وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

دستورالعمل فنی

روش‌های پایش شاخص‌های زیستی خاک

نگارش:

مریم تیموری و طاهره علی‌زاده

۱۴۰۲

عنوان طرح منتج به دستورالعمل فنی	شماره مصوب طرح
ارزیابی برخی شاخص‌های زیستی در جنگل‌های بلوط ناحیه رویشی زاگرس	۹۷۱۰۰۳-۹۷۰۱۲-۰۷۸-۰۹-۰۹-۰۱

عنوان نشریه: روش‌های پایش شاخص‌های زیستی خاک

نویسندگان:

مریم تیموری – استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

طاهره علی‌زاده – پژوهشگر، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تهیه شده در: مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور/ اداره ترویج و انتقال یافته‌های تحقیقاتی / بخش تحقیقات جنگل

مدیر داخلی: فاطمه عباسپور

ویراستار ادبی: اصغر احمدی

نشانی: بزرگراه تهران-کرج، خروجی پیکانشهر، شهرک سرو آزاد، خیابان شهید گودرزی، بلوار باغ گیاه‌شناسی ملی ایران، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور. صندوق پستی: ۱۱۶-۱۳۱۸۵.

تلفن: ۵-۴۴۷۸۷۲۸۲-۰۲۱ **وب‌سایت:** www.rifr-ac.ir

نوبت و سال انتشار: اول - ۱۴۰۲

این نشریه به شماره ۶۴۴۸۲ در تاریخ ۱۴۰۲/۰۸/۳۰ در مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی به ثبت رسیده است.

ISBN : 978-964-473-520-2

فهرست مطالب

چکیده ۵
پایش منابع طبیعی ۶
پایش خاک ۶
شاخص‌های پایش خاک ۷
شاخص‌های فیزیکی پایش خاک ۹
شاخص‌های شیمیایی پایش خاک ۱۰
شاخص‌های زیستی پایش خاک ۱۰
نمونه‌برداری از خاک ۱۴
نحوه انجام ویژگی‌های زیستی خاک ۱۸
اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی ۳۵
نتیجه‌گیری کلی و توصیه‌های اجرایی ۵۵

دامنه

قابل استفاده برای پژوهشگران منابع طبیعی و کارشناسان آزمایشگاه‌های بیولوژی خاک

هدف

این دستورالعمل برای اندازه‌گیری شاخص‌های زیستی خاک به‌منظور پایش تغییرات خاک و نیز ارزیابی کیفیت آن در رویشگاه‌های مختلف و همچنین خاک‌های اراضی کشاورزی قابل استفاده است.

چکیده

خاک یک منبع طبیعی ارزشمند است که به‌دلیل روند بسیار طولانی تشکیل آن، جزء منابع تجدیدناپزیر محسوب می‌شود. خاک به‌عنوان یک سیستم زنده، وظایف متعددی در اکوسیستم‌های زمینی بر عهده دارد که ازجمله آنها می‌توان به ذخیره و تنظیم چرخه مواد غذایی، تنظیم جریان آب، استقرار تنوع زیستی، تجزیه مواد آلی، سمیت‌زدایی از مواد آلوده‌کننده و حمایت فیزیکی برای ساختن جاده‌ها و ساختمان‌ها اشاره کرد. با توجه به اهمیت خاک لازم است برای اطمینان از عملکرد صحیح آن، کیفیت و سلامت خاک حفظ شود. عدم حفظ کیفیت خاک منجر به از بین رفتن حاصل‌خیزی خاک و نیز وقوع گردوغبار در نقاط مختلف جهان شده است که تبعات اقتصادی– اجتماعی فراوانی را به‌دنبال دارد. برای نگهداری و حفاظت از خاک در بلندمدت لازم است تغییرات ویژگی‌های خاک پایش شود تا با تعیین روند تغییرات کیفیت و سلامت خاک، امکان مدیریت خاک برای توسعه پایدار فراهم شود. پایش خاک تنها راه برای اندازه‌گیری میزان و نوع تغییرات خاک در طول زمان است. برای پایش خاک از یک-سو، ویژگی‌هایی از خاک باید انتخاب شوند که اندازه‌گیری آنها آسان و در دسترس همگان باشد و از سوی دیگر با اندازه‌گیری آنها بتوان کیفیت خاک را با توجه به عملکرد طبیعی خاک و نیز اهداف مورد نظر ارزیابی کرد. برای پایش خاک از ویژگی‌های ظاهری، فیزیکی، شیمیایی و زیستی آن استفاده می‌شود. با توجه به حساسیت ویژگی‌های زیستی به تغییرات ناشی از اعمال مدیریت و فعالیت‌های انسانی در مقایسه با سایر ویژگی‌های خاک، اندازه‌گیری آنها اهمیت زیادی برای پیش‌بینی تغییر در کیفیت و سلامت خاک دارد. در این دستورالعمل، ویژگی‌های زیستی مهم در پایش خاک و نحوه انجام آنها در آزمایشگاه ارائه شده است که راهنمای مناسبی برای پژوهشگران منابع طبیعی و کارشناسان آزمایشگاه‌های خاک است.

واژه‌های کلیدی: پایش، خاک، کیفیت، ویژگی‌های زیستی.

پایش منابع طبیعی

عوامل متعددی ازجمله رشد جمعیت جهانی و نیز تغییر اقلیم باعث فشار بیش‌ازحد بر منابع طبیعی که تکیه‌گاه مهم اقتصاد جهان است، شده‌اند. درنتیجه، نیاز به پایش منظم و صحیح منابع طبیعی برای جلوگیری از تخریب آنها افزایش یافته است. عواملی مانند تغییر اقلیم، کاهش منابع آب و رویشگاه‌های در خطر ازجمله عواملی هستند که لزوم پایش محیط‌زیست و اتخاذ سیستم‌های بهتر برای محافظت از آن را نشان می‌دهد.

ریشه کلمه پایش (Monitoring) در زبان انگلیسی از مشاهده، آگاه کردن یا خبر دادن گرفته شده است. بنابراین وقتی از پایش صحبت می‌شود، منظور مشاهده و آگاه شدن یا مطلع شدن پیش از وقوع است. درواقع، هدف از پایش این است که درست بودن جهت حرکت مشخص شود تا در غیر این‌—صورت، اقدامات لازم برای قرار گرفتن در جهت درست، به‌منظور رسیدن به اهداف مورد نظر انجام شود.

پایش تعیین مقادیر پایه برای اجزای اکوسیستم و سپس تعیین تغییرات در طول زمان و مشخص کردن انحراف آنها از مقادیر طبیعی است. در منابع طبیعی، پایش اندازه‌گیری مکرر و تجزیه و تحلیل داده‌ها به‌منظور ارزیابی تغییر در ویژگی مورد نظر است. به عبارت دیگر، منابع طبیعی به این دلیل پایش می‌شود تا معلوم شود آیا شرایط اختصاصی موجود اهداف مورد نظر را تأمین می‌کند یا لازم است شرایط به نفع اهداف مورد نظر مدیریت شود.

پایش خاک

خاک یک منبع طبیعی ارزشمند و تجدیدناپذیر است که تشکیل آن هزاران سال طول می‌کشد و اهمیت آن مانند هوا و آبی است که ما را احاطه کرده است. درواقع، وجود حیات در کره زمین بستگی به وجود آب، هوا و خاک دارد. متأسفانه، اهمیت خاک در گذشته نادیده گرفته شده است که منجر به عواقب ناخوشایندی مانند از بین رفتن حاصل‌خیزی خاک و نیز وقوع گردوغبار در نقاط مختلف جهان شده است. امروزه به نقش سلامت خاک توجه جدی می‌شود و پژوهشگران متعددی در مورد پایش خاک مطالعه می‌کنند.

برای نگهداری و حفاظت از خاک در بلندمدت لازم است تغییرات ویژگی‌های خاک پایش شود تا با تعیین تغییرات کیفیت خاک که گاهی معادل سلامت خاک درنظر گرفته می‌شود، مدیریت خاک در قالب توسعه پایدار انجام شود. پایش خاک در میان‌مدت و بلندمدت تنها راه برای اندازه‌گیری میزان و جهت تغییرات خاک ناشی از فعالیت‌های انسان و فرایند خاک‌زایی است، بنابراین پایش خاک یک ضرورت اساسی برای ارزیابی پایداری خاک می‌باشد. پایش خاک می‌تواند جهت راهبردهای حفاظت را در مناطقی تعیین کند که مجموعه‌ای از ویژگی‌های خاک، اقلیم، جغرافیا و مدیریت موجب ایجاد خطر بالقوه برای تخریب خاک می‌شوند.

شکی نیست که ویژگی‌های خاک نقش حیاتی در پایداری اکوسیستم‌ها دارند، به‌ویژه در مناطقی که در معرض شرایط محیطی نامناسب یا فشار ناشی از فعالیت‌های انسانی هستند. برای پایش خاک ویژگی‌هایی باید انتخاب شوند که اندازه‌گیری آنها آسان است و از سوی دیگر با اندازه‌گیری آنها بتوان کیفیت خاک را با توجه به عملکرد طبیعی خاک و نیز اهداف مورد نظر تعیین کرد. پس از انتخاب ویژگی‌های مناسب به‌عنوان شاخص کیفیت خاک، باید مطمئن شد که روش نمونه‌برداری، پیش‌تیمار و تجزیه داده‌ها مناسب باشد. به‌علاوه، مهم است که روش نمونه‌برداری بتواند تغییرات اتفاق افتاده را با درجه معینی از اطمینان نشان دهد.

شاخص‌های پایش خاک

یک چالش بزرگ و مهم برای دانشمندان علوم خاک، شناسایی ویژگی‌هایی از خاک است که اندازه‌گیری آنها به اندازه کافی ساده و آسان باشد. این ویژگی‌ها باید بتوانند اطلاعات کافی را در اختیار بگذارند تا بتوان ارزیابی درستی از عملکرد خاک داشت. ویژگی‌های مورد استفاده در پایش خاک باید دارای چهار مشخصه باشند: ۱- حساس به تغییرات، ۲- وابسته به عملکرد خاک، ۳- مفید برای فرایندهای اکوسیستم و ۴- اندازه‌گیری آسان و ارزان. برای پایش خاک از اندازه‌گیری ویژگی‌های ظاهری، فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک استفاده می‌شود. از این ویژگی‌ها با عنوان شاخص کیفیت یا

سلامت خاک نیز نام برده می‌شود. نوع شاخص مورد استفاده در پایش بستگی به عملکردی از خاک دارد که مورد توجه است. به‌تقریب، ۸۰٪ خدمات اکوسیستم به عملکرد خاک وابسته است، درنتیجه امنیت و سلامت نوع بشر به عملکرد مؤثر و کارآمد خاک بستگی دارد.

خاک عملکردهای متعددی دارد که عبارتند از: ۱- فراهم کردن شرایط مناسب فیزیکی، شیمیایی و زیستی برای موجودات زنده، ۲- تنظیم و تقسیم جریان آب، ذخیره و گردش مواد غذایی و سایر عناصر، ۳- تنوع زیستی گیاهان و تولیدمثل جانوران، ۴- فیلتر کردن، تجزیه، تثبیت و سمیت‌زدایی از مواد آلی و ۵- فراهم کردن محیط‌زیست برای موجودات زنده. اینکه کدام ویژگی خاک اندازه‌گیری شود، به این موضوع بستگی دارد که کدام عملکرد خاک قرار است اندازه‌گیری و پایش شود. برای ارزیابی کیفیت خاک نمی‌توان فقط از یک ویژگی استفاده کرد، درعین‌حال استفاده از همه ویژگی‌ها برای ارزیابی کیفیت خاک غیرممکن است. بنابراین، باید مجموعه‌ای از ویژگی‌ها شامل ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک برای پایش استفاده شوند. این مجموعه ویژگی‌ها، مجموع حداقل داده‌ها[1] (MDS) نامیده می‌شوند. برای پایش خاک MDSهای متفاوتی وجود دارد. انتخاب اینکه کدامیک مورد استفاده قرار بگیرد، به هدف پایش بستگی دارد. ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی مورد استفاده در برنامه‌های پایش خاک و ارتباط آن با کیفیت خاک در شکل ۱ ارائه شده است.

[1] Minimum dataset

شکل ۱- ویژگی‌های شیمیایی، زیستی و فیزیکی خاک برای پایش

شاخص‌های فیزیکی پایش خاک

بسیاری از ویژگی‌های فیزیکی خاک به ماهیت سنگ مادری و فرایندهای تشکیل خاک بستگی دارد و درواقع موروثی هستند. اما، برخی از ویژگی‌های فیزیکی خاک تحت تأثیر مواد آلی غیرزنده و فعالیت بخش زنده خاک قرار می‌گیرند. این بخش از ویژگی‌های خاک در برنامه‌های پایش استفاده می‌شوند. وزن مخصوص ظاهری خاک، بافت خاک و میزان آب موجود در خاک از مهم‌ترین ویژگی‌های فیزیکی خاک هستند که در پایش مورد استفاده قرار می‌گیرند.

شاخص‌های شیمیایی پایش خاک

پایش شاخص‌های شیمیایی اطلاعاتی را درمورد کمیت مواد غذایی در دسترس به‌شکل ترکیب و آزاد در اختیار قرار می‌دهند. درنتیجه، نشان‌دهنده توان خاک در تأمین رشد گیاهان و میکروارگانیسم‌ها است. به‌علاوه، بر رابطه گیاه و خاک، کیفیت آب، قدرت بافری خاک، حرکت مواد آلوده‌کننده و برخی از ویژگی‌های فیزیکی خاک مانند تمایل به تشکیل پوسته (سله) تأثیر می‌گذارد. از آن‌جایی که بسیاری از ویژگی‌های شیمیایی خاک تحت تأثیر مواد آلی خاک قرار دارند، ارزیابی مواد آلی خاک و اجزای تشکیل دهنده آن در پایش خاک اهمیت ویژه‌ای دارد. علاوه بر میزان مواد آلی خاک، شوری خاک (هدایت الکتریکی خاک)، اسیدیته یا واکنش خاک (pH)، مقدار عناصر پرمصرف (فسفر، ازت و پتاسیم) و گوگرد از دیگر ویژگی‌های شیمیایی هستند که در پایش خاک اندازه‌گیری می‌شوند.

شاخص‌های زیستی پایش خاک

ویژگی‌های زیستی، ویژگی‌هایی از خاک هستند که با فعالیت زیستی خاک ارتباط دارند و به هر نوع تغییر اعمال شده در خاک به سرعت واکنش نشان می‌دهند. از شاخص‌های زیستی خاک می‌توان زی‌توده میکروبی کربن، تنفس خاک، فراوانی و تنوع گروه‌های مختلف مزوفون (کرم‌های خاکی، نماتدها و بندپایان) و میکروفون خاک و نیز فعالیت آنزیمی خاک را نام برد. موجودات زنده خاک جزء شاخص‌های حساس محسوب می‌شوند و تأثیر فعالیت‌های انسانی و تغییرات اقلیم را نشان می‌دهند. تنوع و فراوانی موجودات زنده خاک با عملکردهای آن مانند تجزیه مواد آلی، استقرار و توسعه گیاهان و ریشه آنها (رقابت) و ترسیب و سمیت‌زدایی از فلزات سنگین ارتباط دارد، به‌همین دلیل جزء شاخص‌های کیفیت خاک محسوب می‌شوند. از ویژگی‌های زیستی که در پایش خاک اندازه‌گیری می‌شوند می‌توان تنوع و تعداد جوامع میکروبی، تنفس پایه (تنفس خاک)، تنفس برانگیخته، کربن زی‌توده میکروبی، نیتریفیکاسیون و فعالیت آنزیمی را نام برد.

۱- جوامع میکروبی خاک

میکروارگانیسم‌های خاک با وجود کوچک بودن، موجودات زنده اصلی خاک بوده و نقش کلیدی را در چرخه‌های ژئوشیمیایی ازت، کربن و سایر مواد غذایی دارند. به‌علاوه، جوامع میکروبی در فرایندهای مختلف مانند سمیت‌زدایی از گزنوبیوتیک‌ها نقش کلیدی دارند. با توجه به نقش مهم جوامع میکروبی در کیفیت خاک، بررسی تغییرات جوامع میکروبی همراه با اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی خاک می‌تواند به شناخت کیفیت خاک کمک مؤثری بکند. باکتری‌ها و قارچ‌ها از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های خاک محسوب می‌شوند که از فراوانی و تنوع آنها در پایش کیفیت و سلامت خاک به فراوانی استفاده می‌شود. امروزه برای ارزیابی تنوع میکروبی خاک از رویکردهای جدید مانند متاژنومیکس[۲]، متاترنسکیپتومیس[۳]، متاپروتئومیکس[۴] و متابولومیکس[۵] استفاده می‌شود.

۲-تنفس میکروبی پایه (تنفس خاک[۶])

تنفس میکروبی (تنفس خاک) با اندازه‌گیری دی‌اکسیدکربن منتشر شده توسط میکروارگانیسم‌های خاک در طی تجزیه مواد آلی ارزیابی می‌شود. اندازه‌گیری تنفس خاک در شرایط آزمایشگاهی و شرایط صحرایی انجام می‌شود. در شرایط آزمایشگاهی، دی‌اکسیدکربن توسط میکروارگانیسم‌های خاک تولید می‌شود اما در شرایط صحرایی ریشه‌های گیاهان و نیز فون ماکروسکوپی خاک نیز در تولید دی‌اکسیدکربن دخالت دارند. تنفس خاک یک فرایند کلیدی اکوسیستم است که کربن را به شکل دی‌اکسیدکربن در خاک آزاد می‌کند که توسط گیاهان جذب و به ترکیبات آلی در فرایند فتوسنتز تبدیل می‌گردد. تنفس میکروبی پایه (تنفس خاک) یکی از شاخص‌های مهم در پایش خاک است، زیرا نشان‌دهنده میزان فعالیت میکروبی، ماده آلی و میزان تجزیه آن است.

---

[2] Metagenomics
[3] Metatranscriptomics
[4] Metaproteomics
[5] Metablomics
[6] Soil Respiration

۳-تنفس میکروبی برانگیخته (تنفس برانگیخته خاک[۷])

بیشتر میکروارگانیسم‌های خاک به شکل غیرفعال در خاک وجود دارند، بنابراین میزان تنفس در خاک کم است. تنفس پایه خاک را می‌توان با افزودن ترکیباتی که به آسانی تجزیه می‌شوند مانند گلوکز افزایش داد. افزایش تنفس خاک به‌دنبال اضافه کردن ترکیباتی مانند گلوکز، تنفس برانگیخته خاک نامیده می‌شود. درواقع، تنفس برانگیخته خاک روشی برای ارزیابی جمعیت میکروبی دخیل در تجزیه گلوکز و زی‌توده میکروبی خاک است که قادر می‌باشد بقایای گیاهی با ترکیبات مختلف را تجزیه کند.

۴- کربن زی‌توده میکروبی[۸]

با توجه به اهمیت میکروارگانیسم‌های خاک در عملکرد و عدم امکان کشت و جداسازی همه میکروارگانیسم‌های خاک، اندازه‌گیری زی‌توده میکروبی خاک یک روش به‌نسبت ساده و کمی برای ارزیابی میکروب‌های موجود در خاک است. درواقع، زی‌توده میکروبی خاک بخش زنده ماده آلی خاک به استثناء ریشه گیاهان و فون خاک بزرگ‌تر از 5×10^{3} µm است. با این تعریف، جمعیت میکروبی خاک به‌عنوان یک واحد منفرد و تمایزنیافته درنظر گرفته می‌شود و توده و فعالیت آن می‌تواند اندازه‌گیری شود. زی‌توده میکروبی، زنده و پویا بوده و مسئول تجزیه مواد آلی، تولید انرژی و چرخه مواد در خاک است. از زی‌توده میکروبی خاک برای ارزیابی اثر تغییرات محیطی و فعالیت‌های انسانی بر میکروارگانیسم‌های خاک و به عبارت دیگر برای پایش خاک استفاده می‌شود. بهترین روش برای استفاده از مقادیر زی‌توده میکروبی، کربن یا ازت در پایش خاک، اندازه‌گیری آن به‌طور منظم در نمونه‌هایی است که در تابستان جمع‌آوری شده‌اند. زی‌توده میکروبی خاک[۹] (SMB)در طول سال متغیر است، اما مقدار آن در تابستان به‌دلیل کم بودن مقدار کربن ورودی و آب به خاک پایدار است. به‌عنوان یک اصل کلی، افزایش SMB مفید درنظر گرفته می‌شود. افزایش SMB نشان‌دهنده افزایش عملکردهای زیستی مفید خاک و افزایش کربن آلی خاک در آینده است. به‌طور معمول، کاهش SMB می‌تواند مضر باشد، اگر منجر به کاهش عملکرد خاک شود.

---

[7] Substrate Induced Respiration
[8] Microbial Biomass Carbon
[9] Soil Microbial Biomass

۵- پتانسیل نیتریفیکاسیون[10]

نیتریفیکاسیون فرایندی زیستی است که در طی آن آمونیاک (NH_3) به نیتریت (NO_2) و سپس نیتریت به نیترات (NO_3^-) اکسید می‌شود و یکی از مراحل مهم در چرخه ازت است. هریک از این واکنش‌ها توسط میکروارگانیسم‌های متفاوتی در خاک انجام می‌شوند. البته، گروهی از میکروب‌ها نیز وجود دارند که قادرند آمونیاک را به‌طور مستقیم به نیترات تبدیل کنند که به آنها باکتری‌های Comammox گفته می‌شود. نیتریفیکاسیون از نظر محیط‌زیست و کشاورزی اهمیت زیادی دارد. این فرایند میکروبی می‌تواند باعث مشکلاتی در فراهم کردن ازت برای گیاهان شود، زیرا نیترات براحتی طی فرایندهای نیترات‌زدایی و آبشویی از خاک حذف می‌شود. مقدار زیاد نیتریفیکاسیون در خاک‌هایی که از ازت اشباع شده‌اند، از نظر محیط‌زیستی اهمیت دارد، زیرا باعث اسیدی شدن خاک، کاهش توان بافری خاک، وارد شدن نیترات به آب‌های زیرزمینی و نیز آزاد شدن گازهای گلخانه‌ای می‌شود. ظرفیت نیتریفیکاسیون در خاک‌های مختلف متفاوت است و بستگی به جمعیت (فراوانی و تنوع) باکتری‌های نیتراتساز[11] و شرایط محیطی مانند اسیدیته خاک، مقدار رطوبت، غلظت سوبسترا و مقدار اکسیژن در دسترس دارد.

۶- فعالیت آنزیمی خاک

آنزیم‌های خاک در کل فرایند تجزیه مواد آلی و نیز کاتالیز واکنش‌های ضروری برای فرایندهای حیاتی میکروارگانیسم‌ها در خاک، پایداری ساختمان خاک، تجزیه زباله‌های آلی، تشکیل مواد آلی و چرخه عناصر نقش مهمی دارند که باعث می‌شود به‌عنوان شاخص تاریخچه خاک و تغییرات آن عمل کنند و از آنها به‌عنوان شاخص‌های مناسب در پایش کیفیت خاک استفاده شود. آنزیم‌های خاک ارتباط نزدیکی با مواد آلی، ویژگی‌های فیزیکی، فعالیت میکروبی و زی‌توده در خاک دارند. آنزیم‌های خاک قادرند به تغییرات ایجاد شده در اثر مدیریت خاک یا تنش‌های زیستی و غیرزیستی خیلی سریع، پیش از

---

[10] Nitrfication Potential
[11] Nitrifying Bacteria

آنکه تغییرات ایجاد شده در سایر ویژگی‌ها قابل اندازه‌گیری و ردیابی باشد، پاسخ دهند. از مهم‌ترین آنزیم‌های خاک که در پایش کیفیت خاک از آنها استفاده می‌شود می‌توان آنزیم‌های دهیدروژناز، فسفاتاز، اوره‌آز، آریل سولفاتاز، بتا-گلوکوزیداز، آمیلاز، کیتیناز و سلولاز را نام برد.

نمونه‌برداری از خاک

اصول نمونه‌برداری

اولین مرحله در پایش خاک، نمونه‌برداری از خاک است که باید در شرایط استاندارد انجام شده و به آزمایشگاه منتقل شود تا نتایج قابل اعتماد و استناد باشند. برای این منظور، چند نمونه خاک از منطقه مورد مطالعه را انتخاب و برداشت کنید.

ابزار نمونه‌برداری

ظروف نمونه‌برداری خاک، بیل، بیلچه، استوانه نمونه‌برداری[۱۲] و اوگر [۱۳]هستند.

زمان نمونه‌برداری

زمان نمونه‌برداری به هدف مطالعه بستگی دارد. اگر هدف پایش و بررسی تغییرات ویژگی‌های زیستی خاک است، نمونه‌برداری در فصل بهار و پیش از شروع دوره رویش انجام می‌شود، اما اگر هدف بررسی اثرهای اختصاصی یک گونه است نمونه‌برداری در فصل پاییز و پس از پایان دوره رویشی گیاه مورد نظر انجام می‌شود.

توجه به نکات زیر هنگام نمونه‌برداری ضروریست:

۱- خاک کاملاً خیس یا خشک نباشد؛

۲- در مورد خاک‌هایی که کوددهی می‌شوند، باید نمونه‌برداری ۴ تا ۶ هفته پس از کاربرد کودهای شیمیایی و حداقل ۳ ماه پس از کاربرد کودهای آلی انجام شود.

---

[12] Soil Sampling Cylinder
[13] Auger

انواع نمونه

نمونه ساده

اگر هر یک از نمونه‌های برداشت شده به‌طور جداگانه بررسی می‌شود، به آن نمونه ساده می‌گویند.

نمونه مرکب

اگر تعدادی نمونه ساده با هم مخلوط و آزمایش‌ها بر روی یک نمونه انجام می‌شود، به آن نمونه مرکب می‌گویند.

نمونه دست‌نخورده

اگر حالت و ساختار طبیعی خاک در نمونه برداشت شده حفظ شده باشد، به آن نمونه دست‌نخورده می‌گویند.

نمونه دست‌خورده

اگر حالت و ساختار طبیعی خاک در نمونه حفظ نشده باشد، به آن نمونه دست‌خورده می‌گویند.

نمونه‌برداری و انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه

برای بررسی ویژگی‌های زیستی، حداقل ۵۰۰ گرم خاک نمونه‌برداری و به آزمایشگاه ارسال کنید.

۱- برای آنکه نمونه تهیه شده نماینده واقعی منطقه باشد محل‌های نمونه‌برداری را طوری انتخاب کنید که در منطقه مورد مطالعه پراکنده باشند. بنابراین، از سیستم شبکه‌بندی برای نمونه‌برداری استفاه کنید.

۲- عمق نمونه‌برداری به هدف نمونه‌برداری بستگی دارد. برای پایش ویژگی‌های زیستی از خاک سطحی (۳۰-۰ سانتی‌متری) نمونه‌برداری انجام شود. برای مقایسه ویژگی‌های زیستی خاک سطحی و عمیق می‌توانید از دو عمق ۳۰-۰ و ۵۰-۳۰ سانتی‌متری نمونه‌برداری کنید، اما گاهی برای مقایسه ممکن است از عمق پایین‌تر نیز نمونه‌برداری انجام شود.

۳- نوع ابزار مورد استفاده در نمونه‌برداری به عمق خاک بستگی دارد که در ادامه ذکر شده است (شکل ۲):

الف) خاک سطحی: برای نمونه دست‌خورده از بیل و بیلچه و برای نمونه دست‌نخورده از استوانه نمونه‌برداری استفاده کنید.

ب) خاک عمیق: برای نمونه دست‌نخورده از اوگر استفاده کنید.

شکل ۲- تجهیزات لازم برای نمونه‌برداری از خاک

۴- شیوه نمونه‌برداری

الف) نمونه‌برداری ساده

در این شیوه نمونه‌ها را به‌صورت جداگانه برداشت کرده و به آزمایشگاه منتقل کنید.

ب) نمونه‌برداری مرکب

در این شیوه از چندین نقطه نمونه‌برداری کرده و نمونه‌های مربوط به هر عمق را با هم مخلوط کنید.

پس از تهیه نمونه، آن را داخل کیسه پلاستیکی یا ظروف نمونه‌برداری ریخته و درب ظرف حاوی نمونه را محکم ببندید. مشخصات نمونه شامل نام و نام خانوادگی نمونه‌بردار، تاریخ نمونه‌برداری، محل نمونه‌برداری، عمق نمونه‌برداری و نوع زراعت (برای خاک‌های کشاورزی) را بر روی دو اتیکت نوشته و یکی را بر روی کیسه یا ظرف چسبانده و دیگری را در داخل نمونه قرار دهید.

۵- نمونه‌ها را در دمای ۴ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل کنید.

آماده‌سازی نمونه

۱- خاک را کاملاً مخلوط و با استفاده از الک ۲ میلی‌متری، الک کنید. بهتر است ابتدا خاک‌ها را از الک ۵ یا ۸ میلی‌متری عبور دهید تا بقایای گیاهی و ذرات درشت کاملاً حذف شوند. سپس، نمونه یکدست به‌دست آمده را از الک ۲ میلی‌متری عبور دهید.

۲- خاک الک شده و مرطوب را به ۲ قسمت به‌صورت زیر تقسیم کنید:

الف) خاک خشک (برای پایش ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی): نمونه‌های خاک را به‌مدت یک هفته در دمای اتاق و سایه قرار دهید تا کاملاً خشک شود.

ب) خاک مرطوب (برای پایش ویژگی‌های زیستی).

نگهداری نمونه

۱- اگر طوری برنامه‌ریزی کرده‌اید که ویژگی‌های زیستی نمونه خاک تهیه شده را حداکثر تا یک ماه پس از نمونه‌برداری انجام دهید، نمونه‌ها را در ۴ درجه سانتیگراد (یخچال یا اتاق سرد) نگهداری کنید.

۲- نمونه‌های مرطوب و الک نشده را منجمد کنید (دمای ۲۰- درجه سانتیگراد). پیش از انجام آزمون‌های زیستی باید نمونه‌ها را حداقل ۵ روز در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار دهید تا ذوب شوند و سپس الک کنید. نمونه‌ها را در ظروف پلی‌اتیلنی دهان گشاد نگهداری کنید تا امکان تهویه وجود داشته باشد.

نکته: نمونه‌برداری، انتقال و نگهداری صحیح نمونه‌ها پیش‌نیاز بررسی ویژگی‌های خاک به‌منظور پایش آن است.

نحوه انجام ویژگی‌های زیستی خاک

تعیین درصد وزن خشک خاک

اساس آزمون

مقدار معینی از خاک را وزن کرده و پس از خشک کردن در دمای ۱۰۵ درجه سانتیگراد، با تعیین مقدار کاهش وزن، درصد وزن خشک خاک تعیین می‌شود.

مواد و تجهیزات لازم

نمونه خاک، شیشه ساعت، ترازو و آون (۱۰۵ درجه سانتیگراد).

روش آزمون

۱- ابتدا ترازو را صفر کنید؛

۲- شیشه ساعت خالی را وزن و یادداشت کنید (M1)؛

۳- مقداری خاک به شیشه ساعت اضافه کرده و دوباره وزن آن را تعیین و یادداشت کنید (M2)؛

۴- شیشه ساعت حاوی خاک را درون آون (دمای ۱۰۵ درجه سانتیگراد) قرار دهید. پس از گذشت ۲۴ ساعت، شیشه ساعت را بیرون آورده و درون دسیکاتور شیشه‌ای قرار دهید تا دمای آن به دمای اتاق برسد. دوباره وزن آن را تعیین و یادداشت کنید (M3)؛

۵- از رابطه‌های ۱ تا ۴ درصد وزن خشک خاک را محاسبه کنید.

رابطه ۱ — وزن اولیه خاک M2-M1= S1

رابطه ۲ — وزن خاک پس از خشک شدن M3-M1= S2

رابطه ۳ — وزن آب موجود در خاک S1-S2= W

رابطه ۴ — درصد وزن خشک خاک $=\frac{W*100}{S1}$

**: درصد وزن خشک خاک جزء ویژگی‌های زیستی نیست، اما به‌دلیل اینکه در محاسبات کابرد دارد، در اینجا آورده شده است.*

تعیین جمعیت میکروبی خاک

برای تعیین جمعیت میکروبی خاک از روش‌های وابسته به کشت یا مستقل از کشت استفاده می‌شود که با توجه به عدم دسترسی تمام آزمایشگاه‌ها به روش‌های مستقل از کشت، روش‌های وابسته به کشت توصیه می‌شود.

۱- شمارش باکتری‌های هتروتروف خاک به روش شمارش کلنی

اساس آزمون

در این روش رقت‌های مختلف از خاک تهیه و به یک محیط کشت غنی جامد مانند نوترینت آگار، تریپتوکیس سوی آکار و برین هارت آگار اضافه می‌شود. به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری و سپس تعداد آنها براساس کلنی[۱۴] (CFU)در هر گرم خاک محاسبه و گزارش می‌شود.

مواد و تجهیزات لازم

نمونه خاک، کلرید سدیم، محیط کشت مناسب (نوترینت آگار)، ترازو، پلیت، لوله درپیچ‌دار، ارلن شیشه‌ای، پی‌پت استریل یک میلی‌لیتری یا سر سمپلر استریل، میله شیشه‌ای سرکج، چراغ بنزن الکلی یا گازی، انکوباتور، اتوکلاو، هود میکروبی، ورتکس (همزن لوله) و شیکر (همزن مغناطیسی افقی).

محلول‌ها و محیط کشت

۱- کلرید سدیم ۰/۹٪ (سرم فیزیولوژی یا نرمال سالین):

الف) ابتدا ۹ گرم از کلرید سدیم (NaCl) را وزن کرده به آن یک لیتر آب مقطر اضافه کنید. سپس، ۹۹ میلی‌لیتر را در داخل ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری بریزید و درنهایت، ۹ میلی‌لیتر از این محلول را در لوله‌های درپیچ دار بریزید (حداقل به ۶ لوله نیاز دارید).

ب) محلول‌های آماده شده را در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل کنید.

---

[14] Colony Forming Unite

۲- محیط کشت نوترینت آگار:

الف) بیست گرم از محیط کشت نوترینت آگار (دستورالعمل شرکت سازنده) را وزن کرده و به یک لیتر آب مقطر اضافه کنید.

ب) محیط کشت آماده شده را در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل کنید.

ج) پس از استریل کردن و خنک شدن محیط کشت، آن را در پلیت‌های استریل (یکبار مصرف پلاستیکی یا شیشه‌ای) بریزید. یک شبانه‌روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید تا از استریل بودن آنها مطمئن شوید. در صورت عدم مشاهده آلودگی، برای کشت از آنها استفاده کنید.

نکته: در صورت نبودن نوترینت آگار می‌توان از محیط کشت‌های غنی دیگر مانند Tryptocase Soy Agar یا Brain heart Agar استفاده کرد.

روش آزمون

این آزمایش در زیر هود میکروبی و در شرایط استریل انجام می‌شود.

۱- تهیه رقت‌های متوالی[15]:

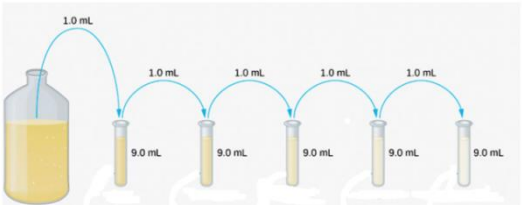
الف) یک گرم از نمونه خاک را با ترازو وزن کرده و به ارلن محتوی ۹۹ میلی‌لیتر کلرید سدیم (۰/۹٪) اضافه کنید (رقت 10^{-2}).

ب) ارلن را بر روی شیکر به مدت ۲ ساعت قرار دهید (۱۵۰ دور در دقیقه).

ج) از این رقت (10^{-2}) رقت‌های متوالی تا 10^{-7} تهیه کنید. برای این منظور، یک میلی‌لیتر از رقت 10^{-2} را با پی‌پت استریل یا با استفاده از سرسمپلز استریل برداشته و به لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر از کلرید سدیم (۰/۹٪) اضافه و با ورتکس کاملاً مخلوط کنید تا یکنواخت شود (رقت 10^{-3}).

د) برای تهیه رقت‌های بعدی همین دستورالعمل را تکرار کنید (شکل ۳).

[15] Serial Dilutions



10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7}

شکل ۳- تهیه رقت‌های متوالی از رقت اولیه (10^{-2}) نمونه خاک مورد آزمایش

۲- کشت نمونه

الف) ۰/۱ میلی‌لیتر (۱۰۰ میکرولیتر) از هر یک از رقت‌ها را به پلیت‌های حاوی محیط کشت نوترینت اگار اضافه کرده و سپس با میله شیشه‌ای سر کج استریل آن را در سطح پلیت پخش کنید (شکل ۴).

ب) پس از آنکه محلول کاملاً جذب محیط کشت شد، پلیت‌ها را برگردانید و در انکوباتور در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتیگراد قرار دهید. بر روی پلیت مشخصات نمونه کشت شده و تاریخ کشت یادداشت شود.

ج) پس از گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت، پلیت‌هایی را که تعداد باکتری‌ها آنها بین ۳۰ تا ۳۰۰ است، شمارش کرده و تعداد باکتری‌ها را بر حسب CFU در یک گرم خاک گزارش کنید.

نکته: برای هر رقت حداقل دو تکرار باید کشت شود.

افزودن ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت تهیه شده پخش کردن با میله شیشه‌ای سرکج گرمخانه‌گذاری، رشد و شمارش کلنی‌ها

شکل ۴- مراحل کشت رقت‌های متوالی تهیه شده از خاک

۲- شمارش باکتری‌های هتروتروف خاک به روش بیشترین تعداد احتمالی MPN[۱۶]

اساس آزمون

روش MPN بر پایه نظریه احتمالات بوده و فرض بر این است که میکروارگانیسم‌ها دارای توزیع یکنواخت بوده و به‌طور اتفاقی در نمونه پخش شده‌اند. در این روش، حجم‌هایی از نمونه مورد آزمایش (در اینجا خاک) به ۳ تا ۵ لوله آزمایش دارای محیط مایع غنی مانند نوترینت برات منتقل می‌شود. لوله ها در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شده و پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت، لوله‌ها بررسی می شوند. تعداد لوله‌های مثبت (مشاهده کدورت) تعیین و بیشترین تعداد احتمالی بر اساس جدول‌های MPN یا نرم‌افزار محاسبه و گزارش می‌شود.

مواد و تجهیزات لازم

نمونه خاک، کلرید سدیم، محیط کشت مایع مناسب (نوترینت برات)، ترازو، لوله درپیچ‌دار، ارلن شیشه‌ای (۲۵۰ میلی‌لیتری)، پی‌پت استریل یک میلی‌لیتری یا سر سمپلر استریل، سمپلر (۱۰۰- ۱۰۰۰ میکرولیتر)، انکوباتور، اتوکلاو، هود میکروبی، ورتکس (همزن لوله) و شیکر (همزن مغناطیسی).

محلول‌ها و محیط کشت

۱-کلرید سدیم ۰/۹٪ (سرم فیزیولوژی یا نرمال سالین):

الف) ابتدا ۹ گرم از کلرید سدیم (NaCl) را وزن کرده به آن یک لیتر آب مقطر اضافه کنید. سپس، ۹۹ میلی‌لیتر را در داخل ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری بریزید و درنهایت، ۹ میلی‌لیتر از این محلول را در لوله‌های درپیچ‌دار بریزید.

ب) محلول‌های تهیه شده را در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل کنید.

۲- محیط کشت نوترینت برات:

الف) بیست گرم از محیط کشت نوترینت برات (دستورالعمل شرکت سازنده) را وزن کرده و به یک

---

[16] Most Probable Number

لیتر آب مقطر اضافه کنید.

ب) نه میلی‌لیتر از محیط کشت را به هر یک از لوله‌های درپیچ‌دار اضافه کرده و لوله‌های حاوی محیط کشت را در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌راد استریل کنید.

ج) یک شبانه‌روز لوله‌های استریل شده را در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید تا از استریل بودن آنها (عدم مشاهده کدورت) مطمئن شوید. سپس، برای کشت از آنها استفاده کنید.

نکته: در صورت نبودن نوترینت برات می‌توان از محیط کشت‌های غنی دیگر مانند Tryptocase Soy broth یا Brain heart broth نیز استفاده کرد.

روش آزمون

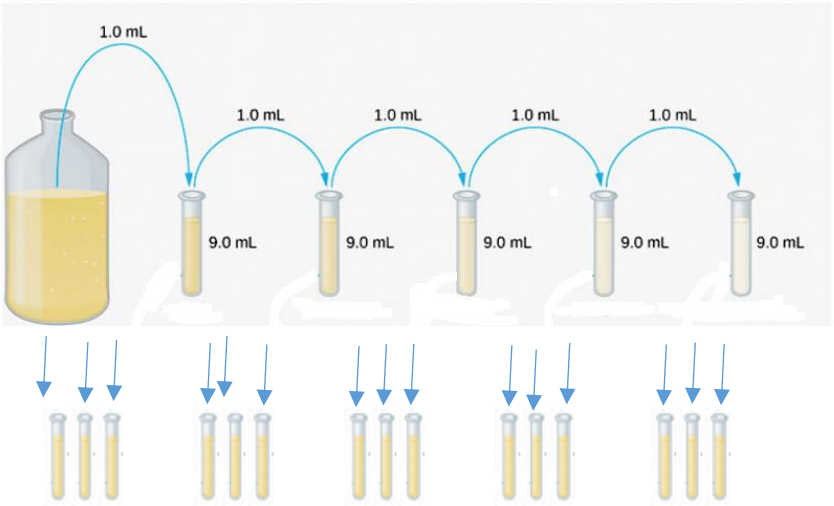
۱- تهیه رقت‌های متوالی (به بخش شمارش باکتری‌های هتروتروف خاک به روش شمارش کلنی مراجعه کنید، شکل ۳).

۲- کشت: در روش MPN سه‌تایی، برای هر رقت ۳ لوله کشت دهید.

الف) یک میلی‌لیتر از هر یک از رقت‌ها را برداشته و به لوله‌های حاوی ۹ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت برات اضافه کنید (شکل ۵).

ب) لوله‌ها را به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری کنید.

ج) وجود کدورت را در لوله‌ها که علامت رشد باکتری است، بررسی کنید و با استفاده از نرم‌افزار (https://mpncalc.galaxytrakr.org/)، بیشترین تعداد احتمالی باکتری‌ها را در هر گرم خاک محاسبه و گزارش کنید.



شکل ۵- روش MPN سه‌تایی،اضافه کردن یک میلی‌لیتر از هر کدام از رقت‌ها به هر یک از ۳ لوله.

تنفس میکروبی پایه (تنفس خاک)

اساس آزمون

در این روش، دی‌اکسیدکربن تولید شده توسط میکروارگانیسم‌های خاک در ظروف دربسته، در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد جذب هیدروکسید سدیم شده و با روش تیتراسیون اندازه‌گیری می‌شود.

مواد و تجهیزات لازم

نمونه خاک، آب مقطر استریل، هیدروکسید سدیم، کلرید باریم، فنل‌فتالین، اتانول، ظروف شیشه‌ای درب‌دار، بشر کوچک (۵۰ میلی‌لیتری)، بالن‌ژوژه، بورت ۵۰ میلی‌لیتری، ترازو، انکوباتور و شیکر (همزن مغناطیسی).

محلول‌ها

هیدروکسید سدیم (سود) ۰/۰۵ مولار: دو گرم هیدروکسید سدیم (NaOH) را وزن کرده و با آب مقطر در بالن‌ژوژه یک لیتری به حجم برسانید.

کلرید باریم ۰/۵ مولار: ۱۲/۲۱۴ گرم از کلرید باریم ($BaCl_2, 2H_2O$) را وزن کرده و در ۶۰

میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید. سپس، در بالن‌ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری به حجم برسانید.

اتانول ۶۰٪: به ۶۰ میلی‌لیتر اتانول خالص، ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کنید.

معرف فنل‌فتالین: ۰/۱ گرم فنل‌فتالین ($C_20H_{14}O_4$) را در اتانول ۶۰٪ حل کرده و سپس با اتانول به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید. *این معرف را در ظروف شیشه‌ای تیره رنگ نگهداری کنید.*

اسید کلریدریک ۰/۱ مولار: در بالن‌ژوژه یک لیتری حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۱/۱۶ میلی‌لیتر از اسید کلریدریک ۳۷٪ (HCl) اضافه کرده و با آب مقطر به حجم برسانید.

روش آزمون

۱- بیست گرم خاک مرطوب را درون یک بشر ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و رطوبت آن را با استفاده از آب مقطر استریل به ۵۰٪ وزنی برسانید.

۲- بشر محتوی خاک را به ظروف شیشه‌ای دردار حاوی ۲۵ میلی‌لیتر سود (۰/۰۵ مولار) منتقل و درب ظروف را محکم ببندید.

۳- ظروف شیشه‌ای حاوی خاک و نیز ۲ ظرف شیشه‌ای حاوی ۲۵ میلی‌لیتر سود (۰/۰۵ مولار) بدون خاک (شاهد) را در دمای ۲۵ سانتیگراد (درون انکوباتور) به مدت ۲۴ ساعت قرار دهید.

۴- پس از گذشت ۲۴ ساعت، درب ظروف را باز کرده پس از برداشتن بشر حاوی خاک به محلول هیدروکسید سدیم موجود ۲ میلی‌لیتر کلرید باریم (۰/۵ مولار) و چند قطره معرف فنل‌فتالین اضافه کنید. محلول به رنگ صورتی یا ارغوانی تغییر رنگ می‌دهد.

۵- نمونه‌ها و شاهد را تا بی‌رنگ شدن محلول تیتر کنید. برای این منظور، محلول اسید کلریدریک ۰/۱ مولار را درون بورت ریخته و به آرامی و قطره قطره به درون محلول صورتی رنگ اضافه کنید تا کاملاً بی‌رنگ شود.

۶- مقدار تنفس (تنفس پایه خاک) را از رابطه ۵ محاسبه و بر حسب $mg\ CO_2.g^{-1}\ dm\ 24\ h^{-1}$ گزارش کنید (شکل ۶).

رابطه ۵ $\text{تنفس پایه خاک} = \frac{(C-S)*2.2*100}{SW*\%dm}$

که در آن: C و S به‌ترتیب حجم اسید مصرفی برای نمونه‌های شاهد و آزمون، ۲/۲ فاکتور تبدیل HCl به دی‌اکسیدکربن، sw وزن خاک و $\frac{100}{\%dm}$ فاکتور تبدیل برای خاک خشک است.

ریختن نمونه‌های خاک در بشر شیشه‌ای

قرار دادن بشر درون ظرف دربدار حاوی سود

گرمخانه‌گذاری در ۲۵°C به‌مدت ۲۴ ساعت

اضافه کردن کلرید باریم و فنل‌فتالین

تیتراسیون با HCl تا بی‌رنگ شدن محلول

شکل ۶- مراحل مختلف اندازه‌گیری تنفس پایه خاک

اندازه‌گیری تنفس برانگیخته (تنفس ناشی از سوبسترا)

اساس آزمون

در این روش نمونه‌های خاک با یک منبع کربن، معمولاً گلوکز، مخلوط می‌شود. دی‌اکسیدکربن تولید شده توسط میکروارگانیسم‌های خاک در ظروف دربسته در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد جذب

هیدروکسید سدیم شده و با روش تیتراسیون اندازه‌گیری می‌شود.

مواد و تجهیزات لازم

نمونه خاک، آب مقطر استریل، گلوکز، هیدروکسید سدیم، کلرید باریم، معرف فنل‌فتالین، اتانول، ظروف شیشه‌ای دربدار، بشر کوچک (۵۰ میلی‌لیتری)، بالن‌ژوژه، بورت ۵۰ میلی‌لیتری، ترازو، شیکر (همزن مغناطیسی)، انکوباتور.

محلول‌ها

هیدروکسید سدیم (سود) ۰/۱ مولار: چهار گرم هیدروکسید سدیم (NaOH) را وزن کرده و با آب مقطر در بالن‌ژوژه یک لیتری به حجم برسانید.

کلرید باریم ۰/۵ مولار: ۱۲/۲۱۴ گرم از کلرید باریم ($BaCl_2, 2H_2O$) را در ۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و در بالن‌ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری به حجم برسانید.

اتانول ۶۰٪: به ۶۰ میلی‌لیتر اتانول خالص، ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کنید.

معرف فنل‌فتالین: ۰/۱ گرم فنل‌فتالین ($C_20H_{14}O_4$) را در اتانول ۶۰٪ حل کرده و سپس با اتانول به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید. *این معرف را در ظروف شیشه‌ای تیره رنگ نگهداری کنید.*

اسید کلریدریک ۰/۱ مولار: در بالن‌ژوژه یک لیتری حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۱/۱۶ میلی‌لیتر از اسید کلریدریک ۳۷٪ (HCl) ریخته و با آب مقطر به حجم برسانید.

روش آزمون

۱- بیست گرم خاک مرطوب را درون یک بشر ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و رطوبت آن را با استفاده از آب مقطر استریل به ۵۰ ٪ وزنی برسانید.

۲- به هر یک از نمونه‌های خاک، ۰/۰۸ گرم گلوکز ($C_6H_{12}O_6$) اضافه کرده و خوب بهم بزنید.

۳- بشر محتوی خاک را به ظروف شیشه‌ای دربدار حاوی ۲۵ میلی‌لیتر سود ۰/۱ مولار منتقل کرده و درب ظروف را محکم ببندید.

۴- ظروف شیشه‌ای حاوی خاک و نیز ۲ ظرف شیشه‌ای حاوی ۲۵ میلی‌لیتر سود ۰/۱ مولار بدون خاک

(شاهد) را در دمای ۲۵ سانتیگراد (درون انکوباتور) به مدت ۴ ساعت قرار دهید.

۵- پس از گذشت ۴ ساعت، درب ظروف را باز کرده پس از برداشتن بشر حاوی خاک به محلول هیدروکسید سدیم موجود ۲ میلی‌لیتر کلرید باریم (۰/۵ مولار) و چند قطره معرف فنل‌فتالین اضافه کنید، محلول به رنگ صورتی یا ارغوانی تغییر رنگ می‌دهد.

۶- نمونه‌ها و شاهد را تا بی‌رنگ شدن محلول تیتر کنید. برای این منظور، محلول اسید کلریدریک (۰/۱ مولار) را درون بورت ریخته و به آرامی و قطره‌قطره به درون محلول صورتی رنگ اضافه کنید تا کاملاً بی‌رنگ شود (شکل ۶).

۷- مقدار تنفس برانگیخته خاک را از رابطه ۶ محاسبه و بر حسب $mg\ CO_2.100g^{-1}\ dm\ .\ h^{-1}$ بیان کنید.

رابطه ۶ $$\text{تنفس برانگیخته خاک} = \frac{(B-S)*2.2*100*100}{4*SW*\%dm}$$

که در آن: B و S به‌ترتیب حجم اسید مصرفی برای نمونه‌های شاهد و آزمون، ۲/۲ فاکتور تبدیل HCl به دی‌اکسیدکربن، ۴ زمان گرمخانه‌گذاری، sw وزن خاک، ۱۰۰ فاکتور تبدیل (۱۰۰ گرم خاک خشک) و $\frac{100}{\%dm}$ فاکتور تبدیل برای خاک خشک است.

کربن زی‌توده میکروبی به روش تدخین-استخراج[۱۷]

اساس آزمون

نمونه‌های خاک با کلروفرم تدخین شده و با محلول سولفات پتاسیم استخراج (عصاره‌گیری) می‌شوند و سپس کربن آلی در عصاره حاصل اندازه‌گیری و به کربن زی‌توده میکروبی تبدیل می‌شود.

مواد و تجهیزات

نمونه خاک، کلروفرم، کربنات کلسیم، دی‌کرومات پتاسیم، اسید سولفوریک غلیظ، سولفات پتاسیم، ارتو فنانترولین، سود رقیق، اسید کلریدریک رقیق، ظروف شیشه‌ای، دسیکاتور شیردار، پمپ خلأ، بورت، شیکر (همزن افقی)، کاغذ صافی، pH متر.

[17] Fumigation-Extraction

محلول‌ها

سولفات پتاسیم ۰/۵ مولار: ۸۷/۱ گرم سولفات پتاسیم (K_2SO_4) را وزن کرده و با آب مقطر در بالن‌ژوژه یک لیتری به حجم برسانید.

دی‌کرومات پتاسیم ۱ مولار: ۴۹/۰۴ گرم از دی‌کرومات پتاسیم ($K_2Cr_20_7$) را وزن کرده و با آب مقطر در بالن‌ژوژه یک لیتری به حجم برسانید.

فروسولفات آمونیوم ۰/۵ مولار: ۱۹۶/۰۸ گرم از فروسولفات آمونیوم ($(NH_4)_2Fe(SO_4)_2{\cdot}6H_2O$) را وزن کرده، در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید. به آن ۱۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ (۹۸ ٪) اضافه کرده و با آب مقطر در بالن‌ژوژه یک لیتری به حجم برسانید.

معرف ارتوفنانترولین: ۱/۴۸۵ گرم ارتوفنانترولین ($C_{12}H_8N_2$) و ۰/۶۹۵گرم از فروسولفات آمونیوم ((Fe(SO4)(NH4)2(SO4)) را در ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و سپس در بالن‌ژوژه به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید. *در ظروف شیشه‌ای تیره رنگ نگهداری کنید.*

روش آزمون

۱- بیست و پنج گرم از نمونه خاک مرطوب را وزن کرده و به ظروف شیشه‌ای منتقل کنید. برای هر نمونه نیاز به حداقل ۲ تکرار دارید.

۲ - نمونه‌های آزمون را در درون دسیکاتور شیردار همراه با ۵۰ میلی‌لیتر کلروفرم (CHCl3) حاوی یک گرم کربنات کلسیم ($CaCO_3$) قرار دهید. درب دسیکاتور را ببندید و شیر آن را به پمپ خلأ وصل و روشن کنید. کلروفرم در شرایط خلأ می‌جوشد. حدود یک دقیقه اجازه دهید تا جوشیدن کلروفرم ادامه پیدا کند. سپس، ورودی هوای دسیکاتور را ببندید و پمپ خلأ را خاموش کنید. روی دسیکاتور را بپوشانید تا نور به نمونه‌ها نرسد.

۳- نمونه‌های شاهد را نیز در شرایط مشابه با نمونه‌های مورد آزمایش، بدون تدخین، در دمای آزمایشگاه قرار دهید.

د- پس از گذشت ۲۴ ساعت، شیر ورودی هوای دسیکاتور را باز کنید تا خلأ از بین برود. نمونه‌ها را

از دسیکاتور خارج کنید.

۴- به تمام نمونه‌ها، آزمون و شاهد، ۱۲۵ میلی‌لیتر سولفات پتاسیم (۰/۵ مولار) اضافه کرده و به‌مدت نیم ساعت بر روی همزن افقی (شیکر) قرار دهید. سپس، نمونه‌ها را با فیلتر (کاغذ صافی) صاف کنید.

۵- چهار میلی‌لیتر از محلول صاف شده را برداشته و pH آن را بین ۶/۵ تا ۶/۸ تنظیم کنید. برای تنظیم pH از اسید کلریدریک رقیق یا سود رقیق با توجه به pH اولیه محلول صاف‌شده استفاده کنید.

۶- محلولی که pH آن تنظیم شده است، به ارلن‌های شیشه‌ای ۵۰۰ میلی‌لیتری منتقل کنید. به آنها ۱۰ میلی‌لیتر دی‌کرومات پتاسیم (۱ مولار) و ۲۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ (۹۸٪) اضافه کنید.

۷- پس از نیم ساعت، ۴ تا ۵ قطره از معرف رنگی فنانترولین و ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کنید.

۸- با فروسولفات آمونیوم (۰/۵ مولار) نمونه‌ها را تا تشکیل رنگ قرمز آلبالویی تیتر کنید (شکل ۷).

۹-کربن زی‌توده میکروبی را از رابطه ۷ محاسبه و بر حسب $mg\ biomass\ C\ 100g^{-1}\ dm$ گزارش کنید.

رابطه ۷

$$\text{کربن زی‌توده میکروبی} = \frac{S-C}{0.35}$$

که در آن: S و C به‌ترتیب میانگین حجم فروسولفات آمونیوم مصرفی در تیتراسیون نمونه‌های آزمون (تدخین شده) و شاهد (تدخین نشده) و ۰/۳۵ ضریب تبدیل کربن آلی به کربن میکروبی است.

تدخین نمونه‌ها

پوشاندن نمونه‌ها و شاهد در دمای آزمایشگاه

اضافه کردن سولفات پتاسیم و هم‌زدن

صاف کردن و تنظیم pH

اضافه کردن دی‌کرومات پتاسیم، اسید سولفوریک، معرف و آب مقطر

تغییر رنگ نمونه‌ها پس از تیتراسیون

شکل ۷- مراحل مختلف اندازه‌گیری کربن زی‌توده میکروبی خاک

اندازه‌گیری پتانسیل نیتریفیکاسیون

اساس آزمون

با استفاده از سولفات آمونیوم به عنوان سوبسترا، نمونه‌ها به‌مدت ۵ ساعت در ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری می‌شوند. نیتریت آزاد شده با کلرید پتاسیم استخراج و پس از اضافه کردن معرف، مقدار آن در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود.

مواد و تجهیزات

نمونه خاک، سولفات آمونیوم، کلرات سدیم، نیتریت سدیم، کلرید پتاسیم، کلرید آمونیوم، سولفانیل آمید، N- (۱- نفتیل) اتیلن‌دی‌آمین‌دی‌هیدروکلرید، اسید فسفریک، بطری‌های پلاستیکی ۱۰۰

میلی‌لیتری، کاغذ صافی، pH متر، انکوباتور شیکردار (۲۵ درجه سانتیگراد)، فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد، اسپکتروفتومتر.

محلول‌ها

سولفات آمونیوم ۱۰ میلی‌مولار (سوبسترای مادر): ۱/۳۲۱۴ گرم سولفات آمونیوم ($(NH_4)_2SO_4$) را وزن کرده و با آب مقطر در بالن‌ژوژه یک لیتری به حجم برسانید.

سولفات آمونیوم ۱ میلی‌مولار (سوبسترای کاری-فرزند): ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول سوبسترای مادر را برداشته و با آب مقطر در بالن‌ژوژه یک لیتری به حجم برسانید.

کلرات سدیم ۱/۵ مولار: ۱۵/۹۷ گرم از کلرات سدیم ($NaClO_3$) را در آب مقطر حل کرده و در بالن‌ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری به حجم برسانید.

کلرید پتاسیم ۲ مولار: ۱۴۹/۱۲ گرم کلرید پتاسیم (KCl) را در آب مقطر حل کرده و در بالن‌ژوژه یک لیتری به حجم برسانید.

بافر کلرید آمونیوم ۰/۱۹ مولار (pH= ۸/۵): ده گرم کلریدآمونیوم (NH_4Cl) را در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده، pH آن را با استفاده از آمونیاک غلیظ بر روی ۸/۵ تنظیم و در بالن‌ژوژه یک لیتری به حجم برسانید.

معرف رنگی: دو گرم سولفانیل آمید ($C_6H_8N_2O_2S$) و ۰/۱ گرم N- (۱- نفتیل) اتیلن‌دی‌آمین دی‌هیدروکلرید ($C_{12}H_{16}C_{l2}N_2$) را در ۱۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و ۲۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک (H_3PO_4) غلیظ به آن اضافه کنید. منتظر بمانید تا محلول خنک شود و سپس حجم آن را با آب مقطر به ۲۰۰ میلی‌لیتر برسانید. *محلول باید بی‌رنگ بوده و روزانه تهیه شود.*

روش آزمون

۱- پنج گرم از نمونه خاک (برای هر نمونه ۲ آزمون و یک شاهد) را وزن کرده و به هر یک ۲۰ میلی‌لیتر از سوبسترای کاری- فرزند سولفات آمونیوم (۱ میلی‌مولار) و ۱/ ۰ میلی‌لیتر از کلرات سدیم (۱/۵ میلی‌مولار) اضافه کنید. نمونه‌های آزمون را در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد بر روی شیکر و نمونه-

های شاهد را در دمای ۲۰ – درجه سانتیگراد به مدت ۵ ساعت قرار دهید.

۲- پس از گذشت ۵ ساعت، به تمام نمونه‌های آزمون و شاهد (پس از ذوب شدن)، ۵ میلی‌لیتر کلرید پتاسیم (۲ مولار) اضافه و سپس فیلتر کنید.

۳- به ۵ میلی‌لیتر از محلول صاف شده، نمونه‌های آزمون و شاهد، ۳ میلی‌لیتر بافر کلرید آمونیوم (pH=۸/۵) و ۲ میلی‌لیتر معرف رنگی اضافه کنید.

۴- پس از گذشت ۲۰ دقیقه، مقدار جذب را در طول موج ۵۲۰ نانومتر بخوانید (شکل ۸).

۵- مقدار ازت نیتریتی تولیدی را با استفاده از منحنی استاندارد رسم شده با نیتریت سدیم تعیین کنید.

۶- پتانسیل نیتریفیکاسون را از رابطه ۸ محاسبه و بر حسب $\mu g\ N.g^{-1}dm.5\ h^{-1}$ گزارش کنید.

رابطه ۸

$$\text{پتانسیل نیتریفیکاسیون} = \frac{(S-C)*25.1*100*100}{5*5*\%dm}$$

که در آن: S و C به‌ترتیب مقدار ازت نیتریتی در نمونه‌های آزمون و شاهد، ۲۵/۱ حجم عصاره، ۱۰۰ فاکتور تبدیل میلی‌گرم به میکروگرم (1mg= 1000 µg)، ۵ حجم عصاره اندازه‌گیری شده، ۵ وزن اولیه خاک و $\frac{100}{\%dm}$ فاکتور تبدیل به خاک خشک است.

ظروف حاوی خاک و سوبسترا

صاف کردن نمونه‌ها

اضافه کردن معرف رنگی و تشکیل رنگ ارغوانی

شکل ۸- مراحل مختلف اندازه‌گیری پتانسیل نیتریفیکاسیون

محلول‌های استاندارد

محلول استاندارد $\mu g\ NO_2^-\text{-}N.ml^{-1}$ ۱۰۰۰ (اصلی): ۴/۹۲۵۷ گرم نیتریت سدیم (NaNO2) را در آب مقطر حل کرده و در بالن‌ژوژه یک لیتری به حجم برسانید. *این محلول به مدت ۲ هفته در دمای ۴ درجه سانتیگراد قابل نگهداری است.*

محلول استاندارد $\mu g\ NO_2^-\text{-}N.ml^{-1}$ ۱۰ (کاری): ۵ میلی‌لیتر از محلول استاندارد اصلی را برداشته و با آب مقطر در بالن‌ژوژه به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر برسانید.

رسم منحنی استاندارد

برای رسم منحنی استاندارد، غلظت‌های مختلف نیتریت سدیم را طبق جدول ۱ تهیه کنید. پنج میلی‌لیتر از هر یک از غلظت‌ها را برداشته و همانند نمونه‌ها به هر یک ۳ میلی‌لیتر بافر کلرید آمونیوم (pH=۸/۵) و ۲ میلی‌لیتر معرف رنگی اضافه کنید. پس از ۲۰ دقیقه، مقدار جذب را در طول موج ۵۲۰ نانومتر با اسپکتروفومتر بخوانید و با استفاده از مقادیر جذب منحنی استاندارد نیتریت سدیم را رسم کنید.

جدول ۱- مقادیر مورد استفاده در تهیه غلظت‌های مختلف نیتریت سدیم

غلظت	آب مقطر	کلرید پتاسیم (۲ M)	استاندارد کاری
۰ µg NO_2^--N.ml^{-1}	۸۰ml	۲۰ml	۰ml
۰/۲µg NO_2^--N.ml^{-1}	۷۸ml	۲۰ml	۲ml
۰/۴µg NO_2^--N.ml^{-1}	۷۶ml	۲۰ml	۴ml
۰/۸µg NO_2^--N.ml^{-1}	۷۲ml	۲۰ml	۸ml
۱µg NO_2^--N.ml^{-1}	۷۰ml	۲۰ml	۱۰ml

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی

۱- آنزیم‌های موثر در چرخه فسفر

عنصر فسفر موقعیت مهمی را در رشد گیاه و زیست‌شناسی خاک دارد. این عنصر در ساختمان ترکیب‌های آلی و غیرآلی خاک، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها وجود دارد. فسفر پس از ازت دومین عنصر مورد نیاز برای رشد گیاهان و میکروارگانیسم‌ها است. نقش اصلی و فیزیولوژیک آن، تجمع و آزاد کردن انرژی در طی متابولیسم سلولی است. فسفر به منزله منبع انرژی عمومی در کلیه فعل و انفعالات بیوشیمیایی در سلول‌های زنده نقش ایفا می‌کند. قسمت عمده فسفر موجود به شکل ترکیبات آلی است و برای اینکه توسط گیاهان قابل جذب باشد باید به شکل معدنی و ارتوفسفات ($H_2PO_4^-$ یا HPO_4^{-2}) تبدیل شود. فسفاتازها (EC 3.1.3.2) و آنزیم‌های دخیل در چرخه فسفر، آنزیم‌های القایی هستند که در شرایط کمبود فسفر در دسترس تولید می‌شوند. این آنزیم‌ها توسط ریشه‌های گیاهان و میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند. فسفاتازهای میکروبی در خاک غالب هستند. فسفاتازها انواع مختلف دارند و می‌توانند ترکیبات انیدریدی یا استری اسید فسفریک را هیدرولیز کنند. از انواع آنزیم‌های فسفاتاز می‌توان فسفومونواستراز [۱۸](فیتاز)، فسفودی‌استراز (نوکلئاز)[۱۹] و پلی‌فسفاتاز (ATPase)[۲۰] را نام برد.

[18] Phosphomonoestrase (Phytase)
[19] Phosphodiesterase (Nuclease)
[20] Polyphosphatase (ATPase)

آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی

اساس آزمون

پس از اضافه کردن محلول سوبسترای پارا-نیتروفنیل فسفات، نمونه‌های خاک در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت گرمخانه‌گذاری می‌شوند. پارا-نیتروفنیل آزاد شده در اثر عمل آنزیم فسفومونواستراز استخراج شده و پس از تشکیل کمپلکس زرد رنگ پارا-نیتروفنلات در اثر واکنش با هیدروکسید سدیم (سود) مقدار آن در ۴۰۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود.

مواد و تجهیزات

نمونه خاک، پارا-نیتروفنیل فسفات، کلرید کلسیم، هیدروکسید سدیم، تریس، اسید مالئیک، اسید سیتریک، اسید بوریک، پارا-نیتروفنل، بطری‌های پلاستیکی ۱۰۰ میلی‌لیتری، کاغذ صافی، pH متر، شیکر (همزن افقی)، انکوباتور و اسپکتروفتومتر.

محلول‌ها

هیدروکسید سدیم ۱ مولار: چهل گرم از هیدروکسید سدیم (NaOH) را در آب مقطر حل کرده و در بالن‌ژوژه به حجم یک لیتر برسانید.

بافر پایه سنجش فعالیت آنزیم فسفاتاز: ۱۲/۱ گرم از تریس (هیدروکسی‌متیل) آمینومتان ($C_4H_{11}NO_3$)، ۱۱/۶ گرم اسید مالئیک ($C_4H_4O_4$)، ۱۴ گرم اسید سیتریک ($C_6H_8O_7$) و ۶/۳ گرم اسید بوریک (H_3BO_3) را در ۵۰۰ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۱ مولار حل کرده و در بالن‌ژوژه یک لیتری با آب مقطر به حجم برسانید. *این محلول باید در یخچال نگهداری شود.*

بافر کاری سنجش فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی (pH= ۶/۵): دویست میلی‌لیتر از محلول بافر پایه را برداشته و به آن ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کنید. pH آن را با استفاده از اسید کلریدریک بر روی ۶/۵ تنظیم کرده و در بالن‌ژوژه یک لیتری با آب مقطر به حجم برسانید.

بافرکاری سنجش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی (pH= ۱۱): دویست میلی‌لیتر از محلول بافر پایه را برداشته و به آن ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کنید. pH آن را با استفاده از هیدروکسید سدیم

بر روی ۱۱ تنظیم کرده و در بالن‌ژوژه یک لیتری با آب مقطر به حجم برسانید.

پارا-نیتروفنیل فسفات ۱۱۵ میلی‌مولار (سوبسترای فسفاتاز اسیدی): ۴/۲۶۸ گرم پارا-نیتروفنیل فسفات ($C_6H_6NO_6P$) را وزن کرده و با بافر کاری سنجش فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی (۶/۵ =pH) را در بالن‌ژوژه یک لیتری به حجم برسانید. این *محلول باید روزانه تهیه شود.*

پارا-نیتروفنیل فسفات ۱۱۵ میلی‌مولار (سوبسترای فسفاتاز قلیایی): ۴/۲۶۸ گرم پارا-نیتروفنیل فسفات ($C_6H_6NO_6P$) را وزن کرده و با بافر کاری سنجش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی (۱۱ =pH) را در بالن‌ژوژه یک لیتری به حجم برسانید. این *محلول باید روزانه تهیه شود.*

کلرید کلسیم ۰/۵ مولار: ۳۶/۷۴ گرم از کلرید کلسیم ($CaCl_2. 2 H_2O$) را در آب مقطر حل کرده و در بالن‌ژوژه به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر برسانید.

هیدروکسید سدیم ۰/۵ مولار: بیست گرم از هیدروکسید سدیم (NaOH) را در آب مقطر حل کرده و در بالن‌ژوژه به حجم یک لیتر برسانید.

روش آزمون

۱- یک گرم از نمونه خاک (برای هر نمونه ۲ آزمون و یک شاهد) را وزن کنید.

۲- به هر یک از نمونه‌های آزمون یک میلی‌لیتر از سوبسترای پارا-نیتروفنیل فسفات (۱۱۵ میلی‌مولار، اسیدی یا قلیایی بر حسب نوع آنزیمی که سنجش می‌شود) اضافه کنید.

۳- به تمام نمونه‌ها (آزمون و شاهد) چهار میلی‌لیتر از بافر مربوط (بافر اسیدی برای آنزیم فسفاتاز اسیدی و بافر قلیایی برای آنزیم فسفاتاز قلیایی) اضافه کنید.

۴- تمام نمونه‌ها را در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت گرمخانه‌گذاری کنید.

۵- پس از گذشت یک ساعت، نمونه‌ها را خارج کرده به آنها چهار میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم (۰/۵ مولار) و یک میلی‌لیتر کلرید کلسیم (۰/۵ مولار) اضافه کنید. این ترکیبات باعث خاتمه فعالیت آنزیم و تشکیل ترکیب رنگی می‌شود.

۶- به نمونه‌های شاهد یک میلی‌لیتر از محلول سوبسترای پارا-نیتروفنیل فسفات (۱۱۵ میلی‌مولار،

اسیدی یا قلیایی بر حسب نوع آنزیم) اضافه کنید.

۷- به همه نمونه‌ها ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کرده، هم زده و سپس فیلتر کنید.

۸- مقدار جذب را در طول موج ۴۰۰ نانومتر خوانده و مقدار پارا-نیتروفنل (PNP) تولیدی را با استفاده از منحنی استاندارد رسم شده با پارا-نیتروفنل تعیین کنید (شکل ۹).

۹- فعالیت آنزیم فسفاتاز را از رابطه ۹ محاسبه و بر حسب $\mu g\ PNP.\ g^{-1}\ dm.\ h^{-1}$ گزارش کنید.

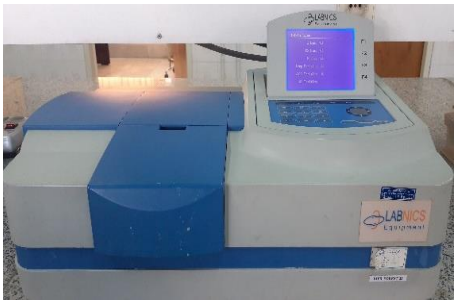
رابطه ۹

$$\text{فعالیت آنزیم فسفاتاز} = \frac{(S-C)*10*100}{\%dm}$$

که در آن: S و C مقدار پارا-نیتروفنل (PNP) در نمونه‌های آزمون و شاهد، ۱۰ فاکتور رقت برای عصاره، $\frac{100}{\%dm}$ فاکتور تبدیل برای خاک خشک است.

پایان فعالیت آنزیم و آماده برای صاف شدن

محلول‌های صاف‌شده



اندازه‌گیری جذب در طول موج ۴۰۰ نانومتر

شکل ۹- مراحل مختلف اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فسفاتاز

محلول‌های استاندارد

محلول استاندارد پارا-نیتروفنل $^{-1}$ mg PNP. ml ۱ (اصلی): یک گرم پارا-نیتروفنل ($C_6H_5NO_3$) را در آب مقطر کرده و در بالن‌ژوژه یک لیتری به حجم برسانید. این محلول باید در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شود.

محلول استاندارد $20\mu g\ PNP^{-}.ml^{-1}$ (کاری): ۲ میلی‌لیتر از محلول استاندارد اصلی را برداشته و با آب مقطر در بالن‌ژوژه به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید.

رسم منحنی استاندارد

برای رسم منحنی استاندارد، غلظت‌های مختلف پارا-نیتروفنل (PNP) را طبق جدول ۲ تهیه کنید. به هر یک از استانداردها ۴ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم (۰/۵ مولار) و یک میلی‌لیتر کلرید کلسیم (۰/۵ مولار) اضافه کنید. مقدار جذب را در طول موج ۴۰۰ نانومتر بخوانید و با استفاده از مقادیر جذب منحنی استاندارد پارا-نیتروفنل (PNP) را رسم کنید.

جدول ۲- مقادیر مورد استفاده در تهیه غلظت‌های مختلف پارا-نیتروفنل

استاندارد کاری	آب مقطر	غلظت
۰ml	۵ml	۰ µg PNP
۱ml	۴ml	۲۰ µg PNP
۲ml	۳ml	۴۰ µg PNP
۳ml	۲ml	۶۰ µg PNP
۴ml	۱ml	۸۰ µg PNP
۵ml	۰	۱۰۰ µg PNP

۲- آنزیم‌های موثر در چرخه ازت

ازت پس از آب مهم‌ترین ماده مورد نیاز گیاهان برای رشد است. ازت موجود در گیاهان حدود ۳۰٪ کل ازت خاک را تشکیل می‌دهد. ازت در بدن موجودات زنده به‌طور عمده در ساختمان پروتئین‌ها وجود دارد. پروتئین‌ها با مرگ موجودات زنده وارد خاک و توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها تجزیه می‌شوند. آنزیم‌های مختلفی در چرخه ازت در خاک دخالت دارند که می‌توان به پروتئازها[۲۱]، آرژینین دآمیناز[۲۲]، اوره‌آز[۲۳] و

[21] Protease
[22] Arginine Deaminase

نیترات رودکتاز[۲۴] اشاره کرد. اوره‌آز (EC 3.5.1.5) عامل تجزیه اوره در خاک و تبدیل آن به آمونیوم و دی‌اکسیدکربن است. آنها می‌توانند ترکیبات آلی ازته با وزن مولکولی کم را به ترکیبات غیرآلی کوچک مانند آمونیوم تبدیل کنند. با توجه به اینکه گیاهان ازت را به شکل آمونیوم جذب می‌کنند، بنابراین فعالیت آنزیم اوره‌آز یکی از ویژگی‌های زیستی خاک است که در پایش و ارزیابی کیفیت خاک مورد توجه است.

آنزیم اوره‌آز

اساس آزمون

پس از اضافه کردن محلول سوبسترای اوره، نمونه‌های خاک در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت گرمخانه‌گذاری می‌شوند. آمونیوم آزاد شده در اثر عمل آنزیم اوره‌آز با کلرید پتاسیم استخراج شده و پس از تشکیل کمپلکس سبزرنگ در اثر واکنش با سالیسیلات سدیم، مقدار آن در ۶۹۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود.

مواد و تجهیزات

نمونه خاک، اوره، کلرید پتاسیم، دی‌کلروایزوسیانورات سدیم، هیدروکسید سدیم، سالیسیلات سدیم، نیتروپروسید سدیم، کلرید آمونیوم، بطری‌های پلاستیکی ۱۰۰ میلی‌لیتری، کاغذ صافی، pH متر، شیکر (همزن افقی)، انکوباتور و اسپکتروفتومتر.

محلول‌ها

اوره ۷۲۰ میلی‌مولار (سوبسترا): ۲۱/۶ گرم اوره (CH_4N_2O) را در آب مقطر حل کرده و در بالن‌ژوژه به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر برسانید. *محلول سوبسترا باید روزانه تهیه شود.*

محلول اسید کلریدریک ۱/ ۰ مولار: در بالن‌ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۱/۱۶ میلی‌لیتر از اسید کلریدریک (HCl) ریخته و با آب مقطر به حجم برسانید

---

[23] Urease
[24] Nitrate Reductase

محلول کلرید پتاسیم ۲ مولار: ۷۴/۶ گرم از کلرید پتاسیم (KCl) را در آب مقطر حل کرده، ۱۰ میلی‌لیتر HCl یک مولار به آن اضافه کرده و در بالن‌ژوژه با آب مقطر به حجم یک لیتر برسانید.

هیدروکسید سدیم ۰/۳ مولار: دوازده گرم از هیدروکسید سدیم (NaOH) را در آب مقطر حل کرده و در بالن‌ژوژه به حجم یک لیتر برسانید.

سالیسیلات سدیم ۱/۰۶ مولار: هفده گرم از سالیسیلات سدیم ($C_7H_5NaO_3$) و ۰/۱۲ گرم نیتروپروسید سدیم ($Na_2[Fe(CN)_5NO]$) را در آب مقطر حل کرده و در بالن‌ژوژه به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید. *این محلول را بلافاصله پیش از استفاده آماده کنید.*

دی‌کلروایزوسیانورات سدیم ۳۹/۱ میلی‌مولار: ۰/۱ گرم از دی‌کلروایزوسیانورات سدیم ($C_3Cl_2N_3NaO_3$) را در آب مقطر حل کرده و در بالن‌ژوژه به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید. *این محلول باید روزانه تهیه شود.*

معرف A : صد میلی‌لیتر از محلول هیدروکسید سدیم ۰/۳ مولار را با ۱۰۰ میلی‌لیتر سالیسیلات سدیم ۱/۰۶ مولار و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط کنید. *این محلول را بلافاصله پیش از استفاده آماده کنید.*

روش آزمون

۱- پنج گرم از نمونه خاک (برای هر نمونه ۳ آزمون و یک شاهد) را وزن کنید.

۲- به هر یک از نمونه‌های آزمون ۲/۵ میلی‌لیتر از سوبسترای اوره و به نمونه‌های شاهد ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کنید.

۳- تمام نمونه‌ها را در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت گرمخانه‌گذاری کنید. پس از گذشت ۲ ساعت، نمونه‌ها را خارج کرده به نمونه‌های آزمون ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و به نمونه‌های کنترل ۲/۵ میلی‌لیتر از سوبسترای اوره اضافه کنید.

۴- به همه نمونه‌ها ۵۰ میلی‌لیتر محلول کلرید پتاسیم (۲ مولار) اضافه کنید و به‌مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر قرار دهید.

۵- نمونه‌ها را صاف کرده و به یک میلی‌لیتر از محلول‌های صاف شده، ۹ میلی‌لیتر آب مقطر، ۵ میلی‌لیتر معرف A و ۲ میلی‌لیتر محلول دی‌کلروایزوسیانورات سدیم (۳۹/۱ میلی‌مولار) اضافه کنید.

۶- لوله‌ها را با ورتکس هم بزنید.

۷- مقدار جذب را پس از نیم ساعت در طول ۶۹۰ نانومتر بخوانید (شکل ۱۰).

۸- مقدار ازت آمونیومی تولیدی را با استفاده از منحنی استاندارد رسم شده با کلرید آمونیوم تعیین کنید.

۹- فعالیت آنزیم اوره‌آز را از رابطه ۱۰ محاسبه و بر حسب $\mu g\ N.\ g^{-1}\ dm.\ 2h^{-1}$ گزارش کنید.

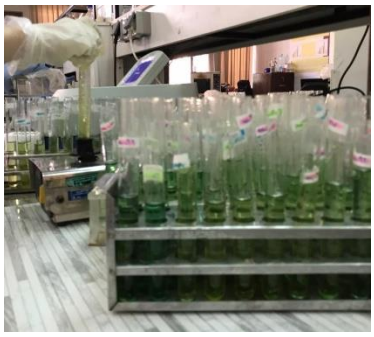
رابطه ۱۰

$$\text{فعالیت آنزیم آوره‌آز} = \frac{(S-C)*10*55100}{5*\%dm}$$

که در آن: S و C میانگین ازت آمونیومی موجود در نمونه‌ها و شاهد، ۱۰-فاکتور رقت برای عصاره، ۵۵-حجم عصاره، ۵ وزن اولیه خاک و $\frac{100}{\%dm}$ فاکتور تبدیل برای خاک خشک است.

اضافه کردن معرف و تشکیل رنگ سبز

هم‌زدن لوله‌ها



خواندن مقدار جذب با اسپکتروفتومتر

شکل ۱۰- مراحل مختلف اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اوره‌آز

محلول‌های استاندارد

محلول استاندارد کلرید آمونیوم $^{-1}$ ml .N-NH^{4+} µg ۱۰۰۰ (اصلی): ۳/۸۲۰۷ گرم کلرید آمونیوم (NH_4Cl) را در آب مقطر حل کرده و در بالن‌ژوژه یک لیتری به حجم برسانید. *این محلول باید در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شود.*

رسم منحنی استاندارد

برای رسم منحنی استاندارد، غلظت‌های مختلف کلرید آمونیوم را طبق جدول ۳ تهیه کنید. به یک میلی‌لیتر از هر یک از استانداردها، ۹ میلی‌لیتر آب مقطر، ۵ میلی‌لیتر معرف A و ۲ میلی‌لیتر محلول دی‌کلروایزوسیانورات سدیم اضافه کنید. محتویات لوله‌ها را ورتکس کنید. پس از گذشت نیم ساعت، مقدار جذب را در طول موج ۶۹۰ نانومتر بخوانید و با استفاده از مقادیر جذب، منحنی استاندارد را رسم کنید.

جدول ۳- مقادیر مورد استفاده در تهیه غلظت‌های مختلف ازت آمونیومی

استاندارد اصلی	کلرید پتاسیم (۲ مولار)	غلظت
۰ ml	۱۰۰ml	۰µg N
۱ ml	۹۹ ml	۱۰µg N
۱/۵ ml	۹۸/۵ ml	۱۵µg N
۲ ml	۹۸ ml	۲۰µg N
۲/۵ ml	۹۷/۵ ml	۲۵µg N

۳- آنزیم‌های موثر در چرخه کربن

عنصر کربن (چهارمین عنصر فراوان)، اصلی‌ترین عنصر زندگی در کره زمین است و در موجودات زنده به شکل‌های مختلف ازجمله مونوساکارید[۲۵] (مانند گلوکز[۲۶])، دی‌ساکارید[۲۷] (مانند مالتوز[۲۸]،

[25] Monosaccharide
[26] Glucose
[27] Disaccharide
[28] Maltose

لاکتوز[۲۹] و ساکارز[۳۰]) و پلی‌ساکارید[۳۱] (مانند سلولز[۳۲]، گزیلان[۳۳] و کیتین[۳۴]) وجود دارد. آنزیم‌های مختلفی در چرخه کربن نقش دارند که می‌توان به سلولاز[۳۵]، گزیلاناز[۳۶]، اینورتاز[۳۷] و کیتیناز[۳۸] اشاره کرد. بتا-گلوکوزیداز[۳۹] یک آنزیم تجزیه‌کننده سلولز است. پیوندهای متعدد بتا-گلوکوزید در گیاهان مرده و در حال تجزیه توسط بتا-گلوکوزیداز هیدرولیز می‌شود. تجزیه سلولز توسط سه آنزیم انجام می‌شود که بتا-گلوکوزیداز، یکی از سه آنزیم مسئول تجزیه سلولز، به عنوان یک شاخص حساس در پایش سلامت خاک است.

آنزیم بتا- گلوکوزیداز

اساس آزمون

پس از اضافه کردن محلول سوبسترای پارا-نیتروفنیل بتا-دی‌گلوکوپیرانوزید، نمونه‌های خاک در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت گرمخانه‌گذاری می‌شوند. پارا-نیتروفنیل آزاد شده در اثر عمل آنزیم بتا- گلوکوزیداز استخراج شده و پس از تشکیل کمپلکس زرد رنگ پارا-نیتروفنلات در اثر واکنش با هیدروکسید سدیم (سود) مقدار آن در ۴۰۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود.

مواد و تجهیزات

نمونه خاک، پارا-نیتروفنیل بتا-دی‌گلوکوپیرانوزید، کلرید کلسیم، هیدروکسید سدیم، تریس (هیدروکسی‌متیل) آمینومتان، اسید مالئیک، اسید سیتریک، اسید بوریک، پارا-نیتروفنل، بطری‌های پلاستیکی ۱۰۰ میلی‌لیتری، شیکر (همزن افقی)، کاغذ صافی، pH متر، انکوباتور، اسپکتروفتومتر.

---

[29] Lactose
[30] Sucrose
[31] Polysaccharide
[32] Cellulose
[33] Xylan
[34] Chitin
[35] Cellulase
[36] Xylanase
[37] Invertase
[38] Chitinase
[39] β-Glucosidase

محلول‌ها

هیدروکسید سدیم ۱ مولار: چهل گرم از هیدروکسید سدیم (NaOH) را در آب مقطر حل کرده و در بالن‌ژوژه به حجم یک لیتر برسانید.

بافر پایه سنجش فعالیت آنزیم بتا- گلوکوزیداز: ۱۲/۱ گرم از تریس (هیدروکسی‌متیل) آمینومتان ($C_4H_{11}NO_3$)، ۱۱/۶ گرم اسید مالئیک ($C_4H_4O_4$)، ۱۴ گرم اسید سیتریک ($C_6H_8O_7$) و ۶/۳ گرم اسید بوریک (H_3BO_3) را در ۵۰۰ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم یک مولار را حل کرده و در بالن‌ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری با آب مقطر به حجم برسانید. *این محلول باید در یخچال نگهداری شود.*

بافر کاری سنجش فعالیت آنزیم بتا- گلوکوزیداز (pH= ۶): ۲۰۰ میلی‌لیتر از محلول بافر پایه را برداشته و به آن ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کنید. pH آن را با استفاده از اسید کلریدریک (۰/۵ مولار) بر روی ۶ تنظیم کرده و در بالن‌ژوژه یک لیتری با آب مقطر به حجم برسانید. *این محلول باید در یخچال نگهداری شود.*

پارا-نیتروفنیل بتا دی‌گلوکوپیرانوزید ۰/۱ مولار: ۳/۰۱ گرم پارا-نیتروفنیل بتا دی‌گلوکوپیرانوزید ($C_{12}H_{15}NO_8$) را وزن کرده و با بافر کاری سنجش فعالیت آنزیم بتا- گلوکوزیداز در بالن‌ژوژه یک لیتری به حجم برسانید. *محلول سوبسترا باید روزانه تهیه شود.*

کلرید کلسیم ۰/۵ مولار: ۳۶/۷۴ گرم از کلرید کلسیم ($CaCl_2.\ 2\ H_2O$) را در آب مقطر حل کرده و در بالن‌ژوژه به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر برسانید.

هیدروکسید سدیم ۰/۵ مولار: بیست گرم از هیدروکسید سدیم (NaOH) را در آب مقطر حل کرده و در بالن‌ژوژه به حجم یک لیتر برسانید.

روش آزمون

۱- یک گرم از نمونه خاک (برای هر نمونه ۲ آزمون و یک شاهد) را وزن کنید.

۲- به هر یک از نمونه‌های آزمون یک میلی‌لیتر از سوبسترای پارا-نیتروفنیل بتا- دی‌گلوکوپیرانوزید (۰/۱ مولار) اضافه نمایید.

۳- به تمام نمونه‌ها (آزمون و شاهد) ۴ میلی‌لیتر از بافر کاری سنجش فعالیت آنزیم بتا-گلوکوزیداز اضافه کنید.

۴- تمام نمونه‌ها (آزمون و شاهد) را در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت گرمخانه‌گذاری کنید.

۵ کلسیم (۰/۵ مولار) اضافه کنید. این ترکیبات باعث پایان فعالیت آنزیم و تشکیل کمپلکس رنگی می‌شود.

۶- به نمونه‌های شاهد یک میلی‌لیتر از محلول سوبسترای پارا-نیتروفنیل بتا- دی‌گلوکوپیرانوزید (۰/۱ مولار) اضافه نمایید.

۷- به همه نمونه‌ها (آزمون و شاهد) ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کرده، هم بزنید و سپس فیلتر کنید.

۸- مقدار جذب (آزمون و شاهد) را در طول موج ۴۰۰ نانومتر بخوانید (شکل ۱۱).

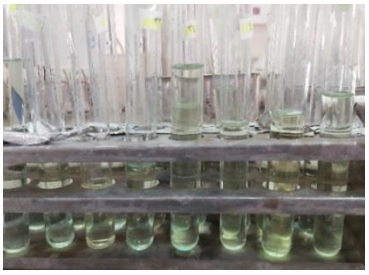
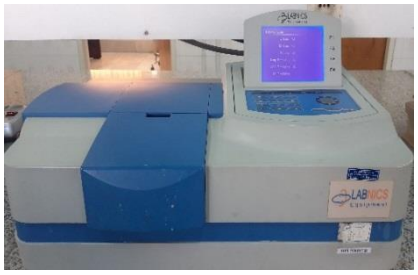
۹- مقدار پارا-نیتروفنل (PNP) تولیدی را با استفاده از منحنی استاندارد رسم شده با پارا-نیتروفنل تعیین کنید.

۱۰- فعالیت آنزیم بتا-گلوکوزیداز را از رابطه ۱۱ محاسبه و بر حسب $\mu g\ PNP.\ g^{-1}\ dm.\ h^{-1}$ گزارش کنید.

رابطه ۱۱

$$\text{فعالیت آنزیم بتا-گلوکوزیداز} = \frac{(S-C)*10*100}{\%dm}$$

که در آن: S و C مقدار پارا- نیتروفنل (PNP) در نمونه‌ها و شاهد، ۱۰ فاکتور رقت برای عصاره، $\frac{100}{\%dm}$ فاکتور تبدیل برای خاک خشک است.

پایان فعالیت آنزیم بتا-گلوکوزیداز　　محلول‌های صاف‌شده　　اندازه‌گیری مقدار جذب در طول موج ۴۰۰ نانومتر

شکل ۱۱- مراحل مختلف اندازه‌گیری فعالیت آنزیم بتا-گلوکوزیداز

محلول‌های استاندارد

محلول استاندارد پارا-نیتروفنل $1\ mg\ PNP.\ ml^{-1}$ (اصلی): یک گرم پارا-نیتروفنل ($C_6H_5NO_3$) را در آب مقطر حل کرده و در بالن‌ژوژه یک لیتری به حجم برسانید. *این محلول باید در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شود.*

محلول استاندارد $20\mu g\ PNP^{-}.ml^{-1}$ (کاری): دو میلی‌لیتر از محلول استاندارد اصلی را برداشته و با آب مقطر در بالن‌ژوژه به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید.

رسم منحنی استاندارد

غلظت‌های مختلف پارا-نیتروفنل (PNP) را طبق جدول ۴ تهیه کنید. به هر یک از استانداردها ۴ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم (۰/۵ مولار) و یک میلی‌لیتر کلرید کلسیم (۰/۵ مولار) اضافه کنید. مقدار جذب را در طول موج ۴۰۰ نانومتر بخوانید و با استفاده از مقادیر جذب، منحنی استاندارد پارا-نیتروفنل (PNP) را رسم کنید.

جدول ۴- مقادیر مورد استفاده در تهیه غلظت‌های مختلف پارا-نیتروفنل

استاندارد کاری	آب مقطر	غلظت
۰ml	۵ml	۰µg PNP
۱ml	۴ml	۲۰µg PNP
۲ml	۳ml	۴۰µg PNP
۳ml	۲ml	۶۰µg PNP
۴ml	۱ml	۸۰µg PNP
۵ml	۰	۱۰۰ µg PNP

۴-آنزیم‌های موثردر چرخه گوگرد

سولفاتازها در معدنی شدن ترکیبات گوگرددار در خاک اهمیت دارند و با هیدرولیز سولفات‌های آلی، گوگرد مورد نیاز گیاهان را تأمین می‌کنند. سولفاتازها عمدتاً منشأ میکروبی دارند و بشکل اگزوآنزیم در خاک یافت می‌شوند. سولفاتازها انواع مختلفی دارند که عبارت است از: آریل‌سولفاتازها[۴۰]، آلکیل‌سولفاتازها[۴۱]، استروئیدسولفاتازها[۴۲]، گلوکزسولفاتازها[۴۳]، کاندروسولفاتازها[۴۴] و مایروسولفاتازها[۴۵]. آریل‌سولفاتازها (EC 3.1.6.1) اولین گروه از آنزیم‌های سولفاتاز شناسایی شده هستند. این آنزیم با عمل بر روی پیوندهای اکسیژن و گوگرد باعث تجزیه استرهای آلی سولفاته به فنل و سولفات می‌شود. عملکرد این آنزیم باعث می‌شود که گوگرد برای گیاهان و میکروارگانیسم‌ها قابل دسترس شود.

آنزیم آریل‌سولفاتاز

اساس آزمون

پس از اضافه کردن محلول سوبسترای پارا-نیتروفنیل سولفات، نمونه‌های خاک در ۳۷ درجه

[40] Arylsulfatase
[41] Alkylsulfatase
[42] Steroidsulfatase
[43] Glucosesukfatase
[44] Chondrosulfatase
[45] Myrosufatase

سانتیگراد به مدت یک ساعت گرمخانه‌گذاری می‌شوند. پارا-نیتروفنیل آزاد شده در اثر عمل آنزیم آریل‌سولفاتاز استخراج شده و پس از تشکیل کمپلکس زرد رنگ در اثر واکنش با هیدروکسید سدیم (سود) مقدار آن در ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود.

مواد و تجهیزات

نمونه خاک، پتاسیم پارا-نیتروفنیل سولفات، هیدروکسید سدیم، استات سدیم، پارا-نیتروفنل، بطری‌های پلاستیکی ۵۰ میلی‌لیتری، کاغذ صافی، pH متر، انکوباتور، اسپکتروفتومتر.

محلول‌ها

بافر استات ۰/۵ مولار (pH= ۵/۸): ۶۴ گرم استات سدیم ($CH_3COONa.\ 3H_2O$) را در ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده، pH آن را با استفاده از اسید استیک خالص ($C_2H_4O_2$) بر روی ۵/۸ تنظیم و در بالن‌ژوژه یک لیتری با آب مقطر به حجم برسانید. *این محلول باید در یخچال نگهداری شود.*

پتاسیم پارا-نیتروفنیل سولفات ۰/۰۲ مولار: ۰/۵۱۵ گرم پتاسیم پارا-نیتروفنیل سولفات ($C_{12}H_{15}NO_8$) را در بافر استات حل کرده و در بالن‌ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری با بافر استات به حجم برسانید. *محلول سوبسترا باید روزانه تهیه شود.*

هیدروکسید سدیم ۰/۵ مولار: بیست گرم از هیدروکسید سدیم (NaOH) را در آب مقطر حل کرده و در بالن‌ژوژه به حجم یک لیتر برسانید.

روش آزمون

۱- یک گرم از نمونه خاک (برای هر نمونه ۳ آزمون و ۲ شاهد) را وزن کنید.

۲- به هر یک از نمونه‌های آزمون یک میلی‌لیتر از سوبسترای پتاسیم پارا-نیتروفنیل سولفات (۰/۰۲ مولار) اضافه کنید.

۳- به تمام نمونه‌ها (آزمون و شاهد) ۴ میلی‌لیتر از بافر استات (۰/۵ مولار، pH= ۵/۸) اضافه کنید.

۴- تمام نمونه‌ها (آزمون و شاهد) را در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت گرمخانه‌گذاری کنید.

۵- پس از گذشت یک ساعت، نمونه‌ها را خارج کرده به آنها (آزمون و شاهد) ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر

اضافه کنید.

۶- به نمونه‌های شاهد، یک میلی‌لیتر از محلول سوبسترای پتاسیم پارا-نیتروفنیل سولفات (۰/۰۲ مولار) اضافه کنید.

۷- هم بزنید و بلاقاصله فیلتر کنید.

۸- شش میلی‌لیتر از عصاره (آزمون و شاهد) را جدا کرده، ۴ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم (۰/۵ مولار) اضافه کنید.

۹- مقدار جذب را در طول موج ۴۲۰ نانومتر بخوانید.

۱۰- مقدار پارا-نیتروفنل (PNP) تولیدی را با استفاده از منحنی استاندارد رسم شده با پارا-نیتروفنل تعیین کنید.

۱۱- فعالیت آنزیم آریل‌سولفاتاز را از طریق رابطه ۱۲ محاسبه و بر حسب $\mu g\ PNP.\ g^{-1}\ dm.\ h^{-1}$ گزارش کنید.

رابطه ۱۲

$$\text{فعالیت آنزیم آریل سولفاتاز} = \frac{(S-C)*30*100}{6*\ \%dm}$$

که در آن: S و C مقدار پارا-نیتروفنل (PNP) در نمونه‌ها و شاهد، ۳۰ حجم عصاره، ۶ حجم عصاره مورد آزمایش و $\frac{100}{\%dm}$ فاکتور تبدیل برای خاک خشک است.

محلول‌های استاندارد

محلول استاندارد پارا-نیتروفنل $1\ mg\ PNP.\ ml^{-1}$ (اصلی): یک گرم پارا-نیتروفنل ($C_6H_5NO_3$) را در آب مقطر حل کرده و در بالن‌ژوژه یک لیتری به حجم برسانید. این محلول باید در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شود.

محلول استاندارد $0/1\ mg\ PNP.ml^{-1}$ (کاری): ده میلی‌لیتر از محلول استاندارد اصلی را برداشته و با آب مقطر در بالن‌ژوژه به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید.

رسم منحنی استاندارد: غلظت‌های مختلف پارا-نیتروفنل (PNP) را طبق جدول ۵ تهیه کنید. به ۴

میلی‌لیتر از هر یک از استانداردها، ۶ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم (۰/۵ مولار) اضافه نمایید. مقدار جذب را در طول موج ۴۲۰ نانومتر بخوانید و با استفاده از مقادیر جذب منحنی پارا-نیتروفنل (PNP) را رسم کنید.

جدول ۵- مقادیر مورد استفاده در تهیه غلظت‌های مختلف پارا-نیتروفنل

استاندارد کاری	آب مقطر	غلظت
۰ml	۳۰ml	۰µg PNP
۱ml	۲۹ml	۲۰µg PNP
۲ml	۲۸ml	۴۰µg PNP
۳ml	۲۷ml	۶۰µg PNP
۴ml	۲۶ml	۸۰µg PNP
۵ml	۲۵	۱۰۰ µg PNP

۵- آنزیم‌های موثر در متابولیسم درون‌سلولی

از آنزیم‌های موثر در متابولیسم درون‌سلولی می‌توان کاتالاز[۴۶] (EC 1.11.1.6) و دهیدروژناز[۴۷] (EC 1.1.1.27) را نام برد. کاتالاز آب‌اکسیژنه تولید شده طی متابولیسم سلولی را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند. از آنجایی‌که تعداد میکروب‌های هوازی به‌ویژه در خاک‌های غیرمتراکم و غیراشباع فراوان است، بنابراین فعالیت کاتالاز را می‌توان به‌عنوان شاخص فعالیت میکروبی درنظر گرفت. دهیدروژنازها جزء آنزیم‌های اکسیدورودکتاز[۴۸] هستند و ترکیبات آلی را با جدا کردن ۲ اتم هیدروژن اکسید می‌کنند. فعالیت دهیدروژناز در خاک نتیجه فعالیت دهیدروژنازهای مختلف است که جزء مهمی از سیستم آنزیمی همه میکروارگانیسم‌ها هستند، بنابراین فعالیت دهیدروژناز به‌عنوان یک شاخص از سیستم‌های احیاء زیستی بوده و از آن به‌عنوان شاخص شدت متابولیسم میکروبی در خاک استفاده می‌شود.

[46] Catalase
[47] Dehydrogenase
[48] Oxidoreductases

آنزیم دهیدروژناز

اساس آزمون

پس از اضافه کردن محلول سوبسترای تری‌فنیل‌تترازولیومکلرید، نمونه‌های خاک در ۲۵ درجه سانتیگراد به‌مدت ۱۶ ساعت گرمخانه‌گذاری می‌شوند. تری‌فنیل‌فورمازان آزاد شده در اثر عمل آنزیم دهیدروژناز با استون استخراج شده و مقدار آن در ۵۴۶ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود.

مواد و تجهیزات

نمونه خاک، تریس‌هیدروکسی متیل آمینومتان، تری‌فنیل‌تترازولیوم کلراید، تری‌فنیل فورمازان، استون خالص، بطری‌های پلاستیکی ۵۰ میلی‌لیتری، کاغذ صافی، pH متر، انکوباتور، اسپکتروفتومتر.

محلول‌ها

بافر تریس ۰/۱ مولار: ۱۲/۱۱ گرم تریس هیدروکسی‌متیل آمینومتان ($C_4H_{11}NO_3$) را در ۶۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده، pH آن را با استفاده از اسید کلریدریک (HCl) براساس اسیدیته خاک مورد مطالعه به‌شرح زیر تنظیم کنید:

الف) pH= ۷/۸ برای خاک‌های اسیدی با pH کمتر از ۶

ب) pH= ۷/۶ برای خاک‌های خنثی با pH ۶ -۷

ج) pH= ۷/۴ برای خاک‌های آهکی با pH بیشتر از ۷

سپس، با آب مقطر به حجم یک لیتر برسانید.

تری‌فنیل‌تترازولیوم کلراید (۰/۱-۲ درصد): غلظت سوبسترا به بافت خاک مورد مطالعه بستگی دارد.

الف) برای خاک‌های شنی با مقدار کمی هوموس و رس (۰/۵-۰/۱٪): حداکثر ۰/۵ گرم از سوبسترای تری فنیل تترازولیوم کلرید (TTC) را برداشته در ۱۰۰ میلی‌لیتر از بافر تریس (pH آن بستگی به اسیدیته خاک مورد مطالعه دارد) حل کنید. *این محلول در ۴ درجه سانتیگراد و تاریکی حداکثر یک هفته قابل نگهداری است.*

ب) برای خاک‌های لومی و هوموسی (۱-۰/۶٪): حداکثر یک گرم از سوبسترای تری فنیل تترازولیوم کلرید (TTC) را برداشته در ۱۰۰ میلی‌لیتر از بافر تریس (pH آن بستگی به اسیدیته خاک مورد مطالعه دارد) حل کنید. *این محلول در ۴ درجه سانتیگراد و تاریکی حداکثر یک هفته قابل نگهداری است.*

ج- برای خاک‌های رسی و هوموسی (۲-۱٪): حداکثر ۲ گرم از سوبسترای تری‌فنیل تترازولیوم کلرید (TTC) را برداشته در ۱۰۰ میلی‌لیتر از بافر تریس (pH آن بستگی به اسیدیته خاک مورد مطالعه دارد) حل کنید. *این محلول در ۴ درجه سانتیگراد و تاریکی حداکثر یک هفته قابل نگهداری است.*

روش آزمون

۱- پنج گرم از نمونه خاک (برای هر نمونه ۳ آزمون و یک شاهد) را وزن کنید.

۲- به هر یک از نمونه‌های آزمون، ۵ میلی‌لیتر از سوبسترای TTC اضافه کنید.

۳ - به شاهد ۵ میلی‌لیتر از بافر تریس اضافه کنید.

۴- همه نمونه‌ها (آزمون و شاهد) را هم بزنید و در ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت گرمخانه‌گذاری کنید.

۵- برای استخراج تری فنیل فورمازان (TPF) حاصل از عمل آنزیم دهیدروژناز به همه نمونه‌ها (آزمون و شاهد) ۲۵ میلی‌لیتر استون اضافه کنید و به‌مدت ۲ ساعت در تاریکی قرار دهید.

۶- محلول‌ها را در اتاق نیمه‌تاریک صاف کنید (شکل ۱۲).

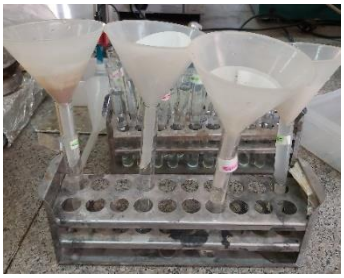
۷- مقدار جذب را در طول موج ۵۴۶ نانومتر بخوانید.

۸- مقدار (TPF) تولیدی را با استفاده از منحنی استاندارد رسم شده با آن تعیین کنید.

۹- فعالیت آنزیم دهیدروژناز را از طریق رابطه ۱۳ محاسبه و بر حسب $\mu g\ TPF.\ g^{-1}\ dm.\ 16\ h^{-1}$ گزارش کنید.

رابطه ۱۳ فعالیت آنزیم دهیدروژناز $= \frac{(S-C)*100}{5*\%dm}$

که در آن: S و C مقدار TPF در نمونه‌ها و شاهد، ۵ وزن اولیه خاک و $\frac{100}{\%dm}$ فاکتور تبدیل برای خاک خشک است.



صاف کردن نمونه‌ها پس از اضافه کردن استون

نمونه‌های آماده برای خوانش جذب در طول ۵۴۶ نانومتر

شکل ۱۲- مراحل مختلف اندازه¬گیری فعالیت آنزیم دهیدروژناز

محلول‌های استاندارد

محلول استاندارد تری‌فنیل فورمازان $^{-1}$ ml .TPF mg۱۰ (اصلی): یک گرم تری‌فنیل فورمازان ($C_6H_5NO_3$) را در استن حل کرده و در بالن‌ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری با استن به حجم برسانید.

محلول استاندارد $^{-1}$.ml^{-}TPF mg ۱ /۰ (کاری): یک میلی‌لیتر از محلول استاندارد اصلی را برداشته و با استن در بالن‌ژوژه به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید.

رسم منحنی استاندارد

غلظت‌های مختلف تری‌فنیل فورمازان (TPF) را طبق جدول ۶ تهیه کنید. مقدار جذب را در طول موج ۵۴۶ نانومتر بخوانید و با استفاده از مقادیر جذب، منحنی استاندارد تری‌فنیل فورمازان را رسم کنید.

جدول ۶- مقادیر مورد استفاده در تهیه غلظت‌های مختلف تری‌فنیل فورمازان (TPF)

استاندارد کاری	استن	غلظت
۰ml	۳۰ml	۰µg TPF
۱ml	۲۹ml	۱۰۰µg TPF
۲ml	۲۸ml	۲۰۰µg TPF
۵ml	۲۵ml	۵۰۰µg TPF
۱۰ml	۲۰ml	۱۰۰۰µg TPF

نتیجه‌گیری کلی و توصیه‌های فنی

تقریباً غیرممکن است که در پایش خاک همه ویژگی‌های زیستی اشاره شده تعیین شود. بنابراین، لازم است یک استاندارد MDS براساس شرایط اختصاصی خاک تبیین شود. این MDSها این امکان را فراهم می‌کنند که چشم‌انداز درست‌تری از ارزیابی و پایش خاک فراهم شود. در خاک واکنش‌های متقابل زیادی وجود دارد که نقش مهمی در ارزیابی خاک دارند. برای شناخت این واکنش‌های متقابل، لازم است که از رویکردهایی جدید مانند متاژنومیکس، متاترنسکیپتومیکس، متاپروتئومیکس و متابولومیکس همراه با ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی استفاده شود. این رویکردها ارزیابی دقیق‌تر و صحیح‌تری از خاک ارائه می‌دهند و به‌علاوه این امکان را فراهم می‌کنند که بدانیم از چه روش‌هایی استفاده کنیم که پایداری و کیفیت خاک مداوم باشد.

انتخاب شاخص مناسب زیستی اولین مرحله در برنامه‌های پایش خاک در سطوح مختلف است. در انتخاب شاخص موارد زیر را مورد توجه قرار دهید:

۱- حداقل باید ۶ تا ۸ شاخص زیستی انتخاب و مورد بررسی قرار گیرند.

۲- همزمان با شاخص‌های زیستی، باید شاخص‌های چشمی[۴۹]، فیزیکی و شیمیایی خاک نیز اندازه‌گیری و ارزیابی شوند.

۳- شاخص‌هایی اولویت دارند که اهمیت و کارکرد اکولوژیک آنها مشخص شده باشد.

۴- شاخص‌هایی انتخاب شوند که در اکوسیستم‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته باشند.

۵- شاخص‌های انتخاب شده باید با عملکرد خاک ارتباط داشته باشند.

۶- اطلاعات به‌دست آمده از اندازه‌گیری شاخص‌ها باید به مدیران یا بهره‌برداران منابع طبیعی در حفظ و یا ارتقای کیفیت خاک کمک کند.

[49] Visual

منابع مورد استفاده

حاج‌عباسی، م. ع.، ا. بسالت‌پور، و.،مللی ا. ۱۳۸۶.اثر تبدیل مراتع به اراضی کشاورزی بر برخی ویژگی‌های فیزیکی وشیمیایی خاک‌های جنوب و جنوب غربی اصفهان. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. ۱۱(۴۲):۵۳۴-۵۲۵.

Alef, K. 1995. Enrichment, isolation, and counting of soil microorganisms:123-191. In: Alef, K. and Nannipieri, P. (Eds.). Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press. United States. 608p.

Berg, P. and Rosswall, T. 1985. Ammonium oxidizer number, potential and actual oxidation rates in two Swedish arable soils. Biology and Fertility of Soils, 1: 131-140.

Brady, N. and Weil, R. 2002. The Nature and Properties of Soils, 13th Edition. Prentice Hall. Upper Saddle River, 960 p.

Eivazi, F. and Tabatabaei, M.A. 1977. Phosphatases in soil. Soil Biology and Biochemistry, 9: 167-172.

Goidts, E., Van Wesemael, B. and Crucifix, M. 2009. Magnitude and sources of uncertainties in soil organic carbon (SOC) stock assessments at various scales. European Journal of Soil Science, 60: 723-739.

Gonzalez-Quiñones, V., Stockdale, E.A., Banning, N.C., Hoyle, F.C., Sawada, Y., Wherrett, A.D., Jones, D.L. and Murphy, D.V. 2011. Soil microbial biomass—Interpretation and consideration for soil monitoring. Australian Journal of Soil Research, 49: 287-304.

Griffith, J.A. 1998. Connecting ecological monitoring and ecological indicators: a review of the literature. Journal of Environmental Systems, 26: 325-363.

Hayano, H. 1973. A method for the determination of βglucosidase activity in soil. Soil Science and Plant Nutrition, 19: 103-108.

Isermeyer, H. 1952. Eine einfache Methode zur Bestimmung der Bodenatmung und der 262 Carbonate im Boden. Z Pflanzenernaehr Bodenkd, 56: 26-38.

Jaggi, W. 1976. Die Bestimmung der COz-Bildung als Mag der bodenbiologischen Aktivitat. 264 Schw Landw Forsch, 371-380.

Jenkinson, D.S. and Ladd, J.N. 1981. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: Paul, E.A. and Ladd, J.N. (Eds.), Soil Biochemistry, vol. 5. Marcel Dekker, New York and Basel, pp. 415-471.

Kandeler, E. and Gerber, H. 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. Biology and Fertility of Soils, 6: 68-72.

Krave, A.S., van Straalen N.M. and van Verseveld, H.W. 2002. Potential nitrification and factors influencing nitrification in pine forest and agricultural soils in Central Java, Indonesia. Pedobiologia, 46: 573-594.

Schinner, F., Öhlinger, R., Kandeler, E. and Margesin, R. 1996. Methods in soil biology. Springer-Verlag, 426p.

Schlichting, E. and Blumer, H.P. 1990. Methods of Soil Analysis, Hamburg, 1994 Schinner, F., and Von Mersi, W., Xylanase, CM-cellulase and invertase activity in soil, as improved method. Soil Biology and Biochemistry, 22: 511-515.

Stone, D., Ritz, K., Griffiths, B.G. and Orgiazzi, A. 2016. Selection of biological indicators appropriate for European soil monitoring. Applied Soil Ecology, 97: 12-22.

Tabatabaei, M.A. and Bremner, J.M. 1970. Arylsulfatase activity in soils. Oil Science Society of America Procceding, 34: 225-229.

Vance, E.D., Brookes. P.C. and Jenkinson, D.S. 1987.An extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil Biology and Biochemistry, 19: 703-707.

Wienhold, B.J., Varvel, G.E. and Doran J.W. 2005. Quality of soil: 349-353. In: Hillel, D. (ed). Encyclopedia of Soils in the Environment, Elsevier, 2219p.

Zewide, I. and Reta, Y. 2021. Review on the role of soil macronutrient (NPK) on the improvement and yield and quality of agronomic crops. Journal of Agriculture and Food Research, 9: 7-11.