

Лиофилизационное высушивание беспозвоночных

2. Подготовительные работы

Б.В. Златанов

Институт зоологии, Аль-Фараби 93, Алматы, 050060, Казахстан

Данная статья является продолжением публикации, посвященной анализу различных традиционных способов сохранения коллекционного материала членистоногих и характеристике лиофилизационного высушивания как перспективного метода фиксации прижизненного облика объектов (Златанов, 2004).

От того, как проведена подготовка организмов к лиофилизационному высушиванию, зависит качество полученного «продукта», поскольку после помещения объектов в вакуумную камеру и включения установки ничего уже изменить или исправить нельзя. Она во многом схожа с таковой при традиционных способах работы с коллекционным материалом, но имеет ряд существенных отличий, обусловленных спецификой метода. Для удобства изложения мы разделяем процесс подготовки на четыре этапа.

1. Отбор объектов

Беспозвоночных для высушивания берут как выращенных или содержащихся в лабораторных условиях, так и в «природе». Предпочтение следует оказывать «природным» организмам, поскольку искусственное содержание негативно влияет на происходящие в них биохимические и физиологические процессы, какими бы «оптимальными» условия содержания ни были. Полностью копировать набор и соотношение биотических и абиотических факторов, обуславливающих полноценное развитие организма в природе, в лаборатории невозможно. Наиболее важным для нас последствием лабораторного содержания беспозвоночных является изменение химического состава и истончение кутикулы. В результате этого во время хранения умерщвленных беспозвоночных, при расправке или в процессе высушивания кутикула может порваться, а внутренности вытечь (в лучшем случае тело деформируется) или переламываются сочленения (чаще всего ног) и объект разваливается. Бывает, что объект невозможно нормально высушить – при извлечении из вакуумной камеры обнаруживается, что он или постоянно «потеет» (покрывается конденсированной влагой), или высох в виде аморфной массы. Такое происходит и с «природными» организмами, но гораздо реже, чем с «лабораторными». Хорошо высушенный объект при перемещении с холода в тепло остается сухим и не деформируется.

Бытует мнение, что изъятие организмов из природы подрывает популяцию вида и наносит вред экосистеме. Это действительно так, когда речь идет о позвоночных. В отношении беспозвоночных оно чаще всего неправомерно в силу того, что их популяции обладают значительным «запасом прочности», обусловленным большой плодовитостью видов. Объекты для наших целей отлавливают (за исключением тех случаев, когда нужна личиночная фаза) половозрелые, уже выполнившие репродуктивную функцию. По сравнению с последствиями хозяйственной деятельности человека ущерб от отлова беспозвоночных в природе очень мал. Поскольку многие виды беспозвоночных животных являются массовыми в природе, проблема редкости для них часто неактуальна. Зачастую специалисты относят некоторых беспозвоночных к редким видам из-за отсутствия сведений по образу жизни и фенологии.

Объекты отбирают целые, недеформированные; особей с утолщенными, укороченными (что часто встречается, например, у каракуртов) или с отсутствующими конечностями или их частями выбраковывают.

2. Умерщвление

Отловленных в природе или лаборатории беспозвоночных необходимо как можно быстрее доставить к месту проведения лиофилизации по возможности живыми. Замаривание или помещение объектов в фиксирующие жидкости нежелательно, так как преждевременное прекращение процессов жизнедеятельности организма приводит к потере тургора и, как следствие, деформации тела, а также разрушению пигментов и обесцвечиванию покровов. Для наших целей умерщвление проводится замораживанием. Годится любая температура ниже 0°C – чем ниже, тем лучше. Оптимальна температура -20-25°C. Этим достигается быстрое

прекращение биохимических и физиологических процессов в организме, предотвращающее разложение пигментов; кристаллизация внутриклеточной воды фиксирует прижизненную форму тела. Но F. Gastaldi (1973) считает, что гусениц предварительно следует усыплять парами эфира, в то время как личинок жуков можно замораживать сразу.

Практически умерщвление беспозвоночных производится следующим образом. Если в ловушке или садке находятся несколько особей, их рассаживают в отдельные емкости по одной. Замороженные объекты становятся ломкими и чтобы их можно было извлечь без помех не размораживая, емкости (резервуары) должны быть достаточно большими. Материал, из которого изготовлены резервуары, их форма могут быть любыми. Мы использовали пластиковые стаканчики с крышками, спичечные коробки, стеклянные банки в зависимости от размера объектов. Емкости с живыми беспозвоночными помещают в морозильную камеру и выдерживают там до полного застывания не менее 3-4 часов в зависимости от температуры.

3. Хранение

Замороженными беспозвоночных, теоретически, можно хранить сколь угодно долго. Но следует иметь в виду, что при низкой температуре объекты постепенно обезвоживаются и при размораживании становятся ломкими. Вымораживание влаги, по нашим наблюдениям, происходит тем быстрее, чем ниже температура хранения. Это делает весьма затруднительной, а часто невозможной, последующую работу с объектами. Здесь может не помочь даже отпаривание в горячей воде, что нежелательно. Максимальный срок, во время которого мы хранили беспозвоночных, не превышал 4 месяцев при температуре -27°C .

Если есть необходимость, в целях экономии места замороженных особей группируют в отдельные резервуары по несколько экземпляров. Желательно это делать прямо в морозильнике (если позволяет его конструкция), осторожно, но быстро перемещая объекты глазным пинцетом из одной емкости в другую. При складывании членистоногих необходимо следить, чтобы они не сцеплялись конечностями. Попутно убирают деформированные и поврежденные экземпляры. Количество объектов в одной емкости может быть любым, ограничением служит функциональность. Гусениц с длинными волосками объединять не следует.

Расправленных беспозвоночных в ожидании сушки желательно хранить в морозильной камере сериями в плоских коробках прикрытыми крышками во избежание повреждений и поставленными друг на друга.

В дальнейшем, по завершении сушки объекты хранятся как высушенные традиционным атмосферным способом насекомые – в энтомологических коробках. Аналогичен и уход за ними, поскольку они так же повреждаются кожейдами.

4. Расправление

Расправление является основным этапом подготовки объектов к высушиванию. Под расправкой беспозвоночного понимают придание ему положения (позы), более или менее соответствующего естественному, и фиксация его в нем. Правильность ее проведения определяет эстетику «готового» объекта. Цель, для которой производится сушка животного – либо это экспонирование в коллекции или демонстрирование в качестве наглядного учебного пособия, либо использование только в научных исследованиях (морфометрия и т.д.) – обуславливает соответствие расправки его прижизненному облику. Это касается в основном членистоногих, прочих беспозвоночных просто раскладывают на подставке-платформе и закрепляют.

Работа с членистоногими гораздо сложнее и требует набора специальных инструментов и приспособлений. Это пинцеты разной величины и конфигурации, стандартные и изготовленные из энтомологических булавок различных номеров препаровальные иглы, энтомологические булавки (в основном 0 и 00) и вилочки (рис.1). Они могут иметь 2, 3 и более луча, но в основном применяют 2-х лучевые. Для некоторых работ нужны вилочки с лопастями различной формы (прямоугольной, треугольной и т.д.) и величины. Размер вилочек произвольный, удобный работнику; длина лучей обусловлена предназначением инструмента (см. ниже). В ряде случаев используют ножницы и скальпель. Также необходима фильтровальная бумага или бумажные салфетки. Расправка осуществляется на подставках-платформах из пенопласта. Толщина их должна быть не менее 1см, площадь – адекватной величине объекта, поскольку каждую особь расправляют на отдельной платформе.

Членистоногое, предназначенное для расправки, осторожно вынимают пинцетом из емкости, где оно хранилось, стараясь не повредить оставшиеся экземпляры. Кладут на лист фильтровальной бумаги или салфетку и оставляют на некоторое время для размораживания. Нужно следить, чтобы размораживание не было полным – достаточно, чтобы восстановилась гибкость сочленений конечностей. При этом объект «потеет». Фильтровальная бумага впитывает влагу с вентральной стороны; дорсальную сторону высушивают, осторожно прикладывая полоски бумаги. На короткое время объект можно поместить в струю теплого воздуха от вентилятора-обогревателя. Обсушивание должно быть по возможности полным, поскольку влага, оставшаяся на поверхности тела, при повторном замораживании объекта образует ледяную корку, замедляющую лио-филизацию.

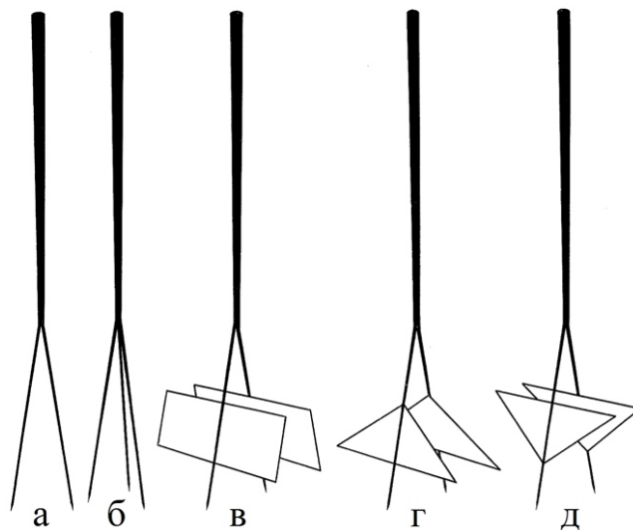


Рис. 1. Вилочки для расправки членистоногих:

а 2-х лучевая; б 3-х лучевая; в-д с лопастями.

Процесс расправки рассмотрим на примере паука (каракурта).

Обсушенного паука берут большим и указательным пальцами одной руки за I пару ног, стараясь обхватить их целиком, и поднимают его. Теми же пальцами другой руки каждую из оставшихся свободными конечностей слегка массируют, разминают сочленения и выгибают в отрицательную сторону. Затем перехватывают IV пару ног и проводят ту же операцию с I парой. При этом надо следить, чтобы не отломилось брюшко. В результате все конечности должны «обвиснуть». Эти действия проводят максимально осторожно и аккуратно. Вместо пальцев можно использовать мягкие глазные пинцеты, но тогда увеличивается риск травмирования объекта.

«Размятого» паука кладут на подставку вентральной стороной. Ноги, подогнувшиеся под туловище, осторожно вынимают пинцетом. Затем берут вилочку с длиной лучей 15-20 мм – оптимальный размер для каракурта (здесь и далее: длина лучей может быть больше, но никак не меньше указываемой). Ее осторожно вводят косо между брюшком и головогрудью так, чтобы лучи располагались по сторонам стебелька, втыкают в подставку и, погружая, также осторожно прижимают к ней (рис.2, точка А). Во избежание заваливания брюшка на сторону, его фиксируют по бокам энтомологическими булавками, воткнутыми вертикально в подставку (точки В и В'). Головогрудь обычно не фиксируют – она прижата нижним концом черенка и основанием лучей вилочки. Прикрепив таким образом туловище, пинцетом распрямляют пальпы и ноги и располагают их радиально. Для придания большей натуралистичности между туловищем объекта и подставкой можно поместить плашку из пенопласта требуемой толщины (рис.3). В результате, высушенное членистоногое будет опираться только на лапки.

Затем приступают к креплению конечностей. Сначала ноги располагают в направлении, в котором планируют закрепить. Рекомендуемое примерное расположение конечностей показано на рис.2. Назовем его условно-естественным – оно не является единственно возможным. Следует иметь в виду, что у пауков различных семейств, несмотря на общую схему, направление и постановка ног не одинаковы. Так, у пауков-волков (сем. Lycosidae) ноги «стоят» несколько иначе, чем у кругопрядов (сем. Araneidae), а у пауков-бокоходов (сем. Thomisidae) третья пара ног вообще направлена в стороны вперед.

Начинают обычно с одной из ног I пары. Например, с левой (рис.2, Г). Для фиксации одной ноги обычно нужны две вилочки: одна с длиной лучей около 10 мм – для предлапки, другая, с лучами около 15 мм – для голени. В случае необходимости используют дополнительные вилочки и (или) энтомологические булавки. Ногу поднимают пинцетом за голень и предлапку, сгибают в сочленениях дугообразно и устанавливают так, чтобы она опиралась на вершину лапки. Обычно ноги обладают достаточной жесткостью и находятся в заданном положении нужное время. В

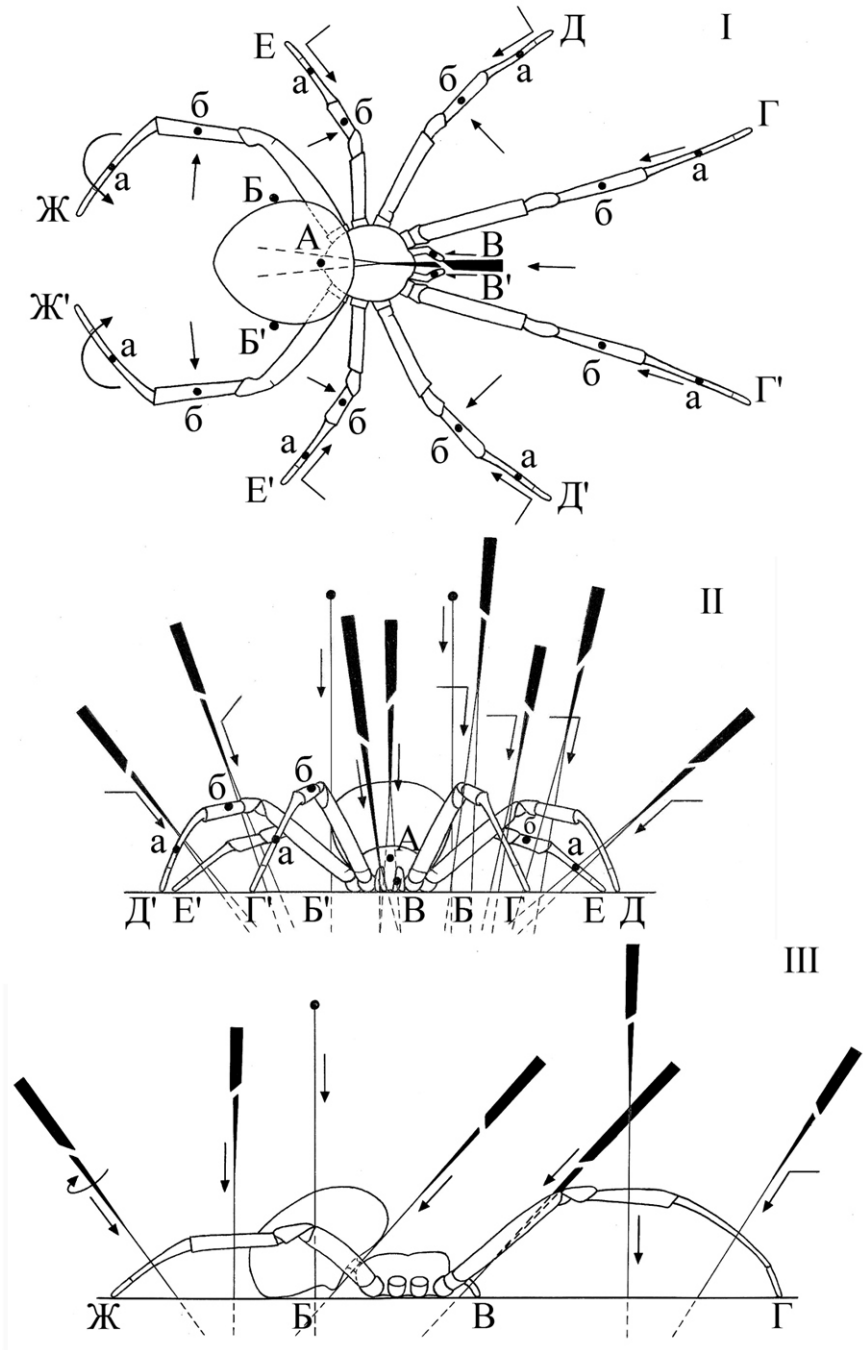


Рис. 2. Фиксирование паука (каракурта) вилочками. I - вид сверху; II - вид спереди; III - вид сбоку.

противном случае их приходится поддерживать пинцетом. Затем вилочку «надевают» на предлапку (точка *Га*) так, как показано на рис.2. II и III, втыкают в платформу и погружают в нее до тех пор, пока предлапка не упрется в основание лучей (развилку). Так же фиксируют голень (точка *Гб*). Эту операцию повторяют с ногой *Г*. Если ноги закреплены неровно и не симметрично воображаемой продольной оси симметрии, проходящей посередине тела объекта, креном вилочек вправо или влево конечности пытаются выправить. Если это не помогает, вилочки приходится вынимать и «перекальвать» до достижения удовлетворительного результата. С приобретением опыта количество таких исправлений сводится к минимуму.

Затем крепят ноги IV пары. Последовательность действий та же, что и с I парой. Но предлапка крепится несколько иначе. Ее берут пинцетом и вводят между лучей вилочки до развилки и слегка вжимают так, чтобы нога не выпадала (точки *Жа* и *Ж'а*). Вращая вилочку вдоль ее оси (если работают с правой ногой, то вправо, если с левой, то влево) заводят предлапку по дуге за брюшко; втыкают вилочку в подставку и погружают до тех пор, пока лапка не коснется ее поверхности. Голень крепят как обычно, но затем препаровальной иглой вжимают в развилку (точки *Жб* и *Ж'б*). Длина лучей вилочек и для голени и для предлапки около 10 мм. Такое крепление задних конечностей применяют в основном при расправке пауков семейств *Aganeidae*, *Theridiidae* и некоторых других. Заднюю пару ног бродячих пауков, например волков (сем. *Lycosidae*), чаще фиксируют подобно передней.

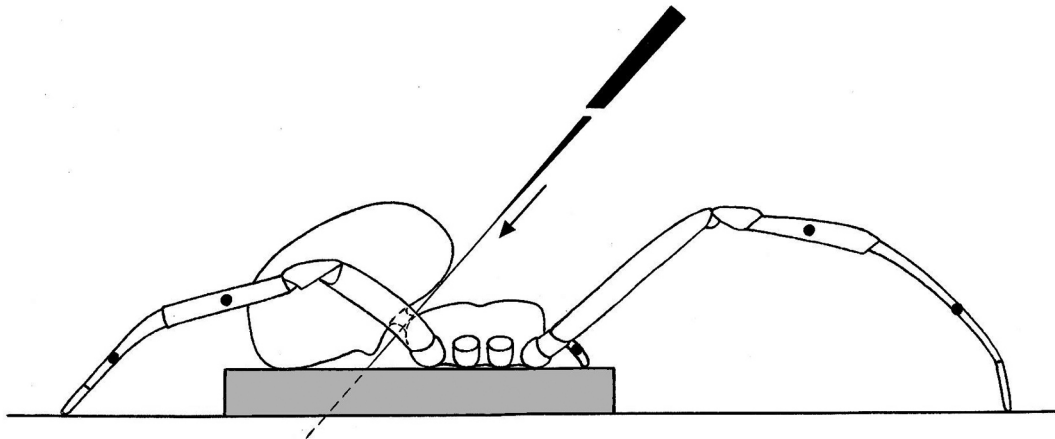


Рис. 3. Фиксирование тела паука на плашке.

После приведения IV пары конечностей в соответствие с осью симметрии закрепляют II и III пары, причем удобнее начать со II (*Д* и *Д'*). Действуют также как при фиксации передних ног. Ставят их, сообразуясь не только с продольной, но и с поперечной осью симметрии. Длина лучей вилочек для II пары такая же, как для I. Предлапки III пары ног (точки *Еа* и *Е'а*) крепят вилочками с лучами длиной около 5 мм, голени (точки *Еб* и *Е'б*) – около 10 мм. Вообще размер вилочек может варьировать – он должен быть пропорциональным величине расправляемого объекта. Так, при расправке, например, самок большинства видов пауков пользуются гораздо большими вилочками, чем при расправке самцов.

Пальпы фиксируют в последнюю очередь. Пинцетом берут пальпу за последний членик и сгибают ее в колене углом вверх. Вилочкой с лучами 2-3 мм осторожно прижимают этот членик вершиной к подставке. То же повторяют со второй пальпой (точки *В* и *В'*).

Описанная выше последовательность действий по расправке и креплению паука, а также приспособления для этого, являются базовыми. Они являются основой для модификации существующих и разработки новых методов и приспособлений для работы с членистоногими, что обусловлено различиями в их морфологии. Так, для крепления гусениц используют вилочки с лопастями (рис. 1, в).

Примером могут служить особенности расправки и фиксации конечностей такого сильно отличающегося от других паукообразных объекта, как сольпуга (рис. 4). Это членистоногое имеет хорошо развитые лапки. Закрепляя ноги, одну из вилочек «надевают» не на предлапку, как у пауков, а на основной членик лапки и прижимают к платформе. Другую вилочку «надевают» на бедро, втыкают в платформу и, погружая в нее, давят на бедро до тех пор, пока голень вершиной не упрется в первую вилочку, а предлапка не соприкоснется с черенком по всей длине. В результате создается ребро жесткости и конструкция обретает устойчивость без дополнительного крепления. Пальпы и I пару ног фиксируют одной вилочкой – между лучей вводят голень и вжимают ее в развилку (на рисунке направление показано пунктирной стрелкой), рассчитывая усилие так, чтобы конечность не выпала. При этом предлапка свободно косо повисает, что примерно соответствует ее естественному положению.

Таким образом, используя знание особенностей строения и механики разных типов членистоногих, можно, разработав методику и приспособления для фиксации, придавать им практически любую, характерную для них прижизненную позу.



Рис. 4. Фиксирование конечностей сольпуги.

Литература

Златанов Б.В., 2004. Лиофилизационное высушивание беспозвоночных. 1. Обоснование метода. *Известия НАН РК., сер. биол. и мед., 4:56-60*

Gastaldi F., 1973. Preparazione a secco di insetti e loro larve mediante liofilizzazione. *Inform. Giovane Entomol., 14(66): 1-4.*

Summary

Zlatanov B.V. Freeze drying of invertebrates. 2. Previous works.

The method of lyophilization of invertebrates is described. Each stage of the process is characterized. The method and equipment is practically illustrated by detailed description of a spider processing. The method described allows further development of equipment and the improving of the method itself to preserve any invertebrate having original articulation and shape, and natural coloration.

Тұжырым

Златанов Б.В. Жұмсақ жабынды омыртқасыздарды кептіру тәсілдері. Дайындық жұмыстары.

Мақалада жұмсақ жабынды омыртқасыздарды кептіру тәсілдері сипатталынып жазылған.