

Санкт-Петербургский Государственный университет
Биологический факультет
Кафедра зоологии беспозвоночных

Лотонин Кирилл Николаевич
Разнообразие и систематика голых лобозных амёб (Amoebozoa) в донных грунтах бухты
Ниво (Балтийское море, пролив Зунд)
Выпускная квалификационная работа бакалавра

Работа выполнена на кафедре зоологии беспозвоночных

Научный руководитель:
Доцент, к.б.н. А. В. Смирнов

Санкт-Петербург
2019

Оглавление

1. Введение	2
2. Цель и задачи исследования.....	4
3. Обзор литературы	5
3.1 Развитие систематики Амoebozoa	5
Использование морфологических признаков	5
Введение молекулярно-филогенетических методов	9
3.2 Исследования фауны амeб.....	19
Общие сведения.....	19
Бухта Ниво.....	22
4. Материал и методики	25
5. Результаты	29
Общая характеристика фауны	29
Описания обнаруженных видов амeб.....	31
6. Обсуждение	42
<i>Cutosea gen. sp.</i> (новый вид и новый род).....	42
<i>Stygamoeba sp.</i> , <i>Balamuthia sp.</i> : два новых вида из родственных групп	44
Мезогалинные представители рода <i>Thecamoeba</i>	47
Новый мезогалинный вид <i>Korotnevella sp.(1)</i>	49
Фауна протистов	50
Основные полученные результаты	52
7. Выводы	53
8. Благодарности	54
9. Список литературы.....	55

1. Введение

«Я считал, что лес - только часть полена. Что зачем вся дева, раз есть колена».
И. Бродский

Первые представления о систематике амeboидных протистов были сформированы в XIX веке, и уже в то время специалисты в данной области понимали, что корректное определение родственных отношений внутри этой особой группы протистов весьма затруднительно. Прежде всего это связано с организацией амeboидной клетки, которая не имеет постоянной формы, а также специализированных органелл, служащих для передвижения. В основе локомоции амeб лежит формирование подвижных выростов цитоплазмы (псевдоподий) за счет работы акто-миозинового цитоскелета клетки. В ходе фиксации практически невозможно сохранить клетку амeбы, не нарушив ее строения, что делает крайне сложным создание репрезентативной базы типовых экземпляров (голотипов) амeboидных организмов.

Адекватная реконструкция филогении амeboидных протистов (Amoebozoa) невозможна без проведения фаунистических работ и изучения разнообразия амeб, составляющих значительную часть биомассы в пресноводных, морских и почвенных местообитаниях. На данный момент большая часть фауны амeboидных протистов остается неизученной, и вероятность обнаружения новых видов в пробах очень высока. Исследование новых видов способствует расширению наших представлений о путях эволюции данной группы организмов. Помимо этого, в ходе изучения биоразнообразия мы получаем данные об их пространственном распределении в различных местообитаниях и трофических связях с другими представителями живого мира.

В целом, развитие методов, используемых как в систематике амeboидных протистов, так и в фаунистических исследованиях, прошло через схожие закономерные этапы. Большинство таксонов, установленных в первых работах по классификации амeб (Bütschli 1880; Delage and Herouard 1896; Calkins 1901), в данный момент не используются, поскольку авторами были использованы морфологические признаки, не отражающие филогенетическое родство. Первые фаунистические работы по описанию видового состава амeб (Leidy 1879; Penard 1902) характеризуются низкой воспроизводимостью результатов из-за отсутствия отработанных методов документации изученного материала. Введение в практику современных методов световой микроскопии положило начало созданию определителей (Bovee 1985) и атласов амeб (Davis et al. 1978), позволило сопровождать описания новых видов микрофотографиями, а также дало возможность сопоставлять идентифицированные виды с обнаруженными в более ранних исследованиях. Дальнейшее привлечение электронной микроскопии позволило изучить тонкое строение клеток амeб, что оказалось полезным для более четкого обозначения границ между таксонами низкого

ранга (Page 1976; 1983; 1987, 1988; 1991). Вместе с этим была продемонстрирована необходимость использования методов электронной микроскопии и в фаунистических исследованиях в случаях, когда, например, определительным признаком служит ультраструктура клеточных покровов (Vørs 1992; Smirnov 1999a).

Наконец, с 90-х годов XX века систематиками активно применяются молекулярно-филогенетические методы для установления родственных отношений между представителями Amoebozoa (Sims et al. 1999; Amaral Zettler et al. 2000). Увеличение выборки таксонов, сравнение генов 18S рРНК, COI и транскриптомов различных видов амёб, построение белковых деревьев, мультигенный анализ – все это позволяет увеличить разрешающую способность создаваемых классификаций, определить высокоуровневые ветвления древа Amoebozoa. В настоящее время описание нового вида, а также идентификация описанных ранее крипточеских видов со схожей морфологией невозможны без анализа молекулярных маркеров (Mesentsev & Smirnov 2019). Помимо этого, накопленные данные о филогенетическом положении различных представителей Amoebozoa зачастую не соответствуют представленным в традиционных классификациях амёбоидных протистов, используемых в определителях (Page 1983; 1988), поэтому таксономические характеристики уже описанных видов требуют постоянного обновления.

Таким образом, полноценное исследование фауны амёб возможно только при применении комплексного подхода, сочетающего в себе как методы микроскопии (световой и электронной), так и методы молекулярной филогении. Сравнивая полученные данные с результатами ранее выполненных работ (Smirnov 1999b; 2002; 2007; Smirnov & Thar 2003; 2004), мы можем проследить сукцессию фауны амёбоидных протистов в данном хорошо изученном местообитании, а также составить ее новую характеристику с использованием молекулярных данных.

2. Цель и задачи исследования

Цель работы: изучить фауну голых лобозных амеб, населяющих донные грунты бухты Ниво (Балтийское море, пролив Зунд), с использованием современных морфологических и молекулярных методов и получить данные об изменении видового состава амеб в этом местообитании за 10 лет, прошедших с момента публикации последнего фаунистического исследования по этому местообитанию.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Отобрать пробы воды и верхнего слоя донных грунтов в бухте Ниво. Установить накопительные культуры, из них впоследствии получить смешанные и клональные культуры обнаруженных видов амеб.
2. Провести светомикроскопические исследования и выполнить описание и фотодокументирование выделенных изолятов амеб. Провести электронно-микроскопические и молекулярные исследования обнаруженных видов амеб
3. Идентифицировать обнаруженные виды амеб как уже известные виды или описать их как новые для науки виды и сопоставить полученные результаты с данными о видовом составе амеб в бухте Ниво, приведенными в более ранних фаунистических работах по этому местообитанию.

3. Обзор литературы

3.1 Развитие систематики Amoebozoa

Использование морфологических признаков

Отсутствие постоянной формы у амeboидной клетки вызывало наибольшие трудности в работе систематиков. Для описания необходимо было использовать признаки, наблюдаемые у амeбы при движении, то есть признаки, характеризующие локомоторную форму клетки. Так, Вэллх (Wallich 1863) впервые отметил, что у различных видов амeб задний конец клетки принимает характерную форму. Шеффер продолжил исследования в этой области и ввел впоследствии термин «уроид» для обозначения заднего конца тела амeбы (Schaeffer 1918). В своих работах еще Грифф (Greeff 1866, 1874) отмечал, что при классификации следует обращать внимание на структуру ядра. Позднее, в качестве определяющего морфологического признака был предложен тип митотического деления ядра (Singh 1952; Chatton 1953; Pussard 1973). В свое время еще Шеффер утверждал, что подобный подход к классификации амeб приведет к созданию искусственной системы. В дальнейшем его прогнозы будут подтверждены исследованиями других ученых. Вопрос о валидности различных признаков оставался открытым. Все более логичным становился переход от сравнения амeб по одному признаку к созданию синтетических систем. Одна из первых подобных классификаций была предложена Шеффером (Schaeffer 1926). Основные признаки, использованные им для характеристики амeб, были так или иначе связаны с локомоторной (движущейся) формой, а также со структурой ядра.

Классификация протистов подверглась ревизии в классификации Хонигберга с соавторами (Honigberg et al. 1964). В работе использовались данные световой микроскопии, цитологического анализа, а также электронной микроскопии. Основным интересом для авторов представляли таксоны высокого ранга (не ниже подотряда). Ранее обособленные группы саркодовых и жгутиконосцев здесь объединены в подтип *Sarcomastigophora*. Надкласс *Sarcodina* включает простейших, передвигающихся с помощью псевдоподий (лобоподий, филоподий, аксоподий и ретикулоподий) и способных формировать раковину или внутренний скелет. Лобозные амeбы (п/кл. *Lobosia*) и филозные амeбы (п/кл. *Filosia*) относятся к классу *Rhizopodea*. Следует отметить, что раковинные (отр. *Arcellinida*) и голые амeбы (отр. *Amoebida*) объединены в подкласс *Lobosia*. Критерием для их сближения послужила способность формировать лобоподии. К классу *Rhizopodea* также причисляются фораминиферы (отр. *Foraminiferida*) и миксомицеты (п/кл. *Mycetozoa*). При разделении протистов внутри надкласса *Sarcodina* авторы, в первую очередь, учитывали форму псевдоподий, особенности покровных структур и жизненного цикла.

Характер тока цитоплазмы в амeboидной клетке представлял для систематиков особый интерес. Так, Бови и Джан (Bovee and Jahn 1965) предложили абсолютно новую

концепцию разделения организмов в группе Sarcodina. Ими была высказана идея о том, что все амeboидные организмы передвигаются с помощью одного из двух механизмов: сократительно-гидравлический (псевдоподия или тело представляет собой способную сокращаться трубку - гель, внутри которой течет жидкая цитоплазма – золь) или активное скольжение (в тонких псевдоподиях различимы два разнонаправленных тока цитоплазмы). Именно этот признак, по их мнению, является доминантным при установлении таксонов высокого ранга. В соответствии с этим Бови и Джан ввели два новых класса: Hydraulea и Autotractea. Примечательно, что в классе Autotractea объединены организмы, образующие как аксоподии, так и гранулоретикулоподии, а в классе Hydraulea – голые и раковинные амeбы.

По мнению Фредерика Пейджа, создание адекватной системы голых лобозных амeб невозможно без рассмотрения признаков в комплексе. В качестве основных критериев в классификации представителей подкласса Gymnamoebia (Page 1976) были использованы: 1) локомоторная форма; 2) наличие или отсутствие жгутиковой стадии; 3) структура ядра; 4) тип митоза. Автором подчеркивается особый характер данной классификации: в ней учитываются морфологические и физиологические свойства амeб. В отдельных случаях используется информация об ультраструктуре, питании и биологии организмов.

Phylum Sarcomastigophora
Subphylum Sarcodina
Superclass Rhizopoda
Class Lobosea
Subclass Gymnamoebia
Order Amoebida
Suborder Tubulina
Family Amoebidae
Family Hartmannellidae
Family Entamoebidae
Suborder Conopodina
Family Paramoebidae
Suborder Acanthopodina
Family Acanthamoebidae
Family Echinamoebidae
Suborder Flabellina
Family Flabellulidae
Family Hyalodiscidae
Suborder Thecina
Family Thecamoebidae
Order Schizopyrenida
Family Vahlkampfiidae
Order Pelobiontida
Family Pelomyxidae

Рисунок 1. Классификация голых лобозных амeб (Page 1976).

Базальное разделение голых амeб (п/кл. Gymnamoebia) было проведено по признаку наличия или отсутствия жгутиковой стадии. По большей части паразитические протисты,

характеризующиеся наличием жгутика на одной из стадий жизненного цикла, были выделены в отряд Schizopyrenida с единственным семейством Valkampfiidae. Автором также указывалась особенность их локомоции: эруптивное движение с образованием «вздутый» во фронтальной гиалиновой зоне. В отдельный отряд помещены моноподиальные амёбы рода Pelomyxa из-за слишком ярких отличий, таких как разнонаправленный фонтанирующий ток цитоплазмы, многоядерность и отсутствие митохондрий. При разбиении отряда Amoebida на пять подотрядов (Tubulina, Conopodina, Acanthopodina, Flabellina и Thesina), в первую очередь, учитывался паттерн движения амёбидной клетки, то есть то, что можно назвать морфотипом (Smirnov and Goodkov 1999c). Позднее эта система голых амёб будет использована в модифицированной классификации протистов (Levine et al. 1980). Одна из главных ее особенностей заключается в выделении двух надклассов: Rhizopoda (образуют лобоподии, филоподии, ретикулоподии) и Actinopoda (образуют аксоподии с упорядоченными пучками микротрубочек). Подобно данной работе, в классификации Бови (Bovee 1985), выполненной с помощью световой микроскопии, раковинные амёбы, а также *Trichosphaerium platyurum* с оболочкой из кальциевых спикул отнесены к подклассу Testacealobosia.

Совершенствование методов электронной микроскопии позволило получить новые данные об ультраструктуре клеток и применить их для классификации амёбидных протистов (Page 1987). Хотя сам Фредерик Пейдж утверждал, что на тот момент, даже обладая таким объемом информации, невозможно было построить абсолютно естественную систему Rhizopoda, тем не менее он считал возможным установление родственных связей между семействами голых лобозных амёб (п/кл. Gymnamoebia). Основные признаки, использованные при классификации: 1) локомоторная форма; 2) размеры клетки; 3) число ядер; 4) структура ядра; 5) тип митоза; 6) цитоплазматические включения; 7) флотирующая форма; 8) структура цист; 9) наличие жгутиковой стадии; 10) ультраструктура органелл, покрова; 11) физиологические характеристики; 12) данные о биохимии и иммунологии. В данной классификации амёбофлагелляты уже отнесены в отдельный класс Heterolobosea (Page & Blanton 1985). Их отличительные особенности: наличие жгутиковой стадии, характерное эруптивное движение, отсутствие клеточных покровов, а также дисковидные кристы митохондрий. Глубокое разделение в классе Lobosea проводится по наличию или отсутствию раковины или тектума. В подклассе голых лобозных амёб (Gymnamoebia) были выделены 4 отряда (Euamoebida, Leptomyxida, Acanthopodida и Loboreticulatida). Опять же следует отметить, что в первую очередь автор обращает внимание на локомоцию клетки. Таким образом, группы лобозных амёб имеют более

Class Heterolobosea	Subclass Testacealobosia
Order Schizopyrenida	Order Himatismenida
Family Vahlkampfiidae	Family Cochliopodiidae
Family Gruberellidae	Order Arcellinida
Order Acrasida	Order Trichosida
Family Acrasidae	Class Caryoblastea
Family Guttulinopsidae	Order Pelobiontida
	Family Pelomyxidae
Class Lobosea	Class Eumycetozoa
Subclass Gymnamoebia	Class Plasmodiophorea
Order Euamoebida	Class Filosea
Family Amoebidae	Subclass Aconchulinia
Family Thecamoebidae	Order Cristidiscoidida
Family Hartmannellidae	Family Nucleariidae
Family Vannellidae	Family Pompholyxophryidae
Family Paramoebidae	Order Cristivesiculatida
Family Vexilliferidae	Family Vampyrellidae
Order Leptomyxida	Family Arachnulidae
Suborder Rhizoflabellina	Subclass Testaceafilosia
Family Flabellulidae	Class Granuloreticulosae
Family Leptomyxidae	Order Athalamida
Suborder Leptoramosina	Family Biomyxidae
Family Stereomyxidae	Order Promycetozoida
Family Gephyramoebidae	Family Reticulomyxidae
Order Acanthopodida	Order Monothalamida
Family Acanthamoebidae	Order Foraminiferida
Order Loboreticulatida	Class Xenophyophorea
Family Corallomyxidae	
Incertae sedis	
Family Echinamoebidae	
Family Entamoebidae	
Family Hyalodiscidae	

Рисунок 2. Классификация амёб – тип Rhizopoda (Page 1987).

обособленный характер по сравнению с предыдущей системой Пейджа (Page 1976), о чем свидетельствует общее повышение таксономических рангов (п/отр. Acanthopodina – отр. Acanthopodida). Несколько семейств голых лобозных амёб были оставлены *incertae sedis* (Echinamoebidae, Entamoebidae, Hyalodiscidae). Несмотря на то что в системе учитывается совокупность всех доступных исследователю морфологических признаков, которые удобно использовать при идентификации видов амёб (на ее основе составлены определители – Page 1988; 1991), а также даны четкие характеристики родов, отсутствие

строгих, исчерпывающих критериев для установления таксонов высокого ранга и неравномерная проработанность самой системы (большая часть внимания уделена подотряду Euamoebida) значительно снижают ее разрешающую способность.

Одна из последних попыток применить чисто морфологический подход к классификации амебоидных протистов была предпринята в начале XXI века (Rogerson and Patterson 2002). Большинство лобозных и филозных амеб (в том числе раковинных), а также представители класса Eumycetozoa (по Page 1987) были объединены в группу Ramicristates (от лат. «ramus» - ветвь). Общий признак – наличие митохондрий с трубчатыми разветвленными кристами. Данный таксон является полифилетическим, поскольку лобозные и филозные амебы имеют независимое происхождение. Система голых лобозных амеб претерпела небольшие изменения (по сравнению с работой Пейджа). Число семейств в отряде Euamoebida осталось прежним, однако некоторые из них пополнились новыми родами. Отряд Acanthopodida получил название Centramoebida из-за наличия у его представителей centrosомы - цитоплазматического центра организации микротрубочек (ЦОМТа). Подобные преобразования в систематике амеб говорят о том, что применение лишь морфологических признаков накладывает значительные ограничения. Классификации, построенные по такому принципу, не дают ответа на вопрос о взаимоотношениях базальных ветвей в филогенетическом древе этих микроорганизмов. Исследование филогении амебоидных протистов, а также их связей с другими эволюционными группами эукариот возможно лишь с применением молекулярных методов.

Введение молекулярно-филогенетических методов

В основу развития современной филогенетической систематики легли принципы кладистики. Многие таксоны, считавшиеся каноническими, были упразднены из-за их поли- или парафилетичности. Основные преобразования в классификации эукариот связаны, в первую очередь, с именем Томаса Кавалье-Смита. В 1998 году им была создана система эукариот, состоящая из 6 царств (Cavalier-Smith 1998). В ходе исследования проводилось сравнение по консервативному гену 18S рРНК малой субъединицы рибосомы. Все эукариоты были также разделены на два безранговых таксона: Bikonta и Unikonta. К одножгутиковым (Unikonta) относятся заднежгутиковые (Opisthokonta), включающие животных и грибы, а также сестринская им монофилетическая группа амебоидных организмов с трубчатыми кристами митохондрий - Amoebozoa. Таким образом, можно сделать вывод о том, что предковыми формами представителей Amoebozoa были одноклеточные организмы с одним жгутиком. Таксон Rhizopoda перестал считаться валидным, поскольку оказался полифилетическим: представители класса Heterolobosea

относятся к группе Excavata, филозные амёбы – к группе Rhizaria. Внутри Амoebozoa были выделены два эволюционных направления: Lobosa (амёбы без жгутиков, образующие лобоподии) и Conosa (характерный признак – наличие пучка микротрубочек, исходящих от кинетосомы).

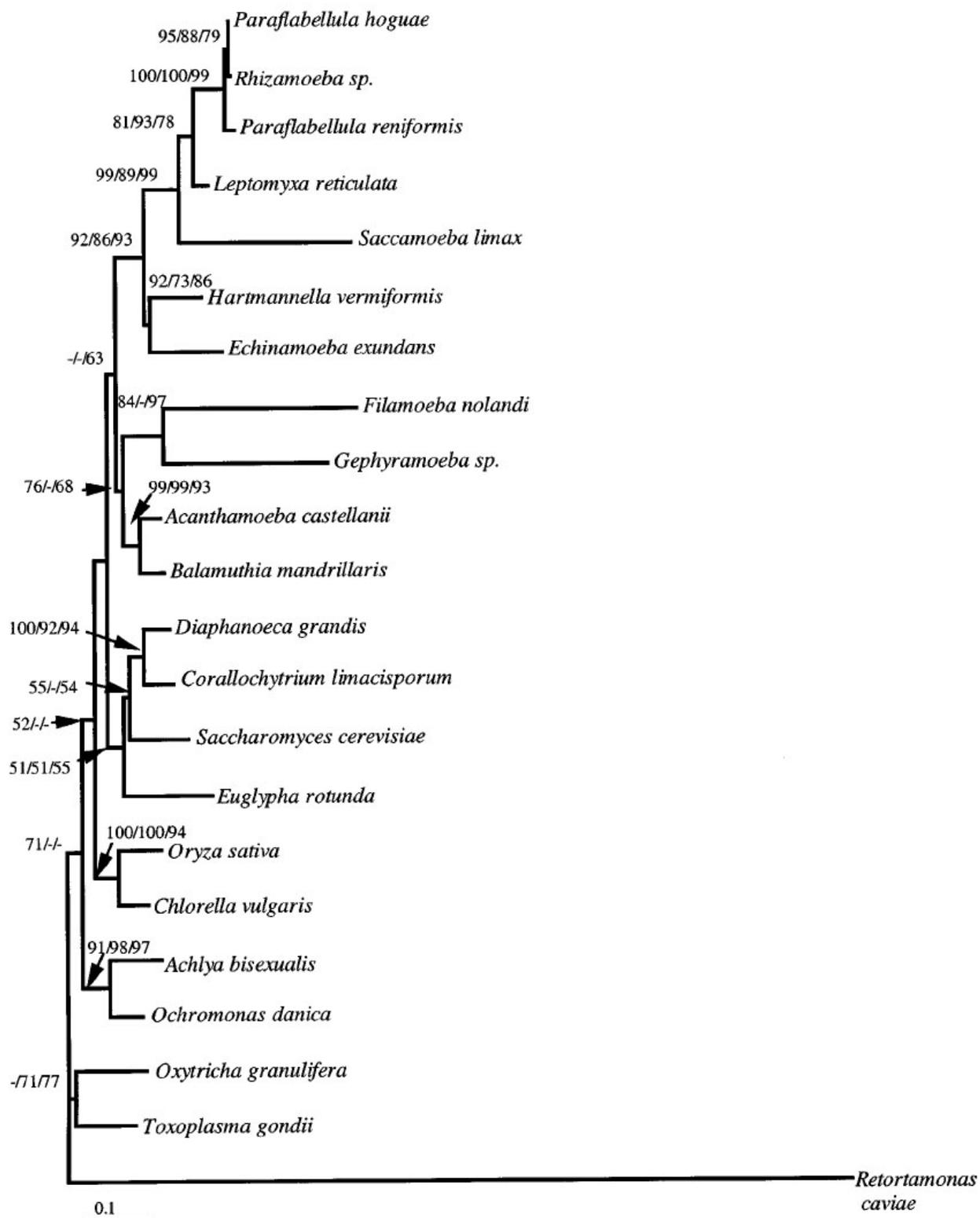


Рисунок 3. Филогенетическое древо, полученное методом максимального правдоподобия; в узлах указана бутстрэп-поддержка (по Amaral Zettler 2000).

В первых работах по анализу последовательностей гена 18S рРНК (Sims 1999) монофилетичность таксона Lobosa не была продемонстрирована, что связано с малым количеством сиквенсов амeboидных протистов в дереве, несовершенством методов статистической обработки данных и, как следствие, эффектом притяжения длинных ветвей. Отряд Leptomyxida был проверен на монофилетичность в работе Эмарэл-Цеттлер (Amaral-Zettler 2000). Для анализа были использованы гены 18S рРНК представителей трех семейств: Flabellulidae, Leptomyxidae, Gephyramoebidae (по Page 1987). Особое внимание было уделено положению патогенной амобы *Balamuthia mandrillaris*, вызывающей гранулематозный энцефалит. Согласно ранее полученным данным по морфологии клеток (Visvesvara 1993), ее следует относить к Leptomyxida. Состоятельность таксона Leptomyxida была подтверждена, причем все его представители при определенных условиях могут принимать схожий морфотип. Напротив, *Balamuthia* образовала устойчивую кладу вместе с *Acanthamoeba castellani*. На родство *Acanthamoeba* и *Balamuthia* указывают не только молекулярные данные, но и особенности их жизненного цикла: представители обоих родов являются факультативными паразитами.

В работе по молекулярной филогении голых лобозных амоб (Bolivar et al. 2001) были получены сиквенсы таких канонических видов амоб, как *Amoeba proteus*, *Amoeba leningradensis*, *Chaos nobile* и *Chaos carolinense*. Все они образуют устойчивую кладу с другими представителями отрядов Euamoebida и Leptomyxida (по Page 1987), целостность

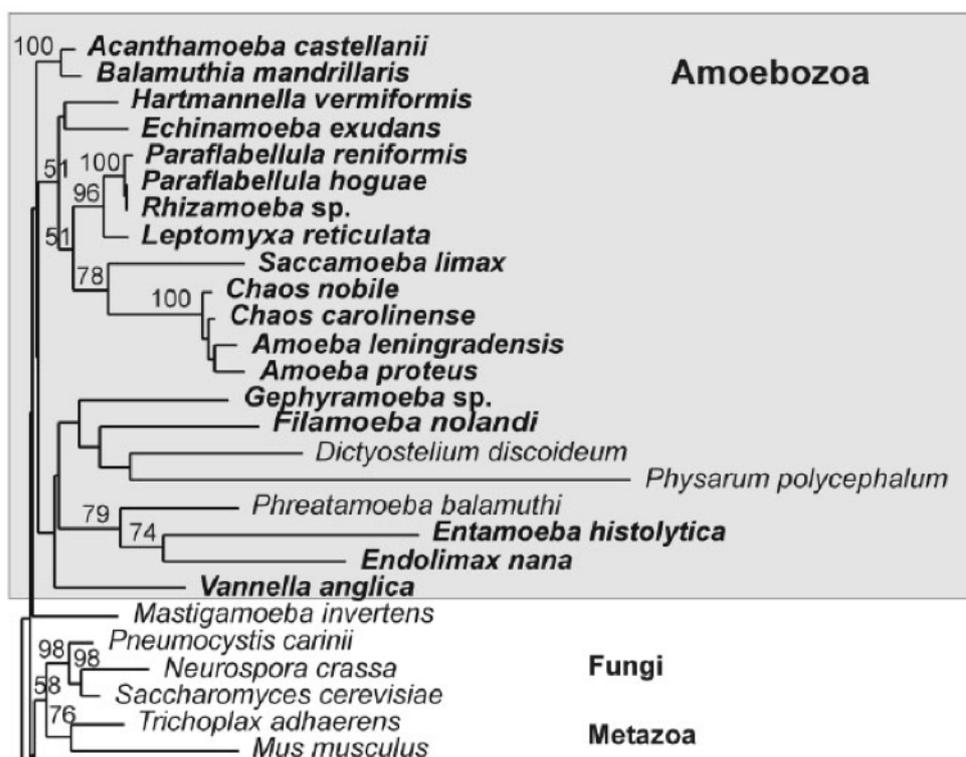


Рисунок 4. Фрагмент филогенетического дерева, построенного по методу Neighbour Joining (по Bolivar et al. 2001).

которых также была подтверждена молекулярными данными. Однако некоторые голые амёбы не группируются внутри обозначенной ранее группы Gymnamoebia (Page 1987), что указывает на ее полифилетичность. В целом, все голые лобозные амёбы образуют единую ветвь на филогенетическом древе, причем среди них находятся два представителя миксомицетов, что указывает на родство Lobosea и Mycetozoa и, как следствие, о монофилетичности таксона Amoebozoa.

Первая попытка по созданию синтетической системы Amoebozoa, сочетавшей в себе как молекулярные данные, так и особенности морфологии амёб, была предпринята Томасом Кавалье-Смитом (Cavalier-Smith et al. 2004). В филогенетическом анализе использованы гены 18S рРНК 142 эукариот. Все представители Amoebozoa образуют

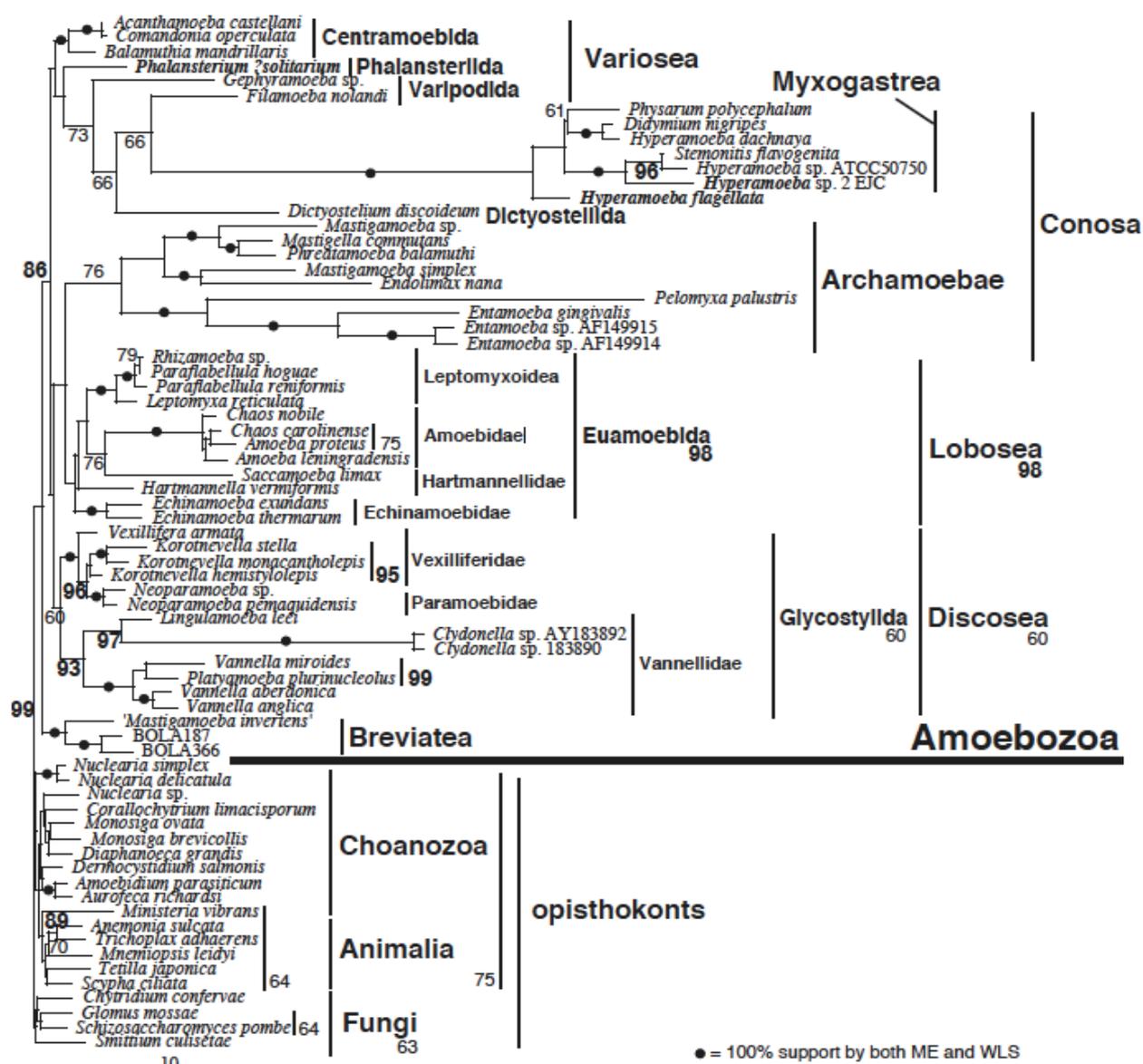


Рисунок 5. Филогенетическое древо, построенное дистанционным методом на основе генов 18S рРНК 71 представителя Unikonta (по Cavalier-Smith et al. 2004).

единую кладу за исключением неверно идентифицированного протиста «*Mastigamoeba invertens*», проявляющего сродство к Excavata, который был ошибочно выделен в класс Breviatea, объединяющий, по мнению авторов, анаэробных, рано дивергировавших амёб. Были установлены следующие таксоны: кл. Variosea (объединяет отряды Phalansteriida, Centramoebida и Varipodida), п/тип Protamoebae (= Lobosea (амёбы с цилиндрическими псевдоподиями, иногда уплощенными) + Variosea + Discosea + Breviatea) и кл. Discosea (уплощенные амёбы с ведущей ламеллоподией, обычно имеют гликоцитили или органические чешуйки). Примечательно, что определяющим признаком при классификации представителей класса Discosea в системе Кавалье-Смитта по-прежнему является строение клеточного покрова. Однако несостоятельность некоторых таксонов (сем. Vexilliferidae, Paramoebidae) и широкое разнообразие клеточных покровов говорит, скорее, об адекватности использования данного признака на уровне род-вид. Из этого можно сделать вывод о том, что базовые морфологические характеристики, соответствующие молекулярным данным, пока обнаружены не были.

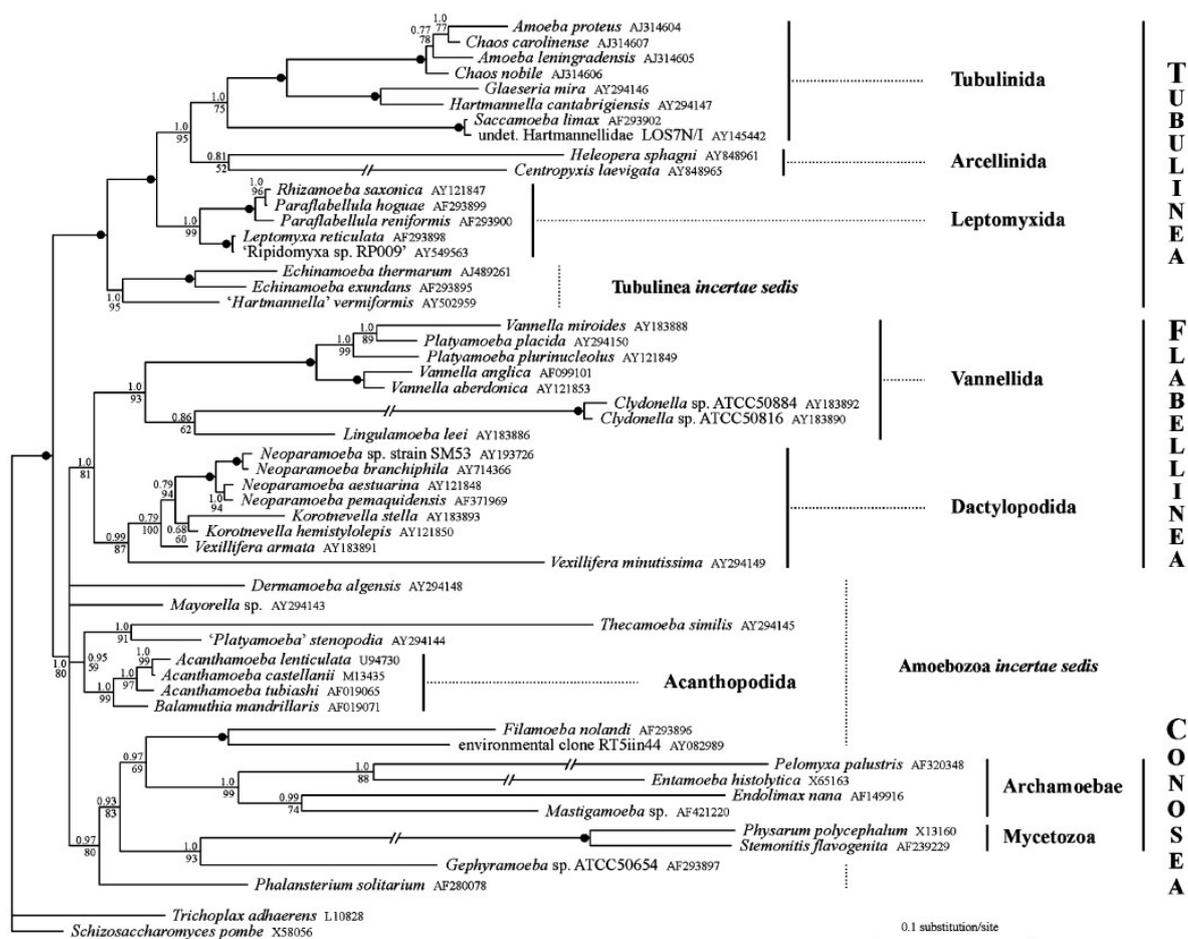


Рисунок 6. Филогенетическое древо, построенное на основе 54 сиквенсов генов 18S рНК при помощи Баесовского анализа (по Smirnov et al. 2005).

Локомоция амёбы является комплексной характеристикой, описывающей организацию цитоскелета, тип клеточного покрова, а также взаимодействие клетки с субстратом. Данный морфологический признак отражает филогенетическое родство, что было подкреплено сравнением генов 18S рРНК в работе Смирнова с соавторами (Smirnov et al. 2005). Были установлены три новых класса в составе Amoebozoa: Tubulinea, Flabellinea, Conosea. В класс Tubulinea были включены как представители голых лобозных амёб (отр. Tubulinida, Leptomyxida), так и раковинных (отр. Arcellinida). Их родство было подтверждено в ходе анализа генов 18S рРНК в работе, выполненной в том же году (Nikolaev et al. 2005). Следует отметить, что представителям класса Tubulinea присущи различные типы клеточных покровов. Однако общей для них является способность образовывать трубчатые псевдоподии с моноаксиальным током цитоплазмы (если не постоянно, то при определенных условиях). Принципиально другой механизм локомоции демонстрируют амёбы класса Flabellinea: уплощенная клетка образует ламеллоподию с полиаксиальным током цитоплазмы. Принятая система лобозных амёб была использована в обновленной классификации протистов (Adl et al. 2005), необходимость создания которой стала очевидной в связи с накоплением большого объема данных, полученных в ходе молекулярных исследований. Авторами была представлена новая безранговая система, включающая 6 супергрупп: Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveolata и Excavata. Отсутствие рангов авторы оправдывают удобством в использовании: изменение одного таксономического ранга не повлечет за собой каскад переименований нижестоящих таксонов.

Разрешающая способность молекулярной филогенетики повышается с применением мультигенного анализа. Так, в работе Тэкле с соавторами (Tekle et al. 2008) для установления местоположения на дереве семи ранее не секвенированных амёбидных протистов использовались данные по четырем генам: 18S рРНК, актин, α -тубулин, β -тубулин. Все исследуемые амёбы относятся к супергруппе Amoebozoa, что находит отражение и в базовых морфологических свойствах, таких как трубчатые кристы митохондрий и способность генерировать псевдоподии. С целью определить принадлежность протистов к той или иной эволюционной группе в составе Amoebozoa был проведен анализ генов рРНК. Для увеличения разрешающей силы данного метода из анализа были исключены виды с высокими темпами эволюционной дивергенции, а также увеличено разнообразие представителей различных таксонов. Однако возможности секвенирования по рибосомальным генам лимитированы в области базальной дивергенции представителей Amoebozoa: монофилетичность таксонов Lobosa и Conosea не была показана.

Классификация Амoebozoa была усовершенствована в работе Смирнова (Smirnov et al. 2011) в связи с расширением базы сиквенсов генов 18S рРНК. В ней объединены данные предыдущих работ, посвященных построению конгруэнтных систем (Cavalier-Smith et al. 2004; Smirnov et al. 2005). В основании группы Lobosa отчетливо прослеживается

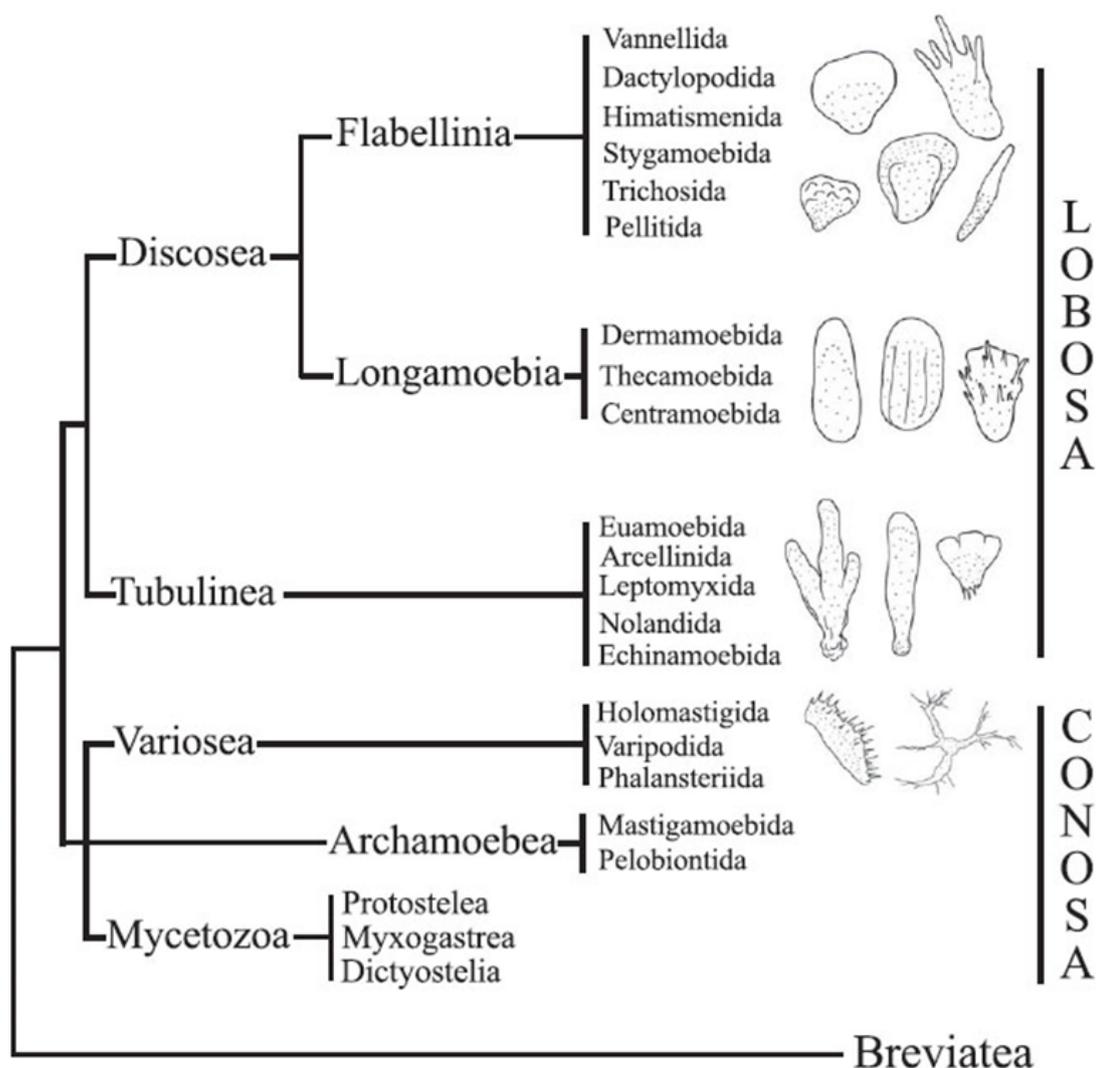


Рисунок 7. Схема взаимоотношений между основными филогенетическими ветвями Амoebozoa (по Smirnov et al. 2011).

дихотомия: класс Discosea (Flabellinea по Smirnov et al. 2005) объединяет амeб с полиаксиальным током цитоплазмы, класс Tubulinea – амeб, демонстрирующих моноаксиальный ток в клетке или в отдельной псевдоподии. Для каждой из этих групп характерен набор определенных морфотипов. Класс Discosea разбит на два подкласса: Flabellinia и Longamoebia. Тем не менее, как уже отмечалось выше, сравнение коротких последовательностей генов 18S рРНК не дает представления о базальной дивергенции представителей Амoebozoa. Именно поэтому установить монофилетичность таксонов Discosea, Variosea и Mycetozoa таким методом не представляется возможным. Кроме того,

между представителями Amoebozoa существует большая разница в темпе эволюции рРНК. Представленная система Amoebozoa будет впоследствии использована в новой безранговой классификации эукариот (Adl et al. 2012). Супергруппа Chromalveolata упразднена из-за полифилетичности, а супергруппы Stramenopiles, Alveolata, Rhizaria объединены под названием SAR. Гипотеза о том, что предком представителей кластера Amoebozoa + Opisthokonta является одножгутиковый организм, оказалась неверной (Kim et al. 2006; Roger and Simpson 2009). Именно поэтому безранговый таксон Unikonta получил название Amorphea, включающий Amoebozoa, Opisthokonta, Breviatea, Apusomonadida и Ancyromonadida. Все эукариоты, за исключением Amorphea и Excavata, объединены в группе Diaphoretickes. Название указывает на разнообразие организации клеток представителей данной группы, произошедших от общего предка. Отсутствие таксонов, описывающих базальную дивергенцию Amoebozoa (Lobosa и Conosa), объясняется недостаточной обоснованностью их монофилетичности в работах по филогении с использованием гена 18S рРНК.

Результаты предыдущих работ не дают представления обо всех аспектах классификации Amoebozoa, что связано со следующими причинами: 1) анализ одного гена (18S рРНК); 2) скудная выборка таксонов. В работе Томаса Кавалье-Смита (Cavalier-Smith et al. 2015) число сравниваемых генов достигло 188. Были получены транскрипты семи представителей различных отрядов Amoebozoa. В представленной работе результаты всех анализов говорят о монофилии Amoebozoa с крепкой бутстрэп-поддержкой. Amoebozoa является сестринской группой по отношению к кластеру Apusozoa + opisthokonts. Анализ по 188 генам 109 эукариот показал, что именно группы Lobosa и Conosa отражают базальное расхождение супергруппы Amoebozoa. Таким образом, предположение о том, что точка бифуркации находится между Tubulinea и остальными представителями Amoebozoa, является неверным. В ходе работы была показана монофилия следующих таксонов: Tubulinea, Discosea, Variosea, Мухомycetes, Dictyostelea и Archamoebae. Несмотря на то, что по результатам большинства анализов группа Discosea носит монофилетический характер, такая оценка не может быть точной, так как были использованы транскрипты/геномы представителей лишь 4 из 9 отрядов данного класса. Примечательно, что в данной работе такие группы, как Flabellinia и Longamoebia (по Smirnov et al. 2011), выявлены не были. Более того, амёбы *Vexillifera* (Flabellinia) и *Acanthamoeba* (Longamoebia) образуют единую кладу. Для решения вопроса о том, является ли такая кладка аргументом против разбиения класса Discosea на два подкласса, необходимо увеличить выборку представителей класса Discosea. Основываясь на особенностях локомоции и ультраструктуре амёбоидных организмов, в составе Conosa выделены две группы: Semiconosia (Mycetozoa + Variosea) и Archamoebae.

В одной из последних работ Томаса Кавалье-Смита (Cavalier-Smith et al. 2016) для построения филогенетических деревьев использовались данные о 187 генах представителей Амoebozoa. При этом было увеличено разнообразие амeбоидных организмов: представлены 8 из 11 отрядов Lobosa, 5 из 16 отрядов Conosa. В ходе такого детального исследования была выявлена новая клада Cutosea, являющаяся базальной по отношению к кластеру Tubulinea + Discosea (объединены в надкласс Glycopoda). Представители Cutosea (*Squamamoeba*, *Sapocribrum*) обитают в морской воде (Kudryavtsev & Pawlowski 2013; Lahr et al. 2015), обладая при этом уникальной морфологией: уплощенная клетка покрыта пластичной оболочкой из мелких чешуек, неплотно прилегающей к плазмалемме и несущей

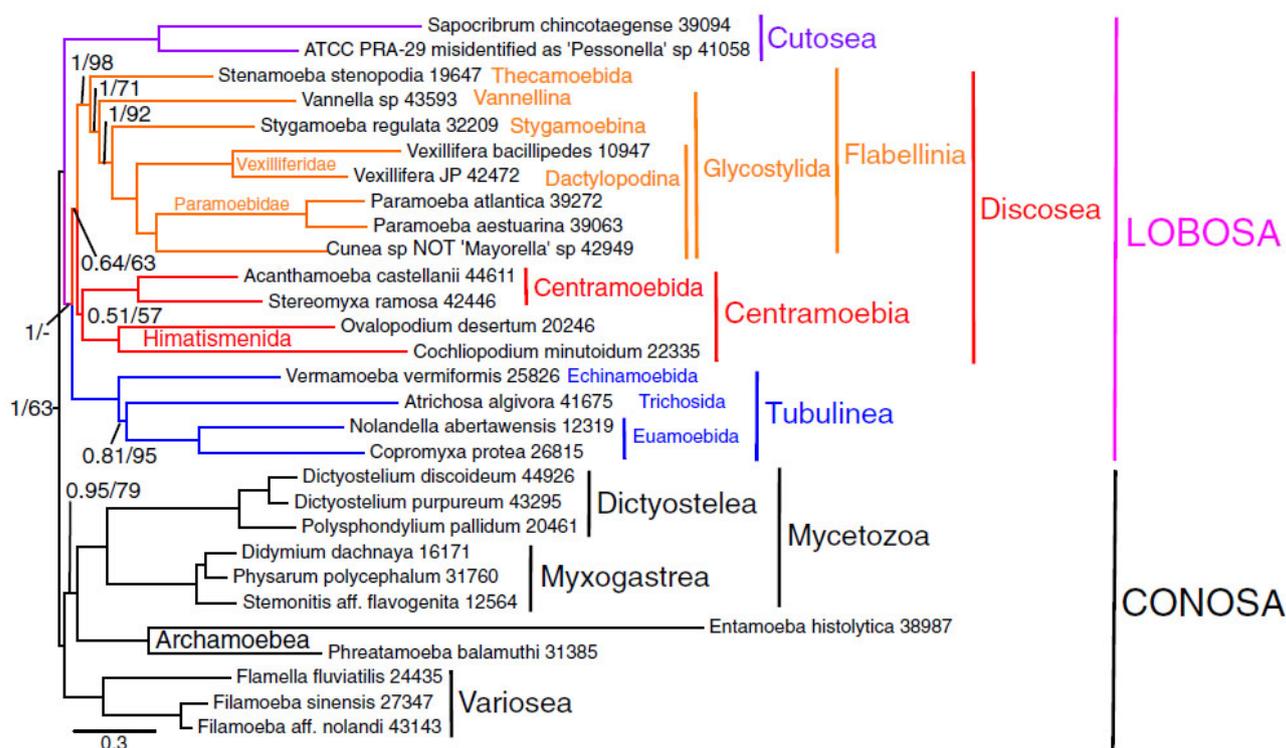


Рисунок 8. Филогенетическое древо, полученное при помощи Баесовского анализа, на основе сиквенсов 187 генов 29 представителей Амoebozoa (по Cavalier-Smith et al. 2016).

отверстия для выхода псевдоподий. Подкласс Flabellinia (по Smirnov et al. 2011) не является валидным, поскольку: 1) отряд Himatismenida проявляет сродство к Centramoebida; 2) отряд Trichosida группируется с Tubulinea. При этом амеба из отряда Thecamoebida (*Stenamoeba stenopodia*) проявляет сродство к Glycostylida, что свидетельствует о нецелостности подкласса Longamoebia (по Smirnov et al. 2011). С помощью молекулярных методов удалось также установить полифилетичность группы Protostelea; часть ее представителей была отнесена к Variosea.

В недавнем филогенетическом анализе Амoebozoa сравнивались последовательности 325 генов 61 различных таксонов Амoebozoa (Kang et al. 2017). Использование такой исчерпывающей выборки помогло в значительной степени определить взаиморасположение базальных ветвей дерева Амoebozoa. Первичная дихотомия наблюдается на уровне таксонов Tevosa и Discosea. Tevosa объединяет две сестринские группы – Tubulinea и Evosea. Клада Cutosea, как оказалось, не является

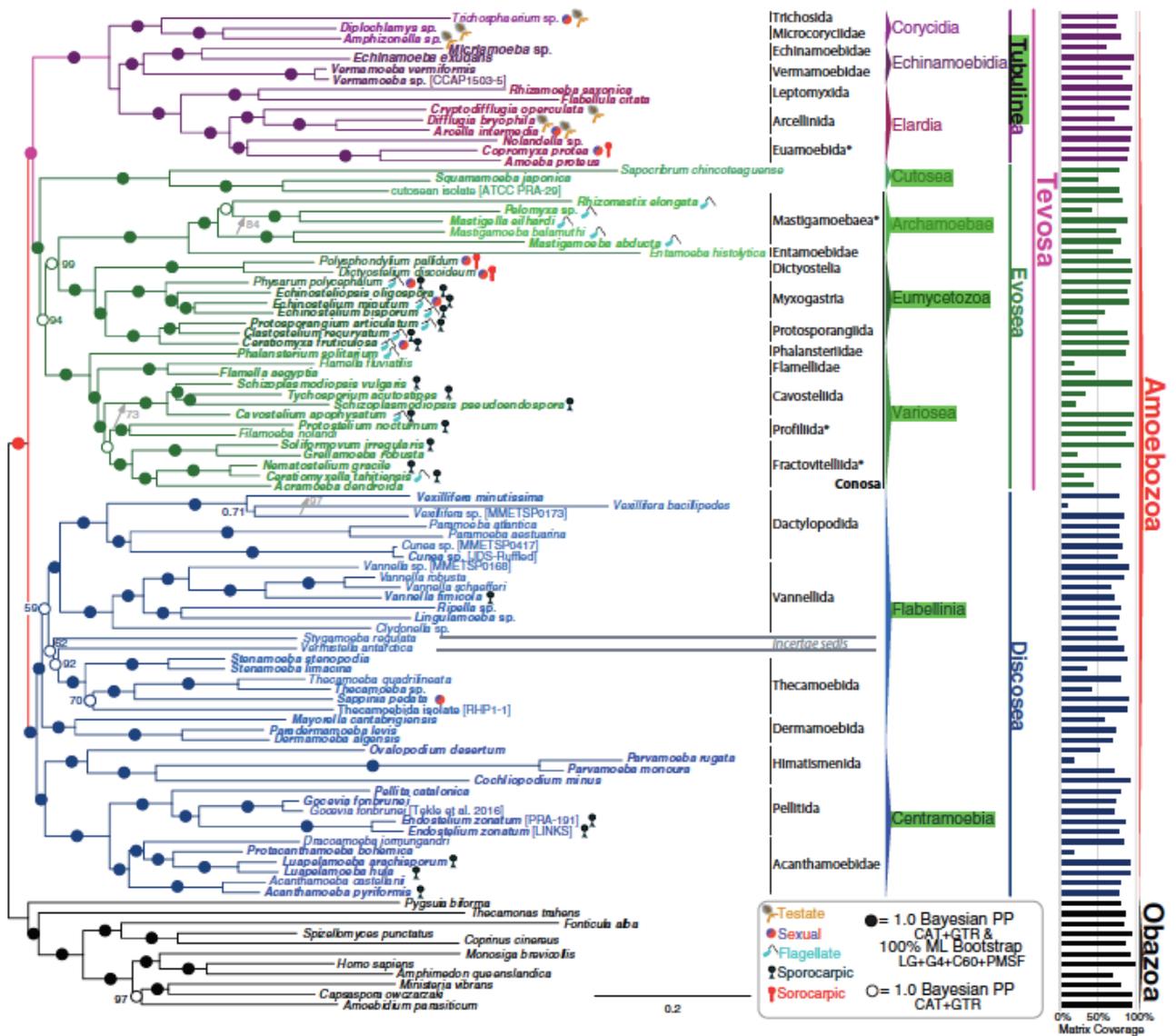


Рисунок 9. Современное филогенетическое древо Амoebozoa (Kang et al. 2017).

сестринской по отношению к кластеру Tubulinea + Discosea, как предполагалось Кавалье–Смитом (Cavalier-Smith et al. 2016), а является сестринской по отношению к Conosa. Таким образом, предложенная ранее дихотомия Lobosa – Conosa не была подтверждена, а таксон Lobosa в данной системе является парафилетическим.

Развитие методов метагеномных методов исследований открыло возможности для установления эволюционных взаимоотношений некультивируемых организмов, что значительно увеличило выборку таксонов эукариот, используемых в анализе. Многие из полученных таким путем данных были использованы при ревизии классификации эукариот (Adl et al. 2019), авторы которой продолжают следовать методам безранговой систематики. Подобно предыдущей классификации (Adl et al. 2012), две главные ветви древа эукариот носят название Amorphea и Diaphoretickes. Amorphea включает Amoebozoa и Obazoa (Opisthokonta + Breviatea + Apusomonadida). Diaphoretickes состоит из супергруппы SAR, Archaeplastida и нескольких более мелких монофилетичных групп. В ходе анализа была также подтверждена состоятельность групп CRYPTISTA и Haptista, а таксон Excavata был упразднен вследствие неясного расположения ветвей Metamonada, Discoba и Malawimonada. В супергруппе Amoebozoa таксонами наивысшего ранга считаются Tubulinea, Evosea и Discosea (по Kang et al. 2017). Достоинством этой системы также является то, что для всех эукариот прописаны стратегии питания, что облегчает интерпретацию данных метагеномного анализа.

3.2 Исследования фауны амёб

Общие сведения

Уже в первой половине XX века исследователей интересовало, какую роль играют амёбодные протисты в природных экосистемах. Так, в работе Сэндона (Sandon 1928) было уделено внимание не только идентификации видов, но и сравнению общей биомассы амёб (Amoebae), жгутиконосцев (Flagellates), ресничных (Ciliates), грибов (Fungi) и нематод (Nematodes). Автором было отмечено, что для выявления определенных групп организмов необходимо использовать специальные питательные среды. Забор образцов почвы производился в разные времена года, и Сэндону также удалось установить гетерогенность численности различных групп протистов в течение года. Однако проведенный анализ видового состава группы Rhizopoda интерпретировать сложно, поскольку на момент выполнения работы большинство известных видов амёб приписывалось к роду *Amoeba*, который впоследствии будет разбит на множество других родов. Особое внимание было уделено виду *Naegleria gruberi* (представитель Heterolobosea по Page & Blanton 1985), поскольку уже к тому моменту появились сведения о ее патогенности. Подобная тенденция к выявлению опасных для человека одноклеточных организмов (в основном, *Naegleria* и *Acanthamoeba*) в различных местообитаниях будет выражена и во многих последующих фаунистических работах (Jonckheere 1981; Fernandez et al. 1989; Bier and Sawyer 1990).

Исследователи также уделяли внимание фауне морских местообитаний. Был составлен определитель морских амёб, встречающихся на северо-западе США с подробным

описанием 76 видов (Bovee and Sawyer 1979). Его достоинством является то, что для каждого вида были представлены несколько рисунков, характеризующих локомоторную, неподвижную и флотирующую формы. В работе Сойера (Sawyer 1971) по описанию фауны залива в штате Мэрилэнд приведены микрофотографии представителей наиболее часто встречаемых родов: *Mayorella*, *Vannella*, *Thecamoeba*. Автор опирается на характеристики родов, представленные в работе Шаффера (Schaeffer 1926), однако не делает попытки определить амеб до вида, поскольку наблюдаемых морфологических признаков для этого недостаточно. Тринадцать видов амеб было обнаружено в ходе исследований в водах Атлантического океана (Davis et al. 1978). Протисты исследовались как на больших глубинах (до 2000 м), так и у поверхностной пленки воды. В ходе работы был сделан вывод о том, что наибольшее видовое разнообразие амебоидных протистов можно наблюдать именно в нейстоне. Тем не менее, некоторые авторы в своих фаунистических исследованиях (O'Dell 1979; Fernandez et al. 1989) не сопровождали список определенных видов соответствующими микрофотографиями, что не позволяло объективно судить о проведенной ими идентификации.

В ходе исследования фауны гетеротрофных протистов (амеб, жгутиконосцев и солнечников) на зоологической станции Тверминне (Финский залив), Найя Форш идентифицировала семь видов лобозных амеб (Vørs 1992). Она отмечает, что в высевах встречалось гораздо большее число амебоидных протистов, однако для их точного определения потребовались бы данные о паттерне митоза и жизненном цикле, что довольно трудно наблюдать в неочищенных культурах. Тем не менее, для семи обозначенных видов представлены не только светомикроскопические фотографии, но и электронограммы, позволяющие судить о видоспецифичных признаках (в первую очередь, о клеточных покровах). В 1995 году было выполнено исследование биомассы амебоидных протистов в донном грунте залива Ферт-оф-Клайд (Butler and Rogerson 1995). Пробы собирались в 4 различных точках, различающихся по глубине и содержанию органического углерода. Поскольку основной целью данной работы являлось определение численности всех амебоидных протистов, авторы лишь обозначили 70 «морфотипов» (возможных видов) амеб. В целом, был сделан вывод о том, что амебы и жгутиконосцы составляют большую часть биомассы бентосных протистов. Подобная работа по количественным подсчетам амебоидных протистов в морских водоемах мангровых лесов была проведена во Флориде (Rogerson and Gwaltney 2000). Из 37 различных «морфотипов» 13 были обозначены как новые виды, что свидетельствует о недостаточной изученности фауны амеб. Такой же вывод был сделан в работе по изучению видового состава амеб озера Лещево на острове Валаам (Smirnov and Goodkov 1996). Всего было изучено 39 видов голых амеб, 26 из

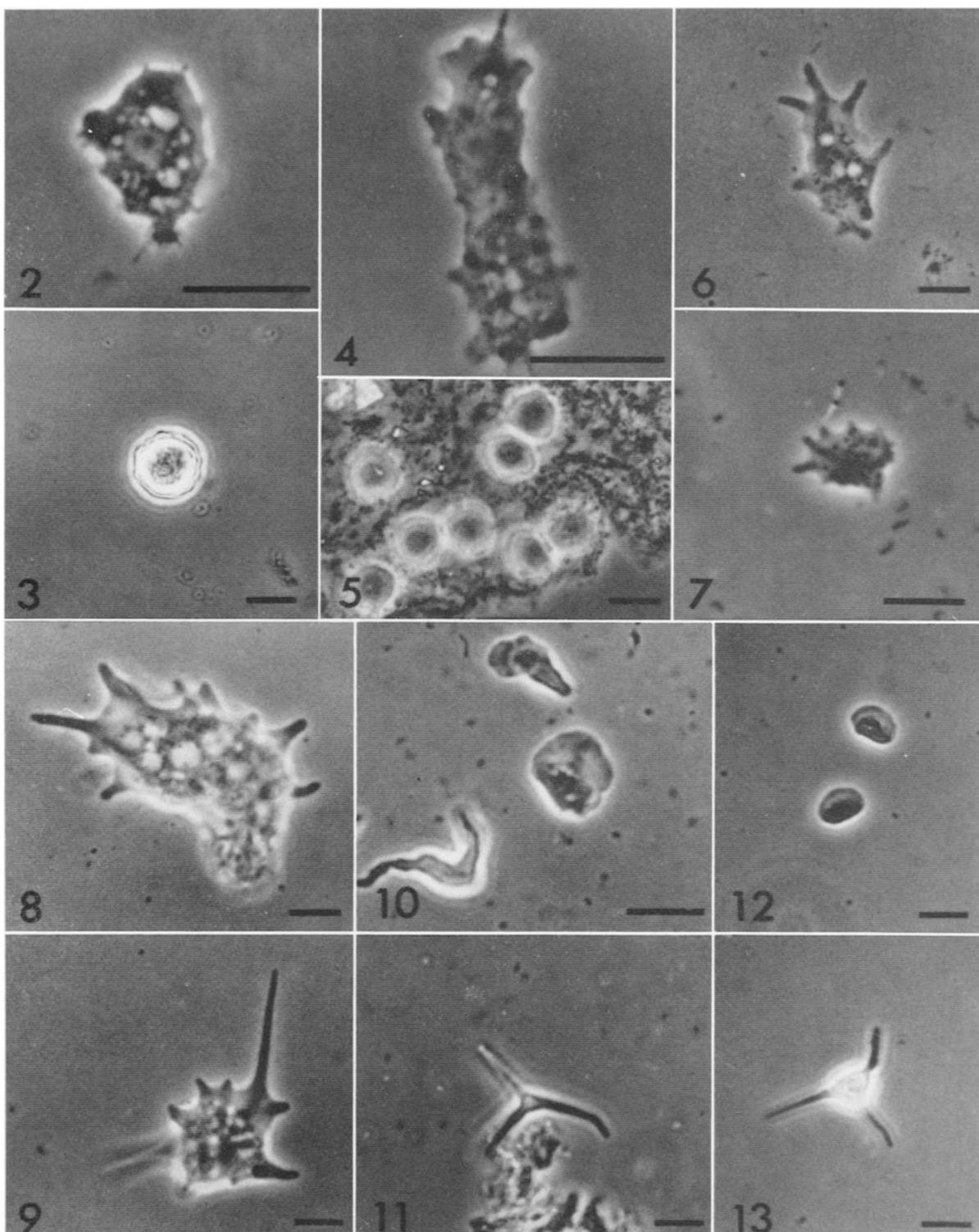


Рисунок 10. Микрофотографии амёб из вод Атлантического океана (Davis et al. 1978).

которых относились к отряду Euamoebida (по Page 1987). При этом большинство из них были исследованы как на уровне световой микроскопии, так и на уровне электронной, что позволило выявить 11 новых видов (Smirnov and Goodkov 1997; 1998). Важная роль амёбидных протистов в микробных сообществах была также продемонстрирована и для пресноводных водоемов (Arndt 1993). Одним из наиболее тщательно исследованных

пресноводных водоемов на предмет разнообразия протистов является пруд Priest Pot в Англии (Finlay and Maberly 2000; Esteban et al. 2011). Здесь была выявлена зависимость распределения различных групп протистов от концентрации кислорода в донных отложениях, а также сезонная изменчивость видового состава протистов. Амебы составляют значительную часть микробного сообщества наряду с ресничными и жгутиконосцами.

Бухта Ниво

В бухте Ниво (Балтийское море, пролив Зунд) на протяжении десятилетий проводились исследования бентосных экосистем (Fenchel 1969; 1987; Fenchel et al. 1977; Fenchel and Finlay 1995). Основные работы по исследованию фауны амебоидных протистов были выполнены Алексеем Смирновым (Smirnov 1996; 1997; 1999a). Так, в 1999 году был составлен атлас видов голых амеб, выделенных из анаэробных бактериальных матов на дне залива (Smirnov 1999a). По мнению автора, для корректной идентификации изученных видов следует сопровождать описание микрофотографиями локомоторной, неподвижной и флотирующей форм, производить окрашивание клеток и применять электронную микроскопию для детального изучения покровов, органелл и цист. Всего было определено 12 видов, причем только один оказался способным к жизни в анаэробных условиях (*Vannella peregrina*). В ходе работы был сделан вывод о том, что для описания всего биоразнообразия амеб необходимо проводить долговременные исследования с большим числом взятых проб.

Позднее было продемонстрировано существование в бухте Ниво скрытого разнообразия амебоидных протистов, то есть пула определенных видов, которые получают распространение при изменении внешних условий, тем самым обеспечивая устойчивость сообщества (Smirnov 2001). В ходе эксперимента, продолжительность которого составила 4 года, проводилось сравнение видового состава амеб в искусственных цианобактериальных матах и грунтовых пробах из залива Ниво. Пробы грунта были подвергнуты заморозке при -20°C в течение 18 часов, чтобы инициировать развитие матов. Согласно результатам, на фоне уменьшения общего разнообразия видов амеб после заморозки, в искусственных матах бактерий получил большое распространение вид цистообразующих амеб *Vannella danica*, в естественных условиях встречающийся очень редко. Это обеспечило сохранение общей численности амебоидных протистов на прежнем уровне. Позднее была выполнена еще одна работа по изменению условий среды и выявлению скрытого биоразнообразия амеб (Smirnov 2007). На этот раз в ходе эксперимента проводились изменения солености воды. После градуального понижения

Обнаруженные виды	1999	2002	2003	2004	2007
<i>Acanthamoeba sp.</i>		+			+
<i>Arcella sp.*</i>					
<i>Cochliopodium gulosum</i>		+	+	+	+
<i>Cochliopodium sp.(1)</i>		+			
<i>Cochliopodium sp.(2)</i>		+	+	+	+
<i>Cochliopodium sp.(3)</i>		+		+	+
<i>Cochliopodium sp.(4)</i>			+	+	+
<i>Cochliopodium sp.(5)</i>			+		+
<i>Cochliopodium sp.(6)</i>					+
<i>Flabellula baltica</i>	+	+		+	+
“ <i>Gocevia pontica</i> ”				+	+
<i>Hartmannella lobifera</i>	+		+	+	
<i>Korotnevella nivo</i>	+	+	+		
<i>Korotnevella diskophora*</i>					
<i>Korotnevella sp.</i>			+	+	+
<i>Korotnevella sp.(2) “stella”*</i>					
<i>Mayorella kuwaitensis</i>	+	+	+	+	+
<i>Mayorella cf. vespertilioides*</i>					
<i>Mayorella sp. (1)*</i>					
<i>Neoparamoeba sp.</i>	+				
<i>Paradermamoeba levis</i>					+
<i>Paraflabellula reniformis</i>					+
<i>Pellita catalonica</i>					+
<i>Saccamoeba sp.</i>			+	+	+
<i>Stygamoeba regulata</i>		+	+	+	+
<i>Thecamoeba munda</i>	+	+		+	+
<i>Thecamoeba orbis</i>	+	+	+	+	+
<i>Thecamoeba sp. (1)</i>				+	+
<i>Thecamoeba sp. (2)</i>				+	+
<i>Trichosphaerium sp.*</i>					
<i>Vannella calycinucleolus</i>	+	+	+	+	+
<i>Vannella danica</i>					+
<i>Vannella cf. miroides*</i>					
<i>Vannella peregrinia</i>	+				
<i>Vannella plurinucleolus</i>	+	+	+	+	+
<i>Vannella simplex</i>			+	+	
<i>Vannella sp.(1)</i>	+	+			
<i>Vannella sp.(2)</i>	+	+	+	+	+
<i>Vannella sp.(3)</i>					+
<i>Variosea gen. sp.*</i>					
<i>Vermamoeba vermiformis</i>		+		+	+
<i>Vexillifera sp.(1)</i>			+	+	
<i>Vexillifera sp.(2)</i>				+	
Всего	12	16	16	22	26

Таблица 1. Виды амеб, обнаруженные в ходе фаунистических исследований в бухте Ниво с 1999 по 2007 год (по Smirnov). Звездочкой (*) отмечены виды, о которых упоминается в рабочих записях А.В. Смирнова, но которые не были включены в публикации, данные о встречаемости для них оставлены незаполненными.

солености с 17‰ до 0,5‰ в течение двух месяцев были выявлены 5 видов амёб, которые не были обнаружены в изначальных пробах.

Неоднородность популяции амёбоидных протистов была подтверждена в ходе исследований по их вертикальному (Smirnov 2002; Smirnov and Thar 2004) и пространственному (плоскостному) распределению (Smirnov and Thar 2003). По полученным результатам, амёбы достигают наибольшей численности и видового разнообразия в верхних слоях грунта (глубиной до 1 см), где концентрация кислорода наиболее велика. Тем не менее было отмечено, что амёбы-аэробы (*Vannella plurinucleolus*) также могут населять и анаэробную зону (глубиной до 10 см). Авторы объясняют это наличием «скрытых» видов, которые могут заселять аэробные микрониши даже на большой глубине в связи с высокой гетерогенностью среды. Пространственное распределение амёб характеризуется тремя основными паттернами: 1) случайное распределение; 2) агрегация в кластеры; 3) равномерное распределение. Анализ также показал наличие точек повышенного биоразнообразия амёбоидных протистов.

Количество выявленных видов амёб сильно зависит от методов исследования проб. Искусственное изменение условий среды (соленость, температура) и продолжительное наблюдение за эволюцией фауны делают возможным обнаружение большего числа видов (26 видов в 2007 году по сравнению с 12 видами в 1999). Существенную роль играет также техника сбора грунта и, в частности, глубина отбора пробы. Так, в 2002 и 2004 годах проводились исследования по вертикальному распределению амёб в донном грунте бухты Ниво (Smirnov 2002; Smirnov and Thar 2004). В 2004 году было выявлено большее количество видов (22), поскольку для анализа был использован самый верхний слой глубиной не более 5 см, в котором наблюдалось наибольшее разнообразие амёбоидных протистов. Стоит также отметить, что виды между собой различаются по частоте встречаемости. Отчетливо прослеживается тенденция увеличения числа идентифицированных видов в связи с накоплением кумулятивных данных по морфологии и пространственному распределению амёб.

4. Материал и методики

Пробы были собраны в августе 2017 и августе 2018 года в бухте Ниво, располагающейся на севере Дании, рядом с городом Хельсингёр (пролив Зунд, 55.928404N, 12.523204E). Дно бухты в прибрежной зоне покрыто бактериальными матами с характерным сероводородным запахом. Пробы были отобраны в 20 пластиковых пробирок («фальконов») объемом 50 мл (Greiner), и 4 пластиковых контейнера объемом 250 мл с донным грунтом и водой. Все емкости, использованные для сбора амёб, были стерильными или были предварительно автоклавированы. Соленость воды в пробах была определена с помощью рефрактометра (Atago, Japan) после доставки проб в лабораторию.

Пробы поддерживали на искусственной фильтрованной морской воде, соленость которой для большей части проб составляла 15‰, а для проб из плавней - 6‰. С течением времени вода из высевов и культур испарялась, и соленость могла достигать 35‰. Это было намеренно использовано для обнаружения скрытого биоразнообразия амёб в данном местообитании. Высевы производили путем добавления небольшого объема воды (около 3 мл) с донным грунтом в стерильные фласки (Greiner, 50 мл) с морской водой и последующим добавлением автоклавированных пшеничных зерен (по одному на фласк) в качестве источника органических веществ. В дальнейшем были получены смешанные и клональные культуры амёб путем пересева в чашки Петри диаметром 60 мм (Orange Bioscience). Культуры поддерживали на отфильтрованном автоклавированном отваре цериофила (0,025%) на морской воде указанной солености. Помимо этого, для получения клональных культур отдельные клетки амёб высевались на чашки с непитательным агаром (C100S agar по Page 1983) и покрывались сверху тонким слоем морской воды. Культуры хранили при температуре +18°C и естественном освещении.

Для наблюдения за высевами и культурами использовался инвертированный микроскоп Leica DMI 3000B, оснащенный фазово-контрастной оптикой, и бинокулярный микроскоп Leica M205C. Наблюдения за амёбами также проводились на предметных и покровных стеклах на микроскопе Leica DM2500, оснащенный камерой Nikon DS-Fi3, с применением фазового контраста и контраста Номарского. В некоторых случаях для получения микрофотографий амёб непосредственно в чашках Петри использовался микроскоп Leica DMI 3000B, оснащенный интегрированным модуляционным контрастом (IMC).

Для идентификации видов амёб использовался определитель морских голых амёб (Page, 1983), данные ранее проводившихся в заливе Ниво фаунистических работ (Smirnov 1999a; 2007), а также работы, посвященные отдельным видам и родам голых амёб (Smirnov 1996; 1997 и др.).

Для выполнения работ по трансмиссионной электронной микроскопии использовался стандартный протокол фиксации:

Глютаральдегид 2,5% (2 ч. глютаральдегида 25%, 5 ч. какодилатного буфера 0,2М, 13 ч. dH ₂ O)	20 минут
Отмывка в какодилатном буфере 0,05М	5 минут (3 раза)
Осмий 1% (1 ч. тетроксид осмия 4%, 1ч. какодилатного буфера 0,2М, 2 ч. dH ₂ O)	15 минут
Отмывка в какодилатном буфере 0,05М	5 минут (3 раза)
Отмывка в смеси к. буфера 0,05М и dH ₂ O (1:1)	5 минут
Этанол 30%	10 минут
Этанол 50%	10 минут
Этанол 70%	10 минут
Этанол 96%	10 минут
Этанол 100%	10 минут (2 раза)
Смесь этанола 100% со смолой (2:1)	30 минут
Смесь этанола 100% со смолой (1:1)	30 минут
Заключение в смолу	Ночь в термостате (60°C)

Таблица 2. Протокол фиксации, обезвоживания и заключения в смолу для трансмиссионной электронной микроскопии.

Дополнительно были получены тотальные препараты амёб на сетках с формваровой подложкой. Клетки отсаживались в капле морской воды на сетки, закрепленные на предметном стекле.

Клетки оседают на подложку	1-2 часа во влажной камере
Добавляется капля осмия 4% в камеру	1-2 минуты
Отмывка в смеси морская вода 15%:dH ₂ O (3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3)	5 минут каждая
Смесь замещается на водный раствор уранилацетата	1 минута
Уранилацетат удаляется фильтровальной бумагой	
Высушивание препарата	Ночь

Таблица 3. Протокол фиксации клеток на сетках с фармваровой подложкой.

Для визуализации срезов и тотальных препаратов использовались микроскопы Jeol JEM-1400 и Jeol JEM-2100.

Для выполнения работ по сканирующей электронной микроскопии клетки амёб фиксировались на покровных стеклах:

Глютаральдегид 2,5% (2 ч. глютаральдегида 25%, 5 ч. какодилатного буфера 0,2М, 13 ч. dH ₂ O)	30 минут
Отмывка в морской воде 15%	5 минут (3 раза)
Фиксация в парах осмия 2%	30 минут
Отмывка в смеси морская вода 15%:dH ₂ O (3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3)	5 минут каждая
Отмывка в dH ₂ O	5 минут (3 раза)
Этанол 30%	10 минут
Этанол 50%	10 минут
Этанол 70%	10 минут
Этанол 96%	10 минут
Этанол 100%	10 минут (2 раза)

Таблица 4. Протокол фиксации для сканирующей электронной микроскопии.

Для визуализации использовался микроскоп Tescan MIRA 3 LMU. При наличии устойчивой чистой клональной культуры амёб для выделения геномной ДНК (генов 18S рРНК и COI) применялся гуанидин-изотиоцианатный метод. В случае, если вид являлся не культивируемым, ДНК выделялась из минимального числа клеток (1-10), отобранных в пробирку. В ходе ПЦР ген 18S рРНК или его фрагмент амплифицировался с помощью пар праймеров RibA – RibB (Pawlowski 2000) и S12.2 – S20R (ПЦР-кит Thermo Fisher). При работе с геном COI использовалась пара праймеров HCO – LCO (Hebert et al. 2003). ПЦР проходила при условиях: начальная денатурация при 95°C 10 минут, 34 цикла (94°C 30 секунд, 50°C 60 секунд, 72°C 2 минуты 30 секунд) и финальная элонгация в течение 10 минут.

Продукты ПЦР-реакции в ходе электрофореза в агарозном геле (170V в течение 30 минут). Окрашивание продуктов проводилось с помощью бромистого этидия (0,5 мкг/мл в течение 10 минут). При получении недостаточных концентраций ДНК нами дополнительно проводилось молекулярное клонирование с использованием кита InsTAclone Fermentas. При лигировании и трансформации использовался штамм бактерий JM107 с вектором-плазмидой pTZ57R/T. Трансформанты высевались на селективную среду (LB-агар,

ампициллин, X-Gal, IPTG) и отбирались в ходе бело-голубой селекции. Впоследствии, амплифицированный продукт секвенировался методом Сэнгера с использованием указанных праймеров.

При работе с некоторыми некультивируемыми амебами нами также использовался альтернативный метод полногеномной амплификации (MDA) с последующим секвенированием продуктов на платформе Illumina (см. описание методов в Bondarenko et al. 2018a; 2018b). Выравнивание последовательностей, а также построение филогенетических деревьев проводилось в программе SeaView v. 4.3.3. Сиквенсы 5' фрагмента генов COI и 18S рРНК анализировали методом максимального правдоподобия (модель эволюции GTR + Γ , 25 категорий скорости нуклеотидных замен).

Реконструкцию филогенетических деревьев и их тестирование методом бутстрэпа также проводили при помощи программы RAxML (Stamatakis 2006), установленной на портале CIPRES (Miller et al. 2010). Использовалась модель эволюции GTR + Γ + I с 4 категориями скорости нуклеотидных замен. Наиболее парсимоничное дерево тестировали с помощью метода бутстрэпа (100 повторностей). Байесовский анализ проводили, используя тот же набор сиквенсов и те же нуклеотидные позиции при помощи программы MrBayes v. 3.2.2 (Ronquist, Huelsenbeck 2003), также на портале CIPRES. При этом осуществляли два независимых запуска восьми цепей Маркова для 10000000 поколений со значением параметра burn-in 25%.

5. Результаты

Общая характеристика фауны

В ходе выполненной работы нами были изолированы из отобранных проб, документированы и изучены 20 видов представителей Amoebozoa. Часть видов является новой как для фауны бухты Ниво, так и для науки в целом. Восемь видов из 20 обнаруженных удалось идентифицировать в соответствии с их морфологическими характеристиками. В целом, список видов наиболее часто встречающихся соответствует приведенным в более ранних работах (Smirnov 1999a; 2001; 2002; 2007) и включает такие виды, как *Cochliopodium gulosum*, *Mayorella kuwaitensis*, *Thecamoeba orbis* и *Vannella danica*. Вместе с тем в пробах отсутствуют некоторые виды амёб, ранее часто встречаемые, например, *Vannella calycinucleolus* и *Vannella plurinucleolus*. Следует отметить, что в предыдущих работах разбор собранных проб и идентификация видов проводились сразу на месте, в то время как в данном случае между высевом проб и непосредственно работой с культурами проходило от 2 до 4 недель. К видам, до этого не встречавшимся в данном местообитании, следует отнести *Mayorella gemmifera*, *Paramoeba sp.*, *Pseudoparamoeba sp.* и *Thecamoeba rugosa*. К тому же нами были изолированы и изучены четыре ранее неописанных вида: *Balamuthia sp.*, *Stygamoeba sp.*, *Korotnevella sp.(1)* и *Cutosea gen. sp.* Последний обладает уникальным покровом и характером движения, что не позволяет отнести его ни к одному известному роду амёб.

1. *Arcella sp.*
2. *Balamuthia sp.* (новый вид)
3. *Cochliopodium gulosum* Schaeffer, 1926
4. *Cochliopodium sp.(2)*
5. *Cutosea gen. sp.* (новый вид)
6. *Flamella sp.*
7. *Korotnevella sp.(1)* (новый вид)
8. *Mayorella gemmifera* Schaeffer, 1926
9. *Mayorella kuwaitensis* Page, 1982
10. *Paramoeba sp.*
11. *Pseudoparamoeba sp.*
12. *Stygamoeba sp.* (новый вид)
13. *Thecamoeba munda* Schaeffer, 1926
14. *Thecamoeba orbis* Schaeffer, 1926
15. *Thecamoeba rugosa* Schaeffer, 1926
16. *Trichosphaerium sp.*
17. *Vannella danica* Smirnov et al., 2007
18. *Vannella simplex* Bovee, 1965
19. *Vannella sp.(3)*
20. *Vexillifera sp.(2)*

Таблица 5. Список амёб, обнаруженных в ходе фаунистической работы.

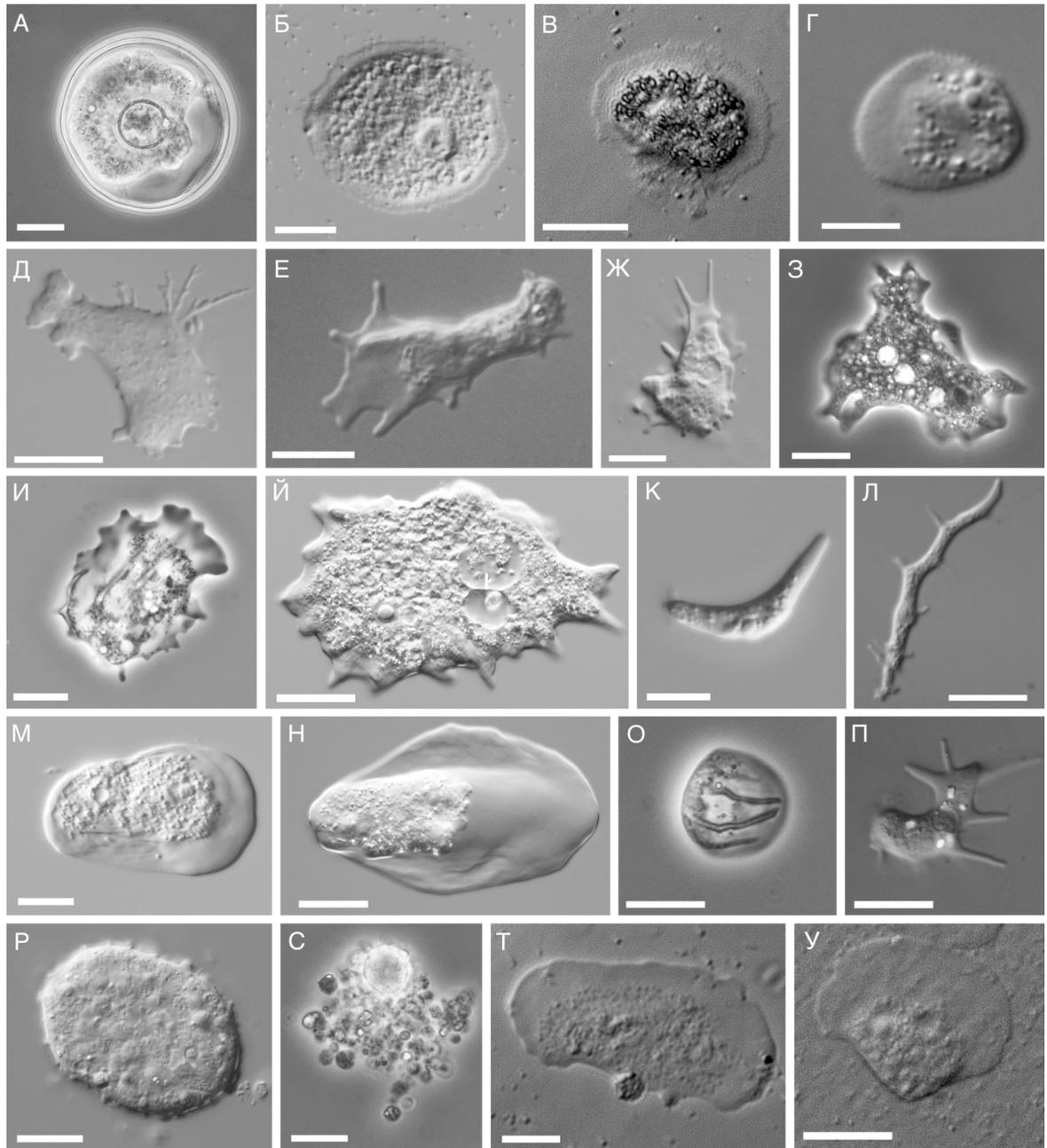


Рисунок 11. Микрофотографии 20 обнаруженных представителей фауны амёб бухты Ниво. (А) *Arcella* sp. (масштабная черта = 10 мкм). (Б) *Cochliopodium gulosum* (масштабная черта = 20 мкм). (В) *Cochliopodium* sp.(2) (масштабная черта = 20 мкм). (Г) *Cutosea* gen. sp. (масштабная черта = 5 мкм). (Д) *Flamella* sp. (масштабная черта = 10 мкм). (Е) *Pseudoparamoeba* sp. (масштабная черта = 5 мкм). (Ж) *Paramoeba* sp. (масштабная черта = 20 мкм). (З) *Mayorella gemmifera* (масштабная черта = 10 мкм). (И) *Korotnevella* sp.(1) (масштабная черта = 20 мкм). (Й) *Mayorella kuwaitensis* (масштабная черта = 20 мкм). (К) *Stygamoeba* sp. (масштабная черта = 10 мкм). (Л) *Balamuthia* sp. (масштабная черта = 5 мкм). (М) *Thecamoeba tunda* (масштабная черта = 10 мкм). (Н) *Thecamoeba rugosa* (масштабная черта = 20 мкм). (О) *Thecamoeba orbis* (масштабная черта = 10 мкм). (П) *Vexillifera* sp.(2) (масштабная черта = 10 мкм). (Р) *Trichosphaerium* sp. (масштабная черта = 20 мкм). (С) Циста *Vannella danica* (масштабная черта = 10 мкм). (Т) *Vannella simplex* (масштабная черта = 10 мкм). (У) *Vannella* sp.(3) (масштабная черта = 10 мкм).

Описания обнаруженных видов амёб

В этом разделе приводятся описания некоторых обнаруженных нами видов амёб. Для представления были выбраны те из них, по которым уже удалось получить достаточное количество материала, включая данные по световой и электронной микроскопии, а также данные по молекулярной филогении.

Cutosea gen. sp.

При локомоции амёба принимает округлую форму, слегка вытянутую вдоль передне-задней оси. Гиалоплазма обычно сконцентрирована на переднем конце клетки и может принимать форму антеро-латерального полумесяца. Движущаяся уплощенная клетка не образует складок и гребней. Амёба отличается весьма высокой скоростью передвижения (40 мкм/мин). Характерный механизм движения – перекачивание, подобно гусенице трактора – отчетливо виден при использовании контраста Номарского. У активно передвигающихся клеток (рис. Г), а также у клеток, только что осевших на субстрат (рис. Д, Е) мы наблюдали нитевидные короткие псевдоподии, расходящиеся радиально, и проходящие через дополнительную оболочку клетки. Средняя длина клеток составляет 17 мкм (10-22,5 мкм, n=50); средняя ширина – 17 мкм (10-22,5 мкм, n=10). Среднее отношение длина/ширина равно 1 (0,9-1,3, n=50). Дифференцированный уроид не выражен.

Мы не наблюдали флотирующие клетки в наших культурах. Ядро везикулярное, в диаметре в среднем 1 мкм (n=30). У движущейся амёбы ядро обычно располагается в задней части клетки. Амёб легко узнать даже при малом увеличении светового микроскопа из-за наличия в гранулоплазме светопреломляющих частиц округлой формы. В культурах цисты обнаружены не были.

При анализе ультраструктуры покровов было выявлено наличие дополнительной оболочки из мелких чешуек, полностью покрывающей клетку и прилегающей к плазматической мембране. На электронограмме хорошо видно, что чешуйки располагаются в один слой (рис. Ж), однако они могут наслаиваться друг на друга в местах, где клетка образует впячивания. Все чешуйки погружены в плотный матрикс, который на стороне, обращенной к субстрату, образует приподнимающие клетку выросты, используемые, возможно, при локомоции. В некоторых местах на поверхности клетки дополнительная оболочка образует поры (рис. З), через которые могут проходить короткие псевдоподии. Во внутриклеточном содержимом клетки хорошо заметны митохондрии с трубчатыми кристами, а также многочисленные пищеварительные вакуоли с бактериями.

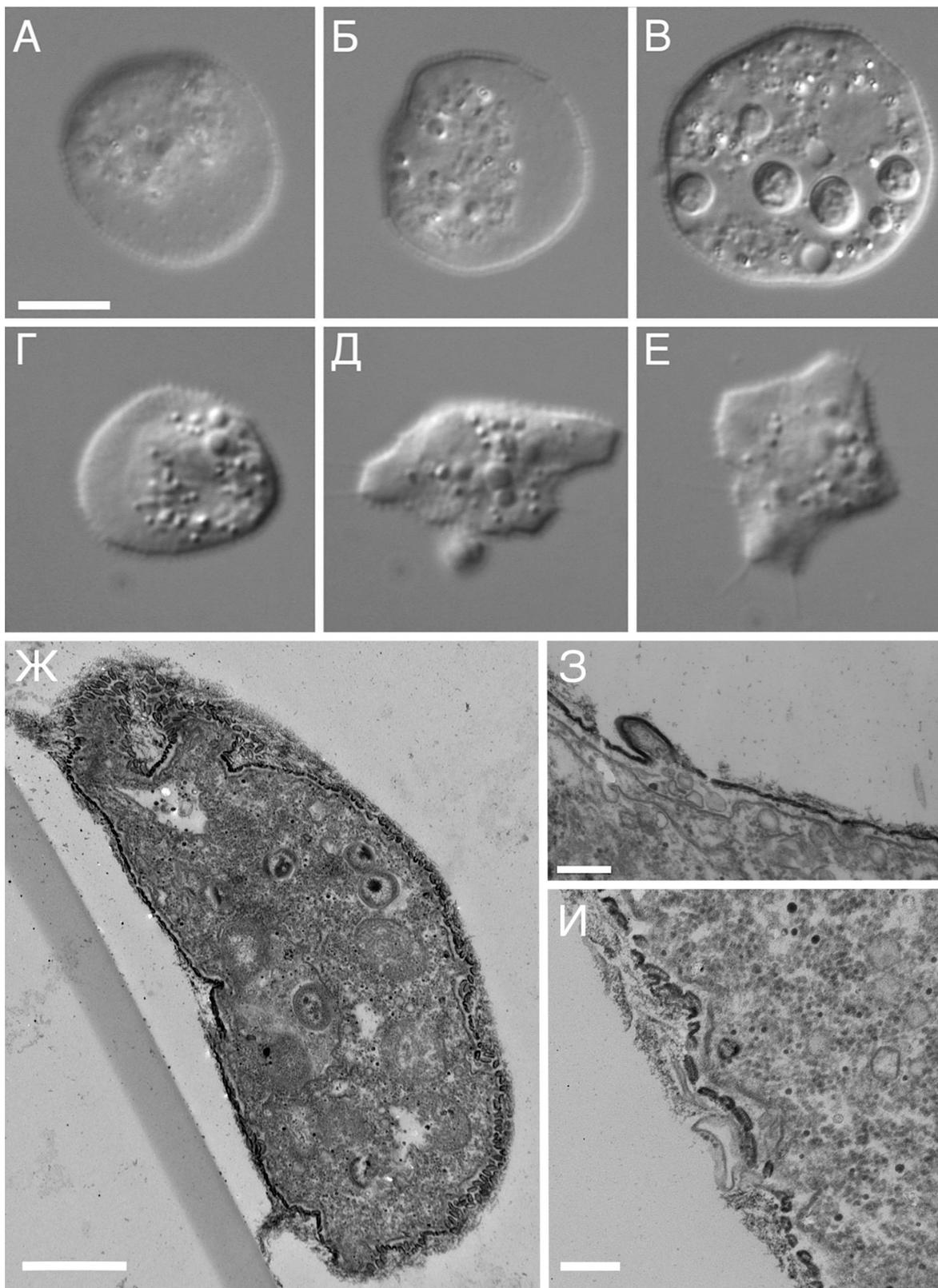


Рисунок 12 *Cutosea gen. sp.* А, Б, Г – локомоторная форма клетки; В – неподвижная клетка; Д, Е – клетка, только что прикрепившаяся к субстрату (все – контраст Номарского); Ж-И – электронограммы, демонстрирующие покровы клетки; З – псевдоподия, проходящая сквозь слой чешуек. Масштабная черта: 5 мкм (А-Е), 1 мкм (Ж), 200 нм (З, И).

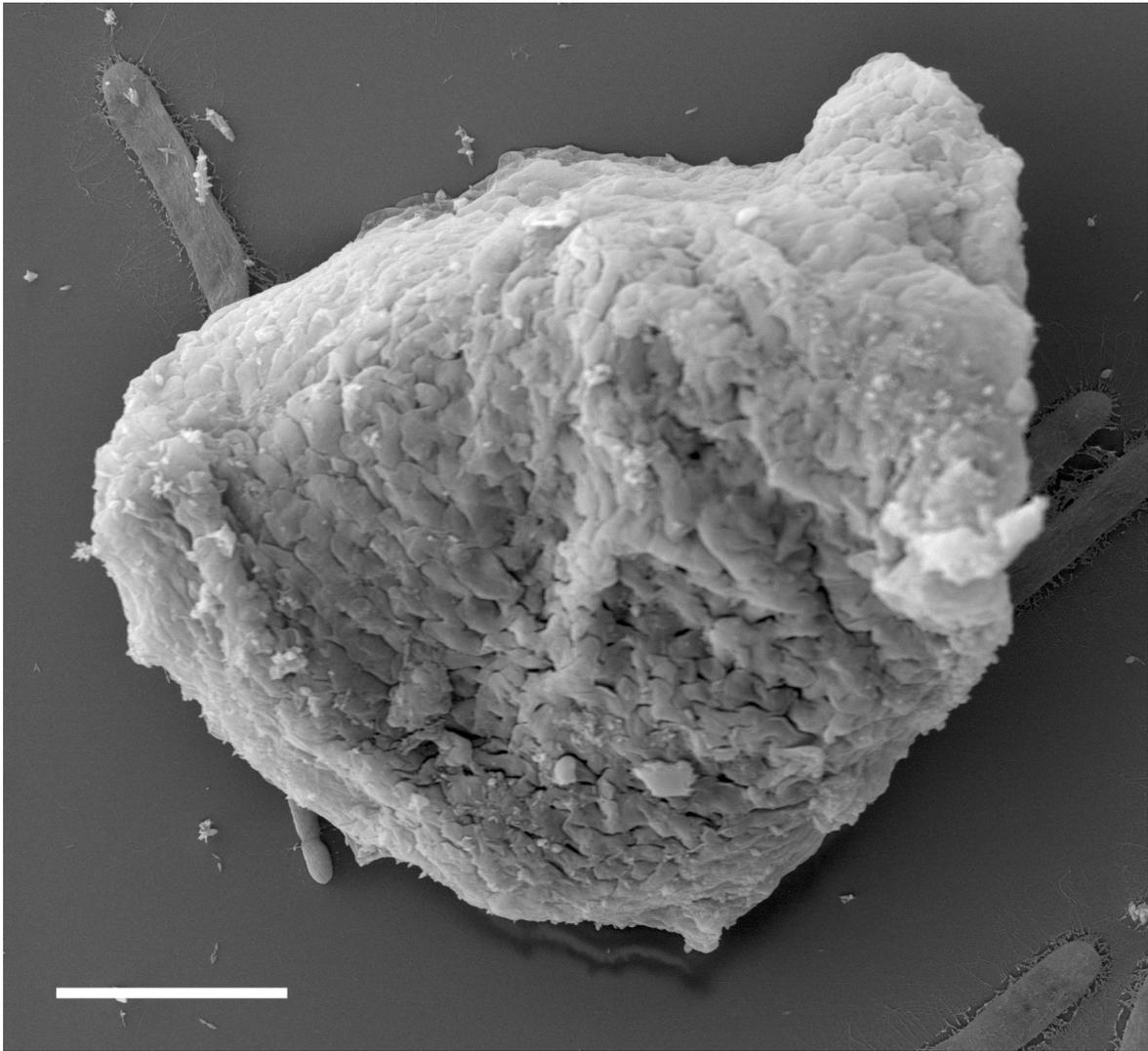


Рис. 13 *Cutosea gen. sp.* Изображение со сканирующего электронного микроскопа, на котором видно, что вся поверхность клетки амёбы покрыта сплошным слоем чешуек. Масштабная черта: 5 мкм.

Balamuthia sp.

При локомоции клетка принимает сильно вытянутую, практически нитевидную форму (рис. А). С обеих сторон образуются мелкие субпсевдоподии, напоминающие шипы, которые могут приподниматься над субстратом. В эти выросты не заходит гранулоплазма, и они располагаются равномерно, чередуясь с левой и с правой стороны. В целом, очертания активно двигающейся клетки напоминают ломаную линию. Гиалоплазма обычно локализуется на кончике формируемой псевдоподии и занимает около 1/7 объема клетки. Средняя длина клетки составляет 22 мкм (15-30 мкм, $n=20$); средняя ширина – 1,3 мкм (1-1,6 мкм, $n=20$). Среднее отношение длина/ширина равно 17 (12-22,6, $n=20$). Уроид имеет булавовидную форму.

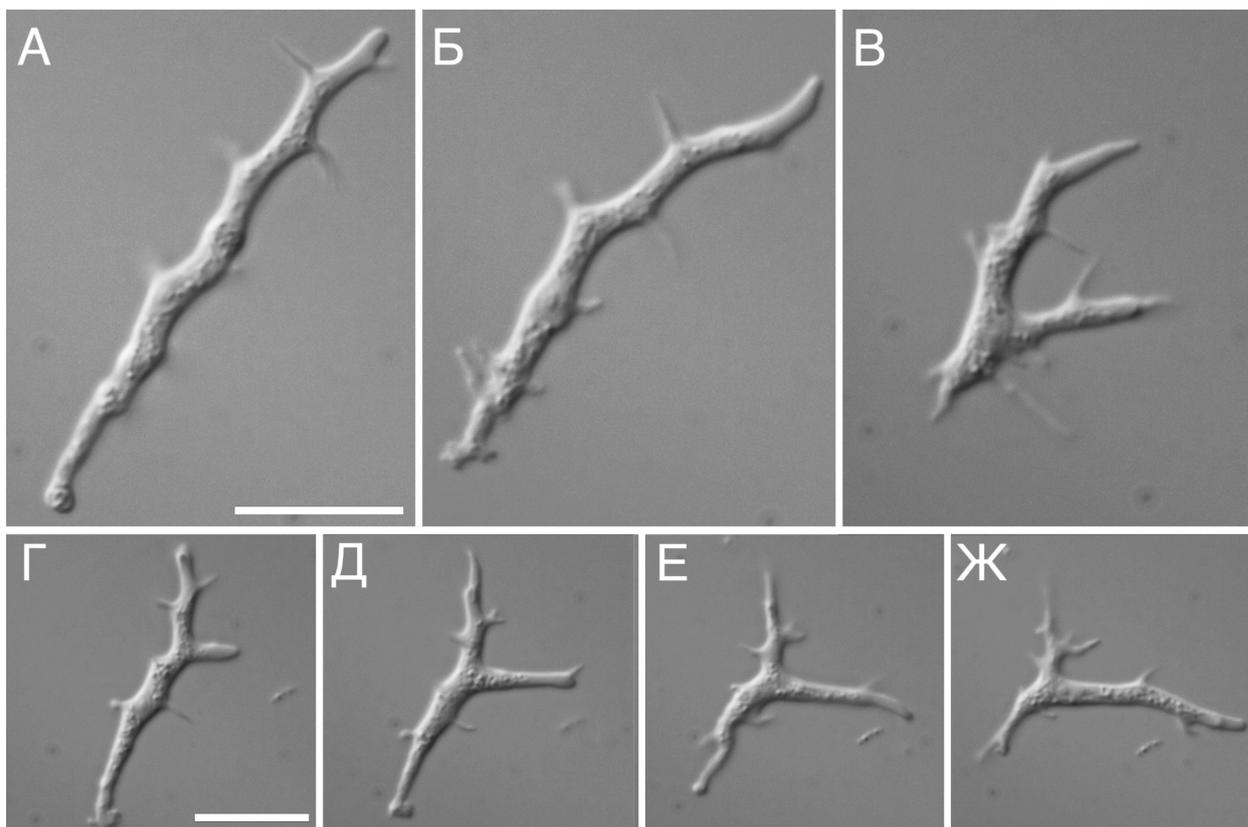


Рисунок 14. *Balamuthia sp.* А, Б – локомоторная форма; В – характерная бифуркация клетки; Г-Ж – паттерн изменения направления движения (все – контраст Номарского). Масштабная черта: 5 мкм.

Флотирующая клетка образует короткие выросты (в среднем около 5), заполненные гиалоплазмой. При остановке клетка принимает менее регулярную форму, постепенно укорачивая формируемые псевдоподии. Смена направления движения часто осуществляется путем образования новой лидирующей псевдоподии практически под прямым углом к предыдущей (рис. Г-Ж). Таким образом, в культуре нередко можно наблюдать разветвленные клетки. Подобный паттерн движения был ранее отмечен у *Stygamoeba polymorpha* (Sawyer 1975). Ядро везикулярное, обычно имеет эллипсоидную форму; средний диаметр равен 1,5 мкм (n=20). Цисты обнаружены не были. Наконец, следует также отметить, что данный вид был обнаружен в высевах из проб, собранных в распресненных водоемах (пробы 1, 2), соленость таких проб была понижена (около 7‰). Представители данного вида чувствительны к повышению солености и отличаются спорадическим характером появления в высевах и культурах.

Stygamoeba sp.

Движущаяся клетка имеет характерную вытянутую форму, практически не отличимую от той, что демонстрирует *Stygamoeba regulata* (рис. А, Б). При использовании

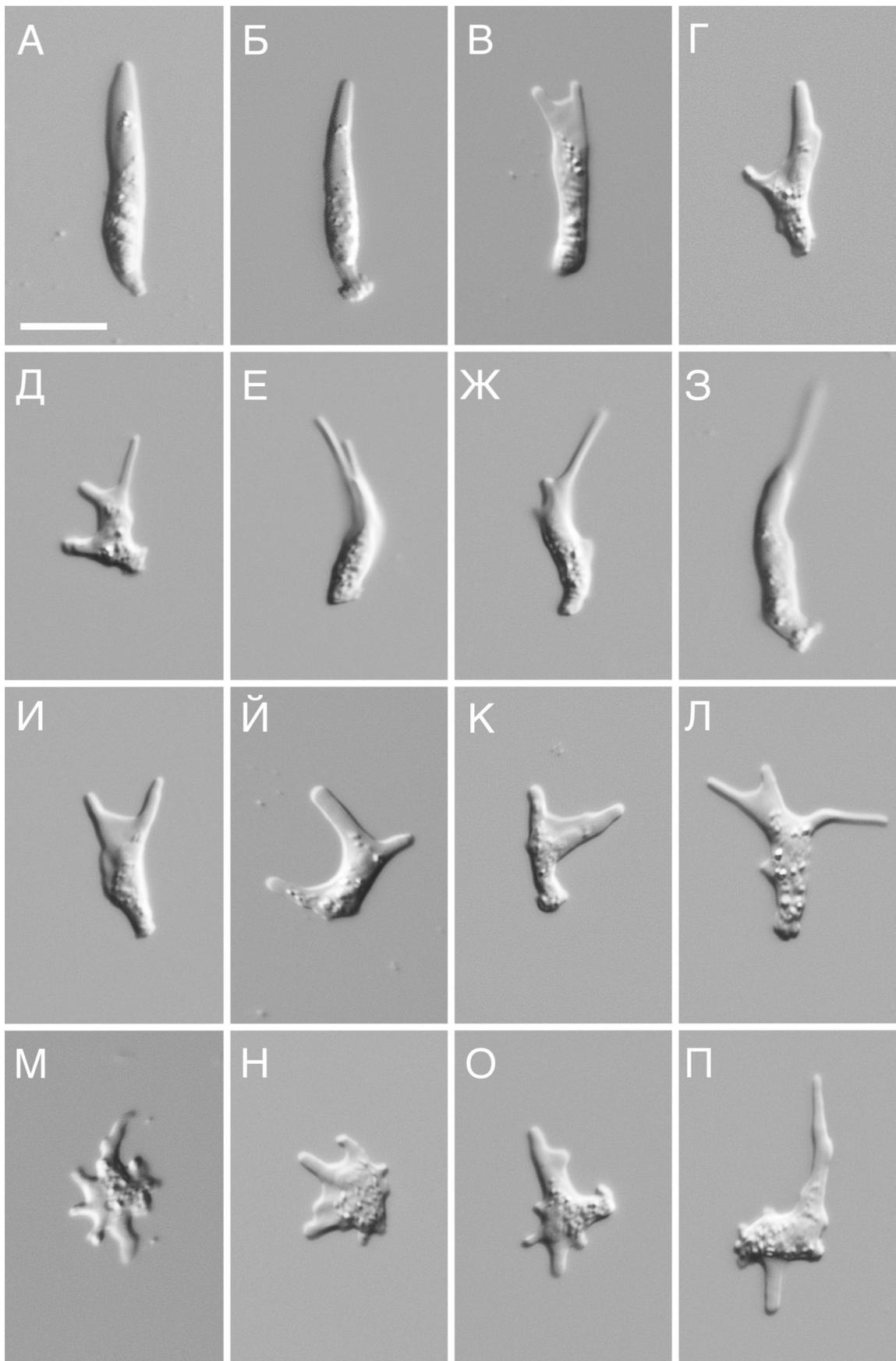


Рисунок 15. *Stygamoeba* sp. А-Л – локомоторная форма клетки; А-Г – активное передвижение; Д-З – формирование тонкой субпсевдоподии; И-Л – смена направления движения; М-П – клетка в покое (все – контраст Номарского). Масштабная черта: 10 мкм.

контраста Номарского хорошо заметно, что центральная часть клетки более выпуклая, чем ее края, однако на поверхности никогда не возникают гребни или складки. Гиалоплазма обычно концентрируется на переднем конце псевдоподии и занимает около 1/3 клетки. При смене направления движения передний конец может раздваиваться (рис. В, И) и формировать два небольших выроста, один из них впоследствии станет лидирующей псевдоподией. Нередко новая псевдоподия формируется под прямым углом, подобно тому, что демонстрирует *Balamuthia sp.* Средняя длина клетки составляет 25 мкм (17,5-30 мкм, n=50); средняя ширина – 4 мкм (2,5-5 мкм). Среднее отношение длина/ширина равно 6,6 (n=50).

Однако даже на уровне световой микроскопии отчетливо видно, что данная амeba отличается от других представителей рода *Stygamoeba*. При локомоции клетка формирует в передней части тонкую субпсевдоподию, заполненную гиалоплазмой и зачастую приподнимающуюся над субстратом (рис. Ж, З). Клетка может «помахивать» этой субпсевдоподией, которая впоследствии прикрепится к субстрату, после чего клетка начнет перетекать в нее с формированием моноподиальной формы. В покое клетка утрачивает характерную вытянутую форму, с одной из сторон различим зачаток формирующейся псевдоподии (рис. М, Н). Флотирующая форма клетки - округлая масса гранулоплазмы с отходящими от нее тонкими (около 3) выростами, заполненными гиалоплазмой. Ядро везикулярное, обычно имеет эллипсоидную форму; средний его диаметр равен 2 мкм (n=50). Цисты обнаружены не были.

***Thecamoeba munda* (Schaeffer 1926)**

При локомоции клетка имеет овальную, слегка вытянутую форму. По периферии она обычно более уплощенная, чем в центральной части. Морфотип стриадный; на дорсальной поверхности прослеживаются 3-4 продольных гребня (рис. А, Б). Гиалоплазма имеет форму антеро-латерального полумесяца, занимает около 1/3 клетки. Средняя длина клеток в культуре составила 37 мкм (35-40 мкм, n=15); средняя ширина – 20 мкм (19-21 мкм, n=15). Среднее отношение длина/ширина равно 1,9 (1,75-2,1, n=15). Дифференцированные уroidные структуры отсутствуют.

Флотирующая клетка принимает округлую форму и образует многочисленные складки на поверхности. Ядро чаще всего имеет округлую форму, хотя оно также может иметь впячивания на поверхности. Тонкий слой ядрышкового материала располагается на периферии ядра; хорошо различимы два ядрышка, расположенных напротив друг друга (рис. Е). У ядра нету четкого места локализации, и оно свободно перемещается вместе с токами гранулоплазмы. Средний диаметр ядра равен 5 мкм (n=15). На заднем конце клетке

у всех клеток имеется оптически прозрачная сократительная вакуоль диаметром около 3 мкм. Содержимое клетки представлено оптически плотными гранулами, кристаллы обнаружены не были.

Эту амёбу достаточно легко определить из-за характерного строения ядра. Данный вид был описан Шаффером (Schaeffer 1926), впоследствии реизолирован Смирновым (Smirnov 1999d). Вид широко распространен в данном местообитании: он упоминается практически во всех фаунистических работах по бухте Ниво.

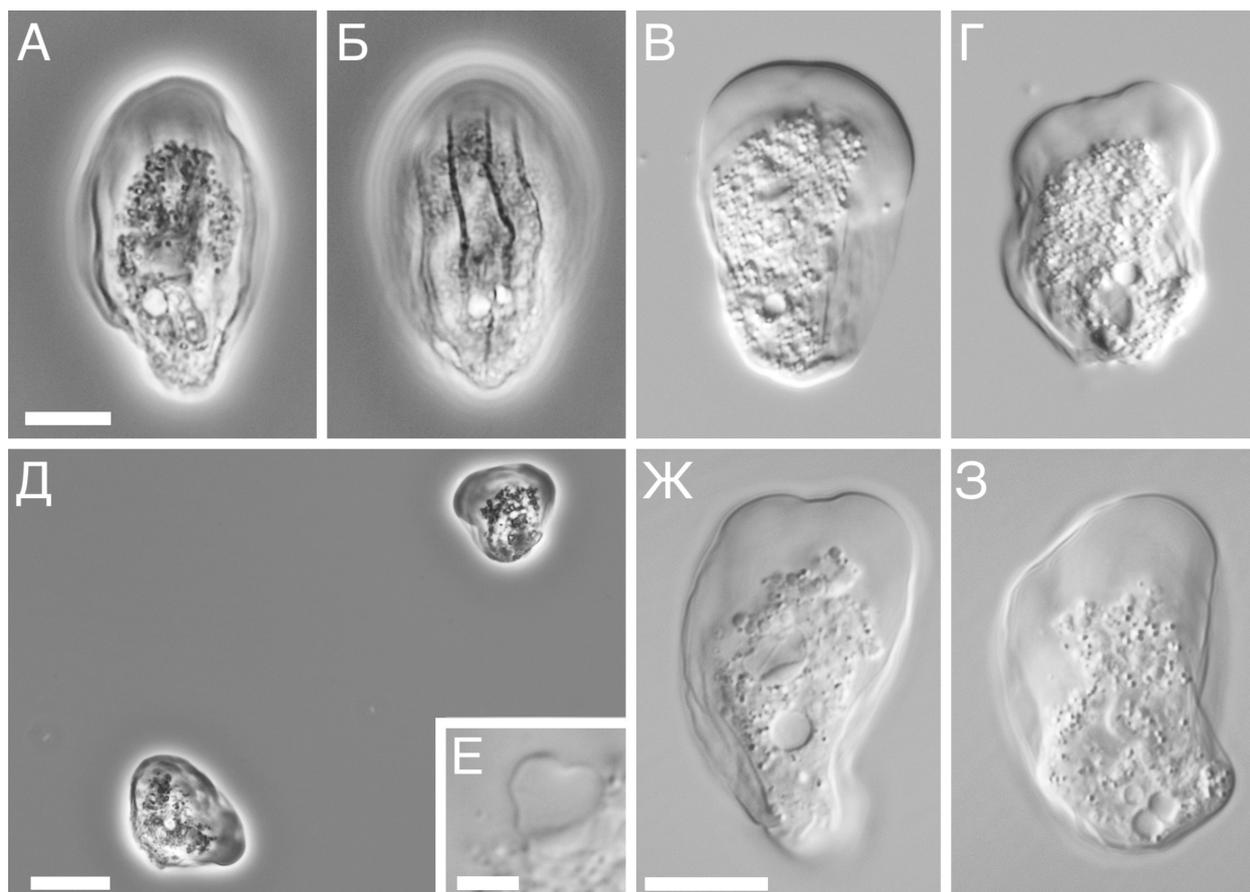


Рисунок 16. *Thecamoeba tunda*. А-Г, Ж, З – локомоторная форма клетки; Д – ненаправленно перемещающиеся клетки; Е – ядро с двумя периферическими ядрышками (А, Б, Д – фазовый контраст; В, Г, Е, Ж, З – контраст Номарского). Масштабная черта: 10 мкм (А-Г, Ж, З), 20 мкм (Д), 3 мкм (Е).

Thecamoeba rugosa (Schaeffer 1926)

Движущаяся клетка имеет уплощенную овальную форму. На дорсальной поверхности различимы 3-4 продольных гребня, начинающихся на заднем конце клетки и доходящих до ее переднего края. Иногда количество мелких продольных складок может

возрастать до 10, что особенно заметно при изменении направления движения клетки. Однако чаще всего они выражены слабо, и поверхность клетки выглядит гладкой (рис. А, Б). Гиалоплазма имеет форму антеро-латерального полумесяца и обычно занимает больше половины объема клетки. Примечательно, что при локомоции гранулоплазма концентрируется в центральной части клетки, делая уплощенные края прозрачными

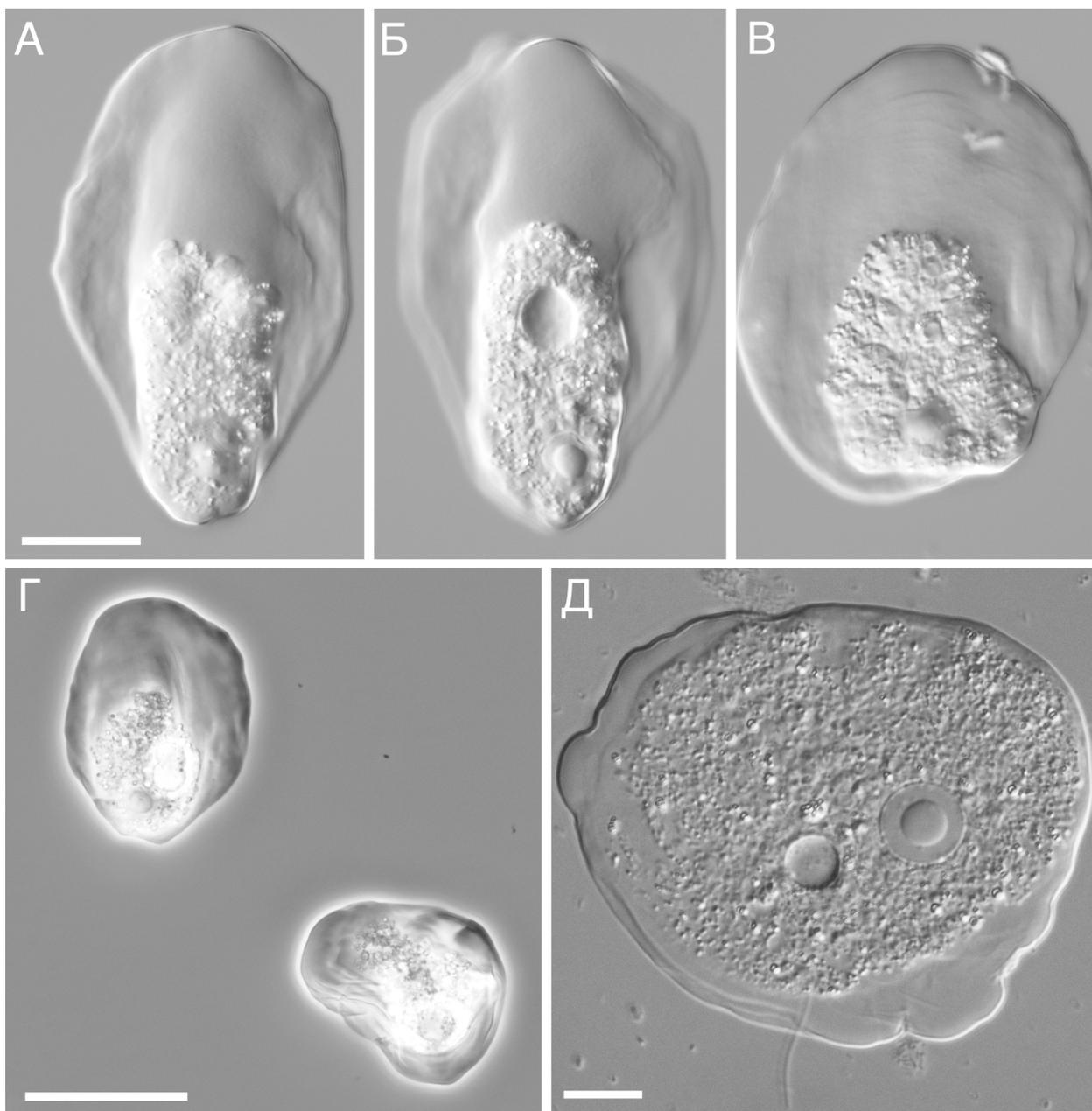


Рисунок 17. *Thecamoeba rugosa*. А-Г – локомоторная форма клетки; Д – раздавленная клетка с хорошо различимым содержимым гранулоплазмы, хорошо различимо ядро (А-В, Д – контраст Номарского; Г – фазовый контраст). Масштабная черта: 20 мкм (А-В), 40 мкм (Г), 10 мкм (Д).

Средняя длина клеток в культуре составила 61 мкм (45-80 мкм, n=15); средняя ширина – 34 мкм (30-45 мкм, n=15). Среднее отношение длина/ширина равно 1,8 (1,5-2,2, n=15). Дифференцированный урод не выражен.

Мы не наблюдали флотирующих форм в полученных культурах. Клетка, прекратившая направленное движение, принимает более округлую форму с многочисленными складками. Ядро везикулярное, средний диаметр равен 8 мкм (n=15), практически всегда находится на заднем конце клетки (рис. Б). Там же практически всегда находится крупная оптически прозрачная сократительная вакуоль. Содержимое клетки представлено мелкозернистыми гранулами.

Thecamoeba orbis (Schaeffer 1926)

Движущаяся амеба имеет почти правильную круглую форму, задний конец клетки более выпуклый, чем ее передняя часть. Гиалоплазма обычно занимает чуть больше половины клетки и имеет форму полукруга (рис. А-В). При локомоции на поверхности клетки обычно хорошо видны 3-4 продольных гребня. Гранулоплазма оттеснена на задний

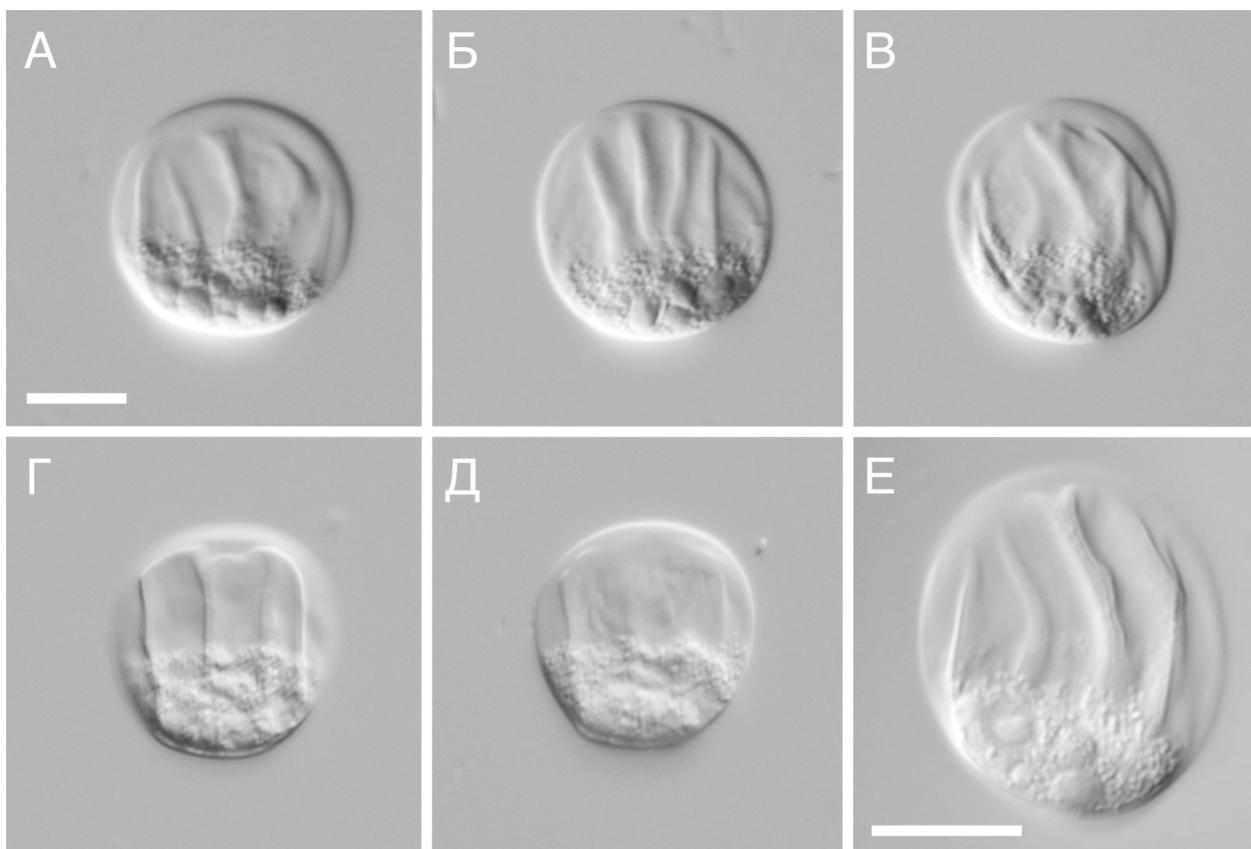


Рисунок 18. *Thecamoeba orbis*. А-Е – локомоторная форма клетки; Е – хорошо заметно везикулярное ядро (все – контраст Номарского). Масштабная черта: 10 мкм.

конец клетки и представлена мелкими гранулами и пищеварительными вакуолями. Средняя длина клеток в культуре составила 20 мкм (17-25 мкм, n=40); средняя ширина – 20 мкм (15-25 мкм, n=40). Среднее отношение длина/ширина равно 1 (0,9-1,1, n=40). Дифференцированный урод не выражен.

Флотирующая клетка принимает округлую или неправильную форму и образует многочисленные складки на поверхности. Везикулярное ядро располагается в заднем конце клетки, ядрышко иногда может быть вытянутым или нести впячивания (рис. Е). Средний диаметр ядра равен 4 мкм (n=40). Сократительная вакуоль отсутствует.

Korotnevella sp.(1)

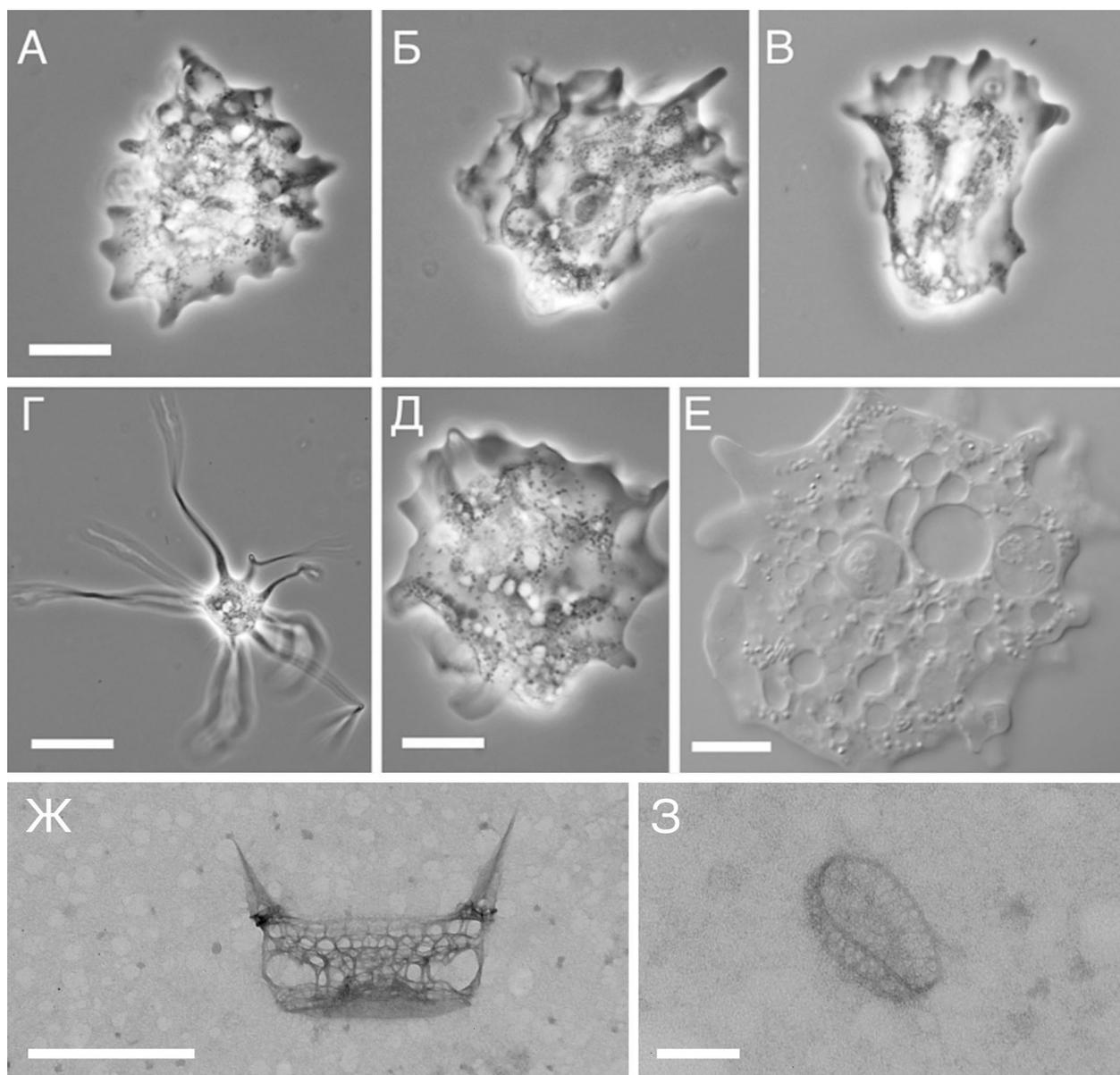


Рисунок 19. *Korotnevella sp.(1)* А, Е – клетка, не двигающаяся в определенном направлении; Б, В, Д – локомоторная форма клетки; Г – флотирующая форма (А-Д – фазовый контраст, Е – контраст Номарского); Ж,З электронограммы с двумя типами чешуек. Масштабная черта: 20 мкм (А-В), 40 мкм (Г), 10 мкм (Д, Е), 500 нм (Ж), 100 нм (З).

Морфотип клетки - дактилоподиальный. При локомоции амеба зачастую принимает четырехугольную форму (рис. Б, В). Гиалоплазма обычно занимает периферическое положение, наиболее отчетлива на переднем конце клетке. Во время движения на поверхности клетки образуются продольные складки, постепенно переходящие в дактилоподии ближе к переднему концу клетки. Останавливаясь, клетка может принимать неправильную, иногда треугольную форму (рис. А). Средняя длина клеток составляет 91 мкм (74-109 мкм, n=15); средняя ширина – 63 мкм (52-75 мкм, n=15). Среднее отношение длина/ширина равно 1,4 (1,3-1,5, n=15). Дифференцированный уроид не выражен.

Мы часто наблюдали флотирующие формы в культуре, особенно при повышении солености воды. От сферической центральной части клетки, заполненной гранулоплазмой, радиально отходят тонкие псевдоподии (в среднем, около 10), в длину достигающие 80 мкм (рис. Г). Средний диаметр ядра равен 8 мкм (n=15); центрально расположенное ядрышко имеет эллипсоидную форму и несет многочисленные складки и лакуны на поверхности. Клетка заполнена многочисленными пищеварительными вакуолями (рис. Е).

Нами был проведен ультраструктурный анализ чешуек, покрывающих поверхность клетки. Наличие чешуек – характерный признак представителей рода *Korotnevella*. Было показано наличие двух типов чешуек – блюдчатых и корзинкообразных. Для последних было характерно наличие двух шипов.

6. Обсуждение

Cutosea gen. sp. (новый вид и новый род)

Локализация клады *Cutosea* на филогенетическом древе Amoebozoa стала возможной только с использованием мультигенного анализа (Cavalier-Smith et al. 2016), спустя несколько лет после обнаружения первого представителя этой клады – *Squamamoeba japonica* - в донных осадках Японского моря на глубине около 2700 м (Kudryavtsev & Pawlowski 2013). Помимо него, в анализе использовались последовательности генов морской амебы под названием PRA-29 (ATCC), изначально неверно идентифицированной как *Pessonella sp.* и впоследствии описанной как *Armaparvus languidus* (Schuler & Brown 2018), а также амебы *Sapocribrum chincoteaguense* (Lahr et al. 2015). На тот момент клада *Cutosea* входила в состав таксона *Lobosa* и была признана базальной по отношению к группам *Discosea* и *Tubulinea*, объединенным в надкласс *Glycoroda*. Авторами статьи было высказано предположение о том, что наличие кутикулы с погруженными в нее чешуйками является анцестральным для всех остальных лобозных амеб. Эта гипотеза подтверждалась тем, что в обеих группах (*Discosea* и *Tubulinea*) есть амебы, занимающие базальное положение и обладающие схожими покровами с проходящими сквозь них мелкими псевдоподиями – *Pellita* (*Discosea*) и *Trichosphaerium* (*Tubulinea*). Таким образом, эволюция покровов лобозных амеб могла идти в направлении повышения их гибкости и подвижности, освобождения от кутикулы и формирования гликостиллей, чешуек или слоя аморфного/филаментозного гликокаликса.

Иное положение клады *Cutosea* занимает на дереве, полученном при филогеномном анализе группы *Discosea* (Tekle et al. 2016). В данном случае *Cutosea* вместе с *Himatismenida* являются сестринскими по отношению к *Tubulinea*. Однако позднее обе указанные выше гипотезы были опровергнуты в последнем исследовании филогении Amoebozoa (Kang et al. 2017). В работе было показано, что изначально в ходе эволюции сформировались две клады – *Discosea* и *Tevoza*. Последняя, в свою очередь, включает *Tubulinea* и новый таксон *Evosea*, состоящий из *Cutosea* и *Conosa* (*Archamoebae*+*Eumycetozoa*+*Variosea*). Из этого следует, что представители *Cutosea* не являются предками *Tubulinea* и *Discodea*, а таксон *Lobosa* является парафилетическим. Тем не менее, изучение клады *Cutosea* необходимо как для реконструкции филогении Amoebozoa в целом, так и для понимания направлений эволюции отдельных групп амебоидных протистов. Клада *Cutosea* является анцестральной по отношению к *Conosa* – группе амебоидных протистов, для которых характерно наличие жгутика. Такое положение *Cutosea* не могло быть выявлено в предыдущих работах, поскольку при построении деревьев либо не проводилось укоренение по аутгруппам (Cavalier-Smith et al. 2016), либо не учитывался эффект притяжения длинных ветвей (Tekle et al. 2016).

На данный момент в состав клады Cutosea входят три вида, описанных из морских местообитаний. Нами был обнаружен новый вид из бухты Ниво, мезогалинного местообитания (15 - 18‰), соленость воды которого гораздо ниже уровня солености мирового океана. Этот вид имеет несколько схожих морфологических черт с амебой *Pellita catalonica*, изолированной ранее из этого же местообитания (Smirnov & Kudryavtsev 2005). Однако *Cutosea gen.sp.* отличается более мелкими размерами и более регулярной округлой формой клетки. С применением электронной микроскопии удалось показать наличие дополнительной оболочки, состоящей из плотного матрикса и погруженных в него чешуек, что говорит о принадлежности амебы к кладе Cutosea.

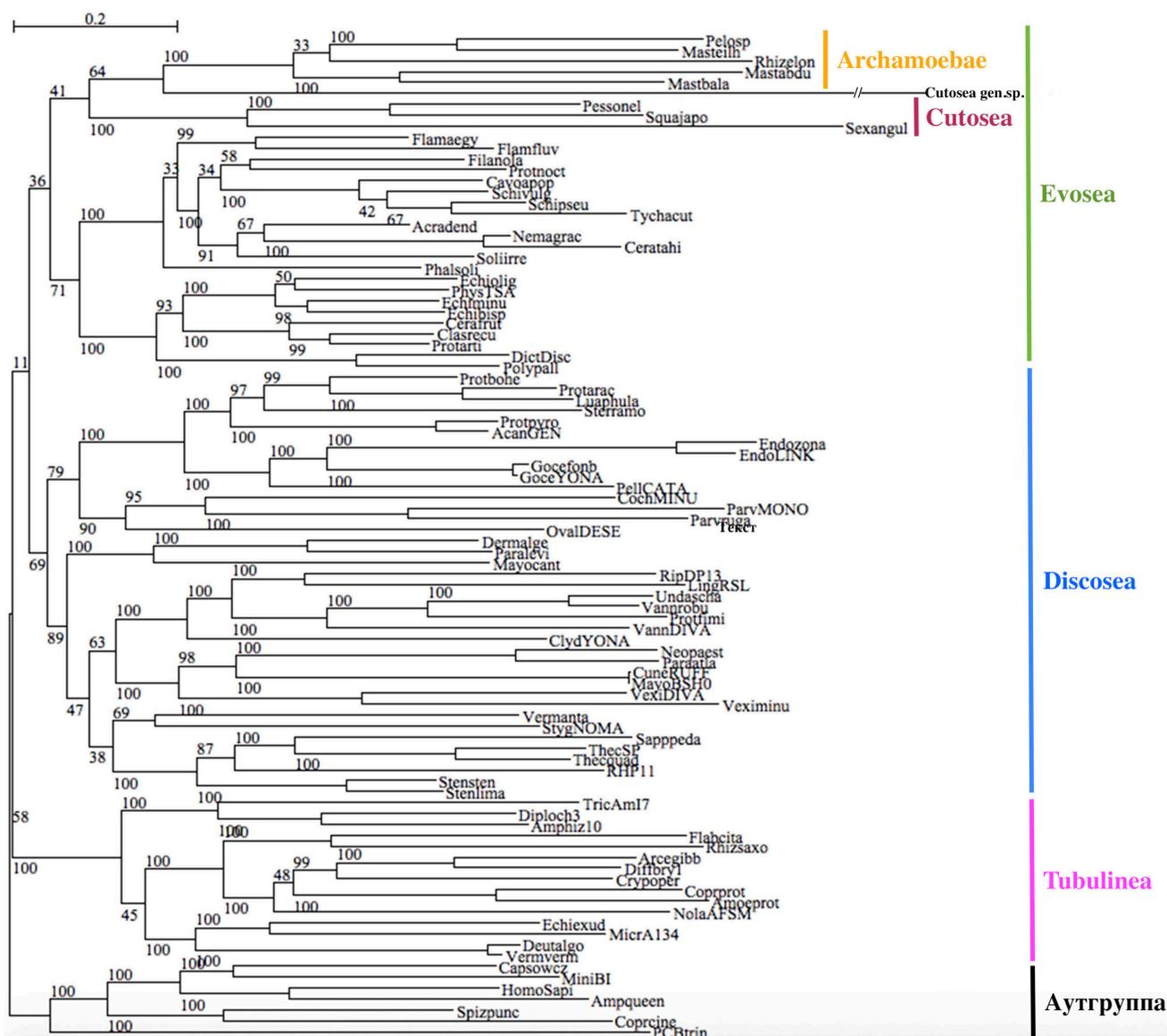


Рисунок 20. Филогенетическое древо, построенное по методу RAxML на основе сиквенсов 20 генов представителей Амоевозоа (6358 н. позиций).

Для установления положения *Cutosea gen. sp.* на филогенетическом древе Амoebozoa нами был выполнен анализ последовательностей 20 генов представителей большинства групп амeбоидных протистов. Так, на древе представлена монофилетическая клада Амoebozoa, подразделенная на три основные эволюционные ветви: *Evosea*, *Discosea* и *Tubulinea* (по Kang et al. 2017). Клада *Cutosea* с высокой поддержкой располагается в основании *Evosea*, к ней проявляет высокое сродство *Cutosea gen. sp.* Такая длина ветви объясняется наличием больших пропусков в генах *Cutosea gen. sp.*, использованных при мультигенном анализе. Этой же длиной обусловлено наличие эффекта притяжения длинных ветвей, в результате которого *Cutosea gen. sp.* оказывается сестринским по отношению к группе *Archamoebae*. На большинстве деревьев, построенных на основе одного гена, *Cutosea gen. sp.* занимает базальное положение в кладе *Cutosea*, вполне возможно, что это же положение будет сохранено и по завершении мультигенного анализа. На данный момент числа сравниваемых нуклеотидных позиций недостаточно для установления окончательного положения *Cutosea gen. sp.*, однако имеющиеся данные указывают на то, что, скорее всего, данные по ультраструктуре покровов верно указали на принадлежность этой амeбы к кладе *Cutosea*.

***Stygamoeba sp., Balamuthia sp.*: два новых вида из родственных групп**

Род *Stygamoeba* был описан Томасом Соьером в 1975 году, и на тот момент его единственным представителем была амeба *Stygamoeba polymorpha*, описанная из поверхностных вод залива Чинкотиг Атлантического океана (Sawyer 1975) и помещенная на основании данных по морфологии в семейство *Stereomyxidae*. Позднее был описан второй представитель данного рода – *Stygamoeba regulata* – из донных осадков бухты Ниво (Smirnov 1996). Помимо данных по световой микроскопии, в работе приводились электронограммы, по которым видно, что кристы митохондрий имеют уплощенную форму, что совсем не характерно для лобозных амeб, скорее это является отличительным признаком амeбофлагеллят из класса *Heterolobosea* (Page & Blanton 1985). Тем не менее, в связи с отсутствием в жизненном цикле жгутиковой стадии, амeбу отнесли к таксону *Rhizopoda*. Примечательно, что эта амeба формирует цисты.

В 2007 году недалеко от шельфового ледника Росса в донных осадках был обнаружен новый вид амeб *Vermistella antarctica* (Moran et al. 2007). Червеобразные, иногда разветвленные клетки с псевдоподией, часто приподнимающейся над субстратом, на своей поверхности несут слой пирамидальных гликоцилей. Авторами также были отмечены уплощенные кристы митохондрий, подобные тем, что были обнаружены у *Stygamoeba*. Роду был присвоен статус *incertae sedis*, поскольку в дереве 18S рРНК он не группировался ни с представителями отрядов *Dactylopodida* и *Vannellida* (класс *Flabellinea* по Smirnov et al.

2005), ни с классом Tubulinea. Использование конкатенированного анализа генов 18S рРНК и актина не дало окончательного ответа о филогенезе *Stygamoeba regulata* и *Vermistella antarctica* (Lahr et al. 2011). Так, *Stygamoeba* проявила сродство к группе Centramoebida, объединяющей амёб из семейств Acanthamoebidae и Balamuthiidae, а *Vermistella* – к кластеру Vannellidae+Dactylopodidae. В обновленной классификации Amoebozoa эти два рода были объединены в семействе Stygamoebidae из-за схожести локомоторных форм и наличия уплощенных крист митохондрий (Smirnov et al. 2011). Недостаточная разрешающая способность гена 18S рРНК была доказана при попытке определить местоположение на филогенетическом древе нового арктического вида *Vermistella arctica* из вод архипелага Шпицберген (Tuml et al. 2015). Несмотря на то, что монофилетичность отряда Stygamoebida (по Smirnov et al. 2011) не была подтверждена, авторы сами указали на низкие поддержки групп, содержащих рода *Vermistella* и *Stygamoeba*. Следует отметить, что для *Vermistella arctica* также характерно наличие митохондрий с уплощенными кристами.

Иное расположение амёбы *Vermistella antarctica* было обозначено при филогеномном анализе (Tekle et al. 2016), где она была включена в состав клады Thesamoebida, правда с очень низкой поддержкой. Кроме того, не была подтверждена монофилетичность группы Discosea (по Smirnov et al. 2011), что в первую очередь связано со скудной выборкой таксонов. В работе Кавалье-Смита отряду Stygamoebida (по Smirnov et al. 2011), включавшему рода *Stygamoeba* и *Vermistella* был присвоен ранг подотряда Stygamoebina (Cavalier-Smith et al. 2016) в связи с его включением в отряд Glycostylida, для представителей которого характерно наличие дифференцированных покровных структур (чешуек, гликостилей, кутикулы). Их отсутствие в покровах *Stygamoeba regulata*, по мнению авторов, связано с вторичной утратой. Наконец, в последнем филогеномном анализе эволюции Amoebozoa обоим родам был присвоен статус *incertae sedis*. Они занимают близкое положение друг к другу и являются сестринскими по отношению к отряду Thesamoebida, хоть и с низкими поддержками.

Таким образом, в большинстве работ прослеживается тенденция к сближению представителей родов *Stygamoeba* и *Vermistella* на основании схожести механизмов локомоции, формы крист митохондрий, а также имеющихся молекулярных данных. В нашей работе мы нашли подтверждение тому, что представители рода *Vermistella* являются близкородственными по отношению к *Stygamoeba regulata* и *Stygamoeba sp.*, новому виду, изолированному из донных осадков бухты Ниво. То, что данный вид является ранее не описанным, было окончательно подтверждено методами молекулярной филогении, а именно сравнением последовательностей генов 18S рРНК. На филогенетическом древе отчетливо видно, что эти два рода являются сестринскими по отношению к семейству

Acanthamoebidae (клада Centramoebia). Однако может возникнуть вопрос, как амёбы, столь различающиеся по морфотипу, могут относиться к одной кладе. Обнаруженный нами новый вид *Balamuthia sp.* относится к семейству Acanthamoebidae, но по морфотипу напоминает амёбу рода *Stygamoeba*. Именно так он и был идентифицирован до проведения молекулярно-филогенетического анализа. Червеобразные, ветвящиеся клетки с булавовидным уроидом – признаки, характерные как для *Stygamoeba sp.*, так и для *Balamuthia sp.* Для установления его точного систематического положения был проведен анализ последовательностей генов 18S рРНК, который показал, что данный новый вид является сестринским по отношению к факультативному паразиту *Balamuthia mandrillaris*, и, следовательно, относится к кладе Centramoebia.

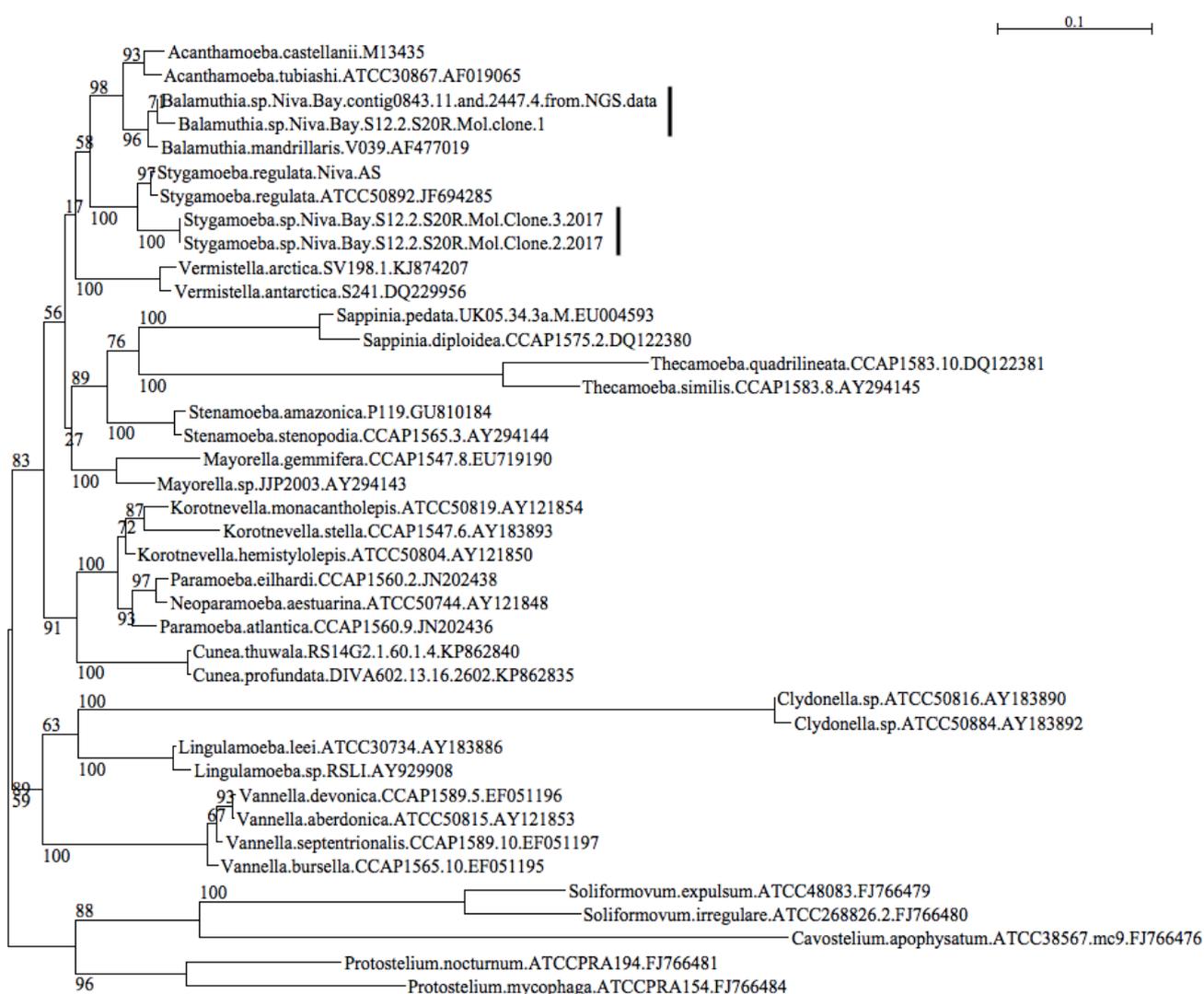


Рисунок 21. Филогенетическое древо, построенное по методу максимального правдоподобия на основе генов 18S рРНК (1369 н. позиций).

Примечательно, что в ходе исследования ультраструктуры *Balamuthia mandrillaris* (Gonzalez-Robles et al. 2015) было показано наличие уплощенных крист (“ламелл”) по периферии митохондрий. Таким образом, мы предлагаем гипотезу, подкрепленную данными молекулярно-филогенетического анализа и данными по ультраструктуре (строение крист митохондрий), о филогенетическом родстве клады Centramoebia и амёб из родов *Stygamoeba* и *Vermistella*.

Мезогалинные представители рода *Thecamoeba*

До недавнего времени в отряд Thecamoebida (по Smirnov et al. 2011) входили 3 рода амёб с организованной в виде антеро-латерального полумесяца гиалоплазмой и поверхностью клеток, образующей продольные гребни и несущей слой аморфного гликокаликса. Новый род с единственным представителем *Stratorugosa tubuloviscum*, обладающий ассоциированным с ядром ЦОМТом, после проведения филогеномного анализа был также включен в состав отряда Thecamoebida (Melton et al. 2018). Таким образом, данный таксон в работах по систематике амёбидных протистов признается монофилетическим, как в анализе гена 18S рРНК, так и в мультигенных реконструкциях.

Представители группы являются свободноживущими протистами, хотя есть сведения об обнаружении *Thecamoeba hoffmani* на жабрах радужной форели (Sawyer et al. 1974), обладающими значительной биомассой в пресноводных и почвенных местообитаниях, особенно в ассоциации со мхами и корой деревьев (Kudryavtsev & Hausmann 2009; Wylezich et al. 2015). Относительно крупные размеры клеток (до 100 мкм) и четкие морфологические признаки (локомоторная форма, структура ядрышка) позволяют определять амёбу до вида на уровне световой микроскопии, однако в некоторых случаях различение видов-двойников становится возможным только после применения молекулярно-филогенетических методов (Mesentsev & Smirnov 2019).

В большинстве работ по систематике Amoebozoa используются последовательности генов текамеб из почвенных или пресноводных местообитаний, в то время как видам из соленых водоемов уделяется гораздо меньше внимания. В ходе исследования фауны бухты Ниво нами были изолированы три вида из рода *Thecamoeba*, два из которых ранее встречались в этом местообитании (*T. munda*, *T. orbis*), а один был обнаружен впервые (*T. rugosa*). Все три вида были описаны в первой половине XX века (Schaeffer 1926), сведения об их распространении в водах Мексиканского залива приведены в определителе Пейджа (Page 1983). Помимо этого, вид *Thecamoeba orbis* имеет очень широкий ареал от северо-западных вод Атлантики до Индийского океана, являясь, возможно, одним из самых распространенных видов морских амёб. Вид *Thecamoeba rugosa*, отличающийся крупными размерами (до 80 мкм) и везикулярным ядром, был изолирован впервые из донных осадков

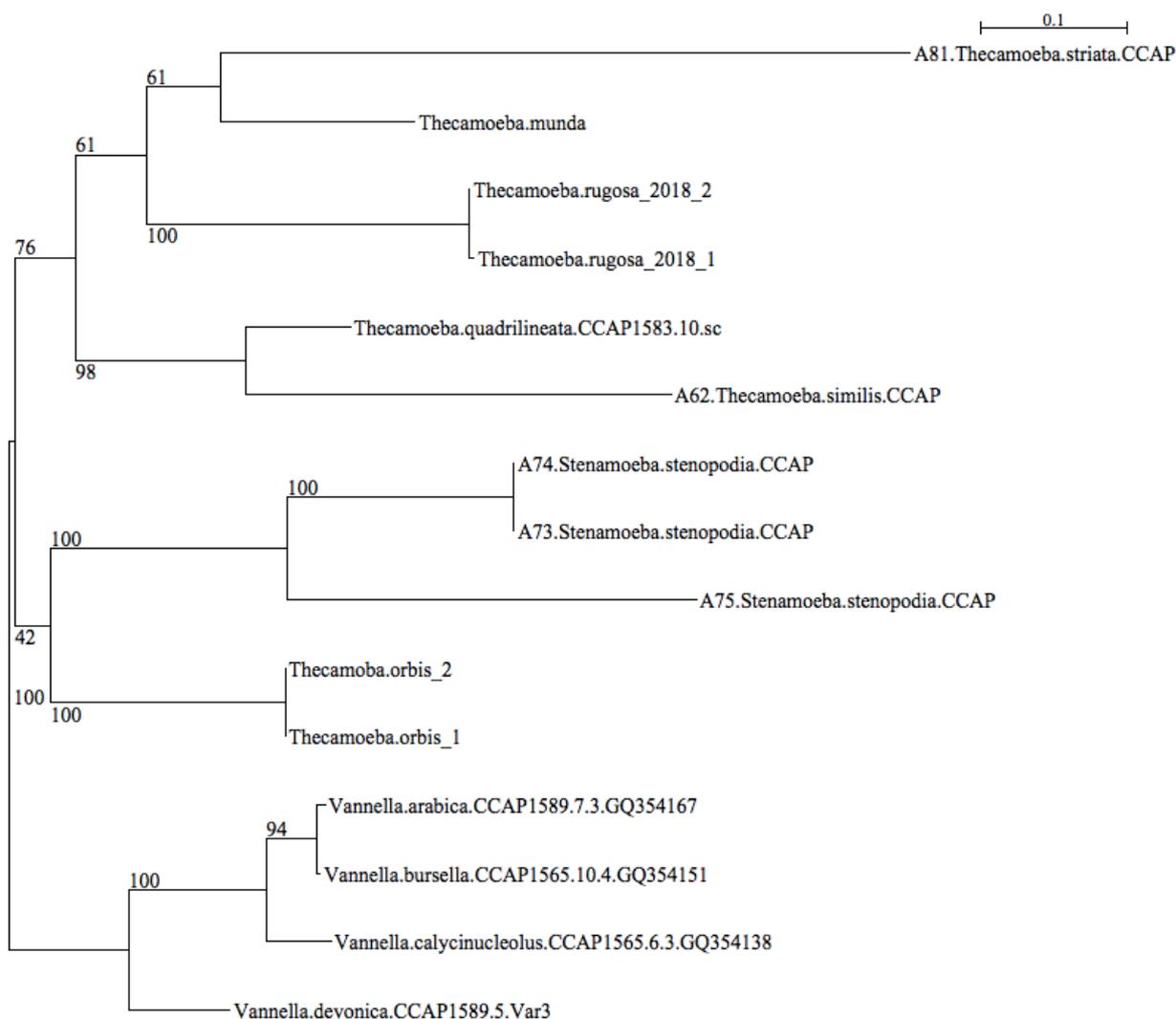


Рисунок 22. Филогенетическое древо, построенное по методу максимального правдоподобия на основе генов COI (637 н. позиций).

бухты Ниво; его морфологические характеристики соответствуют описанию, приведенному в определителе Пейджа.

В качестве молекулярного маркера нами был выбран ген цитохром оксидазы I, активно применяемый при ДНК-баркодинге из-за эффективности в различении близкородственных видов, а также относительной простоты выделения и секвенирования. На филогенетическом древе видно, что представители отряда Thecamoebida (*Thecamoeba*, *Sarrinia*, *Stenamoeba*) формируют хорошо поддержанную кладу. Мезогалинные текамебы не формируют на древе отдельной ветви, что говорит о родстве видов из разных биотопов. Парафилия рода *Thecamoeba* (вид *T. orbis* занимает базальное положение с низкой поддержкой) связана, скорее всего, с недостаточной выборкой таксонов. На данный момент не стоит говорить о корреляции между расположением видов на древе и какими-либо морфологическими признаками, однако по мере накопления базы сиквенсов генов COI

результаты проведенной работы могут лечь в основу более масштабных исследований филогении данной группы голых амёб.

Новый мезогалинный вид *Korotnevella sp.(1)*

Амебы рода *Korotnevella* при локомоции образуют на переднем конце тонкие псевдоподии (дактилоподии), а их поверхность покрыта чешуйками разнообразной формы. Большинство из них описано из пресноводных местообитаний (Udalov et al. 2016; 2017). В одном из первых атласов фауны амёб бухты Ниво было приведено описание вида *Korotnevella nivo* с характерными корзинковидными чешуйками (Smirnov 1999), схожими по строению с чешуйками *Paramoeba eilhardi* (Grell & Benwitz 1970). Есть предположение, что *K. nivo* относится к роду *Paramoeba*, однако она утратила ассоциированную с ядром парасому – облигатного симбионта из группы Kinetoplastida. Для проверки данной гипотезы необходимо проведение молекулярно-филогенетического анализа, однако в последние годы изолировать данный вид не удастся. Нами был обнаружен новый вид *Korotnevella sp.(1)*, который до исследования ультраструктуры покровов был идентифицирован как *K. nivo*, однако различия в строении чешуек показали, что это не так.

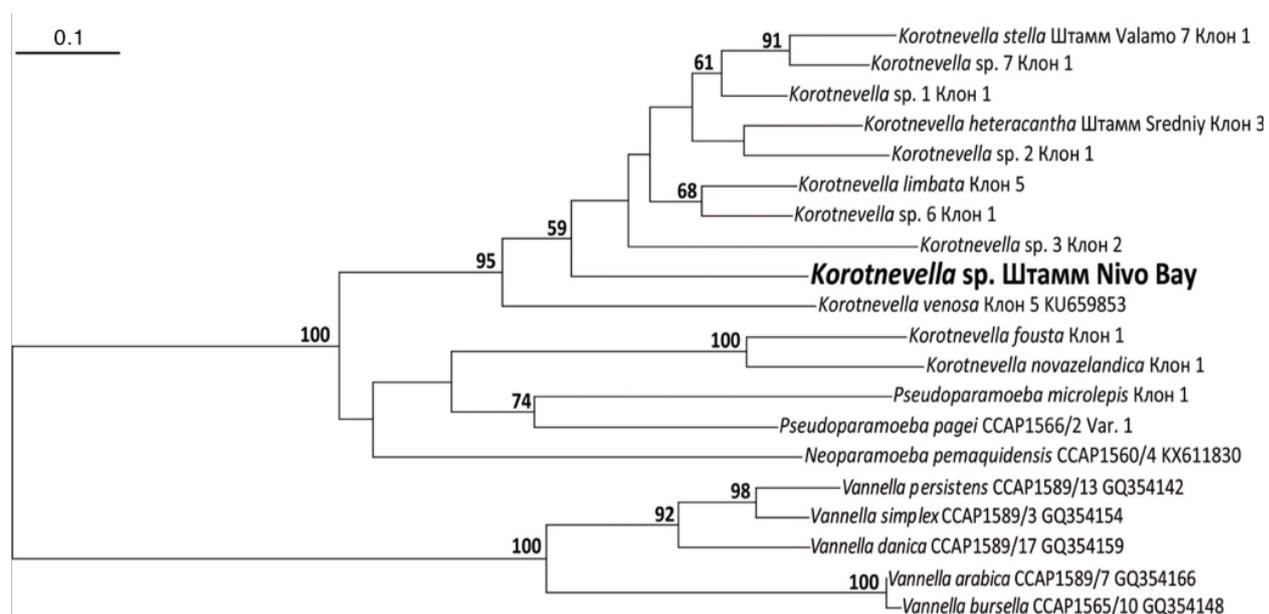


Рисунок 23. Филогенетическое дерево, построенное по методу максимального правдоподобия на основе генов COI (676 н. позиций).

Наличие двух типов чешуек (блюдчатых и корзинкообразных) сближает данный вид с *K. monacantholepis*, также изолированного из мезогалинного местообитания (O’Kelly et al. 2001), но для чешуек этого вида характерно наличие двух шипов, в то время как чешуйки *Korotnevella sp.(1)* обладают симметрией и несут по два шипа. На филогенетическом древе,

построенном на основе гена COI, амeba занимает базальное положение среди других представителей рода *Korotnevella*. Виды *K. fousta* и *K. novazelandica* несут на поверхности овальные чешуйки с шипом посередине и группируются отдельно от остальных коротневелл, обладающих двумя типами чешуек, что, возможно, указывает на необходимость ревизии данного рода голых амeb.

Фауна протистов

К настоящему времени, работ, посвященных изменению видового состава сообществ протистов выполнено не так много. Большинство из них посвящены экологии инфузорий (Fenchel 1969; 1977). Авторы данных работ исследуют вертикальное и горизонтальное распределение фауны протистов, влияние абиотических факторов (рН, концентрация кислорода, соленость, механические свойства среды) на сообщество протистов, а также процессы окисления–восстановления в донных осадках. Особое внимание также уделяется взаимоотношениям инфузорий с экто- и эндосимбиотическими бактериями, утилизирующими их продукты метаболизма (Fenchel 1977). Весьма тщательно изучено сообщество протистов в водоеме Priest Pot, где за годы проведенных исследований были идентифицированы около 600 видов протистов, среди которых наиболее широко представлены жгутиконосцы, инфузории и амebы (Finlay & Maberly 2000). Отдельные исследования были посвящены распространению протистов, несущих на своей поверхности чешуйки, среди которых есть и представители лобозных амeb, например из рода *Korotnevella* (Esteban et al. 2011). Исследователи также поднимали проблемы пространственных и временных границ сообществ протистов, их отличий от сообществ многоклеточных организмов (большая способность к пассивному распространению, разнообразие метаболических путей, высокая скорость адаптации к новым условиям), различия в подходах к описанию их видового разнообразия (Nemergut et al. 2013), а также возможность применения теории Велленда об экологических сообществах (Vellend 2016), согласно которой сообщество главным образом формируется за счет четырех процессов: 1) диверсификация, или появление генетического разнообразия; 2) рассеивание, перемещение организмов в пространстве; 3) отбор, обусловленный разной степенью приспособляемости протистов к изменениям условий среды; 4) случайные изменения численности организмов, особенно ощутимые в сообществах с низким видовым разнообразием.

Описание фауны голых амeb является достаточно трудоемким процессом, поскольку в большинстве случаев для корректной идентификации требуется установление клональной культуры и применение методов электронной микроскопии. Зачастую как при

идентификации уже описанных, так и при изучении неизвестных видов амёб необходимо применять одинаковый набор методик. К тому же, полиморфизм амёб из разных клональных культур может быть таким высоким, что определение их как представителей одного вида может быть весьма затруднительным (Page 1980a; 1980b; 1983).

При работе с фауной протистов определенного местообитания нужно обязательно учитывать тот факт, что видовой состав амёб может значительно меняться с течением сезонов (анаэробные бактериальные маты на дне бухты Ниво достигают пика в летний период). Именно поэтому продолжительные исследования фауны бухты Ниво представляют особую ценность. Несмотря на то, что в данном сообществе есть часто встречающиеся виды (*Cochliopodium gulosum*, *Mayorella kuwaitensis*, *Thecamoeba orbis*), списки обнаруженных видов меняются от года к году (Smirnov 1999a; 2002; 2007), что также подтверждается результатами данной работы. Количество идентифицированных видов с каждым годом растет в связи с введением в практику методов молекулярно-филогенетического анализа. Однако, по-видимому, в донных осадках бухты Ниво происходит постоянный «поток видов», обусловленный перемещением водных масс пролива Зунд и способствующий постоянной сукцессии фауны протистов.

Основные полученные результаты

1. Всего за два года исследований фауны донных грунтов бухты Ниво были обнаружены 20 видов амёб. Среди них представлены как уже известные из этого местообитания (12 видов), так и ранее не встречавшиеся (*Mayorella gemmifera*, *Paramoeba* sp., *Pseudoparamoeba* sp., *Thecamoeba rugosa*), а также ранее не описанные виды (*Balamuthia* sp., *Cutosea* gen. sp., *Korotnevella* sp.(1), *Stygamoeba* sp.).
2. Проведено исследование нового представителя клады *Cutosea* на уровне световой и электронной микроскопии, а также молекулярно-филогенетического анализа. Подготовлены материалы для его описания как представителя нового рода этих амёб.
3. По результатам изучения изолятов *Balamuthia* sp. и *Stygamoeba* sp., также являющихся новыми видами, предложена новая гипотеза о систематическом положении группы амёб *Stygamoeba* – *Vermistella*, подтвержденная данными молекулярной филогении и данными по ультраструктуре клеток амёб.
4. Исследованы мезогалинные представители рода *Thecamoeba*, один из которых был впервые изолирован из донных осадков бухты Ниво (*T. rugosa*). Для всех трех видов (*T. munda*, *T. orbis*, *T. rugosa*) получены молекулярные данные (последовательности генов COI), которые могут быть использованы в дальнейших филогенетических реконструкциях.
5. Подготовлены материалы для описания нового мезогалинного вида амёб из рода *Korotnevella*. Исследована ультраструктура покровов, проведен молекулярно-филогенетический анализ на основе последовательностей гена COI.

7. Выводы

1. Биоразнообразие амёб в природных местообитаниях по-прежнему остается слабо изученным, поэтому вероятность встретить новый вид даже в пробах, взятых из хорошо исследованного местообитания, остается очень высокой. Вероятно, имеет место постоянная сукцессия фауны природных местообитаний, обусловленная заносом новых видов за счет перемещения масс воды, грунта (пыли) и других субстратов, потенциально способных содержать клетки амёб.
2. Наша работа еще раз показала, что для изучения фауны амёб применения только методов световой и электронной микроскопии определенно недостаточно. Для получения точных данных о видовой принадлежности обнаруженных изолятов или описания их как новые виды в настоящее время как правило необходимо применение методов молекулярной филогении.
3. Обнаружены как минимум 3 новых филогенетически важных вида амёб (*Cutosea gen. sp.*, *Balamuthia sp.*, *Stygamoeba sp.*). Полученные по ним данные световой и электронной микроскопии, а также молекулярные данные позволили выдвинуть новые филогенетические гипотезы. Это показывает, что поиск и описание новых видов является одной из ключевых задач, обеспечивающих дальнейшее развитие систематики и филогении Amoebozoa.

8. Благодарности

Автор работы выражает благодарность научному руководителю А. В. Смирнову, а также сотрудниками и студентам кафедры зоологии беспозвоночных СПбГУ: Насоновой Елене Станиславовне, Кудрявцеву Александру Александровичу, Вишнякову Андрею Эксустадиановичу, Камышацкой Оксане Геннадьевне, Мезенцеву Елисею Сергеевичу, Удалову Илье Андреевичу и Волковой Екатерине Николаевне. Отдельная благодарность А.А. Кудрявцеву за разрешение использовать для филогенетического анализа некоторые из неопубликованных его сиквенсов генов амёб и И.А. Удалову за участие в совместной работе по описанию амёб рода *Korotnevella*.

Работа выполнена с использованием оборудования ресурсных центров «Культивирование микроорганизмов», «Биобанк СПбГУ», «Вычислительный центр СПбГУ» и РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» научного парка СПбГУ и поддержана грантами РНФ 17-14-01391 и РФФИ 16-04-01454.

9. Список литературы

1. Adl S.M., Simpson A.G.B., Lane C.E., Lukeš J., Bass D., Bowser S.S., Brown M.W., Burki F., Dunthorn M., Hampl V., Heiss A., Hoppenrath M., Lara E., Le Gall L., Lynn D.H., McManus H., Mitchell E.A.D., Mozley-Stanridge S.E., Parfrey L.W., Pawlowski J., Rueckert S., Shadwick L., Schoch C.L., Smirnov A., Spiegel F.W. The Revised Classification of Eukaryotes // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 2012. – Т. 59, № 5. – стр. 429-493.
2. Adl S.M., Simpson A.G.B., Farmer M.A., Andersen R.A., Anderson O.R., Barta J.R., Bowser S.S., Brugerolle G., Fensome R.A., Fredericq S., James T.Y., Karpov S., Kungrens P., Krug J., Lane C.E., Lewis L.A., Lodge J., Lynn D.H., Mann D.G., McCourt R.M., Mendoza L., Moestrup Ø., Mozley-Standridge S.E., Nerad T.A., Shearer C.A., Smirnov A., Spiegel F.W., Taylor M.F.J.R. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 2005. – Т. 52, № 5. – стр. 399-451.
3. Adl S.M., Bass D., Lane C.E., Lukes J., Schoch C.L., Smirnov A., Agatha S., Berney C., Brown M.W., Burki F., Cardenas P., Cepicka I., Chistyakova L., del Campo J., Dunthorn M., Edvardsen B., Eglit Y., Guillou L., Hampl V., Heiss A.A., James T.Y., Karnkowska A., Karpov S., Kim E., Kolisko M., Kudryavtsev A., Lahr D.J.G., Lara E., Le Gall L., Lynn D. H., Mann D.G., Massana R., Mithcell E.A.D., Morrow C., Park J.S., Pawlowski J.W., Powell M.J., Richter D.J., Rueckert S., Shadwick L., Shimano S., Spiegel F.W., Torruella G., Youssef N., Zlatogursky V., Zhang Q. Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 2018 – Т. 66, № 1. – стр. 4-119.
4. Amaral Zettler L.A., Nerad T.A., O’Kelly C.J., Peglar M.T., Gillevet P.M., Silberman J.D., Sogin M.L. A Molecular Reassessment of the Leptomyxid Amoeboae // *Protist.* – 2000. – Т. 151. – стр. 275-282.
5. Arndt H.A. Critical review of the importance of rhizopods (naked and testate amoeboae) and actinopods (heliozoa) in lake plankton [Журнал] // *Mar. Microb. Food Webs.* - 1993 г.. - Т. 7. - стр. 3-29.
6. Bier J.W., Sawyer T.K. Amoeboae isolated from Laboratory Eyewash Stations [Журнал] // *Curr. Microbiol.* - 1990 г.. - Т. 20. - стр. 349-350.
7. Bolivar I., Fahrni J.F., Smirnov A., Pawlowski J. SSU rRNA-based phylogenetic position of the genera *Amoeba* and *Chaos* (Lobosea, Gymnamoebia): the origin of gymnamoebae revisited // *Mol. Biol. Evol.* – 2001. – Т. 18. – стр. 2306-2314.

8. Bondarenko N., Glotova A., Kamyshatskaya O., Mesentsev Y., Lotonin K., Masharsky A., Polev D., Nasonova E., Smirnov A. – The complete mitochondrial genome of *Clydonella sawyer* (Amoebozoa, Discosea, Vannellida) // *Protistology*. – 2018a. – Т. 12. – стр. 47-54.
9. Bondarenko N., Glotova A., Nasonova E., Masharsky A., Kudryavtsev A., Smirnov A. – The complete mitochondrial genome of *Vannella simplex* (Amoebozoa, Discosea, Vannellida) // *Eur. J. Protistol.* – 2018b. – Т. 63. – стр. 83-95.
10. Bovee E.C. An emendation of the amoeba genus *Flabellula* and a description of *Vannella* gen. nov. // *Trans. Am. Microsc. Soc.* – 1965. – Т.84. – стр. 217-227.
11. Bovee E.C., Jahn T.L. Mechanisms of movement in taxonomy of Sarcodina. II. The organisation of subclasses and orders in relationship to the classes Autotractea and Hydraulea // *Am. Midl. Nat.* – 1965. – Т. 73. – стр. 293 – 298.
12. Bovee E.C., Sawyer T.K. Marine Flora and Fauna of the Northeastern United States. Protozoa: Sarcodina: Amoebae [Книга]: U.S. Department of Commerce, 1979
13. Bovee E.C. Class Lobosea Carpenter 1861 // *An illustrated guide to the protozoa* / Lee J.J., Hutner S.H. and Bovee E.C. (eds). Lawrence, Kansas: Society of Protozoologists, 1985. – стр. 158-211.
14. Butler H.G., Rogerson A. Temporal and spatial abundance of naked amoebae (gymnamoebae) in marine benthic sediments of the Clyde sea area, Scotland [Журнал] // *J. Euk. Microbiol.* - 1995 г.. - Т. 42. - стр. 724-730.
15. Bütschli O. Protozoa. Mit einem Beitrag: Palaeontologische Entwicklung der Rhizopoda, von C. Schwager / H.G. Bronn (ed.) Die Klassen und Ordnungen des Thierreichs, wissenschaftlich dargestellt in Wort und Bild: Winter'sche Verlagshandlung (Leipzig), 3 volumes: Volume 1. 1880-1882, Abtheilung: Sarkodina und Sporozoa. P. I–XVIII, 1-616, pls. 1-38.
16. Calkins G.N. The Protozoa. Columbia Press/Macmillan, New York – 1901.
17. Cavalier-Smith T. A revised six-kingdom system of life // *Biol. Rev.* – 1998. – Т. 73. – стр. 203-266.
18. Cavalier-Smith T., Chao E.E.-Y., Oates B. Molecular phylogeny of Amoebozoa and the evolutionary significance of the unikont *Phalansterium* // *Eur. J. Protistol.* – 2004. – Т. 40. – стр. 21-48.
19. Cavalier-Smith T., Fiore-Donno A., Chao E.E., Kudryavtsev A., Berney C., Snell E.A., Lewis R. Multigene eukaryote phylogeny resolves deep branching of Amoebozoa // *Mol. Phyl. Evol.* – 2015. – Т. 83. – стр. 293-304.
20. Cavalier-Smith T., Chao E.E., Lewis R. 187-gene phylogeny of protozoan phylum Amoebozoa reveals a new class (Cutosea) of deep-branching, ultrastructurally unique,

- enveloped marine Lobosa and clarifies amoeba evolution // *Mol. Phyl. Evol.* – 2016. – Т. 99. – стр. 275-296.
21. Chatton E. *Ordre des Amoebiens nus ou Amoebae* // *Traité de Zoologie* / P.P Grassé (ed). – Т. 1, № 2. – Paris: Masson, 1953. – стр. 5 – 91.
 22. Davis P.G., Caron G.A., Siebuth J.M. Oceanic amoebae from the North Atlant: culture, distribution and taxonomy [Журнал] // *Trans. Amer. Microsc. Soc.* - 1978 г.. - Т. 97. - стр. 73-88.
 23. Delage Y. Hérouard E. *Traité de Zoologie Concrète. Vol. 1: La Cellule et les Protozoaires.* – Paris: Schleicher Frères, 1896. – 584 стр.
 24. Esteban G.F., Finlay B.J., Clarke K.J. Priest Pot in the English Lake District: a showcase of microbial diversity [Журнал] // *Freshwater Biology.* - 2011 г.. - Т. 57. - стр. 321-330.
 25. Finlay B.J. and Maberly S.C. *Microbial Diversity in Priest Pot (A Productive Pond in the English Lake District)* [Книга]. - [б.м.] : Freshwater Biological Association , 2000.
 26. Fenchel T. The ecology of marine microbenthos IV. Structure and function of the benthic ecosystem, its chemical and physical factors and the microfauna communities with special reference to the ciliated protozoa [Журнал] // *Orphelia.* - 1969 г.. - Т. 6. - стр. 1-182.
 27. Fenchel T., Perry T., Thane A. Anaerobiosis and symbiosis with bacteria in free-living ciliates [Журнал] // *J. Protozool.* - 1977 г.. - Т. 24. - стр. 154-163.
 28. Fenchel T. *Patterns in Microbial Aquatic Communities* [Журнал] // *Organization of Communities.* - Blackwell, Oxford : In Gee JHR, Giller PS (ed.), 1987 г.. - стр. 281-294.
 29. Fenchel T., Finlay B.J. *Ecology and evolution in anoxic world* [Журнал]. - Oxford, New York : Oxford University Press, 1995 г..
 30. Fernandez McC.A. Crespo E.P., Mallen M.M., Ares M.P., Casas McL. C. Marine amoebae from water of Northwest Spain, with comments on a potentially pathogenic euryhaline species [Журнал] // *J. Protozool.* - 1989 г.. - Т. 36. - стр. 239-241.
 31. Greeff R. Über einige in der Erde lebende Amöben und andere Rhizopoden // *Arch. Mikrosk. Anat.* – 1866. – Т. 2. – стр. 299-331.
 32. Greeff R. *Pelomyxa palustris* (Pelobius), ein amoebenartiger Organismus des suessen Wassers // *Arch. Mikrosk. Anat.* – 1874. – Т. 10. – стр. 51-73.
 33. Grell K.G., Benwitz G. Ultrastruktur mariner Amöben. I. *Paramoeba eilhardi* Schaudinn // *Arch. Protistenk.* – Т. 112. – стр. 119-137.
 34. Gonzalez-Robles A., Lares-Villa F., Lares-Jimenez L.F., Omana-Molina M., Salazar-Villatoro L., Martinez-Palomo A. *Balamuthia mandrillaris*: further morphological observations of trophozoites by light, scanning and transmission electron microscopy // *Exp. Parasitol.* – 2015. – Т. 157. – стр. 150-155.

35. Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. Biological identifications through DNA barcodes // Proc. Biol. Sci. – 2003. – Т. 270. – стр. 313-321.
36. Honigberg B.M., Balamuth W., Bovee E.C., Corliss J.O., Gojdics M., Hall R.P., Kudo R.R., Levine N.D., Loeblich A.R. Jr., Weiser J., Wenrich D. H. A Revised Classification of the Phylum Protozoa // J. Protozool. – 1964. – стр. 7-20.
37. Jonckheere J.F. The Quantitative study of *Naegleria fowleri* in surface waters [Журнал] // Protistologica. - 1978 г.. - стр. 475-481.
38. Kang S., Tice A.K., Spiegel F.W., Silberman J.D., Panek T., Cepicka I., Kostka M., Kosakyan A., Alcantara D.M.C., Roger A.J., Shadwick L.L., Smirnov A., Kudryavtsev A., Lahr D.J.G., Brown M.W. Between a Pod and a Hard Test: The Deep Evolution of Amoebae [Журнал] // Mol. Biol. Evol.. - 2017 г.. - стр. 1-13.
39. Kim E., Simpson A.G.B., Graham L. Evolutionary relationships of Apusomonads inferred from taxon-rich analyses of 6 nuclear encoded genes // Mol. Biol. Evol. – 2006. – Т. 23. – стр. 2455 – 2466.
40. Kudryavtsev A. & Hausmann A. *Thecamoeba aesculea* n. sp. (Amoebozoa, Thecamoebidae), a terrestrial amoeba with affinities to *Th. sphaeronucleolus* (Greeff, 1891) // Acta protozoologica. – 2009. – Т. 48. – стр. 91-96.
41. Kudryavtsev A. & Pawlowski J. *Squamamoeba japonica* n. g. n. sp. (Amoebozoa): a deep-sea amoeba from the Sea of Japan with a novel cell coat structure [Журнал] // Protist. – 2013. – Т.1. – стр. 13-23.
42. Lahr D.J., Grant J., Nguyen T., Lin J.H., Katz L.A. Comprehensive phylogenetic reconstruction of Amoebozoa based on concatenated analyses of SSU-rDNA and actin genes [Журнал] // PLoS One. – 2011. – Т.6.
43. Lahr D.J., Grant J., Molestina R., Katz L.A., Anderson O.R. *Sapocribrum chincoteaguense* n. gen. n. sp.: A small, scale-bearing amoebozoan with flabellinid affinities [Журнал] // J. Eukaryot. Microbiol. – 2015. – Т. 4. – стр. 444-453.
44. Leidy J. Freshwater rhizopods of North America. United States Geological Survey of the Territories Report. – 1879. – Т. 12. – стр. 1-324.
45. Levine N.D., Corliss J.O., Cox F.E.G., Deroux G., Grain J., Honigberg B.M., Leedale G.F., Loeblich A.R., Lom J., Lynn D., Merinfeld E.G., Page F.C., Poljansky G., Sprague V., Vavra J., Wallace F.G. A newly revised classification of the Protozoa // J. Protozool. – 1980. – Т. 27. – стр. 149-184.
46. Melton J.T. 3rd, Wood F.C., Branch J., Singla M., Tekle Y.I. Phylogenomics of Thecamoebida (Discosea, Amoebozoa) with the description of *Stratorugosa tubuloviscum* gen. nov. sp. nov., a freshwater amoeba with a perinuclear MTOC // Protist. – 2019. – Т. 170. – стр. 8-20.

47. Mesentsev Y.S., Smirnov A.V. *Thecamoeba cosmophorea* n. sp. (Amoebozoa, Discosea, Thecamoebida) – An example of sibling species within the genus *Thecamoeba* [Журнал] // Eur. J. Protistol. – 2019. – Т. 67. – стр. 132-141.
48. Miller M.A., Schwartz T., Pfeiffer W.T. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees [Книга]. – San Diego Supercomputer Center, 2006.
49. Moran D.M., Anderson O.R., Dennett M.R., Caron D.A., Gast R.J. A description of seven Antarctic marine gymnamoebae including a new subspecies, two new species and a new genus: *Neoparamoeba aestuarina antarctica* n. subsp., *Platyamoeba oblongata* n. sp., *Platyamoeba contorta* n. sp. and *Vermistella antarctica* n. gen. n. sp. [Журнал] // J. Eukaryot. Microbiol. – 2007. – Т. 2. – стр. 169-183.
50. Nemergut D.R., Schmidt S.K., Fukami T., O'Neill S.P., Bilinski T.M., Stanish L.F., Knelman J.E., Darcy J.L., Lynch R.C., Wickey P., Ferrenberg S. Patterns and processes of microbial community assembly [Журнал] // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2013. – Т. 77. – стр. 342-356.
51. Nikolaev S.I., Mitchell E.A.D., Petrov N.B., Berney C., Fahrni J., Pawlowski J. The Testate Lobose Amoebae (Order Arcellinida Kent, 1880) Finally Find their Home within Amoebozoa // Protist. – 2005. – Т. 156. – стр. 191-202.
52. O'Dell W.D. Isolation, enumeration and identification of amebae from a Nebraska lake [Журнал] // J. Protozool.. - 1979 г.. - Т. 26. - стр. 265-269.
53. O'Kelly C.J., Peglar M.T., Black M.N.D., Sawyer T.K., Nerad T.A. *Korotnevella hemistylepis* N. Sp. and *Korotnevella monacantholepis* N. Sp. (Paramoebidae), Two New Scale-covered Mesohaline Amoebae [Журнал] // J. Eukaryot. Microbiol.. - 2001 г.. - Т. 48. - стр. 655-662.
54. Page F.C. A revised classification of the Gymnamoebia (Protozoa: Sarcodina) [Журнал] // Zool. J. Linn. Soc.. - 1976 г.. - Т. 58. - стр. 61-77.
55. Page F.C. Fine structure of some marine strains of *Platyamoeba* (Gymnamoebia, Thecamoebidae). – Protistologica. – 1980a. – Т. 16. – стр. 605-612.
56. Page F.C. A key to marine species of *Vannella* (Sarcodina, Gymnamoebia). – J. mar. biol. Ass. U. K. – 1980b. – Т. 60. – стр. 929-946.
57. Page F.C. *Mayorella Schaeffer, 1926* (Rhizopoda: Amoebida): proposed conservation. – Bull. Zool. – 1982. – Т. 39. – стр. 214-217.
58. Page F.C. Marine Gymnamoebae [Книга]. - Cambridge : Institute Terrestr. Ecology, 1983.
59. Page F.C. & Blanton R.L. The Heterolobosea (Sarcodina: Rhizopoda), a new class uniting the Schizopyrenida and the Acrasidae (Acrasida) [Журнал] // Protistologica. - 1985 г.. - Т. 21. - стр. 121-132.

60. Page F.C. The classification of 'naked' amoebae (Phylum Rhizopoda) [Журнал] // Arch. Protistenk.. - 1987 г.. - Т. 133. - стр. 199-217.
61. Page F.C. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae [Книга]. - Ambleside : Freshwater Biol. Assoc., 1988.
62. Page F.C. Nackte Rhizopoda. In Nackte Rhizopoda und Heliozoa (Protozoenfauna Band 2) // Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York. – 1991. – стр. 3 – 187.
63. Pawlowski J. Introduction to the molecular systematics of Foraminifera // Micropaleontology. – 2000. – Т. 50. – стр. 135-139.
64. Penard E. Faune Rhizopodique du bassin du Lemman // Henry Kundig. - Geneve : [б.н.], 1902 г.
65. Pussard M. Modalité de la division nucléaire et taxonomie chez les Amibes (Amoebaea, Protozoa). Révision des notions de promitose, mésomitose et métamitose // Protistologica. – 1973. – Т. 9. – стр. 163-173.
66. Roger A.J., Simpson A.G. Evolution: revisiting the root of the eukaryote tree // Curr. Biol. – 2009. – Т. 19. – стр. 165–167.
67. Rogerson A., Gwaltney C. High Numbers of Naked Amoebae in the Planktonic Waters of a Mangrove Stand in Southern Florida, USA // J. Euk. Microbiol.. - 2000 г.. - Т. 47. - стр. 235-241.
68. Rogerson A., Patterson D.J. The Naked Ramicristate Amoebae (Gymnamoebae). An Illustrated Guide to the Protozoa. 2nd edition // Lee J.J., Leedale G.F., Bradbury P. (eds). Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas, 2002. – стр. 1023-1053.
69. Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics. – 2003. – Т. 19. – стр. 1572-1574.
70. Sandon H. A study of the protozoa of some american soils // Soil Sci.. - 1928 г.. - Т. 25. - стр. 107-120.
71. Sawyer T.K. Isolation and identification of free-living marine amoebae from Upper Chesapeake Bay, Maryland [Журнал] // Trans. Amer. Microsc. Soc.. - 1971 г.. - Т. 90. - стр. 43-51.
72. Sawyer T.K. Marine amoebae from surface waters of Chincoteague Bay, Virginia: two new genera and nine new species within the families Mayorellidae, Flabellulidae and Stereomyxidae [Журнал] // Trans. Amer. Microsc. Soc.. - 1975 г.. - Т. 94. - стр. 71-92.
73. Schaeffer A.A. Three new species of amebas: *Amoeba bigemma* nov. spec., *Pelomyxa lentissima* nov. spec., and *P. schiedti* nov. spec. // Trans. Am. Microsc. Soc. – 1918. – V. 37. – P. 79-96.
74. Schaeffer A.A. Taxonomy of the amoebas // Pap. Dept. Mar. Biol. Carnegie Inst. Wash. – 1926 – Т. 24. – стр. 3-112.

75. Schuler G.A., Brown M.W. Description of *Armaparvus languidus* n. gen. n. sp. Confirms Ultrastructural Unity of Cutosea (Amoebozoa, Evosea) [Журнал] // J. Eukaryot. Microbiol. – 2018. – Т. 66. – стр. 158-166.
76. Sims G.P., Rogerson A., Aitken R. Primary and Secondary Structure of the Small-Subunit Ribosomal RNA of the Naked, Marine Amoeba *Vannella anglica*: Phylogenetic Implications // J. Mol. Evol. – 1999. – Т. 48. – стр. 740-749.
77. Singh B.N. Nuclear division in nine species of free living amoebae and its bearing on the taxonomy of the order Amoebida // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. – 1952. – Т. 236, Issue 636. – стр. 405-461.
78. Smirnov A.V. *Stygamoeba regulata* n. sp. (Rhizopoda)- A Marine Amoeba with an Unusual Combination of Light-Microscopical and Ultrastructural Features [Журнал] // Arch. Protistenkd.. - 1996 г.. - Т. 146. - стр. 299-307.
79. Smirnov A.V. & Goodkov A.V. Systematic diversity of gymnamoebae in the bottom sediments of a freshwater lake in Karelia (Lobosea, Gymnamoebia) [Журнал] // Zoosystematica Rossica. – 1996. – стр. 201-203.
80. Smirnov A.V. Two new species of marine amoebae: *Hartmannella lobiferan* sp. and *Korotnevella nivon* sp. (Lobosea, Gymnamoebia) [Журнал] // Arch. Protistenkd.. - 1997 г.. - Т. 147. - стр. 238-292.
81. Smirnov A.V. & Goodkov A.V. Description of the Large Multinucleate Lobose Amoeba *Chaos glabrum* sp. n. (Lobosea, Amoebidae), with Notes on the Diagnosis of the Genus *Chaos* [Журнал] // Acta Protozoologica. - 1997 г.. - Т. 36. - стр. 227-233.
82. Smirnov A.V. & Goodkov A.V. Study of *Polychaos annulatum* Penard, 1902 comb nov. (Gymnamoebia, Amoebidae) with taxonomical analysis of *Polychaos fasciliatum*-like species [Журнал] // Europ. J. Protistol.. - 1998 г.. - Т. 34. - стр. 1-9.
83. Smirnov A.V. An illustrated survey of gymnamoebae isolated from anaerobic sediments of the niva bay (the sound) (Rhizopoda, Lobosea) [Журнал] // Ophelia. – 1999a г.. - Т. 50. - стр. 113-148.
84. Smirnov A.V. *Korotnevella diskophora* n.sp. (Gymnamoebia, Paramoebidae) - small freshwater amoeba with peculiar scales [Журнал] // Protistology. - 1999b г.. - Т. 1. - стр. 30-33.
85. Smirnov A.V., Goodkov A.V. A new approach to the description of gymnamoebae: illustrated classification of basic morphotypes // Protistology. – 1999c. – Т. 1. – стр. 20-29.
86. Smirnov A.V. Redescription of *Thecamoeba munda* Schaeffer 1926 (Gymnamoebia, Thecamoebidae), isolated from the Baltic Sea // European Journal of Protistology. – 1999d. – Т. 35. – стр. 66-69.

87. Smirnov A.V. Diversity of gymnamoebae (rhizopoda) in artificial cyanobacterial mats after four years in the laboratory [Журнал] // *Ophelia*. - 2001 г.. - Т. 54. - стр. 223-227.
88. Smirnov A.V. Vertical Distribution and Abundance of Gymnamoebae (Rhizopoda) in Bottom Sediments of the Brackish Water Niva Bay (Baltic Sea, The Sound) [Журнал] // *Protist*. - 2002 г.. - Т. 153. - стр. 239-250.
89. Smirnov A.V., Thar R. Spatial Distribution of Gymnamoebae (Rhizopoda, Lobosea) in Brackish-Water Sediments at the Scale of Centimeters and Millimeters [Журнал] // *Protist*. - 2003 г.. - Т. 154. - стр. 359-369.
90. Smirnov A.V., Thar R. Vertical Distribution of Gymnamoebae (Rhizopoda, Lobosea) in the Top Layer of Brackish-Water Sediments [Журнал] // *Protist*. - 2004 г.. - Т. 155. - стр. 437-446.
91. Smirnov A.V., Kudryavtsev A.A. Pellitidae n. fam. (Lobosea, Gymnamoebia) - a new family, accomodating two amoebae with an unusual cell coat and an original mode of locomotion, *Pellita catalonica* n.g., n. sp. and *Pellita digitata* comb. nov. [Журнал] // *Europ. J. Protistol.* - 2005 г.. - Т. 41. - стр. 257-267.
92. Smirnov A.V., Nassonova E.S., Berney S., Fahrni J., Bolivar I., Pawlowski J. Molecular Phylogeny and Classification of the Lobose Amoebae // *Protist*. - 2005. - Т. 156. - стр. 129-142.
93. Smirnov A.V. Cryptic freshwater amoeba species in the bottom sediments of Niva Bay (Oresund, Baltic Sea) [Журнал] // *European Journal of Protistology*. - 2007 г.. - Т. 43. - стр. 87-94.
94. Smirnov A.V., Nassonova E.S., Chao E., Cavalier-Smith T. Phylogeny, evolution and taxonomy of vannellid amoebae [Журнал] // *Protist*. - 2007. - Т. 158. - стр. 295-324.
95. Smirnov A.V., Chao E., Nassonova E.S., Cavalier-Smith T. A Revised Classification of Naked Lobose Amoebae (Amoebozoa: Lobosa) // *Protist*. - 2011. - Т. 162. - стр. 545-570.
96. Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models // *Bioinformatics*. - 2006. - Т. 22. - стр. 2688-2690.
97. Tekle Y.I., Grant J., Anderson O.R., Nerad T.A., Cole J.C., Patterson D.J., Katz L.A. Phylogenetic placement of diverse amoebae inferred from multigene analyses and assessment of clade stability within 'Amoebozoa' upon removal of varying rate classes of SSU-rDNA // *Mol. Phylogenet. Evol.* - 2008. - Т. 47. - стр. 339-352.
98. Tekle Y.I., Anderson O.R., Katz L.A., Maurer-Alcala X.X., Romero M.A.C., Molestina R. Phylogenomics of 'Discosea': A new molecular phylogenetic perspective on Amoebozoa with flat body forms // *Mol. Phylogenet. Evol.* - 2016. - Т. 99. - стр. 144-154.

99. Tysl T., Ditrich O., Kostka M., Dykova I. *Vermistella arctica* n. sp. nominates the genus *Vermistella* as a candidate for taxon with bipolar distribution // *J. Euk. Microbiol.* – 2015. – Т. 63. – стр. 210-219.
100. Udalov I., Zlatogursky V., Smirnov A. A new freshwater naked lobose amoeba *Korotnevella venosa* n. sp. (Amoebozoa, Discosea) // *J. Eukaryot. Microbiol.* – 2016.- Т. 63. – стр. 834-840.
101. Udalov I.A., Volcker E., Smirnov A. *Korotnevella novozelandica* n. sp. (Amoebozoa, Discosea, Dactylopodia) – a new freshwater amoeba with unusual combination of scales // *Protistology.* – 2017. – Т.11. – стр. 238-247.
102. Vellend M. *The theory of ecological communities* [Книга] // Princeton University Press, 2016.
103. Visvesvara G.S., Schuster F.L., Martnez A.J. *Balamuthia mandrialei*, n. g., n. sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals // *J. Euk. Microbiol.* – 1993. – Т. 40. – стр. 504-514.
104. Vors N. Heterotrophic amoebae, flagellates and heliozoa from the Tvaerminne area, gulf of Finland, in 1988-1990 [Журнал] // *Ophelia.* - 1992 г.. - Т. 36. - стр. 1-109.
105. Wallich G.C. On the value of the distinctive characters in *Amoeba*: *Annals and Magazine of Natural History.* – 1863. - Series 3 12. – стр. 111-151.
106. Wylezich K., Corsaro D., Walochnik J., Michel R. Electron microscopical investigations of a new species of the genus *Sappinia* (Thecamoebidae, Amoebozoa), *Sappinia platani* sp. nov., reveal a dictyosome in this genus [Журнал] // *Acta Protozoologica.* – 2015. – Т. 54. – стр. 45-51.