دو فصلنامه

نشریه علمی

# زیست شناسی خاک

شاپا: ۲۳۴۵-۲۵۳۶

جلد ۹ شماره ۲ سال ۱۴۰۰

عنوان | فهرست | صفحه

توانایی باکتری‌های سودوموناس فلوروسنت در افزایش زیست فراهمی فسفرخاک و بررسی چند فرمولاسیون از جدایه‌های برتر ..... ۱۰۷
*عبدالرضا اخگر، مریم صادقی گوغری، پیمان عباس‌زاده دهجی و روح‌الله صابری ریسه*

اثرات جنگل‌تراشی و نوع کاربری زمین بر برخی خصوصیات شیمیایی و میکروبی خاک در شمال ایران (مطالعه موردی: سلیم‌شیخ ساری) .....۱۲۳
*حامد معظمی‌گودرزی، بهی جلیلی، مهدی قاجارسپانلو و سروش سالک‌گیلانی*

تأثیر تلفیقی کمپوست، بیوچار و تلقیح زیستی بر فعالیت آنزیمی و برخی شاخص‌های میکروبی خاک ..... ۱۴۱
*نگار رضائی‌دانش، میرحسن رسولی صدقیانی، ندا مرادی و محسن برین*

تأثیر گونه‌های *Streptomyces* بر کارایی میکوریز آربوسکولار و رشد شبدر .....۱۵۵
*زهرا پورمیرزائی، امیر لکزیان، ناصر علی اصغرزاد، علیرضا دهناد و اکرم حلاج‌نیا*

بررسی خصوصیات محرک رشدی جدایه‌های بومی *Azotobacter* و تأثیر تلقیح آنها در شرایط تنش شوری بر رشد ذرت .....۱۷۱
*هوشنگ خسروی*

اثر ژنوتیپ گیاه و مکان جغرافیایی بر روی فراوانی باکتری اندوفیت *متیلوباکتریوم* در میوه دو رقم توت‌فرنگی ..... ۱۸۹
*محمد اختری، بهمن بهرام‌نژاد، بهروز حریقی و محمد ناجی*

بررسی برهمکنش کیتوزان با سرب بر فعالیت آنزیم‌ها در دو خاک اسیدی و آهکی .....۲۰۳
*سعیده افروغ و فرشید نوربخش*

**انجمن علوم خاک ایران** **مؤسسه تحقیقات خاک و آب**

# نشریه علمی

# زیست‌شناسی خاک

## جلد 9 شماره (2)

**1400**

**صاحب امتیاز: موسسه تحقیقات خاک و آب**

***تأییدیه درجه علمی***

*به استناد نامه شماره 3/18/77610 مورخ 1394/4/23 اعتبار علمی نشریه زیست شناسی خاک تمدید شده است*

*مدیر مسؤول:* **دکتر منوچهر گرجی** **رئیس انجمن علوم خاک ایران و استاد دانشگاه تهران**

*سردبیر:* **دکتر هادی اسدی رحمانی** **استاد مؤسسه تحقیقات خاک و آب**

*اعضاء هیأت تحریریه (به ترتیب حروف الفبا):*

| | |
|---|---|
| **دکتر هادی اسدی‌رحمانی** | **استاد موسسه تحقیقات خاک و آب** |
| **دکتر حسین بشارتی** | **استاد موسسه تحقیقات خاک و آب** |
| **دکتر عبدالحسین ضیائیان** | **دانشیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس** |
| **دکتر حسینعلی علیخانی** | **استاد دانشگاه تهران** |
| **دکتر ناصرعلی اصغرزاد** | **استاد دانشگاه تبریز** |
| **دکتر علیرضا فلاح نصرت آباد** | **دانشیار موسسه تحقیقات خاک وآب** |
| **دکتر احمد گلچین** | **استاد دانشگاه زنجان** |
| **دکتر امیر لکزیان** | **استاد دانشگاه فردوسی مشهد** |
| **دکتر حبیب اله نادیان قمشه** | **استاد دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین اهواز** |
| **دکتر فرشید نوربخش** | **استاد دانشگاه صنعتی اصفهان** |

*مدیر داخلی* ***دکتر علیرضا فلاح نصرت آباد***

*ویراستار انگلیسی:* ***دکتر امیر لکزیان***

*تایپ و صفحه آرایی* **کبری علی نژاد**

*تعداد انتشار در سال* **دو شماره**

پایگاه الکترونیکی نشریه علمی زیست‌شناسی خاک: **www.sbj.areeo.ir**

پایگاه الکترونیکی انجمن علوم خاک ایران: **www.soiliran.org**

پایگاه الکترونیکی موسسه تحقیقات خاک و آب: **www.swri.ir**

آدرس الکترونیکی دفتر مجله: **jsb.soilbiology@yahoo.com**

این نشریه در پایگاه‌های علمی زیر نمایه می‌شود:

پایگاه استنادی علوم جهان اسلام (**ISC**): **www.isc.gov.ir**

پایگاه اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی: **www.sid.ir**

پایگاه سیویلیکا: **www.civilica**

***آدرس: کرج - میدان استاندارد، جاده مشکین دشت، بعداز رزکان نو، بلوار امام خمینی – موسسه تحقیقات خاک و آب، کد پستی: 3177993545***

***تلفن و نمابر: 36208796 (026)*** ***آدرس پایگاه الکترونیکی مجله: www.journals.areo.ir***

**عنوان** **فهرست** **صفحه**

**توانایی باکتری‌های سودوموناس فلوروسنت در افزایش زیست فراهمی فسفرخاک و بررسی چند فرمولاسیون از جدایه‌های برتر ..... 107**
***عبدالرضا اخگر، مریم صادقی گوغری، پیمان عباس‌زاده دهجی و روح‌الله صابری ریسه***

**اثرات جنگل‌تراشی و نوع کاربری زمین بر برخی خصوصیات شیمیایی و میکروبی خاک در شمال ایران (مطالعه موردی: سلیم‌شیخ ساری) .....123**
***حامد معظمی‌گودرزی، بهی جلیلی، مهدی قاجارسپانلو و سروش سالک‌گیلانی***

**تأثیر تلفیقی کمپوست، بیوچار و تلقیح زیستی بر فعالیت آنزیمی و برخی شاخص‌های میکروبی خاک ..... 141**
***نگار رضائی‌دانش، میرحسن رسولی صدقیانی، ندا مرادی و محسن برین***

**تأثیر گونه‌های *Streptomyces* بر کارایی میکوریز آربوسکولار و رشد شبدر .....155**
***زهرا پورمیرزائی، امیر لکزیان، ناصر علی اصغرزاد، علیرضا دهناد و اکرم حلاج‌نیا***

**بررسی خصوصیات محرک رشدی جدایه‌های بومی*Azotobacter* و تأثیر تلقیح آنها در شرایط تنش شوری بر رشد ذرت .....171**
***هوشنگ خسروی***

**اثر ژنوتیپ گیاه و مکان جغرافیایی بر روی فراوانی باکتری اندوفیت *متیلوباکتریوم* در میوه دو رقم توت‌فرنگی ..... 189**
***محمد اختری، بهمن بهرام‌نژاد، بهروز حریقی و محمد ناجی***

**بررسی برهمکنش کیتوزان با سرب بر فعالیت آنزیم‌ها در دو خاک اسیدی و آهکی .....203**
***سعیده افروغ و فرشید نوربخش***

## راهنمای تهیه مقاله نشریه علمی زیست شناسی خاک

مجله زیست شناسی خاک اولین نشریهٔ تخصصی رشته علوم خاک در ایران می‌باشد که مقالات پژوهشی مرتبط با تحقیقات صورت گرفته در کلیه جنبه‌های زیست شناسی خاک را چاپ می‌نماید. هدف از انتشار این مجله ارتقاء دانش اساتید، محققان و دانشجویان علاقمند این گرایش و شناخت هر چه عمیق‌تر اززیست شناسی خاک برای حفظ و بهره‌برداری پایدار از خاک می‌باشد. از اهم زمینه‌های فعالیت این نشریه می‌توان به نقش موجودات زنده خاک در چرخه عناصر غذایی و فرآیندهای زیستی مرتبط با بهبود ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و ارتقاء سطح حاصلخیزی خاک، تغذیه گیاه و افزایش عملکرد، مدل‌سازی مکانیسم‌ها و فرآیندهای زیستی مربوط به پویاسازی، معدنی شدن و آلی شدن عناصر غذایی، جایگاه موجودات زنده خاکزی در ذخیره سازی و تغییر و تبدیلات مواد آلی خاک، تنوع زیستی و عملکردی بخش زنده خاک،آنزیم های خاک، روابط موجودات زنده خاک با یکدیگر و همچنین ریشه گیاهان و تبادلات مولکولی بین آنها، تشخیص، بیان و تبادل ژن در خاک، اثرات متقابل انواع آلودگی‌ها و بخش زنده خاک منجمله زیست پالایی خاک‌های آلوده، فرآیندهای زیستی خاک و نقش آنها در تولید و مصرف گازهای گلخانه‌ای، فناوری زیستی موجودات خاکزی برای تولید انواع مایه تلقیح‌ها و کودهای زیستی، فعال کننده-های تجزیه مواد آلی و پاک کننده‌های زیستی خاک‌های آلوده، استفاده از فناوری‌های مولکولی جدید برای شناسایی و همچنین ردیابی موجودات زنده در خاک و نقش آنها در پدیده‌های مختلف خاک اشاره کرد.

**نکات مهم:**

1- متن مقاله نباید در هیچ نشریه‌ای چاپ و یا همزمان به نشریه دیگری ارسال شده باشد.

2- مسئولیت صحت و سقم کلیه مطالب مندرج در مقاله بر عهده نویسندگان می‌باشد.

3- مسئولیت صحت و سقم ترتیب نام نویسندگان بر عهده شخصی است که مقاله را برای نشریه ارسال می‌کند.

4- مقالات صرفاً می‌بایستی منتج از تحقیقات نویسنده یا نویسندگان و فقط در زمینه زیست شناسی خاک باشد.

مقالات باید با استفاده از word 2007 و در محیط windows xp و با استفاده از قلم نازنین 14 تایپ شده باشند. نویسنده(گان) محترم می‌بایستی مقاله از طریق سایت نشریه **www.iranjsb.ir** ارسال نمایند. ذکر نام و نام خانوادگی نویسندگان، مرتبه علمی، آدرس پستی نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیک کلیه نویسندگان به صورت یک مقاله کامل در قسمت فایلهای با نام و فایل بدون نام نویسندگان در فایلهای بدون نام نویسنده، تکمیل و ارسال نسخه اصل تعهدنامه با امضاء خود نویسنده(گان) در فایلهای پیشنیاز سایت الزامی است.

**نحوهٔ نگارش مقاله**

1- مقاله حداکثر در 15 صفحهٔ A4 با فاصلهٔ خطوط 1/5 و حاشیه‌های 3 سانتی‌متر از هر طرف و به صورت تک ستونی در نرم افزارWord 2007 تایپ شود.

2- نوع قلم فارسی و انگلیسی و اندازهٔ آنها مطابق جدول زیر استفاده شود.

3- تمامی سطور در متن مقاله دارای شماره گذاری (Line numbering) باشد.

4- پیش از نقطه (.) و کاما (،) گذاشتن فاصله لازم نیست، لیکن پس از آنها، یک فاصله لازم است.

5- اصول نگارش زبان فارسی به طور کامل رعایت شده و حتی الامکان از به کاربردن اصطلاحات انگلیسی که معادل فارسی آنها در فرهنگستان زبان فارسی تعریف شده‌اند، پرهیز گردد.

6- برای ذکر جنس و گونه گیاه، جانور و یا میکروارگانیسم ها از حالت *ایتالیک* استفاده شود.
7- در صورت استفاده از واژه (های) مخفف باید در اولین استفاده، واژه مذکور تعریف و پس از آن واژه مخفف در مقاله استفاده گردد.
8- استفاده از پاورقی برای ارائه اطلاعات تکمیلی در مقاله بلامانع است. در صورت استفاده از پاورقی، باید به ترتیب شماره گذاری انجام گیرد.

**جدول 1- نوع و اندازه قلم برای تهیه بخش های مختلف مقاله**

| موقعیت استفاده | نام قلم | اندازه قلم |
|---|---|---|
| **عنوان مقاله** | **BNazaninپر رنگ** | 14 |
| متن مقاله | BNazanin | 12 |
| **عناوین بخش های مقاله** | **BNazanin پر رنگ** | 12 |
| **نام مؤلفان** | **BNazanin پر رنگ** | 12 |
| **کلمات کلیدی(Keywords)** | **BNazanin پر رنگ** | 12 |
| **عناوین جداول و اشکال** | **BNazanin پر رنگ** | 11 |
| متن جداول و شکل ها و منابع | BNazanin | 10 و یا 11 برحسب نیاز |
| متن انگلیسی | Times New Roman | یک واحد کمتر از اندازهٔ فارسی در هر موقعیت |

**ساختار مقاله**

هر مقاله باید شامل برگ مشخصات ، عنوان ، چکیده فارسی، واژه‌های کلیدی فارسی، مقدمه، مواد و روش-ها، نتایج، بحث، سپاسگزاری، منابع مورد استفاده، چکیده انگلیسی و واژه‌های کلیدی انگلیسی باشد.

**برگ مشخصات مقاله**: این قسمت در یک صفحه مجزا تهیه شده و شامل عنوان مقاله، نام و نام خانوادگی، مرتبه علمی، محل خدمت و آدرس پستی و پست الکترونیکی نویسنده(گان) و شماره تماس نویسنده مسئول می‌باشد.

عنوان مقاله: عنوان مقاله حداکثر در 20 کلمه و منعکس کننده محتوای مقاله باشد.در زیر عنوان نام و نام خانوادگی، مرتبه علمی، محل خدمت و آدرس پستی و پست الکترونیکی نویسنده(گان) ذکر گردد.

**چکیده فارسی:** چکیده مقاله در حداکثر 300 کلمه، بیانگر مسئله، هدف، روش و نتایج بدست آمده و نتیجه گیری کلی از پژوهش است. چکیده می‌بایستی ترجیحاً در یک پاراگراف تنظیم گردد.در زیر چکیده فارسی و در پاورقی آدرس پستی نویسنده مسئول ذکر گردد.

**واژه‌های کلیدی:**

واژه‌های کلیدی(**Keywords** ) شامل حداقل 3 و حداکثر 6 کلمه مرتبط با پژوهش انجام شده باشد. این واژه‌ها می‌بایستی به گونه‌ای انتخاب گردد که در عنوان مقاله نبوده تا حداکثر استفاده از آنها برای تهیه فهرست موضوعی (index) امکان پذیر باشد. واژه های کلیدی بر اساس حروف الفبای فارسی مرتب شوند.

**مقدمه**

در این بخش بایستی موضوع پژوهش و فرضیه‌های موردنظر تعریف گردد. بـه مهـم‌تـرین تحقیقـات صـورت گرفته قبلی در داخل و خارج از ایران اشاره شود و سپس لزوم پژوهش موردنظر تشریح و با تأکید بر وجه تمایز ایـن پژوهش با مطالعات قبلی مشخص شود.

**مواد و روش‌ها**

این قسمت شامل مواد مورد استفاده و شرح روش بکار رفته مانند جامعه آمـاری، روش‌هـای نمونـه گیـری، اندازه گیری‌ها و نحوه تجزیه و تحلیل آماری می‌باشد. برای روش‌های متداول و شناخته شده نیازی به ذکر جزئیـات وجود نداشته و فقط به منبع مورد استفاده اشاره شود.

**نتایج**

در این بخش، نتایج بدست آمده از پژوهش به همراه جدول و شکل (اعم از تصویر یا نمودار) بیان می‌شود. از تکرار داده‌ها به صورت چندگانه (جدول، نمودار و غیره) پرهیز گردد. ارسال فایل Excel مربوط به نمودارها الزامی است. از کلماتی نظیر گراف، نقشه، تصویر و نظایر آن خودداری شده و تنها از واژه «شکل» استفاده شود. هر جدول از شماره، عنوان، سرستون ها و متن جدول تشکیل می‌شود. یک جدول باید با خطی افقی از شماره و عنوان جدول متمایز شود. همچنین سر جدول با یک خط افقی از متن جدول جدا و در زیر متن جدول نیز یک خط افقی رسم شود. عنوان جدول در بالای جدول درج و پس از کلمه جدول و شماره آن، خط تیره و سپس عنوان ذکر شود. در متن جدول تا جایی که ممکن است نباید از خطوط افقی و عمودی استفاده کرد. هر ستون جدول باید دارای عنوان و واحد مربوط به کمیّت آن ستون باشد. اگر همهٔ ارقام جدول دارای یک واحد مشترک باشند، آن واحد در عنوان اصلی جدول ذکر شود. توضیحات اضافی عنوان و متن جدول به صورت زیرنویس ارائه شوند.

در نمودارها از نشانه‌های○□Δ●■▲ به صورت توپر و توخالی استفاده شود. برای درج عنوان هر شکل، پس از کلمهٔ شکل و شمارهٔ آن، نقطه و سپس عنوان ذکر شود. اختصارات موجود در شکلها و جداول باید در زیرنویس توضیح داده شوند. تمام اعداد متن و توضیحات جداول و شکلها باید به زبان فارسی ارائه گردد. از ارسال نمودارهای رنگی جداً اجتناب نموده و از رنگهای سفید، سیاه و هاشورهای کاملاً متفاوت استفاده شود..

تمامی جداول و اشکال باید به ترتیب شماره در مقاله آورده شوند و شماره مذکور نیز باید به همان ترتیـب در مـتن مقاله مورد اشاره قرار گیرد.

**بحث**

در این قسمت با استفاده از سایر منابع، یافته‌های پژوهش علت‌یابی شده و دلایل قبول و رد آنها مورد بحث قرار می‌گیرد. بنابراین قسمت عمده بررسی منابع در این قسمت مورد استناد قرار می‌گیرد.

* در صورت لزوم می‌توان نتایج و بحث را توأماً تحت عنوان «**نتایج و بحث**» ارائه کرد.

**نتیجه گیری**

در این بخش نویسنده از پژوهش انجام یافته نتیجه گیری کرده و کاربرد عملی و یا تئوری حاصل از تحقیق را بیان می‌نماید. ارائه پیشنهادات در این بخش انتهائی نیز بلامانع است.

**سپاسگزاری**:

در این بخش نویسنده(گان) از اشخاص و سازمان‌هایی که در اجرای تحقیق همکاری داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌نماید. این بخش در حداکثر 50 کلمه تنظیم گردد.

**منابع مورد استفاده**:

فهرست منابع باید شامل منابعی باشد که در متن ذکر شده و انتشار یافته اند و نیز شامل منابعی می‌شوند که برای چاپ پذیرفته شده اند. مکاتبات شخصی و یا تحقیقات چاپ نشده فقط در متن مقاله قابل ذکر می باشند. در مورد منابعی که بصورت آنلاین چاپ شده اند و فاقد شماره جلد و یا صفحه می باشند، ذکر شناسه دیجیتال (DOI) ضروری است.

شیوهٔ ارجاع به منابع علمی در تمام متن مقاله بایستی به صورتی باشد که منبع مورد ارجاع(چه فارسی و چه انگلیسی) در پایان جمله در داخل پرانتز به فارسی ارائه شود. برای منابع دارای دو نویسنده، نام هر دو نویسنده و منابعی که بیش از دو نویسنده دارند، نخست نام نفر اول و سپس " همکاران" و تاریخ بیان شود. مثال:

..... نتایج مشابهی توسط برخی پژوهشگران نیز گزارش شده است (کریمی و احمدی، 1389).

..... نتایج مشابهی توسط سایر محققان گزارش شده است (آلوی و همکاران، 2010).

..... نتایج مشابهی توسط سایر محققان گزارش شده است (آلوی و همکاران، 2010؛ کریمی و احمدی، 1389).

برای منابعی که لزوما در داخل پرانتز ارائه نمی شود بدین صورت عمل شود.

بای بوردی و همکاران (1382) گزارش کردند...

اسمیت (2002) گزارش کرد ...

اسمیت و جونز (2002) گزارش کردند...

اسمیت و همکاران (2002) گزارش کردند...

فهرست منابع مورد استفاده در پایان متن به صورت پیوسته و به ترتیب منابع فارسی و انگلیسی ارائه شوند. منابع مورد استفاده به ترتیب حروف الفبای نام خانوادگی نگارنده، (یا اولین نگارنده برای منابعی که بیش از یک نگارنده دارند) زیر هم آورده شوند. چنانچه از یک نگارنده چندین منبع ذکر شود، ترتیب درج آن‌ها بر حسب سال انتشار، از جدید به قدیم است. اگر از نگارنده‌ای چندین منبع همسال وجود داشته باشد، با گذاشتن حروف a، b و c پس از سال انتشار منابع از یکدیگر متمایز شوند. چنانچه مقالات منفرد و مشترک در یک سال از یک نگارنده ارائه شود، نخست مقالات منفرد و سپس مقاله‌های مشترک به ترتیب حروف الفبای نام نگارندگان بعدی مرتب شوند.

برای یک مقاله یا کتاب به ترتیب نام خانوادگی نگارنده(گان)، حرف اول اسم کوچک نگارنده(گان)، تاریخ انتشار، عنوان مقاله، عنوان کامل مجله، شماره جلد، و اولین و آخرین صفحه مقاله ارائه شود. برای یک کتاب به ترتیب نام خانوادگی و سپس حرف اول نام کوچک نگارنده، تاریخ انتشار، عنوان کامل کتاب، نام ناشر، محل انتشار ارائه شود.

در مورد مرجعی که نویسنده آن مشخص نیست به جای نام نگارنده از "Anonymous" برای منابع انگلیسی و (بی نام) برای منابع فارسی استفاده شود.

چنانچه منبع ترجمه شده باشد، در فهرست منابع باید نخست نام نویسنده(گان) کتاب اصلی، عنوان مشخصات آن (به زبان انگلیسی) و سپس نام مترجم (مترجمان) ذکر شود.

**مثال‌هایی برای تنظیم منابع**

1- مقاله از مجله

Brennan, E.W. and Lindsay, W.L.1998. Reduction and oxidation effect on the solubility and transformation of iron oxides. Soil Science Society of America Journal 62:930–937.

2- مقاله از کارگاه آموزشی یا علمی

Hanbury, A. 2002. The taming of the hue, saturation and brightness colour Space, 7th Computer Vision Winter Workshop, February 2002, Bad Aussee, Austria.

3- مطلب از کتاب

Lindsay, W.L. 1979. Chemical equilibrium in soils. John Wiley & Sons, New York.

4- مطلب نقل شده یک نویسنده در یک مجموعه مقالات

Logsdon, S.D. and Laird, D.A. 2003. Ranges of bound water properties associated with a smectite clay. p. 101–108. In: Electromagnetic Wave Interaction with Water and Moist Substance. Proc. of Conf., Rotorua, New Zealand. 23–26 Mar. 2003. Industrial Research, Auckland, New Zealand.

5- ذکر مطلب از نویسنده ای در یک کتاب که نام ویراستاران روی جلد آن است

Olsen, S.R. and Sommers, L.E.1982. Phosphorus. p. 403–427. In: Page, A.L. (ed.) Methods of soil analysis. Part 2. 2nd ed. Agron. Monogr. No. 9. ASA and SSSA, Madison, WI.

6- ذکر مطلب از اینترنت

Soil Survey Staff. 2004. NRCS soils [Online]. Available at http://soils. usda.gov [verified 23 Mar. 2005]. USDA-NRCS, Washington, DC.

**چکیده انگلیسی**

چکیده انگلیسی بایستی ترجمه دقیق چکیده فارسی باشد.

واژه‌های کلیدی انگلیسی: باید ترجمه دقیق واژه‌های کلیدی فارسی باشد. واژهای کلیدی بر اساس حروف الفبای انگلیسی مرتب شوند و حرف اول کلمات به صورت بزرگ (کاپیتال) نوشته شود.

کلیه مقالات پس از دریافت توسط سردبیر بررسی و پس از تایید با راهنمای تهیه مقاله تطبیق و در صورت رعایت فرمت نشریه، مقاله برای داوری ارسال خواهد شد. پس از اتخاذ رأی داوران و تأیید گروه دبیران (هیأت تحریریه)، مقاله در نوبت چاپ قرار خواهد گرفت. چنانچه مقاله ارسالی با راهنمای تهیه مقاله تطبیق نداشته باشد به نویسنده مسئول عودت داده خواهد شد و مجدداً از زمان برگشت، تاریخ رسید مقاله منظور و برای داوری ارسال خواهد شد.

# فرم تعهد نامه

**نشریه علمی زیست‌شناسی خاک**

**اینجانب ..... نویسنده مسئول مقاله زیر:**

**موارد زیر را به آگاهی می رسانم:**

1. **کلیه تهیه کنندگان مقاله از ارسال آن به دفتر نشریه شما آگاهند**
2. **مقاله قبلاً در هیچ نشریه داخلی و خارجی منتشر نشده است**
3. **مقاله تا زمان پایان بررسی در آن نشریه به نشریه دیگری ارسال نخواهد شد.**
4. **هیچگونه تغییری در تعداد نویسندگان یا ترتیب ذکر اسامی انجام نخواهد شد.**

**نام نام خانوادگی نویسنده اول:** **امضاء نویسنده اول مقاله**

**نام نام خانوادگی نویسنده دوم:** **امضاء نویسنده دوم مقاله**

**نام نام خانوادگی نویسنده سوم:** **امضاء نویسنده سوم مقاله**

**نام نام خانوادگی نویسنده چهارم:** **امضاء نویسنده چهارم‌مقاله**

## داوران مقالات واصله به دفتر نشریه علمی زیست‌شناسی خاک شش ماه دوم سال 1400

| | | | |
|---|---|---|---|
| دکتر علیرضا توسلی | 1 مقاله | دکتر پیمان عباس زاده | 4 مقاله |
| دکتر کبرا ثقفی | 2 مقاله | دکتر ناصر علی اصغرزاد | 2 مقاله |
| دکتر وحید الله جهاندیده | 1 مقاله | دکتر حسینعلی علیخانی | 1 مقاله |
| دکتر هوشنگ خسروی | 4 مقاله | دکتر علیرضا فلاح | 1 مقاله |
| دکتر مژگان سپهری | 1 مقاله | دکتر رسول میرخانی | 1 مقاله |
| دکتر علی اشرف سلطانی | 2 مقاله | دکتر فرشید نوربخش | 1 مقاله |

# توانایی باکتری‌های سودوموناس فلوروسنت در افزایش زیست فراهمی فسفر خاک و بررسی چند فرمولاسیون از جدایه‌های برتر

عبدالرضا اخگر[1]، مریم صادقی گوغری، پیمان عباس‌زاده دهجی و روح‌الله صابری ریسه

دانشیار گروه علوم خاک دانشگاه ولی عصر رفسنجان؛ **arakhgar@yahoo.com**

دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشگاه ولی عصر رفسنجان؛ **maryam_sadeghi175@yahoo.com**

استادیار گروه علوم خاک دانشگاه ولی عصر رفسنجان؛ **p.abbaszadeh@vru.ac.ir**

دانشیار گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه ولی عصر رفسنجان؛ **r.saberi@vru.ac.ir**

دریافت: **99/2/13** و پذیرش: **1400/3/19**

## چکیده

**فسفر یکی از عناصر مورد نیاز گیاه است و کاهش تثبیت یا افزایش فراهمی آن در خاک می‌تواند نقش مؤثری در کاهش مصرف کودهای شیمیایی داشته باشد. این پژوهش به‌منظور بررسی چند فرمولاسیون از باکتری سودوموناس فلورسنت حل‌کننده فسفات انجام گرفت. بدین منظور ابتدا 30 جدایه از باکتری‌های گروه سودوموناس فلورسنت از بانک میکروبی دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان تهیه گردید. سپس توانایی جدایه‌ها برای حل تری‌کلسیم فسفات در محیط جامد و مایع اندازه‌گیری شد. همچنین در زمان‌های 15، 30 و 60 روز، توانایی جدایه‌ها در افزایش زیست فراهمی فسفر در خاک (با و بدون حضور خاک فسفات) تعیین گردید. در آخر ماندگاری جدایه‌های منتخب در چند فرمولاسیون مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد تمامی جدایه‌ها قادر به افزایش حلالیت تری‌کلسیم فسفات در محیط جامد و مایع PKV و کاهش pH محیط کشت بودند. بیشترین و کمترین حلالیت تری‌کلسیم فسفات در محیط جامد PKV به‌ترتیب مربوط به جدایه‌های D33 و D24 و در محیط مایع به‌ترتیب مربوط به D6 و D4 بود. همچنین نتایج نشان داد که جدایه D33 فراهمی فسفر خاک را در زمان‌های 15، 30 و 60 روز به‌ترتیب معادل 48، 25 و 75 درصد و جدایه D33 به‌ترتیب معادل 72، 50 و 26 درصد نسبت به شاهد افزایش دادند. بررسی جمعیت جدایه‌های D33 و D35 در سه فرمولاسیون پودر تالک، پودر تالک+سبوس برنج و پودر تالک+خاک اره در 150 روز پس از تهیه نشان داد که بیشترین و کمترین جمعیت جدایه D33 به‌ترتیب مربوط به فرمولاسیون پودر تالک و پودر تالک+سبوس برنج ($10^5$ cfu/g) و فرمولاسیون پودر تالک+خاک اره ($8\times10^3$ cfu/g) بود. همچنین بیشترین و کمترین جمعیت جدایه D35 به ترتیب در فرمولاسیون پودر تالک+سبوس برنج ($10^5$ cfu/g) و پودر تالک+خاک اره (10cfu/g) مشاهده گردید. در مجموع فرمولاسیون پودر تالک+سبوس برنج توانست در پایان 150 روز جمعیت جدایه‌های D33 و D35 را در حد قابل قبول و معادل $10^6$cfu/g نگه‌دارد.**

**واژه‌های کلیدی:** باکتری ریزوسفری محرک رشد گیاه، فرمولاسیون، مایه تلقیح

---

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: رفسنجان، دانشگاه ولی عصر رفسنجان، دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی علوم خاک

**مقدمه**

امروزه مشکلات اقتصادی ناشی از افزایش رو به رشد هزینه کودهای شیمیایی از یک سو و مسائل زیست محیطی مرتبط با مصرف غیر اصولی این کودها از سوی دیگر، تفکر استفاده از شیوه‌های زیستی برای تقویت رشد و افزایش عملکرد محصولات زراعی را قوت بخشیده است (کوموتا و همکاران، 2004). فسفر یکی از عناصر اصلی و ضروری مورد نیاز برای رشد و توسعه محصولات کشاورزی است (شارما و همکاران، 2013). اکثر خاک‌های کشاورزی شامل ذخایر بزرگی از فسفر به شکل معدنی هستند، اما غلظت فسفر قابل دسترس برای گیاهان بسیار پایین می‌باشد (ریچاردسون و همکاران، 2009). به دلیل این‌که یون‌های فسفات بسیار واکنش‌پذیر بوده و به شکل کمپلکس‌های فلزی با کلسیم در خاک‌های آهکی و آهن و آلومینیوم درخاک‌های اسیدی تثبیت می‌شوند (نوریش و رز، 1983) لذا بهره‌بردای از فسفر پایین بوده و برای جبران سالانه از منابع معدنی گران قیمت یعنی کودهای فسفره به مقدار زیاد استفاده می‌شود (هاروی و همکاران، 2009) که این امر اقتصادی نبوده و باعث تخریب محیط زیست می‌گردد (گیانشوار و همکاران، 2002). از این رو تلاش‌هایی در جهت جایگزینی ابزارهای بیوتکنولوژی و دوست‌دار محیط زیست در فعالیت‌های کشاورزی پایدار مثل استفاده از کودهایی که پایه میکروبی دارند صورت گرفته است (دوبلر و همکاران، 2003).

تحقیقات انجام شده روی برهم‌کنش بین گیاهان، خاک و سایر ریزجانداران نشان داده است که روابط بین آن‌ها می‌تواند راه‌هایی را برای استفاده از این موجودات در اهداف کشاورزی امکان‌پذیر سازد (مالوسا و همکاران، 2012). از منابع زیستی می‌توان به باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه، که به آن‌ها باکتری‌های[1] PGPR اطلاق می‌گردد، اشاره کرد. در بین باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه، استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB[2]) می‌تواند یک روش جایگزین برای برآوردن نیاز گیاهان به فسفر در کشاورزی پایدار باشد (لاواکوشا و همکاران، 2014). مشخص شده است که تعداد زیادی از ریزجانداران از جمله باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی توانایی انحلال فسفات‌های نامحلول را دارند (باشان و همکاران، 2013؛ سلوی و همکاران، 2017). گزارش‌های متعددی وجود دارد که توانایی سویه‌های مختلف باکتریایی در انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول همچون تری‌کلسیم فسفات، دی‌کلسیم فسفات، دی هیدروکسی آپاتیت و خاک فسفات را نشان می‌دهد (خوشرو و همکاران، 2015؛ ملبوبی و همکاران، 2009؛ ساریخانی و همکاران، 2016). باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌توانند ترکیبات فسفات نامحلول را از طریق فرایندهای تولید پروتون، تولید اسیدهای آلی با وزن ملکولی کم مانند سیتریک اسید، گلوکونیک اسید و نیز تولید عوامل کلات‌کننده به اشکال قابل استفاده برای گیاهان تبدیل کنند (لیو و همکاران، 2014). باکتری‌های حل‌کننده فسفات علاوه بر توانایی انحلال فسفر نامحلول، از طریق مکانیسم‌های دیگری چون تولید هورمون‌های گیاهی، سیدروفور و کنترل ریزجانداران بیماری‌زا تأثیرات مفید دیگری نیز بر روی رشد گیاه دارند (وسی، 2003).

کودهای میکروبی نوعی از کودهای زیستی هستند که از ریزجانداران مفید در بستری از مواد آلی- معدنی بهره برده می‌شود. یکی از کودهای میکروبی مهم، کود میکروبی فسفاتی است که با توجه به اهمیت فسفر به عنوان یکی از عناصر غذایی پرمصرف برای محصولات کشاورزی، استفاده از آن مورد توجه قرار گرفته است (ضیائیان و همکاران، 1388). کاربرد باکتری‌های حل کننده فسفات‌های معدنی در خاک به عنوان کود میکروبی، یکی از راه‌های مؤثر برای افزایش قابلیت جذب فسفر در خاک است. این دسته از باکتری‌ها گرچه فسفر را در ساختار سلولی خود به خدمت می‌گیرند، ولی بخشی از آن

[1] Plant Growth Promoting Rhizobacteria; (PGPR)

[2] Phosphate Solubilizing Bacteria; (PSB)

که در محیط آزاد شده است می‌تواند در اختیار گیاه قرار گیرد (فاجریا، 2009).

اگر چه فرمولاسیون مایع از نظر استفاده آسان و آبگیری مجدد بر فرمولاسیون پودری ارجحیت دارد (ملین و همکاران، 2006). ولی قابلیت ماندگاری آن در طول دوره نگه‌داری در مقایسه با فرمولاسیون پودری بسیار پایین می باشد (ملین و همکاران، 2007). از این رو معمولاً در شرایط مزرعه از مایه تلقیح باکتری‌های محرک رشد به عنوان کود میکروبی به‌صورت مایع (سوسپانسیون باکتریایی) استفاده نمی‌شود بلکه برای سهولت حمل و نقل و ذخیره‌سازی، سوسپانسیون باکتریایی را با حامل جامد معینی مخلوط و به صورت فرمولاسیون مناسب مورد استفاده قرار می‌دهند (کلوپر، 1993). یک محصول میکروبی فرموله شده به معنای محصولی متشکل از توده زیستی به همراه موادی است که رشد و عملکرد محصول را بهبود بخشد (شیسلر و همکاران، 2004).

مختارنژاد و همکاران (1390) در تهیه کود میکروبی برای سلول‌های مخمر از فرمولاسیون‌های پودری تالک، کائولین، سبوس گندم و سبوس برنج همراه با افزودنی‌های مختلف شامل سوکروز، صمغ عربی و سدیم آلژینات استفاده نمودند. در این تحقیق آنها ماندگاری فرمولاسیون‌های نگه‌داری شده در شرایط تاریکی و در دمای 4 و 24 درجه سلسیوس را در مدت شش ماه اندازه‌گیری کردند. نتایج نشان داد بیشترین جمعیت سلول در دمای $4^{oc}$ در فرمولاسیون‌های سبوس گندم همراه با صمغ عربی و سبوس گندم همراه با سوکروز رخ داد و در $24^{oc}$ حداکثر ماندگاری عامل زیستی مربوط به سبوس برنج همراه با سوکروز بود.

در تحقیقی دیگر به منظور تهیه کود میکروبی فسفاته پودری از فرمولاسیونی شامل مخلوطی از سنگ فسفات، باگاس و گوگرد به نسبت 45 : 30 : 15 استفاده گردید. نتایج این پژوهش نشان داد که جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات در این فرمولاسیون با زمان روندی کاهشی داشت؛ به طوری که پس از گذشت شش ماه از تلقیح، میانگین جمعیت جدایه‌های مورد آزمون از $3/5\times10^6$ به $7/3\times10^4$ سلول باکتری در گرم فرمولاسیون (cfu/g ) رسید (خوشرو و ساریخانی، 1397).

رمز موفقیت یک کود میکروبی علاوه بر انتخاب بهترین سویه، فرمولاسیون مناسب با ماندگاری قابل قبول آن است و برای دستیابی به این ماندگاری مناسب، لازم است فرمولاسیون‌های متعددی مورد آزمون قرار گرفته تا مناسب‌ترین فرمولاسیون که بتواند در شرایط خاک عامل میکروبی را تا ظهور ریشه‌ها و تلقیح آنها زنده نگه‌دارد انتخاب نمود. از این رو و با توجه به ضرورت استفاده از کودهای میکروبی به صورت یک فرمولاسیون مناسب در کشاورزی، این پژوهش به هدف بررسی چند فرمولاسیون از حیث ماندگاری باکتری‌های سودوموناس فلورسنت حل‌کننده فسفات‌های معدنی و انتخاب فرمولاسیون مناسب انجام گرفت.

## مواد و روش‌ها

### تهیه جدایه‌های سودوموناس فلورسنت

در این تحقیق تعداد 30 جدایه PGPR از گروه سودوموناس‌های فلورسنت از بانک میکروبی گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصررفسنجان تهیه گردید.

### بررسی توان جدایه‌ها در حل تری‌کلسیم فسفات در محیط جامد

ابتدا باکتری‌ها به مدت 48 ساعت در محیط مایع King B کشت داده شدند. پس از تنظیم تراکم سوسپانسیون‌ها برابر یک در طول موج 600 نانومتر، 10 میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری با روش لکه‌گذاری در سه تکرار روی پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد PKV[1] (در هر لیتر شامل 10 گرم گلوکز، 0/5 گرم $(NH_4)_2SO_4$، 0/5 گرم $MgSO_4.7H_2O$، 0/3 گرم NaCl، 0/03 گرم $FeSO_4.7H_2O$، 0/02 گرم $MnSO_4.H_2O$، 0/3 گرم KCl و 5 گرم $Ca_3(PO_4)_2$) تلقیح و پلیت‌ها در دمای

[1] Pikovskaya

28 درجه سلسیوس به مدت پنج روز در انکوباتور نگه-داری شدند. هاله شفاف اطراف کلنی به عنوان معیاری از میزان حلالیت تری‌کلسیم فسفات در نظر گرفته شد. در این آزمون توانایی جدایه‌ها در انحلال تری‌کلسیم فسفات از طریق محاسبه نسبت قطر هاله بر قطر کلنی تعیین گردید (رشید و همکاران، 2004).

**بررسی توان جدایه‌ها در حل تری‌کلسیم فسفات در محیط مایع**

برای این منظور از محیط مایع PKV حاوی دو و نیم گرم بر لیتر نمک نامحلول تری‌کلسیم فسفات استفاده شد. ابتدا باکتری‌ها به مدت 48 ساعت در محیط مایع King B کشت داده شدند و پس از تنظیم تراکم سوسپانسیون‌ها برابر یک در طول موج 600 نانومتر، 100 میکرولیتر از تعلیق هر باکتری به 30 میلی‌لیتر محیط PKV منتقل گردید. ارلن‌های تلقیح شده همراه با یک شاهد (محیط کشت بدون باکتری) به مدت 120 ساعت تکان داده شدند. آنگاه pH سوسپانسیون‌های باکتریایی قرائت شد. بخشی از سوسپانسیون باکتری‌ها نیز سانتریفوژ (با دور 10000 به مدت 15 دقیقه) شدند. سپس یک میلی‌لیتر از محلول رویی با سه میلی‌لیتر آب مقطر و یک میلی‌لیتر معرف آمونیوم مولیبدات - وانادات مخلوط و پس از 20 دقیقه، میزان جذب نور با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج 470 نانومتر قرائت گردید. غلظت فسفر بر حسب میلی‌گرم بر لیتر با مقایسه جذب نوری هر سوسپانسیون با منحنی استاندارد تهیه شده با $KH_2PO_4$ محاسبه شد (جئوان و همکاران، 2003).

**تهیه خاک**

به منظور بررسی توانایی جدایه‌های منتخب در افزایش زیست فراهمی فسفر در شرایط آزمایشگاهی از یک خاک زراعی با بافت شنی لومی غیر شور با فسفر قابل دسترس کم استفاده شد. برای این خاک برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن شامل بافت به روش هیدرومتر (بایکاس، 1951)، pH گل اشباع به وسیله دستگاه pH متر، هدایت الکتریکی عصاره اشباع با دستگاه هدایت سنج الکتریکی و مقدار فسفر قابل دسترس به روش اولسن (اولسن، 1954) با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل T80UV/VIS Spectrometer) تعیین گردید. همچنین سنگ فسفات مورد استفاده در این آزمون از نوع رسوبی بوده و از معدن پارسا واقع در استان فارس تهیه گردید.

**بررسی تأثیر باکتری‌ها بر افزایش زیست فراهمی فسفر در خاک در شرایط آزمایشگاهی**

هدف از انجام این آزمون ارزیابی توانایی جدایه‌ها در انحلال فسفات‌های معدنی خاک در حضور و عدم حضور سنگ فسفات و انتخاب جدایه‌های برتر برای تهیه فرمولاسیون مناسب بود. با توجه به نتایج آزمون‌های تعیین توان جدایه‌ها در حل تری‌کلسیم فسفات در محیط-های جامد و مایع، تعداد 10 جدایه سودوموناس فلورسنت انتخاب شدند. جدایه‌ها به مدت 48 ساعت درون محیط کشت TSB[1] (با نصف غلظت متعارف) در دمای 28 درجه سلسیوس درون شیکر انکوباتور کشت داده شدند و پس از هم‌سان نمودن تراکم سوسپانسیون‌ها به عنوان مایه‌تلقیح مورد استفاده قرار گرفتند.

این آزمون در شرایط آزمایشگاه، درون ظروف حاوی 40 گرم خاک به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار اجراشد. فاکتورها شامل تلقیح باکتری در 12 سطح (10 جدایه سودوموناس فلورسنت، تیمار بدون باکتری با مقادیر کافی کود فسفره از منبع $K_2HPO_4$به‌عنوان شاهد مثبت و تیمار بدون باکتری و کود فسفره به‌عنوان شاهد منفی) و نوع خاک در دو سطح (ظروف حاوی 40 گرم خاک استریل و ظروف حاوی 40 گرم خاک استریل همراه با 0/03 گرم سنگ فسفات پودر شده) بودند. لازم به ذکر است درتیمارهای باکتریایی، هر خاک با چهار میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری مربوطه با تراکم $10^8$ سلول در هر میلی‌لیتر تلقیح گردید. برای تیمار شاهد مثبت از چهار میلی‌لیتر محیط کشت بدون باکتری و غنی شده با 0/1 مولار $K_2HPO_4$ و برای شاهد منفی صرفاً

[1] Tryptic Soy Broth

از چهار میلی‌لیتر محیط کشت بدون باکتری استفاده گردید. این آزمون برای سه زمان مختلف 15، 30 و 60 روز به‌طور جداگانه انجام و فسفر قابل دسترس خاک با دستگاه اسپکتروفتومتری (مدل T80UV/VIS Spectrometer) و به روش اولسن اندازه‌گیری شد. در ضمن هوادهی ظروف هر پنج روز یک‌بار انجام و رطوبت نمونه‌های خاک نیز هر پنج روز یک بار با آب مقطر استریل در 70% ظرفیت زراعی تنظیم گردید.

**تهیه فرمولاسیون باکتریایی**

در این پژوهش از فرمولاسیون‌های زیر استفاده شد:

1- پودر تالک 64 گرم + CMC[1] 16 گرم + دو میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی واجد $10^9$ سلول باکتری در هر میلی‌لیتر + هشت میلی‌لیتر آب مقطر استریل.

2- پودر تالک 21/3 گرم + سبوس برنج 21/3 گرم + پودر سویا 21/3 گرم + CMC 16 گرم + دو میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی واجد $10^9$ سلول باکتری در هر میلی‌لیتر + هشت میلی‌لیتر آب مقطر استریل.

3- پودر تالک 21/3 گرم + خاک اره 21/3 گرم + پودر سویا 21/3 گرم + CMC 16 گرم + دو میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی واجد $10^9$ سلول باکتری در هر میلی‌لیتر + هشت میلی‌لیتر آب مقطر استریل.

ابتدا برای هر فرمولاسیون، مقادیر ذکر شده به صورت پودری با هم مخلوط گردید. سپس از سوسپانسیون دو باکتریایی منتخب به فرمولاسیون‌ها اضافه و به مدت هشت ساعت زیر هود و در دمای اتاق قرار داده شد تا آب اضافی تبخیر شود. لازم به ذکر است که نسبت CMC به بقیه مواد یک به چهار (1:4) بود (ناکران و همکاران، 2005). در ضمن برای بررسی ماندگاری باکتری در فرمولاسیون‌ها، مقداری از ترکیب حاصل در دمای اتاق درون لوله‌های فالکون نگه‌داری شد تا هر 30 روز یک بار و برای مدت 150 روز جمعیت آنها بررسی گردید.

**تعیین ماندگاری باکتری‌ها در فرمولاسیون‌ها**

برای بررسی ماندگاری باکتری در فرمولاسیون‌های مورد آزمون جمعیت باکتری برای مدت 150 روز و در فواصل زمانی 30 روزه اندازه‌گیری شد. بدین منظور یک گرم از هر فرمولاسیون باکتری به 99 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه و به مدت نیم ساعت با 200 دور بر دقیقه تکان داده شد. سپس از سوسپانسیون حاصل سری رقت تهیه گردید ($10^{-1}$ تا $10^{-9}$). از هر رقت به مقدار 100 میکرولیتر روی محیط کشت جامد TSB (با نصف غلظت متعارف) درون پتری دیش‌ها در سه تکرار پخش و پتری دیش‌ها در دمای 28 درجه سلسیوس درون اینکوباتور قرار داده شدند تا کلنی‌ها ظاهر گردند. جمعیت باکتری در هر گرم فرمولاسیون با شمارش کلنی‌های ظاهر شده در رقت مناسب (50 تا 150 کلنی در پلیت) و معدل‌گیری از تکرارها محاسبه گردید.

**تجزیه و تحلیل آماری**

تجزیه واریانس تمامی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SASصورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. همچنین جدول‌ها و نمودارهای مربوطه با استفاده از برنامه‌های Word و Excel رسم گردید.

## نتایج و بحث

**توانایی جدایه‌های سودوموناس فلوروسنت در حل تری-کلسیم فسفات**

نتایج آزمون توانایی جدایه‌ها در انحلال تری-کلسیم فسفات نشان داد که تمامی جدایه‌های سودوموناس فلورسنت قادر به افزایش حلالیت تری‌کلسیم فسفات در محیط جامد و مایع PKV و کاهش pH محیط کشت بودند. بیش‌ترین و کم‌ترین توانایی انحلال تری‌کلسیم فسفات در محیط جامد به‌ترتیب مربوط به جدایه‌های D26 (با نسبت قطر هاله به کلونی معادل 2/60) و D24 (با نسبت قطر هاله به کلونی معادل 1/12) و در محیط مایع به‌ترتیب مربوط به جدایه D6 (706 میلی‌گرم در لیتر) و D4 (203 میلی‌گرم در لیتر) بود. همچنین بیشترین

[1]. Carboxymethyl cellulose

کاهش pH محیط کشت در نتیجه رشد جدایه D11 بدست آمد (جدول 1). در بین جدایه‌های مورد آزمایش، جدایه‌های D1، D5، D6، D11، D12، D19، D26، D28، D33 و D35 که در مجموع از توانایی بالایی در انحلال تری‌کلسیم فسفات برخوردار بودند برای استفاده در مراحل بعدی پژوهش انتخاب شدند. باکتری‌های حل کننده فسفات با تولید اسیدهای آلی و عوامل کلات کننده می‌توانند موجب افزایش حلالیت فسفات‌های معدنی کم‌محلول در خاک شوند (همیدا و همکاران، 2006). در تحقیقی نشان داده شد که جدایه‌هایی از باکتری‌های حل کننده فسفات شامل *Bacillus* sp. و *Pseudomonas* sp. جداشده از خاک ریزوسفری ، حلالیت فسفر را در محیط مایع PKV حاوی تری‌کلسیم فسفات به‌ترتیب به‌مقدار 12/23 و 9/72 میلی‌گرم در لیتر افزایش داده، pH محیط را از 7 به 3/78 و 5/1 کاهش دادند(سوسیلواتی و سیخفانی، 2014).

**جدول 1- نتایج اندازه‌گیری توان حل تری‌کلسیم فسفات توسط جدایه‌های مورد آزمایش در محیط مایع و جامد PKV و pH محیط کشت جدایه‌ها**

| شماره جدایه | نسبت قطر هاله به کلونی | غلظت فسفر آزاد شده (میلی‌گرم در لیتر) | pH |
|---|---|---|---|
| D1 | 1/73 | 654 | 3/86 |
| D4 | 1/63 | 203 | 5/63 |
| D5 | 2/09 | 530 | 5/82 |
| D6 | 1/66 | 706 | 5/71 |
| D7 | 1/37 | 537 | 5/91 |
| D8 | 2/11 | 499 | 5/94 |
| D9 | 1/38 | 487 | 4/50 |
| D10 | 1/59 | 415 | 5/61 |
| D11 | 2/10 | 596 | 3/62 |
| D12 | 1/27 | 664 | 3/84 |
| D14 | 1/77 | 465 | 5/12 |
| D15 | 1/35 | 412 | 4/97 |
| D16 | 1/95 | 213 | 5/64 |
| D18 | 1/81 | 520 | 3/98 |
| D19 | 1/18 | 650 | 3/87 |
| D20 | 1/71 | 410 | 5/74 |
| D21 | 2/10 | 449 | 5/42 |
| D22 | 1/56 | 352 | 4/12 |
| D23 | 1/74 | 282 | 5/72 |
| D24 | 1/12 | 423 | 5/31 |
| D25 | 2/31 | 447 | 5/91 |
| D26 | 2/60 | 526 | 3/97 |
| D27 | 1/15 | 382 | 5/71 |
| D28 | 2/91 | 559 | 3/95 |
| D29 | 1/57 | 565 | 3/52 |
| D31 | 1/76 | 391 | 77/3 |
| D32 | 1/44 | 567 | 4/31 |
| D33 | 2/61 | 561 | 5/75 |
| D34 | 1/97 | 380 | 5/64 |
| D35 | 2/35 | 465 | 3/86 |

**بررسی تأثیر باکتری‌ها بر زیست فراهمی فسفر در خاک در شرایط آزمایشگاهی**

برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمون بررسی توانایی جدایه‌های منتخب در افـزایـش زیـست فراهمی فسفر در شرایط آزمایشگاهی و همچنین ترکیب شیمیایی سنگ فسفات که در آزمایشگاه گروه مهندسی معدن دانشکده فنی دانشگاه تهران اندازه‌گیری شده است به ترتیب در جداول 2 و 3 ارائه شده است.

**جدول 2- برخی از خصوصیات فیزیکی شیمیایی خاک مورد مطالعه**

| ویژگی | مقدار |
|---|---|
| رس (درصد) | 9/0 |
| سیلت (درصد) | 10/8 |
| شن (درصد) | 80/2 |
| بافت | شنی لومی |
| pH | 8/03 |
| قابلیت هدایت الکتریکی (دسی زیمنس بر متر) | 1/2 |
| فسفر قابل دسترس به روش اولسن (میلی‌گرم در کیلوگرم) | 4/44 |

**جدول 3- ترکیب شیمیایی سنگ فسفات پارسا (کیانی ارثی و همکاران، 2010).**

| اکسید | $SiO_2$ | $Al_2O_3$ | $Na_2O$ | $K_2O$ | CaO | MgO | $P_2O_5$ | $Fe_2O_3$ | MnO | ZnO |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| درصد | 15/7 | 1/41 | 0/09 | 0/50 | 43/10 | 1/04 | 15/39 | 2/49 | 0/01 | 0/04 |

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که کاربرد باکتری و برهمکنش بین باکتری و نوع خاک، تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر انحلال فسفات‌های معدنی در 15، 30 و 60 روز پس از تلقیح خاک بوسیله جدایه‌ها داشت؛ لیکن نوع خاک (حضور یا عدم حضور سنگ فسفات) در دوره‌های زمانی مذکور هیچ تأثیر معنی‌داری نداشت (جدول 4).

**جدول 4- تجزیه واریانس اثر باکتری و نوع خاک بر غلظت فسفر قابل دسترس به روش اولسن**

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 15روز پس از تلقیح | 30 روز پس از تلقیح | 60 روز پس از تلقیح |
| باکتری | 11 | $42/7^{**}$ | $114^{**}$ | $49/2^{**}$ |
| نوع خاک | 1 | $27/4^{ns}$ | $71/3^{ns}$ | $7/18^{ns}$ |
| باکتری x نوع خاک | 11 | $85/5^{**}$ | $83/6^{**}$ | $36/6^{**}$ |
| خطا | 48 | 4/75 | 4/72 | 2/03 |
| ضریب تغییرات | | 11/9 | 10/9 | 9/00 |

**، * و ns به ترتیب معنی‌دار بودن در سطح احتمال یک و پنج درصد و غیرمعنی‌دار بودن را نشان می‌دهند.

**تأثیر باکتری و نوع خاک بر فسفر قابل دسترس خاک در 15 روز پس از تلقیح**

بیشترین مقدار فسفر قابل استفاده در تیمار خاک و تحت تأثیر کنترل مثبت (تیمار واجد کود فسفر) به‌دست آمد. در بین باکتری‌ها سویه‌های D33 و D35 به‌ترتیب با فراهم ساختن 21/0 و 20/5 میلی‌گرم در کیلوگرم فسفر قـابل استفاده بهترین تیمار بودند که اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد داشتند. به‌طور کلی نتایج نشان داد که هر چند جدایه‌ها نتوانستند مقدار فسفر قابل استفاده را در حد کنترل مثبت افزایش دهند، اما تعدادی از سویه‌ها مقدار فسفر قابل استفاده در تیمار خاک و همچنین تیمار خاک + سنگ فسفات را به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد منفی افزایش دادند (جدول 5)

**جدول 5- مقایسه میانگین برهمکنش تیمارهای نوع خاک و باکتری برمقدار فسفر قابل دسترس خاک، 15 روز پس از تلقیح جدایه‌ها به خاک (میلی‌گرم در کیلوگرم)**

| جدایه | خاک | خاک + سنگ فسفات | میانگین |
|---|---|---|---|
| $Control^-$ | 15/1g-h | 15/5g-h | 15/1E |
| D1 | 15/1g-h | 21/6c-e | 18/3CD |
| D5 | 13/3ih | 16/6f-h | 15/6DE |
| D6 | 14/7g-h | 20/9c-e | 17/1DE |
| D11 | 15/8d-g | 16/7f-h | 17/6DE |
| D12 | 20/0c-f | 16/4g-h | 17/3DE |
| D19 | 17/5e-h | 18/3e-g | 17/9DE |
| D26 | 18/5d-g | 13/1i | 15/8DE |
| D28 | 12/9i | 23/2cb | 18/1CD |
| D33 | 22/4b-d | 19/6c-f | 21/0B |
| D35 | 25/8b | 15/3g-h | 20/5BC |
| $Control^+$ | 32/5a | 16/6f-h | 24/6A |
| میانگین | 18/9A | 17/6A | |

میانگین‌های اثرات اصلی دارای حداقل یک حروف لاتین بزرگ مشترک و میانگین‌های اثرات متقابل دارای حداقل یک حروف لاتین کوچک مشـترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند.

$Control^+$ و $Control^-$ به ترتیب تیمار بدون باکتری با مقادیر کافی کود فسفره (شاهد مثبت) و تیمار بدون باکتری و کود فسفره (شاهد منفی)

**تأثیر باکتری و نوع خاک بر فسفر قابل دسترس خاک در 30 روز پس از تلقیح**

نتایج نشان داد که در تیمار خاک، کاربرد جدایه‌های D1، D5، D19 و D35 بـاعث افزایش معنی‌دار فسفر قابل دسترس در مقایسه با کنترل منفی شدند. سویه‌های D6، D11 و D28 در تیمار خاک + سنگ فسفات موثرترین سویه‌ها در افزایش فسفر قابل استفاده بودند (جدول 6).

**جدول 6- مقایسه میانگین برهمکنش تیمارهای خاک و باکتری بر فسفر قابل دسترس خاک، 30 روز پس از تلقیح جدایه‌ها به خاک (میلی‌گرم در کیلوگرم)**

| جدایه | خاک | خاک + سنگ فسفات | میانگین |
|---|---|---|---|
| Control$^-$ | 15/4i-m | 16/8h-l | 16/1D |
| D1 | 20/9d-h | 20/3d-h | 20/6B |
| D5 | 22/5c-f | 13/9k-m | 18/2BC |
| D6 | 14/8j-m | 24/3b-d | 19/5BC |
| D11 | 12/5m | 22/7c-e | 17/6B-D |
| D12 | 16/0i-m | 18/6f-j | 17/3CD |
| D19 | 23/9b-d | 14/9j-m | 19/4BC |
| D26 | 19/1e-g | 18/1g-k | 18/6BC |
| D28 | 13/8lm | 25/9bc | 19/4BC |
| D33 | 19/2e-g | 17/4h-l | 18/3BC |
| D35 | 22/1c-g | 17/7h-l | 19/9BC |
| Control$^+$ | 27/4b | 39/0a | 33/2A |
| میانگین | 18/9B | 20/9A | |

میانگین‌های اثرات اصلی دارای حداقل یک حروف لاتین بزرگ مشترک و میانگین‌های اثرات متقابل دارای حداقل یک حروف لاتین کوچک مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند.

Control$^+$ و Control$^-$ به ترتیب تیمار بدون باکتری با مقادیر کافی کود فسفره (شاهد مثبت) و تیمار بدون باکتری و کود فسفره (شاهد منفی)

**تأثیر باکتری و نوع خاک بر فسفر قابل دسترس خاک در 60 روز پس از تلقیح**

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین مقدار فسفر در60 روز پس از تلقیح جدایه‌ها به خاک، از برهمکنش شاهد مثبت و تیمار خاک + سنگ فسفات بدست آمد و کمترین مقدار آن نیز در تیمار خاک و تحت تأثیر جدایه باکتری D6 ایجاد شد. در تیمار خاک، جدایه D1 با فراهم ساختن 23/6 میلی‌گرم در کیلوگرم فسفر بیشترین تأثیر را داشت. در تیمار خاک + سنگ فسفات سویه‌های D6، D12 و D26 هر سه با فراهم نمودن 17/0 میلی‌گرم در کیلوگرم فسفر قابل دسترس، کارامدترین جدایه‌ها بوده و اختلاف معنی‌داری با شاهد منفی با میانگین 14/1 میلی‌گرم در کیلوگرم فسفر داشتند (جدول 7).

باکتری‌های حل‌کننده فسفات قادرند شرایط را برای افزایش راندمان استفاده از کود فراهم کنند. سازوکار اصلی اینگونه ریزجانداران تولید اسیدهای آلی توسط اکسایش ناقص قندها است که باعث کاهش pH و افزایش حلالیت فسفر محیط می‌شوند (کوموتا و همکاران، 2004). همچنین این باکتری‌ها سبب کاهش تثبیت فسفر در خاک می‌شوند و تلقیح با باکتری‌های حل‌کننده فسفات، فسفر قابل جذب خاک را افزایش می‌دهد (گوپتا و همکاران، 2012). فرناندز و همکاران (2007) اثر مثبت باکتری‌های حل‌کننده فسفر را در حضور سنگ فسفات بر سویا نشان دادند. آنتون (2002) نیز در تحقیقی گزارش نمود باکتری‌های حل‌کننده فسفات با تولید اسید قابلیت حل فسفر را از منابع غیر قابل انحلال نظیر سنگ فسفات افزایش دادند. دوبی و بیلور (1992) نشان دادند اضافه کردن سنگ فسفات به همراه باکتری‌های حل‌کننده فسفات با افزایش فراهمی فسفر در خاک باعث افزایش عملکرد ذرت شد.

**جدول 7- مقایسه میانگین برهمکنش تیمارهای خاک و باکتری بر فسفر قابل دسترس خاک، 60 روز پس از تلقیح جدایه‌ها به خاک (میلی‌گرم در کیلوگرم)**

| جدایه | خاک | خاک+ سنگ فسفات | میانگین |
|---|---|---|---|
| $Control^-$ | 12/1i | 14/1f-h | 13/1G |
| D1 | 23/6b | 15/2e-h | 19/4B |
| D5 | 13/8f-i | 14/9e-h | 14/4D-G |
| D6 | 9/63j | 17/0de | 13/3FG |
| D11 | 15/0e-h | 15/5ef | 15/3C-E |
| D12 | 14/6e-i | 17/0de | 15/8CD |
| D19 | 15/4e-g | 14/7e-i | 15/0E-G |
| D26 | 12/4hi | 17/0De | 14/76E-H |
| D28 | 13/8f-i | 15/5ef | 14/6D-G |
| D33 | 21/2c | 12/8f-h | 17/0C |
| D35 | 15/2e-h | 12/6g-i | 13/9E-G |
| $Control^+$ | 19/3cd | 26/7a | 23/0A |
| میانگین | 15/5A | 16/1A | |

میانگین‌های اثرات اصلی دارای حداقل یک حروف لاتین بزرگ مشترک و میانگین‌های اثرات متقابل دارای حداقل یک حروف لاتین کوچک مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند.

$Control^+$ و $Control^-$ به ترتیب تیمار بدون باکتری با مقادیر کافی کود فسفره (شاهد مثبت) و تیمار بدون باکتری و کود فسفره (شاهد منفی)

لازم به ذکر است در آزمون‌های ارزیابی توانایی جدایه‌ها در انحلال فسفات‌های معدنی خاک در سه زمان 15، 30 و 60 روز پس از تلقیح جدایه‌ها، مقدار فسفر قابل دسترس خاک در تیمار شاهد منفی نسبت به فسفر اندازه‌گیری شده به روش اولسن در خاک خشک (4/4 میلی‌گرم در کیلوگرم) بیشتر بود. از آنجایی که در هنگام تلقیح تیمارها، به تیمار شاهد منفی چهار میلی‌لیتر محیط کشت بدون باکتری افزوده شد و آزمون نیز در شرایط غیر استریل انجام گرفت؛ لذا افزایش مقدار فسفر قابل دسترس در تیمار شاهد منفی را می‌توان به افزایش فعالیت باکتری‌های بومی خاک ناشی از افزودن محیط کشت نسبت داد.

**بررسی ماندگاری باکتری‌های فرموله شده در حامل‌های مختلف**

با در نظر گرفتن نتایج حاصل از توانایی جدایه‌ها در افزایش فسفر قابل دسترس خاک به روش اولسن، دو جدایه سودوموناس فلورسنت D33 و D35 انتخاب و برای بررسی ماندگاری آنها در سه فرمولاسیون پودر تالک، پودر تالک + سبوس برنج و پودر تالک + خاک اره مورد استفاده قرارگرفتند. شکل‌های 1 و 2 ماندگاری جدایه‌های D33 و D35 را در مدت زمان نگه‌داری (150روز در دمای اتاق) برای سه فرمولاسیون پودر تالک، پودر تالک + سبوس برنج و پودر تالک + خاک اره نشان می‌دهند. همانطور که ملاحظه می‌شود جمعیت این باکتری‌ها در این فرمولاسیون‌ها روندی کاهشی داشت و بیشترین شدت افت جمعیت باکتری در این فرمولاسیون‌ها نیز پس از گذشت 30 روز از تهیه فرمولاسیون‌ها رخ داد. بیشترین و کمترین جمعیت جدایه D33 پس از گذشت 150 روز از تلقیح، به ترتیب مربوط به فرمولاسیون پودر تالک و پودر تالک + سبوس برنج ($10^6$ cfu/g) و فرمولاسیون پودر تالک + خاک اره ($6 \times 10^3$ cfu/g) بود. همچنین بیشترین و کمترین جمعیت جدایه D35 به ترتیب در فرمولاسیون پودر تالک + سبوس برنج ($10^6$ cfu/g) و فرمولاسیون پودر تالک + خاک اره (10 cfu/g) مشاهده شد. در مجموع فرمولاسیون پودر تالک + سبوس برنج توانستند در مدت 150 روز (5 ماه) جمعیت قابل

قبولی از هر دو جدایه D33 و D35 را در خود حفظ کنند ($10^6$cfu/g). این درحالی بود که فرمولاسیون پودر تالک + خاک اره نتوانست جمعیت مناسبی از باکتری‌ها را در انتهای زمان آزمون بر روی خود نگه دارد (کاهش جمعیت D33 و D35 از $10^8$ به‌ترتیب به $10^3$× 6 و 10 سلول باکتری بر گرم فرمولاسیون).

استفاده از باکتری‌های محرک رشد ممکن است تحت شرایط مزرعه بدلیل اثر نامطلوب عوامل محیطی، تأثیری متوسط تا بی‌اثر داشته باشد. بنابراین قبل از رهاسازی این عوامل به خاک، باید اقداماتی انجام شود که پایداری، کارایی و رشد عوامل میکروبی را در شرایط طبیعی افزایش دهد. از این رو اغلب این عوامل زیستی را در فرمولاسیون‌های مناسبی قرار می‌دهند، تا از قدرت ماندگاری بهتری برخوردار شوند. برای دستیابی به ماندگاری مناسب، این عوامل زیستی در حامل‌هایی فرموله شده تا بتوانند در شرایط نامساعد خاک و یا سطح بذر زنده مانده و تا ظهور ریشه‌ها جمعیت خود را حفظ نمایند (ناکران و همکاران، 2005).

یکی از جنبه‌های بسیار مهم در مطالعات مربوط به کودهای زیستی، نوع فرمولاسیون آنها می‌باشد (ملین و همکاران، 2007). تالک یک ماده معدنی طبیعی است که در صنعت به صورت پودر استفاده می‌شود و دامنه کاربرد وسیعی دارد. پودر تالک به دلیل ماهیت خنثی و جذب رطوبت پایین، مانع از تشکیل پل‌های هیدراته شده طول دوره انبارداری را کاهش می‌دهد لیکن به دلیل دردسترس بودن، از تالک به‌عنوان یک ماده خام و در نقش حامل در تولید فرمولاسیون‌ها استفاده می‌شود (سیواکومار و همکاران، 2012). کینای و یلدیز (2008) گزارش دادند جمعیت سلول زنده در فرمولاسیون‌های حاوی پودر تالک و کائولین به عنوان مواد حامل، با زمان کاهش یافت. آنها نشان دادند پس از گذشت شش ماه، فرمولاسیون پودر تالک در مقایسه با فرمولاسیون کائولین دارای تعداد سلول زنده بالاتری بود که بیانگر موثر و مفید بودن پودر تالک به‌عنوان یک حامل خوب است. جم هالکار و شارما (2013) نشان دادند که فرمولاسیون مبتنی بر تالک جدایه *Pseudomonas fluorescens* RRB-11 حداکثر ماندگاری و زنده ماندن در ریزوسفر را داشت و توانست شدت بیماری سوختگی باکتریایی برنج را کاهش داده، عملکرد گیاه را افزایش دهد.

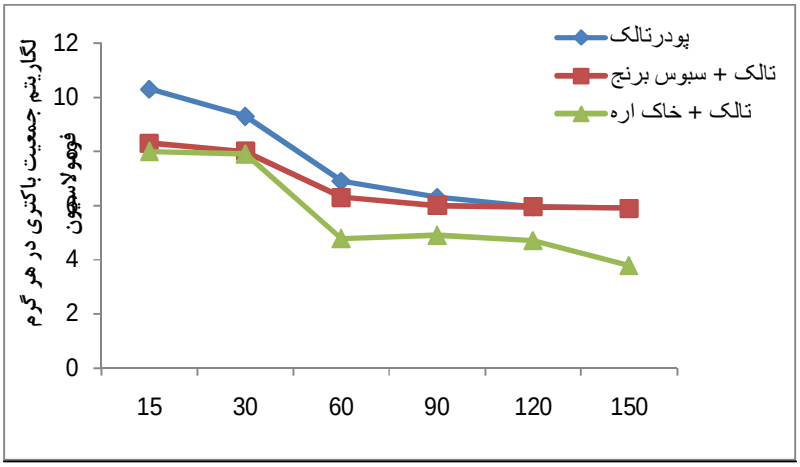
در تحقیقی دیگر که بر روی فرمولاسیون‌های مبتنی بر تالک عوامل بیوکنترل *Trichoderma viride*، *Trichoderma harzianum*، *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus subtilis* انجام شد، مشخص گردید که بیشترین نرخ زنده‌مانی قارچ‌های تریکودرما در فرمولاسیون تالک و باکتری‌ها در فرمولاسیون تالک + کود دامی و 120 روز بعد از ذخیره‌سازی بود (پاراماسیوان و همکاران، 2019).

سبوس برنج به طور طبیعی مقادیر بالایی سیلیس دارد که از آن به عنوان جایگزینی برای پرلیت در چند سال گذشته استفاده شده است (اوانس و گاچوکیا، 2004). در تحقیقی گزارش شد که پودر تالک حامل مناسبی برای فرمولاسیون باکتری‌ها است، لیکن افزودن سبوس برنج به پودر تالک می‌تواند ضمن نگه‌داری رطوبت بیشتر، در تغذیه ریزجاندار نیز نقش داشته باشد (مختار نژاد و همکاران، 1390). در تحقیقی که بر روی فرمولاسیون باکتری‌های سودوموناس فلورسنت و حامل‌های مختلف آلی و معدنی انجام شد مشخص گردید که فرمولاسیون‌های آلی (سبوس برنج و باکتری سودوموناس فلورسنت) موثرتر از فرمولاسیون‌های معدنی (فرمولاسیون پودر تالک و باکتری سودوموناس فلوروسنت) بودند (اردکانی و همکاران، 2010).

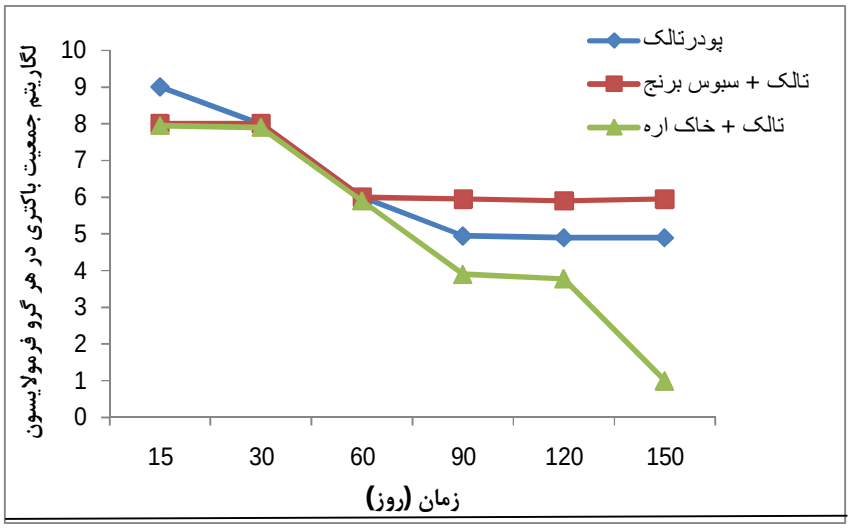
خاک اره دارای نسبت کربن به نیتروژن بالایی است اما قیمت ناچیز، وزن اندک، فراوانی و در دسترس بودن آن در کشور یک مزیت مهم محسوب می‌شود (کولا و همکاران، 2003). از این رو بنظر می‌رسید خاک اره بتواند به عنوان حاملی مناسب برای فرمولاسیون عوامل میکروبی مورد استفاده قرار گیرد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در بین حامل‌های مورد آزمایش، خاک اره دارای

کمترین میزان زنده مانی برای باکتری بود. این کاهش را می‌توان به خواص فیزیکی و شیمیایی آن نسبت داد. در واقع با وارد شدن باکتری به محیط جدید، تنش‌های لحظه‌ای متفاوتی به جمعیت باکتری وارد می‌گردد که باعث می‌شود حامل‌های مختلف تاثیر متفاوتی بر جمعیت باکتری‌ها داشته باشند (قاسمی پیرانلو و همکاران 1398).

عمر انبارداری باکتری‌ها در فرمولاسیوهای مختلف، بسته به جنس باکتری، مواد حامل و اندازه ذرات آنها متفاوت است (احمد زاده و همکاران 1393). بنظر می‌رسد تفاوت در رفتار فرمولاسیون‌های مورد آزمون برای دو جدایه D33 و D35 نیز به همین دلیل باشد. انواع مواد کمکی که در تولید فرمولاسیون به‌کار می‌رود در بهبود و کارایی آن نقش دارند. ماندگاری عوامل میکروبی در فرمولاسیون‌ها با اضافه کردن مواد کمکی (روغن‌ها، چسباننده‌ها و امولسیون‌ها) می‌تواند افزایش یابد. این مواد کمکی با تهیه ذخایر غذایی و محافظت از عوامل میکروبی در برابر خشک شدن و مرگ، باعث افزایش ماندگاری آنها می‌شوند (احمد زاده و همکاران 1393). در تحقیقی نشان داده شد که تغییر ترکیب مواد غذایی داخل فرمولاسیون، بقا و ماندگاری سودوموناس فلوروسنت را افزایش داد ولی کارایی و اثربخشی آن را بیشتر نکرد (احمد زاده و همکاران 1393).




**شکل 1- روند تغییرات جمعیت جدایه D33 در فرمولاسیون‌های مختلف طی مدت نگه‌داری**




**شکل 2- روند تغییرات جمعیت جدایه D35 در فرمولاسیون‌های مختلف طی مدت نگه‌داری**

## نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد جدایه‌های D33 و D35 که قادر به افزایش حلالیت تری‌کلسیم فسفات در محیط جامد و مایع PKV و کاهش pH محیط کشت بودند توانستند فراهمی فسفر در خاک را نیز در طول مدت آزمون (زمان‌های 15، 30 و 60 روز) به طور معنی‌داری افزایش دهند. همچنین بررسی جمعیت جدایه‌های D33 و D35 در سه فرمولاسیون (پودر تالک، پودر تالک + سبوس برنج و پودر تالک + خاک اره) نشان داد که فرمولاسیون پودر تالک + سبوس برنج احتمالاً می‌تواند به عنوان یک حامل مناسب برای هر دو جدایه D33 و D35 مورد استفاده قرار گیرد. این فرمولاسیون توانست برای مدت 150 روز (5 ماه) جمعیت قابل قبولی از باکتری معادل $10^6$cfu/g را در خود نگه دارد. البته برای تأئید کارایی این فرمولاسیون به عنوان یک کود زیستی فسفره نیاز به انجام آزمون‌های کلخانه‌ای و مزرعه‌ای می‌باشد.

## فهرست منابع:


1. احمد زاده، م.، صابری، ر. و عسکری‌نیا، م. 1393. تکنولوژی تولید فرمولاسیون و کاربرد پروبیوتیک‌های گیاهی در کشاورزی. چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران.
2. خوشرو، ب.، ساریخانی، م. ر. 1397. جداسازی و شناسایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات مقاوم به دما برای استفاده در کود میکروبی فسفاتی. نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی). جلد 3 (شماره 1)، 155-167
3. ضیائیان، ا.، سلیم پور، س.، سیلسی پور، م. و صفری، ه. 1388 . ارزیابی برخی از کودهای زیستی و شیمیایی فسفره روی ذرت.اولین کنگره چالش های کود در ایران: نیم قرن مصرف کود. 10-12 اسفند، تهران، ایران.
4. قاسمی پیرانلو، ف.، ساریخانی، م. و نجفی، ن. 1398. بررسی زنده مانی باکتری *Enterobacter cloacae* در چند حامل جامد و اثر زادمایه های تهیه شده بر جوانه زنی و رشد گندم. جلد 29 (شماره 3)، 167- 180.
5. مختارنژاد، ل.، اعتباریان، ح.، فاضلی، م. ر. و خوشایند، م. ر. 1390 بررسی تأثیر مواد افزودنی مختلف روی ماندگاری مخمر *Pichia guilliermondii* در حامل‌های پودری و کارایی آنها در کنترل کپک آبی سیب. مجله بیماری‌های گیاهی. جلد 47 (شماره 4)، 435-446.
6. Antoun, H. 2002. Field and green house trials performed with phosphate solubilizing bacteria and fungi. In: First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. Salamanca University 16:235-237.
7. Ardakani, S. S., Heydari, A., Kohorasani, N. and Arjmandi, R. 2010. Development of New Bioformulation of *Pseudomonas Fluorescens* and evaluation of these products against damping-off of cotton seedlings. Journal of Plant Pathology 92(1):83-88.
8. Bashan, Y., Kamnev, A. A., de Bashan, L. E. 2013. A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth. Biology and Fertility of Soils 49:1-2
9. Bora, T., Ozakan, H., Gore, E. and Aslan, E. 2004. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by wettabe powder formulation of two strain of *Pseudomonas putida*. Journal of Phytopathology 152: 471-475.
10. Bouyoucos, G. J. 1951. A recalibration of hydrometer method for making mechanical analysis of soil. Agronomy Journal 43(9):434-438.
11. Colla, G., Rea, E., Pierandrie, F. and Salerno, A. 2003. Effects of substrates on yield quality and mineral composition of soilless grown cucumbers. Acta Horticulturae 614:205-209.

12. Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. and Okon, Y. 2003. Plant growth promoting effects of diazotroph sinthe rhizosphere. Critical Reviews in Plant Sciences 22(2):107–149.
13. Dubey, S. K. and Billore, S. D. 1992. Phosphate solublizing microorganism as inoculant and their role in augmenting crop productivity in India: A review Crop Research Hisar 5(11):1-11.
14. Evans, M. R. and Gachukia, M. 2004. Fresh parboiled rice hulls serve as an alternative to perlite in greenhouse crop substrates. Horticultural Science 39(2):232-235.
15. Fageria, N. K. 2009. The use of nutrients in crop plants.CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC.USA. New York.
16. Fernandez, L. A., Zalba, P., Gomez, M. A. and Sagardoy, M. A. 2007. Phosphate solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under green house condition. Journal of Biology Fertility Soils 43(6):805- 809.
17. Gupta, M. S., Kiran, H., Gulati, A., Singh, B. and Tewari, R. 2012. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of Aloe barbadensis. Miller Microbiological Research 167(6):358-363.
18. Gyaneshwar, P., Naresh, K. G., Parekh, L. J. and Poole, P. S. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. Plant and Soil 245(1):83–93.
19. Hameeda B, Rupela OP, Reddy G. and Satyavani K, 2006. Application of plant growth-promoting bacteria associated with composts and macrofauna for growth promotion of pearl millet (*Pennisetumglaucum* L.). Biology and Fertility of Soils, 44: 260-266.
20. Harvey, P. R., Warren, R. A. and Wakelin, S. 2009. Potentialto improve root access tophosphorus: the role of non-symbiotic microbial inoculants in the rhizosphere. Crop and Pasture Science 60(2):144–151.
21. Jambhulkar, P. P. and Sharma. P. 2013. Development of bioformulation and delivery system of *Pseudomonas fluorescens* against bacterial leaf blight of rice (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*). Journal of Environmental Biology 35: 843-849.
22. Jeon, J., Lee, S., Kim, H., Ahn, T. and Song, H. 2003. Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. Journal of Microbiology and Biotecnology 41(4):271–276.
23. Jorjani, M., Heydari, A., Zamanizadeh, H. R., Rezaee, S. and Naraghi, L. 2010. Development of Pseudomonas fluorescens and *Bacillus* coagulans based bioformulations using organic and inorganic carriers and evaluation of their influence on growth parameters of sugar beet. Journal of Biopesticides 4(2):180-185.
24. Khoshru, B., Sarikhani, M. R., Aliasgharzad N. and Zare, P. 2015. Assessment the important PGPR features of isolates used in biofertilizers Barvar2, Biosuperphosphate, Supernitroplus and Nitroxin. Applied Soil Research 3(1): 39-52
25. Kiani Ersi, M., Noue Parast, M., and Amini, A. 2010. Concentration of Sedimentary phosphate ore using shaking table and leaching with acetic acid. International Conference on Mining. October 18 -21.
26. Kinay, P. and Yildiz, M. 2008. The shelf life and effectiveness of granular formulations of Metschinkowia pulcherrima and Pichia guilliermondii yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. Biological Control 45:433-440.
27. Kloepper, J. W., 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: Metting Jr, F.B. (ed.), Soil Microbial Ecology: Application in Agricultural and Enviromental Management, Marcel Dekker, New York, pp. 255-274.
28. Kumatha, K., Sempavalan J. and Santhanakrishnan, P. 2004. Effect of Insoluble Phosphate and Dual Inoculation on Soybean. In: Biofertilizers Technology, Kannaiyan, S., Kumar, K. and Govindarajan, K. (Eds.). Jodhpur Scientific Publisher, India, pp: 354-358.

29. Lavakusha, J. Y., Verma, J. P., Jaiswal, D. K. and Kumar, A. 2014. Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). Ecology Engineering 62:123–128.
30. Liu, F. P., Liu, H. Q., Zhou, H. L., Dong, Z. G., Bai, X. H., Bai, P. and Qiao, J. J. 2014. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from betel nut (*Areca catechu*) and their effects on plant growth and phosphorus mobilization in Tropical soils. Biology and Fertility Soils 50(6):927–937.
31. Malboobi, M. A., Owlia, P., Behbahani, M., Sarokhani, E., Moradi, S., Yakhchali, B., Deljou, A. and Morabbi Heravi, K. 2009. Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. The World Journal of Microbiology and Biotechnology 25:1471-1477
32. Malusá, E., Sas-Paszt, L., and Ciesielska, J. 2012. Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers. The Scientific World Journal 23:1-12.
33. Melin, P., Håkansson, S., Eberhad, T. H. and Schnürer, S. 2006. Survival of the biocontrol yeast Pichia anomala after long-term storage in liquid formulations and different temperatures, assessed by flow cytometry. Journal of Applied Microbiology 100:264-271.
34. Melin, P., Håkansson, S. and Schnürer, S. 2007. Optimisation and comparison of liquid and dry formulations of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. Applied Microbiology and Biotechnology 73: 1008–1016.
35. Nakkeeran, S., Fernando, D.W.G. and Siddiqui, Z. A. 2005. Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope. In: Siddiqui, Z. A. (ed). PGPR: biocontrol and bio-fertilization. Springer, Dordrecht, pp 257-296.
36. Norrish, K. and Rosser, H. 1983. Mineral Phosphate. In: Soils, an Australian Viewpoint. Illustrated Edition. Academic Press Melbourne, CSIRO/London, UK, Australia.
37. Olsen, S. R., Cole, C. V., Watanabe, F. S. and Dean, L. A. 1954. Estimation of available phosphorous in soils by extraction with NaHCO3. United States Department of Agriculture, Washington.
38. Paramasivan, M., Thaveedu, S., Mohan, S. and Muthukrishnan, N. 2019. Survival ability of *Trichoderma* spp and *Pseudomonas* in Different carrier Materials. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 8:1539-1546.
39. Raghothama, K. G. and Karthikeyan, A. S. 2005. Phosphate acquisition. Plant and Soil compounds producing plant growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens*. Current Science 82(12):1463-1466.
40. Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S. and Latif, F. 2004. Organic acids productions by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. Pakistan Journal of Biology Science 7(2):187-196.
41. Richardson, A., E. Barea, J., M. Neill, M. c., Prigent, A. M. and Combaret, C. 2009. Acquisition Of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. Plant and Soil 321(2):305-339.
42. Sarikhani, M. R., Khoshru, B. and Oustan, S. 2016. Efficiency of Some Bacterial Strains in Potassium Release from Mica and Phosphate Solubilization under In Vitro Conditions. Geomicrobiology Journal 33(9):832-838.
43. Schisler, D. A., Slininger, D. J., Behle, R. W. and Jakson, M. A. 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant disease. Journal of Phytopathology 94(11):1267-1271.
44. Selvi, K. B., Paul, J. J. A., Vijaya, V. and Saraswathi, K. 2017. Analyzing the efficacy of phosphate solubilizing microorganisms by enrichment culture techniques. Biochemistry and Molecular Biology Journal 3(1):1-9.

45. Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H. and Gobi, T. A. 2013. Phosphate solubilising microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. Springer Plus a Springer Open Journal 2(1):587.
46. Sivakumar, G., Josephrajkumar, A. and Rangeshwaran,R. 2012. Bioefficacy of peat formulation of bacterial antagonists on growth promotion and disease suppression in cardamom (*Elettaria cardamomum Maton*). Journal of Biological Control 26: 255-259.
47. Susilowati, L.E. and Syekhfani, S. 2014. Characterization of Phosphate Solubilizing Bacteria Isolated from Pb Contaminated Soils and Their Potential for Dissolving Tricalcium Phosphate. Journal of Degraded and Mining Lands Management 1:57-62.
48. Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and Soil 255(2):571-586.

# اثرات جنگل‌تراشی و نوع کاربری زمین بر برخی خصوصیات شیمیایی و میکروبی خاک در شمال ایران (مطالعه موردی: سلیم‌شیخ ساری)

حامد معظمی‌گودرزی[1]، بهی جلیلی، مهدی قاجارسپانلو و سروش سالک‌گیلانی

دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری؛ **hmgsbbs@gmail.com**

استادیار گروه علوم خاک، دانشکده‌ی علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری؛ **bahi_jalilis@yahoo.com**

دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده‌ی علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری؛ **sepanlu@yahoo.com**

استادیار گروه علوم خاک، دانشکده‌ی علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری؛ **soroosh1352@yahoo.com**

دریافت: **99/10/16** و پذیرش: **1400/3/19**

## چکیده

**جنگل‌تراشی و به زیر کشت بردن اراضی جنگلی از یک سو و مدیریت نامناسب کشاورزی از سوی دیگر، دو عاملی هستند که همچنان منابع طبیعی و به ویژه خاک را به صورت جدی تهدید می‌کنند. این مطالعه به منظور بررسی اثرات جنگل‌تراشی و نوع مدیریت زمین بر برخی خصوصیات شیمیایی و میکروبی خاک در لایه‌های 10-0، 20-10 و 40-20 سانتی‌متری سه کاربری جنگل انجیلی، باغ مرکبات و مزرعه گندم در شهرستان ساری صورت پذیرفت. محتوای ماده‌ی آلی، نیتروژن کل، کربن و نیتروژن زیست‌توده‌ی میکروبی در تبدیل جنگل به مزرعه (در هر سه لایه) و باغ (در دو لایه‌ی 10-0 و 20-10 سانتی‌متری) به صورت معنی‌دار کاهش یافته بود. این کاهش در تبدیل جنگل به مزرعه و در عمق نخست، برای ماده‌ی آلی، نیتروژن کل، کربن و نیتروژن زیست‌توده‌ی میکروبی بیشترین و به ترتیب 35/5، 51/2، 69/7 و 59/8 درصد بود. فسفر قابل جذب و تنفس میکروبی در تبدیل جنگل به دو کاربری دیگر فقط در عمق 10-0 سانتی‌متری به صورت معنی‌دار کاهش یافته بود و این کاهش در تبدیل جنگل به مزرعه و در عمق نخست، 85/2 درصد برای فسفر قابل جذب و 35/1 درصد برای تنفس میکروبی بود. C/N میکروبی در تبدیل جنگل به مزرعه به صورت معنی‌دار کاهش و ضریب متابولیک میکروبی در تبدیل جنگل به دو کاربری دیگر به صورت معنی‌دار افزایش یافته بود. فعالیت آنزیمی اوره‌آز در تبدیل جنگل به هر دو کاربری و فعالیت آنزیمی فسفاتاز قلیایی فقط در تبدیل جنگل به مزرعه به صورت معنی‌دار کاهش یافته بود. نتایج این پژوهش نشان داد که تبدیل کاربری جنگل به کشاورزی باعث تغییرات خصوصیات شیمیایی و میکروبی خاک شده است که این تغییرات در تبدیل جنگل به مزرعه بارزتر بود. مهمترین دلائل این کاهش کلی در کیفیت خاک را می‌توان از یک سو برداشت محصول (در هر دو کاربری باغ و مزرعه) و از بین رفتن چرخه‌ی طبیعی و تقریباً بسته‌ی موجود در جنگل، و از سوی دیگر خاکورزی (در مزرعه) و کاربرد کود حیوانی (در باغ) به ترتیب به عنوان عوامل تشدید و تقلیل این تغییرات بیان نمود.**

**واژه‌های کلیدی:** تغییر کاربری زمین، کیفیت خاک، زیست‌توده‌ی میکروبی، فعالیت آنزیمی

---

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دانشکده علوم زراعی، گروه علوم خاک

**مقدمه**

تبدیل جنگل‌ها و مراتع به زمین کشاورزی امروزه به یکی از نگرانی‌های قابل توجه در سطح دنیا تبدیل شده (رئیسی و بهشتی، 2015) و شیوه‌های ناپایدار مانند جنگل‌زدایی، کشت سنتی و تغییرات در استفاده از زمین، تخریب خاک را شتاب بخشیده است (کروز و همکاران، 2015). خاک از اجزای مهم محیط زیست است که جنگل‌زدایی، پاکسازی و برداشت‌های مکرر پوشش گیاهی، کشت ناپایدار، شخم مکرر و استفاده از کودهای شیمیایی نامتعادل باعث از دست رفتن کیفیت آن شده است.

هرچند تغییر کاربری زمین کنترل کننده‌ی اصلی تغییر اکوسیستم است (بسیت و همکاران، 2014) اما مدیریت زمین نیز اثرات زیادی بر ویژگی‌های خاک می‌گذارد (مورگان-کرنادو و همکاران، 2015). جنگل‌تراشی از یک سو و از سوی دیگر تردد ماشین‌آلات و انجام عملیات خاکورزی در سیستم‌های کشاورزی، کوددهی و برداشت محصول در زمین‌هایی که پوشش گیاهی خود را از دست داده‌اند، خصوصیات مختلف خاک را کم و بیش تحت تأثیر قرار می‌دهند و باعث بر هم خوردن تعادل بین آن‌ها می‌شود. بررسی سلامت خاک به طیف گسترده‌ای از شاخص‌ها نیاز دارد (ماسکالو و همکاران، 2014). پارامترهای شیمیایی و زیستی از مهمترین شاخص‌های به کار رفته در ارزیابی کیفیت خاک هستند (باستیدا و همکاران، 2008). در این میان، ویژگی‌های زیستی به دلیل ارتباطشان با محتوای ماده‌ی آلی (OM[1])، تنوع میکروبی، محصولات متابولیک و فعالیت‌های خاک و اثر آن‌ها در توسعه و حفاظت خاک مورد استفاده قرار گرفته‌اند (مارتینز-سالگادو و همکاران، 2010)؛ به خصوص جوامع میکروبی خاک که به دلایل ایفای نقش اساسی در فرایندهای اکوسیستم (هابیگ و سانپل، 2015)، ارتباط نزدیک‌شان با چرخه‌ی عناصر غذایی (رنلا و همکاران، 2005) واکنش بیشتر (کروز و همکاران، 2015)، سریعتر (کبیری و همکاران، 2016) و حساس‌تر به آشفتگی‌ها و شیوه‌های مدیریتی(مورگان-کرنادو و همکاران، 2015 و ماهارجان و همکاران، 2016)، بهترین شاخص‌ها برای ارزیابی کیفیت خاک نسبت به تغییرات در نظر گرفته شده‌اند.

تنفس میکروبی ($MR$[2]) به عنوان شاخصی از فعالیت میکروبی خاک، به تنفس ناشی از ریزجانداران خاک در طی تجزیه‌ی لاشبرگ‌ها و ماده‌ی آلی اشاره دارد (لو و ژو، 2006) که اختلالات پوشش گیاهی در اثر اقدامات بشری و مدیریت استفاده از زمین، هتروتروف‌های خاک و در نتیجه تنفس میکروبی را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد (فانین و برتراند، 2016).

در کنار تصاعد کربن به شکل $CO_2$، قسمتی از کربن آلی خاک توسط ریزجانداران به زیست‌توده تبدیل می‌شود (لی و اشمیت، 2014). زیست‌توده‌ی میکروبی خاک به شکل فزاینده‌ای به عنوان یک شاخص حساس کیفیت خاک شناخته شده است (کارا و بالات، 2008). پژوهشگرانی از جمله زیمرمان و فری (2002)، لوپز و همکاران (2011 ) و اراوجو و همکاران (2013) به این نتیجه رسیدند که زیست‌توده‌ی میکروبی خاک به عنوان جزء زنده‌ی ماده‌ی آلی می‌تواند به عنوان یک ویژگی زیست‌محیطی برای ارزیابی تغییرات در خصوصیات خاک ناشی از تخریب مزارع یا جنگل‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

ضریب متابولیک میکروبی ($qCO_2$[3])، به عنوان معدنی شدن بستر آلی در هر واحد از زیست‌توده‌ی میکروبی (باستیدا و همکاران، 2008) به عنوان معیاری برای وضعیت اکوفیزیولوژیکی ریزجانداران خاک به کار می‌رود. ضریب متابولیک میکروبی خاک با نسبت C/N و غلظت نیتروژن لاشبرگ‌ها به ترتیب همبستگی مثبت و منفی دارد و ریزجانداران خاک در محیط‌هایی که بستر در حال تجزیه‌ی آن‌ها نیتروژن کافی ندارد، دارای تنفس

[1]. Organic Matter

[2]. Microbial Respiration

[3]. microbial metabolic quotient

بیشتری می‌باشند (اسپان، 2015) و باعث افزایش نرخ ضریب متابولیک میکروبی می‌شوند.

ریزجانداران خاک آرایه‌ای بزرگ از آنزیم‌هایی را تولید می‌کنند که در فرایندهای مختلف زیست‌بوم مانند تجزیه‌ی ماده‌ی آلی نقش دارند (سیلوا و همکاران، 2012). فعالیت‌های آنزیمی خاک نسبت به اختلالات طبیعی و عوامل انسانی بسیار حساس هستند و به تغییرات نشات گرفته از اختلالات پاسخ سریع می‌دهند (کومر و همکاران، 2013).

فعالیت آنزیم‌های برون‌سلولی می‌توانند نشان‌دهنده‌ی محدودیت مواد مغذی میکروبی و پاسخ به تغییرات کیفیت خاک یا تغییر کاربری زمین باشند (رینکز و همکاران، 2011). از جمله آنزیم‌هایی برون‌سلولی، فسفاتازها هستند که عامل تخریب، تغییر و تحول و معدنی شدن ماده‌ی آلی در خاک می‌باشند. ریزجانداران خاک با تولید این آنزیم‌های برون سلولی و در نتیجه تسریع در آبکافت استرها و انیدریدهای اسید فسفریک، نقش کلیدی در انحلال فسفات بازی می‌کنند (مارتینز-سالگادو و همکاران، 2010).

از دیگر آنزیم‌های برون‌سلولی اوره‌آزها هستند که در خاک وظیفه‌ی هیدرولیز ترکیبات آمیدی که از گیاهان، جانوران و ریزجانداران آزاد می‌شود را به عهده دارند. فعالیت آنزیم اوره‌آز (UA[1]) با توجه به تاثیرپذیری از فاکتورهای خاک نظیر شیوه‌های مدیریت، محتوای کربن آلی خاک و pH می‌تواند به عنوان شاخص کیفیت خاک به کار رود (ژی-شین و همکاران، 2006).

در ایران پژوهشگرانی همچون برومند و همکاران (1393) در استان مازندران، عجمی و همکاران (1391) در استان گلستان و بهشتی‌آل‌آقا و همکاران (1390) در استان گلستان و گیلان به اثرات تغییر کاربری زمین پرداخته‌اند که در این مطالعات یا به خصوصیات میکروبی توجه نشده و یا اینکه کاربری‌های مورد مطالعه، از کاربری‌های مطالعه شده در این پژوهش (جنگل، باغ و مزرعه) متفاوت بوده است. این مطالعه با توجه به گستردگی جنگل‌تراشی و تبدیل زمین‌های جنگلی به کشاورزی و نبود اطلاعات کافی در خصوص تأثیرپذیری خصوصیات میکروبی خاک در اثر جنگل‌تراشی در شمال کشور با هدف معرفی خصوصیت برتر در نمایش این تغییرات و همچنین معرفی نوع کاربری مناسب جهت تولید محصول به عنوان راهکاری ثانویه در جهت بهبود جنگل‌های تخریب شده با حفظ معیشت کشاورزان صورت پذیرفت.

## مواد و روش‌ها

### منطقه‌ی مورد مطالعه

منطقه‌ی مورد مطالعه در شمال ایران، واقع در 14 کیلومتری جنوبی شهر ساری، با مختصات جغرافیایی '6 °53 طول شرقی و '26 °36 عرض شمالی با میانگین دمای سالانه‌ی 16°C، میانگین بارندگی سالانه‌ی 789/2 میلی‌متر و ارتفاع از سطح دریا 260 متر می‌باشد. این منطقه دارای رژیم رطوبتی زریک و رژیم حرارتی ترمیک، اقلیمی مرطوب با تابستان‌های گرم و زمستان‌های نسبتاً سرد می‌باشد.

### مطالعات صحرایی و نمونه‌برداری

کاربری‌های مورد مطالعه شامل جنگل انجیلی، باغ مرکبات (یک هکتار) و مزرعه‌ی گندم (یک هکتار) است که دو کاربری باغ و مزرعه حدود 40 سال پیش در اثر جنگل‌تراشی از کاربری جنگل و در کنار هم ایجاد شده‌اند. باغ مورد مطالعه دارای پوشش متراکمی از علف‌های هرز بر سطح خاک می‌باشد و از زمان احداث با کود حیوانی کوددهی می‌شود. مزرعه مورد مطالعه نیز به صورت دیم می‌باشد و از زمان احداث با کودهای شیمیایی (اوره و سوپر فسفات) کوددهی می‌شود.

برای نمونه‌برداری، نمونه‌ها از نقاطی هم‌شیب (هم‌درجه و هم‌جهت) با توپوگرافی یکسان از سه عمق 10-0، 20-10 و 40-20 سانتی‌متر و در سه تکرار به صورت مرکب گرفته شد. هر نمونه‌ی مرکب حاصل ترکیب 10 نمونه‌ی ساده بود. با توجه به مساحت محدود

[1] Urease Activity

کاربری‌های باغ و مزرعه (یک هکتار) فاصله‌ی بین هر تکرار 70-60 متر و با توجه به لزوم قرار گیری محل نمونه برداری جنگل و باغ در زیر تاج، فاصله‌ی بین نمونه‌های ساده‌ی هر نمونه‌ی مرکب 7-6 متر لحاظ گردید. قسمتی از نمونه‌ها پس از عبور دادن از الک دو میلی‌متر برای انجام آزمایش‌های بیولوژیک در یخچال (با دمای چهار درجه‌ی سلسیوس) قرار داده شد و قسمتی نیز برای تعیین بافت و اندازه‌گیری ماده‌ی آلی و برخی عناصر غذایی پس از یک هفته هوا-خشک شدن و سپس کوبیدن، از الک دو میلی‌متر عبور داده شد.

**آنالیزهای آزمایشگاهی**

برای تعیین بافت خاک به روش هیدرومتری عمل شد (بویوکاس، 1962). ماده‌ی آلی طبق روش اکسیداسیون تر و بر حسب کربن آلی برآورد گردید (نلسون و سامرز، 1996). فسفر قابل جذب ($AP^1$) طبق روش اولسن (اولسن و همکاران، 1954) و نیتروژن کل ($TN^2$) توسط دستگاه کلدال اندازه‌گیری شد (برمنر و مولوینی، 1982).

اندازه‌گیری کربن ($MBC^3$) و نیتروژن ($MBN^4$) میکروبی خاک به روش تدخین-استخراج صورت گرفت، به این ترتیب که کربن قسمتی از نمونه پس از تدخین با کلروفرم و کربن قسمت دیگر بدون عمل تدخین، به روش اکسیداسیون تر (ویت و همکاران، 2000) اندازه گرفته شد و در نهایت از تفاضل این دو و لحاظ نمودن فاکتور تبدیل کربن آلی به کربن زیست‌توده‌ی میکروبی، کربن زیست‌توده‌ی میکروبی محاسبه گردید (شاینر و همکاران، 1996). در خصوص نیتروژن زیست‌توده‌ی میکروبی، محتوای نیتروژن نمونه‌ها نیز پس از اکسیداسیون توسط $K_2S_2O_8$ به صورت نیترات توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 210 نانومتر اندازه‌گیری و از تفاضل میزان نیتروژن نمونه‌های تدخین شده و تدخین نشده، نیتروژن زیست‌توده‌ی میکروبی محاسبه شد (ویت و همکاران، 2000).

تنفس میکروبی پس از رسانیدن رطوبت نمونه‌ها به 60 درصد ظرفیت نگهداری آب و 72 ساعت پیش‌انکوباسیون در دمای 25 درجه‌ی سلسیوس، هر سه روز یک بار بر حسب کربن متصاعد شده‌ی جذب شده توسط هیدروکسید سدیم تا زمان ثابت شدن نرخ تصاعد، به روش تیتراسیون اندازه‌گیری و به صورت تجمعی گزارش شد (شاینر و همکاران، 1996). ضریب متابولیک میکروبی یا تنفس ویژه‌ی زیست‌توده‌ی میکروبی از تقسیم مقدار کربن متصاعد شده (تنفس پایه) بر کربن زیست‌توده‌ی میکروبی به دست آمد (الف و نانیپیری، 1995).

فعالیت آنزیمی فسفاتاز قلیایی ($PA^5$) و اوره‌آز هرکدام جداگانه به ترتیب به صورت مقدار پارانیتروفنول و نیتروژن آمونیومی آزاد شده بر اثر فعالیت این آنزیم‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و سپس طبق معادلات ارائه شده، محاسبه شدند (الف و نانیپیری، 1995).

**تجزیه و تحلیل‌های آماری**

داده ها به صورت فاکتوریل و بر پایه‌ی بلوک‌های کامل تصادفی با دو فاکتور کاربری زمین و عمق خاک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. کاربری زمین در سه سطح جنگل، باغ و مزرعه و عمق خاک در سه سطح 10-0، 20-10 و 40-20 سانتی‌متر و در سه تکرار صورت پذیرفت. برای شناسایی اثرات مرتبط، میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) مقایسه شدند ($P<0.05$). تمام تجزیه و تحلیل ها با استفاده از نرم افزار Statistix 8 انجام شد.

## نتایج

بافت خاک‌های مورد مطالعه، رس سیلتی به عنوان بافت غالب می‌باشد. در جدول 1 مشاهده می‌شود که MBC/MBN و ضریب متابولیک میکروبی تنها نسبت به

1. Available Phosphorus
2. Total Nitrogen
3. Microbial Biomass Carbon
4. Microbial Biomass Nitrogen
5. alkaline Phosphatase Activity

تغییرات کاربری و محتوای فعالیت آنزیمی فسفاتاز قلیایی و فعالیت آنزیمی اوره‌آز در اثر تغییرات کاربری و عمق به صورت جداگانه معنی‌دار شده است؛ اما محتوای ماده‌ی آلی، نیتروژن کل، فسفر قابل جذب، کربن و نیتروژن زیست‌توده و تنفس میکروبی نسبت به تغییرات عمق×کاربری (اثرات متقابل کاربری و عمق) معنی‌دار شده است. همچنین در این جدول مشاهده می‌شود که کربن و نیتروژن زیست‌توده‌ی میکروبی در اثر کاربری، عمق و عمق*کاربری در سطح 0/001 معنی‌دار شده است.

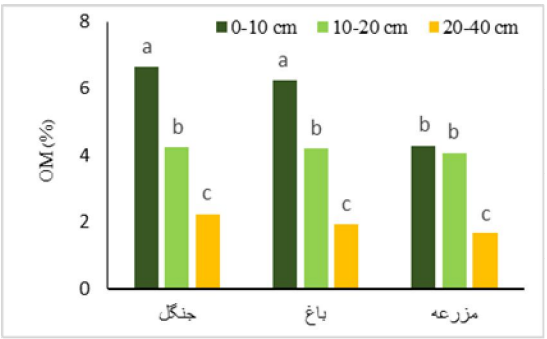
**جدول 1- آنالیز تجزیه‌ی واریانس خصوصیات خاک (ماده‌ی آلی: OM؛ نیتروژن کل: TN؛ فسفر قابل جذب: AP؛ کربن زیست‌توده‌ی میکروبی: MBC؛ نیتروژن زیست‌توده‌ی میکروبی: MBN؛ تنفس میکروبی: MR؛ ضریب متابولیک میکروبی: qCO2؛ فعالیت آنزیمی فسفاتاز قلیایی: PA؛ فعالیت آنزیمی اوره‌آز: UA) در کاربری و عمق‌های مختلف.**

| خصوصیات خاک اندازه گیری شده (منابع) | کاربری | عمق | عمق*کاربری |
|---|---|---|---|
| درجه آزادی | 2 | 2 | 4 |
| OM | 2/54** | 32/67** | 1/25* |
| TN | 0/016** | 0/078** | 0/09** |
| AP | 1036** | 244** | 328** |
| MBC | 577570*** | 406432*** | 80001*** |
| MBN | 4888*** | 4624*** | 1128*** |
| MBC/MBN | 9/82* | 3/28ns | 0/42ns |
| MR | 38262* | 714924*** | 40960** |
| $qCO_2$ | 1999* | 91/39ns | 187ns |
| PA | 768562* | 1105556** | 234601ns |
| UA | 8706*** | 12315*** | 628ns |

ns: P < 0.05; *: P < 0.01; **: P < 0.001; ***بدون اختلاف معنی‌دار

### اثر تغییر کاربری زمین بر ماده‌ی آلی

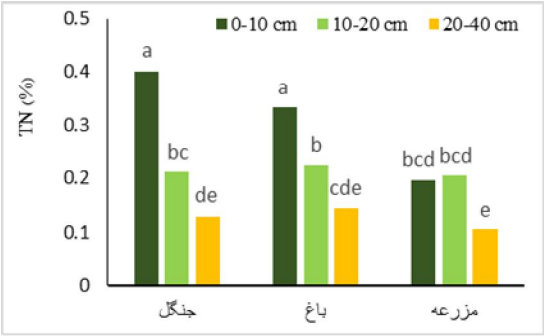
ماده‌ی آلی با افزایش عمق کاهش قابل ملاحظه‌ای داشته است به طوری که کمترین مقدار ماده‌ی آلی در عمق سوم هر سه کاربری بوده است. بیشترین ماده‌ی آلی خاک در عمق نخست دو کاربری جنگل و باغ بوده و تغییر کاربری جنگل به مزرعه باعث کاهش معنی‌دار (35/5 درصد) ماده‌ی آلی در عمق نخست شده است. در عمق‌های بیشتر تفاوت معنی‌داری بین مقدار ماده‌ی آلی کاربری‌های مختلف مشاهده نشد (شکل 1).




**شکل 1- مقایسه‌ی میانگین اثر تغییر کاربری زمین بر ماده‌ی آلی خاک در عمق‌های مختلف**
**تیمارهایی که دارای حداقل یک حرف مشترک باشند، از نظر آماری در سطح 5% معنی‌دار نیستند. حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح 0/05 برابر با 0/9758 می‌باشد.**

### اثر تغییر کاربری زمین بر نیتروژن کل

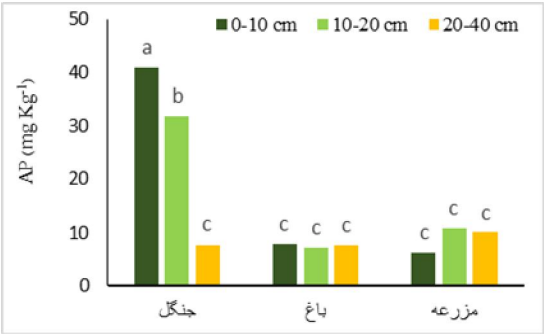
مطابق شکل 2 مشاهده می‌شود که بیشترین نیتروژن کل مربوط به عمق 10-0 سانتی‌متری کاربری جنگل و باغ بوده است و این دو دارای اختلاف معنی‌دار با سایر عمق×کاربری‌ها می‌باشند. تغییر کاربری از جنگل به مزرعه باعث کاهش 51/2 درصدی نیتروژن کل در عمق نخست شده است. همچنین عمق‌های 40-20 سانتی‌متری هر سه کاربری کمترین درصد نیتروژن کل را دارا هستند به طوری که در هر کاربری نسبت به عمق‌های اول و دوم به صورت معنی‌داری کمتر است.




**شکل 2- مقایسه‌ی میانگین اثر تغییر کاربری زمین بر نیتروژن کل در عمق‌های مختلف**
**تیمارهایی که دارای حداقل یک حرف مشترک باشند، از نظر آماری در سطح 5% معنی‌دار نیستند. حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح 0/05 برابر با 0/0796 می‌باشد.**

### اثر تغییر کاربری زمین بر فسفر قابل جذب

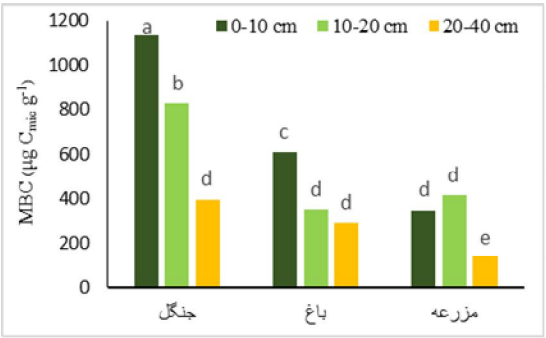
شکل 3 مقادیر فسفر قابل جذب در کاربری و عمق‌های مختلف را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌گردد تغییر کاربری بر میزان فسفر قابل جذب تأثیر بسیار قابل توجهی گذاشته است؛ به نحوی که این خصوصیت در کاربری جنگل حتی تا عمق دوم نیز دارای تفاوت بسیار معنی‌دار با سایر عمق×کاربری‌ها است. تبدیل جنگل به باغ و مزرعه به ترتیب باعث کاهش 81 و 85/2 درصدی فسفر قابل جذب در عمق نخست و 77/5 و 66/1 در عمق دوم شده است.




**شکل 3- مقایسه‌ی میانگین اثر تغییر کاربری زمین بر فسفر قابل جذب در عمق‌های مختلف**
**تیمارهایی که دارای حداقل یک حرف مشترک باشند، از نظر آماری در سطح 5% معنی‌دار نیستند. حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح 0/05 برابر با 6/53 می‌باشد.**

**اثر تغییر کاربری زمین بر کربن زیست‌توده‌ی میکروبی**

شکل 4 نشان‌دهنده‌ی بیش‌ترین میزان کربن زیست‌توده‌ی میکروبی در عمق اول کاربری جنگل با مقدار 1137 و سپس عمق دوم کاربری جنگل با مقدار 827 میکروگرم کربن میکروبی بر گرم خاک خشک است. تبدیل جنگل به باغ و مزرعه به ترتیب باعث کاهش 46/5 و 69/7 درصدی کربن زیست‌توده‌ی میکروبی در عمق نخست و همچنین کاهش 57/5 و 49/6 درصدی در عمق دوم شده است. کاربری زراعی در عمق سوم نیز دارای کمترین میزان کربن زیست‌توده‌ی میکروبی خاک است. تغییر کاربری باعث کاهش کربن زیست‌توده‌ی میکروبی در دو عمق نخست (در تبدیل جنگل به باغ) و هر سه عمق مورد بررسی (در تبدیل جنگل به مزرعه) شده است.



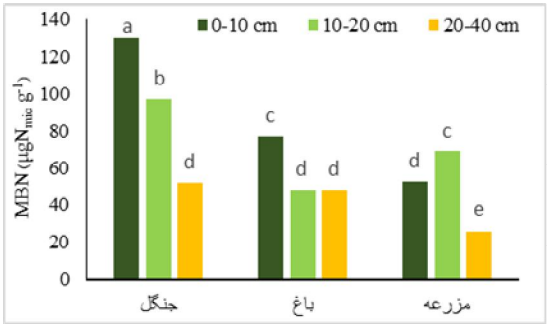

**شکل 4- مقایسه‌ی میانگین اثر تغییر کاربری زمین بر کربن زیست‌توده‌ی میکروبی در عمق‌های مختلف تیمارهایی که دارای حداقل یک حرف مشترک باشند، از نظر آماری در سطح 5% معنی‌دار نیستند. حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح 0/05 برابر با 132/55 می‌باشد.**

**اثر تغییر کاربری زمین بر نیتروژن زیست‌توده‌ی میکروبی**

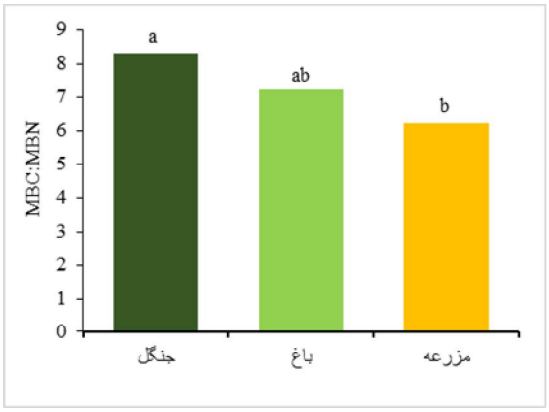
روند تغییرات نیتروژن زیست‌توده‌ی میکروبی در کاربری و عمق‌های مختلف نیز تا حدود زیادی مشابه روند تغییرات کربن زیست‌توده‌ی میکروبی است، بجز نیتروژن زیست‌توده‌ی میکروبی عمق دوم کاربری زراعی که با عمق نخست کاربری باغ هم‌سطح شده است. مطابق شکل 5 عمق اول و سپس عمق دوم کاربری جنگل به ترتیب با 129/77 و 97/13 میکروگرم نیتروژن زیست‌توده‌ی میکروبی بر گرم خاک خشک میزان بیشتر این ویژگی را نشان می‌دهند. تبدیل جنگل به باغ و مزرعه به ترتیب باعث کاهش 40/6 و 59/8 درصدی نیتروژن زیست‌توده‌ی میکروبی در عمق نخست و کاهش 64 و 29 درصدی در عمق دوم شده است.

**اثر تغییر کاربری زمین بر MBC/MBN**

تبدیل جنگل به مزرعه به طور معنی‌دار باعث کاهش 25/2 درصدی نسبت MBC/MBN شده است. کاربری باغ نیز بدون اختلاف معنی‌دار نسبت به دو کاربری دیگر دارای نسبت MBC/MBN حدواسطی است (شکل 6).



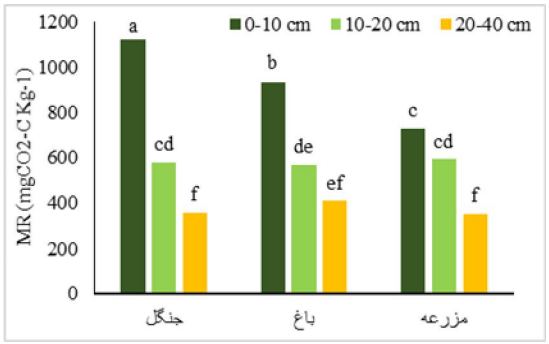

**شکل 5- مقایسه‌ی میانگین اثر تغییر کاربری زمین بر نیتروژن زیست‌توده‌ی میکروبی در عمق‌های مختلف**
**تیمارهایی که دارای حداقل یک حرف مشترک باشند، از نظر آماری در سطح 5% معنی‌دار نیستند. حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح 0/05 برابر با 12/63 می‌باشد.**




**شکل 6- مقایسه‌ی میانگین اثر تغییر کاربری زمین بر C/N زیست‌توده‌ی میکروبی**
**تیمارهایی که دارای حداقل یک حرف مشترک باشند، از نظر آماری در سطح 5% معنی‌دار نیستند. حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح 0/05 برابر با 1/62 می‌باشد.**

### اثر تغییر کاربری زمین بر تنفس میکروبی

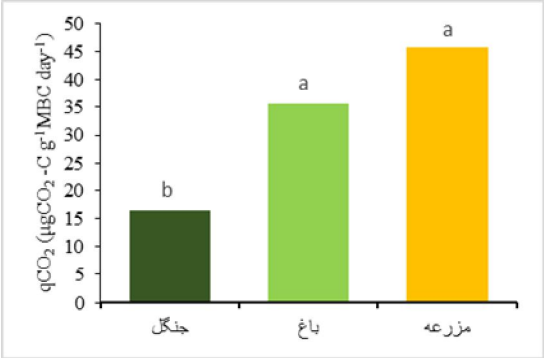
در شکل 7 مشاهده می‌شود که عمق نخست کاربری جنگل و سپس باغ بیشترین مقادیر تنفس میکروبی را دارا هستند و تغییر کاربری باعث کاهش معنی‌دار تنفس میکروبی تنها در عمق نخست شده به طوری که تنفس میکروبی در تبدیل جنگل به باغ و مزرعه به ترتیب 16/5 و 35/1 درصد کاهش یافته است.




**شکل 7- مقایسه‌ی میانگین اثر تغییر کاربری زمین بر تنفس میکروبی در عمق‌های مختلف**
**تیمارهایی که دارای حداقل یک حرف مشترک باشند، از نظر آماری در سطح 5% معنی‌دار نیستند. حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح 0/05 برابر با 159/36 می‌باشد**

### اثر تغییر کاربری زمین بر ضریب متابولیک میکروبی

مقادیر ضریب متابولیک میکروبی نسبت به عمق‌های مختلف معنی‌دار نشد و در خصوص کاربری‌ها، همانطور که در شکل 8 نمایش داده شده است، کاربری مزرعه و باغ نسبت به جنگل به طور معنی‌دار دارای ضریب متابولیک میکروبی بیشتری هستند و تغییر کاربری باعث افزایش 22/4 و 62/2 درصدی این خصوصیت میکروبی به ترتیب در باغ و مزرعه شده است.



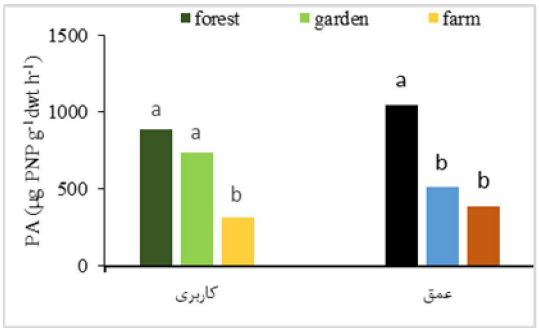

**شکل 8- مقایسه‌ی میانگین اثر تغییر کاربری زمین بر ضریب متابولیک میکروبی**

تیمارهایی که دارای حداقل یک حرف مشترک باشند از نظر آماری در سطح 5% معنی‌دار نیستند. حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح 0/05 برابر با 352/79 می‌باشد.

### اثر تغییر کاربری زمین بر فعالیت آنزیمی فسفاتاز قلیایی

بین فعالیت این آنزیم در جنگل و باغ اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود، اما تبدیل جنگل به مزرعه باعث کاهش 63/7 درصدی فعالیت این آنزیم شده است.

فعالیت آنزیمی فسفاتاز قلیایی عمق نخست نیز نسبت به دو عمق بررسی شده‌ی دیگر به طور معنی‌داری بیشتر شده است (شکل 9).




**شکل 9- مقایسه‌ی میانگین اثر تغییر کاربری زمین و عمق بر فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی**

**تیمارهایی که دارای حداقل یک حرف مشترک باشند، از نظر آماری در سطح 5% معنی‌دار نیستند. حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح 0/05 برابر با 352/79 می‌باشد.**

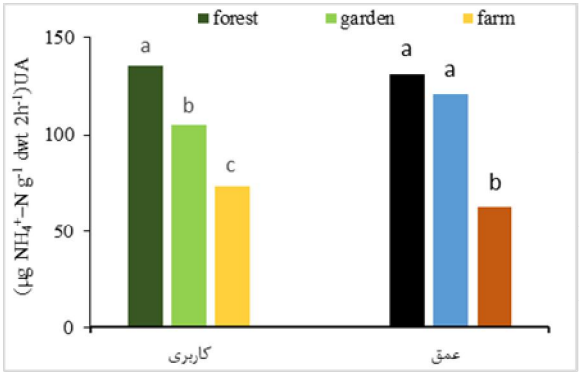
### اثر تغییر کاربری زمین بر فعالیت آنزیمی اوره‌آز

همانطور که در شکل 10 مشاهده می‌شود، بیشترین فعالیت آنزیمی اوره‌آز در کاربری جنگل و پس از آن در کاربری باغ است. تبدیل جنگل به باغ و مزرعه به ترتیب باعث کاهش فعالیت آنزیمی اوره‌آز خاک به مقدار 22/7 و 45/8 درصد شده است. همچنین فعالیت آنزیمی اوره‌آز

در عمق‌های 10-0 و 20-10 سانتی‌متری به طور معنی‌دار نسبت به عمق 40-20 سانتی‌متری بیشتر است.

**همبستگی**

جدول 2 همبستگی بین خصوصیاتی که اثر تغییر کاربری بر آن‌ها معنی‌دار شده است را نشان می‌دهد. همه خصوصیات میکروبی با هم و با سایر خصوصیات اندازه‌گیری شده (به جز فسفر قابل جذب) دارای همبستگی معنی‌داری بودند.




**شکل 10- مقایسه‌ی میانگین اثر تغییر کاربری زمین و عمق بر فعالیت آنزیمی اوره‌آز**
**تیمارهایی که دارای حداقل یک حرف مشترک باشند، از نظر آماری در سطح 5% معنی‌دار نیستند. حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح 0/05 برابر با 24/18 می‌باشد.**

**جدول 2- همبستگی بین خصوصیات اندازه‌گیری شده (n=9)**

| | AP | TN | OM | MR | UA | PA | MBC | MBN |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| AP | 1 | | | | | | | |
| TN | 0/59$^{ns}$ | 1 | | | | | | |
| OM | 0/51$^{ns}$ | 0/96$^{**}$ | 1 | | | | | |
| MR | 0/54$^{ns}$ | 0/97$^{**}$ | 0/96$^{**}$ | 1 | | | | |
| UA | 0/74$^{*}$ | 0/87$^{**}$ | 0/87$^{**}$ | 0/79$^{*}$ | 1 | | | |
| PA | 0/63$^{ns}$ | 0/92$^{**}$ | 0/81$^{**}$ | 0/87$^{**}$ | 0/80$^{**}$ | 1 | | |
| MBC | 0/90$^{**}$ | 0/83$^{**}$ | 0/77$^{*}$ | 0/77$^{*}$ | 0/92$^{**}$ | 0/83$^{**}$ | 1 | |
| MBN | 0/87$^{**}$ | 0/83$^{**}$ | 0/79$^{*}$ | 0/79$^{*}$ | 0/90$^{**}$ | 0/81$^{**}$ | 0/99$^{**}$ | 1 |

**ماده‌ی آلی: OM؛ نیتروژن کل: TN؛ فسفر قابل جذب: AP؛ کربن زیست‌توده‌ی میکروبی: MBC؛ نیتروژن زیست‌توده‌ی میکروبی: MBN؛ تنفس میکروبی: MR؛ ضریب متابولیک میکروبی: qCO2؛ فعالیت آنزیمی فسفاتاز قلیایی: PA؛ فعالیت آنزیمی اوره‌آز: UA**

**بحث**

تغییر کاربری باعث کاهش ماده‌ی آلی، نیتروژن کل، کربن و نیتروژن زیست‌توده‌ی میکروبی در دو عمق نخست (در تبدیل جنگل به باغ) و هر سه عمق مورد بررسی (در تبدیل جنگل به مزرعه) شده بود. علت بیشتر بودن ماده‌ی آلی در عمق 10-0 سانتی‌متری کاربری جنگل را می‌توان به ریزش و مدفون شدن برگ و بقایای گیاهی نسبت داد. کاربری باغ در عمق 10-0 سانتی‌متری نیز به دلایل عدم شخم، دریافت کود حیوانی و وجود پوشش متراکم علف‌های هرز، دارای محتوای ماده‌ی آلی بالایی است. اما در مزرعه به دلایل خاکورزی و تخریب خاکدانه‌ها و در نتیجه قرار گرفتن ماده‌ی آلی خاک در معرض تجزیه‌ی باکتری‌ها و همچنین برداشت محصول،

کاهش آن را در پی داشته است. پژوهشگران زیادی همچون پابست و همکاران (2015) در تانزانیا، کانتی و همکاران (2014) در امریکای جنوبی و زانگمین و همکاران (2014) در چین کاهش محتوای ماده‌ی آلی را در تبدیل اراضی جنگلی به کشاورزی گزارش کردند. نیتروژن به شکل‌های گوناگونی از خاک خارج می‌شود؛ سوزاندن بقایا، آبشویی، فرسایش و برداشت محصول از این موارد هستند که می‌توانند دلایلی بر کمتر بودن درصد نیتروژن کل در کاربری زراعی نسبت به دو کاربری دیگر در عمق نخست باشند. کاربری باغ در این عمق اختلاف معنی‌داری با کاربری جنگل نداشت. در باغ تلفات نیتروژن را بیشتر می‌توان به آبشویی و برداشت محصول نسبت داد که با افزودن کود حیوانی جبران شده است. برخلاف کاربری‌های دیگر، بین نیتروژن کل عمق 10-0 و 20-10 سانتی‌متری مزرعه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت که علت آن ترکیب شدن این دو عمق در کاربری زراعی است. کاهش مقدار نیتروژن خاک در اثر تبدیل زمین‌های جنگلی به زمین‌های تحت تولید محصول نیز توسط پژوهشگرانی همچون کرام و همکاران (2015)، خالدیان و همکاران (1390) گزارش شده است.

تبدیل جنگل به باغ و مزرعه باعث کاهش معنی‌دار فسفر قابل جذب شده بود. شرایط در کاربری‌های باغ و مزرعه به شکلی تغییر کرده که از یک طرف به دلیل برداشت محصول و تلفات فسفر به شکل‌های مختلف از جمله آبیاری (به خصوص در کاربری باغ)، و از سوی دیگر غیر قابل استفاده شدن فسفر به دلایل تثبیت شیمیایی باعث کاهش قابل ملاحظه‌ی شکل قابل جذب آن شده است. در جنگل و با افزایش عمق فسفر قابل جذب به طور منظم کاهش یافته است که در دیگر کاربری‌ها این نظم مشاهده نمی‌شود و این به دلیل عدم برهم‌خوردگی و در نتیجه حفظ حالت طبیعی در کاربری جنگل است. برومند و همکاران (1393) کاهش فسفر قابل جذب خاک در اثر تبدیل جنگل به مزرعه‌ی را گزارش کردند.

تعامل گسترده‌ای از فاکتورها و خصوصیات، فعالیت، جمعیت و میزان جامعه‌ی میکروبی خاک را تعیین می‌کند و تغییر کاربری و پوشش و عملیات زراعی با تأثیر بر این تعاملات، فعالیت، جمعیت و میزان جامعه‌ی میکروبی خاک را تغییر می‌دهند؛ به طوری که حتی دیده می‌شود عمق اول کاربری باغ با دارا بودن ماده‌ی آلی و نیتروژن کل بیشتر نسبت به عمق دوم کاربری جنگل، میزان زیست‌توده‌ی کمتری را دارا بوده است. همچنین مشاهده شد که زیست‌توده‌ی میکروبی در سطح 0/001 نسبت به تغییرات کاربری، عمق و عمق×کاربری معنی‌دار شده و این‌ها حاکی از حساسیت بالای زیست‌توده میکروبی نسبت به شرایط موجود در خاک است. کارا و بالات (2008) در بررسی اثر تغییر کاربری در شمال غربی ترکیه بیشترین کربن و نیتروژن زیست‌توده‌ی میکروبی عمق 5 سانتی‌متری را برای خاک‌های جنگل و کمترین را برای خاک‌های کشاورزی گزارش کردند و بیان کردند که کربن و نیتروژن زیست‌توده‌ی میکروبی به طور قابل توجهی به خواص فیزیکی و شیمیایی خاک مرتبط است و تغییر در کاربری زمین اثر قابل توجهی بر زیست‌توده‌ی میکروبی دارد. پابست و همکاران (2015) بیان نمودند که تبدیل اکوسیستم‌های طبیعی به کشاورزی مرسوم و حتی کشاورزی پایدار اغلب با کاهش کربن زیست‌توده‌ی میکروبی همراه است. نتایج این پژوهش نیز نشان داد که این پارامتر در کاربری باغ (کشاورزی پایدار) نیز به مقدار قابل توجهی کاهش یافته است.

تبدیل جنگل به مزرعه باعث کاهش معنی‌دار نسبت MBC:MBN شده بود. محتمل‌ترین علت را می‌توان به کاربرد نهاده‌های حاوی نیتروژن و کم‌تر بودن ماده‌ی آلی در مزرعه نسبت داد؛ و این با اثرگذاری بر ساختار جامعه‌ی میکروبی، جمعیت را به سمت غالب شدن بیشتر گونه‌هایی با C/N کمتر سوق داده است؛ چرا که ثابت شده است که تغییرات در کاربری زمین ساختار جوامع میکروبی خاک را تغییر می‌دهد (تاردی و همکاران، 2015).

تنفس میکروبی با افزایش عمق کاهش یافت. علت این امر به عوامل محدودکننده در عمق‌های بیشتر برمی‌گردد، عواملی نظیر ماده‌ی آلی و عناصر مغذی مورد نیاز ریزجاندارن که در عمق‌های پایین‌تر، کمتر است. این‌گونه عوامل با تأثیر بر ترکیب جامعه و جمعیت ریزجانداران، باعث کاهش فعالیت آن‌ها در خصوص معدنی کردن کربن آلی در عمق‌های زیرین شده است. بین تنفس میکروبی هر سه کاربری در عمق نخست اختلاف معنی‌داری وجود داشت. برداشت محصول و خاکورزی از علل عمده‌ی کاهش ماده‌ی آلی و در نتیجه کاهش تنفس میکروبی خاک است که تنها عامل اول در باغ رخ می‌دهد و همچنین این کاهش با کاربرد کود حیوانی در باغ مورد مطالعه تا حدودی جبران شده است. برهم‌خوردگی خاک در کاربری زراعی باعث شده است که تنفس میکروبی تا عمق 20 سانتی‌متری (محدوده‌ی اصلی خاکورزی) نسبت به دو کاربری دیگر با شدت کمتری کاهش یابد و حتی در عمق 20-10 سانتی‌متری نسبت به دو کاربری جنگل و باغ در این عمق کمی بیشتر شود؛ که می‌توان گفت ترکیب این عمق با عمق نخست در مزرعه باعث شده که ویژگی‌های این دو عمق تقریبا یکسان شوند. زانگمین و همکاران (2014) مقدار تنفس میکروبی در اراضی جنگلی را به طور قابل توجهی بالاتر از دیگر کاربری‌ها گزارش کردند.

کشت و کار در اراضی جنگلی منطقه باعث شده است که ضریب متابولیک میکروبی در باغ و مزرعه افزایش یابد. ریزجانداران خاک یک نقش مهم در تحولات کربن آلی خاک ایفا می‌کنند که برای حفظ حاصلخیزی خاک و برقراری ثبات کربن در خاک دارای اهمیت است؛ به طوری که کربن آلی خاک توسط ریزجانداران در خاک مصرف و تبدیل به زیست‌توده و یا تحت عمل تنفس به ضریب متابولیک میکروبی تبدیل می‌شود (لی و اشمیت، 2014). تبدیل کاربری‌های دست نخورده به کاربری‌های تحت تولید محصول باعث ایجاد تنش‌هایی نظیر تخریب خاکدانه‌ها و تغییر در دسترسی ریزجانداران به مواد مغذی و به ویژه کربن آلی، تراکم، ورود نهاده و آلاینده‌های حاوی عناصر سنگین و تنش‌های آبی، تهویه‌ای، نوری و دمایی می‌شود که باعث اختلال در سوخت و ساز ریزجانداران خاک می‌شود و ریزجاندارانی که در خاک‌های اراضی بکر زیست‌توده‌ی بیشتری به ازای مصرف هر واحد کربن موجود در خاک تولید می‌کردند، قسمت بیشتری از این کربن را به صورت ضریب متابولیک میکروبی متصاعد کنند؛ لذا ضریب متابولیک میکروبی که از تقسیم مقدار کربن متصاعد شده بر مقدار کربن زیست‌توده‌ی میکروبی بدست می‌آید، در این خاک‌ها افزایش یابد. بینی و همکاران (2013) نیز بیان نمودند با کشت و کار، ضریب متابولیک میکروبی افزایش می‌یابد به طوری که آنها مقدار این خصوصیت را در زمین کشاورزی نسبت به کاربری کاج برزیلی، جنگل ثانویه و جنگل طبیعی در جنوب برزیل بیشتر گزارش کردند.

فعالیت آنزیمی نیز در اثر تبدیل جنگل به زمین‌های کشاورزی، تحت تأثیر قرار گرفته و کاهش پیدا کرده است. نتایج حاصل از پژوهش لی و همکاران (2014) در جنوب غربی چین تأثیر قابل توجه کاربری‌های مختلف زمین بر فعالیت‌های آنزیمی را نشان داد. پابست و همکاران (2015) و گانگا و همکاران (2015) در تانزانیا، رئیسی و بهشتی (2015) در ایران و والنیوس و همکاران (2011) در جنوب غربی فنلاند کاهش فعالیت آنزیمی خاک را در اثر جنگل‌تراشی گزارش کردند. فعالیت آنزیم‌های برون‌سلولی خاک بسته به حضور آزاد آن‌ها در فاز آب خاک یا تثبیت شده در جز هومیک یا محتوای رس خاک متفاوت است (ترنر و هیگارث، 2005). از طرفی، فعالیت آنزیم‌های خاک به صورت مثبت یا منفی در تعامل با سطوح مواد معدنی قرار می‌گیرد و تنوع بالای زمانی و مکانی، روابط آن‌ها با تغییرات محیطی و زیست‌محیطی را مبهم می‌کند (سنسبا، 2010).

در خصوص فعالیت آنزیمی اوره‌آز، شرایط بهینه‌ی جنگل برای رشد گیاه، جانور و ریزجانداران خاک در

وهله‌ی اول باعث فراهم شدن ترکیبات آمیدی بیشتر آزاد شده نسبت به دو کاربری دیگر شده است (علی‌اصغرزاد، 1389)؛ و در نتیجه آنزیم اوره‌آز به عنوان یک آمیداز بستره‌ی بیشتری از آمیدها را در اختیار دارد؛ و در وهله‌ی دوم محیطی مناسب برای مؤثر واقع شدن این آنزیم را ایجاد کرده است و آنزیم‌های تولید شده در کاربری جنگل نسبت به دو کاربری دیگر کمتر دچار تثبیت و یا آبشویی خواهند شد؛ در نهایت این وقایع باعث شده که بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در کاربری جنگلی باشد. این دلایل نسبت به تغییرات عمق نیز صدق می‌کند و با افزایش عمق و کاهش جمعیت ریزجانداران تولیدکننده‌ی آنزیم اوره‌آز، فعالیت این آنزیم کاهش یافت. نتایج پژوهش صورت گرفته توسط ساویوزی و همکاران (2001) نیز حاکی از کاهش قابل ملاحظه‌ی فعالیت آنزیمی اوره‌آز در اثر تولید ذرت در دراز مدت و در سطح فشرده نسبت به اراضی دست‌نخورده بود.

در خصوص فعالیت آنزیمی فسفاتاز قلیایی، شرایط خاک باغ به دلیل تشابه بیشتر با شرایط خاک کاربری جنگل باعث شده که فعالیت این آنزیم به مقدار کمتری در مقایسه با مزرعه کاهش یابد و اختلاف آن با جنگل معنی‌دار نشود. این نتایج نشان می‌دهد که علاوه بر تأثیرپذیری فعالیت دو آنزیم مورد بررسی از تغییر کاربری، فعالیت آنزیمی فسفاتاز قلیایی نسبت به فعالیت آنزیمی اوره‌آز به صورت محسوس تحت تأثیر نوع مدیریت قرار گرفته است. گانگا و همکاران (2015) بیان کردند که هرچند با شدت استفاده‌ی از زمین فعالیت‌های میکروبی و آنزیمی به شدت کاهش می‌یابد اما بین فعالیت آنزیمی فسفاتاز قلیایی و استفاده‌ی از زمین در تانزانیا ارتباطی مثبت وجود دارد و این آنزیم فعالیت بالای خود را در همه‌ی کاربری‌های مورد مطالعه به نمایش گذاشته است که علت آن به ظرفیت نگهداری بالای فسفر در خاک‌های مورد مطالعه نسبت داده شده و فسفر قابل جذب، فعالیت‌های آنزیمی در جنگل و باغ چاگا را تحریک نموده است. اما نتایج این پژوهش نشان داد که کاربری زراعی با وجود فسفر قابل جذب بیشتر نسبت به کاربری باغ، با اختلاف بسیار زیاد، فعالیت آنزیمی فسفاتاز قلیایی کمتری را نشان داد و دلیل اصلی آن را به تفاوت در محتوای ماده‌ی آلی و شرایط نامناسب کاربری مزرعه و در نتیجه کاهش شمار ریزجانداران می‌توان نسبت داد؛ دلایلی که نشان می‌دهد فعالیت آنزیمی فسفاتاز قلیایی تنها تحت تأثیر تعداد محدودی از خصوصیات خاک نیست و معدنی شدن فسفر آلی خاک توسط فسفاتاز بستگی زیادی به ویژگی‌های زیستگاه دارد؛ برای نمونه در پژوهش صورت گرفته توسط ترنر و هیگارث (2005) در انگلستان و ولز ارتباطی قوی بین فعالیت آنزیمی فسفاتاز قلیایی و میزان رس، نیتروژن کل، pH و فسفر آلی گزارش شد.

فعالیت آنزیمی فسفاتاز قلیایی عمق نخست نیز با دو عمق بررسی شده‌ی دیگر اختلافی معنی‌دار داشت و علت آن را نیز می‌توان به کاهش جمعیت و فعالیت ریزجانداران با افزایش عمق نسبت داد. اما با توجه اینکه فعالیت آنزیمی فسفاتاز قلیایی در مقایسه با فعالیت آنزیمی اوره‌آز کاهش بیشتری در عمق‌های مشابه داشت، می‌توان نتیجه گرفت که فعالیت آنزیمی فسفاتاز قلیایی در زمان کوتاه‌تری تغییرات را منعکس می‌کند، چرا که با وجود ترکیب هرساله‌ی دو عمق نخست در کاربری زراعی، تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین فعالیت آنزیمی فسفاتاز قلیایی در این دو عمق مشاهده شد؛ و یا فسفاتاز در مقایسه با اوره‌آز نسبت به تغییرات شرایط با افزایش عمق، حساس‌تر است. نتایج متفاوتی نیز از فعالیت این آنزیم در اثر تغییر کاربری گزارش شده است. کاستا-مارتینز و همکاران (2007) فعالیت آنزیمی فسفاتاز قلیایی مزرعه را نسبت به جنگل، کمتر اما ماهارجان و همکاران (2016) فعالیت آنزیمی فسفاتاز قلیایی در خاک تحت کشاورزی مرسوم نسبت به خاک تحت کشاورزی ارگانیک و جنگل را بیشتر گزارش کردند. بربر و همکاران (2012) در شمال غربی ترکیه تفاوت معنی‌داری در فعالیت این آنزیم بین کاربری جنگل و مزرعه مشاهده نکردند.

خصوصیات مختلف خاک، کم و بیش با هم مرتبط و از یکدیگر تأثیر می‌پذیرند. در این مطالعه به جز تنفس میکروبی و فعالیت آنزیمی فسفاتاز قلیایی که با فسفر قابل جذب فاقد همبستگی بودند، سایر خصوصیات میکروبی با هم و با دیگر خصوصیات اندازه‌گیری شده دارای همبستگی بودند. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که مقدار ماده‌ی آلی دست نخورده در ارتباط با ویژگی‌های بیولوژیکی و بیوشیمیایی است (چائر و همکاران، 2009). مورگان-کرنادو و همکاران (2015) دلیل معنی‌دار بودن تفاوت در ویژگی‌ها و شاخص‌های میکروبی خاک در شیوه‌های مدیریتی مختلف کشاورزی را، ارتباط شدید آن با محتوای ماده‌ی آلی گزارش کردند. یائو و همکاران (2000) بیان کردند که کربن زیست‌توده‌ی میکروبی با کربن آلی و نیتروژن کل در خاک‌هایی با کاربری‌های مختلف در جنوب غربی چین همبستگی مثبت دارد. یان و همکاران (2003) بیان کردند که کربن زیست‌توده‌ی میکروبی به صورت محسوس با کربن آلی خاک همبستگی مثبت دارد. نتایج ابرا و مسکل (2013) نشان داد که دلیل بالا بودن ضریب متابولیک میکروبی در اراضی کشاورزی کمتر بودن کربن آلی است. طی پژوهش صورت گرفته توسط والنیوس و همکاران (2011) در اراضی جنوب غربی فنلاند مشخص شد که ماده‌ی آلی تفاوت‌های عمده در فعالیت آنزیم‌های خاک و زیست‌توده‌ی میکروبی را به خوبی پیش بینی می‌کند. و یا میکاپادیای و جوی (2010) در پژوهشی در شرق هند دریافتند که فعالیت آنزیمی با کربن آلی و محتویات فسفر قابل جذب در خاک دارای همبستگی است. در این پژوهش نیز به طور کل، خصوصیات میکروبی با هم و با دیگر خصوصیات اندازه‌گیری شده همبستگی معنی‌داری داشتند.

## نتیجه‌گیری کلی

تغییر کاربری زمین از جنگل به باغ و مزرعه باعث از دست رفتن کیفیت خاک و بر هم خوردن خصوصیات اندازه‌گیری شده نسبت به تغییرات عمق شده که این تغییرات در تبدیل جنگل به مزرعه و در عمق نخست (10-0 سانتی‌متر) بیشتر مشهود است. مهمترین دلائل این کاهش کلی در کیفیت خاک را می‌توان از یک سو برداشت محصول (در هر دو کاربری باغ و مزرعه) و از بین رفتن چرخه‌ی طبیعی و تقریباً بسته‌ی موجود در جنگل، و از سوی دیگر خاکورزی (در مزرعه) و کاربرد کود حیوانی (در باغ) به ترتیب به عنوان عوامل تشدید و تقلیل این تغییرات بیان نمود.

اندازه‌گیری خصوصیات میکروبی خاک با توجه به حساسیت بالای ریزجانداران به تغییرات، در مقایسه با خصوصیات شیمیایی خاک دید بهتری از وضعیت سلامت خاک ارائه می‌کند که در بین خصوصیات میکروبی، کربن و نیتروژن زیست‌توده‌ی میکروبی با توجه به بروز اختلافات معنی‌دار نسبت به اثرات متقابل کاربری و عمق، کوتاه بودن زمان انجام و همچنین دقت بالا در اندازه‌گیری آن، شاخص‌های بهتری برای ارزیابی تغییرات صورت گرفته هستند.

## فهرست منابع:


1. برومند م.، قاجارسپانلو م. و بهمنیار م.ا. 1393. اثر تغییر کاربری اراضی بر برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک (مطالعه موردی: سمسکنده ساری). پژوهشنامه مدیریت حوزه آبخیز 9: 94-78.
2. بهشتی‌آل‌آقا ع.، رئیسی ف. و گلچین ا. 1390. تأثیر تغییر کاربری اراضی جنگلی به کشاورزیبر برخی شاخص‌های بیولوژیک کیفیت خاک در اکوسیستم‌های جنگلی شمال ایران. نشریه بوم‌شناسی کشاورزی. 3(4): 453-439.

3. خالدیان ی.، کیانی ف.، ابراهیمی س. و موحدی‌نائینی ع. 1390. تأثیر تخریب جنگل‌ها، تغییر کاربری اراضی و ویلاسازی بر برخی شاخص‌های کیفیت خاک در حوضه زیارت استان گلستان. مجله پژوهش‌های حفاظت آب و خاک 18(3): 167-184.
4. عجمی م.، خرمالی ف. و ایوبی ش. 1391. نقش تخریب جنگل‌ها و تغییر کاربری اراضی بر فرسایش‌پذیری خاک‌های لسی شرق استان گلستان.
5. علی‌اصغرزاد ن. 1389. روش‌های آزمایشگاهی در بیولوژی خاک. 522 ص. مجله پژوهش‌های آبخیزداری. 94: 44-37.
6. Abera G. and Wolde-Meskel E. 2013. Soil properties, and soil organic carbon stocks of tropical andosol under different land uses. Open Journal of Soil Science 3:153-162.
7. Acosta-Martinez V., Cruz L., Sotomayor-Ramirez D. and Perez-Alegria L. 2007. Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed. Applied Soil Ecology 35:35-45.
8. Alef K. and Nannipieri P. 1995. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press, London, 578 p.
9. Araujoa A.S.F., Cesarz S., Leite L.F.C., Borges C.D., Tsai S.M. and Eisenhauer N. 2013. Soil microbial properties and temporal stability in degraded and restored lands of Northeast Brazil. Soil Biology & Biochemistry 66:175-181.
10. Bastida F., Zsolnay A., Hernandez T. and Garcia C. 2008. Past, present and future of soil quality indices: A biological perspective. Geoderma 147:159–171.
11. Berber A.S., Farasat F., Naml A. 2012. Afforestation effects on phsycal, chemical and biological soil properties. 8th International Soil Since Congress. Izmir-Turkey.
12. Bremner J.M. and Mulvaney C.S. 1982. Nitrogen total. pp. 595- 624. In: Page, A. L., Miller, R. H. and Keeney, D. R. (eds.). Methods of soil analysis. Part 2. Chemical analysis. American Society of Agronomy and Soil Science Society of American, Madison, Wisconsin.
13. Bini D., Alcantara dos Santos C., Banhos do Carmo K., Kishino N., Andrade G., Zangaro W. and Antonio Nogueira M. 2013. Effects of land use on soil organic carbon and microbial processes associated with soil health in southern Brazil. European Journal of Soil Biology 55:117-123.
14. Bissett A., Abell G.C.J., Brown M., Thrall P.H., Bodrossy L., Smith M.C., Baker G.H. and Richardsson A.E. 2014. Land-use and management practices affect soil ammonia oxidizer community structure, activity and connectedness. Soil Biology and Biochemistry 78:138-148.
15. Bouyoucos G.J. 1962. Hydrometer method improved for making particles size analyses of soils. Agronomy Journal 56:464-465.
16. Chaer G.M., Myrold D.D. and Bottomley P.J. 2009. A soil quality index based on the equilibrium between soil organic matter and biochemical properties of undisturbed coniferous forest soils of the Pacific Northwest. Soil Biology and Biochemistry 41:822-830.
17. Conti G., Perez-Harguindeguy N., Quetier F., Gorne L.D., Jaureguiberry P., Bertone G.A., Enrico L., Cuchietti A. and Diaz S. 2014. Large changes in carbon storage under different land-use regimes in subtropical seasonally dry forests of southern South America. Agriculture, Ecosystems and Environment 197:68-76.
18. Cram S., Sommer I., Fernández P., Galicia1 L., Ríos C. and Barois I. 2015. Soil natural capital modification through landuse and cover change in a tropical forest landscape: implications for management. Journal of Tropical Forest Science 27(2):189-201.
19. Cruz R.E., Cruz R.A., Vaca R, del-Aguila P. and Lugo J. 2015. Assessment of soil parameters related with soil quality in agricultural systems. Life Science Journal 12(1), 154-161.

20. Fanin N. and Bertrand I. 2016. Aboveground litter quality is a better predictor than belowground microbial communities when estimating carbon mineralization along a land-use gradient. Soil Biology and Biochemistry 94: 48-60.
21. Habig J. and Swanepoel C. 2015. Effects of conservation agriculture and fertilization on soil microbial diversity and activity. Environments 2:358-384.
22. Kabiri V., Raiesi F. and Ghazavi M.A. 2016. Tillage effects on soil microbial biomass, SOM mineralization and enzyme activity in a semi-arid Calcixerepts. Agriculture, Ecosystems and Environment 232:73–84.
23. Kara O. and Bolat I. 2008. The effect of different land uses on soil microbial biomass carbon and nitrogen in bartin province. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 32:281-288.
24. Kumar S., Chaudhuri S. and Maiti S.K. .2013. Soil dehydrogenase enzyme activity in natural and mine soil- A review. Middle-East Journal of Scientific Research 13(7):898-906.
25. Lee Z.M., Schmidt T.M. 2014. Bacterial growth efficiency varies in soils under different land management practices. Soil Biology and Biochemistry 69:282-290.
26. Li Q., Liang J.H., He Y.Y., Hu Q.J. and Yu S. 2014. Effect of land use on soil enzyme activities at karst area in Nanchuan, Chongqing, Southwest China. Plant Soil Environ 60(1):15-20.
27. Lopes E.L.N., Fernandes A.R., Ruivo M.L.P., Cattanio J.H. and Souza G.F. 2011. Microbial biomass and soil chemical properties under different land use systems in northeastern Para. Revista Brasileira de Ciencia do Solo 35:1127-1139.
28. Luo Y. and Zhou X. 2006. Soil Respiration and the Environment. Academic Press is an imprint of Elsevier, 316 p.
29. Maharjan M., Sanaullah M. and Kuzyakov Y. 2016. Effect of land use on microbial biomass and enzyme activities in tropical soil. Geophysical Research Abstracts 18:4318.
30. Martinez-Salgado M.M., Gutierrez-Romero V., Jannsens M. and Ortega-Blu R. 2010. Biological soil quality indicators: a review. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology :319-328.
31. Mganga K.Z., Razavi B.S. and Kuzyakov Y. 2015. Microbial and enzymes response to nutrient additions in soils of Mt.Kilimanjaro region depending on land use. European Journal of Soil Biology 69:33-40.
32. Morugan-Coronado A., Garcia-Orenes F. and Cerda A. 2015. Changes in soil microbial activity and physicochemical properties in agricultural soils in eastern Spain. Spanish Journal of Soil Science 5(3):201-213.
33. Mukhopadhyay S. and Joy V.C. 2010. Influence of leaf litter types on microbial functions and nutrient status of soil: Ecological suitability of forest trees for afforestation in tropical laterite wastelands. Soil Biology and Biochemistry 42:2306-2315.
34. Muscolo A., Rosaria Panuccio M., Mallamaci C. and Sidari M. 2014. Biological indicators to assess short-term soil quality changes in forestecosystems. Ecological Indicators. 45:416-423.
35. Nelson D.W. and Somers L.E. 1996. Total carbon, organic carbon and organic matter of soil analysis. Part 3. Chemical Methods. Madision, Wisconsin. USA Pp: 961–1010.
36. Olsen S.R., Cole C.V., Watanabe F.S. and Dean L.A. 1954. Estimation of Available Phosphorous in Soils by Extraction with Sodium Bicarbonate; U.S. Department of Agriculture: Washington, D.C., USDA Circ. 939.
37. Pabst H., Gerschlauer F., Kiese R. and Kuzyakov Y. 2015. Land use and precipitation affect organic and microbial carbon stocks and the specific metabolic quotient in soils of eleven ecosystems of mt. Kilimanjaro, Tanzania. Land Degradation & Development. http://onlinelibrary.wiley.com/ doi/ 10.1002/ ldr.2406/ full.

38. Raiesi F. and Beheshti A. 2015. Microbiological indicators of soil quality and degradation following conversion of native forests to continuous croplands. Ecological Indicators 50:173-185.
39. Renella G., Mench M., Landi L. and Nannipieri P. 2005. Microbial activity and hydrolase synthesis in long-term Cd-contaminated soils. Soil Biology and Biochemistry 37:133-139.
40. Rinkes Z.L., Weintraub M.N., Deforest J.L. and Moorhead D.L. 2011. Microbial substrate preference and community dynamics during decomposition of Acer saccharum. Fungal Ecology 4:396-407.
41. Salek-Gilani S., Raiesi F., Tahmasebi P. and Ghorbani N. 2013. Soil organic matter in restored rangelands following cessation of rainfed cropping in a mountainous semi-arid landscape. Nutrient Cycling in Agroecosystems 96:215-232.
42. Saviozzi A., Levi-Minzi R., Cardelli R. and Riffaldi R. 2001. A comparison of soil quality in adjacent cultivated, forest and native grassland soils. Plant and Soil 9:233-251.
43. Schinner F., Ohlinger R., Kandeler E. and Margesin, R. 1996. Methods in soil biology. Publish in Springer Berlin Heidelberg, 522 p.
44. Silva D.K.A., Freitas N.O., Sousa R.G., Silva F.S.B., Araujo A.S.F. and Maia L.C. 2012. Soil microbial biomass and activity under natural and regenerated forests and conventional sugarcane plantations in Brazil. Geoderma 189:257-261.
45. Sinsabaugh R.L. 2010. Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. Soil Biology and Biochemistry 42:391-404.
46. Spohn M. 2015. Microbial respiration per unit microbial biomass depends on litter layer carbon-to-nitrogen ratio. Biogeosciences 12:817-823.
47. Tardy V., Spor A., Mathieu O., Leveque J., Terrat S., Plassart P., Regnier T., Bardgett R.D., Putten W.H., Roggero P.P., Seddaiu G., Bagella S., Lemanceau P, Ranjard L and Maron P.A. 2015. Shifts in microbial diversity through land use intensity as drivers of carbon mineralization in soil. Soil Biology and Biochemistry 90:204-213.
48. Turner B.L. and Haygarth P.M. 2005. Phosphatase activity in temperate pasture soils: Potential regulation of labile organic phosphorus turnover by phosphodiesterase activit. Science of the Total Environment 344:27-36.
49. Wallenius K., Rita H., Mikkonen A., Lappi K., Lindstrom K., Hartikainen H., Raateland A. and Niemi R.M. 2011. Effects of land use on the level, variation and spatial structure of soil enzyme activities and bacterial communities. Soil Biology and Biochemistry 43:1464-1473.
50. Witt C., Gaunt J.L., Galicia C.C., Ottow J.C.G., Neue H. 2000. A rapid chloroform-fumigation extraction method for measuring soil microbial biomass carbon and nitrogen in flooded rice soils. Biology and Fertility of Soils 30:510-519.
51. Xiangmin F., Qingli W., Wangming Z., Wei Z., Yawei W., Lijun N. and Limin D. 2014. Land use effects on soil organic carbon, microbial biomass and microbial activity in Changbai mountains of northeast China. Chinese Geographical Science 24(3):297-306.
52. Yana T., Yanga L., Campbell C.D. 2003. Microbial biomass and metabolic quotient of soils under different land use in the Three Gorges Reservoir area. Geoderma 115:129-138.
53. Yao H., He Z., Wilson M.J. and Campbell C.D. 2000. Microbial biomass and community structure in a sequence of soils with increasing fertility and changing land use. Microbial Ecology 40:223-237.
54. Zhi-xin Y., Shu-qing L., Da-wei Z. and Sheng-dong F. 2006. Effects of cadium, zinc and land on soil enzyme activities. Journal of Environmental Sciences. 18(6):1135-1141.
55. Zimmermann S. and Frey B. 2002. Soil respiration and microbial properties in an acid forest soil: Effects of wood ash. Soil Biology and Biochemistry 34:1727-1737.

# تأثیر تلفیقی کمپوست، بیوچار و تلقیح زیستی بر فعالیت آنزیمی و برخی شاخص‌های میکروبی خاک

نگار رضائی‌دانش، میرحسن رسولی صدقیانی[1]، ندا مرادی و محسن برین

دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشگاه ارومیه؛ **Negarrdanesh@gmail.com**

استاد دانشگاه ارومیه؛ **m.rsadaghiani@urmia.ac.ir**

استادیار دانشگاه شهید چمران اهواز؛ **n.moradi@scu.ac.ir**

استادیار دانشگاه ارومیه؛ **m.barin@urmia.ac.ir**

دریافت: **99/10/8** و پذیرش: **1400/3/19**

## چکیده

**کاربرد بیوچار و کمپوست به همراه تلقیح زیستی می‌تواند سبب بهبود خصوصیات میکروبیولوژیکی در خاک گردد. به منظور بررسی تأثیر تلفیقی کاربرد بیوچار، کمپوست بقایای هرس درختان سیب و تلقیح زیستی بر برخی شاخص‌های میکروبیولوژیکی خاک، آزمایشی گلدانی بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور منابع آلی (شاهد (بدون منابع آلی)، بیوچار و کمپوست) و تلقیح زیستی (شاهد (بدون تلقیح زیستی)، باکتری‌های محرک رشد (*Pseudomonace fluorescens, Pseudomonace putida, Pseudomonace aeruginose*)، قارچ *میکوریز آربوسکولار (Glomus versiform, Glomus fasciculatum ,Glomus intraradices)* و قارچ *اندوفیت Priformosphora (indica)*) با سه تکرار در شرایط گلخانه‌ای انجام گرفت. در پایان دوره رشد گیاه ذرت (65 روز)، خصوصیاتی از جمله تنفس پایه ($BR^2$)، تنفس ناشی از سوبسترا ($SIR^3$)، کربن زیست توده میکروبی ($MBC^4$)، شاخص قابلیت دسترسی به کربن ($CAI^5$)، آنزیم‌های فسفاتاز و اوره‌آز در خاک اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که افزودن منابع آلی و تلقیح زیستی به خاک باعث افزایش معنی‌دار شاخص‌های بیولوژیکی نسبت به تیمارهای فاقد مواد آلی و تلقیح زیستی شدند. بیشترین میزان تنفس پایه، تنفس ناشی از سوبسترا و شاخص‌های CAI در تیمار کمپوست-باکتری محرک رشد مشاهده شد که به ترتیب 76/2، 33/3 و 77/4 درصد نسبت به تیمار شاهد (فاقد منابع آلی و تلقیح زیستی) افزایش یافتند. افزودن کمپوست و بیوچار سبب افزایش معنی‌داری در میزان کربن زیست توده میکروبی و فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز نسبت به تیمار شاهد (فاقد منابع آلی) گردیدند. کاربرد همزمان تیمارهای آلی و زیستی نیز سبب افزایش فعالیت آنزیم-های فسفاتاز قلیایی و اسیدی نسبت به تیمار شاهد گردید. به طور کلی کاربرد مواد آلی و تلقیح زیستی باعث بهبود خواص بیولوژیکی خاک گردید.**

**واژه های کلیدی:** باکتری محرک رشد گیاه، کربن زیست توده میکروبی، قارچ‌ها، منابع آلی

---

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده کشاورزی، گروه علوم خاک

[2]. Bacterial respiration

[3]. Substrate-induced respiration

[4]. Microbial biomass carbon

[5]. Carbon availability index

**مقدمه**

حفظ سطح بهینه موادآلی در خاک با توجه به تأثیرات نامناسب تغییر اقلیمی جهانی بر باروری و سلامت خاک، برای حفظ خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خاک و همچنین محصولات کشاورزی و عملکرد زیست محیطی ضروری است (مورفی، 2015). وجود ماده آلی علاوه بر اینکه نشان دهنده سلامت و کیفیت خاک است، شاخص مناسبی برای باروری خاک به شمار می‌رود که حاصل برهم کنش فرآیندهای فیزیکی، شیمیایی و زیستی است (ماهاجان و همکاران، 2019). هریک (2000) بیان نمود که شاخص‌های میکروبیولوژیک خاک از جنبه‌های مهم کیفیت خاک هستند و به همین دلیل کیفیت خاک با استفاده از خواص مختلف میکروبیولوژیک نیز ارزیابی می‌شود. موجودات نقش مهمی در تجزیه و تخریب مواد آلی خاک و معدنی شدن آن دارند که با ادامه فرآیند معدنی‌شدن ترکیبات پایدارتر مواد آلی در خاک تجمع می‌یابند. در یک خاک فاقد و یا مقدار کم ماده آلی جمعیت به شدت کاهش یافته و جذب بسیاری از عناصر غذایی که قابلیت آنها برای گیاه وابسته به اکسیداسیون زیستی(بیولوژیکی) در خاک می‌باشد، مختل می‌شود (سینگ و همکاران، 2004). عدم مدیریت مصرف صحیح کودهای شیمیایی و کمبود ماده‌ی آلی در خاک یکی از مشکلات اصلی خاک‌های مناطق خشک و نیمه خشک است که بر کیفیت و باروری خاک تأثیر می‌گذارند (ال-نگار و همکاران، 2019). بنابراین برای حل این مشکلات چندین راهکار اساسی مطرح شده است که می‌توان بکار بردن بیوچار را به عنوان یک اصلاح کننده آلی برای اصلاح ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک پیشنهاد کرد (لمان و همکاران، 2009).

تبدیل مواد آلی به بیوچار (زغال زیستی) از طریق فرآیند پیرولیز، یک روش مدیریتی برای طیف وسیعی از مواد زائد جامد است. بیوچار فرم پایدار زغال تولید شده طی فرآیند پیرولیز مواد آلی در دمای‌های مختلف تحت شرایط اکسیژن کم و یا بدون اکسیژن است (یو و همکاران، 2019). کاربرد بیوچار منجر به تغییر در ترکیب و فراوانی جامعه بیولوژیک خاک می‌شود. کارهو و همکاران (2011) گزارشاتی مبتنی بر تأثیر افزودن بیوچار بر افزایش فعالیت میکروبی خاک و در نتیجه تجزیه ماده آلی ذاتی در خاک‌های جنگلی نیز ارائه دادند. از مواد دیگری که باعث بهبود کیفیت و باروری خاک می‌شود می‌توان به کمپوست اشاره کرد. پسماندهای آلی مانند بقایای گیاهان تحت شرایط کنترل شده از طریق فرآیندهای تجزیه زیستی به کمپوست تبدیل می‌شوند (واینینک، 2002). مصرف کمپوست میزان مواد آلی خاک را افزایش می‌دهد که این عامل باعث افزایش نگهداشت آب در خاک و همچنین افزایش تخلخل خاک شده و در نتیجه میزان مقاومت گیاه در اقلیم‌های گرم و خشک را افزایش می‌دهد. افزایش تخلخل آثار مثبتی بر اکسیژن قابل دسترس خاک و در نتیجه کاهش شرایط بی‌هوازی در خاک و بهبود فعالیت‌های میکروبی خاک و تنفس ریشه‌ای دارد. ماریناری و همکاران (2000) بیان کردند که کمپوست‌ها دارای جمعیت بالایی از میکروارگانیسم‌ها هستند و از این رو با کاربرد کمپوست در خاک موجودات زنده به خاک اضافه می‌شوند. همچنین برخی از مطالعات نشان دادند که کاربرد تلفیقی بیوچار و کمپوست می‌تواند منجر به بهبود خصوصیات فیزیکوشیمیایی و میکروبیولوژیکی خاک شود (اسکوتی و همکاران، 2015؛ تروپیانو و همکاران، 2017).

در این میان استفاده از میکروارگانیسم‌های خاک و مخصوصاً باکتری‌ها که با انجام فرآیندهای مختلف زیستی در رشد گیاه و چرخه عناصر غذایی خاک دخالت دارند به‌طور روز افزونی افزایش یافته است. باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه جزء باکتری‌های همیار یا آزادزی در خاک می‌باشند که این باکتری‌ها اغلب در نزدیک یا حتی درون ریشه گیاهان یافت می‌شوند. باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR) از طرق مختلفی از جمله تثبیت زیستی نیتروژن، تولید

سیدروفورها، تولید هورمون‌های گیاهی، سنتز آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات قارچ‌کش رشد گیاهان را بهبود می‌بخشند (ون‌لون، 2007). بعضی از موجودات زنده خاک قادر به تحریک و افزایش فعالیت‌های زیستی خاک بوده و فعالیت آنزیم‌ها را در خاک تشدید می‌کنند، قارچ-های میکوریز *آربوسکولار* از جمله این موجودات هستند. این قارچ‌ها توانایی تشکیل جوامع همزیست را با اغلب گونه‌های گیاهی داشته و به عنوان یک زادمایه زیستی، برای بهبود کیفیت خاک و در نتیجه افزایش محصولات کشاورزی، دارای اهمیت می‌باشند (میشرا، 2007). یکی دیگر از قارچ‌های همزیست با ریشه گیاهان قارچ *Piriformospora indica* می‌باشد که دارای ویژگی‌های مشابه با قارچ‌های میکوریزی است. قارچ‌های *اندوفیت* با تأثیر بر شرایط فیزیکی و شیمیایی خاک اثر قابل توجهی بر ویژگی‌های ریزوسفر و نیز رشد و عملکرد گیاه دارند (وارما و همکاران، 2012).

با توجه به قرارگیری ایران در منطقه خشک و نمیه خشک با مقدار کم موادآلی و نیز بالا بودن حجم پسماندهای کشاورزی، کاربرد منابع آلی از طریق تبدیل این پسماندها به بیوچار و کمپوست و نیز بهره‌گیری از جانداران خاکزی می‌توانند به رشد گیاه گیاه کمک کنند. همچنین باتوجه به اینکه اطلاعات محدودی در رابطه با تأثیر تلفیقی منابع آلی به ویژه بیوچار و جانداران خاکزی بر شاخص‌های میکروبیولوژیکی در خاک‌های آهکی در دست می‌باشد، لذا در این پژوهش به بررسی تأثیر تلفیقی کاربرد بیوچار، کمپوست و تلقیح زیستی بر برخی از ویژگی‌های میکروبیولوژیکی خاک کشت شده باذرت در شرایط گلخانه‌ای پرداخته شده است.

## مواد و روش‌ها

### انتخاب نمونه خاک

جهت اجرای آزمایش یک نمونه خاک مرکب از عمق 30-0 سانتی‌متر با مقدار ماده‌آلی پایین از محوطه دانشگاه ارومیه واقع در منطقه نازلو استان آذربایجان غربی تهیه گردید و پس از هواخشک شدن از الک دو میلی‌متری عبور داده شد. برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی در آن به روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شدند (اسپارکس و همکاران 1996).

### تهیه و تعیین ویژگی‌های بیوچار و کمپوست هرس ضایعات سیب

برای تهیه بیوچار، بقایای هرس درختان سیب (شاخه‌های دو و سه ساله) از باغ‌های منطقه نازلو واقع در استان آذربایجان غربی شهرستان ارومیه جمع‌آوری گردید. سپس بعد از شست و شو و خرد شدن (بطور متوسط در اندازه دو سانتی‌متر)، در آون تحت دمای 65 درجه سلسیوس به مدت 48 ساعت خشک شدند. نمونه‌های خشک برای تولید بیوچار در دمای 350 درجه سلسیوس به مدت چهار ساعت و نرخ افزایش دمای شش درجه سلسیوس در داخل کوره الکتریکی و شرایط بدون اکسیژن قرار گرفتند (کانترل و همکاران، 2012). کمپوست بقایای هرس نیز از گلخانه تحقیقاتی گروه علوم خاک دانشگاه ارومیه تهیه گردید. pH و EC بیوچار در عصاره-های صاف شده نسبت یک به 20 بیوچار به آب (سینگ و همکاران، 2017)، درصد خاکستر[1]، مقدار کربن و نیتروژن با دستگاه (Vario EL III) CHNS analyzers، فسفر کل به روش هضم با اسید و رنگ‌سنجی و پتاسیم از طریق هضم خشک به روش فلیم‌فتومتری اندازه‌گیری شدند (سینگ و همکاران، 2017). همچنین برخی ویژگی‌های کمپوست با روش‌های متداول اندازه‌گیری شدند. pH و EC کمپوست در عصاره‌های صاف شده نسبت یک به پنج کمپوست به آب، نیتروژن کل به روش کجلدال، فسفر و پتاسیم به روش هضم خشک و کربن به روش اکسیداسیون تر (والکلی و بلک) تعیین شدند.

### آزمایش گلخانه‌ای و اعمال تیمارها

این آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه انجام گرفت. فاکتورهای آزمایش شامل منابع آلی (شاهد، کمپوست

1. ASTM D1762-84

بقایای هرس سیب و بیوچار بقایای هرس سیب) و تلقیح زیستی (شاهد، باکتری‌های محرک رشد، قارچ‌های میکوریزی و قارچ اندوفیت *P.indica*) بود. برای انجام آزمون گلخانه‌ای، خاک نمونه برداری شده بعد از هواخشک و عبور از الک دو میلی‌متری به رطوبت ظرفیت مزرعه‌ای (FC) رسانده شده و داخل گلدان‌ها (ارتفاع 25سانتی‌متر و قطر 20سانتی‌متر) ریخته شد. بیوچار و کمپوست بقایای هرس سیب هرکدام برحسب 0/5 درصد کربن آلی خالص به خاک گلدان‌ها حاوی چهار کیلوگرم خاک اضافه و مخلوط شده و در داخل گلدان‌ها ریخته شد و به مدت یک هفته در شرایط گلخانه‌ای در رطوبت ظرفیت مزرعه‌ای نگهداری شدند. در مرحله بعدی برای اعمال تیمارهای زیستی از محیط آگار مغذی (NB[1]) استفاده شد و مخلوط باکتری‌های محرک رشد (PGPR) از جنس سودوموناس‌های فلورسنت (ترکیبی از گونه‌های *P.aerugonisa*، *P.fluorescens* و *P.putida*) موجود در بانک میکروارگانیسم‌های گروه علوم خاک دانشگاه ارومیه به داخل ارلن حاوی محیط کشت استفاده شد و نیز قارچ-های میکوریزی (ترکیبی از *Glomus versiform, Glomus fasciculatum ,Glomus intraradices*) و قارچ اندوفیت *Primosfora indica* نیز داخل ارلن دیگر حاوی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA[2]) اضافه شدند. برای نمونه‌های شاهد نیز از محیط کشت بدون میکروارگانیسم‌ها استفاده شد.

تیمارهای زیستی همزمان با کاشت به خاک اطراف بذرها اضافه شدند. تعداد شش بذر ذرت (*Zea Mays* L.) رقم KSC 704 پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم 0/5 درصد در مرکز خاک هر گلدان‌ها کشت گردیدند. پس از جوانه زدن بذرهای ذرت، چهار بوته سالم‌تر و قوی‌تر از هر گلدان نگه داشته شدند. در طول دوره رشد، آبیاری براساس کاهش وزن گلدان‌ها صورت گرفت (نگهداری رطوبت حدود 70 درصد ظرفیت مزرعه) و برای تأمین مواد غذایی مورد نیاز گیاهان از محلول غذایی هوگلند استفاده گردید. در پایان دوره پس از گذشت 65 روز عملیات برداشت انجام شده و برخی شاخص‌های میکروبیولوژیکی خاک اندازه‌گیری گردید. کربن زیست توده میکروبی به روش تدخین - استخراج ، از اختلاف مقادیر محاسبه شده برای نمونه‌های تدخین شده با کلروفرم به مدت 24 ساعت و تدخین نشده (جنکینسون و لاد، 1981)، تنفس پایه به روش (1982) به این صورت که خاک مرطوب در ظروف شیشه‌دار درب دار در کنار لوله آزمایش حاوی 10 میلی لیتر هیدروکسید سدیم یک نرمال در دمای 25 درجه سلسیوس قرار داده شد و بعد از شش روز ارلن حاوی هیدروکسید سدیم با اسید کلریدریک 0/5 نرمال تیتر گردید و تنفس پایه بر حسب (mg $CO_2$-C $g^{-1}$ $day^{-1}$) محاسبه گردید، تنفس ناشی از سوبسترا به این صورت که خاک مرطوب در ظروف شیشه‌دار درب دار ریخته شده و 1 میلی‌لیتر گلوکز یک درصد به عنوان سوبسترا به کدام از ظروف افزوده و لوله آزمایش حاوی 10 میلی لیتر هیدروکسید سدیم 0/1 نرمال در دمای 25 درجه سلسیوس قرار داده شد و بعد از شش ساعت ارلن حاوی هیدروکسید سدیم با اسید کلریدریک 0/1 نرمال تیتر گردید و تنفس پایه بر حسب (mg $CO_2$-C $g^{-1}$ $day^{-1}$) محاسبه گردید (الف و نانپیری، 1995).

شاخص قابلیت دسترسی به کربن نیز با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$CAI = \frac{BR}{SIR}$$

که در این رابطه CAI شاخص قابلیت دسترسی به کربن، BR تنفس میکروبی پایه (mg $CO_2$ -C $g^{-1}$ $day^{-1}$) و SIR تنفس ناشی با سوبسترا (mg $CO_2$-C $g^{-1}$ $day^{-1}$) است (چنگ و همکاران، 1993).

برای تعیین فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز، خاک مرطوب بعد از افزودن اوره 0/2 مولار و بافر تریس (pH =9) به مدت دو ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس قرار داده شد و سپس محلول $KCl-Ag_2SO_4$ اضافه گردید و در نهایت مقدار آمونیوم آزاد شده با دستگاه

[1] Nutrient broth
[2] Potato Dextrose Agar

اسپکتروفتومتر در طول موج 660 نانومتر قرائت گردید. فعالیت آنزیم اوره‌آز بر حسب ($mg\ N\ g^{-1}\ soil\ 2h^{-1}$) محاسبه گردید (طباطبایی، 1982). فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی (طباطبایی و برمنر، 1969) نیز توسط افزودن بستره پارانیتروفنول فسفات (برای فسفاتاز اسیدی در pH =6/5 و فسفاتاز قلیایی در pH =11) و انکوباسیون به مدت یک ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 410 نانومتر بر حسب ($\mu g\ PNP\ g^{-1}\ soil\ h^{-1}$) تعیین گردیدند (طباطبایی و برمنز، 1969).

## تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری شامل تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد با نرم افزار SPSS و رسم شکل‌ها با نرم افزار Excel انجام گرفت.

## نتایج و بحث

خاک مورد مطالعه دارای بافت لوم رسی و آهکی بوده و از نظر ماده آلی متوسط بود. همچنین خاک مورد نظر دارای pH قلیایی و غیرشور بوده و از لحاظ عناصر غذایی هم در سطح پایینی قرار داشت (جدول 1).

**جدول 1- برخی از خواص فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه**

| Mn | Cu | Zn | Fe | K | P | $CaCO_3$ | OM | N | EC | pH | بافت خاک |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| mg kg$^{-1}$ | | | | | | % | | | dS m$^{-1}$ | | |
| 10/2 | 1/38 | 0/20 | 9/70 | 187 | 9/80 | 16/5 | 1/04 | 0/10 | 0/83 | 8/30 | لوم رسی |

برخی ویژگی‌های بیوچار و کمپوست مورد استفاده در جدول 2 نشان داد، بیوچار و کمپوست تولید شده از ضایعات هرس درختان سیب دارای pH قلیایی بوده و هردو غیر شور بودند. میزان کربن موجود در بیوچار به مراتب بیشتر از کمپوست بود (چهار برابر). همچنین مقدار عنصر پتاسیم در بیوچار هم نسبتاً بالاتر از مقدار آن در کمپوست بود (تقریباً چهار برابر). اما مقدار عناصر نیتروژن (پنج برابر) و فسفر (دو برابر) در کمپوست بالاتر از بیوچار مشاهده شد.

**جدول 2- برخی ویژگی‌های شیمیایی بیوچار و کمپوست تولید شده از ضایعات هرس سیب**

| P mg kg$^{-1}$ | C/N | خاکستر | K | N | C | EC dS m$^{-1}$ | pH | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | % | | | | | | |
| 0/21 | 291 | 10/2 | 0/62 | 0/22 | 64/0 | 0/05 | 7/11 | بیوچار |
| 0/44 | 15/4 | 53/4 | 0/16 | 1/03 | 15/9 | 0/40 | 7/33 | کمپوست |

نتایج تجزیه واریانس تأثیر منابع آلی و تلقیح زیستی بر برخی ویژگی‌های میکروبیولوژیکی خاک در جدول 3 ارائه شده است. اثرات اصلی منابع آلی (بیوچار و کمپوست) و تلقیح زیستی بر تنفس خاک، تنفس ناشی از سوبسترا، کربن زیست توده میکروبی، شاخص دسترسی کربن خاک، فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز، فسفاتاز اسیدی و فسفاتاز قلیایی معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل منابع آلی و تلقیح زیستی نیز بر تنفس ناشی از سوبسترا، شاخص دسترسی کربن و فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و فسفاتاز قلیایی در سطح احتمال 1/0 درصد و تنفس پایه در سطح یک درصد معنی‌دار بود. اما اثر متقابل منابع آلی و تلقیح زیستی بر کربن زیست توده میکروبی و فعالیت آنزیم آوره‌آز معنی‌دار نبود که نشان دهنده عدم تأثیر متقابل تیمارها بود.

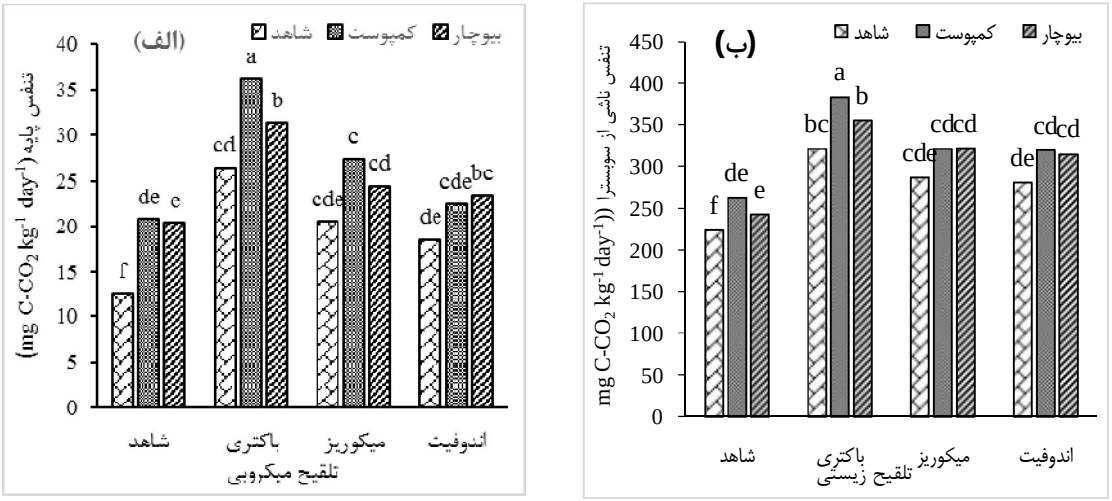
**جدول 3- نتایج تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای آلی و زیستی بر ویژگی‌های میکروبیولوژیکی و فعالیت آنزیمی خاک**

| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | BR | SIR | MBC | CAI | اوره‌آز | فسفاتاز اسیدی | فسفاتاز قلیایی |
| تیمار آلی | 2 | 42/2$^{**}$ | 2132$^{**}$ | 64699$^{***}$ | 0/0001$^{**}$ | 54323$^{***}$ | 54505$^{***}$ | 54505$^{***}$ |
| زیستی | 3 | 197$^{***}$ | 7411$^{***}$ | 29885$^{***}$ | 0/001$^{***}$ | 32555$^{***}$ | 19666$^{***}$ | 19666$^{***}$ |
| آلی$^{x}$زیستی | 6 | 66/2$^{**}$ | 2216$^{***}$ | 7068$^{ns}$ | 0/0001$^{***}$ | 410$^{ns}$ | 2335$^{***}$ | 2335$^{***}$ |
| خطا | 24 | 4/78 | 246 | 3250 | 0/0001 | 610 | 288 | 228 |
| ضریب تغییرات | (%) | 8/66 | 4/96 | 6/07 | 5/81 | 9/01 | 0/31 | 3/41 |

***، ** و ns : به ترتیب معنی‌داری در سطح 0/1 درصد، یک درصد و غیر معنی‌دار

## تأثیر منابع آلی و تلقیح زیستی بر تنفس پایه و تنفس ناشی از سوبسترا

مقایسه میانگین اثر متقابل تأثیر منابع آلی و تلقیح زیستی بر تنفس پایه و تنفس ناشی از سوبسترا نشان داد که با کاربرد کمپوست و بیوچار و همچنین تلقیح‌های میکروبی میزان تنفس پایه و تنفس ناشی از سوبسترا افزایش یافت (شکل 1). بیشترین میزان تنفس پایه و تنفس ناشی از سوبسترا در تیمار کمپوست-باکتری بود. به‌طوریکه میزان تنفس پایه و ناشی از سوبسترا در این تیمار به ترتیب 76/2 و 33/3 درصد افزایش را نسبت به تیمار شاهد (بدون منابع آلی و تلقیح زیستی) نشان دادند. کمترین میزان تنفس پایه و ناشی از سوبسترا هم در تیمار شاهد-شاهد مشاهده شد. به نظر می‌رسد این اختلاف در تیمارهای حاوی کمپوست و بیوچار به دلیل ساختار ساده کمپوست و تجزیه راحت و سریع آن در خاک باشد که در واقع یک منبع سرشار از کربن را به راحتی در اختیار میکروارگانیسم‌ها قرار داده و با بالا بردن فعالیت و جمعیت میکروارگانیسم‌ها باعث افزایش میزان تنـفس پایه و ناشی از سوبسترا می‌شود. در حالیکه بیوچار ساختار پیچیده‌تر و نیمه عمر بالاتری در خاک داشته و در نتیجه دیرتر و سخت‌تر در خاک تجزیه شده و در اختیار میکروارگانیسم‌ها قرار می‌گیرد (لیو و همکاران، 2016). واحدی و همکاران (1398) بیان کردند که تیمار کمپوست به همراه تلقیح میکروبی با افزایش کربن آلی، میزان جمعیت میکروبی و فعالیت آن‌ها سبب افزایش تنفس پایه و تنفس ناشی با سوبسترا گردید. همانطور که نتایج نشان داد تیمار بیوچار نیز در مقایسه با شاهد سبب افزایش تنفس پایه و ناشی از سوبسترا گردید که این نتایج همسو با مطالعات قبلی است (مرادی و همکاران، 1398؛ روتیگلیانو و همکاران، 2014). روتیگلیانو و همکاران (2014) بیان کردند که مواد فرار و ترکیبات جذب سطحی شده بر سطح بیوچار ممکن است به عنوان سوبسترای قابل استفاده عمل کرده و سبب افزایش تنفس با کاربرد بیوچار گردد. نتایج حاکی از این بود که باکتری‌های تلقیح شده میزان تنفس را بیشتر از قارچ‌ها افزایش داده‌اند. زیرا قارچ‌ها دارای راندمان بیشتری در تبدیل کربن به توده‌ی زنده‌ی خود بوده و کمتر کربن را بصورت تنفس هدر می‌دهند (اسلام و ویل، 2000).

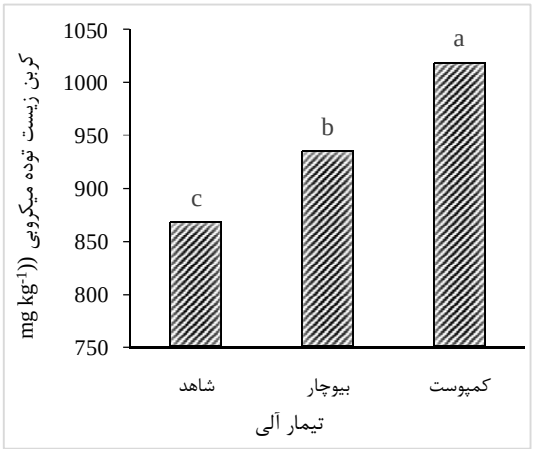


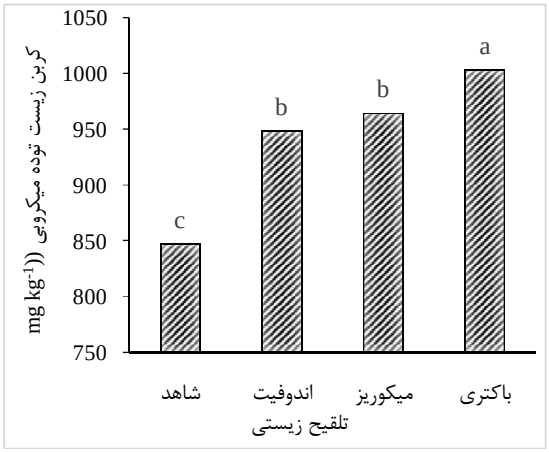

**شکل 1- تأثیر تیمارهای آلی و زیستی بر میزان تنفس پایه (الف) و تنفس ناشی از سوبسترا (ب) در خاک**
**میانگین‌های دارای حروف مشترک بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری (p<0/05) ندارند.**

## تأثیر منابع آلی و تلقیح زیستی بر کربن زیست توده میکروبی

نتایج نشان داد که مصرف مواد آلی (کمپوست و بیوچار) باعث افزایش معنی‌دار کربن زیست توده‌ی میکروبی نسبت به نمونه شاهد شد و این افزایش در نمونه حاوی کمپوست بیشتر از بیوچار بود، به‌طوری‌که میزان این شاخص در نمونه حاوی کمپوست 17/4 درصد و در نمونه حاوی بیوچار 7/84 درصد نسبت به نمونه شاهد افزایش داشت (شکل 2). نتایج پژوهش‌های قبلی نشان داد که مصرف کمپوست زباله شهری به علت افزایش میزان کربن و نیتروژن و کربن آلی محلول در خاک نقش مثبتی در افزایش میزان کربن زیست توده-ی میکروبی دارد که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت (زیمن و همکاران، 2004). افزایش کربن زیست توده میکروبی با کاربرد کمپوست و بیوچار به دلیل تأمین بستر مناسب برای میکروارگانیسم‌ها است که سبب افزایش فعالیت بیولوژیکی خاک می‌گردد (فیرر و همکاران، 2003).

همچنین همانطور که در نتایج مشاهده شده علاوه بر کمپوست، بیوچار هم می‌تواند با فراهم کردن رطوبت، زیستگاه و کربن سبب افزایش فعالیت میکروبی در خاک گردد. ژائو و همکاران (2015) نیز گزارش کردند که خاک‌های تیمار شده با بیوچار در مقایسه با تیمار شاهد سبب افزایش کربن زیست توده میکروبی گردیدند که افزایش آن را می‌تواند به دلیل حضور بخش‌های لبایل کربن با کاربرد بیوچار باشد (لو و همکاران، 2013). همچنین افزودن تلقیح زیستی به خاک نیز باعث افزایش معنی‌دار کربن زیست توده‌ی میکروبی نسبت به نمونه شاهد شد و این افزایش در نمونه حاوی باکتری‌های محرک رشد بیشتر از قارچ‌ها بود (شکل 2). مقدار کربن زیست توده میکروبی در تیمار باکتری‌های محرک رشد (PGPR) در مقایسه با شاهد 19 درصد افزایش یافت. کربن زیست توده‌ی میکروبی قسمتی از کربن آلی خاک است که مربوط به کربن موجود در بدن و دیواره‌ی سلولی میکروارگانیسم‌های خاک به ویژه باکتری‌هاست.




**شکل 2-تأثیر تیمارهای آلی و زیستی بر کربن زیست‌توده میکروبی**
**میانگین‌های دارای حروف مشترک بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری (p<0/05) ندارند.**

### تأثیر منابع آلی و تلقیح زیستی بر شاخص دسترسی به کربن

شاخص دسترسی به کربن (CIA) برای پی بردن به درجه محدودیت سوبسترا به ویژه در خاک‌های تحت کشت بسیار مفید است. نتایج مقایسه میانگین تأثیر اثر متقابل منابع آلی و تلقیح زیستی بر شاخص دسترسی به کربن در جدول 4 نشان داده شده است. بیشترین مقدار شاخص دسترسی به کربن در تیمار کمپوست-باکتری مشاهده شد و کمترین مقدار این شاخص در تیمار شاهد-شاهد بود. مقدار شاخص دسترسی به کربن در تیمارهای کمپوست-باکتری محرک رشد و بیوچار-باکتری محرک رشد در مقایسه با تیمار شاهد-شاهد به ترتیب 77/4 و 66/0 درصد افزایش یافت. این افزایش در تیمارهای حاوی کمپوست تا حدی بیشتر از بیوچار بود که انتظار می‌رود به خاطر ساختار ساده کمپوست و تجزیه راحت و سریع آن در خاک باشد که در واقع یک منبع سرشار از کربن را به راحتی در اختیار میکروارگانیسم‌ها قرار داده و با بالا بردن فعالیت و جمعیت میکروارگانیسم‌ها باعث افزایش میزان شاخص دسترسی به کربن می‌شود. محمدیان و ملکوتی (1381) نیز بیان کردند که کاربرد کمپوست باگاس نیشکر سبب افزایش مقدار کربن آلی خاک گردید که در نتیجه سبب افزایش قابلیت دسترسی به کربن کمپوست می‌شود. همچنین افزودن تیمارهای زیستی به ویژه باکتری‌های محرک رشد نیز باعث افزایش معنی‌دار شاخص دسترسی به کربن نسبت به نمونه شاهد شد. کمتر بودن قابلیت دسترسی در تیمارهای قارچی در مقایسه با باکتری-های محرک رشد می‌تواند به تولید ساختار کیتین توسط قارچ باشد که می‌تواند در شاخص قابلیت دسترسی کربن تأثیرگذار باشد (زلقی و همکاران، 1398). در واقع چنین به نظر می‌رسد که با افزودن تیمارهای زیستی به خاک منابع کربن از جمله بیوچار و کمپوست با سرعت بیشتری توسط میکروارگانیسم-های خاک تجزیه و مصرف شده و طی فرآیند معدنی شدن کربن، دی اکسید کربن تولید می‌شود.

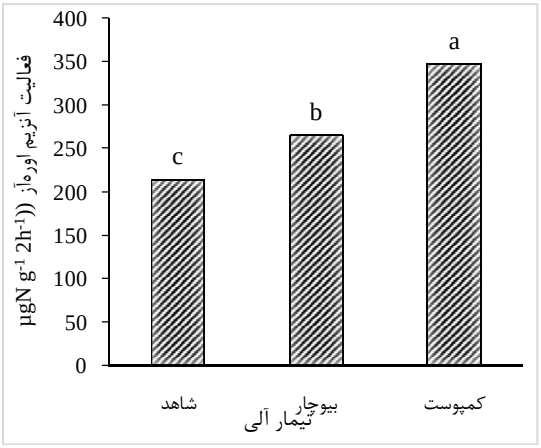
**جدول 4- نتایج مقایسه میانگین تأثیر نوع تیمار آلی و زیستی بر شاخص دسترسی به کربن**

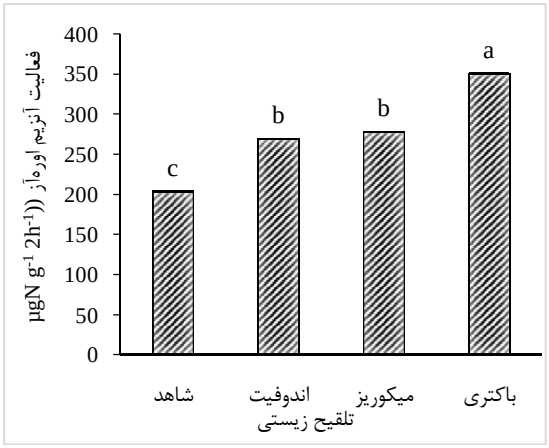
| تیمار آلی | تیمار زیستی | CAI |
|---|---|---|
| شاهد | شاهد | 0/053$^{e}$ |
| | باکتری‌های محرک رشد | 0/082$^{bc}$ |
| | قارچ میکوریزی | 0/071$^{d}$ |
| | قارچ اندوفیتی | 0/067$^{de}$ |
| کمپوست | شاهد | 0/078$^{cd}$ |
| | باکتری‌های محرک رشد | 0/094$^{a}$ |
| | قارچ میکوریزی | 0/085$^{bc}$ |
| | قارچ اندوفیتی | 0/070$^{d}$ |
| بیوچار | شاهد | 0/084$^{bc}$ |
| | باکتری‌های محرک رشد | 0/088$^{b}$ |
| | قارچ میکوریزی | 0/077$^{cd}$ |
| | قارچ اندوفیتی | 0/075$^{cd}$ |

اعدادی که دارای حروف مشترک در هر ستون هستند از نظر آماری در سطح احتمال پنج درصد با آزمون دانکن معنی‌دار نمی‌باشند.

**تأثیر منابع آلی و تلقیح زیستی بر فعالیت آنزیم اوره‌آز**

بر اساس نتایج شکل 3، افزودن کمپوست و بیوچار سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم اوره‌آز در مقایسه با تیمار شاهد گردیدند. بیشترین و کمترین فعالیت آنزیم‌از به ترتیب در تیمار کمپوست و شاهد مشاهده گردید که تیمار کمپوست نسبت به تیمار شاهد 62/6 درصد فعالیت آنزیم اوره‌از را افزایش داد. تیمار بیوچار نیز سبب 23/4 درصد افزایش فعالیت این آنزیم نسبت به تیمار شاهد گردید. تلقیح زیستی نیز باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک نسبت به نمونه شاهد شد (0/05 ≥P). در این بین باکتری‌های محرک رشد (PGPR) بیشترین تأثیر را در افزایش فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز داشت. افزودن ماده آلی به خاک باعث افزایش زیست توده میکروبی، منابع کربن و عناصر غذایی و بهبود شرایط خاک نظیر افزایش نگهداشت آب در خاک و افزایش تخلخل شده و در نهایت میزان فعالیت آنزیم‌ها را افزایش می‌دهد. همچنین افزودن ماده آلی به خاک باعث افزایش فعالیت باکتری‌ها و در نتیجه بهبود و افزایش فعالیت آنزیمی می‌شود زیرا آنزیم‌های همراه مواد آلی به روش کاهش انرژی برای فعالیت باکتری‌های خاک به منظور سنتز آنزیم‌ها منجر به افزایش فعالیت آن‌ها و سرعت تجزیه ماده آلی (بیوچار و کمپوست) در خاک شده و همچنین با تجزیه نسبی در خاک با جذب سطحی و حبس فیزیکی آنزیم‌ها سبب حفاظت از آن‌ها در برابر هیدرولیز آنزیمی می‌شوند (کورتف و همکاران، 2002). علت بالا بودن آنزیم اوره‌آز در نمونه حاوی کمپوست نسبت به نمونه حاوی بیوچار هم می‌تواند به این دلیل باشد که کمپوست ساختمان ساده‌تری نسبت به بیوچار داشته و راحت‌تر تجزیه شده و وارد خاک می‌شود و در اختیار میکروارگانیسم‌های خاک قرار گرفته و با افزایش فعالیت این میکروارگانیسم‌ها فعالیت آنزیمی هم در خاک بیشتر می‌شود. احمدپور و همکاران (1390) نیز گزارش کردند که با ورود کربن آلی ناشی از مصرف کمپوست در خاک، میزان فعالیت آنزیم اوره‌آز به شدت افزایش یافته است.




**شکل 3- تأثیر تیمارهای آلی و زیستی بر فعالیت آنزیم اوره‌آز**

**میانگین‌های دارای حروف مشترک بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ($p<0/05$) ندارند.**

**تأثیر منابع آلی و تلقیح زیستی بر فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی**

نتایج تأثیر تلفیقی منابع آلی و تلقیح زیستی بر فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی نشان داد که کاربرد منابع آلی و میکروبی سبب افزایش فعالیت آنزیم-های فسفاتاز اسیدی و قلیایی گردید (جدول 5). بیشترین میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی در تیمار کمپوست-باکتری‌های محرک رشد مشاهده شد که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با تلقیح میکوریزی و اندوفیتی نداشت. فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی در تیمار کمپوست و باکتری در مقایسه با تیمار کمپوست-شاهد به ترتیب 47/6 و 29/1 درصد افزایش یافتند. کمترین میزان فعالیت این آنزیم‌ها نیز در تیمار شاهد (بدون منبع آلی و میکروبی) مشاهده شد. فرقانی (1382) گزارش کرد که افزودن مواد آلی و کودهای بیولوژیک نظیر کمپوست به خاک سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز و فسفاتاز قلیایی گردیده است که دلیل این امر، افزایش سوبسترای موردنیاز این آنزیم‌ها بود. همچنین فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و اسیدی در تیمار بیوچار-شاهد در مقایسه با تیمار شاهد-شاهد به ترتیب 40/3 و 81/5 درصد افزایش یافتند. طلوعی داراب (1395) با بررسی فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز و فسفاتازهای اسیدی و قلیایی در خاک و بیوچار در کشت گلدانی ذرت تحت تنش کم آبی، نشان داد فعالیت فسفاتازهای اسیدی و قلیایی در خاک‌های تیمار شده با بیوچار نسبت به خاک‌های بدون بیوچار افزایش نشان داد. میکروارگانیسم-ها از طریق معدنی کردن فسفر آلی و انحلال فسفات‌های رسوب یافته، فراهم سازی فسفر برای گیاهان را افزایش می‌دهند (چن و همکاران، 2006). باکتری‌ها در مقایسه با قارچ‌ها در انحلال فسفات بسیار مؤثرترند و جمعیت بالایی را به خود اختصاص می‌دهند (الام و همکاران، 2002). بر اساس نتایج این پژوهش مشاهده شد که، فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی بیشتر از فسفاتاز اسیدی در خاک افزایش یافته است که این مسأله با توجه به pH قلیایی خاک مورد آزمایش (جدول 1) قابل پیش‌بینی بود.

**جدول 5- نتایج مقایسه میانگین تأثیر تیمارهای آلی و زیستی بر فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی**

| تیمار آلی | تیمار زیستی | فسفاتاز اسیدی | فسفاتاز قلیایی |
|---|---|---|---|
| | | ($\mu g\ PNP\ g^{-1}\ h^{-1}$) | |
| شاهد | باکتری های محرک رشد | 228bc | 396de |
| | قارچ میکوریزی | 198de | 377e |
| | قارچ اندوفیتی | 193de | 367e |
| | شاهد | 102f | 283f |
| کمپوست | باکتری های محرک رشد | 344a | 555a |
| | قارچ میکوریزی | 329a | 540a |
| | قارچ اندوفیتی | 319a | 530a |
| | شاهد | 233bc | 430bc |
| بیوچار | باکتری های محرک رشد | 241b | 444b |
| | قارچ میکوریزی | 216cd | 410bcd |
| | قارچ اندوفیتی | 213cde | 408bcd |
| | شاهد | 185e | 397de |

اعدادی که دارای حروف مشترک در هر ستون هستند از نظر آماری در سطح احتمال پنج درصد با آزمون دانکن معنی‌دار نمی‌باشند.

## نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش بر تأثیر مثبت و معنی‌دار کاربرد همزمان مواد آلی (کمپوست و بیوچار حاصل از بقایای هرس درختان سیب) و تلقیح زیستی بر ویژگی‌های کیفی شاخص‌های میکروبیولوژیکی خاک دلالت دارد. البته واضح است که تأثیر انواع میکروارگانیسم‌ها و مواد آلی بکار برده شده و اثرات متقابل آن‌ها بر روی شاخص‌ها و در نتیجه کیفیت خاک و محصول یکسان نبود. گونه‌های باکتریایی استفاده شده در تحقیق حاضر (باکتری‌های محرک رشد) در بهبود خواص میکروبیولوژیکی خاک بسیار کاراتر از گونه‌های قارچی (قارچ‌های میکوریز و اندوفیت *P.indica*) بوده‌اند. بطور کلی تیمار کمپوست- باکتری محرک رشد نسبت به تیمارهای دیگر بیشترین تأثیر را بر بهبود فعالیت آنزیمی و شاخص‌های میکروبی خاک داشت. نتایج این تحقیق حاکی از افزایش فعالیت-های میکروبیولوژیکی خاک با استفاده تلفیقی منابع آلی و تلقیح زیستی در خاک بود. با توجه به حجم بالای پسماندهای کشاورزی به خصوص بقایای هرس درختان سیب در استان آذربایجان غربی، تبدیل آنها به کمپوست و بیوچار می‌تواند سبب افزایش فعالیت میکروارگانیسم‌های خاک‌زی و در نتیجه افزایش کیفیت پارامترهای میکروبیولوژیکی و نهایتاً موجب بهبود کیفیت خاک گردد. لذا با توجه به اهمیت مواد آلی و میکروارگانیسم‌ها در خاک و استفاده از آن‌ها به عنوان راه‌حلی مفید و اقتصادی در جهت بهبود کیفیت خاک و در نتیجه تولید بیشتر محصول توصیه می‌گردد آزمایشات مشابهی با انواع میکروارگانیسم‌های دیگر و تحت تنش‌های مختلف در شرایط گلخانه‌ای و مزرعه‌ای انجام شود.

## فهرست منابع:

1. احمدپور، س.ر.، بهمنیار، م.ع.، سالک گیلانی س. و فرقانی، ا. 1390. ارزیابی میزان فعالیت آنزیم های اوره آز و فسفاتاز قلیایی و تغییر بعضی خصوصیات شیمیایی در خاک تیمار شده با کمپوست و ورمی کمپوست تحت کشت ذرت. پژوهش‌های خاک (علوم خاک و آب). جلد 25. صفحات 113 تا 123.

2. زلقی، ر.، لیموچی، س. و قزلباش، غ.ر. 1398. مطالعه تجزیه باگاس نیشکر توسط قارچ فانروکیت کریزسپوریوم و تأثیر آن بر برخی ویژگی‌های خاک. جمعیت علمی فن‌آوری نیشکر ایران. دوره 45. صفحات 45 تا 51.
3. طلوعی‌داراب، ع. (1395). فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز و فسفاتازهای اسیدی و قلیایی در خاک و بیوچار در کشت گلدانی ذرت تحت تنش کم آبی. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، 87 صفحه.
4. مرادی، ن.، رسولی صدقیانی، م.ح. و سپهر، ا. 1398. تاثیر بیوچارهای تولید شده از بقایای گیاهی (هرس درختان و کاه و کلش) بر برخی شاخص‌های میکروبیولوژیکی در خاکهای آهکی. تحقیقات آب و خاک ایران. دوره 50. شماره 6. صفحات 1381تا 1394.
5. واحدی، ر.، رسولی صدقیانی، م.ح. و برین، م. 1398. ارزیابی خصوصیات کیفی خاک آهکی تیمار شده با بیوچار و کمپوست در حضور باکتریهای محرک رشد گیاه. تحقیقات آب و خاک ایران. جلد 50. صفحات 259 تا 272.
6. Alam, S., Khalil, S., Ayub, N. and Rashid, M. 2002. In vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganism (PSM) from maize rhizosphere. International Journal of Agricultural and Biological Engineering 4:454-458.
7. Alef, K. and Nannipieri, P. 1995. Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, London.
8. Anderson, J.P.E. 1982. Soil Respiration. p. 831-872. In: Page, A.L. et al. (eds) Methods of Soil Analysis. Part 2. 2nd ed. American Society of Agronomy, U.S.A.
9. Cantrell, K.B., Hunt, P.G., Uchimiya, M., Novak, J.M. and Ro, K.S. 2012. Impact of pyrolysis temperature and manure source on physicochemical characteristics of biochar. Bioresource technology 107:419-428.
10. Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arunshen, A.B., Lai, W.A. and Young, C.C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Applied Soil Ecology 34:33-41.
11. Cheng, W., Coleman, D.C., Carroll C.R. and Hoffman, C.A. 1993. In situ measurements of root respiration and soluble carbon concentrations in the rhizosphere. Soil Biology & Biochemistry 25:1189-1196.
12. El-Naggar, A., Lee, S.S., Rinklebe, J., Farooq, M., Song, H., Sarmah, A.K., immerman, A.R., Ahmad, M., Shaheen S.M. and Ok, Y.S. 2019. Biochar application to low fertility soils: a review of current status, and future prospects. Geoderma 337:536-554.
13. Fierer, N. Schimel, J.P. and Holden, P.A. 2003. Variations in microbial community composition
through two soil depth profiles. Soil Biology and Biochemistry 35:167–176.
14. Herrick, J.E. 2000. Soil quality: an indicator of sustainable land management. Applied Soil Ecology 15:75-83.
15. Islam, K.R. and Weil, R.R. 2000. Soil quality indicator properties in mid-Atlantic soils as influenced by conservation management. Journal of Soil and Water Conservation 55: 69-78.
16. Jenkinson, D.S. and Ladd, J.N. 1981. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. p. 415-417. In: Powl, E.A. and Ladd, J.N. (eds.) Soil biochemistry. Dekker, New York.
17. Karhu, K., Tuomas, M.و Irina, B. and Kristiina, R. 2011. Biochar addition to agricultural soil increased CH4 uptake and water holding capacity–Results from a short–term pilot field study. Agriculture, Ecosystems & Environment 140:309–313.
18. Lehmann, J. and Joseph, S. 2009. Biochar for environmental management, Earthscan publishing, London.

19. Liu, X. Zheng, J. Zhang, D. Cheng, K. Zhou, H. Zhang, A. Li, L. Joseph, S. Smith, P. Crowley, D. Kuzyakov, Y. and Pan, G. 2016. Biochar has no effect on soil respiration across Chinese agricultural soils. Science of the Total Environment 554:259–265.
20. Luo, Y., Durenkamp, M., De Nobili, M., Lin, Q., Devonshire, B.J. and Brookes, P.C. 2013. Microbial biomass growth, following incorporation of biochars produced at 350 ° C or 700 ° C, in a silty-clay loam soil of high and low pH. Soil Biology and Biochemistry 57:513-523.
21. Mahajan, N.C., Mrunalini, K., Krishna Prasad, K.S., Naresh, R.K. and Sirisha, L. 2019. Soil Quality Indicators, Building Soil Organic Matter and Microbial Derived Inputs to Soil Organic Matter under Conservation Agriculture Ecosystem: A Review. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 8(2):1859-1879.
22. Marinari, S., Masciandaro, G., Cecanti, B. and Grego, S. 2000. Influnce of organic and mineral fertilisers on soil biological and physical properties. Bioresource Technology 72: 9–17.
23. Mishra, R.R. 2007. Soil Microbiology, Published by CBS Publishers & Distributors Pvt. Ltd, 2000.
24. Murphy, B. 2015. Key soil functional properties affected by soil organic matter - evidence from published literature. IOP Conference Series Earth and Environmental Science 25:012008.
25. Rutigliano, F.A., Romano, M., Marzaioli, R., Baglivo, I., Baronti, S., Miglietta, F. and Castaldi, S. 2014. Effect of biochar addition on soil microbial community in a wheat crop. European Journal of Soil Biology 60: 9-15.
26. Scotti, R., Bonanomi, G., Scelza, R., Zoina, A. and Rao, M.A. 2015. Organic amendments as sustainable tool to recovery fertility in intensive agricultural systems. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 15:333–352.
27. Singh, B., Camps-Arbestain, M. and Lehmann, J. 2017. Biochar: A Guide to Analytical Methods. Csiro Publishing. 320p.
28. Singh, Y., Singh, B., Ladha, J.K., Khind, C.S., Gupta, R.K., Meelu, O.P. and Pasuquin, E. 2004. Long-term effects of organic inputs on yield and soil fertility in the rice-wheat. Soil Science Society of American Journal 68:84665853.
29. Sparks, D.L. Page, A.L. Helmke, P.A. Loeppert, R.H. Soltanpour, P.N. Tabatabai, M.A. Johnston, C.T. and Sumner, M.E. 1996. Methods of soil analysis Part 3-Chemical methods. Soil Science Society of America Book Ser. 5, Madison, Wiscons in, USA, p. 1390.
30. Tabatabai, M. 1982. Soil enzymes1. Methods of Soil Analysis. Part 2. PP. 903-947, Chemical and Microbiological Properties, Madison.
31. Tabatabai, M.A. and Bremner, J.M. 1969. Use of pnitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. Soil Biology and Biochemestry 1:301-307.
32. Trupiano, D., Cocozza, C., Baronti, S., Amendola, C., Vaccari, F.P., Lustrato, G., Di Lonardo, S, Fantasma, F., Tognetti, R. and Scippa, G.S. 2017. The effects of biochar and its combination with compost on lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth, soil properties, and soil microbial activity and abundance. International Journal of Agronomy 2017:3158207. https://doi. org/10.1155/2017/3158207
33. Van Loon, L.C. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. European Journal of Plant Pathology 119:243–254.
34. Varma, A., Bakshi, M. Lou, B. Hartmann, A. and Oelmueller, R. 2012. *Piriformospora indica*: A novel plant growth-promoting mycorrhizal fungus. Journal of Agricultural Research 1: 117-131.

35. Vining, A. M. 2002. Bench scale compost reactors system and self-heading capabilities, MS, C. Thesis, Dept of civil and Enviromental Engineering, Texas A and M university. USA.
36. Yu, H., Zou, W., Chen, J., Chen, H., Yu, Z., Huang, J., Tang, H., Wei, X. and Gao, B. 2019. Biochar amendment improves crop production in problem soils: A review. Journal of Environmental Management 232:8-21.
37. Zaman, M. Matsushima, M. Chang, S. Inubushi, K. Nguyen, L. Goto, S. Kanek, O.F. and Yoneyama, T. 2004. Nitrogen mineralization, $N_2O$ production and soil microbiological prosperities as affected by long-term application of sewage sludge composts. Biology and Fertility of Soils 40:101-109.
38. Zhao, R., Coles, N. and Wu, J. 2015. Carbon mineralization following additions of fresh and aged biochar to an infertile soil. Catena 125:183– 189.

# تأثیر گونه‌های *Streptomyces* بر کارایی میکوریز آربوسکولار و رشد شبدر

زهرا پورمیرزائی، امیر لکزیان[1]، ناصر علی اصغرزاد، علیرضا دهناد و اکرم حلاج‌نیا

دانشجوی دکتری، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد؛ **z.pourmirzai@yahoo.com**

استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد؛ **alakzian@yahoo.com**

استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز؛ **n-aliasghar@tabrizu.ac.ir**

استادیار میکروبیولوژی- دپارتمان بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجانشرقی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، تبریز؛ **a.dehnad@areeo.ac.ir**

استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد؛ **halajnia@um.ac.ir**

دریافت: **99/8/3** و پذیرش: **1400/3/19**

## چکیده

**تعدادی از ریزجانداران از جمله اکتینوباکترها یا برخی متابولیت‌های حاصل از آنها به افزایش توسعه‌ی میسیلیوم‌های قارچی و کلنیزه شدن ریشه با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (AM) و شاخص‌های رشدی گیاهان کمک می‌کنند. پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر چهار گونه‌ی بومی *Streptomyces griseus*، *S. albogriseus*، *S. sp*$_1$ و *S. sp*$_2$ بر کلنیزه شدن و فراوانی هیف و وزیکول در ریشه‌ی گیاه شبدر برسیم (*Trifolium alexandrinum*) میکوریزی شده با قارچ *Rhizophagus irregularis* در قالب طرح کاملا" تصادفی (CRD) با سه تکرار انجام شد. تیمارها شامل 1 شاهد (تنها قارچ *R. irregularis*) و 4 تیمار قارچ *R. irregularis* + گونه‌های *Streptomyces* بودند. آزمایش بررسی تأثیر این چهار گونه‌ی *Streptomyces* بر وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی و غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه میکوریزی شده به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملا" تصادفی با دو فاکتور قارچ در دو سطح (شاهد و *R. irregularis*) و اکتینوباکتر در 5 سطح (شاهد و 4 گونه‌ی *Streptomyces*) در سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که گونه‌ی *S. albogriseus*باعث تحریک تشکیل همزیستی میکوریزی در ریشه‌ی گیاه شبدر شد و همچنین پتانسیل قارچ میکوریزی را در افزایش توانایی گیاه در جذب فسفر و رشد ریشه و اندام هوایی به طور قابل توجهی افزایش داد. سه گونه‌ی *S. griseus*، *S. albogriseus* و *S. sp*$_2$ باعث افزایش معنی‌دار درصد کلنیزه شدن و فراوانی اندام‌های قارچی در ریشه‌ی میکوریزی شبدر شدند. درصد کلنیزه شدن ریشه از 48/61 درصد در شاهد به 86/59، 72/93 و 66/90 درصد به ترتیب در کشت توأم با *S. griseus*، *S. albogriseus* و *S. sp*$_2$ افزایش یافت. فراوانی هیف در ریشه‌ی میکوریزی به ترتیب از 45/32 درصد در شاهد به 92/55، 85/48 و 71/47 درصد در تیمارهای *S. griseus*، *S. albogriseus* و *S. sp*$_2$ افزایش یافت. تلقیح ریشه‌های میکوریزی شبدر با گونه‌ی *S. albogriseus* وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی و غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه را به طور معنی‌داری افزایش داد. گونه‌های *S. griseus* و *S. sp*$_2$ تنها وزن خشک اندام هوایی و غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه را افزایش دادند. با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر پیشنهاد می‌شود که کارایی گونه‌ی *S. albogriseus* در تولید زادمایه‌ی قارچ *R. irregularis* به منظور تقویت پتانسیل آن بررسی شود.**

**واژه‌های کلیدی:** باکتری کمکی میکوریزا، شبدر، همزیستی میکوریزی، *Streptomyces*

---

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: مشهد، دانشگاه فردوسی، دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی علوم خاک

## مقدمه

یکی از ارکان مهم در نیل به توسعه‌ی پایدار، بکارگیری روش‌های زیستی (بیولوژیک) در تولید محصولات کشاورزی است. همزیستی میکوریزی از رایج‌ترین و با سابقه‌دارترین ارتباط‌های همزیستی در سلسله‌ی گیاهی است به طوری که اکثر گیاهان (حدود 95 درصد از گونه‌های گیاهان آوندی) حداقل یکی از تیپ-های میکوریزی را دارا هستند. میکوریز آربوسکولار (AM) رایج‌ترین نوع این همزیستی میکوریزی با گیاهان است. کلنیزه شدن ریشه با این قارچ‌ها سبب افزایش مقاومت آنها در برابر تنش‌های محیطی، افزایش رشد از طریق افزایش جذب عناصر غذایی، بهبود جذب آب در گیاهان و حفاظت از آنها در برابر بیماری‌ها می‌شود (حاتمی و همکاران، 2020). به نظر می‌رسد که همزیستی با قارچ میکوریز، جهت تکامل و گسترش گیاهان اتوتروف امری ضروری باشد و از طرفی قارچ‌های میکوریز خود نیز موجوداتی شیمیوارگانوتروف و همزیست اجباری ریشه‌ی گیاهان هستند (فورتین و همکاران، 2005).

طی سال‌های اخیر روش کشت درون شیشه‌ای (*in vitro*) بیشترین موفقیت را برای تکثیر صنعتی قارچ-های AM در پی داشته است. بررسی‌های اقتصادی صورت گرفته نشان می‌دهد، این روش از لحاظ تأمین امکانات و تجهیزات پایه و همچنین هزینه‌ی لازم برای افزایش حجم زادمایه‌ی تولیدی از مزیت قابل توجهی برخوردار است (دودز و همکاران، 2000). همچنین پتانسیل بسیار خوب این روش برای تکثیر اسپورهای عاری از آلودگی‌های جنبی، پژوهشگران را بر آن داشته تا از این تکنیک ویژه به صورت وسیع در پژوهش‌های مدرن در زمینه‌های مختلف مربوط به قارچ‌های AM استفاده نمایند (فورتین و همکاران، 2002). با این وجود، ماهیت همزیست اجباری این قارچ‌ها با ریشه‌ی گیاه مانع مطالعات دقیق فیزیولوژیکی و ژنتیکی آنها می‌شود. بنابراین برای بررسی تأثیر همزیستی میکوریزی بر شاخص‌های رشدی گیاه و همچنین تکثیر درون شیشه‌ای قارچ‌های AM از اسپورهای تندش یافته این قارچ‌ها استفاده می‌شود (تیلکا و همکاران، 1991). تندش اسپور قارچ‌های AM و رشد و توسعه‌ی میسیلیوم‌های قارچی درشرایط آزمایشگاهی و همچنین شرایط طبیعی خاک فرآیندی غیرقابل‌پیش‌بینی، کند و گاه غیرممکن است و حتی احتمال دارد از چندین روز تا 6 ماه طول طول بکشد (گیووانینی و همکاران، 2020). مقدار تندش اسپور این قارچ‌ها در خاک فقط 2 الی 10 درصد گزارش شده است (دالپه و همکاران، 2005). چه بسا در این زمان طولانی، از بین رفتن ریشه و سایر عوامل متنوع مانع برقراری همزیستی قارچ AM در ریشه‌ی گیاه میزبان خواهد شد. عوامل زیستی و محیطی متعدد، تندش اسپور قارچ‌های AM، رشد هیف آنها و کلنیزه شدن ریشه‌ی گیاهان میزبان را تحت تأثیر قرار می‌دهند (فری- کلیت و همکاران، 2005).

شواهدی وجود دارد که حضور برخی باکتری-های مایکوریزوسفری بواسطه‌ی مکانیسم‌های ویژه و یا تولید برخی متابولیت‌ها باعث تحریک تندش اسپور و رشد هیف قارچ‌های میکوریزی و توسعه‌ی همزیستی‌های میکوریزی در ریشه‌ی گیاهان میزبان می‌شوند. این باکتری‌های کمک کننده قارچ‌های میکوریزی را MHB[2] می‌نامند (گاربای، 1994). مطالعات اخیر نشان داد که باکتری‌های MH (Mycorrhiza helper) ممکن است روی دیواره‌ی اسپور قارچ‌های AM، بین هیف‌های خارج ریشه‌ای در مجاورت اسپورها و یا در سیتوپلاسم اسپورها قرار گیرند. گونه‌هایی از استرپتومایسس‌ها (*Streptomyces* spp.) (علی اصغرزاد و همکاران، 2012)، سودوموناس (*Pseudomonas* sp.) و کرینوباکتریوم (*Corynebacterium* sp.) تندش اسپور قارچ‌های *Funneliformis mosseae*، *Glomus versiforme* و *Gigaspora margarita* را افزایش می‌دهند (گیووانینی و

[1] Mycorrhiza helper bacteria

همکاران، 2020). اکتینوباکترها به دلیل توانایی بالا در هیدرولیز کیتین که ترکیب اصلی دیواره‌ی اسپور قارچ-هاست، از مهمترین باکتری‌های MH هستند (آگنولوسی و همکاران 2015). همچنین استرپتومایسس‌ها به دلیل پتانسیل بالا در تولید متابولیت‌های ثانویه‌ی محلول و فرار، هورمون‌های رشد و فعالیت‌های کیتینولیتیکی، در تحریک تندش اسپور و رشد هیف‌های قارچی اهمیت ویژه‌ای دارند (لانق و همکاران، 2008). این باکتری‌ها علاوه بر تحریک تشکیل همزیستی‌های میکوریزی، پتانسیل قارچ‌های میکوریزی را در افزایش توانائی گیاه میزبان در جذب عناصر معدنی نظیر فسفر و نیتروژن بخصوص از منابع غیر قابل دسترس و کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی به طور قابل توجهی افزایش می‌دهند (تارکا و همکاران، 2009). تحریک بیان ژن-های مربوط به متابولیسم لیپید در قارچ‌های AM از جمله مهمترین سازوکارهای احتمالی باکتری‌های MH در افزایش کلنیزه شدن ریشه‌های میکوریزی می‌باشند. زیرا لیپیدها مهمترین منبع کربن آلی در قارچ‌های AM هستند (گراندموگین- فرجانی و همکاران، 2005) که بالای 45 درصد وزن خشک اسپور این قارچ‌ها را تشکیل می‌دهند (جاباجی- هار و همکاران، 1984).

بنابراین فراوانی لیپیدها در قارچ‌های AM وسیله‌ای برای ارزیابی پتانسیل میکوریزی این قارچ‌ها در ریشه‌های میزبان می‌باشند زیرا تندش اسپور و توسعه‌ی هیف‌ها با استفاده از ذخایر لیپیدی آنها و احتمالاً تأثیر آنزیم‌های هیدرولیتیک از جمله آنزیم لیپاز صورت می‌گیرد (گراندموگین- فرجانی و همکاران، 2005).

میکا و همکاران (2009) گزارش کردند که متابولیت محلول آگزوفوران و آنتی‌بیوتیک WS-5995B تولید شده توسط *Streptomyces* AcH505 با تحریک و افزایش بیان ژن‌های مربوط به متابولیسم لیپید در قارچ اکتومیکوریزایی *Amanita muscaria* از جمله ژن‌های استوآسیل-کوآسنتاز (*Aacs*)، سیکلوفیلین40 (*Cyp40*) و GABA پرمه‌آز (*Uga4*) منجر به افزایش رشد قارچ و توسعه‌ی همزیستی اکتومیکوریزایی موردنظر شد. همچنین باکتری‌های MH با تأثیر بر فیزیولوژی گیاه میزبان و افزایش فتوسنتز گیاه (ناگی و همکاران، 2004)، سنتز هورمون‌های محرک رشد گیاه مثل ایندول استیک اسید (IAA)، جیبرلین‌ها و سیتوکینین و در نتیجه تغییر مورفولوژی ریشه (امیرآبادی و همکاران، 1386) و جلوگیری از رشد قارچ‌های پاتوژن در ریزوسفر (شارما 2008) می‌توانند منجر به افزایش کلنیزه شدن ریشه‌ی گیاه میزبان با قارچ میکوریزی شوند. علاوه بر این سازوکارها اسیدسیتریک یا متابولیت‌های دیگری که توسط برخی باکتری‌های MH تولید می‌شوند، به عنوان سوبسترا برای قارچ‌های میکوریزی مورد استفاده قرار می‌گیرند. ممکن است باکتری‌های MH با غیر سمی کردن متابولیت‌های سمی نظیر پلی‌فنول‌ها که در محیط رشد قارچ میکوریزی تولید می‌شوند، منجر به رشد بیشتر هیف قارچ‌های میکوریزی گردند (توماس و همکاران، 2005).

*P. fluorescens* با ترشح تیامین (ویتامین $B_1$) باعث تحریک و افزایش رشد میسیلیوم‌های قارچ اکتومیکوریزایی *Laccaria bicolor* می‌شود (فری-کلیت و همکاران، 2007). تیامین یک کوفاکتور ضروری برای چندین آنزیم مختلف در متابولیسم کربن مرکزی قارچ میکوریزی است (میکا و همکاران، 2009). کوروناتین تولید شده توسط باکتری *P. syringae* مشابه هورمون گیاهی جاسمونیک اسید عمل کرده و منجر به افزایش کلنیزه شدن قارچ *Arabidopsis tbaliana* در ریشه‌ی گیاه میزبان می‌شود (کوی و همکاران، 2005). دیوپونویز و پلنچت (2003) گزارش کردند که طی یک آزمایش درون شیشه‌ای باکتری *P. Monteilii* هیچ تأثیری بر رشد هیف قارچ اکتومیکوریزایی *Scleroderma dictyosporum* IR109 نداشت ولی در تلقیح با ریشه‌ی درخت اقاقیا منجر به افزایش معنی‌دار کلنیزه شدن ریشه با قارچ شد. آنان با بررسی‌های بیشتر مشاهده نمودند، *P. monteilii* در پاسخ به ترشحات ریشه‌ی اقاقیا منجر به افزایش رشد هیف قارچ شده است و همچنین با تحریک و افزایش

تولید مواد فنولی نظیر هیپافورین توسط ریشه‌ی اقاقیا باعث افزایش قابلیت پذیرش ریشه به این قارچ شده است و در نتیجه قارچ بیشتر به داخل ریشه نفوذ کرده و کلنیزه شدن ریشه میکوریزی افزایش یافته است. به دلیل در دسترس نبودن ژنوم کامل قارچ‌های AM ( http://mycor. nancy. inra. fr/ IMGC/genome sequencing.) و همچنین ماهیت اجباری همزیستی آنها با گیاهان، مطالعات بسیار اندکی در این زمینه انجام شده است.

پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر چهار گونه‌ی بومی خاک‌های منطقه شمالغرب کشور شامل *S. griseus*، *S. albogriseus*، *S.* $sp_1$ و *S.* $sp_2$ بر درصد کلنیزه شدن و فراوانی هیف و وزیکول در ریشه‌ی گیاه شبدر میکوریزی شده با قارچ *R. irregularis* و شاخص‌های رشدی گیاه انجام شد. مؤثرترین گونه به عنوان باکتری MH معرفی شده و می‌توان از آن در تولید انبوه قارچ *R. irregularis*، برای شروع همزیستی و استقرار قارچ در ریشه استفاده کرد. پیشتر طی یک مطالعه‌ی درون شیشه‌ای مشاهده شد که گونه‌ی *S. albogriseus* بیشترین اثر تحریکی را در میان گونه‌های *Streptomyces* مورد آزمایش، بر تندش اسپور و رشد هیف قارچ *R. irregularis* دارد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه زادمایه‌ی قارچی (تکثیر درون شیشه‌ای قارچ AM)

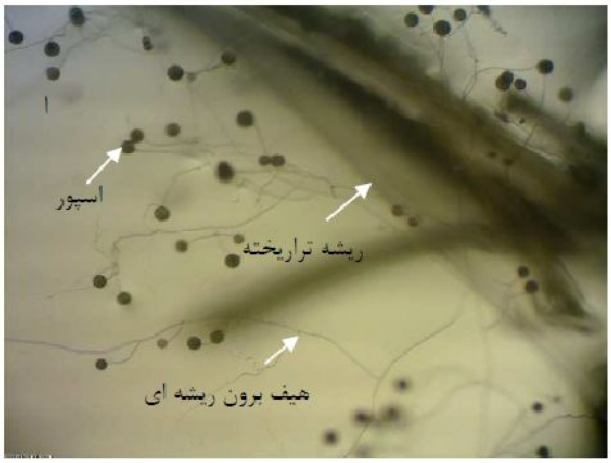
گونه‌ی قارچی *R. irregularis* به روش درون شیشه‌ای در کنار ریشه‌ی هویج تلقیح شده با باکتری *Agrobacterium rhizogenes* (این قارچ و ریشه از مؤسسه تحقیقات آب و خاک کشور دریافت شد) بر روی محیط کشت MSR[3] (کراننبروک و همکاران، 2005) به مدت 4 ماه تکثیر یافت تا رابطه‌ی همزیستی میکوریزی بین آنها بوجود آید و قارچ با توسعه‌ی شبکه هیفی خود و تشکیل اسپورهای فراوان در محیط کشت سیکل زندگی خود را کامل کند (شکل 1). تحت شرایط استریل اسپورهای قارچی با نوک سوزن از محیط MSR جدا شده و پس از شستشو با آب مقطر استریل، ضدعفونی سطوح اسپورها به ترتیب با کلرآمین تی 2 % (20 g /l) به مدت 10 دقیقه، شستشو با آب مقطر استریل، محلول آنتی بیوتیک شامل: استرپتومایسین‌سولفات 0/02 % (20 mg/100 ml) و جنتامایسین‌سولفات 0/01 % (10 mg/100 ml) به مدت 10 دقیقه و شستشو با آب مقطر انجام شد. مراحل فوق سه بار تکرار شد. اسپورهای ضدعفونی شده به مدت یک شبانه روز در آب مقطر استریل در دمای 4+ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند و برای تکثیر قارچ در کنار ریشه‌ی تراریخته بر روی محیط MSR مورد استفاده قرار گرفتند (کراننبروک و همکاران، 2005). بدین طریق زادمایه‌ی قارچی خالص و عاری از آلودگی‌های جنبی برای استفاده در ریشه‌ی گیاه شبدر آماده شد. سپس با بینوکولر به تعداد ریشه‌هایی که باید میکوریزی می‌شدند قطعات 2×2 سانتی‌متری از ژل MSR عاری از آلودگی با 60 اسپور و مقادیر یکسان هیف و ریشه‌های میکوریزی انتخاب شده و آماده‌ی تلقیح در ریشه‌ی گیاه شدند.

### تهیه زادمایه‌ی گونه‌های *Streptomyces*

در این پژوهش از چهار گونه‌ی بومی خاک‌های منطقه شمالغرب کشور *S. griseus*، *S. albogriseus*، *S.* $sp_1$ و *S.* $sp_2$ استفاده شد. این گونه‌های *Streptomyces* از پژوهشکده‌ی بیوتکنولوژی کشاورزی شمال‌غرب و غرب کشور در تبریز دریافت شد. برای تهیه‌ی زادمایه‌ی این اکتینوباکترها از محیط کشت مایع Starch casein مطابق جدول 1 استفاده شد.

---

[2.] Modified Strullu- Romand




**شکل 1- قارچ *R. irregularis* تکثیر شده به روش درون شیشه‌ای در مدت چهار ماه**

**جدول 1- ترکیب محیط کشت S.C برای تهیه یک لیتر از آن (بنی‌اسدی و همکاران، 2009)**

| ترکیب | نشاسته | کازئین | $MgSO_4$ | $FeSO_4$ | $CaSO_3$ | $KNO_3$ | NaCl | $K_2HPO_4$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| مقدار (گرم) | 10 | 0/3 | 0/05 | 0/01 | 0/02 | 2 | 2 | 2 |

ابتدا از هر چهار گونه‌ی *Streptomyces* کشت تراکمی 72 ساعته بر محیط کشت S.C.A (Starch casein agar) داده شد. سپس محیط کشت مایع S.C تهیه شد، محیط کشت در pH=7 تنظیم شد و در دمای 121 درجه سانتی‌گراد و فشار 1/2 اتمسفر به مدت 15 دقیقه اتوکلاو شد. بعد از اتوکلاو شدن، زمانیکه دمای محیط کشت به زیر 45 درجه سانتی‌گراد رسید، با فیلتر استریل (0/22µm Millipore filter) 0/5 گرم قارچ‌کش نیستاتین پس از حل شدن در حلال دی‌متیل‌سولفوکسید به محیط کشت اضافه شد. در نهایت بعد از آماده شدن محیط کشت S.C، از کشت تراکمی گونه‌های *Streptomyces* توسط حلقه‌ی پلاتینی استریل به ارلن‌های حاوی محیط مایع S.C منتقل شد. ارلن‌ها به مدت 10 روز در دمای 29 درجه‌ی سانتی‌گراد بر روی شیکر انکوباتور با دوران 120 دور در دقیقه قرار گرفتند. بعد از پایان این مدت گونه‌های *Streptomyces* با جمعیت $10^8$ CFU.ml$^{-1}$رشد کردند.

**کشت گیاه**

**جوانه دار کردن بذر**

بذرهای شبدر رقم برسیم (*Trifolium alexandrinum*) محصول شرکت پاکان بذر اصفهان با استفاده از محلول هیپوکلریت‌سدیم 2/5 درصد به مدت 3 دقیقه ضدعفونی شد و برای حذف هیپوکلریت‌سدیم باقی‌مانده در سطح بذرها، چندین بار شستشو با آب مقطر استریل صورت گرفت. سپس با رعایت شرایط استریل، به مدت یک هفته در دمای 18 درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند تا جوانه برنند. قابل ذکر است که شبدر رقم برسیم نسبت به سایر ارقام این گیاه رشد بیشتر و سریعتری دارد.

**آماده‌سازی خاک**

خاک با بافت لوم‌شنی (17% رس، 22/3% سیلت، 60/7% شن) از ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، تهیه شده و بعد از هوا خشک و الک شدن به مدت 2 ساعت در دمای 121 درجه‌ی سانتی‌گراد استریل شد. خصوصیات خاک در جدول 2 آورده شده است.

**جدول 2- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش**

| خصوصیت | رطوبتFC | pH(1:1) | EC | CCE | کربن آلی | نیتروژن | پتاسیم | فسفر | آهن | روی |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| مقدار | 11 | 8 | 1/8 | 11/5 | 0/58 | 0/22 | 225/4 | 6/88 | 2/8 | 1/4 |
| واحد | وزنی (%) | - | $dS.m^{-1}$ | (%) | (%) | (%) | $mg.kg^{-1}$ | $mg.kg^{-1}$ | $mg.kg^{-1}$ | $mg.kg^{-1}$ |

**کشت جوانه‌ها و اعمال تیمارها**

براساس طرح آزمایشی بکار رفته، در تیمارهای حاوی قارچ *R. irregularis* از ژل زادمایه‌ی قارچی انتخاب شده به مقدار یکسان و حدود یک گرم با نوک اسپاتول برداشته و در 20 نقطه‌ی مختلف با رعایت فاصله در هر گلدان قرار داده شد. در تیمارهای شاهد بدون قارچ هم به همان مقدار از ژل MSR بدون قارچ قرار داده شد. سپس بذرهای جوانه زده شده یکدست و هم اندازه، در همان نقاط در تماس با زادمایه قرار داده شدند. در تیمارهای حاوی گونه‌های *Streptomyces*، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون *Streptomyces* و برای تیمارهای شاهد بدون *Streptomyces* هم یک میلی‌لیتر از محیط مایع S.C بدون کشت، پای هر بذر جوانه زده شده مایه‌زنی شد. آبیاری تیمارهای آزمایشی به منظور حفظ رطوبت گلدان‌ها تا 90 درصد ظرفیت زراعی صورت گرفت. گلدان‌ها در شرایط کنترل شده اتاقک رشد با شدت نور 8000 لوکس و مدت زمان روشنایی 16 ساعت با دمای روز و شب به ترتیب 2 ±26 و 2 ±14 درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 60 تا 70 درصد به مدت سه ماه نگهداری شدند. در طول این مدت گیاهان ابتدا با نصف غلظت محلول راریسون (راریسون، 1987) و سپس با محلول غذایی کامل راریسون (جدول 3) تغذیه شدند. همچنین در طول دوره‌ی رشد، علایم کمبود نیتروژن در گیاه بررسی و نیاز آن به نیتروژن تأمین شد.

**جدول 3- ترکیب محلول غذایی راریسون (راریسون، 1987)**

| نام محلول | ترکیب | مقدار (گرم) | آب‌مقطر |
|---|---|---|---|
| A | $MgSO_4.7H_2O$ | 62/01 | 500 |
| B | $Ca(NO_3).4H_2O$ | 119/02 | 500 |
| C | $K_2HPO_4.3H_2O$ | 57/69 | 500 |
| | FeEDTA | 6/25 | |
| | $MnSO_4.4H_2O$ | 0/56 | |
| D | $H_3BO_4$ | 0/716 | 500 |
| | $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ | 0/046 | |
| | $ZnSO_4.7H_2O$ | 0/11 | |
| | $CuSO_4.5H_2O$ | 0/099 | |
| E | KCl | 20/85 | 500 |

برای تهیه محلول غذایی راریسون، 2 میلی‌لیتر از هر یک از محلول‌های مادر A، B، C و D به یک لیتر آب مقطر اضافه می‌شود، ولی در تحقیقات میکوریز، از محلول C به جای 2 میلی‌لیتر، 1 میلی‌لیتر برداشته (به علت وجود فسفر) و برای جبران 1 میلی‌لیتر باقی‌مانده از محلول E، 1 میلی‌لیتر اضافه شد.

**پارامترهای مورد اندازه‌گیری**

وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی گیاه شبدر با استفاده از ترازوی (±0/01g) تعیین شد. غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه بعد از هضم نمونه‌ها به طریق خشک سوزانی به روش نیترو وانادو مولیبدات (کاتینه، 1980) و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Hack DR/2000) اندازه‌گیری شد. درصد کلنیزه شدن

ریشه (کورمانیک و مک‌گراو، 1982؛ نوریس و همکاران، 1992) و درصد وزیکول و هیف (السن و همکاران، 2010) در ریشه‌های میکوریزی بعد از رنگ‌آمیزی ریشه به روش تلاقی خطوط شبکه تعیین شد.

**طرح آزمایشی و تجزیه آماری**

آزمایش بررسی تأثیر چهار گونه‌ی *Streptomyces* بر وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی و غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه میکوریزی شده به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با دو فاکتور قارچ در دو سطح (شاهد و*R. irregularis*) و اکتینوباکتر در پنج سطح (چهار گونه‌ی *Streptomyces* و یک شاهد) و با سه تکرار، به صورت کشت گلخانه‌ای گیاه شبدر در خاک (با خصوصیات جدول 2) انجام شد. آزمایش بررسی اثر استرپتومایسس‌ها بر درصد کلنیزه شدن ریشه و فراوانی اندام‌های قارچی شامل 5 تیمار، شامل: 1 شاهد (فقط قارچ *R. irregularis*) و 4 تیمار کشت توأم اسپور قارچ با 4 گونه‌ی *Streptomyces* در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) انجام گرفت. تجزیه آماری داده‌ها شامل تجزیه واریانس، آزمون نرمال بودن توزیع داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها با نرم‌افزار SPSS انجام شد.

## نتایج

**آزمایش بررسی اثر استرپتومایسس‌ها بر درصد کلنیزه شدن ریشه و فراوانی اندام‌های قارچی در ریشه**

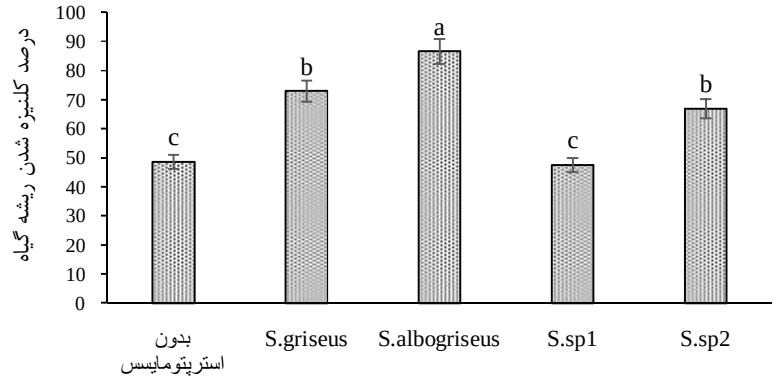
**درصد کلنیزه شدن ریشه**

در تیمارهای *S. griseus*، *S. albogriseus* و *S.* $sp_2$ درصد کلنیزه شدن ریشه‌ی گیاه به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<0/01$) (جدول 4). طوری‌که درصد کلنیزه شدن ریشه از 48/61 درصد در شاهد به 86/59، 72/93 و 66/90 درصد به ترتیب در کشت توأم با *S. albogriseus*، *S. griseus* و *S.* $sp_2$ افزایش یافت (شکل2). *S. albogriseus* بیشترین اثر تحریکی را در افزایش کلنیزه شدن ریشه‌ی شبدر با قارچ *R. irregularis* داشت. شکل 3 ریشه‌ی میکوریزی شده شبدر را نشان می‌دهد.

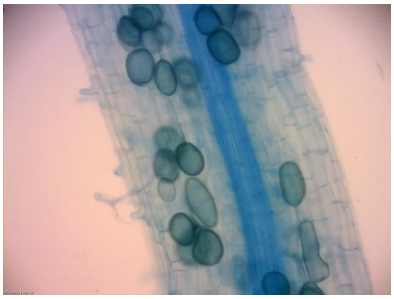
**جدول 4- تجزیه واریانس اثر گونه‌های *Streptomyces* بر درصد کلنیزه شدن و فراوانی هیف و وزیکول در ریشه‌ی میکوریزی شده شبدر با قارچ *R. irregularis***

| منبع تغییر | درجه آزادی | میانگین مربعات | | |
|---|---|---|---|---|
| | | کلنیزه شدن (%) | هیف (%) | وزیکول (%) |
| تیمار | 4 | 829/098** | 1300/464** | 769/728** |
| خطای آزمایشی | 10 | 39/988 | 16/313 | 124/29 |
| ضریب تغییرات (%) | | 9/8 | 5/84 | 8/24 |

ns، * و ** به ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال 5 و 1 درصد




**شکل 2- مقایسه میانگین تأثیر گونه‌های *Streptomyces* بر درصد کلنیزه شدن ریشه‌ی میکوریزی شده شبدر با *R. irregularis***



**شکل 3- ریشه‌ی شبدر کلنیزه شده با قارچ *R. irregularis* در تیمار *S. albogriseus***

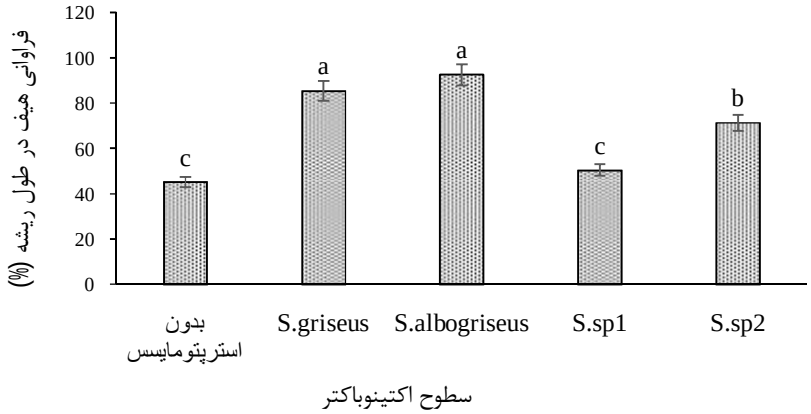
**فراوانی هیف و وزیکول در ریشه‌ی میکوریزی**

در تیمارهای *S. griseus*، *S. albogriseus* و $S. sp_2$ درصد هیف و وزیکول ریشه‌ی میکوریزی شده شبدر به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<0/01$) (جدول 4). درصد هیف در ریشه از 45/32 درصد در شاهد به 92/55، 85/48 و 71/47 درصد به ترتیب در کشت توأم با *S. albogriseus*، *S. griseus* و $S. sp_2$ افزایش یافت (شکل 4). همچنین درصد وزیکول ریشه به ترتیب 49/37، 88/33، 72/37 و 65/63 بود (شکل 5). همانند درصد کلنیزه شدن ریشه، گونه‌ی $S. sp_1$ اثر معنی‌داری بر درصد هیف و وزیکول ریشه نداشت. بیشترین افزایش تولید هیف توسط *S. albogriseus* و *S. griseus* مشاهده شد، در حالیکه تنها گونه‌ی *S. albogriseus* بیشترین اثر تحریکی را در افزایش تولید وزیکول ریشه نشان داد.

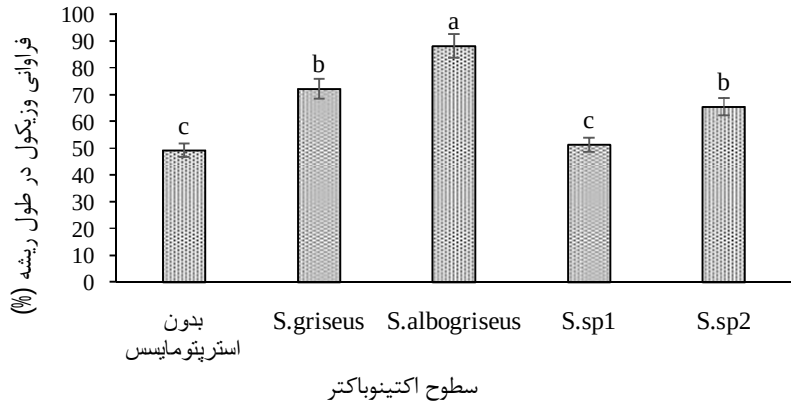
**آزمایش بررسی اثر گونه‌های استرپتومایسس بر وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی و غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه**

**وزن تر و خشک اندام هوایی**

اثر متقابل قارچ *R. irregularis* و تیمارهای *Streptomyces* بر وزن تر و خشک اندام هوایی گیاه معنی‌دار بود ($P<0/01$) (شکل 6 و 7) (جدول 5). بدون حضور گونه‌های *Streptomyces*، با تلقیح قارچ *R. irregularis* در ریشه‌ی گیاه شبدر افزایش معنی‌داری در وزن تر و خشک اندام هوایی گیاه مشاهده نشد ولی در تلقیح توأم قارچ با هر چهار گونه‌ی *Streptomyces* افزایش معنی‌دار در وزن خشک اندام هوایی و تنها با تلقیح گونه‌ی *S. albogriseus* افزایش معنی‌دار در وزن تر اندام هوایی گیاه مشاهده شد. *S. albogriseus* بیشترین اثر تحریکی را بر پتانسیل قارچ *R. irregularis* در افزایش وزن تر و خشک اندام هوایی گیاه شبدر داشت. وزن تر اندام هوایی گیاه را از 26/08 گرم در تیمار قارچی بدون *Streptomyces* به 75/16 گرم و وزن خشک اندام هوایی را از 2/49 گرم تیمار قارچی به 17/04 گرم در تیمار *S. albogriseus* افزایش یافت. قابل توجه است که *S. albogriseus* در تیمارهای بدون قارچ نیز وزن تر و خشک اندام هوایی گیاه را افزایش داده است.




**شکل 4- مقایسه میانگین تأثیر گونه‌های *Streptomyces* برفراوانی هیف ریشه‌ی میکوریزی شده شبدر با *R. irregularis***

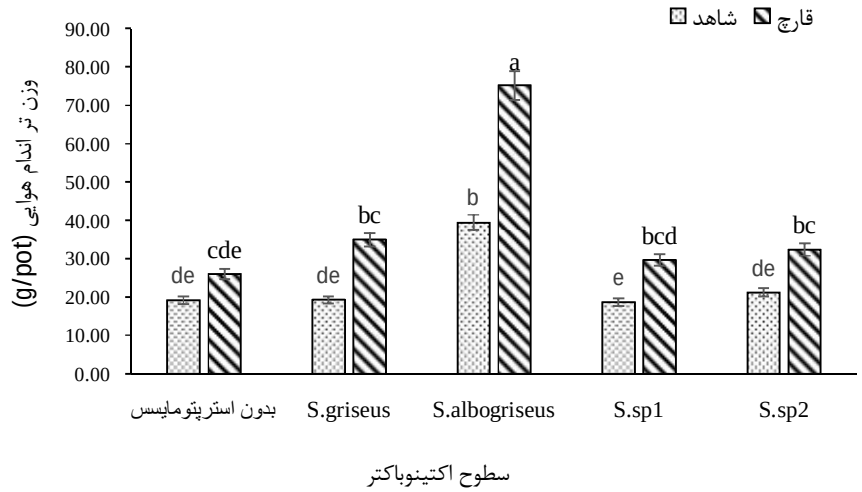



**شکل 5- مقایسه میانگین تأثیر گونه‌های *Streptomyces* برفراوانی وزیکول ریشه‌ی میکوریزی شده شبدر با *R. irregularis***

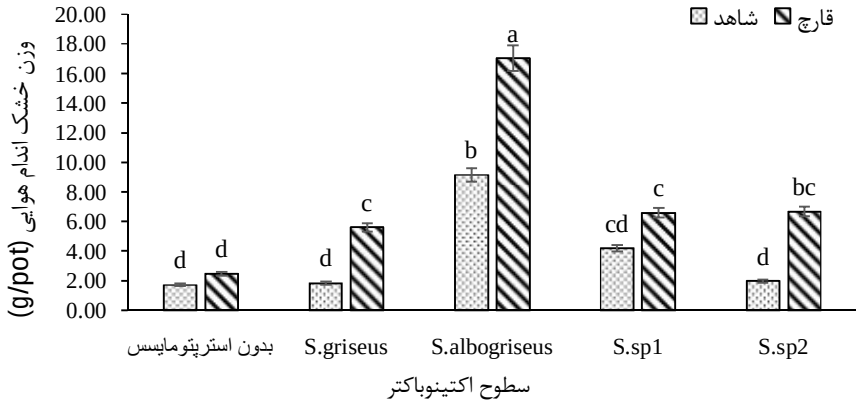
**جدول 5- تجزیه واریانس اثر گونه‌های *Streptomyces* و قارچ *R. irregularis* بر وزن تر، وزن خشک و غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی شبدر**

| منبع تغییر | درجه آزادی | میانگین مربعات | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | وزن تر اندام هوایی | وزن خشک اندام هوایی | وزن تر ریشه | وزن خشک ریشه | فسفر اندام هوایی | فسفر ریشه |
| قارچ *R. irregularis* | 1 | 1936/354$^{**}$ | 114/036$^{**}$ | 275/972$^{**}$ | 18/424$^{**}$ | 313/108$^{**}$ | /712$^{**}$ 128 |
| *Streptomyces* | 4 | 1259/262$^{**}$ | 110/279$^{**}$ | 153/02$^{**}$ | 9/436$^{**}$ | 39/309$^{**}$ | 6/16$^{**}$ |
| قارچ × *Streptomyces* | 4 | 194/151$^{**}$ | 10/728$^{**}$ | 5/58$^{**}$ | 5/434$^{**}$ | 4/683$^{*}$ | 5/224$^{**}$ |
| خطا | 20 | 38/712 | 2/238 | 9/415 | 0/364 | 1/21 | 0/751 |
| ضریب تغییرات (%) | | 19/65 | 26/08 | 22/19 | 29/69 | 12/98 | 18/63 |

ns، * و ** به ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال 5 و 1 درصد



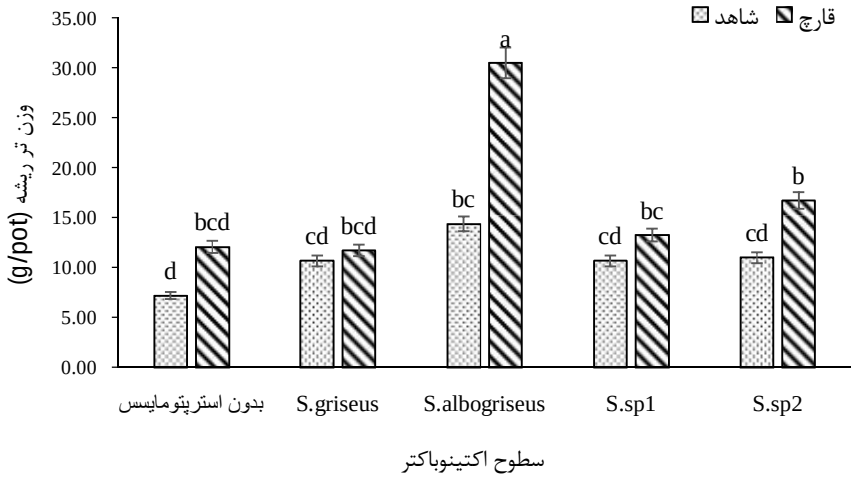

**شکل 6- برهمکنش گونه‌های *Streptomyces* و قارچ *R. irregularis* بر وزن تر اندام هوایی گیاه شبدر**



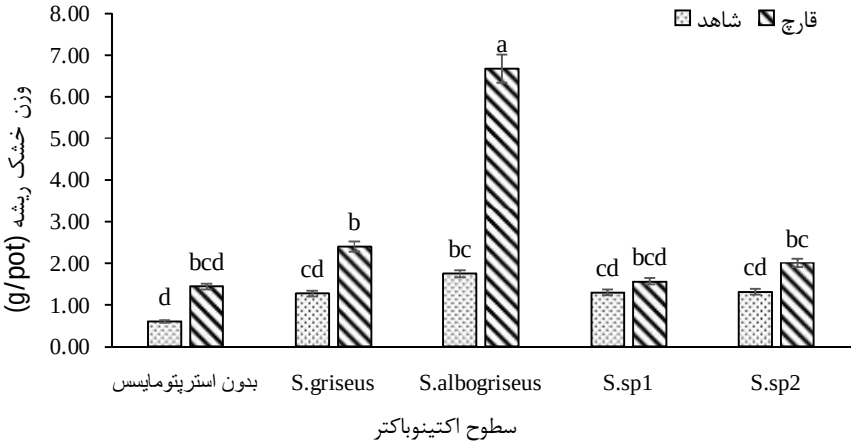

**شکل 7- برهمکنش گونه‌های *Streptomyces* و قارچ *R. irregularis* بر وزن خشک اندام هوایی گیاه شبدر**

**تر و خشک ریشه**

اثر متقابل قارچ *R. irregularis* و تیمارهای *Streptomyces* بر وزن تر و خشک ریشه‌ی گیاه شبدر معنی‌دار بود ($P<0/01$) (شکل 8 و 9) (جدول 5). همانند وزن تر و خشک اندام هوایی گیاه، بدون حضور گونه‌های *Streptomyces* با تلقیح قارچ *R. irregularis* در ریشه‌ی گیاه شبدر افزایش معنی‌داری در وزن تر و خشک ریشه‌ی گیاه مشاهده نشد ولی با تلقیح توأم گونه‌ی *S. albogriceus* افزایش معنی‌داری در وزن تر و خشک ریشه‌ی گیاه مشاهده شد. وزن تر و خشک ریشه به ترتیب از 12/08 و 1/44 گرم در تیمار قارچی بدون *Streptomyces* به 30/50 و 6/67 گرم در تیمار کشت توأم قارچ با *S. albogriceus* افزایش یافت.



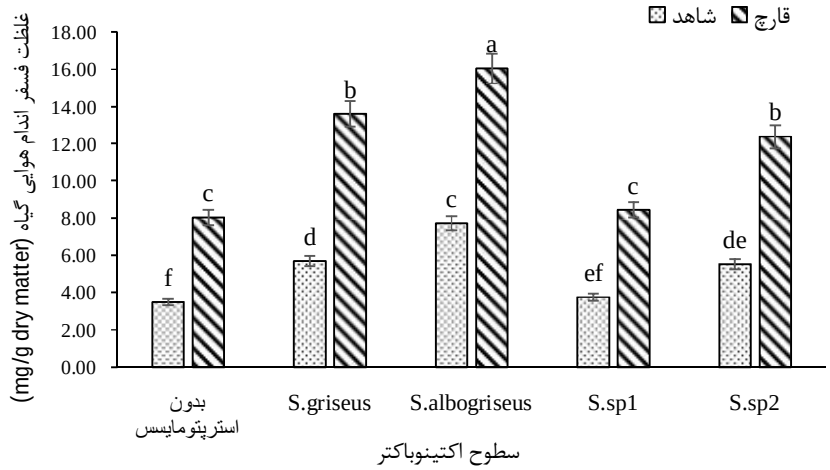

**شکل 8- برهمکنش گونه‌های *Streptomyces* و قارچ *R. irregularis* بر وزن تر ریشه‌ی گیاه شبدر**



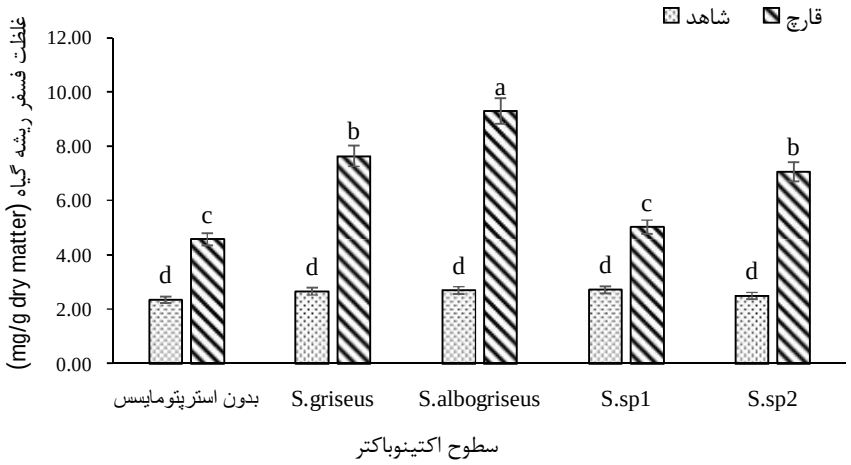

**شکل 9- برهمکنش گونه‌های *Streptomyces* و قارچ *R. irregularis* بر وزن خشک ریشه‌ی گیاه شبدر**

**غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی**

اثر متقابل قارچ *R. irregularis* و تیمارهای *Streptomyces* بر غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه شبدر معنی‌دار بود (P<0/01) (شکل 10 و 11) (جدول 5). تلقیح قارچ *R. irregularis* به تنهایی در ریشه‌ی گیاه شبدر باعث افزایش غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه شد و در تلقیح توأم قارچ با گونه‌های *S. griseus*، *S. albogriseus* و *S. sp*$_2$ غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه به طور معنی‌داری افزایش یافت. غلظت فسفر ریشه‌ی گیاه به ترتیب از 4/58 در شاهد به 7/64، 9/30 و 7/07 mg.g$^{-1}$ dry matter در تیمارهای قارچ با گونه‌های *S. griseus*، *S. albogriseus* و *S. sp*$_2$ افزایش یافت. این افزایش در مورد غلظت فسفر اندام هوایی گیاه به ترتیب 8/03، 13/60، 16/04 و 12/38 mg.g$^{-1}$ dry matter بود. *S. albogriseus* بیشترین افزایش غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه را در تیمارهای قارچی نشان داد.




**شکل 10- برهمکنش گونه‌های *Streptomyces* و قارچ *R. irregularis* بر غلظت فسفر اندام هوایی گیاه شبدر**




**شکل 11- برهمکنش گونه‌های *Streptomyces* و قارچ *R. irregularis* بر غلظت فسفر ریشه‌ی گیاه شبدر**

## بحث

از میان گونه‌های بومی مورد آزمایش تلقیح سه گونه‌ی *S. griseus*، *S. albogriseus* و $S.\ sp_2$ در ریشه‌ی میکوریزی شبدر منجر به افزایش فراوانی هیف، وزیکول و درصد کلنیزه شدن ریشه‌ی میکوریزی شد. اثر تحریکی این سه گونه‌ی *Streptomyces* را می‌توان به نقش این اکتینوباکترها و متابولیت‌های محرک احتمالی حاصل از آنها در افزایش ذخایر لیپیدی اندام‌های قارچی و در نتیجه افـزایـش تـندش اسـپور و رشـد میسیلیوم‌های قارچی در برهمکنش سه جانبه با قارچ و ریشه‌ی گیاه نسبت داد. زیرا عدم توانایی در بیوسنتز کافی لیپیدهای خنثی توسط میسیلیوم‌های خارج ریشه‌ای و اسپورهای قارچ AM مهمترین دلیل محدودیت‌های تندش اسپور و رشد هیف این قارچ‌ها است (باگو و بکارد، 2002). علی اصغرزاد و همکاران (2012) طی یک آزمایش درون شیشه‌ای گزارش کردند که دو گونه‌ی غیربومی *S. griseus* و *S. albogriseus* و متابولیت‌های ثانویه فرار حاصل از آنها باعث افزایش معنی‌دار تندش اسپور و به موازات آن رشد

هیف قارچ *R. irregularis* شدند. افزایش تندش اسپور و رشد هیف‌های قارچی شرط لازم ولی کافی برای کلنیزه شدن ریشه‌ی میکوریزی نیستند و ممکن است گونه‌های *Streptomyces* در پاسخ به ریشه و ترشحات آن سازوکار متفاوتی داشته باشند. بنابراین لازم است اثرات تحریکی یا بازدارندگی این اکتینوباکترها طی آزمایش گلدانی نیز بررسی شود. اسچری و همکاران (2005) دو ترکیب آگزوفوران و 7- دهیدروکسی‌آگزوفوران تولید شده توسط *Streptomyces* AcH505 را بعنوان متابولیت‌های ثانویه محرک رشد قارچ *A. muscaria* معرفی کردند و گزارش کردند که تولید این متابولیت‌ها در حضور قارچ به میزان قابل توجهی افزایش یافت. گونه‌ی *S.* $sp_1$ احتمالا" به علت تولید آنتی‌بیوتیک‌های بیشتر نسبت به سایر گونه‌ها، افزایش معنی‌داری در تندش اسپور، رشد هیف و کلنیزه شدن ریشه با قارچ *R. irregularis* نشان نداد. کریشنا و همکاران (1982) نیز گزارش کردند که *S. cinnamomeous*با تولید آنتی‌بیوتیک سینامیسین و دورامیسین مانع رشد، اسپورزایی و کلنیزه شدن قارچ *G. fasciculatus* در ریشه‌ی گیاه ارزن شد. در آزمایشی اثر باکتری *P. monteilii* سویه HR13 بر فراوانی هیف و وزیکول ریشه‌ی درخت اقاقیای میکوریزی شده با قارچ *R. irregularis* بررسی شد و نتایج نشان داد که این باکتری کمکی منجر به افزایش معنی‌دار فراوانی هیف از 24/1 درصد در شاهد (بدون باکتری) به 91/2 درصد در کشت توأم با باکتری شد و این افزایش در مورد فراوانی وزیکول‌ها به ترتیب از 49/6 درصد به 61/6 درصد بود (دیوپونویز و پلنچت، 2003).

گونه‌های *Streptomyces* علاوه بر افزایش رشد قارچ احتمالاً با تولید برخی ترکیبات از قبیل هورمون‌های محرک رشد باعث رشد و تغییر در مورفولوژی ریشه از قبیل منشعب‌تر و موئین‌تر شدن توده‌ی ریشه‌ای و رشد اندام هوایی گیاه شدند. از آنجا که در تیمارهای بدون قارچ، گونه‌ی *S. albogriseus* باعث افزایش وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی و همچنین غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه شد و گونه‌های *S. griseus* و *S.* $sp_2$ افزایش معنی‌دار در غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه را نشان داده‌اند. بنابراین احتمالاً این گونه‌های *Streptomyces* با ترشح هورمون‌های گیاهی و برقراری تعادل هورمون‌های رشد نظیر اکسین، جیبرلین و سیتوکینین و انواع ویتامین‌های گروه B و غیره باعث افزایش سرعت متابولیسم، رشد، توسعه و افزایش تراکم ریشه (کراوچنو و همکاران، 1994) و در نهایت افزایش نفوذپذیری ریشه، فعالیت‌های فسفاتازی (عبدالفتاح و محمدین، 2000) و جذب عنصر غذایی فسفر و انتقال آن به اندام هوایی گیاه شدند (باشان و دی- باشان، 2005). بسیاری از گونه‌های *Streptomyces* توان تولید این ترکیبات ذکر شده را دارا هستند (دیمکپا و همکاران، 2008)، طوریکه انواعی از باکتری‌های متعلق به جنس *Streptomyces* به عنوان باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR)[4] شناخته شده‌اند (باشان و دی- باشان، 2005).

مشاهده شد که تلقیح قارچ *R. irregularis* به تنهایی در ریشه‌ی شبدر، تنها باعث افزایش غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه شد ولی در رشد ریشه و اندام هوایی گیاه تأثیر معنی‌داری نداشت و در تلقیح توأم با گونه‌ی *S. albogriseus* تمامی پارامترهای رشدی اندازه-گیری شده‌ی گیاه (وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی و غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی) به بیشترین مقدار رسید. همچنین در تلقیح توأم با گونه‌های *S. griseus* و *S.* $sp_2$ تنها وزن خشک اندام هوایی و غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی افزایش یافت. احتمالاً گونه‌های *S. griseus* و *S.* $sp_2$ قادر به بالا بردن پتانسیل قارچ *R. irregularis* در افزایش توانایی جذب آب توسط گیاه نبوده است. این دو گونه با وجود افزایش کلنیزه شدن و فراوانی اندام‌های قارچی در ریشه تأثیر معنی‌داری بر وزن تر اندام هوایی و وزن تر و خشک ریشه‌ی گیاه نداشته است واین احتمالاً به علت عدم تولید هورمون‌های محرک رشد و متابولیسم

[1] Plant growth- promoting

گیاه و یا تولید ترکیبات بازدارنده توسط این دو گونه بود. عبدالفتاح و محمدین (2000) برهمکنش بین قارچ *R. irregularis* و *S. coelicolor* و اثرات آنها را بر شاخص‌های رشدی گیاه سورگوم بررسی کردند. نتایج حاصل از مطالعه‌ی آنان نشان داد که تلقیح *S. coelicolor* سویه‌ی 2389 در ریشه‌های سورگوم کلنیزه شده با قارچ *R. irregularis* باعث افزایش معنی‌دار کلنیزه شدن ریشه-های میکوریزی شد، در حالیکه تلقیح این *Streptomyces* در ریشه‌های میکوریزی باعث کاهش معنی‌دار شاخص-های رشدی گیاه از قبیل سطح برگ، ارتفاع اندام هوایی گیاه، وزن خشک ریشه و اندام هوایی گیاه شد. آنان پیشنهاد کردند که این اثر منفی *Streptomyces* بر شاخص‌های رشدی گیاه به علت تجزیه‌ی کیتین و تولید آنتی‌بیوتیک توسط این *Streptomyces* است.

## نتیجه‌گیری

از میان گونه‌های بومی *Streptomyces* مورد آزمایش، گونه‌ی *S. albogriseus* را می‌توان بعنوان مهمترین MHB (باکتری کمکی میکوریزا) برای قارچ *R. irregularis* معرفی کرد. زیرا گذشته از افزایش تندش اسپور و رشد هیف قارچ بواسطه‌ی تولید متابولیت‌های ثانویه محرک (طبق یافته‌های پژوهش پیشین)، باعث افزایش کلنیزه شدن و تشکیل همزیستی میکوریزی در ریشه‌ی گیاه شبدر شد و پتانسیل این قارچ میکوریزی را در افزایش توانایی گیاه در جذب آب و فسفر به طور قابل توجهی افزایش داد و منجر به افزایش چشمگیر رشد گیاه شد. در تکثیر صنعتی قارچ (روش درون شیشه‌ای) به منظور تولید اسپورهای تندش یافته برای شروع همزیستی و استقرار قارچ در ریشه استفاده از این گونه‌ی *Streptomyces* به طور قابل توجه مؤثر خواهد بود. همچنین پیشنهاد می‌شود که کارایی این گونه‌ی *Streptomyces* در تولید زادمایه‌ی قارچ *R. irregularis* به عنوان عامل کمکی در تقویت پتانسیل آن بررسی شود.

## فهرست منابع:


1. امیرآبادی، م.، م. اردکانی، ف. رجالی، م. برجی، غ. ثواقبی. 1386. بررسی اثر میکوریزا و ازتوباکتر برمیزان کلنیزاسیون ریشه و صفات مورفولوژیکی ذرت علوفه‌ای (رقم سینگل کراس 704) تحت تأثیر مقادیر مختلف فسفر در اراک. صفحات 99-98. دهمین کنگره علوم خاک ایران، 6-4 شهریورماه ،کرج، ایران.
2. Abdel-Fattah, G. M. and Mohamedin, G. M. 2000. Interaction between a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) and *Streotomyces coelicolor* and their effects on sorghum plants grown in soil amended with chitin of braw scales. Biology and Fertility of Soils. 32: 401-409.
3. Agnolucci, M., Battini, F., Cristani, C., Giovannetti, M. 2015. Diverse bacterial communities are recruited on spores of different arbuscular mycorrhizal fungal isolates. Biology and Fertility of Soils. 51: 379- 389.
4. Aliasgharzad, N., Pourmirzaei, Z., Dehnad, A. R. and Najafi, N. 2012. *Streptomyces* species favour spore germination and hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungus. International Journal of Agriculture. 2(6): 765-773.
5. Bago, B. and Becard, G. 2002. Bases of the obligate biotrophy of arbuscular mycorrhizal fungi. In: Gianinazzi, S., Schuepp, H., Barea, J. M. and Haselwandter, K. (eds.) Mycorrhizal technology in agriculture. Birkhauser Basel. pp. 33-48.
6. Baniasadi, F., Shahidi Bonjar, G. H., Baghizadeh, A., Karimi Nik, A., Jorjandi, M., Aghighi, S. and Rashid Farokhi, P. 2009. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*, causal agent of sunflower head and stem rot disease, by use of soil borne actinomycetes isolation. American Journal of Agriculture and Biological Sciences. 4(2):146-151.

7. Bashan, Y. and de-Bashan, L. E. 2005. Plant growth-promoting. In: Encyclopedia of soils in the environment. (Editor-in-Chief) Hillel, D., Elsevier, U. K. Oxford. 1:103-115.
8. Cottenie, A. 1980. Soil and plant testing. FAO Soils Bulletin. No. 38 (2) :94-100.
9. Cranenbrouck, S., Voets, L., Bivort, C., Raurent, L., Strullu, D. G. and declerck, S. 2005. Methodologies for in vitro cultivation of arbuscular mycorrhiza fungi with root organs.In: Declerck, S., Strullu, D. G. and Fortin, A.(eds.) In Vitro Culture of Mycorrhizas. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 341-372. Part VII. Volume 4.
10. Cui, J., Bahrami, A. K., Pringle, E. G., Hernandez-Guzman, G., Bender, C. L., Pierce, N. E. and Ausubel, F. M. 2005. *Pseudomonas syringae* manipulates systemic plant defenses ahainst pathogens and herbivores. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 102:1791-1796.
11. Dalpe, Y., de Souza, F. A. and Declerck, S. 2005. Life cycle of *Glomus* species in monoxenic culture.In: Declerck, S., Strullu, D. G. and Fortin, A. (eds.). In Vitro Culture of Mycorrhizas. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 49-71. Part IV. Volume 4.
12. Dimkpa, C. O., Svatos, A., Dabrowska, P., Schmidt, A., Boland, W. and Kothe, E. 2008. Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. Chemosphere. 74:19-25.
13. Douds, D. D., Gadkar, J. V. and Adholeya, A. 2000. Mass production of VAM fungus biofertilizer. In: Mycorrhizal biology, edited by Mukerji, K. J. Kluwer Academic Plenum Publishers.
14. Duponnois, R. and Plenchette, C. 2003. A mycorrhiza helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. Mycorrhiza. 13:85- 91.
15. Fortin, J. A., Becard, G., Declerck, S., Dalpe, Y., St-Arnaud, M., Coughlan, A. P. and Piche, Y. 2002. Arbuscular mycorrhiza on root-organ culture. Canadian Journal of Botanical Research. 80:1-20.
16. Fortin, J. A., Declerck, S. and Strullu, D. G. 2005. In vitro culture of mycorrhizas. In: Declerck, S., Strullu, D. G. and Fortin, A.(eds.). In Vitro Culture of Mycorrhizas. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp.3-14. Part I. Volume 4.
17. Frey-Klett, P., Chavatte, M., Clausse, M. L., Courrier, S. L. E., Roux, C., Aaijmakers, J., Martinotti, M. G., Pierrat, J. C. and Garbye, G. 2005. Ectomycorrhiza symbiosis affects functional diversity of rhizosphere *Fluorescent pseudomonads*. New Phytologist. 165:313-328.
18. Frey-Klett, P., Garbaye, J. and Tarkka, M. T. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. New Phytologist. 176:22-36.
19. Garbaye, J. 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. Tansley review No. 76. New Phytologist. 128:197-210.
20. Giovannini, L., Pallo, M., Agnolucci, M., Avio, L., Sbranu, C., Turrini, A., Giovannetti, M. 2020. Arbuscular ycorrhizal fungi and associated microbiota as plant biostimulants: research strategies for the selection of the best performing inocula. Agronomy. 10, 106.
21. Grandmougin-Ferjani, A., Fontaine, J. and Durand, R. 2005. Carbon metabolism, lipid composition and metabolism in arbuscular mycorrhizal fungi. In: Declerck, S., D. G. Strullu, and A. Fortin.(eds.). In Vitro Culture of Mycorrhizas. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 159-180. Part 9. Volume 4.
22. Hatami, N., Bazgir, E., Sedaghati, E., Darvishnia, M. 2020. The symbiosis study of arbuscular mycorrhizal fungi with some annual herbaceous plants and morphological identification of dominant species of these fungi in kerman province. Biological Journal of Microorganism. 9th year, No. 33.
23. Jabaji-Hare, S., Deschene, A. and Kendrick, B. 1984. Lipid content and composition of vesicules of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. Mycologia. 76:1024-1030.

24. Kormanik, P. P. and Graw, A. C. Mc. 1982. Quantification of VA mycorrhizae in plant roots. In: Schenck, N. C. (eds.) Methods and principles of mycorrhizal research. American Phytopathological Society. St. Paul. pp.37-45.
25. Kravchenko, L. V., Leonova, E. L. and Trikhonovich, I. A. 1994. Effect of broot exudates of non-legume plants on the response of auxin production by associated diazotroph. Microbial Releases. 2:267-271.
26. Krishna, K. R., Balakrishna, A. N. and Bagyaraj, D. J. 1982. Interaction between a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and *Streptomyces cinnamoeous* and their effects on finger millet. New Phytologist. 92:401-405.
27. Long, L., Zhu, H., Yao, Q., Ai, Y. 2008. Analysis of bacterial communities, associated with spores of *Gigaspora margarita* and *Gigaspora rosea*. Plant and Soil. 310: 1- 9.
28. Mika, T., Tarkka, Sarniguet, A. and Frey-Klett, P. 2009. Inter-kingdom encounters:recent advances in molecular bacterium-fungus interactions. Springer-Verlag. 55:233-243.
29. Nagy, N. E., Fossdal, C. G., Dalen, L. S., Lonneborg, A., Heldal, A. and Johnsen, Q. 2004b. Effects of *Rhizoctonia* infection and drought on peroxidase and chitinase activity in Norway spruce (*Picea abies*). Physiologia Plantarum. 120:465-473.
30. Norris, I. R., Read, D. J. and Varma, A. K. 1992. Methods in Microbiology. Techniques for Study of Mycorrhiza. Academic press, London. Volume 24.
31. Olsson, P. A., Rahm, J. and Aliasgharzad, N. 2010. Carbon dynamics in mycorrhizal symbioses in linked to carbon costs and phosphorus benefits. FEMS Microbiology Ecology. 72:123- 131.
32. Rorisons, A. 1987. Method Sheet 3 Nutrient Solution, recipe obtained from Sheffield University.
33. Schrey, S. D., Schellhammer, M., Ecke, M., Hampp, R. and Tarkka, M.T. 2005. Mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* AcH505 induces differential gene expression in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. New Phytologist. 168:205-216.
34. Sharma, M. Sc. M. 2008. A functional study on the multilateval symbiosis of the fungal order *Sebacinales* with plant hosts and bacteria. Dissertation zur erlangung des doctor grades.
35. Tarkka, M. T., Sarniguet, A. and Frey- Klett, P. 2009. Inter- Kingdom encounters: recent advances in molecular bacterium- fungus interactions. Current Genetics. 55: 233- 243.
36. Thomas, J., Aspray, E., Eirian, Jones, John, M., Gary, D. and Bending. 2005. Impotance of mycorrhization helper bacteria cell density and metabolite localization for the *Pinus sylvestris-Lactarius rufus* symbiosis. FEMS Microbiology Ecology. 1:1-9.
37. Tylka, G. L., Hussey, R. S. and Roncadori. R. W. 1991. Axenic germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: Effects of selected *Streptomyces* species. Phytopathology. 81:751-754.

# بررسی خصوصیات محرک رشدی جدایه‌های بومی *Azotobacter* و تأثیر تلقیح آنها در شرایط تنش شوری بر رشد ذرت

هوشنگ خسروی[1]

دانشیار پژوهش مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران؛ **hhosravi@areeo.ac.ir**

دریافت: **99/7/19** و پذیرش: **1400/3/19**

## چکیده

**بخش زیادی از خاک‌های ایران دارای درجات مختلفی از شوری بوده بطوریکه تولید محصول در این شرایط تنشی دارای محدودیت زیادی است. باکتری *Azotobacter* می‌تواند رشد گیاهان را توسط ساز و کارهای مختلف تحریک نمایند. تلقیح گیاهان با جدایه‌های برتر بومی این باکتری که با مناطق شور سازگار هستند ممکن است تحمل گیاه به تنش شوری را افزایش دهد. در این مطالعه، 20 جدایه *Azotobacter* بومی خاک‌های ایران از نظر توانایی حل‌کنندگی فسفات‌های نامحلول، آزادسازی پتاسیم، تولید اکسین و سیدروفور مورد بررسی قرار گرفتند. توانایی تحمل به شوری جدایه‌ها در محیط کشت باکتری و در هدایت الکتریکی 10، 20، 30، 40 و 50 دسی‌زیمنس بر متر بررسی شد. شش جدایه منتخب در سه سطح شوری در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح بلوک کامل تصادفی و در سه تکرار بر رشد ذرت در شرایط گلخانه‌ای بررسی شدند. تنش شوری از طریق آبیاری با آب دارای هدایت الکتریکی 0/36 (آب معمولی)، 3 و 6 دسی‌زیمنس بر متر اعمال شد. نتایج آزمایشگاهی نشان داد که جدایه‌های Az63، Az69 و Az70 مؤثرترین جدایه‌ها از نظر توانایی حل‌کنندگی فسفات‌ها، آزادسازی پتاسیم و تولید سیدروفور بودند. همه جدایه‌ها در هدایت الکتریکی 10 و بیشتر جدایه‌ها در 20 دسی‌زیمنس بر متر به خوبی رشد کردند و دو جدایه Az22 و Az66 دارای توانایی رشد در 50 دسی‌زیمنس بر متر نیز بودند. نتایج آزمون گلخانه‌ای نشان داد که تلقیح با Az69 در حالت آبیاری با آب معمولی نسبت به شاهد بدون تلقیح، وزن خشک بلال را 64 درصد افزایش داد. تلقیح اثر معنی‌داری بر شاخص‌های رشد ذرت در حالت آبیاری با آب دارای هدایت الکتریکی 3 و 6 دسی‌زیمنس بر متر نداشت. در این پژوهش جدایه Az69 برای بررسی‌های تکمیلی انتخاب شد.**

**واژه‌های کلیدی:** محرک رشد، باکتری، تلقیح، شوری، هدایت الکتریکی.

[1]. نویسنده مسئول، آدرس :کرج، مشکین دشت، بلوار امام خمینی، ص .پ. 311-31785

**مقدمه**

شوری در کشاورزی عبارت از غلظت‌های بالای نمک‌های محلول در ناحیه اطراف ریشه است که در نهایت سبب کاهش رشد و عملکرد گیاه می‌شوند. این غلظت‌های بالای نمک، سبب کاهش قدرت جوانه زنی و کاهش جذب آب و همچنین موجب جذب نامتعادل عناصر غذایی ضروری توسط ریشه و کاهش رشد و عملکرد گیاه می‌شوند. سطح کل زمین‌های مبتلا به شوری در ایران حدود 34 میلیون هکتار برآورد شده است (بی‌نام 2، 1381). از مجموع 18 میلیون هکتار اراضی قابل کشت ایران حدود 6/8 میلیون هکتار آنها مبتلا به درجات مختلف شوری هستند (مؤمنی، 1388). کارهای زیادی برای توسعه گیاهان متحمل به شوری انجام شده است اما تاکنون موفقیت چندانی حاصل نشده است (مونس و تستر، 2008). بنابراین کاهش اثرات منفی شوری بر رشد گیاه بویژه استفاده از راهکارهای مبتنی بر کشاورزی پایدار مورد توجه محققین و دانشمندان است.

ریز جانداران مفید خاک از طریق ساز و کارهای مختلف بر مورفولوژی ریشه تأثیر گذاشته که برآیند آنها سبب بهبود رشد گیاهان می‌شوند. برخی از سویه‌های این ریزجانداران در کاهش اثرات تنشی در گیاهان موفقیت-هایی نشان داده‌اند. در آرژانتین از *Azospirillum* به عنوان مایه تلقیح برای مقابله با تنش شوری و خشکی استفاده می‌شود (گارسیا و همکاران، 2017). در بین باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه، *Azotobacter* به دلیل توزیع گسترده در خاک‌ها و تولید طیف متنوعی از متابولیت‌ها به‌ویژه در ریزوسفر گیاهان دارای اهمیت ویژه‌ای است. این باکتری دارای توانایی تشکیل کیست[1] است که آن را در برابر شرایط نامساعد محیطی حفظ می‌کند. از بارزترین خصوصیات *Azotobacter* توانایی تثبیت نیتروژن مولکولی، تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه و توانایی حل‌کنندگی فسفات‌های نامحلول است (خسروی، 1393).

ذرت (Zea mays. L) از جمله گیاهان زراعی مهم در ایران بوده که برای تغذیه انسان، دام و کاربردهای صنعتی کشت می‌شود. سطح زیر کشت ذرت در ایران حدود 360 هزار هکتار است (بی‌نام 1، 1399). همانند سایر گیاهان، تنش شوری رشد ذرت را تحت تأثیر قرار می‌دهد. جیانگ و همکاران (2006) گزارش کردند که با افزایش تنش شوری میزان وزن خشک و طول گیاهچه-های ذرت به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. عبدل‌غنی و همکاران (2015) اثر تلقیح ذرت با *Pseudomonas fluorescens*، *Pseudomonas putida* و *Azotobacter vinelandii* در شرایط تنش شوری معنی‌دار گزارش کرده-اند. تلقیح بذر چاودار با *Pseudomonas* sp. دارای توانایی تولید آنزیم دآمیناز سبب تحمل گیاه به تنش شوری شده و وزن خشک ریشه و اندام هوایی به طور معنی‌داری نسبت به شاهد بدون تلقیح افزایش یافت (جی و هوانگ، 2008). گزارش شده که تلقیح ذرت با *Azotobacter* و *Azospirillum* تحت تنش خشکی نسبت به تیمار شاهد بالاترین میزان ارتفاع بوته، ردیف بلال، تعداد دانه و وزن هزار دانه را ایجاد کرده است (ناصری و همکاران، 2013). گزارش شده که تلقیح ذرت با *Azotobacter* موجب کاهش اثرات تنش خشکی شده است (خسروی، 1398). اثر تلقیح گندم با سویه‌های ریزوبیوم در شرایط تنش شوری 7 و 10 دسی‌زیمنس بر متر بر رشد و جذب عناصر غذایی معنی‌دار گزارش شده است (خسروی و همکاران،1387). گزارش شده که تلقیح کلزا با *Pseudomonas* موجب کاهش اثرات تنشی حاصل از شرایط شور در این گیاه شده است (اخگر و همکاران، 1387).

هدف از انجام این پژوهش در مرحله اول غربالگری جدایه‌های بومی *Azotobacter* از نظر خصوصیات محرک رشدی و همچنین تحمل به سطوح مختلف شوری آنها و مشخص نمودن جدایه‌های برتر بود.

1. Cyst

هدف نهایی از این مطالعه، بررسی اثر تلقیح جدایه‌های مؤثر در شرایط تنش شوری بر رشد ذرت بود.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه، تعداد 20 جدایه *Azotobacter* بومی خاک‌های ایران از نظر خصوصیات محرک رشدی شامل توانایی حل‌کنندگی فسفات‌های آلی و معدنی نامحلول، آزادسازی پتاسیم، توانایی تولید تولید اکسین و سیدروفور، مورد بررسی قرار گرفتند. این جدایه‌ها از بانک ریزجانداران مؤسسه تحقیقات خاک و آب تهیه شدند. برای رشد *Azotobacter*، از محیط کشت وینوگرادسکی شامل دو جزء به شرح زیر استفاده شد: جزء اول شامل: فسفات هیدروژن دی‌پتاسیم، 5، سولفات منیزیم؛ 2/5، کلرید سدیم؛ 2/5، سولفات آهن III؛ 0/05 و سولفات منگنز؛ 0/05 گرم در یک لیتر آب مقطر حل و پ‌هاش محیط در حدود 7/3 تنظیم و به عنوان محلول ذخیره در یخچال نگهداری شد. جزء دوم شامل: مقدار 0/05 گرم از هر یک از املاح مولیبدات پتاسیم، برات سدیم، نیترات کبالت، سولفات مس و سولفات روی در یک لیتر آب مقطر حل و به عنوان محلول ذخیره در یخچال نگهداری شد. محیط کشت نهایی از اختلاط 50 میلی‌لیتر از محلول اول، 10 گرم مانیتول، یک میلی‌لیتر محلول دوم و 0/5 گرم کربنات کلسیم تهیه شد (کویکندال، 2015).

توانایی حل‌کنندگی فسفات‌های معدنی و آلی نامحلول در محیط مایع با استفاده از اسپکتروفتومتری در طول موج 430 نانومتر اندازه‌گیری شد. برای این منظور از محیط کشت اسپربر حاوی 2/5 گرم در لیتر تری‌کلسیم فسفات $Ca_3(PO_4)_2$ برای فسفات معدنی و اسید فیتیک برای فسفات آلی استفاده شد (اسپربر، 1958). توانایی آزادسازی پتاسیم با استفاده از محیط کشت مایع الکساندورف[1] دارای کانی‌های میکای سفید (موسکویت) و میکای سیاه (بیوتیت) سنجش و مقدار پتاسیم آزاد شده با روش نشر شعله‌ای[2] اندازه‌گیری شد (مینا و همکاران، 2015 و ژانگ و کونگ، 2014). مقدار تولید اکسین جدایه‌ها با استفاده از روش سالکوفسکی و اسپکتروفتومتری در طول موج 535 نانومتر با بکارگیری غلظت‌های مختلف IAA بعنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (بنت و همکاران، 2001). سیدروفور با استفاده از محیط کشت کروم-آزورول-اس- آگار (CAS ،B.A[3]) و بر اساس محاسبه نسبت قطر هاله نارنجی رنگ به قطر کلنی اندازه‌گیری شد (شوین و نیلند، 1987).

بر اساس نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی تعداد 14 جدایه برای ادامه پژوهش انتخاب شدند. تحمل سویه-های انتخابی به شوری در محیط کشت مایع وینوگرادسکی در هدایت الکتریکی 10، 20، 30، 40 و 50 دسی‌زیمنس‌بر متر حاصل از کلرور سدیم مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها در دمای 28 درجه سانتیگراد بر روی شیکر انکوباتور دورانی به مدت یک هفته نگهداری و در نهایت مقدار OD نمونه‌ها در طول موج 600 نانومتر قرائت شد. کلیه بررسی‌های آزمایشگاهی مذکور در سه تکرار انجام شد.

تعداد 6 جدایه شامل Az11، Az63، Az69، Az70 که از نظر توانایی حل‌کنندگی فسفات‌های نامحلول، آزادسازی پتاسیم، تولید سیدروفور و تولید اکسین دارای نتایج بهتری بودند جهت انجام آزمون گلخانه‌ای انتخاب شدند. همچنین دو جدایه Az22 و Az66 که بیشترین تحمل به شوری را در شرایط آزمایشگاهی داشتند نیز انتخاب شدند. برای تهیه مایه تلقیح، از محیط مایع وینوگرادسکی حاوی جدایه استفاده شد

آزمایش گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل و بر پایه طرح بلوک کامل تصادفی و در سه تکرار اجرا شد. خاک مورد استفاده از مزرعه مؤسسه تحقیقات خاک و آب تهیه شد. هر گلدان با 10 کیلوگرم خاک پر شد. بذر ذرت مورد استفاده، رقم سینگل کراس 704 بود که از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه شد. در هر

[1] Aleksandrov

[2] Flame Photometer

[3] CAS Blue Agar

گلدان، چهار عدد بذر ذرت جوانه‌دار شده کشت شد که بعد از یک هفته گیاهان تنک شده و دو گیاه در هر گلدان نگهداری شد. عمل تلقیح در هنگام کاشت و با یک میلی‌لیتر به ازای هر بذر از مایه‌تلقیح با جمعیت حدود $1/5 \times 10^7$ سلول در میلی‌لیتر انجام شد. تیمارهای تلقیحی شامل جدایه‌های منتخب Az11، Az22، Az63، Az66، Az69، Az70 و همچنین مخلوطی از شش جدایه (Mix) بود.

شوری در سه سطح شامل آبیاری با آب معمولی با هدایت الکتریکی 0/36 دسی‌زیمنس بر متر (S0)، شوری سه دسی‌زیمنس بر متر (S3) و شوری شش دسی‌زیمنس بر متر (S6) اعمال شد. برای اعمال تنش شوری با رعایت نسبت جذب سدیم (SAR) از سه کاتیون سدیم، کلسیم و منیزیم که کاتیون‌های غالب خاک‌های شور هستند استفاده شد. این کاتیون‌ها از نمک‌های کلرید سدیم (NaCl)، سولفات منیزیم ($MgSO_4.6H_2O$) و کلرید کلسیم ($CaCl_2.2H_2O$) تأمین شدند. برای این منظور SAR آب آبیاری 10 در نظر گرفته شد. نسبت مولی کاتیون‌ها از فرمول زیر محاسبه شد:

$$SAR = \frac{Na^+}{\sqrt{\frac{1}{2}(Ca^{2+} + Mg^{2+})}}$$

تیمار شاهد با آب معمولی ایستگاه تحقیقات خاک و آب کرج با هدایت الکتریکی 0/36 دسی‌زیمنس بر متر و پ هاش 7/94 آبیاری شد. در طول دوره کشت، برای همه تیمارها رطوبت خاک بین 80 تا 100 درصد ظرفیت مزرعه به روش وزنی تأمین شد. بعد از 120 روز، گیاه از محل سطح خاک برداشت شد. فاکتورهای وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک بلال، محتوای کلروفیل و ارتفاع گیاه اندازه‌گیری شدند. شاخص کلروفیل با استفاده از دستگاه کلروفیل سنج مدل Konica Minolta- SPAD 502 اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار DSAASTAT.XLS. Version 2010.5.04. و با روش One Way ANOVA انجام شد. میانگین‌ها با روش LSD[1] و در سطح احتمال 1 و 5 درصد مقایسه شدند.

## نتایج

### خصوصیات محرک رشدی

نتایج تجزیه واریانس مقادیر حل‌کنندگی فسفات‌های معدنی و آلی نامحلول، آزادسازی پتاسیم، تولید اکسین و سیدروفور توسط جدایه‌ها در جدول 1 ارائه شده است. بر اساس نتایج بدست آمده، جدایه‌های *Azotobacter* از نظر خصوصیات محرک رشدی مذکور دارای اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال 1 درصد نشان دادند.

### توانایی حل‌کنندگی فسفات‌های معدنی و آلی نامحلول

در جدول 2 مقایسه میانگین‌ها در مورد توانایی جدایه‌ها در حل‌کنندگی فسفات‌های معدنی و آلی نامحلول ارائه شده است. بهترین جدایه‌ها از نظر توانایی حل‌کنندگی فسفات‌های معدنی به ترتیب مربوط به جدایه‌های Az63، Az70، Az62 و Az69 بود. همچنین بیشترین مقادیر حل‌کنندگی فسفات‌های آلی به ترتیب مربوط به جدایه‌های Az70، Az69 و Az63 بود.

[1]. The least significant differences

**جدول 1- تجزیه واریانس خصوصیات محرک رشدی جدایه‌ها**

| منابع تغییرات | حل‌کنندگی فسفات معدنی | حل‌کنندگی فسفات آلی | آزادسازی پتاسیم | تولید اکسین | تولید سیدروفور |
|---|---|---|---|---|---|
| باکتری | 67062/43** | 1474/02** | 10/29** | 297/73** | 64/60** |
| خطا | 308/53 | 2/47 | 0/76 | 25/90 | 0/11 |
| ضریب تغییرات | 10/65 | 1/63 | 9/73 | 9/73 | 6/14 |

** معنی‌دار درسطح احتمال 1 درصد

**جدول 2 -مقایسه میانگین توانایی حل‌کنندگی فسفات معدنی و فسفات آلی توسط جدایه‌ها**

| جدایه باکتری | توانایی حل‌کنندگی فسفات‌های معدنی ($\mu g\ ml^{-1}$) | توانایی حل‌کنندگی فسفات‌های آلی ($\mu g\ ml^{-1}$) |
|---|---|---|
| Az9 | 12/96 d-h | 12/69 h |
| Az10 | 9/81 h | 12/75 h |
| Az11 | 11/22 f-h | 10/27 kl |
| Az12 | 11/65 f-h | 10/90 j |
| Az22 | 17/31 c-f | 15/28 f |
| Az26 | 17/20 c-g | 9/96 l |
| Az42 | 11/08 gh | 10/61 jk |
| Az53 | 14/19 d-h | 11/65 i |
| Az58 | 16/92 d-g | 20/93 c |
| Az62 | 23/33 c | 16/22 e |
| Az63 | 133/33 a | 22/42 b |
| Az66 | 18/63 cd | 16/46 e |
| Az69 | 23/30 c | 22/70 b |
| Az70 | 117/74 b | 28/95 a |
| Az71 | 18/59 ce | 17/60 d |
| Az1 | 11/37 fh | 13/12 gh |
| Az2 | 12/47 eh | 13/58 g |
| Az3 | 12/58 d-h | 15/28 f |
| Az4 | 12/59 d-h | 12/06 i |
| Az5 | 15/10 d-h | 10/74 jk |
| Blank | - | - |

**توانایی آزادسازی پتاسیم**

مقایسه میانگین داده‌های مربوط به توانایی آزادسازی پتاسیم توسط جدایه‌های مختلف در جدول 3 ارائه شده است. بهترین جدایه‌ها از نظر توانایی آزادسازی پتاسیم در میکای موسکویت جدایه‌هایAz63 Az3، Az69، و Az22 و در میکای بیوتیت جدایه‌های Az63 ، Az70 و Az22 بودند.

**توانایی تولید اکسین**

مقایسه میانگین داده‌های مقدار اکسین تولید شده در جدول 3 نشان داده شده است. بر این اساس

جدایه‌ها از نظر توانایی تولید اکسین اختلاف معنی‌داری داشتند. بهترین جدایه در حضور ال-تریپتوفان، Az11 و بدون حضور ال-تریپتوفان، Az42 بود.

**توانایی تولید سیدروفور**

مقایسه میانگین داده‌های مربوط به تولید سیدروفور توسط جدایه‌های مختلف در جدول 3 ارائه شده است. بر اساس نتایج بدست آمده برخی جدایه‌ها دارای توانایی تولید سیدروفور بودند. جدایه‌های Az69، Az63 و Az70 به ترتیب بهترین جدایه‌ها از نظر توانایی تولید سیدروفور بودند.

**جدول 3- مقایسه میانگین داده‌های مربوط به توانایی آزادسازی پتاسیم، تولید سیدروفور و اکسین**

| جدایه باکتری | آزادسازی پتاسیم ($\mu g\ ml^{-1}$) | | تولید سیدروفور (قطر هاله به کلونی) | تولید اکسین ($\mu g\ ml^{-1}$) سطح ال-تریپتوفان | |
|---|---|---|---|---|---|
| | بیوتیت | موسکویت | | 0mg $l^{-1}$ | 50mg $l^{-1}$ |
| Az9 | 11/99 $^{j-l}$ | 14/68 $^{c-e}$ | 0 $^{g}$ | 4/47 $^{l-p}$ | 4/93 $^{l-p}$ |
| Az10 | 11/21 $^{l}$ | 14/20 $^{d-f}$ | 0 $^{g}$ | 7/72 $^{c-f}$ | 7/88 $^{b-e}$ |
| Az11 | 14/05 $^{d-g}$ | 14/05 $^{d-g}$ | 1/40 $^{ef}$ | 8/39 $^{a-c}$ | 9/11 $^{a}$ |
| Az12 | 11/52 $^{k-l}$ | 14/05 $^{d-g}$ | 0/47 $^{e}$ | 8/00 $^{b-e}$ | 8/21 $^{b-d}$ |
| Az22 | 16/1 $^{a-c}$ | 15/30 $^{b-d}$ | 1/29 $^{f}$ | 4/21 $^{n-q}$ | 5/23 $^{j-n}$ |
| Az26 | 11/05 $^{l}$ | 14/05 $^{d-g}$ | 1/31 $^{f}$ | 2/95 $^{r}$ | 3/18 $^{q-r}$ |
| Az42 | 11/21 $^{l}$ | 14/68 $^{c-e}$ | 0 $^{g}$ | 9/48 $^{a}$ | 8/16 $^{b-d}$ |
| Az53 | 14/36 $^{c-f}$ | 14/36 $^{c-f}$ | 0 $^{g}$ | 4/92 $^{k-p}$ | 4/86 $^{k-p}$ |
| Az58 | 14/68 $^{ce}$ | 12/ $^{f-l}$78 | 0 $^{g}$ | 4/92 $^{j-n}$ | 4/31 $^{m-q}$ |
| Az62 | 14/52 $^{cf}$ | 14/36 $^{c-f}$ | 2/15 $^{c}$ | 5/54 $^{i-l}$ | 6/83 $^{e-h}$ |
| Az63 | 15/63 $^{ab}$ | 16/57 $^{a}$ | 2/48 $^{b}$ | 6/03 $^{g-k}$ | 4/07 $^{d-g}$ |
| Az66 | 12/31 $^{g-l}$ | 14/84 $^{b-e}$ | 0 $^{g}$ | 4/71 $^{l-p}$ | 5/02 $^{k-o}$ |
| Az69 | 14/36 $^{c-f}$ | 14/84 $^{b-e}$ | 3/26 $^{a}$ | 5/84 $^{g-l}$ | 6/27 $^{g-i}$ |
| Az70 | 17/20 $^{a}$ | 15/63 $^{ab}$ | 2/12 $^{c}$ | 6/40 $^{g-j}$ | 6/32 $^{g-i}$ |
| Az71 | 12/15 $^{h-l}$ | 13/89 $^{d-h}$ | 0 $^{g}$ | 3/34 $^{q-r}$ | 3/77 $^{p-r}$ |
| Az1 | 12/15 $^{h-l}$ | 13/26 $^{e-k}$ | 0 $^{g}$ | 4/96 $^{k-p}$ | 5/51 $^{i-m}$ |
| Az2 | 11/36 $^{l}$ | 13/42 $^{e-j}$ | 0 $^{g}$ | 5/62 $^{h-l}$ | 5/99 $^{g-k}$ |
| Az3 | 12/78 $^{l}$ | 16/57 $^{a}$ | 0 $^{g}$ | 5/87 $^{g-l}$ | 6/32 $^{g-j}$ |
| Az4 | 11/36 $^{l}$ | 13/41 $^{e-j}$ | 1/71$^{d}$ | 4/96 $^{k-p}$ | 4/15 $^{n-r}$ |
| Az5 | 14/68 $^{d-i}$ | 14/21 $^{d-f}$ | 0 $^{g}$ | 6/32 $^{g-j}$ | 6/58 $^{f-i}$ |
| Blank | 11/82 $^{j-l}$ | 11/92 $^{j-l}$ | - | - | - |
| Blank $H_2O$ | 11/57 $^{j-l}$ | 11/90 $^{j-l}$ | - | - | - |

**توانایی تحمل جدایه‌ها به شوری**

نتایج تجزیه واریانس داده‌های $OD_{600}$ مربوط به توانایی رشد جدایه‌های مختلف *Azotobacter* در مقادیر مختلف هدایت الکتریکی در جدول 4 ارائه شده است. بر اساس این جدول در همه مقادیر مختلف شوری اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال 1 درصد مشاهده شد.

**جدول 4- تجزیه واریانس داده‌های $OD_{600}$ جدایه‌های مختلف در مقادیر مختلف هدایت الکتریکی (دسی‌زیمنس بر متر)**

| منابع تغییرات | EC=10 | EC=20 | EC=30 | EC=40 | EC=50 |
|---|---|---|---|---|---|
| باکتری | 2/33** | 1/55** | 0/75** | 0/90** | 0/05** |
| خطا | 0/02 | 0/02 | 0/01 | 0/001 | 0/002 |
| ضریب تغییرات | 6/1 | 9/69 | 22/53 | 4/87 | 6/84 |

** معنی‌دار درسطح احتمال 1 درصد

**مقایسه میانگین توانایی رشد جدایه‌ها در EC=10 دسی‌زیمنس بر متر**

مقایسه میانگین $OD_{600}$ مربوط به جدایه‌های مختلف *Azotobacter* در EC=10 دسی‌زیمنس بر متر به روش LSD در جدول 5 ارائه شده است. همانطوریکه جدول نشان می‌دهد همه جدایه‌ها با نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند. بنابراین این جدایه‌ها برای آزمون تحمل به سطح شوری بالاتر (EC=20) انتخاب شدند.

**جدول 5– مقایسه میانگین داده‌های $OD_{600}$ جدایه‌های مختلف در EC=10 دسی‌زیمنس بر متر**

| ردیف | تیمار | میانگین | گروه های همگن |
|---|---|---|---|
| 1 | Az26 | 3/03 | a |
| 2 | Az62 | 3/00 | a |
| 3 | Az 2 | 2/98 | a |
| 4 | Az66 | 2/98 | a |
| 5 | Az 4 | 2/94 | a |
| 6 | Az12 | 2/92 | a |
| 7 | Az71 | 2/91 | a |
| 8 | Az22 | 2/88 | a |
| 9 | Az70 | 2/60 | ab |
| 10 | Az58 | 2/23 | bc |
| 11 | Az63 | 2/01 | c |
| 12 | Az11 | 1/96 | c |
| 13 | Az3 | 1/34 | d |
| 14 | Az69 | 1/34 | d |
| 15 | Blank | 0/00 | e |

**مقایسه میانگین توانایی رشد جدایه‌ها در EC=20 دسی-زیمنس بر متر**

مقایسه میانگین $OD_{600}$ مربوط به جدایه‌های مختلف *Azotobacter* در EC=20 دسی‌زیمنس بر متر به روش LSD در سطح آماری 5 درصد در جدول 6 ارائه شده است. بر اساس نتایج جدول مذکور، تعداد 12 جدایه که با شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند برای آزمون EC بالاتر (EC=30) انتخاب شدند

**جدول 6- مقایسه میانگین $OD_{600}$ جدایه‌های مختلف در EC=20 دسی‌زیمنس بر متر**

| ردیف | تیمار | میانگین | گروه های همگن |
|---|---|---|---|
| 1 | Az66 | 2/27 | a |
| 2 | Az22 | 2/15 | a |
| 3 | Az12 | 2/00 | a |
| 4 | Az4 | 1/98 | a |
| 5 | Az62 | 1/59 | b |
| 6 | Az69 | 1/52 | bc |
| 7 | Az71 | 1/46 | bcd |
| 8 | Az63 | 1/22 | cde |
| 9 | Az3 | 1/19 | cde |
| 10 | Az11 | 1/12 | de |
| 11 | Az26 | 1/02 | ef |
| 12 | Az70 | 0/66 | f |
| 13 | Az2 | 0/29 | g |
| 14 | Az58 | 0/18 | g |
| 15 | Blank | 0/00 | g |

**مقایسه میانگین توانایی رشد جدایه‌ها در EC=30 دسی-زیمنس بر متر**

مقایسه میانگین $OD_{600}$ جدایه‌های مختلف *Azotobacter* در EC=30 دسی‌زیمنس بر متر به روش LSD در سطح آماری 5 درصد در جدول 7 ارائه شده است. بر اساس نتایج جدول مذکور، تعداد 6 جدایه که با شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند برای آزمون EC بالاتر (EC=40) انتخاب شدند.

**جدول 7- مقایسه میانگین $OD_{600}$ جدایه‌های مختلف در EC=30 دسی‌زیمنس بر متر**

| ردیف | تیمار | میانگین | گروه های همگن |
|---|---|---|---|
| 1 | Az66 | 1/34 | a |
| 2 | Az12 | 1/09 | ab |
| 3 | Az22 | 1/05 | abc |
| 4 | Az69 | 0/93 | bcd |
| 5 | Az62 | 0/88 | bcd |
| 6 | Az11 | 0/72 | cd |
| 7 | Az62 | 0/60 | d |
| 8 | Az70 | 0/14 | e |
| 9 | Az71 | 0/08 | e |
| 10 | Az26 | 0/05 | e |
| 11 | Az14 | 0/00 | e |
| 12 | Az63 | 0/00 | e |
| 13 | Blank | 0/00 | e |

**مقایسه میانگین توانایی رشد جدایه‌ها در EC=40 دسی-زیمنس بر متر**

مقایسه میانگین $OD_{600}$ مربوط به جدایه‌های مختـلف *Azotobacter* در EC=40 دسی‌زیمنس بر متر به روش LSD در سطح آماری 5 درصد در جدول 8 ارائه شده است. بر اساس نتایج جدول مذکور، تعداد 6 جدایه که با شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند برای آزمون EC بالاتر (EC=50) انتخاب شدند.

**جدول 8- مقایسه میانگین $OD_{600}$ جدایه‌های مختلف در EC=40 دسی‌زیمنس بر متر**

| ردیف | تیمار | میانگین | گروه های همگن |
|---|---|---|---|
| 1 | Az62 | 1/49 | a |
| 2 | Az22 | 1/83 | b |
| 3 | Az26 | 1/02 | c |
| 4 | Az66 | 0/95 | c |
| 5 | Az12 | 0/73 | d |
| 6 | Az69 | 0/36 | e |
| 7 | Az11 | 0/00 | f |
| 8 | Blank | 0/14 | f |

**مقایسه میانگین توانایی رشد جدایه‌ها در EC=50 دسی-زیمنس بر متر**

مقایسه میانگین $OD_{600}$ مربوط به جدایه‌های مختـلف *Azotobacter* در EC=50 دسی‌زیمنس بر متر به روش LSD در سطح آماری 5 درصد در جدول 9 ارائه شده است. بر اساس نتایج جدول مذکور، دو جدایه با شاهد اختلاف معنی داری داشتند.

**خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک**

خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در کشت گلخانه‌ای در جدول 10 ارائه شده است.

**جدول 9- مقایسه میانگین $OD_{600}$ جدایه‌های مختلف در EC=50 دسی‌زیمنس بر متر**

| ردیف | تیمار | میانگین | گروه های همگن |
|---|---|---|---|
| 1 | Az22 | 1/50 | a |
| 2 | Az66 | 1/18 | a |
| 3 | Az26 | 0/00 | b |
| 4 | Az62 | 0/00 | b |
| 5 | Az69 | 0/00 | b |
| 6 | Blank | 0/00 | b |

**جدول 10- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در کشت گلخانه‌ای**

| pH | EC | بافت | رس | شن | سیلت | کربن‌آلی (OC) | رطوبت ظرفیت مزرعه (FC) | رطوبت پژمردگی دائم (PWP) | کربنات کلسیم معادل (CCE) | نیتروژن کل (N) | پتاسیم قابل جذب (K) | فسفر قابل جذب (P) | روی قابل جذب (Zn) | مس قابل جذب (Cu) | آهن قابل جذب (Fe) | منگنز قابل جذب (Mn) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | $dS\ m^{-1}$ | | % | | | | | | | | $mg\ kg^{-1}$ | | | | | |
| 7/54 | 0/393 | لومی شنی | 13/5 | 65 | 21/5 | 0/42 | 3/24 | 4/8 | 10 | 0/04 | 380/30 | 2/8 | 0/5 | 1/2 | 5/3 | 11/9 |

**اثر تیمارهای باکتری و شوری بر شاخص‌های مختلف رشد ذرت**

نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای باکتری و شوری بر وزن خشک اندام هوایی، ارتفاع بوته، وزن خشک بلال و شاخص کلروفیل برگ ذرت در جدول 11 نشان داده شده است. بر اساس جدول مذکور بین سطوح مختلف باکتری و همچنین شوری اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد مشاهده می‌شود.

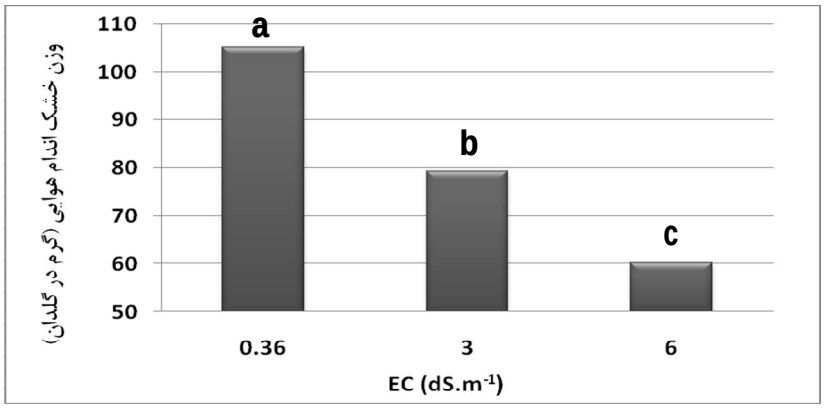
**جدول 11- تجزیه واریانس اثر تیمارهای باکتری و شوری بر شاخص‌های مختلف رشد ذرت**

| | میانگین مربعات | | | |
|---|---|---|---|---|
| منابع | وزن خشک اندام هوایی | ارتفاع بوته | وزن خشک بلال | شاخص کلروفیل برگ |
| باکتری | 130/4$^{**}$ | 147/1$^{ns}$ | 14/816$^{**}$ | 63/101$^{ns}$ |
| شوری | 12266/3$^{**}$ | 32799/2$^{**}$ | 362/732$^{**}$ | 127/128$^{**}$ |
| خطا | 41/4 | 99/2 | 19/097 | 66/118 |
| ضریب تغییرات(cv%) | 7/89 | 8/28 | 40/68 | 25/40 |

ns و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار درسطح احتمال 1 درصد

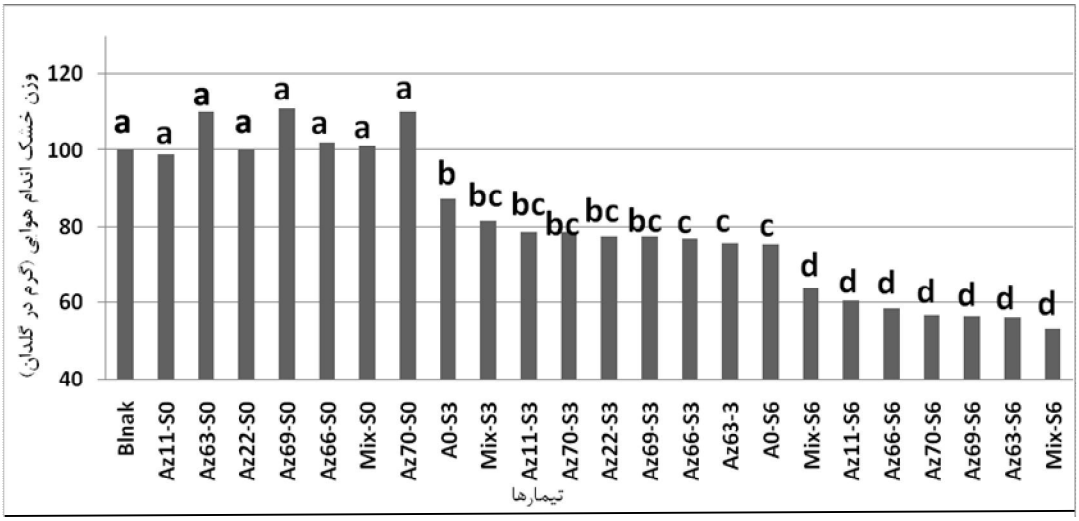
**اثر تیمارهای باکتری و شوری بر وزن خشک اندام هوایی**

مقایسه میانگین‌های اثر ساده شوری بر وزن خشک اندام‌هوایی در شکل 1 نشان داده شده است. شکل نشان می‌دهد که سطوح مختلف شوری بر وزن خشک اندام هوایی اختلاف معنی‌داری داشته‌اند.




**شکل 1- مقایسه میانگین سطوح شوری بر وزن خشک اندام هوایی**

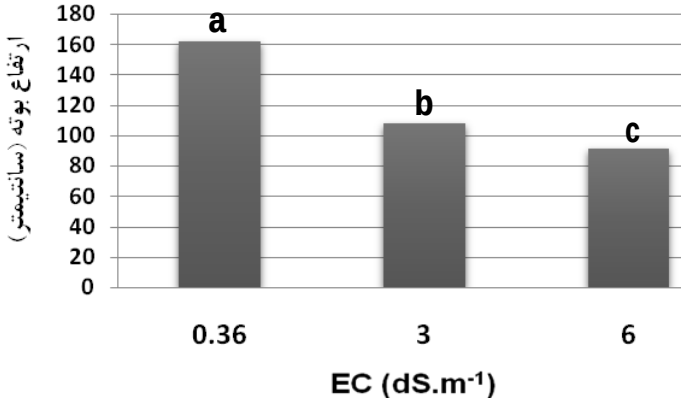
مقایسه میانگین‌تیمارهای باکتری و شوری نشان داد که تلقیح تأثیر معنی‌داری بر وزن خشک اندام هوایی نداشته است (شکل 2).




**شکل 2- مقایسه میانگین اثر تیمارهای باکتری و شوری بر وزن خشک اندام هوایی**

**اثر تیمارهای باکتری و شوری بر ارتفاع بوته**

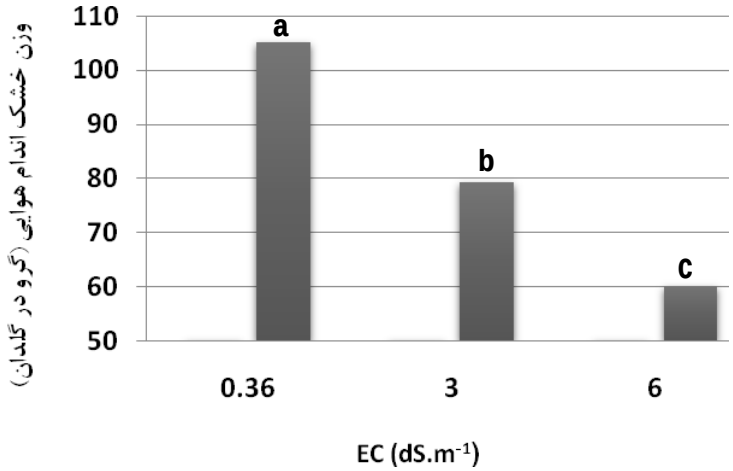
مقایسه میانگین اثر شوری بر ارتفاع بوته در شکل 3 نشان داده شده است. در این شکل شوری 3 دسی‌زیمنس بر متر نسبت به شاهد (شوری 0/36) موجب کاهش حدود 32 درصدی ارتفاع بوته شده است. این کاهش برای شوری 6 دسی‌زیمنس بر متر حدود 54 درصد بوده است.




**شکل 3– اثر شوری بر ارتفاع بوته**

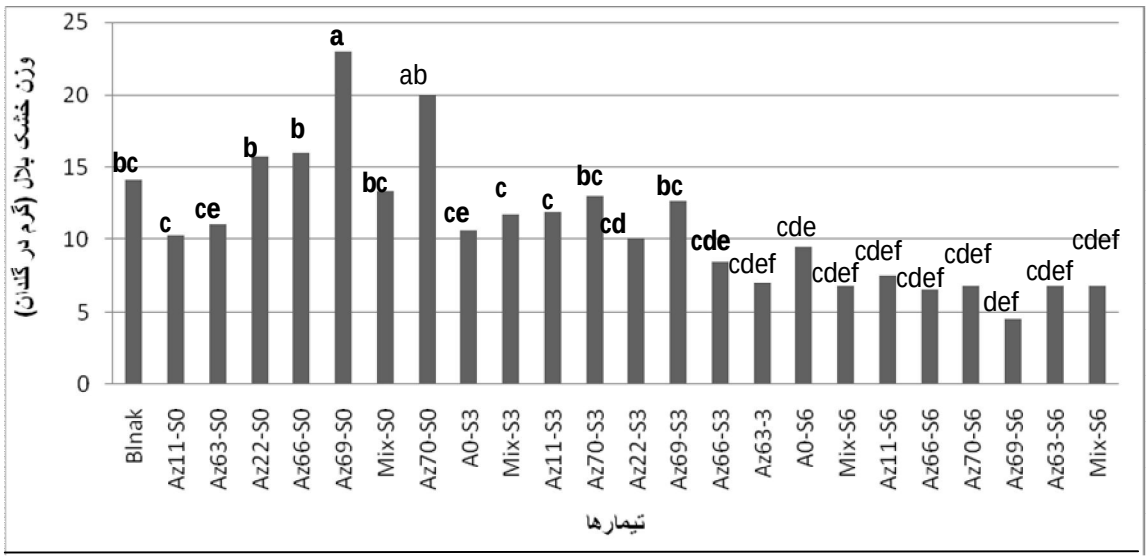
**اثر تیمارهای باکتری و شوری بر وزن خشک بلال**

مقایسه میانگین اثر تیمارهای شوری بر وزن خشک بلال در شکل 4 نشان داده شده است. در این شکل شوری 3 دسی‌زیمنس بر متر نسبت به شاهد (0/36 دسی‌زیمنس بر متر) موجب کاهش حدود 25 درصدی وزن خشک بلال شده است. این کاهش برای شوری 6 دسی‌زیمنس بر متر نسبت حدود 45 درصد بوده است.




**شکل 4- اثر سطوح شوری بر وزن خشک بلال**

مقایسه میانگین اثر تیمارهای باکتری و شوری بر وزن خشک بلال در شکل 5 نشان داده شده است. همانطوریکه از شکل مشخص است جدایه Az69 در تیمارآبیاری با آب معمولی (0/36 دسی‌زیمنس بر متر) اثر معنی‌داری بر وزن خشک بلال داشته است. در تیمار آبیاری با آب شور با EC=3 این جدایه میانگین بالاتری نشان داد اما این افزایش معنی دار نبود.




**شکل 5- مقایسه میانگین اثر تیمارهای باکتری و شوری بر وزن خشک بلال**

**اثر تیمارهای باکتری و شوری بر شاخص کلروفیل برگ**

نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای باکتری و شوری بر شاخص کلروفیل برگ نشان داد که تلقیح تاثیر معنی‌داری بر این شاخص نداشته است (داده‌ها نشان داده نشده است).

**بحث**

علیرغم وجود مقادیر زیاد فسفر کل در خاک‌های ایران، بدلیل مقادیر بالای آهک، بیشتر فسفر آنها به شکل فسفات‌های نامحلول است که نمی‌تواند بوسیله گیاهان جذب شود. توانایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات در انحلال ترکیبات نامحلول به توانایی آنان در کاهش pH

خاک از طریق آزادسازی اسیدهای آلی و پروتون می‌باشد. در این پژوهش جدایه‌های Az69 و Az70 موجب بیشترین حلالیت فسفات‌های آلی و معدنی شدند. گزارش شده که *A. chroococcum* به علت انحلال فسفات‌ها سبب بهبود رشد گندم شده است (کوندو و گاور، 1980). اثر *A. chroococcum* در حل کردن فسفات‌های غیرآلی و افزایش رشد گندم بدین واسطه مثبت گزارش شده است (کومار و نارولا، 1999). اثر تلقیح ازتوباکتر به عنوان باکتری محرک رشد به همراه مواد آلی بر گیاه ذرت بررسی و نتایج نشان داد که قابلیت جذب نیتروژن و فسفر و میزان محصول ذرت به طور قابل توجهی افزایش یافت (هنساودین ،2003). اثر ریزوبیوم و باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر رشد گندم و جذب فسفر مثبت و معنی‌دار گزارش شده است (افضل و بانو، 2008).

جدایه‌های *Azotobacter* بر آزادسازی پتاسیم از دو نوع کانی میکا بیوتیت و موسکویت تأثیر معنی‌داری داشتند (جداول 1 و3). شنگ و هی (2006) بیان کردند که باکتری‌های محرک رشد به سبب ترشح اسیدهای آلی موجب آزادسازی پتاسیم از کانی‌های ایلایت و فلدسپار می‌شوند. میشوستین و همکاران (1981) نیز گزارش دادند که *A. chroococcum* در طی دو هفته حدود هفت درصد پتاسیم موجود در کانی ارتوکلاز را آزاد کرده است.

ال-تریپتوفان به عنوان یک پیش ماده برای بیوسنتز اکسین در باکتری‌ها شناخته شده است. لست و همکاران (1991) ایده مسیر وابسته به تریپتوفان را برای بیوسنتز اکسین ارائه دادند. بیشتر جدایه‌های این پژوهش در سطح 50 میلی‌گرم در لیتر ال-تریپتوفان اکسین تولید کردند. البته برخی جدایه‌ها بدون حضور ال-تریپتوفان هم اکسین تولید کردند. بنابراین احتمالاً این جدایه‌ها مسیر دیگری به غیر از ال-تریپتوفان برای بیوسنتز اکسین استفاده کرده‌اند. در تأیید این مسئله، برون و واکر (1970) گزارش کردند که بعضی از سویه‌های *A. chroococcum* در محیط مایع بدون اضافه کردن ال-تریپتوفان اکسین تولید کرده‌اند.

در این پژوهش برخی جدایه‌های Az63، Az69 و Az70 دارای توانایی تولید سیدروفور بودند ((جداول 1 و3). همانطوریکه در مورد فسفات‌ها هم اشاره شد در خاک‌های آهکی حلالیت ترکیبات آهن نیز کم بوده و لذا جذب آن توسط گیاه با مشکل مواجه است (چن و باراک، 1982). برخی باکتری‌های خاک از جمله *Azotobacter* توانایی تولید موادی به نام سیدورفور را دارند که قادر است با ترکیبات آهن نامحلول خاک تشکیل کلات داده و سبب افزایش قابلیت جذب آهن توسط ریشه گیاه شود (ویلا و همکاران، 2014؛ تیندل و همکاران، 2000 و کورنیش و پیج، 1998). گزارش شده است که تلقیح ذرت با یک سویه *Pseudomonas japonica* دارای توانایی تولید سیدروفور، بطور معنی‌داری وزن تر و خشک و ارتفاع گیاه را نسبت به شاهد بدون تلقیح افزایش داده است (اسحاقی و همکاران،2019). در آزمایشات گلخانه-ای و مزرعه‌ای اثر تلقیح ذرت با باکتری‌های *Bacillus*، *Azotobacter* و *Pseudomonas* دارای توانایی تولید سیدروفور بررسی و گزارش شده که *Azotobacter* و *Pseudomonas* اثرات مثبت و معنی‌داری بر رشد گیاه داشته‌اند (جرک و همکاران، 2012).

نتایج بررسی اثر تیمارهای باکتری و شوری بر رشد ذرت در شرایط تنش شوری نشان داد که تلقیح با جدایه Az69 در تیمار ($Az_{69}$-$S_0$) که با آب معمولی (0/36 دسی‌زیمنس بر متر) آبیاری شده بود نسبت به شاهد بدون تلقیح، وزن خشک بلال را بطور معنی‌داری افزایش داد. اصغر و همکاران (2002) تولید اکسین را عامل افزایش عملکرد و ارتفاع بوته ذرت در اثر تلقیح *Azotobacter* و *Pseudomonas* گزارش کردند. لازم به ذکر است که در این مطالعه، Az69 بیشترین مقدار اکسین را در بین جدایه‌ها تولید کرد.

نتایج آزمایشگاهی نشان داد که باکتری‌ها در شوری‌های زیاد در کشت درون شیشه‌ای توانایی رشد از خود نشان دادند اما در شرایط گلخانه‌ای و در محیط خاک و گیاه حتی در شوری 3 و 6 دسی زیمنس بر متر، معنی-داری بر شاخص‌های رشد ذرت نداشتند عدم توفیق

جدایه‌ها در کاهش اثرات تنش شوری را بایستی در موضوعاتی غیر از توانایی رشد آنها در شرایط شور جستجو کرد. با اینکه گزارشات در مورد عدم موفقیت مایه‌تلقیح‌ها در شرایط تنشی اندک است با اینحال یان و همکاران (2015 ) در یک مطالعه مروری به اثرات منفی تنش شوری بر فعالیت ریزجانداران خاک پرداخته و به بررسی و مطالعه بیشتر در این زمینه تأکید کرده‌اند. پرابهاواتی و مالاله (2009) در یک بررسی گزارش دادند که 75 درصد سویه‌های ریزوبیوم در اثر شوری کارایی تولید اکسین را نداشتند. دشوال و کومار (2013) گزارش کردند که غلظت‌های بالای نمک بر خصوصیات منسوب به محرک رشد گونه‌های مختلف *Pseudomonas* از جمله تولید اکسین، سیدروفور و توانایی حل‌کنندگی فسفات‌های نامحلول اثرات منفی دارد. ثقفی و همکاران (1398) گزارش دادند که برخی از سویه‌های *Pseudomonas fluorescens* در غلظت‌های نمک 100 تا 200 میلی‌گرم در لیتر در شرایط آزمایشگاهی به خوبی رشد کردند با اینحال خصوصیات محرک رشدی آنها از قبیل توانایی تولید سیدروفور، اکسین، قابلیت انحلال فسفات در شرایط غیر شور و معمولی اندازه‌گیری شدند.

در این پژوهش خصوصیات منسوب به محرک رشد در شرایط معمولی و محیط کشت باکتری اندازه گیری شد. احمد و همکاران (2008) گزارش دادند که خصوصیات منسوب به محرک رشد باکتری‌ها مطابق روش‌های مرسوم و در شرایط محیط کشت باکتری و بدون اعمال تنش اندازه‌گیری می‌شوند و سپس بر روی گیاه و در شرایط تنشی مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. بنابراین در مرحله آزمایشگاهی اگر سویه‌ای دارای توانایی تولید هورمون محر رشدی را نشان دهد ممکن است در شرایط تنشی از جمله شوری این ویژگی را بروز ندهد. در تأیید این موضوع کاردینال و همکاران (2015)، تعداد 100 سویه از ریزوسفر دو گیاه متحمل به شوری جداسازی و خصوصیات محرک رشدی آنها را در شرایط آزمایشگاهی بررسی و 22 سویه منتخب را در شرایط شور به جو تلقیح کردند. نتایج آنها نشان داد که بهترین سویه‌ها که در شرایط آزمایشگاهی بالاترین مقادیر را در خصوصیات محرک رشدی نشان داده بودند هیچ تأثیری بر رشد گیاه نشان ندادند. بر عکس سویه‌ای که در شرایط آزمایشگاهی خصوصیات محرک رشدی خوبی نشان نداده بود باعث افزایش قابل توجه رشد گیاه شد.

همانطوریکه ذکر شد در پژوهش حاضر نیز خصوصیات محرک رشدی باکتری‌ها در مرحله آزمایشگاهی در حالت غیر تنشی اندازه‌گیری شد لذا یکی از دلایل عدم موفقیت تلقیح در کاهش اثرات تنش شوری این می‌تواند باشد که ممکن است خصوصیات محرک رشدی باکتری‌ها در شرایط شور همانند شرایط معمولی ظهور و بروز پیدا نکرده باشد. بهرحال به نظر می‌رسد همیشه نمی‌توان خصوصیات رشد و فعالیت باکتری‌ها در شرایط کشت درون شیشه‌ای به شرایط پیچیده خاک تعمیم داد. در هر صورت بررسی اثر باکتری‌های حاصل از این پژوهش در شرایط شور نیاز به تحقیقات تکمیلی دارد. بنابراین پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آتی خصوصیات محرک رشدی باکتری‌ها برای مطالعات در شرایط تنش شوری در محیط کشت باکتری نیز بررسی شود. همچنین گلیک (2012) پیشنهاد داده است که برای حصول نتیجه بهتر در غربالگری باکتری‌های محرک رشد بایستی ساز و کارهای محرک رشد دیگری را جستجو و مورد بررسی قرار داد.

## نتیجه‌گیری

تلقیح ذرت با جدایه‌های بومی *Azotobacter* مقاوم به شوری نشان داد که در شرایط آبیاری با آب معمولی (هدایت الکریکی 0/36 دسی‌زیمنس بر متر) جدایه Az69 نسبت به شاهد بدون تلقیح، وزن خشک بلال را بطور معنی‌داری افزایش داد. با اینحال، تلقیح، اثر معنی‌داری بر شاخص‌های رشد ذرت در شرایط آبیاری با آب دارای هدایت الکتریکی 3 و 6 دسی‌زیمنس بر متر نشان نداد. در این بررسی پیشنهاد شد که در تحقیقات آتی در مرحله غربالگری و خصوصیات محرک رشدی جدایه-ها در شرایط کشت درون شیشه‌ای و محیط شور نیز بررسی شود.

## فهرست منابع:


1. اخگر، ع. 1387. جداسازی، شناسایی و بررسی باکتری‌های ریزوسفری دارای توانایی تولید آنزیم ACC دآمیناز در کاهش اثرات تنش شوری بر رشد کلزا. رساله دکتری، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران. 158 صفحه.
2. بی‌نام، 1399. گزارش برآورد سطح و تولید محصولات زراعی در سال زراعی 98-97. وزارت جهاد کشاورزی، معاونت برنامه ریزی و اقتصادی، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات.
3. بی‌نام، 1381. نقشه 1:1000000 منابع خاک و کاربری اراضی ایران. مؤسسه تحقیقات خاک و آب، تهران- ایران.
4. خسروی, ه. 1398. واکنش ذرت به تلقیح با *ازتوباکتر* در شرایط تنش خشکی. پژوهش آب در کشاورزی (علوم خاک و آب), 33(1), 38-29.
5. خسروی، ه. 1393. *ازتوباکتر* و نقش آن در مدیریت حاصخیزی خاک. نشریه مدیریت اراضی، 2(2):94-79.
6. خسروی، ه.، ح. علیخانی و ب. یخچالی. 1387. بررسی اثر سویه‌های *ریزوبیوم* دارای آنزیم ACC دآمیناز بر رشد گندم در شرایط تنش شوری. مجله تحقیقات آب و خاک ایران (مجله علوم کشاورزی ایران)، 39(1): 103-93.
7. کبری ثقفی ک.، احمدی ج.، اصغرزاده ا.، رکنی زاده ح. و حسینی مزینانی م. 1398. جداسازی، شناسایی و بررسی ویژگیهای محرک رشدی سودوموناس‌های فلورسنت از ریزوسفر درختان زیتون در خاک‌های شور. نشریه زیست شناسی خاک، 7(1): 28-13.
8. مؤمنی ع. 1388. پراکنش جغرافیایی و سطوح شوری منابع خاک ایران. مجله پژوهش‌های خاک، 24(3): 215-203.
9. Abd El-Ghany, T.M., Masrahi, Y.S., Mohamed, A., Abboud, A., Alawlaqi, M.M. and Elhussieny, A., 2015. Maize (*Zea mays* L.) growth and metabolic dynamics with plant growth-promoting rhizobacteria under salt stresses. J Plant Pathol Microb, 6(305), p.2.
10. Afzal, A. and Bano, A., 2008. Rhizobium and phosphate solubilizing bacteria improve the yield and phosphorus uptake in wheat (*Triticum aestivum*). Int J Agric Biol, 10(1), pp.85-88.
11. Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M.S., 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological research, 163(2), pp.173-181.
12. Asghar, H., Zahir, Z., Arshad, M. and Khaliq, A. 2002. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. Biology and Fertility of Soils, 35(4): 231-237.
13. Bent, E., Tuzun, S., Chanway, C.P. & Enebak, S. (2001). Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. Canadian Journal of Microbiology, 47(9): 793-800.
14. Brown, M.E., & Walker, N., (1970). Indolyl-3-acetic acid formation by *Azotobacter chroococcum*. Plant Soil. 32(1), 250-253.
15. Cardinale, M., Ratering, S., Suarez, C., Montoya, A.M.Z., Geissler-Plaum, R. and Schnell, S., 2015. Paradox of plant growth promotion potential of rhizobacteria and their actual promotion effect on growth of barley (Hordeum vulgare L.) under salt stress. Microbiological research, 181, pp.22-32.
16. Chen, Y., Barak, P. (1982). Iron nutrition of plants in calcareous soils. Adv. Agron. 35, 217-240.
17. Cornish, A.S., Page, W.J. (1998). The catecholate siderophores of *Azotobacter vinelandii*: Their affinity for iron and role in oxygen stress management. Microbiology, 144, 1747-1754.
18. Deshwal, V.K. and Kumar, P., (2013). Effect of salinity on growth and PGPR activity of Pseudomonads. Journal of Academia and Industrial Research, 2(6), pp.353-356.

19. Eshaghi, E., Nosrati, R., Owlia, P., Malboobi, M.A., Ghaseminejad, P. and Ganjali, M.R., 2019. Zinc solubilization characteristics of efficient siderophore-producing soil bacteria. Iranian Journal of Microbiology, 11(5), p.419.
20. García, J.E., Maroniche, G., Creus, C., Suárez-Rodríguez, R., Ramirez-Trujillo, J.A. and Groppa, M.D., 2017. In vitro PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress. Microbiological Research, 202, pp.21-29
21. Glick, B.R., 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Scientifica 2012: 1–15.
22. Hasanudin, H. 2003. Increasing of the nutrient and uptake availability of N and P and through corn yield of inoculation of Mycorrhiza and Azotobacter on ultisol organic matter. Journal of Agriculture Sciences of Indonesia, 5(1): 83 – 89.
23. Jarak, M., Mrkovački, N., Bjelić, D., Joscaron, D., Hajnal-Jafari, T. and Stamenov, D., 2012. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on maize in greenhouse and field trial. African Journal of Microbiology Research, 6(27), pp.5683-5690.
24. Jiang, H., Dong, H., Zhang, G., Yu, B., Chapman, L.R. & Fields, M.W. 2006. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an Athalassohaline lake in northwestern China. Appl. Environ. Microb. 72(6), 3832-3845.
25. Kumar, V. and N. Narula. 1999. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. Biology and Fertility of Soils, 28: 201-305.
26. Kundu, B.S., & Gaur, A.C., (1980). Establishment of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria in the rhizosphere and their effect on yield and nutrient uptake of the wheat crop. Plant Soil. 57, 223–230.
27. Kuykendall, L.D. 2015. Rhizobilaes. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, Published by John Wiley & Sons, Inc, in Association with Bergey's Manual Trust.17:1-33.
28. Last R.L., Bissinger, P.H., Mahoney, D.J., Radwanski, E.R., & Fink, G.R. (1991). Tryptophan mutants in Arabidopsis – the consequences of duplicated tryptophan synthase beta genes. Plant. Cell. 3 (4), 345–358.
29. Meena, V.S., Maurya, B.R., Verma, J.P., Aeron, A., Kumar, A., Kim, K. & Bajpai, V.K. (2015). Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): Isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. Ecological Engineering, 81: 340-347.
30. Mishustin, E., Smironova, G. & Lokhmacheva, R. (1981). The decomposition of silicates by microorganisms and the use of silicate bacteria as bacterial fertilizers. Biology Bulletin Academy of Sciences of the USSR (USA).
*31.* Munns, R., & Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. Annu RevPlant Biol 59:651–81. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911.
32. Naseri, R., Moghadam, A., Darabi, F., Hatami, A. and Tahmasebei, G.R. 2013. The Effect of deficit irrigation and *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasilense* on grain yield, yield components of maize (SC 704) as a second cropping in western Iran. Bull. Env. Pharmacol. Life Sci, 2(10): 104-112.
33. Prabhavati, E. & Mallalah, K.V. (2009). Effect of salt concentration on indole acetic acid production byRhizobium sp. nodulating horse gram. International Journal of Agricultural Sciences.5(1): 46-49.
34. Schwyn, B., & Neilands, J.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal. Biochem. 160, 47-56.
35. Sheng, X.F. & He, L.Y. (2006). Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of Bacillus edaphicus and its mutants and increased potassium uptake by wheat. Canadian Journal of Microbiology, 52(1): 66-72.

36. Sperber, J.I. (1958). The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Crop and Pasture Science, 9(6): 778-781.
37. Tindale, A.E., Mehrotra, M., Ottem, D., & Page, W.J. (2000). Dual regulation of catecholate siderophore biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* by iron and oxidative stress. Microbiology, 146, 1617-1626.
38. Villa, J.A., Ray, E.E., & Barney, B.M., (2014). *Azotobacter vinelandii* siderophore can provide nitrogen to support the culture of the green algae *Neochloris oleoabundans* and *Scenedesmus sp*. BA032. FEMS Microbiol. Lett. 351(1), 70-77.
39. Yan N., Marschner P., Cao W., Zuo C. & Qin W. (2015) Influence of salinity and water content on soil microorganisms. International Soil and Water Conservation Research, 3: 316–323.
40. Zhang, C. & Kong, F. (2014). Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from tobacco rhizospheric soil and their effect on tobacco plants. Applied Soil Ecology, 82: 18-25.

# اثر ژنوتیپ گیاه و مکان جغرافیایی بر روی فراوانی باکتری اندوفیت *متیلوباکتریوم* در میوه دو رقم توت‌فرنگی

**محمد اختری، بهمن بهرام‌نژاد[1]، بهروز حریقی و محمد ناجی**

دانش‌آموخته ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج؛ **akhtari.m92@gmail.com**

دانشیار بیوتکنولوژی گیاهی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج؛ **b.bahramnejad@uok.ac.ir**

دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج؛ **b.harighi@uok.ac.ir**

دانش‌آموخته ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج؛ **Mohammad.naji72@gmail.com**

دریافت: **98/4/23** و پذیرش: **1400/3/19**

## چکیده

**اندوفیت به گروهی از میکروارگانیسم ها اطلاق می‌گردد که در قسمتهای داخلی بافت‌های گیاهان زندگی نموده و بر بسیاری از خصوصیات گیاه میزبان تأثیر می‌گذارند. گونه‌های مختلف باکتری اندوفیت *متیلوباکتریوم* در سنتز کاراتنوئیدها، تولید ترکیبات فنولی و فرار، همچنین در افزایش سطح تولید اجزای سازنده عطر و طعم در میوه مؤثر می‌باشند. تنوع و فراوانی این باکتری‌ها تحت تأثیر ژنوتیپ گیاه میزبان، شرایط اقلیمی و خاک می‌باشد. این مطالعه به منظور جداسازی باکتری‌های جنس *متیلوباکتریوم* از دو رقم توت‌فرنگی در مناطق مختلف استان کردستان انجام شد. در این پژوهش باکتری‌های اندوفیت از میوه دو رقم توت‌فرنگی کردستان و پاروس جمع‌آوری شده از سه منطقه انگوژان، گاورود و نشور در استان کردستان جداسازی شدند. شناسایی جدایه های باکتری براساس تعیین توالی ژن 16S rDNA انجام گردید. بدین منظور پس از استخراج DNA ژنومی جدایه‌ها، ژن 16S rDNA به روش PCR تکثیر و پس از تعیین توالی میزان شباهت توالی‌های به دست آمده با توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rDNA سایر باکتری‌های مرجع با استفاده از نرم افزار Blastn محاسبه گردید. سپس جمعیت جدایه‌های باکتری در زمان‌های (مراحل) مختلف رسیدگی میوه تعیین گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که باکتری جدا شده در هر دو رقم کردستان و پاروس متعلق به جنس *متیلوباکتریوم* (*Methylobacterium*) می باشد. جمعیت باکتری‌های متیلوباکتریوم در ارقام مورد مطالعه در مناطق مشابه از لحاظ آماری متفاوت بود. رقم کردستان در مقایسه با رقم پاروس، در هر سه منطقه برتری معنی‌داری از لحاظ جمعیت باکتری نشان داد ($p< 0.05$). بیشترین جمعیت باکتری در هر دو رقم و در مناطق جغرافیایی مورد مطالعه در مرحله رسیدگی میوه محاسبه گردید. با توجه به تفاوت دو رقم گیاه از لحاظ عطر و طعم و همچنین تفاوت معنی‌دار جمعیت باکتری احتمال تأثیر این باکتری‌ها در عطر و طعم این دو رقم وجود دارد.**

**واژه‌های کلیدی:** باکتری اندوفیت، توت‌فرنگی، پاروس، کردستان، *16S rDNA*

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: سنندج، دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

**مقدمه**

توت‌فرنگی[1] متعلق به جنس *Fragaria* از خانواده *Rosaceae* و زیر خانواده *Rosoideae* می‌باشد. توت‌فرنگی‌های کشت شده امروزی حاصل تلاقی *Fragaria × ananassa*، با عدد کروموزومی $n = 8$ $x = 56$ 2 اکتاپلوئید می‌باشند (ایگر، 2019). سطح زیر کشت و تولید جهانی توت‌فرنگی در 35 سال اخیر دائماً در حال افزایش بوده است (سیمپسون، 2018). میوه توت‌فرنگی دارای ترکیبات متابولیتی متنوعی است که بر روی بهبود و حفظ سلامتی انسان تاثیر دارند. توت‌فرنگی منبع خوبی برای فیبر، ویتامین‌ث، آهن، پتاسیم، کلسیم، آهن و فسفر است (هینونن و همکاران، 1998).

باکتری‌های اندوفیت به عنوان باکتری‌های مفیدی شناخته شده‌اند که به طور فعال رابطه طولانی مدت با گیاه میزبان دارند و در اندام‌های مختلف از جمله ریشه، ساقه، برگ، بذر، غده و در برخی موارد در گل و میوه یافت می‌شوند (کواد- هالمان و همکاران، 1997). باکتری‌های اندوفیت باعث القاً مقاومت در گیاهان در برابر برخی تنش‌ها مانند کم‌آبی، شوری، کمبود مواد غذایی و حتی بعضی بیماری‌ها می‌شوند. این باکتری‌ها در اکثر گونه‌های گیاهی وجود دارند و جنس‌های متنوعی از قبیل *Pseudomonas*، *Bacillus*،*Enterobacter* و *Agrobacterium* را شامل می‌شوند (لودویک و همکاران، 2002). باکتریهای اندوفیت مانند *Acetobacter diazoterophic* و *Herbaspirillium seropedica* با توانایی تثبیت نیتروژن اتمسفری به عنوان تامین کننده این عنصر غذایی در نیشکر شناخته شده‌اند (هورک و همکاران، 2002). افزایش مواد معدنی قابل دسترس گیاه از جمله فسفر و جلوگیری از تولید اتیلن در سطوح بالا نیز توسط این دسته از باکتری‌ها گزارش شده است (کری و همکاران، 2013). امروزه نقش باکتری‌های اندوفیت در تولید متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات دارویی گیاهی با ارزش از جمله آلکالوئیدها، استروئیدها، ترپنوئیدها، ایزوکومارین‌ها، کوئینونها، فلاونوئیدها، فنیل پروپانوئیدها، لیگنانها، پپتیدها، فنولیکها، آلیفاتیکها ثابت شده است (کومارا و همکاران، 2014).

تحقیقات نشان داده است که جمعیت باکتری‌ها در بین گونه‌ها و حتی اندام‌های مختلف گیاهان می‌تواند متفاوت باشد (هالمن و همکاران، 1997). تنوع باکتری-های موجود در خاک می‌تواند بر روی ترکیب اندوفیت-های گیاهی مؤثر باشد (دونبار و همکاران، 2002؛ ترینگ و همکاران، 2005). بعلاوه می‌تواند تحت تأثیر طیف وسیعی از عوامل زیستی و غیرزیستی باشد (باکلی و اشمیت، 2002). برای مثال تأثیر نیچ[2] اکولوژیک (اندوسفر در برابر ریشه)، پستی و بلندی بر جمعیت باکتری‌های اندوفیت صنوبر شرقی (*Populus deltoids*) به اثبات رسیده است (گوتل و همکاران، 2011؛ شاکیا و همکاران، 2013). شرایط محیطی نیز نقش مهمی در تعیین نوع باکتری اندوفیت گیاه میزبان دارد؛ به عنوان مثال، باکتری-های اندوفیت که تحمل گیاه به شوری را موجب می‌شوند معمولاً از گیاهان رشد یافته در خاک‌های شور جداسازی می‌شوند (ردمن و همکاران، 2011).

جنس *متیلوباکتریوم* مهمترین باکتری جداسازی شده از میوه توت‌فرنگی می‌باشد. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که باکتری‌های متعلق به جنس *متیلوباکتریوم* در سنتز ترکیبات آروماتیک مرتبط با عطر و طعم میوه توت‌فرنگی مؤثر می‌باشد؛ به طوری که در حضور و یا عدم حضور آن‌ها سنتز این ترکیبات تحت تأثیر قرار می‌گیرد (زابتاکیس، 1997). مطالعه بر روی ترکیبات معطر در توت‌فرنگی از جمله ترکیب 4 هیدروکسی 2 و 5 دی‌متیل فورانون HDMF[3] نشان می‌دهد که میزان کمی این ترکیب در حضور باکتری اندوفیت افزایش می‌یابد (زابتاکیس و همکاران، 1999؛ کوتسومپوگراس و همکاران، 2006). بررسی و مطالعه مکان‌یابی ژن‌های توت‌فرنگی و ژن‌های

1. *Strawberry*

2. Niche

3. 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (HDMF)

باکتریایی توسط هیبریداسیون در محل نشان داد که ارتباط مستقیمی بین باکتری اندوفیت و سلول‌های میوه توت‌فرنگی (*Fragaria×ananassa*) وجود دارد. محققین نتیجه‌گیری کردند که حضور این باکتری‌ها میزان تولید ترکیبات معطر در میوه را افزایش می‌دهد. بعلاوه افزایش عطر و طعم نتیجه افزایش بیان ژن‌های مؤثر در سنتز این ترکیبات می‌باشد (ناسوپولو و همکاران، 2014).

فراوانی و تنوع باکتری‌های اندوفیت تحت تأثیر اندام‌های مختلف گیاهی، تنوع خاک و ژنوتیپ گیاهی است. با بررسی باکتری‌های اندوفیت در ارقام مختلف و همچنین مناطق مختلف کشت یک گیاه، می‌توان اطلاعات مفید و مؤثری در مورد تنوع و تراکم این باکتری‌ها به دست آورد. براین اساس هدف از تحقیق حاضر، مقایسه باکتری‌های اندوفیت جنس *متیلوباکتریوم* جداسازی شده از دو رقم توت‌فرنگی کردستان و پاروس در مناطق مختلف استان کردستان و در زمان‌های مختلف رسیدگی میوه بود.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

در این مطالعه از ارقام توت‌فرنگی زراعی (پاروس و کردستان) استفاده شد. این نمونه‌ها در اردیبهشت ماه سال 94 از مناطق اطراف کامیاران شامل سه منطقه انگوژان با موقعیت جغرافیایی"E (33'05°68 طول،"964N'71°38عرض و m 1476 ارتفاع)، گاورود با موقعیت جغرافیایی ("E11'67 °67 طول، "730N '69°38 عرض و m 1957 ارتفاع) و نشور با موقعیت جغرافیایی ("85E' 04 °65 طول، "937N '81°38 عرض و 1397m ارتفاع) با فاصله زمانی و مکانی متفاوت و در مراحل مختلف رشدی، از میوه‌های رسیده، نیمه رسیده و نارس از هرسه منطقه، نمونه برداری شد. بعد از انجام نمونه-برداری، نمونه‌های گیاهی به آزمایشگاه منتقل گردید و توسط آب معمولی و سپس آب مقطر سترون شستشوی سطحی داده شد. نمونه ها تا زمان جداسازی باکتری در دمای 4 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

### جداسازی باکتری‌های اندوفیت

جداسازی باکتری با روش دی ملو[1] و همکاران (2012) با اندکی تغییر انجام شد. ابتدا میوه‌های توت‌فرنگی جمع‌آوری شده در زیر هود و در شرایط سترون با محلول هیپوکلریت سدیم[2] 0/5 درصد به مدت 1 دقیقه ضد عفونی سطحی گردید و سپس توسط آب مقطر سترون، سه بارشستشو داده شد. هر کدام از نمونه‌ها سپس جداگانه در درون هاون سترون به طور کامل له شدند و پس از گذشت 40 دقیقه، از سوسپانسیون حاصله روی محیط کشت King B کشت داده شد.نمونه‌های کشت داده شده جهت رشد باکتری‌ها در دمای 28 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. جهت حصول اطمینان از ضدعفونی سطحی کامل نمونه‌ها، از آب مقطر سترونی که جهت شستشو استفاده شده بود نیز به عنوان شاهد کشت داده شد. کلونی‌های منفرد باکتری رشد یافته بر روی محیط کشت که از نظر رنگ (باکتری‌های صورتی متمایل به قرمز)، شکل و اندازه متفاوت بودند، انتخاب شده و بر روی محیط کشت King B مجدداً خالص سازی گردیدند.

### جداسازی DNA باکتری

جداسازی DNA باکتری به روش سالونن[3] و همکاران (2010) با کمی تغییر انجام شد. سلول باکتری در محیط مایع King B به مدت زمان 24 ساعت کشت داده شد و پس از سانتریفوژ نمودن، رسوب حاصله در بافر TE[4] حل و با لیزوزیم تیمار شد. سپس، 40 میکرولیتر سدیم‌پرکلرات[5] 4 مولار، 24 میکرولیتر SDS[6] 10% و 8 میکرولیتر پروتیناز K[7] (از غلظت پایه 20 میکروگرم بر میلی‌لیتر) به محلول اضافه گردید و به مدت 2 ساعت در 45 درجه سانتی گراد نگهداری گردید. به محلول به دست آمده 2 برابر حجم، اتانول[8] خالص اضافه گشته و به

1. De Melo
2. 15Sodiumhypochlorite
3. Salonen
4. Tris-EDTA Buffer (TE)
5. Sodium perchlorate
6. Sodium dodecyl sulfate
7. Proteinase K
8. Ethanol

مدت 30 دقیقه یا بیشتر در فریزر نگه‌داری وسپس با سرعت 12000g سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصله پس ازخشک شدن در دمای اتاق در 500 میکرولیتر بافر TE حل گردید. DNA به دست آمده دو بار با ترکیب فنل: کلروفورم: ایزوآمیل‌الکل (به ترتیب به نسبت 25 :24 :1) مخلوط شده و در دمای اتاق هم زده شد تا کاملاً یکنواخت گردد. DNA با اضافه نمودن اتانول خالص و استات‌سدیم 3 مولار با اسیدیته 4/8 به مدت یک شب در فریزر رسوب داده شد. ترکیب به مدت 5 دقیقه با 12000g سانتریفیوژ شد و رسوب توسط اتانول 70% شسته شد. رسوب بعد از خشک شدن در بافر TE حاوی ریبونوکلئاز[1] حل گردید.

**تکثیر ژن 16S rDNA**

برای انجام واکنش PCR به منظور تکثیر ژن 16S rDNA به اندازه تقریبی 1500 جفت باز از آغازگر مستقیم با توالی 5’AGAGTTTGATCATGGCTCAG3’ و آغازگر معکوس با توالی 5’ACGGTTACCTTGTTACGACTT3’ (گیدر، 2009) با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر شرکت بیوراد مدل icycler (Thermal cycler (BioRad; USA)) استفاده گردید. چرخه حرارتی به صورت ذیل صورت گرفت: واسرشت اولیه در دمای 94°C به مدت 5 دقیقه (مرحله اول)، 35-33 چرخه واسرشت سازی در دمای 94°C به مدت 30 ثانیه، اتصال در دمای 52°C به مدت 30 ثانیه، بسط در دمای 72°C به مدت 30 ثانیه (مرحله دوم)، و بسط نهایی در دمای 72°C به مدت 7 دقیقه (مرحله سوم و نهایی).

**آنالیز بیوانفورماتیکی و رسم درخت فیلوژنتیکی (تبار زایی)**

محصول PCR ابتدا توسط شرکت Bioneer کره‌جنوبی تعیین توالی گردید و توالی‌های به دست آمده توسط نرم افزار BioEdit ویرایش و اصلاح شد. سپس توالی‌ها در پایگاه داده NCBI با استفاده از هم‌ردیفی نوکلئوتیدی (Nucleotide BLAST) مورد جستجو قرار گرفت. توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rDNA جدایه‌های استاندارد نزدیک به باکتری جنس *متیلوباکتریوم* از سایت Strain info دریافت شد و آنالیز فیلوژنتیکی بر اساس توالی‌های به دست آمده انجام شود. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGA6 و به روش نزدیک‌ترین همسایگی[2] با بوت‌استرپ[3] 1000 رسم شد.

**اندازه‌گیری جمعیت باکتری**

به منظور اندازه‌گیری تراکم باکتری در دو رقم کردستان و پاروس، نمونه‌های میوه هر سه منطقه انگوژان، گاورود و نشور جهت ضدعفونی سطحی، در هیپوکلریت سدیم 0/5% (جهت از بین بردن باکتری‌های سطحی) به مدت 1 تا 2 دقیقه قرار داده شد و سپس سه مرتبه توسط آب مقطر سترون شستشو انجام شد. یک گرم از قسمت-های مختلف میوه (نارس، نیمه رسیده و رسیده) جدا شده و بعد از له کردن، 50 میکرولیتر از سوسپانسیون[4] تشکیل شده در پتری‌دیش حاوی محیط King B کشت داده شد. نمونه‌ها در دمای 28 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از ظاهر شدن کلونی‌ها شمارش انجام شد. تراکم باکتری براساس تعداد کلنی رشد یافته در یک گرم بافت میوه محاسبه گردید (رونا، 2015). آزمون شامل سه تکرار (شامل سه میوه، سه منطقه، دو رقم و سه تکرار) بود و نتایج توسط برنامه SAS نسخه 9.1 به صورت طرح آشیانه‌ای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

1. Ribonuclease

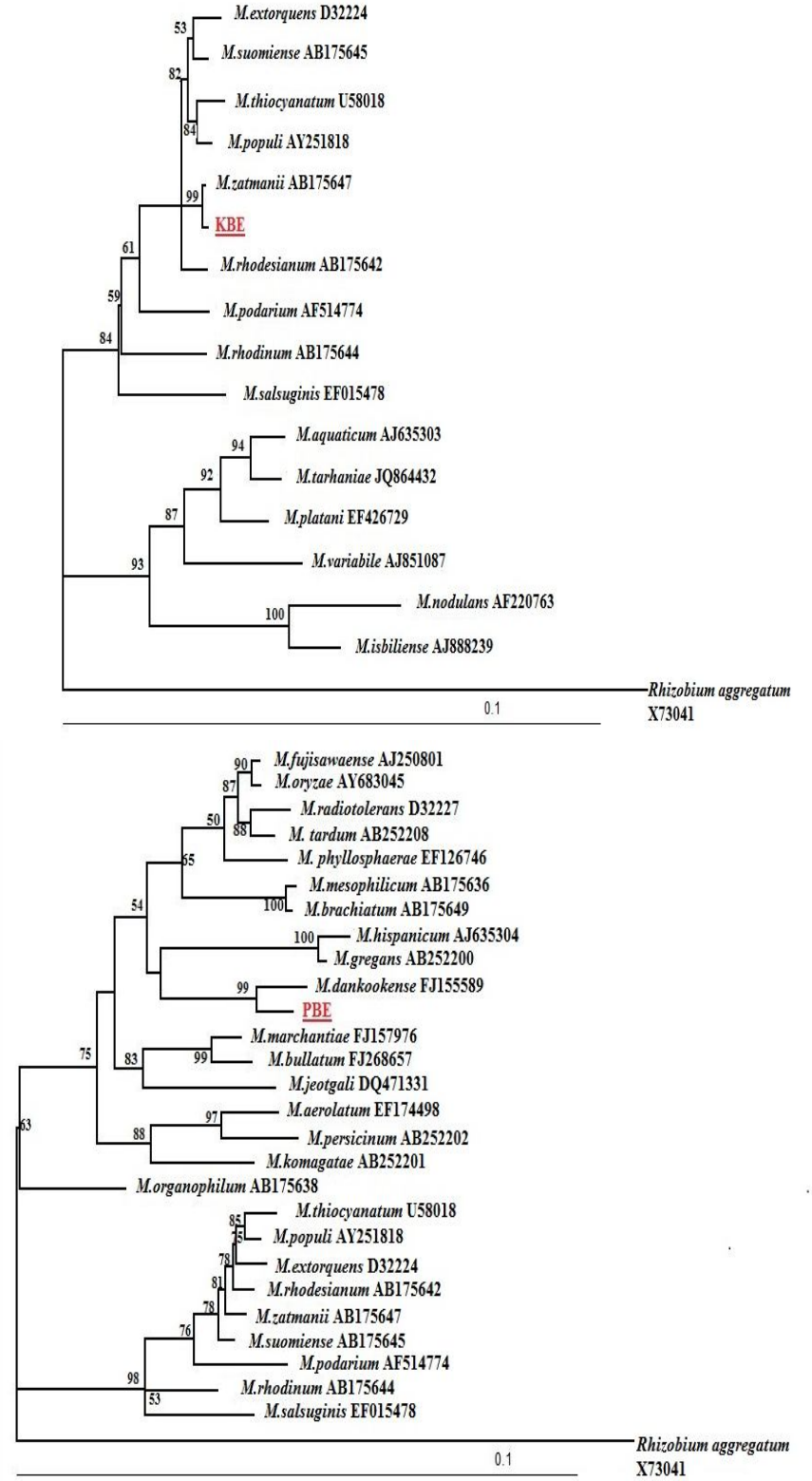
2. Neighbor-joining
3. Bootstrap
4. Suspension

**جدول 1- نتیجه بلاست توالی 16S rDNA مربوط به جدایه باکتری جداسازی شده از توت‌فرنگی رقم کردستان**

| | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Methylorubrum zatmanii* strain PSBB041 chromosome, complete genome | 2375 | 11879 | 100% | 0.0 | 99.54% | CP021054.1 |
| *Methylorubrum extorquens* strain PSBB040 chromosome, complete genome | 2375 | 11879 | 100% | 0.0 | 99.54% | CP019322.1 |
| Uncultured bacterium clone BJ201307-22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2375 | 2375 | 100% | 0.0 | 99.54% | KX508034.1 |
| *Methylobacterium extorquens* strain IARI-IIWP-43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2375 | 2375 | 100% | 0.0 | 99.54% | KF572999.1 |
| *Methylobacterium zatmanii* gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: z15a | 2375 | 2375 | 100% | 0.0 | 99.54% | KF572997.1 |
| *Methylobacterium zatmanii* gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: z15a | 2375 | 2375 | 100% | 0.0 | 99.54% | AB698688.1 |
| *Methylobacterium zatmanii* gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: 37d | 2375 | 2375 | 100% | 0.0 | 99.54% | AB698687.1 |
| Uncultured bacterium clone 16slp87-03h04.p1ka 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2375 | 2375 | 100% | 0.0 | 99.54% | FJ512822.1 |
| *Methylobacterium* sp. 5b.2.1 collection-date 15-Sep-2003 from Germany 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2375 | 2375 | 100% | 0.0 | 99.54% | FJ157971.1 |
| *Methylobacterium extorquens* str. DM4 chromosome, complete genome | 2375 | 11879 | 100% | 0.0 | 99.54% | FP103042.2 |

**جدول 2- نتیجه بلاست توالی ژن *16S rDNA* مربوط به جدایه های باکتری اندوفیت جداسازی شده از توت‌فرنگی رقم پاروس**

| | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Methylobacterium* sp. PB133 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: PB133 | 2348 | 2348 | 99% | 0.0 | 99.23% | AB220083.1 |
| Phenanthrene-degrading bacterium M10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2331 | 2331 | 99% | 0.0 | 99.00% | AY177363.2 |
| Phenanthrene-degrading bacterium M10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2331 | 2331 | 99% | 0.0 | 99.00% | AY177358.2 |
| *Methylobacterium* sp. DDW-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2326 | 2326 | 98% | 0.0 | 99.23% | FJ225120.1 |
| *Methylobacterium dankookense* strain SW08-7 16S ribosomal RNA, partial sequence | 2314 | 2314 | 98% | 0.0 | 99.07% | NR_116545.1 |
| *Methylobacterium* sp. NBCS22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2314 | 2314 | 98% | 0.0 | 99.07% | GQ281067.1 |
| *Methylobacterium* sp. F15 partial 16S rRNA gene, strain F15 | 2314 | 2314 | 98% | 0.0 | 99.07% | AM910533.1 |
| Uncultured bacterium clone BJ201208-28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2303 | 2303 | 98% | 0.0 | 98.91% | KX507658.1 |
| Uncultured bacterium clone B8-42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2303 | 2303 | 98% | 0.0 | 98.91% | KF010709.1 |
| *Methylobacterium* sp. strain CECT 9862 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | 2302 | 2302 | 96% | 0.0 | 99.76% | MN154398.1 |




**شکل 1- دندوگرام حاصل از مقایسه توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن 16S rDNA باکتری های جداسازی شده از توت‌فرنگی رقم کردستان (KBE) و رقم پاروس (PBE) با توالی نوکلئوتیدی سایرگونه‌های جنس *Methylobacterium* که به روش نزدیکترین همسایگی و با بوت-استرپ 1000 توسط نرم‌افزار MEGA6 رسم شده است. *Rhizobium aggregatum* به عنوان فرد برون گروه انتخاب شده است.**

## نتایج

### شناسایی باکتری‌های اندوفیت براساس توالی ژن *16S rDNA*

توالی‌های نوکلئوتیدی حاصل از تعیین توالی *16S rDNA* جدایه‌ها بعد از انجام بلاست (Blastn) در پایگاه داده NCBI باتوجه به درصد یکسانی و E-value با سایر توالی‌های موجود در پایگاه داده مورد بررسی ابتداییقرار گرفت و مشخص شد که دارای بیش‌ترین شباهت به جنس *متیلوباکتریوم* می‌باشد (جدول 1 و 2). آنالیز فیلوژنتیکی براساس مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن *16S rDNA* جدایه‌های مورد مطالعه با سایرگونه‌های متعلق به جنس *متیلوباکتریوم* انجام گردید.

### آنالیز فیلوژنتیکی ژن 16S rDNA

رسم درخت فیلوژنتیکی هر دو رقم به صورت جداگانه و با استفاده از توالی‌های استاندارد جنس مورد نظر انجام شد. توالی مورد نظر بیشترین تشابه را در هر دو رقم کردستان و پاروس به ترتیب به گونه‌های *Methylobacterium zatmani* و *M. dankookense* با میزان تشابه 99 درصد داشته و با بوت استرپ 99 جدا شده است (شکل 1).

همچنین در یک درخت سویه های جداشده از هر دو رقم استفاده شدند که نتایج بدست آمده تفاوتی با درخت‌های جداگانه هر کدام از رقم‌ها نداشت. انتخاب فرد برون‌گروه[1] در درخت فیلوژنتیکی بر اساس نزدیکی به جنس مورد نظر می‌باشد، که از یکی از جنس‌های نزدیک به جنس مورد مطالعه استفاده می‌شود تا نشان دهنده تفکیک بهتر جنس مورد مطالعه از جنس نزدیک باشد (شکل 2).

هم‌ردیفی دو سویه جداسازی شده با هم میزان شباهت بالایی را نشان می‌دهد، ولی احتمالاً مربوط به یک گونه نیستند. این تشابه بالای دو سویه جداسازی شده نشان دهنده این است که این توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به جنس *Methylobacterium* می‌باشند که در بررسی درخت فیلوژنتیکی با بوت‌استرپ بالایی در کنار گونه‌های مورد اشاره قرار گرفته‌اند. لازم به ذکر است دو سویه جداسازی شده با وجود آنکه تشابه بالایی با هم داشته و در حد چند نوکلئوتید اختلاف داشتند، مربوط به گونه‌های متفاوتی بودند.

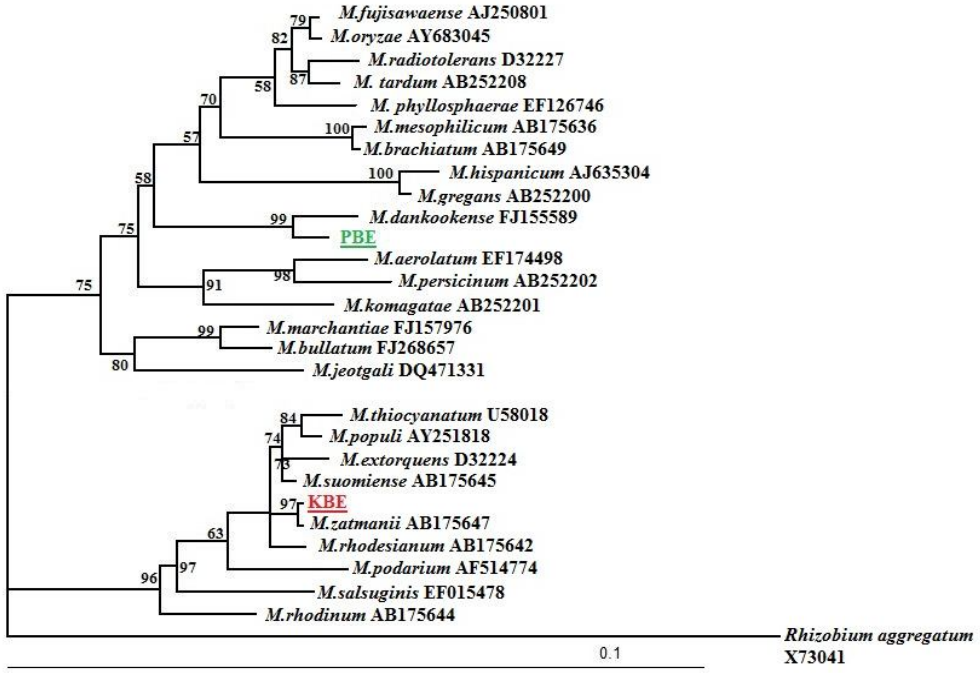
### اندازه‌گیری جمعیت باکتری‌های اندوفیت در ارقام پاروس و کردستان

بر اساس نتایج به دست آمده میزان جمعیت باکتری‌های اندوفیت در ارقام پاروس و کردستان در مناطق مختلف از نظر نمونه برداری متفاوت و معنی‌دار ($P < 0.05$) بود. در منطقه نشور در رقم کردستان میزان جمعیت باکتری در مقایسه با سایر مناطق و رقم پاروس تفاوت معنی‌داری نشان داد. همچنین بالاترین جمعیت در هر منطقه مربوط به میوه‌های رسیده بود که جمعیت بالایی در میوه‌های رسیده نسبت به میوه نارس و نیمه رسیده مشاهده شد. نمودار مربوط به منطقه انگوزان (شکل 3) نشان می‌دهد که میزان جمعیت باکتری اندوفیت در میوه رسیده در مقایسه با میوه نارس و نیمه رسیده بالا می‌باشد که این افزایش جمعیت در رقم کردستان در مقایسه با رقم پاروس معنی‌دار می‌باشد. در منطقه گاورود (شکل 3) در میوه‌های رسیده و نیمه رسیده و نارس هر رقم تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید؛ ولی در مقایسه دو رقم تفاوتی در میزان جمعیت مشاهده نشد. در نمودار مربوط به منطقه نشور (شکل 3) بالاترین میزان جمعیت در میوه‌های رسیده در رقم کردستان نسبت به پاروس مشاهده شد که میوه‌های نارس و نیمه رسیده نیز در این رقم در مقایسه با پاروس تفاوت معنی‌داری نشان داد (شکل 3).

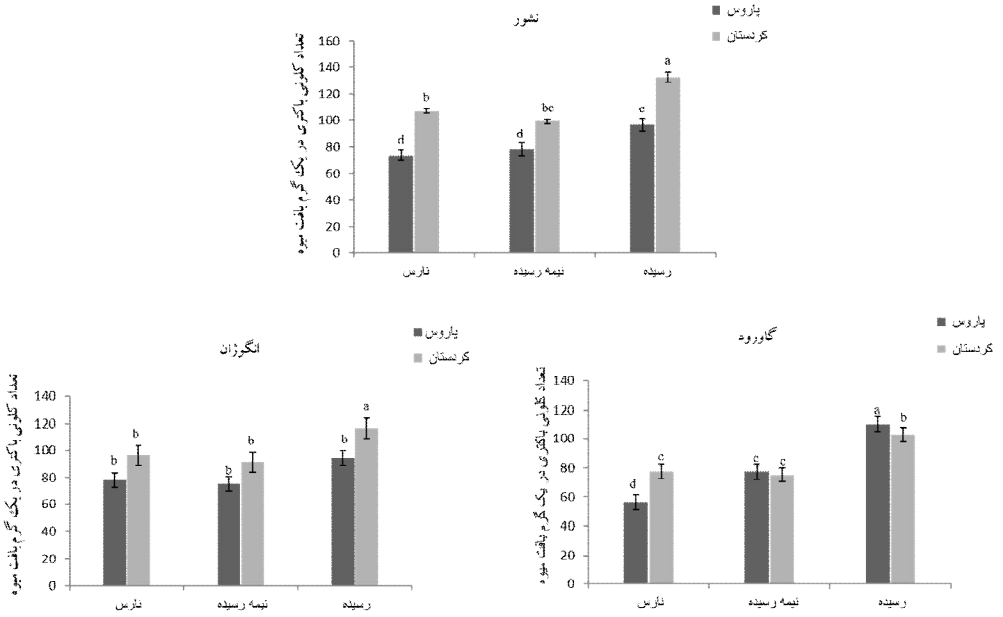
در نمودار مربوط به شکل 5 مشاهده می‌شود که در حالت کلی میزان جمعیت در منطقه نشور در میوه‌های نارس، نیمه رسیده و رسیده در هر دو رقم در مقایسه با سایر مناطق تفاوت معنی‌داری دارد. میزان بالای جمعیت در منطقه نشور مربوط به سایر مناطق به دلیل عوامل زنده و غیر زنده، فاکتورهای مربوط به گیاه و سن گیاه و شرایط دمایی و خاک مناسب و نحوه ورود باکتری به داخل گیاه میزبان بستگی دارد. با این حال میزان جمعیت باکتری اندوفیت توسط بافت گیاهی و شرایط محیطی کنترل می‌شود تا به سطح مناسب از تراکم برسد (برادر و

[1] Outgroup

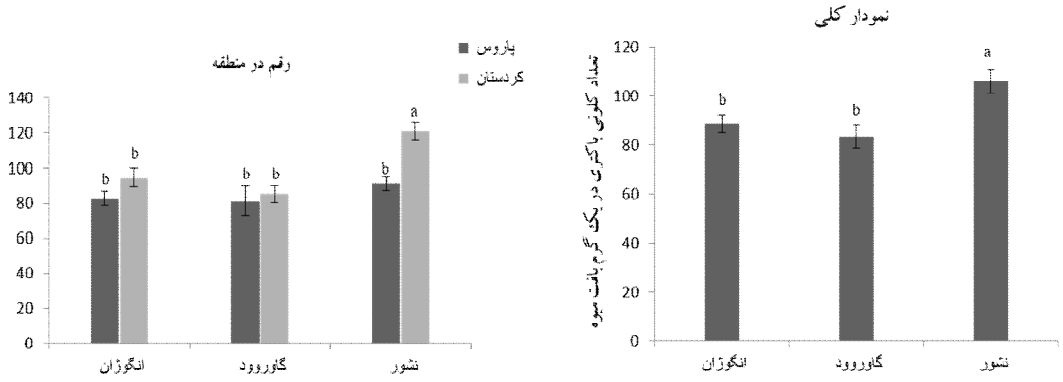
همکاران، 2014). همچنین نمودار کلی(رقم در منطقه) نشان می‌دهد که میزان جمعیت در منطقه نشور در هر دو رقم تفاوت بالایی با سایر مناطق دارد و رقم کردستان نیز جمعیت بالاتری را در مقایسه با رقم پاروس نشان داد ($P < 0.05$) که نتایج طبق نمودارهای زیر قابل مشاهده می‌باشد (شکل 5).




**شکل 2- دندوگرام حاصل از مقایسه توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن *16SrDNA* باکتری جداسازی شده از توت‌فرنگی رقم پاروس (PBE) و کردستان (KBE) با سایر توالی‌های نوکلئوتیدی سویه های استاندارد گونه‌های جنس *Methylobacterium* در پایگاه داده strain info که به روش نزدیکترین همسایگی و با بوت‌استرپ 1000 توسط نرم‌افزار MEGA6 رسم شده است. *Rhizobium aggregatum* به عنوان فرد برون گروه انتخاب شده است.**




**شکل 3- میزان جمعیت باکتری در نمونه های جمع آوری شده از نشور، گاورود و انگوژان برای دو رقم کردستان و پاروس در طی مراحل رسیدگی میوه، حروف متفاوت روی ستون‌ها نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.**




**شکل 4- میزان جمعیت باکتری (اثر رقم در منطقه و اثر کلی فاکتورهای رقم، منطقه و بافت میوه) در دو رقم کردستان و پاروس در طی مراحل رسیدگی میوه. حروف متفاوت روی ستون ها نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است**

## بحث

در این مطالعه باکتری‌های اندوفیت از میوه دو رقم کردستان و پاروس توت‌فرنگی جداسازی و مورد شناسایی قرار گرفتند. نتایج آنالیز فیلوژنی جدایه‌ها براساس مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن *16S rDNA* نشاندهنده تعلق جدایه‌ها به جنس *متیلوباکتریوم* بود. *متیلوباکتریوم‌ها* در انواع زیادی از گیاهان به صورت اندوفیت وجود دارند (دلموته و همکاران، 2009). جنس *متیلوباکتریوم* در گونه‌های مختلف به شکل صورتی رنگ مشاهده شده است که در سنتز کاراتنوئید[1]ها و تولید ترکیبات آلی مانند متانول، متیل‌آمین، ترکیبات فرار و فنولیکی مؤثر می‌باشد،. مهمترین جنسی که در میوه توت‌فرنگی از این باکتری‌ها جداسازی و شناسایی شده، جنس *متیلوباکتریوم* است. در بررسی انجام شده بر روی این ترکیبات و حضور این باکتری‌ها در توت‌فرنگی مشاهده شده است که این باکتری در سنتز عطر و طعم میوه مؤثر بوده و بر اساس رابطه همزیستی نزدیک با میزبان می‌توانند در سنتز این ترکیبات اثر قابل توجهی داشته باشند؛ به طوری که در حضور و یا عدم حضور آن-ها سنتز این ترکیبات تحت تأثیر قرار می‌گیرد (زاباتسکی، 1997). حضور باکتری‌های اندوفیت در بافت میوه توت فرنگی توسط پروب‌هایی برای ژن های 16SrDNA, الکل دی هیدروژناز و ۵،۲-دی متیل-4-هیدروکسی-H2-فوران-3-وان (DMHF) بصورت همزمان نشان دادکه باکتری‌ها در تولید الکل دی هیدروژناز و DMHF نقش دارند (ناسوپولو و همکاران 2014).

در رقم کردستان میزان تراکم جمعیت به مراتب بالاتر از رقم پاروس در منطقه نشور بوده که به احتمال زیاد وجود مواد غذایی کافی و خاک مناسب جهت رشد باکتری و همچنین کمبود میکروارگانیسم‌های رقیب، شرایط دمایی و وجود آشیان مناسب می‌تواند از عوامل افزایش تراکم جمعیت بالای باکتری در این منطقه نسبت به سایر مناطق باشد (کوکلینسکی- سوبرال و همکاران، 2004). جمعیت بالا در این منطقه نسبت به سایر مناطق به احتمال زیاد مربوط به شرایطی می‌باشد که باکتری توانسته است از لحاظ جمعیتی به تراکم مناسب برسد و این شرایط می‌تواند مربوط به عوامل زنده و غیر زنده و شرایط محیطی و دمایی مناسب جهت رشد و تکامل باکتری باشد (روزنبلوث و مارتینز- رومرو، 2006).

در حالت کلی میزان تراکم در میوه‌های رسیده بالاتر از میوه‌های نارس یا نیمه رسیده بود. این افزایش تراکم در میوه رسیده، به گیاه میزبان و شرایط مناسب جهت رشد و

1. carotenoide

تکثیر باکتری برای رسیدن به سطح تراکم مناسب بستگی دارد، که در میوه‌های رسیده نسبت به میوه‌های نارس و نیمه رسیده در هر منطقه، بیشتر قابل مشاهده بود. در مطالعات انجام شده بر روی باکتری‌های اندوفیت و نقش آن‌ها در عطر و طعم میوه نشان می‌دهد که این باکتری‌ها در میزان افزایش سطح تولید ترکیباتی که در سنتز عطر و طعم دخالت دارند، مؤثر می‌باشند. در واقع باکتری‌های اندوفیت بر اساس یک رابطه همزیستی که با میزبان برقرار می‌کنند، در سنتز ترکیبات طعم دهنده دخالت دارند و باعث افزایش سنتز این ترکیبات شده و بر روی میزان بیان ژن‌های موثر در سنتز این ترکیبات، تأثیر می‌گذارند (زبتاکیس و پیرتیلا، 2012؛ زبتاکیس و همکاران، 1999). در مطالعه‌ای که ناسوپولو و همکاران (2014) انجام دادند، مشاهده شده است که یک رابطه همزیستی قوی بین باکتری‌های اندوفیت و توت‌فرنگی وجود دارد که به‌واسطه حضور آن‌ها میزان تولید ترکیباتی که در عطر و طعم میوه مؤثر می‌باشند، افزایش می‌یابد (ناسوپولو و همکاران، 2014). این نتایج بر اساس مطالعات انجام شده توسط زابتاکیس مورد تأیید می‌باشد که افزایش این ترکیبات به‌واسطه حضور باکتری‌های اندوفیت، سبب افزایش بیان ژن‌های مؤثر در سنتز این ترکیبات می‌باشد (زبتاکیس و پیرتیلا، 2012). *متیلوباکتریوم‌ها* تأثیرات مثبتی بر روی رشد و نیز تولید ترکیبات ثانویه در گیاهان داشته و حتی در تعامل و میانکنش با گیاه می‌توانند بر روی بهبود عطر و طعم نیز موثر واقع شوند (آباندا- نک‌پوات و همکاران، 2006).

*متیلوباکتریوم‌ها* به عنوان پیش‌ساز فورانون‌ها[1] در توت‌فرنگی گزارش شده‌اند (پیسارنیتسکی و همکاران، 1992). بررسی‌ها تأثیر باکتری‌های اندوفیت *متیلوباکتریوم* بر عطر و طعم توت‌فرنگی را تأیید کرده است. ورجینر[2] و همکاران (2010) اثر مثبت *Methylobacterium extorquens* را بر عطر و طعم توت‌فرنگی به اثبات رسانده‌اند (ورجینر و همکاران، 2010). *متیلوباکتریوم‌ها* در میزبان‌های مختلفی از جمله پنبه (مک‌اینرو و کولپیپر، 1994)، ذرت شیرین (مک‌اینرو و کولپیپر، 1994)، سویا و حتی کاج اسکاتلندی گزارش شده است. در کاج اسکاتلندی *متیلوباکتریوم* با حضور در سلول‌های اپتلیال مجاری رزین مؤثر بر تولید متابولیت‌های ثانویه گزارش شده است (پیرتیلا و همکاران، 2000).

برای بررسی اثرات مستقیم و غیر مستقیم باکتری‌های جنس *متیلوباکتریوم* نیاز به تحقیقات بیشتری وجود دارد. علاوه بر اثرات این باکتری‌ها بر عطر و طعم شاید متابو لیت‌های ثانویه مهم دیگری نیز تولید کنند که هم ارزش تغذیه‌ای و دارویی دارد و هم باعث سازگاری و مقاومت بیشتر توت‌فرنگی بشوند. استفاده از باکتری‌های اندوفیت برای افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان بصورت عملی تأثیرگذار بوده است. تلقیح ریزوم زردچوبه با باکتری اندوفیت *Azotobactor chroococcum* CL13 باعث افزایش تولید کورکومین در ریشه این گیاه شده است (کومار و همکاران، 2014). در مطالعه دیگری اسپری برگی باکتری *Stenotrophomonas maltophilia* (N5-18) در گیاه خشخاش باعث افزایش تولید آلکالوئیدها و مخصوصا مورفین شد (بونیلا و همکاران، 2014). به علاوه تلقیح گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*) با *باکترهای اندوفیت Staphylococcus sciuri* و *Micrococcus* sp. سبب افزایش تولید متابولیت‌های ضد سرطانی در این گیاه شد (تیواری و همکاران، 2013). یک گونه *متیلوباکتریوم* قادر به تولید گلیوکسیلات می‌باشد که این ماده در تولید مواد معطر و همچنین بعضی از حشره کش‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (شن و وو، 2007). بنابراین احتمالاً بتوان از اسپری باکتری‌های جنس *متیلوباکتریوم* پس از آزمایشات تکمیلی در توت‌فرنگی استفاده نمود.

## تقدیر و تشکر

بدینوسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه کردستان به لحاظ تأمین هزینه -های پژوهشی این تحقیق اعلام میدارند

1. Furanones
2. Verginer

**فهرست منابع:**


1. Abanda-Nkpwatt, D., Müsch, M., Tschiersch, J., Boettner, M. and Schwab, W. 2006. Molecular interaction between Methylobacterium extorquens and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. Journal of experimental botany 57: 4025-4032.
2. Bonilla, A., Sarria, AL., Algar, E., Muñoz Ledesma, FJ., Ramos Solano, B., Fernandes, JB. and Gutierrez Mañero, FJ. 2014. Microbe associated molecular patterns from rhizosphere bacteria trigger germination and *Papaver somniferum* metabolism under greenhouse conditions. Plant Physiology and Biochemistry 74: 133-40.
3. Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F. and Sessitsch, A. 2014. Metabolic potential of endophytic bacteria. Current opinion in biotechnology 27: 30-37.
4. De Melo Pereira, G.V., Magalhaes, K.T., Lorenzetii, E.R., Souza, T.P. and Schwan, R.F. 2012. A multiphasic approach for the identification of endophytic bacterial in strawberry fruit and their potential for plant growth promotion. Microbial ecology 63: 405-417.
5. Delmotte, N., Knief, C., Chaffron, S., Innerebner, G., Roschitzki, B., Schlapbach, R., von Mering, C. and Vorholt, J.A. 2009. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences 106: 16428-16433.
6. Dunbar, J., Barns, S.M., Ticknor, L.O. and Kuske, C.R. 2002. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. Applied and Environmental Microbiology 68: 3035–3045.
7. Edger, P.P., Poorten, T.J., VanBuren, R., Hardigan, M.A., Colle, M., McKain, M.R., Smith, R.D., Teresi, S.J., Nelson, A.D., Wai, C.M. and Alger, E.I. 2019. Origin and evolution of the octoploid strawberry genome. Nature Genetics 51: 541–547.
8. Geider, K., Auling, G., Jakovljevic, V. and Völksch, B. 2009. A polyphasic approach assigns the pathogenic Erwinia strains from diseased pear trees in Japan to Erwinia pyrifoliae. Letter of Applied Microbiology 48: 324–330.
9. Gottel, N.R., Castro, H.F., Kerley, M., Yang, Z.M., Pelletier, D.A., Podar, M., Karpinets, T., Uberbacher, E., Tuskan, G.A., Vilgalys, R., Doktycz, M.J., Schadt, C.W. 2011. Distinct microbial communities within the endosphere and rhizosphere of *Populus deltoides* roots across contrasting soil types. Applied and Environmental Microbiology 77: 5934-5944.
10. Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. and Kloepper, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology 43: 895–9 14.
11. Hancock, J.F. 2000. 17 Strawberries. Temperate Fruit Crops in Warm Climates 445-455.
12. Heinonen, I.M., Meyer, A.S. and Frankel, E.N. 1998. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 4107-4112.
13. Hurek, T., Handley, L.L., Reinhold-Hurek, B. and Piche, Y. 2002. Azoarcus grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. Molecular Plant-Microbe Interaction 15: 233-242.
14. Khan, Z., Guelich, G., Phan, H., Redman, R., Doty, S. 2012. Bacterial and Yeast Endophytes from Poplar and Willow Promote Growth in Crop Plants and Grasses. ISRN Agronomy 2012: 1–11 (doi:10.5402/2012/890280).
15. Knoth, J.L., Kim, S.H., Ettl, G.J. and Doty, S.L. 2013. Effects of cross host species inoculation of nitrogen□fixing endophytes on growth and leaf physiology of maize. Gcb Bioenergy 5: 408-418.
16. Koutsompogeras, P., Kyriacou, A. and Zabetakis, I. 2006. Characterizing NAD-dependent alcohol dehydrogenase enzymes of *Methylobacterium extorquens* and strawberry (*Fragaria*× *ananassa* cv. elsanta). Journal of agricultural and food chemistry 54: 235-242.

17. Krey, T., Vassilev, N., Baum, C. and Eichler-Lobermann, B. 2013. Effects of long- term phosphorus application and plant-growth promoting rhizobacteria on maize phosphorus nutrition under field condition. European Journal of Soil Biology 55: 124-130.
18. Kuklinsky-Sobral, K., Araujo, W.L., Mendonça, C., Geran, L.C., Piskala, A. and Azevedo, J.L. 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. Environmental Microbiology 6: 1244-1251.
19. Kumar, A., Singh, R., Giri, DD., Singh, PK. and Pandey, KD. 2014. Effect of *Azotobacter chroococcum* CL13 inoculation on growth and curcumin content of turmeric (*Curcuma longa* L.). International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 3: 275–283.
20. Kumara, P. M., Shweta, S., Vasanthakumari, M. M., Sachin, N., Manjunatha, B. L., Jadhav, S. S., Shaanker, R. U. 2014. Endophytes and plant secondary metabolite synthesis: molecular and evolutionary perspective. In Advances in Endophytic Research (pp. 177-190). Springer, New Delhi.
21. Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E.R., Taghavi, S., Mezgeay, M. and der Lelie, D.V. 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. Critical Reviews in Plant Sciences 21: 583-606.
22. McInroy, J.A. and Kloepper, J.W. 1994. and the release of GMOs 19-28.
23. Nasopoulou, C., Pohjanen, J., Koskimaki, J.J., Zabetakis, I. and Pirttila, A.M. 2014. Localization of strawberry (*Fragaria ananassa*) and *Methylobacterium extorquens* genes of strawberry flavor biosynthesis in strawberry tissue by *in situ* hybridization. Journal of Plant Physiology 171: 1099-1105.
24. Pirttilä, A.M., Laukkanen, H., Popsiech, H., Myllyla, R., Hohtola, A. 2000. Detection of intracellular bacteria in the buds of scotch pine (Pinus sylvestris L.) by *in situ* hybridisation. Applied and Environmental Microbiology 66: 3073-3077.
25. Pisarnitskii, A.F., Demechenko, A.G., Egorov, I.A. and Gvelesiani, R.K. 1992. Methylpentoses are probable precursors of furanones in fruits. Applied Biochemistry and Microbiology 28: 97-100.
26. Quadt- Hallmann, A., Benhamou, N. and Kloepper, J.W. 1997. A Bacterial endophtes in cotton: mechanisms of entering the plant. Canadian Journal of Microbiology 43: 577- 582.
27. Redman, R.S., Kim, Y.O., Woodward, C., Greer, C., Espino, L., Doty, S.L., Rodriguez, R.J. 2011. Increased fitness of rice plants to abiotic stress via habitat adapted symbiosis: a strategy for mitigating impacts of climate change. PLoS ONE 6: p.e14823.
28. Rosenblueth, M. and Martinez-Romero, E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Molecular plant-microbe interactions 19: 827-837.
29. Rovna, K., Bakay, L., Petrova, J., Terentjeva, M., Cerna, J. and Kacaniova, M. 2015. Characterization of endophytic microflora of Rosa canina fruits. Journal of microbiology. Biotechnology and food sciences 4: 65-68.
30. Salonen, A., Nikkila, J., Jalanka-Tuovinen, J., Immonen, O., Rajilic-Stojanovic, M., Kekkonen, R.A. and de Vos, W.M. 2010. Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. Journal of microbiological methods 81: 127-134.
31. Shakya, M., Gottel, N., Castro, H., Yang, Z., Gunter, L., Labbé, J., Muchero, W., Bonito, G., Vilgalys, R., Tuskan, G., Podar, M., Schadt, C.W. 2013. A multifactor analysis of gungal and bacterial community structure in the root microbiome of mature *Populus deltoides* trees. PLOS one 8: p.e76382.
32. Shen P.-H. and Wu B. 2007. Over-expression of a hydroxypyruvate reductase in *Methylobacterium* sp. MB200 enhances glyoxylate accumulation. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 34: 657–663.

33. Siciliano, S.D., Theoret, C.M., De Freitas J.R., Hucl, P.J. and Germida, J.J. 1998. Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. Canadian Journal of Microbiology 44: 844-851.
34. Simpson D. 2018. The Economic Importance of Strawberry Crops. In: Hytönen T., Graham J., Harrison R. (eds) The Genomes of Rosaceous Berries and Their Wild Relatives. Springer, Cham 1-7.
35. Song, C., Hong, X., Zhao, S., Liu, J., Schulenburg, K., Huang, F.C. and Schwab, W. 2016. Glucosylation of 4-hydroxy-2, 5-dimethyl-3 (2H)-furanone, the key strawberry flavor compound in strawberry fruit. Plant physiology 171: 139-151.
36. Sturz, A.V. and Nowak, J. 2000. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. Applied soil ecology 15: 183-190.
37. Tiwari, R., Awasthi, A., Mall, M., Shukla, AK., Srinivas, KS., Syamasundar, KV. and Kalra, A. 2013. Bacterial endophyte mediated enhancement of in planta content of key terpenoid indole alkaloids and growth parameters of *Catharanthus roseus*. Industrial Crops Production 43: 306-310.
38. Tringe, S.G., Von Mering, C., Kobayashi, A., Salamov, A.A., Chen, K., Chang, H.W., Podar, M., Short, J.M., Mathur, E.J., Detter, J.C. and Bork, P. 2005. Comparative metagenomics of microbial communities. Science 308: 554-557.
39. Verginer, M., Siegmund, B., Cardinale, M., Müller, H., Choi, Y., Míguez, C.B., Leitner, E. and Berg, G. 2010. Monitoring the plant epiphyte Methylobacterium extorquens DSM 21961 by real-time PCR and its influence on the strawberry flavor. FEMS microbiology ecology 74: 136-145.
40. Zabetakis, I. 1997. Enhancement of flavour biosynthesis from strawberry (*Fragaria* x *ananassa*) callus cultures by *Methylobacterium* species. Plant cell, tissue and organ culture 50: 179–183.
41. Zabetakis, I., Gramshaw, J.W. and Robinson, D.S. 1999. 2, 5-Dimethyl-4-hydroxy-2H-furan-3-one and its derivatives: analysis, synthesis and biosynthesis a review. Food chemistry 65: 139-151.
42. Zabetakis, L. and Pirttila, A.M. 2012. The biosynthesis of strawberry flavor and the role of the endophyte *Methylobacterium extorquens.* COST Action 2012; FA11O3: 82.

# فراوانی بررسی برهمکنش کیتوزان با سرب بر فعالیت آنزیم‌ها در دو خاک اسیدی و آهکی

**سعیده افروغ[1] و فرشید نوربخش**

دانشجوی دکتری گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان؛ **saeede.afrough@gmail.com**

استاد گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان؛ **farshid@cc.iut.ac.ir**

دریافت: **99/6/3** و پذیرش: **1400/3/19**

## چکیده

**کیتوزان پلیمری طبیعی و تخریب‌پذیر متشکل از واحدهای گلوکز آمین است که با داشتن گروه‌های عاملی واکنشی می‌تواند فراهمی فلزهای سنگین را برای آنزیم‌های خاک که شناسه‌ای از کیفیت خاک هستند، کاهش دهد. با این حال، آگاهی‌های اندکی از تأثیرپذیری آنزیم‌های خاک در حضور هم‌زمان کیتوزان و فلزهای سنگین در دسترس است. در این پژوهش تأثیر برهم‌کنش کیتوزان در سه سطح شاهد (نبود کیتوزان)، کیتوزان با وزن مولکولی کم (LMC) و کیتوزان با وزن مولکولی زیاد (HMC) با سرب در سه سطح صفر، 50 و 500 میلی‌گرم در کیلوگرم بر غلظت سرب فراهم و فعالیت آنزیم‌های اسید و آلکالین فسفاتاز، ال-گلوتامیناز و هیدرولیز فلورسین دی استات در دو خاک متفاوت (لورک و لنگرود) بررسی و نتایج از نظر آماری مقایسه شدند. هر دو نوع کیتوزان غلظت سرب فراهم را در هر دو خاک به‌طور چشمگیری کاهش داد ولی HMC مؤثرتر بود. در خاک لورک کاربرد هر دو نوع کیتوزان در حضور سرب فعالیت آنزیم‌های اسید فسفاتاز، آلکالین فسفاتاز، ال-گلوتامیناز و هیدرولیز فلورسین دی استات را نسبت به شاهد به‌طور چشمگیری افزایش داد. در خاک لنگرود کاربرد HMC در حضور سرب، سبب افزایش فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز شد، ولی بر فعالیت آنزیم اسیدفسفاتاز، آلکالین فسفاتاز و هیدرولیز فلورسین دی استات تأثیر نداشت. کاربرد HMC در خاک لنگرود نسبت به شاهد تأثیر چشمگیری بر فعالیت آنزیم‌ها نداشت. سطح 50 میلی‌گرم در کیلوگرم سرب در حضور کیتوزان فعالیت اسید فسفاتاز در خاک لورک و هیدرولیز فلورسین دی استات در خاک لنگرود را نسبت به شاهد کاهش داد ولی بر فعالیت آنزیم‌های ال-گلوتامیناز و آلکالین فسفاتاز تاثیر مثبت داشت. سطح 500 میلی‌گرم در کیلوگرم سرب در حضور کیتوزان نیز فعالیت اسید و آلکالین فسفاتاز در خاک لورک و هیدرولیز فلورسین دی استات در خاک لنگرود را کاهش ولی فعالیت دیگر آنزیم‌ها را افزایش داد. به‌طورکلی، در پی افزدون هم‌زمان کیتوزان و سرب به خاک، افزایش یا کاهش فعالیت آنزیم‌ها بستگی به نوع آنزیم، کیتوزان و غلظت فلز داشت.**

**واژه‌های کلیدی:** خاک آهکی یا اسیدی، فعالیت آنزیمی، فلز سنگین، کیتوزان

---

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: اصفهان، دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده کشاورزی، گروه خاکشناسی

**مقدمه**

باتوجه به صنعتی شدن جوامع انسانی، غلظت فلزهای سنگین در خاک به‌شدت رو به افزایش است. فلزهای سنگین آلاینده‌های تخریب ناپذیر محیط زیست هستند که اثرات نامطلوبی بر سلامت اکوسیستم‌های طبیعی دارند. سرب از گروه فلزهای سنگینی است که برای هیچ یک از کارکردهای زیستی نیاز نیست (ووانا و اوکییمن، 2011). عناصر سنگین در غلظت‌های پایین سرطان‌زا هستند و انباشتگی این عناصر در محلول خاک موجب اختلال در رشد گیاهان و فرایندهای زیستی در خاک می‌شود. فلزهای سنگین از منابع طبیعی و فعالیت‌های انسانی وارد خاک می‌شوند. تاکنون روش‌های گوناگونی برای حذف آلاینده‌ها استفاده شده که شامل انعقاد، همرسوبی، اکسیداسیون، ته نشینی، تبادل یونی، جذب سطحی، نانو فیلتراسیون، اسمز معکوس، زیست بهسازی، استخراج با حلال، و غیره است (ژانگ و همکاران، 2016). تثبیت فلزهای سنگین در خاک روشی سازگار با محیط‌زیست است زیرا روش‌هایی که بر پایه حذف و یا انتقال فلز سنگین باشند سبب آلودگی محیط‌زیست می‌شوند. تثبیت فلزهای سنگین در خاک با مواد زائد ساخته‌شده در صنعت و کشاورزی، یک روش ارزان برای پاک‌سازی خاک بشمار می رود. استفاده از مواد طبیعی مانند کیتوزان و بیوچار در مناطق آلوده به فلزهای سنگین در این سال‌ها به دلیل وفور منابع در دسترس و ارزان بودن مورد توجه قرار گرفته است (سوگا، 2001). گزینش روش‌های بهسازی خاک به عوامل گوناگونی ازجمله ماهیت آلاینده‌ها، زمین‌شناسی و نوع خاک، ویژگی‌های منطقه آلوده، هزینه و زمان پاک‌سازی بستگی دارد (لیو و همکاران، 2018).

کیتوزان پلیمری طبیعی دارای کربن و نیتروژن، متشکل از واحدهای گلوگز آمین یکی از مشتقات کیتین است. کیتوزان توسط برخی گونه‌های قارچی نیز تولید می‌گردد. این ترکیب دارای ویژگی‌های منحصربه‌فرد زیستی مانند ضد اکسیداسیون، ضد حساسیت، ضد باکتری و ضد ویروس است. کیتوزان دارای گروه‌های عاملی واکنش دهنده است که می‌توانند سبب کلات کنندگی فلزهای سنگین شوند (تریپاتی و همکاران ، 2017). سه نوع گروه‌های عاملی واکنش دهنده کیتوزان شامل: گروه‌های آمینه در موقعیت کربن شماره دو (C-2)، گروه استامید در موقعیت کربن شماره سه (C-3) و گروه‌های هیدروکسیل در موقعیت کربن شماره شش (C-6) است (نگو و همکاران، 2015). کیتوزان‌های ساخته شده بر پایه وزن مولکولی به سه گروه شامل کیتوزان با وزن مولکولی کم (16 تا 190 کیلو دالتون)، کیتوزان با وزن مولکولی متوسط (190 تا 300 کیلو دالتون) و کیتوزان با وزن مولکولی زیاد (بیشتر از 300 کیلو دالتون) تقسیم می‌شوند (کاماری و همکاران، 2011).

سنجش فعالیت آنزیم‌های خاک برای ارزیابی تأثیرات کوتاه مدت یا بلندمدت آلاینده‌های گوناگون ازجمله فلزهای سنگین در خاک مورد استفاده قرار می‌گیرد. افزون بر این، فعالیت آنزیم‌ها می‌تواند برای نشان دادن اثر فرآیندهای احیای اکوسیستم‌ها یا بازتاب کیفیت خاک پس از بازسازی محیط خاک که توسط فرایندهای صنعتی آسیب دیده است، استفاده شود (سیارکوفسکا ، 2015). هرگونه تغییرات مدیریتی خاک در زمان کوتاهی درتوده‌ی زنده میکروبی و آنزیم‌های خاک منعکس می‌شوند پیش از آن‌که در مواد آلی تغییرات قابل‌اندازه‌گیری دیده شود. فعالیت آنزیم‌های خاک به‌عنوان شاخص‌های اولیه‌ی مناسب ویژگی‌های خاک، به دلیل پاسخ سریع آن‌ها به شیوه‌های مدیریت خاک، ارتباط آن‌ها با بخش زنده‌ی خاک و سهولت اندازه‌گیری، به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است. فعالیت آنزیم‌های خاک برای سرعت بخشیدن به یک شبکه‌ی پیچیده از واکنش‌های بیوشیمیایی لازم برای وقوع فرایندهای زیستی از قبیل تجزیه‌ی بقایای آلی و تشکیل مولکول‌های جدید، چرخه‌ی عناصر غذایی و تأمین مقادیر مناسب از ذخایر عناصر غذایی مورد نیاز گیاه، ضروری است (اکنلر و

طباطبایی ، 2004). به عنوان مثال، اندازه‌گیری هیدرولیز فلورسین دی استات، یک شاخص جایگزین برای اندازه‌گیری فعالیت‌های گروهی از آنزیم‌ها در خاک است. فلورسین دی استات ترکیبی نسبتاً غیر قطبی است که فرض می‌شود به‌سادگی از غشاء یاخته عبور نماید. هیدرولیز فلورسین دی استات در خاک توسط تعدادی از آنزیم‌ها ازجمله لیپازها، پروتئازها، استرازها و دیگر آنزیم‌های برون سلولی تولیدشده توسط جامعه میکروبی، به‌طور غیراختصاصی صورت می‌گیرد. محصول واکنش، فلورسین است که با روش اسپکتروفتومتری قابل اندازه‌گیری است. ازآنجاکه هیدرولیز فلورسین دی استات فرایند گسترده‌ای از فعالیت هیدرولازهای خاک است، می‌تواند نمایانگر فعالیت‌های میکروبی باشد و نشانگر کیفیت عمومی محیط‌زیست میکروبی خاک است (پراسر و همکارن، 2011).

با توجه به فقدان اطلاعات درباره تأثیر کیتوزان بر سطح بازدارندگی که ممکن است فلزهای سنگین بر آنزیم‌های خاک بکار روند، این پژوهش با هدف بررسی برهمکنش کیتوزان و سرب بر فعالیت آنزیم‌های اسید و آلکالین فسفاتاز، ال-گلوتامیناز و هیدرولیز فلورسین دی استات در دو خاک با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی متفاوت صورت گرفت.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری و تعیین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک‌ها

نمونه‌برداری به‌صورت مرکب از عمق 0-15 سانتی‌متری دو منطقه لنگرود (استان گیلان) و لورک (استان اصفهان) زیر کشت چای و جو انجام گرفت. پس از هوا خشک کردن و گذراندن خاک‌ها از الک دو میلی‌متری، برخی از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن‌ها به روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شد (برت ، 2004). بافت خاک به روش پیپت، مقدار pH و قابلیت هدایت الکتریکی در سوسپانسیون یک به 2/5 خاک به آب، کربن آلی به روش اکسیداسیون تر، نیتروژن کل به روش کلدال و کربنات کلسیم معادل به روش خنثی سازی اسید و تیتراسیون برگشتی با سود در حضور معرف فنول فتالئین در خاک‌ها اندازه‌گیری شدند. کربن آلی کیتوزان نیز به روش اکسیداسیون تر اندازه‌گیری شد (بارت، 2004).

### انکوباسیون

برای این کار از خاک‌های برداشت شده نمونه‌های 400 گرمی آماده شد. نمونه‌های 400 گرمی با سرب در سه سطح صفر، 50 و 500 میلی‌گرم فلز در کیلوگرم خاک تیمار شدند. از نمک استات سرب برای آلوده کردن خاک‌ها استفاده شد. نمونه‌های تیمارشده با سرب، برای یک ماه در رطوبت 50 درصد ظرفیت نگهداری آب[1] در دمای 25 درجه سانتی‌گراد در انکوباتور گذاشته شدند. پس از پایان یک ماه انکوباسیون نمونه‌ها از انکوباتور بیرون و هریک از نمونه‌های 400 گرمی بالا به چهار نمونه 100 گرمی تقسیم شد. این چهار نمونه به ترتیب نمونه‌ها با کیتوزان با وزن مولکولی زیاد[2] (به میزان صفر و 10 گرم کربن برکیلوگرم خاک) و کیتوزان با وزن مولکولی کم[3] (به میزان صفر و 10 گرم کربن برکیلوگرم خاک) تیمار و دوباره برای 15 روز در انکوباتور نگهداری شدند.

پس از پایان انکوباسیون، غلظت سرب فراهم و فعالیت آنزیم‌های اسید فسفاتاز، آلکالین فسفاتاز، ال-گلوتامیناز و سرعت هیدرولیز فلورسین دی استات در تیمارها به شرح زیر اندازه‌گیری شد.

### اندازه‌گیری سرب فراهم

برای عصاره‌گیری سرب از خاک از دی اتیلن تری آمین پنتا استیک اسید-تری اتانول آمین[4] (DTPA-TEA) استفاده شد. غلظت سرب در عصاره توسط دستگاه جذب اتمی خوانده شد (اسپارکس و همکاران، 1996).

---

1. Water holding capacity
2. High molucular chitosan
3. Low molucular chitosan
4. Diethylene triamine pentaacetic acid-triethanolamine method (DTPA-TEA)

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها**

برای سنجش فعالیت اسید فسفاتاز و آلکالین فسفاتاز از روش طباطبایی (1994) استفاده شد. در این روش پارانیتروفنل فسفات (PNP) آزاد شده در یک ساعت انکوباسیون خاک در دمای 37 درجه سانتی‌گراد با تولوئن و محلول بافر MUB[1] (pH بافر برای اسید فسفاتاز در 6/5 و برای آلکالین فسفاتاز در 11) به شیوه رنگ‌سنجی در طول موج420 نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. تیمار سود-کلرید کلسیم (pH=10) جهت توقف فعالیت آنزیم به محلول خاک بالا افزوده شد. شاهد تیماری است که قبل انکوباسیون سوبسترا دریافت نکرد و پس از پایان انکوباسیون و افزودن متوقف کننده سوبسترا دریافت نمود. از تفاضل تیمار شاهد و تیمار اصلی فعالیت آنزیم محاسبه گردید (طباطبایی، 1994).

برای سنجش هیدرولیز فلورسین دی استات با روش رنگ‌سنجی، فلورسین آزاد شده در طول موج 490 نانومتر پس از سه ساعت انکوباسیون خاک در دمای 37 درجه سانتی گراد با بافر تریس (pH=7/6) و سوبسترای فلورسین دی استات اندازه‌گیری شد. تیمار استون پس از انکوباسیون برای توقف فعالیت آنزیم‌ها (استون بطور کامل فعالیت را متوقف نمی‌کند) به نمونه‌ها اضافه شد. تیمار شاهد قبل از انکوباسیون به‌جای سوبسترا، استون دریافت نمود و در پایان انکوباسیون پس از افزودن استون، سوبسترا نیز دریافت نمود (گرین و همکاران، 2006؛ پراسر و همکارن، 2011).

سنجش فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز نیز بر اساس اندازه‌گیری آمونیوم آزاد شده از محلول خاک با بافر تریس (pH=10)، سوبسترای گلوتامین و تولوئن در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت بود. آمونیوم آزاد شده در نتیجه تیمار نمونه‌های خاک انکوباسیون شده با اسید کلریدریک دو مولار (جهت توقف فعالیت آنزیمی) و تقطیر بخار یک حجم معین از سوسپانسیون خاک به دست آمده با MgO به مدت چهار دقیقه اندازه‌گیری شد. تیمار گواه قبل از انکوباسیون سوبسترا دریافت نکرد و پس از پایان انکوباسیون و افزودن متوقف کننده سوبسترا دریافت نمود (طباطبایی، 1994).

**تجزیه و تحیل آماری**

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور شامل فاکتور سرب (در سه سطح صفر، 50 و 500 میلی‌گرم بر کیلوگرم) و فاکتورکیتوزان (در سه سطح شاهد یا بدون کیتوزان (C)، کیتوزان با وزن مولکولی بالا (HMW) کیتوزان با وزن مولکولی کم (LMW)) در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری نتایج به کمک نرم افزار SAS و رسم نمودارها توسط نرم افزار Excel صورت گرفت.

## نتایج

**ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی خاک‌های مورد مطالعه**

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک‌های مورد مطالعه در جدول 1 نشان داده شده است. هر دو خاک از نظر کربن آلی متوسط بودند. خاک لنگرد اسیدی و غیرآهکی بود ولی خاک لورک تقریباً خنثی و آهکی بود. غلظت سرب در خاک لنگرود 0/04 و در خاک لورک 1/7 میلی‌گرم بر کیلوگرم بود. بافت خاک لنگرود لوم رسی شنی ولی خاک لورک لوم رسی سیلتی بود. با توجه به ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، خاک لورک از وضعیت مناسب‌تری برای فعالیت جامعه میکروبی برخوردار بود.

[1] Modified universal buffer

**جدول 1- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی اندازه‌گیری شده در خاک‌های مورد مطالعه**

| خاک | بافت | سیلت | رس | کربن آلی | نیتروژن کل | کربنات کلسیم معادل | رطوبت اشباع | سرب فراهم | pH† | †قابلیت هدایت الکتریکی |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | (g/kg) | | | | | | (mg/kg) | | (dS/m) |
| لورک | لوم رسی سیلتی | 450 | 380 | 17 | 1/1 | 383/3 | 490 | 1/7 | 7/2 | 0/7 |
| لنگرود | لوم رسی شنی | 222 | 212 | 25 | 1/4 | ناچیز | 420 | 0/04 | 4/6 | 0/14 |

† pH و قابلیت هدایت الکتریکی در سوسپانسیون 1 به 2/5 خاک به آب اندازه‌گیری شدند.

**اثر کیتوزان بر غلظت سرب فراهم در خاک**

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اصلی کیتوزان در سطح احتمال پنج درصد، اثر اصلی سرب و برهم‌کنش کیتوزان و سرب بر غلظت سرب فراهم در خاک لورک در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول 2). در خاک لنگرود نیز اثرات اصلی کیتوزان، سرب و برهم‌کنش آن‌ها بر غلظت سرب فراهم در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول3). در شکل 1 برهم‌کنش نوع کیتوزان و سطوح سرب بر غلظت سرب فراهم در دو خاک لورک و لنگرود نشان داده شده است. در سطح 500 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک کاربرد هر دو نوع کیتوزان سبب کاهش معنی‌دار غلظت سرب قابل عصاره‌گیری نسبت به تیمار شاهد در هر دو خاک لورک و لنگرود شد. در هر دو خاک اثر کیتوزان با وزن مولکولی زیاد بر کاهش غلظت سرب فراهم بیشتر از کیتوزان با وزن مولکولی کم بود. در سطح 500 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم، غلظت سرب فراهم در تیمار شاهد دو خاک لنگرود و لورک به ترتیب 494/7 و 422/2 میلی‌گرم بر کیلوگرم بود که با افزودن کیتوزان با وزن مولکولی کم به ترتیب به 379/5 و 267/7 میلی‌گرم بر کیلوگرم و با افزودن کیتوزان با وزن مولکولی زیاد به 314/6 و 228/4 میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش پیدا کرد.

**جدول 2- تجزیه واریانس اثر تیمارها بر فعالیت آنزیم‌های اندازه‌گیری شده و غلظت سرب فراهم در خاک لورک**

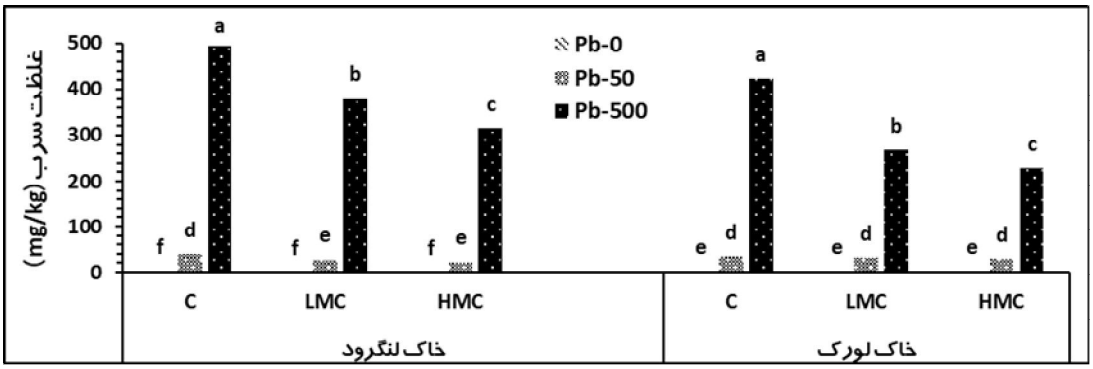
| منابع تغییرها | درجه آزادی | میانگین مربع‌ها | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | غلظت سرب فراهم | اسید فسفاتاز | هیدرولیز فلورسین دی استات | آلکالین فسفاتاز | ال-گلوتامیناز |
| کیتوزان | 2 | 11031* | 1778039** | 1071/8** | 928544/3** | 121363** |
| سرب | 2 | 253417/6** | 227050/2* | 735/5** | 91904/5ns | 7567/2** |
| کیتوزان × سرب | 4 | 71234/3** | 607194** | 611/3** | 311490** | 33057/9** |
| اشتباه | 18 | 120/43 | 11512/6 | 2/13 | 8224/5 | 3/06 |
| ضریب تغییرها | - | 39/1 | 38/5 | 6/7 | 28/7 | 5/6 |

ns، *و ** به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال 5 و 1 درصد است.

**جدول 3-تجزیه واریانس اثر تیمارها بر فعالیت آنزیم‌های اندازه‌گیری شده و غلظت سرب فراهم در خاک لنگرود**

| منابع تغییرها | درجه آزادی | میانگین مربع‌ها | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | غلظت سرب فراهم | اسید فسفاتاز | هیدرولیز فلورسین دی استات | آلکالین فسفاتاز | ال-گلوتامیناز |
| کیتوزان | 2 | 10085/9** | 6248/8* | 68/3ns | 6/5ns | 48/7* |
| سرب | 2 | 437203** | 4670/3* | 690/8** | 1024/8** | 2070** |
| کیتوزان × سرب | 4 | 115603/9** | 3982/7** | 262** | 305/8** | 558/2** |
| اشتباه | 18 | 43/14 | 912/9 | 7/46 | 64/01 | 1/02 |
| ضریب تغییرها | - | 26/4 | 21/2 | 7/5 | 25/5 | 12/9 |

ns، *و ** به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال 5 و 1 درصد است.




**شکل 1- برهم‌کنش نوع کیتوزان و سطوح سرب بر غلظت سرب فراهم در خاک. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال کمتر از پنج درصد است. C: شاهد، LMC: کیتوزان با وزن مولکولی کم و HMC: کیتوزان با وزن مولکولی زیاد. Pb-0، Pb-50 و Pb-500 به ترتیب بیانگر کاربرد صفر، 50 و 500 میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک است.**

**اثر کیتوزان و سرب بر فعالیت اسید فسفاتاز**

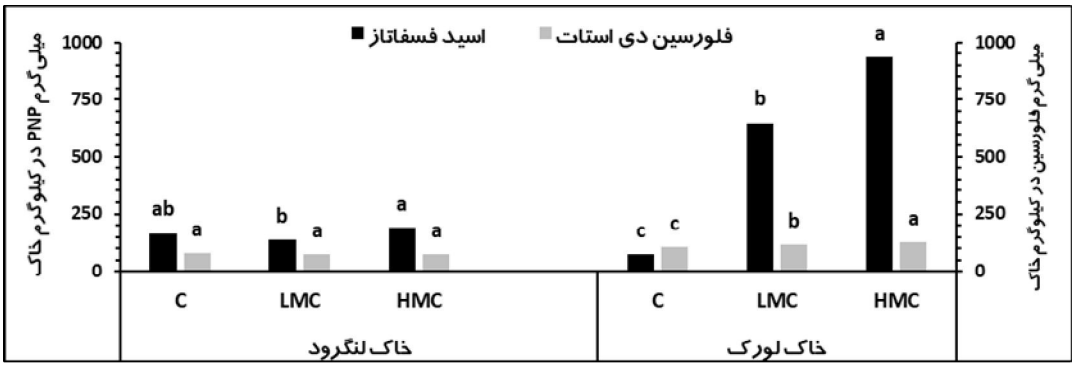
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اصلی سرب در سطح احتمال پنج درصد، اثر اصلی کیتوزان و برهم‌کنش سرب و کیتوزان بر فعالیت اسیدفسفاتاز در خاک لورک در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول 2). در خاک لنگرود نیز اثرات اصلی کیتوزان و سرب بر فعالیت اسید فسفاتاز در سطح احتمال پنج درصد و برهم‌کنش آن‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول 3).

شکل 2 اثر نوع کیتوزان بر فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز را در خاک‌های لورک و لنگرود نشان می‌دهد. کاربرد هر دو نوع کیتوزان در خاک لورک سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز شد (شکل 2). فعالیت اسید فسفاتاز از 75 میلی‌گرم PNP بر کیلوگرم در تیمار شاهد خاک لورک به 649 و 937 میلی‌گرم PNP بر کیلوگرم در تیمارهای کیتوزان با وزن مولکولی کم و وزن مولکولی زیاد افزایش پیدا کرد (شکل 2). با توجه به نتایج، اثر مثبت کاربرد هر دو نوع کیتوزان بر فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز در خاک لورک بیشتر از خاک اسیدی لنگرود بود.

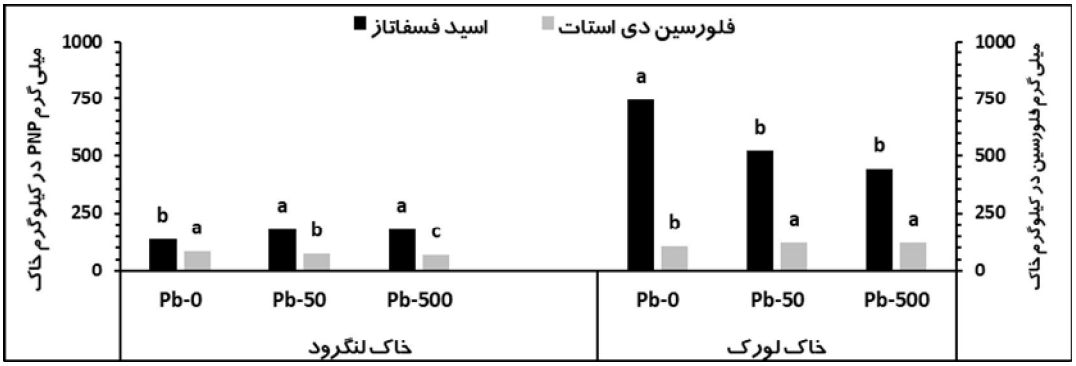
اثر اصلی سرب بر فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز در دو خاک لورک و لنگرود کاملاً متفاوت بود (شکل 3). در خاک لورک با افزایش غلظت سرب فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز به طور چشمگیری کاهش نشان داد حال آنکه در خاک اسیدی لنگرود کاربرد هر دو سطح سرب سبب افزایش فعالیت این آنزیم شد (شکل 3).

در شکل 4 برهم‌کنش نوع کیتوزان و سطوح سرب بر فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز نشان داده شده است. در خاک لورک کاربرد هر دو نوع کیتوزان اثر منفی غلظت

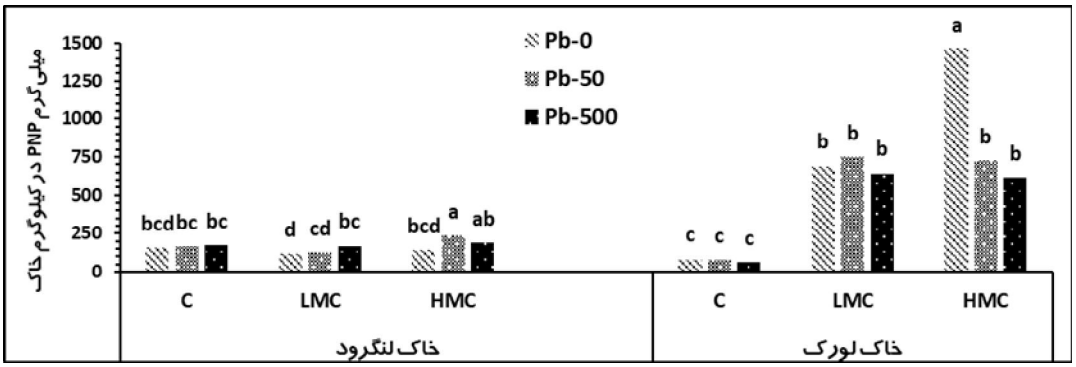
بالای سرب بر فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز نسبت به تیمار شاهد را حذف کرد، ولی در خاک لنگرود تنها کاربرد کیتوزان با وزن مولکولی بالا در سطح 50 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم سبب افزایش فعالیت اسید فسفاتاز شد (شکل 4). بیشترین فعالیت آنزیم فسفاتاز در خاک لورک (1467 میلی‌گرم PNP بر کیلوگرم خاک) و با کاربرد همزمان کیتوزان با وزن مولکولی بالا و سطح صفر سرب (شاهد) مشاهده شد (شکل 4).




**شکل 2- اثر اصلی نوع کیتوزان بر فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز و هیدرولیز فلورسین دی استات در حضور سرب. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال کمتر از پنج درصد است. C: شاهد، LMC: کیتوزان با وزن مولکولی کم و HMC: کیتوزان با وزن مولکولی زیاد**




**شکل 3- اثر اصلی سطوح سرب بر فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز و هیدرولیز فلورسین دی استات. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال کمتر از پنج درصد است. Pb-0، Pb-50 و Pb-500 به ترتیب بیانگر کاربرد صفر، 50 و 500 میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک است**

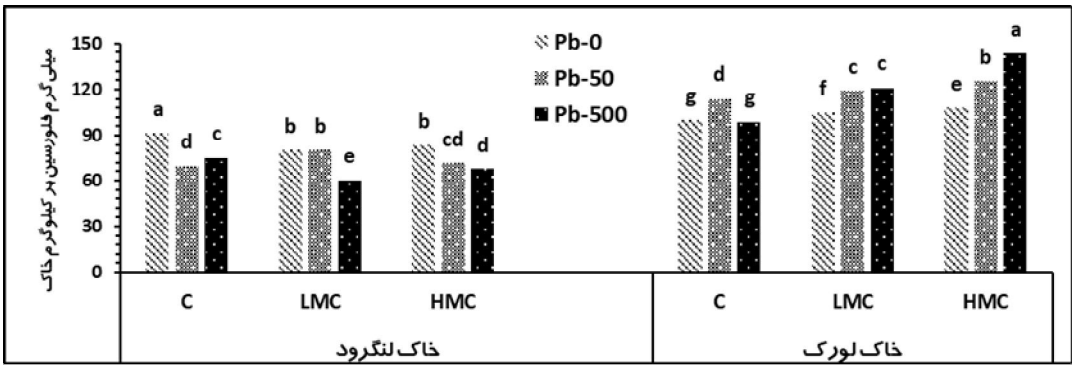



**شکل 4- برهم‌کنش نوع کیتوزان و سطوح سرب بر فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال کمتر از پنج درصد است. C: شاهد، LMC: کیتوزان با وزن مولکولی کم و HMC: کیتوزان با وزن مولکولی زیاد. Pb-0، Pb-50 و Pb-500 به ترتیب بیانگر کاربرد صفر، 50 و 500 میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک است**

**اثر کیتوزان و سرب بر هیدرولیز فلورسین دی استات**

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اصلی کیتوزان، اثر اصلی سرب و برهم‌کنش کیتوزان و سرب بر هیدرولیز فلورسین دی استات در خاک لورک در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول 2). اثر اصلی کیتوزان غیرمعنی‌دار، اثر اصلی سرب و برهم‌کنش آن‌ها بر هیدرولیز فلورسین دی استات در خاک لنگرود در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول 3). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد در خاک لورک کاربرد هر دو نوع کیتوزان موجب افزایش هیدرولیز فلورسین دی استات نسبت به تیمار شاهد شد ولی در خاک اسیدی لنگرود تاثیری بر فعالیت این هیدرولیز نداشت (شکل 2). با افزایش سطح کاربرد سرب هیدرولیز فلورسین دی استات در خاک لنگرود به طور چشمگیری کاهش ولی در خاک لورک افزایش پیدا کرد (شکل 3).

در شکل 5 برهم‌کنش نوع کیتوزان و سطوح سرب بر هیدرولیز فلورسین دی استات نشان داده شده است. در خاک لورک کاربرد هر دو نوع کیتوزان به تنهایی یا همراه با سرب موجب افزایش چشمگیر هیدرولیز فلورسین دی استات نسبت به تیمار شاهد شد ولی در خاک لنگرود نتایج تقریباً برعکس بود (شکل 5). بیشترین میزان هیدرولیز فلورسین دی استات در خاک لورک (143/3 میلی‌گرم فلورسین بر کیلوگرم خاک) در تیمار کیتوزان با وزن مولکولی بالا و سطح 500 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم مشاهد شد. در خاک لنگرود تنها تیمار دارای کیتوازن با وزن مولکولی کم و سطح 50 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم هیدرولیز فلورسین دی استات را نسبت به تیمار شاهد افزایش داد (شکل 5).




**شکل 5- برهم‌کنش نوع کیتوزان و سطوح سرب بر فعالیت آنزیم هیدرولیز فلورسین دی استات. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال کمتر از پنج درصد است. C: شاهد، LMC: کیتوزان با وزن مولکولی کم و HMC: کیتوزان با وزن مولکولی زیاد. Pb-0، Pb-50 و Pb-500 به ترتیب بیانگر کاربرد صفر، 50 و 500 میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک است.**

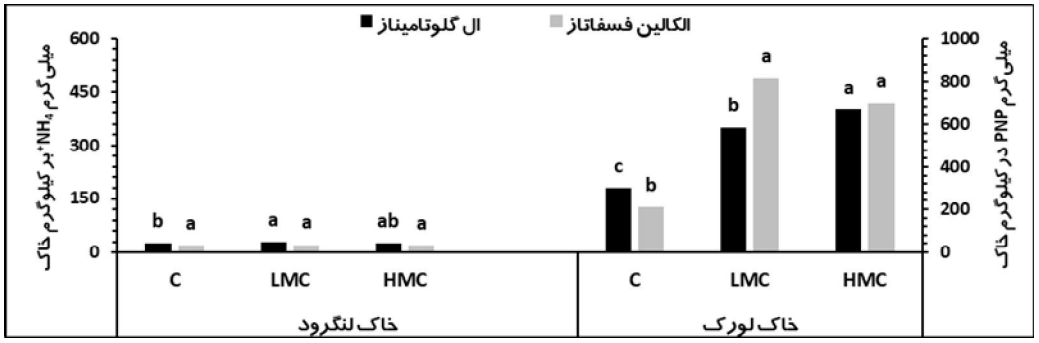
**اثر کیتوزان و سرب بر فعالیت آلکالین فسفاتاز**

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر اصلی کیتوزان و برهم‌کنش کیتوزان و سرب بر فعالیت آلکالین فسفاتاز در خاک لورک در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار و اثر اصلی سرب غیر معنی‌دار بود (جدول 2) همچنین اثر اصلی کیتوزان بر فعالیت آلکالین فسفاتاز در خاک لنگرود غیر معنی‌دار و اثر اصلی سرب و برهم‌کنش سرب و کیتوزان بر فعالیت آلکالین فسفاتاز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول 3). شکل 6 اثر نوع کیتوزان بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز را در خاک‌های لورک و لنگرود نشان می‌دهد. کاربرد هر دو نوع کیتوزان در خاک لورک موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز نسبت به شاهد شد ولی در خاک اسیدی لنگرود هیچ یک از دو نوع کیتوازن اثر چشمگیری بر فعالیت آلکالین فسفاتاز نداشت (شکل 6). فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در خاک لورک به طور قابل

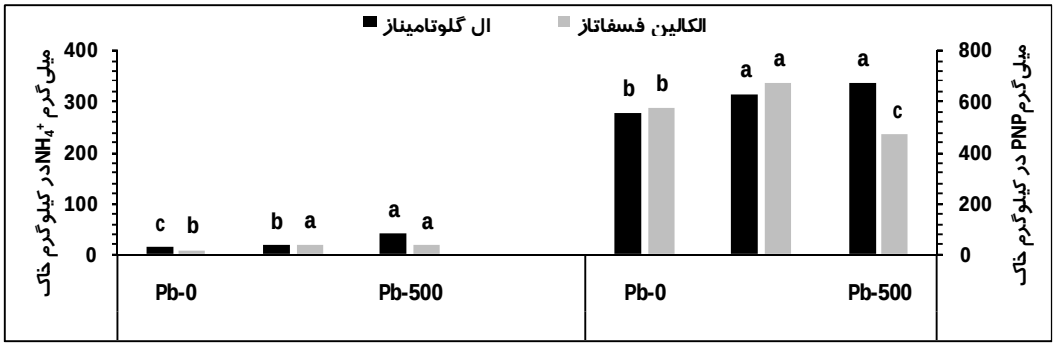
ملاحظه‌ای بیشتر از خاک لنگرود بود. در خاک لورک اثر مثبت کیتوزان با وزن مولکولی کم بر افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز بیشتر از کیتوزان با وزن مولکولی بالا بود. فعالیت آلکالین فسفاتاز از 210 میلی‌گرم PNP بر کیلوگرم در تیمار شاهد خاک لورک به 816 و 697 میلی‌گرم PNP بر کیلوگرم به ترتیب در تیمارهای کیتوزان با وزن مولکولی کم و وزن مولکولی زیاد افزایش پیدا کرد (شکل 6). با توجه به نتایج اثر مثبت کاربرد هر دو نوع کیتوزان بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در خاک آهکی لورک بیشتر از خاک اسیدیی لنگرود بود.

اثر اصلی سرب بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در دو خاک لورک و لنگرود کاملا متفاوت بود (شکل 7). در خاک اسیدی لنگرود با افزایش غلظت سرب فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز به طور چشمگیری افزایش نشان داد حال آنکه در خاک لورک کاربرد سطح 500 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم موجب کاهش فعالیت این آنزیم شد (شکل 7).

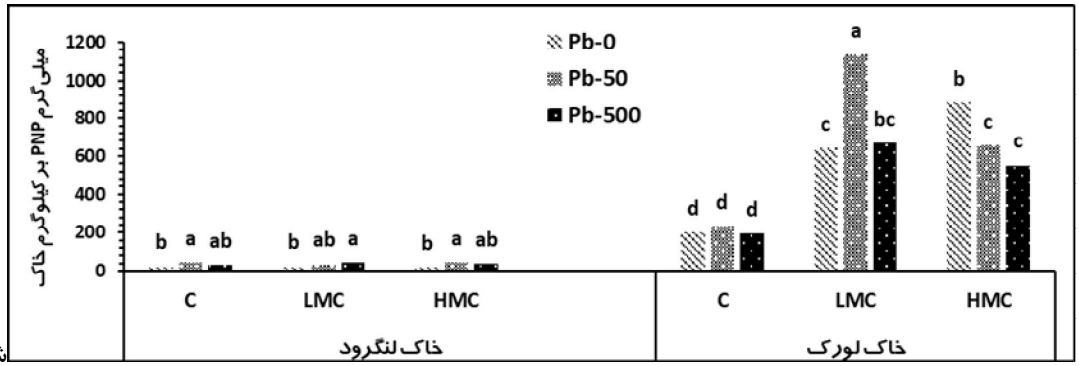
در شکل 8 برهم‌کنش نوع کیتوزان و سطوح سرب بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز نشان داده شده است. در خاک لورک کاربرد هر دو نوع کیتوزان اثر منفی غلظت بالای سرب بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز را نسبت به تیمار شاهد کاهش داد، در حالیکه در خاک لنگرود کاربرد هر دو نوع کیتوزان به‌تنهایی یا در حضور سطوح گوناگون سرب تاثیری بر فعالیت آلکالین فسفاتاز نداشت (شکل 8). بیشترین فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در خاک لورک (1136 میلی‌گرم PNP بر کیلوگرم خاک) و با کاربرد کیتوزان با وزن مولکولی بالا در حضور سطح 50 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم به دست آمد (شکل 8).




**شکل 6- اثر اصلی نوع کیتوزان بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و ال-گلوتامیناز در حضور سرب. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال کمتر از پنج درصد است. C: شاهد، LMC: کیتوزان با وزن مولکولی کم و HMC: کیتوزان با وزن مولکولی زیاد**




**شکل 7- اثر اصلی سطوح سرب بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و ال-گلوتامیناز. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال کمتر از پنج درصد است. Pb-0 ، Pb-50 و Pb-500 به ترتیب بیانگر کاربرد صفر، 50 و 500 میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک است**




شکل 8- برهم‌کنش نوع کیتوزان و سطوح سرب بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال کمتر از پنج درصد است. C: شاهد، LMC: کیتوزان با وزن مولکولی کم و HMC: کیتوزان با وزن مولکولی زیاد. Pb-0، Pb-50 و Pb-500 به ترتیب بیانگر کاربرد صفر، 50 و 500 میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک است.

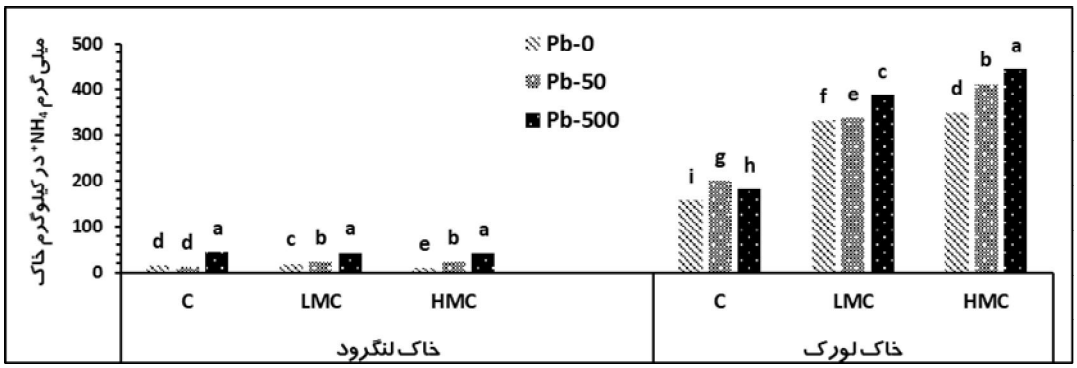
**اثر کیتوزان و سرب بر فعالیت ال-گلوتامیناز**

نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثرات اصلی کیتوزان، سرب و برهم‌کنش آن‌ها بر فعالیت ال-گلوتامیناز در خاک لورک در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول 2). در خاک لنگرود نیز اثر اصلی کیتوزان بر فعالیت ال-گلوتامیناز در سطح احتمال 5 درصد و اثر اصلی سرب و برهم‌کنش سرب و کیتوزان در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول 3). اثر نوع کیتوزان بر فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز در خاک‌های لورک و لنگرود در شکل 6 نشان داده شده است. کاربرد هر دو نوع کیتوزان در خاک آهکی لورک موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز نسبت به تیمار شاهد شد ولی در خاک اسیدی لنگرود تنها کیتوازن با وزن مولکولی کم فعالیت ال-گلوتامیناز را نسبت به شاهد افزایش داد (شکل 6). فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز در خاک لورک به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از خاک لنگرود بود. در خاک لورک اثر مثبت کیتوزان با وزن مولکولی زیاد بر افزایش فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز بیشتر از کیتوزان با وزن مولکولی کم بود. فعالیت ال-گلوتامیناز از 179 میلی‌گرم $NH_4^+$ بر کیلوگرم در تیمار شاهد خاک لورک به 350 میلی‌گرم $NH_4^+$ بر کیلوگرم در تیمار کیتوزان با وزن مولکولی کم و به 401 میلی‌گرم $NH_4^+$ بر کیلوگرم در تیمار کیتوزان با وزن مولکولی زیاد افزایش پیدا کرد (شکل 6). با توجه به نتایج اثر مثبت کاربرد هر دو نوع کیتوزان بر فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در خاک آهکی لورک بیشتر از خاک اسیدی لنگرود بود.

اثر اصلی سطوح سرب بر فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز در دو خاک لورک و لنگرود مشابه بود (شکل 7). در هر دو خاک با افزایش غلظت سرب فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز به طور چشمگیری افزایش پیدا کرد. به عنوان مثال، در تیمار شاهد خاک‌های لورک و لنگرود فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز به ترتیب 278/6 و 14/7 میلی‌گرم $NH_4^+$ بر کیلوگرم بود که با کاربرد سطح 500 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم فعالیت این آنزیم در خاک لورک به 335/8 میلی‌گرم $NH_4^+$ بر کیلوگرم و در خاک اسیدی لنگرود به 42/2 میلی‌گرم $NH_4^+$ بر کیلوگرم افزایش معنی‌دار پیدا کرد (شکل 7).

در شکل 9 برهم‌کنش نوع کیتوزان و سطوح سرب بر فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز نشان داده شده است. در هر دو خاک کاربرد توامان کیتوزان و سرب اثر هم‌افزایی بر فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز نشان داد. در خاک لورک کاربرد کیتوزان با وزن مولکولی بالا نسبت به کیتوزان با وزن مولکولی کم اثر بیشتری در افزایش فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز نشان داد، در حالیکه در خاک لنگرود کاربرد هر دو نوع کیتوزان در حضور سرب اثر مشابهی بر فعالیت

ال-گلوتامیناز داشت (شکل 9). بیشترین فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز در خاک لورک (433/5 میلی‌گرم $NH_4^+$ بر کیلوگرم خاک) و با کاربرد کیتوزان با وزن مولکولی بالا در حضور سطح 500 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم مشاهده شد (شکل 9).




**شکل 9- برهم‌کنش نوع کیتوزان و سطوح سرب بر فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال کمتر از پنج درصد است. C: شاهد، LMC: کیتوزان با وزن مولکولی کم و HMC: کیتوزان با وزن مولکولی زیاد. Pb-0، Pb-50 و Pb-500 به ترتیب بیانگر کاربرد صفر، 50 و 500 میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک است.**

## بحث

نتایج نشان داد که هر دو نوع کیتوزان موجب کاهش غلظت سرب فراهم خاک‌ها نسبت به تیمار شاهد (بدون کیتوزان) شدند. بااین‌حال، رفتار این دو نوع کیتوزان مشابه نبود و کیتوزان با وزن مولکولی زیاد نسبت به کیتوزان با وزن مولکولی کم به‌طور مؤثرتری سبب کاهش غلظت سرب فراهم شد. کاهش غلظت سرب فراهم در خاک‌های مورد مطالعه ناشی از ایجاد پیوند سرب با گروه‌های عاملی کیتوزان است. کیتوزان به دلیل داشتن خاصیت چربی‌دوستی زیاد به علت وجود گروه‌های هیدروکسیل و آمینه اولیه با فعالیت زیاد و ساختار انعطاف‌پذیر زنجیره‌ی پلیمری به‌عنوان یک جاذب خوب برای تمام فلزهای سنگین شناخته شده است (بابل و کورنایوان، 2003). گروه‌های هیدروکسیلی و آمینی کیتوزان می‌توانند به عنوان مکان‌های پیوندی برای کمپلکس کردن یون‌های فلزی عمل کنند (کلودینسکا، 2011؛ تریفاتی و همکاران، 2017). در پژوهش‌های دیگر نیز نسبت به خاک‌های بهسازی نشده، استفاده از کیتوزان قابلیت دسترسی روی (Zn) در خاک و آب منفذی را کاهش داد (تریفاتی و همکاران، 2017). در مطالعه‌ای دیگر گزارش شد که استفاده از کیتوزان در خاک مقدار نیکل قابل استخراج با DTPA را 47 درصد نسبت به شاهد کاهش داد (توران و همکاران، 2018).

فعالیت‌های آنزیمی خاک به آلودگی حساس هستند و به عنوان شاخص تخریب خاک پیشنهاد شده‌اند. با این حال در این مطالعه، رابطه واضحی بین فعالیت برخی از آنزیم‌ها و آلودگی سرب در حضور کیتوزان مشاهده نشد. فعالیت‌های آنزیمی در دو خاک به کاربرد کیتوزان و غلظت سرب به طور متفاوت پاسخ دادند.

تأثیرپذیری آنزیم اسید و آلکالین فسفاتاز در خاک به عواملی از قبیل خاک، نوع کیتوزان و سطح فلز سنگین بستگی دارد. فعالیت فسفاتازها در خاک تحت تأثیر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک شامل میزان رس، رطوبت، عمق، دما، ماده آلی، عناصر غذایی، pH و ویژگی‌های زیستی شامل جامعه میکروبی و فعالیت‌شان است (کیزیلکایا و همکاران، 2007). بیر و همکاران (1992) نیز گزارش کردند که فعالیت‌های بیولوژیکی در خاک از جمله اندازه توده‌ی زنده میکروبی، فعالیت

آلکالین فسفاتاز و دهیدروژناز تحت تأثیر نوع خاک قرار می‌گیرد. میانگین فعالیت اسید فسفاتاز در خاک‌های آلوده به فلزها سنگین 25/95 درصد فعالیت این آنزیم در خاک‌های غیرآلوده بود (لیائو و هوانگ ، 2005). زنگ و همکاران (2007) در غلظت کم سرب اثر تحریکی آن بر فعالیت آنزیم‌های خاک را مشاهده کردند. با این حال، هنگامی که سطح سرب به 500 میلی‌گرم در کیلوگرم افزایش داده شد، فعالیت آنزیم‌های خاک کاهش پیدا کرد. ویسکوفسکا و همکاران (2006) نتیجه گرفتند که سرب در غلظت 50 میلی‌گرم در کیلوگرم فعالیت آنزیم‌های خاک از جمله اسید فسفاتاز و آلکالین فسفاتاز را مهار می‌کند. خان و همکاران (2010) در بررسی اثر سرب، کادمیم و ترکیب سرب-کادمیم بر ساختار جامعه‌ی میکروبی به این نتیجه رسیدند که سرب و/یا کادمیم موجب بازدارندگی فعالیت آنزیم اسید فسفاتاز و کاهش کربن توده‌ی زنده میکروبی می‌شوند. این پژوهشگران همچنین بیان داشتند که شدت بازدارندگی به نوع فلز، غلظت فلز و مدت زمان انکوباسیون بستگی دارد. پان و یو (2011) گزارش کردند که سرب و کادمیم موجب بازدارندگی فعالیت اسید فسفاتاز، اوره‌آز و دهیدروژناز و همچنین تغییر ساختار جامعه‌ی میکروبی می‌شوند. آنها اظهار داشتند که آلودگی ترکیبی سرب و کادمیم اثر بازدارندگی بیشتری برای آنزیم‌های خاک نسبت به آلودگی سرب و کادمیم به تنهایی دارد. به علاوه، غلظت بالاتر این فلزها منجر به بازدارندگی بیشتر شد.

گزارش شده است که میزان بازدارندگی و فعال‌سازی فعالیت آنزیم‌های خاک به عواملی مانند یون فلز سنگین، غلظت فلز، نوع آنزیم، برهمکنش فلزهای سنگین، واکنش بین فلز سنگین و گروه‌های فعال آنزیم‌ها، مواد فیزیکی-شیمیایی و ویژگی‌های خاک (pH، ماده‌ی آلی، نوع و مقدار رس) بستگی دارد (کاراکا و همکاران ، 2010). هر آنزیم خاکی حساسیت متفاوتی به نوع فلز سنگین و شکل شیمیایی آن در محلول خاک نشان می‌دهد (کاراکا و همکاران، 2010). در همین راستا اسفیر و همکاران (1999) گزارش کردند که آرسنیک موجب بازدارندگی فعالیت فسفاتاز و سولفاتاز شد ولی بر اوره‌از بی‌تأثیر بود. واکنش‌های آنزیمی به سه روش گوناگون توسط فلزهای سنگین مهار می‌شوند: (1) کمپلکس کردن سوبسترا (2) ترکیب شدن با گروه‌های عاملی روی آنزیم که توسط پروتئین فعال می‌شوند و (3) واکنش با کمپلکس آنزیم –سوبسترا (ویگ و همکاران، 2003؛ تجادا و همکاران، 2008).

هیدرولیز فلورسین دی استات توسط پروتئینازها، لیپازها و استرازها برای تعیین مقدار قارچ‌ها و باکتری‌های فعال استفاده شده است (اشنورر و راسوال، 1982؛ گسپار و همکاران، 2001). هیدرولیز فلورسین دی استات همچنین به عنوان شاخص خوبی برای فعالیت میکروبی و آلودگی فلزها در خاک در نظر گرفته می‌شود (اشنورر و راسوال، 1982؛ لی و همکاران، 2009). جین یان و همکاران (2014) با کاربرد غلظت‌های صفر تا 2400 میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم در دو خاک قرمز گزارش کردند که با افزایش غلظت سرب هیدرولیز فلورسین دی استات به طور چشمگیری در هر دو خاک نسبت به تیمار شاهد کاهش پیدا کرد. برخی پژوهش‌ها نشان داد که اثر فلز سنگین بر هیدرولیز فلورسین دی استات متغیر است و سنجش فعالیت‌های آن پروتکل مناسبی برای اندازه‌گیری آلودگی آنتیموان نیست (آن و کیم، 2009).

ال-گلوتامیناز به مقادیر اندک یون‌های فلزی شدیدا حساس است. سوبسترای این آنزیم یعنی ال گلوتامین به شکلی از نیتروژن که برای گیاهان قابل دسترس است هیدرولیز می‌شود. مطالعات فرانکنبرگر و طباطبایی (1991) و هارتمن (1971) نشان دادند که فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز توسط یون‌های فلزی سرب، جیوه، نقره و مس مهار می‌شود. اکنلر و طباطبایی (2004) اثر آهک‌دهی و کشاورزی طولانی‌مدت بر فعالیت آریل آمیداز و آمیدوهیدرولازها (آمیداز، اوره‌آز، ال آسپاراژیناز و ال-گلوتامیناز) را مورد بررسی قراردادند. فعالیت آنزیم-ها به طور چشمگیری با pH خاک همبستگی مثبت نشان

داد. در بین آنزیم‌های مورد بررسی ال-گلوتامیناز بیشترین حساسیت را به pH نشان داد. بنابراین pH اسیدی خاک لنگرود یکی از دلایل فعالیت بسیار کمتر آنزیم ال-گلوتامیناز در این خاک نسبت به خاک لورک است. ال-گلوتامیناز منشا میکروبی دارد در نتیجه هرگونه تغییری که منجر به افزایش یا کاهش فعالیت‌های میکروبی گردد فعالیت این آنزیم را تحت تاثیر قرار می‌دهد (فرانکنبرگر و طباطبایی، 1991).

جیانفردا و بولاگ (1996) گزارش کردند که در حضور مهارکننده‌ها، سطح فعالیت نهایی مجموعه‌های آنزیمی به یک سری از ویژگی‌های کاتالیزوری آنزیم مانند: تشکیل پروتئین، هندسه محل فعال، دسترسی به سوبسترا و غیره وابسته است. نتایج این مطالعه تفاوت‌های زیادی بین فعالیت‌های آنزیمی بین دو خاک آزمایش شده نشان داد. این اختلافات احتمالاً تحت تأثیر برخی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک‌ها، به عنوان مثال، pH، میزان کربن آلی و رس قرار گرفته است (اسپیر و همکاران ، 1992). مطالعات متعددی به بررسی روابط بین فعالیت آنزیم و pH خاک اختصاص یافته است. همبستگی مثبت و منفی و عدم همبستگی مشاهده شده است (زانتوا و همکاران ، 1977؛ ابرامیان و گالستیان ، 1981؛ کامرفورد و فاکس، 1992). همبستگی قوی بین pH خاک و حداکثر فعالیت فسفاتازها نشان می‌دهد که پایداری و میزان تولید و آزادسازی این آنزیم‌ها توسط جامعه میکروبی خاک احتمالاً با pH خاک مرتبط است. در همین راستا رنلا و همکاران (2003) گزارش دادند که آلکالین فسفاتاز در خاک اسیدی، در حالیکه اسید فسفاتاز در خاک قلیایی حساس‌تر است. در خاک لورک فعالیت‌های آنزیمی به طور چشمگیری بیشتر از خاک اسیدی لنگرود بود. دلیل آن می‌تواند شرایط مساعدتر خاک لورک از نظر pH و مقدار رس برای فعالیت جامعه میکروبی نسبت به خاک لنگرود باشد. در همین راستا، زنگ و همکاران (2007) در یک آزمایش گلدانی، اثر تیمار سرب بر فعالیت آنزیمی خاک را در یک سیستم خاک-سرب -برنج مورد بررسی قرار دادند. مهار زیاد فعالیت آنزیمی در خاک شنی با میزان ماده آلی کم مشاهده شد. به همین ترتیب، رنلا و همکاران (2003) دریافتند که مهار آنزیم در خاک شنی بیشتر از خاک‌های ریز بافت است زیرا رس از فعالیت آنزیم خاک محافظت می‌کند.

میکروارگانیسم‌های خاک و فرآیندهای میکروبی خاک نسبت به تغییرات کمی و کیفی ماده آلی خاک بسیار حساس هستند (کندلر و همکاران ، 1999). تفاوت در فعالیت آنزیم‌های خاک به تغییرات مرتبط با مدیریت در خصوصیات شیمیایی خاک، مانند میزان ماده آلی خاک نسبت داده شده است (تریزر-سپیدا و همکاران، 2008). تجادا و همکاران (2008) دریافتند که افزایش سطح نیکل باعث کاهش فعالیت‌های آنزیمی خاک شد و بهسازی خاک با ضایعات آلی (کمپوست، کود مرغی) سمیت نیکل برای فعالیت‌های آنزیمی خاک را کاهش داد. بهسازهای آلی فعالیت آنزیمی خاک را به دلایل زیر تقویت می‌کنند: (1) آنزیم‌های درون و برون سلولی باعث تحریک فعالیت میکروبی در مواد اضافه شده می‌شوند، (2) گروه‌های عاملی کربوکسیل، فنول، الکل و کربونیل موجود در مواد آلی با یون‌های سمی واکنش نشان می‌دهند و با تشکیل کمپلکس (کلات کردن فلز) موجب تثبیت آنها می‌شوند (پاسکول و همکاران، 1998). کورو (1996) با کاربرد کیتوزان و باسیلوس سابتیلیس در خاک آلوده به فلزهای سنگین (سرب، مس و روی) افزایش در فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز و کیتوزاناز را گزارش کرد. این پژوهشگر بیان داشت پلی ساکارید کیتوزان رشد باسیلوس‌ها در خاک را تحریک می‌کند. کیتوزان دارای خواص بسیار خوبی به عنوان سکونتگاه برای اطمینان از ادامه رشد باکتری‌ها، سیمان‌سازی سلول‌های میکروبی و فعل و انفعالات متابولیکی در بسترهای جامد مانند خاک است (کورو، 1996). در مطالعه کورو (1996) جمعیت باکتریایی بالاتر با تولید آنزیم بیشتر (فسفاتاز و کیتوزاناز) در تیمار ترکیبی کیتوزان-باسیلوس نسبت به تیمارهای تکی یا شاهد (خاک به علاوه فلز سنگین) همبستگی داشت. این

همبستگی، فعالیت بیولوژیکی بالاتر که توسط پلیمر کیتوزان در تیمارهای مخلوط تحریک شده بود را تأیید می‌کند. در مطالعه حاضر نیز، اکثر فعالیت‌های آنزیمی مورد بررسی در تیمارهای دارای کیتوزان که ماده آلی بیشتری داشتند نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود. کیتوزان می‌تواند برای رشد میکروبی خاک برخی مواد مغذی را فراهم کند و با سرب کلات تشکیل دهد سپس بر روی سرب قابل دسترس در خاک تاثیر بگذارد.

## نتیجه‌گیری

کاربرد کیتوزان در دو خاک آهکی و اسیدی آلوده به سرب قابلیت دسترسی این فلز را کاهش داد. برهمکنش سرب و کیتوازن بر فعالیت‌های آنزیمی بین آنزیم‌ها و بین دو خاک متفاوت و به نوع آنزیم، نوع خاک، نوع کیتوزان و غلظت سرب وابسته بود. اثر مثبت کاربرد هر دو نوع کیتوزان بر فعالیت آنزیم‌ها در خاک آهکی لورک به دلیل شرایط مساعدتر آن برای فعالیت جامعه میکروبی بیشتر از خاک اسیدی لنگرود بود. کیتوزان با وزن مولکولی بالا در کاهش فراهمی سرب و افزایش فعالیت آنزیم‌ها موثرتر از کیتوزان با وزن مولکولی کم بود. اثر بازدارندگی جزئی یا فعال‌کنندگی کیتوزان بر فعالیت‌های آنزیمی به نوع کیتوزان، خاک و آنزیم بستگی داشت. سرب می‌تواند موجب افزایش یا کاهش فعالیت-های آنزیمی خاک شود که اثر آن به غلظت سرب، خاک و آنزیم بستگی دارد. به‌طور کلی حضور هم‌زمان کیتوزان و فلز سنگین می‌تواند موجب افزایش یا کاهش فعالیت‌های آنزیمی شود که اثر آن به خاک، آنزیم، غلظت فلزسنگین و نوع کیتوزان وابسته است. اندازه‌گیری آنزیم‌های خاک به عنوان شاخص‌های زیستی خاک در مناطق آلوده به فلزهای سنگین می‌تواند اثرات مواد بهساز افزوده شده به خاک را به خوبی نشان دهد.

## سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه صنعتی اصفهان انجام شده است که نویسندگان بدین‌وسیله تشکر و قدردانی می‌نمایند.

## فهرست منابع:

1. Abramyan, S. and Galstyan, A. 1981. Acidic basic regulation of soil enzyme action. Pochvovedenie 5: 39-45.
2. An, Y.-J. and Kim, M. 2009. Effect of antimony on the microbial growth and the activities of soil enzymes. Chemosphere 74: 654-659.
3. Babel, S. and Kurniawan, T.A. 2003. Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water: A review. Journal of Hazardous Materials 97: 219-243.
4. Beyer, L., Wachendorf, C., Balzer, F. and Balzer-Graf, U. 1992. The effect of soil texture and soil management on microbial biomass and soil enzyme activities in arable soils of northwest germany. Agribiological Research (Germany) 276-283.
5. Burt, R. 2004. Soil survey laboratory methods manual.
6. Ciarkowska, K. 2015. Heavy metal contamination of soils. Springer.
7. Cuero ,R. 1996. Enhanced heavy metal immobilization by a bacterial-chitosan complex in soil. Biotechnology Letters 18: 511-514.
8. Ekenler, M. and Tabatabai, M. 2004. Arylamidase and amidohydrolases in soils as affected by liming and tillage systems. Soil and Tillage Research 77: 157-168.
9. Fox, T. and Comerford, N. 1992. Rhizosphere phosphatase activity and phosphatase hydrolyzable organic phosphorus in two forested spodosols. Soil Biology and Biochemistry 24: 579-583.
10. Frankenberger Jr, W. and Tabatabai, M. 1991. Factors affecting L-glutaminase activity in soils. Soil Biology and Biochemistry 23: 875-879.
11. Gaspar, M.L., Cabello, M.N., Pollero, R. and Aon, M.A. 2001. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of fungal biomass in soil. Current Microbiology 42: 339-344.

12. Gianfreda, L. and Bollag, J. 1996. Influence of natural and anthropogenic factors on enzyme activity in soil. Soil biochemistry 9: 123-194.
13. Green, V.S., Stott, D.E. and Diack, M. 2006. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. Soil Biology and Biochemistry 38: 693-701.
14. Hartman, S.C. 1971. The enzymes. Elsevier.
15. Jin-Yan, Y., Zhen-Li, H., YANG, X.-E. and Ting-Qiang, L. 2014. Effect of lead on soil enzyme activities in two red soils. Pedosphere 24: 817-826.
16. Kamari, A., Pulford, I. and Hargreaves, J. 2011. Binding of heavy metal contaminants onto chitosans–an evaluation for remediation of metal contaminated soil and water. Journal of Environmental Management 92: 2675-2682.
17. Kandeler, E., Tscherko, D. and Spiegel ,H. 1999. Long-term monitoring of microbial biomass, n mineralisation and enzyme activities of a chernozem under different tillage management. Biology and Fertility of Soils 28: 343-351.
18. Karaca, A., Cetin, S.C., Turgay, O.C. and Kizilkaya, R. 2010. Soil heavy metals. Springer.
19. Khan, S., Hesham, A.E.-L., Qiao, M., Rehman, S. and He, J.-Z. 2010. Effects of cd and pb on soil microbial community structure and activities. Environmental Science and Pollution Research 17: 288-296.
20. Kizilkaya, R., Bayrakli, F. and Surucu, A. 2007. Relationship between phosphatase activity and phosphorus fractions in agricultural soils. Int J Soil Sci 2: 107-118.
21. Kołodyńska, D. 2011. Chitosan as an effective low-cost sorbent of heavy metal complexes with the polyaspartic acid. Chemical Engineering Journal 173: 520-529.
22. Li, Y.-T., Rouland, C., Benedetti, M., Li, F.-b., Pando, A., Lavelle, P. and Dai, J. 2009. Microbial biomass, enzyme and mineralization activity in relation to soil organic c, n and p turnover influenced by acid metal stress. Soil Biology and Biochemistry 41: 969-977.
23. Liao, M. and Huang, C.-y. 2005. Effect of combined pollution by heavy metals on soil enzymatic activities in areas polluted by tailings from pb-zn-ag mine. Journal of Environmental Sciences 17: 637-640.
24. Liu, L., Li, W., Song, W. and Guo, M. 2018. Remediation techniques for heavy metal-contaminated soils: Principles and applicability. Science of the Total Environment 633: 206-219.
25. Ngo, D.-H., Vo, T.-S., Ngo, D.-N., Kang, K.-H., Je, J.-Y., Pham, H.N.-D ,.Byun, H.-G. and Kim, S.-K. 2015. Biological effects of chitosan and its derivatives. Food Hydrocolloids 51: 200-216.
26. Pan, J. and Yu, L. 2011. Effects of Cd or/and Pb on soil enzyme activities and microbial community structure. Ecological Engineering 37: 1.١٨٩٤-٨٨٩
27. Pascual, J.A., Hernandez, T., Garcia, C. and Ayuso, M. 1998. Enzymatic activities in an arid soil amended with urban organic wastes: Laboratory experiment. Bioresource Technology 64: 131-138.
28. Prosser, J.A., Speir, T.W. and Stott, D.E. 2011. Soil oxidoreductases and fda hydrolysis. Methods of soil enzymology 9: 103-124.
29. Renella, G., Ortigoza, A.R., Landi, L. and Nannipieri, P. 2003. Additive effects of copper and zinc on cadmium toxicity on phosphatase activities and atp content of soil as estimated by the ecological dose (ed50). Soil Biology and Biochemistry 35: 1203-1210.
30. Schnürer, J. and Rosswall, T. 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. Applied and Environment Microbiology 43: 1256-1261.
31. Soga, B.H. 2001. Regeneration of heavy metal contaminated soil leachate with chitosan flakes. Doctoral dissertation, McGill University Libraries.

32. Sparks, D.L., Page, A., Helmke, P., Loeppert, R., Soltanpour, P., Tabatabai, M., Johnston, C. and Sumner, M. 1996. Methods of soil analysis. Part 3-chemical methods. Soil Science Society of America Inc.
33. Speir, T., August, J. and Feltham, C. 1992. Assessment of the feasibility of using cca (copper, chromium and arsenic)-treated and boric acid-treated sawdust as soil amendments. Plant and Soil 142: 235-248.
34. Speir, T., Kettles, H., Parshotam, A., Searle, P. and Vlaar, L. 1999. Simple kinetic approach to determine the toxicity of as [v] to soil biological properties. Soil Biology and Biochemistry 31: 705-713.
35. Tabatabai, M. 1994. Soil enzymes. Methods of Soil Analysis: Part 2 Microbiological and Biochemical Properties 5: 775-833.
36. Tejada, M., Moreno, J., Hernández, M. and García, C. 2008. Soil amendments with organic wastes reduce the toxicity of nickel to soil enzyme activities. European Journal of Soil Biology 44: 129-140.
37. Trasar-Cepeda, C., Leirós, M. and Gil-Sotres, F. 2008. Hydrolytic enzyme activities in agricultural and forest soils. Some implications for their use as indicators of soil quality. Soil Biology and Biochemistry 40: 2146-2155.
38. Tripathi, N., Choppala, G. and Singh, R.S. 2017. Evaluation of modified chitosan for remediation of zinc contaminated soils. Journal of Geochemical Exploration 182: 180-184.
39. Turan, V., Ramzani, P.M.A., Ali, Q., Abbas ,F., Iqbal, M., Irum, A. and Khan, W.-u.-D. 2018. Alleviation of nickel toxicity and an improvement in zinc bioavailability in sunflower seed with chitosan and biochar application in ph adjusted nickel contaminated soil. Archives of Agronomy and Soil Science 64: 1053-1067.
40. Vig, K., Megharaj, M., Sethunathan, N. and Naidu, R. 2003. Bioavailability and toxicity of cadmium to microorganisms and their activities in soil: A review. Advances in Environmental Research 8: 121-135.
41. Wuana, R.A. and Okieimen, F.E. 2011. Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. Isrn Ecology 2011.
42. Wyszkowska, J., Kucharski, J. and Lajszner, W. 2006. The effects of copper on soil biochemical properties and its interaction with other heavy metals. Polish Journal of Environmental Studies 15.
43. Zantua, M., Dumenil, L. and Bremner, J. 1977. Relationships between soil urease activity and other soil properties 1. Soil Science Society of America Journal 41: 350-352.
44. Zeng, L.S., Liao, M., Chen, C.L. and Huang, C.Y. 2007. Effects of lead contamination on soil enzymatic activities, microbial biomass, and rice physiological indices in soil–lead–rice (oryza sativa l.) system. Ecotoxicology and Environmental Safety 67: 67.٧٤-
45. Zhang, L., Zeng, Y. and Cheng, Z. 2016. Removal of heavy metal ions using chitosan and modified chitosan: A review. Journal of Molecular Liquids 214: 175-191.

# Investigating chitosan interaction with lead on enzyme activities in two acidic and calcareous soils

**S. Afrough[1], and F. Nourbakhsh**
Ph.D. student, Dep. of Soil Science, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology,
E-mail: saeede.afrough@gmail.com
Professor, Dep. of Soil Science, Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology;
E-mail:farshid@cc.iut.ac.ir
Received: August, 2020 & Accepted: june, 2021

**Abstract**

Chitosan is a natural and destructive polymer that consists of glucosamine units, which, due to reactive groups, can reduce the availability of heavy metals and change soil enzyme activities which is an indicator of soil quality. However, little information is available on simultaneous effect of chitosan and heavy metals on soil enzymes activities. In this study, the interaction of chitosan at three levels of control, low molecular weight (LMC), and high molecular weight (HMC) with Pb at three levels of 0, 50 and 500 mg/kg on available soil lead (Pb) investigated on activity of acid and alkaline phosphatase, L-glutaminase and fluorcine diacetate hydrolysis enzymes in two different soils, Lavark and Langroud. The results were statistically compared. Both chitosan types significantly reduced available Pb concentration in two soils, but HMC was more effective. In Lavark soil, LMC and HMC application to Pb treatments significantly increased the activity of acid and alkaline phosphatase, L-glutaminease and fluorcine diacetate hydrolysis compared to control treatments. In Langroud soil, LMC application to Pb treatments significantly increased L-glutaminease activity, but did not affect the activity of other enzymes. The HMC application in Langroud soil also did not significantly affect activity of any enzymes compared to control. Level of 50 mg/kg Pb in the presence of chitosan significantly decreased acid phosphatase activity in Lavark soil and hydrolysis of fluorcine diacetate hydrolysis in Langroud soil compared to control, but had a positive effect on the activity of other enzymes. Level of 500 mg/kg Pb in the presence of chitosan also reduced acid and alkaline phosphatase activity in Lavark soil and hydrolysis of fluorcine diacetate in Langroud soil, but significantly increased the activity of other enzymes. Generally, increasing or decreasing enzyme activity due to the simultaneous presence of chitosan and Pb depended on soil, enzyme, Pb concentration, and chitosan type.

**Keywords**: Chitosan, calcareous or acidic soil, enzyme activity, heavy metal

[1.] Corresponding author: Soil Science Department, Faculty of Agricultural, Isfahan University of Technology.

# Effect of plant genotype and geographical location on the frequency of endophytic Methylobacterium in two strawberry cultivars fruit

**M. Akhtari, B. Bahramnejad[1], B. Harighi, and M. Naji**

Former Master of Science student of University of Kurdistan; E-mail: akhtari.m92@gmail.com
Associated professor in Plant Biotechnology, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan; E-mail: b.bahramnejad@uok.ac.ir
Associated professor in Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan; E-mail: b.harighi@uok.ac.ir
Former Master of Science student of University of Kurdistan; E-mail: Mohammad.naji72@gmail.com

Received: July, 2019 & Accepted: june, 2021

**Abstract**

Endophytes are microorganisms (bacteria or fungi or actinomycetes) that reside inside the internal tissues of plant with no negative effect on host plants. Endophytic bacteria trigger many positive effects on host plants. The aroma and flavor of strawberry fruit are important characteristics that is affected by endophytic bacteria such as *Methylobacterium.* Endophytic bacteria, are effective in the synthesis of carotenoids and the production of volatile and phenolic compounds. In addition, they are effective in producing the aromatic components in fruit. Endophytic bacterial frequency and genotype can be affected by host plant genotype, climatic and soil conditions. This study was carried out to isolate endophytic bacteria from two strawberry cultivars (Kurdistan and Parous) in three regions (Angouzan, Gavrood and Noshur) in Kurdistan province. For accurate identification of bacterial isolates, 16S-rRNA gene sequencing was used for identification of purified endophytic isolates and their frequency determined at different times of fruit ripening. The results revealed that the all endophytic bacterial isolates from both cultivars were belong to the genus *Methylobacterium.* The frequency of these bacteria was statistically different in two cultivars and in different sampling time. The frequency of Methylobacterium significantly was higher in Kurdistan cultivar compared to Parous cultivar in all three regions ($p < 0.05$). The highest frequency of *Methylobacterium* was observed in the fruit ripening time. It seems that *Methylobacterium* and its frequency probably have an effect on the aroma and delicacy of these two varieties.

**Keywords:** Kurdistan, Parous, Endophytic Bacteria, 16SrRNA, Strawberry

[1] Corresponding author: Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj.

# Evaluation of Plant Growth-Promoting Properties of Native *Azotobacter* Isolates and the Effect of their Inoculation on Growth of Forage Maize under Salinity Stress

**H. Khosravi**[1]

Associate Professor, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran; E-mail: hkhosravi@areeo.ac.ir

Received: October, 2020 & Accepted: june, 2021

**Abstract**

Large areas of Iranian soils have different levels of salinity; so the crop production in those area is very limited. *Azotobacter* can stimulate plant growth by various mechanisms. Inoculation of plants with superior native isolates of *Azotobacter* that are compatible with saline areas may enhance plant growth under salinity stress. In this study, 20 isolates of *Azotobacter* isolated from Iranian soils were evaluated in terms of phosphate solubility, potassium releasing, auxin and siderophore production. Salinity tolerance of isolates was investigated in bacterial culture medium at electrical conductivity of 10, 20, 30, 40 and 50 $dS.m^{-1}$. Six selected isolates at three levels of salinity were evaluated on maize Single Cross 704 in a factorial completely randomized block design with three replications in a greenhouse condition. Salinity stress was applied through irrigation water (0.36, 3 and 6 $dS.m^{-1}$). The laboratory results revealed that Az63, Az69 and Az70 were the most effective isolates in terms of phosphate solubilization and potassium releasing and siderophore production. All isolates of *Azotobacter* grown very well in saline media with electrical conductivity of 10 $dS.m^{-1}$ but some of them could grow in saline media with electrical conductivity of 20 $dS.m^{-1}$. Az22 and Az66 isolates were more tolerant to salinity and they survive at electrical conductivity of 50 $dS.m^{-1}$. The greenhouse results showed that dry weight of clusters increased 64 percent compared to the control when plant inoculated with Az69 isolate under normal irrigation water. Inoculation had no significant effect on growth indices when electrical conductivity of irrigation water was 3 or 6 $dS.m^{-1}$. In this study, Az69 isolate was suggested for further studies.

**Keywords:** Bacteria, Electrical Conductivity, Growth promoter, Inoculation, Salinity.

[1]. Corresponding author: Soil Biology Department, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

# Effects of Streptomycets on colonization and growth of white clover inoculated with arbuscular mycorrhiza

**Z. Pourmirzaei, A. Lakzian[1], N. Ali Asgharzad, A. R. Dehnad and A. Hallajnia**

PhD student, Department of Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad; E-mail: Z.pourmirzai@yahoo.com

Professor, Department of Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad; E-mail: alakzian@yahoo.com

Professor, Department of Soil Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz; E-mail: n-aliasghar@tabrizu.ac.ir

Assistant Professor of Microbiology, Biotechnology Department, East Azerbaijan Research and Education Center Agricultural and Natural Resources, Razi Vaccine and Serum Research Institute, AREEO, Tabriz- Iran; E-mail: a.dehnad@areeo.ac.ir

Assistant Professor, Department of Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad; E-mail: halajnia@um.ac.ir

Received: October, 2020 & Accepted: june, 2021

**Abstract**

The presence of some microorganisms including actinomycetes or their metabolites increase the growth of fungal mycelium, roots colonization and plant growth indices. In this study, an experiment was carried out in a completely random design (CRD) with three replications. The effects of four actinomycete species (*S. griseus*, *S. albogriseus*, *S.*$sp_1$ and *S.*$sp_2$) were examined on the frequency of hyphae, vesicles and colonization of clover root (*Trifolium alexandrinum)* inoculated by *Rhizophagus irregularis.* Wet and dry weight and phosphorus concentrations were measured in shoot and root of clover. The results showed that mycorrhizal symbiosis greatly stimulated by *S. albogriseus* and root and shoot growth and phosphorus absorption significantly increased in shoot and root of clover. Three species of *actinomycetes* considerably improved the fungal organs frequency in clover root, and the percentage of root colonization increased from 48.61% (in control) to 86.59, 72.93% and 66.90% in *S. albogriseus*, *S. griseus*, and S. $sp_2$ treatments respectively. The frequencies of hyphae in clover roots increased from 45.32% (in control) to 92.55, 85.48 and 71.47% *S. albogriseus, S. griseus,* and *S.* $sp_2$ treatments respectively. Inoculation of mycorrhizal roots of clover with *S. albogriseus* significantly increased the wet and dry weight and phosphorus concentrations of clover roots and shoots but *S. griseus* and *S.* $sp_2$ treatments increased shoot dry weight and phosphorus concentration in the roots and shoot of clover root. *S. albogriseus* could possibly be used in the production and preparation of *R. irregularis* inoculant.

**Keywords**: Mycorrhiza helper bacteria, Clover, Mycorrhiza symbiosis, *Streptomyces*.

[1.] Corresponding author: Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad.

# The effect of compost, biochar and bio-inoculant on enzymatic activity and some soil microbial indices

**N. Rezaee Danesh, M. Rasouli-Sadaghiani[1], N. Moradi, and M. Barin**

Former MS student of Urmia University; E-mail: Negarrdanesh@gmail.com
Professor, Urmia University; E-mail: m.rsadaghiani@urmia.ac.ir
Assistant professor, Shahid Chamran University of Ahvaz; E-mail: n.moradi@scu.ac.ir
Assistant professor, Urmia University; E-mail: m.barin@urmia.ac.ir

Received: December, 2020 & Accepted: june, 2021

**Abstract**

Application of biochar and compost with bio-inoculants can improve the microbiological properties of the soil. In order to investigate the effect of *apple pruning* wastes biochar, compost application and bio-inoculants on some biological properties of soil, a pot experiment was performed as a factorial in a completely randomized design with 2 factors: (1) organic resources (control (without organic resources), biochar and compost) and (2) bio-inoculants (control (without bio-inoculants), plant growth-promoting bacteria (*Pseudomonace fluorescens*, *Stenotrophomonas putida*, *Pseudomonace aeruginose*), *arbuscular mycorrhizal* fungus (*Glomus versiform*, *Glomus fasciculatum* ,*Glomus intraradices*) and *endophytic* fungus (*Priformosphora indica*) under greenhouse conditions with three replications. At the end of the corn growth period (65 days), some microbiological properties such as bacterial respiration (BR), substrate-induced respiration (SIR), microbial biomass carbon (MBC), microbial population, carbon availability index (CAI), phosphatase and urease enzymes activity were measured in soil. The results showed that the addition of organic resources and microbial inoculation to the soil caused a significant increase in biological parameters compared to treatments without organic matter and microbial inoculation. The highest levels of BR, SIR, CAI and microbial population were observed in compost- plant growth-promoting bacteria treatments, which increased by 76.2, 33.3, 77.4 and 85.8%, respectively, compared to the control treatment (without organic matter and bio-inoculants). Addition of compost and biochar significantly increased the MBC and the urease activity compared to the control treatment (no organic resources). Simultaneous application of organic and biological treatments also increased the activity of acid and alkaline phosphatase compared to the control treatment. Generally, the application of organic matter and microbial inoculation improves the soil biological properties.

**Keywords**: Fungus, Microbial biomass carbon, Organic matter, plant growth-promoting bacteria

[1]. Corresponding author: Soil Science Department, Faculty of Agricultural, University, Urmia University, Urmia.

# Effects of deforestation and land uses on some chemical and microbial properties of soil in northern Iran (a case study: Salim Sheykh area of Sari)

**H. Moazami Goodarzi[1], B. Jalili, M. Ghajar Sepanlou and S. Salek-Gilani**

Graduate of the master's degree, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University; E-mail: hmgsbbs@gmail.com

Assistant Professor., Dept. of Soil Science, Faculty of Department of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University; E-mail: bahi_jalilis@yahoo.com

Associate Professor., Dept. of Soil Science, Faculty of Department of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Naturl Resources University; E-mail: sepanlou@yahoo.com

Assistant Professor., Dept. of Soil Science, Faculty of Department of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University; E-mail: soroosh1352@yahoo.com

Received: January, 2021 & Accepted: june, 2021

**Abstract**

Deforestation and poor farming practices are two factors that seriously threaten natural resources and seriously damage the soil productivity. This study was conducted to investigate the effects of deforestation and land use on some chemical and microbial properties of soil in different layers of evangelical forest, Citrus Garden and wheat farm soils in Sari township. Organic matter content, total nitrogen, carbon and nitrogen of microbial biomass were significantly reduced when evangelical forest converted to wheat farm (in all three layers) and citrus garden (in two layers of 0-10 and 10-20 cm). When evangelical forest converted to wheat farm (in first layer) organic matter, total nitrogen, carbon and nitrogen of microbial biomass were reduced 35.5, 51.2, 69.7 and 59.8%, respectively. Phosphorus availability and microbial respiration were significantly reduced when evangelical forest converted to wheat farm and citrus garden. The amount of reduction for phosphorus availability and microbial respiration were 85.2% and 35.1% respectively for the top layer of wheat farm. Microbial C/N was significantly reduced when evangelical forest transformed to wheat farm and microbial metabolic coefficient was significantly increased when evangelical forest changed to the two other land uses. The urease activity in both land use (citrus garden and wheat farm) and alkaline phosphatase activity were significantly reduced in wheat farm soils. The results of this study showed that changes in the chemical and microbial properties of the soil was more substantial when evangelical forest converted to agriculture land. The most important reasons for reduction of soil quality may be related to the harvesting (in both citrus garden and wheat farm) and the loss of the closed loop of forest, soil tillage (on the farm) and animal manure application.

**Keywords:** Land use change, soil quality, microbial biomass, enzymatic activity

[1.] Corresponding author: Department of Soil Sciences, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University

# The ability of fluorescent pseudomonads to increase bioavailability of phosphorous in soil and study of some formulation from superior isolates

**A. Akhgar[1], M. Sadeghi Gogheri, P. Abbaszadeh Dahaji and R. Saberi Rice**

Associate professor, Vali-e-Asr University of Rafsanjan; E-mail: arakhgar@yahoo.com
Former MSc. student of Vali-e-Asr University of Rafsanjan;
E-mail: maryam_sadeghi175@yahoo.com
Assistant professor, Vali-e-Asr University of Rafsanjan; E-mail: p.abbaszadeh@vru.ac.ir
Associate professor, Vali-e-Asr University of Rafsanjan; E-mail: r.saberi@vru.ac.ir

Received: May, 2020 & Accepted: june, 2021

**Abstract**

Phosphorus is one of the essential elements for plant growth and increase in the availability of indigenous phosphorus have an effective role in reducing the chemical fertilizers consumption. This study was conducted to investigate some inoculant formulations for phosphate-solubilizing fluorescent pseudomonads for agricultural and environmental uses. For this purpose, 30 isolates belong to fluorescent pseudomonad group were collected from microbial bank of Faculty of Agriculture of Vali-e-asr University of Rarsanjan. Then ability of all isolates for solubilizing tricalcium phosphate were studied. In addition, the ability of those isolates for increasing phosphorus availability in soil amended with and without phosphate rock at 15, 30 and 60 days was inspected. Finally, the persistence of the selected isolate was evaluated in some inoculant formulations. The results indicated that all isolates were able to increase the solubility of tricalcium phosphate in solid and liquid media of PKV and the pH of culture medium also decreased significantly. The maximum and minimum phosphate solubilization in solid media of PKV were related to isolates D33 and D24 and in liquid media, it was related to isolates D6 and D4 respectively. The results showed that isolates D33 and D35 increased the soil phosphorus bioavailability in 15, 30, 60 day after inoculation by 48, 25, 75% and 72, 50, 26% respectively. The cell numbers of D33 and D35 isolates in three inoculant formulations including talcum powder, talcum+rice bran and talcum+sawdust (180 days after inoculation) indicated that maximum and minimum of cell numbers of D33 were occurred in talcum powder and talcum+rice bran ($10^5$ cfu/g) and talcum+sawdust ($8\times10^3$ cfu/g) respectively. Maximum and minimum of cell numbers of D35 were observed in talcum+rice bran ($10^5$ cfu/g) and talcum+sawdust (10 cfu/g) respectively. Finally, inoculant formulation of talcum+rice bran was able to maintained an acceptable cell numbers of both isolates D33 and D35 ($10^6$ cfu/g) at the end of 150 days.

**Keywords:** formulation, inoculant, Plant growth promoting rhizobacteria

[1]. Corresponding author: Soil Science Department, Faculty of Agricultura, Vali-e-Asr University of Rafsanjan.

**Subject** **Page**

**The ability of fluorescent pseudomonads to increase bioavailability of phosphorous in soil and study of some formulation from superior isolates.....8**
***A. Akhgar, M. Sadeghi Gogheri, P. Abbaszadeh Dahaji and R. Saberi Rice***

**Effects of deforestation and land uses on some chemical and microbial properties of soil in northern Iran (a case study: Salim Sheykh area of Sari).....9**
***H. Moazami Goodarzi, B. Jalili, M. Ghajar Sepanlou and S. Salek-Gilani***

**The effect of compost, biochar and bio-inoculant on enzymatic activity and some soil microbial indices .....10**
***N. Rezaee Danesh, M. Rasouli-Sadaghiani, N. Moradi, and M. Barin***

**Effects of Streptomycets on colonization and growth of white clover inoculated with arbuscular mycorrhiza.....11**
***Z. Pourmirzaei, A. Lakzian, N. Ali Asgharzad, A. R. Dehnad and A. Hallajnia***

**Evaluation of Plant Growth-Promoting Properties of Native *Azotobacter* Isolates and the Effect of their Inoculation on Growth of Forage Maize under Salinity Stress.....12**
***H. Khosravi***

**Effect of plant genotype and geographical location on the frequency of endophytic Methylobacterium in two strawberry cultivars fruit.....13**
***M. Akhtari, B. Bahramnejad, B. Harighi, and M. Naji***

**Investigating chitosan interaction with lead on enzyme activities in two acidic and calcareous soils.....14**
***S. Afrough, and F. Nourbakhsh***

**Soil Science Society of Iran  Soil and Water Research Institute**

# Journal of Soil Biology

**Vol. 9, No 2**

**2022**

***Manager-in–Charge* M. Gorji, PhD**

**Professor, College of Agriculture and Natural Resources, Tehran University**

***Professor, University of Tehran***

***Editor-in–Chief: Hadi Asadi Rahmani,* PhD**

**Professor (Research), Soil and Water Research Institute**

## *Editorial Board*

| | |
|---|---|
| **Hadi Asadi Rahmani, PhD** | **Professor (Research), Soil and Water Research Institute** |
| **Hossein Ali Alikhani, phD** | **Professor, University of Tehran** |
| **Naser Aliasgharzad, PhD** | **Professor, University of Tabriz** |
| **Hossein Besharati, PhD** | **Professor, Soil and Water Research Institute** |
| **Alireza Fallah Nosratabad, PhD** | **Associate Professor, Soil and Water Research Institute** |
| **Ahmad Golchin, PhD** | **Professor, University of Zanjan** |
| **Amir Lakzian, PhD** | **Professor, Ferdowsi University of Mashhad** |
| **Habibollah Nadian Ghomshe, PhD** | **Professor, Ramin Agricultural and Natural Resources University of Khuzestan** |
| **Farshid Norbakhsh, PhD** | **Professor, Isfahan University of Technology** |
| **Abdol Hossein. Ziaeian, PhD** | **Associate Professor of Agricultural and Natural Resources Research Center of Fars** |

| | |
|---|---|
| **Executive Manager:** | **Alireza Fallah Nosratabad** |
| **English Editor:** | **Amir Lakzian** |
| **Type and design:** | **Kobra Alinezhad** |

**Address: P. O. Box: 31785-311, Karaj – IRAN**

**Tel / Fax: 026-36208796**

**SSSI Website: www.soiliran.org**

**Soil and Water Research Institute Website: www.swri.ir**

**Journal Website: www.sbj.areeo.ir**

**E-mail: jsb.soilbiology@yahoo.com**

Semiannual

# Journal of Soil Biology

ISSN: 2345-2536

Vol. 9, No. 2, 2022

**Subject** **Page**

**The ability of fluorescent pseudomonads to increase bioavailability of phosphorous in soil and study of some formulation from superior isolates .....8**
*A. Akhgar, M. Sadeghi Gogheri, P. Abbaszadeh Dahaji and R. Saberi Rice*

**Effects of deforestation and land uses on some chemical and microbial properties of soil in northern Iran (a case study: Salim Sheykh area of Sari).....9**
*H. Moazami Goodarzi, B. Jalili, M. Ghajar Sepanlou and S. Salek-Gilani*

**The effect of compost, biochar and bio-inoculant on enzymatic activity and some soil microbial indices .....10**
*N. Rezaee Danesh, M. Rasouli-Sadaghiani, N. Moradi, and M. Barin*

**Effects of Streptomycets on colonization and growth of white clover inoculated with arbuscular mycorrhiza.....11**
*Z. Pourmirzaei, A. Lakzian, N. Ali Asgharzad, A. R. Dehnad and A. Hallajnia*

**Evaluation of Plant Growth-Promoting Properties of Native *Azotobacter* Isolates and the Effect of their Inoculation on Growth of Forage Maize under Salinity Stress.....12**
*H. Khosravi*

**Effect of plant genotype and geographical location on the frequency of endophytic Methylobacterium in two strawberry cultivars fruit .....13**
*M. Akhtari, B. Bahramnejad, B. Harighi, and M. Naji*

**Investigating chitosan interaction with lead on enzyme activities in two acidic and calcareous soils.....14**
*S. Afrough, and F. Nourbakhsh*

www.sbj.areeo.ir