

УДК 576.895.121

**ОЦЕНКА ПАРАЗИТО-ХОЗЯИННЫХ ТРОФИЧЕСКИХ
ОТНОШЕНИЙ ТРЕМАТОД И МОЛЛЮСКОВ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНАЛИЗА СТАБИЛЬНЫХ ИЗОТОПОВ**

© Н. И. Юрлова,¹ * Ш. Сикано,² Г. Канайя,^{2,3}
Н. М. Растяженко,¹ С. Н. Водяницкая¹

¹ Институт систематики и экологии животных СО РАН
ул. Фрунзе, 11, Новосибирск, 630091

* E-mail: yurlova@ngs.ru

² Center for Northeast Asian Studies
Tohoku University, 41 Kawauchi, Sendai, Japan

³ National Institute for Environmental Studies
16—2 Onogawa, Tsukuba 305—8506, Japan

Поступила 26.04.2014

Приведены результаты исследования трофических паразито-хозяйинных отношений между личинками трематод (церкарии и метацеркарии) и их хозяевами-моллюсками на основе анализа стабильных изотопов углерода $\delta^{13}\text{C}$ ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) и азота $\delta^{15}\text{N}$ ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) в тканях моллюсков, церкарий и метацеркарий. Церкарии были обеднены изотопами азота $\delta^{15}\text{N}$ и углерода $\delta^{13}\text{C}$ относительно мускулатуры ноги, также выявлено обеднение изотопа углерода $\delta^{13}\text{C}$ относительно гепатопанкреаса, но слабое обогащение изотопа азота относительно пищеварительной железы хозяина. Метацеркарии обогащены изотопами азота $\delta^{15}\text{N}$ относительно тканей моллюсков, но обеднены изотопами углерода $\delta^{13}\text{C}$ относительно ноги и слабо обогащены относительно пищеварительной железы моллюсков. Возможными объяснениями подобных изотопических различий между церкариями и метацеркариями могут быть селективность питания специфическими аминокислотами или липидами, различия в метаболизме на разных стадиях развития паразита. Показан разный уровень обогащения изотопов азота у метацеркарий разных таксонов, что, возможно, связано с паразитированием в разных органах и спецификой питания представителей разных таксонов. Нами впервые проведено сравнительное изучение трофических отношений между хозяином и эндопаразитами на разных стадиях жизненного цикла с использованием анализа стабильных изотопов.

Ключевые слова: трематода, церкария, метацеркария, моллюск, трофические отношения, стабильные изотопы, фракционирование, углерод, азот.

Природное соотношение стабильных изотопов углерода ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, обозначаемое как $\delta^{13}\text{C}$) и азота ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, обозначаемое как $\delta^{15}\text{N}$) широко используется в последние годы для анализа источников питания макробеспозвоночных в различных экосистемах (например, Vander Zanden, Vade-

bonsoeur, 2002; Doi et al., 2004, 2006). Метод стабильных изотопов основан на том, что соотношение стабильных изотопов азота и углерода преобразовывается от пищевых источников к потребителям и обеспечивает непрерывное измерение трофической позиции организма (Post, 2002; McCutchan et al., 2003).

С каждым трофическим уровнем в пищевых сетях происходит так называемое трофическое обогащение, или фракционирование стабильных изотопов, определяемое как разница между изотопной подписью потребителя и пищи. Разница между изотопной подписью углерода ($\delta^{13}\text{C}$) потребителя и пищи позволяет определить пищевые источники углерода, а разница между изотопной подписью азота ($\delta^{15}\text{N}$) потребителя и пищи — структуру пищевых сетей и дает возможность приблизительно определить относительный трофический уровень разных животных в любой экосистеме (Post, 2002).

С каждым трофическим уровнем подпись азота обычно увеличивается на 2—5 ‰ (DeNiro, Epstein, 1981; Post, 2002). Подпись углерода очень незначительно увеличивается по трофическим уровням между консументом и пищей (лишь на 0.4—0.8 ‰), т. е. остается близкой к пище, и является очень хорошим индикатором пищевого источника углерода (Post, 2002; McCutchan et al., 2003).

Таким образом, на основе фракционирования изотопов между потребителем и пищей можно приблизительно определить: 1) первичные пищевые источники по содержанию в них изотопов углерода ($\delta^{13}\text{C}$), 2) трофический уровень животного по содержанию в них изотопов азота ($\delta^{15}\text{N}$).

В последние годы анализ стабильных изотопов стали успешно применять для изучения трофических паразито-хозяйинных отношений в природных трофических сетях (см. обзор: Lafferty et al., 2008; Doi et al., 2010; Gómez-Díaz, Gonzalez-Solis, 2010). В паразитах как потребителях ожидается увеличение значения стабильных изотопов азота $\delta^{15}\text{N}$ относительно их хозяев (Post, 2002). Однако ряд исследований показал негативное фракционирование изотопов между хозяевами и паразитами различных групп (Pinnegar et al., 2001; Deudero et al., 2002; Doi et al., 2010). Это означает, что ткани паразита обеднены изотопами углерода ^{13}C и/или азота ^{15}N по сравнению с тканями хозяина (McCutchan и др., 2003). В ряде работ показано, что изотопная ниша паразита может варьировать в зависимости от паразито-хозяйинной системы (Pinnegar et al., 2001; O'Grady, Dearing, 2006). Кроме того, уровень обогащения изотопами может варьировать у одного таксона паразита в разных хозяевах (Deudero et al., 2002) или между таксонами паразитов в одном хозяине (Boag et al., 1998; Neilson et al., 2005; Gómez-Díaz, Gonzalez-Solis, 2010).

Несмотря на то что в настоящее время выполнен ряд исследований трофических паразито-хозяйинных отношений с использованием стабильных изотопов, такого рода данные все еще остаются ограниченными. Единичны исследования трофических отношений трематод (Iken et al., 2001; Doi et al., 2010) и совсем отсутствуют данные по трофическим отношениям хозяев и трематод на разных стадиях жизненного цикла, в том числе в системе «моллюск—трематода».

Моллюски являются обязательными хозяевами для партеногенетических поколений трематод, в которых развиваются свободноживущие рас-

селительные личинки — церкарии. Для представителей ряда таксономических групп (например, сем. Echinostomatidae, Strigeidae, Cyathocotylidae и др.) моллюски также служат хозяевами и для трансмиссивных паразитических личинок гермафродитного поколения — метацеркарий и, таким образом, представляют собой интересную модель для изучения трофических отношений. Целью настоящего исследования было исследовать трофические отношения между хозяином и паразитом на разных стадиях жизненного цикла в системе «моллюски — трематоды», используя анализ стабильных изотопов углерода $\delta^{13}\text{C}$ и азота $\delta^{15}\text{N}$.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследуемые организмы, место сбора материала и подготовка образцов

В качестве модельных видов трематод взяты представители семейств Echinostomatidae (церкарии и метацеркарии *Echinoparyphium recurvatum*, церкарии *Hypodereum conoideum*), Plagiorchidae (церкарии *Plagiorchis mutationis*), Strigeidae (метацеркария *Cotylurus cornutus*), Diplostomatidae (церкарии *Diplostomum chromatophorum*, *D. volvens*). Исследованные трематоды имеют триксенный жизненный цикл, в реализации которого участвуют первые и вторые промежуточные и окончательный хозяева. Мы исследовали пресноводных моллюсков *Lymnaea stagnalis* и *L. tumida*, доминирующих в сообществе брюхоногих моллюсков Западной Сибири (Юрлова, Водяницкая, 2005) и являющихся первыми и вторыми промежуточными хозяевами для указанных видов трематод (Юрлова, 2003; Yurlova et al., 2006).

Материал для исследования собран в приустьевой зоне р. Каргат бассейна оз. Чаны на юге Западной Сибири ($54^{\circ}37'76''$ с. ш., $78^{\circ}13'07''$ в. д.) в августе 2009 г. В лаборатории у всех моллюсков измеряли высоту раковины от вершины до устья при помощи штангенциркуля. Всех собранных моллюсков рассаживали индивидуально в емкости объемом 150—300 мл (в зависимости от размера моллюска), наполовину заполненные профильтрованной речной водой. Емкости с моллюсками помещали на освещенную солнцем площадку или под свет настольной лампы и через 2 ч просматривали их под стереомикроскопом МБС-9 для выявления эмиссии церкарий.

При определении видовой принадлежности использовали опубликованные описания церкарий (Гинецинская, Добровольский, 1964; Шигин, 1977; Combes, 1980; Черногоренко, 1983).

Для измерения соотношения изотопов в тканях хозяев и паразитов нами были собраны ткани ноги и пищеварительной железы от зараженных моллюсков, целиком церкарии и метацеркарии. Образцы тканей хозяев и личинок трематод высушивали до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре $+60^{\circ}\text{C}$ в течение не менее 24 ч. Также мы измеряли соотношение изотопов у незараженных моллюсков, поскольку присутствие спорозист и/или редий влияет на значения изотопов пищеварительной железы (Doi et al., 2008). Для измерения соотношения изотопов с применени-

ем масс-спектрометра у таких мелких объектов как церкарии необходимо их большое количество, поэтому нами был разработан специальный метод концентрации церкарий (Юрлова, Водяницкая, 2009). Для изотопного анализа от каждого моллюска было получено 1000 и более церкарий. Кратко суть метода заключается в следующем. Церкарий, вышедших из естественно зараженных моллюсков, отлавливали пипеткой и помещали в профильтрованную речную воду. Воду с церкариями фильтровали через предварительно обожженный (precombusted) GF / F стеклянный фильтр (glass filter). Фильтр с церкариями высушивали в термостате при температуре +60 °С не менее 24 ч и хранили при -20 °С до проведения анализа стабильных изотопов. Для выполнения изотопного анализа образцы растирали до порошкообразной массы, обрабатывали смесью метанола и хлороформа в соотношении 2 : 1 для удаления липидов (Yoshii et al., 1999). Все образцы обрабатывали 1M раствором HCl для удаления карбонатов (Kanaya et al., 2009).

Определение соотношения стабильных изотопов и статистический анализ

Для определения соотношения стабильных изотопов в образцах использовали масс-спектрометр DELTA plus; Finnigan MAT (Германия) в университете Тохоку, Япония. Изотопный состав обозначается как дельта (δ). Он выражается, как отношение тяжелого изотопа к легкому и измеряется в тысячных долях отклонения от международного стандарта:

$$\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) = (R_{\text{образца}} / R_{\text{стандарта}} - 1) \times 1000,$$

$$\delta^{15}\text{N} (\text{‰}) = (R_{\text{образца}} / R_{\text{стандарта}} - 1) \times 1000,$$

где R — соотношение $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ или $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ для $\delta^{13}\text{C}$ или $\delta^{15}\text{N}$ соответственно. Стандартом для углерода ($\delta^{13}\text{C}$) является Pee Dee belemnite (PDB) и для азота ($\delta^{15}\text{N}$) — атмосферный N_2 . Аналитические ошибки определения были в пределах $\pm 0.2 \text{‰}$ как для $\delta^{13}\text{C}$, так и для $\delta^{15}\text{N}$.

Фракционирование (разделение), т. е. изменение соотношения в ходе метаболических процессов изотопов углерода и азота ($\Delta^{13}\text{C}$ и $\Delta^{15}\text{N}$) между моллюском-хозяином и трематодами каждого вида, рассчитывали как разницу между изотопной подписью потребителя (паразита) и пищи (ткань хозяина): $\Delta^{13}\text{C}$ или $\Delta^{15}\text{N} = (\delta^{13}\text{C}$ или $\delta^{15}\text{N}$ паразита) — ($\delta^{13}\text{C}$ или $\delta^{15}\text{N}$ ткани хозяина).

Связь изотопных подписей паразитов с таковыми хозяев оценивали с помощью коэффициента корреляции Пирсона. Для сравнения соотношения стабильных изотопов у моллюсков разных видов (*L. stagnalis* и *L. tumida*), у метацеркарий разных видов (*E. recurvatum* и *C. cornutus*), а также у всех в сумме церкарий и метацеркарий каждого из двух видов использовали тест Mann-Whitney и t-тест. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Office Excel 2003, Statistica 6.0 и Past 2.10.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Величина соотношения стабильных изотопов углерода $\delta^{13}\text{C}$ и азота $\delta^{15}\text{N}$ варьировала в тканях зараженных моллюсков и в исследованных образцах церкарий и метацеркарий (табл. 1, 2; рис. 1). Изотопная подпись азота церкарий положительно коррелировали с таковой ноги и пищеварительной железы ($r = 0.99$ и 0.98 , $P < 0.05$ соответственно), подпись изотопа углерода $\delta^{13}\text{C}$ церкарий — с таковой пищеварительной железы моллюсков ($r = 0.9$, $P < 0.05$). Фракционирование изотопов как углерода $\Delta^{13}\text{C}$, так и азота $\Delta^{15}\text{N}$ церкарий относительно ноги моллюсков было отрицательным. Фракционирование изотопов азота $\Delta^{15}\text{N}$ у церкарий относительно пищеварительной железы было слабо положительным (0.4 ± 0.9), а углерода $\Delta^{13}\text{C}$ — отрицательным (-0.43 ± 0.2) (табл. 1, рис. 2). У обоих исследованных видов метацеркарий подпись изотопа углерода положительно коррелировала с таковой ноги ($r = 0.87$ и 0.86 , $P < 0.05$ соответственно для *C. cornutus* и *E. recurvatum*); связь с пищеварительной железой была недостоверна у обоих видов ($r = 0.48$, $P = 0.1$). Подпись изотопа азота метацеркарий *C. cornutus* не показала связи с таковой в тканях моллюска ($r = 0.21$, $P = 0.7$ и $r = 0.58$, $P = 0.2$); у метацеркарий *E. recurvatum* эта связь была отрицательной и достоверной ($r = -0.76$, $P = 0.05$) с пищеварительной железой и недостоверной ($r = -0.39$, $P = 0.5$) с ногой.

Метацеркарии обоих видов обогащены азотом как относительно ноги (2.8 ± 0.7 ‰, $P < 0.005$ и 1.4 ± 1.6 ‰, $P < 0.05$ для *C. cornutus* и *E. recurvatum* соответственно), так и относительно пищеварительной железы (3.6 ± 0.7 ‰, $P < 0.05$ и 1.6 ± 2 ‰, $P < 0.005$ для *C. cornutus* и *E. recurvatum* соответственно) (рис. 2). Изотопы углерода $\delta^{13}\text{C}$ у метацеркарий обоих видов были обеднены относительно ноги (-0.4 ± 0.8 и -0.1 ± 0.4 ‰, $P > 0.5$ для обоих видов) и обогащены относительно пищеварительной железы. При этом величина обогащения у метацеркарий *E. recurvatum* была выше (1.3 ± 1.2 ‰), чем у *C. cornutus* (0.4 ± 0.6 ‰) ($P < 0.05$) (табл. 2, рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Мы исследовали трофические отношения трематод на двух стадиях жизненного цикла (церкарии и метацеркарии) с их хозяевами — моллюсками. Значения соотношения стабильных изотопов углерода $\delta^{13}\text{C}$ и азота $\delta^{15}\text{N}$ в тканях исследованных моллюсков *L. stagnalis* и *L. tumida* были сходны с опубликованными нами ранее данными (Doi et al., 2008; 2010). Церкарии изученных видов трематод показали обеднение изотопов как азота $\delta^{15}\text{N}$, так и углерода $\delta^{13}\text{C}$ относительно ноги моллюсков. Относительно пищеварительной железы изотоп углерода $\delta^{13}\text{C}$ церкарий также обеднялся, но изотоп азота $\delta^{15}\text{N}$ у одного из исследованных видов (*D. chrotophorum*) показал слабое обогащение. Результаты настоящего исследования подтвердили полученные нами ранее данные об отрицательном фракционировании изотопов азота и углерода у церкарий *E. recurvatum* и *P. mutationis* относительно тканей моллюска-хозяина (Doi et al., 2010). Они также согласуются с исследованиями, показавшими обеднение изотопа азота у других групп паразитов, в том числе гельминтов (Boag et al., 1998;

Таблица 1

Изотопный состав $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ церкарий трематод, пищеварительной железы и ноги моллюска—хозяина и обогащение изотопов углерода $\Delta^{13}\text{C}$ и азота $\Delta^{15}\text{N}$ церкарии относительно тканей хозяина

Table 1. Isotopic composition of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in trematode cercariae, hepatopancreas, and foot of the host snail species and isotopic enrichment of $\Delta^{13}\text{C}$ and $\Delta^{15}\text{N}$ in cercariae.

| Вид | Церкария (паразит) | | Нога | | Пищеварительная железа | | Церкария — нога | | Церкария — пищеварительная железа | |
|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| | $\delta^{13}\text{C}$, ‰ | $\delta^{15}\text{N}$, ‰ | $\Delta^{13}\text{C}$, ‰ | $\delta^{15}\text{N}$, ‰ | $\delta^{13}\text{C}$, ‰ | $\delta^{15}\text{N}$, ‰ | $\Delta^{13}\text{C}$, ‰ | $\Delta^{15}\text{N}$, ‰ | $\Delta^{13}\text{C}$, ‰ | $\Delta^{15}\text{N}$, ‰ |
| <i>L. stagnalis</i> ¹ | -31.8 | 14.3 | -28.8 | 14.4 | -31.2 | 14.0 | -3.0 | -0.1 | -0.6 | 0.3 |
| <i>L. stagnalis</i> ¹ | -31.9 | 2.4 | — | — | -31.3 | 3.9 | — | — | -0.6 | -1.5 |
| <i>L. stagnalis</i> ² | -31.8 | 5.5 | -30.8 | 5.4 | -31.5 | 4.9 | -1.0 | 0.1 | -0.3 | 0.6 |
| <i>L. stagnalis</i> ² | -30 | 15.0 | -28.0 | 16.3 | -28.5 | 13.5 | -1.9 | -1.3 | -1.4 | 1.6 |
| <i>L. stagnalis</i> ² | -32.1 | 6.2 | — | — | -32.1 | 4.6 | — | — | -0.02 | 1.5 |
| <i>L. tumida</i> ³ | -31.6 | 4.9 | -31.6 | 5.9 | -31.7 | 5.3 | -0.02 | -1.0 | 0.1 | -0.4 |
| <i>L. tumida</i> ⁴ | -31.2 | 6.9 | -31.2 | 6.8 | -30.9 | 6.3 | -0.02 | 0.1 | 0.3 | 0.6 |
| <i>L. tumida</i> ⁴ | -31.8 | 6.6 | -31.2 | 6.8 | -30.9 | 6.3 | -0.62 | -0.3 | -0.9 | 0.2 |
| <i>L. tumida</i> ⁵ | -31.2 | 6.0 | -30.6 | 6.5 | -31.1 | 5.6 | -0.6 | -0.55 | -0.1 | 0.4 |

Примечание. Моллюски заражены: ¹*Plagiorchis mutationis*, ²*Diplostomum chromathophorum*, ³*D. volvens*, ⁴*Echinoparyphium recurvatum*, ⁵*Hypoderaeum co-noideum*.

Таблица 2

Изотопный состав $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ метацеркарий трематод, пищеварительной железы и ноги моллюска—хозяина и обогащение изотопов $\Delta^{13}\text{C}$ и $\Delta^{15}\text{N}$ метацеркарий относительно тканей хозяина

Table 2. Isotopic composition of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in trematode metacercariae, hepatopancreas, and foot of the snail host and isotopic enrichment of $\Delta^{13}\text{C}$ and $\Delta^{15}\text{N}$ in metacercariae

| Вид | Метацеркария (паразит) | | Нога | | Пищеварительная железа | | Метацеркария — нога | | Метацеркария — пищеварительная железа | |
|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| | $\delta^{13}\text{C}$, ‰ | $\delta^{15}\text{N}$, ‰ | $\delta^{13}\text{C}$, ‰ | $\delta^{15}\text{N}$, ‰ | $\delta^{13}\text{C}$, ‰ | $\delta^{15}\text{N}$, ‰ | $\Delta^{13}\text{C}$, ‰ | $\Delta^{15}\text{N}$, ‰ | $\Delta^{13}\text{C}$, ‰ | $\Delta^{15}\text{N}$, ‰ |
| <i>L. stagnalis</i> ¹ | -30.0 | 8.8 | -29.6 | 5.6 | -30.5 | 4.9 | -0.3 | 3.3 | 0.6 | 4.0 |
| <i>L. stagnalis</i> ¹ | -32.0 | 8.2 | -30.7 | 6.4 | -31.6 | 5.0 | -1.3 | 1.8 | -0.4 | 3.3 |
| <i>L. stagnalis</i> ¹ | -30.8 | 7.8 | -31.6 | 4.3 | -31.8 | 3.7 | 0.9 | 4.3 | 1.1 | 4.1 |
| <i>L. stagnalis</i> ¹ | -30.7 | 8.6 | -31.6 | 4.3 | -31.8 | 3.7 | 0.9 | 4.3 | 1.1 | 4.9 |
| <i>L. stagnalis</i> ¹ | -31.8 | 8.4 | -31.3 | 5.3 | -31.0 | 5.9 | -0.5 | 3.2 | 0.1 | 2.5 |
| <i>L. stagnalis</i> ¹ | -31.3 | 8.5 | -30.4 | 5.4 | -31.6 | 4.4 | -0.9 | 3.1 | 0.3 | 4.0 |
| <i>L. stagnalis</i> ² | -30.6 | 7.4 | -30.0 | 5.4 | -31.7 | 4.0 | -0.7 | 2.0 | 3.4 | 1.1 |
| <i>L. stagnalis</i> ² | -31.2 | 9.0 | -31.3 | 5.3 | -32.0 | 4.4 | 0.1 | 3.7 | 0.8 | 4.6 |
| <i>L. stagnalis</i> ² | -30.9 | 5.7 | -31.3 | 5.3 | -31.9 | 5.9 | 0.4 | 0.4 | 1.2 | -0.2 |
| <i>L. stagnalis</i> ² | -30.6 | 6.8 | -30.4 | 5.4 | -31.6 | 4.4 | -0.2 | 1.5 | 1.0 | 2.4 |
| <i>L. stagnalis</i> ² | -30.6 | 6.1 | -30.4 | 6.4 | -30.7 | 6.0 | -0.2 | -0.3 | 0.1 | 0.1 |

Примечание. Моллюски заражены метацеркариями: ¹ *Cotylurus cornutus*, ² *Echinoparyphium recurvatum*.

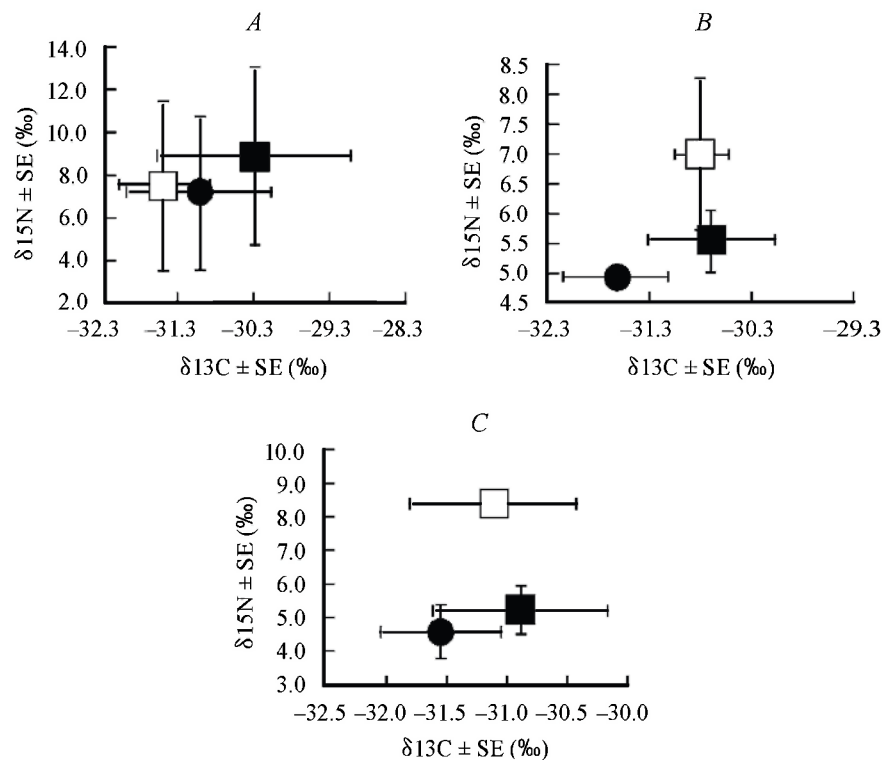


Рис. 1. Изотопный состав тканей моллюсков-хозяев и трематод: церкарий (A), метацеркарий *C. cornutus* (B) и метацеркарий *E. recurvatum* (C).

Среднее значение $\delta^{15}\text{N}$ и $\delta^{13}\text{C}$ (\pm стандартная ошибка) тканей хозяев и паразитов; белый квадрат — паразит (церкария или метацеркария), черный квадрат — мускулатура ноги моллюска, черный круг — пищеварительная железа моллюска.

Fig. 1. Isotopic composition of snail-host and cercariae (A) and metacercariae of *C. cornutus* (B) and *E. recurvatum* (C) tissues.

Mean $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ (\pm SE) values of host tissue and parasite; open squares designate the parasite (cercaria or metacercaria); black squares designate the foot; black circles, designate snail hepatopancreas.

Pinnegar et al., 2001; Deudero et al., 2002; Neilson et al., 2005; O'Grady, Dearing, 2006). В рамках исследования механизма отрицательного фракционирования изотопов между хозяином и паразитом предложена модель паразито-хозяинного фракционирования изотопов азота (McCutchan et al., 2003; Olive et al., 2003). Согласно этой модели, если паразиты питаются избирательно на одном (отдельном) фрагменте тканей хозяина, то уровень изотопов паразита может обедняться относительно хозяина. В случае с эндопаразитами, если азот, выделяемый паразитом сохраняется внутри хозяина и повторно используется через изменение глутамид-дегидрогеназной реакции (Barret, 1981), то фракционирование изотопов азота будет ближе к негативному или небольшому позитивному (Olive et al., 2003).

В отличие от церкарий метацеркарии обоих исследованных видов показали обогащение изотопов азота $\delta^{15}\text{N}$ как относительно ноги, так и относительно пищеварительной железы хозяина (рис. 2). Подпись азота $\delta^{15}\text{N}$ метацеркарий *C. cornutus* показывает ожидаемое, а метацеркарий *E. recurvatum* — близкое к ожидаемому обогащение (2—5 ‰) между потребителем

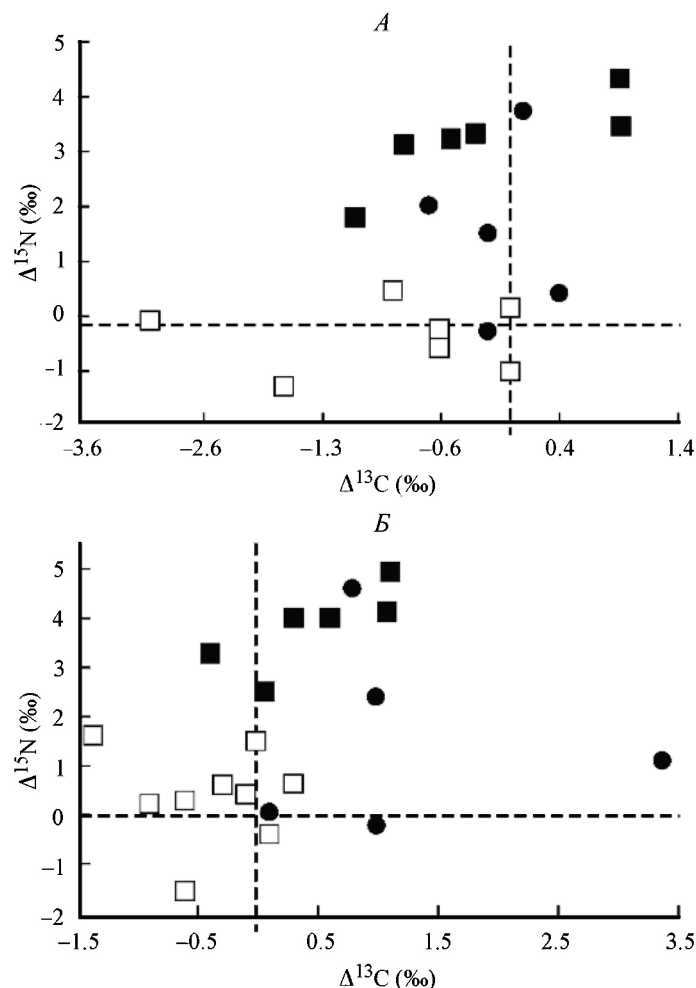


Рис. 2. Изотопное обогащение ($\Delta^{15}\text{N}$ и $\Delta^{13}\text{C}$) у церкарий и метацеркарий трематод относительно тканей хозяина: ноги (А) и пищеварительной железы (Б) моллюсков.

Белый квадрат — церкарии, черный квадрат — метацеркария *C. cornutus*, черный круг — метацеркария *E. recurvatum*.

Fig. 2. Isotopic enrichment ($\Delta^{15}\text{N}$ and $\Delta^{13}\text{C}$) in cercariae and metacercariae in relation to foot (A) and hepatopancreas (B) of the snail host tissues.

Open square designates cercaria, black squares, *C. cornutus* metacercariae; and black circles, *E. recurvatum* metacercariae.

и пищей. Зарегистрированное более высокое значение подписи азота $\delta^{15}\text{N}$ у метацеркарий *C. cornutus* по сравнению с метацеркариями *E. recurvatum* ($P < 0.05$), возможно, связано с локализацией их в разных органах и связанными с этим особенностями трофики.

Паразитизм представляет собой самую обычную стратегию консументов среди организмов (Lafferty et al., 2008). В недавней работе высказывалось предположение о том, что на фракционирование изотопов достоверно влияет таксономическая группа, стадия развития и пища консумента (Caut et al., 2009). В нашем исследовании разные стадии развития парази-

та, а именно церкарин и метацеркарин, связанные с моллюсками, показали различия в обогащении изотопов. Церкарии, как правило, обедняются, а метацеркарии обогащаются изотопами азота. Интересно отметить, что при этом партениты и церкарии всех исследованных видов трематод, а также метацеркарии *C. cornutus* локализируются в пищеварительной железе, а метацеркарии *E. recurvatum* — в почках, перикарде и мантийной полости моллюсков.

Ранее сообщалось о внутрихозяйном разделении ресурсов между паразитами разных таксонов (Boag et al., 1998; Neilson et al., 2005) при паразитировании в одном и том же органе. Например, кишечные нематоды, паразитирующие у кролика, обогащаются изотопом азота ^{15}N , а кишечные цестоды в том же хозяине обедняются изотопом азота ^{15}N (Boag et al., 1998; Neilson et al., 2005). Метацеркарии заключены в цисту, благодаря проницаемости которой между паразитом и хозяином устанавливаются метаболические взаимодействия, приводящие к использованию паразитом энергетического потенциала хозяина (Галактионов, Добровольский, 1998). Свободноживущие личинки церкарии не получают питательные вещества, находясь во внешней среде, они накапливают их за время паразитирования в хозяине, развиваясь внутри спороцист или редий (Гинецинская, 1968). Спороцисты лишены пищеварительной системы и воспринимают пищу всей поверхностью тела из гемолимфы или окружающих тканей, а редиям, имеющим пищеварительную систему, свойственна как гистофагия, так и гематофагия (Cheng, 1963, цит. по: Гинецинская, 1968). Кроме того, партениты могут участвовать во внеорганизменном (внекишечном) пищеварении (см. обзор: Добровольский и др., 1983).

Выявленные различия в ^{15}N обогащении церкарий и метацеркарий, а именно обеднение у церкарий и обогащение у метацеркарий, возможно, могут быть объяснены избирательностью их питания специфическими аминокислотами или липидами, различиями в метаболизме, связанными с разными стадиями развития паразита.

Наблюдаемые различия в уровне обогащения изотопов азота ^{15}N у двух исследованных видов метацеркарий (более высокий у *C. cornutus* по сравнению с *E. recurvatum*, t-тест 0.6, $P < 0.05$) могут быть обусловлены особенностью трофики, связанной как с их разной таксономической принадлежностью на уровне отряда, так и с паразитированием в разных органах хозяина. Метацеркарии *C. cornutus* паразитируют в пищеварительной железе, а метацеркарии *E. recurvatum* — в почке, перикарде и мантийной полости.

Зарегистрированное более высокое значение подписи азота $\delta^{15}\text{N}$ у метацеркарий *C. cornutus* по сравнению с метацеркариями *E. recurvatum* ($P < 0.05$), возможно, обусловлено их локализацией в разных органах и связанными с этим особенностями трофики.

Наши результаты показали трофические паразито-хозяйные отношения между моллюсками и развивающимися в них разными стадиями трематод, а именно церкариями и метацеркариями с использованием анализа стабильных изотопов. Подписи изотопов азота и углерода у церкарий обеднились, а у метацеркарий обогащались по отношению к потребляемым тканям хозяина. При этом степень обогащения у метацеркарий различалась между видами, что может указывать на разделение ресурсов между видами паразита в организме хозяина.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 10-04-01293-а, 12-04-92111-ЯФ_а и 13-04-02075-а).

Список литературы

- Галактионов К. В., Добровольский А. А. 1998. Происхождение и эволюция жизненных циклов трематод. СПб.: Наука. 402 с.
- Гинецинская Т. А. 1968. Трематоды, их жизненные циклы, биология и эволюция. Л.: Наука. 410 с.
- Гинецинская Т. А., Добровольский А. А. 1964. К фауне личинок трематод из пресноводных моллюсков дельты Волги (сем. Echinostomatidae). Тр. Астрахан. зап. веди. Астрахань. 9 : 64—104.
- Добровольский А. А., Галактионов К. В., Мухамедов Г. К., Синха Б. К., Тихомиров И. А. 1983. Партеногенетические поколения трематод. Тр. Ленинград. общ-ва естествоисп. 82 (4) : 1—108.
- Черногоренко М. Н. 1983. Личинки трематод в моллюсках Днепра и его водохранилищ. Киев: Наукова думка. 212 с.
- Шигин А. А. 1977. Морфология, биология и таксономия рода *Diplostomum* от чайковых птиц Палеарктики. Тр. ГЕЛАН СССР. 27 : 5—64.
- Юрлова Н. И. 2003. Влияние паразитирования трематод на репродуктивный потенциал природной популяции *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Lymnaeidae). Зоол. журн. 82 (9) : 1027—1037.
- Юрлова Н. П., Водяницкая С. Н. 2005. Многолетние изменения видового состава и численности легочных моллюсков (Gastropoda, Pulmonata) в озере Чаны (юг Западной Сибири). Сиб. экологич. журн. 2 : 255—266.
- Юрлова Н. П., Водяницкая С. Н. 2009. Метод оценки биомассы церкарий — свободноживущих трансмиссивных личинок трематод. Материалы конференции паразитологов Сибири и Дальнего Востока. Taler-Press. Новосибирск. 329—330.
- Barrett J. 1981. Biochemistry of parasitic helminthes. London, MacMillan. 308 p.
- Boag B., Neilson R., Robinson D., Scrimgeour C. M., Handley L. L. 1998. Wild rabbit host and some parasites show trophic-level relationships for delta ¹³C and delta ¹⁵N: a first report. Isotopes in Environmental and Health Studies. 34 : 81—85.
- Caut S., Angulo E., Courchamp F. 2009. Variation in discrimination factors (D¹⁵N and D¹³C): the effect of diet isotopic values and applications for diet reconstruction. Journal of Applied Ecology. 46 : 443—453.
- Combes C. 1980. Atlas Mondial Des Cercaires-Cemoires du Museum National D'Histoire Naturelle. Paris, Muse'um national d'histoire naturelle. 254 p.
- Gómez-Díaz E., González-Solis J. 2010. Trophic structure in a seabird host-parasite food web: Insights from stable isotope analyses. PLoS ONE. 5 (5) : e10454. doi:10.1371/journal.pone.0010454.
- DeNiro M. J., Epstein S. 1981. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. Geochimica et Cosmochimica Acta. 45 : 341—351.
- Deudero S., Pinnegar J. K., Polunin N. V. 2002. Insights into fish host-parasite trophic relationships revealed by stable isotope analysis. Disease of Aquatic Organisms. 7 : 77—86.
- Doi H., Kikuchi E., Mizota C., Satoh N., Shikano S., Yurlova N., Zuykova E., Yadrenkina E. 2004. Carbon, nitrogen, and sulfur isotope changes and hydro-geological processes in a saline lake chain. Hydrobiologia. 529 : 225—235.
- Doi H., Zuykova E., Kikuchi E., Shikano S., Kannou K., Yurlova N., Yadrenkina E. 2006. Spatial change in carbon and nitrogen stable isotopes of the plankton food web in a saline lake ecosystem. Hydrobiologia. 571 : 395—400.

- Doi H., Yurlova N. I., Vodyanitskaya S. N., Kikuchi E., Shikano S., Zuykova E. I., Yadrenkina E. I. 2008. Parasite-induced changes in nitrogen isotope signatures of host tissues. *Journ. of Parasitol.* 94 : 292—295
- Doi H., Yurlova N. I., Vodyanitskaya S. N., Kanaya G., Shikano S., Kikuchi E. 2010. Estimating isotope fractionations between cercariae and host snail using isotope measurements designed for very small organism. *Journ. of Parasitol.* 96 : 314—317.
- Iken K., Brey T., Wand U., Voigt J., Junghans P. 2001. Food web structure of the benthic community at Porcupine Abyssal Plain (NE Atlantic): a stable isotope analysis. *Progress in Oceanography.* 50 : 383—405.
- Kanaya G., Yadrenkina E. N., Zuykova E. I., Kikuchi E., Doi H., Shikano Sh., Mizota C., Yurlova N. I. 2009. Contribution of organic matter sources to cyprinid fishes in the Chany Lake—Kargat River estuary, western Siberia. *Marine and Freshwater Research.* 60 : 510—518.
- Lafferty K. D., Allesina S., Arim M., Briggs C. J., De Leo G. et al. 2008. Parasites in food webs: the ultimate missing links. *Ecology Letters.* 11 : 533—546.
- McCutchan J. H., Lewis W. M., Kendall C., McGratch C. C. 2003. Variation in trophic shift for stable isotope ratios of carbon, nitrogen, and sulfur. *Oikos.* 102 : 378—390.
- Neilson R., Boag B., Hartley G. 2005. Temporal host-parasite relationships of the wild rabbit, *Orvctolagus cuniculus* (L.) as revealed by stable isotope analyses. *Parasitology.* 131 : 279—285.
- O'Grady S. P., Dearing M. D. 2006. Isotopic insight into host-endosymbiont relationships in Liolaemid lizards. *Oecologia.* 150 : 355—361.
- Olive P. J. W., Pinnegar J. K., Polunin N. V. C., Richards G., Welch R. 2003. Isotope trophic-step fractionation: a dynamic equilibrium model. *Journ. of Animal Ecology.* 72 : 608—617.
- Pinnegar J. K., Campbell N., Polunin N. V. C. 2001. Unusual stable isotope fractionation patterns observed for fish host-parasite trophic relationships. *Journ. of Fish Biology.* 59 : 494—503.
- Post D. M. 2002. Using stable isotopes to estimate trophic position: models, methods, and assumptions. *Ecology.* 83 : 703—718.
- van der Zanden M. J., Vadeboncoeur Y. 2002. Fishes as integrators of benthic and pelagic food webs in lakes. *Ecology.* 83 : 2152—2161.
- Yoshii K., Melnik N. G., Timoshkin O. A., Bondarenko N. A., Anoshko P. N. et al. 1999. Stable isotope analyses of the pelagic food web in Lake Baikal. *Limnology and Oceanography.* 44 : 502—511.
- Yurlova N. I., Vodyanitskaya S. N., Serbina E. A., Biserkov V. Y., Georgiev B. B., Chihev N. H. 2006. Temporal variation in prevalence and abundance of metacercariae in the pulmonate snail *Lymnaea stagnalis* in Chany Lake, West Siberia, Russia: long-term patterns and environmental covariates. *Journ. of Parasitol.* 92 : 249—259.

THE EVALUATION OF SNAIL HOST-TREMATODE PARASITE TROPHIC RELATIONSHIPS USING STABLE ISOTOPE ANALYSIS

N. I. Yurlova, Sh. Shikano, G. Kanaya, N. M. Rastyazhenko, S. N. Vodyanitskaya

Key words: trematoda, cercariae, metacercariae, parasite-host trophic relationships, endoparasite, stable isotope, fractionation, carbon, nitrogen.

SUMMARY

Stable isotope ratios of carbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $\delta^{15}\text{N}$) in snail-host tissue (the foot and hepatopancreas) and trematode parasites on two stages of their life cycle were analyzed. Trophic structure in co-occurring trematode larvae was examined

in the following species: five species of cercariae (*Echinoparyphium recurvatum*, *Hypodereum conoideum*, *Plagiorchis mutationis*, *Diplostomum chromatophorum* and *D. volvens*) and two species of metacercariae (*Cotylurus cornutus* and *Echinoparyphium recurvatum*) within two closely related snail hosts *Lymnaea stagnalis* and *L. tumida* using stable isotope analyses. Snail and parasite sampling was conducted in a riverine portion of the Kargat River of the Lake Chany basin, in the south of Western Siberia (54°37'76" N, 78°13'07" E), in August 2009.

Four out of five studied cercariae species were depleted in ^{15}N as well as in ^{13}C relatively to snail hosts tissues (foot and hepatopancreas), supporting our previously published data for *Plagiorchis mutationis* and *Echinoparyphium recurvatum* cercariae. Such fractionation of cercariae is untypical of the commonly observed relationship between consumers and their food. *D. chromatophorum* cercariae had demonstrated an insufficient enrichment in $\delta^{15}\text{N}$ volume in relation to the hepatopancreas. Both two species of metacercariae (*C. cornutus* and *E. recurvatum*) showed a significant enrichment in $\delta^{15}\text{N}$ volume relatively to the host tissue consumed (fractionation values ranging from 1.5 to 4 ‰ depending on the species). The differences in $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ volume between cercariae and metacercariae observed in this study illustrate the complexity of the host—parasite trophic relationships. Such isotopic differences between cercariae and metacercariae can probably be explained by selective consumption of specific amino acids or lipids or by changes in metabolism associated with the life cycle of the parasite. The present study represents the first comparative analysis of trophic relationships between the host and the endoparasite at different life cycle stages. It demonstrates the potency of the stable isotope analyses for understanding trophic relationships in multispecies parasite communities.
