

УДК 597-12:576.85

## К ВОПРОСУ О БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНАХ КАМЧАТСКОГО КРАБА *PARALITHODES CAMTSCHATICUS* ЗАПАДНОГО ПОБЕРЕЖЬЯ КАМЧАТКИ

В. П. Пугаева, Е. А. Устименко, Н. В. Сергеенко



За период 22–28 июня 2000 г. бактериологическими методами обследовано 60 экз. самцов камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* западнокамчатского шельфа, из которых 66,7% находились в третьей поздней межлиночной категории. Системных заболеваний бактериальной этиологии не выявлено, состояние здоровья оценено как удовлетворительное. Среди изолированных из поврежденных экзоскелета бактериальных патогенов 5 штаммов принадлежали роду *Vibrio* и 2 — *Pseudomonas*. У 96,7% крабов выявлены клинические признаки панцирной болезни. Обсуждается роль вибрионов и псевдомонад в этиологии данной патологии.

Камчатский краб является одним из наиболее ценных промысловых видов животных. Знание состояния здоровья этого гидробионта важно для осуществления рационального лова, оптимального решения проблем сохранения и воспроизводства вида.

При системных заболеваниях ракообразных наиболее часто встречаются бактерии родов *Vibrio*, *Aeromonas*, *Nocardia*, *Aerococcus*, *Streptococcus*, а также хламидие- и риккетсиноподобные организмы. В отношении распространения инфекций в диких популяциях информация скудна (Stewart, 1993).

Наиболее известное бактериальное заболевание морских беспозвоночных — панцирная болезнь, при которой у промысловых ракообразных, включая креветок, омаров, крабов, происходит эрозия кутикулы конечностей и жабр (Couch, Fournie, 1993). Панцирная болезнь камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* отмечается на Аляске с 1960 г. (Sindermann, 1990). На Сахалине некроз панцирных покровов у камчатского краба, находившегося в первой (I) и второй (II) межлиночных категориях, изучали в апреле–июне 1997 г., при этом частота заболеваемости определена в пределах 0,1–1,0% (Вялова, 1998).

Цель настоящих исследований — оценка встречаемости заболеваний бактериальной этиологии у краба *P. camtschaticus*, выловленного на западнокамчатском шельфе.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Живой камчатский краб, отловленный на шельфе западнокамчатской подзоны Охотского моря (в районе п. Усть-Хайрюзово), был отобран нами в цехе рыбоконсервного завода и имел ширину карапакса  $16,0 \pm 1,0$  см и массу  $1,9 \pm 0,3$  кг.

Определение внешней патологии крабов, состояния наружных покровов и внутренних органов при патологоанатомическом вскрытии проводили по методам, рекомендованным Д. Аустинном и Б. Аустинном (Austin, Austin, 1989).

Биологический анализ крабов осуществляли в соответствии с Руководством по изучению десятиногих ракообразных (1979). Межлиночную категорию определяли по методике, описанной Лысенко (2000).

Степень заболевания крабов панцирной болезнью определяли по условной классификации, предложенной Вяловой (1998): начальная степень — площадь поражения хитинового покрова менее  $0,5 \text{ см}^2$ , средняя — до  $1 \text{ см}^2$  и сильная — более  $1 \text{ см}^2$ .

Пробы отбирали из сердца — от 2, гепатопанкреаса — 3, гемолимфы — 58 и повреждений хитинового покрова — 8 экз. Для выделения микроорганизмов использовали универсальные питательные среды: Soja-Casein-Pepton-Agar — TSA, *Vibrio* Selective Agar — TCBS и Soja-Casein-Pepton-Broth — TSB. При изоляции микрофлоры от крабов в питательные среды добавляли 1,5% NaCl, при идентификации — 6%. Посевы инкубировали при 6–10, 20, 37, 42 °С. Изучали культуральные, морфологические и биохимические свойства микроорганизмов. Применяли окраски по Граму, Цилю-Нильсену, Гинса, Ожешко. Подвижность бактерий определяли в нативных (живых) препаратах и по росту на полужидких средах. Хитиноутилизирующие свойства микроорганизмов исследовали по методу Чанга (Chang et al., 1989), а липолитические — согласно руководству Microbiological Media (Atlas, 1997). Тип дыхания устанавливали по росту в бульоне и на среде Хью-Лейфсона. Биохимическое тестирование бактерий проводили с использованием тест-систем API 20NE и API 20E, а таксономическую принадлежность устанавливали по определителю бактерий (Holt et al., 1994).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При патологоанатомическом вскрытии визуально в сердце, гепатопанкреасе, выделительной железе, желудочно-кишечном тракте, ганглиях и мышечной ткани патологических изменений, характерных для системных заболеваний бактериальной этиологии, не обнаружено.

При клиническом осмотре крабов отмечали в разной степени выраженные повреждения хитинового покрова экзоскелета и жабр (табл. 1, 2).

Начальные признаки заболевания проявлялись в виде отдельных эрозий, царапин и пятен светло- и темно-коричневого цвета, расположенных, главным образом, на вентральных поверхностях ходильных ног. С прогрессированием патологии до средней степени тяжести повреждения охватывали также клешни, карапакс, абдомен, сочленения (рис. 1).

При сильно выраженном заболевании отмечали сливающиеся очаги повреждения кутикулы экзоскелета, в том числе на клешнях (рис. 2) и в области сочленений. Участки поражения характеризовались размягчением в центре, некротизацией, изъязвлением и отторжением хитина. У двух экз. крабов отмечали отмирание фрагментов пальцев клешней длиной от 0,5 до 1,0–1,5 см. Имел место случай выраженного поражения кутикулы абдомена (рис. 3).

По клиническим признакам панцирная болезнь выявлена у 58 экз. крабов (96,7%). При этом большинство их (66,7%) находилось в III поздней межлиночной категории (см. табл. 1, 2). В Хайрюзовском районе уже при достижении самцами промыслового размера они начинают линять один раз в два года, а с его увеличением вероятность линьки камчатского краба резко снижается. Вследствие этого крупные самцы в этом районе в основном представлены нелинявшими, сильно обросшими особями (Лысенко, 2000).

У 77,5% крабов в III поздней межлиночной категории наблюдали сильно выраженную степень панцирной болезни, в то время как в III — подобное состояние регистрировали лишь у 5,9% (см. табл. 2). В той же последовательности отмечали вовлечение в патологический процесс сочленений и клешней. Наши предположения о прогрессировании поражения экзоскелета с увеличением размера особей и изменением межлиночной стадии подтверждаются данными зарубежных и отечественных ученых (Sindermann, 1990; Вялова, 1998).

У 26,7% крабов обнаружили поражение апикальных фрагментов жабр с очагами эрозии кутикулы и последующей меланизацией жаберных лепестков (см. табл. 2). Эрозия жабр и некроз жаберных лепестков отмечаются как обычные явления при панцирной болезни ракообразных (Couch, Fournie, 1993).

Признаки механических повреждений экзоскелета наблюдали у 14 экз. крабов (23,2%). В большинстве случаев и в основном у особей в III поздней межлиночной категории с сильно выраженными признаками панцирной болезни отмечали наличие на карапаксе и ходильных ногах меланизированных трещин в виде бурых, ветвистых нитей.

У одного краба без выраженных признаков панцирной болезни регистрировали атрофию третьей ходильной ноги, очевидно, как результат ранее имевшей место травмы или автотомии. Укорочение пальцев клешней классифицируют

Таблица 1. Клинические и патологоанатомические признаки заболевания камчатского краба

Признак	Количество, экз.	Встречаемость, %
<b>Клинические:</b>		
царапины, очаги эрозии, истончения, почернения, хрупкости кутикулы экзоскелета	58	96,7
отсутствие конечности или ее части	2	3,3
отсутствие части клешни	2	3,3
<b>посттравматические меланизированные трещины:</b>		
ходильных ног	6	10,0
карапакса	2	3,3
клешней	2	3,3
<b>Патологоанатомические:</b>		
вздутие, ослизнение, некроз, меланизация, редукция жаберных лепестков	16	26,7
Без патологии	2	3,3

Таблица 2. Межлиночные категории и степень поражения панцирной болезнью камчатского краба

Межлиночная категория	Количество, экз./%	Площадь поражения экзоскелета, см <sup>2</sup>			
		0,0	до 0,5	до 1,0	более 1,0
III ранняя	2/3,3	2	0	0	0
III	17/28,3	0	6	5	1
III поздняя	40/66,7	0	1	8	31
IV	1/1,7	0	0	0	1
Итого	60/100,0	2	7	13	33
Степень заболевания		Отсутствует	Начальная	Средняя	Сильная

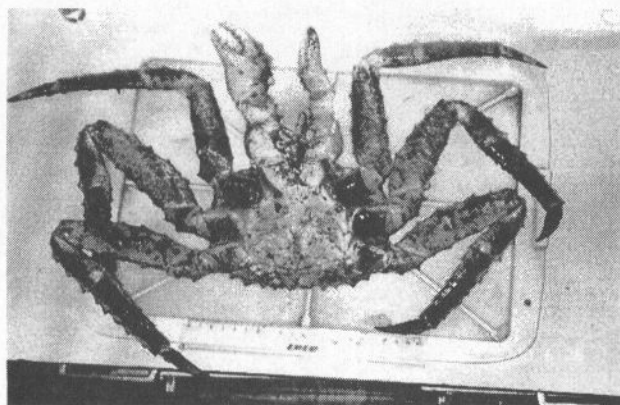


Рис. 1. Панцирная болезнь средней степени тяжести

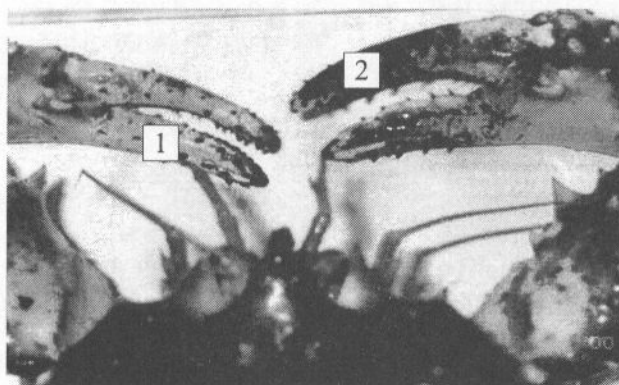


Рис. 2. Выраженные признаки панцирной болезни: 1 — меланизация шипов клешней; 2 — обширный некроз хитина пальцев правой клешни

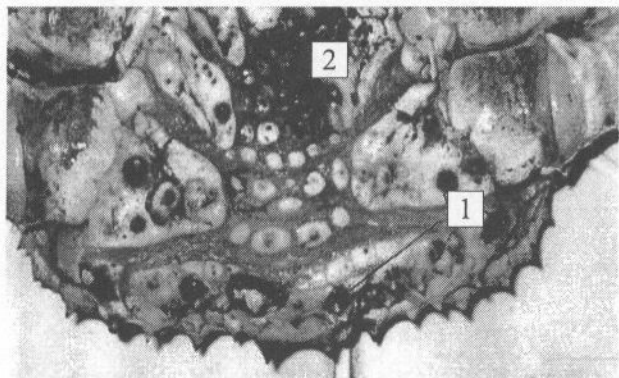


Рис. 3. Поражение панцирной болезнью абдомена: 1 — отпадение шипов, меланизация их оснований; 2 — обширный очаг некроза верхней части абдомена

как посттравматические Тип А, Подтип А1 (Васильев, Степанов, 1998). По нашим предположениям, отсутствие ходильных ног и атрофия могут произойти не только при механическом воздействии или автотомии, но и как следствие панцирной болезни при некрозе сочленений. Известно, что в экологически неблагоприятных акваториях загрязненные осадки могут накапливаться в сочленениях, приводя к повреждениям кутикулы. При этом первоначальные отдельные зоны эрозии сливаются, и часто часть ходильных ног и клешней отпадает (Brock, Lightner, 1990).

При бактериологическом исследовании изолировано 43 штамма бактерий, из них 38 штаммов принадлежали к грамтрицательной флоре и 5 — к грамположительной (табл. 3).

Выделенные от камчатского краба грамположительные бактерии родов *Corynebacterium*, *Propiobacterium*, *Marinococcus*, а также грамтрицательные — *Pasteurella*, *Ochrobacter*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, широко распространены в морской воде и к патогенам ракообразных не относятся.

При некрозе кутикулы экзоскелета преимущественное значение отводится микрофлоре, синтезирующей внеклеточные ферменты, такие как протеазы, липазы и хитиназы (Austin, Austin, 1989).

Эпикутикула ракообразных состоит из тонкого слоя белково-липидного материала, являющегося эффективным защитным барьером. За ней следуют три хитиновых слоя (Sindermann, 1990; Couch, Fournie, 1993). По данным Розена и Фишера (Rosen, 1970; Fisher et al., 1978), микрофлора, синтезирующая протео- и липолитические ферменты, способна оказывать разрушающее воздействие на белково-липидный слой кутикулы, особенно при одновременном механическом истирании.

Как только эпикутикула разрушена, хитиновые слои открыты для воздействия хитинолитических ферментов, выделяемых микроорганизмами. Хотя механическое повреждение эпикутикулы рассматривается как значимый фактор в патогенезе панцирной болезни, также большое значение имеет синергичная активность липолитических бактерий (Baross, Tester, 1975).

Таблица 3. Таксон, количество штаммов, место выделения микрофлоры камчатского краба

Таксон	Место выделения, количество штаммов бактерий				Всего
	Гемо-лимфа	Гепато-панкреас	Сердце	Экзоскелет	
Грам + бактерии	5	0	0	0	5
<i>Vibrio</i>	1	1	0	5	7
<i>Pseudomonas</i>	4	1	2	2	9
<i>Pasteurella</i>	5	1	0	0	6
<i>Ochrobacter</i>	5	0	0	0	5
<i>Moraxella</i>	1	2	1	2	6
<i>Acinetobacter</i>	4	0	0	1	5
Всего	25	5	3	10	43

Вибрионы рассматриваются как наиболее важные этиологические агенты панцирной болезни ракообразных (Sindermann, 1990; Couch, Fournie, 1993). Особенно это относится к видам *V. alginoliticus* и *V. vulnificus*, которые нами выделены из некротических повреждений экзоскелета в количестве 2 и 3 штамма соответственно. Из аналогичных участков кутикулы изолировано только два штамма псевдомонад — *Ps. diminuta* и *Ps. putrefaciens* (табл. 4).

В целом, псевдомонадам отводится меньшая роль в возникновении панцирной болезни (Couch, Fournie, 1993). Но Вялова (1998) при изучении некроза экзоскелета у четырехугольного волосатого краба *Erimacrus isenbeckii* изолировала псевдомонады и описала их как этиологический фактор наблюдавшейся патологии.

Биохимическое тестирование и специально поставленные опыты по определению способности использовать хитин в качестве единственного источника азота и углерода выявили как у вибрионов так и у псевдомонад наличие протео-, липолитических и хитиноутилизирующих свойств. Полученные результаты дают основание предполагать их участие в развитии панцирной болезни. У камчатского краба, вероятно, доминирующее патогенное значение в возникновении заболевания играют вибрионы.

Считается, что некротическое поражение экзоскелета возникает в результате воздействия патогенных микроорганизмов, использующих повреждения или ослабленный статус хозяина. Неблагоприятное состояние окружающей среды может играть при этом роль ускоряющего фактора (Stewart, 1993). Причинами, которые могут ухудшить восстановление эпикутикулы, являются: продолжительные механические повреждения, энзиматические воздействия, неблагоприятный температурный режим, недостаточное питание, сохраняющийся высокий уровень некоторых загрязнителей.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отсутствие клинических и патологоанатомических признаков инфекционного поражения дают основание оценивать состояние здоровья камчатского краба западного шельфа Камчатки в июне 2000 г. как удовлетворительное. Выделение бактерий из внутренних органов и гемолимфы здоровых особей рассматривается как асимптоматическое носительство вторичных патогенов или обычной микрофлоры.

У 96,7% крабов, большая часть которых находились в III поздней межличинной категории, клинически диагностирована панцирная бо-

Таблица 4. Идентификационные признаки бактерий родов *Vibrio* и *Pseudomonas*, выделенные из повреждений экзоскелета камчатского краба

Тест	Штаммы бактерий и результаты						
	26пв	34пв	42пв	7 пв <sub>1</sub>	44пв	33пв <sub>2</sub>	55пв
Подвижность	+	+	+	+	+	+	+
Рост при: 4 °С	+	+	+	+	+	+	+
6% NaCl	+	+	+	+	+	+	+
Вибриостат 0/129	+	+	+	—	+	—	+
Восстановление NO <sub>2</sub>	+	+	+	—	+	—	+
Индол	+	+	+	—	+	—	+
Глюкоза	—	—	—	—	+	—	+
Аргинин	—	—	—	—	—	—	—
Мочевина	—	—	—	—	—	—	—
Эскулин	+	—	+	—	+	нд	+
Желатин	+	+	+	+	+	+	+
Галактозидаза	+	—	+	—	+	—	+
Ассимиляция:							
глюкозы	—	—	—	—	+	—	+
сахарозы	+	+	+	нд	+	нд	+
арабинозы	—	—	+	—	—	нд	—
манозы	—	—	—	—	+	нд	+
маннитола	—	—	—	—	+	нд	+
мальтозы	—	—	нд	—	+	нд	+
Tween 80	+	+	+	+	+	+	+
Хитин	+	+	+	+	+	+	+
ОХ/К	+/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
О/Ф	O <sup>+</sup> /F <sup>+</sup>	O <sup>+</sup> /F <sup>+</sup>	O <sub>к</sub> <sup>+</sup> /F <sub>к</sub>	O <sub>к</sub> <sup>+</sup> /F <sup>-</sup>	O <sub>к</sub> <sup>+</sup> /F <sub>к</sub> <sup>+</sup>	O <sub>к</sub> <sup>+</sup> /F <sup>-</sup>	O <sub>к</sub> <sup>+</sup> /F <sub>к</sub> <sup>+</sup>
Вид бактерий	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>Ps. diminuta</i>	<i>V. alginoliticus</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>V. alginoliticus</i>

Примечание: (+) — реакция положительная, (—) — отрицательная, (±) — слабо положительная, ОХ/К — оксидаза/катализа, к — кислота, О/Ф — реакция оксидативная/ферментативная, нд — нет данных, пв — штамм изолирован с поверхности карапакса.

лезнь. Заболевание не относится к фатальной патологии и не передается на новый покров после линьки. На западнокамчатском шельфе высокий процент поражения камчатского краба панцирной болезнью, по-видимому, связан с малой вероятностью ежегодной линьки у промысловых самцов, характерной для данного района и, вследствие этого, длительным воздействием хитиноразрушающих микроорганизмов на карапакс и конечности.

Среди изолированных из повреждений экзоскелета бактериальных патогенов пять штаммов принадлежали к роду *Vibrio* и 2 — *Pseudomonas*. Основную патогенетическую роль в некрозе панцирных покровов камчатского краба, по результатам наших исследований, играли *V. alginoliticus*, *V. vulnificus*, *Ps. diminuta* и *Pseudomonas sp.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Васильев П.С., Степанов В. Г. 1998. Атлас посттравматических и болезненных изменений конечностей и карапакса крабов прикамчатского шельфа. Петропавловск-Камчатский: Изд-во «Печатный двор». С. 5–8.
- Вялова Г.П. 1998. Некроз панцирных покровов крабов у побережья восточного Сахалина // Рыбохозяйственные исследования в Сахалино-Курильском районе и сопредельных акваториях. Южно-Сахалинск. СахНИРО. Т. 2. С. 126–131.
- Лысенко В.Н. 2000. Особенности линьки камчатского краба на западнокамчатском шельфе в конце 90-х годов // Исследования биологии промысловых ракообразных морей России. М.: Изд-во ВНИРО. С. 111–119.
- Руководство по изучению десятиногих ракообразных *Decapoda* дальневосточных морей. 1979. Владивосток. ТИНРО. С. 18–23.
- Alderman, D.J., S.W. Feist, and J.L. Polglase. 1986. Possible nocardiosis of crayfish, *Austropotamobius pallipes*. J. Fish. Dis. No 9. P. 345–347.
- Atlas, R.M. 1997. Handbook of microbiological media. 2 ed., by CRC Press, Inc. Florida. P. 1491.
- Austin, B., and D.A. Austin. 1989. Methods for the microbiological examination of fish and shellfish. Edinburgh EH1 1HX. Scotland. 260 pp.
- Baross, J.A., and P.A. Tester. 1975. Incidence and etiology of exoskeleton erosion in the spider crab, *Chionoecetes tanneri* Rathbun (Brachyura: Majidae). Abstr. soc. invertebr. pathol. 3 pp.
- Brock, J.A., and D.V. Lightner. 1990. Diseases caused by microorganisms. // Diseases of marine animals. V. III Introduction, Cephalopoda, Annelida, Crustacea, Chaetognatha, Echinodermata, Urochordata. Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland. P. 245–326.
- Chang, L.E., J.L. Pate, and R.J. Betzig. 1984. Isolation and characterization of nonspreading mutants of gliding bacterium *Cytophaga johnsonae*. J. Bacteriol. 159. P. 26–35.
- Couch, J.A., and J.M. Fournie. 1993. Pathobiology of marine and estuarine organisms // CRC Press. Florida. P. 321–327.
- Fisher, W.S., E.N. Nilson, V.P. Steenbergen, and D.V. Lightner. 1978. Microbial diseases of cultured lobsters: a review // Aquaculture. V. 14. P. 115–140.
- Holt, J., N. Krieg, P. Sneath et al. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9 ed. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland 21202, USA. P. 787.
- Rosen, B. 1970. Shell disease of aquatic crustaceans // Reports of sympos. "Diseases of fishes and shellfishes". Washington. P. 409–415.
- Sinderman, C.J. 1990. Principal diseases of marine fish and shellfish // New York: Academic Press. V. 2. P. 9–91.
- Stewart, J.E. 1993. Infectious diseases of marine crustaceans // Pathobiology of marine and estuarine organisms. CRC Press. Inc. Florida. P. 319–342.