



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ, КАТЕДРА „ЕКОЛОГИЯ И ОПАЗВАНЕ НА ОКОЛНАТА
СРЕДА“

Мария Лъчезарова Янкова

***„Екологично проучване на род *Milnesium*
(*Tardigrada: Eutardigrada*) в Пловдивското поле“***

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен
„Доктор“

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика

Професионално направление: 4.3. Биологически науки

Докторска програма: „Екология и опазване на екосистемите“

Научен ръководител:

доц. дбн Дилиан Георгиев
(ПУ „Паисий Хилендарски“,
Катедра „Екология и ООС“, Пловдив)

Пловдив, 2019 г.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за публична защита на разширено заседание на катедра „Екология и опазване на околната среда”, Биологически факултет при ПУ „Паисий Хилендарски” (Протокол № 205 от 14.06.2019 г.).

Дисертационният труд съдържа 125 страници и включва: 15 таблици, 22 фигури, 3 приложения и 236 литературни източника, от които 7 на кирилица и 229 на латиница.

Научно жури:

Проф. дбн Павел Ангелов

Проф. д-р Здравко Хубенов (НПМ, София)

Доц. д-р Диян Георгиев (Тракийски университет, Стара Загора)

Доц. д-р Ивелин Моллов (ПУ „Паисий Хилендарски”)

Доц. дбн Дилян Георгиев (ПУ „Паисий Хилендарски”)

Материалите по защитата са на разположение на интересувашите се в катедра „Екология и опазване на околната среда” и библиотеката на ПУ „Паисий Хилендарски”.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодаря на всички колеги от катедра „Екология и опазване на околната среда“ към Биологическия факултет на ПУ „Паисий Хилендарски“ за доверието и оказаното съдействие при провеждане на изследването.

Настоящото проучване се осъществи благодарение на безкрайното търпение, подкрепа, мотивация и помощ на научния ми ръководител доц. дбн Дилян Георгиев.

Искрени благодарности за помощта на проф. дбн Димитър Бечев (Катедра „Зоология“, Биологически факултет, ПУ „Паисий Хилендарски“), който ни предостави толкова необходимия фазово-контрастен микроскоп и редица полезни съвети (и проби) още в самото начало на изследването.

Безкрайно благодаря на доц. д-р Дойчин Бояджиев (Катедра „Приложна математика и моделиране“, Факултет по Математика и информатика, ПУ „Паисий Хилендарски“) и на гл. ас. д-р Стефан Казаков (Катедра „Водни екосистеми“, ИБЕИ – БАН) за помощта при обработката на данните, както и за тяхната отзивчивост и съпричастност.

Признателна съм на Анелия Павлова (Катедра „Зоология“, Биологически факултет, ПУ „Паисий Хилендарски“), Кирил Иванов (ГХГ, Пловдив), ас. д-р Мария Гевезова-Казакова (Катедра „Медицинска биология“, МУ – Пловдив) и ас. д-р Мирослав Антоу (Катедра „Зоология“, Биологически факултет, ПУ „Паисий Хилендарски“) за техния ентузиазъм за събиране на проби, както и на Юлий Димитров, с чиято помощ открихме бавноходки в различни планини на страната и на големи височини.

Благодаря на проф. д-р Ангел Зайков, доц. д-р Ангелина Иванова, гл. ас. д-р Дойчин Терзийски, биолог Нина Бекирска и химик Стефания Колева от Института по рибарство и аквакултури, Пловдив, за отделеното време и събраните от тях проби.

Проведеното изследване стана възможно благодарение на неограничената отзивчивост и желание за съвместна работа на Витолд Морек (Ягелонски университет, Краков), доц. д-р Лукаш Качмарек (Познански университет „Адам Мицкевич“) и доц. д-р Лукаш Михалчик (Ягелонски университет, Краков).

Благодаря на семейството ми, което в моментите на съмнение ми вдъхна увереност.

И не на последно място искрено благодаря на всички бавноходки и всички други живи организми, които не по собствена воля станаха участници в проведеното изследване, но без които то нямаше да бъде осъществено.

1. УВОД

За първи път представители на тип Tardigrada са открити през 1767 година, но официално данни за тях са публикувани едва през 1773 година от немския зоолог Йохан Гьозе. През 1776 година бавноходките получават своето име (“il Tardigrado”, бавно стъпващ) от италианския учен Лазаро Спаланцани.

Бавноходките са микроскопични многоклетъчни безгръбначни организми достигащи размери от 0.05 до 1.5 мм. До настоящия момент са описани над 1200 вида, но се предполага, че видовото разнообразие на тази група организми е десетократно по-голямо.

Малко се знае за еволюционната история на бавноходките, тъй като са с малки размери и меки тела, което затруднява фосилизацията им. Молекулярната и традиционната таксономия предполагат, че тип Tardigrada е еволюционно близък до тип Arthropoda или тип Nematoda. Това, което е известно със сигурност е, че бавноходките са древни животни (по данни от открит фосил, датиращ от среден Камбрий, т.е. преди близо 550 милиона години) и принадлежат към надтип Ecdysozoa (Cooper, 1964; Bertolani & Grimaldi, 2000; Nielsen, 2012; Borner *et al.*, 2014).

Филогенезата на членестоногите е обект на активен дебат и до днес. Първи Douège (1840) класифицира таксономично Tardigrada, като по-късно Ramazzotti (1962) утвърждава бавноходките като тип в първата си монография. Морфологичните и молекулярните данни сочат, че тардиградите са екдизозои, но в последните години се водят дискусии относно филогенетичното място на бавноходките в надтип Ecdysozoa, т.е. дали тардиградите са циклонеуралии (тип Nematoda, тип Nematomorpha, тип Priapulida, тип Kinorhyncha и тип Loricifera) или панартроподи (еуартроподи и онихофори) (Jørgensen *et al.* 2018). Предложеният нов таксон Panarthropoda все още не е официално потвърден, но е подкрепен от редица морфологични, генетични и палеонтологични изследвания. За общи характеристики на панартроподите се считат наличието на крака и нокти, коремно разположена нервна система и сегментация на тялото.

Всички бавноходки имат по четири чифта крайници, които завършват с различни по структура нокти и сложен буко-фарингеален апарат. Продължителността на живот е средно от 3–30 месеца, като през периодите на нарастване линейат. Нарастването се извършва чрез нарастване на клетките, а не чрез тяхната подмяна. Бавноходките са размножават полово

или безполово (партеногенеза и хермафродизъм) чрез яйца, които депозират директно в заобикалящата ги среда или в съблекла (Nelson *et al.*, 2015).

Тардиградите са известни със своята способност да изпаднат в състояние на криптобиоза (анабиоза) или диапауза и така да оцеляват при екстремни условия, като изсушаване до 10 години (Jönsson & Bertolani, 2001), -272.95°C за 20 часа или -200°C за 20 месеца (Miller, 1997), 151°C за няколко минути (Lindahl & Balsler, 1999), налягане от 6000 атмосфери (Seki & Toyoshima, 1998), вакуум и UV радиация в открития Космос (Jönsson *et al.*, 2008).

До настоящия момент са описани 39 вида от род *Milnesium* (Degma *et al.*, 2018). Представителите на рода се срещат в различни сухоземни и сладководни хабитати, както и в морските крайбрежни зони. *Milnesium* spp. са хищни видове, като основно се хранят с алги, ротифери, нематоди и други по-малки тардигради. Размножават се полово и безполово чрез партеногенеза. Женските индивиди могат да снесат до над 12 яйца в екзувия при процес на линееене (Glime, 2017a).

При предишни проучвания в страната са съобщени 43 вида (Bartoš, 1937; Casper, 1951; Valkanov, 1954, 1957; Iharos, 1961, 1973, 1982; Rudescu, 1969, 1972; Cvetkov & Gruncharova, 1977; McInnes, 1994; Kaczmarek *et al.*, 2011a; Hubenov, 2015), от които един от род *Milnesium* – *Milnesium tardigradum* Douyère, 1840 съобщен последно от Iharos през 1961 година. Всички стари данни за страната трябва да бъдат потвърдени чрез съвременните методи на изследване и таксономия на тип Tardigrada.

При проведеното изследване са установени два нови за страната и един нов за науката вид от род *Milnesium*. При проучването открихме 21 нови находища на род *Milnesium* и 94 нови находища на тип Tardigrada в Пловдивското поле и в други райони на страната.

Представители на род *Milnesium* са установени от различни субстрати и градски и извънградски местообитания, като получените резултати подчертават необходимостта от системно и обстойно изследване на екологията на тип Tardigrada.

2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

2.1. Таксономични данни. Основни морфологични белези с таксонимично значение

Съвременната таксономия на тардиградите се базира основно на следните морфологични структури: нокти, буко-фарингеален апарат, кутикула и структура на обвивката на яйцата. До настоящия момент родът включва 39 вида (Degma *et al.*, 2018).

За първи път през 2016 година, при описанието на нов вид *Milnesium variefidum* от Шотландия и след провеждането на обстоен експеримент и молекулярни изследвания, Morek *et al.* (2016a) потвърждават съществуването на аберации в структурата на ноктите в различни стадии от развитието на индивидите. На базата на обстойното изследване на таксономично значимите морфологични белези (повърхност и структури на кутикулата, брой и относителен размер на околоустните ламели, наличие/отсъствие на главен клон на ноктите, разклонения на главния клон, структура на вторични нокти) чрез морфометрия, фазово-контрастен и сканиращ електронен микроскоп и молекулярен анализ, авторите поставят описаните до края на 2015 г. видове в следните категории:

- видове с пълно описание: 1;
- с много добро описание: 3;
- с добро описание: 7;
- с непълно описание: 15;
- необходимост от повторно изследване и описание: 4.

2.2. Разпространение и местообитания

2.2.1. Биогеографско разпространение

В продължение на повече от 150 години род *Milnesium* е считан за монотипен, силно космополитен род, но нови изследвания например твърдят, че *Milnesium tardigradum sensu stricto* е с разпространение ограничено до Палеарктика (Michalczyk *et al.*, 2012a, b).

2.2.2. Разпространение по местообитания

Род *Milnesium* (Dou ere 1840) е съобщен от много находища, от Антарктика до умерените Арктични региони. Имайки предвид, че някои морфологични характеристики не

са съобщени в по-стари описания на видове от род *Milnesium*, всички съобщени видове преди 2012 година трябва да бъдат потвърдени (Michalczyk *et al.*, 2012a, b).

2.3. Екологични проучвания

2.3.1. Популационна структура

Гъстотата на популациите на тардиградите е силно променлива както в сладководните, така и в сухоземните местообитания. До момента не са известни нито минималните, нито оптималните условия за нарастване на популациите. Промените в гъстотата на популациите се свързват с различни условия на околната среда, включително температура, влага, кислород; замърсяване на въздуха и водата; наличие на храна; конкуренция; хищничество и паразитизъм. Значителни вариации в гъстотата на популациите и във видовото разнообразие се срещат в съседни, привидно идентични микрохобитати. Обикновено се срещат от 2 до 6 вида, но в една проба могат да се открият 10 или повече вида, като субстратите от листни покривки обикновено са най-богати на видове. Разпокъсаността на популациите е характерна за бавноходките (Nelson *et al.*, 2015).

2.3.2. Жизнени процеси и жизнен цикъл

Suzuki (2003, 2008) провежда опити в контролирана лабораторна среда, с цел да проследи жизнения цикъл и поведение на *Milnesium tardigradum*. Подобно изследване провеждат и Scherbakov *et al.* (2010), които проследяват движението на *M. Tardigradum*, подложен на светлинно дразнение. Трябва да се има предвид, че резултатите от подобни изследвания не могат да се приемат за изцяло достоверни, тъй като средата, в която се провеждат, е различна от естествената среда на бавноходките.

2.3.3. Взаимодействие на род *Milnesium* с други микробезгръбначни

Взаимодействието на индивиди от тип Tardigrada, включително на род *Milnesium*, с други микробезгръбначни са слабо проучени. За представителите на род *Milnesium* е известно, че са хищни видове, които се хранят с ротифери, нематоди и други по-малки тардигради.

2.3.4. Проект „TARDIS“ (Tardigrades in Space)

През септември 2007 година тардиградите стават първите животни в историята, които оцеляват след комбинирания ефект на излагане на космически вакуум, космическа радиация и ултравиолетово лъчение в ниската орбита на Земята. Експериментът е проведен

с възрастни индивиди *Milnesium tardigradum*, *Richterus coronifer*, *Echiniscus testudo* и *Ramazzottius oberhaeuseri*. Най-висока смъртност е отчетена при индивидите, изложени на слънчева радиация, докато вакуумът не оказва почти никакво влияние върху оцеляемостта на индивидите. Експериментът продължава и с наблюдения на потомството на космическите тардигради от вида *Milnesium tardigradum*, които не показват намалена жизнеспособност. Това доказва, че отделните тардигради, които са оцелели експозицията на екстремни условия и са били в състояние да се възпроизвеждат, не са прехвърлили никакви генетични увреждания на следващите поколения. (Jönsson, 2007b; Jönsson *et al.*, 2016).

2.3.5. Влияние на различни екологични фактори

На базата на проведения литературен обзор считаме, че изследванията на екологията и биологията на тип Tardigrada, както и на отделни видове или родове, до настоящия момент са малко на брой, като липсва разработена методика за провеждане на този тип проучвания.

Въпреки че много видове са широко разпространени, а сухоземните могат да изпаднат в състояние на криптобиоза, бавноходките са приспособени към даден тип местообитание и към дадените условия на заобикалящата ги среда. Това предполага хипотезата, че тардиградите могат да бъдат под значителен натиск от околна среда в различните типове местообитания, в които се намират (Vicente, 2010).

3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящото изследване е екологично проучване на представителите на род *Milnesium* в района на Пловдивското поле в периода 2015 – 2018 година. За изпълнението на тази цел си поставихме следните задачи:

Проучване на:

1. видовия състав и разпространението на представителите на род *Milnesium*;
2. количествено изследване на индивидите от род *Milnesium* по местообитания, субстрати и сезони;
3. зависимост между представителите на род *Milnesium* и други микробезгръбначни;
4. периодично наблюдение на популация на представител на род *Milnesium*, определен до видово ниво;

4. РАЙОН НА ИЗСЛЕДВАНЕ

Описанието на района на изследване е направено на базата на данни от Димитров, 1972; Мичев и колектив, 1980; Авторски колектив на Географски институт, БАН, 1989; Груев и Кузманов, 1999 и годишен доклад на РИОСВ – Пловдив за 2017 година.

4.1. Физикогеографска и социално-икономическа характеристика

Пловдивското поле е част от Пазарджишко - Пловдивското поле, което е едно от най-добре обособените физикогеографски райони в страната. Ограничава се от северните склонове на Родопите и южните склонове на Средна гора. Образувано е при потъване през неогена и квартернера. Представява обширна алувиална низина, с изключение на Пловдивските сиенитни хълмове. Отводнява се от р. Марица и нейните притоци (Тополница, Луда Яна, Стряма, Чепинска река, Въча, Чепеларска река и др.). Почвите са алувиално-ливадни.

4.2. Климат

Климатът на района е преходно-континентален, с изразен пролетно-летен и есенно-зимен валежен максимум, като се наблюдава тенденция към изравняване между зимните и летни суми на валежите. Сумарната слънчева радиация е около 5500 – 5600 мегаджаул/м² и средна годишна температура от 12°C. Годишните валежи са между 550 – 560 мм/м², което определя района като засушлив.

4.3. Биогеографска характеристика

Районът на изследване попада в Среднобългарския район (подрайон Горнотракийска низина). Горнотракийската низина има еднообразен равнинен релеф. Голяма част от нея е превърната в обработваеми земи, поради което естествено разпространената растителност и фауна са силно ограничени

5. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

5.1. Пробонабиране

Настоящото изследване е проведено през периода 2015 – 2018 година. Събрани са общо **180** проби, от които са изолирани **720** екземпляри от тип *Tardigrada*, от които **97** от род *Milnesium*.

По време на проведеното изследване от района на Пловдивското поле са събрани общо **86** проби, като **38** проби са събрани от същинската градска част на град Пловдив, **10** – от предградията на града и **38** – от малки населени места и извънградски локации в Пловдивското поле. В пробите са установени над **282** индивиди от тип *Tardigrada* (**277** от клас *Eutardigrada*; **5** от клас *Heterotardigrada*), от които **57** от род *Milnesium*. Извън границите на Пловдивското поле са събрани общо **94** проби, като **83** от тях са от извънградски местообитания и **11** - от градски местообитания. В пробите са установени над **438** индивиди от тип *Tardigrada* (**379** от клас *Eutardigrada*; **59** от клас *Heterotardigrada*), от които **40** от род *Milnesium*. В района извън Пловдивското поле събирането на проби е насочено основно върху извънградските местообитания, подложени на слаб антропогенен натиск. Пробите от съответните локации се използват като база за сравнение с данните, получени от местообитанията в Пловдивското поле, тъй като до настоящия момент няма други проведени екологични проучвания на тип *Tardigrada* за страната.

5.2. Лабораторна обработка на пробите

Обработката на пробите е извършена в лабораторията по екология на катедра „Екология и ООС“ на ПУ „Паисий Хилендарски“ и лабораторията по ентомология на катедра „Ентомология“ на Ягелонския университет, Краков. Всички проби са поставени в хартиени пликове за съхранение до тяхната обработка.

5.3. Таксономично определяне

Установените индивиди са таксономично определени, използвайки описания на видове и ключове от Beasley (1968); Bingemer & Hohberg (2017); Biserov (1998); Guidetti & Bertolani (2005); Horning *et al.* (1978); Kaczmarek & Michalczyk (2006; 2009; 2017); Kaczmarek *et al.* (2011a, 2017); Kaczmarek (2003); Michalczyk *et al.* (2012a, 2012b); Morek *et al.* (2016a); Pilato & Binda (2010); Ramazzotti & Maucci (1983); Tumanov (2006). Таксономичните данни следват Degma *et al.* (2018).

5.4. Математическа и статистическа обработка на данните

Количественият анализ на фауната включва определянето на плътността на индивидите към 1 см³ за дадено местообитание, субстрат и сезон. Структурната характеристика на отделните съобщества на тардигради е изразена чрез индекс на срещаемост (A) (Дяков, 1971; Петров и Минчев, 1985), индекс на предпочитание на Hofmann (1987) (P), индекс на индивидуално видово разнообразие на Shannon – Weaver (1963); индекс на разнообразие на Simpson (1949), индекс на доминантност на Berger – Parker (Berger & Parker, 1970), индекс на изравненост на Simpson (1949) и индекс на изравненост на съобществото на Pielou (1966). Количественото сходството на видовия състав е изразено чрез коефициента на сходство на Bray - Curtis (1957). Статистическата обработка на данните е извършена съвместно с доц. д-р Дойчин Бояджиев (Катедра „Приложна математика и моделиране“, Факултет по Математика и информатика, ПУ „Паисий Хилендарски“) и включва извършването на клъстерен анализ за установяване на количествено сходство между отделните местообитания, субстрати и сезони; корелационен анализ за установяване на зависимост между плътността на индивидите от род *Milnesium* и плътността на други установени индивиди от тип Tardigrada, тип Rotifera и тип Nematoda; Хи-квадрат тест на Пирсън за определяне на статистически достоверни разлики в броя на установените находища на род *Milnesium* между отделните местообитания, T – test и дисперсионен анализ (тест на Стюдънт за 2 и тест на Фишер за повече от 2 групи) за установяване на статистически значими разлики в плътността на индивидите от род *Milnesium* за отделните местообитания, субстрати и сезони и регресионен анализ за установяване на зависимост между дадени условия на средата (температура, влажност, валежи) и плътността на популацията на *Milnesium beasleyi*. Данните са обработени с програмите Biodiversity Professional Version 2 (McAleece *et al.*, 1997), IBM SPSS Statistics Version 21.0 и Microsoft Excel 2010.

6. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

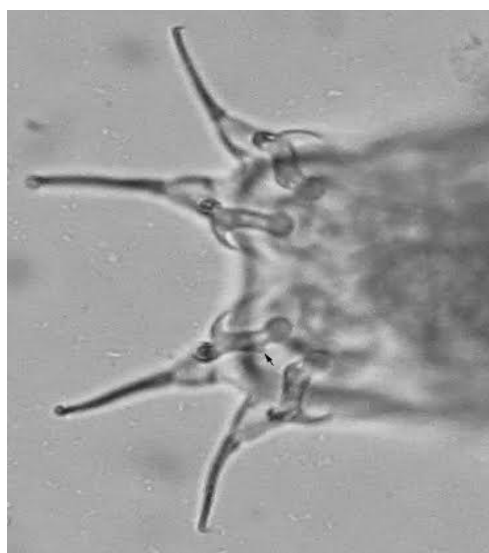
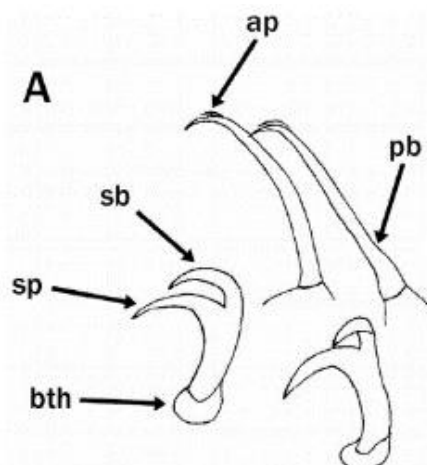
6.1. Видов състав и разпространение на род *Milnesium* и тип Tardigrada

6.1.1. Биогеографско разпространение на род *Milnesium* и тип Tardigrada

От Среднобългарския район (подрайон Горнотракийската низина), в границите на Пловдивското поле, са установени общо **14** находища на представители на род *Milnesium*, от които **5** на *Milnesium tardigradum* и **1** на *Milnesium beasleyi* (Фигура 3 и Фигура 4). От Горнотракийската низина, извън границите на Пловдивското поле, са установени **9** находища на род *Milnesium*, от които **1** на *Milnesium tardigradum*, **1** на *Milnesium berladnicorum* и **1** на *Milnesium inceptum*. Общо от Среднобългарския район (подрайон Горнотракийската низина) са установени **38** находища на тип Tardigrada.

6.1.2. Видов състав

Таксономията на род *Milnesium* се основава на конфигурацията на ноктите (брой на разклоненията на вторичния клон), устройството на буко-фарингеалния апарат и структурата на кутикулата. Конфигурацията на ноктите, по-специално разклоненията на вторичния клон на ноктите, е водещ таксономичен белег при описание на видове от род *Milnesium*. Определянето на структурата на ноктите се извършва, като се определи броят на разклоненията на външните и вътрешни вторични клонове на ноктите (от първи до трети) както и на четвъртата двойка нокти.



1.

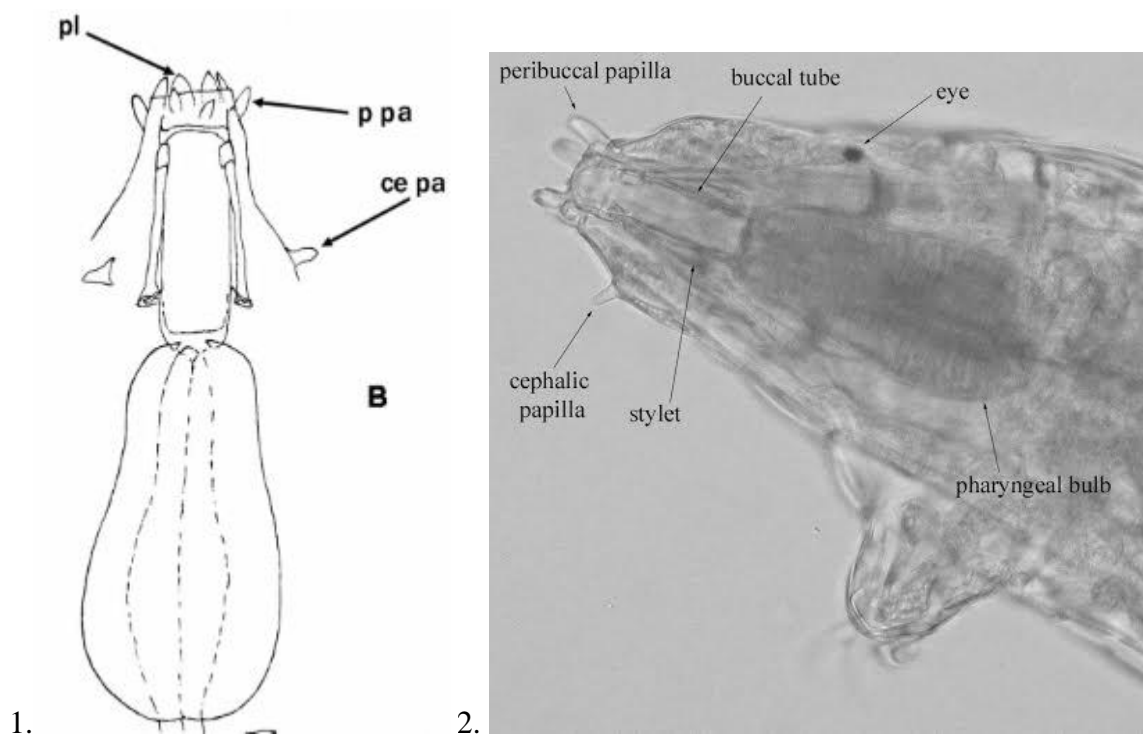
2.

Фигура 6. 1) Конфигурация на ноктите на видове от сем. Milnesiidae. Обозначени структури: ap (accessory points) – акцесорни точки; pb (primary branch) – основен клон; sb (secondary branch) – вторичен клон; sp (spur) – разклонение, „шпора“; bth (basal thickening)

– базално удебеление (Pilato & Binda, 2010). 2) Снимка от светлинен микроскоп (40x) на *Milnesium* sp. ♀ [2-3] [3-2] от местообитание №46 от Пловдивско поле.

До момента са установени 5 конфигурации: [3-3]-[3-3], [2-3]-[3-2], [2-2]-[2-2], [2-3]-[2-2], [2-3]-[3-3] (Michalczyk *et al.* 2012a, b), като най-голям процент от описаните видове са с [3-3]-[3-3] и [2-3]-[3-2] конфигурация на ноктите.

Устройството на буко-фарингеалния апарат и структурата на кутикулата са другите два определящи таксономични белега, които трябва да бъдат взети под внимание. В зависимост от устройството на дорзо-латералната кутикула видовете от род *Milnesium* могат да бъдат разделени на две групи: с гладка и с гранулирана (мрежеста) кутикула. Видовете с гладка кутикула принадлежат към групата *tardigradum*, докато тези със скулптурирана кутикула – към *granulatum*. Въпреки че филогенетичният характер на тези групи в момента е неизвестен, те имат таксономична стойност, като улесняват описанието на различните видове *Milnesium*. Понастоящем 13 таксона (72%) принадлежат към *tardigradum* и 5 вида (28%) към *granulatum* (Michalczyk *et al.*, 2012a, b).



Фигура 7. 1) Устройство на буко-фарингеалния апарат на род *Milnesium*. Обозначени структури: pl (peribuccal lamella) – околоустна ламела; pra (peribuccal papilla) – околоустна папила; cera (cephalic papilla) – околоустна папила (Binda & Pilato, 1990). 2) Снимка от

светлинен микроскоп (40x) на *Milnesium* sp. Допълнително обозначени структури: buccal tube – устна кухина; pharyngeal bulb – фаринкс; stylet – стилета; eye – зрително петно

Тип TARDIGRADA Doyère, 1840

Клас EUTARDIGRADA Richters, 1926

Разред APOCHELA Schuster, Nelson, Grigarick & Christenberry, 1980

Семейство MILNESIIDAE Ramazzotti, 1962

Род *MILNESIUM* Doyère, 1840

Milnesium beasleyi Kaczmarek, Jakubowska & Michalczyk, 2012

Описание на вида: Живите индивиди са с жълтеникав цвят на тялото. Видът принадлежи към *granulatum* групата, кутикулата е покрита с малки и плитки псевдопори. Конфигурацията на ноктите е [2-3] [3-2]. Около устния отвор са разположени 6 перибукални папили (вентрално разположената папила е най-малка) и 6 перибукални ламели (с еднакъв размер). Фарингеалният апарат е удължен, с крушовидна форма, без плакоиди и прегради (Kaczmarek *et al.*, 2012).

Установени находища в изследвания район: Видът е установен в едно находище от Пловдивското поле (№66).

Други известни находища в страната: Няма установени.

Общо разпространение на вида: Турция.

Бележка: Видът се съобщава за първи път за територията на България.

Milnesium berladnicorum Ciobanu, Zawierucha, Moglan & Kaczmarek, 2014

Описание на вида: Живите индивиди са с кафеникав цвят на тялото. Видът принадлежи към *granulatum* групата, кутикулата е покрита с псевдопори. Структурата на кутикулата е сходна с тази на *Milnesium beasleyi*. Конфигурацията на ноктите е [2-3] [2-2]. Около устния отвор са разположени 6 перибукални папили (вентрално разположената папила е най-малка) и 6 перибукални ламели (с еднакъв размер). Фарингеалният апарат е удължен, с крушовидна форма, без плакоиди и прегради (Ciobanu *et al.*, 2014).

Установени находища в изследвания район: Не е установен.

Други известни находища в страната: Видът е установен в едно местообитание извън изследвания район (№75).

Общо разпространение на вида: Румъния.

Бележка: Видът се съобщава за първи път на територията на страната. От лична комуникация с Даниел Чиобану е потвърдена възможността установеният в България вид е *Milnesium berladnicorum*.

Milnesium inceptum Morek, Suzuki, Schill, Georgiev, Yankova, Marley & Michalczyk 2019

Описание на вида: Индивидите са с жълтеникав цвят на тялото и преди фиксация се наблюдават очни петна. Видът принадлежи към *tardigradum* групата, като по кутикулата се наблюдават малки псевдопори. Около устния отвор са разположени 6 перибукални папили (вентралната папила е с най-малък размер) и 6 перибукални ламели (латералната ламела е с най-малък размер). Фарингеалният апарат е с фуниевидна форма. Конфигурацията на ноктите е [3-3] [3-3]. От I - III нокът се наблюдават китикуларни ивици в основата на ноктите. Вторичните клони на всички нокти са с „шпори“. При новоизлюпените индивиди не се наблюдават псевдопори и кутикуларни ивици под ноктите, а при ювенилните индивиди липсват псевдопори по кутикулата (Morek *et al.*, 2019).

Установени находища в изследвания район: Няма установени.

Други известни находища в страната: Видът е установен от едно ново находище за страната извън Пловдивското поле (№88).

Общо разпространение на вида: Европа.

Бележка: Видът е описан съвместно с колеги от Полша, Япония, Германия и Великобритания, по материал събран от *locus typicus* от Италия, лабораторни култури от Германия и Япония и проби от естествени местообитания от Швейцария и България.

Milnesium tardigradum Doyère, 1840

Описание на вида: Младите индивиди са с бяло прозрачно тяло, а възрастните – с жълтеникаво-кафяв цвят. Видът принадлежи към *tardigradum* групата, кутикулата е гладка, без гранули или пори. Конфигурацията на ноктите е [2-3] [3-2]. Около устния отвор са разположени 2 латерални и 6 перибукални папили (вентрално разположената папила е най-малка) и 6 перибукални ламели. Фарингеалният апарат е удължен, с крушовидна форма, без плакоиди и прегради (Michalczyk *et al.*, 2012a, b; Morek *et al.*, 2016a).

Установени находища в изследвания район: Видът е установен в пет нови находища за страната (№11, 33, 40, 43, 51).

Други известни находища в страната: По време на настоящото изследване са установени индивиди *Milnesium tardigradum* от две нови находища извън изследвания регион (№29, 39). Iparos (1961) съобщава за *Milnesium tardigradum* Douy. в района на Северното Черноморие (Варна; Златни пясъци), Рила (Боровец, 1360 н.в.; Рилски манастир), Родопи (Бачковски манастир) и Стара Планина (Карлово, 1400 н.в.).

Общо разпространение на вида: Космополитен.

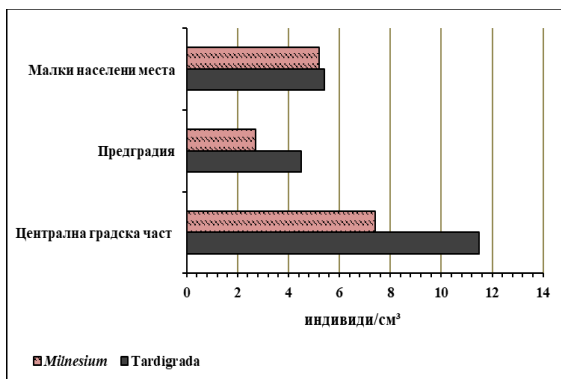
Бележка: Всички стари данни за вида трябва да бъдат потвърдени съгласно съвременните таксономични методики. По време на проведеното изследване видът е потвърден за България и е установен в нови находищата за страната.

6.2. Разпределение на род *Milnesium* по местообитания, субстрат и сезони

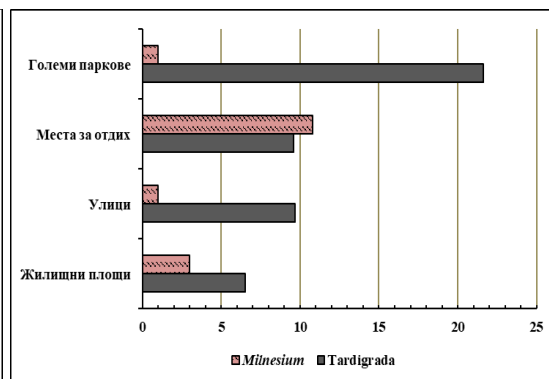
6.2.1. Разпределение на род *Milnesium* и тип *Tardigrada* по местообитания

В района на изследване представители на род *Milnesium* са установени **17.7%** от всички проби. Представители на тип *Tardigrada* са установени в **46.5%** от всички проби. Най-висок процент на срещаемост на индивидите от род *Milnesium* е отчетен за централната градска част на Пловдив – **25.8%**. Най-висока екологична плътност на представителите на род *Milnesium* е отчетена в централната градска част (**7.4** индивиди/см³) и ниска – в предградията на град Пловдив (**2.7** индивиди/см³) (**Фигура 8**). Сравнявайки централната градска част, предградията и малките населени места и извънградски локации в Пловдивското поле, най-високи стойности на индекса на Hofmann (1987) са получени за централната градска част ($P_{ц}=57\%$), като стойностите за предградията и малките населени места в Пловдивското поле са съответно $P_{п}=33\%$ и $P_{ис}=10\%$.

В зоната на централната градска част най-висок процент на срещаемост на индивидите от род *Milnesium* е отчетен в местата за отдых (**33.3%**) и най-нисък – в градските жилищни площи (**8.3%**). Най-висока екологична плътност за представителите на род *Milnesium* е установена в местата за отдых (**10.8** индивиди/см³) (**Фигура 9**). Индексът на предпочитание на Hofmann (1987) за представителите на род *Milnesium* е с най-висока стойност за местата за отдых ($P_{о}=44\%$).



Фигура 8



Фигура 9

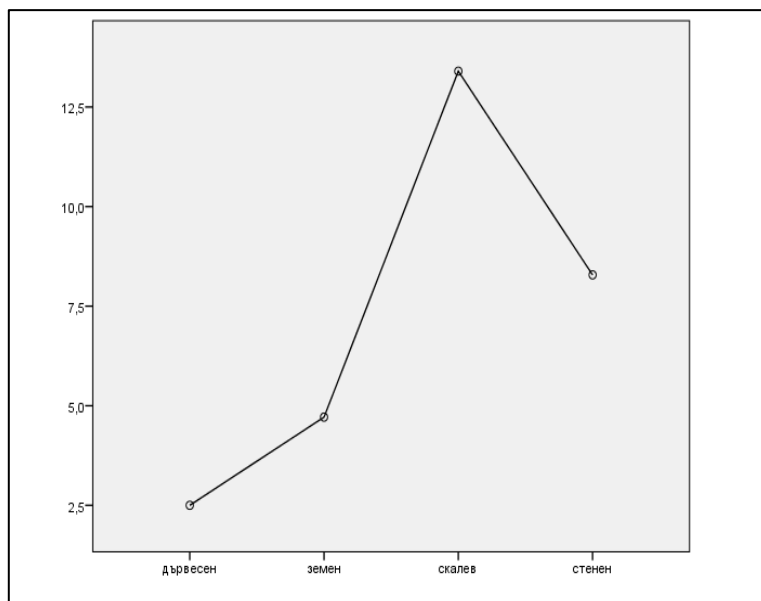
В малките населени места в Пловдивското поле представителите на род *Milnesium* са установени само от две местообитания. Екологичната плътност на индивидите от род *Milnesium* за жилищните площи на малки градове и села е **2.3** индивиди/см³, като сходна плътност е отчетена и в местообитанията, част от междуградската и междуселищна пътната мрежа (**2** индивиди/см³), като процентът на срещаемост на индивидите от род *Milnesium* за тези два хабитата е **25%**. Индексът на предпочитание на Hofmann (1987) за индивидите от род *Milnesium* е с висока стойност за жилищните площи на малките градове и села ($P_{ж}=56\%$).

В естествените местообитания процентът на срещаемост за род *Milnesium* е **14.5%**. В **60.2%** от всички проби са установени представители на тип Tardigrada. Най-висок процент на срещаемост на представителите на род *Milnesium* е отчетен за широколистните гори (**19.4%**). Най-висока екологична плътност на представителите на род *Milnesium* е отчетена в слабо застроените жилищни площи (**11** индивиди/см³). Индексът на предпочитание на Hofmann (1987) на представителите на род *Milnesium* е с най-висока стойност за жилищните площи от селищен тип ($P_{жп}=67\%$).

В района на изследване най-високи стойности на индекса на разнообразие на Shannon-Weaver е отчетен за централната градска част ($H=1.483$; $1-D=0.755$) и най-ниски стойности за предградията ($H=1.05$). Извън границите на Пловдивското поле високи стойности на индексите на разнообразие и индексите на изравненост ($H=1.377$; $1-D=0.712$; $J=0.855$; $E_{1/D}=0.695$), и ниска стойност на индекса на доминантност ($d=0.46$) са отчетени за градските местообитания.

6.2.2. Разпределение на род *Milnesium* и тип *Tardigrada* по субстрати

В района на Пловдивското поле висока плътност на индивидите от род *Milnesium* е отчетена за скалния (8.5 индивиди/см³) и стенния субстрат (7.2 индивиди/см³). Висок процент на срещаемост на представителите на рода е отчетен за стенния субстрат (31.8%). Индексът на предпочитание на Hofmann (1987) за род *Milnesium* е с най-високи стойности за скалния субстрат (P_c=52.1%). Извън района на Пловдивското поле висока плътност на индивидите от род *Milnesium* е отчетена за скалния субстрат (6.7 индивиди/см³) и стенния субстрат (9 индивиди/см³). Висок процент на срещаемост на индивидите от род *Milnesium* е установен за земния субстрат (22.8%). Индексът на предпочитание на Hofmann (1987) за род *Milnesium* е с най-високи стойности за стенния субстрат (P_{ст}=65.1%). Средната плътност на индивидите от род *Milnesium* в района на изследване и извънградските локации е най-висока за скалния субстрат и най-ниска за дървесния субстрат (Фигура 17).

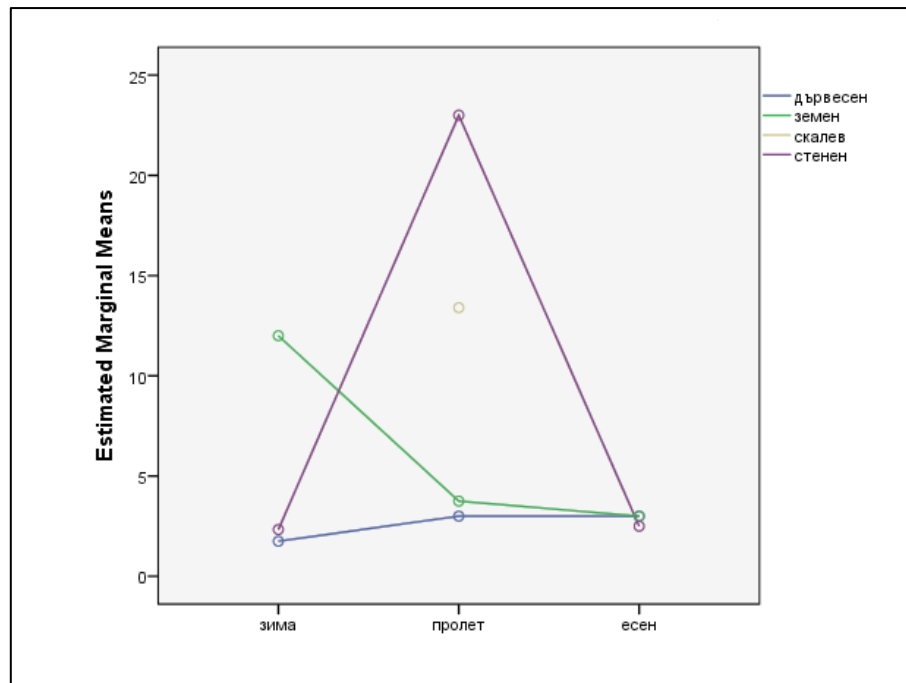


Фигура 17. Средна плътност на род *Milnesium* по субстрати в района на Пловдивското поле и извънградските местообитания.

В района на Пловдивското поле високи стойности на индекса на разнообразие са отчетени за дървесния субстрат (H=1.03; 1-D=0.769). Извън района на изследване най-високи стойности на индексите на разнообразие са отчетени за скалите (H=1.293; 1-D=0.722).

6.2.3. Разпределение на род *Milnesium* и тип *Tardigrada* по сезони

В Пловдивското поле най-висока плътност на род *Milnesium* е отчетена през пролетта (10.2 инд./см³). Висока срещаемост на индивидите от род *Milnesium* е отчетена през пролетта (31.3%). Извън Пловдивското поле най-висока плътност на род *Milnesium* е отчетена през пролетта (6 индивиди/см³). Процентът на срещаемост на представителите на род *Milnesium* през пролетните и летните месеци е съответно 22.6% и 4.3%. В района на изследване високи стойности на индексите на разнообразие са отчетени през пролетта (H=1.324; 1-D=0.745). Извън Пловдивското поле високи стойности на индекса на Shannon – Weaver са отчетени през пролетта и лятото (H=1.735; 1-D=0.744). Установено е взаимодействие между отделните сезони и плътността на индивидите от род *Milnesium* от стенния, скалния и земния субстрат, като най-висока стойност на маргиналните средни стойности е отчетена през зимата за земния субстрат и през пролетта за скалния и стенния субстрат (Фигура 21).



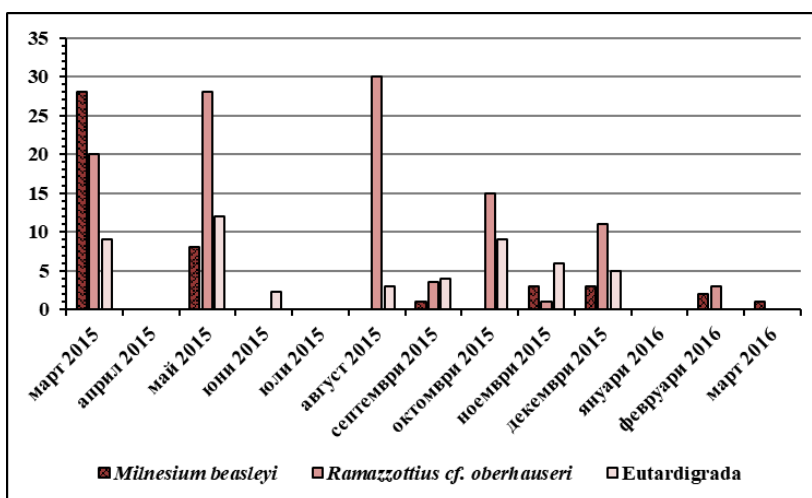
Фигура 21. Маргинална средна стойност на плътността на индивидите от род *Milnesium* от различни субстрати през отделните сезони.

6.2.4. Взаимодействие на род *Milnesium* с други микробезгръбначни

Проведеният корелационен анализ отчете положителна зависимост между плътността на индивидите от род *Milnesium* и плътността на други представители на тип Tardigrada. Установена е слаба положителна зависимост между род *Milnesium* и род *Ramazzottius* ($r=0.4$), както и между *Milnesium* spp. и род *Echiniscus* ($r=0.7$). Положителна зависимост е установена и между индивиди от род *Milnesium* и тип Rotifera ($r=0.8$).

6.3. Периодично наблюдение на популация на *Milnesium beasleyi*

През периода на изследване се наблюдава пик в плътността на *M. beasleyi* през март 2015 година (**28** индивиди/см³), след което е отчетен спад (**Фигура 22**).



Фигура 22. Екологична плътност на *Milnesium beasleyi*, *Ramazzottius cf. oberhauseri* и неопределени индивиди в състояние на криптобиоза в периода март 2015 – март 2016 година.

Проведеният регресионен анализ на факторите на средата и плътността на индивидите *Milnesium beasleyi* отчете, че моделът не е статистически значим. Корелационният анализ установи висока положителна зависимост между плътността на *M. beasleyi* и Nematoda ($r=0.856$; $p=0,0001$) (**Таблица 16**).

		<i>Milnesium</i>	<i>Ramazzottius</i>	Rotifera	Nematoda
<i>Milnesium</i>	Pearson Correlation	1	.422	-.359	.856
	Sig. (2-tailed)		.151	.228	.000
	N	13	13	13	13
<i>Ramazzottius</i>	Pearson Correlation	.422	1	.056	.511
	Sig. (2-tailed)	.151		.856	.075
	N	13	13	13	13
Rotifera	Pearson Correlation	-.359	.056	1	.025
	Sig. (2-tailed)	.228	.856		.935
	N	13	13	13	13
Nematoda	Pearson Correlation	.856	.511	.025	1
	Sig. (2-tailed)	.000	.075	.935	
	N	13	13	13	13

Таблица 16. Корелационен анализ на екологичната плътност на индивиди от род *Milnesium*, род *Ramazzottius*, тип Rotifera и тип Nematoda.

Сухите микрохабитати могат до доведат до намаляване на хранителния ресурс, а постоянно влажните не са благоприятни за полу-сухоземните тардигради, тъй като осигуряват подходяща среда за развитието на патогенни микроорганизми, гъби и паразити. Въпреки че мъховете се овлажняват и изсъхват първо в повърхностните слоеве, се предполага, че тардиградите не мигрират и не образуват струпвания на индивиди във вертикална посока. Повечето тардигради, включително видовете от род *Milnesium*, имат светлинни петна, което е възможен индикатор за ролята на светлината в избора на дадена локация в микрохабитата (Glime, 2017a).

Degma *et al.* (2011) установяват, че хоризонталното разпределение на тардиградите в туфа мъх е агрегирано, но струпването на индивидите не е свързано с влажността на мъха. Авторите предлагат хипотезата, че когато тардиграда попадне в даден хабитат, с подходящи условия, създава микропопулация, след което започва бавно разпространение на индивидите. По този начин микрохабитатите, разположени върху по-големи площи и субстрати, ще имат части, в които липсват тардигради, и такива, в които се наблюдават струпвания на индивиди. Това би обяснило високата степен на вариация при случайно вземане на проби от различни туфи мъх от едно и също място. Въпреки че индивидите са агрегирани, агрегациите са случайни.

7. ИЗВОДИ

Извършеното от нас проучаване представя оригинални данни за екологията, биологията, систематиката и разпространението на род *Milnesium*. На базата на получените резултати могат да бъдат направени следните изводи:

1. Видовият състав на род *Milnesium* в района на изследване е беден. При проведеното проучване са установени **4** вида от род *Milnesium* от общо установени **14** вида тардигради от **8** рода.
2. Представителите на род *Milnesium* в района на изследване и районите използвани за сравнение са рядко срещани (**17.7%** - Пловдивското поле; **14.5%** - извън Пловдивското поле).
3. Представителите на род *Milnesium* са най често срещани в зоната на централната градска част и местообитанията, разположени в нея, като и плътността на популациите им е най-висока там. На второ място срещаемост на представителите на род *Milnesium* са предградията на град Пловдив и местообитанията, разположени в тях. Най-ниска срещаемост на представителите на род *Milnesium* е установена за малките населени места в Пловдивското поле и местообитанията, разположени в и около тях.
4. В естествени природни хабитати висок процент на срещаемост и плътност за представителите на род *Milnesium* са установени за широколистните гори и по-нисък - за иглолистните гори.
5. Представителите на род *Milnesium* имат висока предпочитаемост за обитаване в урбанизираните местообитанията и ниска предпочитаемост за обитаване в естествените природни местообитания, което е признак за синантропизация на видовете.
6. По отношение на субстрата, върху който се развиват мъховете или лишейте, екологичната плътност на представителите на род *Milnesium* е най-висока за скалите и стените на сгради и най-ниска за земната настилка (бетон и асфалт) и дървесния субстрат.
7. Представителите на род *Milnesium* са най-често срещани през пролетта в градските и естествени местообитания. Рядко срещани са през зимата в градска среда и през

лято в природните местообитания. Най-висока плътност на представителите на род *Milnesium* е отчетена през пролетта.

8. Плътността на представителите на род *Milnesium* е в положителна корелация с плътността на основните хранителни компоненти: ротатории и нематоди.
9. Плътността на изследваната популация на *Milnesium beasleyi* се запазва със сравнително ниски сходни стойности през всички месеци от годината, като има само един висок пик през март месец 2015 година.

8. ПРИНОСИ

Настоящата дисертация представя следните оригинални приноси:

Таксономични и фаунистични:

1. Съвместно с колеги от чужбина е описан нов за науката вид: *Milnesium inceptum*.
2. За първи път за фауната на България се съобщават два вида: *Milnesium berladnicorum* и *Milnesium beasleyi*.
3. Потвърден е един вид, *Milnesium tardigradum*, за страната.
4. Установени са 31 нови находища на род *Milnesium* и 94 нови находища на тип Tardigrada.

Екологични приноси:

5. За първи път е проведено количествено изследване на представителите на род *Milnesium* за отделни субстрати и сезони.
6. За първи път е проведено едногодишно проучване на популация на *Milnesium beasleyi*, като това е второто такова проучване на представители на рода.
7. За първи път на Балканите е проведена количествена характеристика на род *Milnesium* за градските местообитания.
8. За първи път в страната е проведено екологично проучване на род *Milnesium* и тип Tardigrada.

Публикации във връзка с темата на дисертационния труд

1. Yankova, M., Morek, W. & Georgiev, D. 2016. Current knowledge of the tardigrades (Tardigrada: Heterotardigrada, Eutardigrada) of Bulgaria: check list and distributional data. *Acta Zoologica Bulgarica*, 68 (3): 299-304; IF: 0.310.
2. Yankova, M. 2018. On the occurrence and density of some tardigrade taxa in the city area of Plovdiv, Bulgaria. *ZooNotes*, 135 (1): 1-4.
3. Yankova, M. & Georgiev, D. 2018. Urban tardigrades from Plovdiv City and some ecological remarks. Специално издание „Фаунистично разнообразие на град Пловдив“, Научен журнал на Регионален природонаучен музей Пловдив, 1 (1): 31-36.
4. Morek, W., Suzuki, A., Schill, R., Georgiev, D., Yankova, M., Marley, N. & Michalczyk, Ł. 2019. Redescription of *Milnesium alpigenum* Ehrenberg, 1853 (Tardigrada: Apochela) and a description of *Milnesium inceptum* sp. nov., a tardigrade laboratory model. *Zootaxa*, 4586 (1): 035-064; IF: 0.931.

Участия в научни конференции с материали по темата на дисертационния труд

1. Yankova, M. & Georgiev, D. 2015. New information on the distribution of some limno-terrestrial tardigrades (Tardigrada: Eutardigrada et Heterotardigrada) in Bulgaria. Втора национална конференция за млади учени “Биологически науки за по-добро бъдеще”, 30-31. 10. 2015 г., гр. Пловдив. ПУ „Паисий Хилендарски“, Биологически факултет.
2. Yankova, M. & Georgiev, D. 2016. Tardigrades found in Plovdiv. Първа национална конференция за докторанти, 01. 11. 2016 г., гр. Пловдив, ПУ „Паисий Хилендарски“, Биологически факултет.

9. ЛИТЕРАТУРА

1. Авторски колектив на Географски институт, БАН. 1989. Том III. География на България. Физико-географско и социално-икономическо райониране. *Издаелство на Българска академия на науките*, София, 583 стр.
2. Груев, Б. и Кузманов, Б. 1999. Обща биогеография. *Пловдивско Университетско Издаелство*, Пловдив, 344 стр.
3. Димитров, Д. 1972. Климатология на България. *Наука и изкуство*, София, 234 стр.
4. Дяков, Ю. 1971. К вопросу определения видового обилия птиц по их встречаемости. *Сборник материалы международной научно-практической конференции*, Смоленск, 301–308.
5. Министерство на околната среда и водите, РИОСВ – Пловдив, Регионален доклад за състоянието на околната среда през 2017 година, 299 стр.
6. Мичев, Н., Михайлов, Ц., Вапцаров, И. и Кираджиев, С. 1980. Географски речник на България. *Наука и изкуство*, София, 564 стр.
7. Петров, Ц. и Мичев, Т. 1985. Относно определянето на природозащитния статус на птиците въз основа на срещаемостта и обилието им. *Известия на музеите в Южна България*, 12: 43–48.
8. Bartoš, E. 1937. Die Tardigraden von Cap Caliacra (Rumänien). *Zoologischer Anzeiger*, 118: 301–304.
9. Beasley, C.W., 1968. The Tardigrades of Oklahoma, with additional records from other states and Mexico, *Ph.D. Dissertation*, University of Oklahoma, Norman, OK.
10. Bertolani, R. & Grimaldi, D. 2000. A new Eutardigrade (Tardigrada: Milnesiidae) in amber from the upper cretaceous (Turonian) of New Jersey. In: Grimaldi, D. (Editor): Studies on fossils in amber, with particular reference to the cretaceous of New Jersey. *Backhuys, Leiden*, 103–110.
11. Bingemer, J. & Hohberg, K. 2017. An illustrated identification key to the eutardigrade species (Tardigrada, Eutardigrada) presently known from European soils. *Soul organisms*, 89 (3): 127–149.
12. Biserov, V. 1998. Tardigrades of the Caucasus with a taxonomic analysis of the genus *Ramazzottius* (Parachela: Hypsibiidae). *Zoologischer Anzeiger*, 236: 139–159.

13. Borner, J., Rehm, P., Schill, R., Ebersberger I. & Burmester, T. 2014. A transcription approach to ecdysoan phylogeny. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 80: 79–87.
14. Caspers, H. 1951. Quantitative untersuchungen über die bodentierwelt des schwarzen meeres im bulgarischen küstenbereich. *Archiv für Hydrobiologie*, 45 (1-2): 1–192.
15. Ciobanu, D., Zawierucha, K., Moglan, I. & Kaczmarek, Ł. 2014a. *Milnesium berladnicorum* sp. n. (Eutardigrada, Apochela, Milnesiidae), a new species of water bear from Romania. *ZooKeys*, 11 (429): 1–11.
16. Cooper, K. 1964. The first fossil tardigrade: *Beorn leggi* Cooper, from cretaceous amber. *Psyche*, 71: 41–48.
17. Cvetkov, L. & Gruncharova, T. 1977. Fouling in the Liman of the Ropotamo river. III.
18. Degma, P., Katina, S. & Sabatovičová, L. 2011. Horizontal distribution of moisture and Tardigrada in a single moss cushion. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 49 (1): 71–77.
19. Degma, P., Bertolani, R. & Guidetti, R., 2018. Actual checklist of Tardigrada species (2009-2018, Ver. 34: 30-06-2018), 1–48.
20. Doyère, M. 1840. Memoire sur les Tardigrades. *Annales des Sciences Naturelles, Series 2*, 14: 269–362.
21. Glime, J. 2017a. Chapter 5 Tardigrades In: Glime, J. (Editor). *Bryophyte Ecology, Volume 2: Bryological Interaction*, Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists, 1–120.
22. Guidetti, R. & Bertolani, R. 2005. Tardigrade taxonomy: an updated checklist of the taxa and a list of characters for their identification. *Zootaxa*, 845: 1–46.
23. Hofmann, I. 1987. Habitat preference of the most frequent moss-living Tardigrada in the area of Giessen (Hessen). In: Bertolani, R. (Editor), *Biology of Tardigrades. Selected Symposia and Monographs U.Z.I. 1*. Mucchi Editore Modena, Italy, 211–216.
24. Horning, D., Schuster, R. & Grigarick, A. 1978. Tardigrada of New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology*, 5: 185–280.
25. Hubenov, Z. 2015. Species composition of the free living multicellular invertebrate animals (Metazoa: Invertebrata) from the Bulgarian sector of the Black Sea and the coastal brackish basins. *Historia Naturalis Bulgarica*, 21: 49–168.

26. Iharos, G. 1961. Grundlage der tardigradenfauna Bulgariens. – *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 7: 111–118.
27. Iharos, G. 1973. Angaben zur geographischen Verbreitung der Tardigraden. – *Opuscula Zoologica*, Budapest, 12: 73–86.
28. Iharos, G. 1982. Tardigradologische Notizen. I. – *Miscellanea Zoologica Hungarica*, 1: 85–90.
29. Jönsson, K. & Bertolani, R. 2001. Facts and fiction about long-term survival in tardigrades. *Journal of Zoology*, 255 (1): 121–124.
30. Jönsson, K., Rabbow, E., Schill, R., Harms-Ringdahl, M. & Petra Rettberg, P. 2008. Tardigrades survive exposure to space in low Earth orbit. *Current Biology*, 18 (7): R729–R731.
31. Jönsson, K., Schill, R., Rabbow, E., Rettberg, P. & Harms-Ringdahl, M. 2016. The fate of the TARDIS offspring: no intergenerational effects of space exposure. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 178 (4): 924–930.
32. Jørgensen, A., Kristensen, R. & Mørberg, N. 2018. Chapter 3. Phylogeny and Integrative Taxonomy of Tardigrada. In: Schill, R. (Editor), *Water Bears: Biology of Tardigrades*, Zoological Monographs 2, Springer Nature Switzerland AG 2018, 96–114.
33. Kaczmarek, Ł. 2003. New records of and key to Tardigrada from Costa Rica; *Zootaxa*, 177: 1–4.
34. Kaczmarek, Ł. & Michalczyk, Ł. 2006. The Tardigrada fauna of Mongolia (Central Asia) with a description of *Isohypsibius altai* sp. nov. (Eutardigrada: Hypsibiidae). *Zoological Studies*, 45 (1): 11–23.
35. Kaczmarek, Ł. & Michalczyk, Ł. 2009. Two new species of Macrobiotidae, *Macrobiotus szeptyckii* (harmsworthi group) and *Macrobiotus kazmierskii* (hufelandi group) from Argentina. *Acta Zoologica Cracoviensia, Seria B - Invertebrata*, 52 (1-2): 87–99.
36. Kaczmarek, Ł., Gołdyn, B., Prokop, Z. M. & Michalczyk Ł. 2011a. New records of Tardigrada from Bulgaria with the description of *Macrobiotus binieki* sp. nov. (Eutardigrada: Macrobiotidae) and a key to the species of the harmsworthi group. *Zootaxa*, 39 (2781): 29–39.

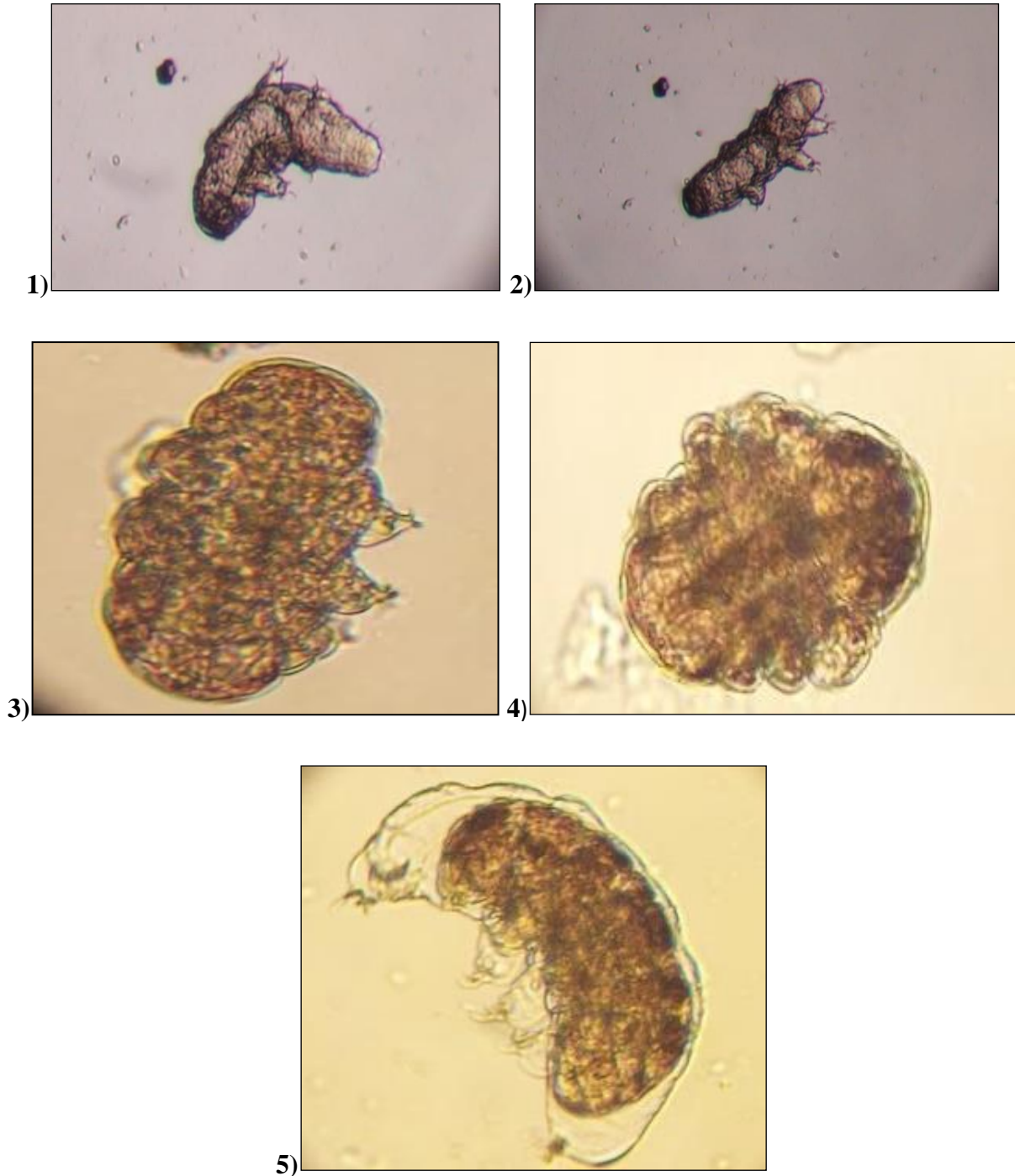
37. Kaczmarek, Ł., Jakubowska, N. & Michalczyk, Ł. 2012. Current knowledge on Turkish tardigrades with a description of *Milnesium beasleyi* sp. nov. (Eutardigrada: Apochela: Milnesiidae, the granulatum group). *Zootaxa*, 64 (3589): 49–64.
38. Kaczmarek, Ł. & Michalczyk, Ł. 2017. The *Macrobotus hufelandi* (Tardigrada) group revisited. *Zootaxa*, 4363: 101–123.
39. Kaczmarek, Ł., Gawlak, M., Bartels, P., Nelson, D., Roszkowska, M. 2017. Revision of the Genus *Paramacrobotus* Guidetti *et al.*, 2009 with the description of a new species, re-descriptions and a key. *Annales Zoologici*, 67 (4): 627–656.
40. Lindahl, K. & Balsler, S. 1999. Tardigrade Facts. Illinois Wesleyan University. Available at: http://www.iwu.edu/~tardisp/tardigrade_facts.html. (Accessed on 29 April 2009).
41. McAleece, N., Lamshead, P., Paterson, G., Gage, J. 1997. BioDiversity Professional. Computer software. The Natural History Museum, The Scottish Association for Marine Sciences, London (UK), Oban (Scotland), Free Statistics Software for Ecology, <http://www.sams.ac.uk/research/software>
42. McInnes, S. 1994. Zoogeographic distribution of terrestrial/freshwater tardigrades from current literature. *Journal of Natural History*, 28 (2): 257–352.
43. Michalczyk, Ł., Welnicz, W., Frohme, M. & Kaczmarek, Ł. 2012a. Redescriptions of three *Milnesium* Doyère, 1840 taxa (Tardigrada: Eutardigrada: Milnesiidae), including the nominal species for the genus. *Zootaxa*, 20 (3154): 1–20.
44. Michalczyk, Ł., Welnicz, W., Frohme, M. & Kaczmarek, Ł. 2012b. Corrigenda of *Zootaxa*, 3154: 1–20 Redescriptions of three *Milnesium* Doyère, 1840 taxa (Tardigrada: Eutardigrada: Milnesiidae), including the nominal species for the genus. *Zootaxa*, 3393: 66–68.
45. Miller, W. 1997. Tardigrades: Bears of the moss. *Kansas School Naturalist*, 43 (3): 3–15.
46. Morek, W., Gąsiorek, P., Stec, D., Blagden, B. & Michalczyk, Ł., 2016a. Experimental taxonomy exposes ontogenetic variability and elucidates the taxonomic value of claw configuration in *Milnesium* Doyère, 1840 (Tardigrada: Eutardigrada: Apochela). *Contributions to Zoology*, 85 (2): 173–200.
47. Morek, W., Suzuki, A., Schill, R., Georgiev, D., Yankova, M., Marley, N. & Michalczyk, Ł. 2019. Redescription of *Milnesium alpigenum* Ehrenberg, 1853 (Tardigrada: Apochela)

- and a description of *Milnesium inceptum* sp. nov., a tardigrade laboratory model, *Zootaxa*, 4586 (1): 035-064.
48. Nelson, D., Guidetti, R. & Rebecchi, L. 2015. Phylum Tardigrada. In: Thorp, J. & Rogers, D. (Editors), *Ecology and General Biology: Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates*, Academic Press, 347–380.
 49. Nielsen, C. 2012. Animal evolution: interrelationships of the living phyla. *University Press, Oxford*, 402.
 50. Pilato, G. & Binda, M. 2010. Definition of families, subfamilies, genera and subgenera of the Eutardigrada, and keys to their identification. *Zootaxa*, 54 (2404): 1–54.
 51. Ramazzotti, G. & Maucci, W. 1983. Il Phylum Tardigrada. *Memorie dell'Istituto Italiano di Idrobiologia Dott Marco de Marchi, Pallanza*, 41: 1–1012.
 52. Ramazzotti, G., 1962. Tardigradi del Cile, con descrizione di quattro nuove specie e di una varietà. *Atti della Società italiana di scienze naturali e del Museo civico di storia naturale di Milano*, 101: 275–287.
 53. Rudescu, L. 1969. Die Tardigraden des Schwarzen Meeres. – *Hidrobiologia*, 10: 3–12.
 54. Rudescu, L. 1972. Tardigrada. In: Mordukhay – Boltovskogo F. (Editor): *The Key for the Fauna of the Black and Azov Seas*. 3. Kiev, *Naukova dumka*, 51–59.
 55. Seki, K. & Toyoshima, M. 1998. Preserving tardigrades under pressure. *Nature*, 395 (1): 853–854.
 56. Shcherbakov, D., Schill, R. O., Brümmer, F. & Blum, M. 2010. Movement behaviour and video tracking of *Milnesium tardigradum* Doyère, 1840 (Eutardigrada, Apochela). *Contributions to Zoology*, 79 (1): 33–38.
 57. Simpson, E. 1949. Measurement of diversity. *Nature*, 163: 688
 58. Suzuki, A. 2003. Life history of *Milnesium tardigradum* Doyère (Tardigrada) under a rearing environment. *Zoological science*, 20 (1): 49–57.
 59. Suzuki, A. 2008. Appearance of males in a thelytokous strain of *Milnesium* cf. *tardigradum* (Tardigrada). *Zoological science*, 25 (8): 849–53.
 60. Tumanov, D. 2006. Five new species of the genus *Milnesium* (Tardigrada, Eutardigrada, Milnesiidae). *Zootaxa*, 23: 1–23.
 61. Valkanov, A. 1954. Die Tardigraden des Schwarzenmeeres. *Arbeiten aus der Biologischen Meeresstation in Varna*, 18: 59–61.

62. Valkanov, A. 1957. Katalog unserer Schwarzmeerfauna. Arbeiten aus der Biologischen Meeresstation in Varna, 19:1–62.
63. Vicente, F. 2010. Micro-invertebrates conservation: forgotten biodiversity. *Biodiversity Conservation*, 19: 3629–3634.

Приложение 3: Снимков материал

Род *Milnesium* и тип Tardigrada



Легенда: 1) и 2) *Milnesium* sp. (светлинен микроскоп, 20x); 3) и 4) Еутардигради в състояние на анахидробиоза (светлинен микроскоп, 40x); 5) Еутардиграда при процес на линеене (светлинен микроскоп; 40x).