

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ПОЛІСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет лісового господарства та екології
Кафедра біоресурсів, аквакультури та природничих наук

Кваліфікаційна робота
на правах рукопису

Ковальчук Олег Ігорович

УДК 574.64:594.38

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
МОНІТОРИНГ ТОКСИЧНОГО ВПЛИВУ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ
НА РЕПРОДУКЦІЮ МОЛЮСКІВ

Спеціальність 207 – Водні біоресурси та аквакультура

Подається на здобуття освітнього ступеня Магістр

Науково-професійна робота містить результати власних досліджень.
Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на
відповідне джерело.

Науковий керівник
Пінкіна Т.В.
канд.біол. наук, доцент

Житомир-2021

АНОТАЦІЯ

Ковальчук О.І. «Моніторинг токсичного впливу іонів важких металів на репродукцію молюсків» – Кваліфікаційна робота на правах рукопису.

Кваліфікаційна робота на здобуття освітнього ступеня магістра за спеціальністю 207 – Водні біоресурси та аквакультура. – Поліський національний університет, Житомир, 2021.

У кваліфікаційній роботі розглянуто питання особливостей репродукційних процесів *Lymnaea stagnalis* за дії важких металів водного середовища. Визначено поведінкові реакції ставковика озерного в період розмноження (від парування до відкладання синкапсул і народження ювенільних особин), які є чутливими до середовища, затруєного досліджуваними токсикантами. Встановлено тривалість парувань молюсків і частоту їх здійснення. У хронічному досліді проведено визначення порушень структурної організації кладок ставковиків, вивчено фізіологію формування синкапсул з особливостями характерної для них будови та обчислено відсоток частоти появи тератогенних порушень в розчинах з різними концентраціями іонів важких металів. У токсикологічному експерименті встановлено, що у порівнянні з дорослими молюсками, ембріональні стадії розвитку та ювенільні особини виявляють значно більшу чутливість до інтоксикації важкими металами. Темпи народження та кількісні характеристики вилуплення ювенільних особин *Lymnaea stagnalis* мають значні відмінності за впливу поллютантів різного ступеня токсичності.

Ключові слова: ставковик озерний, важкі метали, токсичність, репродукція, синкапсула, тератогенні порушення, розвиток.

ANNOTATION

Kovalchuk O.I. Monitoring of the heavy metal ions toxic effects on mollusk reproduction. - Qualification work on the rights of the manuscript.

Qualification work for the master's degree in specialty 207– Bioresources and aquaculture. – Polissia National University, Zhytomyr, 2021.

The peculiarities of reproductive processes of *Lymnaea stagnalis* under the heavy metals of the aquatic environment impact is the scope of the present qualification work. The behavioral reactions of the great pond snail during the breeding season (from mating to the deposition of synapse capsules and the birth of juveniles), which are sensitive to the environment poisoned by the studied toxicants, were determined. The duration and frequency of mollusk mating have been found out. We determined the violations of the structural organization of ponds, studied the physiology of synapse capsules with features of their characteristic structure and calculated the percentage of teratogenic disorders in solutions with different concentrations of heavy metal ions under the chronic experiment. It was found in the toxicological experiment that embryonic stages of development and juveniles are much more sensitive to heavy metal intoxication in comparison with adult mollusks. *Lymnaea stagnalis* juveniles birth rate and quantitative characteristics of hatching are significantly different under the influence of pollutants with varying degrees of toxicity.

Key words: great pond snail, heavy metals, toxicity, reproduction, cincapsule, teratogenic disturbance, evolution.

ЗМІСТ

| | |
|---|----|
| ВСТУП..... | 5 |
| Розділ 1. ВАЖКІ МЕТАЛИ У ПОВЕРХНЕВИХ ВОДАХ УКРАЇНИ ТА ЇХ ВПЛИВ НА ГІДРОБІОНТІВ (ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД) | 9 |
| 1.1. Біологічний моніторинг забруднення поверхневих вод та методи їх біотестування..... | 9 |
| 1.2. Особливості репродукції ставковика озерного (<i>Lymnaea stagnalis</i>) у нормі та за впливу токсикантів..... | 10 |
| 1.3. Чутливість ембріонів та ювенільних особин до впливу токсикантів | 13 |
| Розділ 2. МАТЕРІАЛ І МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ..... | 14 |
| 2.1. Програма проведення досліджень..... | 14 |
| 2.2. Матеріал і методика досліджень..... | 15 |
| 2.3. Характеристика умов проведення досліджень..... | 19 |
| Розділ 3. МОНІТОРИНГ РОЗМНОЖЕННЯ ТА РОЗВИТКУ СТАВКОВИКА ОЗЕРНОГО ЗА ВПЛИВУ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ..... | 21 |
| 3.1. Особливості копуляції ставковика озерного в токсичному середовищі..... | 22 |
| 3.2. Процес яйцекладки та особливості будови кладок ставковика озерного в токсичному середовищі | 25 |
| 3.3. Аномалії у будові кладок за інтоксикації..... | 32 |
| 3.4. Тривалість ембріогенезу та вилуплення ювенільних особин за впливу іонів важких металів..... | 36 |
| ВИСНОВКИ..... | 41 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ..... | 42 |
| ДОДАТКИ..... | 47 |
| Додаток А. Біологічні характеристики <i>L. stagnalis</i> за перебування у середовищі, що містить іони важких металів..... | 47 |

ВСТУП

Актуальність теми. Загострення екологічної ситуації через нераціональне природокористування призводить до надходження забруднюючих речовин у поверхневі та підземні води. На разі відмічається зростання антропогенного навантаження на гідросферу. Серед численних забруднювачів континентальних водойм України зараз одне з провідних місць належить важким металам. Їх концентрація у поверхневих водах України зростає із року в рік, і досить часто перевищує середній гідрохімічний показник цих речовин. Саме це визначило актуальність вивчення впливу підвищених концентрацій іонів важких металів на водні екосистеми.

Зазвичай, контроль якості вод проводять фізичними та хімічними методами. Проте, ці методи досить часто є технічно складними і потребують спеціального устаткування. Окрім цього, загальноприйнята система оцінки гранично допустимих концентрацій (ГДК) токсичних речовин допускає те, що ці токсиканти є нешкідливими у малих концентраціях. Враховуючи кумулятивну здатність важких металів, це не завжди так. Тому актуальним питанням є оцінити небезпеку забруднення внутрішніх вод України іонами важких металів із застосуванням біоіндикації. Це дозволить отримати додаткову інформацію про стан водного середовища і доповнить існуючі інструментальні методи дослідження.

На разі гостро стоїть проблема проведення екологічного нормування вмісту забруднюючих речовин у водних екосистемах та біологічного моніторингу стану навколишнього середовища і виникає потреба в отриманні для вод єдиних, інтегрованих ГДК. Це спонукає пошук чутливих до сприймання токсичної дії та досить репрезентативних видів-моніторів. Пошук тест-реакцій організмів є також актуальним. Вони мають швидко і чітко вказувати на присутність полютанту у оточуючому середовищі. Більшість безхребетних водних тварин є більш чутливими за хребетних до

токсичного впливу, тому для наших досліджень ми обрали водних легеневих молюсків. Розмноження і розвиток гідробіонтів є найбільш ефективними показниками, за допомогою яких можна розробити експрес-методи визначення речовин, що негативно впливають на водні гідроценози. Проте вплив важких металів на ембріональні та ювенільні стадії розвитку гідробіонтів вивчені недостатньо.

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – з'ясувати закономірності дії іонів важких металів водного середовища на особливості репродуктивних процесів та розвиток ставковика озерного (*Lymnaea stagnalis*).

Для досягнення цієї мети потрібно було вирішити наступні задачі:

- виявити етологічні особливості *L. stagnalis* в репродукційний період за перебування в середовищі, яке затруєне іонами важких металів;
- дослідити фізіологію формування синкапсул, особливості їх будови та частоту появи вад розвитку за дії токсикантів;
- виявити наявність відмінностей у кількісних характеристиках вилуплення молоді та темпах народжуваності *L. stagnalis* у розчинах з різними концентраціями Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} водного середовища.

Об'єкт дослідження – ставковик озерний як індикаторний організм визначення забруднення вод важкими металами.

Предмет дослідження – реакції репродуктивної системи *L. stagnalis* на різні рівні інтоксикації Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} .

Методи дослідження – фізичні, біологічні, хімічні, статистичні. Фізичні методи застосовано для встановлення вагових та лінійних параметрів біологічного об'єкту. Біологічні методи включали: мікроскопування – щоби вивчити деталі будови синкапсул молюсків, аномалії будови кладок та розміри яйцевих капсул, синкапсул і новонароджених молюсків. Хімічні методи застосовано для підготовки розчинів іонів важких металів різних концентрацій (метод розведення) та при встановленні гідрохімічних

показників середовища досліджень. Статистичними методами оброблені результати вимірювань із застосуванням прийомів базової та багатовимірної варіаційної статистики (оцінка достовірності, дисперсії, середніх значень, апроксимація отриманих результатів).

Наукова новизна одержаних результатів. Наукова новизна роботи полягає в тому, що тут вперше:

- проведено комплексні дослідження щодо зміни біологічних характеристик *L. stagnalis* у залежності від ступеня забруднення середовища важкими металами (Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+}), з різним рівнем токсичності;

- досліджено зміни статевої поведінки ставковиків, особливості будови кладок, темпи яйцекладки, кількісні зміни вилуплення ювенільних особин за впливу іонів важких металів у залежності від тривалості дії та рівнів токсичності середовища;

- здійснено аналіз причин появи аномалій в синкапсулах молюсків та вад у розвитку ембріонів у середовищі з токсикантами.

Практичне значення отриманих результатів. Отримані нами дані стосовно біологічних характеристик *L. stagnalis* у залежності від ступеня забруднення водного середовища важкими металами дають змогу:

- враховувати вплив Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} на процеси відтворення гідробіонтів у водоймах, які мають антропогенне забруднення;

- обґрунтовувати прогноз тих змін, яких зазнають природні угруповання за дії забруднювачів;

- застосовувати ставковика озерного у якості біоіндикатора для визначення ступеня забрудненості водойм важкими металами.

Особистий внесок здобувача. Автор опанував методи вирішення головних завдань кваліфікаційної роботи і розробив стратегію наукового експерименту; здійснив бібліографічний пошук за темою дослідження; збирав матеріал для досліджень; поставив і провів досліди по вивченню впливу іонів важких металів водного середовища на біологічні

характеристики ставковика озерного; цифрові результати проведених експериментів оброблено загальноприйнятими методами варіаційної статистики; провів аналіз та оформлення одержаних у дослідженнях результатів, їх узагальнення та сформулював висновки.

Публікації за темою роботи:

1. Ковальчук О. І. Особливості росту та розвитку ювенільних особин молюсків в токсичному середовищі. Екологія. Наука. Практика-2021 : мат. XVII-ї Всеукр. наук.-практ. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених. (21 травня 2021 року, м. Житомир). Житомир, 2021. С. 17-18.

2. Пінкіна Т.В., Ковальчук О. І. Особливості репродукції ставковика озерного за впливу токсикантів. Студентські наукові читання – 2021: мат. Всеукраїнської наук.-практ. конф. присвяченої I туру Всеукр. конкурсу студ. наук. робіт (25 січня 2021 року, м. Житомир). Житомир, 2021. С.30.

3. Пінкіна Т.В., Ковальчук О. І. Визначення ступеня подібності впливу важких металів на молюсків. IV Всеукр. наук.-практ. конф. «Водні та наземні екосистеми та збереження їх біорізноманіття - 2021» : зб. наук праць. С. 19-22.

Апробація результатів роботи. Результати роботи були оприлюднені на XVII-й Всеукр. наук.-практ. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених «Екологія. Наука. Практика-2021» (м. Житомир) та на конкурсі студентських наукових робіт з біологічного напрямку (м. Житомир).

РОЗДІЛ 1

ВАЖКІ МЕТАЛИ У ПОВЕРХНЕВИХ ВОДАХ УКРАЇНИ ТА ЇХ ВПЛИВ НА ГІДРОБІОНТІВ (ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД)

1.1. Біомоніторинг забруднення поверхневих вод та методи їх біотестування

Наразі проблема проведення біологічного моніторингу стану навколишнього середовища набула гостроти [7, 14, 29]. Санітарно-гігієнічні нормативи є менш жорсткими, ніж екологічні [8] і можуть бути вищими [16], оскільки останні визначають людину найбільш чутливим компонентом біоти. Проте, певні біологічні види є більш чутливими до окремих токсикантів, аніж людина. Тому, головним напрямком водної токсикології є вивчення закономірностей впливу забруднюючих речовин на гідробіонтів, та їх угруповання аби регламентувати контроль забруднення [2, 27].

Загальновідомо, що у відповідності з гідрологічним та гідрохімічним станом водойми гідробіонтами формується якість води. Система рибогосподарських ГДК, яка діє у наш час, скерована на охорону водойм від опосередкованого та прямого шкідливого впливу [17]. Така система ГДК допускає, що токсикант у малих концентраціях нешкідливий [26, 28], що, зокрема, у випадку з кумуляцією іонів важких металів, не завжди є дійсним [23, 24].

На жаль, далеко не всі забруднюючі речовини та сполуки можуть бути виявлені у пробах води традиційними хімічними методами, оскільки токсиканти часто мають низькі концентрації, за великої їх кількості. І, оскільки, можливість аналітичних методів контролю обмежена, постає необхідним оцінювати потенційну біологічну небезпеку забруднення природних вод. Цьому слугує токсикологічний контроль з використанням методів біотестування [27].

При проведенні біотестування біологічний об'єкт (тест-об'єкт) застосовується як певний датчик щоб оцінити токсичність речовин, які забруднюють водне середовище. Біомоніторинг зазвичай не дасть відповідь на запитання, якою є точна концентрація забруднювача, проте дає уявлення стосовно рівнів забруднення та його наслідків.

У разі проведення еколого-токсикологічного моніторингу досить складно вибрати серед багатьох видів організмів найбільш досить чутливих та репрезентативних [10]. У якості біотестів застосовуються різноманітні представники гідробіонтів [2, 9]. Досить часто в токсикологічних дослідженнях використовують і двостулкових, і черевоногих молюсків [11]. Широке застосування як індикаторний організм знайшов черевоногий молюск ставковик озерний [13, 25], який складає значну частину біофонду найпоширеніших компонентів гідробіоценозів Українського Полісся.

Практикуючи біотести застосовують досить широкий набір фізіологічних реакцій, котрі характеризують життєдіяльність організмів (тест-об'єктів) за їхньої взаємодії із токсичними речовинами. Експериментальні дослідження вказують на те, що розмноження та розвиток водних тварин є досить чутливими показниками, з допомогою яких розробляються експрес-методи для визначення речовин, які негативно впливають на водні екосистеми. Дослідження впливу багатьох токсичних речовин на виживання та розвиток дафній, молюсків (ставковик великий) і риб також вказують, що ранні стадії тварин є найбільш чутливими до інтоксикації.

1.2. Особливості репродукції ставковика озерного (*Lymnaea stagnalis*) у нормі та за впливу токсикантів

Дослідження процесів, які пов'язані з розмноженням ставковиків, передбачає, насамперед, вивчення різних сторін їхньої життєдіяльності і в природі, і за лабораторних умов [19], тому що ці молюски через їх широке розповсюдження у водоймах України, численність, легкість вилову та

утримання у лабораторії є досить зручними об'єктами для різноманітних токсикологічних досліджень.

Хірургічним експериментальним шляхом дослідили процеси, які відбуваються у репродуктивній системі легеневих молюсків (*Lymnaea stagnalis*) після парування та ту роль, котру відіграє самоzapлiднення у цього виду тварин. Перші кладки відмічали у 80-90-денних ставковиків [6]. Встановлено, що період настання статевої зрілості молюсків залежить від температурних умов середовища. За оптимальної температури – вони найменші. Температурний фактор впливає також на відтворення, ріст та виживання молюсків [35].

Популяціям *L. stagnalis* притаманний дворічний життєвий цикл з розмноженням кожен рік – з травня по серпень. Пік репродукції спостерігається в середині червня. На ріст та відтворення молюсків впливає щільність їх посадки. Плідність ставковиків подавляється за максимальної щільності, і чим щільність є вищою, тим статева поведінка інгібуються сильніше. Спостерігається пряма кореляція між ступенем виживання та зниженням щільності посадки. Аналогічні результати мали місце у тих лабораторних дослідженнях, де мали за мету порівняти відтворювальну здатність при парному та поодинокому утриманні легеневих молюсків, зокрема, і ставковика озерного.

Кладки яєць *L. stagnalis* – синкапсули – являють собою слизові видовжені мішечки із більш чи менш багаточисельними яйцевими капсулами заключеними всередині кладки [3, 6]. Відкладання поодиноких капсул у нормі не спостерігається. Процес яйцекладки ставковика озерного складається з кількох етапів: 1) формування яйцевих капсул всередині кладки; 2) формування основних структурних компонентів синкапсули; 3) овіпозиції – це розташування кладки на субстраті.

Прісноводні молюски є досить чутливими до хімічного складу оточуючого їх середовища. Інтенсивність відкладання яйцевих капсул суттєво знижується при утриманні ставковиків у замкнутих неочищуваних

акваріумах. За умови перенесення тварин із брудної води у чисту більш як 90% ставковиків впродовж 3 год відкладають яйцеві капсули.

Відмічено, що молюски, котрі знаходяться в критичних умовах, починають розмноження раніше і при цьому прикладають для нього значно більше зусиль, ніж особини, котрі знаходяться в сприятливих умовах для існування. Однією з реакцій на вплив малих концентрацій поллютантів є зміна ритмічності ембріонального та постембріонального розвитку, а також зміни в амплітуді коливання чисельності їхнього потомства. Зазначається, що необхідно вивчати токсичний вплив забруднювачів за малих концентрацій у хронічному експерименті [21].

Встановлена фазність у реагуванні статевої системи молюсків на різні рівні інтоксикації у чисельних гострих та хронічних токсикологічних дослідах. У розчинах гостролетальних концентрацій тварини зовсім не розмножуються і досить швидко гинуть. За дії хронічних летальних концентрацій спостерігають невелику плідність і невисоку тривалість життя [22, 38]. За сублетальних концентрацій токсикантів має місце стимуляція репродуктивної функції тварин. Вона характеризується підвищенням виживання особин у розчинах токсикантів цих концентрацій порівняно з контролем [35]. Ступінь репродукції молюсків тримається на рівні контролю або є вищим за нього, що призводить до зростання числа відкладених синкапсул і загальної кількості яйцевих капсул в них. На ембріональній стадії розвитку означене явище стимуляції йде по низці показників: збільшення числа синкапсул, котрі починають розвиток, і синкапсул, які розвиваються аж до вилуплення; збільшення кількості ювенільних особин ставковиків, котрі вилупляються. Це призводить до різкого зростання народжуваності молоді [30]. Таку стимуляцію слід розглядати як порушення реакцій молюсків на зміну зовнішніх умов, а не як позитивне явище (підвищення відсотку виживання та зростання кількості потомства). Репродуктивна система ніби то має здатність протидіяти токсичному впливу. Резистентність ювенільних та дорослих форм до дії більшості токсичних речовин є

однаковою: в розчинах токсикантів у молюсків відсутнє пристосування і йдуть процеси порушення їх гаметогенезу [5].

Таким чином, молюски, серед великої групи гідробіонтів, виявляють досить високу чутливість до впливу різних поллютантів і можуть використовуватися як тест-об'єкти при біомоніторингу. Проте, даних про дію важких металів на репродукцію молюсків надзвичайно мало.

1.3. Чутливість ембріонів та ювенільних особин до впливу токсикантів

Відомо, що хімічні реагенти мають потенційну ембріотоксичну та тератогенну дію. У ембріонів гідробіонтів під час досліджень, які проведені на різних об'єктах, за умови аналізу різних біологічних показників, не виявлено пристосування до дії токсичних речовин. І навіть, якщо має місце тимчасове звикання, в решті-решт інтоксикація призводить до зрушення регуляції обмінних процесів молюсків. За тривалого впливу високих концентрацій іонів важких металів у піддослідних тварин мають місце різноманітні вади їх розвитку та спотворення у ембріонів [15].

До впливу важких металів більш чутливими є зародки та ювенільні особини у порівнянні з дорослими особинами. За умови проведення тривалих токсикологічних досліджень з ембріонами водних тварин, через їх надзвичайну чутливість до токсичного впливу, рекомендовано застосовувати проточну воду.

Ефект “різноманітності росту” найбільш яскраво виражений у тварин, що знаходяться у несприятливих умовах. Під цим терміном розуміють різницю у кількісних характеристиках росту та розмноження особин з однієї кладки. При збільшенні концентрацій важких металів у середовищі мають місце затримка росту і лінійне скорочення приросту молоді. За високих концентрацій токсикантів (гостролетальні) ріст ювенільних особин молюсків може зовсім зупинитися. Експериментально встановлено [20], що інтоксикація викликає зниження стійкості у ембріонів гідробіонтів за такими показниками як лінійно-вагові, виживання, чисельність.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Програма проведення досліджень

У відповідності до поставленої мети досліджень та з ціллю вирішення поставлених у кваліфікаційній роботі задач програма досліджень передбачала наступне:

- проведення бібліографічного пошуку з приводу висвітлення проблеми, яка досліджується, в літературних джерелах та обґрунтування обраного напрямку досліджень;
- розробку календарного плану проведення досліджень та опанування методик їх проведення;
- опанування методики збирання, транспортування до лабораторії та визначення видової приналежності молюсків;
- засвоєння методик аклімації об'єкту досліджень до лабораторних умов та акваріумного утримання молюсків;
- опанування методики В. А. Алексєєва з проведення токсикологічних дослідів;
- постановку хронічного досліді (70 діб) для визначення основних біологічних показників ставковика озерного (частоти парувань, тривалості копуляції, довжини синкапсул, довжини яйцевих капсул, кількості відкладених синкапсул у капсулі, кількості вилуплених екземплярів, тривалості ембріогенезу);
- статистичну обробку отриманих у експерименті результатів та формулювання висновків.

2.2. Матеріал і методика досліджень

Матеріал. Дуже зручними об'єктами для токсикологічних досліджень є черевоногі легеневі молюски [25, 33]. Серед них ми обрали черевоногого молюска ставковика озерного *Lymnaea stagnalis* (Linné, 1758) – найбільш звичайного представника гідрофауни Центрального (Житомирського) Полісся. На вибір вплинуло те, що, на разі, цей молюск легко відловлюється і є зручним об'єктом для постановки експериментів. Дослідження виконані з кінця травня по липень 2020-2021 рр. Відбирали однорозмірних ставковиків (середня висота мушлі – $39,5 \pm 1,3$ мм) зібраних у р. Тетерів (правий приток Середнього Дніпра) біля міста Житомира (рис. 2.2.1). Всього досліджено 1 020 дорослих особин і 987 синкапсул. Встановлювали тривалість вилуплення, а також проміжок часу від відкладання синкапсули до вилуплення молоді. Визначено також наступні показники: довжину кладок, довжину яйцевих капсул, число капсул у синкапсулі, кількість ювенільних молюсків, котрі вилупилися, відсоток їх вилуплення.

Методика збирання молюсків. На літоралі тварин збирали вручну з водяної рослинності або з дна. На глибинах застосовували сачок.

Методика транспортування молюсків та визначення видової належності. Відібраних за зовнішніми морфологічними ознаками мушлі молюсків фасували по 10–15 екз. у поліетиленові пакети [31]. Транспортували у лабораторію, де за відповідною літературою визначали їх видову належність [32].

Маркірування особин. Після видалення з поверхні мушлі слизу та обростань та після кількахвилинного просушування, на мушлю кожного молюска наносили нітроемаллю порядковий номер.

Токсикологічні дослідження поставлено із застосуванням методики В.А. Алексєєва [1]. Для створення потрібних концентрацій іонів важких металів у відстояну водопровідну воду, яка була експериментальним середовищем контрольної групи тварин, додавали розраховані (по катіону) кількості

хлоридів шести металів. Усі застосовані реактиви були фірми “Реахим” кваліфікації “хч”.



Рис. 2.2.1. Зовнішній вигляд мушлі *Lymnaea stagnalis* L. 1758, зібраного у басейні р. Тетерів (околиця Житомира).

Основному, проведеному нами, токсикологічному дослідженню передували орієнтовні дослідження, які здійснювалися з метою вибору концентрацій токсиканта для основного дослідження. Нами здійснено по два орієнтовні дослідження для кожного із токсикантів застосованих у роботі. Для першого тварин по 5 екз. поміщали у ємності з концентраціями токсикантів 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10; 100; 1000; 10 000 мг/дм³ і через дві доби визначали ті концентрації, у яких залишаються живими або гинуть 100% тварин. Та концентрація токсиканту, у якій гине 100% молюсків, використовувалась як маточний розчин. Через кожні 10, 30, 60 хв, а потім через 2, 4, 6, 24, 48 год фіксували в журналах симптоми отруєння піддослідних тварин: зміни поведінки (рухової, частоти дихальних рухів, статевої активності, спроби обмежити вплив отруєного середовища або залишити його); патоморфологічні зрушення (виділення надмірної кількості слизу,

порушення цілісності покривів тіла, припинення живлення та ін.), протікання фаз інтоксикації. Другий орієнтовний дослід по тривалості відповідав основному. Тут ми не знімали показники, але стежили за загальним станом та поведінкою молюсків. У цьому дослідженні нами встановлено діапазони концентрацій, в яких пригнічувались основні фізіологічні реакції організму ставковиків і вони гинули впродовж кількох діб (це гостролетальні концентрації), або тварини були загальнопригнічені і впродовж перших місяців дії токсикантів наставала загибель дорослих і ювенільних особин (хронічні летальні концентрації). За певних концентрацій (сублетальні концентрації) ставковики жили увесь період дослідів і у них мало місце певне стимулювання функцій, що проявлялось у активізації статевої і кормової поведінки. І, нарешті, у діапазоні певних концентрацій токсикантів (підпорогові концентрації) поведінка молюсків абсолютно не відрізнялася від такої у контрольній групі тварин.

В основному досліді застосовано 4 концентрації (по одній із кожного діапазону) (табл. 2.2.1).

Таблиця 2.2.1.

Концентрації іонів важких металів (мг/дм³) застосовані у основному досліді

| Іон | Концентрації | | | |
|------------------|----------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| | Гостролетальні | Хронічні летальні | Сублетальні | Підпорогові |
| Cu ²⁺ | 4 | 0,04 | 4·10 ⁻⁵ | 4·10 ⁻⁸ |
| Cd ²⁺ | 5 | 0,05 | 5·10 ⁻⁴ | 5·10 ⁻⁶ |
| Ni ²⁺ | 10 | 0,05 | 5·10 ⁻³ | 5·10 ⁻⁶ |
| Zn ²⁺ | 15 | 0,5 | 5·10 ⁻³ | 5·10 ⁻⁵ |
| Co ²⁺ | 25 | 2,5 | 0,25 | 0,03 |
| Mn ²⁺ | 110 | 30 | 0,3 | 0,03 |

Контролем слугували тварини, яких уміщали у чисту відстояну воду. Кожні 2 доби аналізували стан дорослих особин, їх синкапсул та молоді, що вилупилася, у досліді та контролі. Поведінкові реакції молюсків на отруєне середовище оцінювали за візуальними спостереженнями протягом світлої пори доби. Дослід тривав 70 діб.

Раз на дві доби проводили заміну розчинів із додаванням заданої кількості токсикантів, при цьому молюсків акваріумними сачками, обережно переносили у кювети зі скла чи емалі, а стінки акваріумів мили губками та гарячою водою. Зважені хімічні реактиви зберігали у підписаних скляних пляшечках, щільно закритих притертими корками.

Маточний розчин та робочі розчини зберігали у склянках під кришками.

Методика досліджень на ембріональній стадії розвитку молюсків.

Щоб отримати кладки яєць для тривалого спостереження за репродукцією та розвитком ставковиків їх по 6 екз. уміщували у скляні 3-літрові акваріуми. Синкапсули знімали з субстрату м'якою щіточкою або скальпелем. Виміри синкапсул та вивчення їх елементів проводили під мікроскопом МБС-9. Обраховували загальну кількість яйцевих капсул у кладці, а також кількість зигот, що знаходились у одній яйцевій капсулі. По внутрішній капсульній мембрані вимірювали довжину яйцевих капсул.

Оцінка аномалій будови синкапсул ставковика озерного.

Просторове розміщення та стан яйцевих капсул детально вивчали і порівнювали з нормою. У робочих зошитах ретельно фіксували наявність тератогенних порушень (багаторядність розміщення яйцевих капсул у кладці; відсутність спіралізації або слабка спіралізація тяжів з яйцевими капсулами; пухке розташування яйцевих капсул; здвоєння яйцевих капсул; яйцеві капсули більших чи менших розмірів та неправильної форми; непрозорі слизові скупчення без яйцевих капсул у межах синкапсульної оболонки; багатозиготність; яйцеві капсули, позбавлені зигот; відсутність синкапсульної оболонки; зиготи поза синкапсульною оболонкою) та

аномалій у морфології кладок. Для подальшого розвитку кладки яєць поміщали у чашки Петрі. На них були етикетки з номером кладки, датою її відкладання та концентрацією токсиканту. Фіксували Дата початку вилуплення молоді і проміжок часу впродовж якого тривало вилуплення записувалася в журнал. Всі результати співставлялися з темпами розвитку тварин у контролі.

Дослідження особливостей копуляції молюсків. З метою вивчення копуляції молюсків у лабораторних культурах проводили прямі спостереження за поведінкою молюсків. За особливостями статевої поведінки ставковиків, уміщених у розчини з різними концентраціями токсикантів спостерігали раз у 10 діб, коли проводили 48-годинні експерименти. Встановлювали тривалість копуляції та визначали години, у які переважно здійснювалося парування.

Методика досліджень на постембріональній стадії розвитку. Молодь, що вилупилася, зважували (ваги ВЛР-200) та знімали у них лінійні показники, після чого, на першу-другу добу вилуплення, переносили у скляні ємності. Відомо, що ювенільні особини у своєму живленні можуть задовольнятися плівкою мікроорганізмів, які розвиваються на стінках акваріумів і листках водоростей, тому розчини для утримання молоді готували на воді із зарослих рослинністю акваріумів. Підгодовували молодь розтертим сухим кормом для риб, з вмістом рослинного детриту. Відсоток вилуплення обчислювали за формулою:

$$X = \frac{B \cdot 100}{K},$$

де X – відсоток вилуплення ювенільних молюсків; K – загальна кількість яйцеклітин у одній кладці; B – кількість екземплярів ювенільних особин, котрі вилупилися з окремої синкапсули.

Усі вищеперераховані показники визначали також у тварин, які утримувалися у чистій воді (контрольна група).

Отримані у дослідженні цифрові дані було оброблено із застосуванням стандартних методів варіаційної статистики та спеціальних комп'ютерних програм Excel і "STATISTICA 10.0".

2.3. Характеристика умов проведення досліджень

Відловлені організми поміщали на дві доби у великі ємності з відстояною дехлорованою водою з житомирської водогінної мережі для попередньої адаптації до лабораторних умов (температури лабораторії, кисневого режиму води, що застосована у контролі та дослідах). Відстояну воду зберігали впродовж 1–2 діб в емальованих відрах ємністю 10-12 л.

Молюсків у акваріумах утримували за методикою А. П. Стадниченко (1986). На спеціальних стелажах розміщували садки з піддослідними молюсками. До акваріумів прикріплювали етикетки з датою та описом умов постановки досліду. Ставковиків підгодовували молодим листям кульбаби. Щоденно проводили заміну корму та видалення харчових залишків. Умови експерименту: вміст кисню – 8,39–8,87 мг/дм³, вільної вуглекислоти – 2,33 мг/дм³, температура води – 19-23⁰С, рН – 7,41–8,13, фтору – 0,24 мг/дм³, кальцію – 2,60 мг/дм³. Фоновий вміст іонів важких металів у воді під час експерименту становив: міді – 0,0002 мг/дм³, кадмію < 0,000001 мг/дм³; цинку – 0,0003 мг/дм³, марганцю – 0,092 мг/дм³, нікелю – 0,0001 мг/дм³, кобальту < 0,00001 мг/дм³.

РОЗДІЛ 3

МОНІТОРИНГ РОЗМНОЖЕННЯ ТА РОЗВИТКУ СТАВКОВИКА ОЗЕРНОГО ЗА ВПЛИВУ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Популяція є складною саморегульованою системою і припускає наявність низки регуляторних механізмів, що визначають її щільність та чисельність [36]. До таких механізмів відносяться, насамперед, рівень народжуваності, вікова та розмірна структури популяції [4]. У одновікових особин або ж у особин із однієї кладки відмінності у кількісних характеристиках розмноження та росту, найбільш яскраво виражені у тих тварин, котрі знаходяться у несприятливих умовах існування, зокрема, за дії токсичних речовин [12]. Відтворювальна функція тварин лише до певної межі володіє здатністю протистояти токсичній дії отрут. Важливим питанням є з'ясувати віддалені біологічні наслідки токсичного впливу (ембріотоксичну, мутагенну і канцерогенну дію токсикантів) [36]. Однак, до теперішнього часу належної уваги вивченню механізмів дії іонів важких металів на розвиток та розмноження молюсків, у тому числі і ставковика озерного, на особливості поведінки тварин у період розмноження та адаптивних можливостей цих тварин до тривалої інтоксикації різного ступеня не приділялось.

Щоби охарактеризувати плідність ставковика озерного за впливу на нього іонів важких металів застосовано наступні показники: кількість капсул у кладці; кількість екземплярів, що вилупилися; відсоток вилуплення ювенільних особин. Отримані відмінності порівнювали з контролем і оцінювали їх як здатність піддослідного виду до мобілізації потенціалу стійкості, що дозволяє вижити в екстремальному середовищі існування. Впродовж всього експерименту досить старанно відмічали стан синкапсульної оболонки, оболонок яйцевих капсул, білкового матриксу яйцевої капсули, синкапсульного білкового матриксу. Довжину синкапсул та довжину яйцевих капсул використано для вивчення особливостей будови

кладок як показники токсичності. Тератогенного ефект іонів важких металів на ембріони *L. stagnalis* проявлявся у вадах розвитку і нами визначено різні його ступені. Оцінюючи хід розвитку зародків фіксували тривалість протікання ембріогенезу. Усі одержані результати порівнювали з темпами розвитку у контрольної групи. Молодь ставковиків є більш чутливою до токсичного впливу аніж дорослі особини, тому, з метою визначення сили інтоксикації за різних концентрацій досліджуваних токсикантів, визначали висоту черепашки молоді ставковиків при вилупленні, а далі – зміну росту загальної маси тіла та лінійного росту ювенільних особин з плином часу. Строки загибелі ембріонів та виживання молоді також використано як показники токсичності.

3.1. Особливості копуляції ставковика озерного у токсичному середовищі

Ставковик озерний є одночасним гермафродитом [4], і має дуже мінливу і своєрідну поведінкою при копуляції, на яку може впливати наявність у воді токсичних речовин, зокрема, іонів важких металів. У літературі відсутні дані щодо цього питання.

У середовищі з іонами важких металів поведінка ставковиків під час парування відрізняється від такої у контрольної групи і залежить як концентрації металу у воді, так і від природи іону. Зокрема, спостерігали загальну стимулюючу дію іонів марганцю на статеву поведінку ставковиків. Вона проявлялася у сильній активізації пошукової поведінки партнера для парування і була тим вищою, чим вищою є концентрація даного іону у середовищі. У середньому майже 87% молюсків поводять себе як “самці” у діапазоні гостролетальних концентрацій (від 120 до 210 мг/дм³). У цих концентраціях сильно пригнічується і решта життєвих функцій ставковиків: вони не живляться і на 2–5 добу гинуть. У розчинах хронічних летальних концентрацій (30 мг/дм³) статева активність ставковиків залишається підвищеною. На відміну від попередніх, у цих розчинах зрідка відбувається

копуляція (кількість є майже вдвічі меншою за контроль) (рис. 3.1.1). Ставокиви за цих умов відкладають аномально порожні кладки, які являють собою слизові шнури з довжиною 170–270 мм – прояв стресової дії токсиканту. На 4–5 добу молюски відкладають повноцінні кладки і статева активність зменшується. Через включення репараційних механізмів організм молюсків справляється зі стресом.

За дії сублетальних та підпорогових концентрацій марганцю (0,3 і 0,03 мг/дм³ відповідно) у статевій поведінці *L. stagnalis* немає відмін від контролю (Додаток А.6). Тривалість парування за впливу іонів марганцю є вірогідно меншою ($P < 0,05$), ніж у контрольній групі тварин (рис. 3.1.2).

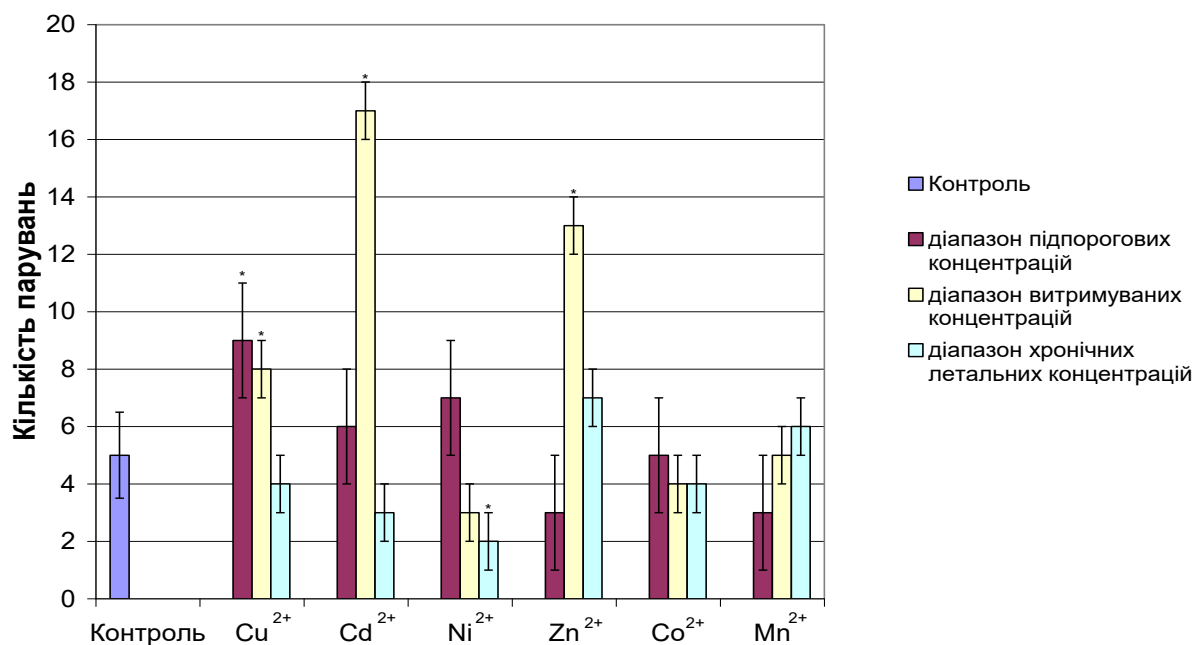


Рис. 3.1.1. Частота парувань *L. stagnalis* (проміжок часу – 48 год) за впливу іонів важких металів. $M \pm m$; $n = 3$. * – відмінності порівняно з контролем вірогідні.

У розчинах з іонами кобальту усіх досліджуваних концентрацій (табл. 2.2.1) суттєвих відмін поведінки ставковиків при паруванні не спостерігається. Лише після досить тривалого знаходження у розчині з цим токсикантом його вплив виявляється у змінах якості і кількості потомства. За дії підпорогових концентрацій тривалість копуляції майже вдвічі

зменшується, у порівнянні з контролем і складає 0,67 год. У випадку підвищення концентрації цього поллютанту тривалість парування трохи подовжується (0,83 год), проте ці значення все ще є нижчими за контрольні (Додаток А.5) (рис.3.1.2).

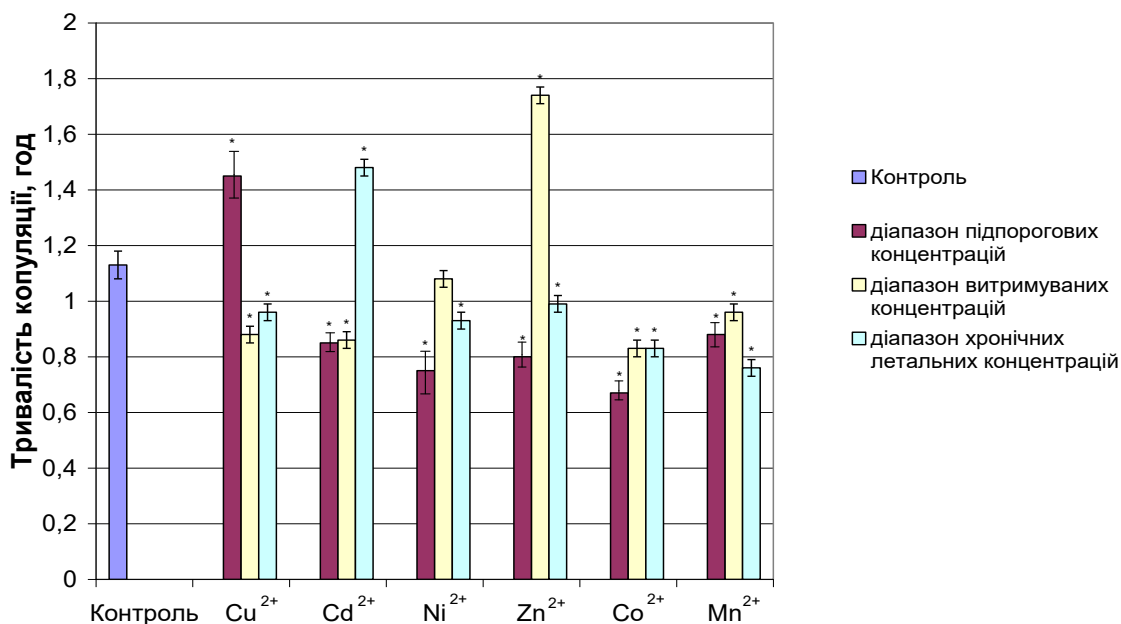


Рис. 3.1.2. Тривалість копуляції (год) *L. stagnalis* (проміжок часу – 48 год) у середовищі з іонами важких металів. $M \pm m$; $n = 3$. * – відмінності порівняно з контролем вірогідні.

У розчинах сублетальних концентрацій Zn^{2+} спостерігається різка стимуляція статевої функції, а за підпорогових концентрацій – статеві активність пригнічена. Тривалість копуляції значно подовжується, становлячи в середньому 1,74 год. Кількість парувань у 3,6 рази більша, ніж у контролі (Додаток А.4). Кількість коїтусів зменшується із підвищенням концентрації іонів цинку, але все ж дещо перевищує контрольний рівень. Тривалість копуляції наближається до контрольних показників (рис. 3.1.1, 3.1.2), однак, статистично вірогідно відрізняється від останніх ($P < 0,05$).

У середовищі з Ni^{2+} концентрацією $0,005 \text{ мг/дм}^3$ кількість парувань падає вдвічі ($P < 0,05$), а тривалість парування відрізняється від контрольних

значень незначно (Додаток А.3). У розчинах хронічних летальних концентрацій нікелю ($0,05 \text{ мг/дм}^3$) обидва показники є вірогідно меншими контрольних значень.

У діапазоні підпорогових концентрацій Cd^{2+} у статевій поведінці молюсків не має відмін від такої у групи контрольних тварин. У сублетальних концентраціях має місце різке збільшення (більше, ніж у 2,5 рази) числа парувань, порівняно з контролем (рис. 3.1.1). За впливу хронічних летальних концентрацій Cd^{2+} , навпаки, спостерігали різке пригнічення статевої активності: тривалість парувань зростає у 1,3 рази, а їх кількість знижується вдвічі у порівнянні з контролем (Додаток А.2) (рис. 3.1.2).

У діапазонах підпорогових та сублетальних концентрацій іони міді стимулюють статеву активність. У розчинах підпорогових концентрацій тривалість копуляції у 1,2 рази перевищує таку в контролі, а з підвищенням концентрації даного токсиканту стає меншою контрольних показників (рис. 3.1.2). У розчинах хронічних летальних концентрацій пригнічення статевої активності не спостерігається: число коїтусів наближається до контрольних значень (Додаток А.1).

Таким чином, слід зазначити, що хоча репродуктивна функція ставковика озерного є досить чутливою до впливу іонів важких металів, однак реагування молюсків не підлягає загальним закономірностям реагування гідробіонтів на токсичний вплив і є досить індивідуальним на кожен іон.

3.2. Процес яйцекладки та особливості будови кладок ставковика озерного у токсичному середовищі

У нормі всередині синкапсули яйцеві капсули укладаються по спіралі та фіксуються щільними міжкапсульними тяжами, які є своєрідним продовженням зовнішньої капсульної оболонки з кількох шарів (рис. 4.2.1 А). У синкапсулах яйцеві капсули досить щільно дотикаються до

синкапсульної оболонки [6]. На поперечному перерізі кладки ставковиків (рис. 3.2.1 Б) добре видно тонкі волокна, які відходять від яйцевих капсул.

В умовах лабораторії субстратом для прикріплення кладок є стінки акваріумів, часточки корму, зрідка – мушлі інших особин молюсків. Спочатку (півгодини-година) кладки каламутні, яйцеві капсули майже невидимі через непрозорість синкапсульного матрикса. Проте швидко вони стають прозорими і їхні структури ущільнюються.

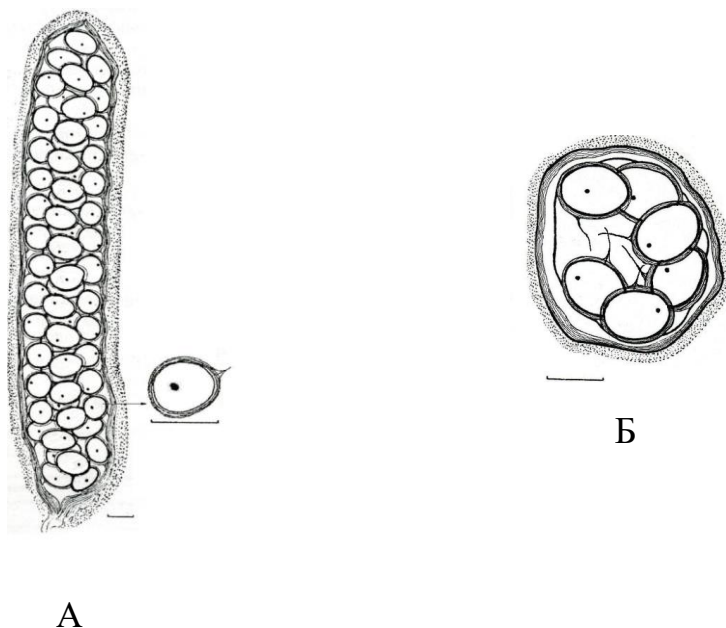


Рис. 3.2.1. Будова синкапсули *L. stagnalis* (р. Тетерів, околиця Житомира): А – загальний вигляд кладки зверху; Б – поперечний переріз через синкапсулу ставковика озерного. Масштабна лінійка – 1 мм (ориг.).

Відомо, що прісноводні молюски є досить чутливими до хімічного складу середовища, в якому вони знаходяться, і на високі концентрації хімічних іонів реагують зменшенням яйцекладки, а за перебування в отруєному середовищі тривалий час, зовсім припиняють відтворення.

У чистій воді в лабораторній культурі тривалість відкладання синкапсул ставковиком озерним коливається в межах 16–23 хв. За впливу сублетальних концентрацій іонів важких металів, коли ми спостерігали стимуляцію статевої функції, тривалість овіпозиції зменшується і складає

12–16 хв. У розчинах хронічних летальних концентрацій досліджуваних політантів за умови пригнічення репродукції молюсків тривалість відкладання синкапсул дещо подовжується (18–28 хв).

Групою контрольних тварин, які перебували у чистій воді, впродовж 70 діб досліду було відкладено у середньому 84 ± 7 кладки. Значення цього показника не були перевищені у жодному з розчинів шести досліджуваних нами іонів важких металів. Це вказує на пригнічення процесу яйцекладки за інтоксикації (рис. 3.2.2). Вночі було відкладено від 72 до 81% синкапсул.

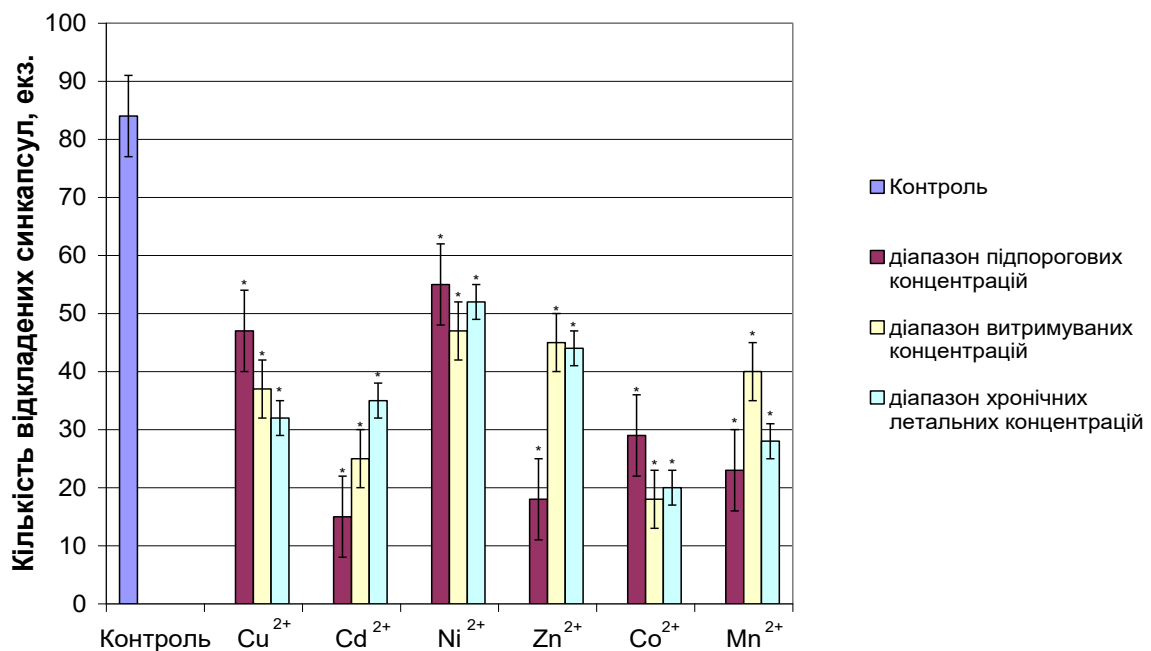


Рис. 3.2.2. Кількість кладок відкладених *L. stagnalis* (проміжок часу – 70 діб) за перебування у середовищі отруєному іонами важких металів. $M \pm m$; $n = 3$.

Кількість відкладених синкапсул коливається в межах 52–66% від контрольних значень у розчинах іонів міді за концентрації $4 \cdot 10^{-8}$ мг/дм³, з іонами нікелю – в усіх досліджуваних концентраціях, у розчинах з іонами цинку – за концентрацій 0,005 та 0,5 мг/дм³. За решти концентрацій розчинів цих та інших досліджуваних металів кількість кладок відкладених молюсками коливається від 44 до 14% порівняно з контролем.

При обговоренні показника кількості синкапсул, відкладених ставковиками у отруєному середовищі, взагалі не можна стверджувати, що є недіючі концентрації, оскільки репродуктивна функція молюсків є надзвичайно чутливою до інтоксикації іонами важких металів. Репродуктивною системою сприймаються ті концентрації цих полютантів, які не спричиняють суттєвих змін в етології тварин та у функціонуванні інших фізіологічних систем організму.

У проведених дослідженнях було встановлено, що у розчинах усіх досліджуваних концентрацій іонів міді динаміка зміни кількості відкладених кладок в цілому відповідає динаміці зміни частоти коїтусів (рис. 3.1.1, 3.2.2). Всі коїтуси молюсків у цих розчинах виявляються ефективними, про що свідчить кількість кладок, оскільки статева активність утримується на постійному рівні. Пропорційне зменшення кількості відкладених синкапсул за хронічних летальних концентрацій пояснюється пригніченням статевої активності.

У розчинах підпорогових і сублетальних концентрацій Cd^{2+} (табл. 2.2.1) кількість парувань велика (в сублетальних концентраціях – у 3,4 рази перевищує контрольні показники). Проте це не завжди супроводжується відкладанням повноцінних кладок. Більшості коїтусів є короткотривалими (близько 0,4 год), що робить їх неефективними. Ми зареєстрували їх як спроби парування, проте вони не супроводжуються відкладанням синкапсул. На початку впливу хронічних летальних концентрацій Cd^{2+} має місце пригнічення статевої функції, а пізніше, завдяки включенню репараційних систем організму молюсків, кількість коїтусів збільшується, що проявляється у кількості відкладених ставковиками синкапсул (рис. 3.2.2).

На початку впливу Ni^{2+} спостерігається пригнічення пошукової поведінки тварин, що виявляється у малій кількості парувань протягом перших двох діб впливу. Це пояснюється сильною токсичною дією означеного іону на репродукційну систему ставковика озерного (рис. 3.1.1). За умови хронічного дослідження (70 діб) репродуктивна система поступово

відновлює своє нормальне функціонування: кількість відкладених синкапсул перевищує таку у всіх розчинах решти досліджуваних іонів.

За впливу підпорогових концентрацій іонів цинку (табл. 2.2.1) мало місце стійке пригнічення репродуктивної функції, статева активність молюсків була невисокою і, як результат, синкапсул відкладається мало. За сублетальних концентрацій спостерігається стимуляція функціонування репродуктивної системи: велика кількість паруваль і дещо менша, але все ж таки досить висока плідність (54% синкапсул відносно контрольних значень). У хронічних летальних концентраціях на початку токсичного впливу мало місце пригнічення статевої активності і кількість паруваль знижується (рис. 3.1.1), а за подовження впливу – кількість відкладених кладок вдвічі зростає і перевищує очікувані показники за кількістю коїтусів у перші дві доби інтоксикації (рис. 3.2.2).

Динаміка відкладання синкапсул за впливу усіх досліджуваних концентрацій іонів кобальту (табл.2.2.1) відповідає передбачуваний за кількістю коїтусів (рис. 3.1.1, 3.2.2). Однак, зазначимо, що кількість синкапсул у розчинах хронічних летальних концентрацій іонів кобальту складає 12 ± 3 за всі 70 діб експерименту і значення цього показника є найменшими серед усіх досліджуваних нами іонів металів. Має місце сильна інтоксикація іонами кобальту означених концентрацій репродуктивної системи молюсків.

Раніше ми відмічали, що іони марганцю надзвичайно активізують пошукову поведінку *L. stagnalis*, що, вочевидь, до певної міри призводить до їх виснаження. Тому спостерігаємо невелику кількість ефективних коїтусів (рис. 3.1.1). Кількість синкапсул є найвищою за дії сублетальних концентрацій. У перші дві доби число паруваль у розчинах хронічних летальних концентрацій Mn^{2+} є значним, проте поступово їх кількість зменшується, що проявляється у зменшенні кількості відкладених кладок (рис. 3.2.2). Отже, пригнічення статевої функції спостерігається за впливу підпорогових концентрацій іонів марганцю, а її стимуляція – за впливу

вищих концентрацій, як реакція організму на затруєне іонами важких металів середовище.

Хоча довжина кладок *L. stagnalis* у розчинах важких металів змінюється досить незначно, проте різниця між середніми контрольними та дослідними величинами є статистично вірогідною ($P < 0,05$) (Додатки А.7, А.9, А.11, А.13, А.15, А.17). За впливу розчинів хронічних летальних концентрацій усіх шести досліджуваних металів довжина синкапсул є у 1,2–1,3 рази меншою за ті, що відкладені в контрольних розчинах (рис. 3.2.3). У розчинах сублетальних концентрацій Cu^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} (табл.2.2.1) синкапсули є дещо довшими за контрольні і у 1,1–1,2 рази мають менші за контрольні розміри в усіх розчинах підпорогових концентрацій (за виключенням з іонами міді у підпорогових концентраціях, де середні значення довжини синкапсул лише незначно перевищують контрольні показники) і за дії сублетальних концентрацій іонів кадмію, цинку та кобальту ($P < 0,05$).

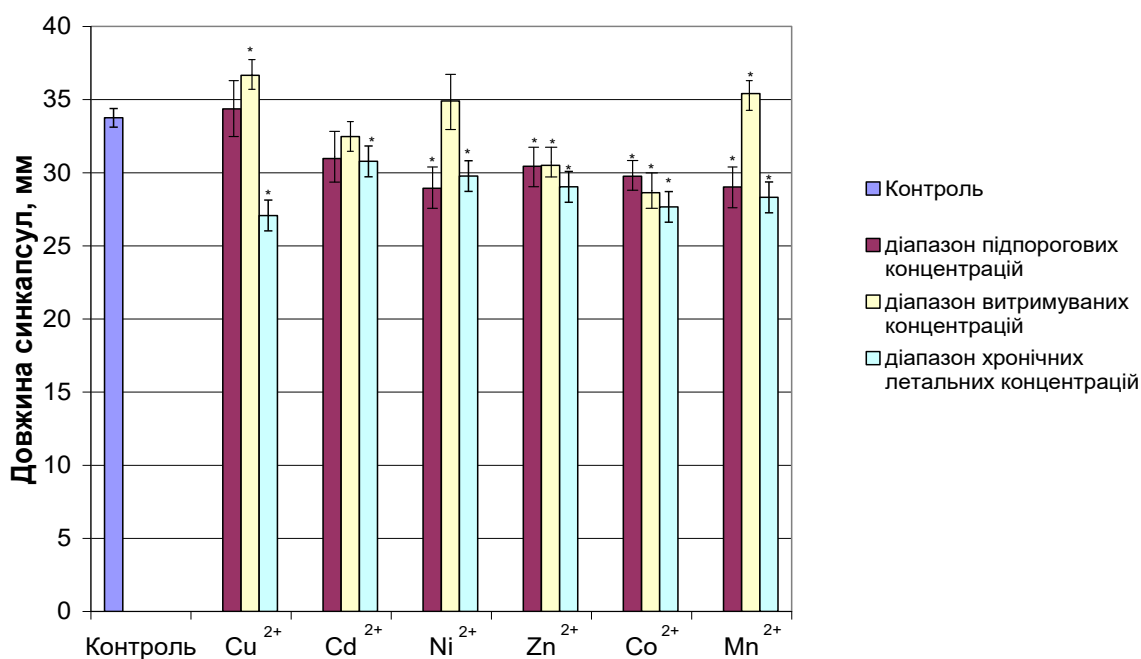


Рис. 3.2.3. Довжина синкапсул (мм), які відкладені *L. stagnalis* за перебування у середовищі отруєному іонами важких металів. $M \pm m$; $n = 3$.

Середні величини довжини яйцевих капсул у 1,1–1,2 рази менші контрольних значень майже в усіх розчинах з досліджуваними іонами ($P < 0,05$) (Додатки А.8, А.10, А.12, А.14, А.16, А.18) (рис. 3.2.4). Виключення складають тільки розміри яйцевих капсул, які відкладені у розчинах з підпороговими та сублетальними концентраціями іонів цинку та в хронічних летальних концентраціях іонів кобальту. Тут вони більші за контрольні показники ($P < 0,05$). У розчинах хронічних летальних концентрацій іонів кобальту яйцеві капсули найкрупніші ($1,52 \pm 0,05$ мм відносно $1,35 \pm 0,01$ мм у контрольної групи). У розчинах хронічних летальних концентрацій іонів кадмію яйцеві капсули відкладені ставковиками мали найменші розміри ($1,14 \pm 0,02$ мм).

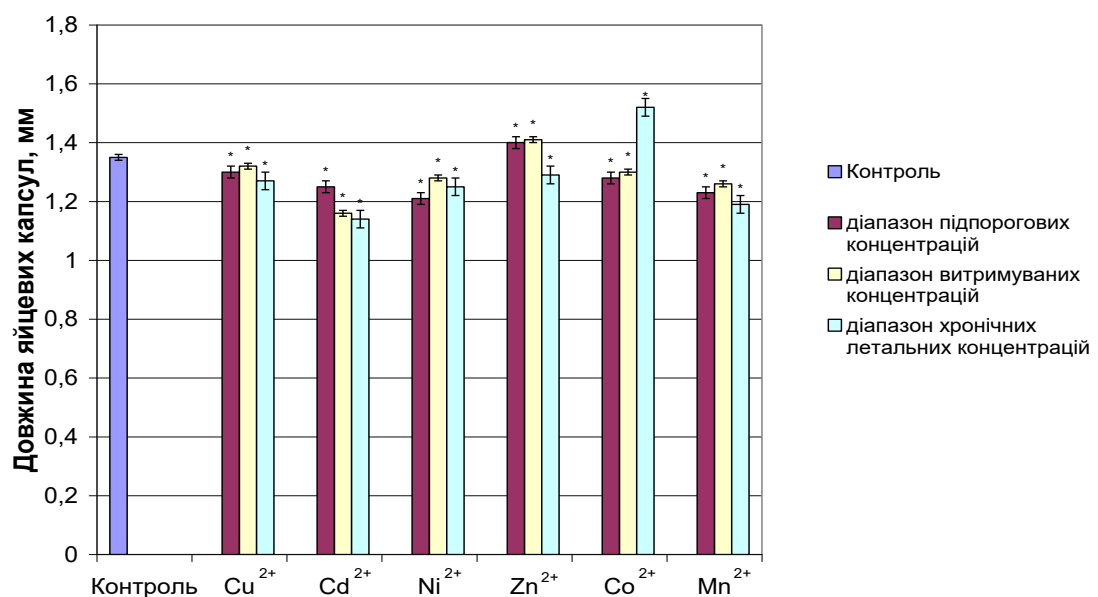


Рис. 3.2.4. Довжина яйцевих капсул (мм) ставковика озерного за перебування у середовищі з іонами важких металів. $M \pm m$; $n = 3$.

Загалом, слід відмітити, що характеристики розмірів синкапсул та кількості яйцевих капсул у кладках молюсків ставковиків залежать від специфічності умов, в яких протікають процеси репродукції (у наших дослідженнях це токсичний вплив іонів важких металів) і є найбільш

мінливими. Коефіцієнт варіації для кількості яйцевих капсул коливається в межах 14,51–46,98%, а для довжини синкапсул – 15,04–46,51%. Тому використовувати означені характеристики у гідроекології може мати доцільність тільки за умови застосування матеріалу великого об'єму, бо в іншому разі дані можуть бути недостатньо точними.

3.3. Аномалії у будові кладок за інтоксикації

Оточуюче середовище певною мірою впливає на функціонування репродуктивної системи молюсків, а від стану статеві системи дорослих тварин залежать характеристики синкапсул ставковиків. Встановлено, що за дії поллютантів у яйцевих капсулах відмічаються структурні та ультраструктурні зміни [37].

За тривалого впливу низьких концентрацій важких металів на репродуктивну систему ставковика відбувається послаблення гомеостатичної регуляції, а це призводить до порушення узгодженості у роботі її відділів і, як результат, до різних аномальних явищ у будові кладок. У наших дослідженнях відмічено наступні типи аномалій: а) відсутність яйцевих капсул у межах кладки (рис. 3.3.1 А); б) слабкість спіралізації тяжа з яйцевими капсулами (рис. 3.3.1 Б); в) багатозиготність яйцевих капсул (рис. 3.3.1 В; 3.3.2 Б); г) однорядність розташування яйцевих капсул у кладці (рис. 3.3.1 Г); д) зрощення в одну крупну кількох яйцевих капсул звичайного розміру (рис. 3.3.2 А); е) відсутність яйцеклітини в капсулі (рис. 3.3.2 Б); є) зменшена кількість яйцевих капсул у кладці (рис. 3.3.2 В); ж) здвоєння двох яйцевих капсул (рис. 3.3.2 Г); з) виявлення яйцеклітин та яйцевих капсул поза синкапсулою (рис. 3.3.2 Д).

Більшість зафіксованих нами порушень у будові синкапсул належить до групи морфологічних аномалій, які не будуть впливати на ембріогенез. Вони трапляються і в кладках контрольної групи тварин. Однак відношення кількості аномалій у контрольної групи до кладок, отриманих у ставковиків

за перебування їх в токсичному середовищі, становить у середньому 1:5. Кількість аномалій у будові кладок за перебування молюсків у розчинах підпорогових концентрацій (табл.2.2.1) дорівнює такому ж у контролі, що свідчить про певне несприймання репродуктивною системою низьких концентрацій поллютантів. Із зростанням концентрацій поллютантів, кількість порушень у будові синкапсул зростає і у розчинах хронічних летальних концентрацій досліджуваних токсикантів, співвідношення показників у контрольної групи щодо отриманих за інтоксикації становить 1:7,5. Зазначимо, що частота аномалій не залежить від природи іону металу.

Кожен відділ репродуктивної системи молюсків бере участь у формуванні певних структур їхніх кладок [3].

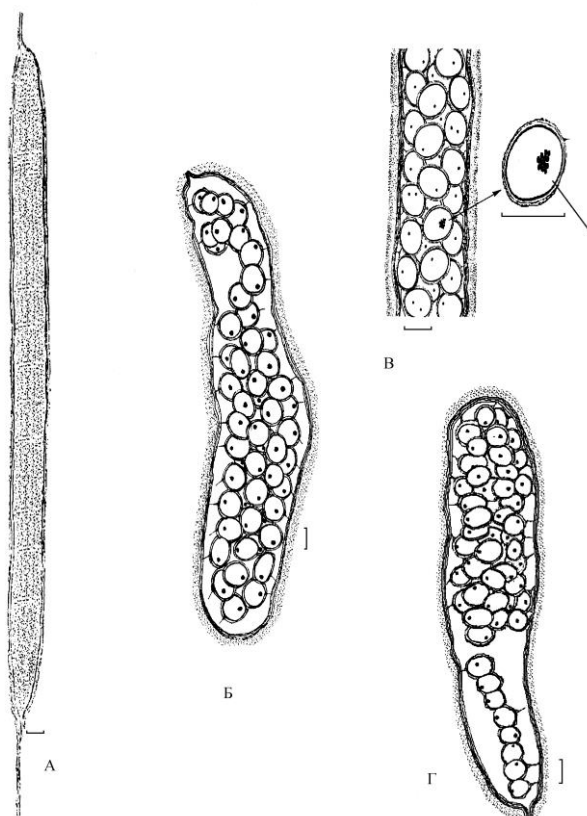


Рис. 3.3.1. Вади розвитку синкапсул ставковика озерного: А – порожні синкапсули (без яйцевих капсул); Б – слабкоспіралізований тяж з яйцевими капсулами всередині; В – багатояйцевість капсул; Г – відсутність спіралізації в стрічці з яйцевими капсулами. 1 – багатозиготність яйцевої капсули.

Масштабна лінійка – 1 мм (ориг.).

Так, явище, коли яйцеві капсули зрощуються у кладках ставковика (рис. 3.3.2 Г) обумовлене уповільненням проходження окремих капсул через початковий відділ лабіринту яйцеводу, що викликає їх тісне зіткнення, а потім злиття внутрішніх мембран капсул, які вкриваються спільною шаруватою оболонкою. Блокування роботи лабіринту яйцеводу призводить до появи аномалії відсутності яйцевих капсул у кладці ставковиків (рис. 3.3.1 А).

Прискорення видалення тяжу з яйцевими капсулами із області укладання в спіраль і де формується макроструктура синкапсул обумовлені зрушенням спіралізації або трансформацією спірального укладання яйцевих капсул в лінійне у синкапсулах ставковика (рис. 3.3.1 Б, Г) [3].

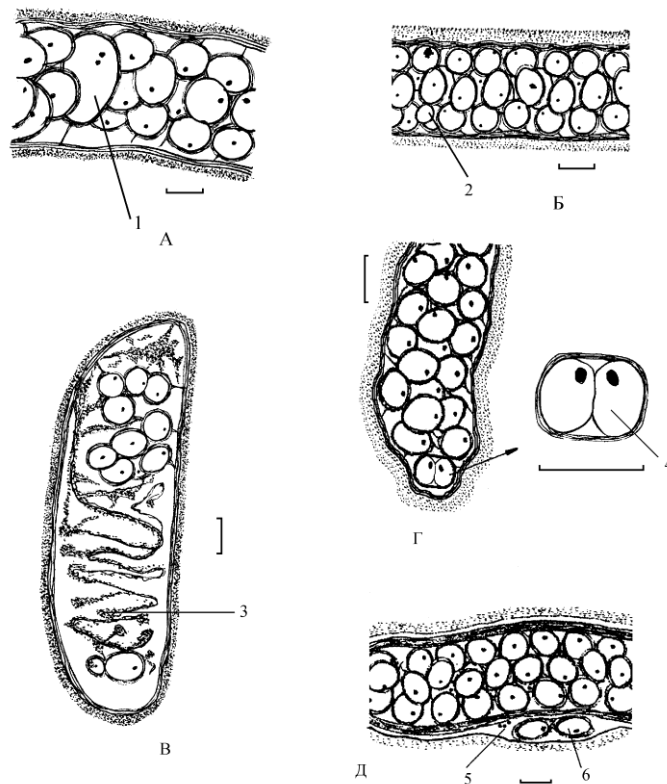


Рис. 3.3.2. Аномалії у будові синкапсул ставковика озерного: А – злиття певної кількості капсул звичайного розміру в одну велику; Б – багатозиготність та відсутність яйцеклітин в яйцевих капсулах; В – зменшення кількості яйцевих капсул у синкапсулі; Г – здвоєння яйцевих капсул; Д – наявність яйцеклітин і яйцевих капсул поза синкапсульним матриксом. 1 – зрощення яйцевих капсул в одну крупну; 2 – відсутність яйцеклітини в яйцевій капсулі; 3 – міжкапсульні тяжі; 4 – здвоєні яйцеві капсули; 5 – яйцеклітини поза синкапсулою; 6 – капсули з яйцеклітинами поза матриксом.

Масштабна лінійка – 1 мм (ориг.).

На протікання ембріогенезу та життєздатність зародків впливають деякі морфологічні аномалії синкапсул ставковика. Такими є: розміщення яйцеклітин поза яйцевими капсулами (рис. 3.3.2 Д); зменшення розмірів капсул, що скоріш за все пов'язане з гіпофункцією білкової залози на етапі проходження потоку овулюючих яйцеклітин через квадривій (рис. 3.3.2 Б). Наслідком зміни властивостей секретів, які виробляються додатковими залозами яйцеводу є поява ущільнених міжкапсульних тяжів (рис. 3.3.2 В). Повністю непрозорими стають усі синкапсули при порушенні функцій матки.

Несправжньою поліембріонією називають явище, коли в одній капсулі з яйцеклітиною випадково опиняються дві або більше яйцеклітин. Яйцеклітини, овулюючі за малий проміжок часу, майже одночасно потрапляють у квадривій і через це опиняються в одній капсулі (рис. 3.3.1 В; 3.3.2 Б). У такому випадку зародки розвиваються незалежно, проте їх розвиток обмежений невеликою кількістю поживних речовин, а також незначними розмірами яйцевої капсули. Розміри молюсків-близнюків є завжди меншими, ніж у особин, котрі розвиваються поодинокі. У контрольних розчинах за сприятливого утримання життєздатними є тільки ті близнюки, які попарно розвиваються всередині капсули. У розчинах з іонами важких металів (особливо за сублетальних та хронічних летальних концентрацій) така молодь виявляється нежиттєздатною, і це суттєво впливає на показники виживання молоді молюсків за інтоксикації. Народження життєздатної молоді (на 3–5 діб раніше звичайного строку) у синкапсулах, які містять двозиготні яйцеві капсули є можливим за перебування кладок молюсків у розчинах підпорогових концентрацій іонів металів. Проте такі ювенільні особини, зазвичай, мають менші розміри (наприклад, висота мушлі молоді, що розвивається з одозиготних яйцевих капсул у розчинах з Zn^{2+} у середньому становить $1,50 \pm 0,02$, а з двозиготних – $1,21 \pm 0,02$ мм мм), не активні і мають низьку життєздатність, що врешті-решт призведе до їх загибелі.

3.4. Тривалість ембріогенезу та вилуплення ювенільних особин за впливу іонів важких металів

Вихід із яйця за оптимальних умов лабораторних досліджень у ставковика озерного відбувається переважно на 17-у добу. На зміну ритмів ембріонального розвитку можуть впливати як обтяжуючий чинник важкі метали [20]. І в залежності від концентрації вони можуть або прискорювати, або пригнічувати розвиток ембріонів, а в подальшому – і молоді молюсків [36]. У розчинах сублетальних концентрацій іонів кобальту та нікелю ми спостерігали найбільші середні значення тривалості ембріогенезу (до 20 діб). У розчинах з Cd^{2+} усіх досліджуваних концентрацій тривалість ембріогенезу у ставковиків є дещо нижчою контрольних значень і складає у середньому 16 діб. За впливу Ni^{2+} у концентрації $0,05 \text{ мг/дм}^3$ спостерігали такий же ефект. За перебування синкапсул в концентрації іонів кобальту $2,5 \text{ мг/дм}^3$ мала місце стимулююча дія на розвиток ембріонів (середні значення тривалості ембріогенезу склали 12 ± 3 діб). Показники середньої тривалості розвитку зародків за впливу Cu^{2+} , Mn^{2+} та Zn^{2+} усіх досліджуваних концентрацій наближались до контрольних значень, інколи перевищували останні, становивши у середньому 17–18 діб. На перший погляд здається, що порушення ритмів ембріонального розвитку за дії іонів важких металів є несуттєвими. Однак слід мати на увазі, що вилуплення ювенільних особин відбувається не в один момент, і що період між часом вилуплення першого молюска із синкапсули і строком, коли останній молюск полишить цю ж кладку, може бути значним. У тварин контрольної групи тривалість викльовування у середньому складає 6–7 діб, у деяких випадках досягаючи 8–9 діб. За впливу усіх досліджуваних іонів металів відмічено загальну закономірність змін тривалості ембріогенезу ставковиків: з підвищенням концентрації токсиканту тривалість викльову молоді зменшується порівняно з контролем і складає 4–5 діб, не дивлячись на подовження тривалості

ембріонального розвитку. Це, ймовірно, можна пояснити наростанням токсичного ефекту важких металів за досить тривалого перебування ембріонів в умовах інтоксикації. Більш інтенсивний вихід молоді із синкапсул у розчинах із високими концентраціями іонів металів можливо пояснити прагненням усунути токсичний вплив. Цим же можна пояснити і те, що у перші три доби новонароджені молюски, які перебувають у токсичних розчинах, прагнуть залишити токсичне середовище: вони активно залишають чашки Петрі, в яких перебували. Молодь у життєздатному стані знаходиться у цих розчинах тривалий час, тому що пізніше, очевидно, включаються адаптаційні механізми.

Обговорюючи показники кількості вилуплених із кладок ювенільних особин ставковиків та відсоток їхнього вилуплення, насамперед варто порівняти середню кількість яйцевих капсул відкладених молюсками у синкапсули. Середня кількість відкладених молюсками яйцеклітин за впливу підпорогових концентрацій іонів міді, нікелю та цинку статистично вірогідно не відрізняється від контрольних значень ($P > 0,05$), за впливу Cd^{2+} цей показник є меншим, а за впливу іонів кобальту та марганцю – у 1,2 рази більшим за контрольні значення ($P < 0,05$) (рис. 3.4.1).

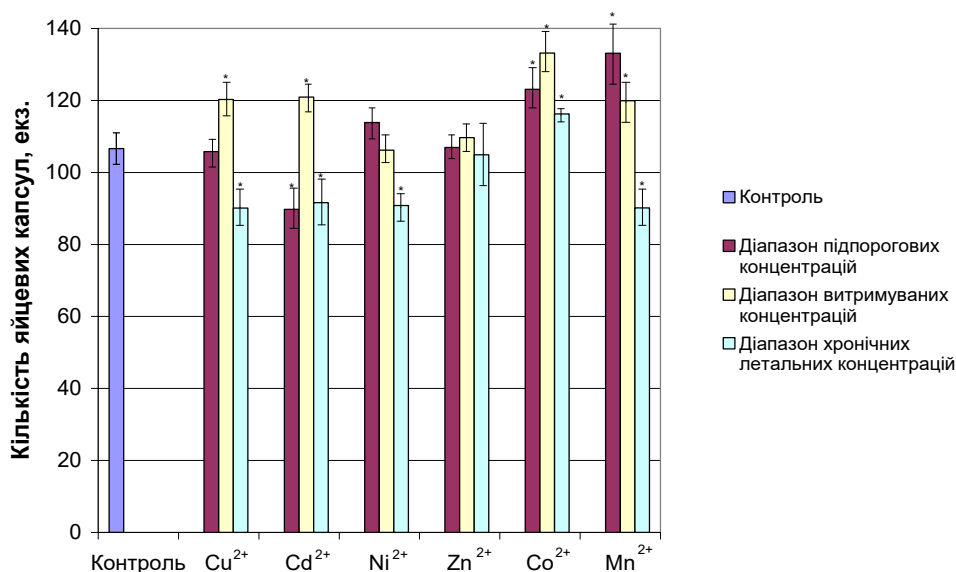


Рис. 3.4.1. Кількість яйцевих капсул у синкапсулах *L. stagnalis* за впливу іонів важких металів.

Слід зазначити, що такі розбіжності у кількості капсул у кладках майже не впливають на відсоток вилуплення молоді, яка перебуває у розчинах з найменшими із досліджуваних концентрацій іонів металів: відсоток вилуплення молюсків або є дещо нижчим від контрольних показників, або наближається до останніх (у розчинах з іонами міді, кобальту та марганцю) (рис. 3.4.2) (Додатки А.19–А.24).

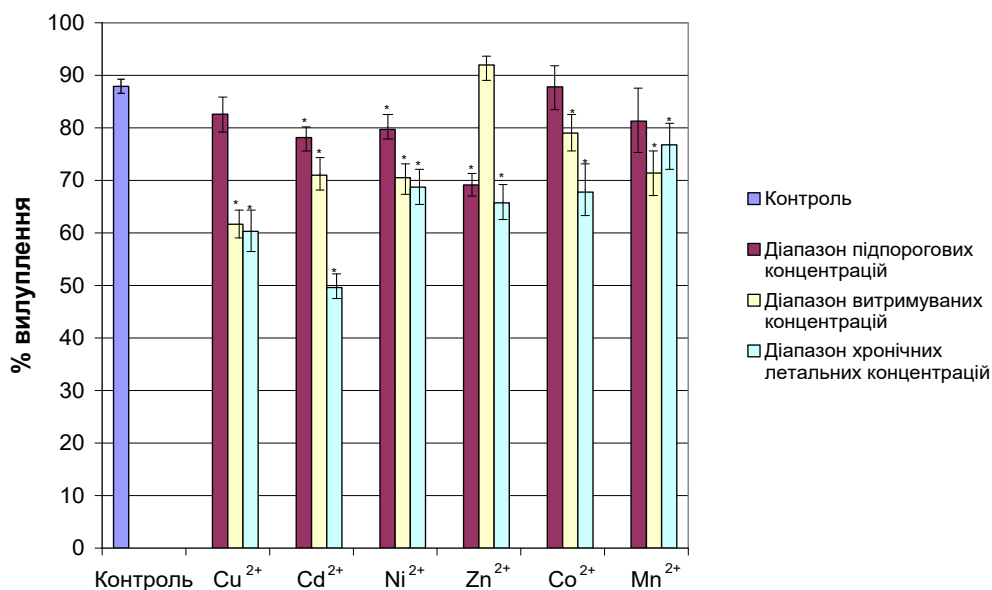


Рис. 3.4.2. Відсоток вилуплення молоді *L. stagnalis* у середовищі отруєному іонами важких металів.

Оскільки ембріони є більш чутливими до інтоксикації, аніж дорослі тварини, то зі зростанням концентрації полютантів у середовищі, процес вилуплення молоді подавляється. На зародки тварин здійснюють стресорний вплив ті концентрації, які не сприймаються або слабо сприймаються дорослими особинами.

У п'яти з досліджуваних іонів (міді, кадмію, нікелю, кобальту, марганцю), коли синкапсули знаходилися у розчинах сублетальних концентрацій – кількість яйцевих капсул значно (у 1,2 рази) перевищує контрольні показники (рис. 3.4.1), хоча відсоток вилуплення ювенільних особин є значно нижчим контрольних значень ($P < 0,05$) (рис. 3.4.2). У ставковиків, котрі знаходяться у цих розчинах, має місце певна стимуляція

статевої функції і, як відгук на інтоксикацію, вони відкладають значно більшу кількість яйцевих капсул. Певні відміни спостерігали за дії іонів цинку. Плідність дорослих молюсків за перебування у розчинах усіх досліджуваних концентрацій цього іону наближається до контрольних значень; у розчинах підпорогових та хронічних летальних концентрацій народжуваність є меншою за контрольну, а у розчинах сублетальних концентрацій – більшою за контрольні значення (рис. 3.4.1, рис. 3.4.2). Очевидно, розчини Zn^{2+} мають стимулюючий вплив на розвиток ембріонів ставковика озерного у сублетальних концентраціях (табл.2.2.1), хоча на виживання молоді це ніяк не впливає.

У діапазоні хронічних летальних концентрацій токсичний вплив досліджуваних поліютантів наростає, що проявляється як у зниженні відсотку вилуплення молоді молюсків так і зменшенню плідності. Нами з'ясовано, що кількість яйцевих капсул перевищує контрольні значення лише у розчинах з Co^{2+} концентрацією 2,5 мг/дм³, проте це зовсім не впливає на відсоток вилуплення ювенільних особин (рис. 3.4.2). До 27% усіх синкапсул не отримують подальшого розвитку (завмирають) за умов перебування у цих концентраціях.

Зазначимо, що між показниками плідності та вилупленням молоді ставковиків, котрі перебувають у токсичному середовищі, відсутня кореляція. Спочатку, зі збільшенням концентрації іонів важких металів у середовищі, у відповідь на інтоксикацію, плідність зростає, але вона не здатна перекрыти смертність ембріонів у отруєному середовищі, і показники відсотку вилуплення молоді зменшуються, а пізніше, зі збільшенням концентрації поліютантів, має місце пригнічення і плідності, і народжуваності.

Досліджені нами концентрації іонів важких металів здатні порушувати фізіологічну рівновагу в організмі ставковика озерного, викликати морфологічні зміни і в органах репродуктивної системи, і в жіночих та чоловічих гаметах, і впливати на якість та кількість потомства. Від

концентрації іону металу та тривалості його впливу у більшій мірі залежить ступінь ушкодження, і у меншій мірі це залежить від природи іону. Поступове пригнічення репродуктивної системи спостерігається з підвищенням концентрацій поліютантів. За впливу високих концентрацій, або за тривалого впливу концентрацій помірних статеві система повністю припиняє функціонування. Наслідки відгуку, а також сила і направленість впливу важких металів на ставковика озерного визначаються здатністю його репродуктивної функції до підтримки та регулювання власного гомеостазу.

ВИСНОВКИ

1. Іони важких металів здатні порушувати фізіологічну рівновагу в організмі ставковика озерного і викликають зміни у функціонуванні статевої системи.

2. Частота парувань досліджуваних молюсків у 2,5–3,6 рази більша відносно контрольних показників у розчинах сублетальних концентрацій Cd^{2+} і Zn^{2+} . За впливу Mn^{2+} у репродуктивний період спостерігаються найяскравіші етологічні зміни (активація пошукової поведінки партнера).

3. З підвищенням концентрації поллютанту у середовищі має місце ушкодження механізмів регуляції розмноження ставковиків, що призводить до зменшення відсотку вилуплення молюсків із кладок (на 15–26%) та зростання плідності (у 1,2 рази) порівняно з контрольною групою. За дії хронічних летальних концентрацій важких металів пригнічуються і плідність, і народжуваність.

4. Аномалії у будові кладок ставковика озерного у розчинах сублетальних концентрацій трапляються у 5 разів частіше, а в хронічних летальних – у 7,5 разів частіше, ніж у контрольної групи тварин. Вплив хронічних летальних концентрацій важких металів призводить до завмирання 20–27% синкапсул.

5. Найбільші середні значення тривалості ембріонального розвитку (20 ± 1 діб) отримано у розчинах сублетальних концентрацій Ni^{2+} і Co^{2+} ; найменші – у хронічних летальних концентраціях Co^{2+} (12 ± 3 діб).

6. Кількість яйцевих капсул перевищує контрольні значення лише у розчинах з Co^{2+} концентрацією $2,5 \text{ мг/дм}^3$, проте це зовсім не впливає на відсоток вилуплення ювенільних особин

7. Кількісні характеристики відтворення та розвитку ставковика озерного, які досліджено в роботі, відображають токсикологічну ситуацію у навколишньому середовищі і можуть бути рекомендовані при біотестуванні природних вод і визначення рівня їх забруднення іонами важких металів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Алексеев В. А. Основные принципы сравнительно-токсикологического эксперимента / В. А. Алексеев // Гидробиол. журн. – 2001. – Т.17, № 3. – С. 92 – 100.
2. Баканов А. И. Использование зообентоса для мониторинга пресноводных водоемов / А. И. Баканов // Биология внутренних вод. – 2008. – № 1. – С. 68-82.
3. Березкина Г. В. Возрастные особенности функционирования репродуктивной системы лимнеид (*Gastropoda, Pulmonata, Lymnaeidae*) / Г. В. Березкина // Научн. докл. высш. шк. Биол. н. – 1983. – № 10. – С. 24-31.
4. Березкина Г.В. Самооплодотворение в размножении пресноводных pulmonat / Г. В. Березкина, Я. И. Старобогатов // Моллюски: систематика, экология и закономерности распространения. 7 Всес. совещ. по изуч. моллюсков. – Л., 1983. – С. 203-206.
5. Березкина Г. В. Экология размножения и кладки яиц пресноводных легочных моллюсков / Г. В. Березкина, Я. И. Старобогатов // Тр. Зоол. ин-та АН СССР Т. 174. – Л.: ЗИН АН СССР, 1988. – 307 с.
6. Березкина Г. В. Некоторые направления адаптивной эволюции кладок яиц пресноводных брюхоногих моллюсков / Г. В. Березкина // Вісн. Житомир. педагог. ун-ту. – 2002. – вип. 10. – С. 55-57.
7. Брагинский Л. П. Биотестирование: возможности и перспективы использования в контроле поверхностных вод / [Брагинский Л. П., Дмитриева А. Г., Крайнюкова А. Н., Филенко О. Ф.]. – Л.: Гидрометеоиздат, 1989. – Вып. 2. – С. 165-215.
8. Брагинський Л. П. Біотестування як метод контролю токсичності природних та стічних вод / Л. П. Брагинский // Гідроекологічна токсикометрія та біоіндикація забруднень. – Львів: Світ, 2005. – С. 27-37.

9. Брагинский Л. П., Линник П. Н. Методика токсикологического эксперимента с тяжелыми металлами на гидробионтах / Л. П. Брагинский, П. Н. Линник // Гидробиол. журн. – 2003. – Т. 39, № 1 – С. 93-104.
10. Брень Н. В. Использование беспозвоночных для мониторинга загрязнения водных экосистем тяжелыми металлами / Н. В. Брень // Гидробиол. журн. – 2009. – Т. 35, № 4. – С. 75-88.
11. Бузинова Н. С. Об особенностях интоксикации прудовика обыкновенного трифенилоловохлоридом / [Бузинова Н. С., Колосова Л. В., Коссова Г. В., Мелехова О. П.] // Биол. науки. – 1987. – № 5. – С. 65-69.
12. Веселов Е. А. Основные фазы действия токсических веществ на организмы / Е. А. Веселов // Тез. докл. Всесоюз. научн. конф. по вопросу водн. токсикол. – М.: Наука, 1968. – С. 15-16.
13. Выскушенко Д. А. Реагирование прудовика озерного (*Lymnaea stagnalis* L.) на воздействие сульфата меди и хлорида цинка / Д. А. Выскушенко // Гидробиол. журн. – 2002. – Т. 38, № 4. – С. 86-92.
14. Вишневецький В. І. Річки і водойми України. Стан і використання / В. І. Вишневецький. – К.: Віпол, 2000. – 376 с.
15. Высоцкая Р. У. Влияние свинца и цинка на некоторые биохимические показатели радужной форели в процессе эмбриогенеза / [Высоцкая Р. У., Ломаева Т. А., Заличева И. Н., Волков И. В.] // Биохимия экто- и эндотермальных организмов в норме и при патологии. – Петрозаводск: Карельский научн. центр АН СССР, 1990. – С. 83-91.
16. Гідроєкологічна токсикометрія та біоіндикація забруднень / За ред. І. Т. Олексіва, Л. П. Брагінського. – Львів.: Світ, 2005. – 440 с.
17. Гідрохімія та радіогеохімія річок і боліт Житомирської області / Сніжко С.І., Орлов О.О., Закревський Д.В. / За ред. С.І. Сніжка, О.О. Орлова. – Житомир: Волинь, 2002. – 264 с.

18. Грубінко В. В. Системна оцінка метаболічних адаптацій у гідробіонтів / В. В. Грубінко // Наук. записки Тернопіль. держ. пед. у-ту ім. В. Гнатюка. Серія: Біологія, № 4 (15). Спец. вип.: Гідроекол. – 2001. – С. 36-39.
19. Данильченко О. П. Оценка действия малых концентраций трипропилоловохлорида на моллюска *Lymnaea stagnalis* L. по изменению показателей размножения / О. П. Данильченко, Н. С. Строганов // Научн. докл. высш. шк.: Биол. науки, 1974. – № 6. – С. 130-139.
20. Данильченко О. П. Процессы приспособления и регуляции у моллюсков и эмбрионов рыб при изменении среды / О. П. Данильченко // Реакции гидробионтов на загрязнение. – М, 1983. – С. 103-112.
21. Забитівський Ю. М. Мінливість морфологічних показників цьогорічок коропа і активності їх травлення залежно від умов вирощування та за дії важких металів: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.10 / Ю. М. Забитівський. – К., 2002. – 20 с.
22. Ігнатюк О. А. Залежність продукційно-енергетичних показників біосистем від рівня забруднення середовища важкими металами: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук / О. А. Ігнатюк. – К., 1999. – 20 с.
23. Киричук Г. Е. Особенности накопления ионов тяжелых металлов пресноводными моллюсками / Г. Е. Киричук // Вісн. Житомир. пед. ун-ту. – вип. 10, 2002. – С. 170-175.
24. Киричук Г. Є. Накопичення іонів важких металів прісноводним молюском *Viviparus viviparous* (*Mollusca: Gastropoda: Pectinibranchia*) / Г. Є. Киричук // Еколого-функціональні та фауністичні аспекти дослідження молюсків, їх роль у біоіндикації стану навколишнього середовища: Зб. наук. пр. – Житомир: Волинь, 2004. – С. 72-76.
25. Колосова Л. В. Использование для токсикологических исследований прудовика обыкновенного / Колосова Л. В., Данильченко О. П.,

- Бузинова Н. С. // Методы биоиндикации и биотестирования природных вод. – Л., 1987. – № 1, – С. 98-103.
26. Линник П. Н. Тяжелые металлы в поверхностных водах Украины: содержание и формы миграции / П. Н. Линник // Гидробиол. журн. – 2009. – Т. 35, № 1. – С. 22-42.
27. Метелев В. В. Водная токсикология / Метелев В. В., Канаев А. И., Дзасохова Н. Б. – М.: Колос, 1971. – 247 с.
28. Мур Дж. Тяжелые металлы в природных водах. Контроль и оценка влияния / Дж. Мур, С. Рамамурти. – М.: Мир, 1987. – 288 с.
29. Никаноров А. М. Биомониторинг металлов в пресноводных экосистемах / А. М. Никаноров, А. В. Жулидов. – Л.: Гидрометеиздат, 1991. – 312 с.
30. Прозорова Л. А. Морфология кладок брюхоногих моллюсков Приморского края / Л. А. Прозорова // Размножение и кладки яиц моллюсков: Тр. ин-та зоол. АН СССР. – Т. 228. – Л.: ЗИН АН СССР, 1991. – С. 74-110.
31. Стадниченко А. П. Методи дослідження молюсків / [Стадниченко А. П., Сластенко М. М., Куркчі Л. М., та ін.] – К., 1999. – 64 с. – ДЕП. в ДНТВ України 22.03.1999, № 78 – Ук 99.
32. Старобогатов Я. И. Класс брюхоногие моллюски (*Gastropoda*) // Определитель пресноводных беспозвоночных Европейской части СССР (планктон и бентос) / Я. И. Старобогатов. – Л.: Гидрометеиздат, 1977. – С. 152-174.
33. Строганов Н.С. Изучение токсичности водной среды на брюхоногих моллюсках / Н. С. Строганов, Л. В. Колосова // Методики биол. исслед. по вод. токсикол. – М.: Наука, 1971. – С. 216-218.
34. Biesinger K. E. Effects of metal salt mixtures on *Daphnia magna* reproduction / Biesinger K. E., Christensen G. M., Fiandt J. T. // Ecotoxicol. and Environ. Safety. – 2006. – 11, N1, - P. 9-14.

35. *Khargarot B.S.* Sensitivity of freshwater pulmonate snails, *Lymnaea luteola* L., to heavy metals / *Khargarot B. S., Ray P. K.* // *Bull. Environ. Contam and Toxicol.* – 1988. – 41, N2. – P. 202-213.
36. *Kulikova I.* Heavy metal watal's organ / *Kulikova I., Seisuma Z., Legzdina M.* – Budapest, 2005. – P. 141-151.
37. *Phillips D. J. H.* The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuariue environments – a review / *Phillips D. J. H.* // *Environ. Pollut.* – 2007. – N 13. – P. 317-381.
38. *Pili Anne* Effects of pollution on freshwater organisms / *Pili Anne, Carle Daria O., Kline Edward, Pickering Quentin, Lazorcza James* // *J. Water Pollut. Contr. Fed.* – 1988. – 60, N6. – P. 994-1065.