

УДК 639.4.09

ЗАБОЛЕВАНИЕ ПРИМОРСКОГО ГРЕБЕШКА *MIZUHOPECTEN YESSOENSIS* (JAY, 1857) В ХОЗЯЙСТВАХ МАРИКУЛЬТУРЫ ПРИМОРЬЯ, ВЫЗЫВАЕМОЕ ПРОСТЕЙШИМИ РОДА *PERKINSUS* LEVINE, 1978

© 2023 г. Т. Е. Буторина¹, * (ORCID: 0000-0001-5914-4234), Е. Д. Дегтева¹ (ORCID: 0009-0007-0989-4599)

¹Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет,
Владивосток, 690087 Россия

*e-mail: boutorina@mail.ru

Поступила в редакцию 01.12.2022 г.

После доработки 14.04.2023 г.

Принята к публикации 08.06.2023 г.

Приведены результаты обследования культивируемого гребешка *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857) в Приморском крае в 2014–2021 гг. Отмечена гибель моллюсков в хозяйствах марикультуры, изучены симптомы болезни “дермо”: высокая смертность гребешка, достигшего двухлетнего возраста, наблюдаемая при осенней пересадке в новые садки в сентябре, присутствие простейших рода *Perkinsus* Levine, 1978 в тканях органов, очаги повреждения мускула-замыкателя, несмыкание створок раковины, почернение, некроз мягких тканей. Установлен минимальный уровень паразитарной нагрузки: 10–15 гипноспор паразита на одного моллюска. Однако, учитывая опасность заболевания, вызывающего массовую гибель моллюсков в течение нескольких лет, быстрое распространение возбудителя, существенные экономические потери, рекомендовано создать в регионе специализированную лабораторию для проведения диагностики и постоянного мониторинга состояния хозяйств марикультуры.

Ключевые слова: марикультура, разведение двустворчатых моллюсков, болезнь “дермо”, перкинсонис, простейшие рода *Perkinsus*, Приморский край

DOI: 10.31857/S0134347523050066, EDN: EOIUZP

Аквакультура приобретает все большее значение для Приморского края в связи с его растущей ролью в решении задач модернизации рыбохозяйственного комплекса России (Бочаров и др., 2015).

В Приморье, как одном из перспективных регионов Дальнего Востока, предусмотрено значительное увеличение объемов марикультуры, включающей культивирование водорослей-макрофитов, двустворчатых моллюсков, иглокожих (Гаврилова, 2005; Макоедов, 2006; Ким и др., 2014). Вместе с тем существуют серьезные проблемы, которые ограничивают возможности воспроизводства гидробионтов и требуют принятия срочных мер. К ним относятся болезни рыб, моллюсков, ракообразных и водорослей (Воронин и др., 2011; Буторина и др., 2018).

Приморский гребешок *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857) остается излюбленным объектом культивирования (Брыков, Колотухина, 2010; Лагунова и др., 2010; Гаврилова, Кучерявенко, 2011; Габаев, Айздайчер, 2012; Гаврилова, Ким, 2016). Однако в последнее десятилетие многие арендаторы рыбодных участков в Приморье сталкиваются с про-

блемой повышенной гибели моллюсков при садковом выращивании (Буторина, Творогова, 2016; Бровкина, Костина, 2020; Гаврилова и др., 2021).

Целью нашей работы было изучение симптомов и выяснение причин заболевания моллюсков в условиях подвешного выращивания. Задачи исследования включали сбор данных о случаях заболевания приморского гребешка в хозяйствах Приморья в 2014–2021 гг., выбор и использование методики обследования, принятой в мировой аквакультуре, анализ полученных данных.

Материал и методика. В основу работы положен материал, собранный при обследовании *Mizuhopecten yessoensis* с признаками заболевания и свежепогибших экземпляров из садковых хозяйств Приморья в бухтах Северная (42°56'13.204" N, 131°24'26.604" E), Нарва (42°59'56.613" N, 131°30'58.040" E) (Хасанский район) и Воевода (42°59'44.124" N, 131°47'33.972" E) (о-в Русский) в июне–июле 2014, 2016 и 2021 гг. (табл. 1).

Скрининг на присутствие паразитов в 2014 и 2016 гг. проводили путем микроскопического обследования тканей жабр, мантии, гонад, мускула-замыкателя, ноги, пищеварительной железы гре-

Таблица 1. Доля зараженного приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis* и симптомы заболевания, вызываемого простейшими рода *Perkinsus*

Район исследования, месяц, год	Число обследованных моллюсков, экз.	Число зараженных моллюсков, экз. (%)	Признаки заболевания
Бухта Северная, июнь 2014	27	3 (11.1)	Гибель моллюсков, очаги повреждения мускула-замыкателя, несмыкание створок раковины из-за ослабления мускула-замыкателя, некроз мягких тканей
Бухта Северная, июль 2016	20	7 (35.0)	
Бухта Воевода, июль 2021	5	5 (100)	
Бухта Нарва, июль 2021	6	4 (66.7)	

Таблица 2. Число паразитов в исследованных приморских гребешках *Mizuhopecten yessoensis*

№ моллюска	Масса мягких тканей, г	Число паразитов в 2 г массы	Рассчитанное число паразитов во всей висцеральной массе
1	44.85	120 трофозоитов	2691 трофозоит
2	27.70	110 трофозоитов	1524 трофозоида
3	42.20	51 трофозоит, 1 гипноспора	1076 трофозоитов, 21 гипноспора
4	37.60	257 трофозоитов	4832 трофозоида
5	41.50	217 трофозоитов	4503 трофозоида
6	43.45	*	Число паразитов не определяемо
7	29.25	3 трофозоида, 1 гипноспора	44 трофозоида, 15 гипноспор
8	31.35	**	0
9	39.35	4 гипноспоры	79 гипноспор
10	35.0	**	0
11	39.05	10 трофозоитов, 2 гипноспоры	195 трофозоитов, 39 гипноспор

*Ткани черные, некротизированные.

**Не заражен.

бешка с использованием микроскопа для морфологических исследований МИКМЕД-5 (ЛОМО, Россия). В 2021 г. дополнительно применяли метод инкубации мягких тканей моллюсков в жидкой среде RFTM (Ray's fluid thioglycollate media) (Ray, 1966; Dungan, Bushek, 2015), который имеет высокую чувствительность к *Perkinsus* spp. (Manual of Diagnostic Tests..., 2023).

Исследование методом инкубации тканей включало приготовление свежей среды RFTM на основе агара Рака-Рея № 3, разведенного морской водой с добавлением тиогликолята натрия, антибиотиков и фунгицида (Manual of Diagnostic Tests..., 2023).

При инкубации мягких тканей моллюска в среде RFTM при температуре 22–25°C в течение 7 сут наблюдали рост массы и объема паразитов (Dungan, Bushek, 2015). В качестве образцов для исследования использовали всю висцеральную массу каждого моллюска, а не отдельные органы, что увеличивало вероятность обнаружения возбудителя (Manual of Diagnostic Tests..., 2023).

Для концентрирования клеток паразита полученную после инкубирования массу центрифугировали с ускорением 1500 g в течение 10 мин при комнатной температуре и отделяли верхний слой жидкости. После перемешивания материала из каждой пробирки брали навеску в 2 г и подвергли гидролизу в 2 М NaOH при температуре 60°C до полного растворения тканей моллюска (около 6 ч). После промывания и повторного центрифугирования (условия те же) остаток образца помещали на предметное стекло, окрашивали свежим раствором Люголя и просматривали на малом ($\times 100$) и большом увеличении ($\times 400$, $\times 1000$) микроскопа. Фотографии разных стадий паразита получали на микроскопе МИКМЕД-5 с помощью цифровой камеры Levenhuk C800 NG 5M pixels (Levenhuk, Китай), помещенной в тубус микроскопа на место окуляра с выводом изображения на монитор. Диагностику заболевания проводили на лабораторной базе Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского (ННЦМБ) ДВО РАН и кафедры “Экология

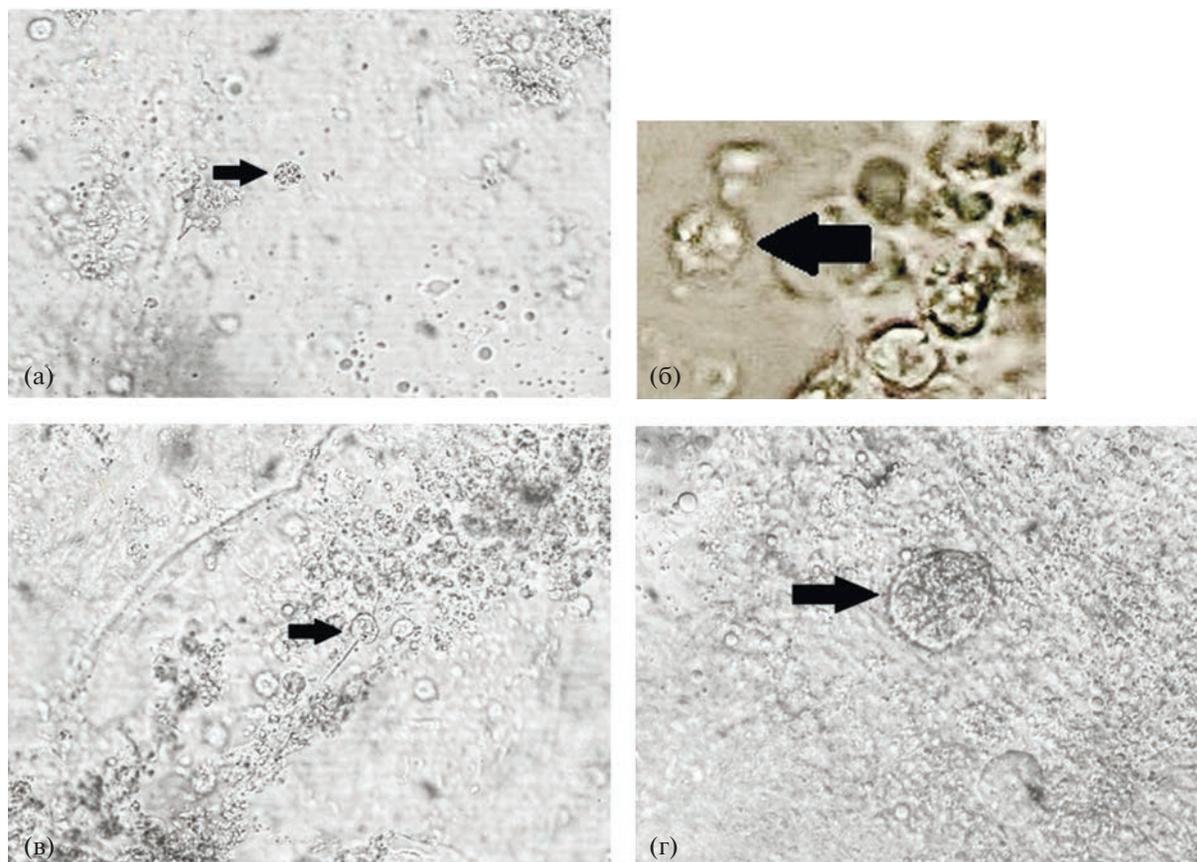


Рис. 1. Неокрашенные трофозоиты *Perkinsus* sp. (указаны стрелкой) в тканях приморского гребешка *Mizuhopecten yessoensis*: в жабрах, 2014 г. (а); клетка-кольцо (“перстень с печаткой”) с крупной вакуолью в центре, образованной паразитом, 2014 г. (б); в ткани жабр, 2016 г., увеличение $\times 400$ (в); в ткани ноги, 2016 г., увеличение $\times 1000$ (г).

и природопользование” Дальневосточного государственного технического рыбохозяйственного университета.

Уровень инфицирования *M. yessoensis* выражали в доле зараженных особей в выборке (табл. 1). Для оценки общей паразитарной нагрузки на одного гребешка в поле зрения микроскопа на препаратах подсчитывали число паразитов на стадии трофозоида и гипноспоры, найденных в 2 г массы каждого экземпляра, и пересчитывали на всю висцеральную массу моллюска (табл. 2).

Результаты. В июне 2014 г. 3 из 27 обследованных особей *Mizuhopecten yessoensis* (11.1%) (табл. 1) имели заметные невооруженным глазом очаги повреждения мускула-замыкателя диаметром 5–7 мм. В тканях мышц и мантии были обнаружены растущие и делящиеся трофозоиты простейшего рода *Perkinsus* Levine, 1978 (рис. 1а). Единично найдены клетки моллюска, содержащие трофозоида, характерной формы для болезни “дермо” с крупной вакуолью, образованной патогеном (рис. 1б).

В июле 2016 г. было заражено 7 из 20 обследованных моллюсков (35%). В тканях жабр и гонад

гребешков найдены многочисленные паразиты на разных стадиях развития — от мелких клеток до многоклеточных образований, окруженных общей оболочкой и содержащих дочерние трофозоиты (рис. 1в, 1г). Реже паразиты отмечены в мышечной и других тканях моллюсков.

В июле 2021 г. все 5 исследованных моллюсков из б. Воевода оказались зараженными, в б. Нарва инфицированы 4 из 6 гребешков (66.7%), у одного все ткани были отмершие, черные. Две особи оказались незараженными (табл. 1).

На окрашенных раствором Люголя препаратах тканей гребешков после инкубации в среде RFTM были выявлены многочисленные трофозоиты и гипноспоры паразита (рис. 2а–2г).

Подсчет общего числа паразитов в мягких тканях каждой особи показал, что паразитарная нагрузка на одного моллюска составляет от 15 до 79 гипноспор и от 44 до 4832 трофозоитов *Perkinsus* sp. (табл. 2). Средняя паразитарная нагрузка на одного гребешка — 10–15 гипноспор и около 1300 растущих и делящихся клеток паразита.

Обсуждение. Простейшие организмы рода *Perkinsus* известны как возбудители болезни “дермо”

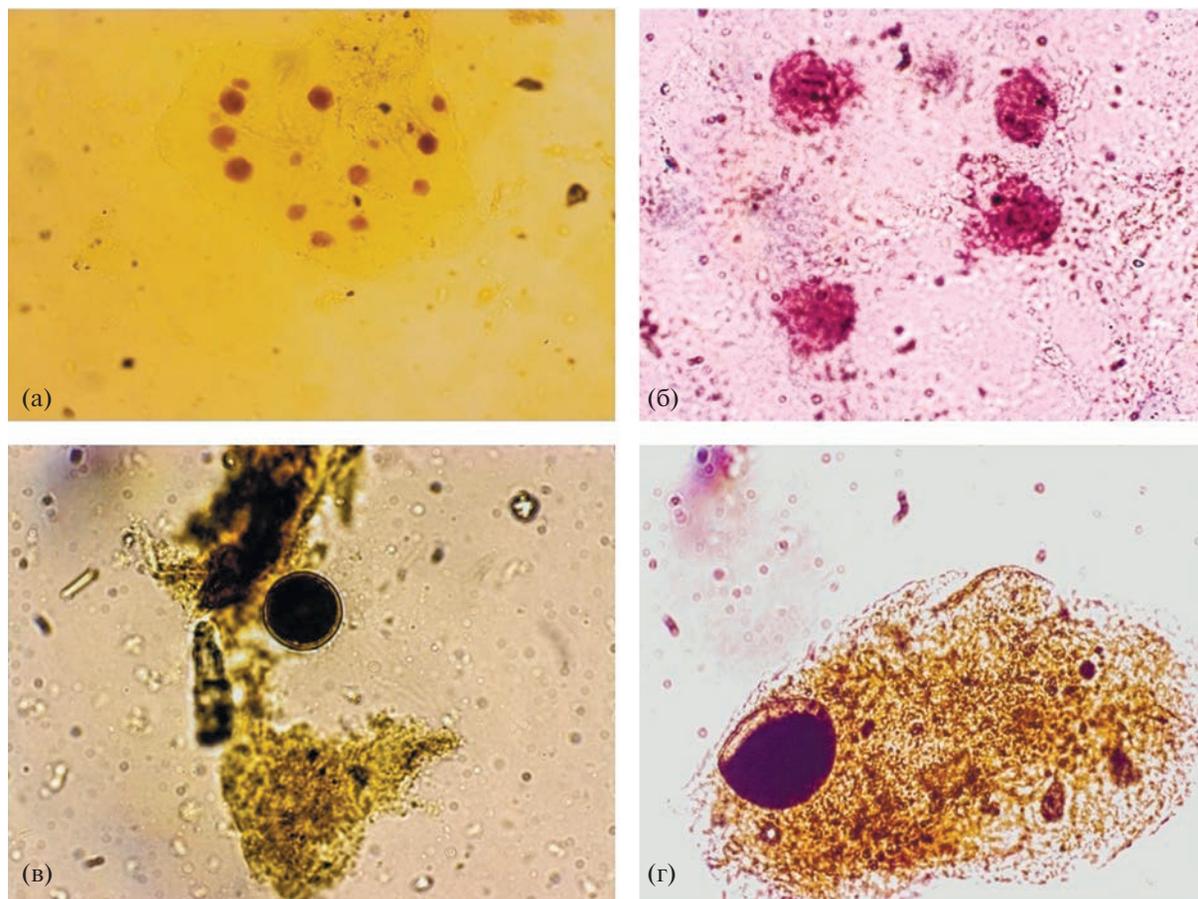


Рис. 2. Трофозоиты и гипноспоры *Perkinsus* sp., окрашенные раствором Люголя после инкубации в среде RFTM, 2021 г.: тропозоиты, увеличение $\times 100$ (а); тропозоиты, увеличение $\times 400$ (б); гипноспоры, увеличение $\times 400$ (в), (г).

у морских двустворчатых моллюсков (Villalba et al., 2004; Choi, Park, 2010; ICES, 2011), которая приводит к большим экономическим потерям в марикультуре. Заболевание характеризуется высокой смертностью гидробионтов, особенно 2–3-летних. Смертность растет при высоких температурах и значительной солености, паразит не гибнет в холодное время года, но наблюдается гибель перезимовавших моллюсков (Бровкина, Костина, 2020; Гаврилова и др., 2021).

Проведенное нами исследование с применением высокочувствительного метода диагностики позволило установить присутствие в тканях жабр, гонад, мантии и других органах приморского гребешка клеток возбудителя на стадиях роста и деления, а также сформированных гипноспор. Обнаружение гипноспор возбудителя говорит о том, что часть паразитов прошла весь цикл развития от ранних, питающихся тканями хозяина и делящихся трофозоитов, до завершающей стадии развития в моллюсках – формирования гипноспор. В гипноспорах или презооспорангиях в морской воде развиваются новые зооспоры, которые слу-

жат источником заражения других моллюсков (Choi, Park, 2010).

При гаглоспориозе у моллюсков поражена и желтеет пищеварительная железа (Гаевская, 2006), у обследованных гребешков таких признаков и паразитов в органе мы не наблюдали. Представленные в работе материалы показали, что весьма вероятным этиологическим агентом заболевания и гибели гребешка при садковом выращивании в хозяйствах из бухт Северная, Нарва и Воевода является простейшее рода *Perkinsus*. Для точной видовой идентификации возбудителя необходимо провести полимеразную цепную реакцию (ПЦР) (Audemard et al., 2004).

Обследование особей *Mizuhopecten yessoensis* выявило ряд неспецифичных, но характерных для болезни “дермо” признаков: повреждение мускула-замыкателя, несмыкание створок раковины из-за его ослабления, некроз, почернение мягких тканей, повышение отхода двухгодовиков в садках с конца июля до сентября на фоне роста температуры воды.

Небольшое число гипноспор (не более 79 в одном моллюске) говорит о невысокой паразитарной нагрузке на каждого исследованного гребешка при садковом выращивании. Она оказалась минимальной для этой болезни (в среднем 10–20 гипноспор и около 1500 растущих и делящихся трофозоитов на особь). При сильном заражении гидробионтов в поле зрения микроскопа можно видеть до нескольких десятков гипноспор паразита (Dungan, Bushek, 2015), мы же отмечали лишь единичные их экземпляры (1–4).

Для развития марикультуры в Приморском крае необходимо контролировать состояние хозяйств и прибрежных акваторий, регулярно проводить анализ на присутствие возбудителей в гидробионтах, лабораторную диагностику состояния их здоровья. Учитывая участвовавшие случаи заболевания культивируемых моллюсков в гребешковых хозяйствах Приморья (Бровкина, Костина, 2020; Гаврилова и др., 2021), высокую смертность молоди, назрела необходимость организации в регионе стационарной лаборатории для постоянного мониторинга состояния популяций моллюсков в хозяйствах марикультуры. Лаборатория должна быть оснащена необходимым оборудованием для проведения обследования моллюсков по методике Рея в среде RFTM и генетического анализа с проведением ПЦР для видовой идентификации возбудителя.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность преподавателю Дальневосточного государственного технического рыбохозяйственного университета Е.П. Бровкиной, а также к.б.н. М.Г. Елисейкиной, сотруднице ННЦМБ ДВО РАН за помощь в организации лабораторного обследования моллюсков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Бочаров Л.Н., Поздняков С.Е., Гаврилова Г.С. и др. Развитие аквакультуры в Приморье: реалии и возможности // *Вопр. рыболовства*. 2015. Т. 16. № 1. С. 7–23.

Бровкина Е.П., Костина Е.А. Характер протекания эпизоотий при садковом выращивании гребешка в Приморье. Перкинсус – вероятная причина воз-

никновения данных заболеваний // *Науч. тр. Дальрыбвтуза*. 2020. Т. 53. № 3. С. 41–52.

Брыков В.А., Колотухина Н.К. Биологические основы культивирования приморского гребешка в прибрежных водах Приморского края // *Вопр. рыболовства*. 2010. Т. 11. № 3 (43). С. 564–586.

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 Международной научно-технической конференции*. Владивосток, 24–26 мая 2016 г. Ч. 1. Владивосток: Дальрыбвтуз. 2016. С. 49–53.

Буторина Т.Е., Кулепанов В.Н., Зверева Л.В. Болезни и паразиты культивируемых и промысловых беспозвоночных и водорослей. СПб.: Лань. 2018. 124 с.

Воронин В.Н., Кузнецова Е.В., Стрелков Ю.А., Чернышёва Н.Б. Болезни рыб в аквакультуре. Практическое руководство. СПб.: Изд-во ФГНУ “ГосНИОРХ”. 2011. 264 с.

Габаев Д.Д., Айздайчер Н.А. Воспроизводство некоторых двустворчатых моллюсков в Приморье (Японское море) // *Бюлл. Дальневост. малакол. об-ва*. 2012. Т. 15/16. С. 135–153.

Гаврилова Г.С. Марикультура беспозвоночных на Дальнем Востоке: этапы, итоги, задачи // *Изв. ТИНРО*. 2005. Т. 141. С. 103–120.

Гаврилова Г.С., Кучерявенко А.В. Продуктивность плантаций двустворчатых моллюсков в Приморье. Владивосток: ТИНРО-центр. 2011. 113 с.

Гаврилова Г.С., Ким Л.Н. Эффективность культивирования приморского гребешка (*Mizuhopecten yessoensis*) в Уссурийском заливе (Японское море) // *Изв. ТИНРО*. 2016. Т. 185. С. 240–250.

Гаврилова Г.С., Мотора З.И., Поздняков С.Е. Результаты исследований состояния приморского гребешка (*Mizuhopecten yessoensis*) на плантациях марикультуры Приморья // *Изв. ТИНРО*. 2021. Т. 201. Вып. 4. С. 895–909.

Гаевская А.В. Паразиты, болезни и вредители мидий (*Mytilus*, Mytilidae). 1. Простейшие (Protozoa). Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика. 2006. 101 с.

Ким Г.Н., Лескова С.Е., Матросова И.В. Марикультура. М.: Моркнига. 2014. 273 с.

Лагунова Д.Д., Герасимова Е.А., Чернецов В.В. Эффективность выращивания гребешка комбинированным способом (сочетание подвешеного и донного) // *Науч. тр. Дальрыбвтуза*. 2010. Т. 22. С. 159–165.

Макоедов А.Н. Основные тенденции развития аквакультуры // *Вопр. рыболовства*. 2006. Т. 7. № 3 (27). С. 366–384.

Audemard C., Reece K.S., Burreson E.M. Real-time PCR for detection and quantification of the protistan parasite *Perkinsus marinus* in environmental waters // *Appl. Environ. Microbiol.* 2004. V. 70. № 11. P. 6611–6618.

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*. Nagasaki: TERRAPUB and Nagasaki Univ. 2010. P. 269–281.

- Dungan 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. Invertebr. Pathol.* 2015. V. 131. P. 68–82.
- ICES. Dermo diseases of oyster caused by *Perkinsus marinus*. Revised and updated by S.E. Ford. ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish. 2011. Leaflet. № 30. 5 p.
- Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2023. Sect. 2.4. Ch. 2.4.6. Infection with *Perkinsus olseni* (version adopted in May 2015). P. 473–484.
- <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/aquatic-manual-online-access>. Accessed 10.04.2023.
- Ray S.M.* A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum*, with suggested modifications and precautions // *Proc. Natl. Shellfish Assoc.* 1966. V. 54. P. 55–69.
- Villalba A., Reece K.S., Ordas M.K. et al.* Perkinsosis in molluscs: a review // *Aquat. Living Resour.* 2004. V. 17. P. 411–432.

The Disease of the Scallop *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857) in the Mariculture Farms of Primorye Caused by Protozoa of the Genus *Perkinsus* Levine, 1978

T. E. Boutorina^a and E. D. Degteva^a

^aFar Eastern State Technical Fisheries University, Vladivostok, 690087 Russia

The results of a study of the cultivated yesso scallop *Mizuhopecten yessoensis* (Jay, 1857) in Primorsky Krai in 2014–2021 are presented. The death of molluscs in mariculture farms was noted, the symptoms of the “dermo” disease were studied: high mortality of scallops that have reached two years of age, observed during autumn displacement into new cages in September, the presence of protozoa of the genus *Perkinsus* Levine, 1978 in the tissues of organs, foci of damage of the adductor muscle, non-closure of the shell valves, black discoloration, necrotizing of soft tissues. The minimum level of the parasitic load was established: 10–15 parasitic hypnospores per mollusc. However, considering the danger of a disease that causes mass death of molluscs for several years, the rapid spread of the pathogen, significant economic losses, it is recommended to create a specialized laboratory in the region for diagnosing and constantly monitoring the state of mariculture farms.

Keywords: mariculture, breeding of bivalves, “dermo” disease, perkinsosis, protozoa of the genus *Perkinsus*, Primorsky Krai