

УДК 574.64:[546.562:595.77]

В. Д. Романенко, М. Т. Гончарова, І. М. Коновець,
Л. С. Кіпніс

**МОРФОФІЗІОЛОГІЧНІ ТА ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ЗМІНИ
У *CHIRONOMUS RIPARIUS* (DIPTERA:
CHIRONOMIDAE) ЗА ДІЇ ЙОНІВ МІДІ**

Досліджено морфофізіологічні та цитогенетичні зміни у *Chironomus riparius* за дії йонів міді. Встановлено, що з ростом концентрації токсиканту відбувається дозо-залежне зниження виживаності та маси личинок, затримка вильоту імаго, спостерігаються морфологічні деформації ротового апарату та структурно-функціональні зміни у політених хромосомах слинних залоз. Показано, що ці порушення є чутливим критерієм сублетального забруднення йонами міді.

Ключові слова: *Chironomus riparius*, морфологічні, фізіологічні та цитогенетичні зміни, йони міді.

Накопичення забруднюючих речовин відбувається переважно у донних відкладах, тому довготривале забруднення водних екосистем призводить до деградації перш за все донних біоценозів. Це зумовлює необхідність вивчення особливостей інтоксикації бентосних організмів.

Одними із масових видів бентосних тварин, які населяють майже всі типи водних екосистем, є представники родини Chironomidae [1, 6, 18, 20]. Їх личинки відіграють провідну функціональну роль у донних угрупованнях завдяки високій чисельності, кормовій цінності [8, 20] та активній участі у процесах самоочищення [6].

Пріоритетними забруднюючими речовинами донних відкладів, поряд з поліароматичними вуглеводнями, поліхлорованими біфенілами та пестицидами, є важкі метали, які не піддаються деструкції та можуть мати кумулятивну і синергічну дію [10, 14]. Серед важких металів найбільшу небезпеку для водних екосистем становлять мідь, кадмій, свинець і хром [8, 10, 14].

Метою нашої роботи було дослідження морфофізіологічних і цитогенетичних змін в організмі личинок *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) за дії йонів міді.

Матеріал і методика досліджень. Для досліджень використовували лабораторну культуру *Ch. riparius (thummi)* біотехнологічного комплексу Інститу-

© Романенко В. Д., Гончарова М. Т., Коновець І. М., Кіпніс Л. С., 2012

ту гідробіології НАН України. Дослідження проводили за температури $20 \pm 2^\circ\text{C}$, вологості 80%, фотоперіоду світло : темрява 16 : 8. Корм (Tetramin®) вносили один раз на дві доби з розрахунку 5 мг/екз.

У дослідах застосовували просіяний та вимитий дрібнопіщаний субстрат з мінімальним вмістом органічних речовин, що досягалось його прожарюванням у муфельній печі за температури 500°C . У субстрат вносили розчин сульфату міді для досягнення концентрації 1, 5, 10, 20 та 50 мг/кг сухої маси субстрату з розрахунку на Cu^{2+} . Для приготування розчинів використовували відстояну водопровідну воду (рН 7,6, перманганатна окисність $< 3,0$ мг $\text{O}/\text{дм}^3$, твердість 5,5 мг-екв/ дм^3 , загальна лужність 5,2 мг-екв/ дм^3 , загальна мінералізація 120,0 мг/ дм^3 , концентрація розчиненого кисню 7,0—7,2 мг $\text{O}_2/\text{дм}^3$). Після змішування субстрату з токсикантом його відстоювали протягом двох діб. Фактичні значення концентрації визначали методом атомної абсорбції [11].

Експозиція личинок першої стадії віком 24—48 год (50 ± 5 екз.) становила 20 та 40 діб. Досліди проводили у шести повторах. Перші три повтори аналізували на 20-у добу, визначали виживаність та приріст сирової маси личинок [12]. Інші три повтори досліджували на 40-у добу експерименту, аналізували час вильоту 50% організмів, частку вильоту та статеву структуру імаго [12].

Досліди з виявлення морфологічних і генетичних порушень проводили у трьох повторах. Тривалість експериментів при дослідженні личинок першої та третьої стадій становила відповідно 20 та 10 діб. Аналізували рівень морфологічних деформацій ротового апарату личинок, а саме антен, субментуму, мандибул, епіфарингеального гребеня та ін. Деформованими вважали частини ротового апарату, в яких була виявлена будь-яка морфологічна аномалія, механічні пошкодження (в результаті абразії, зламу) деформаціями не вважали [31]. Матеріал фіксували 4%-ним формаліном. За дві доби до аналізу додавали їдкий калій для розчинення м'яких тканин. У кожному варіанті досліду було проаналізовано не менше 35 личинок.

Для аналізу структурно-функціональних порушень в клітинах слинних залоз *Ch. riparius* готували цитогенетичні препарати. Личинок четвертої стадії фіксували 95%-ним етиловим спиртом і льодяною оцтовою кислотою у співвідношенні 3 : 1. Слинні залози виділяли у краплині фіксатора та забарвлювали 2%-ним розчином ацетоорсеїну. Після короткої мацерації в 45—60%-ній молочній кислоті робили давлені препарати [12]. В роботі застосовувалися хромосомні карти [7, 23]. У кожному варіанті досліду було проаналізовано не менше 30 личинок.

У досліді з одночасним аналізом морфологічних і генетичних деформацій за дії токсичних речовин зібраний матеріал (личинок четвертої стадії) фіксували, як і у попередньому варіанті, забарвлювали ацетоорсеїном, потім під біокуляром відділяли голову личинки та слинні залози. Голову промивали льодяною оцтовою кислотою та готували тимчасові препарати. Слинні залози мацерували у молочній кислоті та готували давлені препарати [12]. У кожному варіанті було проаналізовано не менше 20 личинок.

1. Ріст і розвиток *Ch. riparius* за дії йонів міді

Розрахункова концентрація, мг Cu^{2+} /кг сухої маси субстрату	Фактична концентрація, мг Cu^{2+} /кг сухої маси субстрату	Вживаність личинок на 20-у добу, %	Приріст маси личинки, мг	Частка вильоту імаго, %	Частка самиць серед імаго, %	Час вильоту 50% організмів, доба
Контроль	0,15	87,2 ± 5,6	8,4 ± 0,2	87,2 ± 4,1	52,7 ± 2,9	28,3 ± 0,6
1	0,9	85,1 ± 6,0	8,4 ± 0,1	82,6 ± 8,5	56,1 ± 7,9	28,7 ± 0,6
5	4,4	76,5 ± 4,7*	8,2 ± 0,1	73,3 ± 5,9*	58,4 ± 12,6	30,0 ± 1,0*
10	8,7	55,8 ± 1,9*	7,5 ± 0,2*	53,9 ± 1,8*	43,7 ± 19,4	36,0 ± 1,0*
20	18,5	37,9 ± 4,7*	3,2 ± 0,2*	34,2 ± 3,1*	45,2 ± 4,5*	—
50	45,4	23,5 ± 4,6*	2,6 ± 0,1*	19,1 ± 4,7*	42,5 ± 6,6*	—

Примітка. «—» — виліт імаго на 40-у добу експерименту становив < 50%; * різниця середніх величин досліду і контролю статистично достовірна, $p \leq 0,05$.

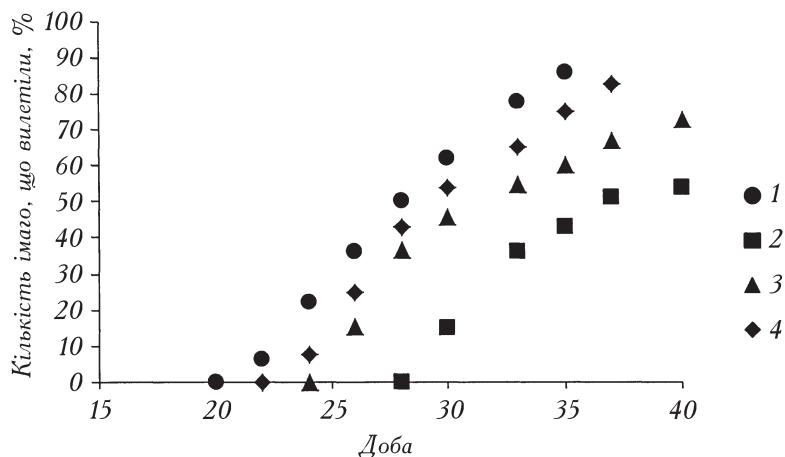
Препарати головних капсул і клітин слинних залоз досліджували за допомогою мікроскопа AxioImager Carl Zeiss (збільшення відповідно $\times 100$ — 400 та $\times 400$ — 1000) Гідроекологічного аналітичного центру Інституту гідробіології НАН України. Статистичну обробку результатів проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики [9].

Результати досліджень та їх обговорення

Аналіз результатів субхронічних експериментів виявив дозо-залежну закономірність, яка проявлялась у зниженні виживаності та приросту маси личинок, зменшенні частки та значної затримки вильоту імаго з ростом концентрації йонів міді (табл. 1).

Встановлено, що за концентрації йонів міді 5 мг/кг сухої маси субстрату виживаність личинок достовірно знижується на 11% порівняно з контролем, а за концентрації 10 та 20 мг/кг — відповідно на 31 та 49%. Суттєво знижується також маса личинок, особливо за концентрації 20 та 50 мг/кг. Також слід відмітити тенденцію до зменшення частки самиць серед імаго, що вилетіли, та значну затримку їх вильоту з ростом концентрації йонів міді (рис. 1). Так, за концентрації 10 мг/кг час вильоту 50% організмів збільшувався в 1,3 разу, а за вищої — 50% організмів не вилетіли за 40 діб експерименту.

Таким чином, недіяльною концентрацією для *Ch. riparius* у хронічному досліді є 1 мг/кг сухої маси субстрату, а за дії 20 та 50 мг/кг спостерігаються



1. Динаміка вильоту імаго *Chironomus riparius* за дії йонів міді: 1 — контроль; 2 — 1 мг/кг; 3 — 5 мг/кг; 4 — 10 мг/кг.

суттєві зміни за всіма досліджуваними показниками. Слід зазначити, що ці значення концентрації є близькими до граничних (Threshold Effect Concentration) валового вмісту міді у донних відкладах згідно з нормативами, прийнятими Агенцією з охорони навколишнього середовища США (31,5 мг/кг) [26]. Досить висока чутливість *Ch. riparius* у наших дослідках може бути пов'язана з підвищеною біодоступністю йонів міді внаслідок застосування піщаного субстрату з незначним вмістом органічних речовин (корм), що мінімізує зв'язування токсиканту порівняно з природними донними відкладами.

Однією з особливостей Chironomidae є висока пластичність гено- та фенотипу у відповідь на дію негативного чинника [4, 30]. Численні дані польових спостережень на різних водних об'єктах чітко вказують на зв'язок між частотою морфологічних деформацій личинок хірономід і токсичним навантаженням [5, 22, 27, 29]. Авторами відмічається, що деякі їх роди, зокрема *Chironomus* та *Procladius*, більш схильні до появи деформацій [21, 33]. У малозабруднених районах, що використовуються як фонові при польових дослідженнях, кількість деформацій варіює в діапазоні 0—8% [21, 22, 27]. Появу порушень в кількості, що перевищує природний фон, пов'язують з наявністю у місцях збору забруднюючих речовин. Індукторами деформацій вважаються, головним чином, важкі метали, пестициди та деякі інші токсиканти [3, 24, 27, 32].

Проведене нами дослідження індукції морфологічних деформацій у личинок *Ch. riparius* йонами міді показало, що у досліді, розпочатому з личинок першої стадії, за дії концентрації 20 мг/кг спостерігались морфологічні деформації ротового апарату (табл. 2) у кількості, що перевищувала найвищу із зафіксованих у літературних джерелах величин природного фону (8%). За дії 50 мг/кг частка деформованих личинок становила 20%. Порушення вияв-

2. Кількість деформацій структур ротового апарату личинок *Ch. riparius* за дії йонів міді

Розрахункова концентрація, мг Cu^{2+} /кг сухої маси субстрату	Кількість личинок з деформаціями, екз.	Кількість деформованих структур ротового апарату личинок				Частка личинок з деформаціями, %
		загальна	ментум	епіфарингс	антени	
Контроль	1	1	1	0	0	2,9
	0	0	0	0	0	0,0
1	0	0	0	0	0	2,9
	1	1	1	0	0	2,9
5	2	2	0	0	2	5,6
	0	0	0	0	0	0,0
10	2	2	2	0	0	5,6
	1	1	1	0	1	2,9
20	3	6	2	1	3	8,6
	0	0	0	0	0	0,0
50	7	12	5	2	5	20,0
	0	0	0	0	0	0,0

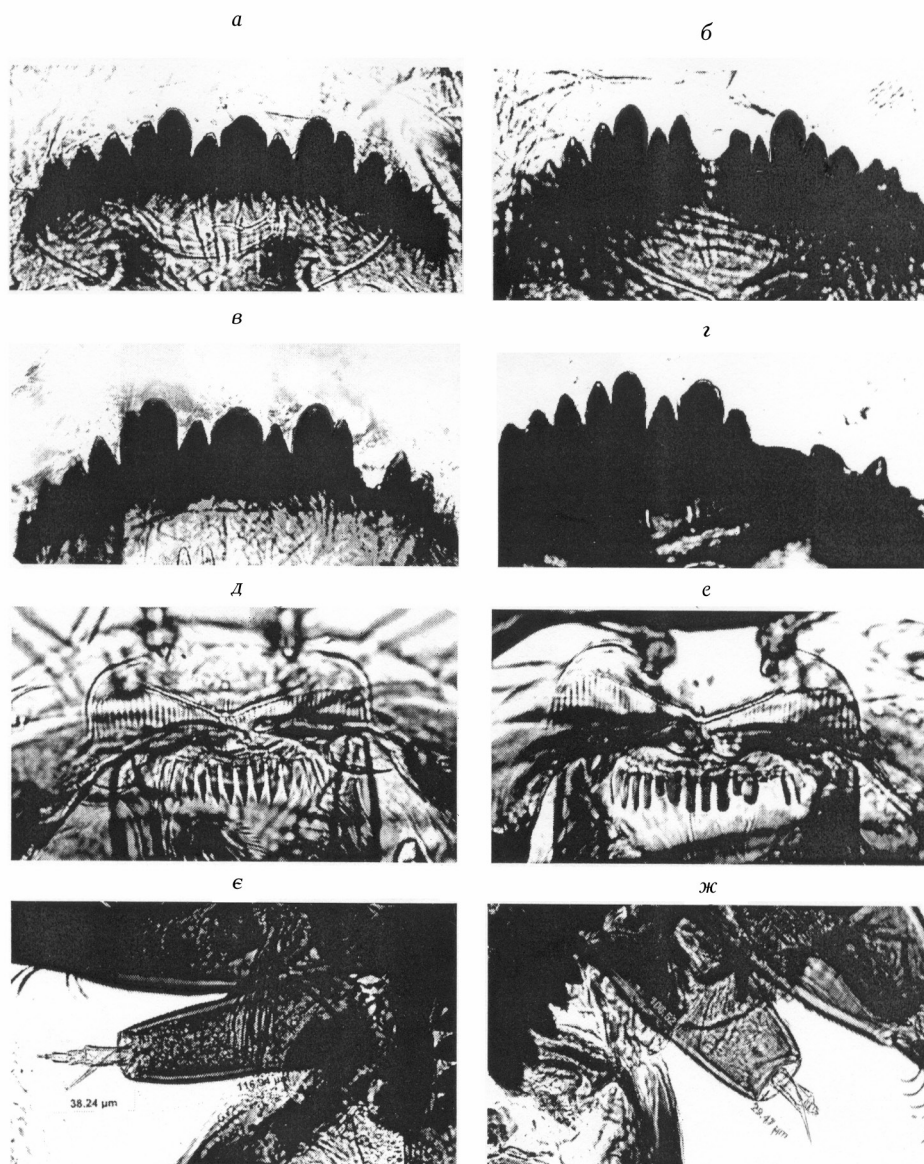
П р и м і т к а. Над рискою — личинки першої стадії (20 діб експозиції), під рискою — личинки третьої стадії (10 діб експозиції), $n = 35$.

ляються, головним чином, у вкороченні та аномальності антен, деформаціях ментуму та епіфарингеального гребеня (випадіння зубців) (рис. 2). З ростом концентрації ступінь деформацій зростає, випадає більша кількість зубців. Поряд з порушеннями слабохітинізованих структур (антен, епіфарингсу) за високих концентрацій токсиканту з'являються деформації сильнохітинізованих — ментума. Деформації мандибул виявлено не було.

Важливо відмітити, що у личинок третьої стадії кількість морфологічних деформацій не перевищує контрольних величин (див. табл. 2). Скоріш за все, вони виникають на першій стадії та зберігаються під час наступних линьок. Це можна пояснити тим, що на першій стадії ротовий апарат личинок *Ch. riparius* сформований ще не повністю [13], при першій линьці відбуваються його суттєві перетворення, а також тим, що на цій стадії розвитку вони є найбільш вразливими до дії токсичних речовин [17].

Літературні дані свідчать про те, що забруднюючі речовини, навіть у концентрації нижчій за гранично допустиму, викликають зміни структур хромосом у Chironomidae [2, 30]. До виникнення хромосомних аберацій також призводить дія радіації [4, 15], важких металів [16, 28, 29] та ксенобіотичних речовин у районах антропогенного забруднення [30].

Проведені нами дослідження показали, що за концентрації 20 і 50 мг/кг спостерігались структурно-функціональні зміни політенних хромосом, які проявлялись у порушенні їх структури та деконденсації, появі нових пувів, соматичних інверсіях, делеціях тощо (табл. 3). При цьому морфологічні де-



2. Типові деформації ротового апарату у личинок *Ch. riparius* за дії іонів міді: а, д, е — контроль; б—г — випадіння зубців ментуму; е — деформації епіфарингсу; ж — вкорочення та аномалія члеників антен.

формації у личинок супроводжувались збільшенням частоти появи пувів у політенних хромосомах.

Відомо, що поява пувів свідчить про активацію синтезу РНК. Як наслідок, синтез додаткових білків може збільшувати толерантність личинок до токсикантів [19]. Поява пувів та їх модифікацій у розмірах і активності можна розглядати як перший сигнал реакції організму на дію несприятли-

3. Зміни у політених хромосомах слинних залоз личинок *Ch. riparius* за дії йонів міді ($n = 30$)

Розрахункова концентрація, мг Cu^{2+} /кг сухої маси субстрату	Частота аберацій, %	Наявність морфологічних деформацій у личинок з абераціями, %
Контроль	0,0	—
1	0,0	—
5	0,0	—
10	0,0	—
20	6,7	100,0
50	16,7	80,0

вих чинників зовнішнього середовища [16]. У *Chironomus* описано виникнення нових пувів і активація синтезу поліпептидів у відповідь на тепловий шок [19]. Ці поліпептиди беруть участь у формуванні адаптивного механізму, що дозволяє клітинам пережити несприятливі умови середовища [25]. Описані також подібні перебудови у політених хромосомах личинок *Ch. riparius* за дії міді [28]. Відмічено дозо-залежний ефект між концентрацією токсиканту та частотою хромосомних перебудов.

Висновки

За дії йонів міді спостерігаються дозо-залежні морфофізіологічні та цитогенетичні зміни у личинок *Ch. riparius*, що проявляються починаючи з концентрації 10 мг/кг сухої маси субстрату — зниження виживаності та маси личинок, затримка вильоту імаго.

Морфологічні деформації ротового апарату спостерігаються з концентрації 20 мг Cu^{2+} /кг сухої маси субстрату, за концентрації 50 мг/кг частка личинок з деформаціями становить 20%. Порушення виявляються, головним чином, у вкороченні та аномалії антен, деформаціях субментуму та епіфарингеального гребеня. У личинок пізніх стадій дія йонів міді не призводить до морфологічних деформацій. Це може свідчити про те, що вони виникають на першій стадії та зберігаються під час наступних линьок.

Починаючи з концентрації 20 мг Cu^{2+} /кг сухої маси спостерігаються структурно-функціональні зміни політених хромосом *Ch. riparius*, які виявляються у появі нових пувів і деконденсації, інверсіях, делеціях тощо. У личинок з морфологічними деформаціями ротового апарату частота появи пувів у політених хромосомах збільшується.

Ступінь морфологічних деформацій ротового апарату та структурно-функціональні зміни політених хромосом личинок хірономід є чутливими критеріями токсичного впливу (зокрема важких металів), що можуть бути застосовані як у скринінгових дослідженнях, так і в лабораторних токсикологічних експериментах.

**

*Исследованы морфофизиологические и цитогенетические изменения у *Chironomus riparius* при воздействии ионов меди. Установлено, что с ростом концентрации токсиканта происходит дозо-зависимое снижение выживаемости и массы личинок, задержка вылета имаго, наблюдаются морфологические деформации ротового аппарата личинок и структурно-функциональные изменения в политенных хромосомах слюнных желез. Показано, что эти нарушения являются чувствительным критерием сублетального загрязнения ионами меди.*

**

*Morphophysiological and cytogenetic alterations in *Chironomus riparius* under effect of copper ions were investigated. Increase of toxicant concentration leads to dose-dependent decrease of larvae's survival and weight, emergence delay, structural and functional changes in polytene chromosomes of salivary glands. It was shown that morphophysiological deformations and changes in polytene chromosomes are sensitive indexes of sublethal copper contamination.*

**

1. Балущкина Е.В. Хиროномиды как индикаторы загрязнения воды // Методы биологического анализа пресных вод. — Л.: ЗИН АН СССР, 1976. — С. 106—118.
2. Белянина С.И., Гаврикова В.В., Логинова Н.В. Влияние ряда ксенобиотиков на генетическую активность и структуру гигантских хромосом хиросомид // Экология и здоровье: Тез. докл. научно-практ. конф. — Саратов: Изд-во Саратов. мед. ун-та, 1991. — С. 52—53.
3. Гребенюк Л.П., Томила И.И. Изменение физиологических и морфологических показателей личинок *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) при действии токсических веществ различной природы // Биология внутр. вод. — 2006. — № 3. — С. 81—90.
4. Гунгерина Л.И. Генетическая изменчивость в эволюции хиросомид (Diptera: Chironomidae): Автореф. дис. ... докт. биол. наук. — Новосибирск, 2001. — 32 с.
5. Екологічний стан водотоків басейну Верхньої Тиси (українсько-румунська ділянка) / За ред. С.О. Афанасьєва. — Ужгород: Інформаційно-видавниче агентство «ІВА», 2010. — 36 с.
6. Зинченко Т.Д. Биоиндикация как поиск информативных компонентов водных экосистем (на примере хиросомид — Diptera, Chironomidae) // Чтения памяти В.Я. Леванидова. — 2005. — Вып. 3. — С. 338—359.
7. Кукнадзе И.И., Шилова А.И., Керкис И.Е. и др. Кариотипы и морфология личинок трибы Chironomini. Атлас. — Новосибирск: Наука, 1991. — 115 с.
8. Клишко О.К., Авдеев Д.В., Зазулина В.Е., Борзенко С.В. Роль хиросомид (Diptera, Chironomidae) в биологической миграции химических элементов в экосистеме антропогенных водоемов // Чтения памяти В. Я. Леванидова. — 2005. — Вып. 3. — С. 360—367.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высш. шк., 1973. — 343 с.

10. Линник П.Н. Донные отложения водоемов как потенциальный источник вторичного загрязнения водной среды соединениями тяжелых металлов // Гидробиол. журн. — 1999. — Т. 35, № 2. — С. 97—109.
11. Методика виконання вимірювань масової концентрації міді методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії. МВВ 081/12-0002-01.
12. Методическое пособие по изучению хирономид / Под ред. Ф. Ахророва. — Душанбе: Дониш, 1982. — 83 с.
13. Объекты биологии развития / Под ред. Т.А. Детлафа. — М.: Наука, 1975. — С. 95—127.
14. Перевозников М.А., Богданова Е.А. Тяжелые металлы в пресноводных экосистемах. — СПб.: ГосНИОРХ, 1999. — 228 с.
15. Петрова Н.А. Хромосомные перестройки трех видов хирономид из зоны Чернобыля (Diptera, Chironomidae) // Генетика. — 1991. — Т. 27, № 5. — С. 836—848.
16. Петрова Н.А., Михайлова П.В., Селла Г. и др. Структурно-функциональные изменения политенных хромосом *Chironomus riparius* из водоемов Италии, загрязненных тяжелыми металлами // Сиб. экол. журн. — 2000. — № 4. — С. 511—521.
17. Романенко В.Д., Гончарова М.Т. Личинки *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) як чутливий до міді тест-об'єкт // Гидробиол. журн. — 2011. — Т. 47, № 4. — С. 107—111.
18. Шобанов Н.А. Род *Chironomus* Meigen (Diptera, Chironomidae): Систематика, биология, эволюция // Автореф. дис. ... докт. биол. наук. — СПб., 2000. — 52 с.
19. Borettino P., Morcillo G., Diez J. Induction of heat shock response by carbon dioxide in *Chironomus thummi* // Cell Differ. — 1988. — Vol. 23, N (1—2). — P. 27—36.
20. Cranston P.S. Introduction // Chironomidae: the biology and ecology of non-biting midges. — London: Chapman & Hall, 1995. — P. 1—10.
21. Dermott R.M. Deformities in larval *Procladius* spp. and dominant Chironomina from the St. Clair River // Hydrobiologia. — 1991. — Vol. 219. — P. 171—185.
22. Dickman M., Rygiel G. Chironomid larval deformity frequencies, mortality and diversity in heavy metal contaminated sediments of a Canadian riverine wetland // Environ. — 1996. — N 22. — P. 693—703.
23. Hagele K. DNA-replikationsmuster der speicheldrüsen chromosomen von chironomiden // Chromosoma. — 1970. — N 31. — P. 91—138.
24. Janssens de Bisthoven L., Vermeulen A., Ollevier F. Experimental induction of morphological deformities in *Chironomus riparius* larvae by chronic exposure to copper and lead // Arch. Environ. Contam. Toxicol. — 1998. — Vol. 35. — P. 249—256.
25. Lindquist S. The heat-shock response // Ann. Rev. Biochem. — 1986. — Vol. 55. — P. 1151—1191.
26. MacDonald D.D., Ingersoll C.G., Berger T.A. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems // Arch. Environ. Contam. Toxicol. — 2000. — Vol. 39. — P. 20—31.

27. Madden C.P., Suter P.J., Nicholson B.C., Austin A.D. Deformities in chironomid larvae as indicators of pollution (pesticide) stress // Neth. J. Aquat. Ecol. — 1992. — Vol. 26. — P. 551—557.
28. Michailova P., Petrova N., Ilkova J. et al. Genotoxic effect of copper on salivary gland polytene chromosomes of *Chironomus riparius* Meigen 1804 (Diptera, Chironomidae) // Environ. Poll. — 2006. — Vol. 144. — P. 647—654.
29. Michailova P., Petrova N., Sella G. et al. Structural functional rearrangements in chromosome G in *Chironomus riparius* Meigen (Diptera, Chironomidae) collected from a heavy metal polluted area near Turin, Italy // Ibid. — 1998. — Vol. 103. — P. 127—135.
30. Michailova P.V. Rearrangements in Chironomidae (Diptera) genomes induced by various environmental stress factors // Вестн. ВОГиС. — 2010. — Т. 14, № 1. — С. 43—54.
31. Saether O.A. Glossary of chironomid morphology terminology (Diptera: Chironomidae) // Entomol. Scand. Suppl. — 1980. — N 14. — P. 1—51.
32. Vedamanikam V.J., Shazili N. A.M. Observations of mouthpart deformities in the *Chironomus* larvae exposed to different concentrations of nine heavy metals // Toxicol. Environ. Chem. — 2009. — Vol. 91, N 1. — P. 57—63.
33. Warwick W.F., Tisdale N.A. Morphological deformities in *Chironomus*, *Cryptochironomus*, and *Procladius* (Diptera: Chironomidae) from two differentially stressed sites in Tobin lakes, Saskatchewan // Can. J. Fish. Aquat. Sci. — 1988. — Vol. 45. — P. 1123—1144.