

17 НОЯ 1997
ОД

на правах рукописи

Зелеников Олег Владимирович

ВЛИЯНИЕ ЗАКИСЛЕНИЯ ВОДЫ НА СТАНОВЛЕНИЕ И РАЗВИТИЕ
ВОСПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ РЫБ В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ

03.00.10 - ихтиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
1997

Работа выполнена в лаборатории лососевых рыб Государственного Научно-Исследовательского Института Озерного и Речного Рыбного Хозяйства (ГосНИОРХ) и на экспериментальной базе лаб. ихтиологии БиНИИ СПбГУ

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
К.Е.Федоров

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, Л.А.Кудерский
кандидат биологических наук, Ю.П.Бабушкин

Ведущая организация: Зоологический Институт РАН

Защита состоится "21" октября 1997 г. в 13 часов
на заседании специализированного совета К 117.03.01
Государственного Научно-Исследовательского Института Озерного и
Речного Рыбного Хозяйства (ГосНИОРХ)
(199053, Санкт-Петербург, наб.Макарова 26)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГосНИОРХ

Автореферат разослан "19" сентября 1996 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

М.А.Дементьева

ВВЕДЕНИЕ

Первые упоминания о закислении континентальных водоемов в результате хозяйственной деятельности человека относятся к 20-м годам XX века. Они свидетельствуют о резком уменьшении численности, а затем и исчезновении популяций атлантического лосося в нескольких реках Южной Норвегии (Jensen, Snekvik, 1972; Haines, 1981). В последующие годы процессы acidификации стремительно нарастали. Это выразилось не только в увеличении уровня кислотности, но и в распространении этого явления на новые акватории.

По мере обеднения ихтиофауны становились все более актуальными исследования последствий кислотного воздействия для лесных и водных биоценозов, и, в частности - ихтиоценозов. В этой связи естественный интерес представляет анализ реакции воспроизводительной системы гидробионтов на экстремальное воздействие и ее роли в поддержании численности и сохранении вида в условиях acidификации экосистем. В большинстве водоемов уровень pH не достигает летальных для рыб величин. Часто закисление имеет временный, сезонный характер, например, в период весеннего половодья (Gunn, Keller, 1986) или ливневых дождей (Janichi, Greening, 1986). В этом случае кислотному воздействию подвергаются рыбы на ранних, наиболее уязвимых стадиях эмбрионального и личиночного развития.

Влияние кислотной среды на воспроизводительную систему рыб изучали на взрослых, половозрелых или близких к созреванию особях (Freeman et al., 1983; Freeman, Sangalang, 1985; Ruby et al., 1977; 1978; Tam et al., 1987; 1988; 1990). Работы по влиянию низких pH на ранние этапы гаметогенеза нам не известны. Вместе с тем показано, что нарушения в развитии гонад, например, в период дифференцировки пола, могут иметь отдаленные негативные последствия для полового созревания рыб (Чмилевский, 1978; Jalabert et al., 1975; Konno, Tashiro, 1982). Анализ становления и развития воспроизводительной системы рыб в раннем возрасте в условиях кислотного воздействия, а также выявление его долгосрочных последствий для созревания и репродуктивного потенциала производителей были целью настоящей работы.

Задачи работы: - исследование гаметогенеза на всех этапах полового созревания радужной форели в условиях системы оборотного водоснабжения;

- изучение влияния закисления воды на гаметогенез радужной форели в период эмбрионального, личиночного и малькового развития;

- сравнительный анализ реакции репродуктивной системы различных по биологии и систематическому положению рыб (радужная форель, русский осетр и мозамбикская тилapia) на закисление воды;

- изучение связанных с кислотным воздействием изменений важных элементов эндокринного статуса рыб;
- оценка долгосрочных последствий кислотного воздействия в раннем возрасте на половое созревание и репродуктивные показатели рыб.

Научная новизна полученных результатов. Впервые прослежено развитие гонад у радужной форели от выплывания до полового созревания при выращивании в системе рециркуляции воды при постоянной, оптимальной для вида температуре 16-17⁰С. Определены сублетальные значения рН воды для молоди осетра. Получены оригинальные данные о ходе раннего гаметогенеза и дифференцировки пола в условиях кислотной среды у трех различных по экологии и систематическому положению видов рыб. Показаны кратко- и долгосрочные последствия влияния токсического фактора (пониженной рН) на ход полового созревания и репродуктивные показатели рыб. Впервые охарактеризована сформированность преоптико-гипофизарной системы у русского осетра в период дифференцировки пола при обычной и пониженной рН. Материалы настоящей работы существенно дополняют базу известных фактических данных, описывающих явление ацидофикации, уточняя роль последствий кислотного стресса, перенесенного в раннем онтогенезе, в становлении дефинитивных функций воспроизводительной системы рыб, репродуктивного потенциала и динамики численности популяции (вида).

Теоретическая и практическая значимость работы. Сравнительные данные, полученные на трех глубоко различных в систематическом отношении видах рыб, представляют интерес в экологическом и эволюционном аспектах, они конкретизируют и развивают представления теории отсроченных эффектов, а в более общем плане - теории адапциогенеза. Полученные данные могут быть использованы при прогнозировании последствий закисления водоемов, разработке системы экологического мониторинга и мероприятий по мелиорации водоемов. Данные о темпе полового развития форели могут быть использованы в рыбоводстве и при планировании экспериментальных исследований.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на конференции «Экологические проблемы севера европейской территории России». г.Апатиты, 11-15 июня 1996 г и научных семинарах лаборатории ихтиологии БиНИИ и кафедры ихтиологии и гидробиологии СПбГУ.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 статей и 8 тезисных сообщений; одна статья находится в печати.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 213 страницах, включая 18 таблиц, 12 графиков, 72 микрофотографии и состоит из следующих

разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, заключение, выводы и список литературы (289 источников).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Работа проводилась в 1992-1996 годах на молоди радужной форели (*Salmo gairdneri* Richardson), русского осетра (*Acipenser gueldenstaedti* Brandt) и мозамбикской тиляпии (*Oreochromis mossambica* Peters).

Для изучения воздействия сублетальной кислотной среды на гаметогенез молоди форели был проведен ряд экспериментов, в которых рыб содержали при температуре 15-17⁰С и плотности посадки от 0,2 до 1 г/л. Опыты различались продолжительностью экспозиции рыб в воде различной рН.

Опыт 1. Содержание рыб при рН 5,80-6,19 (в дальнейшем обозначена как 6,0) в возрасте от 16 до 40 сут с последующим подращиванием до возраста 70 сут в обычных условиях.

Опыт 2. Содержание рыб при рН 6,0 в возрасте от 16 до 55 сут с последующим подращиванием до возраста 70 сут.

Опыт 3. Содержание рыб при рН 5,38-5,70 в течение первых шести суток и при 4.82-5.16 (далее - 5,0) в дальнейшем в возрасте от 16 до 40 сут с последующим подращиванием до возраста 70 сут.

Опыт 4. Содержание рыб при рН 5,0 в возрасте от 16 до 55 сут с последующим подращиванием до возраста 70 сут.

Опыт 5. Содержание рыб при рН 5,0 в возрасте от 16 до 70 сут с сокращенным рационом питания. Поскольку темп роста подопытных рыб во всех экспериментах был ниже, чем у контрольных, нам приходилось сравнивать состояние гонад у разноразмерных или специально отобранных одноразмерных рыб. Поэтому главной задачей настоящего эксперимента было добиться снижения темпа роста контрольных рыб иным, нежели кислотное воздействие, способом, например, сокращением их рациона питания (25-30% от веса рыб при 3-разовом кормлении, в других опытах - 100-40% по мере роста рыб при 8-разовом кормлении). Одновременно при аналогичном кормовом режиме и сублетальном уровне кислотности содержали рыб в подопытном варианте.

Опыт 6. Содержание при рН 5,0 со стадии начала пигментации глазных бокалов эмбрионов до достижения молодью возраста 70 сут.

Опыт 7. Содержание рыб при рН 5,0 в возрасте от 16 до 90 сут с последующим подращиванием до полового созревания в возрасте 21-22 мес.

Контрольных рыб во всех экспериментах содержали в аналогичных условиях при pH 7.70-7.95 (в дальнейшем - 7,8).

Другим объектом исследования была молодь русского осетра - представителя филогенетически более древней группы рыб (хрящевых ганоидов), отличающихся особенно длительным (до 20 лет) половым созреванием. В опыте использовали молодь русского осетра в возрасте 5,5 мес с массой тела 50-100 г, что давало возможность параллельно с анализом гамето- и гонадогенеза исследовать динамику стероидных гормонов в сыворотке крови. Рыб в течение 25 сут содержали при температуре 18,5-20,5 °С в непроточных ваннах с pH 7,2-7,6 и 4,0-4,8.

В отличие от форели и русского осетра, мозамбикская тилапия - теплолюбивый вид с относительно коротким сроком полового созревания. Самки этого вида становятся половозрелыми уже в возрасте 6 месяцев и нерестятся в дальнейшем через каждые 30-40 суток. Молодь мозамбикской тилапии в возрасте с 6 до 12 сут содержали при pH 4,20-4,30 и с 13 до 30 сут - при 3,78-3,85. Ее последующее подращивание шло при pH 8,5 до 90-суточного возраста. Температуру воды поддерживали постоянной 28-29 °С.

При содержании в кислой среде в ваннах рыб кормили живым или мороженным мотылем, при выращивании форели в системе рециркуляции воды - гранулированным кормом согласно имеющимся нормативам (Мильштейн, 1982, Скляр и др., 1984). Воду подкисляли концентрированной серной кислотой. Гидрохимические параметры воды во всех экспериментах были следующие: жесткость (по Ca^{2+} и Mg^{2+}) - 11 мг/л, щелочность (по HCO_3^-) - 3,1 мг/л, Ca^{2+} - 8,6 мг/л, $\text{Fe}^{2+} + \text{Fe}^{3+}$ - 0,78-0,86 мг/л, O_2 - 7.6-9.6 мг/л при работе с осетром и 7,3-11,2 мг/л - в опытах на форели, NH_4^+ - 0.20-0.56 мг/л при содержании осетров, 0,10-0,14 мг/л - при инкубации икры форели и 0,16-0,65 мг/л - при ее дальнейшем выращивании.

Гонады были зафиксированы в жидкостях Буэна и Серра, обработаны гистологически согласно общепринятым методикам (Роскин, 1951) и окрашены железным гематоксилином по Гейденгайну. Всего были обработаны гистологически половые железы 174 осетров, 1078 особей радужной форели и 126 - мозамбикской тилапии.

Для сравнения темпа гаметогенеза у контрольной и подопытной молодежи форели был проведен количественный анализ фонда половых клеток. У каждой особи на 20 срезах гонад (по 10 срезов левой и правой гонады) было подсчитано число половых клеток всех этапов развития, а также измерена площадь каждого из этих срезов. У молодежи русского осетра на 6 поперечных срезах каждой гонады (1, 30 и 60 серийные срезы обеих гонад) было подсчитано число половых

клеток, а также измерена площадь этих срезов и генеративной части отдельно. У мозамбикской тилапии половые клетки были просчитаны на 30 срезах средней части гонад у каждой самки. Такому анализу были подвергнуты гонады 306 самок и 60 самцов форели, 87 осетров и 48 тилапий.

Мозг и гипофизы осетра фиксировали в жидкости Буэна и после проводки через спирты возрастающей концентрации и заключения в парафин-воск, резали серийно по 5-6 мкм. Готовые препараты окрашивали паральдегид-фуксинном (ПАФ) по Гомори-Габу с докраской азокармином. Для разделения ПАС+ тиреотропных и альциан+ гонадотропных базофилов отдельные препараты окрашивали по методу Эрлана (Herlant, 1960).

Для определения концентрации стероидных гормонов брали кровь из хвостовой вены и после свертывания центрифугировали 10 мин при 40000 об/мин. Сыворотку замораживали и хранили при -40°C . Концентрацию гормонов определяли радиоиммунным методом по общепринятой методике (Морозов и др., 1988). Всего концентрация гормонов была измерена в 152 пробах у молодежи осетра и 153 пробах у радужной форели.

У самок форели с гонадами IV стадии зрелости определяли способность ооцитов к созреванию и овуляции, инкубируя ооциты старшей генерации *in vitro* с использованием традиционной методики (Сакун, Гуреева-Преображенская, 1975). Сбор икры у самок и определение качества спермы у самцов форели проводили, следуя указаниям методических пособий (Савостьянова и др., 1977; Казаков, 1978).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Рост и гаметогенез радужной форели в условиях системы с оборотным водоснабжением

При выдерживании радужной форели в воде с постоянной оптимальной температурой $15-17^{\circ}\text{C}$ удельная скорость роста у самок и самцов не различалась в течение всего периода полового созревания. Так в возрасте 13-17 сут (период подъема личинок «на плаву») общая длина и масса форели были 20,5-23,5 мм и 84-124 мг. В возрасте 8 и 18 мес средняя масса самок и самцов была $152,7 \pm 5,6$ г и $147,7 \pm 4,9$ г; $1450 \pm 136,5$ г и $1494 \pm 115,6$ г соответственно. Быстро растущие рыбы обоих полов достигли массы в 1 кг приблизительно в возрасте 12,5 мес, а 2 кг - в 19 мес.

У всех рыб в возрасте 16 сут в гонадах были отмечены только гонии; их число составило в среднем от 0,1 до 3,2 клетки на срез. Цитологическая дифференцировка пола проходила в возрасте 25-40 сут, и в дальнейшем до возраста 8 мес старшую генерацию половых клеток в яичниках составляли

превителлогенные ооциты с максимальным диаметром до 230-260 мкм. В течение всего периода превителлогенеза гонадо-соматический индекс (ГСИ) оставался постоянным - от 0,06% до 0,14%, поскольку рост самок и нарастание массы их ичинок шло пропорционально. В возрасте от 8 до 12 мес практически у всех рыб начался трофоплазматический рост ооцитов старшей генерации. С этого времени в ооцитах шло активное накопление гранул желтка и их укрупнение. Средний диаметр желтковых ооцитов у самок в возрасте с 12 до 19,5 мес увеличился с 0,74 до 4,3 мм, а ГСИ - с 0,22% до 9,5%. Созревание самок форели произошло с 28 ноября по 3 декабря 1996 г, в возрасте 21 мес (638-640 сут) от пика вылупления; их ГСИ варьировал от 15,1 до 23,1%. Абсолютная плодовитость у впервые созревших рыб составила 3500-5600 шт, вес и диаметр овулированных икринок - 64,4-82,9 мг и 4,75-5,27 мм соответственно. Наши наблюдения показывают, что при содержании форели при температуре 15-17⁰С можно добиться созревания практически всех самок в возрасте до 2 лет, однако вряд ли возможно еще более ускорить их половое созревание, как это предполагалось ранее (Титарев, 1975).

В гонадах большинства самцов форели до возраста 8 мес были отмечены только гонии. Вес семенников и ГСИ в индифферентный (в цитологическом отношении) период составили $50,7 \pm 2,7$ мг и $0,034 \pm 0,001\%$ и были в 3 раза меньше соответствующих показателей гонад у одновозрастных с ними самок. Несколько самцов (7,8%) весом 121-200 г, у которых развитие гонад шло по типу «карликовых самцов», достигли половой зрелости в возрасте 8 мес. В возрасте до 12 мес цитологическое определение пола произошло у всех исследованных рыб и хронологически совпало с началом периода трофоплазматического роста ооцитов старшей генерации у самок. В гонадах встречались половые клетки всех типов от сперматогониев до зрелых спермиев. Половое созревание у самцов наступило в возрасте 19-20 мес. Время поступательного движения спермиев (до 10-15 сек) было сравнительно низким для самцов радужной форели ропшинской породной группы (Бабушкин, 1974), что, однако, не помешало добиться 100% оплодотворения икры.

Влияние закисления воды на развитие воспроизводительной системы и рост радужной форели.

Понижение pH воды до 6,0 и 5,5 не привело к заметному увеличению отхода икры за период инкубации; он составил 4,1%. При вылуплении зародышей их гибель в опыте значительно увеличилась - 11,5%. Одной из главных причин гибели личинок была их низкая двигательная активность, неспособность многих из них освободиться от яйцевых оболочек. Наибольший процент погибших личинок (32,4%) совпал с их переходом на внешнее питание в возрасте 6-10 сут.

Вероятно, значительный отход рыб в этом возрасте был обусловлен не только их повышенной чувствительностью на этапах вылупления и перехода на внешнее питание, но и истощением адаптивных резервов организма в условиях длительного стресса. Суммарный отход форели в условиях пониженной рН от начала пигментации глаз эмбрионов до 70-суточного возраста составил 64,6%. При воздействии на рыб от начала активного плавания (возраст 16 сут) отход молоди в разных экспериментах, составил от 23,7 до 30%.

Рост личинок существенно замедлился при помещении в воду с рН 6,0, и практически прекратился при рН 5,0. Темп роста восстановился еще в период кислотного воздействия. Однако возникший в это время у подопытных рыб дефицит массы тела (около 50%) при равной с контрольными рыбами обеспеченности пищей, не был компенсирован вплоть до их полового созревания.

Оогенез. Выявлены три последовательных этапа реакции воспроизводительной системы самок форели на их выдерживание в течение 24-80 сут при рН 5 и 6. На первом ее этапе, непосредственно во время кислотного воздействия, не было отмечено отклонений в сроках и ходе миграции первичных половых клеток (ППК), дифференцировки пола и цитоплазматического роста ооцитов. У 16-суточных личинок половые клетки были представлены только гониями, а в возрасте 25-40 сут у молоди форели проходила цитологическая дифференцировка пола. Вместе с тем данные сравнительного гистологического анализа (табл.1) показали, что во всех вариантах опыта относительное число половых клеток (на единицу площади поперечного среза гонад) было выше у подопытных рыб, чем у контрольных как в индифферентный период развития гонад (возраст 16 сут), так и в начале (возраст 25 сут) и в конце дифференцировки пола (возраст 40 сут). В некоторых сравниваемых выборках вес подопытных рыб и площади сечения их гонад были явно ниже, чем у контрольных. Двухфакторный дисперсионный анализ подтвердил, что вариация площади гонад на срезе многом (доля влияния - 40%) определяется массой тела рыб. Чтобы исключить из анализа возможное влияние обусловленного кислотным стрессом дефицита массы тела подопытных рыб, сравнили показатели гаметогенеза у двух групп одноразмерных контрольных и подопытных самок. В них были включены рыбы, имеющие гонады с площадью сечения в пределах 0,008-0,012 мм². Средний вес таких 11 особей из контроля составил 336,8 мг, средняя площадь поперечных срезов их яичников была равна 0,0097 мм², а относительное

Таблица 1.

Состояние яичников у молоди форели в период кислотного воздействия.

Воз- раст рыб, сут	Ва- ри- ант, К/ ОП	Число рыб, шт	Вес рыб, мг	Площадь поперечного среза гонад $M \cdot 10^{-3} \pm M \cdot 10^{-3}$ mm^2	Число на 0,01 мм ² среза яичников		Относит.число пол.кл. Ооцитов периода		
					всех половых клеток	ооцитов превител- логенеза	оого- ниев профазы мейоза	ранней преви- сугенеза	телло- генеза
<u>Воздействие в возрасте 16-40 и 16-55 сут.</u>									
25	К	22	158±12,3	1,7±0,2	18,8±2,4				
	ОП	24	117±11,1	1,7±0,2	28,9±3,2				
40	К	13	404±25,0	7,2±1,1	26,3±1,5		24,3	75,62	0,08
	ОП	10	416±48,5	10,0±1,5	41,0±2,5		25,0	74,7	0,3
	ОП	20	320±31,8	6,3±0,7	34,4±1,9		28,5	71,45	0,05
70	К	9	2346±117,0	83,6±9,7	9,4±2,3	2,2±0,1	21,6	49,8	28,6
	ОП	9	1646±213,9	91,8±16,6	9,5±1,8	2,3±0,3	28,4	47,4	24,2
	ОП	7	1299±132,9	56,0±15,6	12,2±2,9	2,8±0,4	28,1	48,8	23,1
	ОП	11	1122±91,6	37,6±6,3	9,9±1,7	3,2±0,3	28,4	38,8	32,8
<u>Воздействие при сокращенном рационе питания в возрасте 16-70 сут.</u>									
40	К	10	223±23,0	7,4±1,3	28,8±4,1		28,8	71,2	--
	ОП	10	213±27,1	5,6±1,3	38,1±3,7		24,9	74,71	0,39
70	К	12	568±68,5	42,1±6,6	12,5±2,1	2,3±0,3	32,9	47,0	20,1
	ОП	9	437±38,6	39,5±7,8	13,3±2,2	2,5±0,5	32,9	48,4	18,7
<u>Воздействие со стадии пигментации глазных бокалов эмбрионов до 70-суточного возраста.</u>									
16	К	17	105±3,5	1,4±0,1	8,2±1,2		--	--	--
	ОП	14	80±3,8	1,0±0,06	15,7±2,4		--	--	--
40	К	13	484±41,6	12,8±1,5	14,9±1,4		25,9	71,64	2,46
	ОП	10	209±24,7	6,8±1,2	39,3±4,3		27,3	72,49	0,21
70	К	5	1935±83,4	142,5±14,5	7,1±1,1	1,4±0,1	29,8	51,6	18,6
	ОП	9	452±65,0	36,5±6,0	21,3±4,0	1,4±0,3	51,2	42,3	6,5
<u>Воздействие в возрасте 16-90 сут.</u>									
70	К	6	1283±167,9	86,2±14,6	9,3±1,9	1,9±0,2	24,5	49,0	26,5
	ОП	10	458±76,4	25,4±3,8	21,9±5,3	2,2±0,3	27,8	62,2	10,0
90	К	8	2948±620,4	187,1±24,0	6,1±1,1	1,2±0,1	40,4	36,2	23,4
	ОП	12	1100±174,5	93,0±14,4	6,9±1,4	1,8±0,2	31,8	45,5	22,7

число половых клеток было - $23,57 \pm 2,0$ ($V=17,9\%$). Соответствующие показатели у 12 подопытных рыб: $343,6$; $0,0099 \text{ мм}^2$ и $35,8 \pm 1,8$ ($V=17,9\%$). Из сравнения этих данных видно, что при одинаковой массе тела и размерах гонад число половых клеток у подопытных рыб оказалось достоверно больше ($p < 0,01$). Увеличение резервного фонда половых клеток у рыб в экстремальных условиях существования рассматривается (Персов, 1972; 1975) как одна из видовых, по своей значимости, адаптаций, направленных на повышение надежности функционирования репродуктивной системы и возможности ее быстрого адекватного реагирования на сокращение численности популяции. Согласно нашим данным, это может происходить за счет повышения митотической активности гониев. Так, у молоди форели в возрасте 25 сут митотический индекс у контрольных рыб был 4,5%, а у подопытных 5,8%.

Во второй фазе реакции, с появлением в яичниках превителлогенных ооцитов и началом структуризации их фонда, темп оогенеза у подопытных рыб замедлялся. Так в возрасте 70 и 90 сут они имели меньшую массу тела, размеры гонад и диаметр ооцитов старшей генерации (Табл. 1). Число превителлогенных ооцитов на единицу площади яичников у большинства рыб было таким же, как в контроле, и, следовательно, их общее число (запасной фонд ооцитов) в гонадах подопытных рыб был уменьшен, что в будущем могло стать причиной снижения индивидуальной плодовитости этих самок. Специальный количественный гистологический анализ яичников показал, что кислотное воздействие не привело к нарастанию спонтанно и вяло идущей атрезии некоторой части превителлогенных фолликулов. У подопытных самок значительно увеличилась вариабельность всех изученных показателей гонадо- и гаметогенеза (в первую очередь площади поперечных срезов гонад и числа половых клеток всех периодов развития), что характерно для рыб в условиях стресса (Беккер, 1959).

В третьей фазе реакции репродуктивной системы форели на кислотный стресс (после перевода подопытных рыб в обычные условия) были выявлены отклонения в динамике вителлогенеза в яичниках подопытных самок. Так, начиная с возраста 18 мес, у подопытных рыб были достоверно меньше не только размеры и вес желтковых ооцитов, но и ГСИ, что свидетельствовало о замедлении процесса вителлогенеза. Вследствие этого, созревание подопытных самок произошло в среднем на 15 сут позже, чем в контроле.

Конечным эффектом 2,5-месячной кислотной экспозиции рыб явилось уменьшение массы производителей (на 41,6%), задержка полового созревания и нереста, снижение (на 26,1%) абсолютной плодовитости, а также уменьшение массы икринок (Табл. 2). Известно, что впервые нерестующие самки радужной форели продуцируют относительно мелкую икру - 32-49 мг. (Исаков, 1982; Савостьянова, Никандров, 1976), что связано как с малыми размерами рыб, так и

с относительно низким темпом вителлогенеза (Леманова, 1974; 1976). Такая икра отличается очень низкой выживаемостью (Исаков, 1982; Синявичене, Синявичус, 1982), а личинки, вылупившиеся из икринок менее 40 мг, в большинстве своем оказываются не жизнеспособными (Галкина, 1970). В этой связи представляется очевидным, что, если в результате кислотного воздействия произойдет даже небольшое снижение массы впервые созревших самок, перест всех рекрутов может не состояться или окажется неэффективным.

Мы склонны придать принципиальное значение в целом незначительной задержке полового созревания подопытных самок форели, особенно в плане прогнозирования долгосрочных последствий кислотного стресса. Представляется важным, что после относительно кратковременной экспозиции молоди при низкой рН, не оказывающей видимого поражающего действия на процессы

Таблица 2.

Развитие яичников у радужной форели после содержания в кислотной среде (рН 5,0) в возрасте 16-90 сут.

Воз- раст, мес	Вари- ант, К/ОП	Число рыб	Вес рыб, г	ГСИ, %	Диаметр ооцитов, мм	Вес икринок, мг	Плодо- витость, шт
3	К	8	2,9±0,6	0,10±0,01	0,11±0,003		
	ОП	14	1,1±0,2	0,12±0,02	0,08±0,004		
8	К	33	152±5,6	0,10±0,01	0,22±0,07		
	ОП	22	70±4,5	0,12±0,01	0,20±0,03		
12	К	4	607±36,3	0,22±0,01	0,74±0,02		
	ОП	9	343±13,6	0,21±0,02	0,61±0,03		
13,5	К	10	835±87,1	0,49±0,03	1,40±0,04		
	ОП	11	472±40,7	0,45±0,02	1,32±0,05		
15,5	К	6	1077±58,3	1,35±0,09	2,36±0,05	4,47±0,15	3418±399,1
	ОП	4	606±46,7	1,40±0,24	2,00±0,12	2,77±0,34	3004±266,6
17,5	К	5	1450±136,5	3,78±0,42	2,79±0,12	13,7 ±2,1	4016±280,3
	ОП	4	689±31,2	1,79±0,24	1,98±0,11	4,9 ±0,8	2568±237,2
19,5	К	3	2046±172,9	9,51±0,79	4,32±0,05	50,6 ±0,3	3755±121,6
	ОП	2	1300±280,0	5,71±0,65	3,50±0,09	24,5 ±2,5	2979±33,5
21	К	3	1920±67,7	15,2 ±4,5	4,96±0,18	73,5 ±3,5	3833±938,6
	ОП	3	1137±28,9	12,1 ±3	4,55±0,14	57,9 ±6,5	2398±73,2

раннего гаметогенеза, не происходит полной компенсации отставания в развитии половых желез и много позже последствия кислотного стресса реализуются в форме замедления вителлогенеза и полового созревания рыб. Кажется очевидным, что, если эти изменения стали причиной двух недельной задержки нереста, то вполне возможна и более продолжительная пауза при более сильном или длительном закислении. Как показывает опыт акклиматизационных работ и, в частности, интродукции горбуши (*Oncorhynchus gorbuscha*) на европейском Севере СССР (Персов и др., 1983), даже незначительный сдвиг нереста на более поздние сроки, вследствие задержки созревания производителей, может привести к существенному снижению его эффективности или срыву.

Сперматогенез. Понижение рН воды до 5,0 не оказало какого-либо влияния на гаметогенез самцов форели. Нарастание массы гонад шло пропорционально росту рыб. Так в возрасте 18 мес ГСИ у контрольных и подопытных самцов были $3,95 \pm 1,56\%$ и $3,96 \pm 0,25\%$, а в возрасте 19,5 мес - $6,32 \pm 0,30\%$ и $6,56 \pm 0,64\%$ соответственно. Половое созревание всех подопытных самцов произошло в возрасте 20-21 мес.

Содержание половых стероидных гормонов в сыворотке крови. Для более полного выявления последствий кислотного воздействия, проявившихся в период вителлогенеза у самок и активного сперматогенеза у самцов, измерялась концентрация эстрадиола и тестостерона в сыворотке крови контрольных и подопытных рыб. Уровень эстрадиола у самок до начала вителлогенеза составлял в среднем 117-217 пг/мл, по мере развития вителлогенной функции увеличивался до 2100-2850 пг/мл и на протяжении всего периода полового созревания был достоверно ниже у подопытных рыб (в возрасте 13,5 мес на 28,7%, в 15,5 мес - на 31,7%, в 17,5 мес - на 15,3%, в 19,5 мес - на 55,5%). У контрольных и подопытных самцов концентрация эстрадиола изменялась в пределах 40-200 пг/мл и также была достоверно ниже у подопытных рыб.

Концентрация тестостерона в сыворотке крови у радужной форели в возрасте от 12 мес до 19,5 мес постепенно повышалась от 1,0-1,3 нг/мл до 3,6-8,7 нг/мл; не было выявлено ни половых, ни связанных с кислотным стрессом различий в содержании этого гормона.

Влияние закисления воды на развитие воспроизводительной системы и рост русского осетра в период дифференцировки пола

Масса подопытных осетров в течение первых 8 сут кислотного воздействия уменьшилась на 18,9% ($c 75,6 \pm 4,6$ до $61,3 \pm 5,2$ г) и до окончания эксперимента

оставалась практически неизменной. Масса контрольных рыб за время опыта увеличилась в среднем на 14,9%.

Гаметогенез. В начале эксперимента половые железы молоди осетра находились в индифферентном периоде развития; в генеративной части гонад находили только гонии, участки жировой и стромальной ткани были топографически обособлены. На 8 сут опыта у 70-72% контрольных самок были обнаружены первые признаки анатомической дифференцировки пола - гипертрофия герминативного эпителия и начало его впячивания внутрь гонады. Вблизи формирующейся борозды компактно концентрировались оогонии. У подопытных самок количество оогониев на единицу площади генеративной части яичников было достоверно больше, чем у контрольных ($15,1 \pm 0,6$ и $10,8 \pm 0,9$; $p < 0,05$). На момент окончания эксперимента (25 сут воздействия, возраст 6,5 мес) у всех исследованных контрольных самок анатомическая дифференцировка пола была завершена, а в яичниках 3 из 8 рыб, помимо оогониев, присутствовали ооциты ранней профазы мейоза, т.е. начиналась цитологическая дифференцировка пола. К этому времени анатомическая дифференцировка пола у подопытных рыб еще не завершилась. В отличие от самок, в гонадах самцов герминативный эпителий оставался уплощенным, а половые клетки были равномерно распределены по генеративной части гонады; их относительное количество было в 2,5 раза меньше, чем у самок. Пребывание в среде с рН 4,0-4,8 не повлияло на темп гамето- и гонадогенеза у самок.

Преоптическое ядро гипоталамуса. Учитывая исключительно важную роль преоптико-гипофизарной системы в реализации комплекса защитных реакций организма, а также ее влияние на репродуктивную систему, были изучены связанные со стрессом изменения в крупно-клеточной части преоптического ядра гипоталамуса и гонадотропной зоне аденогипофиза молоди осетра. Из всех исследованных показателей морфофункционального состояния преоптического ядра только один морфометрический признак - относительное количество гранулированных (ПАФ+) нейросекреторных клеток (НСК) - был четко выражен и заметно варьировал. Так, на 8 суток эксперимента у большинства подопытных рыб число гранулированных НСК было больше (3,5-28,2, в среднем 13,1%), чем у контрольных особей (0,6-13,2, в среднем 5,2%). Отмеченный сдвиг был кратковременным: на момент окончания воздействия относительное число гранулированных НСК у молоди обеих групп оказалось сходным.

Аденогипофиз. При сравнительном исследовании гонадотропной зоны аденогипофиза отмечали значительную индивидуальную варибельность ее морфофункционального состояния. Морфологическим выражением поэтапного возрастания ее секреторной активности было последовательное развитие процессов дифференцировки, грануляции и увеличения числа зрелых гонадотропоцитов, вакуолизация их цитоплазмы, голокриновое перерождение,

запустение клеточных ячеек, образование межклеточных скоплений коллоида и локальная васкуляризация железистой паренхимы. Ключевым звеном в этой цепи событий является формирование фонда гранулированных альциан+ базофилов в вентральной зоне proximal pars distalis.

На 8 сут эксперимента доля гранулированных гонадотропоцитов у стрессированных рыб (12,4%) была выше, чем у контрольных (5,2%). На 25 сут кислотного воздействия число таких клеток увеличилось у рыб обеих групп, но у контрольных и подопытных рыб не различалось. У самок как в контроле, так и в опыте их число было всегда больше, чем у самцов. Например, в объединенной выборке, независимо от возраста рыб и варианта опыта, относительное число гранулированных гонадотропоцитов составило у самок - $19,0 \pm 4,7$ (диапазон 2,0-56,6; коэффициент вариации 97%) и у самцов - $8,8 \pm 1,7$ (1,6-29,3; 80%).

Содержание эстрадиола-17 β . Концентрация эстрадиола в сыворотке крови у молоди русского осетра в период дифференцировки пола варьировала в диапазоне от 38 до 375 пг/мл и не различалась ни у контрольных и подопытных рыб, ни у самок и самцов. Так диапазон и среднее значение эстрадиола у 31 самки, независимо от возраста и варианта опыта, составило 121,3 пг/мл (48,0-375,5), а у 46 самцов - 117,3 пг/мл (38,0-339,0).

Содержание тестостерона. Концентрация тестостерона в сыворотке крови у 97,3% молоди осетра варьировала в диапазоне от 0,07 до 5,6 нг/мл. В течение всего периода содержания молоди осетра при pH 4,0-4,8 содержание тестостерона в их сыворотке крови было повышенным, причем у двух особей концентрация гормона - 60,0 и 98,4 нг/мл соответствовала величине этого показателя у половозрелых рыб. Между объемом фонда половых клеток в гонадах и концентрацией тестостерона в крови отмечена прямая корреляция ($r=32,9$, $p<0,01$). Показано, что 28% общей девяти плотности расположения половых клеток в гонадах обусловлено концентрацией тестостерона в крови. У интактных самок осетра уровень тестостерона в крови повышался с началом цитологической дифференцировки пола $0,56 \pm 0,03$ нг/мл в начале и $1,61 \pm 0,13$ нг/мл в конце опыта).

Таким образом, у самок русского осетра, как и у молоди форели, с началом экспозиции в кислотной среде увеличивалось число половых клеток. Это происходило на фоне повышения функциональной активности преоптико-гипофизарной системы и достоверного повышения уровня тестостерона в сыворотке крови. Хорошо известно, что на ранних стадиях развития рыб концентрация андрогенов в крови значительно выше, уровня эстрогенов. Это объясняется особой ролью андрогенов в регуляции роста и морфогенетических процессов, анаболических по своей природе. Обусловленное кислотным стрессом повышение уровня тестостерона в сыворотке крови, по-видимому, сопутствует нарастанию секреции кортикосте-

ронидных гормонов (кортизола и его аналогов), являющихся основными организаторами общего адаптационного синдрома. Хорошо известна гонадотропная функция тестостерона (Giellen, Goose, 1984), его способность активизировать ранний оогенез у рыб (Crim, Evans, 1983). В этой связи можно предположить, что наблюдающаяся в начальный период стресса корреляция темпа размножения оогониев и повыщения концентрации тестостерона носит функциональный характер. Не исключено, что усиление митотической активности гониев явилось побочным полоспецифичным эффектом повышенной концентрации тестостерона. Тот факт, что в условиях стресса активизация митотических делений половых клеток происходит только у самок может объясняться их более высокой гормонокомпетентностью в связи с намного более ранним, чем у самцов, переходом к мейотическим преобразованиям.

Влияние закисления воды на рост и оогенез мозамбикской тилапии

При содержании 6-суточных личинок тилапии в воде с рН около 4,0 темп их роста в первые 10-14 дней существенно замедлился, вследствие чего дефицит массы их тела достиг 18,7%. Он был компенсирован еще до окончания кислотного воздействия (в возрасте 30 сут). Складывалось впечатление, что на определенном этапе стрессорной реакции сублетальная кислотность среды из подавляющего становилась стимулирующим фактором. Уже через трое суток после помещения в воду нормальной кислотности (в возрасте 33 сут) средняя масса подопытных рыб была на 47% больше, чем у контрольных, а в возрасте 90 сут на 61,5%. Рост подопытных самцов был более интенсивным, что хорошо согласуется с имеющимися в литературе данными (Миронова, 1976) о том, что при оптимальной температуре и равной обеспеченности кормом самцы тилапии потребляют его значительно больше, чем самки. В период деления первичных половых клеток и дифференцировки пола пребывание самок в кислотной среде не оказало заметного влияния на темп гонадо- и гаметогенеза. Отставание в азвитии половых желез у подопытных рыб выявилось незадолго до окончания кислотного воздействия ввозрасте 30 сут, когда доля оогониев была на 8,7% больше, а превителлогенных ооцитов на 17,6% меньше, чем в яичниках контрольных рыб. Среднее число превителлогенных ооцитов составило $6,2 \pm 0,9$ и $3,4 \pm 0,5$ ($p < 0,05$) в контроле и опыте, соответственно. Таким образом, с ускорением роста у подопытных тилапий произошло снижение темпа гаметогенеза. Это отставание было компенсировано при переводе рыб в воду с обычной рН. В возрасте 60 сут состояние яичников подопытных рыб по всем критериям соответствовало таковому в контрольном варианте.

В возрасте 90 сут у половин контрольных самок ооциты старшей генерации были окружены столбчатым фолликулярным эпителием, что, как известно, является одним из признаков начала вителлогенеза (Айзенштадт, 1985). В

яичниках остальных рыб преобладали ооциты периода вителлогенеза, содержащие гранулы желтка в цитоплазме. У всех подопытных рыб старшую генерацию половых клеток составляли превителлогенные ооциты, и лишь у одной, самой крупной в этом возрасте самки, они были окружены столбчатыми фолликулярными клетками. У всех самок подопытного варианта в этом возрасте были отмечены гибнущие превителлогенные ооциты, которые выделялись интенсивно окрашенной цитоплазмой.

Ранее было показано, что в условиях кислотного стресса и связанных с ним дополнительных энергетических затрат организма понижается уровень генеративного обмена, происходит торможение процессов продуцирования вителлогенина в печени и отложения желтка в ооцитах (Roy et al., 1990; Tam et al., 1987). Предполагается, что причиной этого является повышение уровня кортикостероидов в крови рыб (Gerking, Lee, 1982). Не исключено, однако, что понижение уровня генеративного обмена может происходить не только непосредственно во время стресса, но и после него. Задержка с началом продуцирования вителлогенина может привести как к ускоренному росту самок (что мы и наблюдали у тилапий), так и к появлению в их яичниках гибнущих ооцитов старшей генерации, завершивших период превителлогенеза и не способных в условиях изменившегося эндокринного статуса организма перейти к трофоплазматическому росту.

ВЫВОДЫ

1. При выращивании радужной форели в системе рециркуляции воды, исключая сезонную динамику температурного режима, существенно изменился темп гаметогенеза: цитологическая дифференцировка пола завершилась в возрасте 35-40 сут., вителлогенез в ооцитах старшей генерации у самок и активный сперматогенез у самцов начались в возрасте 10-11 мес., а половое созревание производителей - в возрасте 19 мес (самцы) и 21-22 мес (самки).

2. Сублетальное закисление среды привело сначала к замедлению, а позднее - к восстановлению темпа роста у молоди тилапии, радужной форели и русского осетра. Динамика постстрессорного роста была видоспецифична: у радужной форели отставание в массе тела не было компенсировано до наступления полового созревания, а у тилапий, особенно у самцов, темп роста подопытных рыб после окончания воздействия превышал рост контрольных.

3. У молоди русского осетра в условиях сублетальной pH активизировалась гонадотропная функция гипофиза и повысилась концентрация тестостерона в сыворотке крови. Обусловленное стрессом изменение гормонального статуса организма привело, с одной стороны, к кратковременной задержке процессов

дифференцировки пола у молоди осетра, а, с другой - к усилению митотической активности гониев и, соответственно, временному увеличению фонда половых клеток у самок осетра и форели.

4. Перенесенное в раннем возрасте кислотное воздействие имело отдаленные последствия для полового созревания самок, проявившиеся в форме задержки начала и замедления вителлогенеза в начале трофоплазматического роста ооцитов старшей генерации у тилапии и на завершающих этапах желткакопления - у радужной форели.

5. У испытанных в раннем возрасте кислотный стресс и достигших половой зрелости самок форели были меньше размеры и масса тела, индивидуальная плодовитость, а также диаметр и масса овулировавших икринок.

По теме диссертации опубликованы и представлены в печать:

1. Федоров К.Е., Чмилевский Д.А., Руденко И.В., Зеленников О.В. Рост и развитие половых желез мозамбикской тилапии в условиях повышенной кислотности воды// Тез. докл на 8 конф. по экологической физиологии и биохимии рыб. Петрозаводск. 1992 - с.138-139.

2. Зеленников О.В. О росте рыб и развитии их репродуктивной системы в условиях кислой среды// Вестник СПбГУ - 1993 - вып.2 - с.40-45.

3. Зеленников О.В. Влияние закисления воды на рост и оогенез радужной форели// в сб. "Систематика, биология и биотехника разведения лососевых рыб", Санкт-Петербург - 1994 - с.71-73.

4. Зеленников О.В. Влияние закисления воды на оогенез мозамбикской тилапии. Воздействие на рыб на этапе дифференцировки пола// Онтогенез - 1994. - т.25 - N.2 - с.31-36.

5. Зеленников О.В. Влияние закисления воды на физиологическое состояние молоди радужной форели (*Salmo gairdneri* Richardson). Воздействие на рост рыб// Вопр. ихтиол. - 1994 - т.34 - N.4 - с.575-576.

6. Зеленников О.В. Дифференциация оогенеза как форма реакции репродуктивной системы радужной форели на кислотное воздействие// Тез. докл. на конф. "Фундаментальные и прикладные проблемы защиты окружающей среды", Томск - 1995 - с.257.

7. Зеленников О.В. Некоторые данные о влиянии высокой кислотности воды на рост рыб и развитие их репродуктивной системы// Тез. докл. на конф. "Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов европейского севера", Петрозаводск - 1995 - с.197-199.

8. Зеленников О.В. Ускорение и дифференциация оогенеза как формы адаптивной реакции репродуктивной системы рыб на кислотный стресс// ДАН - 1996 - т.346 - N.2 - с.570-572.

9. Зеленников О.В., Мосягина М.В., Груслова А.Б., Федоров К.Е. Корреляция морфофункционального состояния гипофиза, гонад и уровня половых стероидных гормонов в крови у молоди русского осетра в норме и в условиях кислотного воздействия// Тез. докл. на конф. "Экологические проблемы севера европейской территории России", Апатиты - 1996 - с.82.

10. Зеленников О.В., Пастухова Т.Ю. Влияние повышенной кислотности воды на эмбриогенез и гаметогенез радужной форели// Тез. докл. На конф. "Экологические проблемы севера европейской территории России", Апатиты - 1996 - с.83.

11. Зеленников О.В. (Zelennikov O.V.) The effect of acidification on the oogenesis of rainbow trout during sex differentiation// J. Fish Biology - 1997 - V.50 - p.18-21.

12. Зеленников О.В., Чмилевский Д.А. Влияние закисления воды на рост и развитие половых желез тилляпии// Сб.трудов БиНИИ СПбГУ - 1997 - т.44 - с.77-83.

13. Зеленников О.В. Влияние кислотной среды на становление и развитие воспроизводительной системы рыб в раннем онтогенезе// Тез. докл. на Первом конгрессе ихтиологов России, Астрахань - 1997 - с.218-219.

14. Зеленников О.В. Рост и гаметогенез радужной форели при оптимальной температуре в период от вылупления до полового созревания// Там же, с.251.

15. Zelennikov O.V., Mosjagina M.V., Fedorov K.E. Oogenesis inhibition, steroidogenesis and morphometric studies of the hypothalamohypophysary system in russian sturgeon exposed to low environmental pH// Aquatic toxicology, 18 pp. (в печати).

Подписано к печати . Заказ 43. Тираж 100 экз. Объем 1 п.л.
Отдел оперативной полиграфии НИИХ СПбГУ.
198904, Санкт-Петербург, Ст.Петербург, Университетский пр.2.