

Оценка токсического действия химического загрязнения воды на эмбрионах рыб

Горюнова А. И.

*Научно-производственный центр рыбного хозяйства
(НПЦ РХ) МСХ РК, Алматы, Казахстан*

Химические загрязнители, поступающие в водоем в значительных количествах, вызывают реакции водных организмов на разных уровнях их организации. Наиболее чувствительными токсикологическими показателями являются нарушения гаметогенеза и зародышевого развития рыб.

Прижизненные наблюдения за размножением рыб в загрязненном водоеме затруднены вследствие ряда объективных (различных экологических факторов, нарушающих нормальное созревание половых продуктов и нерест рыб), а также организационных причин. Поэтому токсикологическая оценка того или иного загрязняющего вещества, поступающего в водоем, предполагает ряд экспериментов в условиях, максимально приближенных к условиям данного водоема.

Наиболее доступны при лабораторном биотестировании эмбриологические исследования, при которых используются такие критерии, как выживаемость и морфологические аномалии. Увязка проблем мониторинга с особенностями развития на ранних стадиях весьма желательна, так как эти стадии являются наиболее чувствительными индикаторами вредного воздействия среды.

Заслуживает внимания темп эмбриогенеза, о чем свидетельствуют результаты экспериментального воздействия на икру разнообразными токсическими веществами. Преобладающее большинство токсикантов вызывают замедление зародышевого развития. Так действуют все фосфорорганические соединения: карбофос (Данильченко, 1985, Хандаль, 1983), антио (Тихонова, 1981), хлорофос (Маляревская, 1979), метафос, метилнитрофос, фозалон, йодофос (Гусева, 1980, Гусева, Данильченко, Корпакова, 1988). Замедляют развитие пестициды: котофор, дозанекс, каратан, диодан (Кузьмина, Прихоженко, Павлов, 1985), соединения фенольного ряда: гидрохинон, триэтиловохлорид, пентахлорфенолят натрия (Данильченко, Строганов, 1973). Пестициды ордрам и сатурн в слабых растворах вызывают ускорение развития, концентрированные – отчетливое замедление (Тихонова, 1981, Тихонова, Шеханова, 1982). Замедляет развитие гербицид 2,4 D-На (Кордэ, Звиргэдс, 1971), седиментаторы, используемые для обработки сточных вод целлюлозно-бумажных производств (Курзыкина, 1983), повышенная соленость воды для чисто пресноводных рыб (Хандаль, 1983), дефицит кислорода (Остроумова, 1963), «цветение» водоема сине-зелеными водорослями (Маляревская, 1979). Во всех опытах замедленное развитие сопровождается появлением разнообразных уродств и высокой (иногда полной) гибелью эмбрионов.

Из краткого обзора токсикологических экспериментов можно сделать ориентировочный вывод такого содержания: если эмбриональное развитие взятого под наблюдение вида рыбы идет замедленным темпом и сопровождается образо-

ванием различных уродств, значит водоем, в котором обитает эта рыба, загрязнен токсикантами высокой концентрации.

Изучение темпа эмбриогенеза тесно связано с проблемой гетерохроний раннего онтогенеза: одновременностью закладки органов, в особенности метамерных. Величина гетерохроний, выраженная амплитудой колебания количества пар сомитов у зародышей, может послужить, по нашему мнению, тест-объектом неблагоприятных условий воспроизводства данного вида рыбы в конкретном водоеме.

Решение поставленных задач проведено при изучении зародышевого развития чехони *Pelecus cultratus* L. Шардаринского водохранилища в 1988 и 1990 гг., когда там наблюдалась гибель рыбы вследствие отравления хлорорганическими пестицидами.

Материал и методы

Шардаринское водохранилище на р. Сыр-Дарье при своём в основном ирригационном назначении, имеет также большой удельный вес среди рыбохозяйственных водоемов. Проектная мощность его при НПП 252,5 – 900 км², объем – 5,7 км³, длина – 100 км, максимальная глубина – 25 м, средняя – 6,0 м. Промысловые рыбы: сазан, сом, судак, белый и пестрый толстолобики, лещ, чехонь, плотва, серебряный карась. Главный источник загрязнения водохранилища – коллекторно-дренажные воды с рисовых и хлопковых полей.

Чехонь Шардаринского водохранилища становится половозрелой на третьем (самцы) – четвертом годах жизни при средней длине 28,8 – 31,9 см (самцы-самки) и массе 205 – 304 г. По характеру икрометания популяция чехони водохранилища неоднородна: представлена одновременно нерестующими и мечущими икру порционно. Морфологически и по размерным характеристикам эти экологические группы неразличимы. В опытах использованы внешне совершенно здоровые текущие особи длиной от 27, 7 до 43,2 см и массой от 174 до 700 г.

В 1988 г. наблюдали развитие икры порционноикромечущих самок в воде водохранилища и параллельно в опытах, где вода была еще более токсичной. Методом «сухой пленки» в воде растворяли смесь пестицидов: гексахлорциклогексан (α , β , γ), 4,4 дихлордифенилтрихлорэтан и его метаболит ДДЭ в следующих количествах: 0,1, 0,5 и 0,9 мкг/л. Отцеженную икру осеменяли спермой самца сухим способом и раскладывали по чашкам Петри глазомерно: ложечкой объемом 2,0 мл. После набухания оставляли в каждой чашке 100 икринок. Процент оплодотворения определяли на стадии мелкоклеточной морулы. Смена воды и растворов – дважды в сутки. Повторность трехкратная.

В 1990 г. проводили наблюдение за развитием икры единовременно- и порционноикромечущих самок чехони в воде водохранилища и в питьевой (контроль), практически той же воде, но прошедшей через естественные фильтры дамбы.

Амплитуду разностадийности регистрировали, начиная с закладки 10-11-го туловищного сомита, отмечая при этом наличие или отсутствие слуховой капсулы. Просчитывали количество туловищных сомитов у 20-ти зародышей каждого скрещивания. Общее количество зародышей, наблюдаемых от оплодотворения до выклева предличинки, в 1988г. – 2300 шт., в 1990 г. – 8800 шт.

На цитологическое исследование зародышей на стадии гастролы фиксировали в жидкости Карнуа, через 12 часов переносили в 70%-ный спирт, в котором хранили до момента анализа, выполненного А.А. Янцен.

Результаты исследований

Зародышевое развитие чехони в опытах 1988 г. проходило при сравнительно низких температурах воды: 9,5 – 24,3° (в среднем 14,7°). Это одна из причин замедленного развития, но не главная. Если сравнить ход эмбриогенеза исследуемой чехони с таковым чехони Аральского моря (Гостеева, Маркова, 1966), тоже в лабораторных условиях, то в близких температурных границах (14,7° и 13,2°) заторможенность развития чехони Шардаринского водохранилища очевидна: выклев предличинки отстает на 90 часов.

Предполагая наличие хлорорганических пестицидов в яйцеклетках самок и сперме самцов, развитие зародышей, инкубируемых в загрязненной пестицидами воде, с отклонениями от нормы не вызывает удивления. Значительный интерес представили результаты опытов с еще большей «пестицидной нагрузкой». Гибель эмбрионов на стадии гастрюляции в ряду - вода водохранилища и растворы пестицидов в концентрациях 0,1 – 0,5 – 0,9 мкг/л - выглядела так: 2,13 – 3,60 – 3,29 – 1,55 %. На стадии закладки туловищных сомитов соответственно: 24,0 – 29,7 – 27,0 – 23,5 %. На стадии 18-ти хвостовых сомитов, когда в слуховых капсулах уже по два отолита, у эмбрионов в воде водохранилища сердце пассивно, тогда как в опытных растворах регистрируется 10-15 уд/мин. Через 24 часа, перед выклевом, предличинки «контроля» уже более развиты: количество сердечных сокращений наибольшее: в среднем 82 уд/мин., против 79 и 74 уд/мин. в опытных растворах. Нарастающий темп сердечных сокращений после выклева не изменяет преимущественного положения «контроля». Показательная в подобных опытах стадия выклева иллюстрирует довольно близкую картину скорости освобождения от оболочек у эмбрионов «контроля» и в опытном растворе максимальной концентрации пестицида 0,9 мкг/л. Еще более парадоксальным можно считать нарушения развития, в данном случае повреждения желточного мешка. Относительное количество «раковин» на желточном мешке составило в «контроле» 90%, в ряду опытных растворов: 19 – 31 – 12%.

Подобное наблюдается довольно часто при эмбриотоксикологических исследованиях. В данном случае можно допустить явление приспособления зародышей к высокой концентрации токсиканта в условиях изначальной адаптации к содержанию их в воде и в половых клетках рыбы.

Результаты опытов, проведенных в 1990 г., показали различное отношение к загрязненной воде эмбрионов двух экологических групп (табл. 1).

Икра единовременно нерестующих самок оказалась низкого качества: инкубация в питьевой воде не имела преимуществ и закончилась выклевом уродов на 100%. Развитие икры порционников также проходило с большим отходом, как в опытных, так и в контрольных средах, но в воде водохранилища на 1,5 – 5,0 % больше, чем в питьевой воде. Начало выклева задерживалось в опыте в среднем на 30 часов, полный выклев – на 60 часов. Весьма значительное замедление на последних стадиях эмбриогенеза – убедительное доказательство неблагоприятного действия воды водохранилища на зародышевое развитие чехони.

Таблица 1
Зародышевое развитие чехони Шардаринского водохранилища,
апрель 1990 г.

Параметры эмбриогенеза		Икра единовременно нерестующих самок			Икра порционно икромечущих самок		
		М ± m	σ	С	М ± m	σ	С
Оплодотворяемость икры, %	а	58,5±8,22	21,8	37,2	88,6±3,11	7,6	9,1
	б	47,0±3,80	10,0	21,3	86,2±10,7	28,2	32,8
Гибель зародышей на стадии дробления, %	а	13,4±2,95	11,0	82,2	16,0±4,65	8,0	50,0
	б	9,2±2,45	9,10	100	17,5±6,81	11,8	67,5
Гибель на гастрულიции, %	а	35,2±7,70	27,8	78,8	24,0±4,76	12,6	37,1
	б	32,0±6,80	24,5	76,6	28,0±4,92	13,0	46,5
Гибель на органогенезе, %	а	37,0±7,20	24,8	66,8	25,5±8,40	22,1	86,6
	б	37,9±6,70	23,2	61,5	30,5±5,89	15,6	50,0
Гибель общая, %	а	91,6±2,30	5,7	6,15	78,0±6,30	16,5	21,2
	б	100	-	-	83,0±6,30	16,5	19,8
Начало выклева (часов от осеменения икры)	а	137,0±2,30	17,0	12,3	91,0±6,68	6,6	16,3
	б	-	-	-	121,0±14,90	33,1	27,2
Полный выклев (часов от осеменения икры)	а	157,0±2,20	17,0	10,8	95,5±3,77	10,0	10,5
	б	-	-	-	156,5±7,88	19,3	12,3
Количество уродов (к общему числу выклюнувшихся предличин), %	а	100	-	-	34,0±10,0	26,5	78,0
	б	-	-	-	51,0±10,4	27,5	54,0

Примечания: а – в питьевой воде (контроль),
б – в воде водохранилища (опыт)

Замедление темпа эмбриогенеза в воде, загрязненной пестицидами, начинается со стадии гастрულიции; на стадиях закладки туловищных сомитов различия значительны и легко регистрируются (табл. 2).

Величина разнотайности, обозначаемая амплитудой колебания количества туловищных сомитов, находится в обратной зависимости от оплодотворяемости икры, возрастает по мере сезонного (или в специальных опытах) перезревания икры (Горюнова, 1971).

У зародышей чехони Шардаринского водохранилища, инкубируемых в воде маточного водоема, амплитуда колебаний количества туловищных сомитов достигает 12-ти в отдельных партиях, в питьевой воде на 2-4 класса меньше (табл. 3).

Таблица 2
Темп эмбриогенеза чехони Шардаринского водохранилища
(в часах от осеменения икры)

Стадии развития		Год наблюдений, варианты опытов			
		Вода водохранилища (контроль, 1988)	Раствор смеси пестицидов, 1988	Питьевая вода (контроль, 1990)	Вода водохранилища, 1990
Гастрюляция	конец образования желтка	29	30	21	25
Сегментация туловищного отдела	4 туловищ. сомита	32	33	24	28
	16 туловищ. сомитов	46	50	35	41
	21 туловищ. сомит	54	60	41	48
Начало вылупления		150	159	91	121
Полное вылупление		185	198	96	157

Примечания: 1988 –при температуре воды 9,0 – 24,3 (14,7)
 1990 –при температуре воды 13,0 – 20,5 (17,0)

Таблица 3
Гетерохронии развития чехони Шардаринского водохранилища на стадии
закладки 11 – 25 туловищных сомитов, апрель 1990 г.

Условия опыта		Количество просмотренных зародышей, шт.	Кол-во классов	Средние вариационные значения		
				M ± m	σ	C
Икра одновременно нерестующих	а	3-7	120	5,46±0,03	0,37	6,77
	б	120	4-9	6,48±0,03	0,35	5,41
Икра порционно нерестующих самок:	а	140	6-8	6,44±0,03	0,38	5,90
	б	140	6-12	8,51±0,03	0,43	5,05

Примечания: а – в питьевой воде (контроль),
 б – в воде водохранилища (опыт)

Регистрирующим признаком гетерохроний развития может служить время появления слуховых капсул относительно числа туловищных сомитов. У зародышей, развивающихся в питьевой воде, они образуются при 18-19 сомитах, у зародышей этой же кладки икры, развивающихся в воде водохранилища, наличие слуховых капсул может быть зарегистрировано при 14-15 сомитах, то есть закладка сомитов отстает от появления слуховых капсул.

В естественных водоемах при оптимальных условиях воспроизводства, величина разностадийности развития не превышает трех классов, также как и при заводском методе получения личинок карпа и растительноядных рыб. В тех случаях, когда вариабельность темпа эмбриогенеза увеличивается в два-три раза, можно предсказать значительный отход на последующих стадиях, так как жизнестойкими являются только особи модалного класса (Горюнова, 1972). Таким образом, гетерохронии в начале органогенеза чехони свидетельствуют о низкой жизнестойкости эмбрионов в условиях водохранилища.

При всех достоинствах эмбриологического метода определения токсичности среды, более надежным и менее вариабельным является, по-видимому, цитологический, наиболее перспективный, так как может служить тест-методом при проведении генетического мониторинга (Костров, 1984). Спонтанное мутирование на ранних стадиях онтогенеза связано с загрязнением водоема, иногда – с состоянием здоровья рыб. Среднее значение частоты спонтанных структурных перестроек, вызванных радиоактивными веществами, у эмбрионов некоторых морских рыб лежит в пределах 2 – 7% (Цыцугина, 1980); у здоровых карасей из старицы р.Исеть патологии митоза составили 16,2%, у карасей из природной популяции, неблагополучной по аэромону – 35,4% (Ильинских, Ильинских, 1982). Аномалии ядерного аппарата у зародышей белого толстолобика из р. Сырдарья, достигающие 20% (Макеева, Шаха, 1985), по-видимому, также вызваны действием хлорорганических пестицидов.

Представляет интерес сравнительный анализ двух экологических групп чехони Шардаринского водохранилища. Икра одновременно нерестующих рыб имеет невысокий отход (9,2 и 13,4%) на стадиях дробления бластодиска, по-видимому, за счет реализации генетической информации, накопленной цитоплазмой яйцеклетки в оогенезе. Со стадии поздней бластулы, когда начинает проявляться морфогенетическая активность собственно ядер зародыша, а, следовательно, происходят и генетические летальные мутации (Черфас, Цой, 1984), гибель достигает 91,6 – 100%.

Цитологические исследования зародышей одновременно нерестующей чехони иллюстрируют заторможенность или даже остановку ядерных преобразований на стадии поздней бластулы – гастролы. Ядра бластомеров светлые, различных размеров, с содержимым в виде глыбок, иные – в состоянии пикноза. Ядрышек нет ни в одной из клеток. Ядра всех просмотренных (подающихся цитологическому анализу) клеток находились в ранней профазе, а следовательно дробление – в периоде синхронных делений.

Икра порционнонерестующих самок при более высокой оплодотворяемости имела, по-видимому, тяжелую наследственность, что проявилось в значительной гибели зародышей на стадиях дробления бластодиска. Но на более поздних стадиях генетический летальный эффект влияния мутагенной воды снизился, составив 83,0% в воде водохранилища и 78,0% в питьевой воде (табл.1).

Цитологический анализ, в отличие от такового одновременно нерестующих самок, показал наличие ядрышек и отсутствие пикнотических ядер. На фоне преобладающей ранней профазы встречаются и поздние профазы и метафазы с хромосомами в виде жирных точек. Но так же как у эмбрионов одновременно нерестующих самок, все зарегистрированные ядерные преобразования протекали с отклонениями от нормы.

Близкая картина хода митозов в клетках эмбрионов, развивающихся в питьевой воде. Отсюда следует, что сравнительно высокий, до 70%, выход предличинок в некоторых скрещиваниях, еще не говорит о жизнеспособности молодежи: в процессе дальнейшего развития могут появиться летальные нарушения.

Высокий уровень митотических аномалий в раннем онтогенезе чехони свидетельствует о мутагенности воды Шардаринского водохранилища, в несколько раз превышающей величину фоновой мутагенности – 0,37% (Якубов, 1988).

Из всего вышеизложенного следует вывод, что перспективу выживания, притом весьма ограниченного, в условиях водоема при современной его загрязненности, имеет лишь популяция порционнонерестующей чехони, при размножении в более чистой воде верховий или в приустьевых участках впадающих в водохранилище рек.

Литература

- Горюнова А.И. 1971.** Изменчивость темпа эмбриогенеза белого амура *Stenopharyngodon idella* (Val.). *Вопр. ихтиол.*, 66 (1): 58–63.
- Горюнова А.И. 1972.** Эмбриогенез, как один из показателей жизнестойкости молоди растительноядных рыб. *Акклиматизация растительноядных рыб в водоемах СССР, Мат-лы VII Всесоюз. совещ. по аккл. растительноядных рыб, Кишинев: 35–36.*
- Гостеева М.Н., Маркова Е.Л. 1966.** Эколого-морфологические особенности ранних этапов развития аральской чехони (*Pelecus cultratus* L.). *Вопр. ихтиол.*, 39 (2): 237–247.
- Гусева С.С. 1980.** Влияние фосфоорганических соединений на эмбриональное и раннее постэмбриональное развитие карпа. *Автореф. дисс. канд. биол. наук, М.: 1-26.*
- Гусева С.С., Данильченко О.П., Корпакова И.Г. 1988.** Реакция карпа *Cyprinus carpio* L. в разные периоды онтогенеза на действие фосфоорганических соединений. *Науч. докл. высш. школы, Биол. науки, М., 289: 53–58.*
- Данильченко О.П. 1985.** Закономерности реагирования эмбрионов и личинок рыб на изменения химического состава воды. *Экспериментальная водная токсикология, Рига, 10: 98–102.*
- Данильченко О.П., Строганов Н.С. 1973.** Сравнительное действие триэтилхлоридофенолята и пентахлорфенолята натрия на эмбриональное развитие костистых рыб. *Экспериментальная водная токсикология, Рига, 5: 61–74.*
- Ильинских Н.Н., Ильинских И.П. 1982.** Мутагенные свойства бактерий *Aeromonas punctata*, выделенных из природной популяции обыкновенного карася *Carassius carassius* (L.). *Вопр. ихтиол.*, 22 (2): 341–343.
- Кордэ Б.А., Звиргэдэ Ю.К. 1971.** Влияние 2.4 D-Na на выживаемость икры и темп раннего эмбрионального развития вьюна. *Экспериментальная водная токсикология, Рига, 2: 31–42.*
- Костров Б.П. 1984.** Биологическое действие фосфора-32 и хлорида ртути на ранние стадии развития вьюна. *Автореф. дисс. канд. биол. наук, М.: 1-26.*
- Кузьмина С.С., Прихоженко Э.Я., Павлов Д.Ф. 1985.** Токсикологическая оценка пестицидов котофора и дозанекса для рыбка в раннем онтогенезе. *Деп. в ВИНТИ 22.10.85 №7375-В, Ростов-на-Дону: 1-15.*
- Кузьмина С.С., Прихоженко Э.Я., Павлов Д.Ф. 1985.** Влияние гербицида карахола на эмбриогенез и раннее постэмбриональное развитие рыбка. *Деп. в ВИНТИ 22.10.85 №7354-В, Ростов-на-Дону.*
- Курзыкина Л.Г. 1983.** Нарушение раннего онтогенеза рыб под действием некоторых компонентов сточных вод целлюлозно-бумажного производства. *Автореф. дисс. канд. биол. наук, Л.: 1-24.*
- Макеева А.П., Шаха Д.Н. 1985.** Цитологическое исследование овулировавших ооцитов и зародышей при искусственном воспроизводстве толстолобиков и белого амура. *Науч. докл. высш. школы, Биол. науки, М., 259: 38–43.*
- Маляревская А.Я. 1979.** Обмен веществ у рыб в условиях антропогенного евтрофирования водоемов. *Киев: 1-256.*
- Остроумова И.Н. 1963.** Рост и развитие радужной форели при разном содержании кислорода. *IV совещ. эмбриологов, тез. докл. эмбр. разв. животных и человека, 19-27 июня 1963, Л.: 138–139.*
- Тихонова Л.С. 1981.** Влияние пестицидов на ранние стадии онтогенеза русского осетра. *Автореф. дисс. канд. биол. наук, М.: 1-26.*
- Тихонова Л.С., Шеханова И.А. 1982.** Влияние пестицидов на развитие русского осетра *Acipenser guldenstadti* (Acipenseridae) в эмбрионально-личиночный период. *Вопр. ихтиол.*, 22(5): 892–894.
- Хандаль С.А. 1983.** Влияние солености и токсичности водной среды на развитие некоторых видов рыб. *Автореф. дисс. канд. биол. наук, М.: 1-26.*

Цыцугина В.Г. 1980. Спонтанное и индуцированное хромосомное мутирование у морских рыб на ранних стадиях онтогенеза. *Кардиологическая изменчивость, мутагенез и гиногенез у рыб, Л.: 70–73.*

Черфас Н.Б., Цой Р.М. 1984. Новые генетические методы селекции рыб. *М.: 1-104.*

Якубов Ш.А. 1988. Генетические аспекты определения ущерба народному хозяйству от загрязнения водной среды. *Деп. в ЦНИИТЭИРХ 15.01.88, № 918-рх Астрах. техн. ин-т рыбн. пр-ти и хоз-ва, Астрахань: 1-8.*

Summary

Gorunova A. I. Evaluation of toxicology impact of water chemical pollution on fish embrions

Research-and-Production Center of Fishery, Almaty, Kazakhstan

Embryonal development of tschechon (*Pelecus cultratus* L.) is proceeded with delay and with high level of the kariokynetic anomalies at the defined water area of the Chardara hydro economic storage pond, which is polluted by chlorine-organic pesticides. Perspectives of survival at those environmental conditions will have a *Pelecus cultratus* population only, which is spawned a hard-roe by portions.