

УДК 594.38:574.64:57.017.64:546.47

С. Н. ШЕВЦОВА, С. Е. ДРОМАШКО

## ВОЗДЕЙСТВИЕ АЦЕТАТА ЦИНКА НА ЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ И РОСТ МОЛОДИ БОЛЬШОГО ПРУДОВИКА (*LYMNAEA STAGNALIS*)

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, e-mail: Shevtsova308@gmail.com

(Поступила в редакцию 24.10.2013)

**Введение.** Наряду со многими стойкими органическими загрязнителями соли тяжелых металлов (ТМ) являются приоритетными консервативными поллютантами пресных вод [1, 2]. В практике мониторинга и биотестирования водной среды используются организмы различной таксономической принадлежности – от бактерий до млекопитающих. При этом брюхоногие моллюски находят все более широкое применение в процедурах оценки качества пресных вод [3–5]. Многие аспекты воздействия ТМ и других антропогенных загрязнителей на пресноводных моллюсков изучены недостаточно, тогда как применение этих беспозвоночных в практике биотестирования оправдано не только благодаря методической простоте, но и экономической выгоде [6, 7]. В данной статье приведены результаты воздействия относительно низких концентраций ацетата цинка на течение эмбриогенеза, эффективность выклева и рост молоди вторично-водного моллюска большого прудовика (*Lymnaea stagnalis* L.).

**Объекты и методы исследования.** Во всех экспериментах был использован цинк уксуснокислый двухводный  $Zn(CH_3COO)_2 \times 2H_2O$  с маркировкой «Ч». С учетом соответствующих вычислений был составлен протокол приготовления маточного раствора ацетата цинка, который получали путем растворения навески соли в дистиллированной воде. Рабочие растворы с заданными концентрациями цинка: 0 (контроль); 0,1, 0,5 и 1 мг/л получали путем разведения предварительно рассчитанных объемов маточного раствора уксуснокислого цинка в отстоявшейся в течение суток водопроводной воде. Расчетные концентрации цинка, использованные в экспериментах, были выбраны с ориентиром на предельно допустимую концентрацию (ПДК) данного ТМ [8].

**Эксперимент 1.** С целью оценки воздействия концентраций цинка (0 (контроль), 0,1, 0,5 и 1 мг/л) на зародышевое развитие и выклев *L. stagnalis* мы использовали кладки, полученные от особей большого прудовика лабораторного разведения. С помощью пластиковой ложки со стенок аквариумов собирали практически одновременно отложенные кладки и исследовали с помощью бинокулярной лупы «МБС-9» на наличие дефектных зародышевых капсул (ЗК), имеющих аномальное строение либо содержащих погибший эмбрион. Перед началом эксперимента все использованные ЗК содержали только живые зародыши на стадии 2–4 бластомеров. От хвостового и головного концов каждой кладки, помещенной на предметное стекло, удаляли скальпелем участок длиной около 3 мм, так как эти области отличаются наибольшей фоновой частотой аномалий, согласно литературным данным [9]. В процессе декапсулирования кладок (т. е. освобождения ЗК от синкапсульной оболочки) ЗК случайным образом расформировывали на четыре экспериментальные группы: «Контроль», «0,1 мг/л Zn», «0,5 мг/л Zn» и «1 мг/л Zn». При этом каждую из групп помещали в стеклянный бюкс емкостью 50 мл, содержащий 15 мл воды или водного раствора цинка. Отстоявшуюся в течение суток водопроводную воду использовали в качестве среды для инкубации контрольных групп. Яйцевые капсулы инкубировали в затененном месте при комнатной температуре и естественном освещении. Каждые 2-е сутки водную среду обновляли. Анализ течения эмбрионального развития проводили на 4, 6 и 8-е сут-

ки в первой и на 5, 7 и 9-е сутки инкубации во второй повторности с помощью микроскопа проходящего света «Olympus BH-2», учитывая частоту отстающих в развитии и погибших эмбрионов, а также мальформаций (МФ). Основным критерием учета эмбриональной гибели служила фрагментация зародыша, а также (со стадии трохофоры до выклева) полная остановка движения внутри ЗК. В составе класса МФ учитывали живых зародышей, которые вращались внутри ЗК и имели видимые нарушения формирования органов и тканей.

При визуальной идентификации стадий эмбрионального развития *L. stagnalis* мы применяли морфофизиологические критерии и терминологию В.Н. Мещерякова [9]. Учет нарушений развития проводили с ориентацией на следующие стадии эмбриогенеза (в порядке от начальных к поздним): поздняя гастрולה → ранняя трохофора → средняя трохофора → поздняя трохофора → ранний велигер → средний велигер → поздний велигер → великонха → переход на ножное движение → стадия вылупливания → собственно выклев.

Например, во второй повторности на 7-е сутки инкубации зародыши с нормальным развитием (максимально быстрым по сравнению с темпами развития прочих эмбрионов) находились на стадии позднего велигера. Зародыши на этапах среднего и раннего велигера учитывались как отстающие в развитии на одну и две стадии эмбриогенеза соответственно. Аналогичным образом анализировали нарушения развития *L. stagnalis* на остальных этапах оценки эмбриогенеза.

Оценку выклева молоди проводили в три этапа: на 13, 15 и 17-е сутки в первой и на 14, 16 и 18-е сутки во второй повторности.

*Эксперименты 2 и 3.* В целях верификации и уточнения данных по влиянию цинка на выклев молоди, полученных в эксперименте 1, мы провели два дополнительных опыта – эксперименты 2 и 3, оба в двух повторностях. Для этого практически одновременно отложенные кладки с эмбрионами на стадии дробления, предварительно исследованные с помощью бинокулярной лупы «МБС-9» на наличие дефектных ЗК, помещали на предметное стекло и разрезали скальпелем вдоль на 2 части. Одну из половинок каждой кладки помещали в отстоявшуюся в течение суток водопроводную воду (контроль), другую – в свежеприготовленный водный раствор ацетата цинка (опытная группа). Условия инкубации яйцевых капсул описаны в подразделе «Эксперимент 1» и в таблице. По окончании инкубации эффективность выклева оценивали в 2–3 этапа.

#### Краткая характеристика условий экспериментов по оценке влияния цинка на выклев и рост молоди *L. stagnalis*

Концентрация цинка, мг/л	Количество использованных кладок, экз.	$t_{\text{cp}}$ воды, °С	Период проведения опыта
<i>Эксперимент 2, повторность 1</i>			
0,05	8	21–23	Апрель 2013
<i>Эксперимент 2, повторность 2</i>			
0,05	8	23–25	Май 2013
<i>Эксперимент 3, повторность 1</i>			
0,1	11	21–23	Апрель 2013
<i>Эксперимент 3, повторность 2</i>			
0,1	9	25–27	Июнь 2013
<i>Эксперимент 4, повторности 1–3</i>			
0,05	6	23–25	Май 2013
<i>Эксперимент 4, повторности 4–6</i>			
0,05	6	24–26	Май 2013
<i>Эксперимент 5, повторности 1–3</i>			
0,1	6	25–27	Июнь 2013

*Эксперименты 4 и 5.* Воздействие 0,05 и 0,1 мг/л цинка на большого прудовика от стадии дробления зиготы до 14-суточного возраста молоди оценивали по итогам экспериментов 4 и 5. Процедура отбора, подготовки кладок и инкубации ЗК в экспериментах 4 и 5 полностью идентична таковой для экспериментов 2 и 3. Выклюнувшуюся молодь моллюсков рассаживали с помощью рисовальной кисти №3 в лабораторные стаканы емкостью 1 л (содержащие чистую воду

и растворы с заданными концентрациями цинка) и далее на протяжении 14 сут культивировали в лабораторных условиях в затененном месте, обновляя водную среду каждые 2-е сутки и задавая с избытком корм – листья салата. Эксперимент 4 проведен в шести, эксперимент 5 – в трех параллельных повторностях. Дополнительные условия инкубации указаны в таблице.

*Эксперимент 6.* Данный эксперимент был проведен в двух параллельных повторностях с целью оценки влияния 0,1; 0,5 и 1 мг/л цинка в течение 14 сут на выклюнувшуюся молодь *L. stagnalis* в возрасте 0–6 ч.

В течение эмбриогенеза кладки инкубировали в отстоявшейся водопроводной воде в лабораторных условиях, в затененном месте, обновляя воду каждые 2-е сутки. Процедура рассадки и дальнейшей инкубации в течение 14 сут идентична таковой для экспериментов 4 и 5. Среднесуточная температура водной среды составляла 24–26 °С.

По окончании экспериментов 4, 5 и 6 сырую массу каждой особи определяли с помощью электронных весов «AND» с ценой деления 0,1 мг.

Статистическую обработку данных проводили по общепринятым методикам [10]. Оценка достоверности различий опытных групп с контролем по сырой массе тела проводили по *t*-критерию (критерию Стьюдента) с учетом разнородности экспериментальных групп по дисперсии с помощью приложения «MS Excel 2003». Критерии достоверности различий между долями (процентами) применяли для оценки влияния цинка на частоту отставаний в развитии, МФ, эмбриональной гибели, а также на выклев молоди *L. stagnalis* [10].

**Результаты и их обсуждение.** *Эксперимент 1.* По итогам эксперимента 1 установлена значительная токсичность наивысших заданных концентраций цинка для зародышей моллюска [11]. На 4-е сутки в группе «0,5 мг/л Zn» первой повторности было зарегистрировано достоверное возрастание частоты отставаний в развитии и МФ. Во второй повторности на 5-е сутки отмечено достоверное увеличение доли отставаний в развитии ( $p < 0,01$ ) в результате влияния 0,5 мг/л цинка. По окончании 6-х суток в первой повторности для группы «0,5 мг/л Zn» зарегистрировано достоверное увеличение частоты эмбриональной гибели и МФ. В группе «0,5 мг/л Zn» второй повторности на 7-е сутки установлено достоверное возрастание частоты МФ и эмбриональной гибели (рис. 1, а, б). На 8-е и 9-е сутки при влиянии 0,5 мг/л цинка в первой и второй повторности соответственно отмечено достоверное возрастание эмбриональной гибели и частоты МФ (рис. 1, в, з).

На 4-е сутки в группе «1 мг/л Zn» первой повторности выявлено существенное увеличение частоты отставаний в развитии, МФ и эмбриональной гибели ( $p < 0,001$ ). На 6-е и 8-е сутки в результате воздействия 1 мг/л цинка эмбриональная гибель в первой повторности значительно возросла по сравнению с контролем (рис. 1, а, в). Для группы «1 мг/л Zn» второй повторности на 5-е сутки отмечено достоверное увеличение эмбриональной гибели и отставаний в развитии на две и три стадии эмбриогенеза. На 7-е и 9-е сутки под влиянием 1 мг/л цинка во второй повторности отмечено существенное возрастание доли МФ и эмбриональной гибели (рис. 1, б, з). При этом полученные результаты свидетельствуют о постепенном накоплении повреждений у зародышей при увеличении длительности воздействия 1 мг/л цинка: на 7-е и 9-е сутки во второй повторности эмбриональная гибель составила 45 и 66 % соответственно, в первой повторности – 47 и 69 % на 6-е и 8-е сутки соответственно.

Выклев составлял около 80 % и был практически одинаковым для контроля и групп «0,1 мг/л Zn» на 17-е сутки в первой и на 18-е сутки во второй повторности соответственно. К окончанию экспозиции во второй повторности в группе «0,5 мг/л Zn» не наблюдалось выклева, а в первой повторности вылупилось около 10 % (рис. 1, д, е). Полученные данные указывают на высокую степень чувствительности эмбрионов большого прудовика к воздействию ацетата цинка, так как при концентрации испытуемого ТМ, соответствующей 0,5 ПДК, наблюдалось существенное возрастание эмбриональной гибели и выраженное угнетение выклева.

В целом полученные результаты указывают на выраженную дозовую и временную зависимость эмбриотоксичности ацетата цинка и согласуются с результатами других исследований. Так, у эмбрионов *Marisa cornuarietis* существенная задержка формирования щупалец и снижение темпов выклева наблюдались при влиянии 0,2 мг/л и 1 мг/л цинка соответственно [12].

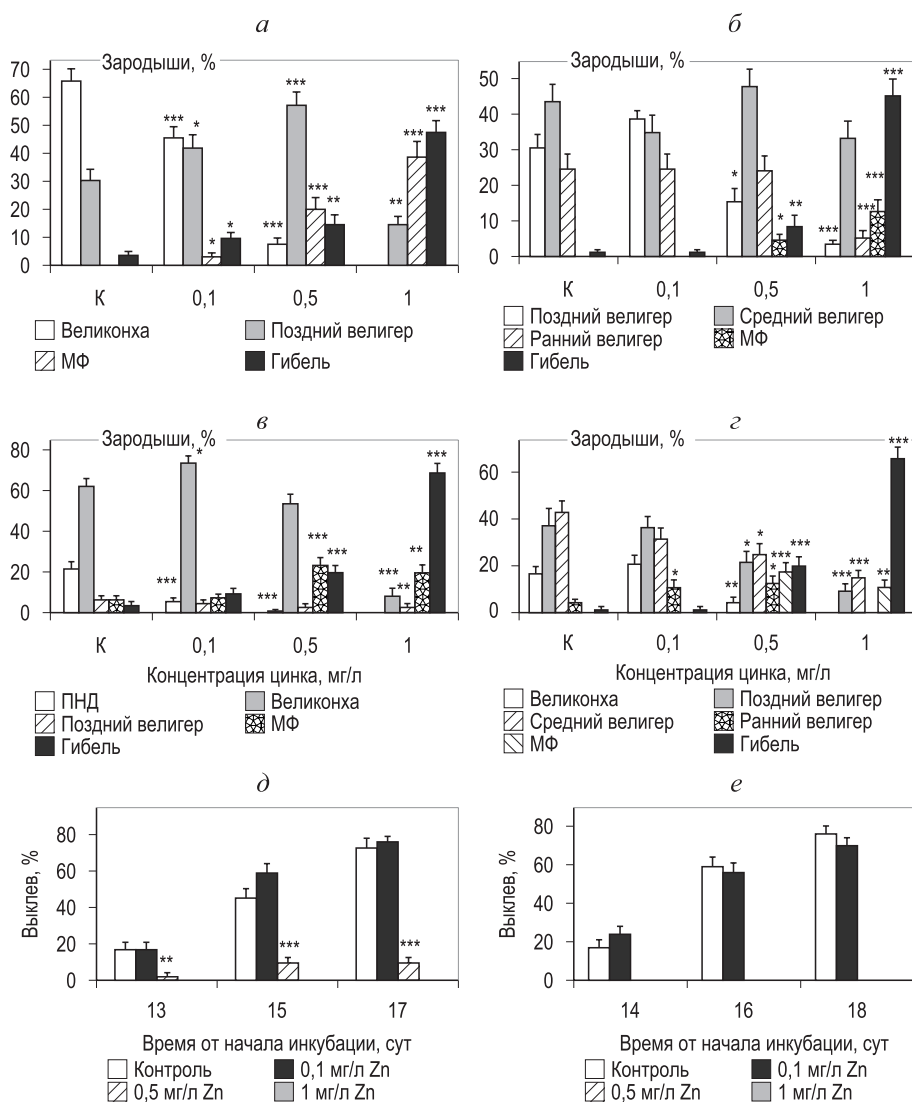


Рис. 1. Аномалии эмбриогенеза *L. stagnalis* под влиянием 0,1; 0,5 и 1 мг/л цинка: а, в – через 6 и 8 сут соответственно (повторность 1), б, з – через 7 и 9 сут инкубации соответственно (повторность 2), д, е – выклев молоди в первой и второй повторностях. К – контроль. Относительные величины приведены как  $M \pm SE$ . Достоверность различий с контролем: \*  $-p < 0,05$ ; \*\*  $-p < 0,01$ ; \*\*\*  $-p < 0,001$ , то же для рис. 2–4

Значительное возрастание частоты нарушений эмбриогенеза отмечалось у пресноводных двустворчатых моллюсков в результате воздействия 0,0027 мг/л цинка [13].

**Эксперименты 2 и 3.** Данные, полученные в экспериментах 2 и 3, свидетельствуют об отсутствии выраженного негативного влияния 0,05 и 0,1 мг/л цинка на эффективность выклева улиток. В первой повторности отмечен достоверный стимулирующий эффект 0,05 мг/л цинка на выклев, тогда как в повторности 2, напротив, наблюдалось статистически достоверное угнетение вылупливания моллюсков (рис. 2, а, б). Результаты начальных этапов оценки эффективности выклева молоди в обеих повторностях эксперимента 3 указывают на достоверное снижение успешности вылупливания под воздействием 0,1 мг/л цинка (рис. 2, в, з). Вместе с тем результаты последующих этапов анализа успешности выклева свидетельствуют об угнетающем влиянии 0,1 мг/л цинка в первой повторности и о нивелировании негативного воздействия указанной концентрации цинка во второй повторности.

В целом по итогам экспериментов 1, 2 и 3 можно сделать заключение об отсутствии существенного воздействия цинка в концентрации 0,05–0,1 мг/л (или 0,05–0,1 ПДК) на эффективность выклева *L. stagnalis*.

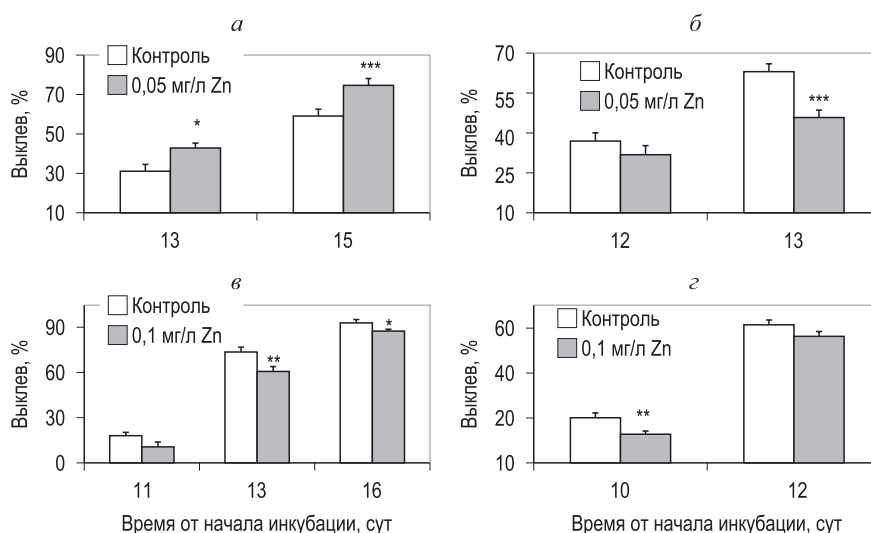


Рис. 2. Изменение выклева *L. stagnalis* при воздействии 0,05 и 0,1 мг/л цинка от стадии дробления зиготы до появления молоди: а, б – влияние 0,05 мг/л цинка на выклев в двух повторностях эксперимента 2, в, г – влияние 0,1 мг/л цинка на выклев в двух повторностях эксперимента 3

*Эксперименты 4 и 5.* Результаты эксперимента 4 позволили выявить достоверное угнетение роста молоди моллюсков в четырех (1, 2, 4 и 6-й) повторностях из шести под влиянием 0,05 мг/л цинка (рис. 3, а). Среднее значение сырой массы тела в третьей и пятой повторностях было также ниже соответствующего показателя в контроле, но без статистической достоверности, что указывает на возможность угнетения роста молоди большого прудовика в результате воздействия 0,05 мг/л цинка в течение эмбрионального развития и двух недель после выклева.

По итогам эксперимента 5 установлено статистически достоверное отставание в росте ювенильных особей *L. stagnalis* по сравнению с контролем во всех повторностях при воздействии 0,1 мг/л цинка (рис. 3, б).

Полученные данные в целом подтверждают установленную ранее способность цинка негативно влиять на рост молоди моллюсков. Например, при воздействии 0,25–0,95 мг/л цинка наблюдалось существенное снижение темпов роста морского брюхоногого моллюска *H. diversicolor supertexta* [14]. Наши результаты также подтверждают временную и дозовую зависимость токсичности ацетата цинка по отношению к зародышам и молоди: концентрация цинка, соответствующая 0,1 ПДК, не оказала негативного воздействия на выклев молоди, однако впоследствии существенно угнетала рост вылупившихся особей *L. stagnalis*.

*Эксперимент 6.* Данные, полученные в обеих повторностях эксперимента 6, свидетельствуют о выраженном негативном влиянии заданных концентраций цинка на рост молоди *L. stagnalis*: по сырой массе тела были отмечены достоверные различия с контролем у групп «0,5 мг/л Zn»

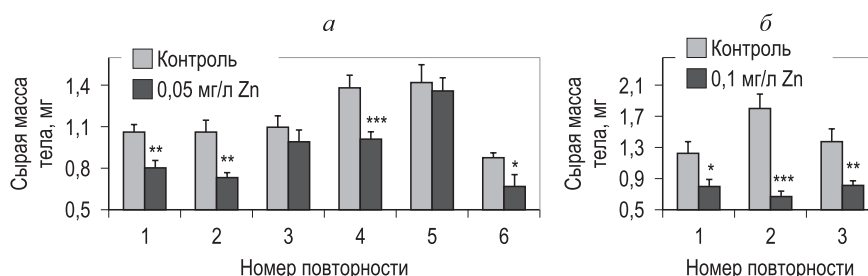


Рис. 3. Изменение сырой массы тела *L. stagnalis* при влиянии 0,05 и 0,1 мг/л цинка от стадии дробления зиготы до 14-суточного возраста молоди: а – влияние цинка на рост молоди в шести повторностях эксперимента 4, б – влияние цинка на рост молоди в трех повторностях эксперимента 5



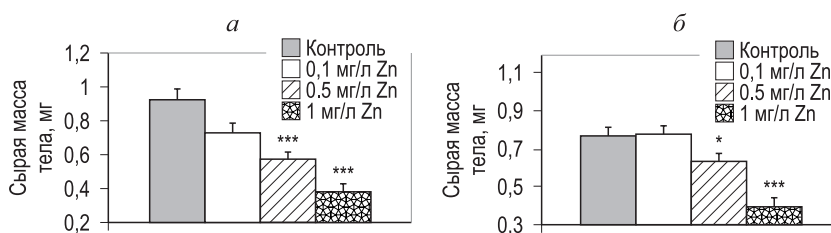


Рис. 4. Изменение сырой массы тела *L. stagnalis* в первой (а) и второй (б) повторностях эксперимента 6 при влиянии 0,1 – 1 мг/л цинка от выклева до двухнедельного возраста молоди

и «1 мг/л Zn» (рис. 4). Для групп «0,1 мг/л Zn» обеих повторностей не было обнаружено достоверных различий с контролем по сырой массе тела моллюсков, что указывает на отсутствие негативного воздействия цинка в данной концентрации на рост молоди.

Отметим, что в экспериментах 4 и 5, где воздействие 0,05 и 0,1 мг/л цинка продолжалось от стадии дробления до двухнедельного возраста молоди, установлено достоверное отставание в росте по сравнению с контролем (рис. 3, б). Вместе с тем в эксперименте 6 было выявлено отсутствие угнетения роста ювенильных особей *L. stagnalis* под влиянием 0,1 мг/л цинка (рис. 4). Полученные данные указывают на выраженную временную и дозовую зависимость токсичности ацетата цинка для большого прудовика.

Очевидно, что зародыши и молодь большого прудовика характеризуются схожей степенью чувствительности к воздействию цинка: достоверное возрастание частоты МФ и эмбриональной гибели были отмечены нами при 0,5 и 1 мг/л цинка (рис. 1, в, г, д, е), а существенное угнетение роста молоди наблюдалось в результате 14-суточного влияния цинка в этих же концентрациях (рис. 4).

**Заключение.** Проведенные эксперименты позволили установить, что цинк в концентрации 0,5–1 мг/л оказывает выраженное токсическое действие на зародыши *L. stagnalis*, обуславливая достоверное увеличение эмбриональной гибели и угнетение выклева. При воздействии 0,05–0,1 цинка на зародышевые капсулы со стадии дробления зиготы до двухнедельного возраста показано отсутствие значительного влияния на эффективность выклева, а также наличие достоверного эффекта угнетения роста молоди. Установлено достоверное снижение темпов роста особей *L. stagnalis* при воздействии 0,5–1 мг/л цинка на выклюнувшуюся молодь в течение 14 сут. Показано, что токсические эффекты уксуснокислого цинка на большого прудовика отличаются выраженной дозовой и временной зависимостью. Эмбрионы и молодь *L. stagnalis* характеризуются сопоставимой и относительно высокой степенью чувствительности к воздействию ацетата цинка. Результаты экспериментов свидетельствуют о перспективности применения таких критериев, как снижение эффективности выклева и темпов роста молоди большого прудовика при биотестировании металлосодержащих отходов.

## Литература

1. Трахтенберг И. М., Колесников В. С., Луковенко В. П. Тяжелые металлы во внешней среде: современные гигиенические и токсикологические аспекты. Мн., 1994.
2. Калинин М. Ю., Пахомов А. В. Оценка состояния водных ресурсов бассейнов рек Западная Двина и Неман в Республике Беларусь / Республиканское унитарное предприятие «Центральный научно-исследовательский институт комплексного использования водных ресурсов». Мн., 2008.
3. Sieratowicz A., Stange D., Schulte-Oehlmann U., Oehlmann J. // Environ Pollut. 2011. Vol. 159, № 10. P. 2766–2774.
4. Ansaldo M., Nahabedian D. E., Di Fonzo C., Wider E. A. // Sci Total Environ. 2009. Vol. 407, № 6. P. 1923–1928.
5. El Gawad S. // Internation J Zool Res. 2009. Vol. 5, № 3. P. 115–125.
6. Salánki J., Farkas A., Kamardina T., Rózsa K. S. // Toxicol Lett. 2003. Vol. 140–141. P. 403–410.
7. Ducrot V., Cognat C., Mons R., Mouthon J. et al. // Chemosphere. 2006. Vol. 62, № 8. P. 1272–1281.
8. Гигиенические нормативы 2.1.5.10-21-2003 // Сб. гигиенических нормативов по разделу коммунальной гигиены. Мн., 2004. С. 38–75.
9. Мецержков В. Н. Объекты биологии развития. М., 1975.
10. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. Мн., 1973.

11. Шевцова С.Н. // Экология человека и проблемы окружающей среды в постчернобыльский период: Материалы Междунар. науч. конф. молодых ученых, аспирантов, магистрантов, студентов. Минск, 11–12 ноября 2010 г. Мн., 2011. С. 98–99.
12. Sawasdee B., Kohler H.R. // Chemosphere. 2009. Vol. 75, № 11. P. 1539–1547.
13. Wang N., Ingersoll C. G., Ivey C. D., Hardesty D. K. // Environ Toxicol Chem. 2010. Vol. 29, № 9. P. 2053–2063.
14. Tsai J. W., Chou Y. H., Chen B. C., Liang H. M. et al. // Bull Environ Contam Toxicol. 2004. Vol. 72, № 1. P. 70–77.

S. N. SHEVTSOVA, S. E. DROMASHKO

## ZINC ACETATE IMPACTS ON THE EMBRYONIC DEVELOPMENT AND ON THE GROWTH OF JUVENILE POND SNAIL (*LYMNAEA STAGNALIS*)

### Summary

The impacts of 0.1; 0.5 and 1 mg/L Zn<sup>2+</sup> exposure on freshwater mollusk *L. stagnalis* embryonic development and hatching success were investigated. It was found that developmental delays, malformations and embryonic mortality frequencies had increased in a dose-dependent manner as a result of zinc exposure.

As a result of 0.05–0.1 mg/L Zn<sup>2+</sup> exposure on the freshwater pond snail for the period from division stage of embryonic development to the 2-week age of juvenile specimens there was shown no hatching success inhibition, but the growth rate had decreased significantly. It was revealed that the growth rate of new hatchlings had decreased significantly as a result of 0.5–1 mg/L Zn<sup>2+</sup> exposure for 2 weeks. The experiment results revealed a high zinc sensitivity of *L. stagnalis* embryos and hatchlings, and expediency of using such criteria as hatching success and the juvenile growth rate for metal-containing sewage biotesting.