

УДК 574.24 + 579

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ИОНОВ ТОКСИЧНЫХ МЕТАЛЛОВ НА МИКРООРГАНИЗМЫ ЛЕЧЕБНОЙ ГРЯЗИ

Мурадов С.В., Хоменко А.И., Мудранова Л.А., Рогатых С.В.

ФГБУН «Научно-исследовательский геотехнологический центр Дальневосточного отделения Российской академии наук», Петропавловск-Камчатский, e-mail: biolab@kscnet.ru

В статье приводятся данные по выявлению зависимости развития пелоидной микрофлоры от концентрации ионов токсичных металлов в среде. Различное соотношение концентраций ионов достигалось путем различных разведений грязевого материала термальной водой Паратунских термальных источников. Критерием устойчивости микроорганизмов к содержанию токсичных металлов в среде служил рост численности этих микробов в сравнении с контрольным вариантом и с образцами, содержащими меньшее количество термальной воды. В процессе инкубирования проб установлено, что в определенных соотношениях, при высокой концентрации термальной воды, происходит угнетение нарастания биомассы микроорганизмов. На основании экспериментальной оценки влияния эффекта разведения термальной водой на микроорганизмы лечебной грязи можно заключить, что существует зависимость роста микробной численности от концентраций привнесенных с термальной водой ионов токсичных элементов. Результаты эксперимента подтверждают данные об угнетающем действии ионов токсичных металлов и требуют дальнейшего изучения проблемы.

Ключевые слова: термальная вода, пелоид, микрофлора, численность, токсичные металлы

ASSESSING THE IMPACT OF TOXIC METAL IONS ON MICROORGANISMS THERAPEUTIC MUD

Muradov S.V., Khomenko A.I., Mudranova L.A., Rogatykh S.V.

Research geotechnological center FEB RAS, Petropavlovsk-Kamchatskiy, e-mail: biolab@kscnet.ru

In the present paper analyzes the data characterizing the influence of the ion concentration of toxic metals on a development of autochthonous microflora of bottom deposits. The dependences of heavy metals studied in a model experiment on therapeutic mud of Lake Utinoe, Kamchatka Kray. Toxicants are in the form of ions contained in the thermal water Paratunskih Baile, Kamchatka Kray. Was held sample dilution of mud with thermal and distilled water in different proportions in 9 conical flasks. Criterion of microbial resistance to toxic metals content served as the cells increase of these microbes in comparison to the control and samples containing a smaller amount of thermal water. The organic substrate in the form of flour was added in flask with investigated suspension on the fifteenth day of the experiment. The study found that cell increase is inhibited in certain ratios, at high thermal water concentration. Based on the experimental evaluation of the influence of thermal water dilution effect on microorganisms of therapeutic mud can conclude that there is dependence between concentrations of the toxic metals ions, made with water, and cells increase.

Keywords: thermal water, heavy metals, therapeutic mud, cells increase

Тяжелые металлы являются особой группой металлов, обладающих значительным биологическим действием. Обладая способностью накапливаться в организме и, в определенных количествах, негативно влиять на биологические процессы, тяжелые металлы также определяются как токсичные металлы (Pb, Hg, Al, Fe, Mn, Mo, Cu, As, Ti, Sr, Si, Ag и др.) [5, 10]. Ионы различных металлов являются неотъемлемым компонентом покровных вод природных водоемов. В зависимости от условий они существуют в разных степенях окисления и в составе различных соединений. Термальная вода – это вода из подземных источников, богатая различными природными минералами и микроэлементами [4].

Значительная доля термальной воды, поступающей из подземных скважин Паратунских гидротермальных источников в воды месторождения лечебной грязи «Озеро Утиное» Камчатского края, определяет изменение гидрохимического состава покровных вод озера. В свою очередь эти

воды являются источником минерального питания при формировании донных отложений. Значительная доля термальных вод (до 40% от питающих вод озера) обуславливает накопление токсичных элементов: Li, F, B, As, Mn, концентрация которых, не превышающая ПДК, наблюдалась в исследованиях донных отложений в 2012 г. [9].

Микроэлементный состав водного экстракта лечебной грязи озера Утиное включает: Al, Fe, Mn, Mo, Cu, As, Ti, Sr, Si, Ag. Будучи фактором положительного бальнеологического действия, эти металлы, однако, более угнетают специфическое микробное сообщество, чем адаптированную санитарно-показательную флору, загрязняющую водоем. Это снижает очистительную способность грязи и водоема в целом.

В настоящее время накоплен значительный объем данных о существенном влиянии высоких доз токсичных металлов на видовой состав и численность микрофлоры [14]. Токсическое действие металлов проявляется в ингибировании процессов

метаболизма. В исследованиях некоторых ученых, например, отмечается высокая чувствительность нитрифицирующей способности к тяжелометалльному загрязнению [3].

Целью настоящей работы было выяснение влияния ионов токсичных металлов термальной воды на жизнедеятельность микроорганизмов лечебной грязи. Для достижения поставленной цели было необходимо экспериментально оценить влияние эффекта разведения термальной воды на микроорганизмы лечебной грязи в процессе активации пелоида.

Материалы и методика исследований

Изучение влияния токсичных металлов проводилось в модельном опыте на лечебной грязи озера Утиное Камчатского края, характеризующейся следующими показателями: минерализация 1,0–1,5 г/л, > 0,5 мг/л сульфидов, > 90%-я зольность, 7,0–9,0 рН, –500–0 Eh, 45–75% влажность [9]. Исследовалось влияние на общее микробное число пелоида месторождения «Озеро Утиное» в процессе активации (разжижения, перемешивания, прогрева). Материалы для культивирования отбирались 11.10.2013 г. Эксперимент проводился с 22.10.2013 г. по 13.11.2013 г.

Опыт проводили в конических колбах, закрытых резиновыми напальчиками. Таким образом, создавалась закрытая система культивирования, позволяющая оценить интенсивность использования кислорода и производства газов в процессе развития культуры. Схема опыта включала внесение токсикантов в виде ионов металлов в составе термальной воды Паратунских источников Камчатского края. Были проведены разведения образцов грязи термальной и дистиллированной водой в разных соотношениях в 9 конических колбах общим объемом 200 мл каждая, кроме «стрессовой» пробы С, содержащей 250 мл материала. Предварительно было оценено исходное соотношение водной и твердой части в образцах путем центрифугирования. Содержание влаги оказалось недостаточно для достижения поставленных целей, пелоидная масса оказалась слишком плотной и вязкой, что затрудняло проведение эксперимента. В связи с этим было принято решение довести материалы до оптимального, по предположительным меркам, соотношения озерной водой, отобранной в тот же период. Таблица разведений приведена ниже (таблица). Проба С (условно названная стрессовой) содержит максимальный объем термальной воды (100 мл) относительно других разведений для получения более показательных результатов. Контрольная проба (К) содержит только 150 мл пелоидного образца и доведена до необходимого объема 50 мл озерной водой.

Таблица использованных разведений

Наименование пробы	Содержание термальной воды, мл (%)	Содержание дистиллированной воды, мл (%)
№ 1	0 (0%)	50 (100%)
№ 2	8,3 (16,6%)	41,7 (83,4%)
№ 3	16,6 (33,2%)	33,4 (66,8%)
№ 4	25 (50%)	25 (50%)
№ 5	33,3 (66,6%)	16,7 (33,4%)
№ 6	41,6 (82%)	8,4 (16,8%)
№ 7	50 (100%)	0 (0%)
С	100 (200%)	0 (0%)
К	0 (0%)	0 (0%)

Примечание. Объем пелоидного материала во всех пробах 150 мл; К – контрольная проба; С – «Стрессовая» проба (условно); сумма объемов термальной и дистиллированной вод для каждой из проб 1–7, составляющая 50 мл, принята за 100%.

Методика эксперимента заключалась в закреплении колб с исследуемым материалом на качалке (70 об/мин) и инкубации их в термостате с поддержанием температуры, близкой к естественным условиям обитания микрофлоры (12–15 °С) на протяжении 22 дней. Критерием устойчивости микроорганизмов к содержанию токсичных металлов в среде служил прирост численности этих микробов в сравнении с контрольным вариантом и с образцами, содержащими меньшее количество термальной воды (что соответствует меньшему содержанию токсичных ионов). Определение численности микроорганизмов производилось каждый день прямым подсчетом клеток в поле зрения микроскопа. Количество микробных клеток определяли по формуле

$$X = N_m \cdot 1,22 \cdot 10^7, \quad (1)$$

где X – число клеток в 1 мл; N_m – среднее арифметическое число клеток в m полях зрения.

Коэффициент $1,22 \cdot 10^7$ рассчитан с учетом объема анализируемой пробы 2 мкл, площади покровного стекла 324 мм² и площади поля зрения 0,0132 мм². Микроскопирование осуществлялось с помощью микроскопа МИКОМЕД 3 с фазово-контрастной насадкой.

На протяжении 22 дней проводилось измерение таких показателей, как реакция среды (рН), окислительно-восстановительный потенциал (Eh). Измерение рН среды производилось с помощью рН-метра «АНИОН 7000», измерение окислительно-восстановительного потенциала проводили измерителем ОВП и температуры «Н1 98120». Значения Eh переводились из mV в условные единицы по формуле

$$rH = \frac{Eh + 200}{30} + 2pH. \quad (2)$$

Изначальные показатели пробы К (Контрольной пробы): pH = 4, число клеток в 1 мл $1,8 \cdot 10^9$ кл/мл, Eh = -12.

На 15 день эксперимента в колбы с исследуемой суспензией был добавлен органический субстрат в виде пшеничной муки.

Результаты исследования и их обсуждение

Характер влияния на микроорганизмы токсичных металлов определяется, как известно, концентрацией токсичных ионов в среде, ее физико-химическими показателями

и биологическими свойствами микробных клеток [2].

На графике ниже представлены наиболее показательные данные, выражающие динамику прироста численности микроорганизмов (рис. 1). Линии графика изображают показатели прироста численности в контрольной пробе, пробе № 1, № 6, № 7 и «стрессовой» пробе. Из этого графика хорошо видно, что максимальные значения прироста микробного числа во всех исследуемых колбах соответствуют датам после внесения дополнительного органического субстрата (муки).

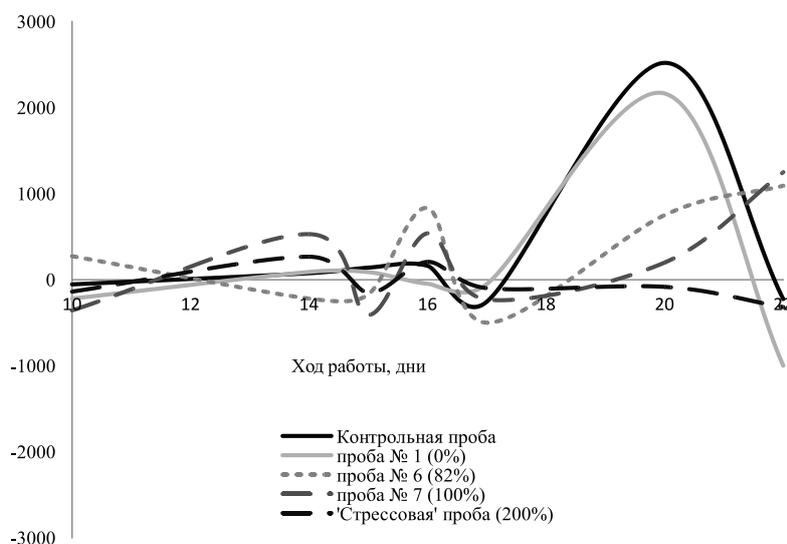


Рис. 1. Изменение динамики прироста клеток в показательных пробах с 10-го дня эксперимента. По оси у – количество клеток в 1 мл исследуемого раствора ($\times 10^7$ кл/мл). В скобках указано процентное содержание термальной воды в пробах от общего разведения

Скачок прироста численности по всем пробам (рис. 2) произошел не сразу, а через 5 дней. Внесение муки и незначительное изменение состава привычной среды сопоставимо с внесением культуры в новую среду. За счет этого, вероятно, замедлились процессы усвоения органики [5]. Это закономерный результат, и объясняется он тем, что к десятому дню инкубирования основной субстрат в колбах был истощен в процессе жизнедеятельности микроорганизмов, а внесение на этих сроках муки послужило толчком для возобновления клетками роста.

Характеризуя полученные данные, можно отметить, что в первые дни наблюдений прямых корреляций не видно. Но разная интенсивность роста микробного числа в колбах с разным разведением после внесения органического субстрата указывает на то, что в тех колбах, где процент термальной воды был выше, размножение клеток заметно менее интенсив-

ное, чем в колбах с большим содержанием дистиллированной воды. То есть в колбах с большим содержанием токсичных ионов (привнесенных с термальной водой), микроорганизмы оказались менее активными и менее интенсивно стали усваивать органику. Это, вероятно, вызвано угнетающим действием возросшей концентрации токсичных элементов на жизнедеятельность микроорганизмов, о чем свидетельствуют литературные источники [5, 7]. Также замечено, что раньше всего скачок численности микроорганизмов произошел в пробах с большим содержанием токсичных ионов, что, вероятно, объясняется использованием, до определенного момента, микроорганизмами термальной воды в качестве дополнительного источника микроэлементов. К тому же можно предположить, что и в первые дни инкубирования микроорганизмы сначала усваивали ионы металлов и использовали их в качестве

биологически активных компонентов в процессе развития, так как в малых, предельно допустимых концентрациях ионы токсичных

металлов являются необходимыми микроэлементами и выходят в состав многих биологически важных макромолекул [11, 12].

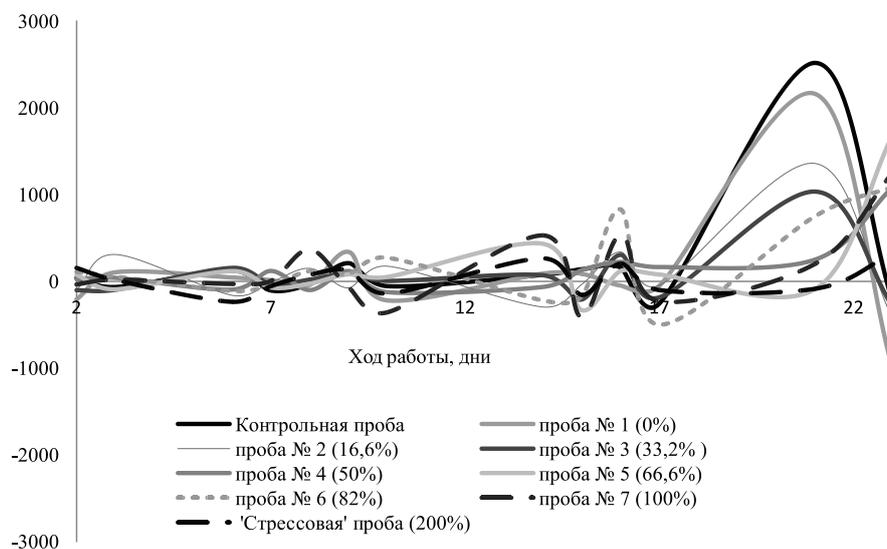


Рис. 2. Изменение динамики прироста клеток по всем исследуемым пробам. По оси у – количество клеток в 1 мл исследуемого раствора ($\times 10^7$ кл/мл). В скобках указано процентное содержание термальной воды в пробах от общего разведения

Известно, что при действии токсичных металлов в клетках микроорганизмов происходит ряд дегенеративных изменений, которые могут вести к ингибированию их размножения. Проникая в живые клетки, металлы нарушают их жизнедеятельность: инактивируют ферменты, вызывают разрывы в цепях нуклеиновых кислот и т.д. [14]. Однако в опытах Каменщиковой В.И. и Федотовой О.А. по изучению влияния токсичных на биологическую активность подзолистых почв было показано, что внесение органических удобрений частично снижает

пагубное воздействие тяжелометалльного загрязнения [6].

Как уже говорилось, токсичность металлов зависит от химического состава среды, pH, Eh и в некоторой степени от температуры.

Было установлено изменение реакции среды в процессе инкубирования в связи происходящими в колбах процессами жизнедеятельности микроорганизмов. По данным значений pH, наблюдаемых за время эксперимента в показательных пробах, также был составлен график (рис. 3) динамики изменения кислотности среды в ходе эксперимента.

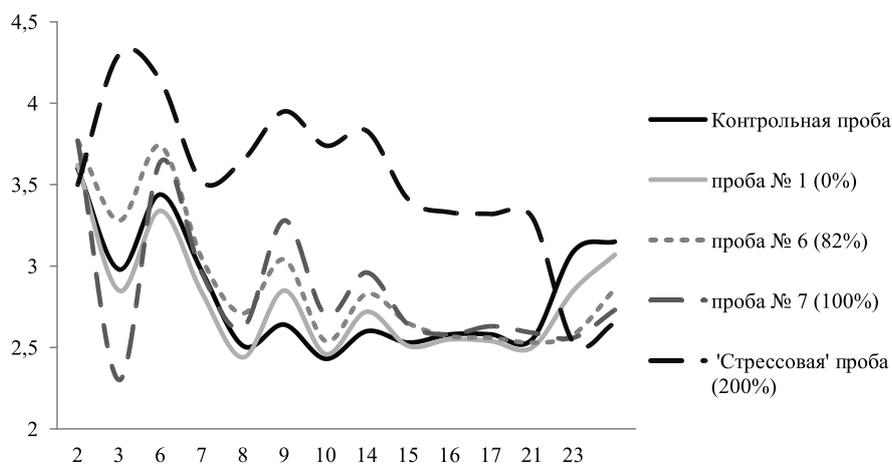


Рис. 3. Динамика изменения pH среды в показательных пробах. По оси х – ход работы (дни), по оси у – pH. В скобках указано процентное содержание термальной воды в пробах от общего разведения

Реакция среды начала падать с 4 и стабилизировалась к 10 дню примерно в районе показателя рН 3, но после внесения муки показатель рН стал постепенно нарастать.

Обратная динамика наблюдается со стороны ОВП – до внесения муки он имел более высокие значения, чем после внесения органики (рис. 4).

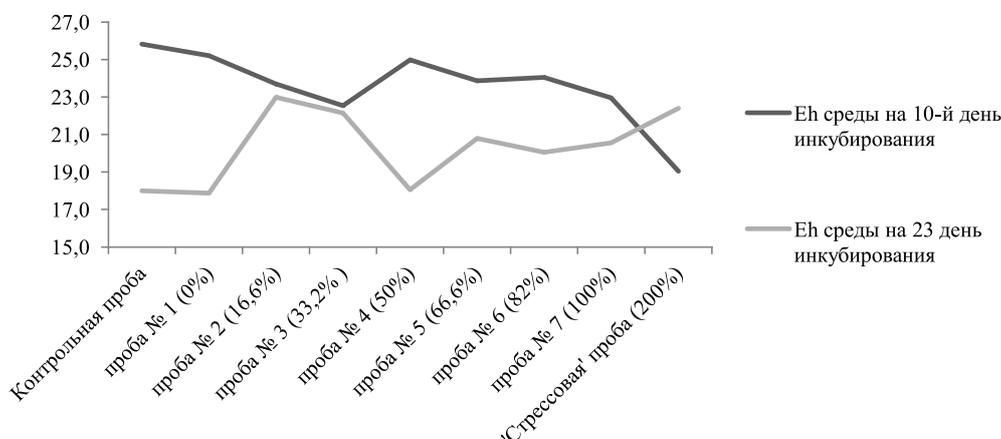


Рис. 4. Динамика изменения Eh среды (ось y). В скобках указано процентное содержание термальной воды в пробах от общего разведения

Исходя из полученных данных, видно, что проба С заметно отличается от других проб. Причиной этому служит наибольшее содержание термальной воды в колбе. Показатель прироста клеток в этой пробе наглядно показывает, что значительное содержание ионов токсичных ионов в среде ингибирует процесс развития микрофлоры.

На основании экспериментальной оценки влияния эксперимента разведения термальной водой на микроорганизмы лечебной грязи можно заключить, что существует зависимость нарастания микробной численности от концентраций, привнесенных с термальной водой токсичных ионов. Следует отметить, что авторами более ранних исследований было установлено, что устойчивость микроорганизмов к токсическому действию подобных элементов зависит как от морфологических, так и от физиологических характеристик клеток [1, 7]. В связи с этим для получения более точных результатов и обобщения выводов требуется проведение серии экспериментов, в которых необходимо выбрать минимальную концентрацию токсичных ионов в отдельном и сочетанном присутствии, под действием которых начинает проявляться эффект токсичности.

Список литературы

1. Алексеева А.Н., Анисимов Д.А., Хоменко В.А. Изменение состава белков оболочки и липополисахарида у кадмийустойчивых псевдомонад // Биол. мембраны. – 1991. – Т. 8. – № 8. – С. 800–804.
2. Андреюк К.І., Іутинська Г.О., Антипчук А.Ф. Функціонування мікробних ценозів ґрунту в умовах антропогенного навантаження. – К.: Обереги, 2001. – 240 с.

3. Евдокимова Г.А., Кислых, Е.Е., Мозгова, Н.П. Биологическая активность почв в условиях аэротехногенного загрязнения на Крайнем Севере. – Л.: Наука, 1984. – 120 с.
4. Иванов В.В., Невраев Г.А. Классификация подземных минеральных вод. – М.: Недра, 1964 – 168 с.
5. Иванова Е.П. Горшкова Н.М., Куриленко В.В. Толерантность к солям тяжёлых металлов морских протеобактерий родов *Pseudoalteromonas* и *Alteromonas* // Микробиология. – 2001. – Т. 70. – № 2. – С. 283–285.
6. Каменщикова В.И. Влияние токсичных металлов на биологическую активность подзолистой почвы / В.И. Каменщикова, О.А. Федотова // Вестник Пермского университета – 2004. – № 2. – С. 163–165.
7. Каравайко Г.И., Дубинина Г.А., Кондратьева Т.Ф. Литотрофные микроорганизмы окислительных циклов серы и железа // Микробиология. – 2006. – Т. 75. – № 5. – С. 593–629.
8. Микробиология. Университетский курс: учебник для студ. учреждений высш. проф. образования / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Издательский центр «Академия», 2012. – 384 с. – (Сер. Бакалавриат).
9. Мурадов С.В. Мониторинг санитарно-микробиологического состояния лечебной грязи озеро Утиное (Камчатский край) за 50 лет эксплуатации месторождения // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 6. – С. 913–917.
10. Новоселова Е.И., Турьянова Р.Р., Рахматуллина А.А., Шарифуллина Л.Н. Влияние тяжелых металлов на ферментативную активность и состав почвенной альгофлоры чернозема обыкновенного // Материалы докладов VI съезда Общества почвоведов им. В.В. Докучаева. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. – 2012. – Кн. 2. – С. 276–277.
11. Сбойчаков В.Б. Санитарная микробиология. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 192 с.
12. Сомов Г.П., Бузолёва Л.С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды. – Владивосток: Примполиграфкомбинат, 2004. – 167 с.
13. Стефурак В.П. Влияние техногенного загрязнения на численность и состав микробных сообществ почв. – Киев, 1982. – 230 с.
14. Чубуков В.Ф. Микробы запасают металлы // Химия и жизнь. – 1982. – № 11. – С. 53–55.

References

1. Alekseeva A.N., Anisimov D.A., Khomenko V.A. *Biochemistry Supplement Series A*, 1991, T. 8, no. 8, pp. 800–804.
2. Andrejuk K.I., Iutyn's'ka G.O., Antypchuk A.F. *Funkcionuvannja mikrobnih cenziv g'runtu v umovah antropogenogo navantazhennja*, Kiev: Oberegy, 2001, 240 p.
3. Evdokimova G.A., Kislyh, E.E., Mozgova, N.P. *Biologicheskaja aktivnost' pochv v uslovijah ajerotehnogenogo zagrjaznenija na Krajnem Severe*, L.: Nauka, 1984, 120 p.
4. Ivanov V.V., Nevraev G.A. *Klassifikacija podzemnyh mineral'nyh vod*, M.: Nedra, 1964, 168 p.
5. Ivanova E.P., Gorshkova N.M., Kurilenko V.V. *Mikrobiologija*, 2001, T. 70, no 2, pp. 283–285.
6. Kamenshikova V.I. *Vestnik Permskogo universiteta*, 2004, no 2. pp. 163–165.
7. Karavajko G.I., Dubinina G.A., Kondrat'eva T.F. *Mikrobiologija*, 2006, T. 75, no. 5, pp. 593–629.
8. Netrusov A.I., Kotova I.B. *Mikrobiologija. Universitetskij kurs: uchebnik dlja stud. uchrezhdenij vyssh. prof. obrazovanija. 4-e izd., pererab. i dop.*, Moscow: Izdatel'skij centr «Akademija», 2012, 384 p.
9. Muradov S.V. *Fundamental'nye issledovanija*, 2013, no. 6, pp. 913–917.
10. Novoselova E.I., Tur'janova R.R., Rahmatullina A.A., Sharifullina L.N. *Materialy dokladov VI s'ezda Obshestva pochvovedov im. V.V. Dokuchaeva «Vlijanie tjazhelyh metallov na fermentativnuju aktivnost' i sostav pochvennoj al'goflory chernozema obyknovennogo» (Influence of heavy metals on the enzymatic activity and the composition of the soil algal flora of ordinary chernozem)*. Petrozavodsk: Karel'skij nauchnyj centr RAN, 2012, book 2, pp. 276–277.
11. Sbojchakov V.B. *Sanitarnaja mikrobiologija*, M.: GJe-OTAR-Media, 2007, 192 p.
12. Somov G.P., Buzoljova L.S. *Adaptacija patogennyh bakterij k abioticheskim faktoram okruzhajushhej sredy*, Vladivostok: OAO «Primpoligrafkombinat», 2004, 167 p.
13. Stefurak V.P. *Vlijanie tehnogenogo zagrjaznenija na chislennost' i sostav mikrobnih soobshhestv pochv*, Kiev, 1982, 230 p.
14. Chubukov V.F. *Himija i zhizn'*, 1982, no. 11, pp. 53–55.

Рецензенты:

Кузякина Т.И., д.б.н., профессор, главный научный сотрудник Научно-исследовательского геотехнологического центра ДВО РАН, г. Петропавловск-Камчатский;

Потапов В.В., д.т.н., заведующий лабораторией химии кремнезема в современных геотермальных процессах Научно-исследовательского геотехнологического центра ДВО РАН, г. Петропавловск-Камчатский.

Работа поступила в редакцию 31.01.2014.