بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تبریز
دانشکده کشاورزی
گروه علوم خاک

رساله

برای دریافت درجه دکتری تخصصی (Ph.D.)
رشته علوم خاک گرایش بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک

عنوان

ارزیابی ساختار جوامع میکروبی متأثر از شوری و پوشش گیاهی با استفاده از بیومارکرهای لیپیدی در خاک‌های زراعی و شورزارهای دشت تبریز

استاد راهنما:

دکتر ناصر علی اصغرزاد

استادان مشاور:

Professor Pål Axel Olsson

دکتر محمد مقدم

دکتر میرحسن رسولی صدقیانی

پژوهشگر

محسن برین

شهریور ۹۲

شماره ۱۸

تقدیم به:

پدر و مادر مهربانم که دعای خیرشان

همواره بدرقه راهم بود

و

به همسر فداکار و فرزندان عزیزم

و

تمام معلمان گرامی

لم یشکرالمخلوق لم یشکرالخالق

شکر و سپاس خدای را که بنده را مورد لطف قرار داده و توفیق علم‌آموزی را برایم عنایت فرمود و به مصداق فرمایش گهربار مولای متقیان حضرت علی (ع) که فرمود "آن کس که به من کلامی بیاموزد مرا بنده خویش گردانیده‌است".

بدینوسیله از زحمات و راهنمایی‌های ارزنده استاد علم و اخلاق جناب آقای دکتر ناصر علی اصغرزاد که در طول تحصیل و تمام مراحل اجرای پایان‌نامه ، صادقانه و با روی گشاده مرا راهنمایی و مساعدت کردند صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می‌نمایم. از استاد ارجمندم جناب آقای پروفسور پل اکسل برای همکاری و راهنمایی‌های علمی و عملی ارزنده و در اختیار قرار دادن امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی در طول فرصت مطالعاتی در کشور سوئد، تشکر و قدردانی می‌کنم. از استاد گرانقدر جناب آقای دکتر مقدم که لطف کردند و منت گذاشته و مشاوره رساله را قبول کردند سپاسگزاری می‌نمایم. از دوست و همکار ارجمندم جناب آقای دکتر صدقیانی که در طول پایان‌نامه همواره از راهنمایی‌های علمی و استفاده از امکانات آزمایشگاهی در طول پایاننامه در دانشگاه ارومیه بهره‌مند بودم کمال تشکر و قدردانی را دارم. از آقایان دکتر جلال جلیلییان، دکتر شاهین اوستان و دکتر محمد رضا ساریخانی بدلیل داوری ارزنده این رساله صمیمانه تشکر می‌نمایم. از آقای دکتر فاخری‌فرد معاون محترم پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده تشکر می‌نمایم.

از سایر اساتید محترم گروه خاکشناسی آقایان دکتر نیشابوری، دکتر جعفرزاده، دکتر نجفی، دکتر ریحانی-تبار و دکتر احمدی و سایر اعضاء و کارکنان گروه تشکر و سپاسگزاری می‌کنم.

از همکلاسی‌ها و دوستان عزیزم آقایان مهیجی، ثروتی، رحمتی، بیرامی، شهابی، رضایی و خانم امانیفر و بقیه عزیزان که نامشان از قلم افتاده و همه عزیزانی که منت گذاشته و در این جلسه حضور یافتند تشکر و قدردانی می‌نمایم.

محسن برین

شهریور ۹۲

نام خانوادگی دانشجو: برین **نام:** محسن

عنوان رساله:

ارزیابی ساختار جوامع میکروبی متأثر از شوری و پوشش گیاهی با استفاده از بیومارکرهای لیپیدی در خاک‌های زراعی و شورزارهای دشت تبریز

استاد راهنما:

دکتر ناصر علی‌اصغرزاد

استادان مشاور:

Professor Pål Axel Olsson دکتر محمد مقدم واحد دکتر میرحسن رسولی‌صدقیانی

مقطع تحصیلی: دکتری **رشته:** علوم خاک **گرایش:** بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک

دانشگاه: تبریز دانشکده: کشاورزی **تاریخ فارغ‌التحصیلی:** شهریور ۹۲ **تعداد صفحه:** ۱۳۷

کلید واژه‌ها: اسید چرب خنثی، اسید چرب فسفولیپید، ، ترکیب جمعیت میکروبی، تنش شوری، قارچ‌ریشه آربوسکولار

چکیده:

تاکنون مطالعات مختلفی در مورد پیامدهای افزایش شوری در اکوسیستم سطح زمین در حوضه دریاچه ارومیه صورت گرفته‌است، اما به‌ندرت مطالعه‌ای در مورد اثر شوری بر اکوسیستم زیر سطح زمین در این حوزه انجام شده‌است تا تصویر واقعی از اکوسیستم متأثر از تنش شوری و یا اثرات طولانی مدت فرایندهایی که باعث تغییر در جامعه میکروبی شده‌اند، بدست آید. با توجه به نقش حیاتی و محوری جوامع میکروبی خاک، تعادل اکولوژیک جوامع میکروبی به عنوان شاخص سلامت اکوسیستم خاک، از اهمیت بالایی برخوردار است. به این منظور تحقیقی جهت بررسی ترکیب جوامع میکروبی خاک در دشت تبریز انجام شد. همچنین همزیستی قارچ‌ریشه‌ای، در شرایط شوری بررسی شد. در این تحقیق سه نوع گیاه با تحمل متفاوت به شوری شامل: تحمل کم تا متوسط (پیاز)، تحمل متوسط تا زیاد (یونجه) و گیاه شور پسند (سالیکورنیا)، از مزارع و نیز شورزارهای دشت تبریز با شوری‌های مختلف انتخاب شد. قبل از نمونه برداری اصلی، از محل‌های مختلف در منطقه مورد نظر نمونه برداری خاک انجام و با EC سنج دستی میزان شوری آنها تعیین شد. بعد از پیدا کردن محدوده نسبتاً وسیعی از EC خاک در هر گیاه، موقعیت محل با GPS تعیین و در دفعات بعدی اقدام به نمونه‌برداری اصلی شد. بعد از حذف نمونه‌های تقریباً مشابه در نهایت ۳۹ نمونه مرکب خاک و ریشه از مزارع پیاز و ۲۹ نمونه مرکب از مزارع یونجه و همچنین ۲۶ نمونه مرکب خاک و ریشه سالیکورنیا از شورزارهای دشت تبریز از عمق حدود ۳۰ سانتیمتر سطح خاک برداشت شد و سپس برای تجزیه فیزیکی و شیمیایی، اسید چرب فسفولیپید (PLFA)، اسید چرب خنثی (NLFA) و تعیین فراوانی اندام‌های قارچ‌ریشه به آزمایشگاه منتقل شد. نتایج نشان داد که با افزایش EC، در

گیاهان قارچ‌ریشه‌ای (یونجه و پیاز) درصد وزیکول افزایش ولی درصد هیف کاهش یافت. همچنین با بررسی میکروسکوپی و آنالیز اسید چرب مشخص شد که سالیکورنیا همزیستی قارچ‌ریشه‌ای برقرار نمی‌کند. از طرف دیگر ملاحظه شد که به علت وابستگی بالای (16:1ω5) PLFA (نشانگر قارچ‌ریشه) به مواد آلی، این معیار خوبی برای ارزیابی قارچ‌ریشه در خاک نیست در صورتی‌که نسبت (16:1ω5) NLFA/(16:1ω5) PLFA در خاک و نیز (16:1ω5) NLFA در ریشه، می تواند به عنوان یک شاخص بهتر برای ارزیابی قارچ‌ریشه در نظر گرفت. بررسی ترکیب جوامع میکروبی خاک‌های مورد مطالعه نشان داد که در نمونه‌های خاک لجن دریاچه با شوری بسیار بالا، بیشترین مقدار PLFA کل وجود دارد که حتی بیشتر از نمونه‌های خاک اطراف ریشه یونجه بود. کمترین میانگین PLFA در خاک اطراف ریشه گیاه پیاز به دست آمد. جمعیت کل میکروبی خاک (PLFA) با افزایش EC همبستگی خوبی نشان نداد زیرا این جمعیت شدیداً وابسته به کربن آلی خاک بوده و کربن آلی نمونه‌های خاک نیز متفاوت بود. همچنین نتایج نشان داد که ترکیب جمعیت میکروبی در نمونه‌های خاک اطراف ریشه گیاهان مختلف به‌صورت زیر است:

اکتینومیست‌ها < قارچ‌های ساپروفیت < باکتری‌های گرم مثبت < باکتری‌های گرم منفی

بررسی میانگین شاخص‌های تنشی، نشان داد که مقدار این صفات در نمونه‌های خاک اطراف ریشه سالیکورنیا به‌طور معنی دار بیشتر از دو گیاه دیگر است. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به عامل‌ها حاکی از آن بود که کل نمونه‌های خاک با توجه به متغیرهای فیزیکی- شیمیایی و بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده، در دو گروه قرار گرفتند. یک گروه شامل نمونه‌های پیاز و یونجه و گروه دیگر شامل نمونه‌های سالیکورنیا بود. همچنین براساس تجزیه به عامل‌ها متغیرهای اندازه‌گیری شده در مورد ساختار جوامع میکروبی خاک نشان داد که متغیرهای شوری و نسبت‌های گرم منفی به گرم مثبت، قارچ ساپروفیت به گرم مثبت، اسیدهای چرب اشباع به اسید چرب با یک پیوند دوگانه و اسید چرب سیکلو به اسید چرب‌های پیش ماده در یک گروه قرار داشته و کربن آلی و گروه‌های میکروبی (PLFA کل، PLFA قارچ ساپروفیت، PLFA باکتری‌ها، PLFA اکتینومیست، PLFA باکتری‌های گرم منفی و PLFA باکتری‌های گرم مثبت) در گروه دیگر قرار گرفتند. سهم اسیدهای چرب اشباع شاخه‌ای در خاک اطراف ریشه سالیکورنیا، نسبت به اشباع و غیر اشباع و همچنین نسبت به دو گیاه دیگر، کمتر بود. همچنین در بین اسیدهای چرب مختلف، پایین‌ترین مقدار اسیدهای چرب 10Me16:0، 10Me17:0 و 10Me18:0 (به‌عنوان نشانگرهای اسید چرب اکتینومیست) و اسید چرب 16:1ω5 (به‌عنوان نشانگر قارچ-ریشه آربوسکولار) در خاک اطراف ریشه سالیکورنیا از پایین‌ترین مقدار برخوردار بودند.

فهرست مطالب صفحه

چکیده

مقدمه

فصل اول: بررسی منابع

۱- ۱- جامعه میکروبی خاک ۱

۱-۲- روش‌های برآورد ساختار جامعه میکروبی خاک ۳

۱-۳- اسیدهای چرب نشانگر، به عنوان روشی برای برآورد جوامع میکروبی خاک ۹

۱-۳-۱- نام‌گذاری اسیدهای چرب ۱۰

۱-۳-۲- کاربرد اسیدهای چرب نشانگر، برای برآورد زیست‌توده قارچ‌ریشه آربوسکولار ۱۴

۱-۳-۳- کاربرد اسیدهای چرب نشانگر (اسید چرب فسفولیپید)، برای برآورد زیست‌توده میکروبی خاک ۱۸

۱-۴- پوشش گیاهی و ساختار جوامع میکروبی خاک ۳۱

۱-۵- اثرات شوری بر جوامع میکروبی خاک ۳۶

فصل دوم : مواد و روش‌ها

۲-۱- وضعیت عمومی منطقه مورد مطالعه ۴۵

۲-۱-۱- مشخصات کلی دشت تبریز ۴۵

۲-۱-۲- مشخصات محدوده مورد مطالعه ۴۵

۲-۱-۳- آب و هوای منطقه ۴۷

۲ -۲- انتخاب گیاه ۴۷

فهرست مطالب | صفحه

۲-۳- مراحل انجام نمونه‌برداری ۴۷

۲-۳-۱- نمونه‌برداری و تفکیک نمونه‌ها جهت انجام آزمون‌ها ۴۸

۲-۴- تجزیه‌های آزمایشگاهی ۴۹

۲-۴-۱- تجزیه خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک ۴۹

۲-۴-۲- اندازه‌گیری PLFA و NLFA در خاک ۵۰

۲-۴-۳- اندازه‌گیری NLFA در بافت گیاهی ۵۹

۲-۴-۴- محاسبات PLFA و NLFA ۶۰

۲-۴-۵- نشانگرهای زیستی اسیدهای چرب مورد استفاده برای هر یک از گروه‌های میکروبی ۶۳

۲-۴-۶- تعیین درصد کلینزاسیون قارچ‌ریشه‌ای ۶۴

۲-۵- تجزیه‌های آماری ۶۶

فصل سوم : نتایج و بحث

۳-۱ خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نمونه‌های خاک مورد مطالعه ۶۸

۳-۲ بررسی قارچ‌ریشه‌ای نمونه‌های خاک اطراف ریشه و ریشه‌ها ۷۱

۳-۲-۱- فراوانی اندام‌های قارچ‌ریشه آربوسکولار در نمونه‌های ریشه (روش میکروسکوپی) ۷۱

۳-۲-۲- الگوی اسیدهای چرب نشانگر قارچ‌ریشه آربوسکولار در نمونه‌های ریشه ۷۷

۳-۲-۳- الگوی اسیدهای چرب نشانگر قارچ‌ریشه آربوسکولار در نمونه‌های خاک ۷۷

۳-۲-۴- تجزیه به عامل (به روش تجزیه به مولفه‌های اصلی) متغیرهای قارچ- ۸۴

فهرست مطالب | صفحه

ریشه‌ای

۳-۲-۵- تجزیه خوشه‌ای نمونه‌های خاک متغیرهای قارچ‌ریشه‌ای ۸۶

۳-۳- بررسی ساختار جوامع میکروبی خاک‌های مورد مطالعه ۸۹

۳-۳-۱- PLFA کل (اسید چرب فسفولیپید کل گروه‌های میکروبی) ۸۹

۳-۳-۲- PLFA قارچ‌های ساپروفیت در خاک ۹۳

۳-۳-۳- PLFA های باکتری‌ها در خاک ۹۵

۳-۳-۴- PLFA های اکتینومیست در خاک ۹۸

۳-۳-۵- بررسی شاخص‌های استرسی ساختار جوامع میکروبی خاک ۱۰۷

۳-۳-۶ - تجزیه خوشه‌ای نمونه‌های خاک متغیرهای ساختار جوامع میکروبی خاک ۱۱۱

۳-۳-۷- تجزیه به عامل (به روش تجزیه به مولفه‌های اصلی) کل نمونه‌های خاک جوامع میکروبی ۱۱۴

۳-۳-۸- تجزیه به عامل (به روش تجزیه به مولفه‌های اصلی) متغیرهای اندازه-گیری شده ساختار جوامع میکروبی خاک ۱۱۶

۳-۳-۹- اسیدهای چرب تشخیص داده‌شده توسط GC در بررسی ساختار جوامع میکروبی خاک‌های ۱۱۸

۳-۴- نتیجه‌گیری کلی ۱۲۱

۳-۵- پیشنهادها ۱۲۳

منابع ۱۲۴

مقدمه

در سال‌های اخیر به دلیل پدیده خشکسالی و کاهش نزولات جوی و کاهش حجم آب‌های ورودی به دریا بر اثر احداث سدهای فاقد ارزیابی محیط زیستی، حفر چاه‌های غیر مجاز، استفاده بی‌رویه آب در کشاورزی (آبیاری سنتی) سبب کاهش سطح آب دریاچه ارومیه (دومین دریاچه شور جهان) شده، و همچنین پیشروی آب دریاچه به سمت آب‌های زیر زمینی در اثر برداشت بی رویه از آب‌ها، سبب کاهش کیفیت آب‌های آبیاری شده‌است. متاسفأنه بر اثر استفاده از آب با کیفیت نامناسب، سوء تدبیرها در حوزه مدیریت آب و یا مدیریت غلط بهره برداری از زمین، روند شوری رو به رشد می‌باشد و هر سال چند هکتار از زمین‌های زراعی به زمین‌های غیرقابل کشت تبدیل می‌شوند. استان‌های آذربایجان شرقی و غربی به خاطر همجواری با دریاچه ارومیه در معرض بیشترین خطر شوری هستند (زهزاد، ۱۳۶۸). تاکنون مطالعات، پروژه‌ها و همایش‌های مختلف در مورد پیامدهای افزایش شوری برتغییر پوشش گیاهی، حیات وحش و غیره در اکوسیستم بالای سطح زمین[1] در حوضه دریاچه ارومیه حتی با حمایت مالی مجامع جهانی مثل بانک جهانی صورت گرفته (زهزاد، ۱۳۶۸؛ بی‌نام، ۱۳۸۱)، اما به ندرت مطالعه‌ای در مورد اثرات شوری، پوشش گیاهی و تنش‌های مختلف محیطی بر اکوسیستم زیر سطح زمین[2] انجام شده‌است. اکوسیستم خاک، محیطی زنده، فعال و پیچیده می‌باشد که هستی بخش توانا، مدیریت خاک را به طور طبیعی به موجودات خاکزی سپرده است و برای انجام چنین کاری توانایی لازم را در طبیعت آنها نهاده است. بهترین نمود این توانایی را می‌توان در اکوسیستم‌های طبیعی مصون مانده از دخالت‌های انسان مشاهده کرد که طی قرن‌های متمادی، سرسبز و پربار در حالت تعادل باقی مانده‌اند (صالح راستین، ۱۳۸۴). در این میان جوامع میکروبی خاک نقش حیاتی و محوری در تجزیه مواد آلی (واردل و همکاران، ۲۰۰۴)، چرخه عناصر غذایی (زک و همکاران، ۲۰۰۳)، هموستازی (کارنی و ماتسون، ۲۰۰۵)، حاصلخیزی خاک و سلامت گیاهان (شن، ۱۹۹۷؛ کیرک و همکاران، ۲۰۰۴؛ بینگ رو و همکاران، ۲۰۰۶) ایفا می-

[1] Aboveground
[2] Underground

کنند. بنابراین منطقی است که تعادل اکولوژیک ترکیب جوامع میکروبی خاک به عنوان شاخص سلامت اکوسیستم خاک به‌کار رود. شاخص‌های مورد استفاده برای بررسی وضعیت اکوسیستم خاک، باید قادر باشند تغییرات در مدیریت، آب و هوا و شرایط تنش را در اکوسیستم منعکس کنند. تا همین اواخر تغییر در خصوصیات فیزیکی شیمیایی مانند pH، EC، وضعیت عناصر قابل دسترس و کربن آلی خاک برای ارزیابی پاسخ به شرایط تنش به‌کار برده می‌شدند (کاور و همکاران، ۲۰۰۵). ولی این ویژگی‌ها به اندازه کافی حساس نیستند تا تغییر در اکوسیستم خاک را در مراحل اولیه پیش‌بینی کنند. از طرفی خصوصیات میکروبی خاک پاسخ خیلی سریع به بهم خوردگی و تغییرات محیط‌زیست می‌دهند. به طور معمول، پاسخ به تنش، با مقیاس میکروبی از نظر تعداد میکروب، شدت تنفس میکروب‌ها و فعالیت میکروبی مطالعه می‌شود. ولی این‌ها شاخص‌های خیلی حساس نیستند چون عملکردهای فراوان و برهمکنش‌های بسیار پیچیده در درون جوامع میکروبی وجود دارد (کاور و همکاران، ۲۰۰۵).

بر اثر شوری و اثرات سوء حاصل از آن بیوماس میکروبی، معدنی شدن کربن و نیتروژن، تثبیت بیولوژیک نیتروژن و فعالیت دهیدروژناز و سلولاز کاهش (پانخورست و همکاران، ۲۰۰۱) و ترکیب جوامع میکروبی (باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی، اکتینومیست، قارچ‌های همزیست، جلبک‌ها، پروتوزوآها) تغییر خواهد کرد. بررسی‌ها نشان داده‌اند که جوانه‌زنی اسپور و رشد هیف قارچ میکوریز بر اثر شوری کاهش می‌یابد (پانخورست و همکاران، ۲۰۰۱). همچنین با افزایش شوری درصد کلنیزاسیون گیاهان گلیکوفیتی به‌طور معنی‌دار کاهش یافته و در گیاه جو در شوری حدود ۲۰ dS/m به حدود ۵ درصد می-رسد (علی اصغرزاده و همکاران، ۲۰۰۱) با افزایش شوری پوشش گیاهی منطقه نیز تغییر می‌کند یعنی گیاهان هالوفیت جایگزین گیاهان گلیکوفیت می‌شوند. پوشش‌های گیاهی مختلف از طریق زیستگاه مناسب و منابع غذایی و با ترشح متابولیت‌های گوناگون در ریزوسفر، بر ترکیب جوامع میکروبی مؤثرند. در سال‌های اخیر مطالعاتی در ارتباط با اثر گیاهان بر برخی پارامترهای میکروبی شامل بیوماس، ترکیب

جوامع میکروبی و ظرفیت کاتابولیکی انجام شده‌است (لوپوایی و همکاران، ۱۹۹۸؛ زک و همکاران، ۲۰۰۳). اثرات مختلف فعالیت انسانی بر خصوصیات جوامع میکروبی نیز توسط برخی محققان بیان شده-است (لوپوایی و همکاران، ۱۹۹۸ و ۲۰۰۱). به همین دلیل برای ارزیابی تغییرات در اکوسیستم خاک، نیاز به تکنیک‌ها و روش‌هایی دارد که بتوان جوامع میکروبی خاک را شناسایی و مورد سنجش قرار داد. تکنیک‌های کشت میکروبی، نمی‌توانند میکروارگانیسم‌های غیر قابل کشت را مشخص کنند (همه میکروارگانیسم‌ها قادر نیستند در محیط کشت رشد کنند). تکنیک‌های مولکولی و تکنیک‌های بر پایه PCR نیاز به هزینه و وقت زیاد داشته ودر ضمن به‌اندازه روش الگوهای اسید چرب فسفولیپیدی (PLFA) اطلاعات وسیع از تنوع، وضعیت فیزیولوژیک و تنشی نمی‌دهند، به همین دلیل یک روش نسبتاً سریع برای ارزیابی زیست‌توده و ترکیب جوامع میکروبی در خاک استفاده از PLFA می‌باشد (رمزی و همکاران ،۲۰۰۶). تجزیه PLFA ترکیب جوامع میکروبی، زیست‌توده هر گروه و وضعیت تغذیه-ای – فیزیولوژیکی جوامع میکروبی را برآورد می‌نماید (زلز، ۱۹۹۹؛ کاردون و گیج، ۲۰۰۶). این روش به-طور وسیع در مطالعات جوامع میکروبی خاک مورد استفاده قرار گرفته‌است (گریفت و همکاران، ۲۰۰۷؛ ولاسکو و همکاران، ۲۰۱۰). در این تحقیق با توجه به اهمیت جوامع میکروبی خاک در پایداری و ثبات اکوسیستم بالای سطح خاک، اثرات شوری و پوشش گیاهی بر زیست‌توده و ترکیب جوامع میکروبی خاک و قارچ‌ریشه آربوسکولار مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق اهداف زیر دنبال می‌گردد:

۱- تعیین ساختار جمعیت میکروبی و زیست توده گروه‌های مختلف میکروبی، با افزایش شوری.

۲- مطالعه میزان تنش شوری در گروه‌های میکروبی خاک

۳- تعیین ترکیب جوامع میکروبی و گروه‌های غالب میکروبی در مزارع یونجه، پیاز و سالیکورنیا

۴- برآورد زیست‌توده قارچ‌ریشه در خاک اطراف ریشه گیاهان مورد مطالعه

۵- بررسی درصد کلنیزاسیون قارچ‌ریشه آربوسکولار در ریشه گیاهان مورد نظر با روش رنگ‌آمیزی

۶- بررسی مقدار کلنیزاسیون قارچ‌ریشه آربوسکولار در ریشه گیاهان مورد مطالعه با استفاده از اسید چرب نشانگر قارچ‌ریشه NLFA 16:1ω5[1]

[1]Neutral Lipid Fatty Acid

فصل اول

بررسی منابع

۱-۱- جامعه میکروبی خاک

خاک یک سیستم بیولوژیک، پویا و پیچیده می‌باشد. قسمت عمده‌ای از این پیچیدگی را می‌توان به دلیل بخش زنده خاک دانست که دنیای اسرار آمیز و پیچیده‌ای از روابط بین موجودات و گیاه را در خود جای داده‌است (نانی‌پیری و همکاران، ۲۰۰۳). خصوصیات میکروبی خاک به عنوان گروهی از شاخص‌های سلامت خاک مطرح می‌باشند چون رابطه تنگاتنگ بین ساختار میکروبی، کیفیت خاک، گیاه و پایداری اکوسیستم وجود دارد (دوران و همکاران، ۱۹۹۴). یک ریزوسفر سالم، گیاه را در مقابل تنش-های زنده و غیرزنده همچون پاتوژن، خشکسالی و آلودگی محافظت می‌کند (کیرک و همکاران، ۲۰۰۴).

کیفیت خاک ممکن است به پایداری فعالیت بیولوژیکی، رشد بهتر و سالم‌تر گیاه تعریف شود (دوران و همکاران، ۱۹۹۴). بخش بیولوژیک خاک در چرخه نیتروژن و کربن، ساختمان خاک (تیسدال، ۱۹۹۱)، تجزیه مواد آلی (پارکینسون و کولمن، ۱۹۹۱)، سموم و غیره دخالت دارند. ایبکوا و کندی (۱۹۹۹) معتقدند که پارامترهای میکروبیولوژیک خاک، تغییرات کیفیت خاک را زودتر پیش‌بینی می‌کنند.

تورسویک و همکاران (۱۹۹۸) اظهار داشتند که هنوز اطلاعات کافی در رابطه با ساختار جامعه میکروبی خاک و نقش آن‌ها در چرخه عناصر غذایی در اکوسیستم وجود ندارد. بخشی از این عدم اطلاعات مربوط به پیچیدگی فوق العاده جوامع میکروبی خاک می‌باشد که تخمین زده می‌شود در یک گرم خاک بیش از ۴۰۰۰ ژنوم مختلف وجود داشته باشد. حدود ۵۰۰۰ گونه باکتری در خاک توصیف شده‌است (پیس، ۱۹۹۷)، ولی یک درصد از جمعیت باکتری‌های خاک را با روش‌های استاندارد می‌توان کشت کرد (تورسویک و همکاران، ۱۹۹۸). تخمین زده می‌شود که ۱۵۰۰۰۰۰ گونه قارچ در دنیا وجود داشته باشد اما بر خلاف باکتری‌ها تعداد زیادی از قارچ‌ها را با شیوه‌های استاندارد مرسوم در آزمایشگاه‌ها نمی توان کشت کرد (گیلر و همکاران، ۱۹۹۷؛ ون و همکاران، ۲۰۰۰). هوگن هلتز و همکاران (۱۹۹۸) اظهار داشتند که قسمت مهمی از پیچیدگی‌های خاک مربوط به این است که میکروارگانیسم‌های جدا

شده از یک نمونه خاک فقط یک بخش کوچکی می‌باشد که قابل کشت است و قسمت عمده میکروارگانیسم‌ها هنوز قابل کشت نیستند. به عقیده بوسی و همکاران (۱۹۹۸) شکی نیست که جمعیت میکروبی خاک به تغییرات محیط حساس است. مطالعات آن‌ها نشان داد که جمعیت میکروبی خاک با بهم خوردگی خاک، اصلاح خاک، روش‌های آبیاری، شخم و حتی نوع گیاه تغییر می‌کند.

بوکلی و شمیت (۲۰۰۱) معتقد بودند که تجزیه و تحلیل ساختار جوامع میکروبی معمولاً تشابه یا تفاوت جوامع میکروبی را بررسی کرده و در خصوص تنوع میکروبی اطلاعاتی بدست نمی‌دهند. اصولاً باید عوامل محیطی که ساختار جوامع میکروبی را تحت تأثیر قرار می‌دهند، مشخص و شناسایی شوند. یکی از عوامل مهم در ساختار جوامع میکروبی آب قابل دسترس می‌باشد. لاندکویست و همکاران (۱۹۹۹) نشان دادند که خشک و مرطوب شدن خاک در مزرعه یا آزمایشگاه بر جوامع میکروبی خاک مؤثر است. تیدج و همکاران (۱۹۹۹) بررسی ساختار جوامع میکروبی خاک را به عنوان باز کردن جعبه سیاه مطرح کرده و عقیده داشتند که تنوع میکروبی خاک خیلی بیشتر از تصورات ما می‌باشد. به عقیده ترینج (۲۰۰۵) باکتری‌ها گروه‌های اصلی موجودات زنده خاک می‌باشند. به طور معمول تعداد ده میلیارد باکتری در هر گرم خاک وجود دارد و همچنین دارای تنوع بالایی می‌باشند. جانسن (۲۰۰۶) با مطالعه خاک‌های متفاوت، گزارش کردند که *Alphaproteobacteria*، *Betaproteobacteria*، *Gammaproteobacteria*، *Acidobacteria*، *Actinobacteria* بیشترین و باکتری‌های گرم مثبت، *Bacteroidetes* و *Planctomycetes* دارای فراوانی کم‌تر در خاک هستند. اسمیت (۲۰۰۶) معتقد بود که تنوع باکتری‌ها در خاک تحت تاثیر عوامل زنده وغیر زنده می‌باشد. برخی مطالعات نشان می‌دهند که الگوی تنوع باکتری‌ها بوسیله چند متغیر محیطی تعیین می‌شود. بوسیو و همکاران (۱۹۹۸) معتقد بودند که اکوسیستم ها کاملاً وابسته به میکروارگانیسم‌ها و ساختار جامعه میکروبی می‌باشند. تغییر

ساختار جامعه میکروبی می‌تواند بهم‌خوردگی را پیش‌بینی کند. عواملی مثل آب، هوا، مواد مادری، جامعه گیاهی، مدیریت و حتی فصل در ساختار جوامع میکروبی مؤثر هستند.

مطابق نظر پل و کلارک (۱۹۹۶) شناخت اکولوژی و بیولوژی خاک برای پایداری و ترمیم اکوسیستم مهم می باشد. در تمام اکوسیستم‌ها میکروارگانیسم‌های خاک نقش مهمی در پوسیدگی و تجزیه مواد آلی، چرخه عناصر غذایی (C، S، N) و فراهمی عناصر غذایی برای گیاه دارند. پیس (۱۹۹۷) عنوان کرد که موجودات زنده در بخش بیوسفر به فعالیت میکروبی وابسته هستند. میکروارگانیسم‌های خاک نقش حیاتی در تداوم چرخه عناصر غذایی و اکوسیستم بالای سطح خاک دارند. کیرک و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که برخی از فعالیت‌های انسانی همچون توسعه شهری، کشاورزی، استفاده از آفت کش‌ها و آلودگی-ها تنوع میکروبی خاک را تحت تأثیر قرار دادند و بطور دقیق مشخص نیست که چگونه تغییرات در ترکیب میکروبی می‌تواند اکوسیستم‌های بالا و زیر سطح زمین را تحت تأثیر بگذارد. قبل از اینکه بتوان گفت چگونه تغییرات در ترکیب جامعه میکروبی عملکرد اکوسیستم خود را تحت تاثیر قرار می‌دهد، نیاز به مطالعه میکروارگانیسم‌های خاک با روش‌های صحیح و قابل اعتماد می‌باشد.

۱-۲ روش‌های برآورد ساختار جامعه میکروبی خاک

روش‌های کارآمد برای مدیریت خاک، تولیدات کشاورزی و کیفیت محیط زیست نیاز به تکنیک-های و روش‌هایی دارد که بتوان جوامع میکروبی خاک را شناسایی و مورد سنجش قرار داد. این تکنیک‌ها (جدول ۱-۱) به دو دسته تکنیک‌های بیوشیمیایی و تکنیک‌های مولکولی تقسیم می‌شوند. مهم‌ترین تکنیک‌های بیوشیمیایی شامل ۱) شمارش کلنی میکروبی[1] ۲) الگوی توزیع فیزیولوژیکی جامعه میکروبی خاک (CLPP)[2] و کاربرد منبع کربن اختصاصی (SCSU)[1] ۳) الگوی اسید چرب فسفولیپیدی

[1] Colony count
[2] Community Level Physiological Profiling (CLPP)

(PLFA)[۲] (ترون و کلات،۲۰۰۰؛ کیرک و همکاران، ۲۰۰۴؛ بینگ رو و همکاران، ۲۰۰۶) می‌باشند. مهم-ترین تکنیک‌های مولکولی شامل ۱) دورگه‌گیری درجا با فلورسنت (FISH)[۳] ۲) درصد مولی گوانین و سیتوزین ۳) الکتروفورز روی ژل با شیب حرارتی (TGGE)[۴] و ژل الکتروفورز با شیب غلظت واسرشت-کننده(DGGE)[۵] ۴) DNA چند شکلی تکثیر شده تصادفی (RAPD)[۶] ۵) چند شکلی طول قطعات تکثیرشده (ALFP)[۷] ۶) چند شکلی در قطعات حاصل از هضم آنزیم‌های برشی (RFLP)[۸] ۷) تفاوت فرم فضایی رشته‌های منفرد (SSCP)[۹] ۸) آنالیز فواصل بین ژنی ژن‌های ریبوزومی (ARISA)[۱۰] ۹) rDNA۱۸s و rDNA۱۶s هستند (زلز و همکاران، ۱۹۹۲؛ تورسویک و همکاران، ۱۹۹۸؛ ترون و کلات، ۲۰۰۰؛ کیرک و همکاران، ۲۰۰۴؛ بینگ رو و همکاران، ۲۰۰۶؛ سیدو و همکاران، ۲۰۰۸) می‌باشند. در جدول ۱-۱ برخی تکنیک‌های مورد استفاده در جوامع میکروبی خاک همراه با مزایا و معایب آورده شده-است.

[1] Sole carbon source utilization (SCSU)
[2] Phospholipid Fatty Acids (PLFA)
[3] Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)
[4] Temperature Gradient Gel Electrophoresis(TGGE)
[5] Denaturing Gradient Gel Electrophoresis(DGGE)
[6] Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)
[7] Amplified fragment length polymor- phism (AFLP)
[8] Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)
[9] Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)
[10] Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (ARISA)

جدول ۱ -۱ برخی تکنیک‌های مورد استفاده در بررسی جوامع میکروبی خاک

تکنیک‌ها	مزایا	معایب
Plate Counts	• سریع • ارزان	• میکروارگانیسم‌های غیر قابل کشت مشخص نمی‌شوند • بیشتر تحت تأثیر گونه‌های سریع الرشد می‌باشد • تحت تأثیر گونه‌های قارچی است که مقدار زیادی اسپور تولید می‌کنند.
Community Level Physiological Profiling (CLPP)	• سریع • تکرارپذیری بسیار بالا • نسبتا ارزان • اختلاف در بین جوامع میکروبی • مقدار زیادی اطلاعات از موجودات زنده می‌دهد • گزینه استفاده از کلنی باکتری‌ها، قارچی‌ها یا محل خاص منابع کربن	• بیشتر نشان دهنده گروه‌های سریع الرشد می‌باشد. • فقط نشان‌دهنده موجوداتی است که قادر به استفاده از منابع کربن قابل دسترس می‌باشند. • تنوع متابولیکی، بالقوه نه تنوع درجا حساس به غلظت ماده تلقیحی
Phospholipid Fatty Acids (**PLFA**)	• ساختار و گروه فیزیولوژیک جمعیت‌های میکروبی را آشکار می‌کند. • کشت میکروبی لازم نیست. • ساختار و ترکیب جمعیت های میکروبی را به طور مستقیم از خاک استخراج می کند.	• تعدادی از اسیدهای چرب در میکروارگانیسم‌های مختلف مشابه می باشند.
mol% G+C	• تحت تاثیرPCR نیست • شامل تمام DNA کمی استخراج شده شامل اعضای نادر جمعیت می‌باشد	• نیاز به مقادیر زیادی از DNA دارد • به راندمان بالای لیز کردن و استخراج دی ان ای وابسته‌است.
Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)	• روش ساده برای شناسایی میکروبی و مطالعات اکولوژی	• اثر انگشت جامعه میکروبی شدیداً تحت تاثیر آنزیم محدود کننده‌است • قادر به شناسایی گونه‌های خاص در

		درون جامعه نیست.
• The Rrna Intergenic Spacer Analysis (RISA)	• شناسایی فیلوژنتیکی موجودات	• پایگاه داده نسبتا کمی برای شناسایی موجودات غیرقابل کشت دارد
• Denaturing Gradient Gel (**DGGE**) Electrophoresis Temperature Gradient Gel Electrophoresis (**TGGE**)	• مشخصات جوامع میکروبی و شناسایی جمعیت از طریق و تعیین توالی باندها	• اطلاعات تعیین توالی از جامعه میکروبی به۵۰۰ جفت باز قطعه rRNA 16S حدود می‌شود. • موجودS rRNA 16 هتروجنسی در برخی از ارگانیسم، ممکن است • باندهای متعدد بر روی ژل تولید کند.
• Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP)	• امکان توان عملیاتی و کمی سازی جامعه میکروبی	• آنزیم‌های برشی چندگانه برای توصیف جمعیت میکروبی مورد نیاز می‌باشد
• Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) •	• کمی‌سازی و شناسایی ارگانیسم خاص در محل	• کمتر از حدود ۳ پروب در یک آزمایش می‌تواند مورد استفاده قرا رگیرد. • پس زمینه فلورسانس اختلال در تشخیص ارگانیسم ایجاد می‌کند.
Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)	• مشابه DGGE / TGGE می‌باشد. • به GC نیاز ندارد.	• وابسته به PCR می‌باشد. • برخی ssDNA می‌توانند بیش از یک فرم پایدارداشته باشند.
• Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (**ARDRA**) Restriction Fragment Length Polymorphism (**RFLP**)	• تغییرات ساختار را در جامعه میکروبی مشخص می‌کند	• وابسته به PCR می‌باشد. • الگوی باندی اغلب پیچیده هستند.
Microarray Technologies	• شناسایی ارگانیسم و تعریف آن • نقش زیست محیطی	• تشکیل هیبریداسیون غیر اختصاصی ممکن است • تولید سیگنال‌های گمراه‌کننده محتمل است • عدم حساسیت ویژه و کمی سازی

از جمله مشکلات در مطالعه جامعه میکروبی، مربوط به کاربرد برخی تکنیک‌های مولکولی می‌باشد. استخراج کل DNA یا RNA از جوامع میکروبی و متعاقب آن ارزیابی جامعه میکروبی با تکنیک‌هایی همچون DGGE و TGGT و یا T-RTLP، به علت تکرارپذیری کم و کارآیی پایین PCR دارای