

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО РЫБОЛОВСТВУ



Дальневосточный государственный технический
рыбохозяйственный университет

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ РЕГУЛИРОВАНИЯ РЫБОЛОВСТВА

Материалы Национальной
научно-технической конференции

(Владивосток, 27–28 октября 2022 г.)

Электронное издание

Владивосток
Дальрыбвтуз
2022

УДК 639.2+338
ББК 65.35(2Р55)
НЗ4

Редакционная коллегия:

Председатель – Бойцов А.Н., канд. техн. наук, доцент, директор Института рыболовства и аквакультуры (ИР иА) ФГБОУ ВО «Дальрыбвтуз».

Зам. председателя – Матросова И.В., канд. биол. наук, доцент, зав. кафедрой «Водные биоресурсы и аквакультура», зам. директора ИРиА по научной работе.

Секретарь – Сергеева М.М., ст. преподаватель кафедры «Водные биоресурсы и аквакультура».

Баринов В.В., канд. техн. наук, доцент кафедры «Промышленное рыболовство».

Беспалова Т.В., канд. физ.-мат. наук, доцент, зав. кафедрой «Высшая математика».

Буторина Т.Е., доктор биол. наук, профессор кафедры «Экология и природопользование».

Казаченко В.Н., доктор биол. наук, профессор кафедры «Водные биоресурсы и аквакультура».

Колесникова Е.В., зав. методическим кабинетом кафедры «Прикладная математика и информатика».

Круглик И.А., канд. биол. наук, доцент, и.о. зав. кафедрой «Экология и природопользование».

Лисиенко С.В., канд. экон. наук, доцент, зав. кафедрой «Промышленное рыболовство».

Осипов Е.В., канд. техн. наук, доцент кафедры «Промышленное рыболовство».

Пилипчук Д.А., ст. преподаватель кафедры «Промышленное рыболовство».

Сергеева М.М., ст. преподаватель кафедры «Водные биоресурсы и аквакультура».

Смирнова Е.В., канд. биол. наук, доцент кафедры «Водные биоресурсы и аквакультура».

Ющик Е.В., канд. техн. наук, доцент, доцент кафедры «Прикладная математика и информатика».

Яценко Е.Н., ст. преподаватель, доцент кафедры «Прикладная математика и информатика».

Харитоновна Л.А., директор Центра публикационной деятельности «Издательство Дальрыбвтуза»

Адрес оргкомитета конференции:

690087, г. Владивосток

ул. Луговая, 52б, каб. 112 «Б»

Дальневосточный государственный технический
рыбохозяйственный университет

Телефон: (423) 290-46-46; (423) 244-11-76

[http:// www.dalrybvtuz.ru](http://www.dalrybvtuz.ru)

E-mail: ingavladm@mail.ru

НЗ4 Научно-практические вопросы регулирования рыболовства: материалы Нац. науч.-техн. конф. [Электронный ресурс]. – Электрон. дан. (38,1 Мб). – Владивосток : Дальрыбвтуз, 2022. – 240 с. – Систем. требования : PC не ниже класса Pentium I ; 128 Mb RAM ; Windows 98/XP/7/8/10 ; Adobe Reader V8.0 и выше. – Загл. с экрана.

ISBN 978-5-88871-762-2

Представлены результаты научно-исследовательских работ в области рационального использования водных биологических ресурсов, искусственного воспроизводства гидробионтов, а также освещены вопросы состояния и тенденции развития рыбохозяйственного образования.

УДК 639.2+338
ББК 65.35(2Р55)

ISBN 978-5-88871-762-2

© Дальневосточный государственный
технический рыбохозяйственный
университет, 2022

Тамара Евгеньевна Буторина

Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет, профессор, доктор биол. наук, ORCID: 0000-0001-5914-4234, Researcher ID: 6508346730, Россия, Владивосток, e-mail: boutorina@mail.ru

Использование метода инкубирования в среде Рэя RFTM для диагностики заболевания гребешка при садковом выращивании в хозяйствах Приморья

Аннотация. При проведении лабораторного исследования приморского гребешка из садковых хозяйств Приморского края методом инкубирования в среде RFTM в пробах идентифицированы гипноспоры (1–4) и трофозоиты на стадии роста и деления (от единичных до 257 экз./моллюска) возбудителя распространенного заболевания культивируемых двустворчатых моллюсков, вызываемого простейшими рода *Perkinsus*.

Ключевые слова: приморский гребешок, *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857), марикультура, садковое выращивание, инкубация, жидкая среда Рэя с тиогликолятом (RFTM), болезни двустворчатых моллюсков, диагностика, Приморье

Tamara E. Boutorina

Far Eastern State Technical Fisheries University, Professor, Doctor of Biological Sciences, ORCID: 0000-0001-5914-4234, Researcher ID: 6508346730, Russia, Vladivostok, e-mail: boutorina@mail.ru

Using the method of incubation in Ray's medium RFTM for the diagnosis of scallop disease in cage culture in the farms of Primorye

Abstract. During a laboratory study of Primorsky scallop from cage farms in Primorsky Krai by incubation in RFTM medium, hypnospores (1-4) and trophozoites at the stage of growth and division (from single to 257 ind./mollusk) of the causative agent of a common disease of cultivated bivalve mollusks were identified in samples, caused by protozoa of the genus *Perkinsus*.

Keywords: Primorsky scallop, mariculture, *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857), mariculture, cage culture, incubation, Ray's fluid thioglycollate culture method (RFTM), bivalve mollusk diseases, diagnostics, Primorye

Культивирование двустворчатых моллюсков, в том числе гребешков, устриц, мидий, наряду с ракообразными и иглокожими, является приоритетным направлением мировой аквакультуры [1] и стратегии развития рыбного хозяйства России, особенно на Дальнем Востоке и в Приморье [2, 3]. В то же время «в Приморском крае в последние годы многие предприятия столкнулись с проблемой массовой смертности товарного садкового гребешка» [4]. Впервые мы обратили внимание на эту проблему еще в 2016 г. [5], описали жизненный цикл, распространение возбудителей, признаки заболевания, однако публикация осталась незамеченной.

Как подчеркивают авторы статьи [4], анализ отмеченных случаев показывает, что они носят систематический характер, повторяются каждый год в самые теплые месяцы и поражают моллюсков в возрасте от 2 до 3 лет, после чего наблюдается определенный спад заболевания. Было высказано предположение, что мы имеем дело с развитием эпизоотической ситуации, но у авторов не было убедительных доказательств того, что болезнь вызывает биологический агент, поскольку на основании выявленных симптомов они не могли поставить точный диагноз заболевания.

Необходимо отметить, что в ихтиопатологической практике аквакультуры разработаны и обычно используются общепринятые методы диагностики заболеваний двусторчатых моллюсков [6, 7]. В связи с этим целью нашей работы было проведение диагностики заболевания гребешков в марихозяйствах Приморья, установление его этиологического агента. В задачи работы входило следующее: выбор современного стандартного метода исследования моллюсков, используемого в мировой практике, выявление симптомов и причины заболевания, анализ результатов.

Основным материалом для исследования послужили отобранные для изучения экземпляры погибших приморских гребешков из двух хозяйств мариккультуры – в Хасанском районе и на о. Русский в июле 2021 г. Всего было обследовано 11 экз. моллюсков. Для расчета общего числа паразитов в моллюске была определена масса тела без раковины (общая висцеральная масса) каждого экземпляра (таблица). Кроме того, с 2014 г. мы изучали состояние гребешков в одном из хозяйств Хасанского района и регистрировали случаи и признаки заболевания, в настоящей работе были учтены полученные данные для того, чтобы проследить развитие эпизоотии.

Для проведения анализа был использован стандартный лабораторный метод выявления источника болезни путем культивирования тканей моллюсков в жидкой среде Рея на морской воде с добавлением тиогликолята натрия (RFTM) [6, 7, 8]. Во время инкубации происходит значительное увеличение размеров и общей массы паразитов [8]. Для приготовления среды RFTM в модификации Рея готовый агар Рака-Рея № 3 для изоляции молочно-кислых бактерий, изготовленный в сертифицированной лаборатории, растворяли в природной морской воде и добавляли эмульгатор и антибиотик, затем вносили порошок тиогликолята натрия (рис. 1), все компоненты взяты в соотношении, соответствующем методике [7]. Приготовленную среду до 2 недель можно хранить в холодильнике, ее подвергают обязательной стерилизации в автоклаве (рис. 2), после охлаждения дополнительно вносят антибиотики и фунгицид для предотвращения развития бактерий и грибов, которые могут подавить развитие возбудителя болезни и затрудняют его идентификацию.

Для исследования мы брали не отдельные органы моллюсков, а всю висцеральную массу (все внутренние органы) гребешка, что значительно повышает качество исследования [9]. Ткани каждого моллюска помещали в отдельную стерильную пробирку и инкубировали в среде RFTM в течение 7 сут в темноте при температуре 22–25 °С (рис. 3). После инкубации растворы, содержащие исследуемые ткани моллюсков, центрифугировали и удалили верхний слой – супернатант (рис. 4), а навеску в 2 г из тканей каждого моллюска отдельно подвергали мацерации и перевариванию в двумолярном (2М) растворе щелочи NaOH. Полученный раствор после тщательного промывания в воде повторно центрифугировали для того, чтобы отделить остатки тканей моллюска от собственно паразитов. В результате мы получили по небольшому остатку (комочку) мягких тканей гребешка, который поместили на предметное стекло стереомикроскопа Микмед-5 и в избытке добавили свежий раствор Люголя для окраски различных стадий паразита. Далее провели микроскопическое исследование препаратов на большом увеличении микроскопа 10 x 40 и 10 x 100. Паразитов фотографировали с помощью цифровой камеры Levenhuk C800 NG, 8M pixels, USB 2,0, совмещенной с микроскопом. Для оценки паразитарной нагрузки мы оценивали общее число паразитов на разных стадиях развития в каждом моллюске, учитывая массу всех мягких тканей. При последующем анализе результатов были использованы все собранные нами в 2014–2021 гг. материалы о культивируемом в садках приморском гребешке в хозяйствах мариккультуры Приморья. Лабораторное обследование гребешков путем культивирования в среде Рея и обработка проб моллюсков были проведены на базе оборудования Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН и лаборатории кафедры «Экология и природопользование». В работе принимали участие студенты кафедры, после обработки эти данные лягут в основу выступлений, публикаций и дипломной работы студентов.

Биологические данные об изученных моллюсках

№ п/п	Общая висцеральная масса моллюска, г	Подвергнуто мацерации в 2 М NaOH, г
1	44,85	2,0
2	27,70	2,0
3	42,20	2,0
4	37,60	2,0
5	41,50	2,0
6	43,45	2,0
7	29,25	2,0
8	31,35	2,0
9	39,35	2,0
10	35,00	2,0
11	39,05	2,0



Рисунок 1 – Компоненты среды RFTM



Рисунок 2 – Стерилизация среды в автоклаве



Рисунок 3 – Термостат для инкубации моллюсков в среде



Рисунок 4 – Подготовка образцов к перевариванию в NaOH

Результаты и обсуждение

В июне 2014 г. при обследовании 27 экз. гребешков из хозяйства в Хасанском районе у трех из них (11,1 %) мы обнаружили хорошо выраженные очаги воспаления ткани мускула-замыкателя, которые имели желтовато-коричневый цвет. Такие признаки характерны для заболевания, вызываемого *Perkissus* sp., хотя не являются специфичными только для этой болезни. Микроскопическое исследование тканей этих моллюсков выявило присутствие в мазках-отпечатках мускула-замыкателя и других органах отдельных округлых образований (рис. 5), аналогичных стадии ранних, растущих трофозоитов паразита, и отдельных кольцеобразных клеток со светлой центральной частью, в которой находится большая вакуоль, и более узкой, плотной и темной периферией, куда отеснена цитоплазма клетки с ядром – так называемые клетки-кольца или клетки-перстни (рис. 6). Находки клеток паразита были редкими, единичными.

В июле 2016 г. было обследовано еще 20 экз. товарных гребешков, при этом признаки заболевания подтвердились. У семи экземпляров (35 %) найдены многочисленные трофозоиты на стадии деления (палинтомии) (рис. 7) и материнские, более крупные клетки, которые содержали дочерние трофозоиты (рис. 8), а также единичные клетки-перстни характерного строения. Клетки паразитов были особенно многочисленны в ткани жабр и гонад моллюсков (рис. 7), но встречались также ноги в ткани и других органах. Одновременно была зарегистрирована гибель 2–3-летних гребешков при садковом выращивании.

Различные органы моллюсков из этой пробы были подвергнуты генетическому анализу в специализированной лаборатории Санкт-Петербурга. К сожалению, ДНК, выделенная из темных включений в ткани моллюсков (предполагаемых паразитов), оказалась уже деградированной, непригодной для дальнейшего анализа, получить «качественный» генетический материал из этих проб не удалось.

В июле 2021 г. лабораторное обследование погибших гребешков из двух хозяйств марикультуры методом культивирования материала в среде RFTM снова подтвердило заболевание гребешков в марикультурных хозяйствах Приморского края. В трех из 11 обследованных моллюсков было обнаружено от одной до четырех гипноспор паразита в расчете на 2 г мягких тканей каждого моллюска (рис. 9). Кроме того, ткани семи моллюсков содержали делящихся трофозоитов (рис. 10) – от единичных находок до 257 экз. в одном гребешке, у одного из моллюсков ткани были полностью некротизированы, два моллюска оказались незараженными.

Мы рассчитали паразитарную нагрузку на каждого гребешка: суммарно во всей висцеральной массе одного моллюска присутствовало от 20 до 60 гипноспор и от 56 до 4800 трофозоитов.

Таким образом, использование высокочувствительного метода для диагностики заболевания позволяет с уверенностью говорить о наличии патогена рода *Perkinsus* в гребешковых хозяйствах Приморья, причем не только на ранних, питающихся тканями моллюска стадиях развития (трофозоиты), но и на стадии сформированных гипноспор, в которых формируются зооспоры для заражения новых хозяев [8, 10]. Но необходимо повторно провести молекулярную диагностику с использованием реакции PCR для того, чтобы точно диагностировать вид возбудителя заболевания [11], которое часто регистрируется в азиатских водах Тихоокеанского бассейна [12].

Полученные данные о количестве паразитов в расчете на одного моллюска говорят о сравнительно небольшой общей паразитарной нагрузке на культивируемых гребешков. В случае сильного заражения моллюсков число гипноспор только в одном поле зрения микроскопа достигает 25 [8], а общее их число значительно больше наблюдаемого в нашем случае, число же делящихся трофозоитов вообще не поддается подсчету.

Проведенное исследование подтверждает высокую эффективность использованного метода для диагностики заболевания приморского гребешка и свидетельствует о необходимости создания в Приморье стационарной, хорошо оснащенной, сертифицированной лаборатории для постоянного мониторинга состояния популяций двусторчатых моллюсков в хозяйствах марикультуры для того, чтобы успешно развивать аквакультуру в регионе.

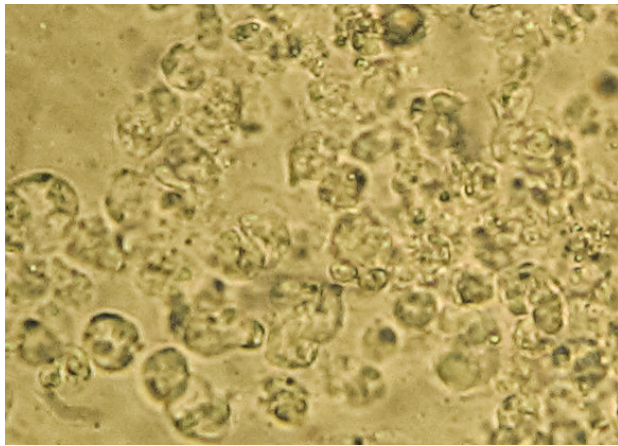


Рисунок 5 – Масса трофозитов в ткани мускула. 10 x 10

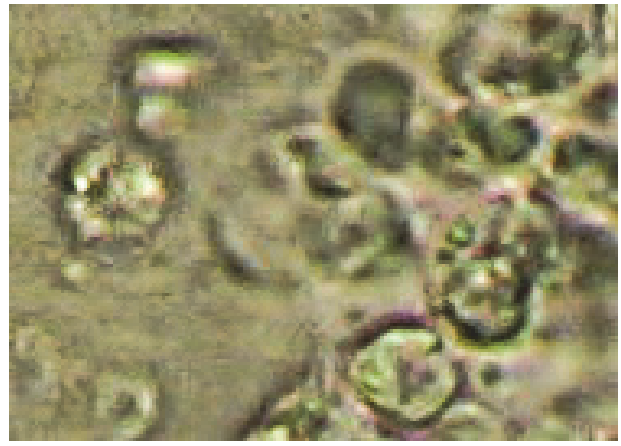


Рисунок 6 – Клетка-кольцо со светлой центральной частью

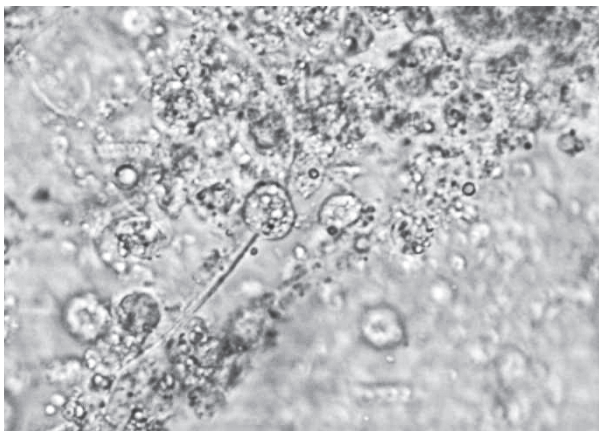


Рисунок 7 – Трофозоиты в ткани жабр. 10 x 40

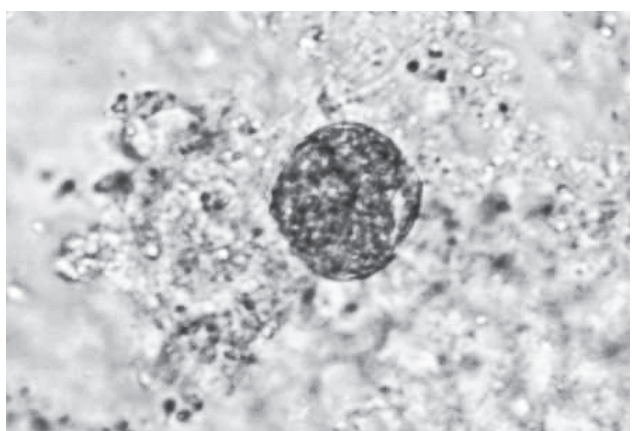


Рисунок 8 – Делящийся трофозоит, жабры. 10 x 40

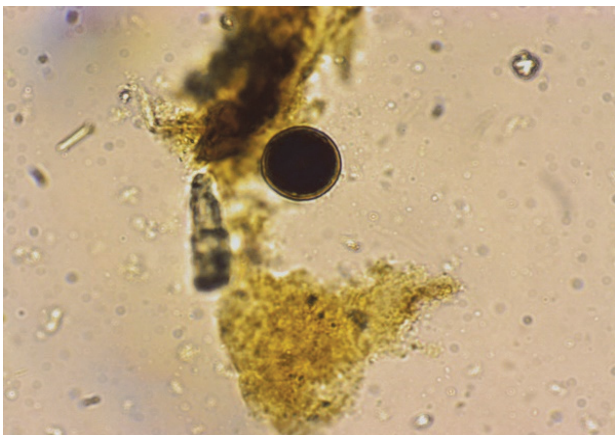


Рисунок 9 – Гишноспора паразита в ткани моллюска. 10 x 40

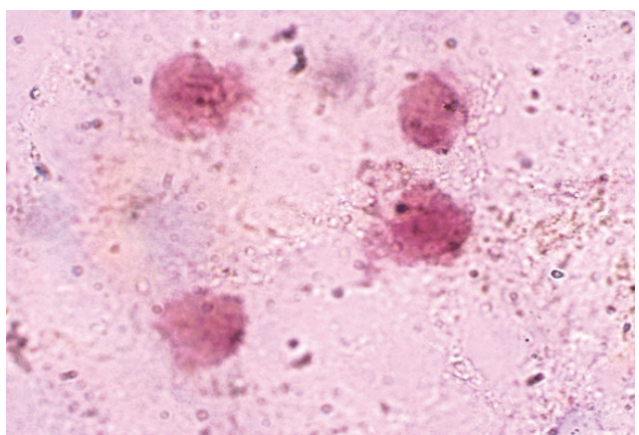


Рисунок 10 – Трофозоиты в ткани моллюска. 10 x 40

Благодарности

Выражаем благодарность доценту кафедры «Промышленное рыболовство» Елене Павловне Бровкиной и сотрудникам лаборатории ННЦМБ ДВО РАН за помощь в организации лабораторного исследования приморского гребешка в 2021 г.

Библиографический список

1. Ким И.Н., Лескова С.Е., Матросова И.В. Марикультура. М.: Моркнига, 2014. 273 с.
2. Стратегия развития рыбохозяйственного комплекса Российской Федерации на период до 2030 г. Распоряжение Правительства РФ от 26 ноября 2019 г. 2019. № 2798-р. 58 с.
3. Развитие аквакультуры в Приморье: реалии и возможности / Л.Н. Бочаров, С.Е. Поздняков, Г.С. Гаврилова и др. // Вопр. рыболовства. 2015. Т. 16, № 1. С. 7–23.
4. Бровкина Е.П., Костина Е.А. Характер протекания эпизоотий при садковом выращивании гребешка в Приморье. Перкинсус – вероятная причина возникновения данных заболеваний // Науч. тр. Дальрыбвтуза. 2020. Т. 53, № 3. С. 41–52.
5. Буторина Т.Е., Творогова Е.В. Заражение моллюсков динофлагеллятами рода *Perkinsus*: этиология, клинические признаки, распространение, диагностика // Актуальные проблемы освоения биологических ресурсов Мирового океана: материалы IV Междунар. науч.-техн. конф. Владивосток: Дальрыбвтуз, 2016. Ч. 1. С. 49–53.
6. Ray S. M. A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum*, with suggested modifications and precautions // Proceedings of the National Shellfisheries Association. 1966. Vol. 54. P. 55–69.
7. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2022. Section 2.4. Chapter 2.4.6. Infection with *Perkinsus olseni* (version adopted in May 2015). С. 473–484. Режим доступа: <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/aquatic-manual-online-access/> (дата обращения: 06.10.2022).
8. Duncan C.F., Bushek D. Development and applications of Ray’s fluid thioglycollate media for detection and manipulation of *Perkinsus* spp. pathogens of marine molluscs // J. Invertebrate Pathology. 2015. Vol. 131. P. 68–82.
9. ICES. Dermo diseases of oyster caused by *Perkinsus marinus*. Revised and updated by Susan E. Ford // ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish. 2011. Leaflet № 30. 5 p.
10. Perkinsosis in mollusks: a review / A. Villalba, K.S. Reece, M.K. Ordas et al. // Aquat. Living Resour. 2004. Vol. 17. P. 211–232.
11. Audemard C., Reece K.S., Bureson E.M. Real-Time PCR for Detection and Quantification of the Protistan Parasite *Perkinsus marinus* in Environmental Waters // Appl. Environ. Microbiology. 2004. Vol. 70, № 11. P. 6611–6618. Режим доступа: <https://www.doi.org/10.1128/AEM.70.11.6611-6618.2004>.
12. Choi K.-S., Park K.-I. Review of the Protozoan Parasite *Perkinsus olseni* (Lester and Davis, 1981) Infection in Asian Waters // Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea / Eds. A. Ishimatsu and H.-J. Lie. Nagasaki: TERRAPUB and Nagasaki Univ., 2010. P. 269–281.