

1
НОМЕР

БОНЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ

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



БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН



КРАСНАЯ ПЛОЩАДЬ. БИТВА ЗА МОСКВУ
Бальтерманц Д.Н., 07.11.1941

2025

УЧРЕДИТЕЛЬ

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

© И.А. Изволь, 2025

УДК 593.13: 620.187.2

И.А. Изволь

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПРИГОТОВЛЕНИЯ ФИКСИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ СОЛНЕЧНИКОВ (CENTROPLASTHELIDA: HAPTISTA) ДЛЯ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

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

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) является одним из наиболее востребованных методов для изучения строения клеточных покровов солнечных и их идентификации. Использование данного метода позволяет получать изображения чешуек солнечных, качество которых напрямую зависит от пробоподготовки препаратов.

Цель. Оптимизировать метод приготовления фиксированных препаратов солнечных для сканирующей электронной микроскопии, для получения более качественных изображений клеточных покровов центрохелидных солнечных.

Материалы и методы. Исследование проведено на центрохелидных солнечных видов *Acanthocystis pectinata* и *Raphidocystis ambigua*. Единичные клетки отбирали под инвертированным световым микроскопом с помощью пипетки Пастера. Перед отсаживанием клеток на покровное стекло, использовали дополнительный этап двукратной отмывки единичных клеток в дистиллированной воде, либо стерильной среде Прата. После этого отмывые клетки переносили на покровные стекла, сушили на воздухе в течение суток. Высушенные препараты отмывали в дистиллированной воде и снова сушили на воздухе в течение суток.

Результаты. Экспериментально установлено, что дополнительный этап отмывания единичных клеток в дистиллированной воде перед их переносом на покровное стекло позволяет значительно уменьшить размеры солевого ореола вокруг клетки, а также снизить количество агрегатов бактерий.

Заключение. Оптимизированный метод приготовления фиксированных препаратов позволяет получить более качественные СЭМ изображения центрохелидных солнечных, на которых можно четко рассмотреть ультраструктуру чешуек, провести их измерения, а также определить видовую принадлежность.

Ключевые слова: солнечники, Centroplasthelida, сканирующая электронная микроскопия, пробоподготовка образцов для СЭМ.

I.A. Izvol

OPTIMIZATION OF THE METHOD OF PREPARATION OF FIXED PREPARATIONS OF SOLAR CELLS (CENTROPLASTHELIDA: HAPTISTA) FOR SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

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

Scanning electron microscopy (SEM) is one of the most popular methods for studying the structure of heliozoan cell covering and identification these protists. This technique allows to create images of heliozoan scales, and the quality of these images depends on the preparation of the samples.

Aim. To optimize the method of preparing fixed specimens of heliozoan cells for scanning electron microscopy, which would provide the high-quality images of centrohelid cell covering.

Materials and methods. The study was conducted on centrohelid cells of species *Acanthocystis pectinata* and *Raphidocystis ambigua*. Single cells were selected under an inverted light microscope using a Pasteur pipette. Before depositing the cells on the cover glass, we added a stage of double washing of the single cells in distilled water or sterile Prat medium. After that, the washed cells were transferred to cover glasses and dried in the air for a day. The dried specimens were washed in distilled water and air-dried again for 24 hours.

Results. It has been revealed that the additional stage of washing single cells in distilled water before transferring them to the cover glass reduces significantly the salt halo around the cell, as well as decreases the number of bacterial aggregates.

Conclusion. The optimized method of preparation of fixed specimens provides high-quality SEM images of centrohelid cells, on which the ultrastructure of the scales can be clearly examined. Also, good quality of the images allows to perform measurements, and to identify centrohelid species.

Keywords: heliozoa, Centroplasthelida, scanning electron microscopy, SEM specimen preparation.

Введение

К солнечникам относится полифилетическая группа хищных протистов с радиальным типом симметрии, которые имеют ловчие органеллы – аксоподии с экструсомами [1]. Центрохелидные солнечники – монофилетическая группа протистов, объединяющая более 100 пресноводных и морских видов, которые повсеместно распространены [2]. По филогеномным данным центрохелиды относятся к супергруппе Haptista [3]. Все центрохелиды, за некоторым исключением, имеют кремниевый или органический наружный скелет в виде тангентально или радиально ориентированных чешуек [4]. Многообразие форм и размеров чешуек имеют важнейшее значение для идентификации и определения таксономического положения центрохелидных солнечников. В связи с этим, для изучения центрохелидных солнечников применяют световую, трансмиссионную и сканирующую электронную микроскопию [5].

Световая микроскопия применяется для выявления солнечников в пробе, не требует специальной подготовки препарата, а также позволяет измерить диаметр живой клетки. Однако, малая разрешающая способность световой микроскопии, которая ограничена длиной световой волны, не позволяет визуализировать тонкую морфологию чешуек и спикул и идентифицировать солнечников до вида.

Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) по сравнению с оптической микроскопией обладает более высоким разрешением и позволяет

изучать ультраструктуру солнечников. Несмотря на высокое разрешение и увеличение, ТЭМ является сложным и дорогостоящим методом, а подготовка материала для работы с микроскопом занимает много времени и требует высокой квалификации исследователя. Кроме того, исследуемые образцы под действием пучка электронов постепенно разрушаются.

В настоящее время для изучения центрохелидных солнечников широко используется сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Данный метод позволяет получать четкие изображения элементов наружного скелета центрохелид и надежно устанавливать морфологические особенности, используемые для их идентификации на уровне вида. На протяжении многих десятилетий СЭМ является традиционным методом при исследовании морфологии и ультраструктуры протистов. Однако, качество получаемых изображений напрямую зависит от этапов пробоподготовки фиксированных препаратов [6].

В связи с этим цель работы заключалась в оптимизации метода приготовления фиксированных препаратов солнечников для СЭМ, который позволил бы получать качественные изображения изучаемых центрохелидных солнечников и определять их до вида.

Материалы и методы

Исследование проводили в мае и октябре 2024 г. в Оренбургской области, на Ушкотинском водохранилище и озере Жетыколь. Отбор проб воды проводили в придонном слое после взмучивания донного осадка. Пробы транспортировали в лабораторию, где помещали в чашки Петри.

Накопительные культуры получали после массового развития мелких гетеротрофных жгутиконосцев в чашках Петри, для которых кормом служила культура бактерий *Aeromonas sobria*. Массовое размножение солнечников наблюдали к концу первой или на второй неделе культивирования. При достижении достаточной численности солнечников выделяли клональные культуры.

Для получения клональных культур единичные клетки солнечников отбирали под инвертированным световым микроскопом TS Eclipse 2 (Nikon, Япония) с помощью оттянутой стеклянной пастеровской пипетки. Далее клетки промывали двукратно в дистиллированной воде, либо в стерильной среде Прата (состав среды: KNO_3 – 0,1 г/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 г/л; K_2HPO_4 – 0,01 г/л). После промывания отмытые клетки помещали на покровные стекла

и сушили на воздухе в течение суток. Высушенные препараты отмывали в дистиллированной воде и снова сушили на воздухе в течение суток.

Покровные стекла помещали на поверхность алюминиевого столика, покрытую двухсторонним электропроводящим углеродным скотчем, напыляли золотом в установке SC7620 Mini Sputter Coater (Quorum Technologies Ltd., Великобритания) в течение 60 с.

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

Результаты и обсуждение

При работе с клетками и культурами солнечных мы столкнулись с рядом проблем, которые возникли в ходе рутинной пробоподготовки препаратов солнечных, включающей отсаживание живой клетки солнечника оттянутой пипеткой Пастера на поверхность обезжиренного покровного стекла, высушивание на воздухе, промывание дистиллированной водой и повторное высушивание препарата на воздухе [7].

Во-первых, в процессе культивирования накопительных и чистых культур солнечных среда становится вязкой в связи с массовым развитием кормовой культуры бактерий *Aeromonas sobria*. Бактерии покрывают наружные покровные элементы клеток солнечных, что существенно затрудняет визуализацию исследуемых структур с помощью СЭМ (рис 1А, Б, В).

Во-вторых, при недостаточном промывании высушенного препарата в дистиллированной воде, может образовываться солевой налет, как показано на рисунке (рис. 1Б, В), что также снижает качество электронного изображения.

В-третьих, более длительное отмывание высушенного препарата в дистиллированной воде может привести к отмыванию самого солнечника с покровного стекла, оставляя на нем лишь отдельные чешуйки и их фрагменты, что затрудняет визуализацию спикул и чешуек, а также видовую идентификацию солнечника (рис. 1Г).

В связи с выявленными недостатками рутинного метода приготовления препаратов из культур солнечных, было решено оптимизировать данный метод, дополнив его этапом отмывания единичных клеток перед их переносом на покровное стекло. Для этого проведена оценка отмывания единичных клеток чистых культур солнечных двух родов *Acanthocystis* и *Raphidocystis* в стерильной среде Прата и дистиллированной воде.

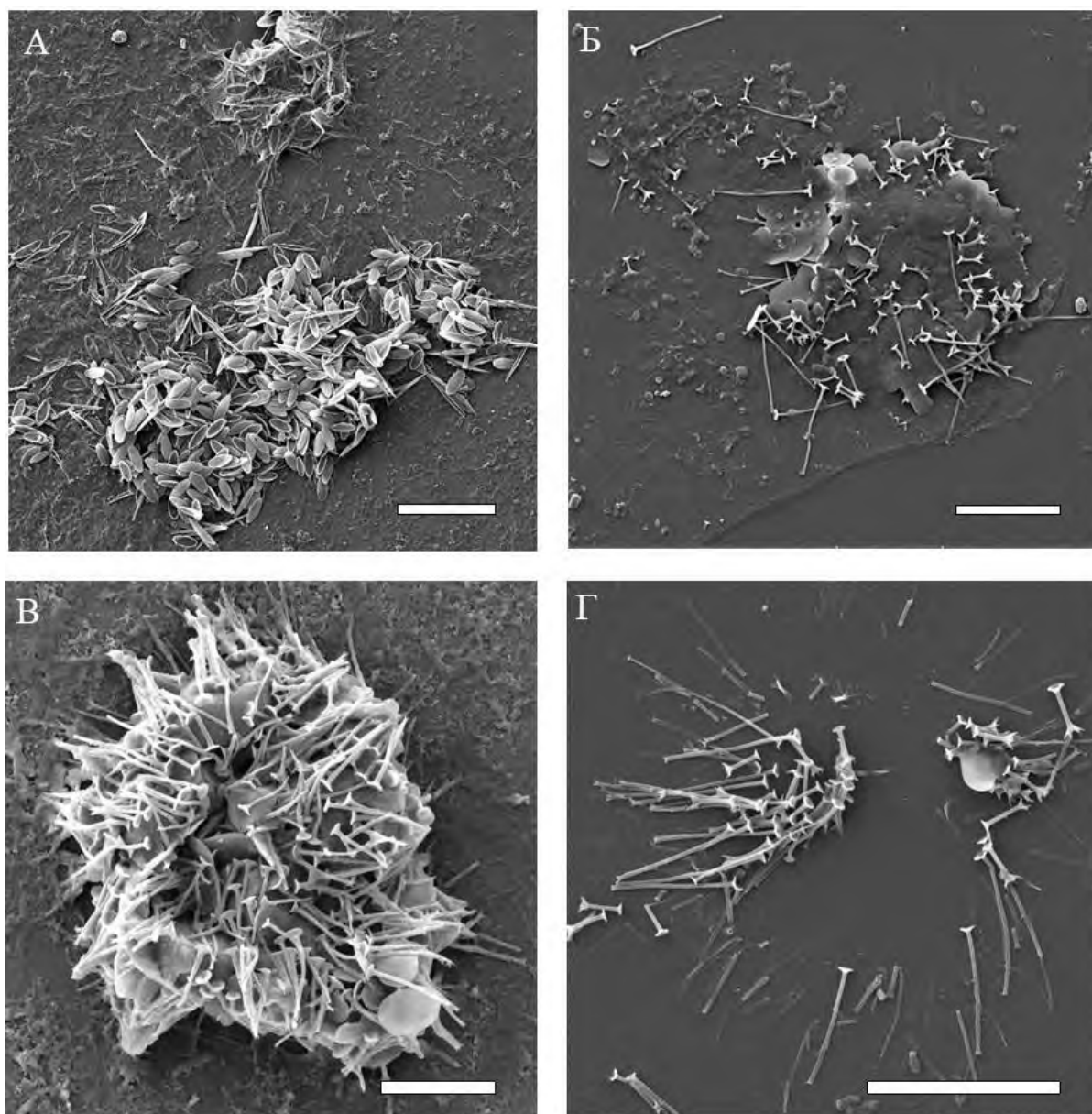


Рис. 1. Микрофотографии солнечников из чистых культур: А, Б, В – клетки солнечников, покрытые бактериями и солевым налетом; Г – фрагмент клетки солнечника после длительного отмывания препарата в дистиллированной воде; Масштаб: А – 20 мкм; Б, Г – 10 мкм, В – 5 мкм.

В результате было выявлено, что при двукратном отмывании единичных клеток *Acanthocystis pectinata* в стерильной среде Прата, на которой они культивировались, большая часть чешуек хорошо отмылась, что позволило провести видовую идентификацию солнечника (рис. 2А).

Однако, некоторые чешуйки солнечников были полностью покрыты агрегатами бактерий, что не позволило детально рассмотреть их ультраструктуру и провести измерения (рис. 2Б). К тому же, после промывки готового препарата в дистиллированной воде сохранялся солевой налет вокруг

клетки, хотя и в значительно меньшем объеме по сравнению с не отмытыми клетками (рис. 2А, Б).

При двукратном отмывании единичных клеток чистой культуры *Acanthocystis pectinata* в дистиллированной воде чешуйки солечника отмылись значительно лучше, чем в среде Прата (рис. 2В, Г). Солевой налет вокруг клетки отсутствует, однако сохраняется небольшое количество агрегатов бактерий, которое всё же позволяет провести видовую идентификацию (рис. 2В).

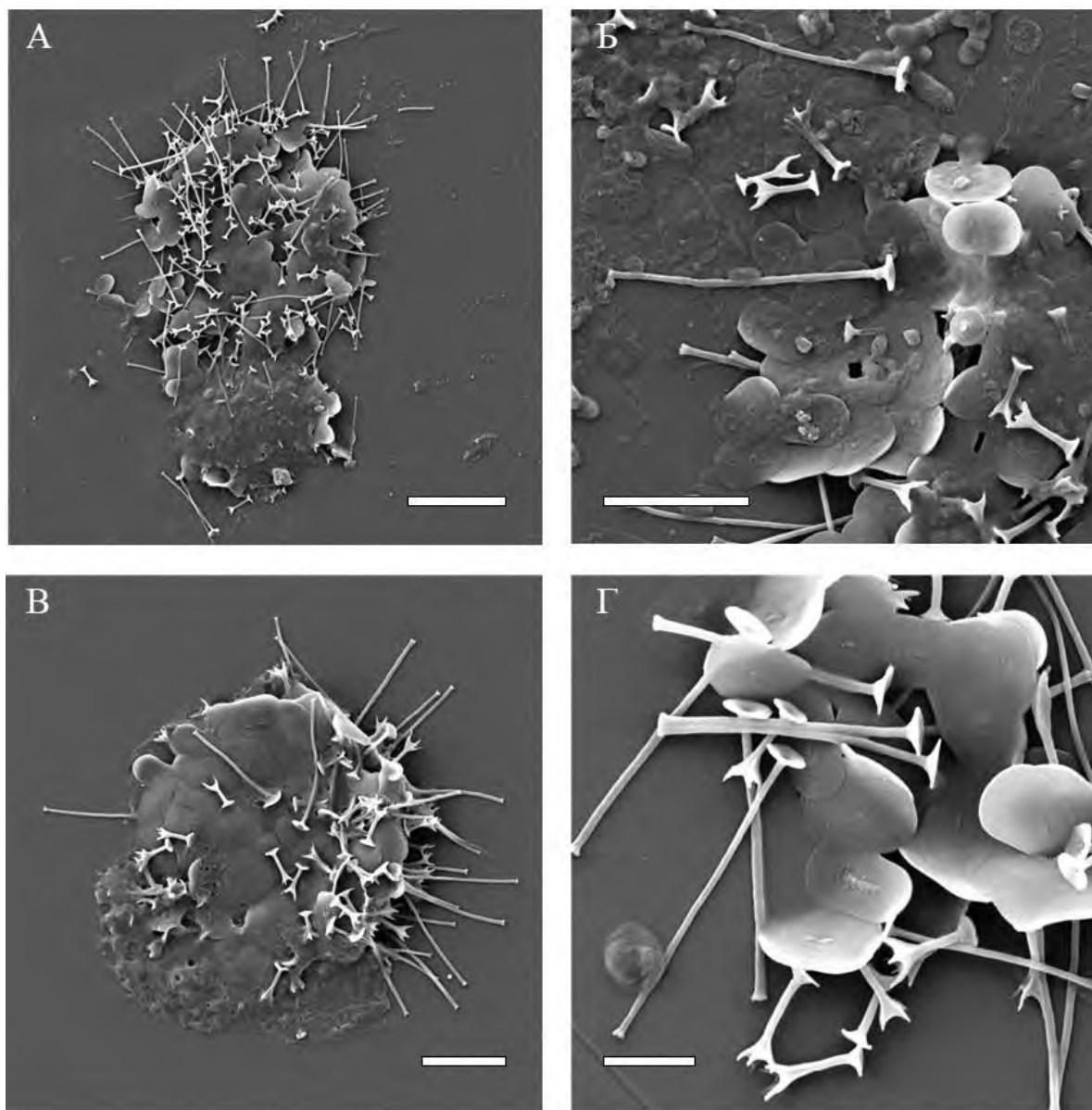


Рис. 2. Микрофотографии клеток солечника *Acanthocystis pectinata*: А, Б – клетки солечника, двукратно отмытые в среде Прата; В, Г – клетки солечника, двукратно отмытые в дистиллированной воде. Масштаб: А – 10 мкм, Б, В – 5 мкм, Г – 2 мкм.

Аналогичные процедуры подготовки препаратов мы провели с чистой

культурой *Raphidocystis ambigua*. Так, при двукратном отмывании единичных клеток в среде Прата, мы получили результаты, схожие с *Acanthocystis pectinata* (рис. 3). Часть чешуек была покрыта налетом, который затруднял рассмотрение их ультраструктуры. Однако это не помешало провести измерения чешуек, а также определить видовую принадлежность. Солевой налет сохранялся как вокруг клетки, так и на некоторых чешуйках (рис. 3А, Б)

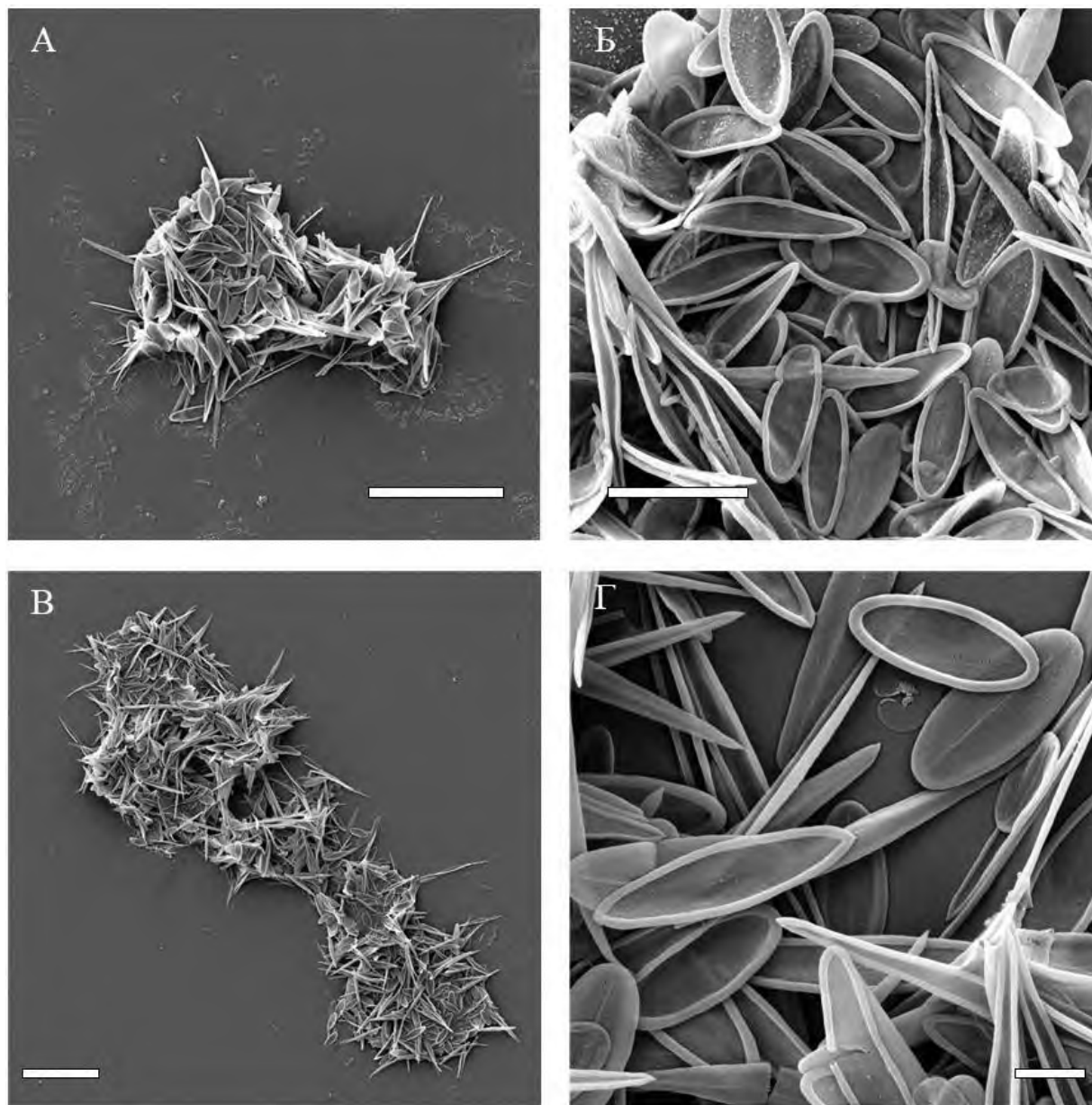


Рис. 3. Микрофотографии клеток солнечника *Raphidocystis ambigua*: А, Б – клетки солнечника, двукратно отмытые в среде Прата; В, Г - клетки солнечника, двукратно отмытые в дистиллированной воде. Масштаб: А, В – 20 мкм, Б – 5 мкм, Г – 2 мкм.

При отмывании клеток *Raphidocystis ambigua* в дистиллированной воде, чешуйки отмылись значительно лучше, чем в среде Прата (рис. 3В, Г). На изображениях СЭМ отсутствуют налет и агрегаты бактериальных клеток,

можно четко рассмотреть ультраструктуру чешуек, провести их измерения, а также определить видовую принадлежность солнечника. Так же вокруг клетки и на чешуйках отсутствует солевой ареол

Таким образом, разработана эффективная методика пробоподготовки препаратов чистых культур пресноводных солнечников, заключающаяся в ряде последовательных этапов: двукратное отмывание единичных клеток в дистиллированной воде, отсаживание отмытых клеток на покрывное стекло и сушка на воздухе в течение суток, отмывание готового препарата в дистиллированной воде и сушка на воздухе в течение суток.

Заключение

В процессе проведенных исследований оптимизирован метод приготовления препаратов клеток солнечников для СЭМ, заключающийся в выполнении ряда последовательных этапов: двукратное отмывание единичных клеток в дистиллированной воде, перенос отмытых клеток на покрывное стекло и сушка на воздухе, отмывание готового препарата в дистиллированной воде и сушка на воздухе.

(Благодарности:

Автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам ИКВС УрО РАН: А.О. Плотникову за ценные советы в процессе подготовки рукописи, М.Е. Игнатенко за помощь в отборе проб и проведении электронной микроскопии. Работа выполнена в ЦКП «Персистенция микроорганизмов» ИКВС УрО РАН).

ЛИТЕРАТУРА

1. Златогурский В.В. Солнечники. Протисты: руководство по зоологии. СПб; М.: Товарищество науч. изданий КМК, 2011: 205-269.
2. Микрюков К.А. Центрохелидные солнечники (Centroheliozoa). М.: Товарищество науч. изданий КМК, 2002. 136 с.
3. Adl S. M., Bass D., Lane C. E., Lukeš J., Schoch C. L., Smirnov A. et al. Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. J. Eukaryot. Microbiol. 2019. Vol. 66, № 1: 4-119.
4. Siemensma F.J. Klasse Heliozoa Haeckel, 1866. Protozoenfauna. Bd. 2. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1991: 171-297.
5. Zlatogursky V.V., Three new freshwater species of centrohelid heliozoans: *Acanthocystis crescenta* sp. nov., *A. kirilli* sp. nov., and *Choanocystis minima* sp. nov. Eur. J. Protistol. 2010. V. 46: 159-163.
6. Плотников А.О., Ермоленко Е.А. Атомно-силовая микроскопия как новый метод изучения протистов отряда Centrohelida. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2012. №2. 8с. (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2012-2/Articles/Plotnikov.pdf>)
7. Плотников А.О., Ермоленко Е.А. Центрохелидные солнечники (Chromista, Harcobia) Южного Предуралья. Зоологический журнал. 2015. Т. 94. №1. 5.

Поступила 27 марта 2025 г.

(Контактная информация: **Изволь Ирина Анатольевна** – научный сотрудник лаборатории биомедицинских технологий Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000 г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел. +7(3532)77-05-12; e-mail: iaermolenko@yandex.ru)

REFERENCES

1. Zlatogurskij V.V. Solnechniki. Protisty: rukovodstvo po zoologii. SPb.; M.: Tovarishestvo nauchnyh izdanij KMK, 2011: 205-269.
2. Mikrjukov K.A. Centrohelidnye solnechniki (Centroheliozoa). M.: Tovarishestvo nauch. izdanij KMK, 2002. 136 p.
3. Adl S.M., Bass D., Lane C.E., Lukeš J., Schoch C.L., Smirnov A. et al. Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. J. Eukaryot. Microbiol. 2019. Vol. 66, № 1: 4-119.
4. Siemensma F.J., Klasse Heliozoa Haeckel, 1866 // Protozoenfauna. Bd. 2. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1991: 171-297.
5. Zlatogursky V.V. Three new freshwater species of centrohelid heliozoans: *Acanthocystis crescenta* sp. nov., *A. kirilli* sp. nov., and *Choanocystis minima* sp. nov. Eur. J. Protistol. 2010. V. 46: 159-163.
6. Plotnikov A.O., Ermolenko E.A. Atomic force microscopy as the new method for examination of protists belonged to the order Centrohelida. Bulletin of the Orenburg Scientific Center, UB RAS. 2012. №2. 8p. (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2012-2/Articles/Plotnikov.pdf>)
7. Plotnikov A.O., Ermolenko E.A. Centrohelid heliozoa (Chromista, Hacrobia) of Southern Cis-Ural region. Zoologicheskij zhurnal. 2015. T. 94. №1. 5.

Образец ссылки на статью:

Изволь И.А. Оптимизация метода приготовления фиксированных препаратов солнечных (Centroplasthelida: Haptista) для сканирующей электронной микроскопии. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2025. 1. 9с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2025-1/Articles/IAI-2025-1.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2025-11001