

# Sanitary-microbiological characteristics of water in the area of the Zmeinyy thermal spring (Northern Baikal, Russia, 2022)

Elovskaya I.S.\*, Chernitsyna S.M., Pavlova O.N., Zemskaya T.I.

Limnological Institute Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Batorskaya Str., 3, Irkutsk, 664033, Russia

**ABSTRACT.** The analysis of sanitary-significant microorganisms in two baths of the thermal spring Zmeinyy, the streams of the baths and at a distance of 5 and 20 meters from the shore was carried out during the day before and the day after tourists' bathing. Exceedance of permissible values of sanitary-microbiological indicators in accordance with SanPiN 1.2.3685-21 were detected in the baths, streams of outflow and in the water edge at a distance of up to 5 meters. The indicator of total (generalized) coliform bacteria (TCB) in all studied samples did not decrease throughout the day, the highest values of the number of opportunistic microorganisms were observed in the baths of the thermal spring and in the streams of outflow, where the water temperature was ~ 32 - 33°C. The obtained self-cleaning coefficients in the littoral zone up to 20 m had low values (from 0.0008 to 2.53).

**Keywords:** Zmeinyy sulfide spring, organotrophic bacteria, coliform bacteria, enterococci

## 1. Introduction

There are about 60 hydrotherms with different temperature characteristics in the Baikal Rift Zone (BRZ) (Lomonosov, 1974; Borisenko and Zamana, 1978; Zamana and Askarov, 2010). Basically, waters of hydrotherms have sodium composition, low mineralization (from 0.1 g/l to 2.0 g/l), high concentration of silicon in the form of orthosilicic acid  $H_4SiO_4$  (40 - 120 mg/dm<sup>3</sup>) and alkaline environment (pH 8.5 - 10.0).

Studies of sanitary condition of hydrotherms are episodically carried out. In alkaline mineral springs of the Barguzin valley high TCB indices were revealed, as well as the presence of opportunistic bacteria of the genera *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Citrobacter* in frequently visited springs (Kuchiger, Seyuya, Goryachinsk, Kumyska), which indicated a large anthropogenic load (Darmaeva, 2007; Barkhutova, Darmayeva and Namsarayev, 2012).

The Zmeinyy spring located in the Chivyrkuisky bay is very popular place, and a significant number of tourists visit it during the summer period. Its waters are hydrocarbonate-sulphate, contain hydrogen sulphide ( $H_2S$ ) at a concentration of 23.2 mg/l, and are used for treatment and prevention of radiculitis and disorders of the musculoskeletal system (Namsaraev et al., 2007).

When examining the diversity of microbial communities by sequencing the V2-V3 region of the

16S rRNA gene on the MiSeq platform (Illumina), representatives of the families that included opportunistic species were identified in different parts of the Zmeinyy Spring in 2019 (Chernitsyna et al., 2023). Significant exceedances of sanitary-bacteriological indicators (SanPiN 1.2.3685-21) were also observed in Zmeinaya Bay in 2022. The number of TCB in this area exceeded the normative indicators 2 times, enterococci 44 times (Suslova et al., 2022). All previous studies were based on single sampling, data on the dynamics of sanitary-significant microorganisms during a day have not been presented before.

The aim of the study is to assess the number of sanitary-significant microorganisms in the thermal spring Zmeinyy and the coastal zone during the day before and the day after tourists' bathing, as well as determining the self-purifying capacity of coastal waters in the places of springs outflow.

## 2. Materials and methods

Surface water samples were taken according to GOST 31942-2012 in the small and large baths (SB, LB), in the streams of the small and large bath (sSB, sLB), near the pier (P), as well as at a distance of 5 and 20 meters from the shore (5 m and 20 m) (Fig.1). Sampling was conducted on July 11, 2022 at 23:00 after daytime tourists' bathing, on July 12 in the early morning after 6-hour absence of bathers and at 9:00 immediately

\*Corresponding author.

E-mail address: [elovskaya.iren@yandex.ru](mailto:elovskaya.iren@yandex.ru) (I.S. Elovskaya)

Received: August 07, 2023; Accepted: October 09, 2023;

Available online: October 24, 2023

© Author(s) 2023. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



after bathing of several groups of tourists. A total of 16 water samples were collected and 320 analyses were conducted in accordance with MUK 4.2.1884-04 and GOST 24849-2014.

At all sites, water quality was assessed by basic sanitary-microbiological indicators in accordance with SanPiN 1.2.3685-21. The following parameters were determined in each sample in accordance with the methodological instructions (MUK 4.2.1884-04, GOST 24849-2014): TCB, *E. coli*, enterococci, the number of which should not exceed 500 CFU/100 cm<sup>3</sup>, 100 CFU/100 cm<sup>3</sup>, 10 CFU/100 cm<sup>3</sup>, respectively.

The total microbial population (TMP) was conducted by direct microscopic counting of microorganisms on 0.22 μm pore size membrane filters (REATREK-Filter) using DAPI dye (4,6-diamino-2-phenylindole) (Porter, 1980). Microscopy was performed with an epifluorescence microscope Axiolmager.M1 ("Carl Zeiss", Germany). At least 20 fields of vision were viewed. Cell counting in the photographs was carried out using the ImageTest program. Calculation of the TMP value was done by the formula:

$$X = \frac{a \cdot b \cdot 10^6}{c \cdot d \cdot e}$$

where a - is the area of filter (mm<sup>2</sup>); b - number of bacteria counted; c - micrometer area (μm<sup>2</sup>); d - volume of applied preparation (ml); e - number of counted fields of vision (Gerhardt, 1981).

To determine the self-cleansing coefficient, we used MUK.4.2.1884-04. The total microbial count (TMC) was calculated, reflecting the total content of mesophilic aerobic and facultatively anaerobic microorganisms capable of forming colonies on meat-peptone nutrient agar (MPA) at 37°C for 24 h (MPA 37°C) and at 22°C for 72 h (MPA 22°C). Also, to determine the abundance of organotrophic bacteria, a medium with fish-peptone agar (FPA:10) was used, the cultivation temperature was 37°C (Gorbenko, 1961).

Physicochemical characteristics of water (pH, Eh, T) were measured with an instrument pH 3310 (WTW, Germany).

### 3. Results

#### 3.1. Physicochemical characteristics of the spring

The Zmeinyi spring is characterized by relatively high temperature compared to other springs of the Barguzin Basin (Namsaraev et al., 2007). The water temperature in the large bath was 43°C, and in the small one was 38.6°C, pH was 9.6. The redox potential

Table 1. Total microbial count (million cells/mL)

Sampling site	LB	SB	sLB	sSB	P	5 m	20 m
23:00	6.87 ± 0.32	6.83 ± 0.14	8.36 ± 0.34	8.28 ± 0.38	2.05 ± 0.07	1.97 ± 0.05	2.14 ± 0.08
5:00	*	8.02 ± 0.37	5.09 ± 0.22	7.96 ± 0.21	2.27 ± 0.06	2.20 ± 0.07	3.00 ± 0.15
9:00	4.69 ± 0.11	3.01 ± 0.22	-	-	-	-	-

Note: "—" no study was conducted; "\*" - number exceeding the maximum value for counting on filters.

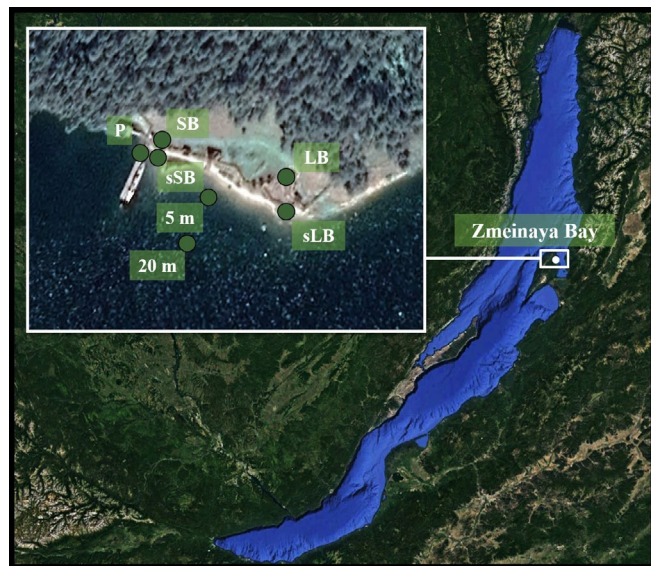


Fig.1. Geographical map of the study area and sampling locations in Zmeinaya Bay (Lake Baikal, Russia). LB – large bath, SB – small bath, sLB – stream of the large bath, sSB – stream of the small bath, P – pier, 5 m - 5 meters, 20 m – 20 meters. Software Earth 7.1.8.3036 Pro <https://www.google.com/intl/ru/earth/versions/#earth-pro> (accessed on February 20, 2023).

(ROP) in the large bath was -434 mV and in the small bath -427 mV, indicating reduced conditions in the spring. At the water's edge, the water temperature was 17°C, pH was 8.8, ROP was -239 mV.

#### 3.2. Number of sanitary-significant microorganisms

On July 11 at 23:00 p.m. after mass tourists bathing in the area of the thermal spring outlet (SB, LB, sSB, sLB), the high TMP values were recorded when cultured on MPA at 37°C, their values ranged from 2013 to 12426 CFU/cm<sup>3</sup> (Fig.2).

This indicator was low at the water's edge near the pier and at a distance of 5 - 20 meters from the shore (10-36 CFU/cm<sup>3</sup>). High count of bacteria growing at 22°C (MPA) and 37°C (FPA:10) was recorded in the stream of small bath (up to 5760 and 3613 CFU/cm<sup>3</sup>, respectively). The TMP value was relatively high in that time in the streams of large and small baths and was 8.36 ± 0.34 and 8.28 ± 0.38 million cells/ml, respectively (Table 1).

High number of TCB was recorded in the large and small baths, in streams and in the littoral zone near the pier (Fig. 3). At a distance of 5 meters from the shore this indicator was also high (up to 626 CFU/100 cm<sup>3</sup>). The stream sample from the large bath showed

continuous growth, while in the littoral zone of the lake this indicator was already within normal limits at 20 meters from the stream (180 CFU/100 cm<sup>3</sup>). High levels of *E.coli* bacteria and recent fecal contamination recorded only in the baths and streams. Spores of sulphite-reducing clostridia were found in the large bath and (2 and 1 CFU/20 cm<sup>3</sup>, respectively).

At 5:00 a.m. on July 12, after a 6-hour break, the count of mesophilic aerobic and facultatively anaerobic microorganisms growing on MPA at 37°C and 22°C decreased. Their count ranged from 563 to 7386 CFU/cm<sup>3</sup> and from 23 to 826 CFU/cm<sup>3</sup>, respectively (Fig. 2). In the littoral zone at a distance of 20 m from the shore, the TMC value (MPA 37°C) increased to 3440 CFU/cm<sup>3</sup>. At this time, an increase in the number of organotrophic bacteria growing on FPA:10 (2330 and 2963 CFU/cm<sup>3</sup>, respectively) was recorded in the small and large baths). A high TMP value was recorded in a large bath when filtering 1 ml of diluted sample, cells formed conglomerates, making counting difficult, which did not allow obtaining reliable values (Table 1). Low TMP values were recorded near the pier and at 5 and 20 m from the shore. Number of TCB in the baths and streams increased approximately 2 times compared to evening values (Fig. 3). At the same time, in the coastal water zone at a distance of 5 and 20 meters from the shore, this indicator decreased by about 30 - 40%. There was also a decrease in the number of *E. coli* and enterococci by 60 - 70 %. Spores of sulfite-reducing clostridia were found only in the stream of the large bath (4 CFU/20 cm<sup>3</sup>) and were not detected in other samples.

At 9:00 a.m. on July 12, after several groups of people bathed, in the large and small baths, the TMC counted on the MPA at 37°C decreased to 903 and 1,050 CFU/cm<sup>3</sup>, respectively, compared to the morning and evening values. The TMP values in the large and small baths were relatively low ( $4.69 \pm 0.11$  and  $3.01 \pm 0.22$  million cells per ml, respectively). The number of TCB in the large bath remained high as it was at 5:00 a.m., while in the small bath this index decreased to 3246 CFU/100 cm<sup>3</sup> (see Fig. 3). The number of spores of sulfite-reducing clostridia was maximum at this time and reached 15 and 12 CFU/20 cm<sup>3</sup>.

Relatively high self-cleaning coefficient was observed in the coastal zone: near the pier (2.53) and at a distance of 5 meters from the shore at 23:00 and 5:00 (1 and 2.16, respectively) (Table 2).

#### 4. Discussion

The healing properties of geothermal springs have been known for a long time. As shown in the work of Buslov S.P. (Buslov, 1990), mineral water from BRZ (Baikal Rift Zone) springs has a beneficial effect on various organ systems: nervous, respiratory, motor, genitourinary, etc., as well as improves skin condition and promotes wound healing. Therefore, the springs are very popular among the population and are open to the public (Namsaraev et al., 2007). At the same time, the geothermal springs of BRZ exceeded repeatedly the normative values of sanitary-significant

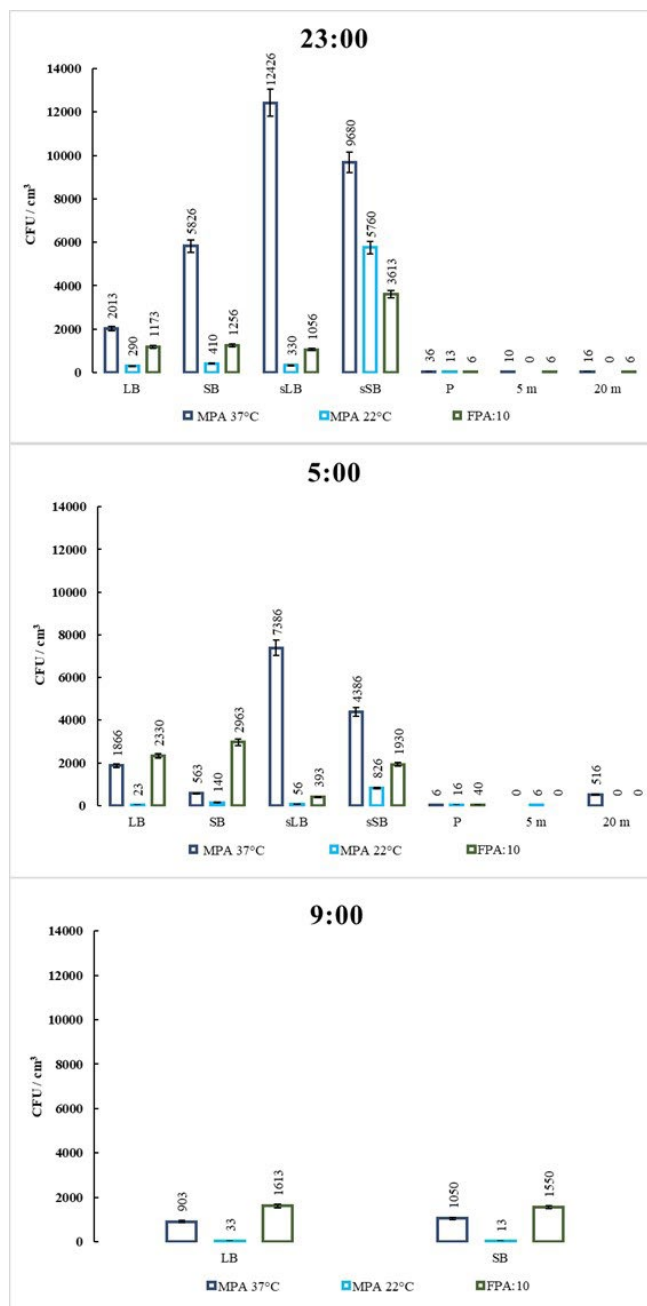


Fig.2. Number of organotrophic mesophilic aerobic and facultatively anaerobic microorganisms in the studied water zone during a day

Table 2. Self-cleaning coefficient in the water area of Zmeinaya Bay

Sampling site \ Sampling time	Sampling site		
	P	5 m	20 m
23:00	0.27	1	0
5:00	2.53	2.16	0.0008
9:00	-	-	-

Note: "-" – no studies were conducted

microorganisms. Thus, in 2012, opportunistic bacteria of the *E. coli* group and bacteria of genus *Enterococcus* were revealed in mineral waters of the Shumak River valley (Suslova et al., 2013). In cold and hot springs of the Baikal region (Kumyska, Serebryany, Goryachinsk), opportunistic microorganisms belonging to the genera *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Citrobacter* and the pathogenic species *Clostridium perfringens*, which is a causative agent of human food poisoning and one of the causative agents of gas gangrene, have also been detected (Barkhutova et al., 2012). As we mentioned above, exceedances of values of sanitary-significant bacteria in the summer period were repeatedly noted in the Zmeinyy spring. Although according to the chemical analysis data, the water of the Zmeinyy spring is constant in time, its composition does not change and corresponds to the previously obtained data (Namsaraev et al., 2007; Plyusnin et al., 2013; Kalmychkov et al., 2020; Chernitsyna et al., 2020). As our studies have shown, an increased content of sanitary-significant microorganisms in the thermal spring of Zmeinaya Bay was observed at different time of the day after the visit of tourists. The highest values exceeding the normative values according to SanPiN 1.2.3685-21 were observed in the evening time of a day (23:00). Early in the morning, despite the 6-hour absence of bathers, the values of TCB, *E. coli*, and enterococci also exceeded the permissible values. Incomplete self-purification processes or insufficient dilution of thermal waters with Baikal waters is evidenced by the values of self-purification coefficient (2.16 - 2.53) near the pier and in the lake littoral zone at a distance of 5 m from the shore.

One of the reasons for constant contamination of the spring with opportunistic microorganisms may be high water temperature (40 - 42°C), which is close to the optimum (37°C) for their growth. For example, *E. coli* has a growth optimum of 37°C, although some strains are able to grow from 40 to 49°C (Ingledew and Poole, 1984). Preservation of bacterial viability, including sanitary bacteria, may be facilitated by low flow of the spring and restored environmental conditions. In streams where water is saturated with O<sub>2</sub> and water temperature is ~ 32 - 33°C, microbial abundance also remains high. The values of TCB, *E. coli*, and enterococci abundance meet the norms only in the littoral zone at a distance of 5 - 20 meters from the shore, where water temperatures are 17°C. It is obvious that a combination of such factors as temperature, water renewal rate in the baths and the number of bathers affect the development and distribution of opportunistic microorganisms in the investigated spring and coastal water area. According to our research results, the waters in the large and small baths of the thermal spring Zmeinyy do not meet the requirements of SanPiN 1.2.3685-21 and are not safe for balneological purposes without special measures. Possible measures to increase the flow of waters of this spring is adding Baikal water at night. Dilution of thermal waters and temporary reduction of temperature in them can reduce the survival rate of opportunistic microorganisms and improve the quality of water in the baths of the spring.

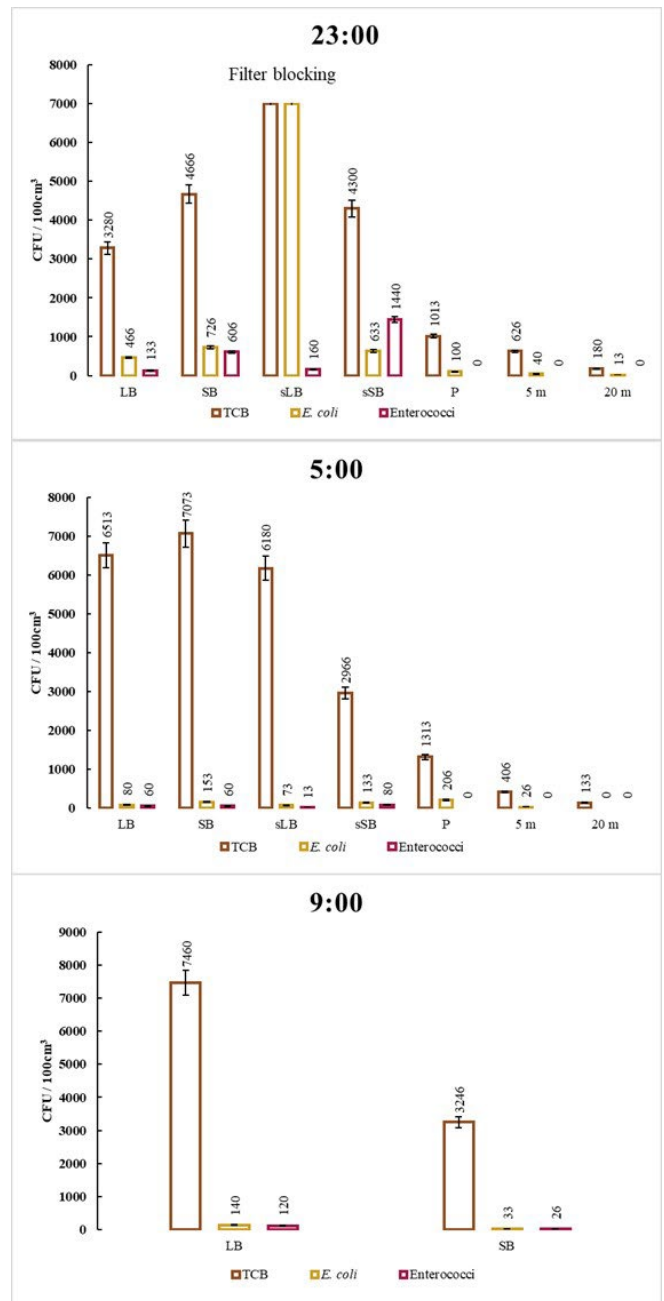


Fig.3. Number of sanitary-significant microorganisms in the studied water area during a day

## 5. Conclusion

According to SanPiN 1.2.3685-21, at different time of the day in the Zmeinyy spring exceedance in the norms of sanitary-microbiological indicators (TCB, *E. coli*, enterococci) were observed. The highest content was observed after tourists bathing, their number remained high and after a 6-hour break. In the littoral zone of the lake (20 meters from the shore) the number of the studied groups corresponded mainly to the norms. It is obvious that a combination of such factors as temperature, water renewal rate in baths and the number of bathers affect the development and distribution of opportunistic microorganisms in the studied spring and coastal water area.

Healing springs, as objects of permanent recreational visit, should be protected from the transfer of opportunistic bacteria in the places of mineral water outlet using special measures. There is also an obvious need to develop regulations for tourists visiting this spring.

## Acknowledgments

The authors thank the staff of Limnological Institute Zakharenko Alexandra Sergeevna and Suslova Maria Yurievna for practical recommendations. The study is carried out within the State assignment 0279-2021-0006 (121032300223-1).

## Conflict of interests

The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Barkhutova D.D., Darmaeva B.V., Namsaraev B.B. 2012. Sanitary-microbiological assessment of cold Arshans and hot mineral springs in the Baikal region. *Acta Biomedica Scientifica* 5(1): 193-196. (in Russian)
- Borisenko I.M., Zamana L.V. 1978. Mineral'nye Vody Buryatskoi ASSR [Mineral water of the Buryat ASSR]. Ulan-Ude: Buryat. Izd. (in Russian)
- Buslov S.P. 1990. Recreational resources of the Lake Baikal basin and prospects of their use. Interaction of socio-economic development and nature protection in the Baikal region. Novosibirsk. (in Russian)
- Chernitsyna S.M., Khalzov I.V., Pogodaeva T.V. 2020. Distribution and morphology of colorless sulfur bacterium of the genus *Thiothrix* in water reservoirs of the Baikal rift zone. *Limnology and Freshwater Biology* (4):976-978. DOI:[10.31951/2658-3518-2020-A-4-976](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2020-A-4-976)
- Chernitsyna S.M., Elovskaya I.S., Pogodaeva T.V. et al. 2023. Bacterial Communities in a Gradient of Abiotic Factors Near a Sulfide Thermal Spring in Northern Baikal. *Diversity* 15(298):1-15 DOI:[10.3390/d15020298](https://doi.org/10.3390/d15020298)
- Darmaeva B.V. 2007. Sanitary-ecological assessment of mineral springs of the Baikal region by microbiological indicators. Cand. Sc. Dissertation, Center for Hygiene and Epidemiology in the Republic of Buryatia, Ulan - Ude, Russia. (in Russian)
- Gerhardt P. 1981. Manual of methods for general bacteriology. Washington: American Society for Microbiology
- Gorbenko Yu.A. 1961. On the most favorable amount of dry nutrient agar in media for culturing marine microorganisms. *Microbiology* 30(1):168-172. (in Russian)
- GOST 31942-2012. Voda pit'yevaya. Otbor prob dlya mikrobiologicheskogo analiza [Drinking water. Sampling for microbiological analysis]. (in Russian) URL:<https://docs.cntd.ru/document/1200097811>
- GOST 24849-2014. Voda. Metody sanitarno-bakteriologicheskogo analiza dlya polevykh usloviy [Water. Methods of sanitary-bacteriological analysis for field conditions] (in Russian) URL:<http://docs.cntd.ru/document/1200115427>
- Inglede W.J., Poole R.K. 1984. The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Washington: American Society for Microbiology 48(3):222-271.
- Kalmychkov G.V., Hachikubo A., Pokrovsky B.G. et al. 2020. Methane with anomalously high  $\delta^{13}C$  and  $\delta D$  values from the coastal thermal springs of Lake Baikal. *Lithology and Mineral Resources* 55(6):439-444. DOI:[10.31857/S0024497X20040035](https://doi.org/10.31857/S0024497X20040035)
- Lomonosov I.S. 1974. Geochemistry and Formation of Modern Hydrotherms of the Baikal Rift Zone. Novosibirsk: Nauka. (in Russian)
- MUK 4.2.1884-04. Sanitarno-mikrobiologicheskii i sanitarno-parazitologicheskii analiz vody poverkhnostnykh vodnykh ob'yektov [Sanitary-microbiological and sanitary-parasitological analysis of water in surface water bodies]. (in Russian) URL:<http://docs.cntd.ru/document/1200039680>
- Namsaraev B.B., Khakhinov V.V., Garmayev E.Zh. et al. 2007. Water systems of the Barguzin Basin. Ulan-Ude: Buryat. Izd. (in Russian)
- Plyusnin A.M., Zamana L.V., Shvartsev S.L. et al. 2013. Hydrogeochemical peculiarities of nitrogen composition of terms in the Baikal rift zone. *Geology and Geophysics* 54(5):647-664. (in Russian)
- Porter K.G. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25:943-94.
- SanPiN 1.2.3685-21. Gigiyenicheskiye normativy i trebovaniya k obespecheniyu bezopasnosti i (ili) bezvrednosti dlya cheloveka faktorov sredi obitaniya [Hygienic standards and requirements for ensuring the safety and (or) harmlessness to humans of environmental factors] (in Russian) URL:<http://docs.cntd.ru/document/1200006938/>
- Suslova M.Yu., Kravchenko O.S., Kostornova T.Y. et al. 2013. Sanitary-bacteriological assessment of water quality in the places of the mineral springs outlets of the Shumak River valley (Tunka Goltsy, Eastern Siberia). *Baikal Medical Journal* 117(2):092-095. (in Russian)
- Suslova M.Yu., Podlesnaya G.V., Zimens E.A. et al. 2022. Sanitary-microbiological characteristics of the coastal zone of Lake Baikal during the seasonal change in the lake level in 2022. *Limnology and Freshwater Biology* (6):1724-1727. DOI:[10.31951/2658-3518-2022-A-6-1724](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2022-A-6-1724)
- Zamana L.V., Askarov Sh.A. 2010. Fluorine in nitrogenous therms of the Bauntov group (Northern Transbaikalia). *Bulletin of Buryat State University* (3):8-12. (in Russian)

# Санитарно-микробиологическая характеристика воды в районе термального источника Змеиный (Северный Байкал, Россия, 2022)

Еловская И.С.\*, Черницына С.М., Павлова О.Н., Земская Т.И.

Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук, ул. Улан-Баторская, 3, Иркутск, 664033, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Проведен анализ санитарно-значимых микроорганизмов в двух ваннах термального источника Змеиный, их ручьях и на расстоянии 5 и 20 метров от берега в течении суток до и после купания туристов. Выявлены превышения допустимых значений санитарно-микробиологических показателей в соответствии с СанПиН 1.2.3685-21 в ваннах, ручьях разлива и в урзе воды на расстоянии до 5 м. Показатель общих (обобщенных) колиформных бактерий (ОКБ) во всех исследованных пробах не снижался на протяжении всего дня, наиболее высокие значения численности условно-патогенных микроорганизмов отмечены в ваннах термального источника и в ручьях разлива, где температура воды составляет ~ 32 - 33°C. Полученные коэффициенты самоочищения в литорали на расстоянии до 20 м имели низкие значения (от 0.0008 до 2.53).

**Ключевые слова:** сульфидный источник Змеиный, органотрофные бактерии, колиформные бактерии, энтерококки

## 1. Введение

В Байкальской рифтовой зоне (БРЗ) насчитывается около 60 гидротерм с разными температурными характеристиками (Ломоносов, 1974; Борисенко и Замана, 1978; Замана и Аскарлов, 2010). В основном, воды гидротерм имеют натриевый состав, низкую минерализацию (от 0.1 г/л – 2.0 г/л), высокую концентрацию кремния в виде ортокремниевой кислоты  $H_4SiO_4$  (40 - 120 мг/дм<sup>3</sup>) и щелочную среду (рН 8.5 – 10.0).

Исследования санитарного состояния гидротерм проводятся эпизодически. В щелочных минеральных источниках Баргузинской долины выявлены высокие показатели ОКБ, а также наличие условно-патогенных бактерий родов *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Citrobacter* в часто посещаемых источниках (Кучигер, Сеюя, Горячинск, Кумыска), что свидетельствует о большой антропогенной нагрузке (Дармаева, 2007; Бархутова и др., 2012).

Источник Змеиный, расположенный в Чивыркуйском заливе, пользуется большой популярностью, в летний период его посещает значительное количество туристов. Его воды относятся к гидрокарбонатно-сульфатным, содержат сероводород ( $H_2S$ ) в концентрации 23.2 мг/л,

и используются для лечения и профилактики радикулита и заболеваний опорно-двигательной системы (Намсараев и др., 2007).

При исследовании разнообразия микробных сообществ методом секвенирования региона V2–V3 гена 16S рРНК на платформе MiSeq (Illumina), в разных частях источника Змеиный в 2019 году были выявлены представители семейств, которые включают условно-патогенные виды (Chernitsyna et al., 2023). Значительные превышения санитарно-бактериологических показателей (СанПиН 1.2.3685-21) в бухте Змеиная отмечались и в 2022 г. Количество ОКБ в этом районе превышало нормативные показатели в 2 раза, энтерококков в 44 раза (Suslova et al., 2022). Все предыдущие исследования основывались на разовых отборах образцов, данные о динамике санитарно-значимых микроорганизмов в течение суток ранее не приводились.

Целью работы являлась оценка численности санитарно-значимых микроорганизмов в термальном источнике Змеиный и прибрежной зоне в течение суток до и после купания туристов, а также определение самоочищающей способности прибрежных вод в местах разлива источников.

\*Corresponding author.

E-mail address: [elovskaya.iren@yandex.ru](mailto:elovskaya.iren@yandex.ru) (И.С. Еловская)

**Поступила:** 07 августа 2023; **Принята:** 09 октября 2023;  
**Опубликована online:** 24 октября 2023

## 2. Материалы и методы

Пробы поверхностной воды отбирали в соответствии с ГОСТ 31942-2012 в малой и большой ванне (БВ, МВ), в ручьях малой и большой ванны (рБВ, рМВ), у пирса (П), а также на расстоянии 5 и 20 метров от берега (5 м и 20 м) (Рис.1). Отбор проб проводили 11 июля 2022 года в 23:00 после дневного купания туристов, 12 июля рано утром после 6-часового отсутствия купающихся и в 9:00 сразу же после купания нескольких групп туристов. Всего отобрано 16 образцов воды и проведено 320 анализов в соответствии с МУК 4.2.1884-04 и ГОСТ 24849-2014.

На всех участках качество воды оценивали по основным санитарно-микробиологическим показателям в соответствии с СанПиН 1.2.3685-21. В каждом образце в соответствии с методическими указаниями (МУК 4.2.1884-04, ГОСТ 24849-2014) определяли следующие показатели: ОКБ, *E. coli*, энтерококки, количество которых не должно превышать 500 КОЕ/100 см<sup>3</sup>, 100 КОЕ/100 см<sup>3</sup>, 10 КОЕ/100 см<sup>3</sup>, соответственно.

Подсчет общей численности микроорганизмов (ОЧМ) проводили по методике прямого микроскопического подсчета микроорганизмов на мембранных фильтрах с размером пор 0.22 мкм (РЕАТРЕК-Фильтр) с использованием красителя ДАФИ (4.6-диамино-2-фенилиндол) (Porter, 1980). Микроскопию проводили на эпифлуоресцентном микроскопе AxioImager.M1 ("Carl Zeiss", Германия). Просмотрено не менее 20 полей зрения. Подсчет клеток на фотографиях проводили с помощью программы ImageTest. Вычисление ОЧМ проводили по формуле:

$$X = \frac{a \cdot b \cdot 10^6}{c \cdot d \cdot e}$$

где *a* – площадь фильтра (мм<sup>2</sup>); *b* – число подсчитанных бактерий; *c* – площадь микрометра (мкм<sup>2</sup>); *d* – объем наносимого препарата (мл); *e* – число просчитанных полей зрения (Gerhardt, 1981).

Для определения коэффициента самоочищения использовали МУК.4.2.1884-04. Подсчитано общее микробное число (ОМЧ), отражающее общее содержание мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов способных образовывать на мясо-пептонном питательном агаре (МПА) колонии при температуре 37°C в течение 24 ч (МПА 37°C) и при температуре 22°C в течение 72 ч (МПА 22°C). Также для определения численности органотрофных бактерий использовали среду с рыбо-пептонным агаром (РПА:10), температура культивирования составляла 37°C (Горбенко, 1961).

Физико-химические характеристики воды (рН, Eh, T) измерены с помощью прибора рН 3310 (WTW, Германия).



Рис.1. Географическая карта района исследования и мест отбора проб в бухте Змеиная (озеро Байкал, Россия). БВ – большая ванна, МВ – малая ванна, рБВ – ручей большой ванны, рМВ – ручей малой ванны, П – пирс, 5 м – 5 метров, 20 м – 20 метров. Программное обеспечение Earth 7.1.8.3036 Pro <https://www.google.com/intl/ru/earth/versions/#earth-pro> (дата обращения: 20 февраля 2023 года).

## 3. Результаты

### 3.1. Физико-химические характеристики источника

Источник Змеиный характеризуется относительно высокой температурой по сравнению с другими источниками Баргузинской котловины (Намсараев и др., 2007). Температура воды в большой ванне составляла 43°C, в малой – 38.6°C, рН 9.6. Окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) в большой ванне был -434 мВ, в малой -427 мВ, что свидетельствует о восстановленных условиях в источнике. В урзе воды температура воды составляла 17°C, рН 8.8, ОВП -239 мВ.

### 3.2. Численность санитарно-значимых микроорганизмов

Вечером 11 июля в 23:00 после массового купания туристов в районе выхода термального источника (МВ, БВ, рМВ, рБВ) зафиксированы высокие показатели ОМЧ при культивировании на МПА при 37°C, их значения варьировали от 2013 до 12426 КОЕ/см<sup>3</sup> (Рис. 2). В урзе воды у пирса и на расстоянии 5-20 метров от берега данный показатель был низким (10-36 КОЕ/см<sup>3</sup>). Большое количество бактерий, растущих при температуре 22°C (МПА) и 37°C (РПА:10), зарегистрировано в ручье малой ванны (до 5760 и 3613 КОЕ/см<sup>3</sup>, соответственно). Показатель ОЧМ в это время был относительно высоким в ручьях большой и малой ванн и составлял  $8.36 \pm 0.34$  и  $8.28 \pm 0.38$  млн. клеток на мл, соответственно (Табл. 1).

Таблица 1. Общая численность микроорганизмов (млн. кл/мл)

Район отбора Время отбора	БВ	МВ	рБВ	рМВ	П	5 м	20 м
23:00	6.87 ± 0.32	6.83 ± 0.14	8.36 ± 0.34	8.28 ± 0.38	2.05 ± 0.07	1.97 ± 0.05	2.14 ± 0.08
5:00	*	8.02 ± 0.37	5.09 ± 0.22	7.96 ± 0.21	2.27 ± 0.06	2.20 ± 0.07	3.00 ± 0.15
9:00	4.69 ± 0.11	3.01 ± 0.22	-	-	-	-	-

Примечание: «-» - исследования не проводились; «\*» - число превышающее максимальное значение для подсчета на фильтрах.

Высокая численность ОКБ зарегистрирована в большой и малой ваннах, в ручьях и в литорали у пирса (Рис. 3). На расстоянии 5 метров от берега данный показатель также был высок (до 626 КОЕ/100 см<sup>3</sup>). В образце ручья из большой ванны отмечен сплошной рост, а в литорали озера, в 20 метрах от ручья, данный показатель был уже в пределах нормы (180 КОЕ/100 см<sup>3</sup>). Высокие уровни бактерий кишечной палочки и энтерококков, свидетельствующие о свежем фекальном загрязнении, зарегистрированы только в ваннах и ручьях. Споры сульфитредуцирующих клостридий обнаружены в большой ванне и в ручье излива (2 и 1 КОЕ/20 см<sup>3</sup>, соответственно).

В 5:00 утра 12 июля после 6-часового перерыва, численность мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов растущих на МПА при температуре 37°C и 22°C, снизилась. Их количество варьировало от 563 до 7386 КОЕ/см<sup>3</sup> и от 23 до 826 КОЕ/см<sup>3</sup>, соответственно (Рис. 2). В литорали на расстоянии 20 м от берега значение ОМЧ (МПА 37°C) возросло до 3440 КОЕ/см<sup>3</sup>. В это время в малой и большой ваннах зафиксировано повышение численности органотрофных бактерий, растущих на РПА:10 (2330 и 2963 КОЕ/см<sup>3</sup>, соответственно). Высокое значение ОЧМ было зарегистрировано в большой ванне: при фильтровании 1 мл разведенного образца, клетки образовывали конгломераты, затрудняя подсчет, что не позволило получить достоверных значений (табл.1). Низкие значения ОЧМ отмечены у пирса и на расстоянии 5 и 20 м от берега. Количество ОКБ в ваннах и ручьях увеличилось примерно в 2 раза, по сравнению с вечерними значениями (Рис. 3). Вместе с тем, в прибрежной акватории на расстоянии 5 и 20 метров от берега данный показатель снизился примерно на 30 - 40 %. Также отмечено снижение численности *E. coli* и энтерококков на 60 - 70 %. Споры сульфитредуцирующих клостридий обнаружены только в ручье большой ванны (4 КОЕ/20 см<sup>3</sup>) и не выявлены в других образцах.

В 9:00 утра 12 июля после купания нескольких групп людей, в большой и малой ваннах ОМЧ, учтенное на МПА при 37°C, снизилось до 903 и 1050 КОЕ/см<sup>3</sup>, соответственно, в сравнении с утренними и вечерними показателями. Значения ОЧМ в большой и малой ваннах было относительно низким (4.69 ± 0.11 и 3.01 ± 0.22 млн. клеток на мл, соответственно). Численность ОКБ в большой ванне оставалась высокой, как и в 5:00 утра, в малой ванне данный показатель снизился до 3246 КОЕ/100 см<sup>3</sup>

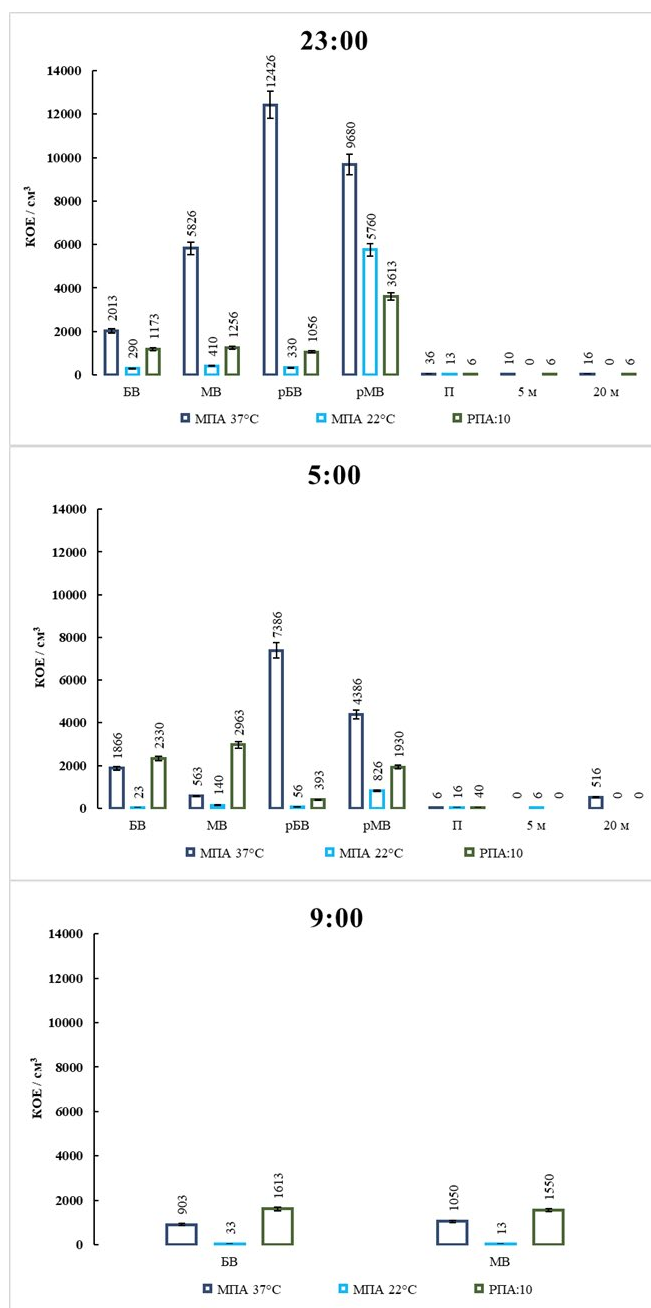


Рис.2. Численность органотрофных мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов в исследуемой акватории в течении суток



(см. рис. 3). Количество спор сульфитредуцирующих кластридий в это время было максимальным и достигало 15 и 12 КОЕ/20 см<sup>3</sup>.

Относительно высокий коэффициент самоочищения отмечен в прибрежной зоне: у пирса (2.53) и на расстоянии 5 метров от берега в 23:00 и 5:00 (1 и 2.16 соответственно) (табл. 2).

#### 4. Обсуждение

О целебных свойствах геотермальных источников известно давно. Как показано в работе Буслова С.П. (Буслов, 1990), минеральная вода источников БРЗ, оказывает благотворное влияние на разные системы органов: нервную, дыхательную, двигательную, мочеполовую и др., а также улучшает состояние кожи и способствует заживлению ран. Поэтому источники очень популярны среди населения и открыты для посещения (Намсараев и др., 2007). Вместе с тем, в геотермальных источниках БРЗ неоднократно отмечалось превышение нормативных значений санитарно-значимых микроорганизмов. Так, в 2012 году в минеральных водах долины реки Шумак, выявлены условно-патогенные бактерии группы кишечной палочки и бактерии рода *Enterococcus* (Суслова и др., 2013). В холодных и горячих источниках Прибайкалья (Кумыска, Серебряный, Горячинск), также были обнаружены условно-патогенные микроорганизмы, относящиеся к родам *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Citrobacter* и патогенный вид *Clostridium perfringens*, который является возбудителем пищевых отравлений человека и одним из возбудителей газовой гангрены (Бархутова, Дармаева и Намсараев, 2012). Как мы упоминали выше, превышения значений санитарно-значимых бактерий в летний период неоднократно отмечались и в источнике Змеином. Хотя по данным химического анализа вода источника Змеиный постоянно во времени, ее состав не изменяется и соответствует ранее полученным данным (Намсараев и др., 2007; Плюснин и др., 2013; Калмычков и др., 2020; Chernitsyna et al., 2020). Как показали наши исследования, повышенное содержание санитарно-значимых микроорганизмов в термальном источнике в бухте Змеиная отмечено в разное время суток после посещения туристов. Наиболее высокие значения, превышающие нормативные по СанПиН 1.2.3685-21, наблюдались в вечернее время суток (23:00). Рано утром, несмотря на 6-часовое отсутствие купающихся, значения показателей ОКБ, *E. coli*, энтерококков также превышали допустимые значения. О незавершенных процессах самоочищения или недостаточном разбавлении термальных вод байкальскими свидетельствует значения коэффициента самоочищения (2.16-2.53) у пирса и в литорали озера на расстоянии 5 м от берега.

Одной из причин постоянной обсеменённости источника условно-патогенными микроорганизмами может быть высокая температура

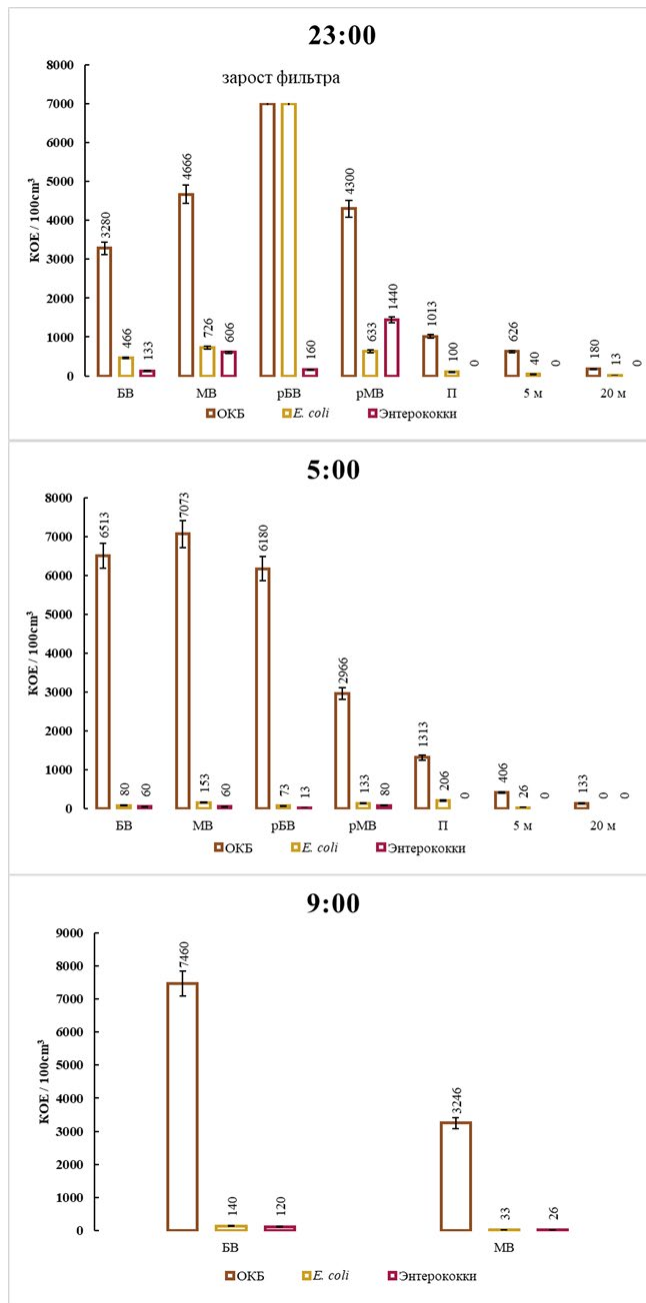


Рис.3. Численность санитарно-значимых микроорганизмов в исследуемой акватории в течении суток

Таблица 2. Коэффициент самоочищения в акватории бухты Змеиной

Время отбора \ Район отбора	П	5 м	20 м
	23:00	0.27	1
5:00	2.53	2.16	0.0008
9:00	-	-	-

Примечание: «-» - исследования не проводились

воды в нем (40-42°C), близкая к оптимальной (37°C) для их роста. Например, *E. coli* имеет оптимум роста 37°C, хотя некоторые штаммы способны расти от 40 до 49°C (Ingledeew and Poole, 1984). Сохранению жизнеспособности бактерий, в том числе санитарно-значимых, может способствовать низкая проточность источника и восстановленные условия среды. В ручьях, где происходит насыщение воды O<sub>2</sub>, и температура воды составляет ~ 32 - 33°C, численность микроорганизмов также остается высокой. Значения численности ОКБ, *E. coli*, энтерококков соответствовали нормативам лишь в литорали на расстоянии 5-20 метров от берега, где температуры воды составляла 17°C. Очевидно, что совокупность таких факторов, как температура, скорость обновления вод в ваннах и количество купающихся влияют на развитие и распространение условно-патогенных микроорганизмов в исследованном источнике и прибрежной акватории. По результатам наших исследований, воды в большой и малой ваннах термального источника Змеиный не соответствуют требованиям СанПиН 1.2.3685-21 и не безопасны для бальнеологических целей без проведения специальных мероприятий. В качестве таких мероприятий можно увеличить проточность вод этого источника, добавлением байкальской воды в ночное время. Разбавление термальных вод и временное снижение температуры в них может снизить выживаемость условно-патогенных микроорганизмов и улучшить качество воды в ваннах источника.

## 5. Выводы

В различное время суток в источнике Змеиный наблюдались превышения нормативов санитарно-микробиологических показателей (ОКБ, *E. coli*, энтерококков) в соответствии с СанПиН 1.2.3685-21. Наиболее высокое содержание отмечалось после купания туристов, их количество оставалось высоким и после 6-часового перерыва. В литорали озера (20 метров от берега) численность исследованных групп в основном соответствовала нормативам. Очевидно, что совокупность таких факторов, как температура, скорость обновления вод в ваннах и количество купающихся влияют на развитие и распространение условно-патогенных микроорганизмов в исследованном источнике и прибрежной акватории.

Целебные источники, как объекты постоянного рекреационного посещения, должны быть защищены от попадания условно-патогенных бактерий в местах выхода минеральных вод посредством проведения специальных мероприятий. Также очевидна необходимость разработки регламента посещения туристами данного источника.

## Благодарности

Авторы выражают благодарность сотрудникам Лимнологического института Захаренко

Александре Сергеевне и Сусловой Марии Юрьевне за практические рекомендации. Работа выполнена в рамках темы гос. задания № 0279-2021-0006 (121032300223-1).

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Список литературы

- Бархутова Д.Д., Дармаева Б.В., Намсараев Б.Б. 2012. Санитарно-микробиологическая оценка холодных Аршанов и горячих минеральных источников Прибайкалья. *Acta Biomedica Scientifica* 5(1):193-196.
- Борисенко И.М., Замана Л.В. 1978. Минеральная вода Бурятской АССР Улан-Уде: Бурятское книжное издательство.
- Буслов С.П. 1990. Рекреационные ресурсы бассейна оз. Байкал и перспективы их использования. Взаимодействие социально-экономического развития и охраны природы в Байкальском регионе. Новосибирск.
- Горбенко Ю.А. 1961. О наиболее благоприятном количестве сухого питательного агара в средах для культивирования морских микроорганизмов. *Микробиология* 30(1):168-172.
- ГОСТ 31942-2012. Вода питьевая. Отбор проб для микробиологического анализа URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200097811>
- ГОСТ 24849-2014. Вода. Способ санитарно-бактериологического анализа для полевых условий URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200115427/>
- Дармаева Б.В. 2007. Санитарно-экологическая оценка минеральных источников Прибайкалья по микробиологическим показателям. Кандидатская диссертация, Федеральное государственное учреждение здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Бурятия», Улан - Удэ, Россия.
- Замана Л.В., Аскарлов Ш.А. 2010. Фтор в азотных термах Баунтовской группы (Северное Забайкалье). *Вестник Бурятского государственного университета* (3):8-12.
- Калмычков Г.В., Nachikubo A., Покровский Б.Г. и др. 2020. Метан с аномально высокими значениями δ<sup>13</sup>C и δD из прибрежных термальных источников озера Байкал. *Литология и полезные ископаемые* 55(6):439-444. DOI:10.31857/S0024497X20040035
- Ломоносов И.С. 1974. Геохимия и формирование современных гидротерм Байкальской рифтовой зоны. Новосибирск: Наука.
- МУК 4.2.1884-04. Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200039680/>
- Намсараев Б.Б., Хахинов В.В., Гармаев Е.Ж. и др. 2007. Водные системы Баргузинской котловины. Улан-Удэ: Издательство Бурятского госуниверситета.
- Плюснин А.М., Замана Л.В., Шварцев С.Л. и др. 2013. Гидрогеохимические особенности состава азотных терм Байкальской рифтовой зоны. *Геология и геофизика* 54(5):647-664.
- СанПиН 1.2.3685-21. Гигиенические нормы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200006938/>

Сулова М.Ю., Кравченко О.С., Косторнова Т.Я. и др. 2013. Санитарно-бактериологическая оценка качества вод в местах выходов минеральных источников долины реки Шумак (Тункинские гольцы, Восточная Сибирь). Байкальский медицинский журнал 117(2):092-095.

Chernitsyna S.M., Khalzov I.V., Pogodaeva T.V. 2020. Distribution and morphology of colorless sulfur bacterium of the genus *Thiothrix* in water reservoirs of Baikal rift zone. *Limnology and Freshwater Biology* (4):976-978. DOI:[10.31951/2658-3518-2020-A-4-976](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2020-A-4-976)

Chernitsyna S.M., Elovskaya I.S., Pogodaeva T.V. et al. 2023. Bacterial Communities in a Gradient of Abiotic Factors Near a Sulfide Thermal Spring in Northern Baikal. *Diversity* 15(298):1-15. DOI:[10.3390/d15020298](https://doi.org/10.3390/d15020298)

Gerhardt P. 1981. Manual of methods for general bacteriology. Washington: American Society for Microbiology.

Ingledeu W.J., Poole R.K. 1984. The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* American Society for Microbiology 48(3):222-271.

Porter K.G. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25:943-94.

Suslova M.Yu., Podlesnaya G.V., Zimens E.A. et al. 2022. Sanitary-microbiological characteristics of the coastal zone of Lake Baikal during the seasonal change in the lake level in 2022. *Limnology and Freshwater Biology* (6):1724-1727. DOI:[10.31951/2658-3518-2022-A-6-1724](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2022-A-6-1724)