نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۲، خرداد – تیر ۱۳۹۶، ص. ۵۵۶-۵۴۵

Journal of Water and Soil
Vol. 31, No. 2, May.-Jun. 2017, p. 545-556

نقش غنی‌سازی پوسته زیستی خاک از طریق تلقیح و تحریک باکتری‌ها در افزایش نیتروژن خاک حساس به فرسایش

حسین خیرفام[۱] – مهدی همایی[۲] – سیّد حمیدرضا صادقی[۳*] – بهروز زارعی دارکی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۷/۰۴

چکیده

بهبود مؤلفه‌های شیمیایی و فیزیکی پوسته‌های زیستی خاک از عوامل مؤثر در افزایش کیفیت و کاهش هدررفت خاک می‌باشد. امروزه غنی‌سازی پوسته‌های زیستی خاک مبتنی بر تلقیح و یا تحریک ریزجانداران خاک به‌عنوان راه‌کاری زیستی و مؤثر در علوم حفاظت خاک مطرح شده است. بر این اساس پژوهش حاضر با هدف بررسی نقش تلقیح جداگانه باکتری‌ها و غنی‌سازی مواد غذایی و هم‌چنین تلقیح ترکیبی باکتری‌ها با غنی‌سازی مواد غذایی بر تغییرات نیتروژن خاک به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مؤلفه‌های شیمیایی کیفیت خاک، در مقیاس کرت‌های کوچک برنامه‌ریزی شد. خاک کرت‌ها از منطقه‌ی حساس به فرسایش تهیه شد. باکتری‌های مؤثر در تثبیت نیتروژن از خاک منطقه جداسازی، و به‌همراه ماده محرّک غذایی به تیمارهای تعریف شده تلقیح شدند. مقادیر نیتروژن خاک در بازه زمانی ۶۰ روزه بین تلقیح تا انتهای آزمایش، در فاصله‌های زمانی هفت یا هشت روزه اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه و تحلیل‌های آماری حاکی از افزایش معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) نیتروژن کل خاک در تیمارهای مطالعاتی بود. در تیمار تلقیح باکتری، غنی‌سازی مواد غذایی و تلقیح باکتری به‌همراه غنی‌سازی مواد غذایی، میزان تثبیت نیتروژن بعد از یک ماه به‌صورت معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) به‌ترتیب ۱۴۸، ۱۱۰ و ۲۸۴ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت. هم‌چنین بعد از یک ماه میزان نیتروژن خاک شروع به کاهش کرد. در نهایت پس از دو ماه مقدار نیتروژن خاک در تیمارها ثابت شده و مقدار آن در تیمار تلقیح جداگانه باکتری و ترکیب با غنی‌سازی مواد غذایی به‌صورت معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) به‌ترتیب ۱۸ و ۱۶ درصد بیش‌تر از تیمار شاهد اندازه‌گیری شد. در مجموع غنی‌سازی پوسته‌های زیستی خاک با تلقیح باکتری‌ها به‌عنوان روشی کاملاً زیستی، ایمن و با صرفه اقتصادی و زمانی در بهبود مؤلفه‌های شیمیایی خاک تأیید شد.

واژه‌های کلیدی: افزودنی‌های خاک، پایداری خاک، تلقیح ریزجانداران خاک‌زی، زیست‌فناوری خاک، فرسایش خاک

مقدمه

پوسته‌های زیستی خاک ترکیبی از سیانوباکترها، باکتری‌ها، خزه‌ها، جلبک‌ها، گلسنگ‌ها و سایر ریزجانداران خاک‌زی بوده (۱۴) که نقش اساسی در افزایش کیفیّت و در نتیجه کاهش هدررفت کیفی و کمّی خاک در مناطق بدون پوشش گیاهی دارند (۲۳، ۲۴ و ۴۶). هر چند نقش پوسته‌های زیستی در کاهش هدررفت خاک و آب از طریق اصلاح ویژگی‌های ناهمواری سطحی خاک، افزایش تخلخل، ظرفیت نگه‌داشت آب، بهبود و پایداری خاک، تجمع مواد غذایی و حاصل‌خیزی خاک، ترشح مواد پلی‌ساکاریدی، تولید فیلم‌های زیستی و تثبیت نیتروژن و ترسیب کربن (۱، ۲۳، ۲۹، ۳۰، ۳۳، ۳۴، ۳۹ و ۴۶) تأیید شده است. با این حال میزان تأثیرگذاری پوسته‌های زیستی بر مؤلفه‌های مؤثر در کیفیت و هدررفت خاک و آب بر اساس میزان غنای زیستی آن متغیر می‌باشد (۱۴). در این بین، ویژگی‌های فیزیکی، زیستی و شیمیایی خاک از قبیل بافت، ساخت، جرم مخصوص، نفوذپذیری، محتوای نیتروژن، کربن، ماده‌ی آلی از شاخص‌های اساسی سلامت و کیفیّت پوسته‌های زیستی خاک می‌باشند (۲۰). با این حال، تراکم و فعالیّت ریزجانداران خاک‌زی به‌عنوان مهندسین و حلقه‌ی اوّل زنجیره زیستی بوم‌سازگان در پوسته‌های زیستی نقش به‌سزایی در بهبود ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک در کوتاه و دراز مدّت دارند (۲۳ و ۴۸). از این‌رو اقدامات مدیریتی و فنی متعدد به‌ویژه کاربرد افزودنی‌هایی از قبیل گچ، آهک، خاک ارّه و خاکستر چوب، پسماندهای شهری (۴۶)، کمپوست آلی، کودهای حیوانی و گیاهی، باقی‌مانده‌ی محصولات

۱و ۳– دانش‌آموخته‌ی دکتری و استاد گروه مهندسی آبخیزداری، دانشگاه تربیت مدرّس
(*–نویسنده مسئول: (Email:Sadeghi@modares.ac.ir)
۲– استاد گروه خاک‌شناسی، دانشگاه تربیت مدرّس
۴– استادیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشگاه تربیت مدرّس
DOI: 10.22067/jsw.v31i2.54598

زراعی و صنایع غذایی (۱۹و ۳۶) ، مالچ‌های نفتی و انواع پلیمرهای زیست‌تخریب‌پذیر[1] (۴) با هدف اصلاح ویژگی‌های فیزیکی، زیستی و شیمیایی خاک از طریق غنی‌سازی پوسته‌های زیستی خاک مورد استفاده و آزمایش قرار گرفته است.

با این حال محدودیت‌هایی هم‌چون ناپایداری و موقتی بودن افزودنی‌ها، هزینه‌بر بودن، محدودیت منابع و هم‌چنین داشتن اثرات مخرب زیست‌محیطی و بهداشتی، استفاده از آن‌ها را تا حدودی به چالش کشیده است (۱۶). لذا اخیراً احیاء پوسته‌های زیستی خاک از طریق معدنی‌سازی زیستی (۴۷)، انتقال پوسته‌های زیستی مناطق غنی به مناطق تخریب شده و جایگزینی با آن (۵۱) و هم‌چنین تلقیح مستقیم ریزجاندارن مفید بر سطوح دامنه‌ها (۲۳، ۲۴، ۳۴ و ۵۰) به‌منظور کاهش هدررفت خاک و آب از طریق بهبود ویژگی‌های فیزیکی، زیستی و شیمیایی خاک مطرح شده است. در این بین، تلقیح مستقیم ریزجاندارن خاک‌زی بر سطوح دامنه‌ها به‌عنوان روشی مؤثر، اقتصادی و دوست‌دار محیط زیست بیش‌تر مورد تأیید و توجه قرار گرفته است. به‌گونه‌ای که وانگ و همکاران (۵۰) نشان دادند که جمعیّت ریزجاندارن تلقیح شده بعد از یک سال، ۴۸ درصد افزایش یافت. از طرفی امکان تلقیح ریزجاندارن خاک‌زی در سطوح گسترده با هدف افزایش تثبیت نیتروژن و ترسیب کربن توسط سییرس و پریتیویراج (۴۳) و خیرفام و همکاران (۲۳) تأیید شده است.

از سویی دیگر میزان نیتروژن از مؤلفه‌های شیمیایی خاک با نقش اساسی در بقاء، رشد و تکامل سایر جانداران وابسته به خاک (۲۶)، تأثیرپذیری زیادی از ریزجاندارن پوسته‌های زیستی خاک در کوتاه مدّت دارد (۳۰). بنابراین تغییرات نیتروژن خاک می‌تواند شاخصی مناسب برای بررسی نقش تلقیح ریزجاندارن بر خاک در کوتاه مدت باشد (۲۳). هم‌چنین از بین ریزجاندارن خاک‌زی نقش مستقیم و غیرمستقیم باکتری‌های آزادزی، تثبیت‌کننده نیتروژن، ترشح‌کننده‌ی پلی‌ساکارید و تولیدکننده‌ی فیلم‌های زیستی در تثبیت نیتروژن در خاک تأیید شده است (۲۳، ۲۵ و ۴۱). بر این اساس پژوهش حاضر با هدف تلقیح باکتری‌های بومی و مؤثر در افزایش نتیروژن خاک و هم‌چنین تحریک بانک ریزجاندار خاک با غنی‌سازی مواد غذایی در افزایش نیتروژن خاک به‌عنوان یکی از شاخص‌های مهم کیفیت خاک، در مقیاس کرت‌های کوچک فرسایشی و شرایط قابل کنترل آزمایشگاهی برنامه‌ریزی شد. حواشی جاده‌ی مرزن‌آباد-کندلوس در استان مازندران به‌سبب وجود تشکیلات و خاک فقیر و حساس به فرسایش به‌عنوان منطقه‌ی مادری برداشت خاک انتخاب شد.

1- Biodegradable

مواد و روش

منطقه برداشت خاک

خاک مورد مطالعه از حواشی جاده‌ی مزرن‌آباد-کندلوس و واقع در حوزه‌ی آبخیز چالوس‌رود در غرب استان مازندران (شکل ۱) به‌صورت نمونه‌برداری حجمی از عمق صفر تا ۲۰ سانتی‌متری برداشت و به آزمایشگاه دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شد. اقلیم منطقه مذکور بر اساس طبقه‌بندی دومارتن بین نیمه‌خشک تا نیمه‌مرطوب سرد می‌باشد. از طرفی تفسیر تصاویر ماهواره‌ای، مشاهدات صحرایی و نتایج حاصل از مطالعات پیشین (۲۱) حاکی از آن است که کاربری اراضی و پوشش گیاهی محل نمونه‌برداری از نوع جنگل خالص زربین (*Cupressus sempervirens* var. *horizontalis*) طبیعی و با تراکم کم‌تر از ۲۵ درصد می‌باشد (۲۱).

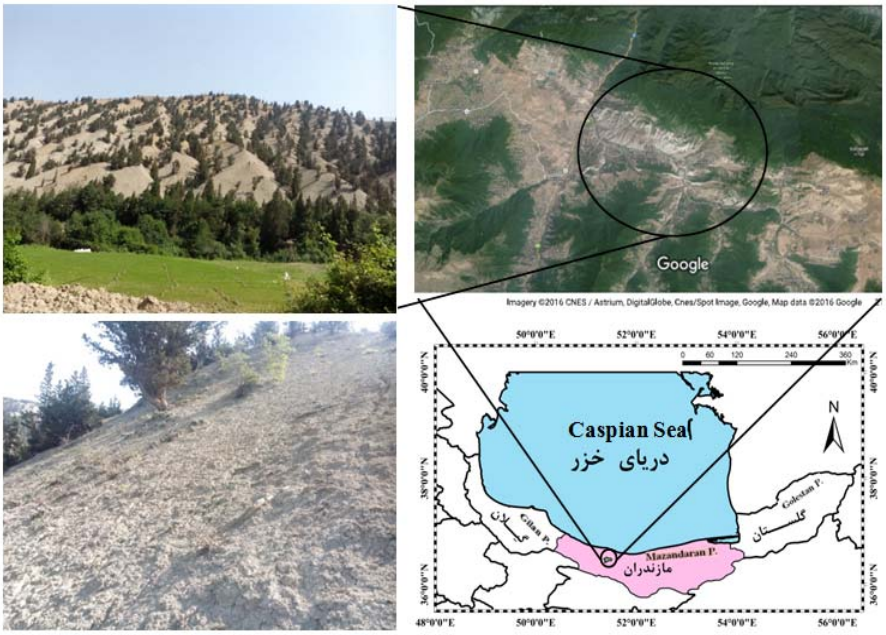
نمونه‌برداری و انتقال خاک

پس از انتخاب محل مناسب نمونه‌برداری، خاک به‌صورت تصادفی و با استفاده از استوانه پلی وینیل کلراید[2] مدرج (۶) از عمق صفر تا دو سانتی‌متری از سطح به‌منظور کشت، استخراج، شناسایی، خالص‌سازی و تکثیر باکتری‌ها انجام شد (۱۳). نمونه‌های برداشت شده در کیسه‌های پلی‌اتیلن استریل شده (۱۴) به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تربیّت مدرّس منتقل و تا قبل از انجام آزمایش‌ها در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری و سپس در زیر هود کاملاً استریل، به ذرات با قطر کم‌تر از دو میلی‌متر تبدیل (۱۴) شدند.

کشت، شناسایی، خالص‌سازی، تکثیر و تلقیح باکتری‌ها

به‌منظور تهیه و خالص‌سازی باکتری‌های موجود در بانک ریزجاندار خاک منطقه، از محیط کشت‌های عمومی آگار تغذیه‌ای با ترکیب ۰/۵درصد پپتون[3]، ۰/۳ درصد عصاره گوشت گاو[4]، ۱/۵ درصد آگار[5] و ۰/۵ درصد سدیم کلرید (۲۵) و TSA[6] با ترکیب ۱۵ گرم تریپتون[7]، ۵ گرم سویتون[8]، ۵ گرم سدیم کلرید و ۵ گرم آگار (۵۱) استفاده شد. لذا با یک گرم از نمونه‌های خاک آماده‌سازی شده اقدام به تهیه سری رقت‌های با نسبت ۱:۱۰ (10^{-1}) تا 10^{-10} با محلول ۰/۸۵ درصد NaCl شد.

2-Polyvinyl chloride (PVC)
3-Peptone
4-Beef Extract
5-Agar
6-Tryptic Soy Agar
7-Tryptone
8-Soytone



شکل ۱- موقعیت جغرافیایی و عمومی محل برداشت خاک واقع در منطقه مرزن‌آباد-کندلوس، استان مازندران

Figure 1- General and geographical view of the soil collected area and located in Marzanabad-Kandelus region, Mazandaran

فرآیند کشت، استخراج و شمارش کلنی‌های آشکار شده باکتری‌ها در ظروف پتری‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد بنسون (۹) انجام شد. در نهایت شناسایی باکتری‌های کشت و استخراج شده از طریق رنگ آمیزی گرم[1] و با استفاده میکروسکوپ‌های نوری با قدرت تفکیک بالا و بر اساس مشخصات ریخت‌شناسی و بهره‌گیری از راهنمای باکتری‌شناسی برگی و برید (۱۰) و همکاری متخصصین مربوطه در حد جنس شناسایی شدند.

پس از فرآیند شناسایی، باکتری‌های مؤثر در افزایش تثبیت نیتروژن در خاک و هم‌چنین بر اساس برخی معیارهای زیست‌محیطی و بهداشتی انتخاب و با استفاده از محیط کشت‌های اختصاصی از بین سایر باکتری‌ها استخراج و خالص‌سازی شدند. برای این منظور و متناسب با باکتری‌های انتخاب شده، از محیط کشت‌های اختصاصی Azotobacter Agar, Modified II (۲) و DSMZ1[2] (۴۲) استفاده شد. در نهایت برای انجام فرآیند تکثیر، باکتری‌ها به‌وسیله لوپ‌های میکروبیولوژی به محیط غذایی مایع LB Broth (۱۸) منتقل و مرتباً تا رسیدن به تعداد 10^{12} سلول در لیتر (۴۹) و قابلیت انتقال به کرت‌ها با استفاده از لام‌های شمارش نئوبار[3] در زیر

1-Gram Stain
2-Nutrient Agar+10.0 mg $MnSO_4 \times H_2O$
3-Neubauer-chamber-cell-counting

زیر میکروسکوپ نوری و هم‌چنین میزان جذب نور[4] در دستگاه اسپکتروفتومتر[5] شمارش شدند (۳). هم‌چنین به‌منظور حمایت غذایی و و تحریک باکتری‌های بانک خاک و هم‌چنین تلقیحی، از یک نوع ماده محرّک غذایی با نام B4 و به‌صورت ترکیبی از ۱۵ گرم در لیتر استات کلسیم، چهار گرم در لیتر عصاره‌ی مخمر و پنج گرم در لیتر دکستروز و با pH برابر هشت برای غنی‌سازی مواد غذایی پوسته زیستی خاک استفاده شد (۴۷). قابل ذکر است که به‌سبب عدم وجود نیتروژن در ترکیبات مورد استفاده در تهیه ماده محرک غذایی B4 امکان تزریق مستقیم نیتروژن به خاک در اثر غنی‌سازی مواد غذایی پوسته زیستی خاک وجود ندارد.

آماده‌سازی کرت‌های آزمایش و فرآیند تلقیح

در این پژوهش از کرت‌های مکعبی به ابعاد ۰/۵ متر و حجم کلی ۰/۱۲۵ استفاده شد. برای آماده‌سازی خاک از روش کار پیشنهادی صادقی و همکاران (۳۷) استفاده شد. به‌همین منظور، ابتدا نمونه‌های خاک هواخشک و برای حذف بقایای گیاهی و سنگ و سنگ‌ریزه از الک هشت میلی‌متری تا زیر سطح دو سانتی‌متری خاک و از الک سه میلی‌متری برای سطح دو سانتی‌متری بالای خاک برای حداکثر تشابه با حالت طبیعی عبور داده شد. سپس تا عمق ۳۵ تا ۴۰ سانتی‌متر

4-Optical Density (OD)
5-Spectrophotometer

کرت‌ها از پوکه معدنی پر شده و خاک به ضخامت حدود ۱۳ سانتی‌متر در بخش بالایی کرت‌ها قرار داده شد، به‌طوری‌که سطح نمونه‌ی خاک با سطح سرریز کرت‌ها یکسان باشد. سپس کوبیدگی لازم توسط غلطک تا رسیدن به وزن مخصوص ظاهری نمونه‌ی خاک دست‌نخورده‌ی منطقه مورد مطالعه (بین ۱/۱۲ تا ۱/۱۵ گرم بر سانتی‌متر مکعب) انجام گرفت. پس از این مرحله، به‌منظور تأمین شرایط رطوبت پیشین خاک و متناسب با شرایط طبیعی، حدود ۲۴ ساعت تحت شرایط اشباع قرار گرفته و سپس به‌مدّت ۲۴ ساعت دیگر رها شد تا به‌حالت شرایط رطوبتی مزرعه برسد صادقی و همکاران (۳۷).

پس از آماده‌سازی کرت‌ها، باکتری‌های تکثیر شده با تعداد حدود 10^{11} تا 10^{12} عدد در ۰/۵ لیتر و هم‌چنین ۰/۵ لیتر از ماده محرّک غذایی B4 به ازای هر کرت تهیه (۴۷) و به‌صورت جداگانه و ترکیبی روی کرت‌ها اسپری شد (۵۰). پس از تلقیح و غنی‌سازی مواد غذایی تیمارهای برنامه‌ریزی شده، به‌منظور بررسی میزان تغییرات نیتروژن در خاک کرت‌ها، به‌صورت مرتب و با رعایت فاصله‌ی زمانی تقریباً هر هفت یا هشت روز یک بار اقدام به برداشت نمونه تقریباً شش گرمی از خاک شد. نمونه‌های خاک‌های برداشت شده در داخل کیسه‌های پلی اتیلن استریل ریخته شدند (۱۴). درنهایت برای اندازه‌گیری میزان نیتروژن کل خاک بر اساس دستورالعمل‌های استاندارد از روش Kjeldahl استفاده شد (۴۰).

تجزیه و تحلیل‌های آماری

در نهایت پس از اندازه‌گیری میزان نیتروژن کل در بازه‌های زمانی تعریف شده، بانک اطلاعاتی در محیط نرم‌افزار Excel 2010 برای تجزیه و تحلیل تشکیل شد. به‌منظور انجام مقایسه‌های آماری، ابتدا نرمال و یا عدم نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk به‌سبب ارجحیت نسبت به سایر آزمون‌های تعیین نرمال بودن داده‌ها به‌ویژه برای داده‌های با تعداد کم بررسی و تبدیل داده‌های غیرنرمال به حالتی با توزیع نرمال مدنظر قرار گرفت. هم‌چنین همگنی واریانس‌ها[1] با آزمون Levene بررسی شد. پس از برقراری شرط‌های مطروحه، تجزیه واریانس یک طرفه[2] برای بررسی اثرات یک‌جانبه و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون Tukey برای انتخاب بهترین تیمار یا تیمارها مورد استفاده قرار گرفت (۱۱). آزمون‌های آماری فوق برای تجزیه و تحلیل داده‌ها در محیط نرم‌افزار SPSS 19 انجام شد.

1- Homogeneity of Variances
2- One-Way ANOVA

نتایج و بحث

بررسی‌ها نشان داد که رژیم رطوبتی و دمایی خاک منطقه به‌ترتیب از نوع زریک و مزیک بوده و مواد بستری از ترکیب مارن و آهک تشکیل شده است (۲۱). هم‌چنین بر اساس بررسی‌های پیشین و برخی اندازه‌گیری‌ها در پژوهش حاضر، ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک منطقه به شرح جدول ۱ بود (۳۸). هم‌چنین نتایج تحلیل‌های آماری و هم‌چنین تغییرات نیتروژن کل خاک در جدول ۲ و شکل ۲ خلاصه شده است.

نتایج استخراج نشان داد تعداد طبیعی باکتری‌های بانک ریزجاندار خاک منطقه مرزن‌آباد-کندلوس تقریباً $7/6\times10^{4}$ عدد در یک گرم خاک بود. لذا گزارش تعداد باکتری‌های خاک در جهان بین 10^{5} تا 10^{9} عدد (۴۹)، حاکی از فقر باکتریایی پوسته زیستی خاک منطقه مورد مطالعه بود. از طرفی دیگر شش جنس از باکتری‌ها از قبیل *Pseudomonas sp.*، *Azotobacter sp.*، *Bacillus sp.*، *Arthrobacter sp.*، *Diplococcus sp.* و *Streptococcus sp.* به‌ترتیب با نسبت حضور ۳۵، ۲۵، ۲۰، ۱۰، ۵ و ۵ درصد از بانک خاک شناسایی شدند. از این بین، باکتری‌های *Azotobacter* sp. و گروه*Bacillus subtilis*[3] از بین گونه‌های *Bacillus sp.* به‌دلیل نقش مستقیم و غیرمستقیم زیاد در تثبیت نیتروژن در خاک، مقاومت زیادی در شرایط نامناسب محیطی، ترشح مواد چسبنده‌ی پلی ساکاریدی بالا، غیربیماری‌زا بودن (۲۸ و ۴۱) و جمعیّت زیاد در خاک به‌عنوان باکتری‌های مناسب برای تلقیح انتخاب شدند. در این راستا دادرسان و همکاران (۱۵) باکتری‌های *Azotobacter sp.* را به‌عنوان تنها باکتری‌های هوازی و آزادزی با توانایی بسیار بالا در تثبیت نیتروژن، بهبود مؤلفه‌های فیزیکی و شیمیایی خاک، تولید مواد تسریع‌کننده‌ی جوانه‌زنی گیاهان، زنده‌مانی و فعالیّت در شرایط نامناسب محیطی معرفی کرده‌اند.

هم‌چنین نتایج پژوهش کومار و همکاران (۲۵) نشان داد باکتری های *Azotobacter sp.* باعث افزایش سرعت جوانه‌زنی و رشد توده‌ی زنده‌ی هوایی و زیرزمینی پوشش گیاهی سطوح دامنه‌ها شده و به‌صورت غیرمستقیم و مستقیم اهداف متصّوره در مدیریت منابع خاک و آب را تأمین می‌کنند. تان (۴۵) اعلام کرد باکتری‌های گروه *Bacillus subtilis* به‌سبب ترشح بسیار زیاد مواد چسبنده‌ی پلی ساکاریدی از دیواره‌ی سلولی، ضمن افزایش مواد مغذی محیط خاک، باعث چسبندگی ذرّات ریز خاک به‌هم و افزایش مقاومت برشی و پایداری خاک‌دانه‌ها و هم‌چنین افزایش تخلخل، تهویه و نفوذپذیری خاک می‌شوند. هم‌چنین هوئیژیا و همکاران (۲۲) نیز باکتری‌های جنس *Bacillus* با کم‌ترین توقع مواد غذایی در خاک را به‌عنوان

3- *Bacillus subtilis* Strain

باکتری بسیار مناسب برای بهبود ویژگی‌های کیفی خاک مناطق بیابانی معرفی کردند. هم‌چنین نتایج (شکل ۲) نشان داد که مقادیر اندازه‌گیری نیتروژن کل در کرت‌های شاهد بین ۰/۰۸۲ تا ۰/۱۳۶ بود.

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک منطقه برداشت واقع در منطقه مرزن‌آباد-کندلوس؛ استان مازندران

Table 1: Physical and chemical properties of the soil sampling study area located in Marzanabad-Kandelus region, Mazandaran

ویژگی Properties	نوع/مقادیر Type/Values	ویژگی Properties	مقادیر Values
بافت Texture	لوم رسی سیلتی Silty clay loam	هدایت الکتریکی (دسی زیمنس بر متر) EC ($ds.m^{-2}$)	0.17-0.25
ساختمان Structure	دانه‌ای متوسط و شکننده در حالت مرطوب Medium granular and fragile in the wet condition	pH	7.42-7.68
عمق خاک (سانتی‌متر) Soil depth (cm)	35-40	شن (درصد) Sand (%)	14
جرم مخصوص ظاهری (گرم بر سانتی‌متر مکعب) Bulk density ($g\ cm^{-3}$)	1.12-1.25	سیلت (درصد) Silt (%)	46
آهک (درصد) Lime (%)	28	رس (درصد) Clay (%)	40

لذا بر اساس استانداردهای تأیید شده (۷)، محدودیت و فقر منابع نیتروژن در خاک منطقه برداشت محسوس بود. با این حال، افزایش مستقیم و غیرمستقیم جمعیّت و فعالیّت باکتری‌های بانک خاک از طریق تلقیح باکتری و تزریق منابع غذایی، افزایش میزان نیتروژن را در پی داشت. به‌گونه‌ای که مقادیر نیتروژن کل خاک در کرت‌های تلقیح باکتری‌ها، غنی‌سازی مواد غذایی و تلقیح ترکیبی باکتری با غنی‌سازی مواد غذایی به‌ترتیب بین ۰/۱۱۰ تا ۰/۲۴۱، ۰/۱۱۷ تا ۰/۲۰۴ و ۰/۱۲۴ تا ۰/۳۷۴ درصد متغیر بود.

تحلیل نتایج و مطالعات انجام شده در این زمینه حاکی از این بود که باکتری‌های آزادزی *Azotobacter* و هم‌چنین *Bacillus subtilis* در شرایط هوازی و غیرهم‌زیستی با گیاهان، با استفاده از تولید آنزیم نیتروژناز به‌عنوان یک کاتالیزور، نیتروژن موجود در جو (N_2) را به نیتروژن قابل مصرف در خاک (NH_4 یا NO_3) تبدیل کرده (۳۱ و ۳۵) و از طریق کپسول ضخیم در اطراف دیواره‌ی سلولی، آنزیم نیتروژناز را از صدمات اکسیژن محافظت کرده‌اند (۱۷). بر این اساس روند افزایشی تثبیت نیتروژن در کرت‌های تلقیحی با گذشت تقریباً ۲۴ روز پس از تلقیح شروع شد (شکل ۲). به‌طوری‌که مقادیر نیتروژن کل در تیمارهای تلقیح باکتری‌ها، غنی‌سازی مواد غذایی و تلقیح ترکیبی باکتری‌ها با غنی‌سازی مواد غذایی به‌ترتیب ۱۶، ۲۷ و ۲۸ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت.

تأثیرگذاری ریزجاندارن خاک‌زی در بهبود ویژگی‌های شیمیایی خاک در بازه‌های زمانی کوتاه‌مدّت نیز توسط وانگ و همکاران (۵۰) و ژائو و همکاران (۵۱) تأیید شده است. هر چند تجزیه و تحلیل‌های آماری ارائه شده در جدول ۲ حاکی از عدم افزایش معنی‌دار ($p>0/08$) تثبیت نیتروژن پس از ۳۰ روز از اعمال تیمارها بود. در حالی‌که پس از ۳۷ روز بین زمان تلقیح تا نمونه‌برداری، تثبیت نیتروژون در خاک در تیمارهای تلقیح باکتری‌ها، غنی‌سازی مواد غذایی و تلقیح ترکیبی باکتری‌ها با غنی‌سازی مواد غذایی به‌صورت معنی‌دار ($p<0/05$) به‌ترتیب ۱۴۸، ۱۱۰ و ۲۸۴ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت.

در این راستای یافته‌های پژوهش حاضر، آسئا و همکاران (۱) میزان افزایش تثبیت نیتروژن بعد از دو ماه از تلقیح ریزجاندارن خاک‌زی را تا ۳۰ برابر گزارش کردند.

نتایج نیشا و همکاران (۳۰) نیز حاکی از افزایش ۱۵ درصدی تثبیت نیتروژن پس از تلقیح ریزجاندارن خاک‌زی به خاک بوده و بیش‌ترین میزان تثبیت را ۴۵ روز پس از تلقیح گزارش کرده‌اند. دقت در نتایج شکل ۲ و جدول ۲ نشان داد که میزان تثبیت نیتروژن در تیمار غنی‌سازی مواد غذایی کم‌تر از دو تیمار با حضور باکتری بوده و تمیار تلقیح ترکیبی باکتری با غنی‌سازی مواد غذایی نیز بیش‌ترین میزان تأثیر در افزایش نیتروژن خاک را داشت. دلایل چنین نتایجی را می‌توان به سرعت بالای تکثیر، فعالیّت و تثبیت نیتروژن باکتری‌ها (۸) نسبت داد.

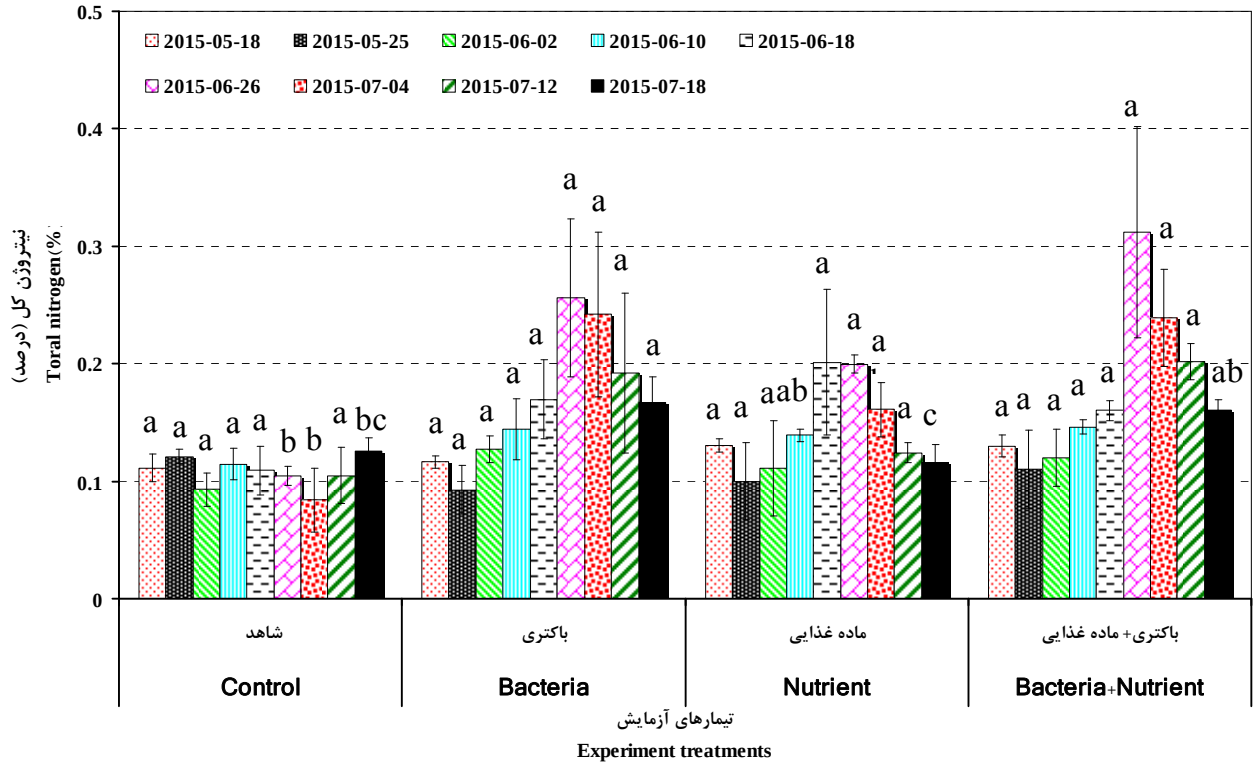
هم‌چنین حمایت باکتری‌ها هم‌زمان با غنی‌سازی مواد غذایی ضمن تحریک فعالیّت ریزجاندارن بانک خاک، تسریع در تکثیر باکتری‌های تلقیح شده را فراهم کرده و از طرق فرآیند هم‌افزایی میزان نیتروژن تثبیت شده نسبت به سایر تیمارها بیش‌تر شد. اثر هم‌افزایی ریزجاندارن خاک‌زی بر بهبود مؤلفه‌های خاک توسط وانگ و همکاران (۵۰) و پراسانا و همکاران (۳۲) نیز گزارش شده است. از طرفی، سرعت تکثیر زیاد باکتری‌ها نیازمند منابع غذایی نامحدود بوده که در تیمارهای پژوهش حاضر محدودیت منابع غذایی پس از گذشت ۴۰ روز از تلقیح، محدودیت منابع غذایی موجود و مصرف ماده غنی

کننده مواد غذایی خاک باعث کاهش فعالیّت و عملکرد بـاکتری‌هـای تلقیح شده و موجود در بانک خاک شد.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس یک طرفه برای تشخیص اثرات یک‌جانبه‌ی تیمارهای باکتری و ماده‌ی غذایی B4 بر مقادیر درصد نیتروژن کل خاک تیمارهای مطالعاتی

Table 2: Results of ANOVA for effect of inoculation of bacteria and stimulant nutrient on nitrogen of studied soil

فاصله زمانی هفت یا هشت روزه تلقیح تا برداشت نمونه Time spans of 7-8 days for sampling	منابع تغییرات Variation sources	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square	آماره F F-value	سطح معنی‌داری p-value
1	بین گروهی Between groups	3	0.000	3.487	0.507
	درون گروهی Within groups	8	0.000		
	کل Total	11			
2	بین گروهی Between groups	3	0.000	0.705	0.575
	درون گروهی Within groups	8	0.001		
	کل Total	11			
3	بین گروهی Between groups	3	0.001	1.043	0.425
	درون گروهی Within groups	8	0.001		
	کل Total	11			
4	بین گروهی Between groups	3	0.001	2.851	0.105
	درون گروهی Within groups	8	0.000		
	کل Total	11			
5	بین گروهی Between groups	3	0.004	3.202	0.084
	درون گروهی Within groups	8	0.001		
	کل Total	11			
6	بین گروهی Between groups	3	0.023	7.358	0.011
	درون گروهی Within groups	8	0.003		
	کل Total	11			
7	بین گروهی Between groups	3	0.017	8.551	0.007
	درون گروهی Within groups	8	0.002		
	کل Total	11			
8	بین گروهی Between groups	3	0.007	5.077	0.029
	درون گروهی Within groups	8	0.001		
	کل Total	11			
9	بین گروهی Between groups	3	۰/۰۰۲	۸/۳۸۸	۰/۰۰۷
	درون گروهی Within groups	8	۰/۰۰۰		
	کل Total	11			



شکل ۲- نمودار مقایسه‌ای درصد نیتروژن کل اندازه‌گیری شده در کرت‌ها برای تیمارهای مطالعاتی

Figure 2- Mean and standard deviation of percentage of total measured nitrogen in treated plots

در این رابطه آسئا و همکاران (۱) معتقدند افزایش نیتروژن تثبیت شده توسط ریزجاندارن فتوسنتز کننده و آزادزی باعث افزایش فعالیّت بیش از پیش ریزجانـدارن دگرتغذیـه[1] در خـاک شـده کـه در نهایـت کاهش ذخیره نیتروژن خاک را در پی خواهند داشت. به‌گونه‌ای که در پژوهش حاضر نیز روند کاهش تثبیت نیتروژن بعد از ۴۰ روز از تلقـیح ادامه پیدا کرده و در روز ۶۰ ام مقادیر نیتروژن کل خاک در تیمارهای تلقیح باکتری‌ها، غنی‌سازی مواد غذایی و تلقیح ترکیبی باکتری‌هـا بـا غنـی‌سـازی مـواد غـذایی بـه‌ترتیـب ۰/۱۶، ۰/۱۲ و ۰/۱۶ درصـد اندازه‌گیری شد. اما با این حال مقادیر نیتروژن خـاک در تیمـار تلقـیح جداگانه باکتری و هم‌چنین تیمار تلقیح ترکیبی باکتری با غنـی‌سـازی مواد غذایی به‌صورت معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) و به‌ترتیب ۲۲ و ۱۸ درصـد بیش‌تر از تیمار شاهد بود.

در مجموع افزایش مستقیم جمعیّت بـاکتری‌هـا (*Azotobacter sp.* و گروه *Bacillus subtilis*) در خاک با تلقیح مستقیم نسـبت بـه افزایش غیرمسـتقیم از طریـق غنـی‌سـازی مـواد غـذایی در افـزایش نیتروژن خاک مناسب‌تر ارزیابی شد (شکل ۲ و جـدول ۲). مطـابق بـا این یافته، دادرسان و همکـاران (۱۵) بـاکتری‌هـای *Azotobacter* را به‌عنوان باکتری‌های آزادزی بسیار مؤثر در تثبیـت نیتـروژن و بهبـود سایر ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی خاک معرفی کرده‌اند. هـم‌چنـین چاگری–مهمت اوغلو و همکاران (۱۲)، هوئیژیا و همکاران (۲۲)، تـان (۴۵) و گزارش کردند که باکتری‌های گروه *Bacillus subtilis*، مواد غذایی خاک را از طریق ترشح پلـی‌سـاکاریدها افـزایش داده و باعـث تحریک تکثیر و فعالیّـت بـاکتری‌هـا و سـیانوباکترهای تثبیـت‌کننـده نیتروژن می‌شوند.

نتیجه‌گیری کلی

غنی‌سازی میکروبی پوسته‌های زیستی خاک‌های فقیـر بـا هـدف بهبود ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی خاک می‌تواند راهکاری مناسـب در افزایش کیفیت و کاهش هدررفت خاک و آب باشد. لذا در پژوهش حاضر تغییرپذیری نیتروژن خاک به‌عنوان شـاخص مهمـی از کیفیـت خاک با افزایش مستقیم و غیرمسـتقیم جمعیّـت ریزجانـدارن خـاک از طریق تلقیح باکتری‌های مؤثر در تثبیت نیتروژن (*Azotobacter sp.* و گروه *Bacillus subtilis*) و غنی‌سازی مواد غـذایی مـورد ارزیـابی قرار گرفت. در این مطالعه نقش تلقیح جداگانه باکتری‌ها و غنی‌سازی مواد غذایی و هم‌چنین ترکیب آن‌ها در افـزایش نیتـروژن خـاک و در نتیجه غنی شدن پوسته‌های زیستی و افزایش کیفیت خاک در مقیاس

1- Heterotrophic Microoganisms

کرت و کوتاه مدّت تأیید شد. باکتری‌های *Azotobacter* ضمن تـوان بالا در تثبیت نیتروژن، آزادزی بوده و به‌سبب وابستگی کم بـه منـابع غذایی، پایداری بیش‌تری در خاک داشته و لذا استفاده از مایع تلقیحی آن در حجم زیاد محصولی کـاملاً زیسـتی و پایـدار در احیـاء و حفـظ پایداری خاک محسوب خواهد شد. بر این اساس می‌توان بـا افـزایش مصنوعی جمعیّت میکروبـی سـطح خـاک‌هـای فقیـر از طریـق روش آب-تلقیحی در سطوح دامنه‌ها و حتی اراضی کشاورزی زمینـه بهبـود کیفیت و پایداری خاک برای دستیابی به اهـداف متصـور در حفاظـت منابع خاک و آب و کشاورزی پایدار را فـراهم آورد. هـر چنـد ارزیـابی نقش تلقیح و تحریک جداگانه و ترکیبی باکتری‌ها و سایر ریزجانداران خاک‌زی از قبیل سیانوباکترها و قارچ‌ها در بهبود کیفیـت پوسـته‌هـای زیستی خاک در شرایط و مقیاس آزمایشـگاهی و صـحرایی پیشـنهاد می‌شود.

منابع

1- Acea M.J., Prieto-Fernandez A., and Diz-Cid N. 2003. Cyanobacterial inoculation of heated soils: effect on microorganisms of C and N cycles and on chemical composition in soil surface. Soil Biology and Biochemistry, 35(4): 513-524.
2- Atlas R.M. 2010. Handbook of microbiological media, 4th ed. Taylor and Francis Group publication, LLC, 2036 p.
3- Awad N.M., Abd El-Kader A.A., Attia M., and Alva A.K. 2011. Effects of nitrogen fertilization and soil inoculation of sulfur-oxidizing or nitrogen-fixing bacteria on onion plant growth and yield. International Journal of Agronomy, 2011: 316856, 6. http://dx.doi.org/10.1155/2011/316856.
4- Awad Y.M., Blagodatskaya E., Ok Y.S., and Kuzyakov Y. 2012. Effects of polyacrylamide, biopolymer, and biochar on decomposition of soil organic matter and plant residues as determined by 14^C and enzyme activities. European Journal of Soil Biology, 48: 1-10.
5- Bahig A.E., Aly E.A., Khaled A.A., and Amel K.A. 2008. Isolation, characterization and application of bacterial population from agricultural soil at Sohag Province, Egypt. Malaysian Journal of Microbiology, 4(2): 42-50.
6- Barger N.N., Castle S.C., and Dean G.N. 2013. Denitrification from nitrogen-fixing biologically crusted soils in a cool desert environment, southeast Utah, USA. Ecological Processes, 2(1): 1-9.
7- Bationo A. (Ed.). 2007. Advances in integrated soil fertility management in sub-saharan africa: challenges and opportunities: challenges and opportunities. Springer Science and Business Media. 1108 p.
8- Belnap J., Wilcox B.P., Van Scoyoc M.W., and Phillips S.L. 2013. Successional stage of biological soil crusts: an accurate indicator of ecohydrological condition. Ecohydrology, 6(3): 474-482.
9- Benson H.J. 2002. Microbiological applications: laboratory manual in general microbiology. 8th ed. short version, McGraw Hill, Boston, MA, USA, 384 p.
10- Bergey D.H., and Breed R.S. 1957. Bergey's manual of determinativebacteriology. 7th ed. American Society for Microbiology. Baltimore,Williams and Wilkins Co. 1134 p.
11- Bihamta M.R., and Zare Chahouki M.A. 2015. Principles of statistics for the natural resources science, 4th ed. University of Tehran Press, 300p (In Persian with English abstract)
12- Cagri-mehmetoglu A., Kusakli S., and Van de Venter M. 2012. Production of polysaccharide and surfactin by Bacillus subtilis ATCC 6633 using rehydrated whey powder as the fermentation medium. Journal of Dairy Science, 95(7): 3643-3649.
13- Chamizo S., Cantón Y., Lázaro R., Solé-Benet A., and Domingo, F. 2012a. Crust composition and disturbance drive infiltration through biological soil crusts in semiarid ecosystems. Ecosystems, 15: 148-161.
14- Chamizo S., Cantón Y., Miralles I., and Domingo F. 2012b. Biological soil crust development affects physicochemical characteristics of soil surface in semiarid ecosystems. Soil Biology and Biochemistry, 49: 96-105.
15- Dadrasan M., Chaichi M.R., Pourbabaee A.A., Yazdani D., and Keshavarz-Afshar R. 2015. Deficit irrigation and biological fertilizer influence on yield and trigonelline production of fenugreek. Industrial Crops and Products, 77: 156-162.
16- Epelde L., Burges A., Mijangos I., and Garbisu C. 2013. Microbial properties and attributes of ecological relevance for soilquality monitoring during a chemical stabilization field study. Applied Soil Ecology, 75: 1-12.
17- Franche C., Lindström K., and Elmerich C. 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. Plant and Soil, 321(1-2): 35-59.
18- Garbeva P., Tyc O., Remus-Emsermann M.N.P., van der Wal A., Vos M., Silby M., and de Boer W. 2011. No apparent costs for facultative antibiotic production by the soil bacterium Pseudomonas fluorescens Pf0-1. PLoS ONE 6(11): e27266.
19- Gholami L., Sadeghi S.H.R., and Homaee M. 2016. Different effects of sheep manure conditioner on runoff and soil loss components in eroded soil. Catena, 139, 99-104.

20- Giacometti C., Demyan M.S., Cavani L., Marzadori C., Ciavatta C., and Kandeler E. 2013. Chemical and microbiological soil quality indicators and their potential to differentiate fertilization regimes in temperate agroecosystems. Applied Soil Ecology, 64: 32-48.
21- Hasti Water Technology Consulting Engineers. 2011. Watershed management studies (detailed) - pedology and land capability of K1-1 sub-watershed of Chalusrood watershed. Nowshahr, 89 p. (in Persian)
22- Huixia P., Zhengming Ch., Xuemei Zh., Shuyong M., Xiaoling Q., and Fang W. 2007. A study on an oligotrophic bacteria and its ecological characteristics in an arid desert area. Science in China Series D: Earth Sciences, 50: 128-134.
23- Kheirfam H., Sadeghi S.H.R, Homaee M., and Zarei Darki, B. 2017. Quality improvement of an erosion-prone soil through microbial enrichment. Soil and Tillage Research, 165: 230-238.
24- Kheirfam H., Sadeghi S.H.R, Zarei Darki, B., and Homaee M. 2017. Controlling rainfall-induced soil loss from small experimental plots through inoculation of bacteria and cyanobacteria. Catena, 152: 40-46.
25- Kumar R., Bhatia R., Kukreja K., Behl R.K., Dudeja S.S., and Narula N. 2007. Establishment of Azotobacter on plant roots: chemotactic response, development and analysis of root exudates of cotton (*Gossypiumhirsutum* L.) and wheat (*Triticumaestivum* L.). Journal of Basic Microbiology, 47(5): 436-439.
26- Liu C.W., Sung Y., Chen B.C., and Lai H.Y. 2014. Effects of nitrogen fertilizers on the growth and nitrate content of lettuce (*Lactuca sativa* L.). International Journal of Environmental Research and Public Health, 11(4), 4427-4440.
27- Lutton E., Schellevisa R., and Shanmuganathan A. 2013. Culture-dependent methods increase observed soil bacterial diversity from Marcellus shale temperate forest in Pennsylvania, Journal of Student Research, 2(1): 9-16.
28- Moore E.R.B., Tindall B.J., Martins Dos Santos V.A.P., Pieper D.H., Ramos J.L., and Palleroni N.J. 2006. Nonmedical: Pseudomonas. Chapter 3.3.21. Prokaryotes. 6: 646-703.
29- Naik S.N., Goud V.V., Rout P.K., and Dalai A.K. 2010. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14(2): 578-597.
30- Nisha R., Kaushik A., and Kaushik C.P. 2007. Effect of indigenous cyanobacterial application on structural stability and productivity of an organically poor semi-arid soil. Geoderma, 138(1): 49-56.
31- Oelze J. 2000. Respiratory protection of nitrogenase in Azotobacter species: is a widely held hypothesis unequivocally supported by experimental evidence? FEMS Microbiology Reviews, 24(4): 321-333.
32- Prasanna R., Joshi M., Rana A., Shivay Y.S., and Nain L. 2012. Influence of co-inoculation of bacteria-cyanobacteria on crop yield and C–N sequestration in soil under rice crop. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(3): 1223-1235.
33- Rodríguez-Caballero E., Cantón Y., Chamizo S., Afana A., and Solé-Benet A. 2012. Effects of biological soil crusts on surface roughness and implications for runoff and erosion. Geomorphology, 145-146: 81-89.
34- Rossi F., Olguın E.J., Diels L., and De Philippis R. 2015. Microbial fixation of CO_2 in water bodies and in drylands to combat climate change, soil loss and desertification. New Biotechnology, 32(1): 109-120.
35- Russell P., Hertz P., and McMillan B. 2013. Biology: the dynamic science. Cengage Learning, 560 p.
36- Sadeghi S.H.R., Gholami L., Homaee M., and Khaledi Darvishan A.V. 2015a. Reducing sediment concentration and soil loss using organic and inorganic amendments at plot scale, Solid Earth, 6: 445-455.
37- Sadeghi S.H.R., Gholami L., Sharifi E., Khaledi Darvishan A., and Homaee M. 2015b. Scale effect on runoff and soil loss control using rice straw mulch under laboratory conditions. Solid Earth, 6: 1-8.
38- Sadeghi S.H.R., Hashemi Arian Z., and Karimi Z. 2015c. Runoff generation and soil loss control using combined application of vermicompost and vinasse. Water Reuse. 2(1): 81-91. (in Persian with English abstract)
39- Sadeghi S.H.R, Kheirfam H., Homaee M. and Zarei Darki B., and Vafakhah, M., 2017. Improving runoff behavior resulting from direct inoculation of soil micro-organisms. Soil and Tillage Research, 171: 35-41.
40- Saez-Plaza P., Michałowski T., Navas M.J., Asueroa A.G., and Wybraniec S. 2013. An overview of the Kjeldahl method of nitrogen determination. Part I. Early history, chemistry of the procedure, and titrimetric finish. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 43(4): 173-223.
41- Satapute P.P., Olekar H.S., Shetti A.A., Kulkarni A.G., Hiremath G.B., Patagundi B.I., Shivsharan C.T., and Kaliwal B. 2012. Isolation and characterization of nitrogen fixing bacillus subtilis strain as-4 from agricultural soil. International Journal of Recent Scientific Research, 3(9): 762-765.
42- Schrey S.D., Erkenbrack E., Früh E., Fengler S., Hommel K., Horlacher N., Schulz D., Ecke M., Kulik A., Fiedler H.P., Hampp R., and Tarkka M.T. 2012. Production of fungal and bacterial growthmodulating secondary metabolites is widespreadamong mycorrhiza-associated streptomycetes, BMC Microbiology, 12: 164.
43- Sears J.T., and Prithiviraj B. 2012. Seeding of large areas with biological soil crust starter culture formulations: using an aircraft disbursable granulate to increase stability, fertility and CO2 sequestration on a landscape scale. IEEE Green Technologies Conference, 19-20 Apr. 2012, Tulsa, OK, 1-3.

44- Sojka R.E., Bjorneberg D.L., Entry J.A., Lentz R.D., and Orts W.J. 2007. Polyacrylamide in agriculture and environmental land management. Advances in Agronomy, 92: 75-162.
45- Tan K.H. 2011. Principles of soil chemistry. CRC Press. 390 p.
46- Thiet R.K., Boerner R.E.J., Nagy M., and Jardine R. 2005. The effect of biological soil crusts on throughput of rainwater and N into Lake Michigan sand dune soils. Plant and Soil, 278(1-2), 235-251.
47- Valencia Y., Camapum J., and Torres F.A. 2014. Influence of biomineralization on the physico-mechanical profile of a tropical soil affected by erosive processes, Soil Biology and Biochemistry, 74: 98-99.
48- Veum K.S., Goyne K.W., Kremer R.J., Miles R.J., and Sudduth K.A. 2014. Biological indicators of soil quality and soil organic matter characteristics in an agricultural management continuum. Biogeochemistry, 117(1): 81-99.
49- Vieira F.C.S., and Nahas E. 2005. Comparison of microbial numbers in soils by using various culture media and temperatures. Microbiological Research, 160, 197-202.
50- Wang W.B., Liu Y.D., Li D.H., Hua C.X., and Rao B.Q. 2009. Feasibility of cyanobacterial inoculation for biological soil crusts formation in desert area. Soil Biology and Biochemistry, 41: 926-929.
51- Zhao Y., Qin N., Weber B., and Xu M. 2014. Response of biological soil crusts to raindrop erosivity and underlying influences in the hilly Loess Plateau region, China. Biodiversity and Conservation, 23(7): 1669-1686.

Journal of Water and Soil
Vol. 31, No. 2, May.-Jun. 2017, p. 545-556

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۲، خرداد – تیر ۱۳۹۶، ص. ۵۵۶-۵۴۵

Role of Biological Soil Crusts Enrichment through Bacteria Inoculation and Stimulation of Nitrogen Increasing in an Erosion-Prone Soil

H. Kheirfam[1]- M. Homaee[2] - S. H. Sadeghi[3*]- B. Zarei Darki[4]

Received: 03-05-2016
Accepted: 25-09-2016

Introduction: Land degradation and soil losses are common and universal problems which is a pose threat to food security, ecosystem health and consequently sustainable development and human well-being. Meanwhile, improving the chemical and physical properties of biological soil crusts is an effective factor in soil loss controlling. Also, the chemical properties specially soil nitrogen are the important factors for soil quality determination. To this end, various strategies on techniques of amendments have been implemented to improve soil properties and quality. Although the application of most strategieshave been verified to soil quality,but their application in real conditions is restricted due to detrimental environmental effects, instability, cost and time-consuming and less accessibility. Recently, biological soil crusts enrichment based on soil microorganism inoculation and stimulation has been raised as a biological and useful strategy in soil conservation sciences. Accordingly, the present study aimed to investigate the role of individual and combined inoculation of bacteria and stimulant nutrient material into small-scale plots on soil nitrogen variation as one of the important soil chemical component.

Material and Methods: The study soil was collected from the erosion-prone and poor biological crust of a sub-watershed from Chalusrood watershed located in Mazandaran Province. The soil sampling was carried out from the upper of the soil surface using a 5cm-diameter coring polyvinyl chloride. The sampled soils were air-dried and sieved by a 2 mm-sized mesh. The Nutrient Agar and Tryptic Soy Agar general were used to bacteria isolation. The identification of isolated bacteria was carried out based on available protocols. Effective nitrogen-fixing bacteria were selected and then purified by selective *Azotobacter* Agar, Modified II and DSMZ1media. The purified bacteria proliferated by LB Broth medium and then inoculated into soil small sized-plots simultaneously with stimulant nutrient material throught spraying technique. The study was conducted at plot scale with 0.5×0.05×0.5 m dimensions and the plots filled by study soil based on standard protocols. The soil samples were taken at once the 7-8 days from surface of soil plots and the amounts of soil nitrogen were measured by using Kjeldahl method. As well as, experiment period was planned about 60 days. The one-way ANOVA and Tukey HSD test were subjected to statistically analyses.

Results and discussion: The results indicated that the *Azotobacter* sp. and *Bacillussubtilis* strain were selected as the most appropriate bacteria to be applied for nitrogen fixing in soil. Also, the results showed that the average total organic nitrogen in control plots ranged from 0.082 to 0.136%, which implies the soil limitation of total nitrogen. However, the measured total organic nitrogen in the bacteria, stimulant nutrient, and combined inoculation plots varied from 0.11 to 0.241%, 0.117 to 0.204%, and 0.124 to 0.374%, respectively. These results demonstrated the positive role of inoculated treatments on fixing nitrogen in the soil. Therefore, the population of *Azotobacter sp*., the *Bacillussubtilis* strain, was considerably increased after the inoculation process, and this led to converted and fixed atmospheric nitrogen (N_2) into utilizable nitrogen (NH_4 or NO_3) in soil by using the enzyme nitrogenase as a catalyst. The statistical analyses and evaluation results were indicative of a significant ($p<0.05$) increase of soil total organic nitrogen in inoculated treatments. After one month, the fixed nitrogen was significantly ($p<0.01$) increased in the bacteria, stimulant nutrient material, and combined inoculated plots to respective of 148, 110, and 284%, compared to control plots. Additionally, decreasing of nitrogen from plots were begun after one month of inoculation time. It can be related to the quickly reducing bacteria nutrient resources due to fast proliferation and activity of bacteria. However, amount of nitrogen in the treated-plots remained fixed after two month of inoculation. Accordingly, after 60 days, the amount of fixed nitrogen in the bacteria and combined inoculated plots were about 16 and 17% more than to control ($p<0.01$).

1 and 3- Former PhD Student and Professor Department of Watershed Management Engineering, Tarbiat Modares University
(*-Corresponding Author EMail: Sadeghi@modares.ac.ir)
2- Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University
4- Assistant Professor, Department of Marine Biology, Tarbiat Modares University

Conclusion: The land degradation rate critically depends on soil quality. Soil crust enriched by inoculation of bacteria can improve soil chemical and especially properties nitrogen and, ultimately, soil quality. Eventually, biological soil crusts enrichment by inoculation of bacteria was proved as a completely biologic, safe and economically techniques in soil chemical properties improving. Though, more insight studies on applicability of soil microorganisms on soil quality and quantity conservation are essentially needed under different conditions with further emphases on field application to allow drawing more certain conclusion.

Keywords: Microorganisms Inoculating, Soil Bio-technology, Soil Erosion, Soil Amendments, Soil Stability