نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۹، شماره ۶، بهمن – اسفند ۱۳۹۴، ص. ۱۶۷۳-۱۶۶۲

Journal of Water and Soil
Vol. 29, No. 6, Jan.-Feb. 2016, p. 1662-1673

بررسی پراکنش باکتری‌های حل‌کننده فسفات و فعالیت فسفاتازی خاک در کاربری‌های متفاوت

محمدرضا ساریخانی[1*]- نسترن چلبیانلو[2]- سید سیامک علوی‌کیا[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۷/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۲۱

چکیده

به منظور بررسی تأثیر کاربری‌های مختلف، اثر اقلیم و خواص فیزیکی و شیمیایی متفاوت بر جمعیت حل‌کنندگان فسفات و فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی خاک، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی درسه کاربری مختلف (لگوم، غلات و عدم‌کشت) با دو اقلیم متفاوت (نیمه‌مرطوب: منطقه فندقلو و نیمه‌خشک منطقه نمین- اردبیل) انجام شد. نتایج به دست آمده از شمارش جمعیت میکروبی در دو اقلیم نیمه‌مرطوب و نیمه‌خشک، بیشترین تعداد کل میکروبی را در کاربری لگوم (بیش از ۶ log cfu/g) نشان داد. همچنین بیشترین جمعیت باکتریهای حل‌کننده فسفات آلی و معدنی در کاربری عدم‌کشت تحت اقلیم نیمه‌مرطوب (زمین‌های تحت پوشش چمن و مرتع) مشاهده شد (۵/۳ log cfu/g). سنجش آنزیمی نیز نشان داد که میزان فسفاتاز اسیدی (۴۳۰ µg pNP/g.h) در اقلیم نیمه‌مرطوب نسبت به نیمه‌خشک حدود سه برابر افزایش داشته است که این امر حاکی از تبعیت این آنزیم از رطوبت خاک و به تبع آن پوشش گیاهی بهتر و میزان مواد آلی بالا در اقلیم نیمه‌مرطوب می‌باشد که خود افزایش فعالیت ریزجانداران خاک و محتوای آنزیمی خاک را به دنبال دارد. همچنین، نتایج این تحقیق نشان داد که میزان تغییرات آنزیم فسفاتاز قلیایی تحت اثر متقابل اقلیم و کاربری بوده است که بالاترین میزان فعالیت این آنزیم تحت کاربری لگوم و اقلیم نیمه‌خشک مشاهده شد (۸۱۰ µg pNP/g.h)، شاید بتوان pH بالاتر خاک در اقلیم نیمه‌خشک را دلیل این امر دانست، بعلاوه ممکن است حمایت ریزوسفر گیاهان لگوم از ریزجانداران مولد فسفاتاز قلیایی دلیل دیگری بر بالا بودن این پارامتر در کاربری لگوم نسبت به سایر کاربری‌ها باشد.

واژه‌های کلیدی: حل‌کنندگان فسفات، فسفاتاز اسیدی و قلیایی، فسفر

مقدمه

فسفر یکی از عناصر ضروری پرمصرف برای گیاه محسوب می‌شود و بعد از نیتروژن دومین عنصر محدودکننده رشد گیاه به شمار می‌رود. برخلاف سایر عناصر غذایی پرمصرف، این عنصر در بیشتر خاک‌ها تحرک و قابلیت جذب کمی دارد و به‌عبارتی کم‌تحرک‌ترین عنصر در خاک می‌باشد (۱۳). در میان جمعیت فلور میکروبی خاک، باکتری‌های حل‌کننده فسفر قابلیت دسترسی فسفر را از طریق ترشح اسیدهای آلی و تولید آنزیم‌های فسفاتاز افزایش می‌دهند، که به‌ترتیب باعث انحلال فسفر معدنی و معدنی شدن فسفر آلی شده و تغذیه فسفری گیاه را بهبود می‌بخشند (۱۹). گزارش‌های متعددی از توانایی گونه‌های مختلف باکتری در انحلال فسفات معدنی کم محلول از قبیل تری‌کلسیم‌فسفات، دی‌کلسیم فسفات، هیدروکسی‌آپاتیت و سنگ فسفات وجود دارد. در بین باکتری‌هایی با این قابلیت، جنس‌های *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Rhizobium*، *Burkholderia*، *Agrobacterium*، *Achromobacter*، *Flavobacterium* (۲۶) و *Pantoea* (۲۱) مشاهده می‌شود. بر اساس این گزارش‌ها، جمعیت های متنوعی از باکتری‌های حل‌کننده‌ی فسفات در خاک و در ریزوسفر گیاه وجود دارد که شامل گونه‌های هوازی و بی‌هوازی با غالبیت گونه‌های هوازی است. همچنین جمعیت آنها در ریزوسفر در مقایسه با خاک غیرریزوسفری به مراتب بیشتر می‌باشد (۲۶).

پونمورگان و گوپی (۲۵) الگوی توزیع و تراکم جمعیتی باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB[4]) را در خاک‌های کشت شده بررسی کردند، جمعیت PSB در خاک ریزوسفری بادام زمینی بالاترین تعداد ($۱۴/۹\times۱۰^{۵}$ بر گرم خاک خشک) و در خاک ریزوسفری Ragi، سورگوم و ذرت کمترین تعداد را داشت. این تغییرات در جمعت PSB ممکن است به بسیاری از فاکتورهای خاک مانند تغذیه خاک، pH، محتوای رطوبتی، ماده آلی و برخی از فعالیت‌های آنزیمی نسبت داده شود. بابی و همکاران (۸) تحقیقاتی بر روی پویایی میکروبی در ریزوسفر گیاه چای انجام دادند و گزارش کردند که تفاوت معنی‌داری

۱ و ۲ – استادیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گرایش بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
(*- نویسنده مسئول: (Email: rsarikhani@yahoo.com
۳- استادیار گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

4- Phosphate solubilizing bacteria

در سطوح جمعیتی PSB در گیاهان چای مورد آزمایش وجود دارد. علاوه بر این، آنان گزارش کردند که جمعیت *Azospirillum* تثبیت‌کننده نیتروژن و PSB در مزارع جوان چای نسبت به مزارع قدیمی‌تر بالاتر می‌باشد. الگوی توزیع PSB در خاک‌های ریزوسفری نشان می‌دهد که سطوح جمعیتی با افزایش فاصله از ریزوسفر گیاه کاهش پیدا می‌کند.

فلاح (۴) تحقیقی را به منظور بررسی رابطه بین جمعیت باکتری‌ها و قارچ‌ها با برخی خصوصیات خاک‌های استان گیلان انجام داد. نتایج تحقیقات وی روی ۵۰ نمونه خاک جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان گیلان، نشان داد که در درصدهای مختلف مواد آلی، جمعیت کل باکتری‌ها در بیش‌تر نمونه‌ها بین $۱۰^{۸}$-$۱۰^{۷}$ سلول در هر گرم خاک متغیر بود. فلاح و همکاران (۵) تعداد کل باکتری‌ها، باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB)، کل قارچ‌ها و قارچ‌های حل‌کننده فسفر (PSF^{1}) را در تعدادی از خاک‌های مناطق مختلف استان گیلان گزارش کردند. نتایج نشان داد که جمعیت کل باکتری‌ها در خاک‌های مورد بررسی از $۱۰^{۶}$ تا $۱۰^{۹}$ سلول در هر گرم خاک متغیر بوده و متوسط کل باکتری‌ها در نمونه‌های جمع‌آوری شده برابر $۵/۸۲\times۱۰^{۷}$ سلول در هر گرم خاک بود. جمعیت PSB در خاک‌های مورد بررسی از صفر تا $۱۰^{۷}$ سلول در هر گرم خاک متغیر بوده و حدود ۹۴٪ از نمونه‌ها حاوی PSB بودند. بالاترین سطح جمعیت PSB ($۳/۸۵\times۱۰^{۶}$ سلول در گرم) در توتستان مشاهده شد. درصد متوسط تعداد نسبت به متوسط کل باکتری‌ها و کل ریزجانداران حل‌کننده فسفات به ترتیب برابر ۳/۹۸ و ۸۸/۰۴ درصد بود. جمعیت PSF نیز در خاک‌های مورد مطالعه از صفر تا $۱۰^{۶}$ در هر گرم خاک متغیر بوده و ۸۶ درصد از نمونه‌ها حاوی PSF بودند. بالاترین سطح جمعیت PSF ($۱/۸\times۱۰^{۵}$ سلول در هر گرم خاک) در بازمانده‌های در حال تخمیر کارخانه چای مشاهده شد.

تولید اسیدهای آلی و آنزیم‌های فسفاتاز توسط موجودات زنده خاک از راهکارهای اصلی درگیر در انحلال و رهاسازی فسفر خاک می‌باشند (۱۹). آنزیم فسفاتاز که پیوندهای استری فسفات آلی را هیدرولیز می‌کند و منجر به آزادسازی فسفات می‌شود، خود به دو گروه اسیدی و قلیایی قابل تقسیم‌بندی است. فسفاتاز اسیدی، بر-خلاف فسفاتاز قلیایی، فعالیت کاتالیتیک بهینه‌ی خود را در مقادیر pH اسیدی تا خنثی نشان می‌دهد. تولید اسید فسفاتازها و فسفاتازهای قلیایی به منظور افزایش انحلال و دسترسی فسفر و غلبه بر مشکل کمبود فسفر، راهکار زیستی میکروفلور خاک و گیاهان می‌باشد. فسفاتاز اسیدی نقش اصلی را در معدنی‌سازی فسفر آلی در خاک بازی می‌کند. از آنجایی که گیاهان عالی فاقد فعالیت فسفاتاز قلیایی هستند، عمده فسفاتاز قلیایی خاک به ریزجانداران نسبت داده می‌شود (۳۰).

فسفاتازهای میکروبی ممکن است معدنی‌سازی بیشتر ترکیبات فسفر آلی را انجام دهد. تولید، فعالیت و انحلال آنزیمی فسفر آلی و معدنی شدن آن تحت تأثیر پارامترهای مختلفی از جمله شرایط اقلیمی (رطوبت و دما)، شرایط خاک (شامل pH، ماده آلی، بافت خاک، کربنات کلسیم، شوری و رطوبت) و نوع کاربری اراضی (کشت و عدم‌کشت و حتی نوع محصول) است. همچنین حضور جمعیت میکروبی مؤثر در انحلال فسفات و پراکنش ریزجانداران حل‌کننده فسفات متأثر از شرایط حاکم بر خاک از جمله شرایط اقلیمی، نوع پوشش گیاهی و حتی نوع کاربری اراضی به لحاظ کشت گیاهان مختلف و عوامل مختلف محیطی نظیر میزان ماده آلی، دما، رطوبت، pH، کوددهی (آلی یا شیمیایی) می‌باشد و در مواجه با شرایط مختلف مکانیسم‌های بکار گرفته شده از جانب آنها در تأمین فسفات از منابع آلی و معدنی موجود در خاک تغییر خواهد نمود (۲۶).

در یک مطالعه در غرب ایالت اورگان آمریکا، دیک و همکاران (۱۱) اثر سیستم خاک‌ورزی را در خاک‌هایی که قبلاً زیرپوشش جنگل بودند، مطالعه کردند. نتایج نشان داد که چهار سال بعد از شروع خاک‌ورزی، فعالیت تمام آنزیم‌های مورد مطالعه (فسفاتاز، آمیداز، دهیدروژناز و آریل سولفاتاز) به میزان ۴۱ تا ۷۵ درصد در عمق ۱۰ تا ۱۵ سانتی متری خاک کاهش یافته است. در مطالعه دیگری بندیک و دیک (۹) گزارش کردند فعالیت فسفاتاز اسیدی، فسفاتاز قلیایی، آریل سولفاتاز، اوره‌آز، اینورتاز و آمیداز در ۷/۵ سانتیمتر بالائی خاک در تیمار بدون خاک‌ورزی بیش از مزارع تحت خاک‌ورزی به روش مرسوم بوده است. همچنین بیان کردند که علفزارهای دائمی و مراتع بکر بخاطر فقدان خاک‌ورزی و تاثیر ریزوسفر، فعالیت آنزیمی بیشتری نسبت به مناطق کشت شده دارند. در مطالعه دیگری در شمال شرق چین، وی و همکاران (۳۱) اثر سیستم‌های خاک‌ورزی (شخم با گاوآهن برگرداندار و سیستم خاک‌ورزی بدون شخم) را بر توزیع فسفر و فعالیت فسفاتاز در خاکدانه‌های خاک مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که فعالیت فسفاتاز قلیایی و فسفودی‌استراز تحت شرایط بدون شخم به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شخم با گاوآهن برگرداندار بیشتر است و پاسخ فسفاتاز قلیایی در خاکدانه‌های ۱ mm- ۰/۲۵ و فسفودی‌استراز در خاکدانه‌های کوچکتر از ۰/۲۵ mm به عملیات شخم حساس‌تر است. در مطالعه دیگری امیدی و همکاران (۲۳) برای ارزیابی اثرات روش‌های مختلف شخم (بدون شخم، شخم حداقل و شخم سنتی) بر روی فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی، فسفاتاز قلیایی و دهیدروژناز آزمایشی را انجام دادند. نتایج آنها نشان داد در مقایسه با روش‌های دیگر شخم، روش بدون شخم فعالیت آنزیمی خاک را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد.

با توجه به مطالب فوق و آگاهی از این موضوع که باکتری‌های حل‌کننده فسفات بسیار متنوع‌اند و توزیع جمعیت و پراکنش آنها در شرایط خاک‌های مختلف فرق می‌کنند و جمعیت آن به خصوصیات

1- Phosphate solubilizing fungi

فیزیکی و شیمیایی خاک، میزان ماده آلی و مقدار فسفر آن و عملیات کشاورزی بستگی دارد و همچنین تولید، فعالیت و انحلال آنزیمی فسفر آلی و معدنی شدن آن تحت تأثیر پارامترهای مختلفی از جمله شرایط اقلیمی (رطوبت و دما) و شرایط خاک (شامل pH، ماده آلی، درجه حرارت و رطوبت)، نوع کاربری اراضی (کشت و عدم کشت و نوع محصول) است، تحقیق حاضر به منظور دنبال کردن اهداف زیر، انجام گرفت.

۱- بررسی تغییرات فعالیت فسفاتازی (اسیدی و قلیایی) خاک تحت کاربری‌های متفاوت (عدم کشت و زیرکشت گیاهان لگوم و غلات) در دو اقلیم متفاوت (نیمه‌مرطوب: منطقه فندقلو و نیمه‌خشک: منطقه نمین- اردبیل).

۲- ارزیابی پراکنش باکتری‌های حل‌کننده فسفات در شرایط اقلیمی متفاوت تحت کاربری‌های متفاوت.

۳- بررسی رابطه بین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک با پراکنش جمعیت میکروبی و فعالیت آنزیمی خاک.

مواد و روش‌ها

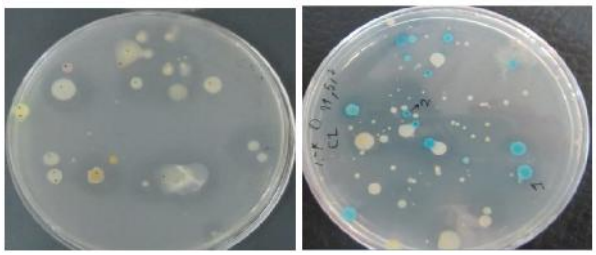
معرفی مکان نمونه‌برداری، روش سنجش فعالیت آنزیمی و شمارش میکروبی

با توجه به اهدافی که در مطالعه دنبال می‌شد، از دو اقلیم نیمه‌مرطوب (منطقه فندقلو- استان اردبیل) و نیمه‌خشک (اردبیل- نمین) در اراضی تحت کشت گیاهان لگوم، غلات و عدم کشت (مرتعی و بایر)، نمونه‌برداری از اعماق ۲۵-۰ سانتیمتر انجام گرفت. قابل ذکر است که کابری عدم‌کشت در شرایط اقلیمی مرطوب با توجه شرایط حاکم به صورت مرتع و چمن‌زار بوده اما در اقلیم نیمه‌خشک زمین بایر بوده است. مقدار متوسط بارندگی سالانه و میانگین دمایی در منطقه (اردبیل- نمین) به ترتیب ۳۱۸ میلی‌متر و ۸ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. با توجه به میزان بارندگی و درجه حرارت، نوع اقلیم نمین به روش آمبرژه، نیمه خشک سرد، با نوع پوشش گیاهی استپی می‌باشد. منطقه فندقلو نیز دارای مقدار متوسط بارندگی سالانه نزدیک به ۵۰۰ میلی‌متر است و دمای میانگین سالانه آن ۱۱ درجه سانتی‌گراد می‌باشد و نوع اقلیم آن به روش آمبرژه، نیمه مرطوب، با نوع پوشش گیاهی استپی و معتدل جنگلی است. از هر کاربری تعداد ۴ نمونه خاک به صورت نمونه مرکب تهیه شد. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد و جهت آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. به منظور شمارش باکتری‌های حل-کننده فسفات، از محیط Sperber معدنی (۲۹) و آلی (۲۷) استفاده شد. بعد از تهیه سری‌های رقت، از ۴ رقت انتهایی 10^{-4} تا 10^{-7} برای کشت در محیط‌های فوق استفاده شد. برای این منظور از هر نمونه خاک ۱۰ گرم خاک توزین و به ارلن حاوی ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل افزوده شد. به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر با تعداد ۱۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد، سپس بعد از رسوب ذرات درشت از فاز رویی، ۱ میلی‌لیتر برداشته و به اولین لوله آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد تا رقت مورد نظر تهیه شود. ۱۰۰ میکرولیتر از ۴ رقت انتهایی، بر روی پلیت حاوی محیط Sperber معدنی یا آلی در ۳ تکرار پخش شد. پلیت‌ها را در دمای ۲۶ درجه سلسیوس به مدت یک هفته درون انکوباتور قرار داده و شمارش کلنی‌های باکتریایی (با تأکید بر تولیدکنندگان هاله شفاف در محیط معدنی و تولیدکنندگان کلنی آبی در محیط آلی) صورت گرفت (مطابق با شکل ۱). قابل ذکر است که به منظور غربالگری باکتری‌های حل‌کننده فسفات، ایزوله‌های برتر از نظر تولید رنگ آبی و هاله شفاف انتخاب تا مطالعات بیشتر روی آنها انجام پذیرد که در این مقاله به جزییات آن پرداخته نشده است.

برای سنجش فعالیت فسفاتازی (اسیدی و قلیایی) خاک از روش‌های مرسوم در اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم استفاده شده است (۳۰). به این ترتیب که بعد از تهیه بافر و سوبسترای مناسب برای اندازه‌گیری فعالیت فسفاتازی خاک، برای هر نمونه خاک ۸ تکرار سنجش که نیمی از آن برای فعالیت فسفاتازی اسیدی و نیم دیگر برای فسفاتاز قلیایی است، لحاظ گردید. همچنین یک نمونه شاهد نیز در هر سنجش به منظور کسر اثرات زمینه‌ای در نظر گرفته شد. قابل ذکر است که سوبسترای مورد استفاده در آزمایش، pNPP[1] بود. مراحل کار به شرح زیر می‌باشد. بعد از الک نمودن خاک از غربال ۲ میلی‌متری و توزین ۱ گرم از نمونه خاک (مرطوب)، آن را به درون لوله‌های آزمایش حاوی ۴ میلی‌لیتر معرف MUB[2] (اسیدی یا بازی) و ۱ میلی‌لیتر سوبسترای pNPP (در بافر اسیدی یا بازی) ریخته و بعد از بهم زدن نمونه، برای فراهم ساختن دمای بهینه فعالیت آنزیم، لوله را در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در حمام آب قرار داده و به مدت ۱ ساعت در این شرایط نگهداری شد. سپس با افزودن محلول‌های متوقف‌کننده (یعنی ۱ میلی‌لیتر $CaCl_2$ ۰/۵ مولار و ۴ میلی‌لیتر NaOH ۰/۵ مولار) واکنش را متوقف ساخته و قبل از قرائت جذب، نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی، صاف شدند. این سوبسترا در اثر فعالیت فسفاتاز به فسفر و پارانیتروفنل (pNP) هیدرولیز می‌شود. برای اندازه‌گیری میزان pNP آزاد شده، جذب آن در طول موج ۴۱۰ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. برای این‌که بتوان فعالیت آنزیمی خاک را به صورت µg pNP/g.h عنوان کرد، لازم است تا منحنی استاندارد این ماده (pNP) را با تهیه استانداردهای ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم رسم کرد. لازم به ذکر است که در مورد نمونه شاهد مراحل کاری یکسان می‌باشد با این تفاوت که محلول

1- para-Nitrophenylphosphate
2- Modified Universal Buffer

متوقف‌کننده ابتدا به نمونه اضافه و سوبسترا در مرحله قبل از صاف کردن، افزوده می‌شود. برای کسر اثر رطوبت از فعالیت آنزیمی خاک، درصد رطوبت هر نمونه خاک محاسبه و تصحیحات مربوط به رطوبت و نمونه شاهد در اعداد نهایی لحاظ شد.



شکل ۱- محیط کشت Sperber آلی و معدنی جهت پایش و شمارش حل‌کنندگان فسفات آلی و معدنی (به ترتیب با ویژگی تولید فنوتیپ آبی و تولید هاله شفاف)

Figure 1- Organic and inorganic Sperber media to monitor and count organic and inorganic phosphate solubilizing microorganisms (respectively with the characteristic of blue phenotype and clear zone production)

همچنین ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی مهم خاک، از قبیل pH، EC، درصد ماده آلی، درصد کربنات کلسیم[1]، فسفر قابل استفاده و بافت خاک بر اساس روش‌های مرسوم در "روش‌های آنالیز خاک" در مورد نمونه‌های خاک با در نظر گرفتن دو تکرار برای هرنمونه، مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (۱۴).

طرح و آنالیز آماری

به منظور بررسی اثر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک، کاربری و شرایط اقلیمی بر جمعیت حل‌کنندگان فسفات و فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با در نظر گرفتن دو فاکتور کاربری و اقلیم صورت پذیرفت. کاربری و اقلیم به ترتیب دارای ۳ و ۲ سطح بودند به صورتی‌که سه کاربری مختلف (شامل لگوم، غلات و عدم‌کشت) در دو اقلیم متفاوت (نیمه‌مرطوب، منطقه فندقلو و نیمه‌خشک، منطقه نمین- اردبیل) در آزمایش لحاظ شد و تعداد تکرار آزمایش نیز ۴ در نظر گرفته شد. به این ترتیب از هر زمین تحت کاربری و شرایط اقلیمی خاص ۴ نمونه مرکب نمونه‌برداری شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزارهای SPPS، MSTATC و Statistica صورت گرفت و مقایسات میانگین به روش دانکن انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک‌ها

خاک‌های مورد مطالعه بافت‌های متفاوتی از رسی تا لوم رس شنی داشتند. محدوده pH خاکها نیز از ۶/۰۲ تا ۷/۸۲ متغیر بود. میزان کربن آلی بین ۰/۶۸ تا ۴/۳۸ درصد متغیر بود در جدول ۱ محدوده تغییرات حداکثر و حداقل ویژگی‌های خاک‌های مورد مطالعه نشان داده شده است.

پراکنش باکتری‌های حل‌کننده فسفات

همان‌طور که در جدول تجزیه واریانس قابل مشاهده است (جدول ۲) صفات مورد مطالعه متاثر از تیمارهای آزمایشی مورد مقایسه میانگین قرار گرفتند. توجه به نتایج به دست آمده از شمارش جمعیت میکروبی در دو اقلیم نیمه‌مرطوب و نیمه‌خشک، بیشترین جمعیت میکروبی (تعداد کل باکتریهای شمارش شده) در محیط آلی و معدنی (شکل ۲) تحت کاربری لگوم مشاهده شد که این میزان در محیط آلی و معدنی به ترتیب در سطح ۱٪ و ۵٪ با دو کاربری دیگر اختلاف معنی‌دار داشت (جدول ۲). به نظر می‌رسد در کاربری لگوم، جمعیت میکروبی حل‌کنندگان فسفات به دلیل امکان برقراری همزیستی باکتری‌های جنس *ریزوبیوم* با گیاهان لگوم افزایش داشته است. در واقع، حضور باکتری جنس *ریزوبیوم* که خود یکی از قوی‌ترین جنس‌های باکتریایی در امر انحلال فسفات می‌باشد (۲۶)، یکی از اصلی‌ترین دلایل افزایش جمعیت میکروبی حل‌کنندگان فسفات تحت کاربری لگوم می‌باشد.

همچنین اثر متقابل اقلیم و کاربری بر تعداد کل باکتریها در محیط معدنی در سطح ۵٪ معنی دار بوده است (جدول ۲). با توجه به شکل ۳ گرچه تعداد باکتری در کاربری‌های سه‌گانه در دو اقلیم اختلاف معنی‌داری با هم ندارند، اما اختلاف آماری بین کاربری لگوم و عدم‌کشت در اقلیم نیمه‌خشک می‌باشد. به نظر می‌رسد در کاربری لگوم، ریشه گیاهان لگوم با ترشح مواد آلی اسیدی و انواع ویتامین‌ها، امکان حضور بیشتر جمعیت میکروبی را در ریزوسفر و منطقه ریشه فراهم می‌کنند.

۱- یا مواد قلیایی خنثی شونده معادل کربنات کلسیم Total Neutralizing Value (TNV)

جدول ۱- دامنه تغییر خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک‌های مورد استفاده

Table 1- The range of physicochemical properties of soils used

	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)	ECe (μScm^{-1})	pH	OC (%)	$CaCO_3$ (%)	P (mg/kg)	Moisture رطوبت (%)
حداقل (Max)	25.5	9.68	32.80	111.4	6.02	0.68	0.75	16.1	5.67
حداکثر (Min)	56	35.66	62.82	717	7.82	4.38	17.25	39.7	33.03
میانگین (Mean)	34.78	16.75	48.46	358.36	7.31	1.91	8.09	28.26	16.12
ضریب تغییرات (CV)	21.63	45.57	17.63	45.22	7.99	62.99	60.63	97.71	43.98

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر اقلیم، کاربری و اثرات متقابل آنها بر جمعیت باکتری‌ها و فعالیت فسفاتازی خاک

Table 2- Analysis of variance the effect of climate, the usage and their interaction on the population of bacteria and soil phosphatase activity

		میانگین مربعات (Mean of Square)					
منابع تغییر Source of variation	درجه آزادی D.F	تعداد باکتریهای دارای هاله شفاف Total bacteria with clear zone	تعداد باکتریهای دارای فنوتیپ آبی Total bacteria with blue phenotype	جمعیت کل باکتریها در محیط معدنی Total bacteria in inorganic medium	جمعیت کل باکتریها در محیط آلی Total bacteria in organic medium	فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیائی Activity of alkaline phosphatase	فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی Activity of acid phosphatase
اقلیم Climate	1	5.433 ns	0.773 ns	0.003 ns	0.581ns	22321.120 ns	358.787**
کاربری Land use	2	0.097 ns	1.345 ns	0.427*	2.762**	66330.062 ns	64.939**
اقلیم ×کاربری Climate× Land use	2	5.406*	4.310*	0.305*	0.312 ns	187457.48**7	343.491**
خطا Error	18	1.615	1.188	0.081	0.270	30593.729	6.206
CV (٪)		33.33	22.49	4.71	8.34	31.99	16.54

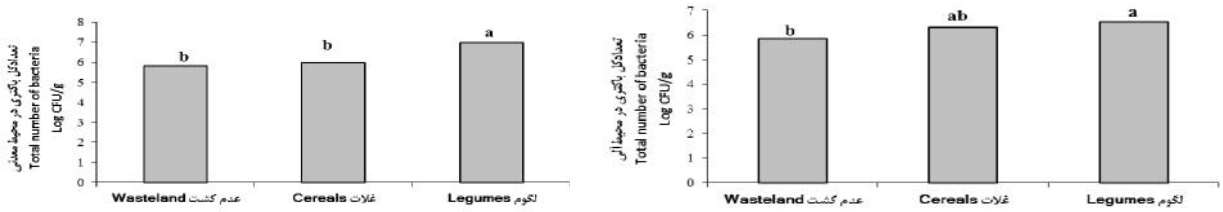
** معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد، * معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد، ns غیر معنی‌دار

** Significant at the 1% level, * significant at the 5% level, ns non-significant

مشابه این نتایج در مطالعات دیگری که در حضور پنج نوع گیاه مختلف به ویژه لگوم صورت پذیرفت، نیز به چشم می‌خورد. لگوم‌ها به طور معنی‌داری در مقایسه با ذرت، چمن و گیاهان بوته‌ای تعداد ریزجانداران قابل کشت و بیوماس میکروبی را افزایش دادند (۱۶).

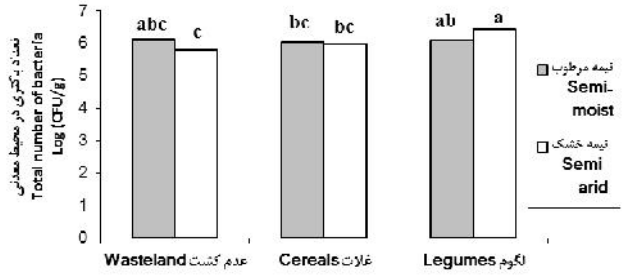
در بررسی اثر متقابل اقلیم و کاربری بر جمعیت حل‌کنندگان فسفات در محیط Sperber آلی و معدنی، بین کاربری‌های مختلف در دو اقلیم به جز کاربری عدم‌کشت، تفاوت آماری مشاهده نشد (شکل ۴). نتایج نشان داد که بیشترین جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات (دارای فنوتیپ آبی) در کاربری عدم کشت تحت اقلیم نیمه‌مرطوب مشاهده شد، یعنی زمین‌های تحت پوشش چمن و مرتع دارای بیشترین جمعیت بودند. لازم به ذکر است که فنوتیپ آبی باکتری ناشی از فعالیت فسفاتازی باکتریهاست. باکتریهای مولد فسفاتاز قادر به هیدرولیز سوبسترای رنگزای BCIP[1] به عنوان سوبسترای آلی فسفردار می‌باشند و آزاد شدن فسفر از این سوبسترا باعث می‌شود تا بنیان آن به رنگ آبی درآید (۲۷). در نقطه مقابل کمترین فنوتیپ آبی باکتریها در کاربری عدم کشت (یعنی زمین بایر) در اقلیم نیمه‌خشک مشاهده شد (شکل ۴). مشابه همین نتایج در بررسی تولید هاله شفاف در محیط Sperber معدنی، یعنی جمعیت میکروبی حل‌کننده فسفات معدنی، نیز مشاهده شد (شکل ۴). تولید اسیدهای آلی توسط حل‌کنندگان فسفات معدنی از جمله دلایل تولید هاله شفاف می‌باشد که به عنوان مکانیسم درگیر در انحلال فسفات معدنی مطرح می‌باشد (۳).

1- 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate



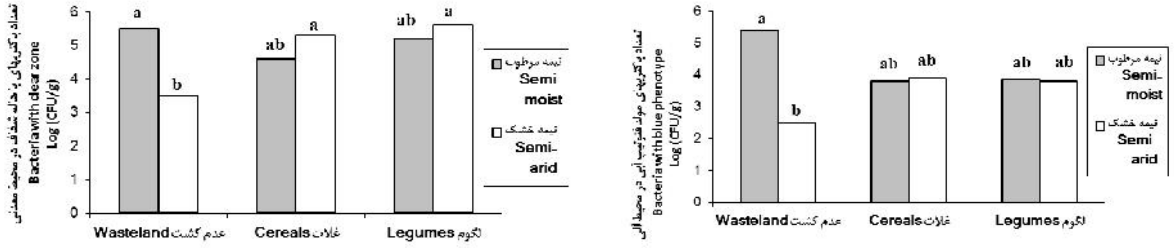
شکل۲- تعداد کل باکتری‌ها تحت سه کاربری مختلف در دو محیط Sperber آلی (راست) و معدنی (چپ)

Figure 2- Total number of bacteria in three different usages in organic Sperber (right) and inorganic Sperber (left)



شکل ۳- اثر متقابل اقلیم و کاربری بر تعداد کل باکتریها در محیط Sperber معدنی

Figrure 3- Interaction effect of climate and land uses on total number of bacteria in inorganic Sperber medium



شکل ٤- اثر متقابل اقلیم و کاربری بر تعداد باکتریهای حل‌کننده فسفات دارای فنوتیپ آبی در محیط Sperber آلی (راست) و دارای هاله شفاف در محیط Sperber معدنی (چپ)

Figure 4- Interaction effect of climate and land uses on number of phosphate solublizing bacteria with blue phenotype in organic Sperber medium (right) and with clear zone in inorganic Sperber medium (left)

در زمین‌هایی با پوشش مرتعی و چمن‌زار (یعنی کاربری عدم‌کشت و اقلیم نیمه‌مرطوب) وجود رطوبت، مواد آلی و پوشش گیاهی بهتر و در نتیجه ترشحات ریشه بیشتر، امکان حضور بیشتر جمعیت میکروبی و به دنبال آن جمعیت میکروبی حل‌کننده فسفات را در ریزوسفر و منطقه ریشه فراهم آورده است. زومی و همکاران (۳۲) تحقیقی به منظور بررسی اثر نوع گیاه (۵ گیاه شامل لگوم، گرامینه، چمن مصنوعی[1] و درختچه مصنوعی[2] و درختچه طبیعی[3]) روی خصوصیات جامعه میکروبی خاک بوسیله روش شمارش کلنی و اسید چرب فسفولیپید انجام دادند و نتیجه گرفتند که لگوم‌ها به‌طور معنی‌داری تعداد میکروارگانیسم‌های قابل کشت (روش شمارش کلنی)، زیست‌توده میکروبی و تنوع کاتابولیک‌های میکروبی را افزایش می-

1- Artificial Turf
2- Artificial Shrub
3- Natural Shrub

دهند. در بین گیاهان غیرلگوم، زیست‌توده قارچ و تنوع کاتابولیکی میکروبی در بوته طبیعی بیشترین مقدار را داشت.

هدلاند (۱۷) نشان داد که پس از دو سال تغییر در مدیریت زمین-های کشاورزی و کاشت گیاهان مرتعی، لگوم و علفی به‌جای گیاهان زراعی، جمعیت باکتری‌ها افزایش یافته است. همچنین با اندازه‌گیری تنفس نشان داد که فعالیت میکروبی و زیست‌توده نیز افزایش یافته - است. جانسون و همکاران (۱۸) دریافتند که ساختار و فعالیت جامعه میکروبی به نوع گیاه وابسته است. کویی و همکاران (۱۰) همبستگی قوی بین جامعه میکروبی و کربن را در مطالعات خود عنوان داشتند.

فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی

فعالیت‌های آنزیمی خاک به عنوان شاخص‌های مناسب برای ارزیابی اثرات مدیریت و کاربری اراضی بر کیفیت خاک شناخته شده‌اند. از جمله آنزیم‌های خاک می‌توان به آنزیم فسفاتاز اشاره نمود. آنزیم فسفاتاز هیدرولیزکننده استرهای فسفات آلی به ارتوفسفات است و بنابراین بخش مهمی از زنجیره بین فسفر معدنی و بخش آلی را در خاک می‌سازد (۲). فعالیت آنزیمی با متغیرهای محیطی نظیر رطوبت، دما، میزان ماده آلی، نوع کاربری اراضی و پراکنش باکتری‌ها تغییر می‌کند (۳۰).

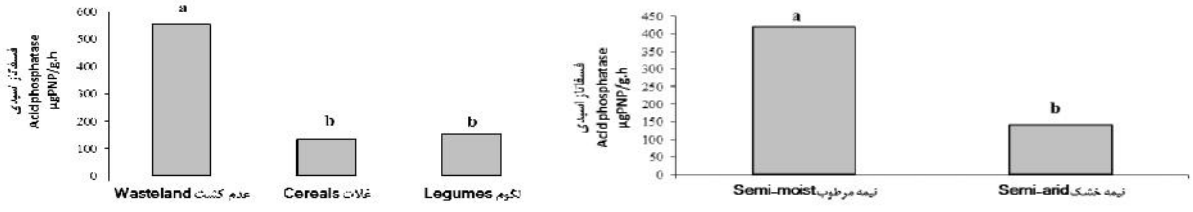
بر اساس جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) فعالیت فسفاتاز اسیدی تحت تاثیر کاربری، اقلیم و اثر متقابل آنها بوده است اما فسفاتاز قلیایی تنها در سطح ۱٪ در تحت تاثیر اثرات متقابل کاربری و اقلیم بوده است. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان فسفاتاز اسیدی در اقلیم نیمه‌مرطوب (۴۳۰ µg pNP/g.h) نسبت به نیمه‌خشک (µg ۱۵۰pNP/g.h) به طور معنی‌داری در سطح ۱٪ افزایش داشته است، مقایسه میانگین‌ها نشان داد که این افزایش نزدیک به سه برابر بوده است. بالا بودن فعالیت این آنزیم در اقلیم نیمه‌مرطوب حاکی از تبعیت این آنزیم از رطوبت خاک و به تبع آن پوشش گیاهی بهتر و میزان مواد آلی بیشتر در اقلیم نیمه‌مرطوب می‌باشد که خود باعث تحریک و افزایش فعالیت ریزجانداران در خاک و افزایش محتوای آنزیمی خاک می‌شود (شکل ۵-الف). از لحاظ کاربری نیز کشت و کار باعث کاهش میزان فسفاتاز اسیدی گردیده و بالاترین میزان فسفاتاز اسیدی در شرایط عدم‌کشت مشاهده شده است که این میزان به طوری معنی‌داری از میزان فسفاتاز اسیدی تحت کاربری لگوم و غلات بیشتر می‌باشد (افزایش نزدیک به ۲۷۰ درصد). این در حالی است که بین دو کاربری لگوم و غلات از لحاظ میزان اسید فسفاتاز اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (شکل ۵-ب). پایین بودن میزان آنزیم فسفاتاز تحت دو کاربری لگوم و غلات نسبت به شرایط عدم‌کشت در اقلیم نیمه‌مرطوب نشان از تاثیر منفی دخالت انسانی در اکوسیستم طبیعی و شرایط مطلوب خاک و به وجود آمدن تغییرات بیولوژیکی نامناسب می‌باشد. همچنین کشت و کار و عملیات خاک‌ورزی (بطور مثال عملیات شخم) باعث تسریع تجزیه‌ی مواد آلی و کاهش میزان مواد آلی در خاک می‌گردد که باعث کاهش جمعیت میکروبی در خاک و کاهش محتوی آنزیمی فسفاتاز می‌گردد (۱).

تفاوت در جمعیت‌های میکروبی و فعالیت‌های آنزیمی خاک در سیستم‌های بدون خاک‌ورزی و خاک‌ورزی مرسوم، با تغییر در مقدار آب، کربن، نیتروژن آلی و pH خاک مرتبط است (۷).

در مجموع بالاترین میزان آنزیم فسفاتاز اسیدی در اقلیم نیمه‌مرطوب و شرایط عدم کشت و پایین‌ترین میزان آنزیم در اقلیم نیمه‌خشک و تحت کاربری لگوم مشاهده شده است (شکل ۶-الف).

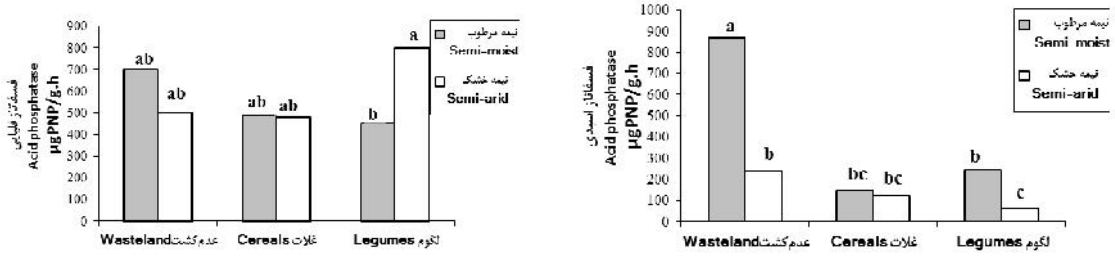
از طرف دیگر، نتایج این تحقیق نشان داد که میزان تغییرات آنزیم فسفاتاز قلیایی تحت اثر متقابل دو اقلیم مذکور و سه کاربری مختلف بوده است که بالاترین میزان آنزیم فسفاتاز قلیایی تحت کاربری لگوم و اقلیم نیمه‌خشک مشاهده شد، شاید بتوان pH بالاتر خاک در اقلیم نیمه‌خشک را دلیل این امر دانست (شکل ۶-ب). حمایت ریزوسفر گیاهان لگوم از ریزجانداران مولد فسفاتاز قلیایی شاید دلیل دیگری بر بالا بودن این پارامتر در کاربری لگوم نسبت به سایر کاربری‌ها بوده است.

شهبازی و همکاران (۲۸) بعد از نمونه‌برداری از خاکهای تحت کاربری باغات سیب، مرتع و زراعت در منطقه میرآباد نقده، اقدام به بررسی برخی از ویژگی‌های زیستی خاک از جمله بیوماس میکروبی و فعالیت آنزیمی خاک (نظیر فسفاتاز قلیایی و اوره‌آز) نمودند.



شکل ۵- تغییرات فسفاتاز اسیدی در دو اقلیم متفاوت (الف) و تحت سه کاربری مختلف (ب)

Figure 5- Acid phosphatase activity changes in two different climates (a) and three different land uses (b)



شکل ٦- اثر متقابل اقلیم و کاربری بر فعالیت فسفاتاز اسیدی (الف) و فسفاتاز قلیایی خاک (ب)

Figure 6- Interaction effect of climate and land uses on soil acidic phosphatase (a) and alkaline phosphatase activity (b)

نتایج مطالعه آنها نشان داد که در کاربری مرتع، بیوماس میکروبی نسبت به دو کاربری دیگر بیشتر می‌باشد همچنین میانگین فعالیت فسفاتاز قلیایی در کاربری مرتع، باغ سیب و زراعت به ترتیب µg pNP/g.h ۲۶۵۹/۱، ۱۱۸۶/۷ و ۷۴۶/۸ به دست آمد.

مونریل و برگ استرام (۲۲) نشان دادند که سطوح فعالیت آنزیم-های سولفاتاز و فسفاتاز در اراضی تحت سیستم حداقل خاک‌ورزی، بیشتر از اراضی تحت خاک‌ورزی شدید می‌باشد و این تفاوت با حفظ بقایای گیاهی در لایه سطحی خاک و یا حفظ آنزیم‌های برون سلولی داخل خاکدانه‌های پایدارتر در اراضی تحت سیستم حداقل خاک‌ورزی مرتبط است. همچنین نتایج پاندی و همکاران نشان داد (۲۴) که کاهش عملیات شخم باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های خاک و سلامت بیشتر خاک می‌شود. گوپتا و جرمایدا (۱۵) خاک‌هایی را که ۶۹ سال سابقه کشت داشتند، با علفزارهای مجاور مقایسه کردند و مشاهده نمودند کشت و کار باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز و آریل‌سولفاتاز به ترتیب به میزان ۴۹ و ۶۵ درصد شده است.

در مطالعه‌ی دیگری که توسط چاوشی و همکاران (۱) انجام پذیرفت، آنها به بررسی فعالیت فسفاتاز و تغییرات آن در کاربری‌های مختلف در اراضی شیبدار اطراف شهرستان سمیرم پرداختند. در این مطالعه سه زمین‌نما تحت کاربری‌های باغ سیب، مرتع و کشت دیم انتخاب شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فسفاتاز، مواد آلی و تنفس میکروبی نشان داد که اراضی تحت کاشت درختان سیب و اراضی زیرکشت دیم به ترتیب دارای بیشترین و کمترین مقدار کربن آلی، فعالیت میکروبی و آنزیمی بودند و اراضی مرتعی مقادیر حدواسط را به خود اختصاص دادند. از طرف دیگر خاک زمین‌نماهای مورد مطالعه در قسمت پایه شیب دارای بیشترین و در قسمت‌های قله و شانه شیب دارای کمترین فعالیت آنزیمی بودند.

بندیک و دیک (۹) بیان داشتند که علفزارهای دائمی و مراتع بکر بخاطر فقدان خاک‌ورزی و تأثیر ریزوسفر، فعالیت آنزیمی بیشتری نسبت به مناطق کشت شده دارند. در کشت‌زار دیم، خاک‌ورزی شدید و در نتیجه کاهش مواد آلی، عوامل مهمی در کاهش تنفس میکروبی و فعالیت آنزیم فسفاتاز می‌باشد. از طرف دیگر دوره‌ی کوتاه رشد فعال ریشه در طول سال، بارندگی کم و استفاده از کودهای معدنی فسفر از جمله عوامل دیگری هستند که همگی در فعالیت کمتر آنزیم فسفاتاز و مقدار تنفس میکروبی در اراضی دیم نسبت به اراضی مرتعی و باغ‌ها مؤثر می‌باشد. تغییرات فعالیت فسفاتازی خاک متاثر از شرایطی نظیرکوددهی، عامل شوری و غیره می‌باشد به صورتی که نتایج تحقیقات زوبتز نشان داد که در خاک‌های با سابقه کشت ۶ سال، استفاده از کود معدنی فسفر باعث افزایش غلظت فسفر محلول و کاهش فعالیت آنزیم فسفاتاز گردیده است (۱۱). لیانگ و همکاران (۲۰) در آزمایشی نشان دادند که کاربرد کود دامی به طور معنی‌داری فعالیت شش آنزیم: اینورتاز، بتاگلوکوزیداز، اوره آز، اسید فسفاتاز، فسفاتاز قلیایی و دهیدروژناز را در خاک در تمامی اندازه‌های اجزای خاک افزایش می‌دهد. همچنین قول‌لرعطا و همکاران (۶) کاهش فعالیت آنزیم های فسفاتاز قلیایی و اسیدی را با افزایش فسفر و سطوح شوری گزارش کردند.

در بررسی اثرخصوصیات فیزیکوشیمیایی بر میزان آنزیم فسفاتاز اسیدی، روابط همبستگی که به دست آمد، را می‌توان در جدول ۳ خلاصه نمود:

بین میزان آنزیم فسفاتاز اسیدی و میزان کربن آلی خاک در سطح ۱٪ همبستگی مثبت معنی‌داری مشاهده شد. این همبستگی نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم فسفاتاز تابع میزان کربن آلی خاک است. بنابراین در اقلیم نیمه‌مرطوب میزان آنزیم فسفاتاز اسیدی نسبت به اقلیم نیمه‌خشک بیشتر بود. همچنین میزان آنزیم فسفاتاز اسیدی با میزان سیلت و رس همبستگی مثبت و با میزان کربنات‌کلسیم خاک همبستگی منفی معنی‌داری در سطح ۵٪ نشان داد. محققین بر این عقیده‌اند که بیشتر آنزیم‌های آزاد شده در ریزوسفر و خاک فقط برای مدت کوتاهی باقی می‌مانند و بلافاصله تجزیه می‌شوند مگر آنکه روی سطوح رس‌ها و کلوئیدها جذب شده و یا با کلوئیدهای هومیک به صورت کمپلکس نگهداری شوند.

جدول ۳- رگرسیون گام به گام متغیرهای فیزیکی و شیمیایی خاک بر روی اسید فسفاتاز و فسفاتاز قلیایی

Table 3- Stepwise regression of soil physicochemical variables on acid and alkaline phosphatases

متغیر وابسته Dependent variable	متغیرهای مستقل مدل Independent variable	ضریب رگرسیون جزء استاندارد شده Standardized partial regression coefficient	خطای استاندارد Standard Error	خطای آلفا (P-value)
اسید فسفاتاز Acid phosphatase	Organic carbon	0.64	0.173	0.002
	$CaCO_3$	−0.21	0.100	0.05
	Clay	0.18	0.081	0.04
	Silt	0.35	0.167	0.05
	pH	0.16	0.109	0.159
		ضریب تبیین تصحیح شده: 0.92 Adjusted coefficient of determination		
فسفاتاز قلیایی Alkaline phosphatase	Clay	0.42	0.162	0.018
	Silt	0.94	0.200	0.0002
	pH	0.76	0.187	0.0007
		ضریب تبیین تصحیح شده: 0.46 Adjusted coefficient of determination		

بنابراین میزان رس و سیلت خاک از طریق پایداری مولکول آنزیم فسفاتاز در خاک باعث افزایش فعالیت این آنزیم می‌شود (۳۰). اگرچه کربنات کلسیم موجود در خاک بر فراهمی فسفر آزاد شده از سوبستراهای آلی متاثر از فسفاتازهای اسیدی تاثیرگذار است و باعث تثبیت و کاهش فراهمی آن می‌شود اما به نظر با اثراتی که حضور آهک در میزان pH خاک دارد، شرایط بهینه از نظر pH را برای فعالیت این آنزیم فراهم نساخته و شاهد رابطه همبستگی منفی این دو پارامتر نسبت به هم هستیم.

در بررسی اثرخصوصیات فیزیکوشیمیایی بر میزان آنزیم فسفاتاز قلیایی خاک روابط همبستگی را می‌توان به صورت جدول ۳ خلاصه نمود. در بررسی اثر خصوصیات فیزیکوشیمیایی بر میزان آنزیم فسفاتاز قلیایی، بین میزان آنزیم فسفاتاز قلیایی و میزان سیلت، pH خاک (در سطح ۱٪) و رس (در سطح ۵٪) همبستگی مثبت معنی‌داری مشاهده شد. همبستگی مثبت بین میزان آنزیم فسفاتاز قلیایی و pH خاک نشان می‌دهد که با افزایش pH خاک شرایط برای فعالیت این آنزیم مساعدتر شده است چرا که pH بهینه بر خلاف فسفاتازهای اسیدی (۶-۵) در محدوده ۸ می‌باشد (۲). همانند آنزیم فسفاتاز اسیدی، ذرات رس و سیلت خاک از طریق پایداری مولکول آنزیم فسفاتاز در خاک باعث افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی شده است.

نتیجه‌گیری

تولید اسیدهای آلی و آنزیم‌های فسفاتاز از مکانیسم‌های اصلی درگیر در انحلال و رهاسازی فسفر خاک می‌باشد. حضور باکتری‌های حل‌کننده فسفات و همچنین فعالیت فسفاتازی خاک متأثر از شرایط حاکم بر خاک از جمله شرایط اقلیمی، نوع پوشش گیاهی و حتی نوع کاربری اراضی به لحاظ کشت گیاهان مختلف می‌باشد. برای درک روابط موجود و با توجه به اهمیت و جایگاه موضوع، در این مطالعه از دو اقلیم متفاوت نیمه‌مرطوب (منطقه فندقلو- استان اردبیل) و نیمه-خشک (منطقه نمین- اردبیل) نمونه‌های خاک از زمین‌هایی با کاربری تحت کشت گیاهان لگوم، غلات و بدون‌کشت نمونه‌برداری شد و فعالیت فسفاتازی (اسیدی و قلیایی) نمونه‌های خاک مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفت که میزان آنزیم فسفاتاز اسیدی در اقلیم نیمه مرطوب و شرایط عدم‌کشت (یعنی زمین‌های با کاربری مرتع) بیشترین بود. آنزیم فسفاتاز قلیایی نیز در کاربری کشت لگوم و اقلیم نیمه‌خشک بیشترین مقدار را دارا بود. بررسی پراکنش باکتری‌های حل‌کننده فسفات با استفاده از محیط‌های اسپربر معدنی و آلی صورت پذیرفت به صورتی‌که شمارش و گزینش باکتری‌ها در محیط اسپربر معدنی با توجه به تولید هاله شفاف در حضور تری‌کلسیم فسفات و در محیط اسپربر آلی (اینوزیتول هگزا فسفریک اسید بعلاوه BCIP) با تولید فنوتیپ آبی برای کلنی‌های رشد یافته انجام گرفت. گرچه تعداد کل باکتریها در کاربری لگوم و اقلیم نیمه‌خشک بیشترین به دست آمد، اما تعداد باکتریهای حل‌کننده فسفات در شرایط عدم کشت و اقلیم نیمه‌مرطوب یعنی زمین‌های مرتعی حداکثر بود. نتایج حاکی از آن بود که بین آنزیم فسفاتاز اسیدی و ویژگی‌های خاک از قبیل کربن آلی، کربنات کلسیم، درصد رس و سیلت خاک روابط معنی‌داری وجود دارد. همچنین در مورد فعالیت فسفاتاز قلیایی خاک و pH، سیلت و رس خاک روابط معنی‌داری مشاهده شد.

منابع

1- Chavoshi A., Khademi H., and Norbakhsh F. 2004. Land usage type and Land Scape position effects on alkaline phosphatase activity. Agriculture Science, 35 (3): 741-751. (in Persian with English abstract)
2- Sarikhani M.R., and Malboobi M.A. 2011. Phytases: enzymology, molecular and biochemical characteristic and applications. Journal of Agricultural Biotechnology. 2 (2): 13-39. (in Persian with English abstract)
3- Sarikhani M.R., Malboobi. M.A., and Ebrahimi M. 2014. Phosphate solubilizing bacteria: Isolation of Bacteria and Phosphate Solubilizing Genes, Mechanism and Genetics of Phosphate Solubilization. Journal of Agricultural Biotechnology. 6(1): 76-110. (in Persian with English abstract)
4- Fallah Nosrat Abad A. 2012. Evaluation of relationships between soil properties and total bacteria and fungi in soils of Guilan. Journal of Soil Management and Sustainable Production. 2 (2): 49-68. (in Persian with English abstract)
5- Fallah Nosrat Abad A., Rahimian H., and Saleh Rastin N. 2001. Study of phosphate solubilizing microorganism's distribution in some soils of Gilan province, Water and Soil Science, 17 (2): 345-383. (in Persian with English abstract)
6- Gollar Ata M., Raiese F., and Nadian H. 2008. Salinity and phosphorus interactions on growth, yield and nutrient uptake by berseem clover (*Trifolium alexandrinum* L.). Journal of Agronomic Researchs of Iran, 22 (2): 217-223. (in Persian with English abstract)
7- Amador J.A., Glucksman A.M., Lyons J.B. and Gorres J.H. 1997. Spatial distribution of soil phosphatase activity within a riparian forest. Soil Science, 162 (11): 808-823.
8- Baby U.I., Tensing Baliah N., Ponmurugan P. and Premkumar R. 2001. Population dynamics of nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria in tea Soil. UpASI Tea Res. Found. Newsletter, 10:4.
9- Bandick A.K., and Dick R.P. 1999. Field management effects on soil en. zyme activities. Soil Biology Biochemistry 31: 1471-1479.
10- Cui J., and Holden N.M. 2015. The relationship between soil microbial activity and microbial biomass, soil structure and grassland management. Soil and Tillage Research, 146A: 32‑38.
11- Dick R.P., Doran J.W., Coleman D.C., Bezdicek D.F., and Stewart B.A. 1994. Soil enzyme activities as indicators of soil quality. American Journal of Soil Science Society. Special Publication, 35: 107-124.
12- Dick R.P., Myrold D.D., and Kerle E.A. 1988. Microbial biomass and soil enzyme activities in compacted and rehabilitated Skil trail soil. American Journal of Soil Science Society, 52: 512-516.
13- Fageria N.K. 2009. The use of nutrients in crop plants. Taylor and Francis Group, LLC. New York.
14- Gee G.W., and Bauder J.W. 1986. Particle size analysis. Methods of Soil Analysis. Part1, Physical and mineralogical methods. American Society Agronomy Publication. 383-411.
15- Gupta V.V.S.R., and Germida J.J. 1988. Distribution of microbial biomass and its activity in different soil aggregate size classes as affected by cultivation. Soil Biol. Biochem. 20: 777-786.
16- Han X.M., Wang R.Q., Liu J., Wang M.C., Zhou J., and Guo W.H. 2007. Effects of vegetation type on soil microbial community structure and catabolic diversity assessed by polyphasic methods in North China. Journal of Environmental Sciences, 19(10): 1228‑1234.
17- Hedlund K. 2002. Soil microbial community structure in relation to vegetation management on former agricultural land. Soil Biology and Biochemistry, 34: 1299–1307.
18- Johnson N.C., Copeland P.J., Crookston R.K., and Pfleger F.L. 1992. Mycorrhizae: Possible explanation for yield decline with continuous corn and soybean. Agron. J., 84: 387-390.
19- Khan A., Jilani G., Akhtar M.S., Saqlan Naqvi S.M., and Rasheed M. 2009. Phosphorus solubilizing bacteria: Occurrence, Mechanisms and their role in crop production. Agricultural biology Science, 1(11): 48-58.
20- Liang Q., Chen H., Gong Y., Yang H., Fan M., and Kuzyakov Y. 2014. Effects of 15 years of manure and mineral fertilizers on enzyme activities in particle-size fractions in North China Plain soil. European Journal of Soil Biology, 60: 112-119.
21- Malboobi M.A., Owlia P., Behbahani M., Sarokhani E., Moradi S., Yakhchali B., Deljou A., and Morabbi Heravi K. 2009. Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25: 1471–1477.
22- Monreal C.M., and Bergstrom D.W. 2000. Soil enzymatic factors expressing the influence of land use, tillage system and texture on soil biochemical quality. Canadian Journal of Soil Science 80: 419-428.
23- Omidi H., Tahmasebi Z., Torabi H., and Miransari M. 2008. Soil enzyme activities and available P and Zn as affected by tillage practices, Canola (*Brassica napus* L.) cultivars and planting dates. European Journal of Soil Bioloy, 44: 443-450.
24- Pandey D., Agrawal M., and Bohra J.S. 2014. Effects of conventional tillage and no tillage permutations on extracellular soil enzyme activities and microbial biomass under rice cultivation. Soil and Tillage Research, 136: 51-60.

25- Ponmurgan P., and Gopi. C. 2006. Distributation pattern and screening of phosphate solubilizing bacteria selected form different food and forage crops. Journal of Agronomy, 5(4): 600-604.
26- Rodrıguez H., and Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances, 17: 319 –339.
27- Sarikhani M.R., Malboobi M.A., Aliasgharzad N., Greiner R., and Yakhchali. 2010. Functional screening of phosphatase-encoding gene from bacterial sources. Iranian Journal of Biotechnology 8(4): 275-279.
28- Shahbazi F., Aliasgharzad N., Ebrahimzad S.A., and Najafi N. 2013. Geostatistical analysis for predicting soil biological maps under different scenarios of land use. European Journal of Soil Biology, Volume 55. 20-27.
29- Sperber J.I. 1985. The incidence of apatite solubilizing organisms in the rhizosphere. Australian Journal of Agricultural research, 9: 778-781.
30- Tabatabai M.A., Weave R.W., Angle S., Bottomley P., Bezdicek D., Smith S., Tabatabai A., and Wollum A. 1994. Soil enzyme, Methods in soil Analysis, part 2: Microbiological and Biochemical properties.
31- Wei K., Chen Z.H., Zhang X.P., Liang W.J. and Chen L.J. 2014. Tillage effects on phosphorus composition and phosphatase activities in soil aggregates. Geoderma, 217-218: 37-44.
32- Xue-mei H., Ren-qing W., Jian L., Meng-cheng W., Juan Z., and Wei-hua1 G. 2007. Effects of vegetation type on soil microbial community structure and diversity assessed by polyphasic methods in North China. J. Environ. Sci., 19: 228–1234.

Journal of Water and Soil
Vol. 29, No. 6, Jan.-Feb. 2016, p. 1662-1673

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۹، شماره ۶، بهمن –اسفند ۱۳۹۴، ص. ۱۶۷۳-۱۶۶۲

Distribution of Phosphate Solubilizing Bacteria and Soil Phosphatase Activity in Different Land Uses

M. R. Sarikhani[1*]- N. Chalabianlu[2]- S. S. Alavikia[3]

Received: 17-10-2014
Accepted: 11-05-2015

Introduction: Phosphorous is one of the essential macronutrients for plant growth and development but its mobility in soil is very low. The utilization of the soil biological potential, in particular phosphate solubilizing bacteria, is an efficient way which can be used for exploiting available sources of phosphorous in the soil. The principal mechanism for mineral phosphate solubilization is the production of organic acid, and acid and alkaline phosphatases play a major role in the mineralization of organic phosphorous in the soil. Presence and distribution of phosphate solubilizing bacteria in the soil and soil phosphatase activities is influenced by soil conditions such as climate, soil type, vegetation and land uses. In order to understand the relationships and considering the importance of the subject, the soil samples were chosen from two different climates; semi-moist (Fandoghlou-Ardabil) and semi-arid (Namin- Ardabil) under culture of legumes, cereals and uncultivated areas, in this experiment.

Materials and Methods: In order to study the effects of different land uses, climate conditions and soil physicochemical properties on phosphate solubilizing microorganism (PSM) distribiution and soil acid and alkaline phosphatase activity, a factorial experiment based on completely randomized design was performed with considering three different land uses (including legumes, cereals and wasteland) and two climate conditions (semi-moist: Fandoghlu- Ardabil and semi-arid: Namin-Ardabil). Four composite soil samples (0-25 cm) were taken from each land uses. Finally, a total number of 24 soil samples were used to enumerate phosphate solubilizng bacteria and evaluate soil phosphatase activities. The enumeration and selection of bacteria in the mineral Sperber medium was done by attention to the clear zone production in the presence of tri-calcium phosphate and in organic sperber (IHP+BCIP) due to blue phenotype of grown colonies. Also, phosphatase activity of soil samples was assessed based on the usual methods for phosphatase assessment. Moreover, after the evaluation of the physicochemical properties of the soil samples and soil enzyme activities and PSB distribution, all data were analyzed by SPSS and MSTAT-C softwares.

Results and Discussion: The Sperber mediums containing mineral and organic phosphates were used in counting the number of PSB. According to the results, the highest total number of bacteria (>6 log cfu/g) was gained in legume land uses in both climate conditions. Furthermore, the highest numbers of organic and mineral phosphate solubilizing bacteria (5.3 log cfu/g) were counted in samples taken from pastures, in other word in soil samples which were collected from uncultured land in semi-moist climate conditions. Enzyme assay showed that acid phosphatase activity (430 µg pNP/g.h) in semi-moist climate conditions were increased three times in comparison to semi-arid climate conditions. Perhaps, this increase can be explained by parameters such as high moisture content and organic matter which can cause an increase in the number of bacteria and soil enzyme content. Our results showed that, alkaline phosphatase activities (APAs) were affectd by interaction effects of land uses and climate, wherein the highest APA (810 µg pNP/g.h) was measured in legume samples in semi-arid climate conditions. The pH of these soil samples and supporting legume rhizospheres from AP producing microorganisms may be the reasons of this increment.

Conclusion: The highest activity of the soil acid phosphatase was observed in soil samples which were taken from uncultivated area under semi-moist climate conditions (namely pastures) (866.59 µgPNP/g.h) while the soil alkaline phosphatase activity had high mean in legume land use soil samples under semi-arid climate conditions (795.15 µPNP/g.h). The total number of bacteria was the highest in semi-arid leguminous land use (14.13×10^6 cfu/g) but the total numbers of solubilizing bacteria in both mineral and organic media were the highest in semi-moist uncultivated area (respectively 1.9×10^6 and 1.48×10^6cfu/g).

Keywords: Acid Phosphatase, Alkaline Phosphatase, Phosphate, Phosphate Solubilizing Bacteria

1 and 2- Assistant Professor and Former M.Sc Student of Soil Biology and Biotechnology, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
(*Corresponding Author Email: rsarikhani@yahoo.com)
3- Assistant Professor of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran