

МЕТАНОТРОФЫ ПСИХРОФИЛЬНОГО МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА ЗАПОЛЯРНОЙ ТУНДРЫ РОССИИ

© 2002 г. Ю. Ю. Берестовская*, Л. В. Васильева*, О. В. Честных**, Г. А. Заварзин*

*Институт микробиологии РАН, Москва

**Центр экологии и продуктивности лесов РАН, Москва

Поступила в редакцию 20.02.01 г.

В тундре при низкой температуре функционирует медленно развивающееся метанотрофное сообщество. Метанооксиляющие бактерии связаны с растениями, которые растут при повышенной влажности – осокой и сфагнумом, но не обнаруживаются в политриховых и аулакомниевых мхах, лишайниках, характерных для более сухих мест. Установлено, что сообщество приурочено к определенным почвенным горизонтам: моховому очесу, оторфованному моховому очесу, торфу. Потенциальная способность метанотрофного сообщества к окислению метана при 5°C увеличивается с глубиной почвенного профиля по мере уменьшения температуры почвы. Показано, что метанотрофное сообщество способно медленно адаптироваться к разным температурам. Способность к адаптации связана с наличием разных представителей метанооксиляющих бактерий в сообществе. Метанотрофы занимают определяемые эконихи в соответствии с температурой и pH. В интервале температур 5–15°C доминирующие формы метанотрофов были распределены в зависимости от pH на три морфологически легко различимые группы. При pH 5–7 и температурах 5–15°C преобладали формы, морфологически сходные с *Methylobacter psychrophilus*, при кислом pH 4–6 и температурах 10–15°C – организмы, сходные с *Methylocella palustris* с типичными биполярными клетками, а при pH 5–7 и температурах 5–10°C обнаружен новый метанотроф, крупные кокковидные клетки которого имеют мощную слизистую капсулу.

Ключевые слова: психрофилия, метаноокисление, бактериальный фильтр, парниковые газы, микробные сообщества.

Основные источники атмосферного метана, являющегося важным парниковым газом, расположены на континентах [1]. Значительный вклад в эмиссию метана вносят амфибиальные ландшафты. Оторфованные и заболоченные земли в России занимают 369 млн. га, из них 3/4 находятся в зоне вечной мерзлоты в условиях низких температур и вносят существенный вклад в биогеохимические процессы [2]. Эмиссия метана контролируется представителями почвенной микрофлоры и зависит от соотношения процессов метанобразования и метаноокисления [3]. Исследования потоков эмиссии метана из заболоченных земель были проведены *in situ* [4–7]. Установлено, что болотные почвы являются природными биофильтрами для метана. Образующийся в анаэробной зоне метан, при определенных физико-химических условиях окисляется метанотрофным сообществом почвы. Показано, что при низких температурах окисление метана происходит как при нейтральной, так и при кислой реакции среды. Обнаружены тесно связанные со сфагнумом психрофильные ацидофильные метанотрофы [8, 9]. В чистую культуру в настоящее время выделены только два психрофильных организма: пресноводный *Methylobacter psychrophilus*, растущий в интервале

температур 3.5–10°C с температурным оптимумом при 6°C [10], и *Methylosphaera hansonii*, требующий для роста морской воды, с оптимумом для роста при температуре 10–13°C и максимумом при 16–21°C [11]. В связи с тем, что микробиологические аспекты биогеохимической деятельности метанооксиляющих бактерий в почвах северных территорий остаются мало изученными, задачей наших исследований было изучение психрофильного метанооксиляющего бактериального сообщества тундры: его связь с растительностью, распределение метанотрофов по почвенному профилю; установление разнообразия метанооксиляющих бактерий в сообществе в зависимости от температуры и pH.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали образцы почвы тундры, отобранные во время полевых исследований вблизи станции Тальник (67°–20' N, 62°44' E) в 20 км к югу от г. Воркуты в июле–августе 1999 г. Местами отбора проб были: мохово-лишайниково-кустарничковая тундра (участок 1) и осоково-моховое болото (участок 2), которые отличались друг

от друга степенью увлажненности, показателями кислотности среды (рН), видовым составом растительного покрова. Почвы тундры характеризуются резким температурным градиентом по профилю. На поверхности почвы участка 1 температура была 19°C, на глубине 5 см от поверхности – 15.4°C, на глубине 10 – 8.3°C. Градиент температур в осоковом болоте был более резким и составил от 20.2 до 4.0°C, начиная с поверхности и до глубины 10 см. Значения рН почвенных растворов 1-го участка был 5.5 и 4.5 на участке 2.

Образцы почвы вырезали в виде монолитов от поверхности до минерального горизонта и доставляли в лабораторию для исследования. Монолиты разделяли послойно в соответствии со следующей схемой: растительный покров (лишайники, мхи, осока); моховый очес; оторфованный моховый очес; торф. Из каждого слоя отбирали по 2–5 г пробы. Для изучения связи метанооксилирующих бактерий с представителями растительного покрова тундры были выбраны доминирующие на исследованных участках лишайники родов: *Cetraria* и *Cladonia*; мхи: *Sphagnum*, *Polytrichum*, *Aulacomnium* и осока – *Carex* sp. (табл. 1). У лишайников исследовали слоевище. Мхи делили на верхнюю зеленую хлорофиллсодержащую часть и лишенные хлорофилла основания растений, составляющие разной толщины слои мохового очеса, которые исследовали отдельно. У осоки изучали надземную (стебли и листья) и подземную (корни и корневища) части.

Навески образцов помещали в сывороточные бутылки объемом 500 мл, а также во флаконы объемом 125 мл и заливали минеральной средой в соотношении 1: 10 (вес/объем). Приготовленные таким образом инкубационные смеси составляли 10% общего объема сосуда для культивирования. Флаконы герметично закрывали, после чего газовую фазу замещали смесью метана и воздуха. Количество метана 30–50% от общего объема газовой фазы.

В работе использовали низкоминерализованную среду, состав которой был подобран специально для культивирования микроорганизмов из ультрапресных мест обитания (мг/л): NH_4SO_4 – 500; MgCl_2 – 40; KH_2PO_4 – 70; раствор микроэлементов – 1 мл/л [8]. Общее количество минеральных солей составляет 0.6 г/л среды, что находится на уровне концентраций почвенных растворов в местах отбора проб.

Интервал исследуемых значений рН составлял 4.0–7.0. Значения рН устанавливали с помощью 0.1 N раствора HCl и NaOH.

Поскольку нас интересовали низкотемпературные процессы, протекающие в почвенных горизонтах, исследования проводили в интервале температур 5–20°C. Количество метана в газовой фазе определяли на газовом хроматографе ЛХМ-

Таблица 1. Связь метанотрофов с представителями растительного покрова

Растение	Наличие метанотрофов		
	5°C	10°C	15°C
Лишайники:			
<i>Cetraria nivalis</i>	–	–	–
<i>Cetraria islandica</i>	–	–	–
<i>Cladonia rangiferina</i>	–	–	–
<i>Cladonia arbuscula</i>	–	–	–
Мхи (хлорофиллсодержащая часть растения):			
<i>Sphagnum</i> sp.	–	–	–
<i>Polytrichum</i> sp.	–	–	–
<i>Aulacomnium</i> sp.	–	–	–
Осока (<i>Carex</i> sp.):			
листья и стебли	–	+	+
корни и корневища	–	–	–

80 с катарометром. Газ-носитель аргон, в качестве сорбента использовали Porapak Q.

Морфологию клеток изучали в световом микроскопе с фазовым контрастом (“Amplival”, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование представителей растительного покрова тундры не показало наличия метанотрофных бактерий на верхней зеленой части мхов, а также на таломых лишайников. В образцах, приготовленных из стеблей и листьев осоки, окисление метана было зафиксировано через 2 мес. культивирования. Это свойство сохранялось при пересевах и свидетельствовало о возможной связи метанового фильтра с проводящей системой осоки аналогично тому, что ранее было показано для риса [12]. Рост численности метанооксилирующих бактерий (микроскопические наблюдения) и активность окисления метана коррелировали с растениями, развивающимися при повышенной влажности – осокой и сфагнумом. Метанотрофы отсутствовали в ассоциациях с растениями более сухих мест – политриховыми и аулакомниевыми мхами и лишайниками. Это может быть связано с тем, что численность метанотрофов выше в местах образования метана – затопленных анаэробных участках, где идет метаногенез [4]. Полученные результаты не согласуются с общепринятым мнением, что поглощение метана атмосферы в тундре происходит преимущественно в хорошо аэрируемых возвышенных сухих местах [13].

Установлена связь бактериального метанотрофного сообщества с разными почвенными го-

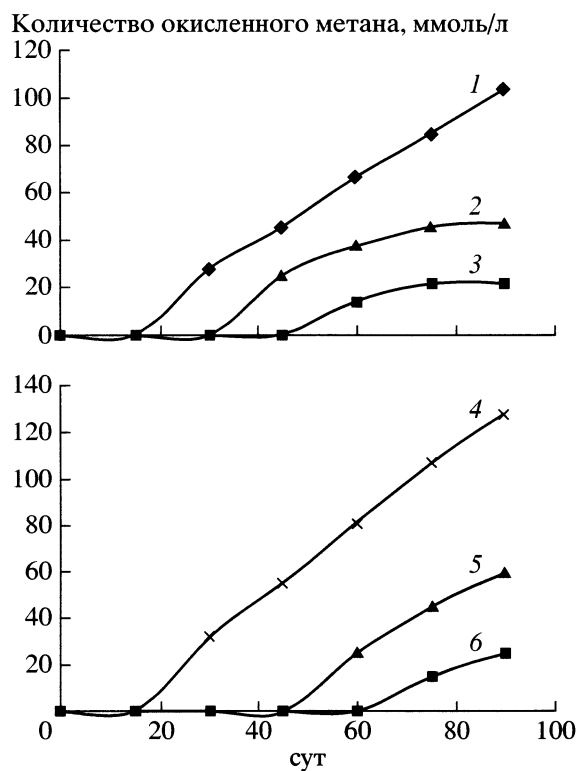


Рис. 1. Окисление метана при 5°C бактериальными сообществами, выделенными из почвенных образцов разной глубины залегания: 1 – 18–20 см; 2 – 6–8 см; 3 – 3–4 см; 4 – 8–10 см; 5 – 4–5 см; 6 – 2–3 см.

ризонтами: моховым очесом, оторфованным моховым очесом и торфом независимо от мощности и глубины залегания этих слоев. Микроскопическое исследование накопительных культур из этих образцов показало наличие в микробных сообществах метанотрофов, которые легко идентифицировались в световом микроскопе вследствие характер-

Таблица 2. Наличие в сообществах морфовидов метанотрофных бактерий в зависимости от pH и температуры

pH	Температура, °C	Морфовид 1	Морфовид 2	Морфовид 3
4	5	–	–	–
	10	–	–	–
	15	–	–	–
5	5	+	+	–
	10	+	+	+
	15	–	–	+
6	5	+	+	–
	10	+	+	+
	15	+	–	+
7	5	+	+	–
	10	+	+	–
	15	+	–	–

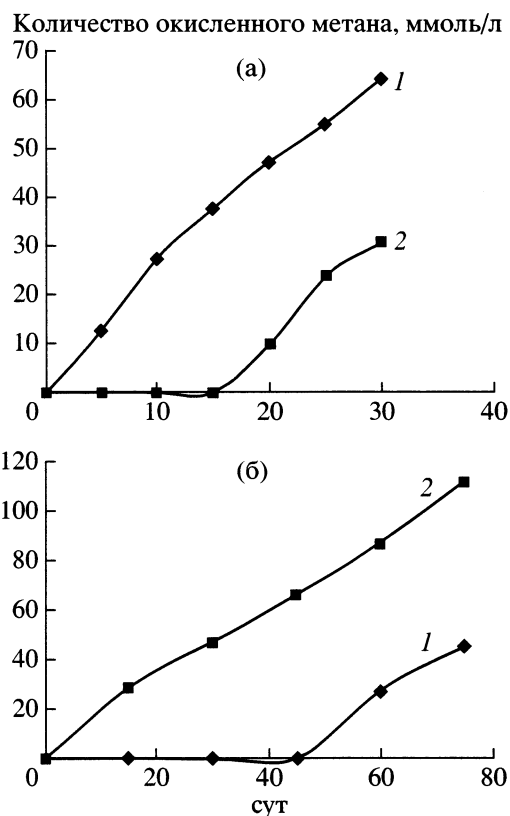


Рис. 2. Окисление метана бактериальными сообществами при разных температурах: а – 10°C; б – 5°C: 1 – бактериальное сообщество, выделенное из почвенного горизонта, имеющего температуру 10°C, 2 – бактериальное сообщество, выделенное из почвенного горизонта, имеющего температуру 5°C.

ной морфологии клеток. Была подтверждена установленная нами ранее связь метанотрофных бактерий с гиалиновыми клетками сфагнума [8]. Возможно, что в условиях малой буферной емкости ультрапресных вод pH поддерживается преимущественно в присутствии растений сфагнума, что и обуславливает тесную связь определенных видов метанотрофных бактерий со сфагнумом.

Метанокисляющая активность психрофильных микробных сообществ накопительных культур при 5°C коррелировала с глубиной отбора образца (рис. 1). С увеличением глубины залегания почвенного горизонта увеличивалось количество метана, потребленного сообществом в пробе при этой температуре. Менялся характер его потребления: по мере приближения к горизонту вечной мерзлоты и уменьшения температуры почвы наблюдалось сокращение лаг-фазы, предшествующей началу потребления метана.

Исследована способность метанокисляющих сообществ адаптироваться к разным температурам. (рис. 2). Бактериальное сообщество, выделенное из почвенного горизонта с температурой 4–5°C начинало потреблять метан при темпера-

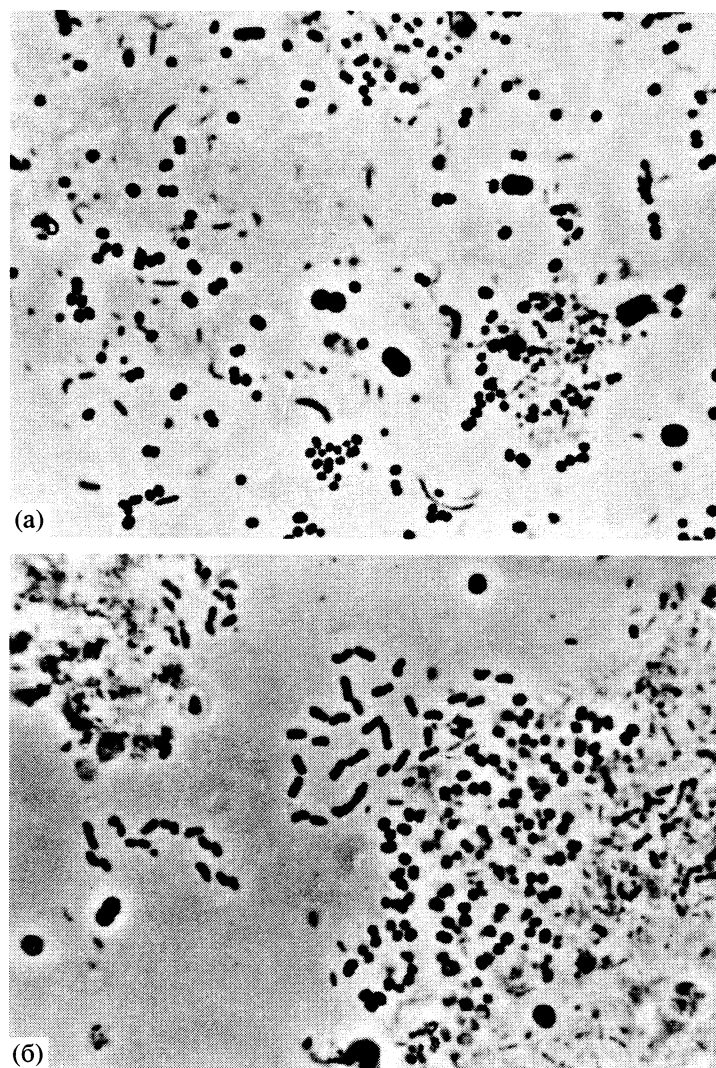


Рис. 3. Морфологические формы метанотрофов метанооксиляющего бактериального сообщества: а – кокковидные бактерии ($\times 950$); б – палочковидные бактерии ($\times 800$).

туре 5°C практически сразу, в то время как при 10°C эта способность проявлялась у него лишь через 10–15 сут от начала культивирования. Точно так же окисление метана бактериальным сообществом, выделенным из слоя почвы с температурой 10°C , начиналось без заметной лаг-фазы при 10°C , а при 5°C адаптационный период к этой температуре составил 40–45 сут. Таким образом, судя по отсутствию быстрой реакции на условия культивирования, линейному характеру потребления метана и длительности лаг-фазы, психрофильное метанооксиляющее сообщество медленно приспосабливается к различным температурным режимам *in vitro*.

Наличие адаптационного периода перед началом окисления метана при разных температурах, а также различия в характере потребления метана в зависимости от температуры и pH свидетель-

ствовали о существовании разных агентов метаноокисления в пробах почвы. Микроскопические исследования микробных сообществ, развивающихся при разных температурах, установили наличие в них разных представителей метанотрофных бактерий, которые, благодаря характерной морфологии, легко определялись в световом микроскопе (рис. 3). В исследованных образцах метанотрофы были представлены по меньшей мере двумя кокковыми формами (рис. 3а), которые различались размерами клеток и наличием везикул. Клетки размером 1–1.4 мкм похожи на описанный нами ранее *Methylobacter psychrophilus* и обозначены как морфовид 1; крупные кокки размером 2–2.5 мкм – как морфовид 2, а палочки, морфологически сходные с *Methylocella palustris* (рис. 3б) – как морфовид 3.

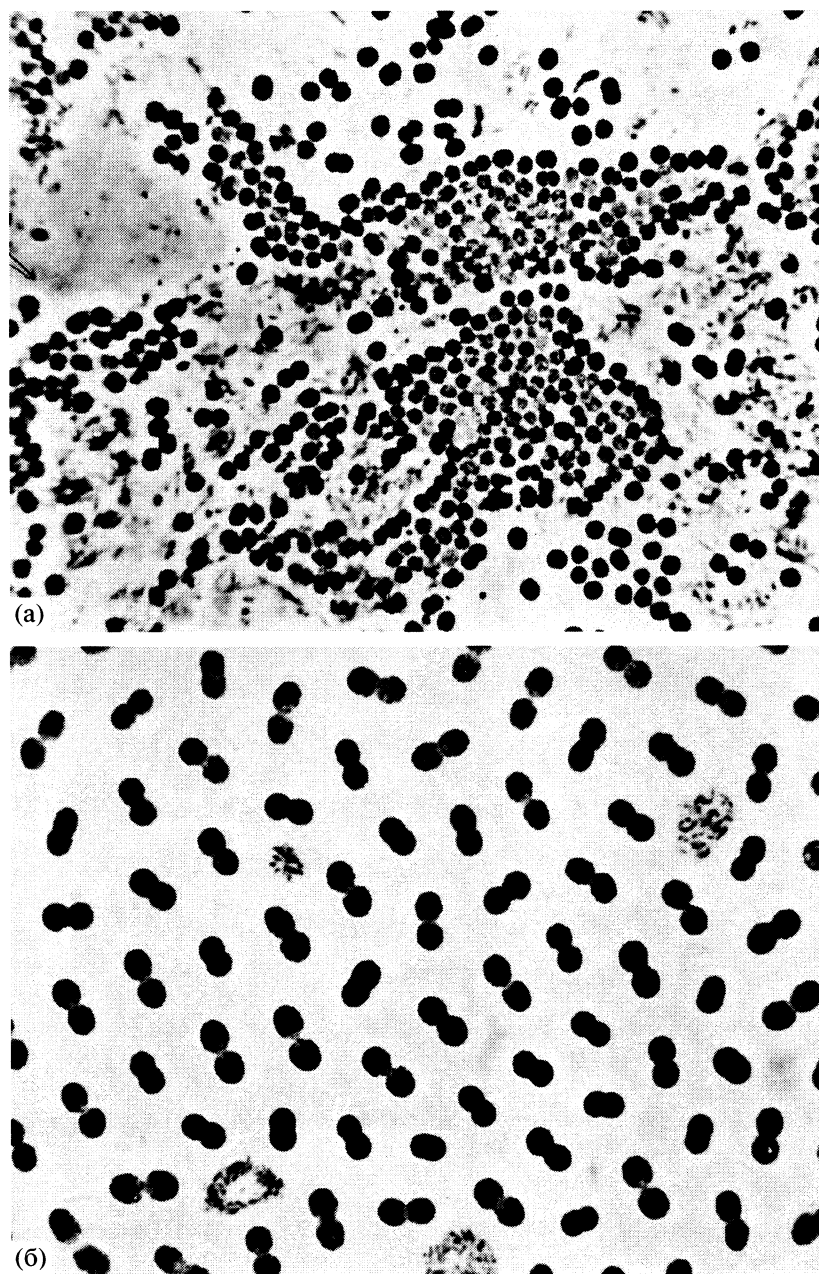


Рис. 4. Накопительные монокультуры метанотрофных бактерий: а – морфовид 1; б – морфовид 2. Увеличение $\times 1120$.

В зависимости от физико-химических условий в изучаемых бактериальных сообществах происходила смена морфовидов (табл. 2). Нами сопоставлено их развитие при температурах 5, 10, 15 и 20°C и значениях pH в пределах 4–7. Количество метана, потребленного при 20°C всеми культурами, было незначительным, поэтому в дальнейшем изложении приведены результаты экспериментов, проводимых в интервале температур 5–15°C. При pH < 4 и температурах культивирования 5, 10, 15°C в микробных сообществах доминировали грибы. Дрожжи росли при всех исследованных

температурах и значениях pH 4–6. Клетки метанотрофов морфовидов 1 и 2 обнаруживали при температурах 5 и 10°C и pH 5–6. Метанооксилюющие организмы морфовида 1 росли при температуре 15°C только при pH выше 5, а бактерии морфовида 2 отсутствовали при этой температуре при всех исследованных значениях pH, представляя собой истинного психрофила. Метанотроф сходный с *Methylocella palustris* появлялся, начиная с температуры 10°C при pH 5, и рос при 10–15°C и pH меньше 7.0 [14]. Наибольшее разнообразие форм было в сообществе при pH 5–6 и

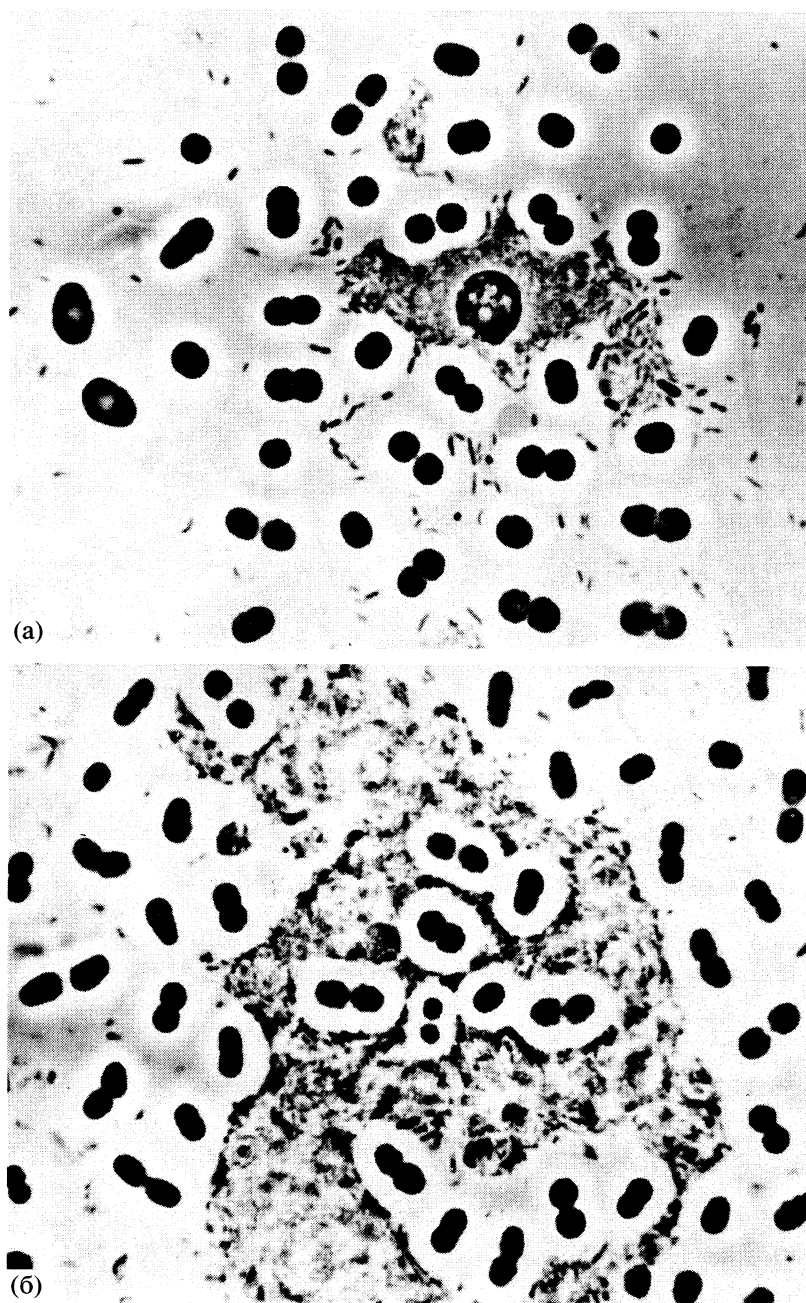


Рис. 5. Структуры бактериального сообщества накопительной монокультуры (морфовид 2). Увеличение $\times 1120$.

температуре 10°C , когда обнаруживались клетки трех морфовидов.

Часть метанотрофов выделена в монокультуры, содержащие палочковидные спутники (рис. 4). Общим свойством этих монокультур была способность к образованию хлопьев по всему объему среды в процессе культивирования. Практически все клетки находились в тесном физически организованном сообществе. Структура таких сообществ представлена на фотографии (рис. 5). Крупные клетки морфовида 2 характеризуются

наличием толстых слизистых капсул, которые предотвращают проникновение к клеткам мелких бактерий и простейших (рис. 5а). Клетки этого организма создают структурированные микроколонию в виде упакованных сфер, в центральной части ячейки которых находились метанотрофы, промежутки между слизистыми сферами занимают палочковидные бактерии (рис. 5б). Такое сообщество является устойчивым и поддерживается при многочисленных пересевах. Исследование структурированных сообществ микроорганизмов интересно не только с точки зрения процессов,

осуществляемых ими, но и с точки зрения изучения физической организации микробных сообществ *in situ* – области исследований, которая называется парагистологией микробных сообществ.

Таким образом, показано, что в болотных почвах тундры при крайне низкой минерализации среды, в так называемых ультрапресных условиях, имеются разные представители метанооксилирующих бактерий, которые составляют метановый фильтр. Морфофизиологическое разнообразие этих организмов обеспечивает приспособленность метанового фильтра к работе при разных физико-химических условиях – рН и температурах. Изучение этой группы бактерий может иметь принципиальное значение для понимания факторов, контролирующих потоки метана в атмосферу с обширных территорий приполярных областей России.

Работа выполнена в соответствии с Государственной научно-технической программой России “Глобальные изменения природной среды и климата”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Atmospheric methane: sources, sinks and role in global change / Ed. Khalil M.A.K. New York, 1993.
2. Вомперский С.Э. Биосферное значение болот в углеродном цикле // Природа. 1994. № 7. С. 44–50.
3. Заварзин Г.А., Васильева Л.В. Цикл метана на территории России // Круговорот углерода на территории России. М., 1999. С. 202–233.
4. Слободкин А.И., Паников Н.С., Заварзин Г.А. Образование и потребление метана микроорганизмами в болотах тундры и средней тайги // Микробиология. 1992. Т. 61. С. 683–691.
5. Паников Н.С., Титлянова А.А., Палеева М.В., Семенов А.М., Миронычева-Токарева Н.П., Макаров В.И., Дубинин Е.В., Ефремов С.П. Эмиссия метана из болот юга Западной Сибири // Докл. АН СССР. 1993. Т. 330. С. 388–390.
6. Заварзин Г.А. Микробный цикл метана в холодных условиях // Природа. 1995. № 6. С. 3–14.
7. Паников Н.С. Таежные болота – глобальный источник метана // Природа. 1995. № 6. С. 14–25.
8. Васильева Л.В., Берестовская Ю.Ю., Заварзин Г.А. Психрофильные ацидофильные метанотрофы из сфагнеты зоны вечной мерзлоты // Докл. РАН. 1999. Т. 368. № 1. С. 125–128.
9. Vecherskaya M.S., Galchenko V.N., Sokolova E.V., Samarkin V.A. Activity and species composition of aerobic methanotrophic communities in tundra soils // Curr. Microbiol. 1993. V. 27. P. 181–184.
10. Омельченко М.В., Васильева Л.В., Заварзин Г.А., Савельева Н.Д., Лысенко А.М., Митюшина Л.Л., Хмеленина В.Н., Троценко Ю.А. Новый психрофильный метанотроф рода *Methylobacter* // Микробиология. 1996. Т. 65. № 3. С. 384–389.
11. Bowman J.P., McCammon S.A., Skerratt J.H. *Methylosphaera hansonii* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic, group 1 methanotroph from Antarctic marine-salinity, meromictic lakes // Microbiology. 1997. V. 143. P. 1451–1459.
12. Holzapfel-Pschorn A., Conrad R., Seiler W. Production, oxidation and emission of methane in rice paddies // FEMS Microbiol. Ecol. 1985. V. 31. P. 343–351.
13. Whalen S.C., Reeburgh W.S. Consumption of atmospheric methane by tundra soils // Nature. 1990. V. 346. № 12. P. 160–162.
14. Dedysh S.N., Liesack W., Khmelenina V.N., Suzina N.E., Trotsenko Y.A., Semrau J.D., Bares A.M., Panikov N.S., Tiedje J.M. *Methylocella palustris* gen. nov. sp. nov., a new methane-oxidizing acidophilic bacterium from peat bogs, representing a novel subtype of serine-pathway methanotrophs // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 955–969.

Methanotrophs of the Psychrophilic Microbial Community of Russian Arctic Tundra

Yu. Yu. Berestovskaya*, L. V. Vasil'eva*, O. V. Chestnykh**, and G. A. Zavarzin*

*Institute of Microbiology, Russian Academy of Sciences, pr. 60-letiya Oktyabrya 7 k. 2, Moscow, 117312 Russia

**Center of Forest Ecology and Productivity, Russian Academy of Sciences, Moscow

Abstract—In tundra, at a low temperature, there exists a slowly developing methanotrophic community. Methane-oxidizing bacteria are associated with plants growing at high humidity, such as sedge and sphagnum; no methanotrophs were found in polytrichous and aulacomnious mosses and lichens, typical of more arid areas. The methanotrophic bacterial community inhabits definite soil horizons, from moss dust to peat formed from it. Potential ability of the methanotrophic community to oxidize methane at 5°C enhances with the depth of the soil profile in spite of the decreasing soil temperature. The methanotrophic community was found to gradually adapt to various temperatures due to the presence of different methane-oxidizing bacteria in its composition. Depending on the temperature and pH, different methanotrophs occupy different niches. Within a temperature range from 5 to 15°C, three morphologically distinct groups of methanotrophs could be distinguished. At pH 5–7 and 5–15°C, forms morphologically similar to *Methylobacter psychrophilus* predominated, whereas at the acidic pH 4–6 and 10–15°C, bipolar cells typical of *Methylocella palustris* were mostly found. The third group of methanotrophic bacteria growing at pH 5–7 and 5–10°C was represented by a novel methanotroph whose large coccoid cells had a thick mucous capsule.

Key words : psychrophily, methane oxidation, bacterial filter, greenhouse gases, microbial communities.