

на правах рукописи



Агильон Гутиеррес Давид Рамиро

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АНТРОПОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НЕРЕСТОВЫХ
ВОДОЕМОВ НА ПОСТЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ ТРЕХ ВИДОВ
БЕСХВОСТЫХ АМФИБИЙ**

Специальности: 03.02.04 – зоология; 03.03.05 - биология развития, эмбриология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2012

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Мегалополисы как крайне урбанизированные системы формируют сложные комплексы различных факторов отрицательно влияющих как на биоценозы в целом, так и на популяции видов, составляющих эти биоценозы. В такие комплексы входят шумовые, световые, тепловые и, особенно, химические загрязнения. Разрастаясь, мегалополисы захватывают новые территории, подвергая воздействию всех этих факторов популяции животных и растений, оказавшихся в черте мегалополиса.

Химическое загрязнение мегалополисов включает бытовые отходы, отходы различных промышленных предприятий, нефтепродукты, а также химические реагенты, такие как антигололедные смеси и детергенты. Существует несколько методов оценки уровня химического загрязнения среды. Оценки методом определения предельно допустимых концентраций (ПДК) и методом биотестирования часто некорректны, так как в реальном урбоценозе, в отличие от эксперимента, на организм действуют не отдельные поллютанты, а сложная смесь органических и неорганических веществ. Метод биоиндикации, достаточно хорошо разработанный для водных экосистем, чувствителен к однородности сообществ и времени года, а также не позволяет оценить характер и специфичность загрязнения (Северцова, 2002). Частично эту проблему пытается решить экотоксикологическая диагностика, основывающаяся на комплексном мониторинге характера загрязнения водоемов (Lanza Espino и др. 2000; Моисеенко, 2009).

Таким образом, изучение характера повреждающего действия поллютантов в условиях, максимально приближенных к тем, в которых они воздействуют на живые организмы в урбоценозе, является крайне актуальным. Для того чтобы выяснить как действуют комплексы поллютантов, необходимо сначала разобраться в том, как действуют отдельные компоненты этих комплексов.

В качестве наиболее опасных загрязнителей среды часто рассматривают пестициды, инсектициды и тяжелые металлы. И если органические поллютанты со временем разлагаются, то сплавы металлов надолго остаются в очаге загрязнения. Отравление тяжелыми металлами может наблюдаться не только в непосредственном очаге, но и распространяться посредством пищевых цепей (Одум, 1986). В связи с этим интересным представляется исследовать влияние загрязнения среды тяжелыми металлами на онтогенез бесхвостых амфибий — пожалуй, самых «экологически активных» животных, способных существовать в условиях мегалополиса. Амфибии обладают сложным онтогенезом, каждая из стадий которого предъявляет специфические требования к среде, связаны как с наземными, так и с водными экосистемами, являются важными компонентами трофических цепей.

Таким образом, исследование влияния антропогенного загрязнения, а особенно загрязнения тяжелыми металлами, на онтогенез бесхвостых амфибий представляется актуальным. Также актуальным является разработка экспериментов, позволяющих проводить такие исследования в условиях, максимально приближенных к природным.

Цели и задачи исследования.

Данное исследование было предпринято с двумя целями:

1. Сравнительный анализ аномалий личиночного развития бесхвостых амфибий, обитающих в городских и загородных популяциях.
2. Изучение особенностей влияния антропогенного загрязнения нерестовых водоемов железом- и свинец-содержащими сплавами на постэмбриональное развитие некоторых видов бесхвостых амфибий.

Для достижения этих целей были поставлены следующие задачи:

1. Охарактеризовать спектр аномалий и сравнить частоту их встречаемости у личинок травяной лягушки (*Rana temporaria* L. 1758) и остромордой лягушки (*Rana arvalis* Nilsson 1852), развивающихся в водоемах г. Москвы и Подмосковья.

2. Выполнить гистологический анализ одной из наиболее типичных аномалий развития.
3. Разработать экспериментальную модель, имитирующую загрязнение нерестового водоема железом- и свинецсодержащими сплавами.
4. Методами морфометрии и статистического анализа охарактеризовать влияние загрязнения водоемов железом- и свинецсодержащими сплавами на развитие головастиков травяной и остромордой лягушек, а также серой жабы (*Bufo bufo* L. 1758),.
5. С помощью спектрохимического и гистохимического анализа исследовать локализацию накопления железа и свинца в организме личинок амфибий.

Научная новизна работы. В работе впервые проведена классификация аномалий, появляющихся в процессе постэмбрионального развития у головастиков травяной (*Rana temporaria* L.) и остромордой лягушек (*Rana arvalis* Nilss.) и серой жабы (*Bufo bufo* L.) в популяциях Москвы и Подмосковья, а также в экспериментальных условиях под действием тяжелых металлов (свинца и железа). Определены концентрации свинца и железа в разных тканях: тело (без внутренних органов), кишечник, печень, жабры и хвост у нормальных и аномальных головастиков. При помощи гистохимического анализа выявлено в каких структурах головастиков накапливаются ионы железа, определены преимущественные пути проникновения поллютантов в организм головастиков.

Теоретическое и практическое значение. Данные диссертации дополняют существующее представление о влиянии антропогенного загрязнения на развитие бесхвостых амфибий. Примененные нами подходы и методы могут быть использованы при изучении состояния городских и загородных популяций земноводных в естественных и экспериментальных условиях. Практическое значение работы связано с возможностью использования личинок бесхвостых амфибий в качестве модельных систем для изучения влияния поллютантов на процесс индивидуального развития позвоночных. Результаты могут служить для развития новых методов биоиндикации, биотестирования и экологического мониторинга. Материалы работы могут быть использованы при составлении лекционных курсов по экологии на естественнонаучных факультетах МГУ им. М.В. Ломоносова и других ВУЗах поддерживающих данное научное направление.

Апробация работы и публикации. Основные материалы диссертации были представлены на «69th Annual Meeting, Society for Developmental Biology and the Japanese Society for Developmental Biologists» (США, 2010), на «IX Congresso Latinoamericano de Herpetología, V Congresso Brasileiro de Herpetología» (Бразилия, 2011), на международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2012» (Москва, 2012). По материалам диссертации опубликовано 4 работы, одна из них – это глава в книге и три статьи в изданиях рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Цель и задачи работы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Работа изложена на 102 страницах, включая 22 рисунков и 5 таблиц. Список литературы содержит 91 наименование.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Полевые исследования. Исследования проводились в весенний период 2010 года. В качестве объекта были выбраны головастики следующих видов бесхвостых амфибий: травяной лягушки (*Rana temporaria* L. 1758) и остромордой лягушки (*Rana arvalis* Nilsson

1852) на стадиях развития с 39й стадии по 52ю, согласно таблицам Дабагян и Слепцовой (1975). Сбор полевого материала осуществлялся в черте г. Москвы, в районах Востряково и Бутово (Юго-Западный административный округ). На территории Звенигородской Биологической Станции им. С. Н. Скадовского (ЗБС) при МГУ им. М. В. Ломоносова, (50 километров к западу от Москвы) был собран материал из двух водоемов.

В каждый водоем в г. Москве и на территории ЗБС были помещены садки с икрой травяной и остромордой лягушек на стадии ранней бластулы. Садки, сделанные из мелкоячеистой сетки, использовали для свободного движения воды и ограничения расплывания головастиков. Были взяты пробы от шести кладок каждого вида. По достижении стадий 38-39, 42-43, 47-48 и 52, головастиков фиксировали в 7% растворе формальдегида. Кроме того, были добавлены данные по фиксации более ранних стадий развития травяной и остромордой лягушек (с 32 по 34), полученным Е.А. Северцовой из тех же водоемов в период с 2004 по 2007 гг. При разборе фиксированного материала выявляли личинок с явными аномалиями развития. Определяли частоту встречаемости отмеченных аномалий. Значимость различий в частотах определяли при помощи критерия χ^2 .

Гистологический анализ. Для наиболее типичной аномалии «деформация осевого комплекса» был проведен гистологический анализ по стандартной методике с окрашиванием по Маллори. Сагиттальные срезы были выполнены для 14 аномальных головастиков *R. arvalis* и 3х головастиков *R. temporaria* на 32-34 стадии развития. Кроме того, были получены срезы 6 контрольных головастиков (по 3 штуки каждого вида).

Экспериментальная часть исследований. Из водоемов, расположенных на территории Звенигородской биологической станции были собраны на стадии ранней бластулы по 5 кладок травяной лягушки, остромордой лягушки и серой жабы. Каждая кладка была разделена на три части и помещена в аквариумы с расчетной плотностью посадки для стадии головастика 1 особь на 0,6 литра воды (Сурова, 2001). Одна часть была помещена в аквариум, в который было добавлено по 30 г свинцовой охотничьей дроби. Вторая часть - в аквариум, куда было добавлено по 10 штук железных гвоздей. Третья часть каждой кладки развивалась в аквариуме, который использовался в качестве контроля. Во всех аквариумах использовалась вода из нативного водоема. Количество зародышей в каждой группе было приблизительно одинаково. С 39ой стадия развития головастиков кормили отваренной крапивой *ad libitum*. По достижении стадии почки задней конечности проводилась первая серия фиксаций. Вторая и третья серии фиксаций осуществлялись по прошествии пяти стадий развития, определяемых согласно таблицам нормального развития. Стадии развития серой жабы определяли по таблицам нормального развития Геснера (Gosner, 1960). При последующем разборе фиксированного материала выявляли видимые аномалии развития и определяли частоту их встречаемости.

Спектрохимический анализ. тканей головастиков для определения концентрации накопленных ионов железа и свинца проводился в Институте Проблем Технологии Микроэлектроники и Особо Чистых Материалов Российской Академии Наук (ИПТМ) РАН (г. Черноголовка, Московская область). На 39й стадии развития у головастиков травяной и остромордой лягушек, а у серой жабы на 26 стадии развития, удаляли кишечник и анализировали отдельно ткани тела головастика и ткани и содержимое кишечника. На 43 стадии развития травяной лягушки и на 34 стадии развития серой жабы помимо отдельного анализа тканей тела и тканей кишечника, в ряде случаев был проведен анализ тканей печени и жабр.

Гистохимический анализ. Для гистохимического анализа использовались головастики травяной лягушки и серой жабы из экспериментальных и контрольных групп. Головастики, фиксированные 7% раствором формальдегида на 43 стадии развития,

препарировались под бинокляром. В анализ были включены: печень, жабры, кишечник и вторичные почки головастиков. Извлеченные органы промывали в дистиллированной воде в течение ночи и обезвоживали в растворе ISOPREP – среде для гистологической обработки на основе изопропанола (BioVitrum), проводя до 5 последовательных смен по часу каждая. После чего образцы помещали в среду HISTOMIX EXTRA (BioVitrum) на 4 часа, делая одну смену среды. После проводки материал заливали в HISTOMIX и получали срезы толщиной 4-5 микрон при помощи микротомы ротационного типа Leica RM2245. Полученные срезы депарафинировали, регидратировали и окрашивали по Перслу (Меркулов, 1969) с целью выявления трехвалентного железа в тканевых образцах. Соединения трехвалентного железа окрашивается в синий цвет. Препараты заключали в монтирующую среду HISTOMOUNT (BioVitrum) и анализировали с помощью микроскопа Axio Scope A1 (Carl Zeiss).

Морфометрический анализ. Морфометрический анализ головастиков травяной лягушки проводили на 39 и 43 стадии развития, а остромордой - только на 39 стадии. Морфометрию серой жабы осуществляли на 26 и 34 стадиях. Анализ был выполнен с использованием бинокляра Carl Zeiss и программы AxioVision. Измеряли признаки, представленные на рисунке 1. Полученные данные обрабатывали при помощи программ Excel и STATISTIKA 6.0. Значимость различий средних значений признаков оценивали при помощи t-критерия Стьюдента. Рассчитывали коэффициенты корреляции Спирмена и на их основе рассчитывались значения коэффициента детерминации.

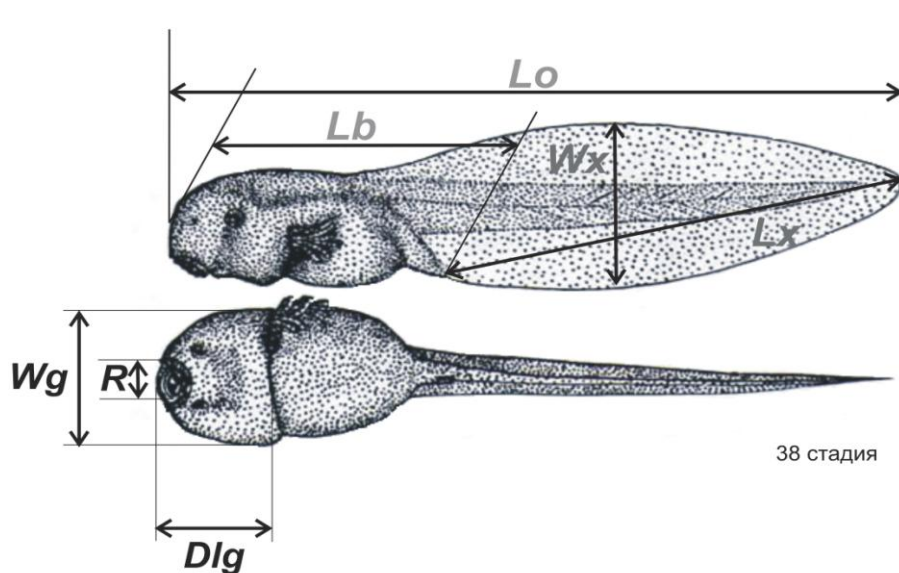


Рисунок 1. Морфометрические признаки на примере 38 стадии развития травяной лягушки. Аналогичные признаки измерялись для остромордой лягушки и серой жабы. Lb - длина туловища: от кончика морды до анального отверстия; Lx - длина хвостовой пластины: от анального отверстия до кончика хвостовой пластины; Wx - максимальная ширина хвостовой пластины; Wg - ширина головы: расстояние, измеренное по линии жаберных щелей; Dlg - длина головы: расстояние от линии жаберных щелей до наиболее выступающей точки морды; R - ширина ротового отверстия: расстояние между уголками ротового отверстия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования частоты встречаемости и характера аномалий головастиков трех видов бесхвостых амфибий.

Аномалии головастиков из водоемов города Москвы и из Подмосковья. Типы аномалий и частота встречаемости.

Под аномалиями развития мы понимали любые морфологические отклонения, отличающие данную особь от описанной в таблицах нормального развития на соответствующей стадии. В результате анализа полевого материала были выделено несколько типов аномалий (рис. 2): «Деформации осевого комплекса» - туловище изогнуто дорсально или вентрально по продольной оси тела, при таком изгибе расстояние от кончика морды до кончика хвостовой пластины меньше, чем общая длина туловища; «Водянки» - водянистые «опухоли», встречающиеся только на хвостовой пластине просмотренных головастика; «Темпы развития» - головастики 27 и более ранних стадий (сбор материала проводился в то время, когда основная масса головастика достигала 32 и старше стадий развития); «Нарушения покровов» - повреждения покровов, не являющиеся следствиями фиксации или неаккуратного обращения с материалом; «Аномалии жабр» - асимметричное развитие жаберных лепестков, недоразвитие или полное отсутствие жабр; «Тотальные уродства» - наличие более двух из вышеперечисленных аномалий у одного зародыша или крайне деформированный зародыш.

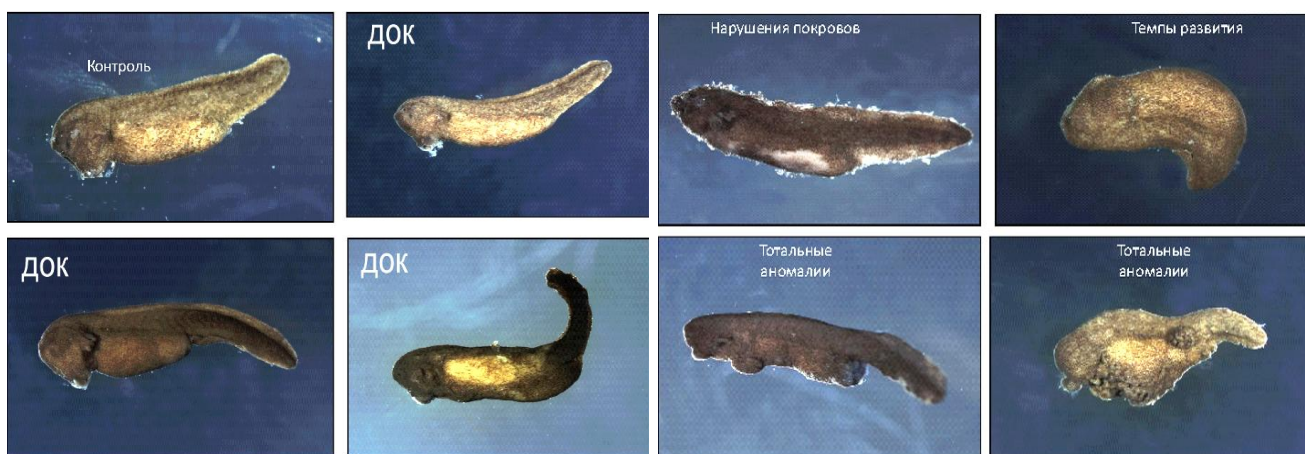


Рисунок 2. А - Некоторые типы аномалий, выявленные у травяной лягушки на 32 стадии развития. Док — деформация осевого комплекса.

Кроме того, при анализе материала были обнаружены случаи разнообразных попарных сочетаний вышеперечисленных аномалий у одного зародыша. Частота встречаемости аномалий развития у травяной и остромордой лягушек на 32-34 стадиях развития в городе и за его пределами не высока и составляет около 3,8-5,83%. На 39 же стадии доля аномалий еще ниже: от 0,9 до 2,8%. Вне зависимости от стадии и анализируемого вида доля аномалий была ниже в подмосковных пробах, по сравнению с московскими. Среди аномалий наибольшую долю на 32-34 стадиях развития составляет «деформации осевого комплекса». У травяной лягушки относительная доля таких аномалий около 50%. У остромордой лягушки, напротив, доля личинок с деформацией осевого скелета ниже, а на первый план выступают аномалии связанные с замедлением развития и нарушениями покровов. На 39 стадии развития травяной лягушки деформации осевого комплекса - по-прежнему наиболее часто встречающаяся аномалия. Среди личинок остромордой лягушки доля отстающих в развитии сокращается и возрастает число личинок с деформацией осевого скелета. Стоит отметить, что разнообразие встречаемых аномалий по мере развития сокращается: если на стадии 32-34 было отмечено около 14 типов аномалий, то на 39й стадии – только восемь. Гистологический анализ аномальных головастика. Наиболее типичной аномалией развития личинок, отмеченной как для городских популяций, так и для загородных и травяной и остромордой лягушек было «деформация осевого комплекса» (рис. 2). Внешне эта аномалия выражается в изгибе хвостовой пластины вниз или вверх в сагиттальной плоскости. Однако возможные внутренние причины приводящие к этой аномалии не изучены. Среди возможных причин могут быть нарушения сомитогенеза,

приводящие к искривлению позвоночника, смещение сомитов относительно друг друга или иные причины, для выяснения которых был проведен гистологический анализ. Анализ сагиттальных срезов личинок на 32 стадии развития в области сомитов показал редукцию сомитной ткани (рис. 3). Такие нарушения могут быть последствиями либо нарушением поворота сомитов, либо результатом нарушения межклеточных контактов. У бесхвостых амфибий подобные аномалии могут быть связаны с нарушениями гастрюляции и механизма удлинения задней части эмбриона на стадии нейрулы (Youn et al., 1980). По-видимому, эти дефекты можно рассматривать как показатели нарушения общей устойчивости развития, поскольку факторы, вызывающие их чрезвычайно разнообразны. Например, тепловой шок и ультрафиолетовое облучение влияют на формирование хорды и сомитов и вызывают уродства, аналогичные тем, что были встречены нами среди личинок (Elsdale et al., 1976; Cooke, Elsdale 1980; Woo Youn, Malacinski, 1981).

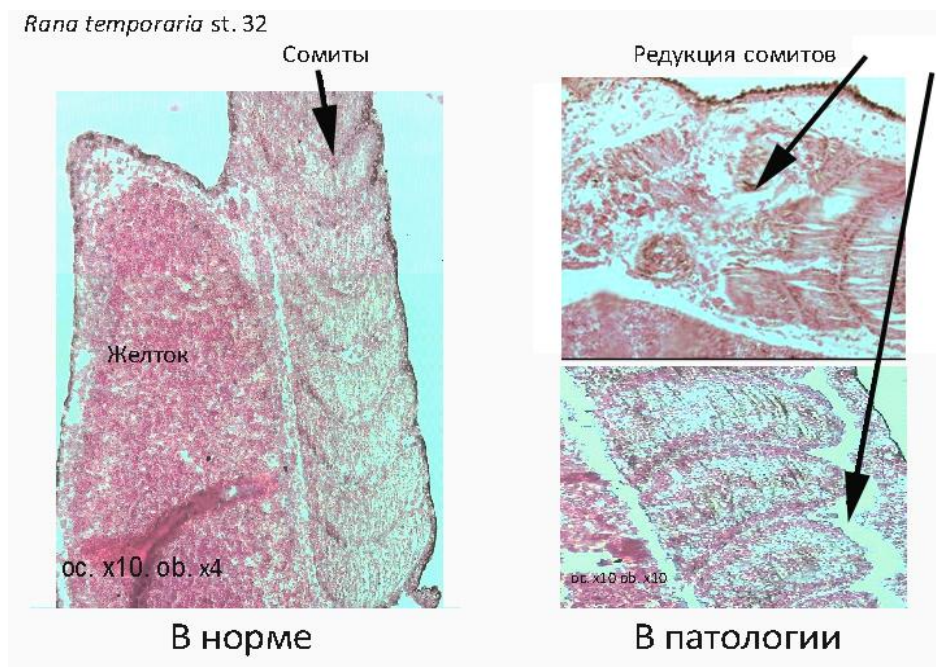


Рисунок 3. Формирование сомитов в норме и при деформации осевого комплекса у травяной лягушки на 32 стадии развития.

Повышение частоты встречаемости аномалий развития у головастика в водоемах г. Москвы по сравнению с головастиками из подмосковного водоема означает увеличение тератогенеза по мере загрязнения нерестилищ. Разнообразие резких отклонений от нормального развития указывает на индивидуальные различия головастика, подвергнувшегося действию поллютантов. Вместе с тем, ограниченный спектр морфологических уродств, свидетельствует о дифференциальной чувствительности органов и их систем к действию поллютантов. По-видимому, многие аномалии возникают, как следствие действия поллютантов на морфогенетические процессы, обусловленные ростом головастика и подготовкой к метаморфозу. Результаты анализа гистологической картины одной из наиболее часто встречаемых аномалий – деформацией осевого скелета, косвенно подтверждают высказанное предположение. Особое место занимает резкое торможение развития без морфологических уродств. Можно предположить, что у таких особей не хватает энергетических возможностей для обеспечения нормальных темпов развития. Сокращение частоты уродств по мере развития указывает на гибель головастика с резким отклонением развития, т.е. на стабилизирующий отбор, выраженный в сохранении нормы даже в условиях резко отличающихся от нормальных.

Исследование влияния имитации загрязнения водоемов железо- и свинец-содержащими сплавами на головастиков трех видов бесхвостых амфибий.

Эксперимент по исследованию влияния имитации загрязнения водоема железо- и свинец-содержащими сплавами проводился в лабораторных условиях для выравнивания основных показателей, влияющих на развитие головастиков бесхвостых амфибий. Различия между сериями эксперимента состояли только в характере загрязнения аквариумной воды: в серии «контроль» головастики развивались в воде из нативного водоема, в серии «железо» - в воде из нативного водоема с добавлением ржавых гвоздей и в серии «свинец» - в воде из нативного водоема с добавлением свинцовой охотничьей дробы. Всего в анализ было включено 8245 головастиков на двух стадиях развития – 39й и 43й для травяной и остромордой лягушек, и 26й и 32-34й для серой жабы.

Проведение эксперимента по имитации загрязнения водоема тяжелыми металлами показало, что наличие металлических соединений в воде практически не меняет концентрацию ионов этих металлов в водной среде. Вода для проведенного эксперимента бралась из нативного водоема, чтобы минимизировать негативные последствия для развивающейся икры и имела рН значения, близкие к 7. В воде водоема содержание ионов железа составляло 320 мг/л, а свинца – 0,2 мг/л. В этих условиях проходило развитие контрольной группы. В аквариумах, куда добавляли ржавые гвозди для имитации загрязнения железом и свинцовую дробь, для имитации загрязнения свинцом, концентрация этих элементов была минимально выше – 340 мг/л железа и 0,3 мг/л свинца. Такое незначительное увеличение концентраций по окончании эксперимента, позволяет судить о фактическом отсутствии растворения этих элементов. Таким образом, добавление железо- и свинец-содержащих сплавов в экспериментальные аквариумы не меняло общих условий развития, по сравнению с контрольной группой. Оно увеличивало только доступность этих поллютантов для головастиков. В естественных водоемах головастики обычно поедают обрастания и эпидермис макрофитов и детрит со дна водоемов. Поэтому, говорить об отсутствии влияния железа и свинца на развитие головастиков ни в коей мере нельзя. Это подтверждается и нашими данными. Уже на 39й стадии развития (для жабы – на 26 стадии) головастики имели явные признаки присутствия в кишечнике соединений железа и свинца. У головастиков из серии «железо» через покровные ткани просвечивало ярко-рыжее содержимое кишечника, заполненного частичками ржавчины. У головастиков серии «свинец» через покровные ткани были видны частички свинца серебристого цвета. Контрольные головастики имели естественный цвет кишечных масс.

Частота встречаемости аномалий развития в эксперименте по имитации загрязнения водоема сплавами железа и свинца. Прежде всего, развитие в условиях имитации загрязнения металлами сказалось на увеличении доли аномальных и погибших головастиков (рис. 4). У травяной и остромордой лягушек в контрольной серии доля таких головастиков была мала – около 1%. В условиях же имитации загрязнения железом – она выросла до значений 6,3 – 6,4%, а в условиях загрязнения свинцом – от 5,2% для остромордой лягушки до 6,6% для травяной. У серой жабы уже в контроле смертность была несколько выше – около 2,9%, что объясняется чувствительностью икры жабы к каким бы то ни было манипуляциям. И в эксперименте доля аномальных головастиков превышала таковую для бурых лягушек. Развитие в аквариуме с железосодержащим сплавом привело к 8,1% доле аномалий, а с свинецсодержащим – к 6,3% доле аномалий. Анализ характера аномалий показал, что наиболее типичной является замедление темпов развития отдельных головастиков (от 10 до 84% от общего числа аномалий). Особенно велико число головастиков, отстающих в развитии, было в серии «свинец». Аномалии хвостовой пластины и деформацией осевого скелета также являются типичными. Однако не во всех группах их возникновение можно объяснить загрязнением воды аквариумов сплавами металлов. У серой жабы эти аномалии наиболее многочисленны, а вот у остромордой лягушки, наоборот, их доля не высока. Аномалия «нарушение покровов» была более характерна для головастиков,

развивавшихся в железо-содержащих аквариумах.

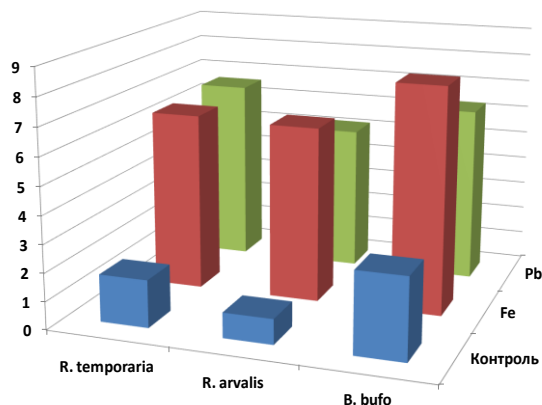


Рисунок 4. Частота встречаемости и типы аномалий в эксперименте.

Не представляется возможным выявить специфичность аномалий. Можно только отметить, что загрязнение свинцом чаще приводит к замедлению развития. Это выражается в присутствии в пробах головастиков, отставших на 2 и более стадии развития от основной массой развивающихся особей. Эти данные вполне соотносятся с результатами других исследований. В частности известно, что накопление в тканях развивающегося головастика ионов свинца затрагивает развитие скелета, что нередко приводит к серьезным аномалиям у метаморфизирующих головастиков (Sparling et al., 2006). Загрязнение железом часто приводит к формированию головастиков с аномалиями покровов.

Морфометрический анализ. Статистический анализ данных морфометрии выявил значимые различия размеров головастиков в опытных и контрольной группах у всех трех видов амфибий ($p \leq 0,05$) (рис. 5). Общая длина тела (признак Lo), а также другие признаки, характеризующие линейные размеры головастиков (длина туловища Lb , длина хвостовой пластины Lx , ширина хвостовой пластины Wx), имели минимальные значения у головастиков из группы «свинец» во всех повторностях эксперимента и у всех видов амфибий. Исключение составляли головастики группы «свинец» травяной лягушки на 39 стадии развития. Возможно, это исключение объясняется погрешностями в проведении этой повторности эксперимента. Таким образом, присутствие в аквариуме свинца было связано с торможением роста головастиков.

Каких-либо закономерностей влияния загрязнения воды сплавами металлов на пропорциональность ростовых процессов у головастиков выявить не удалось. Так, к 39й стадии развития относительный размер тела (Lb/Lo) головастиков травяной лягушки контроля и группы «свинец» оказываются близкими ($p \geq 0,05$). У остромордой лягушки различия значимы между всеми парами групп, а у серой жабы – между группами «железо» и контроль. Относительная длина хвостовой пластины (Lx/Lo) у травяной лягушки из групп «контроль» и «железо» одинакова как на 39й, так и на 43й стадиях ($p \geq 0,05$). У *Bufo bufo* развитие в воде с имитацией свинцового загрязнения не сказалось на формировании относительной длины хвостовой пластины по сравнению с контрольной группой ($p \geq 0,05$), тогда как развитие в железосодержащем аквариуме приводило к значимому уменьшению относительной длины хвостовой пластины по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$).

Структуры переднего отдела тела у головастиков травяной лягушки в разных условиях развития различались значимо: длина головы (Dlg) и ее ширина (Wg), и ширина ротовой

воронки (R) у головастика из контрольной группы и на 39й и на 43 стадиях развития больше, чем у головастика из группы «железо» ($p \leq 0.05$). У серой жабы развитие в группе «свинец» приводило к общему уменьшению размеров головы по сравнению с головастиками из контрольной группы. А вот развитие в группе «железо», напротив, было связано с увеличением размеров головы к 43й стадии до значений, превосходящих таковые в контроле ($p \leq 0.05$).

Условия развития практически не сказываются на пропорциональности признаков головных структур травяной и остромордой лягушек (анализировались признаки относительная длина головы Dlg/Lo , относительные размеры ротовой присоски R/Wg и пропорциональность развития головы Dlg/Wg). Влияние условий развития на пропорциональность головных структур головастика серой жабы оказывается более заметным. Не меняющаяся в ходе развития контрольной группы относительная длина головы (Dlg/Lo) у головастика, развивавшихся в условиях имитации загрязнения металлами к 43й стадии развития снижается со значимо высокого уровня до уровня, характерного для контрольной группы. Пропорциональность развития головы (Dlg/Wg) и относительные размеры ротовой присоски (R/Wg) у головастика групп «контроль» и «свинец» были близки на всем протяжении эксперимента. Развитие же в группе «железо» приводило к увеличению признака Dlg/Wg и уменьшению R/Wg ($p \leq 0.05$).

Более ожидаемо было бы влияние имитации загрязнения воды сплавами металлов на изменчивость постэмбрионального развития головастика. Тем не менее, у травяной лягушки на 39й стадии развития наибольшие значения коэффициентов вариации наблюдаются у головастика из контрольной группы, тогда как головастики, развивавшиеся в группе «свинец» имели наименьшее значение Cv практически по всем признакам. К 43й стадии развития картина меняется с точностью до наоборот: наиболее вариабельно развитие в аквариумах с загрязнением металлами. У остромордой лягушки к 39 стадии наиболее вариабельно развитие в группе «железо». У серой жабы и на 39й стадии и на 43й наибольший уровень изменчивости наблюдался у головастика развивавшихся в группе «свинец», а наименьший – в группе «железо».

Вероятно, взаимодействие развивающихся структур зародыша является регуляторным механизмом, который обеспечивает целостность развития, сохраняя пропорциональность развивающихся частей тела головастика (Северцова, 2007). Наиболее наглядно эту закономерность позволяет продемонстрировать анализ зависимости общего коэффициента вариации, рассматриваемого как показатель вариабельности развития зародышей, при том или ином типе загрязнения на определенной стадии развития, от коэффициента детерминации, показателя общей коррелированности признаков развивающегося организма. Например, в контрольной группе травяной лягушки и на 39й, и на 43й стадиях развития при незначительном увеличении изменчивости коррелированность также незначительно возрастает (рис. 5).

Однако в условиях имитации загрязнения на 39й стадии в группе «свинец» существенное увеличение вариабельности ведет к увеличению коррелированности развития, а в группе «железо» наоборот, по мере возрастания изменчивости коррелированность падает. К 43й стадии эта закономерность нивелируется и только в группе «железо» сохраняется прямая зависимость: чем выше изменчивость – тем выше коррелированность.

Таким образом, для всех исследованных видов амфибий развитие в условиях имитации загрязнения водоемов металлами не оказывает существенного влияния ни на пропорциональность, ни на коррелированность, ни на вариабельность развития. Влияние на общие размеры головастика, напротив, оказывается значимым. При этом воздействие имитации загрязнения свинцом замедляет развитие: головастики всех исследованных видов характеризуются меньшими размерами. Развитие в условиях загрязнения железом приводит к формированию крупных головастика серой жабы, тогда как у травяной лягушки, так же как и свинец, железо замедляет ростовые процессы, что приводит к формированию не крупных особей. Однозначной зависимости для остромордой лягушки выявить не удалось, поскольку

не было проанализировано достаточного количества стадий развития. Наблюдаемые межвидовые различия стоит рассматривать вне связи с характером загрязнения. Скорее всего, причиной их возникновения являются видовые различия и различия в условиях проведения эксперимента.

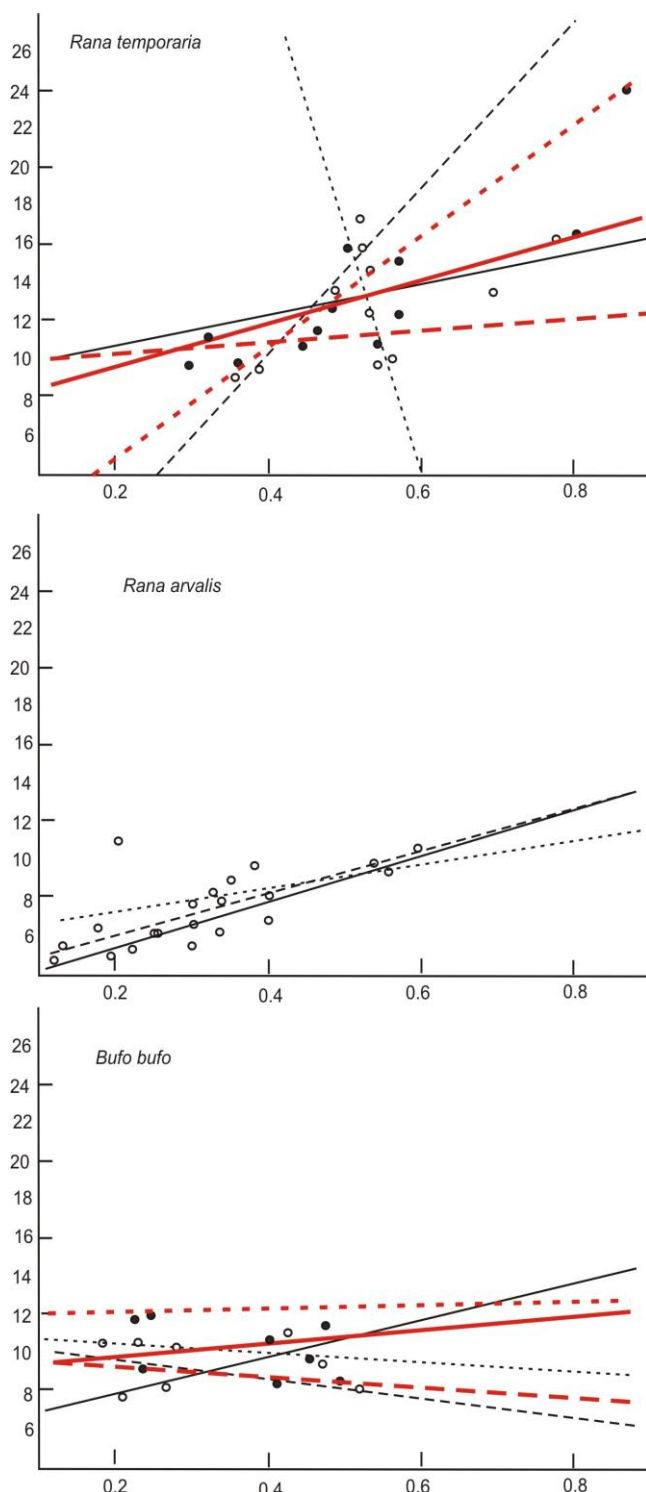


Рисунок 5. Зависимости изменения общего коэффициента вариации (ось Y), рассматриваемого как показатель вариабельности развития зародышей при том или ином типе загрязнения на определенной стадии развития, от коэффициента детерминации (ось X), показателя общей коррелированности признаков развивающегося организма. Сплошная линия — контроль, длинный пунктир — группа «железо», короткий пунктир — группа «свинец». Черным цветом показана 39-я стадия развития, красным — 43-я.

Наши результаты по воздействию железа и свинца на размерные характеристики головастика подтверждаются некоторыми исследованиями, проведенными с использованием растворов солей этих металлов. Головастики, развивающиеся под воздействием оксида железа II (в виде нанопорошка) и сульфата железа имели большие размеры, чем в контроле, хотя темпы развития головастика не менялись (Пескова 2003; Шиян, 2011). При воздействии ионов свинца показан результат аналогичный нашему: снижение веса и отставание в развитии у головастика *X. laevis* (Berzins, Bundy, 2002), *Rana catesbeiana* (Rice, 1998) и *Bufo fowleri* (Barrett et al., 2010).

Спектрохимический анализ тканей головастика. Формирование проб для проведения спектрохимического анализа методически не позволяло проанализировать каждого головастика в отдельности. Поэтому в каждую пробу отбиралось по 7-12 головастика из одной повторности для каждой серии эксперимента. Поскольку эти данные статистически нерепрезентативны, было выполнено качественное сравнение полученных результатов.

Прежде всего, следует отметить, что количество и железа и свинца у головастика, содержащихся в воде нативного водоема в целом меньше, чем у головастика развивавшихся в экспериментальных аквариумах. Так, двукратные различия в уровне содержания ионов железа в тканях тела головастика травяной лягушки контроля и эксперимента наблюдаются на 39й стадии. У остромордой лягушки и у серой жабы аналогичные различия выражены еще сильнее: разница между содержанием железа в эксперименте и контроле составляет около 6 и 8 раз, соответственно.

В тоже время, анализ других тканей головастика показал неравномерное накопление анализируемых элементов в разных отделах организма. И железо, и свинец наиболее интенсивно накапливаются в кишечнике. При этом, концентрация и железа и свинца в кишечнике, может превышать таковую в теле головастика от 5,6 раз для 39й стадии остромордой лягушки до 19,37 раз для 34 стадии развития головастика серой жабы. Не менее существенны накопления ионов и железа и свинца в тканях печени, анализ которой проведен только для 43 стадии у травяной лягушки и 34 стадии серой жабы. Пробы «тело» и «хвост» содержат меньшие концентрации этих элементов во всех сериях и на обеих анализируемых стадиях. Этот факт является интересным, поскольку в этих пробах повышение концентрации исследуемых элементов возможно только либо при его поступлении через пищеварительный тракт с последующим разносом кровью, либо через жабры, являющиеся, как и кожа, основным диффузионным органом головастика. Тем не менее, анализ тканей жабр и для головастика бурых лягушек на 43 стадии развития и для жабы на 32-34 стадии показал еще меньшее содержание этих элементов.

Сравнение 39 и 43 стадий развития травяной лягушки, и 26 и 32-34 стадий, соответственно, для серой жабы, продемонстрировало накопление исследуемых металлов по мере онтогенеза. Это может свидетельствовать об отсутствии или не совершенстве механизмов выведения их из организма, а может быть следствием недостаточно репрезентативной выборки. В отличие от жабы, у травяной лягушки наблюдается не столь интенсивное накопление металлов по мере онтогенеза. Напротив, в ряде случаев концентрация железа в «теле» и в кишечнике снизилась на более поздней стадии развития. Понижение концентрации железа позволяет предположить наличие некоего механизма выведения из организма избытка этого элемента. Ограниченное количество анализов, выполненных для остромордой лягушки, позволяет только отметить, что и у этого вида к 39й стадии развития накопление и железа и свинца происходит преимущественно в кишечнике.

Кроме спектрохимического анализа, проведенного на головастиках, не имевших видимых уродств, анализ накопления ионов железа и свинца проводились и для головастика, для которых были отмечены явные аномалии развития (табл. 1). Для проб были

отобраны головастики травяной лягушки и серой жабы на 43 и 34 стадиях, соответственно, а для остромордой лягушки – только на 39 стадии. Спектрохимический анализ тканей тела таких головастиков (при удаленном кишечнике) показал, что концентрация и железа и свинца очень высока. В ряде случаев она превышала даже концентрацию этих элементов в тканях тела нормальных головастиков, развивавшихся в условиях имитации загрязнения водоема. Можно предположить, что одной из причин формирования аномалий в экспериментальных группах было именно крайне высокое содержание в их тканях ионов этих металлов. Тем не менее, это предположение требует дальнейших исследований.

	<i>Rana temporaria</i>	<i>Rana arvalis</i>	<i>Bufo bufo</i>
Fe (Контроль) мкг/г	4208	883	
Fe (Эксперимент) мкг/г	19232	25775	
Pb (Контроль) мкг/г	14,4	15	10
Pb (Эксперимент) мкг/г	68,3	7155,4	414,2

Таблица 1. Результаты спектрохимического анализа на содержание железа и свинца в тканях тела аномальных головастиков (39 стадия развития), развивавшихся в условиях имитации загрязнения железом или свинцом в сравнении с контролем.

Приведенные результаты свидетельствуют о преимущественно пероральном поступлении металлов в организм головастиков. Это подтверждается и исследования других авторов (Миссюра, Марченковская, 2002), показавшими высокие концентрации некоторых металлов в разных отделах пищеварительного тракта озерной лягушки и зеленой жабы. Теоретически, некоторое количество ионов металлов может попадать в организм вместе с водой, которую головастики постоянно фильтруют, отсеживая пищевые частички и пропуская воду через жабры. Тем не менее, концентрация металлов в тканях жабр настолько невелика, что рассматривать этот путь проникновения ионов в организм не целесообразно. Головастики являются эврифагами. В естественных условиях они часто питаются детритом и донными отложениями (Северцов, 2008), а основное депо металлов в водоемах – донные осадки.

При экстраполяции результатов данного эксперимента на природные сообщества надо учитывать, что распространение металлов, депонированных в теле головастиков, по пищевой цепи ограничено. Основные хищники, уничтожающие головастиков – это личинки *Ditistidae* и *Aeshnidae*, которые метаморфизируют и, следовательно, выносят какую-то часть металлов из водоемов. Выносят свою часть и метаморфизировавшие головастики. Можно считать, что головастики не окончательное депо металлических поллютантов в антропогенных биоценозах.

Гистохимический анализ. Целью проведения гистохимического анализа была идентификация мест локализации ионов железа и свинца в тканях головастиков. К сожалению, подобрать эффективную методику гистохимического анализа на ионы свинца нам не удалось. Поэтому анализ был выполнен только для ионов железа. О правильности выбора нами методики для идентификации мест накопления экзогенного железа свидетельствует положительная реакция красителя с содержимым кишечника. Следовательно, качественная реакция в других тканях организма будет демонстрировать наличие ионов железа, попавших в организм головастиков в результате контакта с загрязнителем – ржавыми гвоздями.

Четкая качественная реакция на трехвалентное железо выявлена в клетках печени. Полученный результат согласуется с данными спектрохимического анализу тканей печени и является биологически значимым, поскольку печень функционально связана с метаболизмом железа и является органом его естественного депонирования. Депозиты железа в печени головастика выявляются в ассоциации с клетками, содержащими пигмент черного-бурого цвета. Это позволяет рассматривать наиболее вероятным кандидатом на роль аккумулирующих трехвалентное железо клеток меланин-содержащие макрофаги или купферовы клетки печени (рис. 6). Данные клетки крупнее обычных гепатоцитов. В печени они функционируют как макрофаги и способны к аккумуляции железа в составе гемоседерина и ферритина. Депозиты железа зачастую образуют скопления.

В стенке кишечника положительная реакция на железо выявляется в области апикальной, обращенной к содержимому кишечника, поверхности энтероцитов (рис. 6). Положительное окрашивание демонстрируют отдельные участки тонкого кишечника. Интенсивность окрашивания может быть различной. В ряде случаев можно различить непрерывные линии включений железа в стенке кишечника. Наличие визуально различимых полос окрашивания, свидетельствует об интенсивном всасывании железа стенкой кишечника. Помимо выявленных сплошных полос, положительную реакцию на железо могут иметь отдельные клетки. В этом случае клетка окрашивается целиком и содержит гранулы темного пигмента. Вероятно, эти клетки являются макрофагами присутствующими в норме в стенке кишечника.

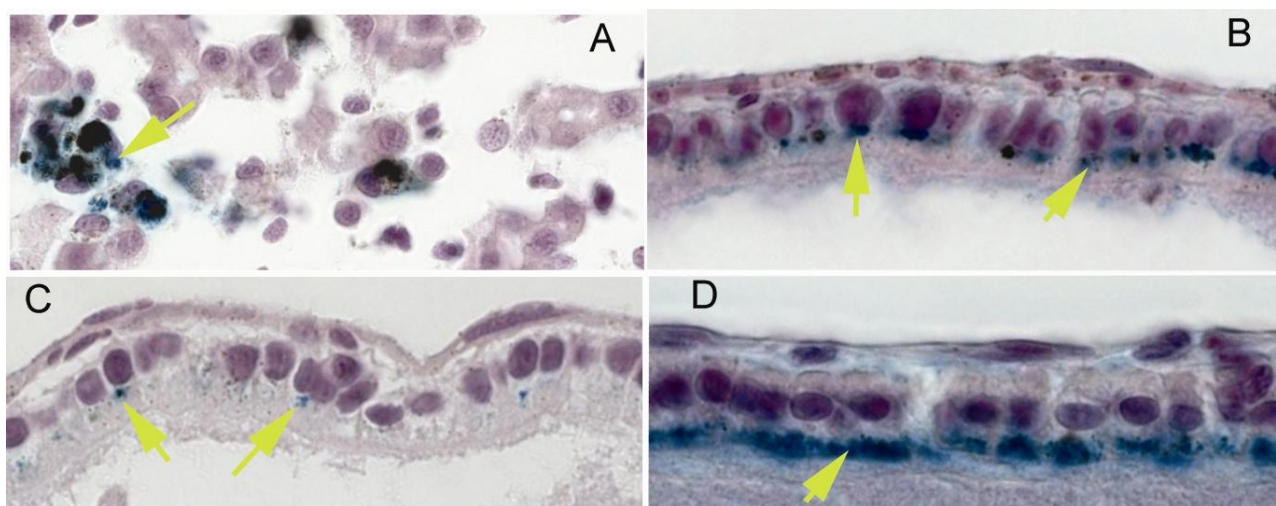


Рисунок 6. Результаты гистохимического анализа. А - Аккумуляция ионов железа меланин-содержащими клетками печени головастика травяной лягушки (контроль). В — Аккумуляция ионов железа клетками стенки кишечника головастика серой жабы (контроль). С, D - аккумуляция ионов железа клетками стенки кишечника головастика серой жабы (группа «железо»). Депозиты железа показаны стрелками. (X1000).

Во вторичных почках накопление соединений трехвалентного железа обнаружено не было, как и в клетках кожи. Это не тривиальный результат. Почки связаны с выведением железа из организма и факт обнаружения его в секрете мог бы указывать на избыток железа в организме, а клетки кожи могли бы накапливать ионы железа, поступающие из воды.

Таким образом, положительная реакция с трехвалентным железом обнаруживается в кишечнике, только в тканях, образующих эпителиальную выстилку кишечника и в печени.

Гистохимическое исследование различных органов головастика было направлено на обнаружение отличий в аккумуляции железа в тканях животных, чье развитие проходило в аквариумах с имитацией загрязнения железосодержащими сплавами в сравнении с контрольной группой. Предполагалось, что уровень железа в тканях опытных животных

должен быть выше за счет увеличения поступления в организм экзогенного железа. Сравнение интенсивности окрашивания содержимого кишечника при выявлении соединений трехвалентного железа указывает на повышение их концентрации в кишечниках опытных животных. Однако характерные полосы всасывания железа обнаруживаются и в контрольной и в опытной группах, что говорит о высоком содержании железа в пищевых массах у обеих групп (рис. 6). Возможно, это объясняется высокой концентрацией железа в пище, которой кормили головастиков как контрольной, так и экспериментальных групп. Другой причиной является достаточно высокая концентрация ионов железа в воде нативного водоема. При этом интенсивность окрашивания в препаратах кишечника опытных животных все-таки выше, а повышенного содержания железа в других органах и тканях головастиков контрольной группы не наблюдается.

Таким образом, гистохимический анализ тканей головастиков на содержание в них ионов трехвалентного железа подтвердил результаты, полученные на основе спектрохимического анализа: основной путь поступления в организм головастика ионов металлов, в данном случае железа, - алиментарный. У личинок бесхвостых амфибий нет эффективного механизма выведения металлов, но существует механизм, смягчающий токсическое действие переизбытка железа. В качестве такого механизма выступает процесс поглощения ионов металлов макрофагами и депонирование в печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Целью данной работы было изучение аномалий развития головастиков в условиях загрязнения нерестовых водоемов в г. Москве и влияния на их развитие тяжелых металлов, свинца и железа. Были изучены головастики трех аборигенных видов: травяной лягушки (*Rana temporaria* L.), остромордой лягушки (*Rana arvalis* Nilss.) и серой жабы (*Bufo bufo* L.). Объектом изучения были выбраны стадии, в течении которых головастики свободно перемещаются в водоеме, активно питаются, но еще не достигли предметаморфозных стадий развития. Выбор этих стадий был обусловлен тем, что в этот период онтогенеза нет крупных морфологических изменений, снижающих устойчивость к повреждающим воздействиям среды.

Увеличение частоты аномалий развития в московских водоемах по сравнению с подмосковными указывает на их сильную загрязненность. Сокращение частоты уродств по мере онтогенеза свидетельствует о гибели головастиков с резкими отклонениями развития и, тем самым, о стабилизирующем отборе нормальных головастиков. Важно отметить ограниченный набор аномалий развития. Часть аномалий, таких как «деформация осевого скелета» и «нарушения развития конечностей» возникают в результате повышенной чувствительности морфогенетических процессов к повреждающему действию поллютантов. Нарушения строения покровов и кишечника объясняются тем, что эти структуры подвергаются наиболее сильному воздействию поллютантов. Загрязненная вода омывает головастиков, а в кишечник поллютанты попадают с пищей. Сильное отставание в развитии без видимых отклонений в строении тела, по-видимому, обусловлено общим подавлением метаболизма.

Вместе с тем, эпигеномные процессы развития устойчивы к отравлению тяжелыми металлами, в данном случае железом и свинцом. Повышенная концентрация их ионов в организмах головастиков всех трех исследованных видов не оказывает существенного влияния на вариабельность развития, изменчивость и пропорции тела. Значимо только влияние на размеры тела. Условия, имитирующие загрязнение водоема свинцом, угнетают ростовые процессы у головастиков всех трех видов. Реакция на повышение концентрации железа видоспецифична: рост и развитие головастиков травяной лягушки замедляется, так же как под действием свинца, а у серой жабы, напротив, ускоряется.

Тяжелые металлы неравномерно распределены в теле головастиков. По данным спектрохимического анализа, основное их количество накапливается в кишечнике и в печени.

Эти данные свидетельствуют о том, что основная масса поллютантов попадает в организм головастиков вместе с пищей, а не путем диффузии через жабры или покровы тела. Низкие концентрации ионов металлов в жабрах – органе, наиболее проницаемом для любых растворенных в воде солей и окислов, подтверждают алиментарный способ поглощения поллютантов. Об этом же свидетельствуют наблюдения за поведением головастиков. Скобление предметов на дне водоемов и захватывание пищи со дна – форма пищевого поведения головастиков исследованных видов. В эксперименте происходило скобление головастиками ржавых гвоздей и свинцовой дроби, добавленных в аквариумы. Спектрохимический анализ тканей головастиков с нарушениями развития показал очень высокую концентрацию в них ионов и железа и свинца. Это позволяет предположить, что тератогенез может быть обусловлен не просто высокой концентрацией металлов в окружающей среде, а индивидуальными особенностями головастиков, связанными со способностью к аккумуляции поллютантов в организме.

Гистохимический анализ распределения ионов железа в организме головастиков подтвердил и уточнил данные о распределении этого металла в тканях. Основной путь поступления металла в организмы личинок травяной лягушки и серой жабы – алиментарный. У головастиков нет эффективного механизма выведения ионов металлов из организма. Метанефрос головастиков не участвует в этом процессе. Тем не менее, существуют механизмы, смягчающие вредное действие переизбытка железа. Макрофаги поглощают и накапливают ионы этого металла. В печени железо накапливают меланин-содержащие макрофаги, депонирующие трехвалентное железо.

Таким образом, можно выделить три тесно взаимосвязанных аспекта полученных результатов: физиологический, онтогенетический и экологический. Физиологическое действие высокой концентрации железа и любой концентрации свинца в организмах головастиков состоит в нарушениях обмена веществ, отрицательно сказывающихся на росте и развитии выживших особей. Тератогенез отражает индивидуальные физиологические особенности головастиков, связанные с повышением концентрации поллютанта в организме. Онтогенетический аспект включает зависимость физиологической реакции головастиков на действие металлов от стадии онтогенеза, дифференциальную реакцию разных органов и тканей на повреждающее действие этих металлов, а также высокую устойчивость, которая может объясняться эпигеномностью процессов роста подсистем организма. Экологический аспект обусловлен прежде всего приспособленностью головастиков к развитию в определенном типе водных биоценозов, в частности способом добывания корма. Соскребывание с поверхности подводных предметов и потребление детрита приводит к поступлению существенно больших количеств металлов, чем их могло бы проникнуть в организм из воды нерестовых водоемов. Способом питания обусловлено преимущественное накопление металлов в кишечнике и в печени. Количество металла, попавшее в процессе питания в организм, определяло торможение процессов роста, тератогенез или гибель. К сожалению, этот тезис лишь частично подтвержден в данной работе и требует дальнейших многоплановых исследований. Все три аспекта представляют собой важные компоненты адаптивного реагирования развивающегося организма на неспецифическое воздействие окружающей среды.

ВЫВОДЫ

1. Частота встречаемости аномалий развития головастиков травяной и остромордой лягушек развивающихся в черте города Москвы и за ее пределами на стадии вылупления примерно одинаковы. Разнообразие типов аномалий по мере развития сокращается.
2. Наиболее распространенными аномалиями являются «деформации осевого комплекса» и «темпы развития». Гистологический анализ аномалии «деформации осевого комплекса» выявил нарушения сомитогенеза.

3. Экспериментальные исследования по имитации загрязнения водоема железом и свинецсодержащими сплавами показали, что тяжелые металлы поступают в организм с пищей и, проникая через стенку кишечника, накапливаются в печени. Гистохимический анализ не выявил возможный путь выведения ионов железа через выделительную систему.
4. Влияние исследованных металлов сказывается только на линейных размерах головастика: накопление железа приводит к увеличению их значений, а свинца – к уменьшению. При этом поступление в организм ионов железа и свинца не оказывает влияния на пропорциональность частей тела развивающихся зародышей, и слабо влияет на изменчивость и коррелированность морфометрических признаков.
5. Пероральное накопление ионов металлов в теле головастика указывает на необходимость учитывать при разработке ПДК для водоемов, особенно рыбохозяйственного назначения, концентрацию поллютантов как в воде, так и в донных отложениях.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Aguillón Gutiérrez D. R., Severtsova E. A. Anthropogenic pollution of spawning ponds as an evolutionary factor affecting the development of frog embryos // 69th Annual Meeting, Society for Developmental Biology and the Japanese Society for Developmental Biologists. (Albuquerque, New Mexico, USA. August 5-9, 2010). *Developmental Biology* 344(2010)A145. 2010.

Aguillón-Gutiérrez D.R., Severtsova E. A. Análisis morfológico y ecotoxicológico en poblaciones de anfibios en zonas urbanas y suburbanas de Moscú, Rusia. IX Congreso Latinoamericano de Herpetología, V Congreso Brasileiro de Herpetología. (Curitiba, Paraná, Brasil, 16-22 de Julho de 2011).

Severtsova E. A., **Aguillón Gutiérrez D. R.**, Severtsov A. S. Morphometry as a Method of Studying Adaptive Regulation of Embryogenesis in Polluted Environments. In: *Embryogenesis*. Edited by Sato K. InTech. P. 555-572. 2012. ISBN-978-953-51-0466-7.

Агильон Гутьеррес Д. Р. Влияние антропогенного загрязнения водоемов на развитие бесхвостых амфибий. XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2012». (9-13 апреля 2012, Москва, Россия).

Северцова Е.А., **Агильон Гутьеррес Д.Р.**, 2012. Влияние имитации загрязнения водоема железом – и свинецсодержащими сплавами на постэмбриональное развитие бесхвостых амфибий // *Зоологический журнал*, в печати.

Северцова Е.А., Никифорова А.И., **Агильон Гутьеррес Д.Р.**, 2012. Спектрохимический и гистохимический анализ тканей головастика травяной лягушки и серой жабы, развивавшихся в условиях имитации загрязнения свинцом и железом // *Вестник МГУ, Серия 16. Биологическая*, в печати.

Severtsova E. A., **Aguillón Gutiérrez D. R.**, Severtsov A. S. 2012. Frequent anomalies in larvae of Common and Moor frogs in Moscow area and in the suburbs of Moscow, Russia // *Russian Journal of Herpetology*, 19(4), p. 277-286.