Эколого-биологический центр «Крестовский остров»

Лаборатория Экологии Морского Бентоса (Гидробиологии)

Группа Исследований Прибрежных Сообществ

*Зенков Евгений*

Связь между индивидуальной пищевой активностью мелких беломорских брюхоногих моллюсков *Peringia ulvae* (Pennant, 1777)

и их заражённостью трематодами

Санкт-Петербург

2019

Пищевую активность можно оценивать по разным факторам. Один из её показателей – пеллеты. Целью данного исследования было выявить влияние заражения трематодами на пищевую активность мелких брюхоногих моллюсков Peringia ulvae, при помощи подсчёта пеллет. Для выявления зависимости был поставлен эксперимент, позволяющий подсчитать количество выделенных экскрементов для каждой из исследуемых особей по отдельности. Результаты эксперимента показали, что на скорость пеллетовыделения достоверно влияют высота раковины моллюска и наличие в нём партенитов трематод.

**Введение**

На физиологическое состояние животного влияет множество разных факторов. Это могут быть как внешние воздействия на его организм, например, абиотические факторы среды в которой он обитает или заражение особи каким-либо паразитом (Оксов 1991), так и внутренние процессы, протекающие в организме, например, развитие половой системы в сезон размножения или гормональные изменения, связанные с реакцией животного на внешнюю среду, такие как всплески адреналина в стрессовых ситуациях (Мантейфель 1980).

Оценивать физиологическое состояние существа напрямую, зачастую достаточно сложно, нередко непосредственное вмешательство в естественные процессы организма приводит к смерти предмета изучения. Поэтому для оценки физиологии животных нам часто приходится пользоваться косвенными показателями. Это могут быть изменения во внешности животного или человека, например, окраски его кожи. Например, известно, что люди, больные разнообразными заболеваниями, нередко покрываются пятнами, а волосы некоторых млекопитающих теряют пигментацию с возрастом (выцветают, седеют). Или возможны изменения в физиологических процессах, видимых на поверхности организма таких как потоотделение при стрессе (Морозов, Хадарцев 2010) или физической нагрузке, или непроизвольные, ритмичные сокращения мускулатуры в холодной среде (дрожание) у млекопитающих (Бочаров 2015).

Одним из хороших показателей физиологических изменений в организме животного – является его пищевая активность. Эту активность можно оценивать по массе экскрементов, выделяемых особью. Например, для таких млекопитающих как крысы известно, что, испытывая стресс, они выделяют заметно больше экскрементов, чем в спокойном состоянии (Буреш 1991). Но оценка пищевой активности по экскрементам затруднительна в случае, когда исследуемый объект слишком маленький, для того чтобы его фекалии можно было взвесить с достаточной точностью. Однако, если экскременты животного оформлены как компартменты, сходные по размеру, уместно измерять пищевую активность не по их массе, а по их обилию.

Удобными модельными объектами для исследования факторов, влияющих на пищевую активность, являются многие морские брюхоногие моллюски, экскременты которых представляют из себя хорошо оформленные пеллеты, которые весьма просто подсчитывать. Одним из видов брюхоногих, выделяющих пеллеты, массово распространённым в морских сообществах на атлантическом побережье является литоральный моллюск *Peringia ulvae* (Fretter, Graham 1994)*.*

Особи этого вида раздельнополы, обладают широким диапазоном размеров и являются промежуточными хозяевами сразу для нескольких видов морских трематод (напр., Skirnisson et al. 1995), что делает их весьма интересными примерами для рассмотрения факторов, влияющих на пищевую активность. Немаловажно также, что они имеют тенденцию выделять количество пеллет, достаточное для адекватной оценки пищевой активности, в короткий срок (Зенков 2015).

Отдельного рассмотрения заслуживает фактор заражения, так как исследований, рассматривающих зависимость количества пеллет от наличия и вида паразита, который может обитать в моллюске, сравнительно мало, хотя паразиты, зачастую, влияют на физиологию гидробий (Левакин 2005) и это может выражаться и в количестве выделяемых моллюсками пеллет.

Целью данного исследования стало выявить влияние заражения на интенсивность выделения пеллет *Peringia ulvae*, и оценить характер этого влияния.

В рамках поставленной цели нам также приходилось оценивать и другие факторы, способные влиять на количество выделяемых пеллет, во избежание искажённой оценки влияния для фактора заражения.

**Материал и методы**

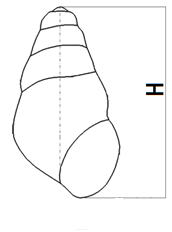
Исследования проводились в рамках 40-й Беломорской экспедиции Лаборатории экологии морского бентоса (гидробиологии), группы исследования прибрежных сообществ, на территории Кандалакшского государственного заповедника в течение июля.

Для постановки эксперимента производился качественный сбор моллюсков с литорали, с грунта и лежащих в приливно-отливной зоне камней, в малую воду. Из проб отбирались особи с высотой завитка не менее 2,1 мм (post hoc измерения), так как известно, что крупные моллюски бывают заражены трематодами гораздо чаще, чем мелкие, чтобы увеличить потенциальное количество инфицированных особей, участвующих в эксперименте.

Моллюски проводили сутки в контейнерах в тёмном, холодном помещении. Предполагалось, что в этот срок гидробии могли питаться диатомовыми водорослями, попавшими в контейнер вместе с налитой туда морской водой.

Для оценки пищевой активности брюхоногих моллюсков был проведён эксперимент. Каждая особь помещалась в отдельный садок, посередине которого в горизонтальной плоскости была натянута сетка с диаметром ячеи 1 мм. Таким образом, пеллеты, выделяемые моллюском беспрепятственно проходили через сетку и падали на дно контейнера, где гидробия не могла съесть их повторно. Экспозиция составляла от 2.5 до 3 часов в разных повторностях, по прошествии этого срока, моллюски вынимались из контейнера, после чего подсчитывалось число выделенных ими пеллет. Большинство моллюсков были активными по окончании эксперимента. Единичные случаи, в которых моллюск погибал в ходе эксперимента, в итоговой оценке не учитывались.

У всех гидробий, с точностью до 0.1 мм, измерялась высота раковины (рис. 1). Путём вскрытия определялся пол каждой особи, а также наличие и вид паразита, которым она заражена. Для самок отдельно проверялось наличие ооцитов.



***Рисунок 1.****Высота раковины (по Barszcz, 2004)*

Для выявления факторов, влияющих на количество пеллет, были применены линейные модели. Поскольку количество пеллет является счётной величиной, мы выбрали генерализованную линейную модель с пуассоновским распределением зависимой величины и остатков. Исходная модель включала в себя следующие предикторы: **Высота раковины**, **Экспозиция** (2.5 ч./3 ч.), **Наличие и вид паразита** (незаражён/Сryptocotyle/Microphallidae), **Пол** (самец/самка), **Наличие ооцитов** (Есть/Нет), а также их взаимодействия. Далее производился выбор оптимальной модели путем удаления незначимых предикторов и их взаимодействий. В результате финальная модель была следующей: *N = H + Inv*, где N – кол-во пеллет, шт, H – высота раковины, а Inv – наличие/вид паразита. Финальная модель была проверена на избыточность дисперсии, и, поскольку она была найдена, применяли предвычисленный поправочный коэффициент. Достоверность влияния факторов проверяли, сравнивая полученные угловые коэффициенты с нулевыми с помощью t-критерия. Все указанные действия проводили в среде R-Studio на языке R (R Core Team 2015). Был использован пакет ggplot2 и dplyr для трансформации и визуализации данных (Wickham 2009; Wickham, Francois 2016).

**Благодарность**

Я выражаю свою искреннюю благодарность администрации Кандалакшского государственного заповедника, предоставившей доступ к заповедным территориям для работы, всем участникам 40й Беломорской экспедиции ЛЭМБ-ГИПС, участвовавшим в сборе и разборках материала, руководителю экспедиции А.В. Полоскину, организовавшему сбор материала, а также отдельно нашему научному руководителю Д.А. Аристову.

**Результаты**

В ходе исследований нами были встречены представители трёх таксонов трематод: *Cryptocotyle concava*, семейство *Microphallidae gen. sp.*, и *Notocotyle sp.* При этом подавляющее большинство заражённых моллюсков подверглись инвазии первыми двумя таксонами, а на долю последнего пришлось всего две особи.

Количество пеллет сильно варьируется у всех моллюсков, даже если они участвуют в одном и том же эксперименте (от 0 шт. до 57 шт.).

Наибольшие средние значения количества пеллет, выделенных моллюсками, наблюдаются не в тех экспериментах, которые длились 3, а в тех, которые длились 2.5 часа, что, вероятно, связано с влиянием на выделение пеллет некоторых других факторов, не известных нам.

Из всех учитываемых нами факторов, а также их попарных взаимодействий, достоверно на количество пеллет влияют высота завитка и наличие заражения. Заражённые моллюски выделяют достоверно меньше пеллет. Также, количество выделенных пеллет меньше у моллюсков с большей высотой раковины. При этом взаимодействие двух этих факторов не имеет достоверного влияния на интенсивность выделение пеллет.

В среднем наименьшее количество пеллет было предсказано для *Cryptocotyle concava*, однако оно не отличается достоверно от такового, рассчитанного для *Microphallidae (Критерий Вилкоксона W = 460,5 p = 0,31)* (Рис. 2).

Наличие ооцитов не оказало влияния на результаты модели.

**Обсуждение**

На литорали Белого моря, как известно из литературных данных (Горбушин 1994, 1995) и из наших исследований прошлых лет (Шевкопляс, Зенков 2016), массово встречаются не менее четырёх таксонов трематод, а именно: (*Cryptocotyle concava, Microphallidae gen. sp., Notocotyle sp. Himasthla sp*.). То, что последние два таксона встречались крайне редко или вовсе не были обнаружены, вероятно, связано с узким кругом мест, в которых производился сбор материала. Тем не менее, *Cryptocotyle concava* и *Microphallidae gen. sp.,* в целом встречаются в области исследования чаще других таксонов.

C:\Users\Женёк\Downloads\fig_model_par (1).tiff

***Рисунок 2.*** *Иллюстрация к модели. По оси OX отложены значения высоты завитка моллюсков, по оси OY – предсказанные значения количества пеллет, цветами обозначены градации фактора заражения. Прямыми отмечены линии регрессии, полосами – доверительные интервалы.*

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Градация  фактора | Угловой  коэффициент | Ошибка  коэффициента | Значение  t-критерия | Вероятность  принятия  нулевой  гипотезы |
| Высота завитка | -0.13 | 0.05 | -2.64 | <0.05 |
| Незаражённые | 0.48 | 0.19 | 2.52 | <0.05 |
| Microphallidae | 0.16 | 0.22 | 0.71 | 0.47 |
| Cryptocotyle  concava | 3.03 | 0.32 | 9.41 | <0.05 |

***Таблица 1****. Значение коэффициентов значимости для финальной модели.*

Очевидно, что количество выделенных пеллет в общем случае зависит от следующих аспектов: скорости поглощения пищи, доля пищи, которая была усвоена и скорости с которой пеллеты проходят пищеварительный тракт. Поэтому влияние исследуемых факторов на количество выделенных пеллет возможно, стоит связать конкретно с некоторыми из этих аспектов.

Вполне возможно, что заражение снижает активность моллюска, что может отражаться как на его перемещении и поглощении пищи, (в связи с чем он питается меньше, чем незаражённый моллюск и выделяет меньше пеллет), так и на перистальтике кишечника, в результате чего пеллеты проходят пищеварительный тракт дольше, чем у незаражённых моллюсков, и гидробия успевает выделить меньшее количество пеллет за отведённое время.

Также, поскольку заражение значимо увеличивает потребности моллюска в энергии, логично предположить, что моллюск вынужден питаться активнее и, следовательно, выделять большее количество пеллет. Однако в данном случае мы видим обратную картину. Возможно, это связано с тем, что гидробия переваривает больший процент поглощённой пищи, если она заражена, и соответственно выделяет меньше непереваренных пищевых остатков в виде пеллет. При этом из некоторых других исследований, связанных с пищевой активностью гидробий, известно, что заражённые моллюски выделяют достоверно больше пеллет, чем незаражённые, что противоречит нашим результатам. Возможно, это противоречие вызвано разными условиями содержания моллюсков перед экспериментом, так как в других исследованиях моллюски имели возможность активно питаться непосредственно перед экспериментом (Mouritsen 1994).

Влияние высоты на количество пеллет, как и в случае с фактором заражения, можно объяснить тем, что большие размеры тела моллюска могут требовать больших энергозатрат, и моллюск вынужден переваривать больший процент пищи, выделяя в виде пеллет лишь малую её часть. Скорее всего высота раковины непосредственно связана с возрастом моллюска (мы предполагаем, что более крупные особи старше более мелких), поэтому нельзя исключать возможность того, что крупные гидробии выделяют меньше пеллет в связи с тем, что их физиологические процессы протекают более медленно под влиянием возраста.

Вопреки литературным данным наличие ооцитов, так же, как и пол моллюсков, не оказало достоверного влияния на зависимую величину, возможно это связано с тем, что эксперименты проводились уже после предполагаемого нереста моллюсков (Горбушин 1995), а потому половые различия влияли на количество пеллет незначительно.

**Заключение**

Заражение влияет на количество пеллет достоверно, независимо от других факторов. Мы считаем, что влияние заражения связано с уменьшением двигательной и пищевой активности у инфицированных особей.

**Литература**

1. Бочаров М. И. Терморегуляция организма при холодовых ­­воздействиях// «Поисковые фундаментальные научные исследования в интересах развития Арктической зоны РФ», №10103-8000/56 2015.
2. Буреш С. А.. Методики изучения головного мозга и поведения. М.: Высшая школа, 399с.// 1991
3. Горбушин А.М., Особенности экологии и биологии Hydrobia ulvae и H. ventrosa (Gastropoda:  Prosobranchia) Белого моря// Автореф. дисс. соиск. ст. к. б. н, СПбГУ - СПб, 1995.
4. Левакин И. А. Влияния инвазии трематодами Bunocotyle progenetica (Hemiuridae) и Cryptocotyle concava (Heterophyidae) на смертность морских литоральных моллюсков Hydrobia ulvae (Gastropoda: Prosobranchia) при замораживании// Паразитология. – 2005. – Т. 39. – №. 5. – С. 407-413.
5. Мантейфель Б.П., Экология поведения животных// , Москва, 1980
6. Морозов В.Н., Хадарцев А.А., К современной трактовке механизмов стресса// Вестник новых медицинских технологий Т. 17, № 1 – С. 15 2010.
7. Оксов И. В., Тканевый уровень организации системы паразит – хозяин// Санкт-Петербург, Паразитология. 25, 1, 1991
8. Шевкопляс А.Е., Зенков Е.А. К описанию системы “Hydrobia ulvae/H. ventrosa (Gastropoda) - дигенетический сосальщик” в вершине Кандалакшского залива Белого моря// Рукопись хранится в библиотеке ЛЭМБ (Гидробиологии). - Санкт-Петербург, 2016.
9. Fretter V., Graham A. British prosobranch molluscs. Revised and updated edition //The Ray Society. – 1994. – Т. 161. – С. 820.
10. Mouritsen K. N., Jensen K. T. The enigma of gigantism: effect of larval trematodes on growth, fecundity, egestion and locomotion in Hydrobia ulvae (Pennant)(Gastropoda: Prosobranchia)// Journal of experimental marine biology and ecology. – 1994. – Т. 181. – №. 1. – С. 53-66.
11. R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL [http://www.R-project.org/](http://www.r-project.org/).
12. Skirnisson K., Galaktionov K. V., Kozminsky E. V. Factors influencing the distribution of digenetic trematode infections in a mudsnail (Hydrobia ventrosa) population inhabiting salt marsh ponds in Iceland //Journal of Parasitology. – 1995.–Т. 90. – №. 1. – С. 50-59.
13. Wickham H. Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2009.
14. Wickham H., Francois R. (2016). Dplyr: A Grammar of Data  Manipulation. R package version 0.5.0.[https://CRAN.R-project.org/package=dplyr](https://cran.r-project.org/package=dplyr)