

ОСОБЕННОСТИ ПРОБОПОДГОТОВКИ ОБРАЗЦОВ МОНАДНЫХ ФОРМ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ ДЛЯ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ *

Рылькова О. А., Боровков А. Б., Ханайченко А. Н., Харчук И. А.,
Гудвиллович И. Н., Лишаев В. Н.

ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»,
г. Севастополь, Российская Федерация,
e-mail: ol.rylkova@yandex.ru

Аннотация: С целью оптимизации пробоподготовки монадных форм микроводорослей для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) проанализированы отечественные и зарубежные руководства. Для отработки методики использовали зелёную микроводоросль *Dunaliella salina* Teodoresco (штамм IBSS-2 из ЦКП «Коллекция гидробионтов Мирового океана» ФИЦ ИнБЮМ), апробация протокола проведена на криптофитовых водорослях Чёрного моря (Севастопольская бухта). Показано, что при фиксации материала целесообразно снижать конечную концентрацию (к. к.) глутарового альдегида (глутаральдегида, ГА) в пробе до 1 % (для *D. salina*) или использовать ступенчатую фиксацию раствором Люголя (для криптофитовых водорослей). При концентрировании микроводорослей, имеющих жгутики, необходимо использовать максимально мягкую фильтрацию (разрежение менее 0,2 атм), промывку пробы проводить только при необходимости, дальнейшую дегидратацию целесообразно осуществлять в бюксе или пластиковом планшете. К хорошему результату приводило использование стёкол, покрытых поли-L-лизинем. Показано, что не существует значительной разницы между «этанольной» и «этанольно-ацетоновой» дегидратацией, однако первый способ занимает меньше времени и не требует работы в вытяжном шкафу. Сушка «в критической точке» (2,5–3 ч) и напыление (Au/Pd; 0,5–1,0 мин) соответствовали режимам, обычно рекомендуемым в современных руководствах по пробоподготовке. При невозможности осуществления всех этапов пробоподготовки в один день или в экспедиционных условиях возможно хранение образцов до двух недель в растворе фиксатора или в 75%-ном растворе этанола (в процессе дегидратации). Предложенный протокол предмикроскопной пробоподготовки для исследований с помощью СЭМ может быть использован для изучения поверхностных структур и детализации морфологических характеристик одноклеточных водорослей, имеющих жгутики, и успешно применён при таксономических и биотехнологических исследованиях.

Ключевые слова: микроводоросли, монадные формы, сканирующая электронная микроскопия, пробоподготовка.

Введение

В альгологических исследованиях всё чаще находит применение интегративный таксономический подход, основанный на комплексном анализе, включающем молекулярно-филогенетические, морфофизиологические и микроскопические (световая и электронная) характеристики культивируемых микроводорослей. Световая микроскопия (СМ), наиболее простая в методическом аспекте, позволяет видеть картину целиком, наблюдать за живыми клетками, проводить

*Работа выполнена в рамках тем госзаданий Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН»: «Комплексное исследование экологических и физиолого-биохимических особенностей микроводорослей различных таксономических групп при адаптации к меняющимся условиям среды» (№ гос. регистрации 1023121900003-0-1.6.16), «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» (№ гос. регистрации № 121030300149-0).

их количественный учёт, но с её помощью не всегда удаётся окончательно установить таксономическую принадлежность микроводорослей. Для детального морфологического описания поверхностных ультраструктур клеток успешно применяется сканирующая электронная микроскопия [Морозова, 2013].

Возможности электронной микроскопии почти целиком зависят от методов предмикроскопной обработки проб, поэтому получение качественных микрофотографий с хорошей сохранностью поверхностных структур клетки с помощью СЭМ требует тщательного осмысления всех этапов пробоподготовки образцов. Методы электронной микроскопии находятся в постоянном развитии, детали обработки могут отличаться, поэтому каждому исследователю приходится подбирать и адаптировать протоколы обработки проб в зависимости от свойств объектов и целей исследования [Морозова, 2013; Hayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016; Dolgin, Adolf, 2019].

Например, для микроводорослей, имеющих крепкий панцирь (диатомовые, панцирные динофитовые, золотистые и др.), главной проблемой при подготовке образца является удаление органических веществ, маскирующих детали поверхностных структур. Обычно клетки обрабатывают кислотами или перекисью водорода, концентрируют на фильтре или наносят на стекло, высушивают на воздухе и перед визуализацией напыляют металлами. Более сложной задачей является подготовка объектов, не имеющих жёсткой клеточной оболочки (например, беспанцирные динофитовые, криптофитовые, некоторые зелёные и др.). Для таких организмов основными этапами пробоподготовки являются: химическая фиксация, иногда постфиксация образца, концентрирование клеток, обезвоживание, высушивание и обеспечение электропроводности [Морозова, 2013; Hayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016; Dolgin, Adolf, 2019].

Химическая фиксация организмов необходима для остановки посмертных изменений и сохранения клетки, максимально близкой к прижизненному состоянию. Все авторы придерживаются мнения, что именно этап фиксирования материала является основным в пробоподготовке образцов для электронной микроскопии [Морозова, 2013; Hayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016; Dolgin, Adolf, 2019].

При фиксировании микроводорослей для световой микроскопии традиционно используют формальдегид. Однако клетки, не имеющие ригидных стенок, в его присутствии могут сильно деформироваться или совсем разрушаться. Наиболее часто в электронной микроскопии (для этих групп организмов) используется более «мягкий» фиксатор — глутаровый альдегид. Этот реагент «сшивает» аминокислоты в макромолекулах белка, что позволяет лучше сохранить исходную форму и размеры клеток [Hayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016]. Известно о применении в качестве фиксатора раствора Люголя [Bistricki, Munawar, 1978; Cerino, Zingone, 2006]. Многими авторами рекомендуется использовать осмиевую кислоту (четырёхоксид осмия) [Морозова, 2013; Hayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016; Dolgin, Adolf, 2019], она не сжимает клетку при фиксации, сохраняя её в состоянии, близком к прижизненному, вызывает наименьшие, едва заметные изменения в структуре ядра и цитоплазмы. Кроме того, четырёхоксид осмия — один из немногих фиксаторов, используемых для изучения митохондрий, сохраняющих как жиры, так и липиды [Cerino, Zingone, 2006]. В виде паров осмиевая кислота используется для фиксации наиболее «нежных» объектов, в частности изолированных клеток криптофитовых; в виде 2%-го водного раствора тетраоксид осмия используется только в сочетании с другими веществами для дофиксации, однако следует учитывать его высокую стоимость и чрезвычайную токсичность [Морозова, 2013; Hayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016; Dolgin, Adolf, 2019]. Часто исследователи используют несколько реактивов (смеси фиксаторов Карновского, МакДауэлла, Трампа и др.), что является авторскими разработками лабораторий [Морозова, 2013; Hayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016; Dolgin, Adolf, 2019].

Для морских проб и альгокультур растворы фиксаторов готовят на морской воде или буферных растворах (с молярностью 0,01–1,0), что позволяет поддерживать pH (7,0–7,4), также необходимо учитывать осмолярность образца. Наиболее часто для электронной микроскопии

используют фосфатный (близкий к цитоплазматической среде большинства биологических образцов, имеет невысокую стоимость и безопасный при использовании) и какодилатный (его формула содержит мышьяк, что требует осторожности при использовании, имеет более высокую стоимость) буферы [Hayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016].

Кроме этого, важным моментом пробоподготовки является концентрирование микроводорослей. Для этого рекомендуется осаждение фильтрацией на поликарбонатные фильтры или центрифугирование. Известно об успешном использовании стёкол, покрытых поли-L-лизинном, что обеспечивает хорошую адсорбцию клеток водорослей на покровное стекло. В этом случае удаётся избежать физических воздействий на клетку [Анисимова, 2014; Šťastný, Kouwets, 2012; Kaufnerova, Eliaš, 2013].

Известно, что все живые организмы содержат значительное количество воды, поэтому, во избежание деформации клеточных стенок, при последующих этапах обработки пробы необходимо выполнить дегидратацию образца (постепенно заменить воду в клетке этанолом или ацетоном) и затем окончательно его высушить. Обезвоживание проводят постепенно, обрабатывая материал водными растворами этанола возрастающей концентрации, заканчивают дегидратацию обычно «абсолютными» (безводными) этанолом или ацетоном.

Методы сушки в первую очередь разработаны для того, чтобы избежать влияния силы поверхностного натяжения — основной причины разрушения поверхностных структур клеток. Известны три наиболее распространённых метода подготовки образцов для СЭМ: сушка на воздухе, сушка «в критической точке» и сублимационная сушка. Воздушная сушка с использованием HMDS (hexamethyldisilazane) или TMS (tetramethylsilane) не требует специального оборудования и является новейшей технологией, набирающей в последние годы всё большую популярность. Сушка «в критической точке» с использованием жидкой двуокиси углерода (один из самых традиционных подходов в альгологии, позволяет при необходимости выполнить отмывку образца в буфере и спиртовых растворах) и сушка вымораживанием (сублимационная сушка, обеспечивает минимальный физический контакт образца с любым реагентом среды, за исключением жидкого азота) требуют специального оборудования [Hayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016].

И наконец, чтобы усилить проводимость и добавить механической прочности образцу, а также локализовать сигнал на поверхности образца, его напыляют тонким (от 1 нм) слоем металла, например золота, платины, палладия или вольфрама [Hayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016].

Целью данного исследования стало изучение и анализ общеизвестных в альгологии способов пробоподготовки микроводорослей для исследования с помощью сканирующего электронного микроскопа, разработка оптимизированного протокола для монадных форм на примере зелёной микроводоросли *Dunaliella salina*, не имеющей плотной целлюлозной оболочки, и апробация полученной методики при изучении криптофитовых водорослей Чёрного моря.

Материалы и методы

Растительный материал. В работе использовали микроводоросль *Dunaliella salina* Teodoresco (штамм IBSS-2 из ЦКП «Коллекция гидробионтов Мирового океана» ФИЦ ИнБЮМ), выращенную на модифицированной среде Ven-Amotz (с добавлением морской соли до концентрации 120 г·дм³ (ПК «Галит», Крым)) [Shaish, Avron, Ben-Amotz, 1990].

Моновидовые культуры штаммов криптофитовых водорослей были получены из нативных проб воды (после изоляции и длительной последовательной очистки клеток путём чередования методов микропипетирования и разбавлений), отобранных в разных биотопах поверхностных прибрежных вод акватории Севастопольской бухты Чёрного моря (44°37'00" с. ш., 33°31'18" в. д., солёность 18 ‰). Чистые штаммы черноморских криптофитовых содержались

в коллекции культур морских водорослей (ССМА) ФИЦ ИнБЮМ при слабом естественном освещении. В работе использовали культуры в экспоненциальной фазе, выращенные в полунепрерывной неаксеничной культуре на среде Уолна, разбавляемой на 30 % каждые 3–4 дня [Algal Culturing ... , 2005].

Фиксирование образцов. В качестве фиксирующих растворов были выбраны раствор Люголя (как реактив, имеющий наименьшую стоимость) и глутаральдегид (как наиболее часто рекомендуемый в руководствах по пробоподготовке образцов для СЭМ, а также менее токсичный и более экономичный по стоимости по сравнению с тетраоксидом осмия). При подготовке образцов для сканирующего электронного микроскопа суспензию клеток микроводорослей (от 1 до 3 мл) фиксировали 15–60 мин, в темноте, при комнатной температуре, раствором Люголя из расчёта 3 капли на 1 мл пробы или 25%-ным раствором глутарового альдегида при 4 °С (конечная концентрация фиксатора в пробе составляла от 1 до 2,5 %) [Bistricki, Munawar, 1978; Pomroy, 1989; Cerino, Zingone, 2006]. При невозможности дальнейшей обработки образца сразу же после фиксирования материала возможно его хранение до двух недель [Bratbak, 1993] в соответствующих для фиксатора условиях (4 °С — для ГА; в темноте, при комнатной температуре — для раствора Люголя). Это так называемый первый этап накопления серии проб.

Перед подготовкой образцов для СЭМ пробы просматривали в световом микроскопе (Carl Zeiss Axiostar plus, Германия), снабжённом камерой (Cannon a 620, Япония), при увеличении от $\times 200$ до $\times 630$.

Подготовка образцов на фильтрах. После фиксирования пробу осаждали при разрежении не более 0,2 атм в фильтровальной воронке (Sartorius производства Германии) или в шприце с насадкой на поликарбонатный фильтр с диаметром пор 3,0 мкм (производства ОИЯИ, г. Дубна, Россия), для более равномерного распределения клеток на фильтре его помещали на влажную подложку из фильтровальной бумаги, предварительно подписанную карандашом. Наличие смоченной подложки не позволяет фильтру с осевшими микроводорослями пересыхать, а маркировка остаётся при дальнейшей дегидратации образцов. При необходимости фильтр дважды промывали 1 или 2 мл раствора 0,01-молярного фосфатно-солевого буфера (PBS, pH 7,2) или стерильной морской водой.

Сразу после фильтрации и промывки (при необходимости) образца фильтр с подложкой переносили в 16-луночный планшет или (в случае дегидратации с ацетоном) в стеклянные бюксы объёмом 50 мл. Смену растворов проводили с помощью пластиковой пипетки Пастера или дозатора. При «этанольной» дегидратации образцы выдерживали последовательно в растворах этанола восходящей концентрации. Режим экспозиции: в 20-, 30-, 50%-ных растворах — по 5 мин; в 75-, 96%-ных — по 10 мин; в 100%-ном — дважды по 10 мин. В случае «этанольно-ацетонового» обезвоживания режим был следующим: в 20-, 30-, 50%-ных растворах этанола выдерживали по 5 мин; в 75%-ном этаноле — 10 мин; в 96%-ном этаноле — дважды по 15 мин; в смеси 96%-ного этанола и 100%-ного ацетона (в соотношении 1 : 1) — 2 часа; в 100%-ном ацетоне — дважды по 15 мин [Анисимова, 2014]. При невозможности дальнейших этапов обработки в этот же день образцы (до двух недель) хранили в 75%-ном растворе этанола (так называемый второй этап накопления серии проб).

Два этапа накопления проб (хранение в фиксаторе или в 75%-ном этаноле до двух недель) может быть весьма полезным, например, в полевых условиях экспедиций [Bratbak, 1993].

Приготовление препаратов на «лизиновых» стёклах. На обезжиренные покровные стёкла размером (24 × 24 мм) наносили 2,4 мкл раствора поли-L-лизина в концентрации 1 мг мл⁻¹ (MC biomedical LCC) и распределяли по всей поверхности стекла с помощью препаровальной иглы. Стёкла размещали на нагревательном столике (около 50 °С) и давали им полностью высохнуть, процедуру нанесения пробы и сушки повторяли трижды. Подготовленные

«лизиновые» стёкла хранили в конвертах из фольги, в холодильнике, в закупоренных склянках или вакуумных пакетах. Для приготовления препарата фиксированную (раствором Люголя или ГА) суспензию микроводорослей наносили небольшими отдельными каплями на «лизиновые» стёкла (важно учитывать, что материал «прилипает» к стеклу в момент прикосновения, а не после оседания в капле). После нанесения материала капле давали немного подсохнуть, чтобы жидкость не текла, но не пересушивали. Остатки жидкости оттягивали фильтровальной бумагой [Анисимова, 2014; Šťastný, Kouwets, 2012; Kaufnerova, Eliaš, 2013]. После этого стёкла сразу помещали на фильтровальную бумагу в 12-луночный пластиковый планшет, где проводили «этанольную» дегидратацию.

Сушка «в критической точке» и напыление образцов. Фильтры с образцами помещали в сушилку (Leica EM SPD300, Германия). В случае использования «лизиновых» стёкол их аккуратно устанавливали в специальную «расчёску». Время сушки составляло 2,5–3 часа. При напылении (Au/Pd; 0,5–1,0 мин) фрагмент фильтра или стекло приклеивали с помощью скотча на алюминиевый столик и помещали в прибор Leica EM ACE200 (Германия). Просматривали образцы с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi SU3500 (Япония) при увеличении от $\times 500$ до $\times 20000$.

Результаты и обсуждение

Для отработки методики выбор *D. salina* в качестве тест-объекта не был случайным. Отсутствие у микроводорослей жёсткой клеточной стенки позволило нам в деталях отработать основные этапы пробоподготовки: подбор фиксатора, его концентрацию, время обработки материала, а также способы концентрирования и обезвоживания клеток. Режимы сушки и напыления оставались всегда постоянными.

С учётом особенностей клеточных покровов *D. salina*, изначально была выбрана кратковременная (15 мин) обработка суспензии клеток раствором Люголя или глутаральдегидом. По данным световой микроскопии, при таком режиме фиксации *D. salina* теряла подвижность. Однако при использовании раствора Люголя значительная часть клеток округлялась (рисунок 1А), тогда как при фиксировании глутаральдегидом в к. к. 2,5 % клетки в основном сохраняли грушевидную форму (рисунок 1Б).

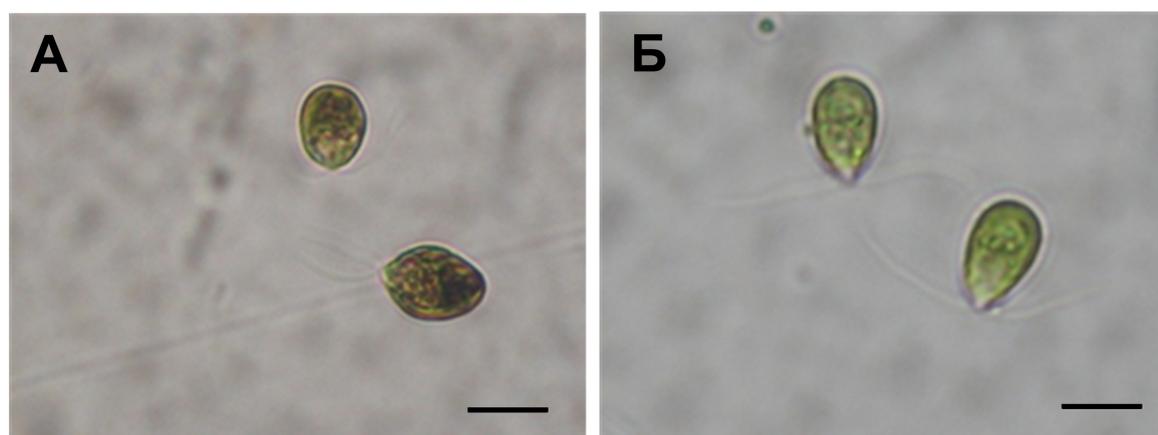


Рис. 1. Морфологические изменения клеток *D. salina* после 15-минутного фиксирования (по данным световой микроскопии): А — раствором Люголя, Б — глутаральдегидом в к. к. 2,5 %. Масштабная линейка соответствует 5 мкм

Однако при просмотре препаратов в СЭМ, при 15-минутной фиксации как раствором Люголя, так глутаральдегидом в к. к. в пробе 2,5 %, наблюдались значительные изменения формы клеток (округление) (рисунок 2А) и деформация клеточной поверхности *D. salina* (рисунок 2Б, 2В), что, вероятно, было связано с последующими этапами пробоподготовки (дегидратация и сушка клеток).

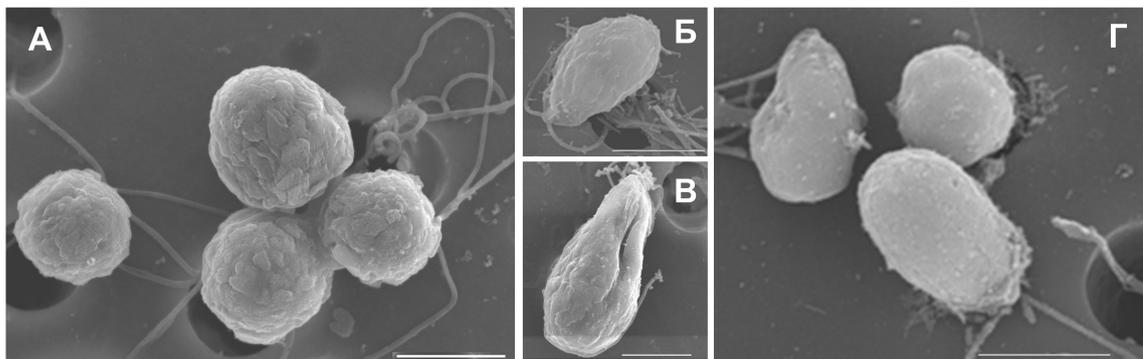


Рис. 2. Электронные микрофотографии деформированных клеток *D. salina* после 15-минутного фиксирования: А — раствор Люголя; Б, В, Г — глутаровый альдегид, к. к. в пробе 2,5 %. Масштабная линейка соответствует 5 мкм

При увеличении времени обработки как ГА, так и раствором Люголя до 60 мин наблюдали значительное снижение деформации поверхности клеток, особенно при обработке ГА.

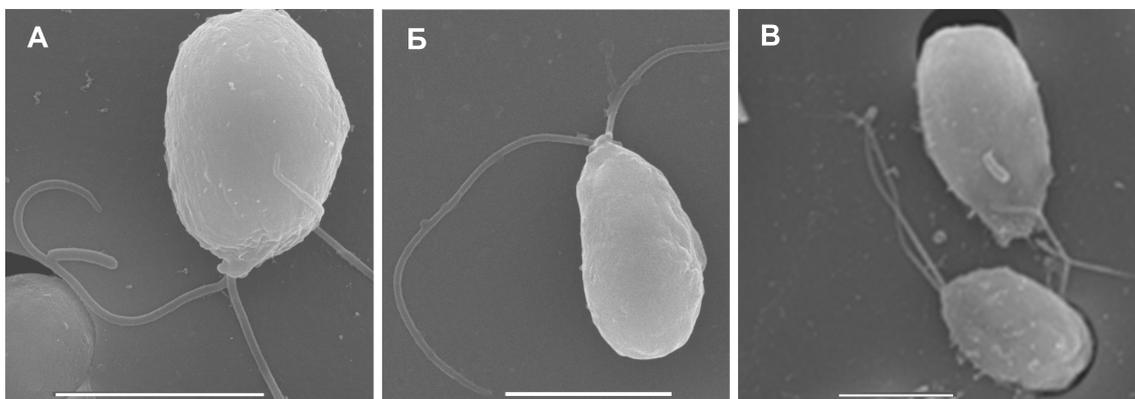


Рис. 3. Электронные микрофотографии клеток *D. salina* при увеличении времени фиксирования до 60 мин: А, Б — глутаральдегид, к. к. в пробе 2,5 %; В — раствор Люголя. Масштабная линейка соответствует 5 мкм

Таким образом, «правило», известное при работе с большинством фиксаторов, используемых в электронной микроскопии (проникновение реагента в образец происходит со скоростью 1 мм ч⁻¹) [Hayat, 1989], не работает в отношении *D. salina*. Несмотря на то что толщина клеток микроводорослей составляет несколько микрометров, нами показано, что кратковременное фиксирование материала (от 15 до 30 мин) было недостаточным и вызывало сильную деформацию клеточной поверхности при дальнейших этапах обработки (рисунок 2).

Подтверждено, что оптимальное время обработки материала фиксирующим реагентом составляет не менее 60 мин (с соблюдением температурных режимов: комнатной температуры для раствора Люголя, 4 °С для ГА), как и указывается в литературе [Bistricki, Munawar, 1978; Pomroy, 1989; Cerino, Zingone, 2006] (рисунок 3).

Однако не всегда рекомендуемая в руководствах конечная концентрация фиксаторов в пробе (для ГА — 2,5 %), а также способ фиксирования материала были идеальными для исследуемых нами водорослей. Оптимальным для *Dunaliella salina* оказалось снижение конечной концентрации ГА в пробе до 1 % (рисунок 4).

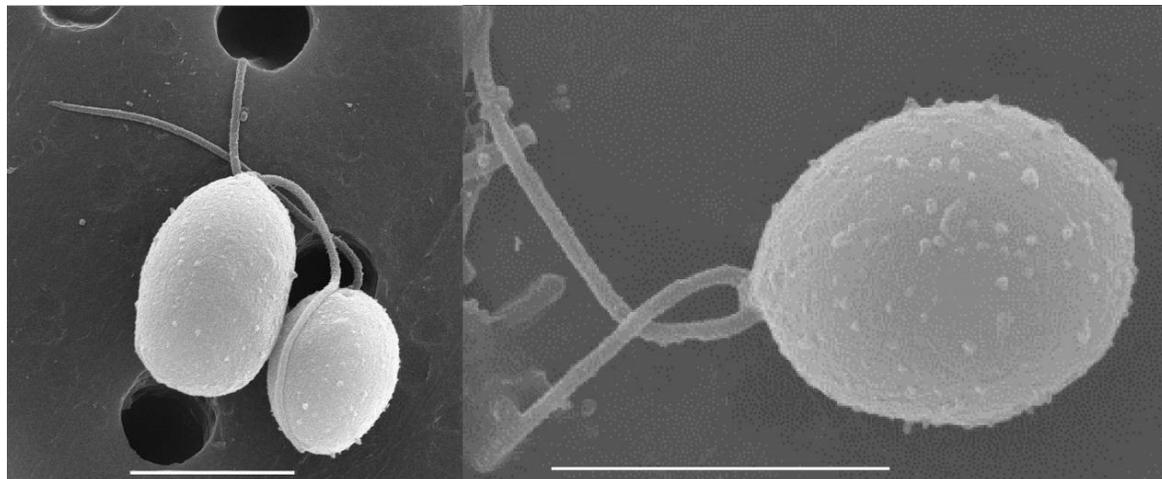


Рис. 4. Электронные микрофотографии, полученные после фиксирования клеток *D. salina* в течение 60 мин глутаровым альдегидом, к. к. в пробе 1 %. Масштабная линейка соответствует 5 мкм

Ещё одним важным моментом оказался этап концентрирования организмов на поликарбонатные фильтры — с помощью шприца-насадки или в фильтровальной воронке. Оказалось, что при чрезмерном разрежении происходило неравномерное их распределение на фильтре (рисунок 5А), затягивание жгутиков в поры фильтра и максимальное концентрирование клеток вокруг пор (рисунок 5Б), кроме того, наблюдали физическую деформацию клеток (рисунок 5В, 5Г). Поэтому для таких «нежных» объектов, особенно снабжённых жгутиками, необходима максимально мягкая фильтрация (разрежение менее 0,2 атм) или даже кратковременное использование вакуума (в случае плотной культуры) и частичный слив излишков пробы. Кроме того, дальнейшую дегидратацию целесообразно проводить не в воронке, а в бюксе или пластиковом планшете (о чём подробно будет сказано далее).

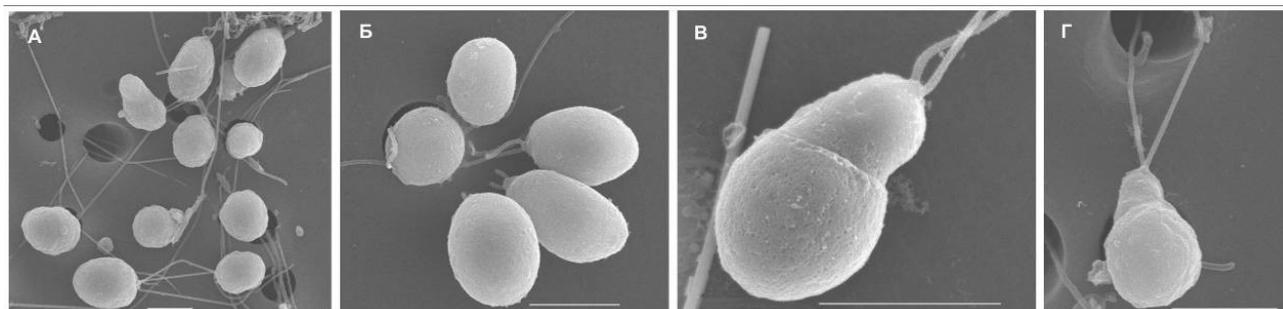


Рис. 5. Клетки *Dunaliella salina* после фильтрации с разрежением более 0,2 атм (фиксация глутаральдегидом 60 мин, к. к. в пробе 1 %, «этанольная» дегидратация): А — неравномерное распределение на фильтре с концентрированием вокруг пор фильтра; Б — затягивание жгутиков в поры фильтра; В, Г — деформация клеток вследствие избыточного разрежения при фильтрации. Масштабная линейка соответствует 5 мкм

При использовании для концентрирования микроводорослей стёкол, покрытых поли-L-лизинном, клетки легко визуализировались, имели необорванные жгутики, однако поверхность клеток выглядела несколько деформированной при использовании раствора Люголя (рисунок 6А), тогда как при фиксировании ГА в к. к. 1 % поверхность была сохранной (рисунок 6Б).

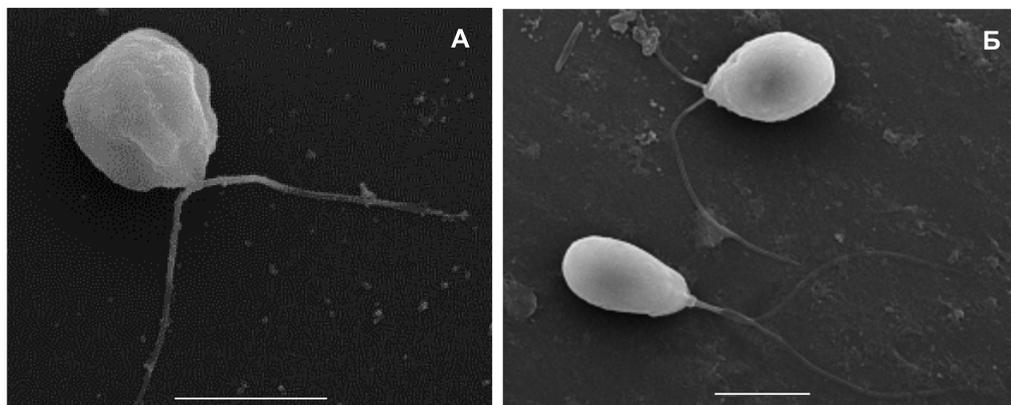


Рис. 6. Электронные микрофотографии *D. salina*, полученные на «лизиновых» стёклах (время фиксирования 60 мин, «этанольная» дегидратация): А — раствор Люголя; Б — глутаровый альдегид, к. к. в пробе 1 %. Масштабная линейка соответствует 5 мкм

Таким образом, при фиксировании *Dunaliella salina* раствором глутаральдегида до конечной концентрации в пробе 2,5 % и особенно при обработке суспензии раствором Люголя при любых способах концентрирования (фильтрация или использование поли-L-лизина) наблюдалась деформация клеточной поверхности. Снижение конечной концентрации ГА в пробе до 1 % оказалось наиболее оптимальным.

Также нами детально был проработан вопрос о способах дегидратации образцов. Оказалось, что достаточно успешным было использование как этанольной проводки в растворах восходящей концентрации, так и их смешанного, «этанольно-ацетонового», обезвоживания. Во втором случае, когда дегидратация заканчивается этанольно-ацетоновой смесью и 100%-ным ацетоном, весь процесс занимает больше времени и проводить его желательно в вытяжном шкафу, используя только стеклянные бюксы. Пипетками Пастера или дозаторами проводится смена растворов.

Полученный протокол (фиксирование в течение 60 мин раствором ГА в к. к. 1 %, разрежение в процессе фильтрации менее 0,2 атм или использование «лизиновых» стёкол) на втором этапе исследований был апробирован на морских криптофитовых одноклеточных водорослях (Cryptophyta) Чёрного моря размером от 7 до 20 мкм.

Рядом исследователей показано, что эти организмы играют важную роль в трансформации неорганического и органического вещества, а также вносят значительный вклад в формирование первичной продукции в водоёмах. Морфологические особенности криптофитовых значительно варьируют в зависимости от комплекса условий в разных местах обитания. Из-за фрагильности клеточных структур при фиксации проб фитопланктона часто происходит разрушение клеток, в результате чего численность и видовое разнообразие криптофитовых недоучитывается. Представители этой группы обладают очень специфическими, характерными покровами, представленными специфическим перипластом, который состоит из плазмалеммы и двух слоёв белкового материала. Под плазмалеммой располагаются четырёх- или шестигранные чешуйки, связанные с интегральными белками плазмалеммы. Именно образуемый чешуйками рельеф на поверхности стенки хорошо виден с помощью СЭМ. Для криптофитовых характерно присутствие на поверхности выстреливающих клеток: крупные эжектосомы располагаются вдоль глоточной выемки,

а мелкие разбросаны по всей поверхности клетки. Каждая эжектосома в интакном состоянии окружена мембраной и содержит две скрученные в цилиндры ленты, которые при выстреливании разворачиваются в длину, а затем сворачиваются продольно, образуя длинные трубки [Clay, Kugrens, Lee, 1999; Cerino, Zingone, 2006; Khanaychenko et al., 2022].

Оказалось, что использование в качестве фиксирующего реагента ГА в конечной концентрации от 1 до 2,5 % было менее успешным для этой группы организмов (рисунок 7А). Лучшая сохранность поверхности клеток наблюдалась в случае использования раствора Люголя при ступенчатой фиксации с разницей от двух до четырёх часов. Причём данная тенденция сохранялась как при осаждении клеток на фильтр, так и в случае использования поли-L-лизина (рисунок 7Б, 7В).

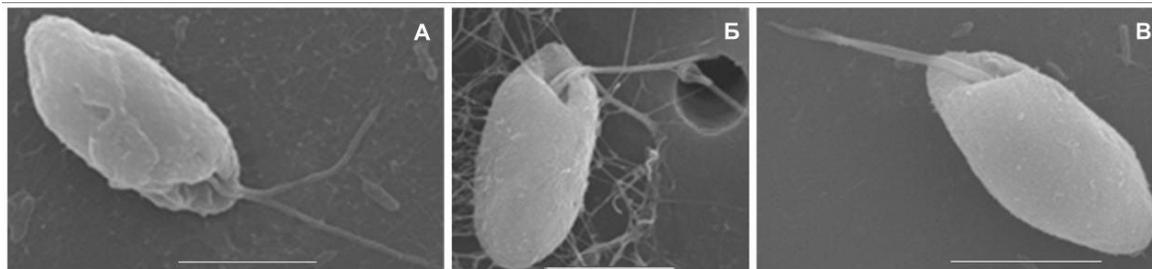


Рис. 7. Электронные микрофотографии Cryptophyta (Чёрное море), (время фиксации 60 мин, «этанольная» дегидратация): А — фиксирование ГА, к. к. в пробе 1 %; Б — ступенчатая фиксация раствором Люголя, осаждение на фильтр; В — ступенчатая фиксация раствором Люголя, осаждение на стекло, покрытое поли-L-лизином. Масштабная линейка соответствует 5 мкм

Использование подобной предмикроскопной подготовки позволило выявить особенности морфологии и поверхностной структуры клеток криптофитовых водорослей: форма асимметричной клетки, длина и локализация субэквалентных жгутиков, расположение и строение вестибулума, строение поверхности перипласта, пор, образованных эжектосомами. Эти результаты указывают на высокую информативность СЭМ для идентификации видов со структурированной клеточной стенкой [Bistricki, Munawar, 1978; Cerino, Zingone, 2006; Khanaychenko et al., 2022].

Таким образом, нами подтверждено, что разнообразные методы подготовки проб для СЭМ, описанные к настоящему моменту в литературе [Морозова, 2013; Nayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016; Dolgin, Adolf, 2019], имеют свои ограничения и преимущества, поэтому неудивительно, что каждому исследователю приходится подбирать индивидуальный протокол в зависимости от вида исследуемого образца.

Для монадных форм микроводорослей при концентрировании материала нами подтверждена успешность фильтрации через трековые мембраны при условии строгого соблюдения режима разрежения (не более 0,2 атм). В случае использования шприца с насадкой необходимо помнить, что фильтрация должна быть очень «нежной», практически капельной. Кроме того, перед сменой растворов (промывочных и/или спиртов восходящей концентрации) необходимо каждый раз перед извлечением поршня из шприца откручивать насадку (в противном случае произойдёт разрыв фильтра с осевшими организмами), затем опять прикручивать насадку с фильтром, наливать раствор и вставлять поршень. Все манипуляции необходимо делать быстро, чтобы не допустить пересыхания образца. Последующую промывку (при необходимости) и дегидратацию образца для монадных форм микроводорослей целесообразнее проводить не в воронке или шприце, а в планшете или бюксе. В таком случае можно избежать травмирующего эффекта фильтрации, а возможный смыв клеток в этом случае не столь критичен, если речь идёт о плотных культурах. Для культур микроводорослей с более прочной клеточной стенкой, а также не столь

«плотных» природных проб концентрирование, промывку и дегидратацию целесообразно осуществлять непосредственно в воронке или шприце во избежание потери организмов.

К неплохому результату приводит использование стёкол, покрытых поли-L-лизинном [Анисимова, 2014; Šťastný, Kouwets, 2012; Kaufnerova, Eliaš, 2013]. Благодаря его адгезивной способности происходит «приклеивание» клеток к поверхности стекла. Данный способ, несомненно, является весьма перспективным при сгущении клеток культур микроводорослей, снабжённых жгутиками, так как позволяет не использовать вакуум в процессе фильтрации или избежать травматического эффекта, наблюдаемого при центрифугировании. Однако многое зависит от плотности культуры, правильности нанесения поли-L-лизина на стекло, правильности хранения готовых стёкол и рабочих растворов, а также последующего аккуратного нанесения образца и деликатности проведения последующих этапов пробоподготовки.

Мы не получили значительной разницы при «этанольной» или «этанольно-ацетоновой» дегидратации, однако первый способ занимает меньше времени и не требует работы в вытяжном шкафу (как в случае окончания обезвоживания 100%-ным ацетоном). Кроме того, во втором случае мы наблюдали сворачивание некоторых типов фильтров (например, Poretics, США), тогда как трековые мембраны производства Объединённого института ядерных исследований (г. Дубна, Россия) не деформировались (к тому же они намного дешевле импортных аналогов).

Необходимо отметить, что при невозможности осуществления всех этапов пробоподготовки в один день возможно хранение образцов до двух недель в растворе фиксатора или в 75%-ном растворе этанола (в процессе дегидратации). Это позволяет накопить пробы, чтобы одновременно просушивать и напылять серию образцов.

Сушка «в критической точке» в наиболее мягком режиме (от 2,5 до 3 часов) и напыление (от 1,5 до 2 мин) соответствовали режимам, обычно рекомендуемым в современных руководствах и публикациях [Морозова, 2013; Hayat, 1989; Murtey, Ramasamy, 2016; Dolgin, Adolf, 2019].

Предложенный протокол предмикроскопной пробоподготовки монадных форм микроводорослей для исследований с помощью сканирующего электронного микроскопа представлен на рисунке 8. Он может быть полезен для изучения поверхностных структур и детализации морфологических характеристик одноклеточных водорослей, не имеющих жёсткой клеточной стенки, и успешно применён при таксономических и биотехнологических исследованиях.

Выводы

Предложено при фиксации микроводорослей, не имеющих жёстких клеточных стенок и снабжённых жгутиками, снижать концентрацию глутаральдегида до 1 % (для *D. salina*) или использовать ступенчатую фиксацию раствором Люголя (для криптофитовых водорослей). При концентрировании монадных форм целесообразна максимально мягкая фильтрация (разрежение менее 0,2 атм), промывку пробы необходимо выполнять только при необходимости, также возможно использование стёкол, покрытых поли-L-лизинном. Дальнейшую дегидратацию необходимо проводить в бюксе или пластиковом планшете, а не в фильтровальной воронке. Показано, что не существует значительной разницы между «этанольной» и «этанольно-ацетоновой» дегидратацией, однако первый способ занимает меньше времени и не требует работы в вытяжном шкафу. Сушка «в критической точке» и напыление соответствовали режимам, обычно рекомендуемым в современных руководствах. При невозможности осуществления всех этапов пробоподготовки в один день или в экспедиционных условиях возможно хранение образцов до двух недель в растворе фиксатора или в 75%-ном растворе этанола (в процессе дегидратации). Предложенный протокол предмикроскопной пробоподготовки монадных форм микроводорослей для исследования с помощью СЭМ может быть полезен при изучении их поверхностных структур, а также детализации морфологических характеристик и успешно применён при таксономических и биотехнологических исследованиях.

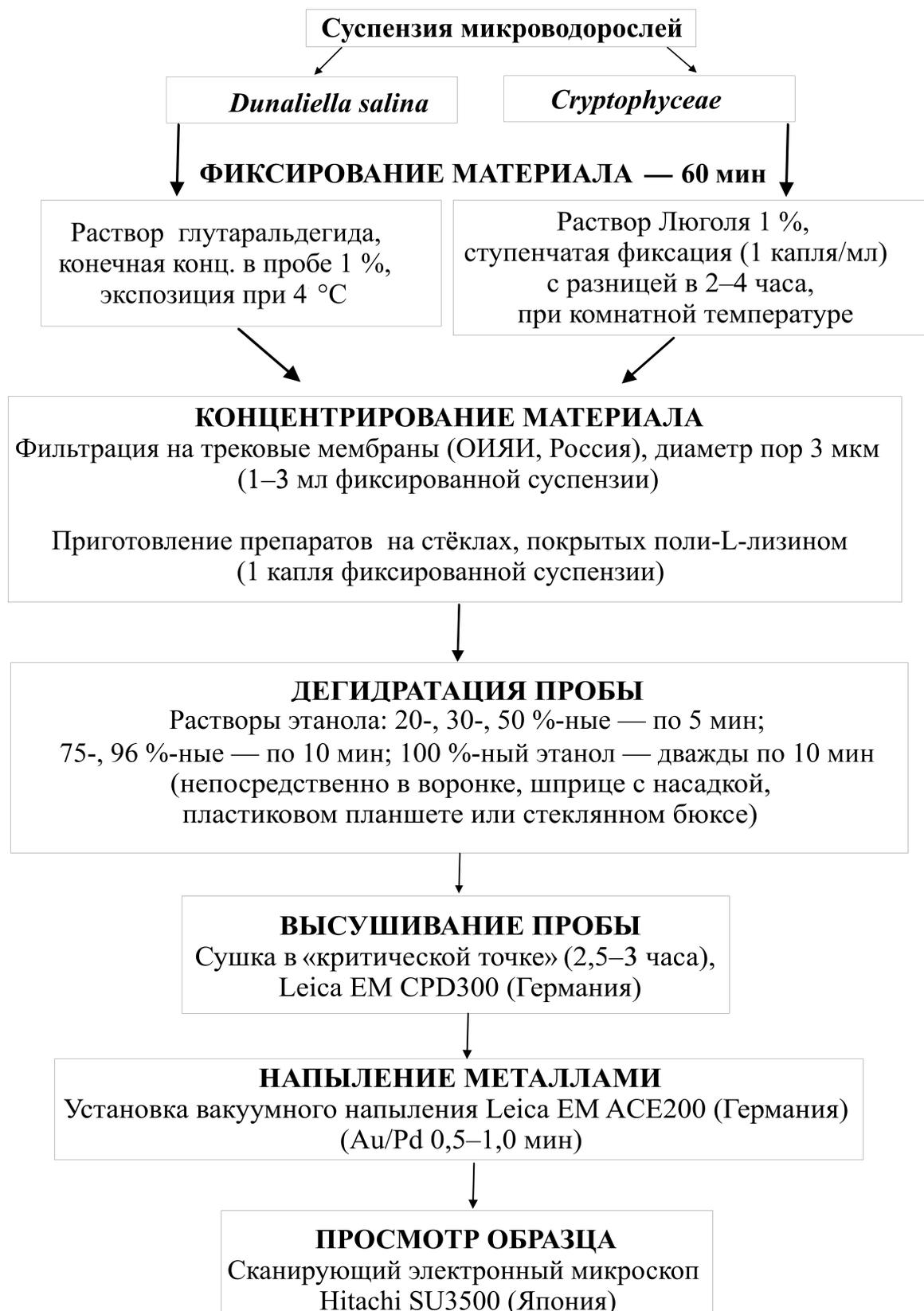


Рис. 8. Оптимизированная схема предмикроскопной пробоподготовки монадных форм микроводорослей для исследования с помощью сканирующего электронного микроскопа

Список литературы

1. Анисимова О. В. Методы подготовки десмидиевых водорослей (Desmidiaceae, Charophyta) для изучения в сканирующий электронный микроскоп // Водоросли: проблемы таксономии, экологии и использование в мониторинге : Материалы III междунар. науч. конф., 24–29 авг. 2014 г., Борок / Рос. акад. наук, Ин-т биологии внутр. вод им. И. Д. Папанина. – Ярославль : Филигрань, 2014. – С. 8–10.
2. Морозова К. Н. Электронная микроскопия в цитологических исследованиях : метод. пособие. – Новосибирск : Изд-во Новосиб. гос. ун-та, 2013. – 85 с.
3. Algal Culturing Techniques / ed. by R. A. Andersen. – Boston : Elsevier [et al.], 2005. – 578 p.
4. Bistricki T., Munawar M. A rapid preparation method for scanning electron microscopy of Lugol preserved algae // Journal of Microscopy. – 1978. – Vol. 114, iss. 2. – P. 215–218. – <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1978.tb00131.x>
5. Bratbak G. Microscope methods for measuring bacterial biovolume: epifluorescence microscopy, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy // Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology / ed. by P. F. Kemp [et al.]. – Boca Raton [et al.] : Lewis Publ., 1993. – P. 309–316. – <https://doi.org/10.1201/9780203752746-37>
6. Cerino F., Zingone A. A survey of cryptomonad diversity and seasonality at a coastal Mediterranean site // European Journal of Phycology. – 2006. – Vol. 41, iss. 4. – P. 363–378. – <https://doi.org/10.1080/09670260600839450>
7. Clay B. L., Kugrens P., Lee R. E. A revised classification of Cryptophyta // Botanical Journal of the Linnean Society. – 1999. – Vol. 131, iss. 2. – P. 131–151. – <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1999.tb01845.x>
8. 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. – URL: <https://www.jyi.org/2019-july/2019/7/1/scanning-electron-microscopy-of-phytoplankton-achieving-high-quality-images-through-the-use-of-safer-alternative-chemical-fixatives>. – Publ. date: July 1, 2019.
9. Hayat M. A. Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications. – 3rd ed. – [Boca Raton, Florida] : CRC Press, 1989. – 469 p.
10. Kaufnerova V., Eliaš M. The demise of the genus Scotiellopsis Vinatzer (Chlorophyta) // Nova Hedwigia. – 2013. – Bd. 97, h. 3/4. – P. 415–428. – <https://doi.org/10.1127/0029-5035/2013/0116>
11. Khanaychenko A. N., Popova O. V., Rylkova O. A., Aleoshin V. V., Aganesova L. O., Saburova M. *Rhodomonas storeatuloformis* sp. nov. (Cryptophyceae, Pyrenomonadaceae), a new cryptomonad from the Black Sea: morphology versus molecular phylogeny // Fottea. – 2022. – Vol. 22, iss. 1. – P. 122–136. – <https://doi.org/10.5507/fot.2021.019>
12. Murtey M. D., Ramasamy P. Sample preparations for scanning electron microscopy – life sciences // Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences / ed. by M. Janecek, R. Kral. – Croatia : InTeck, 2016. – Chap. 8. – P. 161–185.
13. Pomroy A. J. Scanning electron microscopy of *Heterocapsa minima* sp. nov. (Dinophyceae) and its seasonal distribution in the Celtic Sea // British Phycological Journal. – 1989. – Vol. 24, iss. 2. – P. 131–135. – <https://doi.org/10.1080/00071618900650121>
14. Shaish A., Avron M., Ben-Amotz A. Effect of inhibitors on the formation of stereoisomers in the biosynthesis of β -carotene in *Dunaliella bardawil* // Plant and Cell Physiology. – 1990. – Vol. 31, iss. 5. – P. 689–696. – <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077964>
15. Šťastný J., Kouwets F. A. C. New and remarkable desmids (Zygnematophyceae, Streptophyta) from Europe: taxonomical notes based on LM and SEM observations // Fottea. – 2012. – Vol. 12, iss. 2. – P. 293–313. – <https://doi.org/10.5507/fot.2012.021>

PECULIARITIES OF SAMPLE PREPARATION OF SAMPLES OF MONADIC FORMS OF MICROALGAE FOR SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

Rylkova O. A., Borovkov A. B., Khanaychenko A. N., Kharchuk I. A.,
Gudvilovich I. N., Lishaev V. N.

A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation,
e-mail: ol.rylkova@yandex.ru

Abstract: In order to optimize sample preparation of monadic forms of microalgae for scanning electron microscopy (SEM), domestic and foreign guidelines were analyzed. The green microalga *Dunaliella salina* Teodorisco (strain IBSS-2 from the Collection of Hydrobionts of the World Ocean, FIC IBSS) was used to develop the technique, and the protocol was tested on the Black Sea (from Collection of the Black Sea cryptophytes, BS-Cry, IBSS). It was shown that it is reasonable reduce the final concentration (f. c.) of glutaric aldehyde (glutaraldehyde, GA) in the sample to 1 % (for *D. salina*) or to use stepwise fixation with Lugol's solution (for cryptophytic algae) when fixing the material. When concentrating microalgae equipped with flagella, the mildest possible filtration is necessary (vacuum less than 0.2 atm); the sample should be washed only if necessary; further dehydration should be carried out in a bucket or plastic plate. The use of glasses coated with poly-L-lysine led to good results. It has been shown that there is no particular difference between «ethanol» and «ethanol-acetone» dehydration, but that the former method takes less time and does not require operation in a fume cupboard. The «critical point» drying (2.5–3 h) and sputtering (Au/Pd, 0.5–1.0 min), followed the regimes usually recommended in modern manuals. If it is impossible to carry out all stages of sample preparation in one day or in expeditionary conditions, it is possible to store samples for up to two weeks in fixative solution or in 75 % ethanol solution (in the process of dehydration). The proposed protocol for pre-microscopic sample preparation for SEM studies can be useful for studying surface structures and detailing morphological characteristics of unicellular algae equipped with flagella and has been successfully applied in taxonomic and biotechnological studies.

Keywords: microalgae, monadic forms, scanning electron microscopy, sample preparation.

Сведения об авторах

Рылькова Ольга Александровна	кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, ol.rylkova@yandex.ru
Боровков Андрей Борисович	кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель отдела биотехнологии и фиторесурсов, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, spirit2000sev@yandex.ru
Ханайченко Антонина Николаевна	кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, a.khanaychenko@gmail.com
Харчук Ирина Алексеевна	кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, seaferm@yandex.ru
Гудвилевич Ирина Николаевна	кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, gudirina2008@yandex.ru
Лишаев Вячеслав Николаевич	руководитель лаборатории микроскопии, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, me garafik@gmail.com

Поступила в редакцию 28.12.2023 г.
Принята к публикации 01.02.2024 г.