

4
НОМЕР

БОНЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ

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

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

Paeonia hybrida Pall.
Пион гибридный (степной)
Вельмовский П.В.



2022

УЧРЕДИТЕЛЬ

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

© Ю.В. Миндолина, 2022

УДК. 59.08, 593.1

Ю.В. Миндолина

ПРИМЕНЕНИЕ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОТИСТОВ МЕРОМИКТИЧЕСКИХ ВОДОЕМОВ АРКТИКИ

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

В меромиктических водоемах градиенты физико-химических факторов способствуют вертикальному распределению экологических ниш. Данная особенность делает меромиктические водоемы интересным объектом для исследования вертикальной структуры микробиологических сообществ, в особенности сообществ протистов. Одним из методов идентификации и изучения строения клеток протистов, в частности компонентов клеточной поверхности, является сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). В статье рассматриваются различные способы фиксации клеток протистов в образцах воды, отобранных с различных горизонтов меромиктических водоемов, находящихся на побережье Белого моря, и даются рекомендации по приготовлению препаратов для проведения СЭМ.

Ключевые слова: протисты, меромиктические водоемы, сканирующая электронная микроскопия/

Y.V. Mindolina

APPLICATION OF SCANNING ELECTRON MICROSCOPY TO INVESTIGATE PROTISTS IN ARCTIC MEROMICTIC WATER BODIES

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

In meromictic water bodies, gradients of physicochemical factors contribute to the vertical distribution of environmental niches. This feature makes meromictic water bodies an interesting object for studying the vertical structure of microbiological communities, especially protist communities. Scanning electron microscopy (SEM) is one of the methods for species identification and studying the structure of protist cells, in particular, the components of the cell surface. Within the framework in this article discusses various fixing methods of protist cells in samples taken with different horizons of meromictic water bodies located on the coast of the White Sea, and gives recommendations for preparing preparations for SEM.

Key words: protists, meromictic water bodies, scanning electron microscopy/

Введение

Химически стратифицированные водоемы, водная масса которых разделена на несколько слоев различной плотности, не перемешивающихся друг с другом полностью или частично, называют меромиктическими [1, 2]. Для них сезонное и ветровое перемешивание, как для голомиктических озер, характерно только для верхнего слоя воды – миксолимниона [2, 3]. Монимолимнион – нижний слой воды, отличается большей плотностью и

концентрацией растворенных веществ, которые с глубиной увеличиваются [2]. Как правило, более высокие концентрации растворенных веществ и стабильная плотностная стратификация сохраняются в течение всего годового цикла, а Разница в плотности между слоями препятствует вертикальной циркуляции воды и, следовательно, переносу растворенных веществ и тепла [2]. В результате между миксолимнионом и монимолимнионом возникает тонкая переходная зона с резкими химическими градиентами – хемоклин [1, 2]. Помимо колебаний концентрации растворенных веществ от низких до очень высоких значений, показателей рН от кислых до щелочных, меромиктические водоемы характеризуются варьированием окислительно-восстановительных условий – от насыщенных кислородом в поверхностных слоях до анаэробных в придонных слоях [2]. Часто переход между аэробной зоной и бескислородным слоем (редокс-зона) совпадает с хемоклином [3].

Известно около 180 меромиктических озер по всему миру, большая часть которых находится в Северной Америке и Европе [2]. На территории России к 2020 г. выявлено 53 меромиктических водоема, большинство которых является прибрежными водоемами морского происхождения, стратификация в которых образуется в результате перекрытия оставшейся морской воды пресным стоком, то есть они относятся к эктогенным водоемам прибрежного морского типа [3]. На побережье Белого моря (Арктическая зона) насчитывается около пятнадцати меромиктических водоемов, находящихся на разных стадиях изоляции от моря, которые образовались в результате постледникового изостатического поднятия берега [3, 4]. Было установлено, что преобразование морского водоема в пресноводный с прохождением меромиктической стадии может занимать несколько сотен лет [4].

Меромиктические водоемы представляют собой уникальные объекты для изучения сообществ микроорганизмов. Градиенты физико-химических факторов, растворенных веществ и температуры воды формируют условия для вертикального распределения различных организмов [2]. Бактериальные сообщества являются основным объектом микробиологических исследований в меромиктических водоемах, в то время как протисты остаются наименее изученной группой организмов. В частности, имеющиеся исследования разнообразия протистов меромиктических водоемов побережья Белого моря являются отрывочными и недостаточными для понимания структуры их сообществ.

К протистам относятся одноклеточные или колониальные эукариотические

организмы, не входящие в состав царств животных, растений и грибов. Протисты широко распространены в природе и встречаются во всех возможных для жизни средах обитания [5, 6]. Они играют немаловажные роли в глобальных биохимических циклах углерода и азота, являясь ключевым компонентом трофических цепей, так как представляют собой метаболически разнообразную группу организмов, включая автотрофов, гетеротрофов и миксотрофов. Автотрофные протисты, или микроводоросли, являются основными фиксаторами углерода в водной среде, тогда как гетеротрофы способствуют круговороту питательных веществ, потребляя бактерии и пикофитопланктон, что имеет решающее значение в переносе органического вещества на более высокие трофические уровни [7-9].

С появлением методов просвечивающей (ПЭМ) и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) стало возможным более детальное изучение строения клеток протистов, в особенности поверхностных клеточных структур. Поэтому данные методы получили широкое применение в протистологии. Так, например, что касается протистов, имеющих на своей клеточной поверхности кремниевые чешуйки или шипы, таких как *Chrysophyceae*, *Haptophyta*, *Centroplasthelida* и некоторых *Cercozoa* (*Thaumatomonadida*), то их идентификация до видового уровня возможна с применением электронной микроскопии. Помимо этого, изучение морфологии перипласта *Cryptophyceae*, строения панцирей *Diatomeae* и *Dinoflagellata*, домиков раковинных амёб и воротничковых жгутиконосцев (*Choanoflagellata*) выполняется с помощью данного вида микроскопии. Кроме того, СЭМ применяют для обнаружения симбиотических микроорганизмов на поверхности клеток некоторых протистов.

Основная проблема, с которой может столкнуться исследователь при проведении СЭМ в своей работе, состоит в выборе способа фиксации клеток и приготовления препаратов для сканирования. На сегодняшний день в распоряжении исследователей имеется множество способов фиксации для различных типов клеток. Растворы Люголя и формалина наряду с жидкостью Буэна, глутаровым альдегидом и тетраоксидом осмия являются классическими фиксаторами, используемыми в электронной микроскопии.

Цель данного исследования заключается в оценке различных методов фиксации и приготовления препаратов с разработкой оптимального протокола для проведения сканирующей электронной микроскопии проб из меромиктических водоемов Беломорского побережья.

Материалы и методы

Отбор проб воды проводили в сентябре 2021 и 2022 гг. с различных глубин меромиктических водоемов побережья Белого моря с помощью погружного насоса Whale Premium Submersible Pump GP1352 (США).

Были выбраны несколько способов фиксации и подготовки препаратов для СЭМ. Сразу после отбора проб аликвоту воды из каждого водного горизонта объемом 15 мл концентрировали в течение 10 мин при 3000 об/мин на центрифуге Eppendorf 5804 (Eppendorf, Германия). Затем фиксировали раствором Люголя, смесью растворов Люголя и формалина (1:1), либо 4% глутаровым альдегидом. Все фиксирующие растворы добавляли к пробам в соотношении 1:1. Клетки отмывали от фиксирующего реагента с помощью трехкратного центрифугирования по 5 мин при 3000 об/мин на центрифуге Microspin 12 (BioSan, Латвия). Пробы воды из пресных горизонтов фиксировали 95% этанолом, после сушили на воздухе и промывали небольшим количеством дистиллированной воды. Промытые клетки помещали на алюминиевые заглушки, сушили на воздухе и напыляли золотом в установке Quorum SC7620 'Mini' Sputter (Quorum, Англия) в течение 60 с. Единичные клетки *Centroplasthelida* выделяли под инвертированным световым микроскопом TS Eclipse 2 (Nikon, Япония) из образцов с помощью стеклянной пипетки, помещали на покровные стекла и сушили на воздухе.

Сканирующую электронную микроскопию образцов проводили с помощью микроскопа Tescan Mira 3 (Tescan, Чехия) в Центре выявления и поддержки одаренных детей «Гагарин» (Оренбург, Россия).

Результаты и обсуждение

В рамках запланированной работы проведена оценка способов фиксации и приготовления препаратов для проведения СЭМ различных типов клеток протистов из меромиктических водоемов Беломорского побережья. Клетки протистов фиксировали различными способами, включающими использование раствора Люголя, смеси растворов Люголя и формалина в соотношении 1:1, 4% глутарового альдегида и 95 % этанола.

При фиксировании образцов раствором Люголя (рис. 1а) и смесью растворов Люголя и формалина существенной разницы не обнаружено. Однако отмечено, что при использовании смеси растворов Люголя и формалина для фиксации проб воды из горизонтов с соленостью 15-20‰, а также из придонных слоев с содержанием сероводорода, происходит

скопление большого количества клеток и образование агрегатов, что мешает их детальному рассмотрению (рис. 1в, г).

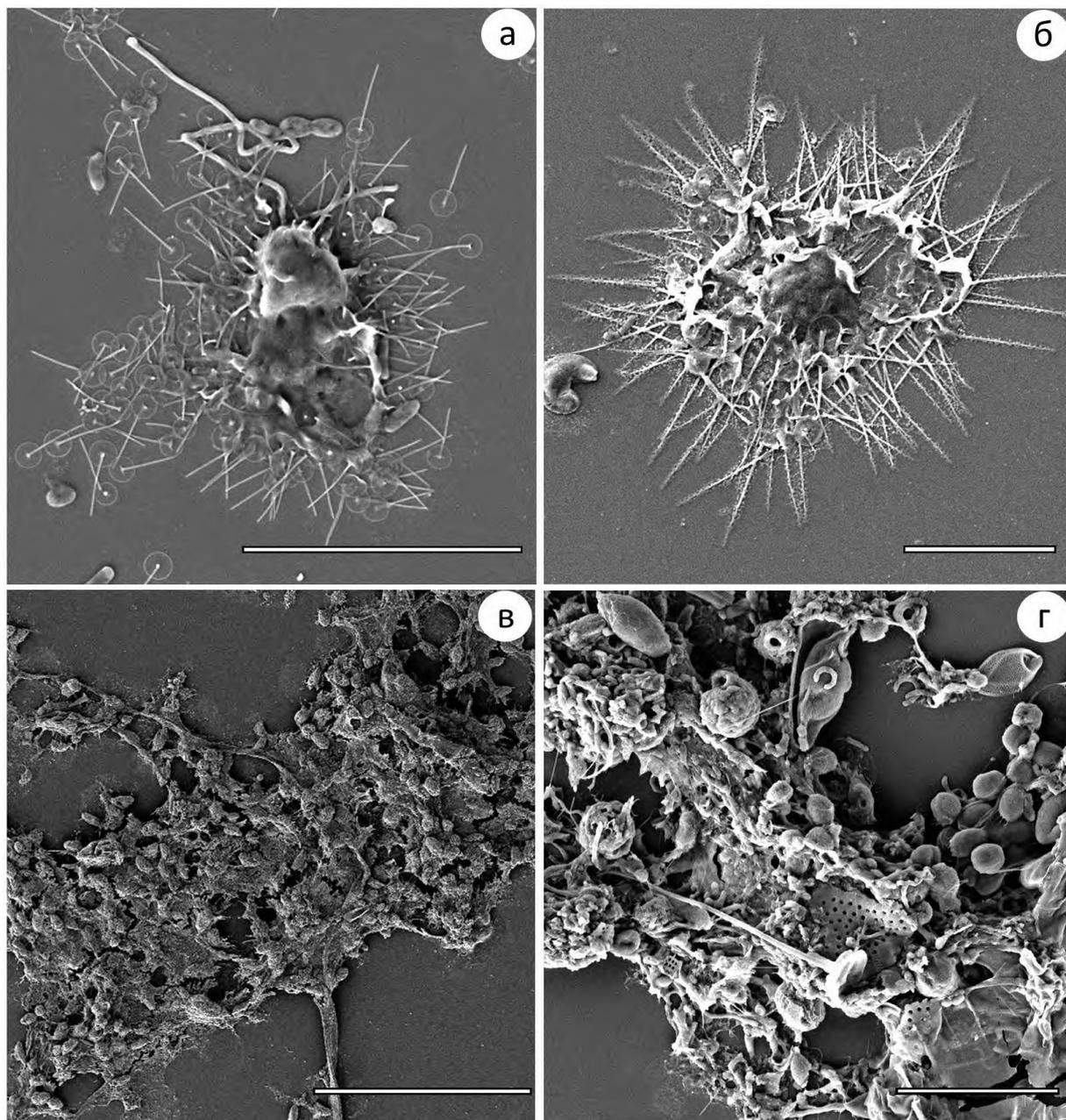


Рис. 1. Микрофотографии протистов, исследуемых с помощью сканирующей электронной микроскопии с применением различных способов фиксации клеток: а – клетка *Paraphysomonas vestita*, фиксированная раствором Люголя; б – клетка *Paraphysomonas vestita*, фиксированная 4% раствором глутарового альдегида; в, г – скопление клеток протистов; Масштаб: а, б, г – 10 мкм; в – 200 мкм.

Фиксация проб 95% этанолом из пресных горизонтов подходит для изучения кремниевых чешуек *Chrysophyceae*. При использовании 4% раствора глутарового альдегида в качестве фиксирующего агента при

недостаточной промывке препарата дистиллированной водой может образовываться солевой налет, как показано на рисунке 1б, что также мешает проведению электронной микроскопии.

Изучение тонкого строения чешуек солнечников методом сканирующей электронной микроскопии с сушкой отобранных единичных клеток на воздухе широко применяется в современной протистологии [11, 12]. В нашем исследовании данный способ хорошо себя зарекомендовал (рис. 2а).

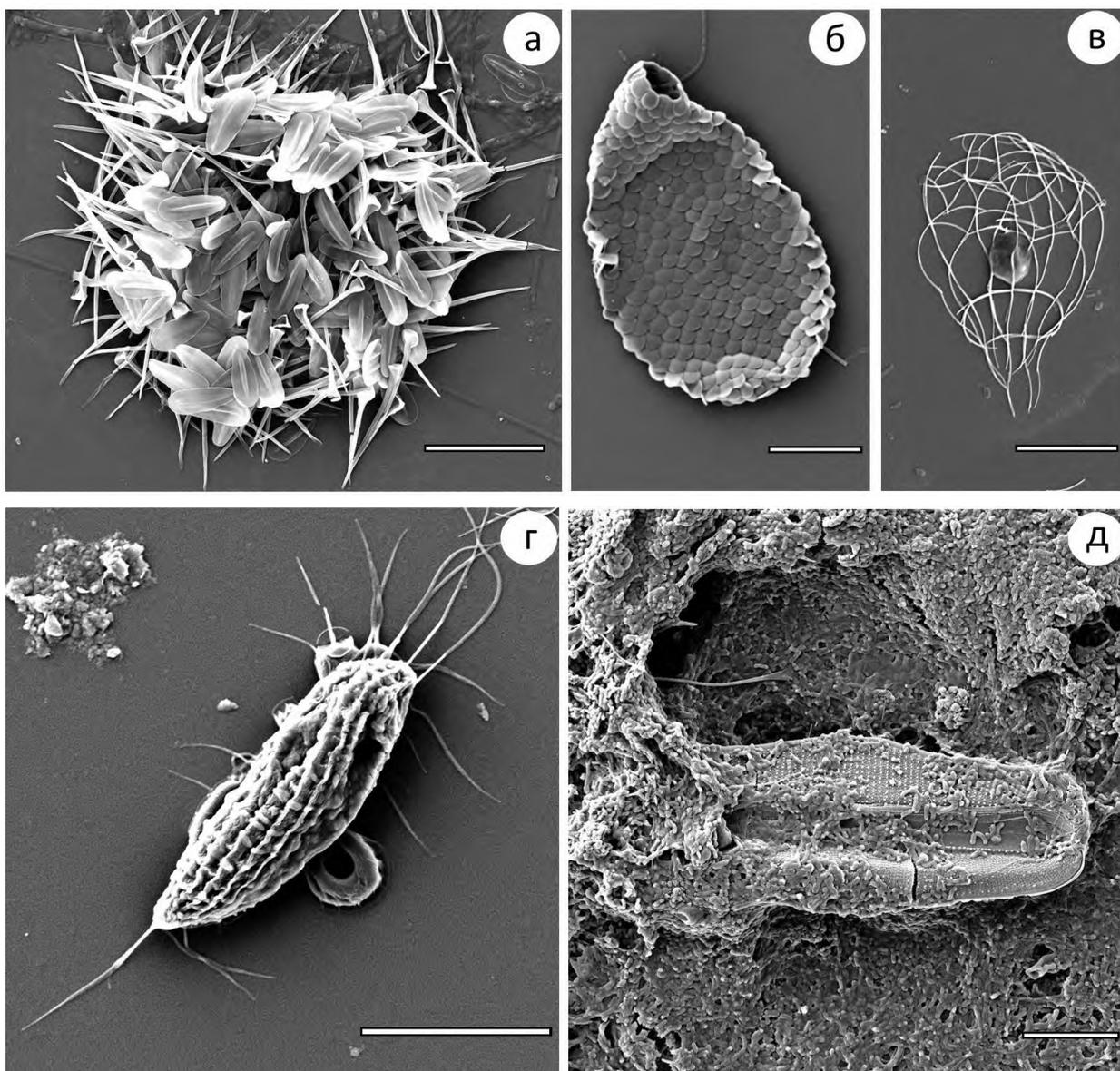


Рис. 2. Микрофотографии протистов, исследуемых с помощью сканирующей электронной микроскопии с применением различных способов фиксации клеток: а – тотальный препарат клетки солнечника *Raineriophrys erinaceoides*; б – клетка раковинной амебы, в – лорика *Diaphanoeca grandis*; г – клетка инфузории при фиксации 4% раствором плутарового альдегида и дальнейшей сушке на воздухе; д – скопление бактерий в препаратах проб из зоны хемоклина. Масштаб: 10 мкм.

Помимо этого, сушка на воздухе оказалась эффективной для изучения домиков раковинных амёб и сканирования некоторых воротничковых жгутиконосцев (рис. 2б, в).

Для сканирования клеток протистов без поверхностных клеточных структур, например, таких как инфузории, следует отдавать предпочтение методике фиксации с помощью жидкости Буэна и глутарового альдегида с последующей сушкой в критической точке [10]. При применении фиксации 4% раствором глутарового альдегида и дальнейшей сушке на воздухе обнаружены деформации клеток инфузорий (рис. 2г).

Следует отметить, что изучение проб воды из зоны хемоклина меромиктических водоемов оказалось затруднительным в связи с массовым развитием в данном горизонте бактерий (рис. 2д). Бактерии в массе покрывают клетки протистов, а также наружные кремниевые чешуйки, панцири диатомовых, что существенно затрудняет визуализацию исследуемых структур. Не исключено, что для таких проб перспективно использовать обработку препаратов диатомовых водорослей раствором кислоты [13].

Заключение

Сканирующая электронная микроскопия нашла широкое применение в протистологии в качестве одного из методов идентификации и изучения строения клеток протистов. На сегодняшний день известно множество способов подготовки препаратов для СЭМ применительно к различным типам клеток протистов. В результате исследования были подобраны подходящие способы фиксации клеток протистов в пробах воды из меромиктических водоемов побережья Белого моря и подготовки препаратов для сканирующей электронной микроскопии.

Рассмотрены возможные проблемы, которые могут возникнуть при проведении СЭМ протистов из меромиктических водоемов, связанные с особенностью химического состава данных водных объектов. При выборе методов пробоподготовки для СЭМ клеток протистов из меромиктических водоемов необходимо учитывать особенности клеточных покровов разных таксонов протистов, а также различия в гидрохимических характеристиках водных слоев на разных горизонтах.

Благодарности:

Автор выражает искреннюю благодарность Е.Д. Красновой (МГУ им. М.В.

Ломоносова), Д.А. Вороновой (ИППИ РАН), А.О. Плотникову и В.Я. Катаеву (ИКВС УрО РАН) за помощь в отборе проб, М.Е. Игнатенко (ИКВС УрО РАН) за помощь с электронной микроскопией. Работа выполнена в ЦКП «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Краснова Е.Д. Экология меромиктических озер России. Ч.2. Континентальные водоемы. Водные ресурсы. 2021. 48(4): 451-460. DOI: 10.31857/S032105962104009X
2. Gulati R.D., Zadereev E.S., Degermendzhi A.G. Ecology of Meromictic Lakes. Springer International Publishing: 2017. 405 p. DOI 10.1007/978-3-319-49143-1
3. Краснова Е.Д. Экология меромиктических озер России. Ч.1. Прибрежные морские водоемы. Водные ресурсы. 2021. 48(3): 322-333. DOI: 10.31857/S0321059621030093
4. Repkina T., Shilova O., Krasnova E., et. al. From the sea strait to the meromictic lake: Evolution and ecosystem of a water body at the Fiard Coast (Lake Kislo-Sladkoe at the Karelian Coast of the Kandalaksha Bay, the White Sea, Russia). Quat. Int. J. 2023, V. 644-645: 96-119. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2022.05.015>.
5. Карпов С.А. Строение клетки протистов: Учебное пособие. СПб.: ТЕССА, 2001. 384 с.
6. Полянский Ю.И., Суханова К.М., Карпов С.А. и др. Протисты: руководство по зоологии Ч.1. Гл. ред. А.Ф. Алимов. СПб.: Наука, 2000. 679 с.
7. Pomeroy L.R. The Ocean's Food Web, A Changing Paradigm. BioScience. 1974. 24: 499-504.
8. Boenigk J., Arndt H. Bacterivory by heterotrophic flagellates: community structure and feeding strategies. Antonie van Leeuwenhoek. 2002. 81: 465-480.
9. Stenuite S., Pirlot S., Tarbe A.-L., et. al. Abundance and production of bacteria, and relationship to phytoplankton production, in a large tropical lake (Lake Tanganyika). Freshwater Biology. 2009. 54: 1300-1311.
10. Orsi W., Charvet S., Vd'ačný P., et al. Prevalence of partnerships between bacteria and ciliates in oxygen-depleted marine water columns. Front Microbiol. 2012 3:341. doi: 10.3389/fmicb.2012.00341.
11. Микрюков К.А. Центрохелидные солнечники (Centroheliozoa). М.: Товарищество научных изданий КМК, 2002. 136 с.
12. Герасимова Е.А. Морфология и видовой состав центрохелидных солнечников (Centroplasthelida) континентальной равнинной реки с градиентом солености. Биология внутренних вод. 2021. 6. DOI: [10.31857/S0320965221060061](https://doi.org/10.31857/S0320965221060061)
13. Балонов И.М. Подготовка водорослей к электронной микроскопии // Методика изучения биогеоценозов. М.: Наука, 1975. С. 87-90.

Поступила 15 ноября 2022 г.

(Контактная информация: Миндолина Юлия Викторовна – м.н.с. лаборатории биомедицинских технологий Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, 460014 г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел. 8(987)198-82-46; e-mail: yliamindolina@mail.ru)

REFERENCES

1. Krasnova E.D. The Ecology of Meromictic Lakes in Russia. Pt.2. Continental Water Bodies Water Resources. 2021. 48(4): 451-460. DOI: 10.31857/S032105962104009X
2. Gulati R.D., Zadereev E.S., Degermendzhi A.G. Ecology of Meromictic Lakes. Springer International Publishing: 2017. 405 p. DOI 10.1007/978-3-319-49143-1
3. Krasnova E.D. Ecology of Meromictic Lakes of Russia. Pt.1. Coastal Marine Waterbodies Water Resources. 2021. 48(3): 322-333. DOI: 10.31857/S0321059621030093
4. Repkina T., Shilova O., Krasnova E., et. al. From the sea strait to the meromictic lake:

- Evolution and ecosystem of a water body at the Fiard Coast (Lake Kislo-Sladkoe at the Karelian Coast of the Kandalaksha Bay, the White Sea, Russia). *Quat. Int. J.* 2023, V. 644-645: 96-119. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2022.05.015>.
5. Karpov S.A. The structure of the protist cell. St. Petersburg: TECCA, 2001. 384 p.
 6. Polyansky Yu.I., Sukhanova K.M., Karpov S.A. et. al. Protista: Handbook on zoology. Pt.1. Editor-in-Chief A.F. Alimov. St. Petersburg: Nauka, 2000. 679 p.
 7. Pomeroy L.R. The Ocean's Food Web, A Changing Paradigm. *BioScience*. 1974. 24: 499-504.
 8. Boenigk J., Arndt H. Bacterivory by heterotrophic flagellates: community structure and feeding strategies. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2002. 81: 465-480.
 9. Stenuite S., Pirlot S., Tarbe A.-L., et. al. Abundance and production of bacteria, and relationship to phytoplankton production, in a large tropical lake (Lake Tanganyika). *Freshwater Biology*. 2009. 54: 1300-1311.
 10. Orsi W., Charvet S., Vd'ačný P., et al. Prevalence of partnerships between bacteria and ciliates in oxygen-depleted marine water columns. *Front Microbiol*. 2012 3:341. doi: 10.3389/fmicb.2012.00341.
 11. Mikrjukov, K.A., Centroheliid Heliozoans (Centroheliozoa), Moscow: KMK, 2002. 136 p.
 12. Gerasimova E.A. Morphology and Species Composition of Centroheliid Heliozoans (Centroplasthelida) from the Continental Lowland River with Salinity Gradient. *Inland Water Biology*, 2021. 14(6). DOI: 10.1134/S1995082921060043
 13. Balonov I.M. Preparation of algae for electron microscopy. *Methods of studying biogeocenoses*. Moscow: Nauka, 1975. P. 87-90.

Образец ссылки на статью:

Миндолина Ю.В. Применение сканирующей электронной микроскопии для исследования протистов меромиктических водоемов Арктики. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2022. 4: 9с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2022-4/Articles/MYV-2022-4.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2022-14003