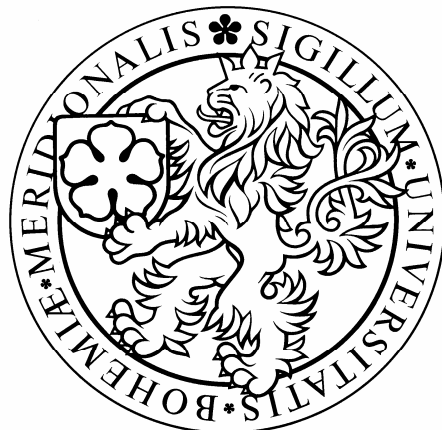


Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Biologická fakulta



**Nálevníci z žaber mořských ryb simultánně kolonizovaných
amfizoickými amébami**



Bakalářská práce
květen 2007

Vypracoval:
Tomáš Tymel

Vedoucí práce:
Prof. MVDr. Iva Dyková Dr.Sc.

bakalářská práce v nezkrácené podobě

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

7.5. 2007 v Českých Budějovicích

Tomáš Týmł

Tyml T (2007) Nálevníci z žaber mořských ryb simultánně kolonizovaných amfizoickými amébami. [Ciliates from gills of marine fish simultaneously colonized with amphizoic amoebae.] Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Ciliates isolated from gills of marine fish (colonized simultaneously with amphizoic amoebae) were characterized on the basis of their morphology. A strain isolated from *Psetta maxima* Linnaeus, 1758 was assigned to the genus *Uronema* Dujardin, 1841. Another two strains, from *Salmo salar* Linnaeus, 1758 and *Balistes polylepis* Steindachner, 1896, were assigned to *Pseudocohnilembus* Evans et Thompson, 1964. Repeated clonal procedures and long-lasting culturing proved that *Cohnilembus reniformis* (strain obtained from UK National Culture Collection) is a polymorphic species.

New data were obtained on cell structure of ciliates under study: rows of tubules found in the close vicinity of mitochondria of the *Uronema* strain; structures slightly protruding on the surface of oral cilia of *C. reniformis*.

Tato práce byla financována Výzkumným centrem ichtyoparazitologie LC522 a Výzkumným záměrem Parazitologického ústavu (BC, AVČR) Z60220518.

Děkuji Prof. MVDr. Ivě Dykové, Dr.Sc. a RNDr. Jiřímu Lomovi, Dr.Sc. za cenné rady a čas, který mi věnovali. Děkuji také celému Oddělení eukaryotických mikroorganismů infikujících ryby za vytvoření příjemného zázemí.

Obsah

1.	Úvod a literární přehled	1
1.1.	Charakteristika nálevníků	1
1.2.	Klasifikace a taxonomicky významné znaky nálevníků	3
1.3.	Metody studia nálevníků	5
1.3.1.	Metody optické mikroskopie	6
1.3.2.	Metody elektronové mikroskopie	9
1.3.3.	Kultivace nálevníků	10
1.4.	Nálevníci cizopasíci u ryb	11
1.5.	Histofágní nálevníci cizopasíci u ryb	12
2.	Cíl práce	14
3.	Materiál	16
4.	Použité metody	18
4.1.	Kultivace studovaných kmenů nálevníků	18
4.2.	Pozorování živých nálevníků	19
4.3.	Fotografování fixovaných nálevníků	20
4.4.	Použité postupy barvení nálevníků	20
4.4.1.	Impregnace stříbrem podle Kleina	20
4.4.2.	Metoda impregnace uhličitánem stříbrným	20
4.4.3.	Metody impregnace protargolem	21
4.4.4.	Fluorescenční barvení nálevníků flutaxem	22
4.5.	Řádkovací/skanovací elektronová mikroskopie	23
4.6.	Prozařovací/ transmisní elektronová mikroskopie	23
4.7.	Dokumentace	23
5.	Výsledky	24
5.1.	Charakteristika nálevníků kmene CCAP 1610/1	24
5.2.	Charakteristika nálevníků kmene CIRL	25
5.3.	Charakteristika nálevníků kmene CMEX	25
5.4.	Charakteristika nálevníků kmene CESP	26
6.	Diskuse	42
6.1.	Poznámky k determinaci studovaných kmenů	42
6.2.	Metodické zkušenosti	43
7.	Souhrn a perspektivy další práce	47
8.	Použitá literatura	48

1. Úvod a literární přehled

1.1. Charakteristika nálevníků

Nálevníci - Ciliophora Doflein, 1901 jsou prvními pozorovanými mikroskopickými organismy, které ve druhé polovině 17. století objevil a popsal pomocí vlastnoručně vyrobeného mikroskopu Holanďan Antony van Leeuwenhoek (Fokin 2004). Pro nálevníky bylo postupně zavedeno několik označení a byla k nim přiřazována i jiná Protozoa nebo i někteří zástupci Metazoi. Do poloviny 20. století byl pro nálevníky používán název Infusoria (nálevníci, zvířata z nálevů), původně však tento název označoval všechny organismy vzdorující vyschnutí (Hausmann a Hülsmann 2003a). S narůstajícím objemem poznatků, který byl získán na základě stále se zdokonalujících metodických přístupů, byl taxon Ciliophora vyhrazen pouze pro organismy charakterizované přítomností cilií, jaderným dimorfismem, složitou vnější vrstvou buňky (kortex, kortikální cytoplazma) a konjugací (pro nálevníky typické sexuální rozmnožování). Některé taxony (Pseudociliata Corliss a Lipscomb, 1982; Opalineia Wenyon, 1926) byly dlouho pokládány za nálevníky kvůli velkému počtu bičíků uspořádaných do řad a teprve s nástupem elektronové mikroskopie získaly status samostatné skupiny (Hausmann a Hülsmann 2003b). Ve starší literatuře (např. Small a Lynn 1985) byli nálevníci uváděni jako součást říše či podříše Protozoa Goldfuss, 1818. Společným znakem zástupců této skupiny jsou kortikální alveoly, řadí se proto do podříše Alveolata Cavalier-Smith, 1991, ve které jsou kromě nálevníků ještě výtrusovci (Apicomplexa) a obrněnky (Dinzoa). Některí autoři (Adl a kol. 2005) řadí Alveolata společně s Cryptophyceae, Haptophyta a Stramenopiles do velké skupiny Chromalveolata Adl a kol., 2005.

Tvar nálevníků určuje kortex, který má velmi složitou stavbu. Zahrnuje dvě hlavní vrstvy: pelikulu a infraciliaturu. K pelikule patří buněčná membrána (plazmalema) a v některých případech i perilema (extracelulární složka). Pinocytickou aktivitu zajišťují parasomální váčky, které jsou vždy bezprostředně vedle řasinky. Přímě pod plazmalemou jsou ploché vezikuly - kortikální alveoly tvořící druhově specifickou mozaiku. Hlubší vrstvu kortexu tvoří infraciliatura, která obsahuje kinetosomy, tj. bazální tělíska řasinek a systém fibril a mikrotubulů. Řada kinetid (kinetosomů a jejich řasinek) tvoří kinetu. Pravidelné podélné uspořádání kinetid je přerušeno pouze cytostomem (buněčná ústa) a cytoproktem (buněčná řiť). Buňka nálevníků je asymetrická, k čemuž kromě cytostomu a cytoproktu přispívá také přítomnost nejméně jedné kontraktilní vakuoly. Nálevníci se dělí pomocí příčného dělení,

které je provázáno dalšími ději, např. stomatogenezí, které zajišťují vytvoření dvou rovnocenných dceřiných buněk. Tvorba nového ústního aparátu (stomatogeneze) je velmi dobrým zdrojem dat pro rekonstrukci fylogeneze ciliátů (Foissner 1996). Přestože většinu detailů kortikální cytoplazmy není možné pozorovat jinak než pomocí elektronového mikroskopu, po použití některé z metod impregnace stříbra lze mnohé složitosti kortexu vysledovat i světelným mikroskopem. Metody impregnace stříbrem odhalují systém stříbřitelných linií (argyrom), který je druhově specifický a je stále základní metodou při určování jednotlivých druhů nálevníků.

Nálevníci se pohybují pomocí kmitavého pohybu řasinek. Cilie (řasinka) je synonymem pro flagelum (bičík) používané u nálevníků. Cilie většinou nepřesahuje 10 μm a je považována za intracelulární organelu, protože její tělo (axonema) je kryté buněčnou membránou. Průměr řasinky nebo bičíku je standardní, 0,25 μm a i vnitřní uspořádání je typické: $9 \times 2 + 2$ (devět dvojic mikrotubulů po obvodu axonemy a jedna dvojice tvořící osu). Cilie mohou vytvářet různé struktury, jako je třeba membranela nebo cirus. Membranela vytváří část orálního aparátu u nálevníků, cirus je trs řasinek ze společné polykinetidy a je typický pro nálevníky podtřídy Hypotrichia (Hausmann a Hülsmann 2003b).

Velmi významným znakem nálevníků je přítomnost dvou typů jader - jaderný dualismus. V buňkách nálevníků se trvale vyskytují jedno či více jader somatických (makronukleů) a jedno či více jader generativních (mikronukleů). Makronukleus bývá tvarově velmi proměnlivý a vždy nápadně větší než mikronukleus. V makronukleu probíhá syntéza RNA a je zde zajišťován normální metabolismus buňky (Hausmann a Hülsmann 2003b). Mikronukleus je výrazně menší, spíše kulovitý a na rozdíl od polyploidního makronukleu je diploidní. Hlavní úlohou generativního jádra je uchovávání a rekombinace genetického materiálu. Podílí se však také na stomatogenezi. V případě experimentálního odstranění mikronukleu, vytváří nálevník v příští generaci abnormální ústní aparát a až po několika dalších generacích se vše vrací k normálu, což je pravděpodobně způsobeno nahrazením funkce ztraceného generativního jádra makronukleem. (Mulish 2003). Pouze mikronukleus se dělí mitózou nebo meiózou za účasti dělicího vřeténka. Protože se při dělení makronukleu neobjevuje dělicí vřeténko a obvykle nejsou patrné ani chromozómy, bývá toto dělení nazýváno amitózou.

Sexuálním procesem nálevníků je konjugace, při níž se spojují dvě buňky téhož druhu a dochází ke vzájemné výměně dvou haploidních jader. V obou buňkách jsou po meióze a sérii mitóz mikronukleu zachována pouze dvě haploidní jádra: stacionární a migrující, ostatní jádra degenerují. Buňky mezi sebou nejprve vytvářejí cytoplazmatický můstek, kterým

se migrující jádra dostávají do připojené buňky, kde splývají se stacionárním jádrem. Tím vzniká nový mikronukleus - synkaryon, diploiní jádro složené z haploidních jader konjugantů. Ze synkaryonu se postupně obnovuje původní sada mikro- a makronukleů a může docházet i k reorganizaci somatické a orální infraciliatury (Miyake 1996). Konjugace se nemusí uskutečňovat striktně jen v rámci jednoho syngenu (geneticky izolovaného druhu), ale i mezi některými odlišnými syngeny tak, jak je tomu například u morfologicky definovaného druhu *Paramecium caudatum* (Mulish 2003).

1.2. Klasifikace a taxonomicky významné znaky nálevníků

V současné době je systematické třídění nálevníků založeno na znacích somatické i orální infraciliatury. Systém vychází ze znaků v ultrastruktuře kortexu, zahrnuje ale také stomatogenezi a další podrobnosti morfogeneze, životní cykly, a pokud jsou známy, i molekulární charakteristiky (Hausmann a Hülsmann 2003b). V nové klasifikaci protistů, která zohlednila výsledky fylogenetických studií molekulárních dat, rozdělili Adl a kol. (2005) nálevníky na dvě velké skupiny, Postciliodesmatophora Gerassimova a Seravin, 1976 a Intramacronucleata Lynn, 1996. Mezi Postciliodesmatophora zařadili dva taxony, Karyoreclitea a Heterotrichea. Intramacronucleata rozdělili uvedení autoři na Spirotrichea, Armophorea, Litostomatea, Phyllopharyngea, Nassophorea, Colpodea, Prostomatea, Plagiopylea a Oligohymenophorea.

Při určování nálevníků, které vždy začíná studiem morfologických znaků nestačí charakteristiky vyšších taxonů uvedené v systému podle Adla a kol. (2005). Následující přehled hlavních taxonomických skupin nálevníků s popisem směřujícím k řádu Scuticociliatida vychází především z Hausmanna a Hülsmanna (2003b), částečně také z práce Lynna a Smalla (2000).

Nadtřída Postciliodesmatophora Gerassimova a Seravin, 1976

Společným znakem nálevníků této nadtržidy je stejný typ dikinetid. Kinetodesmální fibrily, které vycházejí jen od zadního kinetosomu dikinetidy, jsou většinou výrazné a táhnou se jako jednotlivé pruhy do přední a zčásti také do zadní části těla. Postciliární pásy mikrotubulů směřují dozadu a překrývají ty, které přicházejí z kinetosomů téže kinety umístěných vpředu. Spojené mikrotubulární svazky (postciliodesmy) jsou nejdůležitějším morfologickým znakem. Vedle dikinetid se vyskytují také řady s monokinetidami.

Parasomální váčky a také alveoly jsou někdy slabě vyvinuty. Nadtřída Postciliodesmatophora se dělí na dvě třídy - Karyorelictea Corliss, 1974 a Spirotrichea Bütschli, 1889.

Nadtřída Rhabdophora Small, 1976

Nadtřída zahrnuje nálevníky u kterých je somatická ciliatura tvořena monokinetidami. Dikinetidy jsou pouze v oblasti orálního otvoru a vznikají u nich nápadné příčné pásy mikrotubulů (nematodesmy). Rhabdophora se dělí na dvě třídy - Prostomatea Schewiakoff, 1896 a Listomatea Small a Lynn, 1981.

Nadtřída Cyrtophora Small, 1976

Nálevníci řazení do této nadtřídě mají různé somatické kinetidy. Jejich dikinetidy mají postciliární mikrotubuly, které se táhnou směrem k cytostomu. Nálevníci třídy Phyllopharyngea de Puytorac a kol., 1974 mají normální somatické monokinetidy. Dikinetidy převládají u třídy Colpodea Small a Lynn, 1981, charakteristické jsou i pro zástupce tříd Oligohymenophorea de Puytorac a kol., 1974 a Nassophorea Small a Lynn, 1981. Typickým znakem somatické ciliatury třídy Colpodea jsou spirálně vedené kinety. Dělení probíhá převážně uvnitř cyst. Pokud jde o tvar těla, jsou Colpodea poměrně homogenním taxonem, mají nejčastěji ledvinovitý tvar těla. Žijí převážně terestricky nebo ve sladkovodních biotopech, pouze několik druhů je mořských (Small a Lynn 1985). Pro třídu Nassophorea Small a Lynn, 1981 jsou typické příčné mikrotubulární pásy orientované tangenciálně ke kinetosomům, u dikinetid jsou však jen u předního kinetosomu. V oblasti orálního aparátu se nalézají několik nematodesmálních fibril, které vycházejí od kinetosomů orálního pole a od kinetosomů obklopujících cytofarynx. Nematodesmy někdy tvoří košíkovitý cyrtos. Třída Oligohymenophorea de Puytorac a kol., 1974 zahrnuje nejrozšířenější nálevníky a také nejlépe známé druhy. Je pro ně typická přítomnost obvykle 3 orálních polykinet, umístěných na levé straně ústního aparátu proti undulující membráně. Cytostom je umístěn na dně prohlubně ventrálního povrchu buňky. Na rozdíl od třídy Nassophorea neprobíhají příčné mikrotubuly od kinetosomů tangenciálně, ale radiálně. Životní cyklus se často vyznačuje polymorfii. Třída Oligohymenophorea se dále dělí na 4 podtřídy: Hymenostomatia Delage a Hérouard, 1896; Peritrichia Stein, 1859; Astomatia Schewiakoff, 1896 a Apostomatia Chatton a Lwoff, 1928.

Podtřída Hymenostomatia Delage a Hérouard, 1896

Typickou ciliaturu orálního aparátu podtřídy Hymenostomatia tvoří šikmo postavené membranely (většinou 3), utvářené jako polykinety na jedné (levé) straně a jedno- až třídílné parorální kinety (t.j., parorální/endorální membrány) složené z dikinetid, v nichž jen jeden kinetosom na pravé straně nese řasinku. Tělo je stejnoměrně kryto ciliemi. Patří sem dva řády: Hymenostomatida Delage a Hérouard, 1896 a Scuticociliatida Small, 1967.

Řád Hymenostomatida Delage a Hérouard, 1896

Mezi hlavní znaky řádu Hymenostomatida patří jednodílné parorální kinety a většinou monokinetidální somatická ciliatura. V životním cyklu jsou běžná polymorfická stádia.

Řád Scuticociliatida Small, 1967

Na rozdíl od řádu Hymenostomatida je pro řád Scuticociliatida typická somatická ciliatura složená z dikinetid a parorální membrána rozdělená na tři úseky. Při dělení, během stomatogeneze, se objevuje přechodné seskupení holých kinetosomů ve tvaru háku, zvané skutika. Leží u míst, kde se vytvoří zadní konec infraciliární báze parorální membrány.

Základní taxonomicky významné znaky nálevníků (tvar těla, způsob pohybu, přítomnost a orientačně i uspořádání cilií jsou sice pozorovatelné *in vivo*, zviditelnění většiny taxonomicky významných znaků (počet, velikost a umístění jader, infraciliatura, systém stříbřitelných linií, cytostom a orální polykinetidy) je ale vázáno na složitější metody pozorování, které jsou uvedeny v následujících oddílech.

1.3. Metody studia nálevníků

Podobně jako u ostatních skupin jednobuněčných organizmů, i u nálevníků závisel vývoj jejich poznání především na vývoji optického mikroskopu. Mnohem později byly znalosti doplňovány i využitím transmisní a skanovací elektronové mikroskopie. Na úrovni pozorování v optickém mikroskopu sehrály významnou úlohu metody, které usnadňovaly pozorování živých objektů a hlavně barvicí postupy, které zvýrazňovaly taxonomicky významné struktury nálevníků. Barvicími postupy se zabývala řada autorů, proto i literární údaje jsou velmi bohaté. Do současné doby přežilo jen omezené spektrum barvicích metod. Ty byly sumarizovány a kriticky zhodnoceny Foissnerem (1991), předním ciliatologem, jehož práce se mj. vyznačují mimořádnou dokonalostí dokumentace. Souhrn metod zařazený

do přehledu bakalářské práce vychází z Foissnerova přehledu. Základní metody jsou doplněny o některé postupy publikované po roce 1991.

1.3.1. Metody optické mikroskopie

Historicky původní a dosud běžný způsob pozorování nálevníků v optickém mikroskopu využívá procházející světlo. Právě způsobem průchodu světla optickou soustavou a preparátem lze značně ovlivnit výsledný obraz a tím i informaci, kterou pozorovateli přináší. Optické mikroskopy vybavené tzv. fázovým kontrastem (tj. speciálním objektivem a kondenzorem) umožnily fázovým posunem světla zvýšit kontrast pozorovaného objektu. S úspěchem se fázový kontrast využívá dosud u objektů, které nejsou příliš silné. Vznik nežádoucího efektu („hallo effect“) diskriminuje tento způsob pozorování a možnosti dokumentace ve srovnání s Nomarského diferenciálním interferenčním kontrastem (DIC). Nomarského DIC zkontrastňuje nebarvené objekty na základě rozdílů v indexech lomu světla procházejícího různými částmi objektu a vytváří tak částečně trojrozměrný obraz. Nevýhodou je snížená hloubka ostrosti. Optický mikroskop doplněný silným zdrojem světla a různými typy filtrů umístěnými mezi zdroj světla a objekt umožňuje detekci fluorofórů, látek, které jsou schopné absorbovat světlo určité vlnové délky a následně emitovat světlo o větší vlnové délce. Fluorescenční mikroskopie je dnes zejména u jednobuněčných organismů nejčastější metodou pro detekci specifických intracelulárních struktur.

Pozorování živých nálevníků v optickém mikroskopu je základní a zároveň nejstarší metodou jejich studia. Při pozorování a především při fotografování nálevníků za živa bývá největším problémem rychlost jejich pohybu. K imobilizaci nebo zpomalení pohybu nálevníků byla postupně doporučena řada chemických, fyzikálních, biologických, behaviorálních a imunologických metod. Chemické znehybnění nálevníků je možné pomocí některých solí. Pro sladkovodní nebo půdní nálevníky doporučuje Repak (1992) velmi nízkou koncentraci síranu nikelnatého (0,001-0,1%), pro mořské spíše chlorid hořečnatý v koncentraci dosahující až 7,5%. Další možnosti nabízejí nejrůznější fyzikální postupy, které způsobují zpomalení pohybu nálevníků například tlakem krycího skla, zvýšením viskozity média (přidáním methylcelulózy) nebo snížením teploty (Repak 1992). Proto, že většina z uvedených metod mění tvar buňky a ovlivňuje i vnitřní buněčné struktury nálevníků, využívá Foissner (1991) tlaku krycího skla jen částečně a zmírňuje tlak malým množstvím vazelíny, kterou umísťuje mezi podložní a krycí sklo preparátu. Pro pozorování doporučuje

využívat Nomarského diferenciální interferenční kontrast (DIC), pokud není dostupný, lze pozorovat pouze v procházejícím světle, případně použít (pro velmi ploché druhy) fázový kontrast.

Přestože bylo popsáno mnoho barvicích postupů pro nálevníky, většina starších, např. barvení hematoxylinem, byla vytlačena technikami založenými na impregnaci stříbrem. V současné době se z tradičních metod využívají u některých skupin nálevníků pouze Feulgenova reakce a supravitální barvení methylovou zelení a pyroninem. Feulgenova reakce, kterou velmi podrobně popsali např. Lee a kol. (1985) barví specificky DNA, proto znázorňuje jádra (makronukleus i mikronukleus). Ve většině případů její použití není nutné, protože jádra jsou velmi dobře patrná i při barvení protargolem. Využití Feulgenovy reakce má smysl hlavně u druhů s velkým počtem mikronukleů. Protargol není selektivní barvicí postup pro DNA a mikronukleus proto může být snadno zaměněn s jinou, podobně velkou částicí v cytoplazmě. Supravitální barvení methylovou zelení a pyroninem je velmi vhodné pro odhalení mukocyst. Výsledky tohoto barvení jsou mnohem lepší v nativních preparátech než při použití protargolu.

Tzv. stříbření nebo „barvení stříbrem“, které patří k základním metodám studia nálevníků spočívá ve vysrážení solí nebo proteinátu stříbra na infraciliatuře a systému stříbřitelných linií. Využívá se od roku 1843 pro různé účely, zejména v histologii pro specifická barvení nervového systému (Jones 1973). V ciliatologii se sloučeniny stříbra začaly používat v první polovině 20. století. Zavedení metod založených na „stříbření“ bylo silným impulzem pro rozvoj oboru a způsobilo ohromný nárůst nově popsaných druhů nálevníků (Aescht 2001). Všechny metody barvení stříbrem mají schopnost obarvit nejméně bazální tělíska řasinek nálevníků, liší se však použitými sloučeninami stříbra (dusičnan stříbrný, uhličitán stříbrný, proteinát stříbra/protargol), některými kroky postupu barvení a zejména výsledky (spektrem obarvených struktur).

Pro metodu suché impregnace dusičnanem stříbrným se používá často také název barvení podle Kleina. Podle původního popisu (Klein 1926) jde o velmi jednoduchou a časově nenáročnou metodu, která se skládá pouze z několika kroků. Nálevníci se nefixují, nechají se přischnout k podložnímu sklu. Takto připravená skla se ponoří do vodného roztoku dusičnanu stříbrného a poté se nechá stříbro redukovat působením denního světla. Postupně bylo vyvinuto několik variant Kleinovy metody. Základní význam má tato metoda pro determinaci kruhobrvých nálevníků čeledi Urceolaridae, u nichž se používá pro znázornění stavby adhezivního disku. Foissner (1991) modifikoval tuto metodu pro další skupiny nálevníků, které přichytává k podložnímu sklu na vrstvu vaječného albuminu, stříbro redukuje pomocí

40W žárovky a navíc používá složitou vývojku. Hlavní předností této metody je vyloučení chemické fixace. Pomocí tohoto postupu lze velmi dobře odhalit systém stříbřitelných linií a v některých případech i orální a somatickou infraciliaturu. Ve srovnání s ostatními metodami je velkou výhodou časová nenáročnost celého postupu, vyschnutí však může způsobit zborcení buňky a ztrátu informace o tvaru těla nálevníka. U mořských nálevníků pak přistupuje ještě další problém. Nefixované mořské nálevníky nelze před přischnutím na sklo dostatečně zbavit solí z mořské vody, především Cl^- , které reagují s AgNO_3 za vzniku bílé sraženiny (AgCl). Redukce stříbra a následné obarvení nálevníků je tím znemožněno.

Další metoda založená na dusičnanu stříbrném je podle autorů nazývána metodou Chatton-Lwoff nebo podle postupu jako „vlhká“ impregnace dusičnanu stříbrného, protože je používána pro chemicky fixované nálevníky. K fixaci se používají nejčastěji dva roztoky označované rovněž jmény autorů (Champy, Da Fano). Nálevníci se k podložnímu sklu přichytávají pomocí želatiny. Všechny roztoky, které se při barvení používají následně po rozetření nálevníků na podložní sklo, musí být ochlazené ($\sim 5^\circ\text{C}$), jinak by způsobily odlepení želatiny. Pro redukci stříbra je doporučována UV lampa ($< 254 \text{ nm}$), která minimalizuje současné IR záření. Nahřívání preprátů může způsobit narušení želatinové vrstvy (Roberts a Causton 1988). Metoda velmi dobře barví somatickou a orální infraciliaturu. Podle Foissnera (1991) tato metoda relativně slabě barví systém stříbřitelných linií.

Metoda impregnace uhličitanem stříbrným byla popsána pro chemicky fixované nálevníky (Fernandez-Galiano 1976). Jako fixáz se používá formaldehyd, jeho doporučená koncentrace se v modifikacích jednotlivých autorů liší. Důležitou součástí barvicího roztoku je kromě uhličitanu stříbrného také pyridin. Stříbro se z roztoku redukuje teplem (všemi autory je doporučována teplota 60°C). Tato metoda dokáže dobře odhalit infraciliaturu, kortikální a cytoplazmatické struktury (především jádra a kinetodesmální fibrily). Systém stříbřitelných linií zůstává ve většině případech neobarvený. Výsledky „barvení“ uhličitanem stříbrným jsou podle studie Ma a kol. (2003) podobné jako při barvení protargolem, postup barvení protargolem je ale časově mnohem náročnější a výsledky obtížněji reprodukovatelné. Hlavní nevýhodou této metody je, že v trvalých preparátech se intenzita zbarvení rychle snižuje. Foissner (1991) proto doporučuje dokumentovat výsledky barvení okamžitě a nezabývat se přípravou trvalých preparátů.

Techniku barvení proteinátem stříbra (protargolem) popsal Bodian (1936). Stejně jako u postupů využívajících dusičnan stříbrný jde o metodu, která byla původně navržena pro barvení nervové tkáně v histologických řezech. K fixaci nálevníků jsou nejčastěji doporučovány tekutiny nazvané podle autorů receptů, Bouina a Stievena. Bouinova tekutina

obsahuje ledovou kyselinu octovou, koncentrovaný formaldehyd a nasycený roztok kyseliny pikrové v poměru 1:5:15. Stievenova tekutina se skládá ze 3 ml ledové kyseliny octové, 10 ml koncentrovaného formaldehydu a 38 ml nasyceného roztoku chloridu rtuťnatého. Stříbro je z roztoku protargolu redukováno buď čistou mědí, v postupu, který publikoval Lee a kol. (1985) nebo teplem, v časově méně náročném postupu podle Foissnera (1991). Ve většině modifikací je zařazeno bělení v manganistanu draselném následované ponořením do roztoku kyseliny šřavelové (např. Lee a kol. 1985, Foissner 1991). Naopak Silva-Neto (2000) tento krok zcela vypouští. Další možností je tónování v roztoku chloridu zlatitého (Honigberg 1973, Lee a kol. 1985), které následuje po vyjmutí z vývojky. Výsledky barvení jsou obdobné jako u metody impregnace uhličitanem stříbrným. Protargolová metoda však lépe zachovává tvar nálevníka, barví i cilie a mnoho kortikálních a vnitřních struktur. Další velkou výhodou je, že na rozdíl od metody založené na uhličitanu stříbrném, lze připravit i trvalé preparáty obarvených nálevníků. Velkou nevýhodou je časová náročnost. Celý postup podle Lee a kol. (1985) trvá 2 dny.

Z recentně publikovaných metod je třeba uvést především metodu založenou na použití fluoroforu flutax-1 (Arregui a kol. 2002). Uvedený fluorofor (Calbiochem, cat. n. 344082) se specificky váže na mikrotubuly, je proto možné vizualizovat orální a somatické kinetidy. Vlastní metoda je prezentována jako velmi jednoduchá. Do kultury nálevníků (bez nutnosti předchozí fixace) se přidává flutax-1 tak, aby bylo dosaženo 1–10 μM koncentrace. Slábnutí fluorescenčního signálu brání autoři pomocí Citifluor Mounting Media (Pelco Intern'tl Microscopy Mart, USA). Autoři citované publikace vyzkoušeli Flutax-1 na 8 druzích nálevníků z kultur, včetně jednoho mořského druhu (*Euplotes focardii*). Z dokumentace je zjevné, že zvýšené množství solí neovlivnilo výsledky. Pro pozorování nálevníků použili uvedení autoři epifluorescenční mikroskop Zeiss. Pořízená dokumentace je velmi atraktivní, působí trojrozměrným dojmem, v práci ale chybí informace o pořízení základních dat a jejich (zřejmě počítačovým) zpracování.

1.3.2. Metody elektronové mikroskopie

Elektronový mikroskop je obdobou optického mikroskopu, kde jsou fotony nahrazeny elektrony a optické čočky elektromagnetickými čočkami, což je vlastně vhodně tvarované magnetické pole. Využívá se toho, že vlnové délky urychlených elektronů jsou o mnoho řádů menší než u fotonů viditelného světla. Proto má elektronový mikroskop mnohem vyšší

rozlišovací schopnost a může tak dosáhnout mnohem vyššího zvětšení (až 1 000 000×). Existují dva základní typy elektronových mikroskopů. Transmisní elektronový mikroskop (TEM) využívá nepohyblivý elektronový svazek, detekuje elektrony prošlé vzorkem na fluorescenčním stínítku nebo detektorem. Skanovací elektronový mikroskop (SEM) využívá pohyblivý svazek elektronů. Povrchu vzorku zobrazuje pomocí sekundárních elektronů a odražených elektronů.

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM) je metodou používanou pro studium ultrastruktury nálevníků. Její velkou předností je velké rozlišení (až 0,2 nm). Příprava vzorků pro TEM je poměrně složitá a náročná na kvalitu fixace. K fixaci se používá zpravidla glutaraldehyd doplněný o oxid osmičelý, další možností je mrazová fixace. Následuje odvodnění, zalití do pryskyřice a ultratenké krájení bločků. Pro každý z těchto kroků můžeme zvolit postup z velké škály modifikací (Dykstra 1993).

Stejně jako u ostatních jednobuněčných organismů, objevily se již v počátcích rozvoje řádkovací elektronové mikroskopie pokusy o trojrozměrnou dokumentaci nálevníků (Paulin 1992a). Teprve zdokonalení fixačních postupů vhodných pro jednotlivé skupiny nálevníků umocnilo význam skanovací elektronové mikroskopie (SEM) pro studium nálevníků. V dnešní době nabízí SEM trojrozměrný pohled na nálevníka a znaky viditelné na povrchu v mnohem větším rozlišení než u jiných metod. Příprava nálevníků pro pozorování v SEM zahrnuje několik kroků naprosto odlišných od metod využívaných pro optickou mikroskopii. Je nutné použít jiná fixační činidla. Velká pozornost musí být věnována „očišťení“ cílů nálevníků. Stejně důležité je dokonalé odvodnění vzorku, jeho vysušení metodou kritického bodu a následné pokovení. Vzhledem k tomu, že SEM může ukázat pouze omezené množství znaků, určení nálevníků nemůže být založeno jen na použití této metody.

1.3.3. Kultivace nálevníků

Kultivace má pro studium nálevníků mimořádný význam. Pokud se daří, zaručí stabilní zdroj studovaných nálevníků a možnost opakovaného pozorování. Získání kultury nálevníků zahrnuje několik kroků. Nejprve je nutné nálevníky izolovat. Primární izolací je například u histofágických nálevníků míněno přenesení z tkáně hostitele do vhodného kultivačního média. Existuje velké množství nejrůznějších receptů pro přípravu kultivačních médií pro nálevníky (např. Lee a kol. 1985, Nerad a Daggett 1992, Catalogue of the UK National Culture Collection – List of Algae and Protozoa – UKNCC). Úspěch kultivace obvykle závisí i na

eliminaci dalších organismů kontaminujících žádanou populaci buněk. Pro některé účely je nezbytné získat klonovaný materiál (např. podle Soldo 1992). Pro řadu druhů (např. *Ichthyophthirius multifiliis*) zatím není známý postup, jak tyto nálevníky izolovat a dlouhodobě úspěšně kultivovat (Lom a Dyková 1992).

1.4. Nálevníci cizopasíci u ryb

Nálevníci zaujímají ve vztahu k rybám několik životních strategií. Podle nich se dělí na obligátní parazity (např. *Ichthyophthirius multifiliis*), ektokomenzály, kteří využívají svého hostitele jen jako výhodného podkladu (např. *Apiosoma* spp.) a na skupinu, která může strategie střídat (kruhobrví nálevníci čeledi Urceolaridae, např. *Trichodina* spp.) (Lom a Dyková 1992).

Kožovec rybí (*Ichthyophthirius multifiliis*) působí závažné onemocnění sladkovodních ryb zejména v akvakulturách. Kožovec má polymorfní životní cyklus. Pohyblivá stadia (teronti) vznikají z intenzivně se dělících tomontů. Teront aktivě vyhledává hostitele, proniká do tkáně kůže či žaber a mění se v trofické stadium. Trofont přijímá potravu, rozrušuje tkáně napadené kůže či žaber. Po dosažení určité velikosti se trofont uvolňuje z tkáně ryby, přestává přijímat potravu a začíná se intenzivně dělit (vzniká tomont s tomity). Celý cyklus se opakuje, jeho délka závisí především na teplotě. Analogií sladkovodního kožovce je v mořském prostředí *Cryptocaryon irritans*. U volně žijících ryb se vyskytuje poměrně vzácně, ale pro ryby mořských akvárií a akvakultur je nebezpečným patogenem (Lom 2005).

Rod *Chilodonella* zahrnuje množství volně žijících druhů a dva parazitující na rybách (*Chilodonella piscicola*, *Ch. hexasticha*). Oba druhy jsou kosmopolitně rozšířené a hostitelsky nespecifické. Mohou se vyskytovat i v brakických vodách (Basson a Van As 2006).

Chilodonella má vysunovatelný ústní aparát, kterým je schopná rozrušovat povrchové buňky kůže a žaber hostitele. *Brooklynella hostilis* je druh známý především z mořských akvárií a akvakultur. *Brooklynella hostilis* napadá stejně jako *Chilodonella* epitel žaber a epidermis oslabených ryb (např. v mořských akváriích).

Kruhobrví nálevníci čeledi Urceolaridae, jejichž nejznámější zástupci patří do rodu *Trichodina*, stojí na přechodu dvou různých strategií ve vztahu k rybám. Dokud je ryba zdravá a repelentní schopnost slizu na její kůži dostatečná, využívají ji trichodiny pouze jako podkladu a potravu získávají z okolní vody. Jestliže je však ryba oslabená, mohou se na ní tito

nálevníci masově namnožit a značně poškozovat povrch těla nebo žábry. V tomto případě již nejde o ektokomenzály, ale o ektoparazity.

Rod *Balantidium* je běžným endokomenzálem ve střevě některých druhů ryb. Například *Balantidium ctenopharyngodoni* je endokomenzálem amura bílého (*Ctenopharyngodon idella*) se kterým se dostalo i do Evropy. *Balantidium* se však může stát histofágem, který proniká do stěny střevní a živí se tkání hostitele. Okolnosti této přeměny nejsou známe, změnu z neškodného endokomenzála na histofága může způsobit nedostatek škrobu v potravě hostitele (Basson a Van As 2006).

Symforiontí kruhobrví nálevníci, mezi které patří např. rody *Apiosoma*, *Ambiphrya* nebo *Epistylis*, jsou ve vztahu k rybám obligátními ektokomenzály. Živí se především bakteriemi z okolní vody. Jsou přichycení ke svému hostiteli a nechávají se jím pouze pasivně přenášet.

1.5. Histofágní nálevníci cizopasíci u ryb

Histofágní nálevníci představují skupinu zpravidla fakultativních parazitů ryb. Za normálních okolností se živí spíše jako komenzálové na povrchu ryb. Z povrchu těla ryb mohou pronikat do organismu a živit se tkáněmi.

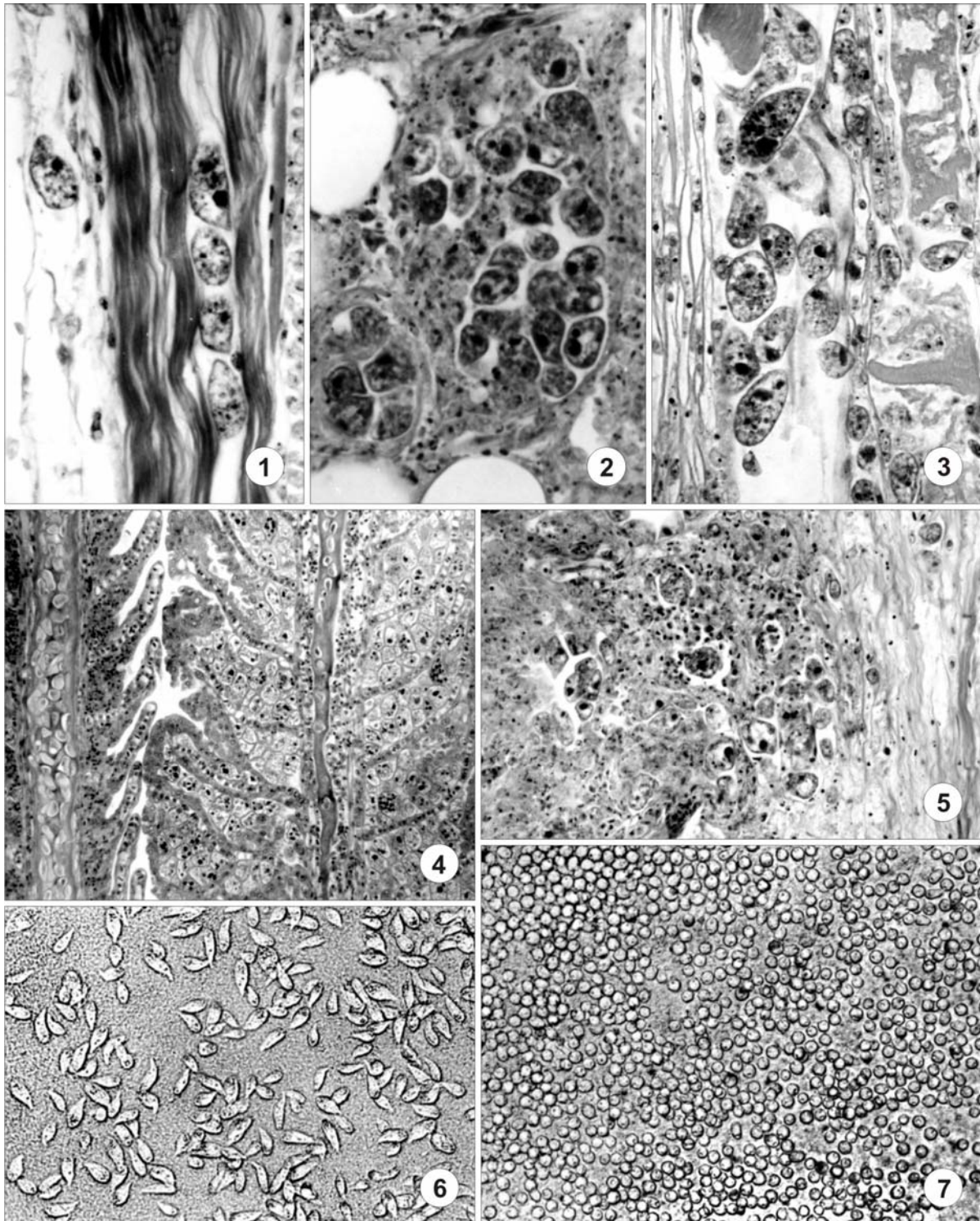
Jako příklad sladkovodního histofágního nálevníka bývá nejčastěji uváděná *Tetrahymena*. Rod *Tetrahymena* zahrnuje především volně žijící saprozoické nálevníky. Existuje však mnoho záznamů o napadení ryb nálevníky tohoto rodu. Přesné druhové určení většinou neexistuje nebo je nejisté (Lom a Dyková 1992). Jako histofágní druhy bývají nejčastěji uváděny *T. corlissi* a *T. pyriformis*. *Tetrahymena corlissi* je zřejmě i parazitem obojživelníků. Napadení sladkovodních ryb bývá často pro hostitele fatální (Lom a Dyková 1992). *T. corlissi* nenapadá pouze povrchové tkáně, ale stejně jako ostatní druhy (*T. pyriformis*, ale i *T. rostrata*, *T. faurei*) byla již zaznamenána v nejrůznějších vnitřních orgánech.

V mořských akváriích a akvakulturách, mohou značné škody působit fakultativně parazitičtí zástupci podtřídy Scuticociliatida. V literatuře jsou nejčastěji uváděni histofágní druhy *Miamiensis avidus* (Lom a Dyková 1992), *Philasterides dicentrarchi* (Iglesias a kol. 2001), *Uronema marinum* (Jee a kol. 2001), *U. nigricans* (Munday a kol. 1997) a *Pseudocohnilembus persalinus* (Kim a kol. 2004). První dva jmenované druhy jsou v současné době považovány za totožné, přičemž *Philasterides dicentrarchi*, Dragesco a kol. 1995 je mladším synonymem pro *Miamiensis avidus*, Thompson a Moewus 1964 (Paramá a kol. 2005, Jung a kol. 2007). Ačkoliv byl *Miamiensis avidus* zaznamenán jako rybí histofág

pouze jedenkrát (Lom a Dyková 1992), přičtením nákaz přisuzovaných druhu *Philasterides dicentrarchi* množství zaznamenaných případů značně narůstá. *Miamiensis avidus* se tak významem řadí k druhu *U. marinum*, která bývá označována za mořskou obdobu sladkovodních druhů rodu *Tetrahymena*. Pro oba nálevníky jsou typické těžké infekce ryb ve stresujícím prostředí (mořská akvária, akvakultury). Pronikají přes kůži do vnitřních orgánů a svaloviny. Napadený hostitel hyne během relativně krátké doby (Lom a Dyková 1992). Obdobné projevy byly zaznamenány i u méně často uváděných histofágických druhů - *Uronema nigricans* (Munday a kol. 1997) a *Pseudocohnilembus persalinus* (Kim a kol 2004b).

2. Cíl práce

Cíl práce, t.j., **charakterizovat nálevníky, kteří byli izolováni z žaber mořských ryb spolu s amfizoickými amébami** byl motivován výsledky předchozích histologických vyšetření, která v několika případech prokázala histofágní nálevníky v interlamelárním epitelu žaber u ryb s klinicky i histologicky prokázaným amébovým onemocněním žaber (Tab. I, obr. 1–5). Při pokusech izolovat amfizoické améby, původce AGD, byli opakovaně (nikoliv však pravidelně) izolováni také nálevníci.



Tabule I. Obr. 1–5. Patogenita histofágních nálevníků (Scuticociliatida) demonstrována změnami ve tkáních *Psetta maxima* (Linnaeus, 1758). 1. Nálevníci v intersticiu svalové tkáně. H&E, $\times 400$. 2. Shluk nálevníků v podkožní pojivové tkáni. H&E, $\times 400$. 3. Nálevníci v dystroficky změněné svalovině. H&E, $\times 500$. 4, 5. Masivní infekce nálevníků v žábřácích (H&E, $\times 200$) a v subepiteliální tkáni zaživacího traktu (H&E, $\times 380$). **Obr. 6, 7.** Primární izolace nálevníků z rozkládajících se vzorků tkáně žaber. 6. Trofická stadia namnožená ve vzorku tkáně umístěné v Petriho misce na nevýživném agaru. $\times 100$. 7. Cysty identického primárního izolátu v rozkládající se tkáni, která na agaru postupně vysychala. $\times 100$.

3. Materiál

Pro bakalářskou práci byly vybrány 3 kmeny nálevníků izolované z žaberní tkáně mořských ryb v průběhu studia amfizoických améb infikujících ryby (**CIRL**, **CMEX** a **CESP**). Vzhledem k tomu, že předběžná pozorování naznačila, že jeden z izolovaných kmenů by mohl patřit do rodu *Cohnilembus* Kahl, 1933, byl pro srovnání získán kmen *Cohnilembus reniformis* (CCAP 1610/1) z anglické sbírky řas a protozoí (UK National Culture Collection, UKNCC).

Kmen CESP

Izolace: 1996, (klon odvozen v r. 2004)

Hostitel/orgán: *Psetta maxima* (Linnaeus, 1758); žábry

Lokalita: průmyslová farma u severovýchodního pobřeží Španělska (Atlantický oceán)

Pozn.: z téhož vzorku žaberní tkáně byly izolovány amfizoické améby zařazené do rodu *Neoparamoeba* Page, 1987

Kmen CIRL

Izolace: 2003, (klon odvozen v r. 2004)

Hostitel/orgán: *Salmo salar* Linnaeus, 1758; žábry

Lokalita: intenzivní chov při pobřeží Irska (Atlantický oceán)

Pozn.: z téhož vzorku tkáně byly izolovány amfizoické améby rodu *Platyamoeba* Page, 1969

Kmen CMEX

Izolace: 2000 (klon odvozen v r. 2004)

Hostitel/orgán: *Balistes polylepis* Steindachner, 1896; žábry

Lokalita: Golfo de California, Mazatlán, Mexico (Tichý oceán)

Pozn.: z téhož vzorku žaberní tkáně byly izolovány amfizoické améby zařazené do čeledi Vannellidae Page, 1987 a minuciózní améboidní organismy předběžně zařazené do rodu *Acrasis* Van Tieghem, 1880.

CCAP 1610/1

Izolace: datum izolace není v katalogu UKNCC uvedeno, (série klonů odvozena v průběhu přípravy bakalářské práce)

Původ: mořský kmen izoloval podle katalogu ciliatolog E. B. Small. Bližší údaje chybí.

Původní sbírkové kultivační medium: ASWP (Artificial Seawater for Protozoa). Složení media je uvedeno v katalogu UKNCC; od 11. pasáže kultivován ve stejném mediu jako ostatní kmeny mořských nálevníků (MY75S).

4. Použité metody

4.1. Kultivace studovaných kmenů nálevníků

Tři primární izoláty nálevníků byly získány při pokusech o izolování amfizoických améb z žaberní tkáně mořských ryb. Pro primární izolace améb byly připraveny Petriho misky s nevýživným, 2,5% agarem (Bactoagar Difco, 75% mořská voda). Vzorky žaber sterilně odebrané z ryb a umístěné na povrch agarů se postupně rozkládaly a uvolňovaly se z nich amfizoické améby. Zatímco množící se améby migrovaly po povrchu agarů směrem od rozkládajících se vzorků tkání k periférii misky, ve vlhké rozkládající se žaberní tkáni se v pozitivních případech množili nálevníci (Tab. I, obr. 6, 7). Koncentrované nálevníky bylo možné přenést do 75% mořské vody obohacené o maltózový a kvasnicový extrakt (MY75S medium podle katalogu UKNCC), zahájit jejich kultivaci a později odvodit klony.

Klonování jsem prováděl tak, že jsem kulturu nálevníků postupně ředil médii tak dlouho, až byl v jedné kapce nalezen při kontrole pod mikroskopem pouze jeden nálevník. Jednoho nálevníka jsem v kapce média přenesl do kultivační jamky plastového panelu do níž jsem napipetoval 1 ml média MY75S. V pravidelných intervalech jsem kontroloval množení nálevníků. Ze získaných klonů jsem pro další kultivaci vybíral ten, který se v daném časovém intervalu namnožil nejvíce. Vybraný klon byl dále kultivován ve větších objemech, obvykle v 50 ml kultivačních nádobách (Falcon) při použití 5 ml čerstvého kultivačního média a 2 ml média s nálevníky z předchozí pasáže. Při kultivaci i klonování jsem dodržoval sterilní postupy práce, abych zabránil kontaminaci houbovými organismy a omezil množení bakterií (původem z primárních izolátů). Rizikovou částí celého postupu byla kontrola přítomnosti jednoho nálevníka v kapce média, která vzhledem k velikosti klonovaných nálevníků a hloubce kultivačních jamek byla prováděna pod mikroskopem. Axenizace nebyla cílem kultivačních postupů. Bakterie byly součástí potravy nálevníků.

Při volbě kultivačních postupů se vycházelo z předpokladu, že nálevníci mohou být histofágní (primárně se namnožili na agaru především v rozkládající se tkáni žaber ryb, minimálně v nárůstu bakterií). Z tohoto důvodu se do kultivačního média přidávala autoklávovaná tkáň žaber (nejčastěji ze zlatých karasů) nebo suspenze EPC buněk (původem z epithelioma papulosum cyprini) z kultury pravidelně pasážované v laboratoři. Buněčnou kulturu jsem preferoval, protože zajišťovala dobré namnožení nálevníků s mnohem větší pravděpodobností než přidavek tkáně žaber. V případě použití žaber bylo velmi důležité

nepřehnat jejich přidávané množství. V opačném případě bylo nutné kulturu každodenně kontrolovat a pasážovat dříve než bylo obvyklé, protože její stav se rychle měnil.

Kulturu *Cohnilembus reniformis* (CCAP 1610/1) nám z anglické sbírky (UKNCC) zaslali v médiu ASWP (složení viz katalog UKNCC). Po odvození prvních klonů (po 10. pasáži) jsem začal nálevníky kultivovat v médiu MY75S, aniž bych zaznamenal jakoukoliv viditelnou změnu ve stavu kultury. Ačkoliv jsem neměl důvod předpokládat, že by *Cohnilembus reniformis* mohl být histofágní, pasážoval jsem jej příležitostně také s použitím buněčné kultury EPC jako zdroje potravy. Nálevníci pak rostli výrazně lépe, čehož jsem využíval zejména před plánovaným barvením nebo přípravou preparátů pro SEM.

Všechny kmeny nálevníků jsem udržoval v inkubátoru při teplotě 20°C a pasážoval alespoň jednou týdně. Jednotlivé kmeny se lišily v rychlosti optimálního namnožení. Zejména při přípravě preparátů pro SEM bylo nutné použít kulturu v optimálním stavu (tj. co nejvíce životaschopných nálevníků na objem). Kmen CESP bylo většinou možné fixovat pro SEM již 2. den po pasážování, kmeny CIRL a CMEX 3–4. den, CCAP obvykle 5. den. Množení nálevníků v kulturách neprobíhalo zcela standardně, několikrát bylo nutné zvýšit počet pasáží na 2–3 týdně, abych kulturu udržel v dobrém stavu.

4.2. Pozorování živých nálevníků

Ve snaze pořídit kvalitní snímky živých nálevníků jsem vyzkoušel několik metod, které měly zajistit zpomalení jejich pohybu. Nálevníci všech 4 kmenů jsou aktivní, takže objektivem 100× je nebylo možné zachytit. Nejprve jsem zkoušel nálevníky zpomalit síranem nikelnatým (Packroff a kol. 2002) v koncentracích od 0,001% – 0,5%. Efekt nebyl výrazný a navíc jsem musel použít vyšší koncentrace síranu nikelnatého, což zjevně měnilo tvar nálevníků. Další zkoušenou metodou bylo zvýšení viskozity média přidáním methylcelulózy (Repak 1992). Do media jsem postupně přidával 1,5% zásobní roztok až konečné koncentrace methylcelulózy dosahovaly 0,3% – 0,6%. Methylcelulóza velmi dobře zpomalovala kmeny CMEX a CCAP, a neměla viditelný vliv na jejich tvar. Kmeny CESP a CIRL byly na použití methylcelulózy výrazně citlivější, jejich buňky se velmi rychle bortily i při použití nižší koncentrace (0,3%). Hledal jsem proto metodu, kterou bych mohl použít u všech kmenů a získat tak rovnocenné snímky živých nálevníků. Chlorid hořečnatý, doporučovaný pro mořská protozoa až v 7,5% koncentraci (Repak 1992), se u našich kmenů nálevníků

neosvědčil. V rozmezí od 0,5% – 4% jsem nenašel takovou koncentraci, která by nálevníky znehybnila a přitom nezměnila jejich tvar.

4.3. Fotografování fixovaných nálevníků

Obtíže spojené s dokumentací živých nálevníků a neuspokojivé výsledky mne přiměly k ověření možnosti fotografovat nálevníky bezprostředně po jejich fixaci. K fixaci nálevníků jsem použil stejně jako Esteban a kol. (2001) oxid osmičelý v koncentraci 0,5%. Nafixované nálevníky bylo možné fotografovat při největším zvětšení optického mikroskopu a zařazení Nomarského diferenciálního interferenčního kontrastu.

4.4. Použité postupy barvení nálevníků

4.4.1. Impregnace stříbrem podle Kleina

Při přípravě preparátů touto metodou jsem nejprve postupoval podle původního popisu (Klein 1926) s jedinou změnou. Místo přímého světla jsem používal UV lampu. Vzdálenost UV lampy jsem neměnil, jen jsem prodlužoval dobu osvitů (od 30 min – 90 min). Tento postup se ale neosvědčil. Na podložním skle jsem nikdy neměl dostatečný počet přischnutých nálevníků a navíc se mi je nedařilo obarvit. Vyzkoušel jsem tedy postup navržený Foissnerem (1991). Při dodržení jeho postupu se dařilo udržet na podložním skle větší množství nálevníků (používá se vaječný albumin). Potíže působila přítomnost mořských solí. Ačkoliv jsem se pokoušel přischnuté nálevníky opakovanými koupelemi v destilované vodě promývat, výsledky se nezlepšily, většinou se narušila vrstva albuminu a s ní zmizeli i přichycení nálevníci. Pokud se obarvení podařilo, bylo velmi nevýrazné a vždy bylo možné najít na podložním skle bílé krystaly chloridu stříbrného. Jediný způsob, kterým se mi podařilo zbavit se mořských solí, byla fixace nálevníků. Použil jsem 4% roztok formaldehydu a fixované nálevníky jsem následně 3× promyl destilovanou vodou a koncentroval centrifugací. Výsledek byl zřetelně lepší. Fixace navíc zachovala i tvar těla nálevníků.

4.4.2. Metoda impregnace uhličitanem stříbrným

Impregnace uhličitanem stříbrným byla první metodou, kterou jsem zkoušel nálevníky obarvit. Nejprve jsem postupoval podle metody Ma a kol. (2003), která pro mořské nálevníky

slibovala velmi dobré výsledky. Ačkoliv byly mé pokusy zpočátku jistě zatížené množstvím chyb, k očekávanému výsledku jsem se nedopracoval ani po mnoha přesných opakováních popsaného postupu. Výsledek byl vždy stejný, nálevníci byly přebarveni tak, že nešlo rozlišit žádné detaily. Proto jsem zkoušel snižovat množství roztoku s obsahem uhličitanu stříbrného a měnit poměry pyridinu, uhličitanu stříbrného a formaldehydu. Ani tyto modifikace nepřinesly uspokojivé, s publikací srovnatelné výsledky. Nálevníci byli buď přebarveni, nebo se neobarvili vůbec. Začal jsem tedy zkoušet metodu, kterou popsal Fernandez-Galiano (1976). Metoda nebyla vypracována původně pro mořské nálevníky, proto neřešila zvýšenou přítomnost Cl^- v barveném materiálu. Fixace na rozdíl od předchozí metody nebyla rozdělena do dvou kroků, a množství fixáže nebylo podle popisu stanoveno jednoznačně (na 5ml bohaté kultury nálevníků 3 kapky koncentrovaného formaldehydu). Formaldehyd není v metodě impregnace uhličitanem stříbrným pouze fixačním činidlem, ale účastní se také vlastní impregnace. Jeho poměr k uhličitanu stříbrnému a pyridinu je zásadní. Oproti původnímu postupu fixace jsem přidával formaldehyd ještě jednou, po předchozím vymytí solí. Tímto způsobem modifikovaná původní metoda (Fernandez-Galiano) se příliš neliší od metody popsané Ma a kol (2003). Žádný z mých pokusů, které měnily poměr jednotlivých složek postupu nepřinesly radikální zlepšení výsledků. Proto jsem ještě vyzkoušel další modifikaci metody impregnace uhličitanem stříbrným, tj. postup popsaný Foissnerem (1991). Postupy popsané Foissnerem se vyznačují tím, že poukazují na kroky, ve kterých je vhodné manipulovat s množstvím přidávaných chemikálií. Přes veškeré pokusy s doporučeným obměňováním jednotlivých složek postupu, jsem nebyl úspěšný, podařilo se mi obarvit pouze jádra nálevníků.

4.4.3. Metody impregnace protargolem

Protože zkoušené metody impregnace uhličitanem stříbrným neposkytly potřebné informace o infraciliatuře nálevníků, začal jsem zkoušet impregnaci protargolem. Podle Foissnera (1991) je technika barvení proteinátem stříbra alternativou k metodě využívající uhličitanu stříbrného. Vyzkoušel jsem dva postupy. Pro oba je velmi důležité použít vhodný protargol. Proteinát stříbra (protargol) je sice možné získat od více výrobců, pro barvení se jich hodí ale pouze několik. Pro obě modifikace jsem používal stejný protargol (Albunosesilber für Mikroskopie - Merck, kat. n. 107447). Zásadní vliv na kvalitu obarvení mělo stáří protargolu. Nejdříve jsem používal protargol ze starších zásob. Infraciliatura byla

impregnována podstatně slaběji, než při použití nově zakoupeného protargolu od stejného výrobce.

Postup podle Foissnera (1991)

V modifikaci metody podle Foissnera (1991) jsem vycházel přesně podle jeho postupu. Ze dvou uvedených možných fixází jsem používal Bouinovu tekutinu. Stievenova tekutina přinášela ale velmi podobné výsledky.

Postup podle Lee a kol. (1985)

Základní metodu, kterou popsali Lee a kol. (1985) jsem použil v modifikaci podle Howarda a kol. (2004). Nálevníky jsem předfixoval 1G4F roztokem, který se skládá z glutaraldehydu a pufovaného koncentrovaného formaldehydu v poměru 1:4. Nafixované nálevníky jsem přichytil na podložní skla pokrytá polylysinem a znovu fixoval, tentokrát Bouinovou tekutinou. V jiných částech se postup od původní metody podle Lee a spol. (1985) nelišil. Metoda nepřinesla očekávané výsledky. Po opakovaných pokusech jsem od této metody ustoupil, hlavně proto, že časově mnohem méně náročná metoda podle Foissnera (1991) přinášela výrazně lepší výsledky.

4.4.4. Fluorescenční barvení nálevníků flutaxem

Při barvení nálevníků flutaxem jsem postupoval podle postupu uvedeném v Arregui a kol. (2002). Podařilo se získat Flutax-1 (Calbiochem, kat. n. 344082) totožný s tím, který použili citovaní autoři. Nálevníky jsem narozdíl od autorů původní metody fixoval 4% formaldehydem. Modifikoval jsem také montování preparátů. Citifluor Mounting Media (Pelco Intern'tl Microscopy Mart, USA) jsem nahradil médiem namíchaným podle Trauta a kol. (1999). Nálevníky jsem k podložnímu sklu přichytil pomocí vrstvy polylysinu. Při prohlížení prvních preparátů se ukázalo, že pozadí (vrstva polylysinu na podložním skle) nesvítilo. Usoudil jsem, že zvolený způsob přichycení nálevníků neovlivňoval výsledek. Přesto nebyly na nálevnicích rozlišitelné žádné struktury a ani opakované pokusy s různými koncentracemi flutaxu nepřinesly výsledky prezentované v práci Arregui a kol. (2002).

4.5. Skanovací elektronová mikroskopie

Při přípravě preparátů pro SEM jsem až na několik modifikací vycházel z postupů podle Paulina (1992a, 1992b). Nálevníci byli předfixováni 3% glutaraldehydem (GTA). K vypírání jsem používal 0,1M kakodylátový pufr. Nálevníci nalepení na polylysinovaná krycí sklíčka byli dofixováni 1% oxidem osmičelým. U kmene CMEX jsem musel pozměnit postup, abych zabránil ztrátě všech cilií. Osvědčila se mi fixace 1% osmiem bez předchozí fixace glutaraldehydem.

4.6. Transmisní elektronová mikroskopie

Až na drobné modifikace jsme při přípravě bločků pro TEM postupovali podle Dykstry (1993). K primární fixaci jsme použili 3% GTA a k postfixaci 1% oxid osmičelý. Vše bylo pufrováno 0,1M kakodylátovým pufr. Pelety s nálevníky byly odvodňovány acetonovou řadou (50-70-75-80-90-100). Součástí 75% acetonu byl z důvodu zvýšení kontrastu 1% uranyl acetát (Schuster 1964). Odvodněné pelety byly prosyceny a zality do Spurrů (Polysciences, kat. n. 01916) a polymerizovány 12 hodin při 70°C. Kontrastování ultratenkých řezů bylo prováděno roztokem uranyl acetátu a citátem olova.

4.7. Dokumentace

Fotodokumentace preparátů byla pořizována na mikroskopu Olympus BX51 vybaveném CCD kamerou DP70. Snímky ze skanovacího elektronového mikroskopu byly nejprve pořizovány na mikroskopu Jeol 6300 později na novějším mikroskopu Jeol 6700F. Ultratenké řezy byly prohlíženy v transmisním elektronovém mikroskopu Jeol JEM 1010 a dokumentovány pomocí digitální kamery Mega View III a programu Soft Imaging System. Jas, kontrast a retušování pozadí jsem prováděl v programu Adobe Photoshop® CS2, finální obrazové tabule jsem sestavil v programu Corel® Draw 11. Některé elektronogramy byly vzhledem k velikosti objektů sestaveny ze série snímků v programu Panorama Maker 3.

5. Výsledky

5.1. Charakteristika nálevníků kmene CCAP 1610/1

Již od počátku vlastní kultivace jsem u sbírkového kmene CCAP 1610/7 pozoroval nápadnou polymorfii. Přítomnost nálevníků různých tvarů a velikostí jsem si nejdříve vysvětloval jako kontaminaci. Předpokládal jsem, že jde o směsnou kulturu různých druhů nálevníků. K jednoznačnému závěru o polymorfii jsem dospěl po opakovaném klonování různých forem tohoto kmene. Klony jsem odvozoval vždy z jedné buňky, vybíral jsem formu, která byla v kultuře zastoupena největším počtem jedinců. Několikrát se mi podařilo oddělit a následně získat klon z největšího jedince. Výsledek další kultivace byl ale vždy stejný. Již v první pasáži se nálevníci diferencovali a v kultuře byly opět zastoupeny všechny formy (Tab. II, obr. 1–10; III, obr. 1–14; V, obr. 1–20). Kromě nejpočetněji zastoupených forem (Tab. II, obr. 5–6; III, obr. 3–6; V, obr. 4–9) s průměrnou velikostí $35 \times 13 \mu\text{m}$ se v kultuře v menší míře vyskytovali i malí nálevníci, s rozměry kolem $15 \times 6 \mu\text{m}$ (Tab. II, obr. 1–3, 7; V, obr. 1, 2; X, obr. 1). Opakovaná pozorování *in vivo*, studium barvených preparátů a elektronogramů ukázalo, že velcí jedinci s enormně nálevkovitě zvětšeným bukálním prostorem (Tab. III, 11–13; V, 16; XI, obr. 1) patří k tzv. makrostomním formám schopným pohlcovat menší jedince svého druhu (Tab. II, obr. 1–3, 7; V, obr. 1, 2; X, obr. 1). Pohlcení menších jedinců se podařilo dokumentovat (Tab. II, obr. 10; V, obr. 19, 20). Ačkoliv se u makrostomních forem tvar těla dramaticky měnil, a výrazně se zvětšoval makronukleus (Tab. V, obr. 14–19), počet poledníkově uspořádaných ciliárních řad zůstával v rozmezí 11–13 (Tab. III/15). V uspořádání hustého kartáče cilií (Tab. XI, obr. 2), který pochází z první nebo druhé membranely, bylo možno vidět analogii s membranelami na levé části peribukálního pole u rodu *Tetrahymena*. Na orálních řasinkách byly ve skanovacím elektronovém mikroskopu pozorovány drobné výrůstky (Tab. X, obr. 4). Na somatických ciliích nebyly nalezeny. Sbírkový kmen CCAP 1610/1 byl registrován pod druhovým jménem *Cohnilembus reniformis* Kahl. Skutečnost, že nebylo možné v literatuře najít popis tohoto druhu, byla důvodem pro ověření rodových znaků.

Základní morfologické znaky se shodují s popisem rodu *Cohnilembus* Kahl, 1933.

5.2. Charakteristika nálevníků kmene CIRL

Nálevníci kmene CIRL mají protáhle hruškovitý tvar těla o rozměrech $19 \times 8 \mu\text{m}$. Dlouhá kaudální řasinka byla pozorována po fixaci osmiem (Tab. II, obr. 13) i ve skanovacím elektronovém mikroskopu (Tab. IX, obr. 2, 3). Orální aparát sahá přes polovinu délky buňky (Tab. II, obr. 13; IV, obr. 4; VI, obr. 1–6, 8–11, 13–24; IX, obr. 3). Makronukleus je umístěn ve střední části buňky (Tab. VI, obr. 1–6, 8–24). Celkem se podařilo rozlišit 11 řad cilií (Tab. VI, obr. 7). Na elektronogramech jsou dokumentovány dikinetidy somatických cilií, řasinku nese vždy kinetosom vzdálenější od apikálního konce. (Tab. XIII, obr. 1, 2). Makronukleus jeví ultrastrukturu typickou pro nálevníky (Tab. XII, obr. 1; XIII, obr. 1, 2). Parorální membrána má střídavě uspořádané kinetosomy (Tab. XIII, obr. 1, 2), cytostom je vystlán fibrilami, které pokračují přes cytofarynx do buňky a obloukovitě se v něm stáčejí (Tab. XII, obr. 2). Pod pelikulou jsou nápadně dlouhé mitochondrie (Tab. XII, obr. 1; XIII, obr. 1). V cytoplasmě nebyly nalezeny žádné potravní vakuoly s bakteriemi.

Základní morfologické znaky nálevníků kmene CIRL se shodují s popisy rodu *Pseudocohnilembus* Evans a Thompson, 1964.

5.3. Charakteristika nálevníků kmene CMEX

Nálevníci kmene CMEX měří v průměru $30 \times 11 \mu\text{m}$ a mají protáhle hruškovitý tvar. Makronukleus je uložen ve střední části buňky (Tab. VII, obr. 1–15). Nálevníci mají nápadně dlouhý ústní aparát zasahující až do druhé poloviny délky těla (Tab. II, obr. 15; IV, obr. 1, 2; VII, obr. 1–14). Těsně k sobě přiložené řasinky tvoří „velum“ (Tab. IX, obr. 1). Po impregnaci protargolem bylo možné pozorovat spojený průběh orální polykinetidy spolu s parorální membránou až za polovinu délky buňky (Tab. VII, obr. 1–14). Vzadu je vidět druhá, krátká polykineta nasedající na dlouhou (Tab. VII, obr. 1–4). Kaudální cilie je relativně dlouhá (Tab. II, obr. 14). Na obrázku ze skanovacího elektronového mikroskopu (Tab. IX, obr. 1) se (patrně jako artefakt) objevily dvě kaudální cilie. Kontraktilní vakuola měla terminální umístění (Tab. VII, obr. 15). Výskyt potravních vakuol byl běžný.

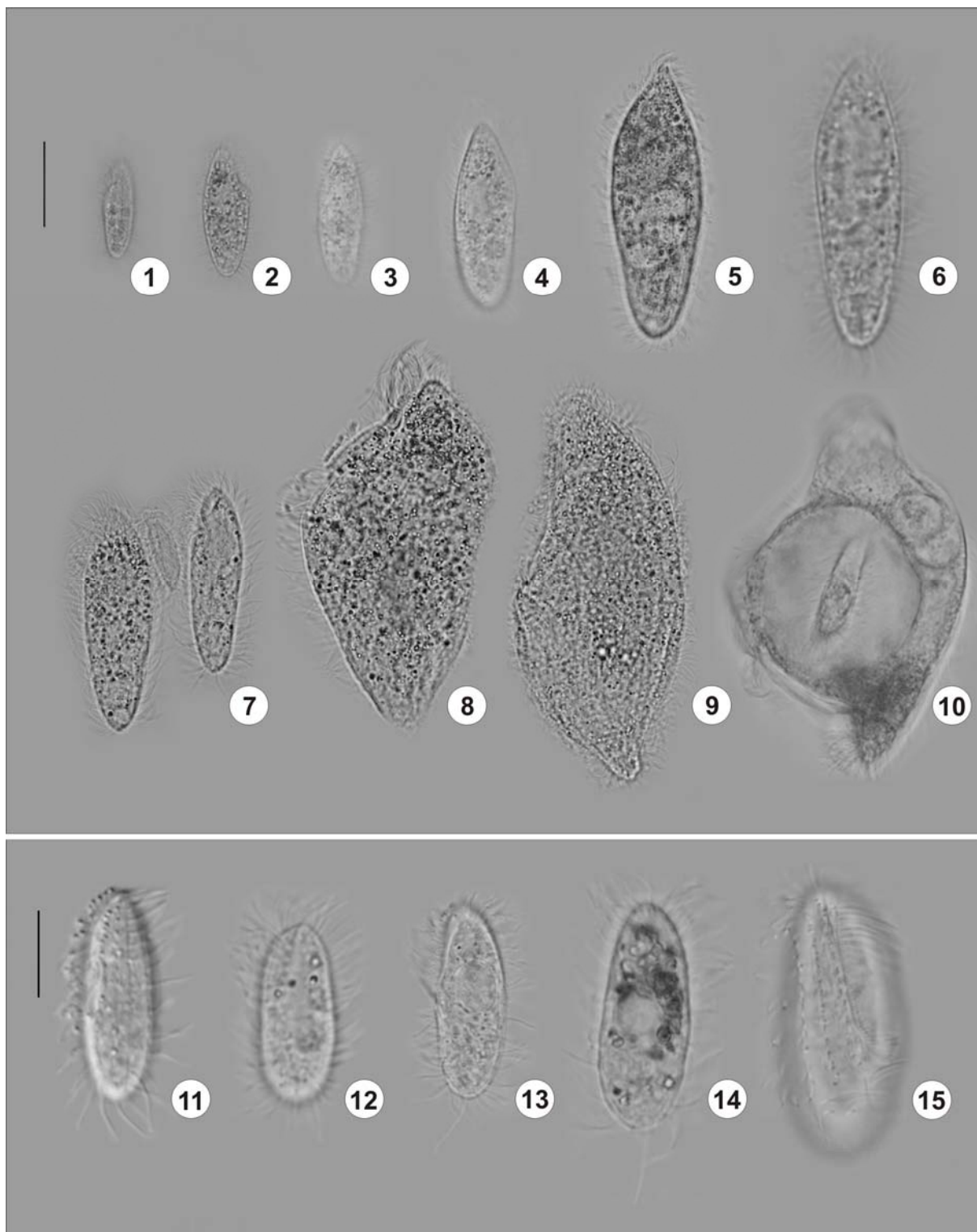
V subbuněčné organizaci jsou nápadně velké a protáhlé mitochondrie umístěné po obvodu celého podélného průřezu buňky (Tab. XIV, obr. 1, 2). Na ultratenkém řezu (Tab. XIV, obr. 1) se podařilo zachytit funkci řady řasinek, které posunují bakterii do ústního otvoru a následně do cytofarynxu. Nálevníci kmene CMEX ve starších kulturách běžně encystovali (Tab. XIV, obr. 2).

Morfologické znaky nálevníků tohoto kmene jsou v zásadě stejné jako u kmene CIRL a odpovídají popisům rodu *Pseudocohnilembus* Evans a Thompson, 1964.

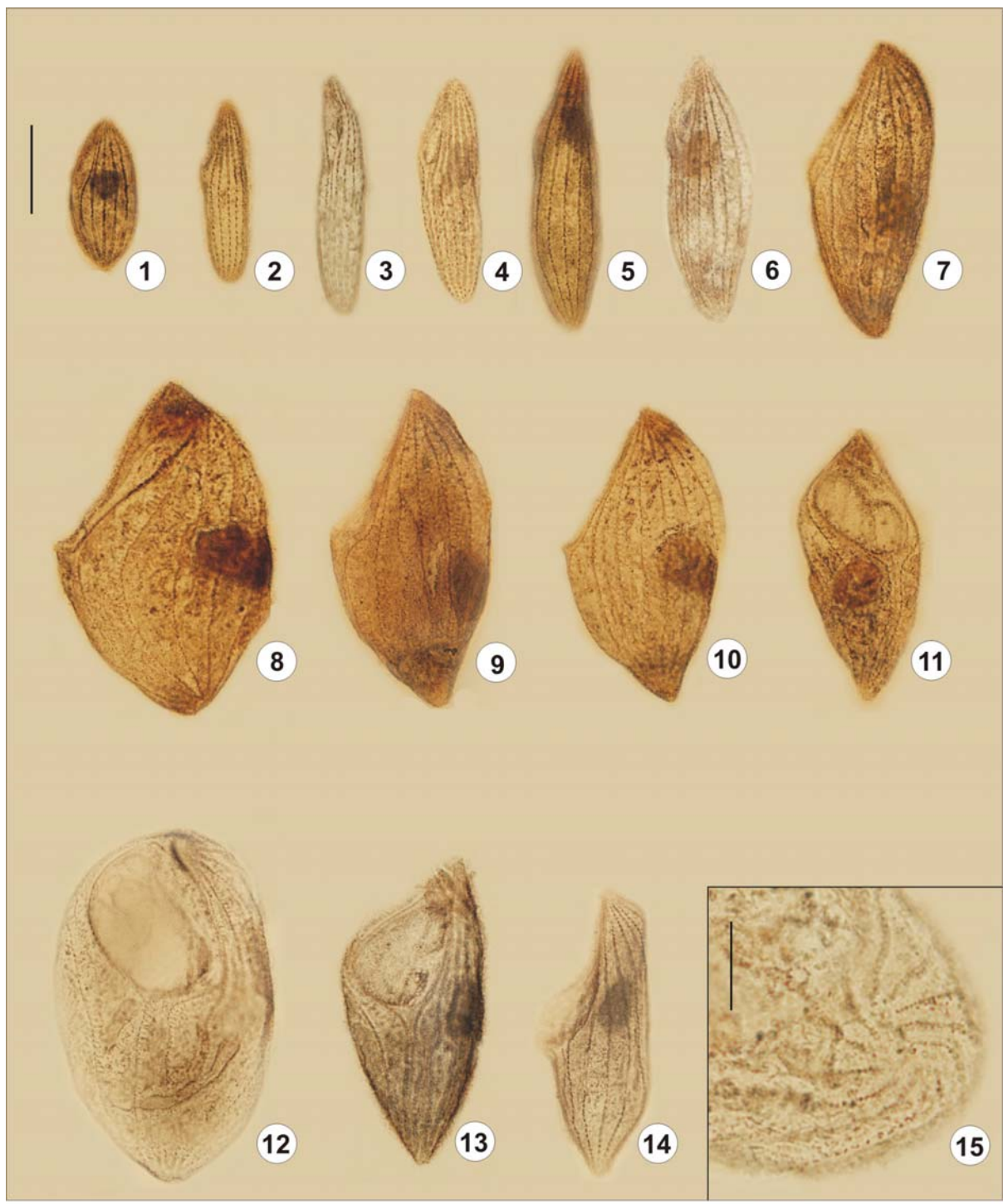
5.4. Charakteristika nálevníků kmene CESP

Pro nálevníky kmene CESP je typický vejčitý tvar těla s průměrnými rozměry 21×12 µm. Makronukleus je umístěn v ekvatoriální rovině buňky (Tab. VIII, obr. 1–5, 7–20). Orální aparát je umístěn ve střední části buňky (Tab. II, obr. 11; IV, obr. 7, 10, 11; VIII, 1–5, 7–11, 13–20). Parorální membrána je poměrně krátká (Tab. VIII, obr. 3, 4, 8, 11, 14, 16) a nápadným obloukem se stáčí kolem cytostomu (Tab. VIII, obr. 8, 14, 16). Pod záhybem parorální membrány je patrný hákovitý útvar - skutika (Tab. VIII, obr. 8, 14). Kaudální cilie nebyla pozorována ani ve skanovacím elektronovém mikroskopu (Tab X, obr. 3). Transmisní elektronová mikroskopie prokázala přítomnost extrusomů (mukocyst) zabudovaných do pelikuly (Tab. XV, 1, 2; XVI, 1, 2). V blízkosti několika mitochondrií byly nalezeny řady tubulů o průměru 60–70 nm (Tab. XVI, obr. 1, 2). Cytoplazma obsahovala potravní vakuoly s bakteriemi (Tab. XV, 1).

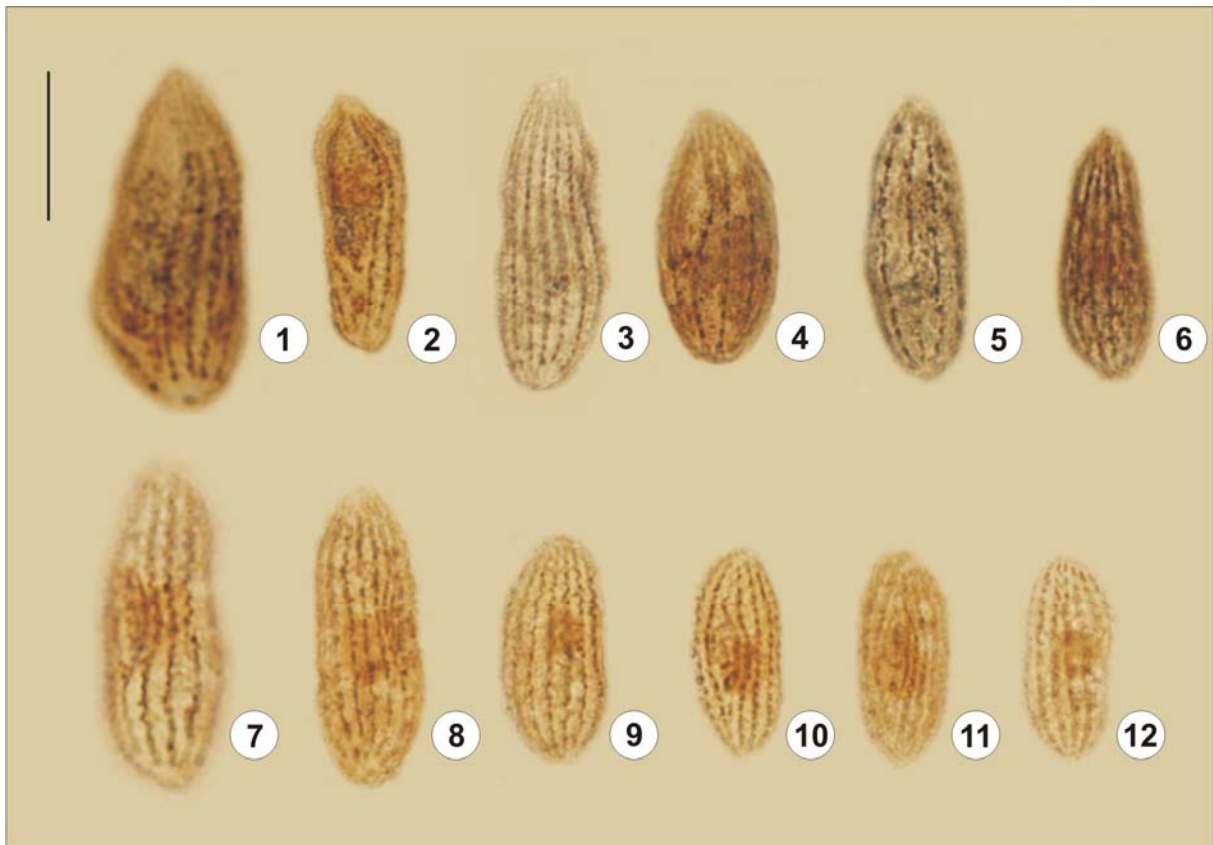
Nálevníci kmene CESP se zásadně liší od ostatních studovaných kmenů. Morfologické znaky (tvar těla, poloha a struktura orálního aparátu) odpovídá rodu *Uronema* Dujardin, 1841. Přítomnost dlouhé kaudální řasinky, která je v popisech rodu uváděna, se nepodařilo prokázat.



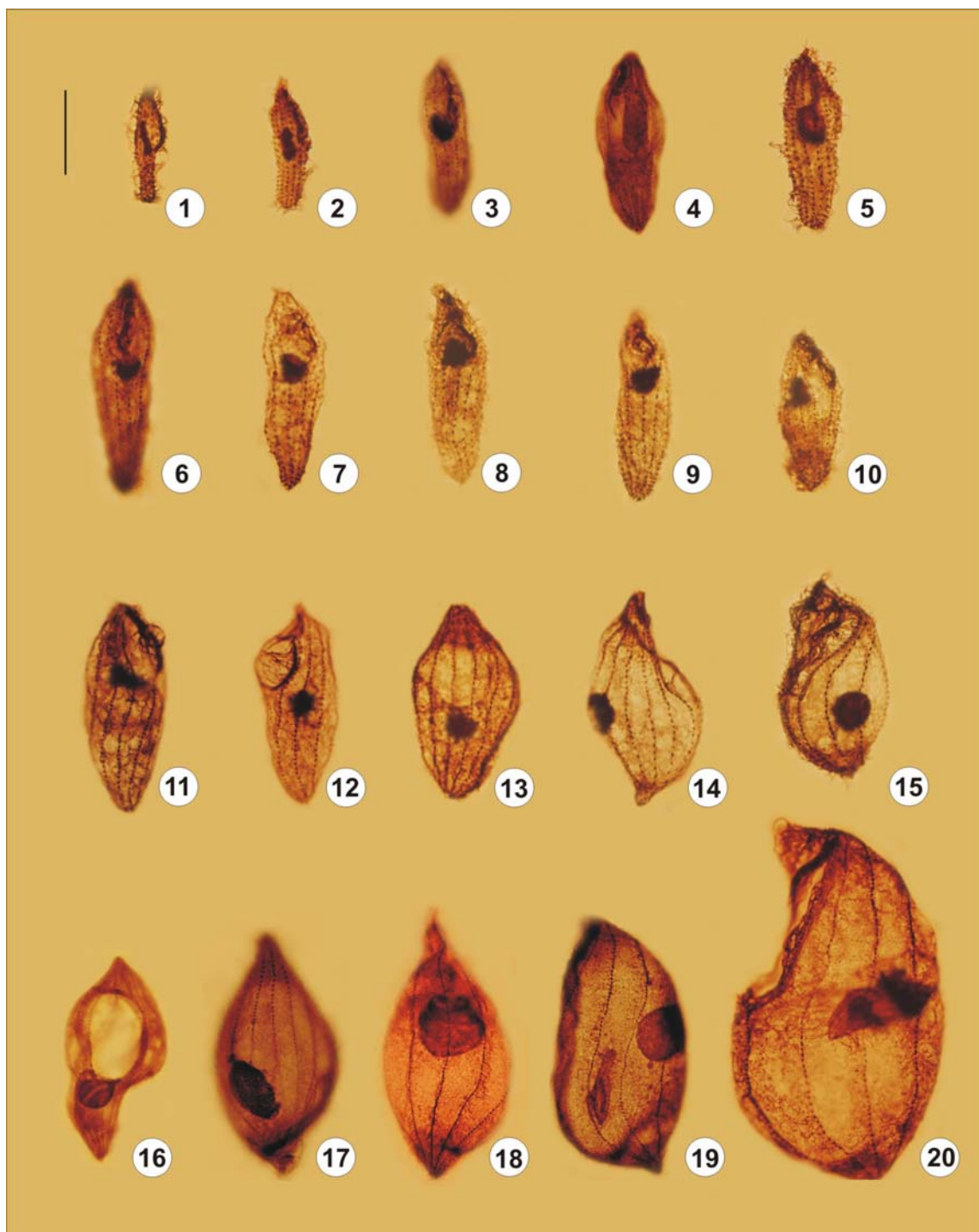
Tabule II. Obr. 1–10. Nálevníci kmene CCAP 1610/1 po fixaci oxidem osmičelým. Nomarského DIC, společný bar = 20 μm . 5, 6. Forma nálevníků nejpočetněji zastoupená v kulturách. 7. Rozdíly ve velikosti tří jedinců pozorovaných v jednom zorném poli. 8–10. Makrostomní formy nálevníků, nápadné svou velikostí. 10. Makrostomní nálevník s pohlčeným malým jedincem z téže klonované kultury. **Obr. 11–15.** Nálevníci po fixaci oxidem osmičelým. Nomarského DIC, společný bar = 10 μm . 11, 12. Kmen CESP. 13. Kmen CIRL. 14–15. Kmen CMEX. Přítomnost kaudální řasinky slabě patrná jen u 13. a 14.



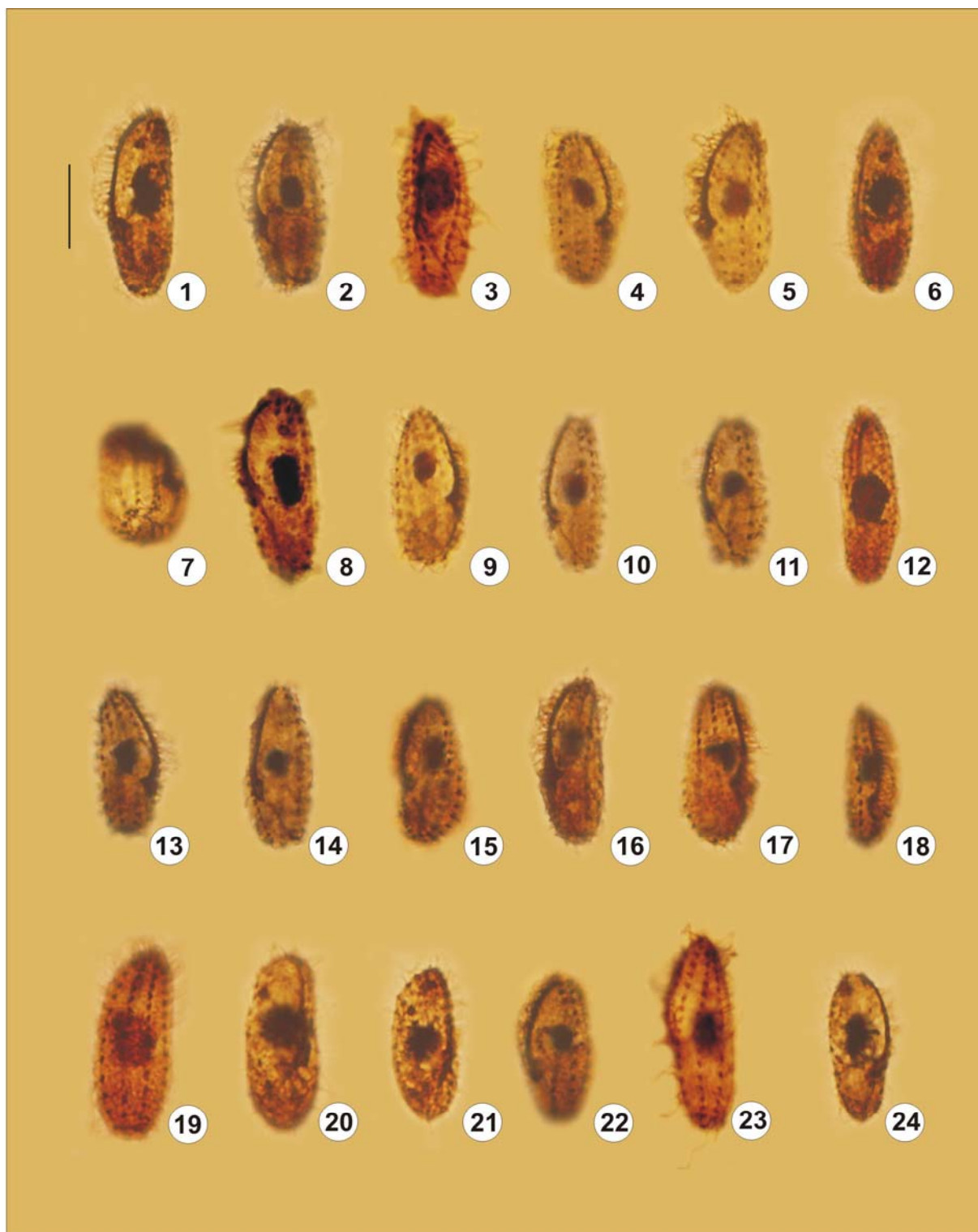
Tabule III. Obr. 1–15. Nálevníci kmene CCAP 1610/1. Impregnace dusičnanem stříbrným podle Kleina. Procházející světlo, společný bar pro 1–14 = 20 μm . 114. Přehled různých forem, které byly pravidelně pozorovány v klonovaných kulturách kmene. K makrostomním nálevníkům patří jedinci dokumentovaní na obrázcích 7–14. Enormně nálevkovitě zvětšený bukální prostor je patrný u jedinců na obr. 11–13. 15. Detail somatické infraciliatury a stříbřitelných linií na zadním konci makrostomního nálevníka. 12 poledníkových řad cílií. Bar = 40 μm .



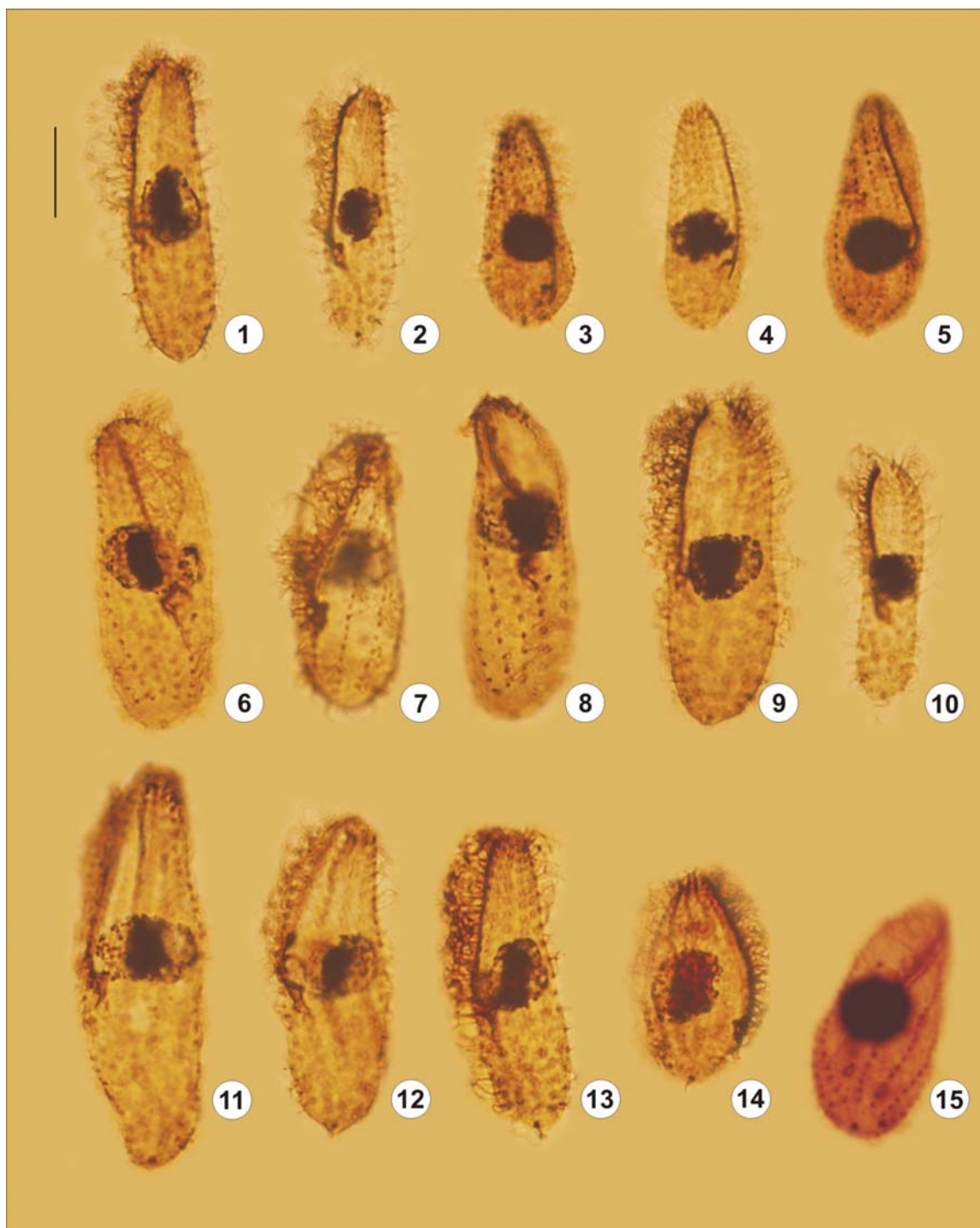
Tabule IV. Obr. 1–12. Nálevníci izolovaní z žaber mořských ryb po impregnaci dusičnanem stříbrným (metodou podle Kleina). Procházející světlo, společný bar = 20 μm . 1–3. Kmen CMEX. Ústní aparát sahající za polovinu délky těla nálevníka demonstruje obr. 2. 4–6. Kmen CIRL. Ústní aparát a jeho velikost přesahující polovinu délky těla nálevníka je patrná na obr. 4. 7–12. Kmen CESP. Typické umístění ústního aparátu ve střední části buňky demonstrují obr. 7, 10 a 11.



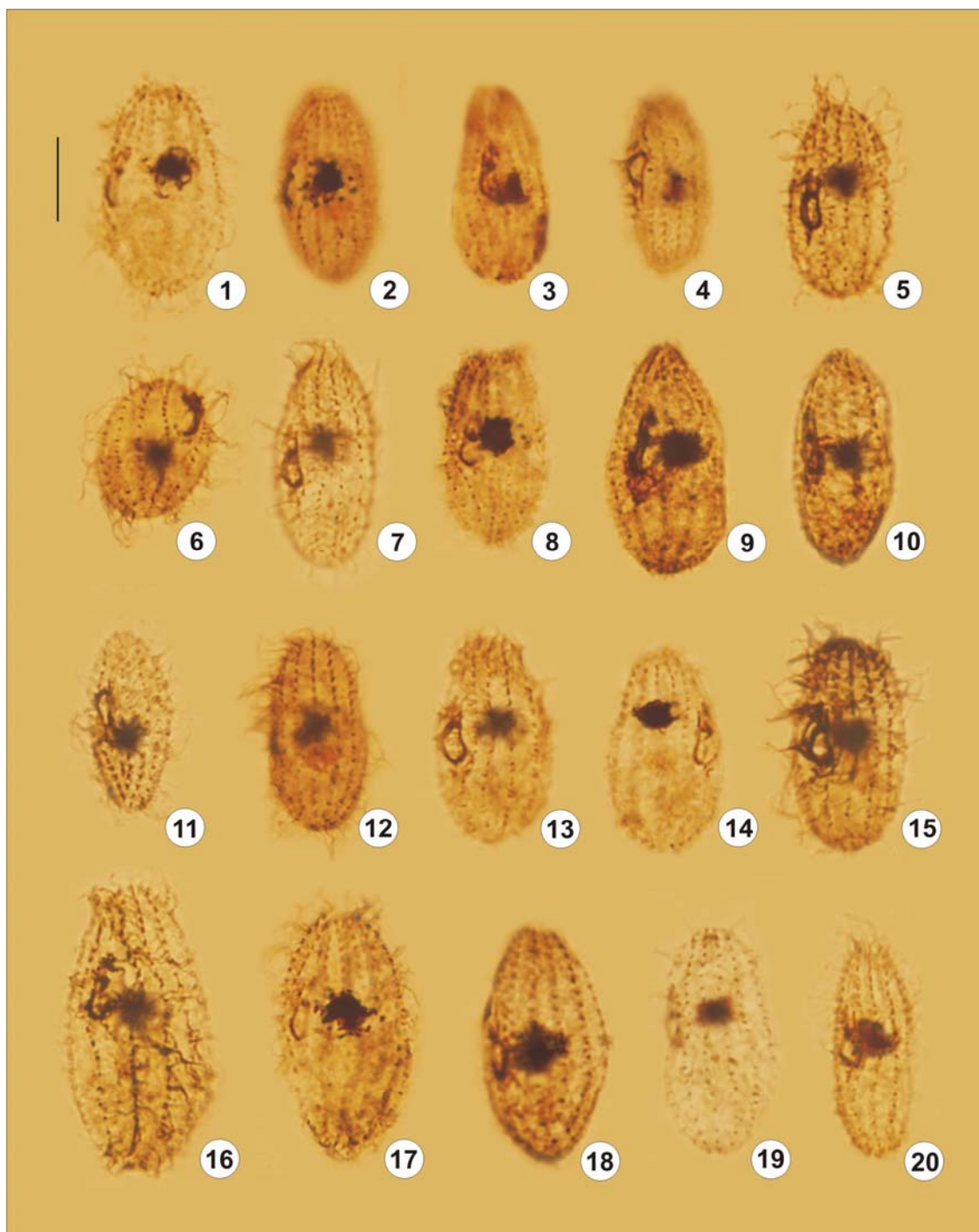
Tabule V. Obr. 1–20. Nálevníci kmene CCAP 1610/1 po impregnaci protargolem podle Foissnera. Procházející světlo, společný bar = 20 μm . Tvar těla nálevníků nejpočetněji zastoupených v kulturách předvádí obr. 4–9. „Přechodné formy“ směřující k makrostomním nálevníkům ukazují obr. 11 a 12. Nápadně zvětšená buněčná ústa v pohledu do jejich dutiny jsou vidět na obr. 16. Zvětšení makronukleu dokládají obr. 17–19. 19, 20. Makrostomní formy s pohlcenými malými jedinci téže klonované kultury.



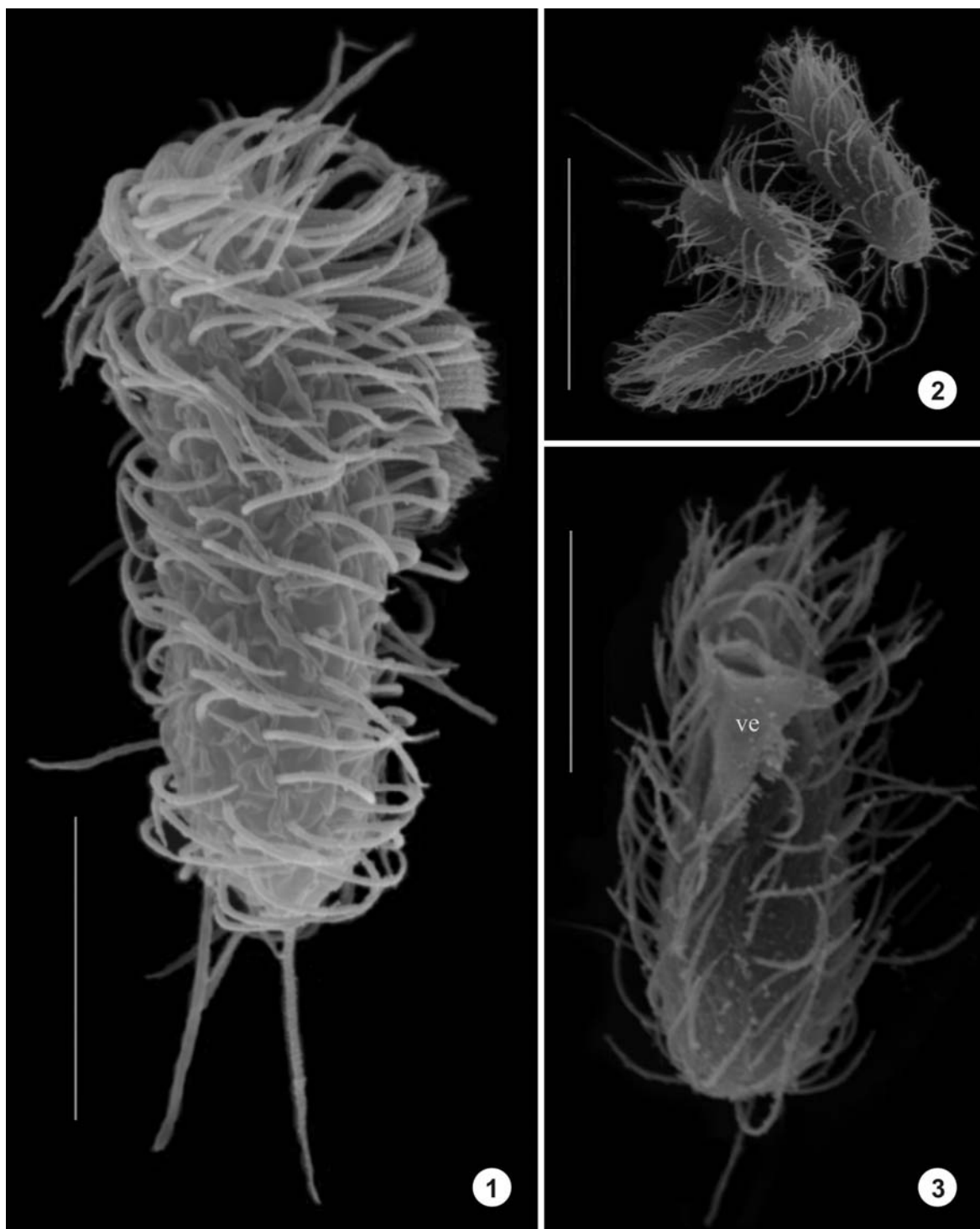
Tabule VI. Obr. 1–24. Nálevníci kmene CIRL po impregnaci protargolem podle Foissnera. Procházející světlo, společný bar = 10 μ m. Na většině obrázků je patrný průběh ústního aparátu, který zasahuje až do druhé poloviny délky těla. Připojení krátké polykinety na dlouhou znázorňují obr. 3 a 8. Počet poledníkově uspořádaných řad cílů je možno odvodit z obr. 7, který demonstruje zadní konec nálevníka.



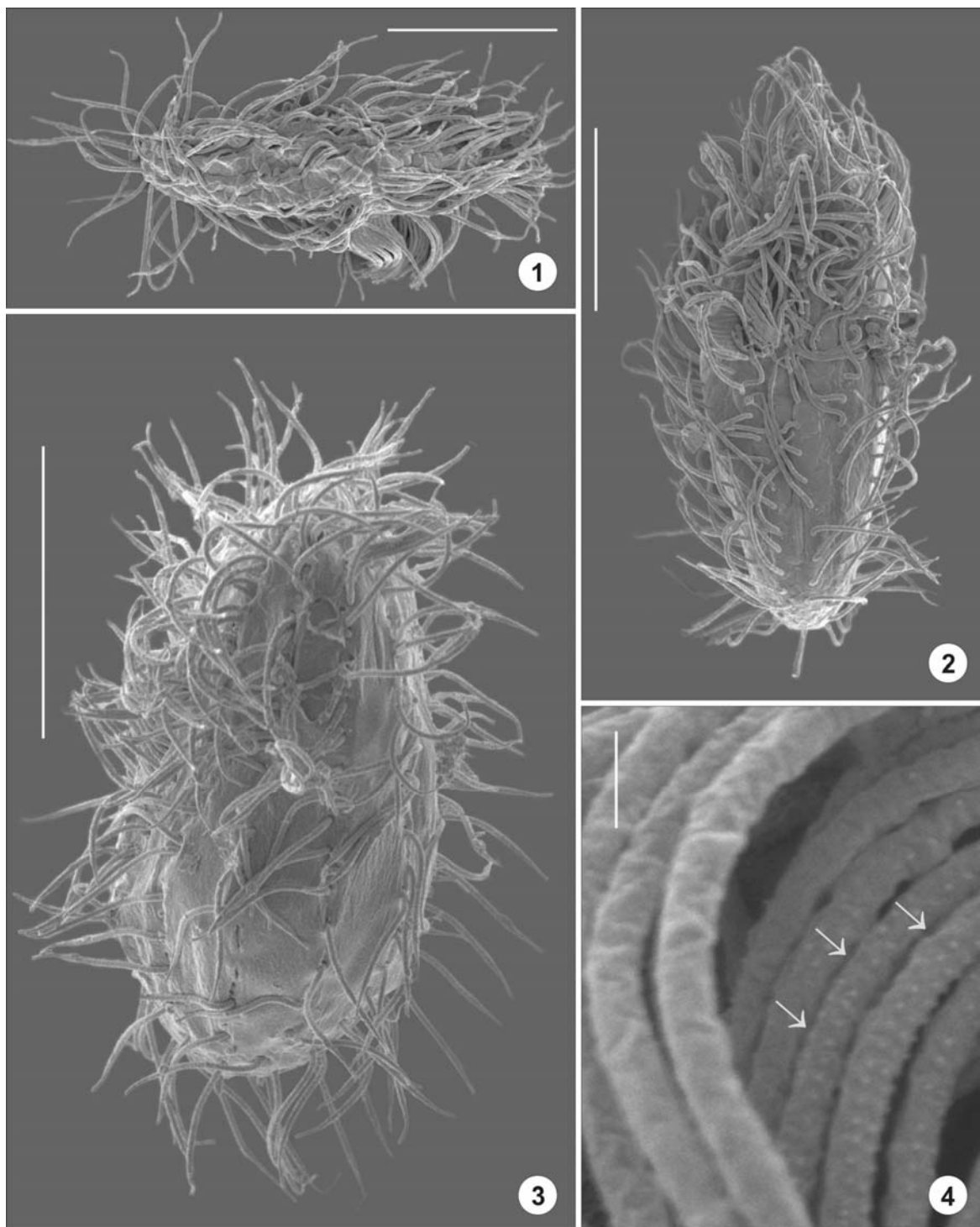
Tabule VII. Obr. 1–15. Nálevníci kmene CMEX po impregnaci protargolem podle Foissnera. Procházející světlo, společný bar = 10 μ m. Spojený průběh orální polykinety a parorální membrány přesahující polovinu délky těla nálevníků je patrný na obr. 1–14. Krátká polykineta nasedající na dlouhou je vidět na obr. 14. Zaostření na terminální kontraktilní vakuolu předvádí obr. 15.



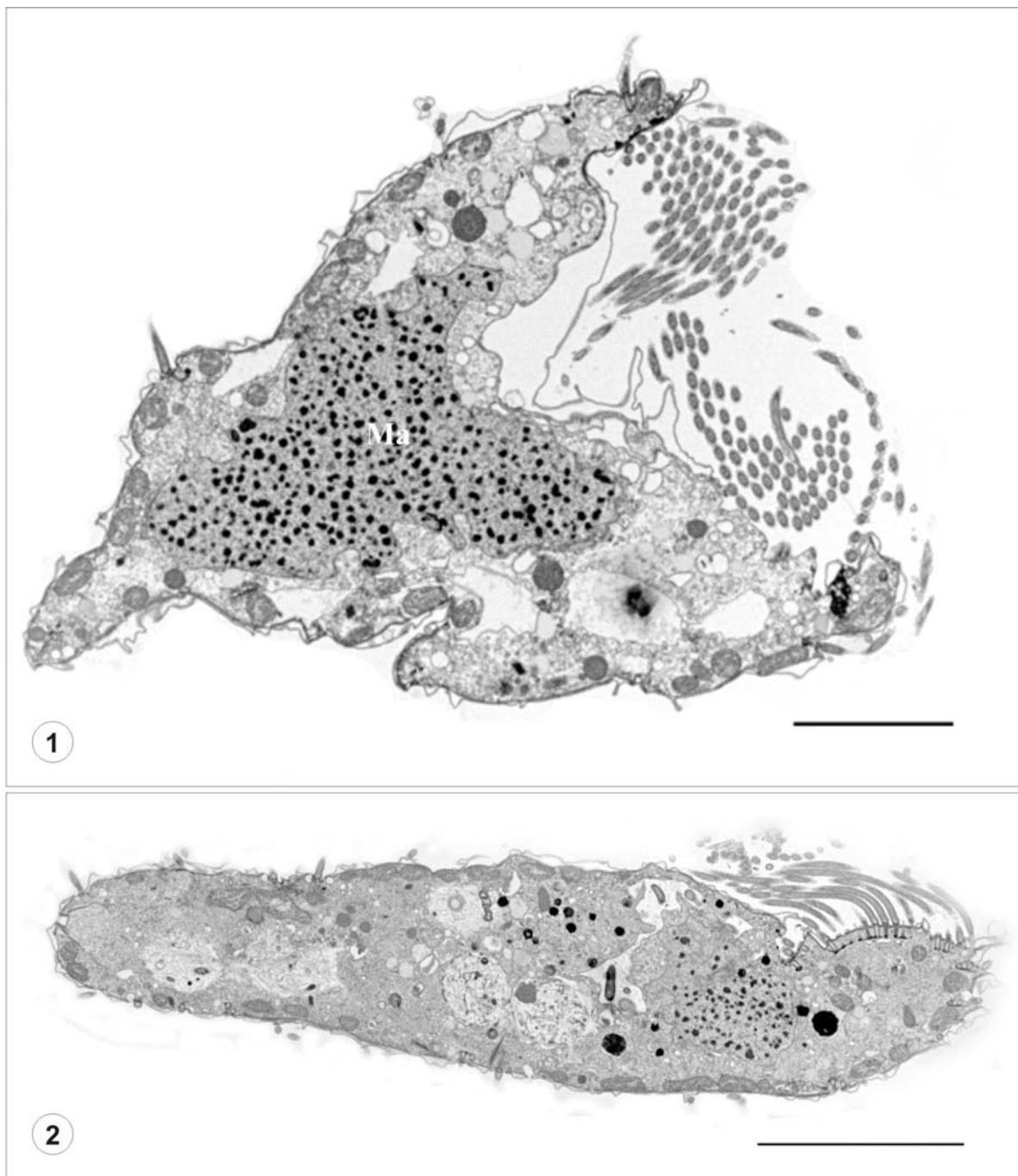
Tabule VIII. Obr. 1–10. Nálevníci kmene CESP po impregnaci protargolem podle Foissnera. Procházející světlo, společný bar = 10 μm . Krátkou parorální membránu demonstrují obrázky 3, 4, 8, 11, 14 a 16. Parorální membránu stočenou pod cytostom a skutiku je možné rozlišit na obr. 8, 14 a 16.



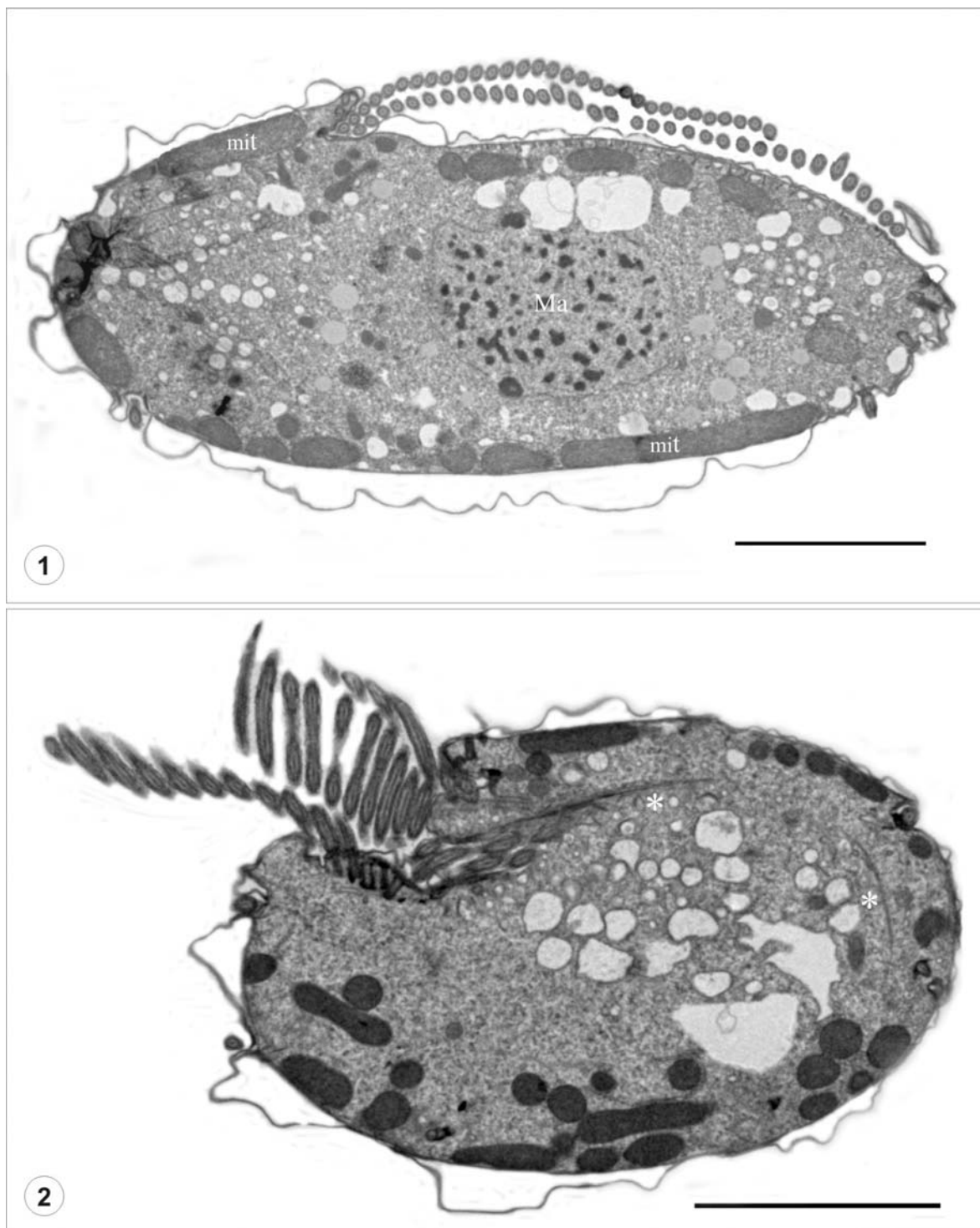
Tabule IX. Obr. 1–3. Trojrozměrné pohledy na tvar těla a ciliaturu nálevníků získané ze skanovacího elektronového mikroskopu Jeol 6300. 1. Nálevník kmene CMEX. Jedinec vybraný pro demonstraci bukálních membranel má kromě dlouhé kaudální řasinky (napravo) ještě jednu, pravděpodobně arteficiálně připojenou ciliu (nalevo). Bar = 10 μm . 2, 3. Nálevníci kmene CIRL. 2. Všichni tři jedinci mají nápadně dlouhé kaudální cilie. Bar = 20 μm . 3. Těsně k sobě přiložené cilie vytvářejí tzv. „velum“ (ve). Bar = 10 μm .



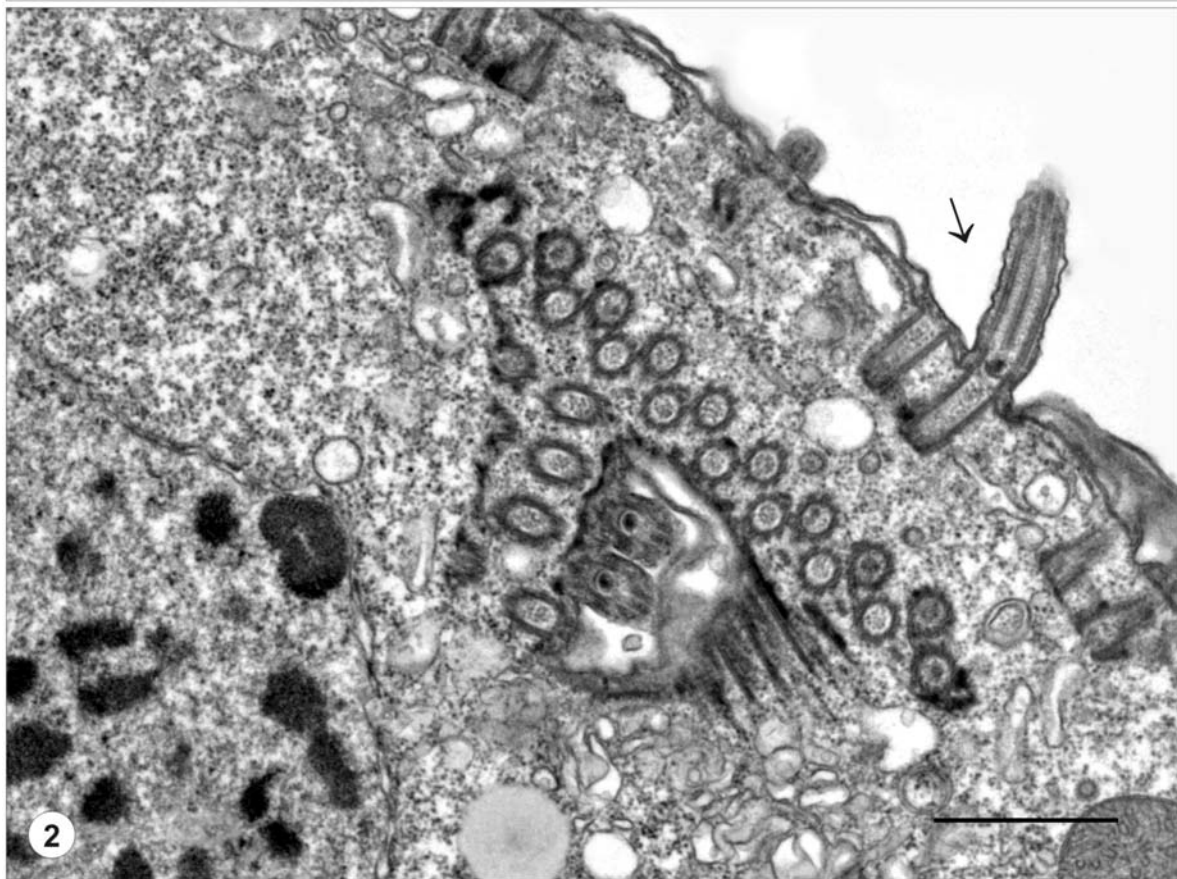
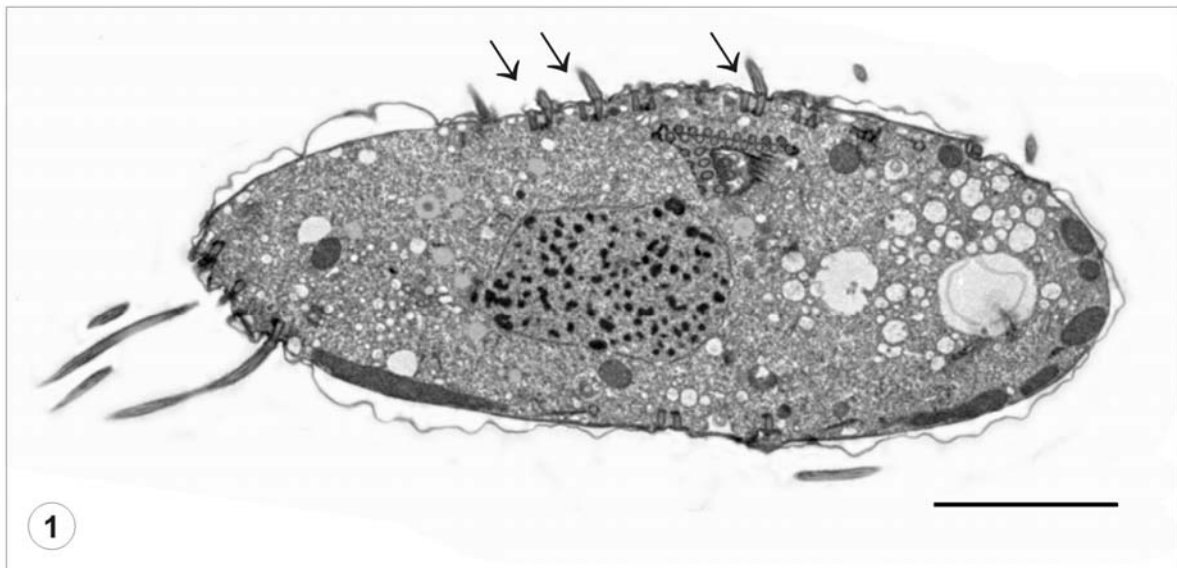
Tabule X. Obr. 1–4. Trojrozměrné pohledy na tvar těla a ciliaturu nálevníků získané ze skanovacího elektronového mikroskopu Jeol 6700F. 1, 2, 4. Nálevníci kmene CCAP 1610/1. 1, 2. Přehledové obrázky demonstrující mj. délku cilií ve vztahu k velikosti těla nálevníků, jejich hustotu a uspořádání v blízkosti orálního aparátu. Bary = 10 μm (1) a 5 μm (2). Drobné výrůstky pravidelně uspořádané na povrchu orálních cilií ↓ u nálevníků kmene CCAP 1610/1 znázorňuje obr. 4. (šipky). Bar = 300 nm. 3. Přehledový obrázek nálevníka kmene CESP. Bar = 10 μm .



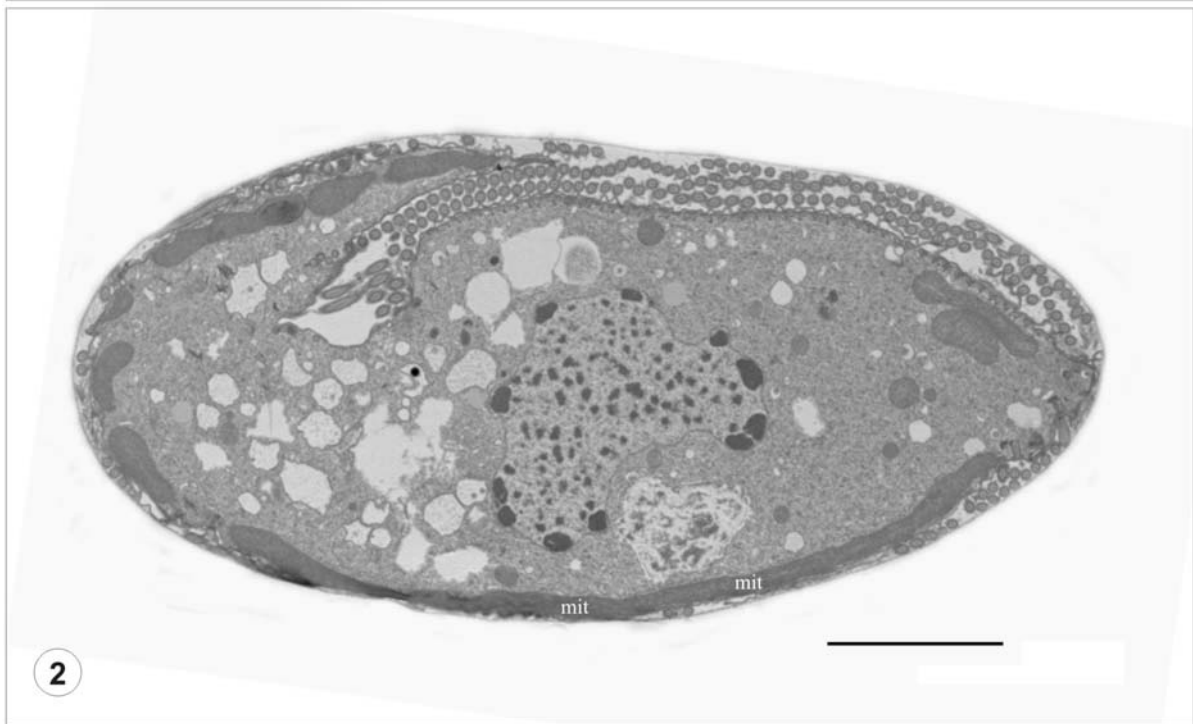
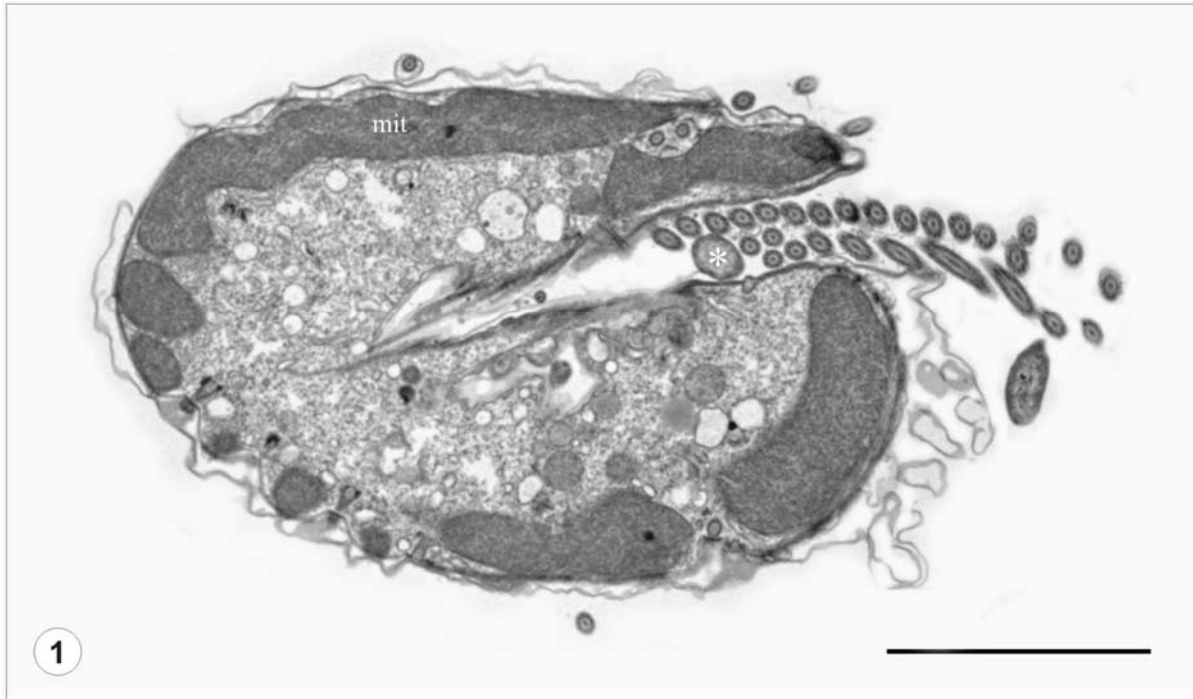
Tabule XI. Obr. 1, 2. Elektronogramy nálevníků kmene CCAP 1610/1. Oba bary = 5 µm. 1. Makrostomní forma *Cohnilembus reniformis* má enormně zvětšeným bukální prostor a makronukleus (Ma) . 2. Podélný řez předvádí jedince z téže klonované kultury. Řez hustým kartáčem řasinek, které patří k 1. nebo 2. membranele, demonstruje v bočním pohledu mnohem menší bukální prostor než vidíme v obr. 1.



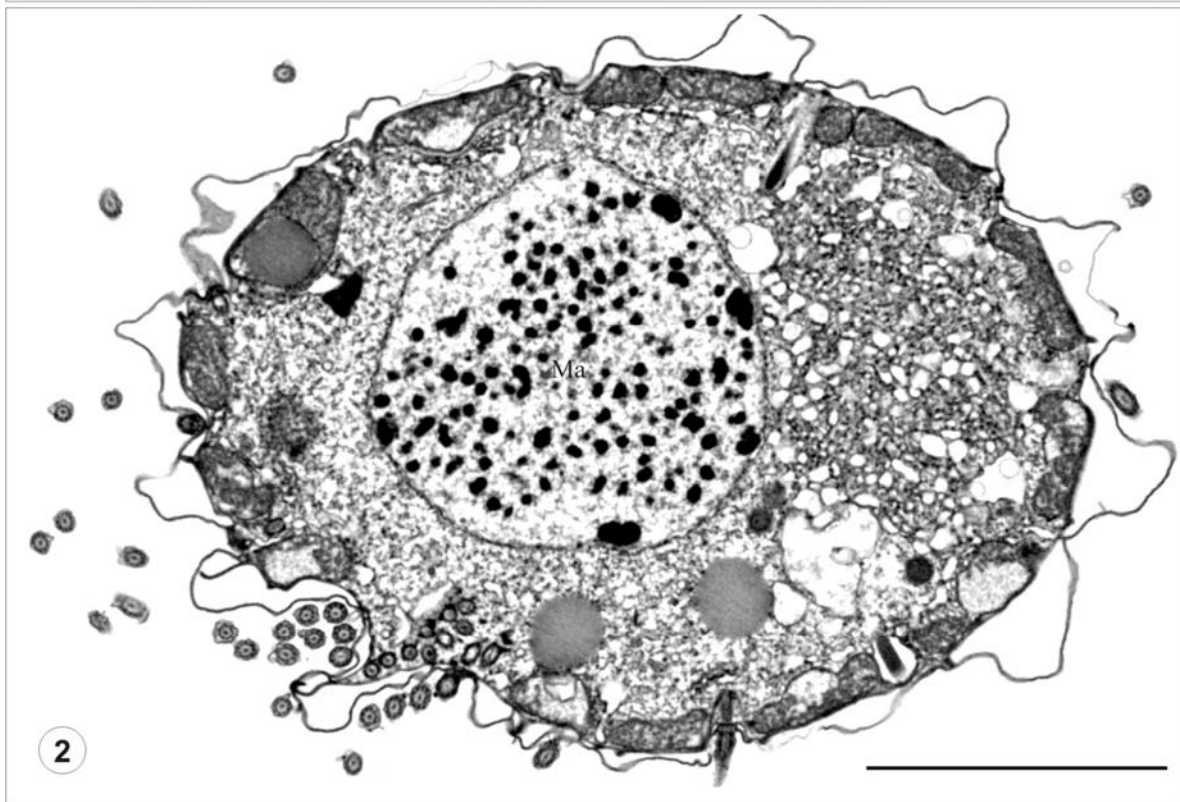
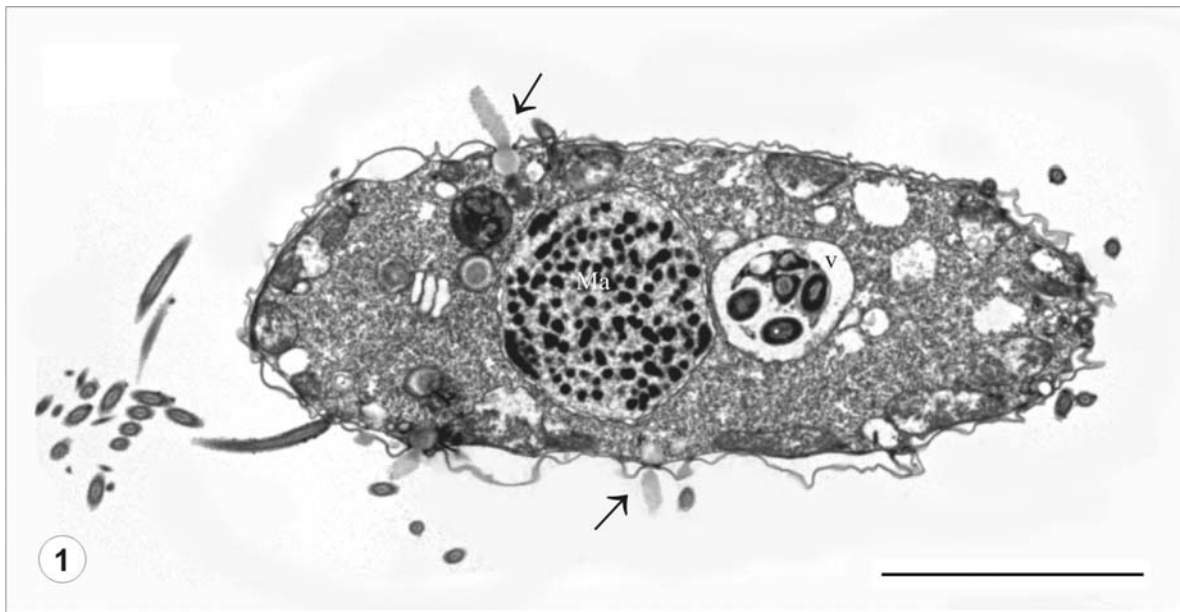
Tabule XII. Obr. 1, 2. Elektronogramy nálevníků kmene CIRL. Oba bary = 5 μm . 1. Ultratenký řez blížící se podélné rovině nálevníka předvádí dlouhé úseky subpelikulárně lokalizovaných mitochondrií (mit) a makronukleus (Ma). 2. Na řezu je zachycen cytosom lemovaný fibrilami (*), které pokračují cytofaryngem do těla buňky a obloukovitě se v něm stáčejí (*).



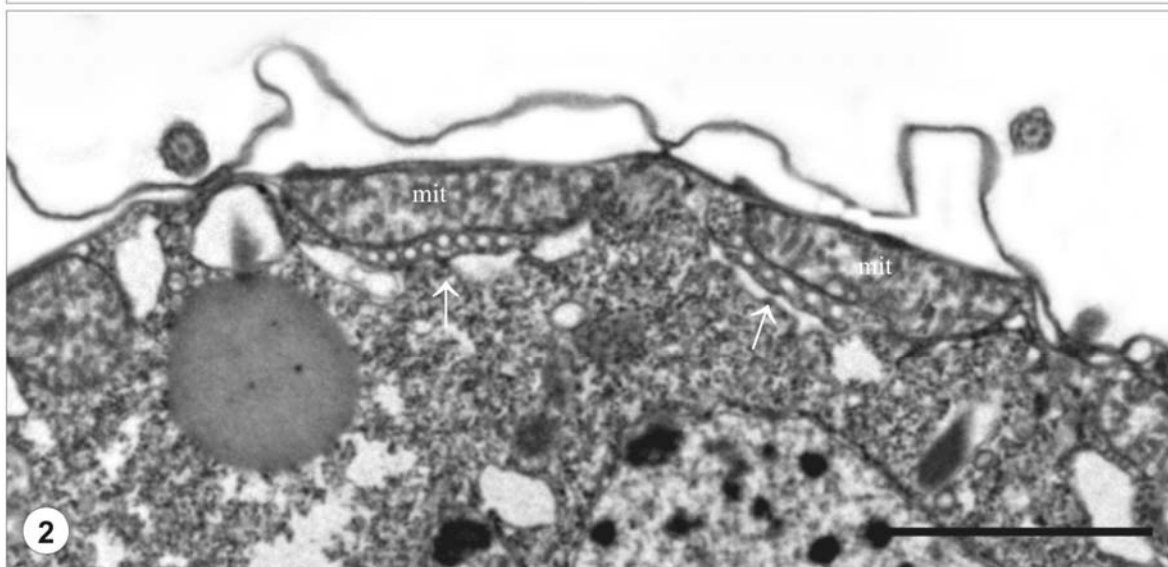
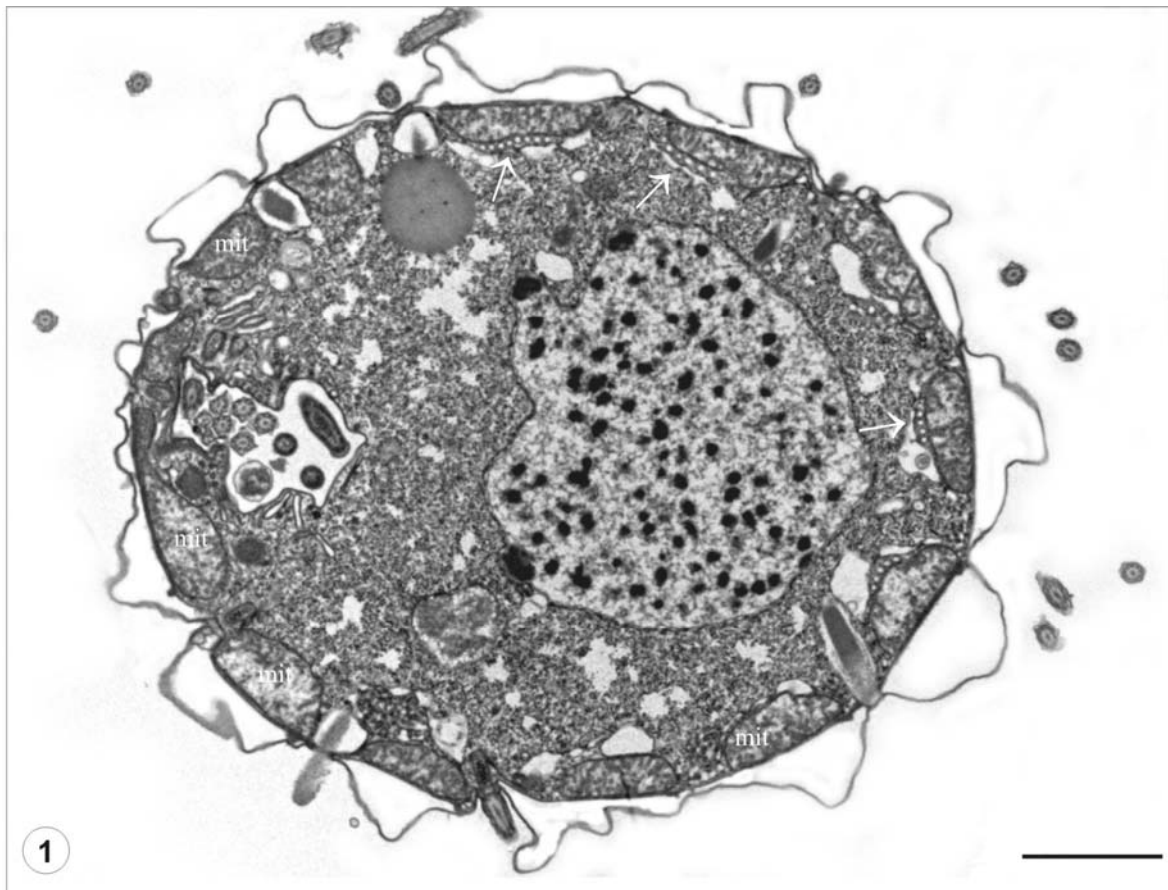
Tabule XIII. Obr. 1, 2. Elektronogramy nálevníků kmene C. irritans. 1. V rovině ultratenkého řezu jsou zachyceny dikinetidy somatických cilií (označeny šipkami). Pouze kinetosomy vzdálenější od apikálního konce nálevníka nesou cilie. Bar = 5 μm . 2. Průřez parorální membránou se střídavě (cik-cak) uspořádanými kinetosomy. Šipkou je označena dikinetida. Bar = 1 μm .



Tabule XIV. Obr. 1, 2. Elektronogramy nálevníků kmene CMEX. Bary = 5 μ m. Dlouhé subpelikulárně lokalizované mitochondrie (mit) jsou patrné na obou obrázcích. 1. Mezi průřezy řasinek orální cilitury je patrný průřez bakterií (*) transportovanou do cytofarynxu. 2. Nálevník v počátečním stadiu encystace. Stěna cysty je velmi tenká.



Tabule XV. Obr. 1, 2. Elektronogramy nálevníků kmene CESP. Bary = 5 μm . 1. Na přehledném průřezu byl zachycen makronukleus (Ma), potravní vakuola (v) vyplněná bakteriemi a průřezy mukocystami (označené šipkami). 2. Ultratenký řez vedený rovinou blízkou příčné předvádí průřezy kortikálně orientovanými, intermeridionálně lokalizovanými mitochondriemi, makronukleus a průřezy ciliemi, které patří k orálnímu aparátu.



Tabule XVI. Obr. 1, 2. Elektronogramy nálevníků kmene CESP. Bary = 2 μm . 1. Příčný průřez tělem nálevníka v rovině, která předvádí intermeridionálně lokalizované mitochondrie (mit), makronukleus a cytofarynx s průřezy několika bakteriemi. Šípky označují průřezy skupinami tubulů, které leží pod mitochondriemi v těsném kontaktu s jejich vnější membránou. Detail předvádí obr. 2.

6. Diskuse

6.1. Poznámky k determinaci studovaných kmenů

Kmen CCAP 1610/1 (*Cohnilembus reniformis*) měl původně sloužit pro srovnání s našimi izoláty. Předpokládali jsme, že budeme vycházet z přesného popisu tohoto druhu. Ukázalo se, že v rámci rodu *Cohnilembus* Kahl, 1933 bylo popsáno několik druhů, žádný ale nenese druhové jméno *C. reniformis* uvedené ve sbírce UKNCC s autorem popisu ale bez data. Rovněž pátrání po možných synonymech v Zoological Record a v bibliografiích předních ciliatologů včetně autora popisu rodu a v pracích E. B. Smalla, který uložil izolát do sbírky, nepřineslo žádný výsledek. Podrobné srovnání znaků tohoto kmene s dalšími druhy rodu *Cohnilembus* je proto určitou výzvou do budoucna a to i proto, že pozorování přinesla i další inspiraci:

Výskyt makrostomních forem u referenčního kmene CCAP 1610/1 je velmi zajímavý, i když jde o jev známý u jiných skupin nálevníků. Makrostomní formy jsou popsány například u *Tetrahymena vorax*, *T. patula* a *T. paravorax* (Corliss 1973) nebo u *Blepharisma americanum* (Lennartz a Bovee 1980). Obecně lze říci, že makrostomní jedinci se obvykle objevují ve stacionární fázi kultury a nálevníci se mohou stát kanibaly po prodlouženém hladovění. Změna morfologie tak umožňuje některým jedincům přežít na úkor jiných. V kultuře kmene CCAP 1610/1 se ale makrostomní formy vyskytují neustále a ve značném počtu, přičemž ve stárnoucí kultuře spíše ubývají na úkor ostatních forem. První dny po pasážování se zdá být potravy v mediu dostatek, s čímž souvisí i zvětšení počtu potravních vakuol v nálevnicích. Je zřejmé, že u tohoto kmene nebude hlavním důvodem tvorby makrostomních forem nedostatek potravy.

Drobné výrůstky na řasinkách kmene CCAP 1610/1 považujeme za velmi zajímavý nález. V literatuře jsme zatím popis podobných struktur nenašli. Skutečnost, že se tyto struktury zjevně vyskytují jen na orálních, nikoliv na somatických řasinkách, považujeme za dostatečně významnou abychom se pokusili ověřit výskyt u jiných skupin nálevníků, případně poznat jejich funkci. Spekulovat je možno o úloze v soudržnosti řasinek při tvoření límce ženoucího potravy do cytosomu.

Vzhledem k původu kmenů CIRL, CMEX a CESP, bylo možné domnívat se, že se jedná o fakultativní parazity (amfizoické druhy) z nichž mají největší význam zástupci skupiny Scuticociliatida Small, 1967, uplatňující se jako oportunní paraziti v mořských akvakulturách

po celém světě (Jung a kol. 2007). Významným a typickým znakem této skupiny nálevníků jsou dikinetidy. Ty byly prokázány u všech studovaných kmenů.

Zástupci rodu *Pseudocohnilembus* se vyskytují převážně v mořích, případně ve slaných jezerech, jsou ale známy i sladkovodní druhy (Foissner a Wilbert 1981, Song 2000). Znaky umožňující určení druhů lze nalézt v orální infraciliatuře (Fernandez-Leboranz a Zaldumbide 1986), což nám ani vybrané preparáty neumožnily, proto se determinace omezila na úroveň rodu. U kmene CMEX by měl být jednoznačně dokumentován počet kaudálních cílů. Tvorba cyst u tohoto kmene nepřekvapila. U některých druhů rodu *Pseudocohnilembus* byla již encystace zaznamenána (Evans a Thomson 1964).

I když základní znaky rodu *Uronema* Dujardin, 1841 se podařilo u kmene CESP rozlišit, je zjevné, že pro determinaci druhu založenou na morfologii by bylo třeba dokázat přítomnost kaudálních cílů a doplnit pozorování na subbuněčné úrovni. Pozornost je třeba věnovat i nálezům výrazných řad tubulů v blízkosti mitochondrií. Identickou lokalizaci tubulů popsali Kaneshiro a Holz (1976) u nálevníků, které provizorně zařadili do rodu *Uronema*. Popsali průběh tubulů, jejich anastomózy v kaudální části nálevníků i propojení s kontraktilní vakuolou a označili je za součást „Fluid Segregation Organelle“ (FSO). Z hlediska srovnání a interpretace detailů ultrastruktury jsou nálezy uvedených autorů velmi zajímavé, nelze je však použít ke zpřesnění determinace kmene CESP. Kaneshiro a Holz (1976) popsali tubulární systém u nálevníků, jejichž rozměry ve srovnání s nálevníky kmene CESP byly téměř dvojnásobné, navíc u těchto velkých nálevníků zaznamenali i detaily ultrastruktury typické pro kmeny CIRL a CMEX. Na podélných řezech dokumentovali nálezy dlouhých, subkortikálně lokalizovaných mitochondrií, které v kaudální části nálevníků fúzovaly. V diskusi uvedli i možnost transformace kratších, intermeridionálně lokalizovaných mitochondrií v extrémně dlouhé pod vlivem vnějších faktorů.

6.2. Metodické zkušenosti

Dokumentace studovaných nálevníků *in vivo* byla značně komplikována malou velikostí a rychlostí jejich pohybu. Při použití imerzního objektivu (100×) nebylo vůbec možné nálevníky fotografovat. Tlak krycího skla a objektivu s imerzí nálevníky zpomaloval jen nepatrně. Metody, které jsem vyzkoušel s cílem zpomalit pohyb nálevníků umožnily snadnější pozorování, nestačily ale k pořízení kvalitní fotodokumentace. Využití methylcelulózy se nejdříve jevilo jako velmi nadějně. Pomohlo mi poříditi snímky kmenů CMEX a CCAP.

Kmeny CESP a CIRL byly bohužel na methylcelulózu výrazně citlivější a jejich buňky se velmi rychle bortily. Dokumentovaný příklad úspěšného využití methylcelulózy se mi v literatuře nepodařilo najít. Chlorid hořečnatý rovněž zklamal. Nepřinesl použitelné výsledky ani u jednoho ze studovaných kmenů, přesto, že Alvarez-Pellitero a kol. (2004) deklarovali úspěšně použití při fotografování mořského scuticociliáta. Jednoznačně nejlepší předpoklady pro pořízení fotodokumentace připravila fixace nálevníků oxidem osmičelým. Byl to jediný postup, který byl úspěšně použit pro všechny 4 kmeny a umožňoval fotografování při největším zvětšení, přičemž se zvýšil kontrast nálevníků.

U impregnačních metod jsem se potýkal s úskalím, které představuje množství solí a jejich reakce se stříbrem. Doporučované promývání materiálu je zvláště složité při použití Kleinova postupu. Fixace materiálu k podložnímu sklu je založená na vyschnutí (Klein 1958), proto vymytí solí obsažených ve zbytcích media není jednoduché a ztráty materiálu mohou být úplné. Foissner (1991) doporučuje ve svém postupu nálevníky přichycené k podložnímu sklu pomocí vaječného albuminu opakovaně ponořit do destilované vody. Tento způsob ale podle mých zkušeností nezajišťuje dostatečné vymytí solí a po ukončení celého postupu překrývá podložní sklo vždy vrstva krystalů chloridu stříbrného. Problém s vysokou koncentrací solí jsem ve své práci vyřešil fixací materiálu 4% formaldehydem s následným opakovaným promytím destilovanou vodou. To je však zásadní změna, která sice minimalizovala ztráty materiálu, ale mohla mít vliv na kvalitu konečného obarvení. Východiskem by mohlo být použití jiné metody impregnace dusičnanem stříbrným, tzv. "vlhké" impregnace, která je častěji nazývána podle autorů (Chatton-Lwoff).

Metodě impregnace uhličitanu stříbrného jsem věnoval největší úsilí, přesto se ale nepovedlo získat žádné dobré preparáty. Ani přes veškeré pokusy s obměňováním poměrů jednotlivých složek, jsem nedocílil výrazného zlepšení. Při zkoušení nejrůznějších modifikací postupu se ukázal být velmi podstatný poměr formaldehydu k roztoku s uhličitanem stříbrným a pyridinem. Ačkoliv jsem používal tyto dvě složky ve spoustě možných kombinací, je možné že nebyly vyčerpány všechny. Vyzkoušení roztoků obsahujících uhličitan stříbrný a pyridin s různě upraveným pH by snad bylo další možností, jak usilovat o dosažení lepšího výsledku. Sám jsem při impregnování protargolem hodnotu pH v roztoku nikdy nekontroloval, ačkoliv někteří autoři (Lynn 1992) doporučují srovnat pH na určitou hodnotu. V dostupné literatuře jsem ale nenašel žádnou zmínku o tom, jaký vliv může mít rozdílné pH roztoku s uhličitanem stříbrným.

Metoda impregnace protargolem podle Foissnera (1991) se osvědčila nejvíce. Po opakovaném použití metody jsem získával standardní výsledky. Ačkoliv jsem používal

k fixaci převážně Bouinovu tekutinu, použití druhé doporučené fixáže (Stievenovy tekutiny) se ve výsledku příliš nelišilo. Jediný problém, který při použití této metody nastával, souvisel s vaječným albuminem. Albumin k přichytávání nálevníků je možné používat jen omezeně dlouhou dobu, na což autor metody upozorňuje. Osvědčilo se mi připravovat vaječný albumin pravidelně každý měsíc. Při barvení jsem používal dva různě staré albuminy. Pokud jeden z nich na podložním skle nedržel, byla vždy šance, že alespoň druhá polovina preparátů přinese nějaký výsledek. Další postup, který jsem zkoušel (Lee a kol. 1985), nepřinášel tak dobré výsledky jako Foissnerova metoda. Vycházel jsem z modifikace této metody ve fázi fixace (Howarda a kol. 2004). Právě složitý postup fixace působil největší problémy. Pokud jsem dodržel postup, byly buňky nálevníků vždy viditelně poškozené fixací. Tento problém je možné omezit fixací před nanesením na polylysinová skla podle postupu Foissnera (1991) a vynecháním druhé fixace. Ačkoliv se obecně s polylysinovými skly pracuje mnohem lépe, pro metodu impregnace protargolem je vhodnější spíše vaječný albumin. Vaječný albumin umožňuje při nanášení vývojky kontrolovat intenzitu obarvení a také ji regulovat (ředěním staré a nové vývojky v nejrůznějších poměrech). Pokud má albumin zlatohnědou barvu, jsou nálevníci zpravidla ideálně obarvení. To je také důvod, proč jsem preferoval Bouinovu fixáž před Stievenovu. Při použití Stievenovy tekutiny nelze pomocí zbarvení albuminu tak jednoduše kontrolovat intenzitu obarvení.

Fluorescenční barvení nálevníků flutaxem-1 nepřineslo uspokojivé výsledky. Podle původní metody (Arregui a kol. 2002) není nutné nálevníky nijak fixovat. Takový postup by byl ale těžko proveditelný. Studované kmeny nálevníků bylo velmi těžké pozorovat živé a v procházejícím světle při dostatečném zvětšení (100×), natož fotografovat. Vyhledávání jednotlivých pohybujících se nálevníků při použití fluorescence bylo nemožné. V metodice (Arregui a kol. 2002) není ale žádný takový problém zmiňován. Podivné také bylo, jakým způsobem autoři dosáhli trojrozměrného vzhledu objektů. Vysvětlení přinesla až novější práce stejných autorů (Arregui a kol. 2003). Autoři se zde zaměřili na jediný druh – *Sterkiella cavicola* Kahl, 1935 (Spirotrichea, Oxytrichidae), na kterém předvedli využití flutaxu-1 jako alternativy k impregnaci protargolem. Do kultury nálevníků nejprve přidali saponin tak, aby jeho konečná koncentrace dosahovala 0,5% a po 15s fixovali 2% paraformaldehydem. Nepoužili žádné montování zabraňující vysvícení fluorescence, pouze roztok s nálevníky přikryli krycím sklem a pozorovali v epifluorescenčním mikroskopu. Podstatné je, že teprve tato práce uvedla použití softwaru na zpracování obrazu – MetaMorph Imaging System (Universal Imaging Corporation), což vysvětluje konečný trojrozměrný dojem z fotografií.

Při přípravě nálevníků pro skanovací elektronovou mikroskopii jsem se potýkal s několika problémy. Kmen CMEX při primární fixaci 3% glutaraldehydem přicházel o všechny cilie. Tento problém jsem vyřešil vynecháním glutaraldehydu a okamžitou fixací 1% oxidem osmičelým. Za normálních okolností jsem po primární fixaci propíral nálevníky 0,1M kakodylátovým pufrem za pomoci stereomikroskopu tak, abych "očistil" jejich cilie. Vzhledem k nebezpečnosti osmiových par to však nebylo možné, propírání muselo předcházet opakované odsávání roztoku (1% oxidu osmičelého) a dolévání destilovanou vodou. Tento postup působil poměrně velké ztráty. Velké problémy zpočátku působil i stav mikroskopu Jeol 6300. Mnohdy na něm nebylo možné fotografovat při zvětšení větším než 4000×. Tento problém se snadno vyřešil při přechodu na nový elektronový mikroskop Jeol 6700F.

7. Souhrn a perspektivy další práce

Morfologické metody použité pro studium nálevníků izolovaných z žaber mořských ryb simultánně infikovaných amfizoickými amébami umožnily determinovat jednotlivé kmeny na úrovni rodů. Kmen izolovaný z kambaly *Psetta maxima* Linnaeus, 1758 byl zařazen do rodu *Uronema* Dujardin, 1841. Kmeny izolované z lososa *Salmo salar* Linnaeus, 1758 a z ostence *Balistes polylepis* Steindachner, 1896 byly zařazeny do rodu *Pseudocohnilembus* Evans a Thompson, 1964.

Opakovaným klonováním a podrobným studiem kultur *Cohnilembus reniformis* Kahl ze sbírky UKNCC bylo jednoznačně prokázáno, že nálevníci tohoto kmene patří k polymorfnímu druhu.

Studium ultrastruktury odhalilo v cytoplasmě nálevníků izolovaných z žaber kambaly přítomnost tubulárního systému, který byl dosud popsán jen jednou, u nálevníků provizorně zařazených do rodu *Uronema*.

Skannovací elektronová mikroskopie umožnila pozorovat unikátní struktury na orálních ciliích nálevníků sbírkového kmene *C. reniformis*.

Vzhledem k tomu, že všechny studované kmeny udržuji v kulturách, může pokračovat práce směřující k jejich druhové determinaci. Její součástí bude podrobné studium povrchových struktur i subbuněčné organizace. Za důležitou fázi dalšího studia považuji ověření rodového, později i druhového zařazení pomocí fylogenetické analýzy založené na sekvencích SSU rRNA genu.

8. Použitá literatura

Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MF (2005) The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* 52: 399–351

Aescht E (2001) Catalogue of the Generic Names of Ciliates (Protozoa, Ciliophora). *Denisia* 1:1–350

Alvarez-Pellitero P, Palenzuela O, Padrós F, Sitjà-Bobadilla A, Rianza A, Silva R, Arán J (2004) Histophagous scuticociliatids (Ciliophora) parasitizing turbot *Scophthalmus maximus*: morphology, in vitro culture and virulence. *Folia Parasitol* 51: 177–187

Arregui L, Muñoz-Fontela C, Guinea A, Serrano S (2003) Flutax facilitates visualization of the ciliature of oxytrichid hypotrichs. *Europ J Protistol* 39: 169–172

Arregui L, Muñoz-Fontela C, Serrano S, Barasoain I, Guinea A (2002) Direct Visualization of the Microtubular Cytoskeleton of Ciliated Protozoa with Fluorescent Taxoid. *J Eukaryot Microbiol* 49: 312–318

Basson L, Van As J (2006) Trichodinidae and Other Ciliophorans (Phylum Ciliophora). In: Woo PTK (ed) *Fish Diseases and Disorders, Volume 1: Protozoans and Metazoan Infections.* - 2nd ed. Wallingford, p 154–182

Bodian D (1936) A new method for staining nerve fibers and nerve endings in mounted paraffin sections. *Anat Rec* 69: 89–97

Catalogue of the UK National Culture Collection – List of Algae and Protozoa – UKNCC.
<http://www.ukncc.co.uk>

Corliss JO (1973) History, Taxonomy, Ecology, and Evolution of Species *Tetrahymena*. In: Elliott AM (ed.) *Biology of Tetrahymena*. Downed, Hutchinson and Ross, Inc, p 1–56

Dykstra JM (1993) Specimen preparation. In: Dykstra JM (ed) *A manual of Applied Techniques for Biological Electron Microscopy*. Plenum Press. New York & London, p 1–27

Esteban GF, Olmo JL, Finlay BJ (2001) Redescription of *Psilotricha acuminata* Stein, 1859 and Revisions of the Genera *Psilotricha* and *Urospinula* (Ciliophora, Hypotrichia). *J Eukaryot Microbiol* 48: 280–292

Evans FR, Thompson JC (1964) Pseudocohnilembidae n. fam., a Hymenostome Ciliate Family Containing One Genus, *Pseudocohnilembus* n.g., with Three New Species. *J Protozool* 11: 344–352

- Fernandez-Galiano D (1976) Silver impregnation of ciliated protozoa: procedure yielding good results with the pyridinated silver carbonate method. *Trans Amer Micros Soc* 95: 557–560
- Fernandez-Leborans G, Zaldumbide MC (1986) Two new marine scuticociliates: *Pseudocohnilembus antoniensis* and *Pseudocohnilembus portuensis* (Ciliophora). *Microbios* 47: 7–22
- Foissner W (1991) Basic Light and Scanning Electron Microscopic Methods for Taxonomic Studies of Ciliated Protozoa. *Europ J Protistol* 27: 313–330
- Foissner W (1996) Ontogenesis in Ciliated Protozoa with Emphasis on Stomatogenesis. In: Hausmann K, Bradbury PC (eds) *Ciliates: cells as organisms*. Gustav Fisher Verlag. Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm, p 95–177
- Foissner W, Wilbert N (1981) A Comparative Study of the Infraciliature and Silverline System of the Fresh-Water Scuticociliates *Pseudocohnilembus putrinus* (Kahl, 1928) nov. comb., *P. pusillus* (Quennerstedt, 1869) nov. comb., and the Marine Form *P. marinus* Thompson, 1961. *J Protozool* 28: 291–296
- Fokin SI (2004) A brief history of ciliate studies (late XVII – the first third of the XX century). *Protistology* 3: 283–297
- Hausmann K, Hülsmann N (2003a) Definice a historie protozoologické terminologie, Historický přehled protozoologického výzkumu. In: Hausmann K, Hülsmann N (eds) *Protozoologie*. Academia, Praha, p 13–24
- Hausmann K, Hülsmann N (2003b) Systém prvoků. In: Hausmann K, Hülsmann N (eds) *Protozoologie*. Academia, Praha, p 58–164
- Honigberg BM (1973) Silver proteinate stains. In: Gray P (ed) *Encyclopedia of Microscopy and Microtechnique*. New York, p 536–538
- Howard DW, Lewis EJ, Keller BJ, Smith CS (2004) Staining. In: Howard DW, Lewis EJ, Keller BJ, Smith CS (eds) *Histological Techniques for Marine Bivalve Mollusks and Crustaceans*. NOAA, National Ocean Service, Oxford, p 85–136
- Iglesias R, Paramá A, Álvarez MF, Leiro J, Fernández J, Sanmartín ML (2001) *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida) as the causative agent of scuticociliatosis in farmed turbot *Scophthalmus maximus* in Galicia (NW Spain). *Dis Aquat Org* 46: 47–55
- Jee B, Kim Y, Park MS (2001) Morphology and biology of parasite responsible for scuticociliatosis of cultured olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Dis Aquat Org* 47: 49–55

- Jones DB (1973) Silver stains. In: Gray P (ed) Encyclopedia of Microscopy and Microtechnique. New York, p 538–540
- Jung S, Kitamura S, Song J, Oh M (2007) *Miamiensis avidus* (Ciliophora: Scuticociliatida) causes systemic infection of olive flounder *Paralichthys olivaceus* and is a senior synonym of *Philasterides dicentrarchi*. Dis Aquat Org 73:227–233
- Kaneshiro ES, Holz GG (1976) Observation on the ultrastructure of *Uronema* spp., marine scuticociliates. J Protozool 23: 503–516
- Kim SM, Cho JB, Lee EH, Kwon SR, Kim SK, Nam YK, Kim KH (2004) *Pseudocohnilembus persalinus* (Ciliophora: Scuticociliatida) is an additional species causing scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Dis Aquat Org 62: 239–244
- Klein BM (1926) Über eine neue Eigentümlichkeit der Pellicula von *Chilodon uncinatus*. Ehrbg Zoolog Anz 67: 160–162
- Klein BM (1958) The “ Dry ” Silver Method and Its Proper Use. J Protozool 5: 99–103
- Lee JJ, Small EB, Lynn DH, Bovee EC (1985) Some techniques for collecting, cultivating and observing protozoa. In: Lee JJ, Hutner SH, Bovee EC (eds) Illustrated Guide to the Protozoa. Society of Protozoologists, Lawrence, p 1–7
- Lennartz DC, Bovee EC (1980) Induction of Macrostome Formation in *Blepharisma americanum* (Suziki, 1954) by Alpha-tocopheryl succinate. Trans Amer Micros Soc 99: 310–317
- Lom J (2005) Ciliophora (Ciliates). In: Rohde K (ed) Marine Parasitology. Wallingford, p 37–41
- Lom J, Dyková I (1992) Protozoan Parasites of Fishes. Developments in Aquaculture and Fisheries Science, vol. 26. Amsterdam, p 237–288
- Lynn DH (1992) Protargol staining. In: Lee JJ, Soldo AT eds. (1992) Protocols in Protozoology. Society of Protozoologists, Lawrence, C4.1–C4.8
- Lynn DH, Small EB (2000) Phylum Ciliophora. In: Lee JJ, Leedale GF, Bradbury P (eds) The Illustrated Guide to the Protozoa. 2nd edition. Society of Protozoologists. Lawrence, p 371–655
- Ma H, Choi JK, Song W (2003) An Improved Silver Carbonate Impregnation for Marine Ciliated Protozoa. Acta Protozool 42: 161–164

- Miyake A (1996) Fertilization and Sexuality in Ciliates. In: Hausmann K, Bradbury PC (eds) Ciliates: cells as organisms. Gustav Fisher Verlag. Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm, p 243–290
- Mulish M (2003) Jádra a sexuální rozmnožování. In: Hausmann K, Hülsmann N (eds) Protozoologie. Academia, Praha, p 230–244
- Munday BL, O'Donoghue PJ, Watts M, Rough K, Hawkesford T (1997) Fatal encephalitis due to the scuticociliate *Uronema nigricans* in sea-caged, southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii*. Dis Aquat Org 30: 17–25
- Nerad TA, Daggett PM (1992) Cultivation of Scuticociliates. In: Lee JJ, Soldo AT (eds) Protocols in Protozoology. Society of Protozoologists, Lawrence, p A50.1–A50.7
- Packroff G, Lawrence JR, Neu TR (2002) In Situ Confocal Laser Scanning Microscopy of Protozoans in Cultures and Complex Biofilm Communities. Acta Protozool 41: 245–253
- Paramá A, Arranz JA, Álvarez MF, Sanmartín ML, Leiro J (2005) Ultrastructure and phylogeny of *Philasterides dicentrarchi* (Ciliophora, Scuticociliatida) from farmed turbot in NW Spain. Parasitology 132: 555–564
- Paulin JJ (1992a) Preparation of Cells for Scanning Electron Microscopy. In: Lee JJ, Soldo AT (eds) Protocols in Protozoology. Society of Protozoologists, Lawrence, p C17.1–C17.2
- Paulin JJ (1992b) Poly-L-Lysine Adhesive for Cell Suspension and Reference to Other Adhesives Used in Scanning Electron Microscopy. In: Lee JJ, Soldo AT (eds) Protocols in Protozoology. Society of Protozoologists, Lawrence, C18.1–C18.2
- Repak AJ (1992) Immobilization methods for Protozoa. In: Lee JJ, Soldo AT (eds) Protocols in Protozoology. Society of Protozoologists, Lawrence, C1.1–C1.13
- Roberts DM, Causton H (1988) Silver Nitrate Impregnation of Ciliated Protozoa. Arch Protistenkd 135: 299–318
- Schuster F (1964) Electron microscope observations on spore formation in the true slime mold *Didymium nigripes*. J Protozool 11: 207–216
- Silva-Neto ID (2000) Improvement of silver impregnation technique (protargol) to obtain morphological features of protists ciliates, flagellates and opalينات. Rev Bras Biol 60: 451–459
- Small EB, Lynn DH (1985) Phylum Ciliophora Doflein, 1901. In: Lee JJ, Hutner SH, Bovee EC (eds) Illustrated Guide to the Protozoa. Society of Protozoologists, Lawrence. 393–575

Soldo AT (1992) Isolation and Purification of Bacterial Symbionts (Xenosomes) from Axenically Cultivated Marine Ciliates. In: Lee JJ, Soldo AT (eds) *Protocols in Protozoology*. Society of Protozoologists, Lawrence, p A4.1–A4.2

Song W (2000) Morphological and Taxonomical Studies on Some Marine Scuticociliates from Chine Sea, with Description of Two New Species, *Philasterides armantalis* sp. n. and *Cyclidium varibonneti* sp. n. (Protozoa: Ciliophora: Scuticociliatida). *Acta Protozool* 39: 295–322

Sterud E, Hansen MK, Mo TA (2000) Systemic infection with *Uronema*-like ciliates in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *J Fish Dis* 23: 33–37

Traut W, Sahara K, Otto TD, Marec F (1999) Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma* 108: 173–180