وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

دستورالعمل اندازه‌گیری ویژگی‌های زیستی خاک

نگارندگان
مهدیه شمشیری پور[1]، ندا علیزاده[2]، خدیجه اربابی[3]، اکرم اوتادی[4]، رویا بزارزاده[5]،
الهام شمشیری پور[6]، وحیداله جهاندیده مهجن آبادی[7]، حسین صفاری[8]
[1 و 5] کارشناس محقق موسسه تحقیقات خاک و آب کشور
[2، 3، 4، 6] کارشناس آزمایشگاه موسسه تحقیقات خاک و آب کشور
[7 و 8] عضو هیات علمی موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

نشریه فنی: 643

1403

مشخصات اثر

عنوان: دستورالعمل اندازه‌گیری ویژگی‌های زیستی خاک

نگارندگان: مهدیه شمشیری پور، ندا علیزاده، خدیجه اربابی، اکرم اوتادی، رویا بزارزاده، الهام شمشیری پور، وحیداله جهاندیده مهجن آبادی، حسین صفاری

ناشر: موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

کارشناس انتشارات: سمانه پورمنصور

ویراستار: ناصر دواتگر

سال انتشار: 1403

حق چاپ برای ناشر محفوظ است.

این اثر با شماره 65341 در تاریخ 1403/2/16 در مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی به ثبت رسیده است.

نقل مطالب با ذکر منبع بلامانع است.

نشانی: کرج، میدان استاندارد، جاده مشکین‌دشت، بلوار امام خمینی (ره)، موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

کد پستی: 3177993545 **صندوق پستی:** 311-31785

نمابر : 02636210121 **تلفن:** 36201900- 026

وب‌سایت: http://www.swri.ir **پست الکترونیکی:** info.swri@areeo.ac.ir

مسئولیت صحت مطالب به عهده نگارندگان است.

فهرست مندرجات

عنوان **صفحه**

1- مقدمه و اهمیت موضوع 1

2- دستورالعمل نمونه‌برداری از خاک 1

2-1- تمهیدات قبل از نمونه‌برداری 2

2-2- تجهیزات مورد نیاز در فرایند نمونه‌برداری 2

2-3- عملیات نمونه‌برداری 3

2-4- نمونه‌برداری از عمق و خاک‌های زیر سطحی 6

2-5- ظروف نگهداری نمونه، حمل و نقل و نگهداری نمونه‌ها 7

3- اندازه‌گیری کربن زیست توده میکروبی خاک 9

3-1- اساس آزمون 10

3-2- وسایل و تجهیزات 10

3-3- مواد و واکنش‌گرها 11

3-4- مراحل انجام آزمون 11

3-5- روش ارزیابی نتایج 13

4- اندازه‌گیری فعالیت تنفس میکروبی خاک 15

4-1- اساس آزمون 15

4-2- وسایل و تجهیزات 15

4-3- مواد و واکنش‌گرها 16

4-4- مراحل انجام آزمون 17

4-5- روش ارزیابی نتایج 18

5- آنزیم‌های خاک 19

5-1- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی در خاک 19

5-1-1- اساس آزمون 20

5-1-2- وسایل و تجهیزات 20

5-1-3- مواد و واکنش‌گرها 21

5-1-4- مراحل انجام آزمون 22

5-1-5- تهیه محلول‌های استاندارد 23
5-1-6- رسم منحنی استاندارد 23
5-2- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک 24
5-2-1- اندازه‌گیری آنزیم اوره‌آز به روش رنگ‌سنجی 25
5-2-1-1- وسایل و تجهیزات 25
5-2-1-2- مواد و واکنش‌گرها 25
5-2-1-3- مراحل انجام آزمون 26
5-2-1-4- روش ارزیابی نتایج 27
5-2-2- اندازه‌گیری آنزیم اوره‌آز به روش تقطیر 28
5-2-2-1- وسایل و تجهیزات 28
5-2-2-2- مواد و واکنش‌گرها 29
5-2-2-3- مراحل انجام آزمون 31
5-2-2-4- روش ارزیابی نتایج آزمون 31
5-3- اندازه‌گیری میزان فعالیت سلولاز در خاک 32
5-3-1- اساس آزمون 32
5-3-2- وسایل و تجهیزات 32
5-3-3- مواد و واکنش‌گرها 33
5-3-4- مراحل انجام آزمون 34
5-3-5- تهیه استاندارد و نمودار کالیبراسیون 35
5-3-6- روش ارزیابی نتایج 35
5-3-7- ملاحظات و نکات مهم 36
6- اندازه‌گیری جمعیت میکروبی خاک 36
6-1- وسایل و تجهیزات 37
6-2- مواد و واکنش‌گرها 37
6-3- مراحل انجام آزمون 38
6-4- روش ارزیابی نتایج 39
7- منابع 40

1- مقدمه و اهمیت موضوع

بخش زنده خاک شامل انواع جانوران و ریز جانداران مانند قارچ‌ها، باکتری‌ها، جلبک‌ها و غیره است. مواد آلی توسط ریزجانداران به ترکیباتی تبدیل می‌شوند که به راحتی در دسترس گیاه قرار می‌گیرند. در طی این فرآیندها زیست توده میکروبی خاک به عنوان منبع مواد غذایی معدنی و آلی عمل می‌کند. از این‌رو ریز جانداران خاک بخش اصلی حاصلخیزی طبیعی خاک هستند. آنها می‌توانند رشد گیاه را تقویت کنند، بهره‌وری محصول را افزایش دهند و به شکل قابل توجهی به تغذیه معدنی گیاهان زراعی کمک کنند.

بررسی ویژگی‌های زیستی خاک آگاهی‌های جدید درباره‌ی کاربردهای پنهان و آشکار میکروب‌های مفید به عنوان کودهای زیستی را ارائه می‌کند. ریزجانداران محرک رشد گیاه (PGPM)[1] بر تغذیه و رشد گیاه از طریق مکانیسم‌های مختلفی از جمله تثبیت نیتروژن، تجزیه مواد آلی، حل شدن مواد معدنی کم محلول، آزادسازی ترکیبات کلات و مواد فعال زیستی مانند فیتوهورمون[2]ها، ویتامین‌ها و آنزیم‌ها و افزایش کارایی سیستم ریشه در جذب عناصر غذایی نقش زیادی دارد (Altomare and Tringovska., 2011). ویژگی‌های زیستی خاک نشان می‌دهد که خاک تا چه اندازه می‌تواند تامین کننده تغذیه‌ای خوبی برای گیاهان باشد. بخشی از این ویژگی‌ها که در این دستورالعمل به آن پرداخته شده است عبارتند از: جمعیت قارچ‌ها و باکتری‌های موجود در خاک، زیست توده و تنفس میکروبی و آنزیم‌های خاک که برای اندازه‌گیری این ویژگی‌ها از روش‌ها و تجهیزات تخصصی در آزمایشگاه استفاده می‌شود. زیاد بودن مقدار این ویژگی‌ها در خاک نشان‌دهنده بیشتر بودن مقدار مواد آلی و کیفیت حاصلخیزی خاک است.

2- دستورالعمل نمونه‌برداری از خاک

از آنجا که یکی از مهمترین بخش‌ها در صحت نتایج اندازه‌گیری خصوصیات میکروبی خاک، نمونه‌برداری صحیح از خاک می‌باشد، تشریح روش‌های جمع‌آوری نمونه‌های خاک برای بررسی ویژگی‌های میکروبی در خاک ضرورت دارد. نمونه‌های

[1] Plant Growth Promoting Microorganisms
[2] Phyto Hormones

خاک می‌توانند به روش‌های مختلف و با تجهیزات متنوع با توجه به عمق دلخواه، نوع نمونه (دست‌خورده یا بکر) و نوع خاک (اراضی زیر کشت، اراضی مستعد و...) برداشت شوند. خاک‌های سطحی یا زیر سطحی با استفاده از بیلچه، ماله و یا کمچه نمونه‌برداری می‌شوند. اوگر دستی، اوگرفلایت و حتی بیل مکانیکی تجهیزاتی هستند که برای برداشت نمونه از عمق‌های بیشتر خاک مناسب هستند.

2-1- تمهیدات قبل از نمونه‌برداری

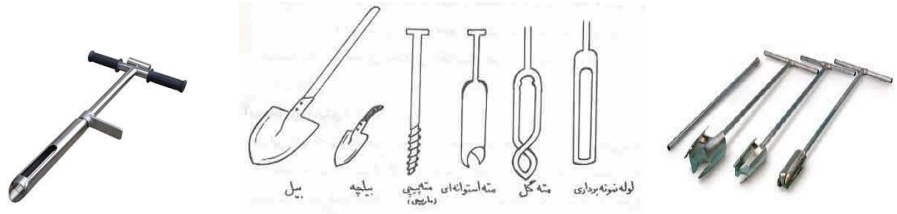
برای آن‌که عملیات نمونه‌برداری بدرستی انجام شده و نمونه‌های لازم در کمترین زمان ممکن با رعایت اصول صحیح تهیه شوند توجه به نکات زیر الزامی است.

- پیش از آغاز نمونه‌برداری نقشه‌های لازم را تهیه کرده و طرح عملیات را برنامه‌ریزی کنید.
- تعداد نمونه‌ها، تعداد نقاط نمونه‌برداری بر حسب وسعت منطقه، هدف آزمایشات و تجهیزات لازم برای اجرای عملیات نمونه‌برداری باید قابل برنامه‌ریزی باشند.
- اطلاعات هواشناسی منطقه را از پیش دریافت و به آن توجه داشت باشید.
- در صورت امکان برای مناطق وسیع و بدون سابقه، بازدید میدانی و شناسایی نقاط هدف را انجام دهید.
- از میخ‌های چوبی و پرچم‌های مناسب برای شناسایی و علامت‌گذاری نقاط نمونه‌برداری استفاده کنید.
- برای انتخاب نقاط نمونه‌برداری هدف داشته و نقاط مناسب را با توجه به شرایط منطقه، محدودیت دسترسی‌ها یا موانع انتخاب کنید.

2-2- تجهیزات موردنیاز در فرآیند نمونه‌برداری

- نقشه‌های منطقه یا نقشه واحد مورد مطالعه
- تجهیزات ایمنی موردنیاز برای عملیات میدانی
- ابزار موردنیاز برای ثبت موقعیت مکانی (GPS دستی)

- متر نواری
- میخ یا پرچم پیمایش
- دوربین و اسباب لازم برای تهیه مستندات (عکس و فیلم)
- سطل، کاسه و ظروف استیل یا پلاستیکی برای همگن سازی نمونه‌ها
- ظروف یا کیسه‌های پلاستیکی نگهداری نمونه با قابلیت بسته شدن مناسب (کیسه زیپ‌دار)
- دفترچه یاداشت و بر چسب اطلاعات نمونه
- بیلچه، کاردک، ماله، قاشقک فلزی یا پلاستیکی
- اوگر، مته و لوله‌های نمونه‌برداری (شکل 1)



شکل 1- انواع اوگر و ابزار نمونه‌برداری

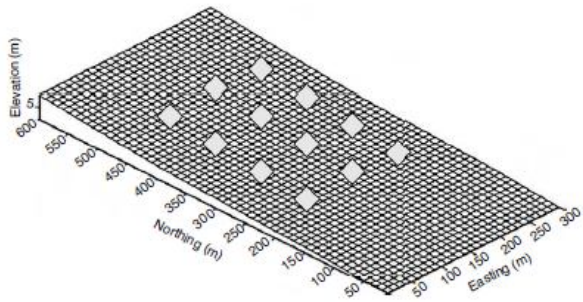
3-2- عملیات نمونه‌برداری

الگوهای نمونه‌برداری و حتی تعداد نمونه‌های برداشت شده بسیار متفاوت است و بستگی کامل به ویژگی‌های سایت و نیز ملاحظات اقتصادی مرتبط با هزینه آزمایشات دارد. معمولا داشتن آن تعداد نمونه که به لحاظ آزمایشی و آماری رضایت‌بخش باشد، بسیار گران و پرهزینه است که عامل مهمی در کم کردن تعداد آزمایشات و در نتیجه هزینه‌های مربوط خواهد بود. باید در نظر داشت در زمین‌های کوچک و محدود که برداشتن تعداد زیادی نمونه محل را تخریب و یا برای مطالعات بعدی نامناسب می‌کند نیز مطلوب نیست. بهرحال همواره باید تعداد نمونه‌های لازم را برای حفظ ملاحظات

آماری در نظر داشت. در هر مزرعه یا عرصه، نمونه‌برداری می‌تواند به روش‌های مختلفی انجام شود. به طور کلی سه طرح برای نمونه‌برداری وجود دارد که عبارتند از:

نمونه‌برداری تصادفی[1]، نمونه‌برداری شبکه‌ای[2] و نمونه‌برداری بنچ مارک[3]. در نمونه‌برداری تصادفی نمونه‌ها از نقاطی که بطور تصادفی در عرصه موردنظر قرار گرفته‌اند انجام می‌شود. برای انتخاب این نقاط می‌توان از دستگاه GPS استفاده کرد. در این روش الگوی زیگزاگی با اجتناب از نقاط غیر مفید مثل چاله‌ها، خطوط حصار، کانال‌های آب و... را می‌توان در سطح مزرعه استفاده کرد. معمولا نمونه‌ها با یکدیگر ترکیب و یک نمونه مرکب حاصل می‌شود. این روش اگرچه با توجه به تعداد اندک نمونه ارزان و اقتصادی بنظر می‌رسد ولی اطلاعات کامل و دقیقی را با توجه به محدود بودن تعداد نمونه‌ها در خصوص ویژگی‌های خاک ارائه نمی‌کند.

در نمونه‌برداری شبکه‌ای یک سیستم شبکه‌ای در نظر گرفته شده و یک نمونه مرکب از هر گره موجود در شبکه برداشت و بعنوان یک نمونه مستقل برای اندازه‌گیری فرستاده می‌شود. این طرح اگرچه روش گران قیمتی در نمونه‌برداری و آنالیز خاک محسوب می‌شود، ولی اطلاعات بسیار زیادی را در باره‌ی ویژگی‌های اندازه‌گیری شده خاک و منطقه هدف ارائه می‌کند (شکل 2).



شکل 2- مثالی از نمونه‌برداری شبکه‌ای شامل 4 نوار برش موازی به شیوه نمونه‌برداری نزدیک به سطح

[1] Random
[2] Grid
[3] Benchmark

در طرح نمونه‌برداری بنچ مارک در محل نمونه‌برداری یک سایت نماینده یا معیار مشخص می‌شود. این سایت معیار می‌بایست تقریبا یک چهارم هکتار یا معادل 30x30 متر باشد. حدود بیست نمونه یا بیشتر بطور تصادفی از سایت برداشت شده و با هم ترکیب می‌شوند. برای آزمایش‌های بعدی و یا سال‌های بعد براحتی می‌توان به این محدوده مراجعه کرد. از برتری این روش این است که می‌توان هر ساله تغییرات ویژگی‌های خاک را، مثلا شرایط تغذیه‌ای و زیستی آن را در این سایت بررسی کرد.

هرگاه هدف از اندازه‌گیری نمونه‌های خاک بررسی شرایط تغذیه‌ای و زیستی خاک باشد از جنبه‌ی زمانی بهتر است نمونه‌برداری در زمان نزدیک‌تر به کاشتن بذر یا زمانی که فعالیت زیستی بسیار کم است انجام شود. نمونه‌برداری پاییز هنگامی مناسب است که دمای خاک کمتر از 10 درجه سلسیوس شده و تغییرات زیادی در مقدار مواد غذایی خاک رخ نمی‌دهد. نمونه‌برداری بهاره می‌بایست پیش از بذرکاری و بعد از پایان یخبندان انجام شود. معمولا عمق مناسب برای نمونه‌برداری 15-0 و 60-15، یا 30-0 و 60-30 سانتی‌متر است.

برای نمونه‌برداری خاک‌های سطحی یا نزدیک به سطح از ابزارهایی مانند بیلچه، کج بیل، ماله و کمچه استفاده می‌شود. برای رسیدن به عمق مورد نظر می‌توان لایه‌های رویی را کنار زده و با قاشقک مناسب (استیل ضد زنگ یا پلاستیکی) نمونه را برداشت نمود. همچنین برای تهیه یک بلوک از خاک، با کمک ماله بنایی تخت نمونه مورد نظر برداشت می‌شود. اگر عوامل مزاحمی مانند تکه چوب، سنگ، گیاهان و یا دیگر مواد اضافی وجود دارد با کمک بیلچه آن‌ها را از محل دور کنید. بهتر است با توجه به تعداد و نوع آزمایشات هدف مقدار کافی از نمونه برداشت و در یک سطل یا کاسه پلاستیکی یا استیل ضد زنگ بریزید. خاک را کاملا مخلوط کرده تا یک نمونه همگن حاصل شود. سپس نمونه را در یک ظرف مناسب برچسب‌گذاری شده منتقل کنید و درب آنرا محکم کنید. در مورد نمونه‌های مرکب همه نمونه‌ها را در یک ظرف بزرگ ریخته خوب مخلوط کرده و سپس به ظرف اصلی منتقل کنید. به تمیز کردن ظروفی که چندین بار استفاده می‌شوند توجه کافی کنید.

2-4- نمونه‌برداری از عمق و خاک‌های زیر سطحی

برای برداشت نمونه‌های بخش‌های عمیق‌تر از اوگر و استوانه نمونه‌گیر جدار نازک استفاده کنید. این سیستم شامل یک اوگر، سر، چند میله امتداد و یک دسته T شکل است. اوگر برای حفر یک گمانه تا عمق دلخواه بکار رفته و سپس خارج می‌شود. نمونه ممکن است مستقیما از سر اوگر برداشت شود. همچنین می‌توان سر اوگر را با یک بخش که مشتمل بر یک استوانه نمونه‌گیر است تعویض نمود و آنرا در گمانه موردنظر فرو برد و در انتها نمونه را بصورت مغزه جدا نمود. مراحل زیر را برای برداشت نمونه خاک با اوگر دنبال کنید.

- سر اوگر را به میله‌های امتداد و به دسته T شکل وصل کنید.
- سطح نقطه برداشت خاک را از ضایعات پاک‌سازی کنید. بهتر است یک لایه نازک از خاک سطحی را در دایره‌ای به قطر 30 سانتی‌متر اطراف نقطه، برداشت و دور ریخته شود.
- هنگام اوگر زدن به تناوب خاک‌های خارج شده را از اطرف گمانه جمع کرده و روی یک سطح پلاستیکی که نزدیک محل کار پهن کرده‌اید بریزید تا از ریزش آن‌ها در داخل اوگر جلوگیری شود (شکل 3). ترمیم محل برداشت با این روش راحت‌تر انجام خواهد شد.
- پس از رسیدن به محل دلخواه اوگر را به آرامی و با دقت از گمانه خارج کنید. سر اوگر را از میله‌های امتداد جدا کرده و با یک غلاف برنده و استوانه نمونه‌گیر جایگزین کنید.
- استوانه نمونه‌گیر را با دقت و آرامی در گمانه پایین برده بتدریج استوانه را در داخل خاک فشار دهید.
- غلاف برنده را خارج کرده از میله‌ها جدا کنید.
- استوانه نمونه‌گیر را خارج کنید.
- خاک بالای مغزه (حدود 2-3 سانتی‌متر) را دور بریزید. تمام یا بخشی از خاک را با کمک قاشقک به ظرف نمونه منتقل و درب ظروف را محکم کنید. در صورت نیاز نمونه را قبلا مخلوط و همگن کنید.

- محل برداشت را با خاک‌های کنار زده شده ترمیم کنید. بطور کلی بهتر است برداشت نمونه‌ها از محیط با کمترین تغییر و دگرگونی انجام شود (شکل 3).

شکل 3- نمونه‌برداری با اوگر دستی

برای برداشت نمونه‌های بعدی تمام تجهیزات استفاده شده که در تماس با خاک بوده‌اند باید بطور کامل تمیز شده و در صورت نیاز ضدعفونی شوند. در صورت تعدد نمونه‌ها تمامی اطلاعات باید در دفترچه عملیات ثبت شود. حداقل اطلاعات موردنیاز عبارتند از:

- نام نمونه بردار و وابستگی او به پروژه، ساعت و تاریخ
- شماره نمونه
- موقعیت برداشت نمونه
- عمق محل تهیه نمونه
- اهداف آزمایشی مرتبط با تهیه نمونه
- شرح تکمیلی در خصوص شرایط برداشت نمونه یا وضعیت محیط، شرایط جوی هنگام برداشت نمونه
- روش برداشت و تهیه نمونه

2-5- ظروف نگهداری نمونه، حمل و نقل و نگهداری نمونه‌ها

از آنجا که معمولا انجام آزمایشات نمونه خاک بلافاصله پس از نمونه‌برداری انجام نشده و نمونه‌ها برای مدت زمانی نیاز به نگهداری دارند، توجه به شرایط استاندارد

ظروف و نیز چگونگی حمل و نگهداری کوتاه مدت یا بلند مدت نمونه‌ها سبب بروز کمترین خطا در نتایج حاصل از آزمایشات خواهد شد. ظروف شیشه‌ای دردار یا کیسه‌های نایلونی زیپ‌دار را می‌توان بعنوان ظرف نمونه مورد استفاده قرار داد. اندازه ظرف بر حسب مقدار نمونه و مواد گیاهی همراه آن می‌تواند متغیر باشد (شکل 4). برای نمونه‌هایی که سنجش مواد فرار در آن‌ها مد نظر نیست می‌توان از ظروف شیشه‌ای دهان گشاد 500 میلی‌لیتری با درب فلزی یا کیسه‌های دهان گشاد با قابلیت مسدود شدن کافی استفاده کرد. بهرحال ظروف باید کاملا بسته و فاقد هر گونه آلودگی باشند. استفاده از مواد شیمیایی برای نگهداری نمونه‌ها توصیه نمی‌شود. پس از برداشت نمونه و ثبت اطلاعات لازم بصورت برچسب روی ظروف، نمونه‌ها سریعا به محیط خنک و دمای 4 درجه و دور از تابش نور خورشید منتقل شوند تا واکنش‌های احتمالی به حداقل برسد. توجه به نکات زیر برای نگهداری و ذخیره نمونه‌ها در شرایط استاندارد ضروری است.

شکل 4- برداشت و انتقال نمونه‌ها به کیسه‌های پلاستیکی

- ظروف یا کیسه‌های حاوی نمونه را کاملا مسدود کنید تا از بروز آلودگی و کاهش رطوبت آن‌ها جلوگیری شود.
- برای پیشگیری از تغییرات ناخواسته و نامطلوب در نمونه‌ها، آن‌ها را در یخچال نگهداری کنید.
- عصاره‌گیری‌ها و یا هضم نمونه‌ها در کوتاه‌ترین زمان انجام شود تا ویژگی موردنظر در هنگام عصاره‌گیری یا هضم، نگهداری و تثبیت شود. برای اندازه‌گیری خصوصیات زیستی خاک این عصاره برای مدت کوتاهی قابل نگهداری است.
- بطور کلی بهتر است اهداف آزمایشی نمونه‌ها در کوتاه‌ترین زمان انجام شود.
- برای اهداف آزمایشی خاص (مواد فرار، برخی آنزیم‌ها و ...) به ملاحظات ویژه مربوط به آن‌ها توجه شود.

3- اندازه‌گیری کربن زیست توده میکروبی خاک[1]

ریز جانداران یک بخش حیاتی در خاک هستند زیرا به طور فعال در چرخه زیست توده میکروبی خاک (SOM)[2] و تولید محصولات میکروبی و تجزیه متابولیک نقش دارند. این بخش ماده آلی خاک که بخش میکروبی قابل دسترسی هستند، یک کسر محلول بوده و از نظر فیزیکی قابلیت عبور از فیلترهای با قطر 0/45 میکرون را دارد (Swenson et al., 2015). ازاین‌رو زیست توده میکروبی یک ویژگی کلیدی خاک است. همچنین یکی از ویژگی‌های اصلی برای ارزیابی تغییرات در ویژگی خاک ناشی از کشت محصولات زراعی یا تغییرات در پوشش گیاهی، کربن زیست توده میکروبی (MBC) است (Lopes et al., 2011).

برای تعیین کربن زیست توده میکروبی، از روش تدخین استخراج استفاده می‌شود (Vance et al; 1987). تخمین زیست توده میکروبی خاک به روش تدخین استخراج [3] (FE) در مقایسه با روش‌های دیگر مزایای متعددی دارد، از جمله اینکه این روش

[1] Soil Microbial Biomass
[2] Soil Organic Matter
[3] Fumigation Extraction Method

بلافاصله پس از افزودن سوبسترا در خاک‌های مختلفی مانند خاک‌های آلی، خاک‌های اسیدی و خاک‌های غرقاب قابل استفاده است.

3-1- اساس آزمون

اصل اساسی روش FE این است که ریز جانداران خاک پس از حمله کلروفرم به غشای سلولی آنها می‌میرند و بخشی از ترکیبات کربنی به ویژه در سیتوپلاسم توسط آنزیم‌ها تجزیه شده و به بخش‌های قابل استخراج تبدیل می‌شود (Joergensen., 1996). کلروفرم استفاده شده در این روش یک زیست‌کش فعال است که در عین حال مواد آلی غیر میکروبی خاک را حل و قابل تجزیه نمی‌کند.

3-2- وسایل و تجهیزات

- قاشقک توزین(اسپاتول)
- ترازوی آزمایشگاهی دقت ده هزارم گرم
- استوانه مدرج 50 و 25 میلی‌لیتری
- بالن 250 میلی لیتری ته صاف
- پی‌پت 5، 10و25 میلی‌لیتری
- بشر شیشه‌ای 50 میلی‌لیتری
- بالن ژوژه 2000، 1000، 500 و 100 میلی‌لیتری
- دستکش لاتکس
- دستگاه هود
- دسیکاتور
- دستگاه سوکسله آزمایشگاهی
- قیف
- کاغذ صافی
- بطری پلاستیکی 50 میلی‌لیتری درب دار

3-3- مواد و واکنش‌گرها

- محلول 0/5 مولار سولفات پتاسیم برای عصاره گیری: 87/135 گرم سولفات پتاسیم پس از توزین در مقداری آب حل شود. سپس در بالن ژوژه به حجم یک لیتر رسانده شود.
- محلول دی‌کرومات پتاسیم 66/7 میلی مولار: 1/961 گرم دی‌کرومات پتاسیم پس از توزین در مقداری آب حل شود. سپس در بالن ژوژه به حجم 100 میلی لیتر رسانده شود.
- مخلوط 2 به 1 اسید سولفوریک 98% و اسید فسفریک 85% : 666/6 میلی‌لیتر اسید سولفوریک را زیر هود داخل بالن ژوژه یک لیتری ریخته و سپس با اسید فسفریک به حجم یک لیتر رسانده شود.
- محلول فروآمونیوم سولفات 40 میلی مولار: مقدار 15/69 گرم فروآمونیوم سولفات در آب مقطر حل شود. پس از اضافه کردن 20 میلی‌لیتر اسید سولفوریک 98% در بالن ژوژه به حجم یک لیتر رسانده شود.
- معرف ارتوفنانترولین فرو سولفات: 1/48 گرم ارتوفنانترولین مونو هیدرات پس از توزین در بالن 100 میلی‌لیتری ریخته، به آن کمی آب اضافه گردد. سپس مقدار 0/7 گرم سولفات آهن به محلول اضافه و به حجم 100 میلی لیتر رسانده شود.

4-3- مراحل انجام آزمون

1- از هر نمونه 50 گرم خاک مرطوب (با رطوبت 50 تا 70 درصد ظرفیت مزرعه) بر اساس وزن خشک تهیه و به دو نمونه 25 گرمی تقسیم شود.

2- جهت عصاره‌گیری، یک نمونه 25 گرمی درون ارلن 250 میلی لیتری ریخته شده و به آن 100 میلی لیتر محلول سولفات پتاسیم 0/5 مولار اضافه و به مدت 45 دقیقه روی شیکر دورانی با سرعت 40 دور در دقیقه قرار گیرند.

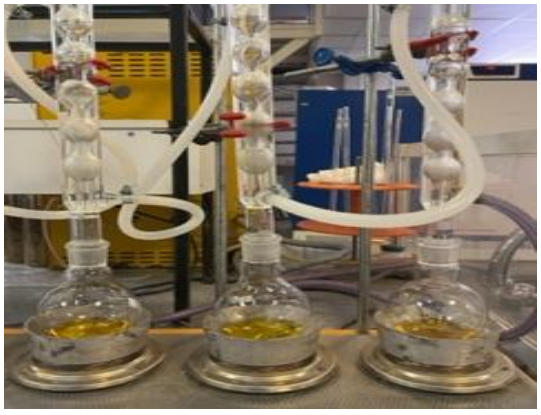
3- سپس با استفاده از قیف و کاغذ صافی واتمن 42 سوسپانسیون موردنظر صاف و در بطری‌های درب‌دار 50 میلی لیتری نگهداری شود.

4- نمونه دوم از از نمونه‌های 25 گرمی، درون بشر شیشه‌ای50 میلی لیتری ریخته شده و در دسیکاتور قرار داده می‌شود. کف دسیکاتور یک کاغذ صافی مرطوب قرار داده شود.

سپس یک ظرف حاوی سودولایم و یک ظرف دیگر حاوی 25 میلی لیتر کلروفرم نیز درون دسیکاتور قرار داده شود. دسیکاتور به پمپ خلا متصل می‌شود و شرایطی ایجاد می‌گردد که کلرو فرم به مدت دو دقیقه بجوشد. پس از مشاهده جوشش پمپ خاموش گردد و دسیکاتور به مدت 24 ساعت در شرایط تاریک قرار گیرد. پس از 24 ساعت نمونه‌هایی که با کلروفرم ضدعفونی شده‌اند به پمپ خلا متصل شده و این عمل چندین بار صورت گیرد تا تمام اضافات کلروفرم از نمونه خارج شود.

5- 100 میلی لیتر سولفات پتاسیم به این نمونه‌ها اضافه شده و به مدت 45 دقیقه روی شیکر دورانی با سرعت 40 دور در دقیقه قرار گیرند. سوسپانسیون حاصل از هر نمونه با کاغذ صافی واتمن 42 صاف شود.

6- برای تعیین کربن زیست توده میکروبی، هشت میلی لیتر از عصاره به همراه دو میلی لیتر دی کرومات پتاسیم و 15 میلی لیتر از مخلوط اسید سولفوریک و اسید فسفریک غلیظ در بالن‌های 250 میلی لیتری ته صاف تحت شرایط دستگاه سوکسله به مدت 30 دقیقه قرار داده شود (شکل5). پس از خنک شدن بالن‌ها 25 میلی لیتر آب به آن اضافه گردد. پس از اضافه کردن معرف ارتو فنانترولین فرو سولفات با فرو سولفات آمونیوم تیتر و باقی مانده دی کرومات پتاسیم درمحیط اندازه‌گیری شود (شکل6) (Kalembasa and Jenikson., 1973; Vance et al .,1987). زمانی که رنگ محیط از سبز به قرمز تیره برگردد زمان پایان تیتراسیون می‌باشد (شکل 7).



شکل5- مرحله رفلاکس نمونه با دستگاه سوکسله

شکل6- مرحله اضافه کردن معرف برای تیتراسیون

شکل7- مرحله تیتراسیون و تغییر رنگ

3-5- روش ارزیابی نتایج

با استفاده از رابطه (1) کربن آلی استخراج شده (C) محاسبه می‌شود:

رابطه 1:

$$C\left(\frac{\mu g}{ml}\right)-\frac{H\text{-}S}{c}\times M\times\frac{D}{A}\times E\times 1000$$

H: حجم فروسولفات آمونیوم مصرف شده برای شاهد گرم (نمونه شاهد که در آن هشت میلی لیتر سولفات پتاسیم به جای عصاره رفلاکس شده است).

S: حجم فرو سولفات آمونیوم مصرف شده برای نمونه

c : حجم فروسولفات آمونیوم مصرف شده برای شاهد سرد (نمونه شاهد بدون رفلاکس که هشت میلی لیتر سولفات پتاسیم با فرو سولفات آمونیوم تیتر شده است).

M : نرمالیته بیکرومات پتاسیم مصرفی (0/4 نرمال)

D : حجم بیکرومات پتاسیم (دو میلی لیتر)

A: حجم عصاره مصرفی (هشت میلی لیتر)

E: ضریب برابر 3 (ضریب تبدیل کروم 6 +به کروم 3+)

برای تبدیل میکرو گرم کربن آلی استخراج شده در هر گرم خاک از رابطه (2) استفاده می‌شود:

رابطه 2:

$$C\left(\frac{\mu g}{g soil}\right) = C(\mu g/ml) \times (K/M_w)$$

K: مقدار عصاره استخراج شده (100 میلی لیتر)

M_W: وزن خاک مرطوب (معادل25 گرم خاک خشک با محاسبه درصد رطوبت)

در نهایت کربن زیست توده میکروبی با استفاده از رابطه (3) محاسبه می‌شود:

رابطه 3:

$$MBC\left(\frac{\mu g}{g soil}\right) = \frac{EC}{0.38}$$

EC : کربن آلی در خاک تدخین شده – کربن آلی در خاک تدخین نشده

K_{EC}: ضریب کالیبراسیون برابر 0/38 (این عدد با محاسبه رابطه نتایج دو روش انکوباسیون و تدخین بدست آمده است).

4- اندازه‌گیری فعالیت تنفس میکروبی خاک[1]

تنفس خاک، که CO_2 تولید شده توسط فعالیت زیستی موجودات خاک در نتیجه تجزیه مواد آلی خاک و بستر گیاهی است، یک جریان اصلی در چرخه جهانی کربن است. CO_2 بیشتر از طریق انتشار مولکولی و به دنبال شیب غلظت به سطح خاک منتقل می‌شود. ازاین‌رو برای ارزیابی فعالیت تنفسی و زیستی ریز جانداران خاک می‌توان به طور غیرمستقیم CO_2 متصاعد شده از خاک را اندازه گرفت. فعالیت تنفسی افزون برمقدار مواد آلی خاک به رطوبت، ساختمان خاک و دردسترس بودن عناصرغذایی بستگی دارد. انجام این آزمون به روش"Closed jars" می‌باشد (Isermeyer; 1952., Nannipieri and Alef; 1995).

4-1- اساس آزمون

CO_2 متصاعد شده، جذب NaOH (در مجاورت خاک) شده و تولید کربنات سدیم می‌کند. سپس با افزودن کلرور باریم، کربنات باریم تولید می‌شود. کلرور باریم باقی‌مانده با NaOH اضافی واکنش داده و هیدروکسید باریم تولید می‌شود که با تیتراسیون توسط HCl و مقایسه با HCl مصرفی برای بطری شاهد مقدار CO_2 محاسبه می‌شود.

4-2- وسایل و تجهیزات

- قاشقک توزین (اسپاتول)
- پیپت 5 میلی‌لیتری
- استوانه مدرج 25 میلی‌لیتری
- قطره چکان
- ظرف نگه‌داری آب مقطر (پیست)
- ظرف شیشه‌ای درب‌دار 300 میلی‌لیتری
- ظروف پلاستیکی کوچک

[1] Soil Microbial Respiration

- پارافیلم
- ارلن مایر 100 میلی‌لیتری
- بورت مدرج 50 میلی‌لیتری
- بالن ژوژه (50 و100و1000 میلی‌لیتری)
- انکوباتور
- ترازوی آزمایشگاهی
- مایکروویو

3-4- مواد و واکنش‌گرها

- محلول هیدروکسید سدیم 0/05 مولار: میزان 2 گرمNaOH آزمایشگاهی پس ازتوزین در مقداری آب مقطرحل شود و سپس داخل بالن ژوژه1000میلی‌لیتری به حجم یک لیتر رسانده شود. محلول فوق برای تعداد 40 نمونه قابل استفاده است.
- محلول 0/05 مولار اسیدکلریدریک: میزان 85/2 میلی‌لیتر HCl غلیظ در بالن ژوژه 1000 میلی‌لیتری ریخته و سپس با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شود. سپس50 میلی‌لیتر از محلول حاصل دربالن ژوژه 1000 میلی‌لیتری دیگر ریخته و با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شود. محلول فوق به منظور تیتراسیون تهیه شده و قابل نگهداری است.
- محلول 0/5 مولار کلرور باریم: میزان 122/14 گرم $BaCl_2 .12H_2O$ پس از توزین در مقداری آب مقطر حل شده و سپس در بالن ژوژه 1000 میلی‌لیتری با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شود. محلول فوق برای تعداد 200 نمونه قابل استفاده است.
- معرف فنل فتالئین: میزان 0/1 گرم فنل فتالئین را در 80 میلی‌لیتر اتانول 60 درصد حجمی (60 میلی‌لیتر اتانول و40 میلی‌لیتر آب مقطر) حل و سپس با اتانول در بالن ژوژه به حجم 100 میلی‌لیتر رسانده شود.
- آب مقطر جوشانده شده (فاقد CO_2): آب پس از جوشش به مدت دو دقیقه، خنک و در ظرف دربسته نگه‌داری شود. در طول آزمایش از همین آب استفاده شود.

4-4- مراحل انجام آزمون

1- میزان 50 گرم از نمونه خاک مرطوب (55 درصد ظرفیت مزرعه) الک شده پس از توزین در ظروف شیشه ای با حجم 250 میلی لیتر (شکل4) ریخته شود.
2- میزان 25 میلی‌لیتر از محلول 0/05 مولار NaOH در ظرف پلاستیکی ریخته و در مجاورت خاک قرار داده شود (شکل 8).
3- درب ظرف، بسته و با پارافیلم کاملا پوشانده شود.
4- سه ظرف به عنوان شاهد (بدون خاک) با همین شرایط تهیه گردد.
5- ظروف شیشه‌ای حاوی نمونه به مدت 72 ساعت درانکوباتور با دمای 25درجه سیلسیوس قرار داده شود.
6- پس از گذشت زمان مورد نظر محلول سود هر ظرف در ارلن مایر 50 میلی لیتری ریخته شود.
7- ظرف پلاستیکی حاوی سود با 20 میلی‌لیتر آب مقطر جوشانده و شستشو داده شده، داخل ارلن ریخته شود.
8- میزان 5 میلی‌لیتر محلول کلروباریم 0/5 مولار و 3 قطره معرف فنل فتالئین به ارلن اضافه شده (پدیدار شدن رنگ ارغوانی) و سپس با محلول اسیدکلریدریک 0/05 مولار تیتراسیون انجام تا محلول بی‌رنگ شود (شکل 9).

شکل 8- نمونه‌های خاک انکوبه شده در مجاورت محلول NaOH

شکل 9- مرحله تیتراسیون نمونه با استفاده از HCl

4-5- روش ارزیابی نتایج

محاسبات لازم برای به دست‌آوردن میزان تنفس میکروبی طبق رابطه زیر انجام می‌شود:

رابطه 4:

$$CO_2\,(mg)/_{Sw/t} = \frac{(V_0 - V) \times 1.1}{dwt}$$

SW : وزن خاک

t : زمان انکوباسیون

V_0 : میانگین حجم اسید استفاده شده برای نمونه شاهد

V: حجم اسید استفاده شده برای نمونه خاک

dwt : وزن خاک خشک ازیک گرم خاک مرطوب

* ضریب 1/1 بیانگر این است که به ازای یک اکی‌والان CO2 یک اکی‌والان NaOH مصرف می‌شود.

نکات

1- تمامی ظروف استفاده شده برای این آزمون باید از پیش با هیدروکلریک اسید 10درصد اسیدشویی شود.

2- درصد رطوبت خاک باید درحد 55 درصد ظرفیت مزرعه (Field Capacity) باشد.

5- آنزیم‌های خاک

آنزیم‌ها بخش اصلی فرایندهای زیستی مانند تجزیه مواد آلی، معدنی شدن و آزاد شدن عناصر غذایی در چرخه‌های گوناگون مثل نیتروژن و فسفر هستند. منابع آنزیم‌های خاک عبارتند از ریزجانداران زنده و مرده، ریشه‌ها و بقایای گیاهان و حیوانات خاک. آنزیم‌ها در ماتریکس خاک انباشته یا تثبیت شده یا با مواد آلی (هوموس) و خاک رس تشکیل کمپلکس می‌دهند. ریزجانداران مهم‌ترین منابع آنزیم‌های موجود در خاک هستند (Tabatabai.,1994). اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های خاک به عنوان شاخصی برای ارزیابی سلامت و کیفیت خاک است. همچنین فعالیت‌های آنزیمی یکی از اولین ویژگی‌های خاک است که در صورت بروز تغییرات در خاک تغییر می‌کند و نقش کلیدی در عملکرد بیوشیمیایی خاک از جمله تشکیل و تخریب مواد آلی خاک، چرخه مواد مغذی و تجزیه آنتی بیوتیک‌ها دارد. از این‌رو دانش فعالیت‌های آنزیمی خاک را می‌توان برای توصیف تغییرات در کیفیت خاک به دلیل مدیریت کاربری زمین و آگاهی از عملکرد اکوسیستم خاک مورد استفاده قرار داد. زیرا هم عرضه عناصر غذایی به گیاهان و هم رشد میکروبی را کنترل می‌کند (AcostaMartınez et al., 2007).

5-1- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی در خاک[1]

در بین آنزیم‌های شناخته شده خاک، آنزیم‌های فسفاتازی از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. فسفاتاز آنزیمی است که از طریق هیدرولیز منواسترهای اسیدفسفریک فسفات معدنی را از بخش آلی و مواد معدنی پیچیده آزاد می‌کند و نقش اساسی در چرخه فسفر دارد. مهم‌ترین انواع فسفاتازهای آنزیمی در خاک‌ها، فسفاتاز اسیدی و قلیایی هستند که به علت اهمیت آن‌ها در معدنی شدن فسفر آلی خاک و تغذیه گیاهان، بیش از دیگر گروه‌های فسفاتاز مورد توجه قرار گرفته‌اند. فسفاتاز اسیدی در

[1] Soil Acid and Alkaline Phosphatase Activity

خاک‌های اسیدی و فسفاتاز قلیایی در خاک‌های قلیایی غالب هستند فسفاتازها به وسیله ریشه گیاهان و ریز جانداران ترشح می‌شوند (Juma and Tabatabai., 1977). اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی با استفاده از روش طباطبایی و برمنر (1969) انجام می‌شود.

5-1-1- اساس آزمون

در این روش نیتروفنیل فسفات به عنوان سوبسترا، امکان سنجش سریع و دقیق فعالیت فسفاتاز خاک را فراهم می‌کند. در حقیقت این روش شامل تخمین نیتروفنل آزاد شده به روش رنگ سنجی است. استخراج پارا نیتروفنل[1] آزاد شده توسط فعالیت فسفاتاز، رنگ پایدار مورد استفاده برای تخمین فنل را ایجاد می‌کند و باعث ارزیابی کمی پارانیتروفنل اضافه شده به خاک می‌شود.

5-1-2- وسایل و تجهیزات

لوازم مورد نیاز به منظور انجام آزمایش به شرح زیر هستند:

- ترازوی آزمایشگاهی
- بالن ژوژه 25 یا 50 میلی‌لیتر
- کاغذ صافی (واتمن)
- لوله‌های آزمایش
- پی‌پت
- قیف
- دستگاه انکوباتور
- دستگاه اسپکتروفتومتر

[2]4-Nitrophenol

5-1-3- مواد و واکنش‌گرها

- تولوئن
- محلول MUB
- محلول اصلی بافر عمومی اصلاح شده:
- Tris (12/1 گرم)
- Maleic acid (11/6 گرم)
- Citric acid (14 گرم)
- Boric acid (6/3 گرم)

موارد ذکر شده در بند (5-1-3) در 488 میلی‌لیتر سود یک مولار (NaOH) حل و با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شود. این محلول در دمای 4 درجه سلسیوس نگهداری می‌شود.

- محلول بافر اصلاح شده (MUB[1] اسیدی، pH =6/5): مقدار 200 میلی‌لیتر از محلول اصلی بافر در 500 میلی لیتر آب مقطر حل و pH نهایی محلول با HCl روی 6/5 تنظیم و سپس با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شود.
- محلول بافر عمومی اصلاح شده (MUB قلیایی، pH = 11): مقدار 200 میلی‌لیتر از محلول اصلی بافر در 500 میلی لیتر آب مقطر حل و pH نهایی محلول با NaOH روی 11 تنظیم و سپس با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شود.
- محلول کلرید کلسیم 0/5 مولار (CaCl2): مقدار 73/5 گرم CaCl2.2H2O در 700 میلی لیتر آب مقطر حل و به حجم یک لیتر رسانده شود.
- محلول NaOH 0/5 مولار: مقدار20 گرم از NaOH در 700 میلی لیتر آب حل و به حجم 1 لیتر رسانده شود.
- محلول استاندارد پارانیتروفنول : میزان یک گرم پارانیتروفنول در 700 میلی لیتر آب مقطر حل و به حجم یک لیتر رسانده و در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شود.

[1] Modified Universal Buffer

- محلول PNP[1] اسیدی و قلیایی: محلول p- نیتروفنیل فسفات 0/05 مولار با 2/927 گرم از دی سدیم پارانیتروفنیل فسفات تتراهیدرات در حدود 40 میلی‌لیتر از بافر عمومی اصلاح شده با pH = 6/5 (جهت سنجش فسفاتاز اسیدی) و با 40 میلی‌لیتر از بافر عمومی اصلاح شده با pH=11 (جهت سنجش فسفاتاز قلیایی) حل شود و محلول تا حجم 50 میلی‌لیتر با استفاده از بافر عمومی اصلاح شده با pH مربوط رقیق و در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شود.

5-1-4- مراحل انجام آزمون

1- یک گرم خاک الک شده (کوچکتر از 2میلی‌متر) در بالن ژوژه 25 یا 50 قرار ریخته شود. برای هر نمونه سه تکرار اسیدی و سه تکرار قلیایی تهیه شود. 0/25 میلی‌لیتر معادل 5 قطره تولوئن به خاک‌ها اضافه شود.

2- در مرحله بعد چهار میلی‌لیتر محلول MUB اسیدی به بالن‌های اسیدی و چهار میلی لیتر از محلول MUB قلیایی به بالن‌های قلیایی اضافه شود. از هر سه تکرار اسیدی و قلیایی یکی از بالن‌ها به عنوان شاهد نمونه خاک درنظر گرفته می‌شود.

3- یک میلی‌لیتر از PNP اسیدی به نمونه‌های اسیدی به جز شاهد و یک میلی‌لیتر از PNP قلیایی به نمونه‌های قلیایی به جز شاهد قلیایی اضافه شده و بالن‌ها به مدت چند ثانیه به صورت دورانی چرخانده شود تا محتویات آن کاملا با یکدیگر مخلوط شوند. سپس درپوش بالن‌ها را گذاشته و در انکوباتور و دمای 37 درجه سلسیوس قرار داده شود. توجه شود در این مرحله به نمونه‌های شاهد، محلول PNP اضافه نمی‌شود.

4- پس از یک ساعت بالن‌ها از انکوباتور خارج و درپوش آنها برداشته و پس از افزودن یک میلی‌لیتر کلریدکلسیم (CaCl2) 0/5 مولار و چهار میلی‌لیتر NaOH 0/5 مولار به آن، تکان داده شود. سپس یک میلی‌لیتر از محلول PNP اسیدی به

[1] 4-Nitrophenyl Phosphate

نمونه‌های شاهد اسیدی و یک میلی‌لیتر از محلول PNP قلیایی به نمونه شاهد قلیایی افزوده شود.

5- سوسپانسیون بدست آمده توسط کاغذ صافی واتمن شماره دو تا شده صاف و سپس در نهایت شدت رنگ زرد محلول صاف شده به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج 400-410 نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. در صورتیکه شدت رنگ محلول صاف شده از 50 میکروگرم استاندارد پارانیتروفنول بیشتر بود، تا جائیکه نیاز است با آب رقیق شود.

در هر سری از نمونه‌ها به یک شاهد اسیدی و یک شاهد قلیایی که فاقد خاک بوده نیاز است که روش کار دقیقا مشابه دیگر نمونه‌ها و مطابق موارد ذکر شده در بالا باشد. از نتایج این نمونه‌ها با عنوان مقادیر شاهد (بدون خاک) در محاسبات استفاده می‌شود.

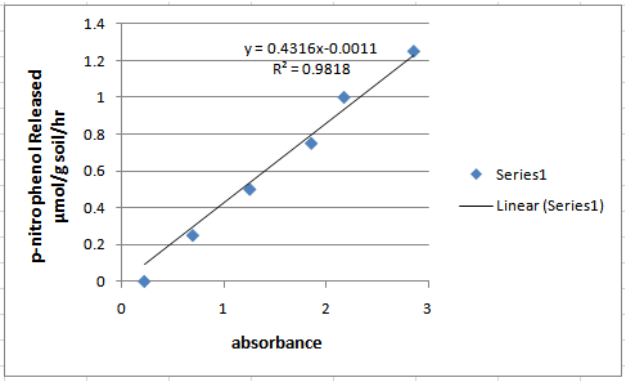
5-1-5- تهیه محلول‌های استاندارد

یک میلی‌لیتر محلول استاندارد P- نیتروفنول در یک بالن ژوژه 100 میلی لیتری ریخته و تا حجم 100 میلی‌لیتر با آب رقیق و کاملا مخلوط شود. سپس با استفاده از پی‌پت مقادیر صفر، یک، دو، سه، چهار و پنج میلی‌لیتر از محلول استاندارد رقیق شده در بالن‌های 25 یا 50 میلی‌لیتری ریخته و با افزودن مقادیر مناسب آب (به ترتیب صفر، یک، دو، سه، چهار و پنج میلی‌لیتر آب) به حجم پنج میلی‌لیتر رسانده شود. در ادامه یک میلی‌لیتر کلریدکلسیم 0/5 مولار و چهار میلی لیتر NaoH 0/5 مولار اضافه و کاملا مخلوط شود . محلول حاصل مثل نمونه‌های خاک صاف توسط کاغذ صافی صاف شود. شدت رنگ زرد محلول صاف شده با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج 400-410 نانومتر اندازه‌گیری و منحنی واسنجی (غلظت پارانیتروفنول در مقابل میزان جذب) رسم شود (شکل10).

5-1-6- رسم منحنی استاندارد

به منظور تعیین مقدار فسفاتاز ابتدا نمودار مقدار جذب و غلظت استاندارد در نرم افزار اکسل رسم و معادله خطی (y=ax-b) با R^2 بالا برای نمودار رسم شده تعیین شود

(شکل10). بر مبنای معادله بدست آمده غلظت جذب‌های قرائت شده برآورد می‌شود. سرانجام میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز هر نمونه بر حسب غلظت نیتروفنول آزاد شده بر گرم خاک بر ساعت و بر اساس معادله (رابطه 5 و 6) بدست می‌آید.



شکل 10- رسم نمودار جذب و غلظت استاندارد

رابطه5:

غلظت میانگین شاهد بدون خاک- غلظت شاهد خاک- (رقت x غلظت برآورد شده) = میزان غلظت پارانیتروفنل

رابطه6:

p-Nitrophenol ($\mu g^{-1} dwh^{-1}$)=C.v/dw.sw.t

در این رابطه C: مقدار غلظت قرائت شده، V: حجم کل عصاره dwt: وزن خاک خشک از یک گرم خاک مرطوب، SW: وزن خاک و t: مدت زمان انکوباسیون است.

2-5- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک[1]

اوره‌آز یکی از آنزیم‌های موجود در خاک است که فرایند هیدرولیز اوره به آمونیوم و دی اکسیدکربن را سرعت می دهد. شدت فعالیت آنزیم اوره‌آز نقش مهمی در کاربرد

[1] Soil Urease Activity

موثر کود اوره و ارزیابی آسیب‌های بالقوه زیست محیطی دارد. از این‌رو ارزیابی میزان فعالیت آنزیم اوره‌آز در خاک در بررسی کیفیت بیوشیمیایی خاک به عنوان شاخصی برای سلامت و کیفیت خاک نیز هست.

5-2-1- اندازه‌گیری آنزیم اوره آز به روش رنگ سنجی

در این دستورالعمل اندازه‌گیری فعالیت آنزیم اوره‌آز مطابق با روش کندلر و گربر (1988) انجام می‌شود.

5-2-1 -1- وسایل و تجهیزات

- ترازوی آزمایشگاهی
- پی‌پت
- ارلن مایر 50 و100 میلی‌لیتری
- بالن ژوژه (100، 500، 1000 و 2000میلی‌لیتری)
- کاغذ صافی واتمن 42
- قیف
- دستگاه شیکر
- دستگاه اسپکتروفوتومتر
- دستگاه pH متر
- دستگاه انکوباتور

5-2-1-2- مواد و واکنش‌گرها

- محلول اوره: مقدار 2/4 گرم اوره در 400 میلی‌لیتر آب مقطر حل و به حجم 500 میلی لیتر رسانده شود (محلول به صورت روزانه تهیه شود)
- محلول کلرید پتاسیم: مقدار 74/6 گرم کلرید پتاسیم در مقداری آب مقطر حل و

سپس مقدار 10 میلی لیتر از HCl یک مولار (HCl 32 درصد برابر با 10 مولار است) به آن اضافه و حجم محلول به 1000 میلی‌لیتر رسانده شود.

- محلول سود 0/3 مولار: 12 گرم سود در مقداری آب مقطر حل و سپس به حجم 1000 میلی لیتر رسانده شود.
- محلول سدیم سالیسیلات: مقدار 17 گرم سدیم سالیسیلات همراه با 120 میلی‌گرم سدیم نیتروپروساید در مقداری آب مقطر حل شود. سپس به حجم 100 میلی لیتر رسانده شود.
- محلول سدیم دی‌کلرو ایزوسیانید: مقدار 0/1 گرم سدیم دی‌کلرو ایزوسیانید در مقداری آب مقطر حل و سپس به حجم 100 میلی‌لیتر رسانده شود (این محلول بلافاصله قبل از استفاده تهیه شود).
- محلول‌های استاندارد آمونیوم: مقدار 3/82 گرم از کلریدآمونیوم در آب مقطر حل و سپس به حجم یک لیتر رسانده شود.
- محلول‌های استاندارد NH_4Cl: مقدار 3/82 گرم از کلرید آمونیوم در آب مقطر حل و سپس به حجم یک لیتررسانده شود (غلظت 1000 میکرو گرم بر میلی لیتر). این محلول تا چند هفته در دمای 4 درجه سلسیوس امکان نگهداری دارد. برای تهیه محلول‌های استاندارد از محلول کلریدآمونیوم، مقادیر صفر، 1، 1/5، 2و 2/5 میلی‌لیتر از محلول تهیه شده برداشته و در بالن ژوژه‌های 100 میلی‌لیتری با محلول کلرید پتاسیم به حجم رسانده شود.

5-2-1-3- مراحل انجام آزمون

1- پنج گرم خاک مرطوب با (رطوبت 50 تا 70 درصد ظرفیت مزرعه‌ای) پس از وزن کردن در ارلن 100 میلی‌لیتری ریخته شود.

2- دو و نیم میلی‌لیتر محلول اوره به آن اضافه و سپس به مدت دو ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شود.

3- پس از اتمام مراحل انکوباسیون، به محلول خاک 50 میلی‌لیتر محلول کلرور

پتاسیم اضافه و به مدت 30 دقیقه روی شیکر قرار داده شود تا کاملاً مخلوط شود.

4- سوسپانسیون حاصل از کاغذ صافی قرار گرفته روی قیف عصاره‌گیری شود.

5- نمونه‌های شاهد همانند مراحل گفته‌شده تهیه شود، با این تفاوت که به‌جای اضافه نمودن دو ونیم میلی‌لیتر اوره، دو ونیم میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه و پس از طی مراحل انکوباسیون دو ونیم میلی‌لیتر محلول اوره به آن اضافه شود.

6- یک میلی‌لیتر از عصاره خاک را به‌وسیله پیپت استریل در ارلن 50 میلی‌لیتری ریخته و سپس نه میلی‌لیتر آب مقطر، پنج میلی‌لیتر از محلول هیدروکسید سدیم به همراه سدیم سالیسیلات (ترکیب مقادیر مساوی از هر دو) و دو میلی‌لیتر سدیم کلرو ایزو سیانید به آن اضافه شود.

7- محلول حاصل به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق قرار داده شود تا پس از گذشت زمان قید شده رنگ محلول‌ها در محدوده رنگ زرد به سبز تغییر نماید.

8- دستگاه اسپکتروفوتومتر با محلول‌های استاندارد تهیه شده، در طول موج 690 نانومتر واسنجی شود. برای واسنجی دستگاه با استاندارد کلرید آمونیوم، یک میلی‌لیتر از هر کدام از رقت‌های تهیه شده را برداشته و نه میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شود. سپس از مخلوط حاصل از محلول سدیم سالیسیلات و هیدروکسید سدیم سه دهم مولار (به نسبت مساوی مخلوط می‌شوند) 5 میلی‌لیتر و از محلول سدیم دی‌کلرو ایزوسیانید 2 میلی‌لیتر به آن اضافه شود. پس از گذشت زمان 30 دقیقه و با تغییر رنگ محلول‌ها در محدوده رنگ زرد تا سبز، محلول‌های استاندارد برای واسنجی کردن دستگاه اسپکتروفوتومتر آماده هستند.

نکته: اگر قرائت نمونه‌ها کمتر از کم‌ترین غلظت محلول استاندارد باشد نیاز به ساخت محلول‌های استاندارد با غلظت‌های کمتری است.

9- میزان جذب نور محلول‌های اصلی نیز به وسیله اسپکتروفوتومتر در طول موج 690 نانومتر قرائت شود و پس از رسم منحنی استاندارد میزان غلظت محاسبه شود.

5-2-1-4- روش ارزیابی نتایج

نتایج به‌دست آمده از قرائت نمونه‌های خاک، پس از تبدیل جذب به غلظت، از مقدار شاهد کم شده و در رابطه زیر قرار داده می‌شود تا میزان فعالیت آنزیم اوره‌آز بر حسب (میکروگرم آمونیوم بر گرم خاک بر 2 ساعت) به دست آید.

رابطه 7:

$$\frac{(\mu g\ NH_4 - Nml^{-1} \times V \times 10)}{(dwt \times 5)}$$

در این رابطه $\mu g\ NH_4\text{-}Nml^{-1}$= غلظت قرائت شده، 10= فاکتور رقت، 5= مقدار خاک استفاده شده، dwt= وزن خاک خشک و V = حجم کل عصاره (52/5 میلی‌لیتر) است.

5-2-2- اندازه‌گیری آنزیم اوره آز به روش تقطیر

این روش بر اساس اندازه‌گیری مقدار آمونیوم آزاد شده بعد از انکوباسیون نمونه‌های خاک با محلول اوره است (Tabatabai and Bremner., 1972).

5-2-2-1- وسایل و تجهیزات

- دستگاه تقطیر بخار آب[1]
- انکوباتور (گرمخانه) با قابلیت تنظیم دما و چرخش هوای داخلی و دما تا 37 درجه سلسیوس
- pH متر
- بالن ژوژه (50، 100، 1000 و 2000 میلی‌لیتری)
- میکروبورت (دستگاه تیتراسیون)
- ارلن مایر 100 میلی‌لیتری
- دسیکاتور

[1] Steam Distillation

- کاغذ صافی
- پی‌پت
- ترازوی آزمایشگاهی

5-2-2-2- مواد و واکنش‌گرها

- تولوئن
- بافر Tris(hydroxymethyl)aminomethane (0/05 میلی‌مولار، pH=9): در یک بالن ژوژه 1000 میلی‌لیتری 6/1 گرم تریس در 700 میلی‌لیتر آب مقطر حل و pH آن با اسید سولفوریک (H_2SO_4) 0/2 مولار بر روی 9 تنظیم گردد و حجم محلول با آب مقطر به 1000 میلی‌لیتر رسانده شود.
- محلول اوره (0/2 مولار): در یک بالن ژوژه 100 میلی‌لیتری 1/2 گرم اوره در 80 میلی‌لیتر بافر تریس حل و حجم آن با بافر مشابه به 100 میلی‌لیتر رسانده شود. این محلول می‌بایست به‌طور روزانه تهیه شده و در چهار درجه سلسیوس ذخیره شود.
- محلول کلرید پتاسیم-سولفات نقره ($KCl-Ag_2SO_4$): در یک بالن ژوژه 1000 میلی لیتری 0/1 گرم Ag_2SO_4 در 700 میلی‌لیتر آب مقطر حل و سپس 188 گرم KCl در این محلول حل شده و حجم آن با آب مقطر به 1000 میلی‌لیتر رسانده شود.
- H_2SO_4 0/005 مولار
- محلول شناساگر: در یک بالن ژوژه 1000 میلی‌لیتری 0/66 گرم بروموکروزول گرین[1] و 0/33 گرم متیل رد[2] در مقداری اتانول 95 درصد حل و حجم آن با اتانول اتانول به 1000 میلی‌لیتر رسانده شود.
- محلول شناساگر بوریک اسید (H_3BO_3): 40 میلی‌لیتر محلول شناساگر و 400 میلی‌لیتر اتانول 95 درصد درون یک بالن ژوژه 2000 میلی‌لیتری ریخته شود. 40

[1] Bromocresol Green
[2] Methyl Red

گرم بوریک اسید با 1400 میلی‌لیتر آب مقطر گرم مخلوط و پس از سرد شدن به درون بالن ژوژه ریخته و بهم زده شود. سپس به‌آرامی NaOH 0/005 مولار به محلول اضافه شود تا زمانی‌که رنگ آن از صورتی به سبز کم‌رنگ تغییر یابد. سپس حجم محلول را با آب مقطر به 2000 میلی‌لیتر رسانده شود.

- MgO: مقداری MgO پایدار در حرارت در یک کوره در دمای 700-600 درجه سلسیوس به مدت 2 ساعت قرار داده و پس از سرد شدن آن در یک دسیکاتور بر روی NaOH یا سیلیکاژل نگهداری شود.
- محلول استاندارد آمونیوم: در یک بالن ژوژه 1000 میلی‌لیتری 0/234 گرم سولفات آمونیوم در مقداری آب مقطر حل و سپس حجم آن با آب مقطر به 1000 میلی‌لیتر رسانده شود (این محلول دارای $50\ \mu g\ NH_4\text{-}N\ ml^{-1}$ است).

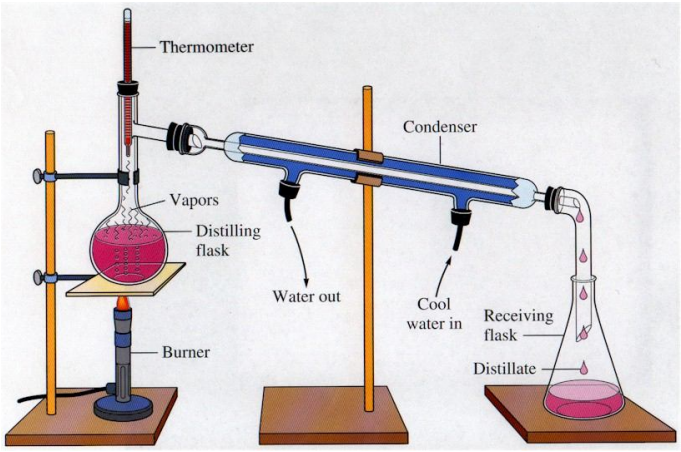
5-2-2-3- مراحل انجام آزمون

- پنج گرم خاک در یک بالن ژوژه 50 میلی‌لیتری ریخته و به آن 0/2 میلی‌لیتر تولوئن و نه میلی‌لیتر بافر تریس اضافه و محتویات مخلوط شود.
- یک میلی‌لیتر محلول اوره 0/2 مولار به آن اضافه شده و محتویات برای چند ثانیه مخلوط شود. درپوش بالن‌های ژوژه بسته شده و به مدت دو ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شود.
- پس از اتمام انکوباسیون 35 میلی‌لیتر محلول $KCl\text{-}Ag_2SO_4$ به بالن ژوژه اضافه و برای چند ثانیه تکان داده شود. بالن ژوژه در دمای اتاق قرار داده شود تا محتویات آن خنک شود (در حدود پنج دقیقه). محتویات با محلول $KCl\text{-}Ag_2SO_4$ به حجم 50 میلی‌لیتر رسانده و کاملاً مخلوط و سپس سوسپانسیون با کاغذ صافی صاف شود.
- برای نمونه شاهد، مراحل بالا انجام شود، اما یک میلی‌لیتر محلول اوره 0/2 مولار پس از افزودن 35 میلی‌لیتر محلول $KCL\text{-}Ag_2SO_4$ به نمونه اضافه شود.
- پنج میلی‌لیتر محلول شناساگر بوریک اسید در یک ارلن مایر 100 میلی‌لیتری ریخته و در مکان ویژه‌ای در زیر کندانسور دستگاه تقطیر قرار داده شود.

- 20 میلی‌لیتر از عصاره در یک بالن تقطیر[1] 100 میلی‌لیتری ریخته شود و به آن 0/2 گرم MgO اضافه شود.

- بالن تقطیر حاوی نمونه به دستگاه تقطیر بخار آب مطابق شکل (11) متصل شود و عمل تقطیر بخار آب به مدت چهار دقیقه انجام شود و در در پایان انتهای کندانسور شسته شود.

- محصول تقطیر با یک میکروبورت و با استفاده از H_2SO_4 0/005 مولار تیتر و مقدار H_2SO_4مصرفی یادداشت شود. تغییر رنگ در نقطه پایانی از سبز به صورتی کمرنگ است.



شکل 11- دستگاه تقطیر بخار آب و اجزای آن

5-2-2-4- روش ارزیابی نتایج آزمون

مطابق فرمول زیر فعالیت اوره‌آز را برای نمونه خاک بدست آوردید:

رابطه 8:

$$\text{Urease activity } (\mu g\ NH_4 - N\ g^{-1}\ dwt\ 2h^{-1}) = \frac{(V1 - V2) \times 70 \times 50}{20 \times (dwt \times 5)}$$

[1] Distilling Flask

V1: حجم اسید سولفوریک مصرفی برای شاهد (ml)

V1: حجم اسید سولفوریک مصرفی برای نمونه (ml)

70: فاکتور تبدیل (یک میلی‌لیتر H_2SO_4 (0/005 مولار) مصرفی معادل NH_4-N µg 70 است)

50: حجم کل عصاره خاک (ml)

20: حجم عصاره مورد اندازه‌گیری (ml)

5: وزن خاک مرطوب استفاده شده در ابتدای آزمایش

dwt: وزن خشک یک گرم خاک مرطوب

3-5- اندازه‌گیری میزان فعالیت سلولاز در خاک

با توجه به اهمیت ترکیبات لیگنوسلولازی در خاک و نقش آنزیم‌های سلولازی و میزان آن در خاک روش اندازه‌گیری سلولاز در بستره کربوکسی متیل سلولاز (CMC) توسط شاینر و وان مرسی (1990) ارائه شده است. در این روش با استفاده از بستره نمونه‌های خاک به مدت 24 ساعت در pH =5/5 نگهداری می‌شود (Schinner and mersi,1990).

5-3-1- اساس آزمون

قندهای احیا کننده آزاد شده در انکوباسیون موجب احیای پتاسیم هگزاسیانو فرات سه ظرفیتی در یک محصول قلیایی می‌شود. محصول احیا شده دو ظرفیتی با سولفات فریک آمونیوم در محیط اسیدی واکنش داده و کمپلکس رنگی فریک هگزاسیانو فرات دو ظرفیتی به روش رنگ سنجی اندازه‌گیری می‌شود.

5-3-2- وسایل و تجهیزات:

- ترازوی آزمایشگاهی
- پی‌پت و میکرو پی‌پت
- ارلن مایر 100 و500 میلی‌لیتری
- استوانه مدرج

- بالن ژوژه (100، 500، 1000 و 2000میلی‌لیتری)
- کاغذ صافی واتمن 42
- قیف
- لوله آزمایش
- دستگاه اسپکتروفوتومتر
- دستگاه pH متر
- دستگاه انکوباتور
- دستگاه بن ماری

5-3-3- مواد و واکنش گرها

- **بافر استات (محلول دو مولار با5/5=pH)**

164/06 گرم استات سدیم بدون آب در آب مقطر حل و به حجم یک لیتر رسانده شود. در یک ارلن 500 میلی لیتری مقدار 60 میلی لیتر اسید استیک خالص ریخته با آب مقطر به حجم رسانده شود.

یک لیتر محلول استات سدیم با 190 میلی لیتر اسید استیک رقیق شده مخلوط و با افزودن اسید استیک pH محلول روی 5/5 تنظیم شود.

- **محلول سوبسترا**

هفت گرم نمک سدیم‌کربوکسی‌متیل (Fulka 21900) در بافر استات حل و به حجم یک لیتر رسانده شود. برای حل شدن بهتر بستره آنرا با همزن برقی به مدت دو ساعت در 45 درجه سلسیوس به هم بزنید.

- **معرف A**

16گرم کربنات سدیم و 0/9 گرم سیانید پتاسیم در آب مقطر حل و به حجم یک لیتر رسانده شود.

- **معرف B**

نیم گرم پتاسیم هگزاسیانو فرات سه ظرفیتی در آب مقطر حل و به حجم یک لیتر

رسانده شود. این محلول در ظرف تیره نگهداری شود.

- **معرف C**

1/5 گرم سولفات فریک‌آمونیوم و یک گرم سدیم دودسیل‌سولفات (SDS) در 900 میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و 4/2 میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به آن اضافه شود. برای حل شدن بهتر تا 50 درجه سلسیوس حرارت داده شود و پس از خنک شدن به حجم یک لیتر رسانده شود.

- **محلول استاندارد مادر**

0/25 گرم گلوکز بدون آب در آب مقطر حل و به حجم یک لیتر رسانده شود.

- **محلول استاندارد آزمایش**

10 میلی‌لیتر از استاندارد مادر یا اصلی در بالن 100 میلی‌لیتری با آب مقطر به حجم رسانده شود.

5-3-4- مراحل انجام آزمون

- 10 گرم نمونه خاک مرطوب (با رطوبت 50 تا 70 درصد ظرفیت مزرعه‌ای) پس از توزین به ارلن 100 میلی‌لیتری با سه تکرار اضافه شود.

- 15 میلی‌لیتر از سوسپانسیون بستره و 15 میلی‌لیتر بافر استات به دو ارلن اضافه و به ارلن سوم فقط 15 میلی‌لیتر بافر استات به عنوان شاهد اضافه شود. محتوی ارلن پس از هم‌زدن و قرار دادن درپوش روی آنها به مدت 24 ساعت در دمای 50 درجه سلسیوس قرار داده شود.

- پس از انکوباسیون، 15 میلی‌لیتر از سوسپانسیون بستره به ارلن شاهد اضافه و به هم زده شود. بلافاصله هر سه ارلن با کاغذ صافی صاف و سپس نیم میلی‌لیتر از هر عصاره در لوله‌های آزمایش با آب مقطر به حجم 20 میلی‌لیتر رسانده شود.

- برای نورسنجی یک میلی‌لیتر از محلول رقیق شده عصاره، یک میلی‌لیتر معرف A و یک میلی‌لیتر معرف B به لوله آزمایش اضافه، در پوش آن را بسته و پس از همزدن به مدت 15 دقیقه در حمام آب جوش قرار گیرد.

- برای خنک کردن، لوله‌ها به مدت پنج دقیقه در آب معمولی قرارگیرد. سپس پنج

میلی‌لیتر معرف C اضافه نموده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری تا رنگ محلول کامل و در 30 دقیقه بعدی مقدار جذب در طول موج 690 نانومتر توسط اسپکترومتر اندازه‌گیری شود.

5-3-5- تهیه استاندارد و نمودار کالیبراسیون

برای تهیه نمودار واسنجی مقادیر صفر، (شاهد استاندارد)، 0/1، 0/2، 0/3، 0/4، 0/5و 0/6، میلی‌لیتر از محلول استاندارد آزمایش به هفت لوله آزمایش اضافه و با آب مقطر به حجم یک میلی‌لیتر رسانده شود. مانند عصاره‌های خاک با افزودن معرف‌های مذکور کمپلکس رنگی ایجاد می‌شود. استانداردهای واسنجی به ترتیب دارای صفر، 2/5، 5، 7/5، 10، 12/5 و 15 میکروگرم گلوکز خواهد بود.

5-3-6- روش ارزیابی نتایج

میزان فعالیت سلولاز بر حسب میکروگرم گلوکز معادل (GE) در هر گرم خاک خشک در مدت انکوباسیون بیان می‌شود. گلوکز معادل از روی نمودار کالیبراسیون محاسبه می‌شود.

رابطه 9:

$$\frac{(S-C)\times 30\times 40\times 100}{10\times \%dm}=\mu gGE.g^{-1}dm.24h^{-1}$$

S: میانگین گلوکز نمونه‌ها

C: میانگین گلوکز شاهد

30 : حجم مخلوط انکوباسیون (میلی‌لیتر)

40: عامل رقت برای عصاره

10: وزن اولیه خاک (گرم)

$\%dm$: عامل محاسبه جرم خاک خشک

5-3-7- ملاحظات و نکات مهم

1- چون فعالیت سلولاز در خاک‌های زیر کشت معمولا کم است، در چنین خاک‌هایی بایستی فعالیت زایلاناز را اندازه گرفت. در خاک‌های مرتعی و جنگلی فعالیت سلولاز بدون مشکل اندازه‌گیری می‌شود. برای این خاک‌ها مقدار پنج گرم خاک کافی است.

2- با توجه به تاثیر منفی نمک‌ها، یون‌های آمونیوم و قدرت یونی زیاد، غلظت بالای نقره، روی، منگنز، اسید اگزالیک، هیدروکسیدها و فلوریدها بر تشکیل رنگ آبی کمپلکس بهتر است عصاره‌های خاک رقیق شود.

3- برای آزمایش نمونه‌های ناشناخته خاک بهتر است پیش آزمایش با رقت‌های مختلف انجام و بهترین درجه رقت بدست آید.

4- پس از افزودن معرف‌های A و B بایستی pH بزرگ تر از 10/5 باشد تا در مرحله جوشاندن عمل احیا به خوبی انجام شود.

5- پس از افزودن معرف C بایستی pH کمتر از دو باشد تا مانع کدر شدن محلول و تولید رسوب شود.

6- به دلیل سمی بودن سیانید، در پایان آزمایش پیش از دور ریختن محلول، آن‌را قلیایی نموده و آب اکسیژنه اضافه کنید تا سیانید اکسید شود.

6- اندازه‌گیری جمعیت میکروبی خاک

ریز جانداران خاک به دلیل نقش اساسی آنها در بسیاری از واکنش‌ها، مانند چرخه ترکیبات معدنی، تجزیه مواد آلی و فرآیندهای مختلف بیوفیزیکی خاک برای محیط زیست ضروری هستند. کودهای آلی و معدنی به طور گسترده‌ای برای افزایش دسترسی به مواد غذایی برای گیاهان استفاده می‌شوند، با این حال، آنها می‌توانند بر جمعیت، ترکیب و عملکرد ریز جانداران خاک تأثیر بگذارند . از این‌رو آگاهی از جمعیت میکروبی خاک می‌تواند راهنمایی برای مصرف صحیح و متعادل کودهای مختلف و همچنین نشان دهنده سلامت خاک از نظر شرایط مساعد محیطی برای کشت گیاهان باشد.

در این دستورالعمل اندازه‌گیری جمعیت میکروبی خاک (شامل جمعیت قارچ و

باکتری) با استفاده از روش Plate count یا Spread plate بر اساس واحد CFU (Colony forming units) و با استفاده از محیط کشت عمومی نوترینت آگار (Nutriant Agar) برای باکتری‌ها و محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار (PDA) برای قارچ‌ها معرفی می‌شود (Krieg et al., 1981. Lorch, 1995).

6-1- وسایل و تجهیزات

- ترازوی آزمایشگاهی
- پی‌پت
- لوله شیشه‌ای 15 سانتی متری
- پنبه
- دیسپنسر
- ارلن مایر 250 میلی‌لیتری
- پتری دیش
- گلس برای پخش کردن سوسپانسیون روی محیط کشت
- دستگاه آون
- دستگاه هود لامینار
- دستگاه اتوکلاو
- دستگاه شیکر ارلن مایر و شیکر لوله
- دستگاه pH متر
- دستگاه انکوباتور

6-2- مواد و واکنش‌گرها

- محیط کشت آماده نوترینت آگار: 28 گرم از محیط آماده نوترینت آگار (مطابق دستور درج شده روی ظرف) در یک لیتر آب مقطر ریخته و در داخل اتوکلاو

قرار داده شود. پس از استریل و خنک شدن محیط زیر دستگاه هود لامینار و در کنار شعله در پلیت‌های استریل پخش شود.

- محیط کشت آماده پوتیتو دکستروز آگار: 39 گرم از محیط آماده (مطابق دستور درج شده روی ظرف) در یک لیتر آب مقطر ریخته و در داخل اتکلاو قرار داده شود. پس از استریل و خنک شدن محیط زیر دستگاه هود لامینار و در کنار شعله در پلیت‌های استریل پخش شود.
- آب مقطر استریل

3-6- مراحل انجام آزمون

1- 10 گرم از خاک مرطوب پس از عبور از الک دو میلی متری، توزین و در ارلن مایر 250 میلی لیتری حاوی 90 میلی لیتر آب مقطر استریل ریخته (رقت 10^{-1}) و درب ظرف با استفاده از فویل بسته شود.

2- ارلن مایر مورد نظر روی شیکر دورانی با سرعت 140 دور در دقیقه، به مدت 30 دقیقه قرار داده شود.

3- برای تهیه سری رقت پس از انتقال نمونه به اتاق کشت و زیر هود لامینار، یک میلی لیتر از سوسپانسیون مورد نظر در لوله شیشه‌ای حاوی نه میلی لیتر آب مقطر استریل ریخته شود. بدین ترتیب رقت 10^{-2} از سوسپانسیون بدست خواهد آمد. سری رقت به همین ترتیب (یک میلی لیتر از آخرین رقت در لوله حاوی آب مقطر نه میلی لیتری) تا رقت 10^{-6} ادامه پیدا خواهد کرد. توجه شود که در هر مرحله لوله حاوی رقت مورد نظر به مدت حداقل 10 ثانیه روی دستگاه شیکر لوله قرار داده شود.

4- یک دهم میلی لیتر از آخرین رقت به وسیله پی پت استریل روی محیط‌های کشت که از پیش آماده شده‌اند ریخته شود و سپس توسط گلس‌های مخصوص که با الکل استریل می‌گردد در کل پلیت پخش شود. برای هر رقت دو تکرار از پلیت حاوی محیط کشت در نظر گرفته شود. به همین ترتیب یک دهم از همه رقت‌های مورد نظر در محیط کشت ریخته و در سطح پلیت پخش شود (شکل 12).

5- پلیت‌های مورد نظر داخل انکوباتور با دمای 28 درجه سلسیوس قرار گیرند. باید

توجه داشت که می‌توان به منظور شمارش یک باکتری خاص در خاک از محیط کشت اختصاصی همان باکتری به جای نوترینت آگار استفاده نمود و سپس نمونه را در دمای اپتیمم رشد آن باکتری قرار داد (Townsend and Naqui, 1998).

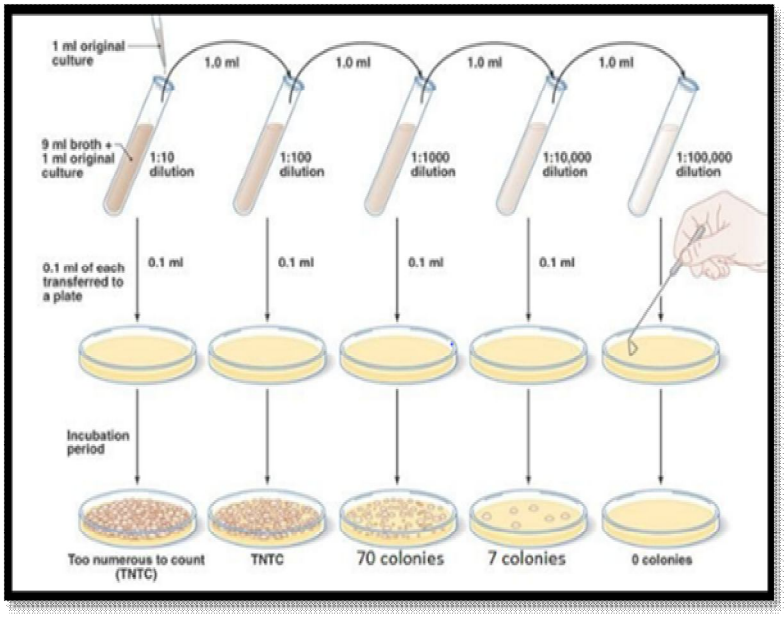
6-4- روش ارزیابی نتایج

پس از گذشت زمان 24 تا 48 ساعت (برای باکتری‌ها و قارچ‌های کند رشد تا یک هفته) و ظهور کلونی‌ها جمعیت با استفاده از رابطه زیر محاسبه شود:

رابطه10:

10^{x} عکس رقت^{x} تعداد کلنی‌های شمارش شده = جمعیت ریزجاندار (CFU/ml)

نکته: در رابطه فوق ضریب 10 برای تصحیح مقدار 0/1 میلی‌لیتر استفاده شده در پلیت‌ها گذاشته شده است.



شکل 12- روش Plate count وسری‌های رقت برای جداسازی و شمارش تعداد کل باکتری‌ها و قارچ‌ها

7- منابع

Acosta-Martínez, V., Cruz, L., Sotomayor-Ramírez, D. and Pérez-Alegría, L. 2007. Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed. Applied Soil Ecology, 35(1), pp.35-45.

Altomare, C. and Tringovska, I. 2011. Beneficial soil microorganisms, an ecological alternative for soil fertility management. Genetics, biofuels and local farming systems, pp.161-214.

Carter, M.R. and Gregorich, E.G. 2007. Soil sampling and methods of analysis. CRC press.

Isermeyer, H. 1952. Estimation of soil respiration in closed jars. Method in applied soil microbiology and biochemistry. Academy, London, pp.214-216.

Joergensen, R.G. 1996. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: calibration of the kEC value. Soil Biology and Biochemistry, 28(1), pp.25-31.

Juma, N.G. and Tabatabai, M.A. 1977. Effects of trace elements on pHospHatase activity in soils. Soil Science Society of America Journal, 41(2), pp.343-346.

Kalembasa, S.J. and Jenkinson, D.S. 1973. A comparative study of titrimetric and gravimetric methods for the determination of organic carbon in soil. Journal of the Science of Food and Agriculture, 24(9), pp.1085-1090.

Kandeler, E. and Gerber, H. 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. Biology and Fertility of Soils, 6 (1): 68-72.

Krieg, N.R. 1981. Enrichment and isolation. Manual of methods for general bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp.112-142.

Lopes, E.L.N., Fernandes, A.R., Lourdes Pinheiro Ruivo, M.D., Cattanio, J.H. and Souza, G.F.D. 2011. Microbial biomass and soil chemical properties under different land use systems in northeastern Pará. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 35, pp.1127-1139.

Lorch, H.J. 1995. Basic methods for counting microorganisms in soil and water. Methods in applied soil microbiology and biochemistry.

Nannipieri, P. and Alef, K. 1995. Methods in applied soil microbiology and biochemistry (pp. 214-216). Academic Press, Londo.

Schinner, F. and von mersi, W. 1990. Xylanase-, Cm-Cellulase- And Invertase Activity In Soil: An Improved Method. Soil Biology and Biochemistry Volume 22, Issue 4, 1990, Pages 511-515.

Scrimgeour, C. 2008. Soil Sampling and Methods of Analysis . Edited by MR Carter and EG Gregorich. Boca Raton, Fl, USA: CRC Press (2008), pp. 1224,£ 85.00. ISBN-13: 978-0-8593-3586-0. Experimental agriculture, 44(3), pp.437-437.

Soil sampling and methods of analysis, second edition, Canadian society of soil science.

Swenson, T.L., Jenkins, S., Bowen, B.P. and Northen, T.R. 2015. Untargeted soil metabolomics methods for analysis of extractable organic matter. Soil Biology and Biochemistry, 80, pp.189-198.

Tabatabai, M.A. and Bremner, J.M. 1972. Assay of urease activity in soils. Soil Biology and Biochemistry, 4(4), 479-487.

Tabatabai, M.A. and Bremner, J.M. 1969. Use of p-nitropHenyl pHospHate for assay of soil pHospHatase activity. Soil biology and biochemistry, 1(4), pp.301-307.

Tabatabai, M.A. 1994. Soil enzymes. Methods of soil analysis: Part 2 Microbiological and biochemical properties, 5, pp.775-833.

Townsend, D.E. and Naqui, A. 1998. Comparison of SimPlate TotalTM plate count test with plate count agar method for detection and quantitation of bacteria in food. Journal of AOAC International, 81(3), pp.563-570.

U.S. EPA Environmental Response Team, Standard Operating Procedures, SOP, Soil sampling, revised 2003.

Vance, E.D., Brookes, P.C. and Jenkinson, D.S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil biology and Biochemistry, 19(6), pp.703-707.