

действие контакта спермиев мидии с экзогенной ДНК на оплодотворение и последующее развитие эмбрионов. В некоторых опытах количество развившихся личинок уменьшалось в результате увеличения концентрации ДНК и времени обработки сперматозоидов мидии. Благодаря использованию групповых скрещиваний, зарегистрированы факты переноса плазмид pCMVlacZ и pMTbGH в икру. Чужеродные последовательности ДНК обнаружены с помощью ПЦР в личинках через 48 ч после оплодотворения. Интенсивный сигнал зарегистрирован в случае электропорации спермиев в 10% ДМСО (C=20 мкФ, R=150 Ом, V=100-500 В).

Полный текст статьи находится в редакции и будет опубликован в следующем выпуске.

* Государственный научный центр прикладной микробиологии, Оболенск, Россия;

** Институт биологии южных морей НАНУ, г. Севастополь, Украина;

*** Институт физиологии, биохимии и литания РАСХН, Боровск, Россия;

**** Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия;

***** Государственный научно-исследовательский институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов, Москва, Россия.

Получено 30.06.99

A. V. KUZNETSOV, A. V. PIRKOVA, G. A. DVORYANCHIKOV,
E. A. PANFERTSEV, A. V. GAVRYUSHKIN, I. V. KUZNETSOVA,
V. E. EROKHIN

ALIEN GENES TRANSFER BY SPERMATIZOIDS INTO OVICELLS OF THE MUSSEL, *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LMK.

Summary

The possibility of exogenous DNA transfer by spermatozooids of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. into ovicells was investigated in natural conditions and with the employment of several transfection methods. The rate of fertilization and larval growth were evaluated after DNA treatment of the spermatozooids. The study has shown a negative impact of the contact between mussel spermatozooids and exogenous DNA on the fertilization and the following development of embryos. During some experiments the number of developed larvae was reducing after DNA concentration and spermatozoid treatment term were increased. Group crossing permitted to document the facts of pCMVlacZ and pMTbGH plasmid transfer into the eggs. Alien DNA sequences were detected in the larvae 48 hours after the fertilization.

УДК 574.64

А. Г. ПЕТРОСЯН

НЕКОТОРЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ БИОТЕСТИРОВАНИЯ СТОЧНЫХ ВОД, СБРАСЫВАЕМЫХ В МОРСКИЕ АКВАТОРИИ

Обсуждается вопрос о ступенчатом биотестировании сточных вод, сбрасываемых в морские акватории, с использованием стандартных тест-объектов: на первом этапе - пресноводных ветвистоусых ракообразных *Ceriodaphnia affinis* Lilljeb., на втором - альготеста с *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. Приведены некоторые итоги экспериментальной оценки токсичности морской среды в Одесском заливе в районе рассеивания сточных вод станции биологической очистки "Южная".

Черное море в районе Одессы в настоящее время испытывает значительные антропогенные нагрузки. Основным источником загрязнения Одесского залива является станция биологической очистки (СБО) "Южная", сброс которой составляет 65,2% от объема стока всех береговых источников загрязнения [1].

Летом 1996 г. произошло аварийное повреждение коллектора СБО в курортном районе Большой Фонтан на глубине 8,5 м и на расстоянии 380 м от берега. В связи с этим Одесским филиалом Института биологии южных морей НАНУ был выполнен комплекс исследований по оценке влияния сточных вод СБО "Южная" в районе аварии, в том числе выполнено биотестирование стока непосредственно из коллектора СБО и в районе рассеивания сточной воды в море.

Материал и методика. Оценка токсичности вод, сбрасываемых СБО "Южная", была выполнена с использованием методов биотестирования. В береговых условиях пробы отбирали непосредственно из сбросного канала, а в морском створе - с борта судна с поверхностного и придонного горизонтов на станциях, расположенных по ходу коллектора от прибрежной пляжной зоны к точке выпуска, и далее - с шагом 50, 100 и 150 м до изобаты 20 м.

Острую токсичность пресноводного неразбавленного стока оценивали на молоди ветвистоусых ракообразных *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg [2]. Критерием токсичности сточных вод служила смертность организмов в тестируемых пробах после 48-часовой экспозиции по сравнению с контролем. Токсичность воды в морском створе оценивали в соответствии с [3, 4] на лабораторной культуре морских одноклеточных водорослей *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (семейство Chrysosphaeraceae) [5].

Результаты и обсуждение. Известно, что основной поток загрязняющих веществ антропогенного происхождения проникает в море с пресноводным стоком. К сожалению, пока не найден и вряд ли реально существует в природе универсальный тест-объект (или тест-функция), пригодный одновременно для биотестирования как пресноводных, так и морских вод. Это связано с тем, что эвригалинные организмы, чувствующие себя в равной степени хорошо и в морской и в пресной воде, очень немногочисленны. В связи с этим, по нашему мнению, для пресноводных источников загрязнения, сбрасывающих сточные воды в прибрежные морские воды, наиболее рационален двухступенчатый контроль. На первом этапе определяется острая токсичность источника загрязнения. Для этой цели пробы отбираются непосредственно из сбросной трубы. На втором этапе проводится исследование морской акватории в зоне рассеяния сточных вод с использованием морских тест-объектов.

За последнее десятилетие, по нашим наблюдениям, токсичность недостаточно очищенных сточных вод, сбрасываемых с СБО "Южная" в прибрежную часть моря, несколько снизилась. В 1991 - 1992 гг. показано, что необходимая кратность разбавления ($K_{p_{min}}$) для снижения острой токсичности сточных вод составляла 7 - 8 раз, в 1994 - 1995 гг. - 3 - 6 раз, в 1998 г. - 1,5 - 2 раза. В сентябре 1996 г. во время проведения морской съемки пробы воды из сбросного коллектора характеризовались следующими параметрами: LT_{100} (среднее время гибели 100% тест-объектов в тестируемой пробе) - менее 24 ч, $K_{p_{min}}$ - 3 раза.

В точке разрыва сбросного коллектора сточная вода пресноводного происхождения сразу же подвергалась разбавлению. Выпуск коллектора (ст. 3) был четко обозначен поднимающейся со дна пеной и взвесью, вода интенсивно перемешивалась. Соленость воды в поверхностном горизонте в точке сброса составляла 14,0 ‰, в придонном горизонте - 15,5 ‰ [1]. Небольшой диапазон колебаний солености (14,0 - 17,2 ‰) на исследуемой акватории позволил использовать для лабораторного контроля тест-культуру *Ph. tricornutum*, выращенную на среде Гольдберга с соленостью 15,5 ‰.

Биотестирование проб воды, отобранных в морском створе, выполненное на лабораторных тест-культурах *Ph. Tricornutum*, показало, что в поверхностном горизонте непосредственно в точке сброса (ст.3) и на прилегающих станциях (ст. 4, 6, 7, 8)

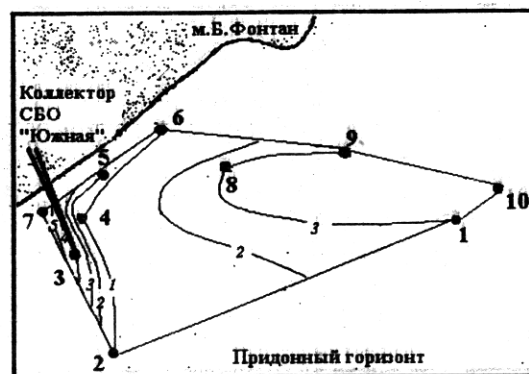
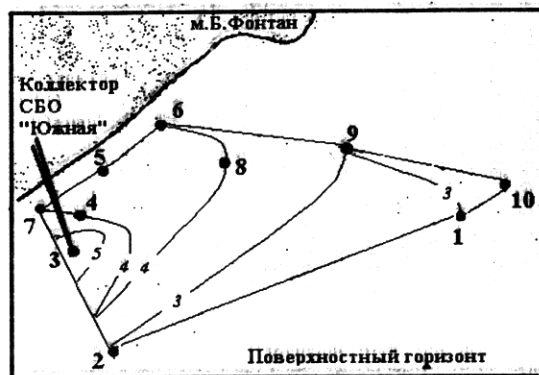


Рис.1. Влияние выпуска СВО "Южная" на численность клеток *Phaeodactylum tricornutum* в культуре (экспозиция 72 ч). Диапазон значений численности клеток: 1 - 75 - 80%; 2 - 81 - 90%; 3 - 91 - 100%; 4 - 101 - 110%; 5 - 111 - 121% по сравнению с контролем.

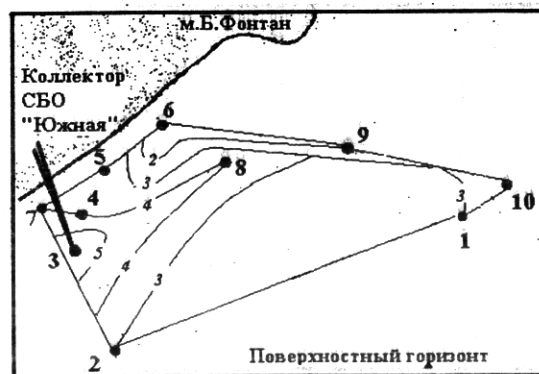


Рис.2. Влияние выпуска СВО "Южная" на коэффициенты деления клеток *Phaeodactylum tricornutum* в культуре (экспозиция 72 ч). Диапазон значений коэффициентов деления: 1 - 5,56 - 6,22; 2 - 6,23 - 6,88; 3 - 6,89 - 7,55; 4 - 7,56 - 8,21; 5 - 8,22 - 8,87; контроль - 7,33.

сформировалось пятно, характеризующееся повышенными показателями роста культур водорослей. Численность клеток *Ph. tricornutum* составляла 106,1 - 121,1 % от контроля (рис.1), коэффициент делений клеток в культурах также превышал контрольные показатели - 8,22 - 7,80 (в контроле - 7,33) (рис.2). Пробы воды со станций, удаленных от места сброса, независимо от того, находились они на мелководье, в прибрежной зоне (ст.6) или за изобатой 10 м (ст.1, 2, 9, 10), характеризовались как нетоксичные и не вызывали отклонений в развитии культур.

Общая картина качества воды в придонном горизонте значительно отличалась от таковой поверхностного горизонта. Непосредственно в точке сброса (ст.3) и на станциях, расположенных мористее (ст. 1, 8, 9, 10), вода не вызывала отклонений от контроля в развитии культур. На прибрежной ст.7 влияние стока было наиболее ощутимо: здесь отмечены максимальные значения численности клеток в тест-культурах (118,2%). Напротив, мелководная зона с затрудненным водообменом у мыса Б.Фонтан (ст. 5 и 6) представляла собой участок, характеризующийся угнетенным состоянием тест-культур водорослей. Численность клеток по итогам экспозиции составляла 75,8 - 87,9% (рис.1), коэффициенты делений - 5,56 - 6,45 (в контроле - 7,33) (рис.2).

Анализ результатов экспериментов с тест-культурами водорослей указывает на мозаичный характер распределения воды с признаками, характерными для разбавленных сточных вод. Показатели роста культур (численность клеток, коэффициент деления) свидетельствуют об умеренном загрязнении акватории.

Также мозаично на изученной акватории были распределены некоторые гидрохимические и гидробиологические показатели. Исключение составляет точка сброса в поверхностном горизонте (ст.3), где были отмечены максимальные концентрации соединений азота и фосфора (PO_4 - 0,064 мг/л, NH_4 - 0,297 мг/л, азота органического - 3,36 мг/л), максимальная величина БПК₅ (2,35 мг/л), а также обнаружено ядро цветения диатомовой водоросли *Skeletonema costatum* (64 млн. кл/л⁻¹). По мере удаления от зоны выпуска сточных вод численность и биомасса фитопланктона уменьшались, а гидрохимические показатели не отличались от фоновых характеристик прибрежных районов моря [1]. Таким образом, повышенные показатели прироста тест-культур водорослей *Ph. tricornutum* непосредственно в точке сброса могут быть связаны с присутствием в сбрасываемых бытовых стоках значительных, по сравнению с фоновыми показателями, количеств нестойких и быстро минерализующихся органических веществ. Этот факт подтверждается данными о количественных характеристиках природного фитопланктона, превышающего фоновые показатели непосредственно в точке сброса.

По результатам съемки было проведено картирование акватории, в которую сбрасываются сточные воды, с использованием шкалы определения токсичности по ростовым показателям лабораторных тест-культур планктонных водорослей *Ph. tricornutum* [6]. Поверхностный слой воды в зоне влияния сточных вод относился к категории "+1" (стимуляция делений клеток водорослей). Придонный горизонт в прибрежном участке акватории был отнесен к категории "-1" (среда со слаботоксичными свойствами). Однако результаты проведенной съемки не дают оснований с уверенностью судить о связи обширного слоя воды со слаботоксичными свойствами и аварийного выпуска сточных вод СБО "Южная".

Сложившаяся в сентябре 1996 г. ситуация смешения в прибрежном районе моря вод с различными характеристиками - от "слаботоксичных" и "нетоксичных" до "стимулирующих деления клеток в тест-культурах" может считаться типичной не только для побережья района Одессы, но и всего северо-западного шельфа Черного моря. Подобная ситуация фиксируется уже несколько лет в местах выпуска дренажных вод пресноводного происхождения в районе городских пляжей, в зоне выпуска аварийного Аркадийского ливневого коллектора, в замкнутых гаванях Одесского порта, в портах Южном и Усть-Дунайск, в зонах смешения речных дунайских и морских вод.

1. Александров Б.Г., Воробьева Л.В., Дятлов С.Е. и др. Санитарно-экологические аспекты формирования качества морских вод в районе выпуска коллектора станции биологической очистки "Южная" // "Вода и здоровье-98": Мат. междунаучно-практической конференции - Одесса, 15-18 сент. 1998 г. - Одесса: Астропринт, 1998. - С. 263-269.
2. КНД 211.1.4.055-97. Методика визначення гострої токсичності води на ракоподібних *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg. - Київ. - 1997. - 13 с.
3. КНД 211.1.4.047-95. Біотестування морської води та стічної, яка відводиться в море. Методика. - Київ. - 1995. - 37 с.
4. Water quality - Algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricornutum*. - Draft International Standard ISO/DIS 10253.2 - 1994. - 12 p.
5. Вассер С.П., Кондратьева Н.В., Масюк Н.П. и др. Водоросли. Справочник. - Киев, 1989. - 608 с.
6. Петросян А.Г., Дятлов С.Е., Доценко Т.В., Ходаков И.В. Методические рекомендации по морским биологическим тестам // Ред. Гидробиол. журн. - Киев, 1996.. - Рукопись деп. в ВИНТИ 22.07.1996 г. N. 2480-B96. - 57 с

ОФ Института биологии южных морей НАНУ,
г. Одесса

Получено 30.04.99

A.G. PETROSYAN

SOME METHODOLOGICAL ASPECTS OF WASTEWATER BIOASSAYS FOR POLLUTED SEA WATER

Summary

The problem of stepped bioassays with waste water in the marine aquatories is discussed. All bioassays are carried out using standard test-objects: on the first stage, with freshwater Crustaceans *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg, in the second stage - algotest with *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. Some experimental measurements of water toxicity were done in the Odessa Bay region not far from the treatment station "Yuzhnaya" where the waste water is dispersed.