

Оригинальная статья / Original article
УДК 597/599;591.343
DOI: 10.18470/1992-1098-2022-3-54-62

Влияние pH на эмбриональное и личиночное развитие малоазиатской лягушки, *Rana macrocnemis*

Джамиля М. Гамидова, Аминат И. Рабаданова

Дагестанский государственный университет, Махачкала, Россия

Контактное лицо

Джамиля М. Гамидова, аспирант кафедры зоологии и физиологии, Дагестанский государственный университет; 367000 Россия, г. Махачкала, ул. Дзержинского, 12.
Тел. +79896747149
Email djamka_90@mail.ru
ORCID <https://orcid.org/0000-0003-0460-9895>

Формат цитирования

Гамидова Дж.М., Рабаданова А.И. Влияние pH на эмбриональное и личиночное развитие малоазиатской лягушки, *Rana macrocnemis* // Юг России: экология, развитие. 2022. Т.17, N 3. С. 54-62. DOI: 10.18470/1992-1098-2022-3-54-62

Получена 3 февраля 2022 г.

Прошла рецензирование 26 апреля 2022 г.

Принята 24 мая 2022 г.

Резюме

Цель. Изучить влияние различных значений pH на особенности эмбрионального и личиночного развития *Rana macrocnemis*.

Материал и методы. В работе использовались фрагменты из 6–7 кладок *R. macrocnemis*, собранных на территории Предгорного Дагестана. Эксперимент включал две серии опытов: в 1-й серии изучался весь цикл эмбрионально-личиночного развития малоазиатской лягушки, а во 2-й – только постэмбриональное развитие *R. macrocnemis*. Икринки поштучно размещались в контейнеры с различными значениями pH (4.0, 5.0 и 9.0).

Результаты. Наиболее уязвимыми периодами в развитии *R. macrocnemis* являются стадии нейрулы, формирования конечностей и метаморфоза. При pH 4.0 снижается потребление кислорода личинками, что сопровождается угнетением пищевого поведения и снижением интенсивности обменных процессов. Кроме того, pH 4.0 оказывает негативное влияние на выживаемость эмбрионов и личинок. При pH 5.0 отмечены изменения, несущие в основном адаптивный характер. На фоне ускоренного развития эмбрионов при этих значениях pH отмечается значительное снижение длины и массы их тела. С переходом к личиночному развитию наблюдается увеличение размеров тела на фоне небольшого прироста массы. Отмечено также удлинение продолжительности периода от начала формирования конечностей до окончания метаморфоза.

Заключение. Полученные данные могут быть использованы при мониторинге уровня кислотности среды и содержания кислорода в естественных водоемах в период нереста, что поможет внести ясность в вопрос о сокращении численности малоазиатской лягушки на территории Дагестана.

Ключевые слова

Эмбриональное развитие, личинки, *Rana macrocnemis*, онтогенез, абиотические факторы, pH.

The effect of pH on embryonal and larval development of the Caucasian Brown Frog, *Rana macrocnemis*

Jamilya M. Gamidova and Aminat I. Rabadanova

Dagestan State University, Makhachkala, Russia

Principal contact

Jamilya M. Gamidova, post-graduate student,
Department of Zoology and Physiology, Dagestan
State University; 12 Dzerzhinsky St, Makhachkala,
Russia 367000.

Tel. +79896747149

Email djamka_90@mail.ru

ORCID <https://orcid.org/0000-0003-0460-9895>

How to cite this article

Gamidova J.M., Rabadanova A.I. The effect of pH on embryonal and larval development of the Caucasian Brown Frog, *Rana macrocnemis*. *South of Russia: ecology, development*. 2022, vol. 17, no. 3, pp. 54-62. (In Russian) DOI: 10.18470/1992-1098-2022-3-54-62

Received 3 February 2022

Revised 26 April 2022

Accepted 24 May 2022

Abstract

Aim. To study the effect of different pH values on the characteristics of the embryonic and larval development of *Rana macrocnemis*.

Material and methods. Fragments from 6–7 clutches of *R. macrocnemis* collected on the territory of Foothill Dagestan were used in the work. The experiment included two series of experiments: in the 1st series, the entire cycle of embryonic-larval development of the *R. macrocnemis* frog was studied, and in the 2nd, only the postembryonic development of *R. macrocnemis* was studied. Eggs were individually placed in containers with different pH values (4.0, 5.0, and 9.0).

Results. The most vulnerable periods in the development of *R. macrocnemis* are the stages of neurula, limb formation, and metamorphosis. At pH 4.0, oxygen consumption by larvae decreases, accompanied by suppression of feeding behavior and a decrease in the intensity of metabolic processes. In addition, pH 4.0 has a negative effect on the survival of embryos and larvae. At pH 5.0, changes are noted that are mainly of an adaptive nature. Against the background of the accelerated development of embryos at these pH values, a significant decrease in the length and weight of their body is noted. With the transition to larval development, an increase in body size is observed against the background of a small increase in weight. An elongation of the duration of the period from the beginning of the formation of limbs to the end of metamorphosis was also noted.

Conclusion. The data obtained can be used in monitoring the level of acidity of the environment and the oxygen content in natural water bodies during the spawning period, which will help clarify the issue of the reduction in the number of *R. macrocnemis* frogs in Dagestan.

Key Words

Embryonic development, larvae, *Rana macrocnemis*, ontogenesis, abiotic factors, pH.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы во многих странах отмечено сокращение численности некоторых видов земноводных в окрестностях населенных пунктов [1; 2]. Поскольку остается непонятным обусловлено ли это изменением климатическими факторами, приводящими к аридизации климата, или антропогенным влиянием, сопровождающимся загрязнением окружающей среды [3-5], возникает необходимость поиска возможных причин этого явления. Одним из важнейших абиотических факторов, влияющих на развитие обитателей водоемов, является кислотность среды, сезонные колебания которой отражают биологические процессы в водоемах. Антропогенное воздействие, повышающее кислотность водоемов, относят к одной из причин глобального сокращения численности земноводных, вследствие закисления поверхностных вод кислотными дождями, содержащими до 90% соединений серы техногенного происхождения. Кислотность атмосферных осадков определяется концентрацией ионов водорода, а основным кислотным агентом является серная кислота [3; 6; 7].

Амфибии очень чувствительны к изменениям факторов окружающей среды, что связано с их широким распространением, двухфазностью жизненного цикла и высокой проницаемостью покровов. Большинство амфибий размножаются в небольших прудах, где могут подвергаться воздействию повышенных концентраций ионов водорода особенно ранней весной во время и сразу после таяния снега. Поскольку именно на это время приходится размножение и начало развития многих видов амфибий, то становится очевидным, что кислотность среды может влиять на их численность. Тем более, что ранее на бесхвостых земноводных было установлено, что особенно восприимчивы к кислотности их эмбриональные стадии [8].

Исследования различных авторов свидетельствуют об увеличении эмбриональной смертности и снижении процента успешного вылупления при низких значениях pH [9-11]. Помимо повышенной смертности, у головастиков могут проявляться различные сублетальные реакции при хроническом и остром воздействии низких pH, что ставит под угрозу долгосрочную выживаемость амфибий в подкисленных местах обитания. Важным следствием влияния pH также является мобилизация токсичных металлов в водной среде (алюминия, кадмия), повышенная концентрация которых может влиять как на эмбриональное, так и на личиночное развитие у бесхвостых амфибий [12-14].

Несмотря на наличие сведений о негативном влиянии низких значений pH на развитие земноводных, данный вопрос остается плохо изученным, поскольку многие авторы указывают на специфичность чувствительности некоторых видов амфибий к действию высоких концентраций ионов водорода в среде [7; 15]. В изученной нами литературе мы не обнаружили данных об особенностях влияния pH на развитие такого широко распространенного вида, как малоазиатская лягушка (*Rana macrocnemis* Boulenger, 1885). Важно отметить, что в последние годы явно намечается тенденция к сокращению численности этого вида в некоторых районах Дагестана [16; 17]. В связи с вышеизложенным актуальным представляется изучение вопроса о влиянии pH на выживаемость этого вида, а также возможность использования *R. macrocnemis* в качестве тест-объекта биоиндикации окружающей среды на основе изучения

влияния различных значений pH на особенности ее эмбрионального и личиночного развития.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Условия содержания и выращивания эмбрионов и личинок Rana macrocnemis

Для понимания механизмов формирования адаптаций у амфибий к существованию в изменяющихся условиях среды нами была изучена жизнеспособность эмбрионов и личинок малоазиатской лягушки на основе оценки темпов их роста, развития и выживаемости. Исследования проводились с конца февраля по июль 2020 г. В работе использовались фрагменты из 6–7 только что отложенных кладок *R. macrocnemis* (3200 икринок), собранных на территории Предгорного Дагестана (с. Ерс, Табасаранский район, высота 600 м над ур. м. и с. Дылым Казбековского района, 860 м над ур. м.). Эксперимент включал две серии опытов, в которых использовалось по восемь контейнеров, размером 35x25x35 (42 л). В первой серии изучался весь цикл эмбрионально-личиночного развития малоазиатской лягушки от недавно отложенных икринок до окончания метаморфоза (полная резорбция хвоста). Для этого икринки размещались поштучно в шесть экспериментальных контейнеров с различными значениями пониженной (4.0 и 5.0) и повышенной (9.0) pH, а также в два контрольных контейнера с обычной для природных водоемов pH (7.5–8.2). Во второй серии исследовалось только постэмбриональное развитие *R. macrocnemis*, для чего личинки (выращивались при нормальной pH) сразу после их перехода к активному питанию размещались в контейнеры с различными значениями pH (4.0, 5.0 и 9.0). Плотность посадки составила 200 икринок (в первой серии) и 200 головастиков (во второй серии) на 25 л воды.

Объекты содержались в фильтрованной воде, полностью заменявшейся каждый день. Личинок после перехода на экзогенное питание кормили листьями шпината, предварительно ошпаренными кипятком, и аквариумным кормом для рыб. Во время вылупления личинок из икринок, при их переходе к активному питанию и на стадиях формирования конечностей производили измерение следующих параметров воды: процент насыщения кислородом (с помощью микропроцессорного портативного оксиметра Hanna "HI 9145"), температуру (с помощью аквариумных термометров "Barbus"), а также кислотность (с использованием карманного pH метра – pH Meterrange 0.00–14.00). Поскольку известно, что уровень pH постоянно меняется в зависимости от многих факторов, тестовые значения pH создавались и поддерживались путем добавления H_2SO_4 и NaOH, которые готовились из 0,1N стандарт/фильтров фиксаналя после каждой смены воды. Измерение pH в контейнерах производилось 4 раза в день. При этом его изменения были незначительными.

В ходе эксперимента температура в помещении увеличивалась от 18°C в начале развития до 26°C – в конце. Подобное изменение температурного режима характерно и для природных условий. Концентрация кислорода в чистой фильтрованной воде в контейнерах при температуре около 24°C составляла 7.9 мг/л. Дополнительное снабжение воды кислородом не производилось, поскольку по литературным данным такая процедура не улучшает условий для развития икры и головастиков, так как связана с их сильным

стрессом [18]. При измерении содержания кислорода было учтено количество особей на единицу объема (250 мл на 2 головастика). Это соотношение поддерживалось на протяжении всего эксперимента.

Измерение морфометрических параметров

На стадиях эмбриогенеза и личиночного развития у 20 случайно выловленных икринок и личинок в каждой серии при различных pH производилось измерение линейно-весовых параметров. Для измерения общей длины икринок и эмбрионов использовали видеочувствительный "ТоурСам 14.0 МР", который встраивали в стереоскопический микроскоп МСП-1 "ЛОМО". Полученные изображения обрабатывались с помощью программного обеспечения TopView. Для измерения общей длины личинок использовали штангенциркуль Electronic Digitalcaliper "ДЕКО" (с точностью 0.1 мм). Масса тела икринок измерялась с помощью торсионных весов "VT-500", вес личинок определялся с помощью электронных весов "Масса-К" (с погрешностью 0.005 г) [19]. Стадии развития (12 – гастрюла, 13 – нейрула, 25–42 – формирование конечностей и 43–46 – резорбция хвоста) определяли по К.Л. Госнеру [20]. Наш выбор именно этой таблицы стадий развития обусловлен простотой её использования в наших условиях. После окончания экспериментов сеголетки лягушек были выпущены в природные биотопы.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программного инструмента Microsoft Excel 7.0. Вычислялись средние значения и стандартное отклонение (M±SD). Статистическая значимость различий средних значений оценивалась при помощи критерия Стьюдента. Использовался метод малых выборок.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Уже на ранних стадиях развития икры (2-е сутки) малоазиатской лягушки нами были отмечены различия в темпах её развития. На этом этапе при нормальной кислотности (контроль) 92% икринок находилось на стадии 12 (поздняя гастрюла). В средах с повышенными и пониженными значениями pH на этой стадии находилось значительно меньшее число икринок. Причем, чем ниже был уровень pH, тем меньший процент икринок находился на этой стадии: pH 9.0 (50%) → pH 5.0 (42%) → pH 4.0 (30%).

У значительной части эмбрионов, содержащихся в средах с экспериментальными значениями pH, начало нейруляции (стадия 13) происходило в ускоренном темпе. Так, уже через 40 часов после начала инкубации икры при pH = 4.0, 5.0

и 9.0 было зафиксировано 70, 58 и 50% эмбрионов (соответственно), находящихся на этой стадии. В то время как в контрольных условиях в этот же период на стадии нейруляции находились всего 6% эмбрионов.

Содержание икринок в средах с различными значениями pH оказывало влияние и на сроки вылупления личинок. В экспериментальных условиях начало вылупления приходилось на более ранние сроки (спустя 53 часа после начала инкубации), чем в контроле. Так, к этому времени в контроле отмечалось лишь незначительное число вылупившихся личинок (2.5%), в то время как при pH = 5.0 и 9.0 число вылупившихся личинок оказалось намного выше и составило 22.0 и 14.0% соответственно. В среде с pH 4.0 вылупления личинок вообще не наблюдалось. Наибольшее число личинок вылуплялось спустя 81 час после начала инкубации. В контроле и при pH 9.0 их число было 98 и 95% соответственно, а при pH 5.0 – только 80%.

Активное питание головастика начинается после расходования запасов желтка и прорыва рта (стадия 21). Начиная с этого периода, головастики интенсивно потребляют пищу, необходимую для их дальнейшего роста и развития. По полученным нами данным пик перехода к активному питанию в двух контрольных сериях опыта был отмечен на 5-е сутки (точнее спустя 105 часов после начала инкубации).

Средняя длительность периода формирования передних и задних конечностей (стадии 25–42) у личинок *R. macrocnemis* в первой серии опытов при pH 5.0 и 9.0 была удлинённой и составила 31 и 24 дня соответственно (против 19 дней в контроле). Средняя длительность периода от начала формирования конечностей до окончания метаморфоза (стадии 25–46) в среде с pH 5.0 составляла 36 дней, pH 9.0 – 30 дней, а в контроле – всего 24 дня.

Во второй серии опытов средняя длительность периода формирования конечностей (стадии 25–42) имела сходные с первой серией значения. Она убывала в следующем ряду: pH 4.0 (36 дней) → pH 5.0 (32 дня) → pH 9.0 (30 дней) → контроль (24 дня). Во второй серии средняя длительность периода от начала формирования конечностей до окончания метаморфоза была несколько выше, чем в первой, в обоих и в кислой (pH 5.0) и щелочной средах (pH 9.0). В среде с наиболее низкой pH (4.0) все головастики погибли, не дожив до окончания метаморфоза.

Выживаемость головастика малоазиатской лягушки в контроле и в экспериментальных растворах различной pH представлена в таблице 1.

Таблица 1. Выживаемость (%) эмбрионов и личинок малоазиатской лягушки при их содержании в средах с различными значениями pH

Table 1. Survival (%) of embryos and larvae of the *Rana macrocnemis* when kept in media with different pH values

Кислотность Acidity	1-я серия опытов 1st series of experiments						2-я серия 2nd series	
	Д / С	Г / G	Н / N	В / H	А / A	Ф / L	Ф / L	М / M
pH = 7.5–8.2	100	100	100	98	98	65	50	50
pH = 4.0	100	90	50	0	0	0	50	0
pH = 5.0	100	98	80	80	80	50	26	25
pH = 9.0	100	100	100	98	98	65	45	45

Примечание: Д – дробление, Г – гастрюла, Н – нейрула, В – вылупление, А – активное питание, Ф – формирование конечностей, М – метаморфоз

Note: C – cleavage, G – gastrula, N – neurula, H – hatching, A – active feeding, L – limb formation, M – metamorphosis

Во всех экспериментальных растворах, кроме pH 4.0, отмечался достаточно высокий процент выживаемости эмбрионов. Переломными этапами в развитии *R. macrocnemis* являлись стадии нейрулы и формирования конечностей. Именно на этих стадиях происходило резкое снижение выживаемости эмбрионов и личинок. Начиная со стадии нейрулы, в среде с pH 5.0 (1-я серия опытов) 20% яиц переставали развиваться. В этой же серии опытов на стадии формирования конечностей (25–42) гибнет ещё 30% особей. До окончания метаморфоза вообще доживали лишь 26%. Во второй серии опытов к концу стадии формирования конечностей выживаемость головастика была 50%, а к окончанию метаморфоза – 25%.

В среде с наиболее кислой средой (pH 4.0) в первой серии опытов только половина яиц продолжала развиваться после прохождения стадии нейрулы, и никто не доживал до окончания эмбриогенеза. Во второй серии до окончания стадии формирования конечностей доживало лишь 50% головастика, а на метаморфозе вообще никто не выживал.

Изменения в размерах и весе у икринок, эмбрионов и головастика при различных pH в двух сериях опыта отображены на рисунке 1. Некоторое увеличение размеров эмбрионов на стадии нейрулы наблюдалось при pH 9.0. В других вариантах опыта на этой стадии отмечалось лишь снижение линейно-весовых параметров.

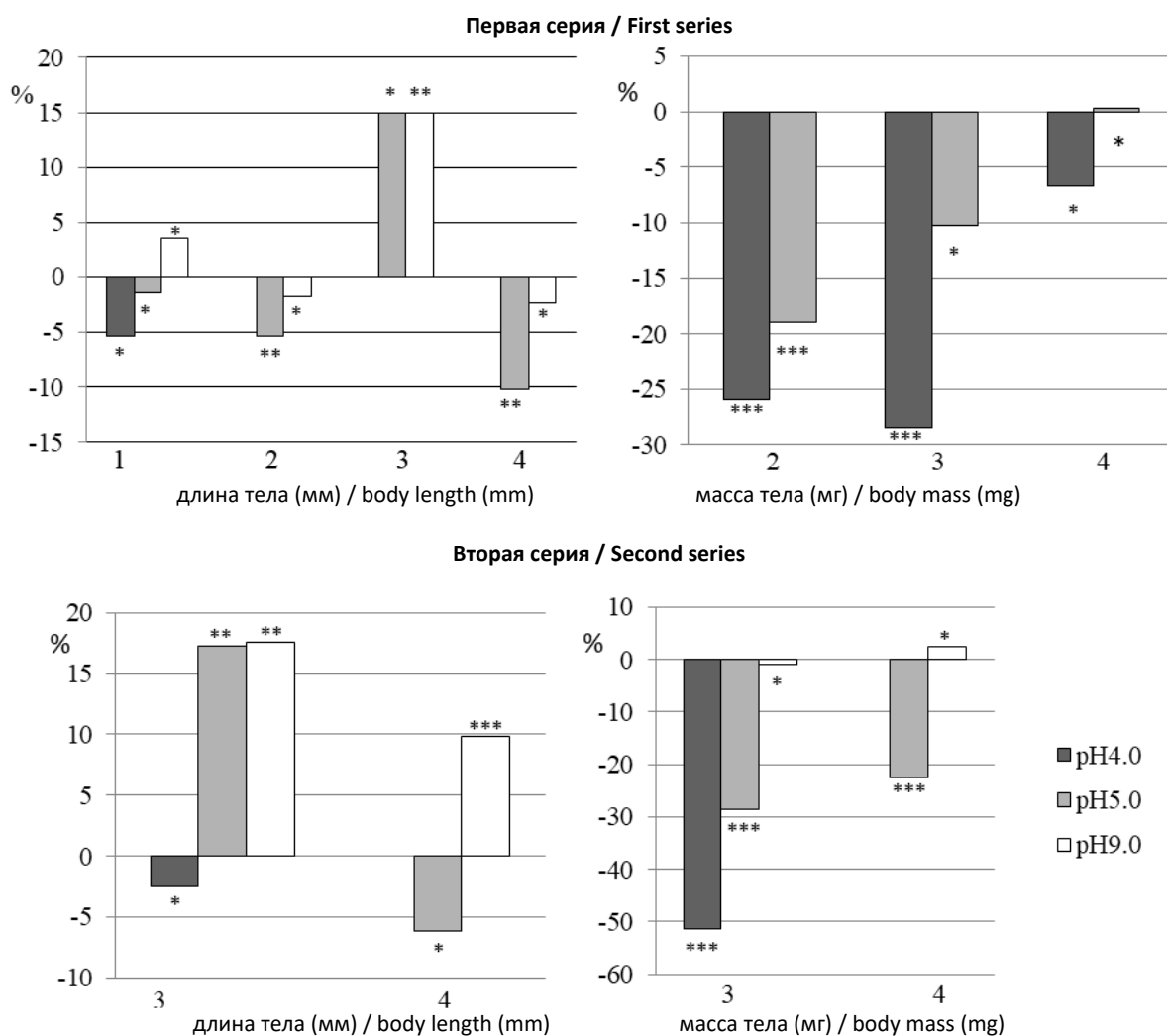


Рисунок 1. Влияние различных значений pH на общую длину и вес эмбрионов и головастика *Rana macrocnemis* (% по отношению к контролю)

1 – Нейрула; 2 – Выупление; 3 – Формирование конечностей; 4 – Метаморфоз. Различия достоверны при * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ и *** $p < 0.001$

Figure 1. Influence of different pH values on the total length and weight of *Rana macrocnemis* embryos and tadpoles (% relative to control)

1 – Neurula; 2 – Hatching; 3 – Formation of limbs; 4 – Metamorphosis. Differences are significant at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$

В первой серии опытов в экспериментальных растворах наиболее существенные отклонения от нормы по общей длине головастика были отмечены к окончанию стадии формирования конечностей. В этот

период при pH 5.0 и 9.0 их размеры были выше контрольных значений в среднем на 15% ($p < 0.05$). Однако к завершению метаморфоза у головастика, содержащихся в более кислой среде (pH 5.0), длина

тела уменьшалась по сравнению с контролем на 10.2% ($p < 0.001$), тогда как в щелочной среде (pH 9.0) отличия от контроля были недостоверными.

Во второй серии опытов отмечалась сходная картина, за исключением того, что к окончанию стадии формирования конечностей длина тела у головастиков, содержащихся в среде с pH 9.0, была достоверно выше контрольных значений (9.8%; $p < 0.01$).

По весовым параметрам нами также были отмечены существенные отличия от контроля. Так, в первой серии опытов сразу же после вылупления личинок их средние значения веса были достоверно ($p < 0.001$) ниже контроля (на 25.9% при pH 5.0 и на 19.0% при pH 9.0). В среде с pH 5.0 к окончанию стадии формирования конечностей личинки имели

пониженные средние значения массы тела (на 15.0% от нормы; $P < 0.01$), тогда как при pH 9.0 весовые параметры головастиков были близки к таковым у контроля. Однако к завершению метаморфоза масса тела при обеих экспериментальных значениях pH существенно не отличалась от контроля. Во второй серии опытов динамика массы тела имела схожий, но более выраженный характер.

Содержание кислорода в воде при всех значениях кислотности постепенно снижалось по мере развития головастиков вплоть до начала их метаморфоза. Однако при разных значениях pH эта тенденция была выражена в различной степени. В контрольных и щелочных растворах это снижение было выражено более сильно, чем в кислых (рис. 2).

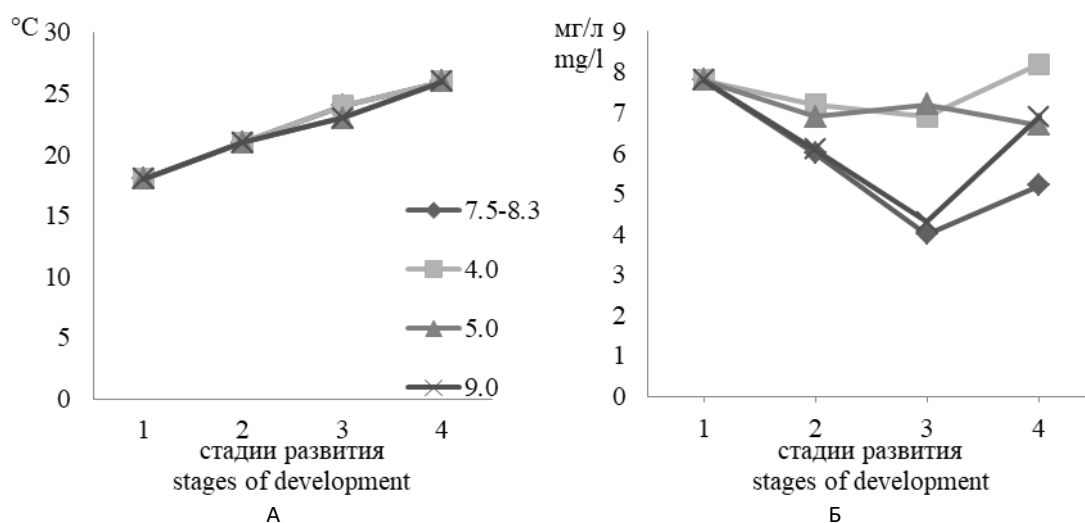


Рисунок 2. Изменение температуры (А) и содержания кислорода (Б) на различных этапах эмбрионального и личиночного развития *Rana macrocnemis* в зависимости от содержания ионов водорода
1 – Вылупление; 2 – Активное питание; 3 – Формирование конечностей; 4 – Метаморфоз. Квадраты – pH 4.0, треугольники – pH 5.0, крестики – pH 9.0, ромбы – контроль

Figure 2. Changes in temperature (A) and oxygen content (B) at different stages of embryonic and larval development of *Rana macrocnemis*, depending on the content of hydrogen ions
1 – Hatching; 2 – Active feeding; 3 – Formation of limbs; 4 – Metamorphosis. Squares – pH 4.0, triangles – pH 5.0, crosses – pH 9.0, diamonds – control

Во время метаморфоза эти изменения в первых двух растворах носили разнонаправленный характер. В контроле уровень кислорода в воде менялся незначительно, указывая на усиленное его потребление метаморфизирующими особями. При pH 9.0 данный показатель резко повысился, указывая на резкое понижение его потребления.

Наши эксперименты убедительно показали, что на протекание эмбрионального и личиночного развития малоазиатской лягушки могут оказывать сильное влияние такие факторы, как концентрация ионов водорода в воде. Так, на этом виде было показано, что повышенные и пониженные значения pH замедляют гастрюляцию икрынок, но ускоряют нейруляцию. Особенно ярко эта тенденция проявлялась в очень кислой среде (pH 4.0). Нами также было отмечено, что отклоняющиеся от нормы значения pH отрицательно влияют на успех вылупления личинок из яиц. Это может быть связано с ингибированием фермента вылупления как пониженными, так и повышенными значениями pH или с нарушениями в процессе формирования камеры перивителлинового пространства. Как следствие возникает плотное сворачивание и деформация

эмбрионов. Сходные результаты были получены и в исследованиях на других видах хвостатых и бесхвостых амфибий [9-11]. Более того, например, эмбрионы *Ambystoma texanum* (Matthes, 1855) начинают скручиваться уже при pH 4.5 [15]. Сравнение строения эмбриональных мембран и механизмов вылупления у разных видов амфибий может пролить свет на то, почему этот эффект при одних и тех же значениях pH может проявляться неодинаково.

Повышенные и пониженные значения pH могут оказывать влияние и на скорость личиночного развития. Результаты наших исследований указывают на удлинении этого периода при воздействии отличных от контроля значений pH, что хорошо согласуется с литературными данными, полученными на близкородственном виде *Rana temporaria* Linnaeus, 1758 [21]. Обнаруженная нами повышенная смертность эмбрионов и личинок, а также удлинение сроков личиночного развития при пониженных значениях pH (4.0 и 5.0) указывает на негативный эффект воздействия высоких концентраций ионов водорода на выживаемость и процесс их развития.

Ранее также было показано [22], что при изменении pH в нерестовых водоёмах, могут происходить разнообразные нарушения в нормальном развитии головастика, задерживаться их рост и развитие. Нами на примере *R. macrocnemis* было показано, что pH может влиять на изменение линейно-весовых параметров. Во время эмбриогенеза низкие значения pH приводят к замедлению прироста их длины и массы. Влияние pH на личиночные стадии оказалось не столь однозначным. Так нами было отмечено ускорение роста личинок (стадия формирования конечностей) как при низком (5.0), так и при высоком (9.0) значениях pH. Однако во время метаморфоза ярко проявилось негативное влияние кислой среды.

Ярко выраженное негативное воздействие пониженной pH было отмечено нами и в отношении весовых параметров на всех стадиях личиночного развития. Полученные нами результаты хорошо согласуются с литературными данными, указывающими на уменьшение массы тела у бесхвостых амфибий под влиянием воздействия низких значений pH [8; 11; 12]. В ряде работ также было показано, что периодические колебания кислотности в природных водоёмах могут положительно отражаться на морфофункциональных характеристиках личинок амфибий [23; 24]. Однако, как отмечают другие авторы [8; 25], отклонения, выходящие за пределы оптимальной зоны, могут сопровождаться уменьшением линейных размеров тела личинок земноводных.

Отклонения в сроках наступления различных стадий развития и по выживаемости в нашем исследовании могли быть связаны либо с непосредственным влиянием pH, либо опосредованы через изменения других физико-химических параметров воды, таких как температура или концентрация кислорода. По результатам исследований некоторых авторов [7], изучивших влияние pH на выживаемость и развитие бесхвостых амфибий, известно, что температура в исследуемых ими водоёмах оказывала более значительное влияние на темпы развития, тогда как кислотность воды являлась ингибирующим фактором, влияющим на выживаемость и развитие. Также показано, что недостаток кислорода является основным лимитирующим жизнеспособность абиотическим фактором [18]. Причем отмечена обратная зависимость между плотностью посадки и уровнем кислорода, что приводит к замедлению процессов развития и к гибели особей. При этом установлено, что разные виды реагируют неодинаково на воздействие различных абиотических факторов (pH, O₂, t°C). Так, например, у личинок серой жабы отмечена меньшая лабильность онтогенетических реакций под воздействием этих факторов по сравнению с травяной лягушкой [26].

В наших исследованиях потребление кислорода эмбрионами и личинками менялось на всем протяжении развития и зависело от кислотности среды. Это согласуется с данными З.С. Токтамысовой [13], согласно которой потребление кислорода головастиками меняется в соответствии с изменениями pH воды. Подобного рода эффекты могут быть связаны как напрямую с влиянием pH на функционирование ключевых ферментов метаболизма, так и посредством изменения уровня усвоения кислорода личинкам *R. macrocnemis*. Результаты наших исследований, с одной стороны, указывают на значительное снижение

потребления кислорода в кислых средах, которое может быть связано с угнетением дыхания, способствующим снижению интенсивности обменных процессов, и приводящим к удлинению сроков развития (вторая серия опытов). С другой стороны, негативное влияние кислой среды на успех вылупления эмбрионов указывает на угнетение фермента вылупления (первая серия опытов), активность которого непосредственно зависит от pH.

Кроме того, обнаруженные нами отклонения линейно-весовых параметров могут свидетельствовать о гормональных перестройках. Так, увеличение длины тела и замедление метаморфоза при pH 5.0 и pH 9.0 может быть обусловлено усилением выработки липотропина (ЛТГ), который активирует липолиз и мобилизацию жирных кислот [27; 28; 29]. Энергия, которая при этом вырабатывается, используется на реализацию адаптивных механизмов, обеспечивающих дальнейшую жизнедеятельность и выживаемость. К таким механизмам может, например, относиться преимущественное перераспределение тирозина с образованием меланина на синтез гормона тироксина, необходимого для реализации стресс-реакции. Это сопровождается неравномерным распределением меланина и осветлением окраски тела головастика, что мы и наблюдали в наших исследованиях при уровне pH 5.0. Положительная динамика в щелочной среде (pH 9.0) может быть связана с активным потреблением кислорода головастиками на всех стадиях развития.

Негативный эффект pH 4.0 на выживаемость эмбрионов и личинок может свидетельствовать об отсутствии возможности включения компенсаторных реакций на ключевых стадиях их развития, на что указывает относительно стабильная скорость начальных этапов развития и гибель всех эмбрионов на стадии нейрулы и личинок перед метаморфозом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при воздействии различных значений pH на развитие *R. macrocnemis* обнаруживается реализация стресс-реакции. При этом при pH 5.0 и 9.0 эта реакция проходит стадии тревоги и резистентности, не доходя до стадии истощения, что указывает на адаптивный характер отмеченных изменений. Очевидно, что рассматриваемые значения pH лежат вне оптимального диапазона и организм стремится компенсировать влияние фактора за счет работы адаптационных механизмов, действие которых приводит к дополнительным энергозатратам. Необходимость приспособления к изменению уровня pH требует от организма дополнительной работы, которая благодаря гиперкомпенсации затрат сопровождается ускорением роста и развития, а также приводит к повышению устойчивости к действию неблагоприятных факторов. Размер энергетических затрат организма возрастает пропорционально с удалением значений фактора от оптимального значения [30] и при pH 4.0 стресс-реакция доходит до стадии истощения, что в конечном итоге и приводит к гибели всех особей.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Мы благодарны С.Н. Литвинчуку (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург) за ценные комментарии и пометки, которые были учтены при работе над рукописью и

А.Д. Аскендеров (Даргестанский государственный университет, Махачкала) за его помощь в сборе материала.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to S.N. Litvinchuk (Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg) for valuable comments and remarks that were taken into account when working on the manuscript and to A.D. Askenderov (Dagestan State University, Makhachkala) for his help in collecting the material.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Pounds J.A. Climate and amphibian declines // *Nature*. 2001. V. 4. P. 639-640.
2. Hamer A.J. Amphibian ecology and conservation in the urbanising world: a review // *Biological Conservation*. 2008. N 141. P. 2432-2449.
3. Natchev N. Green frog invasion in the Black Sea: habitat ecology of the *Pelophylax esculentus* complex (Anura, Amphibia) population in the region of Shablenska Tuzla lagoon in Bulgaria // *Herpetology Notes*. 2011. V. 4. P. 347-351.
4. Steven D.M., Vance L.T. Growth, development and incidence of deformities in amphibian larvae exposed as embryos to naphthenic acid concentrations detected in the Canadian oil sands region // *Environmental Pollution*. 2012. V. 167. P. 178-183.
5. Bernabo I., Bonaccia A., Coscarelli F., Tripepi M., Brunelli E. Effects of salinity stress on *Bufo balearicus* and *Bufo bufo* tadpoles: Tolerance, morphological gill alterations and Na⁺/K⁺-ATPase localization // *Aquatic Toxicology*. 2013. V. 132-133. P. 119-133.
6. Muths E. Hatching success in salamanders and chorus frog at two sites in Colorado USA: effects of acidic deposition and climate // *Amphibia-Reptilia*. 2003. V. 24. N 1. P. 27-36.
7. Brunelli E., Tripepi S. Effects of Low pH acute exposure on survival and gill morphology in *Triturus italicus* larvae // *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*. 2005. V. 303. N 11. P. 946-957.
8. Dunson W.A., Travis J. Interaction of pH density and priority effects on the survivorship and growth of two species of hylid tadpoles // *Oecologia*. 1991. V. 88. N 3. P. 331-339.
9. Griffiths R.A., de Wijer P. Differential effect of pH and temperature on embryonic development in the *British newts* (*Triturus*) // *Journal of Zoology*. 1994. V. 234. P. 613-622.
10. Vignoli L., Bologna M., D'Amen M. The effects of temperature and pH on the embryonic development of two species of *Triturus* (Caudata: Salamandridae) // *Amphibia-Reptilia*. 2007. V. 28. N 2. P. 295-300. DOI: 10.1163/156853807780202521
11. Barth B.J., Wilson R.S. Life in acid: interactive effects of pH and natural organic acids on growth, development and locomotor performance of larval striped marsh frogs *Limnodynastes peronii* // *Experimental Biology*. 2010. V. 213. N 8. P. 1293-1300. DOI: 10.1242/jeb.028472
12. Cummins C.P. Effects of aluminium and low pH on growth and development in *Rana temporaria* tadpoles // *Oecologia*. 1986. V. 69. N 2. P. 248-252.
13. Миронова А.П., Андроников В.Б. Эмбриональное развитие обыкновенной лягушки // *Цитология*. 1992. N 34(8). С. 96-101.
14. Thaban C.M. Morphological alterations in the external gills of some tadpoles in response to pH // *Journal of Morphological Sciences*. 2018. V. 35 (02). P. 142-152. DOI: 10.1055/s-0038-1669476
15. Pierce B.A., Wooten D.K. Acid tolerance of *Ambystoma texanum* from central Texas // *Journal of Herpetology*. 1992. V. 26. N 2. P. 230-232.
16. Mazanaeva L.F. The distribution of Amphibians in Daghestan // *Advances in Amphibian Research in the Former Soviet Union*. Sophia. 2000. V. 5. P. 141-156.
17. Аскендеров А.Д., Мазанаева Л.Ф., Михайлов Р.А., Файзулин А.И. Изучение нерестовых водоемов и их роли в сохранении редких видов амфибий предгорий Республики

Даргестан (Россия) // *Nature Conservation Research. Заповедная наука*. 2018. Т. 3. Приложение 1. С. 83-97. DOI: 10.24189/ncr.2018.057

18. Сурова Г.С. Изменение абиотических условий при содержании головастика с разной плотностью (на примере личинок травяной лягушки *Rana temporaria* и серой жабы *Bufo bufo*) // *Современная герпетология*. 2010. Т. 10. N 1/2. С. 26-39.
19. Hayek L.A. Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for amphibians. Washington DC: Smithsonian Institution Press, 1994. P. 21-38.
20. Gosner K.L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification // *Herpetologica*. 1960. V. 16. P. 183-190.
21. Фоминых А.С. Экспериментальное изучение воздействия высоких показателей щелочной среды на динамику личиночного развития земноводных // *Экология*. 2008. N 2. С. 155-157.
22. Dmitrieva E.V. Influence of the Concentration of Dissolved Oxygen on Embryonic Development of the Common Toad (*Bufo bufo*) // *Russian Journal of Developmental Biology*. 2015. V. 46. N 6. P. 368-380. DOI: 10.1134/S1062360415060041
23. Константинов А.С., Вечканов В.С., Кузнецов В.А., Ручин А.Б. Астатичность абиотической среды как условие оптимизации роста и развития личинок травяной лягушки // *Доклады РАН*. 2000. Т. 371. N 4. С. 559-562.
24. Кузнецов В.А., Ручин А.Б. Влияние колебаний pH и освещенности на рост и развитие озерной лягушки *Rana ridibunda* // *Зоологический журнал*. 2001. Т. 80. N 10. С. 1246-1251.
25. Kuznetsov V.A. Influencing of oscillations of ecological factors on growth, development and fertility *Lymnaea stagnalis* // *Материалы международной конференции «Современные проблемы физиологии и биохимии водных организмов», Петрозаводск, 2004. С. 198.*
26. Seymour R.S., Roberts J.D., Mitchell N.J., Blaylock A.J. Influence of environmental oxygen on development and hatching of aquatic eggs of the Australian frog, *Crinia georgiana* // *Physiological and Biochemical Zoology*. 2000. V. 73. N 4. P. 501-507.
27. Розен В.Б. Основы эндокринологии. Москва: Издательство Московского университета, 1994. 385 с.
28. Божко А.П., Городецкая И.В. Обоснование общебиологического характера адаптивного эффекта тиреоидных гормонов // *Тезисы докладов научной сессии «Актуальные вопросы теоретической и практической медицины и фармации», Витебск, 2001. С. 8-9.*
29. Смирнов С.В. Метаморфоз хвостатых амфибий: особенности, механизм регуляции и эволюции // *Журнал общей биологии*. 2006. Т. 67. N 5. С. 323-334.
30. Шилов И.А. Экология. Москва: Высшая школа, 2001. 512 с.

REFERENCES

1. Pounds J.A. Climate and amphibian declines. *Nature*. 2001, vol. 4, pp. 639-640.
2. Hamer A.J. Amphibian ecology and conservation in the urbanising world: a review. *Biological Conservation*. 2008, no. 141, pp. 2432-2449.
3. Natchev N. Green frog invasion in the Black Sea: habitat ecology of the *Pelophylax esculentus* complex (Anura, Amphibia) population in the region of Shablenska Tuzla lagoon in Bulgaria. *Herpetology Notes*. 2011, vol. 4, pp. 347-351.
4. Steven D.M., Vance L.T. Growth, development and incidence of deformities in amphibian larvae exposed as embryos to naphthenic acid concentrations detected in the Canadian oil sands region. *Environmental Pollution*. 2012, vol. 167, pp. 178-183.
5. Bernabo I., Bonaccia A., Coscarelli F., Tripepi M., Brunelli E. Effects of salinity stress on *Bufo balearicus* and *Bufo bufo* tadpoles: Tolerance, morphological gill alterations and Na⁺/K⁺-ATPase localization. *Aquatic Toxicology*. 2013, vol. 132-133, pp. 119-133.

6. Muths E. Hatching success in salamanders and chorus frog at two sites in Colorado USA: effects of acidic deposition and climate. *Amphibia-Reptilia*. 2003, vol. 24, no. 1, pp. 27-36.
7. Brunelli E., Tripepi S. Effects of Low pH acute exposure on survival and gill morphology in *Triturus italicus* larvae. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*. 2005, vol. 303, no. 11, pp. 946-957.
8. Dunson W.A., Travis J. Interaction of pH density and priority effects on the survivorship and growth of two species of hylid tadpoles. *Oecologia*. 1991, vol. 88, no. 3, pp. 331-339.
9. Griffiths B.A., de Wijer P. Differential effect of pH and temperature on embryonic development in the *British newts* (*Triturus*). *Journal of Zoology*. 1994, vol. 234, pp. 613-622.
10. Vignoli L., Bologna M., D'Amen M. The effects of temperature and pH on the embryonic development of two species of *Triturus* (Caudata: Salamandridae). *Amphibia-Reptilia*, 2007, Vol. 28, no. 2, pp. 295-300. DOI: 10.1163/156853807780202521
11. Barth B.J., Wilson R.S. Life in acid: interactive effects of pH and natural organic acids on growth, development and locomotor performance of larval striped marsh frogs *Limnodynastes peronei*. *Experimental Biology*, 2010, vol. 213, no. 8, pp. 1293-1300. DOI: 10.1242/jeb.028472
12. Cummins C.P. Effects of aluminium and low pH on growth and development in *Rana temporaria* tadpoles. *Oecologia*. 1986, vol. 69, no. 2, pp. 248-252.
13. Mironova A.P., Andronikov V.B. Embryonic development of an ordinary frog. *Citologiya [Cytology]*. 1992, no. 34(8), pp. 96-101. (In Russian)
14. Thaban C.M. Morphological alterations in the external gills of some tadpoles in response to pH. *Journal of Morphological Sciences*, 2018, vol. 35 (02), pp. 142-152. DOI: 10.1055/s-0038-1669476
15. Pierce B.A., Wooten D.K. Acid tolerance of *Ambystoma texanum* from central Texas. *Journal of Herpetology*. 1992, vol. 26, no. 2, pp. 230-232.
16. Mazanaeva L.F. The distribution of Amphibians in Daghestan. *Advances in Amphibian Research in the Former Soviet Union*. Sophia. 2000, vol. 5, pp. 141-156.
17. Askenderov A.D., Mazanaeva L.F., Mikhailov R.A., Fayzulin A. I. Study of spawning water bodies and their role in the conservation of rare amphibian species in the foothills of the Republic of Dagestan. *Nature Conservation Research. Reserved science*, 2018, vol. 3, suppl. 1, pp. 83-97. (In Russian) DOI: 10.24189/ncr.2018.057
18. Surova G.S. Changes in abiotic conditions when keeping tadpoles with different densities (on the example of the larvae of the common frog-*Rana temporaria* and the gray toad-*Bufo bufo*). *Sovremennaya Herpetologiya [Temporary Herpetology]*. 2010, vol. 10, no. 1/2, pp. 26-39. (In Russian)
19. Hayek L.A. Measuring and monitoring biological diversity. *Standard methods for amphibians*. Washington DC, Smithsonian Institution Press, 1994, 384 p.
20. Gosner K.L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*. 1960, vol. 16, pp. 183-190.
21. Fominykh A.S. Experimental study of the impact of high levels of alkaline environment on the dynamics of larval development of amphibians. *Ekologiya [Ecology]*. 2008, no. 2, pp. 155-157. (In Russian)
22. Dmitrieva E.V. Influence of the Concentration of Dissolved Oxygen on Embryonic Development of the Common Toad (*Bufo bufo*). *Russian Journal of Developmental Biology*, 2015, vol. 46, no. 6, pp. 368-380. DOI: 10.1134/S1062360415060041
23. Konstantinov A.S., Vechkanov V.S., Kuznetsov V.A., Ruchin A.B. Astaticity of the abiotic environment as a condition for optimizing the growth and development of common frog larvae. *Doklady RAN [Reports of the Russian Academy of Sciences]*. 2000, vol. 371, no. 4, pp. 559-562. (In Russian)
24. Kuznetsov V.A., Ruchin A.B. Influence of pH and light fluctuations on the growth and development of the lake frog *Rana ridibunda*. *Zoologicheskii zhurnal [Zoological journal]*. 2001, vol. 80, no. 10, pp. 1246-1251.
25. Kuznetsov V.A. Influencing of oscillations of ecological factors on growth, development and fertility *Lymnaea stagnalis*. *Materialy mezhdunarodnoy konferentsii «Sovremennyye problemy fiziologii i biokhimii vodnykh organizmov»*, Petrozavodsk, 2004 [Proceedings of the international conference "Modern problems of physiology and biochemistry of aquatic organisms", Petrozavodsk, 2004]. Petrozavodsk, 2004, pp. 198.
26. Seymour R.S., Roberts J.D., Mitchell N.J., Blaylock A.J. Influence of environmental oxygen on development and hatching of aquatic eggs of the Australian frog, *Crinia georgiana*. *Physiological and Biochemical Zoology*. 2000, vol. 73, no. 4, pp. 501-507.
27. Rozen V.B. *Osnovy endocrinology [Fundamentals of endocrinology]*. Moscow, Moscow University Publ., 1994, 385 p. (In Russian)
28. Bozhko A.P., Gorodetskaya I.V. Obosnovaniye obshchebiologicheskogo kharaktera adaptiv-nogo effekta tireoidnykh gormonov [Substantiation of the general biological nature of the adaptive effect of thyroid hormones]. *Tezisy dokladov nauchnoy sessii «Aktual'nyye vo-prosy teoreticheskoy i prakticheskoy meditsiny i farmatsii»*, Vitebsk, 2001 [Abstracts of the scientific session "Actual issues of theoretical and practical medicine and pharmacy", Vitebsk, 2001]. Vitebsk, 2001, pp. 8-9. (In Russian)
29. Smirnov S.V. Metamorphosis of tailed amphibians: features, mechanism of regulation and evolution. *Zhurnal obshchei biologii [Journal of General Biology]*. 2006, vol. 67, no. 5, pp. 323-334. (In Russian)
30. Shilov I.A. *Ekologiya [Ecology]*. Moscow, Vysshaya shkola Publ., 2001, 512 p. (In Russian)

КРИТЕРИИ АВТОРСТВА

Джамиля М. Гамидова и Аминат И. Рабаданова вместе провели эксперименты и написали рукопись. Оба автора в равной степени несут ответственность при обнаружении плагиата, самоплагиата или других неэтических проблем.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Комиссией по биоэтике Дагестанского государственного университета.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Jamilya M. Gamidova and Aminat I. Rabadanova conducted experiments together and wrote the manuscript. Both authors are equally responsible for plagiarism, self-plagiarism and other ethical transgression.

NO CONFLICT OF INTEREST DECLARATION

The authors declare no conflict of interest. The experiments were carried out in compliance with the ethical standards of work with animals established by the Commission on Bioethics of Dagestan State University.

ORCID

Джамиля М. Гамидова / Jamilya M. Gamidova <https://orcid.org/0000-0003-0460-9895>
Аминат И. Рабаданова / Aminat I. Rabadanova <https://orcid.org/0000-0002-9041-6880>