

АКАДЕМИЯ НАУК СССР



Ю. С. БАЛАШОВ
С. А. ЛЕОНович

**МЕТОДЫ
ПРИМЕНЕНИЯ
РАСТРОВОЙ
ЭЛЕКТРОННОЙ
МИКРОСКОПИИ
В ЗООЛОГИИ**

Русинек О. Г.
1. 06. 84г.



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ЗООЛОГИЧЕСКИЙ
ИНСТИТУТ

Ю. С. БАЛАШОВ,
С. А. ЛЕОНОВИЧ

МЕТОДЫ ПРИМЕНЕНИЯ РАСТРОВОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ В ЗООЛОГИИ



ЛЕНИНГРАД
«НАУКА»
ЛЕНИНГРАДСКОЕ
ОТДЕЛЕНИЕ
1984

УДК 595.

Б а л а ш о в Ю. С., Л е о н о в и ч С. А. Методы применения растровой электронной микроскопии в зоологии. — Л.: Наука, 1984. — 71 с. — (Методы зоологических исследований — практике).

Работа посвящена рассмотрению возможностей применения растрового электронного микроскопа (РЭМ) в различных зоологических исследованиях. Приводится краткое описание принципов работы РЭМ и особенностей получаемого фотографического изображения объектов. Подробно рассматриваются методы подготовки зоологических объектов для изучения их в РЭМ. Работа иллюстрирована многочисленными примерами использования РЭМ для исследования целых животных и их частей, включая простейших, червей, иглокожих, моллюсков, насекомых, клещей, млекопитающих. Текст сопровождается оригинальными схемами и многочисленными фотографиями.

Библиогр. — 70 назв. Ил. 97. Табл. 4.

Г л а в н ы й р е д а к т о р
директор Зоологического института АН СССР
О. А. С к а р л а т о

Р е д а к ц и о н н а я к о л л е г и я:

Ю. С. Б а л а ш о в (отв. редактор), В. В. Х л е б о в и ч (зам. отв. редактора),
В. В. Б у л ь о н, М. А. К о з л о в, И. М. Ф о к и н

О т в е т с т в е н н ы й р е д а к т о р
Г. С. М е Ѹ в е д е в

Р е ц е н з е н т ы:
В. К. Л е б с к и й, Ю. В. М а м к а е в

Б 20050000-564 265-83-IV
042 (02)-84

© Издательство «Наука», 1984 г.

ВВЕДЕНИЕ

Растровый электронный микроскоп (РЭМ) после появления его первых промышленных образцов в 1964 г. («Стереоскан» английского производства) становится все более популярным в самых различных областях зоологии. Сравнительная простота подготовки объектов для исследования и исключительная информативность получаемых изображений постоянно расширяют сферу применения РЭМ, так что при изучении некоторых групп животных с наружным скелетом он даже начал вытеснять световую оптику. К настоящему времени в мировой литературе ежегодно публикуются многие десятки работ, связанных с применением РЭМ в зоологии, а общее число публикаций, по-видимому, значительно больше тысячи.

Описанию принципов работы РЭМ и технических приемов эксплуатации этих приборов, равно как и возможностей их применения в различных областях науки, посвящена обширная литература, включающая и несколько сводок (см., например: Суворов, 1981). В числе последних можно также назвать переведенное на русский язык руководство «Практическая растровая электронная микроскопия» (1978). Методы применения РЭМ в разных областях биологии рассматриваются в 4 томах обзоров под редакцией Хайата (Hayat, 1974а, 1974б, 1975а, 1975б) и в сводке того же автора (Hayat, 1978). К сожалению, значительно слабее освещена специфика применения РЭМ в зоологии. Цель настоящей работы — восполнить этот пробел, особенно в отечественной литературе.

Авторы на основе десятилетнего опыта использования РЭМ «Стереоскан-2» в Зоологическом институте АН СССР знакомят читателя с возможностями подобных приборов для изучения зоологических объектов и с методиками подготовки образцов для исследования в РЭМ. Предлагаемая работа ни в коей мере не является полным руководством по применению РЭМ в зоологии, но лишь кратким методическим пособием для начинающих. Наряду с описанием технических возможностей РЭМ и методов подготовки препаратов пособие иллюстрируется примерами использования этого прибора при работе с различными зоологическими объе-

ктами в области систематики, сравнительной и функциональной морфологии.

Авторы приносят искреннюю благодарность сотрудникам Зоологического института АН СССР И. М. Лихареву, М. Г. Петрушевской, Ф. Н. Голенищеву, Б. И. Иоффе, А. В. Смирнову, а также сотруднику Института паразитологии Чехословацкой Академии наук д-ру З. Ждарской за любезное разрешение использовать их оригинальные фотографии в настоящей книге. Особую признательность авторы выражают инженерам Н. Е. Миккау и А. М. Игнатьеву, обеспечивающим эксплуатацию РЭМ в Зоологическом институте и сделавшим много ценных усовершенствований и приспособлений, а также фотографу П. И. Генкину.

ПРИНЦИП РАБОТЫ И ТЕХНИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ РЭМ

Растровый электронный микроскоп состоит из двух основных частей. Электронно-оптическая система включает электронную оптическую колонну с устройством автоматической откачки воздуха, источник электронов — катод, систему магнитных и электрических линз с диафрагмами, столик объекта и коллектор электронов. Управляющая система состоит из питающего устройства операционной системы блоков управления, демонстрационная система — из электронно-лучевых трубок (кинескопов). В настоящее время существует большое число моделей РЭМ, различающихся по величине разрешения, степени автоматизации операций и другим параметрам, подробное описание которыхдается в проспектах фирм-изготовителей. Однако принципиальная схема работы прибора и основные узлы одинаковы для всех РЭМ (рис. 1).

В основе работы РЭМ лежит принцип перемещения пучка электронов по поверхности исследуемого объекта. В приборе поверхность образца исследуется тонко сфокусированным электронным пучком, который развертывается в растр. В результате взаимодействия сфокусированного электронного пучка с поверхностью образца возникают вторичные и отраженные электроны, оже-электроны, фотоны различных энергий и рентгеновское излучение.

Для анализа формы и топографии объектов в РЭМ используются вторичные электроны, которые могут «выбиваться» с глубины не более 10 нм. Изменения потока вторичных электронов обусловлены разницей в топографии поверхности при развертке электронного пучка в растр. Эти электроны улавливаются коллектором, возбуждаемые ими слабые видеосигналы подвергаются процессам усиления и преобразования, и в конечном итоге за их счет строится видимое изображение объекта на телевизионной трубке-кинескопе. Выход вторичных электронов ограничен областью площадки, на которую попадает пучок, что позволяет получить изображение с относительно высоким разрешением. Впечатление же трехмерности изображения создается за счет большой величины фокусного расстояния РЭМ.

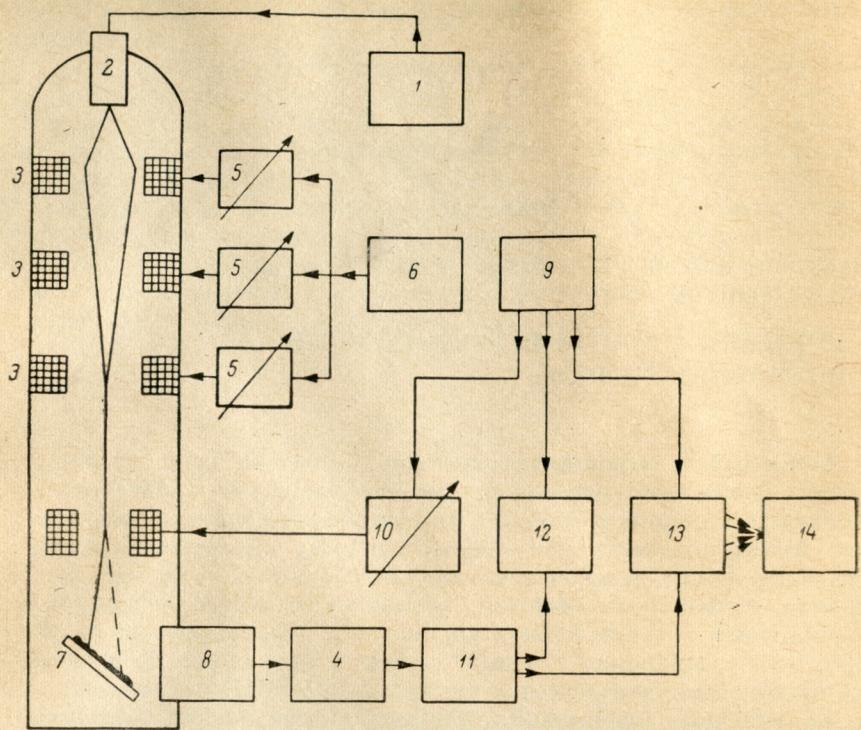


Рис. 1. Упрощенная блок-схема растрового электронного микроскопа (РЭМ).

1 — источник питания электронной пушки; 2 — электронная пушка; 3 — магнитные линзы; 4 — система развертки луча; 5 — регуляторы фокусировки; 6 — источник питания магнитных линз; 7 — объект; 8 — коллектор электронов; 9 — генератор разверток; 10 — регулятор увеличения; 11 — усилитель сигнала; 12 — визуальный индикатор; 13 — регистрирующий индикатор; 14 — фотокамера.

Полученные в РЭМ при малых увеличениях изображения объектов со сложной топографией поверхности обладают значительным сходством с картиной тех же объектов, если бы их можно было наблюдать невооруженным глазом. При микроскопировании в видимом свете освещение образца обладает разной степенью рассеяния и асимметричности. В результате этого неровности поверхности создают тени, а человеческий глаз способен регистрировать лишь отраженный в его направлении свет. При получении изображений в РЭМ с помощью детектора вторичных электронов направленность электронного освещения вдоль пучка сочетается с детектированием диффузных электронов, движущихся во многих направлениях. Соответственно интерпретация эмиссионных изображений в РЭМ на основе светооптической аналогии осуществляется путем подбора направленных и диффузных компонентов каждой из систем. При этом полагают, что источник света мог бы располагаться на месте детектора, а детектор света (глаз) — на месте выхода электронного пучка. Оптимальный подбор угла наклона

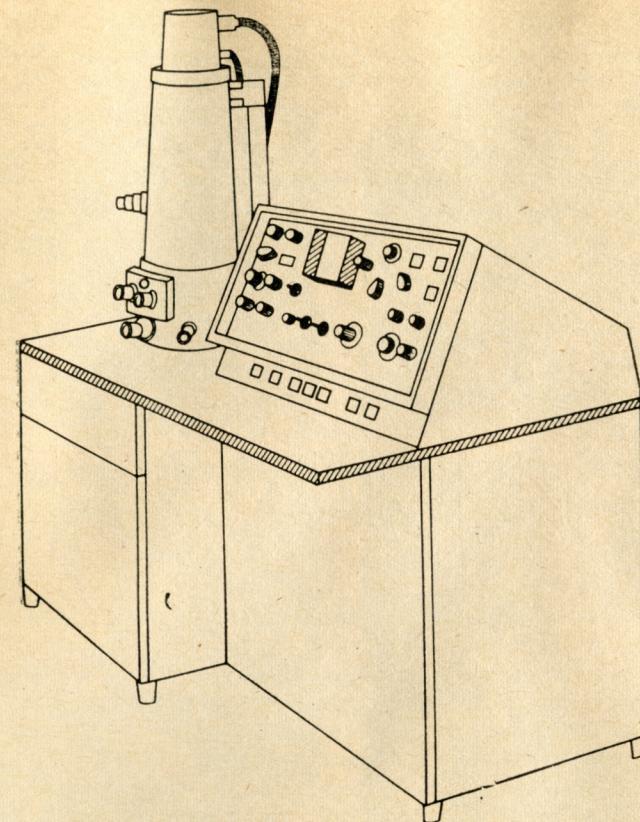


Рис. 2. Внешний вид растрового электронного микроскопа.

поверхности объекта к электронному пучку позволяет добиваться максимальной аналогии с вероятным светооптическим изображением тех же объектов, включая местоположение «освещенных» и «затененных» участков. Тем самым значительно облегчается трактовка электронограмм, полученных с помощью РЭМ.

Основные достоинства РЭМ, обеспечившие широкое распространение и популярность этого прибора (рис. 2) в зоологических лабораториях, определяются несколькими моментами (табл. 1).

1. Принцип получения изображения в РЭМ позволяет изучать объекты независимо от их толщины, так что в камеру микроскопа можно помещать целых животных. Тем самым отпадает необходимость в крайне сложной и трудоемкой процедуре приготовления срезов для просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ). Достаточно большая площадь столика для образцов РЭМ (10—12 мм и больше) позволяет размещать на нем целиком многих животных или отдельные органы.

Таблица 1

Возможности светового (СМ), растрового электронного (РЭМ) и просвечивающего электронного (ПЭМ) микроскопов

Показатель	СМ	РЭМ	ПЭМ
Разрешение:			
нормальное	5 мкм	20—50 мкм	3—5 нм
пределное	0.25 мкм	0.5—2.5 нм	0.15 нм
Глубина фокуса	Малая	Очень большая	Умеренная
Поле зрения	Большое	Большое	Малое
Изображение	Цветное	Черно-белое	Черно-белое
Подготовка объекта	Простая	Простая	Сложная
Типы объектов	Целые организмы, срезы и реплики	Целые организмы и реплики	Тонкие срезы и реплики
Наблюдение живых объектов	Без ограничений	Ограничено	Невозможно

2. Визуальное (на экране кинескопа) или фотографическое изображения РЭМ передают рельеф и структуру изучаемых поверхностей сходно со световой оптикой. Последнее освобождает от трудоемких анатомических реконструкций и крайне упрощает трактовку полученных данных.

3. Исключительная глубина резкости в РЭМ, превышающая таковую световой оптики на 1—3 порядка, обеспечивает объемность изображения. Благодаря этой особенности на фотографиях, получаемых с помощью РЭМ, с недостижимой для световой оптики четкостью видны детали переднего и заднего планов. Большинство изображений зоологических объектов получено при увеличениях 0.1—5 тыс., когда требования к глубине резкости значительно важнее разрешающей способности прибора.

4. Высокая разрешающая способность РЭМ (от 200 нм в серийных приборах до 0.5—10 нм в идеальных условиях) значительно превосходит таковую лучших световых микроскопов (250 нм) и дает возможность исследовать детали при увеличениях до 20—40 тыс. раз и более.

5. Конструкции современных РЭМ позволяют исследовать один и тот же объект в полном диапазоне увеличений прибора (рис. 3—6). На практике это означает, что можно получить фотографии одного и того же объекта сперва при малых увеличениях от 20 до 200 раз, необходимых при анализе общей анатомической топографии. Затем, не вынимая объект из камеры микроскопа, можно исследовать детали его строения при средних увеличениях порядка от 200 до 2 тыс. раз и наконец перейти к исследованию ультраструктурных особенностей поверхностных образований при увеличениях от 2 до 10 тыс. раз и более, т. е. далеко за пределами

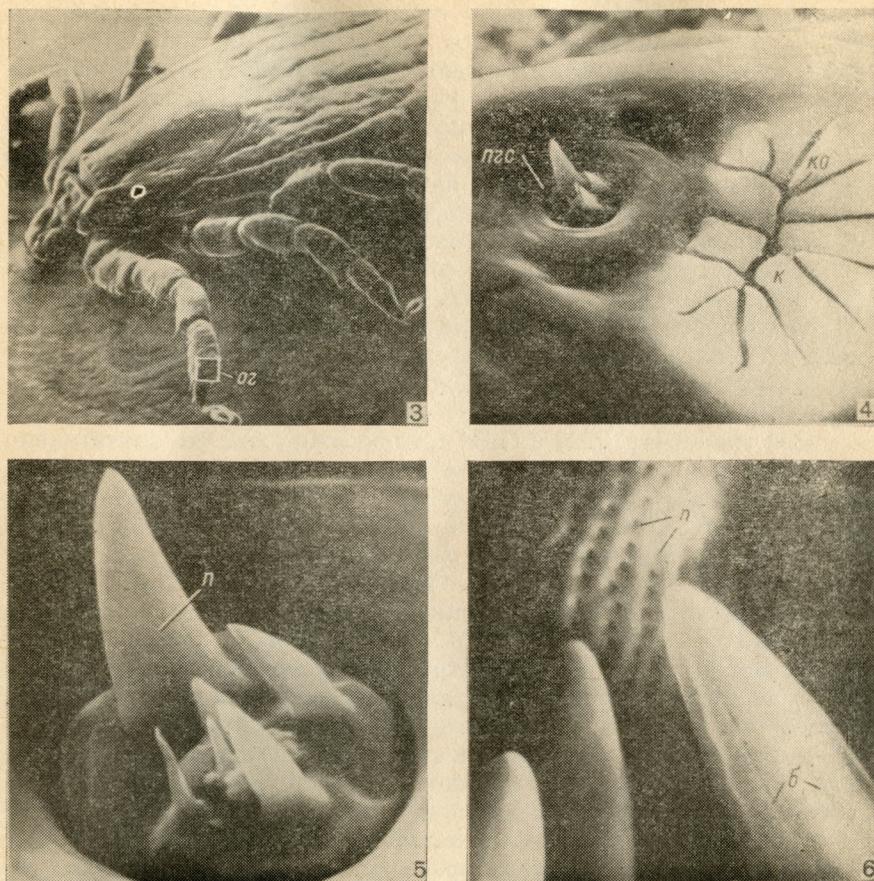


Рис. 3—6. Сенсорный орган Галлера иксодового клеща *Hyalomma asiaticum* при разных увеличениях (по: Атлас электронно-микроскопической анатомии иксодовых клещей, 1979).

3 — местоположение органа на I паре ног самки клеща, $\times 20$; 4 — основные отделы органа, $\times 800$; 5 — передняя группа сенсилл, $\times 2000$; 6 — бороздки и поры на поверхности сенсилл, $\times 16\,000$. *о* — орган Галлера; *о_г* — передняя группа сенсилл; *к* — капсула; *б* — бороздки; *п* — поры; *ко* — капсулярное отверстие.

разрешающей способности световой оптики. При этом отпадает необходимость сложной операции по ориентации исследуемых структур.

Таким образом, основные преимущества РЭМ по сравнению со светооптическими приборами сводятся к недостижимым ранее увеличениям и исключительной глубине фокуса. По сравнению с ПЭМ исследование объектов в РЭМ гораздо менее трудоемко и позволяет изучать живые образцы, а не только срезы, сколы или реплики. В результате если по разрешающей способности РЭМ восполняет и частично перекрывает диапазоны увеличений между световым

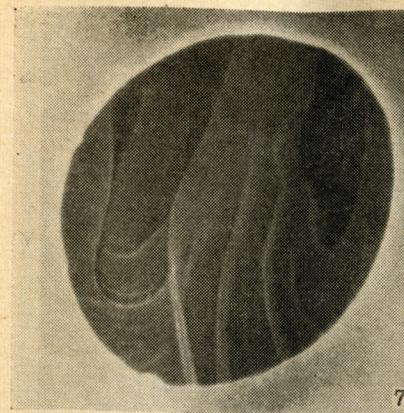
микроскопом и ПЭМ, то по ряду параметров он обладает возможностями, недостижимыми для них (табл. 1).

В то же время применительно к зоологическим исследованиям РЭМ имеет и некоторые недостатки по сравнению со световой оптикой. Не говоря о высокой стоимости и сложности технического обслуживания прибора, в первую очередь следует отметить необходимость помещения объектов в вакуум, что в большинстве случаев исключает наблюдение живых животных, отсутствие цветопередачи и невозможность без специальных дополнительных процедур наблюдать внутренние детали объекта, видимые на просвет в световой микроскоп. Наконец, в отдельных случаях возможны повреждения объекта в процессе исследования из-за теплового разрушения его поверхности пучком электронов с высокой энергией или же разрывов и деформаций недостаточно высушенных «нежных» образцов в условиях вакуума.

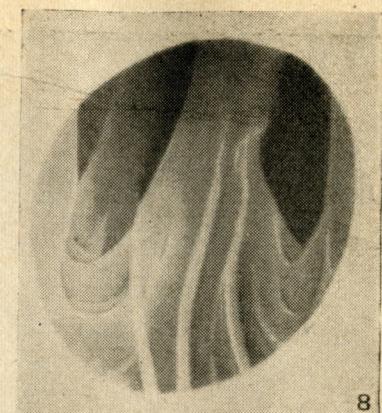
При сравнении РЭМ с ПЭМ следует отметить, что значительно меньшая разрешающая способность не имеет для зоологических исследований существенного значения. Лишь в отдельных случаях зоологи используют увеличения свыше 10 тыс. раз, так что ими не реализуются даже верхние пределы разрешения РЭМ.

На качество изображения в РЭМ влияют как факторы, связанные с подготовкой объекта (фиксация, напыление и др.), так и условия его наблюдения в РЭМ. Из многих факторов, принимающих участие в образовании контрастного изображения вторичными электронами, важнейшими являются топография, атомная масса, электропроводность поверхности образца, а также угол, образованный падающим потоком электронов и исследуемой поверхностью. В частности, при слишком большой энергии электронов, (большое ускоряющее напряжение) и малой атомной массе или недостаточном по толщине слое напыленного металла возможно избыточное образование упругорассеянных (отраженных электронов) из глубины образца. Последние, попадая в коллектор, вызывают не только снижение контрастности изображения и разрешающей способности, но в ряде случаев и возникновение ложной информации.

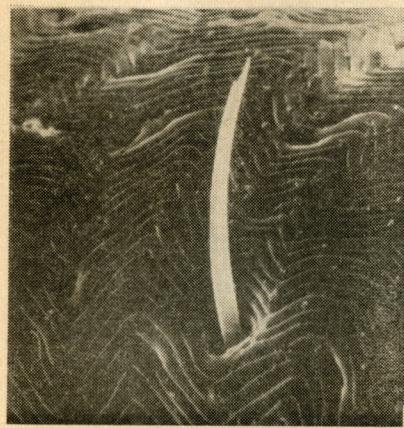
В инструкциях фирм-изготовителей РЭМ для каждой модели дается подробное описание порядка эксплуатации прибора, а также оптимальных режимов работы с разными типами образцов и в разных условиях, так что мы ограничимся лишь замечаниями о некоторых общих особенностях работы с РЭМ. У современных моделей существуют широкие возможности варьирования ускоряющего напряжения, частоты строки и времени развертки луча, рабочего расстояния, размера последней диафрагмы, угла наклона объекта и других параметров. При работе на РЭМ существует возможность выбора между низкой чувствительностью к контрасту во всем диапазоне интенсивностей сигнала при воспроизведении немодифицированного сигнала или использованием преобразования постоянной составляющей сигнала или гамма-преобразования для получения в ограниченном диапазоне интенсивностей сигнала



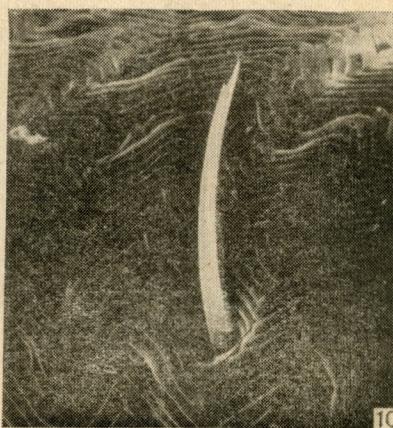
7



8



9



10

Рис. 7—10. Изображение отверстий на поверхности покровов тела иксодового клеща *Ixodes persulcatus* при нормальном (7) и гамма-обработанном (8) сигнале, $\times 20\ 000$; стереопара механорецепторной хеты покровов тела того же клеща, $\times 500$ (9, 10).

сильного контраста (рис. 7, 8). Для зоологических исследований в большинстве случаев используется режим с немодифицированным сигналом. При изучении строения глубоких отверстий, углублений и других деталей может проводиться гамма-преобразование сигнала.

Выбор диафрагмы и рабочего расстояния определяется особенностями поверхности образца и увеличением. При малых увеличениях и сильно шероховатой поверхности, как например в случае с морфологическим исследованием покрытых многочисленными волосками членистоногих, необходимы диафрагма с минимальной апертурой и максимальное рабочее расстояние для получения наибольшей глубины фокуса. Последнее обеспечивает хорошую фокусировку всего исследуемого объекта, важную для получения ка-

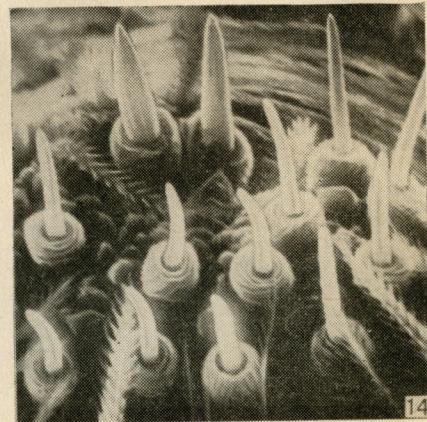
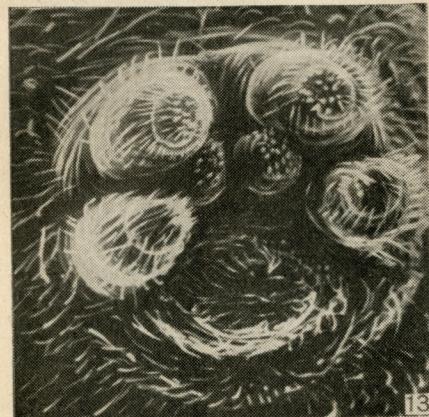
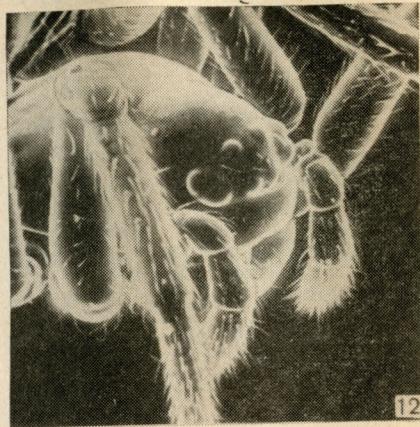


Рис. 11—14. Прижизненные фотографии пауков.

11 — головогрудь паука сем. Mimetidae спереди, $\times 200$. Паук-пигмей сем. Micryphantidae; 12 — головогрудь, $\times 100$; 13 — паутинные бородавки, $\times 100$; 14 — вершина паутинной бородавки с паутинными трубочками, $\times 1000$.

чественных обзорных фотографий. Напротив, при работе с большими увеличениями используют наибольшую апертуру и короткое рабочее расстояние.

Выбор ускоряющего напряжения зависит от объекта исследования, качества напыления и требуемого увеличения. При малых увеличениях (до 500 раз) с ускоряющим напряжением до 5 кВ возможно исследование ненапыленных объектов (зубы, части скелетов, раковины и др.), но качество изображения хуже, чем после напыления. Живых членистоногих (рис. 11—18) с прочным наружным скелетом, выдерживающих условия вакуума и имеющих высокую электропроводность покровов, можно изучать при увеличениях до 5 тыс. раз и ускоряющем напряжении в 10 кВ (Балашов,

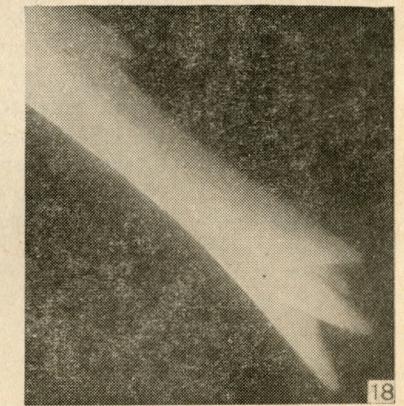
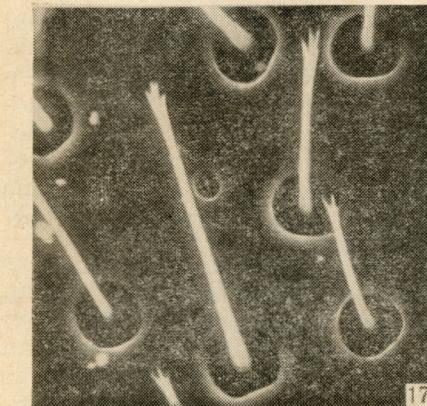
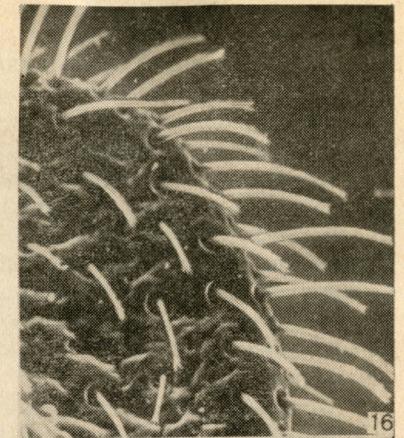
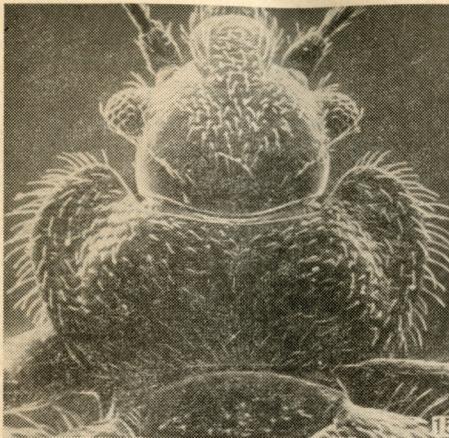


Рис. 15—18. Прижизненные фотографии постельного клопа *Cimex lectularius*.

15 — голова и переднегрудь сверху, $\times 50$; 16 — элитра переднегруди, $\times 500$; 17 — механорецепторные сенсиллы¹¹ переднегруди, $\times 1000$; 18 — то же, зазубренный дистальный конец сенсиллы, $\times 5800$.

Миккау, 1977). В то же время качественное напыление при увеличениях в 2 тыс. раз и более дает хорошие результаты при напряжении в 20 и даже 30 кВ. Во время работы следует руководствоваться правилом, что если образец начинает заряжаться или происходит разрушение его поверхности, то ускоряющее напряжение следует уменьшить до минимально допустимых значений.

Оптимальные условия формирования изображения достигаются при наблюдении образца под углом 30—45° к электронному пучку. Объекты с очень гладкими поверхностями рекомендуют помещать под угол более 45°. Для объектов со сложной поверхностьюной конфигурацией (что при зоологических исследованиях бывает очень часто) угол оптимального наклона объекта может

сильно варьировать. Например, различного рода волоски, расположенные перпендикулярно к поверхности покрова, часто лучше всего видны под углом, близким к 90° . Следует помнить, что при неудачном выборе угла наклона объекта не только ухудшается качество изображения, но и возникает искажение линейных пропорций объекта, внешне сходное с искажением световых изображений при наблюдении в неправильном ракурсе.

РЭМ, благодаря наличию у прибора двух типов кинескопов, позволяет изучать объект как путем визуального наблюдения, так и при помощи фотографий. Первоначальный анализ образцов, равно как и выбор деталей для съемки, осуществляется визуально, но в дальнейшем преимущество отдается анализу микрофотографий, представляющих основную научную документацию подобного рода исследований.

Большая глубина фокуса и хорошее разрешение, присущее РЭМ, позволяют эффективно использовать методику стереосъемки для исследования неровных поверхностей (рис. 9, 10). Методика получения стереопар микрофотографий заключается в повторной съемке одного и того же участка образца, наклоненного под разными углами по отношению к пучку электронов. Разница углов наклона изображений в стереопаре составляет $5-10^\circ$ в зависимости от увеличения. Изменение угла обычно достигается механическим наклоном образца с помощью гoniометра. В дальнейшем стереопару изучают с помощью стереоскопа, который дает суммарное изображение с двух фотографий, создающее иллюзию глубины пространства.

ПОДГОТОВКА ЗООЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ К ИССЛЕДОВАНИЮ В РЭМ

ТРЕБОВАНИЯ К ПРЕПАРАТУ

Препараты, помещаемые в камеру объекта РЭМ, должны отвечать определенным требованиям, что достигается в процессе особых подготовки зоологических объектов.

Препараты наклеиваются на специальный столик-подложку и помещаются в микроскоп. Столики могут иметь разные формы и размеры, что зависит от конструкции той или иной модели РЭМ. Довольно распространены такого вида столики, какые изображены на рис. 19. Естественно, что размеры препарата определяются размерами столика, составляющего в диаметре от примерно 1 см (рис. 19), применяемого в РЭМ «Стереоскан», до 5—6 см (у некоторых японских моделей). Кроме того, имеет значение и высота свободного пространства камеры объекта РЭМ, обычно составляющая 0.5—1 см. Иными словами, целиком в РЭМ могут быть исследованы животные только такого размера, который соответствует указанным параметрам. Во всех остальных случаях необходима препаровка. Немаловажным фактором, ограничивающим размеры препаратов мягких тканей и мягкотелых животных, является специфика существующих методов фиксации и высушивания препаратов.

Исследование препаратов в камере объекта РЭМ проводится в условиях вакуума, поэтому препарат должен быть обезвожен и тщательно высушен, иначе он будет разорван при откачке воздуха из камеры. Высушивание не должно сопровождаться деформацией исследуемой поверхности, поэтому зачастую оно включает в себя предварительную фиксацию объекта, высушивание специальными, иногда трудоемкими методами, сводящими к минимуму нежелательные артефакты, и т. п. Сложные методы фиксации и высушивания не применяются лишь в случае изучения «естественно сухих», твердых объектов, а также при исследовании живых животных.

Кроме того, поверхность образца должна обладать хорошей электропроводностью и иметь электрический контакт с металлическим столиком-подложкой. Это необходимо по той причине, что при сканировании пучка электронов по поверхности препарата на

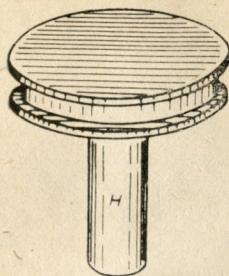


Рис. 19. Общий вид столика-подложки, применяемого для исследования препаратов в РЭМ системы «Стереоскан».
н — ножка столика.

ней индуцируется электростатический заряд. Это затрудняет и даже делает невозможным просмотр препарата в случае, если данный заряд накапливается на поверхности объекта, отклоняя пучок электронов, т. е. если поверхность неэлектропроводна и не имеет электрического контакта со столиком. Проводимость поверхности объекта достигается либо напылением ее металлами в вакуумной напылительной установке, либо другими методами, а контакт со столиками обеспечивается применением особых токопроводящих kleев и иными способами.

Таким образом, процесс подготовки препарата к исследованию в РЭМ в самом общем виде складывается из нескольких основных операций.

1. Предварительные операции: выбор объекта, препарирование и т. п.
2. Фиксация (не применяется при использовании методов лиофильной сушки и замораживания-замещения; см. с. 27 и 30).
3. Обезвоживание и высушивание препарата.
4. Монтирование препарата на столик-подложку.
5. Напыление поверхности препарата металлом в вакуумной напылительной установке.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ОПЕРАЦИИ, ПРЕПАРИРОВАНИЕ ЖИВОТНЫХ

Предварительные операции в значительной мере зависят от характера исследуемого объекта. Так, например, при изучении членистоногих, если имеется такая возможность, следует предварительно отобрать под световым микроскопом наиболее подходящие экземпляры: с чистой поверхностью, неповрежденные; кроме того, желательно очистить поверхность тела членистоногого от загрязнений (с. 21). Крупные животные препарируются под бинокулярным микроскопом. Препаровка мелких животных, например членистоногих, проводится в том случае, если ставится задача изучения тех или иных образований на конкретном участке тела (придатки брюшка, конечности, антены и т. п.). Препарирование проводится под слоем жидкости (обычно 70%-ного спирта) с целью избежать деформаций поверхности у животных с относительно тонкой кутикулой.

Препарирование участков мягких тканей животных проводится либо под слоем фиксирующей жидкости (в случае небольших размеров самого животного), либо в физиологическом растворе, после чего отпрепарированный кусочек переносится в фиксирующий раствор.

Предварительные операции могут производиться и при изучении «природно жестких» образований (элементы скелета позвоночных, иглокожих и т. п.). К ним относятся изготовление сколов, шлифов, выделение скелетных элементов (у иглокожих) и тому подобные процедуры. Особенности работы с разными классами зоологических объектов рассматриваются нами в конце методического раздела.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЖИВЫХ ЖИВОТНЫХ В РЭМ

Зоологические объекты, предназначенные к просмотру в РЭМ, как было отмечено выше, должны быть высушены и напылены металлом, что предполагает изучение только фиксированных, мертвых животных, их органов и кусочков тканей. Однако весьма примечательным является то, что иногда возможно исследование живых животных в РЭМ. Это относится к некоторым членистоногим, а именно к тем из них, у кого в ходе эволюции развились прочная водонепроницаемая кутикула, препятствующая разрыву тела в вакууме камеры объекта, и совершенный замыкательный аппарат дыхальца трахейной системы, появились высокая устойчивость к временному дефициту кислорода в среде и временное снижение его потребления тканями. Примером подобного рода членистоногих служат многие виды клещей, некоторые насекомые.

В исследованиях Пиза с соавторами (Pease et al., 1966), но главным образом Балашова (Балашов, Миккау, 1977), выяснилось, что поверхность кутикулы живых членистоногих, помещаемых в камеру объекта РЭМ, обеспечивает вполне удовлетворительное стекание заряда, индуцируемого на этой поверхности в результате сканирования пучка электронов при напряжениях до 30 кВ (рис. 11—18). При гибели членистоногого кутикула теряет проводящие свойства. Однако пока животное живо, его кутикула все время хорошо проводит электрический ток. Интересно, что некоторые виды иксодовых клещей выдерживают пребывание в течение нескольких часов в камере объекта РЭМ при вакууме 10^{-5} мм рт. ст., впадая в оцепенение, а после извлечения из микроскопа оживают, нормально питаются кровью, а самки откладывают яйца, из которых развиваются личинки (Балашов, Миккау, 1977).

Животное, исследуемое в живом состоянии, например иксодовый клещ, должно быть закреплено на столике. Это делается либо с помощью резинки, либо путем изготовления столиков-подложек специального строения. Предварительно членистоного обездвиживается слабым эфирным или хлороформным наркозом.

Достоинства изучения живых членистоногих в тех случаях, когда это, конечно, реально, заключаются в возможности наблюдать движения придатков тела, например частей ротового аппарата, ног и др.

ФИКСАЦИЯ ЗООЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Предварительная фиксация является одним из основных способов сохранения особенностей рельефа исследуемых в РЭМ поверхностей. Она не применяется лишь в случае использования методов, связанных с быстрым замораживанием животных или кусочков их тканей: лиофильной сушки и замораживания-замещения.

Основные требования к фиксации заключаются в том, чтобы в ходе этого процесса возникновение артефактов, приводящих к деформациям поверхности, было сведено к минимуму. Поэтому выбор фиксатора проводится в зависимости от характера изучаемого объекта.

Условно все варианты фиксации можно подразделить на три основные разновидности: фиксацию этиловым спиртом, фиксацию электронно-микроскопическими способами и фиксацию методами, применяемыми в светооптической гистологии.

Фиксация этиловым спиртом

Фиксация в 70%-ном этиловом спирте применяется при подготовке объектов с достаточно жестким экзоскелетом (различные членистоногие). Возможно также исследование материалов спиртовых зоологических коллекций. Коллекционные материалы, долго хранившиеся в спирте, могут быть использованы для исследования в РЭМ лишь после предварительной очистки поверхности кутикулы. Однако и эта процедура не всегда приводит к желаемым результатам. Оптимальным является изучение свежефиксированного материала.

Фиксация глютаральдегидом и осмием

Наилучшим методом фиксации животных с целью изучения их в РЭМ служит применение фиксирующих жидкостей, используемых обычно в «классической», т. е. просвечивающей электронной микроскопии. Хотя подобная фиксация, как, впрочем, и любая фиксация, сопровождается возникновением артефактов, тем не менее они в данном случае меньше, чем при применении обычных гистологических способов; кроме того, появляется возможность сопоставления данных, полученных методами растровой и просвечивающей электронной микроскопии. Особое внимание в процессе

фиксации следует обращать на предотвращение артефактов, вызывающих деформации поверхности объекта.

Наиболее распространенными электронно-микроскопическими фиксаторами служат глютаральдегид ($\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CHO})_2\text{CHO}$) и четырехокись осмия (OsO_4). Скорость проникновения этих веществ в ткани невелика, что определяет относительно небольшой размер фиксируемых кусочков ткани или животных. Для осмия эта скорость, согласно Бурклу и Шихлю, составляет примерно 0.75 мм/ч (Burkl, Schiechl, 1968). Считалось, что альдегиды, в частности глютаральдегид, проникают в ткани быстрее, однако специальные исследования этого процесса показали, что глютаральдегид проникает в ткани медленнее осмия (Ericson, Biberfeld, 1967). Однако так как в РЭМ исследуется лишь поверхность образца, размеры фиксируемых кусочков тканей или животных могут быть довольно большими. При этом обеспечивается проникновение фиксирующего агента примерно на миллиметр в глубь ткани (при времени фиксации порядка 1.5 ч), что позволяет сохранить поверхностные структуры.

При выборе фиксатора, определении необходимой его концентрации, буферного раствора следует применять тот метод, которым проводятся «классические» электронно-микроскопические исследования данной конкретной группы животных или близкой к ней. Это позволит избежать лишних артефактов, коль скоро методика уже отработана, а также сопоставить данные, полученные методами просвечивающей и растровой электронной микроскопии.

В качестве универсальных фиксаторов, вполне удовлетворяющих требованиям РЭМ, можно рекомендовать 2.5%-ный раствор глютаральдегида на 0.1 М фосфатном буфере, либо 1%-ный OsO_4 на том же буфере, либо последовательную фиксацию в указанных растворах. Фосфатный буфер весьма просто приготавливается из доступных реагентов. Берутся соли Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 и разводятся в дистиллированной воде до концентрации 0.2 М (раствор «A» — 0.2 М раствор Na_2HPO_4 и раствор «B» — 0.2 М раствор NaH_2PO_4).

Для получения буферного раствора с необходимым pH среды эти растворы смешиваются:

30.5 мл раствора «A	+ 19.5 мл раствора «B	... pH 7.0
36.0 мл раствора «A	+ 14 мл раствора «B	... pH 7.2
40.5 мл раствора «A	+ 9.5 мл раствора «B	... pH 7.4

Нужный в конкретном случае pH среды получают добавлением небольшого количества раствора «A» (pH повышается) либо раствора «B» (среда становится более кислой) при постоянном контроле индикаторными бумажками или на pH-метре.

Особое внимание в ходе фиксации следует обращать на осмотическую концентрацию применяемых растворов, так как именно фактор несоответствия осмотических концентраций среды животного и фиксирующих и промывочных сред приводит к деформациям нежных поверхностей клеток мягких тканей.

Оsmомолярность 2%-ного глютаральдегида, разведенного на 0.1 М фосфатном буфере, составляет примерно 440 миллиосмолов, осмомолярность 1%-ного раствора четырехокиси осмия на том же буфере составляет примерно 150 миллиосмолов. В то же время осмотическая концентрация среды в разных группах животных иногда сильно отличается от указанных значений, что видно из табл. 2.

Таблица 2

Примерные диапазоны осмомолярности среды в тканях некоторых групп животных (по: Проссер, Браун, 1967)

Животные	Оsmотическая концентрация (в миллиосмолях)
Кишечнополостные, сипункулиды, кольчатые черви, иглокожие, морские моллюски, морские членистоногие	1100
Пресноводные моллюски, наземные членистоногие	350—500
Рыбы	400—500
Птицы, млекопитающие	350
Насекомые	460—500

Таким образом, гипо- или гиперосмотичность фиксирующего раствора может привести к сжатию либо расширению клеток, а также некоторых поверхностных структур (реснички, микроворсинки и т. п.), что является крайне нежелательным.

Осмотическая концентрация фиксирующих и промывочных сред доводится до необходимого уровня с помощью сахарозы. Количество чистой сахарозы, которое необходимо добавить к данному раствору, легко рассчитывается по формуле

$$x = \frac{34.2 (P_0 - P_1)}{1000},$$

где P_0 — осмомолярность внутренней среды данного животного, P_1 — осмотическая концентрация фиксатора или промывочной среды.

После фиксации препарата раствором глютаральдегида или осмия препарат промывается в буферном растворе, в который также добавлена сахароза (осмотическая концентрация чистого 0.1 М фосфатного буфера составляет примерно 215 миллиосмолов). Время фиксации обычно составляет от 1 до 2 ч в зависимости от размеров кусочка ткани или целого мелкого животного. Можно рекомендовать фиксацию кусочков, размеры которых не превышают 2—3 мм хотя бы в одной плоскости.

После фиксации препарат обезвоживается в серии спиртов возрастающей крепости (30, 40... 100%), после чего высушивается одним из существующих способов.

При необходимости применения иных фиксаторов, буферных

растворов и т. п. нужные сведения о них можно найти в руководствах по гистологической технике в электронной микроскопии (Пиз, 1963; Уикли, 1975, и др.).

Особый случай составляет метод дополнительного осмирования с применением тиокарбогидразида, позволяющий исследовать один и тот же объект как в РЭМ, так и в ПЭМ. Он будет рассмотрен нами отдельно.

Фиксация гистологическими методами

В некоторых случаях положительные результаты дает изучение в РЭМ кусочков тканей или целых животных, фиксированных обычными гистологическими методами (жидкость Буэна и т. п.). Однако в отличие от методов электронно-микроскопической гистологии обычные гистологические методы в общем случае мало применимы для растровой микроскопии по той причине, что, как правило, вызывают артефакты, связанные с деформацией поверхностных структур клеток мягких тканей.

ОЧИЩЕНИЕ ПОВЕРХНОСТИ ОБЪЕКТА ОТ ЗАГРЯЗНЕНИЙ

Одним из условий успешного исследования препаратов в РЭМ является очищение изучаемой поверхности от посторонних загрязнений. Выбор способа очистки зависит как от природы поверхности препарата, так и от характера и степени нежелательных загрязнений.

Механическое удаление относительно крупных посторонних частиц (пылинок, волосков и т. п.) проводится лишь на достаточно жестких препаратах (членистоногие животные и т. п.). Препараты мягких тканей, высущенные одним из специальных способов, могут при этом деформироваться, повреждаться. Удаление относительно крупных посторонних частиц важно, если мы хотим получить общую обзорную картину (фотографию) животного или участка его тела при относительно небольшом увеличении РЭМ. Посторонние частицы осторожно удаляются под контролем бинокулярного микроскопа при помощи глазной реснички, приклеенной к палочке.

Для некоторых объектов хорошим способом удаления крупных частиц загрязнений является очистка при помощи kleev. Суть метода заключается в том, что животное покрывается быстросохнущим kleevом, образующим при высыхании пленку, которая осторожно снимается целиком при помощи пинцета; посторонние частицы, прилипшие к kleevу, удаляются вместе с пленкой (Corvin et al., 1979).

Подобный способ применим к членистоногим со слабоопущенным телом (волоски могут ломаться при удалении kleevой пленки), к раковинам моллюсков и тому подобным объектам.

В качестве доступных и удобных kleев можно рекомендовать поливинилацетатный клей (ПВА), клей «Геркулес» чехословацкого производства и аналогичные им.

В результате длительного хранения в спирте (спирт пожелтел) поверхность тела членистоногих покрывается мелкими грязевыми частицами, выявляющимися в основном при работе на больших увеличениях РЭМ. Подобные загрязнения сильно мешают при исследованиях микрорельефа кутикулы и кутикулярных образований (сенсилл и т. п.). Их особенность состоит в том, что они не удаляются механическими способами и основным методом очистки в данном случае служит применение различных растворителей и их смесей.

Для очистки поверхности кутикулы наземных членистоногих можно рекомендовать следующий способ.

1. Объекты обезвоживаются в серии спиртов (интервалы концентрации через 10%) и доводятся до абсолютного спирта.

2. Объекты помещаются в смесь 100%-ный спирт + хлороформ (1 : 1) на 2—4 ч при температуре 37—45 °С либо оставляются в этой смеси на ночь при комнатной температуре.

3. Препараты промываются в абсолютном спирте той же температуры, что и температура смеси, а затем высушиваются.

Хорошие результаты для некоторых членистоногих дает применение смесей диэтиловый эфир—100%-ный этанол (1 : 1), диэтиловый эфир—100%-ный метиловый спирт (1 : 1). Смешивание высоколетучих растворителей со спиртами необходимо для того, чтобы предотвратить полное испарение жидкостей в процессе очистки.

Подбор растворителя для очистки поверхности объекта может быть проведен эмпирически, исходя из особенностей как самого объекта, так и происхождения и химического состава загрязнений.

В зарубежной практике очистка поверхности иногда проводится вибрацией в ультразвуковом диапазоне: при возникновении высокочастотных колебаний в жидкой среде, куда погружен объект, посторонние частицы «отваливаются» от поверхности объекта. Однако в настоящее время этот способ используется редко.

Нельзя рекомендовать очистку препаратов (кроме, может быть, самых твердых) путем кипячения в дистиллированной воде, что приводит к обилию артефактов и сохранению основной части загрязнений.

ОБЕЗВОЖИВАНИЕ И ВЫСУШИВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ

Просмотр препаратов в РЭМ, как было отмечено выше, проводится в условиях вакуума, поэтому одной из важнейших операций в процессе подготовки препарата к исследованию является полное его обезвоживание и высушивание. При этом структура поверхности исследуемого объекта должна соответствовать таковой жи-

вого материала, т. е. количество артефактов должно быть сведено к минимуму. Среди существующих способов высушивания есть как прямые, связанные с удалением из препарата воды без предварительного обезвоживания (лиофильная сушка), так и косвенные, связанные с удалением из препарата замещивших воду агентов (сушка на воздухе из спирта, сушка способом «критической точки»).

Высушивание из этилового спирта и высоколетучих растворителей

Этот метод наиболее прост и заключается в том, что объект высушивается на воздухе на кусочке чистой фильтровальной бумаги. Коллекционный материал, хранившийся в 70%-ном спирте, высушивается прямо после извлечения из спирта, либо спирт предварительно замещается на высоколетучий растворитель.

Испарение спирта происходит в данном случае на границе фазового раздела, иными словами, оно связано с действием сил поверхностного натяжения, что приводит к значительным деформациям поверхности объекта, если последняя лишена достаточной жесткости. По этой причине сушка на воздухе применяется только в отношении тех объектов, достаточно прочная поверхность которых не деформируется или слабо деформируется силами поверхностного натяжения (например, многие членистоногие животные).

Быстрое испарение жидкости из образца, особенно при сравнительно крупных размерах последнего, способствует уменьшению степени загрязнения его частицами пыли из воздуха. Поэтому можно рекомендовать высушивание на воздухе из абсолютного спирта (после обезвоживания в серии спиртов) либо из какого-нибудь высоколетучего растворителя, которым можно заместить абсолютный спирт: хлороформа, эфира, ацетона и т. п. (Boyde, Wood, 1969).

Высушивание методом «критической точки»

Этот метод высушивания был впервые предложен Андерсоном (Anderson, 1951, 1956). Он основан на свойстве жидкостей переходить в газообразное состояние, минуя границу фазового перехода, при увеличении температуры данной жидкости выше так называемой критической температуры.

Для того чтобы понять суть метода, необходимо кратко остановиться на самом понятии «критическая точка».

Любое жидкое вещество, находящееся в изолированном объеме (например, в замкнутой камере), при нагревании в определенный момент времени перейдет в газообразное состояние. При определенной температуре в момент перехода скорости движения молекул жидкости и находящегося над ней насыщенного пара сравня-

ются и граница фазового перехода исчезнет. Это значение температуры для каждого вещества носит название критической температуры.

Нагревание жидкости в изолированном объеме сопровождается повышением давления. Взаимосвязь этих процессов может быть изображена графически. Конечная точка на кривой парообразования или на диаграмме, отображающей связь двух указанных процессов, носит название «критической точки».

Сушка способом «критической точки» заключается в том, что препарат помещается в особый агент, который полностью замещает в препарате воду. Затем препарат, находящийся в этом агенте, помещается в камеру и герметически закрывается. При нагревании камеры до температуры выше критической (для данного агента) в определенный момент времени вся жидкость как в объекте, так и вне его превращается в газ, т. е. препарат высушивается. После этого объект извлекается из камеры и подвергается дальнейшим процедурам, необходимым для просмотра в РЭМ (напыление и т. п.).

Преимущества подобного способа высушивания препарата заключаются в том, что граница фазового перехода между жидкостью и ее насыщенным паром в момент высушивания отсутствует, и, таким образом, поверхность препарата совершенно не подвергается действию сил поверхностного натяжения, а значит и не деформируется этими силами.

Наиболее употребляемыми сейчас агентами для сушки зоологических препаратов методом «критической точки» служат двуокись углерода CO_2 , а также различные фреоны — фторуглеродные соединения. Использование указанных веществ объясняется тем, что их так называемые критические параметры, т. е. значения критической температуры и давления, лежат в пределах, допустимых для биологических структур (табл. 3).

На рис. 20 приведена принципиальная схема возможного варианта конструкции установки для высушивания препаратов методом «критической точки». Подобного рода установка использу-

Таблица 3

Некоторые характеристики веществ, используемых для высушивания препаратов методом «критической точки»

Газ	Химическая формула	Критическое давление, ат	Критическая температура, °С
Углекислый газ	CO_2	72.7	30.96
Фреон-13	CClF_3	38.2	28.9
Фреон-23	CHF_3	47.7	25.9
Фреон-116	C_2F_6	32.6	24.3
Закись азота *	N_2O	71.7	36.5

* Данное вещество обладает тем преимуществом, что непосредственно смешивается с водой, однако сейчас в силу ряда недостатков, присущих закиси азота, используется весьма ограниченно.

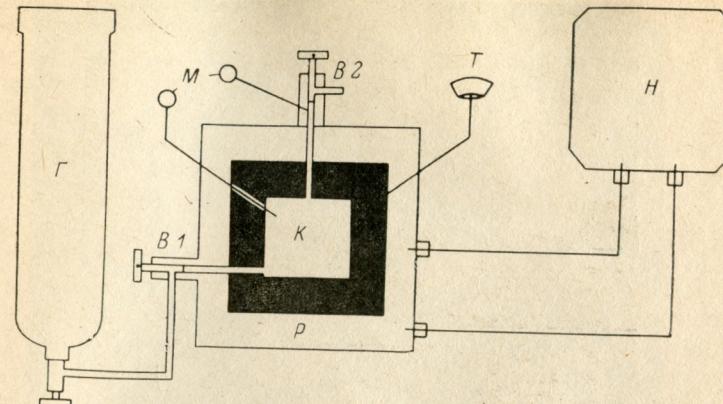


Рис. 20. Принципиальная схема устройства установки для сушки препарата способом «критической точки».

$B1$ — впускной вентиль; $B2$ — выпускной вентиль; G — баллон с углекислотой; K — камера объекта; M — манометр; H — нагревательное устройство, в данном случае — циркуляционный термостат; P — водяная «рубашка»; T — устройство контроля температуры.

ется в Группе электронной микроскопии ЗИН АН СССР. Общий вид этой установки приведен на рис. 21.

Основной частью прибора служит герметически закрываемая камера («бомба»), снабженная завинчивающимися крышками и прокладкой (рис. 20, 21), способными выдержать необходимые давления. В эту камеру помещается специальный держатель с препаратами. Камера снабжена впускным и выпускным вентилями. Впускной вентиль соединен с газовым баллоном (рис. 20). Нагрев

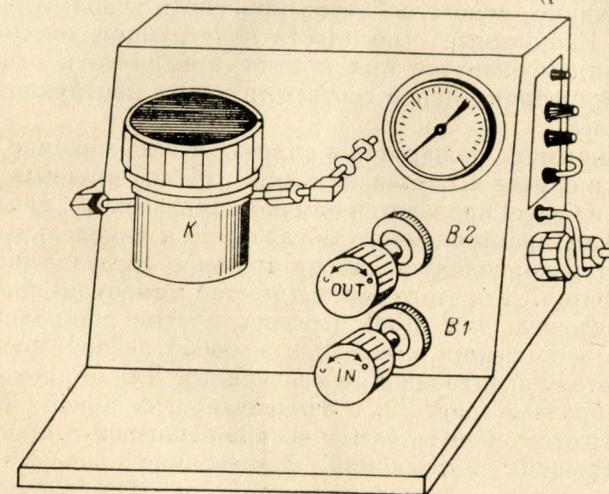


Рис. 21. Общий вид установки для высушивания препаратов способом «критической точки».

Обозначения как на рис. 20.

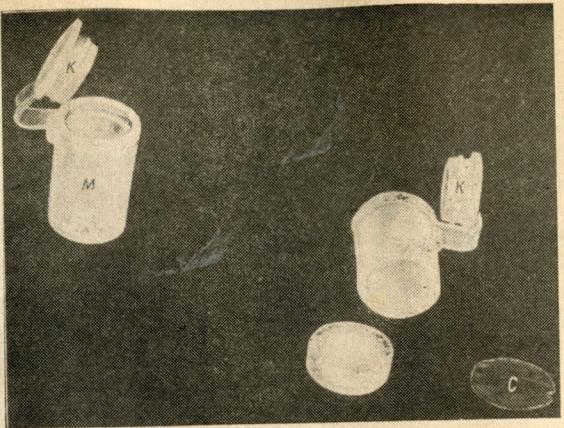


Рис. 22. Устройство держателя для высушивания объектов крупного размера в установке «критической точки».

K — крышка; *M* — микроконтейнер для сеточек; *C* — сеточка.

камеры осуществляется за счет циркуляции горячей воды, подаваемой из циркуляционного термостата по водяной рубашке (рис. 20). Выпускной вентиль обеспечивает плавный, постепенный выпуск газа из камеры, что исключает реконденсацию жидкости на препарате.

Здесь необходимо отметить, что процедура высушивания препаратов на любой установке обладает своими особенностями, поэтому, видимо, нецелесообразно приводить используемую нами методику. Конкретные особенности конструкции установки для высушивания препаратов при критической точке и особенности методов рассматриваются в соответствующих инструкциях фирм-изготовителей.

Обезвоживание препаратов в спиртах и высушивание в камере установки в случае исследования относительно крупных объектов (0.5—1 мм и более) проводятся обычно в держателях, прилагаемых к установкам промышленного образца. Для самодельных приборов можно рекомендовать самостоятельное изготовление боксов для препаратов. Для этого берется пустой микроконтейнер из-под сеточек-подложек для ПЭМ (обычно пустые микроконтейнеры имеются в достаточном количестве в любой лаборатории, применяющей методы электронной микроскопии). Дно микроконтейнера срезается бритвой (рис. 22) и заклеивается сеточкой, используемой для изготовления сетчатых дисков-подложек в просвечивающей электронной микроскопии. Заклеивание проводится термическим способом — нагреванием среза микроконтейнера. Объект помещается в бокс через крышечку (рис. 22). В камеру установки вставляются несколько подобных боксов. После высушивания препараты извлекают из боксов и монтируют на столики.

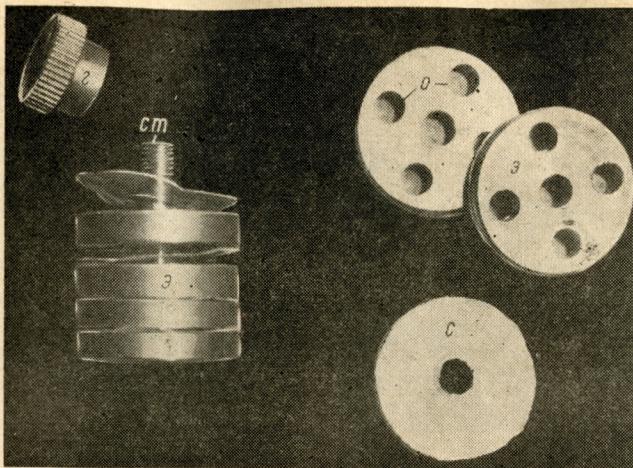


Рис. 23. Устройство держателя для высушивания объектов мелкого размера в установке «критической точки».

2 — крепежная гайка; *o* — отверстия; *c* — сеточка; *ст* — общий стержень держателя; *3* — элементы держателя.

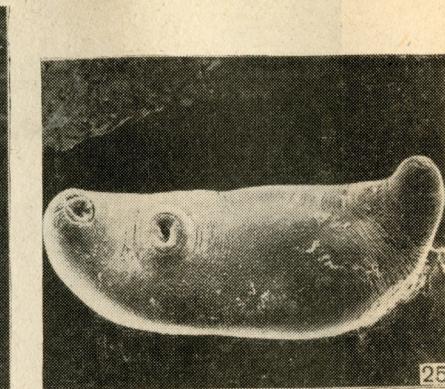
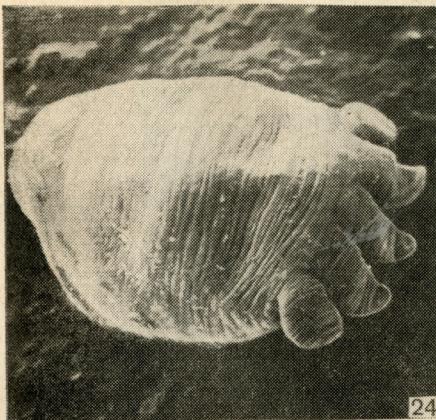
Для более мелких объектов удобен держатель конструкции, показанной на рис. 23. Оба типа держателей могут быть использованы в самодельных установках. В приборах промышленного образца работа проводится в держателях, прилагаемых к установке.

Для обезвоживания мелких зоологических объектов (например, простейших) Хэйес и Поули (Hayes, Pawley, 1975) рекомендуют применение методов последовательного центрифугирования, фильтрации (по Неманику) либо диффузии.

Недостатки применения метода «критической точки» определяются необходимостью химической фиксации объекта, а также возможностью появления артефактов в процессе обезвоживания и проведения через промежуточные агенты (ацетон, амилацетат), которые могут экстрагировать часть компонентов ткани. Однако ряд существенных достоинств (простота операций, быстрота высушивания), а также тот факт, что большинство артефактов затрагивает, как правило, очень мелкие структуры, не играющие существенной роли в зоологических исследованиях, привели к тому, что этот метод получил наибольшее распространение при изучении мягких тканей и объектов в РЭМ (рис. 24—27).

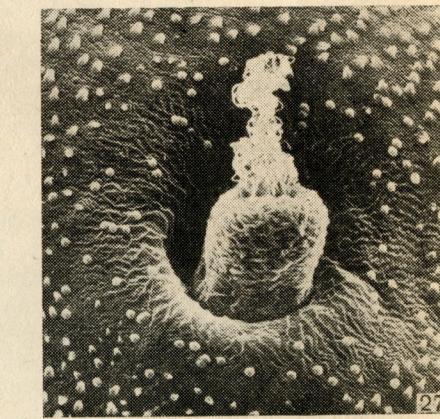
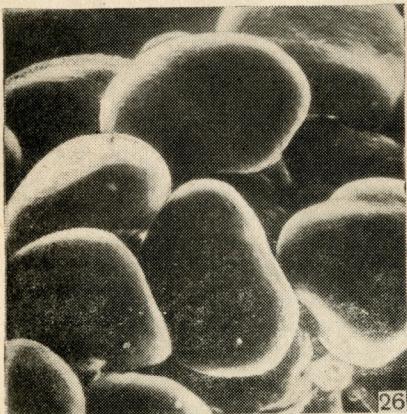
Лиофильная сушка

Метод лиофильной сушки, иначе называемый замораживанием—высушиванием, основан на способности воды переходить в твердоаморфное состояние, минуя кристаллическое, при быст-



24

25



26

27

Рис. 24—27. Изображение мягкотелых животных, отпрепарированных органов и отдельных клеток после их высушивания методом «критической точки».

24 — общий вид турбеллярии *Tetposcerala samperi*, $\times 25$ (фото Б. И. Иоффе); 25 — мантия трематода *Brachylaimus aeguatus*, $\times 130$ (фото З. Ждарской); 26 — отпрепарированные альвеолы слонной железы клеща *Ixalotoma asiaticum*, $\times 1000$; 27 — циррус со спермиями мариты *Hasstileia ovis*, $\times 1500$ (фото З. Ждарской).

ром замораживании до низких температур. Этот процесс получил название витрификации; она осуществляется при быстром замораживании воды до температуры порядка -150°C и ниже.

Из теории следует, что витрификация успешно идет при больших значениях отношения площади поверхности препарата к его объему, иными словами, способ лиофильной сушки оправдан лишь в случае подготовки объектов малого размера (простейшие, иные мелкие животные, маленькие кусочки тканей). Толщина кусочка во всех случаях не должна превышать 0.5 мм.

Вторым условием успешного проведения витрификации является быстрое преодоление температурного интервала между точкой замерзания и температурным районом, где рекристаллизация пренебрежимо мала. Это достигается быстрым помещением объекта в среду с температурой порядка от -160 до -200°C : в жидкий азот, на поверхность твердого азота, на металлическую поверхность, предварительно охлажденную жидким азотом, или в агент, также предварительно охлажденный жидким азотом (пропан, фреоны, изопентан и др.).

Для предотвращения процессов кристаллизации, приводящих к возникновению артефактов (как известно, плотность кристаллического льда меньше плотности воды, и кристаллы могут разорвать поверхности клеток), применяют вещества, поникающие точку замерзания. Наиболее общеупотребительным является выдерживание препарата в растворах глицерина разных концентраций (чаще всего применяют 10%-ный раствор).

С целью избежать образования газовой оболочки вокруг объекта (эффект Лейденфроста), затрудняющей теплопередачу и снижающей, таким образом, скорость замораживания, применяют охлажденные агенты при температуре, близкой к температуре плавления, а не кипения (например, твердый азот), либо добавляют к охладителю определенные присадки.

Температурные характеристики некоторых из применяемых охладителей приведены в табл. 4.

Таблица 4
Температурные характеристики некоторых охладителей

Температура, $^{\circ}\text{C}$	Пропан, C_3H_8	Изопентан, $(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_3$	Азот, N_2	Фреон 22, CHClF_2
Плавления	-187.7	-160	-210	-160
Кипения	-42.1	+28	-195.8	-30.5

После быстрого замораживания следующей задачей является удаление из препарата витрифицированной воды. Процесс испарения с поверхности льда носит название сублимации. Сублимация при низких температурах происходит в сильно разреженной среде, т. е. в вакууме. Установлено, что оптимальным уровнем температуры при проведении сублимации служит температура порядка -77°C . Дело в том, что, если проводить высушивание при температуре замораживания, т. е. ниже -150°C , процесс сублимации сильно затягивается, и, кроме того, возникает проблема создания очень разреженного вакуума. При температуре же -70°C , как показывают расчеты, необходимый уровень вакуума составляет примерно 10^{-3} мм рт. ст., что вполне доступно.

Продолжительность сублимации определяется температурой в ходе процесса, уровнем вакуума и массой препарата. На прак-

тике время высушивания в вакууме составляет от нескольких часов (для очень мелких объектов) до нескольких десятков часов.

Для относительно крупных объектов в растровой микроскопии иногда применяется метод «сушки оболочки», при котором сублимируется вода из верхнего слоя кусочка ткани на глубину в несколько сотен микрон, после чего объект напыляется золотом или платиной, и микрорельеф поверхности, таким образом, укрепляется. После этого вода из остальной части препарата сублимируется при более высоких температурах. Эти процедуры позволяют сократить время высушивания для объектов относительно крупного размера.

Метод лиофильной сушки требует применения специальной аппаратуры, включающей приспособления для быстрого замораживания и для сушки в вакууме при низких температурах.

Достоинства способа замораживания—высушивания заключаются в отсутствии необходимости фиксации, что позволяет избежать связанных с ней артефактов. Однако возможность исследования лишь маленьких кусочков, длительность и трудоемкость процедур, необходимость в специальной вакуумно-охлаждающей аппаратуре привели к тому, что лиофильная сушка сейчас используется в основном при работе с простейшими, а также в специальных цитологических исследованиях. В целом в зоологии этот способ применяется довольно ограниченно.

НЕКОТОРЫЕ СПЕЦИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ПОДГОТОВКИ ПРЕПАРАТОВ К ИССЛЕДОВАНИЮ В РЭМ

Замещение воды в замороженном состоянии

Метод замещения воды в замороженном состоянии представляет собой своеобразную альтернативу методу замораживания—высушивания. Он более прост и не требует вакуумной аппаратуры. Этот метод, как и лиофильная сушка, основан на способности воды к витрификации. Однако после быстрого замораживания высушивание в вакууме не проводится, а вместо этого лед из объекта экстрагируется растворителями с низкой температурой плавления. Молекулы воды диффундируют в замещающий растворитель, а последний занимает место воды в препарате. Процесс замещения проводится при низких температурах (в диапазоне от -70°C до -130°C), чтобы предотвратить рекристаллизацию аморфного льда. Последняя может быть предотвращена также предварительной пропиткой препарата в 10%-ном растворе глицерина в физиологическом растворе. Практически все применяемые для замещения в замороженном состоянии растворители хорошо удаляют из ткани глицерин.

Наиболее употребительными растворителями для замещения

витрифицированного льда служат абсолютные метanol, ацетон, этанол и некоторые другие.

Препараты, быстро замороженные одним из способов (с. 29), помещаются в предварительно охлажденный до необходимой температуры растворитель. Объем растворителя должен значительно превышать объем кусочка ткани. Препарат выдерживается в охлажденном растворителе от нескольких часов до нескольких десятков часов, причем помещается не менее чем в 2 смены растворителя. Размеры кусочка определяются физическими особенностями процесса витрификации, поэтому (так же как в случае лиофильной сушки) способом замораживания—замещения приготавливают мелких животных или кусочки тканей малого размера.

После окончательного замещения воды растворитель нагревается до комнатной температуры и препарат высушивается методом «критической точки».

Метод дополнительного осмирования

Метод дополнительного осмирования, предложенный Зелигманом с соавторами (Seligman et al., 1966), основан на способности металлофильных реагентов (лигандов) образовывать связи с металлом (осмием), связанным в ткани в процессе осмевой фиксации, но при этом они сохраняют способность к образованию дополнительных связей с тем же или другим металлом.

В классической (просвечивающей) электронной микроскопии метод дополнительного осмирования применяется для контрастирования структур. В качестве лиганда при этом используется тиокарбогидразид $\text{H}_2\text{NNHCSNH}_2$.

Применение ОТО-метода (т. е. Осмий-Тиокарбогидразид-Осмий) в РЭМ определяется тем, что появляется возможность непосредственного просмотра препарата в растровом микроскопе без его напыления. Впервые ОТО-метод в растровой микроскопии был предложен Келли с соавторами (Kelley et al., 1973).

При изготовлении препаратов указанным способом они предварительно фиксируются глютаральдегидом, затем постфиксируются четырехокисью осмия, после чего выдерживаются в тиокарбогидразиде и вновь инкубируются в осмии (Kelley et al., 1973; Laczko, Varga, 1976). Высушивание проводится способом «критической точки» либо просто на воздухе. В последнем случае для укрепления структур дополнительное осмирование может быть проведено дважды (ОТОТО-метод).

Достоинства ОТО-метода заключаются в относительной простоте процедур, отсутствии необходимости напыления, а также в том, что появляется возможность совершения различных микрохирургических манипуляций с объектом непосредственно при просмотре прямо в камере объекта РЭМ при помощи специальных приспособлений. В силу того что весь препарат «пропитан» ос-

мием, при разрушении или удалении части поверхности проводимость не нарушается, что происходит в случае, если последняя обеспечивается только за счет поверхностного слоя напыленного металла. Кроме того, тот же препарат может быть залит в эпон или аралдит и исследован на срезах в РЭМ.

Методы репликации в зоологических исследованиях

Метод репликации заключается в том, что в РЭМ исследуется не сам объект, а его объемная обратная копия — реплика. Необходимость прибегнуть к репликации может возникнуть, например, при исследованиях ценного палеонтологического материала, когда нежелательным является напыление уникального коллекционного экземпляра металлом и тем более приклеивание его к столику-подложке. При помощи метода реплик, кроме того, можно получить дополнительную информацию о пространственном строении различного рода полостных образований.

Метод снятия реплик с поверхности твердых объектов без их повреждения разработан весьма слабо и применяется почти исключительно в стоматологических целях. Для репликации применяются материалы, используемые в зубной технике, специальные составы ряда западных фирм, особые репликационные ленты и т. п. Некоторые сведения об этих материалах, помимо каталогов, можно найти у Пэймейкера (Principles..., 1975, vol. 4).

Метод исследования трехмерной организации сосудистых и подобных им систем (коррозионный метод Мураками) заключается в том, что данная система, например сосудистая система легких или почек, перфузируется фиксирующим раствором, а затем предполимеризованной смолой, заполняющей полости сосудов. Затем смола полимеризуется, ткань удаляется, а полученный слепок трехмерной организации сосудистой системы напыляется и исследуется в РЭМ. Возможный вариант коррозионного метода приведен в работе Миронова с соавторами (Миронов и др., 1979).

Изучение инкапсулированных структур

Исследование общей анатомии сложных органов и структур, заключенных в капсулы малого размера (10—40 мкм), таких как статоцисты, комплексные рецепторные органы членистоногих (орган Галлера иксодовых клещей, Хаманнов орган жуков-като-пид и др.), обычно требует изучения серий либо ультратонких срезов в РЭМ, либо полутонких (1 мкм) срезов (сделанных с залитых в полимер объектов) в световом микроскопе, что весьма трудоемко и малоинформативно. Исследование подобных инкапсулированных структур в РЭМ после вскрытия капсулы обычными макрохирургическими методами также трудоемко, а главное, приводит к такому обилию артефактов, что адекватная интерпретация

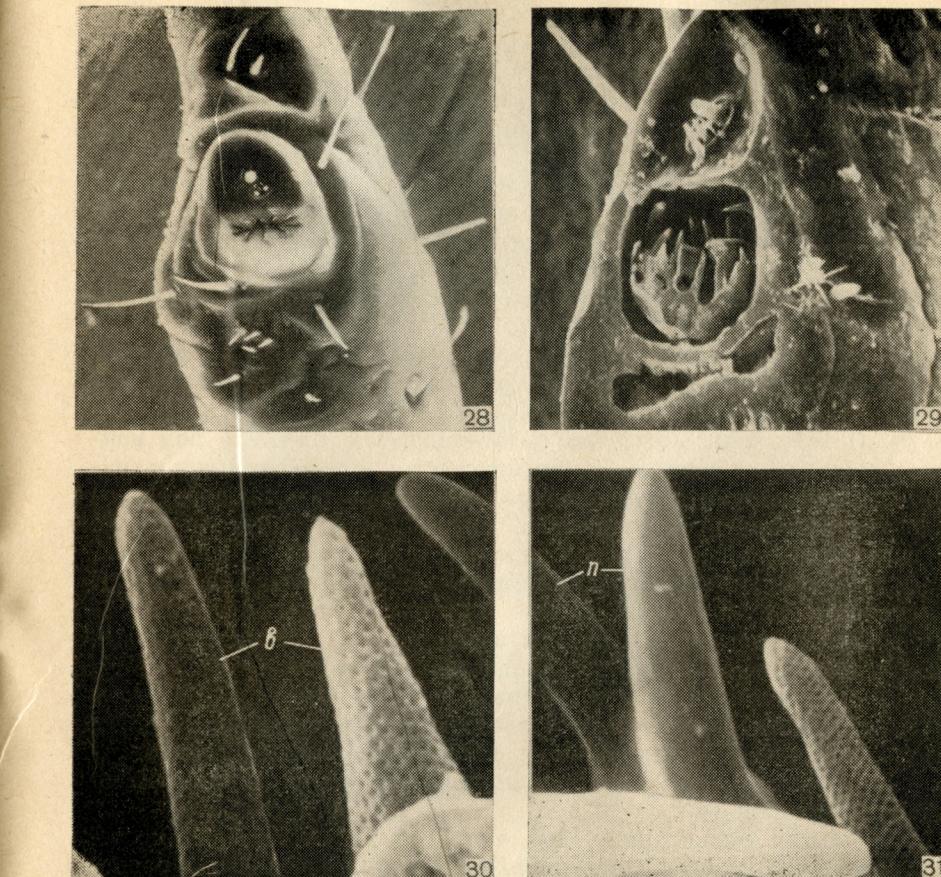


Рис. 28—31. Инкапсулированные структуры после вскрытия на препарате, залитом в полимерную смолу.

28 — чувствительный орган на лапке иксодового клеща *Rhipicephalus turanicus*, ×110; 29 — то же, капсула вскрыта и полимер удален, ×160; 30—31 — детали строения внутрикапсульных структур, ×7200; в — чувствительные волоски с многочисленными порами на поверхности; п — дихотомически ветвящиеся несенсорные плеоморфы.

получаемых в РЭМ изображений становится весьма затруднительной.

Подобное «вскрытие», однако, легко провести на залитом в полимерную смолу (эпон, аралдит) объекте, удалив необходимый участок стеклянным ножом на ультрамикротоме, который в проплавывающей электронной микроскопии используется для приготовления ультратонких срезов. После удаления части капсулы заливочная среда растворяется и объект исследуется в РЭМ. Приведем один из возможных вариантов данного метода, примененный нами при изучении трехмерной топографии внутренних

структур капсулы органа Галлера иксодоидных клещей (рис. 28—31).

1. Фиксация в 2,5%-ном глютаральдегиде на 0,1 М фосфатном буфере. Промывка в буферном растворе.

2. Обезвоживание в серии спиртов (30, 40...100%), помещение в ацетон.

3. Приготовление смолы (эпона или аралдита) по стандартным прописям.

4. Заливка в смолу: ацетон+смола (3 : 1 — 1 ч, 1 : 1 — 1,5 ч, 1 : 3 — 2 ч), помещение в чистую смолу. Видно, что в описанном варианте процесс заливки по сравнению с обычным несколько упрощен.

5. Полимеризация (при 45 °C — 1 сут, при 60 °C — до полного затвердения). Возможно использование блоков, залитых для целей исследования на срезах.

6. Полимеризованные блоки затачиваются бритвой под контролем бинокуляра на необходимый участок, после чего на ультрамикротоме под постоянным контролем в световом микроскопе проводится удаление необходимого участка. Для контроля после срезания небольшого участка делается полутонкий (1 мкм) срез, который помещается на предметное стекло и окрашивается 1%-ным раствором толуидинового синего по стандартной методике.

7. После «вскрытия» блок извлекается из ультрамикротома и лишняя смола осторожно удаляется бритвой.

8. Блок помещается в 2%-ный раствор NaOH в 100%-ном этаноле на 12—24 ч не менее чем в 2 смены раствора.

9. Промывка в нескольких сменах абсолютного этанола.

10. Объект готов к монтированию на столик-подложку и дальнейшим операциям.

Возможно также применение частичного протравливания срезанной на ультрамикротоме поверхности с целью выявления расположения различных гранул в клетках.

Ограничения на приведенный метод накладывает использование щелочи, разрушающей многие мягкие структуры, поэтому его применение более целесообразно при исследованиях кутикулярных и подобных им образований (Леонович, 1979).

МОНТИРОВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ НА СТОЛИК-ПОДЛОЖКУ

Перед напылением и помещением в камеру объекта РЭМ препараты необходимо закрепить на столике-подложке (рис. 19, 32). Закрепление осуществляется либо при помощи выпускаемых промышленностью электропроводных kleев или двустороннелипких проводящих лент, либо при помощи самодельных kleев.

Самодельный проводящий клей может быть изготовлен очень просто. Для этого берется либо нитролак, либо какой-нибудь быстросохнущий клей. В баночку с лаком (клеем) насыпается при постоянном помешивании алюминиевая пудра, до тех пор пока

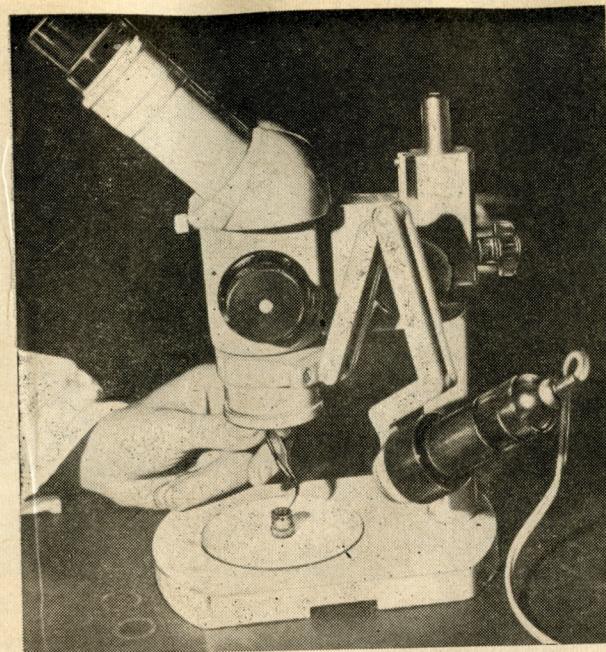


Рис. 32. Монтировка препаратов на столик-подложку под контролем бинокулярного микроскопа.

не образуется масса средней густоты темно-серого цвета. Подобным образом приготовленный клей готов к употреблению. Перед каждым использованием его следует вновь перемешать, лучше всего — стеклянной палочкой. До необходимой вязкости клей разводится соответствующим растворителем (например, нитролак — ацетоном и т. п.).

Применение способа катодного напыления препаратов (с. 39) позволяет наклеивать препараты любым kleem (ПВА, kleй БФ различных номеров и т. п.). Проводимость в данном случае осуществляется за счет тонкого слоя металла, покрывающего образец, kleй и поверхность столика. Однако все же предпочтительнее использование проводящих kleев, особенно при монтировании объектов с поверхностями сложных конфигураций.

Столик-подложка перед размещением на нем препаратов должен быть тщательно очищен и обезжирен (в смеси спирт—эфир, ацетоне, циклогексаноне и т. п.).

Правильный подбор способа наклеивания, степени вязкости kleя имеет важное значение, так как затекание kleя на поверхность образца за счет смачивания и прочие возможные артефакты могут свести на нет результаты предварительных этапов подготовки препарата. Необходимая сировка при этом появляется

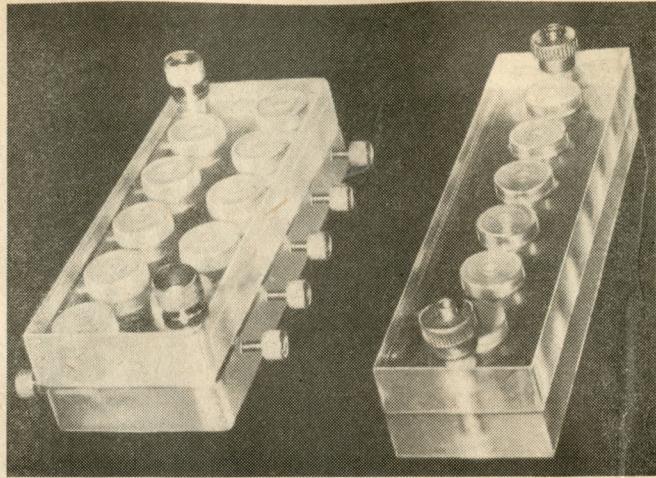


Рис. 33. Различные варианты боксов для хранения столиков с препаратами, подготовленными к исследованию в РЭМ.

лишь в результате опыта самостоятельной работы в области растровой электронной микроскопии.

Готовые препараты на столиках хранятся в специальных боксах с целью предохранения их от механических и прочих повреждений, от загрязнения пылью и других нежелательных воздействий. Конструкция бокса зависит от конструкции столика-подложки, применяемого в РЭМ той или иной модели. Для столиков, используемых в микроскопах «Стереоскан» (фирмы «Cambridge Scientific Instruments, Ltd.»), весьма удобны и просты в изготовлении самодельные боксы из прозрачного плексигласа (рис. 33).

Бокс состоит из основной части, в которой высверливаются углубления для ножек столиков, и крышки. В основе бокса под прямым углом к углублениям высверливаются каналы с нарезкой, служащие для закрепления в ней ножек столиков винтиками (рис. 34). Для размещения прикрепленных к столику препаратов в крышке высверливаются полости, превышающие по диаметру таковой столика-подложки. Крышка закрепляется болтами, встроенными в основу (рис. 34).

В некоторых случаях применяют столики-подложки специального устройства. Примерами подобных столиков служат: столик с углублением в середине для размещения мелких объектов, исследуемых в РЭМ; чашеобразный столик с полированной поверхностью для исследования мелких живых членистоногих; столик с закрепленной на нем иглой или металлическим стержнем, на который «накалывается» исследуемый объект, и другие.

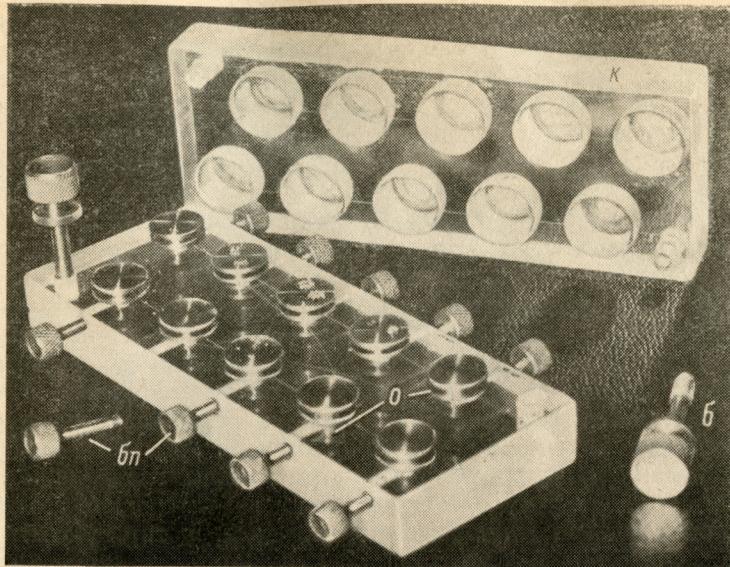


Рис. 34. Устройство бокса для хранения столиков с препаратами.

б — крепежные болты; *бл* — болты крепления препаратов; *к* — крышка бокса с про сверленными отверстиями, соответствующими диаметрам столиков, *о* — отверстия для установки столиков с диаметром, соответствующим таковому ножек столиков-подложек.

При необходимости столики-подложки могут быть изготовлены самостоятельно по промышленным образцам. Наилучшими материалами для этого являются алюминий и латунь.

СОЗДАНИЕ ПРОВОДЯЩЕГО СЛОЯ НА ПОВЕРХНОСТИ ОБЪЕКТА

Для успешного исследования зоологических объектов в РЭМ необходимо, чтобы их поверхность отвечала ряду требований, обеспечивающих получение изображения на телеэкране РЭМ. При сканировании пучка электронов по поверхности препарата некоторая часть электронов поглощается, часть отражается, и, кроме того, с поверхности объекта в результате так называемой вторичной электронной эмиссии выбивается еще часть электронов. Отраженные электроны и электроны вторичной эмиссии принимаются коллектором и преобразуются в сигналы телеразвертки (с. 5). Таким образом, поверхность препарата, исследуемого в РЭМ, должна, во-первых, обеспечивать стекание электростатического заряда, индуцируемого на ней в результате бомбардировки электронами, которые испускаются катодом, т. е. быть электропроводной (и иметь электрический контакт со столиком). Кроме того, желательно, чтобы поверхность обладала высоким коэффициентом вторичной электронной эмиссии, что улучшает изображение. Это достигается главным образом нанесением на поверхность

препарата тонкого слоя металла путем напыления в вакууме. Иногда применяют и иные способы (нанесение на поверхность антистатиков, инкубация в парах осмия и др.).

Препараты можно исследовать в РЭМ и без напыления, но лишь при малых ускоряющих напряжениях (порядка 1—2 кВ), что обеспечивает разрешение лишь на малых увеличениях и потому лишено практического смысла.

Напыление препаратов металлами является основным способом создания проводящего слоя на поверхности объекта. Оно может проводиться двумя способами: термическим и катодным. При развитии растровой микроскопии в качестве напылителей использовались разные металлы: платина, серебро, алюминий, золото и др. Однако в настоящее время практически общепринятым является использование золота в качестве металла-напылителя. Это объясняется рядом свойств золота: оно обладает высоким коэффициентом вторичной электронной эмиссии, легко доступно в химически чистом виде, не формирует выраженных гранул на поверхности препарата при термическом напылении, не реагирует с деталями напылительной установки, что предотвращает их коррозию. Золото также обеспечивает сохранение проводящих свойств поверхности препарата при длительном хранении, так как не окисляется.

Термическое напыление

Напыление данным способом проводится в специальных вакуумных напылительных установках, производимых как в СССР, так и в ряде зарубежных стран. Оно основано на том, что при нагревании (до расплавления) кусочка золота в специальной ванночке в условиях вакуума частицы золота отрываются с поверхности расплава и покрывают препарат, оседая на его поверхности (рис. 35). Для лучшего распыления частиц золота иногда применяют напыление в разреженной атмосфере инертного газа, обычно аргона. Столкновение частиц золота с молекулами газа способствует их рассредоточению, а значит, более равномерным становится наносимый на поверхность объекта слой золота.

Очевидно, что если напыляемый препарат остается неподвижным, то золото ложится лишь на поверхности, обращенные к его источнику. Для обеспечения равномерного покрытия препарата золотом его (препарата) необходимо вращать. Оптимальные условия напыления возникают в том случае, когда помимо вращения в одной плоскости имеется еще и возможность покачивать препарат в перпендикулярном к ней направлении.

Часто, особенно при подготовке препаратов мягких тканей, применяется так называемое двойное напыление, при котором объект напыляют сначала слоем углем и только потом — золотом. Предварительное напыление углем проводится при помощи вольтовой дуги, возникающей между двумя угольными стержнями

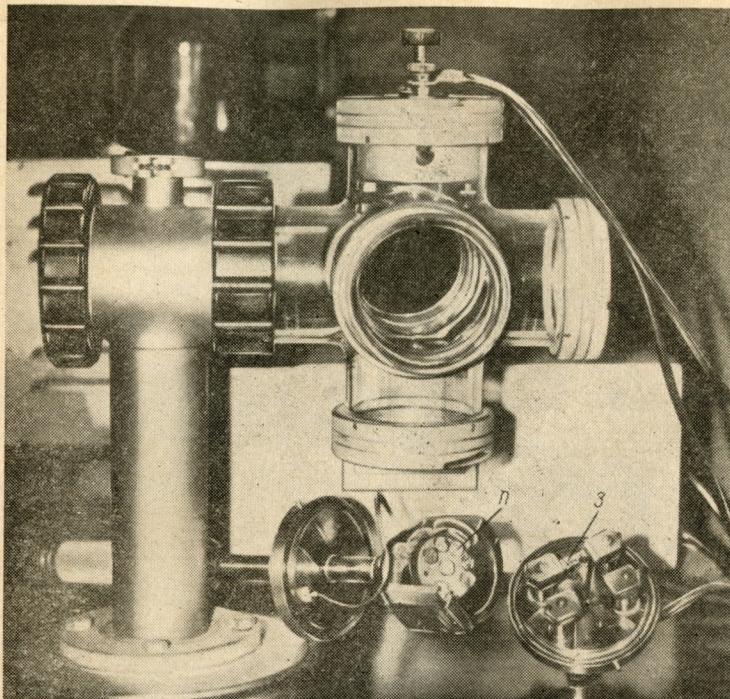


Рис. 35. Общий вид вакуумной камеры для напыления препаратов термическим способом.

n — препараты; *z* — нагреваемая «ложечка» с золотом.

при подаче на них соответствующего напряжения. Преимущества двойного напыления заключаются в том, что уголь стабилизирует рельеф поверхности и она в меньшей степени подвергается деформации при бомбардировке частицами золота; кроме того, слой угля образует субстрат, к которому хорошо «прилипает» золото.

Напыление проводится в вакууме порядка 10^{-5} — 10^{-4} мм рт. ст. или менее. Оптимальная толщина слоя угля составляет примерно 20 нм, а слоя золота 30 нм.

Катодное напыление

Этот способ иначе может быть назван ионным напылением. Он основан на том, что в вакуумной камере между держателем с препаратом (катодом) и золотым анодом создается разность потенциалов (напряжение порядка 2 кВ). Ионы золота движутся к держателю и «напыляют» препарат (рис. 36). Достоинства ионного напыления заключаются в том, что оно идет не частицами (кусочками) золота, как при термическом способе, а ионами, что



Рис. 36. Общий вид вакуумной камеры для напыления препаратов катодным способом.

a — анод; *κ* — сплошной катод; *n* — препараты; *c* — изолирующая сеточка.

позволяет обеспечить значительно более равномерное покрытие препарата слоем металла даже в случае напыления поверхностей сложных конфигураций; при этом золото расходуется более экономно. Недостатки катодного способа состоят в длительности процесса (в сравнении с термическим методом), нагреве препарата, а также в необходимости применения золотого анода большой площади с целью исключить напыление металлом, из которого изготовлен держатель (в некоторых установках с этой целью применяются сплошные золотые диски диаметром в несколько сантиметров). Последнее затруднение, впрочем, легко преодолимо: диск из какого-либо металла, служащий анодом (например, медный диск), предварительно напыляется золотом термически, после чего используется для катодного напыления.

Конкретные особенности напыления, характерные для той или иной вакуумной напылительной установки промышленного образца, приводятся в инструкциях к данному прибору.

Применение антистатиков

Способ заключается в распылении на препарат аэрозоля антистатика. Его использование считалось целесообразным при исследовании сильно пористых твердых материалов, когда проникновение золота в глубь препарата при обычном напылении затруднено. Способ применим только к твердым образованиям, так как вызывает деформацию высушенных мягких структур в результате повторного смачивания и высушивания. Кроме того, обеспечиваемая проводимость позволяет работать только на небольших увеличениях РЭМ. В настоящее время этот способ почти не используется.

ОСОБЕННОСТИ ПОДГОТОВКИ НЕКОТОРЫХ РАЗНОВИДНОСТЕЙ ЗООЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ К ИССЛЕДОВАНИЮ В РЭМ

Все зоологические объекты, изучаемые в РЭМ, можно условно подразделить на несколько разновидностей, которые характеризуют свойства объектов в плане методических особенностей их подготовки.

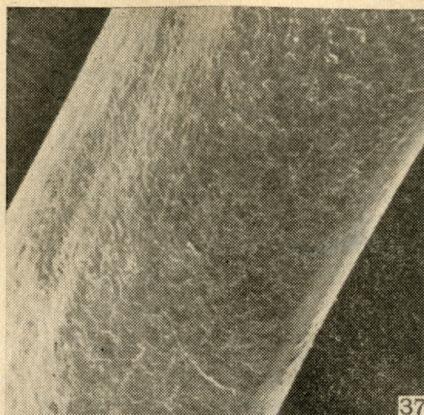
К первой разновидности можно отнести твердые объекты, совершенно не деформируемые силами поверхностного натяжения жидкости при высушивании. Подобные препараты включают элементы скелета позвоночных, иглокожих, некоторых кишечно-полостных и простейших, раковины моллюсков, палеонтологический материал и тому подобное. Этот тип объектов, как правило, не нуждается в фиксации и обезвоживании, что определяет сравнительную простоту предварительных операций.

Ряд объектов, также твердых, но в меньшей степени, в той или иной мере деформируемых при высушивании, которые требуют предварительной фиксации, а иногда и специальных способов сушки, включает животных, обладающих кутикулярным экзоскелетом (типа членистоногих).

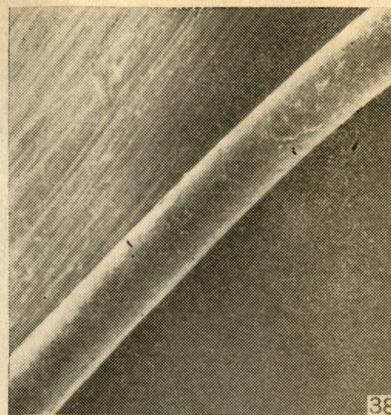
Мягкие ткани и мягкотельные животные составляют отдельный класс объектов, требующий специфических сходных процедур, которые обеспечивают сохранение рельефа поверхности исследуемой ткани или животного. Некоторые из них из-за чрезвычайно мелких размеров требуют применения методов, несколько отличающихся от таковых, используемых при подготовке мягких тканей. К таким объектам относятся прежде всего простейшие; многоклеточные животные, по размерам соответствующие простейшим (коловратки и др.); форменные элементы крови и т. п.

Исследование «природно жестких» образований

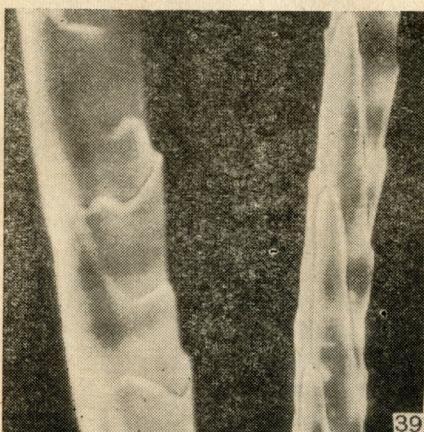
Множество зоологических объектов, исследуемых в РЭМ, не нуждаются в предварительной фиксации, обезвоживании и высушивании. К таким препаратам относятся волосы млекопитаю-



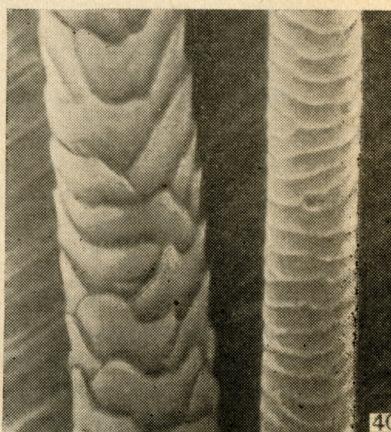
37



38



39



40

Рис. 37—40. Волосы млекопитающих.

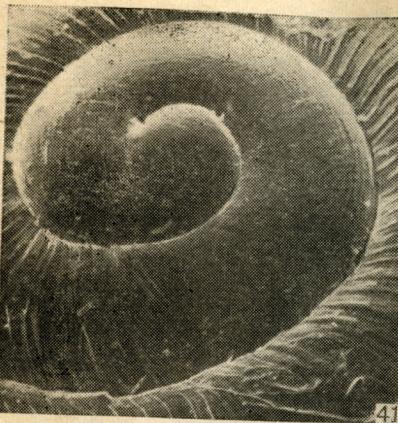
37 — остеевой и 38 — подшерсточный волосы мамонта *Mammuthus primigenius*, $\times 200$; 39 — остеевой и подшерсточный волосы горной полевки *Microtus montanus*, $\times 1000$; 40 — то же, летяга *Pteromys volans*, $\times 1000$.

щих, перья птиц, элементы покровов рептилий, раковины моллюсков, палеонтологический материал и тому подобные образования (рис. 37—44).

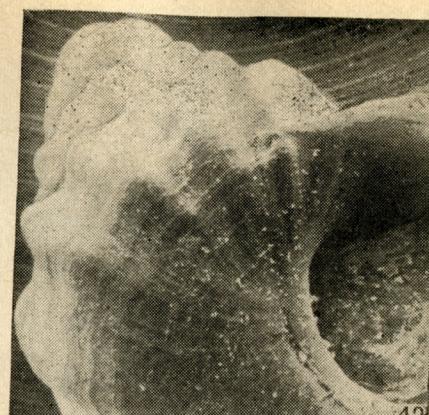
Необходимой процедурой в некоторых случаях может стать очистка поверхности от загрязнений (с. 21).

Иногда при работе с элементами скелета возникает необходимость проправливания поверхности с целью удаления тех или иных компонентов. Оно проводится методами, применяемыми при обычных (не в РЭМ) исследованиях данных образований.

Наклеивание объектов на столик-подложку можно осуществлять проводящими kleями или kleями обычными. В последнем случае необходимо производить напыление катодным способом, который при-



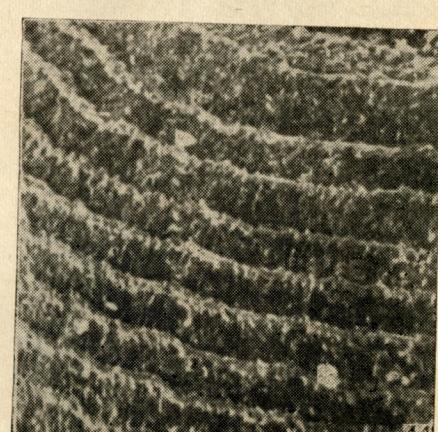
41



42



43



44

Рис. 41—44. Раковины брюхоногих моллюсков (фото И. М. Лихарева).

41 — верхние завитки *Punctum pygmaeum*, $\times 100$; 42 — *Arctonia janmayeni*, $\times 50$; 43 — верхние завитки ($\times 100$) и 44 — поверхностная скульптура раковины ($\times 500$) *Cryonella minuta*.

меняется также при изучении образований сложной объемной архитектоники (перья птиц, скелет радиолярий и др.).

Изготовление шлифов твердых материалов

Сколы и шлифы твердых образований (зубы позвоночных, элементы их скелета и т. п.) приготавливаются с целью исследования тонкой внутренней микроархитектоники самих образований или их элементов, например зубной эмали (рис. 45—48).

Изготовление сколов определяется конкретными особенностями данного объекта и задачами исследования, поэтому оптимальный

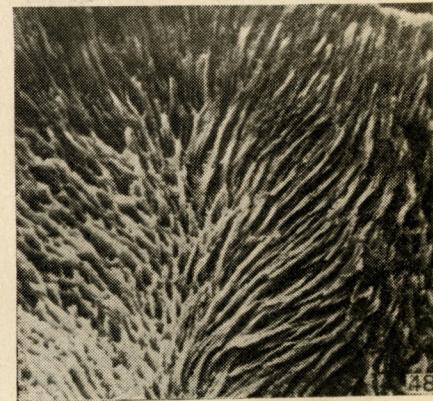
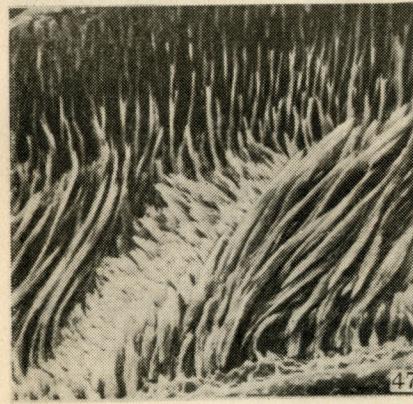
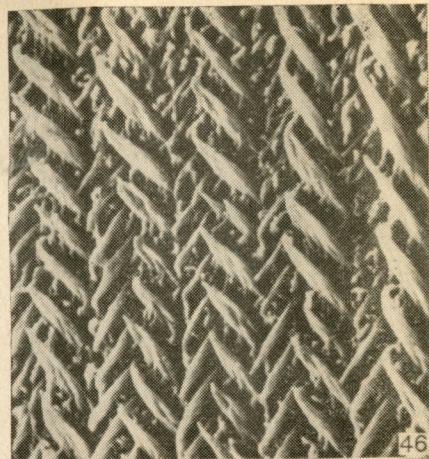


Рис. 45—48. Шлифы зубов млекопитающих (фото Ф. Н. Голенищева).
45 — сагиттальный шлиф нижнего резца тушканчика *Scirtopoda telum*, $\times 700$; 46 — центральная область нижнего резца тушканчика *Paradipus clenodactylus*, $\times 1400$; 47 — поперечный шлиф центральной области нижнего резца морской свинки *Cavia cobaja*, $\times 1000$; 48 — шлиф внутренней поперечной части нижнего резца грызуна *Cryptomys hottentotus*, $\times 1000$.

способ подбирается эмпирически самим исследователем для каждого конкретного случая. Шлиф делается либо непосредственно на объекте, либо последний предварительно закрепляется в полимеризующейся смоле (аралдит, метилметакрилат) для удобства дальнейших операций. Полимерная смола изготавливается по стандартным прописям (см., например: Уикили, 1975). Шлифовка проводится на шлифовальных кругах или наждачными бумагами уменьшающейся зернистости по смоченной водой поверхности. Контроль качества шлифовки проводят под бинокуляром.

Для шлифов костных образований большинство авторов рекомендуют по окончании полировки произвести протравливание

шлифованной поверхности в кислоте. Обычно применяются соляная (HCl), азотная (HNO_3) или фосфорная (H_3PO_4) кислоты в различных концентрациях. Степень концентрированности кислоты определяет время травления. Это время по необходимости может подбираться эмпирически. По Бойду и Хобделлу, хорошие результаты дает протравливание в 0,05 М растворе H_3PO_4 в течение 20—60 с (Boyde, Hobdell, 1969).

В нашей лаборатории протравливание проводится обычно в 2 N растворе HCl в течение 1—5 с (рис. 45—48). После протравливания шлиф промывается в дистиллированной воде и высушивается на воздухе либо непосредственно из воды, либо через ацетон. В практике зарубежных лабораторий иногда применяется быстрое подсушивание шлифа фреоном-13 из аэрозольного баллона.

Подготовленный таким образом объект готов к монтировке на столик-подложку.

Подготовка элементов скелета иглокожих

Некоторые иглокожие (например, часть офиур) относятся к объектам, не нуждающимся в предварительных операциях, так как они хранятся в коллекциях в высушшенном виде.

Выделение скелетных элементов прочих иглокожих (иглы, педицеллярии звезд и ежей) также не представляет особых трудностей, за исключением элементов скелета, заключенных в «коже» (спикулы голотурий и т. п.). В данном случае вырезанный кусочек покровов обрабатывается жавелевой водой, получаемой при пропускании газообразного хлора через раствор едкого натра. Возможно также использование для выделения скелетных образований препаратов, выпускаемых промышленно, например препарата «Хлоракс». После растворения мягких тканей, происходящего в зависимости от природы конкретного объекта через промежуток времени от получаса до нескольких часов, скелетные элементы отмываются водой, высушиваются на воздухе и переносятся на столик-подложку.

Крупные элементы скелета приклеиваются kleem, а для мелких можно рекомендовать следующий способ. Предварительно на столик-подложку наклеивается кусочек фотопленки эмульсией вверх. На эту пленку в капле воды переносятся мелкие объекты. После полного высыхания воды проводится напыление в вакуумной установке.

Элементы скелета некоторых иглокожих, подготовленных указанными способами, представлены на рис. 49—52.

Особенности работы с членистоногими животными

Последовательность основных методических операций, применяемых при работе с членистоногими животными, определяется задачами исследования и состоянием исходного материала.

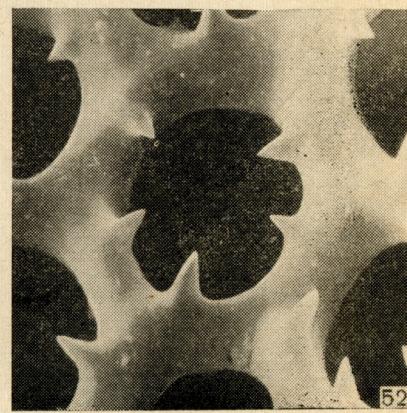
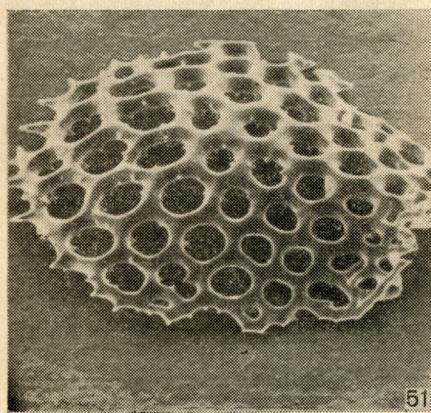
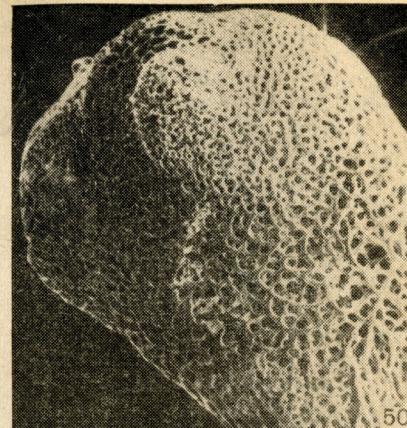
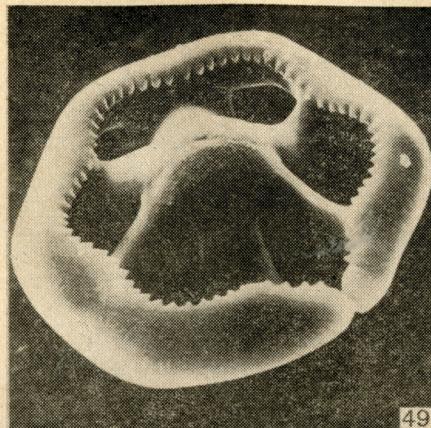


Рис. 49—52. Скелетные образования иглокожих (фото А. В. Смирнова).

49 — спикула голотурии *Cheridota tanensis*, $\times 840$; 50 — дистальный конец суборальной иглы звезды *Pteraster ostaster*, $\times 60$; 51 — спикула голотурии *Prolanekya sp.*, $\times 180$; 52 — то же, деталь спикулы с обратной стороны, $\times 720$.

Для целей систематики в некоторых случаях можно использовать сухие материалы энтомологических коллекций. Сухой объект при этом непосредственно монтируется на столик-подложку при помощи клея.

Для систематических целей, а в некоторых случаях и для целей сравнительной морфологии возможно использование материалов спиртовых коллекций. Препарат либо высушивается на чистом кусочке фильтровальной бумаги непосредственно из 70%-ного спирта, в котором он хранился, либо доводится через серию спиртов до абсолютного и подвергается химической очистке (с. 22). Перед монтировкой желательно также проводить механическую очистку препарата, особенно при необходимости получить обзорные снимки на относительно небольших увеличениях.

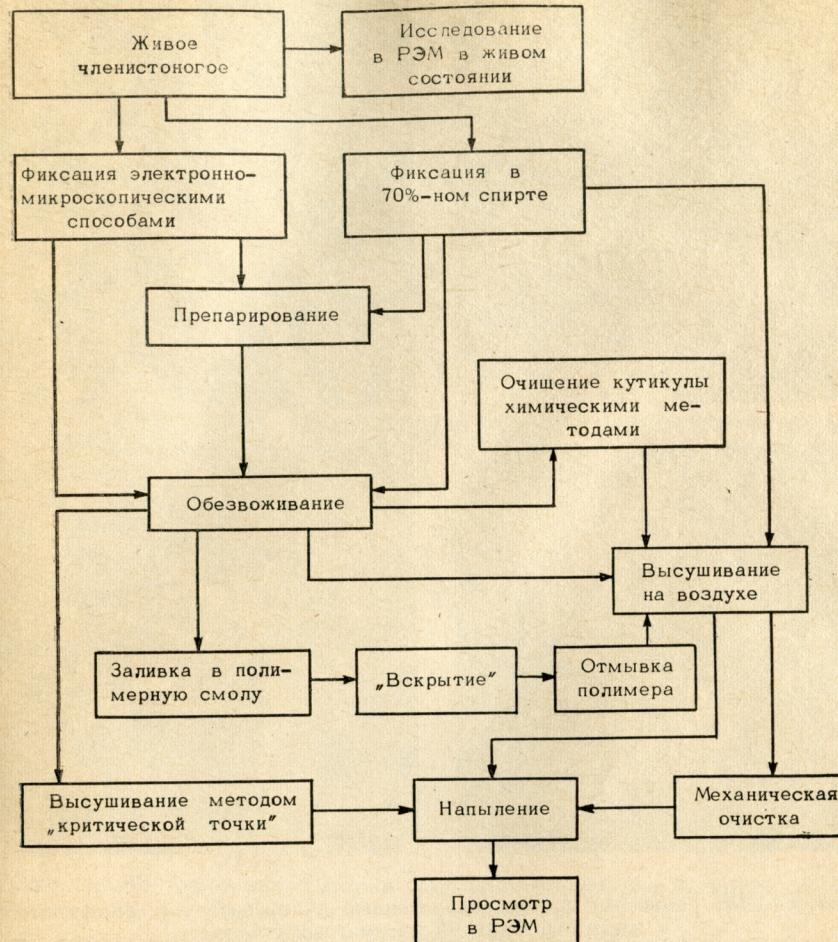


Рис. 53. Последовательность основных методических операций при подгото-
вке членистоногих животных к исследованию в РЭМ.

Для сравнительно-морфологических целей, требующих изучения поверхностных образований на больших увеличениях РЭМ, рекомендуется использование свежефиксированных глютаральдегидом или 70%-ным спиртом животных. Последнее лучше использования спиртового коллекционного материала, так как в случае длительного хранения в спирте на поверхности кутикулы появляется множество загрязнений, затрудняющих интерпретацию изображения при исследовании на больших увеличениях, что необходимо например, при изучении микроструктуры поверхности сенсицелей членистоногих (рис. 5, 6).

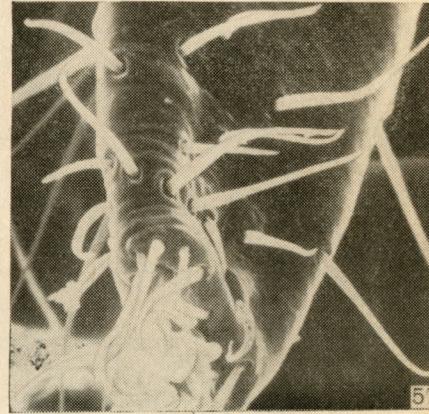
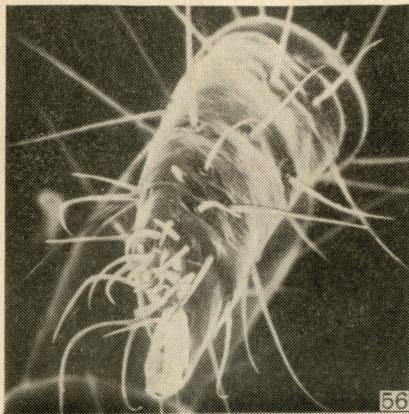


Рис. 54—57. Гамазовые клещи, извлеченные из препаратов, заключенных в жидкость Фора на предметных стеклах.

54 — ротовой аппарат *Hypoaspis aculeifer*, $\times 400$; 55 — участок идиосомы *Haemogamasus dauricus* с зубчатыми хетами, $\times 1600$; 56 — передняя лапка *Euryoparitus emarginatus* с чувствительным тарзальным органом, $\times 420$; 57 — то же, видно характерное «сморщивание» лапки, вызванное высушиванием после 70%-ного спирта, $\times 600$.

Основные методы сушки при работе с членистоногими — это сушка на воздухе из спирта либо иного высоколетучего растворителя и высушивание способом «критической точки» (с. 23). Последнее целесообразно проводить при подготовке животных с относительно мягкой кутикулой. Методы очистки и исследования внутренних кутикулярных структур описаны нами выше (с. 32).

Основная последовательность методических операций при работе с членистоногими животными представлена на схеме (рис. 53).

Некоторые мелкие артроподы, такие, например, как представители многих групп клещей, могут быть определены систематиками только на препаратах, заключенных в жидкость Фора —

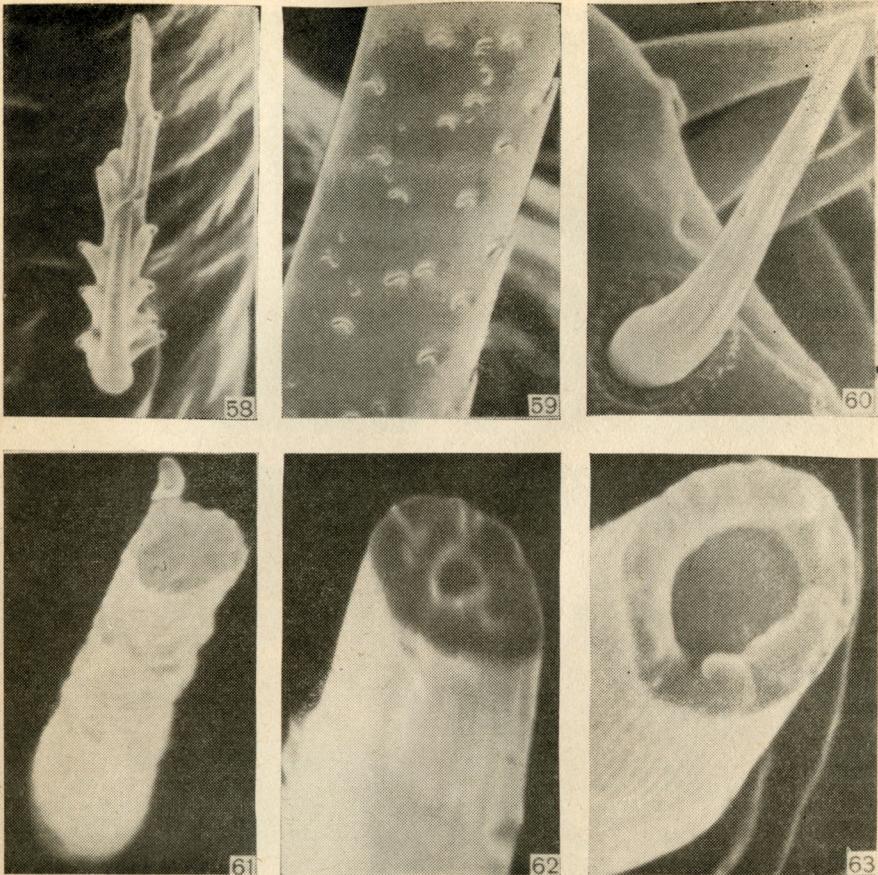


Рис. 58—63. Строение рецепторов гамазовых клещей (по: Леонович, Троицкий, 1981).

58 — зубчаторасположенный (тактильный) волосок *Ameroseius* sp., $\times 4400$; 59 — участок тактильного волоска с мелкими зубчиками *Spinturnix* sp., $\times 4000$; 60 — бороздчатый терморецепторный волосок из тарзального комплекса *Haemogamasus nidi*, $\times 3600$; 61 — скол тактильного рецептора *Euryoparitus emarginatus* (характерно отсутствие полости в сплошном стержневидном волоске), $\times 8500$; 62 — скол бороздчатого волоска *Euryoparitus emarginatus* (видны полости и канальцы), $\times 14\,500$; 63 — обонятельный волосок из тарзального органа *Spinturnix* sp. (на сколе видны поры, сообщающие полость волоска со средой), $\times 3600$.

Берлезе на предметных стеклах. При необходимости исследовать подобные экземпляры методами РЭМ можно рекомендовать следующий способ.

1. Предметное стекло с препаратом помещается в чашку Петри, заливается теплой (40°C) дистиллированной водой и оставляется в ней на ночь.

2. Животные промываются в 1—2 сменах теплой воды с целью удаления остатков жидкости Фора.

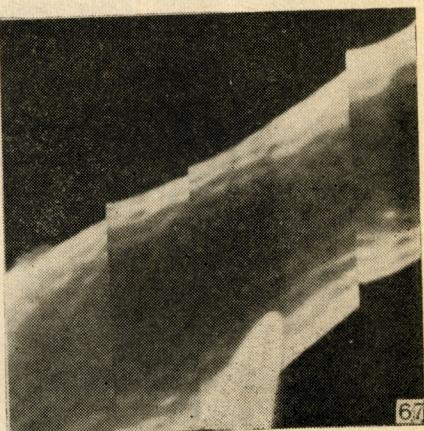
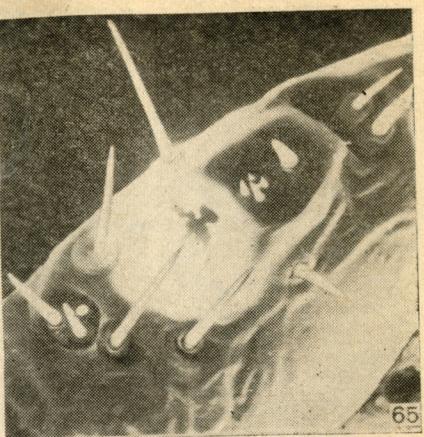
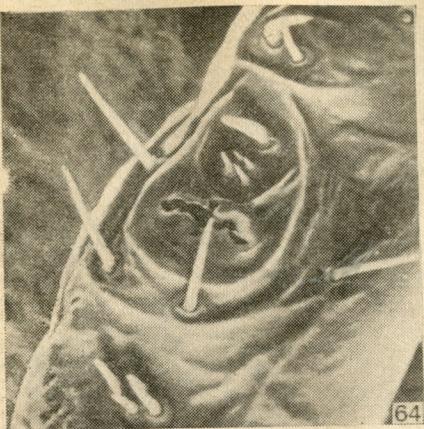


Рис. 64—67. Возможные артефакты изображения в РЭМ на примере органов Галлера членика клеща *Dermacentor silvarum*.

64 — нормальное качественное изображение, $\times 850$; 65 — «свечение» поверхности сложного рельефа при недонапылении, $\times 600$; 66 — слабый электрический контакт, недонапыление, $\times 800$; 67 — недостаточная «устойчивость» объекта, микросдвиги, $\times 11\,000$.

3. Животные обезвоживаются в серии спиртов, начиная с 20%-ного, с интервалом в 5%, чтобы предотвратить сморщивание.

4. Препараты доводятся до 70%-ного спирта и высушиваются на воздухе либо доводятся до абсолютного спирта и высушиваются методом «критической точки» (рис. 54—63).

Известные трудности представляет также просмотр обильно сплющенных членистоногих. При напылении их термическим способом трудно добиться проникновения золота между многочисленными волосками, а это приводит к тому, что отдельные участки поверхности тела заряжаются при сканировании пучка электронов.

То же может наблюдаться при напылении различного рода полостей, частично прикрытых снаружи (рис. 64—65).

Для подобных объектов можно рекомендовать применение катодного напыления либо комбинации из катодного и последующего термического напыления. С целью получения общих обзорных картин рекомендуется работать на небольших ускоряющих напряжениях РЭМ (порядка 5—10 кВ). Участки, которые необходимо изучить при больших увеличениях, приготавливаются отдельно. Предварительно животное просматривается в РЭМ, оценивается степень пригодности нужного участка. Затем при помощи проводящего клея прокладывается «дорожка» от данного участка к столику прямо по поверхности тела животного. Возможна также препаровка необходимого участка.

При просмотре членистоногих иногда наблюдается плохая проводимость в сочленениях конечностей, что приводит к таким артефактам, как полосы от зарядов статического электричества (рис. 66) или же «сдвиги» объекта под электронным пучком (рис. 67). В таком случае можно рекомендовать нанесение мелких капелек проводящего клея на сочленение с той стороны, где они не будут мешать при просмотре препарата в РЭМ.

После исследования в РЭМ иногда появляется необходимость удалить с поверхности препаратов напыленный металл и клей. Удаление золота может проводиться при помощи цианидов (Boyd, 1977). Экономический эффект от подобного мероприятия весьма незначителен, так как для напыления используются весьма небольшие количества золота, к тому же это не ведет к полному «восстановлению» коллекционного материала. Гораздо более существенный проблемой в данном случае является очистка изученных объектов от загрязнений их клеем.

Подготовка мягких тканей и мягкотелых животных к исследованию в РЭМ

Мягкотелые животные небольших размеров (например, ресничные черви и т. п.) фиксируются и высушиваются целиком. Отдельные кусочки тканей крупных животных должны быть сначала отпрепарированы. Препарирование осуществляется либо в физиологическом растворе, либо под слоем фиксирующей жидкости. Фиксацию желательно проводить электронно-микроскопическими методами, причем такими, которые используются при исследованиях данной группы животных (или близкой к ней) в просвечивающей электронной микроскопии. Особое внимание в ходе фиксации и последующих процедур необходимо обращать на постоянство осмотической концентрации фиксирующих и промывочных сред и соответствие ее таковой внутренней среды данного животного (органа).

Основными методами высушивания мягких тканей служат способ «критической точки» и лиофильная сушка (с. 23 и 27). Высушки-

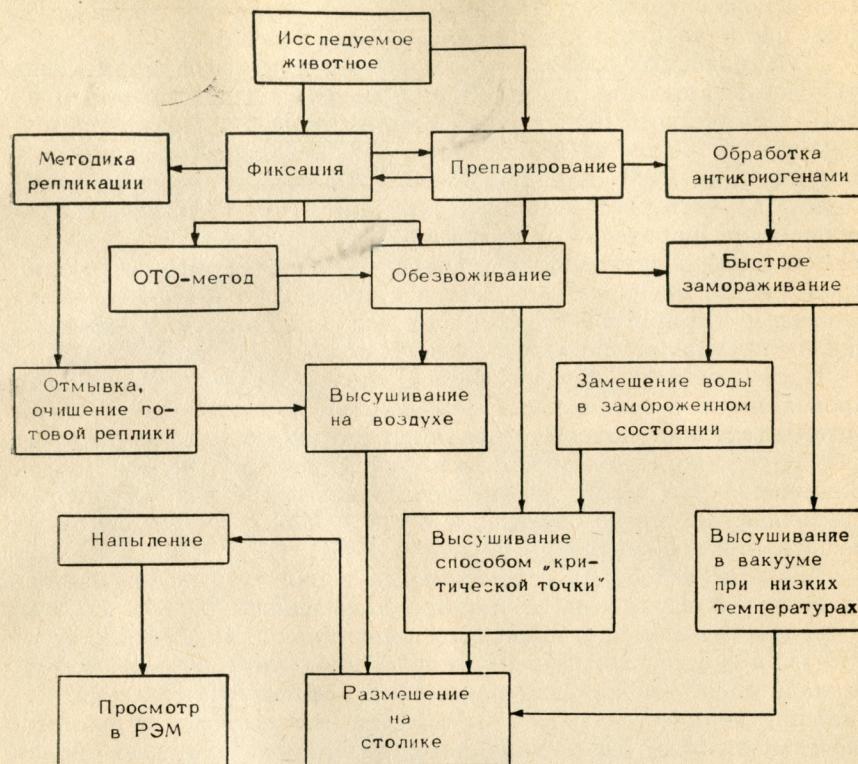


Рис. 68. Последовательность методических операций при подготовке мягких тканей к исследованию в РЭМ.

вание на воздухе можно осуществлять с применением метода дополнительного осмирования с тиокарбогидразидом (с. 31).

При использовании метода лиофильной сушки или замораживания—замещения для понижения точки замерзания применяется пропитка препарата 10%-ным раствором глицерина в физиологическом растворе.

После высушивания необходимо предохранять препараты от контакта с влажным воздухом и сокращать до минимума время между извлечением объекта из камеры, в которой проводилось высушивание, и его помещением в камеру вакуумной установки для напыления.

Основные последовательности операций при работе с кусочками мягких тканей показаны на схеме (рис. 68).

Изучение «мягкотелых» объектов малого размера

К таким объектам относятся прежде всего различные простейшие, многоклеточные животные мелких размеров, а также форменные элементы крови, гемолимфы и т. п.

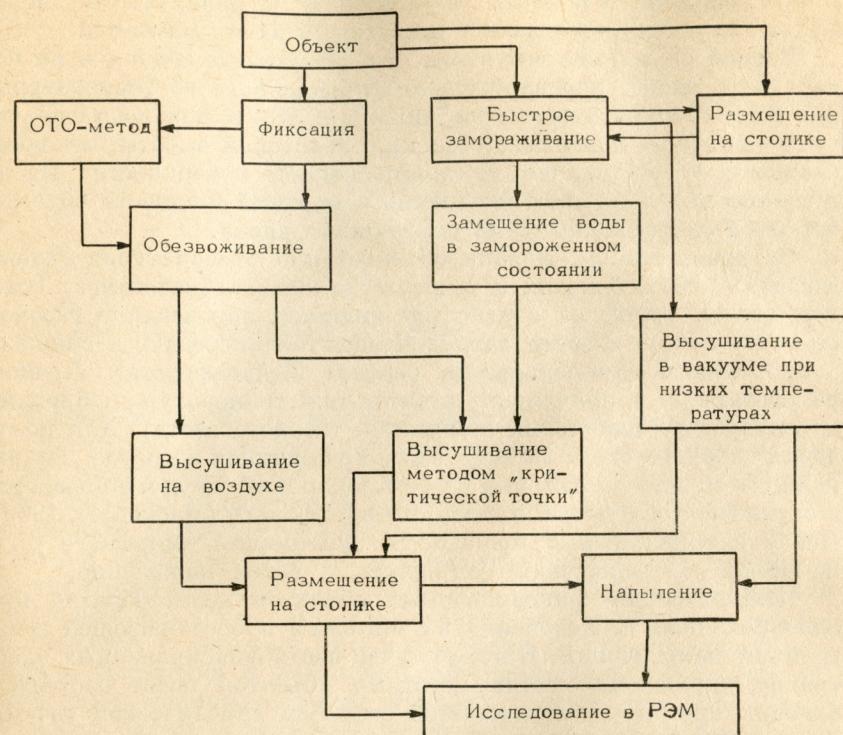


Рис. 69. Последовательность методических операций при подготовке мелких «мягкотелых» объектов к исследованию в РЭМ.

Наиболее целесообразным способом подготовки мелких «мягкотелых» объектов к исследованию в РЭМ служит лиофильная сушка.

Объекты, учитывая их мелкие размеры, должны быть «закреплены» таким образом, чтобы они не потерялись в процессе подготовки. Для этого применяются два основных способа: закрепление до замораживания и закрепление при замораживании. В обоих случаях основой для закрепления служат небольшие тонкие алюминиевые диски. В дальнейшем по окончании процедур высушивания диски приклеиваются к столику-подложке. Особенности закрепления мелких объектов описаны, например, в работах Смолла с соавторами (Small et al., 1968), Хэйеса и Пули (Hayes, Pawley, 1975) и других авторов.

При размещении на диске до замораживания поверхность диска предварительно подвергается «бомбардировке» мелкими частицами алюминия в воздушной струе при большой скорости потока воздуха. При этом она очищается от грязи и изъязвляется мелкими углублениями, канальцами и т. п. При помещении капельки жидкости с объектами на поверхность диска жидкость заполняет эти

микротрецнинки, а объекты «прилипают» к поверхности диска. Сразу же после этого диск с животными замораживается.

Второй способ состоит в том, что объекты помещаются на поверхность диска, предварительно охлажденного до температуры, при которой происходит витрификация (с. 28). Каплю воды с объектами капают на поверхность диска с некоторой высоты, что обеспечивает ее растекание по замороженной поверхности. После высушивания и полного испарения замерзшей жидкости объекты остаются закрепленными на поверхности диска.

Во время замораживания объектов при температурах охлаждающего агента, близких к температуре кипения (например, в жидком азоте), одной из опасностей является образование газовой оболочки вокруг объекта, затрудняющей теплопередачу и снижающей скорость замораживания (эффект Лейденфроста). Лучшие результаты дает применение агентов при температурах, близких к температуре плавления (например, твердого азота). Для получения твердого азота жидкий азот, хранящийся в сосуде Дюара, наливается в пенопластовый или стиропоровый сосуд и помещается в экскатор, обернутый в алюминиевую фольгу (Mackenzie, 1969). После замораживания проводится сублимация аморфного льда из объекта в вакуумной установке, а затем напыление.

Использование фиксированных объектов целесообразно при одновременном исследовании их методами просвечивающей электронной микроскопии. В этом случае часть фиксированных электронно-микроскопическими методами объектов после соответствующих процедур высушивается способом «критической точки». Закрепление объектов удобнее всего проводить на фильтрах, через которые проводится смена фиксирующих и промывочных растворов. Затем фильтр с прилипшими объектами помещается в бокс или специальный держатель и высушивается способом «критической точки». Все процедуры с препаратами, заранее прикрепленными к какой-либо основе, целесообразно проводить на этой же основе (например, для культур клеток, культивируемых на покровных стеклах).

Высушивание на воздухе — наиболее простой способ из существующих — для мелких объектов лучше применять с одновременным использованием ОТО-метода (с. 31).

Основные этапы операций, проводимых при подготовке мелких «мягкотельных» объектов к исследованию в РЭМ, отражены на схеме (рис. 69). Более подробно с особенностями подготовки тех или иных групп объектов данной категории можно ознакомиться в ряде источников, приведенных в списке литературы.

ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ РЭМ

Появление РЭМ ознаменовало начало новой эры в морфологии животных, сравнимой по своему значению с изобретением светового микроскопа. Уже первые исследования с использованием РЭМ показали неоспоримые преимущества этого прибора в документации морфологических данных. Снимки животных, полученные с помощью РЭМ, если исключить возможные артефакты и технические погрешности, содержат большой объем информации об оригинале и, кроме того, обеспечивают ее дальнейшее хранение, размножение и передачу. Это в сочетании со сравнительной легкостью, быстрой и относительно дешевой получения качественных микрофотографий привело к тому, что РЭМ начал вытеснять световую оптику из некоторых областей зоологии и открыл новые, недостижимые прежде возможности исследования.

Большие преимущества РЭМ для зоологических исследований заложены в самом способе формирования этим прибором видимого изображения. Изображение углублений на поверхности образца получается темным, а выступающие детали отбрасывают тени. В результате исследуемый объект выглядит на фотографии объемным и освещен так же, как если бы мы рассматривали его невооруженным глазом. В то же время большая глубина резкости изображения в сочетании с недосягаемой для световой оптики разрешающей способностью создают определенные трудности в трактовке полученной картины. Во многих случаях мы сталкиваемся с ситуациями, когда изображения объектов в РЭМ противоречат нашему повседневному зрительному опыту. Поверхности, кажущиеся слегка неровными, обнаруживают сложный скульптурированный микрорельеф (рис. 74—75), точечный рисунок представляется системой отверстий, а на нитевидных волосках и щетинках выявляются разнообразные структурные элементы (рис. 76—77). Переход от макроструктурного к микроструктурному описанию зоологических объектов осложняется к тому же недостаточным развитием научной терминологии, соответствующей многообразию ультраструктурных деталей. Наибольшие трудности в этом отношении возникают при работе с членистоногими, обладающими максимальной сложностью и разнообразием поверхности покро-

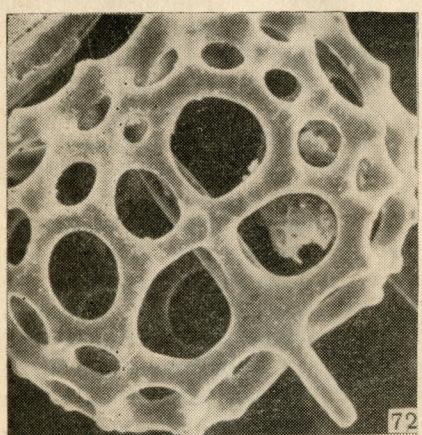
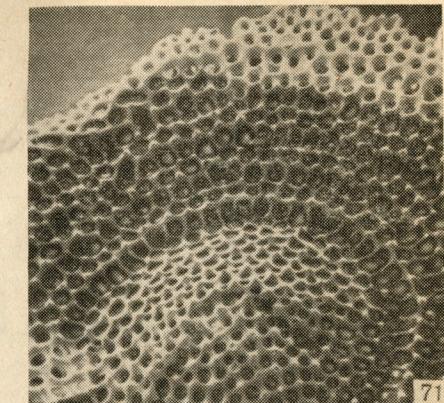
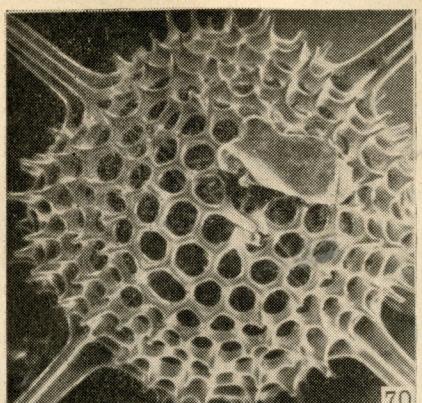


Рис. 70—73. Радиолярии (70—72) и фораминифера (фото М. Г. Петрушевской).

70 — *Hexa cromyum*, $\times 440$; 71 — *Perichlamidium*, $\times 580$; 72 — *Liriospyris*, $\times 1000$; 73 — *Ammodiscus*, $\times 200$.

вов тела, которое снабжено многочисленными выростами со сложным расчленением. Первые попытки создания научной терминологии для описания выявляемых с помощью РЭМ структур были предприняты пока лишь в энтомологии (Harris, 1979; Richards, Richards, 1979).

Поток работ, выполненных с помощью РЭМ, в настоящее время заполняет многочисленные зоологические издания, хотя часть приводимых в подобных статьях фотографий носит чисто иллюстративный характер. РЭМ освободил исследователя от трудоемкой работы по изготовлению рисунков и даже позволил во многих случаях заменить словесные описания подборкой высококачественных фотографий.

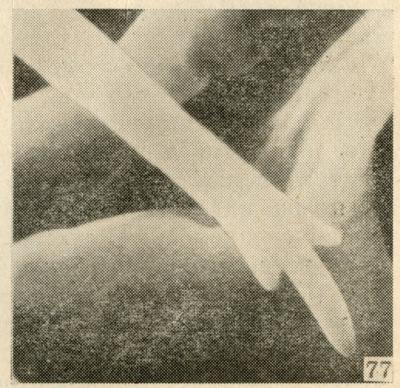
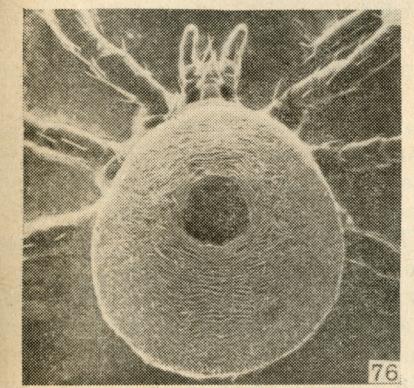
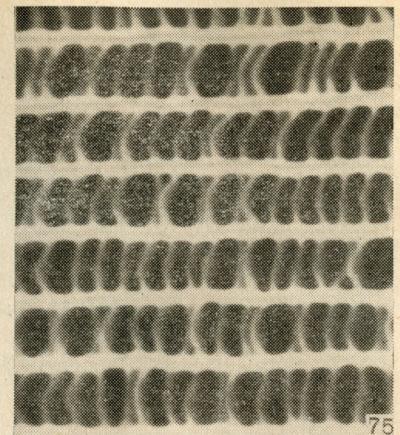
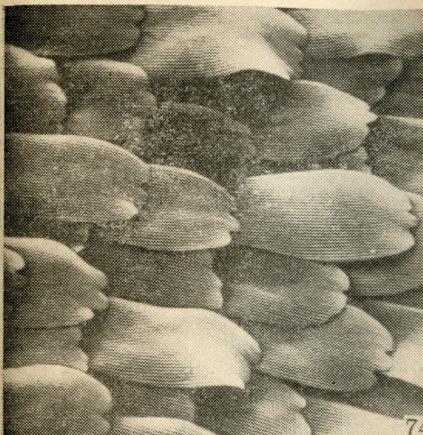


Рис. 74—77. Микроструктурные особенности чешуек крыла бабочки перламутровки *Brentis isis*. (74, 75) и механорецепторных волосков личинки клеща *Argas persicus* (76, 77).

74 — $\times 500$; 75 — $\times 10\,000$; 76 — $\times 50$; 77 — $\times 5000$.

Наиболее широкое распространение методы растровой электронной микроскопии получили в сравнительной морфологии и систематике многих групп животных, а также в микропалеонтологии. Особенно выгодным оказалось применение РЭМ для изучения животных, обладающих прочным наружным скелетом или хорошо сохраняющимся после их гибели или препаровки внутренним скелетом. К числу подобных объектов относятся в первую очередь радиолярии и фораминиферы среди простейших (рис. 70—73), некоторые группы кишечнополостных, большинство моллюсков (рис. 41—44), иглокожие (рис. 49—52) и особенно членистооногие. При работе с подобными объектами процедура исследования, исключая необходимость напыления золотом, существенно не от-

личается от изучения тех же животных обычными светооптическими методами. У позвоночных животных без специальной подготовки исследуются волосы (рис. 37—40), перья, чешуи и другие ороговевшие производные кожи. Широкое распространение получило изучение шлифов зубов (рис. 45—48) и других частей скелета.

Разработка «мягких» способов подготовки образцов, главным образом путем их высушивания методом «критической точки», значительно расширила область применения РЭМ в зоологии. Объектами исследования стали многие группы простейших, включая и паразитов в тканях хозяина (Rausch, Grunewald, 1980), большинство паразитических и свободноживущих червей (рис. 24—25) (Валовая, 1979; Procopić, 1979; Voge et al., 1979; Малахов, Спиридонов, 1980), а также внутренние органы животных (рис. 26). Например, была установлена связь морфологии микроворсинок стенок кишечника с особенностями пищи разных видов грызунов (Наумова, 1979) и паразитических плоских червей (Lumsden, 1975). Анализ микроструктурных изменений в организме с помощью РЭМ оказался очень перспективным для оценки токсичности различных препаратов, в частности антигельминтиков (Becker et al., 1980).

При изучении ископаемых остатков морских организмов в морских отложениях РЭМ стал основным исследовательским инструментом, и анализ огромного объема новой информации существенно расширил не только наши представления в области исторической океанологии (Атлас..., 1977), но и позволил сделать важные выводы об эволюции, видеообразовании и систематике радиолярий (Петрушевская, 1981) и других групп животных, встречающихся в донных осадках. В систематике моллюсков наряду с внешними признаками строения раковины с помощью РЭМ были использованы особенности строения и расположения хитиновых зубов терки передней кишки — так называемой радулы. Оказалось, что эти признаки имеют важное диагностическое значение у переднежаберных брюхоногих моллюсков, тогда как у голых слизней диагностическая ценность строения радулы из-за сильной ее вариабельности невелика (Jungbluth et al., 1980).

Широкое применение РЭМ нашло в систематике членистоногих, где микроструктурные особенности строения покровов используются как при филогенетических построениях на уровне групп высокого таксономического ранга, так и для видовой диагностики. Многие элементы кутикулы членистоногих являются специфичными для целого ряда родов, семейств и отрядов. Например, у насекомых (Бочарова-Месснер, 1977, 1979) к таковым относятся разного рода выросты кутикулы на поверхности крыльев (рис. 78—81). У стрекоз зубцы и шипы располагаются только на жилках крыла (рис. 79), а мембранные внутри ячеек гладкие. У жуков шипиками покрыта большая часть крыла, а у бабочек плоские чешуйки, встречающиеся и у других насекомых, образуют сплошное покрытие крыла (рис. 74). У двукрылых преобладает покры-

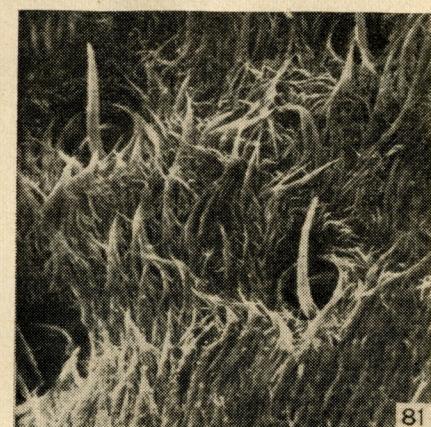
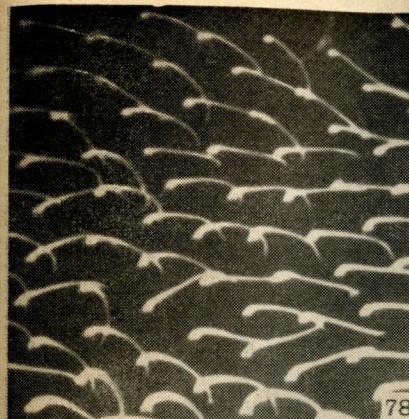
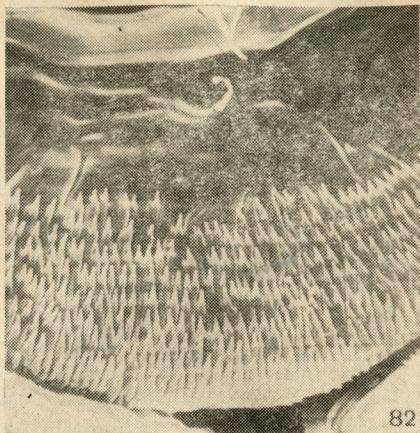


Рис. 78—81. Волоски на крыльях насекомых, $\times 1000$.

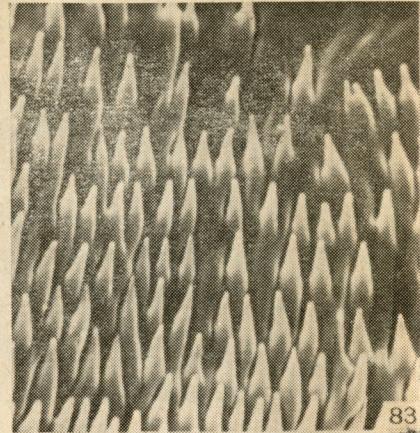
78 — слепень *Hybomitra tarandina*; 79 — стрекоза *Lestes*; 80 — комар *Mansonia richardii*; 81 — жук-снежнотелка *Chionesoma porosum*.

тие из серповидных выростов (рис. 78), причем у *Nematoceps* к ним добавляются чешуйки различной формы (рис. 80). У почвенных и других свободноживущих клещей с помощью РЭМ удалось выяснить многие важные морфологические особенности этих мелких животных, не выявляющиеся в световом микроскопе (Griffiths, Sheals, 1971; Криволуцкий и др., 1979). У иксодоидных клещей важное таксономическое значение может иметь рисунок складчатости скульптуры кутикулы и тонкое строение триходидных тактильных хет, часто обладающих характерными выростами и зубцами (рис. 9, 10, 77) (Балашов, 1973, 1975, 1979).

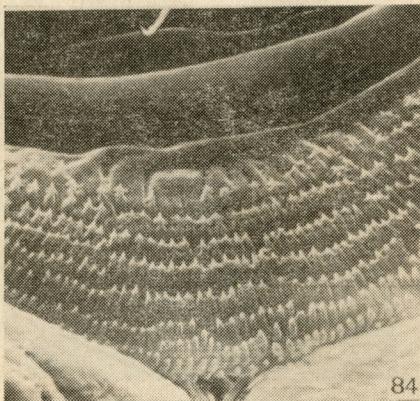
Примером использования микроструктурных признаков для целей видовой диагностики может служить работа Медведева (1977) о таксономическом значении антеннальных сенсицел у жу-



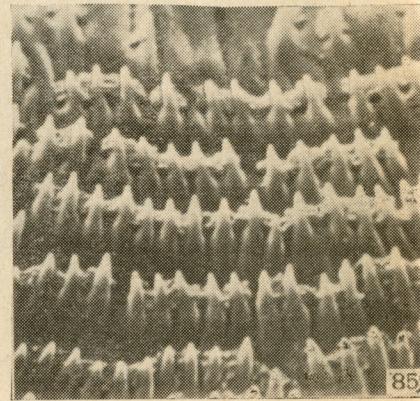
82



83



84



85

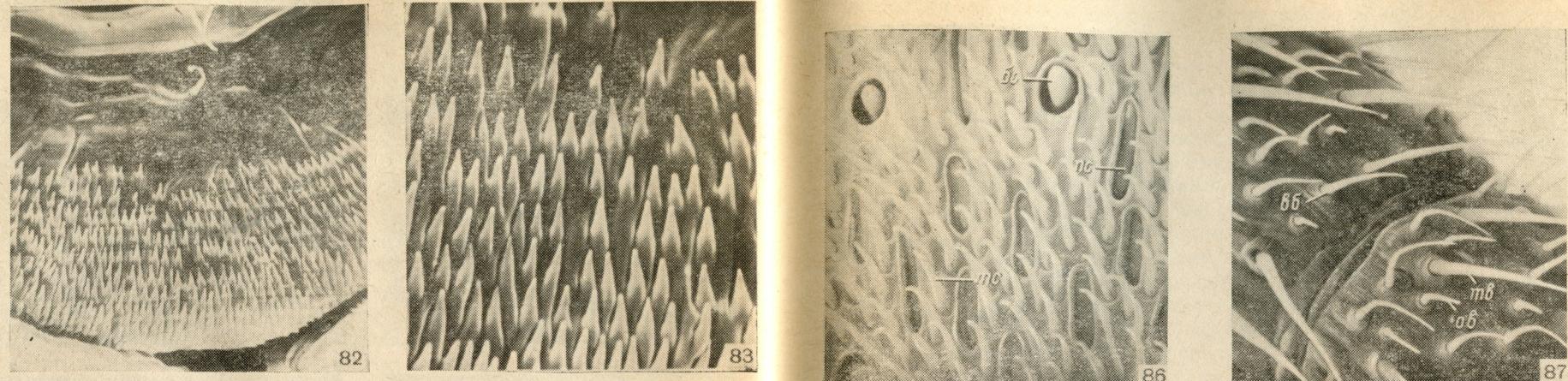
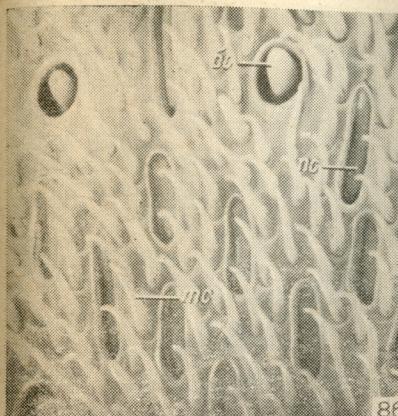


Рис. 82—85. Выросты кутикулы анального кольца нимф клещей *Rhipicephalus* (по: Филиппова, 1981).

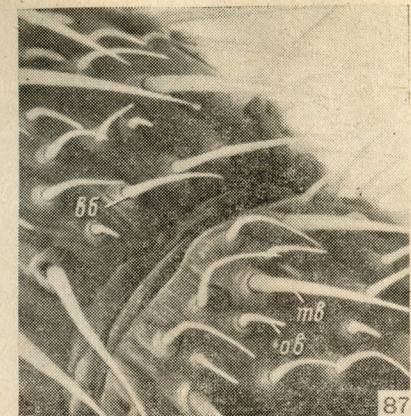
82—83 — *R. scutulzei*, $\times 1150$ и $\times 3000$; 84—85 — *R. sanguineus*, $\times 1150$ и $\times 3000$.

ков-чернотелок. Филиппова (1981) при исследовании трудно различимых видов клещей рода *Rhipicephalus* в качестве диагностических признаков предложила рельеф кутикулы околоанальной области (рис. 82—85), тонкое строение хет и дыхательной пластиинки — перитремы. У комаров видовую принадлежность яиц стало возможным устанавливать по особенностям их поверхностной скульптуры (Matsuo et al., 1974; Hinton, 1981).

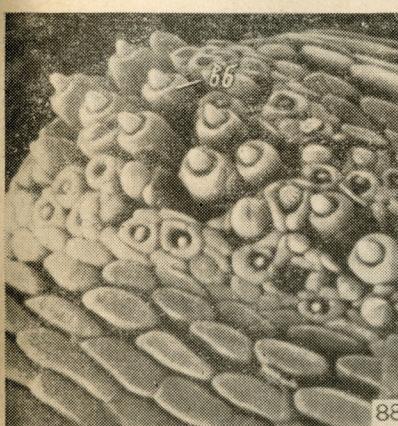
В настоящее время растровая электронная микроскопия находит широкое применение при изучении морфологических особенностей органов чувств, главным образом периферических receptorных образований насекомых, паукообразных, ракообразных и других групп животных, характеризующихся более или менее



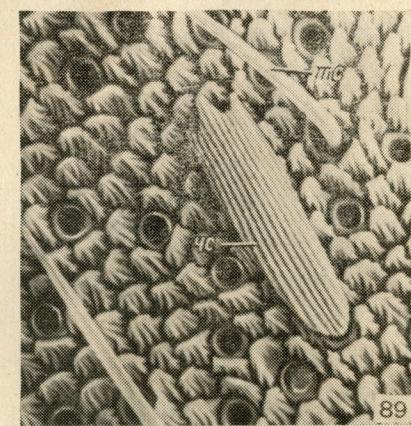
86



87



88



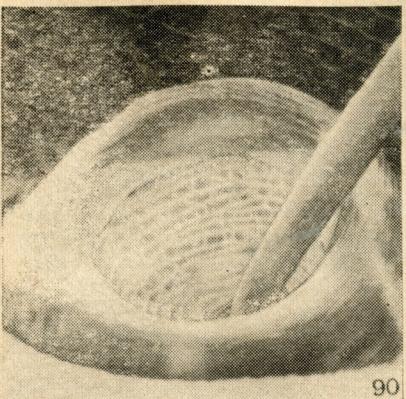
89

Рис. 86—89. Органы чувств насекомых (по: Иванов, 1978а; Леонович, Иванов, 1978).

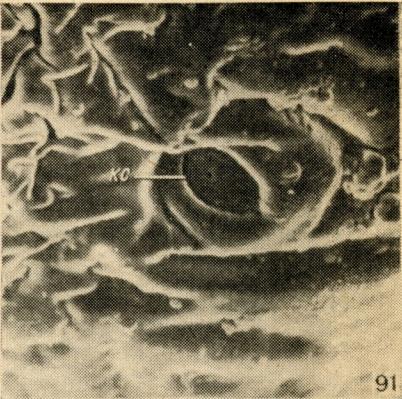
86 — обонятельная плацоидная (*nc*), базиконическая (*bc*) и трихоидная (*mc*) сенсиллы на усике осы *Vespa* sp., $\times 800$; 87 — вкусовая базиконическая (*gb*), обонятельная базиконическая (*ob*) и тактильная трихоидная (*tb*) сенсиллы на усике скорпионницы *Panopoda communis*, $\times 1500$; 88 — базиконическая вкусовая сенсилла (*gb*) на усике жука-плавунца *Acilius sulcatus*, $\times 1200$; 89 — трихоидная (*mc*) и чешуевидная (*cs*) сенсиллы на усике бабочки *Argynnis* sp., $\times 600$.

твёрдыми кутикулярными наружными покровами (Елизаров, 1978; Иванов, 1978а, 1978б, 1981).

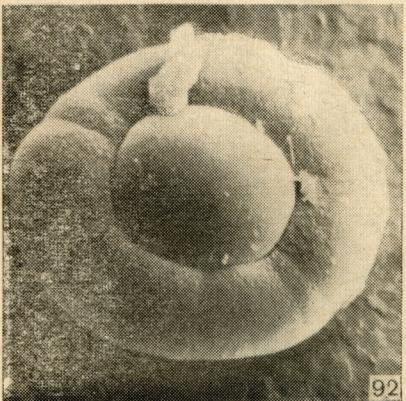
Наибольшим разнообразием кутикулярные отделы рецепторов отличаются у членистоногих и представлены у них преимущественно волосковидными, игловидными и чешуевидными выростами (трихоидные, хетоидные, чешуевидные и др. сенсиллы), куполовидными возвышениями (колоколовидные сенсиллы), кубковидными или пластинчатыми образованиями (плацоидные сенсиллы) (рис. 86—91). Некоторые типы рецепторов характеризуются на-



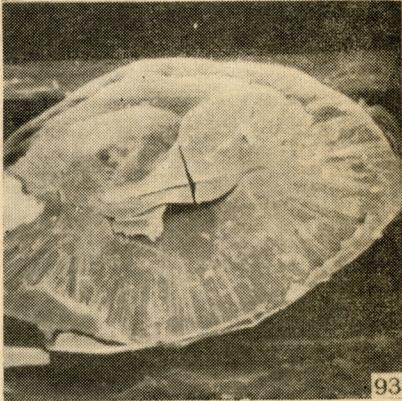
90



91



92



93

Рис. 90—93. Органы чувств членистоногих (по: Иванов, 1974, 1978б, 1981).

90 — трихоботрия скорпиона *Buthus eureus*, $\times 800$; 91 — колоколовидная сенсилла (*кcs*) личинки стрекозы *Aeschna* sp., $\times 1400$; 92 — статолит мизиды *Mysus* sp., $\times 130$; 93 — то же, поперечный скол, $\times 300$.

личием каналов, открывающихся на наружной поверхности кутикулы (целоконические, ампуловидные и др. сенсиллы), или сложно устроенных кутикулярных рецепторных ямок, капсул (орган Галлера и др.), мембранные (тимпальный орган).

Использование РЭМ при изучении рецепторов членистоногих позволило выявить многие важные в функциональном отношении особенности микрорельефа их наружных кутикулярных отделов. Так, например, были обнаружены поры в стенках волосков некоторых типов обонятельных и вкусовых сенсилл, описаны своеобразные складчатые участки поверхности терморецепторных волосков паукообразных, установлено наличие сложной сетчато-

ребристой структуры наружной поверхности сочлененной ячейки трихоботрий скорпионов (рис. 90).

Растровая электронная микроскопия нашла применение и при изучении особенностей наружной поверхности и внутренней структуры статолитов ракообразных (Иванов, 1974). На рис. 92, 93 представлен внешний вид статолита, показывающий его характерную внутреннюю кристаллическую структуру.

Очень перспективным оказалось применение РЭМ при сравнительном изучении сенсорного аппарата. Пользуясь этой методикой, Чайка (1975, 1981) выявил морфологические особенности эволюции обонятельных сенсилл антенн и максиллярных пальп у кровососущих двукрылых, блох, клопов и вшей в связи со способами нахождения прокормителя этими насекомыми. Было установлено, что чем сложнее обнаружение хозяина и выше поисковая активность кровососа, тем большим числом обонятельных сенсилл обладает последний. Например, у насекомых с активным поиском добычи обычно обнаруживают несколько сотен обонятельных сенсилл. У слепней на антенных найдено около 7000 базиконических и целоконических обонятельных сенсилл, у комаров и мошек — 800—1500 булавовидных сенсилл, а у мокрецов — 200. У блох, живущих в гнездах и норах в непосредственной близости от хозяина, количество обонятельных сенсилл на антенных около 20—50, на пальцах — 40—80. У вшей же, постоянно живущих на теле хозяина, количество обонятельных сенсилл близко к 10.

Сравнительное изучение сложного сенсорного образования — органа Галлера, выполняющего наряду с обонятельной функцией еще и ряд других, было проведено у нескольких десятков видов, представляющих все роды иксодоидных клещей — паразитов наземных позвоночных животных (Балашов, Леонович, 1977, 1978, 1981). Орган Галлера располагается на лапках передней пары ног клеща (рис. 3—6) и состоит из нескольких типов сенсилл, анатомически группирующихся в следующие отделы: капсулярные сенсиллы, передняя группа сенсилл и группы дистальных, посткапсулярных и боковых сенсилл (рис. 4). Было установлено, что строение и набор сенсилл органа Галлера имеют характерные особенности для каждого из двух семейств этой группы (Argasidae, Ixodidae), подсемейств, триб и даже некоторых родов и отражают основные направления эволюции иксодоидных клещей. Определенные закономерности в наборе и топографии сенсилл I пары ног (рис. 56, 58—63) выявляются и среди обширной группы гамазовых клещей (Леонович, Троицкий, 1981).

РЭМ открывает широкие возможности для функционально-морфологических исследований. Например, было установлено, что макрорельеф крыльев насекомых, детально изученный только с помощью РЭМ, представляет важный элемент аэродинамических свойств этого органа (Бочарова-Месснер, 1979). У стрекоз и прямокрылых различной формы шипы на жилках и мембранных рассекают поток воздуха на отдельные микроструи, направленные по желобкам микрорельефа крыла («эффект гребенки»). Распреде-

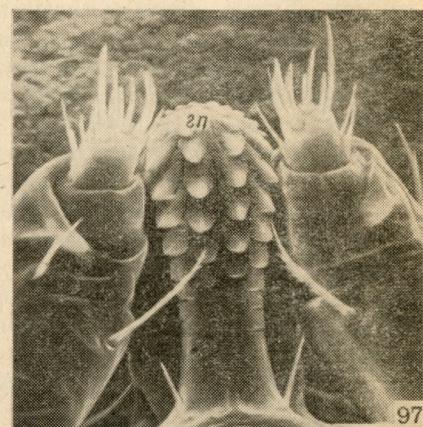
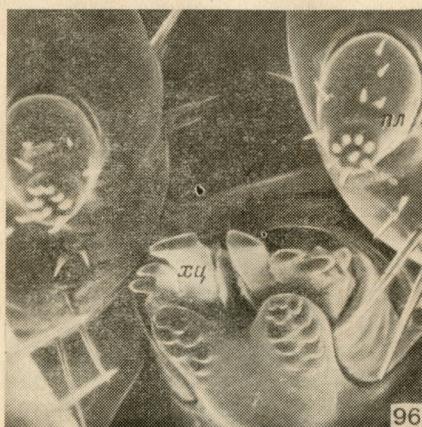
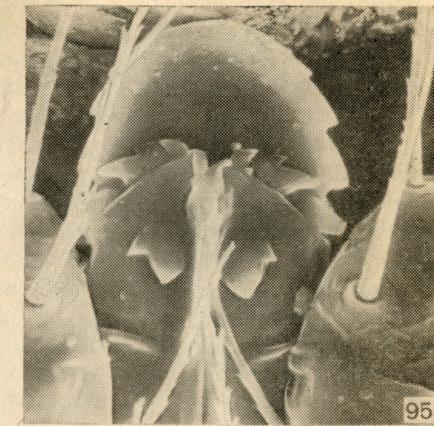
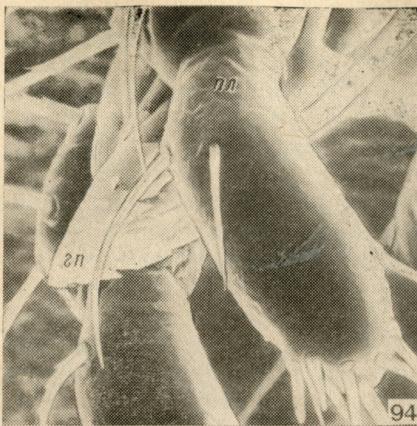


Рис. 94—97. Ротовые органы иксодоидных клещей.

94 — личинка *Argas persicus*, вид сбоку, $\times 1000$; 95 — то же, вид сверху, $\times 1000$; 96 — самец *Ceralixodes putus*, вид спереди, $\times 100$; 97 — личинка *Dermacentor pictus*, вид сверху, $\times 500$. гп — гипостом; хц — хелициеры; пл — пальпы.

ление потоков воздуха по поверхности крыла создается при развитии на его поверхности сплошного слоя однородных выростов типа чешуек у бабочек, шипиков у жуков или серповидных волосков у двукрылых («эффект распределительных дорожек»). В направленном стекании потоков воздуха с крыльев большинства насекомых участвует образованная из микроструктурных элементов система краевых дорожек по краю крыла. Волнообразный контакт работающей поверхности крыла с потоком воздуха создается благодаря упорядоченности топографии элементов микрорельефа по высоте, что хорошо видно на примере многих бабочек.

С помощью РЭМ был установлен сложный механизм дыхания яиц у многих групп насекомых. Оказалось, что различные вы-

росты и сложная система внутренних, содержащих воздух полостей в оболочке яйца — хорионе, формирующие так называемый пластрон, по существу являются аналогами кожных жабр и обеспечивают дыхание яиц в воде или влажных субстратах (Hinton, 1971).

РЭМ впервые позволил создать объемную картину сложнейшего комплекса ротовых аппаратов (рис. 94—97), гениталий и других органов членистоногих, открыл неоценимые возможности для их функционального анализа.

Исследования волос у разных групп млекопитающих в РЭМ (Соколов, 1979) раскрыли роль микроструктуры сердцевинного слоя волоса в удержании воздуха и тем самым в терморегуляции всего организма. Чем тоньше сердцевинный слой, состоящий из рыхлых клеток, которые заполнены воздухом, тем выше его термоизоляционные свойства.

Число примеров применения РЭМ в разного рода зоологических исследованиях можно было бы значительно увеличить, но в этом нет особой необходимости. Важно, что немногим более чем за 10 лет РЭМ стал повседневным исследовательским инструментом многих зоологических лабораторий и возможности его применения в дальнейшем будут все больше расширяться. Поэтому зоологи должны не только уметь анализировать фотографические изображения, полученные с помощью РЭМ, но и в мере возможностей стремиться использовать методы растровой электронной микроскопии в своей повседневной работе.

ЛИТЕРАТУРА

- Атлас микроорганизмов в донных осадках океанов. Диатомеи, радиолярии, силикофлагелляты и нокколиты / Под ред. А. И. Жузе. М., 1977. 196 с.**
- Атлас электронно-микроскопической анатомии иксодовых клещей / Под ред. Ю. Балашова. Л., 1979. 256 с.**
- Балашов Ю. С. Исследования хетома иксодоидных клещей (Parasitiformes: Ixodoidea, Ixodidae) в растровом электронном микроскопе. — Энтомол. обозр., 1973, т. 52, с. 570—573.**
- Балашов Ю. С. Исследования хетома иксодоидных клещей (Parasitiformes: Ixodoidea, Argasidae) в растровом электронном микроскопе. II. Ортотрихоидный хетом личинок аргасовых клещей. — Энтомол. обозр., 1975, т. 54, с. 673—675.**
- Балашов Ю. С. Исследования хетома иксодоидных клещей (Parasitiformes, Ixodoidea) в растровом электронном микроскопе. III. Неотрихоидный хетом и поверхностная структура покровов нимф и имаго аргасовых клещей (Argasidae). — Энтомол. обозр., 1979, т. 58, с. 660—662.**
- Балашов Ю. С., Леонович С. А. Сравнительное исследование органа Галлера аргасовых клещей (Ixodoidea: Argasidae) в растровом электронном микроскопе. — В кн.: Морфология и диагностика клещей. Л., 1977, с. 24—33.**
- Балашов Ю. С., Леонович С. А. Наружная ультраструктура органа Галлера клещей подсемейства Ixodinae (Acarina, Ixodoidea) в связи с систематикой этой группы. — Тр. Зоол. ин-та АН СССР. Л., 1978, т. 77, с. 29—36.**
- Балашов Ю. С., Леонович С. А. Строение и пути эволюции органа Галлера иксодовых клещей подсемейства Amblyomminae. — Паразитол. сб., 1981, т. 30, с. 5—21.**
- Балашов Ю. С., Минкау Н. Е. Изучение живых животных в растровом электронном микроскопе. — Природа, 1977, № 1, с. 137—139.**
- Бочарова-Месснер О. М. Таксономическое значение микроструктуры поверхности крыльев насекомых. — ДАН СССР, 1977, т. 235, с. 1201—1204.**
- Бочарова-Месснер О. М. Особенности крыльев насекомых как аэродинамических поверхностей. — В кн.: Адаптивные свойства эпителия и его производных. Атлас микрофотографий, полученных при помощи электронного сканирующего микроскопа. М., 1979, с. 11—16, 69—106.**
- Валовая М. А. О биологии *Cucullanus cirratus* Muller, 1977 (Nematoda, Cucullanata). — Паразитология, 1979, т. 13, с. 540—544.**
- Елизаров Ю. А. Хеморецепция насекомых. М., 1978. 232 с.**
- Елизаров Ю. А., Давидович Г. Н. Стереоскан на службе систематики и морфологии. — Природа, 1974, № 4, с. 98—99.**
- Иванов В. П. Тонкое строение статоциста мизид. — В кн.: Организмы и сила тяжести. Матер. I Всесоюз. конф. «Гравитация и организм». Вильнюс, 1974, с. 73—80.**
- Иванов В. П. Электронно-микроскопическое исследование механорецепторных волосков насекомых. — Тр. Зоол. ин-та АН СССР. Л., 1978а, т. 77, с. 5—15.**

- Иванов В. П. Тонкое строение джонстонова органа личинок стрекоз *Aeshna* sp. и *Coenagrion* sp. — Тр. Зоол. ин-та АН СССР. Л., 1978б, т. 77, с. 16—28.**
- Иванов В. П. Органы чувств скорпионов (Scorpiones). — Тр. Зоол. ин-та АН СССР. Л., 1981, т. 106, с. 4—33.**
- Криволуцкий Д. А., Друк А. Я., Ласкова Л. М. Перспективы применения стереоскана в изучении панцирных клещей (Acarina, Oribatei). — Тр. Зоол. ин-та АН СССР. Л., 1979, с. 88—90.**
- Леонович С. А. Очищение объектов, заливых в полимерные смолы, с целью исследования инкапсулированных структур в растровом электронном микроскопе. — В кн.: XI Всесоюз. конф. по электрон. микроскопии. Таллин, 1979, т. 2, с. 9.**
- Леонович С. А., Иванов В. П. Тонкое строение джонстонова органа *Panopra communis* L. (Mecoptera, Panorpidae). — Зоол. журн., 1978, т. 57, вып. 2, с. 214—224.**
- Леонович С. А., Троицкий В. А. Рецепторные органы на передних конечностях у гамазовых клещей (Acarina, Gamasina). — Тр. Зоол. ин-та АН СССР. Л., 1981, т. 106, с. 34—46.**
- Малахов В. В., Спиридонов С. Э. Исследование тонкой морфологии киноринхи *Ruscophryne kielensis*. — Биология моря, 1980, № 5, с. 80—81.**
- Медведев Г. С. Таксономическое значение антеннальных сенсилл жуков-чернотелок (Coleoptera, Tenebrionidae). — Тр. Всесоюз. энтомол. о-ва, 1977, т. 58, с. 61—86.**
- Миронов А. А., Катаев С. И., Алексин Ю. И. Способ исследования микропикуляторного руела паренхиматозных органов под сканирующим электронным микроскопом. — В кн.: XI Всесоюз. конф. по электрон. микроскопии. Таллин, 1979, т. 2, с. 13.**
- Мишустина Н. Е. Исследование морских организмов в растровом электронном микроскопе методом «скафандра». — Изв. АН СССР. Сер. биол., 1980, № 3, с. 395—401.**
- Наумова Е. И. Структура поверхности эпителия пищеварительного тракта некоторых грызунов. — В кн.: Адаптивные свойства эпителия и его производных. Атлас микрофотографий, полученных при помощи электронного сканирующего микроскопа. М., 1979, с. 17—22, 107—140.**
- Овчаренко В. И. Науки семейств Gnaphosidae, Thomisidae, Lycosidae (Aranei) Большого Кавказа. — Тр. Зоол. ин-та АН СССР. Л., 1979, т. 85, с. 39—53.**
- Петрушевская М. Г. Радиолярии отряда Nassellaria мирового океана. Л., 1981. 406 с. (Опред. по фауне СССР, издаваемые Зоологическим ин-том АН СССР; Вып. 128).**
- Пиз Д. Гистологическая техника в электронной микроскопии. М., 1963. 164 с.**
- Практическая растровая электронная микроскопия / Под ред. Дж. Гоулдстейна и Х. Яковица. М., 1978. 656 с.**
- Прессер Л., Браун Ф. Сравнительная физиология животных. М., 1967. 766 с.**
- Соколов В. Е. Адаптивные особенности волосяного покрова млекопитающих. — В кн.: Адаптивные свойства эпителия и его производных. Атлас микрофотографий, полученных при помощи электронного сканирующего микроскопа. М., 1979, с. 7—10, 30—58.**
- Суворов Л. А. Микроскопия в науке и технике. М., 1981. 136 с.**
- Уики Б. Электронная микроскопия для начинающих. М., 1975. 325 с.**
- Филиппова Н. А. К диагностике видов рода *Rhipicephalus* Koch. (Ixodoidea, Ixodidae) фауны СССР и сопредельных стран по нимфальной фазе. — Паразитол. сб., 1981, т. 30, с. 47—68.**
- Филиппова Н. А., Панова И. В. *Anomalohimalaya lotozkyi* sp. n. — новый вид иксодовых клещей из хребта Петра Первого (Ixodoidea, Ixodidae). — Паразитология, 1978, т. 12, с. 391—399.**
- Чайка С. Ю. Некоторые закономерности эволюции обонятельного аппарата двукрылых. — Журн. общ. биол., 1975, т. 36, с. 870—877.**
- Чайка С. Ю. Эволюция обонятельной системы кровососущих насекомых**

- в зависимости от их биоценотических связей с хозяином-прокормителем. — Журн. общ. биол., 1981, т. 42, с. 241—252.
- Чевризов Б. П.** К вопросу о применении растрового электронного микроскопа в диагностике сенокосцев (Opiliones). — Тр. Зоол. ин-та АН СССР. Л., 1978, т. 77, с. 70—73.
- Шатров А. Б.** Морфофункциональные особенности ротового аппарата личинок краснотелкового клеща *Neotrombicula pomaranevi* (Trombiculidae). — Паразитология, 1981, т. 15, с. 10—20.
- Anderson T. F.** Techniques for the preservation of three-dimensional structures in preparing specimens for the electron microscope. — Trans. N. Y. Acad. Sci., 1951, vol. 43, p. 130—133.
- Anderson T. F.** Electron microscopy of microorganisms. — Phys. Techn. Biol. Res., 1956, vol. 3, p. 178—181.
- Becker B., Mehlhorn H., Andrews P., Komas H. T., Eckert J.** Light and electron microscopic studies on the effect of praziquantal on *Schistosoma mansoni*, *Dicrocoelium dendriticum* and *Fasciola hepatica* (Trematoda) in vitro. — Z. Parasitenk., 1980, Bd 63, S. 113—128.
- Boyde A.** Cianide removal of gold from SEM specimens. — J. Microsc., 1977, vol. 111, p. 229—231.
- Boyde A., Hobdell M. H.** Scanning electron microscopy of lamellar bone. — Z. Zellforsch., 1969, Bd 93, S. 213—231.
- Boyde A., Wood C.** Preparation of animal tissues for surface-scanning electron microscopy. — J. Microsc., 1969, vol. 90, p. 221—249.
- Burkl W., Schiechl H.** A study of osmium tetroxide fixation. — T. Histochem., Cytochem., 1968, vol. 16, p. 157—161.
- Corvin D., Clifford C. M., Keirans T. E.** An improved method for clearing and preparing ticks for examination with the scanning electron microscope. — J. Med. Entomol., 1979, vol. 16, p. 352—353.
- Ericsen J. L. E., Biberfeld P.** Studies on aldehyde fixation. Fixation rates and their relation to fine structure and some histochemical reactions in liver. — Laboratory Investigation, 1967, vol. 17, p. 221—298.
- Griffiths D. A., Sheals J. G.** The scanning electron microscope in Acarine systematics. — In: Scanning electron microscopy. The systematic association special volume N 4. Systematic and Evolutionary applications / Ed. V. H. Heywood. London : New York, 1971, p. 67—94.
- Harris R. A.** A glossary of surface sculpturing. — Occasional papers in Entomology, 1979, N 28, p. 1—31.
- Hayat M. A.** Introduction to Biological Scanning Electron microscopy. — Baltimore, 1978. 323 p.
- Hayes T. L., Pawley J. B.** Very small biological specimens. — In: Principles and Techniques of scanning electron microscopy / Ed. M. A. Hayat. New York : London, 1975, vol. 3, p. 45—81.
- Hearle J. W. S., Sparrow J. T., Cross P. M.** The use of scanning electron microscopy. Oxford, 1972. 284 p.
- Hinton H. E.** Biology of insect eggs. Oxford : New York, 1981, vol. 1. 473 p.
- Jungbluth J. H., Likharev I. M., Wiktor A.** Vergleichend morphologische Untersuchungen an der Radula der Landnacktschnecken. 1. Limacoidea und Zonitoidea (Gastropoda: Pulmonata). — Arch. Moll., 1980, Bd 111, S. 15—35.
- Kelley R. O., Dekker R. A. F., Bluemink J. G.** Ligand-mediated osmium binding: its application in coating biological specimens for scanning electron microscopy. — J. Ultrastruct. Res., 1973, vol. 45, p. 254—258.
- Laczko L., Varga S.** Experiences with the thiocarbohydrazide mediated osmium binding in coating biological specimens for scanning electron microscopy. — Microscopy, 1976, Bd 32, S. 69—75.
- Lumsden R. D.** Surface ultrastructure and cytochemistry of parasitic helminths. — Exp. Parasitol., 1975, vol. 37, p. 267—339.
- Mackenzie A. P.** Apparatus for the partial freezing of liquid nitrogen for the rapid cooling of cells and tissues. — Biodynamica, 1969, vol. 10, p. 341—343.
- Matsuo K., Yoshido Y., Lien J. C.** Scanning electron microscopy mosquitoes. 2. The egg surface structure of 13 species of *Aedes* from Taiwan. — J. Med. Entomol., 1974, vol. 11, p. 179—188.
- Pease R. F. M., Hayes T. L., Camp A. S., Amer N. M.** Electron microscopy of living insects. — Science, 1966, vol. 154, p. 1185—1186.
- Principles and Techniques of scanning electron microscopy / Ed. M. A. Hayat.** New York : London, vol. 1 (1974), vol. 2 (1974), vol. 3 (1975), vol. 4 (1975), vol. 5 (1976), vol. 6 (1976), vol. 7 (1977).
- Procopić J.** Scanning electron microscopic study of the morphology of *Ascaris suum* Goeze, 1782. — Folia parasitol. (Praha), 1979, vol. 26, p. 377—380.
- Rausch M., Grunewald J.** Light and stereoscan electron microscopic observations on some microsporidian parasites (Cnidosporidia: Microsporidia) of blackfly larvae (Diptera: Simuliidae). — Z. Parasitenk., 1980, Bd 63, S. 1—11.
- Richards A. G., Richards P. A.** The cuticular protuberances of insects. — Int. J. Insect Morphol., Embryol., 1979, vol. 8, p. 143—157.
- Seligman A. M., Wasserkrug H. L., Hanker J. S.** A new staining method (OTO) for enhancing contrast of lipid-containing tetroxid fixed tissue with osmophilic thiocarbohydrazide (TCH). — J. Cell. Biol., 1966, vol. 30, p. 424—432.
- Small E. B., Marszalek K. D. S.** Scanning electron microscopy of fixed, frozen and dried Protozoa. — Science, 1968, vol. 163, p. 1064—1065.
- Voge M., Sogandares-Bernal F., Martin J. H.** Fine structure of the tegument of *Mesocestoides tetraphyridia* by scanning and transmission electron microscopy. — J. Parasitol., 1979, vol. 65, p. 562—567.

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
Введение	3
Принцип работы и технические возможности РЭМ	5
Подготовка зоологических объектов к исследованию в РЭМ	15
Требования к препарату	15
Предварительные операции, препарирование животных	16
Исследование живых животных в РЭМ	17
Фиксация зоологических объектов	18
Фиксация этиловым спиртом (18). — Фиксация глютаральдегидом и осмием (18). — Фиксация гистологическими методами (21).	
Очищение поверхности объекта от загрязнений	21
Обезвоживание и высушивание препаратов	22
Высушивание из этилового спирта и высоколетучих растворителей (23). — Высушивание методом «критической точки» (23). — Лиофильная сушка (27).	
Некоторые специальные методы подготовки препаратов к исследованию в РЭМ	30
Замещение воды в замороженном состоянии (30). — Метод дополнительного осмирования (31). — Методы репликации в зоологических исследованиях (32). — Изучение инкапсулированных структур (32).	
Монтирование препаратов на столик-подложку	34
Создание проводящего слоя на поверхности объекта	37
Термическое напыление (38). — Катодное напыление (39). — Применение антистатиков (41).	
Особенности подготовки некоторых разновидностей зоологических объектов к исследованию в РЭМ	41
Области применения РЭМ	55
Литература	66

Юрий Сергеевич Балашов,
Сергей Александрович Леонович

МЕТОДЫ ПРИМЕНЕНИЯ РАСТРОВОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ
МИКРОСКОПИИ В ЗООЛОГИИ

(В серии: «Методы зоологических исследований — практике»)

Утверждено к печати
Зоологическим институтом Академии наук СССР

Редактор издательства Е. И. Васьковская

Художник Г. В. Смирнов

Технический редактор А. П. Чистякова

Корректор Э. Г. Рабинович

ИБ № 20672

Сдано в набор 21.06.83. Подписано к печати 12.03.84.
М-30598. Формат 60×90^{1/16}. Бумага книжно-журнальная.
Гарнитура обыкновенная. Печать высокая. Усл. печ.
л. 4,5. Усл. кр.-отт. 4,75. Уч.-изд. л. 4,63. Тираж 1000.
Тип. зак. № 517. Цена 75 к.

Издательство «Наука». Ленинградское отделение.
199164, Ленинград, В-164, Менделеевская лин., 1.

Ордена Трудового Красного Знамени
Первая типография издательства «Наука».
199034, Ленинград, В-34, 9 линия, 12.