МОДИФИЦИРОВАННАЯ МЕТОДИКА ИЗГОТОВЛЕНИЯ ТОТАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПАРАЗИТИЧЕСКИХ ПЛОСКИХ ЧЕРВЕЙ

В.В. КУКЛИН

кандидат биологических наук

*Мурманский морской биологический институт КНЦ РАН,
183010, г. Мурманск, ул. Владимирская, 11, e-mail: kuklin@mmbi.info*

Представлен и описан модифицированный метод изготовления тотальных препаратов цестод и трематод. Отмечено, что использование растворов щелочи и соляной кислоты на этапах перед окрашиванием объектов, а также дополнительная фиксация окрашенного материала под гнетом позволяют получать препараты высокого качества с четкой дифференцировкой внутренних органов.

Ключевые слова: тотальные препараты, цестода, трематода, кармин.

Далеко не все известные на сегодняшний день методы окраски и последующего изготовления тотальных препаратов паразитических плоских червей позволяют получить достаточно удовлетворительную картину анатомического строения изучаемых объектов [1–5]. Применение окраски кармином по Блажину (без предварительной фиксации) возможно не всегда, поскольку часто исследователям приходится работать с фиксированным материалом. При изготовлении препаратов из фиксированных цестод и трематод основные сложности связаны, как правило, с недостаточной дифференциацией окраски элементов половой системы, а также со сгибанием и перекручиванием червей при обезвоживании и просветлении. Указанные обстоятельства приводят к деформации и сморщиванию гельминтов, невозможности идентификации многих диагностических признаков и, как следствие, серьезным проблемам при видовом определении материала.

Предлагаемая методика позволяет устранить большинство из перечисленных недостатков. Соблюдение последовательности, временных интервалов каждого этапа и постоянный контроль процесса под биноклем позволяют получить препараты хорошего качества, с четкой дифференцировкой окраски разных органов. Методика разработана и проверена при исследовании морских птиц в Мурманском морском биологическом институте. В качестве объектов использовали трематоды семейств Echinostomatidae, Gymnophallidae, Strigeidae и Heterophyidae, а также цестоды семейств Diphylobothriidae, Dilepididae, Hymenolepididae и Tetrabothriidae. Материал предварительно зафиксирован 70%-ным раствором этилового спирта.

Процесс изготовления тотальных препаратов можно разделить на несколько этапов: подготовка объектов к окрашиванию, окраска и дифференцировка, дополнительная фиксация и обезвоживание, просветление и заключение в бальзам.

Предварительно зафиксированных гельминтов помещали в воду и вымачивали в течение 2–8 ч (в зависимости от величины и состояния объекта после хранения). Затем объект переносили в 5%-ный раствор гидроксида калия на 20–30 мин до появления прозрачности и характерного желтоватого цвета.

После протравливания в щелочи объекты помещали в 2–3%-ный раствор соляной кислоты на 20–30 мин и отмывали в дистиллированной воде в течение 15–20 мин.

Подготовленных гельминтов окрашивали водным раствором кармина (Mucicarmine, Fluka) в течение 25–30 мин. После этого окрашенные объекты отмывали от избытка красителя в дистиллированной воде (15–20 мин с двух- или трехразовой сменой воды). Для дифференцировки окраски гельминтов помещали в подкисленный 70%-ный раствор этанола на 2–3 мин. Затем объекты переносили в 70%-ный раствор этанола на 10–15 мин до появления «облачка» красителя вокруг гельминтов.

Следующий этап (дополнительная фиксация) существенно снижает вероятность деформации червей при последующем обезвоживании. Мелкие объекты удобнее фиксировать на предметном стекле под покровным стеклом, более крупные – между двумя предметными стеклами. Фиксацию окрашенного материала проводят 70%-ным раствором этанола в течение 15–20 мин. Затем гельминтов последовательно переводят в 70%-ный раствор этанола на 10–15 мин, в 96%-ный раствор этанола на 10–15 мин, и в изобутиловый спирт на 10–15 мин.

Просветление объектов проводят в толуоле в течение 5–7 мин. Впоследствии гельминтов заключают в канадский бальзам, разведенный толуолом.

Дополнительные рекомендации: при заключении в бальзам необходимо плотно, но осторожно придавливать объект под покровным стеклом. Наилучшие результаты дает использование максимально разжиженного бальзама; его необходимо каждые 40–45 мин добавлять под покровное стекло при высушивании препарата до прекращения появления пузырей. Смену реактивов лучше проводить после двух, максимум трехкратного использования, а раствор гидроксида калия менять после разового применения. Для поддержания оптимальной консистенции кармин и бальзам во время работы следует держать на нагревательном столике.

Литература

1. *Быховская–Павловская И.Е.* Паразитологическое исследование рыб. – Л.: Наука, 1952. – 109 с.
2. *Быховская–Павловская И.Е.* Паразиты рыб. Руководство по изучению. – Л.: Наука, 1985. – 121 с.
3. *Дубинина М.Н.* Паразитологическое исследование птиц. – М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1955. – 135 с.
4. *Иванов А.В., Полянский Ю.И., Стрелков А.А.* Большой практикум по зоологии беспозвоночных. Учебное пособие. – М.: Высшая школа, 1981. – 504 с.
5. *Ромейс Б.* Микроскопическая техника. – М.: Иностранная литература, 1954. – 718 с.

Modified technique of prepare of total permanent preparations of parasitic flatworms

V.V. Kuklin

Modified method of prepare of permanent stained preparations by cestodes and trematodes is described. Using of 5 % solution of KOH and 2–3 % solution of HCl before painting by carmine of worms fixing by 70 % alcohol and supplementary fixation of worms by 70 % alcohol after painting are recommended.

Keywords: total preparation, Cestoda, Trematoda, carmin.