

Министерство рыбного хозяйства СССР
ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ПРУДОВОГО РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА

На правах рукописи

ГАЛАШ Владимир Тимофеевич

УДК 576.8.097.29:
639.3.043.2

ТОКСИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ТРИХОТЕЦЕНОВЫХ
МИКОТОКСИНОВ НА КАРПА И ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМАЯ
КОНЦЕНТРАЦИЯ Т-2-ТОКСИНА В КАРПОВЫХ КОМБИКОРМАХ

Специальность 03.00.10 - Ихтиология

А в т о р е ф е р а т

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 1988

Министерство рыбного хозяйства СССР
ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ПРУДОВОГО РЫБНОГО ХОЗЯЙСТВА

На правах рукописи

ГАЛАШ Владимир Тимофеевич

УДК 576.8.097.29:
639.3.043.2

ТОКСИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ТРИХОТЕЦЕНОВЫХ
МИКОТОКСИНОВ НА КАРПА И ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМАЯ
КОНЦЕНТРАЦИЯ Т-2-ТОКСИНА В КАРПОВЫХ КОМБИНОРАХ

Специальность 03.00.10 - Иктиология

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 1988

*Дорогому Александру
с искренней благодарностью и
признательностью
от Валеро
ученника
29.03.88
В. Галаш*

Работа выполнена в лаборатории ихтиопатологии Всесоюзного научно-исследовательского института прудового рыбного хозяйства (ВНИИПРХ)

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
В.А.Мусселиус
кандидат биологических наук

А.М.Марченко

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
М.А.Щербина
кандидат биологических наук

А.Н.Леонов

Ведущее предприятие: Таллинское отделение БалтНИИПРХ

Защита состоится "29" марта 1988 г. в II час. на заседании специализированного Совета Д 117.04.01 при Всесоюзном научно-исследовательском институте прудового рыбного хозяйства по адресу: 141821 Московская обл., Дмитровский р-н, п. Рыбное, ВНИИПРХ

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Всесоюзного научно-исследовательского института прудового рыбного хозяйства

Автореферат разослан "26" февраля 1988 г.

Ученый секретарь Совета
кандидат биологических наук

С.П.Тряпкина

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследований. Развитие интенсивных форм рыбоводства, повышение его эффективности возможно только при наличии технологически совершенного кормопроизводства, применении доброкачественного сырья и рационального скармливания кормов рыбам. Установлено, что большое значение в снижении качества сырья и комбикормов имеет заражение их объектами биологической природы, в частности, микроскопическими грибами, которые не только разрушают питательные вещества, но и выделяют в корм токсические метаболиты - микотоксины.

В настоящее время только из грибов рода *Fusarium* выделено и определено более 60 микотоксинов трихотеценового ряда, из которых многие вызывают тяжелые отравления животных (Уено, 1983). Трихотеценовые микотоксины (ТМТ) попадают в организм животных с кормом, в котором они накапливаются в результате поражения грибами зерновых растений как во время вегетации, так и при хранении зерна или продуктов его переработки. Известно, что грибы рода *Fusarium* широко распространены в природе, особенно в средней полосе Советского Союза в зонах с умеренным климатом (Вилай, 1977). Здесь же регистрируются фузариотоксикозы животных, вызываемые ТМТ. Так как до 90% и более массы применяемого для кормления карпов комбикорма составляют компоненты растительного происхождения, то ТМТ представляют реальную опасность для этого вида рыб. Среди ТМТ наибольшее значение имеет Т-2-токсин, отличающийся высокой токсичностью и частой встречаемостью. Об опасности загрязнения им карповых комбикормов свидетельствуют результаты исследований Таллинского отделения БалтийИРХ, согласно которым в 30% образцов комбикорма был обнаружен Т-2-токсин в концентрациях от 1,36 до 2,39 мг/кг (Имемсилла, Таннер, 1987). В то же время сведения о влиянии на карпа Т-2-токсина

и других ТМГ отсутствуют, а они необходимы для оценки степени их токсико-биологического действия и выбора правильных способов диагностики и профилактики отравлений этими соединениями.

Цель и задачи. Цель работы заключалась в определении ПДК Т-2-токсина в карповых комбикормах и разработке на ее основе предложений по профилактике Т-2-токсикоза карпа. Для достижения этой цели предстояло решить следующие задачи:

- 1) изучить биологическое действие Т-2-токсина и комплекса ТМГ на карпа;
- 2) определить параметры и характер острой, подострой и хронической токсичности Т-2-токсина и комплекса ТМГ;
- 3) охарактеризовать влияние ТМГ на физиологическое состояние карпа при различных формах течения трихотеценовых токсикозов;
- 4) изучить влияние ТМГ на организм карпа при различной температуре воды;
- 5) определить кумулятивные свойства Т-2-токсина;
- 6) установить значение ПДК Т-2-токсина в карповых комбикормах;
- 7) разработать предложения по профилактике Т-2-токсикоза карпа.

Научная новизна. Впервые изучено токсико-биологическое действие трихотеценовых микотоксинов на карпа при различных формах течения трихотеценовых токсикозов (острой, подострой, хронической), а также впервые установлена ПДК Т-2-токсина - основного представителя ТМГ - в комбикормах для карпа. Определено, что ТМГ и, в частности, Т-2-токсин чрезвычайно токсичны для карпа. Вероятность как острого, так и хронического отравления рыб ТМГ очень велика. В сравнении с млеопитающими и форелью карп более чем в 8-12 раз чувствительнее к токсическому действию Т-2-токсина. Выявлены особенности течения острого токсикоза при различной температуре воды.

ТТМТ оказывают отрицательное влияние на рост карпов, что сопровождается снижением рыбопродуктивности и увеличением затрат кормов на единицу прироста. Изучены клинические и патологоанатомические (макро- и микро-) признаки трихотеценовых токсикозов карпа, а также некоторые моменты механизма действия Т-2-токсина, которые заключаются при остром действии - в повреждении цитомембран, а при хроническом - в ингибировании биосинтеза белка. При Т-2-токсикозе происходит снижение резистентности карпов к возбудителям инфекционных заболеваний и устойчивости к другим стрессовым факторам. Установлено, что Т-2-токсин обладает слабо выраженной или умеренной кумуляцией.

Практическое значение. Предложен комплекс профилактических мероприятий, направленный на предотвращение возникновения Т-2-токсикоза и в целом трихотеценовых токсикозов карпа. Даны диагностические признаки микотоксикоза, что позволит дифференцировать его от других видов патологии, а значит и правильно определять меры борьбы.

Апробация работы. Основные положения и результаты диссертационной работы доложены на межлабораторных семинарах ихтиопатологов ВНИИРХ, ГосНИОРХ и УкрНИИРХ (Киев, 1984; Ленинград, 1985; Рыбное, 1986), УШ Всесоюзном совещании по паразитам и болезням рыб (Астрахань, 1985), Всесоюзном совещании по промышленному рыбоводству и проблемам кормов, кормопроизводства и кормления рыб (Москва, 1985), Республиканской научно-технической конференции "Интенсификация товарного рыбоводства Молдавии" (Кишинев, 1986).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, в которых отражены основные положения исследований.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 7 глав, обсуждения результатов, выводов и списка лите-

ратуры. Работа изложена на 198 страницах машинописного текста, содержит 42 таблицы и 32 рисунка. Список литературы включает 212 источников, из которых 100-иностранных авторов.

Глава I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Исследованию микотоксикозов в настоящее время посвящено большое количество работ отечественных и зарубежных ученых, однако все они, главным образом, направлены на изучение влияния микотоксинов на теплокровных животных. Недостаточная изученность микотоксикозов рыб вполне объяснима. Во-первых, сама наука микотоксикология сформировалась как самостоятельная отрасль всего лишь 20 лет назад. Во-вторых, давно бытовавшее мнение, что рыбы менее чувствительны к ядам, чем теплокровные животные, надолго задержало начало исследований по данной проблеме.

Токсическое действие ТМТ на рыб описано всего лишь в нескольких работах. Так, например, Вудвуд с сотр. (Woodward et al., 1983) и Постон с сотр. (Poston et al., 1982), изучали влияние Т-2-токсина на форель при экспериментальной хронической интоксикации. Определена острая токсичность Т-2-токсина для форели - LD_{50} равна 6,1-6,5 мг/кг массы тела (Рухляда, 1982; Marasas, 1967). В 1973 году в Польше были описаны 2 случая (Nowak, 1973) отравления карпов, кормившихся кукурузой, пораженной грибами рода *Fusarium*, причем симптомы отравления рыб совпадают с теми, что были обнаружены в проводимых нами экспериментах. Однако авторами упомянутых работ, глубоких исследований не проведено, в связи с чем практических выводов сделано не было. В доступной нам литературе мы не встретили работ, касающихся действия Т-2-токсина и других ТМТ на организм карпа.

Глава II. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена в период с 1984 по 1986 годы в лаборатории иктиопатологии, в прудах ЦЭБ "Якоть" ВНПО по рыбоводству. Хроматографические и биохимические исследования проведены на базе лаборатории энзимологии ИП АМН СССР и при активном участии сотрудников этой лаборатории. Хронический эксперимент по определению поедаемости и переваримости корма, содержащего Т-2-токсин, проводился в секторе физиологии питания рыб ВНИИПРХ.^Х

Объектом исследования являлись карпы, а также 5 штаммов гриба *Fusarium sporotrichiella* - активные продуценты ТТМГ, хроматографически чистый кристаллический Т-2-токсин и комплексы ТТМГ, содержащиеся в искусственно зараженном субстрате.

Всего было исследовано 4 245 экз. рыб, из них: использовано в острых, подострых, хронических экспериментах и подвергнуто патологоанатомическому вскрытию 3 742 экз., гематологическими методами исследовано 445 экз., проведен биохимический анализ органов и тканей от 58 рыб, приготовлено и исследовано 170 гистологических препаратов.

Бактериологические, вирусологические и микологические исследо-

^Х - Автор выражает глубокую признательность д.м.н. В.А.Тутельяму за предоставленную возможность для работы и консультации; к.м.н. Л.В.Кравченко и к.б.н. Л.И.Авреньевой за помощь при проведении биохимических исследований, а также к.б.н. В.С.Соболеву и к.х.н. К.И.Элмеру за проведение хроматографических исследований и участие в выделении Т-2-токсина; члену-корр. АН УССР В.И.Емлаю и к.б.н. И.А.Зиланской за предоставленные культуры гриба *F. sporotrichiella* и консультационную помощь; м.п.с. Л.Д.Буховец за помощь при проведении хронического эксперимента и химическую обработку материала.

дования, а также изучение системы крови и гистопатологических признаков, проводили общепринятыми методами (Иванова, 1974; Егоров, 1976; Головина, 1979; Hill, 1976; Roberts, 1978 и др.).

Компонентный состав ТТМТ в зараженном зерне определяли методом, основанным на капиллярной газожидкостной хроматографии трифторацетильных производных ТТМТ, разработанным К.И.Эллером и В.С.Соболевым (1983).

Химическая обработка проб комбикормов, тела рыб, определение переваримости корма выполнены согласно методическому руководству М.А.Щербины (1983).

Активность органеллоспецифических ферментов печени и сыворотки крови определяли спектрофотометрическими и спектрофлуориметрическими методами (Покровский, Тутельян, 1976), а содержание белка по Лоури (Lowry et al., 1951).

Математическую и статистическую обработку материала осуществляли методами, принятыми в биологии (Беленький, 1963; Першин, 1971; Лакин, 1973; Плохинский, 1981).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Глава III. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ОСТРЫЙ ТРИХОТЕЦЕНОВЫЙ ТОКСИКОЗ

Для проведения исследований была осуществлена предварительная работа, в результате которой определили качественный и количественный состав комплексов ТТМТ в искусственно зараженных субстратах, которые использовали в острых и хронических экспериментах, выделили хроматографически чистый (степень чистоты 98%) кристаллический Т-2-токсин, подобрали оптимальные токсические формы для введения карпам перорально и внутрибрюшинно, определили ориентировочную токсичность комплекса ТТМТ для карпа, что позволило перейти к основным исследованиям.

Цель острых экспериментов заключалась в определении основных токсических параметров Т-2-токсина и комплекса ТМТ при однократном действии на организм карпа, а также в выявлении характера острой интоксикации. Токсичность названных соединений мы оценивали по смертельному эффекту, при этом определяли среднелетальную дозу (ДД₅₀) и другие параметры (табл. 1).

Таблица I
 Параметры острой токсичности Т-2-токсина и ТМТ^х

Цель эксперимента	Параметры токсичности, мг/кг массы рыбы			
	ДД ₅₀	ДД ₁₀₀	минимально смертельная	максимально переносимая
Определение ДД ₅₀ комплекса ТМТ (Т-2, НТ-2, НТ-1, неосолапиол) для карпа при пероральном введении ^{хх} .	0,35±0,02	0,56	0,24	0,18
Определение ДД ₅₀ Т-2-токсина для карпа при пероральном введении	0,46±0,04	1,00	0,32	0,25
Определение ДД ₅₀ Т-2-токсина для карпа при внутривибришном введении	0,21±0,01	0,32	0,13	0,10
Определение ДД ₅₀ Т-2-токсина для форели при пероральном введении	5,37±0,40	8,00	4,00	3,20

^х - в опытах использовали сеголеток карпа и форели

^{хх} - рассчитаны по Т-2-токсину

Установленные значения среднелетальных доз показали, что Т-2-токсин и комплекс ТМТ высокотоксичны для карпа. Карп оказался примерно в 12 раз чувствительнее к токсическому действию Т-2-токсина, чем форель. Комплекс ТМТ, содержащий Т-2-токсин как главный действующий компонент, проявляет более высокую (в 1,3 раза) токсичность, чем Т-2-токсин в чистом виде.

Как показал расчет, зона острого токсического действия (Z_{ac}) Т-2-токсина равна 1,4. Полученный показатель свидетельствует о большой вероятности острого отравления карпов этим токсином.

Т-2-токсин в дозе, равной LD_{50} , вызывает снижение активности лизосомальных ферментов в печени карпа, в то время как в сыворотке крови происходит ее увеличение, наряду с увеличением активности щелочной фосфатазы (табл. 2). Это возникает вследствие повреждающего действия Т-2-токсина на цитомембраны клеток печени карпа, что влечет за собой выход маркерных ферментов лизосом и плазматических мембран в сыворотку крови.

В острых экспериментах при различной температуре воды с применением ТМТ выявлены две особенности в течении токсикоза. Во-первых, при прочих равных условиях быстрота развития токсикоза прямо пропорциональна температуре воды. Во-вторых, клинические проявления токсикоза также зависят от этого фактора, и если при более высоких температурах (18; 21; 24; 27°C) токсикоз протекает по типу некроза жабр, то при низких (15; 12; 8°C) он сопровождается признаками некроза жабр и аэромоноза. Появление признаков спонтанного аэромоноза связано с возникновением бактериальной инфекции. Это подтверждается бактериологическими исследованиями, когда бактериальная обсемененность жабр, печени, почек подопытных рыб, содержащихся при температуре воды 21 и 8°C, в 2-8 раз превышала таковую органов контрольных рыб (Рис. 1).

Т-2-токсин и комплекс ТМТ при остром действии на карпа вызывает глубокие патологические изменения в жабрах, пищеварительном тракте и паренхиматозных органах, однако изменений в системе крови при этом не отмечали.

Используя результаты острых экспериментов, мы перешли к изучению подострой токсичности Т-2-токсина.

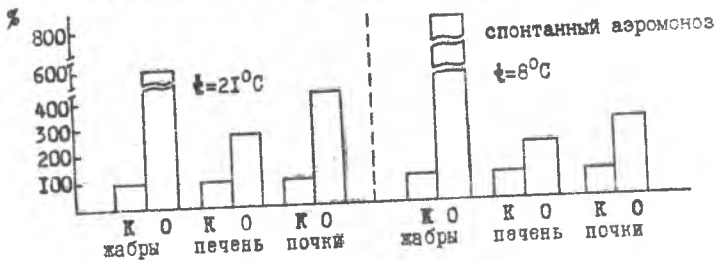
Таблица 2

Активность ферментов и содержание общего белка в сыворотке крови и печени карпа при остром I-2-токсикозе (через 24 часа).

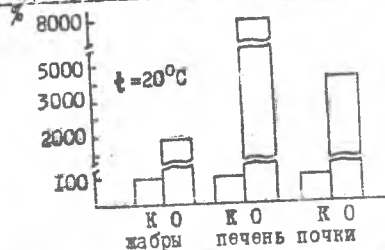
Ферменты	Сыворотка крови		Печень	
	Активность ферментов, нмоль/мин/мл		Активность ферментов, нмоль/мин/мг/белка	
	контрольная группа	опытная группа	контрольная группа	опытная группа
β -N - ацетилглюкозаминидаза	29,5 ± 1,1	224,1 ± 15,1 ^x	245,1 ± 13,3	257,1 ± 7,8
α - маннозидаза	12,5 ± 2,7	20,7 ± 4,3	30,5 ± 3,1	22,1 ± 2,1 ^x
β - галактозидаза	0,70 ± 0,20	7,70 ± 1,5 ^x	8,36 ± 0,77	6,36 ± 0,28 ^x
Щелочная фосфатаза	8,5 ± 0,8	19,4 ± 2,7 ^x	1,05 ± 0,05	0,99 ± 0,07
Общий белок, мг/л; мг/г ткани	49,0 ± 2,5	45,2 ± 3,2	142,4 ± 4,9	139,9 ± 6,6

x - показатели, достоверно отличающиеся от контрольных (P < 0,05)

Острый токсикоз при различной температуре воды



Подострый T-2-токсикоз (спонтанный аэромонас)



Хронический трихотеценовый токсикоз

а) После заражения вирус-лентным штаммом *Aeromonas hydrophila* var. *hydrophila*

б) После дополнительного введения T-2-токсина ($D=LD_{100}$) и понижения температуры воды

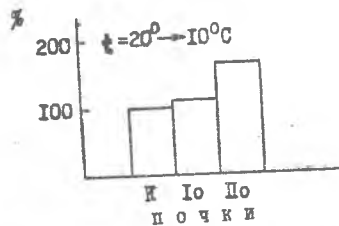
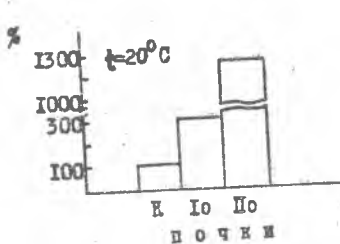


Рис. I. Бактериальная обсемененность органов карпа при различных формах течения трихотеценовых токсикозов.
 О - опыт; Io - I опыт; Po - II опыт; К - контроль; все опытные показатели достоверно отличаются от контрольных ($P < 0,05$).

Глава IV. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ПОДОСТРЫЙ Т-2-ТОКСИКОЗ

Цель подострых экспериментов заключалась в получении данных для обоснования оценки биологического действия Т-2-токсина, обнаружении возможных кумулятивных эффектов и патологических отклонений, а также определении доз, в пределах которых такие отклонения наступают. Кроме того, подострые эксперименты проводились для выбора адекватного метода определения пороговой концентрации Т-2-токсина в хроническом опыте.

В подострых экспериментах применяли схему "субхронической токсичности" Лима (1961), при этом рыбам ежедневно вводили Т-2-токсин, начальная доза которого соответствовала 1/10 ЛД₅₀. Эту дозу через каждые 4 дня увеличивали в 1,5 раза. Параметры подострой токсичности Т-2-токсина представлены в табл. 3.

Таблица 3

Параметры подострой токсичности Т-2-токсина при различных путях введения

Путь введения	Суммарные дозы (п), мг/кг массы рыбы			
	ЛД ₅₀ п	ЛД ₁₀₀ п	минимально смертельная	максимально переносимая
Перорально	2,29±0,58	5,37	0,46	0,39
Внутрибрюшинно	0,68±0,16	1,23	0,26	0,22

В течение 29 и 22 дней экспериментов погибло 100% подопытных рыб как при пероральном введении Т-2-токсина, так и при внутрибрюшинном (соответственно).

Степень выраженности кумулятивных свойств Т-2-токсина оценивали по коэффициенту кумуляции. Расчет показал, что при пероральном введении Т-2-токсина он равен 5,7, а при внутрибрюшинном - 4,0. Это свидетельствует об умеренной или слабо выраженной кумуляции.

При подострой интоксикации было отмечено, что средняя масса подопытных рыб (а это один из важных рыбоводных показателей) уменьшалась, в то время как в контроле происходило ее увеличение (рис. 2).

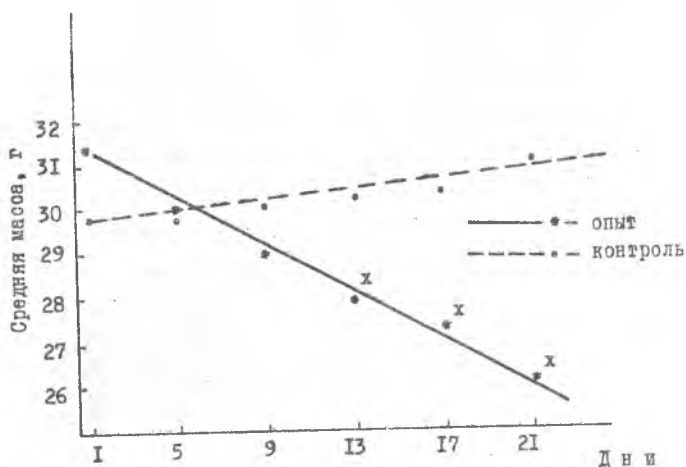


Рис. 2. Динамика массы рыб при подостром Т-2-токсикозе.
 x - статистически достоверные различия показателей ($P < 0,05$)

Снижение массы рыб прослеживалось как по показателям среднесуточного относительного прироста, так и по сухому веществу.

У карпов при подострой интоксикации отмечали снижение дыхательной активности и устойчивости к неблагоприятным факторам. Так резкое изменение температуры воды на 14 сутки эксперимента, когда суммарная доза Т-2-токсина, введенная рыбам, составляла более 1 мг/кг массы рыбы, вызывало гибель 75% подопытных рыб, в то вре-

мя как контрольные все выживали. При исследовании системы крови мы не наблюдали существенных колебаний в концентрации гемоглобина, числе зрелых форм эритроцитов, но при этом происходило снижение гематокритной величины, числа молодых форм эритроцитов, а также моноцитов и лимфоцитов. Клинические и патологоанатомические признаки у карпов при подостром Т-2-токсикозе были подобны, наблюдавшимся в острых опытах. У 20% рыб (при пероральном введении Т-2-токсина) и у 15,4% (при внутривашином) возник спонтанный аэромонос, в результате чего бактериальная обсемененность органов этих рыб была в 12-76 раз больше, чем у контрольных (рис. 1).

Проведенные подострые эксперименты позволили нам сориентироваться в выборе доз Т-2-токсина для хронических опытов, а также наиболее чувствительных показателей токсикоза - это масса рыб, клинические и патологоанатомические признаки, некоторые гематологические показатели и активность маркерных ферментов, как самый чувствительный тест, примененный еще в острых опытах.

Глава V. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ХРОНИЧЕСКИЙ ТРИХОТЕЦЕНОВЫЙ ТОКСИКОЗ

Хронический опыт, с учетом результатов которого устанавливали ПДК Т-2-токсина в комбикормах, являлся заключительным этапом наших экспериментальных исследований. В ходе его выявляли пороговую дозу Т-2-токсина и зону его хронического действия.

Первоначально, мы провели хронические эксперименты в прудах и бассейнах, используя токсичные корма, содержащие разные концентрации комплексов ТМТ, которые составляли в сутки примерно 1/100 и 1/10 от LD_{50} в зависимости от суточных норм, потребляемых рыбами. Динамика массы рыб в этих экспериментах показана на рис. 3.

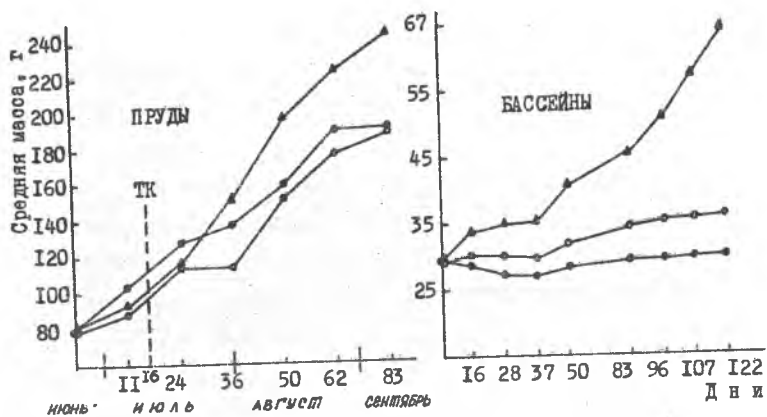


Рис. 3. Динамика массы рыб, выращиваемых в прудах и бассейнах, при хронической интоксикации ТМТГ.

—○— I опыт; —●— II опыт; —▲— контроль; ТК - начало кормления токсичным кормом.

Концентрация Т-2-токсина в комплексе с ТМТГ, мг/кг корма:
 пруды - I опыт - 0,14, II опыт - 1,02; бассейны -
 I опыт - 0,45, II опыт - 0,92.

Токсичный корм, содержащий различные концентрации ТМТГ, в течение 67 дней скармливания в прудах, вызывал снижение массы подопытных рыб на 30%, при этом затраты токсичного корма на единицу прироста возрастали примерно в 2 раза в среднем за сезон, а рыбопродуктивность снижалась на 30% в сравнении с контролем. Рост подопытных рыб, выращиваемых в бассейнах, почти полностью прекращался и их средняя масса к концу опытного периода была на 40-50% ниже, чем в контроле.

В хронических экспериментах мы не наблюдали спонтанного возникновения аэромоназа, однако применение метода функциональных нагрузок с использованием бактерий - возбудителей аэромоназа и сочетание низкой температуры воды с дополнительным введением Т-2-токсина в дозе, равной LD_{100} , позволило выявить различную степень

резистентности подопытных и контрольных рыб. Данные по бактериальной обсемененности при этом показаны на рис. I.

Длительное поступление ТМТ в низких дозах в организм карпа приводит к снижению концентрации гемоглобина, гематокритной величины, числа как зрелых, так и молодых форм эритроцитов в крови, однако, число лейкоцитов возрастает.

В третьем хроническом эксперименте, проведенном в специальных аквариумах, мы установили, что пороговая суммарная доза Т-2-токсина равна примерно 0,2 мг/кг массы рыбы, что составляет в среднем 0,003 мг/кг при суточном поступлении. Именно при данной пороговой суммарной дозе по активности маркерных ферментов удалось обнаружить достоверные отклонения от контроля в состоянии здоровья рыб, при этом также снижалось общее количество белка как в печени, так и в сыворотке крови. На этом же уровне (0,17-0,2 мг/кг массы рыбы; 54-69 дни эксперимента) происходило снижение очень важных интегральных рыбоводных показателей - на 10-40% уровня пищевой активности рыб и на 27% среднесуточного относительного прироста. Как показал расчет, величина зоны хронического действия равна 107, что свидетельствует о скрытом течении хронического отравления. При исследовании переваримости карпами корма, содержащего 0,8 мг/кг Т-2-токсина, выявили снижение гидролитической и резорбтивной функций пищеварительного тракта в период адаптации к токсическому комбикорму, а к 69 дню скармливания как в концентрации 0,8 мг/кг, так и в 10 раз меньшей, Т-2-токсин ингибирует кишечные липазы и одновременно активизирует амилазы.

Глава VI. ГИСТОПАТОЛОГИЧЕСКАЯ КАРТИНА ОРГАНОВ КАРПА С ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ Т-2-ТОКСИНОМ И С ХРОНИ- ЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ ТМТ

Для острого действия Т-2-токсина на карпа характерны в различной степени выраженные некротические явления в гепатопанкреасе, почках, начальном и среднем отделах кишечника, но особенно сильно они проявляются в стенках кровеносных сосудов, жабрах и конечном отделе кишечника.

При хронической интоксикации карпов ТМТ в поджелудочной железе обнаружены характерные изменения, которые, возможно, являются специфическими - это появление среди ацинарных клеток - клеток с однородной светло-коричневой цитоплазмой и ядрами неправильной формы, расположенными по периферии. Кроме того, имеются застойные явления в паренхиматозных органах и слизистое катаральное воспаление кишечника с уплощением эпителия на апикальных участках сопочков.

Глава VII. ОБОСНОВАНИЕ ПРЕДЕЛЬНО ДОПУСТИМОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ Т-2-ТОКСИНА В КОМБИКОРМАХ ДЛЯ КАРПА; ПРОФИЛАК- ТИКА Т-2-ТОКСИКОЗА КАРПА

В соответствии с принципиальными положениями токсикологии по установлению ПДК вредных веществ, мы использовали следующие критерии токсичности Т-2-токсина:

- токсичность и характер действия Т-2-токсина при однократном введении в организм карпа;
- пороговую дозу и зону острого токсического действия Т-2-токсина при однократном воздействии;
- токсичность и характер действия Т-2-токсина при многократных введениях в организм карпа;
- пороговую дозу и зону хронического токсического действия

Т-2-токсина;

- обоснование рекомендуемой ПДК с учетом специфики объекта исследования.

Исходя из вышеизложенного, можно сделать основной вывод, что Т-2-токсин чрезвычайно опасное соединение для карпа. Зона его острого токсического действия, равная 1,4, свидетельствует о большой вероятности острого отравления. Величина зоны хронического действия Т-2-токсина равна 107 - она довольно широкая, значит опасность хронического отравления высокая, так как оно развивается скрыто.

Учитывая неравномерность объемов суточных норм кормления рыб за вегетационный сезон и то, что Т-2-токсин обладает слабо выраженной или умеренной кумуляцией, мы пришли к заключению, что ПДК этого токсина в карповых комбикормах может быть установлена на пороговом уровне - 0,003 мг/кг массы рыбы. Принимая во внимание то, что все исследованные возрастные группы карпов проявили одинаковую чувствительность к Т-2-токсину (по смертельному эффекту) мы считаем, что ПДК должна быть единой независимо от возраста рыб.

Согласно существующим нормативным материалам, в среднем за сезон суточные нормы кормления карпов составляют 8-10% от массы рыб. Продолжительность периода кормления в зависимости от возраста, обеспечивающего получение стандартной массы рыб при разной плотности посадки, колеблется от 60 до 105 дней. Учитывая пороговый уровень действия Т-2-токсина (0,003 мг/кг) и среднюю суточную норму кормления за сезон, мы определили ПДК Т-2-токсина в корме - 0,05 мг/кг.

Установленная ПДК Т-2-токсина в комбикормах для карпа не вызовет у рыб отравления и ухудшения их физиологического состояния, не отразится на рыбоводных показателях, при этом не возникнет патологических изменений в органах и функциональных системах, которые могут привести к снижению устойчивости рыб к неблагоприятным

ятым факторам в течение вегетационного периода и периода зимовки.

Профилактика Т-2-токсикоза карпов должна быть направлена на создание условий, препятствующих развитию грибов-продуцентов и образованию Т-2-токсина в кормах, также на недопущение к скармливанию карпам кормов, содержащих Т-2-токсин в концентрациях превышающих ЦДК.

Прежде всего, большое внимание должно уделяться изготовлению и хранению комбикормов. Комбикорма должны изготавливаться из доброкачественного, очищенного и измельченного сырья. Сырье, поставляемое для производства комбикормов, должно соответствовать действующим стандартам и техническим условиям. Однако в действительности это выглядит зачастую иначе. Грибы-продуценты ТМГ распространены очень широко и поражают зерновые растения на всех этапах их выращивания и уборки, а, к сожалению, люди во многом зависят от природы и иногда оказываются бессильны противостоять развитию плесени во время затяжных дождей, поздней уборки урожая и т.д. В таких случаях зерно чаще становится токсичным, а избавиться от токсинов до настоящего времени не представляется возможным, так как накопленные в зерне ТМГ химически устойчивы и термостабильны и при технологических процессах приготовления комбикормов не разрушаются. Чтобы предупредить изготовление заблаговременно недоброкачественного комбикорма мы предлагаем ряд мероприятий (рис. 4). Основным моментом этих мероприятий является организация при комбикормовых заводах по производству рыбных комбикормов аналитических лабораторий, способных производить исследование сырья на содержание в нем Т-2-токсина и других ТМГ. Это позволит своевременно выявлять партии загрязненного сырья и снижать в нем концентрацию ТМГ путем разбавления доброкачественным или выбраковывать.

Следует особо подчеркнуть, что установленная ЦДК Т-2-токсина

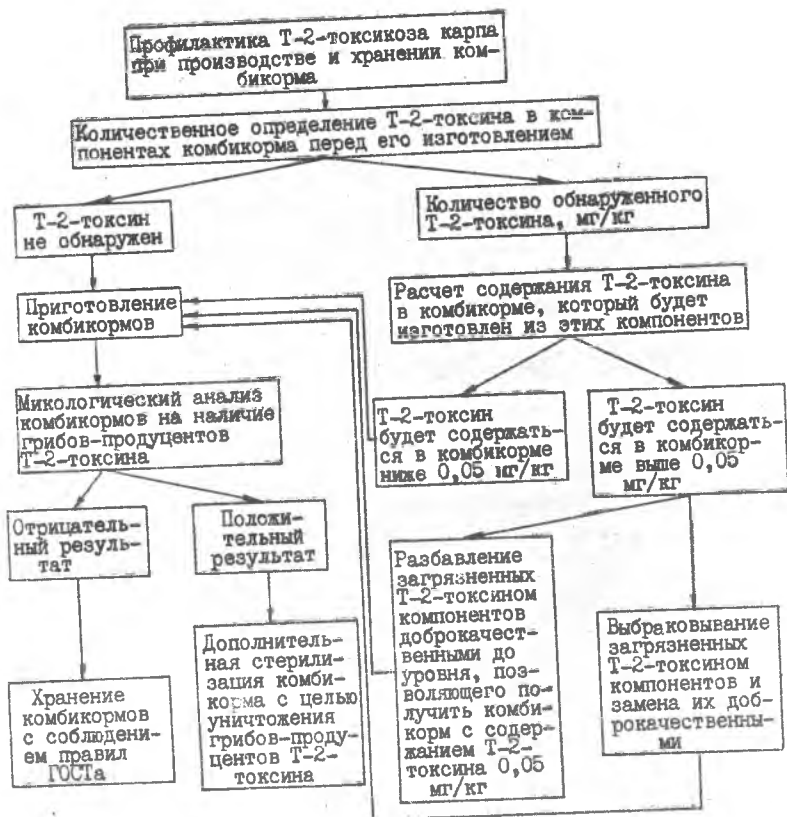


Рис. 4. Профилактика Т-2-токсикоза карпа при производстве и хранении комбикормов.

в карповых комбикормах, предусматривает кормление карпов всех возрастов только при суточных нормах кормления до 10% от массы рыб независимо от температуры воды. В данном случае комбикорм, содержащий Т-2-токсин в концентрациях выше ПДК, следует разбавить доброкачественным до безопасного уровня без учета объема суточной нормы корма (до 10% !). В случаях, когда суточная норма кормления карпов превышает 10% от их массы, мы предлагаем простую формулу пересчета разбавления корма, содержащего Т-2-токсин выше ПДК:

$$X = \frac{K \cdot a}{0,5},$$

где: X - во сколько раз нужно разбавить комбикорм, содержащий Т-2-токсин, доброкачественным;

K - концентрация Т-2-токсина в исходном комбикорме;

a - процент (>10 !) суточной нормы кормления карпов от их массы;

0,5 - постоянный коэффициент (ПДК x 10%).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами результаты позволяют заключить, что ТТМТ и, в частности, Т-2-токсин высокотоксичны для карпа. Установленные значения среднелетальных доз в 8-12 раз ниже по сравнению с дозами, определенными для теплокровных животных и форели. Высокая чувствительность карпа по сравнению с млекопитающими к токсическому действию Т-2-токсина, по-видимому, связана с более выраженной чувствительностью цитомембран, а различная активная среда в пищеварительном тракте карпа и форели (щелочная и кислая соответственно), вероятно, определяет и неодинаковую чувствительность этих видов рыб к Т-2-токсину. Не исключено, безусловно, и влияние других факторов. Комплекс ТТМТ в 1,3 раза токсичнее, чем Т-2-токсин в чистом виде, что повышает опасность этих соединений для карпа, так

как грибы-продуценты, как правило, одновременно синтезируют несколько токсинов этой группы (Билай и др., 1983).

В литературе имеются сведения о содержании Т-2-токсина в кормовом сырье для животноводства в концентрации до 25 мг/кг (Puls, Greenway, 1976; Scott, 1983). Учитывая чувствительность карпов к Т-2-токсину, можно прийти к заключению - если в кормах для него Т-2-токсин будет присутствовать в подобной концентрации и даже намного ниже, то этого будет достаточно, чтобы вызвать 100% гибель рыб уже при однократной даче такого корма.

На наш взгляд, интересными представляются результаты по влиянию Т-2-токсина на изменение массы рыб, так как прирост массы является одним из важных рыбоводных показателей. Одной из главных причин существенного снижения массы рыб является отказ карпов от корма. Отсутствие пищевой активности рыб (или ее снижение) мы наблюдали при всех формах токсикоза - острой, подострой и хронической. Этот же симптом очень характерен и для теплокровных животных при отравлении Т-2-токсином (Левицкая и др., 1985 и др.).

Т-2-токсин и комплекс ТМТ отрицательно влияют на ряд физиологических показателей карпа, что приводит к патологическим изменениям в состоянии его здоровья. Снижение дыхательной активности карпов при подострой интоксикации, по-видимому, связано с повреждающим действием Т-2-токсина на жаберный аппарат. В системе крови карпов при подострой и хронической интоксикации наблюдается снижение концентрации гемоглобина, гематокритной величины, числа эритроцитов, происходит перегруппировка гранулоцитов и агранулоцитов в белой крови. Механизмы, вызывающие снижение количества эритроцитов, возможно, включают в себя повреждающее действие ТМТ на органы кроветворения: почки, селезенку, жабы, а также непосредственный лизис самих клеток красной крови. Снижение числа

эритроцитов сказывается и на уменьшении концентрации гемоглобина, так как основной его синтез идет именно в этих клетках.

В литературе имеются данные, указывающие на ингибирующее действие Т-2-токсина на биосинтез белка у млекопитающих (Уено et al. , 1973; Cannon et al. , 1975). Полученные нами результаты по хроническому действию Т-2-токсина на карпа, согласуются с таковыми, полученными на мышах (Кравченко и др., 1985). Уменьшение содержания белка и снижение активности лизосомальных гидролаз в печени и сыворотке крови карпов является следствием ингибирующего действия Т-2-токсина на биосинтез белка.

Т-2-токсин повышает восприимчивость карпов к стрессовым факторам - резко меняющимся условиям содержания и возбудителям инфекционных заболеваний. Следует учесть, что при выращивании рыб в индустриальных условиях повышается вероятность стрессирования их во время биотехнических процессов, что может являться провоцирующими факторами возникновения различных патологических нарушений у рыб на фоне кормления кормами, содержащими Т-2-токсин в концентрациях выше ПДК.

Анализ результатов гистопатологических исследований показал, что, как и у млекопитающих (Тутельян, Кравченко, 1985), у карпа наблюдаются некрозы в печени, некротические изменения в жабрах, почках, эрозии и некрозы в пищеварительном тракте, причем при острой интоксикации карпов Т-2-токсином эти изменения носят более выраженный характер, чем при хронической. Обнаруженные изменения в поджелудочной железе карпов с хронической интоксикацией ТМТ, возможно, носят специфический характер. Признаки некроза жабр у карпов, наблюдавшиеся нами постоянно во всех проведенных экспериментах, являются также специфическими, что подтверждается отрицательными результатами исследований на бактерии, вирусы и грибы, как факторы, вызывающие поражения жабр.

Возникновение аэромоноза при интоксикации карпов Т-2-токсином и ТМТ мы связываем с их иммунодепрессивным действием, что неоднократно показано для млекопитающих (Тутельян и др., 1985; Wiskott, 1978). Иммунодепрессивное действие ТМТ выявлено и при низких концентрациях их в корме, когда увеличивается восприимчивость карпов к вирулентному штамму *Aeromonas hydrophila* var. *hydrophila*. Учитывая результаты бактериологических исследований, можно сделать вывод, что часто регистрируемые заболевания рыб - некроз жабр и аэромонос, могут являться следствием различных форм интоксикаций карпа ТМТ.

Таким образом, результаты, полученные нами, широко характеризуют токсико-биологическое действие Т-2-токсина и комплексов ТМТ на карпа. Количество примененных методов и учтенных с их помощью признаков и показателей, позволило установить и обосновать допустимый уровень (0,05 мг/кг) Т-2-токсина в комбикормах для карпа.

Соблюдение предлагаемых профилактических мероприятий по предупреждению Т-2-токсикоза карпов на рыбоводных заводах страны даст возможность сохранить здоровье рыб, а также рациональнее использовать комбикорма, тем самым избежать больших экономических потерь.

В Ы В О Д Ы

I. Изучение токсико-биологического действия трихотеценовых микотоксинов на организм карпа позволило установить высокую степень их токсичности:

- В сравнении с теплокровными животными и форелью карп в 8-12 раз чувствительнее к острому действию Т-2-токсина.

- Среднелетальные дозы при пероральном введении карпам составили: $0,46 \pm 0,04$ мг/кг массы рыбы Т-2-токсина; $0,35 \pm 0,02$ мг/кг Т-2-токсина в комплексе с ТМТ; при внутрибрюшинном введении Т-2-

токсина - $0,21 \pm 0,01$ мг/кг массы рыбы.

- Карпы независимо от возраста проявляют одинаковую чувствительность (по смертельному эффекту) к токсическому действию Т-2-токсина и ТТМГ.

2. Выявлены клинические и патологоанатомические признаки на макро- и микроскопическом уровнях Т-2- и трихотеценового токсикозов у карпов при всех формах течения:

- ТТМГ действуют в первую очередь на жабры, пищеварительный тракт и паренхиматозные органы. Патологическое действие ТТМГ заключается в разрушении кровеносных сосудов и, как следствие этого, возникает геморрагический синдром, в жировой дистрофии печени и в различной степени выраженных некротических изменениях в жабрах, печени и кишечнике.

- Появление среди ацинарных клеток поджелудочной железы клеток с однородной светло-коричневой цитоплазмой и пикнотическими ядрами, возможно, является специфическим признаком хронического действия ТТМГ на организм карпа.

3. Кумулятивная способность Т-2-токсина, согласно коэффициентам кумуляции, умеренная или слабо выражена. Однако широкая зона хронического действия Т-2-токсина свидетельствует о скрытом течении хронического токсикоза, следовательно, и о высокой способности его к кумуляции. В связи с этим вопрос о кумуляции Т-2-токсина в отношении организма карпа требует более глубокого изучения.

4. Действие ТТМГ на физиологическое состояние карпа выражается в следующем:

- Снижается дыхательная активность рыб и уровень их пищевой возбудимости.

- ТТМГ оказывает отрицательное влияние на рост карпов при подострой и хронической интоксикации. В зависимости от дозы токсинов происходит потеря массы рыб (на 10-50% по сравнению с контролем),

в результате чего примерно в 2 раза возрастают затраты кормов на единицу прироста.

- Угнетение Т-2-токсином пищеварительной функции кишечника выражается в снижении гидролитических и резорбтивных процессов в период адаптации карпов к комбикорму, а также в ингибировании активности кишечных липаз с одновременным усилением деятельности амилаз кишечника.

- Т-2-токсин и ТТМГ вызывают патологические изменения в системе крови, при этом снижается концентрация гемоглобина, гематокритная величина, уменьшается количество зрелых и молодых форм эритроцитов, наблюдается сдвиг ядра влево в лейкоцитарной формуле, а при подострой и хронической интоксикации наблюдается лейкоцитоз.

- Т-2-токсин при остром действии на организм карпа оказывает повреждающее действие на цитомембраны, а при хроническом - ингибирует биосинтез белка.

5. Изучено действие различных факторов на характер течения трихотеценовых токсикозов карпа:

- Влияние температуры воды в процессе острого трихотеценового токсикоза карпа проявляется в следующем:

а) быстрота развития токсикоза прямо пропорциональна температуре воды, окружающей рыб;

б) токсикоз протекает по типу некроза жабр, а при температуре воды 18°C и ниже - в смешанной форме: с признаками некроза жабр и азромоноза.

- Стрессовые факторы (даже очень слабые) осложняют течение токсикоза, что связано с подавлением резистентности у рыб и с иммунодепрессивным действием ТТМГ.

6. Впервые установлена ЦДК Т-2-токсина - основного представителя ТТМГ - в комбикормах для карпа на уровне 0,05 мг/кг.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Установленная ЦДК Т-2-токсина в карповых комбикормах должна обязательно учитываться при производстве комбикормов на комбикормовых заводах с тем, чтобы предупредить изготовление заблаговременно недоброкачественного комбикорма.

2. В целях сохранения здоровья рыб и рационального использования комбикормов необходимо соблюдать комплекс профилактических мероприятий, направленный на предотвращение Т-2-токсикоза карпов и в целом трихотеценовых токсикозов, что позволит избежать больших экономических потерь.

3. Следует исключать Т-2-токсикоз как первопричину при диагностике некоторых форм некроза жабр и аэромоноза с целью правильного выбора мер борьбы.

По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. Галаш В.Т., Марченко А.М., Эллер К.И., Соболев В.С. Влияние трихотеценовых микотоксинов на карпа. - В кн.: Уш Всес. совещ. по паразитам и болезням рыб: Тез. докл. Л.: Наука, Ленингр. отделение, 1985, с. 27-29.

2. Галаш В.Т. Чувствительность карпа и радужной форели к Т-2-токсину. - В кн.: Всес. совещ. по промышленному рыбоводству и проблемам кормов, кормопроизводства и кормления рыб: Тез. докл. М.: ВНИИПРХ, 1985, с. 17-18.

3. Галаш В.Т., Иванова Н.С. О необходимости изучения микотоксикозов рыб. - Э.И. Сер. Рыбохоз. использование внутренних водоемов. М.: ЦНИИТЭИРХ, 1986, вып. 4, с. 9-17.

4. Галаш В.Т. Действие трихотеценовых микотоксинов на карпа при хронической интоксикации. - В кн.: Респ. научно-техн. конференция "Интенсификация товарного рыбоводства Молдавии": Тез. докл.

Кишинев, 1986, с. 16-18.

5. Гринь А.В., Галаш В.Т. Экспресс-метод определения дыхательной активности рыб при токсикологических исследованиях. - Редколлегия журнала "Рыбоводство и рыболовство" (Рук. деп. во ВНИИТЭИагропром 7.07 1986 № 278 ВС-86 Деп.). М., 1986, 5 с.

6. Галаш В.Т., Головина Н.А. Гематологическая характеристика острого, подострого и хронического Т-2-токсикозов у карпа. - В кн.: Болезни рыб и водная токсикология (Сб. научн. трудов). М.: ВНИИПРХ, 1987, с. 135-144.

7. Галаш В.Т., Головина Н.А., Соболев В.С. Реакция организма карпа на присутствие в кормах трихотеценовых микотоксинов. - В кн.: Вопросы физиологии и биохимии питания рыб (Сб. научных трудов). М.: ВНИИПРХ, 1987, с. 162-175.

8. Кравченко Л.В., Галаш В.Т., Краунаускас А.Э. Активность ферментов, метаболизирующих ксенобистики в печени карпа, в норме и при Т-2-микотоксикозе. - В кн.: Вопросы физиологии и биохимии питания рыб (Сб. науч. трудов). М.: ВНИИПРХ, 1987, с. 175-182.

В. Галаш

И - 77071

Подписано к печати 17.2.68г.

Формат 60 90/8

Тираж - 100 экз.

Заказ № 18

Объем - 1 п.л.

Участок оперативной полиграфии ВНИО по рыбоводству
п. Рыбное, Дмитровский р-он, Московская обл.