

В.С.Абуkenова, Д.Д.Дерр

*Карагандинский государственный университет им. Е.А.Букетова
(E-mail: abu-veronika@yandex.ru)*

Анализ и определение инфузорий (*Ciliophora*) при помощи проекционного микроскопа

В статье приведены сведения об эффективности методик определения микроскопических беспозвоночных, обитающих в водных средах. Оценены возможности исследования представителей типа «инфузории» с помощью программы обработки изображения AxioVision. Эффективность практических методов применения программного обеспечения и прилагающих программ дается на примерах редактирования, изменения яркости, контрастности, подавления шумов, использования специальных фильтров. Оценены возможности изучения анатомо-морфологической организации микроскопических беспозвоночных в учебном процессе.

Ключевые слова: инфузории ресничные, сосущие, брюхогесничные, равноресничные, кругоресничные, графический редактор Adobe Photoshop.

Еще в 1786 г. датский зоолог О.Ф.Мюллер описал свыше 370 видов микроскопических организмов в своем труде «Animalcula infusoria...» Но и сегодня, имея оборудование, абсолютно превосходящее примитивные микроскопы прошлого, мы знаем далеко не все о жизни огромного мира микроскопических животных. До сих пор вопрос о классификации простейших является одним из самых сложных в современной систематике. Все предложенные на данный момент способы разделения протистов на таксономические группы имеют больше недостатков, чем достоинств. В то же время многие микроскопические организмы все чаще используют для биоиндикации водной и почвенной среды. Поэтому исследования микрофауны относятся к традиционным направлениям научной деятельности большинства университетов ближнего и дальнего зарубежья. Эти работы посвящены изучению различных аспектов морфологии, биоразнообразия, систематики, биологии, экологии и молекулярной филогении голых и раковинных амёб, пеллобионтов, фораминифер, инфузорий, а также различных групп круглых червей и тардиград.

Основной концепцией исследований сегодня является сбалансированное сочетание традиционных (рутинная световая микроскопия, ультраструктура, изучение жизненных циклов) и современных (конфокальная микроскопия, молекулярная биология и экология) методов исследования микроэукариот. Большую роль в изучении группы играет материальная база исследований. Это и оборудование для культивирования, и цифровые микроскопы для проведения светомикроскопических исследований, подготовки материала для электронной микроскопии на уровне ведущих европейских университетов. Фундаментальные знания о биоразнообразии, систематике и биологии микрофауны позволяют участвовать в разработке современных проектов по изучению механизмов амёбозидного движения, молекулярной экологии и проблемы вида, индикации загрязнения среды и т.д. Поэтому отработка приемов исследования и организация планомерного и поэтапного изучения микроэукариот остаются актуальными составляющими традиционной университетской науки.

Данное исследование имеет практическую значимость, так как освоение практических методов применения подобранного программного обеспечения вместе с цифровой микроскопией дает возможность формирования базы данных для изучения анатомо-морфологической организации микроскопических беспозвоночных в учебном процессе, составления кадастра видов беспозвоночных. Еще один важный аспект — эстетический. Микроскопические объекты, которые мы не можем увидеть в жизни, могут быть не только полезными. Мир малых величин открывает неожиданную красоту. В увеличенных фотоизображениях возникают новые сочетания линий, форм и красок: симметричное строение крошечных ресничек, сложная фактура поверхности клетки и т.д. Поэтому владение мастерством микрофотографии — несомненный плюс для биолога любого профиля: и педагога, и исследователя [1].

Материалы и методы исследования

Исследование морфологической организации проводилось по фото- или видеосъемке движения объектов в капле воды, при увеличении в 200–400 раз с помощью АИ на основе поляризационного

лабораторного микроскопа «VinaLogic 6XB-PC», предназначенного для наблюдения, фотографирования и видеопроекции прозрачных объектов в проходящем поляризованном и обычном свете.

Методика анализа и обработки изображений, использованная в нашем эксперименте, включает в себя ряд последовательно выполняемых функций:

- ввод изображений препарата, приготовленного на предметном стекле (ввод серий кадров, регистрация входных видеоснимков);
- редактирование полученных снимков (редактирование, изменение яркости, контрастности, морфологические операции, подавление шумов, специальные фильтры и т.д.);
- систематизация зоологических объектов [2, 3].

Основными программами послужили «Camtasia Studio» и графический редактор Adobe Photoshop. Чтобы улучшить визуальное восприятие и проанализировать изображение исследуемых объектов использовался фильтр для устранения «шумов» TopazDeNoise 5.

Для проявления мелких деталей строения органелл, ресничек и цирр, выраженности мембран, подсчета и уточнения места расположения ребер, щетинок и рядов цирр, являющихся важными систематическими признаками инфузорий, использовался фильтр «Увеличение резкости».

Для восстановления исходных цветов полученного изображения, искаженного при вводе в компьютер из-за недостаточного освещения, использовался фильтр «Автотон».

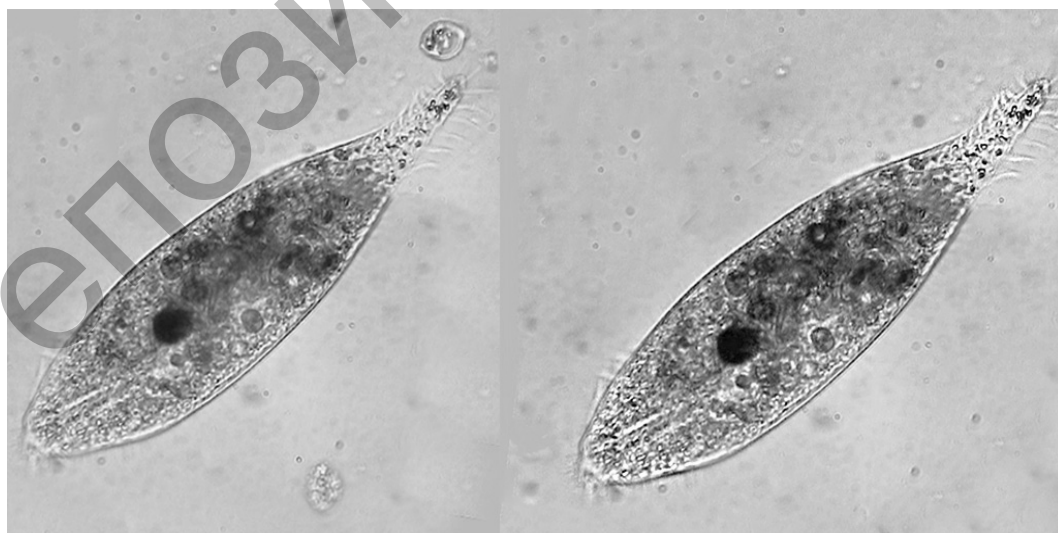
Чтобы выявить отличия форм, размеров и топологии объектов, использовалось сравнение наложением двух изображений друг на друга [3].

Обозначение зон и оформление надписей на изображении проводилось путем нанесения графических символов — текста, стрелок, геометрических фигур и т.д. Чаще всего эти операции были необходимы при сохранении изображений в базе данных, как «метки на память».

Для съемки внешнего вида микроскопических животных с целью визуализации образцов и их первичного поверхностного анализа использовалось программное обеспечение «CamtasiaStudio». Оно позволило производить быстрые и точные снимки высокого разрешения, а также запись видеоклипов. В результате проведенного исследования было сделано более 250 фотографий и более 60 видеозаписей с изображением представителей микрофауны.

Результаты и их обсуждение

Для определения инфузорий применялся фильтр «Увеличение резкости» для лучшей видимости отдельных частей объекта (органелл, сократительных вакуолей, фибрилл, отходящих от ротовых кинет, и т.п.). Использовалась коррекция «Цветовой тон/Насыщенность». На рисунке 1 представлены снимки инфузории *Amphileptus acygnus* до и после обработки.



До обработки

После обработки

Рисунок 1. Инфузория *Amphileptus acygnus*

Проведенный анализ позволил отнести эту инфузорию, имеющую характерную ланцетовидную форму с узким задним концом тела и вытянутым хоботковидным антероном, к следующему типу:

Отряд *Pleurostomatida* (Schewiakoff, 1896)

Подотряд *Amphileptina* (Jankowski, 1967) — рот окаймлен правой и левой ротовыми кинетами, составленными дикинетидами (дисомами); цилиатура правой стороны тела — с бисекантой.

Семейство *Amphileptidae* (Butschli, 1889). Имеются 2 ротовые кинеты, по одной правее и левее ротовой щели; сомакинеты правой стороны в своей верхней части укорочены и сходятся парами зеркально вдоль длинного бисекантного шва вдали от ротовой щели, идущего по оси тела медиально. Обозначение ротовых кинет — ряды P1 на левой стороне тела, P2 — на правой.

Род *Amphileptus* (Ehrenberg, 1830)

Типовой вид *Acuynus*. По обозначению Фроментеля (Fromentel, 1874), крупный род с быстро растущим числом видов, одинаково частых в пресной воде и в море.

Типичные амфилептусы — некрупные плоские ланцетовидные формы с узким задним концом тела и вытянутым хоботковидным антероном, с 2 ядрами, большим числом вакуолей в 1–2 краевых рядах, с длинной ротовой щелью и массой фибрилл, отходящих от ротовых кинет. Ротовая цилиатура — это специализированные верхние части 2 сомакинет, идущих вдоль вентрального ребра справа и слева; ниже рта это гаплокінеты (только с моносомами), как и все остальные ряды, а на уровне рта они, не прерываясь, состоят из тесно сближенных дикинетид (дисом), несущих особо длинные реснички; это имитация ротовых мембран высших цилиат. У большинства видов 2 ядра, у *A. carchesii* — 4. Сомакінеты многочисленны на обеих сторонах тела, бисекантный шов четкий (по традиции у плеуростомат обозначается термином «spica»); левосторонние ряды с короткими щетинками. Тигмон расположен на левой стороне на уровне перистома, вдоль дорсального ребра плоского тела; это один специализированный ряд дисом [3].

Для проявления мелких деталей строения органелл, ресничек, выраженности ротового отверстия и глотки использовался фильтр «Увеличение резкости» (рис. 1).

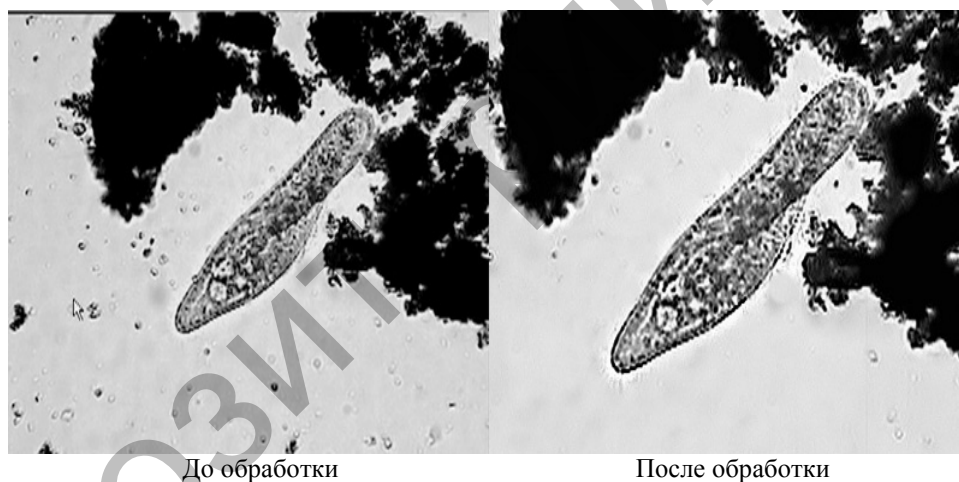


Рисунок 2. Инфузория *Paramecium caudatum*

Проведенный анализ позволил отнести эту инфузорию, имеющую хорошо выраженное ротовое отверстие и характерную форму туфельки, к классу Ресничных, роду *Paramecium*.

Отряд *Hymenostomatida*

Семейство *Parameciidae*. Предротовое углубление в виде продольного желобка представляет собой настоящий перистом, занимающий почти две третьих длины тела.

Вид *Paramecium caudatum* (Ehrenberg, 1838). Задний конец тела конусовидно сужен. Длина тела 120–300 мкм. Встречается во всякого рода загрязненных пресных водоемах, в планктоне и сапропеле, а также в активном илу. Все цитоплазматическое тело инфузории отчетливо распадается на 2 слоя: наружный — более светлый (эктоплазма) и внутренний — более темный и зернистый (эндоплазма). Самый поверхностный слой эктоплазмы образует наружную очень тонкую и вместе с тем прочную и эластичную оболочку — пелликулу, которая играет важную роль в сохранении постоянства формы тела инфузории. В центре тела инфузории (на уровне перистома) помещается большое массивное ядро яйцевидной или бобовидной формы. Активное движение туфельки зависит от работы большого количества тончайших волосковидных придатков — ресничек, которые покрывают все тело инфузории. Количество ресничек у одной особи инфузории туфельки равняется 10–15 тыс. [4].

Для проявления мелких деталей, строения органелл, ресничного аппарата, выраженности мембран использовался фильтр «Увеличение резкости». Удалены ненужные объекты для наилучшего визуального анализа, указанные на рисунке стрелкой. Для восстановления исходных цветов полученного изображения, искаженных при вводе в компьютер из-за недостаточного освещения, использовался фильтр «Автотон» (рис. 2).

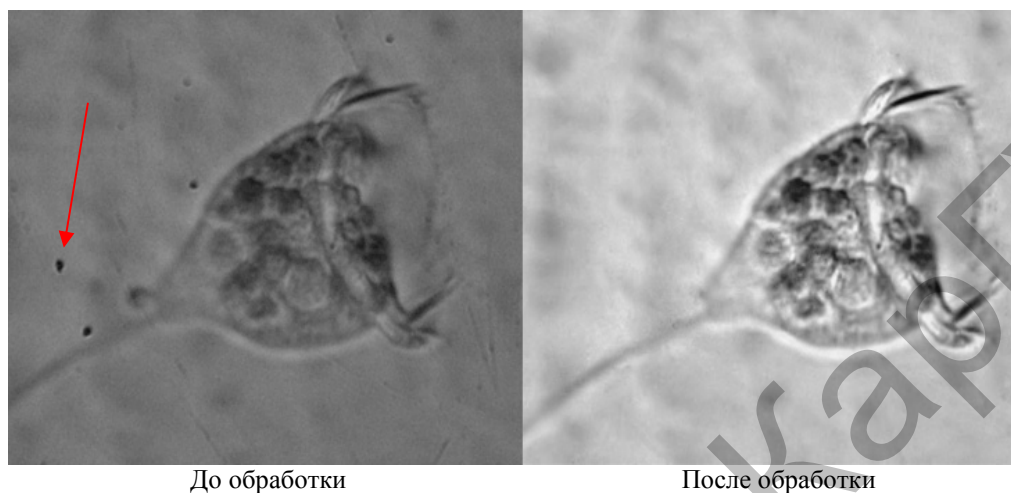


Рисунок 3. Инфузория *Vorticella convallaria*

Проведенный анализ позволил отнести эту инфузорию, имеющую хорошо выраженную форму правильного колокольчика, а также отдельного стебелька, к классу Ресничных, отряду *Peritrichida*.

Подкласс Peritricha — Кругоресничные

Отряд Peritrichida

Семейство Vorticellidae. Напоминает изящный цветок вроде колокольчика или ландыша, сидящий на длинном стебельке, который своим концом прикреплен к субстрату. Большую часть жизни сувойка проводит в прикрепленном к субстрату состоянии. Ресничный аппарат расположен лишь по краю ротового (перистомального) диска.

Вид Vorticella convallaria (Linne, 1758). Тело имеет форму правильного колокольчика, расширенного в области перистома. Длина 50–95 мкм.

Прикрепляется на водной растительности, насекомых, ракообразных, моллюсках. Встречается в загрязненных водоемах, в активном илу. Сувойка способна резко сокращать стебелек, который в долю секунды закручивается штопором. Одновременно с этим сокращается и тело инфузории: перистомальный диск и мембраны втягиваются внутрь и весь передний конец замыкается [4]. Для восстановления исходных цветов полученного изображения, искаженных при вводе в компьютер из-за недостаточного освещения, использовался фильтр «Автотон» (рис. 3).

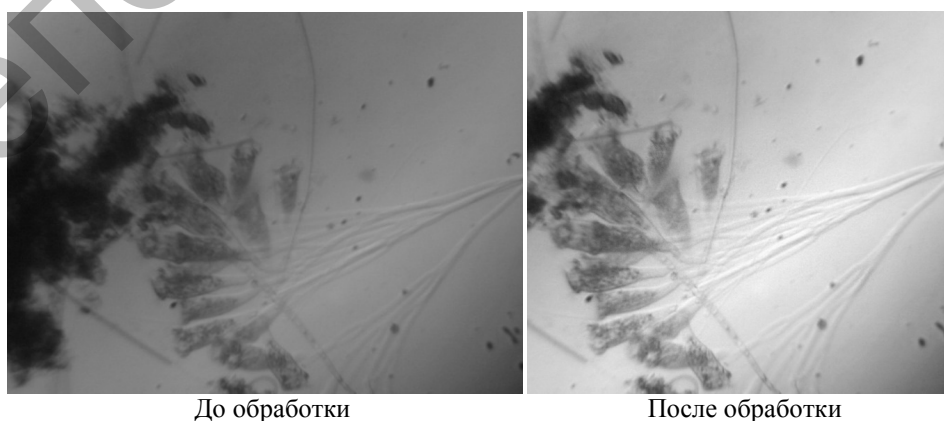


Рисунок 4. Колония *Carchesium polypinum*

Проведенный анализ позволил определить систематическое положение этой инфузории: принадлежность к классу ресничных, роду *Carchesium*.

Pod Carchesium (Ehrenberg, 1830). Сократительная нить стебелька непрерывная, отдельные ветви колонии сокращаются синхронно.

Bud Carchesium polypinum (Linne, 1758). Встречается в активном илу, в планктоне озер, прудов и рек. Олигосапроб. Длина тела около 55 мкм, стебелька — 140–400 мкм. При сокращении стебелька образуется лишь одна широкая петля. Прикрепленная к субстрату форма. Колония с многочисленными индивидами разветвляется зонтикообразно. Зооиды имеют форму колокольчика, несколько вытянутого в задней части. Ма скрюченный, длинный. Длина зооидов 100–125 мкм [5].

Чтобы улучшить визуальное восприятие и проанализировать изображение этой инфузории использовался фильтр для устранения «шумов» TopazDeNoise 5. Использовалась коррекция «Цветовой тон/Насыщенность...».

Удалены ненужные объекты, мешающие визуальному анализу. На исходном изображении указаны стрелкой (рис. 4).

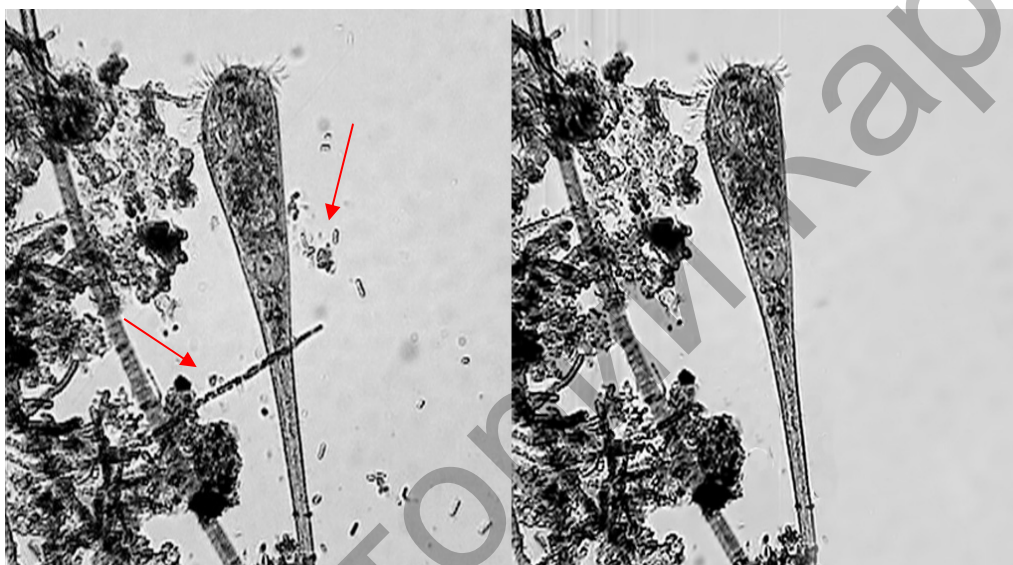


Рисунок 5. *Stentor roeseli*

Проведенный анализ позволил определить систематическое положение этой инфузории: принадлежность к классу Ресничных, отряду *Heterotrichida*.

Подкласс Spirotricha — *Спиральноресничные*

Отряд Heterotrichida

Семейство Stentoridae. Тело широкое, конусовидное, не сплющено, сократимое при раздражении или фиксации, плавно расширяется к вершине, постесома ножковидная, нередко вытянутая; кинеты многочисленные, продольные. Межкинеты широкие, с массой гранул, обычно с пигментом; есть ярко-зеленые, синие, красные, малиновые виды.

Несколько видов с симбионтными зоохлореллами.

Перистом, широко открытый апикально, ведет в инфундибулум. Спиральная полоса из сотен мембранелл проходит по краю перистома и закручена в предротовой воронке; ундулирующая мембрана короткая, обычно не заметна, глубоко погружена. Ядра разного типа, но при делении ядро всегда сферическое, нодулы сливаются вместе.

Большинство видов встречаются в бентосе и перифитоне пресных вод. Прикрепляются сократимой ножкой к субстрату, а также могут вести свободный образ жизни, не прикрепляясь, так называемая бродяжка (рис. 5).

У части видов ножка секретирует тонкий гибкий слизистый домик, покрытый детритом (*S. lorincatus*, *S. muelleri*, *S. roeseli*).

Bud Stentor roeseli (Ehrenberg, 1835). Неокрашенная форма. Размер в вытянутом состоянии до 1,2 мм [5].

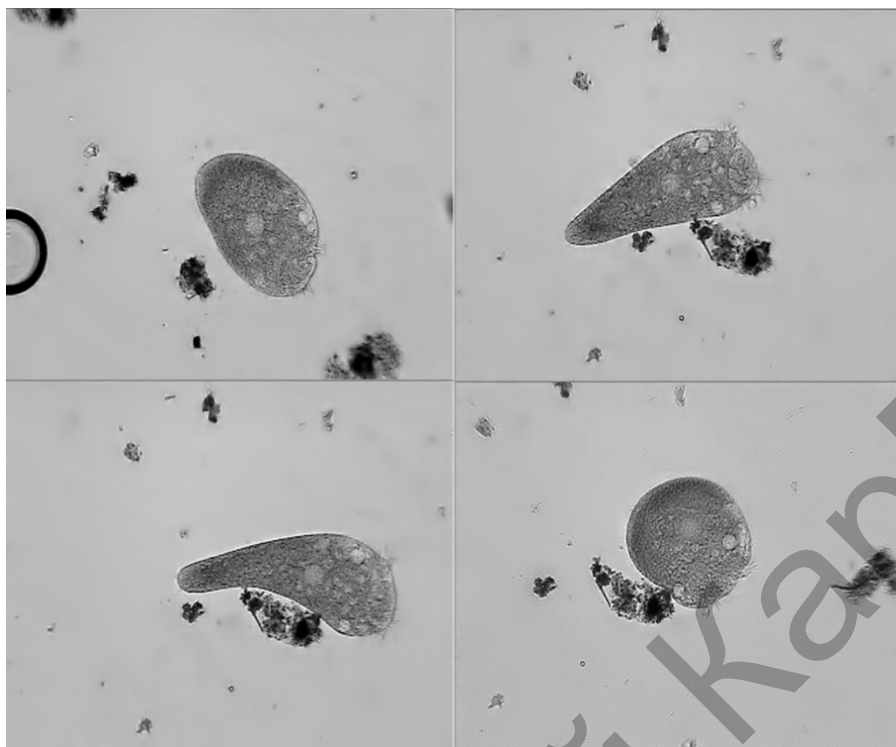


Рисунок 6. *Stentor roeseli*. Изменение формы тела и образование стадии бродяжки

Чтобы улучшить визуальное восприятие и проанализировать изображение этой инфузории, использовался фильтр для устранения «шумов» TopazDeNoise 5. Применялась коррекция «Цветовой тон/Насыщенность...». Удалены ненужные объекты, мешающие визуальному анализу. На исходном изображении они указаны стрелкой (рис. 6).

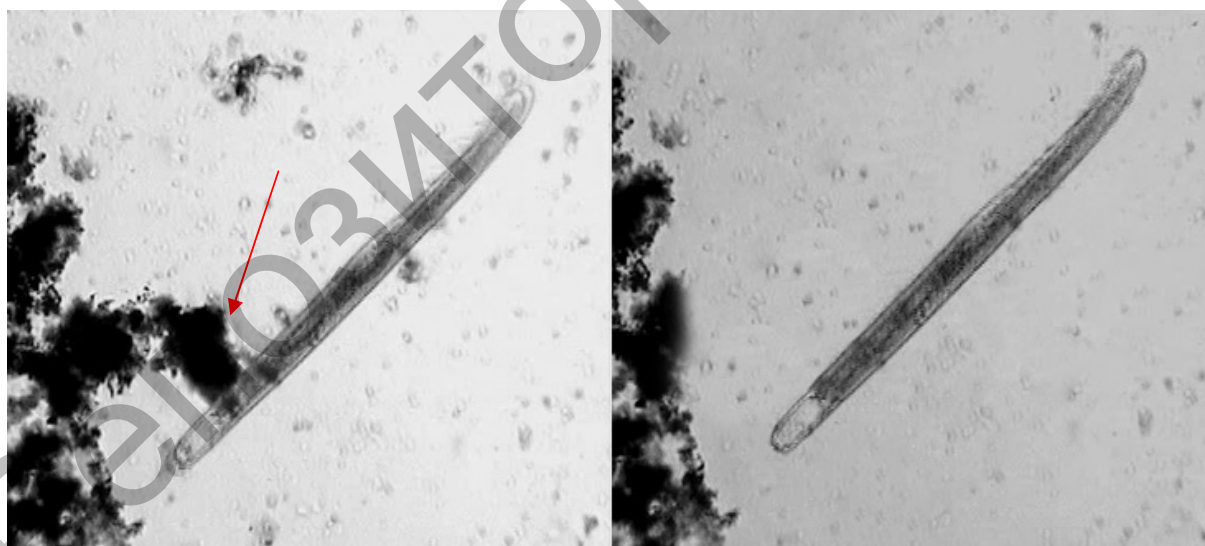


Рисунок 7. *Spirostomum minus*

Проведенный анализ определил систематическое положение этой инфузории: принадлежность к классу Ресничных, отряду *Heterotrichida*.

Семейство Spirostomidae. Тело имеет лентовидную форму, сплюснутую дорсо-вентрально.

Род Spirostomum (Ehrenberg, 1833)

Вид (Ehrenberg, 1833). Отношение длины тела к ширине 20:1. Перистом едва достигает середины тела. Длина 500–800 мкм [3].

Чтобы улучшить визуальное восприятие и проанализировать изображение этой инфузории, использовался фильтр для устранения «шумов» TopazDeNoise 5. Для проявления мелких деталей строения органелл, ресничек и цирр, выраженности мембран, подсчета и уточнения места расположения ребер, щетинок и рядов цирр использовался фильтр «Увеличение резкости» (рис. 7).

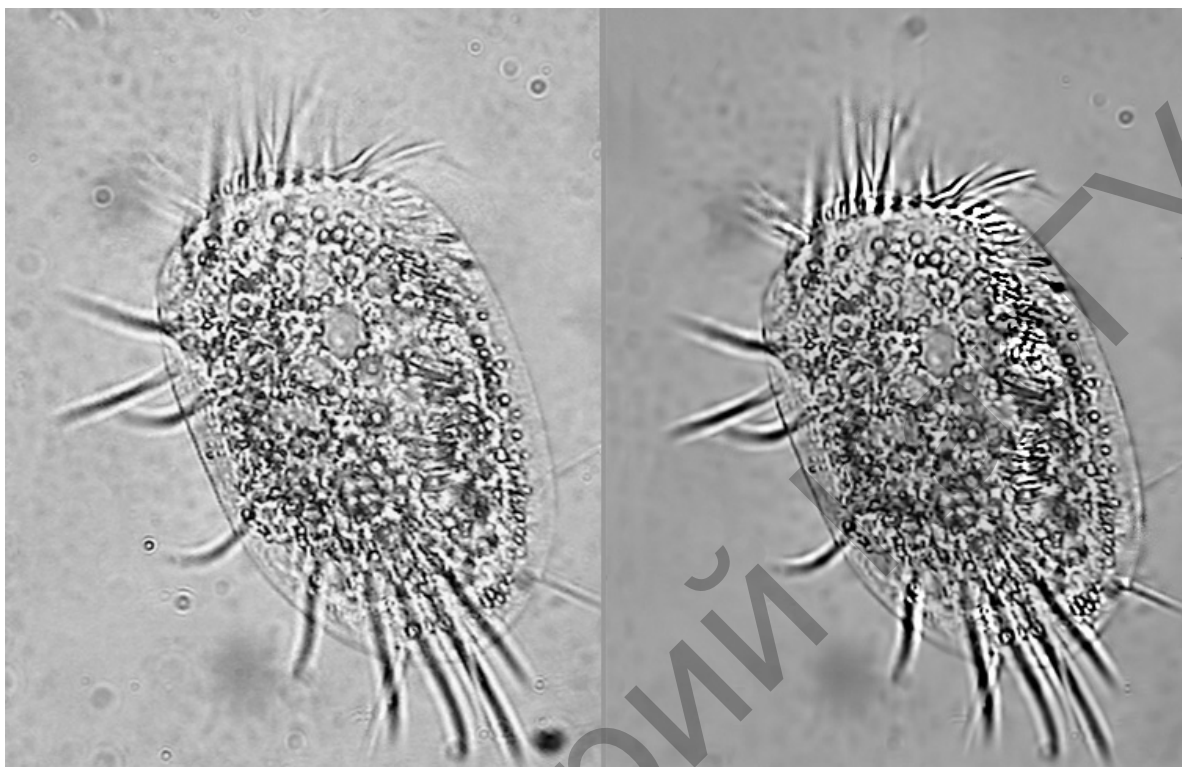


Рисунок 8. *Euplotes patella*

Данные анализа подтвердили систематическое положение этой инфузории: принадлежность к классу Ресничных, отряду Брюхоресничных.

Отряд Нупотрича — Брюхоресничные. Боковые и центральные ряды цирр сильно редуцированы. Вентральных цирр 2–3, поперечных — всегда 5.

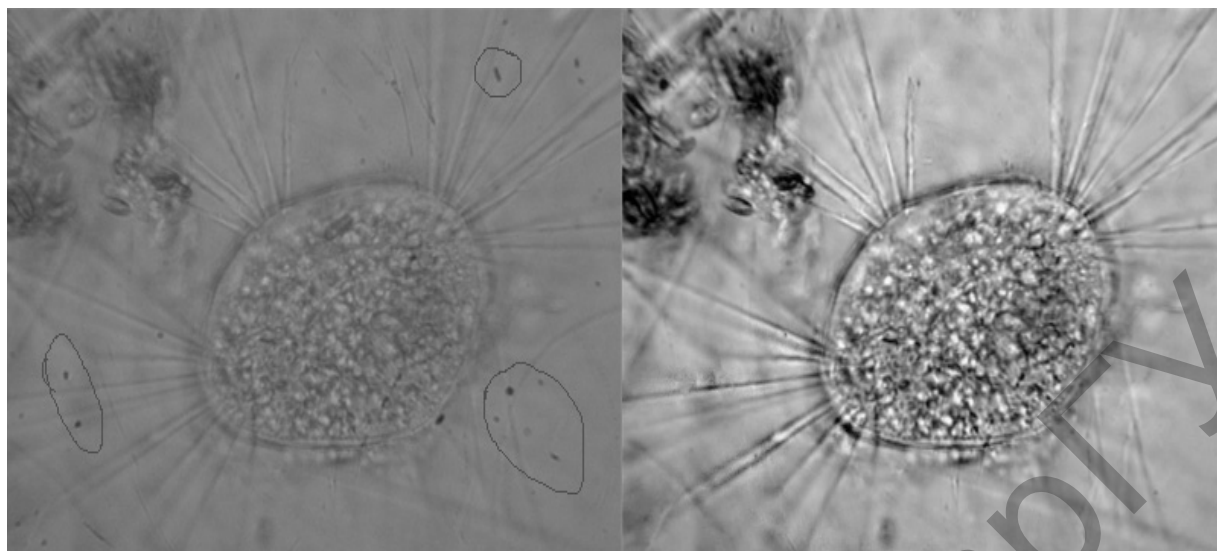
Семейство Euplotidae. Тело овальное, плоское, с хорошо развитым перистомом; дуга мембранелл не прервана; справа — 2 небольшие мембраны, одна из которых погружена; обычно заметна верхняя (пароральная) мембрана.

На дорсуме немного продольных кинет, идущих вдоль ребер панциря; они несут мелкие сенсорные неподвижные щетинки.

Вид Euplotespatella (Muller, 1773). Сравнительно крупный вид (80–150 мкм) с 5–7 ребрами. Девять фронтально-вентральных цирр вместо десяти. Две правые каудальные цирры сильно расщеплены (рис. 8).

Типовой вид *E. patella* (Muller, 1773). В основном пресноводные виды, один вид эвригалинный (*E. woodruffi*). 9 — ФВЦ, с потерей цирруса в ряду VI-3 (нет верхнего цирруса во втором ряду справа). Дорсальный аргиром двойного типа (как у *E. patella*). Зоохлореллы встречаются у одного вида, эндобактерии *Polynudeobacter necessarius* — у 8 видов (часть видов в этом отношении не изучена) [5].

Для проявления мелких деталей, строения органелл, выраженности щупалец использовался фильтр «Увеличение резкости». Удалены ненужные объекты для наилучшего визуального анализа, на рисунке они выделены. Для восстановления исходных цветов полученного изображения, искаженных при вводе в компьютер из-за недостаточного освещения, использовался фильтр «Автотон» (рис. 9).

Рисунок 9. *Discophryas tamrneri*

Проведенный анализ определил систематическое положение этой инфузории: принадлежность к подклассу *Suctoria*, семейству *Discophryidae*.

Подкласс Suctoria. В основном сидячие или свободно парящие в планктоне формы, исключая аберрантный род *Cyathodinium* с признаками неотении и сохранением ресничек, и роды группы *Allantosoma* — неприкрепленные безресничные формы из кишечника млекопитающих.

Внутриклеточные паразиты (*Endosphaera*, *Sphaerophrya*) без рудимента органелл прикрепления, но в жизненном цикле сферофрий есть стебельчатая стадия цисты.

Основная масса видов прикреплена к субстрату чаще всего стебельком, реже — диском или прикрепительной пластинкой или всем телом (*Heliophrya*).

На поверхности тела импрегнация выявляет большое число рассеянных в беспорядке аргиросом, вероятно, безресничные кинетосомы, поры пелликулы (как у перитрих) и сетевидный аргиром такого типа, как у гипостомат и ринходид. При морфогенезе эти аргиросомы участвуют в образовании цилиатуры томита.

Типичный представитель группы — род *Acineta*. Раковинные стебельчатые формы с 2 пучками щупалец по краям тела расположены апикально, с развитием томита внутри тела в зародышевой камере. Щупальца у сукторий расположены поодиночке, в рядах или в пучках, очень разнообразны по форме и строению; можно выделить, как минимум, 15 типов щупалец. Если учесть, что число родов очень велико, становится очевидной роль щупалец для систематики — один род не может включать виды с разным типом щупалец. Типичное щупальце (у ацинет и токофрий) — длинная тонкая трубка с каналом и расширенным акроном, содержащим токсические экструсомы (гаптоцисты); канал и стенка щупальца с опорным аппаратом — имеется наружное кольцо микротубул и внутренний набор микротубулярных пластинок (*phyllae*), четко видимые на поперечном срезе в электронном микроскопе.

По новым данным, число и форма пластинок могут отличаться у морфологически близких видов, и в будущем это даст возможность дифференцировать морфологически неотличимые виды, например, спорные виды рода *Capriniana* на жабрах пресноводных рыб. Даже внешне одинаковые щупальца могут относиться к разным типам. Так, у многих видов рода *Discophrya* при фиксации тонкие булавовидные щупальца мгновенно сокращаются и могут втягиваться в тело, а у *Tokophrya* такие же щупальца фиксируются почти несокращенными. Ветвление щупалец встречается, как исключение, у *Dendrocometes* и близких родов и, возможно, у плохо описанного рода *Dendrocomeiides*.

Семейство Discophryidae (Collin, 1912). В основном стебельчатые формы с пучками щупалец, не всегда четкими; возможны отдельные исключения, например, вторичная утрата стебелька у *Tesludinicola*. Раковина имеется у немногих форм, не ацинстидного типа — базальная или более широкая, без сплющивания тела (отличие от *Periacinetidae*). Щупальца всегда булавовидные, типа акротены (отличие от *Stylocometidae*). Это трудная группа перифитонных несимбионтных родов; это формальный каталог, часть родов можно не признать или понизить до подрода.

Род *Discophrya* разбивается на несколько подродов — видовых групп; различение подродов можно вести по мелким признакам, недостаточным для ранга рода.

Типовой вид *Discophrya stamrneri* (Matthes, 1954) с жуков-гидрофилид *Helochareslividus*; короткий толстый стебелек расширяется в обширную незначительно сплюснутую раковину с краями на разной высоте; трофонг целиком погружен (у *Cyathodiscophrya* лишь частично); края тела с 3–4 четкими пучками шупалец; ядро удлиненное [5, 4].

Таким образом, для изучения анатомо-морфологической организации инфузорий было сделано более 200 фотографий и более 40 видеозаписей, послуживших основой картотеки основных диагностических признаков исследуемых объектов. Стала возможной идентификация 8 видов простейших, представителей типа *Ciliophora*. Определены виды: *Amphileptus acygnus* (Fromentel, 1874), *Paramecium caudatum* (Ehrenberg, 1838), *Vorticella convallaria* (Linne, 1758), *Carchesium polypinum* (Linne, 1758), *Spirostomum minus* (Ehrenberg, 1833), *Stentor roeseli* (Ehrenberg, 1835), *Euplotes patella* (Muller, 1773), *Discophrya stamrneri* (Matthes, 1954).

Список литературы

- 1 Jimenez J.J., Decaens T., Gioia C. et al. The values of soil animals for conservation biology // *European Journal of soil biology*. — 2006. — Vol. 42. — P. 523–538.
- 2 Пантелеев В.Г., Егорова О.В., Клыкова Е.И. Компьютерная микроскопия. — М.: Техносфера, 2005. — 304 с.
- 3 Кутикова Л.А., Старобогатов Я.И. Определитель пресноводных беспозвоночных Европейской части СССР (планктон и бентос). — Л.: Гидрометеониздат, 1977. — 315 с.
- 4 Алимов А.Ф. Протисты // *Руководство по зоологии*. — Ч. 2. — 2007. — 1141 с.
- 5 Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий // *Низшие беспозвоночные*. — СПб., 1994. — Т. 1. — 340 с.

В.С.Абуkenова, Д.Д.Дерр

Проекциялық микроскоп көмегімен инфузорияларды (*Ciliophora*) анықтау және сараптау

Мақалада суда мекендейтін микроскопиялық омыртқасыздарды анықтау әдістемесінің тиімділігі жайлы мәлімет берілді. AxioVision кескіндемелі программалы өңдеуден инфузория типінің өкілдерін зерттеудің мүмкіншіліктері бағаланған. Программалы өңдеудің практикалық әдістерінің тиімділігі түзету, жарық және контрастылық өзгерісі, арнайы сүзгіні қолдану болып табылады. Оқу үдерісінде микроскопиялық омыртқасыздардың анатомиялық-морфологиялық ұйымдасуын зерттеудің мүмкіншіліктері көрсетілген.

V.S.Abukenova, D.D.Derr

Analysis and identification of ciliates (*Ciliophora*) with using the projection microscope

The article provides information about the effectiveness of methods to identify microscopic invertebrates that live in aquatic environments. The possibilities of research representatives type Ciliates using the AxioVision image processing. The efficiency of the practical methods of application of the software and making programs is given in the examples, edit, modify brightness, contrast, noise reduction, use of special filters. The possibilities of studying anatomical and morphological organization of microscopic invertebrates in the learning process.

References

- 1 Jimenez J.J., Decaens T., Gioia C. et al. *European Journal of soil biology*, 2006, 42, p. 523–538.
- 2 Panteleev V.G., Egorova O.V., Klykova E.I. *A computer microscopy*, Moscow: Technosphaera, 2005, 304 p.

- 3 Kutikova L.A., Starobogatov Ya.I. *Determinant of freshwater invertebrates of European part of the USSR (plankton and benthos)*, Leningrad: Hidrometeoisdat, 1977, 315 p.
- 4 Alimov A.F. *Guidance on zoology*, 2007, 2, 1141 p.
- 5 *A determinant of freshwater invertebrates of Russia and contiguous territories, Lower invertebrates*, St. Petersburg, 1994, 1, 340 p.

Репозиторий Қарғу