

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ИНВАЗИОННОЙ СТАДИИ
MYXOSOMA CEREBRALIS (MYXOSPORIDIA: MYXOSOMATIDAE)

А. В. Успенская

Институт цитологии АН СССР, Ленинград

На основании ранее проведенных экспериментов и результатов цитохимического исследования свежевыделенных из больных рыб спор *M. cerebralis* и ее спор, подвергшихся длительному хранению (около четырех месяцев), замораживанию и высушиванию, подтверждается наличие у спор *M. cerebralis* периода созревания во внешней среде, необходимого для достижения ими инвазивности, подтверждается так же большая стойкость спор к замораживанию и высушиванию. Делается вывод о приспособленности цикла паразита к сезонному циклу хозяина. Утверждается, что за 4 месяца пребывания в воде в спорах не происходит слияния ядер. Предполагается, что ответствен за достижение спорами инвазивности во внешней среде стрекательный аппарат споры.

В последнее время интерес к биологии *Myxosoma cerebralis* — возбудителя вертежа лососевых — сильно возрос из-за ущерба, приносимого им лососевому хозяйству, из-за более широкого его распространения среди выращиваемых видов лососевых и завоза его в те страны, где он ранее не отмечался. Особенно интенсивные исследования развернуты в Северной Америке, так как завезенная туда в 1956 г. из Европы *M. cerebralis* стала представлять серьезную опасность для лососеводства (Гоффман, 1971). В статье Вольфа (Wolf, 1974) намечена обширная программа изучения *M. cerebralis*, включающая те стороны биологии, патологии, иммунологии, которые еще остаются неясными. С тех пор появился ряд статей, отвечающих на поставленные Вольфом вопросы (Hoffman, 1974, 1975; Halliday, 1974, 1976; Wolf, Markiw, 1975, и др.).

Я занималась изучением *M. cerebralis* начиная с 1953 г., когда она впервые в нашей стране вызвала вспышку вертежа в одном из форелевых хозяйств (Успенская, 1955б, 1957, 1959). Мною были получены сведения по биологии и экологии паразита, разработаны методы лечения и профилактики, однако многие стороны жизнедеятельности этой миксоспоридии остались невыясненными. Недавно проведены цитохимические исследования разных стадий *M. cerebralis*, которые дополняют имеющиеся о ней сведения.

В настоящей статье подводится итог данным, полученным мною и другими исследователями, относительно спор *M. cerebralis*, которые являются одновременно и инвазивной, и покоящейся стадией паразита, служащей для его распространения. Для подробного исследования жизненного цикла *M. cerebralis* важной задачей было научиться проводить искусственное заражение рыб ее спорами. Однако еще Плен (Plehn, 1924) отметила, что заразить мальков форели свежевыделенными из больных рыб спорами не удается. Мои подобные попытки тоже не увенчались успехом (Успенская, 1955б). Позднее это подтвердили и другие авторы (Hoffman, Putz, 1969, 1971; Гоффман, 1971). Руководствуясь этим фактом и исходя из того, что вертеж поражает мальков лососевых лишь в первые месяцы жизни до начала окостенения их скелета, я предположила, что для дости-

жения инвазионности спорам *M. cerebralis* необходимо проработать какой-то период в воде. В дальнейшем будем называть этот период периодом созревания. Наличие его было бы вполне биологически обосновано, так как споры образуются в хрящах больных рыб лишь к осени, когда скелет сеголеток начинает окостеневать и паразит уже не может в нем беспрепятственно развиваться, а следующее поколение молодежи появляется весной. В условиях северных хозяйств разрыв между этими моментами составляет 4—5 мес (Успенская, 1957, 1959). Было бы выгодно для вида, если споры, попавшие в воду, достигали бы инвазионности именно ко времени выклева молодежи и длительность периода созревания равнялась нескольким месяцам.

Для проверки этого предположения мною в 1954 и 1955 гг. были проведены опыты по заражению молодежи форели спорами *M. cerebralis*, выдержанными в воде в течение 4—4.5, 10 и 12 мес. Результаты опытов были сообщены на 8-ом совещании по паразитологическим проблемам (Успенская, 1955б). В кратких тезисах доклада и в разделе о вертеже форелей в книге «Основные проблемы паразитологии рыб» (Догель, Петрушевский, Полянский, 1958) не приводятся описания опытов, а сообщается лишь вывод. Поскольку методика и результаты опытов были учтены в дальнейших исследованиях и в экспериментах других паразитологов (Hoffman, Putz, 1969, 1971; Гоффман, 1971), я считаю нужным привести их описание.

Споры для эксперимента заготавливали следующим образом: череп зараженных форелей очищали от мягких тканей, очищенный хрящевой скелет измельчали с помощью маленьких ножниц, из полученной кашицы брали пробу на наличие спор; если спор оказывалось много, то оставшуюся порцию помещали в центрифужную пробирку, заливали ключевой водой и центрифугировали на ручной центрифуге. В очищенном таким образом осадке оставались споры и мелкие кусочки хряща. Очищенные споры помещали в пробирки, которые устанавливали в широкогорлую банку, затянутую планктонным газом, а банку ставили на дно ключа с температурой летом +8, а зимой +4° С. Так имитировались естественные условия, в которых споры находятся на дне водоема. По прошествии 4—4.5, 10 и 12 мес эти споры применяли для искусственного заражения. В опытах использовали молодежь радужной форели, полученную из икры, в условиях, исключающих заражение. 100 мальков было отсажено в аквариум и служило контролем. За контрольными рыбами велись наблюдения в течение 90 дней. Ни у одной из них не было замечено признаков вертежа, хотя во время опыта и наблюдался отход (19 рыб). В погибших рыбах не было найдено спор. В конце опыта 81 контрольная рыба была вскрыта, и ни в одной из них спор не было обнаружено. Заражение спорами с 10- и 12-месячным сроком выдерживания в воде не дало положительных результатов, часть подопытных мальков погибла в ранние сроки, часть оказалась незараженной. Из 16 мальков, заражавшихся спорами с 4—4.5-месячным сроком хранения, восьми (5 и 3 в разных сосудах) споры были введены прямо в желудок с помощью тонкой пипетки, а 8 были помещены в сосуды (5 и 3 в каждом) со взвесью спор. У 4 мальков из первой группы и у одного из второй симптомы заболевания проявились на 18—33-й день. Почти все остальные мальки погибли в течение опыта без характерных признаков заболевания, и только 2 из второй группы прожили 80 дней, и в них не было обнаружено спор. 3 малька из пяти зараженных (2 из первой группы и 1 из второй) были целиком зафиксированы, залиты в парафин и порезаны на микротоме. У всех трех в хрящах жаберных дужек и черепной коробки были обнаружены трофозоиты *M. cerebralis*.

При повторении этих опытов через год в одном опыте из 10 мальков, зараженных реп ос спорами, хранившимися в ключе в течение 4.5—5 мес, у двух установлены признаки вертежа (вращательные движения) на 24—35-й день. В другом опыте из 13 рыб один малек на 29-й день имел симптомы заболевания. Гистологической обработки этих рыбок не производилось.

Подопытные и контрольные мальки погибли на 60-й день из-за перегрева воды. До этого в контроле не было признаков вертежа.

В итоге опытов был сделан вывод, что для достижения инвазионности споры *M. cerebralis* должны пробыть в воде несколько месяцев (Успенская, 1955б; Догель, Петрушевский, Полянский, 1958).

Позднее Гоффман, ознакомившись со схемой и результатами моих опытов (Hoffman, Putz, 1969; Гоффман, 1971), поставил эксперимент в более широких масштабах. На дно больших аквариумов он помещал ил, смешанный со спорами, добытыми из зараженных форелей. Споры вносились в аквариумы за 0, 3, 113 дней и за 4 и 6 мес до высадки туда молоди рыб. В результате заражение произошло лишь в тех аквариумах, в которые споры были внесены за 4 мес до высадки молоди. Все эти данные говорят о том, что споры *M. cerebralis* действительно имеют период созревания во внешней среде около четырех месяцев. Этот факт учитывается сейчас многими исследователями, стремящимися получить заражение в экспериментальных условиях (Wolf, Markiw, 1975; Hoffman, 1974, 1975; Holliday, 1973, 1974, 1976).

Интересно, что недавно Юнчис (1974) провел опыты по заражению аквариумных рыб свежевыделенными спорами нескольких видов *Myxobolus* и спорами этих видов, хранившимися в течение 5 мес во внешней среде. Удалось заражение только последними. Возможно, что такая задержка в созревании спор свойственна многим видам миксоспоридий, как приспособление к жизненному циклу хозяев.

Наличие периода созревания поднимает вопрос о том, что препятствует свежевыделенным спорам стать инвазионными и какие компоненты споры или какие процессы ответственны за их созревание. Для разрешения этого вопроса пришлось подвергнуть ряду гистохимических реакций как свежевыделенные из рыб споры *M. cerebralis*, так и споры, хранившиеся в течение четырех месяцев в тех же условиях, что и использованные в опытах по заражению. Сравнение этих двух категорий спор показало, что у спор, долго находившихся в воде, даже не наблюдалось округления амебоидного зародыша. Окраска по Фельгену и железным гематоксилином не выявила сколько-нибудь заметных изменений в ядерном аппарате амебоидного зародыша в результате длительного хранения. В спорах, хранившихся в течение четырех месяцев, по-прежнему остается 2 гаплоидных ядра у амебоида. Слияния их (половой процесс) внутри спор не происходит. Фельгенположительный материал располагается по периферии ядра, в центре находится крупная нуклеола, никаких признаков дегенерации ядер нет. У части свежевыделенных спор по Фельгену окрашиваются еще капсулогенные и вальвогенные ядра. Это, видимо, не вполне зрелые споры. У спор, длительно находившихся в воде, этих ядер уже нет. Должно быть, недоразвитые споры погибают во время хранения. Сулемовый бромфеноловый синий (окраска на общий белок), и у той, и у другой категории спор наиболее сильно окрашивает стрекательные капсулы; при достаточной дифференцировке делаются видны витки нити; окрашивается также оболочка капсул; створки споры имеют слабо-голубой цвет; цитоплазма амебоида голубая, ядра более темные. Увеличения вакуолизации цитоплазмы при хранении не замечено.

Окрашивание спор этих групп флуоресцентным красителем — акридиновым оранжевым — в разведении 1 : 20 000 показало, что ядра и цитоплазма амебоидного зародыша и в том, и в другом случае имеют зеленый цвет. Оболочка спор, хранившихся с осени до весны, оказалась оранжевой, в то время как у свежевыделенных спор она зеленая (об окраске акридиновым оранжевым см. ниже). Таким образом, в результате применения цитохимических методик не было замечено каких-либо изменений в строении цитоплазмы амебоидного зародыша и в состоянии его ядер за 4 мес хранения спор в воде. На основании наших, еще предварительных, данных по механизму действия стрекательного аппарата миксоспоридий (Успенская, 1972, 1975), которые, видимо, говорят о том, что выстре-

ливание стрекательного аппарата — процесс активный, связанный с энергизацией системы, мне кажется вполне вероятным, что неинвазионность спор, находящихся в хрящах рыб, может быть обусловлена какой-то неподготовленностью спор *M. cerebralis* к выстреливанию стрекательного аппарата до прохождения периода созревания в воде. Исследования в этом направлении будут продолжены.

Начиная с конца прошлого века многих ученых интересовала длительность выживания спор микоспориций вне хозяина. Линтон (Linton, 1891 цит. по: Bond, 1938) наблюдал споры *Myxobolus lintoni* в морской воде в течение 10 дней и нашел, что, кроме округления амебоида, других изменений в них не происходило. Телоан (Thélohan, 1895) изучал споры разных видов *Myxobolidae* и отметил, что в воде они дегенерируют за период 1—2 мес. Бонд (Bond, 1938) экспериментировал со спорами разных видов микоспориций (*Myxosoma subtecalis*, *M. funduli*, *Myxidium folium*, *Myxobolus bilineatum*) и обнаружил, что у разных видов споры имеют разные сроки выживания в воде. Состояние спор он проверял на препаратах, окрашенных по Фельгену и железным гематоксилином. Критерием гибели были вакуолизация цитоплазмы амебоида и пикноз его ядер, а также выстреливание полярных нитей. Сроки выживания спор испытанных им видов колебались от 10 до 20 дней, а у *Myxobolus bilineatum* через 28 дней амебоид лишь округлился, не обнаруживая других признаков умирания. У *Myxosoma cerebralis*, как оказалось, эти сроки еще более длинные.

Наличие периода созревания в воде у *M. cerebralis*, дающего возможность спорам сохраняться до появления молоди форели следующего поколения, требует, очевидно, адаптации спор к довольно низким температурам зимой. Известно также, что многолетнее летование не избавляет хозяйство от вертежа (Schäperclaus, 1931). Поэтому было интересно посмотреть, что происходит в спорах при их замораживании и оттаивании и при длительном их высушивании.

В 1955 г. наряду с опытами по искусственному заражению мною был проведен ряд опытов по замораживанию и высушиванию спор (Успенская, 1955б). Тогда считалось, что с помощью акридинового-оранжевого под флуоресцентным микроскопом можно отличить живые клетки от мертвых (Schummelfeder, 1950). Цитоплазма и ядра у живых должны быть зелеными, а у мертвых оранжевыми. Впоследствии интерпретация результатов окрашивания этим красителем в разных концентрациях фиксированных и нефиксированных тканей оказалась далеко не однозначной (Пирс, 1926; Мейсель и др., 1951; Румянцева, 1963; Брумберг и др., 1963; Gomotos et al., 1962, 1963). Однако продолжение опытов, которые проводились бы с учетом новых данных (Smith-Sonneborn, 1974) о способности акридинового-оранжевого окрашивать в разные цвета определенные вещества, могло бы быть интересным. Поэтому я приведу здесь свои результаты, позволяющие сравнить окраску в одинаковых условиях свежевыделенных и подвергнутых замораживанию и высушиванию спор *M. cerebralis*.

Окраска спор производилась раствором акридинового-оранжевого 1 : 20 000 в течение 5 мин, регистрировалась первоначальная окраска до того момента, как она начинала изменяться под влиянием флуорохрома и других воздействий, связанных с самим процессом микроскопирования под флуоресцентным микроскопом. Споры, замораживаемые при -20°C в течение от 10 мин до 3.5 ч, имели зеленого амебоидного зародыша и зеленую оболочку, как и свежевыделенные. Споры после четырехмесячного высушивания с последующим получасовым размачиванием имели зеленого амебоида и оранжевую оболочку. Споры, подвергавшиеся нагреванию до 100°C в течение 10 мин, имели оранжевого амебоида и оранжевую оболочку. Таким образом, реакция с акридиновым-оранжевым после замораживания и высушивания у амебоида не изменилась по сравнению с контролем, а после нагревания до 100°C изменилась. На основании этих опытов тогда мною был сделан вывод, что споры *M. cerebralis* способны

переносить длительное высушивание и по крайней мере трехчасовое замораживание (Успенская, 1955б).

Гоффман и Путц (1969, 1971) получили более надежные данные. Они провели опыты по заражению рыб спорами, подвергавшимися замораживанию в течение 3, 10, 18 дней 2, 9, 32 мес, и пришли к выводу, что споры *M. cerebralis* выдерживают замораживание при -20°C в течение двух месяцев, сохраняя при этом инвазионность в том случае, если они ее достигли. Они проводили также опыты с нагреванием спор и нашли, что десятиминутное нагревание до 60, 80 и 100°C вызывает разрушение и гибель спор, комнатная температура и нагревание до 40°C не вызывает изменений. Все эти наблюдения говорят о большой стойкости инвазионной стадии *M. cerebralis*.

Итак, споры *M. cerebralis*, будучи выведены из больной рыбы, не сразу становятся инвазионными, а требуют периода дозревания в воде, но достигнув инвазионности, сохраняют ее очень долго, несмотря на высушивание и промораживание водоемов. Продолжительность периода дозревания (около четырех месяцев) говорит о приспособленности цикла паразита к жизненному циклу хозяина.

Л и т е р а т у р а

- Б р у м б е р г Е. М., Ч е р н о г р я д с к а я Н. А. 1963. Флуоресцентная микроскопия. В кн.: Руководство по цитологии, т. 1. М.—Л.: 64—71.
- Г о ф ф м а н Г л е н Л. 1971. Вертеж форелей и лосося, вызванный *Myxosoma cerebralis* (*Myxosporidia*, *Myxosomatidae*) в Соединенных Штатах Америки. Паразитолог., 5 (2): 182—185.
- Д о г е л ь В. А., П е т р у ш е в с к и й Ю. К., П о л я н с к и й Ю. И. 1958. Основные проблемы паразитологии рыб. Изд. ЛГУ: 293—296.
- М е й с е л ь М. Н., К о н д р а т ь е в а Т., П о м о щ н и к о в а Н. 1951. Функциональное состояние и реактивность структур клеточного протопласта. Ж. общ. биол. 12 (5): 312.
- П и р с Э. 1962. Гистохимия. ИЛ, М.
- Р у м я н ц е в а В. М. 1963. Действие глубокого охлаждения на бродящие клетки *Endomyces magnusii*. В кн.: Реакция клеток на экстремальные воздействия. М.—Л.: 54—65.
- У с п е н с к а я А. В. 1955а. К биологии и распространению *Myxosoma cerebralis* — возбудителя вертежа форелей. ДАН СССР, 105 (5): 1132—1135.
- У с п е н с к а я А. В. 1955б. Биология, распространение и рыбохозяйственное значение *Myxosoma cerebralis* — возбудителя вертежа форелей. Тез. докл. 8-го совещ. по паразитологическим проблемам. М.—Л.: 155—156.
- У с п е н с к а я А. В. 1957. Экология и распространение возбудителя вертежа форелей *Myxosoma cerebralis* в прудовых хозяйствах Советского Союза. Изв. ВНИОРХ, 42: 43—52.
- У с п е н с к а я А. В. 1959. Методические указания по борьбе с вертежом лососевых. Л.: 1—19.
- У с п е н с к а я А. В. 1972. Исследования механизма действия полярных капсул микоспоридий рыб. Тез. докл. на науч. конф. ИНЦ АН СССР к 15-летию инст.: 94—95.
- У с п е н с к а я А. В. 1976. Механизм действия стрекательного аппарата у микоспоридий. В кн.: Немышечные формы подвижности. Пуццино: 102—108.
- Ю н ч и с О. Н. 1974. Некоторые особенности биологии микоспоридий. Тез. докл. 6. Всесоюз. совещ. по болезням и паразитам рыб. М.: 306—308.
- В о n d F. F. 1938. Resistance of myxosporidian spores to conditions outside of the host. J. Parasit., 24 (5): 470—471.
- Г о м о т о с P. J., Т а м м I., D o l e s S., F r a n k l i n R. M. 1962. Reovirus type 3: physical characteristics and interactions with L cells. Virology, 17: 441—454.
- Г о м о т о с P. J., Т а м м I. 1963. The secondary structure of reovirus RNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 9: 707—714.
- Н о f f m a n G. L. 1974. Disinfection of contaminated water by ultraviolet irradiation, with emphasis on whirling disease (*Myxosoma cerebralis*) and its effect on fish. Trans. Amer. Fisheries society, 103 (3): 541—550.
- Н о f f m a n G. L. 1974. Fish age as related to susceptibility to *Myxosoma cerebralis*, cause of whirling disease. Progr. fish cult., 36 (3): 151.
- Н о f f m a n G. L., P u t z R. 1969. Host susceptibility and the effect of aging, freezing, heat and chemicals on spores of *Myxosoma cerebralis*. Progr. fish cult., 31 (4): 35—37.
- Н о f f m a n G. L., P u t z R. 1971. Effect of freezing and aging on the spores of *Myxosoma cerebralis* — the casual agent of salmonid whirling disease. Progr. fish cult., 33 (2): 95—98.

- Halliday M. M. 1973. Studies on *Myxosoma cerebralis*, a parasite of salmonides. I. The diagnosis of infection. II. The development and pathology of *Myxosoma cerebralis* in experimentally infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fry reared at different water temperatures. Nord. Vet. Med., 25 : 345—358.
- Halliday M. M. 1974. Studies on *Myxosoma cerebralis* of parasite of salmonides. III. Some studies on the epidemiology of *Myxosoma cerebralis* in Denmark, Ireland and Scotland. IV. A preliminary immunofluorescent investigation of the spores of *Myxosoma cerebralis*. Nord. Vet. Med., 26 : 165—179.
- Halliday M. M. 1976. The biology of *Myxosoma cerebralis*: the causative organism of whirling disease of salmonids. J. Fish Biol., 9 : 339—357.
- Plehn M. 1924. Praktikum der Fischkrankheiten : 1—300.
- Schäperclaus W. 1931. Die Drehkrankheit in der Forelenzucht und ihre Bekämpfung. Ztschr. f. Fischerei, 29 (4) : 521—567.
- Schummelfeder N. 1950. Fluorochromierung des lebenden, überlebenden und toten Protoplasmes mit dem basischen Farbstoff Acridin orange und ihre Besehung zur Stoffwechselaktivität der Zelle. Vierchows Arch., 318 : 119—154.
- Smith-Sonneborn J. 1975. Acridine orange fluorescence: a temporary stain for Paramecia. Stain technol., 49 (2) : 77—80.
- Thélohan P. 1895. Recherches sur les Myxosporidies. Bull. Sci. Fr. Belg., 26 : 100—394.
- Wolf K. 1974. Whirling disease research, a deliniation of needs. Fish health news., 3 (4) : 1—12.
- Wolf K., Markiw M. E. 1975. *Myxosoma cerebralis*: serological identification by indirect fluorescent antibody test. Fish health news, 4 (4) : 8.

BIOLOGICAL PECULIARITIES OF THE SPORE STAGE OF MYXOSOMA
CEREBRALIS (MYXOSPORIDIA : MYXOSOMATIDAE)

A. V. Uspenskaja

S U M M A R Y

The data concerning biological peculiarities of spores of *Myxosoma cerebralis* obtained by the author and other researchers are summarized. The life cycle of *M. cerebralis* is well adapted to the seasonal cycle of the host owing to the fact that the infectivity of the spores is attained only after 4 months of aging in water and that the spores are highly resistive to freezing and drying. No sexual process during 4 month aging was observed. It is supposed that the maturity of spores depends to a great extent on the ability of polar capsules for extrusion.
