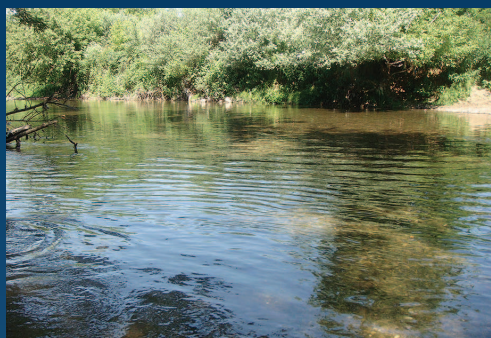


Генетичните биомаркери са подходящи за създаване на бърза, широко обхватна и ефективна мониторинг система, отчитаща геномния отговор на природните популации на моделни растителни и животински видове спрямо настъпили промени в околната среда. Днес те широко се използват при оценка влиянието на различни замърсители върху биоразнообразието, структурата и функцията на водни и сухоzemни екосистеми.

За определяне на екологичния риск в природни популации на зоомониторни видове безгръбначни и гръбначни животни в настоящата разработка се представят цитогенетични и молекулярни биомаркери, отчитайки тяхното теоретично и приложно значение. Установената различна чувствителност към стрес условията на околната среда позволява създаването на интегрирана Геномна Биомаркерна Тест Система (ГБТС) за оценка въздействието на различни замърсители, увреждащи човешкото здраве и оказващи вреден ефект върху околната среда. Получените резултати при използването на зоомониторни видове от семейства Chironomidae (Diptera), Muridae и Arvicolidae (Mammalia, Rodentia) могат да бъдат успешно използвани за създаване, развитие и прилагане на бърза и ефективна методика за оценка на екологичния риск, която да се включи в Националната система за биомониторинг на България.



Genome biomarkers are the basis for fast, comprehensive and effective monitoring system, taking into account the genome response of the natural populations of model plant and animal species to the environmental changes. Today they are widely used in the assessment of the environmental pollution impact on the biodiversity in the water and terrestrial ecosystems.

The present study provides cytogenetic and molecular biomarkers considering their theoretical and applied significance for environmental risk assessment in natural populations of invertebrate and vertebrate zoomonitoring species. The observed sensitivity to the environmental stress agents differs for the examined species. Well distinguished molecular and cytogenetic markers were found only in the zoomonitoring species of the families Chironomidae (Diptera), Muridae and Arvicolidae (Mammalia, Rodentia). These allow the creation of an integrated Genome Biomarker Test System (GBTS) for risk assessment of different pollutants, affecting the human health and the environment. The results received could be used as a basis for development of a fast and effective method for environmental risk assessment for the purposes of the National system for monitoring in Bulgaria.



ГЕНОМНА БИОМАРКЕРНА ТЕСТ СИСТЕМА

ГЕНОМНА БИОМАРКЕРНА ТЕСТ СИСТЕМА

ГЕНОМНА БИОМАРКЕРНА ТЕСТ СИСТЕМА ЗА ОЦЕНКА СЪСТОЯНИЕТО НА ЕКОЛОГИЧНИЯ РИСК

GENOME BIOMARKER TEST SYSTEM FOR ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT



Параскева Михайлова, Ценка Часовникарова, Юлия Илкова,
Снежана Грозева, Драган Чобанов, Елжбиета Вархаловска-Шлива,
Николай Симов, Наско Атанасов, Весела Митковска, Христо Димитров

Paraskeva Michailova, Tsenka Chassovnikarova, Julia Ilkova, Snejana Grozeva,
Dragan Chobanov, Elzbieta Warchałowska-Śliwa, Nikolay Simov,
Nasko Atanassov, Vesela Mitkovska, Hristo Dimitrov

**ГЕНОМНА БИОМАРКЕРНА ТЕСТ СИСТЕМА
ЗА ОЦЕНКА СЪСТОЯНИЕТО
НА ЕКОЛОГИЧНИЯ РИСК**

**GENOME BIOMARKER TEST SYSTEM
FOR ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT**

ГЕНОМНА БИОМАРКЕРНА ТЕСТ СИСТЕМА ЗА ОЦЕНКА СЪСТОЯНИЕТО НА ЕКОЛОГИЧНИЯ РИСК

*Параскева Михайлова, Ценка Часовникарова, Юлия Илкова,
Снежана Грозева, Драган Чобанов, Елжбиета Вархаловска-Шлива, Николай
Симов, Наско Атанасов, Весела Митковска, Христо Димитров*



Sofia–Moscow

2013

ГЕНОМНА БИОМАРКЕРНА ТЕСТ СИСТЕМА ЗА ОЦЕНКА СЪСТОЯНИЕТО НА ЕКОЛОГИЧНИЯ РИСК
GENOME BIOMARKER TEST SYSTEM FOR ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT

Параскева Михайлова¹, Ценка Часовникова¹, Юлия Илкова¹, Снежана Грозева¹, Драган Чобанов¹, Елжбиета Вархаловска-Шлива⁴, Николай Симов², Наско Атанасов¹, Весела Митковска³, Христо Димитров³

¹ Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания, Българска Академия на Науките

² Национален природонаучен музей, Българска Академия на Науките

³ Пловдивски Университет „Паисий Хилендарски“

⁴ Институт по систематика и еволюция на животните, Полска Академия на Науките

Рецензент: доцент д-р Маргарита Топашка-Анчева

Редактори: Параскева Михайлова, Снежана Грозева

ISBN 978-954-642-708-3

© PENSOFT *Publishers*

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior written permission of the copyright owner.

Pensoft Publishers

12 Prof. Georgi Zlatarski Street

1700 Sofia, Bulgaria

Fax: +359-2-8704282

info@pensoft.net

www.pensoft.net

Printed in Bulgaria, December 2013

Книгата е подготвена и се издава по проект
“Нова интегрирана геномна биомаркерна тест система при моделни без-
гръбначни и гръбначни животни за оценка на състоянието за околната среда“

(ДО-02-259/2009-2012),

финансиран от Фонд „Научни изследвания“,
Министерство на образованието, младежта и науката в Р България



Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания, БАН



СЪДЪРЖАНИЕ

Въведение.....	10
Цитирана литература.....	16
 1. Молекулярно-генетични биомаркери при бозайници, използвани в зоомониторинга	21
1.1. Значение на дребните бозайници като зоомониторни видове за оценка на екологичния риск	21
1.2. Характеристика на използваните молекулярни и цитогенетични биомаркери при дребни бозайници за оценка на екологичния риск	23
1.2.1. Микроядрен тест.....	23
<i>In vivo</i> микроядрен тест.....	23
1.2.2. Кометен анализ.....	26
1.2.3. Хромозомни аберации.....	28
1.3. Прилагане на молекулярни и цитогенетични методи при оценка на екологичния риск <i>in situ</i> в популации на дребни бозайници.....	30
1.3.1. Райони за изследване	31
1.3.2. Изследвани видове	34
1.3.3. Резултати, получени при микроядрения тест.....	34
1.3.4. Установяване на директния отговор на генома чрез кометен анализ.....	40
1.3.5. Резултати от изследване на хромозомните аберации	43
1.4. Заключение за ефективността от прилагането на молекулярни и цитогенетични методи при дребните бозайници като зоомониторни видове	45
1.5. Протоколи	46
1.5.1. Полеви методи за улов на дребни бозайници	46
1.5.2. Протокол „Микроядрен тест“	46
Необходимо оборудване.....	46
Методика.....	47
Отчитане на микроядрата	47
Статистическа оценка.....	48
1.5.3. Протокол „Кометен анализ“	48
Неоходимо оборудване	48
Оцветяване на стъклата.....	49
Отчитане на кометите	49
Статистически показатели за оценка.....	50
1.5.4. Протокол „Хромозомни аберации в костномозъчни клетки на бозайници“	51
Необходимо оборудване.....	51
Начин на пробовземане	51
Предварителна обработка на пробите	52
Подготовка на материала за изготвяне на препарати	52
Съхраняване и трайност на пробите.....	53
Изготвяне на цитогенетични препарати за микроскопски анализ.....	53
Методи за анализ.....	53
Режим на пробовземане.....	54

Статистически методи.....	54
1.6. Цитирана литература.....	54

2. Политенни хромозоми при сем. Chironomidae, Diptera и тяхното значение за биомониторинга.....	60
2.1. Значение на семейство Chironomidae за биомониторинговите изследвания	60
2.2. Биомаркерни показатели	63
2.2.1. Външно-морфологични изменения (малформации) в ларвите на видове от сем. Chironomidae, критерий за оценка на замърсяването в околната среда.....	63
2.2.2. Геномни изменения на видове от сем. Chironomidae, критерий за оценка на замърсяването в околната среда.....	65
2.2.2.1. Геномна нестабилност при видове от сем. Chironomidae, реализирана на цитогенетично ниво	66
2.2.2.2. Геномна нестабилност при моделни видове от сем. Chironomidae, реализирана на биохимично ниво.....	84
2.3. Значение и приложение на установените геномни изменения при сем. Chironomidae	85
2.4. Заключение. Оценка на геномния „отговор“ при сем. Chironomidae в резултат от действието на различни токсиканти в околната среда.	86
2.5. Протокол.....	88
2.5.1. Събиране на ларвен материал от сем. Chironomidae и отглеждане на моделния вид <i>Chironomus riparius</i> Mg.	88
2.5.2. Определяне възрастта и пола на ларвите по морфологични признаци	89
2.5.3. Определяне на рода и вида.....	89
2.5.4. Слюнчени политенни хромозоми	90
Ацеторсеиново оцветяване.....	90
Необходимо оборудване за лабораторната работа.....	90
Диференциално оцветяване на политенни хромозоми (C-banding)	90
Необходимо оборудване и реактиви.....	92
Флуоресцентна <i>in situ</i> хибридизация (FISH)	93
Необходимо оборудване и реактиви.....	93
Стандартни хромозомни карти	93
2.5.5. Анализ на структурно-хромозомните и функционални изменения в политенните хромозоми.....	94
2.5.6. Биохимични методи	96
2.5.7. Химичен анализ.....	97
2.5.8. Статистически методи.....	97
2.6. Цитирана литература.....	98

3. Холокинетични хромозоми при Heteroptera - обща характеристика и възможности за използване в биомониторинга	104
3.1. Значение на хетероптерите като зоомониторни видове за оценка на екологичния риск	104
3.2. Характеристика на използваните молекулярно-цитогенетични методи за оценка на екологичния риск.....	105

3.3. Резултати от прилаганите методи.....	107
3.4. Заключение за ефективността на прилаганите методи	108
3.5. Протоколи за работа с холокинетични хромозоми	109
3.5.1. Моделни обекти	109
3.5.2. Събиране.....	109
Необходимо оборудване за полевата работа.....	110
Лабораторна работа	110
Необходимо оборудване за лабораторна работа	110
3.5.3. Анализ на холокинетичните хромозоми	111
Рутинно оцветяване.....	111
С-метод за диференциално оцветяване с цел локализиране и анализ на конститутивния хетерохроматин в холокинетичните хромозоми.....	111
Необходимо оборудване и реактиви	111
Метод за <i>in situ</i> хибридизация (FISH) с клонове от 18s рДНК или теломерни повтори (TTAGG) и анализ на локализацията им в холокинетичните хромозоми	112
Необходимо оборудване и реактиви	112
Dot-blot анализ	113
3.6. Цитирана литература.....	114
4. Цитогенетични биомаркери за оценка на екологичния риск при правокрили насекоми (Разред Orthoptera).....	116
4.1. Значение на правокрилите насекоми за биомониторинга	116
4.2. Избор на моделните обекти и прилаганите биомаркерни системи	117
Методични подходи	118
4.3. Резултати.....	119
4.3.1. Съдържание на йони на тежки метали в пробите от дългопипални скакалци ..	119
4.3.2. Съдържание на йони на тежки метали в пробите от късопипални скакалци	121
4.3.3. Влияние на съдържанието на йони на тежки метали върху кариологичните характеристики на изследваните видове	123
4.4. Закljučения.....	127
4.5. Протокол.....	129
4.6. Цитирана литература.....	130
Списък на статиите на авторите, в които са публикувани представените резултати.	
Изнесени доклади и защитени дисертации	131

Въведение

Параскева Михайлова, Ценка Часовникарова, Юлия Илкова, Снежана Грозева, Драган Чобанов, Елжбиета Вархаловска-Шлива, Николай Симов, Наско Атанасов, Весела Митковска, Христо Димитров

Замърсяването на околната среда е един от важните национални и световни проблеми. В резултат на засиления антропогенен натиск днес биосферата се превръща от самоуправляваща се природна система в система, включваща и отразяваща антропогенния натиск. Възникналите в биосферата изменения могат да доведат до необратими нарушения на екологичното равновесие, до промени в структурата и функцията на екосистемите, до изменения в биоразнообразието и редица преки вредни въздействия върху човека и заобикалящата го околна среда.

Една от важните задачи на нашето общество е да вземе своевременно конкретни мерки за опазване и съхраняване на природното богатство, както в национален, така и в световен аспект.

Биомониторинговите изследвания в България започват още през 80-те години на миналия век. Страната ни е член на Глобалната Система за мониторинг на околната среда и през 1999 г., в рамките на програмата PHARE у нас се разработва „Национална програма за биомониторинг на България“. В нея според типа на екосистемите и характера на замърсителите се определят 19 контролни (фонови) и 95 импактни (замърсени) района в страната. Описани са и методи за биологичен мониторинг, чрез които се оценяват условията за развитие на растителния и животински свят при различни нива на замърсяване.

Екотоксикологичните изследвания в областта на сухоземния и хидробиологичен зоомониторинг обхващат главно проучвания върху влиянието на различни замърсители от околната среда на популационно, биоценотично и екосистемно ниво (Forbes and Forbes 1994). Съществуват различни методи за директно оценяване на нарушенията в съобществата: Invertebrate Community Index, Index of Biotic Integrity и др. (Stokes and Marafante 1998). Мониторингът на околната среда и оценката на състоянието на сладководните басейни и сухоземните биотопи са насочени както към анализ на натрупването на замърсителите в околната среда и живите организми, така и към изследване структурата на съобществата им. Подобни „класически“ биомониторингови методи обаче не позволяват

формулирането на точни заключения за комплексното влияние на средата върху живите организми. Оценката на биоразнообразието например, характеризира качеството на околната среда, но не изследва влиянието на замърсяването върху организмите. Биоаккумуляцията и разпространението на тежките метали и други токсични елементи в органите и тъканите на индивидите не дава отговор за специфичното въздействие на тези елементи върху техните жизнени функции, за наличието на компенсаторни механизми и адаптационната способност на видовете към определени стрес-условия. Подобни изследвания дават оскъдна информация, която е неясна, противоречива и недостатъчна.

По-късно е установена и неефективността на тези традиционни подходи при оценка хроничното въздействие на ниски концентрации на ксенобиотици върху различни организми и при откриване на първичните биологични отговори. Затова се предлага проследяване на дългосрочните въздействия на замърсителите на ниво индивид (Newman and Jagoe 1996), където влиянието може да бъде подробно описано и оценено.

В България съществуват редица изследвания на цитогенетично, молекулярно и биохимично ниво, които ни позволяват да предложим нова интегрирана тест система за разкриване реакцията на генома при определени моделни видове безгръбначни и гръбначни животни в резултат на антропогенно повлияване. Повече от 250 вида насекоми от разредите Orthoptera, Homoptera, Heteroptera и Diptera са изследвани в цитотаксономичен аспект (Michailova 1989, Michailova et al. 2005, 2013, Grozeva and Kuznetsova 1993, Grozeva 1995, Warchałowska-Śliwa 1998, Grozeva and Nokkala 1996, 2003, Grozeva et al. 2006, 2007, 2009, 2013). Описани са различни цитогенетични маркери, които дават възможност да се идентифицират отделни видове насекоми (Michailova 1989, Michailova 1994, Michailova et al. 2007, Grozeva and Nokkala 1996, Grozeva et al. 2004, Kuznetsova et al. 2004, Grozeva et al. 2006, 2007, 2013). Някои от тези видове са предложени за моделни за целите на генотоксикологията (Michailova et al. 2012aб), а техният геном се използва за проследяване въздействието на редица антропогенни замърсители (радиация, йони на тежки метали и др.) и се получава директна информация за токсичния ефект върху отделни индивиди, което е основа за прогнозиране на различни молекулярни и цитогенетични изменения в популациите на тези моделни видове (Michailova and Petrova 1991, Warchałowska-Śliwa and Maryańska-Nadachowska 1991; Michailova et al. 1996; 2000, 2009, 2010,

2012aб, Warchałowska-Śliwa et al. 2003, 2005; Grozeva 2004, Chassovnikarova et al. 2010, Grozeva et al. 2011, Kuznetsova et al. 2011, Simov et al. 2012, Mitkovska et al. 2012a, b).

Дребните бозайници също могат се използват за контролиране промените в състоянието на екосистемите и оценка на тяхното възстановяване. Редица изследвания показват, че дребните бозайници акумулират широк спектър от замърсители, присъстващи в екосистемите (Topashka-Ancheva et al. 1998, 2003б, Gerasimov et al. 1997, Talmage and Walton 1991). Установени са определени връзки между радиоактивността (Iovchev et al. 1995, 1996, 1997), замърсяването с тежки метали (Metcheva et al. 1995, 1997, Gerasimov et al. 1997, Chassovnikarova et al. 2005) и генетичните увреждания при свободно живеещи гризачи (Topashka-Ancheva et al. 1992, 1993; 2003а, Atanasov 1997, Ninova et al. 2004, Chassovnikarova et al. 2004, Chassovnikarova et al. 2010, Mitkovska et al. 2012ab).

Въпреки наличието на множество изследвания на моделни видове безгръбначни и гръбначни животни, в България все още липсва единна Интегрирана Геномна Биомаркерна Тест Система (ИГБТС) за оценка на комплексното влияние на замърсяването в околната среда.

Установено е, че понастоящем се използват около 80000 химични вещества и средно годишно се внедряват около 3000 нови (Ота 1995). Индустриални, битови и селскостопански отпадъци се изхвърлят безразборно във водните и сухоземни екосистеми. Голяма част от тях са в разтворено състояние и се утаяват в седимента на водни басейни или се натрупват в отделни звена на хранителните вериги в екосистемите. Затова контролът върху последствията от влиянието на индустриалните и битови отпадъци, изхвърляни в околната среда, е от голямо значение.

В последните години в Европа се проведеха редица проучвания за оценка състоянието на околната среда (Ecological Risk Assessment - ERA). Голям брой международни институции, като Организацията за икономическо сътрудничество и развитие (OECD), Световната здравна организация (WHO) и Европейският Център по Екотоксикология и Токсикология на химичните вещества (ECETOC) насочват своите усилия за развитието на методология за оценка на риска от химично замърсяване. Комисията по околната среда на Европейския съюз определя оценката на риска от антропогенно замърсяване като главен подход в изследванията, посветени на изучаването и опазването на околната среда.

Досегашният подход за оценка на измененията в околната среда чрез мониторинг на замърсителите и видовото разнообразие е неефективен, скъп и бавен. За да се опази околната среда и да се гарантира здравето на хората в оценката на екологичния риск трябва да се развият и усъвършенстват нови методи и подходи за откриване и контролиране на замърсителите в околната среда, да се търсят нови предупредителни показатели, които да отразяват най-ранния „отговор“ на организмите на влиянието на замърсителите.

Използването на различни биомаркери е относително нов подход за оценка състоянието на околната среда в България и Европа. Биомаркерите са биологичен отговор на „стрес-агентите“ в околната среда, които позволяват оценка на токсичен ефект (Stokes and Marafante 1998). Биомаркери могат да са гени, белтъци, метаболити или липиди, представляващи уникален и възпроизводим модел на молекулярни изменения в организма, резултат от стрес въздействия в околната среда. Нещо повече, биомаркерите на ниските нива на биологична организация дават директно доказателство за въздействие на химичните стрес-фактори и имат предимството да бъдат относително чувствителни и специфични към определен стрес-фактор, така че да послужат като своевременен ранен предупреждаващ индикатор за настъпили увреждания на биологичните видове и извеждането им от нормалното състояние. Следователно биомаркерите могат да послужат за основа на много бърза, широко обхватна и ефективна мониторинг система от биологични показатели, отчитаща бързо влиянието на замърсителите в средата.

В наши дни в екотоксикологията добре се приема използването на биомаркерния подход като успешен и информативен метод за установяване и документиране на въздействието от замърсяването на околната среда.

Използването на биомаркерите в екологичния мониторинг цели установяването на възникнали нарушения на организмово ниво и избягването на нежелателните и необратими последствия на повисоките нива на биологична организация. За тази цел е необходимо да се направят различни изследвания на цитогенетично или молекулярно ниво при отделни индивиди, при които възникват определени реакции, индуцирани от токсични фактори. Реалистична оценка на продължителното въздействие на замърсяването може да бъде получена, когато изследванията включват оценяване на мутагенните агенти върху

организми, обитаващи естествени (природни) биотопи. Изключително важен в този случай е изборът на най-информативния метод и подходящи групи биоиндикаторни организми. Понастоящем насекомите се използват често като тест обект, поради техните специфични характеристики: изключително голямо видово разнообразие, висока чувствителност към различни химични вещества, кратък жизнен цикъл, възможност някои от видовете да се отглеждат при стандартни лабораторни условия (Walker et al. 1998). Дребните бозайници също притежават характеристики на добри биоиндикатори: реагират на стрес-въздействия в околната среда, като интензивността на настъпилите промени в организма корелира с интензивността на стрес-факторите. Тези изменения са биологично важни и се появяват достатъчно рано, за да се предотвратят катастрофални последствия.

В последните години във връзка с проследяване нарушенията в структурата на екосистемите и вземане на определени мерки, особено внимание се обръща на генетичните последствия от замърсяването на околната среда и използването на определени моделни биологични групи за оценка състоянието на околната среда. Особено внимание се обръща на използването на определени биомаркерни системи за целите на екологичния мониторинг.

При настоящото изследване се обединяват разнообразни методични подходи за биомониторинг, включващи две широко разпространени групи животни: насекоми и дребни бозайници-предимно гризачи, обитаващи водни и сухоземни екосистеми. Апробирани са различни геномни биомаркери за оценка на замърсителите в двете екосистеми, които се различават по разнообразие на хабитатите си, начина на използване на природните ресурси, тип на замърсяване и процес на трансформация на замърсителите в тях (Схема 1). От получените резултати се установява различната геномна чувствителност на отделните групи насекоми и дребни бозайници, като се наблюдава значима чувствителност на генома при двукрилите насекоми от сем. Chironomidae, Diptera, както и при видове дребни гризачи (разред Rodentia) от сем. Muridae и сем. Cricetidae.

Имайки предвид значението на биомаркерните системи за оценка състоянието на околната среда в настоящата разработка се представят геномни биомаркери на молекулярно и цитогенетично ниво при безгръбначни – някои групи насекоми и гръбначни животни – групи дребни бозайници, чието прилагане позволява изграждане на интегрирана

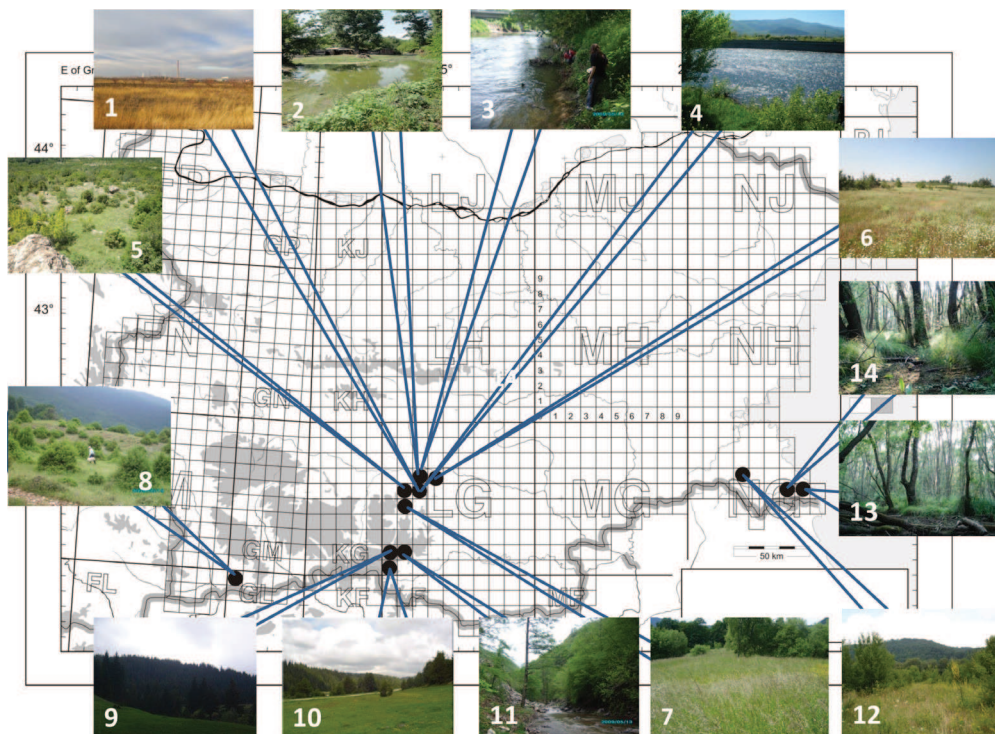


Схема 1. Изследвани биотопи.

1. Комбинат за обогатяване на цветни метали – Пловдив и неговите околности, включващи и лесозащитния пояс.
2. Водоем в стопански двор в близост до устието на река Чая.
3. Река Чая при устието ѝ.
4. Река Чая след Асеновград, преди вливането на замърсените води от КЦМ.
5. Склона на Родопите над с. Куклен - район със силно замърсяване, съседен на комбината за обогатяване на цветни метали КЦМ „Пловдив.
6. Тревисти и храстови местообитания между селата Поповица и Ахматово.
7. Тревисти и храстови местообитания в импактен район покрай пътя Асеновград-Смолян в землището на село Наречен, Родопите.
8. Тревисти и храстови местообитания в планината Алиботуш/Славянка в района на село Голешево.
9. Тревисти местообитания в района на село Проглед, Родопите.
10. Регионална фоновая станция „Астрономическа обсерватория Рожен“.
11. Река Чая над село Проглед, Родопите.
12. Тревисти и храстови местообитания в резерват „Средока“, Странджа.
13. Горски местообитания в резерват „Силкосия“, Странджа.
14. Горски местообитания в резерват „Лопушна“, Странджа.

геномна биомаркерна система за оценка въздействието на различни замърсители, увреждащи човешкото здраве и оказващи вреден ефект върху околната среда в България. Получените резултати при различните групи животни могат да бъдат успешно използвани за приоритетно определени замърсени водни и сухоземни райони и въз основа на тях да се създаде, развие и предложи бърза и ефективна методика за оценка на екологичния риск, която да се включи в Националната система за биомониторинг на България. При разработката на настоящия проект се установи различна чувствителност към стрес условията на околната среда при изследваните видове на цитогенетично и молекулярно-цитогенетично ниво.

Цитирана литература

- Atanassov N (1997) Morphophysiological and cytogenetical analyses of small rodents' biomonitor species from the regions of Pirdop and Regional Background Station „Rozen“ (Bulgaria). In: Peev D, Ammann A, Artinian C (Eds) Ecomonitoring in Rozen and Srednogorie – Bulgaria, 124–127.
- Chassovnikarova Ts, Mecheva R, Dimitrov K (2005) *Microtus guntheri* (Danford & Alston) – a monitor species for estimation of a polymetal dust emission influence. Belgian Journal of Zoology, 134: 27–30.
- Chasovnikarova Ts, Atanassov N, Ninova P, Russev G (2004) A biomonitoring method for complex mutagen's potential assessment of the environment in anthropogenic influenced regions. Forest idea 10(1): 155–160.
- Chassovnikarova Ts, Atanassov N, Kalaydzhieva V, Dimitrov H (2010) Micronucleus test from free living rodents as a biomarker for environmental stress *in situ*. Biotechnology and Biotechnological Equipment 24: 390–396.
- Forbes VE, Forbes TL (1994) Ecotoxicology in Theory and Practice. Chapman and Hall Publishers, London, UK, 247 pp.
- Gerasimov S, Yurukova L, Atanassov N (1997) Results of biomonitoring investigations in Regional Background Stations in Bulgaria. Ecologija (Beograd) 32(1): 7–14.
- Grozeva SM (1995) Karyotypes, male reproductive system, and abdominal trichobothria of the Berytidae (Heteroptera) with phylogenetic considerations. Systematic Entomology, 20: 207–216.
- Grozeva S (2004) A model bug species *Oxycarenus lavaterae* (Insecta, Heteroptera, Lygaeidae) chronically treated with Pb ions. Acta entomologica bulgarica, 10(3): 19–27.
- Grozeva S, Kuznetsova VG (1993) Notes on the karyotypes of some lygaeid bugs (Heteroptera, Pentatomomorpha, Lygaeidae). Folia Biologica (Kraków) 41(3–4): 65–75.

- Grozeva S, Nokkala S (1996) Chromosomes and their meiotic behavior in two families of the primitive infraorder Dipsocoromorpha (Heteroptera). *Hereditas* 125: 31–36.
- Grozeva S, Nokkala S (2003) C-heterochromatin and extra (B) chromosome distribution in six species of the *Nabis* (Heteroptera, Nabidae) with the model male karyotype $2n=16+XY$. *Folia Biologica* 51(1–2): 13–21.
- Grozeva S, Kuznetsova VG, Nokkala S (2004) Patterns of chromosome banding on four nabid species (Heteroptera, Cimicomorpha, Nabidae) with high chromosome number karyotypes. *Hereditas* 140(2): 99–104.
- Grozeva S, Simov N, Josifov M (2007) Karyotaxonomy of some European *Macropsus* species (Heteroptera, Miridae). *Mainzer Naturwissenschaftliches Archiv/Beiheft* 31: 81–87.
- Grozeva S, Nokkala S, Simov N (2006) First evidence of sex chromosomes pre-reduction in male meiosis in the Miridae bugs (Heteroptera). *Folia Biologica (Kraków)* 54(1–2): 9–12.
- Grozeva S, Nokkala S, Simov N (2009) Chiasmate male meiosis in five species of water bugs from infraorders Nepomorpha and Gerromorpha (Insecta, Heteroptera). *Comparative Cytogenetics* 3(2): 125–131.
- Grozeva S, Kuznetsova VG, Anokhin B (2011) Karyotypes, male meiosis and comparative FISH mapping of 18S ribosomal DNA and telomeric (TTAGG) $_n$ repeat in eight species of true bugs (Hemiptera, Heteroptera) *Comparative Cytogenetics* 5 (4): 355–374.
- Grozeva S, Kuznetsova VG, Simov N, Langourov M, Dalakchieva S (2013) Sex chromosome pre-reduction in male meiosis of *Lethocerus patruelis* (Stål, 1854) (Heteroptera, Belostomatidae) with some notes on the distribution of the species. In: Popov A, Grozeva S, Simov N, Tasheva E (Eds) *Advances in Hemipterology*. *ZooKeys* 319: 119–135.
- Iovchev M, Metcheva R, Atanasov N, Apostolova M, Bogoeva L, Zivcov M, Rajkova-Petrova G, Karapetkova M (1995) Total beta-activity of indicator vertebrate species from Rila mountain. *Observatoire de Montagne de Moussala OM2*. 3: 20–24.
- Iovchev M, Metcheva R, Atanasov N, Apostolova M, Bogoeva L, Zivcov M, Rajkova-Petrova G, Belcheva M, Kashukeeva K (1996) Investigations of total beta-activity of indicator vertebrate species from National Park Rila. *Observatoire de Montagne de Moussala OM2*. 4: 38–43.
- Iovchev M, Metcheva R, Peev D (1997) Radiation monitoring: total beta activity of samples from the Rila mountain, Bulgaria. *Observatoire de Montagne de Moussala OM2*. 7: 174–180.
- Kuznetsova V, Grozeva S, Nokkala S (2004) New cytogenetic data on Nabidae (Heteroptera, Cimicomorpha), with discussion on karyotype variation and meiotic patterns and their taxonomic significance. *European Journal of Entomology* 101: 205–210.

- Kuznetsova VG, Grozeva S, Nokkala S, Nokkala C (2011) Cytogenetics of the true bug infraorder Cimicomorpha (Hemiptera, Heteroptera): a review. *ZooKeys* 154: 31–70.
- Metcheva R, Artinian A, Nikolova E, Beltcheva M, Laleva R (1997) Estimation of the environmental quality using monitor species small mammals from two regions with different anthropogenic influences in Bulgaria. In: *Ecomonitoring in Rozhen and Pirdop - Bulgaria*. Ministry of Environment; SDC-Swiss Agency for Development and Cooperation, 113–119.
- Metcheva R, Topalshka-Ancheva M, Atanasov N, Artinian A, Minkova V (1995) Bioaccumulation and distribution of toxic elements, hematological indices and chromosomal changes in the organisms of indicator species of small rodents from Rila Mountain. In: *Observatoire de Montagne de Moussala OM2*, 3: 203–211.
- Michailova P (1989) The polytene chromosomes and their significance for the systematics of family Chironomidae, Diptera. *Acta zoologica fennica* (Helsinki) 186: 1–107.
- Michailova P (1994) The role of heterochromatin in the speciation of family Chironomidae, Diptera. *Folia Biologica* (Kraków) 42(3–4): 79–87.
- Michailova P, Petrova N (1991) Chromosome polymorphism in geographically isolated populations of *Chironomus plumosus* L. (Chironomidae, Diptera). *Cytobios* (Cambridge) 67: 161–175.
- Michailova P, Szarek-Gwiazda E, Kownacki A (2009) Effect to contaminants on the genome of some species of genus *Chironomus* (Chironomidae, Diptera) live in sediments of Dunajec River and Czorsztyn Reservoir. *Water, Air and Soil Pollution*, 202: 245–258.
- Michailova P, Atanasov N, Ilkova J, Chassovnikarova T, Duran M, Karadurmus E (2010) Genome response of Model Invertebrates and Vertebrates species to stress agents in the Environment. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* EQ 24: 390–396.
- Michailova P, Sella G, Petrova N (2012a) Chironomids (Diptera) and their salivary gland chromosomes as indicators of trace metal genotoxicology. *Italian Journal of Zoology*, 79, 218 -230.
- Michailova P, Sella G, Petrova N (2012b) Polytene chromosomes of Chironomidae (Diptera) as a bioassay of trace-metal-induced genome instability. *Proceedings of the 18th International Symposium on Chironomidae*. *Fauna norvegica* 31: 227–234.
- Michailova P, Kownacki A, Langton P (2013) *Chironomus polonicus* sp. n. (Diptera: Chironomidae) from southern Poland. *Zootaxa* 3599(6): 564–576.
- Michailova P, Warchałowska-Śliwa E, Krastanov B, Kownacki A (2005) Cytogenetic variability in species of genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) from Poland. *Caryologia* (Firenze) 58(4): 345–358.

- Michailova P, Petrova P, Ramella L, Sella G, Todorova J, Zelano V (1996) Cytogenetic characteristics of *Chironomus riparius* Meigen, 1804 (Diptera, Chironomidae) from a polluted Po river station. *Genetica* (Hague) 98: 161–178.
- Michailova P, Petrova N, Bovero S, Caviccioli O, Ramella L, Sella G (2000) Effect of environmental pollution on the chromosomal variability of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera, Chironomidae) larvae from two Piedmont stations. *Genetica* (Hague) 108: 171–180.
- Michailova P, Ilkova J, Petrova N, Selvaggi A, Zampicinini GP, Sella G (2007) The relationship between chromosome rearrangements and repetitive DNA clusters in *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) from anthropogenically polluted Palaearctic regions. *Comparative Cytogenetics* 1(1): 45–49.
- Mitkovska V., T. Chassovnikarova, N. Atanasov, H. Dimitrov. (2012a) Environmental genotoxicity evaluation using a micronucleus test and frequency of chromosome aberrations in free-living small rodents. *J. BioSci. Biotech.* 1(1): 67–71.
- Mitkovska V. I., Ts. G. Chassovnikarova, N. I. Atanasov, H. A. Dimitrov. (2012b) DNA damage detected by Comet assay in *Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834) from Strandzha Natural Park. *Acta zoologica bulgarica*, 64 suppl. 4: 151–154.
- Newman MC, Jagoe CH (1996) *Ecotoxicology: A Hierarchical Treatment*, CRC Press New York.
- Ninova P, Chasovnikarova T, Luvchieva G, Atanasov N, Russev G (2004) Comparison of the ability of sister chromatid exchange test and comet assay to detect environmental mutagens. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, 57(7): 109–112.
- Ota US (1995) *Congress Screening and Testing Chemical in Commerce. OTA – BP-ENV 166*. Washington: Office of Technology Assessment, 1995.
- Simov N, Langourov M, Grozeva S, Gradinarov D (2012) New and interesting records of the alien true bugs (Hemiptera, Heteroptera) from Bulgaria. *Acta zoologica bulgarica* 64 (3): 241–252.
- Stokes W, Marafante E (1998) Introduction and Summary of the 13th Meeting of the Scientific Group on Methodologies for the Safety Evaluation of Chemicals (SGOMSEC): Alternative Testing Methodologies. *Environmental Health Perspectives* 106(2): 405–411.
- Talmage SS, Walton BT (1991) Small mammals as monitors of environmental contaminants. *Review of Environmental Contamination and Toxicology* 119: 47–108.
- Topashka-Ancheva M, Atanasov N, Metcheva R, Minkova V (1993) Effects of heavy metals on guenther's vole, *Microtus guentheri*. *Proceedings of the 2-nd International Symposium on Ecology, Bourgas (Bulgaria), September 1993*. Bulgarian Scientists Union, Bourgas Branch publishers, Bourgas, 2: 345–351.
- Topashka-Ancheva M, Metcheva R, Atanasov N (1998) Bioaccumulation and clastogenic effects of industrial dust on *Microtus guentheri* (Microtinae, Rodentia) in an ecologo–toxicological experiment. *Acta zoologica bulgarica*, 50: 117–122.

- Topashka-Ancheva M, Metcheva R, Teodorova S (2003a) A comparative analysis of the heavy metal loading of small mammals in different regions of Bulgaria II: Chromosomal aberrations and blood pathology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54: 188–193.
- Topashka-Ancheva M, Metcheva R, Teodorova S (2003b) Bioaccumulation and damaging action of polymetal industrial dust on laboratory mice *Mus musculus alba* II. Genetic, cell and metabolic disturbances. *Environmental Research* 92(2): 152–160.
- Topashka-Ancheva M, Metcheva R, Atanasov N, Belcheva R (1992) Bioaccumulation and chromosome aberrations investigations in two small rodents' species populations. Proceedings of International Symposium "Ecology '92", Bourgas (Bulgaria), September 1992. Bulgarian Scientists Union, Bourgas Branch publishers, Bourgas, 1: 338–343.
- Walker C, Kaiser K, Klein W, Lagadic L, Peakall D, Sheffield St, Soldan Th, Yasuno M (1998) 13th Meeting of the Scientific Group on Methodologies for the Safety Evaluation of Chemicals (SGOMSEC): Alternative Testing Methodologies for Ecotoxicity. *Environmental Health Perspectives* 106(2): 441–457.
- Warchałowska-Śliwa E (1998) Karyotype characteristics of katydids orthopterans (Ensifera, Tettigoniidae) and remarks on their evolution at different taxonomic levels. *Folia Biologica (Kraków)* 46: 143–177.
- Warchałowska-Śliwa E, Maryńska-Nadachowska A (1991) Chromosome aberration in a natural population of *Tetrix tenuicornis* (Sahlb.) (Tetrigidae: Orthoptera). *Folia biologica (Kraków)* 39: 5–15.
- Warchałowska-Śliwa E, Maryńska-Nadachowska A, Michailova P, Tchobanov D (2003) C-heterochromatin Pattern of Ten Species of Tetrigids (Tetrigidae, Orthoptera). *Folia Biologica (Kraków)* 51(1/2): 47–53.
- Warchałowska-Śliwa E, Niklinska M, Görlich A, Michailova P, Pyza E (2005) Heavy metal accumulation, heat shock protein expression and cytogenetic changes in *Tetrix tenuicornis* (L.) (Tetrigidae, Orthoptera) from polluted areas. *Environmental pollution* 133: 373–381.

1. Молекулярно-генетични биомаркери при бозайници, използвани в зоомониторинга

Ценка Часовникарова, Весела Митковска, Наско Атанасов, Христо Димитров

1.1. Значение на дребните бозайници като зоомониторни видове за оценка на екологичния риск

Свободно живеещите дребни гризачи и насекомоядни бозайници са най-често използвани като тест-обекти за антропогенно замърсяване. Те притежават всички необходими характеристики на добри зооиндикаторни видове: повсеместно разпространение, висока численост, r-тип репродуктивна стратегия, относително кратък жизнен цикъл, специфични предпочитания към условията на средата и сравнително малък индивидуален участък. Дребните бозайници са междинно звено в хранителните вериги и играят съществена роля в натрупването на токсични вещества в следващите трофични звена. Относително малкият размер на тялото им определя и високите нива на метаболизма им, което ги прави по-чувствителни като биоиндикаторни видове, тъй като в по-голяма степен са изложени на въздействието на замърсители в екосистемите в сравнение с по-едрите бозайници. Не на последно място дребните бозайници реагират на стрес-въздействията в околната среда, като интензивността на настъпилите промени в организма им корелира с интензивността на стрес-факторите.

Редица изследвания са показали, че дребните бозайници натрупват токсични вещества в тъканите и органите си, като моделите на акумулация и разпределението им са подобни на тези при хората. Ето защо, гризачите често се използват като моделни видове в екотоксикологията, тъй като резултатите могат най-лесно да се екстраполират при хората. Поради това и свободно живеещите дребни гризачи са подходящи за мониторинг на замърсяването на околната среда и прогнозирането на екологичния риск за хората, живеещи в замърсени райони.

Мишките от род *Apodemus* Kaup, 1829 и род *Mus* Linnaeus, 1758 (Rodentia, Muridae), както и полевките от род *Microtus* Schrank, 1798 (Rodentia, Arvicolidae) са най-често използваните моделни видове за оценка на екологичния риск в Европа, поради факта, че са доминантни видове в съобществата от дребни бозайници (Berry 1975, Abramsson-Zetterberg et al. 1997, Stopka

and McDonald 1999, Adrian et al. 2002, Damek-Poprawa and Sawicka-Kapusta 2003, Ieradi et al. 2003, Metcheva et al. 1994, 2001; Topashka-Ancheva et al. 2003a, b). Последствията от въздействието на различни замърсители е било оценявано при тези видове чрез използването на редица цитогенетични характеристики, като честота на микроядрата (Abramsson-Zetterberg et al. 1997, Ieradi et al. 2003), хромозомни аберации (Metcheva et al. 2001, Topashka-Ancheva et al. 2003a, Velickovic, 2004), аномалии в сперматоцитите (Ieradi et al. 2003). Използвани са и различни морфометрични, морфофизиологични и хематологични показатели (Berry 1975, Stopka and McDonald 1999, Nunes et al. 2001, Adrian et al. 2002, Damek-Poprawa and Sawicka-Kapusta 2003, Topashka-Ancheva et al. 2003a, b; Velickovic 2004).

В България видовете *Microtus arvalis* (Pallas, 1778), *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758), *Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834) и *Mus musculus* Linnaeus, 1758 са широко разпространени (Пешев и др. 2004, Cagnin et al. 1998). Те отговарят на всички изброени критерии за зоомониторни видове. Видовете *A. flavicollis* и *A. sylvaticus* са подходящи за биомониторингови проучвания, тъй като е установено, че техният индуциран радиационен отговор е много близък до този на лабораторни СВА-мишки (Abramson-Zetterberg et al. 1997), а Ieradi et al. (2003) установяват, че *A. flavicollis* е по-подходящ индикатор на естественото замърсяване в сравнение с *Clethrionomys glareolus* (Schreber, 1780). Пригодността на тези видове за целите на екотоксикологията се илюстрира и от изследванията на Topashka and Yordanova (2008), които доказват значително по-високата кариотипна стабилност на *A. flavicollis* спрямо различни ДНК-увреждащи агенти в сравнение с тази на лабораторни ICR-мишки. Ключови видове в биомониторинга се оказват и видовете от род *Mus* (Ieradi et al. 1998). При биомониторните изследвания на тези видове, обитаващи райони в България с различна степен на прахово замърсяване, са наблюдавани множество хромозомни преобразувания (хроматидни и хромозомни разриви, фрагменти, различни типове обмени, полиплоидни клетки и други) (Topashka-Ancheva et al. 1992, 1993; Metcheva et al. 1994, Gerasimov et al. 1997, Atanasov 1997, Atanasov et al. 2000, Chassovnikarova et al. 2004, 2005; Metcheva et al. 2008).

Характерните особености на групата на дребните бозайници и получените до сега резултати относно геномната чувствителност на видовете *Microtus arvalis*, *A. sylvaticus*, *A. flavicollis*, *A. agrarius* и *M. musculus* дават основание тези видове да се използват като моделни тест – обекти за оценка на екологичния риск.

1.2. Характеристика на използваните молекулярни и цитогенетични биомаркери при дребни бозайници за оценка на екологичния риск

1.2.1. Микроядрен тест

Микроядреният тест (Matter and Schmid 1971) е разработен като техника за установяване на цитогенетични повреди, индуцирани от химични мутагени и йонизираща радиация в соматични клетки на човешки и животински популации (MacGregor et al. 1987; Müller and Streffer 1994). Днес е известен като един от най-успешните и сигурни методи за скрининг на генотоксични агенти. Отчитането на микроядра е широко прилагана техника за измерване на генотоксичност както *in vivo*, така и *in vitro*.

Микроядрата (MN) са описани в цитоплазмата на еритроцити преди повече от век и са наречени „фрагменти от ядрен материал“ от Howell или „corpuscles intraglobulaires“ в терминологията на Jolly в края на 18-ти и началото на 19-ти век. Тези овални и гладки структурни образувания (остатък от ядрения хроматин на еритроцита) са познати на хематолозите като „телца на Howell-Jolly“. Evans et al. (1959) установяват значението на микроядрата като маркер за цитогенетично увреждане.

Микроядрата са резултат от повреда на нивото на ДНК или хромозомата, или на нивото на протеини, директно или индиректно отговорни за хромозомното разделяне (например тубулин). Те възникват при отпадане на фрагменти от хромозоми или на цели хромозоми, които не се включват в ядрата на дъщерните клетки при клетъчното делене.

***In vivo* микроядрен тест**

In vivo микроядреният тест е разработен паралелно от Schmid (1973) и Heddle (1973) и обикновено се прилага при изследване на костен мозък и периферна кръв от мишки. Провеждането на микроядрен тест може да се извърши по различни начини, зависещи от целта на изследването, тестваните организми, изследвания клетъчен тип, начина на въздействие на генотоксиканта. При всички случаи обект на изследване са интензивно делящи се клетки. Еритроцитите, произлизащи от стволови клетки в костния мозък, които чрез серия от деления дават еритроцитни предшественици, са идеален обект за отчитане на микроядра, именно поради константния и бърз клетъчен цикъл на предшествениците. Друго важно предимство на еритроцитите е, че в хода на диференциацията им

постепенно клетъчното ядро се отделя от клетката (еритроцитите са единственият тип клетки без ядро при бозайниците, който респективно спира да се дели), което създава условия за лесното микроскопско наблюдение на вече формираните микроядра.

В основата на микроядреният тест е заложена еритропоезата. При възрастните гризачи костният мозък и далакът са хемопоетични органи, в които стволови клетки осъществяват еритропоезата, преминаваща през етапи на пролиферация и зреене. По време на пролиферацията клетките се делят интензивно, като различни агенти могат да причинят хромозомни повреди – фрагментация на хромозоми или други промени, повлияващи директно макромолекули, отговорни за хроматидното разделяне или водещи до дисфункция на делителното вретено. Съответният фрагмент (или цяла хромозома) обикновено изостава по време на клетъчното делене и не се интегрира в дъщерните ядра, а формира микроядро, което може да се види в цитоплазмата. По време на зреенето, когато еритробластът се превръща в полихроматичен еритроцит (PCE, млад еритроцит още съдържащ РНК, който е базофилен и се оцветява в светлосиньо или в синьо-сиво с Гимза или в червено-оранжево с акридиноранж), основното ядро се отделя от клетката, а формираното микроядро обикновено остава в цитоплазмата. Поради липсата на ядра в тези клетки визуализацията на микроядрата е улеснена. Увеличаването на честотата на микроядреният полихроматични еритроцити при животните е индикация за индуцирани хромозомни повреди. Полихроматичните клетки след време губят своята РНК, насищат се с хемоглобин и се превръщат в нормохроматични еритроцити (NCEs, зрели еритроцити (червени кръвни клетки) или в по-малки полихроматични еритроцити (PCEs), ацидофилни и оцветяващи се в оранжево-розово с Гимза. Тези два типа еритроцити, оцветяващи се различно, могат да бъдат видени в костния мозък, далака и кръвта (Krishna and Hayashi 2000).

Различното оцветяване на препаратите от еритроцити (полихроматични или PCE), които са на по-малко от 48 часа, и от зрели еритроцити на възраст 2–35 дни (нормохроматични или NCE), се оказва ефективно за определяне на времето на протичане на хромозомните повреди. Микроядрата в полихроматичните клетки се дължат на скоро станали повреди (през последните изминали 48 часа), а нормохроматичната популация показва резултатите от повреди,

акумулирани през последния месец (новите увредени или неувредени еритроцити преминават от костния мозък в кръвта, за да подменят същото количество стари еритроцити, отпадащи от кръвта). Ето защо за продължителни проучвания на микроядрата в периферна кръв е подходящо отчитането на микроядра от нормохроматични еритроцити. Далакът на мишки е неефективен в отстраняването на увредени еритроцити, докато този при плъховете бързо елиминира еритроцитите с микроядра от циркулацията. По тази причина за дългосрочни изследвания на микроядра от периферна кръв се използват нормохроматични популации на видове от род *Apodemus* и род *Mus*. За интензивни проучвания, особено за анализ на костномозъчна тъкан, се отчитат полихроматични еритроцити (National Toxicology Program).

При някои експериментални ситуации периферната кръв е предпочитана пред костния мозък. За периферна кръв от мишки методът е разработен за първи път от MacGregor et al. (1987) и има няколко важни предимства пред костномозъчния метафазен анализ. Методът е технически опростен, отчитането на резултати е по-обективно и подходящо за автоматизиране, отнема по-малко време, отчита както кластогенни, така и анеугенни промени, лесно се интегрира в цялостни токсикологични изследвания. Изолирането на достатъчно малко количество периферна кръв е щадящ метод – той може да предотврати убиването на изследваните животни, което е от особено значение при работа с редки и защитени видове (Hayashi and Honma 2007).

In vivo микроядреният тест за първи път е приложен при домашната мишка *Mus domesticus* (Schmid 1973, Heddle 1973). Тестът е широко използван цитогенетичен метод за детекция на природни мутагени и успешно се прилага при диви гризачи от 1978 година (Matery and Maslova 1978, Cristaldi et al. 1985, Tice et al. 1987, Eckl and Riegler 1997, Deggrassi et al. 1999). Микроядреният тест за генотоксични повреди е използван в много мониторингови проучвания. По отношение на сухоземната среда, гризачите са предпочитан обект за микроядрен тест, тъй като са отчетени значителни корелации между степента на замърсяване с тежки метали и микроядра при диви гризачи, обитаващи тези замърсени райони (Ieradi et al. 1992, 1996, Tull-Singleton, et al. 1994, Tapisso et al. 2009). Този тип изследвания осигурява информация относно избора на подходящи биомаркери за мутагенност и канцерогенност на природната среда и

допринасят значително за пълноценното проучване на последствията от индустриалното замърсяване.

1.2.2. Кометен анализ

В биомониторинга, за отчитането на ДНК-повредите е необходим оптимален метод, отчитащ широк спектър на увреждания във всякакъв тип клетки, приложим за различни биологични видове, който да е чувствителен, бърз и сравнително евтин. Кометният анализ - стандартна техника за отчитане на единични скъсвания на ДНК, алкално лабилни сайтове, не напълно изрязани репариращи се сайтове и crosslink-взаимодействия в индивидуални клетки - отговаря на всички тези изисквания (Tice et al. 1997).

Развитието на алкалната версия на гел-електрофорезата на единични клетки, известна като кометен анализ, революционизира полето на генетичната екотоксикология. По отношение на бозайниците, този метод дава възможност за проучване на ДНК повреди, репарация и клетъчна смърт (програмирана клетъчна смърт, включваща апоптоза) при различни типове клетки, без да е необходимо предварително познаване на кариотипа и клетъчния цикъл (Dixon et al. 2002, Jha 2004). Това е от особена важност, когато молекулярните и цитогенетичните методи не е възможно или е трудно да се приложат. В изследванията на бозайниците, кометният анализ може да се прилага успешно като неспецифичен, чувствителен, бърз и икономичен биомаркер за детекция на генетични повреди в околната среда (Jha 2008).

В наименованието на метода е използвана метафора от астрономията, която се оказва много удачна при визуализиране на резултатите, тъй като полученият при тази техника образ прилича на „комета“ с ясно очертана глава, съдържаща интактната ДНК, и опашка, състояща се от повредени и скъсани участъци от ДНК. Östling and Johanson (1984) първи прилагат кометния анализ (микрогел-електрофореза на ДНК) като метод за отчитане на ДНК-увреждания на ниво единични клетки. Разработената от авторите техника включва предварително лизиране на единични клетки от детергенти и соли върху микроскопски стъкла с агароза, след което освободената ДНК се подлага на електрофореза при неутрални условия. Електричното поле отделя заредената ДНК от ядрото, така че скъсаните или разхлабени ниско-молекулни ДНК-фрагменти мигрират по-далече. Следва оцветяване на ДНК с флуоресцентното багрило

акридиноранж, което създава зелена емисия, оценявана количествено с микроскоп-фотометър. Клетките с увеличена честота на двойно-верижни разкъсвания в ДНК показват увеличена миграция на ДНК към анода. Östling and Johanson (1984) установяват, че размерът на освободената от ядрото ДНК е функция например от дозата на радиация (лъчение). Тази първа версия на метода обаче отчита само двойно-верижни скъсвания в ДНК-молекулата. Използваните от авторите условия на лизиране се оказват неефективни за отстраняване на всички протеини, така че ДНК-молекулата остава свръх спирализирана в третичната си структура. Оказва се, че неутралните условия ограничават главните преимущества на метода и не позволяват отчитането на друг тип увреди.

Впоследствие Singh et al. (1988) модифицират метода, като провеждат електрофорезата при алкални условия ($\text{pH} > 13$). При това рН интензивната ДНК-миграция е свързана с увеличаване на нивата на едно-верижни скъсвания, причинени от непълното изрязване на репарирани се сайтове (ексцизионна репарация) и алкално лабилни сайтове. Тъй като почти всички генотоксични агенти индуцират много повече едно-верижни разкъсвания и/или алкално-лабилни сайтове, отколкото двойно-верижни разкъсвания, алкалната версия на метода предлага осезаемо по-голяма чувствителност при идентифициране на генотоксични агенти.

След представянето на алкалната ($\text{pH} > 13$) версия през 1988 г., приложенията на метода и използването му от различни изследователи многократно се увеличават. През последното десетилетие методът се явява основно средство в биомониторинговите изследвания, в проучването на ДНК-репарационните механизми и генетичната токсикология. Обобщен преглед на техниката публикуват Tice et al. (1991), McKelvey-Martin et al. (1993), Tice (1995), Fairbairn et al. (1995), Anderson et al. (1998), Roja et al. (1999), Speit and Hartmann (1999), Tice et al. (2000), Hartmann et al. (2003), Burlinson et al. (2007), Collins et al. (2008), Smith et al. (2008). Интересът към метода нараства осезаемо поради високата му чувствителност за отчитане на увреди (скъсвания) във веригата на ДНК на ниво единични клетки. Днес броят на държавите, чиито регулаторни агенции прилагат *in vivo* кометен анализ непрекъснато нараства, а в някои случаи е приет като втори тест за генотоксичност (UKCOM 2000, FDA 2006). Една от причините за всеобщото приемане на метода е изготвянето на стандартен протокол (Tice et al. 2000) и приемането на критерии за провеждането му на международната работна среща за генотоксични тест процедури, приети

на Международната среща по генотоксикология във Вашингтон през 1999 г. (International Workshop on Genotoxicity Test Procedures held in Washington, DC, March 25–26, 1999, an expert panel met to develop guidelines 1999, IWGTP), както и на международната работна среща по кометен анализ в Германия, през 2001 г. (Hartmann et al. 2003). Специално внимание на *in vivo* алкалната версия ($\text{pH} > 13$) при гризачи се обръща на международната работна среща за генотоксични тестове, проведена в Сан Франциско през 2005 г., чиято цел е преглед на процедурите и препоръчаните методики в предишните ръководства и документи (Tice et al. 2000, Hartmann et al. 2003) и приемане на стандартизиран протокол за провеждане на отделните етапи на метода (Burlinson et al. 2007). Публикуваните препоръки намаляват възможността за експериментална вариабилност и обезпечават правилната интерпретация и сравняване на получените резултати. Tice et al. (2000) смятат, че официално разработените от тях стандарти могат да подпомогнат оптимизирането на метода при използването му в други направления, като дават за пример биомониторинга.

1.2.3. Хромозомни аберации

Хромозомите в кариотипа на всеки вид имат постоянна структура и организация. В тази структура в процеса на историческото (филогенетично) развитие на вида, през индивидуалното (онтогенетично) развитие на индивида, под въздействието на външни агенти или спонтанно, настъпват промени. Молекулите на ДНК в хромозомите са постоянни мишени за предизвикано от много фактори увреждане. Хромозомната нестабилност се изразява в образуване на хромозомни аберации, резултат от различни процеси, протичащи при репликацията, репарацията, или сегрегацията на хромозомите (Белчева и Топашка-Анчева 1993, Michor et al. 2005, Thompson et al. 2010). Резултат от такова увреждане са хромозомните аберации, които лесно могат да бъдат открити с прилагането на специфични методики, и наблюдавани с помощта на различни типове микроскопи.

Хромозомните аберации са отклонения в броя, морфологията и структурата на хромозомите, в резултат на които се получават големи промени в генетичния материал. Структурните хромозомни аберации могат да се предизвикват основно чрез директно разкъсване на ДНК молекулата, чрез репликация на увреден участък от ДНК молекулата или

чрез инхибиране на синтеза на ДНК. Те могат да бъдат разделени в две основни категории (Белчева и Топашка-Анчева 1993):

- хромозомен тип аберации с участието на двете хроматиди на една или няколко хромозоми;
- хроматиден тип аберации, които включват само една от двете хроматиди.

Структурните аберации могат да бъдат вътрехромозомни – когато засягат отделна хромозома (делеции, инверсии, дупликации) и междухромозомни – когато се засягат две или повече нехомоложни хромозоми (транслокации).

Бройните хромозомни мутации са два основни типа: анеуплоидии и полиплоидии. По своя механизъм на възникване те рязко се различават от останалите мутации, защото са резултат от увреждане не на самата ДНК молекула, а на нормалното разделение на сестринските хроматиди.

Хромозомните аберации се считат за чувствителни биомаркери при отчитане на ранните ефекти от действието на ДНК увреждащи агенти и генотоксини с различен произход (Герасимова 2012). Появата на хромозомни аберации зависи от концентрацията (или интензивността на въздействие) на мутагенния агент, от изследвания тип клетки и етапа на клетъчния цикъл, в които е настъпило това въздействие (Beskid et al. 2006, Obe et al. 2002). Предизвиканите аберации от хромозомен или хроматиден тип могат да се наблюдават и анализират под микроскоп, като отделните типове се описват, класифицират и обработват статистически. Този тест-анализ на хромозомни аберации може да бъде извършен както върху клетъчни култури, така и върху клетки от костен мозък на бозайници - добре кръвоснабдена, бързоделеща се тъкан, участваща активно в хемопоезата. Редица автори в своите изследвания показват, че костният мозък е един от най-удобните модели за тестване на мутагенните ефекти на факторите на околната среда поради високата клетъчна пролиферативна активност и ниската честота на спонтанно възникващи хромозомни аберации (Schmid 1973, Savage 1976, Rebel et al. 1996, Visnjic et al. 2004).

Определянето на вида и честотата на хромозомните аберации е най-често препоръчваният, приет и широко прилаган стандартизиран тест, с

добре описана методология, позволяваща повторяемост на резултатите (OECD 1997). Стандартизирането се отнася не само до лабораторните методи, но също и до статистическата обработка на получените резултати.

В научната литература, посветена на изследвания върху въздействието на мутагени върху организма на живи организми (хора или животни), при които е приложен тестът, са получени данни за повишаване честотата на аберациите, включващи хроматидни разкъсвания, обмени, ацентрични фрагменти, дицентрични хромозоми, рингове, инверсии и транслокации след излагане на йонизиращо лъчение, различни химични вещества, индустриален полиметален прах и други вредни за организма вещества от околната среда (Zhurkov et al. 1987, Bender et al. 1988, Sorsa et al. 1992, Ieradi et al. 2003, Garcia-Sagredo 2008, Topashka-Ancheva and Teodorova 2010, Gerasimova and Topashka-Ancheva 2010, Topashka-Ancheva and Gerasimova 2012 и др.). Тези резултати показват, че тестът е много чувствителен и високо информативен по отношение състоянието на клетъчния геном.

Установяването на генотоксичните увреждания при моделни видове бозайници, включващи хромозомни аберации и/или сестрински хроматидни обмени могат да бъдат подходящи биомаркери за наличие на мутагенност от околната среда. Данните от цитогенетичен анализ на костен мозък от гризачи, уловени от райони, замърсени с тежки метали, показват висока честота на хромозомни аберации (Gerber et al. 1980, Degreave 1981, Ieradi et al. 1996, Topashka-Ancheva et al. 2003, Topashka-Ancheva and Metcheva 1999 и др.).

При биомониторните видове дребни гризачи (*A. sylvaticus*, *Mus macedonicus*, *Microtus guentheri*, *M. arvalis*, *Chionomys nivalis*), обитаващи райони в България с различна степен на антропогенно замърсяване, са установени хромозомни аберации - хроматидни и хромозомни разкъсвания, фрагменти, различни типове обмени, полиплоидни клетки и други (Topashka-Ancheva et al. 1992, 1993, 1994, 2003, 2010, Metcheva et al. 1994, 2001, Atanasov 1997, Chassovnikarova et al. 2005, Mitkovska et al. 2012a).

1.3. Прилагане на молекулярни и цитогенетични методи при оценка на екологичния риск *in situ* в популации на дребни бозайници

В периода 2010–2012 г. в рамките на проект „Нова интегрирана геномна биомаркерна тест система при моделни безгръбначни и

гръбначни животни“ се проведеха редица изследвания, които потвърдиха приложимостта и надеждността на микроядрения тест, кометния анализ и цитогенетичните методи за оценка на мутагенния потенциал на околната среда в промишлено замърсени райони и природни паркове в България.

1.3.1. Райони за изследване

Изследванията бяха проведени в три района на страната – един импактен (комбинат за обогатяване на цветни метали - КЦМ „Пловдив“ край Асеновград) и два фонове – територията на Природен парк „Странджа“ и районът на Националната астрономическа обсерватория „Рожен“ - Западни Родопи.

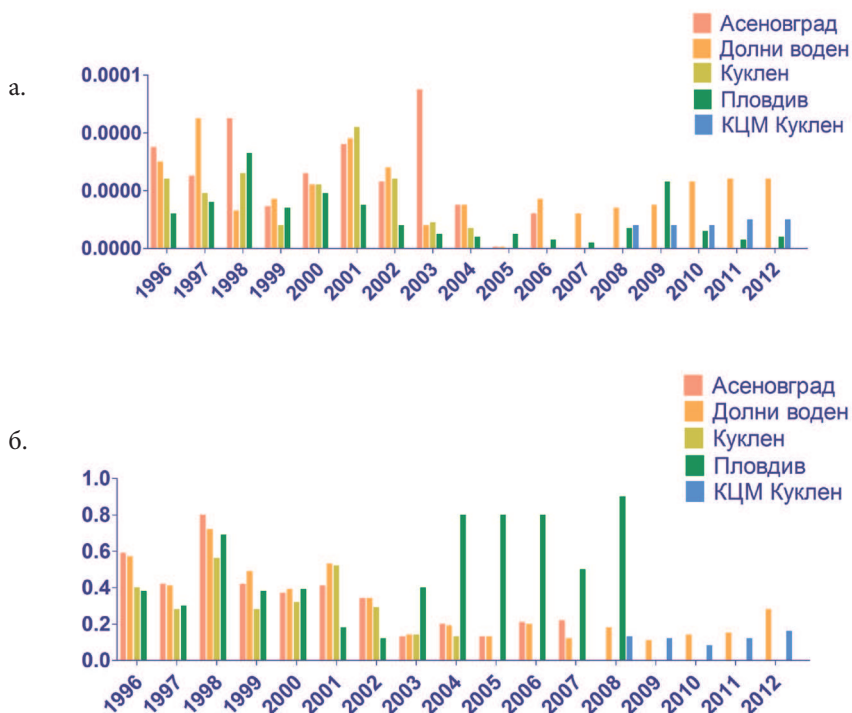
Един от районите със силно замърсяване на въздуха, определен като „hot spot“ за замърсяването в България, е районът на Асеновград, в който се намира КЦМ. Районът е включен в списъка на импактните (замърсени) райони в „Националната програма за биомониторинг на България“ (Пеев и Герасимов 1999). Разположен е в северната част на Западни Родопи, на 230 мнв. В този замърсен район напълно е унищожена естествената горска растителност, като само малка част от разпръснатите мозаечно смесени широколистни гори, както и храстовидните и тревисти компоненти, са все още съхранени. Регистрирано е индустриално замърсяване с SO_2 , NO_2 , Pb, Zn и други токсични вещества. Чрез въздушните емисии (аерозоли) по факела на замърсяване в атмосферата се отделят микроагрегати на олово, кадмий, цинк и мед (медните микроагрегати се отделят от намиращия се в близост до КЦМ завод „Агрия“ при производството на мед-съдържащи фунгициди), които се натрупват върху почвата, попадат върху растителността и водните площи. Обикновено в близост до завода попадат по-големи количества цинк (по-едри агрегати – 250 до 370 микрона), а в далечина по преобладаващия вятър се отнасят по-тежките частици на оловото, които имат минимални размери от 30 до 70 микрона. Продължителните наблюдения показват, че в най-голяма степен полиметалното замърсяване постъпва в почвата. Тежките метали се депонират плитко в орния слой на почвата и се придвижват ограничено в низходяща посока. Изследванията показват, че 80% от замърсяването се осъществява по въздуха (факела на замърсяване), а останалите 20% със замърсените поливни води. От данни, предоставени от РИОСВ-Пловдив, става ясно, че през 2010 г. почвените проби, взети

от пункт КЦМ за изследване съдържанието на йони на тежки метали и металоиди, съдържат 2233,13 mg/kg Zn при ПДК 360; 1112,40 mg/kg Pb при ПДК 80 (Табл. 1.1).

От информацията за атмосферния въздух, предоставена от РИОСВ-Пловдив, прави впечатление динамиката на атмосферно замърсяване с оловни (mg/m^3) и кадмиеви (ng/m^3) аерозоли в мониторинговите пунктове за периода 1996–2011 г. (Фиг. 1.1.а и 1.1.б).

Табл. 1.1. Проби от пункт на 0,5 км югоизточно от КЦМ за 2010–2011 г.

Година	pH	Zn		Pb		Cd	
	/H ₂ O/ 1:2,5	mg/kg	ПДК	mg/kg	ПДК	mg/kg	ПДК
2010	7,8	2233,13	360	930,58	80	81,20	3,0
2011	8,3	1086,24	370	1360,71	80	121,4	3,0



Фиг. 1.1. Динамика на атмосферното замърсяване за периода 1996 – 2011 г. **а.** оловни аерозоли ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) и **б.** кадмиеви аерозоли (ng/m^3) (Dynamics of atmospheric pollution for the period 1996 – 2011 a) lead aerosols ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) and b) cadmium aerosols (ng/m^3)).

Като цяло в района се запазва тенденцията към трайно задържане на годишните концентрации на оловни аерозоли под съответната средногодишна норма ($0.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Причина за наличие на високи концентрации на кадмий в част от измерените проби са както периодични емисионни наслагвания от КЦМ в момента на пробовземането, така и дифузното разпространение на утаените количества от земната повърхност.

Районът на Природен парк „Странджа“ е включен в изследването като контрола, тъй като се предполага, че поради относителната си отдалеченост от промишлени замърсители той представлява относително чист в екологично отношение район. Територията на ПП „Странджа“ е на едно от първите места по биоразнообразие сред защитените територии в Европа и е включена в закона за биологичното разнообразие на България като територия с консервационно значение. На територията на природния парк има 5 резервата – „Силкосия“ – най-старият български резерват, „Лопушна“, „Средока“, „Витаново“ и биосферен резерват „Узунбуджак“. В три от тези резервати е извършен улов на дребни бозайници в рамките на



Фиг. 1.2. Местонаходища на изследваните дребни бозайници от района на ПП „Странджа“ (Sampling sites of the investigated small mammals in the NP „Strandzha“).

настоящото изследване (Фиг. 1.2). В „Националната стратегия за опазване на биологичното разнообразие“ поречиата на р. Велека и р. Резовска са определени като особено ценни влажни местообитания, важни като екологични коридори за много видове дребни бозайници, затова оценката на екологичния риск за тези видове е от изключително значение.

Националната астрономическа обсерватория „Рожен“ е разположена в Перелишко-Преспанския дял на Западните Родопи, в подножието на връх Рожен (1750 мнв). Поради отдалечеността им от големи промишлени замърсители, естествените иглолистни гори и високопланински ливади в района са включени в „Националната програма за биомониторинг на България“ като регионална фоновая станция за биологичен мониторинг.

1.3.2. Изследвани видове

Обект на изследването са представители на сем. Muridae и сем. Arvicolidae:

Сем. Muridae:

- Род *Apodemus*

- Горски мишки (*Apodemus* sp.) - поради трудното разграничаване по външни морфологични белези на видовете обикновена горска мишка (*A. sylvaticus*) и жълтогърла горска мишка (*A. flavicollis*), събраният материал е определен като *Apodemus* sp.;

- Полска мишка (*A. agraius*);

- Род *Mus* (домашни мишки):

- Източносредиземноморска домашна мишка (*M. macedonicus*),

- Домашна мишка (*M. musculus domesticus*);

Сем. Arvicolidae:

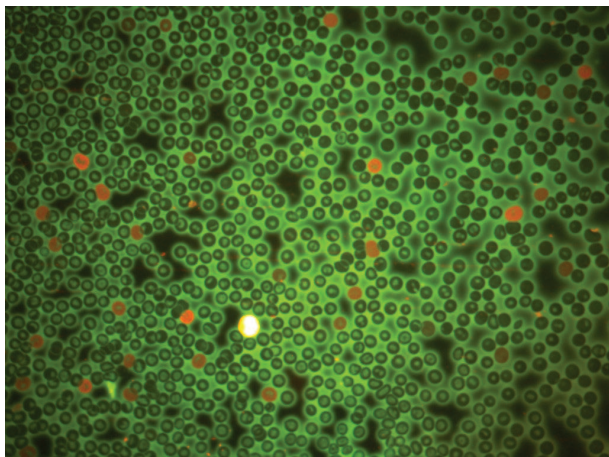
- Род *Microtus* (сиви полевки):

- Обикновена сива полевка (*Microtus arvalis*)

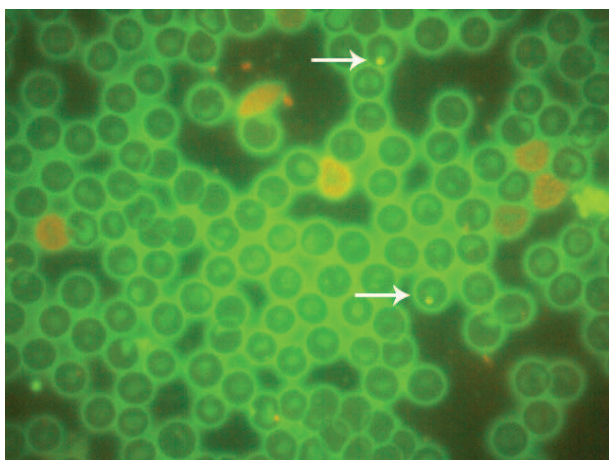
1.3.3. Резултати, получени при микроядрения тест

За да се избегнат вътревидови различия, свързани с възрастта и пола, микроядрената честота е изследвана само във възрастни индивиди, по равен брой мъжки и женски индивиди, като резултатите са обобщени за двата пола, тъй като *t*-теста не показва значими разлики в честотата

Фиг. 1.3. Микрофотография на оцветена с акридиноранж периферна кръв от *Apodemus* sp. от района на ПП „Странджа“ (2010 г.) без микроядра (Microphotograph of acridine orange-stained peripheral blood film of *Apodemus* sp. from NP „Strandzha“ without micronucleated cells).

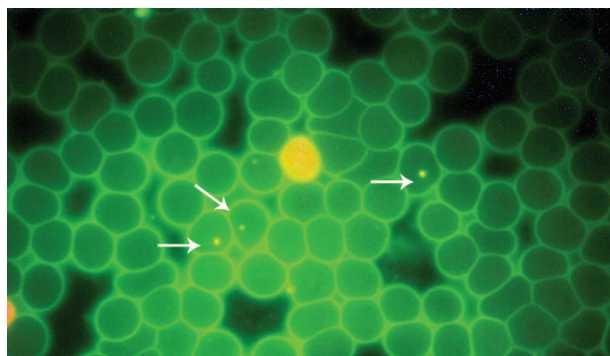


Фиг. 1.4. Микроядро в нормохроматичен еритроцит от периферна кръв на *Apodemus* sp. от района на ПП „Странджа“ (2010 г.) (Micronucleus in normochromatic erythrocyte from peripheral blood of *Apodemus* sp. from NP „Strandzha“ (2010)).

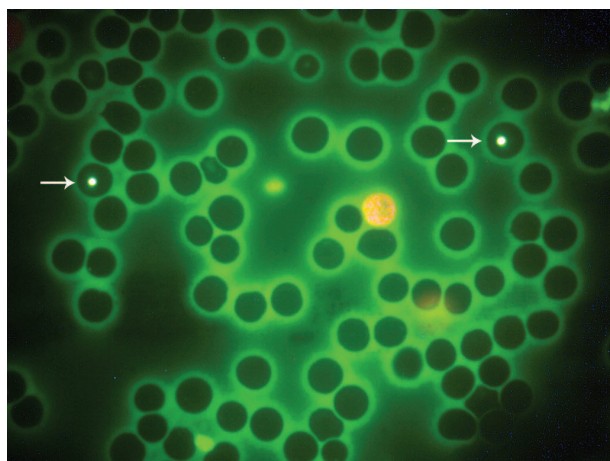


на микроядрата между женските и мъжките животни от една група. За всяко животно честотата на микроядрата (MN) е отчитана в 2000 еритроцита (както в нормохроматични, така и в полихроматични) от периферна кръв.

Резултатите, получени за микроядрените честоти в нормо- и полихроматични еритроцити (Фиг. 1.3 до 1.9) при изследваните видове горска, полска и средиземноморска мишки от ПП „Странджа“ и КЦМ, са показани на Табл. 1.2. Установената средна честота на микроядрата за целия период на изследване е представена на Фиг. 1.10. Тя е най-висока при горските мишки (*Apodemus* sp.) както във фоновия, така и в импактния район. Това определя видовете от подрод *Apodemus* (*A. flavicol-*



Фиг. 1.5. Микроядра в нормохроматични еритроцити от периферна кръв на *Apodemus agrarius* от района на ПП „Странджа“ (2012 г.) (Micronuclei in normochromatic erythrocytes from peripheral blood of *Apodemus agrarius* from NP „Strandzha“ (2012)).

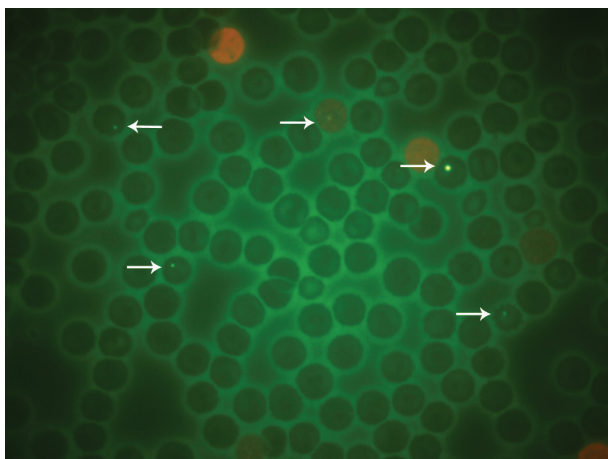


Фиг. 1.6. Микроядра в нормохроматични еритроцити от периферна кръв на *Apodemus* sp. от района на КЦМ „Пловдив“ (2010) (Micronuclei in normochromatic erythrocytes from peripheral blood of *Apodemus* sp. from the region of the lead-zinc smelting factory (2010)).

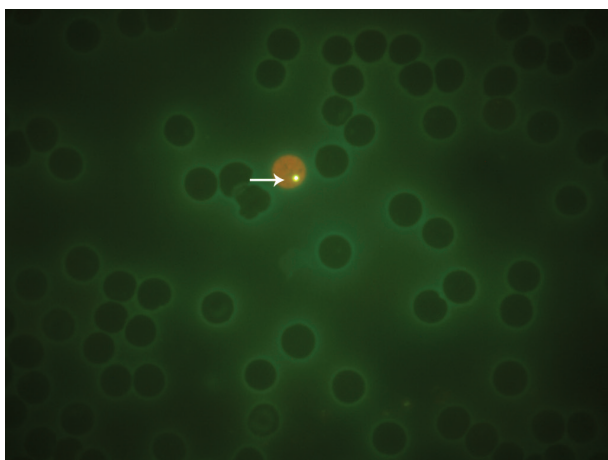
lis и *A. sylvaticus*) като подходящи зоомониторни видове с добра геномна чувствителност. Микроядрената честота при *Mus macedonicus* е по-ниска, но изменчивостта на този показател е значително по-малка в сравнение с тази на горските мишки (Фиг. 1.10), затова видът също може да бъде определен като подходящ за биомониторингови изследвания. Индивидите на полската мишка (*Apodemus agrarius*) от ПП „Странджа“ реагират по-слабо на стрес-агентите от околната среда. Поради относително мозаечното си разпространение в страната и по-тясната си биотопична привързаност, те не са много подходящи като зоомониторни видове.

Врамките на изследваните години (2010 и 2012) се наблюдава тенденция за увеличаване на средната честота на микроядрата както в импактния, така и във фоновия район (Фиг. 1.11). Нарастването на стойностите през 2012 спрямо 2010 не е статистически значимо за видовете от района на КЦМ ($t=1.262$, $df=7$, $P=0,2475$ за *M. musculus*; $t=1.224$, $df=9$, $P=0,2520$ за

Фиг. 1.7. Микроядра в нормохроматични еритроцити от периферна кръв на *Apodemus* sp. от района на КЦМ „Пловдив“ (2012) (Micronuclei in normochromatic erythrocytes from peripheral blood of *Apodemus* sp. from the region of the lead-zinc smelting factory (2012)).

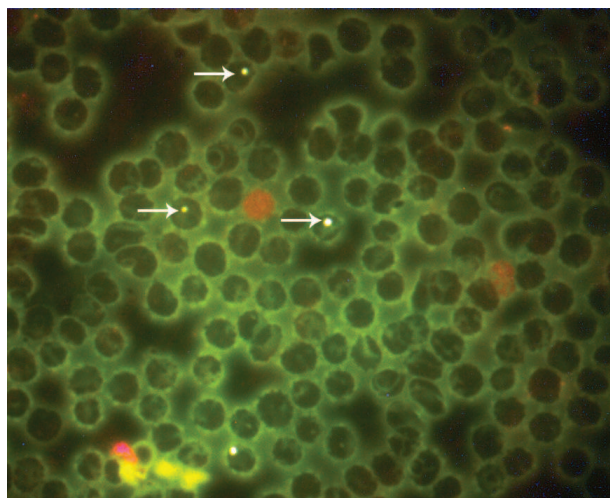


Фиг. 1.8. Микроядро в полихроматичен еритроцит от периферна кръв на *Apodemus* sp. от района на КЦМ „Пловдив“ (2010) (Micronucleus in polychromatic erythrocyte from peripheral blood of *Apodemus* sp. from the region of the lead-zinc smelting factory (2012)).



Apodemus sp.). Това свидетелства за поддържането на един относително постоянен фон на замърсяване през годините, с тенденция за леко покачване. Повишаването на микроядрената честота в този период корелира и с установените повишени концентрации на кадмиеви аерозоли, поради периодичните емисионни наслагвания от КЦМ и дифузното разпространение на утаените количества от земната повърхност.

В района на ПП „Странджа“ тенденцията за нарастване на геномните увреждания през 2012 г. е много по-силно изразена при горските мишки ($F=163.8$, $DFn=9$, $Dfd=2$; $P=0.0122$). Макар и в по-малка степен такава тенденция се установява и при индивидите на *A. agrarius*. Това доказва значителното влошаване на екологичната обстановка в природния парк.



Фиг. 1.9. Микроядра в нормохроматични еритроцити от периферна кръв на *Mus macedonicus* от района на КЦМ „Пловдив“ (2012) (Micronuclei in normochromatic erythrocytes from peripheral blood of *Mus macedonicus* from the region of the lead-zinc smelting factory (2012)).

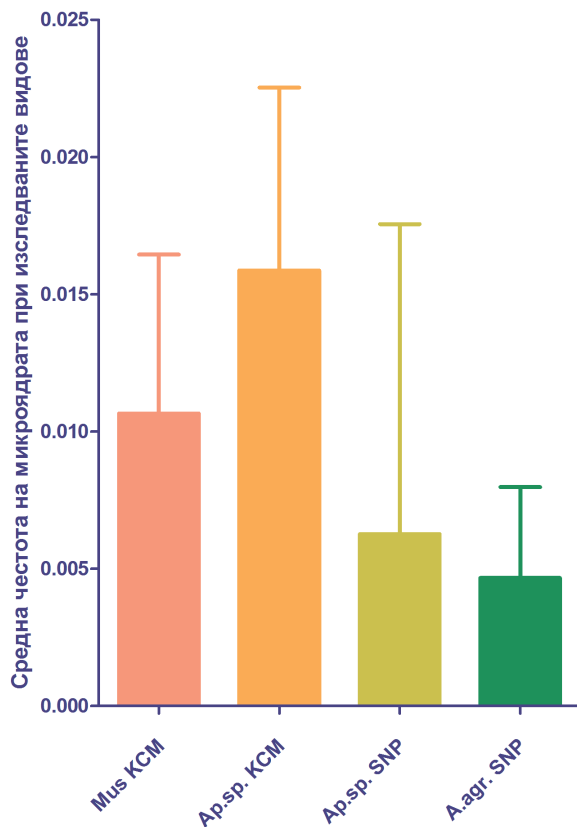
Таблица 1.2. Честота на микроядрата, установена при изследваните видове в импактния и фонов район.

Показатели	КЦМ		ПП „Странджа“	
	<i>Mus musculus</i>	<i>Apodemus</i> sp.	<i>Apodemus</i> sp.	<i>Apodemus agrarius</i>
N	9	12	13	13
Средна стойност	0,01066	0,05841	0,01105	0,004668
SD	0,005783	0,1475	0,01573	0,003313
Минимум	0,002982	0,01014	0	0
Максимум	0,01965	0,5263	0,04704	0,01163

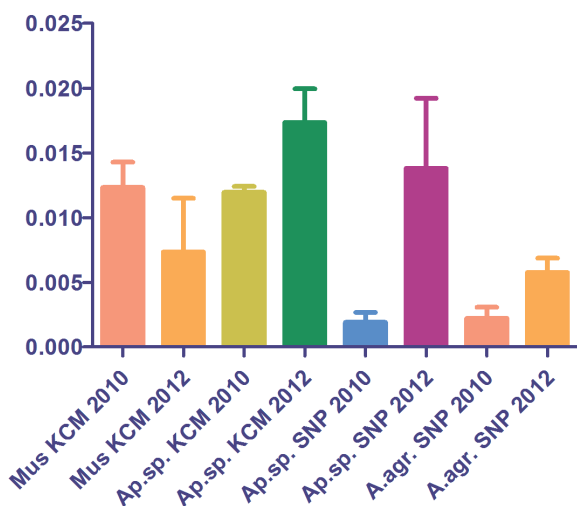
Вероятно то се дължи не само на нарасналото атмосферно замърсяване, дължащо се на промишлената дейност в тази част на страната, но и на подновяване на рудодобива в близки до парка райони, и на провеждани рекултивационни мероприятия с отпадни продукти от органичен произход. Не на последно място значение има и нарасналият автомобилен трафик в резултат на развитието на туризма.

Високастепенна статистически достоверни различия в микроядрените честоти бе установена при сравнителния анализ на горските мишки от ПП „Странджа“ и КЦМ за 2010 г. ($t=11.24$ $df=4$, $P=0,0004$). През 2012 г. различията между горските мишки в двата района са статистически незначими ($F=5.403$, $DFn=9$, $Dfd=7$, $P=0,0368$). Това доказва критичното влошаване на екологичната обстановка в ПП „Странджа“, тъй като

Фиг. 1.10. Средна честота на микроядрата за периода 2010–2012 г. при видовете: *Mus macedonicus* от района на КЦМ (Mus KCM), *Apodemus* sp. от района на КЦМ (Ap. sp. KCM), *Apodemus* sp. от района на ПП „Странджа“ (Ap. sp. SNP), *Apodemus agrarius* от района на ПП „Странджа“ (A. agr. SNP) (Average frequency of micronuclei in the period 2010 - 2012, for the species: *Mus macedonicus* the region of KCM (Mus KCM), *Apodemus* sp. from KCM area (Ap. sp. KCM), *Apodemus* sp. from NP „Strandzha“ (Ap. sp. SNP), *Apodemus agrarius* from NP „Strandzha“ (A. agr. SNP)).



Фиг. 1.11. Динамика на средните честоти на микроядрата през периода на изследване (2010–2012 г.) във фоновия и импактен район. (Dynamics of average frequency of micronuclei in the study period (2010–2012 г.) in background and imapakt area).



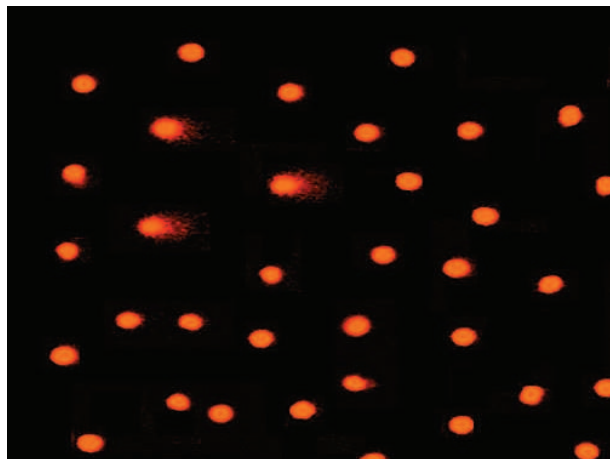
геномният отговор на зоомониторните видове във фоновия район се доближава по степента си до този в импактния район.

Използването на микроядрен тест при периферни еритроцити от диви гризачи, хронично изложени на замърсяване с тежки метали в района на КЦМ, показва, че са налице различия в чувствителността на видовете, определени като зооиндикатори. Видовете горски мишки (*Apodemus* sp.) са подходящи за биомониторингови проучвания чрез използване на микроядрен тест. Резултатите потвърждават, че използваният микроядрен тест при свободно живеещи гризачи от импактни и фонове райони е чувствителен и представителен метод за оценка на екологичния риск.

1.3.4. Установяване на директния отговор на генома чрез кометен анализ

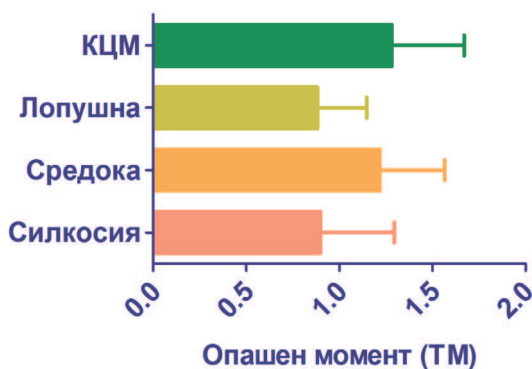
Изследванията на директния отговор на генома в резултат на промишлено замърсяване в природни популации на дребни гризачи са извършвани в района на КЦМ „Пловдив“. Като контролна/фонова станция е изследван района на ПП „Странджа“. Дребни гризачи са улавяни в три от защитените територии на парка – „Средока“, „Лопушна“ и „Силкосия“ (Фиг. 1.2).

Оценката на ДНК уврежданията е извършвана въз основа на отчитане на апоптичните клетки, проявяващи се като кометни (Фиг. 1.12). Индуцираните ДНК повреди са оценявани чрез два параметъра:



Фиг. 1.12. Апоптични клетки, проявяващи се като кометни, с различна степен на ДНК увреждане (Comet images with different levels of DNA damage).

Фиг. 1.13. Средни стойности на опашния момент (ТМ) за различните изследвани местонаходища. (Mean tail moments (ТМ) for the different investigated sampling sites.).



- Опашен момент (tail moment-ТМ) – отчита се количеството ДНК, мигрирало в опашката, умножено по дължината на опашката;
- Процент на ДНК в опашката (% ДНК) – отчита се като отношението между количеството на ДНК в опашката, отнесено към цялото количество ДНК в кометата (Olive et al. 1990).
- Получените средни стойности ($\pm$ SD) на показателите ТМ и % ДНК са показани на Фиг. 1.13. Не са установени статистически достоверни разлики между стойностите на показателите в трите изследвани защитени територии в ПП „Странджа“ ($F=2.24$, $P=14.1$; $F=1.72$, $P=0.21$).

През 2010 г. стойностите на отчитаните показатели са статистически значимо по-високи при индивидите от импактния район (КЦМ „Пловдив“) спрямо тези на индивидите от защитените територии „Лопушна“ и „Силкосия“, докато между индивидите от „Средока“ и тези от импактния район не се установяват достоверни различия (ТМ: $P=0.14$; DNA%: $P=0.14$). Горските мишки от тази защитена територия като цяло са с по-големи генотоксични увреждания в сравнение с индивидите от другите две защитени територии. Данните, получени за 2011 г. показват друга тенденция. Между изследваните индивиди не са установени статистически достоверни различия нито между отделните защитени територии, нито между тях и импактния район (ТМ: $F=1.23$, $P=0.32$; DNA%: $F=1.82$, $P=0.75$). Сравнителният анализ на получените резултати за двете изследвани години показва, че стойностите на ТМ и % ДНК за 2011 г. са статистически значимо по-високи спрямо стойностите, установени за 2010 г.

Получените резултати показват наличие на генетични увреждания при индивидите от защитена местност „Средока“ на ПП „Странджа“, което е свидетелство за наличие на мутагенен потенциал на средата. Установената по-висока степен на ДНК увреждания за периода на 2011 г. (спрямо 2010 г.) свидетелства, че уврежданията на генома не са инцидентно явление, а показват тенденция на повишаване. Територията на ПП „Странджа“ е засегната от общото атмосферно замърсяване на околната среда, причинено от нарасналата промишлената дейност в тази част на страната - подновената рудодобивна дейност в медните мини, засилените рекултивационни мероприятия с тор от пречиствателни станции, емисии от намиращата се в близост петролна рафинерия, засилен автомобилен трафик в региона. Токсичните вещества попадат от атмосферата в почвата и водата, преминават в подпочвените води и по трофичната верига постепенно се натрупват в животинските видове. Установената геномна нестабилност е реакция спрямо нарасналото ниво на стрес-агенти от околната среда. Липсата на статистически различия между импактния район на КЦМ „Пловдив“ и защитената местност „Средока“, намираща в северозападната част на парка (Фиг. 1.2), доказва повишената степен на екологичен риск в тази защитена територия и поставя въпроса за опазване на природните популации на редица редки или застрашени от изчезване видове на територията на парка.

Резултатите от кометния анализ потвърждават още веднъж пригодността на дребните гризачи като зоомониторни видове. Тяхната геномна чувствителност, установена на основата на хромозомни аберации и повишена микроядрена честота (Chassovnikarova et al. 2010, Michailova et al. 2010) ги прави удобни тест-обекти за отчитане на екологичния риск.

Кометният анализ позволява увреждането на ДНК да бъде установено в отделни клетки след остра и/или хронична експозиция на токсични вещества. Резултатите по безспорен начин потвърждават, че методът е достатъчно чувствителен да отчита естествените нива на генотоксичните агенти *in situ*. Мутагенният потенциал на средата в защитените територии трябва да се контролира и дребните бозайници могат успешно да се използват като ключови организми в мониторинга на замърсяването и опазването на околната среда. Получените резултати от кометния анализ илюстрират необходимостта от извършването на дългосрочен мониторинг за оценка на устойчивостта на зоомониторните видове спрямо генотоксични агенти в ПП „Странджа“.

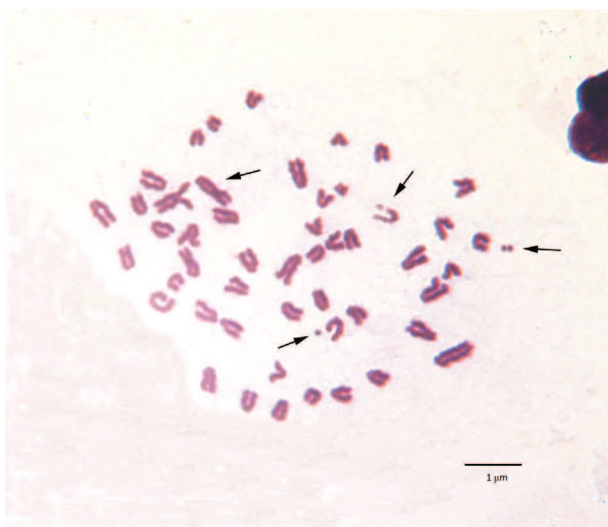
1.3.5. Резултати от изследване на хромозомните аберации

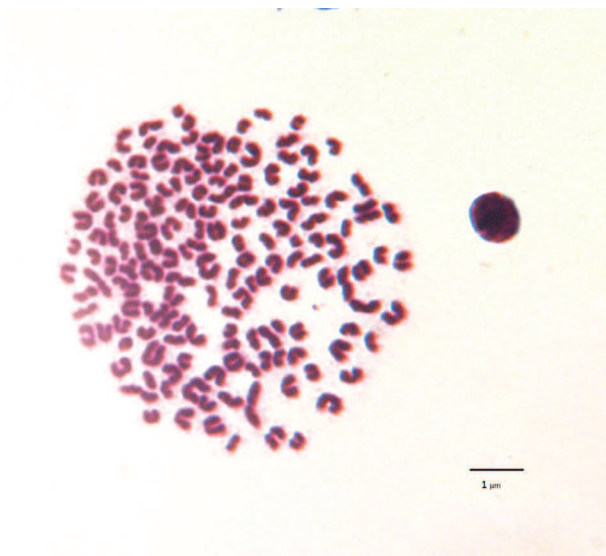
През периода 2009–2011 г. два пъти годишно (през м. май и м. ноември) бяха провеждани улови на дребни гризачи в района на импактна станция КЦМ „Пловдив“ и Националната астрономическа обсерватория „Рожен“ в Родопите. Изследвани бяха зоомониторните видове жълтогърла горска мишка (*Apodemus flavicollis*) и обикновена сива полевка (*Microtus arvalis*). След доставянето им в лабораторията, животните са обработени чрез прилагане на теста за честота на хромозомни аберации в костния мозък на бозайници от импактни и фонові райони. Описаният метод (виж. Протокол № 3 - Хромозомни аберации в костномозъчни клетки на бозайници в приложение) има за цел да покаже чувствителността на костномозъчния тест за определяне на честотата на индуцираните, в резултат на замърсяването на околната среда, хромозомни аберации.

Хромозомните аберации при изследваните индивиди *A. flavicollis* и *M. arvalis* са определени по тип, анализирани са и е определена честотата им в изследваните метафазни клетки (Фиг. 1.14 и Фиг. 1.15). Анализът на типа на хромозомните аберации в клетките на изследваните животни показва, че изохроматидните разкъсвания и появата на чифтни фрагменти преобладават при всички изследвани индивиди от района на импактна станция КЦМ „Пловдив“ (Табл. 1.3).

При *M. arvalis* е установена статистически достоверна разлика в броя на аберантните клетки между индивидите от импактния и от фоновия

Фиг. 1.14. Структурни хромозомни аберации в костномозъчни клетки на *Apodemus flavicollis* от района на КЦМ „Пловдив“ - терминални делеции, разкъсвания и транслокации (Structural chromosome aberrations in bone marrow cells of *Apodemus flavicollis* from the region of KCM – terminal deletions, fragments and translocations).





Фиг. 1.15. Бройни хромозомни аберации в костномозъчни клетки на *Apodemus flavicollis* от района на КЦМ „Пловдив“ – полиплоидия (Numeral chromosome aberrations in bone marrow cells of *Apodemus flavicollis* from the region of KCM – polyploidy).

Таблица 1.3. Брой, тип и честота на хромозомните аберации при зоомониторните видове *Apodemus flavicollis* и *Microtus arvalis* от изследваните райони.

Район	Видове	Брой животни	Брой клетки	Митози с аберации	Разкъсвания	Фрагменти	Обмени	% клетки с аберации $\bar{x} \pm \sigma$
КЦМ	<i>Apodemus flavicollis</i>	5(3м+2ж)*	246	21	15	4	4	10.0±4.8
	<i>Microtus arvalis</i>	4(2м+3ж)	193	15	10	2	4	7.42±1.6
Рожен	<i>Apodemus flavicollis</i>	4(2м+2ж)	196	10	6	2	3	4.11±1.9
	<i>Microtus arvalis</i>	3(2м+1ж)	152	4	3	1	1	1.43±0.6

* - брой изследвани мъжки и женски индивиди.

район ($G = 4,54$; $P \leq 0,005$). Повишаването на честотата на хромозомните аберации е свързано с установените през периода на изследване повишени концентрации на кадмиеви аерозоли, в резултат на емисионни наслагвания от разположения в района КЦМ и дифузното разпространение на утаени количества от земната повърхност към биотата.

При индивидите на *A. flavicollis* се наблюдава тенденция към нарастване на аберантните клетки в импактния район, но не се установява статистически достоверна разлика между двата района ($G = 1,99$; $P \leq 0,1$).

Резултатите от проведените тестове върху зоомониторните видове от двата района показват, че популациите на свободно живеещите гризачи в импактния район са подложени на въздействието на индустриалното замърсяване и могат да бъдат използвани като индикатори за замърсяване, като нивото на това въздействие е в зависимост от комплекс от фактори на средата (вкл. степента на замърсяване) и вътрепопулационните възстановителни механизми в популациите на зоомониторите. Резултатите от теста още веднъж потвърждават пригодността на дребните гризачи за целите на зоомониторинга. Тяхната геномна чувствителност, установена също и на базата на повишена микроядрена честота и кометен анализ (Chas-sovnikarova et al. 2010, Mitkovska et al. 2012b), ги прави удобни тест-обекти за отчитане на екологичния риск при замърсяване на околната среда.

1.4. Заключение за ефективността от прилагането на молекулярни и цитогенетични методи при дребните бозайници като зоомониторни видове

1. Получените резултати от проведеното биомониторингово изследване осигуряват фундаментална информация относно селекцията на подходящи биомаркери за мутагенност на природната среда и допринасят значително за пълноценно проучване на промишленото замърсяване.

2. Използваните три теста отчитат степента на геномния отговор на различни нива при зоомониторните видове. Проведените проучвания показват, че и трите метода са подходящи за целите на *in situ* биомониторинга и са сигурен маркер за мутагенност на средата.

3. *In vivo* микроядреният тест е много подходящ за оценка на генотоксичността в сухоземни екосистеми. Гризачите са най-подходящ обект за микроядрен тест поради високата си спонтанна честота на микроядра в еритроцити от периферна кръв. При изследваните в настоящото проучване видове гризачи с най-висока геномна чувствителност като индикатори на естествено замърсяване се оказаха видовете горски мишки от род *Apodemus* sp., следвани от средиземноморската мишка (*Mus macedonicus*) и полската мишка (*Apodemus agrarius*).

4. Кометният анализ, приложен при гризачи, даде възможност за проучване на ДНК повреди, резултат от директното въздействие на химичните агенти върху ДНК-молекулата при различни типове клетки на дребни гризачи от природни популации. За разлика от микроядрения-

тест, който отчита загуба на генетичен материал в резултат на нерепарирани ДНК-верижни скъсвания, кометният анализ отчита верижни скъсвания, които впоследствие могат да бъдат възстановени от ДНК-репаращата система. В този смисъл кометният анализ е чувствителен метод.

5. Кометният анализ отчита увреждания във всякакъв тип клетки и е приложим за различни видове гризачи, което го прави по-универсален метод по отношение на зоомониторните видове.

6. Освен че е евтин и лесен за приложение, кометният анализ изисква кратък период за провеждане и получаване на резултатите (до няколко часа), за разлика от стандартните цитогенетични методи, които отнемат повече време.

7. Приложеният тест „Хромозомни аберации в костномозъчни клетки на бозайници“ дава добра възможност за установяване на ДНК-увреждания в хромозомите на клетки от костен мозък на дребни гризачи, резултат от въздействието на химичните агенти от средата върху техните природни популации. Хромозомните аберации са предизвикани от директни верижни разкъсвания на ДНК от различни мутагени, репликация на увредени участъци или инхибиране на ДНК синтеза. Поради това методът е достатъчно чувствителен и широко се прилага за целите на биомониторинга.

1.5. Протоколи

1.5.1. Полеви методи за улов на дребни бозайници

Дребните бозайници не са лесен за улов обект. За целта се изисква оборудване – убиващи или живоловни капани тип „Херо“. В капаните се слага примамка (пържен хляб с лук, кашкавал, фастъчено масло) и се разполагат в местообитания, типични за съответния вид, вечер, когато животните са най-активни.

1.5.2. Протокол „Микроядрен тест“

Необходимо оборудване: светлинен микроскоп (при оцветяване с Гимза) или флуоресцентен микроскоп с филтър за акридиноранж (В-филтър) с обектив най-малко 100×; обикновени предметни и покривни стъкла, бехерови чашки за разтворите;

Методика: периферна кръв (5 μ L), събрана от опашната вена на изследваните животни, се разрежда във фосфатен буфер (pH 7.0). Капка от разтвора се разстила на предметно стъкло, фиксира се с абсолютен метанол (Merck) за 10 мин., суши се на въздух и се оцветява с акридин оранж (АО) според протокола на Hayashi et al. (1983).

Акридин-оранж (АО) – разтвор № 1 се приготвя като 0,1% воден разтвор, който може да бъде на разположение за няколко седмици, съхраняван при 4°C. Две части от разтвор №1 и 30 части Sørensen's фосфатен буфер (pH 6,8) (или 0,24 mM АО се разтварят в 1 / 15 М буфер) и се използва като работен разтвор № 2. Фиксираните клетки се оцветяват с разтвор № 2 в продължение на 3 минути при стайна температура. Препаратите се изплакват три пъти в буфера, всеки път за 1 до 3 минути. Ако ядрата на клетките излъчват червеникава флуоресценция, препаратите се изплакват за още няколко минути, за да флуоресцират ядрата оптимално в зелено. Препаратите могат да се превърнат в трайни с парафин балсам или други подходящи фиксатори.

Друг алтернативен и по-прост метод - една капка от 0,04 mM АО разтвор № 2 в Sørensen фосфатен буфер се капва върху препарат с фиксирани клетки и се покрива с покривно стъкло. Излишният разтвор се обира с филтър и препаратът е готов за фотолуминесцентна микроскопия. Наблюденията трябва да бъдат направени в рамките на 24 часа.

Номериранияте предметни стъкла се наблюдават при увеличение 100 $\times$ с В-филтър за АО.

Отчитане на микроядрата: цитоплазмата на полихромните еритроцити (PCE) излъчва червена флуоресценция, а микроядрата (MN), както и ядрата на ядрените клетки, флуоресцират жълтеникаво-зелено или жълто. За всяко животно се анализират за присъствие на микроядра по 2000 периферни еритроцита (както нормохроматични, така и полихроматични). Анализът на всички предметни стъкла трябва да се провежда от един изследовател, за да се избегнат индивидуални различия при наблюдението. За отчитането на микроядра Fenech et al. (1997) предлагат следните критерии:

- Диаметърът на микроядрото трябва да е по-малко от една трета от диаметъра на основното ядро;
- Микроядрото трябва да е ясно отделено или да застъпва само края на клетъчното ядро;
- Микроядрото трябва да дава същото оцветяване като ядрото.

Статистическа оценка: средната честота на MN, изразена като брой MN за 2000 еритроцита, и стандартното отклонение, се изчисляват за всеки вид/популация/група. Данните са анализирани за обективност и MN-честотата се сравнява между изследваните групи и/или местата на пробовземане чрез Mann–Whitney U test ($\alpha = 0.01$).

1.5.3. Протокол „Кометен анализ“

Неоходимо оборудване: водна баня, хоризонтална електрофореза, рН-метър, генератор за лед (или натрушен лед от хладилник), микропипети, предметни стъкла, стандартна лабораторна стъклария (добре затварящи се бутилки за буфери, бехерови чаши).

Методиката протича последователно през следните стъпки:

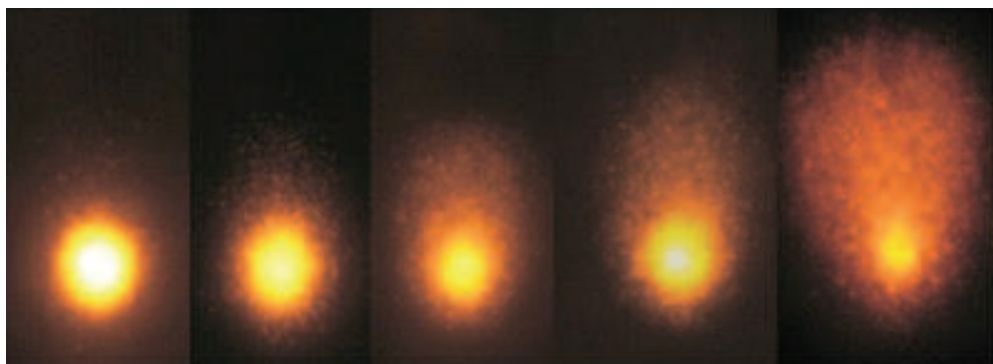
1. Приготвяне на лизиращ разтвор и охлаждане до 2–8°C (или охлаждане с лед минимум 20 минути преди употреба).
Лизиращият разтвор съдържа: 2.5 M NaCl, 100mM EDTA pH10, 10 mM Tris Base, 1% sodium lauryl sarcosinate, 1% Triton-X 100.
2. Агарозата се стапя на водна баня във вряща вода за 5 минути, след което се охлажда 20 минути на водна баня при 37°C. Температурата на агарозата е критичен фактор, тъй като при по-висока температура клетките могат да претърпят температурен шок.
3. Клетъчната суспензия (1×10^5 клетки/ml се добавя към разтопената агароза (37°C) в съотношение 1:10 (v/v), след което 75 μ l се накапват с пипета върху предметното стъкло.
4. Стъклата се оставят при 2–8°C на тъмно (в хладилник) за 10 минути.
5. Следва потапяне в охладения лизиращ разтвор и престой на студено при 2–8°C за 30–60 минути.
6. Стъклата се оцеждат от лизиращия разтвор и се потапят в свежо приготвен алкален денатуриращ разтвор, pH > 13, който за 50 ml съдържа: 0.6 g NaOH, 250 μ l 200 mM EDTA, 49.75 μ l дейонизирана вода. Разбърква се до пълно разтваряне. Разтворът е топъл по време на приготвяне и трябва да се охлади на стайна температура преди употреба.
7. Препаратите се оставят в алкалния разтвор от 20 до 60 минути при стайна температура на тъмно.
8. От алкалния разтвор стъклата се преместват в хоризонтален електрофоретичен апарат на равно разстояние от електродите. Внимателно се излива алкалния разтвор до нивото на пробите. Наглася

се силата на тока – 1 волт/см. Електрическият ток е приблизително около 300 mA, като електрофорезата протича за 20–40 минути.

9. Препаратите се оцеждат внимателно от разтвора и се потапят в етанол за 5 минути.
10. Следва изсушаване при стайна температура. Сушенето допринася за разпределението на клетките в една равнина, което улеснява наблюдението. Пробите могат да се съхраняват при стайна температура.

Оцветяване на стъклата: оцветяването се извършва с 1% разтвор на акридиноранж или с AgNO_3 (при липса на флуоресцентен микроскоп).

Отчитане на кометите: визуално кометите се категоризират в четири или пет различни класа (Фиг. 1.16) – Тип I (неувредени) и Тип IV (силно увредени). Тип I са клетките с цяла ДНК – изглеждат като „слънца“, т. е. имат интактно ядро със симетрично хало от ДНК около него. Клетките, които имат скъсвания в ДНК наподобяват „комети“ с глава (съдържаща неувредената ДНК) и опашка от фрагментирана ДНК (Тип II, клетки с малки и ясни опашки). Тип III – апоптични клетки, изглеждащи като „таралежи“ с малки интактни глави, около които е разпръсната постоянно фрагментираната ДНК.



Фиг. 1.16. Типове клетки, получени след гел-електрофореза на единични клетки: 1 (от ляво на дясно) – клетки с интактна ДНК и симетрично хало („слънца“); от 2 до 5 – клетки с разкъсвания във веригата на ДНК („комети“). (Types of cells obtained by gel-electrophoresis of single cells: 1 (from left to right) – cells with intact DNA and symmetric halo (“suns”); from 2 to 5 – cells with DNA breaks (“comets”).)

Статистически показатели за оценка: съществуват различни възможности за анализ и отчитане при кометния метод (Collins et al. 2008):

1. Измерване на дължината на кометната опашка с фотомикрограф или чрез използване на измервателна скала – трудоемък метод, даващ ограничена информация, тъй като кометната опашка се увеличава само при ниски нива на повреди и бързо достига максимум, което ограничава капацитета на метода;
2. Класифициране на кометите чрез визуално отчитане по принцип в пет категории: 0 представя неувредените клетки (комети без или с едва забележими опашки), а 1 – 4 отразяват нарастването на интензитета (наситеността) на кометната опашка. При всяка степен на повишаване на въздействие на стрес агентите %-а опашна ДНК се увеличава с около 20% от предходната.
3. Оптичен анализ с камера, свързана с компютър и подходящ софтуер – кометните изображения се селектират от оператор;
4. Автоматизирана система, която открива кометите и извършва анализ с минимална човешка намеса.

Три параметъра, характеризиращи миграцията на ДНК, са най-често използвани: дължина на кометната опашка, „момент“ на опашката и %-ДНК в опашката. Измерването на дължината на кометните опашка и глава и техните моменти е в условни единици, които могат да варират между различните проучвания и лаборатории. „Моментът на опашката“ е индекс, отразяващ миграцията на генетичен материал и относителното количество на ДНК в опашката и може да бъде калкулиран по различни начини. „Моментът на опашката на Олив“ например, е продукт от опашната дължина и %-а ДНК в опашката. Последният е мярка за относителната интензивност на флуоресценсия в главата и опашката (Collins, 2004). Collins (2004) вижда %-а опашна ДНК като най-полезния параметър, защото той покрива широк обхват на повреди (от 0 до 100%), независим е от настройките на използваните анализиращи програми и дава известна представа за това, как изглеждат кометите. За разлика от него, опашният момент не е линейно свързан с дозата и не осигурява индикации за вида.

1.5.4. Протокол „Хромозомни аберации в костномозъчни клетки на бозайници“

Костно-мозъчната тъкан е удобен модел за определяне на мутагенния ефект на околната среда поради ниската честота на спонтанни хромозомни аберации, висока пролиферативна активност на клетките и относително бързият и лесен метод за изготвяне на микроскопските препарати. Описаният по-долу метод за изготвяне и анализ на препарати от костен мозък на бозайници е приет като популационен показател за мониторинг на замърсяването в „Националната програма за биомониторинг на България. Експресни и перспективни методи за биологичен мониторинг“ (1999), втора част – Сухоземен зоомониторинг – популационно ниво (Топашка-Анчева, 1999). Тестът „Анализ на хромозомни аберации в костномозъчни клетки на бозайници“ е предложен от Организацията за икономическо сътрудничество и развитие на Европейския Съюз за тестване на химически съединения и замърсители още през юли 1997 г. (OECD 1997).

Необходимо е да се има предвид следното:

1. Клетките трябва да бъдат взети за анализ по време, когато те се намират в първата метафаза след приключване на съответното въздействие, за да бъде отчетена достатъчно точно честотата на индуцираните аберации. Това означава, че материалът за цитогенетичен анализ на изследваните животни трябва да бъде взет не по-късно от 24 часа след улавянето им.

2. Броят на изследваните животни трябва да бъде достатъчно голям така, че индивидуалните вариации в честотата на аберациите да не оказва влияние върху изводите. Броят на изследваните клетки от всяко животно, както и общият брой изследвани клетки, трябва да бъде достатъчно голям, за да даде възможност на базата на подходящ статистически анализ да се направят реалистични заключения върху кластогенния ефект.

Необходимо оборудване: Светлинен микроскоп, центрофуги до 1000 об/мин; аналитични везни; центрофужни епруветки от 5 ml, предметни стъкла.

Начин на пробовземане: Животните трябва да бъдат уловени с живоловни капани в характерните биотопи на съответния фонен или импактен район. Препоръчаният брой е 10 животни за район – по 5 женски

и 5 мъжки индивида. Минималният брой анализирани клетки за всяко животно е 50, така за всеки пол се анализират най-малко 250 метафазни пластинки. Ако е необходимо събирането на специфична информация за животни от един пол, броят на изследваните животни трябва да е най-малко 10. Така общият брой от 500 анализирани метафази би бил достатъчен, за да отговаря на изискванията за минимално количество изследвани метафазни клетки.

Предварителна обработка на пробите: За да има достатъчен брой метафазни пластинки и да се получат метафазни хромозоми, подходящи за цитогенетичен анализ, два часа преди убиването на животните се инжектира някакъв митотичен инхибитор: колхицин - 2 мг/кг телесно тегло, колцемид - 0,5 ml от 0,04% разтвор на мишка или винбластин – дозата е около 5 мг/кг.

Подготовка на материала за изготвяне на препарати: Известни са много методи за изготвяне на препарати за цитогенетичен анализ. Всички те имат някои основни положения. Всеки метод, който подsigурява получаването на добре пръснати метафазни пластинки е подходящ за цитогенетичния анализ.

- Животните се убиват един час след инжектирането на колхицина чрез цервикална дислокация или етерна наркоза. Отделят се двете бедрени кости, като се почистват от мускулната тъкан, костите се отрязват внимателно в двата края и костният мозък се издухва с помощта на спринцовка с хипотоничен разтвор, снабдена с подходяща игла. Клетките се разбиват с помощта на пастъорова пипета. Третирането на клетките от костния мозък с хипотоничен разтвор става като опитните животни се разделят на групи и на интервали след убиването на животните.
- Хипотонично третиране. Прибавя се 0,075M разтвор на калиев хлорид, загрят предварително до 37°C. Накапва се внимателно до 5 ml. Инкубира се за 20 мин. при 37°C на водна баня.
- Фиксиране. След 5 мин. центрофугиране при 800–1000 об./мин. се отлива хипотонизиращия разтвор и се добавя се 0,5 ml фиксатор (метанол и ледена оцетна киселина - 3:1), приготвен непосредствено преди използването му. Добавянето на фиксатора става внимателно, на капки, по стените на епруветката. Остава се да престои 30 мин. при 4°C. Ресуспендира се и след това се центрофугира се за 5 мин при 800

об/мин., внимателно се отлива супернатантът, като се оставя малък обем над утайката. Ресуспендират се клетките в останалия обем. Добавят се 2 ml свеж фиксатор на капки. Тази процедура се повтаря три пъти. Накрая обемът се довежда до 2 ml със свеж фиксатор.

Съхраняване и трайност на пробите: Клетъчната суспензия може да бъде запазена след последния етап чрез добавяне на 2 ml от фиксатора, в добре затворени епруветки, при 4°C.

Изготвяне на цитогенетични препарати за микроскопски анализ:

- Ако клетъчната суспензия е пазена в хладилник, фиксаторът се сменя и многократно се повтаря процедурата (фиксиране, центрофугиране, отливане, фиксиране и т.н.).
- С помощта на пипета се накапват две-три капки от суспензията върху студени, чисти, мокри предметни стъкла, поставени предварително в чаша с дестилирана вода в хладилник. Предметните стъкла се оставят да изсъхнат на въздуха. Приготвят се минимум 4–5 препарата за всяко изследвано животно. В зависимост от плътността на препарата и гъстотата на клетките, което определя и броя на метафазните пластинки, може да се наложи изготвянето на допълнителни препарати от съхранената в хладилник суспензия.
- Препаратите се надписват и номерират така, че да съответстват на номера на изследваното животно.
- Оцветяването на препаратите става с 5%-ен воден разтвор на Гимза за 15 мин., след като са изсушени напълно.

Методи за анализ:

1. Избор на подходящи клетки.

Общоприетият метод за избиране на клетки, подходящи за цитогенетичен анализ, е да се огледа препарата на слабото увеличение и след това клетките, които изглеждат подходящи се анализират на силното увеличение под имерсионен обектив 40×

2. Критерии за отчитане.

Изискване е пробите да бъдат анализирани под съответен код и препаратите да бъдат рандомизирани така, че да не може да се идентифицират отделните проби.

3. Класификация на аберациите.

Съществуват различни схеми за класификацията на хромозомните аберации. Добър пример за такава схема може да бъде намерен в работата на Preston et al. (1987), Marshall (1995) или в „Guideliness for study of Genetic effects in Human Populations“ на Световната здравна организация (1985). Всеки тип хромозомна аберация трябва да бъде означена и маркирана по подходящ начин, като за статистически анализ на данните е допустимо да се комбинират отделните класове аберации в по-общи категории – например, хроматиден тип делеции, хромозомен тип делеции, хроматидни обмени, хромозомни обмени и т.н.

Режим на пробовземане: Вземането на пробите трябва да става поне веднъж годишно за всяка зона. Методът е с висока чувствителност и дава първоначалната сигнална информация за възможно мутагенно въздействие на средата от антропогенен произход.

Статистически методи: За сравняване на получените данни за количеството на хромозомните аберации в пробите от дадена зона с данните от друга зона може да бъде използван t-критерия на Стюдънт.

1.6. Цитирана литература

- Белчева Р, Топашка-Анчева М (1993) Ръководство за практически занятия по генетика. Народна просвета, С., 192 с.
- Герасимова Ц (2012) Сравняване на чувствителността на кариотипа на мониторинни видове дребни бозайници към различни видове мутагени от околната среда. Дисертация за присъждане на научно-образователната степен “Доктор”, София, ИБЕИ-БАН, 197 с.
- Пеев Д, Герасимов С (1999) Национална програма за биологичен мониторинг. Phare. Експресни и перспективни методи за биологичен мониторинг. Пеев Д, Герасимов С (ред.) Изд. Геалибрис, София, 240с.
- Пешев Ц, Пешев Д, Попов В (2004) Фауна на България, том 27. Бозайници. София, (Акад. изд.) “Марин Дринов”, 632с.
- Топашка-Анчева М (1999) Хромозомни аберации в костномозъчни клетки на бозайници. В: Пеев Д, Герасимов С (ред.) Национална програма за биологичен мониторинг на България. Експресни и перспективни методи за биологичен мониторинг. Изд. Геалибрис, София, 86–91.

- Abramsson-Zetterberg L, Grawé J, Zetterberg G (1997) Spontaneous and radiation-induced micronuclei in erythrocytes from four species of wild rodents: a comparison with CBA mice. *Mutation research* 393: 55–71.
- Adrian MS, Johnson J, Cooke A (2002) Lead within ecosystems on metalliferous mine tailings in Wales and Ireland. *Science of the Total Environment* 299: 177–190.
- Anderson D, Yu TW, McGregor DB (1998) Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis*, 13: 539–555.
- Atanassov N (1997) Morphophysiological and cytogenetical analyses of small rodents' biomonitor species from the regions of Pirdop and Regional Background Station „Rozen“ (Bulgaria). In: Peev D, Ammann K, Artinian A (Eds) *Ecomonitoring in Rozen and Srednogorie – Bulgaria*. Enigma press Ltd, Sofia, 124–127.
- Atanassov N, Chassovnikarova T, Markov G (2000) Zoomonitoring in Regional background station „Strandzha“: Cytogenetic characteristic of *Apodemus flavicollis* Melch. In: *Proceedings of scientific conference “75 years Higher Forestry Education in Bulgaria“*. “75 years forestry education in Bulgaria“, Sofia, 227–230.
- Berry RJ (1975) On the nature of the genetical distance and island races of *Apodemus sylvaticus*. *Journal of Zoology* 176: 293–296.
- Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, Escobar P, Honma M, Kumaraveli TS, Nakajima M, Sasaki YF, Thybaudl V, Unom Y, M Vasquez, Hartmann A (2007) Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutation Research* 627: 31–35.
- Cagnin M, Moreno S, Aloise G, Garofalo G, Villafuerte R, Gaona P, Cristaldi (1998) A comparative study of Spanish and Italian terrestrial small mammal coenoses of different biotopes in Mediterranean Peninsular tip regions. *Journal of Biogeography* 25(6).
- Chassovnikarova Ts, Atanassov N, Kalaydzhieva V, Dimitrov H (2010) Micronucleus test from free living rodents as a biomarker for environmental stress in situ. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 24: 390–396.
- Chassovnikarova Ts, Atanassov N, Ninova P, Russev G (2004) A biomonitoring method for complex mutagen's potential assessment of the environment in anthropogenic influenced regions. *Forest idea* 10 (1): 155–160.
- Chassovnikarova Ts, Mecheva R, Dimitrov K (2005) *Microtus güntheri* (Danford & Alston) – a monitor species for estimation of a polymetal dust emission influence. *Belgian Journal of Zoology* 134: 27–30.
- Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivao I, Giovannelli L, Kruszewski M, Smith CC, Stetina R (2008) The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23 (3): 143–151.
- Cristaldi M, Ieradi LA, Licastro E, Lombardi Boccia G, Simeone G (1985) Environmental impact of nuclear power plants on wild rodents. *Acta zoologica fennica* 173: 205–207.
- Damek-Popraway M, Sawicka-Kapustav K (2003) Damage to the liver, kidney, and testis with reference to burden of heavy metals in yellow-necked mice from areas around steelworks and zinc smelters in Poland. *Toxicology* 186: 1–10.

- Degrassi F, Tanzarella C, Ieradi LA, Zima J, Cappai A, Lascialfari A, Allegra F, Cristaldi M (1999). CREST staining of micronuclei from free-living rodents to detect environmental contamination *in situ*. *Mutagenesis* 14 (4): 391–396.
- Dixon DR, Pruski AM, Dixon LRJ, Jha AN (2002) Marine invertebrate eco-genotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis* 17: 495–507.
- Eckl PM, Riegler D (1997) Levels of chromosomal damage in hepatocytes of wild rats living within the area of a waste disposal plant. *The Science of the Total Environment* 196: 141–149.
- Evans HJ, Neary GJ, Williamson FS (1959) The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma rays in *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage; the production of micronuclei, *International Journal of Radiation Biology* 1: 230–240.
- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 339: 37–59.
- FDA (Food and Drug Administration) (2006) Guidance for Industry and Review Staff Recommended Approaches to Integration of Genetic Toxicology Study Results. *Federal Register* 7(2): 350–351. (Wednesday, January 4, 2006) From the Federal Register Online via the Government Printing Office [www.gpo.gov]
- Gerasimova, Ts. M. Topashka-Ancheva (2010) Experimental data for chromosome fragility in small mammal species. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, 63 (2): 277–284.
- Gerasimov S, Yurukova L, Atanassov N (1997) Results of biomonitoring investigations in Regional Background Stations in Bulgaria. *Ecologija* (Beograd) 32 (1): 7–14.
- Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins AR, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice R R (2003) Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. *Mutagenesis* 18: 45–51.
- Hayashi M, Honma M (2007) Evaluation of *in vivo* genotoxicity of chemicals development and application of rodent micronucleus assay. *Pub Med* 125: 17–34.
- Heddle JA (1973) A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutation Researches* 18: 187–190.
- Ieradi LA, Cristaldi M, Mascanzoni D, Cardarelli E, Grossi R, Campanella L (1996) Genetic damage in urban mice exposed to traffic pollution. *Environmental Pollution* 92: 323–328.
- Ieradi LA, Giordano D, Amarena D, Cardarelli E, Campanella L, Grossi R (1992) Heavy metal contamination in small rodents from urban areas. In: Bohac J (Ed) *Proceedings of the VI International Conference Bioindicators Deterioration Regionis*, České Budejovice, Czechoslovakia, 15–21 September 1991, 219–227.
- Ieradi LA, Moreno S, Bolívar JP, Cappai A, Di Benedetto A, Cristaldi M (1998) Free-living rodents as bioindicators of genetic risk in natural protected areas. *Environmental Pollution* 102: 265–268.

- Ieradi LA, Zima J, Allegra F, Kotlánová E, Campanella L, Grossi R, Cristaldi M (2003) Evaluation of genotoxic damage in wild rodents from a polluted area in the Czech Republic. *Folia Zoologica* 52 (1): 57–66.
- Jha AN (2004) Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview, *Mutation Research* 552: 1–17.
- Jha AN (2008) Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23 (3): 207–221.
- Krishna G, Hayashi M (2000) In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research* 455: 155–166.
- MacGregor JT, Heddle JA, Hite M, Margolin BH, Ramel C, Salomon MF, R. Tice R, Wild D (1987) Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research* 189: 103–112.
- Marshall R. (1995) Measurement of chromosome aberrations *in vitro* using human peripheral blood lymphocytes. In: *Methods in molecular biology. In vitro toxicity testing protocols*, Ed. by S. O'Hare and C. Attervill, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 43: 287–298.
- Materiy LD, Maslova KI (1978) Micronuclei in peripheral blood cells of *Microtus oeconomus* Pall. living in areas of enhanced natural radioactivity. *Radiobiologia* 18: 919–922.
- Matter B, Schmid W (1971) Trenimom-induced chromosomal damage in bone-marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test. *Mutation Research* 12: 417–425.
- McKelvey-Martin VJ, Green MH, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Meo MP, Collins A (1993) The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutation Research* 288: 47–63.
- Metcheva R, Atanasov N, Topashka-Ancheva M (1994) Bioaccumulation de métaux toxiques de l'usine de métallurgie non ferreuse près de Plovdiv dans l'organisme du campagnol méditerranéen (*Microtus guentheri* Dan. et als., 1880), (Microtinae, Rodentia). *Acta zoologica bulgarica* 47: 54–65.
- Metcheva R, Belcheva M, Chassovnikarova Ts (2008) Snow vole (*Chionomys nivalis*) an appropriate environmental bioindicator in alpine ecosystems. *Science of the Total Environment* 391(2–3): 278–283.
- Metcheva R, Teodorova S, Topashka-Ancheva M (2001) A comparative analysis of the heavy metal and toxic elements loading indicated by small mammals in different Bulgarian regions. *Acta zoologica bulgarica* 53: 6–80.
- Michailova P, Atanasov N, Ilkova J, Chassovnikarova T, Duran M, Karadurmus E (2010) Genome response of model invertebrates and vertebrates species to stress agents in the environment. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 24: 390–396.
- Müller WU, Streffer C (1994) Micronucleus assays. In: Obe G (Ed) *Advances in Mutagenesis Research*, Springer-Verlag, Berlin, 1–134.

- Nunes AC, Auffray JC, Mathias ML (2001) Developmental instability in a riparian population of the Algerian mouse (*Mus spretus*) associated with a heavy metal polluted area in central Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 41: 515–521.
- Olive PL, Banath JP, Durand RE (1990) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the “Comet” assay. *Radiation Research* 122: 86–94.
- Östling O, Johanson KJ (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123: 291–298.
- Preston R J, Dean B J, Galloways S, Holden H, McFee A F, Shelby M (1987) Mammalian in vivo cytogenetic assays analysis of chromosome aberrations in bone-marrow cells. *Mutation Research* 182(2): 157–165.
- Rojas E, Lopez MC, Valverde M (1999) Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 722: 225–254.
- Savage JRK (1976) Annotation: Classification and relationships of induced chromosome aberration assays, *Journal Medicine Genetics* 13: 103–122.
- Schmid W (1973) Chemical mutagen testing on in vivo somatic mammalian cells. *Agents Action* 3: 77–85.
- Singh NP, Mc Coy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175: 184–191.
- Smith CC, Adkins DJ, Martin EA, O'Donovan M R (2008) Recommendations for design of the rat comet assay. *Mutagenesis* 23 (3): 233–240.
- Speit G, Hartmann A (2006) The comet assay – a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: Henderson DS (Ed.) *Methods in Molecular Biology*, 113, DNA Repair Protocols: Eucaryotic Systems, 2nd ed., Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 275–286.
- Stopka P, Macdonald DW (1999) The market effect in the wood mouse, *Apodemus sylvaticus*: selling information on reproductive status. *Ethology* 105: 969–982.
- Tapisso JT, Marques CC, da Luz Mathias M, Ramalhinho M (2009) Induction of micronuclei and sister chromatid exchange in bone-marrow cells and abnormalities in sperm of Algerian mice (*Mus spretus*) exposed to cadmium, lead and zinc. *Mutation Research* 678: 59–64.
- Tice RR (1995) The single cell gel/Comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Phillipps DH, Venitt S (Eds.) *Environmental Mutagenesis*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, 315–339.
- Tice RR, Andrews PW, Hirai O, Singh NP (1991) The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells.

- In: Witmer CR, Snyder RR, Jollow DJ, Kalf GF, Kocsis JJ, Sipes IG (Eds) Biological Reactive Intermediates. IV. Molecular and Cellular Effects and Their Impact on Human Health, New York, Plenum Press, 157–164.
- Tice RR, Ormiston BG, Boucher R, Luke CA, Paquette DE (1987) Environmental biomonitoring with feral rodent species. *Environmental Science Research* 36: 175–179.
- Tice RR, Agureli E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000) Single cell gel/Comet assay: a guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 5 (3): 206–221.
- Topashka-Ancheva M, Metcheva R, Atanasov N, Belcheva R (1992) Bioaccumulation and chromosome aberrations investigations in two small rodents' species populations. 2-nd International Symposium on Ecology, Bourgas (Bulgaria), September 1993. Bulgaria Scientists Union, Bourgas Branch publishers, Bourgas, 2: 338–343.
- Topashka-Ancheva M, Atanasov N, Metcheva R, Minkova V (1993) Effects of heavy metals on guenther's vole, *Microtus guentheri*. International Symposium "Ecology '92", Bourgas (Bulgaria), September 1992. Bulgarian Scientists Union, Bourgas Branch publishers, Bourgas, 345–351.
- Topashka-Ancheva M, Metcheva R, Teodorova S (2003a) A comparative analysis of the heavy metal loading of small mammals in different regions of Bulgaria II: Chromosomal aberrations and blood pathology. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 188–193.
- Topashka-Ancheva M, Metcheva R, Teodorova S (2003b) Bioaccumulation and damaging action of polymetal industrial dust on laboratory mice *Mus musculus alba* II. disturbances. *Environmental Research* 92 (2): 152–160.
- Topashka-Ancheva M, Yordanova Ts (2008) Comparative analysis of the karyotype sensitivities of *Apodemus flavicollis* and laboratory mice to DNA-damaging agents. *Journal of Natural History* 42: 269–278.
- Tull-Singleton S, Kimball S, McBee K (1994) Correlative analysis of heavy metal bioconcentration and genetic damage in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) from hazardous waste site. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 52: 667–672.
- UKCOM (2000) Guidance on a strategy for testing of chemicals for mutagenicity. United Kingdom Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment, pp. 1–36 (<http://www.dh.gov.uk/asset-root/04/07/71/96/04077196.pdf>).
- Velickovich M (2004) Chromosomal aberrancy and the level of fluctuating asymmetry in black-striped mouse (*Apodemus agrarius*): effects of disturbed environment. *Hereditas* 140 (2): 112–122.

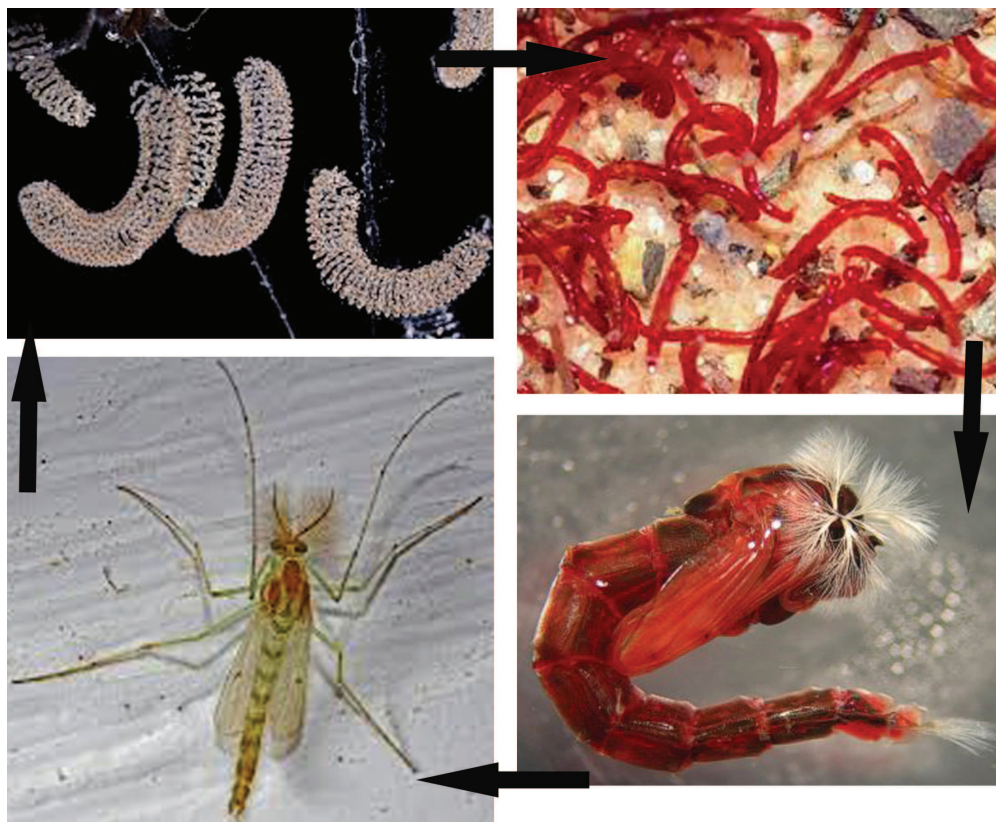
2. Политенни хромозоми при сем. Chironomidae, Diptera и тяхното значение за биомониторинга

Параскева Михайлова, Юлия Илкова

2.1. Значение на семейство Chironomidae за биомониторинговите изследвания

Използването на моделни безгръбначни организми за целите на биологичния мониторинг позволява да се правят оценки на замърсяването на околната среда на индивидуално, популационно и на ниво съобщества. Предотвратяването на дългосрочните последствия от действието на редица замърсители в средата на ниво съобщества и популации е възможно да се оцени чрез възникнали фенотипни или геномни изменения при отделен индивид на избрани индикаторни видове. Осигуряване на връзката между отговор на въздействието на околната среда на индивидуално ниво и промените на по-високи нива на организация на биологичната материя е една от най-важните стъпки за оценка влиянието на стрес агентите в околната среда (Rosenberg 1992). Особено подходящи за този тип изследвания са двукрилите насекоми от сем. Chironomidae.

Редица видове от сем. Chironomidae имат важни физиологични, екологични и генетични особености, които ги правят моделна група за целите на еко-токсикологичните изследвания. Техният жизнен цикъл включва яйца, ларва, какавида и възрастно (Фиг. 2.1). Какавидата и възрастното живеят от два до три дни. Основната функция на възрастните е да участват в репродукцията на вида. Яйцата са във формата на яйчна маса, съдържаща стотици яйца в зависимост от вида. Ларвният стадий е най-продължителният стадий на развитие, протичащ за около 25–30 дни. Ларвите преминават през 4 етапа на развитие, като последният има 7 фази (Кикнадзе 1976, 1978). Поради широкото разпространение на хирономидните ларви в различни водни екосистеми, те играят изключително важна роля за функцията и структурата на тези екосистеми. Хирономидите представляват 50% от безгръбначната фауна на водните басейни, като по численост и биомаса доминират в бентоса на водните басейни, служат като основна храна на много видове гръбначни животни – риби, птици и др., което сочи



Фиг. 2.1. Етапи на развитие на видовете от сем. Chironomidae: Яйчни маси; ларва; какавида; имаго (Metamorphosis of Chironomidae species - egg masses, larvae, pupa, imago)

тяхното участие във важни хранителни вериги. Класификацията на езерата, в зависимост от тяхната степен на замърсяване (олиготрофни, мезотрофни и еутрофни), се извършва въз основа на съобществата на хирономидните ларви (Saether 1975). Ларвите играят и важна роля както в продуктивността на водните екосистеми, така и за тяхното самопречистване. В повечето случаи те обитават дънните отложения (седимента), т.е. местата където се концентрират различни замърсители - радионуклеиди, тежки метали и др., поради което те директно са изложени на антропогенни въздействия, акумулират значителна част от замърсители на околната среда и по този начин участват в трансформацията им. Някои автори (Балушкина 1987) считат, че пластичността и адаптивните способности на тези

организми определят тяхната индикаторна значимост по отношение на един или друг фактор на средата. Друга много важна особеност на повечето представители от тази група насекоми е наличието на хемоглобин в хемолимфата на ларвите (видовете от род *Chironomus* Mg.) - физиологична особеност, осигуряваща адаптацията им в среда бедна на кислородно съдържание.

При избиране районите на изследване с цел проследяване генотоксичния ефект на замърсители в околната среда върху видове от сем. Chironomidae, сме се ръководили от данните за импактни райони, посочени в „Националната програма за Биомониторинг в България“ (Пеев и Герасимов 1999). Базирайки се на информацията в тази програма сме изследвали индустриално замърсени водни басейни: река Марица (край Пловдив) и река Чая/Чепеларска (край КЦМ „Пловдив“, Асеновград), характеризиращи се с по-високи концентрации на Cr, Cu, Mn, Pb, Cd в седимента (Michailova et al. 2012в) в сравнение със стойности, характерни за стандарта (Forstner and Salomons 1980). Например, стойностите на оловните йони от горе посочените водни басейни превишават през изследваните години (2009, 2010) съответно 18 и 34 пъти тези на стандарта. Такива завишени стойности на йони на тежки метали са установени и в други изследвани от нас водоеми на Турция, Полша, Италия (Michailova et al. 2012абвг).

Като основен моделен вид е използван *Chironomus riparius* Mg., чийто ларвен стадий може да бъде намерен във водоеми с различна степен на антропогенно замърсяване. Изследвани са и други широко разпространени видове от Полша и Италия*: *Chironomus melanotus* Keyl, *Kiefferulus tendipediformis* (цитотип 2) Goetghebuer, *Chironomus polonicus*, Michailova, Kownacki, Langton, *Glyptotendipes gripekoveni* Kieffer, *Micropsectra pallidula* (Meigen) и *Polypedilum convictum* (Walker).

При разработването на проекта не са установени видове от сем. Chironomidae от чисти, незамърсени водоеми както у нас, така и във водоеми от някои изследвани страни. Поради тази причина като контрола е използван лабораторно отгледан моделен вид - *Chironomus riparius* Mg. и материал, събран по-рано от чист водоем в Италия - Corio (Sella et al. 2004).

* Геномната изменчивост на видове, събрани от Полша и Италия, представя обобщено изследване на единия автор на разработката (П.Михайлова) в сътрудничество със специалисти от Полската, Руската Академии на науките и Университета в Торино.

2.2. Биомаркерни показатели

За оценка състоянието на околната среда се предлагат няколко биомаркерни системи на морфологично, цитогенетично и биохимично ниво.

2.2.1. Външно-морфологични изменения (малформации) в ларвите на видове от сем. *Chironomidae*, критерий за оценка на замърсяването в околната среда

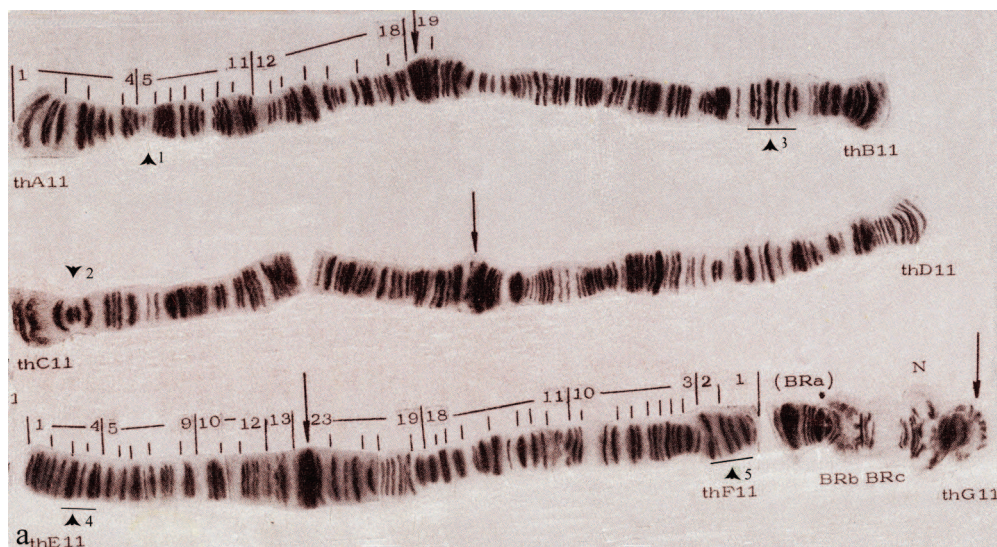
Морфологичните деформации представляват директен фенотипен отговор на стрес-въздействията от околната среда (Warwick 1990) и са използвани като ценни морфологични индикатори за оценка токсичното действие на различните замърсители. Деформации, в резултат на различни замърсители в околната среда, са наблюдавани във важни структури на устния апарат на ларвата (Warwick 1988). Такива изменения са установени при ларви на видове от родовете: *Procladius* Kieffer, *Chironomus* Mg., *Kiefferulus* Goetghebuer, *Procladius* Skuse и др. (Bhattacharyay et al. 2005). Най-често тези изменения възникват при повишено съдържание на йони на различни метали: цинк, кадмий, олово, никел, алуминий и др. В антропогенно замърсени водоеми в Белгия, Канада и Полша е наблюдавана определена зависимост между възникналите деформации в устния апарат на ларвата и замърсителите в околната среда.

Честотата на срещане на тези деформации нараства пропорционално с повишаване на концентрациите на някои тежки метали (Janssens de Bisthoven et al. 1992).

Установена е връзка между повишаване концентрацията на олово и малформациите в антените на видове от род *Chironomus*, *Kiefferulus* и *Procladius* (Bhattacharyay et al. 2005), което сочи наличие на определена зависимост между типа и концентрацията на замърсителите от една страна, и вида и честотата на деформациите в устния апарат от друга. Някои изследвания показват, че измененията в мандибулите и премандибулите са предимно свързани с токсичното действие на йони на тежки метали, а измененията в ментума и антените са резултат от въздействията на органични замърсители и пестициди (Janssens de Bisthoven et al. 1992). Според белгийски изследователи (Vermeulen et al. 1998) деформациите на определени части от устния апарат (ментум) се индуцират дори и при

ниски нива на замърсявания, а тези в мандибулите могат да възникнат само при високи концентрации на различните типове замърсители. Със значително ниска честота установяваме малформации в устния апарат (ментума) на *C. acidophilus* (Michailova et al. 2009a), *C. plumosus* (Ilkova 2004) и *C. riparius* (Michailova et al. 20126).

Наши резултати сочат също, че много по-голяма чувствителеност на външни въздействия има геномът, отколкото външно-морфологичните структури на ларвите на различни видове хирономиди (Michailova et al. 20126). От друга страна, изменения в устния апарат на ларвите, т.е. поява на различни деформации, могат да възникнат и при промяна на температурата, типа на хранене, имбридинг ефект, голяма плътност на



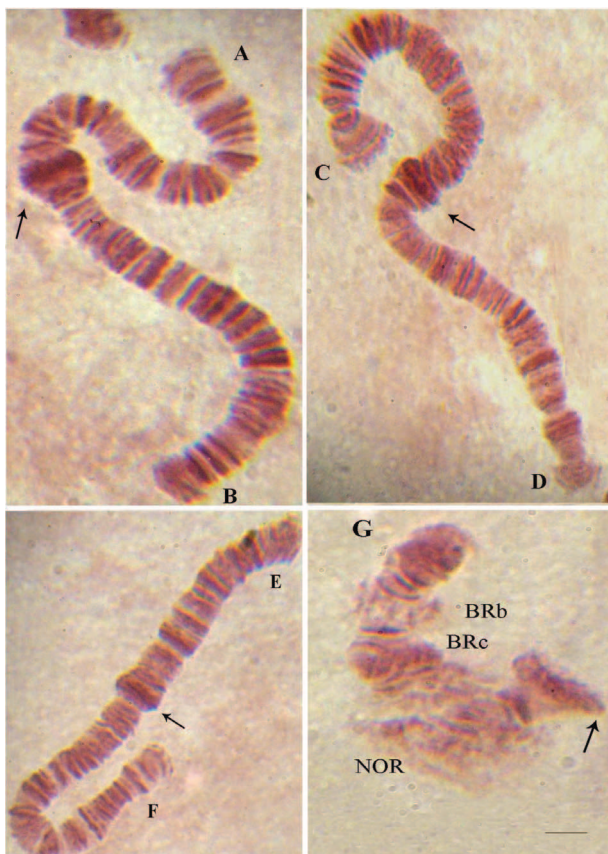
Фиг. 2.2а. Политенни хромозоми на *Chironomus riparius* Mg. (*C. riparius* Mg. polytene chromosomes). Стандартна хромозомна карта (Кикнадзе и др. 1991): малките стрелки показват цитогенетичните маркери за идентифициране на хромозомите AB, CD и EF (standard chromosome map – small arrows indicate the cytogenetic markers for chromosomes AB, CD and EF). Големите стрелки сочат локализацията на центромерния район във всяка хромозома (Large arrows indicate the localization of the centromere regions in the chromosomes). Хромозома G - Балбианови пръстени (BRa, BRc, BRb), ядрцев организатор (N), (Chromosome G, Balbiani rings (BRa, BRb, BRc), Nucleolar Organizer (NOR). thA11, thB11, thC11, thD11, thE, thF, thG - стандартна последователност на дискове в политенните хромозоми на *Chironomus riparius* (standard band patterns of the polytene chromosomes of *Chironomus riparius*).

популацията и др. (Servia et al. 2000), което показва, че те не са достатъчно сигурен маркер за оценка състоянието на водната екосистема. Това наложи да съсредоточим нашето внимание главно върху промените в генома на цитогенетично и биохимично ниво.

2.2.2. Геномни изменения на видове от сем. Chironomidae, критерий за оценка на замърсяването в околната среда

Много важна характеристика на видове от семейство Chironomidae е наличието в редица тъкани на ларвите (малпигиеви тръбици, клетки на храносмилателния тракт, слюнчени жлези) на уникални структури – политенни хромозоми, които са силно чувствителни на въздействия на стрес-агенти от околната среда. Политенните хромозоми са интерфазни хромозоми, получени в резултат на ендомитоза, с размери,

Фиг. 2.26. Политенни хромозоми на *Chironomus riparius* Mg. (*C. riparius* Mg. polytene chromosomes). Политенни хромозоми: Стрелката показва центромерните райони. Балбианови пръстени – BRb, BRc, Ядръцев организатор – NOR. Мащабната линейка е равна на 100 μ m. (Polytene chromosomes: arrows indicate centromere regions; BRc and BRb – Balbiani Rings; NOR- Nucleolar Organizer. Bar = 100 μ m)



значително превишаващи тези на метафазните хромозоми. Поради пълната конюгация на хомолозите им, броят на хромозомите в клетки с политенни хромозоми е равен на хаплоидния им брой хромозоми. Много важна характерна особеност е видово специфичния рисунък по дължината им (Фиг. 2.2аb). Най-добра дисковидна структура имат политенните хромозоми от слюнчените жлези на ларви последна възраст, което определя и тяхното приложение за целите на генотоксикологията. Видово специфичната дисковидна структура на политенните хромозоми позволява детайлен анализ на индуцирани структурни хромозомни и функционални изменения в резултат на редица стрес-условия на средата. Наличието на стандартни хромозомни карти за повечето широко разпространени видове (Кикнадзе и др. 1991, Michailova 1989, 2011, Michailova et al. 2012b) позволява детайлно определяне типа и локализацията на възникналите соматични структурно-функционални изменения – реакция към различни токсиканти на околната среда.

Структурната изменчивост се проявява чрез структурно-хромозомни аберации, засягащи отделни клетки в политенните хромозоми – т.н. соматична изменчивост. Функционалната изменчивост засяга главно важни структури: Балбианов пръстен и ядърцев организатор.

2.2.2.1. Геномна нестабилност при видове от сем. Chironomidae, реализирана на цитогенетично ниво

На цитогенетично ниво е изследван *C. riparius* - широко разпространен вид, чиито ларви се срещат във водоеми с различна степен на антропогенно замърсяване. Важна особеност на вида е отглеждането му в лабораторни условия (Michailova 1985), което осигурява възможност за провеждане на експерименти за определяне генотоксичния характер на даден замърсител (Michailova et al. 2001a). Видът има и важни цитогенетични предимства: 1) Малък брой хромозоми – $2n = 8$, със съчетание на хромозомни рамена AB, CD, EF, G характерно за цитокомплекс „thummi“; 2) Стандартна хромозомна карта (Кикнадзе и др. 1991, Hägele 1970) (Фиг. 2.2a), позволяваща провеждането на детайлен цитогенетичен анализ; 3) Най-малката хромозома G носи важни клетъчни структури, силно чувствителни на стрес-агенти в околната среда: ядърцев организатор (NOR) и три Балбианови пръстена (BRs) – BRa, BRb, BRc, като BRa функционира само в няколко клетки от слюнчената жлеза. Балбиановият пръстен BRa не е чувствителен на стрес-условията в околната среда, но висока чувствителност показват другите

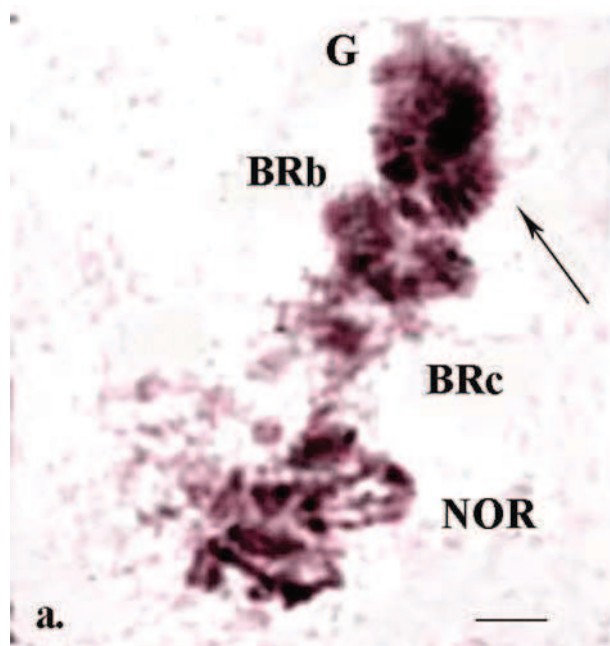
два Балбианови пръстена - BRb и BRc (Michailova et al. 20096, 20126); 4) По външни морфологични признаци лесно може да бъде определена възрастта и фазата на развитие на ларвата (Фиг. 2.3), което е изключително важно при оценка функционалната активност на по-горе посочените важни клетъчни структури (BRs и NORs). За целите на биомониторинга се използват ларви 4-та възраст, фаза 6–7 (Кикнадзе 1978). При нормално развитие на вида, Балбиановите пръстени и ядърцевият организатор в слюнчените политенни хромозоми на ларви от тази възраст се характеризират с висока транскрипционна активност (Кикнадзе 1978). Транскрипционната активност на тези важни клетъчни структури се променя в резултат на въздействия на йони на тежки метали с високи концентрации (Michailova et al. 1998), което на морфологично ниво на политенните хромозоми се реализира с намаляване размерите на тези структури.

Цитогенетичните анализи на моделния вид *C. riparius* от водоеми в България и Турция, със завишени стойности на йони на тежки метали,

сегменти	1	2	2	3	4	5	6	7
1 гърден								
2 гърден								
3 гърден								
8 корем женска								
9 корем женска								
9 корем мъжки								

Фиг. 2.3. Морфологични признаци за определяне на пола и възрастта на ларви от сем. Chironomidae (по Ильинская 1982). (Morphological features for determination of the Chironomidae larval sex and stage). На хоризонтала са посочени фазите на развитие на ларви 4-та възраст. (The phases of 4th larva stage are presented on the horizontal line).

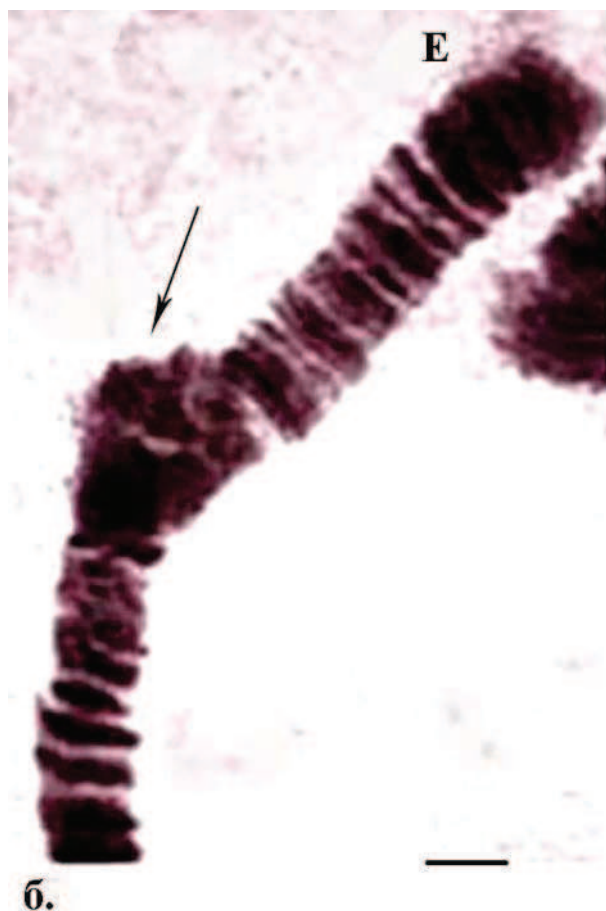
сочат появата на широк спектър от **соматични** структурно-хромозомни изменения – „букет“ от уникални изменения, срещащи се с ниска честота, засягащи няколко клетки от жлезата, обхващащи малък район от хромозомата, и съсредоточени предимно в проксималните райони на хромозомите на вида. В хромозомите AB, CD, EF са установени главно соматични пара- и перичентрични хетерозиготни инверсии (Фиг. 2.4аб). Установени са и други аберации със соматична изява: дефишънси (Фиг. 2.5) и ампликации (Фиг. 2.6), които могат също да се използват като биомаркер за наличие на стрес агенти във водни екосистеми (Michailova et al. 2012абвгде, Jablonska-Brana et al. 2013). Особено чувствителна е малката хромозома G, където соматичните структурно-хромозомни аберации (делеции), обхващат важните клетъчни структури (Балбиановите пръстени BRb и BRc) и тя се превръща в т. н. „помпоноподобна“ хромозома (Фиг. 2.7абв). Тези аберации се срещат със значими стойности в изследвания материал, както от замърсените с тежки метали водоеми в България, така и от изследваните водоеми в Турция. Стойностите на делециите, обхващащи BRc/BRb в хромозома G на вида, събран от замърсените райони в България (р. Марица, р. Чая и водоем до гр. Пловдив) значимо нарастват в сравнение с контролата: съответно за р. Марица – $G-43=834$, $df=1$, $P<0.001$; за р. Чая – $G=33.082$, $df=1$, $P<0.001$;



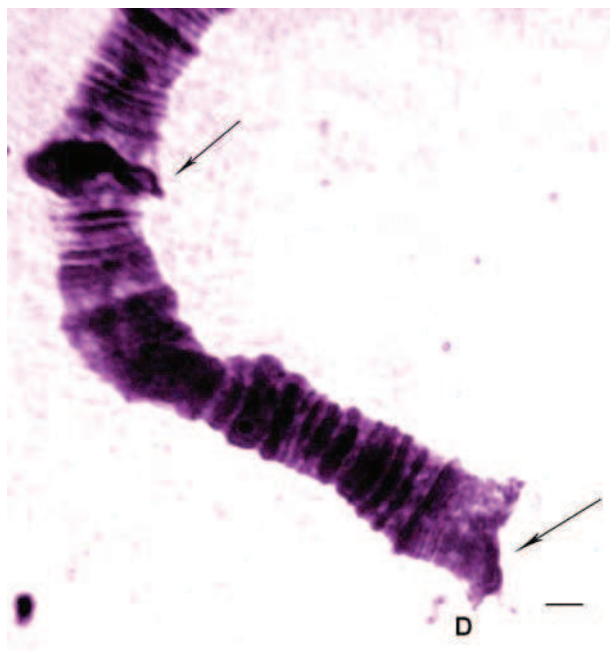
Фиг. 2.4а. Соматични хетерозиготни инверсии в хромозомите на *C. riparius*. Мащабната линейка е равна на 100 μm . (Somatic heterozygous inversions of *C. riparius*) (Duran et al. 2012. Bar = 100 μm .) Парацентрична хетерозиготна инверсия в хромозома G (Paracentric heterozygous inversion in chromosome G). BRb, BRc – Балбианови пръстени (Balbiani Rings), NOR – Ядръцев организатор (Nucleolar Organizer).

за гр. Пловдив (замърсен водоем до стопански двор) – $G = 40.834$, $df = 1$, $P < 0.001$. Същата тенденция на значимо нарастване на този тип аберации в най-малката хромозома G се наблюдава и при вида, събран от замърсени реки от Турция – р. Derincay - $G = 22.088$, $df = 1$, $P < 0.001$; р. Yeshilirmak - $G = 4.41$, $df = 1$, $P < 0.01$. Тъй като малката хромозома много лесно може да бъде идентифицирана в генома на вида, предлагаме възникналите в нея соматични изменения да бъдат използвани като биомаркери за наличие на замърсяване с тежки метали във водни екосистеми.

Соматичните аберации, установени в политенните хромозоми на *C. riparius*, събран от замърсени български и турски водоеми, са със статистически значими стойности ($P < 0.001$) в сравнение с контролата. Но получените резултати показват, че няма корелация между концентрациите на отделните йони тежки метали и конкретни соматични хромозомни



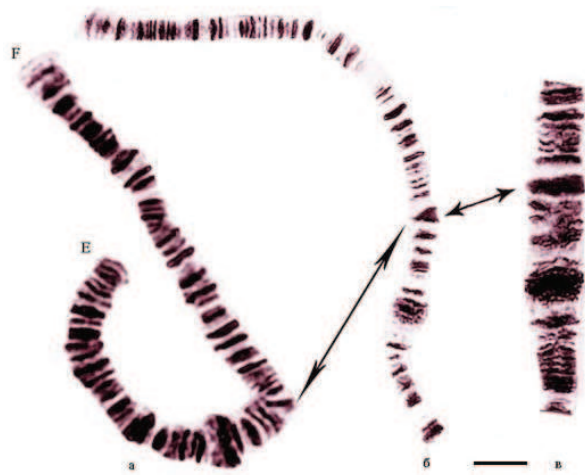
Фиг. 2.46. Соматични хетерозиготни инверсии в хромозомите на *C. riparius*. Машабната линейка е равна на 100 μm . (Somatic heterozygous inversions of *C. riparius*. Bar = 100 μm .) (Duran et al. 2012). Перицентрична хетерозиготна инверсия в хромозома на EF на *C. riparius* Mg. (Pericentric heterozygous inversion in chromosome EF).



Фиг. 2.5. Дефишънс в рамо D на *Chironomus melanotus* Keyl. Мащабната линейка е равна на 100 μm . (Deficiency in arm D of *Chironomus melanotus* Keyl) (Jablonska-Brana et al. 2013. Bar = 100 μm). Центромерният район е в хетерозиготна състояние. (The centromere region is in a heterozygous state).

аберации. Например, в изследваните български реки концентрацията на оловните йони е значимо висока (Michailova et al. 2012в) в сравнение с тези на стандарта, но честотата на индуцираните парацентрични инверсии от този водоем е ниска. Този тип изменения достига значимо по-голяма честота при вида, събран от р. Derinceay, Турция, където концентрацията на този йон не е много висока. Тази специфична реакция на генома се обяснява с факта, че в природата отделните метали не действат самостоятелно, образуват се комплекси, чийто ефект зависи от протичащите физични, химични и биологични процеси в околната среда (Baršienė and Bucinskiene 2001).

Въз основа на установените соматични структурно-хромозомни аберации във всичките хромозоми на изследвания вид е възможно определянето на т. н. соматичен индекс (S index), изчислен въз основа на съотношението на броя възникнали соматични структурно-хромозомни аберации към броя на изследваните индивиди на съответния вид (Sella et al. 2004). Установена бе следната закономерност: стойностите на соматичния индекс нарастват с повишаване концентрацията на тежките метали във водоемите (Michailova et al. 2012б). Тази тенденция се наблюдава и при други широко разпространени видове хирономиди, обитаващи тежко метално замърсени райони (Michailova et al. 2012д). Установява се, че

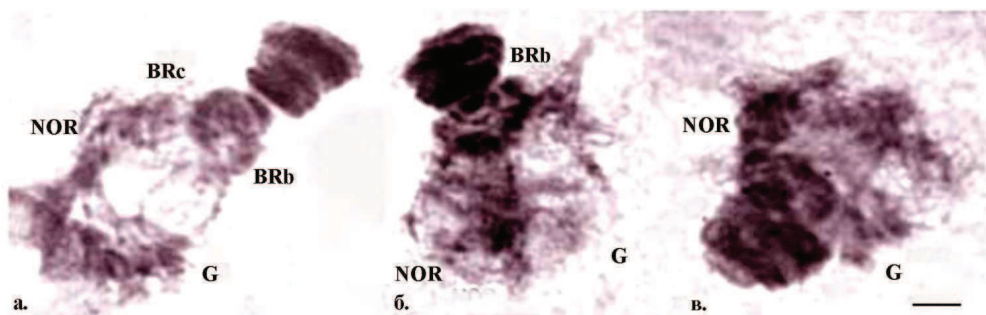


Фиг. 2.6. Амплификация в рамо F на *C. riparius* Mg. Мащабната линейка е равна на 100 μm . (Amplifications in arm F of *C. riparius* Mg. Bar = 100 μm .) (по Михайлова П., 1998. Еукариотна хромозома - структура и функция. Атлас. София, Гея Либрис, 1-71с.)

а. Диск V3h е в нормално хомозиготно състояние (normal homozygous state of band V3h).

б. Хетерозиготна амплификация на диск V3h (heterozygous amplification of V3h).

в. Хомозиготна амплификация на диск V3h (homozygous amplification of V3h).



Фиг. 2.7. Хромозома G при *Chironomus riparius* Mg. Мащабната линейка е равна на 100 μm . (Chromosome G of *C. riparius* Mg. Bar = 100 μm .) BRb, BRc – Балбианови пръстени (Balbiani rings); NOR – Ядърцев организатор (Nucleolar Organizer).

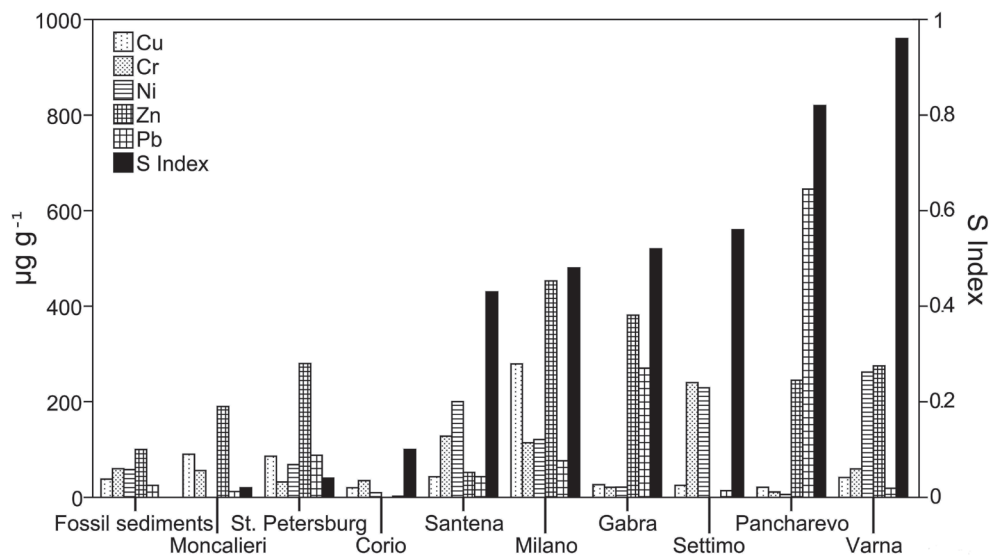
а. Стандарт (standard).

б. Делеция на BRc (Deletion of BRc).

в. Делеция на BRb и BRc, образуване на „помпон“ (Deletions of both BRc and BRb and „pompon“ like chromosome G).

значимото в сравнение със стандарта увеличаване на концентрацията на йони на тежките метали във водоеми на географски изолирани популации на *C. riparius* води до повишаване стойностите на соматичния индекс (Фиг. 2.8), което е израз на повишена геномна нестабилност на вида, изразена чрез множество соматични структурно-хромозомни изменения (Michailova et al. 2012б). Много добре се илюстрира тази закономерност и при сравнителния анализ на соматичната изменчивост на *C. riparius* от замърсени водоеми в България и Турция. Геномната нестабилност на вида, изразена чрез множество соматични пара- и перичентрични хетерозиготни инверсии, дефишънси, амплификации, делеции, значимо нараства в р. Derincay (Турция) (17.2%) със завишени концентрации на йони на тежки метали в седимента, в сравнение с р. Чая (6.05%) ($G = 15.10$, $df=1$, $P<0.001$), където концентрациите на съответните йони на тежки метали са с по-ниски стойности (Michailova et al. 2012в). Съответно соматичният индекс на вида от р. Derincay, Турция е 2.61, а този на вида от р. Чая, България е 1.57.

Заедно с проведените изследвания на геномната изменчивост на *C. riparius* от нашата страна, съвместно с полски специалисти бе проведен и анализ на геномната изменчивост при други широко разпространени



Фиг. 2.8. Концентрация на тежки метали в седимента и соматичен индекс (S) при *Chironomus riparius* Mg. от замърсени водоеми на географски изолирани райони (по Michailova et al. 2012б). (Trace metal concentrations in the sediments and somatic index (S) in *C. riparius* from polluted geographically isolated regions).

видове от сем. Chironomidae от водоеми на минни райони край гр. Краков, датиращи още от 12 век. Измерено бе значимо количество на тежките метали в седимента на водоеми от този район, например концентрацията на оловните йони е над 120 пъти по-висока от тази на стандарта (Michailova et al. 2012a). В този водоем цитотаксономично са детерминирани 24 вида от сем. Chironomidae. Проследяването на геномната нестабилност на 4 масово срещащи се в този район видове (*Kiefferulus tendipediformis* Goetghebuer, *Chironomus polonicus* Michailova, Kownacki, Langton, *C. luridus* Strenzke и *Glyptotendipes gripekoveni* Kieffer) показва значима видово специфична соматична структурно-функционална хромозомна изменчивост, реализирана чрез инверсии, дефишънси и специфична функционална активност на политенните хромозоми, изразена чрез поява на определени пуфи. При различните видове хирономиди с различна биология (бентосни и миниращи), обитаващи водоеми с еднаква степен на метално замърсяване, се установяват различни соматични индекси, характеризиращи тяхната геномна нестабилност. Те са със стойности по-високи при бентосните в сравнение с миниращите видове. Това е лесно обяснимо от една страна поради факта, че бентосните видове са в непосредствен контакт със замърсителя, а от друга поради специфичните геномни особености на всеки вид. Получените резултати от детайлния цитогенетичен анализ на геномната изменчивост дават основание да предложим соматичния индекс да бъде използван като важен показател при редица моделни безгръбначни животински видове за бъдещи изследвания на генотоксичния ефект на йони на тежки метали във водни екосистеми.

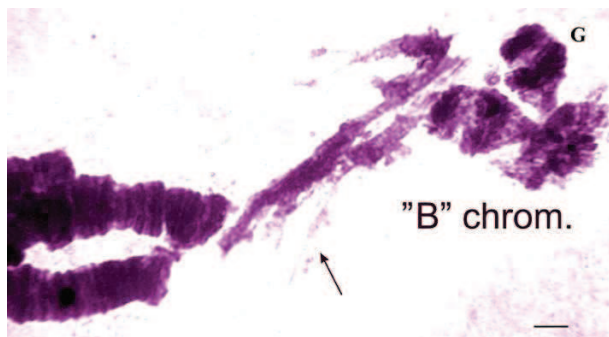
Геномният отговор на видовете, обитаващи тези райони, се реализира в две основни направления: от една страна чрез висок спектър на соматични структурно-хромозомни аберации (хетерозиготни инверсии, дефишънси, делеции), а от друга чрез фиксирани структурно-хромозомни изменения (тандемни транслокации и хомозиготни инверсии), съпроводени с изграждане на нови, свързани генетични групи, имащи отношение към микроеволюционната диференциация на вида (Michailova et al. 2012a). Това явление установихме при широко разпространения вид от тези водоеми *Kiefferulus tendipediformis* (цитотип 2). Видът, събран от водоем на минен район край гр. Краков, има диплоиден хромозомен набор $2n = 6$, с хромозомна комбинация АВ, CD, EFG. Хромозомната комбинация „EFG“ се е получила от тандемното сливането на хромозома G и хромозома EF. Външно морфологично, по определени таксономични признаци, видът не се различава от този,

който е намерен в незамърсени райони в България и Унгария, но с $2n = 8$ (цитотип 1). Следователно в този замърсен от дълъг период от време район, настъпват такива промени в генома на вида, които определят от една страна неговата геномна нестабилност чрез поява на множество соматични структурно-хромозомни изменения, а заедно с това протича и интензивен микроеволюционен процес, реализиран чрез формирането на фиксирани хромозомни аберации, участващи в диференциацията на вида (Michailova et al. 2012a). Кариотипна диференциация въз основа на фиксирани хомозиготни инверсии е установена и при *Chironomus* sp., събран от същия водоем (Michailova et al. 2012a) и описан по-късно като *Chironomus polonicus* sp.n. (Michailova et al. 2013).

Особено внимание заслужава реакцията на генома на *Chironomus melanotus* Keyl, вид от Мазурските езера на Полша, миниращ в макрофити от сем. Characeae. Известно е, че тези макрофити синтезират редица химични съединения, като феноли, серни съединения и др. Наред с широкия спектър на соматични структурно-хромозомни аберации при този вид се откриват и други много рядко срещани се геномни изменения – допълнителна „В“ хромозома и тризомия в хромозомните рамена А, В, С, Е, F, G (Фиг. 2.9), както и висока честота на малформации. Предполага се, че индуцираните изменения са не само резултат от замърсявания с тежки метали, но и от въздействия на редица химични съединения, синтезирани в растителните видове от род *Chara*, където са намерени миниращите ларви на изследвания вид *Chironomus* (Jablonska-Brana et al. 2013).

Анализирана е и геномната изменчивост при видовете *Micropsectra pallidula* (Meigen) и *Polypedilum convictum* (Walker), събрани от река Prądnik, Национален парк Ojców, разположен в южната част на Полша в област на Юрски варовик, който определя хидрохимията на водния басейн. Геохимичният индекс, изследван от седимент на водите на р. Prądnik сочи замърсяване с йони на Pb, Zn и Cd, в значими стойности в сравнение с незамърсени райони (Michailova et al. 2012e). В изследваните видове са установени два типа хромозомни преустройства – наследствени и соматични. Наследствените хетерозиготни инверсии, наблюдавани с висока честота (до 57,81%), имат важно значение за адаптацията на видовете към специфичните условия на водния басейн (Michailova et al. 2012e). Наред с тези хромозомни изменения при *M. pallidula* се откриват и фиксирани структурно-хромозомни изменения в хромозомните рамена В и Е - доказателство за кариотипна диференциация на вида, наблюдавана само при полската популация. При двата вида се открива

Фиг. 2.9. Хетерохроматинова допълнителна „В“ хромосома в генома на *Chironomus melanotus* Keyl. Мащабната линийка е равна на 100 μm . (Strong heterochromatic additional „B“ chromosome of *Chironomus melanotus* Keyl. Bar = 100 μm .)



и широк спектър на соматична структурно-функционална изменчивост, която е добър маркер за наличие на замърсяване с тежки метали, доказано и при химичния анализ на дънните проби, взети от изследвания воден басейн (Michailova et al. 2012e). Въз основа на откритите при двата вида соматични хромозомни изменения е изчислен соматичния индекс, който за *M. pallidula* е 0,346, а за *P. convictum* - 0,555.

В сравнителен аспект е анализирана геномната изменчивост при видове, принадлежащи към три цитоконплекса на род *Chironomus*, формирали се в процеса на еволюцията им въз основа на фиксирани хомозиготни транслокации, довеждащи до различно съчетание на хромозомните рамена във всеки един от цитоконплексите (Keyl 1962, Michailova 1989). Установява се интересна закономерност на видово специфичната реакция на генома в зависимост от неговата ДНК организация и цитогенетична характеристика. Въз основа на получените от нас оригинални резултати върху структурно-функционалната изменчивост на политенните хромозоми на изследваните видове, принадлежащи към различни цитоконплекси на род *Chironomus*, предлагаме оригиналната идея, че различните съчетания на хромозомните рамена в отделните комплекси довеждат до изграждане на различни генетично свързани групи, които определят специфичния характер на геномния отговор на видовете в тези комплекси (Michailova et al. 2012бд). При два вида от род *Chironomus*: *C. riparius* ($2n = 8$, thummi цитоконплекс, AB CD EF G) и *C. bernensis* ($2n = 8$, lacunarius цитоконплекс, AD BC EF G) видове, принадлежащи към два различни цитоконплекса, но срещащи се симпатрично в един и същ водоем, река Сантена, Италия, характеризиращ се със завишени стойности на различни йони на тежки метали, реакцията на генома на двата вида е различна. Например, хромозома G от генома на вида *C. riparius* реагира

на посоченото замърсяване с множество делеции и превръщането ѝ в т. н. „помпоноподобна хромозома“. Докато в генома на вида *C. bernensis*, в теломерата на същата хромозома G се открива специфична видова реакция - образуване на „тъмно тяло“, получено чрез допълнителни цикли на амплификация (Michailova et al. 2012бд) (Фиг. 2.10). В случая двата вида, обитаващи еднакво замърсени райони, имат различна геномна реакция. Те имат различна комбинация на хромозомни рамена, различна генетична структура и различен отговор към стрес условията на околната среда.

Заедно с индуцирането на соматични структурно-хромозомни аберации в изследваните видове се установява и понижаване на транскрипционната активност на важни клетъчни структури в политемните хромозоми. Специално внимание се обръща на функционирането на Балбианови пръстени (BRs) и ядърцев организатор (NOR). Балбиановите пръстени са места, където става синтезата главно на високо молекулни белтъци, които участват в изграждането на

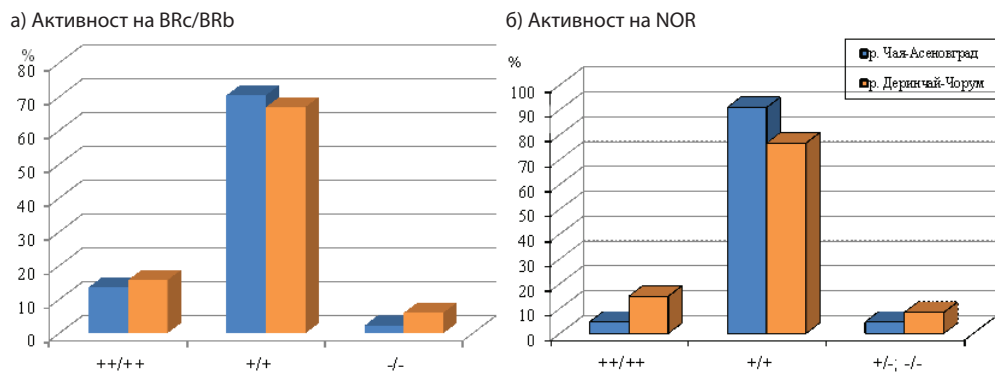


Фиг. 2.10. „Тъмно тяло“ в хромозома G при *Chironomus bernensis* Wülker, Klötzli. Машабната линейка е равна на 100 μm . („Dark knob“ in chromosome G of *Chironomus bernensis* Wülker, Klötzli. Bar = 100 μm .) (по Michailova et al. 2009a).

„къщичките“ на ларвите, където протича тяхното ларвно развитие (Wieslander 1994). По този начин те имат пряко отношение върху нормалното развитие на ларвите - когато транскрипционната активност се понижи, се нарушава процесът на изграждане на „къщичките“, а това води до нарушения в развитието на ларвата.

При изследвания вид *C. riparius*, събран от водоеми в България и Турция със завишени концентрации на йони на тежки метали се установяват три типа на транскрипционна активност на BRc/BRb, съгласно правилото на Beermann (1971): висока ++/++, средна +/+ и слаба или преминаване в колапс -/-. При това е възможно двата Балбианови пръстена да имат различна активност. В политенните хромозоми на вида от р. Марица, р. Чая и р. Yeshilirmak (Турция), събран през 2009г. средната транскрипционна активност на двата Балбианови пръстена BRc/BRb е в значими завишени стойности ($P < 0.001$) в сравнение с нормалната висока активност на контролата, съответно за р. Марица - $G = 336.651$, $df = 1$, за р. Чая - $G = 29.723$, $df = 1$, за р. Yeshilirmak - $G = 26.416$, $df = 1$. Активността на тези Балбианови пръстени от р. Derincay (Турция) значимо намалява до слаба или преминава постепенно в колапс (-/-) - $G = 687.36$, $df = 1$, в сравнение с контролата. Същата тенденция на понижаване на транскрипционната активност в двата Балбианови пръстена в политенните хромозоми на *C. riparius* се наблюдава и при материала, събран през 2010г. от горе посочените замърсени райони (Фиг. 2.11а). Интересна е транскрипционната активност на двата Балбианови пръстена на вида *Kiefferulus tendipediformis*, събран от водоеми на минни райони край гр. Краков. Докато в незамърсените басейни на България и Унгария те се характеризират с висока транскрипционна активност (Michailova 1996), то в силно замърсените минни райони, край гр. Краков, единият от Балбиановите пръстени BR1 е или със слаба активност или в колапс, явление срещащо се с висока честота (97.12%) (Фиг. 2.12аб).

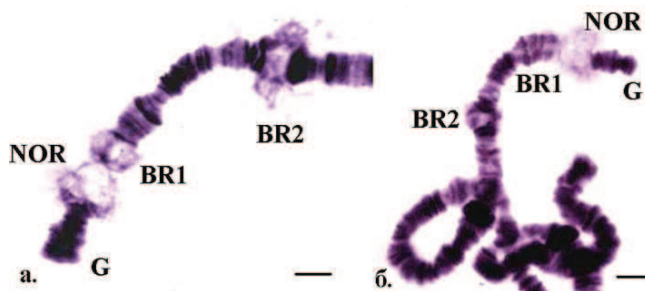
Ядърцевият организатор е друга важна структура, в която транскрипцията на рибозомалната ДНК (rDNA) има отношение към нормалната клетъчна функция. Наблюдава се и репресия на транскрипционната активност на ядърцевия организатор при видовете, събрани от замърсените райони. В политенните хромозоми на *C. riparius*, събран от замърсени с тежки метали райони в България и Турция, високата функционална активност (++) на NOR се понижава, а средната му транскрипционна активност (+) има значими стойности ($P < 0.001$) (Фиг. 2.11б).



Фиг. 2.11. Нива на активност на Балбиановите пръстени (BRc/BRb) и Ядърцевия организатор (NOR) в хромозома G на *Chironomus riparius* Mg., събран от замърсени райони в България и Турция (по Duran et al. 2012). (Activity of Balbiani rings (BRs) and Nucleolar Organizer (NOR) of *C. riparius*, collected from anthropogenically polluted regions in Bulgaria and Turkey).

а. Активност на BRc/BRb (BRc/BRb activity).

б. Активност на NOR (NOR activity).



Фиг. 2.12. Хромозома АВ при *Kiefferulus tendipediformis*; Машабната линейка е равна на 100 μm . (Chromosome AB of *Kiefferulus tendipediformis*) (Bar = 100 μm). (Michailova et al. 2012a). BR1, BR2 – Балбианови пръстени (Balbiani rings), NOR – Ядърцев организатор (Nucleolar Organizer).

а. Нормална активност на двата Балбианови пръстена: BR1, BR2 (Normal activity of both Balbiani Rings - BR1 and BR2).

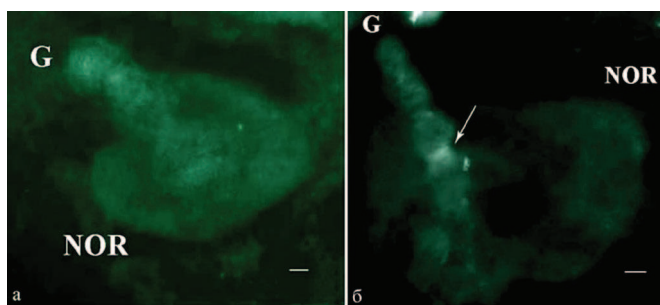
б. Балбиановият пръстен BR1 не е активен. (Balbiani Ring (BR1) has no activity).

Тенденция на понижаване на транскрипционната активност на тези клетъчни структури се открива и при други видове хирономиди (Michailova et al. 2012де). Понижава се транскрипционната активност и на Балбиановите пръстени (BRs) и ядърцевите организатори (NOR-хромозома EF) в генома на *M. pallidula*, вид събран от р. Prądnik,

Национален парк Ојсów, Полша. Видово специфични функционални изменения са наблюдавани и при *P. convictum*, които се разглеждат като специфичен отговор към екологични условия на р. Prądnik (Michailova et al. 2012e).

Интересни резултати са получени при проследяване транскрипционната активност на NOR в хромозома G на *C. riparius* при използване на клон от 28S rDNA (Michailova et al. 2013). Нашите изследвания, с прилагане на *in situ* хибридизация (FISH) и използване на този клон показват понижаване на транскрипционната активност в ядърцевия организатор, като районите, където са локализираны гените на rDNA са силно компактни, докато същите райони при вида от контролата са декондензирани и със значима транскрипционна активност (Фиг. 2.13аб). Тази характерна морфологична промяна на определни дискове в района на ядърцевия организатор сочи понижаване на транскрипционната активност и е доказателство, че 28S rDNA са дикертно отговорни за понижената транскрипционна активност в резултат на въздействие на тежките метали (Michailova et al. 2013).

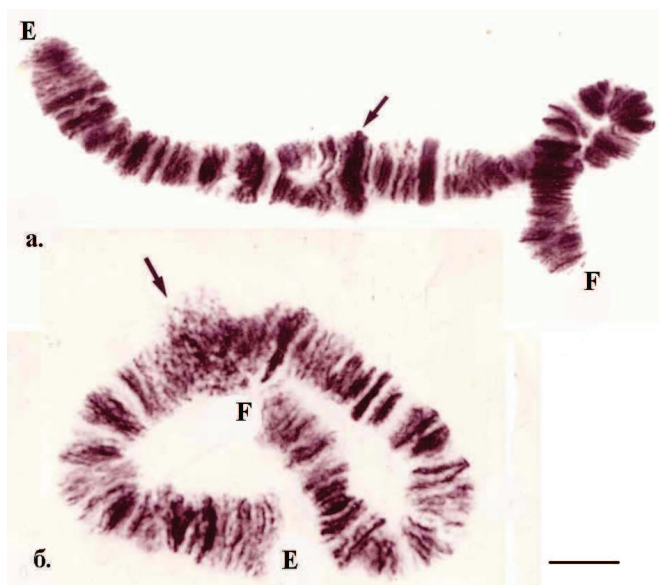
Във функционален аспект се установяват и множество видово специфични реакции на генома на изследваните видове: декондензация на хетерохроматинови центромерни и теломерни райони в политенните хромозоми (Фиг. 2.14), поява на специфични пуфи (Фиг. 2.15), нарушения в конюгацията на политенните хромозоми и др. Получените резултати



Фиг. 2.13. *In situ* хибридизация с 28S rDNA – хромозома G при *Chironomus riparius* Mg. Мащабната линийка е равна на 100 μm. (Localization of 28S rDNA in chromosome G of *C. riparius* Mg. Bar = 100 μm.)

а. Висока транскрипционна активност в района на локализация на 28S rDNA – контрола (High transcriptional activity in the region of localization of 28S rDNA).

б. Районът на локализация на 28S rDNA е силно компактен (The region of 28S rDNA localization is condensed).



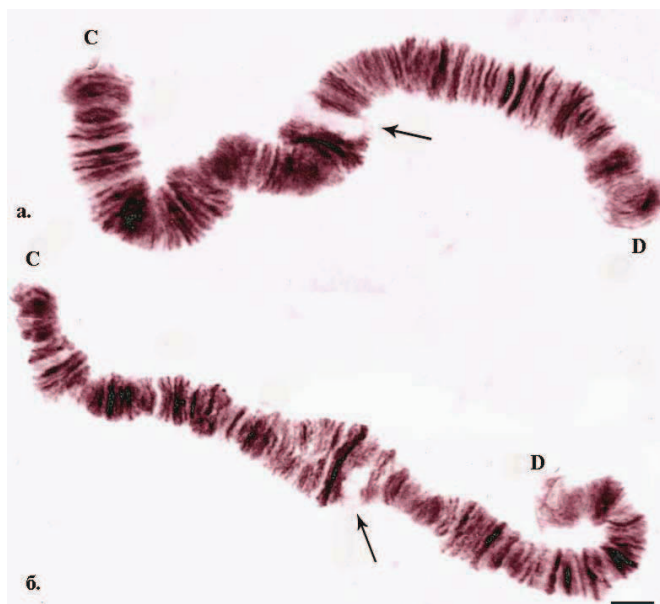
Фиг. 2.14. Центромерен район в хромозома EF на *C. riparius*. Машабната линейка е равна на 100 μm . (Centromere region of chromosome EF of *C. riparius*. Bar = 100 μm)

а. Компактен центромерен район в хромозома EF на *C. riparius*. (Compact centromere region of chromosome EF of *C. riparius*).

б. Декондензиран центромерен район в хромозома EF на *C. riparius*. (Decondensation of centromere region of chromosome EF of *C. riparius*).

подкрепят изказаната от нас идея (Michailova et al. 1996) за инхибиране синтеза на белтъци, участващи в кондензацията на центромерния и теломерния хетерохроматин. Разбира се, за потвърждение на тази хипотеза са необходими специални молекулярно-генетични изследвания, които могат да са обект на бъдещи проучвания.

Наши предишни изследвания показват и участието на друга важна клетъчна структура при мобилизацията на генома на вида в стрес-условия на околната среда. Висока е чувствителността на хетерохроматина (Michailova 2011), който реагира: (1.) чрез трансформация на еухроматина в хетерохроматин; (2.) чрез дозов ефект - изменение в изявата на хетерохроматина в определени райони на хромозомата под влияние на възникнали соматични изменения (Michailova et al. 1997); (3.) чрез различна репликация на центромерния хетерохроматин в двата хомолога на хромозомата (Michailova and Belcheva 1990); (4.) преминаване на центромерния хетерохроматин



Фиг. 2.15. Поява на нови пуфи в хромозома CD на *C. riparius* след третиране с оловни йони. Мащабната линейка е равна на 100 μm . (A new puff in chromosome CD of *C. riparius* after Pb treatment. Bar = 100 μm .) (по Michailova et al. 20016)

а. Хомозиготно състояние (Homozygous state).

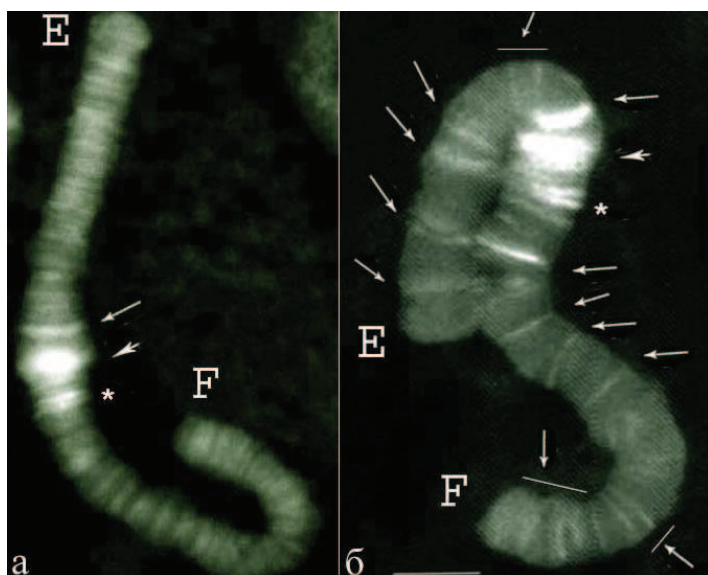
б. Хетерозиготно състояние (Heterozygous state).

в декондензирано състояние (Michailova et al. 1996); (5.) изхвърляне на хетерохроматина от хромозомата (Michailova and Belcheva 1990). Горепосочените примери илюстрират високата чувствителност на хетерохроматина и показват, че той се използва от клетката като „body guard“: защитавайки еухроматина, той може да поглъща всички вредни въздействия и промени от околната среда.

Разглеждайки геномната нестабилност на вида *C. riparius* от райони, характеризиращи се с високи концентрации на йони на тежки метали (Michailova et al. 2009в, 2012б) се установява, че индуцираните соматични хромозомни аберации се разпределят в генома на вида не случайно. Чрез *in situ* хибридизация е проследено разпределянето на три транспозонни елемента (NLRCth1, CTRT1, TFB1) в генома на *C. riparius*, събран от замърсени райони в България и Турция. Транспозонните елементи са важен компонент в генома на вида и представляват около 3% до 50% от геномната му ДНК (Сапу et al. 2000). Те могат да индуцират различни форми на хромозомна нестабилност, която се манифестира чрез множество

соматични хромозомни изменения, понижаване на фертилността на вида и др. Различни фактори – биотични и абиотични могат да съдействат за „мобилизацията“ на транспозонните елементи (Guerreiro 2012), като например, генотоксични стрес-агенти като гама радиация увеличават активността на L1 ретротранспозоните (Farkash et al. 2006). При сем. Chironomidae малко се знае за активирането на транспозонни елементи чрез стрес-агенти на околната среда (Bovero et al. 2002, Ilkova et al. 2007, Michailova et al. 2007, 2009в). Геномната нестабилност на *C. riparius*, събран от тежкометално замърсени райони на България и Турция, се реализира чрез множество хромозомни аберации и съответно повишен брой на хромозомни разриви: за Българските водоеми те варират от 60 (70.6%) до 65 (70.8%), а за Турските - от 14 (58.33%) до 49 (66.2%) (Ilkova et al. 2013).

Анализът на локализацията на изследваните три транспозонни елемента (NLRCth1, CTRT1, TFB1) сочи наличието както на фиксирани сайтове, така и на такива с вариабилна локализация. При всичките изследвани водоеми трите транспозонни елемента имат фиксирана локализация в проксималната част на трите хромозоми АВ, CD и EF, докато вариабилните са разпръснати по цялата дължина на хромозомите (Фиг. 2.16аб) (Ilkova et al. 2013). В повечето изследвани райони се открива една интересна тенденция на значимо съвпадение на локализацията на „общите“ точки на разрывите на аберации (“common” breakpoints – точки на разриви на аберации, които се срещат в повече от един индивид (Bovero et al. 2002) в точно определени сайтове на политенните хромозоми. Например, за река Derinsay (Турция), такова съвпадение е установено между сайтовете на хибридизационните сигнали на CTRT1 и TFB1 и локализацията на „общите“ точки на разриви на хромозомните аберации, съответно за CTRT1, $r_s = 0.59$; $df = 10$; $P < 0.05$; TFB1, $r_s = 0.64$; $df = 10$; $P < 0.05$. В политенните хромозоми на *C. riparius*, събран от река Чая се открива същата тенденция на значима ко-локализация на разрывите на соматичните аберации с тези на сайтовете на транспозонните елементи: CTRT1 – $r_s = 0.55$, $df = 10$; $P < 0.05$; TFB1 – $r_s = 0.85$; $df = 10$; $P < 0.01$. Тези резултати показват, че по дължината на политенните хромозоми има райони особено чувствителни на хромозомни разриви, това са сайтове на локализация на транспозонни елементи, които директно са отговорни за възникването на инверсионните разриви и са наречени от нас „горещи точки“ на хромозомите. В политенните хромозоми на изследвания моделен вид *C. riparius*,



Фиг. 2.16. Локализация на транспозонния елемент NLRCh1 в хромозома EF *Chironomus riparius* Mg., събран от замърсени райони в България. Малките стрелки показват постоянните сайтове на локализация на този транспозонен елемент, а големите – вариабилни сигнали. Мащабната линейка е равна на 100 μm . (Localization of NLRCh1 in chromosome EF of *C. riparius* from polluted rivers in Bulgaria. Bar = 100 μm .) (по Ilkova et al. 2013)

Вариабилен сигнал (variable signal) – дълга стрелка (long arrow).

Фиксиран сигнал (fixed signal) – къса стрелка (short arrow).

а. Фиксиран и вариабилен сигнал в проксималната част на рамо E (B1r) и вариабилен хомозиготен сигнал в рамо F (B2q) - * (strong fixed signals and a strong variable signal in proximal part of arm E (B1r) and a variable homozygous signal in arm F (B2q) - *).

б. Фиксиран сигнал в проксималната част на хромозома EF и вариабилен сигнал в проксималната част на рамо E (B1r); вариабилни сигнали в рамената E, F; вариабилен хетерозиготен сигнал в рамо F (B2q) - * (strong fixed signals in proximal part of chromosome EF, a strong variable signal in proximal part of arm E (B1r); variable signals along arms E and F; a variable heterozygous signal in arm F (B2q) - *).

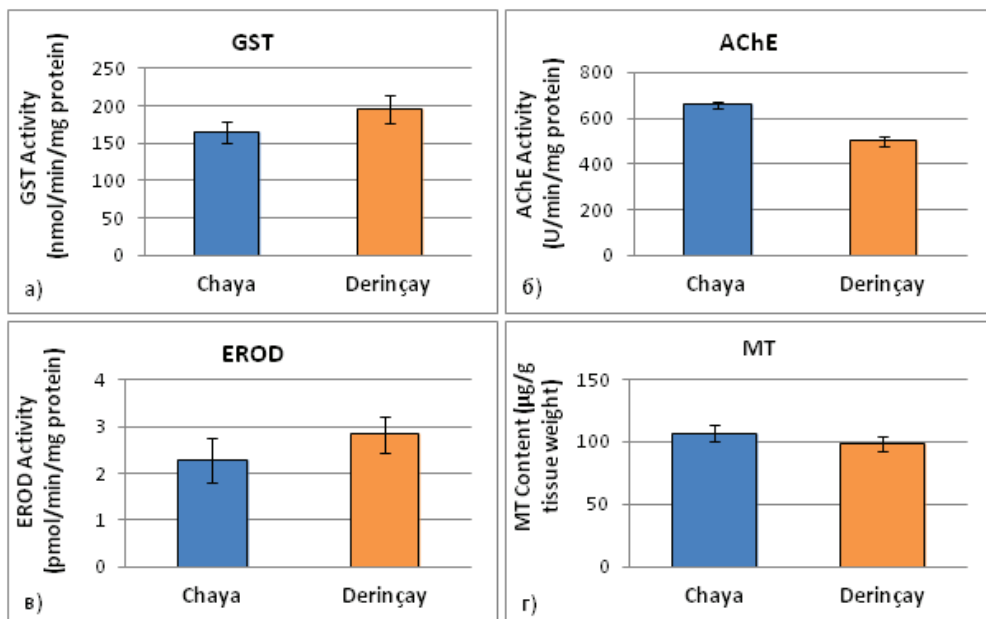
проксималните участъци на хромозомите са сайтове на натрупване на транспозонни елементи и разриви на хромозомни преобразувания. От друга страна, това са места на локализация на конститутивен хетерохроматин и кластери на високо повторени последователности на ДНК - Alu, Hinf, което сочи, че те заедно с транспозонните елементи са важна съставна част на конститутивния хетерохроматин. Интерес представляват изследванията на Kale et al. (2005), които установяват,

че йони на тежки метали и други замърсители предизвикват геномна нестабилност чрез стимулиране на активността на мобилните елементи, които от своя страна генерират появата на соматични структурно-хромозомни аберации. Възможността външни стрес-агенти да променят транспозонната активност, директно или индиректно, представлява важен фактор за индуциране на геномна нестабилност в соматичните клетки. Получените от нас резултати за ко-локализация на транспозонни елементи и разриви на хромозомни аберации потвърждават идеята, че различни стрес-агенти в средата, каквито са високите концентрации на тежките метали, активират редица транспозонни елементи, които от своя страна генерират появата на множество соматични структурно-хромозомни аберации.

2.2.2.2. Геномна нестабилност при моделни видове от сем. Chironomidae, реализирана на биохимично ниво.

Моделният вид *C. riparius* е изследван и на биохимично ниво, с цел проследяване влиянието на стрес-агенти на околната среда върху активността на редица ензимни системи и откриване на биомаркери на биохимично ниво. Изследвана е активността на 4-ри ензимни системи: Glutathione S-transferase (GST), Acetylcholinesterase (AChE), Etoxyresorufin O-deethylase (EROD), металотионинови протеини (MT) при *C. riparius*, събран от замърсени водоеми в България и Турция (Фиг. 2.17). Тези ензимни системи показват значимо високи стойности на активност при вида, събран от р. Марица и водоем близо до гр. Пловдив. Същата тенденция се наблюдава и при ензимите GST и EROD на вида от р. Derinceay и р. Yeshilirmak (Турция). Значима активност показва и ензимната система MT на вида от р. Чая, р. Derinceay (2009г.) както и на тази от водоема при гр. Пловдив (2010г.) ($P < 0.001$) (Michailova et al. 2012в).

Соматичният индекс на вида и активността на отделните му ензимни системи от изследваните водоеми следват една обща тенденция на завишаване на техните стойности при повишаване концентрацията на тежките метали. Но особено важно е да се отбележи, че високата активност на MT се свързва и с тяхната защитна роля в стрес-условия на средата (Amiard et al. 2006). От друга страна установената висока активност на AChE е добър биомаркер, както за замърсяване с тежки метали, така и за замърсяване с пестициди (Ozdemir et al. 2011аб, Michailova et al. 2012в).



Фиг. 2.17. Ензимна активност на *Chironomus riparius* Mg., събран от замърсени райони в България и Турция (по Duran et al. 2012). (Enzyme activity of *C. riparius* collected from polluted regions in Bulgaria and Turkey).

а. GST (Glutathione S-transferase).

б. AChE (Acetylcholinesterase).

в. EROD (7-Ethoxyresorufin-O-deethylase).

г. MT (Metallothionein).

2.3. Значение и приложение на установените геномни изменения при сем. Chironomidae

Получените резултати дават основание да се направят някои предложения в биологичните мониторингови изследвания. Широко разпространени видове от двукрилите насекоми на сем. Chironomidae могат да се използват като тест-системи за биологичен мониторинг и проследяване генотосичния ефект на стрес-агенти в околната среда. При тях е установен определен биологичен отговор на цитогенетично и биохимично ниво. В резултат на проведеното изследване се открива ясна връзка между соматичните структурно-хромозомни изменения, измененията в транскрипционната активност на важни клетъчни структури, промяната в изявата на хетерохроматина, промените в

активността на ензимни системи и замърсяването с тежки метали в околната среда. Установените маркери на цитогенетично и биохимично ниво се предлагат като важен чувствителен биомаркер за оценка на стрес-агенти във водни екосистеми. Те могат да се използват за ранно предупреждение на настъпили промени в околната среда, резултат от антропогенни замърсители. Соматичната структурно-функционална изменчивост на политенни хромозоми при видове от сем. Chironomidae, Diptera заедно с промените в активността на някои от ензимните им системи успешно могат да се използват за оценка на екологичния риск във водни екосистеми. Прилагането на интердисциплинарен подход на изследване, включващ реакцията на генома на цитогенетично, биохимично и молекулярно ниво, позволява навременно оценяване влиянието на замърсители върху отделния индивид и може успешно да се прилага за мониторингови изследвания на промените в околната среда в резултат на действие на различни замърсители.

По този начин промените, които се установяват на индивидуално ниво (на ниво организъм), могат да бъдат сигнали за бъдещи нарушения на популационно ниво, на ниво съобщество и екосистема. Получените резултати показват доколко организмът, намиращ се в стрес-условия, може да се приспособи и преживее условията на антропогенния натиск в границите на нормата на реакция на организма. Редица нарушения, настъпили на организмово ниво, неминуемо водят до нарушения на популационно ниво, на ниво съобщество и екосистема. Те позволяват да се правят прогнози за бъдещата структура на екосистемата и за нейното функциониране. Ето защо тези изследвания имат непосредствено отношение към опазване на екосистемите, подобряване качеството на живот и управление на биоресурсите.

2.4. Заключение. Оценка на геномния „отговор“ при сем. Chironomidae в резултат от действието на различни токсиканти в околната среда.

Получените резултати дават основание да се направят няколко основни извода относно използването на сем. Chironomidae и на геномният „отговор“ на широко разпространени видове от това семейство на действието на различни токсиканти за целите на генотоксикологията:

- Политенните хромозоми на видове от сем. Chironomidae, Diptera могат да се използват за целите на генотоксикологията,

като предложените биомаркери на цитогенетично (соматична геномна нестабилност, изразена чрез соматични структурни и функционални изменения на хромозомите) и биохимично ниво (повишаване на активността на ензимни системи) са важен критерий за оценка състоянието на водни екосистеми.

- Специфична геномна реакция на бентосни и миниращи видове от сем. Chironomidae към замърсяване с тежки метали, се определя от биологичните и геномни особености на тези видове.
- Геномната реакция на широко разпространените видове от това семейство се реализира в две основни насоки: (1.) фиксирани структурно-хромозомни изменения (хомозиготни инверсии и тандемни транслокации), доказващи протичане на интензивен микроеволюционен процес при отделни видове, населяващи замърсени за дълъг период водоеми; (2.) соматични структурно-функционални изменения (инверсии, делеции, дефишънси, изменения в транскрипционната активност на важни клетъчни структури - Балбианови пръстени и ядръцев организатор), наблюдавани в генома на изследваните видове. Те се проявяват от една страна като обща реакция на генома на изследваните видове (широк спектър на соматични структурно-функционални хромозомни изменения), а от друга - като видово специфичен отговор към стрес условията на средата (силна кондензация на хетерохроматин и поява на т. н. „тъмни тела - dark knob“, асинапсис, специфична функционална активност на генома, декондензация на центромери и др.). Тази специфичност в реакцията на генома е в зависимост от организацията на ДНК и цитогенетичната характеристика на вида. Възникналите соматични структурно - хромозомни аберации се разпределят не случайно в генома на вида, а се концентрират в определени места на политемните хромозоми, места богати на високо повторени последователности на ДНК и транспозонни елементи.
- Биомаркерните показатели, установени на цитогенетично и биохимично ниво в отделна хирономидна ларва могат да се използват за бърза, евтина и качествена оценка за наличие на токсиканти във различни типове водни басейни. Те позволяват да се правят прогнози за структурата и функционирането на водните екосистеми, да се вземат навременни мерки за опазването и съхраняването на екосистемите и биологичното разнообразие в тях.

2.5. Протокол

Семейство Chironomidae и използването му в генотоксикологичните изследвания.

2.5.1. Събиране на ларвен материал от сем. Chironomidae и отглеждане на моделния вид *Chironomus riparius* Mg.

Ларвите на повечето видове от сем. Chironomidae са бентосни сладководни организми, които се събират с помощта на хидробиологичен сакилидъночерпател по описана хидробиологична методика (Панкратова 1970). След промиване на събраните проби чрез сито, ларвите се подсушават на филтърна хартия и се фиксират в разтвор на Кларке (96% етилов алкохол и ледена оцетна киселина в съотношение 3:1). Извършват се три смени на фиксиращия разтвор, като продължителността на всяко фиксиране е 15 мин, след което ларвният материал се съхранява в хладилник.

В повечето случаи при изследването е използван моделният вид *C. riparius*, чийто ларви се срещат в различни типове водни екосистеми. Видът успешно се отглежда и в лабораторни условия. Използват се фертилни яйчни маси за приготвяне на т.нар. култура – новоизлюпените ларви, първа възраст, се поставят в малък съд с 2 лъжици предварително смляна целулоза, 2 лъжици стерилизирана при 100°C пръст и дехлорирана вода, а за храна се използва храна за рибки Tetraphyll. След една седмица ларвите се прехвърлят в по-голям съд, хранят се с дрожди (разбита мая за хляб) и се добавят стерилизирана пръст и смляна целулоза. Необходимите условия за нормалното развитие на вида са: постоянна температура 18–20°C; светлинен режим – 16ч светло/8ч тъмно; постоянно аериране и хранене на ларвите два пъти седмично. Лабораторната култура трябва да бъде изготвена само от една яйчна маса, за да се избегне повишаване плътността на ларвите и тяхната смърт (Michailova 1985). Продължителността на развитие на ларвите е около 28–30 дни. Когато започне излюпването на имагото съдове се покриват с марля, а един-два дни по-късно по стените на съда и върху водната повърхност се откриват снесени яйчни маси. Всяка яйчна маса се отделя в самостоятелна чашка с 10–20мл. вода до развитие на ларвите и ако яйчните маси са фертилни, отглеждането на ларвите става по описания по-горе метод.

Необходимо оборудване за полевата работа: Хидробиологичен сак, сито, пластмасови шишета от 100мл, пинсети, 96% етилов алкохол, ледена оцетна киселина, филтърна хартия.

2.5.2. Определяне възрастта и пола на ларвите по морфологични признаци

За лабораторна работа е необходимо да се използват ларви 4-та възраст, 6–7 фаза. За целта събраните ларви се анализират под бинокулярна лупа. Възрастта и фазата се определят по морфологични признаци на ларвата (форма и големина на последните сегменти на тялото - 6–8 сегмент). Използва се схемата на Ильинская (1982) (Фиг. 2.3).

2.5.3. Определяне на рода и вида

а) Външно морфологични белези. От всяка изследвана ларва се изготвят хромозомни препарати (отделят се слюнните жлези) и препарати за външно-морфологичен анализ (Saether 1979) с цел определяне на рода. След отделяне на слюнните жлези, тялото на ларвите и главовата капсула се поставят в малка епруветка с 10% КОН за 24 ч. за изчистване на тъканите и след това се правят трайни микроскопски препарати със синтетична смола еупарал. По главовата капсула и тялото на ларвата се определя рода, като се използват определителя на Pinder and Reiss (1983). Изготвените външно морфологични препарати от ларвата се използват и за установяване наличието на фенотипни изменения (малформации) на части от главовата капсула, възникнали от замърсители на околната среда – важен критерий за оценка състоянието на околната среда.

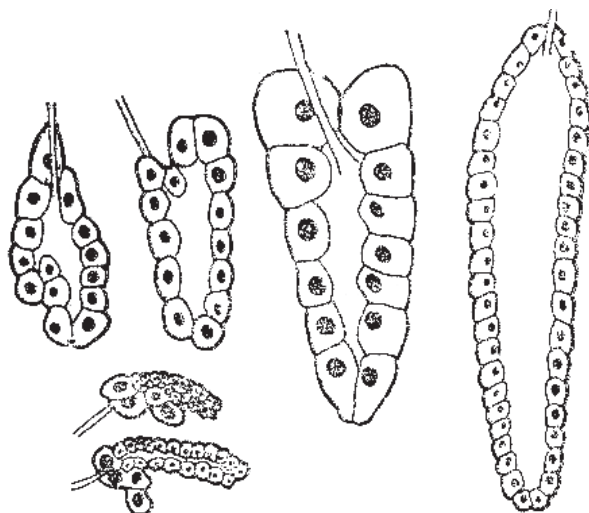
б) Цитотаксономични маркери. Повечето от видовете от род *Chironomus* и широко разпространените видове от подсем. *Chironominae* могат да се детерминират в ларвен стадий по видово специфични хромозомни маркери на политемните хромозоми на ларви IV възраст. За целта се използват стандартни хромозомни карти, съставени от Michailova (1989), Кикнадзе и др. (1991). За генотоксикологични изследвания при моделния вид *C. riparius* са използвани стандартните хромозомни карти на вида (Кикнадзе и др. 1991; Hägele 1970).

2.5.4. Слюнчени политенни хромозоми

а) **Ацеторсеиново оцветяване.** Използва се при изготвяне на препарати от слюнчени политенни хромозоми (Белчева и Михайлова 1991, Michailova 1989). Изолирането на слюнчените жлези на ларвите става под бинокулярна лупа с помощта на специални изготвени за целта препараторни игли. Ларвата се поставя върху предметно стъкло с целулка в капка от фиксиращия разтвор. Прави се надлъжен разрез на трите гръбни сегмента на ларвата и се отделя един чифт слюнчени жлези, които имат различна форма в зависимост от рода и вида (Фиг. 2.18). При моделния вид *C. riparius* те са с форма на „ръкавичка“. След отделянето слюнчените жлези се поставят в 2% млечнокисел ацеторсеин за 30–35 мин. Оцветените жлези се прехвърлят в 60% млечна киселина, където престояват 2–3 мин. Тук става отделянето на клетките от секрета, който се отстранява. Всички клетки се събират в центъра на капката и се покриват с покривно стъкло. Върху покривното стъкло се слага филтърна хартия и се натиска с палец, но без да се движи пръстът (т.нар. „squash“ препарати). Целта е да се разпръснат добре политенните хромозоми, което е важно условие за успешния анализ. Препаратът се надписва, като номерът на препарата трябва да съвпада с номера на епруветката, където са поставени тялото и главовата капсула. Така изготвените временни хромозомни препарати се съхраняват в хладилник в продължение на една седмица, след което се превръщат в трайни, като се използва течен азот и се прилага метод, описан от Белчева и Михайлова (1991). Важен момент за направата на трайните микроскопски препарати е те да се поставят върху специална алуминиева пластинка, охладена с течен азот. Препаратът трябва добре да се изстуди, държи се около 10–15 мин, отстранява се скрежта и с помощта на бръснарско ножче се отделя покривното от предметното стъкло. Обектът остава върху предметното стъкло, след което препаратът преминава през редица от алкохоли (бутанол и ксилол), подробно описани от Белчева и Михайлова (1991).

Необходимо оборудване за лабораторна работа: Бинокулярна лупа, микроскоп, чисти покривни и предметни стакла, предметни стъкла с целулка, препараторни игли, пинсети, гутатори, 2% млечно-кисел ацеторсеин, термос с течен азот, алуминиева пластинка, бръснарско ножче и редица от реактиви за трайни микроскопски препарати.

б) **Диференциално оцветяване на политенни хромозоми (C-band-ing).** Използва се за определяне локализацията на конститутивния



Фиг. 2.18. Форма на слюнни жлези при видове от сем. Chironomidae (Different shapes of salivary glands of Chironomidae species).

хетерохроматин в хромозомите и за отдиференциране на видове двойници и хомосеквентни видове (видове, които имат еднакъв брой хромозоми и еднаква последователност на дисковете в политенните хромозоми). Изготвянето на хромозомите става по метода на Michailova (1987).

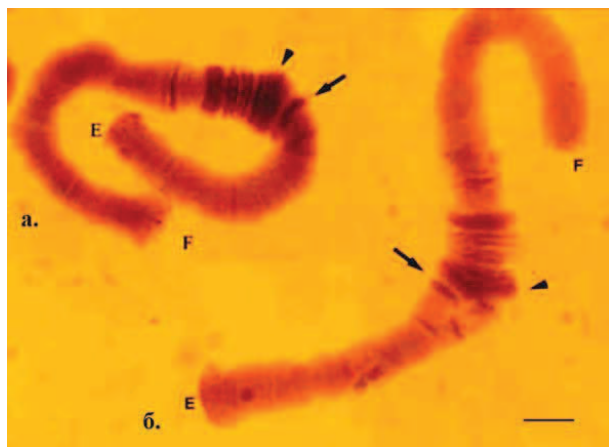
Отделят се слюнчените жлези на фиксирани ларви по метода, описан по горе, след което те се прехвърлят в капка 45% оцетна киселина. Тук се отделят клетките от слюнчения секрет и се разкъсват ядрените обвивки на всяка клетка. Манипулацията се извършва под бинокулярна лупа. Важно условие е да се изолира цитоплазмата, която пречи на получаването на добър препарат за диференциално оцветяване. След отделянето на хромозомите, препаратът се покрива с покривно стъкло, натиска се с пръст върху филтърна хартия и веднага се отделя покривното стъкло с помощта на течен азот, по описания по горе метод. Препаратите се съхраняват на сухо място в кутии до 10 дни, след което се подготвят за обработка по С - метода:

- Промиване в 96% етилов алкохол (5 мин);
- Промиване в дестилирана вода;
- Третиране с 5% Ва (ОН)₂ (изготвена непосредствено преди употребата ѝ) за 5 мин. в термостат при 70°C;
- Изплакване 3 до 5 пъти в дестилирана вода;
- Инкубиране в буфер 2xSSC за 2 часа при 70°C.
- Изплакване в дестилирана вода
- Оцветяване в 1% разтвор на Гимза, рН – 6.8. Времетраенето се определя експериментално (от 5 до 20 мин)

- Изплакване на препарата с дестилирана вода и наблюдение. Ако препаратът неедостатъчно оцветен, се дооцветява. След последващо измиване в дестилирана вода се изготвя траен микроскопски препарат, по методиката на Белчева и Михайлова (1991).

Необходимо оборудване и реактиви: Бинокулярна лупа, микроскоп, препараторни игли, предметни и покривни стъкла, термос с течен азот, алуминиева пластинка, бръснарско ножче, 45% оцетна киселина, 5% $\text{Ba}(\text{OH})_2$; буферен разтвор 2xSSC, 1% разтвор на Гимза (2ml Giemsa, 48 ml dH_2O , 0.5 ml 1% NaHCO_3), дестилирана вода, филтърна хартия.

Анализът се извършва с помощта на микроскоп при увеличения 40× и 100×. Хромозомите са загубили характерната за тях дисковидна структура, а хетерохроматиновите райони на хромозомите са оцветени виолетово-червено. Възможно е да се наблюдават промени в изявата на хетерохроматина под влияние на различни замърсители (Фиг. 2.19).



Фиг. 2.19. „C“ хетерохроматин в хромозома EF на *C. riparius*. Мащабната линейка е равна на 100 μm . („C“ heterochromatin in chromosome EF of *C. riparius*. Bar = 100 μm .)

къса стрелка (short arrow) – центромерен район (centromere region)

дълга стрелка (long arrow) – изява на хетерохроматина (the appearance of a heterochromatin).

а. Локализация на хетерохроматина в хромозома EF на *C. riparius* – контрола. („C“ heterochromatin in chromosome EF of *C. riparius* - control).

б. Изменение в изявата на хетерохроматина в хромозома EF на *C. riparius* при наличие на соматична хетерозиготна инверсия. (Change in the appearance of the heterochromatin in chromosome EF of *C. riparius* due to somatic heterozygous inversion).

в) Флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH). Прилагана е за определяне локализацията на повторени ДНК кластери и транспозонни елементи по дължината на политемните хромозоми. За обработка на препаратите са използвани протоколите на Schmidt (1992) и Hankeln et al. (1993). Изготвянето на препаратите става чрез изолиране на слюнчените политемни хромозоми в 45% ледена оцетна киселина по описаната по-горе методика, след което препаратът се замразява на течен азот и се отделя покривното от предметното стъкло. Следват няколко стъпки на измиване и дехидратиране на хромозомите в редица от алкохоли, стабилизиране при висока температура (70°C), денатурация, хибридизация с белязана проба при 54°C и детекция на сигнала. За настоящото изследване са използвани три проби на ретротранспозони (NLRCth1, CTRT1 и TFB1), които са белязани с Digoxigenin. За установяване на сигнала е използвано anti-DIG антителило. Анализът на резултатите се извършва с флуоресцентен микроскоп (Carl Zeiss Axio Scop A.1, филтри за FITC) при увеличение 40x, 100x. Този метод е използван с цел да се провери предложената от нас хипотеза, че повечето от разрывите на соматичните аберации в политемните хромозоми не възникват на случайни места, а се концентрират в сайтове на локализация на копия на транспозонни елементи. Хромозомите с флуоресценция в отделни райони по дължината им се заснемат веднага. В следствие всяка снимка се анализира и се посочва районът на флуоресценция в съответната хромозома, като се използва хромозомната карта на Hägele (1970) и се сравнява с местата на локализация на хромозомните разрыви, възникнали в резултат на соматични аберации.

Необходимо оборудване и реактиви: Бинокулярна лупа, флуоресцентен микроскоп, препараторни игли, предметни и покривни стъкла, термос с течен азот, алуминиева пластинка, бръснарско ножче. Реактиви: 95%, 70%, 50%, 30% Етилов алкохол, фосфатно буферни разтвори 0.1x SSC, 2x SSC, 1x PBS, NaOH; Na цитрат, NaCl, Na₂HPO₄, KCl, KH₂PO₄, дестилирана вода

г) Стандартни хромозомни карти. Стандартните хромозомни карти на Кикнадзе и др. (1991) и Hägele (1970) (Фиг. 3а, 4) са използвани за:

- детерминирането на вида;
- определяне на тип и локализация на соматичните и наследствени структурно-хромозомни аберации;
- определяне на функционалната активност чрез анализ на специфична функционална активност на хромозомите, реализирана

чрез появата на определени пуфи. Анализирана е и активността на Балбиановите пръстени (BRs) и Ядърцевия организатор (NOR);

- установяване наличието на декондензация, асинапсис, специфични пуфи, ектопични конюгации;
- установяване точната локализация на повторени ДНК последователности и транспозонни елементи по дължината на политемните хромозоми.

2.5.5. Анализ на структурно-хромозомните и функционални изменения в политемните хромозоми

Първа стъпка при анализа е детерминирането на вида по маркерни цитогенетични характеристики (Michailova 1989; Кикнадзе и др. 1991). Видът *C. riparius* принадлежи към цитоккомплекса *thummi* с комбинация на хромозомните рамена AB, CD, EF, G. За детерминирането на вида се използват следните цитогенетични маркери на политемните му хромозоми: стеснения в рамената А и С, секторите 1, 2 разположени близо до теломерите на хромозомите, рисунък от дискове в рамо В -сектор 3, както и рисунките 4 и 5 на рамената Е и F (Фиг. 2.2а). Хромозома G носи ядърцевия организатор (NOR) и три Балбианови пръстена BRa, BRb, BRc, като BRa се експресираща само в няколко клетки на слюнчената жлеза.

а) Соматична структурно-хромозомна изменчивост. За целите на биологичния мониторинг се използват соматичните структурно хромозомни аберации (абарации, които се срещат само в единични клетки на слюнчените жлези на изследвания индивид) (Michailova 2011).

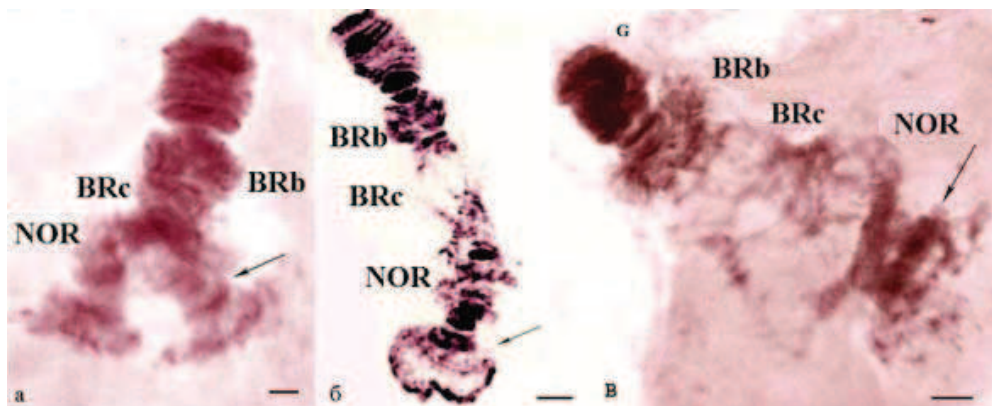
След цитотаксономичното определяне на *C. riparius* се извършва анализ на политемните хромозоми, като се установяват соматични структурнохромозомни абарации. Анализът се провежда чрез сравнение на дисковидната последователност на политемните хромозоми на вида стандартните хромозомни карти, изготвени съответно от Hägele (1970) и Кикнадзе и др. (1991). За тази цел хромозомните рамена на *C. riparius* се разделят на проксимална и дистална част (Bovero et al. 2002), а всяка хромозома е разделена на отделни раздели, означени с букви - А, В, С и т.н. Всеки раздел е разделен на подраздели, означени с цифри 1, 2, 3 и т.н. А всеки подраздел е разделен на по-малки отдели, означени с малки латински букви. Отчитат се само соматичните абарации, абарации

които не засягат целия индивид, а само отделни клетки. При отчитането на аберациите се определя точно тяхната локализация, като се записва по следния начин: напр. рамо A, отдел B1f-g. Най-често срещаните аберации са хетерозиготни парацентрични инверсии (засягат рамената на хромозомите) или перицентрични инверсии (засягат центромерните райони на хромозомата) (Фиг. 2.4аб), хетерозиготни дефишънси (отпадане на генетичен материал от крайна част на хромозомата, засяга само единия хомолог) (Фиг. 2.5), хомозиготни делеции, най-често в хромозома G, отпадане на Балбиановите пръстени и други райони от хромозомата (Фиг. 2.7а,б,в), като често хромозомата се превръща в „помпон“. В някои райони на хромозомата се наблюдава и протичане на амплификационни събития (Фиг. 2.6). Честотата на установените соматични структурно-хромозомни аберации при индивидите, събрани от замърсените водоеми е сравнена с тази при контролните индивиди. Посочените соматични структурно-хромозомни аберации са отлични биомаркери за замърсяване на околната среда с тежки метали.

б) Соматична функционална изменчивост. Освен на структурно ниво, видът може да реагира на различни въздействия на стрес условията в околната среда и на функционално ниво. Анализът включва нивото на пуфова активност на специфични и важни структури от политемните хромозоми - Балбианови пръстени (BRs) и Ядърцев организатор (NOR), установена по скалата за активност на Beermann (1971): (++) - силна активност; (+) средна активност; (-) много слаба или липса на активност (Фиг. 2.20):

- ++/++: двата Балбианови пръстена BRc и BRb са силно активни;
- ++/+-: BRc е силно активен, а BRb е с хетерозиготна активност;
- +/+/-: BRc е силно активен, а при BRb липсва активност;
- +/+: двата Балбианови пръстена BRc и BRb имат средна активност;
- +/- или -/+: единият BR е средно активен, а другият проявява слаба активност;
- /-: и при двата BRc и BRb се наблюдава подтискане на активността.

При 4-та възраст ларви (6–7 фаза) BRs и NOR имат нормално висока активност (++) (Кикнадзе 1978). При наличие на стрес- условия се наблюдава понижаване или подтискане на тяхната активност - важен биомаркер при оценка състоянието на околната среда.



Фиг. 2.20. Различни състояния на активност на Балбианови пръстени и ядръцев организатор в хромозома G на *C. riparius*. Мащабната линейка е равна на 100 μm . (Levels of activity of BRs and NOR in chromosome G of *C. riparius*). Стрелката показва локализацията на центромерния район. (Arrow indicates the localization of the centromere region. Bar = 100 μm .)

а. BRc - липса на активност (-/-), BRb, NOR - средна активност (+/+) (No activity of BRc and intermediate activity of BRb, NOR).

б. BRc - силно активен (++/+), BRb, NOR - средна активност (+/+) (High activity of BRc and intermediate activity of BRb, NOR).

в. BRb, BRc и NOR - силно активни (++/++) (High activity of BRb, BRc and NOR).

Към анализа на функционалните хромозомни изменения се включва и определяне наличието на нови специфични пуфи в хромозомите (Фиг. 2.15), както и поява на декондензация на хетерохроматинови участъци (центромерни и теломерни райони на хромозомите).

2.5.6. Биохимични методи

Определена е активността на три ензимни системи на видове от сем. Chironomidae: Acetylcholinesterase (AChE); Etoxyresorufin O-deethylase (EROD) и Glutathione S-transferase (GST), както и съдържанието на металотионинови протеини (MT). За обработването и изолирането на белтъчни фракции са използвани протоколите на Schenkman and Cinti (1978) и Lowry et al. (1951). Активността на EROD е определена по Burke and Mayer (1974) и Arinc and Sen (1994); за активността на AChE е използвана методиката на Ellman et al. (1961); за GST - Habig et al. (1974). Концентрацията на MT при *C. riparius* е определена по метода на Viarengo et al. (1997) и Ozdemir et al. (2011a). Инхибирането на активността на тези ензимни системи,

както и промяната на концентрацията на МТ в тъканите на ларвите е признак за наличие на определено замърсяване във водоемите (с тежки метали и пестициди) и може да се използва като биомаркер за оценка на състоянието на околната среда. (Биохимичният анализ е проведен от д-р М. Дуран, Турция – Университет в град Памук Калле).

2.5.7. Химичен анализ

Събирани са проби от вода и седимент на всеки от изследваните водоеми за установяване наличието и концентрацията в тях на йони на тежки метали. Количественият анализ е направен по метода ICP-OES и PI-ICP-MS (Perkin Elmer ELAN DRCII). За контрола са използвани данните за седимента на незамърсен водоем в Италия (Corio) (Sella et al. 2004) и данните за фосилен седимент (Forstner and Salomons 1980). (Химичният анализ е проведен от д-р Е. Карадурмус, Турция, Университет в град Чорум).

2.5.8. Статистически методи

а) Честотата на установените структурни и функционални изменения в хромозомите е изчислена в % спрямо общия брой изследвани индивиди и клетки.

б) Fisher-Student's T-test – използван е за обработване на получените резултати за различните нива на активност на BRs (BRc/BRb) и NOR и сравняване на честотата между отделните активности, както и между материал от замърсените райони и контролата.

в) G- test (Програмен пакет „Easy-Stat“ – Sokal and Rholf 1995) е използван за установяване на значими разлики в честотата на клетките/индивидите с аберации при различните извадки на видове от водоеми на изследваните страни. За откриване на отклонение на наблюдаваните точки на разриви на аберации и местата на локализация на повторените ДНК елементи в проксимална и дистална част на хромозомите;

г) Корелационен анализ (Spearman correlation) (Програмен пакет „Easy-Stat“ – Sokal and Rholf 1995) е използван за установяване наличие на съвпадение между точките на разриви на хромозомни аберации и сайтовете на локализация на повторени ДНК елементи по дължината на политемните хромозоми;

rs – коефициент на корелация; df – степени на свобода

Използвани са нива на значимост $P < 0.05$; $P < 0.01$; $P < 0.001$.

2.6. Цитирана литература

- Балушкина ЕВ (1987) Функциональное значение личинок хирономид континентальных водоемов. Наука, Ленинград, 180с.
- Белчева Р, Михайлова П (1991) Ръководство за практически занятия по цитогенетика. Университетско издателство „Кл. Охридски“, София, 137с.
- Ильинская НБ (1982) Методика определения внутривозрастных стадий развития и пола у личинок хирономид. В: Ахроров Ф. (Ответственный редактор), „Методическое пособие по изучению хирономид“, „Дониш“, Душанбе, 30–43.
- Кикнадзе ИИ (1976) Сравнительная характеристика пуффинга в хромосомах слюнных желез *Chironomus thummi* в личиночном развитии и при метаморфозе. I. Пуффинг в хромосоме IV. Цитология 18(11): 1322–1329.
- Кикнадзе ИИ (1978) Сравнительное изучение картины пуффинга в хромосомах слюнных желез *Chironomus thummi* в личиночном развитии и при метаморфозе. II. Картина пуффинга в хромосомах I, II, III. Цитология 20: 514–521.
- Кикнадзе ИИ, Шилова АИ, Керкис ИЕ, Шобанов НА, Зеленцов НИ, Гребенюк ЛП, Истомина АГ, Прасолов ВА (1991) Кариотипы и морфология личинок трибы Chironomini, Атлас. Наука, Новосибирск, 115с.
- Панкратова ВЯ (1970) Личинки и куколки комаров подсемейства Orthocladiinae фауны СССР (Diptera, Chironomidae - Tendipedidae). Определитель по фауне СССР. Наука, Ленинград, 344с.
- Пеев Д, Герасимов С (1999) Национална програма за биологичен мониторинг. Phare. Експресни и перспективни методи за биологичен мониторинг. Пеев Д, Герасимов С (Съставители и научни ред.) Изд. Геалибрис, София, 240с.
- Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pelerin J, Rainbow PS (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquatic Toxicology 76: 16–202.
- Arinc E, Sen A (1994) In vivo effects of anesthetic benzocaine, on liver microsomal cytochrome P450 and mixed-function oxidase activities of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Comparative Biochemistry and Physiology 107 C: 399–404.
- Baršienė J, Bucinskiene R (2001) Cytogenetic damage in the tissues of indigenous and transferred mollusks. Acta Zoologica Lituanica 11: 102–109.
- Beermann W (1971) Effect of alfa amanitine on puffing and intranuclear RNA synthesis in *Chironomus* salivary glands. Chromosoma 34: 152–167.
- Bhattacharyay G, Sadhu A, Mazumdar A, Chaudhuri P (2005) Antennal Deformities of Chironomid Larvae and their use in Biomonitoring of Heavy metal pollutions in the River Damodar of West Bengal, India. Environmental Monitoring and Assessment 108: 67–84.

- Bovero S, Hankeln T, Michailova P, Schmidt E, Sella S (2002) Nonrandom chromosomal distribution of spontaneous breakpoints and satellite DNA cluster in two geographically distant populations of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae). *Genetica* 115: 273–281.
- Burke MD, Mayer RT (1974) Ethoxyresorufin: Direct fluorometric assay of microsomal O-dealkylation which is preferentially induced by 3-methylcholanthrene. *Drug Metabolism and Disposition* 2: 583–588.
- Capy P, Gasperi G, Biemont C, Bazin C (2000) Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? *Heredity* 85: 101–106.
- Duran M, Michailova P, Sari A, Ilkova J, Sen A, Karadurmus E (2012) Assessment of the sediment toxicity in Bulgarian and Turkish Rivers using the biomarkers in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae). *Acta zoologica bulgarica*, Suppl. 4: 163–169.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres JRV, Feather-Stone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7: 88–95.
- Farkash E, Kao G, Horman S, Park E (2006) Gamma radiation increases endonuclease-dependent L1 retrotransposition in a cultured cell assay. *Nucleic Acids Research* 34(4): 1196–1204.
- Forstner U, Salomons W (1980) Trace metal analysis on polluted sediments. I. Assessment of sources and intensities. *Environmental Technology Letters* 1: 494–505.
- Guerreiro M (2012) What makes transposable elements move in the *Drosophila* genome? *Heredity* 108: 461–468.
- Habig WH, Pabst M J, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249: 7130–7139.
- Hägele K (1970) DNA-Replikationsmuster der Speicheldrüsen Chromosomen von Chironomiden. *Chromosoma* 31: 91–138.
- Hankeln T, Keyl H, Ross R, Schmidt E (1993) Evolution of histone gene loci in chironomid midges. *Genome* 36: 852–862.
- Ilkova J (2004) Chromosome variability of species of subfamily Chironominae (Diptera, Chironomidae) from polluted regions near Sofia. *Acta zoologica bulgarica* 56(1): 15–30.
- Ilkova J, Hankeln T, Schmidt E, Michailova P, Sella G, Zampicini GP, Petrova N, White K (2007) Genome instability of *Chironomus riparius* Mg. and *Chironomus piger* Strenze (Diptera, Chironomidae). *Caryologia* 60: 299–305.
- Ilkova J, Cervella P, Zampicini GP, Sella G, Michailova P (2013) Chromosomal breakpoints and transposable-element-insertion sites in salivary gland chromosomes of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera, Chironomidae) from trace metal polluted stations. *Acta zoologica bulgarica* 65(1): 59–73.

- Jablonska-Brana I, Michailova P, Szarek-Gwiazda E (2013). Environmental agents in Lake Łuknajno (Poland) affecting the genome of *Chironomus melanotus* Keyl, 1961 (Diptera, Chironomidae) – a new species of Polish fauna. *Oceanological and Hydrobiological Studies* 42 (2): 20–32.
- Janssen de Bisthoven LG, Timmermans KR, Ollevier F (1992) The concentration of cadmium, lead, copper and zinc in *Chironomus riparius* larvae with deformed versus normal menta. *Hydrobiologia* 239: 141–149.
- Kale S, Moor L, Deininger P, Engel A (2005) Heavy metals stimulate human LINE-1 retrotransposition. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2(1): 14–23.
- Keyl H (1962) Chromosomen evolution bei *Chironomus*. II. Chromosomenumbauten und phylogenetische Beziehungen der Arten. *Chromosoma* 13: 496 – 541.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randal RJ (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265–275.
- Michailova P (1985) Method of breeding the species from family Chironomidae, Diptera in experimental conditions. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences* 38(9): 1179–1181.
- Michailova P (1987) „C“ banding in the polytene chromosomes of a group „*plumosus*“ and their experimental hybrids. *Genetica* 74: 41–51.
- Michailova P (1989) The polytene chromosomes and their significance to the systematics of the family Chironomidae, Diptera. *Acta zoologica fennica* 186: 1–107.
- Michailova P (1996) Cytotaxonomy of Chironomidae, Diptera from Lake Shabla (Bulgaria): Cytogenetic evidence for Introgressive hybridization. *Hydrobiologia* (Brussels) 318: 25–42.
- Michailova P (2011) Rearrangements in Chironomidae (Diptera), genomes induced by various environmental stress factors. *Russian Journal of Genetics: Applied Research* 1(1): 10–20.
- Michailova P, Belcheva R (1990) Different effect of lead on an external morphology and polytene chromosomes of *Glyptotendipes barbipes* (Staege) (Diptera, Chironomidae). *Folia Biologica* 38(1–4): 83 - 88.
- Michailova P, Petrova N, Ramella L, Sella G, Todorova J, Zelano V (1996) Cytogenetic characteristics of a population of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) from a polluted Po river station. *Genetica* 98: 161–178.
- Michailova P, Ramella L, Sella G, Bovero S (1997) C-band variation in polytene chromosomes of *Chironomus riparius* Mg (Diptera, Chironomidae) from a polluted Piedmont station (Italy). *Cytobios* 90: 139–151.
- Michailova P, Petrova N, Sella G, Ramella L, Bovero S (1998) Structural-functional rearrangements in chromosome G in *Chironomus riparius* Meigen (Diptera, Chironomidae) collected from a heavy metal polluted area near Turin, Italy. *Environmental Pollution* 103: 27–35.

- Michailova P, Petrova N, Sella G, Bovero S, Ramella L, Regoli F, Zelano V (2001a) Genotoxic effects of chromium on polytene chromosomes of *Chironomus riparius* Meigen 1804 (Diptera, Chironomidae). *Caryologia* 54(1): 59–71.
- Michailova P, Ilkova J, Petrova N, White K (2001b) Rearrangements in the salivary gland chromosomes of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) following exposure to lead. *Caryologia* 54(4): 349–363.
- Michailova P, Ilkova J, Petrova N, Selvaggi A, Zampicini GP, Sella G (2007) Relationship between chromosome rearrangements and repetitive DNA clusters in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) from anthropogenic polluted Palearctic regions. *Comparative Cytogenetics* 1: 45–49.
- Michailova P, Ilkova J, Kerr R, White K (2009a) Chromosome variability in *Chironomus acidophilus* Keyl, 1960 from the Afon Goch, UK - a river subject to long-term trace metal pollution. *Aquatic Insects* 3(3): 213–225.
- Michailova P, Sen A, Ilkova J, Berber R, Karadurmus E, Duran M (2009b) Response at different levels of the genome of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) collected from polluted rivers in Bulgaria and Turkey – preliminary results. *Genetics and Breeding* 38(1): 21–27.
- Michailova P, Ilkova J, Hankeln T, Schmidt E, Selvaggi A, Zampicini GP, Sella G (2009c) Somatic breakpoints, distribution of repetitive DNA and non-LTR retrotransposon insertion sites in the chromosomes of *Chironomus piger* Strenzke (Diptera, Chironomidae). *Genetica* 135: 137–148.
- Michailova P, Szarek-Gwiazda E, Kownacki A (2012a) Does biodiversity of macroinvertebrates and genome response of Chironomidae larvae (Diptera) reflect heavy metal pollution in a small pond? *Environmental Monitoring and Assessment* 184: 1–14.
- Michailova P, Sella G, Petrova N (2012b) Chironomids (Diptera) and their salivary gland chromosomes as indicators of trace metal genotoxicology. *Italian Journal of Zoology* 79(2): 218–230.
- Michailova P, Ilkova J, Duran M, Karadurmus E, Berber R, Sen A (2012c) Structural and functional alterations in salivary gland chromosomes and enzyme activity of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) from anthropogenically polluted stations in Bulgaria and Turkey. *Caryologia* 65(2): 157–169.
- Michailova P, Szarek-Gwiazda E, Kownacki A, Warchałowska-Śliwa E (2012d) Biodiversity of Chironomidae (Diptera) and genome response to trace metals in the environment. *Pestycydy/Pesticides* 1–4: 41–48.
- Michailova P, Sella G, Petrova N (2012e) Polytene chromosomes of Chironomidae (Diptera) as a bioassay of trace-metal-induced genome instability. *Fauna norvegica* 31: 227–234.
- Michailova P, Szarek-Gwiazda E, Kownacki A, Warchałowska-Śliwa E (2012f) Genomic alterations recorded in two species of Chironomidae (Diptera) in the Upper Jurassic limestone area of the Ojców National Park, Poland attributable to

- natural and anthropogenic factors. *European Journal of Entomology* 109: 479–490.
- Michailova P, Kownazki A, Langton P (2013) *Chironomus polonicus* sp.n. (Diptera: Chironomidae) from southern Poland. *Zootaxa* 3599(6): 564–576.
- Michailova P, Ilkova J, Cervella P, Santovito A, Sella G (2013) NOR Activity in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) is affected by Chronic exposure to trace metal pollution. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences* 66(9): 1273–1278.
- Ozdemir A, Duran M, Akyildiz GK, Sen A (2011a) EROD and Metallothionein in *Limnodrilus profundicola* (Oligochaeta: Tubificidae) as an indicator of pollution exposure in the Curuksu Stream of Menderes River, Denizli - Turkey. *Desalination and Water Treatment* 26: 98–103.
- Ozdemir A, Duran M, Sen A (2011b) Potential use of the Oligochaete *Limnodrilus profundicola* V., as a bioindicator of contaminant exposure. *Environmental Toxicology* 26: 37–44.
- Pinder LCV, Reiss F (1983) The larvae of Chironominae (Diptera: Chironomidae) of the Holarctic region – Keys and diagnoses. *Entomol. Scand, suppl.* 19: 293–435.
- Rosenberg D (1992) Freshwater biomonitoring and Chironomidae. *Netherland Journal of Aquatic Ecology* 26(2–4): 1–122.
- Saether O (1975) Nearctic chironomids as indicators of lake typology. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie* 19: 3127–3133.
- Saether O (1979) Chironomids communities as water quality indicators. *Holarctic Ecology* 2: 65–74.
- Schenkman LB, Cinti DL (1978) Preparation of Microsomes with Calcium. *Methods in Enzymology* 52: 83–89.
- Schmidt E (1992) Multicolor in situ hybridization – a helpful technique for precise gene localization. *Sci Tech Inform Serv* 10(3): 80–84.
- Sella G, Bovero S, Ginepro M, Michailova P, Petrova N, Robotti R, Zelano V (2004) Inherited and somatic cytogenetic variability in Palaearctic populations of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera, Chironomidae). *Genome* 47: 332–244.
- Servia M, Cobo F, Gonzalez M (2000) Seasonal and interannual variations in the frequency and severity of Dieformities in Larvae of *Chironomus riparius* (Meigen, 1804) and *Procladius olivacea* (Meigen, 1818) (Diptera, Chironomidae) collected in a polluted site. *Environment Monitoring and Assessment* 64: 617–626.
- Sokal RR, Rohlf FG (1995) *Biometry*, 3rd ed. WH Freeman and Company, 887 p.
- Vermeulen A, Dall P, Lindegaard C, Ollevier F, Goddeeris B (1998) Improving the methodology of chironomid deformation analysis for sediment toxicity assessment: a case study in three Danish lowland streams. *Archiv fuer Hydrobiologie* 144(1): 103–125.
- Viarengo A, Ponzano E, Dondero F, Fabbri R (1997) A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application

to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research* 44: 69–84.

Warwick WF (1988) Morphological deformities in Chironomidae (Diptera) larvae as biological indicators of toxic stress. In: Evan MS (Ed) *Toxic Contaminants and Ecosystem Health. A Great Lakes Focus*, John Wiley and Sons, 1–80.

Warwick WF (1990) The use of morphological deformities in Chironomid larvae for biological effects monitoring. *Inland Waters Directorate Scientific Publications, Series 173*, Environment Canada ON, 1–34.

Wieslander L (1994) The Balbiani ring multigene family: coding sequences and evolution of a tissue-specific function. *Proceedings of Nucleic Acids Research* 48: 275–313.

3. Холокинетични хромозоми при Heteroptera - обща характеристика и възможности за използване в биомониторинга

Снежана Грозева, Николай Симов

3.1. Значение на хетероптерите като зоомониторни видове за оценка на екологичния риск

Хетероптерите са едни от най-масовите насекоми в биоценозите и представляват важна част от видовото разнообразие на водни и сухоземни насекоми. Много от видовете са фитофаги или имат смесено хранене, и се явяват консументи от първи ред в хранителната верига. Това предполага по-силно и директно влияние на замърсителите и бърз отговор на популационно, организмово и на по-ниски нива на организация на живата материя при високи стойности на йони на тежки метали в организма. От друга страна, при хищните видове бе очаквана по-висока акумулация на замърсителите, приети чрез консумираните жертви.

Хетероптерите са насекоми, които се характеризират със специфични цитогенетични особености, като холокинетични хромозоми, в които кинетичната активност е разпространена по дължината на хромозомата, а не е локализирана в кинетохора, както при моноцентричните хромозоми (каквито са хромозомите на човека и на по-голямата част от изучените в цитогенетично отношение организми). Тази особеност в структурата на холокинетичните хромозоми от една страна позволява да се съхранят при клетъчното делене възникнали по различни причини фрагменти от хромозоми, които могат да се закрепят за нишките на делителното вретено и да достигнат дъщерната клетка, а не да бъдат загубени, както става с ацентричните фрагменти от моноцентрични хромозоми; от друга страна – ги лишава от маркери за идентифициране на отделните двойки хромозоми и проследяване на промени в кариотипа в резултат на различни въздействия. Холокинетичните хромозоми правят хетероптерите не особено удобни за биомониторинг на цитогенетично ниво.

Материал

Изследвани бяха насекоми от различни видове на подразред Heteroptera от повлиян от замърсяване с цветни метали и битово замърсяване

район (района на КЦМ „Пловдив“ край Асеновград и устието на река Чая). За сравнение бяха избрани фонові райони край село Проглед и РФС „Рожен“, както и райони от резервата Алиботуш. При събирането на материала бе установена почти пълната липса на представители на подразеда на територията на КЦМ „Пловдив“. Изключително редки се оказаха хетероптерите и на територията на лесозащитния пояс и в съпътстващите го тревни съобщества. От събрания материал от сем. Miridae и сем. Pentatomidae са изготвени микроскопски препарати с цел сравнителен цитогенетичен анализ и търсене с помощта на съвременни методи за оцветяване на хромозомите на цитогенетични маркери за проследяване на ефекта на антропогенното влияние върху състоянието на околната среда и съотв. кариотипа.

3.2. Характеристика на използваните молекулярно-цитогенетични методи за оценка на екологичния риск

Методи

Уловът на насекомите е осъществяван чрез косене с ентомологичен сак, тръскане на клоните на дървесна и храстова растителност чрез мрежа за дендробионтни организми и хидробиологичен сак. Събраните индивиди от сухоземните видове са фиксирани директно живи, а водните предварително са дисецирани с цел да се преодолее водонепропускливата им кутикула и за осигуряване достъп на фиксатора до тъканите им.

Външно-морфологични методи

Таксономичното определяне на материала бе извършвано по наличните ключове за отделните семейства (Йосифов 1981, Кириченко 1913, Кержнер и Ячевский 1964, Péricart 1972, 1983, 1998; Wagner 1952, 1961, 1974аb, 1975, Пучков 1986).

Цитогенетични методи

Рутинно оцветяване

– Броят и поведението на мейотичните хромозоми на хетероптерите се изследват на *squash* микроскопски препарати от гонадите чрез оцветяване по метода Schiff-Giemsa (Grozeva and Nokkala 1996);

Диференциално оцветяване

- *C-banding* – прилага се модифициран протокол по Sumner (1972) за холокинетични хромозоми (Grozeva and Nokkala 2003). Чрез него се установява локализацията на конститутивния хетерохроматин – белег, използван за диференциране на видове, както и на отделни хромозоми в изследвания кариотип.
- за определяне количеството и разпределението на хетерохроматина по дължината на холокинетичните хромозоми на изследвани моделни видове са използвани някои базисно специфични (АТ/ГЦ) флуорохроми (DAPI и хромомицин А₃) (Grozeva et al. 2004).

Единствените масови видове хетероптери в района на изследване са представителите на род *Turonia* (обитаващи храстите от род *Tamarix* в лесозащитния пояс). Освен тях са изследвани видовете *Deraeocoris ruber* (Linnaeus 1758) и *Megaloceroea recticornis* (Geoffroy 1785). В импактния район са изследвани хетероптери от склоновете на Родопите при с. Куклен и речната тераса при устието на р. Чая - видовете *Deraeocoris rutilus* (Herrich-Schaeffer 1838), *Camptopus lateralis* (Germar 1817), *Graphosoma lineatum* (Linnaeus, 1758), *Heterocapillus tigrisipes* (Mulsant and Rey 1852). За сравнение са използвани същите видове от контролните райони. От контролните райони са събрани и изследвани също така видове от род *Stenodema*, *Notostria*, *Dryophyllocoris*, както и *Eurydema* (s.str.) *oleracea* (Linnaeus, 1758), сравнително масови в агроценози и тревни съобщества.

Анализ на структурните и функционални хромозомни изменения

- анализ на моделните видове относно структурни преобразувания, честота на хиазмите в хромозомите, поведение на холокинетичните хромозоми по време на мейозата.
- сравняване на установените изменения при индивидите от замърсените райони с тези, наблюдавани при индивиди от контролните биотопи.
- точна локализация на NOR в хромозомите на видове от Heteroptera чрез определяне на ГЦ базите с използване на ГЦ специфичен флуорохром хромомицин А₃ (СМА₃) (Grozeva et al. 2004) при индивидите от чисти и замърсени райони.
- *in situ* хибридизация (FISH) – този метод позволява да бъде определена локализацията на конкретен участък ДНК чрез хибридизиране с белязана ДНК проба, а сигналът за флуоресценция

се установява със съответно флуоресцентно белязано антителио. При близко родствени видове Heteroptera се прилага модифициран FISH протокол с цел установяване локализацията на определени ДНК проби (например определяне на NOR с 18S рДНК, а за установяване състава на теломерните последователности - TTAGG проби) в кариотипа на тези видове (Grozeva et al. 2011).

– *dotblot* – прилаган при опитите за установяване състава на теломерните последователности при хетероптерите (Grozeva et al. 2011).

3.3. Резултати от прилаганите методи

Осем вида (изброени по-долу), събрани от замърсения и от контролния район, принадлежащи към 5 семейства на подразред Heteroptera, са анализирани цитогенетично с прилагане на DAPI/CMA₃-оцветяване и флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH) с теломерния повтор (TTAGG)_n и 18S рДНК проби. Определена е хромозомната формула ($2n = 30 + 2m + XY$) на *Deraeocoris rutilus* (Herrich-Schaffer, 1838) и *D. ruber* (Linnaeus, 1758) от сем. Miridae. Чрез *in situ* хибридизация (FISH) е локализиран 18S рДНК кластер при тези два вида, както и при *Megaloceroea recticornis* (Geoffroy, 1785) (Miridae), *Oxycarenus lavatae* (Fabricius, 1787) (Lygaeidae s.l.), *Pyr-rhocoris apterus* (Linnaeus, 1758) (Pyrrhocoridae), *Eurydema oleracea* (Linnaeus, 1758) и *Graphosoma lineatum* (Linnaeus, 1758) (Pentatomidae). Видовете се различават по локализация на рибозомалните гени (18S рДНК кластера), които са разположени в двойка автозоми в кариотипа на *O. lavatae* и *P. apterus* (Фиг. 3.1) и в половите хромозоми при останалите пет вида (Фиг. 3.2), но индивидите, събрани от замърсения и от контролния район, не показват видими различия по локализацията на тези гени. Информация за локализацията на 18S рДНК при изследваните видове е получена за първи път. Чрез методите на молекулярната цитогенетика (FISH и *dot-blot* на геномната ДНК от *C. lectularius*, *Nabis* sp. и *O. lavatae* с пентануклеотида (TTAGG)_n и оседругителни теломерни проби) са установени фундаментални различия в молекулярната структура на теломерите между разред Heteroptera и други разреди хемиптерни насекоми (Hemipteroidea): хромозомите на полутвърдокрилите *D. rutilus*, *M. recticornis*, *Cimex lectularius* (Cimicidae), *E. oleracea* и *G. lineatum* са изгубили теломерния мотив TTAGG, характерен за Hemipteroidea и повечето други разреди насекоми (без двукрилите). Геномът на тези видове не хибридизира също и с използваните шест други

известни типове теломерни последователности, характерни за различни групи животни и растения: $(TTTTGGGG)_n$ и $(TTGGGG)_n$ (ресничести протозои), $(TTAGGC)_n$ (нематоди), $(TTAGG)_n$ (насекоми), $(TAACC)_n$ (скарриди), $(TTAGGG)_n$ (гръбначни), $(TTTAGGG)_n$ (растения) (виж Traut et al. 2007). На базата на получените данни бе направен извод, че разред Heteroptera е придобил алтернативен теломеразно-независим механизъм за поддържане на стабилна дължина на теломерите в края на хромозомите. Получената оригинална информация за теломерната структура на хромозомите на тези интересни в цитогенетично отношение насекоми не даде резултат в търсенето на цитогенетични маркери за отчитане на замърсяването с тежки метали.

3.4. Заключение за ефективността на прилаганите методи

Цитогенетичните изследванията, проведени с различни видове от подразред Heteroptera, показват, че насекомите от тази група не са добър модел за проследяване на ефекта от замърсяването на цитогенетично ниво. От една страна, тези насекоми не бяха намерени масово в силно замърсените райони, а от друга – холокинетичните хромозоми не позволиха да се проследят стабилни кариотипни изменения по отношение генотоксичното влияние на йоните на тежки метали, както и да се намерят надеждни маркери за проследяване на измененията в кариотипа в резултат на въздействието на замърсителите. Поради това не препоръчваме използването им като моделни видове за оценка замърсяването на околната среда и прилагане на ИГБТС чрез цитогенетични изследвания за тази група животни. В бъдеще би следвало да се потърсят други подходящи биохимични или молекулярно-генетични маркери, които да позволят използването за целите на биомониторинга на тази важна за екосистемите група насекоми.

Насекомите от подразред Heteroptera са неподходящ обект за генотоксични изследвания вероятно и поради специфичните механизми за натрупването на токсичните вещества в хитина и освобождаване от тях при смяната на обвивката на ларвите, което ги предпазва от натрупването на йони на тежки метали в организма (Grozeva 2004). Наблюдения по време на това изследване показват, че тези насекоми „избягват“ райони с много високи нива на замърсяване, което води до практически пълна липса на представители на групата в площадката на комбината, въпреки наличието на подходящи хранителни растения. От друга страна, много

от фитофагните видове използват за храна предимно генеративните органи на растенията, а в тях вероятно най-малко се натрупват тежки метали като своеобразен механизъм, с който растенията се предпазват от появата на мутации и предаването им на потомството. Предполагаме, че почти пълната липса на хищни или видове със смесено хранене е причинена от ниската срещаемост на техните потенциални жертви.

3.5. Протоколи за работа с холокинетични хромозоми

3.5.1. Моделни обекти

Предпочитани за изследването са скоро имагинирани мъжки насекоми, които осигуряват по-голяма вероятност да се попадне на подходящи за анализ стадии от сперматогенезата. Използването на масови и широко разпространени видове е препоръчително с оглед сравнимост на резултатите, лесното им събиране в различните площадки и набавяне на нужния брой екземпляри за оценка на статистическата достоверност. Изборът на видове консументи от първи порядък позволява избягването акумулацията на замърсителите по хранителната верига. При хетероптерите това не е трудно, като се има предвид, че голяма част са фитофаги или със смесено хранене. Важно е, обаче, това да се отчита при изследванията. В случая сме използвали представители на трибус *Stenodemini* (сем. *Miridae*), които се изхранват върху различни видове житни треви, представителите на род *Tuponia* (сем. *Miridae*), свързани с тамариска, представители на род *Eurydema* (сем. *Pentatomidae*), трофично свързани със сенникоцветни растения и техните генеративни органи, както и някои други растителноядни и със смесено хранене видове от сем. *Miridae* и *Lygaeidae* (s. l.), хищни представители на сем. *Nabidae* и *Miridae*. Оскъдната хетероптерна фауна в района на КЦМ силно ограничи избора от моделни видове за провеждане на генотоксикологични изследвания и провеждането на анализи, а голяма част от малкото установени видове бяха представени с единични екземпляри.

3.5.2. Събиране

В зависимост от хранителните и биотопни предпочитания на отделните видове екземплярите за изследването се събират с помощта

на ентомологичен сак чрез косене (за хербобионтните видове), мрежа за дендробионтни форми (за обитаващите дървесна и храстова растителност), и сито или с пряко наблюдение и събиране (за обитателите на повърхността, листната подстилка и пространства под камъни или дървесна кора). Животните се фиксират живи в 96% етилов алкохол и ледена оцетна киселина (3:1), и се съхраняват при температура 4–8°C.

Необходимо оборудване за полевата работа: Ентомологичен сак, мрежа за дендробионтни форми и сито, ексхаустер, добре затварящи се съдове с обем от 2,5–50мл., пинсети, 96% етилов алкохол, ледена оцетна киселина, хартиени етикети и молив за надписването им (място, дата, събрал).

Лабораторна работа: Фиксираните насекоми се определят до вид по морфологични белези. За близко родствени таксони се налага отпрепарирането на части от външните репродуктивни органи на мъжките и изготвянето на микроскопски препарати. За изготвяне на хромозомни препарати е необходимо да се отделят гонадите от коремчето на насекомото под бинокулярна лупа с помощта на препараторни игли. Насекомото се поставя върху предварително обезмаслено (в етанол и етер) и подсушено предметно стъкло в капка 45% оцетна/млечна киселина, гонадите се отделят от останалите тъкани и се покриват с покривно стъкло. Препаратът се поставя върху къс филтърна хартия и се покрива с него, натиска се с палец, а с показалеца и средния пръст на другата ръка се придържат краищата на покривното стъкло (*squash* препарат), за да се разпръснат добре хромозомите в клетката и да няма наслагвания на хромозоми и клетки, които затрудняват анализа. Препаратът се надписва така, че да е ясно от какъв материал е изготвен. За превръщането на препарата в траен се охлажда на сух лед (CO₂) около 10–15 мин, покривното стъкло се отлепя с острие на скалпел/бръснарско ножче и препаратът се потапя за 10–15 мин във фиксатор (96% етилов алкохол и ледена оцетна киселина, 3:1), след което се изсушава и прибира на сухо в затворени кутии или мапи, които предпазват стъклата от запрашване.

Необходимо оборудване за лабораторна работа: Бинокулярна лупа, светлинен микроскоп, обезмаслени покривни и предметни стакла, препараторни игли, пинсети, гутатори, устройство за производство на сух лед, скалпел/бръснарско ножче, 96% етилов алкохол, ледена оцетна киселина.

3.5.3. Анализ на холокинетичните хромозоми

Готовите неоцветени микроскопски препарати на хромозоми се анализират с помощта на светлинен микроскоп с фазов контраст. Препаратите трябва да бъдат оцветени преди да започне същинския цитогенетичен анализ.

Рутинно оцветяване: Чрез метода Schiff-Giemsa (Grozeva and Nokkala 1996) препаратите се обработват преди оцветяването за избягване на фон от цитоплазмата и други негативни ефекти. За целта препаратите се държат 20 мин в 1N HCl при стайна температура за 20 мин, след това се хидролизират в 1N HCl при 60°C за 8 мин, и се оцветяват с реактив на Schiff за 20 мин. Несвързалият се реактив се отмива неколккратно в дестилирана вода. След това препаратите се поставят във фосфатен буфер на Sørensen (с pH 6,8) за 5 мин и в 5% разтвор на Giemsa за 20–30 мин, като степента на оцветяване се проверява под микроскоп.

С-метод за диференциално оцветяване с цел локализиране и анализ на конститутивния хетерохроматин в холокинетичните хромозоми: Неоцветените препарати се инкубират в 45% оцетна киселина при стайна температура за 30 мин, после се отмиват в дестилирана вода за 5 мин и се третират 5–8 мин в Ba(OH)₂ при стайна температура. Следва изплакване три пъти по 5 мин в дестилирана вода и инкубиране в буфер 2xSSC за 60 мин при 60°C. След това препаратите се поставят във фосфатен буфер на Sørensen (с pH 6,8) за 5 мин и в 5% разтвор на Giemsa за 20–30 мин, като степента на оцветяване се проверява под микроскоп след изплакване на препарата с дестилирана вода. Ако препаратът не е достатъчно оцветен се дооцветява.

Необходимо оборудване и реактиви: Светлинен микроскоп, кювети, филтърна хартия, 5% Ba(OH)₂, дестилирана вода, реактив на Schiff, 1N HCl, фосфатен буфер на Sørensen (с pH 6,8), 2xSSC буфер и 5% разтвор на Giemsa във фосфатен буфер.

Анализът се извършва с помощта на светлинен микроскоп при увеличения 20× (за търсене на пластинките) и 100× (за анализ). Хромозомите са по-бледи, а хетерохроматиновите райони на хромозомите са оцветени по-ярко във виолетово-червено.

Метод за *in situ* хибридизация (FISH) с клонове от 18S рДНК или теломерни повтори (TTAGG) и анализ на локализацията им в холокинетичните хромозоми (Grozeva et al. 2011): Геномна ДНК е изолирана от *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera, Pyrrhocoridae) с помощта на Chelex-100 extracted method. Таргетният 18S рДНК ген е PCR амплифициран със съответните праймери от геномната ДНК на *P. apterus* и белязан чрез PCR с биотин, а теломерната проба (TTAGG)_n е PCR амплифицирана с TTAGG_F и TTAGG_R праймери и белязана с Rhodamine-5-dUTP (GeneCraft, Germany).

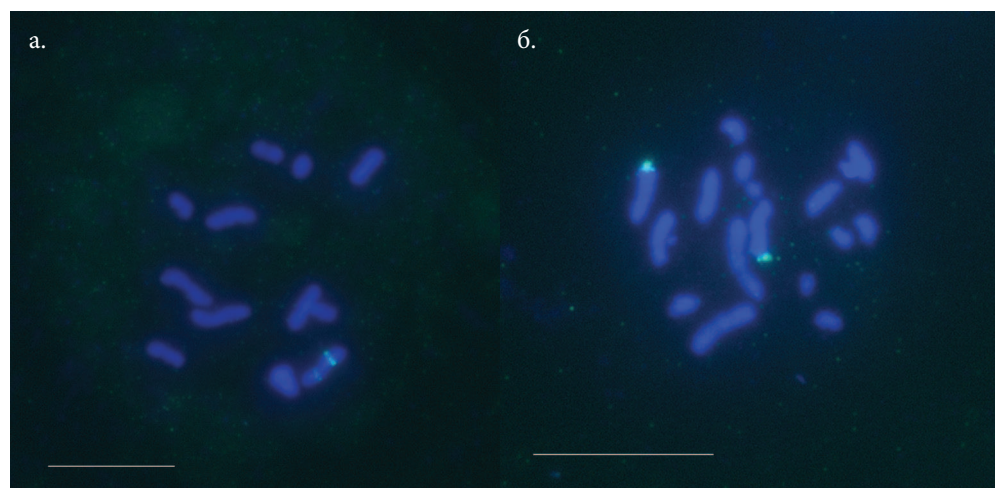
FISH е проведена по Schwarzbacher and Heslop-Harrison (2000) с модификации, като за всеки вид се анализират 1–2 препарата. Хромозомните препарати се дехидролизират през редица 70/80/96% етанол при стайна температура, и се третират с 100 µg/ml RNaseA (Sigma) за 60 min при 37°C във влажна камера; 3× се промиват в 2×SSC (по 5 min) при стайна температура; хидратират се през обратната редица 70/80/96% етанол при стайна температура; инкубират се в 5 mg/ml пепсин в 0.01 N HCl за 15 min при 37°C; промиват се последователно в PBS, в PBSx1/0.05M MgCl₂ за 5 min всеки, в 1% PFA in PBSx1/0.05M MgCl₂ for 10 min, в 1× PBS за 5 min, в PBSx1/0.05M MgCl₂ за 5 min при стайна температура; дехидролизират през редица 70/80/96% етанол при стайна температура или в лед и се сушат. След тази предварителна обработка, върху препаратите се налива хибридизационна смес (около 100 ng от белязаната проба, 50% формамид, 2×SSC, 10% (w/v) декстран сулфат, 1% (w/v) Tween-20 и 10 µg ДНК от спермии на съомга. Препаратите се покриват с покривни стъкла и се запечатват с гумено лепило. Следва денатурация на ДНК, за целта препаратите се поставят за 5 min в термостат при 75°C и последваща инкубация 42–44ч при 37°C. След това препаратите се промиват в 2×SSC за 3 min при 45°C, 50% формамид в 2×SSC за 10 min при 45°C, 2× в 2×SSC (по 10 min) при 45°C, блокиране на хибридизацията в 1.5% (w/v) BSA/4×SSC/0.1% Tween-20 за 30 min при 37°C във влажна камера. Детекцията на 18S рДНК пробата се извършва с 5µg/ml Avidin-Alexa Fluor 488 (Invitrogen), отмиване 3× в 4×SSC/0.02% Tween-20 (по 10 min) при 45°C и дехидратиране през 70/80/96% етанол при стайна температура. Готовите препарати се налива с ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen) и се покриват с предметни стъкла.

Необходимо оборудване и реактиви: Флуоресцентен микроскоп с филтри за DAPI, FITC, Rhodamine, дигитална фотокамера с охлаждане,

термостат, водна баня, PCR апарат, кювети. Реактиви: 95%, 70 %, 50%, 30% етилов алкохол, фосфатно буферни разтвори, 20×SSC, 1×PBS, Na цитрат, NaCl, Na₂HPO₄, KCl, KH₂PO₄, пепсин, 1N HCl, PBS, PFA, MgCl₂, белязана ДНК проба, формамид, декстран сулфат, Tween-20, ДНК от спермии на съомга, BSA, Avidin-Alexa Fluor 488 (Invitrogen), ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen), дестилирана вода.

Анализът на готовите препарати се извършва с помощта на флуоресцентен микроскоп снабден със съответните филтри. Периодът на светене, през който може да бъде наблюдавана флуоресценция (Фиг. 3.1), е кратък, затова наблюдаваните резултати се документират веднага, а анализът на направените фотографии се провежда впоследствие.

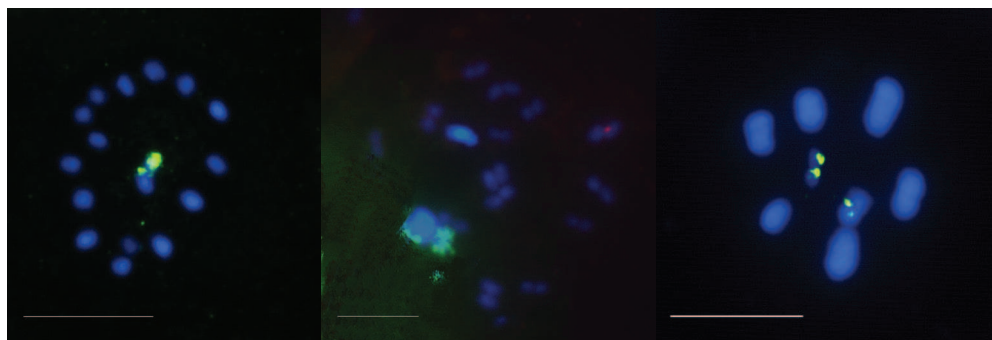
Dot-blot анализ: Геномна ДНК е екстрахирана по стандартен протокол (Phenol/Chloroform nucleic acid extraction protocol). Различните теломерни повтори на ДНК са PCR амплифицирани чрез съответните праймери, белязани с биотин. Около 20 ng изолирана ДНК след денатурация се накапват на Hybond N+ nylon membranes (Amersham, Biosciences). Хибридизацията се извършва за една нощ при 40°C в хибридизационна смес (около 100–200 ng от белязаната проба, 50% формамид, 4×SSC, 0.5%



Фиг. 3.1. Локализация на 18S рДНК (жълто зелено), разположени на двойка автозоми. Мащабната линия е равна на 10 μm (Localization of 18S rDNA (yellow-green) on the autosomes. Bar = 10 μm).

а. в кариотипа на *P. apterus* (Pyrrhocoridae).

б. в кариотипа на *O. lavaterae* (Lygaeidae).



Фиг. 3.2. Локализация на (TTAGG)_n (розово) и 18S рДНК (жълто зелено), разположени на половите хромозоми, мащабната линия е равна на 10 μm. (Localization of (TTAGG)_n (pink) and 18S rDNA (yellow-green) on the sex chromosomes. Bar = 10 μm)

а. *Megaloceroea recticornis* (Geoffroy, 1785) (Miridae).

б. *Deraeocoris rutilus* (Herrich-Schaffer, 1838) (Miridae).

в. *Eurydema oleracea* (Linnaeus, 1758) (Pentatomidae).

(w/v) SDS и 10 μgДНК от спермии на съомга). Следва 2× отмиване в 2× SSC/0.1% SDS (по 10 min) при стайна температура и 2× в 0.2× SSC/0.1% SDS (по 10 min) при стайна температура. За детекция е използван протокола към кита Biotin Chromogenic Detection Kit protocol, Fermentas. Този метод е използван за проверка наличието на съответните ДНК последователности в изследвания геном при опитите за определяне състава на теломерните повтори при хетероптерите.

3.6. Цитирана литература

- Грозева С (2004) Влияние на хронично въздействие с оловни йони върху култура от *Oxycarenus lavaterae* (Heteroptera). Acta entomologica bulgarica 10 (3): 19–27.
- Йосифов М (1981) Фауна на България, 12. Heteroptera, Pentatomidae. АИ “Марин Дринов”, София, 201с.
- Кержнер ИМ, Ячевский ТЛ (1964) Отряд Hemiptera - Полужесткокрылые или клопы. В: Бей-Биенко Г.Я. (ред.). Определитель насекомых европейской части СССР. Т. 1. Наука, Москва, Ленинград, 655 - 845.
- Кириченко АН (1913) Насекомые полужесткокрылые (Insecta Hemiptera). Dysodiidae и Aradidae. Фауна России и сопредельных стран, 6 (1): 301с.
- Пучков ВГ (1986) Полужесткокрылые семейства Rhopalidae (Heteroptera) фауны СССР. Наука, Ленинград, 132с.

- Grozeva SM, Nokkala S (1996) Chromosomes and their meiotic behavior in two families of the primitive infraorder Dipsocoromorpha (Heteroptera). *Hereditas* 125: 31–36
- Grozeva S, Kuznetsova VG, Anokhin BA (2011) Karyotypes, male meiosis and comparative FISH mapping of 18S ribosomal DNA and telomeric (TTAGG)_n repeat in eight species of true bugs (Hemiptera, Heteroptera). *Comparative Cytogenetics* 5(4): 355–374
- Grozeva S, Kuznetsova V, Nokkala S (2004) Patterns of chromosome banding in four nabid species (Heteroptera, Cimicomorpha, Nabidae) with high-chromosome number karyotypes. *Hereditas* 140: 99–104
- Grozeva S, Kuznetsova VG, Anokhin BA (2011) Karyotypes, male meiosis and comparative FISH mapping of 18S ribosomal DNA and telomeric (TTAGG)_n repeat in eight species of true bugs (Hemiptera, Heteroptera). *Comparative Cytogenetics* 5(4): 355–374
- Péricart J (1972) Hémiptères Anthocoridae, Cimicidae et Microphysidae de l'Ouest-paléarctique. Faune de l'Europe et du Bassin méditerranéen 7. Masson, Cie éditeurs, Paris, 402pp.
- Péricart J (1983) Hémiptères Tingidae euro-méditerranéens. Faune de France 69. Fédération Française des Sociétés des Sciences Naturelles, Paris, 618pp.
- Péricart J (1998) Hémiptères Lygaeidae euroméditerranéens (I, II, III). Faune de France 84 (A, B, C). Fédération Française des Sociétés des Sciences Naturelles, Paris, xxix + 1408 pp.
- Schwarzacher T, Heslop-Harrison P (2000) Practical *in situ* Hybridization. BIOS. Scientific Publishers Ltd. Oxford, UK, 338 pp.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304–306.
- Traut W, Szczepanowski M, Vítková M, Opitz C, František M, Zrzavý J (2007) The telomere repeat motif of basal Metazoa. *Chromosome Research* 15: 371–382. doi: 10.1007/s10577-007-1132-3.
- Wagner E (1952) Blindwanzen oder Miriden. *Die Tierwelt Deutschlands*, 41: 1–218.
- Wagner E (1961) Unterordnung: Ungleichflügler, Wanzen, Heteroptera (Hemiptera). *Die Tierwelt Mitteleuropas*, 4: 173.
- Wagner E (1974a) Die Miridae Hahn, 1831, des Mitteleuropas und der Makaronesischen Inseln (Hemiptera, Heteroptera). Teil. 1. Entomologische Abhandlungen Staatliches Museum für Tierkunde in Dresden 37 Suppl. iii + 484 pp.
- Wagner E (1974b) Die Miridae Hahn, 1831, des Mitteleuropas und der Makaronesischen Inseln (Hemiptera, Heteroptera). Teil. 2. Entomologische Abhandlungen Staatliches Museum für Tierkunde in Dresden 39 Suppl. ii + 421 pp.
- Wagner E (1975) Die Miridae Hahn, 1831, des Mitteleuropas und der Makaronesischen Inseln (Hemiptera, Heteroptera). Teil. 3. Entomologische Abhandlungen Staatliches Museum für Tierkunde in Dresden 40 Suppl. ii + 483 pp.

4. Цитогенетични биомаркери за оценка на екологичния риск при правокрили насекоми (Разред Orthoptera)

Драган Чобанов, Елжбиета Вархаловска-Шлива

4.1. Значение на правокрилите насекоми за биомониторинга

Правокрилите са широко използвани за кариологични и кариосистематични изследвания (виж Hewitt 1979, Warchałowska-Śliwa 1998). Отделни големи групи правокрили показват различия в кариотипа, подкрепящи идеята за приблизително паралелната еволюция на кариотипа, морфологичните, физиологични и екологични белези (Hewitt 1979). Смята се, че различията в кариотипа на близки видове не са причина за генетична изолация, а по-скоро резултат от нея (Warchałowska-Śliwa 1998). Както броят, така и морфологията на хромозомите варират между видовете и са резултат от разнообразни хромозомни преобразувания (сливания, транслокации и т.н.), съпътстващи еволюцията им. На различни етапи от еволюцията на отделни групи всички тези изменения се натрупват с различна интензивност. Често в рамките на един род или дори вид се наблюдава вариация не само в морфологията на хромозомите и разпределението на хетерохроматина, но и в броя на хромозомите. При род *Gryllotalpa* Latreille, 1802, например, едни автори считат различията в хромозомния набор като критерий за вид (Baccetti and Capra 1978), а други ги разглеждат само като вътревидови междупопулационни различия (Жантiev 1991) на видове, ясно различни по морфологични и биоакустични белези (Жантiev и др. 2003). В някои случаи чрез успешна хибридизация е доказан полиморфизъм по броя хромозоми и типа на определяне на пола (ХО или neo-XY) в рамките на един вид (Barton 1980, Bugrov et al. 2004, 2005). При други видове е доказана факултативна партеногенеза, съчетана с промяна на хромозомния набор (Hewitt 1979).

За разлика от кариосистематичните изследвания, изследванията на генетичните последствия от замърсяването при правокрилите са твърде оскъдни, ограничени върху някои късопипални скакалци (Warchałowska-Śliwa et al. 2005). В споменатото изследване Warchałowska-Śliwa et al. (2005) установяват вътрепопулационни аномалии в броя на хромозомите и морфологията на дялящите се клетки по време на митоза

и мейоза в резултат на акумулацията на йони на тежки метали в тъкани на късопипалния скакалец *Tetrix tenuicornis* Sahlberg, 1891 (надсемейство Tetrigoidea, семейство Tetrigidae). Установени са допълнителни (B-) хромозоми в зародишните клетки. В оогониите на 50% от женските, събрани от замърсени райони, са установени мозаечни хромозомни групирания, както и диплоидни, хипо- или хипертетраплоидни, тетраплоидни и октоплоидни клетки. В неотдавнашно изследване (Grzywacz et al. 2012) е установено, че популации на същия вид, приспособени към замърсена с тежки метали среда, се характеризират с намалено генетично разнообразие, което е установено на базата на RAPD-PCR (или метода на амплифициране на случайни последователности от полиморфна ДНК). По този начин, замърсяването на околната среда води до намаляване на генетичното и видово разнообразие, чрез оцеляване само на генотипове, осигуряващи преживяването, въпреки вредното влияние на замърсителите.

Въпреки че характеристиките на кариотипа на много видове дългопипални (Ensifera) и късопипални скакалци (Caelifera) са вече изследвани, само при *Tetrix tenuicornis* (Sahlberg, 1891) (виж по-горе) са определени реакции на стрес по отношение на замърсяване на средата с тежки метали. Поради това, целта на настоящото изследване беше да се проследи реакцията към замърсяване с йони на тежки метали при други видове и групи правокрили.

4.2. Избор на моделните обекти и прилаганите биомаркерни системи

За целта на настоящото изследване бяха избрани моделни видове от двата подразреда на разред правокрили – дългопипалните (Ensifera) и късопипалните скакалци (Caelifera). Дългопипалните скакалци включват по-примитивни видове, обикновено със смесено хранене (полифаги). Повечето от тях обитават растителността и се придържат към по-силно овлажнени микрохабитати. Поради това, те са по-добре изолирани от директното въздействие на разтворените в почвената вода замърсители. От друга страна, поради зависимостта им от по-високата атмосферна влажност и наличието на сравнително висока растителна покривка, те са по-уязвими от деградацията на хабитатите и обикновено липсват в райони, подложени на директно замърсяване.

Късопипалните скакалци са основно растителноядни (фитофаги). Те включват еволюционно по-млади видове с по-усъвършенствани

механизми за предпазване от загуба на вода от тялото, поради което много от тях обитават открити хабитати с разрежена тревиста покривка и ниска атмосферна влажност. Поради това и някои видове обитават райони, подложени на директно антропогенно влияние и замърсяване, което заедно с факта, че са в пряк досег с почвата и са консументи от първи порядък ги излага на значително по-силното влияние на разтворените в почвата замърсители.

От групата на дългопипалните скакалци бяха избрани следните два вида от семейство Tettigoniidae, събирани от съответните места:

- *Isophya rhodopensis* Ramme, 1951 – 1) от замърсена площадка по склона на Родопите над с. Куклен, съседен на комбината за обогатяване на цветни метали КЦМ „Пловдив“; 2) замърсена площадка – покрай пътя Асеновград-Смолян в района на с. Наречен; 3) контрола – района на с. Проглед. В допълнение е използван и контролен материал, събиран в района на Смолянски езера.
- *Poecilimon thoracicus* (Fieber, 1853) – 1) от замърсена площадка при устието на р. Чая (Чепеларска); 2) контрола – от незамърсени участъци на Северна България (области Плевен и Велико Търново).

От групата на късопипалните скакалци беше избран видът *Oedaleus decorus* (Germar, 1825) от семейство Acrididae, събиран от съответните места: 1) замърсена площадка на територията на комбинат за обогатяване на цветни метали КЦМ „Пловдив“; 2) контрола от района на селата Поповица и Ахматово; и двата хабитата са тревисти с ксероморфен характер. От тези райони са събрани и проби от тревиста растителност и почва.

Методични подходи

За целта на изследването беше избран цитогенетичният подход, поради възможността директно да бъдат определяни изменения, съответстващи на определено натоварване с йони на тежки метали.

Първоначално беше извършвано наблюдение на хромозомни пластинки с цел установяване броя и морфологията на хромозомите на избраните обекти. Впоследствие са изготвяни „C-banding“-препарати с цел визуализация на хетерохроматинови участъци върху хромозомите

(Sumner 1972). Броят и положението на тези участъци сочи промени, възникнали въз основа на хромозомни аберации по този начин позволява сравнение между популации, подложени на различна степен на антропогенно замърсяване.

Също така е извършено багрене със сребърен нитрат за визуализация на ядърцата и разположението на ядърцевите организатори (съгласно Warchałowska-Śliwa and Maryńska-Nadachowska 1992), които също често определят изменения в структурата и функцията на хромозомите.

Тъканни проби (изсушени екземпляри) от събраните индивиди, както и проби от трева, бяха анализирани за съдържание на йони на тежки метали в специализираната лаборатория на Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания (БАН).

4.3. Резултати

4.3.1. Съдържание на йони на тежки метали в пробите от дългопипални скакалци

Данните от извършения анализ на тъканни проби за съдържание на йони на тежки метали са представени в таблица 4.1 и на Фиг. 4.1 и 4.2.

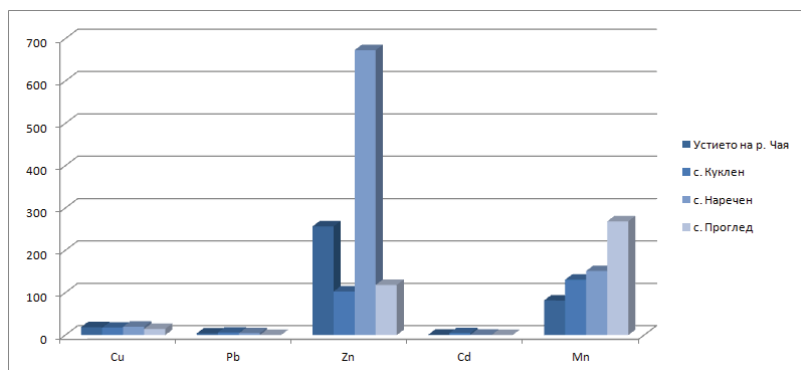
Стойностите за съдържанието на медни йони (Cu) са близки в четирите района, като в контролния район (с. Проглед) са малко по-ниски. Съдържанието на оловни йони (Pb) е най-високо в района на с. Куклен, съседен на Комбината за обогатяване на цветни метали, но е високо и в другите два замърсени участъка, докато при контролата е 11 до 16 пъти по-ниско отколкото в засегнатите райони. Подобна картина се вижда и при стойностите на йоните на кадмия (Cd), където обаче пробата от с. Куклен съдържа между 4.7 и 17 пъти повече кадмий от останалите райони. Силно замърсяване с цинкови йони (Zn) се отбелязва в пробата от с. Наречен, а съдържанието на манганови йони (Mn) е най-високо в контролния участък.

На основата на особеностите в установените концентрации може да се направят следните констатации:

- Районът на с. Куклен е силно повлиян от емисии на цинк и олово в атмосферата, които вероятно чрез почвата и растенията се натрупват в тъканите на правокрили от вида *Isophya rhodopensis*;
- Районите „устието на Чая“ и „Наречен“ са подложени на приблизително еднакви емисии от йони на мед, олово и кадмий,

Таблица 4.1. Съдържание на йони на тежки метали ($\mu\text{g/kg}$) в тъканни проби от дългопипални правокрили насекоми (Tettigoniidae) от замърсени и контролни райони в област Пловдив и Смолян. (Heavy-metal ions content ($\mu\text{g/kg}$) in tissue-samples of bush-crickets from polluted and non-polluted areas in Plovdiv and Smolyan provinces).

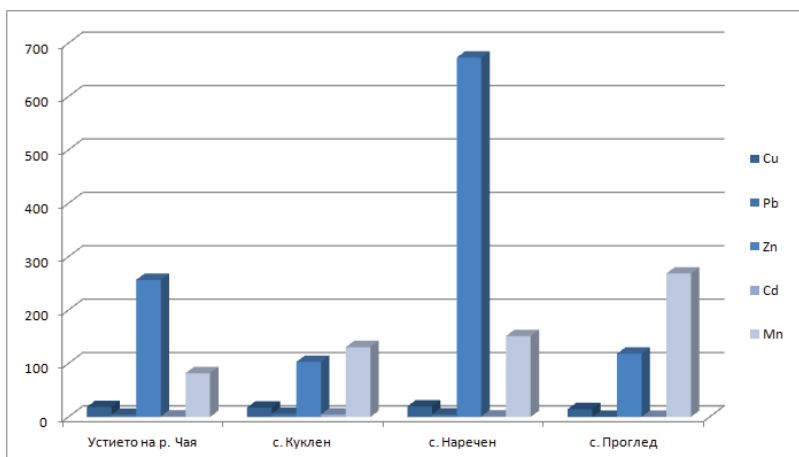
Проба	Вид	Cu	Pb	Zn	Cd	Mn
Устието на р. Чая	<i>Poecilimon thoracicus</i>	18.791	4.186	256.744	1.023	81.860
с. Куклен	<i>Isophya rhodopensis</i>	17.765	6.017	103.152	4.776	130.850
с. Наречен	<i>Isophya rhodopensis</i>	19.847	4.698	673.058	0.959	151.486
с. Проглед (контрола)	<i>Isophya rhodopensis</i>	14.739	0.373	118.470	0.280	268.657



Фиг. 4.1. Разпределение на съдържанието на йони на тежки метали ($\mu\text{g/kg}$) по тъканни проби от дългопипални правокрили насекоми от замърсени и контролни райони в област Пловдив и Смолян. По абсцисата – пунктове за взетите проби, по ординатата – количество определено вещество ($\mu\text{g/kg}$). (Heavy-metal ions distribution ($\mu\text{g/kg}$) in tissue-samples of bush-crickets from polluted and non-polluted areas in Plovdiv and Smolyan provinces).

в първия случай в резултат на замърсяване от отпадни битови и индустриални води (от КЦМ „Пловдив“) и автомобилни газове (районът е недалеч от пътя Пловдив-Хасково), а във втория предимно от замърсяване с автомобилни отпадни газове;

- Районът на с. Наречен е с най-високо съдържание на йони на цинк, което вероятно е в резултат на непосредствената близост до шосето Асеновград-Смолян (отделяне при изтъркването на автомобилните гуми);



Фиг. 4.2. Сравнение на съдържанието на йони на тежки метали ($\mu\text{g/kg}$) в тъканни проби от дългопипални правокрили насекоми от замърсени и контролни райони в област Пловдив и Смолян. По абсцисата – видове вещество, по ординатата – количество определено вещество ($\mu\text{g/kg}$). (Comparison of the heavy-metal ions content ($\mu\text{g/kg}$) in tissue-samples of bush-crickets from polluted and non-polluted areas in Plovdiv and Smolyan provinces).

- Съдържанието на йони на манган намалява с отдалечаване от вътрешността на Родопите и вероятно не е свързано с антропогенно замърсяване, а отразява високото съдържание на манган в скалите в района на с. Проглед и намаляване на съдържанието му в почвите на низината.

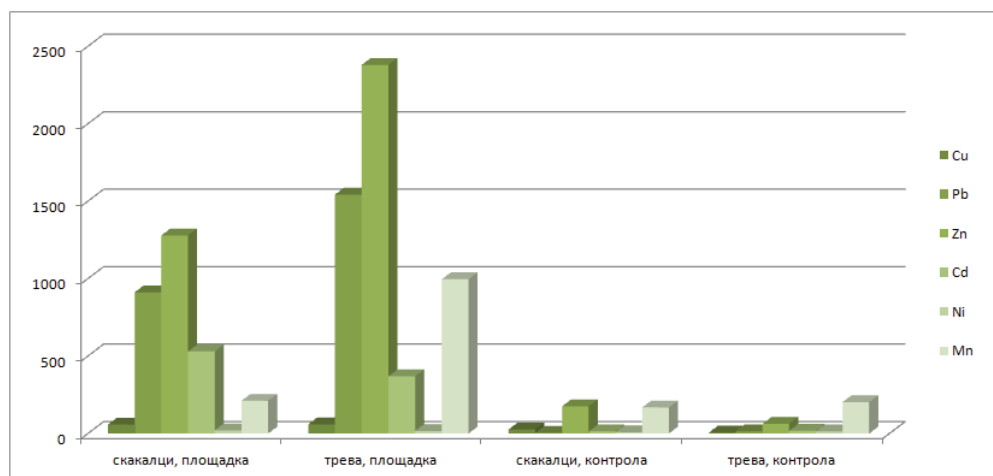
4.3.2. Съдържание на йони на тежки метали в пробите от късопипални скакалци

Данните от извършения анализ на тъканни проби за съдържание на йони на тежки метали са представени в таблица 4.2 и на Фиг. 4.3.

Във всички изследвани случаи стойностите за съдържанието на йони на тежки метали са по-високи в пробите от замърсената площадка. Разликите варират от 2–5 (мед, никел, манган) до 10–40 пъти (цинк и кадмий) и достигат разлики от почти 200 пъти в съдържанието на олово между тъканите на скакалци от замърсения район и контролата. Стойностите в съдържанието на манган при скакалците е почти изравнено в изследвания и контролния район, но в растителни тъкани от замърсената площадка съдържанието му е значително завишено.

Таблица 4.2. Съдържание на йони на тежки метали ($\mu\text{g/kg}$) в тъканни проби от късопипални правокрили насекоми (Acrididae) от вида *Oedaleus decorus* и проби от тревиста растителност от замърсени и контролни райони в област Пловдив. (Heavy-metal ions content ($\mu\text{g/kg}$) in tissue-samples of grasshoppers of *Oedaleus decorus* and plants from polluted and non-polluted areas in Plovdiv province).

Място на пробовземане и вид проба	Вид проба	Cu	Pb	Zn	Cd	Ni	Mn
КЦМ – Пловдив	<i>Oedaleus decorus</i>	57,951	911,661	1279,152	530,035	20,495	211,373
КЦМ – Пловдив	трева	59,780	1542,700	2380,165	369,146	16,804	996,281
Контрола Поповица – Ахматово	<i>Oedaleus decorus</i>	26,757	4,712	175,737	13,605	9,297	168,600
Контрола Поповица – Ахматово	трева	6,628	14,986	62,536	17,579	14,121	203,011



Фиг. 4.3. Разпределение на съдържанието на йони на тежки метали ($\mu\text{g/kg}$) по тъканни проби от късопипални правокрили насекоми и растения от замърсени и контролни райони в област Пловдив. По абсцисата – видове проба, по ординатата – количество определено вещество ($\mu\text{g/kg}$). (Heavy-metal ions distribution ($\mu\text{g/kg}$) in tissue-samples of grasshoppers of *Oedaleus decorus* and plants from polluted and non-polluted areas in Plovdiv province).

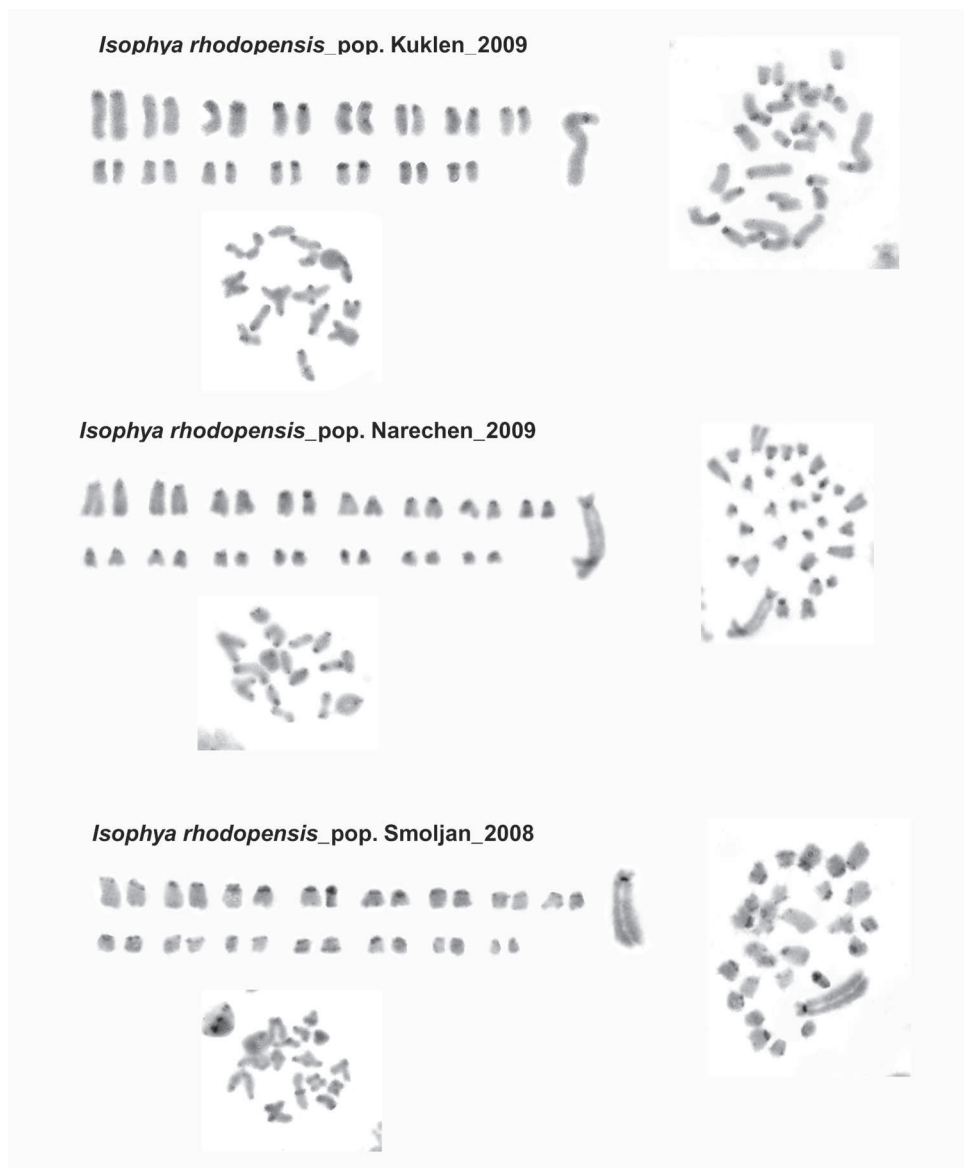
Тенденция за значително по-голямо натрупване на йони на тежки метали в тъканите на изследваните едноседелни растения, за разлика от насекомите (скакалци) се отбелязва във всички случаи, с изключение на съдържанието на мед и цинк в контролните проби.

4.3.3. Влияние на съдържанието на йони на тежки метали върху кариологичните характеристики на изследваните видове

И двата изследвани вида дългопипални скакалци, *Isophya rhodopensis* и *Poecilimon thoracicus*, са диплоидни, с определяне на пола Х0 при мъжките ($2n=31$) и ХХ при женските ($2n=32$) (Фиг. 4.4). Най-големият елемент в кариотипа е половата (Х-) хромозома. При *P. thoracicus* Х-хромозомата и автозомите са акроцентрични с малък центромерен хетерохроматинов участък, а при *I. rhodopensis* Х-хромозомата е субacroцентрична с малък центромерен хетерохроматинов участък, докато автозомите са акроцентрични с различно количество на хетерохроматин в съседния на центромерния и в теломерния участък. С най-голямо количество хетерохроматин се отличават четвъртата и 13-ата двойка автозоми.

Настоящото изследване не показва вариации в броя и морфологията на хромозомите (Фиг. 4.4), както и в разпределението на хетерохроматина и броя на ядръцата между индивиди от замърсени и контролни площадки.

Популации от проучваните видове липсваха в най-силно повлияните райони (работни площадки на КЦМ, депа за отпадъци и т.н.) поради силната засушливост на такива микрохабитати и слабото им обрастване с растителност (виж по-горе). Проучваните видове се явяват фитофилни представители и са силно привързани към растителността, като се придържат в тревисто-храстовия етаж. Поради това е възможно косвено те да се повлияват по-слабо от замърсяването на почвения слой с йони на тежки метали. Все пак, установените различия в концентрацията на йони на тежки метали в тъканите на индивидите от замърсени и слабо-/незамърсени райони показва вероятното наличие на механизми за дезактивиране на йоните на тежките метали или устойчивост на генотипа на изследваните представители на дългопипалните скакалци към повишени концентрации на олово, цинк, кадмий и манган (при медта получените стойности се различаваха слабо). Поради това, подсемейство Barbitistinae, а възможно е и други групи фитофилни дългопипални скакалци, се явяват неподходящи като индикаторни видове за замърсяване с тежки метали.



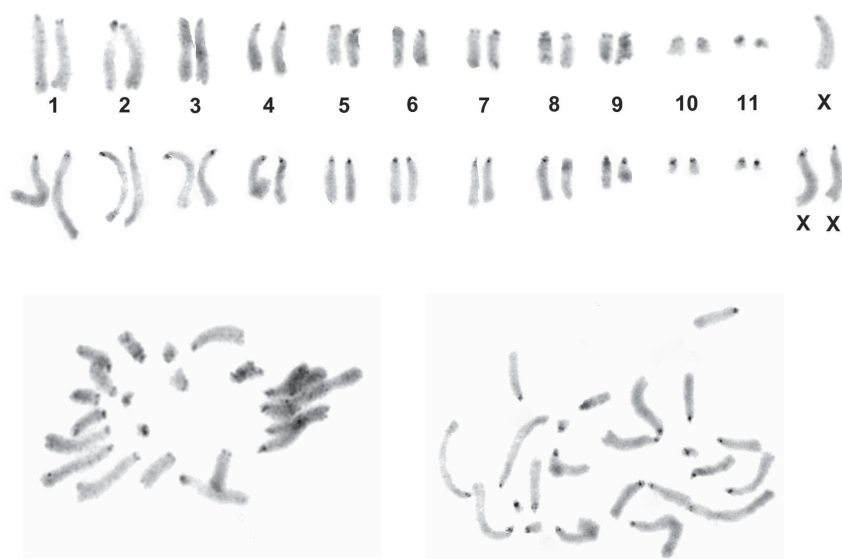
Фиг. 4.4. Хромозомен набор и С-бендинг при три популации на *Isophya rhodopensis* от замърсени (а - Куклен и б - Наречен) и незамърсени райони (в - Смолян). Показани са хромозомния набор с подредени по големина хромозоми (горе), митотична метафаза (вдясно) и диакинеза (долу ляво). (Karyotype and C-banding of three populations of *Isophya rhodopensis* from polluted (A – Kuklen and B – Narechen) and unpolluted (C – Smolyan) regions. The chromosomes are shown following their size (above); mitotic metaphase (below right) and diakinesis (below left) are presented.

Изследваните късопипални скакалци от вида *Oedaleus decorus* са ксерофилни геофили, които обитават открити райони с рядка тревиста растителност и в района на затревените площи в КЦМ „Пловдив“ се срещат в многобройни популации. Придържайки се към почвата и хранейки се с бързо развиващата се тревиста расителност, този вид е по-силно пряко повлиян от почвеното замърсяване.

O. decorus има 23 акроцентрични хромозоми при мъжките ($2n=22 + X$) и 24 при женските ($2n=22 + XX$), като определянето на пола е съответно X0 и XX (Фиг. 4.5). Кариотипът включва три двойки големи (L1-L3), шест двойки средни (M4-M9) и две двойки малки (S10, S11) автозоми, а половата хромозома има среден размер.

Прилаганият C-banding метод показва наличието на тънки хетерохроматинови участъци, разположени в прицентромерните участъци (paracentromeric) на повечето автозоми и половата хромозома (X); само двойката M9 носи промеждутъчен (interstitial) и теломерен (telomeric) хетерохроматин.

Изследваните популации показаха значителна стабилност на кариотипа, като независимо от огромните разлики в съдържанието на метални йони като олово, кадмий и цинк, двете извадки се различаваха

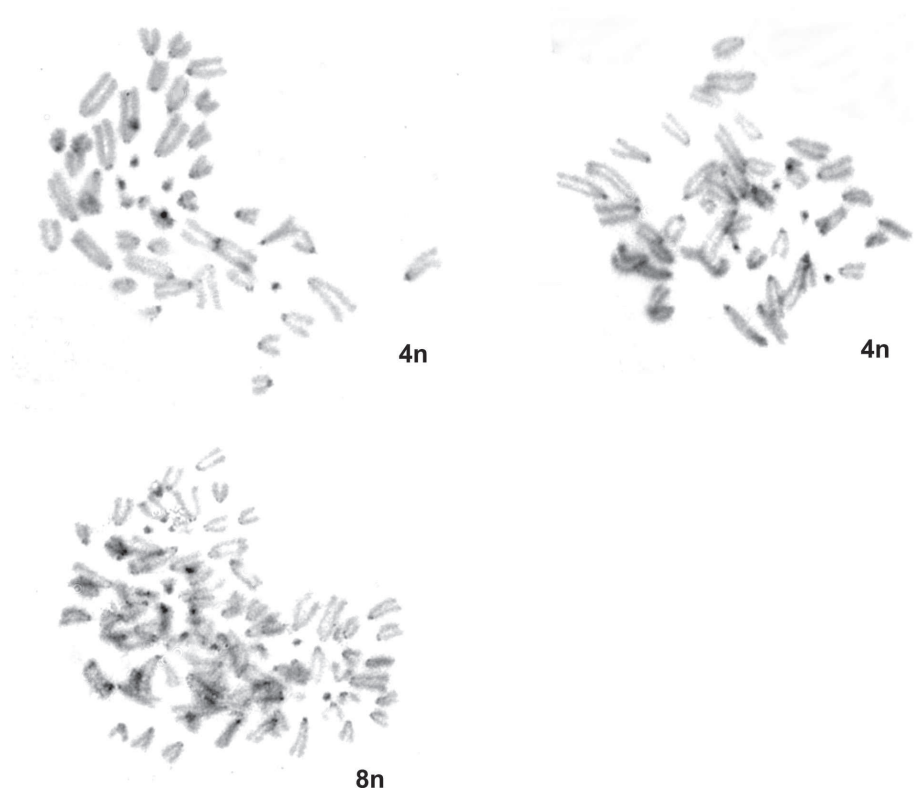


Фиг. 4.5. Хромозомен набор и С-бендинг на *Oedaleus decorus*.
(Karyotype and C-banding of *Oedaleus decorus*).

слабо по отношение изменения на кариотипа. В популацията от замърсения район беше наблюдавана по-честа срещаемост на аномалии, включващи мозаечност при отделни биваленти или митотични делителни пластинки в овогониалните клетки с резултат тетра- и октоплоидни клетки.

Три от петнадесет женски от замърсения район показват мозаечни овогониални митотични хромозомни конфигурации (Фиг. 4.6):

- Екземпляр №4 – 5 клетки $\times 2n$, 2 $\times \sim 4n$;
- Екземпляр №10 – 3 $\times 2n$, 2 $\times \sim 4n$;
- Екземпляр №48 – 7 $\times 2n$, 20 $\times \sim 4n$, 1 $\times \sim 8n$;
- При 12 женски са установени клетки само с $2n$ (85 прегледани митотични пластинки).



Фиг. 4.6. Хромозомен набор и C-banding на полиплоидни клетки от женска на *Oedaleus decorus* от замърсена площадка. (Karyotype and C-banding of polyploid cells of female *Oedaleus decorus* from the polluted site).

При една женска от контролата са наблюдавани две тетраплоидни клетки (10 клетки с $2n$, 2 клетки с $4n$).

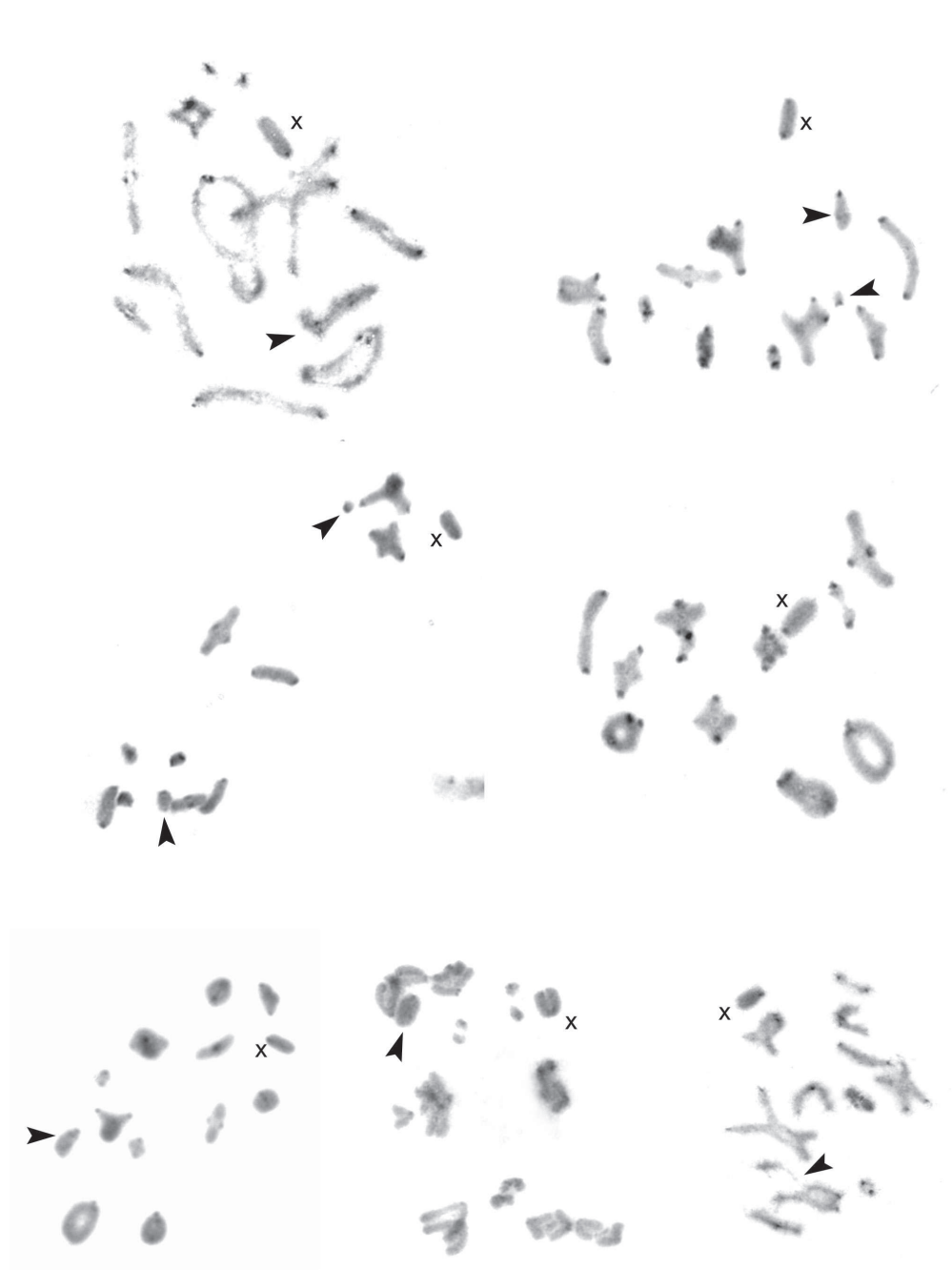
Един от 18 мъжки от замърсения район показва мозаечност при един бивалент: два различни по размер унивалента (non-random segregations) (Фиг. 4.7а-в; 4.7г – нормална диакинеза).

В популацията от замърсения район бяха наблюдавани и клетки с В-хромозоми (допълнителни хромозоми) и автозомни разкъсвания. Все пак, клетки от стените на яйцепроводите при женски скакалци често се характеризират с естествена полиплоидия, поради което разграничаването на типа клетки и причината за полиплоидизация може да представлява проблем. В съчетание с рядката проява на аномалии дори в популации с многократно по-високо натрупване на йони на тежки метали, тези резултати водят до заключението, че скакалците от семейство Acrididae на цитогенетично ниво също не представляват удобен индикаторен обект за изследване съдържанието и ефекта от натрупване на йони на тежки метали. Възможно е скакалците от Acrididae и дори повечето представители на правокрилите да притежават добри механизми за екскреция на вредните йони на тежки метали, както и популационни механизми за отстраняване на вторичното им влияние.

4.4. Заключение

В резултат на проведеното проучване установихме, че изследваните скакалци от семействата Tettigoniidae и Acrididae не са удобен обект за косвено определяне състоянието на околната среда чрез цитогенетични методи. Това вероятно се отнася за болшинството представители на тези две групи, но не е задължително приложимо за всички правокрили. Например, Warchałowska-Śliwa et al. (2005) установяват значителни изменения в кариотипа на *Tetrix tenuicornis* (надсемейство Tetrigoidea, семейство Tetrigidae) в резултат от влиянието на йони на тежки метали.

Всяка група правокрили е характерна за определен тип хабитат и липсата му в даден изследван замърсен район ограничава възможностите за използването на един или друг индикаторен вид. От друга страна, при изследваната група използваният метод изисква значителни усилия и отнема продължително време. Поради това, еколого-фаунистичните проучвания на съобщества от правокрили, в съчетание с химичен анализ на тъканни проби за съдържание на йони на тежки метали,



Фиг. 4.7. Делителни пластинки с аномален бивалент при мъжки на *Oedaleus decorus*. (Nuclei divisions with abnormal bivalent in male *Oedaleus decorus* from the polluted site).

изглеждат по-бърз и ефективен метод за оценка състоянието на околната среда. Бъдещи изследвания върху генома, физиологията, екологията, биологията и т.н. на съобщества от правокрили ще дадат по-добра представа за възможностите за използване на представители на тази група като биоиндикатори за състоянието на околната среда.

4.5. Протокол

След упояване, събраните екземпляри се дисецират и гонадите им се изваждат. Гонадите първоначално се поставят в хипотоничен разтвор (0.9% разтвор на натриев цитрат) за 20 минути с цел получаване на по-подходящо за анализ разпределение на хромозомите в дялящата се клетка. Впоследствие гонадите се фиксират в разтвор на 96% етанол и ледена оцетна киселина в съотношение 3:1 – два пъти по 20 минути, и се консервират в 70% етанол до последваща обработка.

За целите на наблюдение на морфологията на хромозомите, разпределението на хетерохроматиновите участъци и ядърцевите организатори, фиксираните тъкани се третира по следния начин:

- Първоначално изготвяне на микроскопски препарати чрез т.нар. squash техника – отделяне на няколко фоликула или овариоли върху предметно стъкло, смачкване чрез притискане с покривно стъкло, замразяване на „сух лед“ и отделяне на покривното стъкло; изсушаване; избор на подходящи делителни пластинки; оцветяване с разтвор на Гимза за наблюдение.
- Изготвяне на „C-banding“-препарати с цел визуализация на хетерохроматинови участъци върху хромозомите (Sumner 1972) чрез третиране с 0.2 N HCL за 15–20 мин, с $\text{Ba}(\text{OH})_2$ на 61°C за 3–5 мин, изплакване във вода, потапяне в 2×SSC на 61°C за 60 мин, изплакване, изсушаване и багрене с 2% Гимза.
- Багрене със сребърен нитрат за визуализация на ядърцата и разположението на ядърцевите организатори (съгласно Warchałowska-Śliwa and Maryańska-Nadachowska 1992) – няколкодневни препарати се третират с разтвор на сребърен нитрат и се инкубират във водна баня при 60°C за около 10 минути, като особеностите на концентрацията и времето на третиране и инкубиране силно зависят от обекта и трябва да се тестват поотделно.

4.6. Цитирана литература

- Жантiev РД (1991) Медведки (Orthoptera, Gryllotalpidae) Европейской части СССР и Кавказа. Зоологический журнал 70(6): 69–76.
- Жантiev РД, Корсуновская ОС, Сорокин НН, Чуканов ВС (2003) Звуковые сигналы медведок (Orthoptera, Gryllotalpidae) фауны Восточной Европы. Зоологический журнал 82(11): 1339–1346.
- Baccetti B, Capra F (1978) Notulae Orthopterologicae. XXXIV. Le specie italiane del genere *Gryllotalpa* L. Redia 61: 401–464.
- Barton NH (1980) The fitness of hybrids between two chromosomal races of the grasshopper *Podisma pedestris*. Heredity 45: 47–59.
- Bugrov AG, Warchałowska-Śliwa E, Akimoto S (2005) Taxonomic status of the grasshopper *Podisma tyatiensis* and reproductive isolation between *P. tyatiensis* and *Podisma sapporensis*. Entomological Science 8: 85–90.
- Bugrov AG, Warchałowska-Śliwa E, Sugano Y, Akimoto S (2004) Experimental Hybridisation between XO and XY Chromosome Races in the Grasshopper *Podisma sapporensis* Shir. (Orthoptera, Acrididae). I. Cytological Analysis of Embryos and F1 Hybrids. Folia biologica (Kraków) 52(1/2): 39–45.
- Grzywacz B, Warchałowska-Śliwa E, Banach Z, Pyza E (2012) Genetic variability and changes of elemental concentrations in cells of *Tetrix tenuicornis* (Orthoptera: Tetrigidae) from polluted and unpolluted areas. Folia biologica (Kraków) 60(1/2): 17–25.
- Hewitt GM (1979) Orthoptera. Grasshoppers and crickets. In: John, B. (Ed.). Animal Cytogenetics. Vol. 3: Insecta 1. Gebrüder Borntraeger, Berlin-Stuttgart, 170 pp.
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromere heterochromatin. Experimental Cell Research 75: 304–306.
- Warchałowska-Śliwa E (1998) Karyotype Characteristics of Katydid Orthopterans (Ensifera, Tettigoniidae), and Remarks on Their Evolution at Different Taxonomic Levels. Folia biologica (Kraków) 46(3/4): 143–176.
- Warchałowska-Śliwa E, Maryńska-Nadachowska A (1992) Karyotype, C-bands, and NORs locations in spermatogenesis of *Isophya brevipennis* (Orthoptera: Phaneropteridae). Caryologia 45(1): 83–89.
- Warchałowska-Śliwa E, Nikilińska M, Görlich A, Michailova P, Pyza E (2005) Heavy metal accumulation, heat shock protein expression and cytogenetic changes in *Tetrix tenuicornis* (L.) (Tetrigidae, Orthoptera). Environmental Pollution 133: 373–381.

Получените по време на това изследване резултати са публикувани в 25 научни статии в специализирани международни издания (16 с импакт фактор); представени в 17 доклада на международни научни форуми; и включени в 3 защитени дисертации за ОНС „доктор“.

Научни статии

1. Кузнецова ВГ, Грозева С (2010) Ахиазматический мейоз: обзор. Вестник ВОГиС. 14 (1): 79–88.
2. Chassovnikarova T, Atanasov N, Kalajdzieva V, Dimitrov H (2010) Micronucleus test from free living rodents as a biomarker for environmental stress *in situ*. Biotechnology and Biotechnological Equipment 24: 675–678.
3. Grozeva S, Kuznetsova VG, Anokhin B (2011) Karyotypes, male meiosis and comparative FISH mapping of 18S ribosomal DNA and telomeric (TTAGG)_n repeat in eight species of true bugs (Hemiptera, Heteroptera). Comparative Cytogenetics 5 (4): 355–374.
4. Grozeva S, Simov N (2009) Cytogenetic study of two species of *Dryophilocoris*: *Dryophilocoris* (*Camarocyphus*) *flavoquadrimaculatus* (De Geer, 1773) and *Dryophilocoris* (*Dryophilocoris*) *luteus* (Herrich-Schaeffer, 1836) (Insecta, Heteroptera, Miridae). Genetics and Breeding 38 (1): 41–45.
5. Grzywacz B, Maryńska-Nadachowska A, Chobanov DP, Karamysheva T, Warchałowska-Śliwa E (2011) Comparative analysis of rDNA sequence location in the Palaearctic bushcricket genus *Isophya* (Orthoptera: Tettigoniidae: Phaneropterinae). European Journal of Entomology 108: 509–517.
6. Grzywacz-Gibała B, Chobanov D, Warchałowska-Śliwa E (2010) Preliminary phylogenetic analysis of the genus *Isophya* (Orthoptera: Phaneropteridae) based on molecular data. Zootaxa 2621: 27–44.
7. Ilkova J, Cervella P, Zampicini GP, Sella G, Michailova P (2013) Chromosomal breakpoints and transposable-element-insertion sites in salivary gland chromosomes of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera, Chironomidae) from trace metal polluted stations. Acta zoologica bulgarica 65(1): 59–73.
8. Kuznetsova VG, Grozeva S, Nokkala S, Nokkala C (2011) Cytogenetics of the true bug infraorder Cimicomorpha (Hemiptera, Heteroptera): a review. ZooKeys 154: 31–70.
9. Michailova P (2009) The Karyotype and External Morphology of *Dicrotendipes lobiger* Kieffer, 1921 (Diptera, Chironomidae), from different regions of Bulgaria. Acta zoologica bulgarica 61(2): 115–121.
10. Michailova P, Atanasov N, Ilkova J, Chassovnikarova T, Duran M, Karadurmus E (2010) Genome response of model invertebrates and vertebrates species to stress agents in the environment. Biotechnology and Biotechnological Equipment 24: 390–396.

11. Michailova P, Ilkova J, Duran M, Karadurmus E, Berber R, Sen A (2012) Structural and functional alterations in salivary gland chromosomes and enzyme activity of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) from anthropogenically polluted stations in Bulgaria and Turkey. *Caryologia* 65(2): 157–169.
12. Michailova P, Jablonska–Brana I, Szarek–Gwiazda E (2013) Environmental agents in lake Łuknajno (Poland) affect genome of *Chironomus melanotus* Keyl, 1961 (Diptera, Chironomidae) - a new species for Polish fauna. *Oceanological and Hydrobiological studies* 42(2): 164–172.
13. Michailova P, Sella G, Petrova N (2012) Chironomids (Diptera) and their salivary gland chromosomes as indicators of trace metal genotoxicology. *Italian Journal of Zoology* 79(2): 218–230. (IF-0.800).
14. Michailova P, Sella G, Petrova N (2012) Polytene chromosomes of Chironomidae (Diptera) as a bioassay of trace-metal-induced genome instability. *Proceedings of the 18th International Symposium on Chironomidae. Fauna norvegica* 31: 227–234.
15. Michailova P, Sen A, Ilkova J, Berber R, Karadurmus E, Duran M (2009) Response at different levels of the genome of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) collected from polluted rivers in Bulgaria and Turkey – preliminary results. *Genetics and Breeding* 38(1): 21–27.
16. Michailova P, Szarek–Gwiazda E, Kownacki A, Warchałowska-Śliwa E (2012) Genomic alterations recorded in two species of Chironomidae (Diptera) in the Upper Jurassic limestone area of the Ojców National Park, Poland attributable to natural and anthropogenic factors. *European Journal of Entomology* 109: 479–490.
17. Michailova P, Szarek–Gwiazda E, Kownacki A, Warchałowska-Śliwa E (2012) Biodiversity of Chironomidae (Diptera) and genome response to trace metals in the environment. *Pestycydy/Pesticides* 1–4: 41–48.
18. Michailova P, Szarek–Gwiazda E, Kownacki A, Warchałowska-Śliwa E (2012) Genomic alterations recorded in two species of Chironomidae (Diptera) in the Upper Jurassic limestone area of the Ojców National Park, Poland attributable to natural and anthropogenic factors. *European Journal of Entomology* 109: 479–490.
19. Michailova P, Ilkova J, Cervella P, Santovito A, Sella G (2013) NOR Activity in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) is affected by Chronic exposure to trace metal pollution. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences* 66(9): 1273–1278.
20. Jablonska–Brana I, Michailova P, Szarek–Gwiazda E (2013) Environmental agents in Lake Łuknajno (Poland) affecting the genome of *Chironomus melanotus* Keyl, 1961 (Diptera, Chironomidae) – a new species of Polish fauna. *Oceanological and Hydrobiological Studies*, 42(2), 20–32.

21. Michailova P, Szarek-Gwiazda E, Kownacki A (2012) Does biodiversity of macroinvertebrates and genome response of Chironomidae larvae (Diptera) reflect heavy metal pollution in a small pond? *Environmental Monitoring and Assessment* 184(1): 1–14.
22. Mitkovska V, Chassovnikarova T, Atanasov N, Dimitrov H (2012a) Environmental genotoxicity evaluation using a micronucleus test and frequency of chromosome aberrations in free-living small rodents. *Journal of Biological Science and Biotechnology* 1(1): 67–71.
23. Mitkovska V, Chassovnikarova T, Atanasov N, Dimitrov H (2012b) DNA damage detected by comet assay in *Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834) from Strandzha National Park. *Acta zoologica bulgarica* 4: 155–158.
24. Simov N (2011) True bugs collected on snow in Vitosha Mt., Bulgaria in spring and early summer. Probably a good method for investigation of flight activity and dispersal ability of Heteroptera (Hemiptera). *Heteropterus Revista de Entomología* 11 (2): 351–358.
25. Simov N, Langourov M, Grozeva S, Gradinarov D (2012) New and interesting records of the alien true bugs (Hemiptera, Heteroptera) from Bulgaria. *Acta zoologica bulgarica* 64 (3): 241–252.

Доклади, изнесени на международни конференции

26. Duran M, Karadurmus E, Michailova P, Ilkova J, Sen A, Berber R (2010) Effect of Environmental pollution on genome and biochemical characteristics of *Chironomus riparius* Mg. (Chironomidae, Diptera) collected from Bulgarian and Turkish aquatic basins. In: 5th. Annual International Symposium on Environment, 20–23 May 2010, Athens, Greece.
27. Duran M, Michailova P, Sari A, Ilkova J, Karadurmus E (2012) Assessment of the sediment toxicity in Bulgarian and Turkish Rivers using the biomarkers in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae). In: 50 Years Zoology, Plovdiv University, 8–12.X. 2012.
28. Grozeva S, Kuznetsova V (2012) Cytogenetic characterization of Heteroptera with reference to the infraorder Cimicomorpha. *EHC* 6, 25–29 June, 2012 Blagoevgrad.
29. Grozeva S, Kuznetsova V, Anokhin B (2009) The unique cytogenetic characters of the bugs' infraorder Cimicomorpha (Insecta, Heteroptera). *Karyo V*, Novosibirsk August 2010.
30. Ilkova J, Michailova P, Cervella P, Sella G (2011) Cytogenetical alterations and the role of transposable elements in the genome of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) from heavy metal polluted river in Bulgaria. In: International Conference, Wetlands: Functioning, Management and Restoration, 16–19 October, 2011. Albena Resort, Varna, Bulgaria, 54p.

31. Kownacki A, Szarek-Gwiazda E, Michailova P (2012) The effect of contaminations on the biodiversity and genome changes in Chironomidae from Polish aquatic ecosystems. In: Hydrobiological Congress, 20–25. IX. 2012, Krakow.
32. Kuznetsova VG, Anochin B, Grozeva S, Mayanska-Nadachowska A, Karamysheva T (2009) Comparative chromosome mapping of some genes and telomeric repetitive sequences by fish in different invertebrates. Intern. conf. „Modern Microscopy Techniques in biology and medicine“, St Petersburg, 9–10 Nov. 2009.
33. Michailova P, Sella G, Petrova N (2011) Polytene chromosomes of Chironomidae (Diptera) as a bioassay of trace-metal-induced genome instability. In: 18th International Symposium on Chironomidae, Trondheim, Norway, 04–06.07.2011, 34p.
34. Michailova P, Atanasov N, Ilkova J, Chassovnikarova Tz, Duran M, Karadurmus E (2010) Genome response of model invertebrates and vertebrates species to stress agents in the environment. The Second Balkan Conference on Biology, Plovdiv, 21.05.-23. 05. 2010.
35. Michailova P, Sen A, Ilkova J, Berber R, Karadurmus E, Duran M (2009) Response at different levels of the genome of *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) collected from polluted rivers in Bulgaria and Turkey – preliminary research. Национална научна конференция по генетика, 28–30 X. 2009. София.
36. Michailova P, Szarek-Gwiazda E, Kownacki A (2009) Effect of heavy metals biodiversity of macroinvertebrates in pond on a mine spoil. The First Joint PSE –SETAC Conference on Ecotoxicology, „Ecotoxicology in the real world“. 16–19. IX. 2009 Krakow, Poland, p. 59.
37. Michailova P, Szarek-Gwiazda E, Kownacki A, Warchałowska-Śliwa E (2011) Biodiversity of Chironomidae (Diptera) and Genome response to stress agents in the Environment. In: VIIth International Conference on Arthropods: Chemical, Physiological, Biotechnological and Environmental aspect. 18–23 09. 2011, Bialka Tatrzańska, Poland, p. 32.
38. Petrova N, Michailova P, Sella G (2011) Chironomidae as bioindicators of polluted water ecosystems. In: Всероссийская Конференция с международным участием – Экология малых рек в XXI веке: Биоразнообразие, Глобальные изменения и Восстановление экосистем. р 5–8. IX. г. Тольятти, Россия, 2011, р. 14.
39. Szarek-Gwiazda E, Michailova P, Kownacki A, Ciszewski D, Kwatczak U (2011) Biodiversity and genome alterations of Chironomidae larvae as indicators of a strong contamination of water ecosystems with heavy metals. In: 19th International Conference on Environmental Indicators, September 11–14th, 2011 Haifa, Israel. 48–49 pp.
40. Szarek-Gwiazda E, Michailova P, Kownacki A, Ilkova J (2012) Response of the biodiversity and polytene chromosomes of Chironomidae (Diptera) to pollution

- in the Matyllda stream, southern Poland. In: Hydrobiological Congress, 20–25. IX.2012, Krakow.
41. Warchałowska-Śliwa E, Grzywacz B, Maryńska-Nadachowska A, Chobanov DP (2009) Comparative analysis of rDNA and tDNA locations in the genus *Isophya* (Orthoptera, Phaneropterinae) In: 10th International Congress of Orthopterology. Metaleptea, the newsletter of the Orthopterists' Society (special conference issue): 159. 10-и международен конгрес по ортоптерология (Xth International Congress of Orthopterology, Antalya, Turkey). 21–25 юни 2009, „Акдениз Университет“ (Akdeniz University), Анталия, Турция (организатори - Akdeniz University, Анталия, Турция и Orthopterists' Society, Филадельфия, САЩ).
 42. Karadurmus E, Michailova P, Sen A, Ilkova J, Duran M (2010) Determination effects of heavy metal pollution on *Chironomus riparius* using Biomarkers in the Yeserlimark River. Int.Conf. of Biology, Pamukalle University, Turkey, 21.06 – 25.06. 2010.

Защитени дисертации

1. Чобанов ДП (2009) Анализ и оценка на фаунистичното разнообразие на правокрилите насекоми (Orthoptera) в България. Дисертация за присъждане на научно-образователната степен „Доктор“.
2. Димитров Х (2009) Кариотипна и морфологична изменчивост на полската мишка (*Apodemus agrarius* Pallas, 1771) в България, Дисертация за присъждане на научно-образователната степен „Доктор“.
3. Илкова Ю (2009) Изследвания на генотоксичния ефект на метални йони върху видове от сем. Chironomidae (Diptera), Дисертация за присъждане на научно-образователната степен „Доктор“.

