

Научная статья
УДК 579.26(571.52)
DOI: 10.18101/2542-0623-2023-3-49-57

ГИДРОХИМИЧЕСКАЯ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИСТОЧНИКОВ ТУВЫ

**Е. С. Кашкак, А. Б. Лопсан-Ендан, Э. В. Данилова,
У. С. Ооржак, О. П. Дагурова, Д. Д. Бархутова**

© **Кашкак Елена Сергеевна**

кандидат биологических наук,
Тувинский государственный университет
Россия, 667000, г. Кызыл, ул. Ленина, 36
klslena@yandex.ru

© **Лопсан-Ендан Анай-Кара Баз-ооловна**

старший преподаватель,
Тувинский государственный университет,
Россия, 667000, г. Кызыл, ул. Ленина, 36
anakara@mail.ru

© **Данилова Эржена Викторовна**

кандидат биологических наук,
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН
Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6
erzhena_danilova@mail.ru

© **Ооржак Урана Спартаковна**

кандидат биологических наук,
Тувинский государственный университет,
Россия, 667000, г. Кызыл, ул. Ленина, 36
oorzhakus@mail.ru

© **Дагурова Ольга Павловна**

кандидат биологических наук,
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН
Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6
dagur-ol@mail.ru

© **Бархутова Дарима Дондоковна**

кандидат биологических наук,
Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН
Россия, 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6
darima_bar@mail.ru

Аннотация. Представлены результаты изучения физико-химических параметров и микробиологической характеристики минеральных источников, расположенных на

территории Тувы. Показано, что вода исследуемых источников имела нейтральные значения pH, температура воды варьировала от 1,2 до 10 °С. В водах всех исследуемых источников преобладали в основном гидрокарбонат-, хлорид- и сульфат-ионы, а также катионы кальция и магния. Микробные сообщества в исследуемых источниках Тувы были представлены большим разнообразием продуцентов и деструкторов органического вещества. В образцах воды, ила и обрастаний исследуемых источников наблюдается достаточно высокая пептидазная активность, что указывает на высокую деструкцию органического вещества в микробном сообществе. В пробах исследуемых источников Тувы доминирующими были протеолитические и амилолитические бактерии.

Ключевые слова: катионы, анионы, микробное сообщество, деструкторы, Тува, бактерии, микробиологическая характеристика.

Благодарности

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ №23-24-10026.

Для цитирования

Гидрохимическая и микробиологическая характеристика источников Тувы / Е. С. Кашкак, А. Б. Лопсан-Ендан, Э. В. Данилова [и др.] // Природа Внутренней Азии. Nature of Inner Asia. 2023. № 3(25). С. 49–57. DOI: 10.18101/2542-0623-2023-3-49-57

Введение

Республика Тува обладает многочисленными природными водными лечебными ресурсами, которые являются уникальным полигоном для исследования микробных сообществ водных систем. На ее территории встречаются практически все типы минеральных вод: углекислые и азотные термы, углекислые и сероводородные холодные источники, соленые и кислые, радоновые и железистые [Аракчаа, Кужугет, 2013].

Разнообразие минеральных вод по химическому и газовому составу, степени минерализации и температуре, приуроченности к их участкам с различными геологическими условиями делает их весьма интересным объектом для проведения научно-исследовательских работ в различных направлениях. Минеральные воды Тувы представляют значительный интерес как для фундаментальных исследований, так и для потенциальных практических применений.

Целью данного исследования было изучение физико-химических параметров и микробиологической характеристики низкотемпературных источников Тувы.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись вода, обрастания и илы низкотемпературных источников Чурек-Доргун, Ужарлыг, Адарган и Коктей, расположенных на территории Республики Тыва (рис. 1).

Отбор проб воды, донных отложений, растительного и почвенного покровов на территориях источников Тувы проводился согласно общепринятым методикам, соответствующим нормативным документам. Анализ вод, донных отложений и почв проводился классическими и современными инструментальными методами на базе лаборатории физико-химических методов исследований Тувинского государственного университета (г. Кызыл).

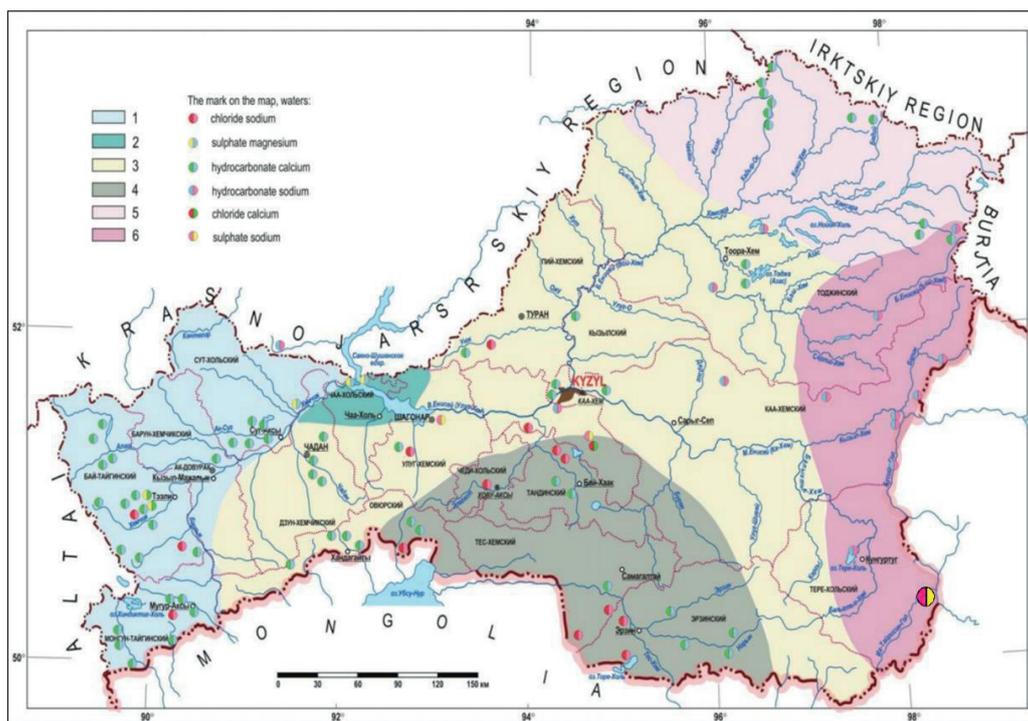


Рис. 1. Карта минеральных источников Тувы

Культивирование и выделение бактерий проводились в лаборатории микробиологии ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН» (г. Улан-Удэ). Протеазную активность на различных пара-нитроанилидных субстратах (GlpAALpNA, BAPA, GlpFpNA, LpNa и PhepNa) определяли по методу Эрлангера [Erlanger et al., 1961].

Изучение таксономического разнообразия прокариот в микробном сообществе природных вод проводилось с использованием молекулярно-генетических методов анализа. Секвенирование проводилось на секвенаторе MiSeq (Illumina, США) с применением набора реагентов v3 для парно-концевого чтения 2×300 bp в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН (г. Оренбург).

Результаты исследования и их обсуждение

Физико-химические параметры вод. Качество природных вод оценивается комплексом различных химических, физико-химических и санитарно-бактериологических показателей. Результаты исследования физико-химических показателей вод исследуемых источников Чурек-Доргун, Ужарлыг, Адарган, Коктей представлены в таблицах 1 и 2. Как видно из таблицы 1, исследуемые воды не имели запаха и вкуса. Для воды источников характерны нейтральные значения pH. Температура воды в исследуемых источниках варьировала от 1,2 до 10 °С. При определении цветности и мутности было выявлено, что воды прозрачны.

Таблица 1

Физико-химические показатели проб воды исследуемых источников

№	Название источника и местоположение	T, °C	pH	Вкус, баллы	Запах, баллы	Цветность, градусы	Мутность, ЕМФ
1	Чурек-Доргун (Каа-Хемский район)	5,6	6,8	0	0	3,0	0
2	Ужарлыг (Тес-Хемский район)	10	7,2	0	0	10	4
3	Коктей (Кызылский район)	6	6,8	0	0	5	11
4	Адарган (Овюрский район)	1,2	6,7	0	0	15	7
	ПДК	20	6–9	2	2	20	2,6

По величине общей жесткости вода исследуемых источников Чурек-Доргун, Адапган и Коктей относилась к водам средней жесткости, а источника Ужарлыг — к мягким водам (табл. 2).

Таблица 2

Макрохимический состав воды исследуемых источников

Проба	Чурек-Доргун	Коктей	Ужарлыг	Адарган	
Тип воды	гидрокарбонатно-сульфатный кальциево-магниевый	хлоридно-гидрокарбонатный, кальциево-магниевый	гидрокарбонатно-хлоридный, кальциевый	гидрокарбонатно-хлоридный, кальциевый	ПДК
°Ж, ммоль/л	6,1	3,5	1,06	4,8	7,0
Ca ²⁺ , мг/л	56,2	53,71	42,08	136,3	200
Mg ²⁺ , мг/л	29,6	36,00	7,76	42,00	100
NH ₄ ⁺ , мг/л	0,8	2,2	1,2	2,0	2,5
Na+K, ммоль/л	-	10,5	35,3	1,5	-
HCO ₃ ⁻ , мг/л	271,5	158,6	170,8	262,3	500
SO ₄ ²⁻ , мг/л	332,5	56,00	4,4	52,00	500
Cl ⁻ , мг/л	28,9	170,2	47,8	83,2	350
NO ₃ ⁻ , мг/л	2,9	7,0	6,5	11,0	45

По макрохимическому составу воды источников Ужарлыг и Адарган относились к гидрокарбонатно-хлоридному, кальциевому типу, источника Чурек-Доргун — к гидрокарбонатно-сульфатному, кальциево-магниевому, а источника Коктей — к хлоридно-гидрокарбонатному, кальциево-магниевому.

Среди катионов в воде исследуемых источников преобладали ионы кальция и магния, содержание других катионов было на порядок меньше. Вода исследуемых источников содержала до 136,3 мг/л ионов кальция и до 42,0 мг/л ионов магния. Магний, как и кальций, содержится во всех поверхностных и подземных водах. В природные воды магний поступает в основном за счет процессов химического выветривания и растворения доломитов, мергелей и других минералов.

Количество ионов аммония в исследуемых водах было незначительным и достигало 2,2 мг/дм³. Содержание гидрокарбонат-ионов варьировало от 158,6 до 271,5 мг/дм³. Концентрация сульфат-ионов достигала 332,5 мг/дм³, хлорид-ионов — 170,2 мг/дм³. Нитрат- и нитрит-ионы присутствовали в меньшем количестве.

Физико-химические показатели в водах не превышали ПДК питьевых вод, что свидетельствует о пригодности исследуемых вод для питья.

Таким образом, все исследуемые источники можно отнести к низкотемпературным водам, в которых преобладают в основном гидрокарбонат-, хлорид- и сульфат-ионы, а также ионы кальция и магния.

Исследование пептидазной активности на субстратах. Ферменты, функционирующие в экстремальных условиях, определяют метаболические процессы и специфические биологические функции микроорганизмов в местах обитания. Среди секретируемых ими внеклеточных ферментов важная роль принадлежит протеазам, принимающим активное участие в использовании микроорганизмами органических субстратов. Протеолитические ферменты (протеазы) относятся к классу гидролаз, в составе которого образуют подкласс пептид-гидролазы, которые принимают активное участие в использовании органических субстратов [Намсараев и др., 2011]. Протеазы выполняют множество сложных физиологических функций, катализируют гидролиз крупных белковых молекул до более мелких пептидов и аминокислот, которые впоследствии поглощаются клетками и используются для поддержания их жизнедеятельности. Важная роль протеолитических ферментов в метаболизме и регуляторных процессах объясняет их присутствие у всех форм живых организмов.

Для изучения внеклеточной протеолитической активности исследуемых источников были отобраны природные образцы проб ила, воды и обрастаний на исследование пептидазной активности на различных *para*-нитроанилидных субстратах (GlpAALpNA, BAPA, GlpFpNA, LpNa и PhepNa). Протеазную активность определяли по методу Эрлангера. В результате анализа во всех образцах была отмечена различная внеклеточная активность фермента по всем субстратам (табл. 3).

Наибольшая пептидазная активность по отношению к субстрату LpNa ($\geq 0,5$ ед.) наблюдалась в нативных образцах 2, 5, 7, 8 и 11, а по субстрату FpNA наибольшая активность (≤ 3 ед.) обнаружена в образцах 7 и 8.

Исследуемые образцы 3, 5 и 10 показали высокую внеклеточную активность на субтилизинподобном субстрате (GlpAALpNA), которые были равны 0,382, 0,874

и 0,384 соответственно. В образцах 5, 7, 8 и 10 также обнаружена высокая активность (более 0,6 ед.) на трипсинподобном субстрате (ВАРА). Активность больше 0,5 ед. по химотрипсинподобному субстрату в исследуемых образцах не отмечена. В образцах 1,4 и 9 отмечены более низкие значения активности на всех субстратах.

Таблица 3

Пептидазная активность в нативных образцах источников Тувы

№	Обозначение образца	GlpAALpNA	BzRpNA (ВАРА)	GlpFpNA	LpNa	FpNA
1	ЧД1 осадок	0,148	0,036	0,027	0,158	0,102
2	ЧД 2 вода	0,146	0,105	0,064	0,543	0,201
3	ЧД 2 осадок	0,382	0,063	0,031	0,161	0,101
4	ЧД 1 вода	0,257	0,127	0,067	0,345	0,263
5	Ада ил	0,874	0,646	0,073	2,281	0,654
6	УУ Т1	0,295	0,331	0,089	0,48	0,776
7	КОК 7 ил	0,119	0,689	0,603	2,168	3,159
8	КОК вода	0,204	0,767	0,821	3,215	3,133
9	Т1	0,087	0,088	0	0,185	0,034
10	Т2	0,384	0,601	0	0,281	0,225
11	АД	0,165	0,206	0,031	0,507	0,417
12	КОК	0,068	0,067	0,054	0,182	2,335

Выделение и характеристика бактерий. В исследуемых источниках доминирующими были протеолитические и амилолитические бактерии, их численность достигала 10 млн и 10 трлн клеток/мл соответственно. Количество сахаролитических бактерий варьировало от 10 до 1 трлн клеток/мл. Максимальная численность целлюлозоразлагающих бактерий достигала 10 тыс. клеток/мл.

Накопительные культуры гидролитических бактерий были представлены в основном подвижными и неподвижными палочками. Из накопительных культур при последовательном пересеве на твердые элективные среды были получены чистые культуры протеолитических и амилолитических бактерий из проб исследуемых источников.

В результате сборки полного генома удалось выяснить, что изолят UU-t1 является ближайшим гомологом денитрифицирующих бактерий *Pseudomonas baetica*, обнаруженных в печени камбалы вида *Dicologlossa cuneata* (Moreau) [López et al., 2012], а изоляты UU-t2, КОК, САМ-В являются ближайшими гомологами растительно-ассоциированной бактерии с противогрибковыми свойствами *Stenotrophomonas rhizophila*, выделенной из растений [Wolf et al., 2002]. Наиболее интересным в плане разнообразия генетических особенностей оказался изолят *Stenotrophomonas sp.* САМ В. В геноме данного изолята было обнаружено большое разнообразие протеолитических ферментов, включающее более 20 генов. Основную часть составляли ферменты класса аминопептидаз, с такими представителями,

как изоаспартиламинопептидаза (ЕС 3.4.19.5), пептидазы группы В (ЕС 3.4.11.23), Хаа-Pro (ЕС 3.4.11.9), СС_2544, дипептидил пептидазы, ациламиноацил пептидазы. Помимо протеолитической активности данный микроорганизм обладает выраженной устойчивостью к антибиотикам и токсичным соединениям. Были обнаружены гены, отвечающие за устойчивость к токсическому действию цинка, кобальта, кадмия. Также данный изолят обладает ферментом бетта-лактамазы, отвечающей за устойчивость к антибиотикам пенициллинового ряда, а также гены, отвечающие за устойчивость к фторхинолонам [Kashkak et al., 2020].

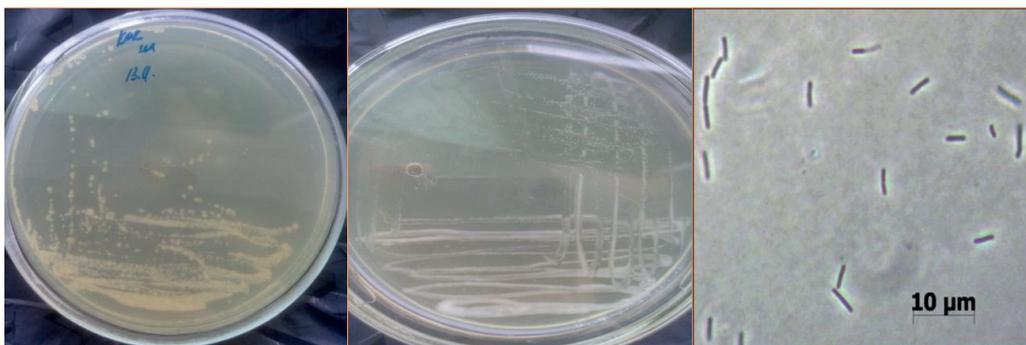


Рис. 2. Рост гидролитических бактерий на твердых средах и их морфология: а) колонии желтого цвета протеолитических бактерий из пробы ила К-1; б) колонии белого цвета амилолитических бактерий пробы ила У-У-1; в) морфология протеолитических бактерий из пробы ила К-1

Заключение

При определении экологических условий формирования и развития микробных сообществ в исследуемых источниках Тувы было выявлено, что вода источников имеет нейтральные значения рН. Все исследуемые источники можно отнести к низкотемпературным водам, в которых преобладают гидрокарбонат-, хлорид- и сульфат-ионы, а также ионы кальция и магния.

В образцах воды, ила и обрастаний исследуемых источников наблюдается достаточно высокая пептидазная активность, что указывает на высокую деструкцию органического вещества в микробном сообществе. В пробах исследуемых источников Тувы доминирующими были протеолитические и амилолитические бактерии. В результате сборки полного генома удалось выяснить, что изолят UU-t1 является ближайшим гомологом денитрифицирующих бактерий *Pseudomonas baetica*, а изоляты UU-t2, КОК, САМ-В являются ближайшими гомологами растительно-ассоциированной бактерии с противогрибковыми свойствами *Stenotrophomonas rhizophila*.

Литература

1. Аракчаа К. Д., Кужугет К. С. Природные водные лечебные ресурсы Республики Тыва: состояние и перспективы исследований // Курортная база и природные лечебно-оздоровительные местности Тувы и сопредельных регионов: опыт и перспективы использования в целях профилактики заболеваний, лечения и реабилитации больных : материалы

I Международной научно-практической конференции Республики Тыва. Кызыл : Аныяк, 2013. С. 8–15. Текст : непосредственный.

2. Геохимическая деятельность микроорганизмов гидротерм Байкальской рифтовой зоны / Б. Б. Намсараев, Д. Д. Бархутова, Э. В. Данилова [и др.]. Новосибирск : Гео, 2011. 302 с. ISBN 978-5-904682-47-4. Текст : непосредственный.

3. Кашкак Е. С. Гидрохимическая и микробиологическая характеристика источников Тывы и Бурятии // Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов экстремальных местообитаний : материалы III Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 80-летию д-ра биол. наук, проф. Б. Б. Намсараева, 100-летию Республики Бурятия, 300-летию Российской академии наук. Новосибирск, 2023. С. 58–59. Текст : непосредственный.

4. Erlanger B. F., Kokowsky N., Cohen W. The Preparation and Properties of Two New Chromogenic Substrates of Trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 1961; 95(2): 271–278.

5. Kashkak E. S., Kataev V. Y., Khlopko Yu. A. et al. Data on Draft Genome Sequence of *Stenotrophomonas* sp. SAM-B Isolated from a Mineral Cold Spring Located in Tyva, Southern Siberia. *Data in Brief.* 2020; 32: 106278. DOI: 10.1016/j.dib.2020.106278

6. López J. R., Diéguez A. L., Doce A. et al. *Pseudomonas baetica* sp. nov., a Fish Pathogen Isolated from Wedge Sole, *Dicologlossa cuneata* (Moreau). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62(4). doi:10.1099/ijs.0.030601-0

7. Wolf A., Fritze A., Berg G. *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a Novel Plant-Associated Bacterium with Antifungal Properties. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002; 52: 1937–1944. DOI:10.1099/00207713-52-6-1937

Статья поступила в редакцию 24.08.2023; одобрена после рецензирования 05.09.2023; принята к публикации 13.09.2023.

HYDROCHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF TYVA SOURCES

E. S. Kashkak, A. B. Lopsan-Endan, E. V. Danilova,
U. S. Oorzhak, O. P. Dagurova, D. D. Barkhutova

Elena S. Kashkak
Cand. Sci. (Biol.),
Tyva State University
36 Lenina St., Kyzyl 667000, Russia
klslena@yandex.ru

Anay-Kara B. Lopsan-Endan
Senior Lecturer,
Tyva State University
36 Lenina St., Kyzyl 667000, Russia
anakara@mail.ru

Erzhena V. Danilova
Cand. Sci. (Biol.),
Institute for General and Experimental Biology SB RAS

6 Sakhyanovoy St., Ulan-Ude 670047, Russia
erzhena_danilova@mail.ru

Urana S. Oorzhak
Cand. Sci. (Biol.),
Tyva State University
36 Lenina St., Kyzyl 667000, Russia
oorzhakus@mail.ru

Olga P. Dagurova
Cand. Sci. (Biol.),
Institute for General and Experimental Biology SB RAS
6 Sakhyanovoy St., Ulan-Ude 670047, Russia
dagur-ol@mail.ru

Darima D. Barkhutova
Cand. Sci. (Biol.),
Institute for General and Experimental Biology SB RAS
6 Sakhyanovoy St., Ulan-Ude 670047, Russia
darima_bar@mail.ru

Abstract. The article presents the results of studying the physicochemical parameters and microbiological characteristics of mineral springs located on the territory of Tyva. It has shown that the water of the sources of interest has neutral pH values, the water temperature vary from 1.2 to 10 °C. Hydrocarbonate, chloride and sulfate ions, as well as calcium and magnesium cations prevail in the waters of all springs under study. Microbial communities in the studied springs of Tyva are represented by a wide variety of producers and destructors of organic substance. Quite high peptidase activity has been observed in the samples of water, sludge and fouling of the springs, indicating a high destruction of organic substance in the microbial community. Proteolytic and amylolytic bacteria were dominate in the samples of the studied springs of Tyva.

Keywords: cations, anions, microbial community, destructors, Tyva, bacteria, microbiological characteristics.

Acknowledgements

The work was carried out within the framework of the Russian Science Foundation grant No. 23-24-10026.

For citation

Kashkak E. S., Lopsan-Endan A. B., Danilova E. V. et al. Hydrochemical and Microbiological Characteristics of Tyva Sources. *Nature of Inner Asia*. 2023; 3(25): 49–57 (In Russ.). DOI: 10.18101/2542-0623-2023-3-49-57

The article was submitted 24.08.2023; approved after reviewing 05.09.2023; accepted for publication 13.09.2023.