

2
НОМЕР

БОНЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ

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

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

Cypripedium calceolus L.
Венерин башмачок настоящий
Вельмовский П.В.



2022

УЧРЕДИТЕЛЬ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ОРЕНБУРГСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

© М.Е. Игнатенко, 2022

УДК. 582.263:57.086

М.Е. Игнатенко

МЕТОДЫ ПОДГОТОВКИ ВОДОРΟΣЛЕЙ К ИССЛЕДОВАНИЮ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН (Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН), Оренбург, Россия

На примере водорослей отделов *Chlorophyta*, *Bacillariophyta* и *Ochrophyta* рассмотрены различные методы подготовки образцов для сканирующей электронной микроскопии с целью получения качественных изображений, отражающих таксономически значимые морфологические признаки. Показано, что выбор того или иного метода пробоподготовки зависит от морфологических особенностей исследуемых водорослей.

Ключевые слова: водоросли, идентификация, фиксация, обезвоживание, высушивание в критической точке, сканирующая электронная микроскопия.

М.Е. Ignatenko

METHODS OF PROCESSING SAMPLES OF ALGAE FOR STUDY BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

Orenburg Federal Research Center, UB RAS (Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis, UB RAS), Orenburg, Russia

On the example of algae of the phyla *Chlorophyta*, *Bacillariophyta* and *Ochrophyta*, different methods of processing samples for scanning electron microscopy are considered in order to obtain high-quality images of taxonomically relevant morphological features. It is shown that the choice of one or another method of processing samples depends on the morphological features of the studied algae.

Key words: algae, identification, fixation, dehydration, critical point drying, scanning electron microscopy.

Введение

Видовая идентификация водорослей – трудоемкая задача. Каждый вид имеет свои таксономически значимые морфологические признаки, ряд из которых не всегда достоверно различимы в световой микроскоп. К числу таких признаков относятся, например, тип орнаментации клеточной поверхности – один из основных таксономических критериев при определении видов у *Desmidiaceae*, *Hydrodictyaceae* и *Scenedesmaceae* [1-4]; ультраструктура чешуек – у чешуйчатых *Chrysophyceae* [5]; строение порового аппарата, число штрихов в 10 мкм и ареол в 10 мкм штриха – у *Bacillariophyta* [6], тип и форма кокколитов – у *Coccolithophyceae* [7] и т.д.

Большую роль в решении многих спорных вопросов по видовой идентификации водорослей сыграло внедрение в практику альгологических исследований сканирующей (СЭМ) и трансмиссионной (ТЭМ) электронной микроскопии [4]. Новый метод требовал определенного подхода к пробоподготовке препаратов. На сегодняшний день в литературе можно найти многочисленные методические рекомендации по подготовке препаратов различных групп водорослей для электронной микроскопии [1, 2, 8-11]. Тем не менее, следует отметить, что в ряде публикаций методика описана недостаточно полно, или есть определенные нюансы, неуказанные автором, что, в конечном итоге, отражается на качестве СЭМ-изображения.

В данной работе представлены разные методы, используемые нами при подготовке некоторых водорослей к исследованию с помощью сканирующей электронной микроскопии.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили пробы воды и обрастания камней озера Журманколь (50°58'45.3"N, 61°09'08.1"E; государственный природный заповедник «Оренбургский»), собранные 13 мая 2020 г., а также лабораторные культуры *Pseudopediastrum boryanum sensu lato*, выделенные из планктонной пробы, отобранной из реки Урал, в черте г. Оренбург (пешеходный мост «Европа-Азия», 51°45'13.1"N, 55°06'26.2"E), в сентябре 2022 г. Выделение *P. boryanum sensu lato* в культуру проводили микропипеточным методом с использованием инвертированного микроскопа марки Nikon Eclipse Ts2 в ЦКП «Персистенция микроорганизмов» ИКВС УрО РАН. Культуры водорослей поддерживали на среде Waris-H, pH=7 [12]. Культивирование проводили в условиях искусственной инсоляции с фотопериодом 16:8 ч. (день:ночь) при температуре +23...+24°C.

Изучение морфологии водорослей проводили с использованием оборудования (микроскоп Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Germany), сканирующий электронный микроскоп Tescan Mira 3 (Tescan Brno, Czech Republic), ионно-плазменная напылительная установка Quorum Q150R S plus (Quorum Technologies Ltd., Великобритания), установка сушки в критической точке Quorum K850 Critical Point Dryer (Quorum Technologies Ltd., Великобритания), центрифуга Microspin 12 (Biosan, Латвия)) ЦКП образовательного Центра выявления и поддержки одаренных детей «Гагарин» (Оренбург).

Результаты и обсуждение

Водоросли, не имеющие кремнеземного панциря, чешуек или теки (например, такие как *P. boryanum sensu lato*), требуют особо тщательной процедуры пробоподготовки для электронной микроскопии, поскольку простое высушивание препаратов таких водорослей на воздухе при комнатной температуре приводит к значительной деформации клеток силами поверхностного натяжения воды при ее испарении. Пробоподготовка данных образцов включает фиксацию, обезвоживание и последующее высушивание в критической точке CO₂. Фиксация необходима для максимального сохранения прижизненной морфологии клетки [8]. Наиболее распространенным фиксатором, используемым при подготовке проб к электронной микроскопии, является глутаровый альдегид из-за его уникальных свойств сшивания молекул белков [2, 8, 13, 14]. Глутаровый альдегид имеет две одинаковые альдегидные группы, расположенные на

обоих концах гибкой углеводородной цепи: $\begin{matrix} \text{O} & & & & \text{O} \\ \parallel & & & & \parallel \\ \text{H}-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}-\text{H} \end{matrix}$. Обе эти группы взаимодействуют с белками, образуя устойчивые меж- и внутрисубъединичные ковалентные связи [14]. Согласно литературным данным, для фиксации водорослевых образцов используют 0,5-2,5% глутаровый альдегид, полученный путем разведения исходного раствора каодилатным, фосфатно-солевым, Na-K-фосфатным и другими буферами [2, 8, 13]. Продолжительность фиксации по мнению разных авторов может варьировать от 1 часа до 24 часов [2, 8, 11, 13]. Также ряд исследователей указывают на необходимость проведения постфиксации образцов раствором тетраоксида осмия, марганцовокислого калия или Люголя [2, 8, 11, 13].

Следующий за этапом фиксации процесс обезвоживания материала предполагает последовательное замещение воды растворами этилового спирта или ацетона возрастающей концентрации с дельнейшим переносом образца в 100%-й этиловый спирт или ацетон. После этого образцы подвергают высушиванию в критической точке CO₂ и напылению.

При исследовании лабораторных культур *P. boryanum sensu lato* мы проводили разведение исходного 25% глутарового альдегида средой культивирования (Waris-H), она же была использована и при отмывке образцов от фиксатора. Продолжительность фиксации в нашем исследовании составила 2 часа; также мы отказались от постфиксации образцов и

увеличили количество концентраций спирта на этапе обезвоживания материала (в отличие от часто применимых концентраций – 30, 50, 70, 96%).

Ниже приведен протокол подготовки культур *P. boryanum sensu lato* для исследования с использованием СЭМ:

фиксацию изучаемых образцов проводили 2,5% глутаровым альдегидом (к образцу объемом 1 мл приливали 0,1 мл 2,5% глутарового альдегида) в течение 2 часов при температуре 4°C и регулярном перемешивании (каждые 30 минут). После двухчасовой экспозиции образцы отмывали от фиксатора средой культивирования путем двукратного центрифугирования (при 3000 об/мин, 2 минут). Далее небольшую каплю исследуемого материала наносили на стекла с поли-L-лизином и, не давая высохнуть, проводили обезвоживание в растворах этилового спирта возрастающей концентрации (15, 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100%; 10 минут в каждом растворе). Затем образцы высушивали в критической точке CO₂ (с четырехкратным замещением CO₂). Образцы напыляли золотом в течение 90 секунд.

СЭМ-изображения, полученные нами с использованием вышеописанного протокола пробоподготовки, приведены на рисунке 1.

Подготовка диатомовых водорослей для СЭМ включала предварительную очистку панцирей от органического вещества. Для этой цели использовали метод «холодного сжигания» [15]. К исследуемому образцу, сконцентрированному седиментационным методом и отмытому путем трехкратного центрифугирования (при 3000 об/мин, 5 минут) от фиксатора (40%-ный раствор формальдегида), приливали 1% хромовую смесь в количестве, равном объему взвеси. Содержимое пробирки осторожно перемешивали и выдерживали 3-5 минут. После периода экспозиции в пробирку приливали дистиллированную воду и центрифугировали при 5000 об/мин, 5 минут. Надосадочную жидкость удаляли пипеткой Пастера. Процедуру отмывки осадка повторяли 4-5 раз. Далее аликвоту очищенного образца диатомовых водорослей наносили на столики СЭМ, высушивали на воздухе при комнатной температуре и напыляли золотом в течение 90 секунд (рис. 2, С).

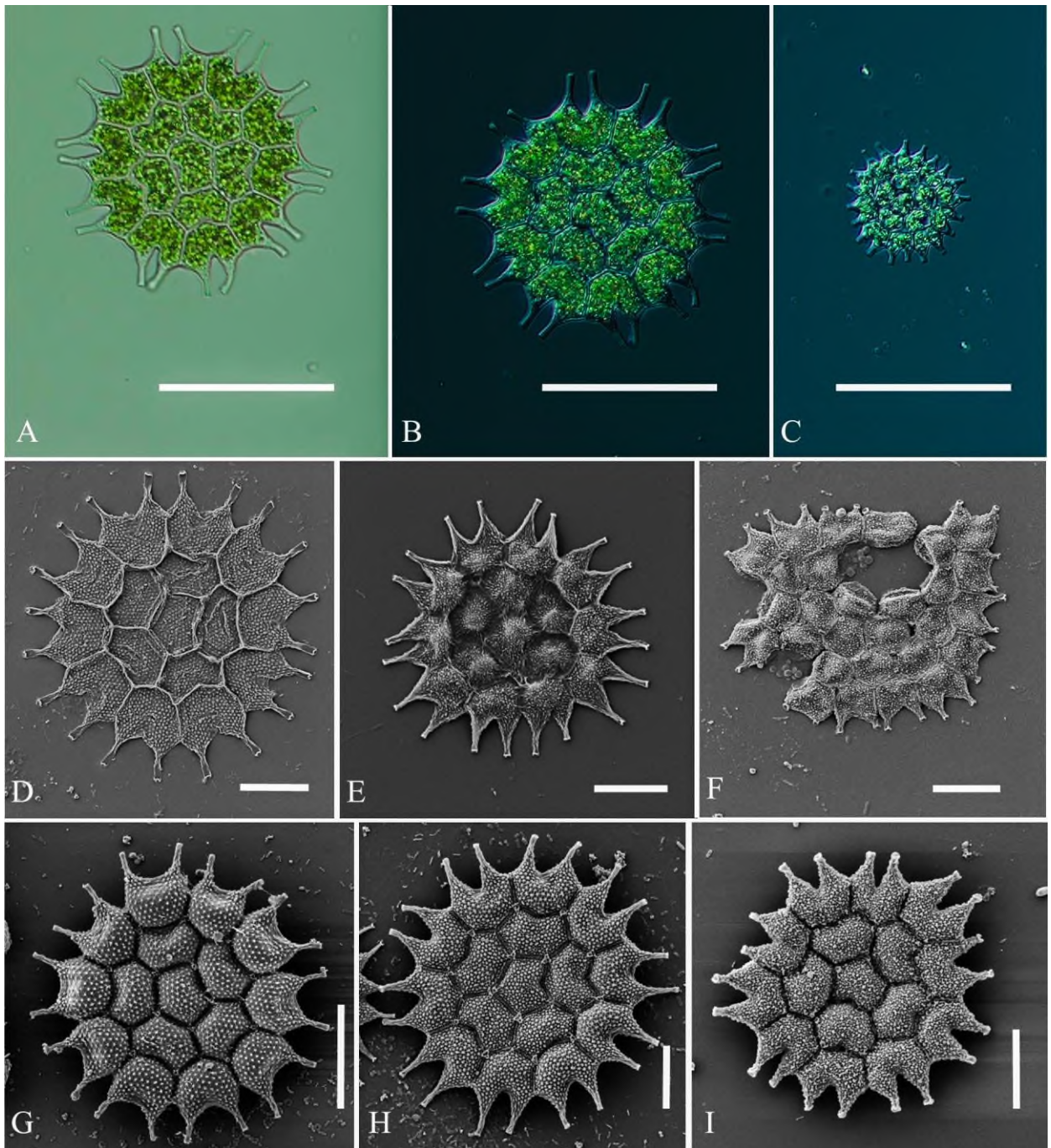


Рис. 1. Культуры *Pseudopediastrum boryanum sensu lato*: А – световая микроскопия; В, С – дифференциальная интерференционно-контрастная микроскопия; D-I – сканирующая электронная микроскопия; D-F – образцы, высушенные на воздухе; G-I – образцы, подготовленные в соответствии с протоколом пробоподготовки. Масштабная линейка: А-С – 50 мкм; D, G – 20 мкм; E, F, H, I – 10 мкм.

Подготовка стоматоцист золотистых водорослей к электронной микроскопии, в виду их плотной кремнистой структуры, оказалась наименее трудоемкой. В большинстве случаев достаточно было простого высушивания

образца на воздухе при комнатной температуре, то есть аликвоту исследуемого образца, предварительно сконцентрированного седиментационным методом, отмывали от фиксатора (40%-ный раствор формальдегида) дистиллированной водой путем трехкратного центрифугирования (при 3000 об/мин, 5 минут), наносили на обезжиренные покровные стекла и высушивали при комнатной температуре. Далее покровные стекла с высушенными образцами крепили двусторонним углеродным скотчем к столикам СЭМ и напыляли золотом в течение 90-120 секунд. В случае высокого содержания в образцах примесей, препятствующих четкой визуализации типа орнаментации стоматоцист, морфологии воротничка или поры, проводили обработку исследуемого материала перекисью водорода. Для этого образцы переносили в пробирки, приливали в равном объеме 30% раствор H_2O_2 и выдерживали на кипящей водяной бане 8 часов. Далее образцы отмывали в дистиллированной воде трехкратным центрифугированием (при 3000 об/мин, 5 минут) (рис. 2, А, В).

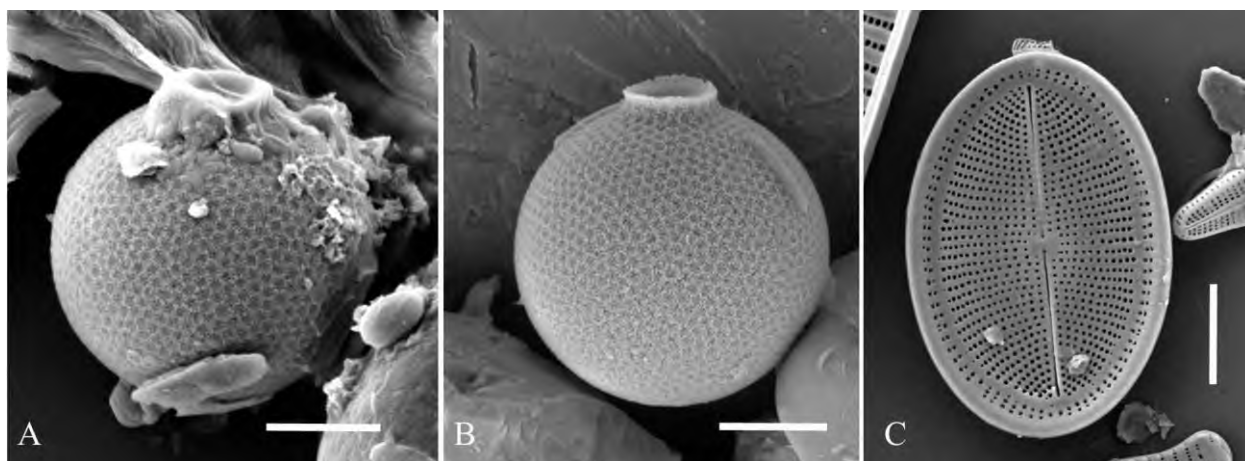


Рис. 2. Стоматоциста 11, Vorobyova et al., 1996 (А – образец без обработки; В – образец, обработанный 30% раствором H_2O_2); *Cocconeis placentula* Ehrenberg (С). Масштабная линейка: А, В – 2 мкм; С – 5 мкм.

При исследовании стоматоцист из образцов почвы, подготовку проб проводили методом «холодного сжигания» [15], увеличив экспозицию в хромовой смеси до 24 часов.

Заключение

Качество получаемых СЭМ-изображений напрямую зависит от того насколько качественно была выполнена пробоподготовка исследуемого материала. При выборе метода подготовки образцов водорослей для электронной микроскопии необходимо учитывать особенности морфологии

клетки и ее покровов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Анисимова О.А. Мелкие представители рода *Cosmarium* (Conjugatophyceae, Desmidiaceae) из двух сфагновых болот Московской области. Новости систематики низших растений. 2013. 47: 13-22.
2. Чубчикова И.Н., Дробецкая И.В., Данцюк Н.В., Челебиева Э.С. Оптимизация метода фиксации пресноводных микроводорослей (Scenedesmeceae, Chlorophyta) для первичной идентификации с использованием сканирующей электронной микроскопии. Вопросы современной альгологии. 2022. 28(1): 102–109.
3. Lenarczyk J., Saługa M., Piątek J. Integrative approach helps clarify confusing taxonomy of the *Pseudopediastrum boryanum* species complex (Chlorophyceae), including recognition of five distinct species. Journal of Phycology. 2020. 56(6): 1557-1574.
4. Fawley M.W., Fawley K.P. Identification of eukaryotic microalgal strains. Journal of Applied Phycology. 2020. 32(5): 2699-2709.
5. Kristiansen J., Preisig H. R. Chrysophyta and Haptophyta Algae, 2nd part: Synurophyceae. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Vol. 1/2. Berlin: 2007. 252 p.
6. Куликовский М.С., Глущенко А.М., Генкал С.И., Кузнецова И.В. Определитель диатомовых водорослей России. Ярославль: Филигрань. 2016. 804 с.
7. Henderiks J., Sturm D., Šupraha L., Langer G. Evolutionary rates in the Haptophyta: exploring molecular and phenotypic diversity. Journal of Marine Science and Engineering. 2022. 10: e798.
8. Крахмальний А.Ф. Динофитовые водоросли Украины. Киев: Альтерпрес. 2011. 444 с.
9. Šťastný, Kouwets. New and remarkable desmids (Zygnematophyceae, Streptophyta) from Europe: taxonomical notes based on LM and SEM observations. Fottea, Olomouc. 2012. 12(2): 293-313.
10. Pang W., Van de Vijver B. Freshwater chrysophycean stomatocysts from Monte Lauro (Buccheri, Sicily, Italy). Phytotaxa. 2021. 494(2): 177–192.
11. Анисимова О.В., Штаер О.В. Морфология поровых каналов клеточной стенки у представителей рода *Euastrum* Ralfs (Desmidiaceae). Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология. 2018. 73(1): 34–37.
12. McFadden G.I., Melkonian M. Use of Hepes buffer for microalgal culture media and fixation for electron microscopy. Phycologia. 1986. 25(4): 551-557.
13. Bray D. Critical point drying of biological specimens for scanning electron microscopy. In book: Methods in biotechnology. Vol. 13. Supercritical fluid methods and protocols. Ed. J.R. Williams, A.A. Clifford. Totowa: Humana Press Inc., 2000. 235-243 pp.
14. Dolgin A., Adolf J. Scanning electron microscopy of phytoplankton: achieving high-quality images through the use of safer alternative chemical fixatives. Journal of young investigators. 2019. 37(1): 1-9.
15. Балонов И.М. Подготовка водорослей к электронной микроскопии. В кн.: Методика изучения биогеоценозов внутренних водоемов; под ред. Ф.Д. Мордухай-Болтовского. М.: Наука. 1975. 87–89 с.

Поступила 14.04.2022 г.

(Контактная информация: **Игнатенко Марина Евгеньевна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник ЦКП «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000 г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел.: 8 (3532) 775417; E-mail: ignatenko_me@mail.ru)

REFERENCES

1. Anissimova O.V. Some small-sized *Cosmarium* (Conjugatophyceae, Desmidiaceae) from sphagnum bogs of Moscow Region. *Novosti sistematiki nizshikh rastenii*. 2013. 47: 13-22.
2. Chubchikova I.N., Drobetskaya I.V., Dantsyuk N.V., Chelebieva E.S. Optimization of freshwater microalgae (Scenedesmeceae, Chlorophyta) fixation method for primary taxonomic identification by scanning electron microscopy. *Voprosy sovremennoi algologii [Issues of modern algology]*. 2022. 28(1): 102–109.
3. Lenarczyk J., Saługa M., Piątek J. Integrative approach helps clarify confusing taxonomy of the *Pseudopediastrum boryanum* species complex (Chlorophyceae), including recognition of five distinct species. *Journal of Phycology*. 2020. 56(6): 1557-1574.
4. Fawley M.W., Fawley K.P. Identification of eukaryotic microalgal strains. *Journal of Applied Phycology*. 2020. 32(5): 2699-2709.
5. Kristiansen J., Preisig H. R. Chrysophyta and Haptophyta Algae, 2nd part: Synurophyceae. *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Vol. 1/2. Berlin: 2007. 252 p.
6. Kulikovskiy M.S., Glushchenko A.M., Genkal S.I., Kuznetsova I.V. Identification book of diatoms from Russia. Yaroslavl: Filigran. 2016. 804 p.
7. Henderiks J., Sturm D., Šupřaha L., Langer G. Evolutionary rates in the Haptophyta: exploring molecular and phenotypic diversity. *Journal of Marine Science and Engineering*. 2022. 10: e798.
8. Krakhmalny A.F. Dinophyta of Ukraine. Kiev: Alterpres. 2011. 444 p.
9. Šťastný, Kouwets. New and remarkable desmids (Zygnematophyceae, Streptophyta) from Europe: taxonomical notes based on LM and SEM observations. *Fottea, Olomouc*. 2012. 12(2): 293-313.
10. Pang W., Van de Vijver B. Freshwater chrysophycean stomatocysts from Monte Lauro (Buccheri, Sicily, Italy). *Phytotaxa*. 2021. 494(2): 177–192.
11. Anissimova O.V., Staer O.V. Morphology of cell wall pore channels in genus *Euastrum* Ralfs (Desmidiaceae). *Bulletin of the Moscow University. Series 16. Biology*. 2018. 73(1): 34-37.
12. McFadden G.I., Melkonian M. Use of Hepes buffer for microalgal culture media and fixation for electron microscopy. *Phycologia*. 1986. 25(4): 551-557.
13. Bray D. Critical point drying of biological specimens for scanning electron microscopy. In book: *Methods in biotechnology*. Vol. 13. Supercritical fluid methods and protocols. Ed. J.R. Williams, A.A. Clifford. Totowa: Humana Press Inc., 2000. 235-243 pp.
14. Dolgin A., Adolf J. Scanning electron microscopy of phytoplankton: achieving high-quality images through the use of safer alternative chemical fixatives. *Journal of young investigators*. 2019. 37(1): 1-9.
15. Balonov I.M. Preparation of algae for electron microscopy studies. – In book: *Methods of the study of biocoenosis in inland waterbodies*. Ed. F.D. Morduchay-Boltovskoy. M.: Nauka. 1975. 87–90 pp.

Образец ссылки на статью:

Игнатенко М.Е. Методы подготовки водорослей к исследованию с использованием сканирующей электронной микроскопии. . Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2022. 4. 8с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2022-2/Articles/IME-2022-2.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2022-12003