

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ВОЗДУХА ПЕЩЕРЫ ТАВРИДА

THE RESEARCH OF MICROBIOLOGICAL DIVERSITY OF THE AIR OF THE CAVE OF TAVRIDA

T. Logadyr
G. Reshetnik
T. Sataieva
A. Sidyakin
G. Samokhin
E. Krutikov
I. Andreev

Summary. For the first time in the Taurida cave, a study was made of the characteristics of microbial communities that form in the conditions of the cave. As part of the study, the total microbial number (TMC) of the air, cultural, morphological and tinctorial properties of isolated bacteria and fungi were studied. Gram-positive bacteria were identified from the colonies grown on nutrient media: rods, cocci, filamentous forms belonging to the putative genera *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*. There were single colonies of mold fungi of the genera *Aspergillum*, *Penicillium*. These microorganisms are typical for the air of the cave and rocky surfaces. In hard-to-reach places where tourists are prohibited, the maximum growth of anaerobes was revealed. The growth of bacteria of the *Escherichia coli* group was not detected on the Endo medium. Since the Taurida cave was opened in 2018, and the excursion flow is from mid-2022, the anthropogenic pressure on the microbiota is not yet felt. These studies will be continued in order to study the diversity of microorganisms, quantitative composition and species.

Keywords: Taurida cave, anaerobes, total microbial count, washings, nutrient media, research points.

Логадырь Татьяна Алексеевна

К.м.н., доцент, Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского»; ФГБОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», Симферополь
cheretaev1956@mail.ru

Решетник Галина Васильевна

К.б.н., доцент, Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского»; ФГБОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», Симферополь
reshetnikgv@gmail.com

Сатаева Татьяна Павловна

Д.м.н., профессор, Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского»; ФГБОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», Симферополь
tanzcool@mail.ru

Сидякин Андрей Иванович

К.б.н., доцент, Институт биохимических технологий, экологии и фармации ФГБОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», Симферополь
acid2302@mail

Самохин Геннадий Викторович

Старший преподаватель, Институт «Таврическая академия»; ФГБОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», Симферополь
gen-samokhin@yandex.ru

Крутиков Евгений Сергеевич

Д.м.н., профессор, Директор Института «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского»; ФГБОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», Симферополь
nephrostar@yandex.ru

Андреев Илья Игоревич

Институт «Медицинская академия имени С.И. Георгиевского»; ФГБОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», Симферополь
ilaha_gasanova@mail.ru

Аннотация. Впервые в пещере Таврида было проведено исследование особенностей сообществ микроорганизмов, формирующихся в условиях пещеры. В рамках исследования были изучены общее микробное число (ОМЧ) воздуха, культуральные, морфологические и тинкториальные свойства выделенных бактерий и грибов. Из колоний, выращенных на питательных средах, определены грамположительные бактерии: палочки, кокки, нитевидной формы, относящиеся к предполагаемым родам *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*.



Пещера Таврида была обнаружена при строительстве федеральной трассы в Белогорском районе республики Крым в 2018 г. Она расположена на северном макросклоне Крымских гор, в междуречье рек Бештерек и Фундуклы (притоки р. Зуи, бассейн р. Салгир), на абсолютной отметке 330 м над уровнем моря и представляет собой крупный горизонтальный лабиринт протяжённостью 1238 м [1,2]. Пещера залегает в эоценовых известняках. С точки зрения генезиса пещера Таврида является реликтовой гипогенной карстовой системой [3,2,4].

Пещеры представляют собой уникальные экосистемы, характерными чертами которых являются отсутствие света, незначительные колебания температуры, высокая влажность, низкое содержание питательных веществ. Они являются геологическими памятниками природы и являются объектами для геологических, инженерно-геологических и геофизических исследований. Однако в пещерах формируются сообщества флоры и фауны, которые приспосабливаются к уникальным условиям жизни. Важным компонентом таких сообществ являются микроорганизмы, к которым относятся бактерии, археи, микроскопические грибы и дрожжи [5,6]. Бактерии в пещерных экосистемах зачастую могут выполнять ключевую роль, отвечая за хемосинтез, преобразуя неорганические вещества [7,8,9,10]. Преобразование и разрушение органических веществ может происходить не только в аэробных, но и анаэробных условиях [11,12].

К изучению пещерной микрофлоры проявляется значительный интерес со стороны учёных, так как микробиология пещер до настоящего времени в полной степени не разработана. Пещера Таврида является уникальным объектом, одним из древнейших на территории Российской Федерации пещерных местонахождений, что вызывает определённый научный интерес для её изучения.

Целью нашей работы явилось изучение экологии микрофлоры пещеры Таврида.

Встречались единичные колонии плесневых грибов родов *Aspergillum*, *Penicillium*. Данные микроорганизмы характерны для воздуха пещеры и скальных поверхностей. В труднодоступных местах, где посещение туристов запрещено, выявлен максимальный рост анаэробов. Рост бактериальной группы кишечной палочки не выявлен на среде Эндо. Так как пещера Таврида открыта в 2018 году, а экскурсионный поток с середины 2022 года, антропогенная нагрузка на микробиоту еще не ощущается. Данные исследования будут продолжаться с целью изучения разнообразия микроорганизмов, количественного состава и видовой принадлежности.

Ключевые слова: пещера Таврида, анаэробы, общее микробное число, смывы, питательные среды, точка исследования.

Материалы и методы исследования

Особенностью пещеры Таврида является изолированность подземных полостей от проникновения воды и воздуха с поверхности, температура воздуха составляет 12°C, влажность достигает 96–97%, [1,2]. Туристические экскурсии в пещере были открыты в мае 2021 года.

Точки забора проб показаны на плане пещеры [рис.] и были проведены на протяжении всего туристического маршрута от входа до выхода. Для исследования было выбрано 10 точек.

В работе использовались стандартные микробиологические методы. Отбор проб воздуха в изучаемых точках пещеры Таврида проводили седиментационным методом на питательные среды МПА, MRS и Сабуро. Чашки Петри с посевами на среде MRS помещали в анаэростат (газпак).

Обследование стен пещеры проводили методом смывов с применением трафарета 100 см². В пробирках в качестве питательной среды использовали среду Сабуро и МПБ.

Все полученные посевы в течение 2 часов были доставлены в лабораторию кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Института «Медицинская академия» им. С.И. Георгиевского Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского.

Посевы на чашках Петри с МПА и Сабуро инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 48 часов, чашки Петри с MRS — в течение 4 суток, затем несколько дней при комнатной температуре для изучения наличия пигментации колоний бактерий, грибов и актиномицетов [15].

Образцы смывов со стен пещеры пересевали на следующие среды — МПА, среда Эндо, Сабуро и кровяной агар, для выявления бактерий и грибов [16].

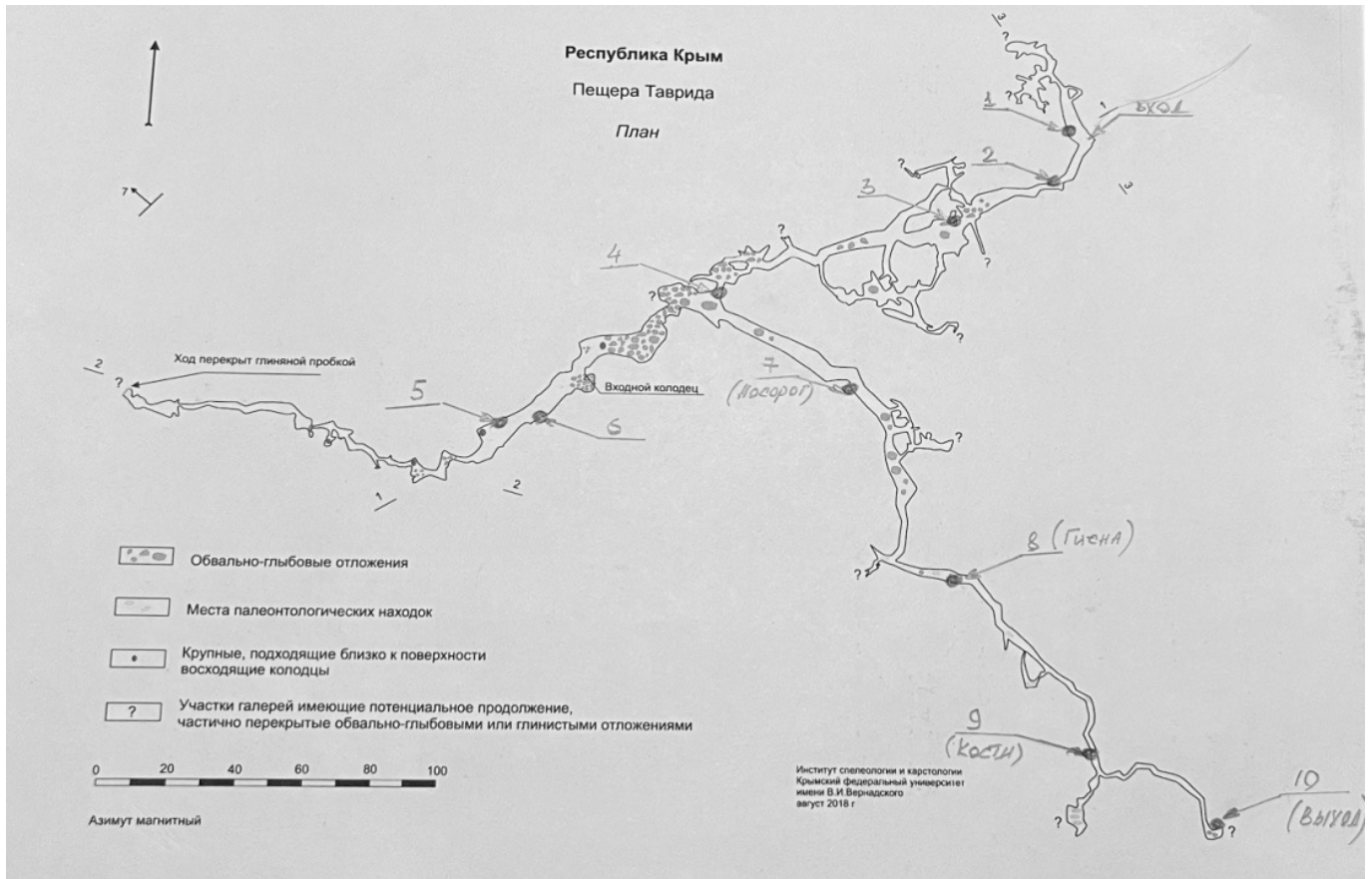


Рис. 1. План пещеры Таврида [составлен Г.В. Самохиным по данным экспедиций Крымского федерального университета, 2018 г.]

Определение общего количества микроорганизмов проводили седиментационным методом, а расчет количества микроорганизмов — по Омелянскому [17].

При описании колоний учитывали следующие признаки: профиль, форма, размер, поверхность, блеск и прозрачность, цвет, край, структура и консистенция [18]. В процессе исследования мазки выросших колоний окрашивали по Граму, которые микрофотографировали при увеличениях от $\times 400$ до $\times 1000$ на микроскопе «Микмед-5».

Результаты и обсуждение

Согласно исследованиям Хижняк [19] микрофлора пещер, особенно бактериальная, до настоящего времени в полной степени не изучена. Исследование микробиоты новой пещеры Таврида проводилось впервые. На данном этапе исследования не ставили задачу идентифицировать выделенные микроорганизмы. В процессе проведения исследовательской работы было определено общее число микроорганизмов, изучены культуральные, морфологические и тинкториальные

свойства выделенных бактерий, микроскопических грибов и актиномицетов.

По данным литературных источников микрофлора пещер не является уникальной по происхождению — это все те же микроорганизмы, обнаруживаемые на дневной поверхности, которые тем или иным способом, в то или иное время попали в пещеры и заселили их [20].

Исследуемая микрофлора пещеры Таврида представлена в незначительном количестве различными представителями бактерий и микромицетов.

Результаты общего микробного числа воздуха (по Омелянскому) исследуемых точек пещеры Таврида представлены в таблице. Учет результатов представлен с посевов плотных питательных сред.

Анализируя полученные результаты, представленные в таблице, следует заметить, что в точках 3 и 5, где исключено присутствие посетителей-туристов, установлено максимальное количество анаэробов. Для дан-

Таблица 1. Общее микробное число воздуха пещеры «Таврида»

Номер точки отбора пробы	Общее микробное число воздуха, КОЕ/м ³ (по Омелянскому)		
	МПА	Сабуро	MRS
Точка 1 — вход в пещеру	Роста нет	35 КОЕ/м ³ ,	0
Точка 2	105 КОЕ/м ³	70 КОЕ/м ³ ,	70 КОЕ/м ³ ,
Точка 3 — «Карман» не посещаемая туристами	70 КОЕ/м ³	0	140 КОЕ/м ³ ,
Точка 4 — Перекрёсток	70 КОЕ/м ³	35 КОЕ/м ³	Роста нет
Точка 5 — галерея (не посещаемая туристами)	Роста нет	0	175 КОЕ/м ³ ,
Точка 6 — Зал Вернадского	210 КОЕ/м ³	70 КОЕ/м ³ ,	105 КОЕ/м ³ ,
Точка 7 — «гиена»	350 КОЕ/м ³	70	70 КОЕ/м ³ ,
Точка 8 — «кости»	105 КОЕ/м ³	0	90 КОЕ/м ³ ,
Точка 9 — « кот»			70
Точка 10 — выход	140 КОЕ/м ³	35	0

ного местоположения характерно нециркулируемость воздуха, чем и объясняется данная осемененность. Не отмечено роста колоний на среде Эндо и кровяном агаре, что совпадает с данными [20] где они указывали, что эти бактерии не обнаруживаются в непосещаемых пещерах.

Максимальный рост колоний на МПА отмечен в месте, где находится чучело гиены. Характер разнообразия колоний и высокое КОЕ/м³ вероятно указывает на остановку посетителей пещеры возле данного экспоната.

В Крыму в пещере «Таврида» впервые на территории Европы найден почти полный череп ископаемой гигантской гиены пахикрокуты [4]. Как пояснили ученые Крымского федерального университета, раньше палеонтологи находили в Европе только фрагменты черепов и отдельные зубы этого хищника. Целый же череп ранее обнаруживали в России, в Забайкалье, и в Китае.

Зал Вернадского (точка исследования № 6) — середина пути туристического маршрута, достаточно просторная, высокая аэрация воздуха и характеризуется достаточно большим микробным числом на всех питательных средах — рост аэробов, анаэробов и микроскопических грибов, что представлено в таблице.

Максимальный рост микромицетов на среде Сабуро характерен для мест (точка 2, 6 и 7), где достаточно высокая проходимость туристов, что может быть результатом занесенной извне спор микрофлоры.

Данный анализ количественного состава микрофлоры пещеры Таврида проведен впервые. Наши данные совпадают с данными литературных источников, где от-

мечается, что в воздухе могут встречаться до 100 видов сапрофитных микроорганизмов: пигментообразующие бактерии (микрোকки, жёлтая сарцина, факультативные и строгие анаэробы и др.), спорообразующие микробы (дрожжи, плесневые грибы, актиномицеты) [17, 20].

В мазках, окрашенных по Граму, обнаружены грамположительные микроорганизмы: кокки, палочки, нитевидные формы, предположительно микроорганизмы следующих родов *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Sarcina*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Actinomyces*, *Staphylococcus*, *Anaerococcus*, *Streptomyces*.

Нами был произведен начальный визуальный осмотр стен пещеры Таврида на обнаружение колоний плесневых грибов. Видимой плесени не обнаружено.

Произведены смывы стен, затем пересеяны на плотные питательные среды. Из выращенных колоний определили микроорганизмы предполагаемых родов *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Actinomyces*, *Anaerococcus*, *Streptomyces*, *Aspergillum*, *Penicillium*. Иногда встречались колонии с розовой пигментацией, предположительно колонии рода *Citrobacter*.

Считается, что бактерии, обитающие на стенах, представляют собой наименее подверженную антропогенной трансформации часть микробиоты спелеосистем. Чаще всего микробные сообщества, представленные бактериями, актинобактериями и литотрофами, что сопоставимо с нашими данными.

Таким образом, впервые произведен общий анализ обследования микрофлоры воздуха пещеры Таврида. В пробах, отобранных в разных точках туристическо-

го маршрута пещеры, были обнаружены преимущественно грамположительные бактерии, как аэробы, так и анаэробы. Предположительно обнаруженные микроорганизмы можно отнести к родам *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Actinomycetes*, *Staphylococcus*, *Anaerococcus*, *Streptomyces*, *Sarcina*. Бациллы в основном представлены видами *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus*.

Энтеробактерии отсутствовали во всех образцах, что свидетельствует об отсутствии заметного антропогенного загрязнения пещеры. Распределение микроорганизмов в исследуемых точках пещеры неравномерное.

Помимо сапротрофной микрофлоры были обнаружены в небольшом количестве колонии плесневых грибов родов *Aspergillum*, *Penicillium*. В удаленных и труднодоступных местах количество грибов не выявлено.

При исследовании микрофлоры смывов со стен пещеры, выделены микроорганизмы предполагаемых родов *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Actinomycetes*, *Anaerococcus*, *Streptomyces*, *Aspergillum*, *Penicillium*.

В связи с увеличением туристического потока в пещере Таврида изучение микробиоты как количественного состава, так видовой принадлежности представляет большой научный интерес и будет продолжаться в дальнейшем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Амеличев Г.Н. Оценка ресурсного потенциала пещеры Таврида (Предгорный Крым) / Г.Н. Амеличев // Геополитика и экогеодинамика регионов. — 2019. — Т. 5 (15). — Вып. 2. — С. 196–213.
2. Червяцова О.Я. Минеральные отложения пещеры Таврида (Предгорный Крым) / О.Я. Червяцова и др. // Учёные записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. География. Геология. — 2019. — Т. 5 (71). — № 3. — С. 226–255.
3. Амеличев Г.Н. Обоснование заповедного статуса карстовых полостей Республики Крым на основе оценки спелеоресурсного потенциала / Г.Н. Амеличев // Вопросы географии. Сб. 147. Спелеология и карстоведение. М.: Издательский дом «Кодекс». — 2018. — С. 363–387.
4. Лопатин А.В. Затерянный мир Тавриды: древнейшая ископаемая пещерная фауна в Крыму, «Природа» / А.В. Лопатин // Природа. — 2019. — № 6. — С. 53–61. DOI: <https://doi.org/10.7868/S0032874X19060073>.
5. Хижняк С.В. Психрофильные и психротолерантные гетеротрофные микроорганизмы карстовых полостей средней Сибири / С.В. Хижняк, И.В. Таушева, А.А. Березикова, Е.В. Нестеренко, Д.Ю. Рогозин // Экология. — 2003. — № 4. — С. 261–266.
6. Семиколенных А.А. Микробные сообщества гипсовых пещер и почв карстовых ландшафтов Архангельской области / А.А. Семиколенных, А.Е. Иванова, Т.Г. Добровольская // Почвоведение. — 2004. — № 2. — С. 224–232.
7. Кузьмина Л.Ю. Микробиота пещеры Киндерлинская (Южный Урал) / Л.Ю. Кузьмина, Н.Ф. Галимзянова, Ш.Р. Абдуллин, А.С. Рябова // Микробиология. — 2012. — Т. 81. — № 2. — С. 273–281
8. Кузьмина Л.Ю. Характеристика новых хитин-деградирующих штаммов *Isocyella* spp. из Новофонской пещеры (Абхазия), продуцирующих термостабильные хитиназы / Л.Ю. Кузьмина, О.Я. Червяцова, Т.Р. Ясакова, В.Р. Сафина, Н.Ф. Галимзянова, А.И. Мелентьева, Г.Э. Актуганова // Микробиология. — 2020. — Т. 89. — № 5. — С. 566–580
9. Рябова А.С. Микромицеты в карстовых пещерах / А.С. Рябова, Л.Ю. Кузьмина, Н.Ф. Галимзянова // Экобиотех. — 2021. — Т. 4. — С. 227–233. 10. Галимзянова Н.Ф. Видовой состав микроскопических грибов, образующих видимые колонии в пещере Киндерлинская (Южный Урал) / Н.Ф. Галимзянова, А.С. Рябова, Л.Ю. Кузьмина // Экобиотех. — 2018. — Т. 1. — С. 25–32. DOI: [10.31163/2618-964X-2018-1-1-25-32](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2018-1-1-25-32).
10. Ferris, F.G. Kinetics of calcite precipitation induced by ureolytic bacteria at 10 to 20 °C in artificial groundwater / F.G. Ferris, V. Phoenix, Y. Fujita, R.W. Smith // *Geochimica et cosmochimica acta*. — 2003. — V. 67, N. 8. — P. 1701–1722.
11. Perry T.D., Duckworth O.W., McNamara C.J., Martin S.T., Mitchell R. Effects of the biologically produced polymer alginate on macroscopic and microscopic calcite dissolution rates / T.D. Perry and all. // *Environ Sci Technol*. — 2004. — 38: — 3040–6.
12. Прудников С.В. Методы микробиологического исследования наземных, водных и воздушных экосистем/ С.В. Прудникова [и др.] // Учебное пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению «Биология» — Красноярск: СФУ. — 2007. — 152 с.
13. МР 4.2.0220–20. 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Методы санитарно-бактериологического исследования микробной обсемененности объектов внешней среды. Методические рекомендации (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 04.12.2020). — М. — 2020.
14. Лавренчук, Л.С. Микробиология: практикум / Л.С. Лавренчук, А.А. Ермошин // М-во науки и высш. образования Рос. Федерации, Урал. федер. унт. — Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та. — 2019. — 107 с.
15. Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии: учеб. пособие / Под ред. Н.С. Егорова. — 3-е изд., перераб. и доп. — М.: изд. МГУ, 1995. — 224 с.
16. Хижняк, С.В. Микробные сообщества карстовых пещер Средней Сибири // Автореф. дисс. ... докт. биол. Наук: 03.00.16 / С.В. Хижняк // Краснояр. гос. аграр. ун-т. — Красноярск. — 2009. — 33 с.
17. Caumartin V. Review of the microbiology of underground environments // *Bulletin of the National Speleological Society*, 1963, v. 25, p. 1–14.

18. Cacchio, P. Biogenicity and characterization of moonmilk in Grotta Nera (Majella, National park, Abruzzi, Central Italy) / P. Cacchio, G. Ferrini, C. Ercole, M.P. Gallo, A. Lepidi // *Journal of cave and karst studies*. — 2014. — V. 76, N. 2. — P. 88–103
19. Adetutu, E.C. Bacterial community survey of sediments at Naraccorte caves, Australia / E.C. Adetutu, K. Thorpe, E. Shamsavari, S. Bourne, X. Cao, R. Fard, G. Kirby, A.S. Ball // *International journal of speleology*. — 2012. — 41 (2). — P. 137–147.

© Логадырь Татьяна Алексеевна (cheretaev1956@mail.ru), Решетник Галина Васильевна (reshetnikgv@gmail.com),
 Сатаева Татьяна Павловна (tanzcool@mail.ru), Сидякин Андрей Иванович (acid2302@mail),
 Самохин Геннадий Викторович (gen-samokhin@yandex.ru), Крутиков Евгений Сергеевич (nephrostar@yandex.ru),
 Андреев Илья Игоревич (ilaha_gasanova@mail.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Крымский Федеральный Университет им. В.И. Вернадского