

ЕКОЛОГІЧНА ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ ВОДНИХ ТВАРИН

УДК [575:001.891:591.524.1](285.33)

М.Т. ГОНЧАРОВА, к. б. н., ст. наук. співроб.,
Інститут гідробіології НАН України,
просп. Володимира Івасюка, 12, Київ, 04210, Україна,
e-mail: mariyagonch83@gmail.com
ORCID 0000-0003-3891-4572

О.В. РОМАНЕНКО, акад. НАН України, д. б. н., проф., зав. каф.,
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця
просп. Перемоги, 34, Київ, 03057, Україна
e-mail: alexrom@i.com.ua
ORCID 0000-0002-8622-1757

Л.С. КІПНІС, к. б. н., ст. наук. співроб., ст. наук. співроб.,
Інститут гідробіології НАН України,
просп. Володимира Івасюка, 12, Київ, 04210, Україна,
e-mail: ecos_inhydro@ukr.net
ORCID 0000-0002-4008-5120

Ю.Г. КРОТ, к. б. н., ст. наук. співроб., в.о. зав. відділу,
Інститут гідробіології НАН України,
просп. Володимира Івасюка, 12, Київ, 04210, Україна,
e-mail: yurikrot@ukr.net
ORCID 0000-0001-8732-1322

Ю.О. СТОЙКА, мол. наук. співроб.,
Інститут гідробіології НАН України,
просп. Володимира Івасюка, 12, Київ, 04210, Україна,
e-mail: julista75@gmail.com
ORCID 0000-0003-0485-7493

ЦИТОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ РАКОПОДІБНИХ *PONTOGAMMARUS ROBUSTOIDES* (AMPHIRODA, GAMMARIDAE) ПРИ ПІДВИЩЕННІ ТЕМПЕРАТУРИ ВОДИ В УМОВАХ МІКРОКОСМУ¹

*Досліджено адаптивні реакції на клітинному рівні *Pontogammarus robustoides*, представника род. Gammaridae, при підвищенні температури води до критичних величин в умовах модельної екосистеми — мікрокосму. Проведено цитогенетичний*

¹ Стаття є третьою в циклі публікацій (див. [8, 39]), присвячених вивченню особливостей пристосування угруповань водних безхребетних прибережної мілководної зони Київського водосховища до підвищення температури води до критичних величин шляхом застосування модельної екосистеми — мікрокосму.

Ц и т у в а н н я: Гончарова М.Т., Романенко О.В., Кіпніс Л.С., Крот Ю.Г., Стойка Ю.О. Цитогенетичний аналіз ракоподібних *Pontogammarus robustoides* (Amphipoda, Gammaridae) при підвищенні температури води в умовах мікрокосму. *Гідробіол. журн.* 2023. Т. 59. № 5. С. 46—58.

аналіз клітин їхніх ембріонів та досліджено ядерцеву активність соматичних клітин. Показано, що в діапазоні температур 25,0—27,5 °C спостерігається нормальний розвиток клітин ембріонів *P. robustoides*. Підвищення температури до 30,0—30,5 °C викликає такі структурно-функціональні зміни в клітинах, як зростання рівня аберантності хромосом та кількості мікроядер. За тривалої дії підвищених температур ці показники наближаються до критичних рівнів. Збільшується кількість ембріональних клітин з фрагментацією ядер, що є свідченням розвитку процесів, спрямованих на апоптоз. За температури 32 °C спостерігається руйнування клітинних структур ембріонів. В соматичних клітинах відмічено збільшення загального об'єму ядерця, що є показником посилення синтезу білків, які, ймовірно, приймають участь у адаптаційному процесі. Зниження температури води до початкового рівня 25 °C сприяє відновленню структурно-функціональних показників геному гамарид, однак все ще спостерігається висока частка порушень поділу клітин на фоні значного зниження рівня мікроядер.

Ключові слова: гамариди, *Pontogammarus robustoides*, температура, цитогенетичний аналіз, адаптивні реакції, мікрокосм.

На сучасному етапі, в умовах кліматичних змін, одним з провідних екологічних чинників є температура навколишнього середовища, найбільш відчутний вплив якої проявляється в прибережних мілководних зонах. Для водосховищ, створених у руслі Дніпра — основної водної артерії України, характерні великі площі мілководь, що в середньому для всіх водосховищ каскаду складають 19,1 %, а в Київському — біля 40 % площі водної поверхні [24]. У цих зонах ключова функціональна роль належить амфіподам, завдяки їхній чисельності та біомасі [35]. Зі створенням каскаду дніпровських водосховищ однією з провідних за чисельністю груп нектобентосних макробезхребетних стали інвазивні види гамарид понто-каспійського комплексу, що поступово витіснили аборигенну фауну [34]. У Київському водосховищі налічується сім видів гамарид [35], *Pontogammarus robustoides* (Sars, 1894) є найпоширенішим на мілководді. На сьогодні він також широко розповсюджений в Європі та багатьох інших регіонах [19]. Цей високоадаптивний вид понто-каспійських гамарид продовжує поширюватись за межі свого природного ареалу. Людська діяльність значною мірою сприяє поширенню *P. robustoides* вздовж великих річок (Вісла, Одер, Німан, Ельба) і судноплавних каналів, а також у штучні водойми та озера [26].

Прогнозування екологічних наслідків глобальних змін клімату вимагає різноманітних підходів, включаючи використання експериментальних моделей [41]. Багатовидовим підходом, в якому об'єднано різні методи, а також масштабні експерименти, в яких можлива реалізація реалістичних рівнів біокомплексності, є мікро- або мезокосми [44]. Мікрокосм — це штучна спрощена екосистема, яка використовується для прогнозування поведінки природних екосистем у контрольованих умовах. Експерименти з використанням «модельних організмів» у мікрокосмах або мезокосмосах можуть бути корисним підходом для вивчення впливу абіотичних або антропогенних стресорів на взаємодію видів, реакції екосистем на зміну клімату [16].

Найбільш об'єктивним та наближеним до природних умов підходом для прогнозування наслідків підвищення температури на біоту мілководних ділянок водойм, що спостерігається в умовах змін клімату, є дослідження її у мікрокосмі [16]. Переважна більшість цитогенетичних досліджень гамарид стосуються їхнього каріотипу [20, 30, 31] або оцінки цитогенотоксичності для них різних забруднюючих речовин, включаючи іонізуюче випромінювання [9, 14, 21, 25, 29, 40, 43]. Робіт, присвячених дослідженню впливу підвищених температур на водних безхребетних, особливо гамарид, в умовах мікрокосму, досить мало [6, 33, 39]. Дослідження цитогенетичних змін гамарид за таких умов дозволить найбільш реалістично спрогнозувати наслідки впливу підвищених температур за умов зміни клімату.

Метою нашого дослідження було вивчення цитогенетичних характеристик гамарид *Pontogammarus robustoides* за динамічних змін температури води в модельній екосистемі — мікрокосмі.

Матеріал і методика досліджень

Основу угруповань в дослідному і контрольному мікрокосмах склали водні безхребетні різних систематичних груп та інші супутні організми (водорості, протисти, бактерії та ін.). Особливу увагу було приділено гамаридам та двостулковим молюскам, які були перевезені разом із природними субстратами з ділянки прибережних мілководь Київського водосховища (ур. Толокунь).

Угруповання гамарид у контрольному та експериментальному мікрокосмі були подібними і склалися з представників род. Gammaridae: *Pontogammarus robustoides* (Sars, 1894), *Dikerogammarus villosus* (Sowinsky, 1894), *D. haemobaphes* (Eichwald, 1841), *Echinogammarus ischnus* (Stebbing, 1899) та род. Unionidae: *Unio tumidus* (Philipsson, 1788), *Unio pictorum* (Philipsson, 1788).

Об'єктом досліджень була домінуюча популяція гамарид *P. robustoides*, що складала 99 % угруповання мікрокосму. Видовий склад гамарид встановлювали за визначниками [5, 23] з урахуванням сучасної номенклатури [27].

Тварин годували нитчастими водоростями *Spirogyra* sp., листям верби та кормом Tetramin® (0,5 г/добу).

Перед початком експерименту тварини у дослідній і контрольній ємностях проходили тривалу аклімацію, що дозволило привести мікрокосми у близький структурно-функціональний стан.

Умови експерименту та динаміка гідрохімічних параметрів описані у попередніх статтях, присвячених особливостям адаптації до підвищеної температури представників родин Gammaridae [39] та Unionidae [8].

Експерименти проводили одночасно у двох однакових ємностях, кожна з яких була розділена перегородкою на два сполучених між собою відсіки з довжиною перебігу води 6,7 м. Потік води в ємностях створювався обертанням за допомогою електроприводу лопатей, насаджених на спільну вісь. Швидкість течії складала 0,05 м/с. Площа поверхні дна скла-

дала 1,27 м², об'єм води — 0,44 м³. Субстратом слугували донні відклади піщано-мулового типу, відібрані в місці мешкання гамарид [8, 39].

Для цитогенетичного аналізу відбирали п'ять самиць гамарид розміром 11—12 мм з яйцями, що знаходились на початкових стадіях розвитку, стадія VI за [1], та готували препарати з 20—30 яєць від кожної самиці. На 10, 13, 14 та 16-ту добу експерименту, через низьку прекопуляційну активність та понижену кількість закладених яєць за цих температур, для аналізу відбирали трьох — чотирьох самиць з 8—16 яйцями.

Цитогенетичний матеріал фіксували розчином Кларка (95 %-вий етиловий спирт та льодяна оцтова кислота у співвідношенні 3 : 1).

Для аналізу структурних цитогенетичних показників самиць гамарид з ембріонами занурювали у 2 %-вий розчин ацетоорсеїну на одну добу, після чого мацерували у льодяній оцтовій кислоті та відділяли ембріони у 60 %-вий молочній кислоті. Готували давлені цитогенетичні препарати [2]. Аналізували мітотичну активність клітин, відсоткову частку клітин в профазі (з усіх клітин в мітозі), рівень аберантності хромосом — порушень поділу, що включали аномалії метафази, відставання хромосом в анафазі та телофазі мітозу та інші структурні порушення поділу (мости, фрагменти, мультиполярний та множинний мітоз та ін.), а також кількість клітин з мікроядрами та фрагментованими ядрами (розпад ядра на невеликі структури, обмежені мембраною, кожна з яких містить ущільнену ДНК).

Для вивчення функціональної активності геному гамарид використовували кількісні характеристики ядерець (кількість та розмір), що представляють собою комплекс ампліфікованих генів рибосомної РНК та їхніх продуктів, зміни їхньої морфології безпосередньо пов'язані з найважливішими молекулярно-генетичними процесами в клітині та об'єктивно відображають особливості її метаболізму [2].

Ядерцеву активність досліджували в соматичних клітинах самиць гамарид розміром 11—12 мм. Для приготування препаратів ядерець шматочки зафіксованих тканин занурювали на 40—60 хв у 45 %-вий розчин оцтової кислоти для хімічної мацерації, потім протягом 5—10 хв подрібнювали механічно у невеликому об'ємі мацерату пінцетом. Суспензію клітин наносили на сухі знежирені предметні скельця і висушували на повітрі. Повітряно-сухі препарати фарбували 50 %-вим розчином нітрату срібла в присутності розчину желатину з додаванням мурашиної кислоти протягом 5—6 хв за температури 60 °С до отримання золотаво-коричневого забарвлення [28]. Кількість ядерець підраховували у 50—100 клітинах у кожній пробі з використанням окулярів $\times 10$, імерсійного об'єктиву $\times 100$ мікроскопу AxioImager A1 Carl Zeiss Гідроекологічного аналітичного центру Інституту гідробіології НАН України, для вимірювання розмірів ядерець використовували програму AxioVision 4.8.

В контрольному мікрокосмі для цитогенетичного аналізу були відібрані самиці гамарид на початку і наприкінці експерименту.

Отримані дані оброблені загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням програми Microsoft Office Excel 2016. У таб-

лиці експериментальні дані представлені як середня величина та її стандартне відхилення при кількості повторів $n = 3-5$. Кожен повтор являв собою усереднену величину з 5—6 цитогенетичних препаратів. Статистичну значущість відмінностей середніх величин оцінювали за двобірковим критерієм Стьюдента (t -тест для незалежних вибірок). Відмінності в результатах вважали достовірними, якщо $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

Динаміка температурного режиму в експериментальному мікрокосмі була наближена до умов перебування безхребетних на ділянках прибережної зони мілководь Київського водосховища в періоди їхнього значного прогрівання [37] і включала етапи зростання температури зі швидкістю $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{добу}$ (1—2-а, 6—8-а доба), стабілізації на рівні докритичних ($27 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 2—5-а доба) і критичних величин ($30 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 8—13-а доба та $32 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 14-та доба), зниження (14—16-та доба) та стабілізації на рівні вихідних величин ($25,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 16—24-та доба). В контрольному мікрокосмі температура становила $25 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

При підвищенні температури води в умовах мікрокосму з $25,0$ до $27,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ розвиток клітин ембріонів гамарид *P. robustoides* відбувався нормально, з високою мітотичною активністю у клітинах ($28,6-32,5\%$) та низьким рівнем порушень поділу (табл. 1). Спостерігались лише незначні порушення, такі як відставання хромосом в анафазі мітозу на рівні $0,3-0,6\%$, що не виходить за межі контрольних величин. Кількість та об'єм ядерць в ядрі достовірно не відрізнялись від показників контрольного мікрокосму та наближались до тих, що спостерігались в місцях природного зосередження виду [3].

Підвищення температури водного середовища до $30,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (8-ма доба) викликало збільшення рівня порушень поділу до 3% , однак цей рівень не є критичним для розвитку рачків. Спостерігалось незначне зменшення кількості ядерць у ядрі.

Подальша дія температури $30,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом двох діб призводила до численних порушень у клітинах ембріонів гамарид, таких як відставання хромосом в анафазі, хромосомні мости, мультиполярний мітоз, розсіювання хромосом та інших порушень, загалом у кількості біля 5% . Спостерігали також появу мікроядер в невеликій кількості ($0,5\%$).

За більш тривалої дії температури $30,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом п'яти діб (13-а доба експерименту) спостерігались порушення поділу клітин ембріонів у кількості $4,1\%$, а саме: відставання хромосом в анафазі та телофазі, мости, фрагменти, мультиполярні мітози, розсіювання хромосом в мітозі, множинні мітози та ін. Як наслідок, кількість клітин з мікроядрами та фрагментацією ядра складала $6,2\%$ (рис. 1), що наближається до критичних для амфіпод величин 10% [9].

Згідно з нашими дослідженнями терморезистентності *P. robustoides* в статичних умовах, межею температурного оптимуму для репродуктивної активності гамарид є температура $27,5-28,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ [38], критичною для виживання — $32\text{ }^{\circ}\text{C}$, абсолютно летальна — $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 24 год [36]. За да-

Таблиця 1
Структурно-функціональні зміни у клітинах ембріонів та ядерцева активність в соматичних клітинах гамарид *P. robustoides* при підвищенні температури води в умовах мікрокосму

Температура, °С	Доба експерименту	Мітогічна активність, %	Кількість клітин в профазі, %	Відставання хромосом, %	Інші структурні порушення поділу, %	Кількість мікроядер та фрагментованих ядер, %	Кількість ядерцевих ядрі	Сумарний об'єм ядерцевих ядрі, мкм ³
Дослід								
25,0	0	28,6±2,0	45,3±3,2	0,3±0,1	0	0	2,9±1,3	11,3±4,5
27,0	2	30,4±2,8	48,1±3,9*	0,4±0,1	0	0	2,9±1,4	13,5±5,5
27,5	5	32,5±2,5*	53,2±3,5*	0,6±0,1	0	0	2,9±1,3	10,8±3,9
30,0	8	34,6±2,7*	53,8±4,8*	3,0±0,2**	0	0	2,4±1,4	18,7±6,9*
30,5	10	28,9±2,1	54,6±6,5*	2,6±0,8**	3,1±0,8**	0,5±0,1*	2,4±1,0	26,1±7,8*
30,0	13	31,2±2,6	30,4±2,9	3,3±1,2**	0,8±0,4*	6,2±0,6**	2,3±0,9	43,9±13,2**
32,0	14	—	—	—	—	—	1,3±0,5*	72,5±20,1**
25,0	16	33,3±3,0*	71,3±5,4**	6,5±2,4**	1,3±0,5*	3,1±0,9**	2,3±1,9	27,1±10,3*
25,0	24	33,2±3,1*	44,6±6,9	7,5±2,6**	2,3±0,7**	1,0±0,8*	2,4±1,2	23,4±5,4*
Контроль								
25,0	0	28,0±1,8	40,4±4,2	0,2±0,1	0	0	2,7±1,2	10,3±4,8
25,0	24	29,5±1,9	42,1±4,5	0,2±0,1	0	0	2,9±1,4	12,2±4,2

Примітка. «—» — не виявлено через руйнування клітинних структур: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

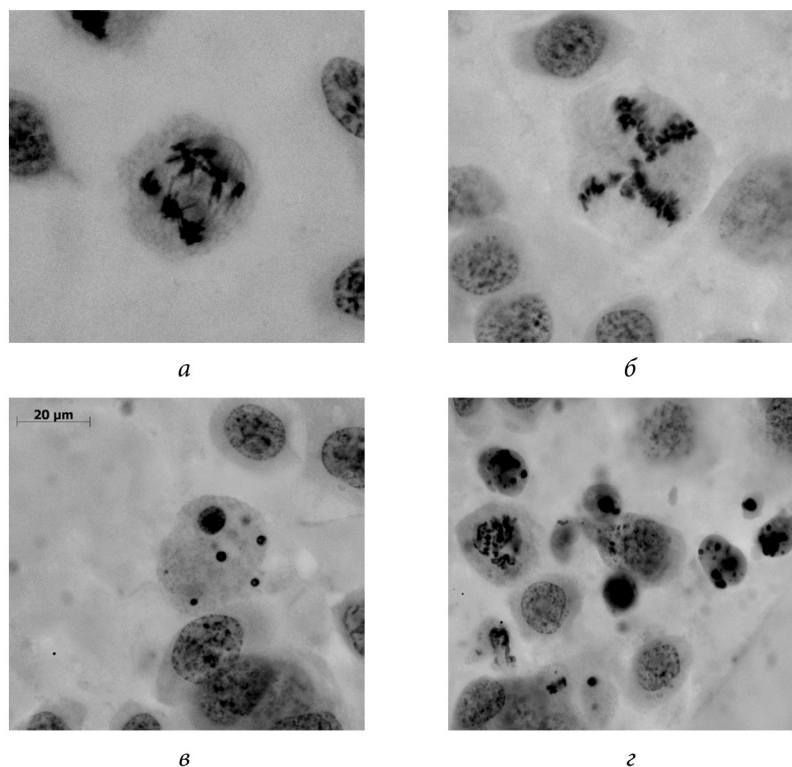


Рис. 1. Порушення поділу у клітинах ембріонів гамарид *P. robustoides* (×400): *а* — множинний мітоз (30 °С, 13-та доба); *б* — мультиполярний мітоз (30,5 °С, 10-та доба); *в* — мікроядра (30 °С, 13-та доба); *з* — фрагментація ядер та мікроядра (30 °С, 13-та доба)

ними інших дослідників, температурна резистентність цього виду становить більше 24 °С [12] і, ймовірно, вище 30 °С [13]. У природних біотопах *P. robustoides* температура води може коливатися від 0 до 30 °С [4]. Однак, за даними наших багаторічних спостережень, в природних біотопах вони уникають температур вище 28 °С, мігруючи на більші глибини [37].

Підвищення температури води до критичних значень призводить до негативного впливу як на організм в цілому, так і на генетичний апарат клітин. Такий вплив характеризується появою первинних генетичних порушень на рівні молекул ДНК або хромосом [30], що виражається у зростанні частоти порушень поділу.

Велика кількість клітин з фрагментацією ядра, що є ланкою у механізмі апоптозу клітин, найбільш вірогідно є наслідком температурного стресу, це явище було також описано і іншими дослідниками [10, 15, 22].

Подальше короткострокове підвищення температури до 32±0,5 °С викликало загибель клітин ембріонів і руйнування клітинних структур.

Для спостереження за зворотністю цих процесів моделювали зниження температури води у дослідному мікрокосмі до вихідних величин.

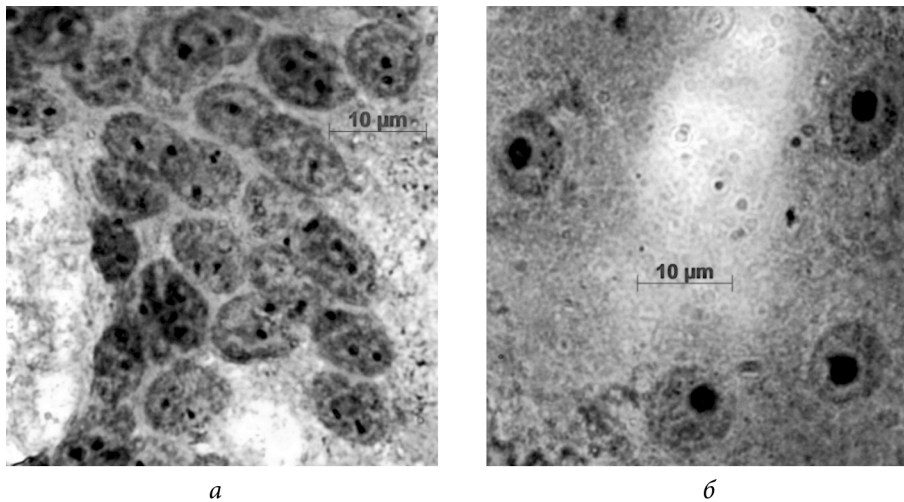


Рис. 2. Ядерця в ядрах соматичних клітин самиць гамарид *P. robustoides* ($\times 1000$): а — за температури водного середовища 25 °С на початку досліджу; б — за температури 32 °С через 14 діб експерименту

За поступового зниження температури з 32 до 25 °С протягом двох діб (16-та доба експерименту) ще спостерігались порушення поділу всіх типів. Слід також зазначити, що за цих умов відбувалась затримка мітозу в профазі, що потребує подальших досліджень.

При утриманні температури 25 °С протягом подальших 8 діб відбувалось часткове відновлення популяції гамарид. Однак в ембріональних клітинах все ще спостерігались відставання хромосом в анафазі у кількості 7,5 % та інші порушення поділу (2,3 %). Проте кількість мікроядер істотно знизилась, що може свідчити про включення репараційних процесів. Велика кількість порушень поділу, ймовірно, пов'язана з істотним пошкодженням геному внаслідок тривалої дії високих температур та недостатнім часом для відновлення, що узгоджується з нашим попереднім дослідженням частоти мікроядер у риб під впливом різної температури та фотоперіоду [7].

Нами було досліджено також функціональні зміни геному соматичних клітин гамарид за кількісними характеристиками — кількістю і розміром ядерць. Ці параметри є чутливим індикатором фізіологічної активності клітин, адже їх зміни відбуваються досить швидко та добре корелюють з інтенсивністю впливу на клітину чинників середовища [42].

Встановлено, що при підвищенні температури води до $30\pm 0,5$ °С спостерігалось зменшення кількості ядерць та збільшення їхнього загального об'єму не лише за рахунок злиття ядерць [18], а й за рахунок збільшення загального об'єму матеріалу ядерць у клітині [11], що свідчить про стимуляцію синтетичної активності клітини. При тривалому впливі (5 діб) температури $30\pm 0,5$ °С та її підвищенні до $32\pm 0,5$ °С виявлено до-

стовірне підвищення цього показника у 4—6 разів порівняно з контрольною групою (рис. 2).

Зміни кількісних і розмірних характеристик ядерць є одним з перших кроків у відповіді клітини на стрес, в тому числі температурний. Ядерце являє собою органелу, залучену у регуляцію відповіді клітини на стрес. Там синтезуються і дозрівають не тільки компоненти рибосом, але й малі регуляторні РНК. Відомо, що розмір ядерця корелює з вмістом білків у цитоплазмі [17]. Ядерця поводять себе подібно до жирних крапель, тому при збільшенні їхнього загального об'єму зливаються у більш об'ємні малочисельні ядерця [32]. Отже, збільшення об'єму ядерця може свідчити про інтенсифікацію синтезу білків, що беруть участь у адапційному процесі. При зниженні температури води до 25 °С у період відновлення популяції на 16—24-ту добу спостерігалось наближення цих показників до контрольних величин.

Висновки

Проведені цитогенетичні дослідження показали, що при підвищенні температури води з 25,0 до 27,5 °С зі швидкістю 1 °/добу розвиток клітин ембріонів гамарид *P. robustoides* характеризувався високою мітотичною активністю та низьким рівнем порушень їхнього поділу.

Підвищення температури до 30 °С негативно впливало на розвиток ембріональних клітин, що проявлялось у численних порушеннях їхнього поділу (загалом у кількості більше 5 %), а також у появі мікроядер. Більш тривала дія цієї температури викликала збільшення кількості та спектру порушень поділу клітин і, як наслідок, появу великої кількості мікроядер та клітин з фрагментацією ядра (більше 6 %), що наближається до критичних величин. Подальше підвищення температури до 32 °С приводило до загибелі клітин ембріонів.

При зниженні температури води до 25 °С все ще спостерігались порушення поділу клітин у кількості більше 7 %, проте частка мікроядер істотно знизилась: це може свідчити про незворотність процесів або недостатній час для відновлення функцій організму.

Дослідження ядерцевої активності соматичних клітин *P. robustoides* виявило тенденцію до зменшення кількості ядерць та збільшення їхнього загального об'єму з наближенням температури до критичних величин, що свідчить про підвищення синтетичної активності клітин і є одним з механізмів адаптації організму в умовах температурного стресу.

Список використаної літератури

1. Бек Т.А. Размножение бокоплавов родов *Gammarus* и *Marinogammarus* на литорали Белого моря. *Тр. Беломор. биол. ст. МГУ*. 1980. Т. 5. С. 103—114.
2. Гончарова М.Т., Кіпніс Л.С., Коновець І.М., Крот Ю.Г. Оцінка токсичності донних відкладів прісноводних об'єктів за допомогою біотестування. Методичні рекомендації. Київ, 2019. 131 с.
3. Гончарова М.Т., Кіпніс Л.С., Стойка Ю.О., Бабич Г.Б. Цитогенетичні дослідження гамарид літоральної зони Київського водосховища (урочище Толокунь). *Біологічні дослідження-2017*. 2017. С. 112—114.

4. Мордухай-Болтовской Ф.Д. Каспийская фауна в Азово-Черноморском бассейне. Москва : Изд-во АН СССР, 1960. 287 с.
5. Определитель фауны Черного и Азовского морей: в 3 т. Т. 2: Свободноживущие ракообразные. Киев : Наук. думка, 1969. 545 с.
6. Романенко В.Д., Крот Ю.Г., Леконцева Т.І. Особливості функціонування дрейсено-гамаридного угруповання в умовах мікрокосму: Структурно-функціональні характеристики угруповання дрейсен і гамарид. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. у-ту. Сер.: Біологія. Спец. вип. Гідроекологія*. 2010. Т. 43, № 2. С. 293—296.
7. Романенко В.Д., Стойка Ю.О., Кіпніс Л.С. Вплив температури та фотоперіода на спонтанний мутагенез клітин риб. *Наук. зап. Терноп. нац. пед. у-ту. Сер.: Біологія*. 2015. Т. 64, № 3—4. С. 579—583.
8. Романенко О.В., Крот Ю.Г., Красюк Ю.М., Коновець І.М. Особливості адаптивних реакцій *Unio tumidus* та *Unio pictorum* (Unionidae) при підвищенні температури води в умовах мікрокосму. *Гідробіол. журн.* 2023. Т. 59. № 1. С. 39—53.
9. Цыцугина В.Г., Поликарпов Г.Г. Идентификация «критических» видов гидробионтов в связи с проблемой оценки экологического риска. *Доп. НАН України*. 2005. № 7. С. 196—200.
10. AnvariFar H., Amirkolaie A.K., Miandare H.K. et al. Apoptosis in fish: environmental factors and programmed cell death. *Cell Tissue Res*. 2017. Vol. 368. P. 425—439. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2548-x>
11. Arkhipchuk V.V., Garanko N.N. A novel nucleolar biomarker in plant and animal cells for assessment of substance cytotoxicity. *Environ. Toxicol.: An Intern. J.* 2002. Vol. 17. N 3. P. 187—194. <https://doi.org/10.1002/tox.10056>
12. Bacela K., Konopacka A. The life history of *Pontogammarus robustoides*, an alien amphipod species in Polish waters. *J. Crustacean Biol.* 2005. Vol. 25, N 2. P. 190—195. <https://doi.org/10.1651/C-2519>
13. Baker E., Dettloff K., Li J. *Pontogammarus robustoides* (G.O. Sars, 1894): U.S. Geological Survey, Nonindigenous Aquatic Species Database, Gainesville, FL, and NOAA Great Lakes Aquatic Nonindigenous Species Information System, Ann Arbor, MI, 2021. <https://nas.er.usgs.gov/queries/greatlakes/FactSheet.aspx?SpeciesID=24&Potential=Y&Type=2>
14. Barabanova L., Galkina S., Mikhailova E. Cytogenetic study on the invasive species *Gmelinoides fasciatus* in the ecosystem of the Gulf of Finland. *J. Marine Biological Association of the United Kingdom*. 2019. Vol. 99, N 3. P. 611—618. DOI:10.1017/S0025315417001357
15. Bellmann K., Charette S. J., Nadeau P. J. et al. The mechanism whereby heat shock induces apoptosis depends on the innate sensitivity of cells to stress. *Cell Stress and Chaperones*. 2010. Vol. 15. P. 101—113. DOI 10.1007/s12192-009-0126-9
16. Benton T.G., Solan M., Travis J.M.J., Sait S.M. Microcosm experiments can inform global ecological problems. *Trends in Ecology & Evolution*. 2007. Vol. 22, N 10. P. 516—521. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.08.003>
17. Boulon S., Westman B. J., Hutte S. et al. The nucleolus under stress. *Molecular cell*. 2010. Vol. 40, N 2. P. 216—227.
18. Brangwynne C.P., Mitchison T.J., Hyman A.A. Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in *Xenopus laevis* oocytes. *Proceed. of the National Academy of Sciences*. 2011. Vol. 108, N 11. P. 4334—4339. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017150108>
19. CABI. *Pontogammarus robustoides* / Invasive Species Compendium. Wallingford, UK: CAB International. 2021. www.cabi.org/isc
20. Coleman C.O. Karyological studies in amphipoda (Crustacea). *Ophelia*. 1994. Vol. 39, N 2. P. 93—105. <https://doi.org/10.1080/00785326.1994.10429537>
21. Di Donato G., De Mattheis E., Ronci L., Setini A. Genotoxicity biomarkers in the amphipod *Gammarus elvirae* exposed in vivo to mercury and lead, and basal levels of DNA

- damage in two cell types. *Chemistry and Ecology*. 2016. Vol. 32, N 9. P. 843—857. DOI:10.1080/02757540.2016.1201078
22. Di Tuccio V., De Luca P., Romano G. Programmed Cell Death in Sea Urchins: A Review. *J. Mar. Sci. Eng.* 2023. Vol. 11. P. 956. <https://doi.org/10.3390/jmse11050956>
23. Dobson M. Identifying Invasive Freshwater Shrimps and Isopods. Freshwater biological association. London, UK : DEFRA, 2012. 30 p. www.secure.fera.defra.gov.uk
24. Dubnyak S.S. Study of water currents in the shallow-water zones of the Dnieper Reservoirs. *Hydrobiol. J.* 1999. Vol. 35, N 2. P. 131—137. DOI:10.1615/HydrobJ.v35.i2.100
25. Florou H., Tsytugina V., Polikarpov G. G. et al. H. Field observations of the effects of protracted low levels of ionizing radiation on natural aquatic population by using a cytogenetic tool. *J. Environ. Radioactivity*. 2004. Vol. 75, N 3. P. 267—283. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2004.01.003>
26. Grabowski M. NOBANIS — Invasive Alien Species Fact Sheet — *Pontogammarus robustoides*. Online Database of the European Network on Invasive Alien Species — NOBANIS. 2011. www.nobanis.org/files/factsheets/Pontogammarus_robustoides.pdf
27. Horton T., Lowr J., De Broyer C. World amphipoda database. 2017. Available from: <https://www.marinespecies.org/amphipoda/aphia.php?p=taxdetails&id=490104>
28. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method, *Experientia*. 1980. Vol. 36. P. 1014—1015. <https://doi.org/10.1007/BF01953855>
29. Lacaze E., Devaux A., Jubeaux G. et al. DNA damage in Gammarus fossarum sperm as a biomarker of genotoxic pressure: intrinsic variability and reference level. *Science of the total environment*. 2011. Vol. 409, N 17. P. 3230—3236. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.05.012>
30. Libertini A., Rampin M. A molecular cytogenetic study on some Icelandic amphipods (Crustacea) by fluorescence in situ hybridization (FISH). *The Open Zoology J.* 2009. N 2. P. 109—116. DOI: 10.2174/1874336601002009109
31. Libertini A., Trisolini R., Rampin M. Chromosome number, karyotype morphology, heterochromatin distribution and nuclear DNA content of some talitroidean amphipods (Crustacea: Gammaridea). *Europ. J. Entomology*. 2008. Vol. 105, N 1. P. 53—58. DOI: 10.14411/eje.2008.007
32. Marko J.F. The liquid drop nature of nucleoli. *Nucleus*. 2012. Vol. 3, N 2. P. 115—117.
33. Perkins D.M., McKie B.G., Woodward G. Environmental warming and biodiversity-ecosystem functioning in freshwater microcosms: partitioning the effects of species identity, richness and metabolism. *Advances in ecological research*. 2010. Vol. 43. P. 177—209. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385005-8.00005-8>
34. Pligin Y.V., Matchinskaya S.F., Zhelezny N.I., Linchuk M.I. Long-term distribution of alien species of macroinvertebrates in the ecosystems of the Dnieper reservoirs. *Hydrobiol. J.* 2014. Vol. 50, N 2. P. 3—17. DOI: 10.1615/HydrobJ.v50.i2.10
35. Pligin Yu.V. Long-term changes in the composition and in the quantitative indices of the development of macrozoobenthos of the Kiev reservoir. *Ibid.* 2009. Vol. 45, N 1. P. 16—31. <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v45.i1.20>
36. Romanenko V.D., Krot Yu.G., Lekontseva T.I., Podrugina A.B. Resistance of gammarids *Pontogammarus robustoides* and *Chaetogammarus ischnus* (Crustacea: Amphipoda) to elevation of temperature of the aquatic medium. *Ibid.* 2014. Vol. 50, N 3. P. 55—63. <https://doi.org/10.1615/hydrobj.v50.i3.60>
37. Romanenko V.D., Krot Yu.G., Lekontseva T.I., Podrugina G.B. Peculiarities of adaptation of Gammaridae of the reservoirs' littoral zone to water temperature increase. *Ibid.* 2020. Vol. 56, N 3. P. 3—12. <https://doi.org/10.1615/HydrobJ.v56.i3.10>
38. Romanenko V.D., Krot Yu.G., Lekontseva T.I. et al. Resistance of gammarids *Pontogammarus robustoides* (Sars) (Crustacea: Amphipoda) to winter temperature of the water medium. *Marine Ecol. J.* 2014. Vol. 13, N 2. P. 63—69.

39. Romanenko V., Romanenko O., Krot Y., Podruhina A. Peculiarities of the *Pontogammarus robustoides* (Amphipoda, Gammaridae) adaptive reactions to the water temperature increasing in the model ecosystem — microcosm. *Turkish J. Fisheries and Aquat. Sci.* 2021. Vol. 21. P. 365—374. http://doi.org/10.4194/1303-2712-v21_8_01
40. Ronci L., De Matthaeis E., Chimenti C., Davolos D. Arsenic-contaminated freshwater: Assessing arsenate and arsenite toxicity and low-dose genotoxicity in *Gammarus elvirae* (Crustacea; Amphipoda). *Ecotoxicology*. 2017. Vol. 26, N 5. P. 581—588. DOI:10.1007/s10646-017-1791-6
41. Stewart R.I. A., Dossena M., Bohan D. A. et al. Mesocosm Experiments as a Tool for Ecological Climate-Change Research. *Advances in Ecological Research*. 2013. Vol. 48. P. 71—181. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417199-2.00002-1>
42. Thiry M., Lamaye F., Lafontaine D. The nucleolus: when two became three. *Nucleus*. 2011. Vol. 2, N 4. P. 289—293.
43. Tsytugina V. Ecological risk assessment to benthic biocenoses. *Radiobiology and Environmental Security*. 2012. P. 297—308.
44. Woodward G., Perkins D.M., Brown L.E. Climate change and freshwater ecosystems: impacts across multiple levels of organization. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2010. Vol. 365. P. 2093—2106. <http://doi.org/10.1098/rstb.2010.0055>

Надійшла 28.03.2023

M.T. Goncharova, PhD (Biol.), Senior Researcher,
Institute of Hydrobiology of the NAS of Ukraine
Volodymyr Ivasyuk Avenue, 12, Kyiv, 04210, Ukraine
e-mail: mariyagonch83@gmail.com
ORCID 0000-0003-3891-4572

O.V. Romanenko, Dr. Sci. (Biol.), Prof., NAS Full Member, Head of Department,
Bogomolets National Medical University,
Peremogy avenue, 34, Kyiv, 03057, Ukraine
e-mail: alexrom@i.com.ua

L.S. Kipnis, PhD (Biol.), Senior Researcher, Senior Researcher,
Institute of Hydrobiology of the NAS of Ukraine
Volodymyr Ivasyuk Avenue, 12, Kyiv, 04210, Ukraine
e-mail: ecos_inhydro@ukr.net
ORCID 0000-0002-4008-5120

Yu.G. Krot, PhD (Biol.), Senior Researcher, Head of Department,
Institute of Hydrobiology of the NAS of Ukraine
Volodymyr Ivasyuk Avenue, 12, Kyiv, 04210, Ukraine
e-mail: yuriikrot@ukr.net
ORCID 0000-0001-8732-1322

Yu.O. Stoyka, Junior Researcher,
Institute of Hydrobiology of the NAS of Ukraine
Volodymyr Ivasyuk Avenue, 12, Kyiv, 04210, Ukraine
e-mail: julista75@gmail.com
ORCID 0000-0003-0485-7493

CYTOGENETIC EFFECTS OF INCREASED TEMPERATURES ON THE
CRUSTACEANS *PONTOGAMMARUS ROBUSTOIDES* (AMPHIPODA,
GAMMARIDAE) IN MICROCOSM EXPERIMENT

Adaptive responses at the cellular level of *Pontogammarus robustoides*, representatives of family Gammaridae, have been studied in conditions of elevated water temperature to critical values in the model ecosystem — the microcosm. Cytogenetic analysis of their embryonic cells was carried out and nuclear activity of somatic cells was investigated. It showed that the normal development of *P. robustoides* embryo cells was observed at the

temperature range of 25.0 — 27.5 °C. Increasing of temperature to 30.0—30.5 °C caused structural and functional alterations: the chromosomes aberration and micronuclei frequency increased to the levels close to critical due to the long-term effect of these temperatures. The number of embryonic cells with nuclear fragmentation increases, which is evidence of the development of processes aimed at apoptosis. At a temperature of 32 °C, the destruction of cellular structures of embryos is observed. In somatic cells, an increase in the total volume of nucleoli was noted, which is an indicator of increased synthesis of proteins that probably take part in the adaptation process. Lowering the water temperature to the initial level of 25 °C helps to restore the structural and functional parameters of the gamarid genome, however, a high number of cell division disorders is still observed against the background of a significant decrease in the level of micronuclei.

Keywords: *gammarids, Pontogammarus robustoides, temperature, cytogenetic analysis, adaptive responses, microcosm.*