———— ОБЗОРЫ ——

# ОБЗОР МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОБНОЙ ПРОДУКЦИИ И ЭМИССИИ МЕТАНА В ПОЧВАХ

© 2021 г. М. В. Глаголев<sup>*a*, *b*, *c*, *d*, \*, О. Р. Коцюрбенко<sup>*b*</sup>, А. Ф. Сабреков<sup>*b*, *c*</sup>, Ю. В. Литти<sup>*e*</sup>, И. Е. Терентьева<sup>*c*</sup></sup>

<sup>а</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия <sup>b</sup>Югорский государственный университет, Ханты-Мансийск, 628011 Россия <sup>c</sup>Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, 119071 Россия <sup>d</sup>Институт лесоведения РАН, Успенское, Московская обл., 143030, Россия <sup>e</sup>ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия \*e-mail: m\_glagolev@mail.ru Поступила в редакцию 13.05.2020 г.

После доработки 16.07.2020 г. Принята к публикации 07.08.2020 г.

Метан — важный парниковый газ, климатический эффект которого невозможно долгосрочно прогнозировать без знания распределения наземных источников его поступления в атмосферу. Цель работы — дать обзор широко используемых в настоящее время методов измерения микробной продукции и эмиссии метана в почвах. Предложена классификация методов измерения продукции метана в почвах, основанная на фундаментальных физических принципах и математических схемах обработки данных для каждого метода измерений. В лабораторных условиях пролукция метана определяется методами инкубации образцов почвы и послойно-балансовым методом, которые позволяют исследовать метаногенный потенциал сообщества для последующего моделирования микробных процессов, но не могут быть напрямую экстраполированы на природную экосистему. Для определения пролукции в полевых условиях применяются почвенно-гралиентные метолы, а также полевая модификация послойно-балансового метода, разработанная для болотных почв. Описаны методы измерения эмиссии метана, их преимущества и ограничения для разных почвенных систем. Традиционные камерные методы до сих пор популярны благодаря простоте использования. Их применение, однако, имеет ряд ограничений: при использовании камеры происходит изменение естественных условий, работа возможна в небольших пространственных масштабах, существуют проблемы при установке камеры в некоторых экосистемах. Этих недостатков лишены более современные микрометеорологические методы, позволяющие получить репрезентативную оценку эмиссии на масштабе биогеоценоза, даже если выделение газа неоднородно в пространстве и во времени. Для определения эмиссии из специфических объектов (полигонов ТБО, животноводческих хозяйств), а также на очень большом пространственном масштабе (региональном и даже глобальном) используется "метод обратной задачи".

Ключевые слова: метаногенез, потенциальная продукция метана, эмиссия метана, камерный метод, микрометеорологические методы, метод обратной задачи **DOI:** 10.31857/S0026365621010055

Метан — один из важных парниковых газов, влияющих на тепловой баланс в климатической системе Земли (Alm et al., 1999). От 70 до 90% атмосферного метана образуется в результате микробных процессов (Ehhalt et al., 1978; Кондратьев и соавт., 2003; Каллистова и соавт., 2017; Kotsyurbenko et al., 2020). До открытия аэробного метаногенеза считалось, что метан образуется исключительно в результате жизнедеятельности метаногенных архей, являясь при этом конечным продуктом анаэробного разложения органического вещества в метаногенном микробном сообществе. В настоящее время доказано, что метан может также образовываться в аэробных условиях при разложении полисахаридных эфиров метилфосфоновых кислот морскими аэробными гетеротрофными бактериями (Kamat et al., 2013; Repeta et al., 2016). Есть также данные об аэробном образовании метана различными фототрофами и метаногенами (Grossart et al., 2011; Bižić-Ionescu et al., 2018).

Основным источником метана являются анаэробные почвенные экосистемы, в особенности те из них, где отсутствуют или находятся в низкой концентрации соединения (сульфаты, окислы железа и т.д.), служащие акцепторами электронов конкурентным для метаногенов микробным группам. Среди таких экосистем следует в первую очередь назвать увлажненные и заболоченные почвы, в том числе расположенные в условиях умеренного и холодного климата (Haas-Laursen et al., 1996; Waddington et al., 1996; Кондратьев и соавт., 2003; Etiope, 2009). Значительное количество метана образуется при разложении различных антропогенных органических отходов, происходящем на полигонах их захоронения (Nozhevnikova et al., 1993; Кондратьев и соавт., 2003; Goldsmith et al., 2012; Foster-Wittig et al., 2015). Также среди почвенных источников следует упомянуть заливные рисовые поля (Cicerone, Shetter, 1981; Минько 1988; Schütz et al., 1989; Marik et al., 2002) и грунты вечной мерзлоты (Kobabe et al., 2004; Ganzert et al., 2007). Наконец, в последнее время возрос интерес к продукции метана в почвах заболоченных лесов и лесов, периодически подвергающихся переувлажнению (Aronson et al., 2012; Christiansen et al., 2012; Glagolev et al., 2018), хотя ранее леса в качестве глобального источника метана всерьез не рассматривались.

Особым интересом к вопросам глобального газообмена отмечен период с начала 80-х гг. ХХ в., когда перед мировым научным сообществом встала проблема прогнозирования изменения климата, и были установлены ранее неизвестные особенности влияния газообразных примесей атмосферы на ее радиационный режим. Результаты мониторинга примесей атмосферы свидетельствуют лишь о вторичных изменениях, происходящих в системе планетарного газообмена. Поэтому уже около 40 лет назад стало ясно, что успешное решение проблемы долгосрочного прогнозирования климатического эффекта парниковых газов невозможно без знания распределения их наземных источников (Минько, 1988). При этом очевидно, что решение различных задач требует разных методов измерения, каждый из которых мог бы работать в своем пространственном масштабе, а вся система методов охватывала бы любые масштабы, условно говоря — от болотной кочки до континентов.

Поначалу в полевых условиях лишь локально измеряли суммарный поток  $CH_4$  на поверхности раздела почва/атмосфера простейшим камерным методом, а иногда только концентрацию метана в пресноводных осадках и почвах (Mah et al., 1977; Cicerone, Shetter, 1981; Harriss et al., 1982), и отбирали образцы. Продукцию или потребление  $CH_4$  определяли в лабораторных условиях, помещая эти образцы во флаконы и инкубируя их при определенной температуре с добавлением субстратов, иногда содержащих радиоактивную метку (Zeikus, Winfrey, 1976; Kelley, Chynoweth, 1980; King et al., 1981). В дальнейшем был разработан новый послойно-балансовый метод для изучения процессов газооб-

мена (Минько и соавт., 1987; Орлов и соавт., 1987; Alperin et al., 1988). Этот метод применялся, в частности, для измерения метаногенеза в "мезокосмах" в лабораторных условиях (Минько и соавт., 1987), а также в полевой модификации (в англоязычной литературе для нее было предложено специальное название – "deep soil chamber technique") в экспериментах in situ (Glagolev, 1998; Panikov et al., 2001). В этом методе скорость метаногенеза рассчитывалась из уравнения баланса массы СН<sub>4</sub> в профиле почвы. В литературе существует некоторая неоднозначность в использовании терминов "микрокосм" и "мезокосм" - ср., например, (Федоров, Гильманов, 1980; Гюнтер и соавт., 1982; Одум, 1986; Blodau et al., 2004). В настоящей статье термин "мезокосм" будет использован для обозначения "образца почвы ненарушенного сложения" (Blodau et al., 2004). Термин "микрокосм" будет использован для обозначения искусственной экосистемы, т.е. почвы с нарушенным строением, например, почвы, разбавленной культуральной средой. Для исследования почвенного мезокосма обычно используют контейнер объемом от нескольких литров до нескольких десятков литров, тогда как для создания микрокосмов используются различные емкости для микробного культивирования, как правило, флаконы 20-120 мл.

Целью работы является обзор широко используемых в настоящее время методов измерения микробной продукции и эмиссии метана в почвах, а также оценка эффективности применения этих методов в различных экосистемах.

#### ПРОДУКЦИЯ И ЭМИССИЯ МЕТАНА В ПОЧВЕННЫХ ЭКОСИСТЕМАХ

Основным источником CH<sub>4</sub> в атмосферу являются переувлажненные болота (Tathy et al., 1992; Bridgham et al., 2013; Lohila et al., 2016), в которых за счет обводнения почв создаются анаэробные условия, необходимые для функционирования метаногенного микробного сообщества. В тропической зоне источниками метана являются почвенные системы мангровых лесов, периодически затопляемые морской водой, и другие тропические переувлажненные земли (Torres-Alvarado et al., 2005; Kristiansen, 2007). Эмиссия  $CH_4$  зарегистрирована также из черноземов, в том числе орошаемых или затопляемых под культуру риса (Каспаров и соавт., 1986; Минько и соавт., 1987; Минько, 1988), дерново-подзолистых, глеетаежных, глее-мерзлотных и др. почв, расположенных в зонах бореального климата (Минько, 1988), в частности, почв под заболоченным лесом (Ullah et al., 2009; Lohila et al., 2016; Mochenov et al., 2018), а также в поймах рек (Bartlett et al., 1990; van Huissteden et al., 2005; Belova et al., 2013; Oshkin et al., 2014) и т.п. Метаногенные археи обнаружены практически во всех типах почвенных экосистем, однако эмиссия метана в атмосферу зависит также от активности метанотрофных микроорганизмов, которые, обитая в поверхностных аэрируемых слоях почвы, потребляют CH<sub>4</sub>. Поступление метана в атмосферу результат работы микробного метанового цикла, основными микробными агентами которого как раз и являются метаногены и метанотрофы.

Эмиссия метана из увлажненных почв также зависит от процессов его транспорта из анаэробной зоны к поверхностным слоям. Метан поступает к ним благодаря трем основным механизмам: пузырьковому, диффузионному и через растения. Учет этих механизмов необходим при корректной оценке потоков CH<sub>4</sub> из увлажненных почв (Torres-Alvarado et al., 2005). Дополнительно, увлажненные торфяные почвы характеризуются пространственной структурной неоднородностью, которая затрудняет экстраполяцию значений продукции или эмиссии метана. Сложность оценки продукции и эмиссии CH<sub>4</sub> в почвах полигонов твердых бытовых отходов (ТБО) также связана с гетерогенностью, поскольку ТБО закладываются на полигоны неоднородными слоями. Слои различаются по химическому составу, количеству и биоразлагаемости органического вещества, содержащегося в ТБО. Более того, велика неоднородность и в пределах одного слоя (Nozhevnikova et al., 1993; Каллистова и соавт., 2006; Foster-Wittig et al., 2015; Teрентьева и соавт., 2017).

Актуальность точной оценки продукции и эмиссии метана из различных почвенных экосистем связана с важной экологической ролью этих экосистем и их существенным вкладом в глобальную эмиссию  $CH_4$ . Современные методы определения продукции и эмиссии метана позволяют в той или иной степени учитывать специфические особенности каждой отдельной почвенной экосистемы. В связи с большим разнообразием этих экосистем, а также физико-химических и гидрологических условий, в которых они находятся, существует необходимость классификации имеющихся методов, анализа их применимости, а также нахождения наиболее оптимального метода для каждой из рассматриваемых экосистем.

## ОБЩИЙ ПРИНЦИП КЛАССИФИКАЦИИ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОДУКЦИИ И ЭМИССИИ МЕТАНА

Проблема классификации методов измерения продукции CH<sub>4</sub> в почвенных экосистемах связана с учетом пространственной структуры и физикохимических условий в месте измерения. С самой общей точки зрения определение интенсивности метаногенеза представляет собой известную в физике задачу определения мощности источника массы какого-либо компонента системы, в данном случае массы метана (мощность источника массы определенного компонента — величина массы этого компонента, порождаемая в единице объема в единицу времени (Филиппов, 1986)). Рассмотренное ниже решение этой задачи применительно к почвенным экосистемам легло в основу предлагаемой классификации.

Источником массы какого-либо компонента называют причину изменения массы компонента за счет внутренних процессов, происходящих в веществе, т.е. в отсутствие потоков массы. Потоком массы называют массу, переносимую в единицу времени сквозь заданную поверхность S (следовательно, размерностью потока будет: ед. массы/ед. времени, например, мг/ч). Для характеристики потока через отдельные элементы поверхности вводится понятие об удельном потоке как о потоке через единицу поверхности. Следовательно, размерностью удельного потока будет: ед. массы · (ед. времени)<sup>-1</sup> · (ед. площади)<sup>-1</sup>, например, мг/(ч ·  $M^2$ ). Количественная характеристика действия источника – мощность источника (Филиппов, 1986), определение которой было дано выше. Согласно определению, размерностью мощность источни- $\kappa a$  будет: ед. массы · (ед. времени)<sup>-1</sup> · (ед. объема)<sup>-1</sup>, например,  $M\Gamma/(\Psi \cdot M^3)$ . Очевилно, что физическое понятие "удельный поток" соответствует широко применяемому в экологии понятию "эмиссия", а "мощность источника" – "продукция" или "скорость продукции".

Для  $CH_4$  источниками будут локальные микробные процессы его образования (метаногенез). Иногда от биологов и экологов можно услышать, что также источниками метана будут места его накопления (газогидраты, сипы, нефтегазовые месторождения и т.д), из которых  $CH_4$  может мигрировать на поверхность. Со строгой физической точки зрения это, конечно, не так, поскольку в этом случае в единице объема масса метана не порождается, а лишь перемещается. Действительно, в данный момент времени и в сипе, и в нефтяном месторождении метан уже есть, он там не "порождается" – не образуется (разве что случай газогидрата несколько более сложен).

Источники, характеризуемые отрицательной мощностью, именуются *стоками* (Филиппов, 1986). Для CH<sub>4</sub> стоками будут любые процессы, в которых он поглощается, например, в атмосфере это фотохимические реакции окисления, в почве – биологическое потребление метанотрофными микроорганизмами.

В общем случае в системе (например, в разных ее частях) могут действовать одновременно источники, мощность которых мы обозначим  $p^+$ , и стоки с мощностью  $p^-$ . В этом случае наблюдаемая результирующая мощность источника (p) будет определяться наложением процессов образования и расходования вещества:

$$p = p^{\scriptscriptstyle \top} - p^{\scriptscriptstyle -}. \tag{1}$$

Однако в реальности эта простая схема подчас существенно усложняется. При оттаивании "вечномерзлых" пород, например, может выделяться метан, не локально образованный метаногенами, а накопленный много лет назад под слоем замерзшей почвы. Может выделяться и абиогенный метан. Формально, раз нет образования/распада метана, а есть лишь перемещение уже существовавшего метана, то описание этих процессов должно идти не через мощность источника массы CH<sub>4</sub>, а через его потоки между разными резервуарами. Но феноменологически и в этом случае часто прибегают к описанию именно через источни-ки/стоки.

Специфика совместного действия источников и стоков метана может проявляться, в частности, в том, что в нижних (анаэробных) слоях профиля болотной почвы может происходить образование метана с высокой интенсивностью  $p^+$ , а в верхнем (насыщенном кислородом) слое – окисление метана с интенсивностью  $p^-$ . Если образование метана немного превышает его окисление, то весь профиль почвы будет выглядеть для внешнего наблюдателя как источник метана с небольшой результирующей мощностью, равной ( $p^+ - p^-$ ). Напротив, какой бы большой ни была величина  $p^+$ , но если окисление метана превышает его образование, то весь профиль почвы будет выглядеть для внешнего наблюдателя как источник метана с небольшой результирующей мощностью, равной ( $p^+ - p^-$ ). Напротив, какой бы большой ни была величина  $p^+$ , но если окисление метана превышает его образование, то весь профиль почвы будет выглядеть как сток метана.

Строгой количественной основой определения результирующей мощности источника является то фундаментальное уравнение, в которое она входит. Это — уравнение закона сохранения массы.

Рассмотрим соотношение, являющееся общей формулировкой закона сохранения массы. Принципиально различных (с физической точки зрения) причин изменения концентрации метана в фиксированном объеме ( $V_0$ ) две: во-первых, это поток газа сквозь поверхность S (охватывающую рассматриваемый объем) и, во-вторых, действие источников/стоков газа в рассматриваемом объеме. Запишем это аналитически:

$$\frac{\partial}{\partial t} \int_{V_0} C dV = \int_{V_0} p dV - \int_{S} \mathbf{j} d\mathbf{n}.$$
 (2)

Здесь C — объемная плотность (концентрация); **j** — удельный поток (далее — УП); p — результирующая мощность источника; вектор **dn** по абсолютной величине равен площади элемента поверхности, а направлен по нормали к ней. Воспользуемся теоремой Остроградского для того, чтобы выразить поверхностный интеграл в этой формуле через объемный, и перенесем все члены в левую часть. Получаем (Филиппов, 1986):

$$\frac{\partial}{\partial t} \int_{V_0} C dV - \int_{V_0} p dV + \int_{V_0} \operatorname{div}(\mathbf{j}) dV = 0.$$
(3)

Или, по известному свойству интеграла ("интеграл суммы равен сумме интегралов"):

$$\int_{V_0} \left[ \frac{\partial C}{\partial t} - p + \operatorname{div}(\mathbf{j}) \right] dV = 0.$$
(4)

Ввиду произвольности выделенной поверхности подынтегральное выражение равно нулю (Филиппов, 1986; Ландау, Лифшиц, 1988):

$$\partial C/\partial t + \operatorname{div}(\mathbf{j}) = p.$$
 (5)

Как видим, скорость изменения концентрации газа, его удельный поток и результирующая мощность источника оказались связаны в едином уравнении. Следовательно, на базе такого уравнения можно теоретически построить классификацию методов измерения и продукции, и эмиссии. Практически же факт указанной связи означает, что, зная динамику концентрации, можно по потокам определить продукцию или, наоборот, по продукции – эмиссию.

Подставив выражение (5) в уравнение (1) получаем уравнение для мощности источника:

$$p^{+} = p^{-} + \frac{\partial C}{\partial t} + \operatorname{div}(\mathbf{j}).$$
 (6)

Замкнутая поверхность S разграничивает две области: внутреннюю D и внешнюю  $D_1$  (рис. 1). При постановке задач необходимо оговаривать, для какой из двух областей требуется искать решение. В соответствии с этим различают внутренние и внешние задачи (Арсенин, 1984). Возникает вопрос, как можно во внешней области  $D_1$  определить мощность источника, расположенного во внутренней области *D*? Для области *D*<sub>1</sub> уравнение (6) превратится в  $\partial C/\partial t = -\text{div}(\mathbf{j})$ , поскольку в  $D_1$  нет источников и стоков, т.е.  $p^+ = p^- = 0$ . Однако при постановке полной математической задачи (уравнение и граничные условия) поток на границе S окажется зависящим от  $p^+$  и  $p^-$ . Следовательно, и во внешней задаче мы будем иметь зависимость поля концентрации от мощности источников, а это значит, что мощность можно будет определить по полю концентраций.

В целом, любой экспериментальный метод определения интенсивности образования какого-либо вещества основан на уравнении (6) или непосредственно на уравнении (2), из которого (6) было получено. При этом экспериментально измеряются все члены в правой части уравнения (6) или эксперимент ставится таким образом, чтобы наиболее сложно измеряемые члены этого уравнения оказались равны нулю, тогда останется экспериментально измерить лишь оставшиеся члены.

Рассмотрим пример. Если взять образец небольшого объема, в котором находятся микроор-



Рис. 1. Схема взаимодействия основных параметров, используемых для классификации методов измерения продукции метана.

ганизмы — источники метана (это может быть болотная почва, осадки озер и т.п.), и поместить его в герметично закрытый сосуд, в котором созданы анаэробные условия, то

1.  $p^{-} = 0$  в силу анаэробности,

2. div(**j**) ≈ 0 в силу малого объема (в данном случае "малость" объема сосуда определяется условием div(**j**)  $\ll \partial C/\partial t$ ).

Необходимо отметить, что анаэробное окисление метана как процесс установлено, хотя ни чистых культур, ни биохимии процесса пока не изучено. Показано, что, как правило, для анаэробного окисления метана нужны такие акцепторы электронов как сульфаты (Boetius et al., 2000; Orphan et al., 2001) или нитраты (Raghoebarsing et al., 2006), хотя есть также указания на осуществление процесса обратного метаногенеза (Moran et al., 2005). Вклад анаэробного окисления в эмиссию метана в океанах оценивается в 6-20%. Для наземных экосистем, оценка не проводилась, но, предположительно, вклад пресных систем значительно ниже. С большой вероятностью в олиготрофных болотах этот процесс либо незначителен, либо вообще не происходит, хотя был отмечен для осадков озер (Eller et al., 2005).

Соответственно, мы можем допустить отклонения  $p^-$  от 0, если мы учитываем анаэробное окисление метана для систем, где оно вполне вероятно, хотя это отклонение будет скорее всего очень невелико. Но для болот и заболоченных территорий этим допущением можно пренебречь.

Следовательно, из (6) при допущении отсутствия или пренебрежимо малого анаэробного окисления метана получаем:  $p^+ = \partial C/\partial t$ , т.е. по возрастанию концентрации метана в сосуде можно напрямую судить о потенциальной продукции метана микроорганизмами. Такой метод широко применяется для исследования метаногенеза в различных образцах — водных, почвенных и др. (подробнее данный способ будет изложен в разделе "Определение потенциальной продукции метана "методом инкубации"").

На основании уравнения (6) предложена классификация наиболее распространенных методов определения продукции и эмиссии метана (табл. 1). При этом оказываются реализованными не все логические возможности. Например, нам не известен метод, который был бы основан на решении внешней задачи при  $p^- = 0$ ,  $\partial C/\partial t \neq 0$  и div(j)  $\neq 0$ . Действительно, представить себе такой метод весьма проблематично. Не ясно, каким образом возможно обеспечить отключение метанотрофии ( $p^- = 0$ ), при том, что концентрация метана измеряется в атмо-

Метод	Члены уравнения (5)			2*
	<i>p</i> <sup>-</sup>	$\partial C / \partial t$	div(j)	Задача*
Определение потенциальной продукции "in vitro"	0	≠0	0	Внутренняя
Полевая модификация послойно-балансового метода (DSC-technique)	0	≠0	≠0	Внутренняя
Почвенно-градиентный метод	0 или ≠0**	0	≠0	Внутренняя
Статический камерный метод	≠0	≠0	0	Внешняя
Динамический камерный метод	≠0	0	0	Внешняя
Статический камерный метод с ингибированием	0	≠0	0	Внешняя
Динамический камерный метод с ингибированием	0	0	0	Внешняя
Градиентный метод	≠0	0	≠0	Внешняя
Метод турбулентных пульсаций	≠0	≠0	≠0	Внешняя

Таблица 1. Сравнение различных методов измерения эмиссии и продукции в рамках классификации, основанной на фундаментальном уравнении переноса

\* Здесь во всех случаях уравнение внешней задачи:  $\partial C/\partial t = -\operatorname{div}(\mathbf{j}), p^-$  входит в нижнее граничное условие.

\*\* В зависимости от конкретной реализации у разных авторов – ср. (Alm et al., 1999; Шнырев, 2016; Глаголев и Сабреков, 2016).

сфере (поскольку задача — внешняя), следовательно, речь идет о достаточно большой пространственной области, в которой div( $\mathbf{j}$ )  $\neq 0$ ?

Таким образом, предложенная классификация, основанная на учете фундаментальных физических основ и математических схем обработки данных для каждого метода измерений, позволяет, во-первых, оценить возможность разработки того или иного метода; во-вторых, (при наличии такой возможности) очертить масштабы его применимости; и, в-третьих, оценить свойственные ему принципиальные ограничения.

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКЦИИ МЕТАНА

#### Определение продукции метана в лабораторных условиях

Определение потенциальной продукции метана "методом инкубации". Метод инкубации, основанный на измерении скорости метаногенеза в почвенных образцах, помещенных в герметичные емкости и инкубируемых при определенной температуре в течение определенного времени, хорошо известен и широко используется. Орлов и соавт. (1987) использовали для этого метода названия "имитационный модельный эксперимент" и "метод имитации", но в дальнейшем эта терминология отошла к области вычислительных экспериментов (расчетов по математическим моделям), и при экспериментальном определении продукции метана она не применяется. Термин "потенциальная" продукция метана используется исходя из предположения, что условия в сосуде, содержащем почвенный образец, отличаются от условий in situ.

Для лабораторных инкубационных экспериментов почвенные образцы используют в виде микрокосмов или суспензий. В последнем случае происходит гомогенизация образца после удаления из него крупных частей растительного материала. Важным критерием при подготовке образцов является соотношение твердой и жидкой фазы, которое должно быть максимально близко к соотношению *in situ* (Chin, Conrad, 1995; Kotsyurbenko, Glagolev, 2015). Перед началом основного эксперимента обычно проводят предынкубацию, целью которой является достижение постоянной скорости метаногенеза.

Для определения потенциала отдельной группы метаногенов в образцы вносят различные субстраты метаногенеза, например, ацетат,  $H_2 + CO_2$ , метилированные  $C_1$ -соединения, и анализируют прирост концентрации метана в газовой фазе при инкубации с использованием конкретного субстрата.

При изучении вклада какого-либо конкретного метаболического пути метаногенеза (как правило, водород-зависимого или ацетокластического метаногенеза) в общую продукцию метана используют радиоактивно меченые субстраты (NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>, Na-[2-<sup>14</sup>C] ацетат), которые добавляют в микроколичествах в образец, инкубируют его в течение нескольких часов в условиях in situ, фиксируют и далее определяют концентрацию радиоактивно меченого метана. В процессе жизнедеятельности метаногенов <sup>14</sup>С из субстрата переходит в продукт <sup>14</sup>С-СН<sub>4</sub>. Радиоактивный метан и СО<sub>2</sub> детектируются с помощью счетчика радиоактивности, после чего вклад определенного пути метаногенеза (f) можно определить из данных по общей динамике субстратов и продуктов процесса образования метана и из динамики их радиоактивной составляющей. Например, вклад водородзависимого метаногенеза ( $f_{H_2}$ ) в общий метаногенез вычисляется посредством расчетов удельных скоростей образования CH<sub>4</sub> (SR<sub>CH<sub>4</sub></sub>) и CO<sub>2</sub> (SR<sub>CO<sub>2</sub></sub>) (Conrad et al., 1989; Conrad, Klose, 1999):

$$f_{H_2} = SR_{CH_4} / SR_{CO_2}, \qquad (7)$$

где  $SR_{CH_4} = C_{CH_4}^* / C_{CH_4}$ , а  $SR_{CO_2} = C_{CO_2}^* / C_{CO_2}$  (соотношение концентраций радиоактивных (\*) и нерадиоактивных веществ).

Метод радиоактивно меченых субстратов дает возможность точно определить, в какие продукты превращается вводимый в образец субстрат. Однако если в системе происходят конкурентные микробные процессы, например, автотрофная сульфатредукция или синтрофное разложение ацетата, то конечный результат будет иметь погрешность. Кроме того, лаборатория, в которой проводятся работы с изотопами, должна отвечать всем необходимым требованиям техники безопасности, чтобы исключить любое радиоактивное заражение.

В качестве альтернативного метода определения вклада различных путей метаногенеза в общую продукцию  $CH_4$  используют специфические ингибиторы. Основное распространение получили ингибиторы общего (бромэтансульфонат и хлороформ) и ацетокластического (фторацетат, фторметил, хлорметил) метаногенеза, принцип действия которых основан на конкурентном ингибировании ключевых ферментов метаногенеза.

При добавлении ингибиторов в образец происходит подавление либо общего, либо ацетокластического метаногенеза, что приводит к дисбалансу трофической цепи анаэробного сообщества и накопление в среде промежуточных продуктов метаболизма. Для каждого из таких продуктов известно уравнение его разложения с образованием либо субстратов метаногенов, либо непосредственно молекулы CH<sub>4</sub>. На основе таких уравнений составляется углеродный баланс по потенциальному образованию ацетата и метана из всех промежуточных продуктов, после чего вычисляется вклад ацетокластического метаногенеза в общий метаногенез (Conrad, Klose, 2000).

Метод ингибиторов достаточно прост и может быть проведен посредством обычной инкубации образцов с последующим измерением накопившихся продуктов. Недостатком метода является точность результатов, которая зависит от определенных допущений. Так же как и в методе изотопов погрешности могут возникнуть при прохождении в системе конкурентных микробных процессов, которые не учитываются при вычислениях.

Еще одним методом для оценки скоростей различных путей метаногенеза является метод, в основе которого лежит явление фракционирования стабильных изотопов углерода <sup>13</sup>С и <sup>12</sup>С. В общем виде фактор фракционирования  $\alpha$  для реакции А  $\rightarrow$  В определяется как:

$$\alpha_{A,B} = (\delta^{13}C_A + 1000) / (\delta^{13}C_B + 1000), \qquad (8)$$

где  $\delta^{13}$ C — величина соотношения стабильных изотопов в образце (в промилле, ‰). Фактор фракционирования  $\alpha$  далее используется в уравнениях для вычисления соотношения вкладов различных путей метаногенеза в общую продукцию CH<sub>4</sub> (Conrad, 2005).

Тем не менее, величина  $\delta^{13}$ C-CH<sub>4</sub>, определяющая соотношение стабильных изотопов в молекуле метана также является важным индикатором преобладания различных путей образования метана в системе, причем как биогенных, так и абиогенных. Микробное образование метана идет преимущественно по ацетокластическому пути, если величина  $\delta^{13}$ C-CH<sub>4</sub> имеет значение –60 (‰) и выше, тогда как водород-зависимый метаногенез преобладает при значениях –70 (‰) и ниже. Диапазон значений –60...–70 относится к смешанной области, в которой оба пути метаногенеза могут преобладать или иметь сходный вклад в общий метаногенез (Whiticar, 1999).

Данный метод применяется при исследовании метаногенеза различных наземных экосистем, таких как болота (Galand et al., 2010) и донные отложения озер (Conrad et al., 2020). Основное преимущество метода — возможность получения информации в отношении очень разнообразных путей образования метана. Однако точность метода не всегда дает возможность уверенно делать выводы о вкладе конкретного пути метаногенеза.

Достоверную информацию о соотношении различных путей образования  $CH_4$  в исследуемой системе и оценке их скоростей можно получить при одновременном применении нескольких вышеописанных методов как взаимодополняющих. К сожалению, методика постановки модельных экспериментов "методом инкубации" исключает возможность изучения пространственной составляющей процесса образования газов, тогда как он протекает не просто в почвенной массе, а в почвенном профиле. Характеризуясь низким коэффициентом подобия по отношению к природной обстановке, настоящий метод может рассматриваться лишь как вспомогательный при исследовании функции почв (Орлов и соавт., 1987).

"Послойно-балансовый метод" (в мезокосмах). В послойно-балансовом методе профиль почвы рассматривается как система диффузионно-связанных слоев. Принимается, что скорость изменения концентрации газа в *i*-ом слое складывается из скорости его продукции в этом слое ( $V_i$ ) и скоростей диффузионного обмена с соседними (вышележащим и нижележащим) слоями. Расчетная формула метода может быть записана в виде:

$$V_{i} = m \frac{c_{i} - C_{i}}{\Delta t} + D_{0} \frac{c_{i} + C_{i} - 0.5(c_{i-1} + C_{i-1} + c_{i+1} + C_{i+1})}{h^{2}},$$
(9)

где  $C_{i-1}, C_i, C_{i+1}$  – концентрации газа в соответствующих слоях в некоторый момент времени t;  $c_{i-1}, c_i, c_{i+1}$  – концентрации газа в соответствующих слоях в момент времени  $t + \Delta t$ ;  $D_0 - \kappa o \Rightarrow \phi \phi u$ циент диффузии газа; *h* – мощность слоя (Минько и соавт., 1987; Орлов и соавт., 1987); *m* – пори-Необходимо отметить, что авторы стость. метода пористость вообще не вводили, как бы допуская, что всегда m = 1, а это неприемлемо для подавляющего большинства почв. Кроме того, формула (9) даже с учетом *т* может использоваться только в том случае, когда коэффициенты лиффузии в соселних слоях не сильно различаются.

Эта формула, фактически, представляет собой обращение схемы Кранка—Николсон решения уравнения диффузии. С данной схемой можно ознакомиться в литературе по численным методам (например, Вазов, Форсайт, 1963; Самарский, 1983; Shih, 1984). Очевидно, что с математической точки зрения суть предложенного метода состоит в следующем:

1. Движение газа в профиле почвы описывается уравнением диффузии — оно приведено ниже при изложении работ Глаголева (Glagolev, 1998) и Паникова и соавт. (Panikov et al., 2001) и обозначено (12).

2. Проводится конечно-разностная аппроксимация этого уравнения по схеме Кранка—Николсон (в предположении постоянства коэффициента диффузии во всей толще почвы).

3. Данная схема обращается, т.е. рассчитывается не концентрация газа, а, напротив, по известным концентрациям газа в соседних слоях вычисляется скорость продукции ( $V_i$ ) в каждом слое.

В статье Орлова и соавт. (1987) приведены также особенности практической реализации этого метода (тип и расположение пробоотборников, исходная концентрация субстрата и т.д.).

Ограничением для применения послойно-балансового метода является интенсивный метаногенез, при котором диффузионный механизм не будет успевать отводить метан. В этом случае возникнет пузырьковый (конвективный) перенос газа, который формула (9) не учитывает. Если рассматривать "послойно-балансовый метод" с учетом не только диффузионного, но и конвективного переноса, то ограничений на его применимость нет.

#### Определение продукции метана в полевых условиях

Почвенно-градиентные методы. Существует несколько модификаций почвенно-градиентных методов, различающихся как техническими деталями, так и математическими расчетами. Здесь мы рассмотрим базовый вариант метода, описанный, в частности, в статье Алма и соавт. (Alm et al., 1999). Его принцип основан на уравнении (5), точнее говоря, на его интегральной форме (3). При этом делаются следующие допущения: во-первых, уравнение применяется к описанию стационарного профиля концентраций (т.е.  $\partial C / \partial t = 0$ ) и, во-вторых, предполагается газообмен только за счет лиффузии, описываемой законом Фика (обычно в почвенной газодинамике принимается, что ось z направлена вглубь почвы, но положительным считается поток, идущий в противоположном направлении):

$$j = D \frac{\partial C_i}{\partial z},\tag{10}$$

где j (мг · м<sup>-2</sup> · ч<sup>-1</sup>) — удельный поток метана из почвенного слоя; D (м<sup>2</sup> · ч<sup>-1</sup>) — коэффициент диффузии в пористой среде (формулы для расчета D см. в Alm et al., 1999). Продукция и потребление метана в простейшем варианте метода не разделяется, т.е. этот метод предназначен для определения не собственно продукции, а эмиссии. Однако в определенных условиях этим методом можно определить величину суммарной продукции во всем профиле. Например, при подавлении метанотрофии естественным образом (за счет высокого уровня воды) или с помощью искусственных ингибиторов (ацетилена, этилена, этана и ряда других, при этом необходимо учитывать, что эти соединения в определенных концентрациях ингибируют и метаногенез тоже, см. Chan and Parkin, 2000), а также, если потребление метана измерено отдельно в специальных экспериментах.

На практике для определения продукции вышеописанным методом используется следующая процедура: из толщи почвы или снега с постоянным шагом (*h*) по глубине берутся пробы газа, затем определяется его концентрация. В этом случае формула (10) может быть записана следующим образом (если приближенно аппроксимировать значение  $\partial C_i/\partial z$  при помощи значений *C* на двух глубинах):

$$j \approx m D_0 (C_i - C_{i-1}) / h,$$
 (11)

где  $C_i$  — концентрация метана на соответствующей глубине, *m* — пористость аэрации,  $D_0$  — коэффициент диффузии метана в воздухе. Конечно, существуют формулы, аппроксимирующие  $\partial C_i/\partial z$  по значениям *C* на трех, четырех и большем числе глубин (Березин, Жидков, 1966; Пантелеев, Кудрявцева, 2017).

Недостатки почвенно-градиентного метода следуют из лежащих в его основе допушений. Если профиль концентраций не является стационарным или если перенос метана происходит не только диффузионным путем, то в методе будет возникать существенная погрешность. Например, Альм и соавт. (Alm et al., 1999) отмечали, что в их измерениях разница между результатами камерного метода и почвенно-градиентного составляла от 28 до 43%. Они считали, что камерный метод дает более реалистичные результаты. Строго говоря, почвенно-градиентные методы относятся к хорошо известным в математике алгоритмам, принадлежащим к так называемым "методам обращения": либо обращения решения прямой задачи. либо обрашения математической молели в зависимости от конкретной реализации почвенно-градиентного метода. Методы обращения описаны, например, в книге Мацевитого и Лушпенко (1990), где справедливо отмечается, что наличие в них операции дифференцирования является причиной существенных ошибок и неустойчивости, и, следовательно, некорректности решения. Что касается алгоритмов расчета продукции (и эмиссии) метана, относящихся к классу "методов обращения решения прямой задачи", то их возможная некорректность детально рассматривается в статье Глаголева и Сабрекова (2016) на примере оценки погрешности для случаев, где не учитывается зависимость коэффициента диффузии от глубины и распределения метанотрофов и метаногенов по глубине.

Полевая модификация послойно-балансового метода ("deep soil chamber technique"). Данный метод разработан для болотных почв в таких условиях метаногенеза, когда отсутствует пузырьковый механизм транспорта газа (Glagolev, 1998; Panikov et al., 2001). Пузырьки не будут образовываться, например, при низких (положительных) температурах, обеспечивающих большую растворимость метана; также они не образуются при более высоких температурах, но относительно слабом метаногенезе. Принцип метода основан на уравнении (5) в модификации для *i*-го почвенного слоя и нескольких возможных механизмов транспорта газа в толще торфа:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = p_i^+ - p_i^- - V_i - F_i - D_i, \qquad (12)$$

где слагаемые представляют собой скорости, соответственно, изменения концентрации ( $\partial C_i/\partial t$ ), продукции ( $p_i^+$ ), потребления ( $p_i^-$ ), а также выноса метана растениями ( $V_i$ ), диффузией ( $D_i$ ) и пузырьками ( $F_i$ ) (Glagolev, 1998; Panikov et al., 2001).

Выше уже было сказано, что рассматриваемый метод применяется только в тех условиях, когда пузырькового переноса нет, поэтому априори  $F_i = 0$ . Более того, после срезания растений и установки

МИКРОБИОЛОГИЯ том 90 № 1 2021

специальной низкой (вровень с уровнем воды) камеры,  $V_i = 0$ . Наконец, растворенный кислород быстро потребляется, поскольку его поступление из атмосферы блокировано камерой, в результате чего аэробное окисление метана метанотрофами прекращается (следовательно,  $p_i^- = 0$ ). Авторы допускают, что в системе нет анаэробного окисления метана (или оно так мало, что им можно пренебречь). Описываемый метод был разработан еще до того, как стало известно о важности анаэробного окисления метана в различных экосистемах. Сейчас анаэробных метанотрофов детектируют повсеместно, и в современной литературе этому процессу уделяется много внимания. Если же анаэробным метанокислением пренебречь нельзя, то данным методом будет определена не собственно продукция, а разность между ней и интенсивностью анаэробного окисления СН<sub>4</sub>.

Итак, уравнение упрощается (Panikov et al., 2001):

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = p_i^+ - D_i. \tag{13}$$

Отсюда очевидно, что под  $C_i$  авторы понимают концентрацию метана, выраженную в единицах массы на единицу объема торфа. Поскольку концентрация определяется в единицах массы на единицу объема почвенной воды или воздуха, то левую часть уравнения следует домножить на пористость (*m*), что будет учтено в дальнейшем.

В соответствии с уравнением (13), скорость продукции  $CH_4(p_i^+)$  может быть вычислена для каждого *i*-го почвенного слоя по экспериментально полученным величинам накопления в нем растворенного метана с учетом диффузии между соседними слоями (Panikov et al., 2001). Диффузия может быть описана на основе закона Фика. Обращение уравнения (13) показывает, что ско-

рость продукции  $(p_i^+)$  является функцией 1-ой и 2-ой производных концентрации метана, соответственно, по времени и глубине:

$$p_i^+ = m \frac{\partial C_i}{\partial t} + D \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2}.$$
 (14)

Обе производные оцениваются при помощи дифференцирования кубического сплайна, аппроксимирующего концентрационный профиль. Такой способ дает вполне реалистичные значения производных для очень широкого диапазона форм профилей (Alperin et al., 1988). В статье Паникова и соавт. (Panikov et al., 2001) приведены особенности практической реализации этого метода (тип и расположение пробоотборников, время отбора проб и т.д.).

Однако обнуление растительного и пузырькового транспорта ( $V_i = 0, F_i = 0$ ), постулируемое в

данном методе, не вполне очевидно. Мнение авторов о том, что срезание растений приведет к прекращению транспорта через них метана, может быть как верным, так и ошибочным в зависимости от того, каков механизм выноса метана растениями. Однако, согласно экспериментальным данным, удаление растений уменьшает вынос метана через них (Sebacher et al., 1985; Waddington et al., 1996; Глаголев и соавт., 1999). В некоторых условиях пузырьки газа также будут образовываться и подниматься вверх. Повторим, что расчеты следует осуществлять только для тех условий, когда пузырьки не наблюдаются, т.е. при относительно невысоких температурах.

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭМИССИИ МЕТАНА

Эмиссия метана – показатель незамкнутости цикла Зенгена, в который объединены микроорганизмы, осуществляющие процессы продукции и потребления СН<sub>4</sub> (Заварзин, 1995), когда часть метана высвобождается из зоны микробного трофического взаимодействия и поступает в атмосферу, где далее участвует в различных фотохимических реакциях, внося вклад в парниковый эффект. Таким образом, измерение эмиссии необходимо для правильной оценки потенциала различных экосистем как источников/стоков метана. Именно почвенные экосистемы являются основными биогенными источниками метана, и наибольший вклад в атмосферную эмиссию вносят увлажненные почвы, представленные болотными торфяными экосистемами. Точность оценки эмиссии метана зависит от правильно выбранного метода измерения, как можно более полно учитывающего специфику конкретной метан-генерирующей почвенной системы.

#### "Сосредоточенные" (камерные) методы

Статический и динамический камерные методы. Традиционно в почвоведении с целью количественной оценки потоков газов на поверхности почвы используется "камерно-статический метод" (Орлов и соавт., 1987), называемый также "методом эмиссионных камер". Принцип метода очень прост. На поверхность почвы устанавливается "камера"; в простейшем случае – это куб, нижняя грань которого отсутствует (в остальном камера герметична). Открытой частью камера ставится на специальное основание, которое позволяет обеспечить герметичный контакт с почвой, например, за счет того, что нижний край основания на несколько сантиметров погружен в почву, а верхний сочленяется с камерой посредством гидрозатвора. Если из почвы выделяются газы, они поступают не в атмосферу, а в камеру, при этом концентрация выходящего из почвы газа в камере будет расти. По кривой изменения

концентрации газа в камере можно рассчитать величину удельного потока.

Существует несколько количественных теорий, описывающих динамику концентрации газа в камере и позволяющих на основании этого рассчитать удельный поток. В общем случае эти теории рассматривают нелинейную динамику, обусловленную тем, что скорость выхода газа из почвы будет тем меньше, чем больше его уже накопилось в камере (Hutchinson, Mosier, 1981; Орлов и соавт., 1987; Nakano et al., 2004; Kutzbach et al., 2007). Однако на практике для метана можно использовать линейное приближение, из которого для удельного потока (*F*) можно получить формулу:

$$F = \frac{2c_2 PMbV}{S(T+T_0)},$$
 (15)

где b (ppm · ч<sup>-1</sup>) – тангенс угла наклона прямой роста концентрации метана в камере в координатах время—концентрация;  $c_2 = 0.12$  (мг · моль · К · · кг<sup>-1</sup> · Дж<sup>-1</sup> · ppm<sup>-1</sup>); M (кг · моль<sup>-1</sup>) – молярная масса газа; P (Па) – давление в камере во время отбора проб (обычно принимается равным атмосферному давлению);  $S(M^2)$  – площадь основания камеры; *Т* и *T*<sub>0</sub> (K) – конечная и начальная температуры в камере во время измерения:  $V(M^3)$  – объем камеры. Эта формула элементарным образом получается с использованием уравнения состояния идеального газа и применяется для расчета эмиссии различных газов, а не только СН<sub>4</sub>. Однако в работах разных исследователей, формула (15) может иметь несколько различный вид (Day et al., 2013; Yevdokimov et al., 2017; Berger et al., 2018; Erkkilä et al., 2018), в частности, обычно принимается упрощение, согласно которому температура в камере не меняется за время измерений, т.е.  $T_0 = T$ .

При измерении газообмена между почвой и атмосферой камерно-статический метод являлся наиболее часто используемым методом, вероятно, из-за его низкой стоимости и легкости применения. Он повсеместно применялся при измерениях эмиссии метана в лесных и болотных экосистемах, особенно там, где отсутствуют постоянные источники электроэнергии (Nakano et al., 2004). На протяжении последних 35 лет в таких экосистемах камерно-статическим методом выполнялась значительная часть измерений эмиссии СН<sub>4</sub> практически во всех регионах Земного шара: в Америке, Африке, Европе и Азии (Harriss et al., 1982; Tathy et al., 1992; Alm et al., 1999; Glagolev et al., 2012). Более того, данный метод используется для измерения газообмена с атмосферой не только лесных и болотных почв, но и почв рисовников, полигонов захоронения бытовых отходов (Cicerone, Shetter, 1981; Nozhevnikova et al., 2003; Sabrekov et al., 2013), a также измерения эмиссии метана из озер, грязевых микровулканов, метановых сипов и др.

(Banik et al., 1993; Etiope, 1999; Awasthi et al., 2005; Etiope, 2009; Belova et al., 2013; Campeau et al., 2014).

Как было отмечено выше, камера не обменивается воздухом с атмосферой. При этом существенное изменение концентрации газа в камере может сильно повлиять на условия его выделения (или поглощения) почвой, и результаты измерений удельных потоков будут искажаться. Чтобы избежать подобных артефактов, была разработана модификация (получившая название "динамического камерного метода"), в которой камера продувается воздухом в процессе измерений. Если в камеру все время достаточно интенсивно поступает атмосферный воздух, то концентрация метана не будет существенно измеряться, и система в течение всего периода измерения будет близка к естественным условиям *in situ*.

Если поток газа из почвы постоянен (а на небольших интервалах времени это так), то в продуваемой воздухом камере достаточно быстро наступает стационарное состояние и справедливым оказывается следующее соотношение для вычисления удельного потока:

$$F \approx \frac{G(C - C_b)}{S},\tag{16}$$

где  $C_b$  и C (мг · м<sup>-3</sup>) – концентрации CH<sub>4</sub> в потоке воздуха на входе в камеру и на выходе из нее соответственно; G (м<sup>3</sup> · ч<sup>-1</sup>) – скорость продувки.

Полуавтоматические и автоматические комплексы. Рутинные измерения камерами, осуществляемые вручную, стимулировали работы для автоматизации этого процесса. По-видимому, исторически первыми были попытки создания полуавтоматических камер, в которых автоматизации подверглась только какая-нибудь одна функция, а не весь процесс определения удельного потока. Например, в 1995 г. на Бакчарском болоте (Западная Сибирь, Томская обл.) была установлена полуавтоматическая камера, разработанная под руководством Иноэ (Inoue et al., 1997), в которой был автоматизирован процесс отбора проб, но не их анализ. В нерабочем состоянии камера висела примерно в полуметре над поверхностью болота в стороне от основания. По команде компьютера автоматическая полъемная система опускала камеру на основание в пазы гидрозатвора, после чего несколько мл воздуха из камеры отбирались последовательно через равные промежутки времени в три флакона. Затем камера опять поднималась для проветривания. Процедура опускания камеры, отбора трех проб и последующего проветривания автоматически выполнялась каждые два часа. В дальнейшем было необходимо все флаконы доставить в лабораторию и проанализировать концентрацию СН<sub>4</sub> в них, после чего по каждым трем последовательным концентрациям

МИКРОБИОЛОГИЯ том 90 № 1 2021

можно было вычислить удельный поток (т.е. он измерялся каждые 2 ч, впрочем, камеру можно было перепрограммировать на любой другой интервал времени).

К полуавтоматическим комплексам мы отнесем и такую систему, в которой исследователь монтирует непосредственно в поле установку, состоящую из камеры (или нескольких камер) и газоанализатора. Подобные установки непрерывно отслеживают концентрации газов и накапливают данные в памяти в течение всего времени экспозиции (Nakano et al., 2004; Молчанов, 2017).

Существуют полностью автоматические системы, реализующие камерный метод измерения потока (см., например, Schütz et al., 1989; Marik et al., 2002; Butterbach-Bahl et al., 2004; Krasnov et al., 2015). Первая из цитированных работ, повидимому, являлась одной из пионерских в области полностью автоматических реализаций камерного метода и была посвящена определению потока метана на рисовых полях (Schütz et al., 1989). В остальных работах описаны более современные системы, предназначенные для определения потока нескольких газов сразу – CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, а в предпоследней еще и NO, NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O.

#### "Распределенные" методы (микрометеорологические)

С середины XX века получили развитие так называемые микрометеорологические методы измерения эмиссии газов, принципиально отличающиеся от камерных методов. Главной идеей микрометеорологических методов является вычисление эмиссии интересующего газа по его концентрации в атмосфере (Aubinet et al., 2012). Микрометеорологические методы приобретали все большую популярность по мере осознания недостатков камерных методов, а именно изменения естественных условий при установке камеры и измерении эмиссии, возможности работы на пространственном масштабе до ~1 м<sup>2</sup>, проблематичности установки камеры в некоторых экосистемах (Baldocchi, 2003). К началу XXI в. они стали основным инструментом измерения эмиссии парниковых газов на масштабе ~10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> м<sup>2</sup> (Baldocchi, 2003; Aubinet et al., 2012; Бурба и соавт., 2016), т.е. на масштабе биогеоценоза. Главным общим достоинством всех микрометеорологических методов является то, что в отличие от камерных методов они позволяют получить репрезентативную и надежную оценку эмиссии даже для тех экосистем, выделение газа из которых неоднородно в пространстве и во времени, а также не воздействуют на почвенную систему при измерении.

Существует несколько микрометеорологических методов, каждый из которых имеет свои



Рис. 2. Принцип измерений потока метана градиентным методом.

ограничения, преимущества и недостатки. Ниже кратко рассмотрены градиентный метод и метод турбулентных пульсаций, т.е. микрометеорологические методы, наиболее активно используемые в настоящее время. Также упомянуты микрометеорологические методы, которые применяются менее широко и/или продолжают развиваться. Применение микрометеорологических методов возможно для любых почвенных микробных систем, но их точность при этом ограничена развитостью турбулентности в атмосфере (при штиле точность падает многократно), сложностью рельефа, размерами интересующей экосистемы и величиной эмиссии из нее.

Градиентный метод. Этот метод основан на описании турбулентной диффузии в атмосфере по аналогии с молекулярной диффузией. Вертикальный турбулентный удельный поток инертной газовой примеси в атмосфере практически не изменяется с высотой в приземном слое (Baldocchi, 2003; Foken, Nappo, 2008). В силу этого для любой точки в пределах приземного слоя удельный поток газа можно записать как произведение коэффициента турбулентной диффузии на вертикальный градиент концентрации газа. Градиент оценивается по измерениям концентрации на двух и более высотах, а коэффициент турбулентной диффузии вычисляется по измерениям скорости ветра (рис. 2). Технические подробности градиентного метода представлены в других публикациях (Arya, 2001; Foken, Nappo, 2008).

Градиентный метод применим только в условиях развитой турбулентности, причем средняя вертикальная скорость ветра за период измерения должна быть близка к нулю. Типичный уровень погрешности градиентного метода составляет от 10–20% в условиях, близких к идеальным, и до 50% в экосистемах со сложным рельефом или при низких скоростях ветра (Baldocchi, 2003; Бурба и соавт., 2016). Типичным уровнем погрешности является величина в 20–30% (Foken, Nappo, 2008).

Метод турбулентных пульсаций (eddy covariance). В русскоязычной литературе также используются наименования "метод турбулентных ковариаций" и "метод микровихревых пульсаций". Метод турбулентных пульсаций основан на высокочастотном (10-20 Гц) измерении вертикальной скорости ветра и концентрации газа на одной и той же высоте в приземном слое воздуха (рис. 3). Далее эти величины в каждый момент времени перемножаются и полученные произведения усредняются. В результате получают среднее значение удельного потока за тот отрезок времени, на котором производилось усреднение. Более подробные выкладки приведены в статье Бальдоччи (Baldocchi, 2003).

За последние два десятилетия разработаны алгоритмы работы метода турбулентных пульсаций, позволяющие применять его в неидеальных условиях. Так, для устранения ненулевого вертикального ветра применяются алгоритмы ротации коорди-



**Рис. 3.** Установка для измерений потоков тепла, паров воды и газов методом турбулентных пульсаций (Югорский госуниверситет, г. Ханты-Мансийск): *1* – аккумуляторный отсек; *2* – энергоустановка для обеспечения бесперебойного электропитания; *3* – блок управления и вывода данных; *4* – ультразвуковой анемометр; *5* – детектор анализатора концентрации газа; *6* – автоматическая метеостанция.

нат. Для работы в условиях нестационарности метеорологических полей применяются различные алгоритмы удаления тренда из наблюдений. Также разработаны поправки для различных частотных характеристик измерительных приборов, на флуктуации плотности воздуха, на нагревание приборов и т.д. Эти алгоритмы реализованы в виде как коммерческих, так и бесплатных программных продуктов, использование которых значительно упрощает расчеты и делает их широко доступными (Aubinet et al., 2012; Бурба и соавт., 2016). Крупные компании-производители поставляют адаптированный под метод турбулентных пульсаций готовый комплекс оборудования с такими программными продуктами. Существует также вариант метода турбулентных пульсаций, при котором газоанализатор и ультразвуковой анемометр устанавливаются на самолете или вертолете, что позволяет сильно увеличить пространственный охват исследования (Kohnert et al., 2018).

Принципиальным условием для успешной работы метода турбулентных пульсаций также является наличие развитой турбулентности. Те данные, которые получены при неразвитой турбулентности, отбрасываются, а для заполнения образовавшихся пропусков применяются различные алгоритмы: регрессия по метеорологическим параметрам, интерполяция, замена на среднее значение, расчет с помощью процессно-ориентированных моделей и нейронных сетей (Aubinet et al., 2012). Наличие вертикальной конвекции (например, над лесами или в ночное время) также приводит к некорректным величинам удельного потока. Для устранения этой проблемы необходимо проводить дополнительные измерения вертикального профиля концентрации газа (Baldocchi, 2003; Aubinet et al., 2012).

Сравнение метода турбулентных пульсаций с градиентным методом и краткий обзор других методов. Преимуществом метода турбулентных пульсаций является то, что это наиболее прямой метод измерения удельного потока, обладающий наименьшим количеством ограничений применимости. Недостатками метода являются высокая стоимость оборудования и большие издержки при организации его энергообеспечения и охраны (Baldocchi, 2003; Бурба и соавт., 2016).

Преимущество градиентного метода заключается в том, что с его помощью можно вести измерения удельного потока тех газов, для которых не существует приборов, способных измерять концентрацию с высокой частотой, что необходимо для метода турбулентных пульсаций. Его применение дешевле метода турбулентных пульсаций в 3-5 раз (Foken, Nappo, 2008). Основным недостатком градиентного метода является невозможность его использования в экосистемах, где удельный поток газа с поверхности неоднороден. Поскольку концентрация на разных высотах формируется разными участками экосистемы (чем больше высота, тем больше площадь, которая влияет на динамику концентрации на этой высоте), пространственная неоднородность удельного потока приводит к искажению градиента, и, как следствие, величины удельного потока. И градиентный метод, и метод турбулентных пульсаций некорректно работают при значимой вертикальной конвекции, которая обычно имеет место при существенных неровностях подстилающей поверхности, например, над лесами (Foken, Nappo, 2008), а также при слаборазвитой турбулентности (Aubinet et al., 2012).

Метод турбулентных пульсаций в настоящий момент является общепринятым стандартом измерения удельного потока газов из почв на масштабе экосистем (Baldocchi, 2014). Он широко используется для измерения эмиссии метана в различных экосистемах (Savi et al., 2016; Erkkilä et al., 2018; Deventer et al., 2019). Остальные микрометеорологические методы используются в ситуациях, когда реализация метода турбулентных пульсаций затруднена из-за небольшой площади экосистемы, слабых ветров, сложного рельефа, точечного характера источников, высокого отношения шума показаний газоанализатора к полезному сигналу, низкой (<10 Гц) частоты измерения газоанализатора и т.д. (Бурба и соавт., 2016). Среди них, помимо описанного выше градиентного метода, следует отметить метод накопления микровихрей (relaxed eddy accumulation method). Этот метод основан на отборе газа с постоянной скоростью в разные емкости при восходящих и нисходящих потоках воздуха. Для его реализации необходим ультразвуковой анемометр, интегрированный с системой отбора газа, закачивающей пробы в разные емкости в зависимости от направления потока воздуха, а также газоанализатор для измерения концентрации газа. Удельный поток і вычисляется следующим образом:

16

$$j = b\sigma_w \left( \overline{c_{\rm up}} - \overline{c_{\rm down}} \right), \tag{17}$$

где b — безразмерный эмпирический параметр, зависящий от свойств турбулентности,  $\sigma_w$  – стандартное отклонение вертикальной скорости ветра для текущего периода измерений (обычно его длительность – 30 мин), а в скобках – разница средних концентраций газа в восходящих и ниспотоках воздуха соответственно ходящих (Ueyama et al., 2013). Основным преимуществом метода по сравнению с методом турбулентных пульсаций является отсутствие необходимости в газоанализаторе с высокой частотой измерений и проведении многочисленных корректирующих пересчетов (Ueyama et al., 2013). Благодаря этому методом накопления микровихрей можно измерять удельные потоки сравнительно малой величины, для которых отношение шума показаний газоанализатора к полезному сигналу в методе турбулентных пульсаций оказывается слишком высоким (Ueyama et al., 2018). К недостаткам метода, объясняющим его редкое использование, относится инженерная сложность конструирования системы отбора газа в зависимости от направления вертикального потока воздуха, а также необходимость дополнительных измерений для учета вертикальной конвекции.

Среди перспективных методов, которые еще не применялись для измерения эмиссии метана ввиду своей новизны, но теоретически пригодны для таких измерений, выделим метод обновления поверхности (surface renewal method). Этот метод основан на высокочастотном (≥10 Гц) измерении концентрации газа. Удельный поток вычисляется на временном промежутке 5–30 мин посредством определения характеристик пиков (длины, высоты и т.д.) на графике зависимости концентрации от времени с использованием эмпирических параметров, зависящих от характеристик турбулентности (Castellví, 2018; Hu et al., 2019; Suvočarev et al., 2019). Основным преимуществом этого метода является его применимость при слаборазвитой турбулентности в отсутствие ветра и, как следствие, в экосистемах небольшой площади (Castellví, 2018). К недостаткам метода относится сложность проводимых вычислений и высокая стоимость газоанализатора с требуемыми характеристиками.

Уникальным инструментом определения эмиссии газов, который применяется на всех пространственных масштабах (от масштаба биогеоценоза до глобального) является метод обратной задачи (inverse modelling method). Этот метод основан на той же идее, что и все микрометеорологические методы, а именно на определении величины эмиссии по концентрации газа в атмосфере. Однако, в отличие от рассмотренных выше микрометеорологических методов, метод обратной задачи предполагает рассмотрение всей совокупности процессов переноса и трансформации газа в атмосфере при минимальных допущениях или упрощениях. Такая общая постановка задачи позволяет использовать метод обратной задачи в тех ситуациях, когда прочие микрометеорологические не могут быть применены из-за своих ограничений. Для разных задач и объектов разработаны специальные вариации этого метода. В рамках настоящего обзора эти вариации не могут быть досконально описаны, поэтому лишь перечислим несколько сфер, где метод обратной задачи успешно применяется. Это глобальные и региональные инвентаризации эмиссии метана (Bergamaschi et al., 2007; Kim et al., 2011; Ware et al., 2019), измерение эмиссии из полигонов ТБО (Foster-Wittig et al., 2015; Терентьева и соавт., 2017; Mønster et al., 2019) и животноводческих ферм (Flesch et al., 2004; McGinn, Flesch, 2018; Prajapati, Santos, 2018) и ряд других областей: определение эмиссии из угольных шахт, газопроводов и даже района проведения пивного фестиваля Октоберфест (Chen et al., 2020). Основные принципы и обзор существующих вариаций метода обратной задачи заинтересованный читатель может найти в (Haas-Laursen et al., 1996; Глаголев, 2010; Mønster et al., 2019). Основным преимуществом метода обратной задачи является его универсальность, то есть применимость к самым разнообразным объектам при различных конфигурациях имеющегося оборудования. Недостатки этого метода в сложности используемых математических алгоритмов и высокой стоимости оборудования, необходимого для реализации метода.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные методы измерения продукции и эмиссии метана в почвенных экосистемах харак-

# ОБЗОР МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИКРОБНОЙ ПРОДУКЦИИ

Пространственный Метод Преимущества Недостатки и ограничения масштаб для применения Определение продукции метана Низкий коэффициент Определение потенциальной Возможность работы in vitro. 5-10 см<sup>2</sup> подобия к природной продукции "in vitro" контролируемые условия обстановке Базовый вариант метода Полевая модификация не работает при наличии послойно-балансового метода ~50-1000 см<sup>2</sup> конвективного транспорта (DSC-technique) газа из почвы Определение актуальной Если профиль концентраций продукции непосредственно не является стационарным в природных условиях или перенос СН<sub>4</sub> происходит Почвенно-градиентный метод не только диффузионным путем, то будет возникать существенная погрешность Существенное изменение концентрации газа в камере может влиять на его выделе-Статический камерный метод Простота и экономичность 0.01-1 m<sup>2</sup> ние (или поглошение): еше с ингибированием отдельного измерения более сильное изменение естественных условий происходит при установке камеры Необходимость постоянной Концентрация метана подачи в камеру газа-ингиби-Динамический камерный ~1 м<sup>2</sup> в камере близка к естествентора метанотрофии приводит метод с ингибированием ным природным условиям к существенному удорожанию метода Определение эмиссии См. выше "Статический Простота и экономичность камерный метод с ингибиро-0.01-1 м<sup>2</sup> Статический камерный метод отдельного измерения ванием" Концентрация метана в Динамический камерный Сложность установки камеры ~1 м<sup>2</sup> камере близка к природным метод в некоторых экосистемах условиям Метод неприменим в экосистемах с большой Нет воздействия  $10^2 - 10^3 \text{ m}^2$ Градиентный метод пространственной неоднона почвенную систему, родностью эмиссии т.е. измерения проводятся в естественных условиях Метод турбулентных Наличие вертикальной  $10^2 - 10^3 \text{ m}^2$ пульсаций конвекции

Таблица 2. Сравнение методов измерения продукции и эмиссии метана в отношении их применимости в различных экосистемах

\* С теоретической точки зрения измерения проводятся в точке. Трудно сказать, насколько далеко в реальной почве могут быть экстраполированы результаты этих измерений от данной точки. Часто исследователи переносят полученные результаты на весь биогеоценоз. Например, если в точке, расположенной в ряме, получено некоторое значение, то оно приписывается вообще всему ряму (площадь которого может составлять, скажем, сотни кв. метров). Очевидно, что это совершенно неверно, хотя бы потому, что для разных элементов микрорельефа (повышений и понижений), расположенных на расстояниях порядка 1 м, могут быть характерны разные значения из-за различных гидротермических условий. Таким образом, необходимо в каждом биогеоценозе проводить многократные измерения в точках, расположенных друг от друга на различных расстояниях. Только благодаря этим многократным измерениям может стать ясно, до какой степени возможно экстраполировать результаты отдельных измерений. теризуются разнообразием лежащих в их основе физических и физико-химических принципов, а также технических решений. кажлое из которых имеет свои преимущества и недостатки (табл. 2). Целесообразность применения того или иного метода определяется поставленной задачей и свойствами метангенерирующей почвенной системы. Широко распространенный метод инкубации образцов почвы для определения продукции метана в лабораторных условиях позволяет оценить метаногенный потенциал микробного сообщества в строго контролируемых условиях. Изменяя условия лабораторных экспериментов можно получить результаты для последующего моделирования процесса метаногенеза. Однако результаты измерений в лабораторных условиях могут быть лишь условно экстраполированы на природную экосистему. Использование мезокосмов позволяет получить метангенерирующую систему в состоянии, максимально приближенном к условиям *in situ* при минимальном воздействии на структуру образца. Методы определения эмиссии метана потенциально могли бы применяться для определения продукции метана. Тем не менее, в реальных условиях практически невозможно исключить вклад процесса микробного окисления метана, кроме случая с использованием ингибиторов метанотрофии при измерении камерным методом.

Методы оценки эмиссии метана из экосистем различаются в зависимости от того, какую площадь они охватывают при измерении: камерные методы работают на масштабе  $\sim 1 \text{ м}^2$ , микрометеорологические методы способны оценить удельный поток с сотен и тысяч м<sup>2</sup>. Поэтому локальную эмиссию/поглощение метана изучают с помощью камерных методов, а оценку удельного потока в масштабе биогеоценоза проводят с использованием микрометеорологических методов.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы приносят искреннюю благодарность С.Ю. Мочёнову и А.В. Смагину, соответственно, за обсуждение классификации методов и необходимости учета пористости в формулах, а также А.А. Лебедеву за частичное техническое редактирование рукописи. Мы также выражаем признательность С.Н. Дедыш (ФИЦ Биотехнологии РАН) за критический анализ и важные рекомендации при подготовке рукописи.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была профинансирована в рамках выполнения проекта РФФИ 18-45-860015 р\_а и частично — по теме госзадания АААА-А15-115122810146-4.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

# КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют отсутствие конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Арсенин В.Я. Методы математической физики и специальные функции. М.: Наука, 1984. 384 с.

*Березин И.С., Жидков Н.П.* Методы вычислений. Т. 1. М.: Наука, 1966. 632 с.

Бурба Г.Г., Курбатова Ю.А., Куричева О.А., Авилов В.К., Мамкин В.В. Метод турбулентных пульсаций. Краткое практическое руководство. М.: ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН, 2016. 223 с.

Вазов В., Форсайт Дж. Разностные методы решения дифференциальных уравнений в частных производных. М.: Изд-во ИЛ, 1963. 486 с.

Глаголев М.В. К методу "обратной задачи" для определения поверхностной плотности потока газа из почвы // Динамика окружающей среды и глобальные изменения климата. 2010. Т. 1. № 1. С. 17–36.

Глаголев М.В., Голышев С.А., Фирсов С.Ю. Оценка переноса метана из почвы в атмосферу болотными растениями // Болота и заболоченные леса в свете задач устойчивого природопользования. Материалы конференции. / Ред. Вомперский С.Э., Сирин А.А. М.: ГЕОС, 1999. С. 177–180.

Глаголев М.В., Сабреков А.Ф. О диссертации Н.А. Шнырева: II. Главные замечания // Динамика окружающей среды и глобальные изменения климата. 2016. Т. 7. № 2. С. 38–55.

Гюнтер Э., Кемпфе Л., Либберт Э., Мюллер Х., Пенцлин Х. Основы общей биологии. М.: Мир, 1982. 440 с.

Заварзин Г.А. Психрофильный цикл Зенгена // Экологическая химия. 1995. Т. 4. С. 3–12.

Каллистова А.Ю., Глаголев М.В., Шнырев Н.А., Кевбрина М.В., Некрасова В.К., Чистотин М.В., Фаустова Е.В., Серебряная М.И., Ножевникова А.Н. Эмиссия метана с поверхности полигона захоронения твердых бытовых отходов (ТБО) в зависимости от возраста полигона и от сезона // Экологическая химия. 2006. Т. 15. С. 13–21.

Каллистова А.Ю., Меркель А.Ю., Тарновецкий И.Ю., Пименов Н.В. Образование и окисление метана прокариотами // Микробиология. 2017. Т. 86. С. 661–683.

*Kallistova A. Yu., Merkel A. Yu., Tarnovetskii I. Yu., Pimenov N.V.* Methane formation and oxidation by prokaryotes // Microbiology (Moscow). 2017. V. 86. P. 671–691.

Каспаров С.В., Минько О.И., Аммосова Я.М., Ермакова С.О. Газы анаэробного происхождения в затопленных почвах // Биологические науки. 1986. № 4. С. 99– 103.

Кондратьев К.Я., Крапивин В.Ф., Савиных В.П. Перспективы развития цивилизации: многомерный анализ. М.: Логос, 2003. 576 с.

*Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М.* Теоретическая физика. Т. VI. Гидродинамика. М.: Наука, 1988. 736 с. *Мацевитый Ю.М., Лушпенко С.Ф.* Идентификация теплофизических свойств твердых тел. Киев: Наук. думка, 1990. 216 с.

Минько О.И. Планетарная газовая функция почвенного покрова // Почвоведение. 1988. № 7. С. 59–75.

Минько О.И., Каспаров С.В., Аммосова Я.М. Газообразные вещества – продукты метаболизма микробных ценозов переувлажненных почв // Журн. общей биологии. 1987. Т. 48. С. 182–193.

*Молчанов А.Г.* Газообмен диоксида углерода с поверхности сфагнума в заболоченном сосняке южной тайги // Динамика окружающей среды и глобальные изменения климата. 2017. Т. 8. С. 43–54.

*Novikov V.V., Rusakov A.V.* Release and absorption of greenhouse gases in ameliorated peat soils of the Rostov lowland // Euras. Soil Sci. 2005. V. 38. P. 745–751.

Одум Ю. Экология. Т. 1. М.: Мир, 1986. 328 с.

Орлов Д.С., Минько О.И., Аммосова Я.М., Каспаров С.В., Глаголев М.В. Современные физические и химические методы исследования почв. М.: Изд-во МГУ, 1987. 203 с.

Пантелеев А.В., Кудрявцева И.А. Численные методы. Практикум. М.: ИНФРА-М, 2017. 512 с.

*Самарский А.А.* Теория разностных схем. М.: Наука, 1983. 616 с.

Терентьева И.Е., Сабреков А.Ф., Глаголев М.В., Коцюрбенко О.Р. Эмиссия метана из полигонов захоронения твердых бытовых отходов // Метеорология и гидрология. 2017. № 5. С. 80–90.

*Terentieva I.E., Sabrekov A.F., Glagolev M.V., Kotsyurbenko O.R.* Methane emission from municipal solid waste landfills // Russ. Meteorol. Hydrol. 2017. V. 42. P. 327–334.

Федоров В.Д., Гильманов Т.Г. Экология. М.: Изд-во МГУ, 1980. 464 с.

*Филиппов Л.П.* Явления переноса. М.: Изд-во МГУ, 1986. 120 с.

Шнырев Н.А. Режимные наблюдения и оценка газообмена на границе почвы и атмосферы (на примере потоков метана болотного стационара средне-таежной зоны Западной Сибири "Мухрино"). Дис. ... канд. биол. наук. М.: Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова (МГУ), 2016.

Alm J., Saarnio S., Nykänen H., Silvola J., Martikainen P.J. Winter CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O fluxes on some natural and drained boreal peatlands // Biogeochemistry. 1999. V. 44. P. 163–186.

*Alperin M.J., Reeburg W.S., Whiticar M.J.* Carbon and hydrogen isotope fractionation resulting from anaerobic methane oxidation // Glob. Biogeochem. Cycles. 1988. V. 2. P. 279–288.

*Aronson E.L., Vann D.R., Helliker B.R.* Methane flux response to nitrogen amendment in an upland pine forest soil and riparian zone // J. Geophys. Res. 2012. V. 117. G03012.

*Arya P.S.* Introduction to Micrometeorology. N.Y.: Academic press, 2001. 447 p.

*Aubinet M., Vesala T., Papale D.* Eddy Covariance: a Practical Guide to Measurement and Data Analysis. Berlin: Springer Science & Business Media, 2012. 438 p.

Awasthi K.D., Sitaula B.K., Singh B.R., Bajracharya R.M. Fluxes of methane and carbon dioxide from soil under forest, grazing land, irrigated rice and rainfed field crops in a

МИКРОБИОЛОГИЯ том 90 № 1 2021

watershed of Nepal // Biol. Fertil. Soils. 2005. V. 41. P. 163–172.

*Baldocchi D.D.* Assessing the eddy covariance technique for evaluating carbon dioxide exchange rates of ecosystems: past, present and future // Glob. Change Biol. 2003. V. 9. P. 479–492.

*Baldocchi D.* Measuring fluxes of trace gases and energy between ecosystems and the atmosphere – the state and future of the eddy covariance method // Glob. Change Biol. 2014. V. 20. P. 3600–3609.

Banik A., Sen M., Sen S.P. Methane emission from jute-retting tanks // Ecol. Engin. 1993. V. 2. P. 73–79.

*Bartlett K.B., Crill P.M., Bonassi J.A., Richey J.E., Harriss R.C.* Methane flux from the Amazon river floodplain: emissions during rising water // J. Geophys. Res. 1990. V. 95. P. 16773–16788.

Belova S.E., Oshkin I.Yu., Glagolev M.V., Lapshina E.D., Maksyutov Sh.Sh., Dedysh S.N. Methanotrophic bacteria in cold seeps of the floodplains of Northern rivers // Microbiology (Moscow). 2013. V. 82. P. 743–750.

Bergamaschi P., Frankenberg C., Meirink J.F., Krol M., Dentener F., Wagner T., Platt U., Kaplan J.O., Körner S., Heimann M., Dlugokencky E.J., Goede A. Satellite chartography of atmospheric methane from SCIAMACHY on board ENVISAT: 2. Evaluation based on inverse model simulations // J. Geophys. Res. 2007. V. 112. D02304. P. 1–26.

*Berger S., Praetzel L.S.E., Goebel M., Blodau C., Knorr K.-H.* Differential response of carbon cycling to long-term nutrient input and altered hydrological conditions in a continental Canadian peatland // Biogeosciences. 2018. V. 15. P. 885–903.

*Bižić-Ionescu M., Ionescu D., Günthel M., Tang K.W., Grossart H.-P.* Oxic methane cycling: New evidence for methane formation in oxic lake water // Biogenesis of Hydrocarbons. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology / Eds. Stams A., Sousa D. Cham: Springer, 2018. P. 1–22. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53114-4 10-1

nttps://doi.org/10.100//9/8-3-319-53114-4\_10-1

*Blodau C., Basiliko N., Moore T.R.* Carbon turnover in peatland mesocosms exposed to different water table levels // Biogeochemistry. 2004. V. 67. P. 331–351.

Boetius A., Ravenschlag K., Schubert C.J., Rickert D., Widdel F., Gieseke A., Amann R., Jørgensen B.B., Witte U., Pfannkuche O. Microscopic identification of a microbial consortium apparently mediating anaerobic methane oxidation above marine gas hydrate // Nature. 2000. V. 407. P. 623– 626.

*Bridgham S.D., Cadillo-Quiroz H., Keller J.K., Zhuang Q.* Methane emissions from wetlands: biogeochemical, microbial, and modeling perspectives from local to global scales // Glob. Change Biol. 2013. V. 19. P. 1325–1346.

Butterbach-Bahl K., Kock M., Willibald G., Hewett B., Buhagiar S., Papen H., Kiese R. Temporal variations of fluxes of NO, NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, and CH<sub>4</sub> in a tropical rain forest ecosystem // Global Biogeochem. Cycles. 2004. V. 18. P. 1–11.

Campeau A., Lapierre J.F., Vachon D., del Giorgio P.A. Regional contribution of  $CO_2$  and  $CH_4$  fluxes from the fluvial network in a lowland boreal landscape of Quebec // Global Biogeochem. Cycles. 2014. V. 28. P. 57–69.

*Castellví F.* An advanced method based on surface renewal theory to estimate the friction velocity and the surface heat flux // Water Resour. Res. 2018. V. 54. P. 10134–10154.

*Chan A.S.K., Parkin T.B.* Evaluation of potential inhibitors of methanogenesis and methane oxidation in a landfill cover soil // Soil Biol. Biochem. 2000. V. 32. P. 1581–1590.

Chen J., Dietrich F., Maazallahi H., Forstmaier A., Winkler D., Hofmann M.E., van der Gon H.D., Röckmann T. Methane emissions from the Munich Oktoberfest // Atmospheric Chemistry & Physics. 2020. V. 20. P. 3683–3696.

*Chin K.-J., Conrad R.* Intermediary metabolism in methanogenic paddy soil and the influence of temperature // FEMS Microbiol. Ecol. 1995. V. 18. P. 85–102. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1995.tb00166.x

*Christiansen J.R., Vesterdal L., Gundersen P.* Nitrous oxide and methane exchange in two small temperate forest catchments – effects of hydrological gradients and implications for global warming potentials of forest soils // Biogeochemistry. 2012. V. 107. P. 437–454.

*Cicerone R.J., Shetter J.D.* Sources of atmospheric methane: Measurements in rice paddies and a discussion // J. Geophys. Res. 1981. V. 86. C8. P. 7203–7209.

*Conrad R.* Quantification of methanogenic pathways using stable carbon isotopic signatures: a review and a proposal // Org. Geochem. 2005. V. 36. P. 739–752.

https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2004.09.006

*Conrad R., Klose M.* Anaerobic conversion of carbon dioxide to methane, acetate and propionate on washed rice roots // FEMS Microbiol. Ecol. 1999. V. 30. P. 147–155.

*Conrad R., Klose M.* Selective inhibition of reactions involved in methanogenesis and fatty acid production on rice roots // FEMS Microbiol. Ecol. 2000. V. 34. P. 27–34.

*Conrad R., Mayer H.-P., Wüst M.* Temporal change of gas metabolism by hydrogen-syntrophic methanogenic bacterial associations in anoxic paddy soil // FEMS Microbiol. Lett. 1989. V. 62 P. 265–273.

https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1989.tb03701.x

Conrad R., Noll M., Claus P., Klose M., Bastos W.R., Enrich-Prast A. Stable carbon isotope discrimination and microbiology of methane formation in tropical anoxic lake sediments // Biogeosciences. 2011. V. 8. P. 795–814. https://doi.org/10.5194/bg-8-795-2011

*Day S., Dell'Amico M., Etheridge D., Ong C., Rodger A., Sherman B., Barrett D.J.* Characterisation of Regional Fluxes of Methane in the Surat Basin. Queensland: CSIRO, 2013.

Deventer M.J., Griffis T.J., Roman D.T., Kolka R.K., Wood J.D., Erickson M., Baker J.M., Millet D.B. Error characterization of methane fluxes and budgets derived from a long-term comparison of open-and closed-path eddy covariance systems // Agric. Forest Meteorol. 2019. V. 278. P. 107638.

*Ehhalt D.H., Schmidt U.* Sources and sinks of atmospheric methane // Pageoph. 1978. V. 116. P. 452–464.

*Eller G., Kanel L., Kruger M.* Cooccurrence of aerobic and anaerobic methane oxidation in the water column of Lake Plußsee // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. P. 8925–8928.

*Erkkilä K.-M., Ojala A., Bastviken D., Biermann T., Heiskanen J.J., Lindroth A., Peltola O., Rantakari M., Vesala T., Mammarella I.* Methane and carbon dioxide fluxes over a lake: comparison between eddy covariance, floating chambers and boundary layer method // Biogeosciences. 2018. V. 15. P. 429–445.

*Etiope G.* Subsoil  $CO_2$  and  $CH_4$  and their advective transfer from faulted grassland to the atmosphere // Journal of Geophysical Research. 1999. V. 104. No D14. P. 16889–16894.

*Etiope G.* Natural emissions of methane from geological seepage in Europe // Atmospheric Environment. 2009. V. 43. № 7. P. 1430–1443.

*Flesch T.K., Wilson J.D., Harper L.A., Crenna B.P., Sharpe R.R.* Deducing ground-to-air emissions from observed trace gas concentrations: a field trial // J. Appl. Meteorol. 2004. V. 43. P. 487–502.

*Foken T., Nappo C.J.* Micrometeorology. Berlin: Springer Science & Business Media, 2008. 306 p.

*Foster-Wittig T.A., Thoma E.D., Green R.B., Hater G.R., Swan N.D., Chanton J.P.* Development of a mobile tracer correlation method for assessment of air emissions from landfills and other area sources // Atmosph. Environ. 2015. V. 102. P. 323–330.

*Galand P.E., Yrjälä K, Conrad R.* Stable carbon isotope fractionation during methanogenesis in three boreal peatland ecosystems // Biogeosciences. 2010. V. 7. P. 3893–3900. https://doi.org/10.5194/bg-7-3893-2010

*Ganzert L., Jurgens G., Münster U., Wagmer D.* Methanogenic communities in permafrost affected soils of the Laptev Sea coast, Siberian Arctic, characterized by 16S rRNA gene fingerprint // FEMS Microbiol. Ecol. 2007. V. 59. P. 476– 488.

*Glagolev M.V.* Modeling of production, oxidation and transportation processes of methane // Global Environment Research Fund: Eco-Frontier Fellowship (EFF) in 1997. Tokyo: Environment Agency. Global Environment Department. Research & Information Office, 1998. P. 79–111.

*Glagolev M.V., Ilyasov D.V., Terentieva I.E., Sabrekov A.F., Mochenov S.Yu., Maksutov S.S.* Methane and carbon dioxide fluxes in the waterlogged forests of south and middle taiga of Western Siberia // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2018. V. 138. 012005.

https://doi.org/10.1088/1755-1315/138/1/012005

*Glagolev M.V., Sabrekov A.F.* Reply to A.V. Smagin: V. What is wrong with an "abiotic paper" and do we always need to take into account the abiotic gas absorption by soil? // Environmental Dynamics and Global Climate Change. 2019. V. 10. P. 48–63.

https://doi.org/10.17816/edgcc16144

*Glagolev M.V., Sabrekov A.F., Kleptsova I.E., Filippov I.V., Lapshina E.D., Machida T., Maksyutov Sh.Sh.* Methane emission from bogs in the subtaiga of Western Siberia: The development of standard model // Euras. Soil Sci. 2012. V. 45. P. 947–957.

*Goldsmith C.D., Chanton J., Abichou T., Swan N., Green R., Hater G.* Methane emissions from 20 landfills across the United States using vertical radial plume mapping // J. Air & Waste Manag. Assoc. 2012. V. 62. P. 183–197.

*Grossart H.-P., Frindte K., Dziallas C., Eckert W., Tang K.W.* Microbial methane production in oxygenated water column of an oligotrophic lake // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 19657–19661.

https://doi.org/10.1073/pnas.1110716108

*Haas-Laursen D.E., Harley D.E., Prinn R.C.* Optimizing an inverse method to deduce time-varying emissions of trace gases // J. Geophys. Res. 1996. V. 101. D17. P. 22823–22831.

Harriss R.C., Sebacher D.I., Day F.P. Methane flux in the Great Dismal Swamp // Nature. 1982. V. 297. P. 673–674.

*Hu Y., Buttar N.A., Tanny J., Snyder R.L., Savage M.J., Lakhiar I.A.* Surface renewal application for estimating evapotranspiration: a review // Adv. Meteorol. 2018. V. 2018. P. 1690714.

https://doi.org/10.1155/2018/1690714

Hutchinson G.L., Mosier A.R. Improved soil cover method for field measurement of nitrous oxide fluxes // Soil Sci. Soc. Amer. J. 1981. V. 45. P. 311–316.

*Inoue G., Takahashi Y., Maksyutov S., Sorokin M., Panikov N.* Methane emission rate from the wetland in West Siberia and its controlling factors // Proc. Fifth Symp. on the Joint Siberian Permafrost Studies between Japan and Russia in 1996. Tsukuba: Isebu, 1997. P. 34–39.

*Kamat S.S., Williams H.J., Dangott L.J., Chakrabarti M., Raushel F.M.* The catalytic mechanism for aerobic formation of methane by bacteria // Nature. 2013. V. 497. P. 132– 136.

*Kelley C.A., Chynoweth D.P.* Comparison of *in situ* and *in vitro* rates of methane release in freshwater sediments // Appl. Environ. Microbiol. 1980. V. 40. P. 287–293.

*Kim H.S., Maksyutov S., Glagolev M.V., Machida T., Patra P.K., Sudo K., Inoue G.* Evaluation of methane emissions from West Siberian wetlands based on inverse modeling // Environ. Res. Lett. 2011. V. 6. P. 035201.

*King G.M., Berman T., Wiebe W.J.* Methane formation in the acidic peats of Okefenokee swamp, Georgia // Amer. Midland Naturalist. 1981. V. 105. P. 386–389.

*Kobabe S., Wagner D., Pfeiffer E.M.* Characterisation of microbial community composition of a Siberian tundra soil by fluorescence *in situ* hybridization // FEMS Microbiol. Ecol. 2004. V. 50. P. 13–23.

Kohnert K., Juhls B., Muster S., Antonova S., Serafimovich A., Metzger S., Hartmann J., Sachs T. Toward understanding the contribution of waterbodies to the methane emissions of a permafrost landscape on a regional scale – A case study from the Mackenzie Delta, Canada // Glob. Change Biol. 2018. V. 24. P. 3976–3989.

*Kotsyurbenko O.R., Glagolev M.V.* Protocols for measuring methanogenesis // Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols (Springer Protocols Handbooks) / Eds. Mc-GeSnity T.J., Timmis K.N., Nogales B. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2015.

https://doi.org/10.1007/8623\_2015\_89

*Kotsyurbenko O.R., Glagolev M.V., Sabrekov A.F., Terentieva I.E.* Systems approach to the study of microbial methanogenesis in West-Siberian wetlands // Environmental Dynamics and Global Climate Change. 2020. V. 11. P. 1–19.

*Krasnov O.A., Maksyutov S.S., Davydov D.K., Fofonov A.V., Glagolev M.V.* Measurements of methane and carbon dioxide fluxes on the Bakchar bog in warm season // Proc. SPIE. 2015. V. 9680. P. 968066–968070.

*Kutzbach L., Schneider J., Sachs T., Giebels M., Nykänen H., Shurpali N.J., Martikainen P.J., Alm J., Wilmking M.* CO<sub>2</sub> flux determination by closed-chamber methods can be seriously biased by inappropriate application of linear regression // Biogeosciences. 2007. V. 4. P. 1005–1025.

Lohila A., Aalto T., Aurela M., Hatakka J., Tuovinen J.P., Kilkki J., Penttilä T., Vuorenmaa J., Hänninen P., Sutinen R., Viisanen Y., Laurila T. Large contribution of boreal upland

МИКРОБИОЛОГИЯ том 90 № 1 2021

forest soils to a catchment-scale  $CH_4$  balance in a wet year // Geophys. Res. Lett. 2016. V. 43. P. 2946–2953.

Mah R.A., Ward D.M., Baresi L., Glass T.L. Biogenesis of methane // Annu. Rev. Microbiol. 1977. V. 31. P. 309–341.

*Marik T., Fischer H., Conen F., Smith K.* Seasonal variations in stable carbon and hydrogen isotope ratios in methane from rice fields // Global Biogeochem. Cycles. 2002. V. 16. P. 41-1–41-11.

*McGinn S.M., Flesch T.K.* Ammonia and greenhouse gas emissions at beef cattle feedlots in Alberta Canada // Agric. Forest Meteorol. 2018. V. 258. P. 43–49.

Mochenov S.Yu., Churkina A.I., Sabrekov S.F., Glagolev M.V., Il'yasov D.V., Terentieva I.E., Maksyutov S.S. Soils in seasonally flooded forests as methane sources: A case study of West Siberian South taiga // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 2018. V. 138, 012012.

https://doi.org/10.1088/1755-1315/138/1/012012

*Mønster J., Kjeldsen P., Scheutz C.* Methodologies for measuring fugitive methane emissions from landfills – a review // Waste Manag. 2019. V. 87. P. 835–859.

*Moran J.J., House C.H., Freeman K.H., Ferry J.G.* Trace methane oxidation studied in several *Euryarchaeota* under diverse conditions // Archaea. 2005. V. 1. P. 303–309.

*Nakano T., Sawamoto T., Morishita T., Inoue G., Hatano R.* A comparison of regression methods for estimating soil-atmosphere diffusion gas fluxes by a closed-chamber technique // Soil Biol. Biochem. 2004. V. 36. P. 107–113.

*Nozhevnikova A., Glagolev M., Nekrasova V., Einola J., Sormunen K., Rintala J.* The analysis of methods for measurement of methane oxidation in landfills // Water Sci. Technol. 2003. V. 48. P. 45–52.

*Nozhevnikova A.N., Lifshitz A.B., Lebedev V.S., Zavarzin G.A.* Emission of methane into the atmosphere from landfills in the former USSR // Chemosphere. 1993. V. 26. P. 401–417.

*Orphan V.J., House C.H., Hinrichs K.-U., McKeegan K.D., DeLong E.F.* Methane-consuming Archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic Analysis // Science. 2001. V. 293. P. 484–487.

Oshkin I.Y., Wegner C.E., Lüke C., Glagolev M.V., Filippov I.V., Pimenov N.V., Liesack W., Dedysh S.N. Gammaproteobacterial methanotrophs dominate cold methane seeps in floodplains of West Siberian rivers // Appl. Environ. Microbiol. 2014. V. 80. P. 5944–5954.

Panikov N.S., Dedysh S.N., Kolesnikov O.M., Mardini A.I., Sizova M.V. Metabolic and environmental control on methane emission from soils: mechanistic studies of mesotrophic fen in West Siberia // Water Air Soil Pollut. Focus. 2001. V. 1. P. 415–428.

*Prajapati P., Santos E.A.* Comparing methane emissions estimated using a backward-Lagrangian stochastic model and the eddy covariance technique in a beef cattle feedlot // Agric. Forest Meteorol. 2018. V. 256. P. 482–491.

Raghoebarsing A.A., Pol A., van de Pas-Schoonen K.T., Smolders A.J., Ettwig K.F., Rijpstra W.I., Schouten S., Damsté J.S., Op den Camp H.J., Jetten M.S., Strous M. A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification // Nature. 2006. V. 440. P. 918–921.

*Repeta D.J., Ferrón S., Sosa O.A., Johnson C.G., Repeta L.D., Acker M., DeLong E.F., Karl D.M.* Marine methane paradox explained by bacterial degradation of dissolved organic matter // Nature Geosci. 2016. V. 9. P. 884–887. Sabrekov A.F., Glagolev M.V., Kleptsova I.E., Machida T., Maksyutov S.S. Methane emission from bog complexes of the West Siberian taiga // Euras. Soil Sci. 2013. V. 46. P. 1182–1193.

Savi F, Di Bene C., Canfora L., Mondini C., Fares S. Environmental and biological controls on  $CH_4$  exchange over an evergreen Mediterranean forest // Agric. Forest Meteorol. 2016. V. 226. P. 67–79.

https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2016.05.014

Schütz H., Holzapfel-Pschorn A., Conrad R., Rennenberg H., Seiler W. A 3-year continuous record on the influence of daytime, season, and fertilizer treatment on methane emission rates from an Italian rice paddy // J. Geophys. Res. 1989. V. 94. D3. P. 16405–16416.

Sebacher D.I., Harriss R.C., Bartlett K.B. Methane emissions to the atmosphere through aquatic plants // J. Environ. Qual. 1985. V. 14. P. 40–46.

Shih T.M. Numerical Heat Transfer. N.Y.: CRC Press, 1984. 563 p.

Suvočarev K., Castellví F., Reba M.L., Runkle B.R.K. Surface renewal measurements of H,  $\lambda E$  and CO<sub>2</sub> fluxes over two different agricultural systems // Agric. Forest Meteorol. 2019. V. 279. P. 107763.

Tathy J.P., Cros B., Delmas R.A., Marenco A., Servant J., Labat M. Methane emission from flooded forest in Central Africa // J. Geophys. Res. 1992. V. 97. D6. P. 6159–6168.

*Torres-Alvarado R., Ramirez-Vives F., Fernandez F.J., Barriga-Sosa I.* Methanogenesis and methane oxidation in wetlands. Implications in the global carbon cycle // Hidrobiologica. 2005. V. 15. P. 327–349.

Ueyama M., Takai Y., Takahashi Y., Ide R., Hamotani K., Kosugi Y., Takahashi K., Saigusa N. High-precision measurements of the methane flux over a larch forest based on a hyperbolic relaxed eddy accumulation method using a laser spectrometer // Agric. Forest Meteorol. 2013. V. 178. P. 183–193.

*Ueyama M., Yoshikawa K., Takagi K.* A cool-temperate young larch plantation as a net methane source – A 4-year continuous hyperbolic relaxed eddy accumulation and chamber measurements // Atmosph. Environ. 2018. V. 184. P. 110–120.

*Ullah S., Frasier R., Pelletier L., Moore T.R.* Greenhouse gas fluxes from boreal forest soils during the snow-free period in Quebec, Canada // Can. J. For. Res. 2009. V. 39. P. 666–680.

*Van Huissteden J., Maximov T.C., Dolman A.J.* High methane flux from an arctic floodplain (Indigirka lowlands, eastern Siberia) // J. Geophys. Res. 2005. V. 110. G02002.

*Waddington J.M., Roulet N.T., Swanson R.V.* Water table control of  $CH_4$  emission enhancement by vascular plants in boreal peatlands // J. Geophys. Res. 1996. V. 101. D17. P. 22775–22785.

*Ware J., Kort E.A., Duren R., Mueller K.L., Verhulst K., Yadav V.* Detecting urban emissions changes and events with a near-real-time-capable inversion system // J. Geophys. Res.: Atmospheres. 2019. V. 124. P. 5117–5130.

*Whiticar M.J.* Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane // Chem. Geology. 1999. V. 161. P. 291–314.

*Yevdokimov I.V., Yusupov I.A., Larionova A.A., Bykhovets S.S., Glagolev M.V., Shavnin S.A.* Thermal impact of gas flares on the biological activity of soils // Euras. Soil Sci. 2017. V. 50. P. 1455–1462.

Zeikus J.G., Winfrey M.R. Temperature limitation of methanogenesis in aquatic sediments // Appl. Environ. Microbiol. 1976. V. 31. P. 99–107.

# Methodologies for Measuring Microbial Methane Production and Emission from Soils—A Review

M. V. Glagolev<sup>1, 2, 3, 4, \*</sup>, O. R. Kotsyurbenko<sup>2</sup>, A. F. Sabrekov<sup>2, 3</sup>, Yu. V. Litti<sup>5</sup>, and I. E. Terentieva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

<sup>2</sup>Yugra State University, Khanty-Mansiysk, 628011 Russia

<sup>3</sup>Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

<sup>4</sup>Institute of Forest Science, Russian Academy of Sciences, Moscow region, 143030 Russia

<sup>5</sup>Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

\*e-mail: m\_glagolev@mail.ru

Received May 13, 2020; revised July 16, 2020; accepted August 7, 2020

Abstract—Methane is an important greenhouse gas. Prediction of its long-term effect on climate changes requires understanding of the sources of its release into the atmosphere. The present work aimed to review the most widely used modern methods for measuring microbial production and emission of methane in soils, and to assess their applicability to various microbial ecosystems. A classification of methods for measuring methane production in microbial soil ecosystems is proposed, based on the basic physical and mathematical approaches to data processing for each method. Under laboratory conditions, methane production is determined by soil samples incubation and layered mass balance methods, which make it possible to investigate the methanogenic potential of a microbial community for subsequent simulation of microbial processes; these methods, however, can not be directly extrapolated to natural ecosystems. To determine methane production in field experiments, gradient methods are used, as well as a "deep soil chamber technique" developed for wetlands. Methods for measuring methane emission are described, as well as their advantages and limitations. While traditional chamber techniques are simple and therefore widely used, their implementation is limited by such factors as changes in environmental conditions caused by using the chamber, small spatial scales, and difficulties in chamber installation in some ecosystems. More recently developed micrometeorological methods are free of these limitations and provide for proper estimations of gas emissions for a biogeocenosis even if these emissions are heterogeneous in space and time. To estimate emissions from such specific objects as landfills and livestock complexes or from large-scale areas (regional or even global), the "inverse modeling method" is used.

**Keywords:** methanogenesis, potential methane production, methane emission, chamber technique, micrometeorological methods, inverse modeling method