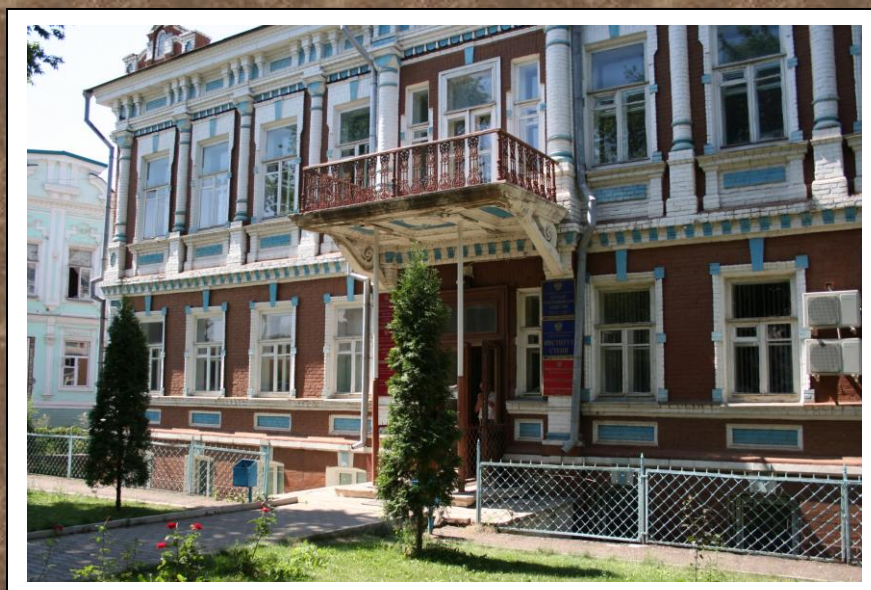


ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН
(электронный журнал)



2012 * № 2

On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© А.О. Плотников, Е.А. Ермоленко, 2012

УДК 574.58

А.О. Плотников¹, Е.А. Ермоленко²

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ КАК НОВЫЙ МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ПРОТИСТОВ ОТРЯДА CENTROHELIDA

¹ Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

² Оренбургский государственный университет, Оренбург, Россия

Впервые с использованием метода атомно-силовой микроскопии (АСМ) изучена морфология протистов отряда Centrohelida и осуществлена их видовая идентификация. Метод АСМ позволил подробно исследовать тонкое строение и морфометрические характеристики трех видов центрохелидных солнечников – *Heterophrys marina* (семейство Heterophryidae), *Raineriophrys erinaceoides* и *Acanthocystis sp.* (семейство Acanthocystidae), а также обнаружить цитоплазматические ямки экструсом на клеточной поверхности солнечников. Основным критерием идентификации послужила морфология элементов наружной клеточной оболочки (перипласта) – чешуек и спикул.

Ключевые слова: Centrohelida, Heliozoa, атомно-силовая микроскопия.

A.O. Plotnikov¹, E.A. Ermolenko²

ATOMIC FORCE MICROSCOPY AS THE NEW METHOD FOR EXAMINATION OF PROTISTS BELONGED TO THE ORDER CENTROHELIDA

¹ Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

² Orenburg State University, Orenburg, Russia

For the first time the morphology of protists belonged to the order Centrohelida was studied with atomic force microscopy (AFM). Identification of the protists at the species level was performed. The method AFM have made it possible to study in detail fine structure and morphometric characters of three species of centrohelid heliozoa – *Heterophrys marina* (family Heterophryidae), *Raineriophrys erinaceoides* and *Acanthocystis sp.* (family Acanthocystidae). AFM have made it possible to visualize cytoplasmic pits from extrusomes on the cell surface of centrohelids. The main criterion of identification was morphology of elements forming external cell coat (periplast), i.e. scales and spicules.

Key words: Centrohelida, Heliozoa, atomic force microscopy.

Введение

Солнечники – полифилетическая группа протистов, обладающих тонкими, длинными псевдоподиями, чаще аксоподиями, радиально расходящимися от округлого тела клетки. Термин «солнечники» (Heliozoa) впервые был предложен Геккелем в отношении сферических одноклеточных организмов с расходящимися лучистыми псевдоподиями [7]. В настоящий момент под термином «солнечники» понимают хищных одноклеточных протистов, объединенных на-

личием лучевидных выростов – аксоподий, расходящихся от сферического клеточного тела. Аксоподии поддерживаются изнутри геометрически правильно уложенными пучками микротрубочек (аксонемами). Представители ряда таксонов могут иметь в дополнение к аксоподиям жгутики, а также цитоплазматические и неклеточные стебельки. Цитоплазма, покрывающая аксонемы, содержит значительное количество стрекательных органелл – экструсом, служащих для закоривания и удержания пищи. У большинства групп солнечных часто присутствует органический или минеральный наружный скелет [7, 8]. В настоящий момент различают восемь типов клеточной организации солнечных, объединенных наличием мощной радиальной системы расходящихся лучей и общей экологической нишей пассивного бентосного хищника [7, 13, 14, 16]. Центрохелидные солнечники представляют собой один из монофилетических таксонов в общей группе Heliozoa.

Центрохелиды или центрохелидные солнечники (Centrohelozoa Dürschmidt, Patterson, 1987), с одной стороны, характеризуются консерватизмом внутренней организации, заключающимся в идентичном строении центропласта, митохондрий, кинетоцист, порядке укладки микротрубочек в аксонемы [5, 13, 14], с другой стороны, отличаются выраженным разнообразием структур наружных клеточных оболочек (перипластов), состоящих из пластинчатых чешуек и спикул. Форма и размер элементов перипласта характеризуются многообразием и имеют ведущее значение в таксономии и идентификации данной группы организмов, насчитывающей в настоящий момент около 100 видов [2, 4, 7, 8, 16].

На данный момент микроскопические методы являются ключевыми для изучения морфологии центрохелид. Традиционно при изучении представителей центрохелидных солнечных использовались методы световой, электронной сканирующей и трансмиссионной микроскопии. Световая микроскопия не требует специальной подготовки препарата, но по причине малой разрешающей способности, ограниченной длиной световой волны, данный метод не позволяет визуализировать тонкую морфологию чешуек и спикул, которая является основным критерием видовой идентификации. Для визуализации видоспецифического строения элементов перипласта центрохелид обычно использовались методы сканирующей электронной (СЭМ) [1-8, 10, 11, 13, 14, 16] и трансмиссионной микроскопии (ТЭМ) [17, 18], которые позволяют определять тонкую мор-

фологию органических и кремниевых чешуек. Данные методы, с одной стороны, дают возможность получать чёткие изображения элементов перипласта, с другой, имеют ряд недостатков, заключающихся, во-первых, в сложной процедуре пробоподготовки, во-вторых, в утрате нативных свойств образца в результате напыления проводящего металла на поверхность объекта.

Целью работы стала оценка возможностей применения метода атомно-силовой микроскопии (АСМ) для изучения морфологии и видовой идентификации протистов отряда Centrohelida.

Методы исследования

Исследовали водоемы Оренбургской области и республики Башкортостан. Отбор проб проводили в сентябре-ноябре 2010 г.а из разнотипных водоемов. Солнечников отбирали в поверхностных слоях донных отложений после взмучивания осадка в плотно закрывающиеся стеклянные флаконы объемом 250 мл, таким образом, чтобы слой жидкости не превышал 2/3 объёма, осадок - 1/10 объёма. Жидкость из флаконов сразу после сбора и транспортировки помещали в чашки Петри. Накопительные культуры подкармливали суточной культурой *Pseudomonas fluorescens*, инкубировали при комнатной температуре. Чашки Петри регулярно просматривали в режиме светлопольной микроскопии в течение месяца под увеличением 100×. Препараты солнечныхников готовили по следующей методике. Живые клетки солнечныхников изолировали тонкой, оттянутой на огне пипеткой Пастера на поверхность обезжиренного покровного стекла, выполняющего роль подложки, далее препараты высушивали на воздухе, отмывали дистиллированной водой, вновь высушивали и сканировали.

Исследование элементов клеточной поверхности проводили с помощью атомно-силового микроскопа СММ-2000 (ЗАО «Завод Протон-МИЭТ», Россия, г. Зеленоград) на воздухе в режиме постоянного контакта. В процессе сканирования использовали кантилеверы MSCT-AUNM («Veeco», США) с жесткостью балки 0,01 Н/м и радиусом кривизны иглы порядка 10-15 нм. Морфометрический анализ полученных изображений проводили с использованием штатного программного обеспечения микроскопа Scan Master.

Числовые данные в статье указаны в формате $A \pm a$, где A – среднее значение признака, a – среднее квадратичное отклонение.

В работе использована макросистема протистов по М. Dürrschmidt и D.J. Patterson (1987 b), систематика Centrohelida приведена по К.А. Микрюкову (2002).

Результаты

В результате исследования были получены серии изображений, анализ которых позволил выделить и идентифицировать три морфологических варианта солнечныхников в исследуемых пробах. Анализ серий полученных изображений позволил определить таксономию и морфологию исследуемых видов центрохелид.

Семейство **Heterophryidae** Poche 1913

Род **Heterophrys** Archer 1869

Heterophrys marina Hertwig et Lesser 1874

Представители данного вида имеют перипласт диаметром 35.0-40.0 мкм, представленный беспорядочно расположенными радиальными спикулами, окруженными слизистым кожухом гетерогенного характера (рис. 1).

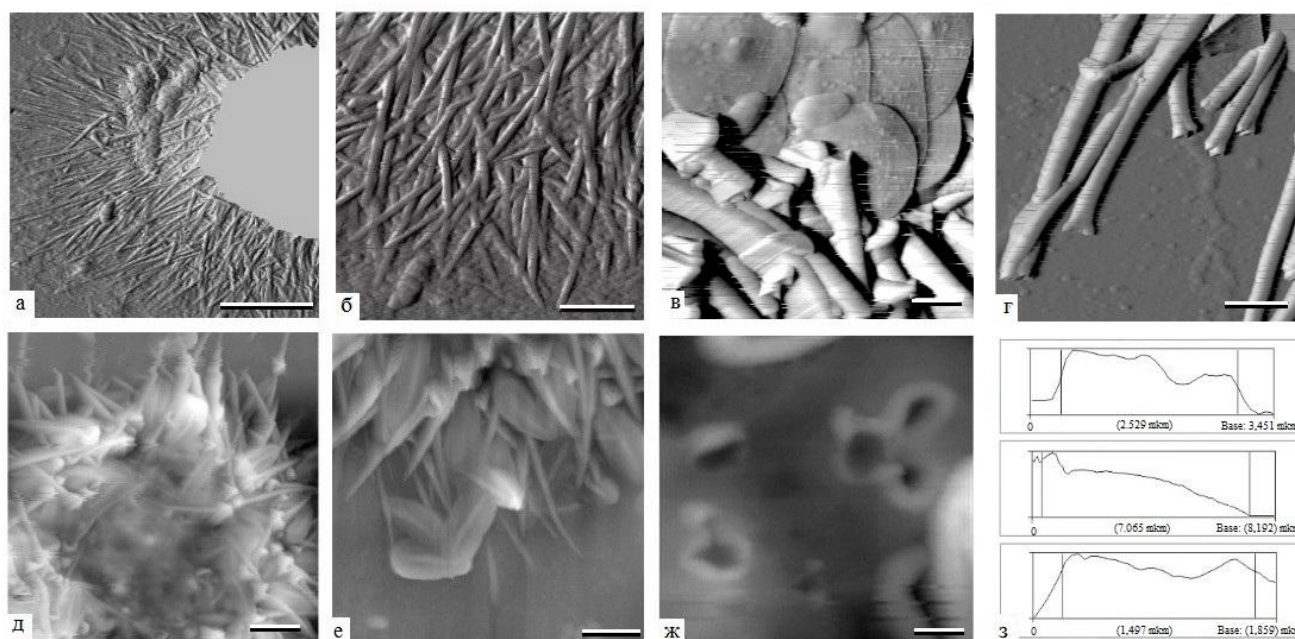


Рис.1. Микрографии солнечныхников (а-ж); графические профили (з): а, б - *Heterophrys marina*; в, г - *Acanthocystis* sp.; д, е - *Raineriophrys erinaceoides*; ж - цитоплазматические ямки экструсом солнечника; з - профили элементов перипласта *R. erinaceoides*. Масштаб: а - 5 мкм; б - 2 мкм; в, г - 1 мкм; д - 6 мкм; е - 3 мкм; ж - 0,5 мкм. На рис. з левым и правым маркерами указаны границы измеренных структур. В подрисуночных подписях графиков указаны абсолютные значения измеренных величин в скобках.

Спикулы равномерной толщины, резко сужаются к острым верхушкам,

имеют длину от 8.3 до 11.0 мкм (*рис. 1 а, б*). Длина спикул примерно равна диаметру клеточного тела, размеры которого составляют 19.8 - 21.5 мкм.

Семейство **Acanthocystidae** Claus 1874

Род **Acanthocystis** Carter 1863

Acanthocystis sp.

Перипласт диаметром 25 ± 2.1 мкм, представлен тангентальными пластинчатыми чешуйками (*рис. 1 в*) и спикулами одного типа (*рис. 1 г*). Радиальные спикулы слегка изогнуты, на верхушке раздваиваются на два полых зубца. Пластинчатые чешуйки овальные, размером $2.0 - 2.5 \times 2.6 - 3.0$ мкм. Все чешуйки имеют хорошо выраженное медиальное утолщение, орнаментированы узкой маргинальной каймой и беспорядочно расположенными гранулами.

Род **Raineriophrys** Mikrjukov 2001

Raineriophrys erinaceoides (Petersen et Hansen, 1960) Mikrjukov, 2001

Представители данного вида имеют перипласт, который дифференцирован на наружные и внутренние эндогенные кремниевые элементы. Внутренние элементы имеют вид тангентальных пластинчатых чешуек, лишенных полой маргинальной каймы, а наружные - вид радиально ориентированных, билатерально или радиально симметричных спикул с хорошо выраженной стерной – стволом.

На полученных изображениях визуализированы характерные для данного вида элементы перипласта, представленные пластинчатыми чешуйками и одним типом спикул. Диаметр перипласта составил 35.0 ± 4.9 мкм (*рис. 1 д*). Спикулы длиной 5.1 - 10.0 мкм, прямые, сужаются к острой верхушке. Основание спикул представлено базальным крылом 1.7 ± 0.2 мкм шириной, расположенным под прямым углом к стволу, и двумя V-образно тянущимися латеральными крыльями, не достигающими половины длины ствола. Пластинчатые чешуйки удлинненно-яйцевидной формы $4.5 - 6.9 \times 1.8 - 3.5$ мкм, с аксиальным гребнем, маргинальная кайма отсутствует.

Метод АСМ позволил обнаружить на клеточной поверхности солнечников цитоплазматические ямки от стрекательных органелл – экструсом (*рис.1 ж*). Экструсомы - цитоплазматические органеллы протистов, способные к «выстреливанию» при механическом или химическом раздражении, являются органеллами защиты, имеют вид удлиненных белковых телец. Обычно

снабжены плотным острием, располагаются в цитоплазме перпендикулярно поверхности тела, при выстреливании вытягиваются в нить с острием на конце. С помощью программного обеспечения микроскопа Scan Master был измерен диаметр цитоплазматических ямок, среднее значение которых составляет 450 ± 64 нм.

С помощью штатного программного обеспечения атомно-силового микроскопа Scan Master были построены графические профили элементов перипласта - чешуек и спикул. На (рис. 1 з) изображены профиль ширины чешуйки с медиальным ребром, профиль радиальной спикулы с базальным основанием и профиль базального основания спикулы вида *R. erinaceoides*.

Обсуждение

Традиционно при определении видовой принадлежности центрохелидных солнечных использовались методы СЭМ и ТЭМ [1-8, 10, 11, 13, 14, 16-18]. Данные методы исследования позволяют выявлять основные ключевые признаки, к которым относятся форма и морфометрические параметры элементов наружного скелета, в частности размер перипласта, длина и ширина тангентальных чешуек, ширина маргинальной каймы, длина спикул, строение верхушек спикул, гранулярная и реберная орнаментация и т.д., на основе которых данные организмы характеризуются четкими морфологическими отличиями и достаточно большим таксономическим разнообразием.

В нашем исследовании применена АСМ - новый метод изучения морфологии центрохелид, который уже использовался ранее для изучения некоторых групп протистов, например, диатомовых водорослей [9, 15]. В нашей работе метод АСМ впервые позволил изучить тонкую морфологию и идентифицировать протистов отряда Centrohelida.

В настоящее время сканирующие зондовые микроскопы нашли применение практически во всех областях науки и широко используются в физике, химии, биологии, являясь основой зондовой нанотехнологии. Перспективным направлением считается совмещение сканирующих зондовых микроскопов с другими классическими и современными методами исследования, а также создание принципиально новых приборов и научных методик [12].

Таким образом, с помощью АСМ можно получать качественные изображения и точные морфометрические характеристики элементов перипласта, работать с самим трехмерным объектом, а не его изображением. Применение ме-

тогда АСМ позволило в данной работе изучить строение перипласта и определить таксономическое положение трех видов центрохелид - *Heterophrys marina*, *Acanthocystis sp.* и *Raineriophrys erinaceoides*. Данный вид микроскопии может быть рекомендован для изучения морфологии и других таксономических групп протистов, имеющих наружный органический или минеральный скелет.

Заключение

В результате исследования с помощью АСМ получены серии изображений, на основе которых были описаны три вида центрохелидных солнечников, относящихся к двум семействам *Heterophrys marina* (семейство Heterophryidae), *Raineriophrys erinaceoides* и *Acanthocystis sp.* (семейство Acanthocystidae). Таким образом, АСМ может быть использована для изучения разных видов центрохелид и рекомендуется для других групп протистов с наружным кремниевым или органическим скелетом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Леонов М.М., Плотников А.О. Центрохелидные солнечники (Centroheliozoa) Центрального Черноземья и Южного Урала: видовой состав, морфология, распространение. Зоологический журнал, 2009. 88 (6): 643-653.
2. Леонов М.М. Солнечники (Heliozoa, Sarcodina, Protista) пресных и морских вод европейской России: видовой состав, морфология, распространение. Зоологический журнал, 2010. 89 (4): 54-66.
3. Леонов М.М. Новые виды центрохелидных солнечников рода *Acanthocystis* (Centroheliozoa). Зоологический журнал, 2010. 89 (5): 1-7.
4. Леонов М.М., Мильников А.П. Центрохелидные солнечники из Южной Карелии. Зоологический журнал, 2012. 91 (5): 515-523.
5. Микрюков К.А. Пересмотр видового состава рода *Choanocystis* (Centroheliozoa: Sarcodina) и многообразие его представителей в Восточной Европе. Зоологический журнал, 1995. 74 (4): 3-17.
6. Микрюков К.А. Ревизия родового и видового состава семейства Acanthocystidae (Centroheliozoa, Sarcodina). Зоологический журнал, 1997. 76 (4): 389-401.
7. Микрюков К.А. К биологии солнечников: феномен образования лучистых форм у бентосных саркодовых. Зоологический журнал, 1998. 77 (2): 147-157.
8. Микрюков К.А. Центрохелидные солнечники (Centroheliozoa). М.: Товарищество научных изданий КМК, 2002. 136 с.
9. Almqvist N., Del Amo Y., Smith B.L., Thomson N.H., Bartholdson Å., Lal R., Brzezinski M., Hansma P.K. Micromechanical and structural properties of a pennate diatom investigated by atomic force microscopy. J. Microscopy, 2001. 202: 518-532.
10. Bardele C.F. The fine structure of the Centrohelidian Heliozoan *Heterophrys marina*./ Cell Tiss. Res., 1975. 161: 85-102.
11. Bardele C.F. Comparative study of axopodial microtubule patterns and possible mechanism of pattern control in the Centrohelidian Heliozoa *Acanthocystis*, *Raphidiophrys* and *Heterophrys*./ J. Cell Sci., 1977. 25: 205-232.
12. Braga P.C., Ricci D. (Eds.) Atomic force microscopy in biomedical research. Methods and protocols. Humana Press, 2011. 508 p.

13. Dürrschmidt M., Patterson D.J. A light and microscopic study of a new species of Centroheliозoon, *Chlamydaster fimbriatus*. Tissue & Cell, 1987a. 19: 365-376.
14. Dürrschmidt M., Patterson D.J. On the organization of the Heliozoa *Raphidiophrys ambigua* Penard and *R. pallida* Schulze. Annales des Sciences Naturelles Zoologie Paris, 1987b. 8: 135-155.
15. Gebeshuber I.C., Kindt J.H., Thompson J.B., Del Amo Y., Stachelberger H., Brzezinski M.A., Stucky G.D., Morse D.E., Hansma P.K. Atomic force microscopy of living diatoms in ambient conditions. J. Microscopy, 2003. 212: 292–299.
16. Siemensma F.J. Klasse Heliozoa Haeckel. Protozoefauna 2, 1991. 2: 171-290.
17. Wujek D.E. Freshwater scaled heterotrophic protists from four Gulf states, including descriptions of two new species. J. of the Alabama Academy of Science, 2003. 74: 164-182.
18. Wujek D.E. Freshwater scaled heterotrophic flagellates and Heliozoa from India including a description of a new species of *Choanocystis*. J. of Bombay Natural History Society, 2006. 103 (1): 164-179.

Поступила 16.06.2012

(Контактная информация: Плотников Андрей Олегович – к.м.н., ведущий научный сотрудник Лаборатории водной микробиологии ИКВС УрО РАН; E-mail: protoz@mail.ru)