بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی

تاثیر موقعیت شیب بر توزیع فعالیت، ثابت‌های سینتیکی و ترمودینامیکی آمیدوهیدرولازها و فراوانی ذخایر ژن *amoA* در خاکدانه‌ها

رساله دکتری خاک‌شناسی

صفورا ناهیدان

استاد راهنما

دکتر فرشید نوربخش

۱۳۹۳

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده کشاورزی

رساله دکتری رشته خاک‌شناسی خانم صفورا ناهیدان

تحت عنوان

تاثیر موقعیت شیب بر توزیع فعالیت، ثابت‌های سینتیکی و ترمودینامیکی آمیدوهیدرولازها و فراوانی ذخایر ژن *amoA* در خاکدانه‌ها

در تاریخ ۹۳/۱۰/۲۴ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

۱- استاد راهنمای رساله	دکتر فرشید نوربخش
۲- استاد مشاور رساله	دکتر محمدرضا مصدقی
۳- استاد داور	دکتر شمس الله ایوبی
۴- استاد داور	دکتر آقافخر میرلوحی
۵- استاد داور	دکتر فرهاد رجالی

سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده — دکتر محمد مهدی مجیدی

تشکر و قدردانی

سپاس بی کران پروردگار یکتا را که هستی‌مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه‌چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت. تشکر خالصانه خود را به بهترین‌های زندگی‌ام، مادر و پدر بزرگوارم به پاس تمام فداکاری‌ها، گذشت‌ها و حمایت‌هایشان تقدیم می‌دارم. همچنین از حضور گرم خواهر و برادرانم قدردانی می‌نمایم. از استاد راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر نوربخش کمال تشکر و سپاسگذاری را دارم که کریمانه مرا مشمول راهنمایی-هایشان قرار دادند. قطعاً پیمودن این مسیر امکان پذیر نبود مگر به همراهی ایشان. از جناب آقای دکتر مصدقی که از مشاورت‌های ارزشمند ایشان بهره‌مند شدم قدردانی می‌نمایم. از جناب آقای پروفسور Zeyer و گروه محترمشان در دانشگاه ETH به خاطر همکاری بی‌دریغشان در انجام بخشی از این رساله سپاسگذارم. از جناب آقای دکتر ایوبی، دکتر میرلوحی و دکتر رجالی که زحمت داوری و بازخوانی این رساله را به عهده داشتند متشکرم. از سایر اساتید محترم گروه خاک‌شناسی که از محضرشان کسب دانش نمودم صمیمانه سپاسگزارم. از همکاری کارشناسان و پرسنل آزمایشگاه‌های گروه خاک‌شناسی کمال تشکر را دارم. همچنین از تمام دوستان عزیزم که همواره چراغ راه و همراه همیشگی‌ام بودند مخصوصاً سرکار خانم وجیهه درستکار و فروغ عقیلی سپاس بی پایان دارم و لحظات تکرار ناشدنی باهم بودنمان را هرگز فراموش نخواهم کرد. موفقیت روزافزون ایشان را در تمامی مراحل زندگی از خداوند سبحان خواستارم.

صفورا ناهیدان

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات،

ابتکارات و نوآوریهای ناشی از تحقیق موضوع این

رساله متعلق به دانشگاه صنعتی اصفهان است

تقدیم به مهربان فرشتگانی که:

تمام تجربه های یکتا و زیبای زندگیم، مدیون حضور سبز آنهاست

تقدیم به خانواده عزیزم

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست مطالب ..... هشت

فهرست اشکال ..... دوازده

فهرست جداول ..... چهارده

چکیده ۱

فصل اول: مقدمه و بررسی منابع ۲

۱-۱- کلیات ۲

۱-۲- اکولوژی میکروبی خاک ۳

۱-۳- آنزیم‌های خاک ۵

۱-۳-۱- ال-آسپاراجیناز ۶

۱-۳-۲- ال-گلوتامیناز ۶

۱-۳-۳- اوره آز ۷

۱-۳-۴- آلکالین و اسید فسفاتاز ۸

۱-۳-۵- آریل سولفاتاز ۹

۱-۴- توپوگرافی ۱۰

۱-۵- تاثیر توپوگرافی بر ویژگی‌های خاک ۱۰

۱-۵-۱- ویژگی‌های فیزیکی خاک ۱۱

۱-۵-۲- ویژگی‌های شیمیایی خاک ۱۲

۱-۵-۳- ویژگی‌های بیولوژیکی خاک ۱۳

۱-۶- خاکدانه‌ها ۱۹

۱-۶-۱- عوامل موثر بر خاکدانه‌سازی ۲۰

۱-۷- مواد آلی در خاکدانه ها ۲۵

۱-۸- ریزجانداران در خاکدانه ها ۲۶

۱-۹- آنزیم‌ها در خاکدانه‌ها ۲۷

۱-۱۰- فرضیات و اهداف ۲۸

فصل دو م: بررسی اثر موقعیت شیب بر الگوی توزیع آمیدوهیدرولازها در خاکدانه‌ها ۳۰
۲-۱- مقدمه و بررسی منابع ۳۰
۲-۲- مواد و روش‌ها ۳۳
۲-۲-۱- مناطق مورد مطالعه ۳۳
۲-۲-۲- نمونه برداری از خاک ۳۴
۲-۲-۳- ویژگی‌های عمومی خاک‌ها ۳۴
۲-۲-۴- جداسازی خاکدانه‌ها ۳۴
۲-۲-۵- اندازه‌گیری فعالیت آمیدوهیدرولازها (ال-آسپاراجیناز، ال-گلوتامیناز و اوره آز) ۳۵
۲-۲-٦- محاسبه سهم نسبی خاکدانه‌ها از کربن آلی و فعالیت آنزیمی خاک ۳۵
۲-۲-۷-شاخص پایداری خاکدانه ۳۶
۲-۲-۸-تجزیه و تحلیل آماری ۳۶
۲-۳- نتایج و بحث ۳۷
۲-۳-۱- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک در طول شیب ۳۷
۲-۳-۲- توزیع اندازه خاکدانه‌ها و پایداری ساختمان خاک در طول شیب ۳۸
۲-۳-۳- توزیع کربن آلی در خاکدانه‌ها در طول شیب ۴۱
۲-۳-٤- توزیع آمیدوهیدرولازها در خاک در طول شیب ۴۴
۲-۳-۵- توزیع آمیدوهیدرولازها در خاکدانه‌ها در طول شیب ۴۵
۲-۴- نتیجه گیری ۵۳
فصل سوم: بررسی اثر موقعیت شیب بر سینتیک و ترمودینامیک آنزیم ال-گلوتامیناز در خاکدانه-ها ۵۴
۳-۱- مقدمه و بررسی منابع ۵۴
۳-۱-۱- سینتیک آنزیم‌ها ۵۴
۳-۱-۲- ترمودینامیک آنزیم‌ها ۵۷
۳-۲- مواد و روش‌ها ۶۰
۳-۲-۱- منطقه مورد مطالعه ۶۰
۳-۲-۲- نمونه‌برداری از خاک ۶۰

۳-۲-۳- ویژگی های عمومی خاک‌ها ۶۱
۳-۲-٤-جداسازی خاکدانه‌ها ۶۱
۳-۲-۵- ویژگی‌های عمومی خاکدانه‌ها ۶۱
۳-۲-۶- تعیین پارامترهای سینتیکی آنزیم ال-گلوتامیناز ۶۱
۳-۲-۷-تعیین پارامترهای ترمودینامیکی آنزیم ال-گلوتامیناز ۶۲
۳-۲-۸- تجزیه و تحلیل آماری ۶۲
۳-۳- نتایج و بحث ۶۲
۳-۳-۱- ویژگی‌های عمومی خاک‌ها ۶۲
۳-۳-۲- توزیع اندازه خاکدانه‌ها ۶۳
۳-۳-۳- ویژگی‌های عمومی خاکدانه‌ها ۶۴
۳-۳-٤- پارامترهای سینتیکی آنزیم ال-گلوتامیناز ۶۶
۳-۳-۵- پارامترهای ترمودینامیکی آنزیم ال-گلوتامیناز ۷۱
۳-۴- نتیجه‌گیری ۷۶
فصل چهارم: بررسی توزیع خاکدانه‌ای فراوانی باکتری‌ها و آرکیای اکسیدکننده آمونیوم با استفاده از تکنیکReal-time PCR درموقعیت‌های مختلف شیب ۷۸
۴-۱- مقدمه و بررسی منابع ۷۸
۴-۲- مواد و روش‌ها ۸۴
۴-۲-۱- مناطق مورد مطالعه ۸۴
۴-۲-۲- نمونه‌برداری از خاک ۸۴
۴-۲-۳- ویژگی‌های عمومی خاک‌ها ۸۴
٤-۲-٤- جداسازی خاکدانه‌ها ۸۴
۴-۲-۵- ویژگی‌های عمومی خاکدانه‌ها ۸۵
۴-۲-۶- پتانسیل نیتریفیکیاسیون ۸۵
۴-۲-۷- جداسازی DNA و تعیین فراوانی ژن *amoA* با استفاده از Real-time PCR ۸۵
۴-۲-۸- محاسبات ۸۶
۴-۲-۹- تجزیه و تحلیل آماری ۸۷
۴-۳- نتایج و بحث ۸۷

٤-٣-١- ویژگی‌های عمومی خاک‌ها ٨٧
۴-۳-۲- توزیع اندازه خاکدانه‌ها ۸۸
۴-۳-۳- کربن آلی و نیتروژن کل ۹۰
۴-۳-۴- پتانسیل نیتریفیکاسیون ۹۰
۴-۳-۵- فراوانی ژن AOB *amoA* و AOA ۹۵
٤-٤- نتیجه گیری ١٠٠
فصل پنجم: اثر موقعیت و جهت شیب بر توده زنده میکروبی و تنوع کاتالیتیک خاک ۱۰۲
۵-۱- مقدمه و بررسی منابع ۱۰۲
۵-۲- مواد و روش‌ها ۱۰۴
۵-۲-۱- منطقه مورد مطالعه ۱۰۴
۵-۲-۲- نمونه‌برداری از خاک ۱۰۴
۵-۲-۳-ویژگی‌های عمومی خاک‌ها ۱۰۵
۵-۲-۴- توده زنده میکروبی ۱۰۵
۵-۲-۵- فعالیت آنزیم‌های خاک ۱۰۶
۵-۲-۶-تجزیه و تحلیل آماری ۱۰۷
۵-۳- نتایج و بحث ۱۰۷
۵-۳-۱- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک ۱۰۷
۵-۳-۲- توده زنده میکروبی و کسر میکروبی (C_{mic}/C_{org}) ۱۱۱
۵-۳-۳- فعالیت‌های آنزیمی خاک ۱۱۲
۵-۴- نتیجه گیری ۱۱۸
فصل ششم: نتیجه گیری و پیشنهادها ۱۲۰
٦-١- نتیجه‌گیری ١٢٠
۶-۲- پیشنهادها ۱۲۲
منابع ۱۲۴

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- تبدیل آمینواسید ال-آسپاراجین به ال-آسپارتیک اسید و آمونیاک توسط ال-آسپاراجیناز..... ۶

شکل ۱-۲- تبدیل آمینواسید ال-گلوتامین به ال-گلوتامیک اسید و آمونیاک توسط ال-گلوتامیناز..... ۷

شکل ۱-۳- تبدیل اوره به دی اکسید کربن و آمونیاک توسط اوره آز..... ۷

شکل ۱-٤- هیدرولیز استرهای فسفاتی توسط فسفومونواسترازها..... ۸

شکل ۱-۵- تبدیل استرسولفات به فنول و سولفات توسط آریل سولفاتاز..... ۹

شکل ۲-۱- توزیع خاکدانه‌ای کربن آلی در طول شیب در مناطق: الف) فریدون‌شهر و ب) چلگرد..... ۴۲

شکل ۲-۲- سهم نسبی هر گروه خاکدانه از کربن آلی خاک در طول شیب در مناطق: A) فریدون‌شهر و B) چلگرد..... ۴۴

شکل ۲-۳- توزیع خاکدانه‌ای اوره آز (A)، ال-گلوتامیناز (B) و ال-آسپاراجیناز (C) در طول شیب در منطقه فریدون‌شهر..... ۴۷

شکل ۲-۴- توزیع خاکدانه‌ای اوره آز (A)، ال-گلوتامیناز (B) و ال-آسپاراجیناز (C) در طول شیب در منطقه چلگرد..... ۴۸

شکل ۲-۵- سهم نسبی هر گروه خاکدانه از اوره آز (A)، ال-گلوتامیناز (B) و ال-آسپاراجیناز (C) در طول شیب در منطقه فریدون‌شهر..... ۵۱

شکل ۲-۶- سهم نسبی هر گروه خاکدانه از اوره آز (A)، ال-گلوتامیناز (B) و ال-آسپاراجیناز (C) در طول شیب در منطقه چلگرد..... ۵۲

شکل ۳-۱- رابطه خطی لاین ویور-برک معادله مایکلیس-منتن آنزیم ال-گلوتامیناز در خاکدانه‌های در اندازه A) ۱-٤ B) ۰/۲۵-۱ و C) ۰/۰۵-۰/۲۵ میلی‌متری موقعیت‌های مختلف شیب سرعت (V) بر حسب $mg\ NH_4^+\text{-}N\ kg^{-1}$ h^{-1} و غلظت سوبسترا (S) بر حسب mM بیان شده است..... ۶۷

شکل ۳-۲- تغییرات فعالیت آنزیم ال-گلوتامیناز با دما در خاکدانه‌های در اندازه A) ۱-۴، B) ۰/۲۵-۱ و C) ۰/۰۵-۰/۲۵ میلی‌متری موقعیت‌های مختلف شیب..... ۷۲

شکل ۳-۳- رابطه خطی معادله آرنیوس در خاکدانه‌های در اندازه A) ۱-۴، B) ۰/۲۵-۱ و C) ۰/۰۵-۰/۲۵ میلی‌متری موقعیت‌های مختلف شیب..... ۷۴

شکل ۴-۱- مراحل مختلف چرخه نیتروژن در خاک..... ۷۹

شکل ۴-۲- الکتروفورز محصول PCR ژن AOB *amoA* (A) و AOA (B) بر روی ژل آگارز..... ۸۷

شـــکل ۴-۳- توزیع خاکدانه‌ای کربن آلی، نیتروژن کل و پتانســـیل نیتریفیکاســـیون در طول شـــیب در منطقه فریدون‌شهر (A، B و C) و منطقه چلگرد (D، E و F)..... ۹۲

شکل ۴-۴- مقدار نسبی کربن آلی، نیتروژن کل و پتانسیل نیتریفیکاسیون در خاکدانه‌ها در طول شیب در منطقه فریدون‌شهر (A، B و C) و منطقه چلگرد (D، E و F)..... ۹۳

شکل ۴-۵- توزیع خاکدانه‌ای فراوانی ژن AOB *amoA* و AOA و نسبت AOB/AOA در طول شیب منطقه فریدون-شهر (A، B و C) و چلگرد (D، E و F)..... ۹۷

شکل ۴-۶- توزیع فراوانی نسبی ژن AOB *amoA* و AOA در خاکدانه‌ها در طول شیب در منطقه فریدون‌شهر (A و B) و چلگرد (C و D)..... ۹۸

شکل ۵-۱- بررسی نظریه دکستر درباره کربن آلی کمپلکس‌شده (COC) و کمپلکس‌نشده (NCOC) خاک در موقعیت و جهت‌های مختلف شیب در منطقه مورد بررسی..... ۱۱۰

شکل ۵-۲- نمودارهای ستاره ای اثر موقعیت شیب بر فعالیت آنزیم‌های خاک در A) شیب شمالی و B) شیب جنوبی..... ۱۱۸

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک‌های مورد بررسی..... ۳۷

جدول ۲-۲- درصد توزیع جرمی اندازه خاکدانه‌ها و پایداری آن‌ها (MWD) در طول شیب تپه در مناطق مورد مطالعه..... ۳۹

جدول ۲-۳- هم‌بستگی پیرسون بین ویژگی‌های خاک و شاخص پایداری ساختمان (MWD)..... ۴۰

جدول ۲-۴- فعالیت آمیدوهیدرولازهای خاک در طول شیب دو منطقه..... ۴۵

جدول ۲-۵- همبستگی پیرسون بین کربن آلی و فعالیت آنزیم‌ها در خاکدانه‌ها در طول شیب..... ۴۹

جدول ۳-۱- ویژگی‌های عمومی خاک‌ها..... ۶۳

جدول ۳-۲- توزیع اندازه خاکدانه در طول شیب..... ۶۴

جدول ۳-۳- ویژگی‌های عمومی خاکدانه‌ها در موقعیت‌های مختلف شیب..... ۶۵

جدول ۳-٤- پارامترهای سینتیکی آنزیم ال-گلوتامیناز در موقعیت‌های مختلف شیب..... ۶۸

جدول ۳-۵- همبستگی بین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاکدانه‌ها و پارامترهای سینتیکی آنزیم ال-گلوتامیناز..... ۶۹

جدول ۳-۶- پارامترهای ترمودینامیکی آنزیم ال-گلوتامیناز در موقعیت‌های مختلف شیب..... ۷۵

جدول ۳-۷- همبستگی بین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاکدانه‌ها و پارامترهای ترمودینامیکی آنزیم ال-گلوتامیناز..... ۷۶

جدول ۴-۱- برخی از ویژگی‌های عمومی خاک‌های مورد بررسی..... ۸۸

جدول ۴-۲- درصد جرمی اندازه خاکدانه در طول شیب در مناطق مورد مطالعه..... ۸۹

جدول ۴-۳- همبستگی بین پارامترهای اندازه گیری شده در خاکدانه‌های خاک در طول شیب..... ۹۵

جدول ۵-۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر جهت و موقعیت شیب بر برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک..... ۱۰۸

جدول ۵-۲- مقایسه میانگین اثر جهت و موقعیت شیب بر برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک..... ۱۰۸

جدول ۵-۳- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر جهت و موقعیت شیب بر ویژگی‌های بیولوژیک خاک..... ۱۱۳

جدول ۵-۴- مقایسه میانگین اثر جهت و موقعیت شیب بر ویژگی‌های بیولوژیک خاک..... ۱۱۳

جدول ۵-۵- مقایسه میانگین اثر متقابل جهت و موقعیت شیب بر فعالیت ال-آسپاراجیناز (LAS)، ال-گلوتامیناز (LGL) و اوره آز (URS)..... ۱۱۴

جدول ۵-۶- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر جهت و موقعیت شیب بر نسبت فعالیت‌های آنزیمی به توده زنده میکروبی..... ۱۱۵
جدول ۵-۷- مقایسه میانگین اثر جهت و موقعیت شیب بر نسبت فعالیت‌های آنزیمی به توده زنده میکروبی..... ۱۱۵
جدول ۵-۸- مقایسه میانگین اثر متقابل جهت و موقعیت شیب بر نسبت فعالیت ال-آسپاراجیناز (LAS)، ال-گلوتامیناز (LGL) و اوره آز (URS) به توده زنده میکروبی..... ۱۱۷

چکیده

توپوگرافی به عنوان یکی از عوامل خاکسازی، نقش مهمی در پویایی جمعیت، فعالیت و اکولوژی ریزجانداران خاک به عهده دارد. اغلب پژوهش‌های انجام شده در زمینه سنجش فعالیت‌های بیولوژیک، در مقیاس کل خاک (۲mm >) انجام گردیده اند ولی شناخت درست و جامعی از پویایی فعالیت‌های میکروبی خاک، نیازمند بررسی موقعیت آن‌ها در سطح زیستگاه و در مقیاس‌های کوچک نظیر مقیاس خاکدانه‌ها است. لذا این رساله به منظور بررسی اثر موقعیت شیب بر توزیع آمیدوهیدرولازها، سینتیک و ترمودینامیک آنزیم ال-گلوتامیناز و فراوانی باکتری‌ها و آرکیای اکسیدکننده آمونیوم در خاکدانه‌ها انجام گردید. همچنین اثر موقعیت و جهت شیب بر توده زنده میکروبی و تنوع کاتالیتیک خاک در مقیاس کل خاک انجام شد. در مطالعه اول، دو شیب‌تپه مرتعی واقع در فریدون شهر و چلگرد انتخاب شدند. نمونه‌برداری از عمق ۰-۱۰ سانتی‌متری ۵ موقعیت قله شیب، شانه شیب، شیب پشتی، پایه شیب و انتهای شیب منطقه فریدون‌شهر انجام شد. در منطقه چلگرد، قله شیب به دلیل فقدان شرایط لازم برای این موقعیت شیب، از نمونه‌برداری حذف گردید. خاکدانه‌ها به روش الک تر در گروه‌های ۲-٤، ۱-۲، ۰/۵-۱، ۰/۲۵-۰/۵ و ۰/۰۵-۰/۲۵ میلی‌متر جداسازی و کربن آلی و فعالیت اوره آز، ال-گلوتامیناز و ال-آسپاراجیناز اندازه‌گیری شدند. کربن آلی و فعالیت آنزیم‌ها در خاکدانه‌های ۲-٤ میلی‌متری بیشترین بودند و با کاهش اندازه خاکدانه کاهش یافتند. با وجود این، سهم این خاکدانه‌ها در کل کربن آلی و فعالیت آنزیمی کمتر از سایر خاکدانه‌ها بودند. موقعیت شیب بر فعالیت مطلق آمیدوهیدرولازها درون خاکدانه‌ها موثر بود ولی الگوی موقعیت مکانی آن‌ها را در خاکدانه‌ها چندان متاثر نساخت. با این حال، موقعیت شیب الگوهای توزیع فعالیت نسبی آمیدوهیدرولازها در خاک را از طریق تاثیر بر تشکیل خاکدانه‌ها و فعالیت مطلق آنزیم‌ها در خاکدانه‌ها تحت تاثیر قرار داد. در مطالعه دوم، پارامترهای سینتیکی (V_{max} و K_m) و ترمودینامیکی (Ea و Q_{10}) ال-گلوتامیناز در خاکدانه‌های (۱-٤، ۰/۲۵-۱ و ۰/۰۵-۰/۲۵ میلی‌متر) سه موقعیت شانه شیب، شیب پشتی و انتهای شیب منطقه چلگرد بررسی گردید. مقادیر V_{max} و K_m از موقعیت شانه شیب به سمت انتهای شیب کاهش در حالی که مقادیر E_a و Q_{10} افزایش یافتند. کربن آلی، نیتروژن کل و رس خاکدانه‌ها در طول شیب با پارامترهای سینتیکی و ترمودینامیکی ال-گلوتامیناز مرتبط بودند. تنها Q_{10} ال-گلوتامیناز تحت تاثیر اندازه خاکدانه قرار نگرفت ولی مقاومت این آنزیم به غیرفعال‌شدن در برابر افزایش دما با کاهش اندازه خاکدانه کاهش یافت. در کل، پارامترهای سینتیکی در مقایسه با پارامترهای ترمودینامیکی دارای توانایی بیشتری در انعکاس تفاوت‌های کاتالیتیکی ال-گلوتامیناز بین خاکدانه‌های مختلف بودند. در مطالعه سوم، فراوانی ژن amoA باکتری‌ها (AOB) و آرکیای (AOA) اکسیدکننده آمونیوم به روش Real-time PCR و پتانسیل نیتریفیکاسیون در خاکدانه‌های (۱-٤، ۰/۲۵-۱ و ۰/۰۵-۰/۲۵ میلی‌متر) سه موقعیت شانه شیب، شیب پشتی و انتهای شیب در دو منطقه فریدون‌شهر و چلگرد اندازه‌گیری شدند. هر دو جمعیت AOB و AOA، موقعیت مکانی یکسانی را در خاکدانه‌های موقعیت‌های مختلف شیب اشغال کردند. با وجود این، نسبت AOB/AOA متفاوت در خاکدانه‌های با اندازه‌های مختلف در طول شیب نشان دهنده عملکرد نابرابر این جمعیت‌ها در خاکدانه‌های موقعیت‌های مختلف شیب بود. فراوانی نسبی AOA و مقدار نسبی پتانسیل نیتریفیکاسیون عموماً با مقادیر نسبی کربن آلی و نیتروژن کل در طول شیب همبستگی مثبت نشان دادند. وجود همبستگی مثبت بین فراوانی نسبی AOA و پتانسیل نیتریفیکاسیون حاکی از آن است که AOA نقش مهم‌تری در فرایند نیتریفیکاسیون در طول شیب این مناطق ایفا کرده است. در مطالعه چهارم، توده زنده میکروبی و فعالیت اسید و آلکالین فسفاتاز، آریل سولفاتاز، اوره آز، ال-گلوتامیناز و ال-آسپاراجیناز در ۳ موقعیت قله شیب، شیب پشتی و پایه شیب واقع در دو جهت شمالی و جنوبی مکانی در چلگرد اندازه‌گیری شدند. توده زنده میکروبی و فعالیت آنزیم‌ها روی شیب شمالی بیشتر از شیب جنوبی بودند. کسر میکروبی روی شیب جنوبی بیشتر از شمالی بود. اسید و آلکالین فسفاتاز و آریل سولفاتاز از قله به سمت انتهای شیب کاهش یافتند. الگوی پراکنش اوره آز، ال-گلوتامیناز و ال-آسپاراجیناز در طول شیب به جهت شیب بستگی داشت. نتیجه آن که آنزیم‌های چرخه نیتروژن نسبت به سایر هیدرولازها به توپوگرافی (جهت و موقعیت شیب) وابستگی بیشتری نشان دادند.

واژگان کلیدی: توپوگرافی، خاکدانه، آمیدوهیدرولازها، سینتیک، ترمودینامیک، اکسیدکنندگان آمونیوم

فصل اول
مقدمه و بررسی منابع

۱-۱- کلیات

فرآیندهای بیولوژیکی و بیوشیمیایی خاک، اساس عملکردهای خشکی را تشکیل می‌دهند. جانداران در خاک، نقش مهمی در بازچرخ ماده آلی و فراهمی عناصر غذایی ایفا می‌کنند. جانداران در طول زندگی کوتاه خود اقدام به تولید آنزیم‌های برون و درون سلولی می‌کنند. این آنزیم‌ها نقش مهمی را در کاتالیز واکنش‌های بیوشیمیایی به عهده دارند. اندازه جمعیت‌های میکروبی و فعالیت هر گروه از آن‌ها، از عوامل زیستی و غیرزیستی بسیاری تاثیر می‌پذیرند. چنین عواملی می‌تواند شامل دما، رطوبت خاک، pH، پتانسیل اکسید و احیا، وضعیت عناصر غذایی، نوع و کیفیت ماده آلی باشد [۱۵۶]. تاثیرپذیری جانداران و فعالیت آن‌ها از چنین عواملی، بستگی به موقعیت فیزیکی آن‌ها درون پیکره خاک دارد. در واقع خاک یک محیط ناهمگن متشکل از واحدهای ساختمانی یا خاکدانه‌ها است که چگونگی و آرایش قرارگیری خاکدانه‌ها در کنار یکدیگر، باعث شده که خاک به ریز مکان‌های[1] متنوعی با ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی متفاوت تفکیک گردد. این شرایط سبب شده تا ریزجانداران نیز بر اساس اندازه و نیازهای فیزیولوژیک منحصر به فردشان در داخل محیط ناهمگن خاک، توزیع متفاوتی داشته باشند [۱۲۳]. استفاده از تکنیک‌های مولکولی

---
[1] Microenvironments

در سال‌های اخیر و مطالعه ریزجانداران در خاک در مقیاس میکرو نظیر خاکدانه‌ها و یا اندازه ذرات می‌تواند به درک بیشتر خاک به عنوان زیستگاه جانداران به پژوهشگران کمک نماید.

توپوگرافی یکی از عوامل مهم و اصلی در توزیع و تنوع خاک‌ها در سطح زمین نما می‌باشد. این عامل به دلیل تأثیر بر میزان نفوذ و انتقال آب، ایجاد ریزاقلیم، آبدوی و فرسایش خاک در تشکیل خاک مؤثر است [۷۰]. توپوگرافی تاثیر عمده‌ای بر فعالیت میکروبی و سرعت واکنش‌های بیوشیمیایی خاک دارد و بدین ترتیب گردش عناصر غذایی و فراهمی آن‌ها برای گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۸۳]. توزیع اندازه خاکدانه‌ها از جمله ویژگی‌های فیزیکی خاک است که تحت تاثیر توپوگرافی قرار گرفته است [۱۲۱]. خاکدانه‌سازی از مهمترین مکانیسم‌هایی است که می‌تواند به صورت غیرمستقیم، فعالیت‌های میکروبی را متاثر کند. بنابراین بررسی اکولوژی میکروبی در مقیاس خاکدانه‌هایی که تحت تاثیر تغییرات حاصل از توپوگرافی قرار گرفته اند می‌تواند دانسته‌های ارزشمندی را در ارتباط با اکولوژی زمین نما در اختیار پژوهشگران قرار دهد. آگاهی از چگونگی تغییرپذیری ویژگی‌های بیولوژیک خاک برای پیش‌بینی روابط خاک و زمین‌نما و مدیریت بهینه اراضی ضروری به نظر می‌رسد.

۱-۲- اکولوژی میکروبی خاک

با وجود این‌که جامعه میکروبی خاک حدود ۵ درصد حجم خاک را تشکیل می‌دهند ولی بسیار فعال و متنوع بوده و با فعالیت متابولیکی خود در تجزیه ماده آلی و چرخه بسیاری از عناصر غذایی نقش بسزایی ایفا می‌کنند. جمعیت میکروبی خاک ترکیبی از پروتوزآ، جلبک‌ها، قارچ‌ها، آرکیا، اکتینومایست‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها هستند. مجموعه این جانداران با عملکرد متفاوت بر پایداری و باروری اکوسیستم خاک موثر هستند [۱۵۶]. شیمل (۱۹۹۵) بیان کرد که ارتباط تنوع جامعه میکروبی و عملکرد خاک، به ویژگی‌های جمعیت‌هایی که مسوول فرآیندهای خاک هستند بستگی دارد. در واقع فرآیندهای موجود در خاک به ۲ گروه عام و خاص دسته‌بندی می‌شوند. فرآیندهای عام (مانند تجزیه ترکیبات ساده کربن‌دار، تنفس میکروبی و ایموبیلیزاسیون نیتروژن) توسط طیف گسترده‌ای از ریزجانداران انجام می‌شوند و بنابراین تغییر در تعداد و تنوع این دسته ریزجانداران ممکن است در فرآیند مورد نظر تاثیر چندانی نگذارد. در مقابل، فرآیندهای خاص (مانند نیتریفیکاسیون و دنیتریفیکاسیون) توسط گروه کوچکی از ریزجانداران (مانند نیتریفیکاتورها و دنیتریفیکاتورها) انجام می‌شوند. این گروه‌های میکروبی به گروه‌های حساس معروف هستند و در نتیجه‌ی تغییر در تعداد و تنوع آن‌ها، عملکرد مربوط به این دسته از ریزجانداران در

خاک دستخوش تغییر بسیار خواهد شد [۱۳۲]. بنابراین بررسی ارتباط چنین فرآیندهایی با ریزجانداران کنترل‌کننده آن‌ها مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است.

رابطه بین ریزجانداران و عملکرد آن‌ها در خاک هنوز به درستی شناخته شده نیست. یکی از دلایل آن ضعف روش‌های اندازه‌گیری تعداد و تنوع جامعه میکروبی خاک است. جداسازی و کشت میکروبی، مهمترین مراحل در روش‌های سنتی گذشته بوده است. با این وجود به این نکته می‌بایستی توجه کرد که بسیاری از ریزجانداران در خاک غیرقابل کشت بوده و تنها با چنین روش‌هایی می‌توان تقریباً ۱ درصد آن‌ها را از نظر تعداد و یا تنوع میکروبی در خاک مورد ارزیابی قرار داد. بنابراین با توجه به این مسئله و همچنین پیشرفت علم در سال‌های اخیر، امروزه در بسیاری از مطالعات میکروبی خاک، از روش‌های بدون نیاز به محیط کشت[1] استفاده شده است [٦٠]. از متداول‌ترین این روش‌ها استفاده از روش‌های مولکولی بر پایه‌ی عصاره‌گیری کل DNA از خاک است. به مطالعاتی که بر روی کل ژنوم استخراج شده از خاک و یا به عبارتی متاژنوم[2] انجام می‌شود، مطالعات متاژنومیکس[3] گفته می‌شود. از متداول‌ترین روش‌ها که در مطالعات متاژنومیکس استفاده شده است، روش‌هایی بر پایه استفاده از واکنش زنجیره‌ی پلیمرار (PCR-based methods[4]) می‌باشد. اساس کار PCR تکثیر ژن مورد نظر به بیش از ۱۰۹ نسخه پس از ۳۰ چرخه متوالی است [٦٠]. از ژن‌های هدف که به صورت نشانگر مولکولی[5] برای شناسایی و تنوع پروکاریوت‌ها در خاک استفاده شده است، می‌توان به ١٦S rRNA اشاره کرد. با این وجود، پس از کشف و شناسایی ژن‌های عملکردی[6] مسوول فرآیندهای خاص مانند amoA، nifH، napA و غیره، توجه بسیاری از محققان به بررسی چنین ژن‌هایی در خاک و به ویژه کمّی کردن آن‌ها با استفاده از تکنیک‌های مولکولی و ارتباط آن‌ها با عملکرد خاک جلب شده است [۱۸۳]. به منظور کمّی کردن ژن‌های عملکردی در خاک از Real-time PCR استفاده شده است. در این روش، مقدار محصول PCR که در طول فرآیند تکثیر ایجاد می‌شود با استفاده از گروهی از رنگ‌های فلورسنت‌زای متصل شده به DNA و یا پروب‌های نشان گذاری شده، توسط Real-time PCR تعیین می گردد. در واقع اساس روش، ارزیابی سیگنال‌های فلورسنت ساطع-شده در اثر ساخت DNA دو رشته‌ای (dsDNA) توسط دستگاه است. از متداول‌ترین رنگ‌های فلورسنت مورد استفاده در این تکنیک می‌توان به سایبرگرینI اشاره کرد. این رنگ، تمایل زیادی به اتصال به

---

[1] Culture-independent techniques
[2] Metagenome
[3] Metagenomics
[4] Polymerase Chain Reaction
[5] Molecular marker
[6] Functional genes

dsDNA دارد. در طی چرخه‌های PCR که محصول دو رشته‌ای تولید می‌شود، رنگ به آن‌ها متصل شده و فلورسنت ساطع می‌نماید. بنابراین افزایش شدت فلورسنت با غلظت dsDNA متناسب خواهد بود. با ادامه یافتن PCR شدت فلورسنت رو به افزایش می‌گذارد. به اولین چرخه‌ای که شدت فلورسنت بیشتر از خط پایه (فلورسنت زمینه) باشد چرخه آستانه یا C_t گویند. با استفاده از عدد C_t نمونه و استانداردهای ژن مورد نظر می‌توان مقدار DNA اولیه را محاسبه نمود [۱۸۳].

از پروب‌های نشان‌گذاری‌شده متداول به منظور تعیین مقدار محصول PCR می‌توان به پروب Taq Man اشاره کرد. این پروب یک توالی الیگونوکلئوتید است که یک رنگ فلورسنت‌زا (reporter) در انتهای ′۵ و یک خاموش‌کننده (quencher) در انتهای ′۳ دارد. ابتدا این پروب در طی مراحل PCR، بر روی DNA تک رشته‌ای از طریق توالی های اختصاصی متصل می‌شود. هنگامی که reporter و quencher در فاصله نزدیکی از هم قرار دارند (در حالت پروب)، اگر نوری از reporter ساطع شود توسط quencher جذب شده و توسط Real-time PCR ثبت نمی‌گردد ولی به محض جداشدن این دو از هم در اثر ساخت dsDNA توسط آنزیم پلی‌مراز، نور ساطع‌شده از reporter توسط quencher، قابل جذب نیست و به صورت فلورسنت توسط Real-time PCR قابل ارزیابی و اندازه‌گیری است [۱۸۳].

۱-۳- آنزیم‌های خاک

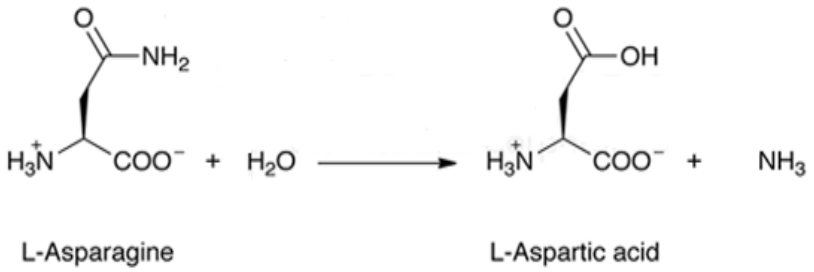
آنزیم‌های خاک، کاتالیزورهای زیستی خاک هستند که با دخالت در سنتز پروتئین‌ها، کربوهیدرات-ها، نوکلئیک اسیدها و همچنین چرخه بسیاری از عناصر غذایی، نقش مهمی در اکولوژی میکروبی ایفا می‌کنند [۱۵۲]. فعالیت هر آنزیم در خاک ترکیبی از فعالیت آنزیم‌های مرتبط با اجزاء زنده و غیر زنده گوناگون مانند سلول‌های در حال تکثیر، بقایای سلولی، کانی‌های رسی، کلوئیدهای آلی و فاز مایع خاک است [۲۰]. گیاهان، حیوانات و ریزجانداران از جمله منابع تولید آنزیم در خاک محسوب می‌شوند [۱۵۲]. تغییر در فعالیت آنزیم‌های خاک نه تنها به تفاوت در بیان ژن، بلکه به تغییر عوامل محیطی وابسته است [۱۱٤]. موقعیت هر آنزیم با زمان تغییر کرده و به عواملی چون اندازه و انحلال پذیری سوبسترای آن، گونه‌های ریزجانداران و ماهیت فیزیکوشیمیایی کلوئیدهای خاک بستگی دارد [۲۰]. دما، pH، غلظت سوبسترا، حضور و عدم حضور بازدارنده‌ها، سرعت واکنش‌های آنزیمی را تحت تاثیر قرار می‌دهند. از فعالیت آنزیم‌ها به عنوان شاخص تنوع عملکرد میکروبی خاک[1] استفاده شده است [۲۲ و ۱۱٤].

[1]Microbial functional diversity

از آن‌جایی که آنزیم‌ها ارتباط نزدیکی با چرخه عناصر غذایی دارند، ارزیابی فعالیت آنزیم‌های موثر در فرآیندهای معدنی‌شدن عناصری چون نیتروژن (ال-آسپاراجیناز، ال-گلوتامیناز و اوره آز)، فسفر (آلکالین و اسید فسفاتاز) و گوگرد (آریل سولفاتاز) می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در مورد سلامت و کیفیت بیولوژیکی اکوسیستم خاک ارائه دهند.

۱-۳-۱- ال-آسپاراجیناز

آنزیم ال-آسپاراجیناز (ال-آسپاراجین آمیدوهیدرولاز EC 3.5.1.1) هیدرولیز ال-آسپاراجین به ال-آسپارتیک اسید و آمونیاک را کاتالیز می‌کند (شکل ۱-۱). این آنزیم در طبیعت توسط گیاهان (*Tamarindus indica*، *Capsicum annum*، *Lupinus angustifolius*) ، باکتری‌ها (*Erwinia aroideae*، *Enterobacter aerogenes*، *Psuedomonas stutzeri*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Serratia marcescence*، *Wolinella succinogenes*، *Escherchia coli*)، قارچ‌ها (*Aspergillus tamarii*، *Aspergillus terreus*، *Penicillium* sp.) و اکتینومایست‌ها (*Streptomyces tendae*) تولید می‌شود [۸۸].



شکل ۱-۱- تبدیل آمینواسید ال-آسپاراجین به ال-آسپارتیک اسید و آمونیاک توسط ال-آسپاراجیناز

۱-۳-۲- ال-گلوتامیناز

ال-گلوتامیناز (ال-گلوتامین آمیدوهیدرولاز EC 3.5.1.2) هیدرولیز ال-گلوتامین به ال-گلوتامیک اسید و آمونیاک را کاتالیز می‌کند (شکل ۱-۲). این آنزیم به صورت اختصاصی پیوندهای C-N غیرپپتیدی در آمیدهای خطی را می‌شکند [۱۵۲].