

✓ 628.394.1#

Особенности действия стробилуриновых фунгицидов на осетровых рыб в период раннего онтогенеза

Н.И. Щербакова, А.Я. Полуян, И.Л. Левина, О.А. Зинчук

В ювенильный период развития, когда происходит становление и функциональное созревание различных физиологических систем, рыбы находятся под непосредственным воздействием среды обитания, не способны покинуть зоны загрязнения, и наиболее подвержены пестицидной интоксикации.

Новым эффективным классом химических соединений с фунгицидной активностью являются стробилурины. Они представляют собой эфиры замещенной β -метоксиакриловой кислоты и ее аза-аналогов, структурно родственных стробилурину А, выделенному из различных видов грибов, подавляют процессы митохондриального дыхания у патогенных грибов, связываясь с цитохромом b.

Действие стробилуринов на ранний онтогенез рыб в настоящее время является не изученным, что и обусловило проведение данных исследований. Объектами исследований являлись икра и предличинки бестера (*Huso huso L. x Acipenser ruthenus L.*).

Степень токсичности различных концентраций 2-х стробилуриновых фунгицидов, являющихся техническими продуктами (действующие вещества) - Трифлуксистробина и Пиракlostробина на развивающуюся икру бестера оценивали по следующим показателям: выживаемость, длительность инкубационного периода, скорость прохождения стадий, патоморфологические признаки выклюнувшихся предличинок. В ходе экспериментов ежедневно проводили учет погибших зародышей, фиксировали стадии развития (Гинзбург, Детлаф, 1969). Влияние исследуемых веществ на раннее постэмбриональное развитие осетровых изучали на предличинках бестера, полученных в производственных условиях, от выклева до их перехода на активное питание. В конце опыта определяли физиологические показатели: темп роста, биомассу, фиксировали патологии развития предличинок (Детлаф и др., 1981). О влиянии фунгицидов на скорость рассасывания желточного мешка судили по количеству общих липидов на 6-е сутки опыта, которые определяли методом Фолча (Folch et. al., 1957).

Изучение токсичности стробилуринов для икры бестера проводили в диапазоне концентраций 0,0005-0,0100 мг/л в течение 4,5 суток. Результаты исследований показали, что с увеличением концентраций фунгицидов возрастала гибель эмбрионов, длительность инкубационного

периода и проявлялось тератогенное действие пестицидов.

На основе выживаемости оплодотворенной икры бестера в токсических средах пестицидов определены токсикометрические параметры стробилуринов (табл. 1). Расчеты токсикометрических параметров производились с вычетом естественной гибели эмбрионов в контроле и опыте (поправка Аббота). Рассчитанные недействующие, пороговые и среднетлетальные концентрации позволили определить, что оба фунгицида - Пиракlostробин и Трифлостробин обладают достаточно высокой степенью токсичности для икры осетровых рыб (особо токсичны, $LK_{50} < 0,5$ мг/л), причем Трифлостробин в два раза токсичнее Пиракlostробина.

Таблица 1

Выживаемость и токсикометрические параметры стробилуринов для эмбрионов бестера

Концентрация, мг/л	Гибель на стадиях, экземпляры					Гибель с поправкой Аббота, %	Токсикометрические параметры, мг/л
	ст.5-12 (дробление)	ст.13-18 (гастру-ляция)	ст.19-29 (нейруляция)	ст.30-35 (перед выкле-вом)	Всего		
Пиракlostробин							
Контроль	2	2	3	2	9	0	$LK_0 = 0,0010$
0,001	3	2	1	2	8	0	$LK_{16} = 0,0016$
0,0025	12	3	6	3	24	29,41	$LK_{50} = 0,0041$
0,005	12	3	6	3	42	64,71	$LK_{84} = 0,0076$
0,01	0	12	48	-	60	100	$LK_{100} = 0,0095$
Трифлостробин							
Контроль	4	3	1	1	9	0	$LK_0 = 0,0005$
0,0005	3	2	3	1	9	0	$LK_{16} = 0,0008$
0,001	2	4	6	6	18	17,65	$LK_{50} = 0,0021$
0,005	6	6	9	33	54	88,24	$LK_{84} = 0,0055$
0,01	6	6	48	-	60	100	$LK_{100} = 0,0085$

При концентрациях Трифлостробина 0,001 и 0,005 мг/л и Пиракlostробина 0,005 мг/л в растворах увеличивалась длительность инкубационного периода - выклев оставшихся в живых зародышей начинался на сутки позже и был растянут во времени (табл. 2).

Динамика выклева и длительность инкубационного периода эмбрионов бестера при выдерживании в растворах стробилуринов

Пестицид	Концентрация, мг/л	Выклев, %		Длительность инкубационного периода, ч
		единичный	массовый	
Пиракlostробин	Контроль	5,88	100	106
	0,001	6,45	100	106
	0,0025	5,56	100	106
	0,005	0	16,67	138
Трифлoксистробин	Контроль	9,98	100	106
	0,0005	11,76	100	106
	0,001	0	19,05	132
	0,005	0	16,67	136

В растворах с концентрациями Трифлoксистробина 0,0005 мг/л и Пиракlostробина 0,001 мг/л отклонений в развитии эмбрионов от контрольной группы не наблюдалось. Скорость прохождения стадий, единичный и массовый выклев проходили синхронно с контролем. У выклюнувшихся эмбрионов патоморфологические признаки отсутствовали.

При изучении выживаемости предличинок бестера в токсических средах пестицидов определены токсикометрические параметры стробилуринов в остром и хроническом экспериментах, представленные в таблице 3.

Расчитанные среднелетальные концентрации острых опытов позволили определить, что оба фунгицида относятся к группе особо токсичных пестицидов для предличинок осетровых. С увеличением длительности воздействия токсичность исследованных фунгицидов усиливалась. Так, в растворах Трифлoксистробина с концентрацией 0,0025 мг/л гибель предличинок в 2-х суточном эксперименте составляла 15 %, а в 6-ти суточном - 80 %. В растворах с аналогичной концентрацией Пиракlostробина при увеличении экспозиции опыта процент смертности рыб возрос с 25 до 40 %.

С первых часов интоксикации у предличинок бестера нарушалась двигательная активность, они залегали на дно экспериментальных сосудов, совершая судорожные движения. Длительные спазмы приводили со временем к искривлению туловища рыб. С увеличением концентраций и длительности воздействия у предличинок развивалась полная

потеря двигательной активности, снижение реакции на механическое раздражение (укол иглой). Указанные симптомы отравления в 6-ти суточном эксперименте сопровождались развитием водянки желточного мешка и кровоизлияниями в области сердца. Вышеописанные признаки интоксикации отмечались в концентрациях Трифлуксистробина от 0,005 и более в остром опыте и от 0,001 до 0,005 мг/л – хроническом; в концентрациях Пираклостробина - от 0,0025 мг/л и выше в остром и хроническом экспериментах.

Таблица 3

Токсикометрические параметры стробилуринов для предличинок бестера в остром и хроническом экспериментах (мг/л)

Экспозиция опыта, сутки	Пестицид	
	Трифлуксистробин	Пираклостробин
2	$LK_0 = 0,0010$ $LK_{16} = 0,0024$ $LK_{50} = 0,0052$ $LK_{84} = 0,0078$ $LK_{100} = 0,0090$	$LK_0 = 0,0012$ $LK_{16} = 0,0016$ $LK_{50} = 0,0033$ $LK_{84} = 0,0069$ $LK_{100} = 0,0096$
6	$LK_0 = 0,0006$ $LK_{16} = 0,0008$ $LK_{50} = 0,0016$ $LK_{84} = 0,0032$ $LK_{100} = 0,0045$	$LK_0 = 0,0011$ $LK_{16} = 0,0014$ $LK_{50} = 0,0024$ $LK_{84} = 0,0042$ $LK_{100} = 0,0054$

В постэмбриональный период развития рыб ведущими процессами являются морфогенез и рост, происходит интенсивное расходование желточной массы, а изменения в организме существенно сказываются на последующих этапах. Под влиянием пестицидов изменяется утилизация желтка, что является показателем эффективности его конвертирования в массу личинок. Таким образом, происходит подавление нормального развития организмов (Велиханов, 1987; Кузьмина, 2003; Hamm, Hinson, 2000).

Результаты наблюдений за темпом роста, весом и скоростью рассасывания желточного мешка у предличинок бестера под влиянием стробилуриновых фунгицидов представлены на рисунке 1.

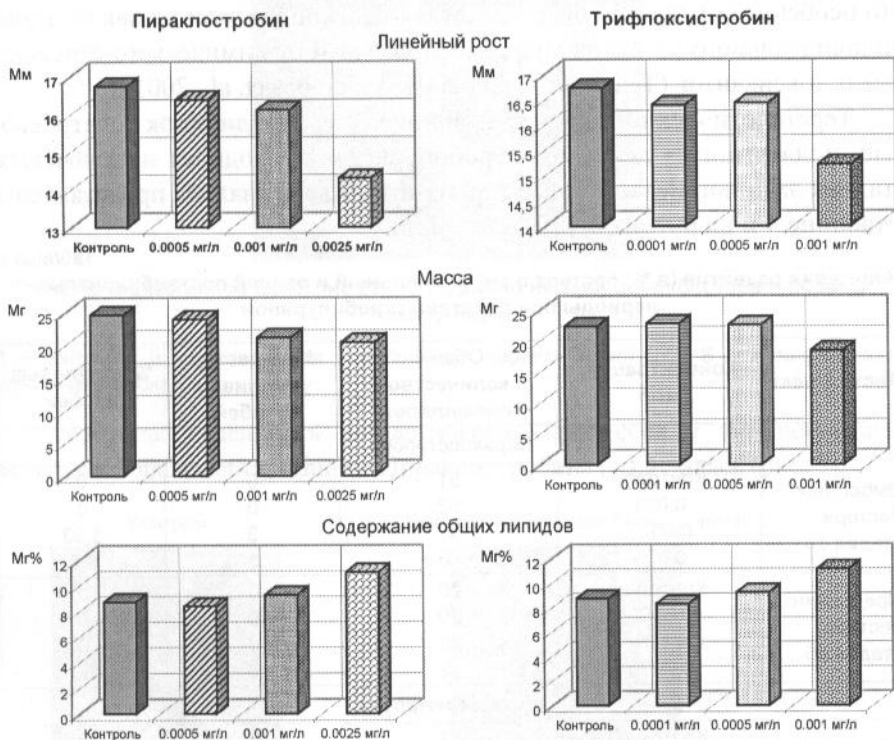


Рис. 1. Темп роста, масса и содержание общих липидов у предличинки бестера при выдерживании в растворах стробилуринов на 6-е сутки эксперимента

Анализ морфометрических показателей подопытных предличинки бестера показал, что, начиная с концентрации 0,001 мг/л, оба фунгицида вызывали снижение темпа линейного и весового роста организмов: длина и масса предличинки развивающихся в опытных растворах была достоверно ниже контроля. При этом содержание общих липидов у предличинки в растворах Пиракlostробина 0,0025 мг/л и Трифлoкcистрoбина 0,001 мг/л было достоверно выше контрольных величин в среднем на 27 %, что свидетельствует о замедлении скорости рассасывания желточного мешка. В растворах обоих фунгицидов с концентрацией 0,0005 мг/л по всем изученным показателям у предличинки бестера отклонений от контроля не отмечалось.

Известно, что наибольшую опасность представляют пестициды, оказывающие тератогенные эффекты (Багодский, Санин, 1991). Аномалии, проявляющиеся на эмбриональной стадии, приводят к выклеву предличинки с уже имеющимися патологиями. Они касаются изменений формы тела, серьезных нарушений структуры внутренних органов и тканей. Важно,

что особенности тератогенного действия пестицидов зависят как от этапа индивидуального развития гидробионтов, так и от химического строения самих токсикантов (Таликина и др., 2001; Villalobos et. al., 2001).

Тератологический анализ эмбрионов и предличинок осетровых рыб, подвергшихся действию стробилуринов, проводился на ключевых стадиях эмбриогенеза. Данные тератологического анализа представлены в таблице 4 и на рисунках 2, 3.

Таблица 4

Аномалии развития (в %) бестера в эмбриональный и ранний постэмбриональный периоды при действии стробилуринов

Тест-объект	Концентрация, мг/л	Общее количество экземпляров	Количество уродливых особей	% уродливых особей
Пиракlostробин				
Эмбрионы бестера, стадия 35	Контроль	51	0	0
	0,001	52	0	0
	0,0025	36	3	8,33
	0,005	18	3	16,67
Предличинки бестера, стадия 45	Контроль	20	0	0
	0,0005	20	0	0
	0,001	20	0	0
	0,0025	12	6	50
Трифлoксистробин				
Эмбрионы бестера, стадия 35	Контроль	51	0	0
	0,0005	51	0	0
	0,001	42	9	21,43
	0,005	6	6	100
Предличинки бестера, стадия 45	Контроль	20	0	0
	0,0005	20	0	0
	0,001	16	2	12,5
	0,0025	4	2	50

В растворах с концентрациями Трифлoксистробина 0,0005 мг/л и Пиракlostробина 0,001 мг/л отклонений в развитии эмбрионов от контрольной группы не наблюдалось. Скорость прохождения стадий, единичный и массовый выклев проходили синхронно с контролем. У выклюнувшихся эмбрионов патоморфологические признаки отсутствовали.

При действии Трифлoксистробина в концентрациях 0,001-0,005 мг/л и Пиракlostробина 0,0025-0,005 мг/л лишь период дробления (стадии 5-12) проходил синхронно с контролем без видимых нарушений. Начиная с периода гастрюляции (стадии 13-18), происходили нарушения развития, которые в дальнейшем приводили к дефектам в строении эмбрионов. В период нейруляции (стадии 19-29) наблюдалась закладка укороченных, искривленных нервных пластинок при наличии желточной пробки (рис. 2).

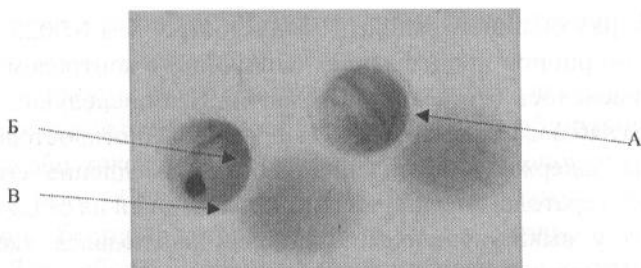


Рис. 2. Тератогенное действие стробилуринов на эмбрионы бестера в период нейруляции

А – контроль, Б – укороченная искривленная нервная пластинка; В – незакрывшаяся желточная пробка.

Далее направленность патологических процессов у эмбрионов под влиянием Трифлуксистробина и Пиракlostробина различалась (рис. 3).

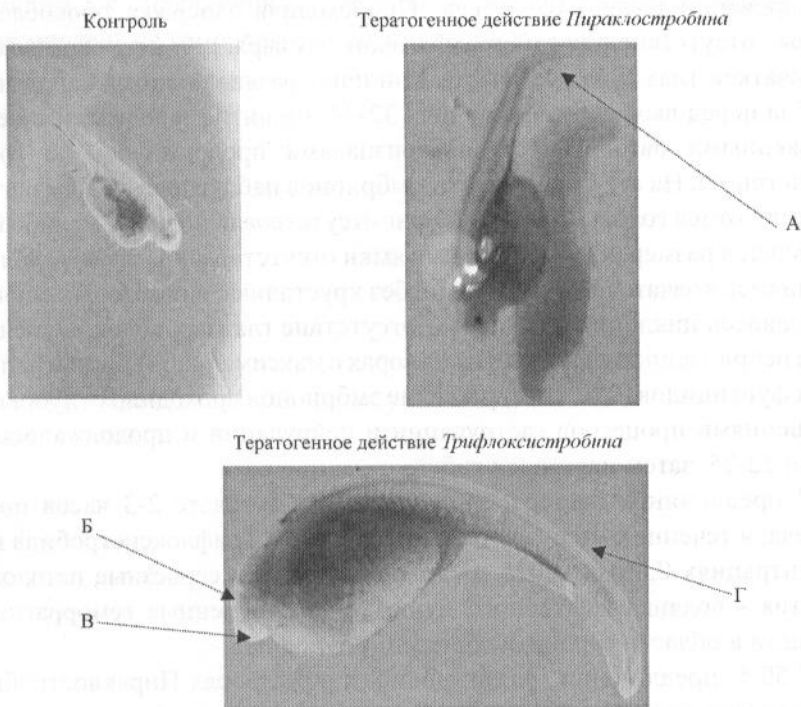


Рис. 3. Тератогенные эффекты стробилуринов у выклюнувшихся эмбрионов бестера

А - укороченный искривленный хвостовой стебель; Б - отсутствие переднего мозга; В - отсутствие обонятельных ямок, глазных яблоч; Г - искривление туловища.

В растворах с концентрациями Пиракlostробина 0,0025-0,0050 мг/л развитие эмбрионов продолжалось синхронно с контролем до стадии 24, затем отмечалось отставание в развитии. На последующих стадиях органогенеза наблюдались нарушения в формировании хвостового отдела. Происходила задержка обособления хвоста, замедление его роста и искривление. Тератологический анализ, проведенный на стадии выклева, показал, что у выклюнувшихся эмбрионов наблюдался укороченный искривленный хвостовой стебель.

При действии Трифлостробина в концентрациях 0,001-0,005 мг/л у эмбрионов на стадии нейруляции отсутствовала часть головного отдела нервной пластинки, что явилось следствием нарушения гастрюляционных процессов, а именно – недоразвития крыши первичной кишки. Отмечено увеличение периода нейруляции по сравнению с контролем. На дальнейших стадиях органогенеза наблюдались нарушения в формировании головного отдела. Происходила задержка обособления головы, отсутствие переднего мозгового пузыря или его образование без зачатков глаз. Большая часть атипично развивающихся зародышей погибла перед выклевом, на стадиях 32-34. Развитие зародышей с менее выраженными патологическими признаками продолжалось до конца эмбриогенеза. На стадии выклева у эмбрионов наблюдался недоразвитый передний отдел головы: передний мозг отсутствовал полностью либо был уменьшен в размерах, обонятельные ямки отсутствовали, глазные яблоки находились в зачаточном состоянии, без хрусталика, в некоторых случаях наблюдалась циклопия или полное отсутствие глазных яблок. Отмечено также искривление туловища. В растворах с максимальной концентрацией обоих фунгицидов (0,01 мг/л) развитие эмбрионов проходило с глубокими нарушениями процессов гастрюляции и нейруляции и продолжалось до стадий 22-25, затем наступала гибель.

У предличинок бестера, загравленных в возрасте 2-3 часов после выклева, в течение 6-ти суток под воздействием Трифлостробина при концентрациях 0,0010-0,0025 мг/л формировались серьезные патологии развития - водянка желточного мешка, многочисленные геморрагии, в основном в области сердца, искривление туловища.

У 50 % предличинок, развивающихся в растворах Пиракlostробина 0,0025 мг/л в течение 6-ти суток, отмечалось укорочение хвостового отдела. Расчетным методом получена эффективная (пороговая) концентрация Пиракlostробина по тератогенезу для предличинок бестера ЭК₁₆, которая составила 0,0013 мг/л.

Как для эмбрионов, так и для предличинок бестера Пиракlostробин

не обладал тератогенным эффектом при концентрации 0,001 мг/л, Трифлуксистробин - при концентрации 0,0005 мг/л.

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что по степени острой токсичности стробилурины относятся к группе особо токсичных пестицидов для эмбрионов и предличинок осетровых рыб. Главным клиническим признаком интоксикации предличинок бестера стробилуринами было нервно-паралитическое действие. Для обоих изученных фунгицидов порог чувствительности составил величину 0,001 мг/л - с этой концентрации стробилуринов происходило подавление нормального развития и роста предличинок осетровых рыб. Однако следует отметить, что при концентрации 0,001 мг/л Пиракlostробин не проявлял тератогенного действия на эмбрионов и предличинок бестера. В то время как Трифлуксистробин вызывал у эмбрионов бестера недоразвитие переднего отдела головы и искривление туловища, у предличинок бестера - водянку желточного мешка, многочисленные геморагии и искривление туловища.