

На правах рукописи

Спирина Елена Владимировна

**АМФИБИИ КАК БИОИНДИКАЦИОННАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА  
ДЛЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ВОДНОЙ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ**

03.00.16. – экология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Ульяновск – 2007

Работа выполнена на кафедре биоэкологии Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования Ульяновский государственный университет

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор  
Романова Елена Михайловна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор  
Горбачев Владимир Николаевич

доктор биологических наук, профессор  
Батлуцкая Ирина Витальевна

Ведущая организация: Федеральное государственное научно-исследовательское учреждение Институт экологии Волжского бассейна РАН

Защита состоится «30» мая 2007 г. в 14<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 212.278.07 при Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования Ульяновский государственный университет по адресу: 432000, г. Ульяновск, Набережная реки Свияга, 106, аудитория 212.

Отзывы на автореферат направлять по адресу: 432000, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42, Ульяновский государственный университет, управление научных исследований.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ульяновского государственного университета.

Автореферат разослан « » \_\_\_\_\_ 2007 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат биологических наук,  
доцент

С.В. Пантелеев

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

Одним из современных и наиболее перспективных методов экологической оценки качества окружающей среды является биоиндикация. Биоиндикация позволяет выявить степень и интенсивность воздействия загрязнителей, а также проследить динамику деградации экосистем во времени и пространстве и выразить это в интегральной форме. Естественные реакции организма животных на качество окружающей среды часто могут быть экстраполированы на человека (Sigel, 1980; Тарасенко и др., 1985; Пескова, 2002; Замалетдинов, 2003).

Преимущества использования биоиндикаторов для интегральной оценки биосистем разного уровня сложности в том, что они реагируют не только на отдельные загрязнители, но и на весь комплекс воздействующих веществ определенными реакциями организма в целом (Лыдня, Пилипенко, 1993; Пескова, 2002; Файзулин, 2004).

Всем требованиям, предъявляемым к видам, используемым для биоиндикации, отвечает озёрная лягушка (*Rana ridibunda* Pall.) – широко распространенный вид амфибий в Европейской части России (Чубинишвили, 1998; Захаров, 2000). Вид обладает чёткими и удобными для исследования признаками, его икра и личинки чувствительны к загрязнителям (Posvay, 1977; Freda, Dunson, 1985; Pierce, 1985; Gunter, Plotner, 1986; Вершинин, 1995). Морфофизиологические параметры организма амфибий отражают состояние локального местообитания. У амфибий отсутствует выраженная тенденция к миграции (Ищенко, 1978), для них характерен высокий уровень полиморфизма, – все эти факторы позволяют успешно использовать *R. ridibunda* Pall. в качестве вида-биоиндикатора.

### Цели и задачи исследования

**Цель исследования** – выявить наиболее информативные морфофизиологические, цитогенетические, популяционные параметры вида *Rana ridibunda* Pall. и обосновать эффективность их использования для биоиндикации экологического состояния водотоков.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Исследование водотоков на содержание тяжелых металлов в воде.
2. Характеристика структуры популяций *R. ridibunda* Pall.
3. Отбор информативных для биоиндикации морфофизиологических параметров *R. ridibunda* Pall.
4. Выявление основных фенотипических отклонений
5. Оценка стабильности развития популяций *R. ridibunda* Pall.

### Научная новизна

- Разработана комплексная мультифакторная тест-система биоиндикации водотоков на основе показателей морфофизиологического и цитогенетического гомеостаза бесхвостых амфибий, включающая оценочные критерии стабильности развития и структуры популяции.

- Дана отличительная характеристика морфофизиологических особенностей и популяционных параметров *R. ridibunda* Pall., включающая морфометрию тела и задних конечностей, индексы внутренних органов и упитанность, а также численность, половое соотношение и фенетический состав популяций в экологически чистых и загрязненных водотоках Ульяновской области.
- Установлено, что показателями загрязнения водотоков являются маркерные фенотипы, высокая внутривидовая гетерогенность и частота встречаемости морфофизиологических аномалий *R. ridibunda* Pall.

### **Практическая значимость результатов**

Выявлены морфофизиологические и генетические особенности амфибий, которые позволяют оперативно провести биоиндикацию экологического состояния водотоков. Выявленный комплекс характеристических параметров может быть использован при проведении экологического мониторинга и в системах экологического прогнозирования. Полученные результаты могут рассматриваться как базовые при экологической оценке водотоков Ульяновской области.

Основные положения и выводы диссертации используются в учебном процессе кафедры биоэкологии экологического факультета Ульяновского государственного университета и кафедры биологии, ветеринарной генетики, паразитологии и экологии факультета ветеринарной медицины Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. *R. ridibunda* Pall. является высокоинформативным биоиндикатором экологического состояния водотоков.
2. В неблагоприятных экологических условиях, регистрируется широкий спектр аномалий развития *R. ridibunda* Pall., снижается численность популяций, смещается половое соотношение, нарастает доля морфы *striata*.
3. Организм *R. ridibunda* Pall. реагирует на загрязнение водотоков комплексом морфофизиологических реакций, проявляющихся в уменьшении размеров тела, увеличении индексов сердца и почек, снижении индексов печени, селезенки, и общей упитанности, обусловленных нарушением морфофизиологического и цитогенетического гомеостаза.

### **Апробация и публикации**

Результаты исследований были представлены и обсуждались на конференциях различных уровней, в том числе: на III Всероссийской научно-практической конференции «Водохозяйственный комплекс России: состояние, проблемы, перспективы» (Пенза, ноябрь 2005 г.); на Всероссийском конкурсе инновационных проектов «Живые системы» (Киров, ноябрь 2005 г.); на IV Международной научно-практической конференции «Природноресурсный потенциал, экология и устойчивое развитие регионов России» (Пенза, январь 2006 г.); на XIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006» (Москва, апрель 2006 г.); на конференции аспирантов и молодых ученых УлГУ «Решение проблемы загрязнения водной среды» (Ульяновск, апрель, 2006 г.); на Международной научно-практической конференции «Проблемы биологии, экологии и образования: история

и современность» (Санкт-Петербург, май 2006 г.). По теме диссертации опубликовано 7 работ.

### **Объем и структура диссертационной работы**

Диссертация изложена на 193 страницах машинописного текста, иллюстрирована 39 рисунками, 5 таблицами. Приложение включает 15 таблиц.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы по изучаемой проблеме – глава 1, материалов и методов исследования – глава 2, результатов собственных исследований – глава 3, заключения, выводов, списка использованной литературы и приложения. Список использованной литературы из 518 источников, в том числе 139 на иностранном языке.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Глава 1. Обзор литературы по изучаемой проблеме**

Глава посвящена обзору литературы по изучаемой проблеме и состоит из 4 подразделов, которые содержат информацию о многогранности подходов к биоиндикации качества окружающей среды в системах экологического мониторинга и перспективах использования амфибий для этих целей.

### **Глава 2. Материал и методы исследования.**

#### **Характеристика районов исследования**

Исследования проводились в Ульяновской области в 2004-2007 гг. Объектом изучения являлась озерная лягушка (*R. ridibunda* Pall.).

В качестве загрязненного водотока была выбрана р. Свяга, а экологически чистого водотока – р. Уса.

В Кузоватовском районе Ульяновской области берет начало р. Свяга. На территории Ульяновской области имеет протяженность 216,4 км, является правым притоком Волги. Русло реки извилистое, ширина 20-30 м, средняя глубина на перекатах 0,6 м, на плесах 1,3 м. Река сильно загрязнена. В Тереньгульском районе Ульяновской области берет начало р. Уса. В своем течении она сходна с р. Свяга, является экологически чистым водотоком. Долина реки пойменная, шириной до 3-4 км.

Для выявления адаптаций, возникающих под действием загрязнения водотоков у представителей вида *R. ridibunda* Pall., нами было проведено исследование на трех уровнях: на уровне популяции (оценивалась численность, половой и фенетический состав), на уровне особи (оценивалась морфология, физиология и стабильность развития) и на уровне клетки (оценивалась стабильность ядерных структур) (рис. 1).

Степень загрязнения воды тяжелыми металлами определяли в отделе химико-аналитического контроля растениеводческой, пищевой продукции и кормов ФГУ «Станция Агрехимической Службы г. Ульяновска». В 2004-2006 гг. были проведены анализы воды из мест обитания озерной лягушки на содержание тяжелых металлов. В исследуемых образцах определяли общее содержание таких элементов, как медь, свинец, кадмий, цинк, хром, никель. Анализы проводились атомно-абсорбционным методом.

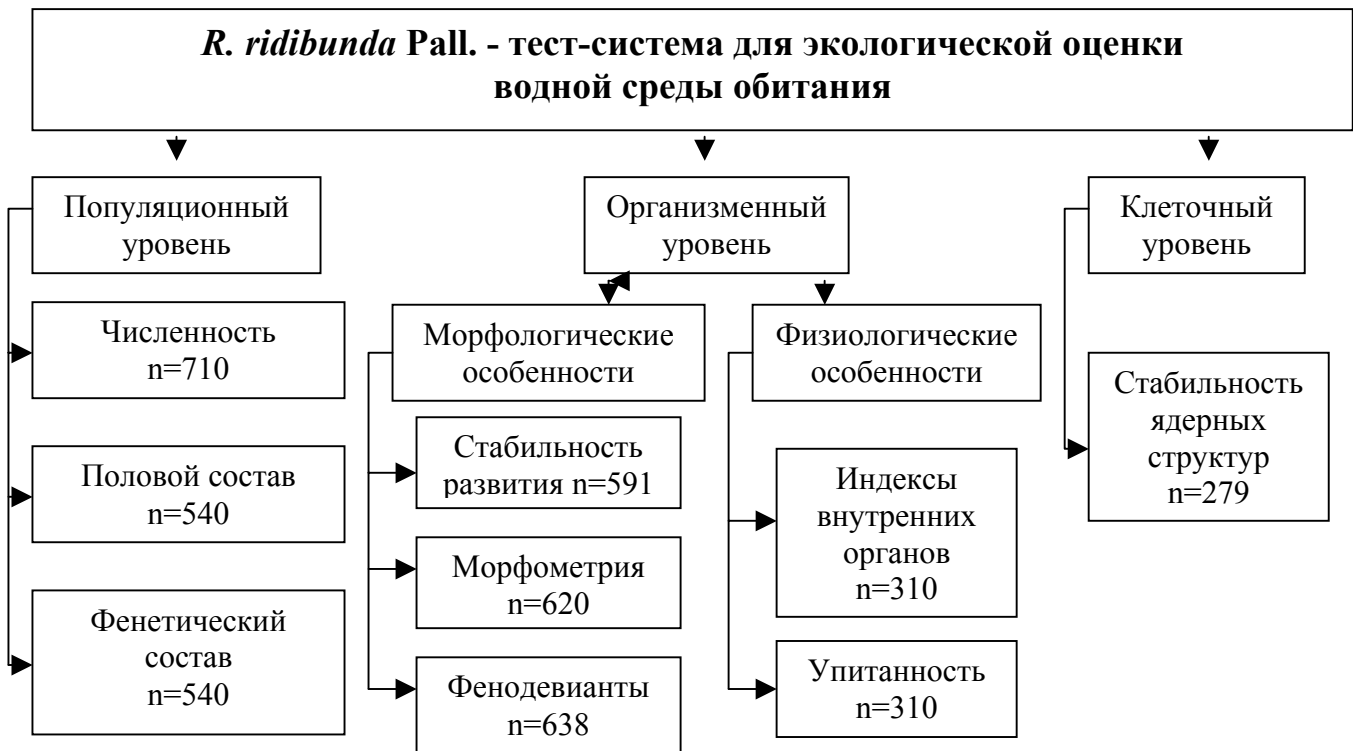


Рис. 2. Направления исследований

Определение видового и количественного состава амфибий проводилось прижизненно по стандартной методике (Кузьмин, 1999; Земноводные..., 2001) на каждые 100 м береговой линии. Половую и фенетическую структуру популяций озерной лягушки анализировали весной без умерщвления животных и изъятия их из мест обитания (Kabisch, 1990). Полиморфизм полученных выборок изучался по соотношению в популяциях морф *striata* – полосатая особь, со светлой дорсомедиальной полосой на спине и *maculata* - пятнистая особь (Жукова, Кубанцев, 1976; Щупак, 1977).

Измерения стандартных морфологических параметров проводилось с помощью штангенциркуля с точностью до 0,1 мм (Определитель земноводных..., 1977). Измерялись 9 показателей по Н.В. Ковылиной (1999). Оценивались средние значения морфологических параметров, коэффициенты вариации. При сравнении средних величин параметров использовался критерий Стьюдента (Sokal, Rohlf, 1981).

Для выявления физиологического состояния амфибий рассчитывали индексы органов (Шварц и др., 1968). С помощью электронных весов определялась масса тела, затем производилось вскрытие и изъятие внутренних органов (сердца, печени, почек, селезёнки), взвешивание их на электронных весах (с точностью до 0,001 г). Индекс упитанности, рассчитывали по Г.В. Никольскому (1974). Все расчеты проводили отдельно для самцов и самок.

Типовая принадлежность аномалий определялась по общепринятым классификациям (Vorikin et al., 1986; Вершинин, 1989; Lada, 1999). Показатель разнообразия типов аномалий ( $\mu$ ) и долю редких типов аномалий ( $h$ ) рассчитывали по Л.А. Животовскому (1982).

Оценку стабильности развития проводили по показателю флуктуирующей асимметрии (Чубинишвили, 1998; 2001). Всего было использовано 13 стандартных признаков. В качестве показателя асимметрии для межпопуляционного сравнения использовалась средняя частота асимметричного проявления на признак (ЧАПП) (Leary et al., 1983; 1984; Чубинишвили, 1998; 2001). Статистическая значимость различий между выборками оценивали по t-критерию Стьюдента (Sokal, Rohlf, 1981). Степень загрязнения водной среды от нормы определяли по нарушению стабильности развития, основанной на флуктуирующей асимметрии, и оценивали по пятибалльной шкале (Чубинишвили, 1998).

Цитогенетический гомеостаз оценивался по микроядерному тесту (Evans et al., 1959). Учёт микроядер производили под микроскопом при увеличении  $\times 1000$ . У каждой особи анализировали по 2000 эритроцитов. При сравнении частот встречаемости клеток с микроядрами использовали t-критерий Стьюдента с  $\phi$ -преобразованием Фишера (Sokal, Rohlf, 1981).

Статистическая обработка полученных данных проводилась при помощи пакета MS Excel 2000 по общепринятым алгоритмам (Ивантер, Коросов, 1992).

### **Глава 3. Результаты исследований**

#### **3.1. Особенности химического состава воды в исследуемых водотоках**

Исследовалось содержание тяжелых металлов в воде р. Свяга, которая относится к сильно загрязненным водотокам, вниз по течению, в 5 точках: с. Спешневка, с. Стоговка, с. Луговое, г. Ульяновск, с. Лаишевка. В качестве фона был выбран экологически чистый водоток - р. Уса, пробы отбирались в 3 точках: с. Елшанка, с. Михайловка, с. Гавриловка. Химический анализ воды показал, что содержание тяжелых металлов в р. Уса было в пределах ПДК.

В р. Свяга содержание тяжелых металлов, во всех районах исследования, многократно превышало ПДК. В поверхностном слое воды р. Свяга наблюдалось превышение ПДК по свинцу: в районе с. Спешневка в 1,5 ПДК, на территории г. Ульяновска в 1,6 ПДК, с. Лаишевка в 1,7 ПДК. В срединном слое воды р. Свяга содержание свинца также было повышено: с. Спешневка (2,5 ПДК), с. Луговое (2,8 ПДК), г. Ульяновск (2,7 ПДК), с. Лаишевка (3,1 ПДК). В придонном слое воды р. Свяга наблюдалось еще более выраженное превышение ПДК по свинцу.

В поверхностном слое воды р. Свяга содержание кадмия составило: с. Спешневка - 6 ПДК, с. Стоговка - 3 ПДК, с. Луговое - 7 ПДК, г. Ульяновск - 6 ПДК, с. Лаишевка - 4 ПДК. Содержание кадмия в срединном слое воды р. Свяга значительно превышало ПДК: около с. Спешневка - в 22 раза (22 ПДК), около с. Стоговка - в 3 раза (3 ПДК), с. Луговое - в 25 раз (25 ПДК), в зоне г. Ульяновска и около с. Лаишевка - в 25-27 раз (25-27 ПДК). Содержание кадмия в придонном слое воды р. Свяга значительно превышало ПДК: около с. Спешневка - 59 ПДК, около с. Стоговка - 36 ПДК, около с. Луговое - 56 ПДК, в зоне г. Ульяновска - 73 ПДК и около с. Лаишевка - 100 ПДК.

Содержание никеля в поверхностном и срединном слоях р. Свяга и во всех слоях р. Уса не превышало предельно допустимой концентрации, в придонном слое р. Свяги около с. Спешневка и с. Луговое содержание никеля составило 2 ПДК, а около с. Лаишевка и на территории г. Ульяновска - 3 ПДК.

Содержание хрома в срединном слое воды р. Свяга около с. Спешневка, с. Луговое, с. Лаишевка и в г. Ульяновске составило 3 ПДК. Содержание хрома в придонном слое воды р. Свяга около с. Стоговка составило 3,5 ПДК, около с. Спешневка – 4,7 ПДК, около с. Луговое – 5,5 ПДК, в зоне г. Ульяновска составило 7,4 ПДК, около с. Лаишевка 9,3 ПДК.

Подводя итог исследованиям, по загрязнению р. Свяга тяжелыми металлами, можно заключить, что на всем течении реки уровни содержания тяжелых металлов во много раз превышает ПДК. Согласно полученным данным, основные загрязнители аккумулируются в придонном слое.

### 3.2. Структура популяций амфибий

#### 3.2.1. Численность амфибий

Структура популяции позволяет оценить степень экологической пластичности популяции и вида в целом (Шварц, 1973). Одним из важнейших оценочных критериев состояния популяции и биологического прогресса или регресса является численность. Численность популяции, по мнению Т.Ю. Песковой (2004), - это интегрирующий показатель, отражающий ее состояние и динамику.

Проведенные исследования показали, что численность популяций озерной лягушки в экологически чистом водотоке (р. Уса) достоверно выше, чем в загрязненном (р. Свяга) ( $p < 0,05$ ) (табл. 1).

Таблица 1

Численность (экз./100 м) популяций озерной лягушки  
(по данным маршрутных учетов)

Пункт выборки	Численность особей на 100 м (n)
р. Уса с. Елшанка	74,86±3,50
р. Уса с. Михайловка	66,43±1,69
р. Уса с. Гавриловка	69,43±3,62
р. Свяга с. Спешневка	44,29±1,73
р. Свяга с. Стоговка	46,57±1,17
р. Свяга с. Луговое	49,0±1,35
р. Свяга г. Ульяновск	22,86±1,26
р. Свяга с. Лаишевка	28,14±1,01

Так, в р. Уса на 100 м маршрута численность популяций озерной лягушки была в 2-3 раза больше, чем в р. Свяга. Согласно данным литературы, прослеживается общая тенденция снижения численности амфибий в загрязненных районах (Брушко, Кириенко, 1993; Ковылина, 1999).

Существует представление об адаптации как процессе, ведущем к сохранению выживаемости, репродукции и подгонке оптимумов под изменившиеся условия среды. При этом выживание и репродукция – цель первого порядка. После того, как она достигнута, организмы начинают преследовать цель второго порядка – оптимизацию приспособительных характеристик до оптимума (Лекавичюс, 1986). Выявленные нами изменения численности амфибий в загрязненном водотоке, свидетельст-



вуют, что адаптация озерной лягушки в р. Свяга находится на стадии достижения цели первого порядка.

В загрязненном водотоке (р. Свяга) все фазы жизненного цикла амфибий от яйца до имаго протекают в среде с существенно измененным химизмом, что ведет к значительным фенетическим изменениям и появлению морфофизиологических адаптаций и, в конечном итоге, формирует измененную популяционную структуру. Поэтому на последующих этапах работы мы изучали другие структурные характеристики популяции.

### 3.2.2. Половая структура популяций

Половой состав – отношение в популяции самцов и самок, теоретически должно быть близким к 1:1. Именно при равной доле самок и самцов в репродуктивной части популяции, формируется более высокий репродуктивный потенциал (Kalmus, Smith, 1960).

По результатам наших исследований, у амфибий загрязненного водотока наблюдалась тенденция изменения половой структуры. В экологически чистом водотоке среди половозрелых животных соотношение полов 1:1, а в загрязненном водотоке это соотношение сдвигалось в сторону самок (1:1,5-4,4) (табл. 2). Это свидетельствует о явном дефиците самцов в популяциях, обитающих в загрязненных водотоках.

Таблица 2

Половое соотношение в популяциях озерной лягушки р. Уса и р. Свяга

Пункт выборки	♂:♀
р. Уса с. Елшанка	1:1,1
р. Уса с. Михайловка	1:1
р. Уса с. Гавриловка	1:1,1
р. Свяга с. Спешневка	1:2,0
р. Свяга с. Стоговка	1:2,0
р. Свяга с. Луговое	1:4,4
р. Свяга г. Ульяновск	1:2,3
р. Свяга с. Лаишевка	1:1,5

По данным литературных источников (Большаков, Кубанцев, 1984; Пескова, 2002), уменьшение числа самок приносит популяции только вред, так как ведет за собой снижение ее репродуктивного потенциала и обеднение ее генетической структуры. По поводу дефицита самцов в литературе существует интересная точка зрения, согласно которой, потеря самцов под влиянием неблагоприятных факторов в определенной степени полезна, так как при этом репродуктивные возможности популяции не страдают или страдают в гораздо меньшей мере, чем при потере самок. В то же время происходит отбор генотипов, стойких к неблагоприятным факторам. Таким образом, обеспечивается микроэволюционный процесс (Пескова, 2002).

Половая структура популяций озерной лягушки может быть использована как маркер загрязнения, который позволяет быстро, надежно, не изымая животных из популяций, проводить биоиндикацию водотоков.

### 3.2.3. Фенетическая структура популяций

Генетическая гетерогенность природных популяций проявляется во внутривидовом полиморфизме. У ряда видов лягушек рода *Rana* встречается так называемая морфа «striata», фенотипически проявляющаяся в виде светлой дорсомедиальной полосы и морфа «maculata» - пятнистая особь (Щупак, 1977). Известно, что у многих видов амфибий, в популяциях наиболее подверженных антропогенному воздействию, возрастает доля морфы striata (Топоркова, 1978, 1985; Вершинин, 1987 б, 1990 а; Гоголева, 1989; Колякин, 1993; Жукова, Кубанцев, 1976; Щупак, Ищенко, 1981). Название и детальное описание этой морфы приведено Е. Шрейбером (Schreiber, 1912). Анализ генетической природы признака свидетельствует о том, что это моногенный мутант. Доминантный аллель диаллельного аутосомного гена – striata определяет наличие полосы (доминирование полное). Такой вариант наследования установлен для *R. arvalis* L. (Щупак, 1977) и *R. rididunda* Pall. Таким образом, striata является хорошим фенетическим маркером, с помощью которого можно изучать фенотипические проявления изменений генетической структуры популяции.

По результатам наших исследований, в загрязненном водотоке – р. Свяга встречаемость морфы striata была достоверно выше, чем в экологически чистом водотоке ( $p < 0,05$ ) (рис. 3).

Таблица 3

Частота встречаемость морфы striata в популяциях *R. ridibunda* Pall.

Район исследований	n	Доля морфы striata (%)	Половое соотношение внутри морфы striata (%)	
			♀	♂
р. Уса с. Елшанка	68	33,8	47,8	52,2
р. Уса с. Михайловка	60	38,3	52,2	47,8
р. Уса с. Гавриловка	72	38,9	53,6	46,4
р. Свяга с. Спешневка	88	52,3	82,6	17,4
р. Свяга с. Стоговка	58	77,6	62,2	37,8
р. Свяга с. Луговое	71	80,3	84,2	15,8
р. Свяга г. Ульяновск	59	64,4	68,4	31,6
р. Свяга с. Лаишевка	64	56,3	52,8	47,2

Встречаемость морфы striata наиболее высока среди *R. rudibunda* Pall. р. Свяга около с. Луговое – 80,3 %, с. Стоговка – 77,6 %, г. Ульяновка – 64,4 % (табл. 3).

Учитывая влияние избирательной элиминации на генетическую структуру популяции (Шварц, 1969, 1980), а также ряд особенностей морфы striata, можно сделать вывод о том, что высокая встречаемость данного фенотипа в загрязненном водотоке Ульяновской области обусловлена рядом преимуществ, которые он получает в этих условиях. Для морфы striata характерен более высокий уровень окислитель-

но-восстановительных процессов, содержание гемоглобина, пониженная натриевая проницаемость и содержание ряда металлов при большей массе тела. Высокая встречаемость морфы *striata* у озёрной лягушки р. Свяга свидетельствует о направленных изменениях в генетической структуре исследуемых популяций в сторону преобладания особей с высоким уровнем обменных процессов. Изменение фенетической структуры популяций амфибий в загрязненном водотоке связано с разной адаптивной ценностью фенотипов, что проявляется в их избирательной смертности.

Таким образом, соотношение фенотипов *striata* и *maculata* в популяциях озерной лягушки может служить удобным признаком для биоиндикации загрязнения.

### **3. 3. Морфологические и морфофизиологические изменения амфибий**

#### **3.3.1. Морфологические показатели амфибий на фоне антропопрессии**

Размеры морфологических признаков формируются в значительной степени под влиянием окружающей среды, и средние величины многих признаков могут служить надежными маркерами происходящих негативных изменений в среде обитания лягушек.

Обитание в загрязненных водотоках обычно связано с изменениями экстерьерных показателей амфибий (длины и массы тела). Результаты наших исследований выявили статистически достоверные различия по ряду морфометрических параметров. Мы исследовали средние значения длины тела, расстояния между барабанными перепонками, максимальных расстояний между основаниями нижних челюстей, расстояния от кончика морды до переднего края глаза, длины бедра, голени, 1-го пальца задней лапки, длины задней лапки и пяточного бугра у лягушек в экологически чистом водотоке (р. Уса) и в загрязненном (р. Свяга).

Было показано, что в загрязненном водотоке амфибии меньше по размерам. Это может быть обусловлено накоплением токсических веществ в их организме, нарушениями метаболизма. Нельзя исключить, что это одна из форм адаптации к средовому стрессу.

Полученные результаты позволяют нам сделать заключение, что средние значения исследованных параметров и коэффициенты вариации длины тела, расстояния от кончика морды до переднего края глаза, длины голени, как самцов, так и самок могут успешно использоваться в целях биоиндикации и оценке экологического неблагополучия.

Для биоиндикации целесообразно использовать, как весь комплекс признаков (самцов и самок), так и отдельные наиболее информативные, поскольку с нарастанием концентрации тяжелых металлов в воде происходит достоверное изменение всех изученных признаков.

#### **3.3.2. Использование индексов внутренних органов в биоиндикационных исследованиях**

В соответствии с концепцией С.С. Шварца (1958, 1980) любое изменение условий жизни прямо или косвенно связано с изменением энергетического баланса организма, что неизбежно приводит к соответствующим морфофункциональным сдвигам.

Мы исходили из предположения, что изменения химизма среды обитания (воды) создает средовой стресс для живых организмов, а токсическое действие тяжелых металлов является дополнительной нагрузкой и изменяет метаболизм. Выживание в неблагоприятных экологических условиях требует дополнительных энергетических затрат на детоксикацию, при этом происходит изменение морфофизиологических показателей.

При исследовании морфофизиологических индексов было обнаружено достоверное превышение индекса сердца амфибий в загрязненном водотоке по сравнению с экологически чистым водотоком ( $p < 0,05$ ) (рис. 2).

Действие загрязняющих факторов водной среды на организм амфибий приводит к мобилизации его защитных функций и ускорению обмена веществ, что в свою очередь обуславливает нагрузку на сердце и вызывает его морфофизиологические перестройки.

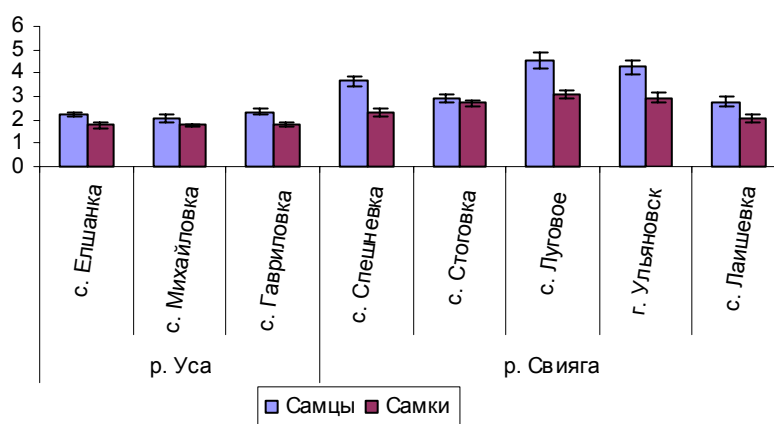


Рис. 2. Индексы сердца самцов и самок в популяциях *R. rudibunda* Pall. р. Уса и р. Свяга

При анализе коэффициентов корреляции индексов сердца самцов была обнаружена связь средней силы между величиной индекса и содержанием свинца, кадмия, никеля и хрома в воде ( $r=0,70$ ). Для самок была характерна сильная связь между величиной индекса сердца и уровнем кадмия ( $r=0,79$ ), связь средней силы по отношению к содержанию свинца, никеля и хрома ( $r=0,75$ ).

Поэтому индекс сердца озерных лягушек может быть эффективно использован для биоиндикации экологического состояния водной среды обитания.

Стандартным критерием, экологического своеобразия популяции является индекс печени. Печень в организме амфибий играет большую роль по детоксикации вредных веществ. Известно, что масса печени изменяется преимущественно за счёт накопления или расходования жиров и углеводов (Ковылина, 1999). Запасов гликогена в печени достаточно лишь на короткий период переживания неблагоприятных условий. При более длительном периоде нагрузки начинают расходоваться жиры. Снижение веса печени сигнализирует о длительном устойчивом воздействии внутренних или внешних неблагоприятных факторов на организм. Печени присуща сезонная изменчивость в связи со сменой характера питания, расходами энергетических запасов на размножение, но при сильном негативном воздействии снижение массы печени выходит за рамки обычной «нормы» (Шварц и др., 1968).

Полученные результаты свидетельствуют, что у амфибий из загрязненного водотока индекс печени был достоверно ниже ( $p < 0,05$ ), чем в популяциях из экологически чистого водотока (рис. 3).

Было установлено наличие отрицательной связи средней силы ( $r = -0,60$ ) между величиной индекса печени самцов и самок и содержанием в воде свинца, кадмия и хрома. По мере увеличения концентрации этих металлов в воде снижается индекс печени.

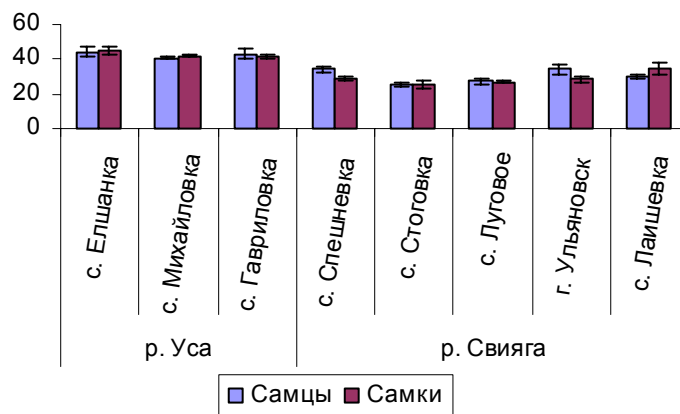


Рис. 3. Индексы печени самцов и самок в популяциях *R. rudibunda* Pall. р. Уса и р. Свяга

Снижение индекса печени у лягушек, обитающих в загрязненных водотоках, скорее всего, связано с повышенными энергетическими затратами, ускоренным расходом гликогена и жиров. В условиях загрязнения восстановление пула гликогена и жиров в печени происходит гораздо медленнее. Полученные результаты позволяют рекомендовать использование индекса печени для оценки экологического состояния водной среды.

По данным литературных источников, индекс почек является индикатором уровня обмена веществ (Шварц и др., 1968).

Определение индекса почек показало, что у амфибий загрязненного водотока он был достоверно выше (рис. 4). При анализе коэффициентов корреляции наблюдалась сильная связь между величиной индексов почек самцов и самок и содержанием свинца и хрома ( $r = 0,80$ ); и связь средней силы по отношению к содержанию никеля в воде ( $r = 0,70$ ). У самок и самцов наблюдалась сильная положительная связь индекса почек и содержанием кадмия в водной среде ( $r = 0,86$ ;  $r = 0,83$  соответственно).

Озерные лягушки из загрязненного водотока имеют меньшие размеры тела, чем амфибии из экологически чистого водотока, а индекс почек обратно пропорционален размерам тела. Высокие величины индексов почек свидетельствуют о возрастании роли данного органа в выведении продуктов метаболизма и токсических соединений. Это может рассматриваться как один из возможных механизмов адаптации к средовому стрессу.

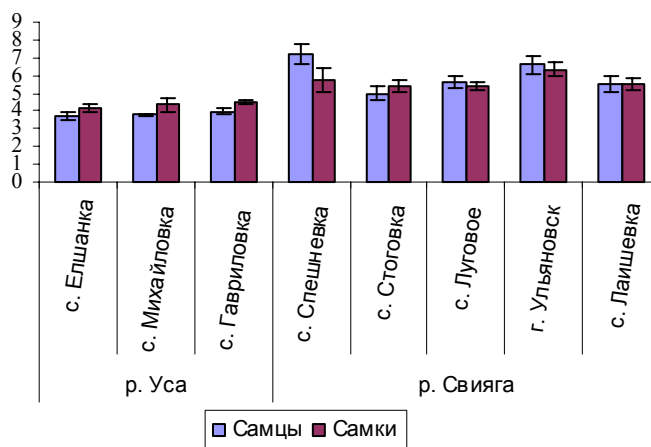


Рис. 4. Индексы почек самцов и самок *R. rudibunda* Pall. р. Уса и р. Свияга

По данным литературы, интенсификация функций органов и тканей под влиянием токсикантов способствует повышению резистентности и выведению ядов из организма (Мисюра, 1989). Нельзя исключить, что выявленные изменения морфофизиологических особенностей почек являются адаптивными приспособлениями и проявлением движущей формы отбора при обитании в загрязненном водотоке.

Наши исследования показали, что индекс почек, как самцов, так и самок, может быть использован в качестве индикатора степени загрязнения водотока.

Селезенка в организме амфибий выполняет функции детоксикации и кроветворения. У животных из загрязненного водотока наблюдалось достоверное снижение относительного веса селезенки ( $p < 0,05$ ).

Анализ морфофизиологических особенностей селезенки у лягушек загрязненных местообитаний выявил ее высокую реактивность. В популяциях озерной лягушки на всех участках р. Свияга наблюдалось статистически достоверное снижение индекса селезенки ( $p < 0,05$ ), по сравнению с величиной этого индекса в популяциях р. Уса (рис. 5). Анализ коэффициентов корреляции индекса селезенки по отношению к тяжелым металлам выявил между ними отрицательную связь средней силы (по свинцу, кадмию и хрому ( $r = -0,65$ )).

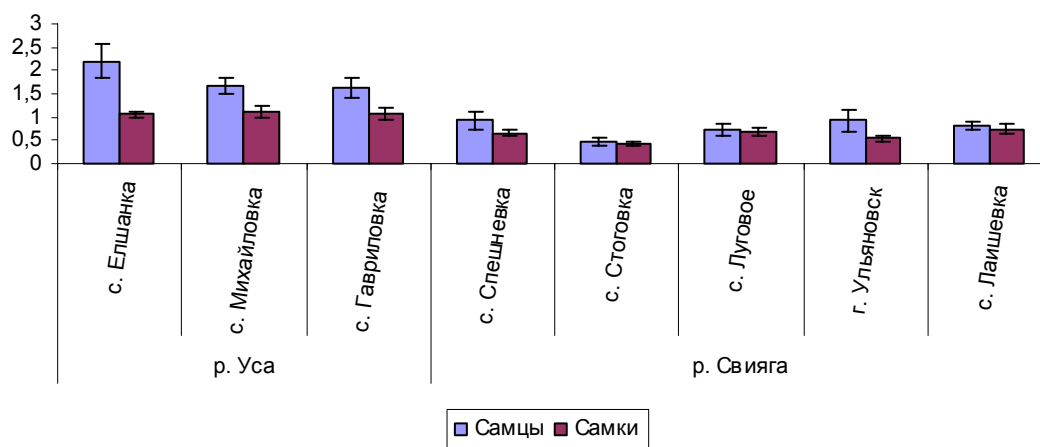


Рис. 5. Величины индексов селезенки самцов и самок *R. rudibunda* Pall. р. Уса и р. Свияга

Сниженные индексы селезенки лягушек из загрязненного водотока, скорее всего, обусловлено угнетением кроветворения. Можно рекомендовать индекс селезенки амфибий, как информативный показатель, для биоиндикации водной среды.

Сравнительные исследования общей упитанности амфибий в экологически чистом водотоке и в условиях загрязнения, показали достоверное снижение этого показателя при повышенном содержании тяжелых металлов в воде (рис. 6). На фоне загрязнения, по данным литературных источников, отмечается истощение организма и снижение его массы (Метелев и др., 1971; Лукьяненко, 1983). Анализ коэффициента корреляции между упитанностью лягушек и содержанием тяжелых металлов в воде, выявил отрицательную связь средней силы между этим показателем и содержанием свинца, кадмия и хрома в воде ( $r=-0,70$ ). Эта тенденция была характерна для самцов и самок.

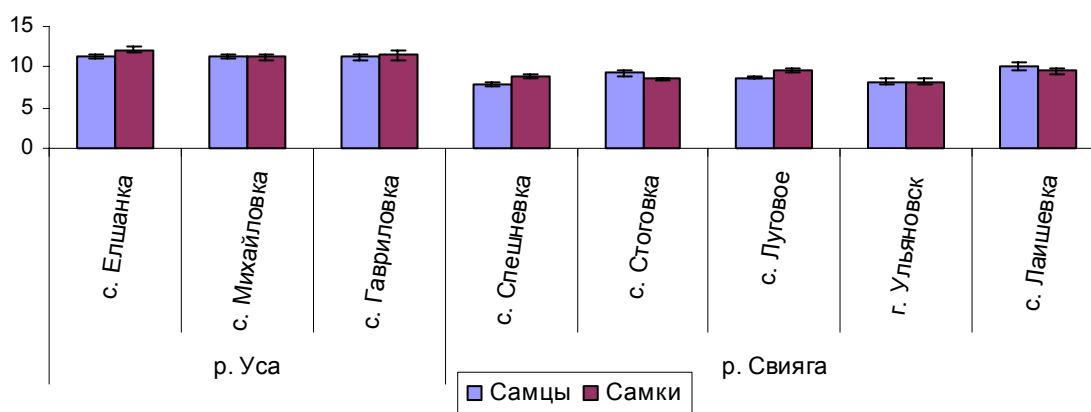


Рис. 6. Упитанность самцов и самок *R. rudibunda* Pall. р. Уса и р. Свяга

По нашему мнению, снижение упитанности озерных лягушек может быть обусловлено преобладанием в популяции особей с высоким уровнем обмена веществ, способных на эффективное выведение из организма экотоксикантов или снижением количества пищевых объектов (насекомых и других беспозвоночных) на территории загрязненного водотока.

Основываясь на концепции С.С. Шварца (1980) о том, что любые дополнительные энергетические затраты ведут к увеличению массы внутренних органов, мы пришли к заключению, что на всех этапах исследований мы наблюдали разные формы проявлений защитных функций организма, которые реализовывались через увеличение индексов сердца, почек и снижение индексов печени и селезенки. Выявленные нами тенденции подтверждали концепцию С.С. Шварца (1980) о дополнительной «энергетической плате» организма в условиях хронического средового стресса.

Полученные нами результаты хорошо согласуются с данными литературных источников, утверждающих, что в условиях средового стресса, адаптивную ценность приобретают перестройки организма, направленные на повышение уровня метаболизма. Это эволюционно отработанный механизм повышения жизнеспособности в ходе преадаптации к неблагоприятным условиям (Моисеенко, 2000). Увеличение массы внутренних органов позволяет организму выдерживать напряжённый энергетический баланс при дополнительных энергетических затратах на детоксикацию. Поэтому все исследованные индексы внутренних органов и упитанность орга-

низма могут быть эффективно использованы для биоиндикации экологического состояния водной среды обитания.

### 3.3.3. Тератогенез популяции

В условиях средового стресса изменяется разнообразие типов аномалий и общая частота aberrаций (Flax, Borkin, 1997; Вершинин, 1990; Замалетдинов, 2000), поэтому разнообразие и частота аномалий может служить показателем степени трансформации природной среды.

В результате проведенных исследований были обнаружены 12 типов морфологических отклонений (по Руцкому, Шведу, 1991; Максимова и др., 2001; Lada, 1999; Замалетдинов, 2003; Файзулин, 2004) с модификациями: экстромелия, полидактилия, эктродактилия, брахидактилия, клинодактилия, гиперплазия, увеличение размеров рудимента, удлинённый палец, циклопия, аномалии зрачка, левосторонний сколиоз, недоразвитие предплечья.

Характеристика общей частоты морфологических аномалий представлена на рис. 7.

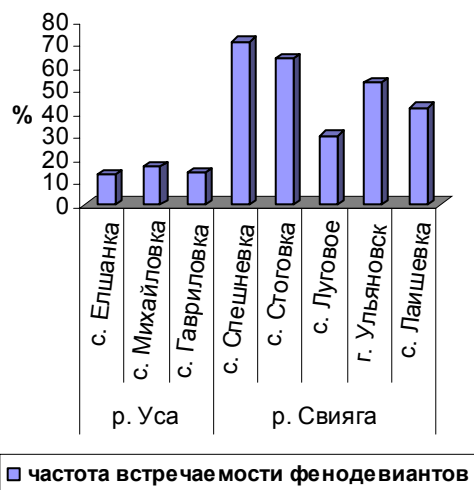


Рис.7. Частота встречаемости фенотипов в популяциях *R. ridibunda* Pall. р. Уса и р. Свияга

Наиболее высокая частота аномалий отмечена в популяциях озерных лягушек, обитающих в р. Свияга. В этих популяциях были обнаружены особи с заболеванием «красных ног», которое вызывается микроорганизмами *Aeromonas hydrophyla* (Carey, 1992; Crawshaw, 1992). Данное заболевание возникает как следствие иммунодепрессии на фоне понижения температуры тела. Эти микроорганизмы атакуют особей с пониженным иммунитетом и резко снижают их выживаемость.

В качестве критериев типового разнообразия аномалий мы использовали показатель внутривидового разнообразия  $h'$  и долю редких фенотипов  $h$ , рекомендованную Л.А. Животовским (1982). Значение параметров разнообразия и доли редких типов аномалий в районах исследования представлены в таблице 4.

Представленные в таблице данные свидетельствуют о том, что типовое разнообразие аномалий максимально в р. Свияга, около с. Спешневка, в зоне г. Ульяновска, около с. Стоговка, Лаишевка, с. Луговое и минимально в р. Уса. При анализе



коэффициентов корреляции среднего числа типов аномалий ( $\mu$ ) была выявлена сильная связь данного параметра с содержанием кадмия ( $r=0,75$ ) и связь средней силы с содержанием свинца, никеля и хрома в воде ( $r=0,60$ ), то есть при увеличении концентрации тяжелых металлов в воде происходит увеличение типового разнообразия аномалий у озерных лягушек.

Таблица 4

Показатели внутривидового разнообразия морфологических аномалий

Популяция	Численность, N	Среднее число типов, $\mu \pm S\mu$	Доля редких фенотипов, $h \pm Sh$
р. Уса с. Елшанка	68	2,890 $\pm$ 0,360	0,518 $\pm$ 0,061
р. Уса с. Михайловка	60	2,924 $\pm$ 0,318	0,415 $\pm$ 0,064
р. Уса с. Гавриловка	72	2,369 $\pm$ 0,232	0,408 $\pm$ 0,058
р. Свяга с. Спешневка	151	12,041 $\pm$ 0,629	0,290 $\pm$ 0,037
р. Свяга с. Стоговка	60	9,120 $\pm$ 0,768	0,298 $\pm$ 0,059
р. Свяга с. Луговое	73	6,150 $\pm$ 0,639	0,441 $\pm$ 0,058
р. Свяга г. Ульяновск	66	9,303 $\pm$ 0,814	0,336 $\pm$ 0,058
р. Свяга с. Лаишевка	88	8,180 $\pm$ 0,669	0,371 $\pm$ 0,052

По нашему мнению, высокая частота и разнообразие типов аномалий может служить показателем хронического средового стресса, обусловленного повышенным содержанием тяжелых металлов в воде. По данным литературы, аномалии - это результат критического нарушения стабильности развития (Захаров и др., 1997).

Частота встречаемости и разнообразие морфологических аномалий может быть высокоэффективно в системах экологического мониторинга.

### 3.4. Стабильность развития

#### 3.4.1. Морфогенетический гомеостаз

Оценка стабильности развития в популяциях озерной лягушки, обитающих в р. Свяга и в р. Уса, дала следующие результаты (рис. 8).

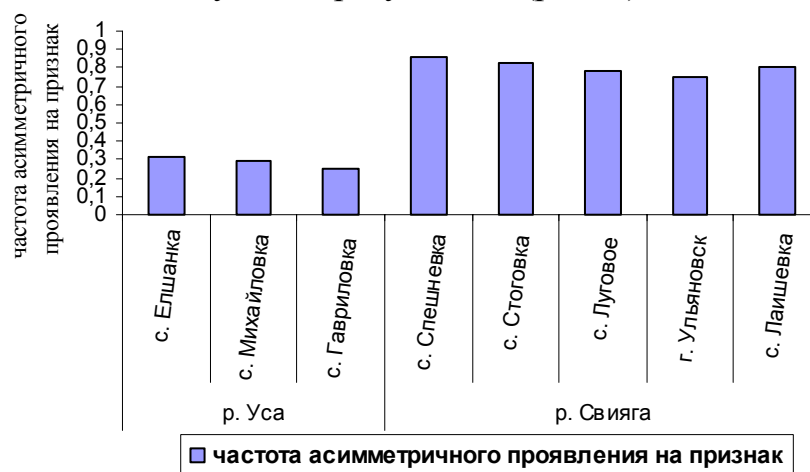


Рис. 8. Показатели морфогенетического гомеостаза в популяциях *R. ridibunda* Pall. р. Уса и р. Свяга

Наибольшие нарушения стабильности развития были обнаружены у озерных лягушек, отловленных в р. Свяга, они характеризуются пятым баллом, что соответствует критическому состоянию организмов. Среди обследованных выборок наиболее благополучными по своему состоянию оказались популяции из экологически чистого района (р. Уса), они характеризовались первым баллом, что соответствовало условно нормальному состоянию.

Значения показателя асимметрии, полученные для выборок из экологически чистых точек (р. Уса с. Елшанка, с. Гавриловка, с. Михайловка), статистически значимо отличались от значений, полученных для лягушек из популяций р. Свяга ( $p < 0,05$ ). При анализе коэффициентов корреляции, между частотой проявления асимметрии и содержанием тяжелых металлов в воде, была выявлена сильная связь в отношении содержания свинца, кадмия ( $r = 0,80$ ), и связь средней силы в отношении содержания никеля и хрома в воде ( $r = 0,70$ ). Показатель флуктуирующей асимметрии также может быть рекомендован для оценки экологического состояния водной среды обитания.

### 3.4.2. Цитогенетический гомеостаз

Для оценки цитогенетического гомеостаза озерной лягушки использовали микроядерный тест, который основан на подсчете эритроцитов с микроядрами.

Микроядерный тест выявил статистически значимые различия между цитогенетическим гомеостазом лягушек, обитающих в р. Уса и в р. Свяга ( $p < 0,05$ ) (рис. 9).

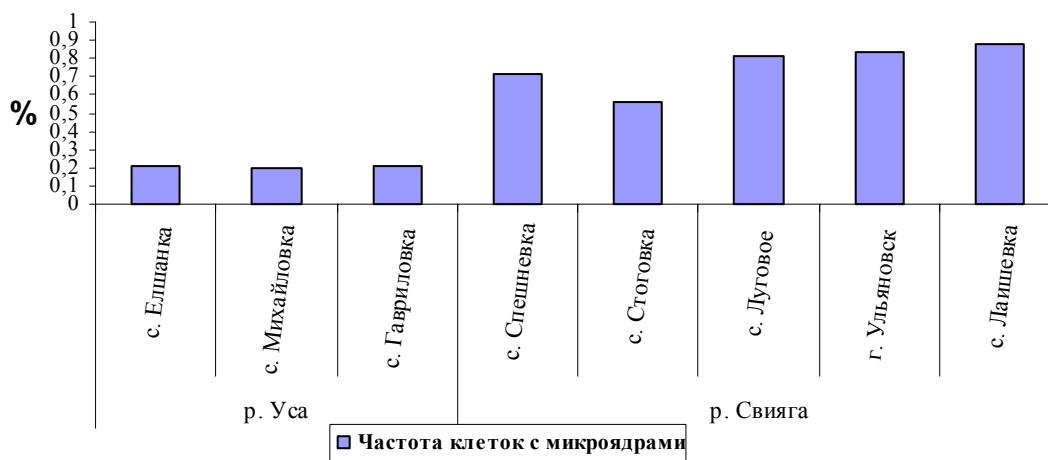


Рис. 9. Частота встречаемости нарушений ядра в популяциях *R. ridibunda* Pall. р. Уса и р. Свяга

У амфибий, обитающих в р. Уса, р. Свяга, были обнаружены клетки, содержащие микроядра. Были выявлены микроядра всех видов (табл. 5).

В клетках периферической крови лягушек, отловленных в р. Свяга и в р. Уса, наиболее часто встречались клетки с микроядрами вида (а), далее по частоте встречаемости были клетки с микроядрами вида (б) и (г-II) (табл. 5).

По мнению Л.Ю. Жулевой и Н.П. Дубинина (1994), наличие в клетках периферической крови озерной лягушки микроядер вида (а) является естественным, тогда как наличие в клетках микроядер других видов является результатом цитогенетического нарушения, произошедшего в организме лягушки под воздействием загрязнителей окружающей среды. При анализе коэффициентов корреляции, между

количеством микроядер типа (а) и содержанием тяжелых металлов в воде, была выявлена линейная зависимость в отношении свинца, кадмия, никеля и хрома ( $r=0,95$ ).

Кроме того, по размерам микроядер можно судить об изменениях, произошедших в хромосомном наборе клеток. Так, появление клеток с крупными микроядрами в основном связано с нарушениями веретена деления, а появление клеток с мелкими микроядрами вызвано преимущественно структурными aberrациями хромосом.

Таблица 5

Доля клеток с микроядрами разных видов у озерных лягушек  
разных мест обитания

Районы исследований	N	Кол-во исследованных клеток		Доля клеток с микроядрами разных видов (%)					
		Всего	Доля с микроядрами, %	а	б	в	г-I	г-II	д
р. Уса с. Елшанка	39	78000	0,206	0,163	0,008	0,015	0,004	0,015	0,001
р. Уса с. Михайловка	37	74000	0,203	0,174	0,004	0	0	0,024	0
р. Уса с. Гаврловка	41	82000	0,209	0,158	0,010	0,017	0,006	0,015	0,002
р. Свяга с. Спешневка	29	58000	0,710	0,417	0,103	0,007	0,050	0,122	0,010
р. Свяга с. Стоговка	27	54000	0,561	0,350	0	0,011	0,033	0,150	0,017
р. Свяга с. Луговое	35	70000	0,814	0,579	0,066	0	0,047	0,097	0,026
р. Свяга г. Ульяновск	37	74000	0,836	0,626	0,035	0,007	0,055	0,093	0,020
р. Свяга с. Лаишевка	34	68000	0,878	0,544	0,146	0,007	0,441	0,116	0,021

По результатам наших исследований, появление микроядер типа «б» имеет линейную зависимость от содержания кадмия ( $r=0,90$ ), имеет сильную связь с содержанием свинца и хрома ( $r=0,84$ ) и связь средней силы с содержанием никеля в воде ( $r=0,70$ ). Наличие микроядр типа «в» свидетельствует о сильной отрицательной связи с содержанием свинца, кадмия, никеля и хрома в воде ( $r=-0,80$ ). Поэтому можно предположить, что образование клеток с микроядрами вида (б) и (в) коррелирует с нарушениями в структуре хромосом. При анализе коэффициентов корреляции микроядер типа (г-I) была выявлена сильная связь с содержанием в воде свинца, кадмия и хрома ( $r=0,84$ ) и связь средней силы с содержанием никеля ( $r=0,62$ ). Появление микроядер типа (г-II) характеризуется связью средней силы с содержанием свинца, кадмия и хрома в воде ( $r=0,63$ ). Наличие микроядер типа (д) связано сильной связью с содержанием свинца, кадмия и хрома ( $r=0,80$ ) и связью средней силы с содержанием никеля ( $r=0,73$ ). Образование клеток с микроядрами вида (г-I), (г-II) и (д) вызвано отставанием расхождения хромосом в мета- или анафазе.

При оценке состояния популяций озерных лягушек цитогенетическими и морфогенетическими методами нами были получены сходные результаты. Наи-

большие нарушения были зафиксированы в популяциях лягушек на всем течении р. Свяги (рис. 10). При анализе коэффициентов корреляции содержания клеток с микроядрами от наличия в воде тяжелых металлов, была выявлена сильная связь, переходящая в линейную зависимость, в отношении свинца, кадмия, хрома и никеля ( $r=0,95$ ).

Применение комплексного подхода, когда состояние организма оценивается не по одному, а по нескольким параметрам (в данном случае по показателям стабильности развития и цитогенетического гомеостаза), позволяет получить более объективную информацию. Следует отметить особенности использованных подходов. Показатели цитогенетического гомеостаза являются отражением физиологической реакции организма на стресс-фактор и при его снятии могут вернуться к норме. Оценка стабильности развития по флуктуирующей асимметрии позволяет судить об условиях, в которых находились животные на ранних стадиях онтогенеза, при формировании изучаемых признаков. Флуктуирующая асимметрия является неспецифической реакцией организма на разовое или хроническое стресс-воздействие.

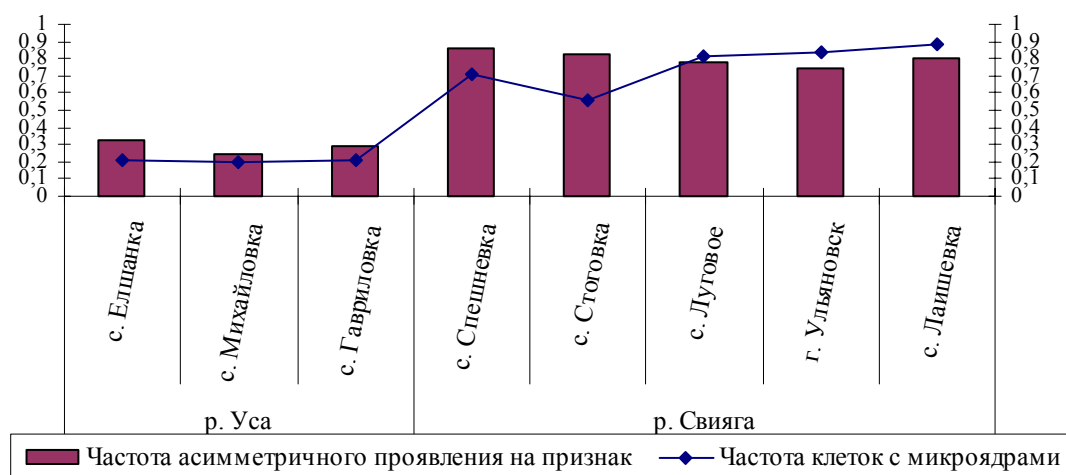


Рис. 10. Сравнение показателей морфогенетического и цитогенетического гомеостаза *R. ridibunda* Pall.

Показатель флуктуирующей асимметрии отражает морфогенетический гомеостаз. Микроядерный тест, помимо оценки мутагенной активности, дает возможность судить об уровне цитогенетического гомеостаза. Синхронность изменений обоих этих показателей свидетельствует о том, что каждый из них характеризует общий гомеостаз организма. Это позволяет предположить, что первичная оценка состояния популяции может быть получена при использовании каждого из указанных тестов при экологическом мониторинге.

В заключении, всесторонне обсуждаются результаты исследований, их теоретическая и практическая значимость. Высокий уровень тяжелых металлов в водной среде приводит к повышенной смертности, морфофизиологическим и цитогенетическим нарушениям амфибий. Изменяются индексы органов, морфометрические показатели и популяционная структура вида. Адаптивные изменения обеспечивают выживаемость амфибий в неблагоприятных условиях и являются первичным материалом микроэволюционного процесса, а патологические изменения свидетельствуют о биологическом и морфофизиологическом регрессе вида.

## Выводы

1. Разработана тест-система биоиндикации экологического состояния водоемов и водотоков с использованием бесхвостых амфибий.
2. Тест-система основана на популяционных, морфофизиологических и цитогенетических параметрах амфибий, чувствительных к изменению среды обитания и включает: изменение структурных характеристик популяций, показателей стабильности развития и морфофизиологических параметров.
3. В водотоках, загрязненных тяжелыми металлами, численность популяций бесхвостых амфибий снижается в 2 раза, половое соотношение смещается в сторону самок и составляет 2:1.
4. В популяциях *R. ridibunda* Pall., в норме, доля морфы *striata* не превышает  $24,7 \pm 1,7$  %. В популяциях, обитающих в среде, загрязненной тяжелыми металлами доля морфы *striata*, возрастает до  $44,4 \pm 3,7\%$  ( $p < 0,05$ ).
5. У половозрелых особей *R. ridibunda* Pall., обитающих в водотоках, загрязненных тяжелыми металлами, достоверно уменьшены размеры тела, увеличены индексы сердца и почек, снижены индекс печени, селезенки и общей упитанности ( $p < 0,05$ ).
6. Высокие значения коэффициентов корреляции между содержанием тяжелых металлов и: уменьшением размеров тела ( $r = -0,86$ ); увеличением индексов сердца и почек ( $r = 0,75$ ); снижением индекса печени ( $r = -0,60$ ), селезенки ( $r = -0,60$ ), упитанности ( $r = -0,60$ ) озерной лягушки свидетельствуют, что выявленные морфофизиологические изменения вызваны загрязнением среды обитания тяжелыми металлами.
7. В среде с повышенным содержанием свинца и кадмия, расширяется типовое разнообразие фенотипов и возрастает доля их носителей с  $14,6 \pm 1,07$  до  $51,88 \pm 7,29$  % ( $p < 0,05$ ).
8. Цитогенетический гомеостаз озерной лягушки является высокоинформативным показателем экологического благополучия водной среды обитания; между нарушением цитогенетического гомеостаза и загрязнением вод тяжелыми металлами существует сильная положительная связь ( $r = 0,95$ ).

## Практические предложения

Для оперативной первичной биоиндикации экологического состояния водоемов и водотоков целесообразно использовать популяционные характеристики бесхвостых амфибий: соотношение самцов и самок, доля морфы *striata* и оценка флуктуирующей асимметрии.

Для расширенной, углубленной оценки экологического состояния водоемов и водотоков может быть рекомендован весь комплекс апробированных популяционных, организменных и цитологических характеристик, чувствительных к загрязнителям среды обитания. Этот комплекс включает (помимо характеристик для первичной биоиндикации) также: вариации морфометрических параметров, индексы внутренних органов и упитанности, выявление спектра фенотипических отклонений, оценку цитогенетического гомеостаза по уровню стабильности ядерных структур.

Высокая частота встречаемости и широкое разнообразие фенотипических отклонений может быть рекомендовано в качестве индикаторов загрязнения водоемов и водотоков тяжелыми металлами.

Разработанная тест система биоиндикации может быть использована в системах оперативного экологического мониторинга и для экологического прогнозирования развития ситуации.

Полученные результаты могут рассматриваться как базовые для дальнейших экологических исследований водоемов и водотоков Ульяновской области.

Результаты исследований могут быть рекомендованы для использования в учебном процессе при подготовке специалистов экологического профиля.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Спирина Е.В. Биоиндикация качества окружающей среды / Е.В. Спирина // Всероссийский конкурс инновационных проектов «Живые системы». – Киров: Вятский государственный университет, 2005. – С. 267-268.
2. Спирина Е.В. Встречаемость морфы *Striata* у озерной лягушки / Е.В. Спирина, О.А. Индирякова // Водохозяйственный комплекс России: состояние, проблемы, перспективы. – Пенза: ПГСХА, 2005. – С. 138-141.
3. Спирина Е.В. Амфибии как биоиндикаторы качества окружающей среды Ульяновской области / Е.В. Спирина, О.А. Индирякова // Природноресурсный потенциал, экология и устойчивое развитие регионов России. - Пенза: ПГСХА, 2006. – С. 208-211.
4. Спирина Е.В. Влияние тяжелых металлов на индексы внутренних органов / Е.В. Спирина // Проблемы биологии, экологии и образования: история и современность. – СПб.: ЛГУ, 2006 г. – С. 217-219.
5. Спирина Е.В. Морфологические аномалии у бесхвостых амфибий / Е.В. Спирина // Тезисы докладов XIII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006», серия «Биология» (12-15 апреля, г. Москва). – М.: МГУ, 2006. – С. 215-216.
6. Романова Е.М. Морфологические адаптации амфибий под влиянием загрязнения / Е.М. Романова, Е.В. Спирина // Ученые записки Ульяновского государ-

ственного университета. Серия Биология / Под ред. В.Ф. Сыча. – Ульяновск: УлГУ, 2006. – Выпуск 1 (10). – С. 54-56.

7. Романова Е.М. Оценка состояния природных популяций озерной лягушки (*R. ridibunda* Pall.) в Ульяновской области / Е.М. Романова, О.А. Индирякова, Е.В. Спирина // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. – Пенза: ПГУ, 2006. – №5 (26). - С. 259-266.

Подписано в печать \_\_\_\_\_. Формат 60x84/16.  
Гарнитура Times New Roman. Усл. печ. л. 2,0.  
Тираж 100 экз. Заказ № \_\_\_\_\_

Отпечатано с оригинал-макета в типографии  
Ульяновского государственного университета  
432000, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42