

УДК 550.72:579.266(571.63)

## ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП БАКТЕРИЙ И ИХ ЧИСЛЕННОСТЬ В ПОДЗЕМНЫХ ХОЛОДНЫХ ВЫСОКОМИНЕРАЛИЗОВАННЫХ ВОДАХ ПРИМОРСКОГО КРАЯ

<sup>1</sup>Лебедева Е.Г., <sup>1</sup>Челноков Г.А., <sup>2</sup>Харитонов Н.А.

<sup>1</sup>ФГБУ «Дальневосточный геологический институт ДВО РАН»,  
Владивосток, e-mail: microbiol@mail.ru;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва

Проведено исследование распространения, структуры и численности различных эколого-трофических групп бактерий в подземных высокоминерализованных водах Приморского края. Показано, что подземные воды населены различными физиологическими группами микроорганизмов, адаптированными к высокой минерализации и высокой концентрации соли в среде. Установлена бедная функциональная структура сообществ, низкая численность бактерий различных физиологических групп и небольшое биоразнообразие сапрофитных бактерий. В подземных рассолах преимущественно развивались тионовые и сапрофитные бактерии, что указывает на происходящие в водах процессы окисления восстановленных соединений серы, а также разложения органических веществ с участием микроорганизмов. Также в рассолах были отмечены в небольшом количестве бактерии, осуществляющие гетеротрофную, автотрофную нитрификацию, денитрификацию и окисление железа и марганца. В цикле железа и марганца преобладали гетеротрофные марганецвосстанавливающие бактерии. Численность сапрофитных бактерий отличалась в средах с добавлением различных концентраций соли и была выше в средах с добавлением 10% соли, что позволяет отнести выделенные микроорганизмы к умеренным галофилам. Выделенные галофильные бактерии на среде МПА формировали светло-серые, светло-бежевые, оранжевые и молочного цвета колонии и были представлены грамположительными палочками различной длины. Среди сапрофитов преобладали микроорганизмы рода *Microbacterium* sp., *Halobacterium* sp. и *Bacillus* sp. Выделенные изоляты проявляли рост в широком диапазоне температур, pH, концентрации соли, что позволяет использовать данные бактерии в биотехнологии и промышленности для очистки сточных вод. На выходе подземных рассолов наблюдалось формирование микробных матов.

**Ключевые слова:** подземные воды, рассолы, физиологические группы, бактерии, биоразнообразие, численность, Речица

## FEATURES OF THE DISTRIBUTION OF DIFFERENT FUNCTIONAL GROUPS OF BACTERIA AND THEIR NUMBERS IN COLD SALINE UNDERGROUND WATERS OF THE PRIMORYE REGION

<sup>1</sup>Lebedeva E.G., <sup>1</sup>Chelnokov G.A., <sup>2</sup>Kharitonova N.A.

<sup>1</sup>Far East Geological Institute, FEB RAS, Vladivostok, e-mail: microbiol@mail.ru;

<sup>2</sup>Moscow State University named after M.V. Lomonosov, Moscow

The study of the distribution, structure and abundance of various ecological-trophic groups of bacteria in the underground highly mineralized waters of Primorye region was carried out. It is shown that groundwater is inhabited by various physiological groups of microorganisms, adapted to high salinity and high salt concentration in the environment. A poor functional community structure, a low number of bacteria of different physiological groups, and a small biodiversity of saprophytic bacteria have been established. Thionic and saprophytic bacteria developed mainly in underground brines, indicating that the oxidation of reduced sulfur compounds occurs in waters, as well as the decomposition of organic substances with the participation of microorganisms. Also in brines, a small amount of bacteria was observed, carrying out heterotrophic, autotrophic nitrification, denitrification and oxidation of iron and manganese. In the cycle of iron and manganese, heterotrophic manganese-reducing bacteria dominated. The number of saprophytic bacteria differed in the media with the addition of different salt concentrations and was higher in media with the addition of 10% salt, which made it possible to isolate isolated microorganisms for moderate halophiles. The isolated halophilic bacteria on the MPA medium formed light gray, light beige, orange, and milky colonies and represented gram-positive rods of various lengths. Among saprophytes are microorganisms of the genus *Microbacterium* sp., *Halobacterium* sp. and *Bacillus* sp. prevailed. Isolated isolates showed growth in a wide range of temperatures, pH, salt concentration, which allows using these bacteria in biotechnology and industry for wastewater treatment. At the exit of underground brines, the formation of microbial mats was observed.

**Keywords:** groundwater, brines, physiological groups, bacteria, biodiversity, abundance, Rechitsa

Подземные воды повышенной минерализации, приуроченные к морским побережьям, выявлены на юге Приморского края при проведении поисково-разведочных работ на углеводороды и термальные воды. Пробуренные в процессе работ скважины глубиной более 2,5 км позволили обнару-

жить ранее не известный в Приморье уникальный тип вод, такой как проявление слабых рассолов Речица [1].

Известно, что подземные воды являются естественной средой обитания различных микроорганизмов. Микробные сообщества являются важным биотическим фактором,

активно влияющим на процессы формирования химического состава глубинных вод, минералообразования и метаморфизма горных пород. Высокая концентрация солей в подземных водах способствует сохранению в них уникальных галофильных бактерий. Проведенные ранее микробиологические исследования выявили присутствие в сероводородных подземных водах источника Усть-Качка (Пермский край) и содово-соленых озерах Забайкалья и Монголии сульфатредуцирующих, галоалкалофильных бактерий рода *Desulfovibrio sp.*, *Desulfomicrobium sp.*, *Halanaerobium hydrogeniformans*, а также микроорганизмов-гидролитиков, участвующих в разложении органического вещества [2–4]. Исследование микробных сообществ из экстремальных мест обитания представляет большой интерес, так как значительно расширяет представление о распространении, структуре, численности различных функциональных групп и разнообразии галофильных бактерий. Несмотря на многолетние наблюдения за температурой и химическим составом подземных рассолов проявления Речица [5–6], сведения о населяющих их микроорганизмах отсутствуют.

В связи с ограниченной информацией целью работы было изучить распространение, структуру и динамику численности различных эколого-трофических групп бактерий, принимающих участие в биогеохимических циклах в холодных подземных рассолах проявления Речица.

#### Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлись холодные подземные воды рассолов проявления Речица, расположенные в восточной части Уссурийского залива, на побережье бухты Суходол, в пределах Партизанской впадины Южно-Приморского прогиба (рис. 1). Пробы минеральных вод отбирали, соблюдая условия стерильности из самоизливающейся скважины № 2ПР в стеклянные бутылки объемом 200 мл в трех повторностях. Отбор проб воды осуществляли в разное время года (июль 2012 г., май 2013 г., июль 2013 г., сентябрь 2013 г.). Пробы воды до лаборатории хранили в холодильнике не более суток. Нестабильные показатели химического состава (рН, температура) измерялись непосредственно на месте.



Рис. 1. Карта-схема расположения скважины подземных высокоминерализованных вод проявления Речица, Приморский край

Для выявления и культивирования бактерий использовали традиционные методы практической микробиологии [7]. Численность различных физиологических групп бактерий определяли методом предельных разведений. Учет численности вели по методу наиболее вероятных чисел (по Мак-Креди). Количество различных физиологических групп бактерий определяли на специально подобранных селективных средах [8] с добавлением в качестве основы подземных вод. Численность бактерий-азотфиксаторов учитывали на среде Эшби, аммонификаторов – определяли на среде Зенгена, количество бактерий, осуществляющих автотрофную нитрификацию, определяли на средах Сориано и Уокера (аммоний-окисляющие) и Уотсона и Менделя (нитрит-окисляющие бактерии), гетеротрофных нитрификаторов выделяли на среде следующего состава (г/л): сухой питательный бульон – 3,5;  $(\text{NH}_2)\text{SO}_4$  – 0,5; вода дистиллированная – 1 л. Численность денитрифицирующих бактерий учитывали на среде Гильтая, тионовых и сульфатредуцирующих бактерий на средах Бейринка и Постгейта С с лактатом натрия, гетеротрофных железо и марганец окисляющих микроорганизмов определяли по Krumbein, 1971, количество автотрофных железоокисляющих бактерий учитывали на среде Летена, гетеротрофных железо и марганец восстанавливающих бактерий определяли на среде Бромфильда с добавкой в качестве источников окисленных форм железа и марганца  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ,  $\text{MnO}_2$  [8]. Численность сапрофитных гетеротрофных бактерий учитывали на питательной среде МПА. Микроорганизмы выращивали в термостате при температуре 25 °С.

Морфологию, размеры, подвижность, спорообразование выделенных чистых культур бактериальных клеток исследовали с использованием светового микроскопа AxioStar plus (Carl Zeiss, Германия), оснащенного фотодокументирующей системой Axiovision и фазово-контрастной приставкой (x1000). Тип клеточной стенки бактерий определяли по Граму [9]. Также оценивали способность выделенных чистых культур бактерий к росту при различных значениях температуры, pH и содержании NaCl. Для этого питательные твердые среды МПА с различным pH (5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0) и содержанием NaCl (1%; 3%; 6%; 8%; 10%; 15%; 20%; 25%) засеивали штрихом выделенные культуры и инкубировали в термостате при температуре 25 °С в течение трех дней. Оптимальные температуры

роста штаммов выявляли путем посева выделенных культур штрихом на МПА с последующим инкубированием при температурах 4 °С; 20 °С; 25 °С; 35 °С; 42 °С; 50 °С. В зависимости от наличия и интенсивности роста микроорганизмов делали вывод о диапазоне роста бактерий. Идентификацию микроорганизмов до рода проводили согласно определителю бактерий Берджи [10].

#### Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования химического состава, проведенного ранее, показали, что воды рассолов являются холодными (10,3–12,1 °С), нейтральными (6,74–7,63), по величине общей минерализации относятся к высокоминерализованным водам (50,4 г/л). Подземные рассолы имеют хлоридный натриево-кальциевый состав. Характерной особенностью прибрежных рассолов проявления Речица являются повышенные концентрации Ca (10,4 г/л), Mg (1,9 г/л) и  $\text{SO}_4$ -иона (2,9 г/л). Воды рассолов значительно обогащены стронцием (171,5–206,8 мг/л), марганцем (4,93–5,37 мг/л) и железом (0,95–1,35 мг/л) [6–7].

Результаты микробиологических исследований показали, что в подземных рассолах проявления Речица во все периоды наблюдений отмечен небольшой состав эколого-трофических групп бактерий (4–5 из 13) и их низкая численность, которая варьировала в среднем от  $0,8 \times 10^2$  до  $2,6 \times 10^2$  кл/мл (таблица). Подобные низкие количества микроорганизмов различных физиологических групп были отмечены нами ранее в различных геохимических типах подземных вод Дальнего Востока России [11–12]. Вероятно, высокая соленость и низкая температура подземных вод способствовала выживаемости в них наиболее устойчивых к экстремальным условиям среды микроорганизмов. В структуре микробных сообществ во все сезоны исследования преобладали тионовые и сапрофитные бактерии, а также в летний период сульфатредуцирующие микроорганизмы, которые принимали участие в биогеохимических циклах углерода и серы. Численность хемолитотрофных тионовых бактерий была высока в течение всего периода исследований и изменялась от  $7,4 \times 10^2$  до  $3,6 \times 10^3$  кл/мл, что указывает на происходящие в подземных водах процессы окисления восстановленных соединений серы с участием микроорганизмов. Количество сульфатредуцирующих бактерий, осуществляющих восстановление сульфатов до сероводорода, было невысо-

ко и достигало наиболее высоких значений в летний период (таблица), что, возможно, связано с низким количеством органического углерода, необходимым для развития этим микроорганизмам [13]. Численность сапрофитных бактерий в рассолах отличалась при добавлении различных концентраций соли и варьировала от 0 до  $7,8 \times 10^2$  кл/мл, и была выше в средах с добавлением 10% NaCl в течение всего периода исследований (таблица), что, вероятно, связано с адаптацией бактерий к определенной концентрации солей в подземных водах. При добавлении 20% NaCl в среды, роста сапрофитных бактерий отмечено не было, что позволяет отнести выделенные микроорганизмы к умеренным галофилам, т.е. организмам, которые развиваются в средах с содержанием NaCl 5–15% [14]. Довольно высокая численность сапрофитных бактерий, отмеченная в рассолах, свидетельствует о происходящих в водах процессах окисления органических веществ с участием микроорганизмов, что может оказывать влияние на газовый состав вод. Сапрофитные бактерии, выделенные из рассолов на среде МПА формировали колонии четырех основных типов: 1 – мелкие,

плоские, светло-серые колонии диаметром 2–4 мм (рис. 2, а), 2 – плоские, матовые колонии молочного цвета диаметром 4–6 мм, 3 – светло-бежевые выпуклые, блестящие колонии с ровными краями, диаметром 3–4 мм, 4 – оранжевые плоские и выпуклые колонии диаметром 2–9 мм (рис. 2, б). Известно, что многие галофильные бактерии имеют желтую, оранжевую или пурпурную окраску. Это объясняется высоким содержанием в их тканях каротиноидов, которые защищают бактерии от повреждающего действия УФ-излучения [14]. Микроскопирование колоний показало, что выделенные бактерии были в основном представлены грамположительными крупными длинными палочками V-образной конфигурации 2,8–5,2 мкм в длину (рис. 3, а), мелкими грамположительными палочками 0,4–2,1 мкм в длину (рис. 3, б) и грамположительными достаточно крупными палочками 1,5–2,5 мкм в длину (рис. 3, в). Идентификация выделенных штаммов сапрофитных бактерий показала, что среди изолятов значительно доминировали грамположительные палочковидные бактерии рода *Microbacterium sp.*, *Halobacterium sp.* и *Bacillus sp.*

Численность различных физиологических групп бактерий в подземных рассолах проявления Речица (скважина № 2 ПР)

Функциональные группы бактерий: (кл/мл)	Даты отбора проб воды:			
	07.2012	05.2013	07.2013	09.2013
Цикл углерода:				
Сапрофитные бактерии + 0% NaCl	0	0	0	0
Сапрофитные бактерии + 1% NaCl	0	$1,0 \times 10^2$	0	0
Сапрофитные бактерии + 3% NaCl	$1,0 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	0
Сапрофитные бактерии + 5% NaCl	$2,3 \times 10^2$	$3,4 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$
Сапрофитные бактерии + 10% NaCl	$5,6 \times 10^2$	$6,3 \times 10^2$	$7,8 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$
Сапрофитные бактерии + 20% NaCl	0	0	0	0
Цикл азота:				
Азотфиксирующие	0	0	0	0
Аммонификаторы	0	0	0	0
Автотрофные нитрификаторы	0	$0,2 \times 10^2$	0	0
Гетеротрофные нитрификаторы	0	$1,2 \times 10^2$	0	0
Денитрифицирующие	0	$0,5 \times 10^2$	0	0
Цикл серы:				
Тионовые	$2,5 \times 10^3$	$8,3 \times 10^2$	$3,2 \times 10^3$	$7,4 \times 10^2$
Сульфатредуцирующие	$1,2 \times 10^2$	0	$0,7 \times 10^2$	0
Цикл железа, марганца:				
Железоокисляющие автотрофы	0	0	0	0
Железоокисляющие гетеротрофы	0	0	$0,1 \times 10^2$	$0,3 \times 10^2$
Железовосстанавливающие	0	0	0	0
Марганцеокисляющие гетеротрофы	$0,3 \times 10^2$	0	0	$0,5 \times 10^2$
Марганцевосстанавливающие	$0,5 \times 10^2$	0	$1,2 \times 10^2$	0
Средняя численность бактерий	$1,9 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$	$2,6 \times 10^2$	$0,8 \times 10^2$

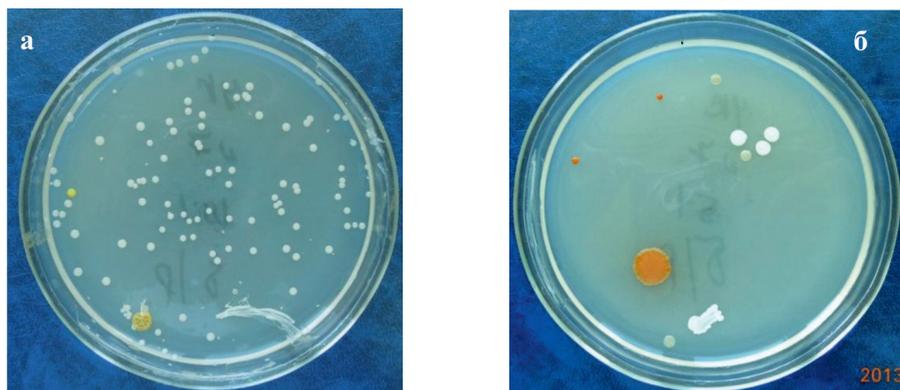


Рис. 2. Типы колоний сапрофитных бактерий, выделенных из рассолов проявления Речица в 2012–2013 гг.

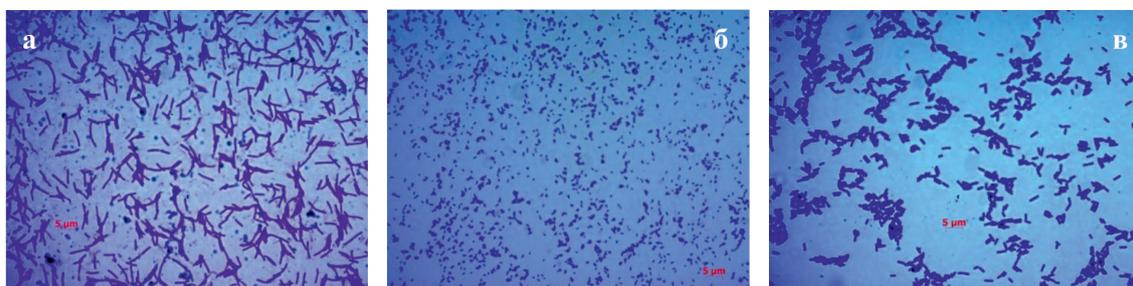


Рис. 3. Морфология выделенных сапрофитных бактерий из подземных рассолов проявления Речица

Также в рассолах были отмечены в небольшом количестве бактерии, осуществляющие гетеротрофную, автотрофную нитрификацию и денитрификацию (только в весенний период) и окисление железа и марганца (таблица), что свидетельствует об участии микроорганизмов в биогеохимических циклах N, Fe и Mn в подземных водах. В цикле железа и марганца преобладали гетеротрофные марганцевосстанавливающие бактерии ( $0-1,2 \times 10^2$  кл/мл), которые обладали способностью восстанавливать четырехвалентный марганец до двухвалентного.

На выходе подземных рассолов из скважины наблюдалось формирование микробных сообществ, основу в которых составляли зеленые микроводоросли (рис. 4), также были распространены диатомовые водоросли и различные физиологические группы бактерий с преобладанием гетеротрофных сапрофитных микроорганизмов.

Также у выделенных штаммов сапрофитных бактерий были изучены особенности физиологии роста. Исследования показали, что температурные пределы роста тестируемых изолятов составили  $4,0-35^\circ\text{C}$ , с оптимумом в  $25^\circ\text{C}$ , что позволяет отнести

выделенные бактерии к мезофильным формам. Оптимум солености для выделенных штаммов составил 8–10%, верхний предел роста отмечался при концентрации NaCl в среде 15%. pH диапазон роста у выделенных изолятов составил 5,0–9,0 с оптимумом 6,0–7,0, что позволяет отнести выделенные бактерии к нейтрофильным формам.

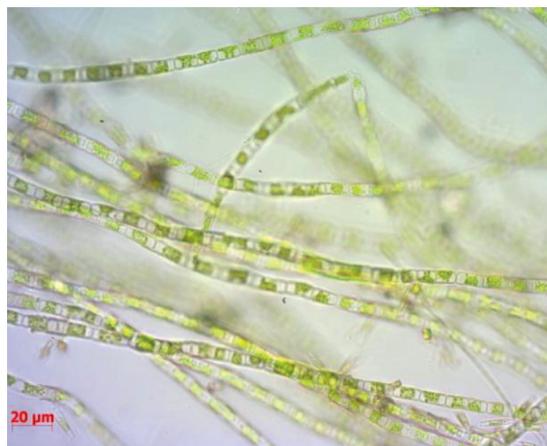


Рис. 4. Зеленые микроводоросли, формирующие основу микробного мата в подземных рассолах проявления Речица

### Заключение

Проведенные исследования показали, что экстремальные условия подземных рассолов (такие как низкая температура, высокая минерализация и соленость вод, низкие концентрации органического вещества) оказывают влияние на распространение, структуру и количество различных эколого-трофических групп бактерий, что выражается в небольшом составе функциональных групп микроорганизмов и их низкой численности, снижении биоразнообразия бактерий. В структуре микробных сообществ доминировали тионовые и сапрофитные бактерии, что указывает на происходящие в подземных водах процессы окисления органических веществ и восстановленных соединений серы с участием микроорганизмов. Выделенные изоляты сапрофитных бактерий проявляли рост в широком диапазоне температур, рН, концентраций NaCl, что позволяет использовать эти микроорганизмы в биотехнологии с целью биодegradации органических загрязняющих веществ, а также как источники холодоактивных ферментов в промышленности.

*Работа выполнена при поддержке гранта ДВО № 18-5-089.*

### Список литературы / References

1. Чудаев О.В., Харитоновна Н.А., Челноков Г.А., Брагин И.В. Гидроминеральные ресурсы Приморского края // Вестник ДВО РАН. 2016. № 5. С. 11–20.

Chudaev O.V., Kharitonova N.A., Chelnokov G.A., Bragin I.V. Water and mineral resources of Primorsky Krai // Vestnik DVO RAN. 2016. № 5. P. 11–20 (in Russian).

2. Pimenov N.V., Veslopolova E.F., Kuranov G.V., Koryukina I.P., Maslov Y.N., Bryukhanov A.L. The sulfate-reducing bacterial community of sulfide-rich water of the Ust-Kacka resort spring, Perm Krai, Russia. *Microbiology*. 2012. Vol. 81. No. 6. P. 721–726. DOI: 10.1134/s0026261712060112.

3. Абидуева Е.Ю., Чжао Жи, Суворова В.А., Самбуева Т.Б. Эколого-микробиологическая характеристика некоторых минеральных озер Забайкалья и Монголии // Вестник Бурятского государственного университета. 2013. № 3. С. 30–32.

Abidueva E.Y., Chzhao Zhi, Suvorova V.A., Sambueva T.B. The ecological and microbiological characteristic of some mineral lakes of Transbaikia and Mongolia // Bulletin of the Buryat State University. 2013. № 3. P. 30–32 (in Russian).

4. Zakharyuk A.G., Kozyreva L.P., Namsaraev B.B. Abundance and activity of the bacteria-destructors of organic matter in saline and soda lake Khilganta (South transbaikalia) in the

pH-salinity gradient. *Contemporary problems of ecology*. 2010. Vol. 3. No. 4. P. 463–468. DOI:10.1134/S1995425510040107.

5. Чудаева В.А., Чудаев О.В., Челноков А.Н., Edmunds W.M., Shand P. Минеральные воды Приморья (химический аспект). Владивосток: Дальнаука, 1999. 156 с.

Chudaeva V.A., Chudaev O.V., Chelnokov A.N., Edmunds W.M., Shand P. Mineral waters of Primorye (chemical aspect). Vladivostok: Dal'nauka, 1999. 156 p. (in Russian).

6. Челноков Г.А., Харитоновна Н.А., Васильева М.К. Геохимия и генезис подземных рассолов северо-восточной части Уссурийского залива (Приморский край) // Геоэкология. Инженерная геология. Гидрогеология. Геокриология. 2012. № 4. С. 310–319.

Chelnokov G.A., Kharitonova N.A., Vasilieva M.K. Geochemistry and genesis of underground brines of the north-eastern part of the Ussuri Bay (Primorsky Territory) // *Geocology. Engineering geology. Hydrogeology. Geocryology*. 2012. № 4. P. 310–319 (in Russian).

7. Лысак В.В., Желдакова Р.А., Фомина О.В. Микробиология, практикум. Минск: БГУ, 2015. 115 с.

Lysak V.V., Zheldakova R.A., Fomina O.V. *Microbiology, practical*. Minsk: BGU, 2015. 115 p. (in Russian).

8. Кузнецов С.И., Дубинина Г.А. Методы изучения водных микроорганизмов. М.: Наука, 1989. 228 с.

Kuznetsov S.I., Dubinina G.A. *Methods for studying aquatic microorganisms*. M.: Nauka, 1989. 228 p. (in Russian).

9. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / Под ред. Егорова Н.С. М.: МГУ, 1995. 224 с.

Guide to practical classes in microbiology / Ed. Egorov N.S. M.: MGU, 1995. 224 p. (in Russian).

10. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Хоулта Д., Крига Н., Снита П., Стейли Д., Уилльямса С. в 2 т. М.: Мир, 1997. Т. 1. 432 с.

The determinant of bacteria Bergey / Ed. Houlton D., Krig N., Snit P., Stali D., Williams S. in 2 vol. M.: Mir, 1997. V. 1. 432 p. (in Russian).

11. Калитина Е.Г., Харитоновна Н.А., Вах Е.А. Микроорганизмы различных функциональных групп в месторождении Малкинских холодных углекислых минеральных вод (Камчатка, Россия) // Международный научно-исследовательский журнал. 2017. № 12–4. С. 26–29. DOI: 10.23670/IRJ.2017.66.013.

Kalitina E.G., Kharitonova N.A., Vakh E.A. Microorganisms of various functional groups in the Malkinsky cold carbonated mineral water field (Kamchatka, Russia) // *International Scientific Research Journal*. 2017. № 12–4. P. 26–29 (in Russian).

12. Kalitina E.G., Kharitonova N.A., Kuzmina T.V., Chelnokov G.A. Microorganisms in the deposits of cold carbon mineral waters of the Russian Far East and their habitats. IOP Conference series: Earth and environmental science. 2018. P. 012033. DOI: 10.1088/1755-1315/115/1/012033.

13. Korneeva V.A., Tourova T.P., Bryukhanov A.L., Pimenov N.V., Krek A.V. Sulfate-reducing bacterial communities in the water column of the Gdansk deep (Baltic sea). *Microbiology*. 2015. vol. 84. no. 2. P. 268–277. DOI: 10.1134/S002626171502006X.

14. Шеховцева Н.В. Экология водных микроорганизмов. Ярославль: ЯрГУ, 2008. 132 с.

Shekhovtseva N.V. *Ecology of aquatic microorganisms*. Yaroslavl: YarGU, 2008. 132 p. (in Russian).