

4
НОМЕР

БОИЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ

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

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

Оренбургская область
Урочище Петровские сосны
Вельмовский П.В.



2023

УЧРЕДИТЕЛЬ

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

© М.А. Насырова, 2023

УДК. 59.08, 593.1

М.А. Насырова

АНАЛИЗ МОРФОЛОГИИ И УЛЬТРАСТРУКТУРЫ РАКОВИН АМЕБ СЕМЕЙСТВА *CYPHODERIIDAE* С ПОМОЩЬЮ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

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

Цель. Исследование морфологических характеристик раковины и детальной ультраструктуры чешуек представителей семейства *Cyphoderiidae*, выявленных в пещерном озере, с помощью сканирующей электронной микроскопии.

Материалы и методы. Единичные клетки раковинных амёб отбирали под инвертированным световым микроскопом с помощью пипетки Пастера, промывали четырёхкратно в дистиллированной воде, переносили на покровные стекла и сушили.

Результаты. Было выявлено, что во время сушки цисты не деформируются, а трофозоиты деформируются таким образом, что происходит частичное разрушение стенки раковины, состоящей из идиосом. Такая деформация позволяет исследовать внутреннюю микроструктуру идиосом раковинных амёб *Cyphoderia sp.*

Заключение. Выявленная деформация раковин трофозоитов представителей семейства *Cyphoderiidae* в процессе пробоподготовки может существенно расширить возможности сканирующей электронной микроскопии для точного описания морфологии и ультраструктуры идиосом раковинных амёб семейства *Cyphoderiidae*.

Ключевые слова: протисты, морфология, раковинные амёбы, идиосомы, *Cyphoderiidae*, сканирующая электронная микроскопия.

М.А. Nasyrova

ANALYSIS OF TEST MORPHOLOGY AND ULTRASTRUCTURE FOR AMOEBAE OF THE FAMILY *CYPHODERIIDAE* USING THE SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

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

Aim. Investigation of the morphological characteristics of the shell and the detailed ultrastructure of the scales of representatives of the family *Cyphoderiidae*, identified in a cave lake, using scanning electron microscopy.

Materials and methods. Single cells of testates amoebas were selected under an inverted light microscope using a Pasteur pipette, washed four times in distilled water, transferred to cover glasses and dried.

Results. It was found that during drying, the cysts do not deform, and the trophozoites deform in such a way that a partial destruction of the shell wall consisting of idiosomes occurs. This deformation makes it possible to investigate the internal microstructure of the idiosomes of the testates amoebas *Cyphoderia sp.*

Conclusion. The revealed deformation of the test of trophozoites of representatives of the *Cyphoderiidae* family during sample preparation can significantly expand the capabilities of scanning electron microscopy to accurately describe the morphology and ultrastructure of idiosomes of testates amoebas of the family *Cyphoderiidae*.

Key words: protists, morphology, testate amoebae, idiosomes, *Cyphoderiidae*, scanning electron microscopy.

Введение

Раковинные амёбы (тестацеи) – полифилетическая группа протистов, включающая в себя филозные и лобозные амёбы, относящиеся к супергруппам TSAR и Amoebozoa соответственно [1]. Они доминируют среди протистов в экосистемах сфагновых болот и торфяников, где являются наиболее важными потребителями микроорганизмов, играя существенную роль в круговороте элементов, будучи одним из звеньев пищевой цепочки [2].

Тестацеи представляют собой одноклеточные амёбы, заключённые в твердую раковину с отверстием, необходимым для выхода псевдоподий [3]. В большинстве случаев клетка не заполняет полость раковины целиком, крепясь к стенкам раковины изнутри с помощью специальных цитоплазматических выростов – эпиподий [3]. Иногда цитоплазматическое тело амёбы соединяется с внутренней поверхностью раковины лишь в области устья, по его периферии [3].

Выделяют органические, агглютинированные, кальциевые и кремниевые раковины [3]. В зависимости от строительного материала раковины могут быть покрыты экзогенными минеральными частицами (ксеносомы) или минеральными элементами эндогенного происхождения (идиосомы) [3]. Строение и размеры идиосом являются одним из основных диагностических признаков, служащих для идентификации и определения таксономического положения, и хорошо визуализируются с помощью сканирующей электронной микроскопии.

К настоящему времени существует большое количество методов подготовки препаратов для СЭМ, направленных на сохранение структуры и формы клетки протистов [4]. К традиционным фиксаторам, применяемым в электронной микроскопии, относят раствор Люголя и формалина, жидкость Буэна, глутаровый альдегид, тетраоксид осмия, параформальдегид и 3% формальдегид [4-6]. К классическим методам пробоподготовки для сканирующей электронной микроскопии относят промывание клеток раковинных амёб дистиллированной водой с дальнейшей сушкой в эксикаторе от одной до двух недель [7]. Также практикуется сушка в аппарате критической точки [5].

Cyphoderia – самый крупный род семейства *Cyphoderiidae*, насчитывающий 14 видов, одиннадцать из которых были обнаружены в пресноводных экосистемах [8]. Типичным представителем данного рода является *C. atripulla*, для которого существует проблема «теневого вида», то есть таксоны

уровня вида не описаны валидно в соответствии с правилами номенклатуры, и сохраняют в течение длительного времени (годы, десятилетия и дольше) свой неофициальный статус наряду с валидными таксонами [3, 9]. «Теневые виды» обычно обладают широкой экологической толерантностью, космополитичной распространенностью или изменчивой морфологией, потому что на самом деле они являются видовыми конгломератами; иногда они даже не монофилетичны [9]. Упоминание «теневых видов» в таксономической литературе приводит к недооценке биоразнообразия и, следовательно, к неправильной интерпретации экологических или эволюционных процессов [9].

Целью данной работы являлось исследование морфологических характеристик раковины и детальной ультраструктуры чешуек представителей семейства *Cyphoderiidae*, выявленных в пещерном озере, с помощью сканирующей электронной микроскопии.

Материалы и методы

Отбор проб воды с захватом донного осадка производился в озере Сказка, расположенном в пещере Новомурадымовская на территории Мурадымовского ущелья Кугарчинского района Республики Башкортостан, в августе 2020 года.

Единичные клетки раковинных амёб отбирали под инвертированным световым микроскопом TS Eclipse 2 (Nikon, Япония) с помощью пипетки Пастера, промывали четырёхкратно в дистиллированной воде, помещали на покровные стекла и сушили на воздухе в течение суток.

Покровные стекла помещали на заранее прикрепленный двухсторонний электропроводящий углеродный скотч к алюминиевому столику, напыляли золотом в установке Quorum SC7620 'Mini' Sputter (Quorum, Англия) в течение 60 с.

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

Результаты и обсуждение

В ходе работы было выявлено, что во время сушки цисты не деформируются, а трофозоиты деформируются таким образом, что происходит частичное разрушение стенки раковины, состоящей из идиосом. Такая деформация позволяет исследовать внутреннюю микроструктуру идиосом раковинных амёб *Cyphoderia* sp., раковина которых снаружи нередко покрыта

слоем органического цемента, который затрудняет работу по описанию ультраструктуры идиосом. Мы полагаем, что данное явление можно объяснить воздействием высушивания на эпиподии клетки, закрепленные на внутренней стенке раковины. При высушивании эпиподии укорачиваются и тянут раковину в местах своей фиксации, вызывая вдавление участков раковины внутрь полости с разрывами соединений между идиосомами. В случае с пустыми раковинками и цистами мы не наблюдали такого эффекта.

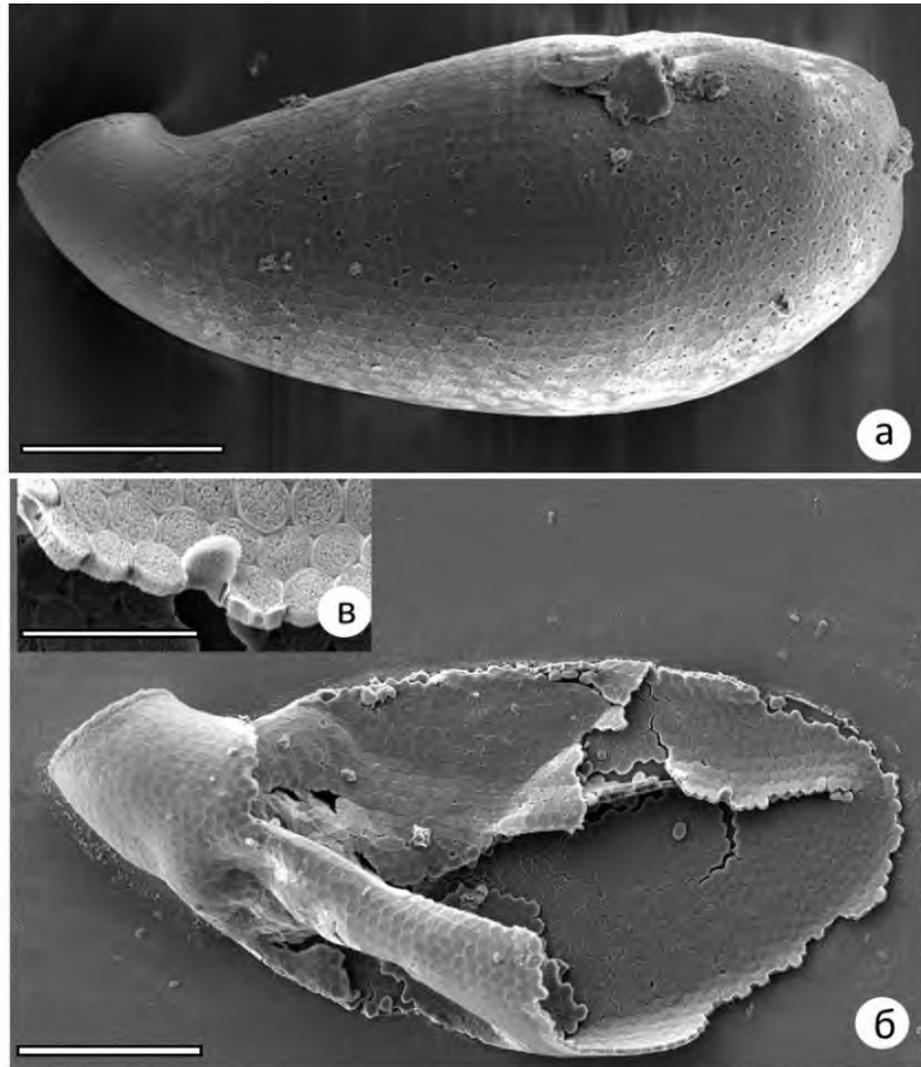


Рис. 1. Микрофотографии раковинных амёб: а – циста; б – разрушенная раковина трофозоида под действием высыхания; в – ультраструктура идиосом с внутренней стороны раковины; Масштаб: а, б – 20 мкм; в – 5 мкм.

Оценка данных сканирующей электронной микроскопии показала, что раковины исследованных представителей семейства *Cyphoderiidae* имеют характерную для данного таксона ретортовидную форму и состоят из округлых идиосом с губчатой структурой (рис. 1).

Анализ литературных данных показал, что ранее для сканирующей электронной микроскопии раковинных амёб применялись аналогичные описанному исследованию методы приготовления препаратов, включающие высушивание клеток и промывку в дистиллированной воде [7]. Однако в цитируемых работах не наблюдалась деформация раковин и, соответственно, не анализировалась ультраструктура идиосом. Таким образом, в нашем исследовании впервые установлена уникальная способность трофозоитов раковинных амёб *Cyphoderia* sp. деформировать раковину в процессе сушки. Не исключено, что данное явление зависит от степени минерализации среды обитания и времени хранения проб после отбора. Слабоминерализованная среда и длительный срок хранения могут повышать хрупкость раковины и способствовать ее деформации в процессе подготовки препаратов, как описано в данной работе.

Заключение

В нашем исследовании впервые выявлена деформация раковин трофозоитов представителей семейства *Cyphoderiidae* в процессе подготовки препаратов к сканирующей электронной микроскопии. Благодаря описанному феномену можно существенно расширить возможности сканирующей электронной микроскопии для точного описания морфологии и ультраструктуры идиосом и более четкой дифференциальной идентификации раковинных амёб семейства *Cyphoderiidae*.

Благодарности:

Автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам ИКВС УрО РАН: А.О. Плотникову за ценные советы в процессе подготовки рукописи, М.Е. Игнатенко за помощь с проведением электронной микроскопии, В.Я. Катаеву, А.С. Балкину, Ю.В. Миндолиной за помощь в отборе проб. Работа выполнена в ЦКП «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Adl S.M., Bass D., Lane C.E. Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2019. 66(1): 4-119. <https://doi.org/10.1111/jeu.12691>
2. Tran H.Q., Tran V.T.H., Tikhonenkov D.V. Freshwater testate amoebae from waterbodies of North Vietnam with the finding of indicator species. *Limnology*. 2021. 22: 151-160. <https://doi.org/10.1007/s10201-020-00642-y>
3. Мазей Ю.А., Цыганов А.Н. Пресноводные раковинные амёбы. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. 300 с.
4. Миндолина Ю.В. Применение сканирующей электронной микроскопии для исследования протистов меромиктических водоемов Арктики. *Бюллетень Оренбургского научно-*

- го центра УрО РАН. 2022. 4. 9с. DOI: 10.24411/2304-9081-2022-14003
5. Burdikova Z., Capek M., Ostasov P. Testate amoebae examined by confocal and two-photon microscopy: implications for taxonomy and ecophysiology. *Microscopy and Microanalysis*. 2010. 16: 735-746 с. doi:10.1017/S1431927610094031
 6. Heger T. J., Mitchell D. A., Ledeganck P. The curse of taxonomic uncertainty in biogeographical studies of free-living terrestrial protists: a case study of testate amoebae from Amsterdam Island. *Journal of Biogeography*. 2009. 36: 1551-1560 с. doi.org/10.1111/j.1365-2699.2009.02094.x.
 7. Heger T. J., Mitchell D. A., Todorov M. Molecular phylogeny of euglyphid testate amoebae (Cercozoa: Euglyphida) suggests transitions between marine supralittoral and freshwater/terrestrial environments are infrequent. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2010. 55(1): 113-122 с. doi.org/10.1016/j.ympev.2009.11.023
 8. Gonzalez-Miguens R., Soler-Zamora C., Useros F. *Cyphoderia ampulla* (Cyphoderiidae: Rhizaria), a tale of freshwater sailors: The causes and consequences of ecological transitions through the salinity barrier in a family of benthic protists. *Molecular Ecology*. 2022. 31(9): 2511-2767. <https://doi.org/10.1111/mec.16424>
 9. Soler-Zamora C., Useros F., González-Miguéns R., The problem of ‘shadow species’ as illustrated with the taxonomic hotchpotch *Cyphoderia ampulla* (Rhizaria: Cyphoderiidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 2023. 199(2): 477-492. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlad040>

Поступила 22 декабря 2023 г.

(Контактная информация: **Насырова Марина Анатольевна** – м.н.с. лаборатории биомедицинских технологий Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, 460014 г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел. 8(987)871-29-55; e-mail: marina_lavrenova_95@mail.ru)

REFERENCES

1. Adl S.M., Bass D., Lane C.E. Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2019. 66(1): 4-119. <https://doi.org/10.1111/jeu.12691>
2. Tran H.Q., Tran V.T.H., Tikhonenkov D.V. Freshwater testate amoebae from waterbodies of North Vietnam with the finding of indicator species. *Limnology*. 2021. 22:151–160. <https://doi.org/10.1007/s10201-020-00642-y>
3. Mazei Y.A., Cyganov A.N. Freshwater testate amoebae. M.: Association of Scientific Publications KMK, 2006. 300 с.
4. Mindolina Y.V. Application of scanning electron microscopy to investigate protists in Arctic meromictic water bodies. *Bulletin of the Orenburg Scientific Center, UB RAS*. 2022. 4: 9с. DOI: 10.24411/2304-9081-2022-14003
5. Burdikova Z., Capek M., Ostasov P. Testate amoebae examined by confocal and two-photon microscopy: implications for taxonomy and ecophysiology. *Microscopy and Microanalysis*. 2010. 16: 735–746 с. doi:10.1017/S1431927610094031
6. Heger T. J., Mitchell D. A., Ledeganck P. The curse of taxonomic uncertainty in biogeographical studies of free-living terrestrial protists: a case study of testate amoebae from Amsterdam Island. *Journal of Biogeography*. 2009. 36: 1551-1560 с. doi.org/10.1111/j.1365-2699.2009.02094.x.
7. Heger T. J., Mitchell D. A., Todorov M. Molecular phylogeny of euglyphid testate amoebae (Cercozoa: Euglyphida) suggests transitions between marine supralittoral and freshwater/terrestrial environments are infrequent. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2010. 55(1): 113-122 с. doi.org/10.1016/j.ympev.2009.11.023
8. Gonzalez-Miguens R., Soler-Zamora C., Useros F. *Cyphoderia ampulla* (Cyphoderiidae: Rhizaria), a tale of freshwater sailors: The causes and consequences of ecological transitions through the salinity barrier in a family of benthic protists. *Molecular Ecology*. 2022. 31(9): 2511-2767. <https://doi.org/10.1111/mec.16424>

- zaria), a tale of freshwater sailors: The causes and consequences of ecological transitions through the salinity barrier in a family of benthic protists. *Molecular Ecology*. 2022. 31(9): 2511-2767. <https://doi.org/10.1111/mec.16424>
9. Soler-Zamora C., Useros F., González-Miguéns R., The problem of ‘shadow species’ as illustrated with the taxonomic hotchpotch *Cyphoderia ampulla* (Rhizaria: Cyphoderiidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 2023. 199(2): 477–492. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlad040>

Образец ссылки на статью:

Насырова М.А. Анализ морфологии и ультраструктуры раковин амёб семейства *Cyphoderiidae* с помощью сканирующей электронной микроскопии. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2023. 4. 7с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2023-4/Articles/MAN-2023-4.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2023-14004