

УДК 549.903.12:574.5:576.321]57.086.3

ОБ ОДНОЙ ИЗ ПРОБЛЕМ ВОДОПОДГОТОВКИ

В.М.Катола

Институт геологии и природопользования Дальневосточного отделения РАН,
675000, г. Благовещенск, пер. Релочный, 1.

РЕЗЮМЕ

На электронномикроскопическом уровне показано, что при выращивании плесневого гриба *Penicillium canescens* в присутствии отходов золотодобычи, из них удаляются тяжелые металлы, скапливающиеся во всех структурах *Penicillium canescens*, включая ядро. При этом одни клетки гибнут от плазмолиза, другие аккумулируют полиморфные частицы преимущественно на клеточной стенке, ее поверхностном слое, цитоплазматической мембране, межклеточных септах и стенке конидий. Предполагается, что фрагменты клеток, нагруженные тяжелыми металлами, способны преодолеть систему фильтрации воды в процессе водоподготовки, и с водопроводной питьевой водой попадают в организм человека.

Ключевые слова: тяжелые металлы, водоподготовка, внутриклеточные структуры, электронная микроскопия.

SUMMARY

ABOUT ONE OF THE PROBLEMS OF WATER TREATMENT PROCESS

V.M.Katola

Institute of Geology and Nature Management of Far
Eastern Branch RAS, 1 Relochniy Lane,
Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation

At the electron microscopic level it was shown that at cultivation of mold fungus *Penicillium canescens* in the presence of gold mining wastes, heavy metals accumulated in all the structures including the nucleus are removed. While some cells are killed by plasmolysis, others accumulate polymorphic particles mainly in the cell wall, its surface layer, cytoplasmic membrane, intercellular septum wall and conidia. It is assumed that fragments of cells loaded with heavy metals are able to overcome a water filtration system in the water treatment process and with tap drinking water they enter the body.

Key words: heavy metals, water treatment, intracellular structures, electron microscopy.

Интенсивное использование водных ресурсов вызывает нарастающее загрязнение поверхностных и подземных вод. В итоге водные экосистемы теряют способность к самоочищению, что заметно ухудшает качество воды [8]. С водой в организмы попадает 80% вредных веществ (микроорганизмы, тяжелые металлы, фенолы, нитриты, нитраты, пестициды и др.) и только 20% – через воздух и продукты питания. Поэтому примерно 90% болезней людей вызваны употреблением некачественной воды [3, 9]. Несмотря на применение

физических, химических, биологических и комбинированных методов очистки воды [1], ее качество далеко не отвечает требованиям законодательства по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Так, согласно данным Роспотребнадзора [2] в 2013 году доброкачественной питьевой водой обеспечено 62,1% населения, большинство которого проживает в городах. В итоге в 8,3 раза выросла заболеваемость туляремией, в 2,5 раза – брюшным тифом, в 3,3 раза – энтеровирусными инфекциями, в 5,7 раза – гепатитом А.

Хотя загрязнение воды микроорганизмами более опасно, чем химическое, значительную угрозу водным источникам представляют тяжелые металлы (ТМ). Они воздействуют на физические, химические и биологические свойства воды, понижают ее биосферные функции и экономическую значимость. В организме человека ТМ не деградируют и не подвергаются существенной модификации, но при длительном поступлении даже в малых концентрациях навсегда остаются в органах и тканях, незаметно вызывая у детского и взрослого населения поражения нервной и сердечно-сосудистой систем, печени, почек, влияя на репродуктивную функцию и индуцируя мутагенные эффекты. Несмотря на большое число приемов и способов водоподготовки (комплекс технологических процессов обработки и очистки воды) [1] полного извлечения из нее ТМ не достигается. В 2013 году увеличилось число проб воды, превышающих гигиенические показатели по алюминию, железу (включая хлорное железо), кальцию, никелю, свинцу и другим металлам [2]. В питьевой воде из-под крана и колонок г. Благовещенска находятся (мг/л) Fe (0,17), Cu (0,003), Co (0,0018), Mn (0,029), Ni (0,05), Cr (0,001), Pb (0,004), Zn (0,007) и Hg (0,0001) [4]. Считается, что наличие ТМ в питьевой воде зависит от особенностей прямых и косвенных факторов, формирующих химический состав природной воды (состав горных пород, хозяйственная активность человека, растительность, атмосферные аэрозоли, вулканические газы, пыль, климат, рельеф, гидрологический режим), использование устаревших технологий, оборудования и материалов, износ систем водоснабжения и пр. В то же время из виду упускается не менее важная причина – перенос ТМ из отходов (отвалов) горнорудной и горнохимической промышленности, цветной и черной металлургии, прочих объектов на носителе, который может преодолевать систему фильтрации воды с размером ячеек фильтра 1,0 мкм и даже меньше. Как представляется, такими биологическими носителями являются бактерии и плесневые грибы, в частности их субклеточные структуры. Исследовать структуру клетки непосредственно в природных условиях чрезвычайно сложно,

поэтому проводятся соответствующие эксперименты.

Материалы и методы исследования

Дикий штамм плесневого гриба *Penicillium canescens* культивировали в течении 5-6 суток в глущине жидкой питательной среды Чапека (источник углерода – глюкоза, азота – NaNO_3 , исходная pH 7,0), содержащей стерильные образцы из отходов золотодобычи в соотношении Т:Ж=1:7. Образцы были взяты из хвостов шлихообогатительной установки (ШОУ) Софийского золотоносного узла (Хабаровский край), богатых рудными и нерудными минералами, промышленными запасами ТМ и пр. Для электронно-микроскопических исследований мицелий *P. canescens* готовили традиционным способом, ультратонкие срезы мицелия толщиной 600-900 Ао получали на ультрамикротоме марки LKB-NOWA с фотографированием в просвечивающем электронном микроскопе TESLA BS-500.

Результаты исследования и их обсуждение

Прежде всего, напомним, что на земной поверхности разрушение горных пород и слагающих минералов с извлечением рудных элементов наиболее интенсивно осуществляют различные таксономические группы аэробных и анаэробных бактерий и плесневых грибов, существующих в почвах, месторождениях, поверхностной и подземной воде и донных осадках. Для этого они синтезируют и выделяют в среду разные агрессивные метаболиты – ферменты, цианиды, перекиси, минеральные (серную и азотную) и органические кислоты (лимонная, уксусная, муравьиная, малоновая и др.), аминокислоты, белки, пептиды и пр. Это происходит и в опытах *in vitro* (закрытой системе). К 5-6 суткам роста *P. canescens* в глубине питательной среды Чапека образуются серовато-белые комочки мицелия из переплетенных и сближенных между собою гиф – нитчатых органов диаметром 1-3 мкм, и конидии – неподвижные органы бесполого размножения. К этому же сроку в среде уже накапливаются продукты обмена веществ: полипептиды, органические, нуклеиновые и жирные кислоты и полисахариды, понижающие ее pH от нейтрального (7,0) до слабокислого (5,0). При таких значениях pH из минерального субстрата в раствор выносятся рудные элементы, которые вступают в химическую связь между собою, с анионами и катионами среды и метаболитами гриба. В результате многие металлы (Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb и др.) не только растворяются, но и выпадают в осадок и обратно переходят в раствор, заодно формируют новые минералы, растворимые и нерастворимые металлоорганические соединения. Протекающие события превращают исходную среду Чапека в гипертонический токсичный раствор с возрастающим дефицитом питательных веществ, накоплением метаболитов и новообразований. Чтобы выжить в токсичном растворе, *P. canescens* вынужден использовать все свои адаптивные возможности. Некоторые процессы его приспособления визуализируются в просвечивающем электронном микроскопе. На рисунке 1 показана аккумуляция металлов, солей и ком-

плексных соединений в межгифальном матриксе, на поверхности гиф и конидий в виде сложных электронноплотных частиц неодинаковой раздробленности, агрегирующих с формированием адсорбата. Не исключено, что образование отдельных частиц и адсорбата в какой-то мере снижает уровень и токсичность ТМ в инкубационном растворе, тем самым обеспечивается жизнедеятельность молодых растущих клеток. Но самое главное в другом – контактным методом сходные фрагменты гиф с полиморфными частицами на поверхности постоянно обнаруживаются непосредственно в природной обстановке [5, 6, 7]. В то же время реакция на ТМ внутриклеточных структур плесневых грибов оставалась неясной.

По форме и размеру клетки каждой гифы плесневых грибов разнообразны, тогда как по набору структур одинаковы. К последним относятся, в отличие от животных клеток, эластичная, многослойная клеточная стенка толщиной 0,2 мкм, защищающая клетку от проникновения вредных веществ. Между клеточной стенкой и эластичной цитоплазматической мембраной, шириной 0,007-0,013 мкм, находятся мембранные структуры – ломасомы. Плотная прилегающая к ним цитоплазматическая мембрана выполняет барьерную, транспортную и другие функции и чехлом окружает цитоплазму, в которой осуществляется внутриклеточный транспорт веществ и содержатся органеллы – эндоплазматический ретикулум (сеть) диаметром 0,05-0,1 мкм, митохондрии, комплекс Гольджи, рибосомы и др. В каждой клетке всегда находится одно либо несколько ядер размером 2-3 мкм, отделенных от цитоплазмы оболочкой с порами. Под воздействием внутренних или внешних факторов все структуры клетки повреждаются, что приводит ее к гибели, в первую очередь, при повреждении цитоплазматической мембраны. Обычно морфологию внутриклеточных структур анализируют, если усилить контрастность срезов напылением солями Ag, Au, Cd, K, Mn, Pb, Zn, W и др. В настоящей работе напыления не требовалось, поскольку экстрагированные из хвостов ШОУ металлы сразу же проникают внутрь клеток, пропитывают и уплотняют структурные компоненты и обеспечивают удовлетворительную визуализацию. Из рисунка 2 видно, что из четырех слоев клеточной стенки самым «чувствительным» к металлам является поверхностный (глюкановый) слой. Представляя в норме мембрану толщиной 0,1 мкм, он насыщается ионами, утолщается до 0,3-0,5 мкм, расслаивается и обрывками отторгается от глюкопротеидного, белкового и внутреннего хитинового слоев, которые соединяются в один контрастированный слой. Однако по мере продвижения ионометаллов внутрь клеток четкость других структурных составляющих на плоскости среза уменьшается, что зависит от стадии развития клетки, толщины границ между органеллами, пространственной ориентировки структур и пр. В наших случаях не видны митохондрии, аппарат Гольджи и рибосомы, слабее контрастируются расширенные (в среднем до 0,6 мкм) с не всегда четкими контурами ломасомы и эндоплазматический ретикулум (рис. 4).

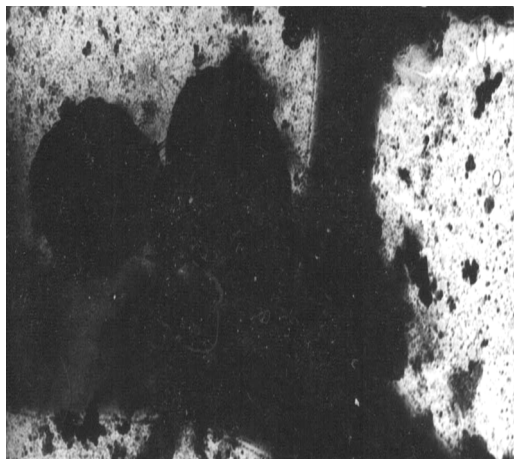


Рис.1



Рис.2

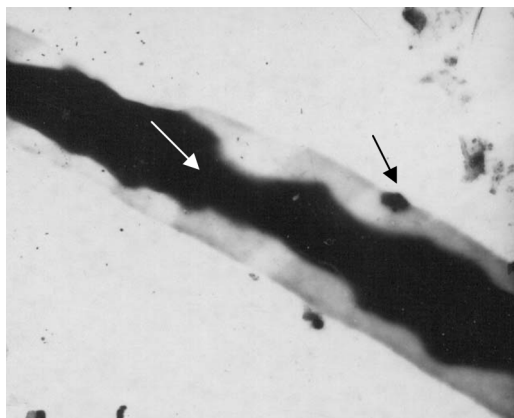


Рис.3

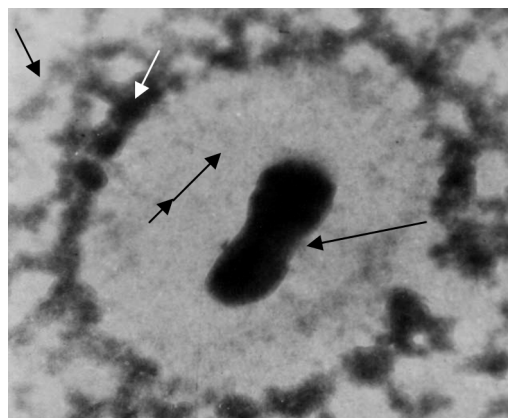


Рис.4

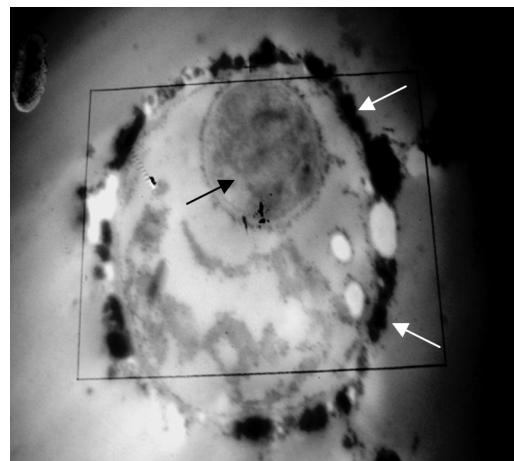


Рис.5

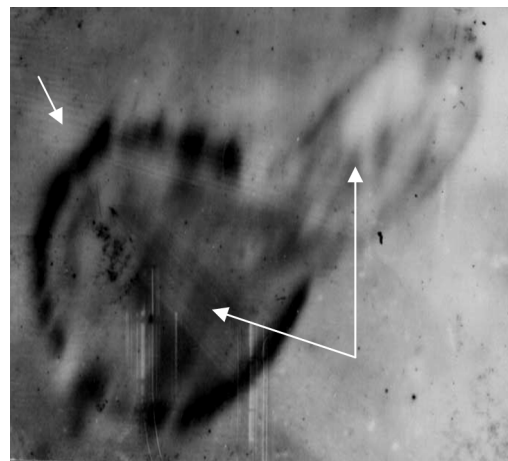


Рис.6

Рис. 1-6. Электронная микроскопия клеток плесени *P. canescens*, контрастированной ионометаллами: 1 – электронноплотные частицы и их конгломераты в межгиловых промежутках, на поверхности гиф и конидий ($\times 3000$); 2 – фрагмент гифы с отслоившимся поверхностным слоем (отмечен короткими черными стрелками), оставшиеся слои и отмеченные длинной черной стрелкой межклеточные септы (ультрасрез, $\times 9000$); 3 – белой стрелкой отмечен выпуклый плазмоллиз клетки, черной стрелкой – единичные частицы на ее поверхности (ультрасрез, $\times 9000$); 4 – короткой черной стрелкой отмечены ломасомы с нечеткими контурами, короткой белой стрелкой – цитоплазматическая мембрана, двойной черной стрелкой – цитоплазма с эндоплазматическим ретикулумом, длинной черной стрелкой – деформированное ядро (ультрасрез, $\times 30000$); 5 – черной стрелкой отмечено круглое ядро, белой стрелкой – крупный адсорбат на клеточной стенке (ультрасрез, $\times 22000$); 6 – короткой белой стрелкой отмечен крупный адсорбат на поверхности конидии, длинной белой стрелкой – неравномерно «окрашенные» структуры цитоплазмы и ростовой трубочки (ультрасрез, $\times 17000$).

По сравнению с ними яснее визуализируется цитоплазматическая мембрана. Она утолщается до 0,3 мкм и местами образует на поверхности довольно крупные частицы трансформированных металлов (рис. 4). Одновременно обращают внимание не столько различные, сколько необычно расширенные (до 10 мкм) межклеточные перегородки (септы). На фоне всех «прокрашенных» структур составляющие клеточной цитоплазмы (вода, минеральные соли, глюкоза, аминокислоты, белки, нерастворимые отходы обменных процессов и запасные питательные вещества) не визуализируются. Тем не менее, проникших в клетку ионометаллов оказалось достаточно, чтобы у нее нарушились электролитный состав, ферментные и прочие системы, утратился тургор и развился плазмолиз. Как правило, уплощение и гибель клетки вызывает выпуклый плазмолиз (рис. 3), меньшая опасность исходит от уголкового плазмолиза. Повышенной степенью светопреломления (рефрактерностью) особенно отличалось ядро. Согласно рисункам 4 и 5 у одних клеток ядро полностью покрывается металлами и деформируется, у других клеток ядерная мембрана задерживает часть металлов в виде нежного адсорбата, другая их часть проникает через ее поры, возможно разрывы, внутрь ядра. При этом слегка просматривается коагуляция хроматина в грубые агрегаты. Наконец, не безучастными остаются конидии *P. canescens* – на их стенке также откладывается грубый адсорбат (рис. 6), чего не бывает у конидий культуры, растущей на питательных средах в отсутствие образцов из хвостов ШОУ.

О том, что экстрагированные рудные элементы адсорбируются на поверхности гиф *P. canescens* и проникают в клетки не выборочно, а комплексно, свидетельствует наличие в растущем мицелии (мкг/г сух. б.м.) Co (34,3), Cr (149,7), Cu (391,8), Ni (111,2), Zn (120,6) и Pb (141,4). В сравнительно меньших количествах металлы содержатся и в инкубационном растворе (мкг/л): Co – 250,0; Cr – 317,0; Cu – 307,0; Ni – 140,0; Zn – 145,0; Pb – 610,0. Эти различия не удивляют, так как большинство грибов вообще склонны аккумулировать ТМ в количествах, во много раз превышающих потребности. По мнению ряда авторов [10] на клеточной стенке в основном задерживаются Hg, Ag и Cd, внутрь клетки частично переносятся Cu, Zn, Ni, Co, Pb, Cr и Sr, с цитоплазматической мембраной реагируют Cu, Zn, Ni, Co, Hg, Ag. Биоаккумуляция ТМ наиболее эффективна при развитии плесневых грибов на полноценной питательной среде, то есть, в первом пассаже. В наших опытах *P. canescens* в присутствии минерального субстрата, без обновления питательной среды и даже при кислом pH (3,0-1,0), развивается и функционирует включительно до шестого пассажа. Столь длительная его жизнеспособность объясняется способностью реутилизировать все необходимые трофические продукты напрямую из токсичного раствора, куда они поступают в процессе гибели клеток и конидий. Однако к этому сроку *P. canescens* заметно «стареет»: уменьшается вес биомассы, теряется потенциал

роста, гифы истончаются, уплощаются и разрываются, конидии полностью разрушаются и больше не прорастают.

Таким образом, ионометаллы, удаленные из хвостов ШОУ плесневым грибом *P. canescens*, проходят через механические клеточные преграды и связываются со всеми структурными звеньями, включая ядро. При этом реакции клеток гифы неодинаковы. Наиболее эффективно ТМ адсорбируются, трансформируются и депонируются: 1) клеточной стенкой; 2) ее поверхностным слоем; 3) цитоплазматической мембраной; 4) межклеточными септами; 5) клетками в состоянии плазмолиза; 6) стенкой конидий. Именно эти клеточные структуры являются ведущими и непосредственными переносчиками ТМ из загрязненных биотопов (почвы вблизи промышленных предприятий, выход эродированных месторождений, техногенные горнорудные отходы и т.д.). При увлажнении либо высушивании биотопа переносчики в бесчисленном множестве переносятся ветром, дождевыми потоками, дикими животными и транспортом из одного места в другое, включая реки, ручейки, природные и искусственные водоемы. Из-за своих малых размеров и высокой податливости фрагменты клеток плесневых грибов, нагруженные ТМ, в процессе водоподготовки упускаются физическими, химическими и биологическими фильтрующими системами. Попав с питьевой водой в организм человека, ТМ могут вызвать дисфункцию органов и систем, повышать сенсibilизацию к остальным поллютантам и природным веществам, воздействовать на общую заболеваемость населения и др. Поэтому для профилактики попадания ТМ в водопроводы необходимо продолжить оптимизацию системы фильтрации воды, обеспечивать выбор места и устройства водозабора экологической надежностью и безопасностью для населения.

Выводы

1. Фрагменты клеток плесневых грибов являются переносчиками тяжелых металлов из техногенных горнорудных отходов. Благодаря своим малым размерам они пропускаются системами фильтрации воды, в том числе фильтрами с мелкими ячейками.
2. Тяжелые металлы, фиксированные на фрагментах плесневых грибов, способны попадать с питьевой водой в организм человека, незаметно влияя на качество и продолжительность жизни.
3. Результаты проведенных исследований указывают на необходимость дальнейшей оптимизации технологии водоподготовки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Водоподготовка. Справочник / под. ред. С.Е.Беликова. М.: Аква-Терм, 2007. 240 с.
2. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2013 году. М., 2014. 191 с.
3. О роли латентных, трудно культивируемых и некультивируемых персистентных бактерий в патологии человека / И.В.Елисеева [и др.] // Анналы Мечниковского

Институту. 2006. №1. С.12–46.

4. Катола В.М. Токсичные металлы в окружающей среде Благовещенска // Экол. и пром. России. 2010. №3. С.27–29.

5. Катола В.М. Морфологическая характеристика бактерий и микроскопических грибов, выпадающих со снежинками на территорию Благовещенска // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2013. Вып.48. С.86–89.

6. Катола В.М. Морфофункциональные особенности бактерий и микромицетов, вегетирующих в старых отходах золотодобычи // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2014. Вып.53. С.109–113.

7. Катола В.М. Хлорирование воды: его эффективность, недостатки, хлорустойчивые микроорганизмы и их значимость // Водоочистка, водоподготовка, водоснабжение. 2015. №6. С.33–37.

8. Вода и воднообусловленные инфекции / А.В.Мокиенко [и др.]. Одесса: АРТ В. 2008. Т.2. 288 с.

9. Мулюкин А.Л. Покоящиеся формы неспорообразующих бактерий: свойства, разнообразие, диагностика: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2010. 48 с.

10. Сенцова О.Ю., Максимов В.Н. Действие тяжелых металлов на микроорганизмы // Успехи микробиологии. 1985. Т.20. С.227–252.

REFERENCES

1. Belikov S.E. Water treatment. Directory. Moscow: Akva-Term; 2007 (in russian).

2. State report «On the state sanitary and epidemiolog-

ical welfare of the population in the Russian Federation in 2013». Moscow; 2014 (in russian).

3. Eliseeva I.V., Babich E.M., Volyanskiy Yu.L., Sklyar N.I., Belozerskiy V.I. *Annali Mechniv's'kogo Institutu* 2006; 1:12–46 (in russian).

4. Katola V.M. *Ekologiya i promyshlennost' Rossii* 2010; 3: 27–29 (in russian).

5. Katola V.M. Morphological characteristics of bacteria and microscopic fungi falling out with snow on Blagoveshchensk. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ – Bulletin physiology and pathology of respiration* 2013; 48: 86–89.

6. Katola V.M. Morphofunctional features of bacteria and micromycetes living in the old gold mining wastes. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ – Bulletin physiology and pathology of respiration* 2014; 53:109–113 (in russian).

7. Katola V.M. *Vodoochistka, vodopodgotovka, vodosnabzhenie* 2015; 6:33–37 (in russian).

8. Mokienko A. V., Gozhenko A. I., Petrenko N. F., Zasyrko L.I., Kotlik L.S., Tarasyuk E.F., Skolenko A.V., Isakova N.P. Water and water infection. Odessa: ART V; 2008 (in russian).

9. Mulyukin A.L. Resting forms of asporogenous bacteria: properties, diversity, diagnosis: abstract of PhD thesis (Biol.). Moscow; 2010 (in russian).

10. Sentsova O.Yu., Maksimov V.N. *Uspekhi mikrobiologii* 1985; 20: 227–252 (in russian).

Поступила 06.08.2015

Контактная информация

Виктор Моисеевич Катола,

кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник,

Институт геологии и природопользования Дальневосточного отделения РАН,

675000, г. Благовещенск, пер. Релочный, 1.

E-mail: katola-amur@list.ru

Correspondence should be addressed to

Viktor M. Katola,

MD, PhD, Leading staff scientist,

Institute of Geology and Nature Management of Far Eastern Branch RAS,

1 Relochniy Lane, Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.

E-mail: katola-amur@list.ru