

جمهوری اسلامی ایران
سازمان برنامه و بودجه کشور

دستورالعمل تهیه نقشه پراکندگی تنوع زیستی خاک

نشریه شماره ۵....

وزارت جهاد کشاورزی
دفتر امور خاک کشاورزی
swid.maj.ir

معاونت فنی و توسعه امور زیربنایی
امور نظام فنی و اجرایی
Nezamfanni.ir

اصلاح مدارک فنی

خواننده گرامی:

امور نظام فنی و اجرایی سازمان برنامه و بودجه کشور، با استفاده از نظر کارشناسان برجسته مباردت به تهیه این ضابطه نموده و آن را برای استفاده به جامعه 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: تهران، میدان بهارستان، خیابان صفی علی شاه- مرکز تلفن ۳۳۲۷۱
سازمان مدیریت و برنامه ریزی کشور، امور نظام فنی و اجرایی
Email: nezamfanni@mporg.ir web: nezamfanni.ir

دستورالعمل و شرح خدمات نقشه پراکندگی تنوع زیستی خاک [نشریه شماره]

اعضای گروه تهیه کننده:

اعضای گروه نظارت:

اعضای گروه تاییدکننده (کارگروه تخصصی تنوع زیستی خاک):

اعضای گروه هدایت و راهبری (سازمان برنامه و بودجه کشور):

عنوان	صفحه
۱- مقدمه و تعاریف.....	۱۱
۱-۱- مقدمه.....	۱۱
۲-۱- تعاریف.....	۱۱
۱-۲-۱- خاک.....	۱۱
۲-۲-۱- اکوسیستم.....	۱۱
۳-۲-۱- عملکرد خاک.....	۱۲
۴-۲-۱- عملکرد اکوسیستم.....	۱۲
۵-۲-۱- خدمات اکوسیستم.....	۱۲
۶-۲-۱- تنوع زیستی خاک.....	۱۲
۷-۲-۱- باکتری.....	۱۲
۸-۲-۱- سیانوباکتر.....	۱۲
۹-۲-۱- قارچ.....	۱۳
۱۰-۲-۱- هیف‌های قارچ.....	۱۳
۱۱-۲-۱- آنزیم‌های خاک.....	۱۳
۱۲-۲-۱- پوسته‌های خاک.....	۱۳
۱۳-۲-۱- پوسته‌های زیستی.....	۱۳
۱۴-۲-۱- گل‌سنگ.....	۱۴
۳-۱- ضرورت ارزیابی تنوع زیستی خاک.....	۱۴
۴-۱- الزامات قانونی ارزیابی تنوع زیستی خاک.....	۱۵
۲- نمونه‌برداری.....	۱۸
۱-۲- انتخاب محل نمونه‌برداری.....	۱۸
۲-۲- زمان نمونه‌برداری.....	۱۸
۳-۲- روش نمونه‌برداری.....	۱۸
۱-۳-۲- نمونه‌برداری برای ویژگی‌های عمومی خاک، جمعیت نماتدها و آنالیز DNA.....	۱۸
۲-۳-۲- نمونه‌برداری برای جمعیت کرم خاکی و صدپایان.....	۱۹
۳-۳-۲- نمونه‌برداری برای چگالی ظاهری خاک و پایداری خاکدانه.....	۲۰
۴-۳-۲- ارزیابی و نمونه‌برداری پوسته‌های زیستی خاک (جامعه گل‌سنگی و سیانوباکتریایی ویژه عرصه‌های طبیعی - غیرکشاورزی)	۲۰
۱-۴-۳-۲- انتخاب محل پلات‌ها و ترانسکت‌ها.....	۲۰
۲-۴-۳-۲- تعداد ترانسکت.....	۲۱

۲۱	 ۳-۴-۳-۲ طول ترانسکت و فواصل مابین آنها
۲۱	 ۴-۴-۳-۲ تعداد و سطح پلات
۲۲	 ۵-۴-۳-۲ شکل پلات (مربع- دایره- مستطیل)
۲۲	 ۶-۴-۳-۲ حداقل سطح مورد مطالعه الزامی برای ارزیابی پوسته‌های زیستی
۲۲	 ۷-۴-۳-۲ زمان ارزیابی پوسته‌های زیستی
۲۳	 ۸-۴-۳-۲ نمونه‌برداری خاک برای ارزیابی پوسته‌های زیستی
۲۴	 ۴-۲ گزارش اطلاعات تکمیلی
۲۴	 ۱-۴-۲ اطلاعات تکمیلی محل نمونه‌برداری
۲۴	 ۲-۴-۲ اطلاعات تکمیلی جامعه گل‌سنگی و سیانوباکتریایی (ویژه عرصه‌های طبیعی- غیرکشاورزی)
۲۶	 ۵-۲ الزامات نمونه‌برداری
۲۷	 ۵-۲ آماده‌سازی نمونه
۳۰	 ۳- روش‌های اندازه‌گیری
۳۰	 ۱-۳ سطح اولیه مطالعات
۳۰	 ۱-۱-۳ ویژگی‌های فیزیکی
۳۰	 ۱-۱-۳ رطوبت اولیه خاک
۳۱	 ۲-۱-۳ چگالی ظاهری
۳۲	 ۳-۱-۳ بافت خاک
۳۳	 ۴-۱-۳ پایداری خاکدانه
۳۴	 ۲-۱-۳ ویژگی‌های شیمیایی
۳۴	 ۱-۲-۳ واکنش خاک (pH)
۳۶	 ۲-۲-۳ هدایت الکتریکی (EC)
۳۶	 ۳-۲-۳ کربن آلی کل
۳۷	 ۴-۲-۳ کربن آلی ذره‌ای
۳۸	 ۵-۲-۳ نیتروژن کل
۳۹	 ۶-۲-۳ فسفر دردسترس به روش اولسن
۴۱	 ۷-۲-۳ معادل کربنات کلسیم
۴۲	 ۸-۲-۳ ظرفیت تبادل کاتیونی (CEC)
۴۴	 ۹-۲-۳ نسبت جذب سدیم (SAR)
۴۴	 ۱۰-۲-۳ درصد سدیم تبادلی (ESP)
۴۵	 ۳-۱-۳ ویژگی‌های زیستی
۴۵	 ۱-۳-۳ کربن زیست‌توده میکروبی

۴۷	۳-۳-۲- ضریب میکروبی (MBC/OC).....
۴۷	۳-۳-۳- تنفس پایه.....
۴۸	۳-۳-۴- ضریب متابولیکی (BR/MBC).....
۴۹	۳-۳-۵- سرعت برگشت کربن (BR/OC).....
۴۹	۳-۳-۶- تنفس ناشی از سوبسترا.....
۵۰	۳-۳-۷- فراوانی و درصد بلوغ جمعیت کرم خاکی.....
۵۰	۳-۳-۸- جمعیت صدپایان.....
۵۱	۳-۳-۹- جمعیت نماتد.....
۵۲	۳-۳-۴- ویژگی‌های پوسته‌های زیستی.....
۵۲	۳-۴-۱- درصد پوشش سطحی پوسته‌های زیستی.....
۵۲	۳-۴-۲- کلروفیل در نمونه خاک.....
۵۳	۳-۴-۳- مواد آگزوپلی ساکاریدی در نمونه خاک.....
۵۶	۳-۲- سطح دوم مطالعات.....
۵۶	۳-۲-۱- جمعیت باکتری و قارچ.....
۵۹	۳-۲-۲- فعالیت آنزیم اوره‌آز.....
۶۱	۳-۲-۳- فعالیت آنزیم آلکالاین فسفاتاز.....
۶۳	۳-۲-۴- فعالیت آنزیم بتاگلوکوزیداز.....
۶۳	۳-۲-۵- فعالیت آنزیم سلولاز.....
۶۵	۳-۲-۶- فعالیت آنزیم دهیدروژناز.....
۶۷	۳-۲-۷- میانگین هندسی آنزیم‌ها.....
۶۷	۳-۲-۸- شاخص شانون آنزیم‌ها.....
۶۸	۳-۲-۹- فعالیت ویژه آنزیم‌ها.....
۶۸	۳-۲-۱۰- نسبت آنزیم به کربن آلی.....
۶۸	۳-۲-۱۱- ویژگی‌های پوسته‌های زیستی.....
۶۸	۳-۱۱-۱- کشت، جداسازی و خالص‌سازی سیانوباکتری‌ها از خاک.....
۷۰	۳-۱۱-۲- کشت، تکثیر و خالص‌سازی سیانوباکتری از پوسته‌های زیستی.....
۷۰	۳-۱۱-۳- اندازه‌گیری کلروفیل در نمونه‌های سیانوباکتری.....
۷۲	۳-۱۱-۴- اندازه‌گیری مواد آگزوپلی ساکاریدی در سیانوباکتری‌ها.....
۷۳	۳-۳- سطح تکمیلی مطالعات.....
۷۳	۳-۳-۱- بررسی تنوع ژنتیکی باکتری‌های خاک بر اساس متاژنومیکس.....
۷۴	۳-۳-۲- شناسایی سیانوباکتری‌ها بر اساس روش‌های مولکولی.....

۷۹	۴- محاسبه شاخص تنوع زیستی خاک.....
۷۹	۴-۱- نمره‌دهی متغیرها.....
۸۰	۴-۲- تلفیق نمرات و محاسبه شاخص تنوع زیستی خاک.....
۸۲	۵- تهیه نقشه تنوع زیستی خاک.....
۸۲	۵-۱- تهیه بانک اطلاعاتی داده‌ها.....
۸۳	۵-۲- تجزیه و تحلیل آماری، ترسیم نقشه و ثبت سویه‌های جدید میکروبی.....
۸۵	پیوست‌ها.....
۸۵	۱- اندازه‌گیری کلسیم و منیزیم محلول در خاک.....
۸۸	فهرست منابع و مراجع.....
	فهرست واژگان.....
	معرفی سایت امور نظام فنی و اجرایی.....

فهرست شکل‌ها

- شکل ۱-۱- ساختار مطالعات تنوع زیستی خاک..... ۱۶
- شکل ۱-۲- برش عرضی از تال یک گلسنگ..... ۲۶
- شکل ۱-۳- تصویر شماتیک کرم خاکی..... ۵۰
- شکل ۲-۳- تصویر شماتیک صدپایان..... ۵۱
- شکل ۱-۵- نمونه کاربرگ اول برای ثبت داده‌های مطالعات تنوع زیستی خاک در اکسل..... ۸۲
- شکل ۲-۵- نمونه کاربرگ مختص به هر ویژگی اندازه‌گیری شده..... ۸۳

فهرست جدول‌ها

- جدول ۱-۲- طول و فواصل بین ترانسکت‌ها ۲۱
- جدول ۲-۲- حداقل سطح ارزیابی مورد نیاز در مناطق مختلف اکولوژیک با توجه به طول و فواصل بین ترانسکت‌ها ۲۲
- جدول ۳-۲- زمان حدودی مناسب برای نمونه‌برداری در مناطق مختلف اکولوژیک ۲۳
- جدول ۴-۲- نمونه برگه اطلاعات برداشته‌ای میدانی از جامعه سیانوباکتریایی خاک ۲۳
- جدول ۵-۲- برگه اطلاعات تکمیلی نمونه خاک در اراضی کشاورزی ۲۵
- جدول ۱-۳- ضریب تصحیح حرارت ۳۳
- جدول ۲-۳- پرایمرهای ژن 16s rRNA برای شناسایی سیانوباکتری‌های خاکزی ۷۷

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 موجودات از جمله نماتدها و بندپایان را می‌توان یافت (1). خاک یک سیستم پیچیده و ناهمگن است. در این بستر خاکدانه‌های آلی-معدنی در اندازه‌های گوناگون، زیستگاه‌هایی در مقیاس‌های فضایی متعدد ایجاد می‌کنند که در ترکیب با منافذ پر از آب و/یا هوا به تعداد بی‌شماری از گونه‌ها با اندازه و بوم‌شناسی مختلف اجازه سکونت می‌دهند. جانداران خاک بر اساس عرض بدن از ۲۰ نانومتر تا ۲۰ تا ۳۰ سانتی‌متر متغیر هستند (1).

بر اساس اطلس جهانی تنوع زیستی خاک، بیشترین تنوع زیستی در خاک‌های مرطوب 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 (2). 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). هم‌اکنون 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 (3).

۱-۲-۲- اکوسیستم

اکوسیستم شامل تمام موجودات زنده، محیط پیرامون و همه روابط متقابل آنها است. در واقع اکوسیستم به جامعه یا گروهی از موجودات زنده اطلاق می‌شود که در یک محیط مشخص زندگی کرده و در تعامل با یکدیگر هستند (4).

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 (5).

۱-۲-۴- عملکرد اکوسیستم

به شرایط و فرایندهای اکولوژیکی که منجر به تحقق و حفظ زندگی انسان می‌شود، عملکرد اکوسیستم می‌گویند. برخی محققان عملکرد اکوسیستم را معادل خدمات اکوسیستم در نظر می‌گیرند؛ اما در واقع اثرات متقابل و تعاملات پیچیده بین اجزای زیستی (موجودات زنده) و غیرزیستی (محیط پیرامون موجودات زنده) اکوسیستم‌ها که منجر به پدیده‌هایی همچون فتوسنتز، گرده‌افشانی و تجزیه مواد می‌شود، عملکرد اکوسیستم به شمار می‌آید (6).

۱-۲-۵- خدمات اکوسیستم

به مزایا و مشارکت‌های مستقیم و غیرمستقیم اکوسیستم‌ها در تأمین رفاه انسان مانند تولید غذا، تصفیه آب، تنظیم اقلیم، کنترل سیل، چرخه آب و عناصر غذایی، تولید اکسیژن اتمسفر و تشکیل خاک خدمات اکوسیستم اطلاق می‌شود (7).

۱-۲-۶- تنوع زیستی خاک

تنوع زیستی خاک نشاندهنده گوناگونی حیات در زیرزمین است که می‌تواند ظرفیت (پتانسیل) خاک را در کشاورزی پایدار، کاهش اثرات تغییرات اقلیمی، افزایش تاب‌آوری در تنش، اصلاح و پالایش خاک و در تغذیه و داروسازی نشان دهد (8). تنوع زیستی خاک به ژن‌ها تا گونه‌ها و جوامعی که تشکیل می‌دهند، همچنین مجموعه‌های اکولوژیکی آنها از زیستگاه‌های میکرو تا چشم‌اندازهای کوچک اشاره دارد (9).

۱-۲-۷- باکتری

باکتری‌ها جانداران تک‌یاخته‌ای هستند که 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 و دریچه‌های اقیانوسی در اعماق دریا تا جو برف قطب شمال یافت می‌شوند (1).

۱-۲-۸- سیانوباکتر

سیانوباکترها باکتری‌های فتوسنتزکننده هستند که با استفاده از CO₂ اتمسفر 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 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- هیف‌های قارچ

هیف‌های قارچ ساختاری طویل، رشته‌ای و شاخه‌دار هستند که در اغلب قارچ‌ها حالت اصلی رشد رویشی محسوب می‌شوند (1).

۱-۲-۱۱- آنزیم‌های خاک

آنزیم‌های خاک در فرایندهای بیوشیمیایی خاک نقش فعال دارند، به متابولیسم در خاک سرعت می‌بخشند و نقش مهمی در جریان انرژی خاک ایفا می‌کنند. از عوامل کلیدی چرخه عناصر از جمله کربن، نیتروژن و فسفر هستند و میزان فعالیت آنها، شرایط سلامت خاک را منعکس می‌کند (10).

۱-۲-۱۲- پوسته‌های خاک

مرزهای اکولوژیکی که جریان مواد و انرژی در فضای بین اتمسفر 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 نیمه‌خشک، که بیش از ۴۰٪ سطح خشکی‌های جهان را شامل می‌شوند، پوسته‌های 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، جلبک، قارچ، گل‌سنگ‌ها و بروفیت‌ها در نسبت‌های مختلف هستند که روی سطح خاک یا در داخل چند میلی‌متر 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).

¹ Hyphae

² Bryophytes

۱-۲-۱۴- گلسنگ

اجتماع متقابل مشخص بین یک جلبک سبز یا سیانوباکتر به عنوان همزیست فتوسنتزی و یک قارچ به عنوان یک همزیست قارچی می‌باشد. انجمن بین المللی گلسنگ‌شناسی در سال ۱۸۹۲ گلسنگ را چنین تعریف کرده است: "ارتباط و معاشرت قارچ و یک همزیست فتوسنتزی که منجر به تشکیل تالی پایدار با ساختار ویژه گردد". توجه داشته باشید که هر جلبک با هر قارچ نمی‌تواند تشکیل گلسنگ بدهد.

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 پاتوژن‌ها 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. تلفات 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 اکولوژیک بیابان‌ها و بوته‌زارهای خشک، علفزارهای گرمسیری و نیمه گرمسیری و جنگل‌های پهن‌برگ و معتدل و مختلط بیشترین عوامل خطر وجود دارد (9).

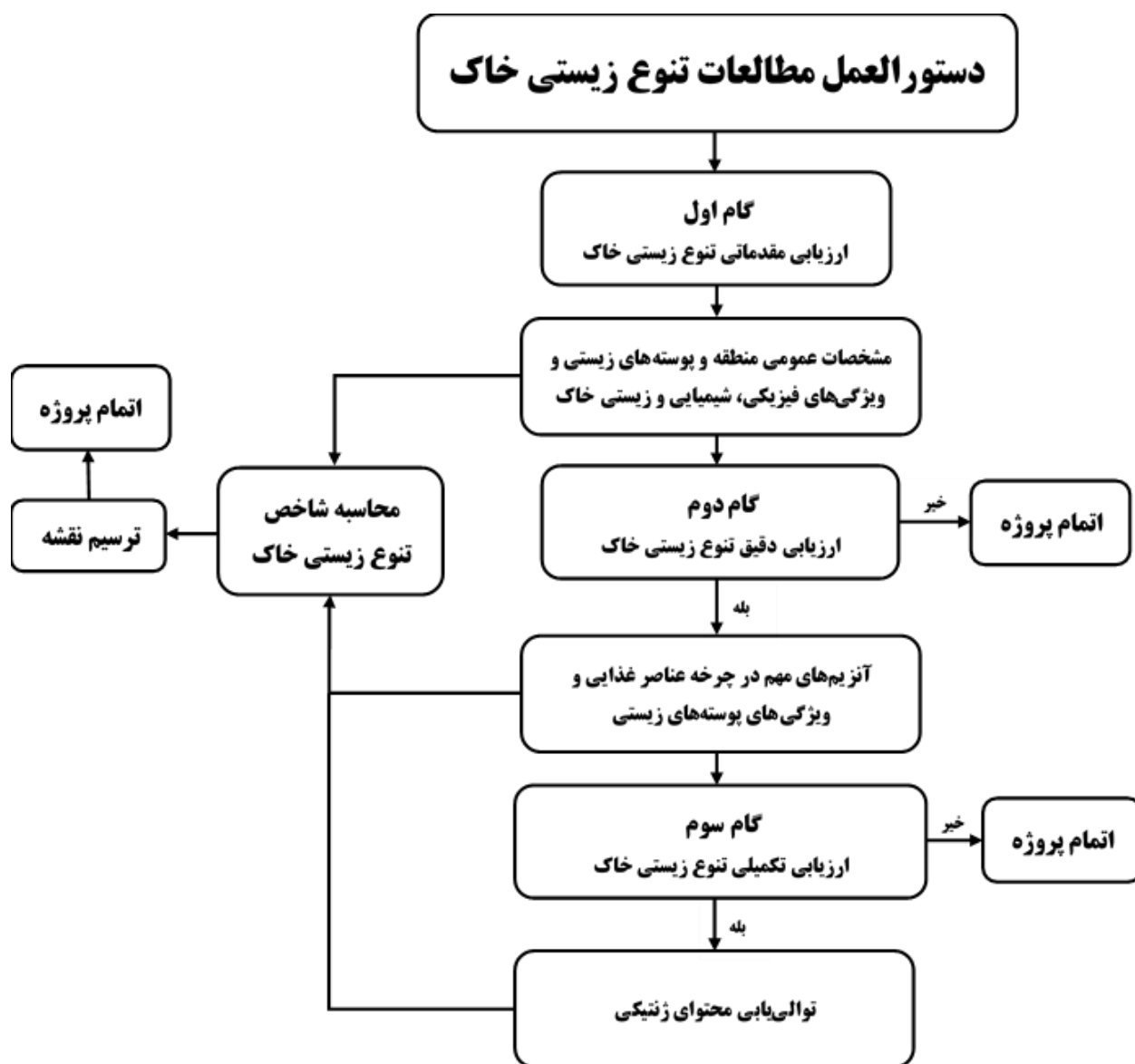
جنگل‌زدایی، توسعه شهرنشینی، تشدید کشاورزی، از دست دادن مواد آلی/کربن خاک، فشرده‌سازی خاک، سله‌بندی، اسیدی شدن خاک، عدم تعادل عناصر غذایی، آلودگی، شوری، سدیمی شدن، بیابان‌زایی، آتش‌سوزی، فرسایش و رانش زمین از مهم‌ترین عواملی است که تنوع زیستی خاک را در معرض خطر قرار داده است. شایع‌ترین خطر برای تنوع زیستی خاک در دنیا هدررفت مواد آلی خاک است که این عامل در ارتباط با سایر خطرات مانند جنگل‌زدایی، تشدید کشاورزی (هر دو مرتبط با تغییر کاربری اراضی) و تغییر اقلیم (به ویژه در مناطق توندرا) می‌باشد. عوامل خطر برای تنوع زیستی خاک نه تنها همزمان رخ می‌دهند، بلکه ممکن است اثرات جمع‌پذیر، متقابل و یا افزایشی بر هم داشته باشند (9).

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 (9).

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 بایستی ترسیم شده و برنامه مدیریت و حفاظت از آن تدوین و ارایه شود (8). 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 (8) 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

۲- نمونه‌برداری

نمونه‌برداری صحیح و آماده‌سازی نمونه مهم‌ترین مرحله هر مطالعه علمی است، به طوری که بهترین تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی نمی‌تواند این ضعف را جبران کند (13). در واقع کار دقیق آزمایشگاهی نمونه‌های خاک و آب به این معنی است که تغییرپذیری عمده در تعیین داده‌ها و نتایج، ناشی از تغییرپذیری نمونه است. بنابراین نمونه‌برداری متغیر محدودکننده دقت بوده (14) و در افزایش صحت نتایج میزان تنوع زیستی خاک نقش بسزایی دارد.

۲-۱- انتخاب محل نمونه‌برداری

مطالعات تنوع زیستی خاک و ترسیم نقشه آن در کشور ما در پایگاه‌های مطالعاتی پایش کیفیت خاک (بنچ مارک‌ها) اجرا خواهد شد.

۲-۲- زمان نمونه‌برداری

زمان دقیق نمونه‌برداری به شرایط محیطی منطقه وابسته است. هوای گرم و خشک شرایط نامساعدی برای نمونه‌برداری نماتدها و حتی کرم‌های خاکی ایجاد می‌کند (15). بنابراین بهتر است نمونه‌برداری مطالعات تنوع زیستی خاک در دما و رطوبتی مشابه با فصل بهار انجام شود. در اقلیم‌های مختلف کشور، چنین شرایطی از اواسط زمستان تا اواسط بهار فراهم خواهد شد. در نتیجه تعیین زمان مطلوب نمونه‌برداری مطالعات تنوع زیستی خاک به اقلیم منطقه مورد مطالعه بستگی دارد. بر اساس شرایط آب و هوایی منطقه مورد مطالعه، زمان نمونه‌برداری را در بازه بهمن تا اردیبهشت ماه انتخاب کنید. برای محدود کردن هر چه بیشتر اثرات فصلی و زمانی، همه نمونه‌ها در کوتاه‌ترین بازه زمانی ممکن جمع‌آوری 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، نمونه‌برداری انجام شود (15).

۲-۳- روش نمونه‌برداری

۲-۳-۱- نمونه‌برداری برای ویژگی‌های عمومی خاک، جمعیت نماتدها و آنالیز DNA

در محل نمونه‌برداری یک قطعه ۱۸×۱۸ مترمربع نسبتاً همگن و منعکس‌کننده 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) نمونه‌برداری انجام شود. بنابراین در هر قطعه ۹ زیرنمونه در عمق صفر تا ۲۰ سانتی‌متر

جمع آوری و یک نمونه مرکب به اندازه حداقل ۱/۵ تا ۲ کیلوگرم وزن (نهایتاً ۵ کیلوگرم) باید برای ارزیابی خصوصیات خاک 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 آنالیز 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 و صدپایان

در مرکز قطعه نمونه برداری (زیربخش ۲-۲-۱) 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، خرخاکی و صدپایان 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 جانوران 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 برچسب 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. همچنین جمعیت صدپایان بایستی شمارش شود. 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.

۲-۳-۳- نمونه برداری برای چگالی ظاهری خاک و پایداری خاکدانه

در رئوس قطعه نمونه برداری (زیربخش ۲-۲-۱) برای تهیه نمونه دست نخورده اقدام کنید. برای چگالی ظاهری، به کمک بیلچه یا اسپاتول سطح زمین را صاف کرده و سیلندر فلزی را کاملاً در خاک فرو کنید، به طوری که تا یک سانتی متری زیر سطح زمین قرار گیرد. این کار نباید سبب فشرده شدن خاک شود. بهتر است برای آنکه لبه های سیلندر آسیب نبیند، روی آن یک تخته مسطح قرار داده و فشار را به تخته وارد کنید. سیلندر را با احتیاط از داخل زمین به کمک بیلچه یا اسپاتول خارج کنید، به گونه ای که خاکی از داخل سیلندر ریزش نکند. خاک های اضافی را به کمک چاقو از بالا و پایین سیلندر حذف کنید تا سطح آن صاف شود. اگر می خواهید خاک را درون حلقه حمل کنید، دو طرف حلقه را با لایه پارچه ای ببندید و به داخل کیسه پلاستیکی منتقل کنید. اگر قرار است از یک حلقه برای چندین نمونه استفاده کنید، خاک یک حلقه را به کیسه پلاستیکی منتقل کرده و کدگذاری کنید (15).

برای پایداری خاکدانه، به کمک بیلچه نمونه برداری را انجام دهید. بدین منظور در نقاط فوق الذکر با بیلچه نمونه خاک را به آرامی از سطح زمین تا عمق ۲۰ سانتی متری برداشت کرده و با کمترین فشار و آسیب به خاکدانه ها به ظروف پلاستیکی در بسته منتقل کنید (17).

ملاحظات

۱- از نمونه برداری از خاک بسیار مرطوب یا بسیار خشک باید خودداری شود. در صورت مساعد نبودن شرایط، توصیه می شود نمونه برداری چند روز به تعویق بیفتد. همچنین در کیسه های نمونه خاک به اندازه کافی محکم باید تا در حین حمل و نقل از ریختن خاک و حتی انتقال خاک به کیسه دیگر جلوگیری شود (15).

۲- روش سیلندر برای خاک های سست و شنی قابل کاربرد نیست. لبه سیلندر نیز باید نازک و تیز باشد تا در طول نمونه برداری از فشرده شدن خاک جلوگیری شود (15).

۳- نمونه برداری در شرایط رطوبتی ظرفیت مزرعه باید انجام شود (18).

۲-۳-۴- ارزیابی و نمونه برداری پوسته های زیستی خاک (جامعه گل سنجی و سیانوباکتریایی ویژه عرصه های طبیعی - غیر کشاورزی)

۲-۳-۴-۱- 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 پلات‌ها به صورت سیستماتیک خواهد بود. همه ترانسکت‌ها 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 می‌شوند لذا آمار هر ترانسکت بیانگر اختلافات ارتفاعی دامنه‌ها نیز خواهد بود.

۲-۳-۴-۲- تعداد ترانسکت

برای مناطق مرطوب و آلی (به دلیل یکنواخت‌تر بودن جوامع پوسته‌های زیستی و خاک) تعداد حداقل ۳ عدد ترانسکت و برای سایر مناطق حداقل برابر ۴ عدد ترانسکت می‌باشد.

۲-۳-۴-۳- طول ترانسکت و فواصل مابین آنها

طول و فواصل بین ترانسکت‌ها بر اساس موارد مندرج در جدول ۱-۲ می‌باشد. هر چه جامعه پوسته‌های زیستی از یکنواختی بیشتری برخوردار باشد، طول و فاصله بین ترانسکت‌ها کمتر در نظر گرفته خواهد شد و برعکس.

جدول ۱-۲- طول و فواصل بین ترانسکت‌ها

منطقه اکولوژیک	طول ترانسکت	فواصل بین ترانسکت‌ها
مرطوب و نیمه مرطوب	۵۰ تا ۱۰۰ متر	۵۰ تا ۱۰۰ متر
آلی و کوه‌های 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

۲-۳-۴-۴- تعداد و سطح پلات

- منطقه مرطوب و نیمه مرطوب: ۳۰ عدد پلات ۰/۵ در ۰/۵ (چمنزارها و علفزارهای پیوسته و انبوه) تا ۱ در ۱ (تیپ گیاهان بالشتکی و گندمیان پایا و یا تیپ گندمیان پایا و بوته) ۴۰ پلات

- منطقه آلی و کوه‌های مرتفع: ۳۰ عدد پلات ۰/۵ در ۰/۵ (چمنزارهای انبوه) تا ۲ در ۱ (بقیه مراتع آلی) ۴۰ پلات

- 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 پوسته های زیستی) ۱۲۰ پلات

- منطقه عمانی و بلوچی: ۴۰ عدد پلات ۲ در ۲ (مناطق با غالبیت پوشش پوسته های زیستی سیانوباکتریایی) تا ۳ در ۳ (مناطق با پوشش غالب پوسته های زیستی سیانوباکتری و خزّه) و همچنین ۸۰ پلات (بسته به غالبیت پوشش پوسته های زیستی سیانوباکتری، خزّه و گل سنگ)

۲-۳-۴-۵- شکل پلات (مربع - دایره - مستطیل)

در مراتع مناطق مرطوب، آلی و نیمه استپی غالباً به شکل مربع و در سایر نقاط به شکل مربع یا مستطیل بسته به ابعاد پلات می باشد.

۲-۳-۴-۶- حداقل سطح مورد مطالعه الزامی برای ارزیابی پوسته های زیستی

حداقل سطحی که برای ارزیابی پوسته های زیستی بایستی مورد بررسی قرار بگیرد، در مناطق اکولوژیک مختلف متفاوت می باشد. در جدول ۲-۲ حداقل سطح مورد نیاز برای بررسی پوسته های زیستی یک منطقه آورده شده است.

جدول ۲-۲- حداقل سطح ارزیابی مورد نیاز در مناطق مختلف اکولوژیک با توجه به طول و فواصل بین ترانسکت ها

منطقه اکولوژیک	حداقل سطح ارزیابی	توضیحات
مرطوب و نیمه مرطوب	۴ تا ۸ هکتار	بسته به طول و فواصل ترانسکت ها و بر اساس جامعه پوسته های زیستی
آلی و کوه های مرتفع	۲ تا ۳ هکتار	بسته به طول و فواصل ترانسکت ها و بر اساس جامعه پوسته های زیستی
نیمه استپی	۵ تا ۶ هکتار	بسته به طول و فواصل ترانسکت ها و بر اساس جامعه پوسته های 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

۲-۳-۴-۷- 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 اکولوژیک، 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 اکولوژیک برای نمونه برداری آورده شده است.

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

منطقه اکولوژیک	زمان مناسب برای نمونه برداری
مرطوب و نیمه مرطوب	اوایل خرداد تا اوایل تیر ماه
آلپی و 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

جدول ۲-۳-۴- 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، آلپی 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:	سطح پوشش:	
اثر تخریب:	اثر چرای دام:	اثر آتش 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.

۴-۲- گزارش اطلاعات تکمیلی

۴-۲-۱- 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 چشم انداز (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.

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

به منظور جمع آوری دقیق اطلاعات و ارزیابی پوسته های زیستی اشکال رویش گلشنگ ها 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 را بوجود 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 معمولا 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 فتوبیونت: زیر کورتکس گلشنگ ها، لایه سبز رنگی وجود دارد که از سلول های فتوبیونت (جلبک سبز و سیانوباکتری) تشکیل شده است. این سلول ها در شبکه ای از هیف های قارچی به دام افتاده اند. فتوبیونت می توانند تک سلولی یا رشته ای باشد.

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

⁵ thallus

ت- کورتکس تحتانی: در بیشتر گلسنگ ها سطح زیرین توسط کورتکس تحتانی محافظت می شود و ساختار آن بسیار شبیه کورتکس بالایی است. در برخی از گلسنگ ها 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 (19).

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

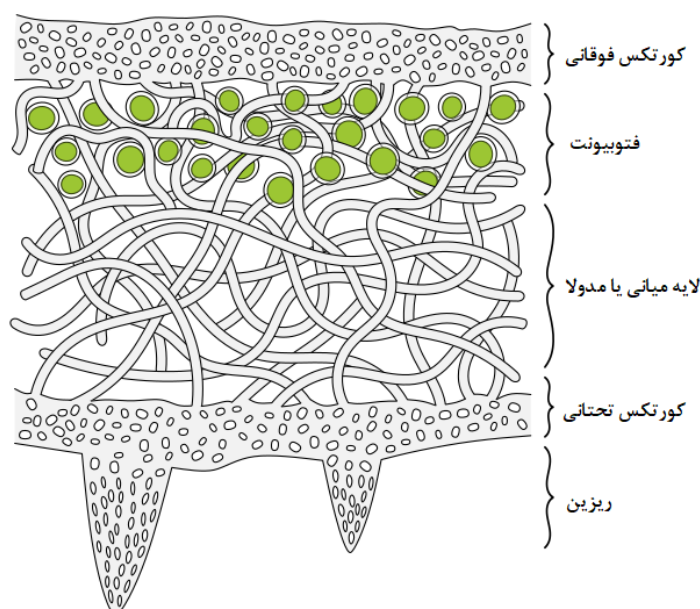
برگه اطلاعات نمونه برداری خاک برای ارزیابی تنوع زیستی			
ویژگی های عمومی	شرح	ویژگی های عمومی	شرح
نام نمونه بردار		کد نمونه	
شهر و استان		تعداد زیر نمونه	
تلفن		X:	
تاریخ نمونه برداری		Y:	
عمق نمونه برداری		سطح مورد نمونه برداری	
شرایط آب هوایی	آفتابی ☐ ابری ☐ بارانی ☐ وزش باد شدید ☐	بافت خاک	درشت ☐ متوسط ☐ ریز ☐
دمای هوا	۱۰- ☐ ۲۰-۱۰ ☐ ۳۰-۲۰ ☐ ۳۰-۳۰ ☐ >۳۰ ☐	رطوبت خاک	خیس ☐ مرطوب ☐ خشک ☐
درجه و جهت شیب		نوع کاربری	کشاورزی ☐ جنگل ☐ مرتع ☐ باير ☐
اراضی زراعی		اراضی غیرزراعی	
نوع کشت	آبی ☐ دیم ☐	پوشش گیاهی غالب	
سیستم مدیریت کشاورزی	سنتی ☐ کم خا کورزی ☐ 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:			

براساس مورفولوژی یا همان شکل رویشی، گلسنگ ها در پنج گروه پوسته ای، پولکی یا فلسی، برگی، بوته ای و ژلاتینی طبقه بندی می شوند:

الف) گلسنگ پوسته ای: گلسنگ های پوسته ای کورتکس تحتانی نداشته بلکه توسط هیف های لایه مدولا به سختی و به گونه ای غیر قابل تفکیک به خاک، صخره یا پوست درختان چسبیده اند. میسلیوم آن ها نیز به صورت رشته های بسیار نازکی روی بستر انتشار می یابند.

ب) گلسنگ برگی: این گلسنگ ها برگ مانند بوده و دارای سطح فوقانی و تحتانی کاملاً مشخص هستند. اغلب تال های برگی صاف بوده و تقریباً همه سطح زیرین تال در تماس با بستر است اما میزان چسبندگی تال به بستر بسیار متغیر است.

- ج) گلسنگ پولکی یا فلسی: گلسنگ های پولکی از نظر ظاهر حد واسط بین فرم های رویشی برگی و پوسته ای هستند. آنها از چند تا صدها پولک تقریباً کوچک با قطر به طور معمول ۱ تا ۱۵ میلی متر تشکیل شده اند که توسط سطح زیرین و یا از طریق یک لبه مثل پلاک های کوچک به بستر اتصال دارند.
- د) گلسنگ بوته ای: تال این گلسنگ انبوه، بوته مانند و مو مانند است. این گلسنگ ها دارای تال منشعب هستند و تال معمولاً از سطح بستر برجسته است و ممکن است به طور عمود بر بستر یا به طور آویزان قرار گرفته باشند.
- ه) گلسنگ ژلاتینی: این گلسنگ ها دارای ساختار تک سلولی از ریسمان های قارچی درهم پیچیده با جلبک های پراکنده در بین آنها هستند و بافتی ژله مانند دارند و معمولاً سیاه رنگ هستند و وقتی که خیس می شود چندین برابر خود متورم خواهند شد (19).



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 برچسب ها باید کد محل، کد نمونه و زیرنمونه، تاریخ نمونه برداری، مختصات، مسئول نمونه برداری و نام آزمایشگاه مرجع ذکر شوند.
- ۴- بایستی نمونه های مرطوب تا زمان رسیدن به آزمایشگاه در جعبه های خنک نگهداری شوند. بنابراین با توجه به میزان نمونه برداری، جعبه خنک با فضای لازم تعبیه شود (13).

۵- تهیه عکس از کرم های خاکی، محل نمونه برداری، فضای اطراف سایت ضروری است. چرا که مستندسازی کامل رویه های جمع آوری، سبب تضمین حفظ ارزش نمونه می شود (20).

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 ۷۰ درصد ضد عفونی کنید تا از انتقال ریز جانداران از یک نمونه خاک به نمونه دیگر جلوگیری شود (15).

۷- شرایط مساعد رطوبتی خاک برای نمونه برداری، پس از خروج آب ثقیلی از پروفیل خاک رخ می دهد. بنابراین از نمونه برداری از خاک های غرقاب و بسیار خیس خودداری کرده و نمونه برداری را تا رسیدن به شرایط مطلوب به تعویق بیندازید. خاک هایی مانند خاک های کنار رودخانه ها و اراضی باتلاقی که غرقاب بودن ویژگی ذاتی آنها به شمار می رود در این مورد استثناء هستند.

۲-۵- آماده سازی نمونه

نمونه های دست نخورده باید با کمترین آسیب به آزمایشگاه منتقل شوند. در مورد نمونه های مرکب، در بدو ورود به آزمایشگاه زیر نمونه های 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 اندازه گیری ویژگی های زیستی و جمعیت نماتدها، بخشی از 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 میلی لیتری را پر کرده (یک تا دو سانتی متر فضای بالای لوله خالی باشد) و فوراً در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد تا پیش از توالی یابی منجمد کنید (16). نمونه های ذوب شده برای استخراج DNA مناسب نیستند (20).

قسمتی از نمونه مرکب را برای اندازه گیری ویژگی های شیمیایی و فیزیکی و همچنین بایگانی خاک جدا کرده و هوا خشک کنید. بدین منظور نمونه را در لایه های نازکتر از ۱۵ میلی متر روی سطح عاری از آلودگی پهن کنید. کلوخه های درشت را با دست، چکش چوبی و یا هاون متلاشی کنید تا سریع تر خشک شده و پس از خشک شدن راحت تر خرد شوند. نمونه ها را از نور مستقیم خورشید دور نگه داشته و این وضعیت را تا زمانی که اختلاف وزن ناشی از تبخیر رطوبت در مدت ۲۴ ساعت کمتر از ۵ درصد باشد ادامه دهید. معمولاً ۴۸ ساعت زمان مناسبی است. برای تسریع در عملیات خشک شدن، می توان نمونه پهن شده را در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار داد. پس از هوا خشک کردن خاک، کلوخه ها را تارسیدن به ذرات مجرا خرد کنید. ذرات ریز چسبیده به سنگ ها را حتی المقدور جدا کنید. سنگ ها، قطعات شیشه، ریشه گیاهان و ... با دست یا الک از خاک حذف کنید. خاک به دست آمده را روی الک ۲ میلی متر ریخته و الک کنید. کلوخه های باقی مانده روی الک را مجدداً خرد کرده و الک کنید. برای جدا کردن قسمتی از نمونه خاک آماده شده برای اندازه گیری ویژگی های فیزیکی و شیمیایی،

نمونه را روی سطح صاف پهن کرده و به چهار قسمت مساوی تقسیم کنید. دو بخش قطری را انتخاب و مخلوط کنید (21).
همچنین حداقل ۲۰۰ گرم خاک هواخشک در ظرف‌های پلی اتیلن برای بایگانی کنار بگذارید (20).

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 فیزیکی، شیمیایی و زیستی مورد نیاز برای دستیابی به این تحلیل کلی از تنوع زیستی خاک می‌پردازیم.

۳-۱-۱- ویژگی‌های فیزیکی

۳-۱-۱-۳- رطوبت اولیه خاک

خصوصیات خاک معمولاً بر مبنای خاک خشک بیان می‌شود. خاک خشک خاکی است که جرم آن در دمای بین ۱۰۰ تا ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به حالت ثابت رسیده باشد. بنابراین برای تصحیح نتایج بسیاری از خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک بایستی میزان رطوبت خاک اندازه‌گیری شود. برای تعیین مقدار رطوبت خاک، کافی است که نمونه خاک قبل و بعد از خشک کردن در آن وزن شود. نکته مهم در اینجا حفظ مقدار رطوبت خاک از نمونه‌برداری تا رسیدن به آزمایشگاه و زمان اندازه‌گیری است. بدین منظور ضروری است که نمونه‌ها در ظرف پلاستیکی کاملاً غیرقابل نفوذ و در یخچال نگهداری شوند. برای اندازه‌گیری رطوبت خاک به روش وزنی، خاک مرطوب را روی سطح غیرجاذب رطوبت ریخته و به خوبی مخلوط نمایید. سنگ‌ها، شاخه‌های کوچک و سایر اجزای بزرگتر از ۲ میلی‌متر را از خاک جدا کنید. قوطی فلزی دربدار با حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر را شسته و در آن با دمای 5 ± 10.5 سانتی‌گراد کاملاً خشک کنید. پس از خنک شدن ظرف، آن را همراه با درب با دقت $0.1/0$ گرم وزن نمایید (m_0). با استفاده از قاشقک (اسپاتول) ۴۰ گرم خاک مرطوب را در قوطی ریخته و پس از گذاشتن درب، آن را با دقت فوق‌الذکر وزن کنید (m_1). درب ظرف را برداشته و آن را همراه با ظرف در آن با دمای 5 ± 10.5 سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت قرار دهید تا به وزن ثابت برسد. پس از آن، درب ظروف را گذاشته و نمونه‌ها را به مدت ۴۵ دقیقه در دسیکاتور حاوی سولفات کلسیم بی‌آب یا جاذب‌الرطوبه مشابه نگه دارید تا به دمای محیط برسند. سپس آنها را با دقت $0.1/0$ گرم وزن کنید (m_2). با کمک رابطه زیر درصد رطوبت وزنی خاک (W_{H_2O}) محاسبه می‌شود:

$$W_{H_2O} = \frac{m_1 - m_2}{m_2 - m_0} \times 100 \quad \text{رابطه (۳-۱)}$$

m_0 جرم قوطی خالی به همراه درب بر حسب گرم

m_1 جرم قوطی و خاک مرطوب به همراه درب بر حسب گرم

m_2 جرم قوطی و خاک خشک شده در آون به همراه درب بر حسب گرم

ملاحظات

۱- نمونه خاک ممکن است پس از اتمام زمان گرمادهی و در حین انتقال به دسیکاتور مجدداً از محیط رطوبت جذب کند. ضمن اینکه پس از وزن خاک و انتقال آن به آون ممکن است تأخیر نسبتاً کوتاهی رخ دهد و سبب از دست رفتن بخشی از رطوبت خاک شود. بنابراین استفاده از درب قوطی فلزی برای کاهش جذب رطوبت محیط و به حداقل رساندن خطای آزمایشی الزامی است.

۲- اندازه‌گیری رطوبت خاک باید در کوتاهترین زمان ممکن پس از نمونه‌برداری انجام شده و در حین فرایند اندازه‌گیری کمترین تأخیر وجود داشته باشد.

۳- نمونه‌های خاک آون خشک شده پس از سرد شدن در دسیکاتور حداکثر ۳۰ دقیقه می‌توانند در محیط نگهداری شوند.

۴- از تجزیه مواد آلی به هنگام خشک کردن نمونه در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد می‌توان صرف نظر نمود. اما در مورد خاک‌های با مواد آلی زیاد (بیش از ۱۰ درصد وزنی) مانند پیت، بهتر است نمونه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شود. استفاده از خلاء سرعت این عملیات را بیشتر می‌کند.

۵- گچ در دمای ۱۰۵ سانتی‌گراد بخش اعظم مولکول‌های آب کریستالی خود را از دست می‌دهد. اگر مقدار گچ خاک بیش از یک درصد بود، میزان رطوبت وزنی خاک باید بر اساس وزن آب کریستالی تصحیح شود. درصد رطوبت خاک تصحیح شده (W_C) به صورت زیر محاسبه می‌شود (14,22):

$$W_C = \frac{W_{H_2O} - (Gypsum \times 0.1942)}{1 + (Gypsum \times 0.1942)} \quad \text{رابطه (۲-۳)}$$

W_{H_2O} درصد رطوبت وزنی خاک

Gypsum درصد گچ اصلاح نشده

۳-۱-۱-۲-۲ چگالی ظاهری

طبق زیربخش ۲-۲-۴ نمونه دست نخورده را تهیه کرده و به آزمایشگاه منتقل کنید. سیلندر و نمونه خاک دست نخورده را در آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار دهید تا خشک شوند و به مدت ۴۵ دقیقه در دسیکاتور حاوی سولفات کلسیم بی‌آب یا جاذب الرطوبه مشابه نگه دارید تا به دمای محیط برسند. وزن سیلندر و خاک و همچنین سیلندر را به دست بیاورید. به کمک کولیس قطر داخلی و ارتفاع سیلندر را اندازه‌گیری کرده و حجم سیلندر (استوانه) را محاسبه کنید. با رابطه زیر چگالی ظاهری در شرایط آون خشک (ρ_{bd}) به دست می‌آید:

$$\rho_{bd} = \frac{(m_d - m_0)}{V} \quad \text{رابطه (۳-۳)}$$

m_d وزن سیلندر به همراه خاک آون خشک

m_0 وزن سیلندر خالی

V حجم داخل سیلندر

ملاحظات

۱- اگر هنگام نمونه‌برداری از یک سیلندر استفاده کرده و نمونه‌های خاک را به کیسه‌های پلاستیکی منتقل کرده‌اید، با دقت تمام خاک را به قوطی فلزی به منظور آون خشک شدن منتقل کنید. توجه داشته باشید که از دست رفتن مقادیر اندک خاک هم در چگالی ظاهری به دست آمده خطا ایجاد می‌کند (23).

۳-۱-۱-۳- بافت خاک

تراکم سوسپانسیون خاک در یک عمق معین با ته نشین شدن ذرات خاک کاهش می‌یابد و مقدار آن در عمق‌های مختلف بستگی به قطر ذرات خاک دارد. در این روش ذرات خاک با هگزامتافسفات سدیم از هم جدا شده و تراکم ذرات با هیدرومتر اندازه‌گیری می‌شود. اگر خاک حاوی مقدار زیادی مواد آلی و آهک باشد، باید این مواد را طبق روش‌های استاندارد مانند روش پی‌پت از خاک حذف نمود. در روش پیش‌رو، ذرات سیلت در دو اندازه مختلف گزارش می‌شوند. در ابتدا دو ماده هگزامتافسفات سدیم و کربنات سدیم را به مدت یک شبانه روز در آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا خشک شوند. ۴۰ گرم هگزامتافسفات سدیم و ۱۰ گرم کربنات سدیم را در آب حل کنید و در یک بالن ژوژه یک لیتری به حجم برسانید. سپس ۵۰ گرم خاک آون خشک را وزن کنید، در ظرف پلی‌اتیلن یک لیتری بریزید و ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول هگزامتافسفات سدیم و بیکربنات سدیم به آن اضافه کرده و به مدت ۱۶ ساعت روی شیکر قرار دهید. پس از طی این زمان، محتویات ظرف را به لیوان همزن مکانیکی انتقال داده و به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر برسانید. به مدت ۲ دقیقه محلول باید در همزن مکانیکی بهم بخورد. سوسپانسیون خاک را در داخل سیلندر بریزید و بعد از شستشوی کامل ظرف، حجم سیلندر را با آب مقطر به یک لیتر برسانید و با همزن دستی به خوبی بهم بزنید. هیدرومتر را با دقت در داخل سوسپانسیون در مرکز سیلندر فرو ببرید. بدین منظور با دو انگشت شست و اشاره انتهای هیدرومتر را گرفته و به آرامی از میانه سیلندر تا جایی پایین ببرید که اگر رهائش کنید به طور ثابت شناور بماند. سپس بعد از ۴۰ ثانیه (A)، ۴ دقیقه (B) و ۲ ساعت (C) عدد هیدرومتر را یادداشت کنید. محاسبه درصد ذرات خاک را بر اساس درجه‌بندی هیدرومتر بر حسب گرم بر لیتر و روابط زیر انجام دهید:

$$\%Clay (< 0.002 \text{ mm}) = \left[\frac{(C+TC)}{S} \right] \times 100 \quad \text{رابطه (۴-۳)}$$

$$\%Silt (0.002 - 0.02 \text{ mm}) = \left[\left[\frac{(B+TC)}{S} \right] \times 100 \right] - \%Clay \quad \text{رابطه (۵-۳)}$$

$$\%Silt (0.02 - 0.05 \text{ mm}) = \left[\left[\frac{(A+TC)}{S} \right] \times 100 \right] - \%Clay - \%Silt (0.002 - 0.02 \text{ mm}) \quad \text{رابطه (۶-۳)}$$

$$\%Sand(0.05 - 2 \text{ mm}) = 100 - \%Clay - \%Silt(0.002 - 0.02) - \%Silt(0.02 - 0.05) \quad \text{رابطه (۷-۳)}$$

S وزن خاک آون خشک

TC ضریب تصحیح درجه حرارت طبق جدول ۱-۳

جدول ۳-۱- ضریب تصحیح حرارت

درجه حرارت (سانتی‌گراد)	ضریب تصحیح برای گرم در لیتر
۱۵	-۲/۰
۱۶	-۱/۵
۱۷	-۱/۰
۱۸	-۱/۰
۱۹	-۰/۵
۲۰	۰
۲۱	+۰/۵
۲۲	+۱/۰
۲۳	+۱/۰
۲۴	+۱/۵
۲۵	+۲/۰

ملاحظات

۱- بر اساس درجه‌بندی روی هیدرومتر، محاسبه باید تصحیح شود.

۲- بعد از هر قرائت، هیدرومتر را به آرامی از سیلندر خارج کرده، با آب مقطر بشوئید و خشک کنید (24).

۳-۱-۱-۴- پایداری خاکدانه

برای اندازه‌گیری پایداری خاکدانه‌ها از روش الک تر و شیوه مرطوب کردن سریع استفاده کنید (25). بدین منظور ابتدا طبق زیربخش ۲-۴-۲ نمونه دست نخورده را تهیه کرده و به آزمایشگاه منتقل کنید. نمونه را هواخشک کرده و بدون کوبیدن از الک ۸ میلی‌متری عبور دهید. الک‌هایی با اندازه‌های ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌متر به ترتیب از پایین به بالا روی هم چیده و سری الک را آماده کنید. به کمک یک نگهدارنده سری الک در یک ظرف آب آویزان شود. ۵۰ گرم از خاک الک شده را به طور یکنواخت روی الک ۴ میلی‌متر بریزید. موتور متصل به دستگاه نگهدارنده را در دامنه نوسان ۳/۸ سانتی‌متر، ۳۰ بار در دقیقه و به مدت ده دقیقه تنظیم کنید. پس از طی این زمان، الک‌ها را به آرامی از آب خارج کرده و خاکدانه‌های باقیمانده روی هر الک را بشوئید و در ظروف جداگانه بریزید. این ظروف را در آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار دهید تا خاکدانه‌ها خشک شوند. سپس ظروف حاوی خاکدانه را به مدت ۴۵ دقیقه در دسیکاتور حاوی سولفات کلسیم بی‌آب یا جاذب‌الرطوبه مشابه نگه دارید تا به دمای محیط برسند و وزن کنید (26).

برای جداسازی ذرات شن، ۲۰ میلی‌لیتر محلول هگزامتا فسفات سدیم ۵ درصد ($\text{pH}=8/5$) را به خاکدانه‌های خشک شده هر الک اضافه کنید و به مدت ۱۵ دقیقه تکان دهید. سپس هر سوسپانسیون را روی الک مربوط به خود تخلیه کرده و با آب بشوئید. ذرات شن باقیمانده روی الک را طبق اصول فوق‌الذکر خشک و وزن کنید و مقادیر به دست آمده را از وزن کلی

خاکدانه باقیمانده روی هر الک کم کنید تا وزن خالص خاکدانه به دست آید (27). میانگین وزنی قطر خاکدانه‌ها (MWD) از رابطه ۳-۸ محاسبه می‌شود:

$$MWD = \sum_{i=1}^n \bar{X}_i W_i \quad \text{رابطه (۳-۸)}$$

$\bar{X}_i$ میانگین قطر خاکدانه‌های باقیمانده روی هر الک i (میانگین قطر سوراخ‌های الک بالایی و پایینی)
 n تعداد الک‌ها

W_i نسبت وزن خاکدانه‌های روی هر الک به وزن کل خاک به کار برده شده در ابتدای آزمایش پس از کسر ذرات شن و سنگریزه است که از رابطه ۳-۹ محاسبه می‌شود:

$$W_i = \frac{w_i - w_{i(s)}}{w_t - \sum_{i=1}^n w_{i(s)}} \quad \text{رابطه (۳-۹)}$$

w_i وزن ذرات باقیمانده در دامنه i

$w_{i(s)}$ وزن ذرات شن و سنگریزه در دامنه i

w_t وزن خاک آون خشک

۳-۱-۲- ویژگی‌های شیمیایی

۳-۱-۲-۱- واکنش خاک (pH)

برای اندازه‌گیری pH نمونه، ۲۰۰ تا ۴۰۰ گرم خاک هواخشک شده را بکوبید و از الک ۲ میلی‌متری عبور دهید. خاک آماده شده را در ظرف مناسب ریخته و در حال بهم زدن، آنقدر آب مقطر اضافه کنید تا نزدیک به حالت اشباع برسد. حالت اشباع حالتی است که سطح گل براق به نظر برسد و وقتی شیار در آن ایجاد می‌کنید، با ضربه زدن به ظرف، شیار بهم بپیوندد. همچنین اگر ظرف محتوی گل را کج کنید، به آرامی گل سرریز شود و یا گل از روی اسپاتول یا کاردک به آرامی سر بخورد. تمام شرایط فوق‌الذکر باید در گل اشباع وجود داشته باشد. در این مرحله در ظرف را گذاشته و گل اشباع را به مدت یک شبانه‌روز به حال خود رها کنید. بعد از سپری شدن مدت زمان لازم، مجدداً گل را بهم زده و در صورت نیاز آب اضافه کنید تا به حالت اشباع برسد.

در مرحله بعد، قیف بوختر را روی پایه عصاره‌گیر و شیشه عصاره‌گیری ۵۰ یا ۱۰۰ میلی‌لیتری را زیر قیف قرار دهید و داخل آن، کاغذ صافی شماره ۲ واتمن بگذارید. پایه عصاره‌گیر را به پمپ خلاء وصل کنید. گل را روی قیف بوختر خالی کنید و با کاردک سطح آن را طوری صاف نمایید که منفذی در آن مشاهده نشود و به بدنه قیف بچسبد. سپس پمپ خلاء را روشن کنید تا عصاره خاک در داخل شیشه عصاره‌گیری جمع شود. این مرحله ممکن است چندین دقیقه طول بکشد و علامت پایان آن، ایجاد شکاف و منفذ در خاک و یا عدم جریان عصاره پس از مدت طولانی است. اگر عصاره کدر بود، آن را صاف و یا سانتریفیوژ کنید. به ازای هر ۲۵ میلی‌لیتر عصاره، یک قطره محلول هگزامتا فسفات سدیم ۰/۱ درصد اضافه کنید.

دستگاه pH متر را مطابق با دستورالعمل سازنده و محلول‌های بافر کالیبره کنید. ظرف نمونه را خوب هم بزنید و الکتروود را در سوسپانسیون همگن شده وارد کنید. پس از رسیدن به تعادل، عدد pH را تا دو رقم اعشار یادداشت کنید. پس از هر قرائت، الکتروود را با آب مقطر شسته و خشک کنید (24).

ملاحظات

- ۱- مقدار خاک مورد استفاده در تهیه گل اشباع بستگی به تعداد آزمایش‌هایی دارد که قرار است روی عصاره اشباع خاک انجام دهید. به طور کلی یک سوم تا یک چهارم رطوبت اشباع را می‌توان به وسیله پمپ خلاء از خاک خارج کرد.
- ۲- قبل از تهیه گل اشباع، نباید نمونه خاک را در آون خشک کنید. زیرا در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد، گچ آب کریستالی خود را از دست می‌دهد و حلالیت آن افزایش می‌یابد.
- ۳- در نمونه خاک‌های با مواد آلی بالا، خاک‌های بافت سنگین و خاک‌های خیلی سبک باید دقت زیادی در تهیه گل اشباع به کار ببرید. در مورد خاک‌های با مواد آلی زیاد باید یک شبانه‌روز خاک خیس بماند تا به اندازه کافی آب جذب کند. روز بعد نمونه خیلی سفت می‌شود که مجدداً باید به هم بزنید و اشباع کنید. در مورد خاک‌های با بافت سنگین باید به اندازه کافی آب به نمونه اضافه کنید و با کمترین هم زدن نمونه را اشباع کنید. اگر نمونه زیاد هم زده شود، به صورت توده گل درمی‌آید. در واقع سرعت در بهم زدن باعث می‌شود که نمونه زودتر به حالت اشباع برسد. در مورد اشباع خاک‌های شنی، باید دقت کنید که آب اضافه به نمونه نیافزاید. اگر آب روی خاک بماند، خاک از حالت اشباع خارج شده و در اندازه‌گیری‌ها خطا ایجاد می‌کند.
- ۴- هگزامتا فسفات سدیم اضافه شده به عصاره برای جلوگیری از رسوب کربنات کلسیم در طول مدت نگهداری عصاره است. این مقدار از هگزامتا فسفات سدیم تقریباً ۰/۰۲ میلی‌اکی‌والان در لیتر سدیم به عصاره خاک وارد می‌کند که این مقدار سدیم اضافه شده به عصاره در مقابل رسوب کربنات کلسیم بسیار ناچیز است.
- ۵- عصاره اشباع را در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش‌ها نگهداری کنید.
- ۶- تعادل عدد pH زمانی اتفاق می‌افتد که تغییر عدد pH پس از گذشت ۵ ثانیه کمتر از ۰/۰۲ باشد. معمولاً تعادل در کمتر از یک دقیقه برقرار می‌شود، اما در مقادیر بالاتر pH، تعادل دیرتر حاصل می‌شود.
- ۷- هر چه کیفیت الکتروود pH متر پایین‌تر و عمر دستگاه بیشتر باشد، تعادل دیرتر برقرار می‌شود.
- ۸- هر چه تفاوت در pH نمونه‌هایی که پشت سر هم قرائت می‌شوند بیشتر باشد، تعادل دیرتر برقرار می‌شود.
- ۹- بهم زدن عصاره قبل از قرائت و یا حین آن در رسیدن به تعادل در زمان کوتاه‌تر کمک می‌کند.
- ۱۰- در خاک‌های با مواد آلی زیاد مانند پیت و خاک‌های آهکی به دلیل امکان جذب کربن دی‌اکسید، رسیدن به تعادل مشکل می‌شود (24).

۳-۲-۱-۳- هدایت الکتریکی (EC)

هدف از اندازه‌گیری هدایت الکتریکی عصاره اشباع، اندازه‌گیری املاح محلول در آن است. مقدار عبور جریان الکتریکی نسبت مستقیم با مقدار یون‌های موجود در محیط دارد. لذا با عبور جریان الکتریکی از یک الکترولیت یا عصاره، می‌توان به میزان املاح محلول در آن پی برد. به منظور اندازه‌گیری این ویژگی، در ابتدا عصاره اشباع خاک را بر اساس روش و ملاحظات ذکر شده در زیربخش ۳-۱-۱-۲ تهیه کنید. سپس کاتالوگ دستگاه EC متر را مطالعه کرده و بر اساس دستورالعمل، دستگاه را راه‌اندازی کنید. مقدار 0.7456 گرم پتاسیم کلرید را به دقت وزن کرده و در بالن ژوژه یک لیتری به حجم برسانید تا محلول 0.1 نرمال این ماده تهیه شود. بعد از روشن کردن دستگاه EC متر باید آن را با پتاسیم کلرید 0.1 نرمال کنترل کنید. بدین صورت که پتاسیم کلرید 0.1 نرمال باید هدایت الکتریکی $1/412$ دسی‌زیمنس بر متر در دمای 25 درجه سانتی‌گراد نشان دهد. پس از کالیبره کردن دستگاه، هدایت الکتریکی عصاره اشباع را قرائت کنید. در همان مرحله دمای عصاره اشباع را نیز با ترمومتر اندازه‌گیری کرده و با استفاده ضرایب تصحیح دمایی، مقدار هدایت الکتریکی را در 25 درجه سانتی‌گراد گزارش کنید (24).

۳-۲-۱-۳- کربن آلی کل

کربن آلی کل خاک را بر اساس روش والکلی و بلاک با استفاده از دی‌کرومات پتاسیم به عنوان اکسیدکننده در حضور اسیدسولفوریک و سپس تیتراسیون دی‌کرومات پتاسیم مصرف نشده با فرو آمونیوم سولفات اندازه‌گیری کنید. بدین منظور بایستی در ابتدا محلول‌های زیر را تهیه کنید:

- دی‌کرومات پتاسیم یک نرمال: اگر دی‌کرومات پتاسیم حاوی کلوخه باشد، باید قبل از توزین آن را خرد کرده و در حرارت 150 تا 200 درجه سانتی‌گراد به مدت سه ساعت خشک کرد. مقدار $49/04$ گرم دی‌کرومات پتاسیم را با دقت وزن کرده و پس از حل کردن در بالن ژوژه آن را به حجم یک لیتر برسانید.

- اسید سولفوریک غلیظ 96 درصد

- فرو آمونیوم سولفات 0.5 نرمال: مقدار $196/08$ گرم فرو آمونیوم سولفات را به دقت وزن کرده و در بالن یک لیتری حل کنید. مقدار 15 میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به آن اضافه کرده و پس از سرد شدن به حجم یک لیتر برسانید.

- معرف ارتوفنانترولین فرو 0.25 مولار: مقدار $14/85$ گرم ارتوفنانترولین منوهیدرات را به دقت وزن کرده و $6/95$ گرم فرسولفات ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) به آن اضافه کنید. سپس در یک بالن ژوژه یک لیتری حل کنید و به حجم یک لیتر برسانید.

مقدار 5 تا 10 گرم خاک هوا خشک را در هاون چینی کاملاً بکوبید. توجه داشته باشید که از هاون فولادی یا آهنی استفاده نکنید. خاک کوبیده شده را از الک 0.5 میلی‌متری عبور دهید، به طوری که تمام خاک از الک رد شود و فقط ذرات شن بزرگتر از 0.5 میلی‌متر روی الک بماند. یک گرم از خاک الک شده را در ارلن مایر 500 میلی‌لیتری بریزید و به آن 10 میلی‌لیتر محلول دی‌کرومات پتاسیم اضافه کنید و به آرامی تکان دهید تا ذرات در محلول پراکنده شوند. سپس 20 میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ را به سرعت به طور مستقیم به محلول اضافه کنید. بلافاصله ارلن مایر را به مدت یک دقیقه به آرامی

تکان دهید و اجازه دهید به مدت نیم ساعت به حال خود بماند. پس از طی این مدت، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کنید و بعد از سرد شدن، ۱۰ قطره ارتوفنانترولین بیافزایید و با فرو آمونیوم سولفات تیترا کنید. در نقطه نزدیک به انتهای تیتراسیون، رنگ نمونه سبز کدر است که با چند قطره اضافی فرو آمونیوم سولفات در مجاورت شناساگر به رنگ قرمز درمی‌آید. در نهایت حجم فرو آمونیوم سولفات مصرفی یادداشت و کربن آلی کل خاک با استفاده از فرمول ۳-۱۰ محاسبه کنید:

$$OC = M \times 0.39 \times \left(\frac{V_1 - V_2}{S} \right) \quad (\text{رابطه ۳-۱۰})$$

M نرمالیتته فرو آمونیوم سولفات

V₁ حجم فرو آمونیوم سولفات مصرفی برای نمونه بلانک بر حسب میلی‌لیتر

V₂ حجم فرو آمونیوم سولفات مصرفی برای نمونه خاک بر حسب میلی‌لیتر

S وزن خاک هوا خشک بر حسب گرم

ملاحظات

۱- در این روش ۷۷ درصد کربن آلی اکسید می‌شود و این موضوع در فرمول محاسبه برای جبران کمبود اکسیداسیون در نظر گرفته شده است.

۲- اگر میزان ماده آلی خاک از ۲/۵ درصد بیشتر است، کمتر از یک گرم خاک باید در آزمایش استفاده شود.

۳- با هر سری خاک باید یک نمونه بلانک تهیه شود.

۴- در خاک‌های شور وجود کلر در این اندازه‌گیری ایجاد مزاحمت می‌کند. چرا که مقداری از دی‌کرومات صرف اکسیداسیون کلر شده و در نتیجه میزان کربن آلی بیشتر از میزان واقعی به دست می‌آید. برای جلوگیری از این مزاحمت، از سولفات نقره به میزان ۱۵ گرم در لیتر اسید سولفوریک استفاده کنید. یعنی اسید سولفوریک اضافه شده برای اندازه‌گیری کربن آلی در خاک‌های شور باید حاوی مقدار ذکر شده سولفات نقره باشد.

۴- وجود آهن دو ظرفیتی در تعیین میزان کربن آلی در خاک مزاحمت ایجاد می‌کند. اغلب در خاک‌های گلی یا خاک‌هایی که از نظر زهکشی مشکلاتی دارند ممکن است حاوی آهن دو ظرفیتی باشند. در این حالت چون خاک در مقابل هوای آزاد خشک می‌شود، آهن دو ظرفیتی به آهن سه ظرفیتی تبدیل شده و مشکلی در اندازه‌گیری ایجاد نمی‌شود (24).

۳-۱-۲-۴- کربن آلی ذره‌ای

برای اندازه‌گیری کربن آلی ذره‌ای بایستی در ابتدا خاکدانه‌ها را با الک تر (سری الک سه تایی شامل ۲۰۰۰، ۲۵۰ و ۵۳ میکرومتر) جداسازی کنید. برای این کار، یک نمونه ۱۰۰ گرمی خاک هواخشک را به آرامی تا رطوبت FC+۵ درصد مرطوب کرده و به مدت ۵ دقیقه در آب دیونیزه در دمای اتاق، بالای الک ۲۰۰۰ میکروتری غوطه‌ور کنید. با حرکت دست، الک را ۵۰ بار در مدت زمان ۲ دقیقه در فاصله ۳ سانتی‌متر بالا و پایین ببرید. خاکدانه‌هایی که روی الک باقی مانده‌اند به آرامی در یک ظرف آلومینیومی بشوید. مواد آلی شناور بزرگتر از ۲۰۰۰ میکرومتر را تخلیه کنید و دور بریزید. آب و خاکی که از الک

عبور کرده را روی الک بعدی بریزید و چرخه مذکور را تکرار کنید، با این تفاوت که مواد شناور روی الک را دور نریزید. ذرات با اندازه ۲۰۰ تا ۲۵۰ میکرومتر را به عنوان خاکدانه درشت و ذرات با اندازه ۲۵۰ تا ۵۳ میکرومتر را به عنوان خاکدانه ریز در نظر بگیرید. به ۱۰ گرم از هر دو بخش خاکدانه‌های ریز و درشت به طور جداگانه ۵۰ میلی‌لیتر محلول ۵ درصد هگزا متافسفات سدیم اضافه و به مدت ۱۸ ساعت شیک کنید. سوسپانسیون‌ها را روی الک ۵۳ میکرومتر بریزید و با آب مقطر آنقدر بشویید تا آب خروجی شفاف گردد. مواد باقیمانده روی الک شامل مواد آلی ذره‌ای و ذرات شن در خاکدانه‌های ریز و درشت است. اندازه‌گیری کمی مواد آلی ذره‌ای از روش کاهش وزن با سوزاندن انجام شود. برای این منظور مواد مذکور را به مدت ۲۴ ساعت در آون در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار دهید. بلافاصله نمونه را به دسیکاتور حاوی سولفات کلسیم بی‌آب یا جاذب‌الرطوبه منتقل کنید و به مدت ۴۵ دقیقه نگه دارید تا به دمای محیط برسد. سپس آن را با دقت ۰/۰۱ گرم وزن کنید و برای مدت ۴ ساعت در دمای ۴۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار دهید. با رعایت شرایط فوق‌الذکر، مجدداً نمونه را وزن کنید و با از اختلاف وزن نمونه قبل و بعد کوره، مواد آلی ذره‌ای (POM) را محاسبه کنید. با استفاده از رابطه ۳-۱۱ کربن آلی ذره‌ای (POC) را به دست بیاورید (28,29):

$$POC = \frac{POM}{1.7} \quad \text{رابطه (۳-۱۱)}$$

۳-۱-۲-۵- نیتروژن کل

نیتروژن کل خاک را به روش کج‌لدال اندازه‌گیری کنید. بدین منظور بایستی مواد زیر را آماده کنید:

- مخلوط کاتالیست سولفات پتاسیم: ۲۰۰ گرم پتاسیم سولفات و ۲۰ گرم مس سولفات ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) و ۲ گرم سلیوم را جداگانه وزن کرده و مخلوط کنید و سپس در هاون چینی بکوبید تا کاملاً نرم شوند.

- اسید سولفوریک غلیظ

- سدیم هیدروکسید ۱۰ نرمال: مقدار ۴۰۰ گرم سدیم هیدروکسید را وزن کرده و در بشر یک لیتری بریزید. سپس بشر را زیر هود قرار داده و به آن ۸۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کنید و با همزن شیشه‌ای بهم بزنید تا کاملاً حل شود. بعد از سرد شدن، محلول را به بالن یک لیتری انتقال بدهید و با شستشوی کامل بشر، حجم بالن را به یک لیتر برسانید. این محلول باید در ظرف پلاستیکی دربسته و حتی‌الامکان دور از CO_2 هوا نگهداری شود.

- محلول معرف: ۰/۱۳ گرم متیل رد و ۰/۲ گرم بروموکروزل گرین در ۲۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد حل کنید.

- محلول اسید بوریک یک درصد و معرف: ۱۰ گرم اسید بوریک را در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب داغ در بالن ژوژه حل کرده و پس از خنک شدن ۲۰ میلی‌لیتر معرف اضافه کنید. سپس محلول حاضر را به حجم یک لیتر برسانید. محلول را به آرامی تکان دهید تا کامل مخلوط شود.

- اسید سولفوریک ۰/۰۱ نرمال

- سولفات آمونیوم ۰/۰۱ نرمال

خاک هواخشک را بکوبید و از الک ۰/۵ میلی‌متری عبور دهید. یک گرم از این خاک را وزن کنید و در بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری پیرکس بریزید. سپس مقدار ۱/۱ گرم مخلوط کاتالیست به آن اضافه کرده و مخلوط کنید. پس از آن ۲ میلی‌لیتر آب مقطر و ۳ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به ترتیب به آن بیافزایید. نمونه را روی هیتر قرار داده و حرارت را به تدریج تا ۳۷۰ درجه سانتی‌گراد افزایش دهید تا نمونه شفاف شود. از این نقطه به بعد، به مدت ۳۰ دقیقه نمونه را حرارت دهید تا نمونه خاک کاملاً هضم شود. توجه داشته باشید که دما نباید از ۴۰۰ درجه سانتی‌گراد تجاوز کند. پس از پایان این مرحله، نمونه را از روی هیتر بردارید و بعد از سرد شدن، مقدار ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر به نمونه اضافه کنید. از طرف دیگر آب مبرد را به جریان بیندازید و ۲۵ میلی‌لیتر اسید بوریک و اندیکاتور را در ارلن مایر ریخته و زیر مبرد دستگاه قرار دهید. سپس محتویات بالن هضم را به بالن تقطیر انتقال دهید و بعد از شستشوی بالن، مقدار ۲۰ میلی‌لیتر محلول سدیم هیدروکسید را اضافه کنید. حجم نهایی محتویات بالن تقطیر حداکثر ۸۰ میلی‌لیتر باشد. حرارت را در سیستم برقرار کنید تا حجم اسید بوریک زیر مبرد به ۷۵ میلی‌لیتر برسد که این فرایند ۷ دقیقه طول خواهد کشید. باید سیستم حرارتی طوری تنظیم شود که این مقدار مایع تقطیر شده را در مدت ذکر شده داشته باشید. سپس ارلن را از سیستم جدا کرده و بعد از شستشوی انتهای مبرد، آن را با اسید سولفوریک ۰/۰۱ نرمال تیترا کنید تا رنگ از سبز به صورتی تغییر کند. در انتهای تیتراسیون pH برابر با ۴/۶ است و هر میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۰/۰۱ نرمال برابر با ۰/۱۴ میلی‌گرم نیتروژن آمونیومی می‌باشد. در انتها با استفاده از رابطه ۳-۱۱ درصد نیتروژن کل خاک را محاسبه کنید:

$$\%N = \left[\frac{(a-b)}{S} \right] \times M \times 1.4 \times mcf \quad \text{رابطه (۳-۱۱)}$$

a اسید سولفوریک مصرفی برای نمونه بر حسب میلی‌لیتر

b اسید سولفوریک مصرفی برای بلانک بر حسب میلی‌لیتر

S وزن خاک هوا خشک بر حسب گرم

M نرمالیت اسید سولفوریک

mcf ضریب تصحیح رطوبتی خاک که برابر است با $\left(\frac{100+\% \theta}{100} \right)$

ملاحظات

۱- همراه نمونه‌ها یک نمونه بلانک تهیه کنید.

۲- برای خاک‌های غنی از مواد آلی ۰/۵ گرم خاک وزن کنید.

۳- از بورت ۱۰ میلی‌لیتر با تقسیمات ۰/۰۱ میلی‌لیتر استفاده کنید.

۴- در این روش نیتروژن نیتراتی مورد سنجش قرار نمی‌گیرد (24).

۳-۱-۲-۶- فسفر در دسترس به روش اولسن

در این روش نمونه خاک با محلول بیکربنات سدیم pH=۸/۵ عصاره‌گیری و با بکارگیری اسید آسکوربیک به عنوان ماده احیاءکننده از طریق رنگ‌سنجی اندازه‌گیری می‌شود. این روش در خاک‌های آهکی، قلیایی و خنثی قابل استفاده است. غلظت

کلسیم در عصاره با رسوب کلسیم کاهش و در نتیجه غلظت فسفر در محلول افزایش می‌یابد. در خاک‌های اسیدی کربنات به عنوان بافر، حلالیت آلومینیم و آهن را متوقف نموده و در نتیجه غلظت فسفر در محلول را افزایش می‌دهد. بنابراین این روش در خاک‌های اسیدی توصیه نمی‌شود. برای انجام این روش، ابتدا مواد زیر را آماده کنید:

- محلول عصاره‌گیری بیکربنات سدیم ۰/۵ نرمال ($\text{pH}=8/5$): ۴۲ گرم بیکربنات سدیم را در یک لیتر آب مقطر حل کرده و pH آن را با سدیم هیدروکسید یک نرمال روی ۸/۵ تنظیم کنید. در صورت بیشتر شدن pH می‌توان از محلول بیکربنات سدیم ۰/۵ نرمال برای پایین آوردن آن استفاده کرد.

- اسید سولفوریک ۴ مولار: ۵۶ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ را به آرامی به ۱۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر در ضمن بهم زدن اضافه کرده و بعد از سرد شدن، حجم را به ۲۵۰ میلی‌لیتر برسانید.

- آمونیوم مولیبدات ۴ درصد: ۴ گرم آمونیوم مولیبدات را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید.

- پتاسیم آنتیمونی تارتارات ۰/۲۷۵ درصد: ۰/۲۷۵ گرم پتاسیم آنتیمونی تارتارات ($\text{KSbOC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید.

- اسید آسکوربیک ۱/۷۵ درصد: ۱/۷۵ گرم اسید آسکوربیک را در آب مقطر حل کرده و سپس به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر برسانید.

- محلول مخلوط: مواد زیر را به ترتیب با استوانه مدرج به درون ظرف ۵۰۰ میلی‌لیتر پلی‌اتیلن یا پیرکس اضافه کنید و به آرامی بهم بزنید تا کاملاً یکنواخت شود:

الف- ۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۴ مولار

ب- ۱۵ میلی‌لیتر محلول آمونیوم مولیبدات

پ- ۳۰ میلی‌لیتر محلول اسید آسکوربیک

ت- ۵ میلی‌لیتر پتاسیم آنتیمونی تارتارات

ث- ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر

- محلول استاندارد ۵۰۰ ppm فسفر: مقدار ۱/۰۹۸۴ گرم پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات را در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید.

- محلول ۲۰ ppm فسفر: ۴۰ میلی‌لیتر از محلول ۵۰۰ ppm فسفر را با محلول عصاره‌گیری (بیکربنات سدیم) به حجم یک لیتر برسانید.

- سری استانداردها: از محلول ۲۰ ppm فسفر به ترتیب ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ میلی‌لیتر برداشته و با بیکربنات سدیم به حجم یک لیتر برسانید. این محلول‌ها دارای ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱، ۱/۲ و ۱/۴ پی‌پی‌ام فسفر هستند. برای استاندارد صفر از محلول بیکربنات سدیم استفاده شود.

پس از تهیه محلول‌های لازم، ۵ گرم خاک هواخشک را وزن کرده و در بطری پلی‌اتیلن ۲۵۰ میلی‌لیتر بریزید. دو نمونه بلانک نیز به عنوان شاهد به نمونه‌ها اضافه کنید. سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول عصاره‌گیری بیکربنات سدیم به آنها اضافه

کرده و بعد از نیم ساعت شیک روی دستگاه شیکر دورانی، بلافاصله با کاغذ صافی شماره ۴۲ صاف کنید. اگر عصاره رنگی بود، معمولاً به ازای هر نمونه ۰/۱ گرم کربن فعال به عصاره بیافزایید، نیم ساعت شیک کرده و سپس صاف کنید. بعد از صاف شدن نمونه‌ها، ۲۵ میلی‌لیتر از عصاره، بلانک و استانداردها را به طور جداگانه در ارلن مایر ۱۲۵ میلی‌لیتر ریخته و ۲۵ میلی‌لیتر محلول مخلوط به آن اضافه کنید. محلول حاصل را به مدت ۱۵ دقیقه شیک کنید و حداقل بعد از یک ساعت رنگ آبی کامل شده را با دستگاه اسپکتروفتومتر در ۸۸۰ یا ۸۲۰ نانومتر قرائت کنید. در پایان با استفاده از رابطه ۳-۱۲ غلظت فسفر در نمونه خاک را بر حسب ppm محاسبه کنید:

$$P(\text{ppm}) = (a - b) \times \left(\frac{V}{S}\right) \times mcf \quad \text{رابطه (۳-۱۲)}$$

a مقدار فسفر عصاره نمونه خاک بر حسب ppm

b مقدار فسفر بلانک بر حسب ppm

V حجم محلول عصاره‌گیری اضافه شده به نمونه‌ها (در این روش کار ۱۰۰ میلی‌لیتر)

S وزن نمونه خاک هوا خشک بر حسب گرم

mcf ضریب تصحیح رطوبتی خاک که برابر است با $\left(\frac{100+\% \theta}{100}\right)$

ملاحظات

۱- اگر محلول بیکربنات سدیم را در حجم زیادی تهیه و نگهداری می‌کنید، باید قبل از استفاده از آن مجدداً pH محلول را روی ۸/۵ تنظیم کنید.

۲- محلول آمونیوم مولیبدات ۴ درصد در ظرف پلی‌اتیلن نگهداری شود.

۳- محلول اسید آسکوربیک ۱/۷۵ درصد و محلول مخلوط باید روزانه تهیه شوند.

۴- با توجه به غلظت فسفر در هر منطقه مطالعاتی، می‌توان غلظت استانداردها را تغییر داد.

۵- در صورت افزایش مقادیر مختلف کربن فعال به نمونه‌ها، برای هر نمونه بلانک تهیه شود. چون کربن فعال ممکن است مقداری فسفر به عصاره وارد یا فسفر از عصاره جذب نماید (24).

۳-۱-۲-۷- معادل کربنات کلسیم

برای اندازه‌گیری میزان معادل کربنات کلسیم در نمونه‌های خاک، در ابتدا مواد زیر را آماده کنید:

- محلول اسید هیدروکلریک ۱ نرمال: ۸۶ میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک غلیظ را در یک لیتر آب مقطر حل کنید. این مقدار

با توجه به چگالی و درصد خلوص اسید تغییر می‌کند و بایستی آن را محاسبه کنید.

- محلول سدیم هیدروکسید ۱ نرمال: ۴۰ گرم سود را در بشر یک لیتری بریزید و در ۷۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید.

محلول را با دقت به بالن یک لیتری منتقل کرده و بشر را با آب مقطر شستشو دهید و به بالن اضافه کنید. بعد از سرد شدن محلول، آن را به حجم یک لیتر برسانید.

- معرف فنول فتالئین: یک گرم فنول فتالئین را در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۶۰ درصد حل کنید.

پس از تهیه محلول‌های لازم، خاک هواخشک را بکوبید و از الک ۲ میلی‌متری رد کنید. از خاک آماده شده، دو گرم وزن کرده و در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتر بریزید. سپس ۲۵ میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک ۱ نرمال را با پیپت یا بورت با دقت به خاک اضافه کنید. ظرف را به آرامی تکان داده و تا شروع جوشش حرارت دهید. بعد از سرد شدن، حدود ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۵ قطره معرف فنول فتالئین به نمونه بیافزایید و سپس با محلول سدیم هیدروکسید تیترا کنید. در نقطه نزدیک به پایان تیتراسیون، وقتی که pH از ۴ عبور کرد، هیدروکسیدهای آهن و آلومینیم شروع به رسوب می‌کنند و با خود مواد معلق موجود در محیط را نیز به ته ظرف می‌برند که در نتیجه محلول رویی صاف و تغییر رنگ به صورتی کاملاً مشهود می‌باشد. برای اطمینان بعد از پایان تیتراسیون مدت ۲۰ ثانیه ارلن را تکان دهید. اگر رنگ صورتی از بین رفته باشد، مجدداً سود اضافه کنید تا رنگ صورتی ظاهر شود. در پایان با استفاده از رابطه ۳-۱۳ معادل کربنات کلسیم را بر حسب درصد محاسبه کنید:

$$\%CaCO_3\text{equivalent} = \frac{(a-b) \times M \times 5}{S} \quad \text{رابطه (۳-۱۳)}$$

a مقدار سدیم هیدروکسید مصرفی برای نمونه بلانک

b مقدار سدیم هیدروکسید مصرفی برای نمونه خاک

M نرمالیت سدیم هیدروکسید مصرفی

S وزن خاک وزن شده

در این روش عدد به دست آمده معادل کربنات کلسیم می‌باشد. چون تمام کربنات‌ها و مواد قلیایی خاک با اسید ترکیب می‌شوند. اکسیدهای آهن و آلومینیوم و ... نیز در اسید حل می‌شوند؛ ولی در موقع تیتراسیون همانطوری که در بالا اشاره شد، دوباره رسوب می‌کنند و معادل همان مقدار اسیدی که برای حل شدن آنها مصرف شده، سدیم هیدروکسید مصرف می‌شود و اختلافی از نظر مقدار مواد خنثی شونده به وجود نمی‌آید.

ملاحظات

- ۱- در تعیین نرمالیت اسید و سدیم هیدروکسید و تهیه محلول آنها دقت بالایی به کار برید تا خطای آزمایش به حداقل میزان خود برسد.
- ۲- بعد از اتمام تیتراسیون، باید بورت را چندین مرتبه با آب معمولی و سپس آب مقطر شستشو دهید تا مواد قلیایی روی بورت اثر نگذارد (24).

۳-۱-۲-۸- ظرفیت تبادل کاتیونی (CEC)

مجموع کلیه کاتیون‌هایی که ۱۰۰ گرم خاک می‌تواند به صورت تبدالی در خود نگهدارد، ظرفیت تبادل کاتیونی نامیده می‌شود و بر حسب میلی‌اکی‌والان در ۱۰۰ گرم یا سانتی‌مول بر کیلوگرم خاک می‌سنجند. برای اندازه‌گیری این ویژگی خاک، ابتدا مواد زیر را آماده کنید:

- استات سدیم یک نرمال: مقدار ۱۳۶ گرم استات سدیم را وزن کرده و بعد از حل شدن در بالن ژوژه یک لیتری به حجم برسانید. سپس pH آن را با اسید استیک یا سدیم هیدروکسید و pH متر به ۸/۲ برسانید.

- اتانول ۹۵ درصد

- استات آمونیوم یک نرمال: مقدار ۷۷ گرم استات آمونیوم را وزن کنید و پس از حل کردن در بالن ژوژه یک لیتری، به حجم برسانید. بایستی pH محلول با pH متر روی ۷ تنظیم شود.

- محلول استاندارد ۱۰۰ میلی اکی‌والان در لیتر سدیم: مقدار ۵/۸۴۵ گرم سدیم کلرید را دقیقاً وزن کرده و در بالن ژوژه یک لیتری با آب مقطر به حجم برسانید. از محلول اولیه استاندارد، محلول‌های ثانویه را با دقت کامل تهیه کنید. بدین صورت که یک بورت را با اسید سولفوکرومیک بشوئید و خشک کنید تا ترکیبات آلی باقیمانده بر سطح بورت پاک شود. سپس با استفاده از این بورت مقادیر ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۲/۵، ۱۵، ۱۷/۵ و ۲۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰۰ میلی اکی‌والان در لیتر سدیم را در بالن ژوژه یک لیتری بریزید و با محلول استات آمونیوم یک نرمال به حجم برسانید. این محلول‌ها شامل ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۲۵، ۱/۵، ۱/۷۵ و ۲ میلی اکی‌والان در لیتر سدیم می‌باشد.

پس از تهیه محلول‌های فوق‌الذکر، مقدار ۵ گرم خاک هواخشک که از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شده را وزن کنید و در لوله سانتریفیوژ ۵۰ میلی‌لیتری بریزید. سپس ۳۳ میلی‌لیتر استات سدیم یک نرمال به آن اضافه کنید و در آن را محکم ببندید. لوله را به مدت ۵ دقیقه روی دستگاه شیکر رفت و برگشتی شیک کنید و پس از آن، با ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در سانتریفیوژ قرار دهید تا تمام ذرات خاک در انتهای لوله جمع شود و بعد مایع رویی را دور بریزید. این مراحل را سه بار تکرار کنید. توجه داشته باشید که بعد از هر بار سانتریفیوژ و اضافه کردن محلول جدید باید با ضربه زدن، ذرات خاک چسبیده به انتهای لوله کاملاً کنده شود. در مرحله بعد، به نمونه خاک داخل لوله مقدار ۳۳ میلی‌لیتر اتانول اضافه کنید و پس از آنکه ذرات کاملاً از انتهای تیوپ جدا شدند، لوله را به مدت ۵ دقیقه در شیکر رفت و برگشتی و ۵ دقیقه در سانتریفیوژ با ۲۵۰۰ دور در دقیقه قرار دهید تا تمام ذرات ته لوله جمع شود. در نهایت مایع رویی را دور بریزید. این مراحل نیز باید سه بار تکرار شوند. در انتهای دور سوم، هدایت الکتریکی اتانول را با دستگاه کندانومتر اندازه‌گیری کنید. اگر هدایت الکتریکی آن کمتر از ۰/۰۴ دسی‌زیمنس بر متر بود، شستشوی نمونه را خاتمه دهید ولی اگر بیشتر از مقدار مذکور بود، شستشوی نمونه با الکترولیت را حداکثر تا دور پنجم ادامه دهید. بعد از هر بار شستشو بایستی هدایت الکتریکی الکترولیت را اندازه‌گیری کنید. در شستشوی نمونه با الکترولیت، تمام املاح محلول و استات سدیم موجود از محیط خاک خارج می‌شوند.

پس از اتمام مرحله شستشو با الکترولیت، مقدار ۳۳ میلی‌لیتر استات آمونیوم به نمونه خاک اضافه کنید. بعد از جدا شدن ذرات ته لوله، آن را به مدت ۵ دقیقه در شیکر رفت و برگشتی قرار دهید. سپس لوله را به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۵۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ کنید. در نهایت مایع رویی لوله را در بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتر بریزید. مراحل اضافه کردن ۳۳ میلی‌لیتر استات آمونیوم، شیک کردن و سانتریفیوژ را دو بار دیگر انجام دهید و مایع رویی لوله را به بالن ژوژه مذکور اضافه کنید. در انتهای کار، بالن را با استات آمونیوم یک نرمال به حجم برسانید. در مرحله اضافه کردن استات سدیم، یون‌های سدیم جای تمام کاتیون‌های قابل تبادل را می‌گیرد و کاتیون‌ها در داخل محلول خاک قرار می‌گیرند. سپس در مرحله شستشو با الکترولیت تمام

ناخالصی‌ها از محیط خاک خارج می‌شود و در مرحله اضافه کردن استات آمونیوم، یون‌های آمونیوم تمام سدیم‌های جذب شده بر کلونیدهای خاک را تبادلی می‌کنند و خود جای آنها را می‌گیرند. مقدار سدیم آزاد شده در محیط که معادل با ظرفیت تبادل کاتیونی خاک است را با دستگاه فلیم فتومتر اندازه‌گیری کنید.

دستگاه فلیم فتومتر را با بلانک (استات آمونیوم) روی صفر دستگاه و حداکثر استاندارد را روی ۱۰۰ دستگاه تنظیم کنید. سپس بقیه استانداردها را به ترتیب از غلظت کم به زیاد به دستگاه بدهید و اعداد را قرائت کنید. بعد از اینکه از صحت کار دستگاه اطمینان حاصل کردید، اقدام به قرائت نمونه‌ها کنید. بعد از ترسیم منحنی استاندارد، مقدار قرائت نمونه‌ها را به غلظت سدیم تبدیل کنید. این غلظت میزان سدیم در ۵ گرم خاک را نشان می‌دهد. با استفاده از رابطه ۳-۱۴ ظرفیت تبادل کاتیونی (CEC) را بر حسب میلی اکی‌والان بر ۱۰۰ گرم خاک محاسبه کنید (30):

$$CEC = (a - b) \times 2 \quad \text{رابطه (۳-۱۴)}$$

a غلظت به دست آمده از منحنی استاندارد برای نمونه خاک

b غلظت به دست آمده از منحنی استاندارد برای نمونه بلانک

ملاحظات

- ۱- اگر سدیم کلرید به صورت کلوخه بود، آن را پودر کنید و در حرارت ۴۰۰ تا ۵۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت حداقل ۸ ساعت یا در حرارت ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت حرارت دهید.
- ۲- اگر قرائت نمونه از حداکثر استاندارد بیشتر بود باید نمونه را رقیق کنید (30).

۳-۱-۲-۹- نسبت جذب سدیم (SAR)

نسبت جذب سدیم (SAR) برای بحث در مورد تعادل کاتیون‌های محلول و تبادلی استفاده می‌شود و از رابطه ۳-۱۵ به دست می‌آید (31):

$$SAR = \frac{[Na^+]}{\sqrt{\frac{[Ca^{2+}] + [Mg^{2+}]}{2}}} \quad \text{رابطه (۳-۱۵)}$$

$[Na^+]$ غلظت سدیم محلول در خاک بر حسب میلی اکی‌والان بر لیتر

$[Ca^{2+}]$ غلظت کلسیم محلول در خاک بر حسب میلی اکی‌والان بر لیتر

$[Mg^{2+}]$ غلظت منیزیم محلول در خاک بر حسب میلی اکی‌والان بر لیتر

روش اندازه‌گیری سدیم، کلسیم و منیزیم محلول در خاک در پیوست‌ها (قسمت ۱ و ۲) آمده است. پس از اندازه‌گیری کاتیون‌های مذکور در آزمایشگاه، با استفاده از رابطه ۳-۱۵ نسبت جذب سدیم نمونه‌های خاک را محاسبه کنید.

۳-۱-۲-۱۰- درصد سدیم تبادلی (ESP)

با استفاده از شاخص نسبت جذب سدیم (SAR) می‌توان درصد سدیم قابل تبادل را تخمین زد. بدین منظور رابطه ۳-۱۶ را به کار ببرید (31):

$$ESP = \frac{100(-0.0126+0.01475SAR)}{1+(-0.0126+0.01475SAR)} \quad \text{رابطه (۱۶-۳)}$$

۳-۱-۳-۳ ویژگی‌های زیستی

۳-۱-۳-۱-۳ 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 ۱ و ۱۰ فنانترولین-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^۷ شیشه‌ای ۵۰ میلی‌لیتری بریزید و در دسیکاتور^۸ی که با دستمال کاغذی مرطوب پوشیده شده و یک ویال آهک سودا^۸ 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

^۷ Vial

^۸ Soda lime

۲۵۰ میلی‌لیتری برای استخراج با پتاسیم سولفات طبق روش مشروح منتقل کنید. توجه داشته باشید که تمام عصاره‌ها بایستی تا قبل از آنالیز 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 لیبیگ 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 ۱ و ۱۰ 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 (32):

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

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 نرمالیه 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

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

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، ریزجانداران کمتر تحت تأثیر کلروفرم قرار می‌گیرند. همچنین سرعت فعالیت آنزیم‌ها و در نتیجه اتولیز سلولی 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 CO_2 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 باید 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. در خاک‌هایی 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 سانتریفیوژ 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 (32).

۳-۱-۳-۲- ضریب میکروبی (MBC/OC)

از تقسیم کربن زیست‌توده میکروبی به کربن آلی خاک، نسبت کربن زیست‌توده میکروبی به کربن آلی $\left(\frac{\text{MBC}}{\text{OC}}\right)$ یا ضریب میکروبی (microbial quotient) را بر حسب درصد محاسبه کنید (33).

۳-۱-۳-۳- 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.

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 (34):

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

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 عامل 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 سانتی‌گراد و درصد رطوبت خاک بین ۵۰ تا ۷۰ درصد WHC می‌تواند متغیر است (34).

۳-۱-۳-۴- ضریب متابولیکی (BR/MBC)

ضریب متابولیکی ($\text{metabolic quotient, } q\text{CO}_2$) 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 (35,36):

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

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 $mg C kg^{-1} soil$

۳-۱-۳-۵- 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 (33).

۳-۱-۳-۶- تنفس ناشی از سوبسترا

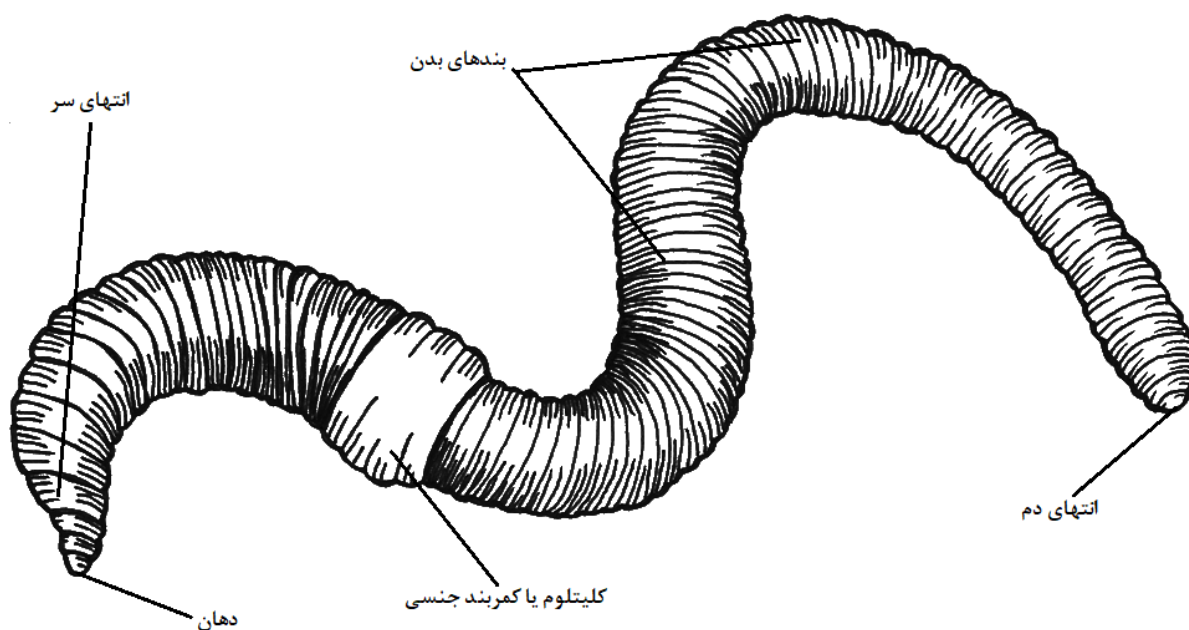
تنفس ناشی از سوبسترا به میزان انتشار CO_2 در حضور سوبسترای مانند گلوکز، اسید آمینه و ... گفته می‌شود. برای اندازه‌گیری تنفس ناشی از سوبسترا، نباید خاک هوا خشک شود. از خاک مرطوب استفاده کنید. توصیه بر آن است که خاک با الک ریزتر از ۲ میلی‌متر الک شود. میزان بهینه غلظت محلول گلوکز برای به دست آوردن حداکثر 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 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 ۳-۱-۳-۳ انجام شود (32).

ملاحظات

- حداکثر دوره نگهداری نمونه‌های خاک برای اندازه‌گیری تنفس ناشی از سوبسترا 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 سوبسترا بیش از ۴ تا ۶ ساعت باشد، انتظار می‌رود که در جمعیت میکروبی خاک تغییر و در نتیجه خطا رخ دهد.

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

کرم‌های خاکی نمونه‌برداری شده را از ظرف نگهداری خارج کرده و خاک چسبیده به آنها را با آب مقطر بشویید. 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

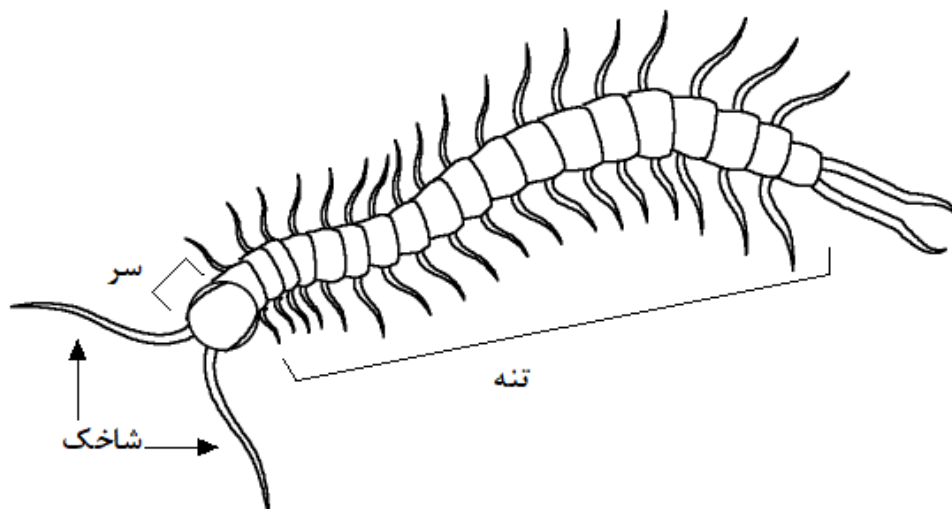
۳-۱-۳-۸- جمعیت صدپایان

رده صدپایان^۹ متعلق به زیرشاخه آرواره‌داران از شاخه بندپایان^۱ است. این جانوران شکارچی کرم‌های خاکی هستند و هر جا که جمعیت کرم‌های خاکی حضور داشته باشند، صدپایان نیز یافت می‌شوند. بدن آنها از دو قسمت سر و تنه تشکیل شده است. سر آنها گرد یا تخت بوده و ضمائم سر آنها شبیه به ضمائم سر حشرات می‌باشد؛ به این صورت که یک جفت شاخک و یک جفت آرواره بالا و یک یا دو جفت آرواره پایین دارند. تنه آنها بندبند بوده و هر بند، به جز بند پس از سر و دو بند آخر بدن، دارای یک جفت پای مفصلی است. تعداد پا در صدپایان از ۱۵ تا ۱۹۱ جفت گزارش شده است. در شکل ۳-۲ تصویر شماتیک این جانور آورده شده است. در حین عملیات نمونه‌برداری کرم خاکی بایستی جمعیت صدپایان در محدوده ۱×۱ متر را شمارش کرده و بر حسب تعداد بر واحد سطح گزارش کنید.

^۹ Chilopoda or Centipedes

^۱ Mandibulata

^۱ Arthropoda



شکل ۳-۲- تصویر شماتیک صدپایان

۳-۱-۳-۹- 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 در دقیقه سانتریفیوژ کنید تا آنچه ته‌نشین شده، معلق شود. محلول حاصل را روی الک ۴۰ مش بریزید تا نماتدها روی الک بر جای بمانند. بدون فوت وقت و با ملایمت، با کمک پیست روی الکی آب بریزید تا محلول قند از نماتدهای روی الک شسته شود (37). 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 (38).

ملاحظات

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

۳-۱-۴- ویژگی‌های پوسته‌های زیستی

۳-۱-۴-۱- 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 خزه‌ها 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.

۳-۱-۴-۲- 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 اسپکترفوتومتر

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.
- مجدداً 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 موج‌های 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.

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

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

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

۳-۴-۱-۳- 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 محلول های استاندارد ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی گرم گلوکز، از محلول ۱۰۰۰ ppm 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 لوله های 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 محلول ها اضافه کنید.
- نمونه های استاندارد را در طول موج ۴۹۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه بگیرید.
- نمودار رگرسیونی نمونه های 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 پلی‌ساکاریدها تهیه شده است برای شناسایی مونوساکاریدها استفاده می‌شود. دستگاه HPLC با توجه به مدل، مقدار ترزریق 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 پلی‌ساکاریدها، ضرورتاً باید نسبت قندهای هگزوز به پنتوز محاسبه شود. قندهای هگزوز هم توسط ریشه‌های گیاهان و هم توسط ریزجانداران خاک ولی پنتوزها توسط ریشه گیاهان تولید می‌شوند. البته قندهای هگزوز عمدتاً توسط ریزجانداران 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 ریزجانداران خاک برای افزایش مواد آگروپلی‌ساکاریدی در خاک تایید می‌شود. در غیر این صورت، پلی‌ساکاریدهای 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 سانتریفیوژ
- کاغذ صافی واتمن
- ترازو
- ارلن مایر ۲۵۰ سی‌سی

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 میلی‌لیتری 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 بالون 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^۱ است. در این روش خاک در آب استریل شده همگن می‌شود. سپس با فرمالدهید سلول‌های باکتریایی و قارچی تثبیت را 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

¹ Epifluorescence

- 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 ۰/۰۵ 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 میلی‌گرم DTAF^۳ را در ۱۰ میلی‌لیتر 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 یک شب در دمای ۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. از این خاک ۲۰ گرم را وزن کرده و ۱۹۰ میلی‌لیتر آب استریلی که به روش فوق‌الذکر تهیه شده را به آن بیافزایید و سپس با یک مخلوط‌کن^{۱۴} به مدت یک دقیقه با سرعت ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه مخلوط کنید. به ۹ میلی‌لیتر از سوسپانسیون خاک یک میلی‌لیتر محلول فرمالدهید اضافه و با ورتکس مخلوط کنید تا سلول‌های باکتریایی و قارچی تثبیت شوند. در این حالت سوسپانسیون حاوی ۹۰ میلی‌گرم خاک بر میلی‌لیتر است. لام‌های میکروسکوپ را قبل از استفاده با اتانول ۷۰ درصد بشوید تا مواد آب‌گریز از سطح شیشه آن پاک شود. برچسبی ضدآب با ابعاد ۲×۴ سانتی‌متر که مرکز آن دایره‌ای به قطر ۱۲ میلی‌متر 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 میلی‌گرم 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 میلی‌متر مربعی نگه می‌دارد. لام‌ها باید در معرض هوا قرار داشته باشند تا خشک شوند و بعد نوار برچسب را جدا کنید. لایه نازک خاک خشک‌شده در سطح لام را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در محلول رنگ‌آمیزی قرار دهید. برای جلوگیری از خشک شدن، در طی این مدت، روی سینی رنگ‌آمیزی 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 اپی‌فلورسنس 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 سانتی‌گراد نگهداری کنید. شمارش باکتری‌ها با میکروسکوپ اپی‌فلورسنس 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 (39):

¹ 5-([4,6-Dichlortriazin-2-yl]aminò)fluorescein

¹ Blender

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

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 میلی‌گرم).

ملاحظات

- از تماس پوستی با فرمالدهید باید اجتناب کنید.
- از تماس پوستی و استنشاق پودر رنگ‌ها باید اجتناب کنید.
- محلول رنگ‌آمیزی حداکثر برای یک روز قابل نگهداری است.
- سوسپانسیون برخی خاک‌ها نیاز دارند که به میزان ۳ تا ۱۰ رقیق شوند. بهترین حالت رقیق‌سازی 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 تثبیت‌شده 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 استریل‌شده حل کرده و به یک لیتر حجم برسانید.
- سوسپانسیون تثبیت‌شده خاک (۹۰ میلی‌گرم خاک بر میلی‌لیتر) را مجدداً هم بزنید و با آب استریل در سه مرحله رقیق کنید. در هر مرحله سوسپانسیون با نسبت ۵:۱ رقیق شود. در نهایت ۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی ۳/۶ میلی‌گرم خاک خواهد بود، که به آن ۵ میلی‌لیتر از محلول رنگ‌آمیزی اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق در محیط تاریک نگهداری کنید. سپس ۴ میلی‌لیتر از این محلول (۱/۴۴ میلی‌گرم خاک) را با فیلتر سیاه پلی‌کربناتی با قطر ۲۵ میلی‌متر که قطر منافذ آن ۰/۸ میکرومتر باشد، صاف کنید. فیلتر را سه مرتبه با ۳ میلی‌لیتر آب تازه استریل‌شده بشویید و روی یک لام با روغن امرسیون غوطه‌ور کنید. لام‌ها را در یک اتاق تاریک زیر میکروسکوپ اپی‌فلورسنس 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 از رابطه ۳-۲۶ محاسبه کنید (39):

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

I تعداد تقاطع در هر محدوده

¹ Calcofluor White M2R

5

¹ Grid

6

A مساحت محدوده (برای مثال 233×233 برابر با 54289 میکرومتر مربع)

L طول کل خطوط در محدوده شمارش (برای مثال 22 خط $233 \times$ میکرومتر که برابر 5126 میکرومتر است).

پس از محاسبه طول هیف، طول کل هیف‌های قارچی بر حسب متر بر گرم خاک را از رابطه $3-27$ به دست آورید (39):

$$F = H \times 10^{-6} \times \left(\frac{A}{B}\right) \times \left(\frac{1}{S}\right) \quad \text{رابطه (3-27)}$$

H طول هیف بر حسب میکرومتر بر محدوده

10^{-6} تبدیل میکرومتر به متر

A مساحت فیلتر که با نمونه پوشیده شده (برای مثال 201 میلی‌متر مربع)

B مساحت محدوده (برای مثال 0.053 میلی‌متر مربع)

S مقدار خاک روی فیلتر (برای مثال $1/44$ میلی‌گرم)

ملاحظات

- لام تهیه شده تا دو ماه در دمای 2 درجه سانتی‌گراد در محل تاریک قابل نگهداری است (39).

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 2 ساعت در دمای 37 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 50 میلی‌مولار و $\text{pH}=9$: $6/1$ گرم تریس را در 700 میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و آن را با اسید سولفوریک $0/2$ مولار در $\text{pH}=9$ تنظیم کنید و با آب مقطر به حجم یک لیتر برسانید.

- محلول اوره 200 میلی‌مولار: $1/2$ گرم اوره را در 80 میلی‌لیتر بافر تریس حل کنید و با آن به حجم 100 میلی‌لیتر برسانید. این محلول را به صورت تازه و روزانه تهیه کنید و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگه دارید.

- محلول پتاسیم کلرید ($2/5$ مولار) - سولفات نقره (100 میلی‌گرم بر لیتر): میزان 100 میلی‌گرم سولفات با گرید معرف^{۱۷} (خلوص بالای 99 درصد) را در 700 میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید. سپس 188 گرم پتاسیم کلرید با گرید معرف را در محلول حل کنید و با آب مقطر به حجم یک لیتر برسانید.

- محلول $0/05$ مولار اسید سولفوریک

- محلول اندیکاتور: میزان $0/66$ گرم بروموکرزول سبز^{۱۸} و $0/33$ گرم متیل رد^{۱۹} را در اتانول 95 درصد حل کنید و با اتانول به حجم 1000 میلی‌لیتر برسانید.

¹ Reagent grade	7
¹ Bromocresol green	8
¹ Methyl red	9

- 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 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):

$$Urease\ activity\ (\mu g\ NH_4 - N\ g^{-1}\ dwt\ 2h^{-1}) = \frac{C \times 50}{dwt \times 5} \quad \text{رابطه (۳-۲۸)}$$

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 (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 پارانیتروفنل: میزان یک گرم پارانیتروفنل 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 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.

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 آنالیز پارانیتروفنل نمونه‌های خاک انکوباسیون‌شده در فوق شرح داده شد، مراحل کار را ادامه دهید. نتایج سوسپانسیون 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 سوسپانسیون 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 سوسپانسیون‌های 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 $pH=6$: 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 ۳-۳-۲ عمل کنید.

- بافر تریس با غلظت ۰/۱ مولار و $pH=10$ و $pH=12$: 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 ۳-۳-۲ عمل کنید.

- محلول پارانیتروفنل بتا دی گلوکوزید (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 $pH=12$ 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 $pH=10$ 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 تاثیر 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 pH=۵/۵: 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 ۰/۷۲ 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.

- معرف B: میزان ۰/۵ گرم پتاسیم آهن هگزاسیانید^۲ 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^۴، یک گرم سدیم دودسیل سولفات^۵ 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 رقیق شده 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

² Carboxymethyl cellulose sodium² salt, CMC

³ Potassium Ferric Hexacyanide

⁴ Ferric Ammonium Sulphate

⁵ Sodium Dodecyl Sulphate

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 سوپانسیون 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 سوپانسیون خاک (در این پروتکل ۳۰ میلی‌لیتر است)

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

sw وزن خاک مرطوب

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 فنندهای 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^۶ (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^۷ (TPF) تبدیل می‌کنند.

² Triphenyl Tetrazolium Chloride⁶

² Triphenyl Formazan⁷

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، pH 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
- 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 سوپانسیون 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 پیپت 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 سوپانسیون 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 (34):

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

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 (34).

۷-۲-۳- میانگین هندسی آنزیم‌ها

میانگین هندسی فعالیت آنزیمی خاک^۸ (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 (40):

$$GME = \sqrt[n]{\sum_{i=1}^n \text{Enzymes}} \quad \text{رابطه (۳-۳۲)}$$

GME میانگین هندسی فعالیت آنزیمی خاک

n تعداد آنزیم‌های اندازه‌گیری شده

Enzymes فعالیت آنزیم i (40).

۸-۲-۳- 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 (41):

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

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

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

P_i مجموع فعالیت آنزیم‌ها

² Geometric Mean of Enzyme activities

$\frac{r_i}{\sum r_i}$ 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.

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 (42).

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 (43).

۳-۲-۱۱- ویژگی‌های پوسته‌های زیستی

اندازه‌گیری کلروفیل آ (Chl a) و مواد آگرو پلی‌ساکاریدی هم در خاک‌های دارای پوشش سیانوباکتریایی و هم در سیانوباکتری‌های استخراج شده از خاک یا پوسته‌های زیستی ضرورت دارد.

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 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 نگه‌دارید 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 ۴-۲ 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 نگه‌دارید 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 خالص‌سازی سیانوباکتری از پوسته‌های 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 همگن‌سازی 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 جمع‌آوری شده مخلوطی از خز، گل‌سنگ و از گونه‌های مختلف خز و گل‌سنگ تشکیل شده باشند. ضرورتاً قبل از شروع به جداسازی و کشت سیانوباکتری‌ها باید نمونه همگن شده باشد. برای همگن‌سازی نمونه‌ها، مراحل ذیل قبل از انتقال به محیط کشت انجام می‌شود.

- پوسته‌های زیستی را از خاک زیرین کاملاً جدا کنید.

- ذرات خاک را با تیغه‌های مخصوص یا با اسپاتول با دقت تمام از روی آنها و ریشه‌ها 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) خالص‌سازی سیانوباکتری‌ها

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

۳-۲-۱۱-۳- اندازه‌گیری 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 سانتی‌فیوژ ۱۵ میلی‌لیتری انتقال دهید.

۳- سه میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد به آن اضافه کنید.

۴- به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۸ درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد با ۶۰۰۰ دور بر دقیقه سانتی‌فیوژ 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 زیاده‌تر از ۰/۰۰۵ بود دوباره آن را سانتی‌فیوژ کنید تا کاملاً شفاف شود.

۹- بعد از اندازه‌گیری باقیمانده عصاره دور بریزید.

۱۰- سه میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد مجدداً به نمونه‌ها اضافه کنید.

۱۱- سی دقیقه در دمای ۷۸ درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد با ۶۰۰۰ دور بر دقیقه سانتی‌فیوژ 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 زیاده‌تر از ۰/۰۰۵ بود دوباره آن را سانتی‌فیوژ 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.

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

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

۳-۲-۱۱-۴- اندازه‌گیری 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 $7500 \times$ سانتریفیوژ کنید.
- مایع رویی را دور بریزید.
- ۱۰ میلی‌لیتر NaCl ۰/۰۵ درصد به مواد باقیمانده اضافه کنید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با دور $7500 \times$ 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 میلی‌لیتر 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 $7500 \times$ 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 پلی‌ساکاریدها

- بر روی مواد Dry-Freez شده ۱ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۱۲ مولار بریزید.
- به محتویات نمونه یک میلی‌لیتر 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 (44,45). 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 (46). از دیگر ابزارهای کنترل کیفیت داده‌ها می‌توان به SeqPrep اشاره کرد.

برای استخراج DNA ژنوم میکروبی از کیت QIAamp Fast DNA Stool Mini ساخت شرکت QIAGEN آلمان طبق دستورالعمل سازنده 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)^۲ 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 (47). در نهایت پس از آنالیز 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 میلی گرم Glassbeads
- 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 میلی گرم 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 نگه می‌داریم 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 (دوقسمتی) 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 ۸۰۰۰ دور بر ثانیه 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 ۳-۲- پرایمرهای ژن 16s rRNA برای شناسایی سیانوباکتری‌های خاکزی

Primer	Sequence	Reference
CYA106F	CGG ACG GGT GAG TAA CGC GTG A	(48)
CYA359F	GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG	(48)
CYA781 (a)	GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T	(48)
CYA781(b)	GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T	(48)
CYA359FGC	cgcccgccgcgccccgcgcccgtcccgccgccccgcccggggaattttccgcaatggg	(48)
CYA784R	gactacaggggtatctaataccc	(48)
CYA781RGC(b)	cgcccgccgcgccccgcgcccgtcccgccgccccgcccgactacaggggtatctaataccccttt	(48)
23S30R	cttcgcctctgtgtgcctaggt	(49)
COR-F	CCATGAAGTCGGAATCGCTAG	(50)
COR-R	ACTCCCATGGGTGTGACGG	(50)
ITS-1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	(51)
27F	5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	(52)
1492R	5'GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	(52)
341F	5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3	(53)
805R	CTACHVGGGTATCTAATCC-3'	(53)
B235SR	5'-CTTCGCCTCTGTGT GCCTAGGT-3'	(54)
684F	5'- GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA-3'	(54)
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	(54)
SP6	5'- ATTTAGGTGACACTATAG-3'	(54)

فصل ۴

محاسبه شاخص تنوع زیستی خاک

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

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 «گزینش دامنه بالا» برابر ۲/۵- و در متغیرهای «گزینش دامنه‌ی پایین» برابر ۲/۵+ است (40).

۲-۴- 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:

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

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^۳ بر اساس رابطه ۴-۵ محاسبه می‌شود.

ضریب اشتراک از آنالیز 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 (55).

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

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 (56). افزون بر آن، چنانچه در ارزیابی‌های تکمیلی این مطالعات سویه جدید میکروبی شناسایی شد، این سویه می‌بایست به ثبت شود. به منظور ایجاد یک وحدت رویه در ارائه نتایج مطالعات تنوع زیستی خاک، 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 یک فایل 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 اندازه گیری شده

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

داده ها بایستی از نظر کمیت و کیفیت ارزیابی شوند و از نظر آماری وضعیت پراکنش مرکز داده ها و پیروی آنها از توزیع نرمال و آماره های توصیفی همچون میانگین، حداقل، حداکثر، انحراف معیار و ضریب تغییرات را با نرم افزارهای آماری رایج مانند SPSS، SAS و یا Minitab بررسی کنید. در صورت عدم پیروی داده ها از توزیع نرمال، از تبدیل های 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 نمره دهی کنید. سپس ضریب اشتراک متغیرها را در آنالیز تجزیه به مؤلفه اصلی به دست بیاورید. در نهایت با کمک ضرایب اشتراک و نمرات ویژگی های خاک، شاخص تنوع زیستی را به دو صورت خطی و غیرخطی محاسبه نمایید. از شاخص های محاسبه شده برای ترسیم نقشه تنوع زیستی خاک استفاده کنید.

ترسیم نقشه را با نرم افزارهای مرسوم می توان انجام داد. نقشه های تهیه شده بایستی دارای مقیاس ۱:۵۰۰۰۰ بوده و در ابعاد ۹۰×۷۰ سانتی متر باشند و پراکنش تنوع زیستی خاک را به صورت نقطه ای نشان دهند. چنانچه فاصله بین نقاط نمونه برداری از ۱۰۰۰ متر کمتر بود، می توان پهنه بندی نقشه های تنوع زیستی خاک را نیز ارائه داد. این بدان معناست که تعداد نقاط نمونه برداری از ۱۰ نقطه در هر هزار هکتار بیشتر بوده است. همچنین نقشه تنوع زیستی خاک بایستی با نقشه های توپوگرافی روی هم گذاری^۳ شوند. راهنمای نقشه های 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، نشانه ها و رنگ های نقشه باشد. مقیاس نقشه نیز در پایین نقشه قرار خواهد گرفت.

سویه‌های جدید میکروبی باید در کلکسیون میکروبی موسسه تحقیقات خاک و آب (CCSM)^۴ 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

پیوست‌ها

۱- اندازه‌گیری کلسیم و منیزیم محلول در خاک

روش تیتراسیون کمپلکسومتری با استفاده از EDTA را برای اندازه‌گیری مجموع کلسیم و منیزیم به کار ببرید. برای به دست آوردن نتایج دقیق باید مزاحمت‌ها را حذف و pH مناسب در محیط ایجاد کرد. یون‌های مختلفی مانند آهن، مس، روی، نیکل و فسفات در این روش با EDTA تشکیل کمپلکس می‌دهند و در نتیجه مزاحمت ایجاد می‌کنند.

سیانید با یون‌های مس، نیکل و آهن دوظرفیتی کمپلکس پایدار تشکیل می‌دهد و می‌تواند در این واکنش مزاحمت‌های این عناصر را حذف کند. هیدروکسیل آمین هیدروکلراید آهن سه ظرفیتی را به دو ظرفیتی احیاء می‌کند. آلومینیم و آهن دوظرفیتی با تری اتانول آمین کلات تشکیل می‌دهند. با احیاء منگنز و رسوب آن به صورت منگنز فروسیانید مزاحمت آن در اندازه‌گیری برطرف می‌شود. فسفات معمولاً مزاحمتی ایجاد نمی‌کند.

سنجش میزان مجموع کلسیم و منیزیم در pH=۱۰ با استفاده از معرف اریوکروم بلک تی^۳ انجام می‌شود. در صورتی که املاح آمونیوم در محیط موجود نباشد، منیزیم در pH=۱۲ یا بیشتر به صورت هیدرات منیزیم رسوب می‌کند. در نتیجه یون کلسیم با استفاده از معرف کالکن کربوکسیلیک اسید^۴ مورد سنجش قرار می‌گیرد. برای سنجش مقدار یون منیزیم باید یون کلسیم به صورت رسوب از محیط خارج شود. برای این منظور از تنگستات سدیم استفاده می‌گردد. وقتی یون کلسیم از محیط حذف شود، یون منیزیم در pH=۱۰ با استفاده از معرف اریوکروم بلک تی مورد سنجش قرار می‌گیرد. بدین منظور بایستی در ابتدا محلول‌های زیر را تهیه کنید:

- محلول بافر: ۶۷/۵ گرم آمونیوم کلرید (NH₄Cl) را وزن و در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید. سپس ۵۷۰ میلی‌لیتر محلول آمونیاک غلیظ (NH₄OH) را به آن اضافه کرده و به حجم یک لیتر برسانید.

- محلول EDTA disodium ۰/۰۲ نرمال: مقدار ۳/۷۲۲۵ گرم EDTA و ۰/۰۳۹ گرم منیزیم کلرید را وزن کرده و در آب مقطر حل کنید. سپس در یک بالن ژوژه به حجم یک لیتر برسانید.

- محلول استاندارد کلسیم: کربنات کلسیم را به مدت ۲ ساعت در حرارت ۴۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار دهید تا خشک شود. مقدار ۰/۵۰۴ گرم از این ماده را وزن و در ۵ میلی‌لیتر هیدروکلریک اسید ۶ نرمال حل کنید. سپس در بالن ژوژه یک لیتری با آب مقطر به حجم برسانید تا محلول ۰/۰۱ نرمال کلسیم تهیه شود.

- محلول استاندارد منیزیم: مقدار ۰/۱۲۱۶ گرم از نوار منیزیم خالص را در محلول رقیق هیدروکلریک اسید حل کنید. سپس در بالن ژوژه یک لیتری با آب مقطر به حجم برسانید تا محلول ۰/۰۱ نرمال منیزیم تهیه شود.

³ Eriochrome Black T 5

³ Calconcarboxylic acid 6

- محلول پتاسیم سیانید: مقدار یک گرم پتاسیم سیانید را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید.
- محلول هیدروکسیل آمین هیدروکلراید ($\text{NH}_2\text{OH}-\text{HCl}$): مقدار ۵ گرم از این ماده را وزن کرده و در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید.
- محلول پتاسیم فروسیانید ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$): مقدار ۴ گرم از پتاسیم فروسیانید را وزن کرده و در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید.
- محلول تنگستات سدیم: مقدار ۲۰ گرم تنگستات سدیم ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) را وزن کرده و در بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتر حل کنید و به حجم برسانید.
- تری اتانول آمین (TEA)
- معرف اریوکروم بلک تی (EBT): مقدار ۰/۲۰ گرم از این معرف را وزن کرده و در ۵۰ میلی لیتر اتانول یا متانول حل کنید. توجه داشته باشید که هر سه هفته یکبار باید محلول تازه معرف تهیه شود. این معرف را می توان به صورت دیگری تهیه کرد. بدین منظور ۰/۵ گرم اریوکروم بلک تی را در ۱۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد حل کنید. ۴/۵ گرم هیدروکسیل آمین هیدروکلراید را به آن بیافزایید و به مدت ۳۰ دقیقه شیک کنید. کریستال های هیدروکسیل آمین هیدروکلراید که در ته ظرف باقی می ماند موجب می شود که به مدت شش ماه معرف قابل استفاده باشد. اگر معرف را به این صورت تهیه کردید، نیازی به افزودن هیدروکسیل آمین هیدروکلراید در فرایند اندازه گیری کلسیم و منیزیم نیست.
- معرف کالکن (کالکن کربوکسیلیک اسید برای سنجش میزان کلسیم): مقدار ۲۰ میلی گرم کالکن را در ۵۰ میلی لیتر متانول حل کنید. هر هفته باید محلول تازه آن تهیه شود.
- محلول سدیم هیدروکسید ۱۰ درصد: مقدار ۱۰ گرم سدیم هیدروکسید را در ۹۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید.
- معرف مورکساید: مقدار ۲۰ گرم پودر پتاسیم سولفات را وزن و با ۰/۱ گرم مورکساید (آمونیم پورپورات) کاملاً مخلوط کنید. سپس مخلوط را در هاون چینی بسابید تا کاملاً نرم شود. بعد از آماده شدن، آن را در ظرف دربسته نگهداری کنید. این پودر باید هفتگی تهیه شود.
- پس از تهیه محلول ها بایستی محلول EDTA استاندارد شود. برای این منظور مقدار ۵ میلی لیتر از محلول استاندارد کلسیم را در داخل سه ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری بریزید و با آب مقطر حجم آن را به ۱۵۰ میلی لیتر برسانید. ۱۵ میلی لیتر محلول بافر، ۱۰ قطره از هر یک از محلول های پتاسیم سیانید، هیدروکسیل آمین هیدروکلراید، پتاسیم فروسیانید، تری اتانول آمین و معرف اریوکروم بلک تی را به آن اضافه کنید. سپس محلول به دست آمده را با محلول EDTA و با استفاده از میکروپورت با دقت و آرام تا رسیدن به رنگ آبی ثابت تیترا کنید. این روش را با ۵ میلی لیتر استاندارد منیزیم تکرار کنید. استاندارد کردن و تعیین فاکتور EDTA را برای هر سری نمونه باید انجام داد. با هر بار استاندارد کردن، باید سه نمونه آب مقطر به عنوان بلانک تیترا شود.
- برای اجرای آزمایش، مقداری از عصاره گل اشباع نمونه خاک را که حاوی یک تا دو میلی گرم کلسیم و منیزیم باشد را در بشر یا ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتر بریزید و حجم آن را با آب مقطر به ۱۵۰ میلی لیتر برسانید. سپس به میزان ۱۵ میلی لیتر بافر

و ۱۰ قطره از هر یک از محلول‌های پتاسیم سیانید، هیدروکسیل آمین هیدروکلراید، پتاسیم فروسیانید و تری اتانول آمین را اضافه کنید. چند دقیقه برای کامل شدن واکنش منتظر بمانید. حرارت دادن انجام واکنش را سرعت می‌بخشد. در مرحله بعد ۱۰ قطره معرف اریوکروم بلک تی را به محلول به دست آمده اضافه کنید و با دقت و به آرامی با EDTA به کمک میکروپورت تیتیر کنید. تغییر رنگ مانند مرحله استاندارد کردن EDTA است.

اگر پایان نقطه تیتراسیون به سختی ایجاد می‌شود، علت آن احتمالاً وجود مقدار زیادی فسفات در محیط است. برای رفع این مشکل، مقداری از عصاره را بردارید و طبق روش مشروح در پاراگراف قبل محلول‌های مورد نیاز را به آن بیافزایید. مقداری معین EDTA (اضافه بر مورد نیاز محلول) به محیط اضافه و با افزودن ۱۵ میلی‌لیتر یا بیشتر محلول بافر pH را به ۱۰ برسانید. محلول را تا نزدیک نقطه جوش چند دقیقه حرارت دهید تا انجام واکنش تسریع گردد. بعد از سرد شدن، ۱۰ قطره معرف اریوکروم بلک تی اضافه کنید و با استاندارد کلسیم تیتیر نمایید تا رنگ از آبی به قرمز ثابت تبدیل شود. در نهایت مجموع غلظت کلسیم و منیزیم در محلول خاک بر حسب میلی‌اکی‌والان بر لیتر از رابطه زیر محاسبه می‌شود:

$$Ca + Mg = \frac{1000 \times (a-b) \times N}{C}$$

a حجم EDTA مصرفی برای نمونه عصاره بر حسب میلی‌لیتر

b حجم EDTA مصرفی برای نمونه بلانک بر حسب میلی‌لیتر

N نرمالیتۀ EDTA

C حجم عصاره خاک تیتیر شده بر حسب میلی‌لیتر

ملاحظات

- اگر از معرف اریوکروم بلک تی با ماندگاری شش ماهه استفاده کردید، نیازی به افزودن هیدروکسیل آمین هیدروکلراید به عصاره نمونه خاک ندارید.

- با بررسی اجمالی روی عصاره خاک‌های هر منطقه و در صورت به دست آمدن نتایج مساوی از افزایش و یا عدم افزایش پتاسیم سیانید، پتاسیم فروسیانید و تری اتانول آمین به عصاره خاک، می‌توانید از افزایش مواد شیمیایی ذکر شده به نمونه مورد اندازه‌گیری صرف نظر نمایید (30).

فهرست منابع و مراجع

1. FAO, ITPS, GSBI, CBD, EC. State of knowledge of soil biodiversity: Status, challenges and potentialities. Rome; 2020.
2. 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.
3. قانون حفاظت از خاک. ۱۳۹۸. p. 91/20704.
4. Chapin FS, Matson PA, Mooney HA. Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology. Springer New York, NY; 2002.
5. 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>
6. 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>
7. 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>
8. آیین نامه اجرایی قانون حفاظت از خاک. ۱۴۰۲. p. 198653/هـ۵۸۳۳۱.
9. FAO. Keep soil alive, protect soil biodiversity. Rome, Italy; 2021.
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 رئیس 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. رنانی م.م، بشری ح.، بصیری م.، مصدقی م. ارزیابی پایداری ساختمان خاک به روش الک تر در برخی از مکان های مرتعی استان اصفهان. نشریه علوم آب و خاک (علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی). ۱۳۹۳؛۱۸(۴): ۱۲۱–۱۳۳.
18. Huber S, Prokop G, Arrouays D, Banko G, Bispo A, Jones R, et al. Environmental Assessment of Soil for Monitoring Volume I: Indicators and Criteria. Luxembourg; 2008.
19. 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>
20. 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>
21. ISO. Soil quality Pretreatment of samoles for physico-chemical analysis. 2006;(11464).
22. ISO. Soil quality Determination of dry matter and water content on a mass basis Gravimetric method. 1993;11465.

23. ISO. Soil quality Determination of particle density. 1998;(11508).
24. علی‌احیایی م، بهبهانی‌زاده ع. شرح روش های تجزیه شیمیایی خاک (جلد اول) نشریه شماره ۸۹۳. موسسه تحقیقات خاک و آب؛ ۱۳۷۲.
25. Sumner ME. Handbook of soil science. TA - TT -. Boca Raton, Fla SE - 1 volume (various pagings) : illustrations ; 26 cm: CRC Press Boca Raton, Fla; 2000.
26. Kemper WD, Rosenau RC. Aggregate stability and size distribution. In: Klute A, editor. Methods of Soil Analysis. 2 nd. Madison, Wisconsin; 1986. p. 425-42.
27. POJASOK T, KAY BD. ASSESSMENT OF A COMBINATION OF WET SIEVING AND TURBIDIMETRY TO CHARACTERIZE THE STRUCTURAL STABILITY OF MOIST AGGREGATES. Can J Soil Sci [Internet]. 1990 Feb 1;70(1):33-42. Available from: <https://doi.org/10.4141/cjss90-004>
28. Six J, Elliott ET, Paustian K, Doran JW. Aggregation and Soil Organic Matter Accumulation in Cultivated and Native Grassland Soils. Soil Sci Soc Am J [Internet]. 1998 Sep 1;62(5):1367-77. Available from: <https://doi.org/10.2136/sssaj1998.03615995006200050032x>
29. Kimble JM, Follett RF, Stewart BA, editors. Assessment Methods for Soil Carbon. CRC Press; 2000.
30. علی‌احیایی م. شرح روش های تجزیه شیمیایی خاک (جلد دوم) نشریه ۱۰۲۴. موسسه تحقیقات خاک و آب
31. McGeorge WT. Diagnosis and Improvement of Saline and Alkaline Soils. Soil Sci Soc Am J [Internet]. 1954 Jul 1;18(3):348. Available from: <https://doi.org/10.2136/sssaj1954.03615995001800030032x>
32. 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>
33. 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>
34. 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>
35. 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>
36. 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>
37. Dickerson OJ. An evaluation of the direct centrifugal-flotation methods of recovering nematodes from soil. Plant Dis Rep. 1977;61:1054-7.
38. 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>
39. 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>
40. 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>
41. 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>
42. 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>

43. 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.
44. 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>
45. Prayogo FA, Budiharjo A, Kusumaningrum HP, Wijanarka W, Suprihadi 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>
46. 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>
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. 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>
52. 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.
53. 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>
54. 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.
55. 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>
56. Rutgers M, van Leeuwen JP, Vreboos D, van Wijnen HJ, Schouten T, de Goede RGM. Mapping Soil Biodiversity in Europe and the Netherlands. Vol. 3, *Soil Systems*. 2019.