

УДК 576.893.194

## О МЕТОДИКАХ ИЗУЧЕНИЯ АКТИНОСПОРЕЙНОЙ ФАЗЫ РАЗВИТИЯ МИКСОСПОРИДИЙ

© В. Н. Воронин, А. С. Дудин

ФГНУ «Государственный научно-исследовательский институт  
озерного и речного рыбного хозяйства»  
наб. Макарова, 26. С.-Петербург, 199053  
E-mail: niorkh@mail.ru  
Поступила 08.04.2010

Приводятся литературные и оригинальные данные о методиках изучения актиноспорейной фазы развития миксоспоридий.

*Ключевые слова:* миксоспоридии, актиноспоры, методы, жизненный цикл.

За прошедшие 25 лет знания о типе Мухозоа претерпели кардинальные изменения. Укоренившееся с момента описания миксоспоридий и подтвержденное рядом экспериментов мнение о моноксенности их жизненных циклов оказалось неверным. По современным данным, представители класса Мухоспорея — в основном паразиты рыб, и класса Актиноспорея — в основном паразиты пресноводных олигохет, являются не самостоятельными организмами, а лишь разными стадиями единого жизненного цикла. Авторами этого открытия стали американские ученые Вольф и Маркив (Wolf, Markiw, 1984), заразившие пресноводных олигохет рода *Tubifex* спорами *Mухosoma (Mухobolus) cerebralis* возбудителя вертежа форели. В организме олигохет сформировались споры актиноспоридий, которые в свою очередь, выйдя в воду, заразили мальков форели с образованием спор *M. cerebralis*.

После первой негативной реакции многих протозоологов на это сообщение последовали многочисленные опыты по заражению олигохет спорами как этого, так и других видов миксоспоридий. В итоге к настоящему времени участие олигохет, а также полихет и мшанок в жизненном цикле миксоспоридий экспериментально подтверждено более чем для 30 видов многих родов этих паразитов (Lom, Dykova, 2006). В соответствии с современными знаниями возникла необходимость в реформировании типа Мухозоа. Группой исследователей было предложено временно не менять систему класса Мухоспорея с сохранением видовых названий паразитов по причине того, что миксоспорейная фаза развития изучена гораздо лучше

(известно более 2000 видов), чем актиноспорейная фаза (известно около 180 видов). Одновременно предложено ликвидировать класс Actinosporea с заменой родового уровня на статус сборной группы (collective group names) без указания ранее данных видовых названий (Kent et al., 1994). При этом некоторые из зарубежных ученых не исключают, что для отдельных видов миксоспоридий возможно наличие моноксенного жизненного цикла (Diamant, 1997).

Очевидно, что в данной ситуации возникла необходимость вновь вернуться к изучению миксоспоридий, но на новом уровне и с обязательной проверкой наличия у конкретных видов миксоспоридий актиноспорейной фазы развития с ее подробным описанием. Сведения о находках актиноспор в России содержатся лишь в работах Успенской (Uspenskaya, 1995) и одного из авторов этого сообщения (Дудин, 2007). Причем в вышеупомянутых публикациях, а также в литературных обзорах на данную тему (Успенская, 1993; Пугачев, 2007) практически отсутствует информация о методических приемах работы с актиноспорами. В связи с этим данной публикации не только привести современные зарубежные данные, но и поделиться собственным опытом в этой области исследований.

Подробные рекомендации по описанию актиноспорейной фазы развития миксоспоридий для получения сопоставимых данных опубликованы в 1997 г. группой зарубежных протозоологов (Lom et al., 1997). В ней четко определены морфологические признаки различных стадий, в первую очередь споры, порядок их описания и терминология. Актуальность подобной работы обусловлена существующим до этого в литературе разным подходом при характеристике актиноспор, вносящим путаницу и затрудняющим сравнение с ранее описанными формами. При современном изучении актиноспор необходимо приводить данные как по трофическим и спорогенным стадиям, так и по морфологии спор. Доспоровые стадии на заключительном этапе своего развития представлены панспороцистами, которые изучаются на гистологическом или электронно-микроскопическом уровнях. При этом выявляют также и локализацию паразитов в организме олигохет, которая возможна в эпителии кишечника, мышечном слое или целомической полости. У выходящих из организма олигохет спор в воде происходит распрямление отростков, завершающее морфогенез, и споры приобретают окончательный вид. Актиноспоры в зависимости от их принадлежности к той или иной сборной группе имеют разное строение, но общим для всех спор является трехлучевая симметрия при наличии трех створок. В результате любая спора состоит из тела (собственно спора) и 3 отростков разной формы и длины (см. рисунок, вкл., А, Б). В верхней (апикальной) части тела споры располагаются три полярные капсулы, внутри которых находятся свернутые полярные нити, число витков которых имеет диагностическое значение. Дистальнее полярных капсул в теле споры располагается спороплазма, представляющая собой плазмодий, включающий от одной до сотен дочерних вторичных клеток (см. рисунок, В). Количество вторичных клеток рассматривается как важный диагностический признак актиноспор. У представителей сборной группы *Triactinomyxon* от тела споры вниз отходит прямой отросток, называемый стилем (англ. style), от которого в свою очередь отходят три длинных каудальных отростка (см. рисунок, А, Б). При описании актиноспор всех сбор-

ных групп, и в особенности *Triactinomyxon* как самой многочисленной и достаточно единообразной по строению, особое значение придается морфометрии. В обязательном порядке измеряют длину и ширину тела споры, полярных капсул, стилиа и каудальных отростков, а их форму представляют в виде рисунков и фотографий. В дополнении к световым и электронно-микроскопическим исследованиям актиноспор все активнее внедряется их идентификация на молекулярно-генетическом уровне путем сравнения последовательностей нуклеотидов рРНК (Hallett et al., 2004).

В ходе нашей работы с актиноспорами сделано несколько практических наблюдений, важных при их описании. В первую очередь для исследования необходимо использовать только недавно выделенные олигохетами споры, так как по мере пребывания в воде возможны изменения в морфологии. Главным образом отмечается набухание спороплазмы, которая, переходя в переднюю часть стилиа, значительно (иногда в 2 раза) увеличивает длину тела споры. Со временем разрушаются каудальные отростки актиноспор, особенно у представителей группы *Triactinomyxon*, в результате их плавучесть снижается и они концентрируются у дна. Также надо иметь в виду, что период выделения спор из олигохет обычно очень короткий (1—2 недели) и на заключительном этапе в воду выводится большое количество незрелых или уродливых форм.

Таким образом, для получения достоверных морфометрических данных необходимо не только проводить большое число измерений, но и правильно проводить отбор самих спор для исследования. Кроме того, сам процесс измерения спор достаточно трудоемок и имеет свою специфику, которая заключается в том, что измеряются живые, а не фиксированные споры. Изучение мазков, окрашенных по Романовскому—Гимза, может дополнять описание, но не является основным. Измерения живых спор необходимо проводить при разных увеличениях микроскопа и достаточно быстро, так как из-за высыхания воды покровное стекло придавливает споры и их ширина увеличивается, что может исказить результаты промеров. Облегчает работу по измерению спор, особенно при больших увеличениях микроскопа, приготовление так называемых водных препаратов, что ранее было предложено при изучении микроспоридий (Воронин, Исси, 1974). Суть методики заключается в предотвращении высыхания воды под покровным стеклом посредством обмазывания его краев разогретой желатин-глицериновой смесью. Также значительно облегчает работу со спорами внесение в воду небольшого количества метиленового синего. Слабый раствор этого красителя слегка подкрашивает стиль и каудальные отростки спор, контрастируя их, и сильно окрашивает тело споры, что позволяет не только легко выявлять актиноспоры в воде, но и облегчает процесс их измерений (см. рисунок, А). При последующем добавлении подкисленного спирта происходит обесцвечивание основных структур споры и четко выявляются вторичные клетки спороплазмы, что делает возможным их подсчет (см. рисунок, В).

Актиноспоры, как материал для исследований, могут быть получены двумя путями. Первый путь — полевой, т. е. сбор олигохет из естественных водоемов, где обитают рыбы, зараженные микроспоридиями, с последующим их выдерживанием в лабораторных условиях с периодическим просмотром воды, в которой они содержатся. Второй путь — эксперимен-

тальный, т. е. заражение лабораторной популяции олигохет спорами конкретного вида микроспоридий с длительным периодом ожидания выхода актиноспор в воду. В многочисленных зарубежных публикациях присутствуют оба направления исследований, преследующих разные цели. В первом случае это в основном экологическое направление, а во втором — таксономическое. Приоритетным в настоящее время представляется последнее, так как только после полного изучения жизненного цикла конкретных видов микроспоридий можно говорить о их валидности.

Кратко остановимся на методических приемах этих направлений исследований. Большинство из известных к настоящему времени актиноспоридий развиваются в пресноводных олигохетах сем. *P. Tubificidae*. Методики сбора олигохет подробно изложены в отечественной литературе (Жадин, 1960) и нет необходимости в их специальном описании. Как показали наши исследования, основное правило при сборе олигохет для их последующего содержания в лабораторных условиях — минимальное травмирование червей, желательно без промывки грунта через мелкочаеистые сита или газ, что применяется большинством зарубежных исследователей. Черви с поврежденными покровами обычно гибнут через 1, 2 дня, а этого времени недостаточно для того, чтобы развивающиеся в них стадии актиноспорейной фазы дозрели и в виде полностью сформированных спор выделились в большом количестве в воду. Наиболее оптимальный вариант — сбор червей при промывке отобранного в водоеме грунта струей воды в белой кювете или разбор пробы в чашке Петри с небольшим количеством воды под контролем стереомикроскопа. При большом количестве олигохет сем. *Tubificidae* в грунте возможен их массовый отбор при размещении собранного ила в виде пласта в большие кюветы с небольшим количеством воды и выдерживанием при комнатной температуре в темноте около 12—24 ч. Выползающие в воду черви образуют скопления, которые легко собрать и перенести в небольшие емкости с водой. В последующие 24 ч проводится интенсивная промывка отобранной пробы олигохет с удалением остатков грунта и погибающих червей. В последующие дни проводится завершающая промывка червей с заменой воды 1—2 раза в сутки при постоянной аэрации воды с использованием компрессоров для аквариумов. Как при сборе проб в природе, так и при лабораторном содержании червей необходим контроль температуры воды.

Следующим этапом является выявление зараженных олигохет, для чего их рассаживают по чашкам Петри с водой. Наша практика показала, что в одной чашке хорошо выживают в течение длительного срока от 100 до 200 червей при регулярной смене воды. Оптимальный срок выдерживания олигохет в подобных условиях — 2—3 мес. при температуре не ниже 20 °С. Перед заменой воды в каждой чашке обычно 1 раз в два дня проводится ее исследование на наличие актиноспор. Исследуется вода в самой чашке по всей ее глубине от дна до поверхности, так как споры разных форм актиноспоридий обладают различной способностью к парению в воде. Наилучшие результаты по выявлению спор дает просмотр в стереомикроскопе в проходящем свете при объективе 4 и окуляре 12.5. При правильно подобранном освещении хорошо заметны как тела актиноспор, обычно в виде ярко светящихся коротких палочек, так и хвостовые отростки в виде полупрозрачных теней. Затем проводится отлов спор пипеткой с

последующим их просмотром под разными увеличениями обычного микроскопа. При положительном результате осуществляется индивидуальное рассаживание червей в лунки вирусологических или серологических планшетов, заполненных небольшим количеством воды, что позволяет выявить как отдельных зараженных особей, так и определить уровень заражения олигохет. Данный методический прием был предложен японскими исследователями еще в 1991 г. (Yokoуama et al., 1991). После завершения подобной процедуры незараженные особи снова возвращаются в чашку Петри с чистой водой для последующего наблюдения, а зараженные черви содержатся индивидуально в небольшом объеме воды, что позволяет создать высокую концентрацию актиноспор в воде и облегчает их отбор для последующей работы.

В большинстве зарубежных работ схема по проведению экспериментов с заражением олигохет спорами микроспоридий обычно подробно описана. В ходе заражения общепринято одноразовое внесение в воду большого числа спор микроспоридий и использование значительного количества стерильных червей. Также необходимо создать хорошие условия содержания олигохет в ходе опытов длительностью до полугода. Обязательными являются наличие ила, регулярная подкормка червей небольшим количеством рыбного корма и аэрация воды. Стандартная температура воды около 20 °С. В ходе наших предварительных опытов температура воды колебалась в пределах 21—25 °С. В результате появления первых актиноспор было отмечено уже через 1 мес., хотя обычный срок развития актиноспорейной фазы в организме олигохет составляет около 3 мес.

#### С п и с о к л и т е р а т у р ы

- Воронин В. Н., Исси И. В. 1974. О методиках работы с микроспоридиями. *Паразитология*. 8 (3) : 272—273.
- Дудин А. С. 2007. Первое сообщение о нахождении актиноспоридий в олигохетах из водоемов Санкт-Петербурга и Ленинградской области. *Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов*. Борок. Матер. Междунар. науч. конф. 216.
- Жадин В. И. 1960. Методы гидробиологического исследования. М.: Высш. шк. 191 с.
- Пугачев О. Н. 2007. Тип Мухозоа. В кн.: *Протисты*. Руководство по зоологии. Ч. 2. СПб.: Наука. 1045—1082.
- Успенская А. В. 1993. Новые проблемы в изучении Мухозоа. *Паразитология*. 27 (5) : 369—374.
- Diamant A. 1977. Fish-to-fish transmission of a marine myxosporean. *Dis. Aquat. Org.* 30 (2) : 99—105.
- Hallet S. L., Atkinson S. D., Erseus C. 2004. El-Matbouli. M. Molecular methods clarify morphometric variation in triactinomyxon spores (Myxozoa) released from different oligochaete hosts. *Syst. Parasitol.* 57 (1) : 1—14.
- Kent M. L., Margolis L., Corliss J. O. 1994. The demise of a class of protists: taxonomic and nomenclatural revisions proposed for the protest phylum Myxozoa Grasse, 1970. *Can. Journ. Zool.* 72 : 932—937.
- Lom J., McGeorge J., Feist S. W., Morris D., Adams A. 1997. Guidelines for the uniform characterization of the actinosporean stages of parasites of the phylum Myxozoa. *Dis. Aquat. Org.* 30 (1) : 1—9.
- Lom J., Dykova Y. 2006. Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitol.* 53 (1) : 1—36.

- Uspenskaya A. V. 1995. Alternation of actinosporean and myxosporean phases in the life cycle of *Zschokkella nova* (Myxozoa). *Journ. Eukariot. Microbiol.* 42 : 665—668.
- Wolf K., Markiw M. E. 1984. Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Science.* 225 : 1449—1452.
- Yokoyama H., Ogawa K., Wakabayashi H. 1991. A new collection method of actinosporeans — a probable infective stage of myxosporeans to fish — from tubificids and experimental infection of goldfish with the actinosporean *Raabeia* sp. *Gyobu Kenkyu.* 28 : 135—139.

ON THE METHODS OF INVESTIGATION OF THE ACTINOSPOREAN  
DEVELOPMENTAL PHASE OF MYXOSPORIDIANS

V. N. Voronin, A. S. Dudin

*Key words:* myxosporidia, actinosporean stage, methods, life cycle.

S U M M A R Y

The paper describes the techniques of the actinospores investigation under field and laboratory conditions. The methylene blue solution for staining of actinospore processes and estimating of daughter cells of sporoplasm is proposed.

---