

УДК 576.893.17 : 597.554.3

## КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *ICHTHYOPHTHIRIUS MULTIFILIS* (CILIATA, OPHRYOGLENIDAE) И ОЦЕНКА ЕГО ВЛИЯНИЯ НА ОРГАНИЗМ РЫБЫ

В. А. Мусселиус, В. Ф. Ванятинский, Н. А. Головина

В статье приведены результаты работы по длительному сохранению на рыбе в лабораторных условиях инфузории рода *Ichthyophthirius*. Изучено влияние ихтиофтириуса на организм карпа в зависимости от интенсивности инвазии паразита.

В ихтиопаразитологии изучение взаимоотношений в системе паразит—хозяин приобретает сейчас все большее научное и практическое значение. Особенно это важно при изучении уровня патогенности тех или иных паразитов, оценке их влияния на организм рыбы в разных экологических условиях; не менее существенно оно для диагностики паразитарных болезней. Однако проведение подобных исследований сдерживается, а иногда вообще не осуществляется из-за отсутствия у исследователя живых паразитов в нужном количестве и постоянно. В ихтиовирусологии и бактериологии нет проблемы сохранения возбудителей в лаборатории. Вирусные агенты культивируются в культуре живых клеток, бактерии — на искусственных питательных средах.

Попытки сохранения паразитов рыб в лабораторных условиях делались неоднократно, но работы в этом направлении немногочисленны и начались лишь в 70-х годах. Исследования велись в двух направлениях: во-первых, культивировали паразитов на искусственных питательных средах; во-вторых, сохраняли и поддерживали паразитов вместе с рыбой.

О культивировании паразитов, в основном простейших (ихтиофтириус, амeba, миксозома, криптобии, трипанозомы), имеются сведения в зарубежной литературе (Hlond, 1967; Beckert, 1967; Volf, Markiv, 1976; Ghittino e. a., 1977; Woo, 1978; Matakasi, Hajdu, 1983). Освоение метода культивирования позволило авторам провести интересные исследования по изучению биологии паразитов и моделировать заболевания в лабораторных условиях. Успех этих работ зависит от правильности подбора питательной среды. Естественно, что для каждого вида паразита необходима среда, отвечающая условиям, в которых он обитает. Так, для культивирования простейших оказалась весьма удачной минимальная среда Игла (МЕМ), используемая в ихтиовирусологии, с добавлением различных веществ в зависимости от вида паразита. Трипанозому, например, успешно культивировали в двухфазовой среде SNB-9, содержащей кровь человека.

Представляет несомненный интерес попытка сохранить ихтиофтириус в лаборатории путем замораживания в растворе диметилсульфоксида. Помещенных в сосуд паразитов охлаждали с  $-1$  до  $-45^{\circ}$ , а затем погружали в жидкий азот для сохранения. Через две недели после оттаивания оказалось, что 60—65% тропонтов были живыми и сохраняли способность к делению (Beeler, 1980).

Попытка культивировать на плотных и жидких питательных средах личинок и половозрелых цестод родов *Ligula*, *Triaenophorus*, *Eubothrium*, *Proteocephalus*, *Caryophyllaeus* (Кротов, 1958; Давыдов, 1970; Стражник, Давыдов, 1975, и др.) не дала положительных результатов. Более успешным было культивирование лигул *in vitro* в среде, основу которой составляла лошадиная сыворотка (Arme, 1966; Smyth, 1969). В данном случае отмечено оплодотворение паразита, а от-

ложенные им яйца были жизнеспособны. В последние годы зарубежными исследователями рекомендовано использовать в качестве основы для культивирования гельминтов среду 199 (тоже применяемую в вирусологии) с добавлением 20%-ной лошадиной сыворотки (Ferretti, Gabriele, 1979).

Возможно сохранение и поддержание паразитических организмов, в том числе простейших, вместе с рыбой (Ванятинский, Мусселиус, 1979; Мусселиус, 1979; Ванятинский, 1983). При этом способе, который можно назвать культивированием *in vitro*, необходимо подобрать такие экологические условия, в которых система паразит—хозяин находилась бы в относительном равновесии, численность паразита поддерживалась на уровне паразитоносительства и не приводила бы к гибели рыбы.

Постоянно имея в лаборатории управляемую систему паразит—хозяин, можно решать ряд важных вопросов по влиянию экологических условий не только на паразита или рыбу, но и на систему в целом, вопросы патогенности паразита и действия химиопрепаратов как на паразита, так и на хозяина. Так, даже кратковременное сохранение на лещах моногеней рода *Dactylogyrus* позволило Куперману и Шульман (1978) выявить некоторые закономерности возникновения дактилогироза и смоделировать заболевание в лабораторных условиях. К сожалению, о самом методе содержания паразитов на рыбе в работе не сказано.

В лаборатории ихтиопатологии ВНИИПРХ в течение 6 лет на карпе сохраняется один из опасных паразитов прудовых рыб — ихтиофтириус. При этом мы провели ряд наблюдений, которые позволяют регулировать численность ихтиофтириусов на хозяине и оценивать влияние различного уровня зараженности на организм карпа.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Работу проводили на годовиках карпа массой 15—25 г в непроточных аквариумах емкостью 65—95 л с постоянной аэрацией воды микрокомпрессором. Посадка 1 экз. карпа такой массы на 25 л воды позволяет содержать рыб вместе с ихтиофтириусами в течение месяца без смены воды. Интенсивность инвазии при этом растет сравнительно медленно и не превышает 30—35 паразитов на рыбу. Известно, что простейшие эктопаразиты интенсивно развиваются на голодающей рыбе, поэтому, чтобы не допустить чрезмерного развития инфузорий, рыбу подкармливали искусственными кормами. После того как рыбы съедали корм, проводили чистку аквариумов. При таких условиях содержания на 2—4-е сутки изменяется активная реакция среды, рН увеличивается с 7.00 до 8.75.

Бродяжки ихтиофтириуса чувствительны к щелочно-кислотному балансу воды. Неоднократно отмечено, что инфузории хорошо развиваются в воде с рН 6.70—8.75. При более высокой щелочности (рН свыше 9.5) развитие ихтиофтириуса угнетается: в 2—3 раза снижается выживаемость бродяжек и уменьшаются размеры трофонтов, что приводит к гибели паразитов через два месяца после начала культивирования.

Влияет на развитие ихтиофтириуса аммиачный азот ( $\text{NH}_4$ ), количество которого резко возрастает при длительном содержании рыб в аквариумах с непроточной водой. К концу 10-х суток содержание аммиачного азота увеличивается с нуля до 4 мг/л, что приводит к гибели большей части бродяжек. Параллельно с этим увеличивается содержание фосфатов до 1 мг/л, щелочности до 6.0 мг—экв/л, что тоже приводит к угнетению культуры ихтиофтириуса. В этом случае воду в аквариуме меняли, так как дальнейшее накопление этих веществ может привести к гибели не только паразита, но и рыбы.

Проведенные работы показали, что ихтиофтириус на рыбе успешно сохраняется в широком диапазоне температуры: от 0.5 до 25 °С. Однако наиболее удобной температурой для поддержания системы паразит—хозяин в лаборатории является 10—12 °С. Отмечено, что при длительном культивировании в условиях постоянных температур развитие ихтиофтириуса угнетается. Паразиты лучше развиваются, когда суточные колебания температуры воды 2—3°. Понижение температуры на 6° и более приводит к гибели значительной части бродя-

жек. Эту особенность ихтиофтириуса использовали для снижения интенсивности инвазии при быстром ее нарастании, меняя 1/4—3/4 объема воды аквариума в течение 15—20 мин.

Стимулирующее действие на развитие паразитов оказывает накопление хлоридов до 15 мг/л. Однако такое содержание хлоридов в аквариальных условиях является критическим для хозяина, поэтому этот показатель необходимо контролировать.

Таким образом, длительное содержание ихтиофтириуса на рыбе в лабораторных условиях возможно. При этом необходимо соблюдение следующих требований: температура воды 10—12 °С, рН 6.7—8.75, содержание аммиачного азота не более 6 мг/л, а кислорода — 5—6 мг/л.

Для оценки влияния различной зараженности ихтиофтириусом на организм карпа опыты проводили с повторностями при температуре 16—18°. В опытах использовали годовиков карпа массой 15—25 г. Было выделено 6 групп рыб с различной интенсивностью инвазии: 1-я группа — контрольная, незараженная; 2-я — с интенсивностью инвазии от 1 до 10; 3-я — от 10 до 50; 4-я — от 100 до 200; 5-я — от 500 до 1000 и 6-я — от 2 до 7 тыс. паразитов на рыбу.

Для получения невысокой интенсивности заражения (от 1 до 200 паразитов) рыбу заражали бродяжками, полученными от одного трофонта диаметром 0.4—0.5 мм, в аквариуме емкостью 8 л. Для получения интенсивности инвазии от 500 до 1000 экз. использовали бродяжек от 3—5 трофонов в том же объеме воды. При этом среди зараженных рыб всегда было 2—3 экз. с более высокой и столько же с единичной интенсивностью заражения. Возможно, это связано с индивидуальной восприимчивостью рыб к ихтиофтириусу. Для получения высокой интенсивности инвазии (рыбы 6-й группы) использовали бродяжек от 10 трофонов (на одну рыбу) или контактный способ заражения. Клинические признаки заболевания появлялись на 10—12-й дни, когда у рыб определяли следующие гематологические показатели: гемоглобин, гематокрит, общее число эритроцитов, лейкоцитов и лейкоцитарную формулу. Работу проводили по общепринятым методам (Иванова, 1970, 1974; Головина, 1979). Оценка численности ихтиофтириуса осуществляли путем подсчета общего числа паразитов на рыбе. Для этого всю слизь с поверхности тела соскабливали в мерную пробирку, тщательно перемешивали стеклянной палочкой с 5 мл воды. Затем 0.2 мл этой смеси наносили на предметное стекло и под микроскопом просчитывали находящиеся там паразиты. Полученный результат умножали на 25 и таким образом определяли общее количество паразитов на поверхности тела. Аналогично подсчитывали число паразитов на жабрах. При низкой интенсивности инвазии количество ихтиофтириусов просчитывали просто в соскобах.

Исследование крови показало, что у опытных рыб из показателей красной крови достоверно изменяется лишь величина гемоглобина. Его содержание снижается с  $66.0 \pm 3.0$  до  $47.0 \pm 0.2$  г/л у рыб 5-й и 6-й групп. Величина гематокрита и число эритроцитов были близки к контрольной группе. Лейкоциты претерпевают количественные и качественные изменения. При высокой интенсивности заражения (5-я и 6-я группы) наблюдали резкое снижение количества лейкоцитов с  $27.0 \pm 3.5$  до  $17.1 \pm 2.2$  тыс./мкл. При средней и низкой интенсивности (4-я и 3-я группы) отмечена лишь частичная лейкопения (с  $45.1 \pm 3.1$  до  $30.9 \pm 1.9$  и  $40.2 \pm 2.4$  тыс./мкл соответственно). Различий в числе лейкоцитов у 2-й и 1-й групп не было.

Качественные изменения лейкоцитов проявляются в лейкоцитарной формуле. В 4—6-й группах отмечено увеличение нейтрофилов, эозинофилов и моноцитов за счет снижения лимфоцитов (см. таблицу). При более низкой интенсивности заражения (2-я и 3-я группы) такие изменения не выявлены. Лейкоцитарная формула у них близка к норме.

Анализируя имеющиеся в литературе данные о влиянии высокой интенсивности заражения ихтиофтириусом на гематологические показатели карпа (Hines, Spira, 1973; Головина, 1976) и полученные нами данные, следует сказать, что увеличение числа нейтрофилов в лейкоцитарной формуле является характерной ответной реакцией организма карпа на ихтиофтириоз. Эти изменения в наших опытах наблюдаются при интенсивности инвазии свыше 100 экз. паразитов на рыбу.

Лейкоцитарная формула карпа при различной интенсивности заражения ихтиофтириусом \*

Группа рыб, интенсивность инвазии (в экз./рыбу)	Нейтрофилы				
	миелоциты	метамиелоциты	палочкоядерные	сегментоядерные	всего
1-я группа (контроль)	1.2 ± 0.2	0.88 ± 0.2	1.1 ± 0.2	0.97 ± 0.2	4.1 ± 0.5
2-я группа (1—10 ихт.)	0.6 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.1	0.75 ± 0.2	4.1 ± 0.4
3-я группа (10—50 ихт.)	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.2	4.1 ± 0.5
4-я группа (100—200 ихт.)	2.6 ± 0.2 *	2.1 ± 0.4 *	1.7 ± 0.3	1.75 ± 0.4 *	8.2 ± 0.6 *
5-я группа (500—1000 ихт.)	7.6 ± 1.6 *	4.6 ± 1.1 *	2.3 ± 0.5 *	1.1 ± 0.3	15.5 ± 2.7 *
6-я группа (2000—7000 ихт.)	14.0 ± 1.8 *	11.5 ± 1.5 *	7.5 ± 1.2 *	1.2 ± 0.3 *	33.9 ± 3.2 *

(продолжение)

Группа рыб, интенсивность инвазии (в экз./рыбу)	Лейкоциты			
	Псевдоэозинофилы	Эозинофилы	Моноциты	Лимфоциты
1-я группа (контроль)	0.63 ± 0.6	1.63 ± 0.4	1.3 ± 0.2	91.9 ± 0.9
2-я группа (1—10 ихт.)	0	1.4 ± 0.3	3.4 ± 0.4 *	89.9 ± 0.9
3-я группа (10—50 ихт.)	0	1.9 ± 0.4	3.4 ± 0.3 *	89.4 ± 3.1
4-я группа (100—200 ихт.)	0	5.1 ± 0.6 *	4.8 ± 0.5 *	83.3 ± 0.96 *
5-я группа (500—1000 ихт.)	1.05 ± 0.5	3.4 ± 0.8	3.8 ± 0.6	73.1 ± 3.5
6-я группа (2000—7000 ихт.)	5.4 ± 1.3 *	17.5 ± 4.2 *	7.6 ± 1.4 *	30.8 ± 4.3 *

\* Показатель достоверно отличается от показателя в контрольной группе.

Многолетний опыт сохранения ихтиофтириуса в лабораторных условиях на рыбе позволяет рекомендовать этот способ как один из вполне надежных для культивирования системы паразит—хозяин. Используя этот способ, удалось установить, что только при интенсивности более 100 ихтиофтириусов у карпа массой 15—25 г выявлены такие отклонения в лейкоцитарной формуле, при которых следует регистрировать болезнь, а не паразитоносительство.

#### Л и т е р а т у р а

- В а н я т и н с к и й В. Ф. Длительное сохранение простейших эктопаразитов в лабораторных условиях. — В кн.: Паразиты и паразитарные болезни рыб (Резюме докл. I Международн. симпоз. по ихтиопаразитол.). Ческе Будевице, 1983, с. 6.
- В а н я т и н с к и й В. Ф., М у с е л и у с В. А. Длительное сохранение простейших эктопаразитов в лабораторных условиях. — В кн.: Болезни рыб и борьба с ними. М., 1979, с. 83—87.
- Г о л о в и н а Н. А. Морфологический анализ клеток крови при заражении карпа инфузорией *Ichthyophthirius multifiliis*. — В кн.: Матер. 2-го Всес. съезда протозоол. Ч. 1. Киев, 1976, с. 38—39.
- Г о л о в и н а Н. А. Использование гематологических методов в ихтиопатологической практике. — Экспресс-информация. Сер. 8. «Рыбохозяйственное использование внутренних водоемов», 1979, вып. 4, с. 8—18.
- Д а в ы д о в О. Н. К методике содержания паразитических червей рыб. — Гидробиол. журн., 1970, т. 6, № 3, с. 122—124.
- И в а н о в а Н. Т. Материалы к морфологии крови рыб. Ростов-на-Дону, Изд-во РГПИ, 1970. 136 с.
- И в а н о в а Н. Т. Методика некоторых гематологических исследований рыб. — В кн.: Типовые методики исследования продуктивности видов рыб в пределах их ареала. Ч. 1, Вильнюс, 1974, с. 83—90.

- Кротов А. И. Содержание и культивирование паразитических червей в искусственных условиях. — Усп. соврем. биол., 1958, т. 46, вып. 2 (5), с. 230—239.
- Куперман Б. Н., Шулъман Р. Е. Опыт экспериментального изучения факторов, влияющих на размножение и численность дактилогирусов леща. — Паразитология, 1978, т. 12, № 2, с. 101—107.
- Мусселиус В. А. Методы культивирования паразитов — в ихтиопаразитологии. — В кн.: VII Всес. совещ. по паразитам и болезням рыб (Тез. докл.). Л., 1979, с. 75—76.
- Стражник Л. В., Давыдов О. Н. О роли повышенных температур в жизнедеятельности некоторых цестод рыб. — Паразитология, 1975, т. 9, № 1, с. 37—46.
- Арме С. Histochemical and biochemical studies on some enzymes of *Ligula intestinalis* (Cestoda; Pseudophyllidea). — J. Parasitology, 1966, vol. 52, p. 63—68.
- Бескерт Н. Culture of some common fish parasites for experimental studies. — Auburn Univ., Agric. Exp. Stn., Zool-Entomol. Dep. Ser., Fish, 1967, vol. 5, p. 1—28.
- Беллер С. R. Fish Parasites: The cryopreservation of *Ichthyophthirius multifiliis*. — Fish Health News, 1980, vol. 9, N 3, p. 1.
- Ферретти Г., Габриэле Ф. In vitro cestode cultures — III: relation of parasite growth to culture medium with particular regard to the non-synthetic component. — Riv. parasitol., 1979, vol. 40, N 1—2, p. 105—114.
- Гиттино П., Андруетто С., Виглиани Е. The amebiasis of hatchery rainbow trout. — Rivista italiana di piscicoltura e ittiopatologia, 1977, vol. 3, p. 74—89.
- Хинес Р. С., Спират Д. Т. Ichthyophthiriasis in the mirror carp *Cyprinus carpio* L. 2. Leukocyte response. — J. Fish Biol., 1973, vol. 5, N 4, p. 527—534.
- Хлод С. Proby hodowania *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876 in vitro. — Wiadom. parasitol., 1967, vol. 13, N 2—3, p. 279—282.
- Матскаси Л., Хайдю Е. In vitro culture of *Trypanosoma markewitschi* Salewska, 1950, from *Silurus glanis*. — In: Parasites and parasitic diseases of fish (abstracts of Papers) I International Symposium of Ichthyoparasitology. Ceske Budejovice, 1983, p. 67.
- Смит Дж. Д. The Physiology of Cestodes. Edinburgh, 1969. 279 p.
- Вольф К., Марки М. Е. Myxosoma cerebralis; in vitro sporulation of the myxosporidian of salmonid whirling disease. — J. Protozool., 1976, vol. 23, N 3, p. 425—427.
- Вуо П. Т. К. Experimental cryptobiasis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). — In: Fourth International Congress of Parasitology. Short com., Sect. C., Warszawa, 1978, p. 202—203.

Всесоюзный НИИ  
Трудового рыбного хозяйства  
пос. Рыбное Московской обл.

Поступило 19 X 1983

CULTIVATION OF ICHTHYOPHTHIRIUS MULTIFILIIS (CILIATA,  
OPHRYOGLLENIDAE) AND EVALUATION OF ITS EFFECT ON FISH ORGANISM

V. A. Musselius, V. F. Vaniatinsky, N. A. Golovina

SUMMARY

For several years this pathogenic carp parasite has been cultivated on carp in tanks. Water temperature from 10 to 12 °C, pH from 6.7 to 8.75, ammonia nitrogen no more than 6 mg/l, and oxygen from 5 to 6 mg/l were observed to be optimal for maintaining the host-parasite system. Pathological changes in the carp organism under the effect of *I. multifiliis* occur at the intensity of over 100 Ciliata per fish.