Archive of SID

مجله کشاورزی بوم‌شناختی ۶ (۱) (۱۳۹۵) ۲۲۶- ۲۱۳

شناسایی و افزایش ریزموجودهای خاکزی با قابلیت استفاده در حفاظت خاک و آب

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

[۱]گروه مهندسی آبخیزداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرّس، مازندران، ایران.

[۲]گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرّس، مازندران، ایران.

[۳]گروه خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرّس، تهران، ایران.

[*]نویسنده مسئول: sadeghi@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۷/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۱۹

خیرفام، ح.، ب. زارعی دارکی، س. ح. ر. صادقی و م. همایی. ۱۳۹۵. شناسایی و افزایش ریزموجودهای خاکزی با قابلیت استفاده در حفاظت خاک و آب. ۶ (۱): ۲۲۶- ۲۱۳.

سابقه و هدف: تخریب اراضی و به‌سبب آن کاهش کمّی و کیفی خاک و آب از چالش‌های اساسی در دستیابی به توسعه‌ی پایدار در کشورهای در حال توسعه می‌باشد. در سال‌های اخیر نقش ریزموجودهای خاکزی در بهبود ویژگی‌های خاک و در نتیجه کاهش حساسیت به تخریب و فرسایش اراضی مورد تأیید قرار گرفته است. از طرفی تلقیح مستقیم ریزموجودها به خاک با هدف افزایش عملکرد آن‌ها می‌تواند راهکاری نوین در حفاظت منابع آب و خاک باشد. لذا شناسایی، افزایش (تکثیر) و کاربرد در سطوح گسترده از باکتری‌ها و سیانوباکترهای مؤثر در کاهش هدررفت خاک و رواناب ضروری می‌باشد. بر این پایه، این پژوهش با هدف استخراج، شناسایی و افزایش مناسب‌ترین باکتری‌ها و سیانوباکترهای بومی خاک در حفاظت خاک و آب برنامه‌ریزی شد.

مواد و روش‌ها: به‌منظور استخراج و شناسایی باکتری‌ها و سیانوباکترها، نمونه‌برداری از خاک سطحی منطقه حساس به فرسایش حواشی جاده مرزن‌آباد-کندلوس انجام گرفت. کشت و استخراج باکتری‌ها و سیانوباکترهای موجود در بانک ریزموجود خاک برابر با دستورکارهای آزمایشگاهی به‌ترتیب با استفاده از محیط‌های کشت عمومی TSA و Nutrient Agar؛ و Bold Basal و CHU10 انجام شد. باکتری‌ها و سیانوباکترهای استخراج شده با بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی در زیر میکروسکوپ نوری در حد جنس شناسایی شدند. سپس مناسب ترین آن‌ها بر اساس معیارهای مؤثر در کاهش هدررفت خاک و رواناب انتخاب و در نهایت پس از خالص‌سازی با استفاده از محیط‌های کشت اختصاصی منحصر به هر ریزموجود، باکتری‌ها و سیانوباکترها به شمار و حجم زیاد تکثیر شدند.

نتایج و بحث: نتایج نشان داد که در بانک ریزموجودهای خاک منطقه، باکتری‌های *Arthrobacter* sp.، *Pseudomonas* sp.، *Azotobacter* sp.، *Diplococcus* sp.، *Streptococcus* sp.، *Bacillus* sp.، سیانوباکترهای *Nostoc* sp.، *Oscillatoria* sp.، *Lyngbya* sp.، *Phormidium* sp.، *Aphanothece* sp. و همچنین تاکسون (آرایه) Diatoms و Xanthophyta شناسایی شدند. بر پایه معیارهایی از جمله توان زنده‌مانی، افزایش و فعالیت در شرایط نامناسب، توان ترشح مواد چسبنده‌ی پلی‌ساکاریدی، رشد شبکه‌ای، تشکیل ریز و بزرگ ساختار، تبدیل مواد غذایی به حالت‌های قابل استفاده توسط ریزموجودها و همچنین بیماریزا نبودن برای انسان و دیگر موجودهای جنس *Azotobacter* sp. به‌عنوان باکتری آزادزی و تثبیت‌کننده نیتروژن و گروه *Bacillus subtilis* با توانایی زیاد در ترشح پلی‌ساکارید از میان باکتری‌ها و *Nostoc* sp. و *Oscillatoria* sp. به‌عنوان تثبیت‌کننده نیتروژن و ترشح‌کننده پلی‌ساکارید از بین سیانوباکترها به‌عنوان جنس‌های با قابلیت بالا در حفاظت خاک و آب انتخاب شدند. از طرفی جمعیّت باکتری‌ها و سیانوباکترها به‌ترتیب از

www.SID.ir

Archive of SID

$۶/۴\times۱۰^{۴}$ و $۱/۳\times۱۰^{۴}$ عدد در یک گرم خاک مادری منطقه به ۲×۱۰^{۱۵} و $۶/۲۵\times۱۰^{۱۴}$ عدد در یک گرم پس از فرآیند افزایش فزونی پیدا کردند. لذا با تلقیح و افزایش جمعیّت باکتری‌ها و سیانوباکترهای یادشده، پویایی میکروبی پوسته‌ی زیستی خاک افزایش یافته و ضمن بهبود ویژگی‌های شیمیایی خاک، با اتصال ذرات خاک با ترشحات پلی‌ساکاریدی و افزایش فضای متخلخل خاک باعث کاهش هدررفت خاک و آب خواهند شد. همچنین امکان افزایش باکتری‌ها و سیانوباکترها در حجم قابل تلقیح به سطوح گسترده به‌عنوان تثبیت‌کننده زیستی و پایدار خاک تأیید شد. بر پایه ارزیابی اقتصادی، هزینه‌ی تولید و تلقیح باکتری‌ها و سیانوباکترها در اراضی گسترده با هواپیماهای سم‌پاشی، افزون بر امکان‌پذیری و صرفه‌جویی در زمان، نسبت به تثبیت‌کننده‌های متداول طبیعی و مصنوعی به‌ترتیب ۲ و ۲۴ برابر کمتر خواهد بود.

نتیجه‌گیری: بنابر نتایج این پژوهش، امکان شناسایی و افزایش ریزموجودهای خاکزی سودمند از خاک حساس به فرسایش در حفاظت خاک و آب تأیید شد. لذا کاربرد ترکیبی از باکتری‌ها و سیانوباکترهای انتخاب و افزایش شده در این پژوهش به‌صورت تلقیح در سطوح گسترده می‌تواند باعث افزایش چسبندگی ذرات خاک، پایداری خاک‌دانه‌ها، تخلخل و نفوذپذیری و در نتیجه حفاظت منابع خاک و آب شوند.

واژه‌های کلیدی: پوسته‌ی زیستی خاک، افزودنی‌های خاک، ریزموجودهای بانک خاک، مدیریت خاک و آب

مقدمه

امروزه فرسایش خاک و رسوب ناشی از تولید آن به‌عنوان چالشی مهم در بحث توسعه‌ی پایدار و تهدیدی اساسی در بوم‌سازگان‌های[1] امروزی تلقی می‌شود (Sadeghi *et al.*, 2009). لذا راه‌کارهای مدیریتی مستقیم و غیرمستقیم چندی به منظور کاهش میزان و تأثیر سوء فرسایش از نخستین مراحل آغاز تا رسوب‌گذاری ارائه و اجرا شده است. لیکن تجربه‌های علمی و عملی گویای آن است که کنترل فرسایش در مراحل اولیه آغاز آن در سطح دامنه‌ها، مؤثرترین اقدام حفاظتی می‌باشد (Toy *et al.*, 2002). بر همین پایه استفاده از تثبیت‌کننده‌ها و افزودنی‌های خاک از جمله مواد طبیعی، آلی و مصنوعی در سطح دامنه‌ها به منظور افزایش حد آستانه‌ی فرسایش‌پذیری و کاهش فرسایش خاک در سطوح خاکی استفاده و یا آزمایش شده است(Sadeghi *et al.*, 2013; Sadeghi *et al.*, 2015). با این حال محدودیت‌هایی همچون ناپایداری و موقتی بودن افزودنی‌ها، هزینه‌بر بودن، محدودیت منابع و همچنین داشتن تأثیر زیانبار زیست‌محیطی و بهداشتی، استفاده از آن‌ها را تا حدودی به چالش کشیده است (Epelde *et al.*, 2013). لذا با توجه به محدودیت‌های موجود برای به کارگیری تثبیت‌کننده‌ها، در سال‌های اخیر پژوهشگران بر جایگزینی روش‌های زیستی به‌جای روش‌های مرسوم تأکید می‌کنند، تا افزون بر رفع کاستی‌های مربوط به استفاده از تثبیت‌کننده‌های متداول، دارای میزان اثربخشی مناسب‌تری بوده و کم‌ترین تأثیر سوء زیست‌محیطی را داشته باشند (Kheirfam *et al.*, 2014).

از آنجایی‌که سطح خاک با ضخامت چند میلی‌متر تا چندین سانتی‌متر محل تجمع موجودهای خاکزی از جمله کرم‌های خاکی، حشرات، باکتری‌ها، خزه‌ها، سیانوباکترها، جلبک‌ها، قارچ‌ها و گلسنگ‌ها بوده و به‌عنوان مهندسان بوم‌سازگان، سطح زیستی خاک[2] (Büdel *et al.*, 2003) را تشکیل می‌دهند، لذا زمینه‌سازی رشد و حمایت از آن‌ها از طریق تغییر شرایط سطح خاک، تأثیر به‌سزایی در پایداری خاک و درنتیجه رویارویی با فرسایش خاک خواهد داشت (Bowker *et al.*, 2006). ریزموجودهای پوسته‌ی زیستی خاک افزون بر ترشح مواد چسبنده‌ی پلی‌ساکاریدی[3] و چسبیدگی ذرات ریز خاک و تشکیل ریزساختار[4] (محیط)، باعث ارتباط و پیوستگی مجموعه‌ای از ریزموجودهای خاکزی با هم‌دیگر به‌صورت ریز شبکه‌ای و تشکیل یک بزرگ ساختار خواهد شد(Dorioz *et al.*, 1993). شرایط به وجود آمده منجر به اصلاح ویژگی‌های ناهمواری سطحی خاک، افزایش تخلخل، ظرفیت نگه‌داشت آب، بهبود و

[1] Ecosystems

[2] Biological soil crust
[3] Polysaccharide secretions
[4] Micro-structure

www.SID.ir

Archive of SID

پایداری خاک و افزایش تجمع مواد مغذی و حاصل‌خیزی خاک (Rodríguez-Caballero *et al.*, 2012) می‌شود. از سویی ریزموجودهای خاکزی از نظر شاخص‌های تغذیه‌ای به دو گروه تغذیه کننده از مواد آلی خاک (دگرپرور)[1] و با فتوسنتز (خودپرور)[2] طبقه‌بندی شده‌اند (Blagodatskaya and Kuzyakov, 2013). در بین ریزموجودهای خاکزی، سیانوباکترها و باکتری‌ها به‌دلیل گستردگی سطحی و توان افزایش و ترشح پلی‌ساکارید بالا، فراوانی و سازگاری با شرایط نامناسب محیطی، به‌عنوان مؤثرترین و مهم‌ترین ریزموجودهای خاکزی شناخته می‌شوند (HuiXia *et al.*, 2007). همچنین باکتری‌ها و سیانوباکترهای خودتغذیه به سبب سامانه تغذیه‌ایی فتوسنتزی، باعث تبدیل مواد کانی (معدنی) به مواد آلی می‌شوند (Wang*et al.*, 2009) که به نوعی با تأمین مواد غذایی ریزموجودهای خاکزی دگرپرور، بستر افزایش و فعالیت بیش‌تر آن‌ها را فراهم می‌کنند. لیکن جمعیت ریزموجودهای خاکزی خودپرور به‌صورت طبیعی در سطح زیستی خاک‌های فقیر کمتر می‌باشد. به همین دلیل عملکرد ریزموجودهای خاکزی در مجموع در خاک‌های تخریب یافته و یا با کمبود مواد آلی در شرایط معمولی مطلوب نمی‌باشد.

در سال‌های اخیر بررسی تأثیر ریزموجودهای خاکزی بر مؤلفه‌های مختلف پایداری و تثبیت خاک و همچنین شناسایی و افزایش مؤثرترین آن‌ها برای هدف‌های مختلف احیاء، ارتقاء و پایداری بوم‌شناختی (اکولوژیک)، نظر بسیاری از پژوهشگران را جلب کرده است. Sears and Prithiviraj (2012) در یک بررسی مروری به تحلیل و امکان‌سنجی افزایش در حجم گستره سیانوباکترها و کاربرد هواپیماهای سم‌پاشی[3] در پاشش و تلقیح سیانوباکترها به پوسته زیستی با هدف تأثیر آن بر میزان افزایش غنای خاک از مواد غذایی، تثبیت نیتروژن و کربن پرداختند. تحلیل‌ها و نتایج، امکان تلقیح شمار شایان توجهی از سیانوباکتر در سطح ۲۰۰ هکتار را تأیید کرد. Abed *et al.* (2013) تنوع زیستی قارچ‌های آزاد و گلسنگی و نقش آن‌ها در بهبود ویژگی‌های خاک وادی Al-Khoud و Al-Jabal Al-Akhdar عمان در برابر فرسایش آبی را بررسی کردند. نتایج نشان داد که میزان خاک هدررفته در پوسته‌ی خاکی حاوی گلسنگ‌ها ۳/۱۲ درصد، پوسته‌ی خاکی حاوی سیانوباکترها ۶/۱۷ درصد و در پوسته‌ی خاکی بدون حضور ریزموجودهای خاکزی ۲۲/۶ درصد از حجم اولیه‌ی خاک بوده است. Bandopadhyay (2014) با استخراج و کشت دوباره باکتری‌های هوازی نمکدوست ۱۰ نقطه متفاوت از دلتای Sunderban واقع در Gosaba هند، عملکرد باکتری های یادشده در بهبود مؤلفه‌های خاک در شرایط آزمایشگاهی را بررسی کرد. نتایج ایشان نشان داد که افزایش جمعیت باکتری‌های بی‌هوازی نمکدوست در ظرف‌های پتری[4] باعث افزایش تا دو برابری ظرفیت نگه داشت آب، میزان کربن و همچنین فسفر خاک شد. هرچند باعث کاهش معنی‌دار تخلخل و ماده‌ی آلی خاک شدند.Chouhan and Kumawat (2014) عملکرد و میزان زنده‌مانی سیانوباکتری‌ها در شرایط مختلف رطوبتی (۲۰ تا ۸۰ درصد) به‌عنوان کودهای زیستی خاک‌های پنبه‌زارها را بررسی کردند. نتایج نشان داد که سه جنس *Nostoc* sp.، *Fischerella* sp. و *Oscillatoria* sp. بیشترین حضور را در خاک داشته و رطوبت ۶۰ تا ۸۰ درصد بهترین شرایط را برای فعالیّت آن‌ها ایجاد کرده است. Kumar and Prasad (2015) به بررسی جمعیت‌های سیانوباکترها در پوسته‌های زیستی خاک‌های مناطق خشک بنگال غربی در هند پرداختند. نتایج گویای آن بود که پس از یک دوره خشکی درازمدت، رخداد بارندگی‌ها باعث شدت افزایش و فعالیت سیانوباکترها شده که نتیجه آن افزایش میزان تثبیت کربن و نیتروژن بوده است. Mu'minah *et al.* (2015) با هدف افزایش پایداری خاک دانه‌ها، به شناسایی و افزایش باکتری‌های تولیدکننده‌ی پلی‌ساکارید اطراف ریزوسفر (ریشه‌گاه) سیب‌زمینی در شیب‌های مختلف در شهر Malino اندونزی اقدام کردند. نتایج نشان داد که ارتباط مستقیم بین پایداری خاک‌دانه ها و حاصل‌خیزی خاک با حضور و جمعیت باکتری‌های تولیدکننده پلی‌ساکارید وجود داد.

در ایران نیز Saadatian and Riahi (2009) اقدام به استخراج، شناسایی و افزایش سیانوباکترهای شالیزار شمال ایران و تلقیح آن‌ها به خاک تیمارهای برنج در شرایط آزمایشگاهی کردند. نتایج نشان داد که چهار گونه از جنس *Anabaena* از خاک شالیزار شناسایی شده و پس از افزایش و تلقیح آن‌ها به خاک‌های تحت تیمار، رطوبت و

[1] Heterotroph
[2] Autotroph
[3] Spraying aircraft
[4] Petri dish

www.SID.ir

Archive of SID

ظرفیت نگه‌داشت آب خاک به‌ترتیب ۲۰ و ۲۸ درصد افزایش و جرم ویژه ظاهری و حقیقی ذرات خاک به‌ترتیب ۹/۸ و ۴/۸ درصد کاهش یافت. از طرفی Kheirfam *et al.* (2014) نیز در یک بررسی مروری نقش ریزموجودهای خاکزی در مهار رواناب و هدررفت خاک را بررسی کرده و در نهایت ضمن تأکید بر زمینه‌سازی سازگاری و یا حمایت از غنای موجودهای خاکزی با توسعه‌ی کمّی ریزموجودها، به‌کارگیری سیانوباکترها و باکتری‌ها به‌عنوان جایگزینی مناسب به‌جای دیگر تثبیت کننده و افزودنی‌های معمول در تحلیل فرآیندهای فرسایش را ضروری دانستند.

جمع‌بندی پیشینه‌ی پژوهشی نشان می‌دهد که به ریزموجودهای خاکزی به‌ویژه باکتری‌ها و سیانوباکترها به عنوان نخستین حلقه‌ی بوم‌سازگان در سال‌های اخیر در مباحث بوم‌شناسی بسیار توجه شده است. لیکن به شناسایی و امکان‌سنجی افزایش در شمار و حجم انبوه باکتری‌ها و سیانوباکترها کمتر توجه شده است. همچنین پژوهشی مستند در رابطه با بررسی مستقیم آزمایشگاهی ریزموجودهای خاکزی با استخراج، شناسایی، خالص‌سازی و افزایش آن‌ها به‌منظور تولید تثبیت‌کننده‌های خاک و همچنین تحلیل، انتخاب و پیشنهاد مناسب‌ترین جنس یا گروه از ریزموجودهای سودمند به‌عنوان روشی زیستی، دائمی و سازگار با محیط زیست برای حفاظت خاک و آب مشاهده نشده است. در همین زمینه این پژوهش با هدف امکان‌سنجی استخراج، شناسایی، خالص‌سازی و افزایش باکتری‌ها و سیانوباکترهای خاک‌زی برنامه‌ریزی شده تا در نهایت پس از بررسی جنبه‌های پرشمار محیط زیستی، بوم سازگانی، بهداشتی، عملکردی و شرایط پایداری آن‌ها، افزون بر معرفی باکتری و سیانوباکترهای مناسب و مؤثر در حفاظت خاک و آب، میزان افزایش کمّی آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی با هدف تولید تثبیت‌کننده‌ی زیستی و پایدار خاک برای تلقیح مستقیم به خاک‌های مادری حساس به فرسایش نیز بررسی شود. برای این منظور خاک دامنه‌های حواشی جاده مرزن‌آباد-کندلوس به‌دلیل وجود تشکیلات و خاک فقیر، تخریب یافته و بسیار حساس به فرسایش و همچنین به‌سبب قابلیت دسترسی انتخاب شد.

مواد و روش‌ها

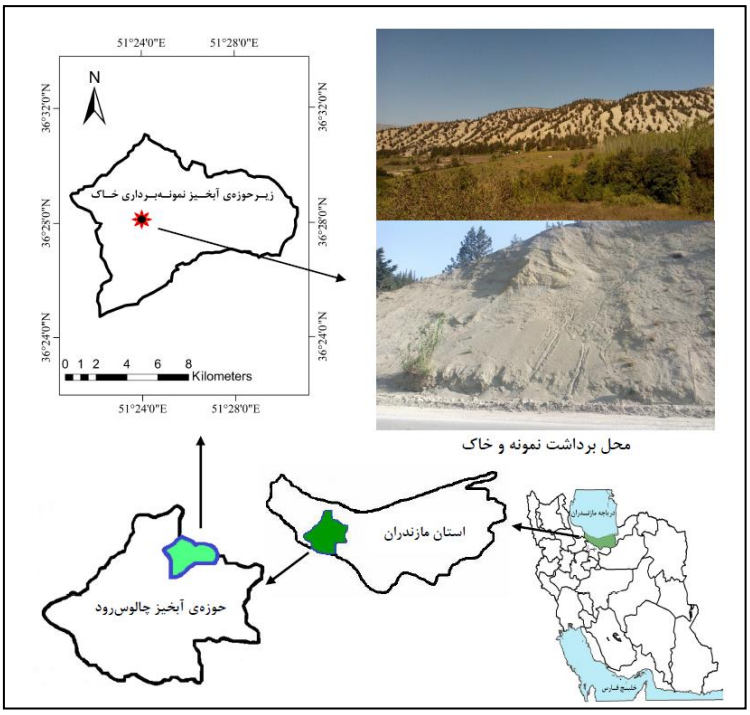
تهیه نمونه‌ی خاک

این پژوهش در یکی از زیرحوزه‌های آبخیز رودخانه‌ی چالوس با گستره‌ی ۸۶/۳۴ کیلومترمربع و واقع در غرب استان مازندران، جنوب شهرستان نوشهر و از توابع بخش کجور انجام شد. شکل ۱ موقعیت عمومی منطقه مورد بررسی و محل برداشت نمونه خاک برای انجام مراحل پژوهش را نشان می‌دهد.

حواشی جاده مرزن‌آباد-کندلوس و روبه‌روی روستای کنیس به‌دلیل وجود تشکیلات و خاک حساس به فرسایش و نیز امکان اجرای نتایج به دست آمده از پژوهش و همچنین قابلیت دسترسی، به‌عنوان منطقه‌ی برداشت نمونه انتخاب شد. موقعیت جغرافیایی منطقه نیز در حد واسط طول جغرافیایی ″۵۷ ′۲۰ °۵۱ تا ″۴۴ ′۳۰ °۵۰ شرقی و عرض ″۴۲ ′۲۴ °۳۶ تا ″۵۹ ′۳۰ °۳۶ شمالی قرار دارد. بافت خاک در این منطقه لومی رسی، ساختمان آن دانه‌ای متوسط با پایداری شکننده در حالت مرطوب، جرم ویژه ظاهری خاک ۱/۱۵ تا ۱/۳ گرم بر سانتی‌مترمکعب، pH خاک از ۷/۴۲ تا ۷/۶۸، قابلیت هدایت الکتریکی از ۱۷/ تا ۰/۲۵ دسی‌زیمنس بر متر، درصد کربن آلی ۰/۹۵، درصد آهک ۲۷/۹ و نیتروژن کل ۰/۰۷ تا ۰/۱۴ درصد می باشد. همچنین حساسیت خاک منطقه مورد بررسی به فرسایش بسیار بالا است. نمونه‌برداری در اواخر شهریور ۱۳۹۳ از ۲۵ نقطه و با سه تکرار به‌صورت تصادفی از عمق صفر تا دو سانتی‌متری از سطح خاک و از سه جهت دامنه و با الگوی شبکه‌ای از پنج ارتفاع و پنج نقطه در هر خط ارتفاعی با استفاده از استوانه‌ی مدرج انجام گرفت. نمونه‌ها در کیسه‌های پلی اتیلن استریل شده (Chamizo *et al.*, 2012) به آزمایشگاه دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس منتقل و تا پیش از انجام آزمایش‌ها در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. پس از آن نمونه‌های خاک در زیر هود به‌کلی استریل و به ذرات با قطر کم‌تر از دو میلی‌متر تبدیل شد (Chamizo *et al.*, 2012). در نهایت، از مخلوط همه‌ی نمونه‌ها ۱۰۰ گرم خاک و با سه تکرار برای جداسازی و شناسایی سیانوباکترها و باکتری‌ها برداشت و آماده شدند (Lecomte *et al.*, 2011).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- موقعیت عمومی منطقه مورد بررسی و محل برداشت نمونه خاک برای انجام مراحل پژوهش.

Fig. 1- General view of the study area and location of soil sampling for conducting the research.

انتخاب و آماده‌سازی محیط‌های کشت

به‌منظور استخراج جنس‌های مختلف باکتری‌ها و سیانوباکترهای موجود در بانک ریزموجودهای خاک منطقه مورد بررسی، اقدام به استفاده از محیط کشت‌های عمومی (Ehlers *et al.*, 2008) باکتری‌ها و سیانوباکترهای خاک‌زی شد. برای این منظور، شمار گسترده‌ای از محیط کشت‌های عمومی باکتری‌ها و سیانوباکترهای خاک بررسی و ارزیابی شده و در نهایت با تأکید بر عملکرد و متداول بودن، میزان توانایی در ایجاد شرایط رشد طیف گسترده‌ای از جنس‌های مختلف باکتری‌ها و سیانوباکترهای خاک، اقتصادی بودن و همچنین قابلیت دسترسی و تهیه آسان، مناسب‌ترین آن‌ها انتخاب شدند. در نهایت محیط کشت‌های عمومی Bold Basal و CHU10 (Andersen, 2005) برای کشت و استخراج سیانوباکترها و محیط‌های کشت عمومی Nutrient Agar (Lutton *et al.*, 2013) و TSA[1] (Lecomte *et al.*, 2011) برای کشت و استخراج باکتری‌ها انتخاب و برابر دستورکارهای استاندارد تهیه شدند. پس از انتخاب محیط‌های کشت عمومی، یک گرم از نمونه‌های خاک برای کشت باکتری‌ها وزن و سری رقیق شده تا ۱۰ سری تهیه شد (Cappuccino and Sherman, 2007). سپس از هر کدام از نسبت‌های رقیق شده یک میلی‌لیتر برداشت و با دو تکرار با هدف افزایش اعتمادپذیری (Jett *et al.*, 1997)، به ظرف‌های پتری منتقل و در نهایت محیط‌های کشت عمومی Nutrient Agar و TSA به‌صورت جداگانه در ظرف‌های پتری ریخته و به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور[2] (کابین رشد) و در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد (Benson, 2002).

پس از خروج ظرف‌های پتری از انکوباتور، شمار کلنی‌های شکل گرفته شمارش و بر پایه روش‌های استاندارد (Jett *et al.*, 1997) شمار باکتری‌ها در یک گرم خاک به دست آمد. برای شناسایی باکتری‌های کشت و استخراج شده، کلنی‌های باکتری از سطح ظرف‌های پتری جدا، رنگ‌آمیزی گرم[3] شده (El-Bestawy *et al.*, 2013) و با استفاده از میکروسکوپ‌هایی با توان جداسازی بالا و بر پایه ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بهره‌گیری از راهنمای باکتری‌شناسی (Bergey and Breed., 1957) باکتری‌های موجود در خاک در حد خانواده و جنس شناسایی شدند.

[1] Tryptic Soy Agar

[2] Incubator

[3] Gram stain

www.SID.ir

Archive of SID

به‌منظور استخراج و شناسایی سیانوباکترها نیز یک گرم از نمونه خاک به ظرف‌های پتری با سه تکرار منتقل و محیط کشت‌های Bold و CHU10 به‌میزان پنج میلی‌لیتر به‌آن‌ها اضافه شد (Hameed and Hasnain, 2005). همچنین به‌منظور پایش و شناسایی سیانوباکترها، لامل‌های ۲۰ در ۲۰ میلی‌متر نیز در درون ظرف‌های پتری تعبیه شده و در بازه زمانی ۱۵ روزه و به‌صورت روزانه با استفاده از میکروسکوپ‌های با توان جداسازی بالا و بر پایه ویژگی‌های ریخت‌شناسی یادشده در راهنماهای باکتری‌شناسی Bergey (Buchanan and Gibbons, 1974) شناسایی شدند.

انتخاب و افزایش جنس‌های مناسب باکتری‌ها و سیانوباکترها

انتخاب و افزایش باکتری‌ها و سیانوباکترها با هدف بهبود مؤلفه‌های کیفی خاک بر پایه ویژگی‌های مختلف از جمله توان زنده‌مانی، افزایش و فعالیت در شرایط دمایی، pH، رطوبتی و خاکی مختلف، توان ترشح مواد چسبنده‌ی پلی ساکاریدی، رشد شبکه‌ای، تشکیل ریز و بزرگ ساختار، تبدیل مواد غذایی به حالت‌های قابل استفاده توسط ریزموجودها، رشد، فعالیت و افزایش سریع، گستره حضور زیاد در مناطق مختلف، استخراج و تکثیر آسان در شرایط آزمایشگاهی و همچنین بیماریزا نبودن برای انسان و دیگر موجودها صورت پذیرفت. سپس به‌منظور خالص‌سازی باکتری‌های شناسایی و انتخاب شده بر پایه معیارهای یادشده، از محیط‌های کشت اختصاصی Azotobacter Agar, Modified II(Atlas, 2010) و DSMZ1(Schrey *et al.*, 2012) استفاده شد. سیانوباکترها به روش پلیت آگار و کشت خطی در چندین مرحله خالص‌سازی شدند (Hameed and Hasnain, 2005). در نهایت به منظور امکان کاربردی کردن تلقیح باکتری‌ها و سیانوباکترهای انتخاب شده در سطوح گسترده، به افزایش باکتری‌ها و سیانوباکترها در حجم و شمار زیاد اقدام شد. لذا برای افزایش باکتری‌ها از محیط غذایی مایع LB Broth و برای افزایش سیانوباکترها از محیط‌های کشت مایع Bold و Chu10 استفاده شد. بدین منظور باکتری‌ها و سیانوباکترها با لوپ‌های میکروبیولوژی به‌ترتیب سری به محیط‌های مایع ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌لیتری منتقل و به‌طورمرتب تا رسیدن به شمار مناسب و قابلیت انتقال به سطوح دامنه شمارش شدند.

نتایج و بحث

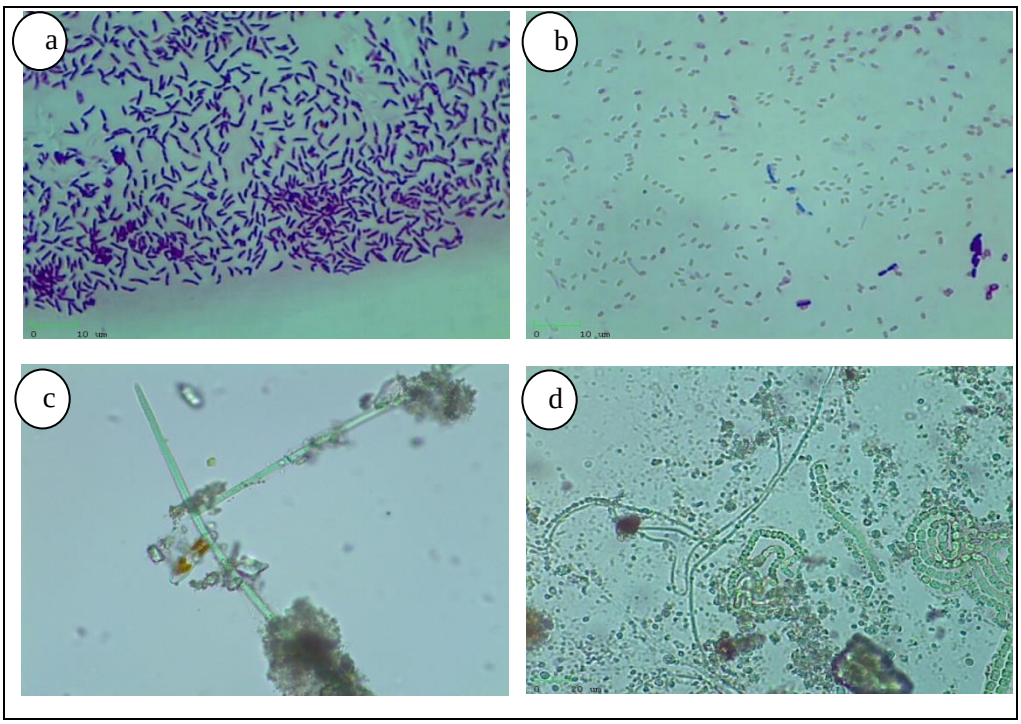
برای انجام این پژوهش پس از نمونه‌برداری از خاک منطقه مورد بررسی، نمونه‌های خاک آماده‌سازی، ترکیب و مناسب‌ترین محیط‌های کشت عمومی نیز پس از بررسی های جامع و کامل انتخاب شدند. فرآیند استخراج و شناسایی باکتری‌ها و سیانوباکترها بر پایه روش‌های استاندارد و به شرح ارائه شده در روش کار انجام گرفت. در این بررسی شمار و درصد جمعیتی شش گونه باکتری *Baclilus* sp. (۳۵ درصد)، *Pseudomonas* sp. (۲۰ درصد)، *Arthrobacter* sp. (۱۰ درصد)، *Azotobacter* sp. (۲۵ درصد)، *Diplococcus* sp. (۵ درصد)، *Streptococcus* sp. (۵ درصد) و پنج جنس سیانوباکتر *Nostoc* sp. (۷۰ درصد)، *Oscillatoria* sp. (۲۰ درصد)، *Lyngbya* sp.، *Phormidium* sp.، *Aphanothece* sp. و شمار تاکسون از Diatoms و Xanthophyta (درکل ۱۰ درصد) از بانک ریزموجودهای خاک منطقه حاشیه جاده مرزن‌آباد-کندلوس شناسایی شد. پس از مراحل شناسایی، اقدام به بررسی معیارهای مورد نظر برای انتخاب باکتری‌ها و سیانوباکترهای سودمند و مؤثر در حفاظت خاک و آب شد. نمونه‌ای از باکتری‌ها و سیانوباکترهای شناسایی شده در شکل ۲ و ویژگی‌های هر یک از باکتری‌ها و سیانوباکترها به‌ترتیب در جدول‌های ۱ و ۲ ارائه شده است. در نهایت بررسی همه ویژگی‌های جنس‌ها و خانواده های شناسایی شده‌ی باکتری‌ها و سیانوباکترها در خاک منطقه مورد بررسی بر پایه معیارهای موردنظر، نشان داد که از بین باکتری‌های خاکزی استخراج و شناسایی شده، *Azotobacter* sp. و گروه *Bacillus subtilis* از بین گونه‌های *Bacillus* و از سیانوباکترها نیز *Nostoc* sp. و *Oscillatoria* sp. بر پایه معیارهای یادشده پیشین، به عنوان مناسب‌ترین ریزموجودهای خاکزی در حفاظت منابع خاک و آب قابل انتخاب هستند. در این زمینه HuiXia *et al.*(2007) نیز باکتری‌های Oligotrophic از جمله *Bacillus* sp. با کمترین توقع مواد غذایی در خاک را به‌عنوان باکتری بسیار مناسب برای بهبود ویژگی‌های کیفی خاک مناطق بیابانی معرفی کردند. همچنین Maqubela *et al.* (2009) تلقیح سیانوباکتر *Nostoc* sp. به خاک کشتزارهای ذرت را باعث افزایش عملکرد در تولید، افزایش پایداری خاک‌دانه‌ها و میزان تثبیت کربن خاک دانسته‌اند. Prasanna *et al.* (2012) نیز

www.SID.ir

Archive of SID

تلقیح سیانوباکتر *Anabaena* sp. به خاک شالیزارها با هدف افزایش عملکرد و تثبیت نیتروژن را پیشنهاد داده‌اند. با توجه به پیشینه‌های پژوهشی که باکتری‌ها و سیانوباکتر ها به‌صورت مستقیم به خاک تلقیح شده‌اند از یک سو و ضرورت تولید و کاربرد تثبیت‌کننده‌هایی که محدودیت‌های تثبیت‌کننده‌های مرسوم را نداشته باشند از سوی دیگر، ضرورت امکان‌سنجی تولید انبوه باکتری‌ها و سیانوباکترهای مؤثر در حفاظت خاک و آب به‌عنوان تثبیت‌کننده‌های زیستی و پایدار خاک را پرهیزناپذیر کرده است.

در همین زمینه نتایج امکان‌سنجی افزایش باکتری‌ها و سیانوباکترهای انتخاب شده به‌عنوان مناسب‌ترین ریزموجودهای خاکزی در حفاظت خاک و آب با هدف زمینه‌سازی رشد و توسعه فضای زیستی آن‌ها با تلقیح مستقیم آن‌ها به پوسته زیستی خاک نیز نشان داد که جمعیت باکتری‌های *Azotobacter* sp. و گروه *Bacillus subtilis* به‌ترتیب در روز اول از $۱/۳\times۱۰^{۴}$ و $۶/۴\times۱۰^{۴}$ به $۶/۲۵\times۱۰^{۱۴}$ و ۲×۱۰^{۱۵} عدد در یک لیتر در پایان روز هشتم افزایش پیدا کردند. همچنین جمعیت سیانوباکترهای *Nostoc* sp. و *Oscillatoria* sp. به‌ترتیب در روز اول از $۴/۷\times۱۰^{۳}$ و $۰/۴\times۱۰^{۳}$ به $۱/۵\times۱۰^{۱۴}$ و $۱/۸\times۱۰^{۱۳}$ عدد در یک لیتر در پایان روز ۲۱ افزایش پیدا کردند. نتایج گویای آن است که امکان افزایش جمعیت باکتری‌ها و سیانوباکترهای سودمند در شرایط آزمایشگاهی مورد تأیید است. لذا تلقیح باکتری‌ها و سیانوباکترها به پوسته زیستی خاک به‌عنوان تثبیت‌کننده زیستی و پایدار خاک در سطوح گسترده با استفاده از فناوری‌هایی از جمله تانکرهای بزرگ خاکپوش (مالچ) پاشی (Wang *et al.*, 2009) و هواپیماهای کوچک سم پاشی (Sears and Prithiviraj, 2012) می‌تواند فرآیندی علمی، کاربردی و با توجیه اقتصادی برای افزایش جمعیت ریزموجودهای خاکزی و بهبود عملکرد آن‌ها در کیفیت و پایداری خاک بوده و شرایط کاهش هدررفت خاک و رواناب را فراهم آورد. همچنین ریزموجودهای خاکزی انتخاب شده به‌صورت جداگانه و ترکیبی نیز برای تولید انبوه تثبیت‌کننده زیستی و پایدار قابل استفاده می‌باشند (Prasanna *et al.*, 2012).



شکل ۲- نمونه‌ای از باکتری‌ها (۱ و ۲) و سیانوباکترهای (۳ و ۴) استخراج و شناسایی شده از بانک ریزموجودهای خاک منطقه مرزن‌آباد-کندلوس.

Fig. 2- A sample of isolated and identified of bacteria (a and b), and cyanobacteria (c and d) from the soil microorganism bank in Marzanabad-Kandelus.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- ویژگی‌های باکتری‌های شناسایی شده از بانک ریزموجودهای خاک منطقه مرزن‌آباد-کندلوس.

Table 1. Characteristics of identified bacteria from the soil microorganisms bank in Marzanabad-Kandelus region.

جنس Genus	ویژگی‌ها Properties	مراجع References
Pseudomonas sp.	بیشتر هوازی، میله‌ای شکل، گرم منفی، بدون تشکیل کپسول، نداشتن توانایی فعالیت در طیف گسترده‌ای از مناطق اقلیمی، بازه‌ی دمایی فعالیت تا چهار تا ۴۲ درجه سلسیوس و pH بین چهار تا هشت، باعث بروز بیماری های انسانی، گیاهی و جانوران، جمعیت کمتر از یک درصد در خاک، قابلیت رشد تنها در مناطق با غنای زیاد مواد غذایی Mostly aerobic, rod-shaped, Gram-negative, without a capsule, inability to be active in a wide variety of climatic zones, activity at temperature range of four to 42 °C and pH between four to eight, causes of human diseases, plants and animals, less than 1% of the all soil bacteria population, ability to grow only in areas with high richness nutrients	(Euzeby, 1997; Moore, 2006)
Arthrobacter sp.	بدون کپسول و ترشح مواد چسبنده‌ی پلی‌ساکاریدی، گرم مثبت و منفی، میله‌ای و یا کره‌ای شکل، فعالیت در بازه دمایی چهار تا ۱۲۵ درجه‌ی سلسیوس و pH پنج تا ۱۰ Without capsule, non-secretion of polysaccharide, Gram-positive and negative, spherical or rod-shaped, activity at temperature range of four to 42 °C and pH between five to 10	(Čipinytė *et al.*, 2011)
Azotobacter sp.	متحرک، بیضی یا کروی شکل، تشکیل کپسول ضخیم، توانایی بالا در ترشح مواد چسبنده‌ی پلی‌ساکاریدی، هوازی، بسیار غیربیماریزا، آزادزی، خودپرور و بدون وابستگی غذایی به خاک، دارای نقش مهم در چرخه نیتروژن در طبیعت، کاربرد در تولید کودهای زیستی، مکمل‌های غذایی و پلیمرهای زیستی، توانایی زیست و فعالیت در pH بین ۴/۵ تا ۸/۵ و دمای مناسب برای رشد و فعالیت بیشینه ۲۰ تا ۳۰ درجه سلسیوس Removable, elliptical or spherical shape, forming thickened capsule, the ability to secrete high adhesive polysaccharide, aerobic, completely non-pathogenic, free-living, self-feeding and nutritional dependency to soil, has an important role in the nitrogen cycle in nature, used in the production of bio-fertilizers, food supplements and biopolymers, high activity at 20 to 30 °C and pH between 4.5 to 8.5	(Kumar *et al.*, 2007)
Diplococcus sp.	کروی شکل، هوازی و بی‌هوازی، گرم مثبت و منفی، دارای کپسول در برخی گونه‌ها، عامل بیماری‌های انسانی از جمله ذات الریه، توانایی زیست در دمای بین ۲۵ تا ۴۰ درجه‌ی سلسیوس و pH بین ۶/۵ تا ۸/۳ Spherical, aerobic and anaerobic, Gram-positive and negative, some species have a capsule, causes of human diseases such as pneumonia, activity at temperatures range of 25 to 40 °C and pH between 6.5 to 8.3	(Kumar, 2012)
Streptococcus sp.	گرم مثبت، عامل بیماری‌های پوستی، عفونی، تنفسی و گوارشی در انسان، وجود کپسول و توانایی ترشح پلی‌ساکارید از دیواره سلولی برخی گونه‌های آن Gram-positive, causes of skin, infectious, respiratory and digestive diseases in humans, forming capsule, the ability to secrete adhesive polysaccharide in some species	(Terao, 2012)
Bacillus sp.	تشکیل ۲۵ درصد جمعیت باکتریایی خاک، میله‌ای شکل، گرم مثبت، دارای اسپور یا کپسول، هوازی یا برخی نیز بی‌هوازی اختیاری، مقاومت زیاد در برابر گرما، سرما، تابش و خشکی، حضور در طیف گسترده‌ای از زیستگاه ها، تقسیم‌بندی بر پایه عملکرد در دو گروه *Bacillus cereus* و *Bacillus subtili*، عامل بیماری‌های انسانی توسط گروه *Bacillus cereus*، بدون بیماریزا بودن گروه *Bacillus subtilis*، توانایی بالای فعالیت گروه *Bacillus subtilis* در شرایط نامناسب محیطی از جمله شرایط محیط با دمای ۴ تا ۵۵ درجه سلسیوس و pH ۴ تا ۱۰، ترشح بالای مواد چسبنده‌ی پلی‌ساکاریدی، تثبیت نیتروژن، سرعت افزایش بالا و قابلیت تحرک زیاد، کاربرد زیاد در علوم محیطی و طبیعی Constituted 25% of soil bacteria, rod-shaped, Gram- positive, forming spore or capsule, aerobic or sometimes optional anaerobic, high resistance against heat, cold, radiation and drought, presence in a wide range of habitats, classified into two groups *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* based on their performances, cause of human diseases by *Bacillus cereus*, the *Bacillus subtilis* strain is not pathogenic, ability of *Bacillus subtilis* strain activity in unsuitable environmental conditions such as at 4 to 55 °C and pH 4 to 10, secretion of adhesive polysaccharides, ability to nitrogen fixation, proliferation of high speed and high mobility, high usage in environmental and natural sciences projects	(Satapute *et al.*, 2012)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- ویژگی‌های سیانوباکترهای شناسایی شده از بانک ریزموجودهای خاک منطقه مرزن‌آباد-کندلوس.

Table 2. Characteristics of identified cyanobacteria from soil microorganisms bank in Marzanabad-Kandelus region.

جنس Genus	ویژگی‌ها Properties	مراجع References
Nostoc sp.	حضور در بوم‌سازگان‌های متنوع، تشکیل کلنی‌هایی به‌صورت رشته‌های مهره‌ای زنجیروار در درون یک غلاف ژلاتینی، حضور در خاک بیشتر از دیگر محیط‌ها، توانایی بالا برای تثبیت نیتروژن، ترشح مواد چسبنده‌ی پلی‌ساکاریدی بالا، برخورداری از سامانه خودپروری (فتوسنتز)، بدون وابستگی غذایی به محیط خاک، توانایی جذب زیاد آب در زمان های رخداد بارش و تأخیر در زمان تشکیل رواناب و ذخیره آب، معروف به‌عنوان ژله ستاره یا جادوگر، توانایی زیست، تشکیل کلنی و فعالیت در بازه‌ی دمایی ۶ تا ۴۵ درجه سلسیوس و pH ۶/۵ تا ۹ Found in a variety of environmental niches, forms colonies composed of filaments of moniliform cells in a gelatinous sheath, presence in the soil is more than other environments, high capacity for nitrogen fixation, high secretion of adhesive polysaccharide, having a self-feeding system (photosynthesis), nutritional dependency to soil, ability to absorb high water in rainfall times and causing storage of water an delay in constituted runoff, known as rot of the stars and star-slime, viability, colony forming and activity in temperature between 6 and 45 °C and pH 5.6 to nine	Moller *et al*., 2014)
Oscillatoria sp.	تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن، دارای رشته‌هایی برای حرکت به‌منظور دسترسی به نور، دارای غلاف چسبنده و قابلیت بالای ترشح پلی‌ساکاریدی، توان زیست و افزایش در شرایط محیطی نامناسب High capacity for nitrogen fixation, have a strings for move to access the light, have a adhesive sheath and capability of polysaccharides secretion, viability and proliferation in unsuitable environmental conditions	Méjean *et al*., 2009)
Aphanothece sp.	تک سلولی، خودتغذیه، جمعیت کم‌تر در خاک، توانایی در تثبیت نیتروژن Unicellular, self-feeding, less population in the soil, ability in nitrogen fixation	Rana *et al*., 2010).
Lyngbya sp.	رشته‌ای، خودپرور، جمعیت کمتر در خاک، توانایی در تثبیت نیتروژن و پالایش آلودگی‌های خاک Non-branching filaments inside a rigid mucilage sheath, self-feeding, less population in the soil, ability in nitrogen fixation and remediation of soil pollutions	Rana *et al*., 2010).
Phormidium sp.	بدون شاخه، پرسلولی و رشته ای، دارای دیوار نازک و شفاف، جمعیت کم در خاک Non-branch, multicellular and filamentous, have a thin walls and transparent, less population in soil	Tiwari *et al*., 2005)

ارزیابی اقتصادی تثبیت‌کننده زیستی خاک پیشنهاد شده بر پایه انحلال محلول یادشده در ۴۰۰۰ لیتر مخزن هواپیماهای سمپاشی، پاشیدن آن در سطح ۲۰۰ هکتار (Sears and Prithiviraj, 2012) و همچنین با احتساب هزینه ریالی تمام شده برای تولید یک لیتر از محصول یادشده با شمار حداقل $۱۰^{۱۴}$ عدد ریزموجود به‌میزان بیشینه دو میلیون ریال، کاربرد تثبیت‌کننده‌ی یادشده برای هدف‌های حفاظت منابع خاک و آب را از نظر اقتصادی و کاربردی توجیه می‌کند. لذا با توجه به میانگین جمعیت باکتری‌ها و سیانوباکترها در یک گرم از خاک به شمار $۱۰^{۴}$ عدد (Kemprai, 2013)، شمار باکتری‌ها و سیانوباکترها در سطح ۲۰۰ هکتار با میانگین جرم ویژه ظاهری خاک ۱/۳ گرم در سانتی‌متر مکعب، $۵/۲\times۱۰^{۱۴}$ عدد خواهد بود که با تلقیح جداگانه و یا ترکیبی حداقل $۱۰^{۱۴}$ عدد باکتری و سیانوباکتر، جمعیت ریزموجودهای یادشده در حدود دو برابر و عملکرد آن‌ها چندین برابر (Sears and Prithiviraj, 2012) خواهد شد. بر پایه ارزیابی‌های اقتصادی، تهیه‌ی افزودنی و تثبیت‌کننده‌های متداول خاک از جمله کودهای دامی و پلی‌اکریل آمید در پیشینه‌ی پژوهشی برای ۲۰۰ هکتار به‌ترتیب، در حدود ۸۰۰۰ و ۶۰۰ میلیون ریال (Kheirfam *et al*., 2014) بوده که اقتصادی و باصرفه بودن تثبیت‌کننده‌های زیستی و پایدار خاک تولید شده از ریزموجودهای خاکزی در این پژوهش را تأیید می‌کند. بنابراین نتایج این پژوهش که به استخراج و شناسایی سیانوباکترها و باکتری‌های بومی خاک که به انتخاب و افزایش انبوه باکتری‌های *Azotobacter* sp. و گروه *Bacillus subtilis* و سیانوباکتر های *Nostoc* sp. و *Oscillatoria* sp. منتج شد، می‌تواند به‌عنوان تثبیت‌کننده‌ای پایدار و زیستی در سطح گسترده با هدف‌های چندجانبه استفاده شود. از آنجایی که باکتری های *Azotobacter* sp. به‌عنوان تنها باکتری‌های هوازی و آزادزی شناخته شده هستند که توانایی بسیار بالایی در تثبیت نیتروژن، تولید مواد تسریع بخش جوانه‌زنی گیاهان، زنده‌مانی و فعالیت در شرایط نامناسب محیطی را

www.SID.ir

Archive of SID

دارند می‌توانند با تأمین مواد غذایی مورد نیاز ریزموجودهای دگرپرور، باعث افزایش فعالیت میکروبی پوسته‌ی زیستی خاک شده و احیاء و پایداری بوم‌سازگان پوسته‌ی یادشده را امکان‌پذیر سازد.

همچنین باکتری‌های *Azotobacter* sp. به‌سبب کاربرد و نتایج مطلوبی که در افزایش عملکردی گیاهان زراعی داشته‌اند (Kumar *et al.*, 2007)، باعث افزایش سرعت جوانه‌زنی، رشد، توده‌ی زنده‌ی هوایی و زیرزمینی پوشش گیاهی سطوح دامنه‌ها شده و به‌صورت غیرمستقیم و مستقیم هدف‌های متصّوره در مدیریت منابع خاک و آب را تأمین می‌کنند. باکتری‌های گروه *Bacillus subtilis* نیز به‌سبب ترشح بسیار زیاد مواد چسبنده‌ی پلی‌ساکاریدی از دیواره‌ی سلولی ضمن افزایش مواد مغذی محیط خاک باعث چسبندگی ذرات ریز خاک به‌هم و افزایش مقاومت برشی و پایداری خاک‌دانه‌ها و همچنین افزایش تخلل، تهویه و نفوذپذیری خاک می‌شود.

سیانوباکترهای *Nostoc* sp. و *Oscillatoria* sp. نیز به سبب داشتن سامانه تغذیه‌ای فتوسنتزی و بدون وابستگی غذایی به محیط خاک از یک سو و توانایی در ترشح بسیار بالای مواد چسبنده‌ی پلی‌ساکاریدی و تثبیت نیتروژن از سوی دیگر ضمن تأمین مواد غذایی مورد نیاز دیگر ریزموجودهای دگرپرور بانک ریزموجودهای خاک می‌تواند باعث افزایش چسبندگی ذرات خاک، پایداری خاک‌دانه‌ها، تخلل و نفوذپذیری می‌شوند. لذا در صورت تأیید علمی و عملی عملکرد ریزموجودهای یادشده در شرایط آزمایشگاهی، کاربرد ترکیبی از باکتری‌ها و سیانوباکترهای انتخاب و افزایش شده در این پژوهش به‌منظور تلقیح به سطوح گسترده، می‌تواند در کنار بهبود مؤلفه‌های مؤثر در حفاظت خاک و آب و هم‌چنین بهبود کیفیت خاک با هزینه اقتصادی شایان توجیه، کاهش تنوع گونه‌ای بانک ریزموجودهای خاک را در پی نداشته باشد. هر چند کاربرد محصول یادشده در شرایط آزمایشگاهی و ارزیابی‌های علمی، عملکردی و محیط زیستی روی تیمارهای خاک و سپس تعمیم آن در سطوح گسترده پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر با هدف شناسایی و تکثیر ریزموجودات خاکزی بومی، مؤثر و قابل کاربرد به‌عنوان نوعی افزودنی کاملاً زیستی در اهداف حفاظت منابع خاک و آب انجام شد. بر اساس یافته‌های پژوهش و مطالعات بوم‌شناختی پیشین، حضور ریزموجودات خاکزی مؤثر در حفاظت خاک و آب حتی در خاک‌های تخریب‌یافته و حساس به فرسایش نیز مورد تأیید قرار گرفت. هر چند جمعیت ریزموجودات خاک‌زی در خاک نسبت به شرایط و خاک‌های نرمال کم‌تر بود، ولی با این حال امکان تکثیر آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی تا شمار بسیار زیاد و قابل تلقیح به سطوح وسیعی از اراضی تأیید شد. لذا جداسازی، انتخاب، تکثیر در حجم و شمار زیاد و تلقیح ترکیبی ریزموجودات خاکزی خودپرور و آزادزی از قبیل سیانوباکترها و باکتری‌های تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن به سطوح اراضی به‌روش آب-تلقیحی (Hydro-seeding) می‌تواند به‌عنوان افزودنی کاملاً زیستی، اقتصادی، کاربردی، پایدار و دوست‌دار محیط زیست در دست‌یابی به اهداف متصور در حفاظت منابع آب و خاک مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

Abed, R.M.M., Al-Sadi, A.M., Al-Shehi, M., Al-Hinai, Sh. and Robinson, M.D., 2013. Diversity of free living and lichenized fungal communities in biological soil crusts of the Sultanate of Oman and their role in improving soil properties. Soil Biology and Biochemistry. 57, 695-705.

Andersen, R.A., 2005. Algal Culturing Techniques, Elsevier Academic Press, London.

Atlas, R.M., 2010. Handbook of Microbiological Media, 4th ed. Taylor and Francis Group publication, LLC.

Bandopadhyay, P., 2014. Isolation of halophilic anaerobic bacteria from the core delta area of west Bengal: Its possible on human health and environmental. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 6(3), 189-198.

Bergey, D.H. and Breed, R.S., 1957. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th

Hameed, A. and Hasnain, Sh., 2005. Cultural characteristics of chromium resistant unicellular Cyanobacteria isolated from local environment in Pakistan. Chinese Journal of Oceanology and Limnology. 23(4), 433-441.

www.SID.ir

Archive of SID

ed. American Society for Microbiology. Baltimore, Williams and Wilkins Co.

Benson, H.J., 2002. Microbiological Applications: Laboratory Manual in General Microbiology, 8th ed. Short version, McGraw Hill, Boston, MA, USA.

Blagodatskaya, E. and Kuzyakov, Y., 2013. Active microorganisms in soil: Critical review of estimation criteria and approaches. Soil Biology and Biochemistry. 67, 192-211.

Bowker, M.A., Belnap, J. and Miller, M.E., 2006. Spatial modeling of biological soil crusts to support rangeland assessment and monitoring. Rangeland Ecology and Management. 59, 519-529.

Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E., 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland.

Büdel, B. and Lange, O.L., 2003. Synopsis: Comparative biogeography and ecology of soil-crust biota and communities. In: Belnap, J., Lange, O.L., (Eds.), Biological Soil Crusts: Structure, Function and Management. Springer-Verlag, Berlin, pp.141-152.

Cappuccino, J.G. and Sherman, N., 2007. Microbiology: A Laboratory Manual. Dorling Kindersley Pvt. Ltd, License of Pearson Education, New Delhi, India.

Chamizo, S., Stevens, A., Cantón, Y., Miralles, I., Domingo, F. and van Wesemael, B., 2012. Discriminating soil crust type, development stage and degree of disturbance in semi-arid environments from their spectral characteristics. European Journal of Soil Science. 63, 42-53.

Chouhan, P.K. and Kumawat, D.M. 2014. Screening of cyanobacteria from black cotton soil and evaluate their potential to survive under wet and dry condition for biofertilizer production. Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences. 1(2), 90-99.

Čipinytė, V., Grigiškis, S., Šapokaitė, D. and Baškys E., 2011. Production of biosurfactants by Arthrobacter sp, a hydrocarbon degrading bacterium. Environment. Technology. 1, 68-75.

Dorioz, J.M., Robert, M. and Chenu, C., 1993. The role of roots, fungi and bacteria on clay particle organization: An experimental approach. Geoderma. 56, 179-194.

Ehlers, K., Bunemann, E.K., Oberson, A., Frossard, E., Frostegard, A., Yuejian, M. and Bakken, L.R., 2008. Extraction of soil bacteria from a Ferralsol. Soil Biology and Biochemistry. 40, 1940-1946.

El-Bestawy, E., Sabir, J., Mansy, A.H. and Zabermawi, N., 2013. Isolation, identification and acclimatization of Atrazine-resistant soil bacteria. Annals of Agricultural Science. 58(2), 119-130.

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.

Euzeby, J.P., 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: A folder available on the internet. International Journal of Systematic Bacteriology. 47(2), 590-592.

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.

Jett, B.D., Hatter, K.L., Huycke, M.M. and Gilmore, M.S., 1997. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. BioTechniques. 23, 648–650.

Kemprai, R., 2013. Biodiversity of cyanobacteria in soils of greater half long and their nitrogen fixing capacity. International Journal of Advance Research (IJOAR). 1(3), 31-41.

Kheirfam, H., Sadeghi, S.H.R., Homaee, M. and Zarei Darki, B., 2014. Role of soil microorganisms in soil and water loss control. Extension and Development of Watershed Management. 2(5), 19-26. (In Persian with English abstract)

Kumar, D. and Prasad, S., 2015. Adhikary diversity, molecular phylogeny, and metabolic activity of cyanobacteria in biological soil crusts from Santiniketan (India). Journal of Applied Phycology. 27, 339-349.

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 (*Gossypium hirsutum* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). Journal of Basic Microbiology. 47(5), 436-439.

Kumar, S., 2012. Textbook of Microbiology. Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd, New Delhi, India.

Lecomte, J., St-Arnaud, M. and Hijri, M., 2011. Isolation and identification of soil bacteria growing at the expense of arbuscular mycorrhizal fungi. FEMS Microbiology Letters. 317, 43–51.

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.

www.SID.ir

Archive of SID

Maqubela, M.P., Mnkeni, P.N.S., Malam Issa, O., Fernández, P., Teresa, M. and D'Acqui, L.P., 2009. *Nostoc* cyanobacterial inoculation in south African agricultural soils enhances soil structure, fertility, and maize growth. Plant and Soil. 315, 79-92.

Méjean, A., Mann, S., Maldiney, T., Vassiliadis, G., Lequin, O. and Ploux. O., 2009. Evidence that biosynthesis of the neurotoxic alkaloids anatoxin-a and homoanatoxin-a in the *cyanobacterium Oscillatoria* PCC 6506 occurs on a modular polyketide synthase initiated by L-proline. Journal of the American Chemical Society. 131, 7512-7513.

Moller, C.L., Vangsøe, M.T. and Sand-Jensen, K., 2014. Comparative growth and metabolism of gelatinous colonies of three cyanobacteria, *Nostoc commune*, *Nostoc pruniforme* and *Nostoc zetterstedtii*, at different temperatures. Freshwater Biology. 59, 2183-2193.

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*. Prokaryotes. 6, 646-703.

Mu'minah, Baharuddin, Subair, H. and Fahruddin 2015. Isolation and screening bacterial exopolysaccharide (EPS) from potato rhizosphere in highland and the potential as a producer indole acetic acid (IAA). Procedia Food Science. 3, 74-81.

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.

Rana, L., Chhikara, S. and Dhankhar, R., 2010. Lead Toxicity in *Lyngbya sp.* Isolated from Sewage Water Irrigated Soil. Environment and We an International Journal of Science and Technology (EWIJST). 5, 79-85.

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.

Saadatnia, H. and Riahi, H., 2009. Cyanobacteria from paddy fields in Iran as a biofertilizer in rice plants. Pant Soil Environment. 55(5), 207-212.

Sadeghi, S.H.R., Gholami, L., Homaee, M. and Khaledi Darvishan, A.V., 2015. Reducing sediment concentration and soil loss using organic and inorganic amendments at plot scale. Solid Earth. 6, 445-455.

Sadeghi, S.H.R., Hazbavi, Z., Younesi, H. and Behzadfar, M., 2013. Trend of soil loss and sediment concentration changeability due to application of polyacrylamide. Journal of Water and Soil Resources Conservation. 2(4), 53-67. (In Persian with English abstract)

Sadeghi, S.H.R., Jalili, Kh. and Nikkami, D., 2009. Land use optimization in watershed scale. Land Use Policy. 26, 186-193.

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.

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 growth modulating secondary metabolites is widespread among mycorrhiza-associated streptomycetes, BMC Microbiology. 12(164), 1-14.

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 $_{C}O_{2}$ sequestration on a landscape scale. In Proceedings of 4th Annual IEEE Green Technologies Conference, 19th-20th April, Tulsa, Oklahoma, USA. pp. 1-3.

Terao, Y., 2012. Streptococcus the virulence factors and pathogenic mechanisms of streptococcus pyogenes. Journal of Oral Biosciences. 54, 96–100.

Tiwari, O.N., Singh, B.V., Mishra, U., Singh, A.K., Dhar, D.W. and Singh, P.K., 2005. Distribution and physiological characterization of cyanobacteria isolated from arid zones of Rajasthan, Tropical Ecology. 46(2), 165–171.

Toy, T.J., Foster, G.R. and Renard, K.G., 2002. Soil Erosion: Process, Prediction, Measurement, and Control. John Wiley and Sons, New York.

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.

www.SID.ir

Archive of SID

Identification and proliferation of soil microorganisms in Marzanabad region with capability in applying for soil and water conservation

Hossein Kheirfam,[1] Behrouz Zarei Darki,[2] Seyed Hamidreza Sadeghi [1,*] and Mehdi Homaee[3]

[1]Department of Watershed Management Engineering, Faculty of Natural Resources, Tarbiat Modares University, Mazandaran, Iran.

[2]Department of Biology Marine, Faculty of Marine Science, Tarbiat Modares University, Mazandaran, Iran.

[3]Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[*]Corresponding author: sadeghi@modares.ac.ir

Introduction: In developing countries land degradation and, as a consequence, soil quantity and quality reduction are the main challenges in sustainable development. Recently, the role of soil microorganisms in improving the soil properties of land prone to erosion and degradation has been approved. However, improving the performance of soil microorganisms through their direct inoculation can be a new strategy in soil and water conservation. Therefore, the identification and bulk scale proliferation and widespread use of bacteria and cyanobacteria are necessary for reducing soil loss and runoff. Accordingly, this study was planned to isolate, identify and proliferate the most appropriate indigenous bacteria and cyanobacteria for soil and water conservation.

Materials and methods: In order to isolate and identify the bacteria and cyanobacteria, soil sampling was carried out from erosion-prone region of the vicinity of Marzanabad-Kandeloos. According to the TSA and Nutrient Agar (Lecomte *et al.*, 2011) and Bold Basal and CHU10 (Andersen, 2005) experimental protocols, general media were used for the isolation and identification of bacteria and cyanobacteria, respectively. The isolated bacteria and cyanobacteria were then identified by microscopic examination along with their distinguishing morphological characteristics (Bergey and Breed, 1957). The most effective bacteria and cyanobacteria were consequently selected for the purpose of soil loss and runoff reduction. The selected soil microorganisms were purified by selective media (Atlas, 2010; Schrey *et al.*, 2012) and then proliferated in high bulk and number.

Results and discussion: The results showed the existence of different bacteria viz. *Pseudomonas* sp., *Arthrobacter* sp., *Azotobacter* sp., *Diplococcus* sp., *Streptococcus* sp. and *Bacillus* sp., and cyanobacteria viz. *Nostoc* sp., *Oscillatoria* sp., *Lyngbya* sp., *Phormidium* sp., *Aphanothece* sp., Diatoms and Xanthophyta in the soil microorganism's bank. Eventually, *Azotobacter* sp. as free-living and nitrogen-fixing bacteria and the *Bacillus subtilis* strain with a high polysaccharides secreting capability and *Nostoc* sp. and *Oscillatoria* sp. as nitrogen-fixing and polysaccharides secreting cyanobacteria were selected as the genus with high functionality in soil and water conservation; this was based on some criteria such as survival power, proliferation and activity under inappropriate conditions, secretion of adhesive polysaccharides power, networking growth, the creation of micro and macro structures and being non-pathogenic for humans and other organisms. Since, after the proliferation process, the population of bacteria and cyanobacteria in one gram of original soil increased from 6.4×10^4 and 1.3×10^4 to 6.25×10^{14} and 2×10^{15} per gram, inoculation and increase of bacteria in soil could enhance the microbial activity of the soil crust. In addition, the secreted polysaccharides of bacteria could connect the soil particles together and increase soil porosity. The maintained processes could improve soil properties, and decrease soil and water loss. Furthermore, the feasibility of bacteria and cyanobacteria inoculation into widespread area was proven as a perdurable and biological stabilizer. According to economic evaluation, the cost of producing and inoculating bacteria and cyanobacteria could be up to 2 to 24 times lower than natural and artificial stabilizers.

Conclusion: The results of the present study proved the feasibility of identification and proliferation of useful soil microorganisms in soil and water conservation from an erosion-prone region. Therefore, combined widespread use of selected and proliferated bacteria and cyanobacteria by aircraft could increase soil particle

www.SID.ir

Archive of SID

adherence, soil aggregate stability, soil porosity and permeability and, consequently, conserve soil and water resourses.

Keywords: Biological soil crust, Soil and water management, Soil amendments, Soil microorganism's bank.

References:

Andersen, R.A., 2005. Algal Culturing Techniques, Elsevier Academic Press, London.

Atlas, R.M., 2010. Handbook of Microbiological Media, 4th ed. Taylor and Francis Group publication, LLC.

Bergey, D.H. and Breed, R.S., 1957. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed. American Society for Microbiology. Baltimore, Williams and Wilkins Co.

Lecomte, J., St-Arnaud, M. and Hijri, M., 2011. Isolation and identification of soil bacteria growing at the expense of arbuscular mycorrhizal fungi. FEMS Microbiology Letters. 317, 43–51.

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 growth modulating secondary metabolites is widespread among mycorrhiza-associated streptomycetes, BMC Microbiology. 12(164), 1-14.

www.SID.ir