



Publisher: Soil Science Society of Iran

Journal of Soil Biology<https://sbj.areeo.ac.ir/>

Review Article

Implication of Biological Indices for Assessing Soil Health

Naser Aliasgharzad¹ 

1- Professor of Soil Biology and Biotechnology, Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Article Info	Extended Abstract
Received: 2025-08-05 Accepted: 2025-11-05 Keywords: Environmental monitoring, Microbial biomass, Microbial diversity, Soil enzymes, Soil quality. Corresponding author's email: naliasghar@tabrizu.ac.ir DOI: 10.22092/SBJ.2025.369574.280	Background and Objectives: Soil is a foundational, non-renewable component of the terrestrial environment, essential for global food production. The escalating pressures of industrialization, population growth, and climate change have placed soil resources under severe threat from pollution, salinity, and inappropriate land management. Consequently, the accurate assessment and monitoring of soil health and quality (SHQ) have become critical priorities for researchers and legislators worldwide. While physical and chemical parameters are established components of soil assessment, biological and biochemical indices are gaining prominence due to their unique sensitivity. Unlike more stable properties, the soil microbiome responds rapidly to environmental changes and management interventions, acting as sensitive, early-warning indicators of soil degradation or restoration. However, a significant challenge persists in their application: a vast and diverse array of potential biological parameters exists, and their measurement is often complex, costly, and time-consuming. It is impractical to measure all available indices in a single study. Therefore, a judicious selection based on clear objectives is necessary to optimize resources. This review article aims to provide a comprehensive analysis and synthesis of the principal microbiological and biochemical indices used for assessing soil health. The objectives are to: (1) categorize and critically evaluate the most common methods for measuring microbial population, biomass, activity, and diversity; (2) analyze the role of soil enzymes and key ecophysiological quotients; and (3) introduce modern, cost-effective solutions, including estimation models and the use of satellite data, to overcome the high cost and labor demands of traditional biological measurements. Review Methods: This study is a comprehensive narrative review based on a synthesis of scientific literature. To gather the requisite information, systematic searches were conducted in major scientific databases, primarily Scopus, Web of Science, and Google Scholar. The search strategy employed a combination of keywords relevant to the article's scope, including "soil health indicators", "soil quality assessment", "biological indicators", "soil microbial biomass", "soil enzymes", "microbial diversity", "phospholipid fatty acids" (PLFA), "metabolic quotient", "rhizosphere interactions", and "digital soil mapping". The criteria for selecting articles for inclusion prioritized foundational papers establishing benchmark methodologies, contemporary research articles demonstrating the application of these indices under various stress conditions, and recent publications detailing methodological and computational advancements. The synthesized information was then structured to provide a critical evaluation of each category of biological index.

Results: This review synthesizes the vast field of soil biological indicators into key categories, evaluating their methodologies and applications. Methods for quantifying microbial abundance range from the accurate but laborious chloroform fumigation (FE/FI) and its faster proxy, Substrate-Induced Respiration (SIR), to culture-independent techniques that also reveal community structure. These modern methods, which supersede limited plate counts, include metagenomics (16S/18S sequencing) for deep taxonomic diversity and Phospholipid Fatty Acid (PLFA) analysis, a powerful tool that simultaneously quantifies viable biomass, community structure, and physiological stress. Soil function is assessed via overall metabolic activity (e.g., Basal Respiration, Dehydrogenase Activity) and a suite of specific soil enzymes (e.g., urease, phosphatase) that govern nutrient cycling. These data are further interpreted using key ecophysiological quotients (e.g., q_{mic} , q_{CO2}) to diagnose carbon dynamics and environmental stress, alongside monitoring crucial plant-microbe interactions (e.g., mycorrhiza, rhizobia) as integrated health indicators. Finally, to overcome the high cost and labor of these analyses, the review highlights emerging solutions, most notably Digital Soil Mapping (DSM), which uses machine learning (e.g., Random Forest) integrated with satellite and terrain data to cost-effectively create predictive, large-scale spatial maps of these complex biological properties.

Conclusion: Biological indices are sensitive, responsive, and indispensable tools for the modern assessment of soil health and quality. This review confirms that no single parameter can comprehensively capture the complexity of soil biological function. A holistic evaluation requires either a carefully selected suite of complementary indices (e.g., combining biomass, activity, and diversity metrics) or the use of multi-parameter composite indices (e.g., SHI, SQI). The selection must be hypothesis-driven, aligning the chosen indicators with the specific ecological question or management goal. Significant challenges remain, primarily the high cost, technical expertise, and time required for many of the most informative analyses (e.g., metagenomics, PLFA). Furthermore, the lack of method standardization across different soil types, climates, and ecosystems hinders the establishment of universal benchmarks for soil health. The future of soil health monitoring lies in overcoming these challenges through integration and technology. We recommend: (1) the establishment of long-term soil microbiome monitoring projects to move beyond static snapshots and understand the temporal dynamics of soil biology. (2) A concerted effort toward international standardization of key methods and the creation of global databases for soil biological data, which are essential for developing robust predictive models. (3) Most promisingly, the continued development and application of Digital Soil Mapping (DSM). By synergistically integrating field-level biological data with remote sensing (satellite) data and machine learning, DSM provides the only viable path toward creating the cost-effective, large-scale, and spatially-explicit soil health maps that land managers and policymakers urgently need for sustainable soil stewardship.

Cite this article: Aliasgharzad. N., 2025. Implication of Biological Indices for Assessing Soil Health .Review article. Journal of Soil Biology, 13 (2),171-191.



DOI: 10.22092/SBJ.2025.369574.280

Publisher: Soil Science Society of Iran



کاربرد شاخص‌های زیستی برای سنجش سلامت خاک

ناصر علی‌اصغرزاد^۱

۱- استاد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. n-aliasghar@tabrizu.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۴/۵/۱۴ پذیرش: ۱۴۰۴/۸/۱۴

چکیده

خاک به‌عنوان یکی از اجزای مهم محیط‌زیست، تأمین‌کننده اصلی غذا و تداوم بخش حیات در کره زمین است. امروزه، حفظ سلامت خاک و تنوع زیستی آن در اغلب کشورها مورد توجه قانون‌گذاران و تولیدکنندگان محصولات غذایی قرار گرفته است. ورود آلاینده‌های صنعتی و کشاورزی، گسترش شوری، تغییرات اقلیمی و مدیریت‌های نامناسب اراضی، تهدیدگرهای اصلی سلامت خاک هستند. گرچه در ارزیابی سلامت خاک، پارامترهای شیمیایی و فیزیکی نیز اهمیت دارند ولی پارامترهای زیستی به دلیل پاسخ سریع به تغییرات محیطی، جایگاه ویژه‌ای دارند. بدیهی است، با توجه به تعداد زیاد پارامترهای زیستی و ماهیت متفاوتشان، نمی‌توان تعداد انبوهی از آنها را در یک کار تحقیقی، اندازه‌گیری نمود. لذا داشتن دانش کافی از ماهیت پارامترها، سبب انتخاب درست آنها بر اساس اهداف خواهد شد و از هزینه‌های غیرضروری جلوگیری می‌شود. در این مقاله، مجموعه روش‌های (۱) میکروبیولوژیک شامل فعالیت، تراکم جمعیت و زیست‌توده میکروبی (۲) بیوشیمیایی شامل فعالیت انواع آنزیم‌های مطرح در چرخه عناصر غذایی، (۳) بررسی تنوع زیستی از طریق کشت مستقیم، تکنیک‌های مولکولی بر مبنای DNA یا RNA، بکارگیری مارکرهای بیوشیمیایی نظیر اسیدهای چرب فسفولیپیدی، (۴) برهمکنش‌های میکروب-گیاه در ریزوسفر شامل تثبیت‌کننده‌های نیتروژن همزیست یا آزادزی و همزیستی میکوریزی، مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرند. همچنین با توجه به هزینه‌های زیاد و زمان‌بر بودن سنجش‌های میکروبیولوژیک، راهکارهای جدید مبتنی بر بکارگیری اطلاعات ماهواره‌ای و یا تخمین شاخص‌ها از روی پارامترهای زودیافت، در این مقاله معرفی خواهند شد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های خاک، زیست‌توده میکروبی، کیفیت خاک، رصد محیط‌زیست، تنوع میکروبی.

مقدمه

خاک به عنوان اصلی‌ترین بستر تولید مواد غذایی، در گذر زمان و با افزایش جمعیت جهانی، صنعتی شدن و مدیریت‌های نامناسب همواره در معرض تهدید بوده است و تاکنون مساحت‌های زیادی از آن تخریب شده یا پتانسیل تولید خود را از دست داده‌اند. اراضی زیر کشت نیز عموماً با پدیده‌های آلودگی، شوری، فرسایش و غیره مواجه بوده و کیفیت خاک آنها کاهش پیدا کرده است. تغییرات اقلیمی نیز که از مدت‌ها پیش مطرح بوده و امروزه اثرات آن به وضوح در همه عرصه‌ها دیده می‌شود، اثرات نامطلوب بر کیفیت و سلامت خاک دارد. برای تولید غذای سلام نیاز به خاک سالم است و در این راستا، تولیدکنندگان عرصه کشاورزی و قانون‌گذاران محیط‌زیست در سراسر جهان در تلاشند با تدوین قوانین خاص و ارائه راهکارهای مناسب، در حفظ سلامت خاک نقش ایفا کنند. همچنین محققین این عرصه با معرفی پارامترهای مناسب و ارائه پروتکل‌های مختلف، سعی در ارزیابی کیفیت و سلامت خاک دارند. تقریباً همه خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و زیستی در تعیین سلامت خاک اهمیت دارند ولی خصوصیات زیستی (میکروبیولوژیک و بیوشیمیایی) دارای حساسیت بیشتری بوده و در کوتاه مدت به تغییرات حاصله، پاسخ می‌دهند (Griffiths et al, 2016; Rhitz et al., 2009). به عنوان نمونه، Domsch و همکاران (1983) پیشنهاد نمودند که اگر تغییرات میکروبیولوژیک خاک در اثر عوامل طبیعی یا مصنوعی، حداکثر پس از ۳۰ روز به حالت عادی برگردند، نوسانات عادی در نظر گرفته می‌شوند. در صورتی که اثر این عوامل تا ۶۰ روز بر پارامترهای میکروبیولوژیک ادامه یابد، آنها را عوامل قابل تحمل می‌نامند، ولی چنانچه این اثرات تا ۹۰ روز پایدار باشند، جزو عوامل تنشی محسوب خواهند شد. البته بسته به نوع پارامتر میکروبیولوژیک، ممکن است این بازه‌های زمانی تغییر کنند. همچنین اندازه‌گیری یک پارامتر به تنهایی، اطلاعات قابل اعتمادی بدست نمی‌دهد. مثلاً اندازه‌گیری کربن زیست‌توده میکروبی به تنهایی

مناسب نبوده ولی به همراه کربن آلی کل خاک، اطلاعات ارزشمندی از اثرات تغییر اقلیم، مدیریت اراضی و تخریب خاک بدست می‌دهد (Brooks, 1995).

گرچه تاکنون، پارامترهای زیستی زیاد و متنوع برای این منظور معرفی شده‌اند ولی اندازه‌گیری اغلب این پارامترها، پرهزینه بوده و مستلزم وقت زیاد است لذا برخی محققین، معیارهایی از قبیل، (۱) حساسیت به تغییرات در مدیریت مزرعه، (۲) داشتن همبستگی خوب با فرآیندهای مفید خاک، (۳) کارایی کافی برای نشان دادن فرآیندهای اکوسیستم، (۴) مفید و قابل درک بودن برای کاربر زمین و (۵) ساده و ارزان بودن اندازه‌گیری را برای انتخاب این پارامترها ارائه نموده‌اند (Doran and Zeiss, 2000). بدیهی است که این معیارها بسیار کلی بوده و بسته به اهداف هر تحقیق می‌توان پارامترهای متناسب را انتخاب نمود. مثلاً در بررسی اثرات محیطی بر چرخه عناصر غذایی و حاصلخیزی خاک، اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های درگیر در چرخه هر عنصر، اهمیت فراوانی دارد، در حالیکه برای مطالعات ترسیب کربن، اندازه‌گیری کربن زیست‌توده میکروبی و کربن آلی کل خاک، الویت خواهند داشت. به همین ترتیب، اندازه‌گیری سهم متابولیک^۱ (qco₂) به عنوان یک پارامتر اکوفیزیولوژیک میکروبی در خاک‌های آلوده و غیر آلوده می‌تواند شدت تنش را در جامعه میکروبی خاک نشان دهد گرچه اندازه‌گیری فعالیت برخی آنزیم‌های مرتبط با فعالیت متابولیک در خاک نظیر دهیدروژناز نیز در تعیین اثر آلاینده‌ها اهمیت دارد (Anderson, 2003).

با توجه به ماهیت پارامترهای زیستی، اندازه‌گیری اغلب آنها نیازمند تجهیزات ویژه و صرف هزینه‌های زیاد است. در این راستا محققین تلاش کرده‌اند که آنها را از روی پارامترهای ساده‌تر و کم‌هزینه‌تر، برآورد کنند و برای اینکار، برخی معادلات تجربی ارائه شده‌اند. این معادلات، به‌ویژه زمانی اهمیت پیدا می‌کنند که تعداد نمونه زیاد باشد. به عنوان مثال، اندازه‌گیری زیست‌توده میکروبی خاک با روش‌های تدخین-استخراج یا تدخین-انکوباسیون گرچه

¹ Metabolic quotient

اندازه‌گیری رایج، توانایی آن در تعیین سلامت خاک مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. همچنین سعی شده است، مبنای انتخاب پارامترها برای رسیدن اهداف تحقیق توضیح داده شود.

تعداد جمعیت میکروبی

شمارش مستقیم^۷

در این روش معمولاً سوسپانسیون هموژنیزه خاک با رنگ‌های فلورسنت نظیر آکریدین نارنجی^۸، رنگ-آمیزی شده و حجم مشخصی از آن بر روی لام قرار گرفته و تعداد میکروب‌ها توسط میکروسکپ اپی‌فلورسنت شمارش می‌شوند (Bloem et al., 1995). آکریدین نارنجی قابل عبور از دیواره میکروب‌ها بوده و به DNA متصل می‌شود. هنگام اتصال به DNA دو رشته‌ای، فلورسنت سبز و در اتصال به DNA تک رشته‌ای یا RNA، فلورسنت قرمز دارد. چون در حالت عادی، غالبیت با DNA دو رشته‌ای است لذا در میکروسکپ فلورسانس، میکروب‌ها با رنگ فلورسنت سبز دیده می‌شوند. رنگ‌های دیگر شامل FITC^۹، DAPI^{۱۰} یا سایبرگرین^{۱۱} نیز به اسیدهای نوکلئیک متصل می‌شوند و در مشاهده با میکروسکپ اپی‌فلورسنت، رنگ‌های زرد تا سبز نشان می‌دهند. با توجه به اتصال غیراختصاصی این رنگ‌ها به DNA آزاد متصل به ذرات خاک یا سایر کلوئیدهای خاک، نتایج شمارش میکروبی، توأم با خطا بوده و غالباً بیش برآوردی دارد. اخیراً، استفاده از رنگ سایتوکس‌گرین^{۱۲} در شمارش باکتری‌های خاک، نتایج بهتری بدست داده است زیرا با آنالیز طول‌موج‌های خروجی از میکروسکپ اپی‌فلورسنت، باکتری‌ها به رنگ سبز روشن ولی ذرات خاک به رنگ‌های آبی و قرمز دیده می‌شوند (Klauth et al., 2004). همچنین رنگ سایتوکس‌گرین فقط به سلول‌های زنده نفوذ

دقت خوبی دارند ولی بسیار پرهزینه و زمان‌بر هستند لذا معادلاتی برای برآورد آن از روی تنفس برانگیخته^۲ (SIR) ارائه شده‌اند. البته این معادله‌ها بر اساس شرایط محیطی، متفاوت هستند. شمارش جمعیت میکروبی خاک با روش‌های کشت نیز بسیار پرزحمت و زمان‌بر هستند در حالیکه مطالعات متعدد نشان داده‌اند که جمعیت میکروبی را می‌توان از روی تنفس پایه^۳ (BR)، فعالیت دهیدروژناز یا مقدار ATP خاک برآورد نمود چون بین جمعیت میکروبی فعال و پارامترهای مذکور، همبستگی آماری قابل قبول برقرار است (Aliasgharzad, 2010). اخیراً بکارگیری مدل‌های^۴ MLR،^۵ RF و^۶ CU برای برآورد پارامترهای زیستی پرهزینه از روی پارامترهای ساده، همچنین تحلیل‌گرهای زمین آمار ArcGIS در ترسیم نقشه‌های کیفیت و سلامت خاک نقش بسزایی در این راستا ایفا کرده‌اند (Siemi et al., 2022)

نگرش کلی مبنی بر اینکه احداث باغ یا عملیات کشاورزی در اراضی بایر یا مرتعی سبب آسیب‌رسانی به شاخص‌های میکروبیولوژیک و کاهش کیفیت و سلامت خاک می‌گردد، در اغلب موارد صحیح بوده ولی عمومیت ندارد و بسته به شرایط ممکن است نتایج متفاوت بدست دهد. Rezaei و همکاران (2015) در مطالعه خود بر روی تغییر کاربری اراضی بایر و مرتعی کم بازده به باغ سیب و زراعت‌های یونجه و ذرت، دریافتند که بسیاری از شاخص‌های میکروبیولوژیک، اکوفیزیولوژیک و آنزیمی خاک در این کاربری‌ها بهبود یافته‌اند. لذا با انتخاب درست این شاخص‌ها می‌توان به این‌گونه تغییرات اکولوژیک انسان‌زاد نیز پاسخ منطقی داد.

در ادامه مطالب، مهم‌ترین پارامترها و شاخص‌های میکروبیولوژیک و بیوشیمیایی خاک، دسته‌بندی شده و در هر مورد ضمن اشاره به ماهیت آن و روش‌های

⁸ Acridine orange

⁹ Fluorescein isothiocyanate

¹⁰ 4',6-diamidino-2-phenylindole

¹¹ Sybr green

¹² Sytox green

² Substrate induced respiration

³ Basal respiration

⁴ Multiple linear regration

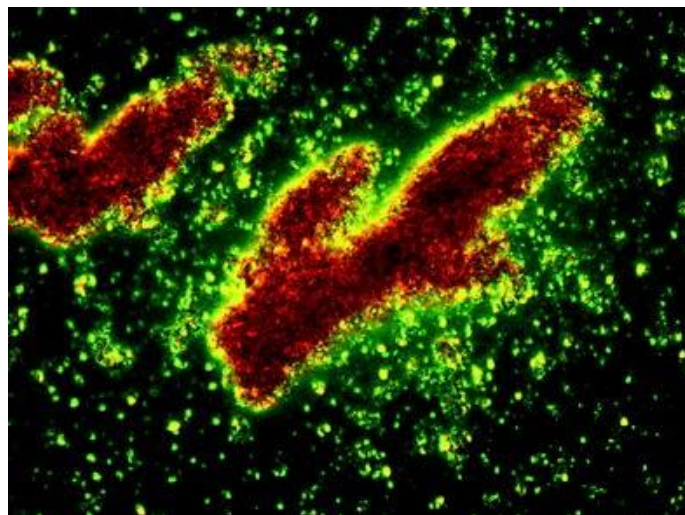
⁵ Random forest

⁶ Cubist

⁷ Direct count

شرایط خاک و ترکیب جامعه میکروبی متفاوت خواهد بود. فلوسایتومتری^{۱۳} نیز یک روش سنجش سریع برای تعداد باکتری‌های خاک است ولی اغلب به دلیل عدم تمایز بین باکتری‌ها و ذرات خاک هم اندازه آنها، بیش برآوردی دارد (Bressan et al., 2015).

کرده و در نتیجه جمعیت زنده شمارش می‌شود (Yepes-Pérez et al., 2024) در آزمایشی توسط Klauth و همکاران (2004)، جمعیت معینی از باکتری به خاک پاشیده شد. شمارش و بازیابی جمعیت با سایبرگرین ۳۸٪ ولی با سایتوکس گرین ۸۱٪ بود. بدیهی است، درصد بازیابی بسته



شکل ۱- رنگ آمیزی باکتری‌های خاک با سایتوکس گرین. باکتری‌ها به رنگ سبز و ذرات خاک به رنگ قرمز تیره دیده می‌شوند (Klauth et al., 2004).

Figure 1- Staining of soil bacteria with Sytox green. Green color represents bacteria, and red color represents soil particles (Klauth et al., 2004).

برای رشد میکروب‌ها ضروری بوده اما تأمین همه آنها در یک محیط کشت مصنوعی امکان‌پذیر نیست. در این راستا، برخی محققین سعی کرده‌اند با عصاره‌گیری از خاک و افزودن آن به محیط کشت، بتوانند نیازهای غذایی انواع میکروارگانیسم‌های خاکزی را تأمین کنند ولی گرچه تعداد کلنی‌های میکروبی افزایش یافته ولی مقایسه آن با نتایج تکنیک‌های مولکولی، نشان داده که هنوز بسیاری از میکروب‌ها نتوانسته‌اند در محیط غنی‌شده با عصاره خاک رشد نمایند. عدم کارایی عصاره‌گیری برای استخراج همه ترکیبات موجود در خاک، می‌تواند یکی از علل این امر باشد. ضمناً برهم‌کنش‌های بین میکروارگانیسم‌های خاک که توأم با تبادل سیگنال‌های مولکولی است و سبب القای رشد در برخی گونه‌های میکروبی می‌شود، نیز می‌تواند از دلایل عدم رشد برخی از آنها در محیط مصنوعی باشد.

شمارش به روش کشت میکروبی

روش‌های شمارش مبتنی بر کشت عموماً تعداد میکروب‌های قابل کشت را بدست می‌دهند زیرا بسیاری از میکروارگانیسم‌های خاک به دلیل عدم توان رشد در محیط کشت‌های مصنوعی، قابل شمارش در این روش‌ها نیستند. مطالعات متعدد بر مبنای روش‌های مولکولی بیانگر این هستند که کمتر از ۱۰ درصد میکروب‌های خاک قادر به رشد در محیط کشتهای رایج هستند (Hartmann et al., 2004). بنابراین، روش‌های مرسوم شامل شمارش کلنی^{۱۴} یا MPN^{۱۵} گرچه به‌طور وسیع برای تعیین جمعیت میکروبی در خاک بکار می‌روند ولی فقط تعداد میکروب‌هایی را بدست می‌دهند که توانایی رشد در محیط کشت مصنوعی را دارند. در محیط بسیار پیچیده‌ای نظیر خاک، تعداد بی‌شماری از ترکیبات آلی و معدنی وجود دارند که

¹⁵ Most probable number

¹³ Flow cytometry

¹⁴ Colony counting

بتوان تعداد میکروب‌های خاک را هم‌زمان با دو روش مبتنی بر کشت و مستقل از کشت، شمارش نمود، اطلاعات مفید دیگری هم بدست می‌آید. به‌عنوان مثال، شاید بتوان نسبت جمعیت زنده به مرده یا نسبت هوازی به بی‌هوازی را تخمین زد.

زیست‌توده میکروبی

در برخی مطالعات، تعداد سلول میکروبی را در جرم تقریبی یک سلول ضرب نموده و از این طریق زیست‌توده میکروبی را تخمین زده‌اند. (Bolter et al., 1993). با توجه به اینکه شمارش تعداد میکروب‌ها به روش مشاهده مستقیم میکروسکوپی یا روش‌های کشت، توأم با خطای بیش برآورد یا کم برآورد بوده و همچنین جرم یک سلول در گونه‌های مختلف میکروبی یکسان نیستند لذا نتایج حاصل از این روش قابل‌اعتماد نخواهد بود. در این راستا، روش‌های نسبتاً دقیق‌تر ارائه‌شده‌اند که در این قسمت به‌طور اجمالی مورد بحث قرار می‌گیرند. در روش‌های تدخین-انکوباسیون^{۱۶} یا تدخین-استخراج^{۱۷} که با بخار کلروفرم انجام می‌گیرند، مقدار کربن میکروبی خاک اندازه‌گیری شده و سپس با در نظر گرفتن درصد کربن میکروبی، آن را به جرم زیست‌توده (خشک یا تر) تبدیل می‌کنند (Lee et al., 2021; Mori et al., 2021). در روش تدخین-استخراج، علاوه بر کربن، نیتروژن و فسفر میکروبی نیز قابل‌اندازه‌گیری است. توجه شود که در خاک‌های با ماده آلی زیاد، بهتر است از روش تدخین-انکوباسیون استفاده نمود زیرا در روش تدخین استخراج، مقادیر زیاد از کربن آلی در محلول استخراج وارد شده و مشاهده تغییرات کربن آلی بین خاک تدخین شده و نشده با مشکل مواجه خواهد شد. همچنین در روش‌های مبتنی بر تدخین، گاهی عدم خروج کامل بخار کلروفرم از توده خاک، سبب بیش برآوردی کربن آلی خاک می‌شود. کارآیی پمپ مکش و اعمال خلاء در دسیکاتور و تعداد تکرار این فرآیند، در حذف کامل کلروفرم از خاک مؤثر است (FAO

همچنین در روش‌های مبتنی بر کشت از جمله MPN یا کشت در پلیت، انواع بی‌هوازی رشد نمی‌کنند چون شرایط کشت در این روش‌ها به‌صورت هوازی است. در منافذ ریز خاک که غالباً پر از آب هستند یا داخل خاکدانه‌ها که نفوذ اکسیژن در آنها بسیار کند است، باکتری‌های بی‌هوازی به تعداد قابل‌ملاحظه وجود دارند (Lee et al., 2021; Bolter et al., 2002). علیرغم نقایص روش‌های کشت میکروبی برای تعیین جمعیت آنها در خاک، هنوز هم در بسیاری از تحقیقات، این روش‌ها مورداستفاده قرار می‌گیرند زیرا هدف اینگونه تحقیقات صرفاً مقایسه فراوانی نسبی جمعیت میکروبی در بین انواع خاک‌ها است. در روش‌های مبتنی بر کشت میکروب، می‌توان از محیط‌زیست اختصاصی استفاده نموده و فراوانی نسبی گروه‌های مختلف میکروبی را بدست آورد. همچنین با افزودن بازدارندهای مختلف می‌توان گروه‌های خاصی را کشت داد. به‌عنوان مثال، با افزودن قارچ‌کش مناسب مثل نیستاتین می‌توان جمعیت باکتریایی، و با افزودن باکتری‌کش مناسب مثل کلرامفنیکل یا سیکلوهورگزمید، جمعیت قارچ‌ها را تعیین نمود. گرچه تعیین تعداد میکروب‌ها در خاک تابع عوامل مختلف از قبیل عمق نمونه‌برداری، فصل نمونه‌برداری، روش انتقال به آزمایشگاه، نحوه نگهداری خاک تا زمان شمارش و روش رقیق‌سازی خاک، است ولی به‌طورکلی تعداد کل میکروب‌ها در هر گرم خاک طبیعی ممکن است از یک میلیون در خاک‌های بیابانی و کویری تا یک میلیارد در خاک‌های مرتعی و جنگلی تغییر کند. تهیه سری رقت‌های خاک بسته به روش، ممکن است با آب مقطر، سرم نمکی یا پیروفسفات سدیم رقیق انجام شود که مسلماً نتیجه متفاوت خواهند داشت. روش شمارش نیز نتیجه را به‌طور زیاد تغییر می‌دهد. مثلاً در روش MPN تعداد باکتری‌ها تقریباً نصف روش رنگ‌آمیزی DNA با رنگ‌های اپی-فلورسنت به دست آمد زیرا برخی از این رنگ‌ها با DNA باکتری‌های مرده و سایر ذخایر DNA در خاک نیز واکنش میدهند (Lee et al., 2021). البته اگر در کارهای تحقیقی

¹⁷ Fumigation-extraction

¹⁶ Fumigation-incubation

با استخراج برخی مولکول‌های نشان مثل ارگسترول (استرول ویژه بازیدیومیسیت‌ها) یا گلومالین (گلیکوپروتئین ویژه قارچ‌های آربوسکولار) از خاک و اندازه‌گیری دقیق مقدار آنها، می‌توان زیست‌توده این گروه‌های قارچی را محاسبه نمود (Heidarianpour et al., 2020). آنالیز اسیدهای چرب فسفولیپیدی^{۱۸} (PLFA) و اسیدهای چرب لیپیدی خشتی^{۱۹} (NLFA) در خاک، از روش‌های بسیار دقیق است که در تعیین تنوع و فراوانی میکروارگانیسم‌های خاک مورد استفاده قرار می‌گیرد و برای تعیین زیست‌توده کل میکروبی یا زیست‌توده گروه‌های خاص میکروبی در خاک نیز بکار می‌رود (Frostegård and Bååth, 1996; Aliasgharzad et al., 2010; Lewe et al., 2021). با توجه به کاربرد زیاد این روش در تعیین تنوع میکروبی خاک، جزئیات روش در بخش ۳ توضیح داده می‌شود.

تنوع میکروبی

کشت عصاره خاک بر روی محیط کشت‌های جامد و تعیین تنوع میکروبی از روی مرفولوژی کلنی‌ها، کم‌دقت‌ترین روش تعیین تنوع میکروبی خاک است که در گذشته مورد استفاده قرار می‌گرفت. همانطوریکه در قسمت بالا توضیح داده شد، اولاً تعداد زیادی از گونه‌های میکروبی قادر به رشد در محیط کشت‌های مصنوعی نیستند، ثانیاً بسیاری از گونه‌های متفاوت باکتریایی یا قارچی دارای کلنی‌های با مورفولوژی مشابه هستند. لذا امروزه این روش، تقریباً منسوخ شده است.

روش‌های مولکولی مبتنی بر DNA، برای تعیین تنوع میکروبی خاک، بسیار دقیق و قابل اعتماد هستند زیرا میکروارگانیسم‌هایی که قادر به رشد در محیط کشت مصنوعی نیستند، در این روش شناسایی می‌شوند (Schloter et al., 2018). از این روش‌ها می‌توان به

2024). مقدار کربن زیست‌توده میکروبی از حدود ۱۷ در خاک‌های بیابانی تا ۲۶۰۰ میلی‌گرم کربن در کیلوگرم خاک در مراتع غنی و در خاک‌های کشاورزی از ۲۰۰ تا ۷۰۰ mg/kg گزارش شده است (Das et al., 2023). بدیهی است که عوامل متعددی از قبیل آب و هوا، نوع خاک، پوشش گیاهی، نحوه نمونه‌برداری، نگهداری نمونه و روش اندازه‌گیری می‌توانند نتیجه را تحت تأثیر قرار دهند. به‌طور کلی، مقدار کربن زیست‌توده میکروبی خاک حدود ۱ تا ۲ درصد از کل کربن آلی خاک را تشکیل می‌دهد. هرچه سهم کربن میکروبی از کل کربن آلی خاک بیشتر باشد، بیانگر پویایی و کیفیت خوب خاک است. با توجه به اینکه کربن میکروبی تقریباً ۵۰ درصد زیست‌توده خشک میکروبی را تشکیل می‌دهد لذا با ضرب کربن میکروبی در عدد دو می‌توان جرم خشک توده میکروبی را تخمین زد.

یکی از روش‌های غیرمستقیم تعیین زیست‌توده میکروبی، اندازه‌گیری تنفس برانگیخته است که با افزودن گلوکز به خاک و تعیین مقدار CO₂ خروجی انجام می‌شود. تنفس برانگیخته بیانگر جمعیت فعال میکروبی در خاک بوده و از طریق برخی روابط تجربی، به زیست‌توده میکروبی تبدیل می‌شود (Sparling, 1995). روابط تجربی ارائه‌شده، بسته به شرایط اقلیمی منطقه، پوشش گیاهی، خصوصیات خاک و فراوانی گروه‌های میکروبی، متفاوت بوده و در انتخاب آنها باید شرایط مذکور را در نظر گرفت. (Ananyeva et al., 2011). رابطه (۱) به‌عنوان نمونه توسط Nakamoto and Wakahara (2004) برای خاک‌های آندوسول ژاپن ارائه شده است. در این روش نیز می‌توان با افزودن بازدارنده‌های باکتریایی یا قارچی، تنفس-برانگیخته را در گروه هدف اندازه‌گیری نمود. این روش گرچه کم هزینه بوده و به مدت‌زمان کمتری نیاز دارد (حدود شش ساعت) ولی در مقایسه با روش‌های تدخین که در بالا شرح داده شد، دقت کمتری دارد.

(۱)

$$\text{Biomass C } (\mu\text{g g}^{-1} \text{ dry soil}) = 81.9 \times \text{CO}_2 (\mu\text{l g}^{-1} \text{ dry soil hr}^{-1})$$

¹⁹ Neutral lipid fatty acids

¹⁸ Phospholipid fatty acids

از آنها استفاده نمود (Lewe et al., 2021; White and Ringelberg, 1998). در این روش، مجموعه فسفولیپیدهای خاک استخراج‌شده و پس از استری کردن آنها، در دستگاه کروماتوگرافی گازی مورد آنالیز قرار می‌گیرند (Quideau et al., 2016). بر اساس زمان بازداری، هر یک از پیک‌ها نماینده یک گونه، جنس یا گروه میکروبی خاص است که از این طریق می‌توان به تنوع میکروبی در نمونه موردنظر دست‌یافت (شکل ۲). مساحت زیر منحنی در هر پیک بیانگر فراوانی آن میکروب بوده که با داشتن پیک استاندارد، می‌توان آن را به‌طور کمی محاسبه نمود و مقدار فسفولیپید موردنظر را برحسب میکروگرم در واحد وزن خاک به دست آورد. معادلات تجربی برای تبدیل مقدار فسفولیپید به زیست‌توده میکروبی ارائه‌شده‌اند؛ بنابراین در این روش، علاوه بر تعیین انواع میکروبی، می‌توان به فراوانی جمعیت هر گروه میکروبی نیز دست‌یافت. حتی در این روش، وضعیت فیزیولوژیک هر گروه میکروبی از نظر تغذیه‌ای یا وجود تنش، قابل ارزیابی است زیرا در شرایط فوق، تغییراتی در مولکول اسید چرب حاصل می‌شود که در کروماتوگرام قابل مشاهده است (Barin et al., 2013). پس از مرگ سلولی، فسفولیپیدها توسط آنزیم‌های فسفاتاز هیدرولیز گشته و تبدیل به اسیدهای چرب خنثی می‌شوند، در نتیجه با تعیین نسبت PLFA/NLFA می‌توان به فراوانی جمعیت فعال و غیرفعال در هر گروه میکروبی دست‌یافت (Frostegård and Bååth, 1996). علیرغم دقت زیاد در این روش و طیف وسیع اطلاعات حاصله، به دلیل نیاز به تجهیزات پیشرفته و هزینه‌های زیاد، در همه آزمایشگاه‌ها قابلیت اجرا ندارد.

روش تعیین پروفیل فیزیولوژیکی در جامعه میکروبی^{۲۳} در سالیان اخیر برای تعیین تنوع عملکردی^{۲۴} میکروبی در خاک مورد استفاده قرار گرفته است (Garland et al., 1997). در این روش که کیت‌های آن توسط شرکت‌های مختلف از جمله بایولاگ^{۲۵} تهیه می‌شوند،

DGGE^{۲۰}، TGGE^{۲۱} و متاژنومیکس^{۲۲} اشاره نمود. در هر سه روش، کل DNA نمونه خاک استخراج‌شده و سپس ناحیه ژنی 16S rDNA برای پروکاریوت‌ها یا 18S rDNA برای یوکاریوت‌ها از طریق PCR تکثیر می‌شود (Aman et al., 1990 & 1995; Lewe et al., 2021). در روش DGGE، قطعات تکثیرشده بر اساس گرادیان غلظت اوره در ژل آگارز، الکتروفورز گردیده و تعداد باندهای حاصله به‌عنوان تنوع میکروبی در نظر گرفته می‌شود. در روش TGGE نیز به همین طریق عمل نموده با این تفاوت که جداسازی قطعات DNA بر روی ژل بر اساس گرادیان دمایی انجام می‌گیرد (Muyzer and Smalla, 1998). در متاژنومیکس، محصولات حاصل از PCR، توالی‌یابی می‌شوند. داده‌های توالی‌یابی، به کمک نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی هوشمند آنالیز شده و تنوع و فیلوژنی جوامع میکروبی خاک به دست می‌آید (Vestergaard et al., 2017). با توجه به ابداع روش‌های پیشرفته توالی‌یابی که منجر به کاهش هزینه‌های توالی‌یابی نیز می‌شود، امروزه استفاده از این تکنیک برای بررسی تنوع موجودات زنده از جمله میکروب‌ها در اکوسیستم‌های طبیعی (آب، خاک و گیاه) و حتی فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان و حیوانات، در حال افزایش است. توالی‌یابی نواحی ITS1 یا ITS2 به جای ژن 16S rDNA، یا توالی-یابی یکی از نواحی V3-V4، V1-V3، V4-V5 از ژن 16S rDNA بجای توالی‌یابی کامل، می‌تواند ضمن صرفه‌جویی در هزینه‌ها، برای شناسایی جمعیت باکتریایی و تعیین تنوع مورد استفاده قرار گیرند (Lewe et al., 2021).

بررسی تنوع میکروبی از طریق مارکرهای لپیدی نیز در سالیان اخیر مورد توجه قرار گرفته است. فسفولیپیدهای موجود در غشای سیتوپلاسمی موجودات زنده از نظر ساختار مولکولی اسیدچرب برای گروه‌های مختلف میکروبی، اختصاصی بوده و می‌توان به‌عنوان مولکول نشان

²³ Community-level physiological profiling (CLPP)

²⁴ Functional diversity

²⁵ BioLogTM

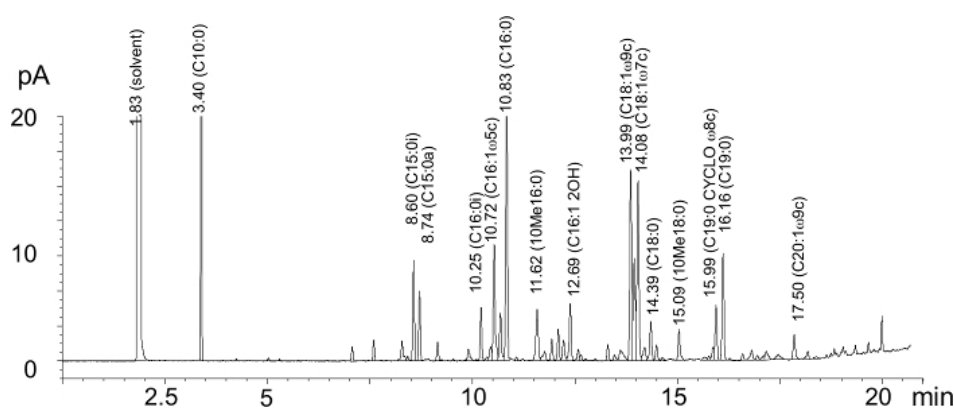
²⁰ Denaturing gradient gel electrophoresis

²¹ Temperature gradient gel electrophoresis

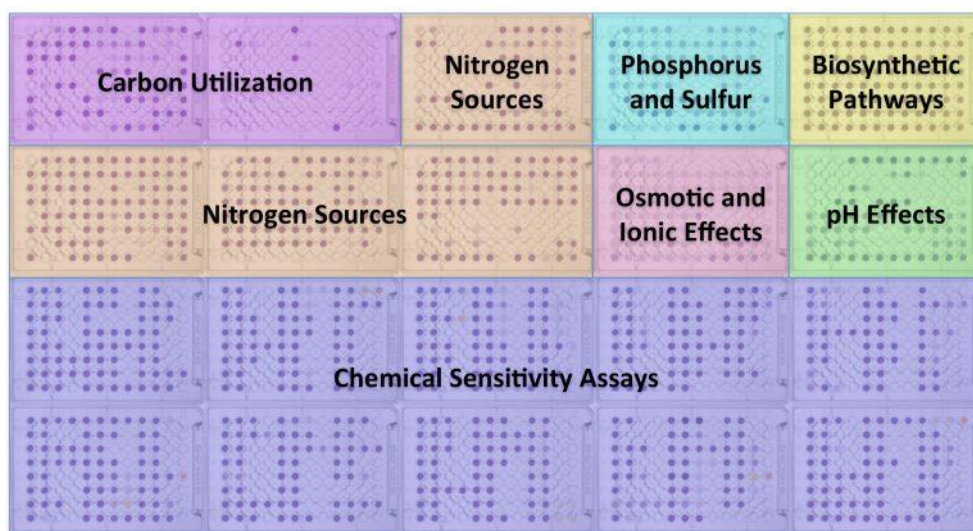
²² Metagenomics

شدت رنگ ایجادشده، متفاوت خواهد بود. سپس صفحه چاهک‌ها در دستگاه الایزا^{۲۶} قرار داده شده و نتیجه قرائت، توسط نرم‌افزار بیولاگ مورد آنالیز قرار گرفته و تنوع عملکردی نمونه خاک به دست می‌آید (Breure and Rutgers, 2000). برای استفاده از این روش نیاز به خرید کیت‌های مخصوص خاک به همراه نرم‌افزار از شرکت مربوطه است. کیت‌ها بسیار متنوع بوده و با کاربردهای میکروبیولوژی محیطی، پزشکی و صنعتی توسط شرکت‌های مختلف در جهان تولید می‌شوند.

پلیت‌هایی شامل ۹۶ چاهک وجود دارند که بر اساس الگوی خاص در هریک از آنها، ترکیبات ویژه شامل انواع قندها، آمینو اسیدها، سطوح مختلف اسیدیته و شوری، برخی آنتی‌بیوتیک‌ها، انواع اسیدهای چرب قرار داشته، بعلاوه همه چاهک‌ها حاوی یک ترکیب شیمیایی ویژه (مثل تری فنیل تترازولیوم کلراید) برای آشکارسازی فعالیت میکروبی هستند (Taha et al., 2015) (شکل ۳). عصاره خاک با مقادیر یکسان به همه چاهک‌ها افزوده شده و پس از انکوباسیون، بر اساس میزان فعالیت میکروبی در هر چاهک،



شکل ۲- نمونه‌ای از کروماتوگرام حاصل از آنالیز اسیدهای چرب فسفولیپیدی در خاک (Quideau et al., 2016)
Figure 2- A chromatogram originated from soil phospholipid fatty acids analysis (Quideau et al., 2016)



شکل ۳- نمونه‌ای از پلیت بایولاگ با الگوی توزیع ترکیبات مختلف در چاهک‌ها (Taha et al., 2015)
Figure 3- A schematic of BioLog plate with distribution pattern of different compounds in wells (Taha et al., 2015)

فعالیت میکروبی

اندازه‌گیری فعالیت تنفسی پایه یا برانگیخته، فعالیت آنزیم دهیدروژناز، مقدار ATP، الحاق تیمیدین یا لوسین^{۲۷} نشاندار به DNA در خاک (Baath, 1990)، مهم‌ترین روش‌هایی هستند که به‌طور رایج در تعیین فعالیت میکروبی خاک مورد استفاده قرار می‌گیرند. برای تعیین تنفس پایه، خروج گاز کربنیک از مقدار معینی از خاک و در مدت زمان مشخص اندازه‌گیری می‌شود. در مورد تنفس برانگیخته، ابتدا مقدار معینی محلول گلوکز به خاک افزوده‌شده و سپس شدت تنفس همانند روش تنفس پایه ولی در مدت کوتاه (۴-۶ ساعت) اندازه‌گیری به عمل می‌آید. برای تعیین فعالیت آنزیم دهیدروژناز، سوسترای مناسب نظیر تری فنیل تترازولیوم کلراید (TTC) به مقدار معینی از خاک افزوده‌شده و به مدت معینی در دمای مناسب انکوبه می‌گردد. مقدار تری فنیل فورمازان (TPF) حاصل از فعالیت دهیدروژناز، پس از استخراج با یک حلال آلی، با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری می‌شود (Bloem et al., 1995). فعالیت تنفس پایه بیانگر فعالیت میکروبی بومی خاک با استفاده از کربن آلی موجود در خاک است. چون غالباً کربن آلی خاک از نوع نسبتاً پایدار و سخت تجزیه شونده است لذا رقابت چندانی بین میکروب‌ها در استفاده از این منابع وجود ندارد ولی تنفس برانگیخته که با افزودن کربن آلی سهل‌الوصول (گلوکز) به خاک همراه است، گروه میکروبی فعال و پویا به سرعت پاسخ داده و در رقابت با سایر گروه‌های میکروبی، پیروز میدان خواهند بود. در نتیجه زیاد بودن شدت تنفس برانگیخته در یک خاک بیانگر سهم بالای میکروب‌های فعال نسبت به کم فعال است (Aliasgharzad, 2000). فعالیت آنزیم‌های گروه دهیدروژناز که در چرخه تنفسی و زنجیره انتقال الکترون برای تولید انرژی دخیل هستند، همبستگی بسیار بالایی با فعالیت میکروبی دارد. این گروه آنزیمی از دسته درون‌سلولی بوده و در بخش غیرزنده خاک وجود ندارد.

مقدار ATP در خاک نیز که مولکول تأمین‌کننده انرژی فعالیت‌های زیستی است، مستقیماً بیانگر فعالیت بیولوژیک خاک است. گاهی، استخراج و اندازه‌گیری ATP+ADP به‌عنوان معیاری از فعالیت میکروبی خاک در نظر گرفته می‌شود، گرچه سهم هریک آنها در تخمین فعالیت زیستی یکسان نیست. از این رو، در فرمول‌های محاسباتی به آنها وزن داده می‌شود، مثلاً مقدار ADP به عدد دو تقسیم‌شده و سپس با مقدار ATP جمع می‌شود.

سرعت و مقدار الحاق نوکلئیدهای تیمین یا لوسین به DNA نیز بیانگر سرعت سنتز مولکول DNA و همانندسازی آن بوده و برآوردی مستقیم از فعالیت میکروبی در خاک است. در این روش، مقدار معینی از نوکلئیدهای تیمین یا لوسین نشان‌دار به محیط کشت افزوده‌شده و سپس با سوسپانسیون خاک مایه‌زنی می‌شود. پس از رشد میکروب‌ها در مدت زمان معین، مقدار نوکلئیدهای نشان‌دار در توده میکروبی اندازه‌گیری شده و از این طریق فعالیت میکروبی در خاک برآورد می‌گردد (Baath, 1990).

روابط میکروب-گیاه

در بین روابط سودمند بین میکروب‌ها و گیاهان، رابطه همزیستی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. همزیستی باکتری‌های ریزوبیومی با ریشه لگوم‌ها از نظر تأمین نیتروژن گیاه و سایر اثرات مفید این باکتری‌ها بر رشد گیاه، به‌طور وسیع مورد مطالعه قرار گرفته و اثرات محیطی و مدیریتی بر کارایی این همزیستی بررسی شده است. وجود گره‌های فراوان و فعال (گره‌های با مقطع صورتی رنگ) در ریشه لگوم‌ها حاکی از حضور جمعیت فراوان و کارآمد از باکتری‌های ریزوبیومی در خاک مزرعه بوده و بیانی از سلامت خاک نیز است. در بررسی اثرات کودهای شیمیایی مخصوصاً نیتروژنه، آلاینده‌های مختلف، تغییرات اقلیمی، تنش‌های خشکی و شوری و غیره بر اکوسیستم خاک، مطالعه وضعیت این همزیستی به‌عنوان یکی از شاخص‌های

²⁷ Thymidine or leucine incorporation

مهم محسوب می‌شود، به‌ویژه که لگوم‌ها جزو گیاهان رایج در اراضی کشاورزی و مرتعی هستند. برخی از این شاخص‌ها شامل شمارش تعداد گره در ریشه، تعیین درجه گره‌بندی و تعیین وزن مجموع گره‌ها در ریشه هستند که برحسب نوع گیاه لگوم، یک یا همه این شاخص‌ها مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. همچنین، اندازه‌گیری شدت تثبیت زیستی نیتروژن در گره‌ها که عموماً با روش احیای استیلن و دستگاه کروماتوگرافی گازی انجام می‌شود، از دیگر شاخص‌های مهم در این رابطه است.

همزیست‌های میکوریزی که بین قارچ‌ها و ریشه گیاهان ایجاد می‌شوند، نیز در پایداری اکوسیستم‌های زراعی، باغی، مرتعی و جنگلی اهمیت شایانی داشته و می‌تواند به‌عنوان یکی از شاخص‌های کیفی و سلامت خاک موردنظر قرار گیرد. انواع میکوریز بر اساس مشخصات مورفولوژیک در شش گروه قرار می‌گیرند که از بین آنها، میکوریز آربوسکولار^{۲۸} غالباً در اکوسیستم‌های زراعی، باغی و مرتعی گسترش داشته و میکوریز غلاف‌دار^{۲۹} در اکوسیستم‌های جنگلی مخصوصاً سوزنی برگان غالب هستند. همزیستی‌های میکوریزی نیز تحت تأثیر عوامل محیطی و مدیریتی مزرعه بوده و در بین کودهای شیمیایی، انواع فسفره مخصوصاً در مقادیر زیاد، تأثیر منفی بر استقرار و عملکرد این همزیستی دارد. مهم‌ترین نقش قارچ‌های میکوریزی، تأمین فسفر گیاه است. مصرف بی‌رویه کودهای فسفره سبب کاهش استقرار همزیستی میکوریزی شده و به‌تدریج، جمعیت قارچ‌های همزیست نیز تقلیل می‌یابد. اثر منفی کودهای شیمیایی فسفره بر همزیستی میکوریز آربوسکولار بیشتر از بقیه انواع میکوریز است زیرا قارچ‌های شرکت‌کننده در این نوع میکوریز، همزیست اجباری بوده و برای ادامه حیات و حفظ جمعیت خود نیاز به برقراری همزیستی با ریشه گیاهان دارند. وجود فسفر قابل‌جذب زیاد در خاک سبب جذب فسفر کافی توسط گیاه از خاک شده و در نتیجه تمایل به ایجاد همزیستی میکوریزی در گیاه کاهش پیدا می‌کند (Olsson et al., 2010). با توجه

به نقش‌های متعدد این همزیستی در بهبود رشد گیاه (علاوه بر تأمین فسفر) از طریق افزایش جذب آب و سایر عناصر غذایی، افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش‌های زیستی (آفات و عوامل بیماری‌زای گیاهی) و غیر زیستی (شوری، خشکی، سرما، فلزات سنگین و سایر آلاینده‌ها) و همچنین نقش مؤثر این قارچ‌ها در بهبود خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک خاک، مطالعه این قارچ‌ها در خاک اهمیت زیادی دارد. در این راستا، اندازه‌گیری پارامترهای مرتبط با این همزیستی از جمله تعیین درصد کلنیزاسیون میکوریزی ریشه و شمارش تعداد اسپور قارچ‌ها در خاک، می‌تواند در ارزیابی سلامت خاک موردتوجه قرار گیرد.

در سالیان اخیر، استفاده از مارکرهای پروتئینی (گلیکوپروتئین، گلومالین) و فسفولیپیدی (16:1ω5) به‌عنوان مولکول‌های نشان برای قارچ‌های میکوریز آربوسکولار برای مطالعه فراوانی این قارچ‌ها در خاک و ریشه، مورد استقبال محققین قرار گرفته است زیرا به دلیل ماهیت اجباری در همزیستی این قارچ‌ها با ریشه گیاهان، کشت و جداسازی آنها در محیط‌های مصنوعی امکان‌پذیر نیست لذا بکارگیری این مارکرها می‌تواند به راحتی زیست‌توده این قارچ‌ها را در خاک و ریشه تعیین کند (Quideau et al., 2016; Siami et al., 2022). قارچ اندوفیت *Serendipita indica* (با نام قبلی *Piriformospora indica*) که همزیستی مفیدی با ریشه اغلب گیاهان ایجاد میکند، از دیگر قارچ‌های مفید خاکی است و در افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی از جمله خشکی و شوری، نقش مهمی ایفا میکند. همچنین در بهبود تغذیه گیاهان نیز اثر مثبتی دارد (Heidarianpour et al., 2020). در برخی گیاهان اثر هم‌افزایی آن در تلقیح توأم با قارچ‌های میکوریزی و/یا باکتری‌های ریزوبیومی گزارش شده است بررسی فراوانی این قارچ در اکوسیستم‌های خاکی، یکی دیگر از شاخص‌های مهم در ارزیابی میکروبیولوژیک کیفیت خاک است. برای این منظور باید نمونه‌های ریشه یا خاک به روش‌های مولکولی مبتنی

²⁹ Sheathing mycorrhiza

²⁸ Arbuscular mycorrhiza

است مقایسه نمود یا خاک یک مترع دست نخورده با بخش دیگر آن که تحت کشت و کار قرار گرفته است قابل قیاس است. به عنوان مثال، مقدار آن در حالت تک‌کشتی مداوم و تناوب زراعی در خاک‌های مناطق خشک به ترتیب ۲۳ و ۵۰ و مناطق مرطوب به ترتیب ۲۹ و ۱۵ mg/g است. مقادیر بالاتر و پایین‌تر از این اعداد به ترتیب نشان‌دهنده تجمع و اتلاف کربن فعال در خاک است (Aliasgharzad, 2010). سهم میکروبی با استفاده از رابطه (۲) محاسبه می‌شود که در آن q_{mic} سهم میکروبی بر حسب میلی گرم بر گرم، C_{mic} کربن میکروبی بر حسب میلی گرم در واحد وزن خاک و C_{org} کربن آلی کل خاک بر حسب گرم در واحد وزن خاک هستند. چون وزن خاک در صورت و مخرج کسر، یکسان است لذا از فرمول حذف شده است.

(۲)

$$q_{mic} = C_{mic} / C_{org}$$

در برخی تحقیقات، این شاخص را با استفاده از رابطه (۳) بر حسب درصد محاسبه کرده‌اند. در این صورت سهم میکروبی برای خاک‌های کشاورزی معمولی بین ۱ تا ۲٪ گزارش شده است. برای خاک‌های شالیزاری حدود ۲/۷ درصد، جنگلی حدود ۲٪ و مرتعی تا ۳٪ نیز تعیین شده است (Liu et al., 2023). با وجود این، در خاک‌هایی که تجمع کربن آلی بسیار زیاد است (مثل خاک‌های سطحی جنگل‌ها)، حتی با وجود جمعیت میکروبی زیاد، ممکن است این درصد کمتر به دست آید چون مقدار کربن آلی در مخرج کسر قرار می‌گیرد؛ بنابراین در مطالعات مقایسه‌ای باید به این نکات توجه شود.

(۳)

$$\%q_{mic} = [(C_{mic} / C_{org}) / 1000] \times 100$$

سهم متابولیک^{۳۱}

سهم متابولیک بیانگر میزان دی‌اکسیدکربن آزادشده از کربن میکروبی است. هرچه این شاخص کمتر باشد چرخه‌های میکروبی کارآمدتر خواهد بود. مقدار

بر DNA آنالیز شوند چون روش کشت قارچ از خاک یا مشاهده میکروسکوپی قارچ در ریشه، قابل اطمینان نیستند. مخصوصاً در مورد ریشه گیاهان که به‌طور طبیعی همزیستی میکوریزی دارند، تمایز اندام‌های این قارچ با قارچ‌های میکوریزی در مشاهدات میکروسکوپی دشوار است (Tavasolee et al., 2011).

شاخص‌های اکوفیزیولوژیک

همانطوریکه در بخش ۲ توضیح داده شد، بیومس میکروبی خاک از شاخص‌های مهم در ارزیابی کیفیت و سلامت خاک است. از بین روش‌های مختلفی که در بالا به آنها اشاره شد، روش تدخین-انکوباسیون یا تدخین-استخراج، بسیار مرسوم بوده و از طریق اندازه‌گیری کربن میکروبی خاک و سپس بکارگیری روابط تجربی، مقدار بیومس میکروبی محاسبه می‌شود. برخی شاخص‌های اکوفیزیولوژیک خاک را می‌توان با استفاده از داده‌های حاصل از این روش، محاسبه نمود که در زیر توضیح داده می‌شوند.

سهم میکروبی^{۳۰}

یکی از این شاخص‌ها، سهم میکروبی^۳ است که با محاسبه نسبت کربن میکروبی به کربن آلی کل خاک بدست می‌آید و زیاد بودن این شاخص بیانگر پویایی کربن آلی خاک است. هر چه سهم کربن میکروبی از کربن آلی خاک بیشتر باشد، دلیل بر فعالیت میکروبی بیشتر و به تبع آن، سرعت زیاد چرخه عناصر غذایی خواهد بود. برآیند این عوامل در حاصلخیزی خاک نمود پیدا می‌کند. البته تعیین محدوده برای این پارامتر نمی‌تواند قابل تعمیم به همه اکوسیستم‌ها باشد؛ زیرا مقادیر آن در خاک‌های زراعی، باغی، مرتعی و جنگلی بسیار متفاوت است و اصولاً باید در اکوسیستم‌های مشابه، مقایسه شود. به عنوان نمونه، مقدار تقریبی آن در یک منطقه که جنگل تراشی شده است، می‌توان این پارامتر را با نواحی حاشیه که جنگل دست‌نخورده

³¹ Metabolic quotient³⁰ Microbial quotient

می‌شود. چون وزن خاک در صورت و مخرج کسر، یکسان است لذا از فرمول حذف شده است.

(۴)

$$q_{CO_2} = CO_2 - C / C_{mic} \times h$$

فعالیت آنزیمی

آنزیم‌های خاک مراحل معینی از تجزیه مواد آلی را کاتالیز می‌کنند و در چرخه بیوژئوشیمیایی عناصر غذایی دخیل هستند؛ بنابراین آنزیم‌های خاک کاتالیزورهایی هستند که در تنظیم پاسخ‌های اکوسیستم از طریق تغییرات شرایط غیرزیستی (دما، رطوبت، دسترسی عناصر غذایی، کیفیت سوبسترای ورودی) و زیستی نقش بزرگی را بازی می‌کنند (Paz-Ferreiro et al., 2015). آنزیم‌ها به دو گروه درون سلولی^{۳۲} و برون سلولی^{۳۳} تقسیم می‌شوند. انواع درون سلولی نظیر دهیدروژناز، نیتروژناز، کاتالاز، پراکسیداز و نیترات ریداکتاز فقط داخل سلول‌های زنده فعالیت نموده و اندازه‌گیری فعالیت آنها نه تنها سرعت فرایندهای بیوشیمیایی مربوطه را نشان می‌دهد بلکه همبستگی بالایی نیز با فعالیت میکروبی خاک دارد. بدیهی است عوامل مؤثر بر فعالیت جامعه میکروبی، به سرعت در فعالیت آنزیم‌های درون سلولی نیز منعکس می‌گردد. آنزیم‌های برون سلولی نظیر اوره‌آز، سلولاز، فسفاتازها و دی-آمینازها علاوه بر فعالیت در داخل سلول‌های زنده، در محیط خارج از سلول نیز فعال هستند؛ بنابراین فعالیت این آنزیم‌ها در خاک ممکن است لزوماً با فعالیت میکروبی همبستگی نداشته باشد. بخش اعظم آنزیم‌های برون سلولی در خاک به‌صورت جذب‌شده در سطوح کلئیدها هستند و این پدیده سبب ماندگاری بیشتر در خاک شده و همچنین نسبت به تغییرات محیطی مقاوم‌تر می‌شوند (Alef and Nannipieri, 1995). در اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های برون سلولی، بخش تثبیت‌شده در سطوح ذرات خاک نسبت به بخش داخل سلولی، سهم بیشتری دارد. انتخاب نوع آنزیم در مطالعات سلامت و کیفیت خاک بسیار اهمیت دارد و باید به‌صورت سنجیده عمل شود. اگر جنبه‌های

معمول این پارامتر در خاک‌های کشاورزی ۳-۰/۵ میلی گرم کربن CO₂ بر گرم کربن میکروبی در ساعت است. در مطالعات وسیع که در مراتع استرالیا، آسیا، اروپا و آمریکای شمالی و جنوبی انجام گرفته، سهم متابولیک از ۰/۱۸ تا ۴/۱ mg CO₂-C/g MBC/h (Risch et al., 2023) به‌طور استاندارد، برای محاسبه این شاخص باید تنفس پایه در خاک در مدت ۷ روز انکوباسیون اندازه‌گیری شود ولی در تحقیقات مختلف، مدت زمان انکوباسیون برای تعیین تنفس متفاوت بوده و از چند روز تا چند هفته گزارش شده است. کربن زیست‌توده میکروبی نیز با روش‌های مختلف اندازه‌گیری شده است در حالیکه روش نسبتاً دقیق‌تر برای این منظور، تدخین-استخراج است. از این رو، محدوده‌های گزارش شده برای این شاخص متنوع هستند. به‌طور کلی، سهم متابولیک که در یک منطقه با روش‌های معین اندازه‌گیری شده باشند، قابل مقایسه خواهند بود. مقادیر بیشتر و کمتر از این محدوده مناسب نیستند. سهم متابولیک زیاد (به‌طور نسبی) به دلیل وجود تنش‌هایی نظیر خشکی، شوری، کودهای شیمیایی، علف‌کش‌ها، آلاینده‌ها و فقر غذایی در جامعه میکروبی خاک است که باعث می‌شود میکروارگانیسم‌ها به‌طور غیرطبیعی تنفس بیشتری انجام داده و مصرف انرژی و اتلاف کربن بیشتری رخ دهد (Anderson, 2003). سهم متابولیک به‌عنوان یک شاخص اکوفیزیولوژیک، در ارزیابی سلامت و کیفیت زیستی خاک کاربرد زیادی داشته و تأثیر عوامل تنشی بر فعالیت میکروبی خاک را به‌سرعت نشان می‌دهد. Anderson (2003) گزارش کرد که مقادیر بیشتر از ۲ میلی گرم کربن CO₂ بر گرم کربن میکروبی در ساعت برای سهم متابولیک بیانگر کارایی کمتر جامعه میکروبی است و حاکی از وجود تنش در آنهاست. سهم متابولیک (q_{CO2}) با استفاده از رابطه (۴) محاسبه می‌شود که در آن تعداد میلی گرم CO₂ (برحسب کربن) حاصل از تنفس پایه خاک در یک ساعت به مقدار کربن میکروبی (گرم) تقسیم

³³ Exoenzyme

³² Endoenzyme

(۶)

$$EAN = DHA + (CA/10) + (PA/40) + (DAA/2) + (AMA/20)$$

محدوده‌های عددی به دست آمده برای این شاخص‌های تجربی (BFI, EAN) بسیار متفاوت هستند زیرا تابع عوامل زیادی از جمله آب‌وهوا، خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک خاک، پوشش گیاهی، کاربرد کودهای شیمیایی و سموم آفت‌کش و غیره هستند و اصولاً در هر مطالعه باید داده‌های حاصل از همان منطقه مقایسه شوند. در این راستا، شاخص‌های چند پارامتری دیگری از قبیل ^{۳۶}SHI، ^{۳۷}SQI، ^{۳۸}IMI نیز ارائه شده‌اند که برخی از آن‌ها ترکیبی از پارامترهای فیزیکی، شیمیایی و گاهی بیولوژیک هستند.

ارتباط پارامترها با همدیگر و با سلامت خاک

مهم‌ترین پارامترها و شاخص‌های زیستی و میکروبیولوژیک برای ارزیابی کیفیت و سلامت خاک در قسمت‌های قبلی مورد بحث و بررسی قرار گرفتند ولی باید در نظر داشت که کیفیت و سلامت خاک یک مفهوم بسیار گسترده بوده و صرفاً با استناد به ویژگی‌های زیستی قابل ارزیابی جامع نیست. در این راستا، در بخش زیستی نیز اکتفا نمودن به یک یا دو پارامتر زیستی ممکن است گویای وضعیت واقعی در شرایط طبیعی خاک نباشد (Bünemann et al., 2018). بر این اساس، باید با ملحوظ داشت اهداف تحقیق، در انتخاب پارامترهای زیستی دقت کافی نمود و همچنین بررسی ارتباط بین پارامترها برای تفسیر نتایج دارای اهمیت زیادی است. بدیهی است که در یک اکوسیستم خاکی معین، شاخص‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیک نمی‌توانند مستقل از هم باشند و به احتمال زیاد، همبستگی‌های معنی‌داری میان آنها خواهد بود (Bastida et al., 2008). گاهی فقدان چنین همبستگی‌ها در برخی تحقیقات، سؤال‌برانگیز است و اگر

تغذیه گیاهان مدنظر باشد، آنزیم‌های دخیل در چرخه‌های نیتروژن و فسفر در الویت قرار می‌گیرند. البته در هر کدام از این چرخه‌ها، تعداد زیادی آنزیم دخیل هستند ولی با در نظر گرفتن صرف وقت برای اندازه‌گیری‌ها و همچنین هزینه‌های مربوطه، اصولاً یک یا دو آنزیم کلیدی در هر چرخه انتخاب می‌شود. مثلاً اوره‌آز و ال-آسپاراژیناز یا ال-گلوتامیناز در چرخه نیتروژن و فسفاتازهای اسیدی و قلیایی در چرخه فسفر، مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. برای چرخه کربن، آنزیم‌های سلولاز (خاک‌های مرتعی، جنگلی، باغی)، زایلاناز (خاک‌های زراعی) و بتاگلوکوزیداز بیشتر توصیه شده‌اند. برای بررسی تولید هوموس از مواد چوبی که با هیدرولیز لیگنین کاتالیز می‌شود، آنزیم‌های لاکاز یا فنل اکسیداز اهمیت دارند. در چرخه گوگرد، آریل سولفاتاز نقش کلیدی دارد. عموماً در ارزیابی سلامت و کیفیت خاک، استناد به فعالیت یک آنزیم، قابل اعتماد نیست و اصولاً باید بیش از یک آنزیم مدنظر باشد زیرا ممکن است یک آنزیم به دلیل عدم وجود سوبسترای لازم یا وجود یک بازدارنده خاص در خاک، فعالیت بسیار کمتری نشان دهد که بیانگر شرایط واقعی آن خاک نیست (Rahul et al., 2022). برخی محققین، با استفاده از قرار دادن فعالیت چندین آنزیم در معادلات تجربی، شاخص‌های کاربردی معرفی کرده‌اند (Alkorta et al., 2003). به عنوان مثال شاخص بیولوژیک حاصلخیزی خاک ^{۳۴} (BFI) با معادله زیر محاسبه می‌شود که در آن DA فعالیت دهیدروژناز، K ضریب نسبت و CA فعالیت کاتالاز است (Saviozzi et al., 2011).

(۵)

$$BFI = (DA + K \times CA) / 2$$

در رابطه تجربی دیگر برای ارزیابی حاصلخیزی خاک از شاخص EAN (عدد فعالیت آنزیمی ^{۳۵}) استفاده شده است که در آن DHA, CA, PA, DAA, AMA به ترتیب فعالیت آمیلاز، دی‌آمیناز، فسفاتاز، کاتالاز و دهیدروژناز می‌باشند (Paz-Ferreiro et al., 2016).

³⁷ Soil quality index³⁸ Integrated microbial index³⁴ Soil biological fertility index³⁵ Enzyme activity number³⁶ Soil health index

از دقت اندازه‌گیری‌ها (نمونه‌برداری و سنجش‌های آزمایشگاهی) مطمئن هستیم، باید به دنبال توجیه و تفسیر علمی آنها باشیم. مثلاً عدم وجود همبستگی معنادار بین فعالیت دهیدروژناز با فعالیت تنفس میکروبی خاک، به راحتی قابل تفسیر نیست.

برآورد شاخص‌های زیستی به کمک اطلاعات ماهواره‌ای و مدل‌ها

با توجه به ماهیت پارامترهای زیستی، اندازه‌گیری اغلب آنها نیازمند تجهیزات ویژه و صرف هزینه‌های زیاد است. مخصوصاً زمانی که اینگونه ارزیابی‌ها در مقیاس وسیع مورد نیاز باشد، عملاً اندازه‌گیری چنین پارامترها مقرون به صرفه نبوده و به مدت زمان زیادی نیاز خواهد داشت. در این راستا محققین تلاش کرده‌اند که آنها را از روی پارامترهای ساده‌تر و کم‌هزینه‌تر، برآورد کنند و برای اینکار، برخی معادلات تجربی ارائه شده‌اند. این معادلات، به ویژه موقعی اهمیت پیدا می‌کنند که تعداد نمونه زیاد باشد. به عنوان مثال، اندازه‌گیری زیست‌توده میکروبی خاک با روش‌های تدخین-استخراج یا تدخین-انکوباسیون گرچه دقت خوبی دارند ولی بسیار پرهزینه و زمان‌بر هستند لذا معادلاتی برای برآورد آن از روی تنفس برانگیخته ارائه شده‌اند. البته این معادله‌ها بر اساس شرایط محیطی، متفاوت هستند. شمارش جمعیت میکروبی خاک با روش‌های کشت نیز بسیار پرزحمت و زمان‌بر و درعین حال کم‌دقت هستند در حالیکه مطالعات متعدد نشان داده‌اند که جمعیت میکروبی را می‌توان از روی تنفس پایه، فعالیت دهیدروژناز یا مقدار ATP خاک برآورد نمود چون بین جمعیت میکروبی فعال و پارامترهای مذکور، همبستگی آماری قابل قبول برقرار است (Sparling, 1995). اخیراً به کارگیری مدل‌های آماری مختلف از جمله RF برای برآورد پارامترهای زیستی پرهزینه از روی پارامترهای ساده، همچنین تحلیل‌گرهای زمین‌آمار ArcGIS در ترسیم

نقشه‌های کیفیت و سلامت خاک نقش بسزایی در این راستا ایفا کرده‌اند (Minasny and McBratney, 2016).

به طور کلی تغییرپذیری مکانی ویژگی‌های خاک از یک نقطه به نقطه دیگر باعث گردیده است که تخمین‌های نقطه‌ای با استفاده از نقشه‌های سنتی خاک از دقت مناسبی برخوردار نباشند (زیادت ۲۰۰۷). به دنبال آن نقشه‌برداری رقومی خاک^{۳۹} (DSM) که برای اولین بار توسط McBratney و همکاران (2003) ارائه گردید، تحول عظیمی در مطالعات خاک پدید آورد که در بررسی‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است و روزبه‌روز نیز در حال افزایش است (Minasny and McBratney, 2016). Kempen و همکاران (2012) نیز گزارش نمودند که با کاربرد DSM نه تنها هزینه‌های صرف شده حدود ۳۰ درصد در مقایسه با روش‌های مرسوم نقشه‌برداری خاک کاهش یافته است، بلکه دقت نقشه‌های تولیدشده نیز افزایش پیدا کرده است.

برای پیش‌بینی پراکنش مکانی ویژگی‌های خاک، مدل‌های مختلفی در محیط R وجود دارد. مدل جنگل تصادفی (RF) نیز یکی از مدل‌های مطرح است که در سال‌های اخیر به وفور با موفقیت در DSM مورد استفاده قرار گرفته است. مدل RF توسط Breiman (2001) ارائه شده است که از توسعه درخت‌های تصمیم‌گیری ایجاد شده است. این مدل در تحقیقات مختلفی مانند پیش‌بینی مقدار گلومالین (گلیکوپروتئین خاص در قارچ‌های آربوسکولار) خاک (Siami et al., 2022)، شاخص‌های آلودگی خاک (Alvyar et al., 2022) و کربن آلی و کربن غیر آلی خاک (Sreenivas et al., 2016) با دقت قابل قبولی مورد استفاده قرار گرفته است.

نتیجه‌گیری کلی و چشم‌انداز آینده

با توجه به تغییرات جهانی محیط‌زیست و روند رو به افزایش تخریب اراضی، درک صحیح از فرآیندهای فیزیکی، شیمیایی و زیستی برای مدیریت دقیق آنها،

³⁹Digital soil mapping

ضروری است. در این میان، شاخص‌های زیستی خاک، بسیار حساس به تغییرات بوده و در کوتاه‌مدت پاسخ می‌دهند. همچنین، شاخص‌های چند پارامتری یا ترکیبی که در این مقاله برخی از آنها معرفی شدند، بهتر از حالت انفرادی آنها، وضعیت سلامت خاک را ارزیابی می‌کنند. گرمایش زمین و تغییرات اقلیمی از مسائل اساسی کره خاکی است که حیات در آن را تهدید می‌کند و نقش خاک در بیلان کربن اتمسفر انکارناپذیر است. چرخه کربن بین اتمسفر و لیتوسفر تحت تأثیر جامعه گیاهی و میکروبی خاک است. لذا در کنار سایر خصوصیات تعیین‌کننده خاک، باید پروژه‌های جامعی برای سنجش پارامترهای بیوشیمیایی و میکروبیولوژیک تدوین شوند. اجرای پروژه‌های میکروبیوم خاکی از اهمیت خاصی برخوردار هستند زیرا اطلاعات جامع و کاربردی از وضعیت زیستی و پتانسیل‌های ژنتیک خاک به دست می‌دهند. این پروژه‌ها نباید در مقطع زمانی خاص بلکه به‌طور منظم و تابع زمان اجرا شوند

تا شدت تغییرات در طول زمان رصد شوند. برای کاربردی شدن نتایج این مطالعات، باید روش‌های استاندارد بین‌المللی تعریف شوند که دارای توجیه اقتصادی بوده و قابلیت اجرا در نقاط مختلف جهان داشته باشند. گرچه ارائه روش واحد برای همه اکوسیستم‌های خاکی و شرایط آب و هوایی متفاوت، هنوز چالش برانگیز است. در این ارتباط، ایجاد بانک جهانی داده‌ها از اهمیت خاصی برخوردار است و در بسیاری از موارد می‌تواند با ارائه راهکارها و مدل‌های آماری، از ضرورت انجام آزمایش‌های وسیع و پرهزینه بکاهد. به‌کارگیری اطلاعات ماهواره‌ای و تلفیق آن‌ها با داده‌های میدانی پارامترهای زیستی می‌تواند کمک شایانی در تهیه نقشه‌های رقومی وضعیت سلامت خاک را فراهم کند. حمایت‌های مالی و تجهیزاتی پروژه‌ها از سوی سازمان‌های بین‌المللی مربوطه نیز مورد انتظار است.

References

1. Alef, K. and Nannipieri, P. 1995. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, London.
2. Aliasgharzad, N. 2010. *Methods in Soil Biology*. Translated to Farsi, 2nd Edition, Tabriz University Press. (In Persian)
3. Aliasgharzad, N., Mårtensson, L.M. and Olsson, P.A. 2010. Acidification of a sandy grassland favours bacteria and disfavours fungal saprotrophs as estimated by fatty acid profiling. *Soil Biology and Biochemistry* 42, pp.1058–1064.
4. Alkorta, I. Aizpurua, A. Riga, P. Albizu, I. Amezaga, I. and Garbisu, C. 2003. Soil enzyme activities as biological indicators of soil health. *Review Environmental Health* 18, pp.65–73. doi: 10.1515/REVEH.2003.18.1.65
5. Alvyar, Z. Shahbazi, F. Oustan, S. Dengiz, O. and Minasny, B. 2022. Digital mapping of potentially toxic elements enrichment in soils of Urmia Lake due to water level decline. *Science of the Total Environment*, 808, 152086.
6. Amann, R.I. Binder, B.J. Olson, R.J. Chisholm, S.W. Devereux, R. and Stahl, D.A. 1990. Combination of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* 56, pp.1919–1925.
7. Amann, R.I. Ludwig, W. and Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *FEMS Microbiology Reviews* 59, pp.43–169.
8. Ananyeva, N.D. Susyan, E.A. and Gavrilenko, E.G. 2011. Determination of the soil microbial biomass carbon using the method of substrate-induced respiration. *Eurasian Soil Science*, 44, pp.1215–1221. <https://doi.org/10.1134/S1064229311030021>.
9. Anderson, T.H. 2003. Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 98, pp.285–293.
10. assessment of side-effects of agrochemicals on soil micro-organisms. *Residue Reviews* 86, 65–105.
11. Bååth, E. 1990. Thymidine incorporation into soil bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* 22, pp.803–810
12. bacterial and fungal biomass in soil. *Biology and Fertility of Soils* 22, 59e65.
13. Barin, M. Aliasgharzad, N. Olsson, P.A. Rasouli-Sadaghiani, M.H. and Moghddam, M. 2013. Abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil salinity around Lake Urmia in northern Iran analyzed by use of lipid biomarkers and microscopy. *Pedobiologia*, 56, pp.225–232.
14. Bastida, F. Zsolnay, A. Hernandez, T. and Garcia, C. 2008. Past, present and future of soil quality indices: a biological perspective. *Geoderma* 147, pp.159–171.
15. Bloem, J. Bolhuis, P.R. Veninga, M.R. and Wieringa, J. 1995. Microscopic methods
16. Bölker, M. Bloem, J. Meiners, K. and Möller, R. 2002. Enumeration and biovolume
17. Bölker, M. Möller, R. and Dzomla, W. 1993. Determination of bacterial biovolume with epifluorescence microscopy: comparison of size distributions from image analysis and size classifications. *Micron* 24, pp.31–40
18. Breiman, L. 2001. Random forests. *Machine Learning*, 45, pp.5–32.
19. Bressan, M. Trinsoutrot Gattin, I. Desaire S. Castel, L. Gangneux, C. and Laval, K. 2015. A rapid flow cytometry method to assess bacterial abundance in agricultural soil. *Applied Soil Ecology* 88, pp.60–68. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.12.007>
20. Breure, A.M. and Rutgers, M. 2000. The application of Biolog plates to characterize microbial communities. In: Benedetti, A. Tittarelli, F. de Bertoldi, S. and Pinzari, F. (eds) *Proceedings of the COST Action 831, Joint Working Group Meeting Biotechnology of Soil, Monitoring, Conservation and*

- Bioremediation. 10–11, December 1998, Rome, Italy, (EUR 19548), pp.179–185.
21. Brookes, P.C. 1995. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution
22. Bünemann, E.K. Bongiorno, G. Baic, Z. Creamer, R.E. et al. 2018. Soil quality – A critical review. *Soil Biology Biochemistry* 120, pp.105–125
23. by heavy metals. *Biology and Fertility of Soil* 19, pp.269–279.
24. Das, S. Deb, S. Sahoo, S.S. and Sahoo, U.K. 2023. Soil microbial biomass carbon stock and its relation with climatic and other environmental factors in forest ecosystems: A review, *Acta Ecologica Sinica*, 43 (6), pp.933–945, <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2022.12.007>
25. determination of microbial cells – a methodological review and recommendations for applications in ecological research. *Biology and Fertility of Soils* 36, pp.249–259.
26. Domsch, K.H., Jagnow, G. and Anderson, T.H. (1983) An ecological concept for the
27. Doran JW, Zeiss MR, 2000. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology* 15:3–11.
28. FAO. 2024. Standard operating procedure for soil microbial biomass (carbon): chloroform fumigation-extraction method. Rome.
29. for counting bacteria and fungi in soil. In: Alef, K. and Nannipieri, P. (eds) *Methods*
30. Frostegård, Å. and Bååth, E. 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate
31. Garland, J.L. Cook, K.L. Loader, C.A. and Hungate, B.A. 1997. The influence of microbial community structure and function on community-level physiological profiles. In: Insam, H. and Rangger, A. (eds) *Microbial Communities: Functional versus Structural Approaches*. Springer, New York, pp.171–183
32. Griffiths, B.S. Römcke, J. Schmelz, R.M. Scheffczyk, A. Faber, J.H. Bloem, J. Peres, G. Cluzeau, D. Chabbi, A. Suhadolc, M. et al. 2016. Selecting cost effective and policy-relevant biological indicators for European monitoring of soil biodiversity and ecosystem function. *Ecological Indicators* 69, pp.213–223.
33. Hartmann, A. Pukall, R. Rothballer, M. Gantner, S. Metz, S. Schlöter, M. and Mogge, B. 2004. Microbial community analysis in the rhizosphere by *in situ* and *ex situ* application of molecular probing, biomarker and cultivation techniques. In: Varma, A. Abbott, L. Werner, D. and Hampp, R. (eds) *Plant Surface 288 Plant-Microbe Interactions and Soil Quality Microbiology*. pp. 449–469 Springer-Verlag, Berlin.
34. Heidarianpour, M.B. Aliasgharzad, N. Olsson, P.A. 2020. Positive effects of co-inoculation with *Rhizopagus irregularis* and *Serendipita indica* on tomato growth under saline conditions, and their individual colonization estimated by signature lipids. *Mycorrhiza* 30, pp.455–466. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00962-y>
35. in *Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, London, pp.162–173.
36. Kempen, B. Brus, D.J. Stoorvogel, J.J. Heuvelink, G.B.M. and de Vries, F. 2012. Efficiency Comparison of Conventional and Digital Soil Mapping for Updating Soil Maps. *Soil Science Society of American Journal*, 76, pp.2097–2115.
37. Klauth, P. Wilhelm, R. Klumpp, E. Poschen, L. and Groeneweg, J. 2004. Enumeration of soil bacteria with the green fluorescent nucleic acid dye Sytox green in the presence of soil particles. *Journal of Microbiological Methods* 59, pp.189–198. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.07.004>
38. Lee, J. Kim, H.S. Jo, H.Y. and Kwon, M.J. 2021. Revisiting soil bacterial counting methods: Optimal soil storage and pretreatment methods and comparison of culture-dependent and -independent methods. *PLoS One* 16(2):e0246142. doi:10.1371/journal.pone.0246142.
39. Lee, J.S. Lee, Y. Lee, E.J. Pros, K. Kim, K. and Han, G.H. 2021. A simple method to determine soil microbial

- biomass carbon by facilitating gaseous diffusion of chloroform into pores. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer* 54(4), 660-666. doi:10.7745/KJSSF.2021.54.4.660
40. Lewe, N. Hermans, S. Lear, G. Kelly, L.T. Thomson-Laing, G. Weisbrod, B. Wood, S.A. Keyzers, R.A. and Deslippe, J.R. 2021. Phospholipid fatty acid (PLFA) analysis as a tool to estimate absolute abundances from compositional 16S rRNA bacterial metabarcoding data. *Journal of Microbiological Methods*, 188, 106271, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106271>
 41. Liu, C. Tian, J. Cheng, K. Xu, X. Wang, Y. et al. 2023. Topsoil microbial biomass carbon pool and the microbial quotient under distinct land-use types across China: A data synthesis. *Soil Science and Environment* 2(5). <https://doi.org/10.48130/SSE-2023-0005>
 42. McBratney, A.B. Mendonça Santos, M.L. and Minasny, B. 2003. On digital soil mapping. *Geoderma*, 117, pp.3–52.
 43. Minasny, B. and McBratney, A.B. 2016. Digital soil mapping: A brief history and some lessons. *Geoderma*, 264, pp.301–311.
 44. Mori, T. Wang, S. Wang, C. Mo, J. and Zhang, W. 2021. Is microbial biomass measurement by the chloroform fumigation extraction method biased by experimental addition of N and P?. *iForest* 14, pp.408-412. doi: 10.3832/for3374-014
 45. Muyzer, G. and Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, pp.127–141.
 46. Nakamoto, T. and Wakahara S. 2004. Development of substrate induced respiration (SIR) method combined with selective inhibition for estimating fungal and bacterial biomass in humic Andosols. *Plant Production Science* 7(1), pp.70-76.
 47. Olsson, P.A. Rahm, J. and Aliasgharzad, N. 2010. Carbon dynamics in mycorrhizal symbioses is linked to carbon costs and phosphorus benefits. *FEMS Microbiology Ecology* 72, pp.125–131.
 48. Paz-Ferreiro, J. and Fu, S. 2016. Biological Indices for Soil Quality Evaluation: Perspectives and Limitations. *Land Degradation and Development* 27, pp.14–25.
 49. Paz-Ferreiro, J. Fu, S. Méndez, A. and Gascó, G. 2015. Biochar modifies the thermodynamic parameters of soil enzyme activity in a tropical soil. *Journal of Soils and Sediments* 15(3), pp.578-583.
 50. Quideau, S.A. McIntosh, A.C. Norris, C.E. Lloret, E. Swallow, M.J. and Hannam, K. 2016. Extraction and analysis of microbial phospholipid fatty acids in soils. *Journal of Visualized Experiments*, 26 (114), 54360. doi: 10.3791/54360.
 51. Rahul, R. Sharma, P. Singh, A. Singh, J. and Kumar, M. 2022. Soil enzymes and their role in soil health improvement. In: Nayak, S.K. Baliyarsingh, B. Mannazzu, I. Singh, A. Mishra, B.B. (eds) *Advances in Agricultural and Industrial Microbiology*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-8918-5_3
 52. Rezaei, H. Jafarzadeh, A. Aliasgharzad, N. and Alipoor, L. 2015. Soil quality investigation based on biological and micro-morphological traits under different land uses. *Carpathian Journal of Earth and Environmental Sciences*, 10 (1), pp.241 – 254.
 53. Risch, A.C. Zimmermann, S. Schütz, M. et al. 2023. Drivers of the microbial metabolic quotient across global grasslands. *Global Ecology and Biogeography* 32 (6), pp.904–918. <https://doi.org/10.1111/geb.13664>
 54. Ritz, K. Black, H.I. Campbell, C.D. Harris, J.A. and Wood, C. 2009. Selecting biological indicators for monitoring soils: a framework for balancing scientific and technical opinion to assist policy development. *Ecological Indicators* 9, pp.1212-1221.
 55. Saviozzi, A. Cardelli, R. Di Puccio, R. 2011. Impact of salinity on soil biological activities: A laboratory experiment. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 42(3),

- pp.358–367.
<https://doi.org/10.1080/00103624.2011.542226>
56. Schlöter, M. Nannipieri, P. Sørensen, S.J. and van Elsas, J.D. 2018. Microbial indicators for soil quality. *Biology and Fertility of Soils* 18, pp.1-10.
57. Siami, A. Aliasgharzad, N. Maleki, L.A. Najafi, N. Shahbazi, F. and Biswas, A. 2022. Recalcitrant C source mapping utilizing solely terrain-related attributes and data mining techniques. *Agronomy* 12, 1653.
<https://doi.org/10.3390/agronomy12071653>
58. Sparling, G.P. 1995. The substrate-induced respiration method. In: Alef, K. and Nannipieri, P. (eds) *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, New York, pp. 397–404.
59. Sreenivas, K. Dadhwal, V.K. Kumar, S. Harsha, G.S. Mitran, T. Sujatha, G. Janaki R. Suresh, G. Fyze, M.A. and Ravisankar, T. 2016. Digital mapping of soil organic and inorganic carbon status in India. *Geoderma*, 269, pp.160–173.
60. Taha, M. Kadali, K.K. AL-Hothaly, K. et al. 2015. An effective microplate method (Biolog MT2) for screening native lignocellulosic-straw-degrading bacteria. *Annals of Microbiology* 65, pp.2053–2064.
<https://doi.org/10.1007/s13213-015-1044-y>
61. Tavasolee, A. Aliasgharzad, N. Salehi, G.R. Mardi, M. Asgharzadeh, A. and Akbarivala, S. 2011. Effects of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on fungal occupancy in chickpea root and nodule determined by real-time PCR. *Current Microbiology* 63(2), pp.107-114. doi: 10.1007/s00284-011-9951-z.
62. Vestergaard, G. Schulz, S. Schöler, A. and Schlöter, M. 2017. Making big data smart—how to use metagenomics to understand soil quality. *Biology and Fertility of Soils* 53, pp.479-484.
63. White, D.C. and Ringelberg, D.B. 1998. Signature lipid biomarker analysis. In: Burlage, R.S. Atlas, R. Stahl, D. Geesey, G. and Sayler, G. (eds) *Techniques in Microbial Ecology*. Oxford University Press, New York, pp. 255–272.
64. Yepes-Pérez, M. Carrero-Contreras, K. Vásquez-Araque, N.A. Mora Martínez, A.L. Correa-Londoño, G.A. and Leotta, G. 2024. Development of a SYBR Green qPCR intralaboratory validation for the quantification of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied Biosciences*, 3(3), 326-347.
<https://doi.org/10.3390/applbiosci3030022>