

СКАНИРУЮЩАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ
ПРИ ИССЛЕДОВАНИЯХ НЕКОТОРЫХ ПАРАЗИТИЧЕСКИХ
ПРОСТЕЙШИХ РЫБ

Г. Е. Горюшкин, В. А. Мусселиус

Всесоюзный научно-исследовательский институт прудового рыбного хозяйства,
Рыбное Московской обл.

Предлагаются методы подготовки некоторых паразитирующих на рыбах простейших для сканирующей электронной микроскопии. На примере миксоспоридий и инфузорий обсуждаются вопросы интерпретации данных, полученных с ее помощью.

Биологические исследования в последние годы обогатились новыми возможностями, связанными с появлением сканирующей электронной микроскопии, позволяющей изучать поверхность объектов в широком диапазоне увеличений от $7\times$ до $150\ 000\times$. Высокая разрешающая способность в сочетании с глубиной резко изображаемого пространства позволяет получить изображение поверхности самых различных объектов.

Перспективно применение сканирующей электронной микроскопии в паразитологии. Паразитизм как форма взаимоотношения организмов разного уровня развития вызывает возникновение специализированных структур, морфологически чрезвычайно разнообразных. Морфология структуры определенным образом связана с функцией как самой структуры, так и объекта в целом. Сканирующая электронная микроскопия, давая объемное изображение объекта или его частей, позволяет охватить объект в целом, увязать функции частей с функцией всего организма.

Для исследования были выбраны 3 представителя миксоспоридий и ресничная инфузория *Chilodonella cyprini*. Сведений о применении сканирующей электронной микроскопии в исследованиях паразитов рыб немного (Lom, Weiser, 1972; Lom, 1973, и др.).

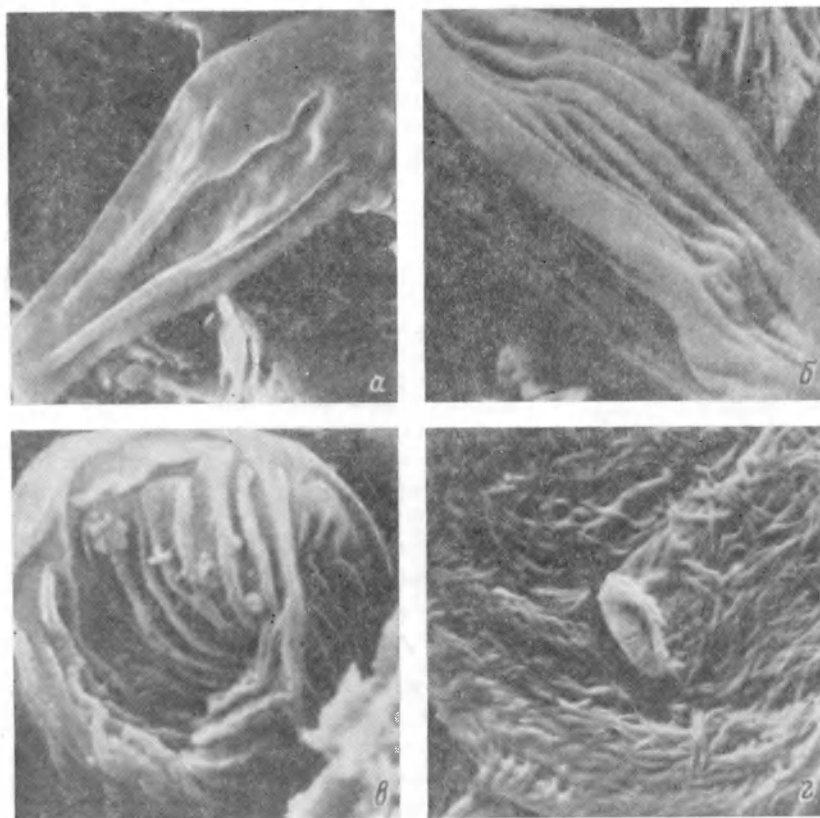
МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Подготовка препаратов велась в режиме, рекомендованном для свободных клеток (Jeol news, 1972). Миксоспоридии *Myxidium rhodei* Leger, 1905 из плотвы *Rutilus rutilus* и *Henneguya psorospermica* Thelohan, 1895 из щуки *Esox lucius* были получены из глицерин-желатиновых препаратов, приготовленных для световой микроскопии. *Chloromyxum truttae* Leger, 1905 выделяли из желчного пузыря семги *Salmo salar*, а *Chilodonella cyprini* из слизи с поверхности тела пестрого толстолобика *Aristichthys nobilis*. Исследования проводили с помощью микроскопа «СWIKscan-100-4».

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рисунке (а) представлена *Henneguya psorospermica*. Общие очертания совпадают с изображением, наблюдаемым в оптической микроскопии. Поверхность створки имеет впячивания, бугры, складки, часть которых,

по всей вероятности, связана с фиксацией. Можно предположить, что 2 бугра в передней части соответствуют полярным капсулам. Впячивание соответствует области расположения амeboидного зародыша. Назначение и происхождение двух складок, идущих вдоль поверхности створки (от полярных капсул до хвостовой части), менее ясно. Шов между створками четко просматривается в отдельных местах в виде тонкой линии. Шовный валик не всюду достаточно четок, что связано с ракурсом съемки.



Сканирующие электронные микрофотографии. Напыление золотом.

a — микоспоридия *Henneguya psorospermica*, увел. 16 000; *б* — микоспоридия *Myxidium rhodei*, увел. 30 000; *в* — микоспоридия *Chloromyxum truttae*, увел. 20 000; *г* — участок вентральной поверхности с ротовым отверстием инфузории *Chilodonella cyprini*, увел. 15 000.

Хвостовой отросток изогнут вниз, и этот изгиб обусловлен пластичностью отростка по крайней мере от зоны контакта со створкой.

На рисунке (*б*) показана спора *Myxidium rhodei*. Хорошо заметна продольная складчатость поверхности, которая отмечается в виде полос и в световой микроскопии. Складчатость имеет регулярный характер и располагается с двух сторон от средней более толстой складки. Толстую складку следует принять, видимо, за шовный валик, соединяющий 2 створки. Единственным возражением против этого предположения является отсутствие шва. Возможные причины этого явления обсуждаются ниже. Обращает на себя внимание тот факт, что наличие складок не исключает образование впячиваний. При этом складки следуют рельефу впячиваний.

На рисунке (*в*) показана спора *Chloromyxum truttae*. Общая форма совпадает с данными световой микроскопии. Видимые в световой микроскоп ребрышки в действительности представляют собой тонкие складки, которыми богата поверхность споры. Рисунок складок весьма разнообразен. Шовный валик хорошо просматривается вместе со швом. Поверхность

каждой створки разделена дополнительным валиком на 2 части; в расчете на целую створку каждая такая часть — четверть целой. Каждая «четверть» имеет впадину, захватывающую приблизительно половину поверхности. Рисунок складок во впадине отличается от рисунка остальной части и, возможно, не зависит от нее. В угловой части поверхности впадины, между шовным и дополнительным валиками, в каждой четверти имеется складка с бульбообразным расширением, в центре которого имеется впадина пуговицеобразной формы. Вероятно, это пробочка, закрывающая отверстие полярной капсулы. Число (4) и расположение бульбообразных расширений свидетельствуют в пользу сделанного предположения.

На рисунке (з) показан участок вентральной поверхности *Chilodonella cyprini* с ротовым отверстием. Видны многочисленные реснички, имеющие в отдельных местах упорядоченное расположение. Цитостом имеет форму воронки с внутренними складками. Базальный конец ресничек не виден, поэтому способ крепления их к поверхности клетки неясен.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на простоту и наглядность получаемых в сканирующей микроскопии изображений, необходимо учитывать весь комплекс факторов, образующих это изображение. По существу каждая микрофотография представляет собой результат физического эксперимента над химически обработанным препаратом. Поэтому при интерпретации полученных данных необходимо учитывать влияние всех ступеней обработки от взятия материала до обработки фотоснимков. Основной принцип интерпретации заключается в том, что получаемая информация является лишь отражением истинной, которая прошла через искажающее воздействие приборов и способов обработки.

Образование изображения в сканирующем электронном микроскопе происходит за счет вторичных электронов, выбиваемых с поверхности объекта тонким электронным лучом. Вторичные электроны попадают на специальный детектор, который генерирует сигнал, преобразуемый затем в телевизионное изображение. Электронный луч скользит по поверхности объекта (сканирует), и там, где упал первичный луч, выбиваются вторичные электроны. Их количество и энергия зависят от свойств вещества объекта и рельефа поверхности. Благодаря этому можно наблюдать поверхность объекта. Углубления и впадины будут выглядеть более темными, чем выступы. Однако свойство веществ поверхности оказывает на изображение не меньшее влияние, чем рельеф. Если вещество поверхности плохо генерирует вторичные электроны, то пятно из такого вещества будет казаться «ямой» на фоне вещества, легко образующего вторичные электроны. Поверхность, обладающая плохими электропроводящими свойствами, будет выглядеть более ярко, что связано с накоплением заряда на ней. Яркость может быть столь большой, что происходит «забывание» деталей объекта и он выглядит как светлое пятно.

Это особенно часто происходит при наблюдении биологических объектов, которые в дегидратированном состоянии обладают плохой электропроводностью. Для устранения этих эффектов материал вместе с подложкой напыляют тонким слоем металла в вакууме. В результате электропроводность фона и образца выравнивается, и в построении изображения ведущую роль начинает играть рельеф поверхности. Пленка металла выполняет и другую положительную роль, отводя тепловую энергию электронного пучка и защищая объект от разрушения.

Такая подготовка имеет свои отрицательные стороны. Разрешение деталей зависит от толщины слоя напыляемого металла. Детали объекта становятся больше по размерам, и это увеличение трудно контролировать. Детали объекта, которые меньше толщины слоя металла могут не выявляться на изображении, что не говорит об их отсутствии. Особенно сильные потери деталей происходят при расположении объекта на плоской поверхности. Технология напыления приводит к незначительному сглажи-

ванию рельефа, которого достаточно, чтобы скрыть мелкие детали, например нити. Положение усложняется еще и тем, что слой металла, например золото, может образовывать собственные трещины, которые видны при больших увеличениях и сильно мешают выявлению деталей объекта, имеющих более мягкие очертания. Разрешение деталей зависит также от ракурса съемки и способов обработки фотоматериала. Вероятно, эти причины привели к тому, что шов на шовном валике *Myxidium rhodei* (см. рисунок, б) не просматривается. Вполне возможно, что дополнительный валик у *Chloromyxum truttae* (см. рисунок, в) также имеет шов. Однако шов может не выявляться и в том случае, если он имеет уплощенный рельеф.

Вопрос о влиянии вакуума на получаемое изображение требует отдельного рассмотрения. Вкратце он заключается в следующем. При химической обработке препарата часть жидкости может остаться внутри и при помещении в вакуум начнет испаряться, деформируя поверхность объекта. Микроспоридии считаются объектами с жесткой структурой, т. е. имеют твердое поверхностное покрытие. Поэтому при помещении в вакуум они могут деформироваться, в частности образовывать наблюдаемые нами складки. Такая деформация говорила бы о некоторой доле эластичности в створках споры. Исследованные объекты, однако, имеют подобную исчерченность и в световой микроскопии, где они не подвергаются воздействию вакуума. Вопрос все же не может быть решен однозначно без дополнительных исследований. На рисунке (а) видно, что отросток *Henneguya psorospermica* изогнут в плоскости, перпендикулярной плоскости шовного валика, и, судя по фотографии, этот изгиб вызван пластической деформацией во время химической обработки.

Сильным мешающим фактором является пленкообразование на поверхности объекта во время подготовки. Особенно сильно это проявляется при фиксации объектов, обитающих в слизи. Отмывка слизи буферным раствором не дала эффекта и, кроме того, приводила к гибели хилодонелл (сморщивание, сворачивание). Фиксация в нативной жидкости неизменно давала пленку, которая, видимо, образовывалась за счет полимеризации слизи глютаровым альдегидом. После некоторых неудачных попыток удалось разработать удовлетворительную методику фиксации, названную «глютаровый шок». К соскобу слизи на часовое стекло добавляли несколько капель воды и после выхода хотя бы части хилодонелл из комка слизи добавляли 1—2 капли 25%-го глютарового альдегида. После полу-минутной выдержки добавляли тройное количество чистой воды или буфера и пипеткой отбирали хилодонелл в другое часовое стекло, где промывали их еще раз чистой водой. Сворачивания хилодонелл не происходило, образования пленки тоже не наблюдали. По-видимому, слизь полимеризовалась, и хилодонеллы отмывались от нее током воды. Высокая концентрация глютарового альдегида вызывала мгновенную остановку жизнедеятельности и фиксацию структур, не допуская посмертных изменений. Предложенный метод подготовки некоторых паразитических простейших рыб для сканирующей электронной микроскопии дал вполне хорошие результаты.

Л и т е р а т у р а

- L o m J., W e i s e r J. 1972. Surface pattern of some Microsporidian spores as seen in the Scanning Electron microscope. Folia parasitologica, Praha, 19 : 359—363.
L o m J. 1973. The adhesive disc of Trichodinella epizootica — ultrastructure and injury to the host tissue. Folia parasitologica, Praha, 20 : 193—202.

SCANNING ELECTRON MICROSCOPY IN STUDIES OF SOME PARASITIC PROTOZOA OF FISHES

G. E. Gorjushkin, V. A. Musselius

S U M M A R Y

It is expedient to use the scanning electron microscopy for studies of parasitic Protozoa of fishes. The structure of myxosporidians (*Henneguya psorospermica*, *Myxidium rhodei*, *Chloromyxum truttae*) and *Chilodonella cyprini* was analysed. Microphotos taken by «CWIKscan-100-4» are given. The technique of the preparation of the object for scanning microscopy with regard for its structure is discussed.