

*Dr. D. Русаков*

МИНИСТЕРСТВО ОБЩЕГО И ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО  
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

БУРЯТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ  
К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ  
ПО ПАРАЗИТОЛОГИИ

Улан-Удэ  
1998

МИНИСТЕРСТВО ОБЩЕГО И ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО  
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

БУРЯТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ  
К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ  
ПО ПАРАЗИТОЛОГИИ

Баронец  
Ольга Николаевна  
Ширяевна - Русина  
Софья Борисовна  
Григорьевна  
8-10.99.

Улан-Удэ  
Издательство Бурятского госуниверситета  
1998

УДК 597.0 (0.75.23) Печатается по решению редакционно-издательского совета Бурятского госуниверситета  
М 545

Рецензенты  
В.А.Шабаев, проф. кафедры паразитологии Бурятской государственной сельхозакадемии  
А.В.Некрасов, канд.вeter. наук (Институт общей и экспериментальной биологии РАН)

Составители  
С.В.Пронина, д-р биол.наук (кафедра общей биологии БГУ)  
Н.М.Пронин, канд. биол.наук (лаборатория паразитологии Института общей и экспериментальной биологии РАН)

**Методические указания к практическим занятиям по паразитологии.** Состав. С.В.Пронина, Н.М.Пронин.- Улан-Удэ: Издательство Бурятского госуниверситета, 1998. – 52 с.

Методические указания по паразитологии, раздел "Подцарство Простейшие Protozoa", составлены согласно программе по спецкурсу и предназначены для студентов биологического профиля университетов.

Цель методических указаний - помочь студентам в приобретении навыков самостоятельного паразитологического исследования животных, изготовления тотальных препаратов, изучения морфологии паразитологических простейших.

ISBN 5-85213-141-5

© Бурятский госуниверситет, 1998  
© Институт общей и экспериментальной биологии РАН, 1998

Лицензия ЛР №020047 от 05.02.97.

Подписано в печать 20.04.98. Формат 60x84 1/16. Уч.-изд.л. 3,08. Усл. печ. л. 3,02.  
Тираж 60. Заказ 488. Цена договорная.

Издательство Бурятского госуниверситета, 670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24а.

## Предисловие

Настоящее руководство составлено в соответствии с программой спецкурса по паразитологии, основная задача которого - расширение и углубление знаний студентов биологического профиля, полученных ими из курса зоологии беспозвоночных. Пособие позволяет наиболее полно и продуктивно использовать время лабораторно-практических занятий, формирует навыки самостоятельной работы с биологическими объектами, учит читать и анализировать гистологические препараты..

Часть I руководства включает разделы: техника микроскопирования, паразитологический анализ животного, техника приготовления тотальных препаратов, изучение паразитических простейших; часть II - гельминты, моллюски, членистоныогие.

Каждый раздел включает цели и задачи, задание для самоподготовки, методические указания к выполнению работ, тесты текущего и итогового контроля, литературу.

## ТЕМА. УСТРОЙСТВО СВЕТОВЫХ МИКРОСКОПОВ И ТЕХНИКА МИКРОСКОПИРОВАНИЯ

**Цель и задачи.** Ознакомить с названием и назначением основных частей микроскопа. Усвоить правила работы с микроскопом и приемы использования его для изучения биологических объектов.

### Задание для самоподготовки.

Выучить основные части микроскопа, знать их устройство и назначение. Знать расположение на микроскопе механической, оптической и осветительной частей и знать их устройство. Выучить правила работы с микроскопом.

### Работа 1. Микроскопы МБР или МБИ, МБС и правила работы с ними

Микроскоп по-прежнему остается основным рабочим инструментом паразитолога. Поэтому детальное знание и владение техникой микроскопирования крайне необходимо. Разрешающая способность светового микроскопа невелика. Разрешающая способность микроскопа - это наименьшее расстояние между двумя точками, при котором они видны раздельно. Теоретически рассчитанный предел разрешающей способности оптического микроскопа составляет  $1/3$  длины волны используемого источника света. Поскольку длина волн видимого света колеблется в пределах  $0,4 - 0,78$  мкм, минимальный размер структур, которые могут быть хорошо различимы в световой микроскоп, равняется  $0,2$  мкм.

Микроскоп МБИ (микроскоп биологический) или МБР (микроскоп биологический рабочий).

Основные части микроскопов МБИ или МБР: механическая, оптическая и осветительная (рис. 1).

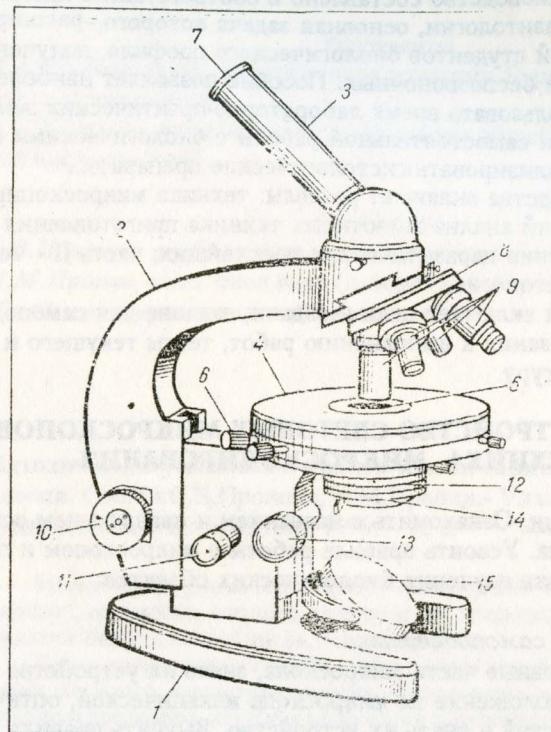


Рис. 1. Микроскоп МБР. 1 - основание (штатив),  
2 - тубусодержатель, 3 - тубус, 4-предметный столик,  
5 - отверстие предметного столика, 6 - винты, пере-  
мещающие столик, 7 - окуляр, 8 - револьвер,  
9 - объективы, 10 - макрометрический винт,  
11 - микрометрический винт, 12 - конденсор,  
13 - винт конденсора, 14 - диафрагма, 15 - зеркало.

К механической части микроскопа относят: основание (штатив) (1), тубусодержатель (2), тубус (3), предметный столик (4) с отверстием по в середине (5), револьвер (4), макрометрический (5) и микрометрический (6) винты. На столик помещают рассматриваемый предмет. По бокам столика находятся два винта (6) для передвижения столика вместе с объектом в горизонтальной плоскости. Макрометрический винт (10) служит для поднятия и опускания тубуса (грубая наводка на фокус). Микрометрический винт (11) служит для точной наводки на фокус. Об-

ращаться с ним необходимо очень осторожно, вращать его можно только не более чем на половину оборота.

Оптическая часть микроскопа представлена окуляром (7) и объектива-ми (9). Окуляр ( от лат. oculus - глаз) находится в верхней части тубуса и об-ращен к глазу. Окуляр - это система линз, заключенных в металлическую гильзу цилиндрической формы. Кратность его увеличения ( $\times 7$ ,  $\times 10$ ,  $\times 15$ ) обозначена цифрами на его верхней поверхности. С противоположной сто-роны расположена пластинка, или револьвер с гнездами для объективов. Объектив также представляет собой систему линз, заключенных в общую металлическую оправу. Кратность увеличения объективов обозначена циф-рами на его боковой поверхности. Различают объектив малого увеличения ( $\times 8$ ), объектив большого увеличения ( $\times 40$ ) и иммерсионный ( $\times 90$ ), используе-мый для изучения наиболее мелких объектов. Общее увеличение микроскопа равно увеличению окуляра, умноженному на увеличение объектива.

Изображение в микроскопе получается обратным, поэтому, чтобы рассмотреть верхнюю часть препарата, необходимо передвинуть его вниз. Поскольку изображение в микроскопе увеличено, передвигать препарат надо медленно и плавно, чтобы нужная деталь не вышла за поле зрения мик-роскопа.

Осветительная часть микроскопа состоит из зеркала (15), конденсора (12) и диафрагмы (14). Зеркало укреплено на штативе ниже предметного сто-лика и благодаря подвижности ему можно придать любое положение, необ-ходимое для направления луча света через отверстие предметного столика на объектив. Зеркало имеет вогнутую и плоскую поверхность. При обычных лам-пах используют вогнутое зеркало.

Осветитель (конденсор) - это главная часть осветительного аппарата. Это плоско-выпуклая линза, закрепленная в особом кольце. Осветитель служит для концентрации световых лучей на объект.

#### Правила работы с микроскопом МБИ или МБР

1. Установить микроскоп штативом к себе, предметным столиком от себя на такое расстояние, чтобы не приходилось к нему тянуться.

2. Поставить в рабочее положение объектив малого увеличения, поворачивая револьвер до тех пор, пока нужный объектив не займет срединное по-ложение по отношению к тубусу и предметному столику, при этом слышит-ся легкий щелчок и револьвер фиксируется.

3. С помощью макрометрического винта поднять объектив над столиком на высоту примерно 0,5 см. Открыть диафрагму и немного приподнять кон-денсор.

4. Глядя в окуляр, вращением зеркала добиться равномерного и достаточ-но яркого освещения поля зрения.

5. Положить препарат на предметный столик (обязательно покровным стеклом вверх) так, чтобы объект находился против отверстия столика.

6. Медленно опустить тубус с помощью макрометрического винта, так чтобы объектив находился на расстоянии около 2 мм от препарата (наблюдая сбоку за объективом).

7. Смотреть в окуляр и медленно поднимать тубус с помощью кремальеры до тех пор, пока в поле зрения не появится изображение объекта.

8. Для того чтобы рассмотреть объект при большом увеличении, необходимо поместить интересующий участок в самый центр поля зрения. Глядя в окуляр, передвигайте препарат руками или с помощью винтов препаратороводителей, пока объект не займет нужного положения.

9. Вращая револьвер, перевести объектив большого увеличения в рабочее положение.

10. Опустить тубус под контролем глаза (смотреть сбоку) почти до соприкосновения с препаратом и затем, глядя в окуляр, медленно поднимать тубус до тех пор, пока не появится изображение. Для тонкой фокусировки используйте микрометрический винт.

11. При зарисовке препарата смотреть в окуляр лучше левым глазом, правый остается открытим.

По окончании наблюдения и зарисовки следует поднять тубус, перевести револьвер на слабое увеличение и только тогда освободить зажимы и снять препарат со столика.

Вынимать препарат из-под сильного объектива нельзя, это может привести к повреждению препарата и объектива.

При изучении в световом микроскопе очень мелких объектов используют иммерсионный объектив. При работе с ним на покровное стекло помещают каплю иммерсионного масла. Тубус опустить так, чтобы нижняя линза объектива погрузилась в каплю иммерсионного масла. Затем, глядя в окуляр, с помощью микровинта осторожно немножко опустить, а потом поднять объектив до получения четкого изображения.

Микроскоп МБС (микроскоп биологический стереоскопический).

МБС - является стереоскопическим микроскопом, позволяющим получить прямое и объемное изображение рассматриваемого объекта.

Микроскоп МБС состоит из столика, штатива, оптической головки и бинокулярной насадки (все обозначения на рис. 2).

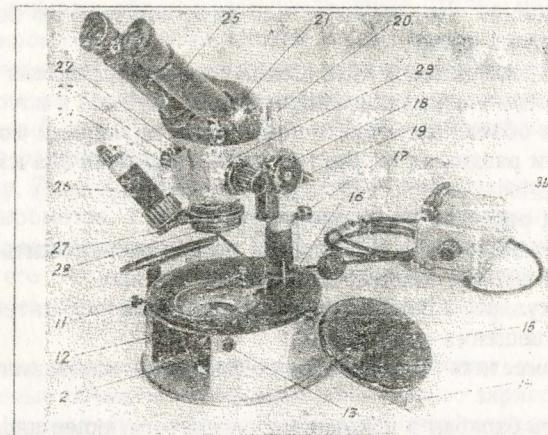


Рис. 2. Общий вид микроскопа МБС. 2 - отражатель, 11 - рукоятка, 12 - корпус, 13 - винт зажимной, 14 - планка, 15 - пластина, 16 - основание, 17 - прижимной хомутик, 18 - рукоятка, 19 - винт, 20 - стержень, 21 - корпус призмы, 22 - стопорный винт, 23 - оптическая головка микроскопа, 24 - рукоятка, 25 - окулярная трубка, 27 - поворотный кронштейн, 28 - оправа объектива, 29 - подшипник, 30 - трансформатор.

Столик имеет вид круглого (квадратного у МБС-9 и МБС-10) корпуса и обеспечивает устойчивость микроскопа. Внутри столика вмонтировано плоское зеркало, одна сторона его матовая. Зеркало вращается только в горизонтальной плоскости. В стенке корпуса напротив зеркала сделан вырез, через который свет падает на зеркало. При работе с искусственным освещением рекомендуется использовать матовую поверхность зеркала.

Штатив микроскопа представляет собой массивный стержень, вмонтированный в плоское основание, которое является верхней поверхностью столика и несущий на себе оптическую головку. Спереди, над зеркалом, основание микроскопа имеет прорезь округлой формы, закрытую стеклянной пластинкой. На основании расположены два зажима (клеммы) для закрепления препарата.

Оптическая головка - это основная часть микроскопа. Корпус оптической головки прямоугольной формы, верхняя часть ее несет резьбу для бинокулярной насадки, на нижней части укреплен объектив. На боковых сторонах оптической головки расположены барабан с рукояткой, представляющие собой часть устройства для регулировки увеличения. Ось барабана выведена на боковую стенку оптической головки и имеет цифры 0,6; 1; 2; 4; 7, обозначающие кратность увеличения. На боковой стороне оптической головки позади барабана расположен винт (18), служа-

щий для перемещения головки вверх или вниз по стержню при ориентировочной наводки на фокус.

На верхней поверхности оптической головки укреплена окулярная насадка. Она состоит из двух цилиндрических трубок, в которые вставлены окуляры и объективы. Расстояние между окулярами можно изменять, сдвигая или раздвигая их руками до тех пор, пока два изображения не сольются в одно.

#### Правила работы с микроскопом МБС.

1. Установить микроскоп штативом к себе и расположить так, чтобы свет падал через вырез в корпусе столика на зеркало.

2. Глядя в окуляры и поворачивая зеркало, добиться интенсивного и равномерного освещения поля зрения.

3. Объект поместить на стеклянную пластинку основания микроскопа.

4. Установить барабан в положение соответствующее цифре 1 и поднятием или опусканием оптической головки с помощью винта добиться изображения объекта.

5. Сдвигая и раздвигая окулярные трубы, добиться соединения двух изображений в одно.

При работе с микроскопом необходимо помнить следующее: при переносе микроскопа брать его только за штатив. Нельзя без необходимости: вынимать окуляры; вывинчивать объективы; крутить микрометрический винт. После работы с иммерсионным объективом нужно обязательно протереть препарат и объектив мягкой тряпочкой. Осветитель включать и выключать при минимальном напряжении трансформатора.

Световое микроскопирование дает хорошие результаты при исследовании окрашенных и высоко контрастных объектов. При изучении живых неокрашенных биологических объектов обычно используется фазово-контрастная микроскопия, которая дает в светлом поле зрения чрезвычайно контрастные изображения живых неокрашенных клеток и тканей.

Для фазово-контрастной микроскопии используются приспособления: осветитель; вспомогательный микроскоп малого увеличения, вставляемый вместо окуляра; фазовый конденсор с револьвером и специальными диафрагмами для каждого объектива; специальные объективы (ахроматы Ф10, Ф20, Ф40 и масляная иммерсия ФОИ90); светофильтры.

#### Измерение микроскопических объектов.

При работе с паразитологическими объектами часто приходится прибегать к измерениям. Под микроскопом измерения производят с использованием окуляр-микрометра. Окуляр-микрометр представляет собой прозрачную стеклянную пластинку, на которой нанесена шкала с ценой деления 0,1 мм. Увеличение микроскопа зависит от фокусных расстояний окуляра и объектива, а также и от оптической длины тубуса. Поэтому необходимо прежде рассчитать, чему соответствует одно деление окуляр-микрометра при данном увеличении конкретного микроскопа. Достигает-

ся это следующим образом. На предметный столик микроскопа кладется объект-микрометр, представляющий собой нанесенную на стекло шкалу с ценой деления 0,01 мм, и, достигнув резкого изображения шкалы, отсчитывают сколько делений объект-микрометра приходится на известное число делений окуляр-микрометра, вычисляя абсолютное значение одного деления окуляр-микрометра.

Пример. 7 делений объекта покрываются 52 делениями окуляр-микрометра. 1 деление объект-микрометра равно 10 мкм, 1 деление окуляр-микрометра равно  $10 \times 7 : 52 = 1,3$  мкм. При измерении объекта размер его сначала определяют в делениях окуляр-микрометра и затем умножают на абсолютную величину одного деления.

#### Правила оформления лабораторной работы

Изучаемые объекты необходимо обязательно зарисовывать в альбоме. Зарисовка позволяет лучше понять и закрепить строение объекта, форму отдельных структур и их взаиморасположение. Зарисовки необходимо производить в альбоме, для этого иметь простой и цветные карандаши.

При зарисовке необходимо придерживаться следующих правил.

1. Рисовать только на одной стороне листка.

2. До начала зарисовки вверху страницы необходимо записать название темы. Указать название типа, подтипа, класса и вида, к которому относится объект или экземпляр в соответствии с международной номенклатурой. Каждое из этих названий пишется на отдельной строке по-русски и по-латыни.

3. Рисунок должен быть крупным, детали хорошо различимы. На одной странице не должно быть более 3 - 4 рисунков. Если объекты крупные и сложные, то лучше делать один рисунок на странице.

4. Рисунок должен правильно отображать формы, соотношения объема и размеров отдельных частей и целого. Чтобы легче добиться этого, сначала рисуйте общий контур объекта (крупно), затем внутри него слегка наметьте контуры остальных деталей и лишь после этого вырисуйвайте их четко. Рисунок должен изображать не абстрактный, а конкретный объект с его индивидуальными особенностями.

5. Вокруг рисунка не нужно рисовать контуры поля зрения микроскопа.

6. К каждому рисунку обязательно должны быть сделаны обозначения его отдельных частей.

Обозначения можно делать двумя способами:

а) к отдельным частям объекта ставятся стрелочки и против каждой пишут название. Все надписи должны быть параллельны друг другу;

б) к отдельным частям объекта ставят стрелочку и против каждой пишут цифру, затем сбоку от рисунка или под ним столбиком пишут цифры, а против них - название. Второй способ предпочтительней.

7. Работа в конце занятия должна быть подписана преподавателем. Если работа не соответствует предъявляемым требованиям, студент обязан ее переделать.

#### Тесты контроля

1. Перечислите элементы механической части микроскопа.
2. Каким образом с помощью конденсора и диафрагмы можно увеличить интенсивность освещенности объекта?
3. Перечислите элементы оптической части микроскопа, укажите их назначения.
4. Перечислите элементы осветительной части микроскопа.
5. Окуляры какой кратности увеличения имеет микроскоп?
6. Назовите объективы малого, большого увеличения, иммерсионный объектив.
7. Перечислите основные части МБС-1 и их назначение.
8. Какие и в каком порядке необходимо соблюдать правила работы с МБР-1 и МБС-1?
9. Какие и в каком порядке следует проделать операции при переходе к рассмотрению объекта при большом увеличении?
10. Перечислить основные правила оформления лабораторных работ.
11. Как определить цену деления окуляр-микрометра?

#### ЛИТЕРАТУРА

Валовая М.А., Кавтарадзе Д.Н. Микротехника. Правила, приемы, искусство, эксперимент. М., МГУ, 1993. - С. 5-82.

Быховская-Павловская И.Е. Паразитологическое исследование рыб. Руководство по изучению. Л., Наука, 1985. - 121 с.

#### Общие представления о подготовке паразитов для микроскопирования

При изучении биологического объекта он должен удовлетворять двум основным требованиям: 1) он должен быть прозрачным; 2) его структуры должны быть контрастны, т.е. они должны иметь разные показатели преломления.

Подготовка биологического объекта к микроскопированию состоит из следующих этапов: фиксация, уплотнение, окраска и заключение в бальзам. Если объект очень толстый, то после уплотнения его пропитывают парафином или целлоидином, затем разлагают на тонкие срезы с использованием особого прибора - микротома.

#### Фиксация и хранение паразитов

Цель фиксации - сохранение тканевых структур в состоянии близком к прижизненному и их предохранение от дальнейших разрушений. Обя-

зательное условие фиксации - материал должен быть свежим. Перед фиксацией собранных паразитов (кроме нематод) необходимо хорошо промыть водой и выдержать некоторое время в воде для расслабления мускулатуры.

Фиксаторов и способов фиксации существует много, выбор их зависит от систематической принадлежности паразитов и от задачи исследования. Самым простым и удобным средством фиксации и сохранения ленточных червей является 60-75-градусный спирт. Скребней фиксируют 70-градусным спиртом. Для того, чтобы хоботок был вывернут, их помещают между двумя предметными стеклами, иногда с грузиком. Толстые экземпляры можно прокалывать в двух-трех местах.

Круглых червей фиксируют и хранят в жидкости Барбагалло (3 % -ный раствор формалина в физиологическом растворе поваренной соли).

Пиявок лучше всего фиксировать 1 - 2 % -ным раствором формалина. Паразитических раков и личинок моллюсков фиксируют 70-градусным спиртом или 3 % формалином. В последнем случае сохраняют их в 70 - 75-градусном спирте.

Моногеней рекомендуется фиксировать 4 %-ным формалином (лучше горячим), крупных моногеней можно фиксировать 70-градусным спиртом. Лучшие результаты получаются при заключении нефиксированных моногеней в глицерин-желатин. Свежих паразитов кладут на предметное стекло, затем маленький кусочек глицерин-желатина нагревают над пламенем спиртовки (не доводя до кипения), капают на паразита и осторожно накрывают покровным стеклом. Покровное стекло слегка надавить, следя за тем, чтобы паразиты не оказались за покровным стеклом. На покровное стекло положить грузик и оставить на 1-2 часа. Препараты при хранении беречь от пыли.

При фиксации объектов необходимо, чтобы объем фиксирующей жидкости превосходил в 20 - 40 раз объем фиксируемых объектов. Паразитов, собранных из разных органов или относящихся к разным систематическим группам, фиксировать и хранить раздельно.

Для изучения анатомо-гистологического строения паразитов фиксируют сложными фиксаторами (жидкость Буэна, Ценкер-формол, Карнуа и др.), заливают в парафин, или целлоидин и приготавливают тонкие срезы.

#### Окраска паразитов и изготовление препаратов

Тотальные препараты готовят из мелких объектов. Для изготовления тотального препарата паразитов фиксируют одним из указанных выше фиксаторов и после соответствующей обработки окрашивают. Для окрашивания тотальных препаратов часто используют борный, квасцовский или уксуснокислый кармин. Тотальные препараты бывают временные и постоянные. Временные тотальные препараты изготавливают таким образом: паразитов просветляют в глицерине или молочной кислоте и заклю-

чают в глицерин-желатин. Такой препарат может храниться в течение года.

Для исследования простейших из них делают сухие или влажные мазки, последние предпочтительнее. Покровные стекла с мазками помещают в дистиллированную воду, затем в 2,5 %-ный водный раствор железоаммиачных квасцов на 2-8 часов, сполосывают дистиллированной водой (1-2 мин). После этого мазки помещают в раствор железного гематоксилина на 6-24 часа, прополаскивают водопроводной водой и дифференцируют (под контролем микроскопа) 1 % раствором железоаммиачных квасцов до появления четких рисунков ядер на фоне голубовато-стального цвета цитоплазмы. Затем мазки промывают водопроводной водой в течение 30 мин и обезвоживают в спиртах возрастающей концентрации (70-, 96-, 100-градусном), просветляют и переносят в каплю канадского бальзама на предметное стекло.

Из миксоспоридий можно получать хорошие препараты и без окраски. В этом случае из цисты берется небольшое количество содержимого и наносится на предметное стекло, затем на кончик скальпеля помещают небольшой кусочек глицерин-желатина, который нагревают (не доводя до кипения) над спиртовкой, капают на предметное стекло и быстро покрывают покровным стеклом.

Таким же способом готовят тотальные препараты моногеней. Для этого берут 2-3 паразита и помещают в каплю воды на предметное стекло для расправления паразитов, затем оттягивают избыток воды и капают каплю расплавленного глицерина и покрывают покровным стеклом. Под контролем бинокуляра придавить покровное стекло, пока хитиноидные образования не станут хорошо видимыми.

Крупных моногеней фиксируют 70-градусным спиртом и окрашивают в одном из карминов.

Скребней можно исследовать без окраски. В этом случае их просветляют в концентрированной молочной кислоте и заключают в глицерин.

Круглых червей просветляют в глицерине или молочной кислоте, помещая в эти среды сразу из фиксатора. Просветление может длиться от нескольких минут до 2-3 часов в зависимости от размера паразита. Просветленных паразитов кладут на предметное стекло, капают каплю глицерина и покрывают покровным стеклом. Края покровного стекла обмазывают канифолью или вазелином для предохранения от высыхания.

Очень часто паразитологические объекты исследуют живыми. В этом случае паразита помещают на предметное стекло и покрывают покровным стеклом. Делать это нужно осторожно, чтобы не раздавить паразита. После исследования и зарисовки паразита покровное стекло осторожно снимают с помощью иглы, а объект помещают в фиксатор.

При изучении простейших и моногеней лучше пользоваться фазово-контрастным устройством.

#### Приготовление фиксаторов и красителей

Для получения 70-градусного спирта (из исходного 96-градусного) необходимо к 100 мл исходного спирта прибавить 39,2 мл дистиллированной воды.

**Жидкость Барбагалло.** Растворить 9 г поваренной соли в 1 л дистиллированной воды и прибавить 30 мл 40 %-ного раствора формалина.

**Жидкость Буэна.** Смешивают 150 мл насыщенного водного раствора пикриновой кислоты с 50 мл 40 %-ного формалина и 10 мл ледяной уксусной кислоты перед самым употреблением. Время фиксации от 2 часов до нескольких суток. Отмыкну фиксатор производят 70-градусным спиртом, сменяя его до тех пор, пока спирт не перестанет окрашиваться в желтый цвет. Фиксатор очень удобен в полевых условиях.

**Жидкость Карнума.** Перед фиксацией смешивают 6 мл абсолютного спирта с 1 мл ледяной уксусной кислоты и 3 мл хлороформа. Использовать только один раз. Преимущества фиксатора перед другими в том, что он очень быстро проникает в ткани. Время фиксации - от 10 мин до 3 часов. После фиксации объекты хранить в 80-градусном спирте.

**Квасцовый кармин.** Растворить 10 г калийных или аммиачных квасцов в 200 мл дистиллированной воды и прибавить 1 г тщательно растертого в ступке кармина. Кипятить 1 ч. Охладить и профильтровать. Добавить 1-2 кристалла тимола или фенола во избежание развития плесени. Краска используется многократно.

**Применение.** Паразитов отмывают от фиксатора в проточной воде, мелких в течение 6 - 7 часов, крупных - в течение 24 часов. Обсушивают фильтровальной бумагой. Красят 2 - 24 часа. При перекрашивании дифференцируют 70-градусным подкисленным спиртом (1 мл соляной кислоты на 100 мл 70-градусного спирта). Тщательно промыть в воде (пока не будет отходить краска), затем провести по спиртам возрастающей концентрации (70-, 80-, 90-, 96-, 100-градусный), выдерживая по 10 - 30 мин в каждом, просветлить в диметилфталате или гвоздичном масле, поместить паразита на предметное стекло и заключить в бальзам. На покровное стекло положить грузик и оставить до полного высыхания. При приготовлении препарата следить за тем, чтобы под покровным стеклом не оставалось пузырьков воздуха и поверхности, не занятой бальзамом. Для удаления пузырьков воздуха препарат поместить в термостат при 37 градусах. При наличии поверхности не занятой бальзамом под покровное стекло подпустить каплю бальзама.

**Уксуснокислый кармин** является одновременно и фиксатором. Смешать 45 мл ледяной уксусной кислоты с 55 мл дистиллированной воды, всыпать 3 - 4 г мелко растертого кармина, кипятить в течение часа на медленном огне (на водяной бане) для получения насыщенного раствора. Надсадочную часть раствора профильтровать. Перед употреблением 1 объем краски развести в 2 объемах 45 %-ной уксусной кислоты.

**Применение.** Паразитов отмыть от фиксатора и поместить в краску на 5 - 10 мин, дифференцировать в 70-градусном подкисленном спирте и последовательно провести по спиртам возрастающей крепости (80-, 85-, 90-,

96-градусный) для обезвоживания, просветлить в диметилфталате и заключить в бальзам.

**Железный гематоксилин по Гейденгайну.** Растворить 0,5 г гематоксилина в 10 мл 90-градусного спирта. В раствор добавить 90 мл дистиллированной воды и оставить на 3-4 недели для созревания. Горлышко сосуда завязать марлей или заткнуть рыхлой ватной пробкой. Перед употреблением краску разбавить в 2 раза водой.

Применение. Паразитов отмыть от фиксатора и поместить на несколько минут (10 - 15 ) в дистиллированную воду, затем перенести из дистиллированной воды в 2,5%-й раствор железных квасцов на 1 - 12 час, сполоснуть в нескольких сменах дистиллированной воды (общая продолжительность пребывания в воде 0,5 - 2 мин) и перевести в краску на 6 - 24 ч, сполоснуть водопроводной водой и дифференцировать 1%-м раствором железо-аммиачных квасцов под контролем микроскопа, промыть водопроводной водой 10 - 15 мин, обезводить в спиртах (70-, 96-, 100-градусном), выдерживая по 10 -15 мин в каждом, просветлить и заключить в бальзам.

**Глицерин-желатин.** Желатин 7 г залить 43 мл дистиллированной воды и оставить на 2 - 3 часа для набухания, затем прибавить 50 г глицерина и 0,5 г фенола, нагреть при помешивании на водяной бане (не доводя до кипения), профильтировать. Хранить в плотно закрывающемся сосуде.

**Окраска мазков крови.** Окраску производят готовым раствором краски Романовского-Гимза. Перед употреблением краску разводят дистиллированной водой (1-2 капли краски на 1 см<sup>2</sup> воды) и пипеткой наливают на мазки крови, расположенные горизонтально на 30 мин. Затем стекла быстро споласкивают дистиллированной водой и высушивают. После этого мазки просматривают под микроскопом с иммерсией при увеличении х 90.

Если позволяет время, можно не фиксировать, а сразу подсушенные мазки помещать в краску, которая в этом случае будет являться и фиксатором.

## Тема. ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЖИВОТНОГО

**Цель и задачи** - получить навыки самостоятельного паразитологического анализа животного и приготовления тотальных препаратов.

Наиболее удобным и легко доступным объектом для данной цели, на наш взгляд, является рыба.

### Задание для самоподготовки.

1. Выучить анатомическое строение рыбы и уметь находить ее основные органы.

2. Прочитать и усвоить основные рекомендации по технике паразитологического анализа рыб.

3. Выписать из методички приемы окраски паразитов уксуснокислым кармином и мазков крови по Романовскому-Гимза.

2. Знать определение таких понятий: экстенсивность заражения, интенсивность заражения, средняя интенсивность заражения, индекс обилия, лимиты.

## Работа 2. Техника паразитологического исследования рыб

Для паразитологического анализа нужно брать живую или только что погибшую рыбу. Для обездвиживания рыбы делают надрез спины за головой до под позвоночной артерии или разрушают спинной мозг с помощью препараторальной иглы. Полный паразитологический анализ необходимо производить в строгой последовательности.

1. Вначале необходимо внимательно осмотреть поверхность тела рыбы. Рыбу помещают в кювету с небольшим количеством воды и внимательно осматривают покровы тела и плавники, последние оттягивают от тела и просматривают на свет с обеих сторон. Затем берут слизь с поверхности тела. На коже и плавниках могут быть обнаружены инфузории, цисты миксоспоридий, моногеней, ракчи, пиявки, моллюски. Выявленных паразитов собрать и зафиксировать, данные занести в дневник или карточку вскрытия..

2. Взятие биологических показателей рыбы: длина, масса, пол, возраст. Длина тела рыбы измеряется от конца рыла до конца чешуйного покрова (это промысловая длина и записывается как - l) и полная длина (обозначается L), которая измеряется от конца рыла до конца хвостового плавника. У лососевидных рыб вместо L измеряется длина по Смиту от конца рыла до вырезки на хвостовом плавнике. Для определения возраста берут чешую, которую соскабливают с переднебоковой поверхности тела выше боковой линии (15 - 20 чешуек), у рыб с голой кожей берут отолиты (подкаменщики) или позвонки (например, сом, налим), у окуня - жаберную крышку. Материал для определения возраста помещают в чешуйную книжку или специальные конверты и снабжают этикеткой, куда заносят все показатели данной особи.

Внешний осмотр рыбы и снятие биологических показателей необходимо производить очень быстро во избежание свертываемости крови.

3. **Взятие крови.** После измерения рыбы необходимо взять кровь для последующего исследования кровепаразитов. Кровь берут из сердца, жаберной или хвостовой артерии и делают тонкий мазок. Изготовление мазка - маленькую каплю крови очень быстро помещают на чистое обезжиренное предметное стекло на расстоянии 0,5 см от правого края, другое предметное стекло (отшлифованное по краям) ставится под углом 45 градусов и подводится к капле, когда кровь растечется по краю стекла, его продвигают влево от капли по первому стеклу (рис. 3).

Мазок должен быть очень тонким и сплошным. Мазок подсушивают на воздухе и помещают в фиксатор (смесь этилового спирта с эфиром 1:1) в течение 5 минут. Затем мазок подсушивают, подписывают и сохраняют до окрашивания. Если позволяет время, можно не фиксировать, а сразу подсушенные мазки помещать в краску, которая в этом случае будет являться и фиксатором.

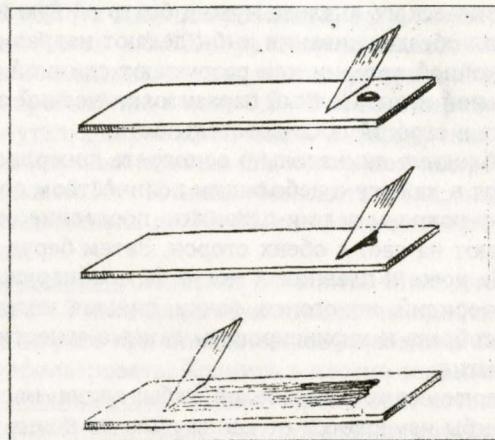


Рис. 3. Изготовление мазка крови.

После взятия крови приступают к исследованию внутренних органов.

**4. Обследование внутренних органов.** Внутренние органы обследуют в такой последовательности: носовые полости (обонятельные ямки) - ротовая полость - жабры - полость тела - выделительная система - пищеварительная система - гонады - плавательный пузырь - нервная система (головной и спинной мозг) - мускулатура - кожа.

**Носовые полости.** Пипеткой с оттянутым концом ввести небольшое количество воды в носовые ямки, а затем отсосать обратно вместе со слизью, слизь покрыть покровным стеклом и исследовать под микроскопом при сильном увеличении. В слизи из носовых полостей могут встретиться простейшие, моногенеи, ракчи.

**Ротовая полость.** Тщательно осмотреть полость рта, снять обнаруженных паразитов, затем сделать соскоб. С каждого участка ротовой полости делать отдельный соскоб, чтобы точно обозначить локализацию паразитов. В ротовой полости можно обнаружить простейших, моногеней, trematod, ракчи, пиявок.

**Жаберный аппарат.** Вначале необходимо удалить жаберную крышку, а затем вырезать жабры и отделить жаберные лепестки, запомнив порядок их расположения. Каждую жаберную дужку рассматривают под бинокуляром, перебирая двумя препаровальными иглами каждый лепесток. Обнаруженных паразитов отделяют от тканей и помещают в воду. После отмычки от слизи их фиксируют в 70 градусном спирте или готовят препараты. С лепестков необходимо соскоблить скальпелем слизь и еще раз перебрать под микроскопом. Кроме моногеней и ракчи в жабрах могут быть инфузории, цисты миксоспоридий, личинки моллюсков.

**Полость тела.** Пипеткой взять жидкость из полости тела и капнуть на предметное стекло, покрыть покровным стеклом и просмотреть при сильном увеличении микроскопа. В полостной жидкости можно обнаружить жгутиконосцев. В полости тела карповых и некоторых других видов рыб могут быть обнаружены личинки лентецов *Ligula* и *Digamma*. В полостном жире, на стенке пищевода, желудка, пилорических придатках лососевидных рыб (омуль, сиг, хариус, ленок) часто можно увидеть белые цисты размером от 1 до 5 мм, в которых находятся личинки (плероцеркоиды) лентца чае *Diphyllothrium dendriticum* (рис. 4) и *D. ditrematum*. В полости тела, на поверхности органов, в мускулатуре многих хищных рыб (щука, окунь, налим и др.) локализуются личинки широкого лентца *D. latum* (паразита опасного для человека).

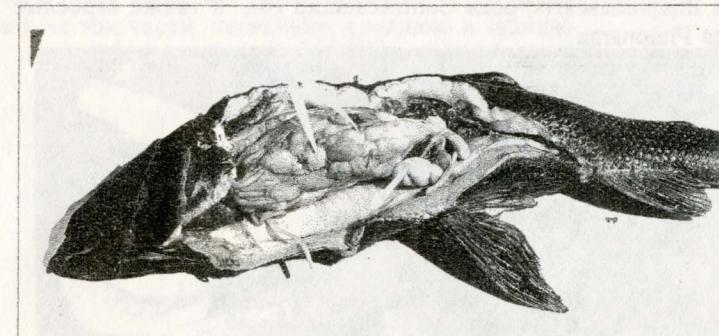


Рис. 4. Пищеварительный тракт косогольского хариуса из оз. Хубсугул с личинками цестоды *D. dendriticum* (оригинал, фото Урбазаева В.)

В полости тела на внутренних органах и на мезантерии многих видов рыб можно встретить цисты с личинками (метацеркарии) trematod (рис. 5).

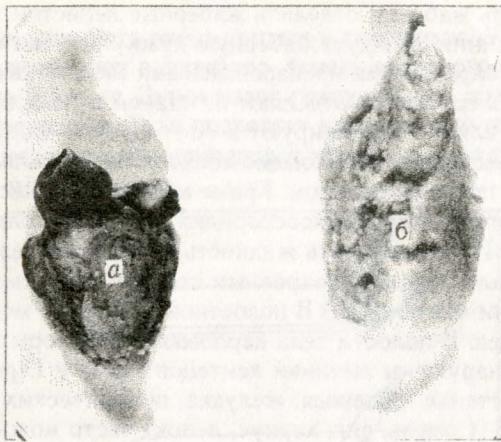


Рис. 5. Сердце ленка в норме (а), (б) сердце ленка с метацеркариями трематоды *Ichthycotylurus erraticus* (оригинал, фото Урбазаева В.).

На поверхности внутренних органов часто встречаются личинки нематод рода *Raphidascaris*, рода *Contraeacesum* (б), а также взрослые формы рода *Philonema*.

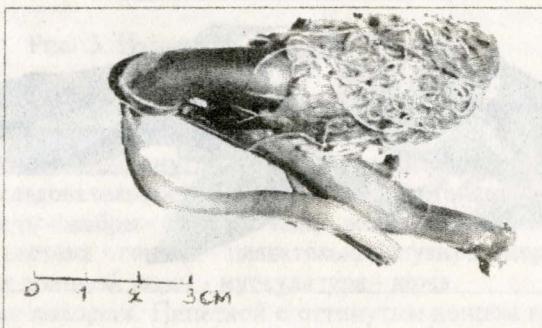


Рис. 6. Пищеварительный тракт омуля, пораженный личинками нематоды *Contraeacesum osculatum* (оригинал, фото Н.М.Пронина).

**Выделительная система.** Мочевой пузырь и почки исследуют отдельно. Мочевой пузырь отделить от почек, затем его содержимое поместить на предметное стекло, покрыть покровным стеклом и рассматривать при сильном увеличении. Затем сделать соскоб со стенки мочевого пузыря и также обследовать при сильном увеличении. В мочевом пузыре можно обнаружить плазмодии и споры миксоспоридий, инфузории, триходины, трематоды.

Почки поместить между двумя большими предметными стеклами, или фотопластинкой и предметным стеклом, сильно придавить и обследовать под бинокуляром. Особенно внимательно необходимо просматривать выводные каналы и мочеточники, где можно обнаружить трематод рода *Phyloodistomum*. Из разных участков почки ткань просмотреть под микроскопом при сильном увеличении с целью выявления простейших.

**Пищеварительная система.** Все органы пищеварительной системы осторожно отделяют и помещают в разные чашки Петри. Затем осторожно отделяют от печени желчный пузырь. Стенку его разрезают и отдельно исследуют под микроскопом при сильном увеличении желчь и соскоб с его внутренней стенки. Здесь можно обнаружить плазмодии и споры миксоспоридий, ооцисты кокцидий, личинки трематод. Печень вначале подвергают наружному осмотру, а затем небольшие кусочки ее проплавливают между предметными стеклами и обследуют под бинокуляром, а часть - при сильном увеличении микроскопа (последнее для обнаружения кокцидий). В печени можно обнаружить цисты личинок трематод рода *Ichthyocotylurus*, капсулы личинок цестод родов *Triaeporogonus*, *Diphyllobothrium*, нематод родов *Raphidascaris*, *Contraeacesum* и др. Таким же способом компрессория обследуют селезенку.

Пищеварительный тракт разделяют на пищевод, желудок, кишечник (рис. 7), а у карповых, у которых нет четко выраженного желудка, разрезают на три части: переднюю, среднюю и заднюю.

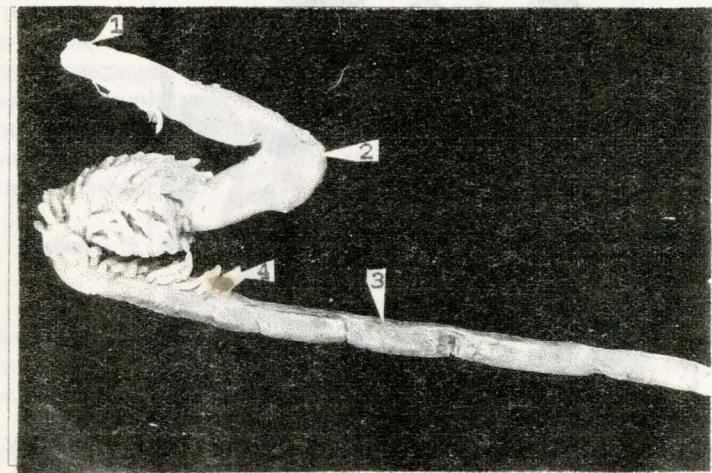


Рис. 7. Пищеварительный тракт омуля: 1-пищевод, 2-желудок, 3-кишечник, 4-пилорические придатки (оригинал, фото Урбазаева В.).

Каждую часть отдельно разрезают вдоль, содержимое помещают в чашку Петри, добавляют немного воды, просматривают, выбирая крупных паразитов, затем исследуют под МБС. Далее делают соскоб со стенки и

просматривают под микроскопом при сильном увеличении. В полости пищеварительного тракта можно обнаружить трематод, цестод, нематод, сибней, в стенке - миксоспоридий, кокцидий.

**Гонады.** Вначале осматривают с поверхности, затем небольшие кусочки ткани - под бинокуляром компрессорным методом. В гонадах можно обнаружить инкапсулированных личинок нематод и трематод. У осетровых рыб в икринках могут паразитировать кишечнополостные *Polypodium hydriiforme*, которых можно увидеть невооруженным глазом в икринке, раздавленной в воде.

**Плавательный пузырь.** Осмотреть снаружи, затем разрезать, расправить и осмотреть изнутри и сделать соскоб с внутренней стенки органа. Стенку компрессорным способом исследовать под бинокуляром, соскоб - под МБИ при сильном увеличении. В плавательном пузыре можно обнаружить нематод, а в стенке - миксоспоридий, кокцидий и инцистированных личинок стригеид (трематоды).

**Глаза.** Глазное яблоко осторожно вырезать из орбит (стараться не повредить его оболочки), разрезать по экватору, удалить стекловидное тело с хрусталиком, последний отделить. В глазах рыб часто паразитируют личинки нескольких видов трематод рода *Diplostomum* (рис. 10), которые слабо отличаются морфологическими признаками, но проявляют строгую специфичность к разным частям глаза.



Рис. 8. Метацеркарии рода *Diplostomum* в жидких средах глаза рыбы (оригинал, фото Прониной С.В.)

Поэтому необходимо отдельно исследовать хрусталик, стекловидное тело и ретину. После исследования стекловидного тела и хрусталика необходимо тщательно выскооблить внутреннюю часть глазного яблока и также просмотреть под бинокуляром. Хрусталик помещают в каплю воды

и поворачивают двумя препаровальными иглами, затем зажав пинцетом, снимают верхние слои до твердого ядра. Кроме диплостом в соединительной ткани глаза, при просмотрении компрессорным методом, могут быть обнаружены миксоспоридии.

**Кожа и мускулатура.** Для снятия кожи сделать круговой надрез за головой и вдоль позвоночника до хвостового плавника, и отрезать с обеих боков рыбы и обнажить мускулатуру. Осмотреть внутреннюю часть кожи. У некоторых видов рыб здесь могут паразитировать цисты трематод (*Posthodiplostomum cuticola*), нематоды. Мышцы надрезают в виде книжки и внимательно просматривают вначале визуально, а затем продавливают между стеклами и просматривают при сильном увеличении. У байкальских рыб (омуль, сиг) в мышцах паразитируют миксоспоридии (*Henneguya zschokkei*) и личинки цестоды (*Triaenophorus crassus*). Они хорошо видны невооруженным глазом, имеют вид белых или слегка желтоватых цист. Чаще всего они локализуются около спинного и анального плавников. В некоторых регионах России в мышцах язя, ельца, плотвы, леща паразитируют личинки трематоды *Opisthorchis felineus*. Паразит вызывает у людей тяжелое и трудно поддающееся лечению заболевание - описторхоз. У рыб в мускулатуре могут встречаться личинки ряда других трематод, а у морских рыб, кроме трематод могут паразитировать и нематоды.

**Головной и спинной мозг.** Снять участок черепа со спинной стороны и извлечь головной мозг. Просмотреть его вначале под бинокуляром, а затем из нескольких участков - при сильном увеличении микроскопа. Для извлечения спинного мозга необходимо разрезать спинной хребет, срезав предварительно спинные отростки и ребра, и, отломывая небольшими участками позвоночник, достать спинной мозг. Просмотреть под бинокуляром и при сильном увеличении под микроскопом. В нервной системе рыб можно обнаружить личинки стригеид (трематод), миксо- и миксоспоридий.

### Работа 3. Методика приготовления тотального препарата

Для успешного проведения данного занятия лучше брать мелкие объекты, которые можно заготовить на полевой практике по зоологии. Этими объектами могут быть диплостомы, филлокистомы, бунодеры, мелкие цестоды или их личинки.

Тотальные препараты обычно готовят для определения вида паразита. Для этой цели используют живые или фиксированные объекты. Препараты могут быть временные и постоянные. Методика изготовления временных препаратов дана выше. На данном занятии студент должен научиться готовить постоянный препарат из фиксированных объектов.

Необходимое оборудование для занятия: предметные и покровные стекла (по числу студентов в группе), батареи бюксов с растворами для окраски (можно одну батарею на двух студентов), часовые стекла, пи-

## ЛИТЕРАТУРА

- Быховская-Павловская И.Е. Паразитологическое исследование рыб. Л.: Наука, 1985 - 107 с.  
Шигин А.А. Трематоды фауны СССР. М.: Наука, 1986 - С. 7-16.

пипетки с оттянутыми концами, препоравальные иглы, пинцеты, бальзам. Батарея биоксов для окраски состоит из дистиллированной воды, краски (уксусно-кислого кармина), подкисленного спирта (1% раствор соляной кислоты на 70° спирте), спиртов возрастающей концентрации - 80°, 85°, 96°, и бальзам.

Перед окраской паразиты должны быть отмыты от фиксатора, это достигается выдерживанием их в воде в течение нескольких часов. Удобнее вечером поместить паразитов в воду и оставить до утра (это может проделать лаборант).

### Ход работы.

1. Окраска. Из воды паразитов поместить в краску на 10 - 30 мин, в зависимости от размеров паразита (в краске паразитов осторожно поворачивать препоравальной иглой для равномерного окрашивания),

2. Дифференцировка. Из краски объект перенести в подкисленный спирт (для дифференцировки) на 1 - 2 мин. В подкисленном спирте удаляется избыток краски и лучше становятся заметны структуры паразита, но необходимо следить за тем, чтобы паразит не обесцвеклся.

3. Обезвоживание объекта. Это достигается помещением объекта в спирты возрастающей концентрации 80, 85, 96 градусном, в последнем дважды. В каждом спирте объект держать 10 - 20 мин.

4. Просветление производят диметилфталатом, его добавляют во второй 96 градусный спирт. Паразит, помещенный в спирт с диметилфталатом, некоторое время находится на поверхности, пропитавшись опускается на дно, что указывает на окончание этой операции.

5. Заключение в бальзам. После просветления паразита поместить на предметное стекло, капнуть маленькую каплю канадского бальзама и покрыть покровным стеклом. Во избежание пузырьков воздуха под покровным стеклом, его необходимо поставить на предметное стекло слева от объекта под углом 45° и постепенно опускать вторую сторону, держа пинцетом, после соприкосновения с бальзамом, покровное стекло слегка придавить и поставить на него грузик.

6. Препарат подписать и показать преподавателю для оценки качества.

Если объекты очень мелкие, то их лучше окрашивать в часовых стеклах, при этом менять растворы, внося их с помощью пипеток.

### Тесты контроля

- Назовите последовательно этапы паразитологического анализа рыб.
- Какие биологические показатели рыб необходимо снять и для чего?
- В каком порядке необходимо исследовать органы? Обоснуйте.
- В каких органах можно обнаружить простейших, трематод, цестод, нематод, скребней, раков?
- Какие типы тотальных препаратов существуют и с какой целью их готовят?
- Изложить методику приготовления постоянного тотального препарата.

## ТЕМА. ПОДЦАРСТВО ПРОСТЕЙШИЕ - PROTOZOA

**Цель и задачи** - сформировать у студентов представление о многообразии простейших - паразитов рыб и показать участие их в регуляции численности хозяев. Научить дифференцировать простейших до рода или вида.

### Задание для самоподготовки

- Выучить общую характеристику подцарства простейших.
- Усвоить особенности строения типа Жгутиконосцев -

### Mastigophora.

- Знать строение и жизненный цикл представителей класса Кокцидии - Coccidiomorpha.

4. Ознакомиться со строением и жизненным циклом представителей класса Слизистые споровики - Myxosporidia.

- Особенности строения типа ресничные Ciliophora.

Простейшие (*Protozoa*) - это животные, состоящие из одной, реже из небольшого количества клеток. Они характеризуются тем, что их тело морфологически соответствует одной клетке, а физиологически представляет собой целый организм со всеми присущими ему свойствами. Клетка как одноклеточных, так и многоклеточных организмов состоит из цитоплазмы, ядра и органелл. С поверхности клетка покрыта оболочкой - плазмолеммой (цитолеммой), построенной из трех слоев, двух липидных и белкового. Цитоплазма включает в себя гиалоглазму, обязательные клеточные компоненты - органеллы и различные непостоянные структуры - включения. Органеллы принято делить на мембранный и немембранный строения. К мембранным органеллам относят эндоплазматическую сеть (это сеть каналцев с местными расширениями, пронизывающими в различных направлениях цитоплазму клетки); аппарат Гольджи; митохондрии; лизосомы. Немембранными органоидами являются рибосомы, центросомы, протофибриллы, микротрубочки, микрофиламенты..

Включения цитоплазмы - необязательные компоненты клетки, которые могут возникать и исчезать в зависимости от метаболического состояния клетки. Различают трофические, секреторные, экскреторные и пигментные включения.

Ядро, являющееся составной частью клетки, с поверхности покрыто ядерной оболочкой, состоящей из двух мембран, разделенных перинуклеарным пространством. В ядре заключены кариоглазма, ядрышко (или яд-

рышки) и хромосомы. Ядерная оболочка содержит многочисленные поры, через которые осуществляется обмен между ядром и цитоплазмой.

Для определения простейших используются только те признаки, которые можно рассмотреть под световым микроскопом, применение же электронной микроскопии для идентификации отдельных видов простейших слишком сложно и не для всех лабораторий приемлемо.

Пищу простейшие захватывают путем впячивания плазмалеммы и последующим смыканием ее краев под погрузившимися в цитоплазму частичками пищи, или путем образования на поверхности выростов, активно захватывающих пищу. Процесс захвата твердых частиц называется **фагоцитозом**, жидких - **пиноцитозом**. У одних простейших место приема пищи и вывода непереваренных остатков не локализовано, у других наблюдается строгая локализация места приема пищи. У одних видов имеется специальный воспринимающий бугорок из мягкой и клейкой цитоплазмы или сосательные щупальца или цитостом - отверстие, соответствующее ротовому. Некоторые виды имеют выводное отверстие - порошицу или цитопрот.

В цитоплазме пресноводных простейших имеются одна или несколько сократительных (пульсирующих) вакуолей, которые заполняются жидкостью и периодически выводят ее наружу. Они служат в основном для осморегуляции.

Органами передвижения простейших служат псевдоподии - временно образующиеся выступы тела, жгутики или реснички.

Размножаются простейшие в основном бесполым путем, но в ряде случаев может происходить и половой процесс. При бесполом размножении особь делится на две, или путем шизогонии (множественного деления) на большое число особей. У некоторых паразитических инфузорий и жгутиконосцев внутри цисты происходит многократное деление на две, в процессе этого образуются тысячи дочерних клеток (инвазионных стадий), называемых бродяжками или цилиоспорами. Жизненный цикл у простейших может быть относительно простым или очень сложным. Форма паразита, находящегося на стадии, когда происходит питание, рост и бесполое размножение его, называется вегетативной, или трофозоитом. При неблагоприятных условиях или в определенный период жизненного цикла простейшие инцистируются (окружаются защитной оболочкой), при этом они не питаются, не двигаются и все жизненные процессы в них замедляются. В таком состоянии им легче переносить неблагоприятные условия.

На пресноводных рыбах России паразитируют представители 6 типов простейших: *Mastigophora*, *Sarcodina*, *Sporosoa*, *Microsporidia*, *Cnidosporidia*, *Ciliophora*.

## Работа 1. Тип **ЖГУТИКОНОСЦЫ** - *Mastigophora*

К жгутиконосцам относятся простейшие, передвигающиеся с помощью жгутиков, берущих начало на переднем конце тела в количестве от 1 до 8 и более. Жгутик берет начало от базального тела, часто расположенного рядом с кинетопластом. Последний имеет митохондриальное происхождение и поэтому хорошо заметен на окрашенных препаратах. Тело жгутиконосцев покрыто пелликулой. Питание аутотрофное, гетеротрофное и сапрофитное. Размножаются продольным делением, реже почкованием или шизогонией.

В рыбах паразитируют представители двух классов - *Kinetoplastomonada* и *Parasitomonada*.

### Класс **Кинетопластиды** - *Kinetoplastomonada*

Представители класса мелкие бесцветные, несут от 1 до 2 (4) жгутиков. Включает два отряда *Trypanosomatida* и *Bodomonadida*.

#### Отряд **Trypanosomatida**

Мелкие бесцветные жгутиконосцы, несущие один жгутик и имеющие ундулирующую мембрану. Иногда жгутик и ундулирующая мембрана могут отсутствовать. Ядро одно. Размножение бесполое путем продольного деления, реже множественным делением. Питаются всей поверхностью тела. Ведут исключительно паразитический образ жизни, являясь кровепаразитами. Содержат одно семейство.

#### Сем. **Trypanosomidae**

Жгутиконосцы имеют удлиненное тело, несущее один жгутик, свободный или соединенный с телом посредством ундулирующей мембранны и свободно продолжающимся за пределы переднего конца. У некоторых видов свободная часть жгутика редуцируется, у других может отсутствовать ундулирующая мембрана и жгутик. Ядро одно, сравнительно крупное круглое или овальное. Размножение бесполое. В рыбах паразитируют представители одного рода *Trypanosoma*.

#### Род **Trypanosoma**

Представители рода имеют удлиненное тело заостренное на обоих концах. Ундулирующая мембрана часто переходит на переднем конце тела в свободный жгутик. Развитие происходит со сменой хозяев. У рыб локализуются только в крови. Большая часть жизненного цикла паразитов проходит в организме кровососущих пиявок (*Piscicola geometra* и

др.). В кишечнике пиявок, куда паразиты попадают во время сосания крови зараженных рыб, трипаносомы проходят определенные стадии развития (амастиготная, промастиготная, эпимастиготная, опистомастиготная, трипомастиготная), принимая различные морфологические формы. После усиленного размножения трипаносомы скапливаются в полости хоботка пиявок. Во время кровососания они попадают в кровь рыб, заражая последних. По мнению ряда исследователей трипаносомы не обладают строгой специфичностью к видам рыб.

### Объекты изучения

#### Препараты для изучения и зарисовки

1. Кровь окуня. Окраска по Романовскому-Гимза. При малом увеличении найти паразита и перевести на увеличение  $\times 40$  и рассмотреть. Тело паразита удлиненное, заостренное на обоих концах, базальное тело и кинетопласт находятся на заднем конце тела. Ундулирующая мембрана переходит на переднем конце тела в свободный жгутик. Ядро продольно-ovalное и располагается в передней трети тела. Кинетопласт и жгутик лучше видны с иммерсией. На покровное стекло капнуть маленькую каплю бальзама и перевести на увеличение  $\times 90$ .

Зарисовать и обозначить: 1 - ядро, 2 - кинетопласт, 3 - ундулирующую мембрану, 4 - жгутик.

По таблице попытаться определить вид трипаносомы.

#### Отр. Bodomonadida

Мелкие бесцветные жгутиконосцы, округлой или удлиненной формы с 2-мя жгутиками разной длины, один из которых обычно направлен вперед, а другой - назад. Питаются через цитостом, при его отсутствии всей поверхностью тела. Размножаются путем продольного деления. Есть свободно живущие и паразитические формы. В рыбах паразитируют представители двух родов *Cryptobia* и *Costia*.

#### Род. *Cryptobia*

Жгутиконосцы удлиненной формы, с 2-мя жгутиками, передний жгутик свободный, задний частично прирастает к телу, но не образуя типичной ундулирующей мембранны. Тело имеет тонкую пелликулу. Кинетопласт удлинен и слегка изогнут. Являются паразитами беспозвоночных и рыб. У рыб встречаются в кишечнике, на жабрах и в крови. Паразиты кишечника и других органов развиваются без смены хозяев. Паразиты крови, так же как трипаносомы развиваются со сменой хозяев. Их переносчиками являются кровососущие пиявки, в кишечнике которых они усиленно размножаются, а затем скапливаются во влагалище хоботка. При акте сосания попадают в кровяное русло рыб.

### Объекты изучения

#### Препараты для изучения и зарисовки

2. Кровь подкаменщика. Окраска по Романовскому-Гимза. При слабом увеличении добиться резкого изображения клеток крови и перевести на увеличение  $\times 20$ . Отыскать среди клеток крови небольшие, окрашенные в синий или темно-серый цвет жгутиконосцы, рассмотреть их с иммерсией. Тело паразита овальной формы, один конец заострен, другой закруглен, жгутиков два и отходят они от противоположных концов. Ядро небольшое, округлой формы, расположено на границе  $1/3$  и  $1/2$  длины тела. Кинетопласт небольшой, палочковидный. Цитоплазма у разных экземпляров окрашивается с разной интенсивностью, содержит зернистость.

Зарисовать и подписать: 1 - ядро, 2 - передний жгутик, 3 - задний жгутик, 4 - кинетопласт.

#### Микрофотографии

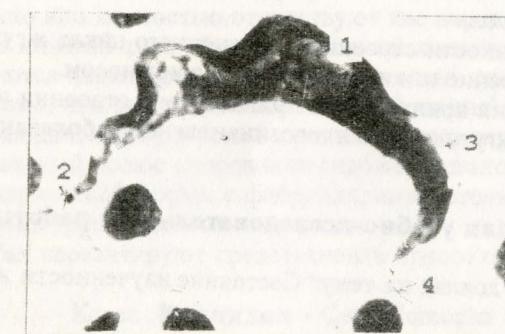


Рис. 9. Трипаносома в мазке крови рыбы. Окраска по Романовскому-Гимза. Увеличение 2250. Обратить внимание на форму тела, форму и расположение ядра (1), положение кинетопласта (2), наличие ундулирующей мембранны (3), жгутика (4) и его длину, на соотношение ширины ядра и ширины тела, форму заднего конца тела (оригинал, фото Прониной С.В.).

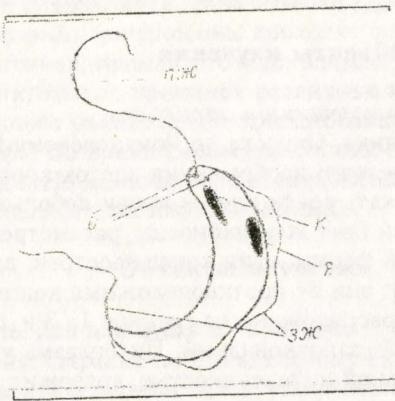


Рис. 10. Схема строения *Cryptobia cyprini* (из: Doflein, 1953). Обратить внимание на форму тела, форму кинетопласта (к), его длину, форму и расположение ядра (я), сравнить длину переднего (пж) и заднего жгутиков (зж).

#### Тесты контроля

1. Каковы особенности строения и жизненного цикла жгутиконосцев?
2. Опишите строение и жизненный цикл трипаносом.
3. Каковы отличия криптобий от трипаносом в строении и биологии?
4. Какова роль жгутиконосцев в возникновении заболеваний у рыб, млекопитающих?

#### Задания для учебно-исследовательской работы (УИРС)

1. Подготовить доклад на тему: "Состояние изученности жгутиконосцев в регионе".

#### ЛИТЕРАТУРА

##### Основная

- Догель В.А. Зоология беспозвоночных. М.: Высшая школа, 1981. - 605 с.
- Догель В.А., Полянский Ю.И., Хейсин Е.М. Общая протозоология. М.-Л.: АН СССР, 1962, 591 с.
- Баумер О.Н., Мусселиус В.А., Николаева В.М., Стрелков Ю.А. Ихтиопатология. М.: Пищевая промышленность, 1977. - С. 180-189.

#### Дополнительная

Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Паразитические простейшие / Ответ ред. С.С. Шульман. Л.: Наука, 1984. Т. - I. - С. 13-42.

Заика В.Е. Паразитофауна рыб озера Байкал. М.: Наука, 1965. - 106 с.

#### Работа 2. Тип СПОРОВИКИ - Sporozoa

К споровикам относят одноклеточных паразитических животных, у которых в течение большей части жизненного цикла отсутствуют органеллы движения. Для споровиков характерен очень сложный жизненный цикл, в течение которого имеет место чередование поколений. Вначале несколько раз повторяется бесполое размножение (мерогония), затем следует половой процесс (гаметогония), заканчивается жизненный цикл образованием спор (спорогонии). У споровиков в онтогенезе возникают, функционируют, исчезают и вновь появляются типичные для них органеллы, придающие им определенный план строения. С поверхности споровики покрыты пелликулой - трехслойной оболочкой, у тех стадий, которые находятся вне клетки. У трофозоитов, находящихся внутри клетки, частично или полностью отсутствуют две внутренние мембранны. Пелликула инвагинируя, образует сложный комплекс структур. У споровиков имеются характерные для них органеллы - роптрии и микронемы. Предполагают, что они представляют собой единый железистый комплекс, играющий важную роль в проникновении паразита в клетку хозяина. Апикальный полюс споровиков снабжен органоидом конусообразной или цилиндрической формы с фибрillлярными стенками - коноид, играющий у разных групп различные функции.

В рыбах паразитируют представители одного отряда *Coccidia*.

#### Класс Кокцидии - Coccidiomorpha

Паразитируют внутри клеток эпителия кишечника, печени, почек и других органах позвоночных и беспозвоночных. Некоторые представители паразитируют в клетках крови эритроцитах и лейкоцитах. Для жизненного цикла характерно правильное чередование полового и бесполого размножения. Взрослые вегетативные формы овальной формы, не имеют пелликулы и содержат одно пузыревидное ядро.

Мужские и женские гаметы заметно различаются. Гаметогенез их протекает в разных клетках и по-разному. Один макрограмонт образует одну макрогамету, а из одного микрограммита развивается несколько микрограммов.

В рыбах паразитируют представители отряда *Coccidida*

## Отряд **Coccidida**

Гаметы развиваются в разных клетках хозяина. Из одного микрогамонта развивается одна макрогамета. Один микрогамонт продуцирует большое количество микрогамет и часто размер его не меньше, а даже больше, чем макрогамонта.

### Сем. **Eimeridae**

Относятся кокцидии, у которых ооцисты с 0, 1, 2 и более спороцистами; в спороцисте содержится один и более спорозоитов. У рыб паразитируют представители одного рода *Eimeria*.

#### Род **Eimeria**

Представители этого рода паразитируют в эпителиальных клетках кишечника, печени, почек, гонад и других органов позвоночных. Ооциста окружной или овальной формы, содержит 4 спороцисты с 2 спорозоитами в каждой.

Цикл развития довольно сложный. При попадании в хозяина спорозоиты покидают спороцисту и внедряются в клетки органа, где растут превращаясь в окружную или овальную крупную клетку (шизонт) с пузыреподобным ядром. При достижении шизонтом определенной величины ядро начинает многократно делиться на большое количество дочерних ядер. Затем вокруг каждого ядра обособляется цитоплазма и весь шизонт распадается на большое количество червеобразных или колбасовидных мерозоитов, т.е. происходит процесс шизогонии. Образовавшиеся мерозоиты проникают в другие клетки хозяина, снова растут, превращаясь в шизонта и выше описанный процесс шизогонии повторяется. Этот процесс может повторяться несколько раз, в результате чего происходит усиленное самозаражение хозяина. За несколькими бесполыми поколениями следует половой процесс и спорообразование. Мерозоиты, образованные при последней шизогонии, преобретают половую дифференцировку и образуют макрогаметы и микрогаметоциты. Микрогаметы, снабженные 2 жгутиками, активно двигаясь, находят макрогаметы, сливаются с ними и образуют зиготу, которая покрывается плотной оболочкой и превращается в ооцисту. Ядро ооцисты делится на 4 дочерних ядра, вокруг которых обособляется небольшое количество цитоплазмы. Так образуются споробласти. Споробласти окружаются оболочкой, образуя спороцисты, внутри которых происходит еще одно деление с образованием 2 спорозоитов. Ооцисты выводятся из хозяина вместе с экскрементами.

#### Объекты изучения

Микропрепараты для изучения и зарисовки

1. Стенка кишечника рыбы. Окраска гематоксилин-эозин. При увеличении х 20 объектива отыскать в эпителиальных клетках окружные образования со слабо базофильной цитоплазмой. Это шизонты. Перевести на сильное увеличение и рассмотреть. Обратить внимание на светлое пузырковидное ядро и мелкую слабо-базофильную зернистость в цитоплазме. Обратить внимание на изменения в эпителиальной клетке, в которой находится шизонт и вокруг нее.

Зарисовать и подписать: 1 - эпителиальная клетка, а - цитоплазма, б - ядро; 2 - шизонт, в - цитоплазма шизонта, г - ядро шизонта.

2. Стенка кишечника рыбы. Окраска гематоксилин-эозин. При увеличении х 20 объектива отыскать окружные окси菲尔ные (розовые) образования ооцисты, находящиеся в эпителиальных клетках. Перевести на сильное увеличение и рассмотреть. В ооцисте отчетливо заметны спороцисты. В зависимости от того как прошел зрез, их может быть 4, 3, 2. Обратить внимание на форму ооцисты, на размеры ооцисты, оболочку ооцисты, форму спороцисты, на толщину стенки спороцисты, на размеры спороцист, на форму спорозоита.

Зарисовать и подписать: 1 - эпителиальная клетка, а - цитоплазма, б - ядро; 2 - ооциста, а - оболочка ооцисты, б - спороциста, в - спорозоит.

#### Микрофотографии



Рис. 11. Шизонты кокцидии рода *Eimeria* в стенке кишечника рыбы. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение х 1000. Обратить внимание на

округлые зернистые образования (шизонты) (1) в эпителиальных клетках стенки кишечника (оригинал, фото Прониной С.В.).



Рис. 12. Ооцисты кокцидий рода *Eimeria* в стенке кишечника рыбы. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение х 1000. Обратить внимание на светлые округлые образования (ооцисты) (1) в базальной части эпителиальных клеток, а в них на темные колбасовидной формы спороцисты (2) (оригинал, микрофото Прониной С.В.).

#### Тесты контроля

1. Дать характеристику класса Кокцидии.
2. Каковы особенности жизненного цикла представителей класса Кокцидии?

#### Задания для УИРС

Подготовить реферативный доклад на одну из следующих тем:

1. Болезни рыб, вызываемые споровиками.
2. Состояние изученности споровиков в регионе.

#### ЛИТЕРАТУРА

##### Основная

Догель В.А. Зоология беспозвоночных. М.: Высшая школа, 1981.

- 605 с.

Определитель паразитов пресноводных рыб. Паразитические простейшие /Ответ. ред. С.С. Шульман Л.: Наука, 1984. - Т. I. - С. 48-53.

#### Дополнительная

Бауэр О.Н., Мусселиус В.А., Николаева В.М., Стрелков Ю.А. Ихтиопатология. М.: Пищевая промышленность, 1977. С. 189-197.

Заика В.Е. Паразитофауна рыб озера Байкал. М.: Наука, 1965. - С. 55-57.

#### Работа 3. Тип КНИДОСПОРИДИИ - Cnidosporidia

Полостные или тканевые (реже внутриклеточные) паразитические простейшие. Паразитируют у беспозвоночных и низших позвоночных. В рыбах паразитируют представители класса *Myxosporidia*.

#### Класс Слизистые споровики, или Миксоспоридии - Myxosporidia

Миксоспоридии являются самой многочисленной группой простейших - паразитов рыб. Миксоспоридии сочетают в себе целый ряд черт, сближающих их с простейшими, однако по ряду признаков они выходят за рамки Protozoa, поднимаясь до надклеточного или даже многоклеточного уровня. Поэтому их исследование представляет большой теоретический интерес. Многие миксоспоридии являются возбудителями серьезных заболеваний и вызывают массовую гибель рыб, как в прудовых хозяйствах, так и в естественных водоемах. Это определяет большое практическое значение их изучения.

Жизненный цикл миксоспоридий слагается из 2-х фаз. Паразитическая фаза представлена активно питающимися и растущими трофозоитами в виде многоядерных плазмодиев, форма и размеры которых у разных видов различны. На этой стадии происходит размножение трофозоитов, т. е. увеличение их количества путем плазмомонии и почкования с предшествующей нуклеогонией (Успенская, 1984).

Затем в вегетативных формах (трофозоитах) начинается спорообразование. В вегетативных формах наряду с вегетативными ядрами имеются амебообразные генеративные клетки, дающие начало споробласту или панспоробласту. Путем деления и дифференцировки клеток панспоробласта в них образуются споры.

Покоящаяся спора является другой фазой жизненного цикла и протекает во внешней среде. Споры служат для расселения и заражения нового хозяина. Они представляют собой многоклеточные образования, состоящие из соматических структур (створки, полярные капсулы со спирально закрученной стрекательной нитью) и гамет - амебоидного заро-

дыши или спороглазмы. Зрелые споры выходят во внешнюю среду. Для некоторых видов необходимо дозревание их во внешней среде.

Рыбы заражаются при заглатывании спор. В кишечнике полярные капсулы выстреливают свои стрекательные нити, с помощью которых спора прикрепляется к стенке кишечника. Створки раскрываются, амебоидный зародыш выходит и попадает в кровеносные сосуды и по ним с током крови достигает соответствующего органа. В этот период 2 ядра в амебоидном зародыше сливаются в одно, образуя зиготу. В инвазированном органе амебоид растет, его ядро многократно делится, образуя многоядерные вегетативные стадии различных размеров и формы (в зависимости от вида паразита).

В случае паразитирования в тканях хозяина (тканевое паразитирование) вегетативные формы приобретают вид крупных цист, окруженных соединительнотканной капсулой, формируемой хозяином (но с участием паразита), в других случаях паразит может быть отделен от тканей хозяина бесформенной массой.

При паразитировании в полостях органов (полостное паразитирование) плазмодии имеют вид округлых, овальных, вытянутых или даже разветвленных амебоидов, передвигающихся с помощью коротких псевдоподий.

Миксоспоридии делят на два отряда - *Multivalvulaea*, представители которого встречаются только у морских видов рыб и *Bivalvulaea*, паразитирующие как в морских, так и пресноводных рыbach.

#### Отряд *Bivalvulaea*

Вегетативные формы в виде плазмодия, цисты или диффузной инфильтрации. Споры двусторчатые, имеют 2, реже 1 или 4 полярные капсулы открывающиеся или на разных полюсах, или на одном из полюсов споры (переднем). Размеры и форма спор, соотношение их частей имеют большое значение в систематике представителей отряда.

Строение споры показано на рис. 13.

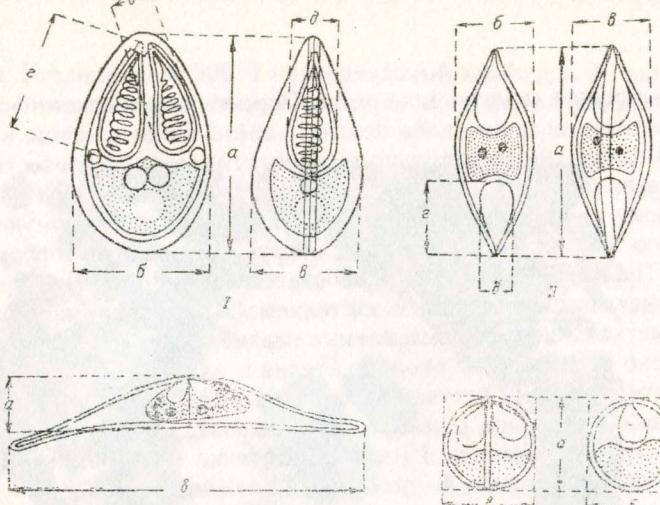


Рис. 13. Схема измерения спор миксоспоридий (из Определителя..., 1984). I - Myxobolus, II - Myxidium, III - Ceratomyxa, IV - Sphaerospora. Обозначения: а - длина спор; б - ширина спор; в - толщина спор; г - длина полярной капсулы; д - толщина полярной капсулы

#### Сем. *Myxidiidae*

Споры веретеновидной формы, иногда сильно изогнуты, полярные капсулы расположены на противоположных полюсах. Полярные капсулы открываются или на полюсах, или несколько сдвинуты от полюсов. Встречаются формы с одной полярной капсулой. В пределах семейства 4 рода, из которых *Myxidium* и *Zschokkella* - паразитируют как у морских, так и пресноводных рыб, а *Sphaeromyxa* и *Ceratomyxa* - только у морских рыб.

#### Род *Myxidium*

Большинство видов паразитируют в полостных органах (желчный пузырь, мочевой пузырь и мочеточники). Вегетативные формы имеют вид крупных плазмодиев. Некоторые виды являются тканевыми паразитами, в этом случае вегетативные формы в виде цист. Встречаются как у морских, так и пресноводных рыб.

Споры веретеновидной формы, иногда изогнуты в виде полумесяца или спирально-S-образно. Полярные капсулы расположены на разных полюсах и открываются строго на концах ее. Амебоидный зародыш расположен между полярными капсулами, в редких случаях - сбоку.

#### Объекты для изучения и зарисовки

##### Микропрепараты

1. Плазмодии в мочеточнике рыбы. Окраска гематоксилин-эозин. При слабом увеличении микроскопа отыскать срезы мочеточников, в которых находятся плазмодии (вегетативные формы) паразита. Перевести на сильное увеличение и рассмотреть строение плазмодия. Обратить внимание на форму и размер плазмодиев, на псевдоподии, на крупную темно-фиолетовую "зернистость", это ядра, вокруг которых будут формироваться споры. Плазмодии находятся в просвете мочеточника. Изнутри мочеточники выстланы многорядным эпителием. Обратить внимание на изменения в клетках эпителия, вызываемые плазмодиями. Последние иногда очень близко расположены около эпителия и их псевдоподии проникают между эпителиальными клетками. Эпителиальные клетки в этих участках с признаками дистрофии, а некоторые и некроза.

Зарисовать и обозначить: 1 - эпителий стенки мочеточника, 2 - плазмодий, 3 - ядра плазмодия, 4 - псевдоподии плазмодия.

2. Споры представителей рода *Myxidium*. Неокрашенный тотальный препарат. На слабом увеличении отыскать споры, перевести на сильное увеличение и изучить. Обратить внимание на форму и размер споры, на соотношение длины и ширины споры, на положение полярных капсул, их форму. Последние расположены по противоположным полюсам споры, амебоидный зародыш - в центре споры.

Зарисовать и обозначить: 1 - створки споры, 2 - полярные капсулы, 3 - амебоидный зародыш.

#### Микрофотографии



Рис. 14. Почка хариуса в норме. Окраска гематоксилин-

-эозином. Увеличение x 500. 1 - артериальный клубочек, 2 - канальцы нефрона, 3 - межуточная ткань (оригинал, микрофото Прониной С.В.).

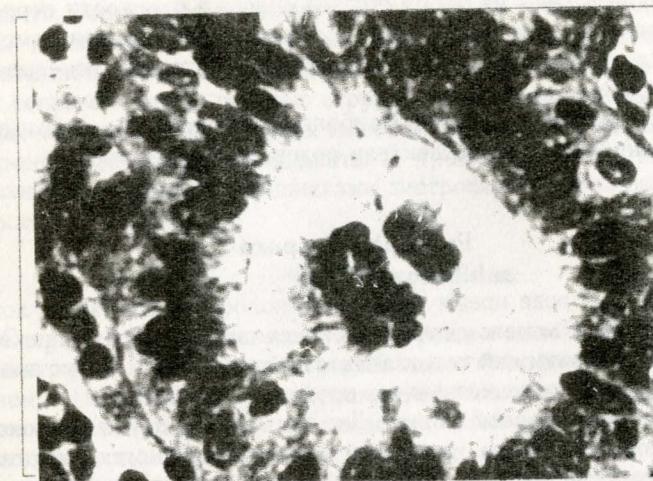


Рис. 15. Плазмодии *Myxidium noblei* в канальце почки хариуса. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение x 1000 Обратить внимание на крупные плазмодии (1) в просвете мочеточника (2) (оригинал, микрофото Прониной С.В.).



Рис. 16. Плазмодии *Myxidium noblei* (1) в эпителии (2) стенки мочеточника хариуса. Окраска гематоксилин-эозином. Увеличение x 500. Обратить внимание на изменения в межуточной ткани и в эпителии канальцев зараженных *M. noblei* (оригинал, микрофото Прониной С.В.).

## Сем. *Sphaerosporidae*

Споры сферической или близкой к ней формы. Полярные капсулы (2, 4, реже 1) расположены на одном полюсе споры, в плоскости перпендикулярной плоскости шва. Вегетативные формы чаще в виде плазмодиев, реже в виде цист. Паразиты желчного, мочевого пузырей, мочевыводящих путей, реже тканей.

Семейство содержит 5 родов. Наибольшее распространение и практическое значение имеют представители родов *Sphaerospora* и *Chlorotukum*.

### Род. *Sphaerospora*

Представители рода преимущественно полостные паразиты, локализуются в желчном и мочевом пузыре, в почечных канальцах, в некоторых случаях могут паразитировать в тканях. Некоторые виды могут вызывать заболевание рыб, преимущественно в прудовых хозяйствах.

Споры почти сферической формы. Две полярные капсулы расположены на одном из полюсов споры. На заднем полюсе спор иногда имеются зубчики или нитевидные отростки. Шовный валик слабо выражен или выступает в виде киля. Вегетативные формы в виде плазмодиев, реже в виде цист.

#### Объекты для изучения и зарисовки

##### Микрофотография



Рис. 17. *Sphaerospora pectinacea* в почках окуня. Окраска гематокси-

лин-эозин. Увеличение х 250. Паразиты находятся на стадии завершения спорообразования. Трофозоиты почти полностью заполнены, находящимися на разных стадиях формирования, спорами. Капсула, окружающая паразита, очень тонкая, состоит из 2 - 3 слоев тонких коллагеновых волокон и небольшого количества клеток фиброцитов. Гистопатологические изменения в почках очень сильно выражены (сравнить с рисунком 14). Они сопровождаются гибелью структурно-функциональных единиц - нефронов. Одновременно в почках имеет место закладка канальцев новых нефронов. Зарисовать и подписать: 1 - трофозоит, 1 - споры, 3 - капсула, 4 - канальцы нефрона с признаками дистрофии, 5 - закладки новых канальцев.

## Сем. *Myxobolidae*

Споры с 2 полярными капсулами, реже с одной, но расположенной асимметрично. Амебоидный зародыш имеет йодофильтрующую вакуоль. На заднем полюсе створок у представителей некоторых родов имеются хвостовые отростки. Большинство представителей семейства являются тканевыми паразитами. Вегетативные формы их имеют вид многоядерных и многоспоровых цист. Семейство состоит из 6 родов. Наибольшее практическое значение имеют роды *Myxobolus* и *Henneguya*.

### Род *Myxobolus*

Споры округлой, овальной, грушевидной или близкой к ним формы. Большинство видов имеют две полярные капсулы. Споры не имеют отростков. Амебоидный зародыш содержит йодофильтрующую вакуоль. Все представители рода тканевые паразиты. Вегетативные стадии в виде цист или диффузного инфильтрата. Представители этого рода широко распространены у рыб, локализуются в различных органах и при сильном заражении могут вызывать заболевания хозяина.

#### Объекты для изучения и зарисовки

##### Микропрепарат

Вегетативные стадии миксоспоридии *Myxobolus lotae* в жабрах налима. Окраска гематоксилином-эозином. При слабом увеличении отыскать крупные вегетативные стадии в жаберных лепестках у основания лепесточков. При сильном увеличении рассмотреть строение. Вегетативные формы округлой формы с тонкой соединительно-тканной стенкой. Споры овальной формы, шовный валик узкий. На переднем полюсе споры имеют небольшое углубление. Полярные капсулы грушевидной формы, их длина равна или меньше половины длины споры. Интеркапсуллярный от-

росток хорошо заметен из-за суженности и широкой расставленности их передних концов. Длина спор 8,4 - 10,4, ширина 6,2 - 6,5, длина полярных капсул 3,4 - 4,4 мкм. Обратить внимание на разную интенсивность окраски спор, что обусловлено разной степенью их зрелости. Рассмотреть изменения структур жаберного лепестка вблизи цисты.

Зарисовать жаберный лепесток вместе с вегетативной формой микроспоридии. Подписать: 1 - жаберный лепесток, 2 - жаберный лепесточек, 3 - вегетативная форма микроспоридии: а-эктоплазма, б-эндоплазма, г-споры.

#### Род *Henneguya*

Вегетативные стадии в виде цист. Споры округлой, овальной или ветреновидной формы, от заднего конца створок отходят хвостовые отростки (двойные или одинарные). Полярные капсулы - две, грушевидной формы. Все представители рода - тканевые паразиты. Некоторые виды рода вызывают бугорковую болезнь лососевидных рыб. Над цистой наблюдается ерошение чешуи. При созревании спор кожа над цистой и ее стенка разрываются, и на этом месте образуется язва, которая является воротами для вторичной инфекции. Мерами борьбы является отлов больных рыб.

#### Объекты для изучения и зарисовки.

##### Микропрепарат

1. Вегетативные стадии *Henneguya cerebralis* в тканях головы хариуса. Окраска гематоксилин-эозином. При слабом увеличении найти крупные округлые или овальной формы образования - вегетативные формы паразита. При сильном увеличении рассмотреть строение. Обратить внимание на мелкозернистую эктоплазму и эндоплазму. В последней видны формирующиеся споры. Паразит окружен соединительнотканной капсулой, обратить внимание на ее строение и на клеточную реакцию вокруг нее. Зарисовать паразита вместе с капсулой. Подписать: 1 - эктоплазма, 2 - эндоплазма, 3 - споры, 4 - капсула.

##### Тотальный препарат

2. Мазок из цисты *H. zschokkei*. Тотальный, неокрашенный препарат. При слабом увеличении найти споры, перевести на сильное увеличение и изучить их строение. Споры овальной формы с закругленным передним концом и суживающимся задним, постепенно переходящим в хвостовые отростки. Полярные капсулы небольшие грушевидной формы. Их передние концы широко расставлены, а задние сближены. Длина спор

10-14 мкм, ширина 7-11, толщина 6, длина хвостовых отростков 26-40, длина полярных капсул 3,7-6, а диаметр 2,3-3 мкм.

Зарисовать споры и подписать: 1 - створки, 2 - полярные капсулы, 3 - амебоидный зародыш, 4 - хвостовые отростки.

#### Микрофотографии



Рис. 18. Вегетативная стадия *Henneguya cerebralis* в соединительной ткани головы хариуса. Окраска гематоксилин-эозин. Увеличение х 500. Сильная клеточная реакция хозяина приводит к образованию соединительнотканной капсулы вокруг паразита (оригинал, микрофото Прониной С.В.).



Рис. 19. Вегетативная стадия *H. cerebralis* (1) в гиалиновом хряще (2) головы хариуса. Обратить внимание на отсутствие клеточной реакции хозяина вокруг паразита. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение х 500 (оригинал, микрофото Прониной С.В.).

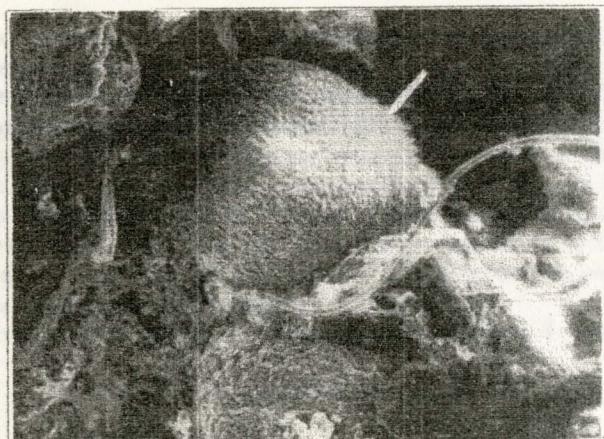


Рис. 20. Сканирующая электронная микрофотография цисты *H.cerebralis*, внешний вид. Увеличение х 650 (оригинал).

#### Тесты контроля

1. Дать характеристику жизненного цикла слизистых споровиков.

2. Какое общетеоретическое и практическое значение имеет изучение миксоспоридий?
3. Функциональная морфология миксоспоридий.
4. Способ питания и типы обмена веществ у плазмодиев миксоспоридий из разных мест обитания.
5. Паразитохозианные отношения при заражении миксоспоридиями.

#### Задания для УИРС

Подготовить доклады на следующие темы:

1. Состояние изученности миксоспоридий в регионе.
2. Использование знаний биологии миксоспоридий в практике.
3. Филогения миксоспоридий.
4. Миксоспоридозы рыб.

#### ЛИТЕРАТУРА

##### Основная

Шульман С.С. Миксоспоридии фауны СССР. М.-Л.: Наука, 1966. - 507 с.

Успенская А.В. Цитология миксоспоридий. Л.: Наука, 1984. - 114 с..

Шульман С.С., Донец З.С., Ковалева А.А. Класс миксоспоридий мировой фауны. Санкт-Петербург: Наука, 1997. - 558 с..

##### Дополнительная литература

Бауэр О.Н., Мусселиус В.А., Николаева В.М., Стрелков Ю.А. Ихтиопатология. М.: Пищевая промышленность, 1977. - С. 198-216.

Пронин Н.М., Пронина С.В. Экологические и микроморфологические аспекты взаимоотношений в паразитарных системах миксоспоридии-рыбы. Ж. Паразитология, 1986. - Т.20. - С. 169-173.

Донец З.С. Миксоспоридии бассейнов южных рек СССР: фауна, экология, эволюция и зоогеография. Автореф. дис. д. биол. наук. Л., 1982. - 30 с.

#### Работа 4. Тип РЕСНИЧНЫЕ - Ciliophora

Представители типа являются наиболее сложно устроеными простейшими. Органоидами движения являются реснички, которые покрывают всю поверхность тела или частично. Они располагаются рядами - кинетами. Общий ресничный аппарат носит название кинетом или цилиатура. Уплотненный поверхностный слой эктоплазмы образует пелликулу, что обеспечивает постоянную форму тела. У большинства представи-

телей имеется постоянное ротовое отверстие - цитостом, которое часто лежит в особом углублении - перистоме. Размножаются чаще бесполым путем, в этом случае происходит деление на два или множественное деление. Половой процесс осуществляется путем коньюгации, при котором обе особи частично (реже полностью) соединяются.

В пресноводных рыбах СНГ встречаются представители 6 классов.

### Класс ЦИРТОСТОМАТА - Cytostomata

Тело уплощенное с круглым ртом, смещенным вниз. Соматическая цилиатура полностью развита у низших форм и в той или иной степени редуцирована у высших. Между ртом и передним полюсом имеется характерный шов, к которому подходят вершины кинет. Ротовая цилиатура лежит на поверхности тела. Макронуклеус один.

На пресноводных рыбах паразитируют представители отряда *Hypostomatida*.

#### Отряд Hypostomatida

Представители с частично редуцированной цилиатурой. Ресничками покрыта плоская или вогнутая сторона тела, дорзальная выпуклая сторона лишена ресничек, за исключением небольшого их числа около переднего полюса. Шов между передним полюсом и ртом на вентральной стороне смещен влево. Ротовая цилиатура простого типа. На рыбах паразитируют только представители сем. *Chilodonellidae*.

#### Сем. Chilodonellidae

Тело уплощенное листовидной формы. Вентральная сторона покрыта ресничками, которые частично редуцированы. Глотка снабжена палочковым аппаратом. На пресноводных рыбах СНГ обнаружен только представитель рода *Chilodonella*.

#### Род Chilodonella

Тело сплющено в дорзовентральном направлении. Выпуклая дорзальная сторона почти лишена ресничек. На вентральной стороне имеется 2 полосы соматокинет. Посторальные кинеты отсутствуют. Предротовая цилиатура состоит из 3 рядов кинет: два фрагмента над ртом и длинный ряд вдоль шва. Макронуклеус один. На рыбах СНГ паразитируют 2 вида. *Chilodonella hexasticha* и *Chilodonella piscicola*.

#### Объекты для изучения и зарисовки

*Chilodonella piscicola* встречается почти у всех пресноводных рыб

СНГ. Локализуется на жабрах, плавниках, коже. Вызывает заболевание хилоденеллез, часто сопровождающийся значительным отходом рыб, особенно в зимовых прудах.

#### Рисунок

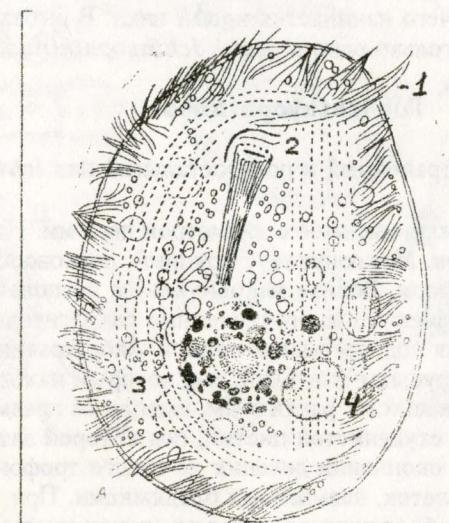


Рис. 21. Внешний вид трофонта, фиксация сулемой, фазовый контраст (рис. А.В. Янковского). Зарисовать и подписать: 1 - реснички, 2 - цитостом, 3 - макронуклеус, 4 - сократительные вакуоли.

### Класс ПЛЕНЧАТОРЫТЕ - Hymenostomata

Небольшие инфузории с хорошо развитой соматической цилиатурой. Рот расположен на дне перистома и снабжен специальной цилиатурой. Предротовая цилиатура образована специальным комплексом из мембран. У пресноводных рыб СНГ паразитируют представители отряда *Tetrahymenida*.

#### Отряд Tetrahymenida

Мелкие или овальные инфузории с кинетами, идущими от заднего конца тела к перистому. Перистом смещен на вентральную сторону. Имеются послеротовые кинеты, идущие от рта до конца тела. На рыбах СНГ паразитируют представители двух семейств: *Tetrahymenidae* и *Ophryoglenidae*.

Сем. Ophryoglenidae

Крупные инфузории различной формы. Соматическая цилиатура очень густая. Перистом небольшой с мембраной и 3-мя мембраниллами. Деление происходит в цистах, в которых развивается несколько молодых особей, которые, выходя из цист, активно плавают, растут, снова инфицируются, после чего начинается новый цикл. В рыбах СНГ обнаружен представитель только одного рода - *Ichthyophthirius*.

Род *Ichthyophthirius*

Широкораспространенный и полигостальный вид *Ichthyophthirius multifiliis*.

Тело округлое или овальное с диаметром до 1 мм. На теле располагаются ряды ресничек. Макронуклеус крупный, подковообразный или вытянутый у молодых форм. Вблизи макронуклеуса располагается небольшой микронуклеус. Имеются многочисленные сократительные вакуоли. Паразит локализуется под эпителием кожи и жабр хозяина. Зрелые паразиты (трофоны) разрушают эпителий, под которым находятся, и попадают в воду. Приклеившись к различным подводным предметам, они окружаются нежной студенистой цистой, под которой затем несколько раз делятся на 2. По окончании деления из одного трофонта образуется до 2 тыс. дочерних клеток, называемых бродяжками. При помощи фермента гиалуронидазы бродяжки растворяют стенку цисты и выходят в воду, где, свободно плавая, отыскивают рыбу и внедряются под эпителий, растут и созревают, затем цикл повторяется. Паразит вызывает заболевание (ихтиофириоз) многих пресноводных рыб в прудовых и рыбоводных хозяйствах. Есть сведения о возникновении ихтиофириоза и в естественных водоемах.

Объекты для изучения и зарисовки

Схема (рис. 22)

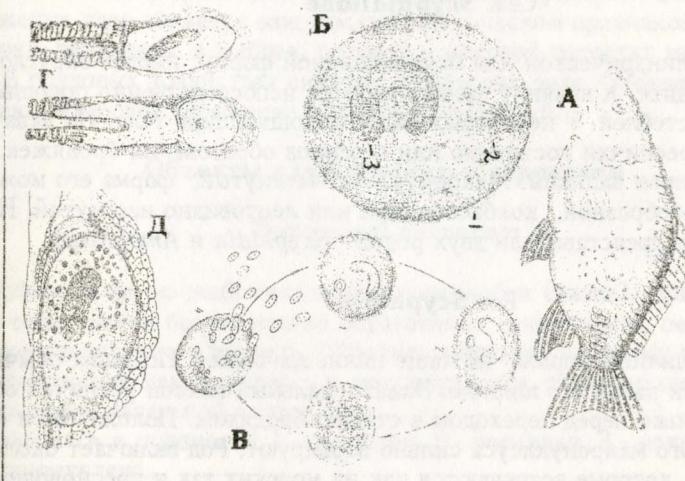


Рис. 22. *Ichthyophthirius multifiliis*. А - рыба, пораженная ихтиофириусом; Б - ихтиофириус; В - жизненный цикл паразита; Г - локализация трофонта в жабрах; Д - локализация трофонта в эпидермисе рыбы.

Зарисовать и подписать: Б - ихтиофириус: 1 - реснички, 2 - цитостом; 3 - макронуклеус; В - жизненный цикл: 1 - зрелый паразит из кожи рыбы, 2 - паразит, покинувший рыбу, 3 - циста размножения, 4 - выход бродяжек (томитов) из цисты; Г - трофонты в жаберных лепестках; Д - трофонт в эпидермисе: 1 - трофонт, 2 - эпидермис (рис. из Определитель..., 1984).

Класс КРУГОРЕСНИЧНЫЕ - Peritrichia

Включает один отряд.

Отряд Peritrichia

Ротовая цилиатура развита хорошо и расположена на верхнем полюсе животного. Соматическая цилиатура редуцирована, от нее остался лишь поясок ресниц, опоясывающий заднюю половину тела. Нижний абор-

ный полюс превращен в подошву, служащую для прикрепления к субстрату. Отряд делится на 2 подотряда: *Sessilina* и *Mobilina*.

Подотряд *Sessilina* Kahl, 1933 представлен 4 семействами, но только два из них *Scyphidiidae* и *Epistylidae* обитают на рыбах.

### Сем. *Scyphidiidae*

Тело цилиндрической или бочонковидной формы, иногда округлое или чашевидное. К хозяину прикрепляются непосредственно подошвой, не образуя стеблей. У некоторых видов подошва шире тела. По экватору тело несет реснички постоянно или в период образования бродяжек. Перистом окружен валиком. Макронуклеус вытянутый, форма его может быть подковообразной, колбасовидной или лентовидно изогнутой. На рыбах живут представители двух родов - *Scyphidia* и *Ambiphrya*.

#### Род *Scyphidia*

Тело различной формы, но чаще цилиндрическое. Подошва обычно уже тела или равна его ширине. Экваториальный поясок ресничек образуется только перед переходом в стадию бродяжек. Положение и форма вытянутого макронуклеуса сильно варьируют. Род включает около десятка видов, которые встречаются как на морских так и пресноводных рыбах.

#### Объекты для изучения и зарисовки

##### Тотальный препарат

*Scyphidia* sp. из жабр хариуса (мазок). При слабом увеличении найти бочонкообразные структуры и изучить при сильном увеличении. Обратить внимание на расположение ресничек вокруг перистома, на форму и положение макронуклеуса и микронуклеуса.

Зарисовать и подписать: 1 - перистом, 2 - реснички, 3 - макронуклеус, 4 - микронуклеус.

### Сем. *Epistylididae*

Инфузории семейства обладают несократимым стеблем. Перистом окружен хорошо выраженным перистомальным валиком. Включает два подсемейства *Epistylidinae* и *Apiosomatinae*.

#### Род *Apiosoma*

Формы преимущественно одиночные, но некоторые виды могут образовывать колонии. К рыбе прикрепляются при помощи подошвы, колони-

альные формы образуют стебель. Форма тела может быть различной, но большинство апизом имеют колоколовидную или бокаловидную форму. Макронуклеус всегда лежит в нижнем гомогенном участке цитоплазмы. Форма его различная - от каплевидной и яйцевидной до округлой или полуперечно вытянутой. Микронуклеус шаровидный или палочковидный всегда лежит в непосредственной близости от макронуклеуса. Взаимное расположение ядер является важным систематическим признаком. Обитают на коже, плавниках, в жабрах, ротовой и носовой полостях многих видов рыб. В прудовых хозяйствах сидячие инфузории рода *Apiosoma* могут вызывать массовое заражение и гибель молоди рыб.

#### Объекты для изучения и зарисовки

##### Тотальный препарат

*Apiosoma* sp. из жабр песчаной широколобки (мазок). При слабом увеличении найти бокаловидные образования (инфузории), перевести на сильное увеличение и изучить. Обратить внимание на форму тела, форму и расположение макронуклеуса и микронуклеуса, характер цитоплазмы апикальной и базальной частей тела.

Зарисовать и подписать: 1 - перистом, 2 - реснички, 3 - макронуклеус, 4 - микронуклеус..

Схема (рис. 23).

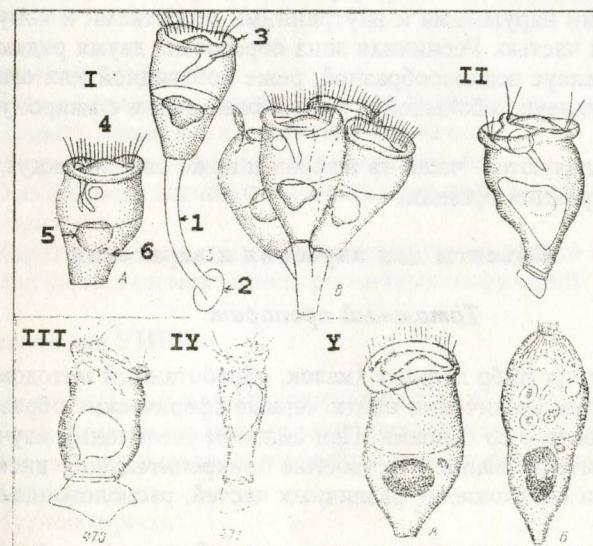


Рис. 23. Различные виды апизом. Зарисовать одиночные и колониальные

виды апиозом с различной формой тела. I - *Apiosoma gasterostei*: A - одиночная особь без стебля, Б - такая же со стеблем, В - колония; II - *A. microstylum*; III - *A. lomi*; IV - *A. pseudopiscicolum*; V - *A. campanulatum*: А - с открытым и Б - с закрытым перистомом. Подписать: 1 - стебель, 2 - подошва, 3 - цитостом, 4 - реснички, 5 - макронуклеус, 6 - микронуклеус (из Определитель..., 1984).

### Сем. Trichodinidae

Тело представителей этого семейства блюдцеобразной формы с округлым опорным диском, который состоит из кольца хитиноидных крючьев, различной величины и формы. Макронуклеус подковообразный, микронуклеус округлой формы и обычно расположен вблизи макронуклеуса. Форма и размеры крючьев, макронуклеуса и микронуклеуса и их взаимное расположение являются важными систематическими признаками. Тело паразита окружено венчиком ресничек, которые используются для передвижения по хозяину и плавания в воде. Размножаются простым делением. Круглоресничные инфузории вызывают заболевание триходиноз у различных видов и возрастов рыб и очень опасны в нерестовых прудах и для выращивания молоди на рыбоводных заводах.

#### Род *Trichodina*

Тело дискоидальное или полусферическое. Зубцы опорного диска с хорошо развитыми наружными и внутренними отростками и конусовидной центральной частью. Ресничная зона образована двумя рядами ресничек. Макронуклеус подковообразной, реже бобовидной или овальной формы. Микронуклеус небольшой и расположен рядом с макронуклеусом.

Инфузории локализуются чаще на жабрах и коже рыб, но могут встречаться и во внутренних органах.

#### Объекты для изучения и зарисовки

##### Тотальный препарат

*Trichodina sp.* из жабр хариуса (мазок, обработанный методом серебрения). При слабом увеличении найти черные сферические образования, напоминающие колесо со спицами. При сильном увеличении изучить их строение. Обратить внимание на строение прикрепительного диска (на размеры, форму и соотношение различных частей, расположенных на нем, зубчиков).

Зарисовать и подписать: А - прикрепительный диск. 1 - зубчики, 2 - внутренний венчик, 3 - наружный венчик.

Схема (рис. 24).

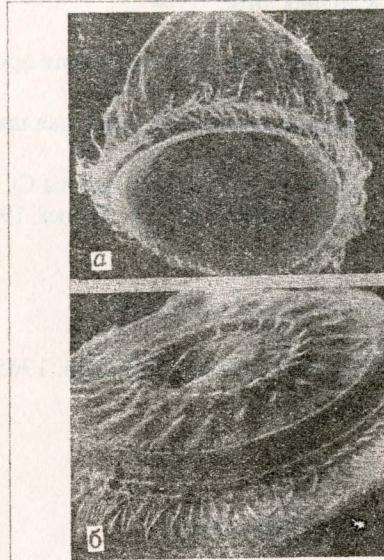


Рис. 24. Электронная сканирующая микрофотография, общий вид. а - *Trichodinella episootica* x 4000 (из Лома, 1973); в - *Trichodina* sp. x 15 000. Зарисовать.

##### Тесты контроля

1. Дать общую характеристику типа Ресничные.
2. Назвать основные классы типа Ресничные.
3. Охарактеризовать класс Пленчаторотые.
4. Особенности жизненного цикла представителей сем. *Ophryogenidae*.
5. Характеристика строения представителей класса Круглоресничные.
6. Эпизоотологическая роль ресничных инфузорий.

##### Задания для УИРС

Подготовить доклады на следующие темы:

1. Состояние изученности ресничных инфузорий в регионе.
2. Болезни, вызываемые ресничными инфузориями:  
Хилоденеллез,  
Ихтиофтириоз,  
Апиозомозы,  
Триходинозы.

## ЛИТЕРАТУРА

### Основная литература

Догель В.А., Полянский Ю.И., Хейсин Е.М. Общая протозоология. М. - Л.: АН СССР, 1962. - 592 с.

Догель В.А. Зоология беспозвоночных. М.: Высшая школа, 1981. - 605 с.

Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Паразитические простейшие / Отв. ред. С.С.Шульман. Л.: Наука, 1984. - Том 1.- С. 88-322.

### Дополнительная литература

Заика В.Е. Паразитофауна рыб озера Байкал. М.: Наука. 1965. - 107 с.

## Содержание

Тема 1. Устройство световых микроскопов и техника микроскопирования.....3

Тема 2. Паразитологический анализ животного.....10

Учебно-методическое издание

### Методические указания к практическим занятиям по паразитологии

Светлана Васильевна Пронина  
Николай Мартемьянович Пронин

Редактор В.П.Крылов