

# **ОЦЕНКА МЕТОДА СУБСТРАТ-ИНДУЦИРОВАННОГО ДЫХАНИЯ (ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЧВЕННОЙ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ) НА ПРИМЕРЕ ПОЧВ МОЛДОВЫ**

**С.С. Корчмару**

*Институт микробиологии и биотехнологии АНМ*

## **Введение**

Метод субстрат-индуцированного дыхания (СИД) в настоящее время является одним из стандартных средств определения микробной биомассы почвы – одной из ключевых почвенных характеристик [12]. Впервые он был предложен в 1978 г. Его авторы, J.P.E Anderson и K.H. Domsch [2], показали, что максимальный прирост почвенного дыхания в течение первых часов после внесения в почву глюкозы (в насыщающей концентрации) находится в прямо пропорциональной зависимости от величины активной микробной биомассы. Проанализировав 50 образцов различных лесных и пахотных почв, они выявили достоверную корреляцию между данными СИД и величиной микробной биомассы, определённой в тех же почвах с помощью метода фумигации-инкубации. Согласно полученным результатам, индуцированное глюкозой почвенное дыхание на уровне 1 мл  $\text{CO}_2$ /час/г почвы соответствовало 40 мг углерода микробной биомассы (при 22°C). В итоге были сделаны выводы о том, что метод СИД даёт объективные характеристики микробной биомассы в почве и может использоваться, в том числе, для оценки соотношения активности бактерий и грибов в почве (при селективном ингибировании).

Таким образом, в основе метода СИД лежит конверсия интенсивности индуцированного внесением глюкозы почвенного дыхания в показатели микробной биомассы. Среди достоинств СИД отмечают относительную

простоту и малую трудоёмкость, экспрессность, возможность оценок именно активной микробной биомассы – как в целом, так и по составляющим – и, наконец, достаточно хорошую корреляцию с другими современными способами оценки биомассы: фумигацией-экстракцией [3, 8], методами учёта АТФ [8] и минерализации аргинина [10], прямой микроскопией [11] и кинетическим методом [4].

Вместе с тем, как и любой другой метод, СИД наделён рядом ограничений, без учёта которых невозможно его адекватное применение. В частности, СИД имеет практический смысл только тогда, когда есть достаточно общеупотребимый коэффициент пересчёта интенсивности дыхания в единицы микробной биомассы. Для этого, прежде всего, важно, чтобы внесение глюкозы в разные почвы и в разное время индуцировало одинаковое удельное дыхание микробной биомассы. Поскольку к подобного рода одинаковости приближается исключительно не растущая биомасса, то критическим условием для возможности нахождения перерасчётного коэффициента и дальнейшего применения СИД является отсутствие в тестируемых почвах какого-либо значимого количества активно делящихся микроорганизмов. Известно, что наличие в почве свежевнесённых субстратов, а также высушивание почвы и её последующее увлажнение негативно сказываются на результатах СИД [8]. В частности, при анализе почв, относительно недавно обогатённых различными субстратами, метод СИД дал завышенную оценку биомассы, и потребовалась длительная (от четырёх недель и выше) предварительная инкубация-стандартизация почвенных образцов, прежде чем данные СИД начали показывать реальную картину. В связи с этим, в отношении пахотных почв было рекомендовано отбирать почвенные образцы ранней весной, когда влияние сельскохозяйственного фактора минимально, и анализировать их не раньше, чем после недельной предварительной инкубации в просеянном виде [2, 4, 12].

Ещё одним существенным моментом, усложняющим нахождение эффективного перерасчётного коэффициента, является то, что дыхание почвенных микроорганизмов не является единственной переменной, определяющей скорость выделения  $\text{CO}_2$  из почвы. Последняя может меняться в зависимости от скорости растворения  $\text{CO}_2$  в почвенном растворе и, возможно, от других процессов, которые, в свою очередь, зависят от pH и влажности почвы, концентрации  $\text{CO}_2$  в надпочвенном воздухе и других почвенных особенностей. Трудность полного учёта подобных факторов очевидна, и потому не удивительно, что до сих пор так и не предложен единый коэффициент, который мог бы с одинаковым успехом использоваться на разных почвах и в разных условиях. Согласно Q.Lin и P.C.Brookes [8], диапазон значений пересчётного коэффициента, предлагаемого в литературе разными авторами, составляет от 16 до 50, когда СИД определяется в  $\text{мл CO}_2/\text{г/час}$ , или от 30 до 100, когда СИД определяется в  $\text{мг CO}_2\text{-C/г/час}$ . Ширина этого диапазона весьма красноречива и даёт повод ставить под сомнение саму принципиальную возможность нахождения универсального коэффициента [5].

Исходя из вышеизложенного, целью настоящей работы было оценить возможности метода СИД на примере почв Молдовы.

## Материалы и методы исследования

**Отбор и стандартизация почвенных проб.** Почвенные пробы отбирали с глубины 0-10 см. До анализов почвы хранили во влажном состоянии при 4°C не более 3-4 недель. Перед анализом из каждой пробы тщательно удаляли растительный материал, камешки и видимую глазом фауну. Почву просеивали через сито на 2 мм, доводили влажность до 40% от водоудерживающей способности, затем помещали в аэрируемый пластиковый мешок и инкубировали в течение 10 дней в темноте при 25°C, периодически восстанавливая влажность.

**Определение микробной биомассы в почве.** Биомассу определяли методом фумигации-экстракции [13]. Три навески-повторности по 25 г а.с. почвы фумигировали хлороформом (не содержащим этанол) в течение 24 часов при 25°C. После удаления фумиганта к каждой навеске добавляли 100 мл 0.5 М  $K_2SO_4$  и в течение 30 минут (на качалке) экстрагировали органический С. Одновременно с фумигацией таким же образом проводили экстракцию из трёх нефумигированных навесок повторностей. Профильтрованные экстракты замораживали и хранили при -20°C. Органический С в почвенных экстрактах определяли методом бихроматного окисления [6]. Микробную биомассу (С микробной биомассы -  $B_c$ ) в почве вычисляли по уравнению:  $B_c = 2.22 \times E_c$ , где  $E_c$  – разница между количествами органического С, экстрагированного из фумигированной и нефумигированной навесок почвы.

**Индукция дыхания в почве и замер СИД.** Для индукции дыхания вносили глюкозу – 6 мг на 1 г а.с. почвы. При этом глюкозу вносили в чистом виде и в виде концентрированной глюкозо-минеральной смеси (КГМС), которая содержала дополнительные дозы по 0.6 мг/г  $K_2HPO_4$  и  $(NH_4)_2SO_4$ . Были предусмотрены варианты внесения субстрата в виде раствора и в виде порошка с тальком (в дозе 20 мг/г или согласно дополнительным указаниям). В первом случае навеску (3 г а.с. почвы) сначала помещали в стеклянный флакон на 15 мл и потом наносили на поверхность до 1 мл раствора субстрата. Во втором случае навеску распределяли тонким слоем на кальке, добавляли смесь субстрата и талька (перетёртых в ступке до состояния пудры), тщательно перемешивали и переносили во флакон. Через 30 минут после добавления субстрата флакон с почвой герметично закрывали резиновой пробкой с металлическим зажимом и инкубировали 3 часа при 25°C. Замер содержания  $CO_2$  во флаконе проводили с помощью газового хроматографа Chrom-5. СИД выражали в  $mg\ CO_2-C/g\ а.с.\ почв\ /час$ .

**Статистический анализ результатов.** Замеры дыхания проводили в 4-х кратной повторности, фумигацию-экстракцию – в 3-х кратной. В каждом из случаев определяли среднюю арифметическую и доверительный интервал при  $P=0.05$ . Для оценки взаимосвязи между данными СИД и показателями фумигации-экстракции использовали корреляционный анализ.

## Результаты и обсуждение

**Оценка способов индукции респирации в почве.** Существуют два способа внесения глюкозы: в виде порошка с наполнителем (как правило, тальком или

целлюлозой) и в виде водного раствора [10]. В первом случае для достижения максимального эффекта необходимо тщательное перемешивание почвенного образца после добавления глюкозы. Во втором случае в перемешивании необходимости нет, и раствор может быть нанесён прямо на поверхность почвы. Таким образом, второй способ менее трудоёмок, но при этом содержит некоторый риск создания анаэробных условий в почве за счёт переувлажнения. Чтобы это не произошло, можно или минимизировать объём воды, который вносится в почву с раствором, или, наоборот, вносить заведомо избыточное количество воды (до 120% от водоудерживающей способности) и далее инкубировать почвенную суспензию в режиме постоянного взбалтывания [1, 10, 14]. Помимо этих двух способов существуют ещё и две разновидности внесения глюкозы: в чистом виде, или в виде концентрированной глюкозо-минеральной смеси (КГМС) из глюкозы,  $K_2HPO_4$  и  $(NH_4)_2SO_4$  [1, 14, 15].

На примере бурой почвы и типичного чернозёма были изучены следующие способы внесения глюкозы: совместно с минеральными добавками и без, в виде порошка с тальком и в виде раствора. Согласно полученным данным, в бурой почве интенсивность дыхания была несколько большей во всех случаях внесения глюкозы в виде порошка (рис. 1), тогда как в типичном чернозёме достоверная разница между вариантами с порошком и с раствором отсутствовала (рис. 2).

Относительно повышенные данные в вариантах с тальком в бурой почве, скорее всего, вызваны перемешиванием: дополнительной аэрацией почвы при внесении порошка и/или более равномерным распределением в ней глюкозы.

Внесение талька как самого по себе, так и в «порошковых» вариантах с глюкозой явно подавляло почвенное дыхание пропорционально дозе внесения. Вместе с тем, максимальная доза талька не оказала какого-либо отрицательного эффекта в случаях, когда дыхание индуцировалось внесением глюкозы в виде раствора КГМС (рис. 2). Из этого можно предположить, что подавляющий эффект талька в вариантах без внесения растворов связан с изменением водно-физических условий в почвенных образцах.

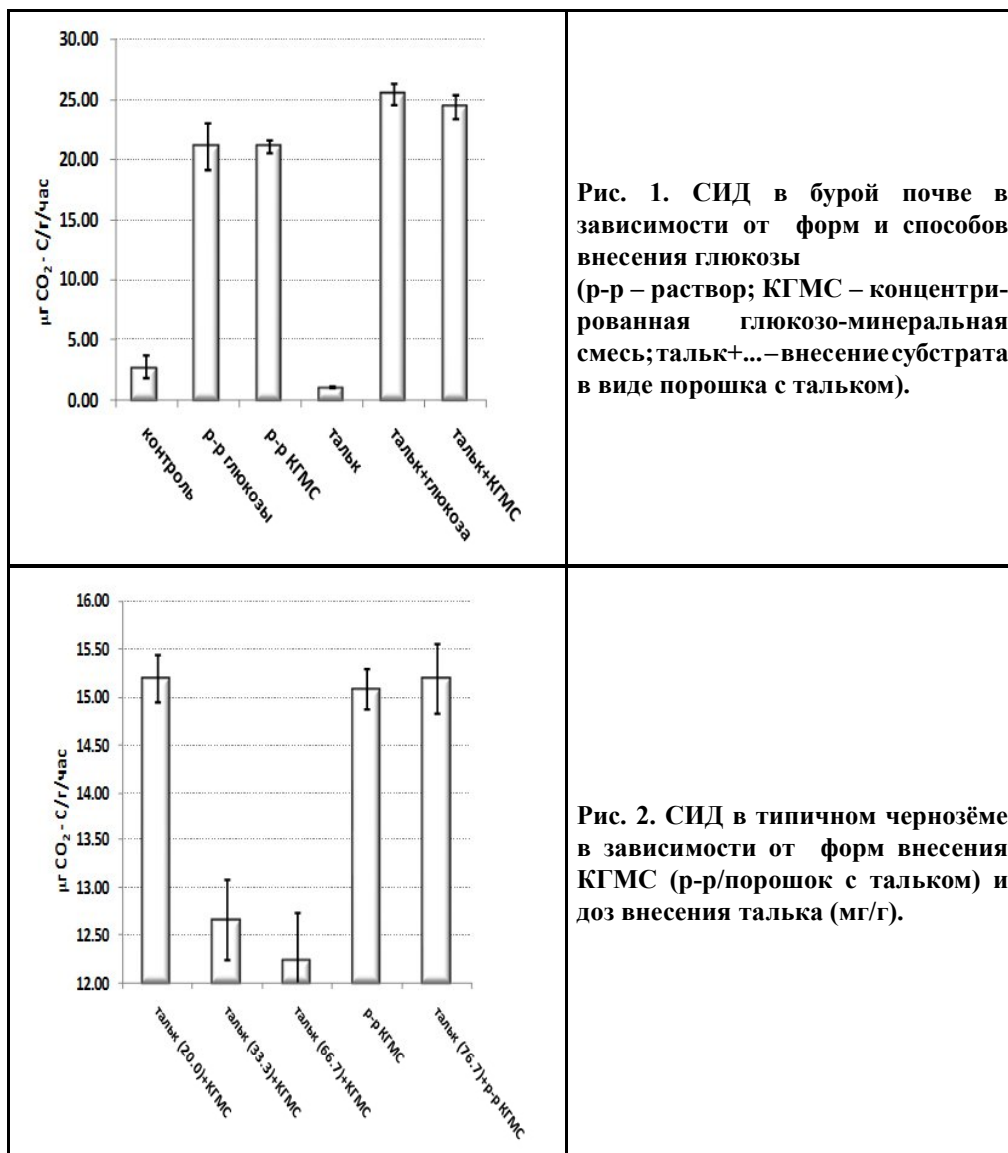
Ни в одном из опытов не была отмечена достоверная разница между параллельными вариантами внесения глюкозы в чистом виде и в виде КГМС.

Полученные результаты позволили прийти к заключению о том, что в условиях проведённых опытов варьирование форм и способов внесения глюкозы не играло существенного значения при условии, что тальк как наполнитель не вносился в дозах, превышающих 20 мг/г а.с. почвы. Во всех дальнейших опытах индуцирование дыхания проводили путём внесения раствора КГМС.

**Оценка эффективности СИД для почв, подвергшихся экологическому стрессу.** Оценку проводили в модельных лабораторных условиях на примере бурой почвы, искусственно загрязнённой медью. После стандартизации исходный почвенный образец (с естественным содержанием меди 15 мг/кг) был разделён на 5 подобразцов, в которые внесли возрастающие дозы медного купороса (от 0 до 300 мг Cu/кг).

Далее почву инкубировали в течение 1,5 лет в темноте при постоянной влажности (40% от водоудерживающей способности) и температуре (25°C), причём в течение

первого этапа инкубации в неё периодически (5 раз с месячным промежутком) вносили глюкозу (0.5%). Интенсивность индуцированного внесением глюкозы дыхания сравнивали с данными биомассы, полученными методом фумигации-экстракции (рис. 3). В итоге была обнаружена высокая корреляция ( $R^2=0.92$ ) между интенсивностью индуцированного дыхания и микробной биомассой почвы, продемонстрировавшая принципиальную возможность использования СИД в данных условиях. Перерасчётный коэффициент в данном случае составил 87.99.



*Оценка эффективности СИД для почв, используемых в различных агроусловиях.* Оценку проводили на примере почв чернозёмов карбонатного (экспериментальная база Государственного аграрного университета Молдовы,

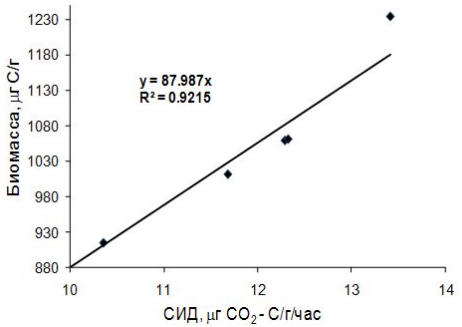
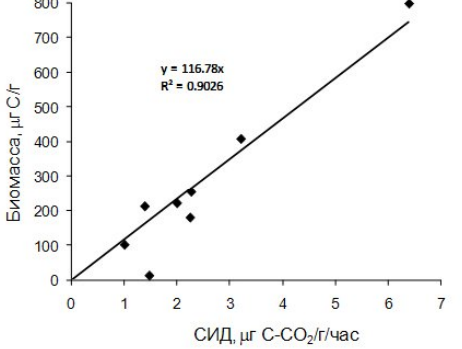
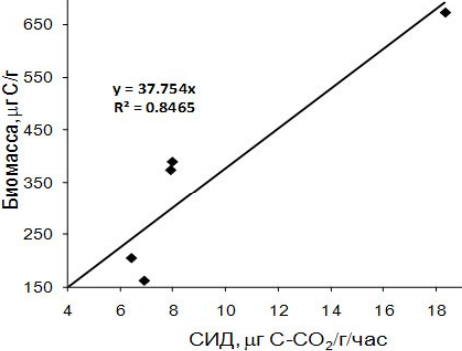
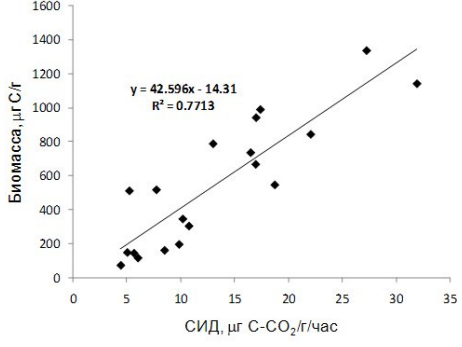
г. Кишинёв) и типичного (экспериментальная база Научно-исследовательского института полевых культур «Селекция», г. Бельцы). В первом случае почвенные образцы были отобраны в феврале 2007 года из полевых вариантов с чёрным паром, перелогом, многолетними травами, бессменными озимой пшеницей, подсолнечником и кукурузой, а также из двух вариантов с озимой пшеницей в разных севооборотах. Во втором случае образцы отбирали в мае 2007 года из полевых вариантов с перелогом, бессменной сахарной свеклой с внесением органоминеральных удобрений и без, кукурузой в севооборотах с внесением органоминеральных удобрений и без.

Согласно полученным результатам (рис. 4, 5), в каждом из случаев была выявлена достоверная корреляция между данными СИД и показателями биомассы почвенных микроорганизмов, определённых с помощью фумигации-экстракции. Вместе с тем, перерасчётный коэффициент для карбонатного чернозёма (116.78) оказался примерно в 3 раза больше коэффициента для типичного чернозёма (37.75).

**Оценка эффективности СИД для основных типов и подтипов зональных почв Молдовы.** Для анализа были отобраны пробы следующих почв: бурая слабонасыщенная оподзоленная, бурая типичная (неоподзоленная), светло-серая, серая, тёмно-серая, чернозём оподзоленный, чернозём выщелоченный, чернозём типичный, чернозём обыкновенный и чернозём карбонатный. Пробы отбирали в июне 2008 г, причём для каждой почвы были предусмотрены параллельные «естественный» и сельскохозяйственный варианты. Исключение составил только оподзоленный чернозём, где анализировали только «естественный» вариант. В итоге была выявлена достаточно высокая корреляция между данными СИД и показателями биомассы, определёнными с помощью фумигации-экстракции ( $R^2=0.77$ , рис. 6). Величина перерасчётного коэффициента составила 41.79 (рис. 6).

Обобщение всех полученных результатов позволяет в очередной раз констатировать как несомненные достоинства метода СИД, так и его недостатки. Высокие корреляции между данными СИД и показателями микробной биомассы продемонстрировали возможность адекватной оценки микробной биомассы на основе СИД.

Эта возможность была реальна как для отдельно взятых почв (при оценках последствий загрязнения медью и различных условий сельскохозяйственного использования), так и для широкого спектра, охватывающего все основные типы и подтипы зональных почв Молдовы, при чём вне зависимости от того, находились ли они в «естественном» состоянии, или были вовлечены в сельскохозяйственное использование. Вместе с тем, тот факт, что в четырёх случаях нахождения перерасчётного коэффициента был практически воспроизведён весь диапазон приводящихся в литературе данных, указывает на высокую чувствительность метода к конкретным обстоятельствам, в которых он применяется. Иными словами, выбор условий эксперимента (какие и сколько почв исследуются, в каких конкретных обстоятельствах) в значительной мере влияет на величину перерасчётного коэффициента, и это нельзя не учитывать.

 <p>Биомасса, <math>\mu\text{g C/g}</math></p> <p><math>y = 87.987x</math> <math>R^2 = 0.9215</math></p> <p>СИД, <math>\mu\text{g CO}_2\text{-C/g/час}</math></p>	<p><b>Рис. 3. Корреляция данных биомассы и СИД в бурой почве с разными дозами внесённой меди.</b></p>
 <p>Биомасса, <math>\mu\text{g C/g}</math></p> <p><math>y = 116.78x</math> <math>R^2 = 0.9026</math></p> <p>СИД, <math>\mu\text{g C-CO}_2\text{/г/час}</math></p>	<p><b>Рис. 4. Корреляция данных биомассы и СИД в образцах карбонатного чернозёма из различных агровариантов опытов Государственного аграрного университета Молдовы.</b></p>
 <p>Биомасса, <math>\mu\text{g C/g}</math></p> <p><math>y = 37.754x</math> <math>R^2 = 0.8465</math></p> <p>СИД, <math>\mu\text{g C-CO}_2\text{/г/час}</math></p>	<p><b>Рис. 5. Корреляция данных биомассы и СИД в образцах типичного чернозёма из различных агровариантов опытов Научно-исследовательского института полевых культур «Селекция».</b></p>
 <p>Биомасса, <math>\mu\text{g C/g}</math></p> <p><math>y = 42.596x - 14.31</math> <math>R^2 = 0.7713</math></p> <p>СИД, <math>\mu\text{g C-CO}_2\text{/г/час}</math></p>	<p><b>Рис. 6. Корреляция данных биомассы и СИД в образцах основных типов и подтипов зональных почв Молдовы.</b></p>

Можно предположить, что отклонения коэффициента в ту или иную сторону в зависимости от условий эксперимента складываются из различий по удельному дыханию (интенсивности дыхания, индуцируемого внесением глюкозы в единице микробной биомассы) и различий по абиотическим факторам, влияющим на скорость выделения  $\text{CO}_2$ . В обоих случаях эти различия определяются особенностями анализируемых почв. Почва, как среда обитания (которая может быть в разной степени благоприятной или, наоборот, неблагоприятной) влияет на состояние обитающих в ней микроорганизмов (и, следовательно, на удельное дыхание микробной биомассы в целом), и она же, в зависимости от своих физико-химических особенностей, влияет на то, какая часть выделяемого при дыхании  $\text{CO}_2$  переходит в воздух, а какая задерживается. В таком случае, если по-настоящему универсальный перерасчётный коэффициент существует, то путь к нему лежит через приведение почвы и находящейся в ней биомассы в максимально стандартное состояние. В этом плане, уже предложен целый ряд мер. В частности, предложена процедура стандартизации почвенных образцов перед анализом, в рамках которой почва определённым образом очищается, просеивается, увлажняется до стандартного состояния и инкубируется в стандартных условиях. Далее, предложено находить для каждой отдельной почвы оптимальные дозу глюкозы и время инкубации - чтобы добиться максимального прироста интенсивности дыхания биомассы, но при этом не «упустить» последнюю в фазу экспоненциального роста [2, 11]. Также, указаны необходимость не допускать превышения критического уровня концентрации  $\text{CO}_2$  (1%) в надпочвенном воздухе, при котором начинается ускоренное растворение  $\text{CO}_2$  в почвенном растворе [5], а также необходимость не допускать анаэробных условий в самой почве [14]. Наконец, рекомендован учёт (калибровка) способности почвы поглощать  $\text{CO}_2$  в случаях, когда почвенный  $\text{pH} > 6.6$  [7].

Все эти и другие существующие методические рекомендации, хотя и заметно усложняют СИД, пока ещё не в состоянии учесть все известные факторы. Например, известно, что молодые микробные клетки имеют большее удельное СИД по сравнению со старыми, что удельное СИД зависит от степени адаптированности почвенной биомассы к легко усваиваемым субстратам [7]. Подобного рода особенности весьма проблематично оценивать и учитывать в большинстве случаев, когда применяется СИД. Поэтому не удивительно, что перспектива нахождения универсального коэффициента пока видится малодостижимой. С практической точки зрения, более реалистичным выглядит нахождение частных перерасчётных коэффициентов, рассчитанных на конкретные экспериментальные условия. Как показала данная работа, в таком случае можно легко обойтись без дополнительных методических ухищрений, ограничиваясь только стандартизацией почвенного образца перед анализом. Необходимость корректировки коэффициента СИД для каждой новых экспериментальных конфигураций, безусловно, делает метод излишним, когда требуются единичные оценки. Но в случаях с многократными замерами (мониторинг), его преимущества становятся бесспорными.

*Автор выражает благодарность академику АНМ Андрею Фёдоровичу Урсу за помощь в локализации основных типов и подтипов зональных почв Молдовы.*



### Список литературы:

1. *Ananyeva N.D., Susyan E.A., Chernova O.V., Wirth S.* Microbial respiration of soils from different climatic regions of European Russia // *Europ. J. of Soil Biol.* 2008. V. 44. P. 147-157.
2. *Anderson J.P.E., Domsch K.H.* A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil // *Soil Biol. & Bioch.* 1978. V. 10. P. 215-221.
3. *Anderson T.-H., Joergensen R.G.* Relationship between SIR and FE estimates of microbial biomass C in deciduous forest soils at different pH // *Soil Biol. & Bioch.* 1997. V. 29. P. 1033-1042.
4. *Blagodatsky S.A., Heinemeyer O., Richter J.* Estimating the active and total soil microbial biomass by kinetic respiration analysis // *Biol. Fertil. Soils.* 2000. V. 32. P. 73-81.
5. *Hintze T., Gehlen P., Schröder D.* Are microbial biomass estimations equally valid with arable soils and forest soils? // *Soil Biol. & Bioch.* 1994. V. 26. P. 1207-1211.
6. *Kalembasa, S.J. & Jenkinson, D.S.* A comparative study of titrimetric and gravimetric methods for the determination of organic carbon in soil // *J. Sci. Food Agric.* 1973. V. 24. P. 1085-1090.
7. *Laboratory Manual of the Soil Microbial Biomass Group / Comp. by Grace C., Hart M., Brookes P.C.* Rothamsted: Rothamsted Research, 2006. 65 p.
8. *Lin Q., Brookes P.C.* Comparison of methods to measure microbial biomass in unamended, ryegrass-amended and fumigated soils // *Soil Biol. & Bioch.* 1996. V. 28. P. 933-939.
9. *Lin Q., Brookes P.C.* An evaluation of the substrate-induced respiration method // *Soil Biol. & Bioch.* 1999. V. 31. P. 1969-1983.
10. *Lin Q., Brookes P.C.* Arginine ammonification as a method to estimate soil microbial biomass and microbial community structure // *Soil Biol. & Bioch.* 1999. V. 31. P.1985-1997.
11. *Lin Q., Brookes P.C.* Comparison of substrate induced respiration, selective inhibition and bio-volume measurements of microbial biomass and its community structure in unamended, ryegrass-amended, fumigated and pesticide-treated soils // *Soil Biol. & Bioch.* 1999. V. 31. P. 1999-2014.
12. *Martens R.* Current methods for measuring microbial biomass C in soil: potentials and limitations // *Biol. Fertil. Soils.* 1995. V. 19. P. 87-99.
13. *Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S.* An extraction method for measuring soil microbial biomass C // *Soil Biol. & Bioch.* 1987. V. 19. P. 703-707.
14. *West A.W. & Sparling G.P.* Modifications to the substrate-induced respiration method to permit measurement of microbial biomass in soils of differing water contents // *J. of Microb. Method.* 1986. V. 5. P. 177-189.
15. *Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Звягинцева Д.Г. М.: Изд-во МГУ.*