

УДК 550.72: 553.061: 579.266

МИКРООРГАНИЗМЫ И ОБРАЗОВАНИЕ СПЕЛЕОТЕМЫ «ЛУННОЕ МОЛОКО» В КАРСТОВЫХ ПЕЩЕРАХ

Л.М. Кондратьева, О.С. Полевская*

Институт водных и экологических проблем ДВО РАН, Хабаровск, Россия

*Эл. почта: oksasha.polevskaya@mail.ru

Статья поступила в редакцию 24.04.2017; принята к печати 25.05.2017

Геологи и спелеологи исследуют карстовые пещеры, рассматривая их внутренние пейзажи в макромасштабе. Для оценки динамики биогеохимических процессов, происходящих в пещерах в контактной зоне «вода–порода» в микромасштабе, проведено экспериментальное исследование трансформации карбонатов кальция при участии микробных комплексов, входящих в состав натечного образования (спелеотемы) «лунное молоко» из карстовой пещеры Снежная (Абхазия). Интенсивную адгезию микроорганизмов за счет продуцирования полимерного матрикса и образование биопленок на поверхности стекла наблюдали на 30-е сутки в присутствии дрожжевого экстракта при 23 °С независимо от концентрации кальцита. Наиболее активная агрегация кристаллов карбоната кальция и их растворение происходили под влиянием слизистых полимеров. Полное растворение 1 г/л кристаллов кальцита бактериальным консорциумом «лунное молоко» наблюдали при 4 °С. С помощью сканирующей электронной микроскопии были показаны разные этапы формирования биопленок и характер растворения кальцита. Дополнительное внесение примесей органических веществ стимулировало растворение кристаллов. Рассмотрены предпосылки для возможной кальцификации порового пространства карстовых пещер под влиянием экологических факторов.

Ключевые слова: микроорганизмы, биопленка, «лунное молоко», пещеры.

MICROORGANISMS AND MOONMILK SPELEOTHEMS FORMATION IN KARST CAVES

L.M. Kondratyeva, O.S. Polevskaya*

Institute of Aquatic and Ecological Problems, Far East Branch of the Russian Academy of Sciences,
Khabarovsk, Russia

* E-mail: oksasha.polevskaya@mail.ru

Geologists and speleologists investigate karst caves by observing their inner views on macroscopic scales. To assess the course of biogeochemical processes occurring in caves on a microscopic scale at interfaces between aqueous and rocky phases an experimental study of calcium carbonates transformation by microbial complexes obtained from moonmilk speleothems found in Snezhnaya Cave (Abkhazia) has been carried out. Strong microbial adhesion due to polymeric matrix production and biofilm formation on glass surfaces were observed on the 30th day of culture at 23 °C in the presence of yeast extract irrespective of added calcite levels. The most active aggregation of calcium carbonate crystals and their dissolution occurred under the effect of mucous polymers. The complete dissolution of 1 g/l calcite by bacterial moonmilk community was observed at 4 °C. Scanning electron microscopy revealed different stages of biofilm formation and calcite dissolution. Added organic contaminants stimulated the dissolution of crystals. Prerequisites for calcification of the porous space of karst caves under the effects of environmental factors are discussed.

Keywords: microorganisms, biofilm, moonmilk, caves.

ВВЕДЕНИЕ

В.И. Вернадский высказывал идею о «всюдности жизни», считая, что живое вещество способно «растекаться» по поверхности планеты, захватывая все незанятые участки биосферы [6]. В пределах биосферы нет абсолютно безжизненных пространств, поэтому «живой организм биосферы» должен изучаться как особое тело, целиком, а не как нечто сводимое к известным физико-химическим системам. Формы нахо-

ждения многих химических элементов существенно изменяются при взаимодействии с живым веществом биосферы [5, 8].

Даже в самых суровых условиях обитания можно найти бактерии и другие микроорганизмы. Микробиологическая активность сохраняется в зонах многолетней мерзлоты, в северных морях, сверхглубоких скважинах (до 10–15 км) и поровом пространстве холодных биотопов подземной биосферы [17, 18, 45, 53]. Наиболее благоприятными для жизнедеятельности

микроорганизмов являются зоны трещиноватости и активной флюидодинамики, независимо от генезиса вмещающих пород. С глобальной биогеохимической активностью подземной микробиоты связывают формирование химического состава подземных вод [9], газового состава земной атмосферы, современные процессы метаморфизма горных пород и новообразование биоминералов [17]. Лимитирующими факторами функционирования подземной биосферы являются физико-химические параметры среды обитания, возможность обмена веществ с внешней средой, наличие субстратов для энергетического и пластического обмена веществ и возможность утилизации экзометаболитов [36, 37].

Большинство микроорганизмов в естественных и искусственно созданных экосистемах существуют в виде структурированных, прикрепленных к поверхности сообществ – биопленок (БП) [16, 28]. Биопленка – это микробное сообщество, состоящее из клеток, плотно прикрепленных к субстрату, поверхности или друг к другу, заключенное в матрицу внеклеточных полимерных субстанций (ВПС) [27]. Установлено, что ВПС продуцируются в основном в экспоненциальной фазе роста и служат в дальнейшем источником углерода и энергии, а также определяют внешнюю и внутреннюю структуру БП, поддерживают ее целостность [34, 43, 51, 54]. Соли кальция, способствуя агрегации бактериальных клеток, слизиобразованию, могут ускорять формирование биопленок и их взаимодействие с горными породами [29].

Карстовые горные массивы являются важной частью биосферы: способствуют сохранению влаги и обеспечивают питание рек и ручьев [52]. Карстовые пещеры выступают в качестве автономных подземных экосистем, которые могут быстро откликаться на изменение климатических условий и состояния окружающей среды [40]. Водоносные горизонты и поровое пространство пород предоставляют собой специфические местообитания для микроорганизмов [41]. Морфогенез карстовых полостей некоторые специалисты также связывают с деятельностью бактерий [32]. Одним из факторов карстообразования является растворение карбонатных минералов микробными метаболитами.

Современный цикл кальция определяется, прежде всего, биологически опосредованными реакциями растворения (выщелачивания) и осаждения карбонатов, а также биоминералогией образования скелета некоторыми гидробионтами [7]. Активное преобразование материнских пород микроорганизмами обусловлено их способностью окислять и восстанавливать элементы с переменной валентностью, которые входят в состав кристаллической решетки минералов, а также влиянием их метаболитов (H_2SO_4 , HNO_3 , органические кислоты, слизи, щелочи, серово-

дород и др.) [14]. В результате бактериального метаболизма минерал может быть полностью разрушен или (при избирательном выносе элементов) трансформирован в другой вторичный минерал [13].

В этой связи особый интерес среди разнообразных минеральных геологических структур представляет натечное образование (спелеотема) «лунное молоко» (*moonmilk*), которое формируется на вертикальных и горизонтальных поверхностях карстовых пещер [47]. «Лунное молоко» обнаружено в пещерах по всему миру в различных климатических условиях [12, 20–22, 25, 39, 44]. Считают, что это вторично отложенный пластичный минерал белого (реже палево-кремового) цвета, представленный, по данным многих исследователей, микрокристаллическими кальцитами с высоким содержанием воды (60–90%). Долгое время ученые учитывали только геологические процессы, влияющие на его образование. В последнее время стали уделять больше внимания микробиологическому фактору с использованием физиолого-геохимического подхода.

Исследователи спелеотем пещеры Altamira (Испания) на основании результатов экспериментов составили эволюционную модель формирования «лунного молока» при участии актиномицетов, которая состоит из трех стадий [23]. В начальную стадию (микробная колонизация) микроорганизмы и органическое вещество поступают в глубь пещеры, формируется сеть из актиномицетов, вырабатываемой ими слизи и кристаллов кальцита. В эпитаксиальную стадию (нарастание одного кристаллического материала на другом) в процессе жизнедеятельности актиномицетов происходит их разрастание, отмирание и минерализация. Процессы частичного микробного разрушения во внутренней части биопленки приводят к задержке воды, а водное насыщение микросреды генерирует биопленку. В заключительной стадии (коркообразование) фрагменты разрушенных волокон накапливаются и эпитаксиально формируют кору.

Было показано, что с бактериальной активностью связаны первые стадии осаждения карбоната кальция, а по мере накопления кальцита происходит постепенная дезактивация микроорганизмов [48]. Однако авторы не уделяют должного внимания первопоселенцам – литотрофным бактериям, которые выступают в роли специфических биомаркеров типа микрофосфилий, обнаруженных в образцах древних отложений железных руд [30].

В ряде работ приведены убедительные данные о присутствии в «лунном молоке» различных физиологических групп микроорганизмов [23, 24, 42]. Считается, что гетеротрофные микроорганизмы часто поступают в подземные экосистемы с воздушными потоками, с инфильтрационными и подземными водами. Известно, что большинство бактерий рода *Bacillus* – типичные хе-

моорганотрофы, при этом их влияние на карбонатные породы остается предметом дискуссии [4]. С одной стороны, предполагается способность этих бактерий выветривать горные породы за счет биовыщелачивания основных элементов [50]. С другой стороны, бактериальные полимерные слизи могут служить катализаторами процессов биогенного минералообразования [31]. Экспериментально показано, что бактериальные клетки являются не только центрами кристаллообразования, они влияют на морфологию и размер кристаллов, минеральный состав и растворимость карбонатов. Например, в присутствии бактерий *Vacillus pasteurii* происходит образование более крупных слабо растворимых кристаллов CaCO_3 [38].

В связи с глобальным изменением климата и антропогенной нагрузкой на экосистемы все более актуальными становятся биогеохимические исследования процессов взаимодействия воды с горными породами [19]. Участие микроорганизмов в круговороте основных элементов не вызывает сомнения, однако многие механизмы остаются недостаточно изученными [8, 26]. Так, природные циклы большинства элементов, форма их существования в растворенном или нерастворенном состоянии зависят от окислительно-восстановительных условий, которые создаются ми-

кробными клетками в результате их индивидуального развития *in situ* [11]. Пещерная биота и ее трофическая структура являются важным объектом для изучения процессов формирования различных по уровню иерархии экосистем пещер [1]. Это находит свое отражение в формировании микробных комплексов натечных образований и активности их представителей.

Цель работы, представленной ниже, – показать роль микроорганизмов натечного образования «лунное молоко» из пещеры Снежная (Абхазия) в растворении кальцита *in vitro* и определить влияние абиотических условий на основные этапы формирования биопленок.

Материалы и методы исследования

Образцы натечного образования «лунное молоко» *moonmilk* (рис. 1) были отобраны в 2015 г. со стен Хрустального меандра Рифовой галереи (глубина 1000 м) из пещеры Снежная (пещерная система Снежная-Меженного-Иллюзия).

Пещера Снежная расположена в Хыпстинском карстовом массиве, состоящем из южного склона Бзыбского хребта и его южного отрога – хребта Раздельного (Западный Кавказ, Абхазия) [3]. По опубликованным данным, протяженность пещерной системы

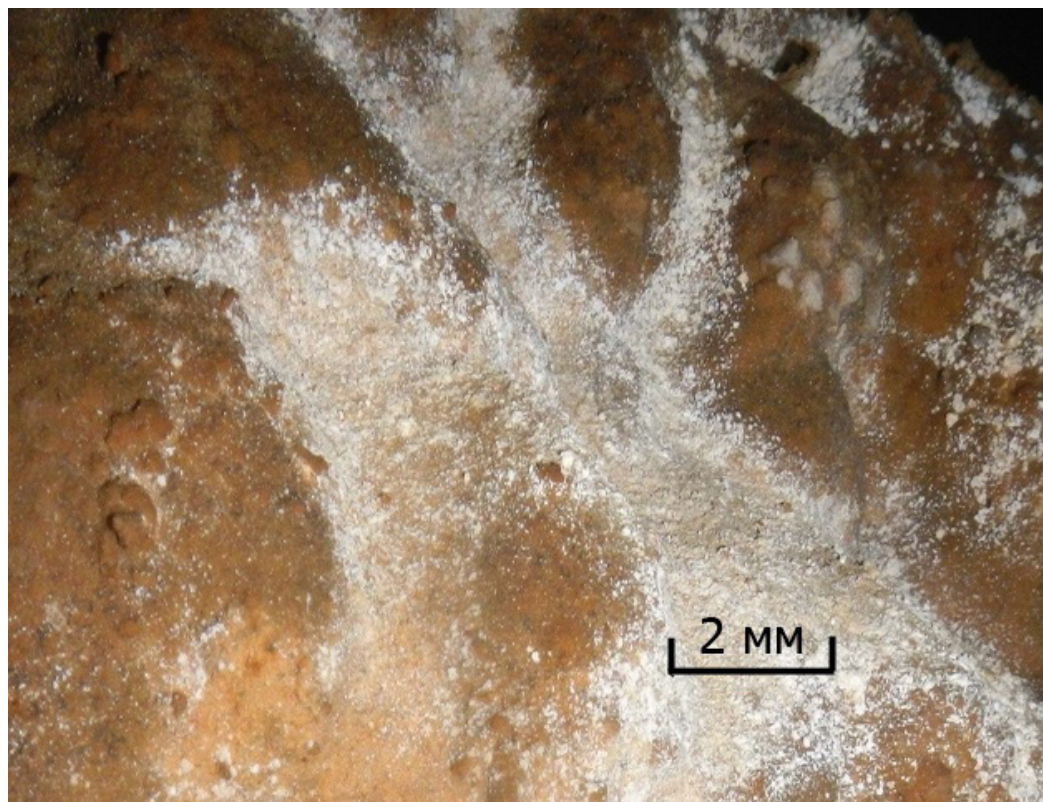


Рис. 1. Натечное образование «лунное молоко» из пещеры Снежная

Снежная-Меженного-Иллюзия составляет 27078 м, глубина 1753 м, она является третьей по глубине в мире и самой длинной карстовой полостью Кавказа. В ней встречаются различные вторичные минералы: Mg- и Sr-содержащий кальцит, арагонит, гипс, гидромагнезит, целестин, стронцианит, доломит, гетит, рутил и циркон [2].

Первичный микробиологический посев образцов «лунного молока» проводили на разные агаризованные питательные среды: крахмал-аммиачный агар – КАА, мясо-пептонный агар – МПА, рыбо-пептонный агар – РПА и РПА, разбавленный в 10 раз.

Для определения способности микробных комплексов натечного образования «лунное молоко» осуществлять адгезию на стекле и растворять карбонат кальция (CaCO_3) был проведен эксперимент с использованием метода «Стекла обрастания» [15]. В колбы с 75 мл жидкой питательной среды Виноградского вносили разное количество CaCO_3 , в часть колб добавляли в качестве источника углерода дрожжевой экстракт (ДЭ), затем во все колбы помещали стерильные предметные стекла. В качестве инокулята использовали по 1 мл суспензии, приготовленной из массы «лунного молока», сохраненной на среде Стюарта (полужидкий, бедный питательными веществами субстрат для сохранения и транспортировки широкого спектра микроорганизмов). Эксперимент проводили при двух температурах 4 и 23 °С. Варианты эксперимента представлены в табл. 1.

Через 30 суток были проведены комплексные исследования образцов культуральной жидкости (КЖ) и осадка, окрашивание стекол обрастания по Граму. Для измерения оптической плотности КЖ использовали спектрофотометр Unicо 2800 (United products instruments inc., США). Высев КЖ осуществляли из каждой колбы на агаризованные питательные среды (КАА, РПА, РПА:10, МПА), культивирование проводили при температурах 4 и 23 °С. Для оценки пищевых потребностей выделенных представителей со-

общества (штаммов) были использованы различные источники углерода (трисахариды, дисахариды, моносахариды, салицин, сорбит, малонат натрия). Осадок анализировали с помощью сканирующего электронного микроскопа (EVO-40HV, Carl Zeiss) с напылением платины в режиме вторичных электронов.

Результаты и обсуждение

Для понимания возможных этапов формирования биопленки «лунное молоко» необходимо изучение активности ее отдельных представителей и всей совокупности бактерий микробного консорциума (МК) при воздействии на них изменяющихся абиогенных факторов (температура, доступность органических веществ и др.).

Ранее, в результате количественного ПЦР-анализа исследуемых проб исходной массы «лунного молока» было установлено, что во всех пробах значительную долю составляли представители рода *Rhodofe* – около 34% общего количества обнаруженных копий ДНК эубактерий [10]. Чаще всего эти бактерии используют в качестве акцепторов электронов $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Штаммы *R. ferrireducens* могут утилизировать широкий спектр органических соединений, включая глюкозу, фруктозу, сахарозу, ксилозу, лактат, пропионат, малат и бензоат [33]. Группа железобактерий обладает адгезивными свойствами и способна прикрепляться к поверхности минеральных частиц благодаря продуцированию экзополимеров.

Физиологические особенности развития МК «лунное молоко»

Особенности развития микроорганизмов в питательной среде в присутствии солей кальция в значительной степени зависели от внесения дрожжевого экстракта (ДЭ) и температуры культивирования (табл. 2). Так, наиболее активный рост микроорганизмов, в толще КЖ регистрируемый по изменению ее

Табл. 1

Варианты эксперимента для определения характера растворения CaCO_3 микробными комплексами

№ варианта	Температура 4 °С		№ варианта	Температура 23 °С	
	CaCO_3 , г/л	ДЭ, г/л		CaCO_3 , г/л	ДЭ, г/л
1	1	–	7	1	–
2	5	–	8	5	–
3	10	–	9	10	–
4	1	0,1	10	1	0,1
5	5	0,1	11	5	0,1
6	10	0,1	12	10	0,1

Примечание: «–» – отсутствие вещества.

оптической плотности, был установлен в присутствии ДЭ и не зависел от температуры. Это свидетельствует о способности представителей МК «лунное молоко» использовать для роста и развития природные органические вещества (ОВ), которые продуцируются в результате метаболизма микробных комплексов и лизиса бактериальных клеток. Также была отмечена способность микроорганизмов продуцировать слизистые пленки, оседающие на дне колб.

По отношению к кислороду на 30-е сутки эксперимента были выявлены две основные группы бактериального сообщества, способные к адгезии на стекле: аэробная группа – формирование биопленки наблюдали в контактной зоне жидкая среда-воздух; факультативно-анаэробная группа – развивающаяся в толще питательной среды. Адгезия микроорганизмов происходила фактически на всей поверхности стекла.

Наиболее активное образование биопленок на предметных стеклах наблюдали при 23 °С независимо от наличия дрожжевого экстракта и концентрации кальцита (варианты 7–12). При низкой температуре без добавления ДЭ и внесении 1 г CaCO₃ наблюдали хлопья, слизистые тяжи и полное растворение частиц кальцита. Внесение ДЭ стимулировало адгезию бактериальных клеток на стекле при 4 °С. На разделе фаз ярко выраженные биопленки формировались при 4 °С, в том числе в вариантах 3 (без внесения ДЭ) и 5 (с внесением ДЭ). Присутствие биопленок на стеклах обрастания в виде дискретных чередующихся полос

было обнаружено при низкой температуре в варианте 6 (избыток кальция, в присутствии ДЭ). Формирование обрастаний в 3 слоя свидетельствует об изменении структуры сообщества при последовательной утилизации разных метаболитов.

При избытке карбоната кальция (10 г/л) на стеклах обрастания зарегистрирован сложный «микробный пейзаж». Рост биопленки был отмечен выше раздела фаз. Это возможно при участии в структуре сообщества бактерий, обладающих скользящим ростом, который способствует быстрой колонизации твердых поверхностей.

Высев экспериментальной КЖ на агаризованные среды позволил оценить степень влияния предварительного поступления ОВ на дальнейшее развитие биопленки. Согласно визуальному осмотру колоний на агаризованных средах, поступление ДЭ способствовало интенсивности роста микроорганизмов, но не влияло на разнообразие сообщества. Наиболее активное слизееобразование колониями отметили при температуре 4 °С (варианты 5 и 6) на среде КАА, содержащей крахмал. Известно, что полимерные вещества стимулируют образование биопленок и способствуют активному функционированию микробного сообщества [41]. Во многих случаях микроорганизмы и их внеклеточные полимерные вещества действуют как эффективные центры формирования новых структур, которые могут привести к пассивной инкрустации биопленок и повлиять на структуру натечных образований [46].

Табл. 2

Особенности роста микроорганизмов «лунного молока» в различных условиях эксперимента

№ варианта	Адгезия на стекле		Рост в толще КЖ	Пленки на дне
	в толще КЖ	на разделе фаз		
4 °				
1	+	+	+	++++
2	+	++	+	+++
3	+	++++	+	+++
4	++	+++	++	+
5	++	++++	++	++
6	++	+++	++	++
23 °				
7	++++	+++	+	++
8	++++	+++	+	++
9	++++	+++	+	++
10	++++	+++	++	+
11	++++	+++	++	+
12	++++	+++	++	+

Примечания.

«++» – замедленный рост; «+++» – умеренный рост; «++++» – активный рост.

Для исследования потребностей МК в различных источниках углерода среди бактерий, выделенных на агаризованных питательных средах, были отобраны 7 наиболее активных штаммов. Установлено, что некоторые из них активно используют в качестве источника углерода моносахариды: рамнозу, маннозу, арабинозу; дисахарид мальтозу; глюкозид салицин. Два штамма были способны ферментировать моносахарид ксилозу; дисахариды сахарозу и мальтозу; трисахарид раффинозу и спирт сорбит. В кооперации эти бактерии могли утилизировать широкий спектр органических веществ.

Известно, что сложная архитектура биопленок создает условия, способствующие симбиотическим взаимоотношениям между бактериями разных видов, так называемый эффект quorum sensing (взаимной поддержки). При этом образование или потребление какого-либо субстрата в биопленке происходит с большей интенсивностью, чем отдельными представителями [35]. Это позволяет микробному комплексу оптимально использовать все доступные источники питания и энергии, обеспечивая этим жизнедеятельность смешанного консорциума.

Трансформация карбонатов кальция *in vitro*

Анализ осадка с помощью сканирующего электронного микроскопа позволил выявить разные стадии растворения кубических кристаллов кальцита *in vitro* при участии микробного сообщества «лунное молоко». Полное растворение 1 г/л карбоната кальция было зарегистрировано при 4 °С. При более высоких концентрациях карбоната кальция (5 и 10 г/л) происходило склеивание не растворившихся взвешенных частиц кальцита (рис. 2). Внесение ДЭ стимулировало более активное склеивание кристаллов CaCO_3 за счет интенсивного образования слизистого полимерного материала. При температуре 23 °С и низкой концентрации CaCO_3 также наблюдали его постепенное растворение. Максимальное количество биопленок, погруженных в полимерный матрикс, наблюдали при низкой температуре. В этом варианте эксперимента были зафиксированы самые крупные биопленки и обильное слизееобразование. При более высоких концентрациях карбоната кальция можно было зафиксировать разные стадии растворения его кристаллов.

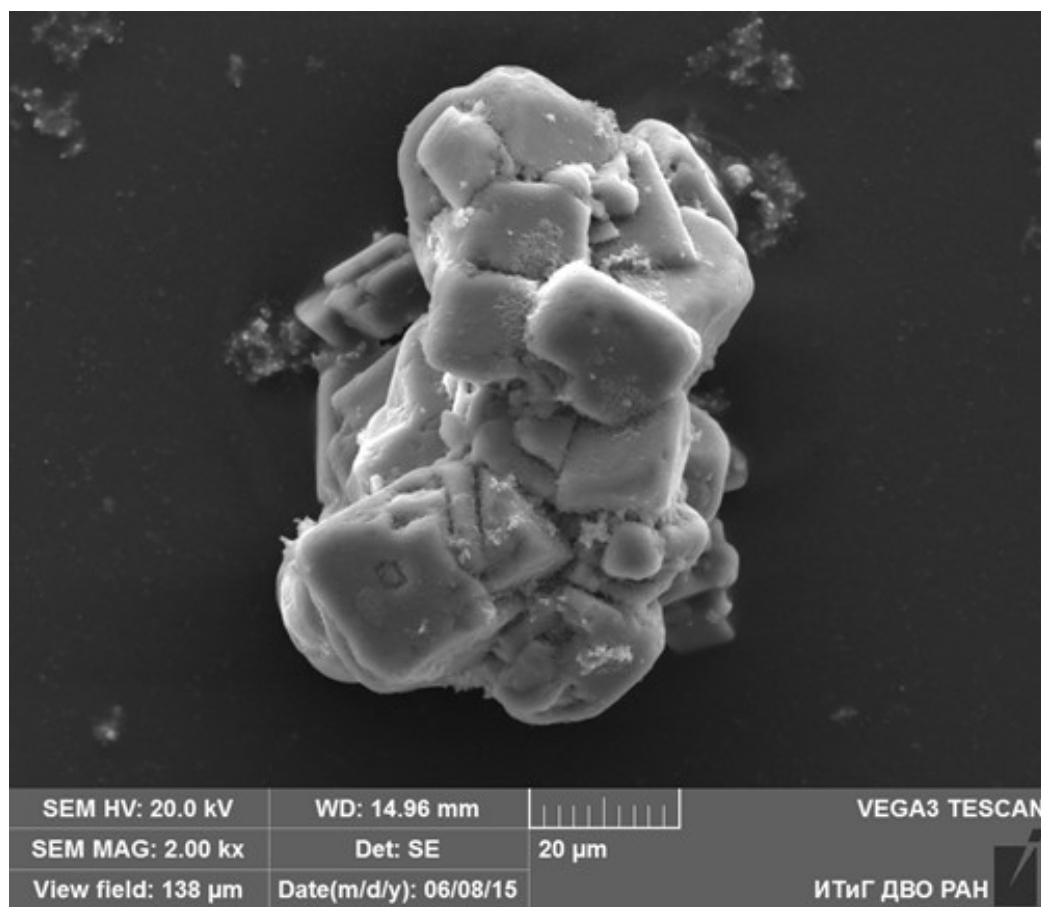


Рис. 2. Тонкодисперсный осадок из склеенных кристаллов карбоната кальция (вариант 3, ×2000)

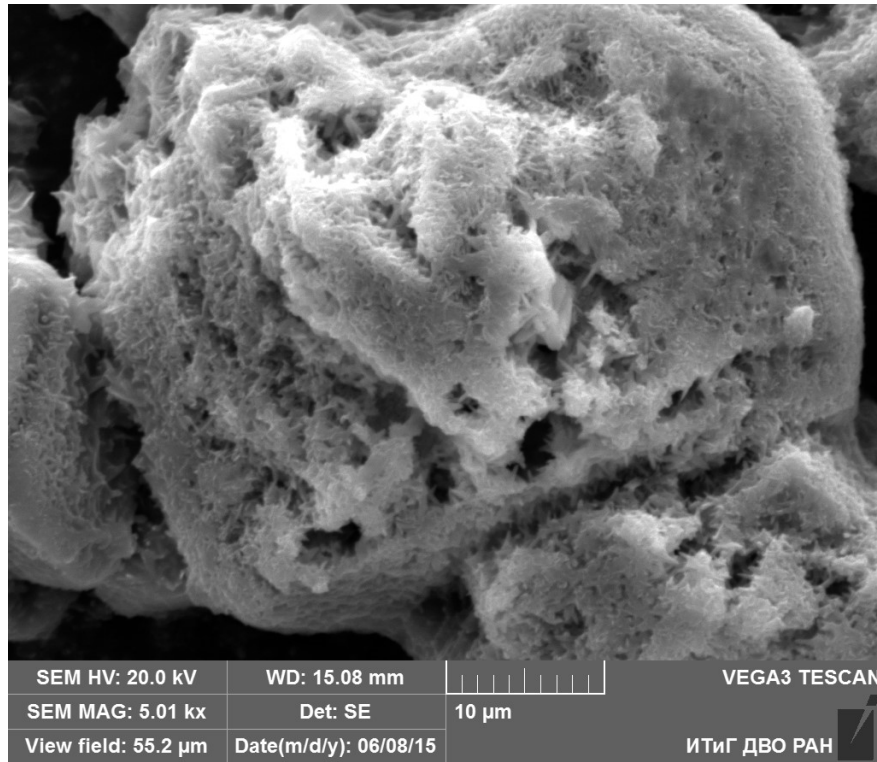


Рис. 3. Стадия растворения кристалла кальцита через 30 суток культивирования (вариант 12, $\times 5000$)

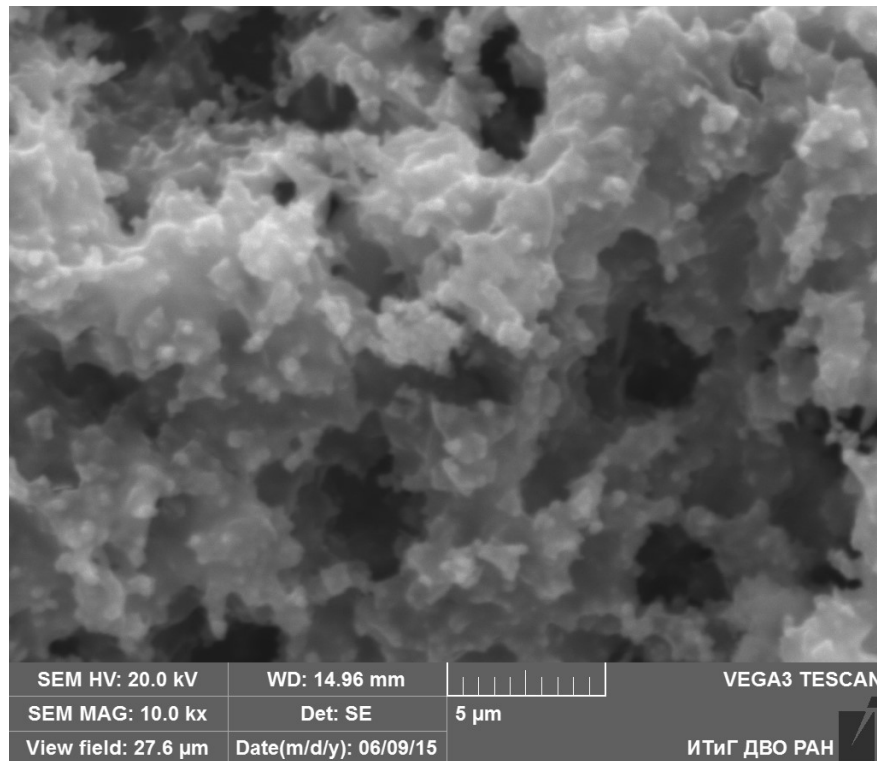


Рис. 4. Основная масса осадка представлена в виде биопленок, состоящих из овальных клеток бактерий, погруженных в слизистый матрикс (вариант 12, $\times 10^4$)

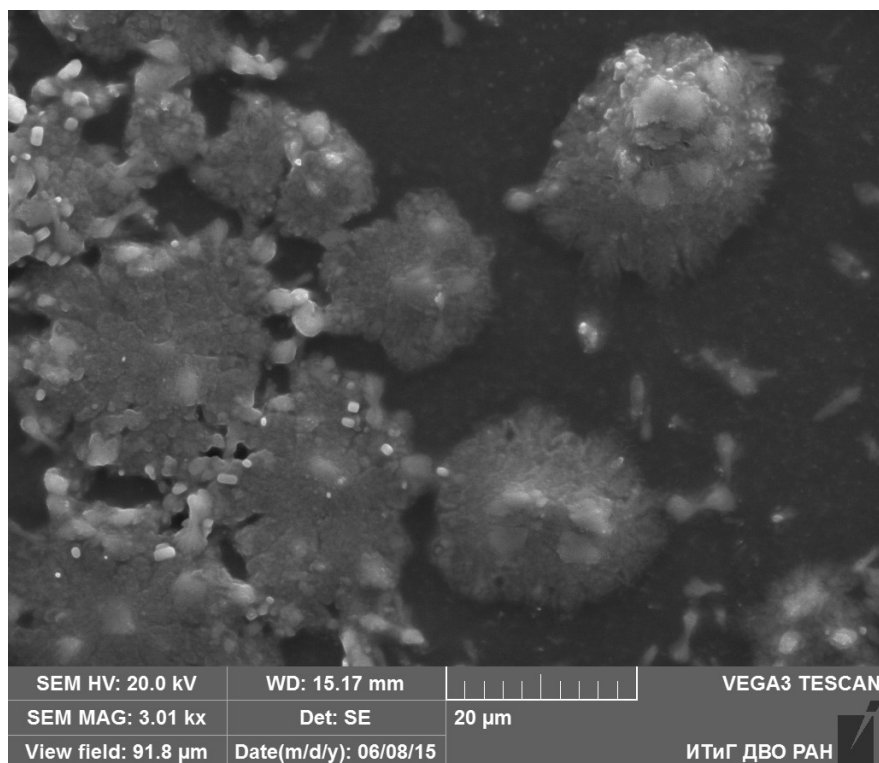


Рис. 5. Вторичное переотложение солей кальция вокруг бактериальных колоний ($\times 3000$)

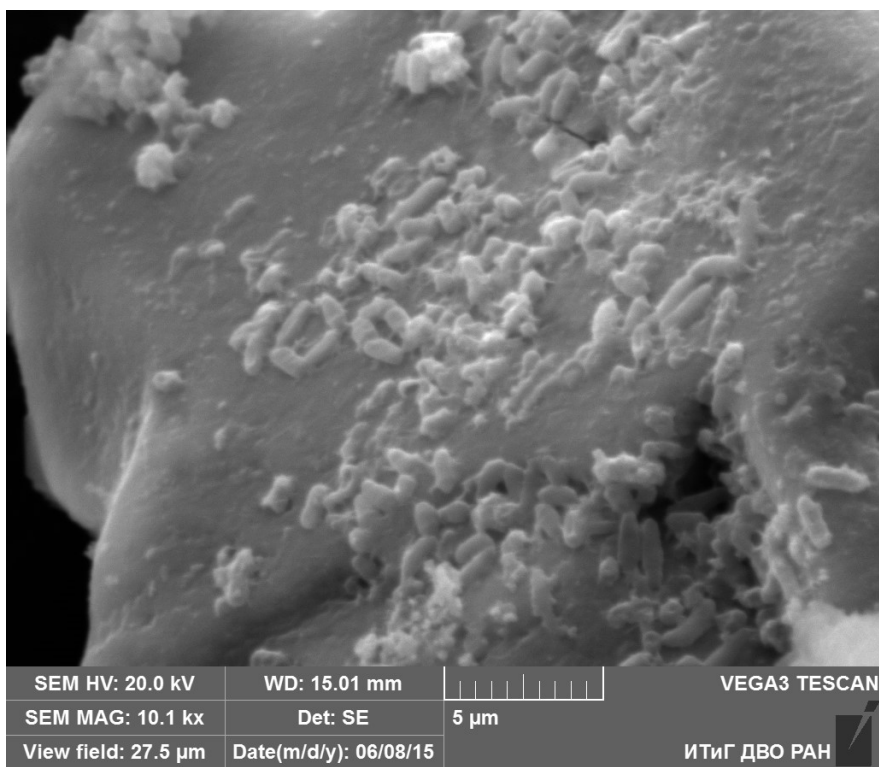


Рис. 6. Колонизация поверхности кристаллов кальцита бактериальными клетками ($\times 10^4$)

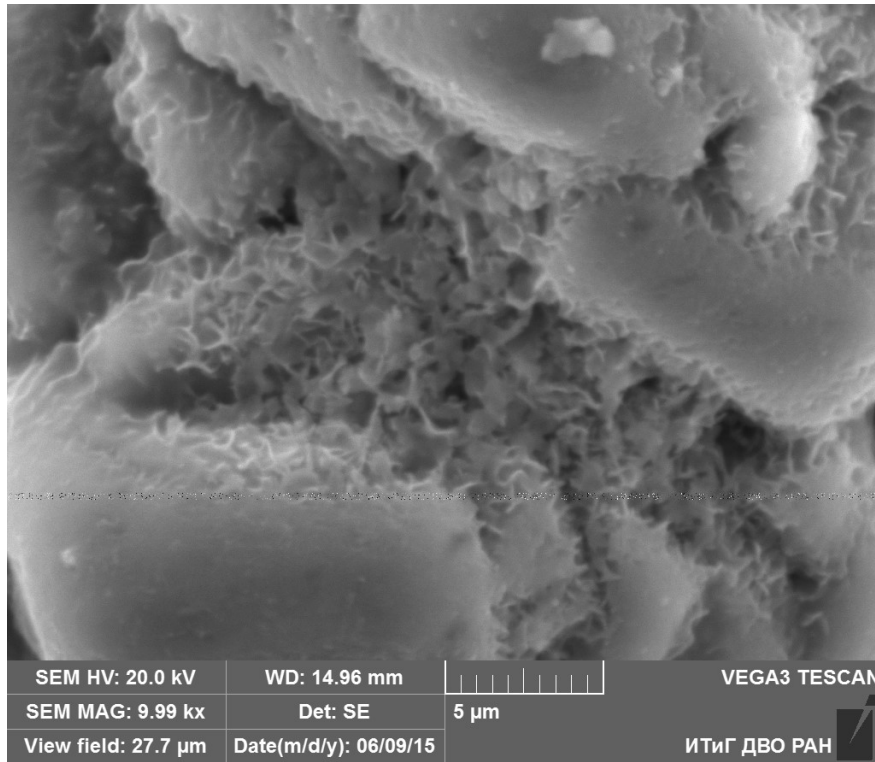


Рис. 7. Кристаллы кальцита, покрытые биопленками ($\times 10^4$)

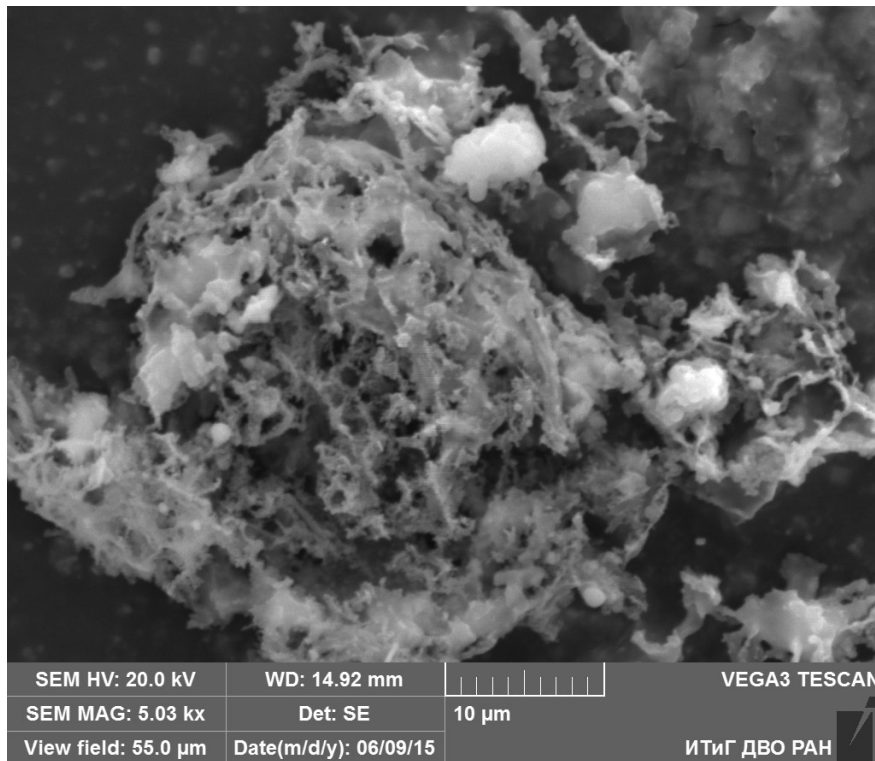


Рис. 8. Биопленки в виде сетчатых структур, повторяющие контуры растворенного кристалла кальцита (вариант 10, $\times 5000$)

При электронном сканировании слизистого осадка обнаружены конгломераты из растворимых кристаллов карбоната кальция (рис. 3) и бактериальные клетки, погруженные в слизистый матрикс (рис. 4).

Экспериментально подтверждено переотложение солей кальция в составе биопленки. Так, только в варианте 9 (23 °С, избыток кальцита, без внесения ДЭ) на предметном стекле на разделе фаз через 30 суток появилась ярко выраженная белая полоса. Электронное сканирование тонкодисперсных частиц из этого варианта эксперимента позволило выявить специфические сферические структуры, которые напоминали микроколонию, инкрустированные кристаллами (рис. 5).

Наглядно стадии колонизации кристаллов кальцита представлены на электронных изображениях осадков при избытке субстрата (10 г/л). Так на рис. 6 зафиксирована первая фаза адгезии бактериальных клеток на поверхности кристалла кальцита. В центре электронного изображения видно, как овальные клетки объединяются друг с другом в виде цифры «100». На следующем изображении (рис. 7) показана стадия активного развития биопленок и растворение кристалла кальцита.

Особенно обильное образование слизистой массы установлено при 23 °С в присутствии ДЭ, причем сформировавшиеся биопленки отличались высокой вязкостью. На электронном изображении можно было увидеть контуры растворенных кристаллов в виде заполненного биопленками пространства (рис. 8).

Выше было сказано, что ионы кальция способствуют агрегации бактериальных клеток и формированию биопленок. При избытке карбоната кальция его нерастворенные частицы при обильном слизиобразовании тоже формируют агрегаты. Вполне вероятно, что скорость нарастания массы «лунного молока» *in situ* может возрастать при увеличении концентрации ионов кальция с поступающими в пещеры водными массами. Фактически, консистенция натечного образования «лунное молоко» может выступать в качестве экологического индикатора разрушения пород и интенсивности образования карстовых пустот.

Ранее было показано, что формирование биопленок в поровом пространстве водоносного горизонта, его «цементация» за счет аккумуляции различных элементов (кальция, магния, железа) бактериальными клетками и полимерным матриксом может привести к кольматации порового пространства вокруг водозаборных скважин [9]. Изменение экологической обстановки в поровом пространстве может привести к переотложению ионов кальция на горных породах, покрытых первопоселенцами. Как следствие будет происходить цементация (кальцинирование) порового пространства, прекращение инфильтрации природных вод (трещиноватой и капельной) и прекращение нарастания массы «лунного молока».

Этапы развития биопленки «лунное молоко»

На основании проведенных исследований и имеющихся литературных данных [23, 28, 49] предлагается схема основных этапов формирования биопленки «лунное молоко» (moonmilk) в карстовых пещерах (рис. 9).

1. Этап необратимой адгезии микроорганизмов. Данный этап начинается с поступления дождевой, талой воды при инфильтрации через почву и некарстовые породы, подземной воды из зоны взаимодействия «вода–порода» или при ее конденсации на стенах пещеры. Поступившие с водой первопоселенцы (хемолитотрофы, хемоорганотрофы или споры гетеротрофных микроорганизмов) необратимо прикрепляются к поверхности материнской породы. Предположительно, в разных экологических нишах в зависимости от глубины и структуры пещеры источник первопоселенцев будет определяться категорией, близостью и скоростью водотока.

2. Этап роста биопленки. В результате роста колоний за счет природных органических веществ и продукции полимерного матрикса происходит формирование и созревание биопленки. Поступление органических веществ в пещеру осуществляется с водными массами (поверхностные и подземные), воздухом, биотой и в результате антропогенного вмешательства. На этом этапе микробные комплексы за счет выделения продуктов жизнедеятельности могут растворять горные породы и вновь переводить отдельные элементы (кальций, железо, марганец) в нерастворенное состояние (биогенное минералообразование).

3. Этап накопления биомассы «лунного молока». В результате утилизации метаболитов первопоселенцев начинают активный рост колонии органотрофных микроорганизмов, которые продуцируют полимерный матрикс, аккумулируют различные элементы, в результате чего увеличивается общая биомасса «лунного молока».

4. Этап дисперсии и коркообразования. На последнем этапе развитие биопленки зависит от интенсивности поступления поверхностных и подземных вод и может пойти в двух направлениях. Если дренаж воды продолжается, происходит периодическая дисперсия микроорганизмов. При этом от зрелой биопленки отрываются отдельные клетки, способные вновь прикрепляться к поверхности, образовывать новые колонии и завоевывать новые пространства. В случае прекращения доступа воды можно наблюдать процесс коркообразования, когда происходят инкрустация бактериальных биопленок различными элементами и формирование на поверхности материнской породы минеральных корок.



Рис. 9. Схема этапов развития натечного образования «лунное молоко»

Заключение

Таким образом, по комплексу признаков натечное образование «лунное молоко» (*moonmilk*) из пещеры Снежная можно отнести к сложному микробному консорциуму, в котором роль «первичных колонизаторов» могут играть хемолитотрофные представители рода *Rhodoferox* и хемоорганотрофные бактерии рода *Bacillus*. Полимерный матрикс может выступать как активный аккумулятор других элементов, способствуя увеличению биомассы «лунного молока».

Экспериментально показано, что при создании определенных условий для жизнедеятельности микробного сообщества на минеральных частицах карбоната кальция изменяется его структура и характер метаболизма, в частности, это может привести к доминированию микроорганизмов, активно растворяющих коренную породу. Анализ электронных изображений позволил выявить разные стадии растворения кубических кристаллов кальцита *in vitro* при участии комплексного микробного сообщества спелеотемы «лунное молоко». Полное растворение 1 г/л кристаллов CaCO_3 происходило при 4 °C за 30 суток. Также при электронном сканировании биомассы одного из

штаммов бактерий был выявлен начальный этап кристаллообразования в биопленке.

Следует отметить, что присутствие «лунного молока» в пещерах свидетельствует об активной фильтрации поверхностных и подземных вод. Прекращение развития биомассы «лунного молока» и переход его в твердые породы можно использовать в качестве показателя нарушения водного дренажа и прогнозирования изменения экологического состояния пещер. Водный режим в пещерах в значительной степени зависит от сезонных и многолетних изменений климата.

Биосферный подход к исследованию натечного образования «лунное молоко» основан на междисциплинарных исследованиях, которые опираются на макропроцессы (геологические, геохимические) и микропроцессы, которые происходят в масштабах микробных клеток и формирующихся из них биопленок. «Лунное молоко» является ярким доказательством роли живого вещества в преобразовании горных пород подземных экосистем. Трансформация кальцитов приводит к формированию специфических натечных образований в виде биопленок и преобразованию карстовых пещер.

Литература

Список русскоязычной литературы

1. Абдуллин ШР. Разнообразие трофической структуры экосистем пещер. Усп совр биол. 2014;134(2):192-204.
2. Базарова ЕП, Мазина СЕ, Ходырева ЕВ. Минералогические исследования в пещерной системе Снежная-Меженного-Иллюзия (Западный Кавказ, Бзыбский хребет): предварительные результаты и направления дальнейших работ. Спелеология и карстология. 2013;(10):76-85.
3. Вахрушев БА, Дублянский ВН, Амеличев ГН. Карст Бзыбского хребта. Западный Кавказ. М.: РУДН; 2001.
4. Власов АД. Разработка научно-методических подходов к мониторингу объектов культурного наследия антропогенных ландшафтов на основе исследования литобионтных систем. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.: СПбГУ; 2015.
5. Вернадский ВИ. Биосфера и ноосфера. М.: Наука; 1989.
6. Вернадский ВИ. Химическое строение Биосферы Земли и ее окружения. М.: Наука; 2001.
7. Заварзин ГА. Лекции по природоведческой микробиологии. М.: Наука, 2003.
8. Заварзин ГА. Эволюция прокариотной биосферы. Микробы в круговороте жизни: 120 лет спустя. Чтение им. СН Виноградского. М.: МАКС Пресс; 2011.
9. Кондратьева ЛМ, Литвиненко ЗН. Формирование биопленок микробными комплексами подземных вод *in vitro*. Биотехнология. 2014;(3): 73-82.
10. Кондратьева ЛМ, Полевская ОС, Литвиненко ЗН, Голубева ЕМ, Коновалова НС. Роль микробного сообщества в формировании натечного образования «лунное молоко» в карстовой пещере Снежная (Абхазия). Микробиология. 2016;85(5):598-608.
11. Кулаков ВВ, Кондратьева ЛМ. Биогеохимические аспекты очистки подземных вод Приамурья. Тихоокеанская геология. 2008;27(1):109-18.
12. Мазина СЕ, Семиколенных АА. Различные формы лунного молока пещер России в свете проблемы генезиса. Пещеры. 2010;(33):34-44.
13. Максимович НГ, Хмурчик ВТ. Влияние микроорганизмов на минеральный состав и свойства грунтов. Вестник Пермского университета. 2012;3(16):47-54.
14. Максимович НГ, Мещерякова ОЮ, Хмурчик ВТ. Микробиологические процессы при нефтяном загрязнении карстовых массивов. Актуальные проблемы экологии и природопользования. 2010;(12):89-93.
15. Намсараев ББ, Бархутова ДД, Хахинов ВВ. Полевой практикум по водной микробиологии и гидрохимии. Методическое пособие. Улан-Удэ: Изд-во Бурятского госуниверситета; 2006.
16. Николаев ЮА, Плакунов ВК. Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма? Микробиология. 2007;76(2):149-63.
17. Оборин АА, Рубинштейн ЛМ, Хмурчик ВТ, Чурилова НС. Концепция организованности подземной биосферы. Екатеринбург: УрО РАН; 2004.
18. Семенов АМ, Федоренко ВН, Семенова ЕВ. Микроорганизмы на поверхности морских макрофитов в северных морях России и их возможное практическое использование. Биосфера. 2014;6:60-76.
19. Шварцев СЛ, Рыженко БН, Алексеев ВА. Геологическая эволюция и самоорганизация системы вода-порода. Новосибирск: Изд-во СО РАН; 2007.

Общий список литературы/Reference List

1. Abdullin SR. [The diversity of the trophic structure of cave ecosystems]. Uspekhi Sovremennoy Biologii. 2014;134(2):192-204. (In Russ.)
2. Bazarova EP, Mazina SE, Hodyreva EV. [Mineralogical investigations in the Snezhnaya-Mezhenogo-Illuziya cave system (Bzybkiy Ridge, Western Caucasus): preliminary results and directions for further research]. Speleologiya i Karstologiya. 2013;(10):76-85. (In Russ.)
3. Vakhrushev BA, Dublyansky VN, Amelichev GN. Karst Bzybskogo Khrabta. Zapadnyi Kavkaz. [Bzyb Karst Ridge. Western Caucasus]. Moscow: RUDN; 2001. (In Russ.)
4. Vlasov AD. [The Development of Scientific and Methodological Approaches to the Monitoring of Cultural Heritage of Anthropogenic Landscapes Based on Studies of Lithobiotic Systems]. PhD Theses. Saint Petersburg: SPbGU; 2015. (In Russ.)
5. Vernadsky VI. Biosfera i Noosfera. Moscow: Nauka, 1989. (In Russ.)
6. Vernadsky VI. Khimichaskoye Stroyeniye Biosfery Zemli I Yeyo Okruzheniya. [The Chemical Structure of Earth Biosphere and its Environment]. Moscow: Nauka, 2001. (In Russ.)
7. Zavarzin GA. Leksii po Prirodovedchaskoy Mikrobiologii [Lectures on Naturalist Microbiology]. Moscow: Nauka; 2003. (In Russ.)
8. Zavarzin GA. Evoliutsiya Prokariotnoy Biosfery. Mikroby v Krugovorote Zhizni: 120 Let Spustia [The Evolution of the Prokaryotic Biosphere. Microbes in the Cycle of Life: 120 Years After]. Moscow: MAKS Press; 2011. (In Russ.)

9. Kondratyeva LM, Litvinenko ZN. [Biofilm formation by microbial complexes of underground waters in vitro]. *Biotekhnologiya*. 2014;(3):73-82. (In Russ.)
10. Kondratyeva LM, Polevskaya OS, Litvinenko ZN, Golubeva YeM, Konovalova NA. [The role of microbial community in the formation of moonmilk speleothems in Snezhnaya Karst cave (Abkhazia)]. *Mikrobiologiya*. 2016;85(5):598-608. (In Russ.)
11. Kulakov VV, Kondratyeva LM. [Biogeochemical aspects of groundwater cleansing in Amur Region]. *Tikhookeanskaya Geologiya*. 2008;27(1):109-18. (In Russ.)
12. Mazina CE, Semikolennykh AA. [Various forms of moonmilk in Russian caves in the light of the problem of their genesis]. *Peschery*. 2010;(33):34-44. (In Russ.)
13. Maksimovich NG, Khmurchik VT. [The Influence of microorganisms on the mineral composition and properties of soils]. *Vestnik Permskogo Universiteta*. 2012;3(16):47-54. (In Russ.)
14. Maksimovich NG, Mescheryakov OY, Khmurchik VT. [Microbiological processes in oil pollution of karst massifs. *Aktualnye Problemy Ekologii i Prirodopolzovaniya*]. 2010;(12):89-93. (In Russ.)
15. Namsaraev BB, Barkhutova DD, Khakhinov VV. [Field Workshop on Water Microbiology and Hydrochemistry.]. Ulan-Ude: Buryat State University; 2006. (In Russ.)
16. Nikolayev UA, Plakunov VC. [Biofilm: a «germ city» or an equivalent of the multicellular organism?]. *Mikrobiologiya*. 2007;76(2):149-63. (In Russ.)
17. Oborin AA, Rubinstein LM, Khmurchik VT, Churilova NS. *Kontseptsiya Organizovannosti Podzemnoy Biosfery*. [The Concept of Orderliness of Underground Biosphere]. Yekaterinburg: UrO RAN; 2004. (In Russ.)
18. Semenov AM, Fedorenko VN, Semenova EV. [Microorganisms on the surfaces of marine macrophytes in the Northern seas of Russia and prospects for their practical application]. *Biosfera*. 2014;6:60-76. (In Russ.)
19. Shvartsev CO, Ryzhenko BN, Alekseyev VA. *Geologicheskaya Eholiytsiya i Sammorganizatsiya Sistemy Voda-Poroda*. [The Geological Evolution and Self-Organization of Water-Rock System]. Novosibirsk: SO RAN; 2007. (In Russ.)
20. Blyth AJ, Frisia S. Molecular evidence for bacterial mediation of calcite formation in cold highaltitude caves. *Geomicrobiol J*. 2008;25:101-11.
21. Boston P, Spilde M, Northup D, Melim L, Soroka D, Kleina L, Lavoie K, Hose L, Mallory L, Dahm C, Crossey L, Schelble R. Cave biosignature suites: Microbes, minerals and mars. *Astrobiology*. 2001;1:25-55.
22. Borsato A, Frisia S, Jones B, Van der Borg K. Calcite Moonmilk: crystal morphology and environment of formation in caves in the Italian Alps. *J Sediment Res*. 2000;70:1179-190.
23. Cañaveras JC, Hoyos M, Sanchez-Moral S, Lario J, Laiz L, Gonzalez JM, Saiz-Jimenez C. On the origin of fiber calcite crystals in moonmilk deposits. *Naturwissenschaften*. 2006;93:27-32.
24. Curry M, Boston P, Spilde M, Baichtal J, Campbell A. Cottonballs, a unique subaqueous moonmilk, and abundant subaerial moonmilk in Cataract Cave, Tongass National Forest, Alaska. *Int J Speleol*. 2009;38:111-28.
25. Chirienco M. Calcite moonmilk in the Humpleu Cave System (Romania). The relationship between crystal morphology and cave topoclimate. *Cave Karst Sci*. 2002;29:101-4.
26. Cosmidis J, Benzerara K, Gheerbrant E, Estève I, Bouya B, Amaghaz M. Nanometer-scale characterization of exceptionally preserved bacterial fossils in Paleocene phosphorites from Ouled Abdoun (Morocco). *Geobiology*. 2013;11:139-53.
27. Costerton JW. *The Biofilm Primer*. Berlin, New York: Springer; 2007.
28. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber JW, Lappin-Scott HM. *Microbial biofilms*. *Annu Rev Microbiol*. 1995;49:711-45.
29. Das T, Sehar S, Koop L, Wong YK, Ahmed S. Influence of calcium in extracellular DNA mediated bacterial aggregation and biofilm formation. *PLoS One*. 2014;9(3):1-11.
30. Dubinina GA, Sorokina AYU. Neutrophilic lithotrophic iron-oxidizing prokaryotes and their role in the biogeochemical processes of the iron cycle. *Microbiology (Moscow)*. 2014;83:1-15.
31. Ercole C, Cacchio P, Botta A L, Centi V, Lepidi A. Bacterially induced mineralization of calcium carbonate: The role of exopolysaccharides and capsular polysaccharides. *Microscopy Microanalysis*. 2007;13:42-50.
32. Hill CA, Forti P. Cave mineralogy and the NSS: past, present, future. *J Cave Karst Stud*. 2007;69:35-45.
33. Finnerant KT, Johnsen CV, Lovley DR. *Rhodoferraxferrireducens* sp. nov., a psychrotolerant, facultatively anaerobic bacterium that oxidizes acetate with the reduction of Fe(III). *Int J Systemat Evolut Microbiol*. 2003;53:669-73.
34. Flemming HC. Biofouling in water systems-cases, causes, counter measures. *Appl Environ Biotechnol*. 2002;59:629-40.
35. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8:623-33.
36. Kerr RA. Life goes to extremes in the deep earth – and elsewhere. *Science*. 1997;276:703-7.

37. Lehman RM, Colwell FS, Bala GA. Attached and unattached microbial communities in a simulated basalt aquifer under fracture- and porous-flow conditions. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:2799-809.
38. Mitchell AC, Ferris FG. The influence of *Bacillus pasteurii* on the nucleation and growth of calcium carbonate. *Geomicrobiol J.* 2006;23:213-26.
39. Mulec J, Zalar P, Zupan Hajna N, Rupnik M. Screening for culturable microorganisms from cave environments (Slovenia). *Acta Carsologica.* 2002;31(2):177-87.
40. Musgrove M, Banner JL. Controls on the spatial and temporal variability of Vadose dripwater geochemistry: Edwards Aquifer, central Texas. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 2004;68:1007-20.
41. Perry TD, Duckworth OW, McNamara CJ, Martin ST, Mitchell R. Effects of the biologically produced polymer alginic acid on macroscopic and microscopic calcite dissolution rates. *Environ Sci Technol.* 2004;38:3040-6.
42. Portillo MC, Gonzales JM. Moonmilk deposits originate from specific bacterial communities in Altamira Cave (Spain). *Microb Ecol.* 2011;61:182-9.
43. Ras M, Lefebvre D, Derlon N, Paul E, Girbal-Neuhauser E. Extracellular polymeric substances diversity of biofilms grown under contrasted environmental conditions. *Water Res.* 2011;45:1529-38.
44. Richter DK, Immenhauser A, Neuser RD. Electron backscatter diffraction documents randomly orientated c-axes in moonmilk calcite fibres: Evidence for biologically induced precipitation. *Sedimentology.* 2008;55:487-97.
45. Salas ES, Bhartia R, Anderson L, Hug WF, Reid RD, Iturrino G, Edwards KJ. *In situ* detection of microbial life in the deep biosphere in igneous ocean crust. *Front Microbiol.* 2015;6:1260.
46. Sallstedt T, Ivarsson M, Lundberg J, Sjöberg R, Vidal Romaní JR. Speleothem and biofilm formation in a granite/dolerite cave, Northern Sweden. *Int J Speleol.* 2014;43(3):305-13.
47. Sanchez-Moral S, Portillo MC, Janices I, Cuezva S, Fernandez-Cortes A, Cañaveras JC, Gonzalez JM. The role of microorganisms in the formation of calcitic moonmilk deposits and speleothems in Altamira Cave. *Geomorphology.* 2012;139:285-92.
48. Summers EA, Paoletti MG, Beggio M, Dorigo L, Pamio A, Gomiero T, Furlan C, Brilli M, Dreon AL, Bertoni R, Squartini A. Comparative microbial community composition from secondary carbonate (moonmilk) deposits: implications for the Cansiliella servadeii cave hydropetric food web. *Int J Speleol.* 2013;42(3):181-92.
49. Sing R, Paul D, Jain RK. India Biofilms: implications in bioremediation. *Trends Microbiol.* 2006;14(9):49-64.
50. Štyriaková I, Štyriak I, Oberhänsli H. Rock weathering by indigenous heterotrophic bacteria of *Bacillus* spp. at different temperature: a laboratory experiment. *Minerol Petrol.* 2012;105:135-44.
51. Sutherland IW. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology.* 2001;147(1):3-9.
52. Vesper DJ, Loop CM, White WB. Contaminant transport in karst aquifers. *Theor Appl Karstol.* 2001;(13-14):101-11.
53. Vorobyova E, Soina V, Gorlenko M, Minkovskaya N, Zalinova N, Mamukelashvili A, Gilichinsky D, Rivkina E, Vishnivetskaya T. The deep cold biosphere: facts and hypothesis. *FEMS Microbiol Rev.* 1997;(20):277-90.
54. Ye F, Peng G, Li Y. Influences of influent carbon source on extracellular polymeric substances (EPS) and physicochemical properties of activated sludge. *Chemosphere.* 2011;84:1250-5.

