

Assessment of Great pond snail toxicological resistance towards manganese (II) ions in water environment

T.V. Pinkina, A.A. Pinkin

Zhytomyr National Agroecological University
Stary Boulevard 7, Zhytomyr, 10008, Ukraine

E-mail: pinkinatv61@gmail.com; Orcid: 0000-0001-9443-8406

E-mail: Anatoliypinkin@gmail.com; Orcid: 0000-0002-6413-1494

Submitted: 12.01.2018. Accepted: 12.03.2018

Under the conditions of growing environmental pollution heavy metal ions took one of the first places among other pollutants. Nowadays annual anthropic entry of a great number of heavy metals into hydrosphere several times exceeded the entry from natural sources. The topicality of the research influence of the above pollutants on hydrobionts with the aim of introducing the research results to the ecological monitoring system is beyond doubt. *Lymnaea stagnalis* (Linné, 1758) a secondary-water lung pondmollusc, can be a suitable object for toxicological investigations. The fundamental ecotoxicological indices of *L. stagnalis* effected by various concentrations of Mn^{2+} water environment and the ranges of acute – and chronically lethal, transferred and subthreshold toxicant concentrations as well as the decrease of toxicity of ions covered have been determined. The fundamental ecotoxicological indices of *L. stagnalis* effected by various concentrations of Mn^{2+} water environment and the ranges of acute – and chronically lethaled, transferred and subthreshold toxicant concentrations as well as the decrease of toxicity of manganese ions (II) covered have been determined. The effect of Mn^{2+} on dimensional and weight characteristics and the survival of adult and young mollusks has been studied. Reversibility of poisoning *L. stagnalis* by different Mn^{2+} has been studied. Restoration of the broken functions is of a reversible nature. The linear indices varying considerably with toxicity have been distinguished. At first the aquatic balance in the bodies of mollusks is becoming positive along with the increase in the heavy metal concentrations in the environment, while under the toxicant concentration increase the balance gradually tends to be positive. The paper covers the effects of manganese ions on the pond snail behavioral reactions. The paper investigates the effects of Mn^{2+} (acute lethal concentration – 100–195 mg/dm³; chronically lethal – 35–95 mg/dm³; transferred – 0,3–20 mg/dm³; subthreshold concentration – 1 mg/dm³) on the peculiarities of *L. stagnalis* reproduction and development. There have been determinate sensitive ethological responses of *L. stagnalis* at their reproductive period in the polluted environment. The studies have been made into structural stability of mollusk syncapsule, the peculiarities of their texture and formation physiology as well as an incidence of evolution disturbances at different intoxication levels by manganese ions (II). The research makes it possible to ecologically estimate the nature of the substance influence and the response of the affected organism.

Key words: *Lymnaea stagnalis* L.; Mn^{2+} ; toxicity; reproduction; syncapsule; teratogenic disturbance

Оцінка токсикорезистентності ставковика озерного (Mollusca: Gastropoda) до впливу йонів мангану (II) у водному середовищі

Т.В. Пінкіна, А.А. Пінкін

Житомирський національний агроекологічний університет
Старий бульвар 7, Житомир, 10008, Україна

E-mail: pinkinatv61@gmail.com; Orcid: 0000-0001-9443-8406

E-mail: Anatoliypinkin@gmail.com; Orcid: 0000-0002-6413-1494

В умовах всезростаючого забруднення навколишнього середовища серед інших полютантів на одне з перших місць вийшли йони важких металів. На сьогоднішній день щорічне надходження багатьох важких металів у гідросферу в

кілька разів перевищує надходження з природних джерел. Не викликає сумнівів актуальність дослідження впливу цих поллютантів на гідробіонтів з метою впровадження отриманих результатів в систему екологічного моніторингу. Зручним об'єктом для токсикологічних досліджень може бути вторинноводний легеневиий моллюск – ставковик *Lymnaea stagnalis* (Linné, 1758). Встановлено основні екотоксикологічні показники ставковика озерного за дії на нього різних концентрацій Mn^{2+} водного середовища та діапазони гостролетальних, хронічних летальних, сублетальних та підпорогових концентрацій токсиканту. Визначена ступінь токсичності досліджуваної речовини. Досліджено вплив йонів мангану (II) на розмірно-вагові характеристики і виживання моллюсків. Досліджена зворотність отруєння моллюсків різними концентраціями цього токсиканту. Встановлено, що відновлення втрачених функцій здійснюється у зворотному порядку. Виділено лінійні показники, які найбільш чутливі до зміни токсичності. Водний баланс у організмі моллюсків з підвищенням концентрації важких металів у середовищі спочатку стає позитивним, але з підвищенням концентрації токсиканту поступово і плавно зсувається в негативний бік. Визначено вплив Mn^{2+} на поведінкові реакції ставковика озерного. Досліджено вплив Mn^{2+} (гостролетальні концентрації – 100–195 мг/дм³; хронічні летальні – 35–95 мг/дм³; сублетальні – 0,3–20 мг/дм³; підпорогові концентрації – 1 мг/дм³ і нижче) на особливості репродукції та розвитку ставковика озерного. Знайдено чутливі етологічні реакції ставковика озерного в репродукційний період за перебування його у отруєному середовищі. Визначено частоту і тривалість паруваль. Проведено порівняльне вивчення стійкості структур синкапсул моллюсків, виявлено особливості їх будови, фізіології формування та встановлено частоту появи вад розвитку за різних рівнів інтоксикації йонами мангану (II). Дослідження дають можливість оцінити з екологічної точки зору характер впливу речовини й реакцію-відповідь організму, що сприймає цей вплив.

Ключові слова: ставковик озерний; Mn^{2+} ; токсичність; репродукція; синкапсула; тератогенні порушення

Вступ

Антропогенне надходження хімічних елементів у навколишнє середовище перевищує природні потоки або співставимо з ними (Guseva et al., 2000; Mur & Ramamurti, 1987; Matsui, 1991). У наш час токсиканти стали вагомим чинником зовнішнього середовища, що впливають на живі організми, у тому числі й на гідробіонтів (Arsan, 2003; Pinkina, 2010b). Дуже гостро це питання стоїть в Україні. Поміж інших поллютантів на одне з перших місць вийшли важкі метали, які є найбільш розповсюдженими високотоксичними речовинами, що здатні довго зберігатися у середовищі. Водні організми, здебільшого, надзвичайно чутливі до впливу цих токсикантів (Khangarot & Ray, 1988). Важкі метали, що присутні у природних водах, належать до групи мікроелементів, що в мікро- та ультрамікродозах відзначаються високою фізіологічною активністю. Сполучення проблеми мікроелементів і проблеми хімічного забруднення природного середовища у значній мірі обумовлене тим, що одні і ті ж елементи за певних концентрацій виконують роль ініціаторів та активаторів біохімічних процесів у організмах, а за досягнення деяких граничних рівнів накопичення спричиняють токсичний вплив на живі організми, являючись отрутами локальної дії. Поміж важких металів для дослідження було обрано Манган, відомості про токсичну дію якого на гідробіонтів є вкрай обмеженими.

Біологічна роль Мангану визначається його зв'язками з ферментами (пролідазою, імідодипептидазою, серин-оксиметилтрансферазою, піруваткарбоксилазою та ін.), гормонами та вітамінами. Зв'язок Мангану з ферментами проявляється входженням його в молекули деяких ферментів та у вигляді неспецифічної їх активації. Манган має велике значення у циклі ди- та трикарбонових кислот, активує карбоксилазу, впливає на ріст, розмноження тварин, імунологічну стійкість організму. За підвищеного вмісту Мангану в середовищі існування та організмі тварин спостерігається враження деяких органів та тканин (Nozdrihina, 1977). Є дані, що вказують на мутагенну та гонадотоксичну дію Мангану (Matsui, 1991).

У проведенні еколого-токсикологічного моніторингу можуть бути використані будь-які групи тварин. Широко застосовуються червононогі легеневи моллюски як індикаторні організми (Stroganov & Kolosova, 1971; Canton & Slooft, 1977; Brown, 1980, Kolosova, Daniilchenko & Buzinova, 1987, Horuzhaya, 1989). З чисельної групи цих моллюсків для дослідження було використано ставковика озерного *Lymnaea stagnalis* (Linné, 1758), оскільки цей моллюск є одним із найпоширеніших компонентів гідробіоценозів Українського Полісся і складає значну частину їх біофонду.

Забруднення води важкими металами та іншими токсичними речовинами впливає на фізіологічні та поведінкові характеристики моллюсків (Flerov, 1974). Порівняльне вивчення різних функціональних систем організму дозволяє визначити найбільш слабе місце у комплексі порушень і дає можливість обґрунтовано говорити про токсичний ефект і порогову концентрацію поллютанта.

Особливу увагу у ході досліджень приділено процесу розмноження та змін, котрі відбуваються у здійсненні репродуктивної функції моллюсків за впливу на них йонів мангану (II) водного середовища. Важливість вивчення особливостей розмноження гідробіонтів у токсичному середовищі підкреслюють і інші дослідники (Stroganov & Kolosova, 1971), адже від нього, в першу чергу, залежать темпи відтворення чисельності популяцій, їх густини і, врешті решт, – збереження видів. Дослідження актуальні з огляду на те, що без цих відомостей не можна обійтися у перспективі при біотестуванні екологічного моніторингу вод.

Матеріали та методи

У дослідях використано 178 екземплярів ставковика озерного *L. stagnalis*, зібраного вручну у басейні Середнього Дніпра р. Тетерів (м. Житомир). У лабораторію тварин доставляли у поліетиленових пакетах із невеликою кількістю води. Кожен екземпляр зважували (ваги ВЛТК-500), визначали висоту черепашки (середня висота черепашки – 39,5±1,1 мм).

Умови експерименту: температура води – 19–23 °С, рН 7,2–8,6, вміст кисню 8,6–8,9 мг/дм³. Токсикант – манган (II) хлорид (ч.д.а.). Розчин готували на дехлорованій відстоюванням (1 доба) воді з Житомирської водогінної мережі.

У лабораторії, задля здійснення тривалих спостережень за фізіологічними відправленнями, моллюсків по 5 екз. уміщали у скляні 3-літрові ємності. Ставковикам як корм давали листя кульбаби. Видалення харчових залишків та заміну корму проводили щоденно.

Токсикологічні досліді поставлено за методикою В. А. Алексєєва (Alekseev, 1981). Перед основними дослідженнями поставлено по два орієнтовних досліді для застосованого у роботі токсиканту. У першому – визначали концентрації, у яких гинуть або залишаються живими 100% тварин. Діапазон між летальною та недіючою концентраціями було обрано вихідним для основного досліді, а концентрація токсиканту, за якої гинуло 100% тварин, була концентрацією маточного розчину. У другому орієнтовному досліді, який за тривалістю відповідав основному, встановлювали діапазони гостролетальних, хронічних летальних, сублетальних та підпорогових концентрацій. В основному досліді використано 4 концентрації, по одній із кожного діапазону концентрацій. Концентрацію йонів мангану створювали додаванням у відстоюну водопровідну воду розрахованої (по катіону) кількості манган (II) хлориду. Контролем слугували тварини, поміщені у чисту воду. Тривалість досліді – 70 діб.

В основному досліді використано 4 концентрації, по одній із кожного діапазону концентрацій (табл. 1).

Таблиця 1. Концентрації йону мангану (мг/дм³), використані у досліді.

Йон	Концентрації			
	Гостролетальні	Хронічні летальні	Сублетальні	Підпорогові
Mn ²⁺	110	30	0,3	0,03

Під час гострого 48-годинного експерименту встановлювали основні екотоксикологічні показники ставковика озерного за впливу на нього Mn²⁺: LC₀, LC₅₀, LC₁₀₀, ступінь токсичності, порогову концентрацію, латентний період, летальний час, летальний середній час, коефіцієнт витривалості (Kitaev & Kalinichenko, 1974), час виживання, коефіцієнт пристосування (Malacea, 1968).

Кладки з субстрату знімали скальпелем або м'якою щіточкою і поміщали для подальшого розвитку у чашки Петрі. Вивчення і виміри синкапсул та їх елементів проводили під мікроскопом МБС-9 та МБІ-3. Підраховували загальну кількість яйцевих капсул у синкапсулі і зигот в одній яйцевій капсулі. Довжину яйцевих капсул вимірювали по внутрішній капсульній мембрані. Молодь переносили у скляні ємності на першу-другу добу після виходу її з синкапсул, попередньо зваживши та знявши лінійні показники.

В експерименті детально вивчали і порівнювали з нормою стан та просторове розміщення яйцевих капсул. Відмічали і ретельно фіксували у робочих зошитах наявність аномалій у морфології кладок та тератогенних порушень. Замальовування кладок яєць та їх елементів, а також усіх морфологічних відхилень від норми проводили за допомогою рисувального апарату РА-1 для МБС-9.

Отримані цифрові дані оброблено з використанням стандартних методів варіаційної статистики (Lakin, 1990) та спеціальних комп'ютерних програм.

Результати та обговорення

Перш ніж з'ясувати особливості реагування будь-яких фізіологічних систем організму моллюсків на різні рівні інтоксикації їх йонами мангану ми вирішили висвітлити загальні особливості токсичного впливу на *L. stagnalis* означеного полютанту, для чого нами було визначено основні токсикологічні показники (табл. 2).

Таблиця 2. Основні токсикологічні показники (мг/дм³) для ставковика озерного, підданого 48-годинній дії розчинів Mn²⁺

Йон	LC ₀	LC ₅₀ *	LC ₁₀₀	Ступінь токсичності	Порогова концентрація
Mn ²⁺	90	500	3000	500	0,3

*Встановлено графічно (Prozorgovskiy, 1960)

Виходячи з отриманих токсикологічних показників, встановлено зони токсичної активності Мангану – < 90–3000 мг/дм³. Згідно зі шкалою токсичності речовин для гідробіонтів (Meteliev, Kapaev & Dzasohova, 1971) досліджена нами речовина,

яка в гострих дослідах викликає загибель 50% тварин, за ступенем токсичності віднесена до групи слабкотоксичних речовин (вище 100 мг/дм³).

Слід відмітити, що не дивлячись на досить широкий розмах показників ступеню токсичності та діапазонів концентрацій від гостролетальних до підпорогових (табл. 3), молюски досить чутливі до йонів мангану; на це вказують значення порогових концентрацій цього поліянтану. Навіть якщо організм реагує серйозними морфологічними та фізіологічними зрушеннями, знаходячись у розчинах з більшими концентраціями (особливо чітко це можна прослідкувати саме за впливу Мангану), перші реакції на токсикант з'являються за досить низьких його концентрацій.

Таблиця 3. Діапазони концентрацій йонів мангану (II) (мг/дм³) за характером їхнього впливу на ставковика озерного

Йон	Концентрації			
	Гостролетальні	Хронічні летальні	Сублетальні	Підпорогові
Mn ²⁺	195 – 100	95 – 35	20 – 0,3	0,03 і нижче

При визначенні токсикологічних показників враховано *швидкі поведінкові та фізіологічні реакції молюсків*: рухову активність тварин, ступінь ослизнення їх тіла, реакції уникнення та випадіння. Поведінка тварин у токсичному середовищі є найпершим та найбільш чутливим показником його токсичності. За порогових концентрацій Mn²⁺ перша реакція на їх вплив проявляється у підвищенні рухової активності молюсків. З підвищенням концентрації досліджуваного токсиканту (від 0,3 до 30 мг/дм³) у ставковика озерного спостерігається посилення секреторної діяльності залозистих клітин, що виділяють слиз. Таке явище триває впродовж перших двох діб експерименту і скероване на послаблення токсичного ефекту поліянтану.

Швидкою фізіологічною реакцією *L. stagnalis* у відповідь на вплив йонів мангану (II) різних концентрацій є набряк їх тіла, спричинений зрушенням водного балансу. За сублетальних концентрацій об'єм тіла збільшується у 1,55-2,3 рази і це, в свою чергу, не дає тваринам змоги втягнути тіло всередину черепашки. Спостерігається, так звана, реакція випадіння або вивисання.

По мірі збільшення концентрацій (діапазони хронічних летальних та гостролетальних) Mn²⁺ спостерігається зневоднення тіла молюсків (об'єм тіла зменшується у середньому на 2,5 мм³). Після хаотичних спроб залишити токсичне середовище, ставковики опускаються на дно акваріумів і, втягнувши тіло всередину черепашки, знерухомлюються. Значення *латентного періоду*, який визначали за візуальними спостереженнями, вказують на те, що ставковики чутливі навіть до дуже невисоких концентрацій йонів мангану (II) – завжди можна спостерігати зміни поведінки тварин. Перші етологічні реакції у розчинах токсиканту спостерігаються через 5–15 хв (діапазони концентрацій в межах 300–3000 мг/дм³). За низьких концентрацій поліянтану (0,03 мг/дм³) перші незначні зміни поведінки тварин спостерігаються в кінці першої на початку другої доби експерименту, що вказує на слабку токсичність цього елемента за незначних концентрацій його у воді.

Концентрація Mn ²⁺ (мг/дм ³)	3000,0	300,0	30,0	3,0	0,30	0,03
Латентний період (год.)	0,10	0,25	1,0	2,0	3,36	26,0

Тривалість розвитку необоротного отруєння (*летальний час*) зменшується зі збільшенням концентрації розчину. У розчинах йонів мангану (II) оборотність отруєння молюсків досить незначна: ставковики, перенесені у чисту воду у стані втрати рухливості, майже завжди гинуть.

Концентрація Mn ²⁺ (мг/дм ³)	3000,0	300,0	30,0
Летальний час (год)	1,1	14,0	26,3

Значення *летального середнього часу* підтверджують віднесення йонів мангану (II), до визначеного нами ступеня токсичності.

Концентрація Mn ²⁺ (мг/дм ³)	3000	300
Летальний середній час (год)	3	47

Час виживання менший від летального середнього часу за високих концентрацій токсиканту (у таких розчинах інтоксикація організмів наростає стрімко). Порівняння значень показників часу виживання та летального середнього часу дозволяє зробити висновок, що після настання фази розвитку смертельного отруєння загибель 50% тварин в усіх концентраціях токсиканту настає через досить невеликий проміжок часу.

Концентрація Mn ²⁺ (мг/дм ³)	3000,0	300,0	30,0	3,0
Час виживання (год)	1,3	14,2	45	47,5

Значення коефіцієнту витривалості (КВ) тим менші, чим меншою є концентрація токсиканту, тобто тварини до дії менших концентрацій пристосовуються краще. За малих концентрацій йону мангану (II) неможливо встановити КВ, оскільки у таких розчинах відсутня загибель усіх особин до кінця гострого досліду.

Концентрація Mn^{2+} (мг/дм ³)	3000
Коефіцієнт витривалості	3,86

Експериментально встановлено, що значення коефіцієнту пристосування мають невеликі значення для Mn^{2+} , оскільки він відноситься до слабкотоксичних елементів (1 год). Пояснюється це вищими значеннями летальних концентрацій та більшою різницею між летальними та сублетальними концентраціями для слабкотоксичних важких металів.

Досліджуючи зміни маси тіла молюсків та висоти черепашки у токсичному середовищі, дійшли висновку, що для зміни цих показників визначальним критерієм є час, оскільки, за перші 30 діб експерименту не спостерігалось будь-яких значущих змін цих показників. І лише з подовженням тривалості перебування тварин в отруєному середовищі лінійні розміри та маса тіла ставковиків зазнають суттєвих змін щодо контрольних значень. Встановлено, що товщина черепашки та маса тварин є більш чутливим показником, ніж висота черепашки.

За впливу різних концентрацій йонів мангану (II) висота черепашки збільшується з плином часу тим повільніше, чим більшою є концентрація розчину токсиканту. Проте ріст навіть за хронічних летальних концентрацій мангану не припиняється до моменту загибелі тварин.

За впливу Mn^{2+} у сублетальних та хронічних летальних концентраціях спостерігається різке порушення мінерального обміну *L. stagnalis*, що проявляється у прогресуючому потоншенні мушлі цих молюсків. Такі процеси відбуваються тим стрімкіше, чим більшою є концентрація токсиканту, і наростають з подовженням впливу останнього. За впливу хронічних летальних концентрацій на момент загибелі тварин (35–40 доба експерименту) різниця у показниках товщини мушлі щодо середніх контрольних значень становить 52%.

Зміни маси тіла молюсків також залежать від концентрації йонів металу та тривалості їх впливу. У розчинах підпорогових концентрацій маса молюсків протягом хронічного досліду зростає у відповідності до її росту у групі контрольних тварин. Молюски активно живляться і більшість трофологічних показників у них реєструється на рівні контролю. Водний баланс за впливу цих концентрацій не порушується.

У сублетальних концентраціях Mn^{2+} спостерігається тенденція більш повільного наростання маси молюсків, ніж у контролі. Це можна пояснити як зрушенням водного балансу у негативний бік, так і пригніченням споживання молюсками корму. Тобто деструктивні зміни в організмі молюсків з'являються у цих розчинах досить скоро. За впливу йонів мангану (II) хронічних летальних концентрацій, ставковики протягом перших тижнів досліду різко втрачають загальну масу тіла. У цих розчинах вони споживають мало корму, а за 5–6 днів до загибелі повністю перестають жити. Повільне та незначне збільшення маси тіла в одному випадку і різке зменшення маси тіла піддослідних тварин – в іншому не може мати пристосувального значення і, отже, є наслідком патологічних змін у організмі досліджуваних гідробіонтів.

Відомо, що існує взаємозв'язок між лінійними розмірами та масою тіла молюсків (Pinkina, 2008). Дослідження лінійно-вагових співвідношень молюсків, які перебували в отруєному середовищі, показали, що значення величин маси тіла ставковика озерного у контролі та за впливу підпорогових і сублетальних концентрацій йонів металів співвідносяться зі значеннями висоти мушлі: зі зростанням маси тіла зростають лінійні розміри молюсків (рис. 1).

Для описання змін лінійно-вагових характеристик молюсків найкраще підходять експоненційна та степенева функції (Umпов, 1976). Порівняння отриманих значень маси (m) в залежності від висоти мушлі (h) показало, що експоненційна функція краще апроксимує залежність маси від лінійних розмірів ставковиків. Коефіцієнт достовірності (R^2) такої апроксимації досить великий (0,93–0,99) (рис. 1). Аналіз отриманих залежностей маси молюска від висоти його мушлі показує, що у розчинах з йонами мангану (II) за впливу підпорогових та сублетальних (витримуваних) концентрацій швидкість динаміка змін маси тіла не відрізняється від такої у контролі (рис. 1). За впливу хронічних летальних концентрацій досліджуваного важкого металу маса ставковиків досить різко зменшується зі збільшенням висоти мушлі, що вказує на розлад регуляторних механізмів у організмі цих тварин (рис. 1).

Відомо (Veselov, 1968, Pinkina, 2010с), що за впливу токсичної речовини на організм молюсків спостерігається фазність реагування: байдужість, стимуляція, депресія, смерть. У розчинах гостролетальних концентрацій йонів мангану (II), ставковики проходять лише дві останні фази: після депресії, яка виникає майже відразу після уміщення тварин у ці розчини, через кілька діб вони гинуть.

У діапазоні хронічних летальних концентрацій кількість особин, які вижили, з плином часу стрімко зменшується, і відсоток виживших особин у 2 рази менший, ніж у контролі. Розчини сублетальних концентрацій спричиняють стимулюючу дію на ставковиків. Це проявляється у збільшенні відсотку особин, які дожили до кінця експерименту порівняно з контрольною групою тварин. У розчинах мангану ці показники вищі контрольних у середньому на 16%.

У розчинах підпорогових концентрацій (табл. 1) відсоток молюсків, які вижили у 70 діб експерименту, суттєво не відрізняється від значень, отриманих у контрольній групі тварин і знижується тільки в кінці досліду (на 2%). Проте слід зазначити, що вплив концентрацій, які тривалий час сприймаються організмом як недіючі (бо сила їхнього впливу спочатку не сягає рівня реактивності тканин), проявляється по мірі збільшення часу перебування молюсків у цих розчинах і відповідно зі збільшенням дозового навантаження на організм тварин.

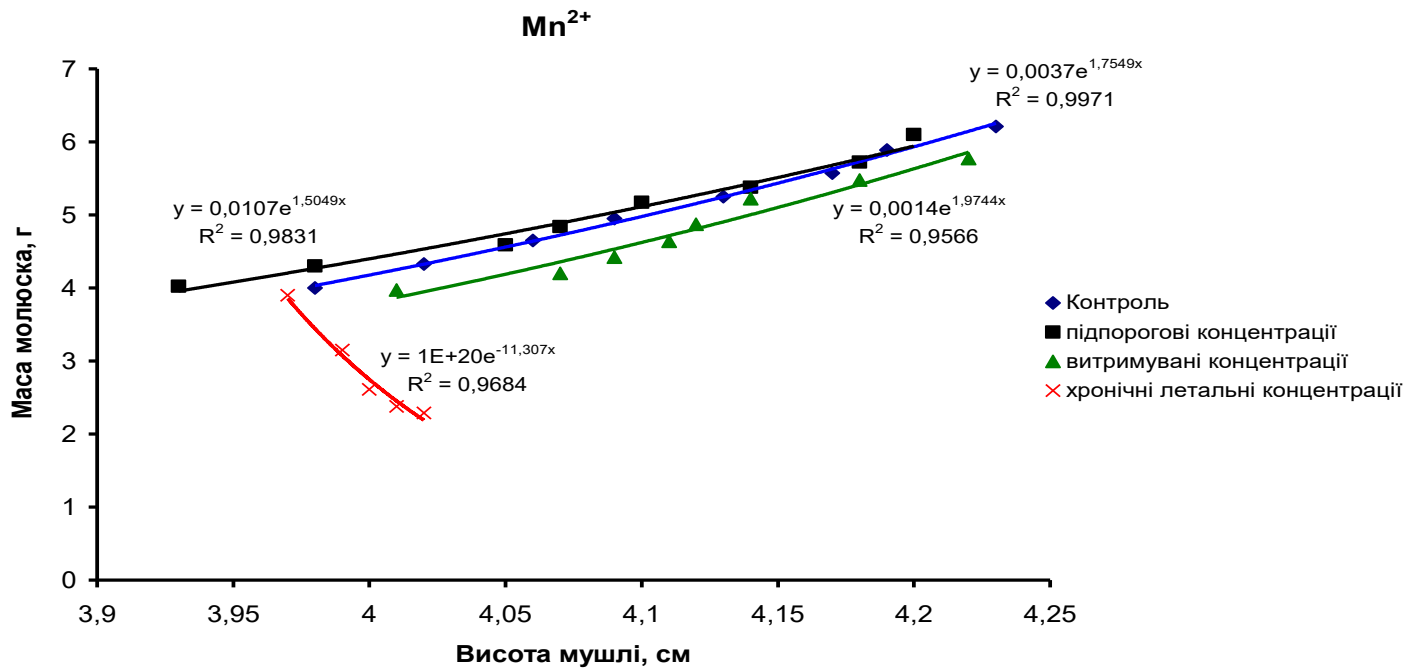


Рис. 1. Залежність зміни загальної маси тіла від висоти мушлі *L. stagnalis* за дії Mn²⁺, M±m.

При вивченні токсикорезистентності будь-якої групи тварин, як досить чутливий показник можна використовувати співвідношення води та сухого залишку, що вказує на наявність певних патологічних змін у організмі тварин. Пояснюється це винятковим значенням води у перебігу всіх фізіологічних та біохімічних процесів життєдіяльності будь-якого організму, зокрема, молюсків (Kolesnik & Saykin, 2002). Щоби встановити характер порушень обміну у тілі ставковиків, які перебували в отруєному середовищі, нами були встановлені співвідношення середніх значень сирової маси тіла тварин і маси сухої речовини (після висушування у сушильних шафах). Дослідження показало, що найсильніший токсичний вплив на процеси обміну у тілі ставковиків мають розчини хронічних летальних концентрацій йонів мангану (II). За впливу цих концентрацій спостерігаємо стійке негативне зрушення водного балансу молюсків, що проявляється у зневодненні їх тіла, а через це значення показників відношення сухої маси тіла до сирової його маси є найменшими порівняно з контрольними значеннями (відхилення становлять у середньому 8% у негативний бік, $P < 0,05$). Найбільші коливання значень обговорюваного показника спостерігаємо за сублетальних концентрацій токсиканту. За впливу Mn²⁺ спостерігаємо посилення інтоксикації і, відповідно, статистично вірогідне зменшення показників відношення маси сухої речовини тіла до його сирової маси ($P < 0,05$).

За впливу підпорогових концентрацій полютанту (табл. 1) токсичний вплив має місце: усі отримані значення досліджуваного показника є меншими контрольних. Тривалий вплив малих концентрацій Mn²⁺ призводить до порушення гомеостазу тварин, поступового наростання зневоднення їх тканин, розладів мінерального обміну. І хоча значення показників відношення сухої речовини тіла до його сирової маси наближаються до контрольних, проте, навіть незначна, на перший погляд, їх відміна від останніх є статистично вірогідною ($P < 0,05$). Отже, за впливу йонів мангану (II) водного середовища, загальна маса молюсків переважно збільшується (на 25%), а маса сухого залишку м'якого тіла та мушлі зменшується (на 12%). Збільшення загальної маси тіла цих тварин в отруєному середовищі (за виключенням впливу хронічних летальних концентрацій) відбувається в основному за рахунок значного накопичення води в їхньому тілі.

Найважливішими показниками, на які слід звернути увагу при дослідженні токсичного впливу речовини на організм тварини є показники, котрі стосуються особливостей процесів розмноження та розвитку в токсичному середовищі. Це є важливим з огляду на те, що від цих процесів залежить біорізноманіття та відновлення природних ценозів, тому дослідження особливостей репродукції молюсків у токсичному середовищі є актуальним. З метою вивчення автогамії, молюсків утримували як групами (по 5-7 особин), так і ізольовано. І хоча гаметогенез у них зазвичай асинхронний, сперматогенез та овогенез починаються у них одночасно і протікають сумісно протягом усього життя молюсків. Було відмічено, що відсоток тварин, які вдавалися до самозапліднення під час ізоляції, був у 1,5 рази більший у тварин, які перебували в розчинах з підпороговими та сублетальними концентраціями йонів мангану (II) порівняно з контролем. Хоча у перший тиждень утримання в цих розчинах, вони відкладають значно менше синкапсул (на 16%). Пояснити це можна тим, що попри важливість процесів розмноження, тварини розміщені в токсичне середовище і ізольовані від інших особин, переживають значний стрес і їх фізіологічні відправлення, насамперед, скеровані на процеси виживання за несприятливих умов. У цей період спостерігається збільшення кількості спожитого молюсками за добу корму. І лише після певної адаптації до токсичного середовища, коли включаються репараційні механізми їх організму, молюски вдаються до самозапліднення і починають досить активно відкладати синкапсули.

Через 30 діб ізольованих тварин переносили в акваріуми до моллюсків, які утримувалися групами. Було помічено, що копулятивна активність моллюсків збільшується з подовженням часу ізоляції одних особин від інших і є більшою, для моллюсків, котрі знаходяться в розчинах сублетальних концентрацій Mn^{2+} . При спарюванні партнер, що знаходився у стані ізоляції, довше грає роль самця. При наступній копуляції ця особина стає функціонально самкою, а моллюск, що раніше був самкою, не надає переваги ролі самця чи самки. За перебування в розчинах хронічних летальних концентрацій статова поведінка через 10–15 діб інгібується як у ізольованих так і у особин, що перебувають у масовій культурі. У перахунку на одну особину, встановлено, що поодинокі моллюски відкладають більше кладок, ніж ті, що утримувалися групами. Зменшення швидкості розмноження під час групового утримання пояснюється множинністю копуляцій.

Цей ефект пов'язаний зі значним подовженням інтервалу між кладками у особин, що виступають самками. Збільшення часу між кладками не компенсується збільшенням розмірів кладки. Високі показники автогамії серед ставковиків як у токсичному середовищі, так і у чистій воді (контроль) імовірно, пов'язані з високим ступенем мінливості, а звідси зі здатністю оселятися у прісних водоймах із широкою амплітудою коливання важливих факторів середовища (Pinkina, 2010a). Основою для цього може бути тільки прискорена реалізація генофонду, яка і забезпечує самозапліднення значної частини яйцеклітин. Моллюски досить чутливі до наявності у воді токсикантів, відкладання ними яйцеклітин напряду залежить від якості середовища. Якщо моллюски знаходяться у критичних умовах, вони починають відтворення раніше і прикладають до цього більше зусиль, ніж ті особини, що знаходяться в сприятливих місцях існування (Berezkina, 2002). Це підтверджують і результати наших досліджень.

У гострих та хронічних токсикологічних дослідах нами встановлена фазність у реагуванні репродуктивної системи моллюсків на різні рівні інтоксикації. У ході експерименту були виявлені деякі загальні закономірності реагування репродуктивної системи моллюсків на різні концентрації Mn^{2+} , котрі дали можливість охарактеризувати тенденції змін в організмі моллюсків за різних рівнів інтоксикації. Відмічено загальний стимулюючий ефект йонів мангану (II) на статеву поведінку моллюсків, що проявляється у сильній активізації пошукової поведінки партнера. Така активність є тим вищою, чим вища концентрація Mn^{2+} у середовищі.

Гостролетальні концентрації – такі, за яких повністю подавляються основні функції організму моллюсків, в тому числі і репродуктивна і вони гинуть протягом декількох діб. У серії чисельних дослідів встановлено, що ставковики навіть за досить високих концентрацій Mn^{2+} можуть жити декілька діб. Загибель протягом перших двох діб відмічено за концентрації 700 мг/дм³; через три доби – за 600 мг/дм³; чотири доби 500 мг/дм³ і сім діб – 400 мг/дм³. У цих розчинах моллюски інтенсивно виділяли слиз, не живились, не розмножувались, проте відмічалася надзвичайна активізація пошукової поведінки партнера У діапазоні гостролетальних концентрацій, за яких моллюски жили до 10 діб (від 100 до 195 мг/дм³) у середньому майже 87% моллюсків поводять себе як "самці": вони вип'ячують преуціум, стають надзвичайно активними, хаотично і уривчасто рухаються у пошуках партнера. Проте, стикаючись із сусідніми особинами вони не зближуються з ними, парування не відбувається. Тільки за концентрації 200 мг/дм³ спостерігалось парування і відкладання синкапсул. Відмічені наступні види аномалій у будові відкладених моллюсками кладок: багатозиготність яйцевих капсул, деспіралізація стрічки з яйцевими капсулами; зрощення кількох яйцевих капсул звичайного розміру в одну крупну та здвоєння яйцевих капсул (рис. 2, В, Г, Д, Е). Як особливу аномалію у цих розчинах слід виділити двозиготність яйцевих капсул (близько 89 % від загальної кількості).

Хронічні летальні концентрації – такі, за яких пригнічені основні життєві функції моллюсків (репродуктивна у тому числі) і протягом перших місяців впливу наступає загибель як дорослих особин, так і молоді. У дослідах такий ефект спостерігається за концентрації 35–95 мг/дм³ Mn^{2+} : моллюски гинуть впродовж перших 30 діб експерименту. За хронічних летальних концентрацій йонів мангану (II) у середовищі (30 мг/дм³) статеву активність моллюсків також підвищена, вони активно шукають партнерів, майже не споживають корм. У цих розчинах, на відміну від попередніх, зрідка відбуваються парування (їх кількість майже вдвічі менша ніж у контрольній групі тварин) Проте, стресова дія токсиканту проявляється у цих випадках у тому, що ставковики відкладають аномальні порожні синкапсули, які являють собою довгі слизові шнури довжиною 180–300 мм (рис. 2А). На 4–5 добу статеву активність зменшується і моллюски відкладають повноцінні кладки, хоча дещо коротші ніж у контролі (табл. 4). Очевидно, у них включаються репараційні механізми і організм тварин справляється зі стресом. Довжина капсул та їх кількість у синкапсулах у розчині Mn^{2+} є дещо меншою, ніж у контролі (табл. 4, 5).

Таблиця 4. Вплив Mn^{2+} на довжину (мм) синкапсул та яйцевих капсул *Lymnaea stagnalis*

n	Довжина синкапсули, мм				Довжина капсули, мм				
	lim	M±m _m	σ	V	n	lim	M±m _m	σ	V
Контроль									
40	21,8-42,3	32,86±0,92	5,81	17,68	40	1,27-1,61	1,37±0,01	0,09	6,25
Mn^{2+} 0,03 мг/дм ³									
19	15,9-43,1	29,09±1,61	7,01	24,16	19	0,98-1,44	1,23±0,03	0,13	10,72
Mn^{2+} 0,3 мг/дм ³									
8	25,8-43,3	35,41±2,04	7,01	24,16	8	1,08-1,54	1,26±0,05	0,15	11,54
Mn^{2+} 30 мг/дм ³									
11	15,8-40,2	28,31±2,63	8,74	30,86	11	1,17-1,52	1,33±0,03	0,11	8,38

Таблиця 6. Вплив Mn^{2+} на висоту черепашки (мм) молоді *Lymnaea stagnalis*

n	Довжина молоді, мм			σ	V
	lim	$M \pm m_M$			
	Контроль				
40	1,35-1,78	1,58±0,02	0,11	6,66	
	$Mn^{2+} 0,03$ мг/дм ³				
19	0,28-1,72	1,51±0,03	0,11	7,64	
	$Mn^{2+} 0,3$ мг/дм ³				
8	1,42-1,75	1,59±0,03	0,09	5,73	
	$Mn^{2+} 30$ мг/дм ³				
11	1,39-1,61	1,52±0,02	0,07	4,40	

Сублетальні концентрації – такі, за яких молюски живуть протягом хронічного дослідження, при цьому у них можливе стимулювання одних і пригнічення інших функцій. Цей рівень концентрацій є досить широким. Вплив токсикантів у діапазоні сублетальних концентрацій, як правило, призводить до стимуляції репродуктивної функції. Така стимуляція розмноження є результатом процесом ряду змін у життєдіяльності молюсків. Вона починається з підвищеного виживання у розчинах порівняно з контролем. Підвищення виживання супроводжується розмноженням молюсків на рівні контролю або вище нього, що призводить до збільшення числа відкладених кладок і загальної кількості яєць. Інтенсивність відкладання синкапсул молюсками в розчинах цих концентрацій вдвічі більша, ніж у контролі за цей же проміжок часу, що свідчить про стимулюючу дію цього токсиканту на репродуктивні здатності молюсків (22 синкапсули – у контролі, 50 – у досліді). Таку стимуляцію розглядають не як позитивне явище (підвищення виживання та збільшення кількості потомства), а як порушення реакцій молюсків на зміну зовнішніх умов. Відтворювальна функція як би має здатність протистояти токсичній дії отруту.

Сублетальні концентрації Mn^{2+} лежать у діапазоні від 0,3 до 20 мг/дм³. Хаотична пошукова поведінка ставковиків за цих умов майже припиняється. Середні значення довжини яйцевих капсул дещо менші порівняно з контролем. У 1,5 рази зменшилась кількість капсул у синкапсулі. Однак відсоток екземплярів, які вилупилися значно вищий, ніж у контролі, що може свідчити про стимулюючу дію даних концентрацій токсиканта. Лінійні розміри молоді не відрізняються від таких у контролі. Проте, на фоні стимуляції ембріонального розвитку, відсоток виживання молодих особин втричі менший, ніж у контролі (16 і 58% відповідно).

Частота і характер тератогенних порушень відповідає частоті зустрічальності останніх у контролі (яйцеклітини поза капсулами, часткова деспіралізація, збільшення кількості яйцеклітин в одній капсулі, порожні яйцеві капсули).

Отже, можна дійти висновку, що за сублетальних концентрацій ступінь пошкодження зростає. Результатом є збільшення смертності молоді у кінці дослідження. Поступове пригнічення репродуктивної функції за цих концентрацій токсиканту дає змогу констатувати, що їх слід розглядати як такі, які організм терпить, переносить, а не адаптивно реагує на них.

Підпорогові концентрації – ті, сила впливу яких протягом хронічного дослідження не сягає рівня реактивності тканини. У результаті основні функції молюсків реєструються на рівні контролю (недіючі концентрації). Концентрації, що реєструються під час хронічного дослідження як підпорогові, з часом (по мірі накопичення токсиканту в організмі молюсків) можуть перейти у діапазон сублетальних.

У досліді підпорогові концентрації – 0,3 мг/дм³ Mn^{2+} нижче. Отримані дані щодо зміни тут показників розмноження у ставковика озерного вказують на те, що вони майже не відрізняються від таких, отриманих у контролі (табл. 4, 5, 6).

Слід зазначити, що у розчинах сублетальних та підпорогових концентрацій мангану (II) (0,3 і 0,03 мг/дм³ відповідно) статистична поведінка *L. stagnalis* не відрізняється від такої у контролі, про що свідчить кількість ефективних коітусів. Тривалість основного етапу парубання, протягом якого відбувається переміщення сім'яної рідини, коливається незначно (0,76–0,96 год) при змінах концентрації йону в середовищі. Проте, тривалість копуляції вірогідно менша ($P < 0,05$), ніж у тварин контрольної групи.

Протягом 70 діб дослідження групою контрольних тварин, які перебували у чистій воді, було відкладено у середньому 84 ± 7 синкапсули. Цей показник не перевищено за перебування ставковиків у жодному з розчинів йонів мангану (кількість синкапсул складає 23% від контролю). Від 72 до 81% кладок було відкладено вночі.

Слід відмітити, що інтенсивність відкладання кладок ставковиками за час хронічного дослідження у більшості випадків відповідає динаміці зміни частоти парубань під час гострого 48-годинного експерименту. Йони мангану (II), як було попередньо уже відмічено, надзвичайно активізують пошукову поведінку ставковиків і це, очевидно, до певної міри виснажує їх. Тому кількість ефективних коітусів невелика. Кількість кладок найвища за сублетальних концентрацій. І хоча число парубань у розчинах хронічних летальних концентрацій Mn^{2+} у перші 2 доби є значним, поступово їх кількість зменшується і це виражається у зменшенні кількості відкладених синкапсул. Отже, за впливу підпорогових концентрацій Mn^{2+} спостерігається пригнічення статевої функції, а за впливу вищих концентрацій – її стимуляція, як реакція організму на середовище, отруєне цими йонами.

Ще одним показником, за яким можна визначити токсикорезистентність ставковиків є тривалість ембріогенезу. За впливу Mn^{2+} усіх досліджуваних концентрацій показники середньої тривалості розвитку зародків наближались до

контрольних значень, інколи перевищуючи останні, і становили 17–18 діб. На перший погляд порушення ритмів ембріогенезу за впливу Mn^{2+} є незначними. Проте слід мати на увазі, що викльовування молоді відбувається не одномоментно і розрив між строком вилуплення першого молюска із кладки і строком, коли останній молюск залишить цю ж синкапсулу, може бути досить значним. У контрольних тварин тривалість викльову у середньому становить 6–7 діб, досягаючи у деяких випадках 8–9 діб. Відмічено загальну закономірність впливу усіх досліджуваних концентрацій Mn^{2+} на тривалість ембріогенезу ставковика озерного: тривалість викльовування молоді з підвищенням концентрації токсиканту зменшується порівняно з контролем і становить 4–5 діб, хоча тривалість ембріонального розвитку при цьому збільшується. Це, ймовірно, пов'язане з наростанням токсичного ефекту полютанту за тривалого перебування ембріону в отруєному середовищі.

Висновки

Досліджені концентрації Mn^{2+} порушують фізіологічну рівновагу в організмі ставковика, викликають етологічні та морфологічні зміни. За сукупністю основних токсикологічних показників для *L. stagnalis*, підданих дії Mn^{2+} встановлено, що він є слабкотоксичним.

Виживання особин у токсичному середовищі залежить від концентрації йону металу та тривалості його впливу і характеризується фазністю реагування з боку організму тварин (байдужість, підвищення активності, депресія, смерть). За гостролетальних концентрацій йонів мангану (II) ставковика проходять дві останні фази отруєння. Загибель у цих розчинах спостерігається протягом перших діб. Елімінація молюсків за хронічних летальних концентрацій Mn^{2+} вірогідно відбувається через порушення їх розмноження або розвитку на фоні пригнічення функціонування інших органів. Ці концентрації виявляються летальними для всіх особин популяції. Розчини сублетальних концентрацій спричиняють стимулюючу дію на ставковиків.

Найбільш чутливим до зміни складу середовища лінійним показником є товщина мушлі, найменш чутливим – висота мушлі. Вплив мангану призводить до збільшення (на 25%) загальної маси тіла ставковиків, викликаного його гідратацією і зменшенням (на 12%) маси сухого залишку.

З підвищенням концентрацій полютанту спостерігається поступове пригнічення репродуктивної системи, яка за впливу високих концентрацій, або за тривалого впливу концентрацій помірних, повністю припиняє функціонування.

Найяскравіші етологічні зміни (сильна активація пошукової поведінки партнера) у репродуктивний період спостерігаються за впливу хронічних летальних концентрацій Mn^{2+} . За цих же концентрацій пригнічуються як плідність, так і народжуваність. Аномалії у будові синкапсул ставковика у розчинах сублетальних концентрацій Mn^{2+} зустрічаються у 5 разів частіше, а в розчинах хронічних летальних концентрацій – у 7 разів частіше, ніж у контрольної групи.

У токсикологічних дослідженнях щодо впливу полютанту на репродукцію молюсків можна використовувати наступні показники: кількість відкладених синкапсул; довжина синкапсул; кількість яйцевих капсул у синкапсулі та довжина яйцевих капсул. Розміри синкапсул та кількість яйцевих капсул у кладці є найбільш мінливими, тому їх з обережністю слід застосовувати в біомоніторингових дослідженнях.

Середні значення тривалості ембріогенезу у досліджуваних розчинах Mn^{2+} складають 17 ± 1 діб і мало залежать від концентрації полютанту.

Сила, направленість та наслідки відгуку ставковика озерного на вплив Mn^{2+} визначаються здатністю відтворювальної функції цього молюска підтримувати і регулювати власний гомеостаз.

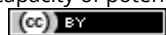
References

- Alekseev, V.A. (1981) Basic principles of the comparative-toxicological experiment. *Hydrobiol. journal*, 17 (3), 92–100 (in Russian).
- Arsan, V.O. (2003). The influence of ionic form of copper (II) of water environment on content of metabolites of glycolysis and the tricarboxylic cycle in carp tissues. *Hydrobiol. journal.*, 39(2), 109–115 (in Russian).
- Berezkina, G.V. (2002). Some directions of the egg clusters adaptive evolution in freshwater gastropods. *Zhytomyr Ivan Franko State University Journal*, 10, 55–57 (in Russian).
- Brown, L. (1980). The use of *Hydrobia jenkinsi* to detect intermittent toxic discharges to a river. *Water Res.*, 8, 14.
- Calow, P. (1981). Adaptational aspects of growth and reproduction in *Lymnaea peregra* (Gastropoda: Pulmonata). From exposed and sheltered aquatic habitats. *Malokologija*, 21 (1-2), 5–13.
- Canton, J.H., Slooft, W. (1977). The usefulness of *Lymnaea stagnalis* as a biological indicator in toxicological bio-assays (model substance HCH). *Water Res.* 11(1), 117–121.
- Flerov, B.A. (1974). About using the animal behavior studies in the water toxicology. *Hydrobiol. journal.*, 10(5), 114–120 (in Russian).
- Guseva, T.V., Molchanova, Ya. P., Zasha, E.A., Vinichenko, V.N., Averochkin, E.M. (2000). Hydrochemical indicators of the state of the environment. Kiev: Ecolyne (in Russian).
- Horuzhaya, T. A. (1989). Prospects for use of biochemical test functions in the biomonitoring of natural waters. *Hydrobiol. journal.*, 25 (5), 47–52 (in Russian).
- Khargarot, B.S., Ray, P.K. (1988). Sensitivity of freshwater pulmonate snails, *Lymnaea luteola* L., to heavy metals. *Bull. Environ. Contam and Toxicol.*, 41 (2), 202–213.
- Kitaev, S.P., Kalinichenko, L.T. (1974). Stability and sensitivity of hydrobionts to the action of industrial sewage of sulphate-cellulose plant. Petrozavodsk: Petrozavodsk University (in Russian).

- Kolesnik, O.O., Saykin, M.B. (2002). Breach of the stability of the water balance of *Lymnaea stagnalis* under the influence of the zinc chloride. *Zhytomyr Ivan Franko State University Journal*, 10, 176-178 (in Ukrainian).
- Kolosova, L.V., Danilchenko, O.P., Buzinova, N.S. (1987). The use of *Lymnaea stagnalis* for toxicological research. Saint Petersburg: Nauka (in Russian).
- Lakin, G.V. (1990). Biometrics. Moscow: Vysshaya shkola (in Russian).
- Malacea, Ion Areh. (1968). The fishes adaptation. *Hydrobiol.* 65 (1), 46-51.
- Matsui, S. (1991). Movement of toxic substance through bioaccumulation. *Guidelines of lake management. ILEC/UNEP*, 27-41.
- Metelev, V.V., Kanaev, A.I., Dzasohova, N.B. (1971). *Water Toxicology*. Moscow: Kolos (in Russian).
- Mur, Dzh., Ramamurti, S. (1987). Heavy metals in natural waters. Monitoring and impact assessment. Moscow: Mir (in Russian).
- Nozdrihina, L.R. (1977). The biological role of microelements in animals and human bodies. Moscow: Nauka (in Russian).
- Pinkina, T.V. (2008). Dimensional and weight characteristics and survival youngs molluscs of *Lymnaea stagnalis* (Mollusca, Pulmonata, Lymnaeidae) lake in the toxic environment. *Visnyk Lviv Univer. Series Biology*, 44, 173-180 (in Ukrainian).
- Pinkina, T.V. (2010). Certain pond by the peculiarities of *Lymnaea stagnalis* lay and cincapsule structure in the environment containing heavy metal ions. *Visnyk of National university of water and environmental engineering*, 1(49), 49-56 (in Ukrainian).
- Pinkina, T.V. (2010). Effect of the Heavy Metals on Biological Characteristics the Pond Snail (*Lymnaea stagnalis* L.) from the Water Bodies with Different Rate of Radionuclide Contamination. *Hydrobiological journal*, 46 (3), 103-111.
- Pinkina, T.V. (2010). The ecotoxicological characteristic of *Lymnaea stagnalis* upon heavy metals of the water environment. *Prirodnyy almanah. Series Biology*, 14, 138-149 (in Ukrainian).
- Prozorovskiy, V.B. (1960). The choice of method for constructing the curve of lethality and determining the median lethal dose. *Journal of General Biology*, 21 (3), 221-228 (in Russian).
- Stroganov, N.S., Kolosova, L.V. (1971). The study of water toxicity on gastropods. Moscow: Nauka (in Russian).
- Umnov, A.A. (1976). The use of statistical methods for estimating the parameters of empirical equations describing the relationship between empirical exchange and body weight of animals. *Journal of General Biology*, 37(1), 71-86 (in Russian).
- Veselov, E.A. (1968). The main phases of the action of toxic substances on organisms. Moscow: Nauka (in Russian)

Citation:

Pinkina, T.V., Pinkin, A.A. (2018). Assessment of Great pond snail toxicological resistance towards manganese (II) ions in water environment capacity of potentially toxic elements. *Ukrainian Journal of Ecology*, 8(1), 719-729.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0. License
