

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ВСЕСОЮЗНОЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ

Успехи микробиологии

18

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ВСЕСОЮЗНОЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ

Успехи микробиологии

18



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»

Москва 1983

Сборник включает статьи, посвященные вопросам генной инженерии в микробиологической промышленности, экологии микроорганизмов, коллекциям микроорганизмов в СССР и за рубежом, биологии плазмид, молекулярным методам в систематике, таксису бактерий, амидиногидролазам микроорганизмов, морской и почвенной микробиологии, дифференциации микроорганизмов в связи с синтезом антибиотиков, метилотрофным эукариотам, белковым ингибиторам ферментов метаболизма нуклеиновых кислот.

Книга рассчитана на микробиологов, генетиков и биохимиков.

Редакционная коллегия:

академик А. А. ИМШЕНЕЦКИЙ (отв. редактор),

Е. Н. КОНДРАТЬЕВА (зам. отв. редактора),

В. И. БИРЮЗОВА, Г. Ф. ГАУЗЕ, Б. В. ГРОМОВ,

Д. И. ДУДА, М. В. ИВАНОВ

УСПЕХИ МИКРОБИОЛОГИИ. ВЫП. 18

Утверждено к печати Институтом микробиологии Академии наук СССР

Редактор издательства Н. Д. Бабурина

Художественный редактор Н. Н. Власик. Технический редактор Н. Н. Плехова.

Корректоры А. Б. Васильев, Н. И. Казарина

ИБ № 27124

Сдано в набор 3.05.83. Подписано к печати 7.07.83. Т-09970. Формат 70×108^{1/8}

Бумага книжно-журнальная. Гарнитура литературная. Печать высокая.

Усл. печ. л. 21,7. Уч.-изд. л. 25,5. Усл. кр.-отт. 21,7. Тираж 1400 экз.

Тип. зак. 4557 Цена 4 р. 30 к.

Издательство «Наука». 117864. ГСП-7. Москва, В-485. Профсоюзная ул., 90

Л-я типография издательства «Наука». 121099. Москва, Г-95, Шубинский пер., 10

ЭКОЛОГИЯ МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ

А. И. Нестеров, М. В. Иванов

Метанокисляющие бактерии, или, как их теперь называют, — метанотрофы, представляют собой специфическую группу микроорганизмов, характерной особенностью которых является способность использовать метан в качестве источника углерода и энергии. Изучение экологии этих бактерий представляет интерес главным образом в связи с оценкой масштабов микробиологического окисления метана в природе и вклада этого процесса в глобальный круговорот углерода.

Первые работы по экологии метанотрофов были проведены в тридцатых годах нашего столетия Л. Россомо и З. Кузнецовой (1934) и С. И. Кузнецовым (1934) при изучении кислородного режима озер. Позднее направленное изучение распространения метанотрофов в природе было начато Г. А. Могилевским (1938) в связи с разработкой микробиологического метода поиска нефтяных и газовых месторождений. Однако относительно широкий размах экологические исследования метанотрофов получили только в последнее десятилетие благодаря усовершенствованию техники выделения и культивирования метанотрофов, пополнению наших знаний о биологии этих микроорганизмов и разработке новых методов определения численности и активности метанотрофов в природных экосистемах.

Специальных обзоров литературы по экологии метанотрофов до сих пор не было. Отдельные аспекты этой проблемы затронуты в монографии С. И. Кузнецова (1970) и в статье Виттенбарг с соавторами (Whittenburg et al., 1976). Наиболее широко вопросы экологии метанотрофов освещены в монографии Ю. Р. Малащенко и др. (1978). Однако уже после издания названной монографии было опубликовано около десятка принципиальных работ, касающихся распространения и геохимической деятельности метанотрофов в природе.

Обобщение и анализ имеющихся данных по экологии метанотрофных бактерий с целью определения путей дальнейшего развития исследований в этой области составляют содержание предлагаемого обзора.

МЕТОДЫ В ЭКОЛОГИИ МЕТАНОТРОФОВ

МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО УЧЕТА МЕТАНОТРОФОВ

В результате сравнения различных методов количественного учета метанотрофов в природных водах Виттенбарг с соавторами (Whittenburg et al., 1976) в качестве наилучшего выбрали метод прямого подсчета колоний микроорганизмов, развивающихся на мембранных фильтрах, которые после фильтрации через них исследуемой воды инкубируются на поверхности агаризованной минеральной среды в атмосфере метана и воздуха. Этот метод дает, очевидно, несколько заниженные результаты, потому что конгломераты и скопления бактерий развиваются и учитываются на мембранных фильтрах как одна колония.

Метод учета метанотрофов, предложенный В. И. Романенко (1939), состоит в подсчете радиоавтографов колоний микроорганизмов, вы-

Таблица 1. Влияние источника азота на обнаружение в подземных водах метанотрофных бактерий (Богданова и др., 1975)

Район	Число проб	Число проб с наличием бактерий при разных источниках азота	
		нитратный азот	аммонийный азот
Ставропольская возвышенность	64	4	12
Равнинный Дагестан	100	7	9
Площадь газохранилищ Ленинградской области	132	28	11
Борская депрессия Куйбышевской области	60	6	8
Мангышлакский нефтеносный район БССР, Припятская впадина	65 114	12 20	7 21

растающих на мембранных фильтрах, которые после фильтрации через них исследуемой воды инкубируются в атмосфере метана и воздуха на поверхности агаризованной минеральной среды, содержащей ^{14}C -бикарбонат. Этот метод недостаточно специфичен — фиксировать бикарбонат наряду с метанотрофами могут и другие группы микроорганизмов. Поскольку колонии микроорганизмов на мембранных фильтрах могут быть учтены прямым подсчетом, радиоавтографический метод выглядит не оправданно сложным и его применение в настоящее время не целесообразно.

Метод проращивания колоний микроорганизмов на мембранных фильтрах применяется также для учета метанотрофов в илах и почвах (Adamse et al., 1972; Whittenbury et al., 1976). Основная методическая трудность заключается в данном случае в достижении наиболее полной десорбции бактерий из плотных образцов в жидкость. С этой целью образцы измельчают и подвергают действию ультразвука (Reed, Dugan, 1978).

Широко используется для определения численности метанотрофов как в водах, так и в плотных природных субстратах высев исследуемого материала в жидкие питательные среды методом предельных разведений (Лауринавичус и др., 1978; Иванов и др., 1978, 1979; Саралов, 1979а). Ошибка этого метода связана, по-видимому, с допущением, что рост микроорганизмов в предельном разведении всегда обусловлен присутствием одной бактериальной клетки, а не их группой. Поэтому применение метода предельных разведений, как правило, приводит к получению заниженных величин численности метанотрофов в природном материале.

При количественном учете метанотрофных бактерий описанными выше методами принципиальное значение имеет состав применяемой питательной среды. Предложено свыше десятка различных сред для роста метанотрофов, состав которых приведен в монографии Ю. Р. Малащенко с соавторами (1978). Большинство известных в настоящее время штаммов метанотрофных бактерий было выделено на средах АМС (аммонийная минеральная среда) и НМС (нитратная минеральная среда), предложенных Виттенбарри с соавторами (Whittenbury et al., 1970), или сходной с ними по составу среде К (Квасников и др., 1969; Гальченко и др., 1977). Эти среды, по-видимому, являются наиболее благоприятными для выявления и учета метанотрофов в природных экосистемах. При этом необходимо одновременно использовать среды, содержащие аммонийный и нитратный азот. Опыт показывает, что в природных водах метанотрофная микрофлора в одних случаях выявляется более полно на среде с аммонийным азотом, в других — с нитратным (табл. 1).

Рекомендованные питательные среды, конечно, не позволяют выявить все многообразие метанотрофов в природе. Расширить возможности стандартных питательных сред в этом плане можно путем введения в

их состав части исследуемых природных материалов. Так, накопительная культура окисляющих метан микроорганизмов, выделенная из озера № 227 (Rudd, Hamilton, 1976), могла расти на стандартных средах только при добавлении в них по крайней мере 5% озерной воды. Причем свойства воды как комплексного ростового фактора терялись при ее стерилизации автоклавированием.

При приготовлении плотных питательных сред для метанотрофов можно использовать только высокоочищенный агар типа Difco (Whittemburg et al., 1970) или кремневый гель (Гальченко, 1975). Агар, содержащий органические примеси, ингибирует рост метанотрофов (Малашенко и др., 1971). Для получения колоний метанотрофов на мембранных фильтрах плотные среды с успехом могут быть заменены фильтровальной бумагой, пропитанной соответствующим минеральным раствором (Adamse et al., 1972; Carpenberg, 1972).

Выявление жизнеспособных метанотрофных микроорганизмов в природных образцах может считаться надежным при использовании в качестве источника углерода только высокоочищенного метана. В случае применения для этой цели сетевого газа за счет содержащихся в нем гомологов метана в минеральных средах может происходить рост различных не утилизирующих метан микроорганизмов (Малашенко и др., 1978). По этой причине достоверность результатов ряда работ по распространению метанотрофов в природе, выполненных с использованием сетевого газа (Могилевский, 1953; Телегина, 1961; Смирнова, 1961; Славина, 1963), вызывает сомнения.

Для количественного учета отдельных видов метанотрофных бактерий в естественных биопленках начинают использовать иммунолюминесцентный метод. Рид и Дуган (Reed, Dugan, 1978) применили непрямой иммунолюминесцентный метод для изучения распределения метанотрофов *Methylobomonas methanica* и *Methylosinus trichosporium* в Кливлендском заливе озера Эри. Осажденные на мембранных фильтрах микроорганизмы из воды и ила обрабатывались иммунной кроличьей сывороткой, специфической для *M. methanica* или *M. trichosporium*, а затем — люминесцирующей иммунной сывороткой к кроличьим глобулинам. Люминесцирующая сыворотка содержала антитела, меченные флюорохромом родамин-изотиоцианатом. В случае присутствия в исследуемых образцах искомым метанотрофов на поверхности мембранных фильтров образовывались светящиеся комплексы: микроорганизмы (антигены) — кроличья сыворотка (антитела I) — люминесцирующая сыворотка (антитела II). Число таких комплексов подсчитывалось под люминесцентным микроскопом. Показано, что получаемые к различным штаммам облигатных метанотрофов иммунные сыворотки обладают строгой видовой специфичностью (Кондратенко и др., 1981).

Иммунолюминесцентный метод открывает широкие возможности для изучения аутоэкологии (экологии отдельных видов) метанотрофных бактерий и, вероятно, является наиболее точным из существующих методов количественного учета этих микроорганизмов в природных образцах.

О наличии метанотрофов в природных водах можно судить по величине биологического потребления кислорода в изолированных образцах исследуемой воды, в которые вводится небольшое количество метана (Кузнецов, 1939). Ю. И. Сорокин (1975) оценивал относительную активность метанотрофной микрофлоры по включению в клетки микроорганизмов ^{14}C -бикарбоната, вводимого в изолированную пробу воды вместе с метаном. Поскольку данный метод не позволяет определить ни численности метанотрофов, ни реальной интенсивности окисления ими метана в природных водах, он не может конкурировать с существующими прямыми количественными методами определения названных характеристик.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ МЕТАНА

Успешному развитию экологии метанотрофных бактерий во многом способствовало введение в практику исследований газохроматографического и радиоизотопного методов количественной оценки интенсивности окисления метана микроорганизмами в природных водах. Сущность этих методов составляет измерение количества потребленного микроорганизмами метана в изолированных объемах исследуемых вод за время их инкубации в условиях, близких к естественным.

Газохроматографический метод определения интенсивности микробиологического окисления метана впервые был применен Ховардом с соавторами (Howard et al., 1971). Позднее появились различные модификации этого метода, затронувшие технику подготовки образцов воды для измерения концентрации растворенного в них метана. Было показано, что хроматографическое определение метана может быть проведено как непосредственно в воде (Carpenberg, 1972), так и в газовой смеси, извлеченной из воды путем вытеснения аргонном (Rudd et al., 1974) или действием вакуума (Naguib, 1978; Саралов, 1979а). Количество израсходованного микроорганизмами метана учитывается как разность между его содержанием в опытной и контрольной пробах воды. Последняя представляет собой пробу исследуемой воды, в которой жизнедеятельность микроорганизмов подавлена добавлением антисептика. Чувствительность газохроматографического метода определения интенсивности микробиологического окисления метана по расчетам А. И. Саралова (1979а) составляет 0,2 мкл CH_4 /л воды в сутки.

Радиоизотопный метод оценки интенсивности окисления метана микроорганизмами в природных водах независимо был разработан Раддом с соавторами (Rudd et al., 1974) в Канаде, Лаурниавичусом с соавторами (1974) в Советском Союзе и Паттом с соавторами (Patt et al., 1974) в США. В отличие от газохроматографического этот метод сопряжен с некоторым нарушением исходного состояния исследуемых проб воды, поскольку в них перед инкубацией вводится небольшое количество ^{14}C -метана. Однако радиоизотопный метод чувствительнее газохроматографического метода и позволяет оценить не только общее количество использованного микроорганизмами метана, но и дифференцированно учесть долю метана, включенного в биомассу, углекислый газ и прочие экзометаболиты.

Показано, что развитие метанотрофных бактерий сопровождается фракционированием стабильных изотопов углерода метана: происходит обогащение остаточного метана тяжелым изотопом углерода (^{13}C) и образование изотопно-легкой углекислоты. При этом утяжеление метана прямо пропорционально степени его потребления микроорганизмами (Алексеев и др., 1978; Зякун и др., 1979). Последнее обстоятельство свидетельствует о принципиальной возможности использования масс-спектрометрического метода для оценки интенсивности микробиологического окисления метана в природных экосистемах.

Применение масс-спектрометрического метода может дать также ценную информацию о масштабах геохимической деятельности метанотрофной микрофлоры в геологическом прошлом. В литературе описано несколько примеров, когда сопоставление изотопного состава углерода карбонатов и метана дает основание предполагать, что формирование отложений известняков происходило с участием изотопно-легкой углекислоты, образованной при микробиологическом окислении метана (Cheney, Jensen, 1965; Hathaway, Degens, 1965; Deuser, 1970; Ленин и др., 1977; Борищевский, Степанова, 1978).

Таким образом, существует достаточно широкий спектр методов определения численности и активности метанотрофных бактерий в природных экосистемах. Для количественного учета метанотрофов в жидких и плотных природных образцах могут быть рекомендованы метод

прямого подсчета колоний метанотрофов, развивающихся на мембранных фильтрах, метод предельных разведений и иммунолюминесцентный метод. Интенсивность микробиологического окисления метана в природных водах может быть измерена радиоизотопным и газохроматографическим методами.

Методы определения активности метанотрофной микрофлоры в илах, почвах и породах не разработаны. В отдельных случаях, вероятно, активность метанотрофов в названных природных объектах может быть определена с использованием масс-спектрометрии углерода, которую целесообразно широко применять при изучении роли метанотрофных микроорганизмов в диагенетических процессах.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ГЕОХИМИЧЕСКАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МЕТАНОТРОФОВ

Метанотрофные бактерии широко распространены в природе. Чистые и смешанные культуры этих микроорганизмов были выделены из различных природных объектов в разных частях земного шара: из почв, из озерных, речных, морских и океанических осадков, из различного типа вод, с поверхности водных растений, из рубца жвачных животных (Whittenbury et al., 1970; Малащенко и др., 1978). Метанотрофы обнаружены в породах и подземных водах на глубинах до 1500 м (Славина, 1963; Богданова и др., 1977; Иванов и др., 1979).

Представление о численности метанотрофных бактерий в природных экосистемах дает табл. 2. Как следует из приведенных в этой таблице данных, содержание метанотрофов в почвах и илах в среднем на два-три порядка выше, чем в водах. Известно также, что в водной толще пресных озер метанотрофы могут отсутствовать, но всегда обнаруживаются в озерных илах (Кузнецов, 1947).

Прослеживаются определенные закономерности в распространении отдельных таксономических групп метанотрофов в природе: роды *Methylosinus* и *Methylocystis* одинаково распределяются в различных экосистемах, род *Methylomonas* обитает преимущественно в стоячих водах, а род *Methylobacter* — в почвах нефтеносных районов (Хейер, 1977). Однако накопленный фактический материал не позволяет говорить о строгой приуроченности метанотрофов и их отдельных видов к местам заметного скопления метана в природе или к конкретным экосистемам. Термофильные, термотолерантные и мезофильные культуры метанотрофов, относящихся к различным родам и видам, были выделены из одного образца воды или ила (Whittenbury et al., 1976). Отсутствие преимущественного распространения метанотрофов в местах миграции подземных газов ограничивает использование этих микроорганизмов в качестве индикаторов на наличие нефтяных и газовых залежей (Могилевский, Стадник, 1977). Установлено, что метанотрофные бактерии встречаются одинаково часто в почвах как над нефтяными месторождениями, так и за их пределами (Iizuka et al., 1965), а в отдельных случаях в почвах нефтеносных и газовых аномалий эти бактерии отсутствуют (Квасников и др., 1974). Было показано также, что метанотрофная микрофлора почвы в районе утечки газа из подземной магистрали практически не отличалась от таковой в почвах, прилегающих к этому району (Adamse et al., 1972).

Считают (Adamse et al., 1972; Whittenbury et al., 1976), что одной из причин широкого распространения метанотрофных бактерий в природе является наличие в цикле развития всех известных видов этих микроорганизмов покоящихся стадий (экзоспores и цисты), устойчивых к высушиванию и повышенным температурам. Количество покоящихся форм может составлять от 10 до 90% от общего числа обнаруживаемых метанотрофов (Whittenbury et al., 1976). Очевидно, высокая встречаемость метанотрофов в природе может быть обусловлена также ин-

Таблица 2. Численность метанотрофных бактерий в природных экосистемах

Экосистема	Количество бактерий в 1 мл (г)	Автор, год
Воды		
Оз. Плюсзее	3 000 000	Overbeck, Ohle, 1964
Рыбническое водохранилище	100—800	Романенко, 1966
	10 000	Саралов, 1979а
Оз. Вехтеп	500	Carpenberg, 1972
Пресные водоемы	100—1800	Whittenbury et al., 1976
Марийские озера	250—250 000	Лауринавичус и др., 1978
Кливлендский залив оз. Эри	570—800	Reed, Dugan, 1978
	(Methylomonas methanica)	
Угольные шахты Донбасса	100—1 000 000	Иванов и др., 1978
Породы нефтегазовосных районов Нижнего Поволжья	60—250	Иванов и др., 1978
Почва, мл		
Почва в зоне утечки газа из подзем- ной магистрали	32 000 000	Adamse et al., 1972
Пресные водоемы	50 000 000	Whittenbury et al., 1975
Кливлендский залив оз. Эри	180 000—510 000	Reed, Dugan, 1978
	(Methylomonas methanica)	

роким распространением процесса биологической генерации метана в биосфере (Wolfe, Higgins, 1979).

Ниже рассматриваются имеющиеся данные о распространении и геохимической деятельности метанотрофных бактерий в различных экосистемах.

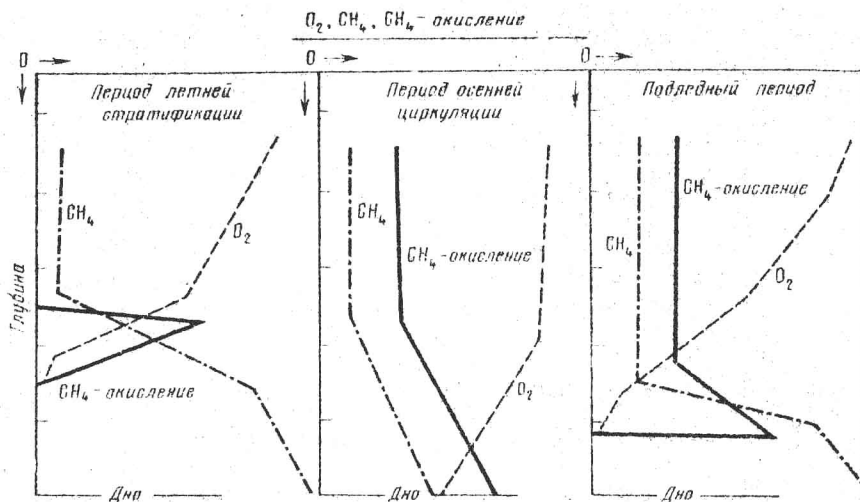
Пресные озера. По имеющимся данным, распределение и активность метанотрофной микрофлоры в мезо- и евтрофных озерах определяются сезонными изменениями в их водной толще. Типичные профили распределения метана, кислорода и интенсивности микробиологического окисления метана в евтрофных озерах в разное время года схематически изображены на рисунке.

Во время летней стратификации озер окисление метана микроорганизмами наблюдается преимущественно в зоне термоклина, где одновременно присутствуют метан и кислород. В эпилимнионе, несмотря на наличие метана и кислорода, этот процесс или не происходит (Rudd, Hamilton, 1975a), или идет с незначительной скоростью (Patt et al., 1974; Лауринавичус и др., 1978). В гипolimнионе аэробное окисление метана не происходит из-за отсутствия кислорода.

В течение осеннего перемешивания озерных вод, когда термоклин нарушается и метан с кислородом практически равномерно распределены в водной массе, микробиологическое окисление метана происходит по всему профилю озер. Наблюдается некоторое увеличение интенсивности этого процесса в направлении от поверхности озер к донным отложениям (см. рисунок).

В подледный зимний период окисление метана микроорганизмами осуществляется по всему профилю озер, за исключением слоя придонной воды, где формируется бескислородная зона. Максимальные скорости этого процесса наблюдаются на границе анаэробной и аэробной зон (см. рисунок).

Установлено, что наиболее высокие интенсивности процесса микробиологического окисления метана в озерах приурочены к слоям воды, содержащие растворенного кислорода в которых меньше 1 мг/л (Россолимо, Кузнецова, 1934; Rudd, Hamilton, 1975a). В опытах с озерной водой и с выделенными из этой воды накопительными культурами



Типичные профили распределения метана, кислорода и микробиологического окисления метана в водной толще евтрофных озер в разные сезоны года (Rudd, Hamilton, 1975b)

показано, что концентрации кислорода выше 1 мг/л ингибируют жизнедеятельность метанотрофной микрофлоры в озерах (Rudd, Hamilton, 1975a).

Как выяснилось впоследствии, ингибирующее действие кислорода на метанотрофную популяцию в период летней стратификации озер обусловлено высокой чувствительностью процесса азотфиксации у метанотрофов к парциальному давлению кислорода (Whittenbury et al., 1976; Rudd et al., 1976).

Известно, что фиксация молекулярного азота метанотрофами может происходить при дефиците в среде аммонийного и нитратного азота только при низких концентрациях кислорода, тогда как рост этих бактерий за счет минерального связанного азота не чувствителен к изменению парциального давления кислорода в достаточно широких пределах (De Bont, Mulder, 1974; De Bont, 1976; Dalton, Whittenbury, 1976). По данным Радда с соавторами (Rudd et al., 1976), содержание суммы ионов NH_4^+ и NO_3^- в воде озера № 227 летом составляло всего 2 мМ/л, в то время как осенью оно превышало 20 мМ/л, а в подледный период — 40 мМ/л. С использованием ^{15}N было показано, что выделенные из этого озера накопительные культуры метанотрофных микроорганизмов способны фиксировать молекулярный азот при незначительных концентрациях кислорода и хлористого аммония. Повышение концентрации кислорода приводило к подавлению процессов азотфиксации и окисления метана этими культурами, а последующее увеличение содержания хлористого аммония вновь вызывало окисление ими метана (Rudd et al., 1976). Следует отметить, что такая зависимость микробиологического окисления метана от содержания растворенных кислорода и минерального связанного азота была подтверждена в опытах с образцами морской воды (Sansone, Martens, 1978). Кроме того, в условиях модельной системы, имитирующей пресный водоем, было продемонстрировано увеличение в составе метанотрофной популяции численности метанотрофов-азотфиксаторов при истощении в среде аммонийного азота (Whittenbury et al., 1976).

Согласно приведенным выше фактическим данным вертикальное распределение микробиологического окисления метана, наблюдаемое в евтрофных озерах в разное время года, объясняется следующим образом.

В период летней стратификации озер содержание аммонийного и нитратного азота в воде чрезвычайно мало и развитие метанотрофов происходит за счет фиксации свободного азота. Поскольку этот процесс чувствителен к повышенному парциальному давлению кислорода, микробиологическое окисление метана наблюдается только или преимущественно в узкой зоне термоклина, где концентрации растворенного кислорода меньше 1 мг/л. Метанотрофная популяция в озерах в это время года представлена в основном видами метанотрофов, способными активно использовать молекулярный азот.

Во время осеннего перемешивания вод и в зимний период из илов в водную толщу озер поступает достаточное количество минерального связанного азота. Метанотрофная популяция переключается с азот-фиксации на использование этого азота, перестает быть чувствительной к кислороду и окисляет метан во всей кислородсодержащей водной массе озер.

На основании проведенных ими исследований Радд и Хамилтон (Rudd, Hamilton, 1975b) пришли к заключению, что концентрация кислорода и минерального азота в воде являются важнейшими факторами, контролирующими скорость и масштаб микробиологического окисления метана в пресных озерах. Содержание метана может лимитировать интенсивность этого процесса только при оптимальных концентрациях растворенного кислорода. Температура и pH воды обычно слабо влияют на активность метанотрофов в типичных евтрофных озерах.

Наиболее высокие скорости микробиологического окисления метана в озерах зафиксированы в летний период (Rudd et al., 1975b; Лауринавичус и др., 1978). Однако в пересчете на все озеро количество окисленного микроорганизмами метана за одни сутки летом в десятки — сотни раз меньше, чем за это же время в период осенней (весенней) циркуляции озерных вод, поскольку в первом случае микробиологическое окисление метана происходит только в узком слое воды, а во втором — во всей водной массе озера (Rudd, Hamilton, 1975b).

Использование радиоизотопного метода позволило установить, что в условиях пресных озер не более 30% углерода используемого микроорганизмами метана расходуется на синтез биомассы, а основная его часть трансформируется в углекислый газ и прочие экзометаболиты. При этом прослеживается тенденция к некоторому увеличению доли углерода метана, включенного в клетки микроорганизмов, по мере возрастания интенсивности окисления ими метана и уменьшения температуры воды в озере (Rudd et al., 1974; Patt et al., 1974; Беляев и др., 1975).

При определении интенсивности микробиологического окисления метана в озерах радиоизотопным методом неоднократно было замечено, что ^{14}C -метан включается в биомассу микроорганизмов в пробах воды, в которых кислород аналитически не выявляется (Patt et al., 1974; Rudd, Hamilton, 1975b; Лауринавичус и др., 1978; Panganiban et al., 1979). Кроме этого, поглощение метана было зафиксировано в бескислородных зонах морских осадков и вод (Reeburgh, 1976; Reeburgh, Higgin, 1977). Эти данные свидетельствуют о реальности существования в природе и, в частности, в озерах, процесса анаэробного микробиологического окисления метана. Не ясно пока, какие группы микроорганизмов ответственны за анаэробное окисление метана в природных экосистемах.

Изучение возможности использования метана в качестве единственного источника углерода и энергии сульфатредуцирующими бактериями дало отрицательный результат (Сорокин, 1957). Однако сульфатредуцирующие бактерии *Desulfovibrio desulfuricans* окисляли некоторое количество метана в ходе их роста на среде с лактатом (Davis, Igarbrough, 1966). Панганибан с соавторами (Panganiban et al., 1979) выделили из анаэробной зоны оз. Мендота окончательную культуру микроорганизмов, использующую метан в отсутствие кислорода при

обязательном наличии в среде ацетата и сульфатов. При этом метан трансформировался только в углекислый газ, а ацетат включался в клеточный материал микроорганизмов. Предполагается, что акцентором электронов при окислении метана в данном случае служили сульфаты. Названные исследователи пришли к заключению, что в оз. Мендота процесс окисления метана осуществляется двумя группами микроорганизмов. Одна из них окисляет метан свободным кислородом, другая — связанным кислородом сульфатов.

Описаны микроорганизмы, использующие метан за счет денитрификации (Davies, 1973), но многократные попытки других авторов выделить такие микроорганизмы были безуспешны (Whittenbury et al., 1970; Panganiban et al., 1979).

Имеется сообщение о способности метанообразующих бактерий окислять до 0,3% метана, образуемого ими в ходе анаэробного разложения органических кислот или путем восстановления углекислоты водородом. Метан при этом в основном превращается в углекислый газ и частично ассимилируется клетками бактерий. Образовывать и окислять метан в одно и то же время были способны все девять испытанных штаммов метанообразующих бактерий, относящихся к различным родам и видам (Zehnder, Brock, 1979).

Таким образом, согласно имеющимся данным в какой-то мере окислять метан в отсутствие кислорода могут сульфатовосстанавливающие, денитрифицирующие и метанообразующие бактерии. Однако эти данные нуждаются в подтверждении.

Угольные шахты можно рассматривать как искусственную экологическую систему, созданную производственной деятельностью человека. Вследствие обводненности, постоянного присутствия метана и принудительной аэрации в угольных шахтах создаются благоприятные условия для развития метанотрофной микрофлоры.

Установлено, что в свежесбояженных каменноугольных пластах и вмещающих их породах метанотрофные бактерии отсутствуют (Мчедишвили, 1972; Малащенко, Романовская, 1974; Иванов и др., 1978), но, как показывает наш собственный опыт, метанотрофы могут встречаться в образцах угля, отобранных с поверхности пластов, длительное время контактировавших с рудничной атмосферой, или из пластов, подвергавшихся искусственному увлажнению водой с целью снижения запыленности горных выработок. Очевидно, обнаруживаемые в таких случаях метанотрофные бактерии представляют микрофлору шахтного воздуха и используемой воды, а не собственно микрофлору угля.

Отсутствуя в каменноугольных пластах, метанотрофные бактерии часто обнаруживаются в шахтных водах (Мчедишвили, 1972; Малащенко, Романовская, 1974; Малащенко и др., 1975; Могилевский, 1976; Нестеров, 1976; Иванов и др., 1978). Метанотрофы практически всегда и в значительных количествах (до 10^6 кл/мл) встречаются в водах шахтных отстойников и выработанных пространств. В водах, просачивающихся через угольные пласты и породы, а также в ручьях, текущих по шахтной почве, метанотрофы или отсутствуют или содержатся в незначительном количестве (Иванов и др., 1978).

По нашим данным, в водах бурогоугольных шахт метанотрофные бактерии встречаются несколько реже, чем в водах угольных шахт. Бурые угли, как правило, не содержат метан. Вероятно, поэтому в бурогоугольных шахтах метанотрофная микрофлора обнаруживается преимущественно в водах выработанных пространств (табл. 3), где происходит современное образование метана (Нестеров и др., 1971).

На примере нескольких шахт Донецкого угольного бассейна была прослежена заселенность шахтных вод метанотрофными бактериями в зависимости от глубины расположения угольных выработок. Для сравнения были выбраны воды центральных водоотливов в шахтах, разрабатывающих один и тот же крутозалегающий угольный пласт. Оказалось, что заселенность шахтных вод метанотрофами определяется не

Таблица 3. Распространение метанотрофных бактерий в водах бурогольных шахт Подмосковного бассейна

Шахта	Места отбора проб	pH	Количество бактерий в 1 мл
№ 1—2	Лава. Угольный пласт и порода	7,0	0
	Заперемычное выработанное пространство	6,3	10 ²
	Штрек. У перемычки	7,3	9
	Забивной фильтр. Надугольные пески	7,0	0
	Почва западного штрека	7,1	10 ⁵
	Водосборник центрального водоотлива	7,5	10
№ 4	Лава. Угольный пласт и порода	6,4	0
	Заперемычное выработанное пространство	6,4	10 ⁴
		6,9	10 ³
		6,6	0
№ 7	Забивной фильтр. Надугольные пески	7,0	0
	Скважина над шахтным полем. Доломитовый горизонт	6,9	10
	Заперемычное выработанное пространство	6,5	0

глубиной угольных шахт, а степенью минерализации шахтных вод (Иванов и др., 1978).

По видовому составу метанотрофная микрофлора вод угольных шахт не специфична. В шахтных водах идентифицированы метанотрофы *Methylosinus trichosporium*, *Methylosinus sporium*, *Methylocystis parvus*, *Methylomonas methanica* (Иванов и др., 1978), *Methylomonas rubrum*, *Methylococcus luteus* и *Methylococcus ucrainicus* (Малашенко и др., 1978), которые широко распространены и в других экосистемах. Однако Е. С. Волошина с соавторами (1976) считают, что специфическим обитателем вод угольных шахт является метанотроф *Methylomonas rubrum*. В целом видовой состав метанотрофной микрофлоры угольных шахт изучен недостаточно.

Интенсивность микробиологического окисления метана в водах угольных шахт может достигать высоких значений — около 1 мл $\text{CH}_4/\text{л}$ воды в сутки. При этом в среднем около 50% углерода используемого бактериями метана включается в растворимые экзометаболиты, около 40% — в углекислый газ и только около 10% — в биомассу микроорганизмов (Иванов и др., 1978). Поскольку аналогичное распределение углерода метана в продуктах метаболизма метанотрофов наблюдается и в озерах (Беляев и др., 1975), можно предположить, что в природе процесс микробиологического окисления метана характеризуется низким экономическим коэффициентом использования метана. В условиях лабораторного культивирования до 63% углерода используемого метанотрофами метана может переходить в их биомассу (Нестеров и др., 1977).

Жизнедеятельность метанотрофных бактерий в водах угольных шахт не отражается существенно на газообильности последних. По нашим расчетам, количество окисляемого микроорганизмами метана в масштабе шахты составляет меньше одного процента от метана, выделяющегося из угля. Однако при проведении комплекса биогеотехнологических мероприятий поступление метана в горные выработки может быть заметно снижено за счет его окисления микроорганизмами в угольных пластах и выработанных пространствах (Москаленко, Нестеров, 1975; Мякенький и др., 1979).

Моря и океаны. О геохимической деятельности метанотрофных бактерий в морях и океанах пока известно мало. Имеются отдельные указания на присутствие жизнеспособных метанотрофов в этих экосистемах.

Наличие метанотрофов в бактериальной пленке на поверхности грунтов Каспийского и Азовского морей было показано В. С. Буткевичем (1938). Позднее присутствие этих микроорганизмов в грунтах Кас-

пийского моря было подтверждено Л. К. Осницкой (1953). По данным Ю. И. Сорокина (1975), активная метанотрофная микрофлора обитает в водах Черного моря на глубинах от 100 до 800 м.

Метанотрофные бактерии были обнаружены в верхних горизонтах морских осадков у побережья Калифорнии, в Мексиканском заливе, а также в прибрежных осадках Атлантического океана. В слоях осадков глубже 10 см эти микроорганизмы, как правило, отсутствовали (Hutton, Zobell, 1949).

В последнее время ряд новых данных по распространению метанотрофов в морских и океанических осадках был получен в нашей лаборатории. Проведенные исследования показали, что в осадках Тихого и Индийского океанов количество метанотрофов варьирует от 10 до 2500 клеток/г сырого ила. Численность метанотрофных бактерий при этом уменьшается в направлении от берегов в открытую часть океана и по мере углубления в толщу осадков. В осадках открытой части океана, а также в слоях осадков глубже 60 см метанотрофные микроорганизмы не обнаруживаются.

Такие же закономерности распространения метанотрофных бактерий установлены нами и для илов Балтийского моря. Однако максимальное содержание метанотрофов в 1 г влажного ила в данном случае достигало 100 000 клеток, т. е. на два порядка выше, чем в океанических осадках.

Имеющиеся сведения о присутствии метанотрофных микроорганизмов в почве (уже приводившиеся выше) не позволяют выявить закономерности их распространения в этой экосистеме. Всего две публикации (Намсараев, Заварзин, 1972, 1974) касаются распределения и активности метанотрофов в болотах.

ЭКОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МЕТАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ

Метанотрофные бактерии играют важную роль в круговороте углерода в природе. Метан, постоянно образующийся в различных экосистемах в результате анаэробной деструкции органических веществ, трансформируется метанотрофами в биомассу, углекислоту и другие углерод-содержащие экзометаболиты, которые вновь вовлекаются в углеродный цикл.

Представление о масштабах геохимической деятельности метанотрофных бактерий в природе дает табл. 4. Как следует из приведенных в таблице данных, интенсивность микробиологического окисления метана в природных водах варьирует в широких пределах: от сотых долей микролитра метана в 1 л воды за сутки в подземных водах до сотен микролитров — в озерах и угольных шахтах.

Строгих количественных данных по интенсивности микробиологического окисления метана в плотных илах, почвах и породах нет. Однако сведения о численности метанотрофов и их потенциальной активности в почвах и илах (Adamse et al., 1972; Малащенко и др., 1975; Whittenbury et al., 1976; Reed, Dugan, 1978) дают основание полагать, что и в этих экосистемах микроорганизмы могут осуществлять процесс окисления метана достаточно интенсивно.

Вклад процесса микробиологического окисления метана в круговорот углерода в озерах был оценен Раддом и Хамилтоном на примере озера № 227 в Канаде (Rudd, Hamilton, 1978). Согласно полученным ими данным (см. ниже) около 70% образующегося в озере метана

Процесс	г С на 1 м ² поверхности озера в год	Процесс	г С на 1 м ² поверхности озера в год
Образование метана	18	Первичная продукция	138
Окисление метана	12	Общее поступление углерода	33

Таблица 4. Интенсивность микробиологического окисления метана в природных водах

Экосистема	Интенсивность окисления CH_4 , мкл/д в сутки	Автор, год
Оз. Эри	86,0	Howard et al., 1971
Оз. № 227	537,6	Rudd et al., 1974
Оз. № 120	80,6	Rudd et al., 1974
Оз. Черный Кичнер	7--464	Лауринявичус и др., 1974
Оз. Большой Кичнер	6,5--44,5	Беллев и др., 1975
Оз. Киву	11,0	Jannasch, 1975
Оз. Кузнециха	1,5--23,2	Лауринявичус и др., 1974
Угольные шахты Донбасса	36--990	Иванов и др., 1978
Бухта Кейп Люкаут	4,7	Sansone, Martens, 1978
Породы нефtega-носных районов Нижнего Поволжья	0,015--0,045	Иванов и др., 1979
Рыбинское водохранилище	51,1--86,2	Саралов, 1979a

превращается метанотрофами в биомассу и углекислый газ. Таким образом, метанотрофные бактерии предотвращают потерю в виде метана 30% бюджета углерода в озере. Количество образующихся при этом биомассы и углекислого газа незначительно по сравнению с объемом первичной продукции в озере. Это дало основание названным исследователям полагать, что в летний период вклад метанотрофов в создание пищевого фонда для водных животных в озере не существен. Но во время зимы, когда интенсивность синтеза первичной продукции фитотрофами мала, метанотрофные микроорганизмы могут служить важным источником пищи для водных животных (Rudd, Hamilton, 1978).

Важное экологическое значение метанотрофных бактерий состоит также в том, что они в ряде случаев оказывают определяющее влияние на кислородный режим водоемов. Потребляя кислород в ходе аэробного окисления метана в водной толще, метанотрофы способствуют возникновению кислородного дефицита в озерах (Россолимо, Кузнецова, 1934; Кузнецов, 1934, 1939, 1970; Overbeck, Ohle, 1964; Rudd, Hamilton, 1978). Количество расходуемого метанотрофами кислорода определяется масштабами поступления в озера метана из иловых отложений. В озерах с обильным донным газоотделением за счет бактериального окисления метана поглощается до 70% растворенного в воде кислорода (Кузнецов, 1970, 1974). Геохимическая деятельность метанотрофных бактерий является главной причиной образования анаэробных зон в гниломитномезотрофных и евтрофных пресных озер во время их летней стратификации. В подледный период микробиологическое окисление метана может приводить к полному исчезновению кислорода в водоемах, сопровождающемуся замором рыб в них (Россолимо, Кузнецова, 1934; Кузнецов, 1934; Rudd, Hamilton, 1978).

В уже упоминавшемся выше озере № 227 кислород полностью поглощался микроорганизмами в течение 77 сут после замерзания озера. Однако это происходило только в том случае, если период осеннего перемешивания озера был кратковременным и соответственно диффузия метана из водной толщи в атмосферу была небольшой. Когда же замерзание озера наступало поздно и значительное количество метана уходило из озера в атмосферу за время осенней циркуляции вод, концентрация кислорода в водной толще в течение всей зимы оставалась довольно высокой (Rudd, Hamilton, 1978). Таким образом, кислородный режим озер в значительной мере контролируется балансом метана в них.

Утилизируя метан в водоемах и земной коре, метанотрофные бактерии препятствуют его накоплению и тем самым играют важную роль

в поддержании газового баланса биосферы. В отдельных случаях метанотрофы входят в состав бактериальных пленок, которые представляют собой естественные поглотители метана на пути его миграции в атмосферу. Такая пленка была обнаружена на поверхности грунтов в мелководных районах Каспийского и Азовского морей (Буткевич, 1938). Преимущественная локализация метанотрофов в нейстонной пленке была показана в экспериментах, моделирующих низовое болото (Намсараев, Заварзин, 1974). В озерах метанотрофные микроорганизмы могут поглощать от 40% (Лауринвичус и др., 1978) до 70% (Rudd et al., 1978) продуцируемого в иловых отложениях метана, а иногда — весь продуцируемый в водоеме метан. В опытах, имитирующих пресный водоем, Виттенбурги с соавт. (Whittenbury et al., 1976) наблюдали полное потребление микроорганизмами выделяющегося из ила метана уже в 2—5-сантиметровом слое воды над илом. Геохимическая деятельность метанотрофов, по данным Янаша (Jannash, 1975), ответственна за отсутствие выделения в атмосферу метана из оз. Киву (Центральная Африка), количество окисляемого микроорганизмами метана в котором составляет 116 млн. м³ в год.

Кроме метана, постоянно образующегося при анаэробном разрушении органических веществ биосферы, метанотрофные бактерии окисляют также захороненный метан, выделяющийся в ходе разработки газовых, нефтяных и угольных месторождений. Таким образом, благодаря метанотрофам в биологический круговорот вводится углерод, участие которого в этом процессе не было «предусмотрено» природой.

Участие метанотрофов в круговороте углерода, по-видимому, не сводится только к преобразованию метана. Эти микроорганизмы способны использовать также в качестве основных источников углерода и энергии метанол, диметиловый эфир, метилформинат, диметилкарбонат и формальдегид (Whittenbury et al., 1976). Дополнительными источниками углерода для роста метанотрофов могут служить двуокись углерода, ацетат и некоторые аминокислоты. Кроме того, утилизируя метан, метанотрофы могут соокислять многие углеродсодержащие соединения, такие, как окись углерода, пропан, этан, пропанол, бутанол, ацетон, ацетамид и т. д. (Whittenbury et al., 1976). Очевидно, некоторые из перечисленных выше соединений присутствуют в природных экосистемах и наряду с метаном подвергаются воздействию метанотрофов в ходе рециркуляции ими углерода биосферы.

Важное экологическое значение метанотрофных бактерий связано, по-видимому, и с их участием в круговороте азота в природе, что обусловлено в первую очередь способностью этих микроорганизмов фиксировать свободный азот (De Bont, Mulder, 1974; De Bont, 1976; Dalton, Whittenbury, 1976). По данным А. И. Саралова (1979б), на долю метанотрофов приходится около 10% всего фиксируемого микроорганизмами азота в димиктических озерах Эстонии. Кроме этого, превращая аммонийный азот в нитраты и нитриты, метанотрофы выполняют в природе функцию нитрификаторов (Whittenbury et al., 1976). Однако недостаток количественных характеристик азотного метаболизма метанотрофных бактерий в природных условиях не позволяет оценить их вклад в азотный фонд различных экосистем и их роль в круговороте азота.

Совокупность имеющихся данных по экологии метанотрофных бактерий свидетельствует о широком распространении этих микроорганизмов в природе и их важной роли в биогеохимических процессах биосферы. Экологическое значение метанотрофов определяется их участием в круговоротах углерода и азота, а также их существенным влиянием на кислородный режим водоемов.

Оценивая современное состояние экологии метанотрофных бактерий, следует признать наши знания о закономерностях распростране-

ния, видовом составе и геохимической деятельности метанотрофов недостаточными для определения их биогеохимической значимости в глобальном масштабе. Наиболее детально изучены основные вопросы экологии метанотрофов в пресных водоемах и водах угольных шахт. Отдельные работы касаются экологии этих микроорганизмов в подземных водах, морях и океанах и практически ничего неизвестно об экологии почвенных метанотрофов. В связи с этим первоочередной задачей в области экологии метанотрофных бактерий является исследование слабо изученных экосистем с использованием современных методов.

Для решения вопросов аутоэкологии метанотрофов и структуры метанокисляющих биоценозов необходимо шире использовать иммунолюминесцентный метод учета отдельных видов метанотрофов и методы физического моделирования различных экосистем. Надежные результаты обеспечивают газохроматографический и радионизотопный методы количественной оценки интенсивности окисления метана микроорганизмами в природных водах. Ценную информацию о масштабах геохимической деятельности метанотрофных бактерий в геологическом прошлом может дать использование масс-спектрометрического метода.

Особого внимания заслуживает вопрос о существовании анаэробного окисления метана микроорганизмами в природных экосистемах.

Одной из важнейших перспективных задач в области экологии метанотрофов является разработка методов количественного определения интенсивности микробиологического окисления метана в плотных пластах, почвах и породах.

ЛИТЕРАТУРА

- Алексеев Ф. А., Войтов Г. И., Лебедев В. С., Несмеянов З. И. Метан. М.: Недра, 1978, с. 96—98.
- Беляев С. С., Лауринавичус К. С., Иванов М. В. — Микробиология, 1975, **44**, № 3, с. 542—545.
- Богданова В. М., Могилевский Г. А., Телегина З. П. — Микробиол. пром-сть, 1975, № 1 (121), с. 27—31.
- Богданова В. М., Могилевский Г. А., Стодник Е. В., Телегина З. П. — Микробиол. пром-сть, 1977, № 3, с. 6—8.
- Борщевский Ю. А., Степанова Н. А. — ДАН СССР, 1978, **242**, № 5, с. 1177—1180.
- Буткевич В. С. — Микробиология, 1938, **7**, № 9, с. 1005—1020.
- Волошина Е. С., Грищенко Н. Н., Богаченко В. Н., Малащенко Ю. Р. — В кн.: Тез. докл. 1 Респ. науч.-теорет. конф. молодых ученых — микробиологов. Ташкент: Фан, 1976, с. 33—34.
- Гальченко В. Ф. — Прикл. биохимия и микробиология, 1975, **11**, № 3, с. 447—450.
- Гальченко В. Ф., Шишкина В. Н., Сузина Н. Е., Троценко Ю. А. — Микробиология, 1977, **46**, № 5, с. 890—897.
- Зякин А. М., Бондарь В. А., Намсараев Б. Б. — Геохимия, 1979, № 2, с. 291—297.
- Иванов М. В., Нестеров А. И., Намсараев Б. Б., Гальченко В. Ф., Назаренко А. В. — Микробиология, 1978, **47**, № 3, с. 489—493.
- Иванов М. В., Беляев С. С., Лауринавичус К. С., Намсараев Б. Б. — Микробиология, 1979, **48**, № 1, с. 129—132.
- Квасников Е. И., Малащенко Ю. Р., Романовская В. А. — Микробиология, 1969, **38**, № 4, с. 968—974.
- Квасников Е. И., Малащенко Ю. Р., Романовская В. А. — Успехи микробиологии, 1974, № 9, с. 125—152.
- Кондратенко Г. П., Николенко Ю. И., Безрукова Л. В., Нестеров А. И., Гальченко В. Ф. — Микробиология, 1981, **50**, № 2, с. 320—325.
- Кузнецов С. И. — Микробиология, 1934, **3**, № 4, с. 486—505.
- Кузнецов С. И. — Труды Лимнологической станции в Коснне, 1939, **22**, с. 53—71.
- Кузнецов С. И. — Микробиология, 1947, **16**, № 5, с. 429—436.
- Кузнецов С. И. Микрофлора озер и ее геохимическая деятельность. Л.: Наука, 1970, с. 227—233.
- Кузнецов С. И. Развитие идей С. И. Виноградского в области экологической микробиологии. М.: Наука, 1974, с. 39—46.
- Лауринавичус К. С., Беляев С. С., Иванов М. В. — Тез. докл. конф. «Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов». Пушкино, 1974.
- Лауринавичус К. С., Беляев С. С., Иванов М. В. — Изв. АН СССР. Сер. биол., 1978, № 2, с. 308—311.
- Левин А. Ю., Иванов М. В., Ривкина Е. М., Бондарь В. А. — Геохимия, 1977, № 4, с. 578—588.