

Responses of microbial complexes to freezing/thawing in the surface and groundwater interaction zone

Original Article

LIMNOLOGY
FRESHWATER
BIOLOGY

Kondratyeva L.M.*, Andreeva D.V.

Institute of Water and Ecology Problems, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Khabarovsk Federal Research Center, 56, Dikopolceva Str., Khabarovsk, 680000, Russia

ABSTRACT. This paper presents the research results of the activity of microbial communities (MCs) in relation to humic substances after cyclic freeze-thaw. Groundwater from different aquifer depths from wells at different distances from the riverbank filtration (RBF) zone and river water were used as inoculum. Cyclic freeze-thaw (CFT) was carried out in two stages: the first freezing lasted 30 days at -18°C ; then 5 cycles of freezing and thawing were carried out alternately after 7 days. Two types of thawing conditions were created: slow thawing from -18°C to $+4^{\circ}\text{C}$ and fast thawing from -18°C to $+23^{\circ}\text{C}$. Growth activity on peptone, an easily available substrate, confirmed the survival of the MCs from groundwater and river water after CFT. The maximum activity after CFT with sodium humate (HNa) at a thawing temperature of 4°C was shown by MCs from a depth of 41 m from wells 1,500 m off the bank. It was comparable to the MC activity in river water during the observation period. At a thawing temperature of 23°C , microorganisms in river and groundwater from wells close to the bank were highly active, regardless of the carbon source composition during the CFT period. The growth activity of MCs was affected by the thawing temperature of 23°C in distant wells following CFT, depending on the water sampling depth. Thus, in MCs from depths of 21 m and 41 m, the activity increased with the distribution of easy-to-access co-substrate. The thawing temperature had an impact on the change in the spectral characteristics of HNa after CFT. The distance of the wells from the bank affected the aromatic compound contribution to the composition of the HNa transformation products ($\lambda = 275 \text{ nm}$). At a temperature of 23°C , the aromatic compound values were higher in the MCs of river water and wells located in the RBF zone compared to those at 4°C . Slow thawing at 4°C had a positive effect on the transformation of humic substances by microorganisms from distant wells due to their natural adaptation potential.

Keywords: microbial communities, freezing/thawing, riverbank filtration, humic substances

For citation: Kondratyeva L.M., Andreeva D.V. Responses of microbial complexes to freezing/thawing in the surface and groundwater interaction zone // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 955-970. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-955

1. Introduction

Large-scale changes in the biosphere and cryosphere are predicted in the coming years due to global warming (Margesin and Collins, 2019). The consequences of permafrost thawing are associated with changes in the composition of surface and ground waters. Multiple studies in regions with thawing permafrost have shown that large-scale effects on terrestrial and aquatic ecosystems can be related to biogeochemical activity at the microscopic level (Zona, 2016).

Psychrophilic microorganisms are thought to be the most abundant organisms in terms of biomass and diversity: their adaptation to cold is the result of evolutionary selection and is genetically encoded in protein sequences (Struvay and Feller, 2012). The ability of microorganisms to survive at low temperatures is related to the production of cold-active enzymes that break down various organic substrates, including lactose, cellulose, lignin, starch, and lipids (Hou et al., 2017; Manyapu et al., 2022). Psychrophilic microorganisms are capable of transforming persistent organic matter (OM) in conditions of seasonal freezing and thawing in the aquatic environment. Experimental studies simulating permafrost thawing found that microbiome responses depended more on thawing temperature than on sampling and filtration location (Messan et al., 2020).

*Corresponding author.

E-mail address: kondratevalm@gmail.com (L.M. Kondratyeva)

Received: May 06, 2024; Accepted: May 27, 2024;

Available online: August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



Humic substances (HS), which participate in complex biogeochemical processes, play an important role in the research of the OM transformation dynamics in seasonal freeze/thaw conditions. Microorganisms use HS to stimulate biodegradation processes and/or reduce the bioavailability of certain metals. HS, in turn, by controlling environmental conditions, change the structure of microbial communities (MCs) and their activity (Kulikova and Perminova, 2021). The biodegradation of HS affects the general condition and functioning of the hydrosphere by determining the chemical composition of water (Young et al., 2004).

The HS composition depends on the nature of the interaction of surface and ground waters with soils, rocks, and, to a large extent, climate change (Lipczynska-Kochany, 2018). The HS reactivity in the environment is thought to depend on the set of functional groups in the structure of the macromolecules (Lee et al., 2015). A change in the ratio of ketone and auxochrome groups in the aromatic rings affects the intensity of the coloration of the aquatic solution, and the color of a solution of HS is determined by the presence of chromophore functional groups: nitrogen-containing ($-N=N-$), azomethine ($>C=N-$), carboimine ($>C=NH$), nitro- ($-NO_2$), and nitroso groups ($-NO$) (Chen et al., 2002).

Previously, on the basis of experimental studies, it was hypothesized that a significant part of HS fractions represents a dynamic system of macroaggregates differing in composition and character of subunit interactions. Macroaggregates are formed by means of hydrophobic, hydrogen, ester bonds, etc. The optical characteristics of the included HS and the reactivity of macromolecules are changed during freezing and thawing of various soils and stones (Shirshova et al., 2009). Some authors (Esparza-Soto and Westerhoff, 2003) explain such processes by hydrophobic interaction between humic substances and extracellular polymers of bacterial cells.

The interaction of microorganisms with the HS macromolecules (biosorption) is the first step preceding their fermentative digestion, hydrolysis and microbiological consumption. The ability of microorganisms to produce extracellular polymers and the presence of divalent cations such as calcium and magnesium are key factors (Goode and Allen, 2011). The further evolution of HS depends on the presence of low-molecular-weight organic acids, the hydrophobicity of biopolymers, and various elements that form with them mobile chelate complexes (Huber et al., 2011).

It is established that resistance to stress factors and adaptation potential are increased under groundwater aeration. The microbial complexes of underground hydrosphere exist in the form of complex-structured consortia (Flemming and Wuertz, 2019). The adaptive potential of microorganisms to stress factors changes when groundwater is aerated by the inflow of surface and river waters.

Hypothetically, at the biogeochemical barrier in the riverbank filtration zone of river water into the aquifer (AF), iron may act as a regulator of organic matter behavior of different genesis. In this case, the

dominant process is the reaction of dissolved iron with humic substances (Krupińska, 2017). It has been demonstrated that approximately 90% of dissolved iron is combined with HS during extreme floods in the Amur River (Yan and Guan, 2014).

Pumped water from wells located in the riverbank filtration zone (RBF) contained three groups of microorganisms: autochthonous bacteria from the aquifer and pore space, allochthonous soil microorganisms entering with surface infiltration, and microorganisms entering the edge waters with river filtrate. Braun et al. (2016) previously found that the microbial community in unexploited wells was mainly dominated by the phylum *Proteobacteria* (95%), *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* (~5%). After saturation of AF with aerated water, there was a significant reorganisation of the community structure and an increase in microbial species diversity: *Actinobacteria* (~20-50%); *Proteobacteria* ~ 30-50%; *Bacteroidetes*, *Nitrospirae*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia* et al. (~20-50%).

In our opinion, the dominance of certain microorganisms depends not only on the depth of pumped water, but also on the organic matter (OM) that comes with surface water. The composition and availability of organic matter influences the activity, behavior and succession dynamics of dominant microbial groups. For example, more than 300 different organic compounds were detected in the thawing of Greenland frozen soils using mass spectrometry method (Kramshøj et al., 2018), and these compounds could include products of microbiological transformation of OM of different genesis.

Our research aimed to determine the activity of microbial communities under cyclic freeze/thaw conditions in relation to the low-molecular-weight peptides (peptone) and humic substances (sodium humate), as well as during the interaction of ground and surface waters in the riverbank filtration zone.

2. Materials and methods

The study area is located in the central part of the Middle Amur Lowland. Its relief is quite varied, with a slight slope in the northeast direction. The Amur River channel and floodplain form an extensive and complex floodplain-channel system. The floodplain is rather heavily watered, and during floods, a significant part of it is flooded. The morphology of the river channel in this zone is characterized by intensive bank erosion. In winter, up to 60% of the total Amur River flow passes along the left bank, and in summer, when levels rise by 4-5 m, the share of flow decreases to 45%.

The Tunguska groundwater deposit (GW) is located in the interstream of the Amur and Tunguska rivers in the aquifer of Pliocene-Quaternary alluvial deposits (sands, gravels). The observation wells are located at different distances from the Amur River channel (Fig.1). A biogeochemical barrier is formed at the site where the GW interacts with river water.

The contribution of each component depends on the hydrological regime and season. During low water periods, the interaction of surface and ground waters is

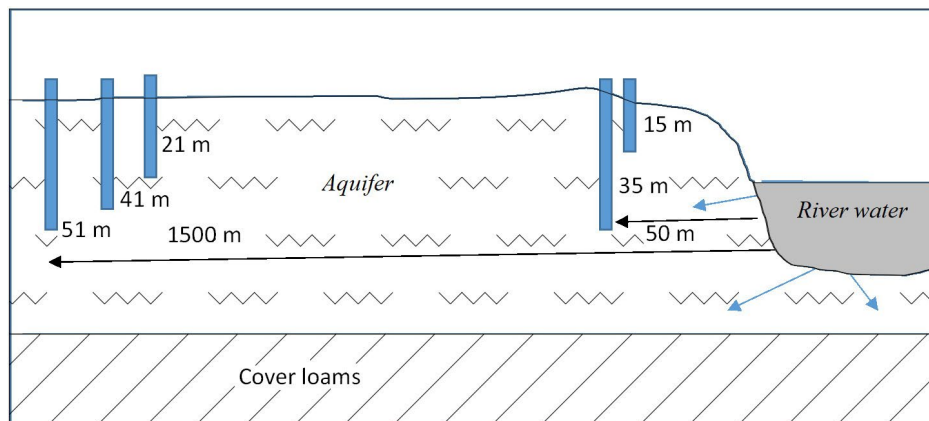


Fig.1. Location of observation wells for groundwater sampling from different depths of the aquifer and at different distances from the riverbank

multidirectional, resulting in the unloading of groundwater into the river channel. Conversely, during flood periods and catastrophic floods, there is a reverse infiltration of river water into the AF (Kulakov, 2024). The biogeochemical barrier, which is subject to seasonal freezing and thawing, is the site of a number of microbiological processes that have not been extensively studied. These processes contribute significantly to the formation of natural water quality.

The GW samples of the Tunguskoye deposit were collected in November 2023 from five wells at varying depths and distances from the left bank of the Pemzenskaya channel (Amur River). River water was sampled from a depth of 0.5 m from the surface and 50 m from the bank (Table 1).

The following carbon sources were used in the experiments: a preparation of humic substances (humic acid sodium salt, H16752, Germany), as an analogue of difficult-to-mineralize OMs; peptone (GOST 13805-76, Obolensk, series 299), which is a mixture of polypeptides, free amino acids, enzymes, and nucleic acids.

Cyclic freeze/thaw (CFT) was performed in sterile disposable 50-mL medical polymer containers with a lid (Berimed, EVROKEP LLC, Russian Federation). The containers were filled with two variants of sterile

medium (g/L): KH_2PO_4 — 1.33; K_2HPO_4 — 2.67; NH_4Cl — 1; Na_2SO_4 — 2; KNO_3 — 2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.001; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.1. The first variant contained 0.2 g/L sodium humate (HNa), while the second one was supplemented with an additional co-substrate of 0.2% low-molecular-weight peptides (peptone). Each sample was inoculated with 5 ml of natural water.

The first freeze lasted 30 days in a freezer at -18°C . Two groups of samples were then formed, differing in their thawing conditions. The first group underwent a slow thawing process at a temperature of -18°C to $+4^\circ\text{C}$, while the second one underwent a rapid thawing process at a temperature of -18°C to $+23^\circ\text{C}$. All samples were subjected to five cycles of alternating CFT after seven days. Control samples without inoculum were subjected to all stages of CFT.

The total number of culturable heterotrophic bacteria (CHB) was determined by the limiting dilution method on fish peptone agar diluted 10 times (FPA:10). Ammonifying bacteria (AFB), involved in the process of ammonification of OM, were grown on FPA (Namsaraev et al., 2006). The number of microorganisms was expressed in colony-forming units (CFU/ml).

A fluid nutrient medium on readily available carbon source (0.2% peptone) was used to assess the

Table 1. General characterization of groundwater from the monitoring wells in the riverbank filtration zone in November 2023

Water samples	Indicators								
	Distance from river bank, m	Depth, m	pH	Fe, mg/l	Mn, mg/l	NH_4 , mg/l	SAC_{254} , m^{-1}	CHB, CFU/ml	AFB, CFU/ml
GW 1-15	50	15	6.57	18.0	1.40	0.274	20.5	185.3	126.3
GW 1-35		35	6.43	23.9	1.12	0.075	12.8	135.2	97.3
GW 51-21	1500	21	6.48	26.0	6.50	0.350	7.6	52.2	45.2
GW 51-41		41	6.46	24.7	1.15	0.404	8.2	79.3	63.4
GW 51-51		51	6.43	17.3	0.59	0.412	9.7	119.6	95.2
River water		50 m from the left bank	0.5	7.34	0.70	0.073	0.168	20.8	179.0

Note: CHB - cultivable heterotrophic bacteria; AFB - ammonifying bacteria; SAC – spectral absorption coefficient organic content; CFU - colony forming units

viability and growth activity of microbial communities (MCs) in natural waters after CFT. The nature of growth on peptone at 23°C was determined using photometric method by the change in the optical density (OD) of the culture fluid using KFK-3-01 spectrophotometer at a wavelength of 600 nm. The impact of varying thawing temperatures on the characteristics of microbiological transformation of HS was assessed by examining the absorbance values at different wavelengths: change in the total OM content at $\lambda = 254$ nm; transformation of the aromatic compound of HS at $\lambda = 275$ nm (Kumar, 2006); content of the chromophoric groups at $\lambda = 465$ nm (Shirshova et al., 2015) using a SHIMADZU UV-3600 spectrophotometer.

3. Results and discussion

When analyzing the seasonal dynamics of the number of culturable heterotrophic bacteria (CHB) and ammonifying bacteria (AFB) in the river and ground waters sampled from wells located in the riverbank filtration zone (RBF), there was a general trend of increase in the number of microbial communities in the late autumn period (Table 2). The maximum CHB abundance in the AF during the observation period was recorded in November at a depth of 15.7 m and was comparable to the CHB abundance in river waters. More significant differences in CHB abundance between river and groundwater are recorded at 35.7 m depth during spring and autumn. The AFB abundance rates in ground waters were significantly lower than in river water, especially in the deeper AF layers where less OM was supplied as a result of vertical and horizontal filtration.

The total number of microorganisms in the lower AF layers can be supported by autochthonous OMs, which are formed as a result of microbiological processes during the interaction of water with rock formations. These may include microbial metabolites, including extracellular biopolymers and lysis products of bacterial biofilms.

3.1. MC growth activity from river and groundwaters on peptone after CFT

At the end of the experiment, culture fluid samples after CFT were used as inoculum to evaluate the survival and growth activity of microbial communities (MCs) on nutrient medium with peptone (Table 3). The growth activity depended not only on the survival after

30 days of freezing at -18°C but also on the thawing temperature. The used carbon and nitrogen sources played an important role: variants with HNa alone and in combination with a co-substrate in the form of peptone (P).

When thawed at 4°C, the MCs from a depth of 41 m of the wells located 1,500 m from the bank showed the maximum activity after CFT with HNa. The differences in the activity of the MCs from the other depths were minimal. At this thawing temperature, their growth activity on peptone after CFT was high regardless of the presence of HS alone as a carbon source or with the supplemental addition of a low-molecular-weight co-substrate. Microbial communities of river water showed high activity with HNa after thawing at 4°C, even without co-substrate application. The MCs from groundwater sampled from a well as close to bank as possible at a depth of 15 m were less active, regardless of the composition of the OMs used.

When thawed at 23°C, the other patterns in MC responses were observed. Microorganisms of river and groundwater from wells close to the bank showed high protease activity independently of the composition of carbon sources during the CFT period. In wells far from the bank, the thawing at 23°C had an effect on the growth activity after CFT, depending on the depth of water sampling. For example, the activity in MCs from depths of 21 m and 41 m increased with the addition of co-substrate. The MC activity from a distant well at 51 m depth during thawing at 23°C remained high despite the combination of organic substrates. It should be noted that in the presence of HS alone as a carbon source, the thawing temperature did not significantly affect the protease activity of MCs from the RBF zone at 35 m depth and river water. This may explain the close relationship between surface water and groundwater in the bank zone, which is reflected in the similar responses of microbial communities to different thawing temperatures.

3.2. Influence of microbial communities and thawing temperature on the spectral characteristics of HS after CFT

The ability of the vast majority of OMs of different classes to absorb light in the UV band at wavelengths of 250-280 nm is well known. Unsaturated and aromatic compounds with various atom groupings, including proteins, phenols, humic substances, lignin-sulfonic

Table 2. Seasonal dynamics of the abundance of culturable microbial communities of ground and surface waters in the riverbank filtration zone (CFU/ ml)

Sampling date	River water		GW from different depths			
	CHB	AFB	CHB		AFB	
			15.7 m	35.7 m	15.7 m	35.7 m
27.03.2023	56 ± 4	60 ± 2	62 ± 10	83 ± 6	15 ± 2	10 ± 2
1.06. 2023	69 ± 2	54 ± 2	58 ± 3	65 ± 2	22 ± 1	19 ± 2
1.08.2023	127 ± 8	93 ± 6	112 ± 7	100 ± 6	84 ± 5	53 ± 3
13.11.2023	179 ± 5	138 ± 6	185 ± 3	135 ± 3	126 ± 4	97 ± 3

Note: CHB – culturable heterotrophic bacteria, AFB- ammonifying bacteria

Table 3. Impact of the co-substrate and thawing temperature on the growth activity of microbial community after CFT

Microbial communities	OD, 600 nm			
	HS 4 °C	HS + P 4 °C	HS 23 °C	HS + P 23 °C
GW 1-15	0.100 ± 0.003	0.098 ± 0.003	0.133 ± 0.006	0.144 ± 0.009
GW 1-35	0.154 ± 0.010	0.108 ± 0.004	0.157 ± 0.010	0.150 ± 0.010
GW 51-21	0.115 ± 0.005	0.139 ± 0.008	0.095 ± 0.003	0.168 ± 0.012
GW 51-41	0.167 ± 0.012	0.169 ± 0.012	0.108 ± 0.004	0.141 ± 0.008
GW 51-51	0.115 ± 0.005	0.135 ± 0.007	0.136 ± 0.007	0.132 ± 0.007
River water	0.170 ± 0.012	0.131 ± 0.006	0.159 ± 0.010	0.160 ± 0.010

acids, and other complex compounds, are intensively absorbed in this UV band. Inorganic ions, with few exceptions, do not absorb in this band. There was a direct correlation between the UV-indicator values at $\lambda = 254$ nm and the C_{org} , COD, and BOD_5 indicators.

For the determination of fluorophores (chromophoric groups) formed during the microbiological transformation of terrigenous material and humic substances, the 450-500 nm wavelength range is often used (Birdwell and Engel, 2010). Natural and anthropogenic factors are thought to influence the relationship between absorption spectra and the molecular structure of HS (Shirshova et al., 2015). The choice of specific wavelengths for assessing changes in the molecular structure of HS is still a subject of debate.

After CFT during thawing at 4°C, the microbial communities from groundwater were actively involved in the transformation of sodium humate compared to microorganisms from river water (Table 4). Based on the spectral characteristics of the nutrient solution with sodium humate, changes in the aliphatic ($\lambda = 254$ nm) and aromatic compounds of the molecule occurred with the participation of MCs ($\lambda = 275$ nm). MCs from groundwater in the RBF zone increased their activity with depth. In groundwater sampled from distant wells, the MC responses differed by the AF layers. An active change in the aromatic compounds was observed in MCs present at 21 m and 51 m depths. Minimal changes in spectral characteristics at three wavelengths at this thawing temperature were observed in MCs from a depth of 41 m. Changes in the composition of chromophoric groups ($\lambda = 465$ nm) coincided with the activity of MCs in relation to the aromatic compound of HNa.

During thawing at 23°C, the microbiological transformation of sodium humate also depended on the water of the sampling points and the corresponding MC activity in relation to different compounds of a humic substance molecule. MCs from river and ground waters sampled from a depth of 15 m in the RBF zone were characterized by minimal activity. The spectral characteristics of sodium humate after CFT at a thawing temperature of 23°C were comparable when MCs from wells at different distances from the bank and at different depths were used (GW 1-35 and GW 51-21). This may be related to the survival during rapid thawing of the same microbial species present in the general groundwater pool and capable of degrading hard-to-reach organic matter.

Changes in the spectral characteristics of HNa as a result of microbiological transformation are most commonly associated with changes in the condensed aromatic nucleus (aromatic compound at $\lambda = 275$). Taking into account that aliphatic side chains without double bonds (polysaccharides, polypeptides, and saturated hydrocarbons) are not responsible for HS coloration, it can be assumed that the process of their utilization is related to the change in the absorbance value at $\lambda = 254$ nm.

According to the conducted studies, MCs of groundwater after CFT, independent of the place of their localisation *in situ*, participated in the transformation of aliphatic and aromatic compounds of humic compounds at different thawing temperatures. In contrast, MCs in river water were less active in relation to sodium humate.

Table 4. Influence of microbial communities on changes in the spectral characteristics of HNa at different thawing temperatures

Microbial communities	Thawing temperature					
	4 °C			23 °C		
	254 nm	275 nm	465 nm	254 nm	275 nm	465 nm
Control of HNa	2.502	2.227	0.392	2.636	2.361	0.400
GW 1-15	1.952	1.698	0.256	2.150	1.894	0.309
GW 1-35	1.682	1.470	0.216	1.769	1.553	0.245
GW 51-21	1.649	1.430	0.217	1.772	1.555	0.237
GW 51-41	1.960	1.733	0.302	1.900	1.672	0.274
GW 51-51	1.743	1.510	0.221	1.745	1.539	0.250
River water	2.269	1.980	0.331	2.185	1.925	0.327

3.3. Change in the component composition of complex nutrient medium after CFT

As shown above, in the MC freeze/thaw experiment with a single carbon source of sodium humate (HS), changes in the spectral characteristics were related to the metabolic activity of microbial communities from different habitats. However, the changes in the state of humic substances may not only be related to the transformation of their macromolecules. An important factor is biosorption, which is associated with specific mechanisms of hydrophobic interaction between HS and extracellular polymers of bacterial cells (Esparza-Soto and Westerhoff, 2003).

It's worth to remark that the addition of a readily available co-substrate to a nutrient solution containing HS resulted in a significant alteration in its optical properties. In comparison to the control, the absorbance values at the three wavelengths demonstrated an increase (Fig.1), which can be attributed to the functioning of MS. In addition to the aliphatic and aromatic compounds resulting from the HNa metabolism, products of the peptone metabolism may also be present. Moreover, the sequence of consumption of each carbon source and the contribution of specific metabolic products to changes in spectral characteristics are challenging to predict under CFT conditions. It is not excluded that in our experiment, there was a partial biosorption of HNa on the biomass of developing microorganisms due to the consumption of low-molecular-weight peptides. This biomass was removed by filtration before using spectrophotometry. Nevertheless, it was found that there were some differences in the spectral characteristics of the culture fluid when MCs of groundwater at different thawing temperatures were involved.

Thus, following CFT, the change in the total OM content (at $\lambda = 254$ nm) when MCs were cultured with HNa in the presence of co-substrate depended on the thawing temperature and on the location of the microbial community (Fig. 2). The highest level of the activity was observed in microbial communities (MCs) from wells situated at a distance from the riverbank, at a thawing temperature of 4°C. This level of activ-

ity decreased with the depth of the active layer (AF). Groundwater samples collected from the RBF zone did not exhibit a response to the thawing temperature, but their activity was lower than that of MCs from river water.

The distance of the wells from the riverbank influenced the contribution of the aromatic compound to the OM composition (at $\lambda = 275$ nm). However, the slow thawing temperature of 4°C had a positive effect on MC from the distant wells. This is caused by the natural adaptation of MCs to the corresponding temperatures. In the RBF zone, the temperature regime is influenced by river water, while in the distant wells, the temperature is more stable between 4-6°C, depending on the depth of groundwater sampling. Therefore, the diversity of the HNa transformation metabolites in the presence of readily available sources of nitrogen-containing OM related to aromatic compounds may increase in distant wells, especially during spring. At a thawing temperature of 23°C, the MCs of river and ground waters from a distant well at a depth of 41 m were more active.

The response of chromophoric groups ($\lambda = 465$ nm) determining the colour of natural waters also depended on two factors: the distance of the wells from the bank and the thawing temperature during CFT. Figure 2 shows that the most active in the HNa transformation processes in the presence of co-substrate at 4°C were the MCs of the groundwater sampled from a depth of 41 m of the distant well GW 51-41. However, at a thawing temperature of 23°C, the spectral characteristics of the chromophoric groups were comparable when the MCs from the distant well GW 51-41 and the MCs of the river water were involved. Microorganisms from this AF layer in the distant well had high adaptive potential for transforming a mixture of carbon sources during rapid and slow thawing.

4. Conclusions

The conducted studies showed that staying frozen at -18°C for 30 days and 5 freeze/thaw cycles had no effect on the viability of microorganisms. The thawing range and the presence of readily available co-substrate

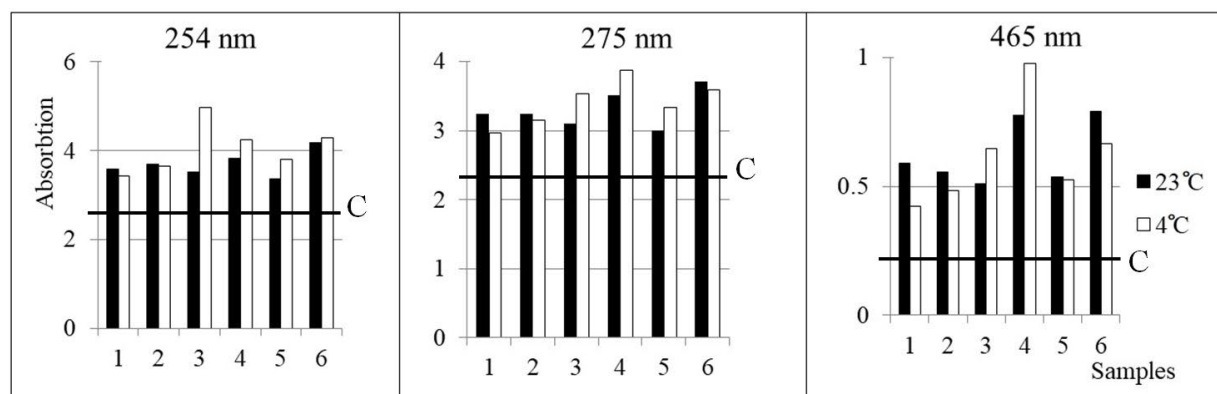


Fig.2. Changes in the spectral characteristics of nutrient medium (HNa + co-substrate) involving microbial communities of ground and river waters after CFT at different thawing temperatures: 1– GW 1-15; 2 – GW 1-35; 3 – GW 51-21; 4 – GW 51-41; 5 – GW 51-51; 6 – river water; C – control.

proved to be important factor affecting the HNa transformation. According to the spectral characteristics of HNa after CFT, the responses of the MC of groundwater differed among the aquifer layers. A change in the aromatic compound was observed at a thawing temperature of 4°C in MCs present at depths of 21 m and 51 m in wells located at a distance from the bank. At a thawing temperature of 23°C, close absorption values for the content of aromatic groups were recorded with the participation of the MCs from the different aquifer depths and independently of the distance of wells from the bank.

After CFT in the presence of co-substrate, thawing temperature affected subsequent growth on peptone and the manifestation of proteolytic activity. At a thawing temperature of 4°C, the high activity of MCs from wells located 1,500 m from the bank was preserved. However, at the thawing temperature, activity decreased in MCs of river water and MCs from the deep aquifer layers in wells located in the riverbank filtration zone. A distinct pattern was observed at a thawing temperature of 23°C in the presence of a co-substrate in the MCs from wells that were maximally distant from the bank. The highest activity was observed in microbial communities from the upper layers of the aquifer, and it gradually decreased with depth.

When a complex medium with two substrates was used, the most significant changes in the spectral characteristics of the culture fluid at different thawing temperatures were observed when the MCs of groundwater were applied. They responded to the thawing temperature with a greater change in spectral characteristics responsible for the chromophoric groups. Their abundance was maximized at 4°C with the MCs from a distant well (41 m depth). The MCs from river water were less dependent in their activity on thawing temperature, rather preferring 23°C.

It is important to emphasize that the activation of proteolytic activity in the MCs was accompanied by active gas generation and biofilm formation. These characteristics of the MC responses may provide evidence that readily available carbon sources entering groundwater during the summer can have a significant impact on the groundwater quality, with biofilm formation acting as a risk factor for the colmatage of wells.

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Birdwell J.E., Engel A.S. 2010. Characterization of dissolved organic matter in cave and spring waters using UV-Vis absorbance and fluorescence spectroscopy. *Organic Geochemistry* 41: 270–280. DOI: [10.1016/j.orggeochem.2009.11.002](https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2009.11.002)
- Braun B., Schröder J., Knecht H. et al. 2016. Unraveling the microbial community of a cold groundwater catchment system. *Water Research* 107(15): 113–126.
- Chen J., Gu B., LeBoeuf E.J. et al. 2002. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere* 48 (1): 59–68.
- Esparza-Soto M., Westerhoff P. 2003. Biosorption of humic and fulvic acids to live activated sludge biomass. *Water Research* 37 (10): 2301–2310.
- Flemming H.-C., Wuertz S. 2019. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology* 17(4): 247–260.
- Goode C., Allen D.G. 2011. Effect of calcium on moving-bed biofilm reactor biofilms. *Water Environment Research* 83 (3): 220–232.
- Hou N., Wen L., Cao H. et al. 2017. Role of psychrotrophic bacteria in organic domestic waste composting in cold regions of China. *Bioresource Technology* 236: 20–28.
- Huber S.A., Balz A., Abert M. et al. 2011. Characterisation of aquatic humic and non-humic matter with size-exclusion chromatography – organic carbon detection – organic nitrogen detection (LC-OCD-OND). *Water Research* 45(2): 879–885.
- Kramshøj M., Albers C.N., Holst T. et al. 2018. Biogenic volatile release from permafrost thaw is determined by the soil microbial sink. *Nature Communications* (9): e-3412. DOI: [10.1038/s41467-018-05824-y](https://doi.org/10.1038/s41467-018-05824-y)
- Krupińska I. 2017. Effect of organic substances on the efficiency of Fe (II) to Fe (III) oxidation and removal of iron compounds from groundwater in the sedimentation process. *Civil and Environmental Engineering Reports* 26: 15–29.
- Kulakov V.V. 2024. Interaction of surface and groundwater in the Khabarovsk Amur water hub. In: *Rivers of Siberia and the Far East. Preservation of river ecosystems in the era of global changes*. B.A. Voronov, O.I. Nikitina (Ed.). Moscow: World of Science: 28–31. (in Russian)
- Kulikova N.A., Perminova I.V. 2021. Interactions between humic substances and microorganisms and their implications for nature-like bioremediation technologies. *Molecules* 26: e 2706. DOI: [10.3390/molecules26092706](https://doi.org/10.3390/molecules26092706)
- Kumar S. 2006. *Organic chemistry. Spectroscopy of Organic Compounds*: Guru Nanak Dev University. 36 p.
- Lee B.M., Seo Y.S., Hur J. 2015. Investigation of adsorptive fractionation of humic acid on graphene oxide using fluorescence EEM-PARAFAC. *Water Research* 73C: 242–252. DOI: [10.1016/j.watres.2015.01.020](https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.01.020)
- Lipczynska-Kochany E. 2018. Effect of climate change on humic substances and associated impacts on the quality of surface water and groundwater: A review. *Science Total Environment* 640–641: e 1548.
- Manyapu V., Lepcha A., Sharma S.K. et al. 2022. Role of psychrotrophic bacteria and cold-active enzymes in composting methods adopted in cold regions. Chapter One. *Advances in Applied Microbiology* 121: 1–26.
- Margesin R., Collins T. 2019. Microbial ecology of the cryosphere (glacial and permafrost habitats): current knowledge. *Applied microbiology and biotechnology* 103: 1–13. DOI: [10.1007/s00253-018-9435-1](https://doi.org/10.1007/s00253-018-9435-1)
- Namsaraev B.B., Barkhutova D.D., Khakhinov V.V. 2006. *Field workshop on aquatic microbiology and hydrochemistry*, ed. M.B. Weinstein. Publishing house of Buryat State University, Ulan-Ude. 68 p.
- Messan K.S., Jones R.M., Doherty S.J. et al. 2020. The role of changing temperature in microbial metabolic processes during permafrost thaw. *Public Library of Science One* 15(4): e 0232169. DOI: [10.1371/journal.pone.0232169](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232169)
- Shirshova L.T., Kholodov A.L., Zolotareva B.N. et al. 2009. Fluorescence spectroscopy studies of humic substance fractions isolated from permanently frozen sediments of Yakutian coastal lowlands. *Geoderma* 149 (1–2): 116–123.
- Shirshova L.T., Gilichinsky D.A., Ostroumova N.V. et al. 2015. Application of spectrophotometry for quantification of humic substances in the permafrost sediments. *Earth's cryosphere* 19(4): 94–106. (in Russian)
- Struvay C., Feller G. 2012. Optimization to low temperature activity in psychrophilic enzymes. *International Journal of Molecular Sciences* 13(9): 11643–11665. DOI: [10.3390/](https://doi.org/10.3390/)

[ijms130911643](#)

Zona D. 2016. Long-term effects of permafrost thaw. *Nature* 537 (7622): 625–626.

Yan B., Guan J. 2014. Effects of extreme flood on dissolved iron in Amur river basin. *Proceedings of the 3rd International Meeting of Amur-Okhotsk Consortium*: 25–27. URL: <http://amurokhotsk.com/>

Young K.C., Maurice P.A., Docherty K.M. et al. 2004. Bacterial degradation of dissolved organic matter from two northern Michigan streams. *Geomicrobiology Journal* 21: 521–528.

Ответные реакции микробных комплексов на замерзание/оттаивание в зоне взаимодействия поверхностных и подземных вод



Кондратьева Л.М.*, Андреева Д.В.

Институт водных и экологических проблем Дальневосточного отделения Российской Академии наук, Хабаровского федерального исследовательского центра, Дикопольцева, 56, Хабаровск, 680000 Россия

АННОТАЦИЯ. В работе представлены результаты исследований активности микробных сообществ (МС) по отношению к гуминовым веществам после циклического замерзания/оттаивания. В качестве инокулята использованы подземные воды с разной глубины водоносного горизонта из скважин, расположенных на разном удалении от зоны речной береговой фильтрации (РБФ), и речная вода. Циклическое замораживание/оттаивание (ЦЗО) проходило в два этапа: первое замораживание длилось 30 суток при температуре -18°C ; затем проводили поочередно 5 циклов замораживания и оттаивания через 7 суток. Были сформированы два варианта условий оттаивания: медленное оттаивание от -18°C до $+4^{\circ}\text{C}$; быстрое оттаивание от -18°C до $+23^{\circ}\text{C}$. Выживаемость МС из подземных и речных вод после ЦЗО подтверждена по активности роста на легкодоступном субстрате пептоне. Максимальную активность после ЦЗО с одним гуматом натрия (ГNa) при температуре оттаивания 4°C проявляли МС с глубины 41 м из скважин, удаленных от берега на расстоянии 1500 м. Она была сопоставимой с активностью МС из речной воды в период наблюдений. При температуре оттаивания 23°C микроорганизмы из речных и подземных вод из скважин, расположенных близко к берегу, проявляли высокую активность независимо от состава источников углерода в период ЦЗО. В удаленных от берега скважинах температура оттаивания 23°C влияла на активность роста МС после ЦЗО в зависимости от глубины отбора проб воды. Так у МС с глубины 21 м и 41 м активность увеличивалась при внесении легкодоступного ко-субстрата. Температура оттаивания оказывала влияние на изменение спектральных характеристик ГNa после ЦЗО. На вклад ароматической составляющей в составе продуктов трансформации ГNa ($\lambda = 275 \text{ nm}$) влияла удаленность скважин от берега. При участии МС речной воды и МС из скважин, расположенных в зоне РБФ при температуре оттаивания 23°C показания содержания ароматических соединений были выше, чем при температуре 4°C . Медленное оттаивание при температуре 4°C оказывало положительный эффект на трансформацию гуминовых веществ микроорганизмами из удаленных скважин за счет их природного адаптационного потенциала.

Ключевые слова: микробные сообщества, замерзание/оттаивание, речная береговая фильтрация, гуминовые вещества

Для цитирования: Кондратьева Л.М., Андреева Д.В. Ответные реакции микробных комплексов на замерзание/оттаивание в зоне взаимодействия поверхностных и подземных вод // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 955-970. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-955

1. Введение

В ближайшие годы в связи с глобальным потеплением прогнозируют крупномасштабные изменения в биосфере и криосфере (Margesin and Collins, 2019). Последствия таяния многолетней мерзлоты связывают с изменением состава поверхностных и подземных вод. Многочисленные исследования в регионах с оттаивающей многолетней мерзлотой

показали, что крупномасштабные эффекты для наземных и водных экосистем могут быть связаны с биогеохимической активностью на микроскопическом уровне (Zona, 2016).

Считают, что наиболее распространенными организмами с точки зрения биомассы и разнообразия являются психрофильные микроорганизмы, их адаптация к холоду является результатом эво-

*Автор для переписки.

Адрес e-mail: kondratevalm@gmail.com (Л.М. Кондратьева)

Поступила: 06 мая 2024; Принята: 27 мая 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



люционного отбора и генетически закодирована в последовательности белков (Struvay and Feller, 2012). Способность микроорганизмов выживать при низких температурах, связывают с продукцией холодоактивных ферментов, расщепляющих различные органические субстраты, включая лактозу, целлюлозу, лигнин, крахмал и липиды (Hou et al., 2017; Manuaru et al., 2022). Психрофильные микроорганизмы способны трансформировать стойкие органические вещества (ОВ) в условиях сезонного замерзания и оттаивания водной среды. В результате экспериментальных исследований, имитирующих оттаивание многолетней мерзлоты, установлено, что ответные реакции микробиомов зависели в значительной степени от температуры оттаивания, чем от местоположения отбора проб и их фильтрации (Messan et al., 2020).

Важное место в исследованиях динамики трансформации ОВ в условиях сезонного замерзания/оттаивания занимают гуминовые вещества (ГВ), которые участвуют в сложных биогеохимических процессах. Микроорганизмы используют ГВ для стимулирования процессов биоразложения и/или снижения биодоступности некоторых металлов. В свою очередь ГВ, контролируя окружающие условия, изменяют структуру микробных сообществ (МС) и их активность (Kulikova and Perminova, 2021). Биодegradация ГВ влияет на общее состояние и функционирование гидросферы, определяя химический состав воды (Young et al., 2004).

Состав ГВ зависит от характера взаимодействия поверхностных и подземных вод с почвами, горными породами, и в значительной степени от изменения климата (Lipczynska-Kochany, 2018). Считают, что реакционная способность ГВ в окружающей среде зависит от набора функциональных групп в структуре макромолекул (Lee et al., 2015). Изменение соотношения кетонных и аукохромных групп в составе ароматических колец влияет на интенсивность окрашивания водной среды, а цветность раствора ГВ обусловлена присутствием хромофорных функциональных групп: азотсодержащих ($-N=N-$), азометиновых ($>C=N-$), карбоиминовых ($>C=NH$), нитро- ($-NO_2$) и нитрозогрупп ($-NO$) (Chen et al., 2002).

Ранее, на основании экспериментальных исследований была выдвинута гипотеза о том, что значительная часть фракций HS представляют собой динамичную систему макроагрегатов, различающихся составом и характером взаимодействия субъединиц. Макроагрегаты формируются за счет гидрофобных, водородных, сложноэфирных связей и др. При промерзании и оттаивании разных почв и пород меняются не только оптические свойства включенных в них HS, но и реакционная способность макромолекул (Shirshova et al., 2009). Подобные процессы некоторые авторы (Esparza-Soto and Westerhoff, 2003) объясняют гидрофобным взаимодействием между гуминовыми веществами и внеклеточными полимерами бактериальных клеток.

Взаимодействие микроорганизмов с макромолекулами ГВ (биосорбция) является первым

шагом, предшествующим их ферментативному расщеплению, гидролизу и микробиологическому потреблению. Ключевыми факторами выступают способность микроорганизмов продуцировать внеклеточные полимеры и присутствие двухвалентных катионов, в том числе кальция и магния (Goode and Allen, 2011). Дальнейшая судьба ГВ зависит от присутствия низкомолекулярных органических кислот, гидрофобности биополимеров и различных элементов, образующих с ними подвижные хелатные комплексы (Huber et al., 2011).

Установлено, что при аэрации подземных вод повышаются устойчивость к стресс-факторам и адаптационный потенциал. Микробные комплексы подземной гидросферы, существуют в виде сложно-структурированных консорциумов (Flemming and Wuertz, 2019). При аэрации подземных вод за счет поступления поверхностных и речных вод изменяется их адаптационный потенциал к стресс-факторам.

Гипотетически на биогеохимическом барьере в зоне береговой фильтрации речной воды в водоносный горизонт (ВГ) железо может выступать регулятором поведения ОВ различного генезиса. В этом случае доминирующим процессом выступает реакция взаимодействия растворенного железа с гуминовыми веществами (Krupińska, 2017). Показано, что в период экстремальных наводнений в р. Амур около 90 % растворенного железа находится в комбинации с ГВ (Yan and Guan, 2014).

В откачиваемой воде из скважин, расположенных в зоне речной береговой фильтрации могли присутствовать три группы микроорганизмов: автохтонные бактерии из водоносного горизонта и порового пространства; аллохтонные почвенные микроорганизмы, поступающие с поверхностной инфильтрацией; микроорганизмы, поступающие в пластовые воды с речным фильтратом.

Ранее было установлено (Braun et al., 2016), что в неэксплуатируемых скважинах в микробном сообществе в основном доминировали филумы Proteobacteria (95%) Actinobacteria, Bacteroidetes ~ 5%. После насыщения ВГ аэрируемой водой, происходила значительная перестройка структуры сообщества и увеличивалось видовое разнообразие микроорганизмов: Actinobacteria ~ 20-50%; Proteobacteria ~ 30-50%; Bacteroidetes, Nitrospirae, Firmicutes, Chloroflexi, Verrucomicrobia и др. ~ 20-50%.

На наш взгляд, доминирование той или иной группы микроорганизмов зависит не только от глубины залегания откачиваемой воды, а также от вклада ОВ, поступающих с поверхностными водами. Состав и доступность ОВ влияют на активность микробных сообществ, их поведение и динамику сукцессии доминантных групп. Например, при оттаивании мерзлых грунтов Гренландии методом масс-спектрометрии обнаружено более 300 различных органических соединений (Kramshøj et al., 2018), в их состав могли входить продукты микробиологической трансформации ОВ различного генезиса.

Цель наших исследований состояла в определении активности микробных сообществ в условиях циклического замерзания/оттаивания по отношению к легкодоступным низкомолекулярным пептидам (пептон) и гуминовым веществам (гумат натрия), при взаимодействии подземных и поверхностных вод в зоне речной береговой фильтрации.

2. Материалы и методы

Район исследований расположен в центральной части Среднеамурской низменности. Ее рельеф достаточно разнообразен с незначительным наклоном в северо-восточном направлении. Русло и пойма р. Амур, образуют обширную сложную пойменно-русловую систему. Пойма довольно сильно обводнена и во время паводков значительная ее часть затапливается. Морфология русла реки на этом участке характеризуется интенсивным размывом берегов. В зимний период вдоль левого берега проходит до 60 % всего стока р. Амур, а летом при подъеме уровней на 4-5 м доля стока уменьшается до 45 %.

Тунгусское месторождение подземных вод (ПВ) находится в междуречье рек Амур и Тунгуска в водоносном горизонте плиоцен-четвертичных аллювиальных отложений (пески, гравий). Наблюдательные скважины расположены на разном удалении от русла р. Амур (Рис. 1). На участке, где ПВ взаимодействуют с речной водой, формируется биогеохимический барьер. Вклад каждой составляющей зависит от гидрологического режима и времени года. Разнонаправленное взаимодействие поверхностных и ПВ в период межени приводит к разгрузке подземных вод в русло реки, а в период паводков и катастрофических наводнений происходит обратная инфильтрация речных вод в ВГ (Kulakov, 2024). Именно здесь, на биогеохимическом барьере, в период сезонного замерзания и оттаивания происходят мало изученные микробиологические процессы, вносящие существенный вклад в формирование качества природных вод.

Пробы ПВ Тунгусского месторождения отбирали в ноябре 2023 г. из 5 скважин, с разной глу-

бины ВГ и расположенных на разном удалении от левого берега Пемзенской протоки (р. Амур); речную воду отбирали с глубины 0.5 м от поверхности в 50 м от берега (Таблица 1).

Для экспериментов в качестве источников углерода использовали: препарат гуминовых веществ (Humic acid sodium salt, H16752, Germany), как аналог трудно минерализуемых ОВ; пептон (ГОСТ 13805-76, г. Оболенск, серия 299), представляющий собой смесь полипептидов, свободных аминокислот, ферментов и нуклеиновых кислот.

Циклическое замораживание/оттаивание (ЦЗО) проводили в стерильных одноразовых медицинских полимерных контейнерах на 50 мл с крышкой (Berimed, ООО «ЕВРОКЭП», РФ). В контейнеры заливали два варианта стерильной среды (г/л): KH_2PO_4 — 1.33; K_2HPO_4 — 2.67; NH_4Cl — 1; Na_2SO_4 — 2; KNO_3 — 2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.001; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.1. Первый вариант содержал 0.2 г/л гумата натрия (ГNa), во второй вариант вносили дополнительный ко-субстрат 0.2 % низкомолекулярных пептидов (пептон). В качестве инокулята использовали по 5 мл природных вод.

Первое замораживание длилось 30 суток в морозильной камере при температуре -18°C . Затем были сформированы две группы образцов, которые отличались условиями оттаивания: первая — оттаивание в холодильнике от -18°C до $+4^\circ\text{C}$; вторая — быстрое оттаивание, при комнатной температуре от -18°C до $+23^\circ\text{C}$. Все образцы прошли 5 циклов поочередного ЦЗО через 7 суток. Контрольные образцы без инокулята проходили все этапы ЦЗО.

Общую численность культивируемых гетеротрофных бактерий (КГБ) определяли методом предельных разведений на рыбо-пептонном агаре, разбавленном в 10 раз (РПА:10). Аммонифицирующих бактерий (АМБ), участвующих в процессе аммонификации ОВ, выращивали на РПА (Намсараев и др., 2006). Численность микроорганизмов выражали в колониеобразующих единицах (КОЕ/мл).

Для оценки жизнеспособности и активности роста микробных сообществ (МС) природных вод после ЦЗО использовали жидкую питательную среду с легкодоступным источником углерода (0.2

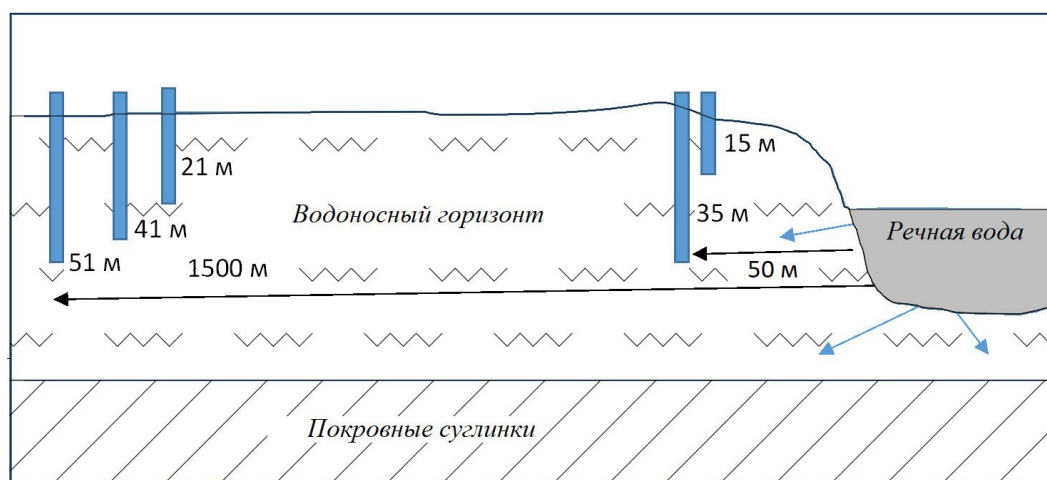


Рис.1. Расположение наблюдательных скважин по отбору подземных вод с разной глубиной водоносного горизонта и на разном расстоянии от берега реки.

Таблица 1. Общая характеристика подземных вод из наблюдательных скважин в зоне речной береговой фильтрации в ноябре 2023 г.

Образцы воды	Индикаторы								
	Расстояние от речного берега, м	Глубина, м	pH	Fe, мг/л	Mn, мг/л	NH ₄ , мг/л	SAC ₂₅₄ , м ⁻¹	КГБ, КОЕ/мл	АМБ, КОЕ/мл
ПВ 1-15	50	15	6.57	18.0	1.40	0.274	20.5	185.3	126.3
ПВ 1-35		35	6.43	23.9	1.12	0.075	12.8	135.2	97.3
ПВ 51-21	1500	21	6.48	26.0	6.50	0.350	7.6	52.2	45.2
ПВ 51-41		41	6.46	24.7	1.15	0.404	8.2	79.3	63.4
ПВ 51-51		51	6.43	17.3	0.59	0.412	9.7	119.6	95.2
Речная вода	50 м от левого берега	0.5	7.34	0.70	0.073	0.168	20.8	179.0	137.8

Примечание: КГБ – культивируемые гетеротрофные бактерии; АМБ – аммонифицирующие бактерии; SAC₂₅₄ – спектральный абсорбционный показатель содержания ОВ; КОЕ/мл - количество колонии образующих единиц в 1 мл.

% пептон). Характер роста на пептоне при температуре 23°C определяли фотометрическим методом по изменению оптической плотности (ОП) культуральной жидкости на КФК-3-01 при длине волны 600 нм. Влияние диапазона температуры оттаивания на особенности микробиологической трансформации ГНа оценивали по изменению значений абсорбции при разных длинах волн: изменение общего содержания ОВ при $\lambda = 254$ нм; трансформацию ароматической составляющей ГНа при $\lambda = 275$ нм (Kumar, 2006), содержание хромовых групп при $\lambda = 465$ нм (Shirshova et al., 2015), используя спектрофотометр SHIMADZU UV-3600.

3. Результаты и обсуждение

При анализе сезонной динамики численности культивируемых гетеротрофных бактерий (КГБ) и аммонифицирующих бактерий (АМБ) в речной воде и подземных водах, отобранных из скважин, расположенных в зоне речной береговой фильтрации (РБФ), был отмечен общий тренд увеличения численности микробных сообществ в позднесенний период (Таблица 2). Максимальная численность КГБ в ВГ за период наблюдения установлена в ноябре на глубине 15.7 м, она была сопоставима с численностью КГБ в речных водах. Более существенные различия в численности КГБ между речными и

подземными водами установлены на глубине 35.7 м в весенний и осенний периоды. Показатели численности АМБ в подземных водах были значительно ниже, чем в речной воде, особенно в более глубоких слоях ВГ, куда в меньшем количестве поступали ОВ в результате вертикальной и горизонтальной фильтрации.

Общую численность микроорганизмов в нижних слоях ВГ могут поддерживать автохтонные ОВ, которые образуются в результате микробиологических процессов при взаимодействии воды с горными породами. Среди них могут присутствовать микробные метаболиты, включая внеклеточные биополимеры и продукты лизиса бактериальных биопленок.

3.1. Активность роста МС из речных и подземных вод на пептоне после ЦЗО

В конце эксперимента образцы культуральной жидкости после ЦЗО были использованы в качестве инокулята для оценки выживаемости и активности роста микробных сообществ (МС) на питательной среде с пептоном (Таблица 3). Активность роста зависела не только от выживания после 30-суточного заморозания при -18°C, а также от температуры оттаивания. Важную роль играли используемые

Таблица 2. Сезонная динамика численности культивируемых микробных сообществ подземных и поверхностных вод в зоне речной береговой фильтрации (КОЕ/мл)

Дата	Речная вода		Подземная вода на разной глубине			
	КГБ	АМБ	КГБ		АМБ	
			15.7 м	35.7 м	15.7 м	35.7 м
27.03.2023	56 ± 4	60 ± 2	62 ± 10	83 ± 6	15 ± 2	10 ± 2
1.06. 2023	69 ± 2	54 ± 2	58 ± 3	65 ± 2	22 ± 1	19 ± 2
1.08.2023	127 ± 8	93 ± 6	112 ± 7	100 ± 6	84 ± 5	53 ± 3
13.11.2023	179 ± 5	138 ± 6	185 ± 3	135 ± 3	126 ± 4	97 ± 3

Таблица 3. Влияние ко-субстрата и температуры оттаивания на активность роста микробных сообществ после ЦЗО

Микробные сообщества	ОП, 600 нм			
	ГNa 4°C	ГNa + П 4°C	ГNa 23°C	ГNa + П 23°C
ПВ 1-15	0.100 ± 0.003	0.098 ± 0.003	0.133 ± 0.006	0.144 ± 0.009
ПВ 1-35	0.154 ± 0.010	0.108 ± 0.004	0.157 ± 0.010	0.150 ± 0.010
ПВ 51-21	0.115 ± 0.005	0.139 ± 0.008	0.095 ± 0.003	0.168 ± 0.012
ПВ 51-41	0.167 ± 0.012	0.169 ± 0.012	0.108 ± 0.004	0.141 ± 0.008
ПВ 51-51	0.115 ± 0.005	0.135 ± 0.007	0.136 ± 0.007	0.132 ± 0.007
Речная вода	0.170 ± 0.012	0.131 ± 0.006	0.159 ± 0.010	0.160 ± 0.010

источники углерода и азота: варианты только с ГNa и в сочетании с ко-субстратом в виде пептона (П).

При температуре оттаивания 4°C максимальную активность после ЦЗО с ГNa проявляли МС с глубины 41 м из скважин, удаленных от берега на расстоянии 1500 м. Различия в активности между МС с других глубин были минимальными. При этой температуре оттаивания их активность роста на пептоне после ЦЗО была высокой независимо от присутствия в качестве источника углерода одного ГNa или при дополнительном внесении низкомолекулярного ко-субстрата. Микробные сообщества из речных вод проявляли высокую активность на ГNa после оттаивания при 4°C даже без внесения ко-субстрата. МС из подземных вод, отобранных из скважины максимально приближенной к берегу с глубины 15 м были менее активными, независимо от состава использованных ОМ.

При температуре оттаивания 23°C отмечены иные закономерности в ответных реакциях МС. Микроорганизмы речных и подземных вод из скважин, расположенных близко к берегу, проявляли высокую протеазную активность независимо от состава источников углерода в период ЦЗО в зависимости от глубины отбора проб воды. Так у МС с глубины 21 м и 41 м активность увеличивалась при внесении ко-субстрата. Активность МС из удаленной скважины на глубине 51 м при температуре оттаивания 23°C сохранялась высокой независимо от сочетания органических субстратов. Стоит подчеркнуть, что в присутствии только ГNa в качестве источника углерода, температура оттаивания не оказывала существенного влияния на протеазную активность МС из зоны РБФ на глубине 35 м и речных вод. Этим можно объяснить тесную взаимосвязь между поверхностными и подземными водами в прибрежной зоне, которая проявляется в одинаковых ответных реакциях микробных сообществ на разную температуру оттаивания.

3.2. Влияние микробных сообществ и температуры оттаивания на спектральные характеристики ГNa после ЦЗО

Известна способность подавляющего большинства ОВ различных классов поглощать свет в УФ-области при длинах волн 250-280 нм. В этой

области интенсивно поглощают ненасыщенные соединения и соединения ароматического ряда с различными группировками атомов, в том числе протеины, фенолы, гуминовые вещества, лигнин-сульфоновые кислоты и другие сложные соединения. Неорганические ионы, за малым исключением, в этой области не поглощают. Уставлена прямая корреляция значений УФ-показателя при $\lambda = 254$ нм с показателями $S_{\text{орг}}$, ХПК и БПК₅.

Для определения флуорофоров (хромофорных групп), образующихся при микробиологической трансформации терригенного материала и гуминовых веществ, часто используют диапазон длин волн от 450-500 нм (Birdwell and Engel, 2010). При этом считают, что связь между спектрами поглощения и молекулярной структурой ГВ, зависит от природных и антропогенных факторов (Shirshova et al., 2015). Выбор конкретных длин волн для оценки изменения молекулярной структуры ГВ по-прежнему является предметом дискуссий.

После ЦЗО при температуре оттаивания 4°C микробные сообщества из подземных вод, по сравнению с микроорганизмами речной воды принимали активное участие в трансформации ГNa (Таблица 4). Если судить по спектральным характеристикам питательного раствора с гуматом натрия, при участии МС происходили изменения в его алифатической ($\lambda = 254$ нм) и ароматической составляющей молекулы ($\lambda = 275$ нм). МС из подземных вод в зоне РБФ увеличивали свою активность с глубиной. В подземных водах, отобранных из удаленных скважин, ответные реакции МС различались по слоям ВГ. Активное изменение ароматической составляющей отмечено у МС, присутствующих на глубине 21 м и 51 м. Минимальные изменения спектральных характеристик при трех длинах волн при этой температуре оттаивания наблюдали у МС с глубины 41 м. Изменения в составе хромофорных групп ($\lambda = 465$ нм) совпадали с активностью МС по отношению к ароматической составляющей ГNa.

При температуре оттаивания 23°C микробиологическая трансформация ГNa также зависела от мест отбора проб воды и соответствующей активности МС по отношению к разным составляющим молекулы гуминового вещества. Минимальной активностью отличались МС из речной воды и из подземных вод, отобранных с глубины 15 м в зоне РБФ. Спектральные характеристики гумата натрия после ЦЗО при температуре оттаивания 23°C оказа-

Таблица 4. Влияние микробных сообществ на изменение спектральных характеристик ГНа при разной температуре оттаивания

Микробные сообщества	Температура оттаивания					
	4 °С			23 °С		
	254 нм	275 нм	465 нм	254 нм	275 нм	465 нм
Контроль ГНа	2.502	2.227	0.392	2.636	2.361	0.400
GW 1-15	1.952	1.698	0.256	2.150	1.894	0.309
GW 1-35	1.682	1.470	0.216	1.769	1.553	0.245
GW 51-21	1.649	1.430	0.217	1.772	1.555	0.237
GW 51-41	1.960	1.733	0.302	1.900	1.672	0.274
GW 51-51	1.743	1.510	0.221	1.745	1.539	0.250
Речная вода	2.269	1.980	0.331	2.185	1,925	0.327

лись сопоставимыми при участии МС из скважин, удаленных от берега на разное расстояние и находящиеся на разной глубине (ПВ 1-35 и ПВ 51-21). Это может быть связано с выживаемостью при быстром оттаивании одних и тех же видов микроорганизмов, присутствующих в общем пуле подземных водах и способных разлагать труднодоступные органические вещества.

Изменение спектральных характеристик ГВ в результате микробиологической трансформации чаще всего связано с изменением конденсированного ароматического ядра (ароматическая составляющая при $\lambda = 275$). Принимая во внимание, что алифатические боковые цепи, не несущие двойных связей, (полисахариды, полипептиды, насыщенные углеводороды), не отвечают за окраску ГВ можно предположить, что процесс их утилизации связан с изменением величины абсорбции при $\lambda = 254$ нм.

Согласно проведенным исследованиям МС подземных вод после ЦЗО независимо от места их локализации *in situ* принимали участие в трансформации алифатической и ароматической составляющей гуминовых соединений при разном диапазоне температуры оттаивания. В отличие от них МС из речной воды оказались менее активными по отношению к ГНа.

3.3. Изменение компонентного состава сложной питательной среды после ЦЗО

Как было показано выше, в вариантах эксперимента по замерзанию/оттаиванию МС с одним источником углерода — гуматом натрия (ГНа) изменение его спектральных характеристик было связано с метаболической активностью микробных сообществ из разных местообитаний. Однако, изменение состояния гуминовых веществ может быть связано не только с трансформацией их макромолекул. Важным фактором выступает биосорбция, связанная с особыми механизмами гидрофобного взаимодействия между ГВ и внеклеточными полимерами бактериальных клеток (Esparza-Soto and Westerhoff, 2003).

Стоит отметить, что при дополнительном внесении легкодоступного ко-субстрата в пита-

тельный раствор, содержащий ГНа, происходило существенное изменение его оптических свойств. По сравнению с контролем мы наблюдали увеличение показателей абсорбции при трех длинах волн (Рис.1) за счет функционирования МС. Среди алифатических и ароматических компонентов могут присутствовать не только продукты метаболизма НS, но и пептона. Причем последовательность потребления каждого источника углерода и вклад конкретных продуктов метаболизма в изменение спектральных характеристик трудно прогнозировать в условиях ЦЗО. Не исключено, что в нашем эксперименте происходила частичная биосорбция ГНа на биомассе развивающихся микроорганизмов за счет потребления низкомолекулярных пептидов. Эта биомасса удалялась фильтрованием перед проведением спектрофотометрии. Но, несмотря на это, были установлены некоторые различия в спектральных характеристиках культуральной жидкости при участии МС из подземных вод при разной температуре оттаивания.

Так после ЦЗО изменение общего содержания ОМ (при $\lambda = 254$ нм) при культивировании МС на ГНа в присутствии ко-субстрата зависело от температуры оттаивания и от локации микробного сообщества (Рис. 2). Максимальную активность проявляли МС из удаленных от берега скважин при температуре оттаивания 4°С, которая снижалась с глубиной ВГ. Микроорганизмы из подземных вод, отобранных в зоне РБФ, фактически не реагировали на температуру оттаивания, но их активность была ниже, чем у МС из речной воды.

На вклад ароматической составляющей в составе ОМ (при $\lambda = 275$ нм) влияла удаленность скважин от берега. При температуре оттаивания 23°С показания содержания ароматических соединений были немного выше, чем при температуре 4°С при участии МС из речной воды и скважин, расположенных в зоне РБФ. Однако медленная температура оттаивания при 4°С оказывала положительный эффект на МС из удаленных скважин. Это обусловлено природной адаптацией МС к соответствующим температурам. В зоне РБФ на температурный режим влияют речные воды, а в удаленных скважинах температура более стабильная в пределах 4-6°С, в зависимости от глубины отбора подземных вод.

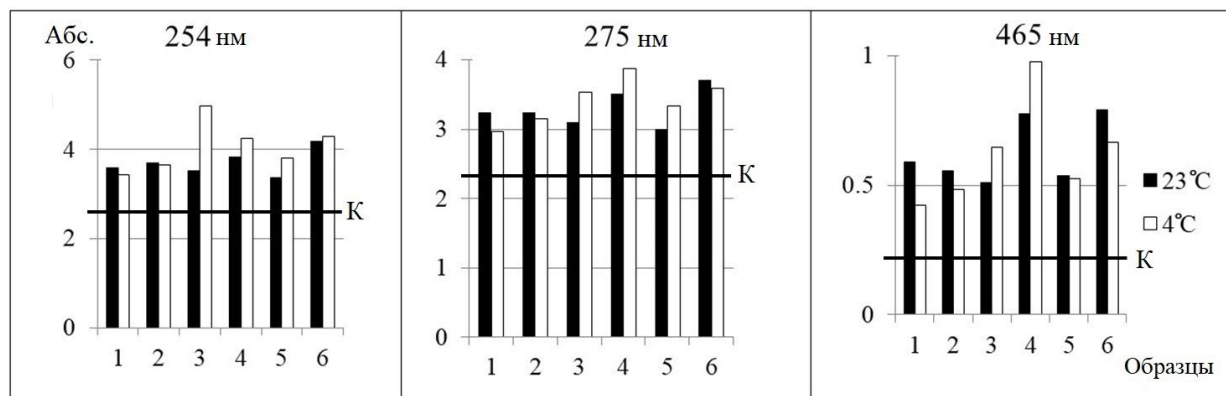


Рис.2. Изменение спектральных характеристик питательной среды (ГNa + ко-субстрат) при участии микробных сообществ подземных и речных вод после ЦЗО при разной температуре оттаивания: 1–ПВ 1-15; 2–ПВ 1-35; 3–ПВ 51-21; 4–ПВ 51-41; 5–ПВ 51-51; 6–речная вода; К–контроль.

Поэтому разнообразие метаболитов трансформации ГВ в присутствии легкодоступных источников азотсодержащих ОВ, относящихся к ароматическим соединениям, может увеличиваться в удаленных скважинах, особенно в весенний период. При температуре оттаивания близкой к 23°C более активными оказались МС речной воды и МС подземных вод из удаленной скважины с глубины 41 м.

Поведение хромофорных групп ($\lambda = 465$ нм), определяющих цветность природных вод также зависло от двух факторов: удаленности скважин от берега и от температуры оттаивания вовремя ЦЗО. На рисунке 1 видно, что наиболее активными в процессах трансформации ГNa в присутствии ко-субстрата при температуре 4°C оказались МС подземных вод, отобранных с глубины 41 м из удаленной скважины ПВ 51-41. Однако при температуре оттаивания 23°C спектральные характеристики хромофорных групп были сопоставимыми при участии МС из удаленной скважины ПВ 51-41 и МС речных вод. Микроорганизмы из этого слоя ВГ в удаленной скважине обладали высоким адаптационным потенциалом при трансформации смеси источников углерода при быстром и медленном оттаивании.

4. Выводы

Проведенные исследования показали, что пребывание микроорганизмов в замороженном состоянии при -18°C в течение 30 суток и 5 циклов заморзания/оттаивания, не оказало влияния на их жизнеспособность. Важным фактором, влияющим на трансформацию ГNa, оказался диапазон оттаивания и присутствие легкодоступного ко-субстрата.

Согласно спектральным характеристикам ГNa после ЦЗО ответные реакции МС подземных вод различались по слоям водоносного горизонта. Активное изменение ароматической составляющей при температуре оттаивания 4°C отмечено у МС, присутствующих на глубине 21 м и 51 м в удаленных от берега скважинах. При температуре оттаивания 23°C близкие значения абсорбции по содержанию ароматических групп были зарегистрированы при участии МС с разных глубин водоносного горизонта и независимо от удаленности скважин от берега.

После ЦЗО в присутствии ко-субстрата температура оттаивания влияла на последующий рост на пептоне и проявление протеолитической активности. При температуре оттаивания 4°C сохранялась высокая активность МС из скважин, удаленных на 1500 м от берега. Однако при этой температуре оттаивания снижалась активность у МС речной воды и МС из глубоких слоев водоносного горизонта в скважинах, расположенных в зоне речной береговой фильтрации. Совсем иная закономерность установлена при температуре оттаивания 23°C в присутствии ко-субстрата у сообществ из скважин максимально удаленных от берега. Самая высокая активность отмечена у сообществ микроорганизмов из верхних слоев водоносного горизонта, с глубиной она постепенно снижалась.

При использовании сложной среды с двумя субстратами наиболее существенные изменения в спектральных характеристиках культуральной жидкости при разной температуре оттаивания отмечены при участии МС подземных вод. Они реагировали на температуру оттаивания, в большей степени изменяя спектральные характеристики ответственные за хромофорные группы. Их количество максимально увеличивалось при температуре 4°C при участии МС из удаленной скважины (глубина 41 м). МС из речных вод в меньшей степени зависели в своей активности от температуры оттаивания, скорее предпочитали 23°C.

Важно подчеркнуть, что активизация протеолитической активности МС сопровождалась активным газообразованием и формированием биопленок. Эти особенности ответных реакций МС могут служить в качестве свидетельства того, что легкодоступные источники углерода, поступающие в подземные воды в летний период, могут оказывать существенное влияние на их качество, а образование биопленок выступает фактором риска кольматажа скважин.

Конфликт интересов

Авторы декларируют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Birdwell J.E., Engel A.S. 2010. Characterization of dissolved organic matter in cave and spring waters using UV-Vis absorbance and fluorescence spectroscopy. *Organic Geochemistry* 41: 270–280. DOI: [10.1016/j.orggeochem.2009.11.002](https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2009.11.002)
- Braun B., Schröder J., Knecht H. et al. 2016. Unraveling the microbial community of a cold groundwater catchment system. *Water Research* 107(15): 113–126.
- Chen J., Gu B., LeBoeuf E.J. et al. 2002. Spectroscopic characterization of the structural and functional properties of natural organic matter fractions. *Chemosphere* 48 (1): 59–68.
- Esparza-Soto M., Westerhoff P. 2003. Biosorption of humic and fulvic acids to live activated sludge biomass. *Water Research* 37 (10): 2301–2310.
- Flemming H.-C., Wuertz S. 2019. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology* 17(4): 247–260.
- Goode C., Allen D.G. 2011. Effect of calcium on moving-bed biofilm reactor biofilms. *Water Environment Research* 83 (3): 220–232.
- Hou N., Wen L., Cao H. et al. 2017. Role of psychotrophic bacteria in organic domestic waste composting in cold regions of China. *Bioresource Technology* 236: 20–28.
- Huber S.A., Balz A., Abert M. et al. 2011. Characterisation of aquatic humic and non-humic matter with size-exclusion chromatography – organic carbon detection – organic nitrogen detection (LC-OCD-OND). *Water Research* 45 (2): 879–885.
- Kramshøj M., Albers C.N., Holst T. et al. 2018. Biogenic volatile release from permafrost thaw is determined by the soil microbial sink. *Nature Communications* (9). e-3412. DOI: [10.1038/s41467-018-05824-y](https://doi.org/10.1038/s41467-018-05824-y)
- Krupińska I. 2017. Effect of organic substances on the efficiency of Fe (II) to Fe (III) oxidation and removal of iron compounds from groundwater in the sedimentation process. *Civil and Environmental Engineering Reports* 26: 15–29.
- Kulakov V.V. 2024. Interaction of surface and groundwater in the Khabarovsk Amur water hub. In: *Rivers of Siberia and the Far East. Preservation of river ecosystems in the era of global changes*. B.A. Voronov, O.I. Nikitina (Ed.). Moscow: World of Science: 28–31. (in Russian)
- Kulikova N.A., Perminova I.V. 2021. Interactions between humic substances and microorganisms and their implications for nature-like bioremediation technologies. *Molecules* 26: e 2706. DOI: [10.3390/molecules26092706](https://doi.org/10.3390/molecules26092706)
- Kumar S. 2006. *Organic chemistry. Spectroscopy of Organic Compounds*: Guru Nanak Dev University. 36 p.
- Lee B.M., Seo Y.S., Hur J. 2015. Investigation of adsorptive fractionation of humic acid on graphene oxide using fluorescence EEM-PARAFAC. *Water Research* 73C: 242–252. DOI: [10.1016/j.watres.2015.01.020](https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.01.020)
- Lipczynska-Kochany E. 2018. Effect of climate change on humic substances and associated impacts on the quality of surface water and groundwater: A review. *Science Total Environment* 640–641: e 1548.
- Messan K.S., Jones R.M., Doherty S.J. et al. 2020. The role of changing temperature in microbial metabolic processes during permafrost thaw. *Public Library of Science One* 15(4): e 0232169. DOI: [10.1371/journal.pone.0232169](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232169)
- Manyapu V., Lepcha A., Sharma S.K. et al. 2022. Role of psychrotrophic bacteria and cold-active enzymes in composting methods adopted in cold regions. Chapter One. *Advances in Applied Microbiology* 121: 1–26.
- Margesin R., Collins T. 2019. Microbial ecology of the cryosphere (glacial and permafrost habitats): current knowledge. *Applied microbiology and biotechnology* 103: 1–13. DOI: [10.1007/s00253-018-9435-1](https://doi.org/10.1007/s00253-018-9435-1)
- Намсараев Б.Б., Бархутова Д.Д., Хахинов В.В. 2006. Полевой практикум по водной микробиологии и гидрохимии, под ред. М.Б. Вайнштейна. Изд-во Бурятского государственного университета, Улан-Удэ. 68 с.
- Shirshova L.T., Kholodov A.L., Zolotareva B.N. et al. 2009. Fluorescence spectroscopy studies of humic substance fractions isolated from permanently frozen sediments of Yakutian coastal lowlands. *Geoderma* 149 (1–2): 116–123.
- Shirshova L.T., Gilichinsky D.A., Ostroumova N.V. et al. 2015. Application of spectrophotometry for quantification of humic substances in the permafrost sediments. *Earth's cryosphere* 19(4): 94–106. (in Russian)
- Struvay C., Feller G. 2012. Optimization to low temperature activity in psychrophilic enzymes. *International Journal of Molecular Sciences* 13 (9): 11643–11665. DOI: [10.3390/ijms130911643](https://doi.org/10.3390/ijms130911643)
- Zona D. 2016. Long-term effects of permafrost thaw. *Nature* 537 (7622): 625–626.
- Yan B., Guan J. 2014. Effects of extreme flood on dissolved iron in Amur river basin. *Proceedings of the 3rd International Meeting of Amur-Okhotsk Consortium*: 25–27. URL: <http://amurokhotsk.com/>
- Young K.C., Maurice P.A., Docherty K.M. et al. 2004. Bacterial degradation of dissolved organic matter from two northern Michigan streams. *Geomicrobiology Journal* 21: 521–528.