

РАСПРОСТРАНЕНИЕ БАКТЕРИЙ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОЛОГО-ТРОФИЧЕСКИХ ГРУПП В ПОДЗЕМНЫХ ТЕРМАЛЬНЫХ ВОДАХ КУЛЬДУРСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ (ДАЛЬНИЙ ВОСТОК РОССИИ)

Калитина Е.Г.¹, Харитоновна Н.А.², Вах Е.А.³

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

²ФГБОУ ВБ «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, e-mail: tchenat@mail.ru;

³ФГБОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», Владивосток, e-mail: adasea@mail.ru

Проведено исследование распространения и численности различных эколого-трофических групп бактерий в подземных водах месторождения Кульдур. Установлено неравномерное распределение функциональных групп бактерий в разных скважинах и их низкая численность. Наименьший состав эколого-трофических групп бактерий и их минимальное количество отмечено в скважинах подземных вод № 1-87, 2-87, что определялось более высокой температурой вод (72 °С). В подземных термальных водах скважин № 1-87 и 2-87 преимущественно развивались тионовые бактерии. Воды скважин № 3-87, 3-51 и 5-51 характеризовались развитием наибольшего количества групп микроорганизмов, среди которых преобладали тионовые бактерии и микроорганизмы геохимического цикла железа и марганца. В поверхностных водах реки Кульдур доминировали гетеротрофные марганецоксилирующие бактерии, а также микроорганизмы цикла азота и углерода.

Ключевые слова: подземные воды, микроорганизмы, геохимические циклы, Кульдур, скважины, численность, эколого-трофические группы.

DISTRIBUTION OF VARIOUS ECOLOGO-TROPHIC GROUPS OF BACTERIA IN THE UNDERGROUND THERMAL WATERS OF THE KULDUR FIELD (FAR EAST RUSSIA)

Kalitina E.G.¹, Charitonova N.A.², Vach E.A.³

¹Far East geological Institute, FEB RAS, Vladivostok, e-mail: microbiol@mail.ru

²Moscow state University named after M. V. Lomonosov, Moscow, e-mail: tchenat@mail.ru;

³Far Eastern Federal University, Vladivostok, e-mail: adasea@mail.ru

Distribution and abundance of various ecological-trophic groups of bacteria in the underground waters of the Kuldur deposit were investigated. The results of the study showed an uneven distribution of the functional groups of bacteria in different wells and their low numbers. The lowest composition of ecological-trophic groups of bacteria and their minimum quantity was noted in groundwater wells No. 1-87, 2-87, which was determined by a higher water temperature (72 °C). In the underground thermal waters of wells No. 1-87 and 2-87, thionic bacteria predominantly developed. The waters of wells No. 3-87, 3-51 and 5-51 were characterized by the development of the largest number of groups of microorganisms, among which thionic bacteria and microorganisms of the geochemical cycle of iron and manganese predominated. The surface waters of the Kuldur river were dominated by heterotrophic manganese-oxidizing bacteria, as well as microorganisms of the nitrogen and carbon cycle.

Keywords: groundwater, microorganisms, geochemical cycles, Kuldur, wells, number, ecological and trophic groups.

Кульдурское месторождение термальных вод располагается во внутриконтинентальной части юга Дальнего Востока, в районе поселка Кульдур Еврейской автономной области. Кульдурские источники выходят в центральной части Пионерского гранитного массива и приурочены к зоне Меридионального разлома на участке пересечения с оперяющим его нарушением северо-восточного направления. Кульдурское месторождение термальных вод является наиболее высокодебитным и высокотемпературным среди термальных полей внутриконтинентальной части юга Дальнего Востока [1]. Кульдурские термы представляют собой типичные напорные трещильно-жильные воды, поднимающиеся

с глубин порядка 2-3 км. Их формирование происходит за счет инфильтрационных вод атмосферного происхождения, а нагревание обусловлено эффектом нормального геотермического градиента [2]. Благодаря хорошим бальнеологическим свойствам термальные воды используются для лечения населения в санаториях «Кульдур», «Военный», «Санус» и «Горняк», расположенных в этом районе. Несмотря на многолетние режимные наблюдения за температурой и химическим составом термальных вод, сведения о населяющих их микроорганизмах очень ограничены и практически отсутствуют. В литературе отмечена только одна работа, в которой методом измерения оптической плотности показана активность микробценозов по отношению к некоторым органическим веществам и выявлен всего 1 морфотип колоний бактерий [3].

Цель исследования

В связи с ограниченной информацией целью работы было изучить распространение, численность и состав различных эколого-трофических групп бактерий в Кульдурских термальных источниках.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлись термальные подземные воды Кульдурского месторождения: скважина № 1-87 (72 °С, рН=9,11), № 2-87 (72 °С, рН=9,13), № 3-87 (61 °С, рН=9,07), № 3-51 (60 °С, рН=9,24), № 5-51 (28 °С, рН=9,53), а также р. Кульдур (10,7 °С, рН=7,6). Пробы термальных и холодных вод отбирали, соблюдая условия стерильности, в августе 2014 года в стерильные стеклянные флаконы объемом 1000 мл, в трех повторностях. Пробы воды до лаборатории хранили в холодильнике не более суток. Для выявления и культивирования различных групп бактерий использовали традиционные методы практической микробиологии [4]. Численность различных эколого-трофических групп бактерий определяли методом предельных разведений и методом Коха [5]. Количество различных эколого-трофических групп бактерий определяли на специально подобранных селективных средах [6-8]. Микроорганизмы выращивали в термостате при температуре 60 °С (подземные воды) и 25 °С (р. Кульдур).

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследований химического состава, проведенных ранее, показали, что воды Кульдурского термального поля являются щелочными фторидно-хлоридно-кремниевыми гидрокарбонатными натриевыми, слабоминерализованными. Растворенная газовая составляющая терм представлена азотом (до 99%), в незначительном количестве метаном (0,8%), кислородом (0,5%) и аргоном (0,16%). Содержание общего углерода органического имеет невысокие значения и колеблется в пределах 0,3-3,7 мг/л, причем минимальные его значения наблюдаются в воде из центральных скважин (1-87, 2-87), а максимальные – в воде

из скважины 3-51 [1; 9]. Результаты микробиологических исследований показали, что бактерии различных эколого-трофических групп были неравномерно распределены в подземных водах разных скважин, при этом они характеризовались достаточно низкой численностью, которая составляла от 0 до $2,5 \times 10^3$ кл/мл (тионовые бактерии, 60 °С, скв. № 3-87) (таблица). Наиболее бедный состав эколого-трофических групп бактерий и низкое их количество отмечено в воде центральных скважин № 1-87 и 2-87, что совпадало с минимальными значениями общего органического углерода в этих водах [1]. При температуре культивирования 60 °С в термальных водах скважин № 1-87 и 2-87 развивались только тионовые ($0,9 \times 10^2$ кл/мл - 1-87, $4,5 \times 10^2$ кл/мл - 2-87), нитритоксилирующие ($0,2 \times 10^2$ кл/мл - 2-87) и железовосстанавливающие бактерии ($0,2 \times 10^2$ кл/мл - 2-87), остальные группы микроорганизмов не проявляли роста, что, возможно, связано с проточным режимом, а также высокой температурой термальных вод (72 °С), в которой способны выживать не все микроорганизмы. При температуре культивирования 25 °С из скважин № 1-87, 2-87 были выделены только колониеобразующие формы сапрофитных и олиготрофных бактерий, численность которых была не высока (таблица). Сапрофитные бактерии, выделенные из скважины № 1-87, на среде УК формировали яркие оранжевые колонии двух типов: 1 - выпуклая, гладкая, с блеском с полупрозрачными ровными краями, диаметром 3-4 мм, 2 – плоская, шершавая, с выпуклой точкой в центре, диаметром 1-2 мм (рис. 1а). Сапрофиты из скважины № 2-87 образовывали мелкие, выпуклые светло-бежевые блестящие колонии с ровными краями диаметром 1-1,5 мм (рис. 1б). Подземные воды скважин № 3-87 и 3-51 характеризовались развитием большого числа различных эколого-трофических групп микроорганизмов, что может быть связано с более низкой температурой термальных вод (60-61 °С), которая более благоприятна для жизнедеятельности бактерий, а также застойным гидрохимическим режимом термальных вод, который, вероятно, способствовал формированию специфических микробоценозов. Наибольший состав и численность физиологических групп бактерий в воде скважин № 3-87 и 3-51 отмечены при температуре культивирования 60 °С, тогда как при комнатной температуре (25 °С) рост бактерий практически отсутствовал, что позволяет отнести большинство выделенных микроорганизмов к облигатным термофилам (т.е. бактериям, которые не способны развиваться при температуре ниже 40 °С). При температуре культивирования 25 °С были выделены только сапрофитные и олиготрофные бактерии, численность которых была ниже, чем при температуре 60 °С (таблица).

Численность различных эколого-трофических групп бактерий в месторождении подземных термальных вод Кульдур

Функциональные группы микроорганизмов	Скважины термальных вод					р. Кульдур (КОЕ/мл, кл/мл)
	1-87	2-87	3-87	3-51	5-51	
	Температура культивирования бактерий, °С					
	60/25	60/25	60/25	60/25	60/25	25
<i>Микроорганизмы геохимического цикла углерода</i>						
Сапрофиты, КОЕ/50 мл	0/1,6×10 ¹	0/1,0×10 ²	1,7×10 ² /0,4×10 ¹	0,6×10 ² /0,4×10 ²	0,5×10 ¹ /3,2×10 ²	1,0×10 ³
Олиготрофы, КОЕ/50 мл	0/0,9×10 ¹	0/0	0,8×10 ² /0,2×10 ¹	1,4×10 ² /0,5×10 ²	0,2×10 ¹ /4,1×10 ²	0
<i>Микроорганизмы геохимического цикла азота</i>						
Азотфиксаторы, КОЕ/50 мл	0/0	0/0	0,5×10 ² /0	0/0	0/6,4×10 ²	4,4×10 ²
Аммонификаторы, КОЕ/50 мл	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	
Аммонийокисляющие, кл/мл	0/0	0/0	0,9×10 ¹ /0	0,2×10 ² /0	0/2,4×10 ²	2,5×10 ³
Нитритоокисляющие, кл/мл	0/0	0,2×10 ² /0	0,9×10 ¹ /0	0,4×10 ² /0	0/0,9×10 ²	0,2×10 ²
Гетеротрофные нитрификаторы, КОЕ/50 мл	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	1,2×10 ³
Денитрификаторы, кл/мл	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0,4×10 ²
<i>Микроорганизмы геохимического цикла серы</i>						
Тионовые бактерии, кл/мл	2,5×10 ² /0	4,5×10 ² /0	2,5×10 ³ /0	0,9×10 ² /0	0/1,4×10 ³	0,9×10 ¹
Сульфатредукторы, кл/мл	0/0	0/0	0/0	0,2×10 ² /0	0/0	0
<i>Микроорганизмы геохимического цикла железа и марганца</i>						
Железоокисляющие бактерии гетеротрофы, КОЕ/50 мл	0/0	0/0	1,5×10 ² /0	1,2×10 ³ /0	0/3,5×10 ²	1,0×10 ²
Железоокисляющие бактерии автотрофы, кл/мл	0/0	0/0	0,9×10 ² /0	1,4×10 ² /0	0/0	0
Железовосстанавливающие бактерии, кл/мл	0/0	0,2×10 ² /0	4,5×10 ² /0	0,9×10 ¹ /0	0/0,7×10 ²	0
Марганцеокисляющие гетеротрофы, КОЕ/50 мл	0/0	0/0	0/0	0,5×10 ² /0	0/1,8×10 ²	5,0×10 ³
Марганцевосстанавливающие бактерии гетеротрофы, КОЕ/50 мл	0/0	0/0	1,0×10 ² /0	7,5×10 ² /0	0/0,5×10 ¹	3,0×10 ²
Силикатные бактерии, КОЕ/50 мл	0/0	0/0	0,3×10 ² /0	6,5×10 ² /0	0/0	0,5×10 ²

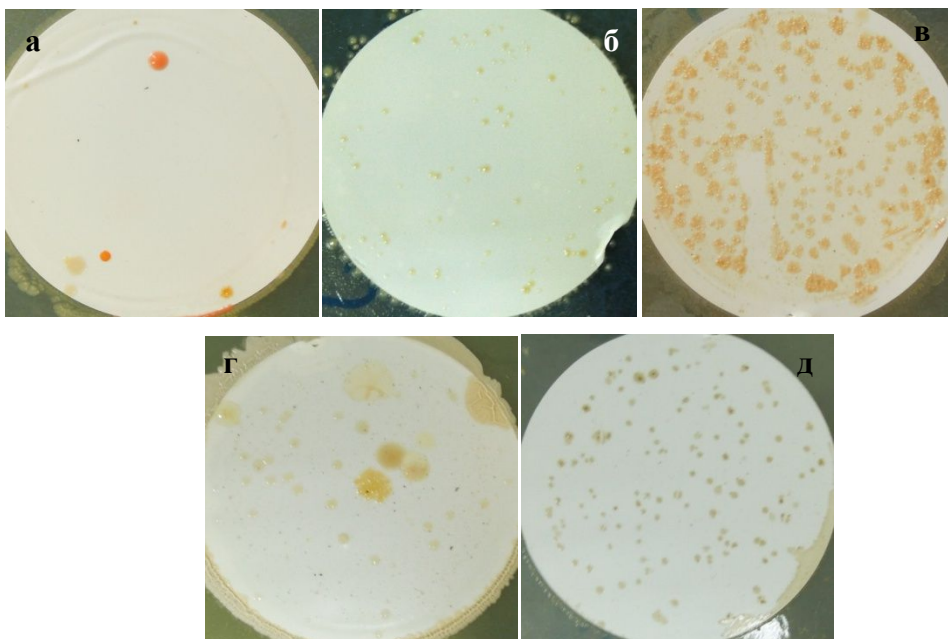


Рис. 1. Морфологические формы колоний сапрофитных бактерий, выделенных из термальных вод Кульдур, КОЕ/50 мл: а - скважина 1-87 (25 °С); б – скважина 2-87 (25 °С); в – скважина 3-87 (60 °С); г – скважина 3-51 (60 °С); д – скважина 5-51 (25 °С)

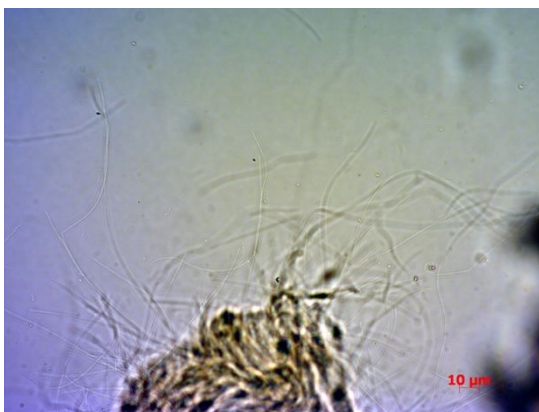


Рис. 2. Морфологические формы марганцевосстанавливающих бактерий, выделенных из скважины 3-87 термальных вод Кульдур

Присутствие сапрофитов и олиготрофов в воде скважин свидетельствует об идущих процессах деструкции органического вещества с участием бактерий. Термофильные сапрофитные микроорганизмы в воде скважин № 3-87 и 3-51 при температуре 60 °С формировали разные типы колоний (рис. 1 в, г). Распределение и количество экологотрофических групп при температуре 60 °С в воде скважин № 3-87 и 3-51 отличалось. В подземных водах скважины № 3-87 численность бактерий изменялась от 0 до $2,5 \times 10^3$ кл/мл, при этом ее минимальные значения наблюдались для микроорганизмов геохимического цикла азота, максимальные - для тионовых бактерий цикла серы (таблица). Известно, что тионовые бактерии являются хемолитоавтотрофами и способны в анаэробных условиях

окислять восстановленные соединения серы с дальнейшим образованием серной кислоты [10]. Тионовые бактерии в результате своей жизнедеятельности, вероятно, способствуют образованию сульфатов в термальных водах Кульдур. Также обнаружена довольно высокая численность микроорганизмов цикла железа и марганца, среди которых преобладали термофильные анаэробные железовосстанавливающие бактерии ($4,5 \times 10^2$ КОЕ/50 мл), гетеротрофные железooksисляющие бактерии ($1,5 \times 10^2$ КОЕ/50 мл) и марганцевосстанавливающие анаэробные микроорганизмы ($1,0 \times 10^2$ КОЕ/50 мл). Марганцевосстанавливающие микроорганизмы были способны восстанавливать четырехвалентный марганец, при этом образовывали тонкие пленкообразные колонии с оранжевым пигментом. Микроскопирование колоний показало, что бактерии представлены крупными нитевидными палочками от 31,43 мкм в длину, формирующими крупные нити до 150 мкм в длину (рис. 2). В термальных водах скважины № 3-51 при температуре культивирования 60 °С численность эколого-трофических групп бактерий варьировала от 0 до $1,2 \times 10^3$ КОЕ/50 мл, при этом их наименьшие количества выявлены для микроорганизмов цикла азота, наибольшие значения отмечены для железooksисляющих микроорганизмов (таблица). Термофильные железooksисляющие бактерии на селективной среде формировали различного размера и интенсивности окраски оранжевые плоские, блестящие колонии с прозрачной окантовкой вокруг с нечетким размытым краем, диаметром 0,1–3 мм (рис. 3а). Клетки бактерий представлены одним типом грамотрицательных палочек размером 2,3–4,5 мкм в длину. Палочки преимущественно располагаются по 2 клетки вместе (рис. 3б). Также достаточно высокой численности в воде скважины № 3-51 достигали хемолитотрофные железooksисляющие ($1,4 \times 10^2$ кл/мл), тионовые ($0,9 \times 10^2$ кл/мл), марганцевосстанавливающие ($7,5 \times 10^2$ КОЕ/50 мл), олиготрофные бактерии ($1,4 \times 10^2$ КОЕ/50 мл) и марганецooksисляющие микроорганизмы ($0,5 \times 10^2$ КОЕ/50 мл), а также силикатные бактерии ($6,5 \times 10^2$ КОЕ/50 мл). Термофильные гетеротрофные марганецooksисляющие бактерии образовывали на селективной среде плоские, блестящие колонии светло-оранжевого цвета с точкой в центре, диаметром 2–2,5 мм (рис. 3в). Микроскопия колоний показала, что бактерии были представлены грамотрицательными мелкими палочками размером 1,5–2,5 мкм в длину (рис. 3г). Палочки преимущественно группировались по 2 клетки и образовывали длинные нити, соединяясь с другими клетками в цепочку. Подземные воды скважины № 5-51 характеризовались температурой 28–29 °С. В этих условиях микроорганизмы различных эколого-трофических групп преимущественно развивались при температуре культивирования 25 °С, что указывает на преобладание мезофильных форм бактерий. Однако при температуре 60 °С развивались только сапрофитные и олиготрофные бактерии в небольшой численности, что свидетельствует о способности некоторых мезофильных бактерий к росту при повышенных

температурах. Сапрофитные бактерии при температуре 25 °С формировали на питательной среде мелкие, плоские, светло-коричневые колонии диаметром 2-4 мм (рис. 1д). Особенностью подземных вод скважины № 5-51 являлась довольно высокая численность тионовых бактерий ($1,4 \times 10^3$ кл/мл), а также микроорганизмов геохимического цикла азота и углерода, особенно азотфиксаторов и олиготрофов ($6,4 \times 10^2$ КОЕ/50 мл; $4,1 \times 10^2$ кл/мл), также были развиты гетеротрофные железо- и марганецокисляющие бактерии ($3,5 \times 10^2$; $1,8 \times 10^2$ КОЕ/50 мл) (таблица). В поверхностных водах реки Кульдур обнаружена значительно более высокая численность различных эколого-трофических групп микроорганизмов, которая составляла $0-5,0 \times 10^3$ КОЕ/мл, что может быть связано с более высоким содержанием органического углерода в реке.

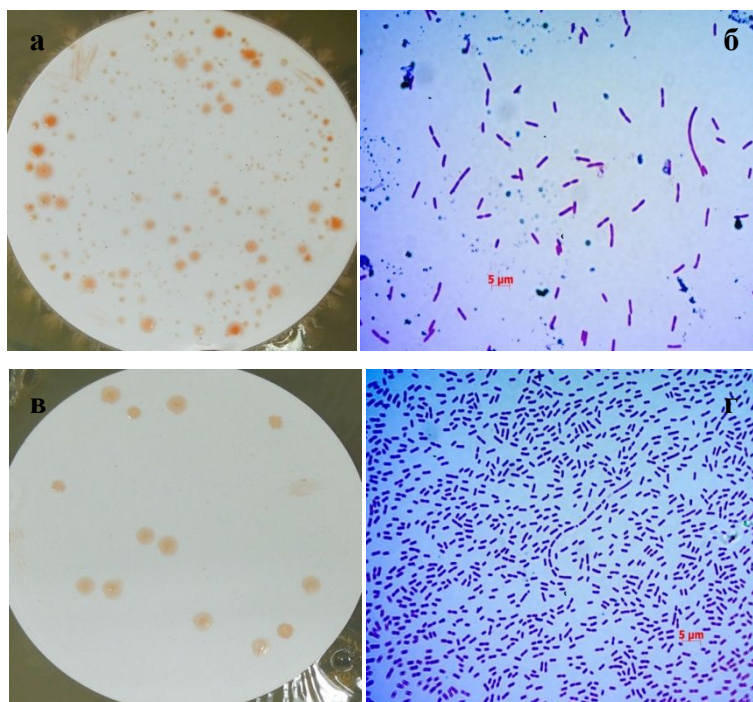


Рис. 3. Внешний вид колоний и морфология термофильных гетеротрофных железоокисляющих (а, б) и марганецокисляющих (в, г) бактерий, выделенных из скважины № 3-51 подземных термальных вод Кульдур

В водах реки были наиболее развиты гетеротрофные марганецокисляющие бактерии ($5,0 \times 10^3$ КОЕ/мл), автотрофные аммонийокисляющие ($2,5 \times 10^3$ кл/мл) и гетеротрофные нитрифицирующие микроорганизмы ($1,2 \times 10^3$ КОЕ/мл), осуществляющие окисление аммония до нитритов и нитратов, а также сапрофитные бактерии ($1,0 \times 10^3$ КОЕ/мл). Присутствие вышеперечисленных эколого-трофических групп в водах реки в достаточно высоких количествах может свидетельствовать о происходящих в поверхностных водах реки Кульдур процессах минерализации органических веществ. Только в водах реки обнаружены микроорганизмы, осуществляющие денитрификацию, т.е. восстановление нитратов до

свободного азота, численность которых была не высока и составляла $0,4 \times 10^2$ кл/мл. Олиготрофные бактерии, ассимилирующие органические соединения в условиях их низких концентраций в среде, не были обнаружены в поверхностных водах реки, возможно, в связи с ингибированием их роста более высокими количествами органического углерода.

Заключение

Таким образом, особенности химического состава, низкое содержание органики, наличие восстановительной обстановки в термальных водах Кульдур влияло на развитие разнообразных функциональных групп бактерий, что в целом создает в них специфический микробиологический пейзаж. В результате выполнения исследований были выделены накопительные и чистые культуры микроорганизмов различных функциональных групп, способных расти в щелочных условиях среды (рН 8,5-9,5) при температурах (54–72 °С). Выделенные бактериальные культуры представляют интерес для биотехнологии как активные ремедиаторы среды, устойчивые к высоким значениям температуры и рН.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-35-60098 мол_а_док.

Список литературы

1. Компаниченко В.Н. Вариации состава органического вещества в водах Кульдурского геотермального месторождения (Дальний Восток России) / В.Н. Компаниченко, В.А. Потурай // Тихоокеанская геология. – 2015. - № 4 (34). – С. 96-107.
2. Потурай В.А. Органическое вещество в подземных и поверхностных водах Кульдурского месторождения термальных вод, Дальний Восток России // Вестник КРАУНЦ. Науки о земле. – 2013. - № 1 (21). – С. 169-182.
3. Фишер Н.К., Компаниченко В.Н. Термофильные бактерии в Кульдурских горячих источниках // Территориальные исследования цели, результаты, перспективы: тезисы докл. Всерос. конф. ИКАРП ДВО РАН. – Биробиджан, 2007. – С. 156-159.
4. Лысак В.В., Желдакова Р.А., Фомина О.В. Микробиология, практикум. - Минск: БГУ, 2015. - 115 с.
5. Руководство к практическим занятиям по микробиологии / под ред. Егорова Н.С. - М.: Изд-во МГУ, 1995. - 224 с.
6. Кузнецов С.И., Дубинина Г.А. Методы изучения водных микроорганизмов. - М.: Наука, 1989. - 228 с.
7. Youchimizu M. Study of intestinal microflora of Salmonids / M. Youchimizu, T. Kimura // Fish. Pathol. - 1976. - № 10 (2). – С. 243-244.

8. Ильинский В.В. Гетеротрофные бактерии городских родников: Московский заповедник «Крылатские холмы» / В.В. Ильинский, Н.А. Шадрина, Т.И. Комарова // Водные ресурсы. – 2010. - № 4 (37). – С. 494-501.
9. Компаниченко В.Н. Особенности химического состава вод Кульдурского термального поля / В.Н. Компаниченко, В.А. Потурай, В.Л. Рапопорт // Региональные проблемы. - 2009. - № 12. - С. 20-25.
10. Bosch J. Anaerobic, nitrate-dependent oxidation of pyrite nanoparticles by *Thiobacillus denitrificans* / J. Bosch, K.-Y. Lee, G. Jordan et al. // Environmental science and technology. – 2012. - Vol. 46. - P. 2095-2101.