

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО РЫБОЛОВСТВУ



**Дальневосточный государственный технический
рыбохозяйственный университет**

РЫБОЛОВСТВО – АКВАКУЛЬТУРА

**Материалы Национальной научно-технической
конференции студентов, аспирантов и молодых ученых**

(Владивосток, 19–20 апреля 2023 года)

Электронное издание

Владивосток
Дальрыбвтуз
2023

УДК 639.2+338
ББК 65.35(2Р55)
Р93

Организационный комитет конференции:

Председатель – канд. техн. наук, директор Института рыболовства и аквакультуры (ИРиА) ФГБОУ ВО «Дальрыбвтуз» Вальков Владимир Евгеньевич.

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

Секретарь – ассистент кафедры «Водные биоресурсы и аквакультура» Журавлева Наталья Николаевна

Адрес оргкомитета конференции:

690087, г. Владивосток

ул. Луговая 52-б, 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: matrosova.iv@dgtru.ru

Р93 Рыболовство – аквакультура : материалы Нац. науч.-техн. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых [Электронный ресурс]. Электрон. дан. (27,5 Мб). – Владивосток : Дальрыбвтуз, 2023. – 330 с. – Систем. требования : PC не ниже класса Pentium I ; 128 Мб RAM ; Windows 98/XP/7/8/10 ; Adobe Reader V8.0 и выше. – Загл. с экрана.

Представлены материалы, посвященные рациональному использованию водных биологических ресурсов, искусственному воспроизводству гидробионтов, экологическим проблемам и возможностям использования математических методов для решения биологических вопросов.

Приводятся результаты научных исследований студентов, аспирантов и молодых ученых.

УДК 639.2+338
ББК 65.35(2Р55)

УДК 639.4.09

Екатерина Дмитриевна Дёгтева

Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет,
гр. ЭПБ-412, Россия, Владивосток, e-mail: dmitrevnaekaterina@gmail.com

Научный руководитель – Тамара Евгеньевна Буторина, доктор биол. наук, профессор

**Диагностика заболевания приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis*
(Jay, 1857) в хозяйствах марикультуры Приморского края
методом инкубирования**

Аннотация. В результате обследования культивируемого приморского гребешка из садковых хозяйств Приморья был установлен возбудитель болезни – простейшие рода Perkinsus. Лабораторное исследование методом инкубирования мягких тканей моллюсков в среде RFTM показало наличие гипноспор и трофозоитов на стадии роста и деления паразита.

Ключевые слова: марикультура, приморский гребешок, *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857), садковое выращивание, перкинсозис, простейшие рода Perkinsus, инкубация, жидкая среда Рэя с тиогликоллятом RFTM, Приморский край

Ekaterina D. Degteva

Far Eastern State Technical Fisheries University, EPb-412, Russia, Vladivostok, e-mail: dmitrevnaekaterina@gmail.com

Scientific adviser – Tamara E. Butorina, Doctor of Biological Sciences, Professor

**Diagnosis of disease in the scallop *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857)
in the mariculture farms of Primorsky Krai by the incubation method**

Abstract. As a result of the examination of the cultivated seaside scallop from the cage farms of Primorye, the causative agent of the disease, a protozoan of the genus Perkinsus, was identified. A laboratory study using the method of incubation of soft tissues of mollusks in the RFTM medium showed the presence of hypnospores and trophozoites at the stage of growth and division of the parasite.

Keywords: mariculture, scallop, *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857), cage culture, perkinsozsis, protozoa of the genus Perkinsus, incubation, Ray's liquid medium with thioglycollate RFTM, Primorsky Krai

Приморский гребешок *Mizuhopecten yessoensis* является одним из наиболее ценных и перспективных объектов марикультуры в морях Дальнего Востока, распространен в Японском море и южной части Охотского моря [1, с. 50].

В последние годы в Приморском крае хозяйства марикультуры столкнулись с проблемой массовой смертности садкового гребешка [2, с. 47]. В связи с этим целью данной работы было проведение диагностики заболевания приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* в хозяйствах марикультуры Приморья. Задачи исследования включали изучение симптомов и выяснение причин заболевания моллюсков в условиях садкового выращивания; выбор и использование современного стандартного метода исследования моллюсков; анализ результатов.

Материалом для исследования послужили две выборки погибших гребешков из бухт Нарва (Хасанский район) и Воевода (о. Русский) в июле 2021 г. (рис. 1). Всего было обследовано 11 экз. моллюсков.

Для проведения лабораторного анализа использован стандартный метод выявления возбудителя болезни путем инкубирования мягких тканей моллюсков на питательной среде Рэя на морской воде с добавлением тиогликолята натрия (RFTM) [7–9].

Бухта Нарва вдается в берег между мысами Бриннера и Турек, находится к востоку – северо-востоку от мыса Бриннера. Акватория бухты имеет площадь 10,04 км². Бухта Воевода вдается в западный берег о. Русский непосредственно к юго-юго-западу от б. Филипповского. Акватория бухты имеет площадь 4 км² [11].

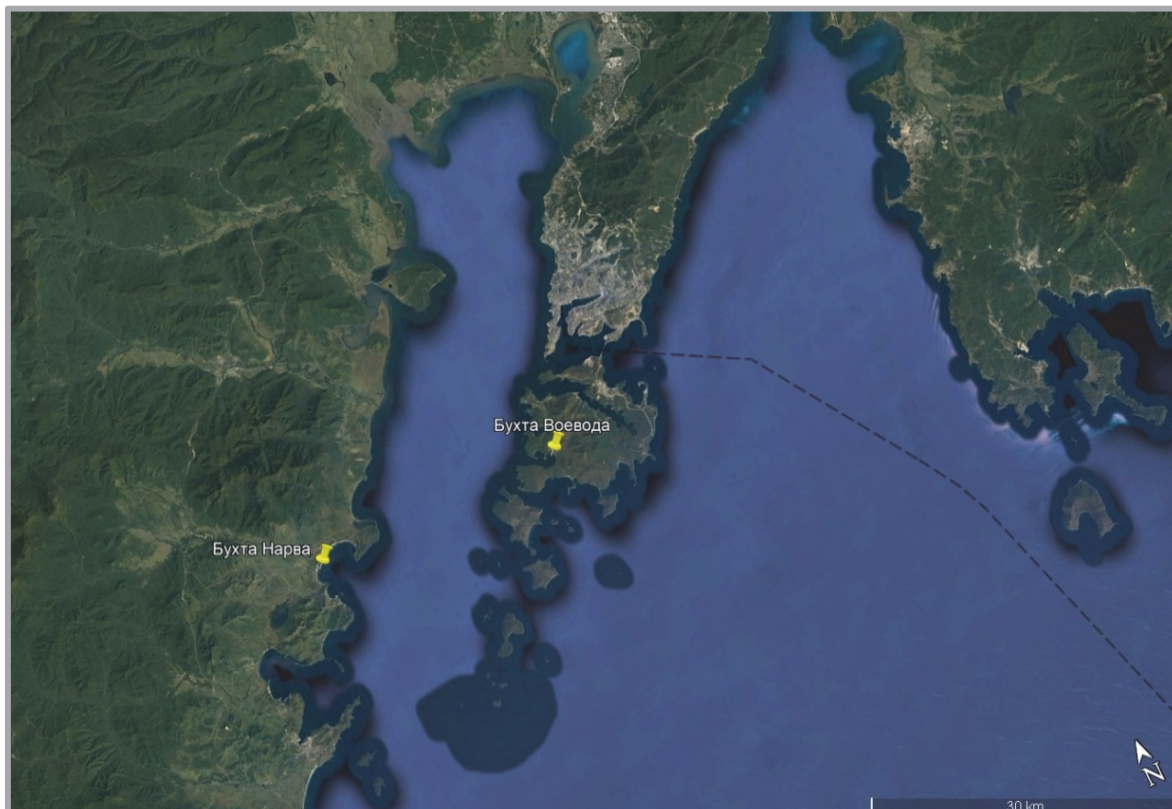


Рисунок 1 – Карта-схема отбора проб (Google Earth Pro)

Впервые в дальневосточной аквакультуре был опробован стандартный лабораторный метод инкубирования тканей моллюсков для выявления источника болезни приморского гребешка. При инкубации в жидкой среде Рэя общая масса и размер паразитов увеличиваются в несколько раз. Для проведения анализа гребешков использовалась лабораторная база ННЦМБ имени А.В. Жирмунского ДВО РАН и кафедры «Экология и природопользование».

Для приготовления среды RFTM использовали готовый агар Рака-Рэя, растворяли в морской воде и добавляли эмульгатор и антибиотики, затем вносили порошок тиогликолята натрия и фунгицид. Полученную среду подвергали стерилизации в автоклаве при температуре 121 °С. После охлаждения для того, чтобы предотвратить развитие бактерий и грибов, дополнительно вносили антибиотики и фунгицид [2, с. 48; 9, с. 358].

Для инкубации брали не отдельные органы, а всю висцеральную массу каждого моллюска, что увеличивает вероятность обнаружения возбудителя. Ткани каждого гребешка помещали в стерильную пробирку, закрывали пробкой и инкубировали пробы при 22–25 °С в темноте в течение 7 дней.

После инкубирования полученные растворы подвергали центрифугированию, а навески в 2 г помещали в двумолярный раствор NaOH при температуре 60 °С до полного растворения

мягких тканей гребешка. После этого ткани моллюсков промывали и повторно центрифугировали [2, с. 48; 9, с. 358].

После инкубации остатки тканей моллюсков помещали на предметное стекло, отбирали лишнюю жидкость, добавляли каплю свежего раствора Люголя и накрывали покровным стеклом [9, с. 358]. После этого проводили микроскопическое обследование мягких тканей моллюсков на малом и большом увеличениях ($\times 10$, $\times 40$ и $\times 100$), искали гипноспоры и трофозоиты. С помощью цифровой камеры Levenhuk C800 NG, 8M pixels, USB 2,0, совмещенной с микроскопом, были сфотографированы паразиты.

В июле 2021 г. микроскопическое обследование 11 экз. гребешков в растворе Люголя из бухт Воевода и Нарва в обеих выборках выявило присутствие в тканях моллюсков простейших рода *Perkinsus*. Это внутриклеточные паразиты, которые наиболее близки к динофлагеллятам. Они известны как возбудители болезни морских двустворчатых моллюсков «дермо», или перкинсозис, которая приводит к большим экономическим потерям в марикультуре [3, с. 49; 10, с. 1]. Размножению и развитию перкинсусу способствуют повышенные температура ($20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) и соленость ($> 15\text{ ‰}$) воды. При низких температурах (менее $18\text{ }^{\circ}\text{C}$) и солености (ниже 15 ‰) паразиты не погибают, но происходит задержка их развития [3, с. 50; 6, с. 39].

Анализ показал присутствие паразитов на разных стадиях развития: питающихся тканями хозяина (трофозоиты) (рис. 2) и размножающиеся стадии, а также покоящиеся стадии – гипноспоры (стадия, иначе называемая презооспорангием) (рис. 3), которые завершают цикл развития паразита в моллюсках [3, с. 49].



Рисунок 2 – Возбудитель клетка – кольцо (увел. 40×10)

В каждом из пяти исследованных моллюсков из б. Воевода обнаружены в основном размножающиеся паразиты (от 15–20 до 257 экз. трофозоитов) и единично – гипноспоры.

У одного из шести исследованных гребешков в б. Нарва обнаружено много черных включений отмерших тканей. В двух моллюсках обнаружены гипноспоры (2–6), а в двух других гребешках – размножающиеся паразиты. Два моллюска оказались незараженными.

В б. Нарва размножающиеся стадии протист в тканях гребешков встречались реже. Возможно, они уже перешли на более позднюю стадию – гипноспоры, а мелкие гипноспоры могли быть пропущены при микроскопическом исследовании. Наличие презооспорангиев

говорит о том, что в моллюсках протисты растут, размножаются и проходят свой жизненный цикл развития, и в них снова будут формироваться новые зооспоры, которые будут заражать новых моллюсков [3, с. 49].

В результате анализа выявлен ряд признаков болезни «дермо»: несмыкание створок раковины у больных моллюсков, развитие очагов воспаления мускула-замыкателя, а также других тканей и органов, присутствие в тканях жабр, гонад и других органов клеток паразита на стадии роста и деления, массовая гибель гребешков.

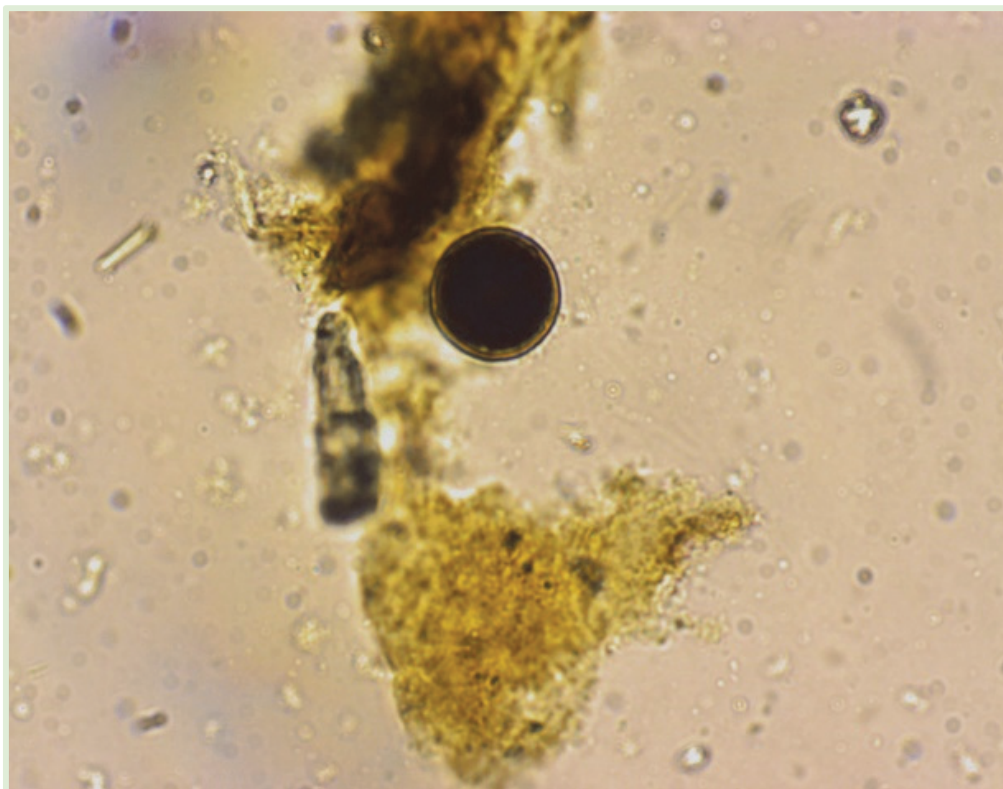


Рисунок 3 – Гипноспора в ткани гребешка (увел. 40×10)

Чтобы оценить паразитарную нагрузку на моллюсков, был произведен расчет общего числа паразитов в тканях каждого приморского гребешка и всех моллюсков в пробе (таблица).

Число паразитов во всех исследованных моллюсках из бухт Воевода и Нарва (11 экз.)

№ п/п	Общая висцеральная масса гребешка, г	Число паразитов в 2 г массы гребешка	Рассчитанное общее число паразитов во всей висцеральной массе гребешка
1	44,85	120 трофозоитов	2691 трофозоитов
2	27,7	110 трофозоитов	1524 трофозоита
3	42,2	51 трофозоит, 1 гипноспора	1076 трофозоитов, 21 гипноспор
4	37,62	257 трофозоитов	4834 трофозоита
5	41,5	217 трофозоитов	4503 трофозоита
6	43,45	черные некротизированные ткани	-
7	29,25	3 трофозоита, 1 гипноспора	44 трофозоита, 15 гипноспор
8	31,35	Не заражен	-
9	39,35	4 гипноспоры	79 гипноспор
10	35,0	Не заражен	-
11	39,05	10 трофозоитов, 2 гипноспоры	195 трофозоитов, 39 гипноспор

Из данных таблицы видно, что на одного гребешка паразитарная нагрузка составляет от 15 до 79 гипноспор и от 44 до 4834 трофозоитов. Средняя паразитарная нагрузка на одного гребешка составляет 10–15 гипноспор и около 1350 растущих и делящихся клеток паразита.

Общая паразитарная нагрузка на каждого обследуемого гребешка невысокая, поскольку найдено небольшое число презооспорангиев. Паразитарная нагрузка на одного моллюска минимальна для болезни перкинсозис (в пределах 10–15 гипноспор и не более 1500 трофозоитов).

Апробация лабораторного метода путем инкубирования тканей гребешков в питательной среде Рэя показала его высокую эффективность для диагностики заболевания моллюсков. Высокочувствительный метод позволяет выявить простейших рода *Perkinsus* в тканях моллюсков не только на ранних стадиях развития (трофозоиты), но и на стадии гипноспоры [2, с. 50].

Таким образом, паразиты рода *Perkinsus* отмечены в двух исследуемых бухтах, но в б. Воевода они были преимущественно на более ранней стадии бесполого размножения. Но небольшое число гипноспор было обнаружено. В б. Нарва протисты были преимущественно на более поздней стадии, в основном уже образования гипноспор. Можно предположить, что в б. Нарва найдено больше гипноспор (поздних стадий), чем в б. Воевода, так как б. Нарва находится западнее, чем б. Воевода. У западного берега Амурского зал. температура воды всегда выше, чем у восточного [4], а высокая температура является главным условием для развития и распространения простейших рода *Perkinsus*.

Чтобы снизить риск развития болезни перкинсозис, необходимо использовать разреженные посадки моллюсков, не выбрасывать в море больных и погибших гребешков, избегать расселения привозной молодежи, при обнаружении признаков заболевания проводить проверку на обнаружение возбудителя болезни «дермо», проводить ранний сбор молодежи минимального товарного садкового размера [5, с. 51; 6, с. 40.]. Предприятия, которые занимаются садковым разведением моллюсков, должны разрабатывать меры профилактики сообща для эффективного развития марикультуры в Приморье.

В настоящее время не существует вакцины от болезни «дермо» [3, с. 52]. Все известные лекарственные препараты находятся на стадии разработки и исследования. Необходимо провести дальнейшие их исследования с инфицированными и неинфицированными моллюсками, чтобы изучить их воздействие на простейших рода *Perkinsus*. Обязательно провести их апробацию для приморского гребешка, а также поиск и разработку новых лекарственных средств.

Библиографический список

1. Евсеев Г.А., Яковлев Ю.М. Двустворчатые моллюски дальневосточных морей. Владивосток : ПК «Поликон», 2006. 120 с.
2. Буторина Т.Е. Использование метода инкубирования в среде Рэя RFTM для диагностики заболевания гребешка при садковом выращивании в хозяйствах Приморья // Научно-практические вопросы регулирования рыболовства : сб. науч. статей. Владивосток : Дальрыбвтуз, 2022. Ч. 1. С. 47–52.
3. Буторина Т.Е., Творогова Е.В. Заражение моллюсков динофлагелятами 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.
4. Лоция 1401. Северо-западный берег Японского моря [Электронный ресурс]. URL : <http://parusa.narod.ru/bib/books/fareast/1401.htm> (дата обращения : 16.03.2023).
5. 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. Вып. 3. С. 41–52.
6. Буторина Т.Е., Кулепанов В.Н., Зверева Л.В. Болезни и паразиты культивируемых и промысловых беспозвоночных и водорослей. СПб. : Изд-во «Лань», 2018. 124 с.

7. 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.

8. 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.

9. International Office of Epizootics. Aquatic Animal Health Standards Commission. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. Paris, France: Office International des epizooties, 2009. P. 358.

10. ICES (International Council for the Exploration of the Sea). *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.

11. <http://portal.esimo.ru/portal> – официальный сайт портала Единой государственной системы информации об обстановке в Мировом океане (ЕСИМО) (дата обращения : 10.07.2022).