

1
НОМЕР

БОИЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ

On-line версия журнала на сайте

<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН



2017

УЧРЕДИТЕЛИ

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН

ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© Коллектив авторов, 2017

УДК 593.13

Е.А. Герасимова¹, К.И. Егорова², А.О. Плотников¹

НОВЫЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ КЛОНАЛЬНЫХ КУЛЬТУР ЦЕНТРОХЕЛИДНЫХ СОЛНЕЧНИКОВ (HAPTISTA, HACROBIA, CENTROHELEA)

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

² Оренбургский государственный университет, Оренбург, Россия

Цель. Разработка удобного и эффективного метода выделения клональных культур и лабораторного культивирования пресноводных и солоноватоводных солнечников.

Материалы и методы. Исследованы пробы воды из рек Письменка и Тузлукколь (Оренбургская область), проводилось выделение накопительных культур солнечников.

Результаты. Разработана методика выделения клональных культур солнечников из накопительной культуры путем отсаживания единственной клетки. Из накопительной культуры тонко оттянутой пипеткой Пастера отдельные клетки солнечников переносили в капли стерильной среды под инвертированным микроскопом, вносили кормовые микроорганизмы *Pseudomonas fluorescens* и *Bodo saltans* или *Bodo saliens* и инкубировали. После размножения клональные культуры просматривали под микроскопом и переносили из капли в чашку Петри со свежей средой. Из полученных клональных культур готовили препараты для сканирующей электронной микроскопии и экстракты для выделения ДНК. Установлены особенности культивирования пресноводных и солоноватоводных солнечников. Обсуждаются достоинства и недостатки разработанного метода.

Заключение. В результате исследования была разработана методика выделения клональных культур пресноводных и солоноватоводных солнечников, заключающаяся в ряде последовательных этапов: отбор пробы воды из водоемов, получение накопительных культур, выделение клональных культур методом отсаживания единственной клетки, поддержание клональных культур методом периодического пересева.

Ключевые слова: солнечники, протисты, Centrohelea, клональная культура.

E.A. Gerasimova¹, K.I. Egorova², A.O. Plotnikov¹

THE NEW METHOD OF CLONAL CULTURES ISOLATION OF CENTROHELID HELIOZOA (HAPTISTA, HACROBIA, CENTROHELEA)

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

² Orenburg State University, Orenburg, Russia

Objective. Development of a convenient and efficient method of clonal cultures isolation and laboratory cultivation of freshwater and brackish heliozoans.

Materials and methods. Samples of water from the Pishmenka River and the Tuzlukkol River (Orenburg region) were studied; the enrichment cultures of heliozoans were obtained.

Results. The method of clonal cultures isolation of heliozoans from an enrichment culture through passage of a single cell has been developed. From the enrichment culture the isolated cells of heliozoans were transferred with the tapered Pasteur's pipette into drops with sterile medium under inverted microscope; then feed organisms *Pseudomonas fluorescens* and *Bodo saltans* or *Bodo saliens* were added, and the cultures were incubated. After multiplication the clonal cultures were seen in a microscope and transferred from the drop into a Petri dish with a new medium. From obtained clonal cultures, specimens for scanning electron microscopy and extracts for DNA isolation were made. Features of cultivation of fresh and brackish heliozoans have been established. Advantages and disadvantages of developed method are discussed.

Conclusion. As a result of the study the method of clonal cultures isolation of fresh and brackish heliozoans has been developed. The method consists of consequent stages, such as sampling of water from water bodies, obtaining of enrichment cultures, isolation of clonal cultures through passing of a single cell, maintaining of isolated clonal cultures by regular passage.

Keywords: heliozoans, protists, Centrohelea, clonal culture.

Введение

Центрохелидные солнечники представляют собой монофилетический таксон хищных амебоидных безжгутиковых одноклеточных протистов, объединяющий более 100 видов [1, 2]. Центрохелиды имеют плоские кристы в митохондриях и мощную систему радиально расходящихся аксоподий, снабженных стрекательными органеллами, которые устроены по типу экструсом и служат для ловли и удержания мелкой и подвижной добычи [1].

Солнечники характеризуются всесветным распространением (убиквитарностью), являются компонентом бентоса и перифитона пресноводных, морских [3] и солоноватоводных экосистем [4, 5], встречаются практически во всех биотопах, являясь звеном микробных пищевых петель, обеспечивающих трансформацию вещества и энергии в водных экосистемах [3, 6]. Один или два раза в год в течение кратковременного периода солнечники обнаруживаются и в планктонных сообществах, где, как и в основных биотопах, являются консументами высшего порядка и играют роль малоподвижных хищников [1].

Поверхность клетки большинства представителей солнечников покрывают кремниевые, реже органические чешуйки двух типов: радиальные и тангентальные или пластинчатые чешуйки [1, 3]. Структура и размерные характеристики чешуек являются важнейшими диагностическими признаками, служащими для идентификации и определения таксономического положения центрохелидных солнечников. В последнее время для идентификации солнечников часто используются методы микроскопии в совокупности с секвенированием ДНК [3, 7, 8]. Для секвенирования необходимо получить клональную культуру исследуемого солнечника, чтобы гарантировать чистоту полученных нуклеотидных последовательностей.

Цель работы заключалась в разработке удобного и эффективного метода выделения клональных культур и лабораторного культивирования пресноводных и солоноватоводных солнечников.

Материалы и методы

Отбор проб воды проводили в мае-июле 2016 г. в р. Тузлукколь Беляевского района Оренбургской области и р. Письменка Кувандыкского района Оренбургской области. Река Тузлукколь, протекающая в Беляевском районе, представляет собой небольшой левобережный приток р. Урал. Минерализация воды в основном течении реки составляет 0,44 г/л, в урочище Тузлукколь повышена до 7,8 г/л. В русле реки находятся многочисленные родниковые выходы с сульфатно-кальциевыми и кальциево-натриевыми водами. Река Письменка пресноводная (минерализация менее 1,0 г/л), протекает в Оренбургской области и республиках Татарстан и Башкортостан. В месте отбора пробы вода имела минерализацию 0,01 г/л и рН 7,3.

Образцы воды отбирали в выжимках водных макрофитов и бентосе прибрежных зон после взмучивания донного осадка. Минерализацию проб в биотопах измеряли рефрактометрическим методом (рефрактометр Master-S28M). После сбора и транспортировки в лабораторию пробы хранили в герметично закрывающихся флаконах при температуре +10-12°C. Работу с накопительными и клональными культурами проводили на инвертированном микроскопе TS Eclipse 2 (Nikon, Япония). Микроскопию клональных культур также проводили с применением микроскопа Axioskop (Carl Zeiss, Германия) с фазово-контрастной оптикой.

Накопительные культуры получали в чашках Петри (диаметр 90 мм) путем внесения 20 мл пробы воды из изучаемого биотопа и 300 мкл суспензии бактерий *Pseudomonas fluorescens* в качестве кормового ресурса для мелких гетеротрофных жгутиконосцев [9], которые, в свою очередь, выступали кормовой базой для солнечников. Массовое размножение солнечников наблюдали к концу первой или второй недели культивирования. При достижении достаточной численности солнечников выделяли клональные культуры.

Результаты и обсуждение

В рамках запланированной работы разработана методика выделения клональных культур солнечников из накопительной культуры путем отсаживания единственной клетки. Клональные культуры солнечников получали из накопительных культур следующим образом. В стерильной пластиковой чашке Петри диаметром 60 мм делали 9-12 отдельных капель стерильной воды объёмом 20 мкл, капли располагали по три в ряд (рис. 1). Вода для клональных культур была получена из исходной пробы путем стерилизации

фильтрованием с использованием нитроцеллюлозного фильтра с диаметром пор 0,22 мкм.

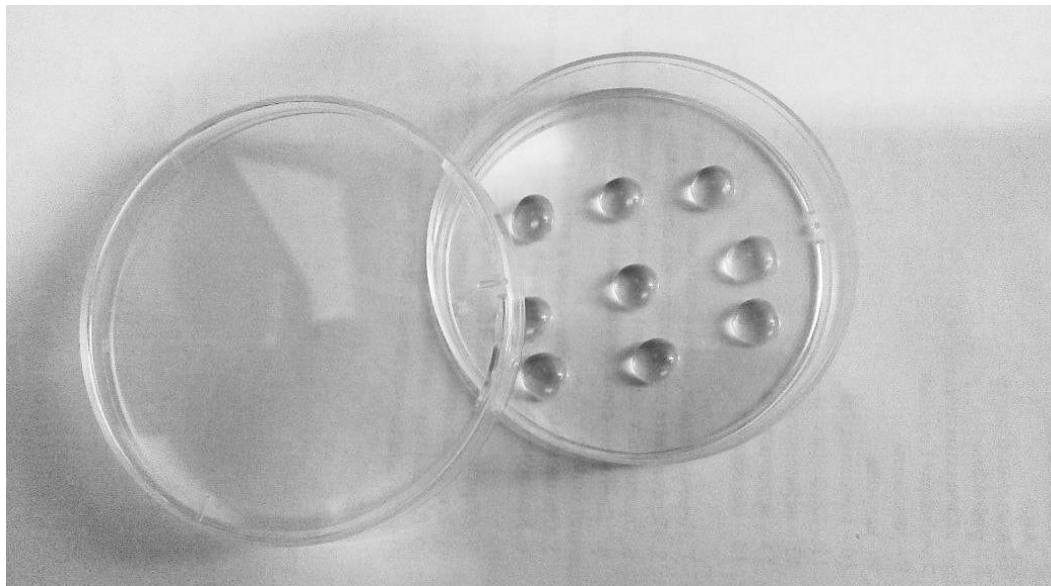


Рис. 1. Капли воды в чашке Петри для клонирования солнечных.

Все манипуляции с клетками солнечных проводили с использованием инвертированного микроскопа (увеличение 100x) под непрерывным контролем зрения. Пипетку Пастера перед каждой манипуляцией опускали оттянутым концом в кипящую дистиллированную воду на 30-60 секунд с целью очистки от жизнеспособных клеток протистов.

Для клонирования солнечных из накопительной культуры тонко оттянутой пипеткой Пастера с резиновой грушей отбирали одну клетку в чашку Петри со стерильной средой. Стеклопипетки Пастера оттягивали над пламенем спиртовки таким образом, чтобы диаметр просвета был в 1,5-2 раза больше диаметра клетки протиста. Оттянутый конец пипетки Пастера должен быть не слишком узким, так как это повредит клетку, но и не слишком широким, иначе в пипетку попадут другие клетки. Длина оттянутого конца пипетки, наиболее удобная для манипуляций, не должна превышать 2 см. Среду для отмывки клеток получали из исходной пробы воды методом фильтрования, описанным выше. Отмывка необходима для визуального контроля, позволяющего оценить количество отобранных клеток.

На следующем этапе клонируемую клетку из чашки Петри со стерильной средой под контролем зрения отбирали пипеткой Пастера и переносили в чашку Петри с каплями среды с последующим микроскопическим контролем.

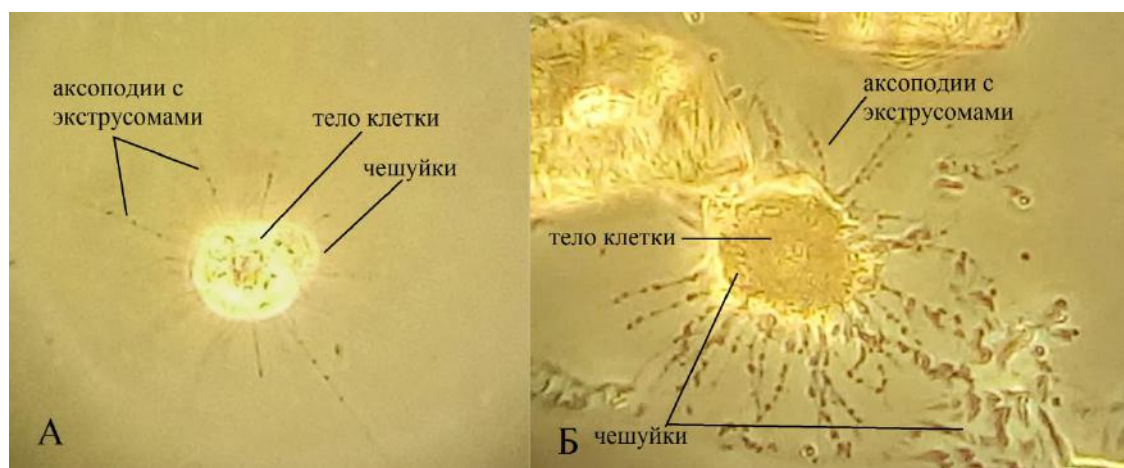


Рис. 2. Фотографии солнечника из клональной культуры, полученные с применением фазово-контрастной микроскопии (400×): А – нативный препарат, Б – высушенный препарат.

Для размножения солнечников в каплях воды в качестве подкормки использовали культуру жгутиконосцев *Bodo saltans* для пресноводных солнечников и *Bodo saliens* для солоноватоводных. Для поддержания численности жгутиконосцев в достаточном для размножения солнечников количестве, в капли с клональными культурами вносили кормовой объект для жгутиконосцев – суспензию бактерий *Pseudomonas fluorescens*. Для получения бактериальной суспензии 3-4 петли 2-х или 3-х суточной агаровой культуры бактерий *P. fluorescens* суспендировали в 5 мл стерильной воды. Затем смешивали полученную бактериальную суспензию с двойным объёмом 3-7 суточной культуры жгутиконосцев. В капли с клонированными клетками солнечников добавляли по 10 мкл микст-культуры кормовых организмов.

Размножившихся в капле солнечников переносили в новые чашки Петри диаметром 40 мм со стерильной средой из исходного биотопа. После размножения клональных культур в чашках Петри, клетки солнечников подвергали микроскопическому обследованию с применением фазового контраста (рис. 2А), чтобы убедиться в принадлежности данных культур к классу *Centrohelea* по наличию характерных для этого таксона органелл (аксоподии с экструсомами и чешуйки). В дальнейшем полученные клональные культуры необходимо пересевать с периодичностью один раз в 20 дней.

Из части клеток клональных культур готовили сухие препараты для сканирующей электронной микроскопии. Применение фазового контраста позволяет даже на сухом препарате увидеть аксоподии с экструсомами, а

также чешуйки или на поверхности клетки, или отслоившиеся от нее (рис. 2Б). Часть клеток использовали для выделения ДНК с целью последующего секвенирования.

В процессе работы установлены особенности работы с культурами пресноводных и солоноватоводных солнечников. Отмечено, что культуры пресноводных солнечников растут быстрее по сравнению с солоноватоводными. Данная зависимость на примере двух культур, выделенных из пресного и солоноватого водоемов, отображена на рисунке 3: на 14-й день культивирования пресноводных солнечников в чашке Петри обнаруживалось около 100 клеток, солоноватоводных – около 50 клеток.

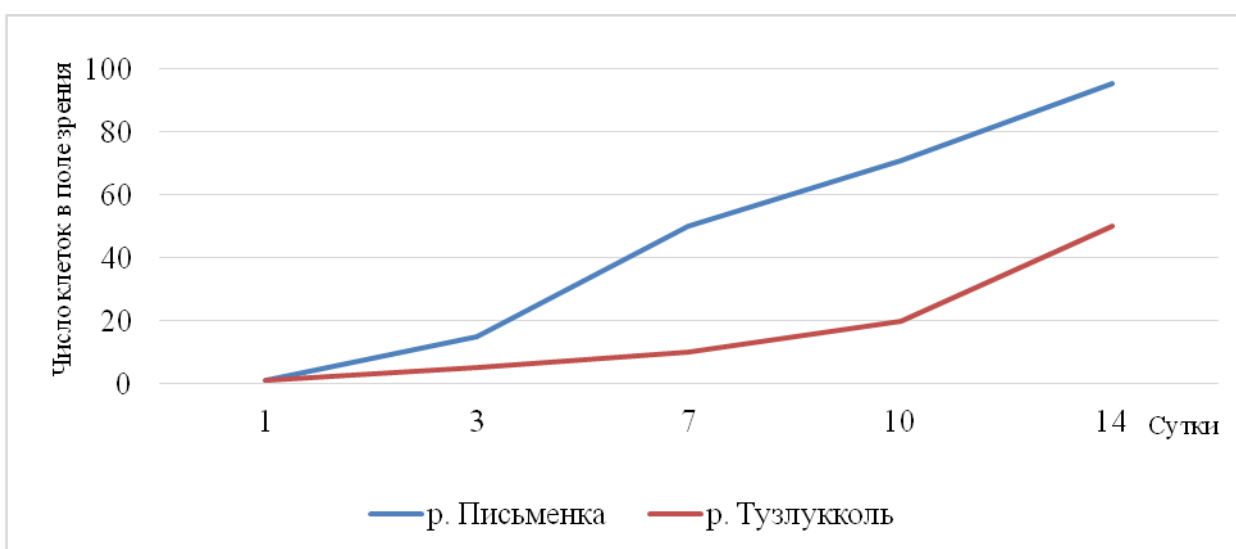


Рис. 3. Зависимость роста культуры солнечников от минерализации среды.

В процессе работы установлен ряд ограничений разработанной методики клонирования солнечников. В частности, при отсаживании единичной клетки в каплях может оказаться больше одной клетки. В этом случае можно лишнюю клетку из капли удалить пипеткой Пастера. Другая проблема связана с визуальным отсутствием клетки в капле после процедуры клонирования. Одной из причин этого может быть локализация клонированной клетки на границе капли в области с максимальной рефракцией, которая препятствует чёткой её визуализации. Поэтому для уверенности в эффекте клонирования в данную каплю не стоит больше отсаживать клетки, но можно повторить микроскопию капли через несколько часов или дней.

Заключение

Таким образом, разработана относительно простая и эффективная методика выделения клональных культур пресноводных и солоноватоводных солнечников, заключающаяся в ряде последовательных этапов: отбор пробы воды из водоемов, получение накопительных культур, выделение клональных культур методом отсаживания единственной клетки, поддержание клональных культур методом периодического пересева.

(Работа выполнена на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (г. Оренбург) и поддержана грантами РФФИ №№ 17-04-00565, 17-04-00899, 17-04-02079, 15-29-02518).

ЛИТЕРАТУРА

1. Микрюков К.А. Центрохелидные солнечники (Centroheliozoa). М.: Товарищество науч. изданий КМК, 2002. 136 с.
2. Cavalier-Smith T., Chao E.E., Lewis R. Multiple origins of Heliozoa from flagellate ancestors: New cryptist subphylum Corbihelia, superclass Corbistoma, and monophyly of Haptista, Cryptista, Hacrobia and Chromista. Mol. Phylogenetics and Evol. 2015. 93: 331-362.
3. Златогурский В.В. Солнечники. Протисты: руководство по зоологии. СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2011. Ч. 3. 474 с.
4. Микрюков К.А. Интересные находки солнечников (Protista) в Черном море и Крыму: к вопросу об общности морской и пресноводной фауны этих организмов. Зоологический журнал. 1999. 78 (5): 517-527.
5. Плотников А.О., Герасимова Е.А. Центрохелидные солнечники (Centrohelea, Haptista, Hacrobia) соленых и солоноватых континентальных водоемов и водотоков России. Биология внутренних вод. 2017. 2: 1-21.
6. Леонов М.М. Видовое разнообразие и морфология солнечников (Heliozoa) водоемов и водотоков Европейской части России: Автореф. дис. ...канд. биол. наук. М., 2012. 24 с.
7. Cavalier-Smith T., von der Heyden S. Molecular phylogeny, scale evolution and taxonomy of centrohelid heliozoan. Mol. Phylogenet. and Evol. 2007. 3 (44): 1186-1203.
8. Cavalier-Smith T., Chao E.E. Oxnerella micra sp. n. (Oxnerellidae fam. n.), a tiny naked centrohelid, and the diversity and evolution of Heliozoa. Protist. 2012. 4 (163): 574-601.
9. Tikhonenkov D., Mylnikov A., Gong Y. et al. Heterotrophic Flagellates from Freshwater and Soil Habitats in Subtropical China (Wuhan Area, Hubei Province). Acta Protozoologica. 2012. 1 (51): 65-79.

Поступила 17.03.2017

*(Контактная информация: **Егорова Кристина Ивановна** – студент кафедры биохимии и микробиологии химико-биологического факультета Оренбургского государственного университета; адрес: 460018, г. Оренбург, пр. Победы, д. 13; тел. 89228533672; e-mail: egorova_kristina00@mail.ru)*

LITERATURA

1. Mikrjukov K.A. Centrohelidnye solnechniki (Centroheliozoa). М.: Tovarishhestvo nauch. izdaniy KMK, 2002. 136 s.
2. Cavalier-Smith T., Chao E.E., Lewis R. Multiple origins of Heliozoa from flagellate ancestors: New cryptist subphylum Corbihelia, superclass Corbistoma, and monophyly of Haptista,

- Cryptista, Hacrobia and Chromista. *Mol. Phylogenetics and Evol.* 2015. 93: 331-362.
3. Zlatogurskij V.V. *Solnechniki. Protisty: rukovodstvo po zoologii.* SPb.; M.: Tovarishestvo nauchnyh izdanij KMK, 2011. Ch. 3. 474 s.
 4. Mikrjukov K.A. *Interesnye nahodki solnechnikov (Protista) v Chernom more i Krymu: k voprosu ob obshhnosti morskoy i presnovodnoj fauny jetih organizmov.* *Zoologicheskij zhurnal.* 1999. 78 (5): 517-527.
 5. Plotnikov A.O., Gerasimova E.A. *Centrohelidnye solnechniki (Centrohelea, Haptista, Hacrobia) solenyh i solonovatyh kontinental'nyh vodoemov i vodotokov Rossii.* *Biologija vnutrennih vod.* 2017. 2: 1-21.
 6. Leonov M.M. *Vidovoe raznoobrazie i morfologija solnechnikov (Heliozoa) vodoemov i vodotokov Evropejskoj chasti Rossii: Avtoref. dis. ...kand. biol. nauk.* M., 2012. 24 s.
 7. Cavalier-Smith T., von der Heyden S. *Molecular phylogeny, scale evolution and taxonomy of centrohelid heliozoan.* *Mol. Phylogenet. and Evol.* 2007. 3 (44): 1186-1203.
 8. Cavalier-Smith T., Chao E.E. *Oxnerella micra sp. n. (Oxnerellidae fam. n.), a tiny naked centrohelid, and the diversity and evolution of Heliozoa.* *Protist.* 2012. 4 (163): 574-601.
 9. Tikhonenkov D., Mylnikov A., Gong Y. et al. *Heterotrophic Flagellates from Freshwater and Soil Habitats in Subtropical China (Wuhan Area, Hubei Province).* *Acta Protozoologica.* 2012. 1 (51): 65-79.

Образец ссылки на статью:

Герасимова Е.А., Егорова К.И., Плотников А.О. Новый метод выделения клональных культур центрохелидных солнечников (Haptista, Hacrobia, Centrohelea). *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН.* 2017. 1: 8с. [Электронный ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2017-1/Articles/GEA-2017-1.pdf>).