

Методика подготовки раковин глохидиев (*Bivalvia*, *Unionidae*) для работы на сканирующем электронном микроскопе

Е.М. САЕНКО*, В.М. КАЗАРИН

Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты восточной Азии ДВО РАН, Владивосток 690022, РОССИЯ. *E-mail: sayenko@ibss.dvo.ru (автор-корреспондент)

РЕЗЮМЕ. Изучение морфологического строения зрелых глохидиев пресноводных двустворчатых моллюсков может выявить новые таксономически значимые признаки. Наиболее эффективно подобные исследования могут быть выполнены с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ), однако для этого требуются специальные методики сбора, хранения и подготовки материала. Приведены описания различных методик, с анализом как положительного, так и отрицательного опыта. Описаны взаимодействия химических веществ, используемых для фиксации и растворения мягких тканей глохидиев. Детально обсуждаются и сравниваются различные процедуры очистки и монтажа глохидиальных раковин унионид для работы на СЭМ.

[https://doi.org/10.35885/ruthenica.2022.32\(1\).2](https://doi.org/10.35885/ruthenica.2022.32(1).2)

Sample preparation of glochidial shells (*Bivalvia*, *Unionidae*) for scanning electron microscopy

Е.М. SAYENKO*, V.M. KAZARIN

Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022, RUSSIAN FEDERATION. *E-mail: sayenko@ibss.dvo.ru (corresponding author)

ABSTRACT. Mature glochidia of freshwater bivalves can give additional features for taxonomic revisions. To study morphology of glochidia with the scanning electron microscope (SEM), special collecting techniques, storage and preparation are required. Based on extensive personal experience, an overview of various techniques is presented, both positive and negative. The interactions of chemicals used for the storage of glochidia and dissolution of glochidial tissue are described. Techniques for cleaning and mounting the glochidial shells of *Unionidae* for investigations by SEM are described and compared.

Электронная микроскопия – это метод исследования структур, находящихся вне пределов видимости светового микроскопа и имеющих размеры менее одного микрона. Наиболее востребованы два типа электронной микроскопии: трансмиссионная (просвечивающая) и растровая (сканирующая). Сканирующая электронная микроскопия позволила выявить новые признаки, пригодные в таксономических и ревизионных

исследованиях пресноводных двустворчатых моллюсков [Hoggarth, 1999; Pimpão *et al.*, 2012; Sayenko, 2015, 2016; Sayenko *et al.*, 2021; и др.]. Систематика унионид, первоначально основанная по большей части на отличиях раковин взрослых моллюсков, все чаще включает данные по строению личинок – глохидиев, которые оказались морфологически более разнообразны и богаты таксономически значимыми признаками, чем взрослые моллюски. Полученные с помощью СЭМ сведения о микроскульптуре наружной поверхности створок глохидиальных раковин говорят о различии данного признака у разных таксономических групп унионид [Hoggarth, 1999; Sayenko, 2014, 2015, 2016; Chernyshev *et al.*, 2020].

Хотя у ряда современных оптических микроскопов есть программно-аппаратные решения для преодоления ограничений в глубине резкости (например, применение камеры AxioCam HRC и программы AxioVision), возможности СЭМ несравненно больше (Рис. 1).

Электронный микроскоп – это прецизионный прибор, который требует особых методов приготовления препаратов. При работе с биологическими объектами крайне важно сохранить их микроскульптуру и другие легко разрушаемые тонкие структуры. Обеспечение надлежащей сохранности образца, правильная подготовка его к работе – важнейшие условия успешной работы на СЭМ. Как правило, первоначально биологический образец химически фиксируется. Затем проводится дегидратация с помощью ацетона или этанола, т.к. присутствие молекул



РИС. 1. Общий вид фиксированных этанолом глохидиев в световой (А) и сканирующий электронный (В) микроскопы (*Amuranodonta kijaensis*, бассейн р. Амур, Хинганский заповедник, Амурская обл.). Масштаб 100 мкм. Микроскопы Nikon (А) и Zeiss EVO 40 (В), напыление золотом.

FIG. 1. Ethanol-fixed glochidia (*Amuranodonta kijaensis*, Amur River basin, Khingansky Nature Reserve, Amur Oblast), light (A) and scanning electron (B) microscopes. Scale bar 100 μ m. Light Nikon (A) and scanning electron Zeiss EVO 40 (B) microscopes, sputter coating with gold.

воды будет нарушать вакуум и, соответственно, искажать изображение. Недостаточная сушка образца может привести к обширной деформации или разрушению структур. Еще одна проблема заключается в том, что большинство биологических образцов состоят из неплотного материала, не проводящего ток. Поэтому после процесса дегидратации требуется напыление на поверхность образца тонкого слоя проводящего материала (золото, золото/палладий, хром, углерод, и т.д.).

В данной работе подробно рассматриваются разные методики изучения личиночных раковин пресноводных двустворчатых моллюсков семейства Unionidae, приводится изложение личного опыта работы, даются рекомендации, которые могут помочь другим исследователям избежать ряда возникающих проблем.

В работе использован обширный коллекционный материал глохидиев унионид, хранящийся в лаборатории пресноводной гидробиологии ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН, г. Владивосток. Фотографии глохидиев получены на сканирующих электронных микроскопах Zeiss EVO 40 и Zeiss MERLIN (Центр коллективного пользования «Биология и генетическая инженерия», ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН).

Далее приводим описание всех стадий подготовки глохидиальных раковин к работе на СЭМ, начиная с процесса сбора проб и заканчивая хранением напыленных образцов. Подобная структура подачи материала ранее неоднократно

использована при описании методик работы с другими объектами исследования, например, при работе с микромоллюсками [Geiger *et al.*, 2007], диатомовыми водорослями [Taylor *et al.*, 2007], при подготовке мелких объектов к фотографированию [Callomon, 2020] и др.

Подготовка к работе. При работе с очень мелкими объектами, такими как личинки пресноводных двустворчатых моллюсков (их размеры составляют 60–420 мкм), крайне важно четко выдерживать время, выделяемое для реализации различных этапов пробоподготовки. Для этого следует заранее подготовить рабочее пространство и все необходимые инструменты. Очень важно принимать соответствующие меры предосторожности при работе с ядовитыми, токсичными, легковоспламеняющимися химическими веществами (этанол, формалин, КОН). По возможности, все работы с ними следует проводить в вытяжном шкафу, в крайнем случае, в очень хорошо проветриваемом помещении и с применением специальных защитных очков. В отличие от формалина, раствор щелочи не обладает выраженным запахом, поэтому если при работе по очистке глохидиев с помощью КОН без вытяжного шкафа вдруг появляется металлический вкус во рту, необходимо сразу хорошо проветрить помещение. Растворы щелочи и формалина очень сушат кожу, приводя к повреждению пальцев рук вплоть до трещин на них, поэтому рекомендуем использовать тонкие медицинские перчатки.

На разных этапах работы понадобятся различные пинцеты, ножницы с прямыми лезвиями, препаровальные иглы, стеклянные пипетки с оттянутым концом или полимерные лабораторные пипетки Пастера, герметичные стеклянные либо химически устойчивые флаконы подходящего объема, а также пластиковые лабораторные поддоны. Вслед за коллегами [Geiger *et al.*, 2007], советуем отказаться от применения конических микропробирок типа Эппендорф на любом этапе работы, от фиксации и хранения до процедуры очистки раковин от мягких тканей – практика показала, что извлекать мелкие раковины из зауженной части пробирки крайне трудно, кроме того данные микропробирки не обладают нужной герметичностью, поэтому длительное хранение материала в них просто невозможно.

Отбор материала. Для изучения морфологии личиночных раковин с помощью СЭМ используются только зрелые глохидии, т.е. активно двигающиеся створками. Подобная активность хорошо заметна под стереомикроскопом (бинокуляром) даже при небольшом увеличении. У представителей семейства Unionidae для сохранения развивающихся личинок приспособлены

наружные полужабры, их форма и цвет могут свидетельствовать о степени зрелости глохидиев. В ряде случаев цвет наружных полужабр, наполненных зрелыми глохидиями – таксономически значимый признак. Например, для перловиц Японии указаны следующие цвета наружных полужабр со зрелыми глохидиями: *Lanceolaria grayana* (Lea, 1834) – кремово-желтые или пунцовые, *L. oxyrhyncha* (Martens, 1861) – желтые или пунцовые, *L. gladiola* (Heude, 1874) – темно-розовые или темно-коричневые, *Unio douglasiae nipponensis* Martens, 1877 – темно-желтые, *U. biwae* Kobelt, 1879 – от молочно-белых до темно-кремовых [Higashi, Hayashi, 1964; Kondo, 1987, 1997; Inaba, 1941, 1964].

Фиксация. Идеальным вариантом является возможность взять полужабру со зрелыми личинками непосредственно у живого, не фиксированного моллюска, с тем чтобы сразу начать процесс очистки от мягких тканей и подготовку к работе на СЭМ. Однако предварительно рекомендуем провести обработку живых личинок анестетиком, расслабляющим замыкающий мускул. В таком случае створки глохидия будут открыты, что позволит изучать не только сами раковины, но и внутренние мягкие ткани личинок.

Существует несколько способов обработки анестетиком. Например, рекомендуется выдерживать глохидии в 2% растворе хлоралгидрата [Lima *et al.*, 2006], добавить несколько кристаллов химически чистого ментола или небольшое количество его раствора [Lee *et al.*, 2007], использовать изотонический раствор хлорида магния (75 г $MgCl_2$ на 1 л воды) [Geiger *et al.*, 2007] или раствор лидокаина. На собственном опыте были опробованы варианты с ментолом и лидокаином: в первом случае живые глохидии помещали с помощью пипетки во флакон с 10 мл дистиллированной воды и 2–3 кристаллами ментола, во втором случае глохидии добавляли в 10 мл раствора лидокаина, в обоих случаях раковины выдерживали по 30 мин.

В ряде случаев работа с живым материалом невозможна, например, из-за длительной транспортировки или работы со старыми коллекционными экземплярами. Для фиксации только жабр с личинками рекомендовано использовать 70–75% раствор этанола [Antonova, 1986] либо смесь 80-ти частей 96%-го этанола, 5-ти частей глицерина и 15-ти частей воды [Hoggarth, 1999], т.к. добавление глицерина помогает сохранить микроскульптуру раковин. Личная практика длительного (более 25 лет) хранения образцов показала, что в пробах без добавления глицерина кислотность спирта постепенно разрушает наружную микроскульптуру раковин, в то время как в образцах с глицерином процесс деструкции

замедляется. Для сохранения микроскульптуры в раствор этанола можно попробовать добавлять буру, перетертые в порошок арагонит или кальцит (раковины), следуя методикам фиксации раковин микромоллюсков (с размерами < 5 мм) [Geiger *et al.*, 2007]. Точные количества добавок авторами не указаны, однако известно, что бура и арагонит могут создавать проблемы вследствие перекристаллизации (выпадения в осадок при понижении температуры). Чтобы уменьшить проблему растворения раковин в водно-этанольных смесях, концентрацию спирта можно увеличить, а во избежание усадки ткани (если планируется исследовать не только раковину, но и органы глохидиев) необходимо использовать градуированную серию (30%, 50%, 60%, 70% этанол) при переводе образцов из водных растворов в спиртовые.

Формалин является хорошим фиксатором мягких тканей, поэтому его можно применять при планировании работ на СЭМ с целью изучения внутреннего строения глохидиев. В этом случае необходимо использовать нейтральный раствор формалинового фиксатора, забуференного фосфатами (для фиксации биологических препаратов). Глохидии первоначально фиксируют на 2 часа в 10% растворе, а затем на 24 часа в 5% растворе формалина [Lima *et al.*, 2006], после чего промывают дистиллятом и проводят дегидратацию в серии спиртов (75%, 80%, 96% этанол). Использование полной серии спиртов (30%, 50%, 60%, 70%) не приветствуется, поскольку доказано, что растворы этанола концентрацией до 70% расширяют ткань и могут повредить тонкие структуры [Glauert, Lewis, 1998].

Для исследования микроскульптуры глохидиальных раковин формалин не подходит, т.к. при длительном хранении происходит постепенная деструкция скульптуры наружной поверхности раковин: элементы микроскульптуры (линии, гранулы) со временем расплываются, оседая по высоте и за счет этого делаясь шире, местами постепенно сливаются друг с другом. На Рис. 2 приведены фотографии наружной микроскульптуры глохидиев *Sinanodonta*, длительное время хранившиеся в спирте (Рис. 2 А) и формалине (Рис. 2 В), при этом у образца из формалина скульптурные линии оплыли, а местами слились друг с другом. Кроме того, формалин считается аллергеном и входит в список предполагаемых канцерогенов («Перечень веществ, продуктов, производственных процессов, бытовых и природных факторов, канцерогенных для человека»). ГН.1.1.725-98, утвержденного Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 23 декабря 1998 г. № 32).

Этикетирование проб. Содержащая все необходимые данные этикетка не должна на-

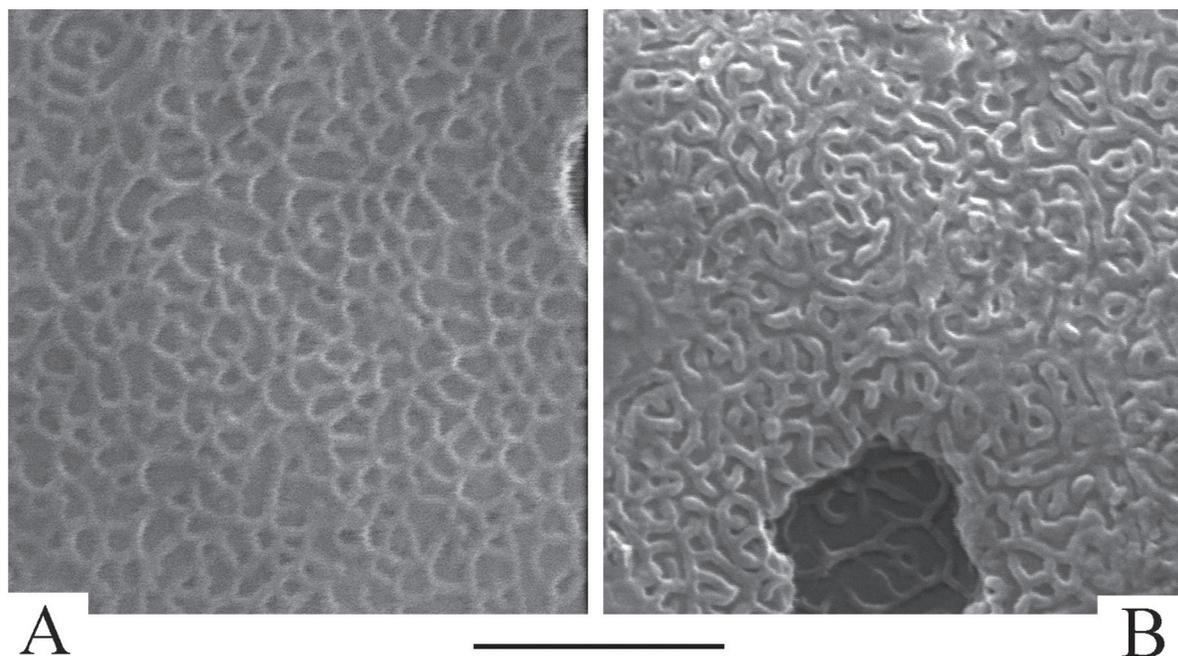


РИС. 2. Сравнение наружной микроскульптуры гложидиев при длительной фиксации 75% этанолом (А) и 10% формалином (В). А. *Sinanodonta schrenkii* (р. Раздольная, Приморский кр., сбор VI.1999). В. *Sinanodonta calipygos* (окрестности Киото, о-в Хонсю, Япония, сбор V.1982). Масштаб 2 мкм. Микроскоп Zeiss EVO 40, напыление хромом.

FIG. 2. Comparison of the external microsculpture of glochidia after long-time fixation by 75% ethanol (A) and 10% formalin (B). A. *Sinanodonta schrenkii* (Razdolnaya river, Primorsky Krai, collected VI.1999). B. *Sinanodonta calipygos* (environs of Kyoto, Honshu Island, Japan, collected V.1982). Scale bar 2 μ m. Zeiss EVO 40 microscope, sputter coating with chromium.

ходиться в прямом контакте с личиночными раковинами, даже крошечные этикетки лучше не класть непосредственно в емкость с гложидиями. Этикетку с подробной информацией можно приклеить на флакон прозрачным скотчем, однако лучше каждый флакон с зафиксированными личинками поместить в отдельный пластиковый пакет, и уже в этот пакет (а не флакон) доложить этикетку. Другим вариантом может быть использование регистрационных номеров: такой номер заранее указывают на небольшой этикетке, которую приклеивают непосредственно на флакон с пробой с помощью прозрачного скотча, а нужную расшифровку (с указанием даты и места сбора, ФИО сборщика пробы, типом фиксации, полным видовым названием моллюска) заносят в отдельный журнал. Нанесение регистрационного номера маркером непосредственно на флакон с пробой возможно только как очень временный вариант, т.к. при длительном хранении высок шанс случайного стирания такой надписи.

По возможности, этикетирование необходимо вести на специальной, химически устойчивой, бескислотной бумаге. Недопустимо использование обычной шариковой ручки на этикетках, т.к. под действием даже малых концентраций паров этанола со временем запись расплывается и становится нечитаемой.

Очистка гложидиев от мягких тканей.

Основная задача при очистке гложидиев – правильно выдержать время процедуры, с тем чтобы полностью очистить раковину от мягких тканей, однако при этом не допустить повреждения наружного слоя самой раковины. Раковины гложидиев унионид состоят из двух слоев, внутренний толстый слой пронизан порами. Выходы этих пор покрыты тонким наружным слоем, который и формирует особую микроскульптуру (Рис. 2). Открытые поры на наружной поверхности створок гложидиев свидетельствуют о том, что наружный слой поврежден излишне долгой процедурой очистки, у таких раковин изучать микроскульптуру уже невозможно (Рис. 3 А). При излишне длительной очистке даже в случае сохранения наружного слоя происходит деформация микроскульптуры (Рис. 4). Поэтому при выборе метода очистки необходимо оценить не только легкость и доступность самого метода, но и степень вероятности повреждения личиночных раковин.

Наиболее простой и доступный способ очистки раковин гложидиев от мягких тканей – метод мацерирования [Antonova, 1986, 1987; Antonova, Starobogatov, 1989; Lima *et al.*, 2006]. В этом случае полужабры с гложидиями, взятые у живых моллюсков, помещают в воду на достаточно длительное время, от недели до месяца. Фиксированный материал предварительно промывают в дистилляте, рекомендуем делать это не менее 10 раз. Для мацерирования подходит только

стеклянная посуда, т.к. в емкостях из пластика или металла возможно выпадение осадка в виде соединений гидроксидов.

Достоинством данного метода является его простота и полная экологичность, т.к. для мацерирования нужны только подходящие по объему емкости, в которые будут помещены полужабры с личинками, и вода. К недостаткам относятся долгое время очистки, а также высокий риск деформации гложидиальных раковин, т.к. выделяющийся при гниении газ часто деформирует створки и крючки, либо полностью отрывает крючки. Возможно поэтому, первоначально предложенный срок мацерирования в один месяц и более [Antonova, 1986], позднее был сокращен до недели [Antonova, 1987; Lima *et al.*, 2006]. Основываясь на личном опыте, рекомендуем периодически проверять под биноклем степень готовности гложидиев – по крайней мере у трети раковин створки должны быть полностью открыты.

По завершении процедуры мацерирования рекомендуется провести обеззараживание материалов 2,5% раствором глутаральдегида в течение 2-х часов, после чего раковины тщательно промываются и фиксируются. Как показала практика, не прошедшие обеззараживание раковины после пробоподготовки и работы на СЭМ плохо хранятся вне зависимости от того, чем было проведено напыление – золотом, углеродом или хромом. При длительном хранении на таких раковинах появляется обильное бактериальное загрязнение и даже гифы грибов (Рис. 5).

Другой метод подразумевает очистку раковин с помощью различных сильных отбеливателей: 10–20% перекись водорода [Antonova, 1986; Geiger *et al.*, 2007], 1% раствор жавелевой воды (жавелевая вода – это 10%-ный раствор едкого кали, насыщенный хлором) [Kholodov *et al.*, 2017], либо, например, доступный бытовой хлорный отбеливатель «Белизна». В любом случае необходимо потренироваться с разными концентрациями и временем экспозиции, начиная со слабых растворов, помещая в них гложидии на 1–2 минуты. Следует также учитывать, что эффективность отбеливателей сильно зависит от их возраста, и недавно разлитая жидкость гораздо эффективнее, чем долго хранившаяся. В результате действие отбеливателя может быть разным даже при использовании одной и той же марки вещества. Входящий в состав ряда отбеливателей метасиликат натрия может выпасть на поверхности личиночных створок в виде мелких кристаллов, поэтому необходимо исключить длительную экспозицию раковин в растворе такого отбеливателя. После очистки гложидиальные раковины необходимо многократно промыть в дистиллированной воде и залить 75% этанолом. Достоинством данного способа является доступ-

ность используемых реагентов, недостатком – непредсказуемость получаемого результата.

Наконец, оптимальный, т.е. наиболее предсказуемый и наименее времязатратный метод подразумевает очистку раковин 5% раствором КОН [Kwon *et al.*, 1993]. Лично опробовав в течение нескольких лет способ очистки с помощью мацерирования и применения «Белизны», выбор в конечном итоге остался за применением 5% раствора КОН. Данная щелочь предпочтительнее по сравнению с NaOH, т.к. она менее гигроскопична и слабее взаимодействует с углекислым газом воздуха. Для приготовления раствора необходим химически чистый КОН, желателен не порошковый, а в виде небольших сфер или полусфер (в таком виде процесс реакции КОН с углекислым газом из воздуха идет медленнее). Раствор готовят на дистиллированной воде и обязательно в стеклянной посуде. Не следует хранить готовый раствор КОН более месяца, чтобы избежать появления осадка. Подготавливать раствор для одной пробы, конечно, нецелесообразно. Необходимо спланировать работу так, чтобы каждая партия раствора щелочи расходовалась в течение недели-двух, при этом за один раз лучше очищать сразу несколько проб, но не более 6–8 одновременно.

Со временем при длительном использовании стеклянного сосуда для приготовления и хранения раствора КОН, на дне и стенках емкости может образоваться осадок или белый налет, который практически невозможно отмыть. В этом случае необходимо заменить стеклянную емкость на новую.

Зафиксированные полужабры первоначально также подвергают тщательной промывке в дистиллированной воде (желательно воду менять не менее 5 раз), после дистиллята сливается, а полужабры заливают 5% раствором КОН, оставляя в нем на 1,5–2 часа. Время от времени емкость нужно энергично встряхивать – это поможет извлечь гложидии из марсупиев полужабры, а также отделить остатки мягких тканей от раковины. Гложидии считаются хорошо очищенными, если по крайней мере у трети створки раскрыты на 180°, что хорошо видно под биноклем. Как и в случае с мацерированием, слишком долгое нахождение гложидиев в растворе щелочи приводит к деформации и утере крючков (Рис. 6 А–С), а затем и к разрушению самих створок (Рис. 3 А, В).

После очистки в растворе КОН пробу тщательно промывают дистиллятом, каждый раз энергично встряхивая, чтобы отмыть остатки мягких тканей. Достаточно 30–40 сек для осаждения большинства раковин гложидиев на дно емкости. Далее жидкость с остатками мягких тканей аккуратно удаляется пипеткой и добавляется новая порция дистиллированной воды. Такую процедуру необходимо повторять до тех

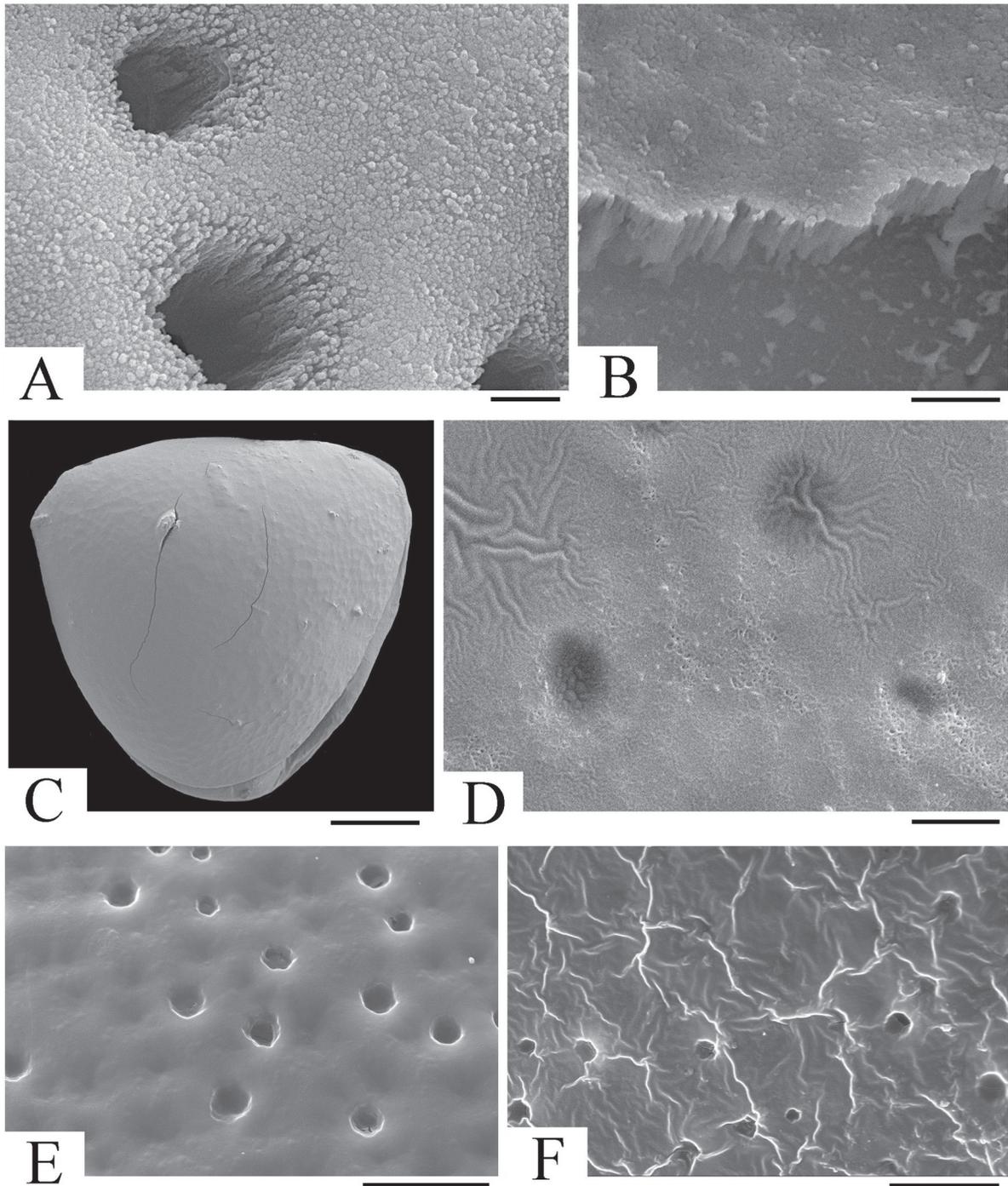


РИС. 3. Примеры дефектов глосидиев при работе на СЭМ. **А, В.** Наружная поверхность раковины глосидия без верхнего слоя, разрушенного из-за долгой очистки в растворе щелочи (*Anodonta anatina* (=Colleopterum), р. Обь, Новосибирская обл.). **С.** Трещины на раковине глосидия вследствие излишнего высушивания перед напылением (*Middendorffinaia mongolica*, р. Артёмовка, Приморский кр.). **Д.** Поврежденная микроскульптура наружного слоя глосидия из-за недостаточного обезвоживания перед напылением (*Anodonta anatina*, р. Москва). **Е.** «Замыленность» микроскульптуры наружной поверхности глосидия из-за напыления на недостаточно просушенные раковины (*Sinanodonta schrenkii*, р. Илистая, бассейн оз. Ханка, Приморский кр.). **Ф.** Поврежденный, сморщенный наружный слой раковины глосидия из-за пересушивания перед напылением (*Kunashiria japonica*, оз. Чухуненко, Приморский кр.). Масштаб 1 мкм (**А, В**), 5 мкм (**С**), 10 мкм (**Д, Е, Ф**). Микроскопы Zeiss MERLIN (**А–Д**), Zeiss EVO 40 (**Е, Ф**), напыление хромом (**А–Е**), углеродом (**Ф**).

пор, пока жидкость на поверхности емкости при встряхивании не перестанет пениться. Тщательная промывка от щелочи – один из важных этапов дальнейшей успешной подготовки глохидиев к работе на СЭМ, т.к. недостаточно промытые раковины невозможно исследовать на больших увеличениях (Рис. 7).

У крупных моллюсков, таких как *Cristaria* и *Sinanodonta*, для очистки глохидиев лучше брать только часть материала – одну из зафиксированных полужабр или даже часть полужабры. Оставшийся зафиксированный материал можно использовать для дальнейших исследований, либо для подготовки к работе на других электронных микроскопах, с целью получить максимально качественный результат. При работе с мелкими моллюсками, например *Inversiunio*, приходится использовать всю полужабру, и в случае неправильно проведенной очистки весь материал окажется непригодным для дальнейшей работы. Это надо учитывать и заранее отработать всю процедуру на массовом материале.

Монтаж образцов, дегидратация, напыление. Перед началом монтажа личиночных раковин на специальные столики для СЭМ необходимо обязательно провести маркировку данных столиков, например, указав номер и начальную букву родового названия тонким маркером на обратной стороне столика. Всю маркировку обязательно записывают в журнал с полной расшифровкой. Следует помнить, что любой материал, даже самый редкий и уникальный, без точной маркировки и этикетирования перестает представлять научную ценность.

Прикрепление образцов к поверхности столиков осуществляют разными способами, в зависимости от размеров исследуемого объекта. Раковины глохидиев унионид весьма мелкие, менее 1 мм, поэтому нет необходимости в очень клейких веществах (специальный высокотемпературный клей, коллоидный графит и пр.) и трудоемких методах. Достаточно использовать двусторонний скотч, который удовлетворяет вакуумным требованиям (не должен выделять газов в вакуумной камере), а для обеспечения лучшей проводимости

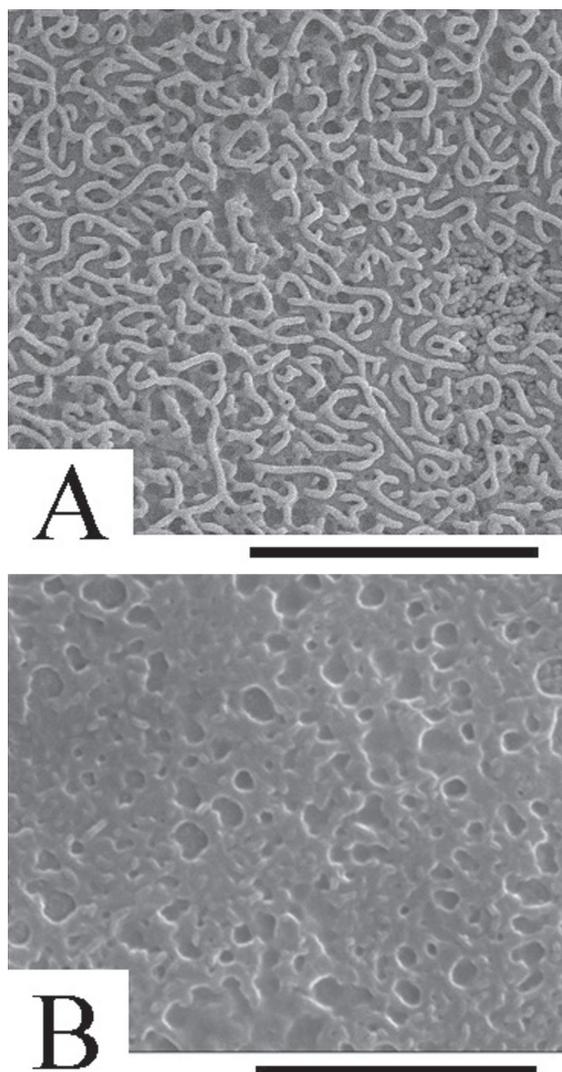


РИС. 4. Наружная микроскульптура глохидиев при разных условиях очистки раковин (*Inversiunio yanagawensis*, р. Гион, о-в Хонсю, Япония) в растворе щелочи. **А.** Неповрежденная микроскульптура. **В.** Поврежденная при передержке в растворе щелочи. Масштаб 2 мкм. Микроскопы Zeiss MERLIN (**А**), Zeiss EVO 40 (**В**), напыление хромом (**А**), золотом (**В**).

FIG. 4. Exterior valve microsculpture under different conditions of cleaning in alkali (*Inversiunio yanagawensis*, Gion River, Honshu Island, Japan). **A.** Undamaged microsculpture. **B.** Damaged microsculpture by excessive treatment in alkali. Scale bars 2 μm . Zeiss MERLIN (**A**) and Zeiss EVO 40 (**B**) microscopes, sputter coating with chromium (**A**) and gold (**B**).

FIG. 3 (on opposite page). Defects of SEM glochidia samples. **A, B.** Exterior glochidia valve with completely destroyed outer layer by overcleaning in alkali (*Anodonta anatina* (= *Colletopterum*), Ob' River, Novosibirsk Oblast). **C.** Cracks on the glochidia shell due to excessive drying before coating (*Middendorffinaia mongolica*, Artyomovka River, Primorsky Krai). **D.** Damaged exterior valve microsculpture due to insufficient dehydration before coating (*Anodonta anatina*, Moskva River). **E.** «Blurredness» of exterior valve microsculptures due to coating of insufficiently dried shells (*Sinanodonta schrenkii*, Ilistaya River, Khanka Lake basin, Primorsky Krai). **F.** Damaged, wrinkled outer shell layer due to overdrying of glochidia before coating (*Kunashiria japonica*, Chukhunenko Lake, Primorsky Krai). Scale bars 1 μm (**A, B**), 5 μm (**C**), 10 μm (**D, E, F**). Zeiss MERLIN (**A–D**) and Zeiss EVO 40 (**E, F**) microscopes, sputter coating with chromium (**A–E**) and carbon (**F**).

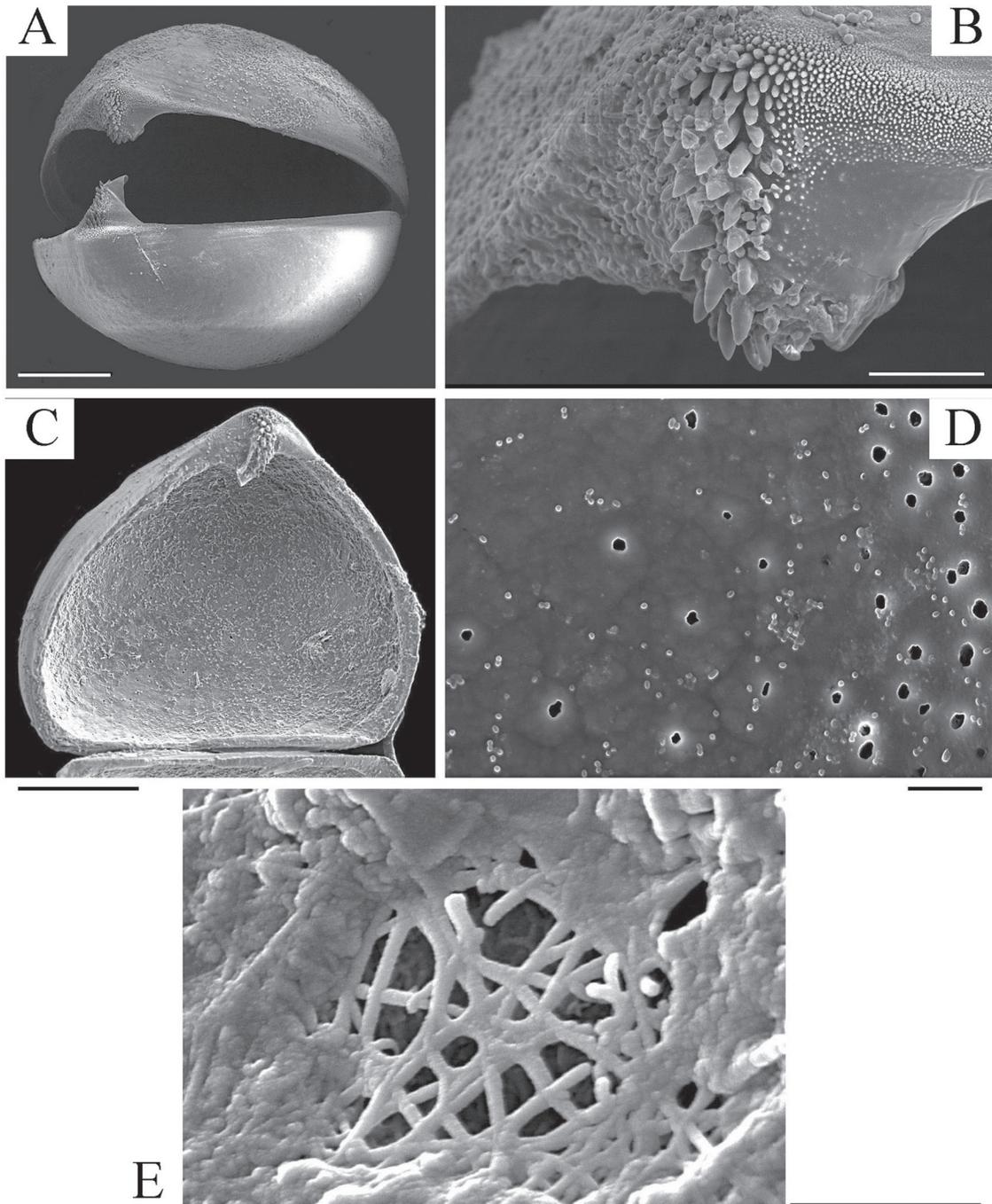


РИС. 5. Загрязнение готовых образцов для СЭМ при длительном хранении в негерметичных условиях (А–С) либо при хранении прошедших процедуру мацерирования без последующего обеззараживания (D, E). А–С. Бактерии на поверхности глохидиев (*Nodularia douglasiae*, р. Илистая, бассейн оз. Ханка, Приморский кр.). А. Внешний вид глохидия, основное загрязнение на створке в верхней части фото. В. Крючок глохидия, основное загрязнение в левой части фото. С. Створка, вид изнутри. D. Единичные бактерии на створке глохидия, вид изнутри (*Kunashiria japonica*, оз. Утиное, о-в Зелёный, Курильские о-ва). E. Гифы гриба на створке глохидия, вид на наружную пору (*Beringiana beringiana*, оз. Азабачье, Камчатка). Масштаб 50 мкм (А, С), 10 мкм (B, D), 1 мкм (E). Микроскопы Zeiss MERLIN (А, В, С, E), Zeiss EVO 40 (D), напыление хромом (А–С), золотом (D), углеродом (E).

FIG. 5. Contamination of the SEM ready-made samples during long-term storage under unsealed conditions (A–C) or during storage the samples that have passed the maceration procedure without subsequent disinfection (D, E). A–C. Bacteria on the glochidia surface (*Nodularia douglasiae*, Ilistaya River, Khanka Lake basin, Primorsky Krai). A. Glochidium with the main pollution on the valve in the upper part of the photo. B. Hook with the main pollution on the left side of the photo. C. Interior valve. D. Bacteria on the interior valve (*Kunashiria japonica*, Utinoe Lake, Zeliony Island, Kuril Islands). E. Fungal hyphae on the pore of exterior valve (*Beringiana beringiana*, Azabachye Lake, Kamchatka). Scale bars 50 μm (A, C), 10 μm (B, D), 1 μm (E). Zeiss MERLIN (A, B, C, E) and Zeiss EVO 40 (D) microscopes, sputter coating with chromium (A–C), gold (D), and carbon (E).

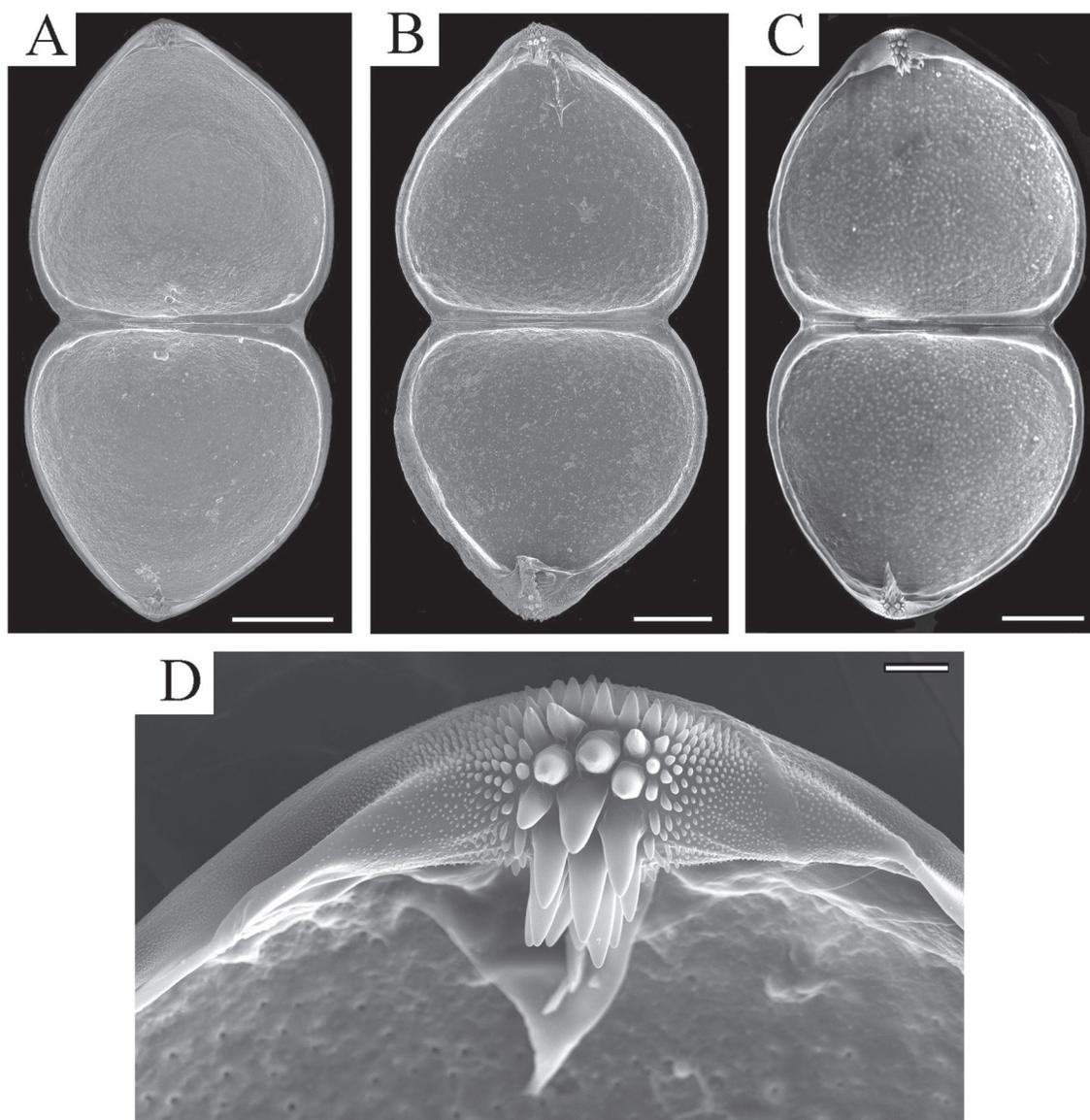


РИС. 6. Крючки глохидиев, поврежденные во время подготовки к работе на СЭМ. **A, B.** При очистке методом мацерирования [*Beringiana beringiana*, оз. Пернатое, о-в Парамушир, Курильские о-ва (A) и оз. Элергытгын, бассейн р. Хатырка, Камчатка (B)]. **C.** При очистке в растворе щелочи [*Anodonta anatina* (= *Colleopterum*), оз. Арахлей, Забайкальский кр.]. **D.** Во время сушки перед напылением [*Anodonta anatina* (= *Colleopterum*), р. Ирба, Красноярский кр.]. Масштаб 100 мкм (A–C), 10 мкм (D). Микроскопы Zeiss MERLIN (A, B), Zeiss EVO 40 (C, D), напыление хромом.

FIG. 6. Hooks damaged during SEM preparation. **A, B.** By maceration cleaning [*Beringiana beringiana*, Pernatoo Lake, Paramushir Island, Kuril Islands (A) and Lake Elergytgyn, basin of the Khatyrka River, Kamchatka (B)]. **C.** By alkali cleaning [*Anodonta anatina* (= *Colleopterum*), Arakhley Lake, Zabaikalsky Krai]. **D.** By drying before sputter coating [*Anodonta anatina* (= *Colleopterum*), Irba River, Krasnoyarsk Krai]. Scale bars 100 μm (A–C), 10 μm (D). Zeiss MERLIN (A, B) and Zeiss EVO 40 (C, D) microscopes, sputter coating with chromium.

сти может быть токопроводящим. Существует целая линейка специальных токопроводящих двусторонних скотчей для СЭМ – углеродных, на основе меди, алюминия, никеля – с различными адгезивными свойствами. Рекомендация [Geiger *et al.*, 2007] использовать обычный, не проводящий тока двусторонний скотч для офиса была также проверена нами на практике и подтверждена возможность применения такого скотча без ущерба для качества получаемых изображений.

Перед монтажом на столике небольшое количество предварительно очищенных раковин проводят через серию спиртов (75%, 80%, 90%, 96%) для дегидратации. При отсутствии специальной центрифуги это можно делать в небольшой емкости, спирт из нее удаляется пипеткой после полного осаждения глохидиальных раковин и затем добавляется новая порция спирта более высокой концентрации. После этого порция личинок встряхивается для хорошего перемешивания,

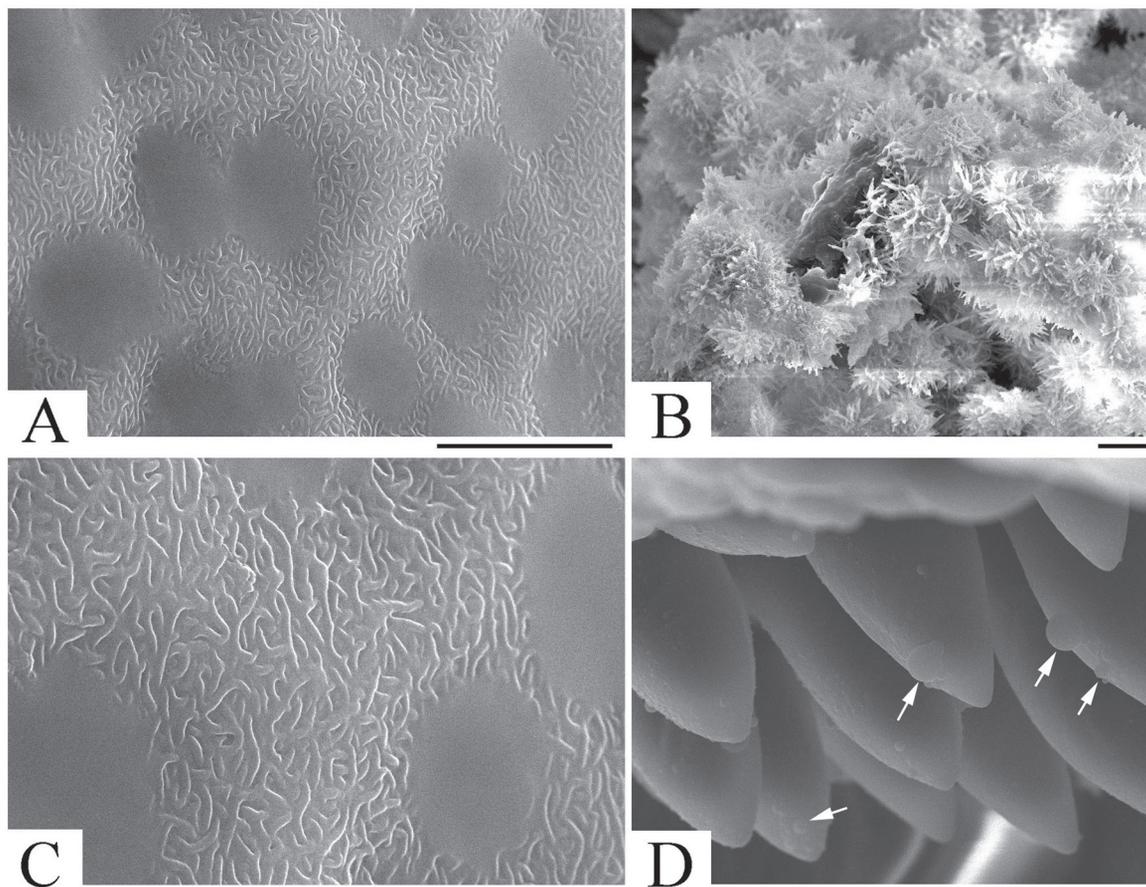


РИС. 7. Недостаточная промывка раковин глохидиев после очищения в щелочи (5% KOH). А, С. «Замыленность» пор наружной поверхности створок (*Cristaria tuberculata*, оз. Ханка, Приморский кр.). В. Остаток щелочи, выпавший кристаллами на поверхности личинки (*Unio dembeae*, р. Дуко, Эфиопия). D. Капли раствора щелочи (указаны стрелками) на поверхности шипов крючка (*Nodularia douglasiae*, р. Гион, о-в Хонсю, Япония). Масштаб 5 мкм (А, С), 2 мкм (В, D). Микроскоп Zeiss MERLIN, напыление углеродом (А, В), хромом (С, D).

FIG. 7. Insufficient rinsing of glochidia after cleaning in alkali (5% KOH). А, С. «Blurredness» of the exterior valve pores (*Cristaria tuberculata*, Khanka Lake, Primorsky Krai). В. Precipitation of alkali crystals on the exterior glochidia surface (*Unio dembeae*, Duko River, Ethiopia). D. Drops of alkali (indicated by arrows) on the hook spines (*Nodularia douglasiae*, Gion River, Honshu Island, Japan). Scale bars 5 μm (А, С), 2 μm (В, D). Zeiss MERLIN microscope, sputter coating with carbon (А, В) and chromium (С, D).

дается время на полное осаждение раковин, после чего процедура замены спирта повторяется.

Для получения полной информации о внешнем виде и морфологии глохидиев, необходимо сделать следующие изображения: вид закрытой раковины со стороны створки, виды самих створок снаружи и изнутри, общий вид прикрепительного аппарата в разных проекциях, а также отдельно макрошипов, изображение лигамента. После дегидратации небольшое количество раковин пипеткой переносится на столик с уже наклеенным на него двусторонним скотчем. Чтобы добиться всех необходимых проекций, можно дополнительно капать 96% этанол и аккуратно поворачивать еще не приклеенные раковины тонкой деревянной иглой. Необходимо добиваться равномерного распределения раковин по поверхности столика. Если раковины лягут излишне кучно, это скажется на качестве напыления, а при работе на

СЭМ может произойти «засветка» разных частей изучаемого объекта (Рис. 8 А, В).

В случае напыления на недостаточно высушенные раковины на поверхности створок будут видны дефекты в виде темных пятен из-за деформации наружного слоя, а изучение микроскульптуры станет невозможным (Рис. 3 D, E; Рис. 9). Излишнее пересушивание ведет к деформации раковин и крючков, образованию трещин на створках и даже потере крючков (Рис. 6 D; Рис. 3 C, F). Таким образом, напыление необходимо проводить сразу после высушивания раковин на столике.

Личиночные раковины унионид – достаточно крупные для СЭМ объекты (размерами не менее 200 мкм), поэтому для получения качественного изображения как самой раковины, так и прикрепительного аппарата в виде крупных крючков, достаточно напыления углеродом. Для изображений

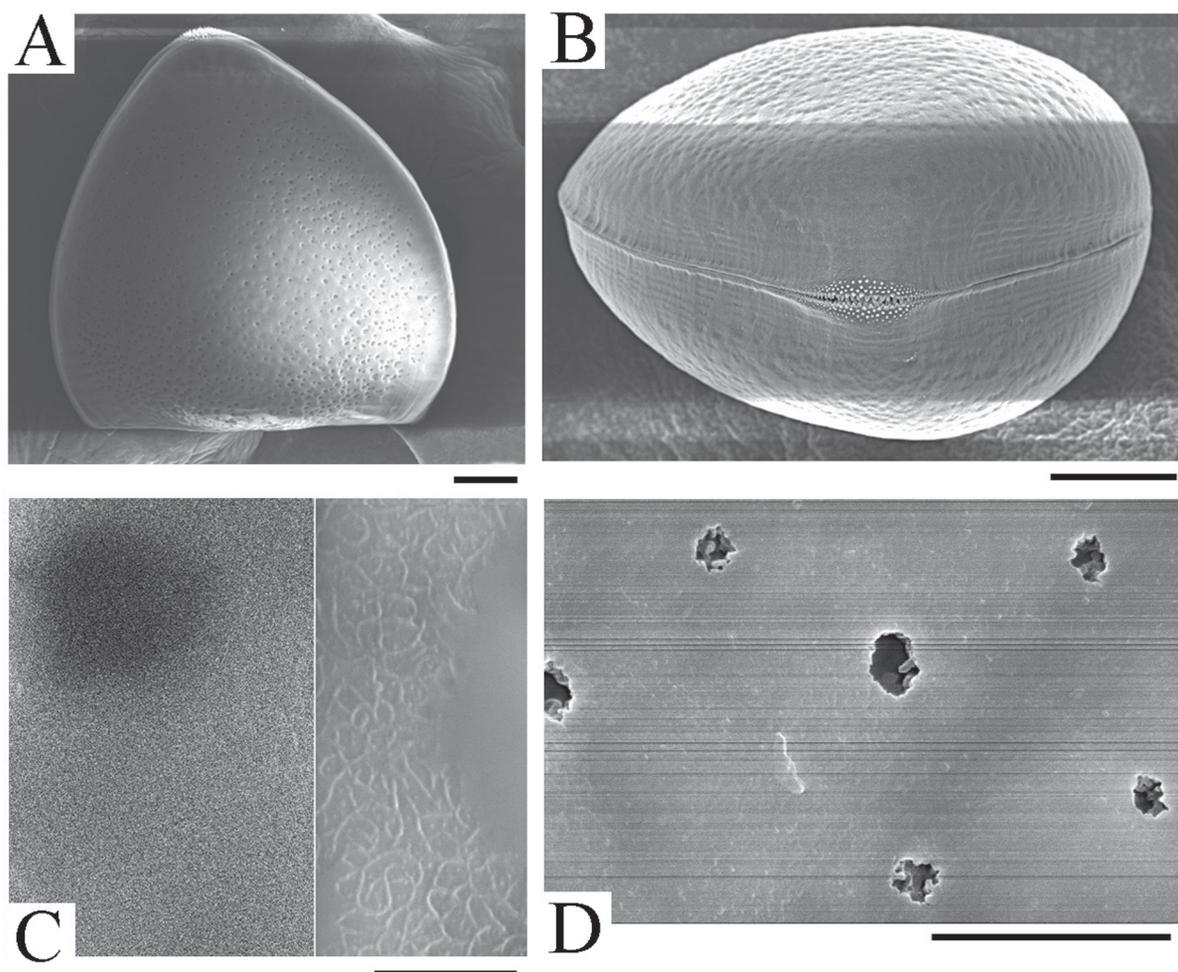


РИС. 8. Примеры проблем с изображением при работе на СЭМ. **А, В.** Засветка различных частей раковин глохидиев (**А.** *Anodonta anatina* (= *Colleopterum*), оз. Красное, Хакасия. **В.** *Inversiunio reinianus*, оз. Бива, о-в Хонсю, Япония). **С.** Разная скорость сканирования (слева – очень быстрая, справа – медленная) наружной поверхности глохидия (*Anodonta cygnea*, р. Ялма, Московская обл.). **Д.** Артефакты в виде горизонтальных полос вследствие накопления отрицательного заряда при недостаточном напылении внутренней поверхности глохидия (*Nodularia douglasiae*, Петровская протока, бассейн р. Амур, Хабаровский кр.). Масштаб 50 мкм (**А, В**), 2 мкм (**С**), 5 мкм (**Д**). Микроскопы Zeiss EVO 40 (**А, С, Д**), Zeiss MERLIN (**В**), напыление углеродом (**А, С**), хромом (**В, Д**).

FIG. 8. Illustration of different problems with SEM images. **A, B.** Overall illumination of some glochidia shells parts (**A.** *Anodonta anatina* (= *Colleopterum*), Krasnoe Lake, Khakassia. **B.** *Inversiunio reinianus*, Biwa Lake, Honshu Island, Japan). **C.** Different scanning speed (faster on the left and slower on the right) of the exterior glochidia valve (*Anodonta cygnea*, Yalma River, Moscow Oblast). **D.** Artifacts as horizontal stripes because of additional accumulation of a negative charge due to insufficient coating of the interior glochidia valve (*Nodularia douglasiae*, Petrovskaya channel, Amur River basin, Khabarovsk Krai). Scale bars 50 μm (**A, B**), 2 μm (**C**), 5 μm (**D**). Zeiss EVO 40 (**A, C, D**) and Zeiss MERLIN (**B**) microscopes, sputter coating with carbon (**A, C**) and chromium (**B, D**).

сверхвысокого разрешения (микроскульптуры поверхности створок или шипов на крючках) необходимо напыление хромом, золотом или сплавом золото/палладий (Рис. 10).

Особенности работы на СЭМ, влияющие на качество изображения. При работе на СЭМ следует учитывать такие параметры как яркость, контрастность, скорость сканирования, а также накопление электрического заряда (Рис. 8; Рис. 11). Недостаточная яркость или избыточная контрастность приводят к появлению черных

и белых областей, детали которых становятся неразличимы (Рис. 11). Быстрое сканирование позволяет уменьшить время работы с образцом, но снижает качество получаемого изображения (Рис. 8 С). Уменьшение скорости сканирования повышает качество изображения за счет снижения уровня зашумленности, однако длительное воздействие электронным пучком может привести к необратимым изменениям в образце (выгорание), о чем также не стоит забывать. Недостаточное напыление становится причиной искажения отдельных участков изображения либо

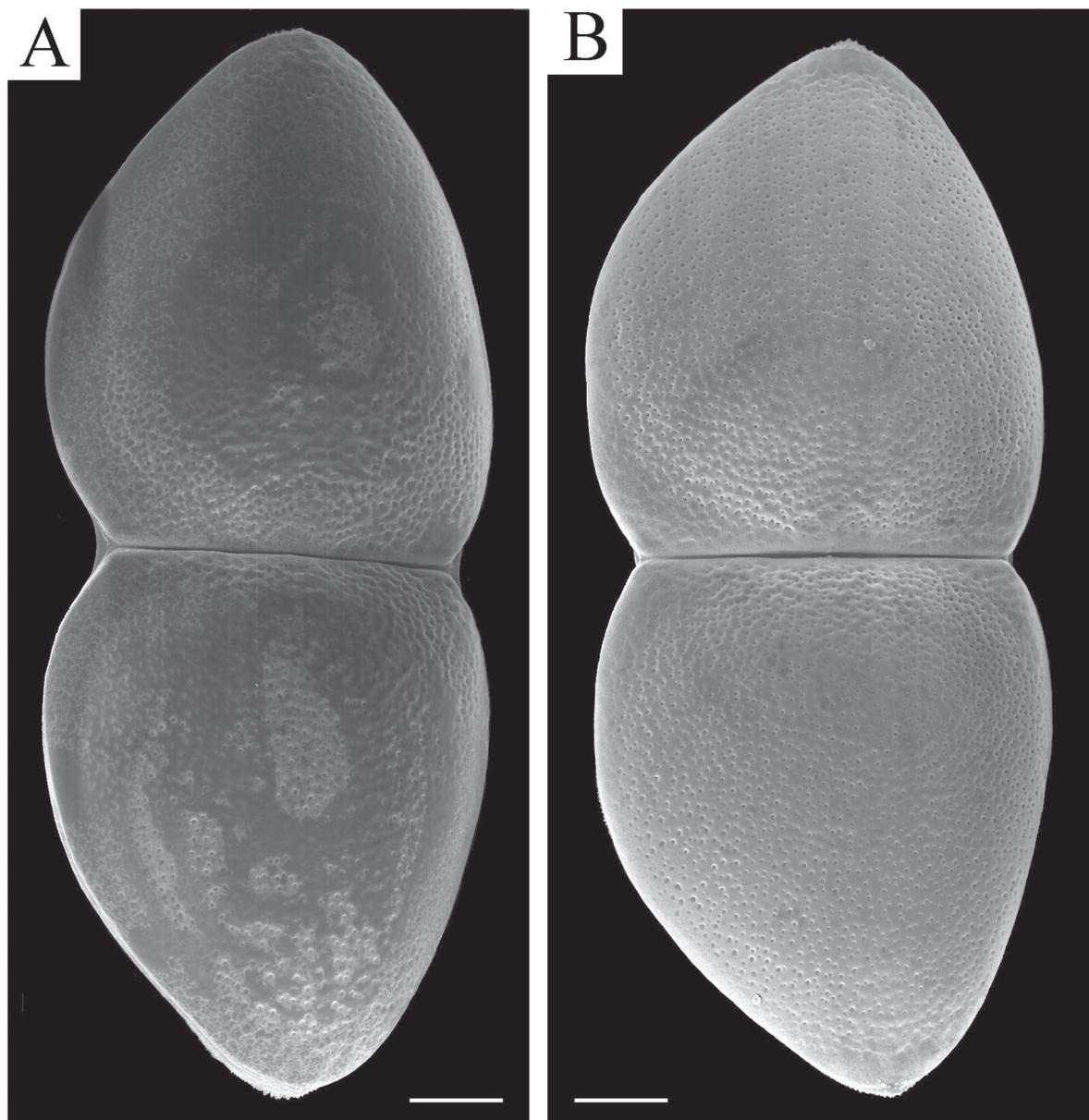


РИС. 9. Внешний вид раковин глохидиев (*Sinanodonta woodiana*, р. Одра, Польша), очищенных с помощью щелочи (5% KOH). **А.** Темные пятна на поверхности, свидетельствующие о недостаточной промывке после щелочи. **В.** Хорошо очищенная и правильно промытая раковина. Масштаб 50 мкм. Микроскоп Zeiss EVO 40, напыление золотом.

FIG. 9. Glochidia shells (*Sinanodonta woodiana*, Odra River, Poland) cleaned in alkali (5% KOH). **A.** Dark spots on the shell surface, indicating insufficient rinsing after alkali. **B.** Properly cleaned and rinsed shell. Scale bars 50 μm . Zeiss EVO 40 microscope, sputter coating with gold.

появлению артефактов в виде полос вследствие накопления отрицательного заряда (Рис. 8 D), что можно исправить повторным напылением.

Иногда после очень длительного хранения качество изображения получается недостаточно хорошее, по сравнению с сделанными ранее. Если это не связано с появившимся бактериальным загрязнением, то советуем провести повторное напыление – в ряде случаев этого достаточно для достижения желаемого результата.

Хранение образцов. Хранение коллекционно-

го материала в надлежащем качестве и с сохранением всех морфологических признаков – одна из важных задач исследовательского процесса.

Собранные и зафиксированные полужабры либо фиксированные очищенные глохидии рекомендуем хранить в стеклянных или специальных химически устойчивых емкостях подходящего объема, с притертыми крышками, например, в стеклянных флаконах пенициллиновых ФО-1 на 10 мл, как наиболее доступных. Столики с образцами желательно хранить в герметично закрытых контейнерах.

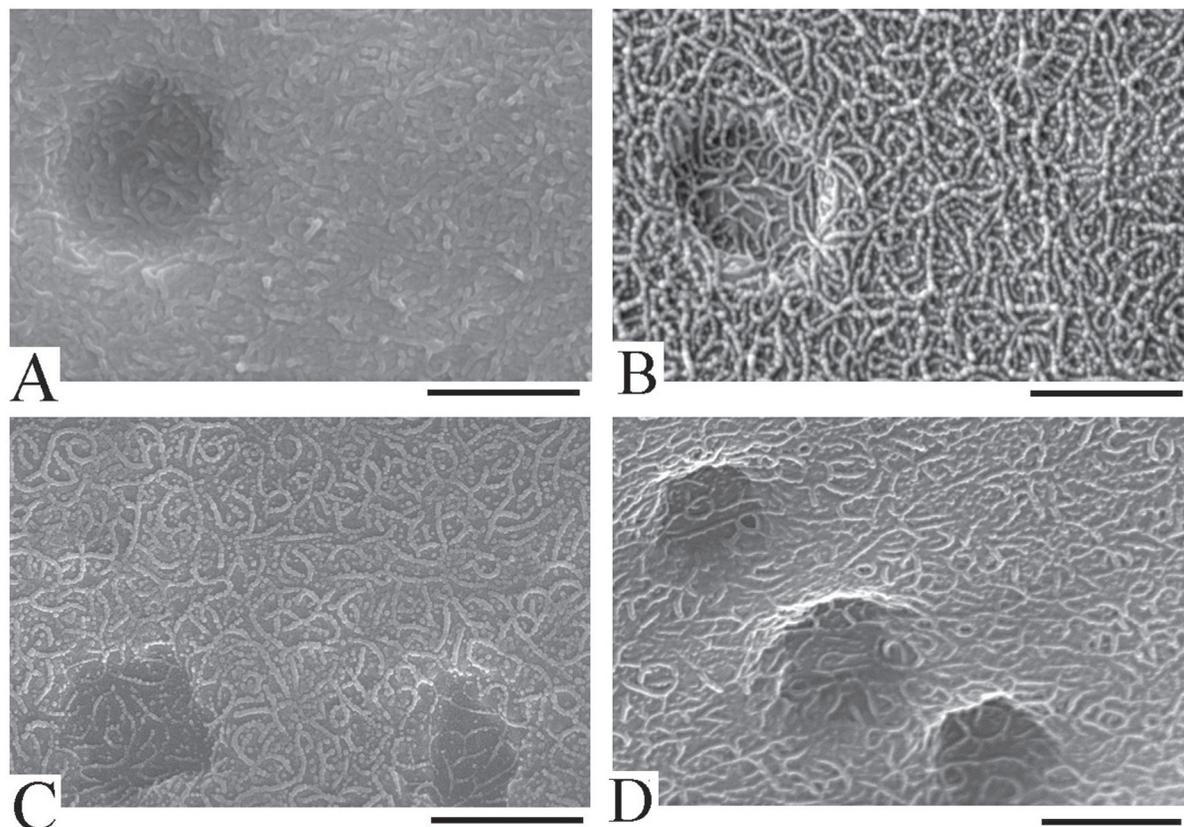


РИС. 10. Наружная микроскульптура раковин глохидиев при напылении разными материалами. **А.** Углеродом (*Kunashiria haconensis*, оз. Песчаное, о-в Кунашир, Курильские о-ва). **В.** Хромом (*Kunashiria haconensis*, оз. Песчаное, о-в Кунашир, Курильские о-ва). **С.** Хромом (*Anodonta cygnea*, оз. Хамржицкое, Польша). **Д.** Золотом (*Anodonta cygnea*, оз. Хамржицкое, Польша). Масштабная линейка 2 мкм. Микроскопы Zeiss EVO 40 (А, С), Zeiss MERLIN (В, D).

FIG. 10. External glochidia microsculpture with different material coating. **A.** Carbon coated (*Kunashiria haconensis*, Peschanoe Lake, Kunashir Island, Kuril Islands). **B.** Chromium coated (*Kunashiria haconensis*, Peschanoe Lake, Kunashir Island, Kuril Islands). **C.** Chromium coated (*Anodonta cygnea*, Khamrzhitskoe Lake, Poland). **D.** Gold coated (*Anodonta cygnea*, Khamrzhitskoe Lake, Poland). Scale bars 2 µm. Zeiss EVO 40 (A, C) and Zeiss MERLIN (B, D) microscopes.

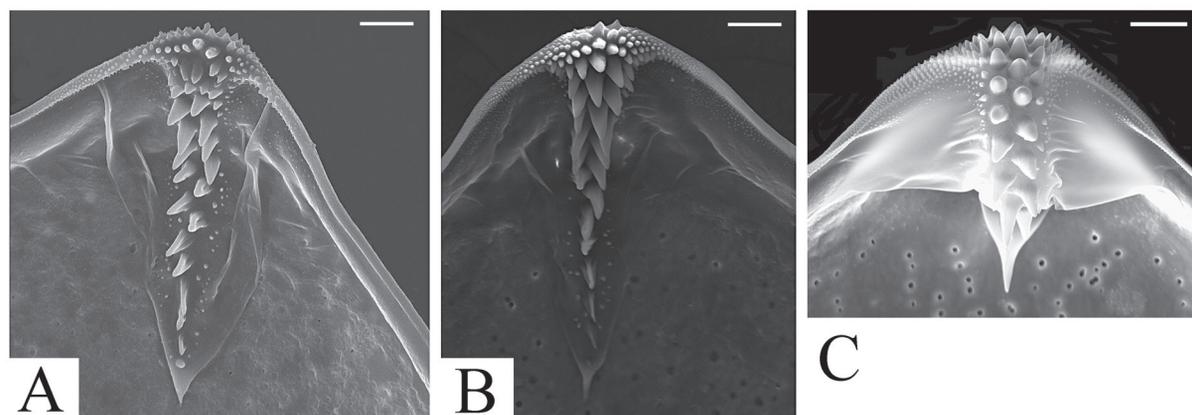


РИС. 11. Изображения крючков глохидиев при разной настройке яркости и контрастности (*Anemina arcaiformis*, р. Сита, Хабаровский кр.). **А.** Оптимальные яркость и контрастность. **В.** Избыточная контрастность. **С.** Избыточная яркость. Масштаб 20 мкм. Микроскоп Zeiss EVO 40, напыление углеродом.

FIG. 11. Imagines of glochidia hooks with different brightness and contrast value (*Anemina arcaiformis*, Sita River, Khabarovsk Krai). **A.** Optimal brightness and contrast. **B.** Excessive contrast. **C.** Excessive brightness. Scale bars 20 µm. Zeiss EVO 40 microscope, sputter coating with carbon.

Для лучшей герметизации емкостей с фиксированными собранными полужабрами, фиксированными уже очищенными раковинами и контейнерами с готовыми столиками для СЭМ можно рекомендовать специальную лабораторную пленку Parafilm M, которая существенно повысит защиту от испарения и внешнего загрязнения.

Необходимо учитывать, что образцы с раковинами, очищенными методом мацерирования, но без последующего обеззараживания, при длительном хранении подвержены внутреннему грибковому и бактериальному загрязнению (Рис. 5). Даже при условии хранения столиков в герметичных условиях, внутренняя инфекция со временем испортит такие образцы.

Благодарности

За помощь в работе на Zeiss EVO 40 выражаем свою искреннюю благодарность к.б.н. Н.Н. Нарышкиной. Авторы признательны рецензентам за тщательную работу с рукописью, критические замечания и советы, которые в результате позволили существенно улучшить статью.

Список литературы

- Antonova L.A. 1986. On the possibility of identification of the ripe glochidia of abundant European species from the subfamilies Unioninae and Anodontinae (Bivalvia Unionidae). In: Scarlato O.A. (ed.) Morphological and ecological bases of the molluscan taxonomy. *Trudy Zoologicheskogo Instituta, Leningrad*, 148: 46–51 [In Russian].
- Antonova L.A. 1987. Morphological variations in glochidia of mass *Unio* species (Bivalvia) of the European part of the USSR. *Zoologicheskij zhurnal*, 66(9): 1412–1414 [In Russian].
- Antonova L.A., Starobogatov Ya.I. 1989. Use of the scanning electron microscope (SEM) for identification of generic belonging of unionidan glochidia. *Zoologicheskij zhurnal*, 68(3): 118–126 [In Russian].
- Callomon P. 2020. *A simple system for holding mollusk shells and other small objects for photography*. Philadelphia PA: P. Callomon. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.25585.92000>
- Chernyshev A.V., Sayenko E.M., Bogatov V.V. 2020. Superspecific taxonomy of the Far Eastern unionids (Bivalvia, Unionidae): review and analysis. *Biology Bulletin*, 47(3): 267–275. <https://doi.org/10.1134/S1062359020010045>
- Geiger D.L., Marshall B.A., Ponder W.F., Sasaki T., Warén A. 2007. Techniques for collecting, handling, preparing, storing and examining small molluscan specimens. *Molluscan Research*, 27(1): 1–50.
- Glauert A.M., Lewis P.R. 1998. Biological specimen preparation for transmission electron microscopy. In: Glauert A.M. (Series ed.) *Practical Methods in Electron Microscopy*. Princeton University Press, Portland Press, 17: 1–326.
- Higashi S., Hayashi K. 1964. On the larvae of freshwater bivalves in the Lake Biwa-ko. *Bulletin of the Japanese Society for Scientific Fisheries*, 30(3): 227–233.
- Hoggarth M.A. 1999. Descriptions of some of the glochidia of the Unionidae (Mollusca: Bivalvia). *Malacologia*, 41(1): 1–118.
- Inaba S. 1941. A preliminary note on the glochidia of Japanese freshwater mussels. *Annotations Zoologicae Japonenses*, 20(1): 14–23.
- Inaba S. 1964. Morphological and ecological studies on the glochidia larvae of the Unionidae. *Science Reports of the Faculty of Liberal Arts and Education*, Gifu University, 3: 275–307.
- Kholodov V.I., Pirkova A.V., Ladygina L.V. 2017. *Cultivation of mussels and oysters in the Black Sea*. Voronezh: OOO «IZDAT-PRINT», 508 p.
- Kondo T. 1987. Breeding seasons of seven species of unionid mussels (Bivalvia: Unionidae) in a small creek. *Venus (Japanese Journal of Malacology)*, 46(4): 227–236.
- Kondo T. 1997. Taxonomic position and distribution of *Unio biwae* (Bivalvia: Unionidae). *Venus (Japanese Journal of Malacology)*, 56(1): 41–47.
- Kwon O.-K., Park G.-M., Lee J.-S., Song H.-B. 1993. Scanning electron microscope studies of the minute shell structure of glochidia of three species of Unionidae (Bivalvia) from Korea. *Malacological Review*, 26(1-2): 63–70.
- Lee Y.S., Min B.-J., Kang S.W., Jo Y.H., Kim T.Y., Kho W.-G., Han Y.S., Park H.-S., Jeong K.-H. 2007. A scanning electron microscopic study on the glochidial encystment of a freshwater clam, *Anodonta arcuiformis* on the host fish, *Carassius auratus*. *Korean Journal of Malacology*, 23(2): 181–187.
- Lima P., Kovitvadhi U., Kovitvadhi S., Machado J. 2006. *In vitro* culture of glochidia from the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. *Invertebrate Biology*, 125(1): 34–44. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2006.00037.x>
- Pimpão D.M., Mansur M.C.D., Bergonci P.E.A., Beasley C.R. 2012. Comparative morphometry and morphology of glochidial shells of Amazonian Hyriidae (Mollusca: Bivalvia: Unionida). *American Malacological Bulletin*, 30(1): 73–84. <https://doi.org/10.4003/006.030.0106>
- Sayenko E.M. 2014. Data on microsculpture of glochidial shells of anodontine bivalves (Unionidae, Anodontinae). *Vladimir Ya. Levanidov's Biennial Memorial Meeting*, 6: 585–593 [In Russian].
- Sayenko E.M. 2015. A comparison of micro-sculpture of the glochidia of *Beringiana* and *Kunashiria* (Bivalvia: Unionidae: Anodontinae). *Bulletin of the Russian Far East Malacological Society*, 19: 17–24 [In Russian].
- Sayenko E.M. 2016. The microsculpture of glochidia of some anodontine bivalves (Unionidae). *Biology Bulletin*, 43(2): 127–135.
- Sayenko E.M., Soroka M., Akiyama Y.B., Uechi T., Ito K., Kondo M. 2021. Taxonomic status of genera *Nodularia*, *Middendorffinaia* and *Inversiunio* (Bivalvia: Unionidae) from South-East Asia: morphometric, genetic and GenBank data. *Systematics and Biodiversity*, 19(1): 54–73. <https://doi.org/10.1080/14772000.2020.1844817>
- Taylor J.C., Harding W.R., Archibald C.G.M. 2007. A method manual for the collection, preparation and analysis of diatom samples. Version 1.0. *WRC Report TT No 281/07*. Pretoria, South Africa: Water Research Commission, 49 p. ●