхневих водах……………………………………………………………………………… 22

3.2. Вплив триклозану та нонілфенолу на процеси репродукції гіллястовусих ракоподібних *Daphnia magna.*…………………………………………………..24

3.3. Вплив тестостерону та естрону на репродуктивні характеристики дафній……………………………………………………………………………..26

ВИСНОВКИ……………………………………………………………………….29

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ……………………………………31

ВСТУП

Антропогенний вплив на гідросферу постійно зростає. Окрім того, водні екосистеми є концентраторами забруднень з повітря та ґрунту. Стічні води містять іони важких металів, ароматичні вуглеводні, пестициди, поверхнево-активні речовини, різноманітні медичні препарати гормональної та гормоноподібної природи [1].

Проявляючи різноплановий вплив на фізіолого-біохімічні процеси у водяних тварин, ксенобіотичні біологічно активні сполуки можуть суттєво впливати на метаболізм та репродукцію, модифікувати адаптивні реакції, викликані абіотичними чинниками, ускладнюючи таким чином пристосування до навколишнього середовища, що постійно змінюється. З іншого боку, водяні тварини можуть бути чутливим індикатором наявності у водному середовищі сполук, що спричиняють ендокринні порушення [2].

В роботі розлянуто проблему накопичення у водних об’єктах України забруднювачів нового класу ( в англомовній літературі –emerging contaminants) – ксенобіотичних органічних сполук, що можуть негативно впливати на водні екосистеми через порушення метаболізму і репродукцію прісноводних безхребетних – фільтраторів, зокрема, гіллястовусих ракоподібних. У гідробіонтів виявлено модифікуючий вплив деяких екзогенних гормонів та сполук, що порушують роботу ендокринної системи. Найбільшважливими з них є зміни в репродуктивних органах і тканинах , що реєструються у водяних організмів нижче по течіїпісля скиду стічних вод, причиною якихвважають вплив біологічно активних сполук гормональної дії. Спостерігаютьсяанатомічні та фізіологічні зміни, зокрема, фемінізація гонад самців [3].

Дослідження антропогенних хімічних забруднювачів показали, що деякі з них мають гормональну активність, а концентрація їх зростає в деяких річках в п’ять разів від витоків до устя. Цевпливає на здатність водних екосистем до самоочищення, якістьпитної води та на людину, як кінцевогоспоживача.

1.НЕБЕЗПЕКА ЗАБРУДНЕННЯ ВОДОЙМ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИМИКСЕНОБІОТИКАМИ

* 1. Джерела надходження біологічно активних сполук ксенобіотичного походження у водне середовище

Останнє десятиріччя агенціями з охорони природи у провідних країнах світу Північніої Америки, Західної Европи та Азії розроблені стратегії дослідницьких робіт по з’ясуванню впливу «нововиявлених забруднювачів» (emerging contaminants) на стан водного середовища та здоров’я людини [4]. Ці забруднюючі речовини включають фармацевтичні препарати, засоби персональної гігієни, антимікробні препарати, антипірени, наноматеріали, які надходять до водойм з неочищеними або недоочищеними стічними водами. Хоча деякі з цих речовин виявлені у навколишньомусередовищібільшніж два десятиріччя тому, усвідомленняризикуїх токсичного впливуще є недостатнім. Були такожзробленіспробивиявитивзаємозв’язокміж станом навколишньогосередовища і здоров’ялюдини з концентраціями таких забруднювачів [5].

Гормональні препарати (стероїди) були першими біологічно активними сполуками і першими фармацевтичними препаратами, які привернули увагу науковців як стійкі забруднювачі довкілля, що проявляють біологічні ефекти на водяних організмах в надзвичайно низьких концентраціях — нг/л [1, 2]. Це були естрогенні ліки, які широко застосовуються при естрогензамісній терапії, оральні контрацептиви та препарати, які використовуються у ветеринарії для прискорення росту тварин (рис.1.1.). Небезпечність цих сполук для довкілля обумовлена їх здатністю порушувати або модифікувати ендокринну систему організмів , яка є центральною в їх функціонуванні, розвитку та репродукції.

Було показано, що концентрація естрогенів в зразках різних вод від каналізаційної до питної варіює дуже сильно - на 6 порядків [4]. Зокрема, синтетичні оральні контрацептиви визначаються в витоках очисних споруд в дуже малих концентраціях, наприклад,17-альфаетинілестрадіол - 17 нг/л. Проте вважається, що в комбінації зі стероїдними естрогенами, як 17-бетаестрадіол і естрон, вони здатні порушувати поведінку самок риб та викликати фемінізацію чоловічої статі риб (утворення вітелогеніну) [6]. Фемінізація у риб при надзвичайно низьких концентраціях стероїдних гормонів вперше спостерігалась у відстійниках на очисних спорудах в Німеччині у середині 80-х років [7].

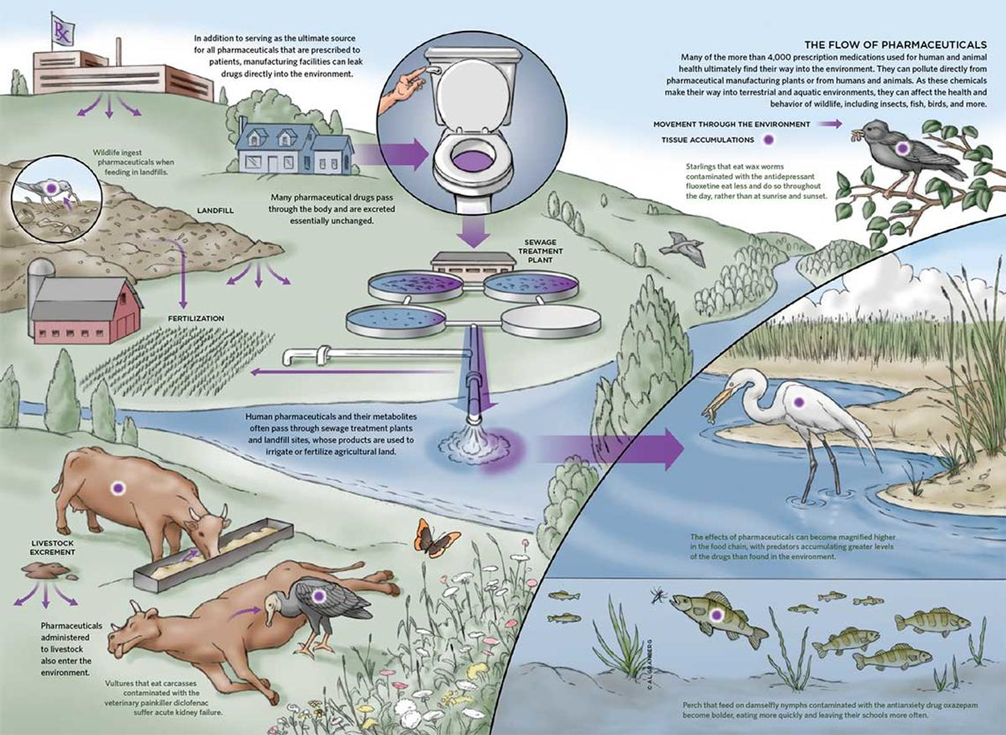
Велика увага, особливо в останні роки, приділяється ендокринімітуючим або ендокринпорушуючим речовинам, до яких відносяться біологічно активні ксенобіотики гормональної дії.

Рис.1.1. Надходження біологічно активних речовин з фармацевтичних препаратів у водойми

Вони взаємодіють з функціонуючою ендокринною системою, модулюють або блокують дію природних гормонів в організмі, запускають ідентичні для них реакції, впливаючи на синтез, секрецію, транспорт, зв'язування, дію або елімінацію природних гормонів.

Слід відмітити, що їх активність виявляється у дуже низьких дозах.

Ендокринпорушуючі речовини, які внаслідок недостатньої очистки води можуть надходити в організм людини, небезпечні для репродуктивної системи та розвитку, вносять значний вклад у виникнення раку, неврологічних та поведінкових розладів, кількість яких значно зросла в останні десятиріччя [1].Надходження біологічно активних ксенобіотиків у навколишнє середовище пов’язане передусім з антропогенним навантаженням на екосистеми – збільшенням об’ємів промислового виробництва, застосуванням екологічно небезпечних технологій, накопиченням небезпечних токсичних відходів, хімізацією сільського господарства, збільшенням фармакологічного виробництва тощо.

На сьогодні ідентифіковано більше 50 синтетичних хімічних речовин як ендокринпорушуючих. Принаймні половина з них є персистентними і стійкими до природної деградації. Зокрема, до них належать широко застосовувані антисептичний засіб триклозан та поверхнево активна речовина нонілфенол [8]. Серед інших фізіологічно активних речовин значну небезпеку для водної біоти представляють природні гормони тестостерон та естрон, які внаслідок недостатнього очищення стічних вод надходять у водойми та впливають на ембріональний розвиток різних видів водяних організмів [9].

Незважаючи на те, що при надходженні у поверхневі водойми стічні води значнорозбавляються, надзвичайнабіологічнаактивністьсинтетичних і природнихгормонів та речовин гормональної дії, недостатняефективність їхелімінації на очисних спорудах, зростаючий рівень використання, роблять ці речовини потенційно небезпечними для водних екосистем.

Побутові стічні води з цієї точки зору являють собою сумішендокринно-активних сполук синтетичної та натуральноїприроди , концентраціяяких може складати віддесятих долей міліграму у літрі до мільйонних, але цьогодостатньо, щоб викликати ендокринні порушення у водяних організмів. При цьому ці речовини можуть імітувати дію, або виступати антагоністами природних гормонів [10].

Серед найбільш розповсюджених природних і синтетичних стероїдних гормонів у каналізаційних водостоках виявлені естрадіол, естрон, естріол та синтетичний естроген етинілестрадіол. Андрогени також широко присутні в стічних водах [4]. Проведення відповідних дослідженьщодо стану проблеми в Україні забруднення поверхневих вод екзогенними біологічно активними сполуками гормональної дії дозволило би отримати важливі дані щодо їх потенційного ризикудля мешканців водного середовища.

* 1. Вплив біологічно активних сполук гормональної дії на прісноводних безхребетних

Гормони виявлені в усіх досліджуваних безхребетних. Нейросекреторні клітини, основна складова їх гуморальної системи, виявлені у плоских та кільчастих червів, молюсків, гіллясовусих ракоподібних. В кожній з цих груп безхребетних вірогідно існує гормональна регуляція росту та регенерації, розмноження, метаболізму. Стероїди виконують також функції хімічної комунікації, хімічного захисту та в деяких випадках травлення. Відповідальні за це клітини не завжди знаходяться у головному відділі, а в деяких випадках в нервовому ланцюжку, що дозволяє пояснити регенерацію деяких безхребетних з частин тіла [6].

Незважаючи на наявність багаточисельних свідчень важливої ролі стероїдних гормонів у репродукційних процесах прісноводних безхребетних, отриманих у лабораторних дослідах, кількість даних щодо визначення їх концентрації у тканинах у природних умовах є обмеженою. Аналоги стероїдних гормонів хребетних (прогестагени, андрогени та естрогени) знайдено в усіх класах молюсків [9,10].

Переважає думка про те, що метаболізм і біологічна роль стероїдних гормонів у хребетних тварин і безхребетних подібні. Встановлено також, що стероїдні гормони беруть безпосередню участь в контролі розмноження, росту, обміні речовин, циркуляції крові та води, процесів іонного обміну і у представників морських молюсків Mytilusedulis [3, 6].

Так, в роботах ряду авторів встановлена кореляція між антропогенним навантаженням та активністю статевих гормонів та їх рецепторів у двостулкових молюсків, а також виявлено негативний вплив на гонадо–соматичний індекс, затримку у дозріванні гонад [6,9]. Вважають, що одним зі шляхів впливу органічних ксенобіотиків на прісноводних безхребетних є порушення синтезу гормонів шляхом впливу на систему перетворення холестерину в гормони та порушення ароматизації анрогенів до естрогенів. Жіночий статевий гормон прогестерон має стимулюючий вплив на водяні оранізми, особливо виражений на пізніх стадіях розвитку ембріона. Як відомо, у хребетних тварин більшість статевих гормонів впливають на організм через взаємодію з рецепторами. Рецептороподібні білки статевих гормонів знайдено і у безхребетних гідробіонтів - черевоногих та двостулкових молюсків. Встановлено такі білки з окремими ділянками приєднання для андрогенів та естрогенів [11]. Це підтверджує думку про те, що прісноводні безхребетні можуть бути чутливим індикатором наявності сполук, що спричиняють ендокринні порушення у водному середовищі.

Таким чином, у літературі представлена велика кількість даних, що підтверджують гіпотезу про подібність механізмів дії та біологічної ролі стероїдних гормонів у хребетних та безхребетних тварин .

Показано, що ендокринно-модулюючі сполуки можуть впливати на чутливі гормональні шляхи, які регулюють репродуктивні функції у безхребетних, цим самим зменшуючи чисельність популяції. Зменшується число та якість сперматозоїдів, кількість запліднених яєць, порушується діяльність статевих органів на всіх стадіях репродуктивного циклу. Спостерігається гормональний дисбаланс, порушується біохімічна взаємодія, що може призвести до порушення репродуктивної функції в подальших поколіннях [6].

Так, забруднення води нонілфенолом (неіонна поверхнево-активна речовина) викликає зменшення тканинної концентрації тестостерону та естродіолу у Dreissenapolymorpha завдяки порушенню обміну холестерину [11]. Іншим шляхом впливу токсичних речовин на обмін стероїдних гормонів може бути інгібування активних центрів ферментів, що каталізують кон'югацію гормонів з утворенням неактивної форми [9].

Таким чином, гормоноруйнуючим впливом характеризується широкий діапазон забруднюючих речовин. Для виявлення їх негативної дії на ендокринну систему водяних організмів в світовій практиці досліджень широко використовуються біохімічні та молекулярні підходи, у тому числі пов’язані з вивченням пошкодження ДНК, апоптозу тощо. Розглядається можливість використання цих показників як біомаркерів [11].

З іншого боку, значні порушення гормонального балансу виявлені у водяних хребетних через споживання планктонних та бентосних організмів, значну частину яких становлять безхребетні, що зазнали екзогенного впливу синтетичних гормонів стічних вод [6].

Незважаючи на існування механізмів регуляції та підтримки стабільного гормонального фону у прісноводних безхребетних, внаслідок імітування дії природних гормонів, екзогенні гормони спричиняють розбалансування гормональної системи, що в свою чергу чинить значний негативний вплив як на перебіг фізіолого-біохімічних процесів у окремих особин, так і на природні популяції безхребетних.

Таким чином, прісноводні безхребетні зазнають значного впливу внаслідок забруднення води біологічно активними ксенобіотиками гормональної дії і можуть бути чутливим індикатором наявності сполук, що спричиняють ендокринні порушення у водному середовищі.

1.3.Зниження здатності водних екосистем до самоочищення внаслідок забруднення води біологічно активними ксенобіотиками

Потужним фактором очищення водойм є бiологiчне самоочищення, яке включає бiофiльтрацiю, бiоакумуляцiю, бiодетоксикацiю, мінералiзацiю, фотосинтетичну аерацiю та реаерaцiю. Збалансовані гідробіоценози розглядаються як «біофабрики» питної води, якість якої визначається всією сукупність процесів, що в них відбуваються. Бiофiльтрацiю здiйснюють органiзми-фiльтратори, головним чином, двостулковi молюски та гіллястовусі ракоподiбнi. Пропускаючи через своє тiло велику кiлькiсть води i очищаючи її вiд завислих частинок, вони використовують органiчнi речовини як корм, а решту виводять у воду у вигляді слизових грудок, що осiдають на дно. 3авдяки цьому вiдбувається освiтлення води та зменшується концентрацiя забруднюючих речовин. Деякi з них можуть повертатись у воду пiсля вiдмирання гiдробiонтiв, але значна частина пiдлягає руйнуванню пiд дiєю ферментативних систем або переходить у неактивну форму. Крім того, гідробіонти здатні накопичувати токсичні речовини у своїх тканинах і органах, що розглядається як біоакумуляція забруднюючих агентів. Руйнування та бiоконцентрування токсичних речовин за участю водяних органiзмiв відносяться до процесів бiологiчної детоксикaцiї. Значна частина токсикантів, особливо органічного і біогенного походження підлягає розщепленню до води та вуглекислого газу, тобто мінералізації. Чим більше у водоймі гідробіонтів-гетеротрофів і чим вище рівень їхнього метаболізму, тим більше органіки підпадає під біологічне окиснення і, відповідно, тим енергійніше відбувається самоочищення водних мас [1].

Внаслідок впливу на метаболізм та репродукцію водяних організмів забруднення води впливає на структуру та стан популяцій безхребетних-фільтраторів і відповідно на якість води. З іншого боку, водяні тварини можуть бути чутливим індикатором наявності сполук, що спричиняють ендокринні порушення у водному середовищі. Автори робіт [2,3] вказують, що такими індикаторами можуть бути прісноводні безхребетні. Ця думка цілком збігається з нашою, оскільки описані у науковій літературі дослідження показують, що вони мають розвинену ендокринну систему (принаймні, що стосується стероїдних гормонів).

При дослідженні впливу препарату преднізолону (аналога гормону хребетних кортизолу) на активність соматичного росту, роботу кровоносної системи і плодовитість гіллястовусого рачка *Daphnia magna* в ряду трьох послідовних поколінь вказується на те, що цей гормон чинив достовірний вплив на досліджувані морфофункціональні показники життєдіяльності цього виду [6]. Це свідчить про чутливість обраного тест-об'єкта до екзогеннихгормонів і біологічно активних речовин гормональної дії і дозволяє запропонувати використовувати дафній для оцінки впливу забруднення води на ендокринні порушення у гідробіонтів.

Проведений огляд літератури свідчить про те, що завдяки вдосконаленню аналітичних методів аналізу ксенобіотичних та природних біологічно активних полук в останнє десятиріччя значна увага приділяється проблемі забруднення водних екосистем стероїдними гормонами природного та синтетичного походження, які виявляються зручними маркерами надходження у водні об'єкти неочищених або недоочищених стічних вод. Показано, що організми-фільтратори здатні накопичувати в своєму організмі значні кількості речовин токсичної дії, ліпофільних ксенобіотичних сполук фармацевтичного призначення тощо. Беручи також до уваги собливості регуляції статевої структури популяцій у прісноводних безхребетних, вони можуть бути індикаторами порушень гормональної системи гормоноподібними речовинами та синтетичними стероїдними гормонами. Проте дані щодо забруднення останніми водного середовища, їх вмісту в тканинах та впливу на організм гідробіонтів обмежені.

Таким чином, метою даної роботи було виявлення впливу синтетичних біологічно активних органічних речовин триклозану та нонілфенолу, а також екзогенних стероїдних гормонів тестостерону та естрону – сполук, що можуть викликати порушення ендокринної системи, процесів репродукції і внаслідок цього змінювати чисельність популяцій безхребетних-фільтраторів.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ КСЕНОБІОТИКІВ НА БЕЗХРЕБЕТНИХ ГІДРОБІОНТІВ

Наукова робота виконувалась на базі Інституту гідробіології НАН України на основі договорів про співпрацю.

2.1. Характеристика біологічно активних ксенобіотиків триклозану та нонілфенолу

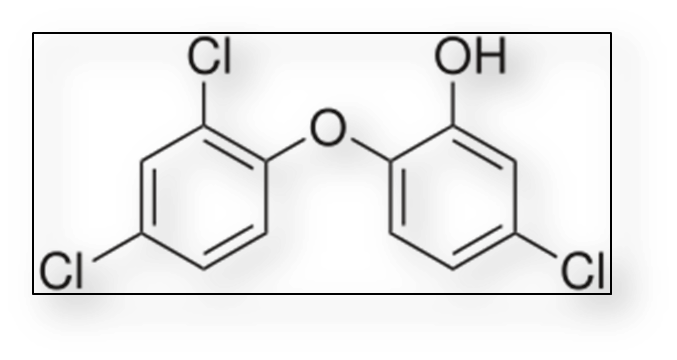
В даний час триклозан (рис.2.1.) широко застосовується в миючихзасобах, а також засобах особистої гігієни, таких як мила, дезодоранти, вологі серветки.

Рис. 2.1. Триклозан

Виявляється в грунтових водах, грунтах, організмах водяних мешканців. Триклозан має властивості речовини, що порушує роботу ендокринної системи. Встановлено, що він впливає на репродуктивну функцію.

Триклозан - (5-хлор-2-[2,4-дихлорфеноксі]фенол) - загальний біоцид, токсикант і антисептичний засіб, який має виражену антибактеріальну активність, часто використовується як антимікробний інгредієнт при виготовленні зубних паст ("Маклінз" та ін.), мила ("Сейфгард" та ін.), шампунів, косметики, антисептичних розчинів і пластичних матеріалів, що застосовуються в медицині [8,11]. Він має також і неспецифічний тип дії — порушує мембрани клітин та впливає на синтез ліпідів. В США зареєстрований як пестицид.

Оксиетильовані алкілфеноли, в тому числі нонілфенол (рис.2.2.), широко застосовуються в промисловості, а також як миючі речовини для транспортних засобів. Нонілфенол виявляється в грунтових водах, грунті, водяних організмах. Нонілфенол є ефективною неіоногенною водорозчинною поверхнево-активною речовиною.

Рис. 2.2 Нонілфенол

Нонілфенол використовується у багатьох галузях промисловості, як у технічних, так і побутових цілях, входить до складу миючих засобів технічного і побутового призначення, служить активним піногасником. Цю популярну поверхнево-активну речовину застосовують для виробництва мастильних, гідравлічних, охолоджуючих та інших рідин для технологічних процесів, а також у складі автошампунів і рідини для склоомивача [8,12].

Нонілфенол широко розповсюджений у навколишньому середовищі і діє як речовина, що порушує роботу ендокринної системи. Занепокоєння з приводу широкого застосування нонілфенолу зростає через його токсичність для морських і прісноводних видів і його здатності призводити до фемінізації чоловічих особин. Крім того, нонілфенол стимулює ріст клітин раку молочної залози.

2.2. Характеристика природних гормонів естрогену та тестостерону

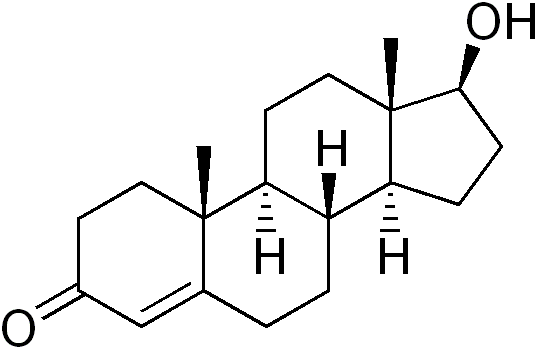
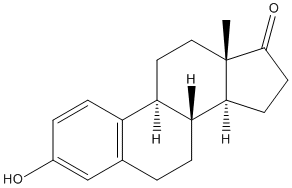
****Естроген відноситься до жіночих статевих гормонів (рис.2.3). За хімічною структурою відноситься до стероїдів. Естрогени проникають у ядра клітин, активують синтез ДНК і РНК, впливають на синтез білка.

Рис.2.3 Естроген

Тестостерон - основний чоловічий статевий гормон, [андроген](https://chemiday.com/uk/encyclopedia/3-1-0-39), відноситься до стероїдів (рис.2.4). Є продуктом периферичного метаболізму, відповідає за вірилізацію у хлопчиків і андрогенізацію у дівчаток. Тестостерон має виражені анаболічні властивості: збільшує м'язову масу, прискорює синтез білку, забезпечує сперматогенез і статеву поведінку, впливають на азотистий і фосфорний обмін [11].

Рис.2.4 Тестостерон

Тестостерон та естроген, виводяться з організмів людей і тварин з сечею, з недостатньо очищеними стічними водами потрапляють до водоймищ, де впливають на безхребетних, риб, амфібій та інших мешканців підводного світу, схожим чином, як і на ендокринну систему людини.

В наших дослідженнях ми використовували природні гормони естроген та тестостерон для порівняння їх впливу на прісноводних безхребетних *Daphnia magna*  з впливом біологічно активних ксенобіотиків гормональної дії триклозаном та нонілфенолом.

2.3. Дослідження токсикологічних і репродукційних показників *Daphnia magna*



Нами досліджувалися репродукційні показники гіллястовусих безхребетних *Daphnia magna* в лабораторних умовах аквакомплексу Інституту гідробіології НАН України при забрудненні води біологічноактивними речовинами гормональної дії. Дафнії - вид невеликих планктонних ракоподібних розмірами від 0,2 до 5 мм, розмір самок досягає 3 мм, самці в 1,5-2 рази менше, постійні мешканці стоячих і слабопроточних водойм. Члени роду є одними з найменших водяних ракоподібних, та входять до групи морських блох за притаманний їм характер руху. Вони мешкають у різноманітних середовищах від кислих боліт до прісноводних озер, ставків та річок. Особливістю цього роду ракоподібних є те, що в їхньому життєвому циклі чергуються покоління, які розмножуються статево і шляхом партеногенезу. За способом харчування дафнії -активні фільтратори, які живляться у воді планктоном і детритом. Дафнії використовуються для біотестування води.

Рис.2.5 *Daphnia magna*

Аклімацію дафній до лабораторних умов проводили з підтримкою кисневого та температурного режиму водного середовища близько 25±1ºС впродовж 7 діб. Тварин годували щоденно хлорелою, концентраціюмікроводоростейпідтримували в діапазоні 0,1–0,7 мг C/ (мг водоростевогоорганічноговуглеводу) [13].

Для оцінки токсичності біологічно активних сполук ксенобіотичного походження були проведені гострі і хронічні досліди на *Daphniamagna* (ДСТУ 4166-2003, КНД 211.1.4.054-97) [14]. Встановлювали основні показники – вітальну (LС0), абсолютно летальну (LС100) і медіанну (LС50) концентрації. Медіанну концентрацію розраховували методом екстраполяції.

Дослідження впливу біологічно активних речовин гормональної дії проводилися на відстоянійводопровіднійводі, рН 7,7; насичення киснем – 100%, при температурі 23 0С. Необхідніконцентрації препаратів одержували шляхом внесеннявідповіднихкількостей у середовище для культивування. На кожнуконцентраціюречовинидослідипроводилися в 3-х повторах. В кожному повторівикористано по 10 екземплярів рачків. Для дослідів використовувалисинхронізовану, генетичнооднорідну культуру *Daphnia magna*.

У хронічномудослідіоцінювалидіюбіологічноактивних сполук ксенобіотичногопоходження за їхвпливом на основніпараметрижиттєдіяльності тест-організмів, якіхарактеризуютьвсіжиттєвоважливіфункції тест-об’єкту – тривалістьжиття, тривалістьембріонального та постембріональногорозвиткурачків, кількістьвиметіввідоднієї самки за періоддосліджень, кількістьмолоді в одному виметі, якістьнащадків. Інтегральнимпоказником є продуктивність тест-об’єкту в ряду поколінь. За кожнимпоколіннямрачківпроводилисяспостереженняпротягом 10 діб. В деякихвипадках, в залежностівідконцентрації препарату, спостереженняпроводилисяпротягомвсьогожиттярачків. Оцінку статистичної достовірності отриманих результатів проводили загальноприйнятими методами [14].

2.4. Методика визначеннябіологічноактивнихксенобіотиків уводі

Визначення біологічно активних речовин у водіпроводили методом високоефективної рідинної хроматографії та мас-спектрометрії на приладі Agilent 1200 SL/DAD/FD/MSD 6130. Як стандарти використовували відповідні продукти фірм Sigma, як рухомі фази застосовували воду та органічні розчинники хроматографічної якості, колонку Discovery HS C18 5 мкм 250x46 мм, градієнт 90–0% вода з 0,1% мурашиної кислоти та суміш ацетонітрил : метанол 50 : 50 з 0,1% мурашиної кислоти. Детекцію проводили в режимі поодинокого моніторингу іонів (SIM), поляризація позитивна, величини m/z 363,2, 315,1 та 289,1 відповідно. Метод іонізації – електроспрей (ESI), об’єм ін’єкції у потік рухомої фази – 50 мм3.

Аналіз екзогенних біологічно активних виконували у фільтрованій природній воді і завислих речовинах, для чого зразки води фільтрували крізь целюлозний мембранний фільтр з діаметром пор 0,45 мкм. Методвизначеннябазувавсянарекомендаціях, наведенихуроботі EPA Method 1694: Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water, Soil, Sediment, and Biosolids by HPLC/MS/MS. Об’єм зразкуводистановив 0,25 дм3. Вимірювання проводилися в спеціалізованій лабораторії Інституту гідробіології НАН України.

1. ВПЛИВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК ГОРМОНАЛЬНОЇ ДІЇ НА ПРОЦЕСИ РЕПРОДУКЦІЇ У ГІЛЛЯСТОВУСИХ РАКОПОДІБНИХ
   1. Вмістбіологічноактивних ксенобіотиків у стічних і поверхневих водах

З метою визначення проблеми забруднення поверхневих вод екзогенними біологічно активними сполуками антропогенного походження, нами був проведений аналіз літературних даних [4, 15-19]. В нашій роботі до переліку цільових сполук були обрані фармацевтичні препарати, продукти персональної гігієни, антимікробні препарати та деякі інші біологічно активні сполуки, частота виявлення і концентрації яких у очищених стічних і поверхневих водах за літературними даними були найбільшими. В спеціалізованій лабораторії Інституту гідробіології НАН України були проведені вимірювання концентрацій біологічно активних ксенобіотиків у зразках стічних і поверхневих вод.

У таблиці 3.1 наведено дані аналізу вмісту цих сполук у водах, що надходять до станції очищення побутових вод на Бортницькій станції аерації (місто Київ) та повертаються до річки Дніпро через скидний канал після їх очистки. Біологічно активні речовини визначалися у профільтрованих пробах стічних вод та пробах води зі скидного каналу.

Отримані дані подібні до результатів, приведених у сучасній світовій літературі для станцій очистки стічних вод у Північній Америці ї Європі [4, 18,19]. Це свідчить про універсальність досліджуваної проблеми, оскільки технологія очистки комунальних стічних вод за допомогою аеротенків є досить подібною у всіх країнах.

Виявлені сезонні особливості надходження досліджуваних сполук до станції очистки виражаються у збільшенні їх концентрації у вхідних стічних водах у осінній період у порівнянні з весняним. Незважаючи на досить високий ступінь очистки води (в середньому 83,6±15,5% та 87,5±16,8% у осінній і весняний періоди відповідно), сезонна різниця між їх вмістом настільки велика, що концентрації деяких біологічно активних сполук антропогенного походження у зворотних водах восени співставні з вхідними концентраціями весняного періоду. При змішуванні поверхневих і недоочищених зворотних вод досліджувані біологічно активні сполуки перерозподіляються у водному середовищі у відповідності до своїх фізико-хімічних властивостей і властивостей середовища.

Таблиця 3.1

Вміст біологічно активних ксенобіотиків (мкг/дм3) до і після очищення стічних вод на Бортницькій станції аерації (м.Київ)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Речовина | Осінь | | Весна | |
| Вхід | Вихід | Вхід | Вихід |
| Еритроміцин | 0,072 | 0,012 | 0,066 | 0,01 |
| Кофеїн | 18,2 | 0,128 | 4,06 | 0,025 |
| Окситетрациклін | 0,13 | 0,03 | 0,07 | 0,07 |
| Сульфадиметоксин | 0,29 | 0,015 | 0,05 | 0,008 |
| Сульфадиметоксазол | 0,375 | 0,064 | 0,015 | 0,01 |
| Тестостерон | 0,131 | 0,012 | 0,018 | 0,02 |
| Тетрациклін | 0,114 | 0,016 | 0,02 | 0,02 |
| Триклозан | 3,05 | 0,6 | 0,39 | 0,05 |
| Нонілфенол | 2,88 | 0,154 | 1,04 | 0,206 |

Таким чином, виявлений вміст біологічно активних сполук ксенобіотичого походження у профільтрованих зразках зворотних вод станцій очищення стічних побутових вод коливається в діапазоні концентрацій від десятків нанограмів до десятків мікрограмів на один дм3 (10-8–10-5 г/дм3), при цьому їх концентрації у осінній період у середньому на порядок вищі, ніж навесні. Отриманий порядок величин концентрацій свідчить про можливість їх впливу на метаболічні і репродуктивні процеси у водянихбезхребетних і організмів-фільтраторів зокрема, що стало мотивом для наших досліджень.

З підвищенням ліпофільних властивостей цих сполук змінюється їх розподіл між водою і завислими органічними речовинами на користь нерозчинної форми. Порядок величин виявлених концентрацій свідчить про необхідність перевірки гіпотези про можливість їх впливу на репродуктивні процеси у водяних безхребетних і організмів-фільтраторів зокрема, а також використання останніх для біоіндикації забруднення водного середовища біологічно активними сполуками ксенобіотичого походження.

3.2 Вплив триклозану та нонілфенолу на процеси репродукціїгіллястовусихракоподібних

У водяних тварин (безхребетні, риби, вищі водні хребетні) найбільш чітко фіксованим токсичним ефектом є смерть піддослідних організмів [13,14]. За хронічного отруєння низькими концентраціями токсичних речовин виникають різного роду порушення життєдіяльності, які виражаються у зміні поведінкових реакцій, втраті здатності до рецепції зовнішніх подразнень, порушенні функціонування систем органів, обміну речовин, відхиленні від норми біохімічних показників, у першу чергу, зміні рівнів активності окремих ферментів або ферментативних систем загалом.

В проведених нами дослідах по біотестуванню встановлено величини LC5048 (медіанної летальної концентрації за 48 год експозиції) для триклозану та нонілфенолу, які становили 330 та 190 мкг/дм3 відповідно,що приблизно на порядок перевищували величини NOEC (недіяльних концентрацій в хронічних дослідах) – 30 та 12,5  мкг/дм3 відповідно, що є характерним проявом неспецифічної оксичної дії.

Результати визначення дії ксенобіотичних сполук нонілфенолу та триклозану в діапазоні концентрацій 3,0–30,0 мкг/дм3 на основні біологічні та репродуктивні параметри *Daphniamagna* представлені у табл. 3.2.

Як видно з наведених даних, при концентрації триклозану та нонілфенолу 0,3 мкг/дм3 питома кількість нащадків на одну самицю достовірно збільшувалася у порівнянні з контролем на 28,7% та 33,5% відповідно. Слід зазначити, що явище стимуляції плодючості *Daphnia magna* низькими концентраціями триклозану та нонілфенолу є характерним. Як відомо з наукової літератури, загальний розвиток інтоксикації у тваринних організмів зі зростанням токсичної дози проходить у три фази: 1) стимуляція процесів життєдіяльності, 2) депресія, 3) загибель. Тривалість і вираженість фаз видоспецифічна [1,7].

Таблиця 3.2

Середнізначенняосновнихбіологічних та репродуктивних параметрів*Daphniamagna*(% до контролю) в дослідах з триклозаном та нонілфенолом

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Концен-трація, мкг/дм3 | Показники | | | |
| Період дозрівання, год | Тривалість життя, діб | Кількість  виметів, шт | Питома кількість нащадків на одну самицю, екз |
| Контроль | 48±6 | 40±4 | 14±4 | 186±12 |
| Триклозан % до контролю | | | | |
| 0,3 | 94,2 | 110,5 | 124,8 | 128,7\* |
| 3,0 | 98,2 | 100,3 | 96,1 | 105,2 |
| 30,0 | 125,3 | 83,2 | 78,9 | 78,4\* |
| Нонілфенол % до контролю | | | | |
| 0,3 | 97,3 | 100,9 | 124,3 | 133,5\* |
| 3,0 | 115,6 | 88,1 | 81,9 | 82,3\* |
| 30,0 | 128,3 | 74,2 | 71,9 | 62,8\* |

Примітка: «\*» різниця середніх величин досліду і контролю статистично достовірна, *p*<0,05.

Відповідно до цього, ми спостерігали приконцентрації триклозану 30,0 мкг/дм3 зменшення кількості нащадків на 21,6% від контролю, а для такої ж концентрації нонілфенолу – на 37,2%. Таке зниження показника пов’язане з більш тривалим періодом дозрівання рачків та меншою кількістю молоді в одному виметі.

Дозрівання гонад при цих концентраціях відбувається овше. Аналогічні прояви негативного впливу спостерігались і при концентрації нонілфенолу 3,0 мкг/дм3– кількість нащадків була на 17,7% меншою від контролю. В усіх випадках не булозафіксованопроявівспецифічноїдії (появасамців, порушенняембріональногорозвиткутощо).

Важливим показником хронічного отруєння безхребетних є зниження плодючості у ряді поколінь, що визначається при проведенні тривалих спостережень. Втрата здатності до повноцінного відтворення є свідченням отруєння не тільки безхребетних, а також і для риб та водних ссавців. Різноманітність реагування тварин на дію токсичних реагентів зростає з ускладненням рівня їхньої біологічної організації. Найбільш чітке, специфічне і показове реагування, яке піддається реєстрації, властиве рибам та водним ссавцям, що пов’язано зі складною організацією їхніх сенсорних та регуляційних систем [2, 20]. .

Таким чином, у проведенних дослідах встановлено пригнічуючий вплив на процеси репродукції гіллястовусих безхребетних *Daphnia magna S*. при концентраціях досліджених біологічно активних речовин від 3,0 мкг/дм3 до 30,0 мкг/дм3.

3.3. Вплив тестостерону та естрону на репродуктивніхарактеистикидафнії

На відміну від біологічно активних ксенобіотичних сполук триклозану та нонілфенолу, природні гормони тестостерон та естрон не проявляли суттєвої негативної дії на плодючість *Daphnia magna* в межах досліджуваних концентрацій (табл. 3.3). Невелике зниження репродуктивних показників спостерігалося при концентраціях гормонів 30,0 мкг/дм3.

Таблиця 3.3

Середні значення основних біологічних параметрів *Daphnia magna* (% до контролю) в дослідах з тестостероном та естроном

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Концен-трація, мкг/дм3 | Показники | | | |
| Період дозрівання, год | Тривалість життя, діб | Кількість виметів, шт | Питома кількість нащадків на одну самицю, екз |
| Контроль | 74±6 | 40±4 | 14±4 | 186±12 |
| Тестостерон % до контролю | | | | |
| 0,3 | 98,3 | 97,9 | 104,2 | 108,4 |
| 3,0 | 96,4 | 103,4 | 98,6 | 110,3 |
| 30,0 | 102,2 | 96,4 | 94,7 | 98,7 |
| Естрон % до контролю | | | | |
| 0,3 | 99,6 | 101,5 | 102,4 | 106,3 |
| 3,0 | 96,7 | 95,3 | 98,3 | 105,4 |
| 30,0 | 108,7 | 92,8 | 95,4 | 96,7 |

Важливим є той факт, що дія тестостерону в досліджених концентраціях не призводила до появи самців серед партеногенетичних нащадків. Естрон у наших дослідах також не впливав на структуру потомства. Це свідчить, на нашу думку, про «нестероїдні» механізми регуляції статі і дозрівання гонад у партеногенетичних безхребетних.

Окрім того, показано, що за дії екзогенних естрону і тестостерону спостерігається дозо-залежне підвищення їх концентрації в організмі дафній за відсутності появи зв’язаної форми, що може свідчити про відсутність відповідної ферментативної активності [11 ].

Таким чином, використання гіллястовусих ракоподібних для індикації забруднення водних екосистем сполуками, що можуть викликати порушення ендокринної системи, має відповідні обмеження щодо екстраполяції на еволюційно більш високорозвинені організми.

Незважаючи на існування механізмів регуляції та підтримки стабільного гормонального фону у безхребетних, внаслідок імітування дії природних гормонів, біологічно активні ксенобіотики гормональної дії спричиняють розбалансування гормональної системи, що в свою чергу чинить значний негативний вплив як на перетікання фізіолого-біохімічних процесів у окремих особин, так і на природні популяції.

Таким чином, прісноводні безхребетні можуть бути чутливим індикатором наявності ксенобіотичних сполук, що спричиняють ендокринні порушення у водному середовищі.

Досліджені нами біологічно активні сполуки у концентраціях, які були виявлені в природних водоймах – приймальниках зворотних вод станцій очищення побутових стічних вод, статистично достовірної негативної дії на виживання і продуктивність *Daphnia magna* не чинили. Проте дослідження впливу триклозану та нонілфенолу у концентраціях, на два порядки менших від NOEC, виявили їх статистично вірогідний ефект, який проявлявся у прискоренні лінійного росту та статевого дозрівання молоді *D. magna* , а на порядок менших від NOEC і вищих виявлено статистично достовірне пригнічення репродукційних показників [21,22].

В науковій літературі є дані, що забруднення води нонілфенолом викликає зменшення тканинної концентрації тестостерону та естрадіолу у *Dreissena polymorpha* внаслідок порушення обміну холестерину [9]. Однак з’ясування механізмів впливу триклозану та нонілфенолу на репродукцію прісноводних безхребетних потребує подальших досліджень.

**ВИСНОВКИ**

1. Досліджено наявність у недоочищених стічних водах забруднювачів нового класу (emerging contaminants) – ксенобіотичнихорганічнихсполук, що можуть негативно впливати на водні екосистеми через порушення метаболізму і функціонування ендокринної системи гідробіонтів. Виявлений вміст біологічно активних сполук ксенобіотичого походженняу профільтрованих зразках зворотних вод станції очищення стічних побутових вод коливаються в діапазоні концентрацій від десятків нанограмів до десятків мікрограмів на один дм3 (10-8–10-5 г/дм3), при цьому їх концентрації у осінній період у середньому на порядок вищі, ніж навесні. Виявлені концентрації біологічно активних сполук ксенобіотичого походженняу зразкахводи поверхневих водойм,що приймають зворотні води, близькі до літературних даних, наведених для станцій очистки побутових стічних вод США та європейських країн, що також використовують технологію аеротенків.
2. В проведених дослідах по біотестуванню на *Daphnia magna* встановлено величини LC5048 (медіанної летальної концентрації за 48 год експозиції) для триклозану та нонілфенолу, які становили 330 та 190 мкг/дм3 відповідно.
3. Виявлено пригнічуючий вплив на процеси репродукції гіллястовусих безхребетних *Daphnia magna* нонілфенолу та триклозану в діапазоні концентрацій 3,0 мкг/дм3 \_30,0 мкг/дм3. Так, при концентрації триклозану 30,0 мкг/дм3 спостерігалося зменшення кількості нащадків на 21,6% від контролю, а для такої ж концентрації нонілфенолу – на 37,2%. Аналогічні прояви негативного впливу спостерігались і при концентрації нонілфенолу 3,0 мкг/дм3 – кількість нащадків була на 17,7% меншою від контролю. В усіх випадках не було зафіксованопроявів специфічної дії (поява самців, порушення ембріонального розвиткутощо).
4. На відміну від біологічно активних ксенобіотичних сполук триклозану та нонілфенолу, природні гормони тестостерон та естрон не проявляли суттєвої негативної дії на плодючість *Daphnia magna*  в межах досліджуваних концентрацій. Невелике зниження репродуктивних показників спостерігалося при концентраціях гормонів 30,0 мкг/дм3
5. Дія тестостерону в досліджених концентраціях не призводила до появи самців серед партеногенетичних нащадків. Естрон у наших дослідах також не впливав на структуру потомства. Це свідчить, на нашу думку, про «нестероїдні» механізми регуляції статі і дозрівання гонад у партеногенетичних безхребетних.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ**

1. Дудник С.В., Євтушенко М.Ю. Водна токсикологія: основні теоретичні положення та їхнє практичне застосування [Монографія] / С.В.Дудник, М.Ю.Євтушенко. – К.: Вид-во Українського фітосоціологічного центру, 2013. – 297 с.
2. Беспалова Л.Е. Водна токсикологія: навчальний посібник / Л.Е.Беспалова, В.В.Оліфіренко, А.В.Рачковський – Херсон: ВЦ «Колос», 2011. – 131 с.
3. Моисеенко Т.И. Водная экотоксикология: Теоретические и прикладные аспекты / Т.И.Моисеенко. – М.: Наука, 2009. – 400 с.
4. Occurrence of Contaminants of Emerging Concern in Wastewater From Nine Publicly Owned Treatment Works / EPA-821-R-09-009, 2009. – 85 P.;
5. Гандзюра В.П. Концепція шкодочинності в екології / В.П.Гандзюра, В.В.Грубінко – Київ-Тернопіль: Вид-во ТНПУ ім. В.Гнатюка, 2008. – 144 с.
6. Köhler, H.-R., Kloas, W. , Schirling, M., Lutz, I., Reye, A.L., Langen, J.-S., Triebskorn, R., Nagel, R., Schönfelder, G. Sex steroid receptor evolution and signalling in aquatic invertebrates // Ecotoxicology. - 2007, Vol. 16(1). - P. 131-143.
7. Куценко С.А. Основы токсикологии / С.А.Куценко – Санкт- Петербург, 2002. – 395 с.
8. Вергейчик Т.Х. Токсикологическая химия: учебник / Т.Х.Вергейчик – М.:МЕДпресс-информ, 2012. – 432 с.
9. Hines, G. A., Bryan, P. J., Wasson, K. M., McClintock, J. B., and Watts, S. A. Sex steroid metabolism in the antarcticpteropod *Clione antarctica* (Mollusca: Gastropoda) // Invertebrate Biology. - 1996, Vol. 115. - P 113-119.
10. Kudikina N.P. Effect of hormonal compounds on embryogenesis of the pond snail Lymnaea stagnalis // Ontogenez. - 2011, 42(3). - Р. 213-239.
11. Walker C.H., Hopkin S.P., Sibly R.M., Peakall D.B. Principles of Ecotoxicology/ - L.:Taylor and Francis, 2001. – 307 p.
12. Остроумов С.А. Биологические эффекты поверхностно-активных веществ в связи с антропогенными воздействиями на биосферу / С.А.Остроумов - М.: МАКС-Пресс, 2000. – 116 с.
13. Єфремова О. О. Біотестування. Сучасний стан практичного використання / О. О. Єфремова, І. П. Крайнов // Вісник Кременчуцького державного політехнічногоуніверситету. – 2006. – №6. – C. 27 – 30.
14. Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод/(О.М.Арсан, О.А.Давидов, Т.М.Дьяченко та ін.); за ред. В.Д.Романенка.- НАН України. Ін-т гідробіології. – К.: ЛОГОС, 2006. – 408 с.
15. Романенко В.Д. Основи гідроекології / В.Д.Романенко - К.: Обереги, 2001. – 726 с.
16. Екологічне оздоровлення Дніпра (досвід міжнародної співпраці) / В.Шевчук, О.Мазуркевич, В.Навроцький та ін. — К., 2001. — 267 с.
17. Остроумов С.А. Сохранение биоразнообразия и качество воды: роль обратных связей в экосистемах / С.А.Остроумов - М.: ДАН. 2002.- Т. 382. № 1. - С. 138-141.
18. Фомин Г.С. Вода. Контроль химической, бактериальной и радиационной безопасности по международным стандартам. Энциклопедический справочник / Г.С.Фомин – М., 2000. – 848 с.
19. Черных Н.А. Экологический мониторинг токсикантов в биосфере / Н.А.Черных, С.Н.Сидоренко – М.: Изд-во РУДН, 2003. – 430 с.
20. Plysiuk М. Influence of pollution by metabolic disruptors and anabolic steroids on water ecosystems. Актуальні проблеми соціально-гуманітарних і природничих наук в контексті сучасних глобальних викликів: матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених і здобувачів вищої освіти (м. Кам’янець-Подільський, 07–08 червня 2018 року). – Кам’янець-Подільський: ПДАТУ. – 2018. – 397 с. (C. 382-385).
21. Плисюк М. В., Тремасова П. С. Вплив біологічно активних ксенобіотиків на безхребетних гідробіонтів. Інноваційні технології: тези доп. наук.-техн. конф. студентів, аспірантів, докторантів та молодих учених / за заг. ред. Бабікової К. О., Мельничук Л. М. ; ІНТЛ НАУ (м. Київ, 20-21 листоп. 2019 р.). Київ, 2019. 349 с. (C. 75-79).
22. Т.Білик, М.Плисюк, П.Тремасова Небезпека забруднення річки дніпро біологічно активними ксенобіотиками. Техногенно-екологічна безпека України: стан та перспективи розвитку / ТЕБ-2019: тези доп. ІХ Всеукраїнської науковопрактичної Інтернет-конференції, Ірпінь, 04-15 листопада 2019 р. – Університет ДФС України. – Ірпінь, 2019. – 350 с. (C. 195-198).