

A talaj katabolikus aktivitás mintázatának elemzése mikrorespirációs (MicroResp™) módszerrel

¹*SZILI-KOVÁCS Tibor, ^{1,2}MUCSI Márton, ¹FÜZY Anna, ¹TAKÁCS Tünde,
²K. BORSODI Andrea

¹HUN-REN ATK, Talajtani Intézet, Budapest, Magyarország;
²Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológiai Intézet, Mikrobiológiai Tanszék,
Budapest, Magyarország

(Beérkezett: 2023.09.27.; Elfogadva: 2023.11.27.)
(Online megjelent: 2023.12.05.)

Szemle
© Szerző(k) 2023



Összefoglalás

A talaj mikrobiális közösségének funkcionális diverzitása a talaj ökoszisztéma szolgáltatások jelentős részéhez hozzájárul, sok esetben meghatározó jelentőségű. Többféle kísérleti és elméleti megközelítés közül a katabolikus aktivitás-mintázat mikrorespirációs – MicroResp™ – módszerrel történő megközelítését mutatjuk be. A módszer a régebből ismert szubsztrát-indukált respiráció több-szubsztrátos, mikrotiter lemez alapú kiterjesztése, amivel a talaj mikroba-közösség *in-situ* közösségi-szintű fiziológiai mintázata határozható meg. Mivel az egyes mikroorganizmusok szubsztrát-hasznosítása eltérő, a mikroba-közösség aktuális összetételétől, abundanciájától függően változó a szubsztrát hasznosítási mintázat egy-egy talajminta esetében. Az alkalmazott szubsztrátok köre tetszőleges, rendszerint egyszerű cukrok, aminosavak, aminok, karbonsavak. A módszer gyors, érzékeny, megbízható, ezért alkalmazása tervezett kísérletekben és talajmonitoring programokban egyaránt javasolható.

Kulcsszavak: funkcionális diverzitás, talajlégzés, szubsztrát-indukált respiráció, talaj mikroorganizmus

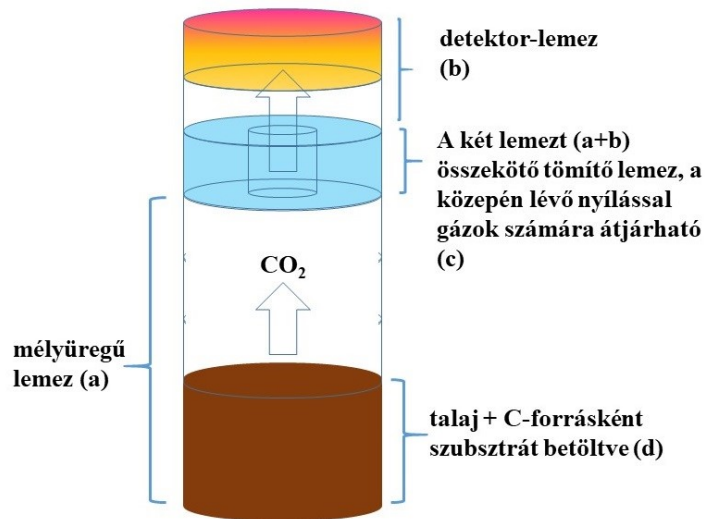
Bevezetés

A talaj mikrobiális közösségek taxonómiai sokféleségének megismerése mellett a funkcionális diverzitás elemzése is fontos. Ez a kettő azért válhat szét, mivel a talajból kimutatható taxonok jelentős része nem aktív és nagy mennyiségben kimutathatóak a holt, csak DNS fragmentumokban létező mikroorganizmusok is, ezért inkább a funkcionális, mint a taxonómiai sokféleség biztosíthat nagyobb

*Levelező szerző: SZILI-KOVÁCS TIBOR, HUN-REN ATK, Talajtani Intézet, 1022 Budapest, Herman Ottó út 15.
E-mail: szili-kovacs.tibor@hun-ren.atk.hu

betekintést a mikrobák ökoszisztémákban betöltött szerepébe” (ZAK et al., 1994). Ugyanakkor, azonos anyagcsere képességekkel taxonómiailag nagyon eltérő csoportok képviselői is rendelkezhetnek. A talaj heterotróf mikrobiális közösség funkcionális diverzitásának jellemzésére GARLAND és MILLS (1991) a dehidrogenáz enzimaktivitáson alapuló módszert dolgozott ki a kereskedelmi forgalomban kapható, szénforrás hasznosításhoz gyártott lemezekre. Ezt a módszert mikroorganizmus izolátumok szubsztrát-hasznosításának azonosítására alkalmazták korábban, elsősorban klinikai szempontból fontos baktériumok esetében. A steril Biolog GN (Biolog, Inc.) mikrotiter lemezeken rendszerint 96 csövecske található, melyek közül 95 eltérő szénforrást tartalmaz, 1 pedig szénforrás nélküli kontroll. A csövecskékben TTC (trifenil-tetrazólium-klorid) redox indikátor is van, ami a dehidrogenáz enzimek hatására vörös színű trifenil-formazánná alakul és a színreakció spektrofotometriás mérése alapján történik a mikrobiológiai aktivitás, illetve az enzimaktivitás kiértékelése. A talajok funkcionális diverzitását a Biolog® mikrotiter lemezekkel úgy határozzák meg, hogy azokat talajszuszpenzióval beoltják és 24–96 óra inkubáció után, a TTC reakció alapján az adott talaj szubsztrát hasznosítási aktivitás mintázatát határozzák meg. A Biolog-teszt egyszerűsége és gyorsasága miatt keltette fel a talaj mikrobiális ökológiával foglalkozók figyelmét, azonban számos kritika is megfogalmazódott az alkalmazhatóságát illetően. Az egyik ilyen az inokulum sűrűség volt, amit standardizálni kell a különböző minták összehasonlíthatóságának érdekében. További probléma, hogy a kiértékeléshez több időpontban történő abszorbancia leolvasás, és az ezekből nyert görbék elemzése szükséges. A lemezeken egy szubsztrát csak egyszer szerepel, ami bizonytalanná teheti az értékelést, továbbá a szubsztrátok köre nem feltétlenül tükrözi az ökológiai szempontból fontos szubsztrátokat (INSAM & GOBERNA, 2004). Az eredetileg használt Biolog GN lemezek használata helyett ezért a továbbfejlesztett Biolog EcoPlate™ lemezek használata ajánlott, ami 31 szubsztrátot plusz egy szubsztrát nélküli kontrollt tartalmaz 3 ismétlésben (INSAM, 1997). A Biolog EcoPlate™ elsősorban olyan szubsztrátokat tartalmaz, amelyek a növények gyökérexudátumában fordulnak elő (CAMPBELL et al., 1997), továbbá erős diszkriminációs képességgel rendelkeznek a különböző mikrobiális közösségek között (HITZL et al., 1997; CAMPBELL et al., 1997). DEGENS és HARRIS (1997) a Biolog-módszerrel történő funkcionális diverzitás meghatározási technikával (GARLAND & MILLS, 1991; ZAK et al., 1994) kapcsolatban azzal a kritikával élt, hogy a hosszú inkubációs idő alatt a lemezeken mikrobiális növekedés megy végbe, ami ráadásul szelektív is a táptalajokon történő tenyésztéshez hasonló módon és így a mérés során nem az aktuális, hanem a potenciális aktivitás mintázatot kapják meg. Figyelembe véve, hogy a hagyományos táptalajokon a mikrobiális közösségnek legfeljebb 1 %-a tenyészhető ki (FÆGRI et al., 1977), feltehetően a Biolog EcoPlate™ lemezeken is hasonló mértékű szelekció lehet, így az aktivitás mintázat is erősen szelektált módon jelenhet meg. DEGENS és HARRIS (1997) ezért egy új módszert javasolt, ami a szubsztrát indukált respiráció (SIR) WEST és SPARLING (1986) által kidolgozott technikáján alapul. Ebben a glükóz mellett még számos egyszerű szénforrást alkalmaztak, és a rövid idejű (4 óra) inkubáció során kapott respirációs válaszból, amelyet gázkromatográffal mértek, az egyes talajok katabolikus-aktivitás mintázatát

határozták meg (SZILI-KOVÁCS, 2004). A Biolog® módszerrel ellentétben a DEGENS és HARRIS (1997) által ismertett eljárásban az inkubációs idő rövid ahhoz, hogy jelentős mikrobiális növekedés menjen végbe, ezért ezzel az eljárással ténylegesen az aktuális aktivitás mintázatról nyerhetünk információt.



1. ábra

A talaj katabolikus aktivitás-mintázat vizsgálatához alkalmazott MicroResp™ módszer sematikus képe

Alul a mélyüregű lemez (deepwell plate) a betöltött talajjal és a hozzáadott szubsztráttal. Középen az elválasztó és egyben összekötő szilikon lapka (világoskék), ami hermetikus zárást biztosít, de a közepén lévő nyíláson keresztül átjárható. Legfelül a detektor lemez, ami szorosan illeszkedik a mélyüregű lemez tetejére, ez tartalmazza a pH indikátor krezolvöröst.

DEGENS és HARRIS (1997) kezdetben 83 szubsztrátot próbált ki a módszerfejlesztés során, de ezek számát később jelentősen csökkentették (36-ra, majd 25-re). Ezek a szubsztrátok a szénhidrátok, alkoholok, aminosavak, aminok, amidok, aromás vegyületek, karboxilsavak csoportjába tartoztak. A több szubsztrátos respirációs módszer mikrotiter-lemez alapú technikájának kidolgozásával CAMPBELL munkatársaival (2003) továbbfejlesztette és így rendkívül hatékonyá tette azt. Az eljárásban a mélyüregű polipropilén lemezekben lévő talajból a szubsztrát hozzáadása után képződött CO_2 a vele szemben elhelyezkedő detektor lemez agaros közegében elnyelődik. Az elnyelődött CO_2 a detektor lemezben lévő krezolvörös pH indikátor színváltozását idézi elő, amit fotométerrel egyszerűen lehet detektálni a krezolvörös 572 nm elnyelési maximumán (1. ábra). LALOR és munkatársai (2007) összehasonlítva DEGENS és HARRIS (1997) módszerét a mikrorespirációs módszerrel (CAMPBELL et al., 2003) megállapították, hogy ugyanazon minták esetében ez utóbbi módszer sokkal jobban elkülönítette egymástól a különböző mintákat. Azonban itt meg kell jegyezni, hogy LALOR munkatársaival (2007) – DEGENS és HARRIS (1997)

módszerét követve – a talajból szuszpenziót hozott létre szubsztrátoldat hozzáadásával, ezzel kiküszöbölve a vizsgálatok során a talajok eltérő nedvességállapotából adódó hatást. Ugyanakkor véleményünk szerint ez nem tekinthető optimálisnak a mikroorganizmusok számára a limitált oxigén hozzáférés miatt, ellentétben a CAMPBELL és munkatársai (2003) által alkalmazott módszerrel.

A mikrorespirációs módszer rövid leírása

A mikrorespirációs módszer részletes ismertetése meghaladná a jelenlegi terjedelmi korlátokat, másrészt az részben megtalálható az eredeti cikkben (CAMPBELL et al., 2003), illetve minden részletre kiterjedően a MicroResp™ honlapon (www.microresp.com) megrendelhető, a gyártó által forgalmazott technikai ismertetőben. A módszer kivitelezésének lépései a következők: 1. talajminta előkészítése; 2. detektor lemezek elkészítése; 3. szubsztrát oldatok elkészítése; 4. talajminták betöltése a mélyüregű lemezekbe (2. ábra); 5. a mérés technikája (3. ábra) és 6. az eredmények értékelése.

Talajminta előkészítése

Először ellenőrizzük a talaj nedvességtartalmát, ha ez megfelelő, akkor a többi módszerhez hasonlóan a talajmintákat 2,0 mm-es rozsdamentes acélszítán átszítálgjuk, a mintából eltávolítjuk a növényi maradványokat és a köveket. Annak érdekében, hogy az átszított talaj nedvességtartalmát is meghatározzuk, célszerű 60 g szitált talajt félretenni a vizsgálatokhoz. A vizsgálatok kezdetéig, ajánlottan legfeljebb 1 hónapig a talajmintákat hűtőszekrényben, átlagosan 4 °C körüli hőmérsékleten kell tárolni. A mikrorespirációhoz használt talaj nedvességtartalmát megfelelően be kell állítani, azért, hogy ne legyen se túl száraz, se túl nedves. Az eredeti módszerleírás a talaj maximális víztartó-képességének 30–60% közötti nedvességre történő beállítását javasolja. A talajmikrobiológiában elfogadott, hogy a szabadföldi vízkapacitás körüli nedvesség tartalom (pF ~ 2,5) a legkedvezőbb a mikrobiális aktivitás számára, ezért ha ismerjük ezt, akkor célszerű ehhez állítani a nedvességtartalmat. A talajnedvesség beállítása után 3–5-napos előinkubáció beiktatása szükséges a mérés előtt 25 °C-on zárt edényben, nedves papírtörkövel kibélelve a talajnedvesség megőrzése érdekében, továbbá egy főzőpohár szódamésszel (Ca(OH)₂, NaOH), a keletkezett CO₂ megkötésére.

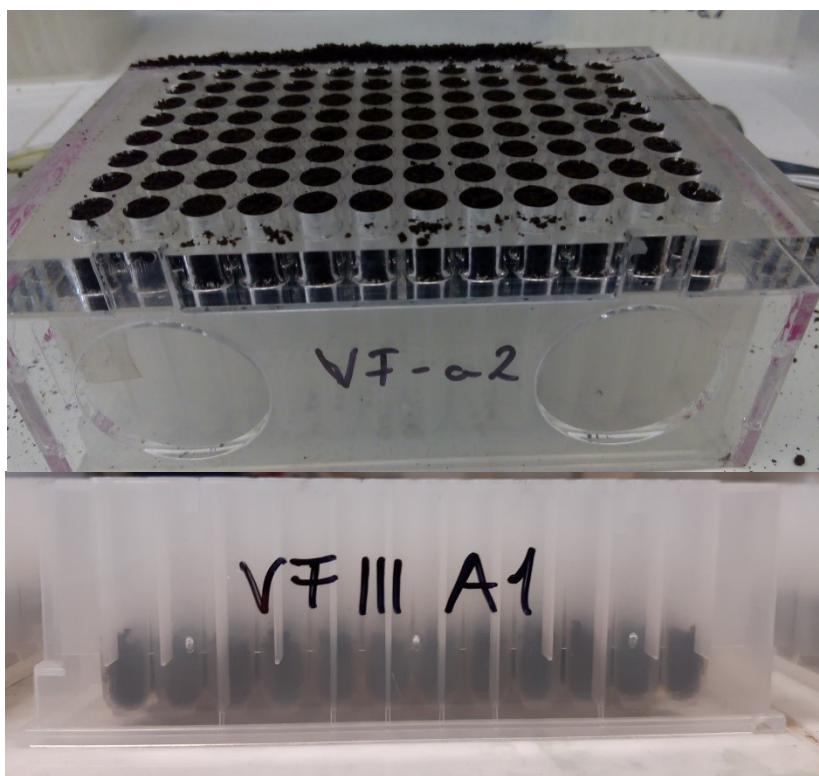
Detektorlemezek elkészítése

A detektorlemezek elkészítése jó kézügyességet igényel. Külön kell elkészíteni a krezolvörös indikátort tartalmazó oldatot, ami krezolvörös indikátort, kálium-kloridot és nátrium-hidrogénkarbonátot tartalmaz, és külön a 3%-os agar oldatot. A frissen elkészített 3%-os 100 cm³ agar oldatot autoklávban vagy mikrohullámú sütőben felmelegítünk, míg teljesen fel nem oldódik az agar. Az agar oldatot és a krezolvörös indikátoros oldatot (200 cm³), 60 °C-os rázóvízfürdőbe helyezzük. Miután felvették a 60 °C hőmérsékletet, összeöntjük őket és 8-csatornás, 1200 µl-es pipettával 150 µl adagokban a mikrotiter lemezekre adagoljuk. Az agar megszilárdulását követően a lemezeket lefedjük parafilmmel és jól záródó

tárolódobozba helyezzük, amelybe egy-egy főzőpohárban vizet, illetve szódamészet is elhelyezünk a lemezek mellé. Az így elkészített detektorlemezek többször újra használhatók és hosszú ideig tárolhatók.

A szubsztrát-oldatok elkészítése

Viszonylag időigényes a szubsztrát-oldatok elkészítése, ezért célszerű egyszerre nagyobb mennyiséget készíteni, ami több mérésorozatra elegendő, és ezeket kisebb adagokban lefagyaszttva tárolni. A szubsztrátok kiválasztásának szempontja a vízben való oldhatóság és a természetben, főleg a gyökérexudátumokban való előfordulás. Emellett célszerű a szakirodalomban mások által is használt szubsztrátok előnyben részesítése, az összehasonlíthatóság miatt. A mérések során a 15 vagy 23 eltérő szubsztrát alkalmazása terjedt el. A szubsztrát-oldatok pH-ját az aminosavak és szerves savak esetében az elkészítéskor 6,5 és 7,0 közötti értékre kell beállítani 1 mol l⁻¹ koncentrációjú NaOH vagy HCl segítségével.

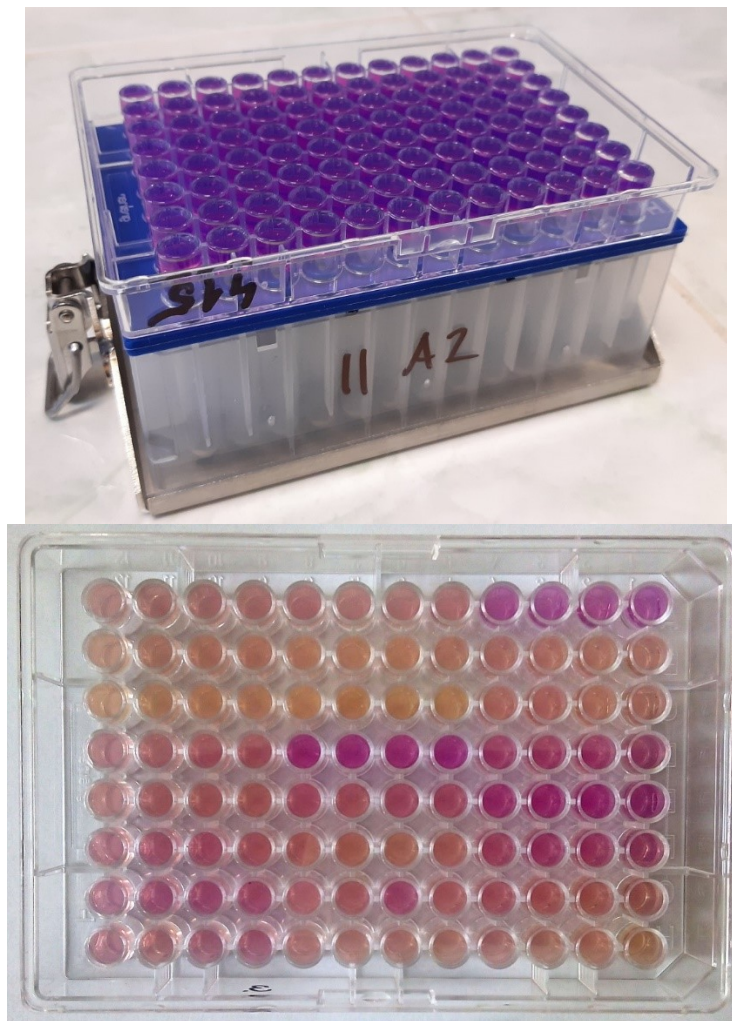


2. ábra

Egy talajminta betöltése a mélyüregű lemezbe (deepwell plate)
Kb. 300 µl minta kerül egy üregbe.

A talajminták betöltése

A talajmintákat egy speciális betöltő eszköz segítségével (MicroResp™ filling device) töltjük a 1,2 cm³ térfogatú polipropilén lemezekbe, az ún. mélyüregű lemezekbe (2. ábra). Mivel a betöltés térfogat alapján történik, ezért szükséges, hogy a minta viszonylag egyenletes szemcseeloszlású legyen és nem szabad tömöríteni a betöltéskor. A betöltés után ellenőrizni kell a talaj mennyiséget mérlegen, ez alapján kiszámíthatjuk az egy csövecskébe jutó átlagos talajtömeget.



3. ábra

Felül a talajmintát tartalmazó mélyüregű lemez, szemben a detektor lemezzel.
Lent egy detektorlemez a 6-órás inkubáció után. A krezolvörös színe az elnyelt CO₂ általi pH változás miatt a kezdeti lilától halványsárga szín irányába tolódik.

A mérés technikája

A mérés napján, vagy egy nappal előtte vegyük ki a fagyasztóból a szubsztrát-olatokat tartalmazó edényeket és engedjük fel őket szobahőmérsékletűre. A mérés során rendezzük el a talajmintákat tartalmazó polipropilén lemezeket, majd 8-csatornás pipettával adagoljuk ki a szubsztrátokat, és 30–60 perc várakozás után zárjuk le a lemezeket. Még a lemezek lezárása előtt olvassuk le a detektorlemezek abszorbancia értékeit fotométer segítségével 570 nm hullámhosszúságon. A lemezek lezárása során helyezzünk a talajokat tartalmazó mélyüregű lemezekre egy szilikon lapkát, amin lyukak vannak az üregek helyén, majd ennek a tetejére pontosan illesszük rá a detektor lemezeket, jól nyomjuk össze és zárjuk le a speciális fémlezárával. A lemezeket inkubáljuk termosztátban 25 °C-on 5 vagy 6 órán keresztül (3. ábra). Ezt követően szedjük szét a lemezeket és ismét mérjük le a detektorlemezek abszorbancia értékeit fotométer segítségével. A szubsztrát kiadagolás utáni várakozási idő azt a célt szolgálja, hogy a karbonátokból képződő CO₂ eltávozzon. Bár az eredeti módszer leírásban hangsúlyozzák, hogy pH < 7,0 talajoknál lehet a módszert fenntartások nélkül alkalmazni, azonban a szubsztrát oldatok pH-jának beállításával és a szubsztrát kiadagolás utáni várakozási idővel a módszer kiterjeszhető pH > 7,0 talajokra is (SZILI-KOVÁCS et al., 2017).

Az eredmények értékelése

Az eredmények értékelésénél több szempontot is figyelembe kell venni. Az egyedi detektorlemezekben belül különbségek vannak már a kiinduláskor is. A kisebb egyenetlenségek kiküszöbölésére a lemez átlagra normalizált abszorbancia értékekkel számolhatunk. Ha egy-egy helyen kiugró értéket kapunk, azt célszerű kihagyni a számításból. Az abszorbancia érték CO₂-ra történő átszámításához kalibrációra van szükség. Az általunk is alkalmazott legegyszerűbb módszer az, hogy eltérő CO₂ koncentrációjú lezárt edényekbe szétszedhető detektorlemez csíkokat helyezünk, ugyanúgy 6 órán keresztül inkubáljuk a lemezeket, majd gázkromatográfival mérjük az edényekben a levegő CO₂ koncentrációját. Az edényekből kivéve mérjük a detektorlemez csíkok abszorbancia értékét fotométerrel. Egy alkalmas görbeillesztő program segítségével megkeressük az abszorbancia és CO₂ koncentráció összefüggését legjobban kifejező egyenletet, és annak paramétereit használjuk a számítások során. A respirációs aktivitás-szintek között eleve jelentős különbségek lehetnek mintánként, minden szubsztrátra nézve. Mivel minket elsősorban az aktivitások mintázata érdekel, ezért a szubsztrát-indukált respirációs értékeknek az adott mintánál az összes szubsztrát általi respirációnak az átlagára standardizált értékeit hasonlítjuk össze a minták között. Ha van különbség az eltérő kezelések vagy eltérő talajminta típusok között, akkor a következő lépés annak a vizsgálata, hogy milyen környezeti háttér változók okozhatták ezt. Ehhez például redundancia-analízis, kanonikus korrespondencia vagy egyéb eljárás használható. A következő elemzés pedig annak eldöntésére irányulhat, hogy konkrétan mely szubsztrátok hasznosítása felelős a minták közötti szétválásért.

Néhány szakirodalmi példa a mikrorespirációs módszer alkalmazására

A módszer alkalmazásával különböző talajtípusokat, talaj használati módokat, művelési módokat vagy különböző kezeléseket hasonlítottak össze. Az összehasonlítás alapja lehet valamelyik alfa-diverzitás index csoportba tartozó mutató, például a kumulatív szubsztrát indukált respiráció (az összes szubsztrát hasznosításából származó CO₂ képződés összege), a Shannon (BENDING et al., 2004; SAUL-TCHERKAS & STEINBERGER, 2009) és a Simpson indexek (MAGURRAN, 2004) és a katabolikus változatosság ("catabolic versatility", CV) (SHARMA et al., 1998). Az adott mintákra vonatkozó alfa-diverzitás mutatók mellett vagy helyett sok esetben a minták közötti közvetlen összehasonlítást szolgáló béta-diverzitás jellegű összehasonlítás, például főkoordináta analízissel eredményesebb lehet.

A módszer alkalmazásában azonos talajtípuson belül eltérő talajhasználati, illetve művelésű területek között azt tapasztalták (DEGENS et al., 2000), hogy az intenzívebb talajhasználat (kukorica, gabona, kertészeti hasznosítás) mellett a talaj katabolikus egyenletessége („evenness”) kisebb (16,4–19,6), mint a legelő művelésű és az eredeti növényzettel fedett talajokban (19,7–23,6). A vetésforgó talajának katabolikus egyenletesség értéke a kettő között helyezkedett el (17,7–20,5). Számos vizsgálat szerint a talaj megnövekedett szervesanyag-tartalma fokozta a katabolikus egyenletességet az eltérő földhasználat miatt, például a rét és a szántóföld összehasonlításában, vagy szerves trágya alkalmazása esetén (BRACKIN et al., 2013; DEGENS et al., 2000; SRADNICK et al., 2013; GAZDAG et al., 2019). Eltérő növénytársulásokat vizsgálva ANDRUSCHKEWITSCH és munkatársai (2014) a katabolikus egyenletességben nem tudtak szignifikáns különbséget kimutatni, amit azzal magyaráztak, hogy a vizsgált talajok szervesanyag-tartalmában sem volt jelentős különbség.

A mikrobiális közösség katabolikus aktivitás mintázata szignifikáns eltérést mutatott három eltérő növényfaj alól vett talajminta között egy vegyes állományú tölgyesben (KOURTEV et al., 2002), jelezve, hogy különböző növények hatására alapvető változások következhetnek be a talaj mikrobiális közösségben. Ezzel szemben ANDRUSCHKEWITSCH és munkatársai (2014) az eltérő vegetáció hatására nem állapítottak meg különbséget a katabolikus aktivitás mintázatban, viszont a talaj pH erős hatását egyértelműen igazolták a mintaterületek között. PIGNATARO és munkatársai (2012) az erdőirtás hatását vizsgálták egy olaszországi tölgyesben, és megállapították, hogy az erdőirtott terület talajának megnövekedett az enzimaktivitása, a szubsztrát hasznosítási potenciálja a kontrollhoz képest. Vizsgálataikban párhuzamosan alkalmazták a Biolog EcoPlate™ és MicroResp™ módszert, megállapítva, hogy ez utóbbi hatékonyabb a kezelések közötti különbségek elkülönítésére.

Azonos talajtípus esetén az alacsonyabb katabolikus diverzitással jellemzett szántóföldi talaj különböző stressz hatásokkal (kiszáritás-nedvesítés, fagyasztás-felolvasztás ciklusok, pH-csökkentés, só- és Cu-kezelés) szembeni rezisztenciája kisebb volt, mint a nagyobb katabolikus diverzitású legelő talajé (DEGENS et al., 2001). Bányászott homokdűnék rehabilitációja (GRAHAM & HAYNES, 2004) során a természetes erdő, a fenyőültetvény a 0 és 10 éves rehabilitált terület talajának

mikrobiális közösség katabolikus diverzitása szignifikánsan elkülönült egymástól 36 szubsztrát respirációs mintázata alapján. A természetes erdő és a 25 éves rehabilitált terület katabolikus diverzitása volt a legnagyobb. A talajszennyezés hatását eddig kevés tanulmány vizsgálta a katabolikus aktivitás-mintázatra nézve. LEMMEL és munkatársai (2019) vizsgálatai szerint a PAH (policiklikus aromás szénhidrogén) szennyezés nem okozott változást a funkcionális diverzitásban, viszont a fémszennyezés (Zn, Pb, Cd) olyan mikrobiális közösséget szelektált, aminek a metabolikus funkcionális diverzitása lecsökkent Biolog EcoPlate™ módszerrel nézve, de a cinkkel szemben nagyobb toleranciát mutatott. MicroResp™ módszerrel a funkcionális diverzitásra nem volt szignifikáns hatással sem a PAH, sem a fémszennyezési index.

Az EcoFinders projekt keretében Európában 81 helyről származó talajminta katabolikus aktivitás mintázatát vizsgálták a MicroResp™ módszerrel, összesen 7 szubsztrátot használva, ami kevesebb, mint az általánosan alkalmazott 15 vagy 23 szubsztrát (CREAMER et al., 2016). A talaj tulajdonságok közül a pH, a szerves anyag, az összes nitrogén és a kationcserélő kapacitásnak volt szignifikáns hatása a respirációs mintázatra, ezenkívül a földhasználat tekintetében a gyepterület kontra szántóföld között volt szignifikáns különbség, míg a biogeográfiai zónák hatása nem volt szignifikáns. MOSCATELLI munkatársaival (2018) számos korábbi vizsgálat funkcionális diverzitás adatait elemezve az ún. kvantilis regressziós modellel (QRM) megállapították, hogy az eltérő földhasználati kategóriák közötti különbségek jól elkülöníthetők. Az erdő, mint földhasználati változó, minden esetben pozitív hatással volt a talaj mikrobiális funkcionális diverzitásra. A diverzitás indexek a vizsgálatba bevont talajokra vonatkoztatva sokkal erőteljesebben függtek a talaj pH-tól, mint a szervesanyag-tartalomtól. Ez összhangban van FIERER és JACKSON (2006), LEMANCEAU és munkatársai (2015) valamint ZHALNINA és munkatársai (2014) tanulmányaival, akik arról számoltak be, hogy a mikrobiális diverzitás és fajgazdagság legerősebben a talaj pH-tól függ. Az eltérő sótartalmú és kémhatású szikes talajok katabolikus aktivitás-mintázatuk alapján élesen elkülönültek egymástól (BÁRÁNY et al., 2014; MUCSI et al., 2017). A talaj pH és sótartalom (elektromos vezetőképesség alapján) növekedésével a szubsztrát indukált respiráció valamennyi szubsztrát esetében lecsökkent és a szubsztrát hasznosítási mintázat is szignifikánsan megváltozott (BORSODI et al., 2021).

A talaj biológiai sokféleségének és ökoszisztéma-funkciójának nyomon követésére, monitoringjára javasolták a potenciális indikátorok között a katabolikus aktivitás mintázatot is a MicroResp™ módszer alapján (GRIFFITHS et al., 2016).

Következtetések

A mikrorespirációs (MicroResp™) módszer alkalmazása ígéretesnek tűnik a talaj mikrobiális közösség *in situ* katabolikus aktivitás-mintázatának elemzésére eltérő talajok, különböző művelési módok és egyéb kezelések hatásának kimutatására is. Talaj-monitoring programokban is ajánlható, mivel érzékeny, gyors, a nálunk kialakított gyakorlatban naponta 24 minta vizsgálata is elvégezhető. A vizsgálatok során ügyelni kell a minta-előkészítési protokoll pontos betartására, a

detektorlemezek elkészítésére és tárolására, a szubsztrátok kiválasztására, az oldatok megfelelő elkészítésére, és a korrekt statisztikai kiértékelésre. A talajminták katabolikus aktivitás mintázatát a talaj fizikai és kémiai tulajdonságai közül elsősorban a szervesanyag-tartalom, a pH és a sótartalom befolyásolja, de közvetett módon a növényzet hatása is fontos lehet. Az eltérő földhasználati módok hatására is általában szignifikáns különbség mutatható ki a talajok katabolikus aktivitás-mintázatában.

Köszönetnyilvánítás

Munkánkat az Országos Tudományos Kutatási Alap támogatta (OTKA- K108572).

Irodalom

- ANDRUSCHKEWITSCH, M., WACHENDORF, C., SRADNICK, A., HENSGEN, F., JOERGENSEN, R. G., WACHENDORF, M., 2014. Soil substrate utilization pattern and relation of functional evenness of plant groups and soil microbial community in five low mountain NATURA 2000. *Plant and Soil*. **383**. 275–289.
- BÁRÁNY, Á., SZILI-KOVÁCS, T., KRETT, G., FÜZY, A., MÁRIALIGETI, K., BORSODI, A.K., 2014. Metabolic activity and genetic diversity of microbial communities inhabiting the rhizosphere of halophyton plants. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. **61**. (3) 347–361.
- BORSODI, A.K., MUCSI, M., KRETT, G., SZABÓ, A., FELFÖLDI, T., SZILI-KOVÁCS, T., 2021. Variation in sodic soil bacterial communities associated with different alkali vegetation types. *Microorganisms*. **9**. 1673.
- BENDING, G.D., TURNER, M.K., JONES, J.E., 2004. Interactions between crop residue and soil organic matter quality and the functional diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*. **34**. 1073–1082.
- BRACKIN, R., ROBINSON, N., LAKSHMANAN, P., SCHMIDT, S., 2013. Microbial function in adjacent subtropical forest and agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry*. **57**. 68–77.
- CAMPBELL, C.D., GRAYSTON, S.J., HIRST, D.J., 1997. Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*. **30**. 33–41.
- CAMPBELL, C.D., CHAPMAN, S.J., CAMERON, C.M., DAVIDSON, M.S., POTTS, J.M., 2003. A rapid microtiter plate method to measure carbon dioxide evolved from carbon substrate amendments so as to determine the physiological profiles of soil microbial communities by using whole soil. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**. 3593–3599.
- CREAMER, R.E., STONE, D., BERRY, P., KUIPER, I., 2016. Measuring respiration profiles of soil microbial communities across Europe using MicroResp™ method. *Applied Soil Ecology*. **97**. 36–43.
- DEGENS, B. P., HARRIS, J. A., 1997. Developmet of physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*. **29**. 1309–1320.

- DEGENS, B.P., SCHIPPER, L.A., SPARLING, G.P., VOJVODIC-VUKOVIC M., 2000. Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry*. **32**. 189–196.
- DEGENS, B. P., SCHIPPER, L.A., SPARLING, G.P., DUNCAN, L.C., 2001. Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? *Soil Biology and Biochemistry*. **33**. 1143–1153.
- FÆGRI, A., TORSVIK, L.V., GOKSÖYR, J., 1977. Bacterial and fungal activities in soil: separation of bacteria and fungi by a rapid fractionated centrifugation technique. *Soil Biology and Biochemistry*. **9**. 105–112.
- FIERER, N., JACKSON, R.B., 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *PNAS*. **103**. (3) 626–631.
- GARLAND, J.L., MILLS, A.L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon source utilization. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**. 2351–2359.
- GAZDAG, O., KOVÁCS, R., PARÁDI, I., FÜZY, A., KÖDÖBÖCZ, L., MUCSI, M., INUBUSHI, K., TAKÁCS, T., 2019. Density and diversity of microbial symbionts under organic and conventional agricultural management. *Microbes and Environments*. **34**. 234–243.
- GRAHAM, M.H., HAYNES, R.J., 2004. Organic matter status and the size, activity and metabolic diversity of the soil microflora as indicators of the success of rehabilitation of mined sand dunes. *Biology and Fertility of Soils*. **39**. 429–437.
- GRIFFITHS, B.S., RÖMBKE, J., SCHMELZ, R.M., SCHEFFCZYK, A., FABER, J.H., BLOEM, J., PÉRÈS, G., CLUZEAU, D., CHABBI, A., SUHADOLC, M., SOUSA, J.P., MARTINS DA SILVA, P., CARVALHO, F., MENDES, S., MORAIS, P., FRANCISCO, R., PEREIRA, C., BONKOWSKI, M., GEISEN, S., BARDGETT, R.D., DE VRIES, F.T., BOLGER, T., DIRILGEN, T., SCHMIDT, O., WINDING, A., HENDRIKSEN, N.B., JOHANSEN, A., PHILIPPOT, L., PLASSART, P., BRU, D., THOMSON, B., GRIFFITHS, R.I., BAILEY, M.J., KEITH, A., RUTGERS, M., MULDER, C., HANNULA, S.E., CREAMER, R., STONE, D., 2016. Selecting cost effective and policy-relevant biological indicators for European monitoring of soil biodiversity and ecosystem function. *Ecological Indicators*. **69**. 213–223.
- HITZL, W., RANGGER, A., SHARMA, S., INSAM, H., 1997. Separation power of the 95 substrates of the Biolog system determined in various soils. *FEMS Microbiology Ecology*. **22**. 167–174.
- INSAM, H. 1997. A new set of substrates proposed for community characterization in environmental samples In: INSAM, H, RANGGER, A. (eds.) *Microbial Community*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 259–260.
- INSAM, H., GOBERNA, M., 2004. Use of Biolog® for the Community Level Physiological Profiling (CLPP) of environmental samples. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*, Second Edition. Kluwer Academic Publishers, Alphen aan den Rijn, The Netherlands. pp. 853–860.
- KOURTEV, P. S., EHRENFELD, J.G., HÄGGBLUM, M., 2002. Exotic plant species alter the microbial community structure and function in the soil. *Ecology*. **83**. 3152–3166.

- LALOR, B.M., COOKSON W.R., MURPHY, D.W., 2007. Comparison of two methods that assess soil community level physiological profiles in a forest ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*. **39**. 454–462.
- LEMANCEAU, P., MARON, P.A., MAZURIER, S., MOUGEL, C., PIVATO, B., PLASSART, P., RANJARD, L., REVELLIN, C., TARDY, V., WIPF, D., 2015. Understanding and managing soil biodiversity: a major challenge in agroecology. *Agronomy for Sustainable Development*. **35**. 67–81.
- LEMME, F., MAUNOURY-DANGER, F., FANESI, A. LEYVAL, C., CÉBRON, A., 2019. Soil properties and multi-pollution affect taxonomic and functional bacterial diversity in a range of French soils displaying an anthropisation gradient. *Microbial Ecology*. **77**. 993–1013.
- MAGURRAN, A.E., 2004. *Measuring Biological Diversity*. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- MOSCATELLI, M.C., SECONDI, L., MARABOTTINI, R., PAPP, R., STAZI, S.R., MANIA, E., MARINARI, S., 2018. Assessment of soil microbial functional diversity: land use and soil properties affect CLPP-MicroResp and enzymes responses. *Pedobiologia – Journal of Soil Ecology*. **66**. 36–42.
- MUCSI, M., CSONTOS, P., BORSODI, A., KRETT, G., GAZDAG, O., SZILI-KOVÁCS, T., 2017. A mikrorespirációs (MicroResp™) módszer alkalmazása apajpusztai szikes talajok mikrobaközösségeinek katabolikus aktivitás mintázatának vizsgálatára. *Agrokémia és Talajtan*, **66**. 165–179.
- PIGNATARO, A., MOSCATELLI, M.C., MOCALI, S., GREGO, S., BENEDETTI, A., 2012. Assessment of soil microbial functional diversity in a coppiced forest system. *Applied Soil Ecology*. **62**. 115–123.
- SAUL-TCHERKAS, V., STEINBERGER, Y., 2009. Substrate utilization patterns of desert soil microbial communities in response to xeric and mesic conditions. *Soil Biology and Biochemistry*. **41**. 1882–1893.
- SHARMA, S., RANGGER, A., VON LÜTZOW, M., INSAM, H., 1998. Functional diversity of soil bacterial communities increases after maize litter amendment. *European Journal of Soil Biology*. **34**. 53–60.
- SRADNICK, A., MURUGAN, R., OLTMANN, M., RAUPP, J., JOERGENSEN, R.G., 2013. Changes in functional diversity of the soil microbial community in a heterogeneous sandy soil after long-term fertilization with cattle manure and mineral fertilizer. *Applied Soil Ecology*. **63**. 23–28.
- SZILI-KOVÁCS, T., 2004. Szubsztrát indukált respiráció a talajban. *Agrokémia és Talajtan*. **53**. 195–214.
- SZILI-KOVÁCS, T., BÁRÁNY, Á., FÜZY, A., TAKÁCS, T., KRETT, G., KOVÁCS, R., BORSODI, A., 2017. Mikrobiális anyagcsere aktivitás-mintázat és mikorrhiza gomba kolonizáció elemzése három szikes tó melletti talaj rizoszférában. *Agrokémia és Talajtan*. **66**. 149–164.
- WEST, A.W., SPARLING, G.P., 1986. Modifications to the substrate-induced respiration method to permit measurement of microbial biomass in soils of different water contents. *Journal of Microbiological Methods*. **5**. 177–189.

- ZAK, J.C., WILLIG, M.R., MOORHEAD, D.L., WILDMAN, H.G., 1994. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry*. **26**. 1101–1108.
- ZHALNINA, K., DIAS, R., DE QUADROS, P.D., DAVIS-RICHARDSON, A., CAMARGO, F.A.O., CLARK, I.M., MCGRATH, S., HIRSCH, P.R., TRIPLETT, E.W., 2014. Soil pH determines microbial diversity and composition in the park grass experiment. *Microbial Ecology*. **69**. 395–406.

Analysis of soil catabolic activity patterns by micro-respiration (MicroResp™)

^{1*}Tibor SZILI-KOVÁCS, ^{1,2}Márton MUCSI, ¹Anna FÜZY ¹Tünde TAKÁCS,
²Andrea K. BORSODI

¹Institute for Soil Sciences, HUN-REN CAR, Budapest, Hungary;

²Department of Microbiology, Biological Institute, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary

Summary

Functional diversity of the soil microbial community participates in most of the soil ecosystem services, often they have an essential role. From the many theoretical and experimental approaches, the catabolic activity pattern based on MicroResp™ technique is shown here. The method is the extension of the old-fashioned substrate induced respiration method to the microplate based multi-substrate induced respiration detection, allowing *in situ* community level physiological pattern of the soil microbial community. As the substrate utilization of the individual microbes may differ, the substrate utilization pattern of the sample depends on the actual composition and abundance of the soil microbial community. Substrates used in this method can be variable, mainly simple sugars, amino acids, amines or carboxylic acids are applied. The microrespiration method is fast, sensitive and reliable, therefore it is recommended to use in planned experiments and in soil monitoring programs as well.

Keywords: functional diversity, soil respiration, substrate induced respiration, soil microorganisms

Tables and figures

Figure 1. Schematic diagram of the MicroResp™ method for soil catabolic activity pattern analysis. Below, one well of the deepwell plate (a) with the loaded soil and added substrate (d). In the middle is the separating and connecting MicroResp™ seal mat (c), which provides a hermetic seal but is permeable through the opening in the centre. At the top is the detector plate containing cresolred pH indicator (b), which fits tightly on top of the deepwell plate.

Figure 2. One soil sample is loaded into the deepwell plate, approximately 300 µl of sample per well.

Figure 3. Above, the deepwell plate containing the soil sample, facing the detector plate. Below, a detector plate after 6 hours of incubation. The cresol red color shifts from the initial purple to pale yellow due to the pH change caused by the absorbed CO₂.

Összeférhetlenségi nyilatkozat

Az első szerző, Szili-Kovács Tibor a szerkesztőbizottság tagja. A kéziratot a bizottság egy másik tagja kezelte, ő a bírálat folyamatában semmilyen formában nem vett részt.

Open Access nyilatkozat: A cikk a Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) feltételei szerint publikált Open Access közlemény, melynek szellemében a cikk bármilyen médiumban szabadon felhasználható, megosztható és újraközölhető, feltéve, hogy az eredeti szerző és a közlés helye, illetve a CC License linkje és az esetlegesen végrehajtott módosítások feltüntetésre kerülnek. (SID_1)
