

В.Ф. ГАЛЬЧЕНКО, А.Ю. ЛЕИН, Э.М. ГАЛИМОВ,  
академик М.В. ИВАНОВ

### МЕТАНОТРОФНЫЕ БАКТЕРИИ-СИМБИОНТЫ КАК ПЕРВИЧНОЕ ЗВЕНО ПИЩЕВОЙ ЦЕПИ В ОКЕАНЕ

В конце 70-х годов у выходов высокотемпературных гидротерм в рифтовых зонах океана были обнаружены так называемые "оазисы жизни" с необычно высокой для глубоководных районов концентрацией бентосных животных [1, 2]. Поскольку низкое содержание органического вещества в глубоководных осадках не могло обеспечить пищевые потребности животных в оазисах, были высказаны предположения, что основным компонентом их пищи являются хемоавтотрофные бактерии, развивающиеся за счет окисления восстановленных газов ( $H_2S$ ,  $CH_4$ ,  $H_2$ ,  $CO$ ,  $NH_4$ ), поступающих из гидротерм. Действительно, в зонах смещения гидротермальных флюидов и океанической воды обнаружены значительные количества бактерий и высокие скорости хемосинтеза [3, 4]. В дальнейшем было показано, что сероводородокисляющие бактерии обнаруживаются не только в воде, но и в специализированных тканях (трофосомах) глубоководных вестиментифер, а также в жабрах некоторых двустворчатых моллюсков [5]. Выявление ключевых ферментов ассимиляции  $CO_2$  (цикл Кальвина) и окисления серных соединений, эксперименты с радиоактивной углекислотой и изучение изотопного состава углерода тканей этих животных однозначно доказали, что продукты хемосинтеза сероводородокисляющих бактерий-симбионтов включаются в метаболизм глубоководных животных [7-11].

Поскольку в составе гидротермальных флюидов были найдены заметные количества метана, высказаны предположения, что метанотрофные бактерии также могут использоваться в питании беспозвоночных животных [9-11]. На это указывали результаты изучения изотопного состава углерода тканей некоторых животных [12], поскольку низкие величины  $\delta^{13}C$  (до  $-33,6\text{‰}$ ) логичнее всего было объяснять включением в ткани животных изотопнолегкого углерода метана. Однако прямых доказательств участия метанотрофных бактерий в питании беспозвоночных не было, хотя в одной из работ [13] показано, что в жабрах неидентифицированного моллюска из семейства *Mytilidae* обнаружены бактериальные клетки, морфологически сходные с метанотрофами, а гомогенаты жабр и целые животные интенсивно окисляют метан до  $CO_2$  в аэробных условиях.

Задача нашей работы — изучение возможности симбиоза метанотрофных бактерий с некоторыми беспозвоночными и оценка вклада хемосинтезирующих и метанотрофных бактерий в питание этих животных.

Материал для исследования собран с помощью подводных обитаемых аппаратов "Пайсис" на гидротермальных полях Тихого океана в районе подводного хребта Хуан-де-Фука и во впадине Гуаймас в Калифорнийском заливе, а также в районе подводного выхода метана над газогидратной залежью в Охотском море в 11<sup>а</sup>- и 12-м рейсах нис "Академик Мстислав Келдыш" в июне-ноябре 1986 г. Были изучены двустворчатые моллюски родов *Conchocele* (сем. *Thyasiridae*), *Calypptogena* (сем. *Vesicomidae*) и неидентифицированный моллюск семейства *Ledidae*, а также вестиментиферы *Ridgeia phaeophiale* и *Riftia pachyptila*.

Таблица 1

Интенсивность ассимиляции  $\text{CO}_2$ , окисления метана и включения углерода метана (мкг С на 1 г белка в час) в ткани беспозвоночных животных и изотопный состав углерода тканей ( $\delta^{13}\text{C}$ , ‰)

| Организм и место отбора                                       | Анализируемый материал | Окисление $\text{CH}_4$ | Включение углерода метана в ткани | Ассимиляция $\text{CO}_2$ | Величина $\delta^{13}\text{C}$ |
|---|------------------------|-------------------------|-----------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| 1. Вестиментиферы   |                        |                         |                                   |                           |                                |
| Ridgeia pleurhiale, хребет Хуан-де-Фука, ст. 1506, гл. 1560 м | Трофосома              | 0,2                     | 0,1                               | 19,4                      | -14,37                         |
|   | Трубка                 | 1,6                     | 0,1                               | 3,2                       | -14,72                         |
|   | Щупальцы               | 1,0                     | 0,1                               | 3,2                       | -                              |
|   | Вестиментум            | 1,5                     | 0,1                               | 1,6                       | -                              |
|   | Весь организм          | -                       | -                                 | -                         | -14,64                         |
| Riftia pachyptila, впадина Гуаймас, ст. 1522, гл. 2000 м      | Трофосома              | 0,1                     | 0,1                               | 21,4                      | -15,89                         |
|   | Трубка                 | 0,1                     | 0,1                               | 3,1                       | -16,17                         |
|   | Щупальцы               | 0,2                     | 0,1                               | 4,6                       | -                              |
|   | Вестиментум            | 0,2                     | 0,1                               | 2,9                       | -15,10                         |
| 2. Двустворчатые моллюски                                     |                        |                         |                                   |                           |                                |
| Calyptogena sp., впадина Гуаймас, ст. 1524, гл. 2000 м        | Жабры                  | 9,0                     | 3,2                               | 6,9                       | -                              |
|   | Мантия                 | 1,4                     | 0,8                               | 1,6                       | -                              |
|   | Нога                   | 0,7                     | 0,2                               | 1,1                       | -35,69*                        |
|   | Желудок                | 0,6                     | 0,3                               | 1,4                       | -36,14; -36,22                 |
|   | Сорг раковины          | -                       | -                                 | -                         | -31,66                         |
| С <sub>мид</sub> раковины                                     | -                      | -                       | -                                 | -1,01                     |                                |
| Calyptogena sp., хребет Хуан-де-Фука, ст. 1506, гл. 2000 м    | Жабры                  | 24,3                    | 10,9                              | 16,1                      | -                              |
|   | Мантия                 | 4,1                     | 0,1                               | 1,1                       | -                              |
|   | Нога                   | 1,8                     | 0,4                               | 1,1                       | -                              |
|   | Желудок                | 2,2                     | 0,9                               | 0,8                       | -                              |
| Conchocole sp., Охотское море, ст. 1407, гл. 800 м            | Жабры                  | 61,4                    | 25,8                              | 8,0                       | -                              |
|   | Мантия                 | 18,0                    | 3,4                               | 1,6                       | -                              |
|   | Весь организм          | 20,0                    | 6,2                               | 2,0                       | -                              |
| Conchocole sp., впадина Гуаймас, ст. 1619, гл. 2000 м         | Жабры                  | 24,3                    | 10,5                              | 4,8                       | -                              |
|   | Мантия                 | 4,1                     | 0,6                               | 1,1                       | -                              |
|   | Желудок                | 7,5                     | 0,7                               | 1,8                       | -                              |
| Ledida sp., впадина Гуаймас, ст. 1597, гл. 2000 м             | Жабры                  | 10,4                    | 0,8                               | 0,8                       | -                              |
|   | Мантия                 | 10,7                    | 1,6                               | 1,0                       | -                              |
|   | Нога                   | 6,5                     | 2,2                               | 0,6                       | -                              |
|   | Желудок                | 5,1                     | 0,8                               | 0,5                       | -                              |

\* Величина  $\delta^{13}\text{C}$  метана гидротерм впадины Гуаймас - 44,85 ‰.

Образцы тканей животных немедленно после поступления на борт судна фиксировали для электронно-микроскопических исследований 3%-ным раствором глутаральдегида в какодилатном буфере в присутствии рутениевого красного с последующей постфиксацией  $\text{OsO}_4$ . Интенсивность  $\text{CH}_4$ -окисления и  $\text{CO}_2$ -ассимиляции определяли радиоизотопным методом с  $^{14}\text{CH}_4$  и  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$  в гомогенатах тканей, которые готовили при 0 °С в стерильной морской воде с фосфатным буфером (рН 7,7), растирая с кварцевым песком. Углекислоту, образовавшуюся

при метанокислении, отгоняли в сцинтилляционную смесь с 2-фенилэтиламином и обсчитывали на жидкостном сцинтилляционном счетчике "Rackbeta". Клеточный материал с ассимилированным углеродом  $\text{CH}_4$  или  $\text{CO}_2$  осаждали на мембранных фильтрах, отмывали стерильной морской водой, подкисленной фосфорной кислотой, и также обсчитывали на счетчике. Белок в гомогенатах определяли модифицированным методом Лоури. Пробы тканей для определения изотопного состава углерода (величина  $\delta^{13}\text{C}$ , ‰) высушивали при 60 °С. Сжигание тканей до  $\text{CO}_2$  и измерение изотопного состава углерода проводили на масс-спектрометре "Varian MAT 230" с точностью  $\pm 0,1$ ‰.

Результаты экспериментов (табл. 1) показали, что у вестиментифер основным механизмом фиксации углерода является автотрофная ассимиляция  $\text{CO}_2$  в специализированных органах — трофосомах, как это и было установлено ранее [7–8]. Совершенно другая картина наблюдается у моллюсков, в жабрах и мантии которых выявлено интенсивное окисление метана, практически полностью отсутствующее у вестиментифер. Основная часть меченого углерода окисленного метана во всех экспериментах с тканями моллюсков обнаружена в углекислоте, однако нельзя не обратить внимание на то, что у представителей родов *Conchocele* и *Calyptogena* от 30 до 40% углерода окисленного метана входит в состав тканей, а у представителей *Conchocele* доля фиксированного "метанового" углерода в 2–3 раза превышает количество углерода, фиксированного в экспериментах с меченой  $\text{CO}_2$ .

При электронной микроскопии ультратонких срезов жабр моллюсков обнаружены многочисленные бактериальные клетки (рис. 1 см. вкл. между стр. 720–721), а на питательной среде для метанотрофов в метано-воздушной атмосфере выделены накопительные культуры этих микроорганизмов. Таким образом, проведенные эксперименты не только подтвердили наличие процесса метанокисления в жабрах моллюсков, установленное ранее газохроматографическим методом [13], но и показали, что значительная часть углерода окисленного бактериями метана фиксируется в жабрах моллюсков родов *Conchocele* и *Calyptogena* из разных районов океана.

Определение величины  $\delta^{13}\text{C}$  различных тканей вестиментифер гидротермальных полей хребта Хуан-де-Фука и впадины Гуаймас (табл. 1) показало, что для органического углерода всех органов и тканей этих животных величина  $\delta^{13}\text{C}$  колеблется в довольно узком интервале от  $-14,4$  до  $-16,2$ ‰. Из экспериментов с  $^{14}\text{CO}_2$  следует, что в тканях этих организмов происходит процесс хемоавтотрофной фиксации  $\text{CO}_2$  (табл. 1), поэтому можно полагать, что необычный изотопный состав углерода вестиментифер обусловлен процессом фракционирования углерода при хемосинтезе.

Изотопный состав углерода моллюсков *Calyptogena* sp. с гидротермального поля впадины Гуаймас характеризуется гораздо более высоким содержанием изотопа  $^{12}\text{C}$ : величины  $\delta^{13}\text{C}$  углерода разных тканей варьируют от  $-31,7$  до  $-36,2$ ‰ (табл. 1).

Сам по себе этот факт не является абсолютно новым, поскольку еще в предыдущих работах [12] по изотопному составу углерода тканей животных с гидротермальных полей было показано, что ткани моллюсков заметно обогащены изотопом  $^{12}\text{C}$  по сравнению с вестиментиферами. Однако вразумительного объяснения разницы в величинах  $\delta^{13}\text{C}$  для этих двух групп животных, обитающих в сходных экологических условиях, в литературе не было дано [14].

По нашему мнению, обнаружение симбиотического микробного окисления метана в жабрах моллюсков и включения радиоактивной метки из метана в ткани этих животных позволяет рассматривать данные по изотопному составу углерода тканей моллюсков как дополнительное свидетельство использования в метаболизме животных либо окисленных производных метана, либо биомассы метанотроф-

ных бактерий-симбионтов. Величина  $\delta^{13}\text{C}$  метана гидротерм впадины Гуаймас равна  $-44,85\%$ , поэтому некоторое утяжеление изотопного состава углерода тканей моллюсков может быть объяснено либо вовлечением в их метаболизм изотопно-тяжелой углекислоты, либо использованием моллюсками биомассы как метанотрофов, так и хемоавтотрофных бактерий. Довольно заметное включение в жабры углерода  $^{14}\text{CO}_2$  (табл. 1) делает второе объяснение более вероятным.

Обнаруженное нами явление симбиоза метанотрофных бактерий с двустворчатыми моллюсками может играть существенную роль в пищевых цепях в океане. Об этом говорят появившиеся в самое последнее время сообщения о легком и экстремально легком изотопном составе углерода биомассы различных бентосных животных океана, обитающих как у выходов подводных гидротерм, так и в обычных восстановленных осадках шельфа и континентального склона. Обнаружено, что величины  $\delta^{13}\text{C}$  тканей погонофор Бискайского залива и фиордов Норвегии [15] колеблются в пределах от  $-40,0$  до  $-46,0\%$  [9]. Еще более интересные данные ( $\delta^{13}\text{C}$  от  $-31$  до  $-74\%$ ) были получены при изучении тканей двустворчатых моллюсков Мексиканского залива в районе рассеянных подводных выходов ("сипов") углеводородных газов [15].

Если учесть, что ежегодная продукция метана в восстановленных осадках океана составляет величину порядка 500 млн. т., а из зоны фотосинтеза на всю площадь океанического дна поступает 2000–2500 млн. т. органического углерода, то следует признать, что использование метана метанотрофными бактериями, в том числе и симбионтами, может иметь существенное значение в пищевых цепях в океане.

Можно утверждать, что использование энергетического потенциала и углерода метана в пищевых цепях в океане, осуществляемое беспозвоночными животными при помощи уникального ферментного аппарата метанотрофов, представляет собой, наряду с использованием продукции органического вещества из углекислоты при фито- и хемосинтезе, третью пищевую стратегию животного мира.

Институт микробиологии  
Академии наук СССР, Москва

Поступило  
16 IX 1987

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Lonsdale P.F. — Deep-Sea Res., 1977, vol. 24, p. 857.
2. Corlis J.B., Dymond J. et al. — Science, 1979, vol. 203, p. 1037.
3. Jannasch H.W., Wirsen C.O. — BioScience, 1979, vol. 29, p. 492.
4. Karl D.M., Wirsen C.O., Jannasch H.W. — Science, 1980, vol. 207, p. 1345.
5. Cavanaugh C.M. — Nature, 1983, vol. 302, p. 58.
6. Rau G.H. — Science, 1981, vol. 213, p. 338.
7. Felbeck H. — Science, 1981, vol. 213, p. 336.
8. Belkin S., Nelson D.C., Jannasch H.W. — Biol. Bull. mar. biol. Lab., Woods Hole, 1986, vol. 170, p. 110.
9. Southward A.J., Southward E.C. et al. — Nature, 1981, vol. 293, p. 616.
10. Fisher C.R., Childress J.J. — Amer. Zool., 1984, vol. 24, p. 57a.
11. Childress J.J., Arp A.J., Fisher C.R. — Mar. Biol., 1984, vol. 83, p. 109.
12. Williams P.M., Smith K.L. et al. — Nature, 1981, vol. 292, p. 448.
13. Childress J.J., Fisher C.R. et al. — Science, 1986, vol. 233, p. 1306.
14. Rau G.H. — Biol. Soc. Wash. Bull., 1985, № 6, p. 143.
15. Spiro B., Greenwood P.B. et al. — Mar. Ecol., 1986, vol. 28, p. 233.

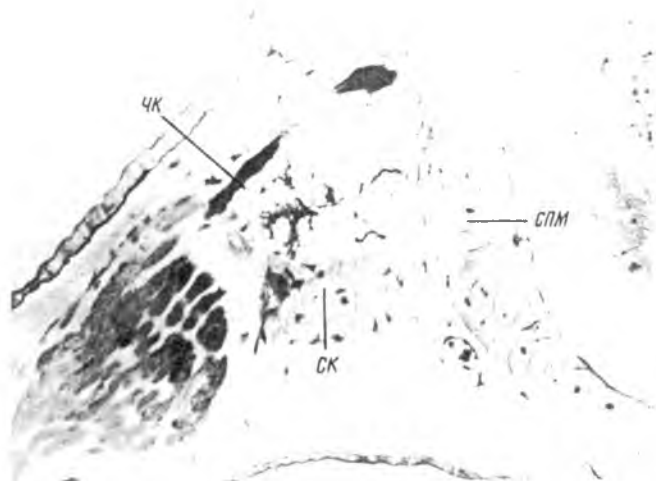


Рис. 1. Поперечный срез головы аксолотля длиной 23 мм, стадия 49 на уровне слуховой косточки. Оперированная сторона – слуховая косточка прикрепляется к стенке полости мозга, стapedиальная подошва отсутствует. СК – слуховая косточка, ЧК – чешуйчатая кость, СПМ – стенка полости мозга

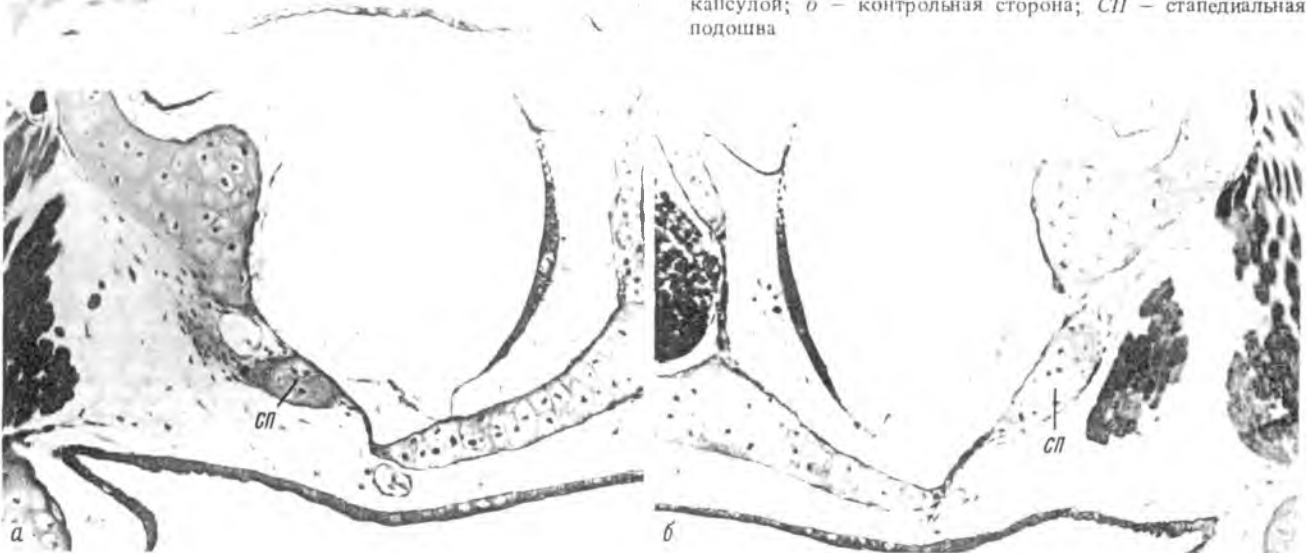


Рис. 2. Поперечный срез головы аксолотля длиной 30 мм, стадия 56 на уровне подошвы слуховой косточки. а – оперированная сторона с частично регенерировавшей слуховой капсулой; б – контрольная сторона; СП – стапедиальная подошва

et al. –  
9, p. 492.  
h С.М. –  
eck H. –  
– Biol.  
C. et al. –  
А, p. 57a.  
ams P.M.,  
– Science,  
. Spiro V.

студии  
IX 1987

терода  
гильми  
собой,  
ты при

целках  
да, то  
в том  
цепях

длках  
) што-  
да, то  
в том  
цепях

длках  
) што-  
да, то  
в том  
цепях

длках  
) што-  
да, то  
в том  
цепях

длках  
) што-  
да, то  
в том  
цепях

длках  
) што-  
да, то  
в том  
цепях

длках  
) што-  
да, то  
в том  
цепях

длках  
) што-  
да, то  
в том  
цепях

длках  
) што-  
да, то  
в том  
цепях



Рис. 1. Срез тканей жабр *Conchocele* sp. *a*-*в* - моллюск со станции № 1407, Охотское море; *г*-*е* - моллюск со станции № 1619, Гуаймас, Калифорнийский залив (БС - скопления бактериальных клеток в полостях ткани, БК - бактерии в клетках ткани, К - бактериальная капсула)