

## ИЗОТОПНОЕ ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ В СИСТЕМАХ $\text{CH}_4\text{—H}_2\text{O}$ И $\text{CH}_4\text{—CO}_2$ В МИКРОБИАЛЬНОМ МЕТАНОГЕНЕЗЕ В ЗЕМНОЙ КОРЕ

Л.К. Гуцало

*Институт физической химии Национальной академии наук Украины, 79053, Львов, ул. Научная, 3а, Украина*

Изучено распределение изотопов водорода (D/H) и углерода ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) в микробных системах  $\text{CH}_4\text{—H}_2\text{O}$  и  $\text{CH}_4\text{—CO}_2$  различных районов мира. По характеру распределения изотопов водорода или углерода в системах  $\text{CH}_4\text{—H}_2\text{O}$  и  $\text{CH}_4\text{—CO}_2$  можно отличить в земной коре микробный метан, образующийся путем  $\text{CO}_2$ -редукции, от метана, образующегося путем ферментации ацетата. В случае образования микробного метана путем  $\text{CO}_2$ -редукции биологическое распределение изотопов водорода и углерода в указанных системах отвечает изотопному термодинамическому обменному равновесию при данной температуре среды метаногенеза. Если микробный метан образуется в результате ферментации ацетата, то распределение изотопов водорода и углерода в системах  $\text{CH}_4\text{—H}_2\text{O}$  и  $\text{CH}_4\text{—CO}_2$  носит преимущественно неравновесный характер. При этом между изотопными составами  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{CO}_2$  выявлена линейная связь вида:  $\delta\text{D—CH}_4 = \alpha_{\text{D}}^b \delta\text{D—H}_2\text{O} + b$  и  $\delta^{13}\text{C—CH}_4 = \alpha_{\text{C}}^b \delta^{13}\text{C—CO}_2 + d$ , где  $\alpha_{\text{D}}^b$  и  $\alpha_{\text{C}}^b$  есть общие факторы неравновесного биологического фракционирования соответственно изотопов водорода и углерода в системах  $\text{CH}_4\text{—H}_2\text{O}$  и  $\text{CH}_4\text{—CO}_2$ . Они определяются из выражений  $10^3 \ln \alpha_{\text{D}}^b = -477.357(10^6/T^2) + 3458.55$  и  $10^3 \ln \alpha_{\text{C}}^b = -277.954(10^6/T^2) + 1998.677$ , где  $T$  (K) есть температура среды ацетатного метаногенеза. Значения  $\alpha_{\text{D}}^b$  и  $\alpha_{\text{C}}^b$  не зависят, а значения  $b$  и  $d$  зависят от вида бактерий, а также от температуры среды метаногенеза. Предложена (на термодинамической основе) модель формирования изотопного состава микробного метана в природной обстановке. Вариации изотопного состава водорода и углерода микробного метана на различных геологических объектах обуславливаются в основном изменениями температуры среды метаногенеза и процессами смешивания в разных пропорциях метана, образованного путем ферментации ацетата, с метаном редукции  $\text{CO}_2$ . Доли метана ферментации в общем балансе микробного метана на различных природных объектах колеблются в широких пределах: от 52 до 100 % в морских осадках лагунного бассейна (Cape Lookout Bight, Северная Каролина, США), от 65 до 100 % в поверхностных пресных водах оз. Вюрмзи (Северная Германия) и составляют 35 % в водах оз. Киву (Восточно-Центральная Африка).

*Изотопы, геохимия, микробный метаногенез.*

## ISOTOPE FRACTIONATION IN THE SYSTEMS $\text{CH}_4\text{—H}_2\text{O}$ AND $\text{CH}_4\text{—CO}_2$ DURING MICROBIAL METHANE GENESIS IN THE EARTH'S CRUST

L.K. Gutsalo

Distribution of hydrogen and carbon isotopes (D/H and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) in the microbial systems  $\text{CH}_4\text{—H}_2\text{O}$  and  $\text{CH}_4\text{—CO}_2$  was studied in different world's regions. According to the type of distribution of the isotopes in the above systems, two types of microbial methane are recognized in the Earth's crust: (1) resulting from  $\text{CO}_2$  reduction and (2) produced through acetate fermentation. In the case of methane 1, the biologic distribution of hydrogen and carbon isotopes in the above systems corresponds to a thermodynamic isotope exchange equilibrium at a given temperature of the methane genesis medium. In the case of methane 2, the same systems show mainly a nonequilibrium distribution of these isotopes. We have revealed a linear relationship between the isotopic compositions of  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , and  $\text{CO}_2$ :  $\delta\text{D—CH}_4 = \alpha_{\text{D}}^b \delta\text{D—H}_2\text{O} + b$  and  $\delta^{13}\text{C—CH}_4 = \alpha_{\text{C}}^b \delta^{13}\text{C—CO}_2 + d$ , where  $\alpha_{\text{D}}^b$  and  $\alpha_{\text{C}}^b$  are the general factors of biologic nonequilibrium fractionation of hydrogen and carbon isotopes, respectively, in the systems  $\text{CH}_4\text{—H}_2\text{O}$  and  $\text{CH}_4\text{—CO}_2$ . These factors are determined from the equations  $10^3 \ln \alpha_{\text{D}}^b = -477.357(10^6/T^2) + 3458.55$  and  $10^3 \ln \alpha_{\text{C}}^b = -277.954(10^6/T^2) + 1998.677$ , where  $T$  (K) is the temperature of the methane 2 genesis medium. The values of  $\alpha_{\text{D}}^b$  and  $\alpha_{\text{C}}^b$  do not depend (in contrast to the values of  $b$  and  $d$ ) on the kind of bacteria and the temperature of the methane genesis medium. Based on thermodynamic data, we proposed a model for the formation of the isotopic composition of microbial methane in nature. Variations in the hydrogen and carbon isotope compositions of microbial methane in different geologic objects are due mainly to the variations in the temperature of the methane genesis medium and the mixing (in different proportions) of methane 1 with methane 2. The portions of acetate fermentation methane in the total balance of microbial methane in different geologic objects vary over a wide range of values: 52 to 100% in marine deposits of Cape Lookout Bight, North Carolina, US; 65 to 100% in surface fresh waters of Lake Wuermsee, Germany; and 35% in Lake Kivu, East Central Africa.

*Isotopes, geochemistry, microbial methane genesis*

## ВВЕДЕНИЕ

Микробиальный метан в природе образуется в водонасыщенных осадках двумя основными путями — посредством ферментации ацетата и  $\text{CO}_2$ -редукции [Takai, 1970; Koyama et al., 1973; Winfrey, Zeikus, 1977; Schoell, 1980] соответственно следующим общим уравнениям:



Полагают [Koyama, 1963; Jeris, McCarty, 1965; Smith, Mah, 1966; Microbial..., 1976], что в природе около 70 % метана образуется в результате диссимиляции ацетата и 30 % — за счет редукции  $\text{CO}_2$ . При этом оба процесса образования микробиального метана могут происходить одновременно, что нередко приводит к образованию смесей [Martens et al., 1986; Burke et al., 1988]. Отличить на геологических объектах метан ацетатной ферментации от метана  $\text{CO}_2$ -редукции очень трудно, поскольку влияние разных факторов на пути его микробиального образования изучено недостаточно.

Использование стабильных изотопов водорода (D/H) и углерода ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) для выявления различий между указанными путями образования микробиального метана на геологических объектах базируется на ряде эмпирических фактов и ограничивается некоторыми, недостаточно обоснованными, на наш взгляд, допущениями. Так, между изотопным составом водорода метана и ассоциирующей с ним водой выявлена [Nakai et al., 1974; Ерохин, 1978] эмпирическая линейная связь:

$$\delta\text{D}-\text{CH}_4 = a\delta\text{D}-\text{H}_2\text{O} + b, \quad (3)$$

где величина наклона  $a$ , по мнению Шея [Schoell et al., 1980, 1984], дает информацию о том, сколько водорода в молекуле метана прибыло из воды, а сколько — из органического вещества, а значение свободного члена  $b$  отражает изотопное фракционирование водорода в системе  $\text{CH}_4-\text{H}_2\text{O}$ . В случае образования микробиального метана путем  $\text{CO}_2$ -редукции величина  $a$  равна единице [Schoell, 1980, 1984; Woltemate et al., 1984; Whiticar et al., 1986; Whiticar, 1999], так как единственным источником водорода образующегося метана является вода [Daniels et al., 1980], а  $b$  равно  $-160 \pm 10$  ‰ или, по уточненным данным [Whiticar et al., 1986],  $-180 \pm 10$  ‰. Если метан продуцируется путем гидрогенизации  $\text{CH}_3$ -радикалов, то значение  $a$  равно 0.25, так как только один атом водорода поступает из воды. При образовании метана одновременно двумя указанными путями значение  $a$  может изменяться от 1 до 0.25 [Schoell, 1980, 1984; Woltemate et al., 1984; Whiticar et al., 1986; Whiticar, 1999]. Отметим, что величина наклона  $a$ , полученная в эксперименте по образованию микробиального метана путем чисто ацетатной ферментации, равная 0.15 [Schoell et al., 1988], существенно отличается от теоретического ожидания 0.25, что не находит пока удовлетворительного объяснения. При образовании микробиального метана путем ферментации ацетата значение постоянной  $b$  в уравнении (3) зависит от ряда факторов [Whiticar, 1986] и составляет, по данным эксперимента,  $-318$  ‰ [Schoell et al., 1988], а по результатам расчетов равна  $-393$  ‰ [Jenden, Kaplan, 1986].

Использование стабильных изотопов углерода ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) для определения путей образования микробиального метана в природе базируется на статистически выявленных различиях в значениях факторов фракционирования изотопов углерода в системе  $\text{CO}_2-\text{CH}_4$ . Для  $\text{CO}_2$ -редукции значения  $\alpha$   $\text{CO}_2-\text{CH}_4$  находятся обычно между 1.05 и 1.10. В то же время для ацетатной ферментации значения  $\alpha$   $\text{CO}_2-\text{CH}_4$  изменяются от 1.04 до 1.06 [Whiticar, Faber, 1985; Whiticar et al., 1986; Whiticar, 1999]. При этом упомянутые исследователи особо подчеркивают [Whiticar et al., 1986], что рассчитанные ими факторы фракционирования для изотопов углерода в системе  $\text{CO}_2-\text{CH}_4$  не являются равновесными, а указывают только величину изотопного разделения по углероду в этой системе. По их мнению [Whiticar et al., 1986], фракционирование изотопов углерода в течение микробиального метаногенеза в общем описывается кинетическим изотопным эффектом, а не изотопным обменным равновесием.

В последние десятилетия появилось множество работ, посвященных различным аспектам микробиального метаногенеза. Однако все еще остаются недостаточно изученными и обоснованными критерии определения основных путей образования микробиального метана в природной обстановке в земной коре. В большинстве своем эти критерии базируются на эмпирических связях или статистической основе [Sugimoto, Wada, 1995; Waldron et al., 1999; Hornibrook, 2000; Chidthaisong et al., 2002; Fey et al., 2004; Valentine et al., 2004], что может приводить к неоднозначным выводам.

Так, на основании экспериментов в пресноводной среде А. Сугимото и В. Вада [Sugimoto, Wada, 1995] установили следующие различия в изотопном составе микробиального метана, полученного в процессе  $\text{CO}_2$ -редукции и ацетатной ферментации соответственно:

$$\delta\text{D} - (\text{CH}_4-\text{CO}_2) = (0.683 \pm 0.020)\delta\text{D}_{\text{вода}} - (317 \pm 20)$$

и

$$\delta D - (\text{CH}_4\text{-Ac}) = (0.437 \pm 0.045) \delta D_{\text{вода}} - (302 \pm 15).$$

По их мнению, установленный наклон (0.437) связи  $\delta D_{\text{вода}} - (\delta D - \text{CH}_4)$  для ацетатной ферментации указывает, что некоторая часть атомов водорода в метил-группах ацетата обменивается с водой в процессе метаногенеза.

В то же время для той же пресноводной среды другие исследователи [Waldron et al., 1999] на основе статистической обработки выделяют (независимо от путей образования микробиального метана) две связи  $\delta D - \text{CH}_4$  с  $\delta D - \text{H}_2\text{O}$  для природной обстановки и лабораторных экспериментов соответственно:

$$\delta D - \text{CH}_4 = 0.675 \delta D - \text{H}_2\text{O} - 284 \text{‰} (p < 0.0001)$$

и

$$\delta D - \text{CH}_4 = 0.444 \delta D - \text{H}_2\text{O} - 321 \text{‰} (p < 0.0001).$$

Как полагают авторы [Waldron et al., 1999], пути метаногенеза могут также влиять на изотопный состав микробиального метана, но основы для этой гипотезы должны быть пересмотрены, поскольку существующие полевые и лабораторные данные не подтверждают ее.

Все вышеизложенное свидетельствует о неопределенности и неинформативности существующих методов (критериев) для оценки путей образования микробиального метана в природной среде.

Цели данного исследования: показать несостоятельность современных представлений о сущности изотопных связей в системах  $\text{CH}_4 - \text{H}_2\text{O}$  и  $\text{CH}_4 - \text{CO}_2$  в природном микробиальном метаногенезе; на основе новых представлений разработать термодинамические изотопные критерии для оценки путей образования микробиального метана в земной коре; оценить в общем балансе микробиального метана на геологических объектах относительный вклад каждого из двух основных путей его образования; обосновать на термодинамической основе модель формирования изотопного состава микробиального метана в природной обстановке.

#### ИСХОДНЫЕ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ПРЕДПОСЫЛКИ

**Метан  $\text{CO}_2$ -редукции.** Основные факторы, обуславливающие формирование изотопного состава микробиального метана путем  $\text{CO}_2$ -редукции, рассмотрены ранее [Гуцало, 2003а,б]. Поэтому мы приведем ниже лишь некоторые выводы из этих работ, необходимые для построения модели формирования изотопного состава микробиального метана в природной обстановке.

Исследования [Гуцало, 2000б] показали, что в случае образования микробиального метана в природе путем  $\text{CO}_2$ -редукции значения фактора биологического фракционирования изотопов водорода ( $\alpha_D^e$ ) в системе  $\text{CH}_4 - \text{H}_2\text{O}$  при данной температуре среды отвечают известному изотопному термодинамическому равновесию [Lyon, Hulston, 1984]. В интервале от 0 до 100 °C оно аппроксимируется уравнением [Гуцало, 2003б]:

$$10^3 \ln \alpha_D^e \text{CH}_4 - \text{H}_2\text{O} = - 10.37(10^6/T^2) - 76.22, \quad (4)$$

где  $T$  (К).

Фактор равновесного термодинамического фракционирования изотопов водорода  $\alpha_D^e$  в системе  $\text{CH}_4 - \text{H}_2\text{O}$  в уравнении (4) для любой температуры можно представить:

$$\alpha_D^e = (\delta D - \text{CH}_4 + 10^3) / (\delta D - \text{H}_2\text{O} + 10^3). \quad (5)$$

На основании уравнения (5) путем преобразования получено выражение [Гуцало, 2003б] для расчета изотопного состава микробиального метана, образующегося путем  $\text{CO}_2$ -редукции:

$$\delta D - \text{CH}_4 = \alpha_D^e \delta D - \text{H}_2\text{O} + b^e, \quad (6)$$

где  $\alpha_D^e = a$  в ранее выявленной эмпирической связи (3),

$$b^e = 10^3(\alpha_D^e - 1). \quad (7)$$

Из вышеизложенного следует, что представления ряда авторов [Schoell, 1980, 1984; Woltemate et al., 1984; Whiticar et al., 1986; Jenden, Kaplan, 1986; Sugimoto, Wada, 1995; Whiticar, 1999] о том, что величина коэффициента  $a$  в уравнении (3) показывает, как много водорода в молекуле метана прибыло из воды или органического материала, несостоятельны [Гуцало, 2003б]. Параметр  $a$  в уравнении (3) — это фактор биологического фракционирования изотопов  $\alpha_i$ . Он отражает характер распределения изотопов водорода в микробиальной системе  $\text{CH}_4 - \text{H}_2\text{O}$ : равновесный — при формировании метана путем  $\text{CO}_2$ -редукции и кинетический — при его образовании посредством ферментации ацетата [Гуцало, 2003б].

Установлено [Гуцало, 2003а], что при образовании метана путем  $\text{CO}_2$ -редукции имеет место термодинамическое изотопно-обменное равновесие по углероду, обусловленное биологическими процессами: биологическим разделением изотопов. При этом значения фактора биологического фракционирования изотопов углерода ( $\alpha_C^e$ ) в системе  $\text{CH}_4^{\text{газ}} - \text{CO}_2^{\text{газ}}$  отвечают известному термодинамическому изотопному равновесию [Lyon, Hulston, 1984] при данной температуре среды. В интервале от 0 до 100 °C оно описывается уравнением [Гуцало, 2003а]:

$$10^3 \ln \alpha_C^e \text{CH}_4^{\text{газ}} - \text{CO}_2^{\text{газ}} = -4.63(10^6/T^2) - 15.97, \quad (8)$$

где  $T$  (К).

Выявлено также [Гуцало, 2003а], что и в системе  $\text{CH}_4^{\text{газ}} - \text{HCO}_3^-$  в бактериальном метаногенезе путем  $\text{CO}_2$ -редукции значения фактора биологического фракционирования изотопов углерода ( $\alpha_{\text{HC}}^e$ ) достигают известного термодинамического изотопного равновесия [Lyon, Hulston, 1984] при данной температуре среды. В интервале от 0 до 100 °C оно аппроксимируется уравнением [Гуцало, 2003а]:

$$10^3 \ln \alpha_{\text{HC}}^e \text{CH}_4^{\text{газ}} - \text{HCO}_3^- = -6.1175(10^6/T^2) - 7.011, \quad (9)$$

где  $T$  (К).

В уравнениях (8) и (9)  $\alpha_C^e$  и  $\alpha_{\text{HC}}^e$  можно представить

$$\alpha_C^e = (\delta^{13}\text{C} - \text{CH}_4 + 10^3) / (\delta^{13}\text{C} - \text{CO}_2 + 10^3) \quad (10)$$

и

$$\alpha_{\text{HC}}^e = (\delta^{13}\text{C} - \text{CH}_4 + 10^3) / (\delta^{13}\text{C} - \text{HCO}_3^- + 10^3). \quad (11)$$

На основании (10) и (11) путем преобразования получены уравнения [Гуцало, 2003а], аналогичные (6), для расчета изотопного состава углерода микробиального метана, образующегося путем  $\text{CO}_2$ -редукции:

$$\delta^{13}\text{C} - \text{CH}_4 = \alpha_C^e \delta^{13}\text{C} - \text{CO}_2 + d^e, \quad (12)$$

где

$$d^e = 10^3(\alpha_C^e - 1), \quad (13)$$

$$\delta^{13}\text{C} - \text{CH}_4 = \alpha_{\text{HC}}^e \delta^{13}\text{C} - \text{HCO}_3^- + c^e, \quad (14)$$

где

$$c^e = 10^3(\alpha_{\text{HC}}^e - 1). \quad (15)$$

Установленные на термодинамической основе связи — уравнения (4), (6)—(9), (12)—(15) впервые позволяют конкретно рассчитать для любой температуры среды (от 0 до 100 °C) изотопный состав как водорода, так и углерода метана, образующегося путем редукции  $\text{CO}_2$ .

**Метан ферментации ацетата.** Как справедливо отмечают исследователи в статье, специально посвященной расчету фракционирования изотопов водорода в биогеохимических системах [Sessions, Hayes, 2005], на протяжении нескольких десятилетий утвердилось мнение, что в биологических системах при фракционировании одного компонента реагент ( $\delta_r$ ) и продукт ( $\delta_p$ ) связаны между собой зависимостью:  $\delta_p = \alpha \delta_r + \varepsilon$ , где  $\alpha$  и  $\varepsilon$  — одно и то же фракционирование и  $\varepsilon = \alpha - 1$ . При этом величина фракционирования может быть определена из пересечения ( $\varepsilon$ ), с наклона ( $\alpha$ ) или с обоих параметров. Однако проведенный авторами анализ показал [Sessions, Hayes, 2005], что указанные параметры ( $\varepsilon$  и  $\alpha$ ) существенно отличаются между собой, что свидетельствует о некорректности таких расчетов.

Упомянутые исследователи [Sessions, Hayes, 2005] пришли к выводу, что в биологических системах в смеси двух компонентов (каковыми являются и системы  $\text{CH}_4 - \text{H}_2\text{O}$  и  $\text{CH}_4 - \text{CO}_2$ ), каждый из которых фракционирует на протяжении смешивания, нет никакого однозначного решения для трех неизвестных переменных (два фактора фракционирования и неконтролируемое смешивание двух источников водорода).

Ниже рассматривается новая методика расчета факторов неравновесного биологического фракционирования изотопов водорода и углерода в биологических системах в микробиальном ацетатном метаногенезе, которая базируется на известных экспериментальных данных [Games, Hayes, 1976; Fuchs et al., 1979; Schoell, 1984; Schoell et al., 1988] (табл. 1).

Как показали наши исследования [Гуцало, 2003а,б], при образовании микробиального метана в земной коре путем ферментации ацетата биологическое разделение изотопов водорода в системе  $\text{CH}_4 - \text{H}_2\text{O}$  и углерода в системе  $\text{CH}_4 - \text{H}_2\text{O}$  носит преимущественно неравновесный характер.

Таблица 1.

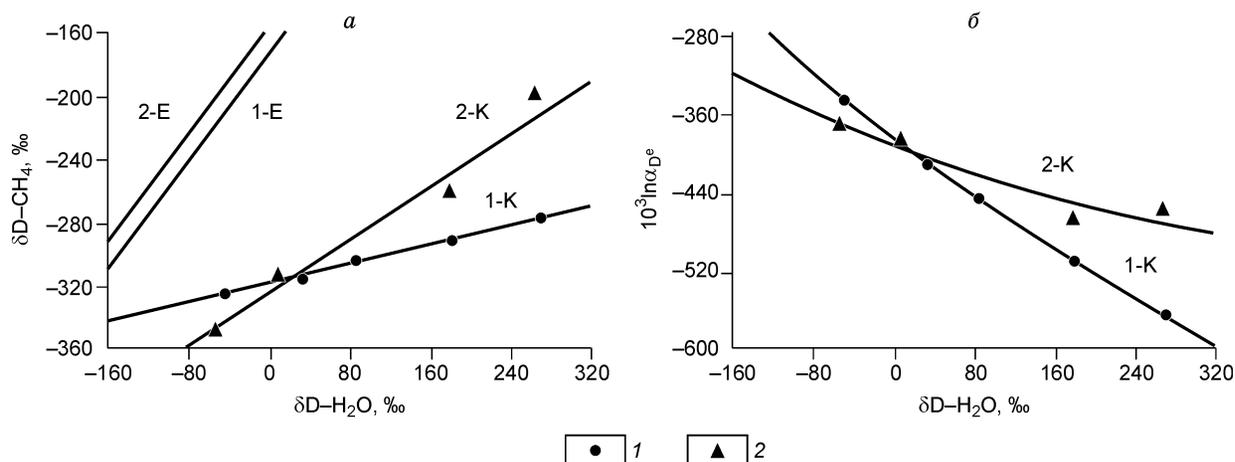
**Разделение изотопов водорода (D/H) и углерода ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) в процессе микробного метанообразования в экспериментах**

$T, ^\circ\text{C}$	$\delta\text{D}-\text{CH}_4, \text{‰}$	$\delta\text{D}-\text{H}_2\text{O}, \text{‰}$	$10^3 \ln \alpha_D^e$	Лит. ссылка	$T, ^\circ\text{C}$	Время, ч	$\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4, \text{‰}$	$\delta^{13}\text{C}-\text{CO}_2, \text{‰}$	$10^3 \ln \alpha_C^e$	Лит. ссылка
<i>Methanosarcina culture</i> с осадками оз. Киву					<i>M. thermoautotrophicum</i>					
26	-324	-45.0	-346	[Schoell, 1984; Schoell et al., 1988; Whiticar et al., 1986]	65	—	-64.9	-41.4	-24.8	[Games, Hayes, 1976]
26	-315	33.0	-411	»	65	5.5	-64.5	-39.8	-26.1	»
26	-303	86.0	-444	»	20	13	-65.1	-37.0	-29.6	»
26	-291	181.0	-510	»	20	24	-65.0	-27.9	-38.9	»
26	-276	271.0	-563	»	25	48	-55.3	3.9	-60.8	»
Сточные грязи					25	48	-50.5	9.8	-61.6	»
60	-348	-54.0	-372	[Schoell, 1984; Whiticar et al., 1988]	60	168	-43.0	-4.7	-39.2	»
60	-313	9.0	-384	»	65	—	-37.6	-3.5	-34.8	[Fuchs et al., 1979]
60	-260	179.0	-466	»	65	—	-40.0	-0.6	-40.2	»
60	-200	266.0	-459	»	—	—	—	—	—	—

Примечание. В экспериментах с водородом вариации изотопного состава воды в культурной среде были искусственно увеличены путем добавления  $\text{D}_2\text{O}$  [Schoell, 1980; Schoell et al., 1988].

Для построений мы используем в качестве исходных данных (см. табл. 1) как результаты экспериментов по образованию микробного метана путем чисто ацетатной ферментации (уравнение (1)) осадков оз. Киву и сточных грязей [Schoell, 1984; Whiticar, 1986; Schoell et al., 1988], так и опытные данные по образованию метана (в закрытой системе) путем  $\text{CO}_2$ -редукции в среде, полностью свободной от органического материала (2), где  $\text{CO}_2$  был единственным источником углерода для образования метана [Games et al., 1976, 1978].

Представленные на рис. 1, а данные свидетельствуют о том, что между изотопным составом водорода воды и метана, образующегося при ацетатной ферментации, наблюдается (в широком диапазоне изменения) тесная прямая линейная связь ( $r = 0.99$ ), которая по форме выражается уравнением (3), но отличается от термодинамически равновесной связи (6) при образовании метана посредством  $\text{CO}_2$ -редукции. Это со всей очевидностью свидетельствует о том, что при образовании бактериального метана путем



**Рис. 1. а — связь между значениями  $\delta\text{D}$  метана и  $\delta\text{D}$  сосуществующей воды в процессе микробного метанообразования.**

Связь в равновесном процессе  $\text{CO}_2$  редукции по расчету из уравнений (4), (6), (7): прямая 1-Е для  $26^\circ\text{C}$ , прямая 2-Е для  $60^\circ\text{C}$ . Связь в неравновесном процессе ферментации ацетата в экспериментах (см. табл. 1): 1 — для  $26^\circ\text{C}$  (линия 1-К:  $\delta\text{D}-\text{CH}_4 = 0.153\delta\text{D}-\text{H}_2\text{O} - 317.923$ ,  $r = 0.997$ ,  $n = 5$ ), 2 — для  $60^\circ\text{C}$  (линия 2-К:  $\delta\text{D}-\text{CH}_4 = 0.431\delta\text{D}-\text{H}_2\text{O} - 323.32$ ,  $r = 0.987$ ,  $n = 4$ ).

**б — связь между значениями фактора фракционирования изотопов водорода  $10^3 \ln \alpha_D^e$  в системе  $\text{CH}_4-\text{H}_2\text{O}$  и значениями  $\delta\text{D}$  сосуществующей воды в неравновесном процессе ферментации ацетата в экспериментах (см. табл. 1).**

ферментации ацетата изотопное фракционирование по водороду в системе  $\text{CH}_4\text{—H}_2\text{O}$  контролируется преимущественно кинетическим эффектом, а не термодинамическим обменным равновесием. При этом значение тангенса угла наклона прямых (1-К и 2-К) относительно оси абсцисс ( $\alpha_D^b$ ) зависит от температуры среды ацетатного метаногенеза (см. рис. 1, а). Оно отражает общий фактор неравновесного биологического фракционирования изотопов водорода при данной температуре среды согласно уравнению:

$$\alpha_D^b = (\delta D_{2\text{-CH}_4} - \delta D_{1\text{-CH}_4}) / (\delta D_{2\text{-H}_2\text{O}} - \delta D_{1\text{-H}_2\text{O}}), \quad (16)$$

где  $\delta D\text{-H}_2\text{O}$  и  $\delta D\text{-CH}_4$  с индексами 1 и 2 — различные соответствующие значения указанных параметров на одной прямой.

В корректности (16) легко удостовериться. Полагая, что в точке с индексом 1 исходные значения  $\delta D_{\text{исходн}}\text{-H}_2\text{O}$  и  $\delta D_{\text{исходн}}\text{-CH}_4$  и что знаменатель дроби в (16) представляет собой приращение  $\Delta D_{2-1}\text{-H}_2\text{O}$  на отрезке прямой с индексами 2 и 1 или 2 и исходное значение, получаем:  $\delta D_{2\text{-CH}_4} = \alpha \Delta D_{2-1}\text{-H}_2\text{O} + \delta D_{\text{исходн}}\text{-CH}_4$ .

Принимая во внимание, что  $a = \alpha_D^b$ , уравнение (3) можно переписать:

$$\delta D\text{-CH}_4 = \alpha_D^b \delta D\text{-H}_2\text{O} + b^b, \quad (17)$$

где параметр  $b^b$  — есть специфический фактор неравновесного биологического фракционирования изотопов водорода (%), характерный для определенного вида или биоценоза бактерий.

Обращаем внимание на то, что в уравнении (17) параметры  $\alpha_D^b$  и  $b^b$  — есть постоянные величины при данной температуре, а значение  $\delta D\text{-H}_2\text{O}$  исходной воды, а следовательно, и значение  $\delta D\text{-CH}_4$ , чаще всего величины переменные (за исключением океанической воды, где  $\delta D\text{-H}_2\text{O}$  близко к нулю). При  $\delta D\text{-H}_2\text{O}$ , равном 0,  $\delta D\text{-CH}_4$  равно  $b^b$ .

Находим зависимость  $\alpha_D^b$  от температуры для прямых 1-К и 2-К (см. рис. 1, а):

$$10^3 \ln \alpha_D^b = -477.357(10^6/T^2) + 3458.55, \quad (18)$$

где  $T$  (К) среды метаногенеза.

Отметим, что в уравнении (18) величина  $\alpha_D^b = 1$  при 98.4 °С, т. е. близко 100 °С, что находится в пределах точности расчета. По мере снижения температуры изотопное фракционирование возрастает, а само значение фактора неравновесного фракционирования изотопов водорода  $\alpha_D^b$  снижается до 0.053 при 0 °С.

Наши исследования показали, что значения  $\alpha_D^b$  в уравнении (17) справедливы для всех видов бактерий ацетатного метаногенеза. В то же время величина постоянной  $b^b$  в уравнении (17) зависит от вида бактерий, а также от температуры среды. Как будет показано ниже, для биоценоза бактерий ацетатного метаногенеза в условиях морской среды с недостатком кислорода лагунного бассейна (Северная Каролина, США) (см. табл. 2) [Burke et al., 1988] зависимость  $b^b$  от окружающей температуры (от 7 до 28 °С на графике) и, по-видимому, в диапазоне 0—100 °С выражается уравнением вида:

$$b^b = k(10^6/T^2) + m, \quad (19)$$

где  $k = 27.35$ ,  $m = -586.69$ ,  $T$  (К) среды метаногенеза.

Как показали наши исследования, и для других видов метаногенерирующих бактерий наблюдается то же значение  $k$ , равное 27.35, что и в уравнении (19), но величина свободного члена  $m$  разная. Для *Methanosarcina barkeri strain* в осадках оз. Киву в Восточно-Африканской рифтовой системе (см. табл. 1) расчетная величина  $m = -623.53$ ; для биоценоза бактерий ацетатного метаногенеза сточных грязей, Германия (см. табл. 1)  $m = -569.74$ ; для биоценоза бактерий оз. Вюрмзи, Северная Германия  $m = -656.55$  (табл. 3).

Установлено, что неравновесное разделение изотопов, обнаруженное для водорода в системе  $\text{CH}_4\text{—H}_2\text{O}$  при образовании микробияльного метана путем ферментации ацетата, наблюдается в эксперименте (рис. 2, а) и при образовании микробияльного метана путем редукции  $\text{CO}_2$  для изотопов углерода в системе  $\text{CH}_4\text{—CO}_2$ . Анализ показал (см. рис. 2, а), что это обусловлено тем, что в эксперименте было недостаточно времени для достижения изотопного термодинамического равновесия в системе, которое обычно наблюдается, как было показано [Гуцало, 2003а], в природных условиях. Согласно расчету на основании зависимости значения  $10^3 \ln \alpha$  от времени эксперимента (см. табл. 2), для достижения изотопного термодинамического равновесия продолжительность эксперимента должна была составлять 57 ч

Таблица 2. Расчетный, из выражений (24) и (25), вклад метана ферментации ацетата в общий баланс микробияльного метана в поверхностных морских осадках с недостатком кислорода лагунного бассейна, Северная Каролина, США

Дата отбора пробы	T, °C	$\delta D_{M-CH_4}$ , ‰	$\delta^{13}C_{M-CH_4}$ , ‰	$\delta^{13}C_{M-CO_2}$ , ‰	$\delta D_{R-CH_4}$ , ‰	$\delta D_{F-CH_4}$ , ‰	$\delta^{13}C_{R-CH_4}$ , ‰	$\delta^{13}C_{F-CH_4}$ , ‰	$f_D$ , %	$f_C$ , %
6 июня 1983	21.0	—	-64.5	-6.8	—	—	-73.5	-58.5	—	60
19 июля 1983	26.5	—	-62.2	-8.6	—	—	-73.4	-57.0	—	68
3 августа 1983	27.0	—	-61.7	-8.8	—	—	-73.4	-57.1	—	72
19 августа 1983	27.5	-284	-56.8	-9.4	-174	-284	-73.9	-56.9	100	100
14 и 15 сентября 1983*	28.0	-261	-60.3	-8.3	-174	-285	-72.6	-56.4	78	76
16 октября 1983	23.0	-265	-60.0	-7.2	-177	-275	-73.2	-57.8	90	86
20 ноября 1983	15.0	—	-62.2	-8.0	—	—	-76.7	-61.2	—	94
2 февраля 1984	7.0	-238	-64.3	-6.0	-188	-238	-77.8	-64.3	100	100
7 апреля 1984	14.0	-240	-63.8	-5.1	-183	-255	-74.3	-60.9	79	78
6 мая 1984	18.0	-231	-63.8	-3.0	-180	-264	-70.9	-58.6	61	58
31 мая 1984	23.0	-228	-68.5	-7.0	-177	-275	-80.4**	-57.7	52	52
14 июня 1984	23.0	-233	-64.1	-6.2	-177	-275	-72.2	-57.5	57	55
2 июля 1984	24.0	-271	-59.4	-10.0	-176	-277	-75.5	-58.3	94	94
18 июля 1984	26.0	-263	-60.6	-10.6	-175	-281	-75.4	-57.6	83	83
10 и 11 августа 1984*	25.0	-277	-57.3	-7.6	-175	-279	-72.9	-57.2	98	99
30 и 31 августа 1984*	26.0	-281	-57.4	-8.9	-175	-281	-73.8	-57.3	100	101
19 и 22 сентября 1984*	26.0	-276	-58.0	-8.1	-175	-281	-73.0	-57.0	95	94
17 ноября 1984	16.0	-260	-61.0	—	-181	-260	—	—	100	—

Примечание. Для расчетов использованы изотопные и температурные данные из работ [Martens et al., 1986; Crill, Martens, 1986; Burke et al., 1988]. Прочерк — нет определений.

\* Параллельные определения  $\delta D-CH_4$ ,  $\delta^{13}C-CH_4$  и  $\delta^{13}C-CO_2$  отсутствуют, поэтому использованы данные с соответствующими параметрами в ближайшие указанные даты (см. ссылки в Примечании).

\*\*  $\delta^{13}C_{R-CH_4}$  рассчитаны из уравнения (14).

(вместо 48 ч в эксперименте) при 20—25 °C (прямая 1-Е на рис. 2, б) и около 380 ч при 65 °C (прямая 2-Е на рис. 2, б).

Учитывая небольшую продолжительность эксперимента (см. табл. 1) и при этом большую степень приближения к состоянию изотопного термодинамического равновесия по углероду в системе  $CH_4-CO_2$  за время эксперимента (см. рис. 2), получает логическое объяснение и становится очевидным существование в геологических масштабах времени изотопного термодинамического равновесия по углероду в системе  $CH_4-CO_2$  в природном процессе  $CO_2$ -редукции.

Рисунок 2, а показывает, что в эксперименте в закрытой системе образование микробияльного метана в процессе редукции  $CO_2$  сначала идет за счет предпочтительного использования легкого изотопа  $^{12}C$   $CO_2$ . Со временем это приводит (см. табл. 1, рис. 2, а) к обогащению изотопом  $^{13}C$  остаточного  $CO_2$  и, как следствие, к соответствующему закономерному обогащению изотопом  $^{13}C$  метана, образованного из этого  $CO_2$  (см. рис. 2, а). При этом отчетливо прослеживается тенденция изотопов углерода в системе  $CH_4-CO_2$  к достижению со временем изотопного термодинамического равновесия (см. рис. 2, а, б).

Сравнение рис. 1 и 2 показывает, что неравновесное распределение изотопов углерода в системе  $CH_4-CO_2$  аналогично таковому для изотопов водорода в системе  $CH_4-H_2O$ . Поэтому в дальнейшем при рассмотрении поведения изотопов углерода в системе  $CH_4-CO_2$  мы ограничимся только выводами.

При рассмотрении вопросов разделения изотопов углерода в системе  $CH_4-CO_2$  следует учитывать фазовое состояние  $CO_2$  и  $CH_4$  и карбонатную форму  $CO_2$  в флюидах земной коры [Гуцало, 2003а].

Как видно из рис. 2, а, значение тангенса угла наклона прямых 1-К и 2-К относительно оси абсцисс ( $\alpha_C^b$ ) зависит от температуры и отражает общий фактор неравновесного биологического фракционирования изотопов углерода при данной температуре среды метаногенеза соответственно уравнению:

$$\alpha_C^b = (\delta^{13}C_2-CH_4 - \delta^{13}C_1-CH_4) / (\delta^{13}C_2-CO_2 - \delta^{13}C_1-CO_2), \quad (20)$$

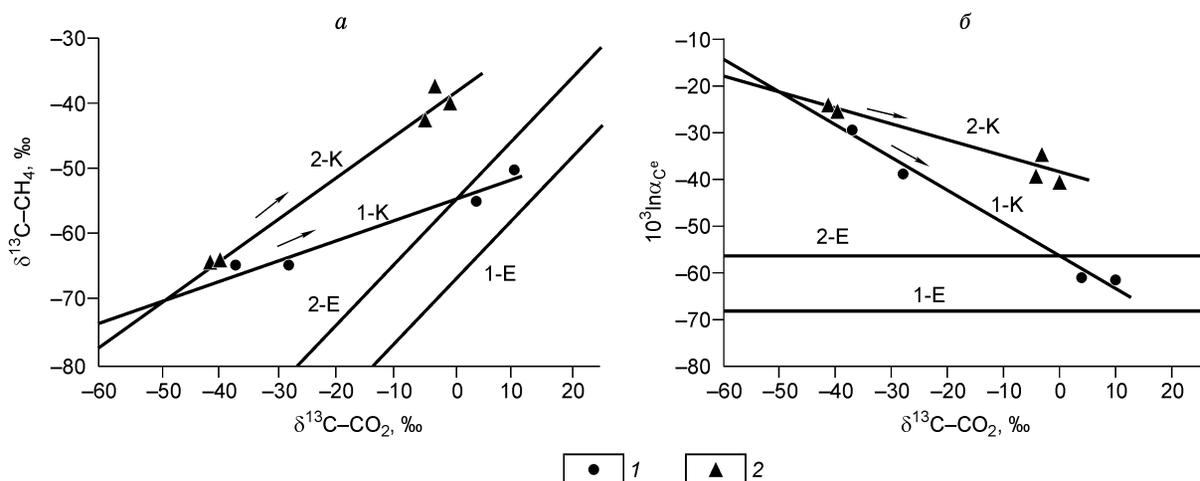
Таблица 3. Расчетный из выражений (24) и (25) вклад метана ферментации ацетата в общий баланс микробияльного метана в поверхностных пресноводных осадках оз. Вюрмзи, Северная Германия

Станция	T, °C	Глубина, см	$\delta D_M-CH_4$	$\delta^{13}C_M-CH_4$	$\delta D_M-H_2O$	$\delta^{13}C_M-CO_2$	‰					%	
							$\delta D_R-CH_4$	$\delta D_F-CH_4$	$\delta^{13}C_R-CH_4$	$\delta^{13}C_F-CH_4$	$f_D$	$f_C$	
1	17.5	0—5	-317	-59.5	-21.2	-15.1	-198	-335	-90.3	-54.3	87	86	
		5—15	-312	-57.7	-21.2	-14.6	-198	-335	-81.9	-54.2	82	87	
2	19.0	0—5	-291	-60.2	-27.9	-3.0	-202	-339	-78.4	-50.3	65	65	
		5—15	-296	-60.3	-27.9	-3.2	-202	-339	-78.6	-50.4	69	65	
		15—30	-306	-55.7	-27.9	-4.5	-202	-339	-72.0**	-50.8	76	77	
		30—50	-294	-57.8	-27.9	-7.9	-202	-339	-75.2**	-51.7	67	74	
3	18.8	0—5	-319	-58.0	-27.0	-8.8	-202	-339	-83.9	-52.1	85	81	
		5—15	-308	-57.8	-27.0	-9.3	-202	-339	-76.5**	-52.2	77	77	
		15—30	-309	-59.9	-27.0	-9.7	-202	-339	-84.7	-52.3	78	78	
		30—50	-312	-59.4	-27.0	-7.1	-202	-339	-83.9	-52.1	80	77	
4	19.0	0—5	-320	-56.0	-27.9	-11.4	-199	-339	-78.4**	-52.7	86	87	
		5—15	-322	-56.3	-27.9	-15.2	-199	-339	-82.0**	-53.8	88	91	
		15—30	-322	-57.3	-27.9	-17.1	-199	-339	-83.8**	-54.3	88	90	
		30—50	-319	-56.9	-27.9	-9.1	-199	-339	-84.1	-52.1	86	85	
5	17.5	0—5	-329	-57.5	-21.8*	-13.8	-198	-335	-89.1	-53.9	96	90	
		15—30	-324	-57.4	-21.7	-17.9	-198	-335	-85.0**	-55.1	92	92	
6	16.0	0—5	-329	-58.3	-14.4	-21.1	-193	-331	-96.5	-56.4	99	95	
		5—15	-331	-58.7	-14.4	-9.8	-193	-331	-86.1	-53.4	101	84	
		15—30	-332	-57.0	-14.4	-13.5	-193	-331	-89.5	-54.4	100	93	
		30—50	-334	-55.3	-14.4	-14.4	-193	-331	-90.3	-54.7	102	98	
7	17.5	0—5	-314	-59.0	-21.2	-15.6	-198	-335	-82.9**	-54.4	85	84	
		5—15	-316	-59.5	-21.2	-16.1	-198	-335	-91.2	-54.6	86	87	
		15—30	-318	-58.9	-21.2	-13.8	-198	-335	-89.1	-53.9	87	86	
		30—50	-320	-59.0	-21.2	-10.8	-198	-335	-86.3	-53.1	89	82	
8	17.5	0—5	-326	-58.4	-21.2	-10.8	-198	-335	-86.3	-53.1	93	84	
		5—15	-327	-58.6	-21.2	-11.2	-198	-335	-86.7	-53.2	94	84	
		15—30	-327	-58.9	-21.2	-10.8	-198	-335	-86.3	-53.1	94	83	
		30—50	-322	-60.0	-21.2	-11.6	-198	-335	-87.1	-53.3	90	80	
9	15.5	0—5	-313	-59.2	-12.3	-14.1	-192	-330	-90.3	-54.8	88	88	
		5—15	-315	-56.7	-12.3	-12.7	-192	-330	-80.9**	-54.4	89	91	
10	17.5	0—5	-323	-58.2	-21.2	-11.5	-198	-335	-87.0	-54.2	91	88	
		5—15	-326	-58.7	-21.2	-12.5	-198	-335	-87.9	-53.6	93	85	
		15—30	-335	-58.2	-21.2	-10.9	-198	-335	-86.4	-53.2	100	85	
		30—50	-334	-58.9	-21.2	-13.0	-198	-335	-88.4	-53.7	99	85	
11	19.0	5—15	-325	-55.9	-27.9	—	-202	-339	—	—	90	—	
12	18.0	0—5	-327	-58.3	-20.0*	-10.3	-196	-336	-85.6	-52.8	94	83	
		5—15	-330	-58.7	-25.0*	-11.5	-201	-337	-86.8	-53.1	96	83	
13	18.0	0—5	-321	-53.9	-23.4	-5.1	-199	-337	-72.9**	-51.4	88	88	
		5—15	-323	-54.9	-23.4	-4.7	-199	-337	-80.5	-51.1	90	87	
		15—30	-323	-54.0	-23.4	-3.6	-199	-337	-79.4	-50.9	90	89	
		30—50	-325	-54.8	-23.4	-3.7	-199	-337	-79.5	-51.0	91	87	
14	18.5	0—5	-333	-53.4	-25.7	-7.6	-201	-338	-82.9	-51.8	96	95	
		5—15	-334	-53.9	-25.7	-7.9	-201	-338	-83.2	-51.9	97	94	
		15—30	-338	-52.1	-25.7	-8.5	-201	-338	-83.7	-52.1	100	100	
		30—50	-332	-52.5	-25.7	-9.8	-201	-338	-84.9	-52.5	96	100	
15	18.5	0—5	-328	-60.4	-24.6*	-14.0	-200	-338	-88.8	-53.6	93	81	
		5—15	-331	-60.5	-27.3*	-12.4	-202	-338	-87.3	-53.3	95	79	
		15—30	-334	-57.8	-25.7	-13.5	-201	-338	-88.4	-53.5	97	88	
		30—50	-333	-58.0	-25.7	-15.4	-201	-338	-90.1	-54.0	96	89	
16	19.0	200	-324	-64.1	-28.1*	-15.3	-202	-339	-89.8	-53.8	89	71	

Примечание. Использованы изотопные и температурные данные из работ [Woltemate et al., 1984; Whiticar et al., 1986].

\*  $\delta D_M-H_2O$  измеренные величины, для остальных образцов они были рассчитаны на основании выявленной зависимости измеренных величин от температуры:  $\delta D_M-H_2O = 54.87(10^6/T^2) - 670.73$ ,  $r = 0.814$ ,  $n = 7$ , где  $T$  (K).

\*\* $\delta^{13}C_R$  этих образцов были рассчитаны из уравнения (8), а для остальных образцов - определялись из уравнения (9).



**Рис. 2. а** — связь между значениями  $\delta^{13}\text{C}$  метана и  $\delta^{13}\text{C}$  сосуществующей  $\text{CO}_2$  в процессе микробного метаногенеза.

Связь в равновесном процессе  $\text{CO}_2$ -редукции по расчету из уравнений (8), (12), (13): линия 1-Е для  $22.5^\circ\text{C}$ , линия 2-Е для  $65^\circ\text{C}$ . Связь в неравновесном процессе  $\text{CO}_2$ -редукции в экспериментах в закрытой системе (см. табл. 1): 1 — для  $22.5^\circ\text{C}$  (линия 1-К:  $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4 = 0.307\delta^{13}\text{C}-\text{CO}_2 - 55.046$ ,  $r = 0.974$ ,  $n = 4$ ), 2 — для  $65^\circ\text{C}$  (линия 2-К:  $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4 = 0.649\delta^{13}\text{C}-\text{CO}_2 - 38.312$ ,  $r = 0.991$ ,  $n = 5$ ).

**б** — связь между значениями фактора фракционирования изотопов углерода  $10^3 \ln \alpha_C^e$  в системе  $\text{CH}_4-\text{CO}_2$  и значениями  $\delta^{13}\text{C}$  сосуществующего  $\text{CO}_2$  в процессе микробного метаногенеза.

Связь в равновесном процессе  $\text{CO}_2$ -редукции по расчету из уравнения (9) и в неравновесном процессе в экспериментах (см. табл. 1). Стрелки показывают направление процесса во времени.

где  $\delta^{13}\text{C}-\text{CO}_2$  и  $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4$  с индексами 1 и 2 — различные соответствующие значения указанных параметров на одной прямой. При этом в одном и том же эксперименте изменение температуры среды метаногенеза от  $65$  до  $25-20^\circ\text{C}$  вызывает соответствующее изменение и тангенса угла наклона прямой (см. рис. 2, а и табл. 1).

Исходя из рис. 2, а, по аналогии с (17) можно записать

$$\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4 = \alpha_C^b \delta^{13}\text{C}-\text{CO}_2 + d^b, \quad (21)$$

где параметр  $d^b$  — есть специфический фактор неравновесного биологического фракционирования изотопов углерода (‰), характерный для определенного вида или биоценоза бактерий. При  $\delta^{13}\text{C}-\text{CO}_2 = 0$   $\delta^{13}\text{C}-\text{CH}_4 = d^b$ .

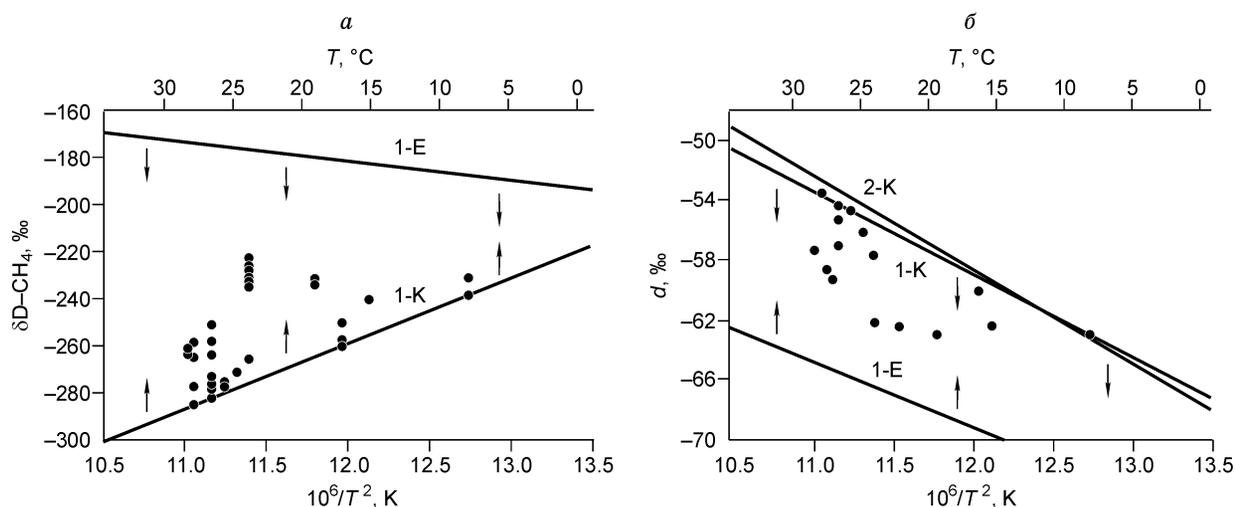
Для прямых 1-К и 2-К (см. рис. 2, а) находим зависимость  $\alpha_C^b$  от температуры

$$10^3 \ln \alpha_C^b = -277.954(10^6/T^2) + 1998.677, \quad (22)$$

где  $T$  К среды метаногенеза.

Заслуживает внимания тот факт, что  $\alpha_C^b = 1$  при  $99.8^\circ\text{C}$ , т. е. при той же температуре (около  $100^\circ\text{C}$ ), при которой и  $\alpha_D^b$  в уравнении (18) также равно единице. При этом пределы изменения значений факторов неравновесного биологического фракционирования изотопов водорода ( $\alpha_D^b$ ) в системе  $\text{CH}_4-\text{H}_2\text{O}$  и изотопов углерода ( $\alpha_C^b$ ) в системе  $\text{CH}_4-\text{CO}_2$  отвечают интервалу температуры (от  $\sim 0$  до  $100^\circ\text{C}$ ), в котором чаще всего проявляется жизненная активность основной массы микроорганизмов. Температура свыше  $100^\circ\text{C}$  убивает, как правило, большую часть микроорганизмов, а ниже  $-10^\circ\text{C}$  — ограничивает их развитие. Резкие изменения температуры вызывают гибель микроорганизмов. Перемежающиеся замораживание и оттаивание действуют на бактерии губительно [Бирштехер, 1957]. Следует отметить, что, по мнению [Welhan, 1988], экстраполяция экспериментов Д. Колемана и др. [Coleman et al., 1981] до  $100^\circ\text{C}$  указывает на то, «что фракционирование изотопов углерода в бактериальном процессе окисления метана приближается к нулю вблизи точки кипения воды» [Welhan, 1988, с. 187].

Таким образом, можно сделать важный вывод, что температура кипения воды ( $100^\circ\text{C}$ ) является биологическим изотопным репером, тем температурным пределом, превышение которого прекращает (в большинстве случаев) само существование, жизнедеятельность биологических систем, а следовательно, и биологическое разделение изотопов.



**Рис. 3. а** — связь между значениями  $\delta D$  метана и температурой среды микробияльного метаногенеза в морских осадках с недостатком кислорода лагунного бассейна (Северная Каролина, США).

Линия 1-Е — связь в равновесном процессе  $CO_2$ -редукции по расчету из выражений (4)—(7) при условии, что  $\delta D-H_2O$  в выражении (6) равно 0. Линия 1-К — связь в неравновесном процессе ферментации ацетата в морских осадках с недостатком кислорода лагунного бассейна (см. табл. 2):  $\delta D-CH_4 = 27.35(10^6/T^2) - 586.69$ .

**б** — связь между значениями параметра  $d$  ( $d^e$  в выражении (12) и  $d^b$  в выражении (21)) и температурой среды микробияльного метаногенеза в морских осадках с недостатком кислорода лагунного бассейна.

Линия 1-Е — связь в равновесном процессе  $CO_2$ -редукции по расчету из выражений (8), (10), (12), (13) при условии, что  $\delta^{13}C-CO_2$  в уравнении (12) равно 0. Линия 1-К — связь в неравновесном процессе ферментации ацетата в морских осадках с недостатком кислорода лагунного бассейна:  $d^b = -5.5489(10^6/T^2) + 7.673$ . Линия 2-К — связь в неравновесном процессе  $CO_2$ -редукции в экспериментах в закрытой системе (см. табл. 1) из уравнения (23).

Проведенный нами анализ показал независимость значений  $\alpha_c^b$  в уравнении (21) от вида бактерий метаногенеза. В отличие от  $\alpha_c^b$  постоянная  $d^b$  в уравнении (21) напротив зависит как от вида бактерий, так и от температуры среды. При редукции  $CO_2$  в  $CH_4$  в экспериментах с *Methanobacterium thermoautotrophicum* (см. табл. 1, рис. 2, а) зависимость  $d^b$  от температуры (в изученном интервале температуры от 22.5 до 65 °С и, по-видимому, до 100 °С) выражается уравнением:

$$d^b = n (10^6/T^2) + p, \quad (23)$$

где  $n = -6.2094$ ,  $p = 15.989$ ,  $T$  К среды метаногенеза.

Как будет показано ниже (рис. 3, б), для биоценоза бактерий при ацетатном метаногенезе в условиях морских осадков с недостатком кислорода лагунного бассейна (Северная Каролина, США) (табл. 2) значения параметров  $n$  и  $p$  в уравнении (23) составляют соответственно  $-5.5489$  и  $7.673$ . Важно подчеркнуть, что расчетные по указанным параметрам величины  $d^b$  в уравнении (23) существенно не отличаются от таковых, рассчитанных по данным эксперимента (ср. прямые 1-К и 2-К на рис. 3, б). Для биоценоза бактерий ацетатного метаногенеза оз. Вюрмзи (Северная Германия) расчетная величина  $n = -5.5489$  и  $p = 15.522$  (см. табл. 3).

Выявленные на термодинамической основе связи — уравнения (16)—(23) позволяют впервые конкретно рассчитать для определенного вида бактерий или природного биоценоза метан-генерирующих бактерий изотопный состав водорода и углерода метана, образующегося путем ферментации ацетата в интервале температуры от 0 до 100 °С.

Выявленная близость расчетных значений параметра  $d^b$  (из уравнения (23)) в случае неравновесного разделения изотопов углерода в системе  $CH_4-CO_2$  как при образовании микробияльного метана путем  $CO_2$ -редукции в эксперименте, так и в ацетатной ферментации на природных объектах (прямые 1-К и 2-К на рис. 3, б) может свидетельствовать об общности биологического распределения изотопов в неравновесных процессах.

Нами установлено, что в ацетатном метаногенезе при одной и той же температуре среды чем меньше значение  $\delta D-H_2O$  исходной воды, тем ближе распределение изотопов водорода в системе  $CH_4-H_2O$  к состоянию термодинамического изотопного равновесия (см. рис. 1, а). И, наоборот, в ацетатном метаногенезе чем больше значение  $\delta^{13}C$  исходного  $CO_2$ , тем ближе распределение изотопов углерода в системе  $CH_4-CO_2$  к состоянию термодинамического изотопного равновесия (см. рис. 2, а).

Обращаем особое внимание на то, что выражения для расчета факторов неравновесного биологического (16), (20) и равновесного термодинамического (5), (10), (11) фракционирования изотопов водорода в системе  $\text{CH}_4\text{—H}_2\text{O}$  и изотопов углерода в системе  $\text{CH}_4\text{—CO}_2$  неидентичны и существенно различаются между собой. Поэтому использование исследователями [LaZerte, 1981; Woltemate et al., 1984; Witicar et al., 1986; Jenden, Kaplan, 1986; Sugimoto, Wada, 1995; Whiticar, 1999; Waldron, 1999; Hornibrook et al., 2000; Chidthaisong et al., 2002; Fey et al., 2004] выражений вида (5), (10), (11) для расчета факторов неравновесного фракционирования изотопов водорода, углерода (и, по-видимому, других элементов) в биологических системах неправомерно. Оно приводит к ошибочным выводам о зависимости значения факторов изотопного фракционирования ( $10^3 \ln \alpha$ ) от величины исходного значения изотопного состава  $\text{H}_2\text{O}$  или  $\text{CO}_2$  при одной и той же температуре, что наглядно демонстрируют рис. 1, б и 2, б и что в случае с водородом невозможно объяснить разную степень истощения субстрата (см. Примечание к табл. 1).

## ПРИЛОЖЕНИЕ МОДЕЛИ К ПРИРОДНЫМ ОБЪЕКТАМ

Предложенная выше на термодинамической основе модель неравновесного биологического распределения изотопов водорода и углерода в системах  $\text{CH}_4\text{—H}_2\text{O}$  и  $\text{CH}_4\text{—CO}_2$  в ацетатном метаногенезе базируется в основном на экспериментальных данных. Ниже мы приводим результаты применения предложенной модели к ряду природных объектов.

С этой целью привлечены, прежде всего, данные по морским осадкам с недостатком кислорода лагунного бассейна (Северная Каролина, США), где имеются параллельные определения изотопного состава водорода в системе  $\text{CH}_4\text{—H}_2\text{O}$  и углерода в системе  $\text{CH}_4\text{—CO}_2$  [Martens et al., 1986; Crill, Martens, 1986; Burke et al., 1988].

Как видно из рис. 3, а, асистемное поле фактических данных (см. табл. 2) [Burke et al., 1988] на графике ограничивается четко снизу прямой 1-К, которая, как показал анализ, характеризует тесную зависимость изотопного состава водорода метана от температуры диссимиляции ацетата в интервале от 7 до 28 °С. Хаотическое поле точек между прямыми 1-К и 1-Е на рис. 3, а отражает смешивание в разных пропорциях метана, образованного в процессе ацетатного метаногенеза и редукции  $\text{CO}_2$  в  $\text{CH}_4$ .

Обращает на себя внимание (см. рис. 3, а) противоположный характер изменения изотопного состава водорода метана от температуры среды метаногенеза при образовании его путем редукции  $\text{CO}_2$  (прямая 1-Е) и посредством ферментации ацетата (прямая 1-К).

Для тех же фактических данных, что и по изотопам водорода (см. табл. 2), также отмечается связь изотопного состава углерода метана с температурой среды ацетатного метаногенеза (см. рис. 3, б). Это обусловлено тем, что при неравновесном характере разделения изотопов одного элемента такая же закономерность должна наблюдаться в том же процессе и для изотопов других элементов. Поле точек сверху ограничивается прямой 1-К, которая характеризует связь изотопного состава углерода метана, выраженную значениями параметра  $d$ , с температурой среды ацетатного метаногенеза. В отличие от значений  $\delta\text{D—H}_2\text{O}$ ,  $\delta^{13}\text{C—CO}_2$  есть величины переменные. Поэтому на рис. 3, б по оси ординат нанесены на график только значения  $\delta^{13}\text{C—CH}_4$ , равные постоянному параметру  $d^b$ , рассчитанному из уравнения (21) по фактическим данным  $\delta^{13}\text{C—CO}_2$  (см. табл. 2) и расчетному значению  $\alpha_c^b$  из зависимости (22). Для сравнения на график нанесена также прямая 2-К изменения значений параметра  $d^b$ , рассчитанная по экспериментальным данным (см. табл. 1) из уравнения (23). Между прямыми 1-К и 1-Е на графике (см. рис. 3, б) расположились смеси метана в разных пропорциях (см. табл. 2), образованные двумя различными путями — ферментацией ацетата и редукцией  $\text{CO}_2$  в  $\text{CH}_4$ .

Для того чтобы проверить корректность предложенной модели формирования изотопного состава микробиального метана и ряда выявленных термодинамических связей достаточно воспользоваться обычным уравнением изотопного баланса [Jenden, Kaplan, 1986]:

$$\delta A_M = f \delta A_F + (1 - f) \delta A_R, \quad (24)$$

где  $\delta A_M$  — есть измеренный изотопный состав водорода ( $\delta D_M$ ) или углерода ( $\delta^{13}C_M$ ) метана;  $\delta A_F$  — изотопный состав водорода ( $\delta D_F$ ) или углерода ( $\delta^{13}C_F$ ) метана, сформировавшегося путем ацетатной ферментации;  $\delta A_R$  — изотопный состав водорода ( $\delta D_R$ ) или углерода ( $\delta^{13}C_R$ ) метана, образованного в результате  $\text{CO}_2$ -редукции;  $f$  есть доля (фракция) метана, образовавшегося посредством диссимиляции ацетата, рассчитанная по балансу изотопов водорода ( $f_D$ ) или углерода ( $f_C$ ) метана из выражения:

$$f = (\delta A_M - \delta A_R) / (\delta A_F - \delta A_R). \quad (25)$$

Измеренный изотопный состав водорода ( $\delta D_M$ ) и углерода ( $\delta^{13}C_M$ ) метана морских осадков с недостатком кислорода лагунного бассейна (Северная Каролина, США) при данной температуре среды приведен в табл. 2. Значения  $\delta D_R$  для изотопов водорода и  $\delta^{13}C_R$  для изотопов углерода метана рассчитаны,

исходя из выявленных соответствующих зависимостей (4), (6) — (9), (12) — (15). Принимая во внимание, что  $\delta D-H_2O$  для поровых вод исследуемого лагунного бассейна составляет около 0 ‰ [Burke et al., 1988], уравнение (6) упрощается и  $\delta D_R-CH_4 = b^e$  (см. рис. 3, а), уравнение (17) упрощается и  $\delta D_F-CH_4 = b^b$ . Изотопный состав водорода ( $\delta D_F$ ) и углерода ( $\delta^{13}C_F$ ) метана, образованного путем ферментации ацетата, рассчитан из выражений (17) — (19), (21) — (23). Результаты расчетов всех компонентов изотопного баланса микробияльного метана представлены в табл. 2.

Результаты расчетов показывают, что практически совпадают (в широком диапазоне изменения) доли метана ферментации ацетата в общем балансе метана морских осадков с недостатком кислорода лагунного бассейна, рассчитанные по изотопному составу, как водорода ( $f_D$ ), так и углерода ( $f_C$ ) метана (см. табл. 2). Причем они колеблются в разные годы и сезоны года от минимальных значений 52—60 % в мае—июне до максимальных значений 70—100 % обычно в июле—августе. Однако в 1983 г. с середины сентября до начала февраля 1984 г. доля метана ферментации возросла от 77 до 100 % (см. табл. 2). В то же время, по данным радиоактивного трассера  $^{14}C$ , доля метана ферментации в общем балансе микробияльного метана лагунного бассейна в июле—августе 1983 г. составляла только от 20 до 29 % [Martens et al., 1986], что, по-видимому, свидетельствует о некорректности расчетов.

Исследования показали, что вариации изотопного состава водорода и углерода микробияльного метана в разные сезоны года обуславливаются в основном изменениями температуры среды метаногенеза и процессами смешивания в разных пропорциях метана, образованного путем ферментации ацетата, с метаном редукции  $CO_2$ .

Совпадения (в широком интервале значений) долей метана ферментации в общем балансе метана, независимо рассчитанных по изотопному составу как водорода ( $f_D$ ), так и углерода ( $f_C$ ) метана (см. табл. 2), служат однозначным, веским доказательством корректности предложенной на термодинамической основе модели формирования изотопного состава микробияльного метана в природе.

Аналогичный расчет изотопного баланса по водороду и углероду был проведен нами по данным [Woltemate et al., 1984; Whiticar et al., 1986] и для микробияльного метана из поверхностных пресных вод оз. Вюрмзи в Северной Германии. Он показал (см. табл. 3), что микробияльный метан этого озера представляет собой главным образом смеси в разных пропорциях, в которых доля метана, образуемого в процессе ферментации ацетата, обычно преобладает, составляя от 65 до 100 % общего баланса, что согласуется с прежними выводами [Woltemate et al., 1984]. При этом в целом для выборки (см. табл. 3) расхождения расчета смесей по изотопному балансу водорода и углерода метана составляют в среднем не более 5 %. Расхождения, выходящие за указанные пределы, обусловлены, по-видимому, как использованием преимущественно расчетных параметров  $\delta D-H_2O$  (см. Примечание к табл. 3), так и методикой отбора проб газов [Woltemate et al., 1984], которая может особенно сказываться на карбонатной системе. Анализ показал (см. табл. 3), что выделяемый из водонасыщенных проб осадков  $CO_2$  находится в водном растворе в основном в форме гидрокарбонат-иона.

Особый интерес представляет исследование изотопного баланса микробияльного метана оз. Киву (Восточно-Центральная Африка). Это обусловлено тем, что полученные результаты модельных экспериментов [Schoell et al., 1988] и расчетов [Jenden, Kaplan, 1986] противоречат теоретическим предпосылкам ряда авторов [Schoell, 1980, 1984; Jenden, Kaplan, 1986; Sugimoto, Wada, 1995; Whiticar, 1999]. Измеренное значение  $\delta D_M-CH_4$  оз. Киву составляет  $-218$  ‰, а изотопный состав озерной воды  $\delta D-H_2O$  равен  $+11$  ‰ [Schoell et al., 1988]. Для температуры оз. Киву  $+26$  °C [Whiticar et al., 1986] расчетное значение  $\delta D_R$  метана редукции  $CO_2$  из уравнений (4), (6), (7) составляет  $-166$  ‰, а расчетная величина  $\delta D_F$  метана, образованного путем ферментации ацетата, равна  $-316$  ‰ из уравнений (17) — (19). Исходя из уравнения баланса изотопов водорода (25), доля метана, образовавшегося в оз. Киву посредством диссимиляции ацетата ( $f_D$ ), составляет 35 %, что близко (33—41 %) к более ранним расчетам [Schoell et al., 1988], базировавшимся на статистической основе.

Расчет изотопного баланса микробияльного метана оз. Киву по изотопному составу углерода на термодинамической основе не представляется возможным. Это обусловлено тем, что отсутствуют сведения об изотопном составе углерода  $CO_2$  в проведенном эксперименте, а также ввиду отсутствия на время эксперимента определений в озере изотопного состава углерода  $CO_2$ , который существенно варьирует во времени и пространстве [Deuser et al., 1973; Schoell et al., 1988].

Все вышеизложенное позволяет сделать вывод о корректности предложенной на термодинамической основе модели формирования изотопного состава микробияльного метана в природных условиях и достоверности выявленных связей.

## ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ

На основе исследования характера распределения изотопов водорода (D/H) и углерода ( $^{13}C/^{12}C$ ) в микробияльных системах  $CH_4-H_2O$  и  $CH_4-CO_2$  разработаны (на термодинамической основе) новые изотопные критерии для оценки путей образования микробияльного метана в земной коре. В случае

образования микробиального метана путем  $\text{CO}_2$ -редукции биологическое распределение изотопов водорода и углерода в указанных системах отвечает изотопному термодинамическому обменному равновесию при данной температуре среды метаногенеза. Если микробиальный метан образуется в результате ферментации ацетата, то распределение изотопов водорода и углерода в системах  $\text{CH}_4\text{-H}_2\text{O}$  и  $\text{CH}_4\text{-CO}_2$  носит преимущественно неравновесный характер. Предложена на термодинамической основе модель формирования изотопного состава микробиального метана в природной обстановке. Вариации изотопного состава водорода и углерода микробиального метана на различных геологических объектах в морских и пресноводных осадках обуславливаются в основном изменениями температуры среды метаногенеза и процессами смешивания в разных пропорциях метана, образованного путем ферментации ацетата, с метаном редукции  $\text{CO}_2$ .

#### ЛИТЕРАТУРА

- Бириштехер Э.** Нефтяная микробиология. Л., Гостоптехиздат, 1957, 314 с.
- Гуцало Л.К.** О характере распределения изотопов углерода в системе  $\text{CH}_4\text{-CO}_2$  при образовании микробиального метана путем  $\text{CO}_2$ -редукции // Докл. РАН, 2003а, т. 388, № 2, с. 220—224.
- Гуцало Л.К.** Распределение изотопов водорода в  $\text{CH}_4\text{-H}_2\text{O}$  природной системе в микробиальном метаногенезе // Докл. РАН, 2003б, т. 392, № 3, с. 379—382.
- Ерохин В.Е.** К анализу содержания дейтерия в углеводородных газах // Ядерная геология. М., ОНТИ ВНИИЯГГ, 1978, с. 47—55.
- Burke R.A., Martens C.S., Sackett W.M.** Seasonal variations of D/H and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratios of microbial methane in surface sediments // Nature, 1988, v. 332, p. 829—831.
- Chidthaisong A., Chin K.-J., Valentine D.L., Tyler S.C.** A comparison of isotope fractionation of carbon and hydrogen from paddy field rice roots and soil bacterial enrichments during  $\text{CO}_2/\text{H}_2$  methanogenesis // Geochim. Cosmochim. Acta, 2002, v. 66, p. 983—995.
- Coleman D.D., Rizatti J.B., Schoell M.** Fractionation of carbon and hydrogen isotopes by methane-oxidizing bacteria // Geochim. Cosmochim. Acta, 1981, v. 45, p. 1033—1037.
- Crill P.M., Martens C.S.** Methane production from bicarbonate and acetate in an anoxic marine sediment // Geochim. Cosmochim. Acta, 1986, v. 50, p. 2089—2097.
- Daniels L., Fulton G., Spencer R.W., Orme-Johnson W.H.** Origin of hydrogen in methane produced by *Methanobacterium thermoautotrophicum* // Bacteriol., 1980, v. 141, p. 694—698.
- Deuser W.G., Degens E.T., Harvey G.R., Rubin M.** Methane in Lake Kivu: new data bearing on its origin // Science, 1973, v. 181, p. 51—54.
- Fey A., Claus P., Conrad R.** Temporal change of  $^{13}\text{C}$ -isotope signatures and methanogenic pathways in rice field soil incubated anoxically at different temperatures // Geochim. Cosmochim. Acta, 2004, v. 68, p. 293—306.
- Fuchs G.D., Thaver R., Zeigler H., Stichler W.** Carbon isotope fractionation by *Methanobacterium thermoautotrophicum* // Arch. Microbiol., 1979, v. 120, p. 135—139.
- Games L.M., Hayes J.M.** On the mechanisms of  $\text{CO}_2$  and  $\text{CH}_4$  production in natural anaerobic environments. Environmental biogeochemistry // Proc. 2nd Int. Symp. Environmental Biogeochemistry / Ed. J.O. Nriague Michigan, Science Press, 1976, v. 1, Chap. 5, p. 51—73.
- Games L.M., Hayes J.M., Gunsalus R.P.** Methane-producing bacteria: natural fractionations of the stable carbon isotopes // Geochim. Cosmochim. Acta, 1978, v. 42, p. 1295—1297.
- Hornibrook E.R.C., Longstaffe F.J., Fyfe W.S.** Factors influencing stable isotope ratios in  $\text{CH}_4$  and  $\text{CO}_2$  within subenvironments of freshwater wetlands: implications for  $\delta$ -signatures of emissions // Isotopes Environ. Health Stud., 2000, v. 36, p. 151—176.
- Jeris J.S., McCarty P.L.** The biochemistry of methane fermentation using  $^{14}\text{C}$  tracers // J. Water Pollut. Control Fed., 1965, v. 37, p. 178—192.
- Jenden P.D., Kaplan I.R.** Comparison of microbial gases from the Middle America Trench and Scripps Canyon: implications for the origin of natural gas // Appl. Geochem., 1986, v. 1, p. 631—646.
- Koyama T.** Gaseous metabolism in lake sediments and paddy soils and the production of atmospheric methane and hydrogen // J. Geophys. Res., 1963, v. 68, p. 3971—3973.
- Koyama T., Nikaido M., Tomino T., Hayakawa H.** Decomposition of organic matter in lake sediments // Proc. Symp. Hydrogeochemistry and Biogeochemistry. Tokyo, The Clarke Co., 1973, p. 512—535.
- LaZerte B.D.** The relationship between total dissolved carbon dioxide and its stable carbon isotope ratio in aquatic sediments // Geochim. Cosmochim. Acta, 1981, v. 45, p. 647—656.
- Lyon G.L., Hulston J.R.** Carbon and hydrogen compositions of New Zealand geothermal gases // Geochim. Cosmochim. Acta, 1984, v. 48, p. 1161—1171.

**Martens C.S., Blair N.E., Green C.D., Des Marais D.J.** Seasonal variations in the stable carbon isotopic signature of biogenic methane in coastal sediments // *Science*, 1986, v. 233, p. 1300—1303.

**Microbial Production and Utilization of Gases** / Eds. H.G. Schlegel, N. Pfenning. Goltze, Gottschalk, Gottingen, 1976, 375 p.

**Nakai N., Yoshida Y., Ando N.** Isotopic studies on oil and natural gas fields in Japan // *Chikyakaya Kagaku*, 1974, v. 7/8, p. 87—98.

**Schoell M.** The hydrogen and carbon isotopic compositions of methane from natural gases of various origin // *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1980, v. 44, p. 649—661.

**Schoell M.** Wasserstoff- und Kohlenstoff-Isotopen-variationen in organischen Substanzen, Erdolen und Erdgasen // *Geol. Jahrb. D-67*. Hannover, 1984, 164 p.

**Schoell M., Tietze K., Schoberth S.M.** Origin of methane in Lake Kivu (East-Central Africa) // *Chem. Geol.*, 1988, v. 71, p. 257—265.

**Sugimoto A., Wada W.** Hydrogen isotopic composition of bacterial methane: CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> reduction and acetate fermentation // *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1995, v. 59, p. 1329—1337.

**Sessions A.L., Hayes J.M.** Calculation of hydrogen isotopic fractionations in biogeochemical systems // *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2005, v. 69, p. 593—597.

**Smith P.H., Mah R.A.** Kinetics of acetate metabolism during sludge digestion // *Appl. Microbiol.*, 1966, v. 14, p. 368—371.

**Takai Y.** The mechanism of methane fermentation in flooded paddy soil // *Soil Sci. Plant Nutrition*, 1970, v. 16, p. 238—244.

**Valentine D.L., Chidthaisong A., Rice A., Reeburgh W.S., Tyler S.C.** Carbon and hydrogen isotope fractionation by moderately thermophilic methanogens // *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2004, v. 68, p. 1571—1590.

**Waldron S., Lansdown J.M., Scott E.M., Fallick A.E., Hall A.J.** The global influence of the hydrogen isotope composition of water on that of bacteriogenic methane from shallow freshwater environments // *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1999, v. 63, p. 2237—2245.

**Welhan J.A.** Origins of methane in hydrothermal systems // *Chem. Geol.*, 1988, v. 71, p. 183—198.

**Whiticar M.J.** Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane // *Chem. Geol.*, 1999, v. 161, p. 291—314.

**Whiticar M.J., Faber E.** Methane oxidation in sediment and water column environments — isotope evidence // *Advances in Organic Geochemistry*, 1985, v. 10, p. 759—768.

**Whiticar M.J., Faber E., Schoell M.** Biogenic methane formation in marine and freshwater environments: CO<sub>2</sub> reduction vs. acetate fermentation — isotope evidence // *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1986, v. 50, p. 693—709.

**Winfrey M.R.A., Zeikus J.G.** Effects of sulfate on carbon and electron flow during microbial methanogenesis in fresh water sediments // *Appl. Environ. Microbiol.*, 1977, v. 33, p. 275—281.

**Woltemate I., Whiticar M.J., Schoell M.** Carbon isotopic composition of bacterial methane in a shallow lake // *Limnol. Oceanogr.*, 1984, v. 29, p. 985—992.

*Рекомендована к печати 7 сентября 2007 г.  
Г.Н. Аношиным*

*Поступила в редакцию  
11 мая 2007 г.*