

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Биологический институт

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПРОТИСТОВ

Учебно-методическое пособие
по курсу «Большой практикум «Протисты»
для студентов биологического института
направлений подготовки 06.03.01 –
биология, Академические бакалавры

Томск
Издательский Дом Томского государственного университета
2015

РАССМОТРЕНО И УТВЕРЖДЕНО методической комиссией биологического института

Протокол № 144 от «24» декабря 2014 г.

Председатель МК Би А.Л. Борисенко

Пособие составлено в соответствии с тематикой практических занятий и программой курса «Большой практикум «Протисты» для студентов биологического института направлений подготовки 06.03.01 – биология, Академические бакалавры. Особое внимание уделено созданию и поддержанию искусственных культур основных групп протистов (амебодные, жгутиковые, инфузории, анаэробные симбионты). Пособие содержит краткий иллюстрированный определитель некоторых широко распространенных пресноводных протистов; методические указания по сбору, фиксации и изготовлению микроскопических препаратов протистов, предлагаемые для рассмотрения на практических занятиях.

Для преподавателей, аспирантов, студентов и магистрантов, слушателей ФПК.

СОСТАВИТЕЛИ:

А.В. Симакова, Т.Ф. Панкова

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	4
Введение	7
1. Общая характеристика протистов	12
2. Содержание культур протистов, полученных в природе	16
2.1. Места сбора протистов	16
2.2. Техника сбора	18
2.3. Содержание культур в лаборатории	19
3. Искусственные культуры протистов	21
3.1. Амебоидные протисты	23
3.2. Жгутиковые	25
3.3. Инфузории	27
3.4. Культивирование анаэробных симбиотических протистов	29
4. Фиксация и изготовление микроскопических препаратов протистов	33
5. Определитель некоторых широко распространенных пресноводных протистов	41
Литература	65

ПРЕДИСЛОВИЕ

В современной биологии выделяется самостоятельный раздел – биотехнология, традиционным направлением которого была техническая микробиология и биохимия, новым – генетическая и клеточная инженерия. С развитием биологии представление о биотехнологии менялось. По крайней мере, сейчас можно говорить о биотехнологии, в компетенцию которой входит культивирование (разведение) клеток, тканей, организмов в целях практического их использования, основанное на знании общебиологических закономерностей и процессов.

Главными направлениями биотехнологии являются: 1) производство с помощью микроорганизмов и культивируемых эукариотических клеток биологически активных соединений (ферментов, витаминов, гормональных препаратов), лекарственных препаратов (антибиотиков, вакцин, сывороток, высокоспецифичных антител и др.), а также белков, аминокислот, используемых в качестве кормовых добавок; 2) применение биологических методов борьбы с загрязнением окружающей среды (биологическая очистка сточных вод, загрязнений почвы и т. и.) и для защиты растений от вредителей и болезней; 3) создание новых полезных штаммов микроорганизмов, сортов растений, пород животных и т. п.

Одним из направлений биотехнологии является разведение различных видов животных для практических целей, именуемое как зоокультура. В настоящее время накоплено много данных по разведению отдельных видов животных, как за рубежом, так и у нас. Есть обобщающие отечественные работы (Злотин, 1989; Тамарина, 1990), касающиеся общих принципов и методов разведения животных. Но, в основном, сведения разрознены, не всегда доступны, особенно это касается протистов.

Разведение животных, особенно позвоночных, имеет древнюю историю. Из беспозвоночных издревле были окультурены только медоносная пчела и шелкопряды (тутовый и отчасти дубовый). Менее древние традиции имеет зоокультура морских беспозвоночных (устрицы, мидии, морской гребешок, трепанги, жемчужница морская и другие). Вообще же, все, что сделано в отношении разведения беспозвоночных, относится к новейшему времени. В настоящее время зоокультура беспозвоночных перспективна в четырех направлениях: 1) получение животного белка значительно более экономными (по энергетическому балансу) способами, чем при использовании позвоночных животных; 2) культура паразитических и хищных беспозвоночных для обеспечения биологических методов борьбы с вредителями и паразитами хозяйственно ценных организмов; 3) разведение некоторых массовых беспозвоночных.

звоночных (представители почвенной мезофауны, насекомые-опылители, гидробионты-филтраторы и т. п.) в целях биогеоэкологической мелиорации и охраны окружающей среды; 4) культура малоиспользуемых в настоящее время шелкопрядов с целью получения новых сортов естественного шелка.

В развитии этих направлений есть обнадеживающие результаты. В частности, есть опыт культивирования: свободноживущих простейших (инфузорий) в целях индустриального рыбоводства; дождевых червей для улучшения плодородия почв; личинок домашней мухи – для утилизации навоза и производства белка. В производственных масштабах разводится культура видов трихограмм, используемых в биологической борьбе, разведение тутового шелкопряда для получения натурального шелка и другие.

Настоящее методическое пособие посвящено культивированию протистов. Исключительно большая их теоретическая и практическая значимость обуславливает тот факт, что простейшие, как зоологические объекты, занимают значительное место в программах зоологических дисциплин, изучаемых в различных учебных заведениях – школах, профессиональных училищах, техникумах, медицинских и педагогических институтах, университетах.

Несмотря на многочисленность, разнообразие и, почти, на «вездесущность» окружающих нас протистов, преподаватели часто испытывают трудности в обеспечении учебным материалом практических и лабораторных занятий, тем более, в организации самостоятельной работы студентов. Это обусловлено, с одной стороны, отсутствием стандартных комплектов препаратов, выпускаемых соответствующими организациями (комбинатами) или невозможностью их приобретения, а с другой – разрозненностью методик, отсутствием обобщенных методических пособий, позволяющих получать живой материал в своих лабораториях. Кроме того отсутствуют доступные и простые в обращении определители наиболее широко распространенных свободноживущих протистов, что вызывает определенные сложности при идентификации этих организмов.

Цель данного труда – обобщение и систематизация имеющихся материалов по разведению протистов. В нем содержатся общие сведения о протистах, методы культивирования различных групп, а также краткий определитель наиболее распространенных свободноживущих протистов. Рассматривая лабораторное разведение как определенные периоды культурального биотехнологического процесса, авторы приводят некоторые теоретические положения, знания которых необходимы для проведения работ по культивированию.

Значительную часть книги занимают сведения о практической работе, а именно: содержание культур основных групп протистов, полученных в природе; создание искусственных культур аэробных и анаэробных простейших; фиксация и изготовление препаратов протистов. Приведенный определитель некоторых широко распространенных пресноводных протистов, сопровождаемый рисунками, дает возможность самостоятельного определения этих микроорганизмов.

Методическое пособие может оказать помощь не только лаборантам, обслуживающим учебный процесс, но и в организации самостоятельной практической работы студентов. Участие студентов в работе по разведению протистов имеет определенное воспитательное значение. Взяв из природы исходный материал и поддерживая культуру одноклеточных животных в лаборатории, студент уже не эксплуатирует постоянно природные ресурсы, а воссоздает их для своих конкретных целей. Культивирование протистов способствует расширению и углублению знаний по биологии тех или иных видов, выработке умения и навыков лабораторных работ, выявлению способностей студентов.

Полезным методическое пособие может оказаться и для начинающих научных работников разных специальностей, объектом изучения которых являются протисты.

ВВЕДЕНИЕ

Культивирование или, иначе, разведение отдельных видов живых организмов – это одно из направлений современной биотехнологии. Видовое разнообразие беспозвоночных, их способность быстро наращивать биомассу (в сотни раз быстрее позвоночных), питаться самыми различными субстратами, в том числе отходами производства, находить в природе и использовать мельчайшие пищевые резервы, общая сумма которых очень значительна – все это громадные резервы, которые человечество может и должно использовать.

Наряду с использованием беспозвоночных животных в хозяйственных целях, многие из них являются объектами научных исследований – генетических, физиологических, микробиологических и др.; многие используются для изготовления учебных и музейных коллекций; немалое число видов, особенно насекомых, являются неотъемлемым компонентом зоосадов (к примеру, в Японии); значительное количество видов – исчезающих, занесенных в Красную книгу. Все это говорит о необходимости воспроизводства и охраны определенных видов беспозвоночных животных.

На первом этапе введения вида в культуру при выборе объекта культивирования необходимо: 1) знание «жизненной схемы вида» (Беклемишев, 1942, 1945; Тамарина, 1990), т. е. совокупности приспособлений вида к совокупности условий его существования (этот принцип естественной эволюции организмов может быть плодотворно использован при создании искусственных популяций); 2) выявление коадаптированных экологических комплексов – совместно существующих видов с близкими экологическими нишами; 3) представление об особенностях сезонного развития (составление «популяционного портрета», включающего распределение в онтогенезе основных жизненных отправок вида: питания, размножения, расселения, переживания). После комплектования стартовой колонии основная задача – замкнуть жизненный цикл вида в условиях лаборатории (Тамарина, 1990).

Протисты – представители огромного мира беспозвоночных животных, в последнее время привлекают внимание как объекты культивирования. До недавнего времени они использовались лишь как компонент активного ила при биологической очистке сточных вод. В настоящее время эти микроорганизмы представляют интерес исследователей как продуценты биологически активных веществ. В этом качестве рациональнее использовать свободноживущих протистов, обладающих разнообразными биосинтетическими возможностями и потому широко распространенными в природе.

Их популярность как лабораторных животных обусловлена доступностью и относительно дешевой методикой культивирования, возможностью получать аксенические (быстро самовоспроизводящиеся) культуры, простотой выделения клонов протистов из природных популяций, высоким темпом клеточного деления, сравнительно легко регулируемым методическими приемами, возможностью получения большой биомассы генетически однородного материала.

В тоже время, такие особенности протистов как существование значительных клональных различий в пределах отдельных видов протистов, изменение физиологических свойств клонов с возрастом культур, наличие различных форм внутривидовой дифференцировки требуют от исследователей соблюдения определенных правил и методов работы при использовании этих микроорганизмов в любых биологических экспериментах.

В связи с этим, для сравнения результатов, полученных разными исследователями, необходимо указывать: 1) вид клона; 2) место, из которого была выделена клетка, давшая начало клону; 3) дату выделения клетки из природной популяции или получения экспериментально (например, в генетических экспериментах) среды, на которой культивируется клон; 4) вид используемого пищевого объекта; 5) температуру культивирования и, по возможности, 6) принадлежность к определенным внутривидовым группам (например, у инфузорий – сингенам и типам спаривания). Перечисленные выше требования к культурам протистов, используемых в фундаментальных и прикладных протистологических исследованиях, делают естественной необходимость создания структурно оформленных региональных и общесоюзных коллекций протистов с правильным хранением культур и информационным банком. В настоящее время специальных коллекций протистов, отвечающих современным требованиям, нет не только в нашей стране, но и за пределами РФ.

В "World Directory of collections of cultures of microorganisms" приводится более 500 коллекций микроорганизмов, среди которых только пять, наряду с микроорганизмами, содержат культуры свободноживущих простейших. Две из них находятся в США, две – в Англии, одна – в Австралии. Существуют большие коллекции национального масштаба, такие, например, как American Type Culture Collection (ATCC), а также разнообразные специализированные зоологические, ботанические, микробиологические и т.п. коллекции, поддерживаемые иногда в отдельных научных учреждениях и лабораториях, но имеющие, тем не менее, важнейшее значение для исследования биологии различных групп организмов

(например, Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP), National Center for Marine Algae and Microbiota (NCMA), Canadian Center for the Culture of Microorganisms (CCCM), All-Russian Collection of Microorganisms (VKM), и многие другие).

В нашей стране достигнуты большие успехи в изучении морфологии, систематики, фаунистики и аспектов жизнедеятельности отдельных групп свободноживущих и паразитических протистов. Исследования ведутся в ЗИН РАН, БИННИИ, СПбГУ, ВИЗР (Санкт-Петербург), ИБВВ РАН (Борок), Лимнологическом институте Сибирского отделения РАН (Иркутск), ТГУ (Томск) и пр. В Институте Цитологии РАН (Санкт-Петербург) с 1960 года поддерживается постоянная коллекция штаммов крупных свободноживущих амёб типа «proteus», объекты которой используются в различных научных исследованиях.

Культуры используются для проведения учебных занятий со студентами разных кафедр, а также в научных исследованиях по выявлению чувствительных тест-объектов для определения токсичности некоторых веществ в химической промышленности и медицине совместно с рядом учреждений (институт экологической токсикологии в г. Байкальске, Военно-медицинская АН, институт вакцин и сывороток).

Ведутся работы по использованию протистов в биологической очистке промышленных и сточных вод, как индикаторных видов в определении степени органического загрязнения водоемов, а также в стратиграфии. Известна роль почвенных протистов в повышении всхожести семян, в подавлении активности фитопатогенных грибов, в повышении жизнедеятельности некоторых червей.

Особый интерес в настоящее время представляют собой некоторые протисты как источники биологически активных веществ. К примеру, простейшие, обитающие в рубце жвачных животных, могут быть источником ценного фермента целлулазы, который они вырабатывают. Возбудитель южноамериканского трипаносомоза – *Trypanosoma cruzi* стала первым продуцентом противоопухолевого препарата круцина (СССР) и его аналога – трипанозы (Франция). У жгутиконосцев фосфолипиды и полиненасыщенные жирные кислоты имеют такой же состав и строение, как в организме человека и животных.

Из *Astasia longa* (свободноживущий жгутиконосец) получают водорастворимый полусинтетический препарат – астазилид, обладающий противоопухолевым действием. Он представляет собой комплекс эфиров сахарозы и жирных кислот. Было установлено, что астазилид вызывает увеличение проводимости, поверхностного натяжения, а также уменьшение электромеханической стабильности липидных мембран.

Астазилид действует главным образом на клеточное звено иммунитета, вызывая повышение фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов, увеличение способности индуцировать развитие гиперчувствительности замедленного типа и некоторых других показателей. Препарат предотвращает гибель 60–80 % животных, зараженных бактериальными инфекциями (*E. coli*, *Ps. aeruginosa*), а также лейшманиями.

Разнообразие полисахаридов, синтезируемых простейшими, также достаточно велико. Структурные полисахариды, входящие в состав клеточных мембран простейших, – это гетерополисахариды, содержащие глюкозу, маннозу, ксилозу, арабинозу, рибозу, галактозу, рамнозу, фруктозу, глюкозамин. Особый интерес представляет парамилон, характерный для эвгленоидных жгутиконосцев. Представители родов *Astasia* и *Euglena* способны к сверхсинтезу парамилона, составляющему свыше 50 % сухого остатка клеток. Этот полисахарид изучается как стимулятор иммунной системы млекопитающих. Парамилон, выделенный из *A. longa*, практически нетоксичен. Выраженное иммуномодулирующее действие и низкая токсичность этого препарата являются предпосылкой для его углубленного исследования в сочетании с препаратами прямого противоопухолевого действия, радиотерапией и другими адъювантами.

Эвглениды являются одним из наиболее перспективных источников глюканов. В настоящее время в мире придается большое значение производству глюканов не только для медицинских целей, но и для пищевой и текстильной промышленности.

Большой интерес представляет выяснение антигенной взаимосвязи между непатогенными и патогенными для человека видами трипаносомид. Установлено, что при введении мышам полисахаридов из культур непатогенных для человека простейших – *Herpetomonas* sp. и *Crithidia fasciculata* – повышалась резистентность животных к *Tripanozoma cruzi*, возбудителю болезни Чагаса у человека.

Данные по биомассе протистов и их биохимическому составу позволяют выделить формы, перспективные для промышленного получения кормовой массы. Так, биомасса простейших содержит до 50 % белка, включающего незаменимые аминокислоты, причем содержание свободных аминокислот в них на порядок выше, чем в биомассе микроводорослей, бактерий и в мясе; а продукты основного метаболизма включают соединения, обладающие антибактериальной, противовирусной, противоопухолевой и иммунологической активностью.

Для оптимального использования протистов в возможных направлениях (тест-объекты, индикаторные виды, биологическая очистка, мелиорация почвы, индустриальное рыбоводство, получение пищевого белка)

отмечается целесообразность промышленного культивирования свободживущих простейших, в частности, инфузорий.

Известны работы по созданию технологической схемы непрерывного культивирования инфузории *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1838, как "стартового" корма для рыб (Олексив, 1986), а также по массовому культивированию инфузорий в морской воде (Новоселова, 2013). Разработан аппарат для непропорционально-проточного культивирования крупных инфузорий *Spirostomum ambiguum* Muller, 1786 (Пролубников, Кокова, 1987), в котором определены оптимальные площадь поверхности дна для оседания инфузорий и интенсивность аэрации. Получены мутации простейших, снижающие запрет на размножение, т.е. утратившие характерные для них стадии покоя и размножающиеся непрерывно многие годы (Хлебович, 1986). *Spirostomum ambiguum* также широко применяется для токсикологических и фармакологических исследований (Цисанова и др., 2010).

Исследуют возможность массового культивирования хлореллы как источника ценных химических соединений (каротиноидных комплексов, аминокислот и других ценных соединений). Показано, что суспензия и сырая паста хлореллы при добавлении к рационам сельскохозяйственных животных и птиц повышают их продуктивность до 30 % (<http://hydrobiologist.wordpress.com/2009/12/10/organisms-cultivation/>).

Несомненен разноплановый теоретический интерес изучения протистов.

Поэтому не случайно протисты привлекают внимание многих исследователей, а протистология достаточно интенсивно развивается.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОТИСТОВ

Протисты – это парафилетическая совокупность мелких, преимущественно микроскопических эукариотических организмов, которые не образуют единой, естественной группы. В настоящее время к протистам относят классических простейших, одноклеточных фототрофов (таких как диатомовые) и низшие грибы. Термин «протисты» используется при рассмотрении систематических или таксономических вопросов, «простейшие» – когда речь идет об облигатных гетеротрофных организмах (Хаусман и др., 2010). Исключительно большое разнообразие и обилие протистов в природе, особенности их микроскопического строения всегда привлекали исследователей. Но их изучение стало возможным только начиная с XVII века, когда был изобретен микроскоп.

Анатомически тело этих организмов преимущественно представлено одной клеткой, а функционально представляет собой целостный организм со всеми присущими ему функциями (питание, дыхание, движение, размножение и пр.). Тело состоит из цитоплазмы, ядра, различных органелл, обеспечивающих функции питания, движения, выделения и т.д.

Одноклеточные организмы принципиально устроены также, как любые эукариотные клетки с присущими им органоидами (– oidea – окончание, означающее подобие, т.е. подобные органам). Но у протистов есть и специальные органоиды, не встречающиеся у более высокоорганизованных организмов, в частности, микро- и миофибриллы, сократительные и пищеварительные вакуоли, митосомы, гликосомы, гидрогеносомы, экструсомы, кинетопласт.

Как у всякой эукариотной клетки, в основе поверхностных структур протистов лежит плазмалемма, образованная трехслойной поверхностной мембраной, и прилегающим к ней снаружи слоем гликокаликса. Многие протисты покрыты только плазмалеммой, но существует немало организмов, имеющих дополнительные осложнения покровов, которые выполняют различные функции: защита, цитоскелет, движение, размножение, питание, дыхание, энергетический обмен. Морфологические осложнения покровов протистов делят на две группы:

а) осложнения за счет образования структурированных или аморфных надмембранных слоев (гликостили, чешуйки, домики).

б) осложнения за счет изменения прилегающей к плазмалемме цитоплазмы. Иногда эти типы покровов могут сочетаться др. с другом (акти-

новые и миозиновые филаменты, фибриллы, тубулема, кутикула, перипласт, кутикула, тека).

По химическому составу скелет может быть органическим (хитиновым) и неорганическим, представляющим отложения CaCO_3 , SiO_2 или SrSO_4 на органическом скелете. Клетка протиста может иметь прикрепительные устройства: слизь, внутри- и внеклеточные стебельки, присоскообразные структуры, эпимериты – структурированные области тела у паразитических видов.

Основные функции клетки протиста: обмен веществ, движение, раздражимость, размножение.

Разнообразны типы обмена веществ (питания): 1) автотрофный по типу фотосинтеза или голофитный=растительный; 2) гетеротрофный (сапротрофный, голозойный); 3) миксотрофный (смешанный).

Способы приема пищи – фагоцитоз, пиноцитоз или мизоцитоз (всасывание жертвы). В обмене веществ велика роль осморегуляторных процессов, выполняемых сократительными вакуолями.

Движение простейших – амебоидное, метаболирующее (эвгленоидное), скользящее, жгутиковое, ресничное или с помощью системы ресничек (мембранеллы, цирры), с помощью ундулирующей мембраны (проtoplазматическая мембрана вдоль жгутика).

Поведение протистов подразделяют на два типа: один регулируется внутренне, и его называют спонтанным; а другой индуцируется стимулами внешней среды и называется индуцированным.

Протисты обладают фотокинезами и фототаксисами, отрицательными хемо- и тигмотаксисами, положительными реотаксисами и реакцией на пищу, температуру, гальвано- и гравитаксисами. Все факторы внешней среды влияют на функции протистов. Раздражители воспринимаются протистами с помощью различных органоидов чувств – осязания (псевдоподии, реснички, жгутики), светочувствительных органоидов (стигмы – глазки), органоидов равновесия. Есть у простейших органоиды защиты и нападения (экструсомы).

Исключительной особенностью протистов как одноклеточных организмов, отличающей их от клетки многоклеточных, является разнообразие способов размножения и наличие жизненного цикла. В зависимости от поведения ядерной оболочки, а также от симметрии, положения и степени развития центров, организующих веретено, у протистов выделяют 6 типов митоза: открытый ортомитоз (эумитоз), полузакрытый ортомитоз, полузакрытый плевромитоз (парамитоз), внутриядерный плевромитоз, внутриядерный ортомитоз, внеядерный плевромитоз. У протистов встречаются две основные формы мейоза: с

двумя делениями ядра (двухступенчатый мейоз), и с одним делением (одноступенчатый).

Протистам свойственно бесполое размножение (монотомия, палинтомия, мерогония, почкование наружное и внутреннее, ведущее часто к образованию временных или постоянных колоний), и половое (копуляция гологамная и мерогамная (изо-, анизо-, оогамная)), а также характерный только для инфузорий половой процесс – конъюгация. Разнообразие способов размножения значительно усложняют жизненные циклы простейших, среди которых наиболее характерны следующие их типы: 1) только с бесполом размножением; 2) только с половым размножением; 3) со сменой полового и бесполого размножения.

В ходе жизненного цикла проявляется уникальная способность особи простейшего существовать в виде различных форм, что сопровождается существенными изменениями в морфологии (рассасывание органоидов и формирование их заново) – морфогенез. Эти процессы последовательны во времени и пространстве. Интересен морфогенетический феномен – инцистирование, т.е. когда тело протиста покрывается плотной оболочкой (цистой). Циста может возникать факультативно, как защита от неблагоприятных факторов среды (пересыхание водоемов и др.) – циста покоя; и циста как стадия жизненного цикла – циста размножения.

Протисты широко распространены в природе, свободноживущие обитают в водоемах и почве, паразитические – в организме человека, животных, растений, где выполняют разнообразную роль. Многие из них – важнейшие начальные звенья в пищевых цепях, определяющие численность других водных обитателей, преобладающие компоненты осадочных пород, участники почвообразовательных процессов. К настоящему времени описано, по меньшей мере, 213000 видов одноклеточных эукариот, из них более 100000 видов – вымершие, более 10000 видов ныне живущих – паразитические, среди которых возбудители тяжелых заболеваний человека, животных. Свободноживущие виды составляют, по меньшей мере, 85 % от всех современных протистов.

Места обитания заселены протистами с большой плотностью. Так, в водоемах их численность может достигать 20 млрд. особей на 1 м². Амеб и жгутиконосцев в 1 г. влажной почвы может быть 103–106 особей, инфузорий – 103 особи, а раковинных амеб – 104 в лесной и до 250 в 1 г полевой почвы. Биомасса протистов из-за их колоссальной численности довольно значительна – до нескольких центнеров на гектар, а соответственно и их роль в экономике природы велика.

Протисты не являются монофилетической группой одноклеточных эукариот, поэтому единая система их классификации отсутствует. Они

встречаются в различных группах современной системы эукариот, которая была составлена по данным нескольких авторов (Baldauf, 2003; Adl et al., 2005; Keeling et al., 2005; Shalchian-Tabrizi et al., 2008; Howe et al., 2011; Протисты, 2011). По мере накопления знаний детали этой системы будут уточняться, но можно надеяться, что в ближайшее десятилетие эта система не будет противоречить основным представлениям о филогении эукариот. В настоящее время для протистов трудно определить ранг таксона выше семейства, рода и вида.

2. СОДЕРЖАНИЕ КУЛЬТУР ПРОТИСТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ В ПРИРОДЕ

Лабораторное изучение и определение протистов преимущественно ведется на живом материале, поскольку любая фиксация деформирует или разрушает клетку простейшего. Поэтому в лаборатории необходимо постоянно наличие живых культур. Это достигается содержанием культур протистов, полученных в природе.

2.1. Места сбора протистов

Для получения культуры протистов, которая бы содержалась в лаборатории, необходимо знать места их обитания. Обычно это влажные и водные стоячие биотопы (пруды, старицы, канавы и др.), в текучих водах протистов значительно меньше.

Биологический метод оценки степени загрязнения природных вод был разработан в 1902 г. немецкими исследователями Кольквитцем (ботаник) и Марссоном (зоолог).

1. Сильно загрязненные воды с резким преобладанием восстановительных процессов – **полисапробная зона** (гр. «poly» много, «sapros» гнилой).

2. Воды, в которых восстановительные процессы прекратились и начались окислительные, с постепенным преобладанием последних – **мезосапробная зона** (гр. «mesos» средний).

3. Воды, в которых наблюдается полное окисление поступавшего органического вещества – **олигосапробная зона** (гр. «oligos» незначительный).

Позднее мезосапробную зону разделили на две:

- **α-мезосапробную**, более загрязненную, близкую к полисапробной,
- **β-мезосапробную**, приближающуюся к олигосапробной.

Затем была введена еще **катаробная зона** (гр. «katharos» чистый), под которой подразумевалась абсолютно чистая вода, не содержащая органических веществ.

Таким образом, была создана система из 5 зон или степеней сапробности, характеризующая процесс самоочищения от крайней степени загрязнения до постепенно возрастающей чистоты воды. В каждой из зон сапробности развивается присущий ей комплекс животных и растительных организмов, способных существовать в данных условиях, которые и

были названы авторами этой системы сапробными организмами или сапробионтами.

Так, в стоячих водоёмах случайного характера – остатках снеговых вод в окрестностях г. Томска в конце мая–начале июня можно обнаружить *Phacus*, *Petalomonas*, *Vorticella*, *Paramecium caudatum*, *Chilodon cucullus*, *Stylonychia mytilus*, *Leonotus fasciola* и др. (Голубева, 1925).

Водоёмы постоянные в зависимости от их величины, освещенности, прогреваемости и степени загрязнения по-разному заселены протистами. В стоячих водоёмах с чистой прозрачной водой обычен *Stentor coeruleus* – инфузории сидят группами на различных мелких донных предметах; подобным же образом скапливается в больших количествах на водных предметах сувойки (*Vorticella* sp.), образуя даже на глаз видимый налет; на корешках ряски нередко *V. lemnae*.

В стоячих водоёмах – прудах, озерах, не очень сильно загрязненных (олигосапробных), многочисленны жгутиконосцы *Eudorina elegans*, в планктоне таких водоёмов часты *Volvox aureus* и *V. glabator*.

В стоячих водоёмах, богатых органическими веществами – мезо- и полисапробных (пруды, озёрки, канавы и др.), многочисленны эвглены. Различные их виды живут или на поверхности дна или вблизи его, в сырой земле у самого берега, в поверхностном слое ила, образуя ярко-зеленые пленки (пятна). Многочисленны в водоёмах (лужицы, канавки) более или менее богатых органическими веществами виды *Chlamydomonas*, которые, развиваясь в больших количествах, вызывают «цветение» водоёмов. Виды рода *Bodo* предпочитают сильно загрязненные водоёмы.

В стоячих загрязненных водоёмах (с гниющими листьями и другими растительными остатками) или в мелких затененных медленнотекущих, заросших водной растительностью водоёмах, обитают различные амебы. Наиболее благоприятная для размножения амеб температура вода –18...–20°C. В таких водоёмах обнаруживаются *A. proteus*, раковинные амебы (Arcellidae, Diffugiidae), виды рода *Centropyxis*, *Actinosphaerium* (*A. eichhorni*). Нередки они, причем, в больших количествах, в торфяных болотах.

Некоторые виды инфузорий, в частности *Stylonychia mytilus*, живут в любом небольшом стоячем водоёме. Виды родов *Loxodes*, *Bursaria* осенью (сентябрь–октябрь) встречается в очень многих водоёмах.

Для полисапробных водоёмов характерны такие инфузории, как *Caenomorpha*, *Colpidium*, *Epalxella*, *Lacrymaria*, *Metopus*, *Vorticella*; для α-мезосапробной – *Carchesium*, *Chilodonella*, *Paramecium*, *Urocentrum*; для β-мезосапробной – *Euplotes*, *Halteria*, *Spirostomum*, *Stentor*; для олигосапробной – *Dileptus*, *Strobilidium*, *Thuricola*.

Лучшие места для взятия проб в водоемах – это пологие берега с гниющими растительными остатками. Здесь происходит обильный рост бактерий, служащих основной пищей для многих протистов. В воде пробы лучше брать с глубины не более нескольких сантиметров от поверхности дна, где условия для жизни протистов более оптимальны. Сбор протистов возможен в течение всего периода, когда водоемы не замерзшие (май–октябрь).

2.2. Техника сбора

Методы и приемы сбора определяются особенностями обитания протистов во влажных и водных биотопах.

Так, обитателей толщи воды собирают очень частой планктонной сеткой (из газа). Осадок помещают в банку и заливают большим количеством воды, взятой из того же водоема.

При сборе донных простейших вместе с водой зачерпывают со дна или или взмученный ил, а также старые листья, водоросли, водные растения. Это можно делать как планктонной сеткой, так и планктонным сачком, проводя ими вблизи поверхности дна. Зачерпнуть взмученный ил можно с помощью батарейного стакана или четырехугольной аквариумной банки. При опускании их в воду отверстием вниз и быстром поворачивании отверстием вверх около дна водоема выходящий из них воздух взмучивает ил, который зачерпывается сосудом.

Для получения протистов из влажных субстратов (болотной почвы, мха) используют выжимки из них. Верхние части (стебли мха) отжимают рукой, прополаскивают в отжатой жидкости и снова отжимают. В отстоявшемся остатке этой жидкости обнаруживаются различные виды Testacea.

Для получения возможно более разнообразной фауны протистов берется значительное количество проб из разных водоемов. Сосуды для проб – это чистые стеклянные банки, ополоснутые несколько раз водой из водоема, откуда берутся протисты.

При перевозке протистов необходимо защищать их от перегревания.

Раковины фораминифер собираются вместе с морским песком. Песок отмучивают для удаления ила; грубые примеси удаляются просеиванием через металлическое решето с ячейками до 2 мм в диаметре. Раковинки фораминифер выбирают препаровальными иглами под лупой.

2.3. Содержание культур в лаборатории

Содержание культур протистов в лаборатории – это уход за ними, требующий определенных знаний и навыков.

Первоначально принесенные в лабораторию полевые пробы разливают по сосудам меньшей емкости (банки, стаканы), добавляют в них гниющую листву или водные растения, или детрит и ил (лучше разнообразить среду каждого сосуда для получения большего разнообразия видов протистов), и закрывают стеклянными крышками (это уменьшает испарение воды и загрязнение культуры пылью). Для содержания протистов используется только прозрачная (не зеленая) стеклянная посуда. Использование металлической посуды исключается, так как металл оказывает вредное влияние на животных. Эти культуры содержат большое число разных видов и относятся к смешанным или сырым культурам. Учитывая особенности трофики протистов, сосуды с культурами следует помещать в разные условия (Т °С, освещенность).

Для получения фотосинтезирующих (зеленых) форм часть проб необходимо ставить в умеренно светлое место, и эвглены размножатся через 1–2 недели. Для развития гетеротрофных видов часть проб следует поместить в затемненное место.

Необходимо помнить о том, что созданная лабораторная культура – это экологическая система, в которой протисты подвергаются действию различных факторов. Опасно перегревание, которое может легко произойти в небольшом объеме жидкости и вызвать гибель микроорганизмов – основного пищевого субстрата простейших и самих простейших, поэтому следует защищать сосуды с культурой от ярких солнечных лучей, особенно в жаркое время года. Оптимальной считается для культивирования протистов (для обычных повседневных, например, учебных целей) комнатная температура (+ 18–22°C). В условиях температуры +10°C и ниже протисты прекрасно существуют, но слабо размножаются. При температуре +25°C обмен и размножение ускоряются, культура быстро обогащается количественно, но так же быстро и исчезает.

В сосудах с культурами протистов не должно быть их хищников, в основном низших ракообразных (дафний, циклопов и др.).

Различные абиотические, биотические факторы, биологические особенности видов протистов определяют распределение их в данной искусственной экосистеме во времени и в пространстве. Некоторые виды (амебы *A. proteus*, *Pelomyxa palustris* и др.) обнаруживаются сразу в придонном слое отстоявшейся воды и ила, и могут в таких «исходных» условиях жить несколько недель. Другие (*Stylonychia mytilus*) обнаруживаются

спустя неделю. С течением времени протисты начинают плохо размножаться, инцистируются, или совсем исчезают. Это показатель неблагоприятных условий содержания, в частности недостатка корма. Для стимулирования развития бактерий в сосуд 2–3 раза в месяц добавляют 5–10 капель сырого молока. Вместо молока можно использовать отвары: овсяный, рисовый, пшеничный, пшениный. Для приготовления отвара 50 г одной из круп кипятят в 1 л воды в течение 15–30 минут. К культурам отвар добавляют не более двух раз в месяц по 5–10 см³.

Кормить амёб для сохранения их культуры при комнатной температуре можно крахмалом (одна петля измельченного крахмала на пробирку с амёбами каждые 10–12 суток). В этом случае жизнеспособные амёбы (*Entamoeba invadens*) сохраняются в одной пробирке 5–7 месяцев (Панасюк, 1982).

Следует учитывать пищевые потребности хищных протистов. Например, *Bursaria* охотно питается жгутиконосцами и другими более мелкими протистами. Поэтому ее содержание требует наличия в банках эвглен или других жгутиконосцев.

В культуральных банках различные виды протистов распределяются в разных местах, соответственно местам обитания в естественных условиях. Поэтому, чтобы протисты не рассеивались по толще воды, банки с культурами следует держать в покое, не встряхивать. В частности, зеленые жгутиконосцы фототропичны и держатся у стороны сосуда, обращенной к свету; в придонных слоях воды – инфузории; налет, покрывающий стенки долго стоящих аквариумов с растениями, нередко состоит из раковин *Arcella* и *Centropyxis*; солнечники также обитают на стенках сосуда и т.д.

Зная особенности обитания, можно извлекать (для изучения) требуемые виды протистов из этих смешанных культур. Протистов извлекают из аквариума пипетками, лучше снабженными грушами, и переносят на предметное стекло, где рассматривают в капле жидкости.

3. ИСКУССТВЕННЫЕ КУЛЬТУРЫ ПРОТИСТОВ

Искусственные культуры, в отличие от смешанных, «естественных», – это чистые культуры определенных видов протистов, выводимые (индивидуальное культивирование) из свободноживущей особи. Отдельная клетка помещается в микроаквариум (стекла с каплей среды, помещенные во влажную камеру), а затем через сутки или другое время одна из дочерних клеток снова помещается в микроаквариум со свежей средой и кормом. В дальнейшем для ведения индивидуальной культуры берутся часовые стекла, помещенные во влажную камеру (Цингер, 1947). Для стерильного ведения индивидуальной культуры используются пластины с лунками, покрытыми стеклом. Такие приспособления (солонки) легко стерилизуются и могут быть применены без влажной камеры, так как стеклянная пластинка предотвращает испарение.

Кроме того, некоторыми исследователями используются стеклянные кольца, помещенные в расплавленный питательный агар до автоклавирования, которые после охлаждения образуют микроаквариумы с питательным дном, куда высеивают бактерии. После того, как бактерии вырастают, в микроаквариумы добавляют минеральную среду и помещают инфузорий. Используют и стекла с лунками, на дно которых помещается агар, а затем высеиваются бактерии. Метод индивидуальной культуры сыграл большую роль в изучении протистов. Пользуясь этим методом, протистологи выяснили, какие условия среды, корма, рН среды, температуры в сочетании могут давать высокий темп деления инфузорий.

В настоящее время этот метод культивирования протистов широко и эффективно применяется протозоологами и цитологами для решения ряда научных задач. Массовое периодическое культивирование свободноживущих протистов позволяет получать большое количество материала.

Получение искусственных культур – второй путь, дающий постоянный лабораторный материал. Он предусматривает использование определенных сред, нередко специфичных, для культивирования отдельных видов или определенных их групп.

Культивирование кишечных простейших на специальных питательных средах является биологическим методом обогащения, позволяющим из единичных экземпляров паразитов получить достаточное их количество. Увеличение количества экземпляров в результате их размножения на питательной среде облегчает обнаружение и изучение паразитов.

Культивирование патогенных протистов осуществляется в термостате при 37 градусах. Пересевы проводятся через день.

Малярийные плазмодии и токсоплазмы не растут на искусственных питательных средах. Их, как и вирусов, культивируют в культуре ткани, курином эмбрионе и в организме восприимчивого животного.

Культивирование анаэробов сложнее, чем аэробов, так как их необходимо лишить доступа свободного кислорода воздуха. Для этого из питательной среды удаляют воздух, применяя различные способы:

1. Удаление кислорода механическим путем. Анаэробные микроорганизмы можно культивировать в обычных чашках Петри, помещая их сразу после засева в анаэроостат, из которого затем откачивается воздух. Анаэроостаты – это вакуумные металлические или стеклянные эксикаторы.

2. Замещение воздуха в анаэроостате азотом, аргоном, водородом или смесью азота с углекислым газом.

3. Культивирование в высоком столбике агара с глюкозой. При этом способе микроорганизмы растут на дне, защищенные от воздуха высоким слоем среды. Метод Виньяля – Вейона заключается в том, что посев производят в пробирку с расплавленным и остуженным до 45 градусов агаром. Содержимое пробирки перемешивают и набирают в пастеровскую пипетку при помощи груши, заполняя пипетку до самого верха. Необходимо следить, чтобы в пипетку не попали пузырьки воздуха. Тонкий конец пипетки запаивают и пипетку помещают в термостат. В толще агара вырастают изолированные колонии анаэробов.

4. Добавление в среду редуцирующих (окисляющих) веществ. Используют среду Китт – Тароцци, содержащую в качестве редуцирующих веществ 0,5 % раствор глюкозы, кусочки печени или яичного белка. Перед посевом среду кипятят 20 мин на водяной бане для удаления из нее растворенного кислорода. Перед посевом в пробирку на поверхность питательной среды наливают стерильное масло слоем 0,5–1,0 см для защиты анаэробов от проникновения кислорода.

5. Биологический метод Фортнера. В чашку Петри наливают толстым слоем агар с 5 % крови. Чтобы культуры не смешивались, по диаметру чашки делают желобок в агаре. На одну половину питательной среды засевают аэробы, на другую – анаэробы. Края чашки тщательно заливают парафином. Посевы ставят в термостат. Сначала вырастают аэробы, а после поглощения ими кислорода, находящегося в чашке, начнут развиваться анаэробы.

По происхождению и составу питательные среды можно разделить на **натуральные** (природные), **синтетические** и **полусинтетические**. Натуральные среды бывают растительного и животного происхождения. Синтетические среды готовят из определенных химически чистых соединений указанных концентраций. Полусинтетические среды имеют сложный

состав. Компонентами этих сред (углеводы, фосфаты, нитраты и другие) являются натуральные продукты: мясной отвар, дрожжевой экстракт, пивное сусло.

По назначению среды бывают: **стандартные** или среды общего назначения (в таких средах выращивают или накапливают биомассу протистов); **специальные** среды или среды специального назначения. Эти среды предназначены для выявления тех или других биохимических особенностей микроорганизмов или для получения их культур, которые обладают особыми свойствами.

3.1. Амебодные протисты

Амеб культивируют преимущественно в стеклянных сосудах (некоторые сорта стекла для амеб токсичны!). Для массовых культур удобны невысокие бюксы, чашки Коха и т.п., для клонирования – солонки, пластинки с лунками и т.д. Обнаруженных в них амеб переносят в заранее приготовленную питательную среду.

Почвенно-древесный настой. Наиболее часто применяется для культивирования *A. proteus*. Составляется смесь из почвенного настоя и настоя на древесных ветках.

Почвенный настой готовится заливкой $\frac{1}{4}$ по объему огородной почвы $\frac{3}{4}$ сырой воды и выдерживается 7–10 дней. В течение такого же срока настаивается сырая вода на молодых ветках лиственных деревьев (лучше березы). После сливания равных частей этих настоев среда готова для заражения через 5–7 дней, в зависимости от степени развития в ней простейших, служащих пищей амебам. Для заражения такой среды амеб вылавливают пипеткой из ила, в пробе, взятой в водоеме. Пересевы на свежую среду производят раз в 2–3 месяца.

Отвар рисовых зерен. Для этого круто отваривают рис, несколько десятков отдельных рисовых зерен помещается в чашки Петри и заливается кипяченной водой. Через несколько дней, когда вокруг зернышек разовьется бактериальная флора, производится заражение амебами. Амебы прекрасно размножаются, их легко выбирать из чашки пипеткой под лупой. Пересевать амеб в новые чашки нужно раз в два–три месяца.

Агар-агар. Благоприятная питательная среда для культивирования амеб. Агар-агара – 0,5–1,0 гр.; водопроводной воды – 90 см³, обыкновенного щелочного питательного бульона – 10 г. После кипячения разливают в чашки Петри и стерилизуют.

Для периодической массовой культуры простейших используются и неорганические среды. Предложены многочисленные рецепты неорганических сред для культивирования амёб. Ниже приводится состав обычно используемых для этой цели солевых растворов.

Среда Чокли используется в нескольких модификациях. Одна из них имеет следующий состав (в гр. на 1 л дистиллированной воды): NaCl – 0,08, Na₂HPO₄ – 12, H₂O – 0,001, NaHCO₃ – 0,004, KCl – 0,002, CaHPO₄ – следы.

Среда Прескотта (в гр. на 1 л дистиллированной воды): NaCl – 0,01, MgSO₄ – 0,002, CaCl₂ – 0,01, CaHPO₄ – 0,004, KCl – 0,006.

Среда Принсгейма (в гр. на 1 л дистиллированной воды): Ca(NO₃)₂•H₂O – 0,2, MgSO₄•7H₂O – 0,02, KCl – 0,026, FeSO₄•7H₂O – 0,002, Na₂HPO₄•2H₂O – 0,02.

В любом из этих растворов амёбы культивируются одинаково хорошо.

Такие «прудовые» культуры часто используют для поддержания основных штаммов в коллекциях, так как они требуют минимума оборудования и внимания. Однако они имеют ряд существенных недостатков: более или менее отчетливо выраженная фазность; различное физиологическое состояние; клонирование и массовое выращивание амёб затруднено, либо вовсе не удается; наличие сопутствующих трудно удалимых организмов.

Значительно более совершенным является метод, предложенный Прескоттом и Джеймсом и разработанный далее Гриффином. Суть его в том, что амёб содержат в неорганической среде (например, среде Прескотта) и периодически добавляют им живые, тщательно промытые пищевые организмы (инфузории *Tetrahymena pyriformis*). Их выращивают в аксенических (безбактериальных) культурах на 2 % растворе протеозопептона или дрожжевом экстракте (70 г пекарских дрожжей кипятят в 1 литре водопроводной воды в течение часа, освобожденный от остатков дрожжевых клеток отвар разводят вдвое 1/45 М фосфатным буфером, pH 6,5–7,0, разливают в сосуды и автоклавируют). Среду заливают стерильно тетрахименами из аксенической культуры и инкубируют при комнатной температуре 2–3 суток. Затем тетрахимен собирают, концентрируют и отмывают от остатков культуральной среды трехкратным центрифугированием при небольших скоростях (порядка 800 g) со свежими порциями среды Прескотта, разбавляют этой средой до нужной плотности суспензии и в таком виде используют для кормления амёб.

Хорошие результаты дает следующий режим кормления: среду Прескотта в культуре амёб меняют ежедневно (можно сливать ее прямо через край культурального сосуда, т.к. основная масса амёб достаточно прочно

прикреплена к его стенкам), корм дают через день, после очередной смены среды, в таком количестве, чтобы к следующему дню почти все тетрахимены были съедены.

Во всех случаях следует опасаться перекорма культур, т.к. это часто приводит, по неизвестным причинам, к непоправимому ухудшению их состояния и, в конце концов, к вымиранию.

Сосуды с амебами следует держать при 17–25°C в затемненном месте. Время от времени, по мере загрязнения дна и стенок сосуда, культуру нужно переливать в чистый сосуд. Сбор раковинных амеб в природе, культивирование в лаборатории, приготовление питательной среды и рассаживание на предметные стекла осуществляется так же, как указано для голых амеб (Зеликман, 1969).

Для культивирования кишечных амеб применяется среда, в состав которой входят четыре яйца и среда Локка (1000 мл дистиллированной воды, NaHCO₃ – 0,2 г, хлористый кальций – 0,2 г, KCl – 0,4 г, NaCl – 9,0 г, глюкозы – 2,5 г, рН среды – 7,4). Для получения скошенной поверхности среды, пробирки в наклонном положении помещают в аппарат для свертывания и выдерживают при 70 градусах до затвердевания. Перед посевом в пробирку с плотной питательной средой добавляется несколько капель инактивированной человеческой или лошадиной сыворотки и 1–2 петли стерильного рисового отвара (<http://mikrobio.ho.ua/contents-4-2-2.html>).

3.2. Жгутиковые

Минеральной средой для пресноводных зоофлагеллят может служить профильтрованная и стерилизованная вода, взятая из места их обитания. Эвглены и другие жгутиконосцы могут быть получены на некоторых средах вместе с амебами (сенной настой), а также и на специальных средах.

Пептоно-виноградная среда: 0,5 г пептона, 0,5 г виноградного сахара, 0,2 г лимонной кислоты, 0,2 г сернокислой магнезии, 0,05 г. фосфорнокислого калия (K₂HPO₄) и 100 см³ воды.

Навозный настой. Культивирование *Bodo* удается в «навозных» культурах. Небольшое количество слегка перепревшего конского навоза заливают на $\frac{3}{4}$ водой. Через несколько дней наблюдается массовое развитие различных простейших, и в том числе *Bodo*.

Искусственные среды: некоторые виды *Euglena* (*E. gracilis*, *E. viridis*, *E. deses*) удается довольно легко культивировать в минеральных средах:

Среда Кноппа: вода дистиллированная 1000 г, $MgSO_4$ – 0,25, $Ca(NO_3)_2$ – 1,0, KH_2PO_4 – 0,25, KCl – 0,12, $FeCl_3$ – следы.

Среда Бенекс: вода дистиллированная 1500 г, NH_4NO_3 – 0,3, $CaCl_2$ – 0,15, K_2HPO_4 – 0,15, $MgSO_4$ – 0,15, $FeCl_3$ – следы.

Среда Прагга: KNO_3 – 0,1, $MgSO_4$ – 0,01, K_2HPO_4 – 0,01, $FeCl_3$ – 0,001 г/л.

Основная масса зоофлагеллят питается бактериями. Наиболее пригодными при выращивании жгутиконосцев являются бактерии *Aerobacter aerogenes*. Для культивирования жгутиконосцев в среду добавляют живых или убитых бактерий. Можно в среду вместо бактерий добавлять любое быстро разлагающееся органическое вещество, которое служит пищей для бактерий: стерильное молоко, этанол, метанол, дрожжевой автолизат, уксуснокислый натрий, пептон, глюкоза, сахароза, мясной бульон (0,25 % либиховского экстракта). Мясной бульон готовится путем кипячения в воде мелко нарезанных кусочков мяса (без жира). Бульон фильтруется через вату. Несколько его капель добавляют к минеральной среде. Стерильность среды для культивирования эвглен не требуется. Для более длительного хранения бульон следует простерилизовать обычным способом в автоклаве. Бульон можно добавлять к почвенной вытяжке (вместо искусственной минеральной среды) и получить также хорошую среду для культивирования эвглен.

Для культивирования вольвоксов готовят питательную среду на почвенном наваре. 3 кг сухой огородной земли кипятят в 2 л воды в эмалированной посуде, а затем настаивают в течение двух дней и фильтруют. Профильтрованную жидкость уваривают до 0,5 л и добавляют в нее немного хлористого железа ($FeCl_3$). Навар можно хранить в пробирке, закрытой пробкой из стерильной ваты. При использовании навар для приготовления среды его разбавляют в 40 раз дистиллированной водой. В приготовленную таким образом питательную среду вносят живых вольвоксов, накрывают сосуд стеклом и ставят на светлое место (например, на подоконнике).

Для большинства видов зоофлагеллят оптимальная для развития активная реакция среды составляет pH – 6–8, а температура +20–+25°C. Для культивирования аэробных жгутиконосцев необходимо, чтобы уровень культуральной жидкости не превышал 1–3 см. Наиболее подходящими сосудами для длительного культивирования зоофлагеллят являются чашки Петри и плоскодонные колбы. Недостаток кислорода вызывает гибель аэробов. Посуда должна быть тщательно вымыта хромовой смесью. Культуральные среды стерилизуют в автоклаве 20 мин при давлении 1 атм. Минеральные среды необходимо готовить из химически чистых

селей. Малейшие концентрации тяжелых металлов (меди, свинца, ртути) вызывают гибель зоофлагеллят.

Для того чтобы легче было выловить эвглен, сосуд, в котором они содержатся, оборачивают со всех сторон черной бумагой с вырезанным в ней небольшим отверстием. Сосуд ставят в светлое место, и в течение суток все эвглены скапливаются около отверстия, откуда их и вылавливают пипеткой.

3.3. Инфузории

Культуры инфузорий наиболее широко используются в научных исследованиях, в учебном процессе, в последнее время привлекают внимание как объект биотехнологии. Для их получения наиболее часто используются: сенной отвар, молочный раствор, настой салата, сенной настой, агар и др.

Сенной отвар. Культуральной средой может служить сенной отвар: 15 грамм сухого измельченного сена кипятят в колбе с чистой водой в течение 15–30 минут, затем фильтруют. Среду разливают в чашки Коха или в стеклянные банки. Сосуды с отваром оставляют открытыми на несколько дней, пока в нем не разовьются в массе сенные бактерии (*Bacillus subtilis*), являющиеся прекрасной пищей для инфузорий. Через 1–2 дня в отвар вносят парameций, которые в таких культурах быстро размножаются и сохраняются несколько недель. Чтобы поддерживать культуру, ее необходимо время от времени пересевать, т.е. полстакана культуры прибавляют в банку со свежим санным настоем или иной питательной жидкостью.

Молочный раствор. В чистые химические пробирки (лучше новые, не бывшие в употреблении) наливают по 15–20 куб. см. воды (водопроводной, колодезной, дождевой). В каждую пробирку прибавляют по 2–3 капли сырого молока и взбалтывают. В каждую пробирку впускают примерно 10–20 парameций и неплотно затыкают кусочком ваты. Через 5–7 дней инфузории сильно размножаются и могут жить в этой пробирке месяцами. Два раза в месяц в пробирки добавляют по капле молока.

Кроме парameций, на молочном растворе с таким же успехом разводятся брюхоресничные инфузории – стилонихии и спиростомум. В молочном растворе инфузории питаются размножающимися молочно-кислыми бактериями.

Настой салата. В стеклянные сосуды с кипяченой водой опускают предварительно прокипяченный мешочек из «газа» или тюля с листьями

салата. Сосуды закрывают стеклянной пластинкой. В таком настое развивается, особенно благоприятная для питания туфельек, бактериальная флора. Еще лучше, если основной жидкостью для культуры берется 0,025 % водный раствор либиховского экстракта.

Сенной настой. Берут луговое сено, режут его и кладут в стеклянный сосуд с дождевой водой. Дня через три к подученному сенному настою приливают полстакана воды из пруда или водоема, богатого разлагающимися органическими веществами.

С течением времени в культуре появляются различные инфузории; в конце концов, появляются и туфельки *Paramecium*. Культура оказывается наиболее богатой недели через две после прибавления прудовой воды. На поверхности культуры образуются точечные пленки из скопившихся бактерий, среди которых движется много инфузورий.

Агар-агар. Легко можно культивировать инфузورий на обыкновенном агаре, который употребляется для культуры амёб. Несколько инфузорий пипеткой переносят на агар-агар, где они быстро размножаются при содержании культуры в тепле (+15–20°C). Получающаяся культура пригодна для изучения вегетативных форм и их деления.

Приготовление среды: агар-агара – 0,6–1,0 г, водопроводной воды – 90 см³, обыкновенного щелочного питательного бульона – 10 г. После кипячения разливают в чашки Петри и стерилизуют.

Экстракт свиного мозга. Позволяет получить богатую и почти чистую культуру *Paramecium* (в большинстве *P. aurelia*). 120 грамм свиного мозга нарезают на кусочки и раздавливают в воде; смесь оставляют стоять на полдня и затем продавливают ее через чистую салфетку. Полученный «мозговой сок» разбавляют водой до одного литра и разливают в банки, куда прибавляют по 1 см³ сенного настоя. Инфузории появляются дня через три. Поверхностную пленку с культуры удаляют каждый день.

Для получения возможно более чистых культур, 0,025 % водный раствор либиховского экстракта засевают *Bacillus proteus*, которые вытесняют другие бактерии. Затем в жидкость пускают многократно отмытых в стерильной воде парамеций, которые размножаются за счет питания бактериями.

Для изучения конъюгации пользуется водными культурами инфузорий, для чего в часовое стекло помещают инфузорий из разных культур.

Активные хищники *Dileptus*, *Didinium* хорошо разводятся на сенных или навозных культурах при наличии достаточного количества пищи. Пищей могут служить живые инфузории туфельки, которых разводят в отдельной культуре. Небольшое количество их необходимо добавлять к среде, в которой живут хищные инфузории.

Дилептусы очень хорошо живут в чашках Петри на зернах риса. Получается многочисленная культура: на рисе разводят бактерий, которые служат пищей инфузориям (парамеции). Последними, в свою очередь, питаются хищники. При отсутствии пищи дилептусы и дидиниумы легко инцистируются. Столь же легко они выходят из цист при пересеве на свежую среду.

Можно использовать минеральную **среду Лозина-Лозинского**. Так, инфузория *Spirostomum ambiguum* культивируется на минеральной среде следующего состава: (мг/л): KCL – 4, NaCl – 30, CaCl₂•2H₂O – 5, MgCl₂ 6H₂O – 5, NaHCO₃ – 7,5. В качестве корма используют бактерий *Aerobacter aerogenes* или *Bacillus subtilis*, а также дрожжи *Saccharomyces ellipsoides* (в отношении 1:1 по объему сырой массы). Кормление производят один раз в неделю. После четырёх кормлений культуры очищают и обновляют.

При культивировании балантидий может быть использована **среда Френкеля** (4,0 г аспарагина, 6,0 г ammonium lacticum, 2,0 г двухзамещенного фосфорнокислого калия, 5,0 г NaCl, 1000 мл дистиллированной воды). Среда стерилизуется в автоклаве в течение 20 минут при 120°C, 1 атм. Затем к ней добавляются стерильные лошадиная сыворотка в разведении 1:10 и 2–3 капли крахмала (рН среды 7,2–7,4).

3.4. Культивирование анаэробных симбиотических протистов

В настоящее время разработаны различные методы культивирования протистов, для существования которых необходимо наличие хозяина (комменсалы, мутуалисты и паразиты). В основном это жгутиконосцы и инфузории.

Так, для *Proteomonas laceratae viridis*, представителя класса Proteromonadea типа Opalinata (непатогенного обитателя кишечника моллюсков, ящериц, черепах и пр.) разработано 2 типа культур in vitro. Это аксенические культуры на жидкой питательной среде и культивирование с добавлением дрожжей *Candida* sp. (Kulda, 1973).

Ряд видов *Retortamonas* и *Chilomastix* (жгутиконосцы, непатогенные обитатели кишечника некоторых позвоночных) выделены в культуры in vitro и живут в них при регулярной смене культуральной среды в течение длительного времени. Для культивирования чаще всего используются двухфазные среды, пригодные для роста кишечных амёб и трихомонад. Наиболее часто используются модифицированные среды на растворе Рингера и Рингера–Локка с добавлением сыворотки крови и со-

держимого куриного яйца. Среда подвергается стерилизации в автоклаве.

Для содержания культур необходимы следующие условия. Культуральная среда должна иметь рН в пределах 7,2–7,4. Жгутиконосцы, обитающие в кишечнике млекопитающих, растут наиболее быстро при 35–37°C, виды из кишечника птиц – при 38–40°C, виды же из кишечника амфибий, рептилий и беспозвоночных – при комнатной температуре в анаэробных условиях. При комнатной температуре способны размножаться также виды из кишечника млекопитающих и птиц, но развитие культуры идет значительно медленнее. В культурах ретортамонады регулярно образуют цисты.

Культивирование *in vitro* гипермастигид рода *Cryptocercus*, населяющих кишечник термитов и тараканов, осуществляется в особой камере, где поддерживаются особый режим, имитирующий анаэробные условия (95 % азота и 5 % углекислого газа при свободном кислороде 0,8–20 мкм при 13°C).

Культуры *in vitro* получены для немногих видов эндопаразитических диплонад. Культуру *Giardia (Lambliа) intestinalis* впервые получил Карапетян (1960), вычленив трофозонты из дуоденального содержимого человека. В состав питательных сред, выбранных для этой культуры, были включены солевые растворы Ханкса и Эрла, куриный эмбриональный экстракт, сыворотка крови человека, перевар Хотгйнгера и антибиотики: пенициллин, стрептомицин. Лямблии росли в культуре вместе с дрожжевыми грибами *Candida quilliermondi*, которые обитают в двенадцатиперстной кишке человека. Культуры *Giardia intestinalis* росли при 37°C в анаэробных условиях в течение 7 мес. Получены также аксенические культуры *Giardia intestinalis*.

Большинство попыток культивировать эндопаразитические виды *Hexamita* пока не увенчались успехом. Получены только временные культуры *H. salmonis* и *H. nelsoni*. Такие же временные культуры получены при попытках выращивания на курином эмбрионе *Spironucleus meleagridis* и видов рода *Enteromonas*.

Разработана впервые методика культивирования свободноживущих диплонад – обитателей водоемов с высоким содержанием органических веществ, обитателей сооружений биологической очистки сточных вод. К ним относятся анаэробные виды: *Trigonomonas tortuosa*, *T. inflata*, *Trepomonas agilis*, *T. rotans*, *Hexamita inflata*, *H. fissa*, *H. caudata*, *H. mutabilis*. В качестве оптимальной питательной среды для этих жгутиконосцев предложена среда Пратта (KNO₃ – 0,1, MgSO₄ – 0,01, KHPO₃ – 0,01, FeCl₃ – 0,001 г/л) с добавлением 1 г пептона или мясо-пептонного бульона на 1 л среды. Среда не должна содержать кислорода, так как любая его концентрация губительна для анаэробов, рН должен быть равен 6,5–7,8, а водородный показатель рН – 17–18 единиц. Пищей для свободноживущих диплонад в культуре

служат бактерии *Klebsiella (Aerobacter) aerogenes* или бактерии из очистных сооружений. Для культур благоприятна температура 7–12°C.

Изучение трихомонадид культуры *in vitro* имеет особое значение и широко используется с целью диагностики трихомонозов животных и человека для электронно-микроскопических и биохимических работ, изучения антигенных свойств форм изменчивости, а также воздействия факторов внешней среды. Разработаны методы клонирования трихомонадид в культурах, изучения вирулентности клонов, специфичности к хозяину разных видов трихомонадид, действия лекарственных препаратов и пр.

Наиболее хорошо разработаны методы культивирования и питательные среды для патогенных видов трихомонадид: *Trichomonas vaginalis*, *T. gallinae*; *T. suis* и других. Эти культуры требуют совершенно определенных условий, при которых возможно их длительное содержание: анаэробные условия, для некоторых – наличие CO₂, температура 37°C и другие. Для культивирования *Trichomonas vaginalis* предложено много разнообразных сред. Культуры этого вида на минеральных средах известны с начала 20-х гг. нашего столетия.

В настоящее время разработан целый ряд сред для аксенических культур трихомонадид, а также полужидкие и плотные среды, содержащие разные количества агар-агара. Состав питательных сред различен. Обычная печеночная среда с добавлением цистеина, пептона и мальтозы, печеночная среда с добавлением цистеина, триптозы и мальтозы, а также упрощенная среда – сыворотка крови с триптиказой. В культуральные среды добавляют антибиотики: пенициллин, стрептомицин, неомицин и другие с целью уничтожения бактерий, что необходимо для длительного культивирования трихомонадид.

В изучении морфологии, клеточного метаболизма, патогенности и других особенностей биологии трихомонадид большое значение имеет замораживание их культур при сверхнизких температурах от –79 до –190°C. Разработаны специальные режимы замораживания и оттаивания. Например, аксенические культуры *Trichomonas vaginalis* замораживались до температуры –190°C с добавлением в них 5 % ДМСО в качестве криопротектора. При замораживании культур, находившихся в поздней логарифмической или ранней стационарной фазах, выживало 80–100 % трихомонад. Размораживание культур проводилось также ступенчато. В опытах ряда исследователей получены данные о том, что после замораживания в жидком азоте и пребывания в таком состоянии в течение 2 лет *T. vaginalis* не только сохраняет жизнеспособность, но и не теряет патогенность.

T. gallinae хорошо переносит замораживание в жидком азоте с добавлением ДМСО или глицерина. В культурах эти трихомонады находились

в замороженном состоянии 12 лет, после чего оставалось живыми свыше 90 % особей. Они были подвижны и без каких-либо морфологических изменений.

Замораживание при -79 , -95 и -190°C хорошо переносят также *Tritrichomonas foetus*, *Trichomonas tenax* и *Pentatrichomonas hominis*, если при охлаждении культур в них добавляют ДМСО или глицерин.

4. ФИКСАЦИЯ И ИЗГОТОВЛЕНИЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИСТОВ

Основным методом изучения протистов является, исследование их *in vivo*. Для микроскопического исследования объекты помещаются по возможности в ту же среду, в которой они живут. Чаще всего это пресная вода, для паразитов – содержимое того органа, где они паразитируют или физиологический раствор NaCl, или раствор Рингера (состав: дистиллированной воды 100 см³, NaCl – 0,85 г, KCl–0,025 г, CaCl₂–0,03 г). В растворе Рингера паразиты выживают гораздо дольше, чем в растворе NaCl. Наблюдения можно вести просто взяв с поверхности культуры пипеткой каплю на предметное стекло, покрыв покровным стеклом без ножек.

Амеб достают из культуры либо пипеткой, либо кладут чистое покровное стекло плашмя на поверхность культуры; при этом амебы обычно скапливаются на стекле. Через 15–30 минут стекло вынимают и помещают "лицом вниз" (т.е. смоченной в культуре стороной) на маленькую каплю той же жидкости на предметном стекле.

При наблюдении голых амёб суживают диафрагму микроскопа, так как на очень светлом поле зрения прозрачные амебы могут остаться незамеченными.

Рассматривая инфузорий на живом материале, применяют кроме обычных светооптических систем фазово-контрастное устройство, что резко улучшает видимость ресничных образований.

Серьезным препятствием при изучении многих объектов *in vivo* является их подвижность. Для преодоления этого используют различные методы. Наиболее обычным является осторожное придавливание объекта между покровным и предметным стеклами, что достигается путем отсасывания жидкости фильтровальной бумагой.

К удовлетворительным результатам приводит также (особенно для инфузорий) следующий прием: на предметном стекле в капле жидкости с изучаемым объектом препаровальными иглами расщипывается на отдельные волокна кусочек гигроскопической ваты и препарат покрывается покровным стеклом. Благодаря тигмотаксису мелкие животные как бы "прилипают" к волокнам ваты, оставаясь некоторое время неподвижными или мало подвижными.

Для замедления движения инфузорий и других протистов можно перенести их в каплю раствора вишневого клея или чистого гуммиарабика. Раствор не должен быть очень густым. В вязкой среде движения животного замедляются.

Лучшим средством замедления движения инфузорий и других протистов является коррагеновый мох. Несколько кусочков мха промываются перед употреблением в 0,5 % растворе соды, заворачиваются в кусочек мягкой промтой марли и опускаются на дно сосуда с культурой инфузорий. На 100 мл³ – 4–6 г мха. Движение инфузорий уже на третий день сильно замедляется. Для более быстрого сгущения жидкости с инфузориями берут несколько капель на предметное стекло и жидкость быстро начинает подсыхать и загустевать.

Кроме того, для быстрого или ускоренного замедления движения инфузорий берут 1–2 веточки коррагенового мха, промывают в 0,5–1 % растворе соды и опускают в небольшую емкость с 5–8 см культуры инфузорий. Через несколько часов образуется почти совершенно загустевшая масса, в которой простейшие движутся чрезвычайно медленно. При этом отлично видно движение каждой реснички.

Обездвиживание крупных инфузорий (*Spirostomum*, *Paramecium*, *Stentor*) достигается заливкой в 0,5–1,5 % раствор желатина. Данный метод обеспечивает надежное закрепление тела инфузории, без каких-либо визуальных повреждений.

К некоторым простейшим (*Stentor*, сувойки и др.) применяется анестезия высокой температурой. Предметное стекло с каплей простейших осторожно нагревается до температуры 30–35°C. При этом движение прекращается, но разрушения еще не происходит. Малейший перегрев вызывает гибель организма и распад клетки.

При изучении особенностей морфологии протистов на живых объектах в ряде случаев используется окраска витальными красителями, и прежде всего нейтральным красным (1:1000). Эта краска хорошо контрастирует объекты и отчетливо выявляет пищеварительные вакуоли.

Форма, длина и характер формирования псевдоподий амёб изучаются с помощью прижизненной окраски 0,01 % раствором альциановой сини, который выявляет слой гликокаликса, хорошо развитый у амёб.

Для фиксации протистов особенно часто применяется жидкость Шаудина при изготовлении тотальных препаратов, срезов и мазков. Готовится следующим образом: сулема (насыщенный раствор) – 2 части, спирт (96° или абсолютный) – 1 часть. Обычно применяют в подогретом (50–60°C) состоянии. Срок фиксации 5–10 минут. После фиксации по Шаудину особенно хорошо красятся ядра.

Очень хорошие результаты дает метод Бресслау. На предметное стекло наносится очень маленькая капля воды с простейшими и рядом с ней такой же величины, капля 100 % раствора Opalblau (лучше с прибавлением на 1 см³ этого раствора 6 капель Phloxinhodamin). Обе капли на пред-

метном стекле смешиваются и размазываются по стеклу, мазок быстро подсушивается в струе теплого воздуха, а затем препарат заключается в канадский бальзам.

Изучение ядер у амёб проводят на постоянных препаратах изготовленных следующим образом. На поверхность водной культуры, где имеется пленка с амёбами, осторожно помещают одно или несколько покровных стекол; они не тонут благодаря своему небольшому весу и существованию пленки поверхностного натяжения. Через несколько часов (12–24 часа) стекла снимают и той же самой стороной опускают на поверхность слегка нагретой фиксирующей жидкости Шаудина. Этот раствор фиксирует, быстро убивает, уплотняет и консервирует амёб, сравнительно мало изменяя при этом их форму и внутреннюю структуру. Для фиксирования амёб достаточно 2–3 минут, после чего стекло с фиксированными и при этом плотно прилипшими к нему формами переносят в йодированный спирт (на 100 частей 70° спирта – 1–2 грамма обыкновенной йодной тинктуры) для отмывания сулемы. При обесцвечивании йодного раствора приливают его до тех пор, пока цвет не перестанет изменяться (10–15 мин), так как если в протоплазме останется сулема, она впоследствии, уже в готовом препарате, выкристаллизуется и испортит препарат.

Затем покровное стекло последовательно отмывают 70° спиртом и дистиллированной водой и переносят в водный раствор гематоксилина по Делафилдну и оставляют в нем на 24 часа; после этого отмывают в водопроводной воде, быстро переводя через спирты возрастающей концентрации, вплоть до абсолютного, и ксилол (или гвоздичное масло) заключают в канадский бальзам.

Изготовление тотальных микропрепаратов раковинных амёб ведется так же, как описано для голых амёб; микропрепараты раковин готовятся более простым путем. Раковины раковинных корненожек не нуждаются в фиксации, окраске, обезжизивании и просветлении; вместо канадского бальзама можно использовать смесь глицерина-желатины. Приготовление: 7 г кристаллической желатины размочить в течение 2–3 ч в 42 см³ дистиллированной воды; добавить 50 г глицерина и 0,5–1 г кристаллической карболовой кислоты; смесь, помешивая, подогреть на водяной бане, профильтровать через стеклянную вату и охладить; смесь затвердевает в прозрачную желеобразную массу.

Раковинные корненожки также фиксируются и опрашиваются жидкостью Люголя, которая окрашивает полисахариды, контрастирует контуры раковинки и устья, выявляет структуру раковинки, что способствует более точному определению видов.

Покровное стекло, снятое с поверхностной пленки аквариума с приставшими к нему раковинами, перенести на сутки в глицерин. Кусочек приготовленной смеси поместить в центре предметного стекла и слегка подогреть (над пламенем спиртовки, на металлической пластинке, лежащей на электроплитке, или иным путем); смесь разжижается; накрыть ее покровным стеклом с раковинами корненожек и очень осторожно подогреть с тем, чтобы избежать бурных токов смеси, которые могут вынести объект за пределы покровного стекла. Смесь должна заполнить все пространство под покровным стеклом, не выступая за края его.

Изучение строения жгутиконосцев проводят как на живом материале, так и на фиксированном.

Так, эвглен можно консервировать 96° спиртом; затем перенести в смесь равных объемов 96° спирта и глицерина и заключить в смесь глицерин-желатины.

Для заключения эвглен в глицерин-желатин на предметное стекло пипеткой наносят капельку спирто-глицериновой смеси, вырезают небольшой кусочек глицерин-желатины и кладут его на чистое покровное стекло, которое осторожно подогревают снизу, держа пинцетом над спиртовкой. Следить, чтобы от нагревания не появлялись пузырьки воздуха в желатине; когда она от действия тепла расплавится, стекло быстро переверачивают каплей желатины книзу и осторожно кладут на капельку смеси с эвгленами; желатина растекается под покровным стеклом и быстро застывает. Чтобы предотвратить его высыхание, края покровного стекла обводят железным лаком.

Для обнаружения жгута эвглен к капле культуры на предметном стекле прибавляют каплю 10-процентного раствора красителя – опаловый синий. Тотчас же делают на том же стекле тонкий мазок: другое (чистое) предметное шлифованное стекло подводят к капле смеси (культуры и красителя) и, удерживая стекло в наклонном положении, передвигают его вдоль первого стекла; смесь распределяется на предметном стекле тонким слоем. После подсыхания на мазок наносится капля канадского бальзама или глицерин-желатины, накрывается покровным стеклом. Бесцветные жгутики видны на голубом фоне красителя.

Для обнаружения хроматофоров эвглены обесцвечиваются. Для этого их держат 1–2 дня в темноте; парамил при этом потребляется, а хроматофоры выступают отчетливее. Фиксируют 2-процентным формалином, обезвоживают глицерином: к капле воды с фиксированными эвгленами добавляют каплю глицерина и осторожно ее отсасывают; поверх кладут комочек смеси глицерин-желатины, подогревают и накрывают покровным стеклом.

Простейший способ изготовления микропрепаратов вольвоксов: к капле воды с отсаженными фиксированными вольвоксами прибавляют немного порошка гуммиарабика (на кончике скальпеля), оставляют препарат для высыхания (накрыть каким-нибудь колпаком), наносят на образовавшуюся пленку каплю канадского бальзама или глицерин-желатины, накрывают покровным стеклом.

Предпочтительнее готовить микропрепараты на гуммиарабиковой смеси: в каплю такой смеси на предметном стекле пересаживают несколько фиксированных в формалине вольвоксов и накрывают покровным стеклом. Не требуется при этом ни обезжизивания, ни просветления объекта. Способ приготовления гуммиарабиковой смеси: 1 часть сухого гуммиарабика растворить в 10 частях дистиллированной холодной (без подогревания) воды с добавлением 10 частей глицерина; использовать через несколько месяцев после приготовления.

Раковины фораминифер фиксируют 70-градусным спиртом. Микропрепараты готовят на канадском бальзаме с проведением из 96-градусного спирта через абсолютный спирт или, при его отсутствии, через карбол-ксилол: одна объемная часть карболовой кислоты и четыре части ксилола.

Структура многих инфузорий хорошо сохраняется при фиксации их в парах OsO_4 .

Для этого поступают следующим образом: небольшую каплю с инфузориями на предметном стекле переворачивают жидкостью вниз над открытым сосудом с 2 % раствором осмиевой кислоты. Пары ее быстро убивают инфузорий, хорошо сохраняя их форму и реснички. Препарат покрывают покровным стеклом; изучение ведется без окраски в капле воды. Можно использовать также кратковременную фиксацию в осмиевых смесях (5–15 мин) с последующим рассмотрением объекта без окраски в капле воды. При этом хорошо видны кинетиды.

Прибавленная к такому препарату слабая уксусная кислота отчетливо выявляет ядерный аппарат, а прибавление йода – реснички и жгуты, причем окрашивается крахмал (в синий цвет) и гликоген (в красно-бурый цвет). При прибавлении 2–4 % раствора соды очень рельефно выступают ресничный аппарат, различные другие эктоплазматические отростки, а также строение рта и глотки.

Для изучения ядерного аппарата инфузорий используются тотальные препараты, фиксированные сулемовыми или пикриновыми смесями и приклеенные к стеклу целлоидином. Жидкость с живыми объектами наносят тонкой пипеткой на чисто вымытое обезжиренное стекло, распределяют равномерно по его поверхности. Избыток воды отсасывают.

На стекло наливают несколько капель фиксатора (удобна жидкость Буэна). Через 10–20 минут фиксатор сливают или отсасывают. Стекло ополаскивают 96° спиртом. Объекты, слегка приклеившиеся фиксатором, остаются при этом на стекле. После этого на угол стекла с объектами наносят каплю (из пипетки) жидкого раствора целлоидина на смеси равных частей абсолютного спирта и серного эфира (0,25–0,5 %). Покачиванием стекла добиваются равномерного растекания целлоидина. Стекло с объектами, покрытыми целлоидиновой пленкой, переносят на 10–15 мин. (можно и больше) в 70° спирт для уплотнения пленки. После уплотнения целлоидина стекло промывается в воде и препарат окрашивается. Такая методика позволяет надежно приклеить протистов к стеклу и прекрасно сохраняет тончайшие цитологические детали.

Часто при изготовлении тотальных препаратов из протистов применяется метод центрифугирования. Пробы с густой культурой протистов сливают в центрифужную пробирку и центрифугируют. Осадок из живых инфузорий (после отсасывания пипеткой воды) обрабатывают в течение одной минуты горячим сулемовым спиртом, затем снова центрифугируют, удаляют сулемовый раствор и помещают осадок с инфузориями в 70° спирт, смешанный с равным объемом люголевского раствора (1 г металлического йода, 1 г йодистого калия, 100 см³ дистиллированной воды), на две минуты (жидкость осторожно перемешивают, наклоняя пробирку); указанную смесь заменяют 70° спиртом на две минуты, затем осадок с инфузориями переводят в воду на 1–2 минуты; на 4 часа объект помещают в 2,5 % водный раствор железо-аммиачных квасцов; потом снова центрифугируют и после короткого промывания водой (несколько секунд) переводят в старый (не менее 4-недельной давности созревания) 1 % водный раствор гематоксилина (растворять в горячей воде). Сливают краску, и осадок снова переводят в раствор железо-аммиачных квасцов для дифференцировки (оттягивания) краски. Степень дифференцирования контролируют на пробках парамеций под микроскопом; дифференцирование доводят до выявления ядер в виде черных или темно-синеватых образований на фоне сероватой протоплазмы. Затем объекты промывают водой и через 70° и 96° спирт переводят (пользуясь всякий раз центрифугой) в абсолютный спирт, затем в кедровое масло. Здесь окрашенные инфузории могут храниться долгое время. Препарат готовят, нанося на чистое предметное стекло каплю канадского бальзама; в ее центр помещают капельку кедрового масла с инфузориями, взятую капиллярной пипеткой. Препарат покрывают покровным стеклом, предварительно перемешав осторожно чистой иглой масло с бальзамом. Под покровное стекло кладут вместо ножек обломки покровного же стекла.

Особенно важно при изучении инфузорий хорошо разобраться в строении ротового аппарата и ресничных образований. Для этого применяют различные методики импрегнации солями серебра.

Методика Шаттона и Львова в модификации Корлиса.

1. Фиксация инфузорий в солонке свежеприготовленной смесью Шампи 1–5 мин. Жидкость Шампи состоит из следующих компонентов:

Двуххромовокислый калий ($K_2Si_2O_7$) 3 % – 40 см³.

Хромовая кислота 1 % – 40 см³.

Осмиевая кислота 2 % – 20 см³.

2. Постепенная замена смеси Шампи раствором Да-Фано (пипеткой оттягивается смесь Шампи и другой пипеткой добавляется раствор Да-Фано). Состав смеси Да-Фано: $CaNO_3$ – 1 г, $NaCl$ – 1 г, формалин 40 % – 10 см³, дистиллированная вода – 90 см³. Выдерживают объекты в растворе Да-Фано не менее 2 часов. При необходимости в растворе можно хранить объекты неделями.

3. Отмывают инфузорий от раствора Да-Фано в 2–3 сменах дистиллированной воды.

4. Дальнейшую работу продолжают на нагревательном столике 37–45°C (можно заменить чашкой Петри, в которую налита горячая вода).

5. Каплю с инфузориями помещают на подогретое (очень чистое) предметное стекло и добавляют каплю предварительно подогретой солевой желатины (состав ее: желатина – 10 г, хлористый натрий химически чистый – 0,05 г, дистиллированная вода – 100 см³). Каплю с простейшими и каплю желатины перемешивают тёплой стеклянной палочкой. Размазывают по стеклу (по размеру покровного стекла). Избыток оттягивают подогретой пипеткой. Дальнейшие процедуры проводят при температуре 5–10°C. В качестве холодильника можно использовать чашку Петри, на дно которой положены кусочки льда и фильтровальная бумага.

6. Предметное стекло с объектом в желатине переносят на несколько минут в холодильную камеру для застывания желатины.

7. Предметное стекло с объектом помещают в 3 % раствор азотнокислого серебра (заранее охладить). Раствором можно пользоваться 2–3 раза. Продолжительность выдерживания в растворе варьируют в зависимости от размеров объекта в пределах 10–30 минут.

8. Быстро и тщательно промывают объект в 2–3 сменах холодной дистиллированной воды.

9. Препарат погружают на глубину 3–4 см в чашку с холодной водой, которую ставят в большую чашку со льдом. Выставляют под источник УФ света. Проявлять следует в белой фарфоровой чашке, либо под стеклянную прозрачную чашку положить лист белой бумаги. Время восста-

новления серебра в препаратах зависит от мощности источника УФ излучения. Удобно пользоваться ртутно-кварцевыми лампами ПРК, широко применяемыми в медицинской практике. Время освещения под такой лампой 30–40 мин. Расстояние от препарата до источника света 20–30 см.

10. После прекращения экспозиции быстрая отмывка в 70° холодном спирте.

Дальнейшие манипуляции проводятся при комнатной температуре.

11. Обезвоживание в 96° и абсолютном спирте, просветление в ксилоле или в толуоле, заключение в бальзам.

При удавшейся окраске в черный цвет импрегнируется каждая кинетосома, что дает ясную картину распределения ресничного аппарата.

Гораздо проще методика, предложенная Клейном. Каплю культуры с объектами размазывают по стеклу и высушивают на воздухе (без нагрева). Сухой мазок (лучше через несколько дней после высушивания) на 6–8 мин помещают в 2 % раствор азотнокислого серебра. Промывают дистиллированной водой и в белой фарфоровой чашке выставляют на свет (не прямой солнечный, но достаточно яркий). Срок освещения 4–10 часов в зависимости от яркости света. При освещении УФ ртутной лампой срок сокращается до 20–30 мин. Отмывают в воде, высушивают и заключают в бальзам. Импрегнируются кинетосомы, частью реснички, фибриллярные структуры.

Инфузорий из желудка жвачных консервируют в 10 % растворе формалина прямо на бойне. Инфузорий заключают или в глицерин-желатин (предварительно проводя через воду с глицерином (1:1) и чистый глицерин), или же окрашивают борным кармином, дифференцируют подкисленным спиртом и, в конце концов, заключают в канадский бальзам.

5. ОПРЕДЕЛИТЕЛЬ НЕКОТОРЫХ ШИРОКО РАСПРОСТРАНЕННЫХ ПРЭСНОВОДНЫХ ПРОТИСТОВ

Определитель включает лишь наиболее распространенные формы. Идентификация здесь идет только до рода.

Размеры протистов варьируют от нескольких микрон до нескольких миллиметров. В приведенном ключе оцениваются как «мелкие» – меньше 15 мкм, «среднего размера» – 15–50 мкм, «крупные» – более 50 мкм.

1. Одноклеточные организмы с подвижными ресничками, жгутиками или псевдоподиями. Эти органеллы в норме используются для движения или для создания токов воды (например, при захвате пищи). Клетки одиночные или входят в состав колоний, сидячие или свободно передвигающиеся. Формы с хлоропластами или без них 2.

– Существуют многочисленные организмы, которые благодаря своим очень малым размерам и (часто) свободной подвижности могут быть легко спутаны с простейшими. К ним относятся, например, диатомовые и сине-зеленые водоросли, бактерии, а также низшие Metazoa, такие как коловратки, гастротрихи, турбеллярии (см. специальную литературу об этих организмах).

2. Клетки мелкие или средние со жгутиками, могут образовывать агрегаты или крупные колонии. Жгутики относительно величины клетки длинные, в количестве 1, 2 или 4. Клетки мелкие или среднего размера 3.

– Клетки без жгутиков, с относительно короткими многочисленными ресничками или псевдоподиями 21.

3. Клетки прикреплены к субстрату, одиночные или в виде колоний. Виды с хлоропластами редки 4.

– Клетки не прикреплены, а плавающие или скользящие 7.

4. Клетки без хлоропластов 5.

– Клетки с хлоропластами. Образуют средних или крупных размеров колонии, причем каждая клетка живет в органическом домике. Домики

вставлены друг в друга, благодаря чему возникают древовидные колонии. Клетки мелкие *Dinobryon* (рис. 1).

5. Клетки с единственным апикальным жгутиком, окруженным тонким цитоплазматическим воротничком. Одиночные или колониальные формы. Клетки прикреплены к субстрату либо непосредственно, либо с помощью тонкой органической или состоящей из кремнеземных игл оболочки. Часто встречаются стебельки. Клетки мелкие: *Choanoflagellida* (воротничковые жгутиконосцы) *Salpingoeca* (рис. 2, а); *Monosiga* (рис. 2, б).

– Жгутиконосцы без воротничка, обычно с двумя жгутиками 6.

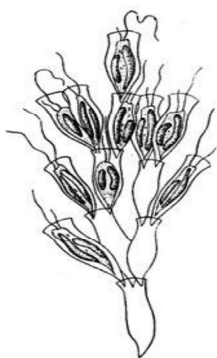
6. Одиночные двухжгутиковые жгутиконосцы, живущие в тонких бокаловидных домиках из органического материала. Один из жгутиков, торчащий из домика, используется для загона пищи. Другой направлен назад внутри домика и крепит к нему клетку. Клетки способны внезапно сокращаться. Мелкие формы *Bicoeca* (рис. 3).

– Колониальные организмы, образующие шаровидные агрегаты на концах ветвей внеклеточного стебелька. Стебелек мягкий гранулярный, у основания часто коричневатый. Клетки мелкие, колонии среднего размера или крупные *Anthophysa* (рис. 4).

7(3) Клетки образуют колонии (хлоропласты обычно имеются) 8.

– Клетки одиночные. Виды с хлоропластами или без них 9.

8. Золотистые шаровидные колонии. Клетки среднего размера, связаны друг с другом задними концами, каждая с двумя почти равной длины, но неодинаковыми по форме жгутиками. *Synura* (рис. 5).



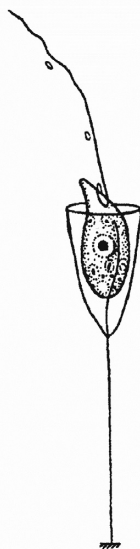
1



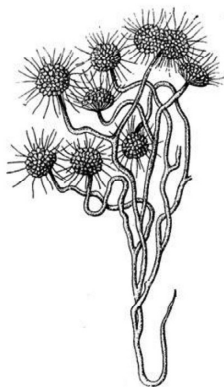
2a



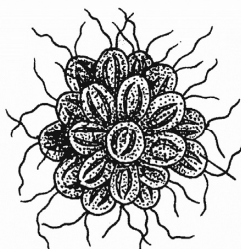
2б



3



4



5

Рис. 1–5. 1 – *Dinobrion*; 2 а – *Salpingoeca*; 2 б – *Monosiga*;
3 – *Bicosoeca*; 4 – *Anthophysa*; 5 – *Synura*

– Колония ярко-зеленая: жгутиконосцы отряда Volvocida. Клетки погружены в слизь, каждая из которых имеет стенку и равные по длине жгутики. Размеры колоний варьируют от мелких клеточных агрегатов до крупных сфер *Pandorina* (рис. 6, а), *Volvox* (рис. 6, б).

9(7) Клетки с хлоропластами 10.

– Клетки без хлоропластов 16.

10. Клетки с ярко-зелеными хлоропластами 11.

– Клетки с хлоропластами другого цвета 12.

11. Клетки мелкие или средние, с двумя или четырьмя жгутиками на одном из полюсов, окружены прозрачной стенкой, придающей ей жесткость. Обычно имеется один хлоропласт и одно глазное пятно (стигма) в хлоропласте: жгутиковые отряда Volvocida. *Chlamydomonas* (рис. 7, а), *Carteria* (рис. 7, б).

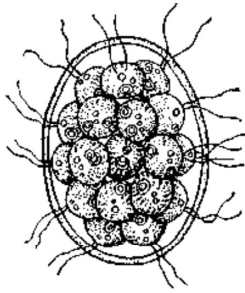
– Клетки средние или крупные, как правило, с одним хорошо видимым жгутиком, многими пластидами, и одной стигмой, лежащей вне хлоропластов. Организмы иногда с очень изменчивым телом: жгутиконосцы отряда Euglen *Euglena* (рис. 8, а); *Phacus* (рис. 8, б).

12(10). Красноватые клетки с толстой жесткой клеточной стенкой. Мелкие формы *Haematococcus* (рис. 9).

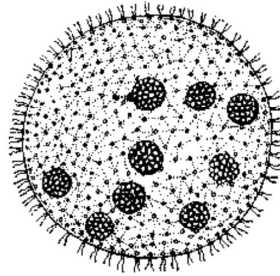
– Клетки с зелеными, оранжевыми или золотистыми хлоропластами 13.

13. Клетки кажутся окрашенными в тона от оранжевого до синевато-черного, что зависит от цвета стенки домика. Каждая клетка живет в гладком или шиповатом домике с узким отверстием, из которого торчит наружу единственный жгутик. Пластиды зеленые. Виды среднего размера *Trachelomonas* (рис. 10).

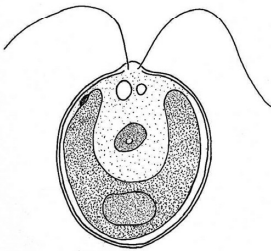
– Жгутиконосцы с хлоропластами, имеющие иное строение 14.



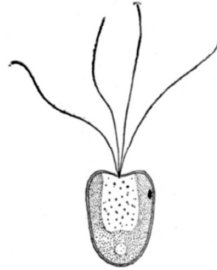
6a



6б



7a



7б



8a



8б

Рис. 6–8. 6 а – *Pandorina*, 6 б – *Volvox*, 7 а – *Chlamydomonas*,
7 б – *Carteria*, 8 а – *Euglena*, 8 б – *Phacus*

14. Клетки постоянной формы. Поверхность голая или покрыта панцирем из отдельных пластинок. Два жгутика, из которых один в желобке, проходящем по экватору клетки, а другой в продольном желобке, направленном назад. Виды среднего размера или крупные: отряд Dinoflagellida *Gymnodinium* (рис. 11, а); *Ceratium* (рис. 11, б).

– Строение клеток иное

15.

15. Клетки постоянной формы. Два жгутика одинаковой длины выходят из слегка скошенного углубления на переднем конце клетки. Несколько продольных рядов светопреломляющих частиц (эжектосом) располагаются ниже жгутиков. Обычно с двумя зелеными, золотистыми иногда оливково-зелеными, красными или синими пластидами. Клетки мелкие или средних размеров: отряд Gruptomonadida *Cryptomonas* (рис. 12).

– Клетки не жесткие или с панцирем из силикатных чешуек или игл. Два жгутика неравной длины на переднем полюсе клетки. У некоторых видов возможен фагоцитоз. Две пластиды золотистого цвета. Мелкие формы: отряд Chrysomonadida *Ochromonas*, *Nallomonas* (рис. 13).

16(9). Клетки постоянной формы. Два жгутика одинаковой длины выходят из слегка скошенного углубления на переднем конце клетки. Несколько продольных рядов светопреломляющих частиц (эжектосом) располагаются ниже жгутиков. Обычно с двумя зелеными, золотистыми, иногда оливково-зелеными или синими пластидами (но есть исключения). Мелкие или средних размеров формы: отряд Gruptomonadida *Cryptomonas* (рис. 12).

– Клетки изменчивой формы

7.

17. Клетки скользят по субстрату

18.

– Клетки плавают

19.

18. Мелкие клетки с двумя жгутиками: одним тонким, направленным назад, и одним, направленным обычно вперед: подотряд Bodonina. У *Rhynchomonas* передний жгутик укорочен и превращен в подобие хоботка. Клетки большей частью скользят по субстрату. Однако *Bodo saltans*

может на короткое время прикрепляться задним жгутиком к субстрату и выполнять тогда прыгающие движения. Мелкие формы *Bodo* (рис. 14).

– Виды с одним или двумя жгутиками, из которых один направлен назад. Клетки могут выполнять перистальтические движения (метаболия): отряд Euglenida. Иногда наблюдаются палочковые аппараты, служащие для приема пищи. Мелкие или средних размеров формы. *Peranema* (рис. 15, а), *Entosiphon* (рис. 15, б).

19(17). Гибкие, хотя частично окруженные стенкой клетки с двумя-четырьмя жгутиками на одном из полюсов: бесцветные Voivocida. Мелкие формы *Polytomella* (рис. 16).

– Клетки непостоянной формы 20.

20. Один видимый жгутик. Клетки плавают медленно, по спирали: Euglenida. Формы средних размеров *Astasia* (рис. 17).

– Мелкие короткие клетки с несколькими тонкими жгутиками, которые начинаются от переднебокового края клетки и в некоторых случаях направлены назад: Diplomonadida *Trepomonas* (рис. 18, а); *Hexamita* (рис. 18, б).

21. Клетки передвигаются и захватывают пищу с помощью псевдоподий. Хлоропластов нет: отряд Amoebida. Тело голое, лишенное плотной оболочки или раковинки, лишь изредка имеется уплотненная пелликула 22.

– Клетки не передвигаются очевидным образом с помощью псевдоподий (главным образом инфузории и солнечники) 34.

22. Организмы живут в жесткой раковинке с одним иногда двумя отверстиями, через которые выходят псевдоподии 23.

– Организмы не живут в раковинке 25.

23. Раковинка целиком органическая, с возрастом становится коричневатой. Мелкие или среднего размера формы *Arcella* (рис. 19, а), *Centropyxis* (рис. 19, б).

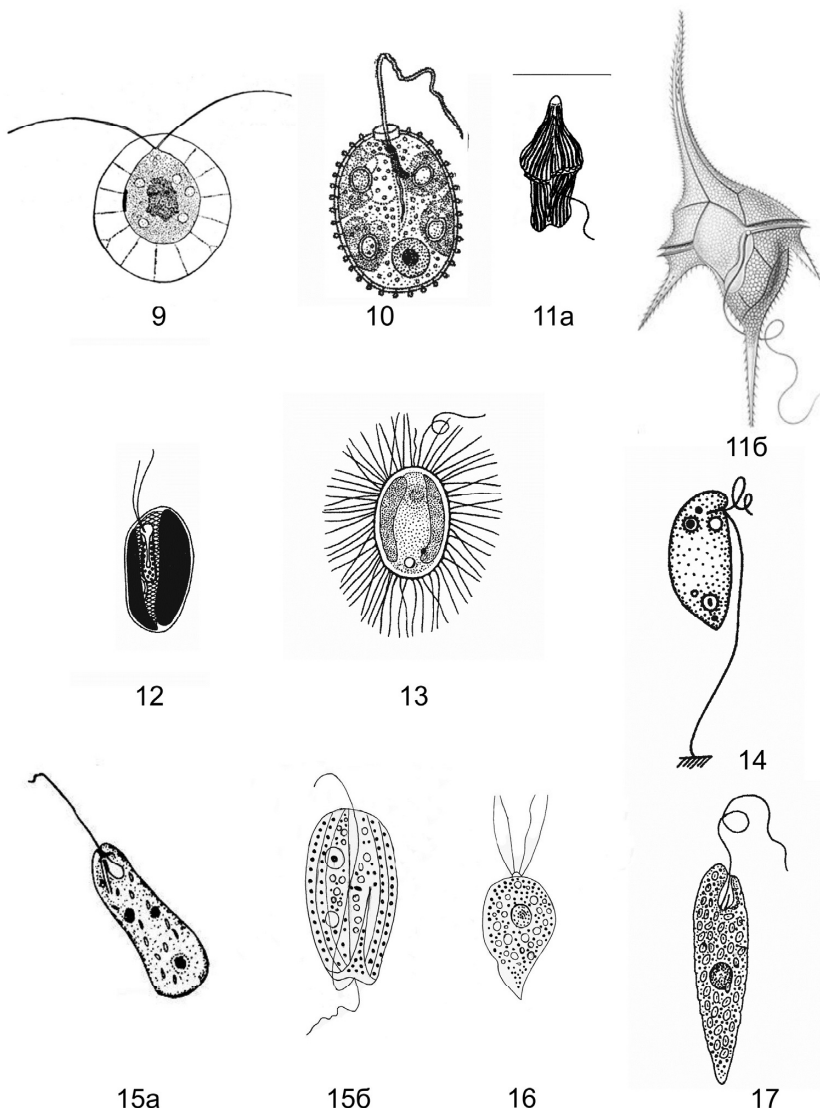


Рис. 9–17. 9 – *Haematococcus*, 10 – *Trachelomonas*, 11 а – *Gymnodinium*,
 11 б – *Ceratium*, 12 – *Cryptomonas*, 13 – *Mallomonas*, 14 – *Bodo*,
 15 а – *Peranema*, 15 б – *Eathosiphons*, 16 – *Polytomelia*, 17 – *Astasia*

– Раковинка состоит преимущественно из частиц, выделенных или захваченных клеткой 24.

24. Раковинка вытянута по продольной оси, иногда шаровидная, может быть слегка сжата с боков, с встроенными посторонними частицами, например, створками диатомей, зёрнами песка. Мелкие или среднего размера формы *Diffugia* (рис. 20).

– Раковинка из силикатных пластинок правильной формы (овальные или округлые), выделенных клеткой. Мелкие или среднего размера организмы *Nebela* (рис. 21, а); *Trinema* (рис. 21, б).

25(22). Амебы с очень гибкой оболочкой из очень тонких чешуек. Мелкие или среднего размера формы *Cochliopodium*.

– Амебы иного строения 26.

26. Клетки с нитевидными псевдоподиями. Особи мелкие или среднего размера 27.

– Клетки с широкими закруглёнными псевдоподиями. Размеры от мелких до крупных 28.

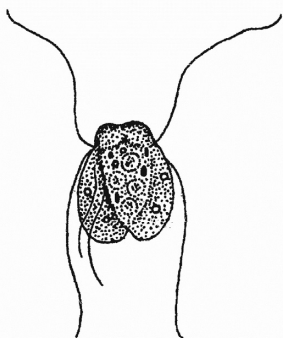
27. На поверхности находятся частицы, захваченные из среды или же выделенные самим организмом. Мелкие или среднего размера формы *Elaeorhanis*, *Pinaoiophora*.

– Поверхность тела голая. Некоторые виды заглатывают водоросли. Формы среднего размера *Nuclearia*, *Vampyrella*.

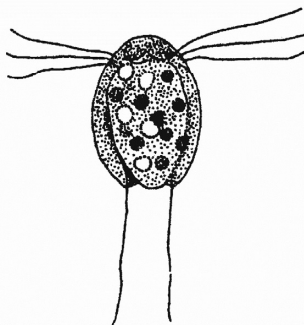
28(26). Амёбы с многочисленными широкими закругленными псевдоподиями. Обычно крупные формы 29.

29. Амебы с одним большим складчатым ядром. Крупные формы *Amoeba* (рис. 22).

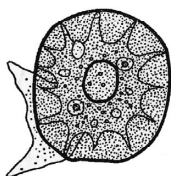
– Амебы более чем с одним крупным ядром. Ядра трудно различимы. Крупные формы *Chaos* (рис. 23).



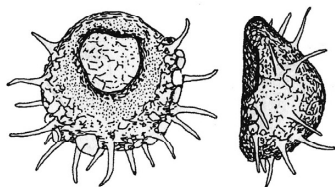
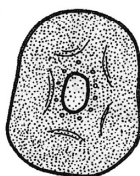
18a



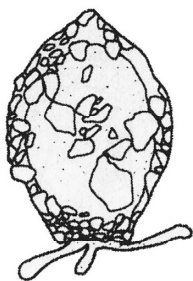
18б



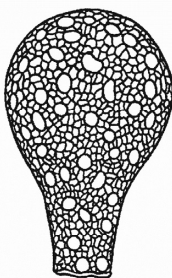
19a



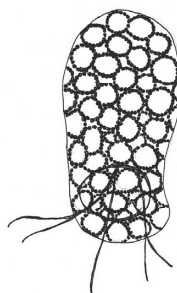
19б



20



21a



21б

Рис. 18–21. 18 а – *Trepomonas*, 18 б – *Hexamita*, 19 а – *Arcella*, 19 б – *Centropyxis*, 20 – *Diffugia*, 21 а – *Nebela*, 21 б – *Trinema*

30(28). Амеба движется как единственная лобоподия. Размеры от очень мелких до крупных 31.

– Клетки иного строения 33.

31. Крупные многоядерные амебы, ядер до нескольких сотен. Клетки как бы наполнены зернами песка. Уроид стильно складчатый. Крупные формы, во время движения форма тела меняется мало, широколопастные псевдоподии всегда направлены вперед *Pelotuxa* (рис. 24).

– Амебы иного строения 32.

33. Движение спокойное, типа равномерного перетекания. Мелкие или среднего размера формы *Saccamoeba* (рис. 22, б), *Thecamoeba* (рис. 22, а).

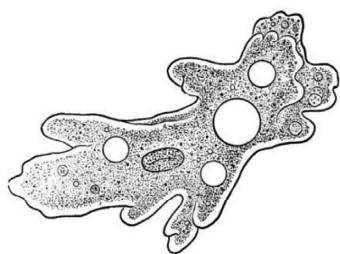
– Трубчатой формы амебы с одной псевдоподией, которая внезапно (эруптивно) начинает расти в одном направлении (впечатление вытекания содержимого из лопнувшего мешочка). Многие формы без культивирования не поддаются точному определению. Амебы могут образовывать жгутиковые стадии и цисты. Мелкие формы *Naegleria* (рис. 26).

33(30). Формы с многочисленными короткими коническими псевдоподиями. Формы среднего размера *Mayorella* (рис. 27).

– Амебы с тонкими нитевидными субпсевдоподиями, отходящими от одной широкой псевдоподии. Мелкие формы *Acanthamoeba* (рис. 28).

34(21). Клетки с жесткими лучевидно расположенными аксоподиями или щупальцами: *Heliozoa* и *Suctorina* 35.

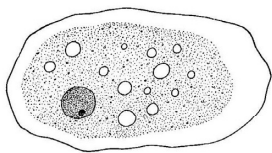
– Клетки с ресничками, служащими для движения и (или) захвата пищи 36.



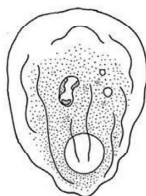
22



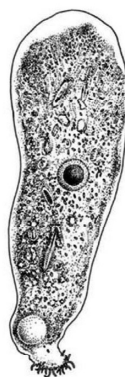
23



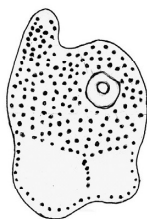
24



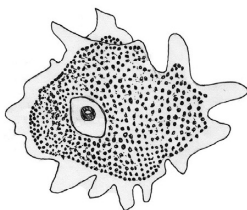
25a



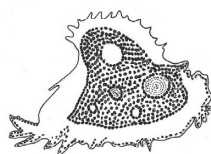
25b



26



27



28

Рис. 22–28. 22 – *Amoeba*, 23 – *Chaos*, 24 – *Pelomyxa*, 25 a – *Thecamoeba*, 25 б – *Saccamoeba*, 26 – *Naegleria*, 27 – *Mayorella*, 28 – *Acanthamoeba*

35. Клетки с жесткими лучевидно расходящимися аксоподиями. Тело без окружающей его раковинки. Ядро одно, центрально расположенное. Нет отчетливой границы между экто- и эндоплазмой. Некоторые виды несут на теле чешуйки или шипы. Мелкие или средних размеров формы: *Heliozoa* *Actinophrys* (рис. 29, а), *Acanthocystis* (рис. 29, б).

– На концах щупалец характерные, головчатые утолщения. Добыча (преимущественно инфузории) «высасывается» с помощью этих щупалец. Свободно передвигающиеся личинки с ресничками образуются в результате почкования. Взрослые организмы обычно прикреплены к субстрату стебельком или домиком. Тело относительно постоянной формы. Средних размеров или крупные организмы: *Suctorina Discophria*, *Tokophria* (рис. 30).

36(34). Сидячие инфузории, прикреплённые к субстрату с помощью выделенного ими же стебелька. Время от времени образуют подвижных бродяжек. В препарате под покровным стеклом взрослые формы нередко отделяются от стебелька и начинают свободно плавать 37.

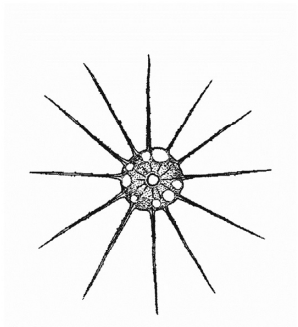
– Свободно передвигающиеся инфузории 40.

37. Бокаловидные клетки с цитоплазматическим воротничком на апикальном полюсе. Реснички, находящиеся в желобке внутри воротничка, прижизненно видны с трудом. Эктобионты на ракообразных. Формы среднего размера *Spirochona* (рис. 31).

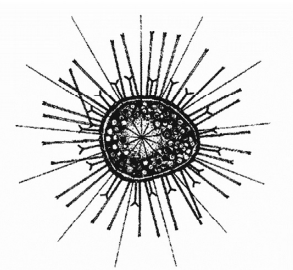
– Строение иное 38.

38. Клетки в форме трубы. Апикальная поверхность окаймлена хорошо развитой полосой ресничек. Тело с равномерной цилиатурой. Как правило, ярко окрашенные формы (зеленые, голубые, красноватые). Клетки очень сократимы; они легко отделяются от субстрата. Крупные формы *Stentor* (рис. 32).

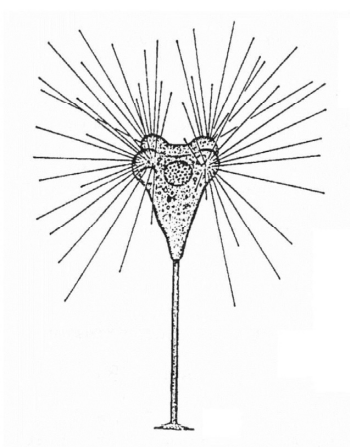
– Клетки конической формы с апикальным венчиком ресничек, но без цилиатуры на теле (в лучшем случае имеется ресничный, поясок сзади). Обычно тело и (или) стебелек сократимы: отр. *Peritrichida* 39.



29a



29б



30



31

Рис. 29–31. 29 а – *Actinophryus*, 29 б – *Acanthocystis*,
30 – *Tokophrya*, 31 – *Spirochona*

39. Колониальные формы; клетки крупные *Carchesium* (рис. 33, а); *Zoothamnium* (рис. 33,б).

– Одиночные формы; клетки крупные *Vorticella* (рис. 34).

40(36). Виды, ползающие по субстрату; при неблагоприятных условиях могут отделяться от субстрата и плавать 41.

– Свободноплавающие формы, способные в поисках пищи ползать по субстрату 48.

41. Клетки с хорошо развитыми вентральными циррами, дающими им способность "бегать" по субстрату; отряд *Hypotrichida* 42.

– Цирр нет 44.

42. Ротовой аппарат малозаметен. Формы среднего размера *Aspidisca* (рис. 35).

– Имеется адоральная зона мембранелл, проходящая по телу от переднего края клетки до вентрально расположенной ротовой области 43.

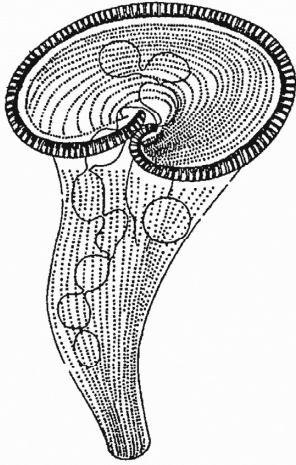
43. Форма тела постоянная. Цирры, как правило, развиты хорошо. Формы средних размеров *Euplotes* (рис 36, а), *Stylonichia* (рис.36, б).

44(41) Клетки с эндобионтными водорослями. Тело равномерно покрыто ресничками, имеется адоральная полоса мембранелл. Крупные формы *Climacostomum* (рис. 38).

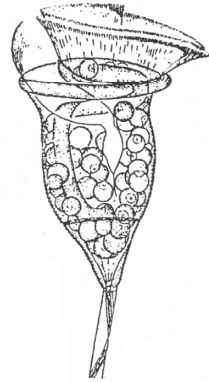
– Строение иное 45.

45. Рот в серповидном углублении близ переднего конца клетки. Цитоплазма сильно вакуолизирована. Инфузории среднего размера *Loxodes* (рис. 39).

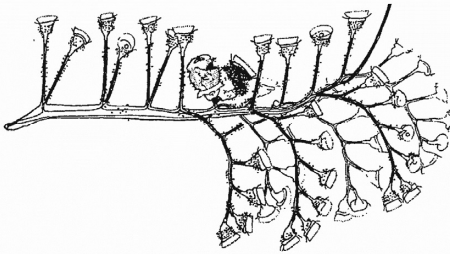
– Строение иное 46.



32



33a



33б

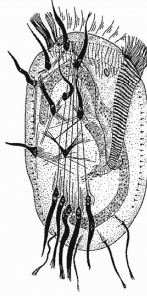


34

Рис. 32–34. 32 – *Stentor*, 33 а – *Carchesium*,
33 б – *Zoothamnium*, 34 – *Vorticella*



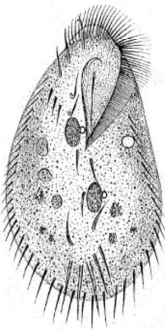
35



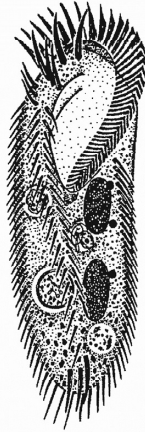
36a



36b



37a



37b



38

Рис. 35–38. 35 – *Aspidisca*, 36 а – *Euplotes*, 36 б – *Stylonychia*,
37 а – *Oxytricha*, 37 б – *Holosticha*, 38 – *Climacostomum*

46. В ротовой области реснички, служащие для захвата пищи. Формы среднего размера *Glaucoma* (рис. 40, а), *Cinetochilum* (рис. 40, б).

– Реснички для захвата пищи не используется 47.

47. Рот расположен в средней части вентральной стороны тела не на поверхности, а в глубокой ямке (преддверии), усилен палочковым аппаратом. Вентральная сторона тела плоская, дорсальная, выпуклая. Окрашенные формы *Clamydodon* (рис. 41, а), *Nassula* (рис. 41, б).

– Рот без палочкового аппарата, но с многочисленными токсическими, используемыми для ловли и умерщвления добычи. Крупные формы *Homalozoon*, *Litonotus* (рис. 42).

48(40). Клетки без равномерного ресничного покрова. Они могут иметь несколько цирр в экваториальной области, однако передвигаются главным образом с помощью сильно развитой адоральной зоны мембранелл. Характер движения "прыгающий": отряд Oligotrichida. Формы среднего размера *Halteria* (рис. 43, а); *Strombidium* (рис. 43, б).

– Строение иное 49.

49. Клетки с довольно жесткой поверхностью, на которой шипы и складки 50.

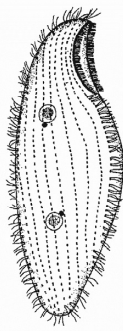
– Клетки без видимых шипов и складок 51.

50. Конусовидные клетки со спирально проходящей щелью, ведущей к хвостовому шипу. Формы среднего размера *Caenomorpha* (рис. 44).

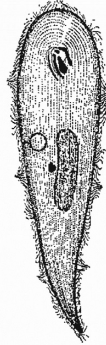
– Мелкие уплощенные клетки с ресничным покровом, редуцированным до нескольких пучков ресничек *Epalkella* (рис. 45).

51(49). Клетки с равномерным ресничным покровом на теле и адоральной полосой мембранелл: отряд Heterotrichida 52.

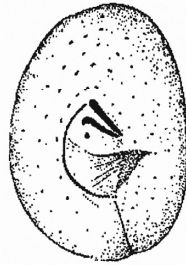
– Виды с равномерным ресничным покровом на теле, но без адоральной зоны мембранелл 53.



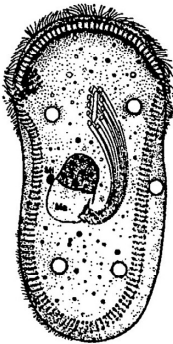
39



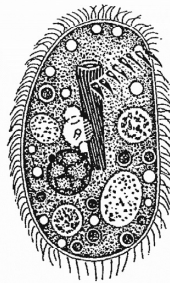
40a



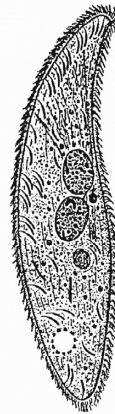
40б



41a

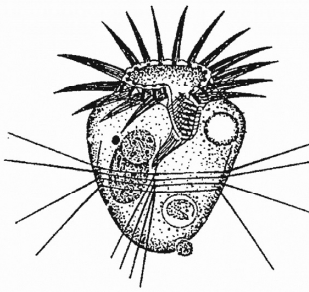


41б

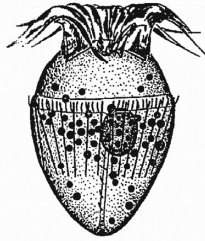


42

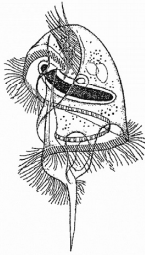
Рис. 39–42. 39 – *Loxodes*, 40 а – *Glaucoma*, 40 б – *Cinetochilum*,
41 а – *Chlamydodon*, 41 б – *Nassula*, 42 – *Litonotus*



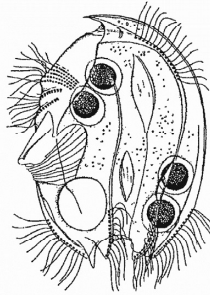
43a



43б



44



45



46

Рис. 43–46. 43 а – *Halteria*, 43 б – *Strombidium*;
44 – *Caenomorpha*; 45 – *Epalxella*; 46 – *Spirostomum*

52. Явственно сократимые клетки размером часто до нескольких миллиметров *Spirostomum* (рис. 46), *Stentor* (рис. 32).

– Клетки несократимы, иногда явственно пигментированы. Формы среднего размера или крупные *Blepharisma* (рис. 47, а), *Metopus* (рис. 47, б).

53(51). В основном вытянуты в длину клетки с ротовой полостью, в которой с помощью густо сидящих ресничек создаются токи воды и отфильтровываются пищевые частицы 54.

– Клетки без ротовой полости или она плохо выражена 55.

54. Когда клетки неподвижны и питаются, у них различима «вуаль» из ресничек, огибающая рот с одной стороны. Формы средних размеров *Ciclidium* (рис. 48, а), *Pleuronema* (рис. 48, б).

– Ротовой аппарат без ресничной «вуали». Пищей, как правило, служат бактерии. Формы средних размеров или крупные *Paramecium* (рис. 49, а); *Colpidium* (рис. 49, б).

55(53). Бочонковидные формы с многочисленными мелкими пластинками в кортексе. Формы средних размеров или крупные *Coleps* (рис. 50).

– Строение иное 56.

56. Тело бочонковидное 57.

– Тело иной формы. Ротовой аппарат, лежащий на переднем конце клетки или вблизи него, окружен токсистами, используемыми при ловле добычи. Формы среднего размера или крупные *Lacrymaria* (рис. 51, а), *Dileptus* (рис. 51, б).

57. Рот на переднем полюсе, часто с палочковым аппаратом и токсистами вокруг ротового отверстия. Формы среднего размера или крупные *Didinium* (рис. 52, а), *Prbrodon* (рис. 52, б).

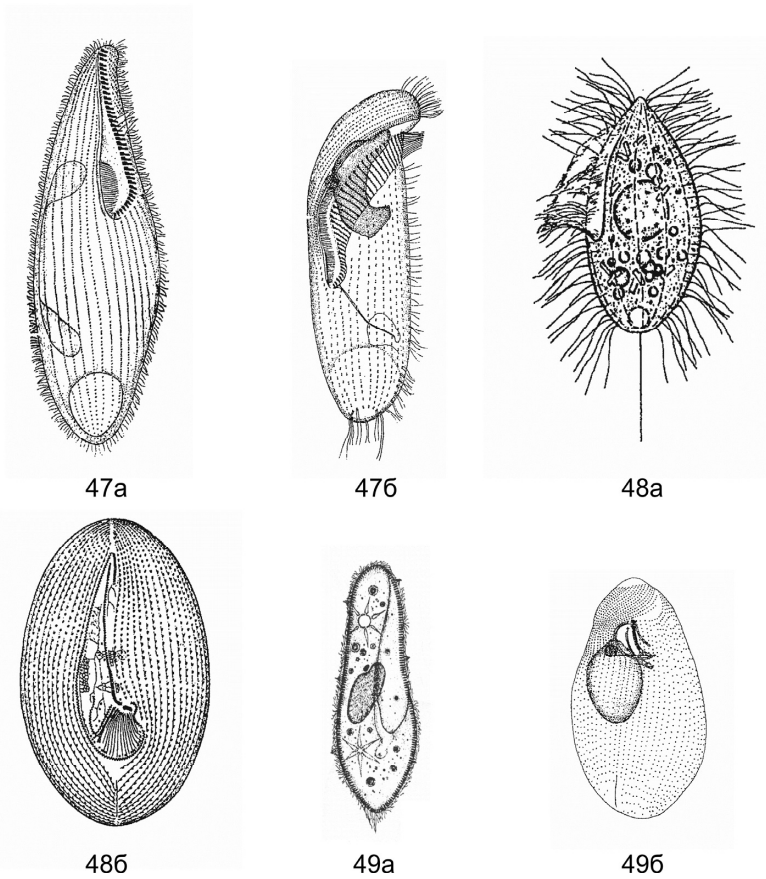


Рис. 47–49. 47 а – *Blepharisma*, 47 б – *Metopus*,
 48 а – *Cyclidium*, 48 б – *Pleuronema*, 49 а – *Paramecium*, 49 б – *Colpidium*

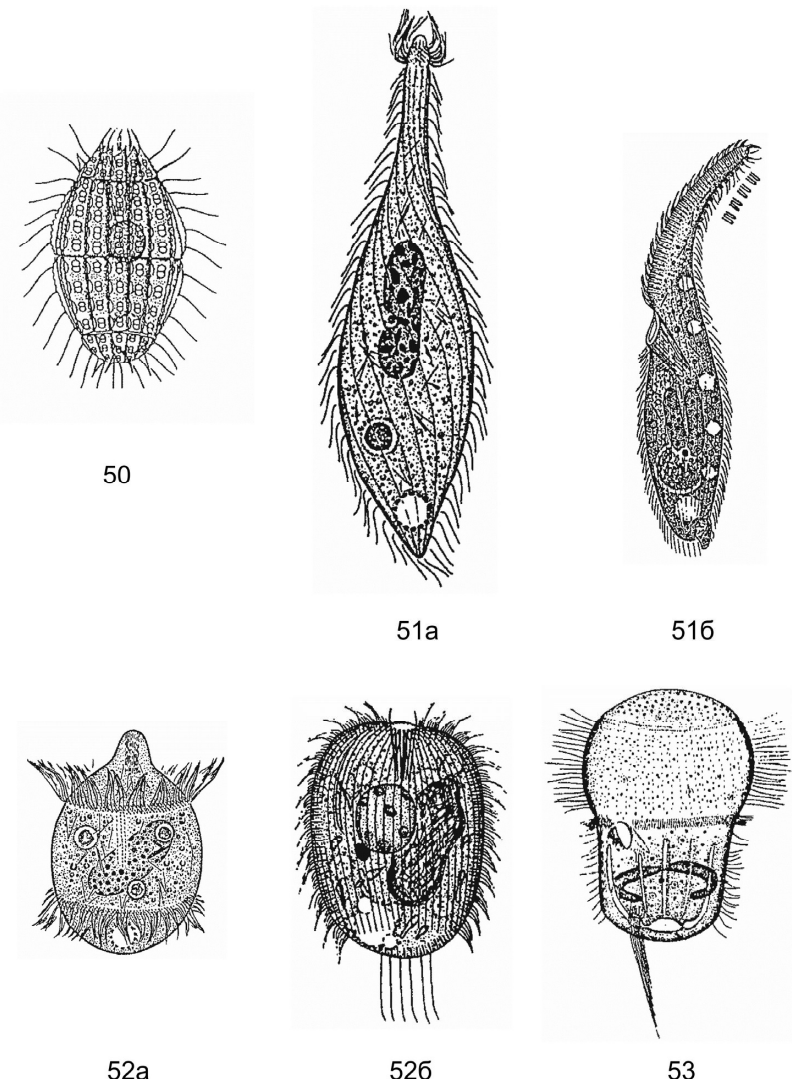


Рис. 50–53. 50 – *Coleps*, 51 а– *Lacrymaria*, 51 б – *Dileptus*,
52 а – *Didinium*, 52 б – *Prorodon*; 53 – *Urocentrum*

– Рот не на переднем полюсе, а сбоку или вблизи заднего конца тела, плохо различим. На дорсальной стороне тела пучок ресничек, с помощью которого клетка временами может прикрепляться к субстрату. Формы среднего размера *Urocentrum* (рис. 53).

Если рассматриваемый организм определить не удалось, то либо где-то выше был сделан неправильный выбор между тезой и антитезой, либо речь идет о протисте, не включенном в данный ключ для определения.

Литература

1. *Аверинцев С.В.* Малый практикум по зоологии беспозвоночных. М.: Советская наука, 1947. С. 56–87.
2. *Балакиец Н. И.* Культивирование микроорганизмов: Очерки по микробиологии, 2011–2014. URL: <http://mikrobio.ho.ua/contents-4-2-2.html>
3. *Банина Н.Н., Суханова К.М.* Саркодовые активного ила // Простейшие активного ила. Л.: Наука, 1983. С. 55–75.
4. *Беклемишев В.Н.* О сравнительном изучении жизненных схем кровососущих членистоногих // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 1942. Т. 2, № 3. С. 39–44.
5. *Беклемишев В.Н.* О принципах сравнительной паразитологии в применении к кровососущим членистоногим // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 1945. Т. 14, № 1. С. 4–11.
6. *Гаевская Н.С.* Простейшие (Protozoa): Жизнь пресных вод / под ред. В.И. Жадина: М. –Л.: изд-во Академии Наук СССР. 1949. Т. 2. С. 229–310.
7. *Голубева Н.А.* Материалы по фауне пресных вод города Томска и его ближайших окрестностей // Известия ТГУ. 1925. Т. 75. С. 135–137.
8. *Гончаров О.В.* Лабораторный практикум по зоологии: Методические рекомендации: Изд-во «Лицей», 2002. URL: http://www.licey.net/bio/practicum/glava2_1
9. *Догель В.А.* Как производить биологические наблюдения над простейшими. Л.: Гос. изд. 1926. 87 с.
10. *Жуков Б.Ф., Мыльников А.П.* Культивирование свободноживущих бесцветных жгутиконосцев из сооружений биологической очистки // Простейшие активного ила. Л.: Наука, 1983. С. 142–152.
11. *Зеликман А.Л.* Практикум по зоологии беспозвоночных. 2-е изд. М.: Высшая школа, 1969. 335 с.
12. *Злотин А.З.* Техническая энтомология: справочное пособие. Киев: Наукова Думка. 1989. 183с.
13. *Иванов А.В., Полянский Ю.И., Стрелков А.А.* Большой практикум по зоологии беспозвоночных. М.: Высшая школа, 1961. С. 8–178.
14. Итоги науки и техники. Энтомология. М., 1987. Т. 7. 145 с.
15. *Каранетян А.Е.* Методики культивирования лямблий // Цитология. 1960. Т. 2. № 3. С. 379–384.
16. *Кокова Б.Е.* Непрерывное культивирование беспозвоночных. Новосибирск: Наука, 1982. 132 с.
17. *Кокова В.Е., Лисовский Т.М.* Непропорционально-проточная культура простейших. Новосибирск: Наука, 1976. 75 с.

18. Крылов М.В., Добровольский А.А., Исси И.В., Михалевич В.И. и др. Новые представления о системе одноклеточных животных // Труды Зоологического Ин-та АН СССР. Л.: 1980. Т. 94. С. 122–132.

19. Новоселова Н. В. Опыт массового культивирования инфузорий в морской воде // Современные рыбохозяйственные и экологические проблемы Азово-Черноморского региона. Материалы VIII международной конференции Керчь, ЮГНИРО, 26–27 июня 2013. Керчь, 2013. С. 129–135.

20. Олексив И.Т. Непрерывное культивирование одноклеточных организмов // Тезисы докладов на I всесоюзном совещании по проблемам зоокультуры. М., 1986. Т. 3. С. 53.

21. Осипов Д.В., Борхсениус О.Н., Раутиан М.С., Скобло И.И., Фокин С.И. О необходимости создания коллекций культур свободно живущих простейших // Тезисы докладов на I всесоюзном совещании по проблемам зоокультуры. М., 1986. Т. 3. С. 224–226.

22. Павловский Е.Н. Практикум по зоологии: Учебно-педагогическое изд-во Наркомпроса РСФСР: Л., 1938. С. 5–47.

23. Панасюк А.Л. К методике культивирования амёб *Entamoeba invadens* // Тезисы докладов и сообщений 4 съезда Всесоюзного общества протозоологов, Ленинград, февраль, 1987 г. Л.: Наука, 1987. С. 40.

24. Пролубников А.М., Кокова В.Е. Разработка аппарата для непропорционально-проточного культивирования крупных инфузорий // Тезисы докладов и сообщений 4 съезда Всесоюзного общества протозоологов, Ленинград, февраль, 1987. Л.: Наука, 1987. С. 45.

25. Протисты. Часть 1. СПб.: Наука, 2000. 679 с.

26. Протисты. Часть 2. СПб.: Наука, 2007. 1018 с.

27. Протисты. Часть 3. СПб.: Наука, 2013. 474 с.

28. Серавин Л.Н. Простейшие... Что это такое? Л.: Наука, 1984. 170 с.

29. Тамариша Н.А. Основы технической энтомологии. М.: Изд-во Московского ун-та, 1990. 205 с.

30. Хаусман К. Протозология. М.: Мир, 1988. С. 274–276.

31. Хаусман К., Хюлбсман Н., Радек Р. Протистология. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2010. 495 с.

32. Хлебович В.В. Биологические предпосылки и пути введения в культуру беспозвоночных из экологических комплексов эфемерных водоемов и эстуариев муссонной зоны // Тезисы докладов на I всесоюзном совещании по проблемам зоокультуры. М., 1986. Т. 1. С. 86.

33. Цингер Я.А. Простейшие. Учпедгиз, 1947. 88 с.

34. Цисанова Е.С., Сыроешкин А.В., Успенская Е.В., Ульяновцев А.С., Плетнева Т.В., Климова Э.В., Берсенева Е.А. Изучение биологической

активности и соотношения дейтерий/протий (d/h) в воде с помощью клеточного биосенсора *S.ambiguous* // Электронный научный журнал «ИС-СЛЕДОВАНО В РОССИИ», 2010. С. 588–593. URL: <http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2010/046.pdf>,

35. Чорик Ф.П., Набережной А.И., Шубернецкий И.В. Промышленное культивирование водных организмов: Herald Hydrobiology, 1983. URL: <http://hydrobiologist.wordpress.com/2009/12/10/organisms-cultivation/>

36. Юдин А.Л. Амеба – Амoeba // Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975. С. 5–12.

37. Adl S. M., Simpson A. G. B., Farmer M. A., Andersen R. A., Anderson O. R., Barta J. R., S. S. Bowser, Brugerolle G., Fensome R. A., Fredericq S., James T. Y., Karpov S., Kugrens P., Krug J., Lane C. E., Lewis L. A., Lodge J., Lynn D. H., Mann D. G., Mccourt R. M., L. Mendoza, Moestrup Ø., S. E. Mozley-Standridge, Nerad T. A., Shearer C. A., Smirnov A. V., F. W. Spiegel, Taylor M. F. J. R. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists // J. Eukaryotic Microbiology. 2005. 52 (5). P. 399–451.

38. Baldauf S.L. The deep roots of eukaryotes // Science. 2003. Vol. 300. P. 1703–1706.

39. Howe A.T., Bass D., Scoble J.M., Lewis R., Vickerman K., Arndt H., Cavalier-Smith T. Novel cultures protists identify deep-branching environmental DNA clades of Cercozoa: new genera *Tremula*, *Micrometopion*, *Minimasistera*, *Nudifila*, *Peregrinia* // Protists. 2011. Vol. 162. P. 332–372.

40. Keeling P.G., Burger G., Durnford D.G., Lang B.F., Lee R.W., Pearlman R.E., Roger A.J., Gray M.W. The tree of eukaryotes // TRENDS in Ecology and Evolution. 2005. Vol. 20, No. 12. P. 670–676.

41. Kulda J. Axenic cultivation of *Proteomonas laceratae viridis* (Grassi, 1879) // Journal Protozoology. 1973. Vol. 20, # 4. P. 118–127.

42. Shalchian-Tabrizi K., Minge M.A., Espelund M., Orr R., Ruden T., Jakobsen K.S., Cavalier-Smith T. Multigene phylogeny of choanozoa and the origin of animals. 2008. PLoS One. 3:e2098.

43. URL:http://microbiology.ucoz.org/inndex/kultivirovanie_spirokhet_i_prostejshikh/0-38

Издание подготовлено в авторской редакции

Отпечатано на участке цифровой печати
Издательского Дома Томского государственного университета

Заказ № 814 от «27» января 2015 г. Тираж 100 экз.