593.121

ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГОЛИХ АМЕБ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ СУЧАСНИХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Пацюк Марина Костянтинівна,
к.б.н., доцент
Житомирський державний університет імені Івана Франка
м. Житомир, Україна

Анотація: у роботі наведені відомості щодо ідентифікації голих амеб за допомогою молекулярно-генетичних методів дослідження. ДНК виділено з таких амеб: *Saccamoeba* sp., *T. similis, Thecamoeba* sp., *V. lata, Vannella* sp., *Ripella* sp., ***V. bacillipedes,*** *C. actinophorum, C. minus, Cochliopodium* sp., *Acanthamoeba* sp., *W. magna*. Усі послідовності фрагментів ДНК амеб відправлено у GenBank, відповідно присвоєно номери. Амеби виділені з водойм України, Австрії, Польщі, Чехії та Туреччини.

Ключові слова: голі амеби, дослідження, ДНК, водойми, Україна.

Голі амеби – одноклітинні твариноподібні організми, які не мають позаклітинних покривних структур типу черепашки, або «тектуму», переміщуються за рахунок активності акто-міозинового цитоскелету, рух цитоплазми плавний, рівномірний. Тільки гетеролобозним амебам (клас Heterolobosea Page & Blanton, 1985) властивий еруптивний (виверджений) ток цитоплазми. Життєвий цикл голих амеб включає стадії трофозоїта та цисти, хоча у багатьох видів інцистування не описано. Статевий процес відмічається у *Sappinia diploidea* [8]. Відома невелика кількість дійсно описаних видів голих амеб. Більшість науковців вважає, що голі амеби – космополітні організми, оскільки для них характерний простий життєвий цикл, малі розміри, утворюють цисти для переживання несприятливих умов, поширюються повітряними потоками та морськими течіями [5–7]. Існують труднощі в ідентифікації голих амеб, тому відсутня достатня кількість даних щодо

поширення цих протистів. Існують роботи, в яких зазначаються списки голих амеб, ідентифікація яких заснована переважно на морфологічних даних. В останні роки більшість амебологів для встановлення видової приналежності амеб використовують молекулярно-генетичні методи дослідження [2–4]. Для того, щоб отримати надійні дані щодо особливостей поширення голих амеб у різних природних біотопах з різними умовами, необхідно виділяти цих протистів із віддалених місцезнаходжень і порівнювати їх із видами, які входять у склад локальних фаун [5–7]. Метою роботи є вивчення голих амеб, ізольованих із водойм різних регіонів України та віддалених місцезнаходжень (водойм Австрії, Польщі, Чехії) й ідентифікація видів за допомогою молекулярно-генетичних методів дослідження.

Матеріал і методи дослідження

Матеріал зібраний впродовж 2015–2021 р.р. Проби води відібрані з водойм України: р. Камянка, р. Тетерів та р. Гуйва поблизу м. Житомира; р. Прут поблизу м. Чернівці, р. Дніпро в Запорізькій області; р. Стохід Ковельського району Волинської області. Додатково відібрано проби води з оз. Багер (Австрія), р. Варта (Польща), р. Ельба (Чехія). Проби води (поверхневий шар донного ґрунту та невелика кількість придонної води) відбирали вручну у скляні посудини ємкістю до 500 мл і доставляли в лабораторію. Розмноження амеб здійснювали у чашках Петрі на непоживному агар-агарі (non-nutrient agar (NNA)) за методикою Пейджа з додаванням зерен рису [12]. Ідентифікацію амеб здійснювали таким чином: спочатку проводили визначення їх морфотипу, після чого використовували таксономічний визначник Пейджа [12]. Геномна ДНК була виділена за допомогою гуанідин-ізотіоціанатного методу [10]. Ген 18S рРНК ампліфікували з використанням універсальних еукаріотичних праймерів RibA 5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3' та RibB 5'-TGATCCTTCTGCAGGTTCACCTAC-3' [11]. Для кожного виду використовували одні й ті ж праймери для секвенування. Порівняння

отриманих послідовностей ДНК із даними ГенБанку (GenBank) проводилося за допомогою програми BLAST (NCBI) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Результати дослідження

Сьогодні ідентифікація голих амеб заснована не лише на світловій та електронній мікроскопії, а й на молекулярно-генетичних методах дослідження. Як діагностичні ознаки можна використовувати такі: форма крист мітохондрій, тонка будова покривів клітин, порівняння послідовностей генів – 18S-РНК, тубуліну, актину та ін. [2, 3]. Побудова філогенетичних дерев за послідовностями генів показує, що група голих амеб розпадається на незалежні групи високого рангу [2, 3, 9, 13]. Виділення таксонів високого рангу в межах Amoebozoa Luxe, 1913 постійно обговорюється в молекулярно-генетичних роботах з проблемами походження групи. Враховуючи молекулярні дані таксони високого та низького рангів неодноразово піддавалися переогляду. Різні таксони демонструють філогенетичну спорідненість, для груп високого рангу в складі амеб сформульовані діагнози [1–3, 13].

Наші цілеспрямовані дослідження впродовж 2013–2021 р.р. дали змогу ідентифікувати 44 види голих амеб у водоймах України. Із 12 прісноводних видів нам вдалося виділити ДНК, що спростило визначення цих протистів. Усі нуклеотидні послідовності відправлені у базу даних GenBank, відповідно присвоєні номери. Із р. Тетерів (околиці м. Житомира) виділені такі амеби: *Saccamoeba* sp. (номер у базі даних GenBank MZ079370), *Thecamoeba* sp. (MZ079371), *Vannella* sp. (MZ079372), *Cochliopodium* sp. (MZ079368), *Willaertia magna* De Jonckheere, Dive, Pussard & Vickerman, 1984 (OK649263). Із р. Кам'янка (околиці м. Житомира) виділені *Vannella lata* Page, 1988 (OL305063), *Cochliopodium actinophorum* Auerbach, 1856 (MZ079367). У р. Гуйва виявлені *Ripella* sp. (MZ079369) та *Acanthamoeba* sp. (MZ079366). Із р. Прут (поблизу м. Чернівці) виділена *Thecamoeba similis* (Greeff, 1891) Lepşi, 1960 (OL604177), із р. Дніпро (Запорізька область) – ***Vexillifera bacillipedes*** Page, 1969 (OK649262), із р.

Стохід (Ковельський район, Волинська область) – *Cochliopodium minus* Page, 1976 (OK649264).

Як було зазначено вище ми виділяємо амеб із водойм різних регіонів, для того щоб порівняти склад та умови існування амеб із віддалених місцезнаходжень. Так, із оз. Багер (Австрія) виділено амебу *T. similis (*OL604178*), із р. Варта (Польща) – V. lata* (OL305064), із р. Ельба (Чехія) – *Acanthamoeba* sp. (OK649261).

Слід зазначити, що ми вивчаємо голих амеб не лише з прісних водойм України, а й морських. У Чорному морі (Одеська область) знайдено 12 видів голих амеб. Із двох видів вдалося виділити ДНК – *V. simplex* Bovee, 1965 (OM403052) та *Acanthamoeba griffini* Sawyer, 1971 (OM522832). Ці ж види були знайдені в Середземному морі (Сіде, Турція) – *V. simplex* (OM403053), *A. griffini* (OM522833).

Висновки

Отже, сьогодні для ідентифікації голих амеб, як і для інших груп протистів, все частіше використовують молекулярно-генетичні методи дослідження. З більшості амеб не вдається виділити «чисту» ДНК, оскільки в культурах, окрім останніх, містяться ще й інші еукаріотичні організми, які є харчовими об’єктами амеб. У ході досліджень нами виділено ДНК із 14 видів голих амеб. Нуклеотидна послідовність ДНК цих видів буде використана для філогенетичного аналізу.

Список літератури

1. Adl S. M., Simpson A., Lane C. E. et al. The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2012. 59 (5). P. 429–514.

2. Cavalier-Smith T., Chao E., Oates B. Molecular phylogeny of Amoebozoa and the evolutionary significance of the unikont *Phalansterium*. *European Journal of Protistology*, 2004. 40. P. 21–48.

3. 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. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2016. Vol. 99. P. 275–296.

4. Dyková I., Kostka M., Pecková H. Three new species of the Amoebozoan genus *Vexillifera* Schaeffer, 1926. *Acta Protozoologica*, 2011. 50. P. 55–63.

5. Foissner W. Biogeography and dispersal of micro-organisms: a review emphasizing protists. *Acta Protozoologica*, 2006. 45. P. 111–136.

6. Foissner W. Dispersal and biogeography of protists: recent advances. *Japanese Journal of Protozoology*, 2007. 40. P. 1–16.

7. Foissner W. Protist diversity and distribution: some basic considerations. *Biodiversity and Conservation*, 2008. 17. P. 235–242.

8. Goodfellow L. P., Belcher J. H., Page F. C. A light- and electron-microscopical study of *Sappinia diploidea*, a sexual amoeba. *Protistologica*, 1974. 2. P. 207–216.

9. Lara E., Dumack K., Garcia-Martin J. M. et al. Amoeboid protist systematics: A report on the «Systematics of amoeboid protists» symposium at the VIIIth ECOP/ISOP meeting in Rome, 2019. *European Journal of Protistology*, 2020. 76. P.1–12.

10. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982.

11. Medlin L., Elwood H. J., Stickel S., Sogin M. L. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, 1988. 71. P. 491–499.

12. Page F. C., Siemensma F. J. Nackte Rhizopoda und Heliozoea (Protozoenfauna Band 2). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1991. P. 3–170.

13. Pawlowski J., Burki F. Untangling the phylogeny of amoeboid protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2009. 56. P. 16–25.