

جمهوری اسلامی ایران
وزارت جهاد کشاورزی
معاونت آب و خاک
دفتر امور خاک کشاورزی

دستورالعمل تهیه نقشه پراکندگی تنوع زیستی خاک

اسفند ۱۴۰۳

اصلاح مدارک فنی

خواننده گرامی:

معاونت آب و خاک وزارت جهاد کشاورزی، با استفاده از نظر کارشناسان برجسته مباردت به تهیه این دستورالعمل نموده و آن را برای استفاده به جامعه علمی و مهندسی کشور عرضه نموده است. با وجود تلاش فراوان، این اثر مصون از ایراد و اشکال نیست.

از این رو، از شما خواننده گرامی صمیمانه تقاضا دارد در صورت مشاهده هر گونه ایراد و اشکال فنی مراتب را به صورت زیر گزارش فرمایید:

- ۱- شماره بند و صفحه موضوع مورد نظر را مشخص کنید.
 - ۲- ایراد مورد نظر را به صورت خلاصه بیان دارید.
 - ۳- در صورت امکان متن اصلاح شده را برای جایگزینی ارسال نمایید.
 - ۴- نشانی خود را برای تماس احتمالی ذکر فرمایید.
- کارشناسان این امور نظرهای دریافتی را به دقت مطالعه نموده و اقدام مقتضی را معمول خواهند داشت. پیشاپیش از همکاری و دقت نظر جنابعالی قدردانی می شود.

نشانی برای مکاتبه: کرج، جاده ماه دشت، کیلومتر ۷، کد پستی: ۳۱۸۳۹۵۳۱۴۱

معاونت آب و خاک، دفتر امور خاک کشاورزی

web: swid.maj.ir

Email: Soiloffice98@gmail.com

دستورالعمل تهیه نقشه پراکندگی تنوع زیستی خاک

اعضای گروه تهیه کننده:

هانیه جعفری وفا	کارشناس ارشد شرکت مهندسین مشاور کاواب
فرهاد رجالی	عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات خاک و آب
محمد سهرابی	عضو هیأت علمی پژوهشکده زیست فناوری سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران
لیلا کاشی زنوزی	محقق موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور
شهره آریایی نژاد	عضو هیأت علمی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
ربابه لطیف	عضو هیأت علمی گروه زیست شناسی دانشگاه سمنان

اعضای گروه نظارت:

فایز رئیسی گهروئی	عضو هیأت علمی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه شهرکرد
احمدعلی پوربابایی	عضو هیأت علمی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تهران
ناصر علی اصغرزاد	عضو هیأت علمی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز
حسین ترابی گلسفیدی	عضو هیأت علمی گروه علوم و مهندسی خاکشناسی دانشگاه شاهد
شیرین محمودی	محقق مرکز ملی مدیریت منابع ژنتیکی کشاورزی و منابع طبیعی
شهرام شاهرخی	عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور
نجمه طیبی	کارشناس معاونت آب و خاک وزارت جهاد کشاورزی

نهاد تخصصی ارزیابی و تایید کننده نهایی:

بخش تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

عنوان	صفحه
۱- مقدمه و تعاریف.....	۱۰
۱-۱- مقدمه.....	۱۰
۲-۱- تعاریف.....	۱۰
۱-۲-۱- خاک.....	۱۰
۲-۲-۱- زیست بوم.....	۱۱
۳-۲-۱- عملکرد خاک.....	۱۱
۴-۲-۱- عملکرد زیست بوم.....	۱۱
۵-۲-۱- خدمات زیست بوم.....	۱۱
۶-۲-۱- تنوع زیستی خاک.....	۱۱
۷-۲-۱- باکتری.....	۱۱
۸-۲-۱- سیانوباکتری.....	۱۲
۹-۲-۱- قارچ.....	۱۲
۱۰-۲-۱- هیف یا ریشه های قارچ.....	۱۲
۱۱-۲-۱- آنزیم های خاک.....	۱۲
۱۲-۲-۱- پوسته های خاک.....	۱۲
۱۳-۲-۱- پوسته های زیستی.....	۱۳
۱۴-۲-۱- گل سنگ.....	۱۳
۳-۱- ضرورت ارزیابی تنوع زیستی خاک.....	۱۳
۴-۱- الزامات قانونی ارزیابی تنوع زیستی خاک.....	۱۴
۲- نمونه برداری.....	۱۷
۱-۲- انتخاب محل نمونه برداری.....	۱۷
۲-۲- زمان نمونه برداری.....	۱۷
۳-۲- روش نمونه برداری.....	۱۷
۱-۳-۲- نمونه برداری برای جمعیت نماتدها و تجزیه مولکولی.....	۱۷
۲-۳-۲- نمونه برداری برای جمعیت کرم خاکی.....	۱۸
۳-۳-۲- ارزیابی و نمونه برداری پوسته های زیستی خاک (جامعه گل سنگی و سیانوباکتریایی ویژه عرصه های طبیعی - غیر کشاورزی)	۱۹
۱-۳-۳-۲- انتخاب محل پلاتها و ترانسکتها.....	۱۹
۲-۳-۳-۲- تعداد ترانسکت.....	۱۹
۳-۳-۳-۲- طول ترانسکت و فواصل مابین آنها.....	۱۹

۲۰	۲-۳-۴- تعداد و سطح پلات
۲۰	۲-۳-۵- شکل پلات (مربع- دایره- مستطیل)
۲۰	۲-۳-۶- حداقل سطح مورد مطالعه الزامی برای ارزیابی پوسته‌های زیستی
۲۱	۲-۳-۷- زمان ارزیابی پوسته‌های زیستی
۲۱	۲-۳-۸- نمونه‌برداری خاک برای ارزیابی پوسته‌های زیستی
۲۲	۲-۴- گزارش اطلاعات تکمیلی
۲۲	۲-۴-۱- اطلاعات تکمیلی محل نمونه‌برداری
۲۳	۲-۴-۲- اطلاعات تکمیلی جامعه گل‌سنگی و سیانوباکتریایی (ویژه عرصه‌های طبیعی- غیرکشاورزی)
۲۵	۲-۵- الزامات نمونه‌برداری
۲۶	۲-۶- آماده‌سازی نمونه
۲۸	۳- روش‌های اندازه‌گیری
۲۸	۳-۱- سطح اولیه مطالعات
۲۸	۳-۱-۱- کربن زیست‌توده میکروبی
۳۰	۳-۱-۲- ضریب میکروبی (MBC/OC)
۳۱	۳-۱-۳- تنفس پایه
۳۲	۳-۱-۴- ضریب متابولیکی (BR/MBC)
۳۲	۳-۱-۵- سرعت برگشت کربن (BR/OC)
۳۲	۳-۱-۶- تنفس ناشی از سوبسترا
۳۳	۳-۱-۷- فراوانی و درصد بلوغ جمعیت کرم خاکی
۳۳	۳-۱-۸- جمعیت نماتد
۳۴	۳-۱-۹- ویژگی‌های پوسته‌های زیستی
۳۴	۳-۱-۹-۱- درصد پوشش سطحی پوسته‌های زیستی
۳۵	۳-۱-۹-۲- کلروفیل در نمونه خاک
۳۶	۳-۱-۹-۳- مواد اگزوپلی ساکاریدی در نمونه خاک
۳۹	۳-۲- سطح دوم مطالعات
۳۹	۳-۲-۱- جمعیت باکتری و قارچ
۴۲	۳-۲-۲- فعالیت آنزیم اوره‌آز
۴۴	۳-۲-۳- فعالیت آنزیم آلکالاین فسفاتاز
۴۵	۳-۲-۴- فعالیت آنزیم بتاگلوکوزیداز
۴۶	۳-۲-۵- فعالیت آنزیم سلولاز
۴۸	۳-۲-۶- فعالیت آنزیم دهیدروژناز

۵۰	۷-۲-۳- میانگین هندسی آنزیم‌ها.....
۵۰	۸-۲-۳- شاخص شانون آنزیم‌ها.....
۵۱	۹-۲-۳- فعالیت ویژه آنزیم‌ها.....
۵۱	۱۰-۲-۳- نسبت آنزیم به کربن آلی
۵۱	۱۱-۲-۳- ویژگی‌های پوسته‌های زیستی
۵۱	۱-۱۱-۲-۳- کشت، جداسازی و خالص‌سازی سیانوباکتری‌ها از خاک.....
۵۳	۲-۱۱-۲-۳- کشت، تکثیر و خالص‌سازی سیانوباکتری از پوسته‌های زیستی
۵۳	۳-۱۱-۲-۳- اندازه‌گیری کلروفیل در نمونه‌های سیانوباکتری
۵۵	۴-۱۱-۲-۳- اندازه‌گیری مواد اکزوپلی ساکاریدی در سیانوباکتری‌ها.....
۵۶	۳-۳- سطح تکمیلی مطالعات.....
۵۶	۱-۳-۳- بررسی تنوع ژنتیکی باکتری‌های خاک بر اساس متاژنومیکس
۵۶	۲-۳-۳- شناسایی سیانوباکتری‌ها بر اساس روش‌های مولکولی
۶۲	۴- محاسبه شاخص تنوع زیستی خاک.....
۶۲	۱-۴- نمره‌دهی متغیرها.....
۶۳	۲-۴- تلفیق نمرات و محاسبه شاخص تنوع زیستی خاک.....
۶۵	۵- تهیه نقشه تنوع زیستی خاک.....
۶۵	۱-۵- تهیه بانک اطلاعاتی داده‌ها.....
۶۶	۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری، ترسیم نقشه و ثبت سویه‌های جدید میکروبی
۶۸	فهرست منابع و مراجع.....

فهرست شکل‌ها

- شکل ۱-۱- ساختار مطالعات تنوع زیستی خاک ۱۵
- شکل ۱-۲- برش عرضی از تال یک گلسنگ ۲۵
- شکل ۱-۳- تصویر شماتیک کرم خاکی ۳۳
- شکل ۱-۵- نمونه کاربرگ اول برای ثبت داده‌های مطالعات تنوع زیستی خاک در اکسل ۶۵
- شکل ۲-۵- نمونه کاربرگ مختص به هر ویژگی اندازه‌گیری شده ۶۶

فهرست جدول‌ها

- جدول ۱-۲- طول و فواصل بین ترانسکت‌ها..... ۱۹
- جدول ۲-۲- حداقل سطح ارزیابی مورد نیاز در مناطق مختلف بوم‌شناختی با توجه به طول و فواصل بین ترانسکت‌ها..... ۲۰
- جدول ۳-۲- زمان حدودی مناسب برای نمونه‌برداری در مناطق مختلف بوم‌شناختی..... ۲۱
- جدول ۴-۲- نمونه برگه اطلاعات برداشت‌های میدانی از جامعه سیانوباکتریایی خاک..... ۲۲
- جدول ۵-۲- برگه اطلاعات تکمیلی نمونه خاک در اراضی کشاورزی..... ۲۳
- جدول ۱-۳- پرایمرهای ژن 16s rRNA برای شناسایی سیانوباکتری‌های خاکزی..... ۶۰

فصل ۱

مقدمه و تعاریف

۱- مقدمه و تعاریف

۱-۱- مقدمه

خاک‌ها به لحاظ زیستی متنوع‌ترین زیستگاه روی کره زمین محسوب می‌شوند؛ به طوری که محققان تخمین می‌زنند که در یک گرم خاک بیش از یک میلیارد سلول باکتری شامل ده‌ها هزار گونه مختلف، تا دویست متر هیف‌های قارچی و طیف گسترده‌ای از جانوران ریز و درشت مانند پرتوزوآها، نماتدها، بندپایان و کرم‌های خاکی را می‌توان یافت. خاک یک سیستم پیچیده و ناهمگن با تغییرات زمانی و مکانی زیاد است. در این بستر خاکدانه‌های آلی-معدنی در اندازه‌های گوناگون، زیستگاه‌های متعددی ایجاد می‌کنند که می‌توانند شرایط هوازی، نیمه هوازی و یا بی‌هوازی داشته باشند. از این روی، تعداد بی‌شماری از گونه‌های میکروبی و جانوری با اندازه (بر اساس عرض بدن از ۲۰ نانومتر تا ۲۰ تا ۳۰ سانتی‌متر) و بوم‌شناسی مختلف در خاک وجود دارند (1).

به طور متعارف تنوع زیستی خاک تعداد گونه‌های متمایز را نشان می‌دهد اما این مفهوم قابل تعمیم به تنوع ژنتیکی، فنوتیپی، عملکردی، ساختاری یا تغذیه‌ای است. بنابراین تنوع زیستی خاک به گوناگونی ژن‌ها تا گونه‌ها و جوامعی که تشکیل می‌دهند و عملکرد آنها اشاره دارد (2). بر اساس اطلس جهانی تنوع زیستی خاک، بیشترین تنوع زیستی در خاک‌های مناطق معتدل و مرطوب گرمسیری یافت می‌شود. پس از آن خاک‌های با درجه حرارت بالا و بارندگی کم قرار دارند. سطح پایین‌تر تنوع زیستی در خاک‌های سرد و خشک است. کمترین میزان تنوع زیستی خاک در ارتباط با شرایط دشوار دمایی (بسیار گرم یا بسیار سرد) است (3). دانش مرتبط با تنوع زیستی خاک پس از آغاز برنامه‌های جهانی «ابتکار بین‌المللی برای محافظت و استفاده پایدار از تنوع زیستی خاک» در سال ۲۰۰۲ و مشارکت جهانی خاک (GSP) در سال ۲۰۱۲ و چاپ اطلس جهانی تنوع زیستی خاک در سال ۲۰۱۶ افزایش زیادی داشت. همچنین این موضوع مرهون پیشرفت شگرف در روش‌های مطالعه جانداران خاک بود (1). هم اکنون نیز تنوع زیستی خاک یکی از ده حوزه عملیاتی مشارکت جهانی خاک محسوب شده و ترویج استفاده پایدار از تنوع زیستی خاک و حفاظت از آن در شبکه بین‌المللی تنوع زیستی خاک (NETSOB) دنبال می‌شود.

۱-۲- تعاریف

۱-۲-۱- خاک

خاک پیکره‌ای طبیعی، متحول و پویا است که طی مجموعه‌ای از واکنش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی و متأثر از آب، اقلیم و موجودات زنده، با گذر زمان روی پوسته زمین یا سنگ مادر به وجود می‌آید. این تعریف شامل خاک درجا و رسوبی نیز می‌شود (4).

۱-۲-۲- زیست‌بوم

زیست‌بوم شامل تمام موجودات زنده، محیط پیرامون و همه روابط متقابل آنها است. در واقع زیست‌بوم به جامعه یا گروهی از موجودات زنده اطلاق می‌شود که در یک محیط مشخص زندگی کرده و با یکدیگر و همه‌ی عوامل و اجزای فیزیکی غیرزنده محیط در تعامل هستند (5).

۱-۲-۳- عملکرد خاک

فرایندهای طبیعی مانند چرخه عناصر غذایی، چرخه آب و هوادیدگی که تمام و یا بخشی از آنها در خاک رخ می‌دهد، عملکرد خاک محسوب می‌شوند (6).

۱-۲-۴- عملکرد زیست‌بوم

به شرایط و فرایندهای بوم‌شناختی که منجر به تحقق و حفظ زندگی انسان و دیگر موجودات زنده می‌شود، عملکرد زیست‌بوم می‌گویند. در واقع اثرات متقابل و تعاملات پیچیده بین اجزای زیستی (موجودات زنده) و غیرزیستی (محیط پیرامون موجودات زنده) زیست‌بوم‌ها که منجر به پدیده‌هایی از قبیل فتوسنتز، گرده‌افشانی و تجزیه مواد می‌شود، عملکرد زیست‌بوم به شمار می‌آید (7).

۱-۲-۵- خدمات زیست‌بوم

به مزایا و مشارکت‌های مستقیم و غیرمستقیم زیست‌بوم‌ها در تأمین رفاه انسان مانند تولید غذا، تصفیه آب، تنظیم آب و هوا، ترسیب کربن، کنترل سیل، چرخه آب و عناصر غذایی، تولید اکسیژن جو و تشکیل خاک خدمات زیست‌بوم اطلاق می‌شود (8).

۱-۲-۶- تنوع زیستی خاک

تنوع زیستی خاک نشان‌دهنده گوناگونی حیات در خاک است که می‌تواند ظرفیت (پتانسیل) خاک را در مواردی از قبیل کشاورزی پایدار، افزایش تاب‌آوری در مقابل تنش‌ها (از جمله تغییرات اقلیمی، اصلاح و پالایش خاک و در تغذیه و داروسازی نشان دهد (9).

۱-۲-۷- باکتری

باکتری‌ها ریزسازواره‌های تک‌یاخته‌ای هستند که تمام آنچه که برای ادامه حیات خود نیاز دارند را دارا می‌باشند. این موجودات که به صورت تکی باکتریوم نامیده می‌شوند، در دسته سلول‌های پروکاریوتی جای می‌گیرند. به این معنا که سلولی است فاقد هسته و اندامک و ماده ژنتیکی آن در داخل سلول آزادانه می‌چرخد. این جانداران میلیاردها سال قبل از گیاهان و حیوانات روی زمین وجود داشتند. آنها در اشکال مختلف مانند سلول‌های کروی، میله‌ای شکل یا مارپیچی وجود دارند و با

انواع متنوعی از متابولیسم، به شدت با شرایط مختلف محیطی سازگار می‌شوند. باکتری‌ها در تمام کره زمین، از چشمه‌های آب گرم تا قطب شمال یافت می‌شوند (1).

۱-۲-۸- سیانوباکتری

سیانوباکتری‌ها همان باکتری‌های فتوسنتزکننده یک یا چند سلولی هستند که با استفاده از دی‌اکسید کربن جو (به عنوان منبع کربن) و نور خورشید (به عنوان منبع انرژی)، ترکیبات آلی تولید می‌کنند. جانداران دیگر می‌توانند از این ترکیبات آلی استفاده کنند (1).

۱-۲-۹- قارچ

قارچ‌ها گروه بسیار متنوعی از موجودات زنده هستند که طیف وسیعی از اشکال حیات را در بر می‌گیرند. اغلب گونه‌های قارچی که تاکنون ثبت شده‌اند حداقل بخشی از چرخه زندگی خود را در خاک سپری می‌کنند. قارچ‌های خاک چرخه کربن را هدایت می‌کنند و با قابلیت تجزیه بسیاری از مواد پیچیده، بخشی جدایی‌ناپذیر از شبکه‌های غذایی خاک به شمار می‌روند (1).

۱-۲-۱۰- هیف یا ریشه‌های قارچ

هیف یا ریشه‌های قارچ ساختار سلولی طولی، رشته‌ای و منشعبی هستند که در اغلب قارچ‌ها با رشد و توسعه خود، شکل‌دهنده پیکره و حالت‌دهنده اصلی شکل قارچ محسوب می‌شوند (1).

۱-۲-۱۱- آنزیم‌های خاک

آنزیم‌ها در فرایندهای بیوشیمیایی خاک نقش فعال دارند، سرعت متابولیسم را افزایش می‌دهند و نقش مهمی در جریان انرژی و انتقال در خاک و اکوسیستم ایفا می‌کنند. از عوامل کلیدی چرخه عناصر از جمله کربن، نیتروژن و فسفر هستند. میزان فعالیت آنزیمی یک شاخص مناسب برای ارزیابی کیفیت و سلامت خاک محسوب می‌شود (10).

۱-۲-۱۲- پوسته‌های خاک

پوسته‌های خاک مرزهای بوم‌شناختی هستند که جریان مواد و انرژی در فضای بین جو و سطح خاک و بین توده خاک و ریشه‌های گیاه را کنترل می‌کنند (11). پوسته‌ها از اصلی‌ترین ویژگی‌های ساختاری سطح خاک‌ها و رسوبات به ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک هستند. پوسته‌های خاک به چند نوع پوسته‌های شیمیایی، فیزیکی و زیستی تقسیم‌بندی می‌شوند. پوسته‌های شیمیایی و فیزیکی جزء پوسته‌های غیر زیستی سطح خاک محسوب می‌شوند که وجود آن‌ها، ویژگی بسیاری از مناطق بیابانی است (11). در مناطق خشک و نیمه خشک، که بیش از ۴۰٪ سطح خشکی‌های جهان را شامل می‌شوند، پوسته

¹ Hyphae

های فیزیکی و زیستی خاک گسترده شده‌اند. اگر چه پوسته‌های فیزیکی و زیستی تقریباً بخش ناچیزی از پروفیل خاک را شامل می‌شوند (کمتر از یک تا چند میلی‌متر ضخامت)، اما به ویژه در مناطق کم آب، چندین نقش را بر عهده دارند (12).

۱-۲-۱۳- پوسته‌های زیستی

پوسته‌های زیستی خاک اجتماعی تنگاتنگ بین ذرات خاک و موجودات زنده‌ای از قبیل سیانوباکتری، جلبک‌ها، قارچ‌ها، گل‌سنگ‌ها، خزها و هیپاتیک‌ها^۲ در نسبت‌های مختلف هستند که روی سطح خاک یا در عمق چند میلی‌متری لایه فوقانی خاک زندگی می‌کنند. ذرات پراکنده خاک بواسطه حضور و فعالیت این موجودات زنده به همدیگر متصل می‌شوند و در نتیجه پوشش پوسته‌های زیستی به عنوان یک لایه منسجم سطح زمین را می‌پوشانند (11).

۱-۲-۱۴- گل‌سنگ

هم‌زیستی بین یک جلبک سبز و یا سیانوباکتری به عنوان شریک هم‌زیست فتوسنتز کننده (فوتوبیونت) و یک بخش قارچی هتروتروف به عنوان یک شریک غیر فتوسنتز کننده (مایکوبیونت) منجر به تشکیل اجتماع یا کنسرسیومی از یک بیوفیلم متحدالشکل می‌شود که گل‌سنگ نام دارد که ممکن است با حضور برخی قارچ‌های مخمر بازیدیومیستی و باکتری‌های غیر فتوسنتز کننده دخیل در هم‌زیستی و شبه ویروس‌ها همراه باشد.

۱-۳- ضرورت ارزیابی تنوع زیستی خاک

حفاظت از تنوع زیستی خاک یک عامل کلیدی تعیین‌کننده در پایداری سلامت خاک و خدمات زیست‌بوم است. با این وجود، غالباً در مدیریت خاک بر مدیریت حاصلخیزی به جای حفاظت از تنوع زیستی تمرکز می‌شود. این در شرایطی است که سلامت خاک علاوه بر تولید غذا، می‌تواند تولید آب زیرزمینی سالم، ذخیره کربن و نیتروژن آلی و در نتیجه کاهش انتشار گازهای گلخانه‌ای، تنظیم دسترسی گیاهان و ریزجانداران به آب خاک و کنترل عوامل بیماری‌زا را تضمین کند (1). گستره وسیعی از جانداران خاک از جمله مهندسان زیست‌بوم و ریزجانداران مفید مانند قارچ‌های میکوریزا و باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن نقش مهمی در خدمات زیست‌بوم دارند. نقش مهم تنوع زیستی خاک در عملکرد زیست‌بوم و فراهم کردن خدمات زیست‌بومی ممکن است به دلیل فعالیت‌های انسانی و یا فجایع طبیعی تهدید شود؛ اگرچه دلیل دوم نیز ممکن است تحت تأثیر دخالت‌های انسان در طبیعت باشد. کاهش تنوع زیستی خاک می‌تواند بر خدمات زیست‌بوم همچون بهره‌وری اولیه گیاه و تولید غذا، کیفیت آب، چرخه عناصر غذایی و تشکیل ساختار خاک تأثیر منفی بگذارد. تنوع زیستی خاک در مناطق مختلف جهان در معرض خطرات مشابه نیست. در مناطق بوم‌شناختی بیابان‌ها و بوته‌زارهای خشک، علفزارهای گرمسیری و نیمه گرمسیری و جنگل‌های پهن‌برگ و معتدل و مختلط بیشترین عوامل خطر وجود دارد (2).

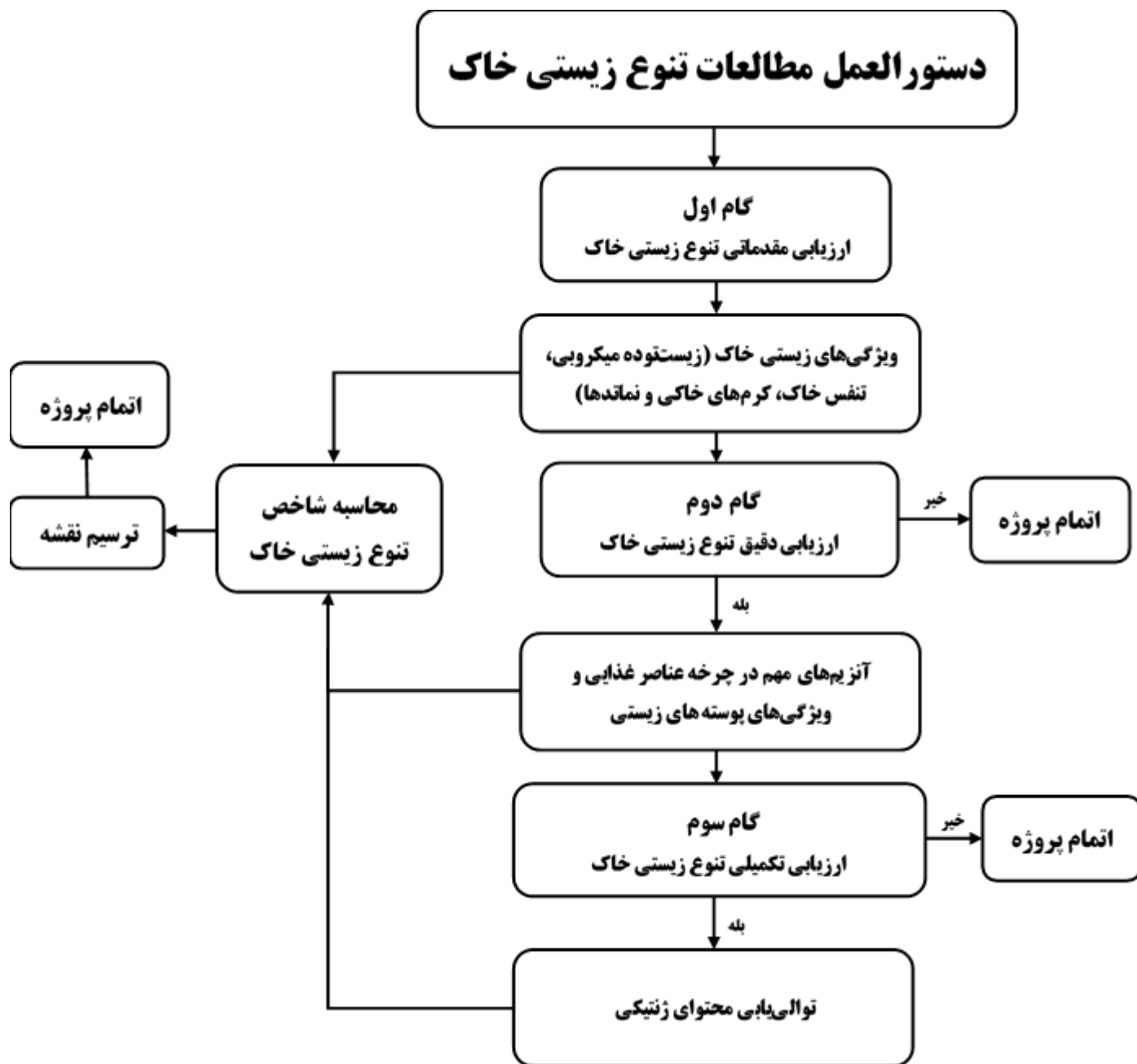
² Hepatica

جنگل‌زدایی، توسعه شهرنشینی، گسترش و توسعه کشاورزی شدید، از دست دادن مواد آلی/کربن خاک، فشرده‌سازی خاک، سلب‌بندی، اسیدی شدن خاک، عدم تعادل عناصر غذایی، آلودگی، شوری، سدیمی شدن، بیابان‌زایی، آتش‌سوزی، فرسایش و رانش زمین از مهم‌ترین عواملی است که تنوع زیستی خاک را در معرض خطر قرار داده است. شایع‌ترین خطر برای تنوع زیستی خاک در دنیا هدررفت مواد آلی خاک است که این عامل در ارتباط با سایر عوامل تهدیدکننده از قبیل جنگل‌زدایی، گسترش و توسعه کشاورزی (هر دو مرتبط با تغییر کاربری اراضی) و تغییر اقلیم (به ویژه در مناطق توندرا) می‌باشد. عوامل تهدیدکننده تنوع زیستی خاک نه تنها همزمان رخ می‌دهند، بلکه ممکن است اثرات تجمعی، متقابل و یا افزایشی بر هم داشته باشند (2).

بررسی و ارزیابی وضعیت تنوع زیستی خاک در مقیاس منطقه‌ای و جهانی برای حفاظت و مدیریت آن در سطح زیست‌بوم اهمیت دارد. تاکنون ۲۲ کشور در جهان اقدام به نقشه‌برداری تنوع زیستی خاک کرده‌اند (1). برای اندازه‌گیری تنوع زیستی خاک از شاخص‌های گوناگون در کشورهای مختلف استفاده شده است و شاخص‌های مربوط به مدیریت حاصلخیزی خاک و پس از آن شاخص‌های مرتبط با ترسیب کربن خاک از عمومیت بیشتری برخوردار هستند. با وجود تمام مطالعات و پژوهش‌ها، انتخاب شاخص‌های زیستی که به خوبی بیانگر وضعیت تنوع زیستی خاک در هر منطقه باشند همچنان یک چالش به شمار می‌آید (2).

۱-۴- الزامات قانونی ارزیابی تنوع زیستی خاک

در کشور ما در راستای آیین‌نامه اجرایی قانون حفاظت از خاک، نقشه پراکندگی تنوع زیستی خاک کشور با اولویت اراضی زراعی و باغی باید ترسیم شده و برنامه مدیریت و حفاظت از آن تدوین و ارایه شود (9). همچنین بر مبنای آیین‌نامه مذکور، بایستی در مطالعات ارزش اقتصادی خاک ارزش غیربازاری نظیر خدمات محیط زیستی و تنوع زیستی هم در نظر گرفته شود (9) که خود مستلزم تبیین روش اندازه‌گیری و ارزیابی تنوع زیستی خاک است. برای اجرای این آیین‌نامه بایستی در ابتدا دستورالعملی جامع و مطابق استانداردهای جهانی برای تعیین تنوع زیستی خاک و ترسیم نقشه آن تدوین شود. بنابراین هدف اصلی این دستورالعمل، ارائه روشی اجرایی برای اندازه‌گیری، ارزیابی و ترسیم نقشه تنوع زیستی خاک‌های کشور با الهام از تجربیات جهانی و متناسب با اقلیم منحصربه‌فرد ایران، منابع موجود، امکانات و زیرساخت‌ها است. بدین منظور، در طی جلسات متعدد با متخصصان این عرصه تصمیم بر آن شد تا مطالعات تنوع زیستی خاک در کشور در سه گام اجرایی تعریف شود. گام اول مطالعات برای طرح‌های ارزیابی تنوع زیستی خاک کشور لازم‌الاجرا است. بنا بر هدف، بودجه و امکانات در دسترس، گام دوم مطالعات می‌تواند در تمام مکان‌های مورد بررسی و یا در شماری از آنها انجام شود. در نهایت با توجه به نتایج به دست آمده در گام‌های اول و دوم مطالعات تنوع زیستی خاک و شناسایی کانون‌های تنوع زیستی، بنابر صلاحدید کارشناسان می‌توان گام سوم مطالعات را برای به دست آوردن اطلاعات تکمیلی در نقاط خاصی اجرا نمود (شکل ۱-۱).



شکل ۱-۱- ساختار مطالعات تنوع زیستی خاک

فصل ۲

نمونه برداری و آماده سازی نمونه خاک

۲- نمونه برداری

نمونه برداری صحیح خاک و آماده سازی نمونه مهم ترین مرحله در مطالعات علوم خاک است، به طوری که بهترین تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی نمی تواند این ضعف را جبران کند (13). در واقع کار دقیق میدانی و آزمایشگاهی نمونه های خاک به این معنی است که تغییرپذیری داده ها و نتایج، ناشی از تغییرپذیری نمونه است. بنابراین الگوی نمونه برداری عامل محدودکننده دقت بوده (14) و در افزایش صحت نتایج تنوع زیستی خاک نقش بسزایی دارد.

۲-۱- انتخاب محل نمونه برداری

مطالعات تنوع زیستی خاک و ترسیم نقشه آن در کشور ما در پایگاه های مطالعاتی پایش کیفیت خاک (بنچ مارک ها) اجرا خواهد شد.

۲-۲- زمان نمونه برداری

زمان دقیق نمونه برداری به شرایط محیطی منطقه وابسته است. هوای گرم و خشک شرایط نامساعدی برای نمونه برداری نماتدها و حتی کرم های خاکی ایجاد می کند (15). بنابراین بهتر است نمونه برداری مطالعات تنوع زیستی خاک در دما و رطوبتی مشابه با فصل بهار انجام شود. در اقلیم های مختلف کشور، چنین شرایطی از اواسط زمستان تا اواسط بهار فراهم خواهد شد. در نتیجه تعیین زمان مطلوب نمونه برداری مطالعات تنوع زیستی خاک به اقلیم منطقه مورد مطالعه بستگی دارد. بر اساس شرایط آب و هوایی منطقه مورد مطالعه، زمان نمونه برداری را در بازه بهمن تا اردیبهشت ماه انتخاب کنید. برای محدود کردن هر چه بیشتر اثرات فصلی و زمانی، همه نمونه ها در کوتاه ترین بازه زمانی ممکن جمع آوری شوند (16). اگر منطقه مورد مطالعه جزو اراضی فعال کشاورزی بود یک تا دو هفته پس از برداشت محصول اصلی (زمستانه یا بهاره) و قبل از هر مرحله عملیات کشاورزی دیگری، نمونه برداری انجام شود (15).

۲-۳- روش نمونه برداری

۲-۳-۱- نمونه برداری برای جمعیت نماتدها و تجزیه مولکولی

در محل نمونه برداری یک قطعه 18×18 متر مربع نسبتاً همگن و منعکس کننده خصوصیات سایت (مانند خاک، پوشش گیاهی و کاربری زمین) انتخاب گردد. در مرکز، رئوس و میانه اضلاع قطعه (در مجموع ۹ نقطه) بایستی به وسیله اوگر (در

صورت نبود اوگر به کمک بیل) نمونه برداری انجام شود. بنابراین در هر قطعه ۹ زیرنمونه در عمق صفر تا ۲۰ سانتی متر جمع آوری و یک نمونه مرکب تهیه کنید.

ملاحظات

۱- اگر دمای هوا در زمان نمونه برداری بیش از ۱۵ درجه سانتی گراد است، باید نمونه های خاک در جعبه های خنک^۴ در دمای چهار درجه سانتی گراد قرار گیرند تا در برابر نور و گرما محافظت شوند. نمونه ها در اسرع وقت به آزمایشگاه مرجع منتقل شده و در یخچال نگهداری شوند تا تغییرات در ویژگی های زیستی به حداقل برسد (15).

۲- بایستی نماتدها در کمترین زمان ممکن، از نمونه خاک مرطوب استخراج شوند. پس از استخراج و تثبیت آنها در فیکساتیو، در نوبت تجزیه قرار می گیرند (15).

۳- برای بررسی تنوع ژنتیکی خاک در گام سوم مطالعات، نمونه ها به مدت محدود در دمای ۴ درجه سانتی گراد قابل نگهداری هستند و بایستی استخراج DNA آنها در حداقل زمان ممکن انجام شود. نمونه هایی که در دمای منفی نگهداری می شوند می توانند از نظر ترکیب جمعیت میکروبی تغییر کنند.

۲-۳-۲- نمونه برداری برای جمعیت کرم خاکی

در مرکز قطعه نمونه برداری (زیربخش ۲-۳-۱) محدوده ای با ابعاد ۱×۱ متر مشخص کرده پوشش گیاهی سطح زمین را بریده و جدا کنید، اما ریشه ها در خاک باقی بمانند. اگر در سطح زمین لایه لاشبرگ وجود داشت، به دقت حضور کرم خاکی در آن را بررسی کنید. محدوده علامت گذاری شده را با بیلچه برش زده و با بیل تا عمق ۲۰ سانتی متری حفر کنید (13). برای جلوگیری از فرار جانور مذکور، خاک حفر شده را روی یک لایه پلاستیکی مانند نایلون زباله یا یک سینی بزرگ با ابعاد ۵۰×۲۵ سانتی متر و با عمق ۲۰ سانتی متر بریزید. دستکش یکبار مصرف را پوشیده و به دقت خاک و ریشه گیاهان را بررسی کنید. تمام کرم های خاکی بالغ و نابالغ بایستی جداسازی شده و همراه با مقداری خاک فوراً به ظروف پلاستیکی دارای در و پرچسب منتقل شوند. برای جلوگیری از کاهش زیست توده کرم های خاکی تا زمان رسیدن به آزمایشگاه، این ظروف را در جعبه خنک و دور از نور مستقیم خورشید نگهداری کنید. پس از اتمام کار، خاک ها را به گودال برگردانده و محل نمونه برداری را تمیز کنید (15).

ملاحظات

۱- زمان نمونه برداری باید خاک به اندازه کافی مرطوب و جانوران خاک فعال باشند. این شرایط بر اساس منطقه، آب و هوا، پوشش گیاهی و کاربری زمین متفاوت است، اما معمولاً با فصل بارانی همزمان می باشد.

۲- حداکثر تا ۲۴ ساعت بعد از نمونه برداری، کرم های خاکی باید شمارش و تعداد بالغ و نابالغ آنها تعیین شوند. اگر برای مقاصد خاص، هدف دارید به مدت طولانی نمونه ها را نگهداری کنید، در طی این زمان بایستی به فیکساتیو منتقل شوند.

^۴ Cool Box

۲-۳-۳- ارزیابی و نمونه برداری پوسته های زیستی خاک (جامعه گلشنی و سیانوباکتریایی ویژه عرصه های طبیعی - غیر کشاورزی)

۲-۳-۳-۱- انتخاب محل پلات ها و ترانسکت ها

طی بازدیدهای صحرایی، ابتدا تیپ غالب پوسته های زیستی منطقه بایستی تعیین شود. در داخل تیپ غالب، پوسته های زیستی محدوده مورد مطالعه مشخص می گردند. نمونه گیری در این محدوده به روش تصادفی - سیستماتیک خواهد بود. بدین منظور محل اولین خط ترانسکت در منطقه مورد مطالعه را با پرتاب سنگ بصورت تصادفی تعیین کنید. محل اولین پلات روی هر خط ترانسکت نیز تصادفی خواهد بود. انتخاب دیگر ترانسکت ها و دیگر پلات ها روی هر ترانسکت را به صورت سیستماتیک انجام دهید. به این ترتیب موقعیت اولین ترانسکت و اولین پلات تصادفی انتخاب شده و موقعیت بقیه ترانسکت ها و پلات ها به صورت سیستماتیک خواهد بود. همه ترانسکت ها را موازی هم و عمود بر شیب عمومی منطقه تعیین کنید. مزیت این روش این است که سه تا چهار ترانسکت با فواصل منظم در ارتفاعات مختلف یک دامنه انداخته می شوند لذا آمار هر ترانسکت بیانگر اختلافات ارتفاعی دامنه ها نیز خواهد بود.

۲-۳-۳-۲- تعداد ترانسکت

برای مناطق مرطوب (به دلیل یکنواخت تر بودن جوامع پوسته های زیستی و خاک) تعداد حداقل ۳ عدد ترانسکت و برای سایر مناطق حداقل برابر ۴ عدد ترانسکت می باشد.

۲-۳-۳-۲- طول ترانسکت و فواصل مابین آنها

طول و فواصل بین ترانسکت ها بر اساس موارد مندرج در جدول ۱-۲ می باشد. هر چه جامعه پوسته های زیستی از یکنواختی بیشتری برخوردار باشد، طول و فاصله بین ترانسکت ها کمتر در نظر گرفته خواهد شد و برعکس.

جدول ۱-۲- طول و فواصل بین ترانسکت ها

منطقه اکولوژیک	طول ترانسکت	فواصل بین ترانسکت ها
مرطوب و نیمه مرطوب	۵۰ تا ۱۰۰ متر	۵۰ تا ۱۰۰ متر
کوه های مرتفع	۵۰ تا ۱۰۰ متر	۵۰ تا ۱۰۰ متر
نیمه استپی	۵۰ تا ۱۰۰ متر	۵۰ تا ۱۰۰ متر
استپی	۱۵۰ متر	۱۰۰ متر
بیابانی	۲۰۰ متر	۱۰۰ متر
عمانی و بلوچی	۳۰۰ متر	۵۰ تا ۱۰۰ متر

۲-۳-۳-۴- تعداد و سطح پلات

- منطقه مرطوب و نیمه مرطوب: ۳۰ عدد پلات ۰/۵ در ۰/۵ (چمنزارها و غلفزارهای پیوسته و انبوه) تا ۱ در ۱ (تیپ گیاهان بالشتکی و گندمیان پایا و یا تیپ گندمیان پایا و بوته) ۴۰ پلات
- منطقه کوه‌های مرتفع: ۳۰ عدد پلات ۰/۵ در ۰/۵ (چمنزارهای انبوه)
- منطقه نیمه استپی: ۴۰ عدد پلات ۱ در ۱ تا ۲ در ۲ (بسته به یکنواختی و همگن بودن پوشش پوسته‌های زیستی) ۵۰ پلات

- منطقه استپی: ۶۰ عدد پلات ۲ در ۱ تا ۲ در ۲ (بسته به یکنواختی و همگن بودن پوشش پوسته‌های زیستی) ۸۰ پلات
- منطقه بیابانی: ۶۰ عدد پلات ۲ در ۱ تا ۳ در ۴ (بسته به یکنواختی و همگن بودن پوشش پوسته‌های زیستی) ۱۲۰ پلات

- منطقه عمانی و بلوچی: ۴۰ عدد پلات ۲ در ۲ (مناطق با غالبیت پوشش پوسته‌های زیستی سیانوباکتریایی) تا ۳ در ۳ (مناطق با پوشش غالب پوسته‌های زیستی سیانوباکتری و خز) و همچنین ۸۰ پلات (بسته به غالبیت پوسته‌های زیستی سیانوباکتری، خز و گل‌سنگ)

۲-۳-۳-۵- شکل پلات (مربع - دایره - مستطیل)

در مراتع مناطق مرطوب و نیمه استپی غالباً به شکل مربع و در سایر نقاط به شکل مربع یا مستطیل بسته به ابعاد پلات می‌باشد.

۲-۳-۳-۶- حداقل سطح مورد مطالعه الزامی برای ارزیابی پوسته‌های زیستی

حداقل سطحی که برای ارزیابی پوسته‌های زیستی بایستی مورد بررسی قرار بگیرد، در مناطق بوم‌شناختی مختلف متفاوت می‌باشد. در جدول ۲-۲ حداقل سطح مورد نیاز برای بررسی پوسته‌های زیستی یک منطقه آورده شده است.

جدول ۲-۲- حداقل سطح ارزیابی مورد نیاز در مناطق مختلف بوم‌شناختی با توجه به طول و فواصل بین ترانسکت‌ها

منطقه بوم‌شناختی	حداقل سطح ارزیابی	توضیحات
مرطوب و نیمه مرطوب	۴ تا ۸ هکتار	بسته به طول و فواصل ترانسکت‌ها و بر اساس جامعه پوسته‌های زیستی
کوه‌های مرتفع	۲ تا ۳ هکتار	بسته به طول و فواصل ترانسکت‌ها و بر اساس جامعه پوسته‌های زیستی
نیمه استپی	۵ تا ۶ هکتار	بسته به طول و فواصل ترانسکت‌ها و بر اساس جامعه پوسته‌های زیستی
استپی	۱۳ هکتار	-
بیابانی	۱۵ هکتار	-

عمانی و بلوچی	۱۲ تا ۲۰ هکتار	بسته به طول و فواصل ترانسکت ها و بر اساس جامعه پوسته های زیستی
---------------	----------------	---

۲-۳-۳-۷- زمان ارزیابی پوسته های زیستی

زمان ارزیابی پوسته های زیستی تاثیر بسیار زیادی بر نتایج آن دارد و بایستی زمانی عملیات ارزیابی و نمونه برداری انجام شود که عرصه طبیعی از آمادگی لازم برخوردار باشد. با توجه به منطقه بوم شناختی، ترکیب گیاهی و سایر عوامل تأثیرگذار در تخریب پوسته های زیستی خاک از جمله زمان حضور دام، زمان مناسب عملیات ارزیابی متفاوت خواهد بود. در جدول ۲-۳ زمان حدودی آمادگی مناطق مختلف بوم شناختی برای نمونه برداری آورده شده است.

جدول ۲-۳- زمان حدودی مناسب برای نمونه برداری در مناطق مختلف بوم شناختی

منطقه بوم شناختی	زمان مناسب برای نمونه برداری
مرطوب و نیمه مرطوب	اوایل خرداد تا اوایل تیر ماه
کوه های مرتفع	اواخر خرداد تا اواسط تیر ماه
نیمه استپی	اوایل خرداد تا اوایل تیر ماه
استپی	۱- اواسط اردیبهشت تا اواسط خرداد ماه ۲- اواخر مهر تا اواسط آبان ماه
بیابانی	۱- اواسط اردیبهشت تا اواسط خرداد ماه ۲- اواخر مهر تا اواسط آبان ماه
عمانی و بلوچی	اواسط اسفند تا اوایل فروردین ماه

۲-۳-۳-۸- نمونه برداری خاک برای ارزیابی پوسته های زیستی

عمق نمونه برداری خاک در مناطق بیابانی، استپی و عمانی و بلوچی تا ۱۰ سانتی متر و در مناطق نیمه استپی و مرطوب تا ۲۰ سانتی متر خواهد بود. نمونه های خاکی که از پای بوته ها برداشته می شود باید همواره از پای یک بوته مشخص برداشته شوند. زیرا گونه های مختلف تاثیرات متفاوتی بر خاک پای خود خواهند داشت. برای برداشت خاک باید لاشبرگ و خاشاک را کنار زده و سپس از سطح رویی خاک برداشت انجام شود. برداشت خاک در طول ترانسکت های اول، دوم و سوم انجام خواهد شد. به این ترتیب که در طول ترانسکت های یاد شده ۳ بار از فضای بین بوته ها خاک ها جمع آوری شده و با هم مخلوط می شوند. همچنین ۳ بار از پای یک بوته مشخص خاک ها برداشت شده و مخلوط می شوند. به این ترتیب ۶ نمونه خاک خواهیم داشت. اگر قرق وجود داشته باشد باید ۱۲ نمونه خاک جمع آوری شود. ۶ عدد از داخل قرق و ۶ عدد دیگر از خارج قرق بر اساس دستورالعمل یاد شده. نمونه های خاک جمع آوری شده را در جعبه های خنک قرار دهید و در اسرع وقت به آزمایشگاه

منتقل کرده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری کنید. نمونه برگه اطلاعات برداشت میدانی به صورت زیر در جدول ۲-۴ آورده شده است:

جدول ۲-۴- نمونه برگه اطلاعات برداشت های میدانی از جامعه سیانوباکتریایی خاک

شماره قطعه نمونه:	تاریخ برداشت:	برداشت کننده :	نام منطقه:	مختصات جغرافیایی:
ارتفاع از سطح دریا:	جهت شیب:	درصد شیب:		
گونه (گونه های غالب گیاهی):				
ضخامت لایه:	رنگ خاک:		عمق خاک:	
اثـر تخریب:	اثـر چـرای دام:		اثـر آتـش سوزی در منطقه:	

ملاحظات

- چنانچه دامنه کوه کوتاه بود می توان طول و فواصل ترانسکت ها را کمتر در نظر گرفت.
- سطح پلات باید به نحوی در نظر گرفته شود که دو برابر بزرگترین گونه گیاهی موجود در منطقه باشد.
- هر چه پراکنش گیاهی غیر یکنواخت تر باشد (مانند زیست بوم های گرم و خشک در مناطق استپی و بلوچی) باید تعداد پلات بیشتری در نظر گرفته شود.

۲-۴- گزارش اطلاعات تکمیلی

۲-۴-۱- اطلاعات تکمیلی محل نمونه برداری

توصیف کامل محل نمونه برداری نه تنها زمینه را برای بررسی خصوصیات مختلف خاک فراهم می کند، بلکه ابزار مفیدی در ارزیابی و تفسیر نتایج آزمایشگاهی نمونه خاک است. در زمان نمونه برداری داده هایی از قبیل مکان نمونه (مختصات گرفته شده در نقطه مرکزی قطعه)، پوشش گیاهی (پوشش و ترکیب)، شیب، ارتفاع از سطح دریا، موقعیت در سیمای سرزمین (شیب بالا، میانه و پایین، دره، خط الراس) و تاریخچه کاربری زمین را جمع آوری نمایید. همچنین از قطعه خاک، کرم های خاکی جمع آوری شده و محیط اطراف عکس تهیه شود (14). در جدول ۲-۵ نمونه فرم اطلاعات تکمیلی برای اراضی کشاورزی و غیر کشاورزی آورده شده که در حین عملیات نمونه برداری بایستی تکمیل شوند.

جدول ۲-۵- برگه اطلاعات تکمیلی نمونه خاک در اراضی کشاورزی

برگه اطلاعات نمونه برداری خاک برای ارزیابی تنوع زیستی			
ویژگی های عمومی	شرح	ویژگی های عمومی	شرح
نام نمونه بردار		کد نمونه	
شهر و استان		تعداد زیر نمونه	
تلفن		مختصات جغرافیایی (UTM)	X:
تاریخ نمونه برداری			Y:
عمق نمونه برداری		سطح مورد نمونه برداری	
شرایط آب هوایی	آفتابی ☐ ابری ☐ بارانی ☐ وزش باد شدید ☐	بافت خاک	درشت ☐ متوسط ☐ ریز ☐
دمای هوا	۱۰-۲۰ ☐ ۲۰-۳۰ ☐ ۳۰-۳۰ ☐	رطوبت خاک	خیس ☐ مرطوب ☐ خشک ☐
درجه و جهت شیب		نوع کاربری	کشاورزی ☐ جنگل ☐ مرتع ☐ بایر ☐
اراضی زراعی		اراضی غیرزراعی	
نوع کشت	آبی ☐ دیم ☐	پوشش گیاهی غالب	
سیستم مدیریت کشاورزی	سنتی ☐ کم خاکورزی ☐ سایر ☐	درصد پوشش زمین	
نوع کوددهی	شیمیایی ☐ آلی ☐ تلفیقی ☐	فاصله تا آب های سطحی	
سابقه مدیریت مذکور (سال)		قرق	
استفاده از منابع آب نامتعارف	بله ☐ خیر ☐	خسارت های انسانی	آلودگی محرز ☐ چرای شدید دام ☐ سایر ☐
ناهنجاری اقلیمی (خشکسالی، سیل، زلزله و ...)	بله ☐ خیر ☐	ناهنجاری اقلیمی (خشکسالی، سیل، زلزله و ...)	بله ☐ خیر ☐
در پنج سال گذشته		در پنج سال گذشته	
توضیحات:			

۲-۴-۲- اطلاعات تکمیلی جامعه گلشنگی و سیانوباکتریایی (ویژه عرصه های طبیعی - غیر کشاورزی)

به منظور جمع آوری دقیق اطلاعات و ارزیابی پوسته های زیستی اشکال رویشی گلشنگ ها (پوسته ای، برگه ای و بوته ای) بایستی گزارش شوند. شکل رویش گلشنگ ها نسبت به شکل ظاهری اجزاء تشکیل دهنده آن ها یعنی قارچ و جلبک در حالت انفرادی متفاوت است. این اجتماع مجموعه متمایز نیافته ای بنام تال^۵ به وجود می آورد. مطابق با شکل ۲-۱ با تهیه برش عرضی از تال یک گلشنگ می توان لایه های زیر را مشاهده نمود:

- الف- کورتکس فوقانی: سطح فوقانی بیشتر گلشنگ ها دارای یک کورتکس توسعه یافته است که معمولاً از سلول هایی با دیواره ضخیم تشکیل شده اند. این لایه از گلشنگ به عنوان یک پوست محافظ نگهداری می کند.
- ب- لایه جلبکی یا لایه فوتوبیونت: زیر کورتکس گلشنگ ها، لایه سبز رنگی وجود دارد که از سلول های فوتوبیونت (جلبک سبز و سیانوباکتری) تشکیل شده است. این سلول ها در شبکه ای از هیف های قارچی به دام افتاده اند. فوتوبیونت می تواند تک سلولی یا رشته ای باشد.

⁵ thallus

پ- لایه میانی یا مدولا: در زیر لایه فوتوبیونت لایه میانی فشرده تری وجود دارد که معمولاً بیشترین قسمت تال را می سازد. هیفها در لایه میانی معمولاً رشته ای و منشعب و با دیواره نازک هستند.

ت- کورتکس تحتانی: در بیشتر گلسنگها سطح زیرین توسط کورتکس تحتانی محافظت می شود و ساختار آن بسیار شبیه کورتکس بالایی است. در برخی از گلسنگها کورتکس تحتانی وجود ندارد و همان لایه میانی در سطح زیرین تال مشاهده می شود. این بخش دارای ریزوئید یا ریزین است که سبب تثبیت گلسنگ روی تکیه گاه شده، همچنین عمل جذب مواد غذایی را نیز انجام می دهد (17).

براساس مورفولوژی یا همان شکل رویشی، گلسنگها در سه گروه اصلی پوسته ای، برگي، بوته ای طبقه بندی می شوند:

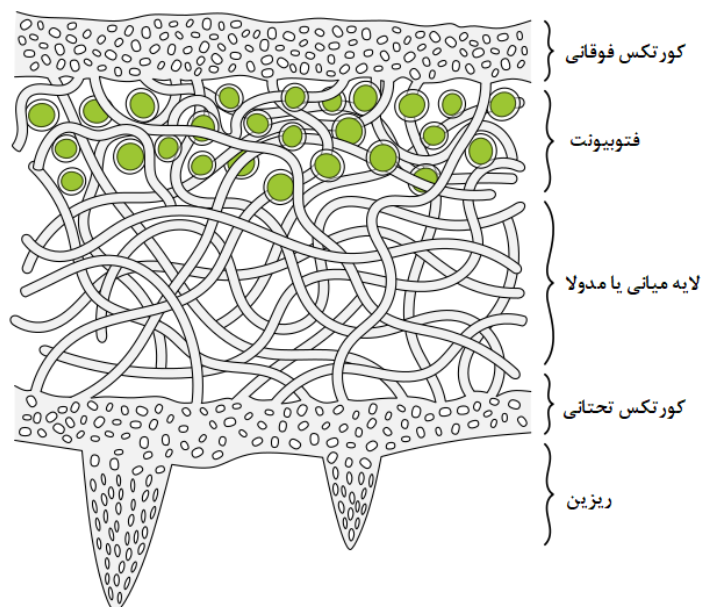
الف) گلسنگ پوسته ای: در گلسنگهای پوسته ای حالت یک بعدی وجود دارد. برای مثال کورتکس تحتانی در این فرم رویشی وجود نداشته بلکه توسط هیفهای لایه مدولا به سختی و به گونه ای غیر قابل تفکیک به خاک، صخره یا پوست درختان چسبیده اند. میسیلیوم آنها نیز به صورت رشته های بسیار نازکی روی بستر انتشار می یابند.

ب) گلسنگ برگي: این گلسنگها در واقع حالت دو بعدی داشته و شکل رویشی آنها برگ مانند بوده و دارای سطح فوقانی و تحتانی کاملاً مشخص هستند. اغلب تالهای برگي صاف بوده و تقریباً همه سطح زیرین تال در تماس با بستر است اما میزان چسبندگی تال به بستر بسیار متغیر است.

پ) گلسنگ بوته ای: تال این گلسنگ سه بعدی بوده و شکل یک بوته کوچک دیده می شود. گونه های مختلفی با این فرم رویشی دیده می شود که به شکل رشته ای یا مو مانند می باشند. این گلسنگها دارای تال منشعب هستند و تال معمولاً از سطح بستر برجسته تر بوده و ممکن است به طور عمود بر بستر یا به طور آویزان قرار گرفته باشند.

فرمهای رویشی فرعی نیز در این راستا دیده می شود که گاه تشخیص آن برای افراد غیر متخصص کمی دشوار است. برای مثال در برخی گونه ها فرم رویشی به حالت پولکی یا فلسی مشاهده می شود که در واقع یک فرم رویشی فرعی است. گلسنگهای پولکی و فلسی از نظر ظاهر حد واسط بین فرمهای رویشی برگي و پوسته ای هستند. آنها از چند تا صدها پولک تقریباً کوچک با قطر به طور معمول یک تا ۱۵ میلی متر تشکیل شده اند که توسط سطح زیرین و یا از طریق یک لبه مثل پلاکهای کوچک به بستر اتصال دارند.

ت) گلسنگ ژلاتینی: این نوع گلسنگها از نظر فرم رویشی جزو گلسنگهای برگي و به ندرت بوته ای می باشند و دارای ساختار درهم تنیده ای از ریشه های قارچی با سیانوباکتری ها هستند که به شکل همگن یا ناهمگن شکل گرفته اند. وقتی رطوبت کافی دریافت کنند به شکل بافتی ژله مانند در می آیند. معمولاً سیاه رنگ هستند و پس از خیس شدن با باران و برف چندین برابر خود متورم خواهند شد (17).



شکل ۲-۱- برش عرضی از تال یک گل‌سنگ

۲-۵- الزامات نمونه برداری

- ۱- ظروف نمونه برداری باید از جنس پلاستیک و دارای در محکم باشند.
- ۲- برای هر زیرنمونه بایستی ظرف جداگانه در نظر گرفت.
- ۳- قبل از شروع نمونه برداری نقاط نمونه برداری کدبندی شده و روی در و بدنه ظروف نمونه برداری را برچسب بزنید.
- ۳- در برچسب‌ها باید کد محل، کد نمونه و زیرنمونه، تاریخ نمونه برداری، مختصات، مسئول نمونه برداری و نام آزمایشگاه مرجع ذکر شوند.
- ۴- بایستی نمونه‌های مرطوب تا زمان رسیدن به آزمایشگاه در جعبه‌های خنک نگهداری شوند. بنابراین با توجه به میزان نمونه برداری، جعبه خنک با فضای لازم تعبیه شود (13).
- ۵- تهیه عکس از کرم‌های خاکی، محل نمونه برداری، فضای اطراف سایت ضروری است. چرا که مستندسازی کامل رویه‌های جمع‌آوری، سبب تضمین حفظ ارزش نمونه می‌شود (18).
- ۶- در مطالعات تکمیلی و با توجه حساسیت تجزیه و تحلیل توالی ژنتیکی، باید پس از اتمام نمونه برداری در یک محدوده، دستگاه نمونه بردار را با الکل اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی کنید تا از انتقال ریزجانداران از یک نمونه خاک به نمونه دیگر جلوگیری شود (15).
- ۷- شرایط مساعد رطوبتی خاک برای نمونه برداری، پس از خروج آب ثقلی از پروفیل خاک رخ می‌دهد. بنابراین از نمونه برداری از خاک‌های غرقاب و بسیار خیس خودداری کرده و نمونه برداری را تا رسیدن به شرایط مطلوب به تعویق بیندازید.

خاک‌هایی مانند خاک‌های کنار رودخانه‌ها و اراضی باتلاقی که غرقاب بودن ویژگی ذاتی آنها به شمار می‌رود در این مورد استثناء هستند.

۲-۶- آماده سازی نمونه

نمونه‌های دست نخورده باید با کمترین آسیب به آزمایشگاه منتقل شوند. در مورد نمونه‌های مرکب، در بدو ورود به آزمایشگاه زیرنمونه‌های مربوط به هر نمونه خاک باید به صورت دستی همگن شوند. برای جلوگیری از آسیب به نماتدها، همگن شدن به صورت مکانیکی نباید انجام شود (15). به منظور اندازه‌گیری ویژگی‌های زیستی و جمعیت نماتدها نمونه مرکب را به صورت مرطوب و در ظروف پلاستیکی در بسته در یخچال نگهداری کنید. اگر هدف پروژه، اجرای سطح سوم مطالعات تنوع زیستی خاک نیز باشد، برای تجزیه و تحلیل DNA، لوله فالکن ۵۰ میلی‌لیتری را پر کرده (یک تا دو سانتی‌متر فضای بالای لوله خالی باشد) و فوراً در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا پیش از توالی‌یابی منجمد کنید (16). نمونه‌های ذوب‌شده برای استخراج DNA مناسب نیستند (18).

فصل ۳

روش‌های اندازه‌گیری

۳- روش‌های اندازه‌گیری

۳-۱- سطح اولیه مطالعات

سطح اولیه مطالعات در دستورالعمل و شرح خدمات نقشه پراکندگی تنوع زیستی خاک کشور با نگاهی اجرایی و در نظر گرفتن کمترین امکانات به رشته تحریر درآمده است. در این بخش به کمک شاخص‌های ساده و کاربردی، برآوردی کلی از تنوع زیستی خاک برای ترسیم نقشه آن ارائه می‌شود. اجرای این بخش از دستورالعمل برای مطالعات تنوع زیستی خاک الزامی است. در ادامه به ویژگی‌های زیستی مورد نیاز برای دستیابی به این تحلیل کلی از تنوع زیستی خاک می‌پردازیم.

۳-۱-۱- کربن زیست‌توده میکروبی

برای اندازه‌گیری کربن زیست‌توده میکروبی به روش تدخین-استخراج در ابتدا باید مواد زیر را تهیه کرد:

- پتاسیم سولفات ۰/۵ مولار: ۸۷/۱۳۵ گرم از پتاسیم سولفات را در آب مقطر حل کرده و به حجم یک لیتر برسانید.
- کلروفرم بدون اتانول
- آهک سودا (گرید دارویی)
- پتاسیم دی‌کرومات ۶۶/۷ میلی‌مولار: ۱۹/۶۱۲۵ گرم از این ماده را در آب مقطر حل کرده و به حجم یک لیتر برسانید.
- فسفریک اسید غلیظ (۸۵ درصد)
- سولفوریک اسید غلیظ (۹۸ درصد)
- محلول سولفات آمونیوم آهن $[(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \times 6H_2O]$ با غلظت ۴۰ میلی‌مولار (محلول تیتراسیون): ۱۵/۶۹ گرم از این ماده را در آب مقطر حل کرده و با ۲۰ میلی‌لیتر سولفوریک اسید غلیظ اسیدی کنید. سپس با آب مقطر به حجم یک لیتر برسانید.
- محلول کمپلکس ۱۰ و ۱۰ فنانتروлін-آهن سولفات ۲۵ میلی‌مولار
- مخلوط اسید فسفریک و اسید سولفوریک: دو قسمت اسید سولفوریک غلیظ را با یک قسمت اسید فسفریک غلیظ مخلوط کنید.

نمونه خاک مرطوب (معادل ۵۰ گرم خاک آون خشک) را به دو قسمت (هر کدام معادل ۲۵ گرم خاک آون خشک) تقسیم کنید. یک قسمت را به عنوان نمونه کنترل تدخین نکنید و در بطری ۲۵۰ میلی‌لیتری بریزید. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر پتاسیم سولفات ۰/۵ مولار به آن اضافه کنید (نسبت ماده استخراج‌کننده به وزن خاک خشک چهار به یک است) و بلافاصله به مدت ۳۰ دقیقه در یک شیکر رفت و برگشتی با ۲۰۰ دور در دقیقه یا ۴۵ دقیقه در یک شیکر دورانی با ۴۰ دور در دقیقه قرار دهید. پس از آن نمونه را با کاغذ واتمن ۴۲ صاف کنید. قسمت دیگر نمونه خاک باید تدخین شود. به منظور تدخین، نمونه خاک

مرطوب را در یک ویال ۵۰ میلی‌لیتری بریزید و در دسیکاتوری که با دستمال کاغذی مرطوب پوشیده شده و یک ویال آهک سودا^۶ در آن قرار دارد، بگذارید. یک بشر که حاوی ۲۵ میلی‌لیتر کلروفرم بدون اتانول و چند تراشه شیشه‌ای باشد، در درون دسیکاتور قرار دهید و درب دسیکاتور را ببندید. پمپ خلاء را وصل کنید تا زمانی که کلروفرم به مدت ۲ دقیقه بجوشد و سپس دسیکاتور را در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون کنید. پس از تدخین، شش مرتبه پمپ خلاء وصل می‌شود تا کلروفرم کاملاً از محیط دسیکاتور حذف شود. در مرحله بعد خاک را به بطری‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری برای استخراج با پتاسیم سولفات طبق روش مشروح منتقل کنید. توجه داشته باشید که تمام عصاره‌ها بایستی تا قبل از تجزیه در دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد نگهداری شوند.

در مرحله بعدی ۸ میلی‌لیتر عصاره صاف شده را به بالن ۲۵۰ میلی‌لیتری ته گرد بریزید و دو میلی‌لیتر محلول دی‌کرومات پتاسیم و ۱۵ میلی‌لیتر مخلوط اسید فسفریک و اسید سولفوریک اضافه کنید. محتویات بالن باید به مدت ۳۰ دقیقه رفلاکس شود بدین معنی که مخلوط واکنش جوشانده شده و بخارات آن به کمک کندانسور لیپیگ (کندانسور ساده یا مبرد ساده) متراکم شده و به بالن بازگردد. پس از رفلاکس، اجازه دهید مخلوط واکنش سرد شود و بعد با ۲۰ تا ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر، کندانسور را شستشو داده و آن آب را به مخلوط واکنش اضافه کنید. این مرحله برای اطمینان از کامل بودن واکنش و جمع‌آوری تمام محصولات رفلاکس مهم است. دی‌کرومات باقی‌مانده در محلول با تیتراسیون برگشتی با محلول سولفات آمونیوم آهن ۴۰ میلی‌مولار و با استفاده از محلول کمپلکس ۱۰ و ۱۰۱ فنانتروлін-آهن سولفات ۲۵ میلی‌مولار به عنوان معرف، اندازه‌گیری می‌شود. در نهایت با کمک روابط ۱۷-۳، ۱۸-۳ و ۱۹-۳ میزان کربن زیست‌توده میکروبی را محاسبه کنید (19):

$$\text{Organic C} (\mu\text{g ml}^{-1}) = \frac{(H-S)}{C \times M \times \frac{D}{A} \times E \times 1000} \quad \text{رابطه (۱۷-۳)}$$

S حجم محلول تیتراسیون مصرف شده برای نمونه بر حسب میلی‌لیتر

H حجم محلول تیتراسیون مصرف شده برای نمونه بلانک رفلاکس شده بر حسب میلی‌لیتر

C حجم محلول تیتراسیون مصرف شده برای نمونه بلانک رفلاکس نشده بر حسب میلی‌لیتر

M نرمالیت محلول پتاسیم دی‌کرومات

D حجم دی‌کرومات اضافه شده به مخلوط واکنش

A حجم عصاره در مخلوط واکنش

E برابر با ۳ (تبدیل کروم شش ظرفیتی به سه ظرفیتی)

$$\text{Organic C} (\mu\text{g g}_{\text{soil}}^{-1}) = \text{Organic C} (\mu\text{g ml}^{-1}) \times \left(\frac{K}{DW} + W \right) \quad \text{رابطه (۱۸-۳)}$$

K میزان ماده استخراج کننده

DW وزن خشک نمونه خاک بر حسب گرم

W آب خاک

⁶ Vial

⁷ Soda lime

$$\text{Biomass } C = \frac{E_C}{K_{EC}} \quad \text{رابطه (۱۹-۳)}$$

E_C تفاضل کربن آلی استخراج شده از خاک تدخین شده و تدخین نشده

K_{EC} فاکتور کالیبراسیون که معادل ۰/۳۸ است.

ملاحظات

- تنها در صورتی که نمونه‌های خاک نیاز به همگن شدن دارند، آنها را با رطوبت تقریبی ۴۰ درصد WHC الک کنید.
- در این آزمایش وزن خاک می‌تواند از ۲۰۰ میلی‌گرم تا ۲۰۰ گرم متغیر باشد.
- محتوای آب خاک باید بالاتر از ۳۰ درصد WHC باشد. چرا که در خاک‌های خشک، ریزجاندانان کمتر تحت تأثیر کلروفرم قرار می‌گیرند. همچنین سرعت فعالیت آنزیم‌ها و در نتیجه اتولیز سلولی (خودهضمی) در رطوبت کمتر از ۳۰ درصد WHC کندتر است.
- این روش برای خاک‌های غرقابی نیز قابل کاربرد است. اگرچه ممکن است در خاک‌های بسیار فشرده همراه با خطا باشد.
- آهک سودا دی‌اکسید کربن منتشر شده در طی فرایند پیش-انکوباسیون و تدخین را جذب می‌کند و اثرات سمی یا تداخلات CO_2 را به حداقل می‌رساند.
- فرایند تدخین به زمان و دما وابسته است. دمای پایین‌تر و زمان کوتاه‌تر ممکن است بر تخمین زیست‌توده میکروبی تأثیر گذاشته و خطا ایجاد کند.
- در خاک‌هایی که بیش از ۲۰ درصد ماده آلی دارند، نسبت خاک به عصاره‌گیر باید از ۱:۴ به ۱:۲۰ باید افزایش پیدا کند.
- سلول‌های ریشه‌های جوان نیز تحت تأثیر بخارات کلروفرم قرار می‌گیرند و پس از تدخین، ممکن است پتاسیم سولفات مواد داخل سلولی آنها را استخراج کند. خاک‌هایی که دارای مقادیر زیادی ریشه زنده هستند، بایستی مراحل پیش استخراج اجرا شود. بدین منظور هر کدام از زیرنمونه‌های خاک مرطوب را به طور جداگانه در بطری ۲۵۰ میلی‌لیتری بریزید. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر پتاسیم سولفات ۰/۰۵ مولار (۸/۷۱۴ گرم بر لیتر) به آن بیافزایید و به مدت ۲۰ دقیقه در شیکر رفت و برگشتی با سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه قرار دهید. سپس مواد داخل بطری از الک بگذرانید. برای خاک‌های زراعی از الک مش ۲ میلی‌متر و برای خاک‌های مرتعی از الک مش ۳ میلی‌متر استفاده کنید. با ۷۵ میلی‌لیتر پتاسیم سولفات ۰/۰۵ مولار ریشه‌ها و سنگ‌های کوچک روی الک را بشوئید تا ذرات خاک کاملاً جدا شوند. سوسپانسیون خاک را در بطری شیشه‌ای به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۵۰۰ سانتیفریوژ کنید. سپس محلول رویی خاک را جدا کرده و اندازه‌گیری کنید. به زیرنمونه‌ای که بایستی تدخین شود، ۳ قطره کلروفرم اضافه کرده و طبق روش فوق‌الذکر تدخین کنید. در نهایت هر دو زیرنمونه طبق فرایند مشروح در ابتدای روش با پتاسیم سولفات ۰/۵ مولار استخراج می‌شوند (19).

از تقسیم کربن زیست‌توده میکروبی به کربن آلی خاک، نسبت کربن زیست‌توده میکروبی به کربن آلی ($\frac{MBC}{OC}$) یا ضریب میکروبی (microbial quotient) را بر حسب درصد محاسبه کنید (20).

۳-۱-۳- تنفس پایه

تنفس خاک یکی از پرکاربردترین پارامترها برای تعیین میزان فعالیت میکروبی خاک است. تنفس پایه به عنوان میزان تنفس خاک بدون افزودن هیچ گونه سوبسترای اضافی تعریف می‌شود. برای اندازه‌گیری تنفس پایه در ابتدا مواد زیر را تهیه کنید:

- سدیم هیدروکسید ۰/۰۵ مولار

- هیدروکلریک اسید ۰/۰۵ مولار

- محلول باریوم کلرید ۰/۵ مولار: مقدار ۱۲۲/۱۴ گرم از این ماده را در آب مقطر حل کرده و به حجم ۱۰۰۰ برسانید.

- معرف فنول فتالین: مقدار ۰/۱ گرم فنول فتالین را در ۸۰ میلی‌لیتر اتانول ۶۰ درصد حل کرده و با آن به حجم ۱۰۰ برسانید.

برای اندازه‌گیری تنفس پایه مقدار ۵۰ گرم خاک الک شده که رطوبت آن در ۵۵ درصد WHC تنظیم شده را در یک بشر تخت ریخته و در کف یک قوطی یک لیتری قرار دهید. سپس ۲۵ میلی‌لیتر محلول سدیم هیدروکسید را در یک بشر ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و در کنار خاک کف قوطی قرار دهید. بلافاصله در قوطی را محکم بسته و درزها را با پارافیلیم ببندید تا از عدم نفوذ هوا مطمئن شوید. علاوه بر نمونه‌های خاک، ۳ تا ۵ قوطی را به عنوان نمونه کنترل به روش مشروح در فوق آماده کنید، با این تفاوت که خاکی در قوطی قرار ندهید. تمام قوطی‌ها را به مدت ۳ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون کنید. پس از گذشت دوره انکوباسیون، در قوطی را باز کرده و به محلول سدیم هیدروکسید، ۵ میلی‌لیتر محلول باریوم کلرید اضافه کنید. با افزودن محلول کلرید باریوم به محلول سدیم هیدروکسید، یون بی‌کربنات (HCO_3^-) تولید شده طی دوره انکوباسیون رسوب می‌کند. سپس به این محلول چند قطره معرف فنول فتالین بیافزایید و با هم زدن مداوم، سدیم هیدروکسید باقیمانده را با هیدروکلریک اسید ۰/۰۵ مولار تیتیر کنید. این فرایند را تا زمانی ادامه دهید که رنگ از صورتی به بی‌رنگ تغییر کند. با استفاده از رابطه ۳-۲۰ نرخ تنفس خاک را محاسبه کنید (21):

$$CO_2(mg\ g_{soil}^{-1}t^{-1}) = \frac{(V_0 - V) \times 1.1}{SW \times t \times dwt} \quad \text{رابطه (۳-۲۰)}$$

V_0 حجم مصرفی محلول هیدروکلریک اسید برای نمونه بلانک بر حسب میلی‌لیتر

V حجم مصرفی محلول هیدروکلریک اسید برای نمونه خاک بر حسب میلی‌لیتر

SW میزان وزن خاک خشک بر حسب گرم

t زمان انکوباسیون بر حسب ساعت

dwt وزن خشک یک گرم خاک مرطوب

۱/۱ ضریب تبدیل (یک میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید ۰/۰۵ مولار برابر ۱/۱ میلی‌گرم CO_2)

ملاحظات

- در این آزمایش دمای انکوباسیون مورد استفاده بین ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی گراد و درصد رطوبت خاک بین ۵۰ تا ۷۰ درصد WHC می‌تواند متغیر است (21).

۳-۱-۴- ضریب متابولیکی (BR/MBC)

ضریب متابولیکی (qCO_2 , metabolic quotient) که شاخص آشفستگی (تنش) میکروبی به شمار می‌رود، انرژی لازم برای پایداری و بقای زیست‌توده میکروبی را با انرژی لازم برای رشد آن مقایسه می‌کند. بنابراین به عنوان راندمان میکروبی از آن یاد شده و در خاک‌های تحت تنش مقدار بیشتری نشان می‌دهند. این شاخص را از تقسیم مقدار تنفس پایه بر کربن زیست‌توده میکروبی خاک محاسبه کنید (22,23):

$$qCO_2 = \frac{R.R.}{MBC} \quad (\text{رابطه‌ی ۳-۲۱})$$

qCO_2 ضریب متابولیکی بر حسب $\mu g CO_2-C mg^{-1} MBC day^{-1}$

R.R. مقدار کربن حاصل از تنفس میکروبی طی یک روز بر حسب $\mu g CO_2-C kg^{-1} soil day^{-1}$ که معادل تنفس پایه می‌باشد.

MBC مقدار کربن موجود در زیست‌توده میکروبی بر حسب $mg C kg^{-1} soil$

۳-۱-۵- سرعت برگشت کربن (BR/OC)

از تقسیم تنفس پایه به کربن آلی خاک، نسبت تنفس پایه به کربن آلی $\left(\frac{R.R.}{OC}\right)$ یا سرعت برگشت کربن (C turnover rate) را بر حسب درصد محاسبه کنید (20).

۳-۱-۶- تنفس ناشی از سوبسترا

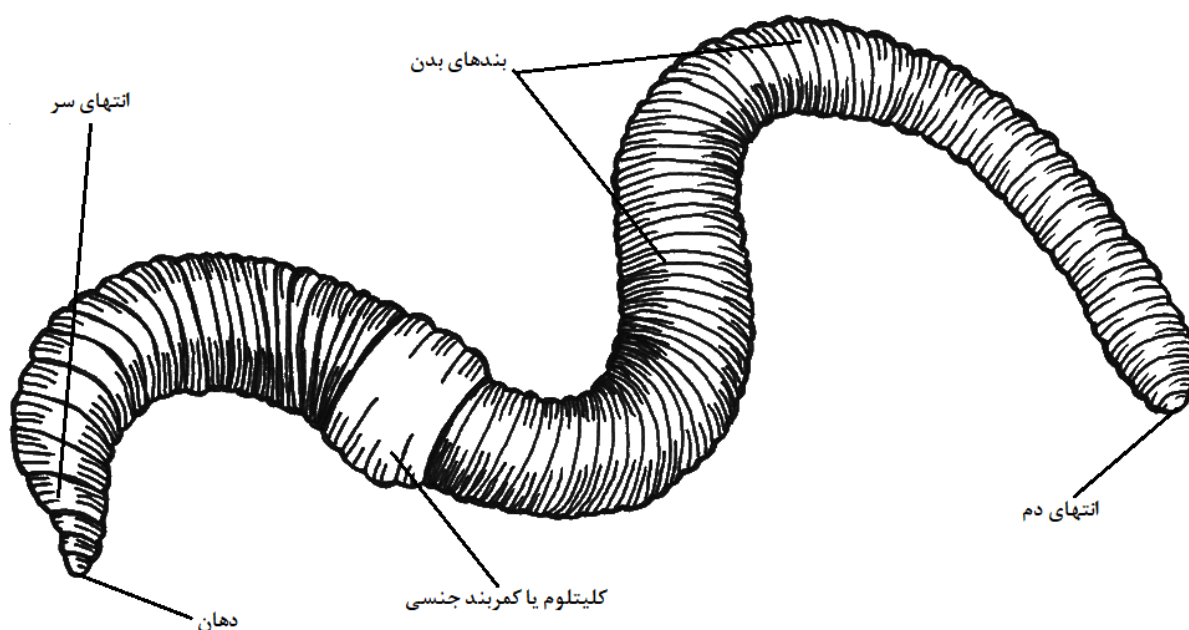
تنفس ناشی از سوبسترا به میزان انتشار دی‌اکسید کربن در حضور سوبستراهایی از قبیل گلوکز و اسید آمینه گفته می‌شود. برای اندازه‌گیری تنفس ناشی از سوبسترا، نباید خاک هواخشک شود. از خاک مرطوب استفاده کنید. توصیه بر آن است که خاک با الک ریزتر از ۲ میلی‌متر الک شود. میزان بهینه غلظت محلول گلوکز برای به دست آوردن حداکثر پاسخ تنفسی در خاک باید در آزمایش‌های بهینه‌سازی مشخص شود؛ اما غلظت‌های توصیه شده بین ۰/۸ تا ۳ درصد متغیر است. باید توجه داشته باشید که محلول گلوکز باید قبل از انجام آزمایش و به طور تازه تهیه و مصرف شود. پس از افزودن محلول گلوکز به خاک، طبق روش مشروح در زیربخش ۳-۳-۱ نمونه را آماده کرده و به مدت ۴ تا ۶ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون کنید. هر نمونه خاک بایستی یک نمونه کنترل داشته باشد. در نمونه کنترل، تنفس خاک بدون افزودن سوبسترا اندازه‌گیری می‌شود. از تفاضل تنفس نمونه خاک و تنفس نمونه کنترل، تنفس ناشی از سوبسترا اندازه‌گیری می‌شود. همچنین نمونه بلانک (بدون خاک و سوبسترا) برای تصحیح CO_2 محیط در نظر گرفته شود. تمام مراحل اندازه‌گیری تنفس و محاسبات مانند زیربخش ۳-۳-۱ انجام شود (19).

ملاحظات

- حداکثر دوره نگهداری نمونه‌های خاک برای اندازه‌گیری تنفس ناشی از سوپسترا ۳ تا ۴ هفته پس از نمونه‌برداری در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد است.
- قبل از شروع آزمایش، باید اجازه دهید نمونه خاک به دمای اتاق برسد.
- اگر دوره انکوباسیون در تنفس ناشی از سوپسترا بیش از ۴ تا ۶ ساعت باشد، انتظار می‌رود که در جمعیت میکروبی خاک تغییر و در نتیجه خطا رخ دهد.

۳-۱-۷- فراوانی و درصد بلوغ جمعیت کرم خاکی

کرم‌های خاکی نمونه‌برداری شده را از ظرف نگهداری خارج کنید. تعداد کل جمعیت کرم خاکی بشمارید و فراوانی این جانور در خاک را بر حسب تعداد بر واحد سطح گزارش کنید. وجود کمر بند جنسی یا کلیتلوم در کرم‌های خاکی نشان‌دهنده بلوغ این جانور است. تعداد کرم‌های خاکی که کمر بند جنسی در آنها قابل مشاهده است را یادداشت کنید و از این آمار نسبت به کل جمعیت کرم خاکی درصد بگیرید تا درصد بلوغ جمعیت کرم خاکی به دست آید.



شکل ۳-۱- تصویر شماتیک کرم خاکی

۳-۱-۸- جمعیت نماتد

از روش شناورسازی-سانتریفیوژ برای استخراج نماتدهای فعال و غیرفعال استفاده کنید. بدین منظور ۴۰۰ گرم از نمونه خاک مرطوب را با ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مخلوط و همگن کنید و از الک ۴۰ مش عبور دهید. این کار را سه بار تکرار کرده و اجزای باقیمانده روی الک را دور بریزید. آبی که از الک ۴۰ مش عبور کرده را به ترتیب با الک‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۲۵ و ۴۰۰ مش صاف کنید و آبی که از الک ۴۰۰ مش عبور کرده است را دور بریزید. توجه داشته باشید که بقایای روی این الک‌ها را با

مقداری آب شسته و داخل یک استوانه مدرج جمع‌آوری کنید. استوانه مدرج را به مدت ۳۰ دقیقه به حال خود رها کنید تا نماتدها ته‌نشین و مواد اضافی روی آب جمع شوند. روی محلول را خالی کنید و قسمت پایین محلول را به خوبی هم بزنید و داخل لوله‌های سانتریفیوژ بریزید. لوله‌ها را که دو به دو به صورت مساوی پر شده‌اند را در دستگاه مقابل هم قرار دهید و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ کنید. محلول رویی را دور بریزید و لوله سانتریفیوژ را با محلول قند ۴۵۰ گرم در لیتر آب پر کنید. دهانه لوله را ببندید و به مدت نیم تا یک دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کنید تا آنچه ته‌نشین شده، معلق شود. محلول حاصل را روی الک ۴۰۰ مش بریزید تا نماتدها روی الک بر جای بمانند. بدون اتلاف وقت و با ملایمت، با کمک پیست روی الکی آب بریزید تا محلول قند از نماتدهای روی الک شسته شود (24). سپس نماتدها را در الک ۴۰ درصد در یخچال در ظرف دربسته نگهداری کنید. جمعیت نماتدها را در یک اسلاید شمارش با بزرگنمایی ۴۰ با استفاده از میکروسکوپ اندازه‌گیری کنید (25).

ملاحظات

- این آزمایش باید در دمای اتاق (۲۰ درجه سانتی‌گراد) انجام شود.

۳-۱-۹- ویژگی‌های پوسته‌های زیستی

۳-۱-۹-۱- درصد پوشش سطحی پوسته‌های زیستی

اندازه‌گیری درصد تاج پوشش پوسته‌های زیستی داخل پلات به صورت تصویر عمودی و صرف نظر از همپوشانی (درصد پوشش حداکثر برابر صد خواهد بود) به تفکیک گونه‌های دایمی با اندازه‌گیری دو قطر عمود برهم هر پایه درون پلات و تخمین مجموع یکساله‌ها انجام می‌گیرد. دقت شود که باید همه گونه‌های پوسته‌های زیستی اندازه‌گیری شوند و از تخمین خودداری شود. زیرا تجربه نشان داده است که اعداد حاصل از تخمین چندان دقیق نبوده و در صورت تغییر کارشناس، داده‌ها قابل اعتماد و ارزیابی نخواهند بود. حتی تخمین یک کارشناس در دو بار پیاپی در یک منطقه مشخص، متفاوت است. لذا داده‌های تخمین در عملیات پایش کارایی چندانی ندارند. ضمناً پلات‌هایی که توسط نخ تقسیم‌بندی شده‌اند (مثلاً پلات‌های یک متر مربعی که به ۱۰۰ بخش تقسیم شده‌اند) برای ارزیابی درصد پوشش سطحی پوسته‌های زیستی بسیار دقیق‌تر بوده و باعث سرعت در کار ارزیابی تنوع زیستی می‌شوند.

تعیین درصد پوشش خزها و گل‌سنگ‌های تک گونه بسیار مشکل می‌باشد. لذا بهتر است نمونه‌بردار، در چند پلات درصد پوشش آنها را به طور دقیق اندازه‌گیری نماید و رابطه‌ای بین درصد پوشش و میزان تراکم پیدا کند (اگر شمارش آنها آسان‌تر از اندازه‌گیری پوشش آنهاست) و همان رابطه را برای پلات‌های بعدی مبنا قرار دهد. یعنی در پلات‌های بعدی تنها با ارزیابی تراکم به میزان پوشش دست یابد. دقت شود که گاهی در برخی پلات‌ها به دلایل مختلف این رابطه جواب نخواهد داد. به طور

مثال ممکن است گونه خزه مورد نظر در ترانسکت اول که در منطقه مساعدتر و با شیب کمتر قرار گرفته است، به ازای هر گونه، پوشش بیشتری داشته باشد و لذا در این ترانسکت نیاز به برقراری یک رابطه جدید باشد.

۳-۱-۹-۲- کلروفیل در نمونه خاک

الف) ابزار و مواد لازم

- آون
- هاون چینی
- ترازوی حساس
- کاغذ صافی واتمن نمره ۲
- بالن ژوژه ۵۰ میلی لیتری
- بشر ۲۵۰ میلی لیتری
- استون ۱۰۰ درصد
- دستگاه اسپکتروفتومتر

ب) مراحل عصاره گیری

- نمونه خاک را در هاون چینی بسابید و هم بزنید.
- نمونه خاک را به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد خشک کنید.
- مجددا نمونه‌ها در هاون چینی ریخته و بسابید.
- دوباره به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد در آون قرار دهید تا خشک شود.
- نمونه را توزین کرده، در بشر بریزید و ۵۰ میلی لیتر استون ۱۰۰ درصد به آن اضافه کنید.
- درب بشر را با پارافیلیم محکم بسته و در تاریکی در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار دهید.
- نمونه را با کاغذ صافی واتمن صاف کنید.

پ) اندازه گیری کلروفیل آ (Chl a)

- ابتدا دستگاه اسپکتروفتومتر را با استفاده از استون صفر کنید.
- عصاره سبز رنگ را در طول موج های ۳۸۴، ۶۶۵ و ۴۹۰ نانومتر قرائت کنید.
- طبق روابط ذیل غلظت کلروفیل آ (Chl a)، سیتونمین و کاروتنوئیدها را محاسبه و به صورت میکروگرم بر گرم یا میکروگرم بر میلی گرم گزارش کنید.

$$A_{384}(\text{SCYT}) = 1.04 (A_{384}) - 0.79(A_{665}) - 0.27(A_{490}) \quad \text{رابطه (۳-۲۲)}$$

$$A_{665}(\text{Chl a}) = 1.02(A_{665}) - 0.027(A_{384}) + 0.01(A_{490}) \quad \text{رابطه (۳-۲۳)}$$

$$A_{490}(\text{Car}) = 1.02(A_{490}) - 0.08(A_{384}) - 0.026(A_{665}) \quad \text{رابطه (۳-۲۴)}$$

۳-۱-۹-۳- مواد اگزوپلی ساکاریدی در نمونه خاک

الف) ابزار و مواد لازم

-ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری

-اسید سولفوریک ۹۸ درصد (۱۲ مولار)

-آب مقطر

-محلول فنول ۵ درصد

-اسپکتروفتومتر

-حمام شن

-الک استاندارد شماره ۱۰

-ترازو

-لوله آزمایش

ب) مراحل عصاره گیری

-خاک ها را به مدت یک هفته در دمای اتاق هواخشک کنید.

-نمونه خاک را از الک استاندارد آشتو ۲۷ (ASHTO T27) شماره ۱۰ رد کنید.

-یک گرم خاک را توزین و در ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری بریزید.

-۴ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد (۱۲ مولار) به آن بیافزایید.

-درب ظرف را با پارافیلیم بسته و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق بگذارید.

-۹۲ میلی لیتر آب مقطر به محتویات ارلن مایر اضافه کنید و به مدت ۲ ساعت در حمام شن در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد

قرار دهید.

-نمونه ها را صاف کنید.

پ) اندازه گیری پلی ساکاریدها

- در لوله های آزمایش یک الی ۳ میلی لیتر از عصاره ها برداشته و یک میلی لیتر محلول فنول ۵ درصد به آنها اضافه کنید

و بگذارید تا رنگ زرد کهربایی مشاهده شود.

-برای تهیه محلول استاندارد گلوکز ابتدا محلول ۱۰۰۰ ppm گلوکز را تهیه کنید. ۰/۱ گرم از D-Glucose را در ۱۰۰

میلی لیتر آب حل کنید.

- برای تهیه محلول‌های استاندارد ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی گرم گلوکز، از محلول ppm ۱۰۰۰ گلوکز به ترتیب ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی لیتر برداشته و در بالن ژوژه ۵۰ میلی لیتری بریزید.
- ۳ میلی لیتر از محلول استاندارد برداشته و در لوله‌های آزمایش (پیرکس) بریزید.
- یک میلی لیتر محلول فنول ۵ درصد به هریک از آنها اضافه کنید.
- یک تا ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد به هریک از محلول‌ها اضافه کنید.
- نمونه‌های استاندارد را در طول موج ۴۹۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه بگیرید.
- نمودار رگرسیونی نمونه‌های استاندارد را ترسیم نموده و معادله آن را بدست آورید و بر مبنای آن مقادیر پلی ساکاریدها را محاسبه کنید.

ت) شناسایی مونوساکاریدها به روش کروماتوگرافی مایع (HPLC)

ابزار و مواد لازم

- دستگاه HPLC

- استانداردهای مونوساکاریدها شامل گلوکز، آرابینوز، مانوز، زایلوز، رامنوز، فروکتوز، گالاکتوز، ریبوز و ساکارز

- پیپت مدرج

- آب مقطر

روش کار

از محلول عصاره که برای اندازه‌گیری پلی ساکاریدها تهیه شده است برای شناسایی مونوساکاریدها استفاده می‌شود. دستگاه HPLC با توجه به مدل، مقدار ترزیک و سرعت حرکت مایع در آنها تفاوت‌های جزئی دارد که این تفاوت‌ها تأثیری در نتیجه آزمون نخواهد داشت. خروجی دستگاه HPLC میزان غلظت و نوع مونوساکاریدهای موجود در نمونه خواهد بود.

ث) تعیین نسبت هگزوز به پنتوز

پس از انجام آزمون HPLC و اندازه‌گیری غلظت و نوع مونوساکاریدهای تشکیل‌دهنده پلی ساکاریدها، ضرورتاً باید نسبت قندهای هگزوز به پنتوز محاسبه شود. قندهای هگزوز هم توسط ریشه‌های گیاهان و هم توسط ریزجاندانان خاک ولی پنتوزها توسط ریشه گیاهان تولید می‌شوند. البته قندهای هگزوز عمدتاً توسط ریزجاندانان خاک تولید می‌شوند و شاخص خوبی برای اطمینان از فعالیت آنها هستند. در صورتی که نسبت غلظت قندهای هگزوز به پنتوز از ۱/۵ بیشتر باشد فعالیت ریزجاندانان خاک برای افزایش مواد آگروپلی ساکاریدی در خاک تایید می‌شود. در غیر این صورت، پلی ساکاریدهای موجود در خاک ممکن است توسط گیاهان، حیوانات و یا حشرات خاکزی تولید شده باشد.

ج) اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های کل خاک

ابزار و مواد لازم

- آب مقطر

- اسید سولفوریک ۹۸ درصد

- محلول فنول ۵ درصد (۵ گرم فنول را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید)
- محلول یک دهم مولار از Na_2EDTA (۱۸/۶ گرم از Na_2EDTA را در بالن ژوژه ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته و ۳۰۰ میلی‌لیتر آب به آن اضافه کنید).

- یک دهم گرم D-Glucose

- بالن ژوژه

- دستگاه اسپکتروفتومتر

- دستگاه سانتیفریوژ

- کاغذ صافی واتمن

- ترازو

- ارلن مایر ۲۵۰ سی سی

روش کار

- نمونه خاک را هواخشک کنید و از الک ۲ میلی‌متری رد کنید.
- خاک را در هاون چینی بسابید تا همگن شود.
- یک گرم از نمونه خاک را توزین و در ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتر بریزید.
- ۴ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۱۲ مولار به آن اضافه کنید.
- درب ارلن مایر را ببندید و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار دهید.
- ۹۲ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه کنید تا اسید رقیق شود و به ۰/۵ مولار برسد.
- درب شیشه‌ای ارلن مایر را بر روی آن قرار دهید و به مدت ۲ ساعت روی حمام شن بگذارید.
- نمونه را از روی حمام شن بردارید و صاف کنید.

کالیبراسیون

- برای تهیه محلول استاندارد گلوکز ابتدا محلول ۱۰۰۰ ppm گلوکز را تهیه کنید. ۰/۱ گرم از D-Glucose را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب حل کنید.
- برای تهیه محلول‌های استاندارد ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم گلوکز، از محلول ۱۰۰۰ ppm گلوکز به ترتیب ۱، ۲، ۳ و ۴ میلی‌لیتر برداشته و در بالن ژوژه ۵۰ میلی‌لیتری بریزید.
- ۳ میلی‌لیتر از محلول استاندارد برداشته و در لوله‌های آزمایش (پیرکس) بریزید.
- یک میلی‌لیتر محلول فنول ۵ درصد به هریک از آنها اضافه کنید.
- یک تا ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد به هریک از محلول‌ها اضافه کنید.
- نمونه‌های استاندارد را در طول موج ۴۸۸ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه بگیرید.
- نمودار رگرسیونی نمونه‌های استاندارد را ترسیم نموده و معادله آن را بدست آورید.

۳-۲- سطح دوم مطالعات

۳-۲-۱- جمعیت باکتری و قارچ

یک روش رایج برای شمارش مستقیم باکتری‌ها و قارچ‌ها در خاک استفاده از میکروسکوپ‌های اپی‌فلورسنس^۸ است. در این روش خاک در آب استریل شده همگن می‌شود. سپس با فرمالدهید سلول‌های باکتریایی و قارچی را تثبیت می‌کنند. مقدار مشخصی از این سوسپانسیون روی ناحیه مشخصی از لام میکروسکوپی قرار می‌گیرد. ریزجانداران با رنگ‌های فلورسنت رنگ‌آمیزی می‌شوند و با استفاده از میکروسکوپ شمارش انجام می‌شود.

الف) جمعیت باکتری‌ها: برای اندازه‌گیری جمعیت باکتری‌های خاک به روش شمارش مستقیم در ابتدا موارد زیر باید

تهیه شود:

- آب تازه و استریل شده با فیلتر ۰/۲ میکرومتر

- محلول فرمالدهید ۳۷ درصد استریل شده با فیلتر ۰/۲ میکرومتر

- محلول بافر: میزان ۷/۸ گرم دی‌سدیم فسفات (Na_2HPO_4) و ۸/۵ گرم سدیم کلرید را در یک لیتر آب مقطر حل کرده و به حجم برسانید تا غلظت ۰/۵ مولار دی‌سدیم فسفات و ۰/۵۸ درصد سدیم کلرید در محلول بافر داشته باشید. محلول باید در $\text{pH}=9$ تنظیم شود. محلول بافر باید قبل از استفاده با غشای ۰/۲ میکرومتری فیلتر شود.

- محلول رنگ‌آمیزی: میزان ۲ میلی گرم DTAF^۹ را در ۱۰ میلی لیتر محلول بافر حل کنید. محلول رنگ‌آمیزی باید قبل از استفاده، با غشای ۰/۲ میکرومتری فیلتر شود.

بایستی زیرنمونه‌های خاک به طور دستی مخلوط و به مدت یک شب در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. از این خاک ۲۰ گرم را وزن کرده و ۱۹۰ میلی لیتر آب استریلی که به روش فوق‌الذکر تهیه شده را به آن بیافزایید و سپس با یک مخلوط‌کن به مدت یک دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه مخلوط کنید. به ۹ میلی لیتر از سوسپانسیون خاک یک میلی لیتر محلول فرمالدهید اضافه و با ورتکس مخلوط کنید تا سلول‌های باکتریایی و قارچی تثبیت شوند. در این حالت سوسپانسیون حاوی ۹۰ میلی گرم خاک بر میلی لیتر است. لام‌های میکروسکوپ را قبل از استفاده با اتانول ۷۰ درصد بشوئید تا مواد آب‌گریز از سطح شیشه آن پاک شود. برچسبی ضدآب با ابعاد ۴×۲ سانتی متر که مرکز آن دایره‌ای به قطر ۱۲ میلی متر پانچ شده را روی لام بچسبانید. می‌توان از لام‌های آماده چاپی هم استفاده نمود. برای رنگ‌آمیزی، سوسپانسیون خاک را مجدداً با ورتکس هم بزنید. سپس اجازه دهید که سوسپانسیون ۲ دقیقه ساکن بماند تا ذرات درشت ته‌نشین شوند. بلافاصله ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون خاک (معادل ۰/۹ میلی گرم خاک) را در مرکز اسلاید درون دایره مذکور بریزید و به طور مساوی در سطح آن پخش کنید. برچسب ضدآب سوسپانسیون را در یک مساحت ۱۱۳ میلی متر مربعی نگه می‌دارد. لام‌ها باید در

⁸ Epifluorescence

⁹ 5-([4,6-Dichlorotriazin-2-yl]amino)fluorescein

¹ Blender

معرض هوا قرار داشته باشند تا خشک شوند و بعد نوار برچسب را جدا کنید. لایه نازک خاک خشک شده در سطح لام را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در محلول رنگ آمیزی قرار دهید. برای جلوگیری از خشک شدن، در طی این مدت، روی سینی رنگ آمیزی را بپوشانید. سپس لام‌ها را سه بار و هر بار به مدت ۲۰ دقیقه با بافر و در نهایت برای چند ثانیه با آب مقطر شستشو دهید. برای سهولت در کار و اطمینان از انجام صحیح فرایند از نگهدارنده‌های لام استفاده کنید. در انتهای فرایند اجازه دهید تا لام در هوا خشک شود. رنگ به دیواره سلولی باکتری‌ها متصل و با میکروسکوپ اپی فلورسنس قابل شمارش می‌شوند. در مرحله بعد، یک لامل را با یک قطره روغن امرسیون روی لام نصب کنید و با لاک ناخن، لبه‌های لامل را روی لام ثابت کنید. لام‌ها را تا زمان شمارش در دمای ۲ درجه سانتی گراد نگهداری کنید. شمارش باکتری‌ها با میکروسکوپ اپی-فلورسنس با بزرگنمایی ۱۰۰۰ تا ۱۲۵۰ در یک اتاق تاریک انجام می‌شود. یک الگوی شبکه‌ای روی چشمی میکروسکوپ قرار دهید و به طور تصادفی ۱۰ تا ناحیه از آن را انتخاب کرده و شمارش کنید. این ۱۰ ناحیه باید به گونه‌ای انتخاب شوند که به طور تصادفی گسترش خاک را بپوشانند. به عنوان مثال می‌توانید دو خط فرضی که از نقطه میانی یکدیگر با زاویه عمود عبور می‌کنند را در نظر بگیرید و ۵ ناحیه روی هر خط را انتخاب کنید. در نهایت تعداد باکتری‌ها بر گرم خاک (B) از رابطه ۳-۲۵ محاسبه می‌شود (26):

$$B = \left(\frac{N}{X}\right) \times \left(\frac{A}{b}\right) \times \left(\frac{1}{S}\right) \quad \text{رابطه (۳-۲۵)}$$

N تعداد باکتری‌های شمارش شده

X تعداد ناحیه‌های شمارش شده

A ناحیه‌ای از اسلاید که با نمونه پوشیده شده است (۱۱۳ میلی‌متر مربع)

b مساحت نواحی که شمارش شده که به میکروسکوپ و بزرگنمایی آن هم بستگی دارد و با میکرومتر اندازه‌گیری می‌شود.

S مقدار خاکی که روی لام آغشته شده است (۰/۹ میلی گرم).

ملاحظات

- از تماس پوستی با فرمالدهید باید اجتناب کنید.
- از تماس پوستی و استنشاق پودر رنگ‌ها باید اجتناب کنید.
- محلول رنگ آمیزی حداکثر برای یک روز قابل نگهداری است.
- سوسپانسیون برخی خاک‌ها نیاز دارند که به میزان ۳ تا ۱۰ رقیق شوند. بهترین حالت رقیق سازی زمانی است که حداقل ۲۵ سلول در هر میدان دید وجود داشته باشد.

(ب) طول کل هیف‌های قارچی: برای اندازه‌گیری طول کل هیف‌های قارچی از سوسپانسیون خاک تثبیت شده با فرمالدهید استفاده کنید که شرح تهیه آن در قسمت اندازه‌گیری جمعیت باکتری‌ها به طور دقیق آورده شده است. علاوه بر آن، آب تازه را نیز به همان روش فوق‌الذکر استریل کنید. همچنین محلول زیر را آماده نمایید:

- محلول رنگ‌آمیزی: ۲ گرم کالکفور سفید^۱ M2R را در آب تازه استریل شده حل کرده و به یک لیتر حجم برسانید. سوسپانسیون تثبیت شده خاک (۹۰ میلی گرم خاک بر میلی لیتر) را مجدداً هم بزنید و با آب استریل در سه مرحله رقیق کنید. در هر مرحله سوسپانسیون با نسبت ۱:۵ رقیق شود. در نهایت ۵ میلی لیتر سوسپانسیون حاوی ۳/۶ میلی گرم خاک خواهد بود، که به آن ۵ میلی لیتر از محلول رنگ‌آمیزی اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق در محیط تاریک نگهداری کنید. سپس ۴ میلی لیتر از این محلول (۱/۴۴ میلی گرم خاک) را با فیلتر سیاه پلی کربناتی با قطر ۲۵ میلی متر که قطر منافذ آن ۰/۸ میکرومتر باشد، صاف کنید. فیلتر را سه مرتبه با ۳ میلی لیتر آب تازه استریل شده بشویید و روی یک لام با روغن امرسیون غوطه‌ور کنید. لام‌ها را در یک اتاق تاریک زیر میکروسکوپ اپی فلورسنس با نور UV و بزرگنمایی ۴۰۰ مشاهده کنید. این میکروسکوپ باید مجهز به شبکه شمارش چشمی ۱۰×۱۰ باشد. در یک یا دو ترانسکت روی فیلتر حدود ۵۰ تا محدوده را در نظر بگیرید و تعداد تقاطع هیف‌ها با خطوط شبکه شمارش را تخمین بزنید. طول هیف (H) بر حسب میکرومتر بر محدوده^۲ را از رابطه ۳-۲۶ محاسبه کنید (26):

$$H = I\pi \frac{A}{2L} \quad \text{رابطه (۳-۲۶)}$$

I تعداد تقاطع در هر محدوده

A مساحت محدوده (برای مثال ۲۳۳×۲۳۳ برابر با ۵۴۲۸۹ میکرومتر مربع)

L طول کل خطوط در محدوده شمارش (برای مثال ۲۲ خط ۲۳۳× میکرومتر که برابر ۵۱۲۶ میکرومتر است).

پس از محاسبه طول هیف، طول کل هیف‌های قارچی بر حسب متر بر گرم خاک را از رابطه ۳-۲۷ به دست آورید (26):

$$F = H \times 10^{-6} \times \left(\frac{A}{B}\right) \times \left(\frac{1}{S}\right) \quad \text{رابطه (۳-۲۷)}$$

H طول هیف بر حسب میکرومتر بر محدوده

10^{-6} تبدیل میکرومتر به متر

A مساحت فیلتر که با نمونه پوشیده شده (برای مثال ۲۰۱ میلی متر مربع)

B مساحت محدوده (برای مثال ۰/۰۵۳ میلی متر مربع)

S مقدار خاک روی فیلتر (برای مثال ۱/۴۴ میلی گرم)

ملاحظات

- لام تهیه شده تا دو ماه در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد در محل تاریک قابل نگهداری است (26).

¹ Calcofluor White M2R

1

¹ Grid

2

۳-۲-۲- فعالیت آنزیم اوره‌آز

آنزیم اوره‌آز هیدرولیز اوره به CO_2 و NH_3 را کاتالیز و در چرخه نیتروژن نقش مهمی ایفا می‌کند. با افزودن اوره به نمونه‌های خاک و انکوباسیون آنها به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و بر اساس آمونیاک آزاد شده، فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک را تخمین می‌زنند. بدین منظور در ابتدا باید مواد زیر را تهیه کرد:

- تولوئن

- بافر تریس (هیدروکسی متیل) آمینو متان با غلظت ۵۰ میلی‌مولار و $\text{pH}=9$: ۶/۱ گرم تریس را در ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و آن را با اسید سولفوریک ۰/۲ مولار در $\text{pH}=9$ تنظیم کنید و با آب مقطر به حجم یک لیتر برسانید.

- محلول اوره ۲۰۰ میلی‌مولار: ۱/۲ گرم اوره را در ۸۰ میلی‌لیتر بافر تریس حل کنید و با آن به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید. این محلول را به صورت تازه و روزانه تهیه کنید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه دارید.

- محلول پتاسیم کلرید (۲/۵ مولار) - سولفات نقره (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر): میزان ۱۰۰ میلی‌گرم سولفات با گرید معرف^{۱۳} (خلوص بالای ۹۹ درصد) را در ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید. سپس ۱۸۸ گرم پتاسیم کلرید با گرید معرف را در محلول حل کنید و با آب مقطر به حجم یک لیتر برسانید.

- محلول ۰/۰۰۵ مولار اسید سولفوریک

- محلول اندیکاتور: میزان ۰/۶۶ گرم بروموکرزول سبز^۴ و ۰/۳۳ گرم متیل رد^۵ را در اتانول ۹۵ درصد حل کنید و با اتانول به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسانید.

- محلول اندیکاتور بوریک اسید: میزان ۴۰ میلی‌لیتر از محلول اندیکاتور و ۴۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد را در یک بالن ژوژه ۲ لیتری بریزید. از طرف دیگر، ۴۰ گرم بوریک اسید را با ۱۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر گرم مخلوط و پس از سرد شدن به بالن ژوژه ۲ لیتری فوق‌الذکر اضافه کنید. سپس سدیم هیدروکسید ۰/۰۵ مولار را به بالن پیپت کنید تا زمانی که رنگ یک میلی‌لیتر محلول با افزودن یک میلی‌لیتر آب مقطر از صورتی به سبز روشن تغییر کند. در نهایت محلول را با آب مقطر به حجم ۲۰۰۰ میلی‌لیتر برسانید.

- منیزیم اکسید (MgO): منیزیم اکسید را در دمای ۶۰۰ تا ۷۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار دهید. سپس در یک دسیکاتور حاوی سدیم هیدروکسید یا ژل سیلیکا سرد کرده و نگهداری کنید.

- محلول استاندارد آمونیاک: میزان ۰/۲۳۴ گرم سولفات آمونیوم را در آب مقطر حل کرده و به حجم یک لیتر برسانید. هر میلی‌لیتر محلول حاوی ۵۰ میکروگرم نیتروژن آمونیومی است.

پس از تهیه مواد مورد نیاز، میزان ۵ گرم خاک مرطوب را در بالن حجمی ۵۰ میلی‌لیتری بریزید. سپس ۰/۲ میلی‌لیتر تولوئن و ۹ میلی‌لیتر بافر تریس به آن بیافزایید و محتوا را مخلوط کنید. پس از آن، یک میلی‌لیتر محلول اوره را اضافه کرده

¹ Reagent grade	3
¹ Bromocresol green	4
¹ Methyl red	5

و مجدداً برای چند ثانیه مخلوط کنید. درب بالن حجمی را ببندید و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون کنید. پس از اتمام زمان انکوباسیون، ۳۵ میلی‌لیتر محلول پتاسیم کلرید-سولفات نقره را به بالن حجمی اضافه کنید و به مدت چند ثانیه آن را هم بزنید. اجازه دهید حدود ۵ دقیقه زمان بگذرد تا محتویات بالن به دمای اتاق برسند. با افزودن محلول پتاسیم کلرید-سولفات نقره، محتویات بالن را به ۵۰ میلی‌لیتر برسانید و کاملاً مخلوط کنید. برای نمونه کنترل همین روند را دنبال نمایید، اما با این تفاوت که یک میلی‌لیتر محلول اوره را پس از افزودن ۳۵ میلی‌لیتر محلول پتاسیم کلرید-سولفات نقره، اضافه کنید.

برای تخمین آمونیوم آزاد شده، ۵ میلی‌لیتر محلول اندیکاتور بوریک اسید را در یک ارلن مایر بریزید. از طرف دیگر، ۲۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون نهایی خاک را به یک بالن تقطیر ۱۰۰ میلی‌لیتری پیپت کنید و ۰/۲ گرم منیزیم اکسید را به آن بیافزایید. سپس محتویات بالن را تقطیر کنید تا زمانی که ۳۰ میلی‌لیتر عصاره در ارلن مایر جمع آوری شود. در نهایت عصاره را با اسید سولفوریک ۰/۰۰۵ مولار تیترو کنید. یک میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۰/۰۰۵ مولار معادل ۷۰ میکروگرم نیتروژن آمونیومی است. نتایج غلظت نیتروژن آمونیومی سوسپانسیون خاک را با نمونه‌های کنترل تصحیح کرده و با رابطه ۳-۲۸ فعالیت آنزیم اوره‌آز خاک را محاسبه کنید (10):

$$\text{Urease activity } (\mu\text{g NH}_4 - \text{N g}^{-1} \text{dwt } 2\text{h}^{-1}) = \frac{C \times 50}{\text{dwt} \times 5} \quad \text{رابطه (۳-۲۸)}$$

C غلظت اندازه‌گیری شده نیتروژن آمونیومی تصحیح شده بر حسب میکروگرم نیتروژن آمونیومی بر میلی‌لیتر سوسپانسیون خاک

50 حجم کل سوسپانسیون خاک

dwt وزن خشک یک گرم خاک مرطوب

5 وزن کل خاک مرطوب مورد استفاده در آزمایش

ملاحظات

- برای تهیه محلول پتاسیم کلرید-سولفات نقره بایستی در ابتدا سولفات نقره را در آب مقطر حل کرد و سپس پتاسیم کلرید را به آن افزود. چرا که سولفات نقره در محلول پتاسیم کلرید حل نمی‌شود.
- پس از افزودن محلول پتاسیم کلرید-سولفات نقره به سوسپانسیون تا زمان تعیین آمونیوم، می‌تواند ۲ ساعت فاصله باشد. چرا که این محلول هیدرولیز آنزیمی اوره را در طی این مدت متوقف می‌کند.
- زمان صاف کردن سوسپانسیون و استخراج آمونیوم در نمونه‌های مختلف نباید متفاوت باشد.
- صاف کردن سوسپانسیون خاک باید با کاغذ صافی بدون نیتروژن انجام شود تا از آلودگی نیتروژن جلوگیری شود.
- حداقل سه تکرار برای هر نمونه آزمایش باید اجرا شود (10).

۳-۲-۳- فعالیت آنزیم آلکالاین فسفاتاز

این روش برای تخمین فعالیت آنزیم آلکالاین فسفاتاز، بر اساس تعیین غلظت پارانیتروفنیل آزاد شده پس از انکوباسیون خاک با پارانیتروفنیل فسفات استوار است. بدین منظور در ابتدا مواد زیر را تهیه کنید:

- تولوئن

- محلول استوک بافر MUB: میزان ۱۲/۱ گرم تریس، ۱۱/۶ گرم مالئیک اسید، ۱۴ گرم سیتریک اسید و ۶/۳ گرم بوریک اسید را در ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول سدیم هیدروکسید یک مولار حل کنید و با آب مقطر به حجم یک لیتر برسانید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید.

- بافر MUB با pH=۱۱: میزان ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول استوک MUB را با سدیم هیدروکسید ۰/۱ مولار تحت شرایط هم‌زدن مداوم در pH برابر با ۱۱ تنظیم کنید و با آب مقطر به حجم یک لیتر برسانید.

- محلول پارانیتروفنیل فسفات^۱ (PNP): ۱۵ میلی‌مولار: میزان ۲/۹۲۷ گرم دی‌سدیم پارانیتروفنیل فسفات تتراهیدرات را در ۴۰ میلی‌لیتر بافر MUB با pH=۱۱ حل کرده و با همان بافر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر برسانید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید.

- محلول کلسیم کلرید ۰/۵ مولار: میزان ۷۳/۵ گرم کلسیم کلرید را در آب مقطر حل کرده و به حجم یک لیتر برسانید.

- محلول سدیم هیدروکسید ۰/۵ مولار: میزان ۲۰ گرم سدیم هیدروکسید را در آب مقطر حل کرده و به حجم یک لیتر برسانید.

- محلول سدیم هیدروکسید ۰/۱ مولار: میزان ۴ گرم سدیم هیدروکسید را در آب مقطر حل کرده و به حجم یک لیتر برسانید.

- محلول استاندارد پارانیتروفنیل: میزان یک گرم پارانیتروفنیل را در ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و به حجم یک لیتر برسانید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید.

پس از تهیه مواد مورد نیاز، یک گرم خاک مرطوب را در ارلن مایر ۵۰ میلی‌لیتری بریزید و ۰/۲۵ میلی‌لیتر تولوئن، ۴ میلی‌لیتر بافر MUB با pH=۱۱ و یک میلی‌لیتر محلول پارانیتروفنیل فسفات را به آن بیافزایید. محتوای ارلن مایر را مخلوط کرده و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون کنید. پس از انکوباسیون، یک میلی‌لیتر محلول کلسیم کلرید ۴ و ۴ میلی‌لیتر محلول سدیم هیدروکسید ۰/۵ مولار به ارلن مایر اضافه کنید. سوسپانسیون خاک را مخلوط و سپس با کاغذ واتمن شماره ۲ صاف کنید. در نهایت جذب نور را در ۴۰۰ نانومتر اندازه بگیرید. برای نمونه کنترل همین روند را دنبال نمایید، اما با این تفاوت که یک میلی‌لیتر محلول PNP را پس از افزودن محلول‌های کلسیم کلرید و سدیم هیدروکسید و بلافاصله قبل از صاف کردن سوسپانسیون خاک، اضافه کنید.

¹ Modified Universal Buffer

6

¹ p-Nitrophenyl phosphate

7

برای تهیه منحنی کالیبراسیون، یک میلی‌لیتر از محلول استاندارد پارانیتروفنل را در بالن ژوژه بریزید و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید. مقدار صفر، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌لیتر از این محلول استاندارد رقیق‌شده را به ارلن مایرهای ۵۰ میلی‌لیتری پیپت کنید و با اضافه کردن آب مقطر، حجم را در ۵ میلی‌لیتر تنظیم نمایید و همانطور که برای تجزیه پارانیتروفنل نمونه‌های خاک انکوباسیون‌شده در فوق شرح داده شد، مراحل کار را ادامه دهید. نتایج سوپانسیون خاک را با نمونه‌های کنترل تصحیح کرده و پارانیتروفنل در هر میلی‌لیتر عصاره را با مراجعه به منحنی کالیبراسیون محاسبه کنید. در نهایت فعالیت آنزیم آلکالاین فسفاتاز در هر گرم خاک را با رابطه ۳-۲۹ به دست آورید (10):

$$p - \text{Nitrophenol} (\mu\text{g } g^{-1} \text{dwt } h^{-1}) = \frac{C \times v}{\text{dwt} \times \text{SW} \times t} \quad \text{رابطه (۳-۲۹)}$$

C غلظت اندازه‌گیری‌شده پارانیتروفنل بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره

v حجم کلی سوپانسیون خاک بر حسب میلی‌لیتر

dwt وزن خشک یک گرم خاک مرطوب

SW وزن نمونه خاک استفاده شده (یک گرم)

t زمان انکوباسیون بر حسب ساعت

ملاحظات

- حداقل سه تکرار برای هر نمونه آزمایش باید اجرا شود.
- به جای فیلتراسیون می‌توان از سانتریفیوژ سریع استفاده کرد.
- می‌توان با قرار دادن سوپانسیون‌های خاک در یخ پس از انکوباسیون، واکنش آنزیمی را متوقف کرد (10).

۳-۲-۴- فعالیت آنزیم بتاگلوکوزیداز

آنزیم بتاگلوکوزیداز آنزیم محدوده‌کننده سرعت در تجزیه میکروبی سلولز به گلوکز است. اصول اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم در خاک بر اساس میزان رهاسازی پارانیتروفنل پس از انکوباسیون خاک با محلول پارانیتروفنل گلوکوزید طی یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. بدین منظور در ابتدا مواد زیر را تهیه کنید:

- تولوئن

- بافر MUB با pH=۶: مطابق دستورالعمل زیربخش ۳-۲-۳ محلول استوک بافر MUB را تهیه کنید. میزان ۲۰۰ میلی‌لیتر

از این محلول را با هیدروکلریک اسید ۰/۱ مولار تحت شرایط هم‌زدن مداوم در pH برابر با ۶ تنظیم کنید و با آب مقطر به حجم یک لیتر برسانید.

- محلول کلسیم کلرید ۰/۵ مولار: مطابق دستورالعمل زیربخش ۳-۲-۳ عمل کنید.

- بافر تریس با غلظت ۰/۱ مولار و pH=۱۰ و pH=۱۲: ۱۲/۱ گرم تریس را در ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و آن را

با اسید سولفوریک ۰/۲ مولار در pH مدنظر تنظیم کنید و با آب مقطر به حجم یک لیتر برسانید.

- محلول استاندارد پارانیتروفنل: مطابق دستورالعمل زیربخش ۳-۲-۳ عمل کنید.

- محلول پارانیتروفنل بتا دی‌گلوکوزید (PNG) ۲۵ میلی‌مولار: میزان ۰/۳۷۷ گرم از PNG را در ۴۰ میلی‌لیتر بافر MUB حل کنید و با همان بافر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر برسانید. این محلول باید در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود.

پس از تهیه مواد مورد نیاز، یک گرم خاک مرطوبی که از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شده را در ارلن مایر ۵۰ میلی‌لیتری بریزید و ۰/۲۵ میلی‌لیتر تولوئن، ۴ میلی‌لیتر محلول MUB و یک میلی‌لیتر محلول PNG به آن اضافه کنید. محتوای ارلن را کاملاً مخلوط کنید و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون نمایید. پس از انکوباسیون، یک میلی‌لیتر محلول کلسیم کلرید و ۴ میلی‌لیتر بافر تریس با $\text{pH}=12$ به سوسپانسیون خاک بیافزایید. ارلن را به خوبی هم بزنید و بلافاصله محتوای آن را صاف کنید. چگالی نوری را در ۴۰۰ نانومتر اندازه بگیرید. اگر چگالی نوری عصاره خیلی زیاد است، توسط بافر تریس با $\text{pH}=10$ آن را رقیق کنید. برای نمونه بلانک، سوبسترای PNG را پس از انکوباسیون و قبل از افزودن کلسیم کلرید و بافر تریس به ارلن مایر اضافه کنید. تهیه منحنی کالیبراسیون و محاسبه فعالیت آنزیم مشابه زیربخش ۳-۳-۲ است. برای انجام این مراحل به زیربخش مذکور مراجعه کنید (10).

ملاحظات

- تمام نمونه‌ها باید در سه تکرار به همراه یک نمونه بلانک اندازه‌گیری شوند.
- محلول PNG تا چند روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد پایدار است (10).

۳-۲-۵- فعالیت آنزیم سلولاز

سلولز فراوان‌ترین پلی‌ساکارید ساختاری دیواره سلولی گیاهان است. بنابراین تخریب میکروبی سلولز یک فرایند مهم در تخریب بقایای گیاهی به شمار می‌آید. تخریب سلولز در خاک یک فرایند آهسته بوده و نوع لاشبرگ، غلظت سوبسترا، pH ، دما و محتوای آب تأثیر قابل توجهی بر سرعت این فرایند می‌گذارد. آنزیم سلولاز عمدتاً توسط قارچ‌های خاک تولید می‌شود و فعالیت آن در خاک عموماً در pH بین ۵ تا ۶ و در دمای ۳۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد رخ می‌دهد. هواخشک کردن خاک به شدت این آنزیم را غیرفعال می‌کند. یک روش برای تعیین فعالیت آنزیم سلولاز در خاک، اندازه‌گیری میزان گلوکز رها شده پس از انکوباسیون خاک‌های تیمار شده با کربوکسی متیل سلولز به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد است. بدین منظور در ابتدا مواد زیر را تهیه کنید:

- بافر استات ۲ مولار با $\text{pH}=5/5$: میزان ۱۶۴/۰۸ گرم از سدیم استات بدون آب را در ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و pH را با استیک اسید در ۵/۵ تنظیم کنید و با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسانید.
- محلول نمک سدیم کربوکسی متیل سلولز^۱ ۰/۷ درصد وزنی حجمی: میزان ۷ گرم CMC را در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر بافر استات حل کنید. این محلول باید به مدت ۲ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد با همزن مغناطیسی هم بخورد.
- معرف A: میزان ۱۶ گرم سدیم کربنات بدون آب و ۰/۹ گرم پتاسیم سیانید را در آب مقطر حل کرده و به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسانید.

¹ Carboxymethyl cellulose sodium salt, CMC

- معرف B: میزان ۰/۵ گرم پتاسیم آهن هگزا سیانید^۹ را در آب مقطر حل کرده و به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسانید و در بطری‌های تیره رنگ نگهداری کنید.

- معرف C: میزان ۱/۵ گرم سولفات آمونیوم آهن^۱؛ یک گرم سدیم دودسیل سولفات^۲ و ۴/۲ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ را در آب مقطر با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد حل کنید و به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسانید.

- محلول گلوکز مونوهیدرات: میزان ۲۸ میلی‌گرم از این ماده را در آب مقطر حل کرده و به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر برسانید. پس از تهیه مواد مورد نیاز، میزان ۱۰ گرم خاک مرطوبی که از الک ۲ میلی‌متری عبور کرده را در ارلن مایر بریزید و ۱۵ میلی‌لیتر بافر استات و ۱۵ میلی‌لیتر محلول CMC را به آن بیافزایید. درب ارلن مایر را ببندید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون کنید. پس از انکوباسیون، سوسپانسیون خاک را با کاغذ صافی فیلتر کنید. برای نمونه کنترل همین روند را دنبال نمایید، اما با این تفاوت که ۱۵ میلی‌لیتر محلول CMC را پس از انکوباسیون و بلافاصله قبل از صاف کردن سوسپانسیون خاک، اضافه کنید. یک میلی‌لیتر از عصاره را با آب مقطر به حجم ۲۰ میلی‌لیتر (برای خاک‌های کشاورزی) یا ۳۰ میلی‌لیتر (برای خاک‌های جنگلی) برسانید. یک میلی‌لیتر از عصاره رقیق‌شده را با پیپت به لوله شیشه‌ای بریزید و یک میلی‌لیتر معرف A و یک میلی‌لیتر معرف B به آن بیفزایید. درب لوله را ببندید و به خوبی محتوای آن را با ورتکس مخلوط کنید. لوله را در یک حمام آب با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه بجوشانید. سپس لوله شیشه‌ای را به مدت ۵ دقیقه در حمام آب با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا خنک شود و بعد ۵ میلی‌لیتر معرف C به آن بیفزایید، خوب مخلوط کنید و اجازه دهید به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد بماند تا رنگ ایجاد شود. پس از آماده شدن نمونه‌ها، نهایتاً طی مدت ۳۰ دقیقه چگالی نوری را در ۶۹۰ نانومتر قرائت کنید. برای تهیه منحنی کالیبراسیون، میزان صفر، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۸، ۰/۹ و ۱ میلی‌لیتر محلول گلوکز مونوهیدرات را به لوله‌های آزمایش پیپت کنید و با آب مقطر تا حجم یک میلی‌لیتر رقیق کنید. طبق توضیحات فوق‌الذکر برای اندازه‌گیری گلوکز معرف‌های A، B و C اضافه کرده و مراحل کار را پیش ببرید. نتایج سوسپانسیون خاک را با نمونه‌های کنترل تصحیح کرده و گلوکز در هر میلی‌لیتر عصاره را با مراجعه به منحنی کالیبراسیون محاسبه کنید. در نهایت فعالیت آنزیم سلولاز در هر گرم خاک را با رابطه ۳-۳۰ به دست آورید (10):

$$\text{Glucose equivalent } (\mu\text{g g}^{-1} \text{dwt } 24\text{h}^{-1}) = \frac{C \times v \times f}{sw \times dwt} \quad \text{رابطه (۳-۳۰)}$$

C غلظت گلوکز اندازه‌گیری شده بر حسب میکروگرم گلوکز بر میلی‌لیتر عصاره

v حجم سوسپانسیون خاک (در این پروتکل ۳۰ میلی‌لیتر است)

f ضریب رقت (۲۰ برای خاک‌های کشاورزی و ۳۰ برای خاک‌های جنگلی)

sw وزن خاک مرطوب

¹ Potassium Ferric Hexacyanide ⁹

² Ferric Ammonium Sulphate ⁰

² Sodium Dodecyl Sulphate ¹

dwt وزن خشک یک گرم خاک مرطوب

ملاحظات

- محلول CMC به مدت یک هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری است.
- معرف‌های A، B و C معرف‌های مورد نیاز برای تعیین قندهای احیاکننده مانند گلوکز هستند.
- در مراحل اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سلولاز، رعایت دقیق زمان حمام آب از اهمیت برخوردار است و بایستی لوله شیشه‌ای دقیقاً ۱۵ دقیقه جوشانده شود.
- کنترل دقیق pH در هنگام تعیین گلوکز ضروری است. پس از افزودن معرف‌های A و B باید pH بیشتر از ۱۰/۵ باشد.
- اما پس از افزودن معرف C باید pH کمتر از ۲ باشد (10).

۳-۲-۶- فعالیت آنزیم دهیدروژناز

اندازه‌گیری فعالیت یک یا چند آنزیم در زنجیره تنفسی می‌تواند به عنوان شاخصی برای کل فعالیت‌های اکسیداتیو سلول مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین فعالیت آنزیم دهیدروژناز در خاک به عنوان معیاری برای فعالیت کلی جامعه میکروبی به شمار می‌آید. یکی از متداول‌ترین روش‌ها برای تخمین فعالیت دهیدروژناز در خاک مبتنی بر استفاده از تری‌فنیل تترازولیوم کلراید^۲ (TTC) به عنوان یک پذیرنده مصنوعی الکترون است. این ماده محلول در آب، دارای پتانسیل رد اکس ۰/۰۸- ولت بوده و به عنوان پذیرنده الکترون دهیدروژناز عمل می‌کند. تقریباً همه ریزجانداران TTC را به تری‌فنیل فورمازان^۳ (TPF) کاهش می‌دهند که می‌توان سرعت این فرایند را با انکوباسیون خاک در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و با کمک رنگ‌سنجی تخمین زد. بدین منظور در ابتدا مواد زیر را تهیه کنید:

- بافر تریس-هیدروکلریک اسید با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار: میزان ۱۲/۱ گرم تریس (هیدروکسی متیل) آمینو متان را در ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و pH را با هیدروکلریک اسید به حد لازم برسانید. اگر pH خاک بزرگتر از ۷/۵ بود، بافر را روی ۷/۴ و اگر pH خاک بین ۷/۵ تا ۶ بود، pH بافر را روی ۷/۶ تنظیم کنید. در نهایت محلول را به حجم یک لیتر برسانید.

- محلول TTC: بر اساس نوع خاک، مقدار TTC مورد استفاده از ۰/۱ تا ۱/۵ گرم متغیر خواهد بود. بر اساس راهنمای ذیل، مقدار مورد نیاز TTC را وزن کرده و در ۸۰ میلی‌لیتر بافر تریس حل کنید و با همان بافر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید. مقدار مورد نیاز TTC به شرح زیر است:

- ۰/۱ گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر برای خاک‌های شنی با ماده آلی پایین
- ۰/۳ تا ۰/۴ گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر برای خاک‌های شن لومی، لوم شنی و شنی آلی
- ۰/۶ تا ۰/۸ گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر برای خاک‌های لومی، آلی و لوم شنی

² Triphenyl Tetrazolium Chloride²

² Triphenyl Formazan³

▪ ۰/۸ تا ۱ گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر برای خاک‌های لوم رسی

▪ ۱ تا ۱/۵ گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر برای خاک‌های رسی و آلی

- عصاره‌گیر: استون با درجه خلوص آزمایشگاهی

- محلول استاندارد TPF: میزان ۵۰ میلی‌گرم TPF را در ۸۰ میلی‌لیتر استون حل کرده و به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید.

یک میلی‌لیتر این محلول حاوی ۵۰۰ میکروگرم TPF است.

پس از تهیه مواد مورد نیاز، ۵ گرم خاک مرطوب را وزن کنید، در لوله‌های آزمایش بریزید و به آن ۵ میلی‌لیتر محلول TTC بیافزایید. لوله آزمایش باید گنجایش ۶۰ میلی‌لیتر را داشته و قطر آن ۲/۵ سانتی‌متر باشد. همچنین دارای درپوش لاستیکی مقاوم در برابر حلال‌ها باشد. مواد داخل لوله آزمایش را مخلوط کرده و درب لاستیکی آن را ببندید و برای ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون کنید. نمونه‌های کنترل فقط حاوی ۵ میلی‌لیتر بافر تریس (بدون افزودن TTC) هستند. پس از انکوباسیون، ۴۰ میلی‌لیتر استون به لوله آزمایش اضافه کنید و کاملاً تکان دهید. سپس در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت در تاریکی نگهداری کنید و با فواصل لوله‌ها را تکان دهید. بعد ۱۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون خاک را صاف کنید و چگالی نوری آن را در ۵۴۶ نانومتر (رنگ قرمز) قرائت نمایید. برای تهیه منحنی کالیبراسیون، میزان صفر، ۰/۵، ۱/۰، ۲/۰، ۳/۰ و ۴/۰ میلی‌لیتر از محلول استاندارد TPF را در بالن حجم‌سنجی ۵۰ میلی‌لیتری پیمت کنید و ۸/۳ میلی‌لیتر بافر تریس با pH ۷/۶ را به آن بیافزایید. بالن‌ها را با استون به حجم ۵۰ میلی‌لیتر برسانید تا محلول‌هایی با غلظت صفر، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میکروگرم TPF بر میلی‌لیتر تهیه شوند. نتایج سوسپانسیون خاک را با نمونه‌های کنترل تصحیح کرده و غلظت TPF در هر میلی‌لیتر عصاره را با مراجعه به منحنی کالیبراسیون محاسبه کنید. در نهایت فعالیت آنزیم دهیدروژناز را برحسب میزان TPF در هر گرم خاک را با رابطه ۳-۳۱ به دست آورید (21):

$$\text{Dehydrogenase activity } (\mu\text{g TPF g}^{-1}\text{dwt}) = \frac{C \times v}{\text{dwt} \times \text{sw}} \quad \text{رابطه (۳-۳۱)}$$

C غلظت TPF اندازه‌گیری شده بر حسب میکروگرم TPF بر میلی‌لیتر عصاره

v حجم سوسپانسیون خاک (در این پروتکل ۴۵ میلی‌لیتر است)

sw وزن خاک مرطوب

dwt وزن خشک یک گرم خاک مرطوب

ملاحظات

- محلول‌های TTC و TPF را در ظروف تیره رنگ و دور از نور خورشید نگهداری کنید.

- به دلیل حساسیت محلول‌های فوق‌الذکر به نور، کلیه مراحل آزمایش باید تحت تمهیدات خاص باشد. برای مثال ورود

نور به آزمایشگاه باید کنترل شود. پرده‌ها را بکشید یا پنجره‌ها با ورقه‌های مات بپوشانید. لامپ‌های آزمایشگاهی نیز باید با

فیلترهای محافظ پوشانیده شوند تا شدت و جهت نور را تغییر دهد (21).

۳-۲-۷- میانگین هندسی آنزیم‌ها

میانگین هندسی فعالیت آنزیمی خاک^۴ (GME) یک شاخص کیفی بوده که برای مقایسه کردن واحدها و مقادیر متفاوت آنزیم‌های مورد مطالعه به کار می‌رود و فعالیت زیستی خاک را نشان می‌دهد. این شاخص را با استفاده از رابطه ۳-۳۲ محاسبه کنید (27):

$$GME = \sqrt[n]{URE \times ALP \times BGC \times CE \times DH} \quad (\text{رابطه ۳-۳۲})$$

GME میانگین هندسی فعالیت آنزیمی خاک

n تعداد آنزیم‌های اندازه‌گیری شده

URE فعالیت آنزیم اوره‌آز

ALP فعالیت آنزیم آلکالاین فسفاتاز

BGC فعالیت آنزیم بتاگلوکوزیداز

CE فعالیت آنزیم سلولاز

DE فعالیت آنزیم دهیدروژناز (27).

۳-۲-۸- شاخص شانون آنزیم‌ها

شاخص تنوع عملکرد (H') و یکنواختی عملکرد (E_{pielou}) شانون-ویور برای فعالیت آنزیمی خاک را بر اساس روابط ۳-۳۳، ۳-۳۴ و ۳-۳۵ محاسبه کنید (28):

$$P_i = \frac{r_i}{\sum r_i} \quad (\text{رابطه ۳-۳۳})$$

$$H' = - \sum P_i \ln P_i \quad (\text{رابطه ۳-۳۴})$$

$$E_{\text{pielou}} = \frac{H'}{\ln(n)} \quad (\text{رابطه ۳-۳۵})$$

P_i مجموع فعالیت آنزیم‌ها

$\frac{r_i}{\sum r_i}$ نسبت فعالیت هر آنزیم به مجموع فعالیت همه آنزیم‌ها

H' شاخص تنوع عملکرد

E_{pielou} شاخص یکنواختی عملکرد شانون-ویور

n تعداد آنزیم‌های سنجش شده.

² Geometric Mean of Enzyme activities

۳-۲-۹- فعالیت ویژه آنزیم‌ها

فعالیت ویژه هر آنزیم را با تقسیم فعالیت آن آنزیم بر میزان توده زنده میکروبی محاسبه کنید. نسبت فعالیت آنزیم‌ها به کربن زیست‌توده میکروبی (Enzyme/MBC) نشان‌دهنده فعالیت آنزیمی به ازای هر واحد کربن زیست‌توده میکروبی می‌باشد (29).

۳-۲-۱۰- نسبت آنزیم به کربن آلی

نسبت فعالیت آنزیم به کربن آلی (Enzyme/OC) را با تقسیم میزان فعالیت آنزیم‌ها به کربن آلی محاسبه کنید. این نسبت نشان‌دهنده فعالیت آنزیمی به ازای هر واحد کربن آلی می‌باشد (30).

۳-۲-۱۱- ویژگی‌های پوسته‌های زیستی

۳-۲-۱۱-۱- کشت، جداسازی و خالص‌سازی سیانوباکتری‌ها از خاک

الف) ابزارهای مورد نیاز

- پتری‌دیش‌های حاوی آگار ۱/۵ درصد
- پتری‌دیش‌های بزرگ برای کشت نمونه
- پتری‌دیش‌های کوچک برای خالص‌سازی
- یک عدد پتری‌دیش کوچک برای خنک کردن سر سوزن
- پنس‌ها و سوزن‌های استیل
- یک عدد لوپ
- اتانول ۹۶ درصد برای چراغ الکی (جهت ضدعفونی کردن پنس‌ها)
- اتانول ۷۰ درصد
- محلول ضدعفونی کننده دست
- استریومیکروسکوپ
- ماکرهای ضد آب
- پارافیلیم

ب) کشت سیانوباکتری‌ها

- میز کارتان را با اتانول ۷۰ درصد استریل کنید.
- دست‌هایتان را با محلول ضدعفونی کننده استریل کنید.

- پشت پتری‌دیش‌های بزرگ را به ۴ قسمت مساوی تقسیم کنید و در هر قسمت مشخصات نمونه شامل: نام محقق، کد نمونه، نوع محیط کشت و تاریخ کشت را بنویسید.
- نمونه‌ها را زیر لوپ و میکروسکوپ به دقت بررسی کنید.
- پنس را بر روی شعله چراغ الکی آنقدر نگه دارید تا نوک آن قرمز شود.
- نوک پنس را به پتری‌دیش کوچک در داخل آگار فرو ببرید تا سرد شود
- با پنس استریل شده قسمت‌هایی از نمونه را که با لوپ بررسی کرده‌اید برداشته و در هر قسمت از پتری‌دیش یک تکه کوچک از نمونه را قرار دهید اندکی در داخل آگار مدفون کنید به طوری بر روی آگار ثابت شود و با تکان دادن پتری‌دیش جابجا نشود.

- درب پتری‌دیش را بر روی آن قرار داده و با پارافیلیم کاملاً ببندید و به حالت برگردان در داخل سینی بگذارید.
- سینی حاوی پتری‌دیش‌ها را در اتاق مخصوص در دمای مناسب (۲۰-۱۸ درجه سانتی‌گراد) قرار دهید. سیانوباکتری‌ها بین ۲-۴ هفته شروع به رشد خواهند نمود. هفته‌ای یک بار وضعیت رشد نمونه کشت‌ها را کنترل کنید.

پ) خالص‌سازی سیانوباکتری‌ها

مرحله اول

- میز کارتان را با اتانول ۷۰ درصد استریل کنید.
 - دست‌هایتان را با محلول ضدعفونی‌کننده استریل کنید.
 - پشت پتری‌دیش‌های بزرگ را به ۴ قسمت مساوی تقسیم کنید و در هر قسمت مشخصات نمونه شامل: نام محقق، کد نمونه، نوع محیط کشت و تاریخ کشت را بنویسید.
 - نمونه‌ها را زیر لوپ و میکروسکوپ به دقت بررسی کنید
 - پنس را بر روی شعله چراغ الکی آنقدر نگه دارید تا نوک آن قرمز شود.
 - نوک پنس را به پتری‌دیش کوچک در داخل آگار فرو ببرید تا سرد شود
 - با پنس استریل شده کلونی‌هایی را که با لوپ بررسی کرده‌اید برداشته و در هر قسمت از پتری‌دیش یک تکه کوچک از نمونه را قرار دهید از هر کلونی تکه‌ای برداشته و بر روی یکی از ۴ قسمت پتری‌دیش قرار دهید. اندکی در داخل آگار مدفون کنید به طوری بر روی آگار ثابت شود و با تکان دادن پتری‌دیش جابجا نشود.
 - درب پتری‌دیش را بر روی آن قرار داده و با پارافیلیم کاملاً ببندید و به حالت برگردان در داخل سینی بگذارید.
 - سینی حاوی پتری‌دیش‌ها را در اتاق مخصوص در دمای مناسب (۲۰-۱۸ درجه سانتی‌گراد) قرار دهید. سیانوباکتری‌ها بین ۲-۴ هفته شروع به رشد خواهند نمود. هفته‌ای یک بار وضعیت رشد نمونه کشت‌ها را کنترل کنید.
- نکته:** مرحله خالص‌سازی نمونه را آنقدر تکرار کنید تا نمونه‌های خالص و یک‌دست تهیه شوند. در هر بار مرحله خالص‌سازی یک تا دو ماه منتظر بمانید تا کلونی‌های سیانوباکتری کاملاً شکل گیرند.

۳-۲-۱۱-۲- کشت، تکثیر و خالص سازی سیانوباکتری از پوسته های زیستی

الف) ابزار و مواد مورد نیاز

همه ابزار و مواد مورد نیاز عیناً مطابق با زیربخش ۳-۲-۱۱-۱ قسمت «الف» هستند. فقط دو مورد ذیل ضرورتاً برای همگن سازی نمونه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

- آسیاب برقی کوچک

- الک استاندارد آمریکایی آشتو (ASHTO T27) شماره ۱۲۰

ب) کشت سیانوباکتری‌ها

همان مراحل زیربخش ۳-۲-۱۱-۱ قسمت «ب» که برای کشت و استخراج سیانوباکتری‌ها از خاک انجام می‌شود، برای استخراج سیانوباکتری‌ها از پوسته‌های زیستی نیز قابل اجرا هستند. ممکن است پوسته‌های زیستی جمع آوری شده مخلوطی از خزه، گل‌سنگ و از گونه‌های مختلف خزه و گل‌سنگ تشکیل شده باشند. ضرورتاً قبل از شروع به جداسازی و کشت سیانوباکتری‌ها باید نمونه همگن شده باشد. برای همگن سازی نمونه‌ها، مراحل ذیل قبل از انتقال به محیط کشت انجام می‌شود.

- پوسته‌های زیستی را از خاک زیرین کاملاً جدا کنید.

- ذرات خاک را با تیغه های مخصوص یا با اسپاتول با دقت تمام از روی آنها و ریشه ها جدا کنید.

- پوسته‌های زیستی را آسیاب کنید و از الک شماره ۱۲۰ رد کنید.

- مراحل زیربخش ۳-۲-۱۱-۱ قسمت «ب» را اجرا کنید.

پ) خالص سازی سیانوباکتری ها

دقیقاً همانند زیربخش ۳-۲-۱۱-۱ قسمت «پ» اجرا می‌شود.

۳-۲-۱۱-۳- اندازه گیری کلروفیل در نمونه‌های سیانوباکتری

الف) ابزار و مواد لازم

- اتانول ۹۶٪

- یخ مکعبی به مقدار لازم

- سانتریفیوژ

- اسپکتروفتومتر

- حمام آب (بن ماری)

ب) روش کار

۱- نمونه‌ها را در هاون ریخته و بسابید تا همگن شوند.

۲- نمونه‌ها را به تیوپ‌های سانتریفیوژ ۱۵ میلی‌لیتری انتقال دهید.

- ۳- سه میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد به آن اضافه کنید.
 - ۴- به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۸ درجه سانتی گراد در حمام آب (بن ماری) بگذارید.
 - ۵- مقداری یخ مکعبی در داخل ظرف یونولیتی بریزید و نمونه‌ها را بعد از حمام آب به مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ بگذارید تا خنک شوند.
 - ۶- به مدت ۵ دقیقه در دمای ۵ درجه سانتی گراد با ۶۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ کنید.
 - ۷- دستگاه اسپکتروفتومتر را با اتانول ۹۶ درصد (شاهد یا بلانک) صفر کنید.
 - ۸- میزان کلروفیل را در طول موج‌های ۶۳۲، ۶۴۹، ۶۶۵ و ۶۹۶ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه بگیرید. همچنین میزان کدورت نمونه را در طول موج ۷۵۰ نانومتر قرائت کنید. میزان کدورت نمونه نباید بیش از ۰/۰۰۵ باشد. در صورتی که زیادتر از ۰/۰۰۵ بود دوباره آن را سانتریفیوژ کنید تا کاملاً شفاف شود.
 - ۹- بعد از اندازه‌گیری باقیمانده عصاره دور بریزید.
 - ۱۰- سه میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد مجدداً به نمونه‌ها اضافه کنید.
 - ۱۱- سی دقیقه در دمای ۷۸ درجه سانتی گراد در حمام آب (بن ماری) قرار دهید.
 - ۱۲- به مدت دقیقه نمونه‌ها را بر روی یخ بگذارید تا خنک شوند.
 - ۱۳- به مدت ۵ دقیقه در دمای ۵ درجه سانتی گراد با ۶۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ کنید.
 - ۱۴- دستگاه اسپکتروفتومتر را با اتانول ۹۶ درصد (شاهد یا بلانک) صفر کنید.
 - ۱۵- میزان کلروفیل را در طول موج‌های ۶۳۲، ۶۴۹، ۶۶۵ و ۶۹۶ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه بگیرید. همچنین میزان کدورت نمونه را در طول موج ۷۵۰ نانومتر قرائت کنید. میزان کدورت نمونه نباید بیش از ۰/۰۰۵ باشد. در صورتی که زیادتر از ۰/۰۰۵ بود دوباره آن را سانتریفیوژ کنید تا کاملاً شفاف شود.
 - ۱۶- بعد از اندازه‌گیری باقیمانده عصاره دور بریزید.
- مراحل ۱۰ تا ۱۶ را تا زمانی که قرائت ۶۶۵ نانومتر عدد صفر را نشان دهد تکرار کنید.
- نکته:** برای کاهش میزان احتمالی پراکنش و خطاهای ضریب شکست نور می‌توان $MgCO_3$ اضافه نمود. برخی محققان در مقالات بدان اشاره نموده‌اند، لیکن افزودن آن در انجام آزمایش ضرورت ندارد.

پ) محاسبه کلروفیل

مقدار کلروفیل از هر مرحله استخراج را طبق رابطه ۳-۳۶ محاسبه کنید و با هم جمع بزنید.

$$\text{Chl a (mgL}^{-1}\text{)} = ([11.9035 * A_{(665)}] * V) / (\text{gcrust} * L) \quad \text{رابطه (۳-۳۶)}$$

L طول قطر اپتیکی سل‌های اسپکتروفتومتر به میلی‌متر (در سل کریستالی مخصوص با قطر ۱۰ میلی‌متر اندازه‌گیری می‌شود بنابراین عدد ۱۰ را جایگزین کنید)

V حجم عصاره به لیتر (همچنین می‌توان به میلی لیتر نوشت)

g وزن پوسته‌های زیستی بر حسب گرم (اگر وزن را به میلی گرم در فرمول جاگذاری کنید واحد کلروفیل هم به μgml^{-1}) خواهد بود)

۳-۲-۱۱-۴- اندازه گیری مواد اگزوپلی ساکاریدی در سیانوباکتری‌ها

الف) ابزار و مواد لازم

- سانتریفیوژ
- ترازو
- دستگاه Dry-Freezer
- اسید سولفوریک ۱۲ مولار
- فنول ۵ درصد
- اسپکتروفتومتر
- محلول نمک NaCl ۰/۰۵ درصد
- محلول Na₂EDTA ۰/۱ مولار

ب) مراحل عصاره‌گیری

- نمونه‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور $\times 7500$ سانتریفیوژ کنید.
- مایع رویی را دور بریزید.
- ۱۰ میلی لیتر NaCl ۰/۰۵ درصد به مواد باقیمانده اضافه کنید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با دور $\times 7500$ سانتریفیوژ کنید.
- مایع رویی را در تیوپ جداگانه خالی کنید. این مایع حاوی مواد اگزوپلی ساکاریدی با باندهای ضعیف هستند (LB-EPS) که کمی نامحلول بوده و محیط را متخلخل می‌کنند.
- به مواد باقیمانده ۱۰ میلی لیتر محلول محلول Na₂EDTA ۰/۱ مولار اضافه کنید و به مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بر روی دستگاه شیکر قرار دهید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور $\times 7500$ سانتریفیوژ کنید.
- محلول رویی را در تیوپ جداگانه بریزید. این مایع حاوی مواد اگزوپلی ساکاریدی با باندهای محکم و قوی هستند (TB-EPS). این مواد هم در داخل و هم در خارج سلول گسترش یافته و کلونی‌های سیانوباکتری را در برابر هیدرولیز مقاوم می‌کنند.
- از هر کدام از محلول‌ها ۲ میلی‌لیتر برداشته و با دستگاه Dry-Freezer خشک کنید.

پ) اندازه‌گیری پلی ساکاریدها

- بر روی مواد Dry-Freeze شده ۱ میلی لیتر اسید سولفوریک ۱۲ مولار بریزید.
- به محتویات نمونه یک میلی لیتر فنول ۵ درصد اضافه کنید.
- نمونه‌ها را در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت کنید.

- محلول استاندارد گلوکز را مطابق با زیربخش ۳-۱-۲-۴ قسمت «پ» تهیه کنید و پس از ترسیم منحنی رگرسیونی مقادیر پلی‌ساکاریدها را محاسبه کنید.

۳-۳- سطح تکمیلی مطالعات

۳-۳-۱- بررسی تنوع ژنتیکی باکتری‌های خاک بر اساس متاژنومیکس

متاژنومیکس یک مطالعه مستقل از کشت است که به صورت تئوری امکان مطالعه DNA هر نوع نمونه‌ای را از کل جامعه جانداران فراهم می‌کند. این فناوری چهار مرحله اصلی دارد: ۱- جداسازی ماده ژنتیکی کل موجودات زنده میکروسکوپی موجود در محیط مورد مطالعه، ۲- انتقال مواد ژنتیکی به ناقل‌ها، ۳- ساخت کتابخانه ژنومی و ۴- تجزیه و تحلیل مواد ژنتیکی در کتابخانه متاژنومیکس. بنابراین اولین قدم، استخراج نمونه و ریزجانداران از محیط و سپس توالی‌یابی ژنوم آنها است (31,32). در استخراج ریزجانداران به طور کلی مشخص می‌شود که چه درصدی از داده‌ها در گروه‌های مختلفی از باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و ... قرار می‌گیرند. پس از استخراج نمونه‌ها از محیط متاژنومی مورد نظر و استخراج DNA، توالی‌یابی داده‌ها انجام می‌شود. داده‌های توالی‌یابی شده در اولین قدم باید از نظر کیفیت مورد بررسی قرار گیرند (33). از دیگر ابزارهای کنترل کیفیت داده‌ها می‌توان به SeqPrep اشاره کرد.

برای استخراج DNA ژنوم میکروبی طبق دستورالعمل سازنده کیت پیش بروید. برای ارزیابی کیفیت و یکپارچگی DNA از الکتروفورز ژل آگارز استفاده و غلظت DNA را با دستگاه اسپکتروفتومتر Thermo Scientific NanoDrop 2000 اندازه‌گیری کنید. سپس تمام گروه‌های نمونه‌های DNA متاژنومی در پلتفرم Illumina را با استفاده از توالی زوجی ۱۵۰ جفت باز توالی‌یابی کنید. پس از پیش پردازش داده‌ها و بررسی کیفیت خوانش‌ها، نرم افزار MEGAHIT را برای اسمبلی و سرهم‌بندی خوانش‌های کوچک و تولید توالی‌های بزرگتر (کانتیگ‌ها)^{۲۴} مورد استفاده قرار دهید. این نرم‌افزار به کاربر اجازه می‌دهد تا داده‌های بزرگ و پیچیده با حجمی بیش از صدها گیگابایت را مورد بررسی و اسمبلی قرار دهد. با استفاده از نرم‌افزار BWA، خوانش‌های جفت شده به منظور تعیین میزان پوشش پروفایل، به کانتیگ‌های اسمبلی شده نگاشت شده و پس از آن از Samtools برای تبدیل به فرمت BAM استفاده کنید. با استفاده از نرم‌افزار MetaBAT2 برای بازسازی Bin‌ها در ژنوم، کانتیگ‌ها را بر اساس میزان پوشش و فرکانس تترانوکلئوتید کلاس‌بندی کنید. در نهایت با عملیات binning نمونه‌ها، تعدادی bin تولید خواهد شد که بایستی آنها را از نظر کامل بودن، آلودگی و ناهمگنی سویه با استفاده از برنامه Checkm ارزیابی کنید (34). در نهایت پس از تجزیه داده‌های متاژنوم، جمعیت و نوع باکتری‌های نمونه‌های خاک را مقایسه کنید.

۳-۳-۲- شناسایی سیانوباکتری‌ها بر اساس روش‌های مولکولی

عصاره‌گیری سیانوباکتری‌ها بر اساس روش DNA با DNeasy Plant Mini Kit از QIAGEN انجام می‌شود.

الف) ابزار و مواد لازم

- نیتروژن مایع
- یخ‌های مکعبی
- تیوپ‌های استریل ۲ میلی‌لیتری ۲ سری
- تیوپ‌های استریل ۱/۵ میلی‌لیتری ۱ سری
- ۱/۲۵ تا ۱/۵۵ میلی‌گرم Glassbeeds
- دستگاه heater یا شیکر با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد
- ورتکس با صفحه افقی برای میکروتیوپ‌ها
- آب اکسیژنه ۳ درصد برای ضدعفونی کردن سطوح

ب) مراحل عصاره‌گیری

- با آب اکسیژنه ۳٪ تمام سطوح میز را ضدعفونی می‌کنیم.
- مقداری از نمونه را در تیوپ ۲ میلی‌لیتری ریخته و بر روی پایه‌های فلزی یا پلاستیکی قرار می‌دهیم. مشخصات و کد نمونه‌ها را روی تیوپ‌ها می‌نویسیم.
- تیوپ‌ها را سانتریفیوژ می‌کنیم تا اگر آبی مخلوط با نمونه وجود دارد از نمونه جدا شود و این آب رویی دور ریخته می‌شود. این کار بستگی به نمونه دارد و در برخی موارد نمونه دو یا سه بار متوالی سانتریفیوژ کنید. تعداد دور سانتریفیوژ و مدت زمان آن به صورت تجربی برای نمونه‌های مختلف متفاوت است. معمولاً با دستگاه مینی‌سانتریفیوژ (دارای جایگاه مخصوص میکروتیوپ‌ها) آب اضافی نمونه تفکیک می‌شوند. مایع که در تیوپ جمع می‌شود نباید بیش از طول یک بند انگشت باشد.
- مقداری Glassbeads را با اسپاتول برداشته و در تیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری می‌ریزیم و به مدت ۳۰ دقیقه در زیر دستگاه UV قرار می‌دهیم. حدوداً ۱۰ دقیقه بعد از خاموش کردن لامپ UV نمونه را از زیر دستگاه خارج کنید.
- مقدار ۱/۲۵-۱/۵۵ میلی‌گرم Glassbeads اسپاتول برداشته و بر روی نمونه‌ها می‌ریزیم.
- Heater را روشن نموده و دمای آن تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم می‌کنیم.
- نمونه‌ها را بر روی نیتروژن مایع به مدت ۳۰ ثانیه قرار داده و فریز می‌کنیم.
- با انبرک مخصوص تیوپ‌ها را از ظرف نیتروژن مایع برداشته و بر روی پایه پلاستیکی قرار داده می‌شوند. بلافاصله روی Heater قرار داده و گرم می‌شوند.
- مراحل ۷ و ۸ دوبار تکرار کنید.
- تیوپ‌ها را بر روی دستگاه Vortex مخصوص میکروتیوپ‌ها به حالت افقی قرار دهید و به مدت ۱۰ دقیقه شیکر کنید.
- یک سری تیوپ‌های جدید ۲ میلی‌لیتری برداشته و کد نمونه‌ها بر روی آنها بنویسید. به ترتیب کد و مشخصات نمونه‌ها را بر روی پایه فلزی یا پلاستیکی قرار دهید.

- تیوپ‌ها را از دستگاه Vortex برداشته و با مینی‌سانتریفیوژ به مدت ۵ ثانیه سانتریفیوژ کنید.
- با سمپلر یک میلی‌لیتری ۴۰۰ میکرولیتر بافر AP1 به تیوپ‌ها اضافه کنید.
- تیوپ‌ها را روی دستگاه ورتکس چیده و به مدت سه دقیقه شیک کنید.
- تیوپ‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد گرم کنید. به طوری که در فواصل زمانی ۴ یا ۳ دقیقه‌ای ۲ یا ۳ بار تیوپ‌ها را بر روی دستگاه ورتکس چیده و شیک کنید.
- تیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری جدید (دو قسمتی) روی پایه‌های پلاستیکی یا فلزی قرار داده و مشخصات نمونه‌ها بر روی آنها درج کنید. توجه داشته باشید که اکنون سه سری تیوپ جدید بر روی سه پایه فلزی یا پلاستیکی داریم.
- با سمپلر یک میلی‌لیتری ۱۳۰ میکرولیتر بافر P3 بر روی نمونه‌ها بریزید.
- تیوپ‌ها را بر روی یخ که در ظرف یونولیتی قبلاً تهیه شده‌اند به مدت ۵ دقیقه قرار دهید.
- تیوپ‌ها را به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه ۱۴۰۰۰ دور بر ثانیه سانتریفیوژ (سانتریفیوژ بزرگتر) کنید.
- دستگاه Heater را خاموش کنید.
- مایع رویی تیوپ‌ها را با سمپلر یک میلی‌لیتری به تیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری (دو قسمتی) منتقل کنید.
- تیوپ‌ها را به مدت ۲ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد با ۲۰۰۰۰ دور بر ثانیه سانتریفیوژ کنید.
- مایع جمع شده در بخش خارجی تیوپ‌های دو قسمتی را دور ریخته و مایع جمع شده در قسمت داخلی تیوپ را برای ادامه مراحل نگهدارید.
- با سمپلر یک میلی‌لیتری از نمونه‌ها (مایع جمع شده در قسمت داخلی تیوپ‌ها) برداشته و در تیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری جدید (دو قسمتی) بریزید. ۴۵۰ میکرولیتر از عصاره باید داشته باشید. اگر مقدار عصاره کم است همه آن را به تیوپ‌های جدید انتقال دهید.
- با سمپلر یک میلی‌لیتری ۱/۵ میلی‌لیتر از بافر AW1 به تیوپ‌ها اضافه کنید.
- بعد از افزودن بافر AW1 با همان سمپلر یک میلی‌لیتری ۶۵۰ میکرولیتر از نمونه را برداشته و به تیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری جدید انتقال دهید.
- به مدت یک دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۸۰۰۰ سانتریفیوژ کنید.
- قسمت بیرونی تیوپ‌ها را جدا کرده و محتوای داخلی آنها را دور می‌ریزیم. بعد از خالی کردن دهانه تیوپ‌ها را بر روی دستمال کاغذی گذاشته و اندکی نگه‌می‌داریم تا مایع دهانه تیوپ جذب دستمال کاغذی شده و خشک شود.
- دوباره قسمت بیرونی تیوپ‌ها را بر روی آنها نصب کنید و دوباره طبق مرحله ۲۸ سانتریفیوژ کنید.
- قسمت بیرونی تیوپ‌ها را جدا کرده و مایع داخل آن را دور بریزید.
- مایع درون قسمت داخلی تیوپ‌ها را به تیوپ‌های جدید ۲ میلی‌لیتری (دو قسمتی) منتقل کنید.
- با سمپلر یک میلی‌لیتری ۵۰۰ میکرولیتر از بافر AW2 به تیوپ‌ها اضافه کنید و به مدت یک دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۸۰۰۰ سانتریفیوژ کنید.

- قسمت بیرونی تیوپ را جدا کرده و مایع درون آن را دور بریزید.
- به قسمت داخلی تیوپ‌ها، قسمت خارجی جدید متصل کنید.
- با سمپلر یک میلی‌لیتری ۵۰۰ میکرولیتر بافر AW2 اضافه کنید.
- به مدت ۲ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد با ۲۰۰۰۰ دور بر ثانیه سانتریفیوژ کنید.
- مایع درون قسمت داخلی تیوپ‌ها را به تیوپ‌های جدید ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل کنید.
- با سمپلر میکرولیتری ۱۰۰ میکرولیتر آب ایزوتوپ (داخل یخچال در کیف سرمه‌ای شبیه کیف پول) به نمونه‌ها اضافه کنید. این آب فریز شده است و باید منتظر بمانید تا کاملاً مایع شود.
- بعد از افزودن آب ۵ دقیقه نمونه را در دمای اتاق به حال خود رها کنید.
- به مدت یک دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد ۸۰۰۰ دور بر ثانیه سانتریفیوژ کنید.

پ) انجام PCR:

- نمونه را به مدت ۱۰ دقیقه در زیر اشعه ماوراء بنفش قرار دهید تا استریل شود.
- بیست میکرولیتر از عصاره را با پیپت بردارید و مواد ذیل به آن اضافه کنید:
- ۱۰ میکرولیتر PCR-Mastermix
- ۲ میکرولیتر Primer اول
- ۲ میکرولیتر Primer دوم
- ۱ میکرولیتر DNA
- ۵ میکرولیتر آب مقطر
- به مدت ۳۰ ثانیه مجدداً در زیر اشعه UV قرار دهید.
- نمونه را به مدت ۹۰ الی ۱۰۰ دقیقه در دستگاه Biometra قرار دهید.
- سپس نمونه را در دستگاه الکتروفورز در ژل ۸ درصد (۴ گرم آگارز + ۵۰ میلی لیتر TAE) قرار دهید.
- پنج میکرولیتر ژل DNA (Midori Green) را به آن اضافه کنید.
- یک میکرولیتر ladder اضافه کنید.
- سه میکرولیتر PCR product اضافه کنید.
- به مدت ۲۰ دقیقه در زیر اشعه UV قرار دهید.

جدول ۳-۱- پرایمرهای ژن 16s rRNA برای شناسایی سیانوباکتری‌های خاکزی

Primer	Sequence	Reference
CYA106F	CGG ACG GGT GAG TAA CGC GTG A	(35)
CYA359F	GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG	(35)
CYA781 (a)	GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T	(35)
CYA781(b)	GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T	(35)
CYA359FGC	cgccccgcgcgccccgcgccccgtccccgcgccccgccccgggggaattttccgcaatggg	(35)
CYA784R	gactacaggggtatctaattccc	(35)
CYA781RGC(b)	cgccccgcgcgccccgcgccccgtccccgcgccccgccccgactacaggggtatctaattcccttt	(35)
23S30R	cttcgcctctgtgtgcctaggt	(36)
COR-F	CCATGAAGTCGGAATCGCTAG	(37)
COR-R	ACTCCCATGGGTGTGACGG	(37)
ITS-1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	(38)
27F	5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	(39)
1492R	5'GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	(39)
341F	5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3	(40)
805R	CTACHVGGGTATCTAATCC-3'	(40)
B235SR	5'-CTTCGCCTCTGTGT GCCTAGGT-3'	(41)
684F	5'- GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA-3'	(41)
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	(41)
SP6	5'- ATTTAGGTGACACTATAG-3'	(41)

فصل ۴

محاسبه شاخص تنوع زیستی خاک

۴- محاسبه شاخص تنوع زیستی خاک

تنوع زیستی خاک در ذات خود مفهومی پیچیده و حساس به تغییرات محیطی و مدیریتی است. بنابراین بایستی همزمان از چند متغیر برای پی بردن به وضعیت تنوع زیستی خاک بهره برد. ترکیب متغیرهای اندازه‌گیری شده و محاسبه شاخص تلفیقی تنوع زیستی خاک در مقایسه با تفسیر جداگانه متغیرها، ارزیابی بهتری از داده‌های جمع‌آوری شده ارائه می‌دهد. برای محاسبه شاخص تلفیقی تنوع زیستی خاک، در ابتدا با کمک توابع خطی و غیرخطی، متغیرهای اندازه‌گیری شده را نمره‌دهی و در نهایت نمرات متغیرها را با استفاده از روش جمع پذیر وزنی تلفیق کنید. در عرصه‌های طبیعی و اراضی غیرکشاورزی، ویژگی‌های مربوط به پوسته‌های زیستی که اندازه‌گیری شده‌اند نیز به مجموعه داده‌ها برای نمره‌دهی و محاسبه شاخص تنوع زیستی خاک افزوده می‌شوند.

۴-۱- نمره‌دهی متغیرها

متغیرهای اندازه‌گیری شده را با استفاده از توابع خطی و غیرخطی نمره‌دهی کنید تا نمرات بدون واحد و قابل ترکیب بین صفر تا یک به دست آید. متغیرهای «هر چه بیشتر بهتر»^۶ متغیرهایی هستند که افزایش مقادیر آنها مطلوب تلقی می‌شود. در نمره‌دهی خطی این دسته از متغیرها، هر مشاهده به بزرگترین مقدار مشاهده شده تقسیم می‌شود؛ به طوری که بزرگترین مشاهده نمره یک را به خود اختصاص می‌دهد. در نمره‌دهی خطی متغیرهای «هر چه کمتر بهتر»^۷ (متغیرهایی که کاهش مقادیر آنها مطلوب است) کوچکترین مقدار مشاهده شده به هر مشاهده تقسیم می‌شود؛ به طوری که کوچکترین مشاهده نمره یک را به خود اختصاص می‌دهد. از روابط ۴-۱ و ۴-۲ به عنوان تابع نمره‌دهی خطی استفاده کنید:

$$L - SF(Y) = \frac{X}{X_{\max}} \quad \text{رابطه (۴-۱)}$$

$$L - SF(Y) = \frac{X_{\min}}{X} \quad \text{رابطه (۴-۲)}$$

که در آن $L-SF(Y)$ نمره خطی بین صفر تا ۱، X مقدار ویژگی، $X_{\max}$ حداکثر و $X_{\min}$ حداقل مقدار مشاهده است. از رابطه ۴-۳ نیز برای نمره‌دهی غیرخطی متغیرها استفاده کنید:

$$NL - SF(Y) = \frac{a}{\left(1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b\right)} \quad \text{رابطه (۴-۳)}$$

که در آن $NL-SF(Y)$ نمره‌ی غیرخطی هر متغیر با دامنه بین صفر تا ۱، a حداکثر مقدار (a برابر ۱ فرض شود)، X مقدار متغیر انتخاب شده و X_0 میانگین مقدار هر متغیر است. b نیز شیب معادله بوده و در متغیرهای «هر چه بیشتر بهتر» برابر $2/5$ و در متغیرهای «هر چه کمتر بهتر» برابر $2/5 +$ است (27).

² more is better
² less is better

۴-۲- تلفیق نمرات و محاسبه شاخص تنوع زیستی خاک

تلفیق نمرات ویژگی‌های خاک و محاسبه شاخص تنوع زیستی خاک (SBI) بر اساس رابطه ۴-۴ صورت گرفت:

$$SBI = \sum_{i=1}^n W_i S_i \quad \text{رابطه (۴-۴)}$$

n تعداد خصوصیات خاک

S_i نمره خطی یا غیرخطی ویژگی i ام خاک

W_i وزن تخصیص یافته به ویژگی i ام خاک

وزن تخصیص یافته به هر ویژگی خاک (W_i) با استفاده از ضریب اشتراک متغیرها^{۲۸} بر اساس رابطه ۴-۵ محاسبه می‌شود.

ضریب اشتراک از تجزیه به مؤلفه اصلی به دست می‌آید و برآوردی از درصد واریانس نشان داده شده توسط مؤلفه برای آن

متغیر می‌باشد. این پارامتر را به عنوان قابلیت اطمینان متغیر در نظر می‌گیرند (42).

$$W_i = \frac{C_i}{\sum_{i=1}^n C_i} \quad \text{رابطه (۴-۵)}$$

C_i ضریب اشتراک متعلق به ویژگی i ام خاک

فصل ۵

تهیه نقشه تنوع زیستی خاک

۵- تهیه نقشه تنوع زیستی خاک

نتایج نهایی مطالعات تنوع زیستی خاک بایستی به صورت نقشه‌های رقومی ترسیم شود. تهیه نقشه‌های رقومی تنوع زیستی خاک در تصمیم‌گیری‌های کلان و سیاست‌گذاری برای حفاظت از عملکرد خاک و خدمات زیست‌بوم نقش زیادی دارد (43). افزون بر آن، چنانچه در ارزیابی‌های تکمیلی این مطالعات سویه جدید میکروبی شناسایی شد، این سویه می‌بایست ثبت شود. به منظور ایجاد یک وحدت رویه در ارائه نتایج مطالعات تنوع زیستی خاک، هنگام تهیه نقشه و ثبت سویه‌های جدید میکروبی الزامات زیر بایستی رعایت شود. لازم به ذکر است که ملاحظات بیشتر با توجه به اهداف و اعتبار مصوب بلامانع است.

۵-۱- تهیه بانک اطلاعاتی داده‌ها

پس از انجام تجزیه‌های آزمایشگاهی، بایستی مطابق شکل ۵-۱ در محیط اکسل، در کاربرگ اول کل نتایج اندازه‌گیری ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک و پوسته‌های زیستی هر نقطه نمونه‌برداری شده به همراه موقعیت مکانی آن را ثبت کنید. کاربرگ‌های بعدی به ترتیب به ویژگی‌های مذکور در کاربرگ اول اختصاص دارد. بدین صورت که هر کاربرگ مختص به یک ویژگی خواهد بود و در آن کاربرگ بایستی داده‌های خام، ضرایب، واحد نهایی و محاسبات آن ویژگی آورده شود (شکل ۵-۲).

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Sample code	X	Y	Bacterial numbers/g soil	Total length of fungal hyphae	Urease	Alkaline phosphatase	B-Glucosidase
2	1							
3	2							
4	3							
5	4							
6	5							
7	6							
8	7							
9	8							
10	9							
11	10							
12	11							
13	12							
14	13							
15	14							
16	15							
17	16							
18	17							
19	18							
20	19							
21	20							

شکل ۵-۱- نمونه کاربرگ اول برای ثبت داده‌های مطالعات تنوع زیستی خاک در اکسل

	A	B	C	D	E	F	G
1	Sample code	X	Y	Abs. of suspension	Abs. of Control	Corrected p-nitrophenol	Alk. phosphatase activity ($\mu\text{g p-Nitrophenol/g dwt.h}$)
2	1						
3	2						
4	3						
5	4						
6	5						
7	6						
8	7						
9	8						
10	9						
11	10						
12	11						
13	12						
14	13						
15	14						
16	15						
17	16						
18	17						
19	18						
20	19						
21	20						

شکل ۵-۲- نمونه کاربرگ مختص به هر ویژگی اندازه‌گیری شده

۵-۲- تجزیه و تحلیل آماری، ترسیم نقشه و ثبت سویه‌های جدید میکروبی

در ابتدا دقت و صحت داده‌ها را ارزیابی کرده و از نظر آماری وضعیت پراکنش مرکز داده‌ها و پیروی آنها از توزیع نرمال و آماره‌های توصیفی همچون میانگین، حداقل، حداکثر، انحراف معیار و ضریب تغییرات را با نرم‌افزارهای آماری رایج مانند SPSS، SAS و یا Minitab بررسی کنید. در صورت عدم پیروی داده‌ها از توزیع نرمال، از تبدیل‌های مرسوم از قبیل لگاریتمی و ریشه دوم استفاده شود. بر اساس روش مذکور در فصل چهارم، ابتدا با کمک توابع خطی و غیرخطی هر ویژگی خاک را نمره‌دهی کنید. سپس ضریب اشتراک متغیرها را در تجزیه به مؤلفه اصلی به دست بیاورید. در نهایت با کمک ضرایب اشتراک و نمرات ویژگی‌های خاک، شاخص تنوع زیستی را به دو صورت خطی و غیرخطی محاسبه نمایید. از شاخص‌های محاسبه شده برای ترسیم نقشه تنوع زیستی خاک استفاده کنید.

ترسیم نقشه را با نرم‌افزارهای مرسوم می‌توان انجام داد. نقشه‌های تهیه شده باید در ابعاد 90×70 سانتی‌متر باشند و پراکنش تنوع زیستی خاک را به صورت نقطه‌ای نشان دهند. چنانچه فاصله بین نقاط نمونه‌برداری از ۱۰۰۰ متر کمتر بود، می‌توان پهنه‌بندی نقشه‌های تنوع زیستی خاک را نیز ارائه داد. این بدان معناست که تعداد نقاط نمونه‌برداری از ۱۰ نقطه در هر هزار هکتار بیشتر بوده است. همچنین نقشه تنوع زیستی خاک بایستی با نقشه‌های توپوگرافی روی هم گذاری^۹ شوند. راهنمای نقشه‌های تهیه شده در سمت راست و پایین نقشه قرار گرفته و باید حاوی اطلاعاتی از قبیل عنوان پروژه، ناظر پروژه، محل نقشه و معنای علائم، نشانه‌ها و رنگ‌های نقشه باشد. مقیاس نقشه نیز در پایین نقشه قرار خواهد گرفت.

سویه‌های جدید میکروبی باید در کلکسیون میکروبی موسسه تحقیقات خاک و آب (CCSM) ثبت شوند. این کلکسیون از سال ۲۰۰۵ عضو رسمی فدراسیون بین‌المللی کلکسیون‌های میکروبی (WFCC) با شماره عضویت WFCC891 است. لازم به ذکر است که پس از راه‌اندازی سامانه جامع اطلاعاتی ژنتیکی متعلق به سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، سویه‌های جدید میکروبی بایستی در سامانه فوق‌الذکر به ثبت برسند.

³ Culture Collection for Soil Microorganisms, CCSM

فهرست منابع و مراجع

1. FAO, ITPS, GSBI, CBD, EC. State of knowledge of soil biodiversity: Status, challenges and potentialities. Rome; 2020.
2. FAO. Keep soil alive, protect soil biodiversity. Rome, Italy; 2021.
3. Jeffery S, Gardi C, Jones A, Montanarella L, Marmo L, Miko L, et al. Biodiversity, European Atlas of Soil. Luxembourg: European Commission, Publications Office of the European Union; 2010.
4. ۱۳۹۸. قانون حفاظت از خاک. p. 91/20704.
5. Chapin FS, Matson PA, Mooney HA. Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology. Springer New York, NY; 2002.
6. Karlen DL, Mausbach MJ, Doran JW, Cline RG, Harris RF, Schuman GE. Soil Quality: A Concept, Definition, and Framework for Evaluation (A Guest Editorial). Soil Sci Soc Am J [Internet]. 1997 Jan 1;61(1):4–10. Available from: <https://doi.org/10.2136/sssaj1997.03615995006100010001x>
7. Srivastava DS, Vellend M. Biodiversity-Ecosystem Function Research: Is It Relevant to Conservation? Annu Rev Ecol Evol Syst [Internet]. 2005 Nov 10;36(1):267–94. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.36.102003.152636>
8. Stavi I, Bel G, Zaady E. Soil functions and ecosystem services in conventional, conservation, and integrated agricultural systems. A review. Agron Sustain Dev [Internet]. 2016;36(2):32. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13593-016-0368-8>
9. آیین نامه اجرایی قانون حفاظت از خاک. ۱۴۰۲/۱۴۵۸۳۳۱. p. 198653/۱۴۰۲.
10. Alef K, Nannipieri PBT-M in ASM and B, editors. 7 - Enzyme activities. In London: Academic Press; 1995. p. 311–73. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125138406500227>
11. Belnap J, Lange OL, editors. Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management. Springer Berlin, Heidelberg; 2003. XVIII, 506.
12. Maestre FT, Quero JL, Gotelli NJ, Escudero A, Ochoa V, Delgado-Baquerizo M, et al. Plant Species Richness and Ecosystem Multifunctionality in Global Drylands. Science (80-) [Internet]. 2012 Jan 13;335(6065):214–8. Available from: <https://doi.org/10.1126/science.1215442>
13. Anderson JM, Ingram JSI. Tropical Soil Biology and Fertility: A Handbook of Methods. Wallingford: CAB International; 1993.
14. دستورالعمل تجزیه های آزمایشگاهی نمونه های خاک و آب (نشریه شماره ۴۶۷). دفتر نظام فنی اجرایی معاونت برنامه ریزی و نظارت راهبردی رییس جمهور; ۱۳۸۷.
15. Calviño DF, Gómez DS, Brandt KK, Waeyenberge L. HANDBOOK: Protocols for sampling, general soil characterization and soil biodiversity analysis. SoildiverAgro project financed by the European Union; 2020.
16. Orgiazzi A, Panagos P, Fernández-Ugalde O, Wojda P, Labouyrie M, Ballabio C, et al. LUCAS Soil Biodiversity and LUCAS Soil Pesticides, new tools for research and policy development. Eur J Soil Sci [Internet]. 2022 Sep 1;73(5):e13299. Available from: <https://doi.org/10.1111/ejss.13299>
17. Rossi F, Mugnai G, De Philippis R. Complex role of the polymeric matrix in biological soil crusts. Plant Soil [Internet]. 2018;429(1):19–34. Available from: <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3441-4>
18. Bissett A, Fitzgerald A, Meintjes T, Mele PM, Reith F, Dennis PG, et al. Introducing BASE: the Biomes of Australian Soil Environments soil microbial diversity database. Gigascience [Internet]. 2016;5(1):21. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13742-016-0126-5>
19. Joergensen RG. 8 - Microbial biomass. In: Alef K, Nannipieri PBT-M in ASM and B, editors. London: Academic Press; 1995. p. 375–417. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125138406500239>
20. Horwath WR, Paul EA. Microbial Biomass. In: Weaver, R.W., Angle, S., Bottomley, P., Bezdicek, D., Smith, S., Tabatabai, A., Wollum A, editor. Methods of Soil Analysis [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 1994. p. 753–73. Available from: <https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2136/sssabookser5.2.c36>
21. Alef K, Nannipieri PBT-M in ASM and B, editors. 5 - Estimation of microbial activities. In London: Academic Press; 1995. p. 193–270. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125138406500203>
22. Fernández I, Cabaneiro A, Carballas T. Organic matter changes immediately after a wildfire in an atlantic forest soil and comparison with laboratory soil heating. Soil Biol Biochem [Internet]. 1997;29(1):1–11. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071796002891>

23. Suman A, Lal M, Singh AK, Gaur A. Microbial Biomass Turnover in Indian Subtropical Soils under Different Sugarcane Intercropping Systems. *Agron J* [Internet]. 2006 May 1;98(3):698–704. Available from: <https://doi.org/10.2134/agronj2005.0173>
24. Dickerson OJ. An evaluation of the direct centrifugal-flotation methods of recovering nematodes from soil. *Plant Dis Rep*. 1977;61:1054–7.
25. PM 7/119 (1) Nematode extraction. *EPPO Bull* [Internet]. 2013 Dec 1;43(3):471–95. Available from: <https://doi.org/10.1111/epp.12077>
26. Alef K. 4 - Enrichment, isolation and counting of soil microorganisms. In: Alef K, Nannipieri PBT-M in ASM and B, editors. London: Academic Press; 1995. p. 123–91. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125138406500197>
27. Raiesi F, Kabiri V. Identification of soil quality indicators for assessing the effect of different tillage practices through a soil quality index in a semi-arid environment. *Ecol Indic* [Internet]. 2016;71:198–207. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470160X16303910>
28. Lagomarsino A, Benedetti A, Marinari S, Pompili L, Moscatelli MC, Roggero PP, et al. Soil organic C variability and microbial functions in a Mediterranean agro-forest ecosystem. *Biol Fertil Soils* [Internet]. 2011;47(3):283–91. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00374-010-0530-4>
29. Kandeler E, Eder G. Effect of cattle slurry in grassland on microbial biomass and on activities of various enzymes. *Biol Fertil Soils* [Internet]. 1993;16(4):249–54. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF00369300>
30. Trasar-Cepeda C, Leirós MC, Gil-Sotres F. Hydrolytic enzyme activities in agricultural and forest soils. Some implications for their use as indicators of soil quality. *Soil Biol Biochem* [Internet]. 2008;40(9):2146–55. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071708001247>
31. Bashir Y, Pradeep Singh S, Kumar Konwar B. Metagenomics: An Application Based Perspective. Song J, editor. *Chinese J Biol* [Internet]. 2014;2014:146030. Available from: <https://doi.org/10.1155/2014/146030>
32. Prayogo FA, Budiharjo A, Kusumaningrum HP, Wijanarka W, Supriyadi A, Nurhayati N. Metagenomic applications in exploration and development of novel enzymes from nature: a review. *J Genet Eng Biotechnol* [Internet]. 2020;18(1):39. Available from: <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00043-9>
33. Ariaeenejad S, Sheykh Abdollahzadeh Mamaghani A, Maleki M, Kavousi K, Foroozandeh Shahraki M, Hosseini Salekdeh G. A novel high performance in-silico screened metagenome-derived alkali-thermostable endo- β -1,4-glucanase for lignocellulosic biomass hydrolysis in the harsh conditions. *BMC Biotechnol* [Internet]. 2020;20(1):56. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00647-6>
34. Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res*. 2015 Jul;25(7):1043–55.
35. Nübel U, Garcia-Pichel F, Muyzer G. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol*. 1997 Aug;63(8):3327–32.
36. Taton A, Grubisic S, Brambilla E, De Wit R, Wilmotte A. Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *Appl Environ Microbiol*. 2003 Sep;69(9):5157–69.
37. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Kaczmarek EB, Fox AJ. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol*. 2000 May;38(5):1747–52.
38. GARDES M, BRUNS TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* [Internet]. 1993 Apr 1;2(2):113–8. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
39. Ferrera I, Massana R, Balagué V, Pedrós-Alió C, Sánchez O, Mas J. Evaluation of DNA extraction methods from complex phototrophic biofilms. *Biofouling*. 2010 Apr;26(3):349–57.
40. Herlemann DPR, Labrenz M, Jürgens K, Bertilsson S, Waniek JJ, Andersson AF. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J* [Internet]. 2011;5(10):1571–9. Available from: <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.41>
41. Mehda S, Muñoz-Martín MÁ, Oustani M, Hamdi-Aïssa B, Perona E, Mateo P. Microenvironmental Conditions Drive the Differential Cyanobacterial Community Composition of Biocrusts from the Sahara Desert. Vol. 9, *Microorganisms*. 2021.
42. Isong IA, John K, Okon PB, Ogban PI, Afu SM. Soil quality estimation using environmental covariates and predictive models: an example from tropical soils of Nigeria. *Ecol Process* [Internet]. 2022;11(1):66. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13717-022-00411-y>
43. Rutgers M, van Leeuwen JP, Vrebos D, van Wijnen HJ, Schouten T, de Goede RGM. Mapping Soil Biodiversity in Europe and the Netherlands. Vol. 3, *Soil Systems*. 2019.