

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БЕСХВОСТЫХ АМФИБИЙ В БИОИНДИКАЦИИ ПРИРОДНОЙ СРЕДЫ

Пястолова О.А., Трубецкая Е.А.

Земноводные - самый малочисленный класс позвоночных (в мировой фауне 3373 вида). На территории СССР обитает всего 33 вида (Банников и др., 1977), большинство из которых является узкоареальными, имеет небольшую численность и подлежит охране. По-видимому это явилось одной из причин немногочисленных исследований по применению этой группы животных в качестве индикаторов окружающей среды. Однако в последние годы появился ряд работ, авторы которых, используя различные подходы и методы, обосновывают положение о возможности использования земноводных для целей мониторинга; (Вершинин, 1983; Кубаниев, Жукова, 1982; Бугаева, 1983; Шарыгин, 1979 и др.). Анализируя имеющиеся литературные и собственные материалы, рассмотрим критерии, по которым определяется пригодность амфибий как биоиндикаторов.

Критерии отбора амфибий для биоиндикации

1. Широкое распространение. Ареал должен охватывать различные ландшафтно-климатические зоны, включая лесотундровую и лесостепную. Узкоареальные, исчезающие, подлежащие охране виды не могут быть использованы.

2. Обитающие на нашей территории виды имеют в основном небольшие размеры (15-20 г), поэтому их численность должна быть достаточной для сбора необходимых материалов. Здесь также надо учитывать разрешающую возможность метода. Для микроэлементного анализа минимальная величина навески должна составлять около 5 г сухого веса (2-3 г золы) какой-либо ткани организма.

3. В силу биологических особенностей (несовершенное строение наземных органов дыхания, постоянное испарение влаги с поверхности кожи и др.) ограничивающим фактором для земноводных является влажность, а отсюда их приуроченность к влажным биотопам, отсутствие больших миграций. Это позволяет использовать амфибий в качестве объекта исследований степени загрязненности организмов в соответствии с развитием определенного вида промышленности.

4. Принадлежность к нескольким звеньям трофодинамической цепи. В этом плане амфибии занимают особое место. Взрослые животные являются хищниками. Они поедают те объекты, которых в данной местности много. В их рацион входят насекомые (комары, москиты, оводы, слепни и их личинки), моллюски, черви и даже позвоночные. Сами земноводные являются пищей для некоторых видов пресмыкающихся и млекопитающих (Шварц, 1948). Личинки амфибий питаются, в основном, растительной пищей (диатомовые и зеленые водоросли и другие водные растения). Животный корм в их рационе составляет небольшой процент. Являясь консументами I, II, III порядков, земноводные выполняют связующую роль между трофическими звеньями водных и наземных экосистем (Гаранин, 1977). Как правило, отходы промышленности

распространяются на значительные территории и весной с помощью талых вод и осадков смываются в понижения, где концентрируются в почве, иле, в водной и прибрежной растительности, и развивающиеся там личинки земноводных могут явиться первым звеном в транспорте токсикантов в вышестоящие звенья трофической цепи.

5. Непременное условие используемых для целей мониторинга видов - это их принадлежность к естественным сообществам. Поэтому не следует отлавливать животных в садах, огородах, вблизи поселков, на урбанизированных территориях и т.д. В результате длительного контакта с человеком у животных могут вырабатываться определенные приспособления к действию различных токсикантов, а также выведению их из организма,

6, Для сбора материала по амфибиям не требуется сложных и дорогостоящих приборов и инструментов. При достаточной численности взрослых животных можно отлавливать без каких-либо приспособлений или с помощью канавок и цилиндров; головастиков - с помощью сачка.

Выбор показателей, пригодных для индикации

При выборе органов и тканей, пригодных для взятия проб на загрязненность, следует учитывать размещение животных на территории, особенности развития, функциональное значение органов и тканей, их способность аккумулировать различные токсиканты. Следует также иметь в виду, что в воде токсические вещества способны находиться в растворенном виде и проникать в организм через кожные покровы.

В качестве критерия оценки загрязненности организма можно использовать содержание, распределение и динамику микроэлементов, в отдельных органах и тканях и в целом организме. У взрослых амфибий для определения содержания микроэлементов используют кости, мышцы, печень, гонады. С помощью методики полуколичественного эмиссионного спектрального анализа можно определить до 40 химических элементов (Шарыгин, 1979). Однако при определении микроэлементов для одной пробы требуется не менее 10 особей из одного пункта. По понятным причинам в антропогенном ландшафте сделать это не только трудно, но и нежелательно. Следует учитывать и реакцию животных на возмущающие факторы: взрослые особи менее чувствительны, чем организмы в период закладки формирования органов и систем (Айверсон, 1979). Поэтому полагаем, что наряду со взрослыми животными (где это возможно) следует использовать в качестве биоиндикаторов личинок амфибий.

Используя яйца и личинок амфибий в качестве тест-объекта также имеется в виду возможность параллельной постановки модельных опытов и наблюдений в природе. Кроме того характерные изменения, происходящие у амфибий в течение постэмбрионального развития, осуществляющиеся путем метаморфоза, легко поддаются качественному и количественному определению. Поэтому для оценки влияния загрязнений на отдельные организмы и состояние популяций в целом в качестве параметров можно использовать: выживаемость яиц и личинок, морфофизиологические (размеры печени), цитологические (размеры гепатоцитов, их ядер, цитоплазмы, наличие или отсутствие липосом) показатели и уровень обмена сего-леток.

1. Для учета эмбриональной смертности амфибий лучше всего использовать икру лягушек, которые откладывают ее в виде комка. Как правило, развитие яиц в кладке проходит дружно и к концу эмбриогенеза легко подсчитывать количество нормально развившихся, недоразвившихся и погибших яиц. В подверженных загрязнению водоемах смертность бывает значительно выше (иногда в 2-4 раза), чем в норме. Однако при этом необходимо учитывать колебания температуры воды. Длительное воздействие низких температур (0°C) оказывает губительное действие на развивающиеся яйца даже северных популяций лягушек (Herreid. Kinney, 1966).

Используя в качестве показателя личиночную смертность следует учитывать такие факторы, как наличие хищников, плотность личиночных популяций, стадии развития. Личиночную смертность в естественных условиях учесть трудно. Она малозаметна и проявляется лишь в случаях массовой гибели. Однако, присутствие в воде повреждающих факторов сказывается на внешнем облике головастиков. К концу личиночного периода развития они имеют не характерную для них грушевидную форму тела, отечные и гиперемированные задние конечности, сильно выступающий осевой скелет. Встречаются животные с искривленными хвостами, с белыми пятнами на коже, со сползающим с хвостового плавника эпидермисом. Наиболее распространенные изменения, головастиков из загрязненных водоемов - отечность брюшной полости и вздутый, заполненный слизью кишечник. Такие животные к концу личиночного периода развития, при смене среды обитания элиминируют из популяции.

2. Наряду с антропогенными факторами на темпы роста и развития личинок амфибий оказывают влияние температура, химизм воды, сроки икрометания, плотность популяции, продукты метаболизма животных, кормовые ресурсы, в результате действия которых увеличивается вариабельность исследуемых показателей. Высокий коэффициент вариации или его резкое снижение в середине личиночного периода развития может служить лишь сигналом неблагополучного состояния популяции. Поэтому использование скорости роста и развития в качестве самостоятельных параметров для оценки степени загрязнения среды не представляется возможным. Однако, экспериментальные и полевые исследования, проведенные нами, позволяют считать, что изучение в комплексе скорости роста, относительного прироста и вариабельности размеров тела на протяжении всего периода личиночного развития с учетом внешних факторов может служить оценкой состояния популяции.

3. Печень - мультифункциональный орган, выполняющий экскреторную, трофическую, защитную, кроветворную и др. функции. Токсические вещества, попадающие в организм, в первую очередь накапливаются в печени и богатых липидами тканях. (Барбье, 1978). Одним из наиболее чувствительных показателей, реагирующим на повышенное содержание в среде микроэлементов, С.С.Шварц (1954) считает относительные размеры печени. При этом отмечает неоднозначность действия различных микроэлементов на весовые показатели в период раннего онтогенеза. Так, повышенное содержание в воде меди вызывает резкое увеличение, а никеля - торможение роста печени у головастика остромордой лягушки. Наблюдения, проведенные в природе, в условиях техногенного ландшафта показали, что относительные размеры печени могут увеличиваться до 60-70%, что превышает контрольные показатели на 10-30% (Пястолова и др., 1981). Учитывая, что большинство личинок амфибий развиваются в небольших водоемах и лужах, питающихся в основном за счет талых вод и атмосферных осадков, и способность их печени концентрировать

токсиканты, считаем возможным использовать относительный вес печени в качестве критерия оценки загрязнения организма.

4. Из ранних работ (Самохвалова, 1929) известно, что внешние и внутренние факторы, нарушающие физиологическое состояние организма, оказывают влияние на размер клеток. Однако сведений о влиянии химических веществ на размеры гепатоцитов, ядер и их соотношение крайне мало (Вермель, 1940). Под влиянием промышленных загрязнений клетки печени могут измениться, при этом увеличивается размер ядра, а цитоядерное соотношение уменьшается. В благоприятных условиях клетки имеют тенденцию сохранять постоянное отношение между цитоплазмой и ядром. Экспериментально установлено, что в слабых растворах некоторых химических соединений (сульфат меди, сульфат натрия, хлористый натрий) в среднем клетки печени сеголеток больше варьировали, чем у контрольных животных, и количество клеток более крупных размерных классов было выше. В растворах этих же солей, но сильных концентраций, средние размеры гепатоцитов меньше. По-видимому, это связано с более жестким отбором, высоким уровнем обмена и интенсивным расходом питательных веществ. Цитологический анализ животных из загрязненных водоемов подтвердил результаты экспериментов.

Таким образом цитологические исследования печени выходящих на сушу сеголеток являются хорошим показателем состояния популяции, подверженной, влиянию антропогенных загрязнений. Увеличение ядер в первую очередь свидетельствует о загрязнении водоемов, и для скорости проверки состояния популяции можно использовать только этот показатель.

5. К началу метаморфического климакса в гепатоцитах увеличивается содержание гликогена, полисахаридов, липидов (Quetant 1973 и др.). Также была высказана мысль о том, что пока личинка не сделает минимального запаса энергии, их метаморфоз невозможен (Crump, 1981). Исследуя клетки печени, нетрудно проследить за содержанием в них липидов и использовать этот показатель в качестве индикатора загрязнения среды. Исследованиями В.А.Бугаевой (1983) обнаружено начало образования жировых включений в гепатоцитах головастиков остромордой лягушки в "чистых" водоемах на 25-26 стадиях развития, в водоемах, подверженных антропогенному загрязнению, позднее - на 26-26 стадиях. В период метаморфического климакса, когда животные не питаются, а затраты энергии в связи с перестройкой личиночных органов и тканей увеличиваются, идет интенсивное расходование жировых запасов. В клетках животных из "чистых" водоемов липиды сохраняются после окончания метаморфоза. Таким образом, развитие животных под воздействием неблагоприятных факторов сопровождается замедлением процесса накопления и интенсивным расходом липидов в период метаморфического климакса. Это снижает жизнеспособность молодых особей, рекрутируемых в популяцию.

6. Наряду с перечисленными параметрами при выборе критериев оценки загрязненности среды и ее влияния на биоту может быть использован уровень обмена веществ. Показано, что интенсивность обмена животных, развитие которых проходило в антропогенном ландшафте, выше, чем сеголеток из "чистых" районов. Это в свою очередь ведет к увеличению энергозатрат и отражается на выживаемости животных.

Методики отбора проб

Для оценки состояния популяций амфибий в районе действия промышленных предприятий, прежде всего, необходимо подобрать водоемы, которые являются местами икрометания. Они должны находиться на различном расстоянии от источника эмиссий. Это позволит проводить анализ в сравнительном плане. Необходимо давать полное описание водоемов (форма, площадь водного зеркала, глубина, освещенность, температура вода, характер грунта, происхождение, месторасположение относительно источника загрязнения, видовой состав растений и животных, гидрохимический анализ воды и грунта)

Лягушки обычно откладывают икру в неглубокие, хорошо прогреваемые солнцем водоемы или заводи, где нет сильного течения. Кладка икры около суток может лежать на дне; затем всплывает. За развитием икры легко проследить и в природе, и в условиях лаборатории. В зависимости от возраста и вида самка откладывает, от 500 до 2750 яиц. В оптимальных условиях выклев личинок происходит на 4-5 сутки. В этот момент кладку следует взять из водоема, поместить в кристаллизатор и подсчитать соотношение вылупившихся личинок, недоразвившихся и погибших яиц. Обычно из одного водоема исследуются не менее 5 кладок. Затем исследуемые кладки возвращаются в водоем.

Начальная плотность (число личинок на 1 л воды) определяется с помощью следующих параметров: примерного объема воды в водоеме, количества кладок и среднего числа яиц в кладке с учетом их выживаемости. В конце периода, перед метаморфозом плотность личинок определяется с помощью биоценометра. Подсчитывается количество личинок, попавших в объем воды биоценометра в момент измерения. Плотность можно определять и с помощью мечения головастиков нейтральным красным (Северцов, Сурова, 1979)

Количественный учет завершивших метаморфоз и выходящих на сушу животных сопряжен с большими трудностями. Для их учета мы использовали все подручные средства, укладывая по периметру водоема доски, палки, ветки, под которыми обычно прячутся первые 10-12 часов после выхода на сушу животные. Под этими укрытиями их достаточно легко можно учесть. Подсчет следует проводить не менее трех раз в сутки и таким образом можно установить процент вышедших на сушу животных по отношению к отложенной икре, процентное соотношение морфотипов, морфологические аномалии, динамику сроков развития всей популяции личинок.

Для получения данных по динамике роста и развития личинок еженедельно из разных участков водоема сачком берется проба не менее 30 особей, длина тела каждого животного измеряется штангенциркулем с точностью до 1 мм, взвешивание производится на торсионных весах с точностью до 1 мг. Предварительно каждое животное обсушивается фильтровальной бумагой. Величину относительного прироста массы тела личинок за каждые 7 дней определяли по формуле:

$$R = \frac{v_2 - v_1}{\frac{1}{2}(V_2 + V_1)}$$

где v_1 и v_2 - средний вес выборки животных в начале и в конце периода соответственно (Шмальгаузен, 1935). Стадии развития определяется по классификации П.В.Герентьева (1950). После взятия промеров животные возвращаются в водоем. После резорбции хвоста и выхода, животных на сушу из каждого водоема берется, проба 30 особей для

морфофизиологических исследований. Сеголетки взвешиваются, измеряются, умерщвляются декапитацией, вскрываются, определяется вес печени, готовятся ее препараты. Работа выполняется в соответствии с "Правилами проведения научных исследований с использованием экспериментальных животных", утвержденными распоряжением Президиума АН СССР от 2 апреля 1980 г. № 12200-496.

Печень сеголеток - самый крупный, хорошо препарированный орган, в норме темно-красного цвета. Взвешивание производится на торсионных весах, индекс печени определяется как отношение веса печени к весу тела, выражается в промилях.

Исследование цитологических показателей производится по следующей методике. На чистое обезжиренное предметное стекло наносятся отпечатки печени (мазки или растирание между стеклами приводят к сильному повреждению и деформации клеток) и 5 минут фиксируют метанолом. Препараты окрашиваются по методу Романовского (Ромейс, 1953). По этой методике препараты изготавливаются быстро и сохраняют свои исходные качества несколько лет.

С помощью рисовального аппарата РА-4 при увеличении светового микроскопа 10х20 с каждого препарата зарисовывается 100 клеток. Измерение цитоплазмы и ядра производится по двум перпендикулярным диаметрам, вычисляется площадь проекции клеток по формуле S круга.

Определение сроков исчезновения липосом производится следующим образом. Из каждого водоема отлавливали 50 особей 30 стадии развития, через сутки животных, достигших 31 стадии развития, помещали в отдельный кристаллизатор. Животных не кормили, содержали при температуре 20°C, ежедневно вскрывали, готовили препараты печени и определяли наличие липосом.

Газообмен у сеголеток определяли по количеству выделенного CO_2 с помощью оптико-акустического газоанализатора ОА-550I (Добринский, Малафеев, 1974). Учитывая существенные различия размеров сеголеток, при вычислении дыхательного обмена исходили из известного правила Рубнера (количество выделенного CO_2 относили к величине, определяемой как $\sqrt[3]{P^2}$ час, где P - вес животного). После намерения уровня метаболизма животных выпускали в район их изъятия.

Итак, для контроля за изменениями, происходящими в природной среде в результате хозяйственной деятельности человека в комплексе видов-индикаторов, наряду с другими группами животных целесообразно использовать амфибий. При этом следует учитывать влияние среды, как на ранние этапы онтогенеза, так и на взрослых животных. Получение объективной оценки в каждой конкретной ситуации возможно только при использовании совокупности показателей.

ЛИТЕРАТУРА

Айварсон Р.Л. Использование биологические индикаторов для мониторинга загрязнения морской среды // Человек и биосфера. 1979. Вып.3. - С.75-85.

Банников А.Г., Даревский И.О., Ищенко В.Г., Рустанов А.К., Щербак Н.Н. Определитель земноводных и пресмыкающихся фауны СССР. - "Просвещение". 1977.

Барбье М. Введение в химическую экологию. - М.: Мир, 1978. -С.150.

Бугаева Е.А. Влияние антропогенных факторов на рост, развитие и выживаемость личинок остромордой лягушки / Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Свердловск, 1983. С.5.

- Бермель Б.М. Исследование о клеточных размерах // Уч. зап. Моск. гос.пед. ин-та. М., 1940. Вып.1. С.7-131.
- Вершинин В.Л. Материалы по росту и развитию амфибий, в условиях большого города // Экологические аспекты скорости роста и развития животных. Свердловск, 1983. С.17.
- Гаранин В.И. О месте амфибий и рептилий в биогеоценозах антропогенного ландшафта // Вопросы герпетологии. Л., 1977.. Вып.4. С.63-64.
- Добринский Л.Н., Малафеев Ю.М. Методика изучения интенсивности выделения углекислого газа мелкими пойкилотермными животными с помощью оптико-акустического газоанализатора // Экология, 1974. - № 1. - С.73-78.
- Кубанцев Б.С., Жукова Т.И. Некоторые экологические результаты антропогенных воздействий на популяции и среду обитания озерной лягушки.// Экология, 1982. - № 6. - С.46-51.
- Пястолова О.А., Бугаева В.А., Большаков В.Н. Личинки амфибий как биоиндикаторы загрязнения среды // Вопросы герпетологии. Л., 1981. С.112.
- Ромейс Б. Микроскопическая техника. М.: Иностранная литература, 1953. С.324.
- Самохвалова Г.В. Величина клетки и величина тела //Тр. лаб. эксперим. биол. Московского зоопарка. М., 1929. Вып.4. С. 188-189.
- Северпов А.С., Сурова Г.С, Гибель личинок травяной лягушки и факторы, ее определяющие. - Зоол.ж., 1979. Т.VIII, вып.3. С.393-403.
- Терентьев П.В. Лягушка. М.: Советская наука, 1950. С.354.
- Шарыгин С.А. Микроэлементы в организме некоторых амфибий и рептилий и их динамика под влиянием антропогенных факторов / Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Свердловск, 1979. С.49.
- Шварц С.С. О специфической роли амфибий в лесных биоценозах в связи с вопросом об оценке животных с точки зрения их значения для человека. - Зоол.ж., 1948. Т.27, вып.5. -С.441-445.
- Шварц С.С. Влияние микроэлементов на животных в естественных условиях рудного поля //Тр. Биогеохим. лаб. АН СССР. 1954, т.10. С.7С-8I.
- Шмальгаузен И.И. Определение основных понятий и методика исследования роста // Рост животных. М.; Л., 1935. С.231.
- Crump M.L. Energy accumulation and amphibian metamorphosi .- Oecologia, vol, 49, № 2, 1981, p.167-169.
- Quetant R. Consequences de l'effect de groupe chez le tetrad d'Alytos obscetrigans Laur. variations ponde'rales et structural. Z.Anat. ad Entwicungs.1973, vol.140, N.2, p.173 - 186.