

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ НИЗКИХ ДОЗ НЕОНИКОТИНОИДОВ И КРИТЕРИЙ ИХ ТОКСИЧНОСТИ ДЛЯ МЕДОНОСНОЙ ПЧЕЛЫ

Е.С. Салтыкова, Л.Р. Гайфуллина, М.Д. Каскинова, А.В. Поскряков, А.Г. Николенко

Уфимский федеральный исследовательский центр РАН, Уфа, Россия

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних двух десятилетий неоникотиноиды остаются основной группой высокоэффективных и широко используемых инсектицидов. Неоникотиноиды оказывают влияние на нецелевых беспозвоночных, вызывая их гибель. Действие неоникотиноидов причисляют к ряду факторов, вызывающих массовые потери пчелиных семей в разных странах мира. Неоникотиноиды неблагоприятно воздействуют на воспроизводство и развитие личинок, нарушают координацию, обонятельную память, навигационные способности пчел. Крупномасштабные исследования в разных странах свидетельствуют, что распад пчелиных семей является результатом действия нескольких факторов, в том числе неоникотиноидов, увеличивающих восприимчивость пчелиных семей к болезням.

Очень часто они включают широкий спектр воздействий в мало значимых, фоновых концентрациях, в том числе на особой пчелиной семьи, не посещающих растения с целью опыления – это матка и трутни [1; 2].

Хотя трутни не участвуют в задачах жизнеобеспечения колонии, но их жизнь находится под влиянием инсектицидов аналогичным образом, как и других ее членов, потому что они проводят свои первые дни до половой зрелости в колонии и вскармливаются загрязненной пищей, привнесенной рабочими пчелами с полей обработанными неоникотиноидами.

Цель исследования – оценка последствий разового и хронического воздействия на трутней при действии фоновой концентрации (5 ppb) имидаклоприда (IMD) на сперматозоиды, их подвижность, жизнеспособность, активность АТФазы митохондрий, протеолитический состав эякулята.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводился во время пчеловодного сезона (июнь–август 2018) и трутни выращивались в пчелиных семьях (*Apis mellifera carpathica*). Каждая пчелиная семья содержала 2-летнюю королеву, естественно спарившуюся. Девять пчелосемей были случайным образом распределены на три группы. Семьям контрольной группы давали пищу, свободную от имидаклоприда (IMD), в то время как пища, вводимая в колонии из групп Р (разовый контакт с IMD) и Х (хроническое отравление IMD в течение 10 дней) была загрязнена 5 ppb отравляющего препарата. Пчелы питались сахарным сиропом (соотношение сахар к воде 5: 3). Предполагается, что IMD был передан также всем особям в улье, включая трутней. Королевы во всех ульях были временно изолированы в верхней части соторамок для создания трутневого потомства. Все королевы были сестрами, воспитанными от одной матери-королевы. Изолированные трутневые ячейки были запечатаны на 23-й день после откладки яиц, рамки с трутневым расплодом были помечены.

Появившиеся трутни были взвешены и помечены цветным маркером, а затем они были помещены в пчелиные семьи с изоляторами, где они оставались до конца изучения. Трутни оставались в колониях до 15 дней. За три-четыре часа до сбора спермы трутни отлавливались и доставлялись в лабораторию вместе с рабочими пчелами в клетках (130 × 115 × 70 мм), снабженные кормом. Масса тела трутней у всех групп была в среднем одинаковой (330,6 ± 21,5, 322,9 ± 30,3 и 321,1 ± 30,7 мг, для контроля, разовой интоксикации IMD и хроническим отравлением соответственно) и различия не были статистически значимы ($p = 0,12$). Сперма была собрана капилляром, провоцируя извлечение копулятивного органа эндофаллуса у трутней. Каждый самец давал примерно 1 мкл эякулята. Суспензии спермы с небольшим разбавлением 1:1 физиологическим раствором были взяты для анализа подвижности сперматозоидов. Подвижность сперматозоидов была оценена субъективно с использованием микроскопа Axio Imager 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия).

Определение активности АТФазы. Активность оценивали по приросту неорганического фосфата после инкубации при 370С и выражали в наномолях неорганического фосфата (Фн) отщепленного 1 мг белка в 1 мин. Активность Na^+ , K^+ – АТФазы измеряли в той же среде, заменяя 15 мМ NaCl на 15 мМ 51 KCl.

Неорганический фосфат определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 390 нм. Данный метод основан на изменении поглощения молибдата в невосстановленном комплексе фосфорномолибденовой кислоты. Он позволяет с большой точностью определять неорганический фосфор в присутствии легкогидролизуемых фосфорных эфиров.

Данные представлены в виде среднеарифметических значений. Их достоверность определяли по t-критерию Стьюдента, пользуясь программой Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Тестирование качества спермы трутней важно для контроля и понимания биологии спаривания медоносных пчел, в том числе здоровья трутней, конкуренции спермы при полиандрии пчел. Информативность единичных тестов очень ограничена для оценки качества спермы у трутней. Таким образом, подход множественного тестирования рекомендуется для того, чтобы учесть разные аспекты репродуктивного поведения трутней. Контроль качества спермы важен, чтобы оценить эффективность и / или нарушение сперматогенеза, а также оценить, насколько трутни могут потенциально оплодотворять королевы и обеспечивать продуктивность колоний. Подвижность сперматозоидов отражает как энергетическую эффективность и качество моторики аппарата; это также важно для передачи спермы королеве в сперматеке. Измерения активности АТФ-азы в сперме необходимо для косвенной оценки функции митохондрий, которые особенно важны для производства энергии во время движения спермы.

Половозрелые трутни из контрольных ульев без проблем расправляли копулятивный орган для взятия у них спермы. Под микроскопом в поле зрения сперма представляла густую подвижную массу. При действии на пчелиную семью разовой дозы имидаклоприда 5ppb у трутней наблюдали затруднения с расправлением эндофаллуса и под микроскопом наблюдали в поле зрения образование концентрических кругов из сперматозоидов, которые двигались по кругу. При хроническом употреблении имидаклоприда пчелиной семьей у трутней снижается тургор брюшка, возникают проблемы со сбором спермы. Под микроскопом сперматозоиды представляют разреженные неподвижные нитевидные образования. Изменения в состоянии спермы и копулятивного аппарата трутней могут представлять серьезную проблему для оплодотворения королевы, что может привести к сокращению численности пчелиных семей и даже гибели.

Подвижность сперматозоидов является важным параметром качества спермы [3]. Подсчитано, что только 2,5 % сперматозоидов активно мигрируют на длительное хранение в сперматеке королевы для оплодотворения. Wegener и соавт. [4] обнаружили корреляцию между подвижностью спермы и показателями производительности сперматозоидов в осеменении королевы. В нашем исследовании мы заметили значительное снижение подвижности сперматозоидов не только для трутней, которые подвергаются длительному воздействию низкой концентрации IMD, но и разовому. Сублетальные изменения в подвижности сперматозоидов не могут быть исключены, например, через совокупные эффекты низких концентраций IMD.

Изменения мембранного потенциала митохондрий могут быть чрезвычайно важными для жизнеспособности и подвижности сперматозоидов медоносных трутней [5]. Митохондрии охватывают основание жгутика сперматозоида. Активность фермента АТФазы спермы важна как параметр для оценки функции митохондрий, которые жизненно важны для производства энергии во время движения спермы. Наши результаты показали значительное воздействие IMD на активность данного показателя (табл. 1).

Таблица 1. Снижение активности АТФ-азы в сперме трутней от дозы имидаклоприда

Вариант	Активность АТФазы (нмоль/мин/мг белка)
Контроль	12,33± 0,05
5ppb разовое	5,4±0,02
5ppb хроническое	3,97±0,04

Потенциальный механизм различия в жизнеспособности сперматозоидов между колониями может быть связан также с различиями в содержании белка в семенной жидкости [6]. Возможно, такие различия отражают механизм влияния IMD на репродуктивный потенциал трутней. Это важно отметить, потому что в полевых условиях такой факт не может оказать особо заметного влияния на плодовитость королевы, так как

королевы спариваются примерно с 20-ю трутнями и могут собрать в спермаприёмнике достаточный запас жизнеспособных сперматозоидов. При таких условиях наличие достаточного количества жизнеспособных сперматозоидов может сохранить репродуктивный потенциал королевы.

Наши данные значительно дополняют эти результаты, демонстрируя, что мужское репродуктивная система также может быть нарушена неоникотиноидами. Следовательно, воздействие неоникотиноидов на медоносных пчел может потенциально нарушать репродуктивный потенциал трутней и, возможно, приведет к постепенной гибели колонии из-за плохого качества спаривания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Раннее реагирование спермы трутней на незначительное отравление неоникотиноидами помогает спрогнозировать развитие дальнейшей реакции ульевых пчел. Ранее результаты наших исследований показали, что хроническое действие имидаклоприда нарушает реакцию защитных систем рабочих пчел. Нарушается работа пищеварительного тракта и разрушение клеток жирового тела, что в целом ведет к снижению иммунитета. Нарушение структуры семенной жидкости у трутней может служить маркером раннего отравления пчел при посещении агроценозов.

Работа поддержана грантом РФФИ 19–54–70002 е-Азия_т и часть ее выполнена в рамках госзадания № 01201350736.

ЛИТЕРАТУРА

1. Dively G.P., Embrey M.S., Kamel A., Hawthorne D.J., Pettis J.S. Assessment of chronic sublethal effects of imidacloprid on honeybee colony health. PLoS ONE. 2015. 10 (3). 11–87.
2. Pisa L.W., Amaral-Rogers V., Belzunces L.P., Bonmatin J.M., Downs C.A. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. Environ. Sci. Pollut. Res. 2015.22 (1). 68–102.
3. Cresswell, J.E. A meta-analysis of experiments testing the effects of a neonicotinoid insecticide (imidacloprid) on honeybees. Ecotoxicology. 2011. 20 (1). 149–157.
4. Wegener J., May T., Knollmann U., Kamp G., Müller T. In vivo validation of in vitro quality tests for cryopreserved honeybee semen. Cryobiology. 2012. 65 (2), 126–131.
5. Ruttner F., Koeniger G. Die Füllung der Spermatheka der Bienenkönigin. Aktive Wanderung oder passiver Transport der Spermatozoen? Z. Vgl. Physiol. 1971. 72. 411–422.
6. Baer B., Zareie R., Paynter E., Poland V., Millar A.H. Seminal fluid proteins differ in abundance between genetic lineages of honeybees. J. Proteom. 2012. 75 (18). 5646–5653.