

УДК 597.825:574.24

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ РАСТВОРЕННОГО КИСЛОРОДА НА ЭМБРИОНАЛЬНОЕ РАЗВИТИЕ СЕРОЙ ЖАБЫ (*BUFO BUFO*)

© 2015 г. Е. В. Дмитриева

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12

E-mail: aurelia@mail.ru

Поступила в редакцию 22.08.2014 г.

Окончательный вариант получен 27.01.2015 г.

Проведены несколько серий экспериментов по исследованию влияния концентрации растворенного кислорода на темпы развития и смертность в эмбриогенезе серой жабы *Bufo bufo*. В результате проведенных экспериментов показано, что при одиночном развитии икринок недостаток кислорода не приводит к увеличению смертности в к моменту вылупления, а приводит лишь к изменению динамики смертности: смертность возникает на более ранних стадиях развития, чем в условиях нормального доступа кислорода. Учитывая совместное воздействие плотности икры и концентрации растворенного кислорода, мы повышаем точность анализа результатов проводимых экспериментов, а также улучшаем интерпретацию результатов этих исследований. В условиях разной начальной плотности икры влияние концентрации растворенного кислорода на смертность и темпы развития эмбрионов серой жабы проявляются по-разному. При высокой плотности посадки к моменту вылупления выживает лишь небольшой процент эмбрионов, и эти эмбрионы существенно отстают в развитии от особей, развивающихся в условиях нормального доступа кислорода. Недостаток растворенного в воде кислорода ведет к замедлению развития эмбрионов серой жабы.

Ключевые слова: растворенный кислород, гипоксия, онтогенез, серая жаба, *Bufo bufo*, смертность.

DOI: 10.7868/S047514501506004X

Эмбриональное развитие бесхвостых амфибий проходит в водной среде, поэтому на их развитие не может ни оказывать влияния концентрация растворенного в воде кислорода. Водный и энергетический обмен амфибий существенно изменяется в онтогенезе. Это особенно заметно в эмбриональном и личиночном периодах развития земноводных. Например, в эмбриогенезе зеленой жабы скорость потребления кислорода увеличивается в 5 раз, а интенсивность потребления кислорода, рассчитанная на сырую массу, увеличивается в 4 раза (Владимирова и др., 2009). Поэтому концентрация растворенного в воде кислорода оказывает существенное влияние на эмбриональное и личиночное развитие амфибий. При пониженной концентрации кислорода в воде в естественных водоемах повышается смертность эмбрионов лягушек и жаб (Флякс, 1985).

Развитие и энергетический обмен – взаимосвязанные, комплексные процессы. Процесс поступления воды в яйца амфибий играет значительную роль в процессах, связанных с транспортом кислорода к развивающемуся зародышу. Кислород поступает из внешней среды, проходя через студенистый слой, капсульную оболочку,

вителлиновую и желточные мембраны икры амфибий (Salthe, 1963). В процессе развития образуется перивителлиновое пространство, которое увеличивается в объеме за счет поступления воды. От оплодотворения до нейрулы вода поступает в зародыш; на стадии нейрулы содержание воды в зародыше снижается вследствие секреции воды в перивителлиновое пространство; на последующих стадиях содержание воды в зародыше вновь увеличивается (Зотин, 1961). Увеличение этого пространства приводит к увеличению площади поверхности газового обмена и уменьшению толщины капсульной оболочки, окружающей вителлиновую мембрану, что способствует лучшей диффузии кислорода к поверхности зародыша (Seymour, Roberts 1991; Seymour, Laveridge 1994; Seymour, Bradford, 1995).

Многими исследователями изучалось влияние концентрации растворенного кислорода на эмбриональное и личиночное развитие амфибий, как в природных, так и в лабораторных условиях (Zotin et al., 1967; Feder, 1982; Флякс, 1985; Seymour, Roberts, 1991; Crowder et al., 1998; Seymour et al., 2000; Владимирова и др., 2000; 2009, 2010 и др.). Например, у 2-х видов *Ambystoma* хрониче-

ская гипоксия приводила к замедлению развития, задержке вылупления и появлению эмбрионов, которые были менее развиты в момент вылупления, у лягушек *Rana sphenoccephala* и *Rana palustris* гипоксия не влияла на скорость развития (Mills, Barnhart, 1999). Гипоксия может оказывать влияние на смертность особей. Известно, что повышенная смертность в кладках амфибий может возникать из-за недостатка кислорода (Сурова, Северцов, 1985). Таким образом, концентрация растворенного в воде кислорода оказывает существенное влияние на эмбриональное и личиночное развитие амфибий.

На потребление растворенного в воде кислорода эмбрионами амфибий могут оказывать влияния различные факторы. Колебания температуры влекут за собой изменения скорости обменных реакций, что в свою очередь приводит к изменению темпов развития. Кроме того, при повышении температуры может увеличиваться интенсивность потребления кислорода. Ультрафиолетовое излучение также оказывает влияние на потребление растворенного в воде кислорода. Например, Formicki с соавторами исследовали влияние ультрафиолетового излучения на эмбриональные и личиночные стадии развития серой жабы *Bufo bufo* (Formicki et al., 2003). Было показано, что головастики серой жабы, которые подвергались ультрафиолетовому излучению UV-A (320–400 нм) на эмбриональных стадиях, существенно увеличивали потребления кислорода в процессе дальнейшего развития (например, на стадиях головастика). Если же они подвергались воздействию этого же излучения, как на эмбриональных, так и на личиночных стадиях развития, никаких изменений в потреблении кислорода не наблюдалось. Другой тип облучения – UV-B (280–320 нм) – вызвал значительное снижение потребления кислорода во всех исследованных группах головастиков. Таким образом, на потребление кислорода, как в эмбриональный, так и в личиночный периоды развития, могут оказывать влияние различные типы ультрафиолетового излучения.

На концентрацию растворенного в воде кислорода влияют две группы противоположно направленных процессов: одни увеличивают содержание кислорода, другие уменьшают его. В природных условиях обогащение воды кислородом происходит, в основном за счет следующих процессов: абсорбции кислорода из атмосферы и выделение кислорода водной растительностью в процессе фотосинтеза (Dejours 1981; Ginot, Herve, 1994), а также поступление в водоемы с дождевыми и талыми водами, которые обычно пересыщены кислородом. В лабораторных же условиях, в отсутствие дополнительной аэрации, обогащение воды кислородом происходит только за счет абсорбции кислорода из воздуха. Таким образом,

плотно закрыв аквариумы крышкой без прослойки воздуха сверху, мы перекрываем процесс растворения дополнительного кислорода в воде.

Содержание кислорода в воде снижается, в основном, за счет различных биологических и химических процессов. К химическим процессам, которые снижают концентрацию растворенного кислорода, можно отнести окисление различных органических и неорганических соединений, расход кислорода при разложении органических веществ. К биологическим процессам, снижающим содержание кислорода в воде, относится в первую очередь дыхание различных живых организмов, поэтому потребление растворенного кислорода также может зависеть от плотности особей. Например, в природных водоемах смертность в скоплениях *Rana temporaria* вызывается факторами, зависящими от плотности (накопление продуктов обмена, гипоксия и др.), и к моменту выклева в разных частях кладки неравномерна, на краях скопления она составляет всего 9%, тогда как в центре и в нижних частях скоплений она может достигать 80% (Сурова, Северцов, 1985). Ранее мною было показано, что плотность развивающейся икры оказывает существенное влияние на темпы развития и смертность эмбрионов серой жабы (Dmitrieva, 2005; Дмитриева, 2007, 2013). Вероятно, в условиях разной плотности на темпы развития и смертность эмбрионов серой жабы также может оказывать влияние количество кислорода растворенного в воде.

В связи с вышеизложенным, целью данной работы являлось изучение влияния концентрации растворенного кислорода на эмбриональное развитие серой жабы *Bufo bufo* и зависимость этого влияния от плотности икры.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа проводилась на икре серой жабы (*Bufo bufo*), полученной естественным путем в лабораторных условиях. Производители отлавливались в период массового икрометания в Стерляжьем пруду на Звенигородской биостанции МГУ (50 км к западу от Москвы). В природных условиях серая жаба откладывает икру в виде длинных шнуров, которые натягивает между различными подводными предметами, наматывает на них икранные шнуры. Пары производителей сразу после отлова помещали в отдельные аквариумы для откладки икры, в которые помещались ветки и прутья, чтобы обеспечить естественные условия для откладки икры серой жабы, максимально приближенные к природным условиям (рис. 1). Сразу после завершения процесса икрометания полученную икру раскладывали по экспериментальным аквариумам. Для рассадки выбирались качественные участки кладки серой жабы (не смятые, не деформированные), что существенно снижало случай-

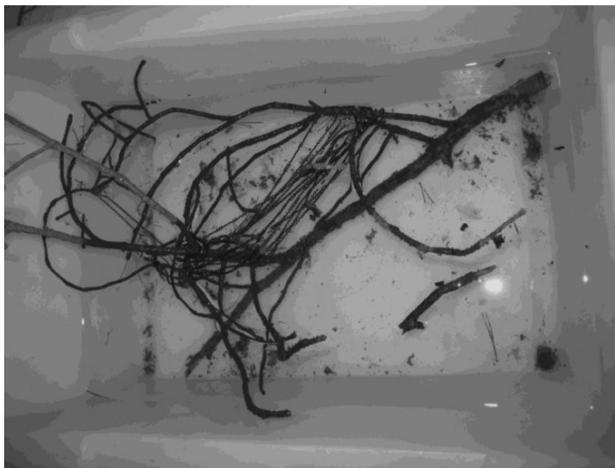


Рис. 1. Кладка серой жабы, полученная в лабораторных условиях.

ный вклад в результирующую смертность поврежденных и неоплодотворенных эмбрионов. Икрные шнуры разрезались на необходимые для экспериментов фрагменты. Любое дополнительное воздействие, проводимое в процессе проведения экспериментов, может оказывать существенное влияние на результат (Dmitrieva, 2005), поэтому все подобные воздействия (замена воды, перемешивание воды в аквариуме, дополнительные манипуляции с эмбрионами) в процессе проведения экспериментов были сведены к минимуму.

Для исследования влияние недостатка кислорода на раннее развитие (до момента вылупления) было поставлено три серии экспериментов.

В первой серии экспериментов одиночные икринки, полученные от одной пары производителей, помещались в 6-ти луночные планшеты с площадью дна каждой лунки 1.0 см^2 , объем воды примерно 0.02 л . Лунки, в которые помещались одиночные икринки, заполнялись водой до самого верха, т.е. с одинаковой высотой столба воды. Часть планшетов закрывалась крышками, которые плотно закрывали лунки, полностью перекрывая обмен доступ воздуха из окружающей среды, препятствуя растворению кислорода в воде. Другая часть планшетов оставалась открытой, обмен кислорода с окружающей средой не был затруднен. Температура на протяжении эксперимента поддерживалась на уровне $13\text{--}14^\circ\text{C}$. В данной серии экспериментов было исследовано 420 икринок из 6 кладок.

Вторая серия экспериментов была поставлена в условиях повышенной плотности икринок (120 икринок/чашку). В стеклянные чашки Петри помещалось по 120 икринок серой жабы. Чашки до краев заполнялись водой. Часть чашек Петри плотно закрывались крышкой, предотвращая свободный обмен кислорода в процессе эксперимента. Другая часть оставалась открытой, кисло-

родный обмен осуществлялся свободно. Температура в данном эксперименте также была $13\text{--}14^\circ\text{C}$. Всего в данном эксперименте было исследовано 4 кладки серой жабы (5760 эмбрионов). Концентрация растворенного кислорода в обоих экспериментах измерялась методом титрования с помощью теста TetraTest O_2 .

Третья серия экспериментов была поставлена в условиях разной плотности икринок. Для данного эксперимента были использованы одинаковые аквариумы (стеклянные емкости с диаметром дна 70 мм и высотой 35 мм , объем воды — 0.13 л). В данные емкости помещались икрные шнуры по 30 и 120 икринок, которые до краев заполнялись водой. Как и в предыдущей серии экспериментов, часть емкостей плотно закрывались крышкой, предотвращая свободный обмен кислорода, а часть оставалась открытой. Температура в период проведения эксперимента поддерживалась на постоянном уровне $17.3 \pm 0.5^\circ\text{C}$. Всего было исследовано 4 кладки, было поставлено по 6 повторностей для каждой серии эксперимента. Общее количество исследованного материала — 7200 эмбрионов. Концентрация растворенного кислорода измерялась в начале эксперимента (в момент рассадки икры), а также по окончании эксперимента (массовое вылупление) с помощью цифрового оптического датчика LDO (портативный оксиметр HQ30D.99. фирмы HACH).

Через равные промежутки времени (8 часов) подсчитывалось количество мертвых икринок, а также оценивалась стадия развития каждой икринки. За 0 принималось время окончания икрометания парой серой жабы. Икринка считалась умершей, если наблюдалось помутнение (обеление) эмбриона. Таким образом, по окончании эксперимента было получено количество погибших эмбрионов в конкретный момент времени через каждые 8 часов с момента окончания икрометания во всех экспериментальных емкостях. Первоначальная плотность посадки принималась за 100%. Доля умерших эмбрионов считалась как % погибших эмбрионов от первоначального количества.

Оценка стадий развития проводилась с помощью таблиц нормального развития для серой жабы R. Cambar и J. Girouloux (Cambar, Girouloux, 1956). Для сравнения аквариумов между собой по темпам развития было введено понятие “индекс уровня развития”, которое оценивалось по формуле (Dmitrieva, 2005):

$$X(t) = \frac{\sum_{i=1}^J (K(i)n(i))}{M(t)},$$

где $X(t)$ — индекс уровня развития эмбрионов в одном аквариуме в момент времени t ,

Таблица 1. Количество выделенных стадий развития (по Cambar, Girouloux, 1956) (J) и присвоенный им условный коэффициент ($K(i)$)

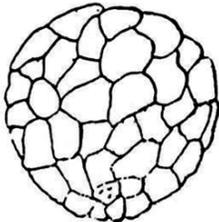
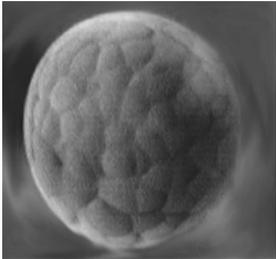
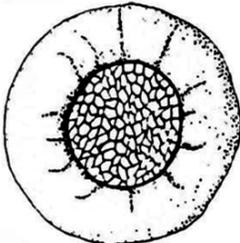
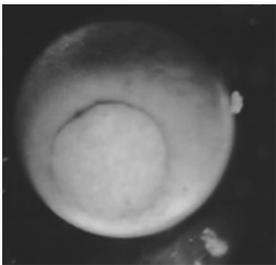
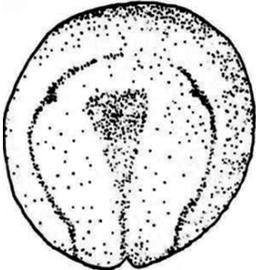
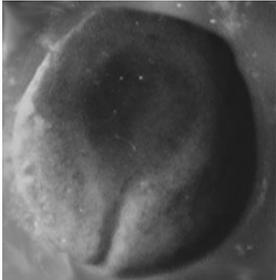
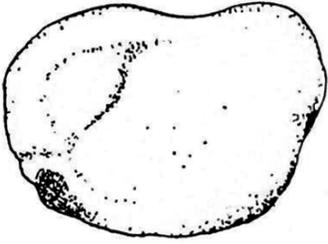
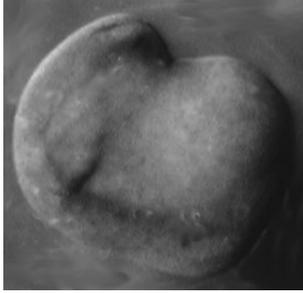
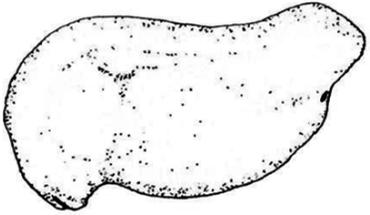
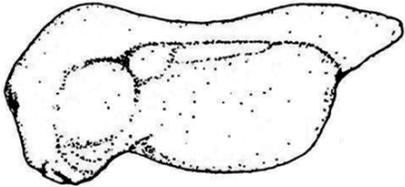
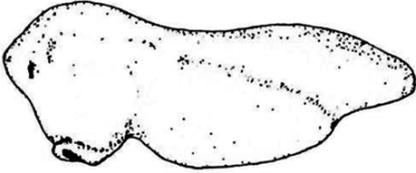
№ стадии по Cambar, Girouloux, 1956	Рисунок стадии по Cambar, Girouloux, 1956	Фото стадии	Условный коэффициент ($K(i)$)
Дробление			0
Гастрюляция			1
II (9)			2
II (10)–II (11)			2.5
II (12)			3

Таблица 1. Окончание

№ стадии по Sambar, Girouloux, 1956	Рисунок стадии по Sambar, Girouloux, 1956	Фото стадии	Условный коэффициент ($K(i)$)
II (13)			4
III (1)			5
III (2)			6
III (3)			7

$M(t)$ – общее количество выживших икринок в момент времени t ,

J – количество выделенных стадий развития (по Sambar, Girouloux, 1956)

$n(i)$ – количество эмбрионов, находящихся на стадии развития i в момент времени t ,

$K(i)$ – условный коэффициент, присвоенный каждой стадии развития (дробление – 0, гаструла – 1 и т.д. до вылупления). Условный коэффициент $K(i)$ присваивался таким стадиям развития, которые

можно отличить на глаз от предыдущих без использования микроскопа. Всего было выделено 7 коэффициентов по количеству стадий, которые легко визуально отличить друг от друга без использования микроскопа (табл. 1). На глаз легко выделить стадию II(9) – стадия формирования нервной пластины, когда нервные валики начинают приподыматься (условный коэффициент – 2). До этого момента разделить стадии развития на глаз без использования микроскопа крайне про-

Рис. 2. Динамика смертности одиночно развивающихся эмбрионов при развитии в закрытых (без доступа воздуха) и открытых планшетах (при свободном обмене воздухом с окружающей средой): (а) кладка № 1, (б) кладка № 2, (в) кладка № 3, (г) кладка № 4.

блематично. Визуально можно отличить дробящиеся эмбрионы и закончившие дробление. Дробящимся эмбрионам присвоен условный коэффициент 0, а прошедшим дробление – 1. Визуально хорошо отличимы друг от друга следующие стадии развития: II (10)–II(11), II (12), II (13), III (1), III (2), III (3). Этим стадиям присвоены коэффициенты 3, 4, 5, 6 и 7 соответственно. Таким образом, вычисляемый показатель “уровня развития” дает возможность количественно оценить не только распределение эмбрионов по стадиям и синхронность развития в группе, но и темпы их развития, а также позволяет сравнивать экспериментальные группы с помощью статистических критериев для обоснованности сделанных выводов.

Результаты экспериментов были обработаны с помощью пакета программ Statistica 6.0. Достоверность различий оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney U Test), различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате экспериментов на одиночно развивающихся икринках было показано, что смертность к моменту вылупления практически не различается между эмбрионами, развивающимися в закрытых планшетах и эмбрионами, развивающимися в открытых планшетах (табл. 2.). Различия по смертности наблюдаются лишь в кладке 2. Однако картина смертности (количество погибших эмбрионов в зависимости от времени развития или “динамика смертности”) на протяжении эмбрионального развития различна. Динамика смертности при недостатке кислорода (закрытые планшеты) и нормальном доступе кислорода (открытые планшеты) различна (рис. 2). В кладке 2 эксперимент был прекращен на более ранних стадиях развития (рис. 2б), очевидно поэтому результаты данного эксперимента несколько отличаются от остальных. На остальных графиках видно, что гибель эмбрионов серой жабы в закрытых емкостях в условиях недостатка кислорода начинается раньше, чем в емкостях открытых с нормальным доступом кислорода.

Например, в кладке № 1 при недостатке кислорода смертность эмбрионов возникала на более ранних стадиях развития (стадия II(9)–II(10) – примерно 112-й час развития) и интенсивно возрастала до стадии II(13) (Cambar, Girouloux, 1956) (примерно 136-й час развития), после чего наблюдалось замедление смертности. При нормальных условиях развития возрастание смертности

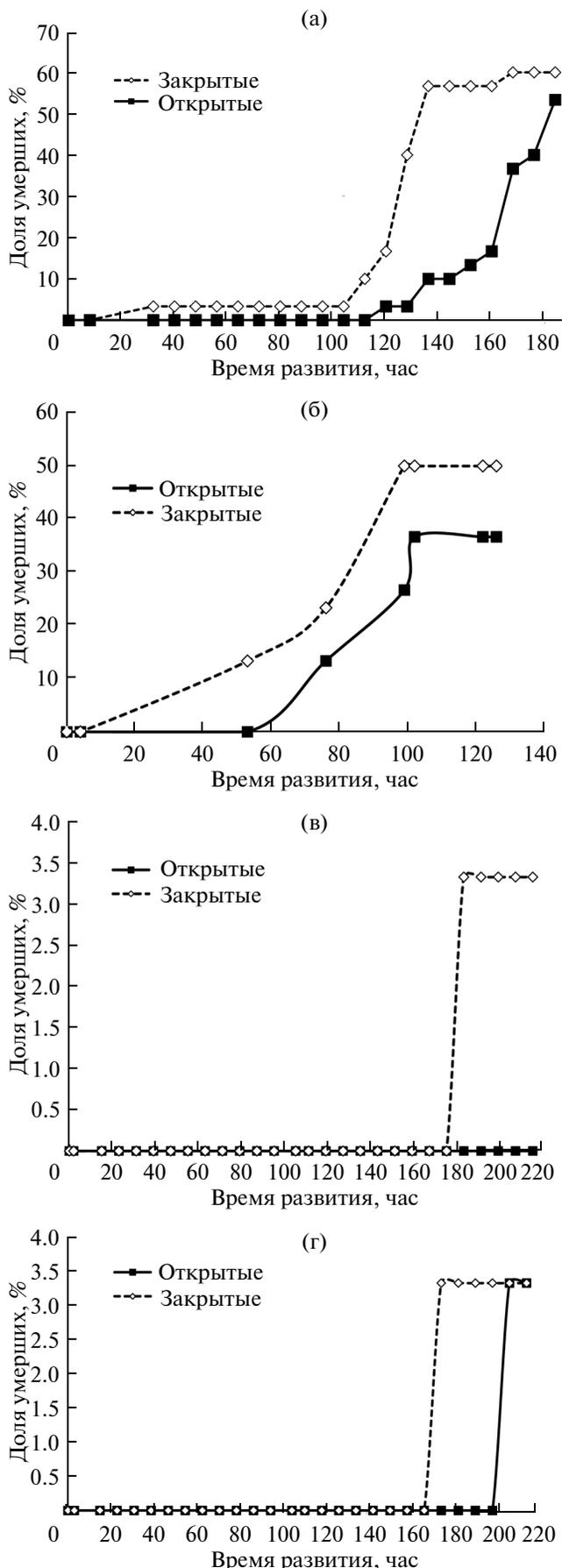


Таблица 2. Смертность эмбрионов серой жабы к моменту вылупления при одиночном развитии (доля умерших от исходного количества, %)

№ кладки	Открытые планшеты	Закрытые планшеты	<i>p</i>
1	0.0	3.33	0.343
2	3.33	3.33	1.000
3	3.33	3.33	1.000
4	43.33	43.33	1.000
5	60.00	53.33	0.587
6	36.67	50.0	0.314

эмбрионов наблюдается примерно со стадии П(13) (примерно 136-й час развития) и интенсивно возрастает к моменту вылупления. Таким образом, в результате проведенных экспериментов показано, что при одиночном развитии икринок серой жабы недостаток кислорода не ведет к увеличению смертности к моменту вылупления, а лишь сдвигает смертность на более ранние стадии развития. Темпы развития одиночных икринок развивающихся как в открытых, так и в закрытых планшетах существенно не отличаются. Наблюдается высокая синхронность развития одиночных эмбрионов.

Используемые в данном эксперименте кладки отличаются по жизнеспособности. Смертность в кладках 4, 5 и 6 существенно выше, чем в кладках 1, 2 и 3. Однако при этом картина динамики смертности в обеих группах кладок сходная: в закрытых емкостях смертность возникает раньше по времени, чем в открытых емкостях. Таким образом, общая жизнеспособность кладок не влияет на смертность, обусловленную недостатком растворенного в воде кислорода.

Во второй серии экспериментов, в условиях повышенной плотности (120 икринок/чашку) итоговая смертность к моменту вылупления различается достоверно в 3-х из 4-х исследованных кладок (табл. 3). В кладке № 3 достоверных различий не наблюдается из-за большой дисперсии по смертности в закрытых емкостях (табл. 3).

Динамика смертности при недостатке кислорода (закрытые чашки) и нормальном доступе кислорода (открытые чашки) несколько различна

(рис. 3). В условиях недостатка кислорода эмбриональная смертность начинается несколько раньше, чем при нормальных условиях развития. Так в кладке № 1 смертность в закрытых емкостях возникает на 151-м часу развития и возрастает к 191-му часу, когда в открытых емкостях смертность эмбрионов только начинается (рис. 3а). В кладке № 3 эмбриональная смертность в закрытых емкостях возникает на 108-м часу развития, а в открытых только в самом конце перед вылуплением на 200-м часу (рис. 3в). Исключение составляет кладка № 2, в ней смертность возникла сначала в открытых емкостях в условиях нормального доступа кислорода. Однако это произошло лишь в одной чашке фактически сразу после начала эксперимента (20-й час эксперимента). Скорее всего, в данную чашку попали неоплодотворенные икринки, которые исказили картину смертности. В остальном, картина динамики смертности в данной кладке такая же, как и в 3 остальных кладках.

Концентрация растворенного кислорода в данном эксперименте была измерена методом титрования с помощью TETRA TEST O₂. К сожалению, тест не является точным, позволяет измерять лишь диапазон концентраций растворенного кислорода. Концентрация растворенного кислорода в открытых чашках Петри находится в диапазоне 8–11 мг/л, а в закрытых в пределах 2–5 мг/л. Таким образом, к моменту вылупления концентрация растворенного кислорода существенно снижается в закрытых емкостях, по сравнению с открытыми. В емкостях с одиночно развивающимися эмбрионами эту разницу уловить вовсе не удастся. Все концентрации находятся в пределах 8–11 мг/л. Однако, разница, видимо все-таки есть, так как наблюдаются различия в динамике смертности в закрытых и открытых планшетах с одиночно развивающимися икринками.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов, показано, что небольшой недостаток кислорода при одиночном развитии эмбрионов серой жабы не ведет к увеличению смертности в раннем развитии *Bufo bufo*, а лишь сдвигает смертность на более ранние стадии развития. При повышенной же плотности (120 икринок) смертность к моменту вылупления достоверно различается, в условиях недостатка кислорода она существенно выше, чем при нормальных условиях до-

Таблица 3. Смертность эмбрионов серой жабы к моменту вылупления при плотности посадки 120 икринок на аквариум

№ кладки	Открытые	Закрытые	<i>U</i>	<i>Z</i>	<i>p</i>	<i>N1</i>	<i>N2</i>
1	1.81 ± 0.66	22.50 ± 13.38	10	1.28	0.20	6	6
2	1.39 ± 0.98	74.31 ± 6.02	0	2.88	0.004	6	6
3	1.67 ± 0.77	76.81 ± 11.15	0	2.88	0.004	6	6
4	8.19 ± 1.28	67.08 ± 6.15	0	2.88	0.004	6	6

Рис. 3. Динамика смертности эмбрионов, развивающихся при плотности 120 икринок/чашку в закрытых чашках (без доступа воздуха) и открытых чашках (при свободном обмене воздухом с окружающей средой): (а) кладка № 1, (б) кладка № 2, (в) кладка № 3, (г) кладка № 4.

ступа кислорода. Динамика же смертности при повышенной плотности развития сходна с динамикой смертности одиночно развивающихся эмбрионов.

Третья серия экспериментов по влиянию концентрации растворенного кислорода на темпы развития и смертность эмбрионов серой жабы была поставлена с использованием высокоточного прибора по измерению концентрации растворенного кислорода. Концентрация растворенного кислорода измерялась в начале эксперимента (в момент рассадки икры), а также по окончании эксперимента (массовое вылупление) с помощью цифрового оптического датчика LDO (портативный оксиметр HQ30D.99. фирмы HACH). Как показали результаты экспериментов, концентрация кислорода в исследуемых аквариумах отличается в начале и в конце эксперимента. Результаты измерения концентрации растворенного в воде кислорода приведены в таблице 4. В начале эксперимента концентрация кислорода примерно одинакова во всех аквариумах и составляет в среднем 9.46 ± 0.06 мг/л (насыщенность кислородом 113.56 ± 0.35).

Концентрация растворенного кислорода (мг/л) тесно скоррелирована с насыщенностью (%). Относительное содержание кислорода в воде, выраженное в процентах его нормального содержания, называется степенью насыщения кислородом. Эта величина зависит от температуры воды, атмосферного давления и солености, вычисляется по формуле:

$$M = \frac{a \times 101308}{NP} \times 100,$$

где M – степень насыщения воды кислородом, %;

a – концентрация кислорода, мг/дм³;

P – атмосферное давление в данной местности, Па;

N – нормальная концентрация кислорода при данной температуре, минерализации (солености) и общем давлении 101308 Па.

Таким образом, определяется степень насыщения воды кислородом (в %) по отношению к равновесному содержанию при данных температуре и атмосферном давлении.

Используемый оксиметр HQ30D.99 измеряет не только концентрацию растворенного кислорода, но и температуру воды, атмосферное давление и насыщенность воды кислородом (в %). Поскольку измерения происходят в разное время суток, в разные дни, когда температура и атмосферное дав-

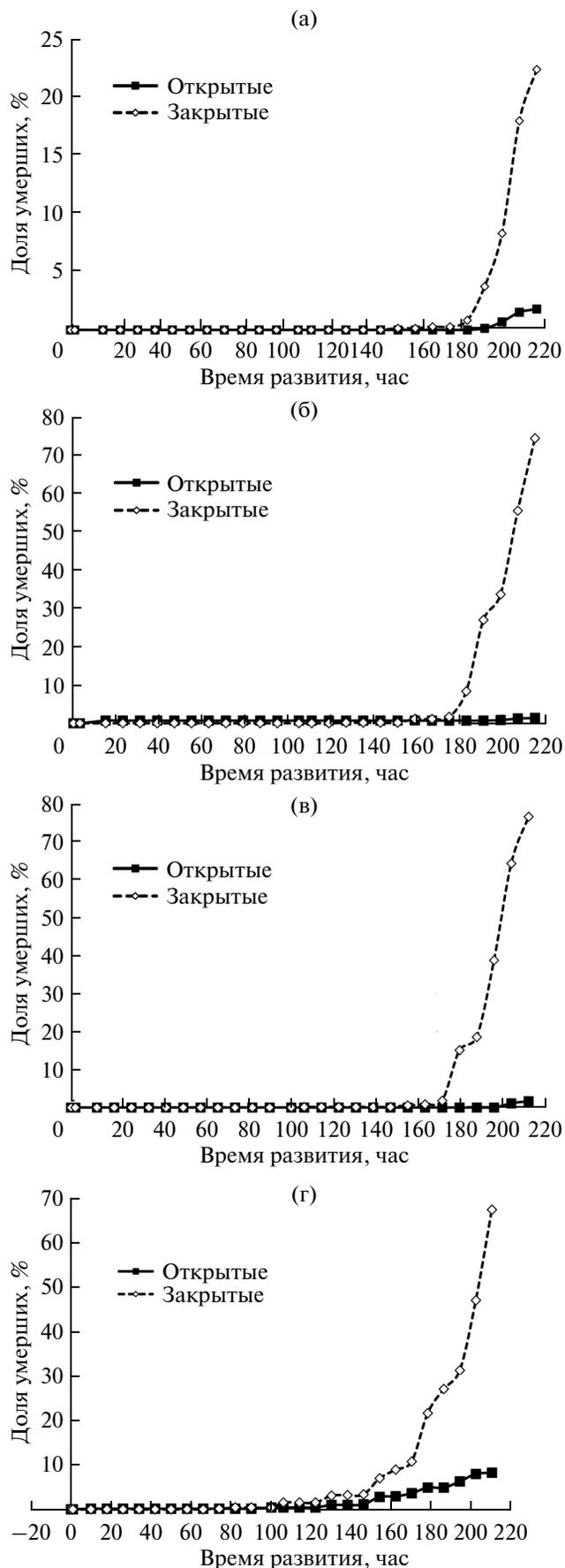


Таблица 4. Концентрация растворенного в воде кислорода в начале и в конце эксперимента

№ кладки	Плотность посадки	Условия опыта	Начало эксперимента		Конец эксперимента	
			концентрация (мг/л)	насыщенность (%)	концентрация (мг/л)	насыщенность (%)
1	30	Открытые	9.46 ± 0.02	112.53 ± 0.12	6.94 ± 0.21	91.48 ± 2.78
		Закрытые	9.46 ± 0.02	112.53 ± 0.12	0.87 ± 0.15	11.53 ± 2.10
	120	Открытые	9.45 ± 0.04	112.18 ± 0.25	2.43 ± 0.43	32.52 ± 5.76
		Закрытые	9.45 ± 0.04	112.18 ± 0.25	0.31 ± 0.03	4.27 ± 0.42
2	30	Открытые	9.92 ± 0.01	115.10 ± 0.15	6.44 ± 0.34	85.55 ± 4.49
		Закрытые	9.92 ± 0.01	115.10 ± 0.15	1.49 ± 0.62	20.02 ± 8.39
	120	Открытые	9.81 ± 0.01	114.48 ± 0.26	2.08 ± 0.43	27.97 ± 5.77
		Закрытые	9.81 ± 0.01	114.48 ± 0.26	0.38 ± 0.05	5.05 ± 0.71
3	30	Открытые	9.51 ± 0.02	116.15 ± 0.17	6.50 ± 0.14	86.48 ± 1.92
		Закрытые	9.51 ± 0.02	116.15 ± 0.17	0.36 ± 0.04	4.73 ± 0.54
	120	Открытые	9.47 ± 0.06	115.33 ± 0.63	1.90 ± 0.33	25.02 ± 4.31
		Закрытые	9.47 ± 0.06	115.33 ± 0.63	0.32 ± 0.04	4.23 ± 0.56
4	30	Открытые	8.86 ± 0.07	110.23 ± 0.24	5.94 ± 0.25	81.15 ± 3.45
		Закрытые	8.86 ± 0.07	110.23 ± 0.24	0.37 ± 0.05	5.12 ± 0.73
	120	Открытые	9.21 ± 0.05	112.48 ± 0.24	1.86 ± 0.11	24.97 ± 1.45
		Закрытые	9.21 ± 0.05	112.48 ± 0.24	0.34 ± 0.07	4.61 ± 1.00

Таблица 5. Насыщенность воды кислородом по окончании эксперимента (стадия вылупления) при разной плотности посадки икры

№ кладки	Условия опыта	Плотность 30	Плотность 120	<i>U</i>	<i>Z</i>	<i>p</i>	<i>N1</i>	<i>N2</i>
1	Открытые	91.48 ± 2.78	32.52 ± 5.76	0	2.88	0.004	6	6
	Закрытые	11.53 ± 2.10	4.27 ± 0.42	0	2.88	0.004	6	6
2	Открытые	85.55 ± 4.49	27.97 ± 5.77	0	2.88	0.004	6	6
	Закрытые	20.02 ± 8.39	5.05 ± 0.71	6	1.92	0.05	6	6
3	Открытые	86.48 ± 1.92	25.02 ± 4.31	0	2.88	0.004	6	6
	Закрытые	4.73 ± 0.54	4.23 ± 0.56	14.5	0.56	0.58	6	6
4	Открытые	81.15 ± 3.45	24.97 ± 1.45	0	2.88	0.004	6	6
	Закрытые	5.12 ± 0.73	4.61 ± 1.00	13	0.8	0.42	6	6

ление могут варьировать, наиболее точным показателем количества кислорода в воде является насыщенность (%). Поэтому в дальнейших результатах будем рассматривать именно эту величину.

По окончании эксперимента концентрация растворенного кислорода существенно снижается, соответственно снижается и насыщенность воды кислородом (табл. 4). В открытых емкостях с икрой насыщение кислородом снижается меньше, чем в закрытых емкостях. Насыщенность кислородом в открытых и закрытых емкостях во

всех исследуемых кладках различается достоверно, т.е. при закрытых емкостях с икрой концентрация растворенного кислорода существенно ниже, чем в открытых емкостях. Таким образом, в закрытых емкостях эмбрионы серой жабы развиваются в условиях с явным недостатком кислорода, по сравнению с развитием в открытых емкостях.

Различия в открытых и закрытых емкостях достоверны всегда, независимо от плотности развивающейся икры. Т.е. и при плотности 30, и при плотности 120 икринок на аквариум, насыщен-

Таблица 6. Смартность эмбрионов серой жабы к моменту вылупления при плотности посадки 120 икринок на аквариум

№ кладки	Открытые	Закрытые	<i>U</i>	<i>Z</i>	<i>p</i>	<i>N1</i>	<i>N2</i>
1	4.31 ± 0.84	96.67 ± 0.86	0	2.88	0.004	6	6
2	5.00 ± 0.86	96.67 ± 1.27	0	2.88	0.004	6	6
3	12.22 ± 3.19	98.06 ± 0.77	0	2.88	0.004	6	6
4	8.89 ± 2.52	96.39 ± 0.85	0	2.88	0.004	6	6

Таблица 7. Смартность эмбрионов серой жабы к моменту вылупления при плотности посадки 30 икринок на аквариум

№ кладки	Открытые	Закрытые	<i>U</i>	<i>Z</i>	<i>p</i>	<i>N1</i>	<i>N2</i>
1	0.00 ± 0.00	5.56 ± 2.53	6	1.92	0.05	6	6
2	1.11 ± 1.11	3.89 ± 1.34	7.5	1.68	0.09	6	6
3	4.44 ± 2.81	11.67 ± 2.55	9	1.44	0.15	6	6
4	1.11 ± 1.11	36.11 ± 4.82	0	2.88	0.004	6	6

ность воды кислородом существенно ниже в закрытых емкостях, чем в открытых. Однако концентрация растворенного кислорода, а соответственно и насыщенность воды кислородом, при плотности 120 икринок на аквариум обычно достоверно ниже, чем при плотности 30 икринок на аквариум (табл. 5).

Следует обратить внимание, что в нормальных условиях насыщенности кислородом (в открытых емкостях) различия между плотностью 30 и плотностью 120 икринок на аквариум всегда достоверны. Т.е. в условиях достатка кислорода при плотности 120 икринок на аквариум насыщенность воды кислородом существенно ниже, чем при плотности 30 икринок на аквариум. В условиях же недостатка кислорода различия не всегда достоверны, в половине исследованных кладок насыщенность воды кислородом при закрытых емкостях достоверно не различается (табл. 5). Таким образом, в условиях свободного доступа воздуха, при разной плотности посадки насыщенность воды кислородом к моменту вылупления личинок серой жабы достоверно различается всегда. В закрытых же емкостях и при высокой, и при пониженной плотности потребляется практически весь растворенный в воде кислород.

Концентрация растворенного кислорода оказывает влияние на смертность эмбрионов серой жабы. При плотности 120 икринок на аквариум смертность в условиях недостатка кислорода существенно выше, чем в нормальных условиях развития (табл. 6). По результатам теста Манна-Уитни смертность достоверно различается во всех исследованных кладках. В закрытых емкостях в условиях недостатка кислорода смертность к моменту вылупления близка к 100%, т.е. выживает

лишь небольшой процент икринок серой жабы (табл. 6).

По результатам критерия Манна-Уитни при плотности посадки 30 икринок на аквариум смертность к моменту вылупления достоверно различается лишь в 2 из 4 исследованных кладок (табл. 7). Смертность хорошо различается в кладке 4, а в кладке 1 различия на грани достоверности. Таким образом, в условиях пониженной плотности смертность эмбрионов серой жабы к моменту вылупления достоверно не различается в 2 из 4 исследованных кладок. При повышенной плотности посадки в условиях недостатка кислорода смертность к моменту вылупления близка к 100%, т.е. выживает лишь небольшой процент эмбрионов серой жабы, тогда как в условиях нормального доступа кислорода смертность относительно невысока. При пониженной плотности посадки смертность эмбрионов серой жабы достоверно ниже, чем при повышенной плотности, как в условиях недостатка кислорода, так и в нормальных условиях. Однако в условиях недостатка кислорода эта разница более существенная, во всех случаях различия достоверны при $p < 0.01$, тогда как в нормальных условиях эта разница не всегда столь существенна.

Таким образом, смертность эмбрионов серой жабы к моменту вылупления при повышенной плотности посадки выше, чем при пониженной плотности независимо от насыщенности воды кислородом, т.е. на смертность оказывает влияние не только концентрация растворенного кислорода, но и фактор плотности.

В условиях недостатка кислорода индекс уровня развития к моменту вылупления достоверно ниже, чем в условиях нормального доступа кислорода (табл. 8, 9). При высокой плотности по-

Таблица 8. Индекс уровня развития эмбрионов серой жабы к моменту вылупления при плотности посадки 120 икринок на аквариум

№ кладки	Открытые	Закрытые	<i>U</i>	<i>Z</i>	<i>p</i>	<i>N1</i>	<i>N2</i>
1	5.40 ± 0.1	3.80 ± 0.24	0	2.74	0.006	6	5
2	4.96 ± 0.07	4.25 ± 0.15	4.5	1.92	0.055	6	5
3	5.25 ± 0.08	4.04 ± 0.17	0	2.56	0.010	6	4
4	5.83 ± 0.04	3.87 ± 0.06	0	2.74	0.006	6	5

Таблица 9. Индекс уровня развития эмбрионов серой жабы к моменту вылупления при плотности посадки 30 икринок на аквариум

№ кладки	Открытые	Закрытые	<i>U</i>	<i>Z</i>	<i>p</i>	<i>N1</i>	<i>N2</i>
1	5.94 ± 0.02	4.80 ± 0.23	0	2.31	0.02	4	4
2	5.84 ± 0.12	4.66 ± 0.19	0	2.31	0.02	4	4
3	5.78 ± 0.13	5.04 ± 0.12	0	2.31	0.02	4	4
4	5.99 ± 0.01	4.83 ± 0.25	0	2.12	0.03	4	4

садки к моменту вылупления выживает лишь небольшой процент эмбрионов серой жабы (табл. 6), и эти эмбрионы существенно отстают в развитии от особей, развивающихся в условиях нормального доступа кислорода (табл. 8). По данным критерия Манна-Уитни различия достоверны в трех кладках, а в кладке 2 различия на грани достоверности.

Таким образом, при плотности посадки 120 икринок на аквариум в условиях недостатка кислорода темпы развития существенно ниже, чем при нормальных условиях доступа кислорода. Недостаток кислорода вызывает замедление развития эмбрионов серой жабы. В условиях пониженной плотности (30 икринок на аквариум) темпы развития эмбрионов также достоверно различаются (табл. 9). В условиях недостатка кислорода темпы развития ниже, чем при нормальном доступе кислорода, что отражается на показателе "индекс уровня развития". В условиях недостатка кислорода больше разброс по стадиям, т.е. больше отстающих в развитии эмбрионов, что видно по среднему значению индекса уровня развития и ошибке среднего (табл. 9).

Темпы развития в условиях пониженной плотности (30 икринок на аквариум) достоверно ($p < 0.05$) выше, чем в условиях повышенной (120 икринок на аквариум). В нормальных условиях доступа кислорода темпы развития эмбрионов серой жабы всегда достоверно выше, а в условиях недостатка кислорода эти различия достоверны в 3 из 4 изученных кладок. В кладке 2 индекс уровня развития в условиях недостатка кислорода достоверно не различается при разной плотности посадки. Это может быть обусловлено особенностями самой кладки по реакции на недостаток кислорода. В условиях недостатка кислорода при повышенной плотности темпы развития в этой кладке, выше, чем в 3 других кладках.

Таким образом, концентрация растворенного кислорода при разной плотности развивающихся эмбрионов серой жабы по-разному сказывается на смертности и темпах развития. Так, например, концентрация растворенного кислорода в закрытых емкостях при повышенной (120 икринок на аквариум) и пониженной (30 икринок на аквариум) плотности достоверно не различается в 2 из 4 исследованных кладок (табл. 5.), т.е. условия насыщенности воды кислородом одинаковые. Однако при повышенной плотности эти условия гораздо сильнее сказываются как на уровне смертности, так и темпах развития эмбрионов серой жабы. Таким образом, в условиях повышенной плотности недостаток кислорода сильнее сказывается на развитии эмбрионов серой жабы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Концентрация растворенного в воде кислорода оказывает существенное влияние на эмбриональное и личиночное развитие амфибий. При пониженной концентрации кислорода в воде в естественных водоемах повышается смертность эмбрионов лягушек и жаб (Флякс, 1985). В результате экспериментов на одиночных эмбрионах было показано, что смертность к моменту вылупления не зависит от концентрации растворенного кислорода, однако динамика смертности при недостатке и нормальном доступе кислорода различна. При недостатке кислорода смертность резко возрастает уже на стадии нейрулы, тогда как в условиях свободного доступа кислорода смертность возрастает только на стадии формирования хвостовой почки. Таким образом, в результате проведенных экспериментов, показано, что при одиночном развитии икринок серой жабы недостаток кислорода не ведет к увеличению

смертности до вылупления, а лишь сдвигает смертность на более ранние стадии развития.

В процессе раннего развития организма существуют так называемые “критические периоды”, в которые резко повышается чувствительность к воздействию различных факторов, т.к. происходит детерминация путей дальнейшего развития организма, и любое неблагоприятное воздействие способно нарушить дальнейший ход его развития (Светлов, 1976; Дыбан, 1988). На ранних стадиях эмбриогенеза эти периоды являются критическими для всего организма в целом, на более поздних стадиях имеются критические стадии в развитии отдельных органов. Внешние факторы, к которым особенно велика чувствительность в эти периоды, могут ускорять, замедлять или совсем приостанавливать развитие (Б.П. Токин, 1987). В нашем случае таким фактором является гипоксия, которая, как показано многими исследователями, оказывает существенное влияние на раннее развитие амфибий (Сулова, Северцов, 1985; Флякс, 1985; Mills, Barnhart, 1999; Seymour, Roberts, 1991; Crowder et al., 1998; Seymour et al., 2000; Владимирова и др., 2000; 2009, 2010). Недостаток растворенного кислорода во время “критических периодов” развития приводит к изменению картины смертности одиночных эмбрионов (рис. 2). Таким образом, в условиях гипоксии при одиночном выращивании эмбрионов критическим периодом является стадия нейруляции (индекс уровня развития порядка 2.5). В нормальных условиях доступа кислорода таким периодом является стадия хвостовой почки, т.е. ближе к вылуплению (индекс уровня развития – 4–5), когда отмечается повышенная смертность икринок.

Результаты проведенных экспериментов показали, что концентрация растворенного кислорода при разной плотности развивающихся эмбрионов серой жабы по-разному сказывается на смертности и темпах развития. Так, концентрация растворенного кислорода в закрытых емкостях при повышенной (120 икринок на аквариум) и пониженной (30 икринок на аквариум) плотности достоверно не различается в 2 из 4 исследованных кладок (табл. 5), т.е. условия насыщенности воды кислородом одинаковые. Однако при повышенной плотности эти условия гораздо сильнее сказываются как на уровне смертности, так и индексе уровня развития эмбрионов серой жабы. Смертность эмбрионов серой жабы к моменту вылупления при повышенной плотности посадки выше, чем при пониженной плотности, независимо от насыщенности воды кислородом, т.е. на смертность оказывает влияние не только концентрация растворенного кислорода, но и плотность. Таким образом, в условиях повышенной плотности недостаток кислорода оказывает более сильное влияние на развитии эмбрионов серой жабы.

Как было показано ранее, плотность развивающихся эмбрионов серой жабы оказывает влияние на их смертность и темпы развития (Dmitrieva, 2005; Дмитриева, 2007, 2013). Однако, это влияние не выражается, как принято считать, в объеме воды, в котором развивается один эмбрион. На смертность эмбрионов серой жабы оказывает влияние “поверхностная” (посчитанная как отношение числа икринок в аквариуме к величине площади дна аквариума) и “линейная” (посчитанная как отношение количества икринок и длины икринного шнура, на которую он растянута) плотности (Дмитриева, 2013). Объемная же плотность (отношение количества икринок к объему воды, в котором они развиваются) не оказывает влияния на смертность эмбрионов серой жабы. Таким образом, учет совместного воздействия плотности икры и исследуемого фактора (в нашем случае, влияние концентрации растворенного кислорода) повышает точность оценки влияния исследуемого фактора на раннее развитие амфибий.

Большинство исследователей при постановке экспериментов не учитывают влияния плотности на результаты проводимых исследований. Однако, например, при исследовании влияния концентрации меди на смертность и развитие эмбриональных и личиночных стадий южной леопардовой лягушки (*Rana sphenoccephalus* – *Lithobates sphenoccephalus*) показано, что результаты этих экспериментов могут зависеть от начальной плотности икры (Lance et al., 2012). Таким образом, учитывая при проведении эксперимента по влиянию концентрации растворенного кислорода на эмбриональное развитие серой жабы такой важный фактор, как плотность икринок, мы повышаем точность анализа результатов проводимых экспериментов, а также улучшаем интерпретацию результатов этих исследований.

В условиях недостатка кислорода индекс уровня развития в период массового вылупления достоверно ниже, чем в условиях нормального доступа кислорода (табл. 8, 9). При высокой плотности посадки к моменту вылупления выживает лишь небольшой процент эмбрионов серой жабы, и эти эмбрионы существенно отстают в развитии от особей, развивающихся в условиях нормального доступа кислорода. Таким образом, при плотности посадки 120 икринок на аквариум в условиях недостатка кислорода темпы развития существенно ниже, чем при нормальных условиях доступа кислорода, т.е. недостаток кислорода вызывает замедление развития эмбрионов серой жабы. В условиях повышенной плотности (120 икринок на аквариум) в условиях недостатка кислорода картина смертности эмбрионов серой жабы очень похожа на картину смертности при критических плотностях (480 и 960 икринок на 0.13 л – Dmitrieva, 2005; Дмитриева, 2007). При очень вы-

сокой плотности посадки наблюдалось замедление развития, даже остановка на стадии гастрюлы (индекс уровня развития 1), а затем начиналась массовая гибель особей (Дмитриева, 2007). Т.е. эмбриональное развитие в неблагоприятных условиях (существенного недостатка кислорода и/или повышенной плотности) замирает на стадии гастрюлы, не переходя к стадии формирования нервной пластины, переживая неблагоприятные условия. Если же условия развития не улучшаются, то начинается массовая гибель особей. Когда большая часть эмбрионов погибает, то небольшое количество эмбрионов при этом может все-таки выжить и достичь стадии вылупления.

Таким образом, при повышенной плотности развивающихся эмбрионов существенный недостаток растворенного в воде кислорода в “критические периоды” приводит к полной остановке развития. Как показывают результаты экспериментов, при плотности 120 икринок на 0.13 л, таким чувствительным периодом является начало нейруляции (индекс уровня развития 2–2.5). Очевидно, развивающимся в условиях повышенной плотности эмбрионам не хватает кислорода для формирования нервной трубки, и развитие останавливается на стадии поздней гастрюлы.

Период гастрюляции – период бурных морфогенетических процессов, которые, сопровождаются повышением энергического метаболизма. Потребление кислорода заметно возрастает на стадии гастрюлы. Так, например, на стадии дробления за час яйцо лягушки поглощает 0.054 мл³ на миллиграмм сухой массы, на стадиях средней и поздней гастрюлы – соответственно 0.141 в 0.162 мл³ (Токин, 1987). На следующей стадии развития – на стадии нейрулы потребление кислорода возрастает еще больше. Например, скорость потребления кислорода у хвостатой лягушки (*Ascaphus truei*) постепенно возрастает на стадии бластулы-гастрюлы, а затем резко – на стадии нейрулы (Brown, 1977). Очевидно, эмбрионам серой жабы в условиях недостатка кислорода и плотности посадки 120 икринок на 0.13 л хватает растворенного кислорода на формирование гастрюлы, а для перехода к формированию нервной пластины кислорода уже не хватает. При этом эмбрионы сразу не погибают, а останавливаются в развитии. Эта остановка может составлять порядка 32-х часов, после чего начинается массовая гибель эмбрионов.

Погибшие эмбрионы начинают разлагаться, разрушаясь бактериями, претерпевая аэробное биохимическое окисление с образованием оксида углерода, содержание кислорода в воде снижается дополнительно за счет химических процессов. При этом на окисление потребляется растворенный в воде кислород, лишая таким образом развивающиеся эмбрионы остатков кислорода. Интересно, что при этом единичные эмбрионы (от

2-х до 10-и в разных кладках) серой жабы все-таки развиваются и достигают стадии вылупления.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. При одиночном развитии икринок недостаток кислорода не приводит к увеличению смертности в эмбриогенезе серой жабы, а приводит лишь к изменению динамики смертности: смертность возникает на более ранних стадиях развития, чем в условиях нормального доступа кислорода.

2. В условиях разной начальной плотности икры влияние концентрации растворенного кислорода на смертность и темпы развития эмбрионов серой жабы проявляются по-разному.

3. При высокой плотности посадки к моменту вылупления выживает лишь небольшой процент эмбрионов серой жабы, и эти эмбрионы существенно отстают в развитии от особей, развивающихся в условиях нормального доступа кислорода.

4. Недостаток растворенного в воде кислорода ведет к замедлению развития эмбрионов серой жабы.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-14-00330).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Владимирова И.Г., Злочевская М.Б., Озернюк Н.Д. Динамика интенсивности дыхания в раннем онтогенезе амфибий // Онтогенез. 2000. Т. 31. № 5. С. 350–354.
- Владимирова И.Г., Радзинская Л.И., Алексеева Т.А., Клейменов С.Ю. Динамика водного и энергетического обмена в раннем онтогенезе зеленой жабы *Bufo viridis* // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера. 2009. Материалы XXVIII Международной конференции 5–8 октября 2009 г. Петрозаводск: КарНЦ РАН. С. 116–119.
- Владимирова И.Г., Клейменов С.Ю., Алексеева Т.А. Динамика массы тела и потребления кислорода в онтогенезе иглистого тритона *Pleurodeles waltl*. 1. Эндотрофный период развития // Изв. РАН. Сер. биол. 2010. № 6. С. 653–660.
- Дмитриева Е.В. Влияние плотности икры на темпы развития и смертность серой жабы (*Bufo bufo*) в лабораторных условиях // Зоол. журн. 2007. Т. 86. № 2. С. 229–235.
- Дмитриева Е.В. Влияние структуры кладки серой жабы (*Bufo bufo*) на эмбриональное развитие // Зоол. журн. 2013. Т. 92. № 12. С. 1437–1449.
- Дыбан А.П. Раннее развитие млекопитающих. Л.: Наука. 1988. 228 с.
- Зотин А. И. Физиология водного обмена у зародышей рыб и круглоротых. М.: Изд-во АН СССР, 1961. 317 с.
- Светлов П.Г. Теория критических периодов развития и ее значение для понимания принципов действия среды на онтогенез // Вопросы цитологии и общей физиологии. М., Изд-во АН СССР, 1976. С. 263–285.

- Светлов П.Г. Физиология (механика) развития: в 2х т. Л.: Наука, 1978 г.
- Сурова Г.С., Северцов А.С. Гибель травяной лягушки (*Rana temporaria*) в раннем онтогенезе и вызывающие ее факторы // Зоол. журнал. 1985. Т. 64. № 1. С. 61–71.
- Токин Б.П. Общая эмбриология: Учеб. для биол. спец. ун-тов. 4-е изд. М.: Высшая школа. 1987. 480 с.
- Флякс Н.Л. Выживаемость амфибий на ранних этапах развития на острове Сахалин // Вопросы герпетологии. Автореф. докладов. 6-я всесоюз. герпет. конф. Ленинград, Наука. 1985. С. 214–215.
- Brown H.A. Oxygen consumption of a large, cold-adapted frog egg (*Ascaphus truei* (Amphibia: Ascaphidae)). Canadian Journal of Zoology, 1977. V. 55. № 2. P. 343–348.
- Cambar R., Gipouloux J. Table chronologique du development embryonnaire et larvaire du crapaud commun *Bufo bufo* L. // Bulletin biologique de la France et de la Belgique, 1956. V. 90. P. 198–217.
- Crowder W.C., Nie M., Ultsch G.R. Oxygen uptake in bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*) // J. Exp. Zool. 1998. V. 280. P. 121–134.
- Dmitrieva E. The effects of density on mortality and development of the *Bufo bufo* eggs and tadpoles // Herpetologia Petropolitana, 2005. Ananjeva N. And Tsinenko O. (eds.), P. 130–133.
- Dejours P. Principles of Comparative Respiratory Physiology. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1981. 282 p.
- Feder M.E. Effect of developmental stage and body size on oxygen consumption of anuran larvae: a reappraisal // J. Exp. Zool. 1982. V. 220. № 1. P. 33–42.
- Ferrari L., de la Torre F.R., Demichelis S.O., Garcia M.E., Salibian A. Ecotoxicological assessment for receiving waters with the premetamorphic tadpoles acute assay // Chemosphere. 2005. V. 59. № 4. P. 567–75.
- Ginot V., Herve J. Estimating the parameters of dissolved oxygen dynamics in shallow ponds // Ecol Modell. 1994. V. 73. P. 169–187.
- Lance S.L., Erickson M.R., Flynn R.W., Mills G.L., Tuberville T.D., Scott D.E. Effects of chronic copper exposure on development and survival in the southern leopard frog (*Lithobates [Rana] sphenoccephalus*) // Environmental Toxicology and Chemistry. 2012. V. 31. № 7. P. 1587–94.
- Mills N.E., Barnhart M.C. Effects of Hypoxia on Embryonic Development in Two Ambystoma and Two Rana Species // Physiological and Biochemical Zoology 1999. V. 72. № 2. P. 179–188.
- Salthe S.N. The egg capsules in the amphibian // Journal of Morphology. 1963. V. 113. № 2. P. 161–171.
- Seymour R.S., Bradford D.F. Respiration of amphibian eggs // Physiol Zool. 1995. V. 68. P. 1–25.
- Seymour R.S., Laveridge J.P. Embryonic and larval respiration in the arboreal foam nests of the african frog *Chiromantis xerampelina* // J. Exp. Biol. 1994. V. 197. P. 31–46.
- Seymour R.S., Roberts J.D. Embryonic respiration and oxygen distribution in foamy and nonfoamy egg masses of the frog *Limnodynastes tasmaniensis* // Phys. Zool. 1991. V. 64. № 5. P. 1322–1340.
- Seymour R.S., Roberts J.D., Mitchell N.J., Blaylock A.J. Influence of environmental oxygen consumption on development and hatching of aquatic eggs of the australian frog, *Crinia georgiana* // Physiol. Biochem. Zool. 2000. V. 73. № 4. P. 501–507.
- Zotín A.I., Faustov V.S., Radzínshaja L.I., Ozernyuk N.D. ATP level and respiration of embryos // J. Embryol. exp. Morph., 1967. V. 18. № 1. P. 1–12.

Influence of the Concentration of Dissolved Oxygen on Embryonic Development of the Common Toad (*Bufo bufo*)

E. V. Dmitrieva

Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

e-mail: aurelia@mail.ru

Received August 22, 2014; in final form, January 27, 2015

Several series of experiments investigating the influence of dissolved oxygen concentrations on the growth rates and mortality in the embryogenesis of the common toad *Bufo bufo* were carried out. The experiments showed that, when the eggs develop singly, the lack of oxygen does not lead to an increase in mortality by the time of hatching and results only in a change in the dynamics of mortality: mortality occurs at an earlier stage of development than in the conditions of normal access to oxygen. Taking into account the combined effect of the density of eggs and the dissolved oxygen concentration, we increase the accuracy of analysis of the experimental results and improve the interpretation of the results. In the conditions of different initial density of eggs, the impact of the concentration of dissolved oxygen on mortality and rates of development of the common toad embryos is manifested in different ways. At high density, only a small percentage of embryos survives by the time of hatching, and the embryos are significantly behind in their development compared with the individuals that developed in normal oxygen conditions. The lack of oxygen dissolved in the water slows down the development of embryos of the common toad.

Keywords: dissolved oxygen, hypoxia, ontogenesis, the common toad, *Bufo bufo*, mortality