

УДК 597.851:591.393:591.431:591.2

CHYTRIDIOMYCOSIS У ЛИЧИНОК *RANA ARVALIS* NILSSON НА СРЕДНЕМ УРАЛЕ

Трубетская Е.А.

Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, e-mail: trubet-l@mail.ru

На основании диагностических признаков приводятся доказательства, указывающие на то, что *Chytridiomycosis* существует в популяциях *Rana arvalis* на Среднем Урале. Показана методика обнаружения заболевания по аномалиям ротового аппарата личинок и отслеживания динамики частоты встречаемости его в популяции. В экстремальных условиях инфекция поражает ослабленных и ведет к их выбраковке, что приводит к ускорению адаптации популяции в целом в быстро изменяемой среде.

Ключевые слова: хитридиомикоз, остромордая лягушка, аномалии, ротовой аппарат личинок, выживаемость

CHYTRIDIOMYCOSIS THE LARVAE *RANA ARVALIS* NILSSON THE MIDDLE URAL

Trubetskaya E.A.

Institute of plant ecology and animals the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, e-mail: trubet-l@mail.ru

On the basis of the diagnostic features are evidence indicates that there *Chytridiomycosis* in populations of *Rana arvalis* in the Middle Ural. Shows the method of detection of the disease by abnormalities mouthparts of larvae and track the dynamics of its frequency of occurrence in the population. In extreme conditions the infection affects the weak and leads to their rejections, which leads to faster adaptation of the general population in a rapidly changing environment.

Keywords: Chytridiomycosis, *Rana arvalis*, anomalies, mouthparts of larvae, survival

В последние десятилетия в зарубежной печати, широко обсуждается заболевание амфибий – *Chytridiomycosis*. Возбудителем является грибок *Batrachochytrium dendrobatidis*, который приводит к глобальному сокращению численности амфибий и зарегистрирован к настоящему времени на всех материках, кроме Антарктиды и Азии [8, 13]. Заражение происходит в воде подвижными зооспорами, в результате поражаются кератиновые клетки ротового аппарата личинок и эпидермы взрослых земноводных [16]. Повреждение ротового аппарата у личинок не приводит к массовой гибели животных, но в период метаморфического климаткса кератинизированные клетки образуются в эпидерме. Их поражение приводит к нарушению дыхательного обмена, водно-го баланса и массовой гибели до завершения метаморфоза [17].

К настоящему времени существуют цитологические, гистологические, гистохимические, иммуногистохимические и др. методы диагностики, дорогостоящие и трудоемкие, требующие специализированного лабораторного оборудования. В связи с этим, в научной литературе ведется обсуждение первичной диагностики заболевания по нарушению ротового аппарата личинок амфибий.

Выявление деформации личиночных ротовых аппаратов амфибий в качестве быстрого и надежного метода диагностики *Chytridiomycosis*. было предложено Lips K.R. [15] и Fellers G.M. и др. [11]. Однако этот метод может быть использован с определенной осторожностью, так как, к

аналогичным изменениям могут привести и другие факторы: интоксикация ДДТ [20] и изменения температуры среды [18].

У тропических видов лягушек патогенность грибка возрастает при 17–23 °С, но снижается при температурах превышающих 28 °С. В связи с этим, большинство авторов склоняются к мнению, что инфицирование амфибий умеренного климата *Batrachochytrium dendrobatidis* может привести к их массовому вымиранию [18]. К тому же рост заболеваемости накладывается на другие стрессовые факторы: изменение климата, загрязнение среды обитания, инвазийные виды. Изменение климата меняет динамику паразита, формируя более благоприятные условия для роста патогенных микроорганизмов. В то же время, стрессовые факторы способствуют снижению иммунного ответа амфибий, делая их более восприимчивыми к инфекционным заболеваниям.

В данной статье на основании диагностических признаков мы приведем доказательства, указывающие на то, что *Chytridiomycosis* существует в популяциях *Rana arvalis* на Среднем Урале, и опишем методику обнаружения заболевания в популяции по аномалиям ротового аппарата личинок.

Материалы и методы исследования

Изучением видов аномалий ротовых аппаратов у личинок *R. arvalis*, причин и последствий их возникновения занимались на протяжении 8 лет. Всего за этот период обследовано более 6,5 тыс. особей. Исследование проводили как в экспериментальных, так и в естественных условиях.

Первоначально брали пробы от кладок в лабораторию и через 6 суток после выхода из икры проверяли личинок на наличие аномалий с повторными обследованиями. Было отмечено, что больше всего личинок с отклонениями наблюдается на 11-15 сутки. Для сравнения по кладкам, условиям развития или популяционным группировками необходимы данные об одновозрастных особях, что невозможно получить на живом материале. Поэтому личинок фиксировали через 15 суток после выхода из икры в 70% этаноле.

Поскольку в эксперименте [4] аномальные личинки выживали на протяжении всего периода личиночного развития, считали, что если у личинок данной популяции есть отклонения, то они будут обнаружены у головастиков в пробе из водоема. Оказалось, что очень важен периодический отбор проб (раз в неделю) начиная с 7 суток от начала личиночного развития до завершения метаморфоза всей группировкой. Это связано с уменьшением и даже отсутствием аномалий в середине и увеличением в конце периода развития. На результаты накладывают отпечаток и продолжительность нереста. В Екатеринбурге икрометание проходит за 2-3 дня, у «западной» популяции до 12 дней.

После того, как обнаружили, что в большинстве случаев нарушение связано с инфекционным заболеванием [6], стали обрабатывать сачки горячей водой с ПАВ, пробы (10 мл) от отдельно расположенных кладок брали одноразовыми перчатками и пробниками в начале нереста.

Исследование аномалий проводилось на двух территориях Свердловской области. «Восточная» – оз. Шарташ – рекреационная зона, р. Исеть – городская территория г. Екатеринбурга (восточный склон Уральских гор). «Западная» – пос. Верхние Серги (Нижнесергинский район, западный склон Уральских гор). Выбор территорий обусловлен тем, что длительное время распространение *Chytridiomycosis* на разных материках объяснялось интродукцией амфибий. В Екатеринбурге таким видом является *R. ridibunda* Pall [3]. «Западная» популяция *R. arvalis* удалена от «восточной» на 100 км и интродуцированные виды здесь отсутствуют.

Чтобы определить долю инфицированных кладок, из нерестовых водоемов брали пробы икры, распределяли их в пластиковые контейнеры и фиксировали личинок через 15 суток. Как было отмечено выше, пробы личинок в водоемах первоначально брали без учета их возраста, и только начиная с 2010 года, стали отслеживать динамику численности аномалий за весь период развития.

Результаты исследования и их обсуждение

Приведем аргументы, которые позволяют судить о том, что причиной повреждения клюва является поражение *B. dendrobatidis*.

1. Характер повреждения клюва.

А. Инфицирование *B. dendrobatidis* оказывает значительное влияние на возникновение и тип ротовых деформаций у головастиков [10]. Ассиметричное нарушение кератиновых структур ротового аппарата связано с грибковым поражением, равномерное сокращение толщины пластины клюва или симметричное отсутствие ке-

ратина с боков – результат влияния низкой температуры [19]. Грибок уничтожает живые, начинающие кератинизироваться клетки. В результате, образуется участок свободный от рогового слоя [7].

Если кладка инфицирована, то у части личинок наблюдаются явно выраженное ассиметричное повреждение клюва. У живых личинок хорошо видны разрывы верхнего и нижнего клюва, но почти не обнаруживаются начальные стадии его разрушения, которые проявляются на фиксированном материале. На внутренней поверхности верхней челюсти видны небольшие углубления, участки лишенные кератиновых клеток. При исследовании фиксированного материала количество аномальных личинок увеличивается на 20–30% за счет выявленных нарушений с внутренней стороны верхней пластины клюва (см. табл. 1). Описание нарушений клюва было ранее дано в статье [4].

Б. При хитридиомикозе реже повреждается нижняя роговая пластина [13].

В пластиковых контейнерах были варианты с 90 процентным повреждением верхней пластины, но не более 30% особей с аномальным нижним элементом клюва. У личинок в естественной среде повреждения верхней пластины встречаются в 3,4 раза чаще (см. табл. 1). Кроме того, разрушаются и кератиновые зубы рядов. В связи с тем, что аномалии рядов могут возникать по многим причинам, мы сосредоточили внимание только на роговых пластинах ротового аппарата.

2. Патогенный эффект.

А. Для выявления патогенного характера нарушения клюва, по 15 личинок из сеток на водоеме от 5 здоровых кладок распределяли в два контейнера. Из них в один помещали по 3 больных личинки, другой служил контролем. Во всех 5-и вариантах, через 10 суток наблюдали появление личинок с пораженным ротовым аппаратом и отсутствовали особи с признаками заболевания в контрольных контейнерах.

Б. В эксперименте, который был описан ранее [4], для замедления роста личинок использовали слабые дозы сульфата меди. Скорость поражения клюва по сравнению с контролем была замедлена и снижена в данных условиях в 2 раза. Причину можно объяснить только инфекционной природой аномалии. Кроме того, становится понятно, что высокая выживаемость личинок в экспериментальных условиях под воздействием слабых доз сульфата меди, фенола, хлорида натрия по сравнению с контролем связана с их стерилизующим эффектом [1].

Таблица 1

Частота встречаемости аномалий клюва у личинок из водоемов

Место сбора	Год	Дата	Выборка (n)	Вкр* (%)	Вкв** (%)	Нкр*** (%)	Всего аномалий (%)
«Восточный»- Шарташ	2004	2 июня	40	0,0	0,0	0,0	0,0
	2008	1 июня	57	5,9	1,8	1,8	9,4
«Восточный»- Исеть	2005	21 мая	69	3,6	1,4	1,4	6,4
«Западный»	2009	8 июня	119	7,6	10,1	5,9	23,5
		7 июля	84	10,7	8,3	6,0	25,0
«Западный»	2010	11 мая	40	0,0	0,0	2,5	2,5
		17 мая	120	5,8	2,5	2,5	10,8
		24 мая	159	1,9	1,3	2,5	5,7
		31 мая	97	8,2	8,2	1,0	17,5
		7 июня	76	9,2	1,3	3,9	14,5
		16 июня	40	15,0	0,0	2,5	17,5

Примечания:

* – разрыв верхней пластины; ** – начальное повреждение на внутренней стороне верхней пластины; *** – повреждение нижней пластины клюва.

В. Лабораторные испытания показывают, что некоторые виды амфибий способны не только к выживанию, но также и к полному очищению от инфекций [14, 9], что ведет к селективному преимуществу некоторых особей в популяции [12]. Скорость проявления патологии и количество зараженных особей во многом зависит от характера, силы и продолжительности действия стрессоров, индивидуальных возможностей и функциональных резервов организма.

Проведенные эксперименты прямо указывают на то, что каждая кладка и популяционная группировка индивидуальны. Городские кладки устойчивы к высоким температурам и больше поражаются при резких колебаниях температуры. В рекреационной среде выше разброс индивидуальной восприимчивости кладок к температурным условиям [5]. Показано, что чем более стрессоустойчива кладка к температурным условиям, тем меньше заболевших особей [6].

3. Постметаморфическая смертность.

Из литературных источников известно, что повреждение ротовых аппаратов при хитридиомикозе не ведет к массовой смертности, но животные гибнут в период метаморфического климакса [8]. В эксперименте, проведенном в 2003 году [4] было отмечено, что разрыв клюва чаще проявляется перед метаморфическим климаксом. Эти особи и те, у которых клюв был поврежден раньше, задерживаются в развитии от основной массы на 6 и более суток и гибнут до завершения метаморфоза. Пястоловой О.А. [2] было показано, что при содержании личинок без питания в лабораторных условиях наблюдалось нормальное развитие и успешное прохождение метаморфиче-

ских изменений. Таким образом, аномалиям ротового аппарата у головастиков уделяется мало внимания, поскольку это не влияет на дальнейшую судьбу личинки. Смертность в период метаморфического климакса при нарушенном ротовом аппарате однозначно указывает на инфекционное поражение.

4. Степень зараженности популяций.

Полученные результаты по кладкам в лаборатории приведены в табл. 2.

Ежегодно более половины взятых на водоеме проб икры оказываются инфицированы. Поскольку пробы брали одноразовыми перчатками и от отдельно лежащих кладок в начале нереста, велика вероятность того, что заражение происходит от родительской пары. Следовательно, около половины животных в популяции являются носителями хитридиомикоза. Стрессоустойчивость позволяет выжить отдельным особям в зараженных кладках.

Кроме того, на основе доли больных животных по всем кладкам, можно предположить максимальную встречаемость пораженных личинок в пробах водоема. В первые недели личиночного развития в «восточной» популяции аномальных личинок обнаружено в два раза меньше, чем в лаборатории (см. табл. 1). Однако в середине периода развития аномальные личинки исчезают и вновь появляются к концу развития. Причин отсутствия больных личинок в пробах может быть несколько: выедание хищниками или выздоровление с наступлением благоприятных условий. В экспериментах больные личинки отстают в росте и развитии, малоподвижны и ведут скрытый образ жизни, поэтому могут просто не попадать во взятую из водоема выборку.

Таблица 2

Частота встречаемости личинок с повреждениями клюва в пробах от кладок

Место сбора кладок	Год	Кол-во кладок/ личинок (n)	Доля инфицированных кладок, %	Больных личинок в кладке (M ± m)/(min-max), %	Доля больных личинок по всем кладкам, %
«Восточный» - Шарташ	2004	14/386	21,4	17,5 ± 12,5/5,0 – 30,0	4,4
	2008	10/305	71,4	16,0 ± 3,8/10,0 – 38,0	13,1
	2009	11/398	63,6	36,5 ± 11,5/8,3 – 84,8	28,6
«Восточный» - Исеть	2005	17/380	58,8	27,3 ± 9,5/5,0 – 89,5	14,4
«Западный»	2009	7/203	71,4	32,6 ± 10/17,6 – 72,5	26,6
	2010	11/262	50	18,8 ± 4,9/8,8 – 35,0	8,8

В «западной популяции» данные по водоему приближены к лабораторным результатам (2009 г. – 23,5 и 26,6% и 2010 г. – 2,5; 10,8; 5,7% в водоеме и 8,8% в лаборатории). Водоемы этого района остаются прозрачными на протяжении всего периода личиночного развития, что позволяет качественно собрать выборку. При этом хорошо прослеживается как начальное повреждение на внутренней поверхности клюва сокращается с 31 мая по 16 июня и нарастает число особей с разрывом клюва (см. табл. 1).

Таким образом, грибковая природа заболевания личинок амфибий не вызывает сомнения. Предложенный метод позволяет выявить присутствие инфекции в популяции и степень ее зараженности доступным способом, не требующим специальных навыков и оборудования.

При проведении экспериментов следует соблюдать меры предосторожности (стерилизация сачков и инструментов) для предотвращения инфицирования подопытных животных.

Квалифицированная диагностика позволила бы окончательно выяснить географический диапазон *Chytridiomycosis*. Если это заболевание обнаружено на всех материках, то территория России с большой вероятностью не является исключением. Поскольку сейчас широко обсуждаются причины распространения инфекции, следует уделить внимание этому вопросу и на территории России. Если пересматривать результаты прежних экспериментов [1], то вполне вероятно, что данное заболевание на Среднем Урале существовало уже в 80-е годы и возможно, встречается везде на Земном шаре, где обитают амфибии. В этом случае опровергается и сама причина распространения инфекции путем интродукции амфибий.

Исследование динамики взаимодействия паразитизма в популяциях амфибий нарушенной антропогенной среды приближит к пониманию отношений между био-

логической вариативностью и динамикой болезни как фактор, ведущий к адаптивным изменениям. В экстремальных условиях инфекция поражает ослабленных и ведет к их выбраковке, что приводит к ускорению адаптации популяции в целом в быстро изменяемой среде.

Список литературы

1. Бугаева Е.А. Влияние антропогенных факторов на рост, развитие и выживаемость личинок остромордой лягушки: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Свердловск, 1983.
2. Пястолова О.А.
3. Топоркова Л.Я., Боголюбова Т.В., Хафизова Р.Т. Фауна Урала и Европейского Севера. – Свердловск: Изд-во Урал. гос. ун-та, 1979. – С. 108-115.
4. Трубецкая Е.А. // Экология. – 2006. – №3. – С. 214-220.
5. Трубецкая Е.А. // Известия Челябин. науч. центра. – 2007. – Вып. 3, №37. – С. 60-65.
6. Трубецкая Е.А. // Животный мир горных территорий: междунар. конф. – Нальчик, М., 2009. – С. 489-494.
7. Altig R. // Herpetological Conservation and Biology – 2007. – №2(1) – P. 1-4.
8. Berger L., Speare R., Daszak P., Green D. E., Cunningham A., Goggin C., Slocombe R., Ragan M., Hyatt A., McDonald K. R., Hines H. B., Lips K. R., Marantelli G., Parkes H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol. 95. – P. 9031-9036.
9. Davidson E.W., Parris M., Collins J.P., Longcore J.E., Pessier A.P., Brunner J. // Copeia – 2003. – №3. – P. 601-607.
10. Drake D.L., Altig R., Grace J.B., Walls S.C. // Copeia. – 2007. – №2. – P. 449-458.
11. Fellers, G. M., Green D. E., Longcore J. E. // Copeia – 2001. – №4. – P. 945-953.
12. Kerry M., Hero K., Hero J. // Eco.Health. – 2006. – №3. – P. 171-177.
13. Knapp R.A., Morgan J.A. // Copeia. – 2006 – №2. – P. 188-197.
14. Lamirande E. W., Nichols D K // Proceedings of the Sixth International Symposium on the Pathology of Reptiles and Amphibians. – Saint Paul, Minnesota, USA, 2002. – P. 3-13.
15. Lips K. R. // Conserv. Biol. – 1999. – Vol. 13. – P. 117-125.
16. Longcore, J.E., Pessier A.P., Nichols D.K. // Mycologia. – 1999. – Vol. 91. – P. 219-227.
17. Nichols D.K., Lamirande E.W., Pessier A.P., Longcore J.E. // J. Wildl. Dis. – 2001. – Vol. 37 – P. 1-11.
18. Rachowicz L.J. // Herpetol. Rev. – 2002. – Vol. 33. – P. 263-265.
19. Rachowicz L.J., Vredenburg V.T. // Diseases of Aquatic Organisms. – 2004. – Vol. 61. – P. 75-83.
20. Rowe C.L., Kinney O.M., Congdon J.D. // Copeia – 1998. – №1. – P. 244-246.