

قابلیت دسترسی زیستی فلزات سنگین خاک با کاربرد زغال زیستی و باکتری ریزوسفری در فرآیند گیاه‌پالایی بید سفید

سحر مکرم کشتیبان^۱، سیدمحسن حسینی^{۲*}، مسعود طبری کوچکسرای^۳، حبیب‌الله یونسی^۴

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۱۹)

چکیده

زغال زیستی یک افزودنی پرکاربرد در بهبود کارایی گیاه‌پالایی از طریق افزایش رشد گیاه بوده که اثرگذاری آن به صورت جداگانه و یا در ترکیب با باکتری‌های ریزوسفری در کاهش قابلیت دسترسی زیستی فلزات سنگین خاک یک مزیت مهم به‌شمار می‌آید. پژوهش حاضر با هدف بررسی کاربرد جداگانه و ترکیبی زغال زیستی (تولید شده از ضایعات چوب جنگلی ممرز، در سه سطح صفر، ۲/۵ و ۵ درصد وزن خاک) و باکتری *Pseudomonas fluorescens* روی ویژگی‌های رویشی نهال گلدانی بید سفید (*Salix alba* L.) کاشته شده در خاک آلوده به فلزات سنگین (سرب، مس و کادمیوم)، و همچنین شاخص‌های قابلیت دسترسی زیستی، کارایی حذف فلزات، فاکتور انباشت (تغلیظ) زیستی و فاکتور انتقال فلزات در شرایط گلخانه و بازه زمانی ۱۶۰ روزه برنامه‌ریزی شد. نتایج نشان داد که بیش‌تر مؤلفه‌های رویشی نهال تحت تأثیر کاربرد جداگانه و نیز ترکیب باکتری-زغال زیستی معنی‌دار بود. تیمار ترکیبی باکتری-زغال زیستی (سطح پنج درصد) موجب افزایش ۵۹، ۳۶، ۱۴۲ و ۸۵ درصدی به‌ترتیب، در وزن خشک برگ، ساقه، ریشه و کل نهال‌ها نسبت به شاهد (بدون باکتری-بدون زغال زیستی) شد. در تیمارهای زغال زیستی، شاخص‌های قابلیت دسترسی زیستی، کارایی حذف فلزات (به‌جز سرب)، فاکتور انباشت زیستی و فاکتور انتقال (فقط در سطح مصرف ۲/۵ درصد زغال زیستی) سرب، مس و کادمیوم به‌ترتیب ۱۳ تا ۵۷، چهار تا ۴۷، ۲۹ تا ۶۰ و ۱۶ تا ۳۳ درصد کم‌تر از شاهد اندازه‌گیری شد. تیمار ترکیبی باکتری-زغال زیستی نسبت به تیمار جداگانه زغال زیستی منجر به بهبود ۱۹۱، ۷۹، ۸۴ و ۱۳ درصدی به‌ترتیب در شاخص‌های مذکور شد. در کل، بر اساس یافته‌های پژوهش، ترکیب باکتری-زغال زیستی، منجر به دسترس‌پذیر کردن فلزات سنگین و بهبود کارایی نهال‌ها در حذف فلزات سنگین شد. از این رو، کاربرد ترکیبی باکتری-زغال زیستی به‌عنوان دو اصلاح‌کننده خاک، ضمن بهبود مؤلفه‌های رویشی نهال بید سفید، می‌تواند دسترس‌پذیری فلزات سنگین توسط گیاه را تا حدودی فراهم کرده و فرآیند گیاه‌پالایی را بهبود بخشد.

واژه‌های کلیدی: آلودگی خاک، انباشت زیستی فلزات، باکتری‌های محرک رشد گیاهی، بید سفید، زیست‌پالایی

مکرم کشتیبان س، حسینی س. م، طبری کوچکسرای م، یونسی ح. ۱۳۹۸. قابلیت دسترسی زیستی فلزات سنگین خاک با کاربرد زغال زیستی و باکتری ریزوسفری در فرآیند گیاه‌پالایی بید سفید (*Salix alba* L.). تحقیقات کاربردی خاک. جلد ۷، شماره ۴. صفحه: ۲۱۱-۱۹۶.

۱- دانش‌آموخته دکتری جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، گروه جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس

۲- استاد، گروه جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس

۳- استاد، گروه جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس

۴- استاد، گروه علوم محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس

*پست الکترونیک: hosseini@modares.ac.ir

مقدمه

فیزیکی حذف، انتقال یا تثبیت این آلاینده‌ها از خاک، رسوب و آب استفاده می‌شود (Bittsánszky *et al.*, 2009). در این بین، به‌منظور عدم یا کاهش ورود فلزات سنگین پالایش شده به چرخه غذایی، کاربرد گیاهان پالاینده چوبی غیرمثمر جنگلی به‌ویژه گونه‌های متعلق به خانواده‌ی *Salicaceae* از جمله گونه بید سفید (*Salix alba* L.) نسبت به سایر گونه‌ها، با سیستم ریشه‌ای قوی، طول دوره رویشی بیشتر و قابلیت انباشت زیاد^۵ آلودگی در اندام‌های خود، به‌عنوان راهکاری مطمئن و مؤثر مورد توجه قرار گرفته است (Bittsánszky *et al.*, 2009). با این حال، سرعت رویش کم و جذب پایین گیاهان چوبی به‌عنوان محدودیتی اساسی در کاربرد آن‌ها در فرآیندهای پالایش آلودگی به‌شمار می‌آید (Saladin, 2015) که اخیراً استفاده از برخی افزودنی‌های خاک از قبیل زغال زیستی^۶ با هدف تسریع در رشد و عملکرد گیاهان توسط پژوهش‌گران پیشنهاد شده است (Sousa *et al.*, 2015). زغال زیستی ماده کربنی متخلخل بوده که در اثر سوختن مواد آلی در دمای بالا و عدم حضور اکسیژن به‌دست می‌آید (Khanmohammadi *et al.*, 2015) و موجب پالایش آلودگی‌های آلی و معدنی، بهبود ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک و افزایش رشد گیاه می‌شود (Puga *et al.*, 2015).

یافته‌های پژوهش‌های پیشین حاکی از این است که کاربرد زغال زیستی متناسب با سطح مصرف، قابلیت کاهش غلظت مشخصی از فلزات سنگین و بهبود درصد متناظری از ویژگی‌های کمی و کیفی خاک را منجر می‌شود (Cui *et al.*, 2013). افزون بر این، کاهش تنش‌های محیطی یا افزایش مقاومت گیاهان در برابر آلاینده‌ها و سایر تنش‌های محیطی از دیگر کارکردهای زغال زیستی در فرآیند گیاه‌پالایی است (Joseph *et al.*, 2013). در این راستا، (Paz-Ferreiro *et al.*, 2014) افزایش ظرفیت تبادل کاتیونی، جذب و حذف فلزات سنگین از خاک، تحریک رشد گیاه، بهبود ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک، افزایش مواد مغذی خاک و افزایش جذب فلزات سنگین توسط گیاهان با

آلودگی خاک توسط فلزات سنگین یکی از مشکلات اکولوژیکی بسیار جدی در سراسر جهان به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه است (Jafari Monsef, 2017). هرچند وجود مقادیر اندک فلزات در خاک هم‌چون مس، روی و نیکل به‌صورت طبیعی در پایداری زیستی خاک مؤثر بوده ولی انباشت بیش از حد آن‌ها و یا فلزات سنگینی هم‌چون کادمیوم، سرب، کروم و جیوه به‌عنوان آلودگی در خاک به‌شمار می‌رود (Abbaszadeh *et al.*, 2018). خاک‌های آلوده به غلظت بالای فلزات سنگین نه تنها باعث سمیت در گیاهان و ریزموجودات خاک‌زی شده، بلکه اختلال در کیفیت زیستی خاک و آب را در پی داشته و با آلوده‌سازی چرخه غذایی، سلامت جوامع انسانی را تهدید می‌کنند. لذا، راهکارهای متعدد سنتی و نوین به‌ویژه رویکردهای دوست‌دار محیط‌زیست از قبیل استفاده از جذب‌کننده‌های زیستی^۱، اصلاح‌کننده‌های زیستی^۲ پسماندهای زیستی جنگلی^۳، پسماندهای زیستی کشاورزی^۴ و کاربرد روش‌های زیست‌پالایی و گیاه‌پالایی با هدف حذف آلودگی‌های فلزات سنگین از خاک مطرح شده و مورد آزمایش و استفاده قرار گرفته است (Khodaverdiloo & Hamzenejad Taghliabad, 2014). از برتری‌های اصلی این روش‌ها، کم هزینه بودن، کارایی بالا، کاهش پسماندهای شیمیایی، تولید جذب‌کننده‌های زیستی و امکان احیاء و استفاده دوباره از فلزات جذب شده برای اهداف دیگر می‌باشد. در این بین، کاربرد روش‌های گیاه‌پالایی افزون بر تأمین اهداف مورد نظر در کاهش و حذف آلودگی‌های فلزات سنگین از خاک، به‌سبب قابلیت پایداری بالا، افزایش پایداری خاک، تنوع زیستی، بهبود زیبایی چشم‌انداز و کاهش هدررفت آب و خاک، نسبت به سایر روش‌های یاد شده، برتری دارند (Hao & Jiang, 2015). در روش گیاه‌پالایی از توانایی و قابلیت گیاهان به‌عنوان یک جایگزین اقتصادی پاک و طبیعی، به‌جای روش‌های شیمیایی و

1 . Bio-absorbance

2 . Bio-amendments

3 . Forest bio-waste

4 . Agricultural bio-waste

5 . Hyperaccumulating

6 . Biochar

در این بین، باکتری ریزوسفری *Pseudomonas fluorescens* به عنوان یک گزینه کارا، مقاوم و پرکاربرد در فرآیند گیاه‌پالایی به‌ویژه در شرایط هم‌زیستی با گونه بید سفید معرفی شده است (Guarino & Sciarrillo, 2017). بنابه ضرورت پالایش فلزات سنگین از بوم‌سازگان‌ها و هم‌چنین بهبود عملکرد پتانسیل پالایندگی گیاهان، کاربرد افزودنی‌ها از قبیل زغال زیستی در بهبود ویژگی‌های محیطی خاک و رویش گیاهان پالایش‌گر مورد توجه محققین است. از طرفی، کاهش زیست‌فراهمی فلزات سنگین در شرایط استفاده از زغال زیستی در فرآیند گیاه‌پالایی، بهره‌مندی از افزودنی‌های مکمل از قبیل باکتری‌های ریزوسفری با هدف افزایش بهره‌وری گیاهان پالاینده فلزات سنگین اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. در این بین، عملکرد چنین رویکرد ترکیبی برای خاک‌های آلوده چندفلزی و با حضور گیاهان چوبی غیرمثمر چندساله ولی در بازه زمانی کوتاه‌مدت کم‌تر مورد بررسی قرار گرفته که نیازمند تحلیل و پژوهش‌های بیشتر می‌باشد. از این‌رو، پژوهش حاضر به منظور تحلیل و ارزیابی میزان قابلیت دسترسی زیستی فلزات سنگین سرب، مس و کادمیوم تحت شرایط کاربرد باکتری (*Pseudomonas fluorescens*) و زغال زیستی تولید شده از بقایای درخت ممرز، در فرآیند گیاه‌پالایی با گونه بید سفید (*Salix alba* L.) در شرایط گلخانه و در مقیاس گلدان‌های آلوده شده برنامه‌ریزی شد.

مواد و روش‌ها

آلوده‌سازی خاک

در مراحل انجام پژوهش، گلدان‌های سه کیلویی با خاک جنگلی کم تراکم و در حال تخریب تهیه شده از منطقه بلده (۳۶ درجه و ۲۷ دقیقه شمالی و ۵۱ درجه و ۸۰ دقیقه شرقی) استان مازندران پس از هوا خشک کردن و عبور از الک دو میلی‌متری به صورت نسبت دو به یک با شن پر شده (Balseiro-Romero *et al.*, 2017) و آلوده‌سازی خاک گلدان‌ها از طریق اضافه کردن فلزات سنگین انجام شد. در این راستا آلوده‌سازی خاک مورد مطالعه به فلزات سنگین مس، سرب و کادمیوم به ترتیب از نمک‌های نیترات مس $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ، نیترات سرب $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ و نیترات کادمیوم $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ به ترتیب به

کاربرد زغال زیستی را گزارش کرده‌اند. هم‌چنین نقش زغال زیستی بر بهبود برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و ریخت‌شناسی و هم‌چنین مورد استفاده در گیاه‌پالایی تأیید شده است (De Tender *et al.*, 2016). بهبود رشد و قابلیت پالایش فلزات سنگین توسط سه گونه بید در دراز مدت در شرایط کاربرد زغال زیستی (نیز گزارش شده است (Lebrun *et al.*, 2016). با وجود تأیید کارایی زغال زیستی در بهبود ویژگی‌های خاک و گیاه و هم‌چنین فرآیند گیاه‌پالایی، مواردی هم‌چون جذب فلزات سنگین در بافت اسفنجی زغال زیستی و کاهش دسترسی زیستی^۱ فلزات سنگین برای گیاه و در نتیجه کاهش شدت گیاه‌پالایی و مقدار آن در کوتاه‌مدت (Meng *et al.*, 2018) از چالش‌های مهم استفاده از زغال زیستی برای پالایش آلاینده‌ها از خاک توسط گیاهان می‌باشد. دسترسی زیستی (زیست‌فراهمی) فلزات سنگین در ریزوسفر خاک، میزان قابلیت تبادل و جذب فلزات سنگین برای گیاهان بوده که مقادیر آن بر اساس نوع گیاهان، شکل و رفتار فلزات، ویژگی‌های خاک و هم‌چنین نوع افزودنی‌های خاک متغیر می‌باشد (Meng *et al.*, 2018). به عبارتی، بهبود ویژگی‌های محیطی و افزودنی‌ها، قابلیت دسترسی زیستی فلزات سنگین در خاک برای گیاهان افزایش می‌یابد و در نهایت منجر به بهبود عملکرد گیاهان در پالایش آلاینده‌های خاک می‌شود. از این‌رو، بهره‌گیری از راهکارها و افزودنی‌های مکمل با زغال زیستی به منظور کاهش اثرگذاری آن در کاهش زیست‌فراهمی فلزات مورد توجه قرار گرفته است. در این راستا، کاربرد باکتری‌های مؤثر و مقاوم به تنش‌های محیطی به صورت تلقیح ریزوسفری و هم‌زمان با زغال زیستی با هدف تعدیل اثرگذاری زغال زیستی در کاهش قابلیت دسترسی فلزات سنگین برای گیاهان و هم‌چنین اثر هم‌افزایی هر دو افزودنی بر فرآیند گیاه‌پالایی و ویژگی‌های خاک و گیاه توصیه شده است (Hussain *et al.*, 2018). هرچند، کاربرد جداگانه باکتری‌های ریزوسفری در بهبود فرآیند گیاه‌پالایی و ویژگی‌های گیاه و خاک نیز گزارش شده است (Karimi *et al.*, 2018).

¹ Bioavailability

تهیه باکتری ریزوسفری

به دلیل نیاز به حجم و تعداد سلول زیاد باکتری برای تلقیح به تیمارهای آزمایش، نمونه اولیه باکتری ریزوسفری و محرک رشد *Pseudomonas fluorescens* از آزمایشگاه بیولوژی مؤسسه تحقیقات آب و خاک ایران تهیه شد. باکتری تهیه شده به محیط غذایی LB¹ منتقل شد و در انکوباتور استاندارد با شرایط دمایی ۳۷ درجه سلسیوس و چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد (Arslan et al., 2014). سپس به منظور جداسازی باکتری‌های تکثیر شده از محیط غذایی، اقدام به سانتریفیوژ کردن مایع مورد نظر با دور ۸۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه شد. باکتری‌های جدا شده با بافر فسفات پتاسیم (۱۰۰ میلی‌مول و pH=۷) شستشو داده شد و در سدیم کلرید (NaCl) ۸۵ درصد انتقال داده شد. در نهایت به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر مایع تلقیح تهیه شده حاوی ۱۰^۸ سلول باکتری مورد نظر به ازای هر گلدان آماده شد (Sousa et al., 2015). به تیمارهای فاقد باکتری به منظور ایجاد شرایط آزمایش یکسان، صرفاً محلول سدیم کلراید (بدون باکتری) اضافه شد.

کاشت نهال‌ها و اجرای آزمایش

برای انجام پژوهش حاضر، قلمه‌های بید سفید در اواخر زمستان ۱۳۹۴ از شاخه‌های یک ساله درختان بید واقع در خزانه مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اردبیل جدا شد و به گلخانه دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شد. سپس قلمه‌های تهیه شده در اندازه ۲۰ تا ۳۰ سانتی‌متر و قطر تقریبی ۱/۵ تا دو سانتی‌متر آماده شدند. قلمه‌های آماده شده در گلدان‌های یک کیلویی با بستر ماسه و شرایط گلخانه‌ای با دمای ۱۸ تا ۲۵ درجه‌ی سلسیوس تحت نور طبیعی و تأمین رطوبت یکسان تا زمان ظهور ریشه و زمان بازکاشت نهال‌ها در گلدان‌های سه کیلویی با خاک تیمار شده نگهداری شدند (Vamerali et al., 2009). پس از ۶۰ روز، نهال‌های همگن (از نظر ابعاد) حاصل از قلمه‌های پیش کاشته شده در گلدان‌های یک کیلویی با بستر ماسه‌ای، به منظور بازکاشت نهال‌ها انتخاب شدند. سپس نهال‌های هر تیمار با رعایت تمام اصول کاشت و حداکثر تلاش برای حفظ سلامت فیزیکی

میزان ۲۰۰، ۵۰۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آلوده شدند. به منظور توزیع یکنواخت فلزات سنگین اضافه شده به خاک گلدان‌ها و مطابق با روش پیشنهادی (Fahmi et al., 2018)، نمک‌های مورد استفاده در آب حل شده و به صورت محلول به گلدان‌ها اضافه شد. پس از آلوده‌سازی خاک به فلزات مورد نظر، گلدان‌ها به صورت سر بسته و به مدت هشت هفته در داخل گلخانه و شرایط دمایی بین ۱۸ تا ۲۵ درجه‌ی سلسیوس رها شدند تا امکان برهم‌کنش خاک و آلودگی و هم‌چنین ایجاد شرایط طبیعی فراهم شود (Fahim et al., 2018). به منظور ایجاد توزیع یکنواخت فلزات اضافه شده در تمام پروفیل خاک گلدان‌ها، در طی این دوره، دو الی سه بار در هفته مقدار مشخصی آب با توجه به ظرفیت زراعی (۷۵ درصد) به گلدان‌ها اضافه شد (Fahim et al., 2018).

تهیه زغال زیستی

به سبب ضرورت تهیه زغال زیستی، ابتدا اقدام به شناسایی و جمع‌آوری ضایعات چوبی گونه مرمر (*Carpinus betulus*) از محیط جنگلی دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تربیت مدرس شد. ضایعات چوبی تبدیل به پودر و هوا خشک شد (Heidari et al., 2014) و به کارخانه بهینه نقش انرژی در تهران و زیر نظر پژوهشگاه صنعت نفت منتقل و فرآیند تهیه زغال زیستی از آن‌ها در دمای ۴۰۰ درجه‌ی سلسیوس و به مدت دو ساعت و در شرایط عدم حضور اکسیژن انجام شد (Randolph et al., 2017). در نهایت زغال زیستی تهیه شده در هاون به شکل پودر کامل و همگن در آمد و از الک ۰/۴ میلی‌متری عبور داده شد (Joseph et al., 2013). زغال زیستی تهیه شده دارای pH=۸/۵ و مقدار کربن، نیتروژن، اکسیژن و هیدروژن آن به ترتیب ۰/۰۲، ۰/۷۸/۸، ۱۵/۹ و ۳/۷ درصد بود. افزون بر این، محتوای فسفر، پتاسیم، کلسیم، منیزیم و آهن در آن به ترتیب ۲/۱۹، ۴/۹۲، ۱۴/۱۹، ۱/۶۱ و ۰/۷۱ گرم بر کیلوگرم و محتوای فلزات سنگین مس، سرب و کادمیوم به ترتیب ۱۱/۶۱، ۷/۴۲ و ۰/۱۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم اندازه‌گیری شد. در نهایت از زغال زیستی تهیه شده، با مقادیر صفر، ۲/۵ و پنج درصد وزنی خاک گلدان‌ها آماده شد (Puga et al., 2015).

¹ . Luria Broth

مس و کادمیوم خاک پس از اعمال تیمارها، نسبت به میزان آن‌ها در ابتدای آزمایش به صورت درصد تعیین شد (Huang *et al.*, 2004).

اندازه‌گیری ضریب انباشت (تغلیظ) زیستی و فاکتور انتقال فلزات سنگین

ضریب انباشت زیستی^۲ و فاکتور انتقال^۳ فلزات سنگین نشان‌دهنده توانایی گیاهان برای تحمل و انباشت فلزات سنگین در اندام‌های گیاهی بوده که فاکتور انباشت زیستی با تقسیم غلظت فلزات سنگین انباشت شده در ریشه گیاه به مقدار آن در خاک محاسبه شد (Cicero-*et al.*, 2016). فاکتور انتقال نیز از طریق نسبت غلظت فلزات سنگین انباشت شده در ساقه گیاه به غلظت آن در ریشه محاسبه شد (Goswami & Das, 2016). در این راستا اندازه انباشت زیستی و فاکتور انتقال گیاهان با مقادیر بیش از یک برای اهداف گیاه‌پالایی مناسب می‌باشند (Yoon *et al.*, 2006).

تجزیه و تحلیل آماری

در نهایت پس از اندازه‌گیری مقادیر متغیرهای مورد بررسی، بانک اطلاعاتی در محیط نرم‌افزار Excel 2013 برای تجزیه و تحلیل تشکیل شد. در پژوهش حاضر سه تکرار برای هر تیمار لحاظ شد. به‌منظور انجام مقایسه‌های آماری، ابتدا نرمال و یا عدم نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk بررسی و تبدیل داده‌های غیرنرمال به حالتی با توزیع نرمال مدنظر قرار گرفت. هم‌چنین همگنی واریانس‌ها با آزمون Levene بررسی شد. پس از برقراری شرط‌های یاد شده، تجزیه واریانس یک طرفه^۴ برای بررسی اثرات یک‌جانبه و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن (Duncan test) انجام شد. آزمون‌های آماری فوق برای تجزیه و تحلیل داده‌ها در محیط نرم‌افزار SPSS 23 صورت گرفت.

نتایج و بحث

تغییرات زی‌توده نهال‌ها

اندام‌های هوایی و زمینی برداشت و به گلدان‌های حاوی سه کیلو خاک آلوده به فلزات سنگین مس، سرب و کادمیوم و هم‌زمان با اعمال تیمارها منتقل شدند. پس از اعمال تیمارها و بازکاشت نهال‌ها، پایش و نگاه‌داری از نهال‌ها در تمام شرایط محیطی انجام شد. برای این منظور به‌صورت مرتب کنترل شرایط نور طبیعی، تأمین رطوبت گلدان‌ها از طریق آبیاری هم‌زمان و هم‌اندازه انجام شد و دمای گلخانه نیز بین ۱۸ تا ۲۵ درجه سلسیوس تنظیم شد (Zimmer *et al.*, 2009). در پایان، با گذشت ۱۶۰ روز پس از بازکاشت و اجرای آزمایش‌ها، نهال‌های برداشت شده از خاک گلدان‌ها برای انجام آزمایش‌های آتی به آزمایشگاه علوم محیط زیست دانشگاه تربیت مدرس منتقل شد.

اندازه‌گیری دسترسی زیستی و کارایی حذف فلزات سنگین

برای تعیین زیست‌فراهمی فلزات سرب، مس و کادمیوم و به‌عبارتی غلظت فلزات در فاز محلول و قابل دسترس گیاه برای نهال‌های تیمارهای آزمایش از روش استیک اسید استفاده شد. از این‌رو، ابتدا یک گرم خاک در داخل ظرف پلی‌اتیلن ریخته شد و به مقدار ۲۰ میلی‌لیتر استیک اسید ۰/۱۱ نرمال به آن اضافه شد. سپس محلول آماده شده به‌مدت ۱۶ ساعت مخلوط شد و در نهایت فاز محلول آن از طریق سانتریفیوژ با دور ۸۰۰۰ در دقیقه به‌مدت ۲۰ دقیقه جدا شد. فاز مایع جدا شده از این فرآیند از کاغذ صافی ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد و به حجم رسانده شد (Liu *et al.*, 2017). به‌منظور تعیین غلظت فلزات سرب، مس و کادمیوم در خاک گلدان‌ها و نهال‌های بید سفید، نمونه‌های خاک و گیاه به‌وسیله اسید نیتریک و پرکلریک هضم شدند (De Maria *et al.*, 2011). نمونه‌های هضم شده از کاغذ صافی عبور داده و به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شدند. پس از اتمام مراحل یاد شده، میزان فلزات سرب، مس و کادمیوم نمونه‌های هضم شده با استفاده از دستگاه جذب اتمی مدل GBC Scientific Equipment SavantAA) سنجش شدند. از طرفی، میزان کارایی حذف^۱ فلزات سنگین توسط نهال‌ها در هر یک از تیمارها، از طریق محاسبه میزان غلظت فلزات سرب،

2 . Bioaccumulation factor

3 . Translocation factor

4 . One-Way ANOVA

1 . Removal efficiency

نسبت به تیمار تلقیح باکتری بدون ترکیب با زغال زیستی تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۲). با این حال، در سطح مصرفی زیاد (پنج درصد) زغال زیستی به همراه تلقیح باکتری، وزن خشک ریشه و کل نهال‌ها افزایش معنی‌دار و به ترتیب ۵۷ و ۳۰ درصدی نسبت به تیمار تلقیح باکتری بدون ترکیب با زغال زیستی داشت (جدول ۲). بر اساس یافته‌های پیشین، تزریق هم‌زمان زغال زیستی و تلقیح باکتری‌ها می‌تواند با افزایش میزان کربن و نیتروژن (Cui *et al.*, 2013)، بهبود ویژگی‌های، فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک و تحریک جوامع میکروبی (Joseph *et al.*, 2013)، افزایش ظرفیت تبادل کاتیونی، جذب و حذف فلزات سنگین از خاک (Paz-Ferreiro *et al.*, 2014) به صورت مستقیم و غیرمستقیم مؤلفه‌های زی‌توده نهال‌ها را بهبود بخشد که در پژوهش حاضر نیز مشاهده شد.

شاخص‌های رفتارسنجی فلزات سنگین در خاک

میزان زیست‌فراهمی و کارایی حذف هر سه فلز سنگین (سرب، مس و کادمیوم) و هم‌چنین pH خاک با افزودن زغال زیستی تغییر کرد. تلقیح باکتری نیز منجر به تفاوت معنی‌دار در مقادیر شاخص‌های مذکور شد و در تیمار ترکیبی باکتری-زغال زیستی، صرفاً pH خاک، زیست‌فراهمی مس و کارایی حذف سرب و کادمیوم دارای تغییرات معنی‌داری بودند (جدول ۳). هم‌چنین، pH خاک در دو تیمار نسبت به شاهد (۸/۰۷) تغییر داشت که در شرایط تلقیح باکتری (بدون زغال زیستی)، کاهش (۷/۹۳) و در تیمار زغال زیستی پنج درصد (بدون تلقیح باکتری) افزایش (۸/۱۳) یافت (شکل ۱).

زغال زیستی به صورت ذاتی دارای مقدار pH و هدایت الکتریکی بیش‌تری نسبت به محیط خاک است. از طرفی، این افزودنی حاوی مواد قلیایی (از قبیل خاکستر چوب)، برخوردار از بار منفی کربوکسیل و دارای عملکرد فنولیکی است که می‌تواند منجر به قلیایی شدن خاک می‌شود (Jin *et al.*, 2019). بر خلاف زغال زیستی، باکتری‌ها قادر به تولید پروتون، اسیدهای آمین و آلی از طریق فعالیت‌های متابولیکی باکتریایی بوده که در نهایت منجر به کاهش pH خاک می‌شوند (Wu *et al.*, 2006).

نتایج نشان داد که در تیمار تلقیح باکتری اختلاف میزان تغییرات در مقادیر زی‌توده‌های خشک اندام‌های ریشه، ساقه و کل نسبت به شرایط بدون تلقیح معنی‌دار بود، در حالی‌که تأثیر معنی‌داری در اثر اعمال تیمار تلقیح باکتری روی زی‌توده خشک برگ نسبت به شاهد مشاهده نشد (جدول ۱). تیمارهای زغال زیستی به شکل معنی‌داری بر میزان زی‌توده‌های خشک اندام‌های برگ، ساقه، ریشه و کل گیاه نسبت به شاهد معنی‌دار بود. تیمار تلفیقی باکتری و زغال زیستی نیز بر میزان زی‌توده‌های شاخه و کل گیاه تأثیر معنی‌داری داشته‌اند. در تیمار شاهد (در خاک آلوده و بدون هیچ گونه افزودنی)، زی‌توده خشک برگ، ساقه، ریشه و کل اندام‌های نهال‌ها به ترتیب ۰/۹۳، ۰/۸۵، ۱/۰۸ و ۲/۸۳ گرم بود (جدول ۲). در شرایط تلقیح باکتری اندازه‌های وزن خشک ساقه، ریشه و کل نهال‌ها به ترتیب ۳۷، ۵۶ و ۴۲ درصد نسبت به شرایط بدون تلقیح افزایش داشتند (جدول ۲). باکتری‌ها از طریق تأمین منابع غذایی و انواع پروتئین‌های مورد نیاز گیاه (Khan, 2005)، سبب بهبود ویژگی‌های شیمیایی، فیزیکی و زیستی خاک (Miransari, 2011)، افزایش تولید اسیدهای آمینه و آلی (Rajkumar *et al.*, 2011)، کاهش اثرات تنش‌های محیطی خاک از طریق افزایش مقاومت گیاه و حفظ رطوبت بیش‌تر در اطراف ریشه (Deng & Cao, 2017)، قادر به بهبود مؤلفه‌های ریخت‌شناسی نهال‌های تحت تیمار با خاک آلوده هستند. زغال زیستی در شرایط تلقیح و بدون تلقیح باکتری، روی وزن خشک اندام‌های برگ، ساقه، ریشه و کل نهال تأثیر معنی‌داری داشت (جدول ۱). به‌گونه‌ای که در سطوح مصرفی ۲/۵ و ۵ درصد زغال زیستی، وزن خشک برگ، ساقه، ریشه و کل نهال‌ها به ترتیب ۳۲ و ۶۰ درصد، ۲۸ و ۳۶ درصد، ۱۶ و ۷۵ درصد و ۲۵ و ۵۹ درصد به صورت نسبت به شاهد (شرایط بدون تلقیح باکتری و بدون زغال زیستی) افزایش یافت (جدول ۲). زغال زیستی منبع بزرگی از کربن‌های فعال بوده که در کنار افزایش منابع غذایی محیط خاک (Cui *et al.*, 2013)، از طریق جذب فلزات سنگین در بافت اسفنجی خود و کاهش دسترسی زیستی فلزات سنگین شرایط برای رشد بهینه نهال‌ها را فراهم می‌کند. در سطح مصرفی کم (۲/۵ درصد) زغال زیستی به همراه باکتری، وزن خشک هیچ‌کدام از اندام‌ها

جدول ۱- تجزیه واریانس سطوح مختلف زغال زیستی و تلقیح باکتری بر عملکرد شاخسار بید سفید

Table 1. Analysis variance of biochar levels and bacteria inoculation on white willow dry matter

Source of variation	df	Leaf dry weight	Shoot dry weight	Root dry weight	Total dry weight
Biochar	2	0.29***	0.04*	1.70***	3.99***
Bacteria	1	0.009 ^{ns}	0.05*	1.14***	1.89***
Bacteria×Biochar	2	0.06 ^{ns}	0.05*	0.16 ^{ns}	0.56***
Error	12	0.04	0.01	0.05	0.07
Coefficient of variation (%)	-	21.41	13.01	24.36	20.9

در جدول بالا ns و *، ** و *** به ترتیب نشان دهنده عدم وجود معنی داری، وجود معنی داری در سطح های پنج، یک و ۰/۱ درصد در طی تجزیه واریانس یک طرفه می باشد.

Significant F-test value was indicated by *(p< 0.05), **(p< 0.01), ***(p< 0.001), and ns= not significant obtained by one-way ANOVA analysis.

جدول ۲- اثرات اعمال سطوح زغال زیستی و تلقیح باکتری بر عملکرد ماده خشک بید سفید

Table 2. Main effects of biochar application rate and bacterial inoculation on dry matter of white willow

Seedlings tissues	Biochar application rate (%)					
	Control (without bacteria inoculation)			Control (without bacteria inoculation)		
	0	2.5	5	0	2.5	5
Dry weight of leaf (g pot ⁻¹)	0.93 ^b	1.23 ^{ab}	1.49 ^a	1.20 ^{ab}	1.11 ^{ab}	1.48 ^a
Dry weight of shoot (g pot ⁻¹)	0.85 ^b	1.09 ^a	1.16 ^a	1.17 ^a	1.08 ^a	1.16 ^a
Dry weight of root (g pot ⁻¹)	1.08 ^d	1.26 ^{cd}	1.89 ^b	1.69 ^{bc}	1.39 ^{cd}	2.66 ^a
Total dry weight (g pot ⁻¹)	2.86 ^d	3.58 ^c	4.55 ^b	4.06 ^c	3.58 ^c	5.30 ^a

حروف انگلیسی غیرمشابه روی اعداد نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها در سطح معنی داری پنج درصد بر اساس مقایسه میانگین ها توسط آزمون توکی می باشد.

Different letters within columns indicate significant differences according to Tukey's multiple range tests.

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف زغال زیستی و تلقیح باکتری بر واکنش خاک، زیست فرآهمی و کارایی حذف فلزات

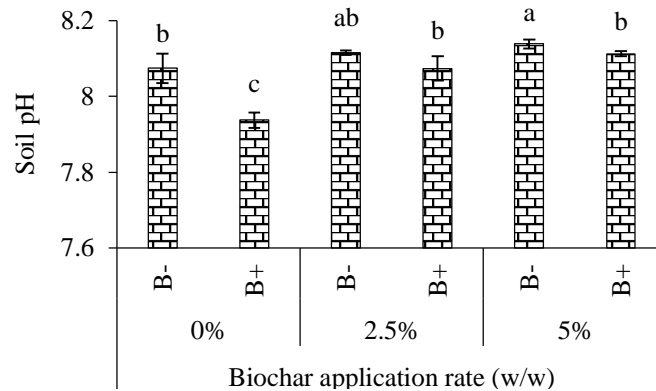
مس، سرب و کادمیوم

Table 3. Variance analysis of biochar levels and bacteria inoculation effects on soil pH, bioavailability and removal efficiency of Cu, Pb, and Cd.

Source variation	df	pH	biavalable Cu	Cu removal efficiency	biavalable Pb	Pb removal efficiency	Biavalable Cd	Cd removal efficiency
Biochar	2	0.02***	41.84***	465.9***	77.08***	169.95***	0.547***	44.33***
Bacteria	1	0.02***	24.35***	720.75***	537.67***	753.49***	0.567***	46.48**
Biochar× Bacteria	2	0.005***	4.72***	20.77 ^{ns}	11.1 ^{ns}	86.03**	0.058 ^{ns}	2.95*
Error	12	0.001	0.19	17.31	6.71	14.634	0.03	0.738
Coefficient of variation (%)	-	0.87	15.23	21.91	20.46	17.44	16.61	17.44

در جدول بالا ns و *، ** و *** به ترتیب نشان دهنده عدم وجود معنی داری، وجود معنی داری در سطح های پنج، یک و ۰/۱ درصد در طی تجزیه واریانس یک طرفه می باشد.

Significant F-test value was indicated by *(p< 0.05), **(p< 0.01), ***(p< 0.001), and ns= not significant obtained by one way ANOVA analysis.



شکل ۱- تغییرات pH خاک تیمارهای شاهد (بدون زغال زیستی و باکتری)، افزودن زغال زیستی در سطوح مختلف (۲/۵ و پنج درصد وزنی خاک) با (B+) و بدون (B-) تلقیح باکتری در نهال بید سفید

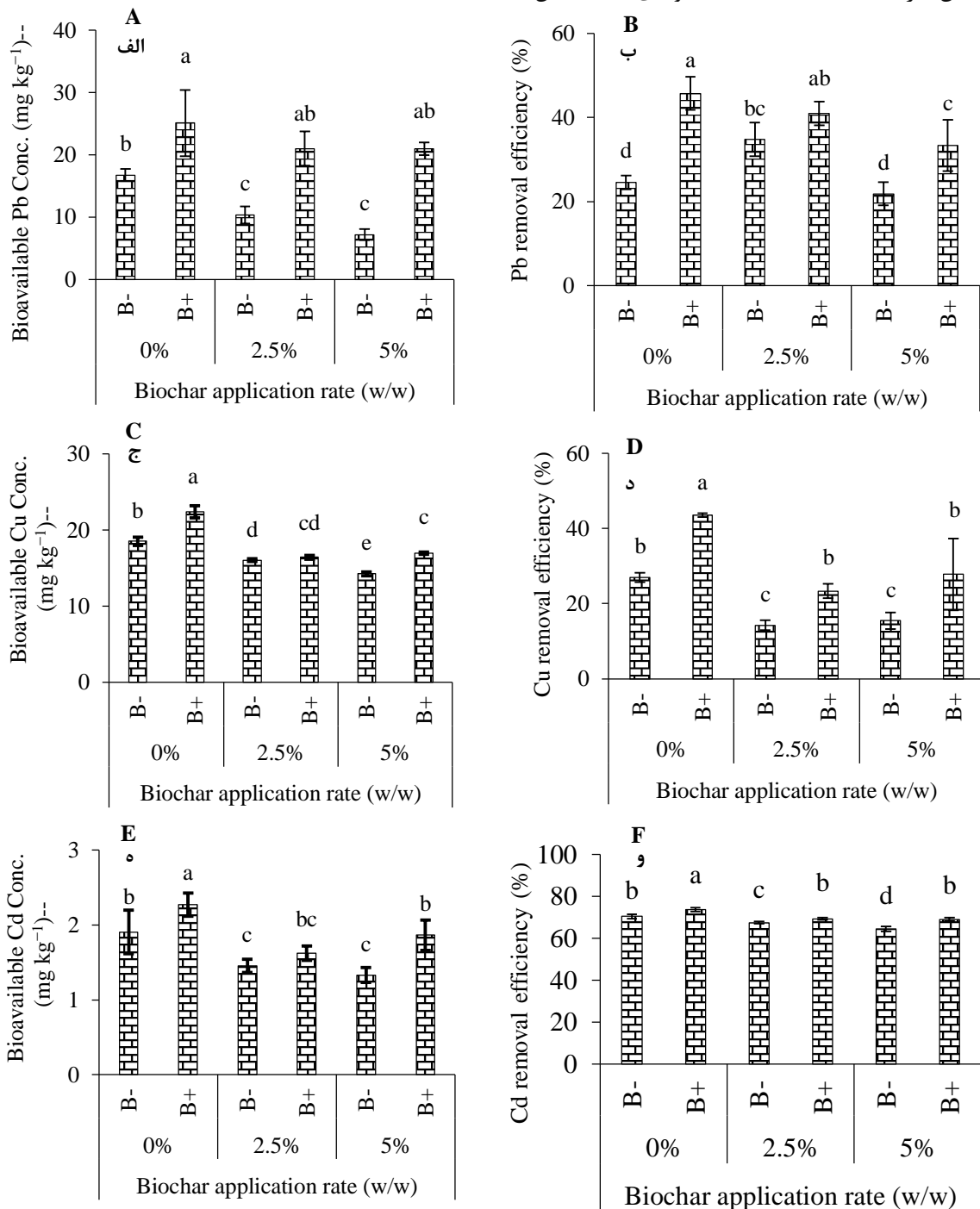
Figure 1. Variation of soil pH in the control (without biochar and bacteria), biochar amendment at various levels (2.5 and 5% of soil weight) with (B+) and without (B-) bacteria inoculation for white willow seedlings

کاهش یافته و در نتیجه میزان دسترسی ریشه گیاه به فلزات سنگین کاهش می‌یابد (Meng *et al.*, 2018). فرآیندهای یاد شده عوامل مهمی در بهره‌گیری از زغال زیستی در تثبیت و کاهش زیست‌دسترس‌پذیری فلزات سنگین و در نتیجه جلوگیری از اثر سمیت آن‌ها روی گیاهان مستقر در خاک‌های آلوده می‌باشد (Xu *et al.*, 2018). مطابق یافته‌های این پژوهش، با تلقیح باکتری، مقدار زیست‌فراهمی فلزات سنگین سرب، مس و کادمیوم نسبت به تیمار شاهد (بدون هیچ‌گونه افزودنی) به ترتیب ۵۰، ۲۱ و ۱۹ درصد افزایش معنی‌دار داشته که به ترتیب ۲۵/۱۰ (شکل ۲الف)، ۲۲/۳۹ (شکل ۲ج) و ۲/۲۷ (شکل ۲ه) میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک اندازه‌گیری شد. همان‌گونه که قبلاً نیز اشاره شد تلقیح باکتری به ریزوسفر نهال‌ها با بهبود شرایط خاک برای رشد گیاه افزایش رشد و توسعه طولی و حجمی ریشه را در پی داشته که در این شرایط دسترسی فلزات سنگین خاک برای نهال افزایش پیدا می‌کند. در این راستا، یافته‌های کریمی و همکاران (Karimi *et al.*, 2018) نیز افزایش زیست‌فراهمی فلزات سنگین توسط گیاه با تلقیح باکتری به خاک‌های آلوده را تأیید کرده‌اند. تلقیح باکتری به تیمارهای زغال زیستی تا حدودی منجر به افزایش زیست‌فراهمی سرب، مس و کادمیوم نسبت به شرایط کاربرد زغال زیستی شد (شکل ۲). از این‌رو، قلیابیت خاک ایجاد شده در اثر کاربرد زغال زیستی، توسط باکتری‌های تلقیح شده تعدیل شد (شکل ۱) که در نهایت منجر به بهبود نسبی دسترسی فلزات

نتایج نشان داد (شکل ۲) که مقدار زیست‌فراهمی فلزات سنگین سرب، مس و کادمیوم در تیمار شاهد (بدون تلقیح باکتری و افزودن زغال زیستی) ۱۶/۷۵، ۱۸/۵۱ و ۱/۹۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک بوده که میزان آن با افزودن هر دو سطح کم و زیاد زغال زیستی کاهش معنی‌دار داشت. افزایش قلیابیت خاک توسط زغال زیستی یکی از عوامل مهم در کاهش دسترسی نهال‌ها به فلزات سنگین است (Jien & Wang, 2013) به‌گونه‌ای که حمزه‌نژاد تقلیدآباد و سپهر (Hamzenejad Taghlidabad Sepehr, 2018) نقش تثبیت‌کنندگی و کاهش دسترسی زیستی فلزات سنگین توسط زغال زیستی را گزارش کرده‌اند. حمایت نهال‌ها از طریق افزودن زغال زیستی، زیست‌فراهمی فلزات سنگین محتوای خاک را به سبب قابلیت تثبیت‌کنندگی خود کاهش داده که در این راستا کاهش زیست‌فراهمی و شستشوی فلزات سنگین با افزودن زغال زیستی به خاک آلوده توسط حمزه‌نژاد تقلیدآباد و سپهر (Hamzenejad Taghlidabad Sepehr, 2018) و زو همکاران (Xu *et al.*, 2018) گزارش شده است. به‌عبارتی زغال زیستی متشکل از ذرات بسیار ریز با سطح ویژه بالا بوده و با برخورداری از حفرات میکروسکوپی متراکم در لایه‌های اسفنجی (Meng *et al.*, 2018) موجب جذب فلزات سنگین محتوای خاک اطراف ذرات زغال زیستی افزوده شده به خاک می‌شوند. بر همین اساس، غلظت فلزات سنگین محلول در محتوای آب در محیط خاک

میزان آن منجر به افزایش زیست‌دسترسی‌پذیری فلزات شده (Mousavi *et al.*, 2018) که با تلقیح باکتری چنین نتیجه‌ای مشاهده شد (شکل‌های ۱ و ۲).

سنگین سرب، مس و کادمیوم نسبت به استفاده به‌تنهایی زغال زیستی گردید (شکل‌های ۲ الف، ج و ه). میزان pH نقش بسیار مهم در زیست‌فرآهمی فلزات سنگین در محیط خاک داشته به‌گونه‌ای که کاهش



شکل ۲- تغییرات زیست‌فرآهمی و کارایی حذف سرب (الف و ب)، مس (ج و د) و کادمیوم (ه و و) در تیمارهای شاهد (بدون زغال زیستی و باکتری)، افزودن زغال زیستی در سطوح مختلف (۲/۵ و پنج درصد وزنی خاک) با (B+) و بدون (B-) تلقیح باکتری در نهال بید سفید

Figure 2. Variation of bioavailability and removal efficiency of Pb (A and B), Cu (C and D), and Cd (E and F) in the control (without biochar and bacteria), biochar amendment at various levels (2.5 and 5% of soil weight) with (B+) and without (B-) bacteria inoculation for white willow seedlings

اندام گیاهی (کارایی حذف فلزات از خاک) را افزایش داد. افزون بر فاکتورهای زیست‌فراهمی و کارایی حذف فلزات سنگین که به‌عنوان شاخص‌های مهم رفتار فلزات سنگین در خاک می‌باشند، فاکتور انباشت زیستی (BCF) و فاکتور انتقال (TF) فلزات سنگین که به‌ترتیب نسبت غلظت فلزات سنگین انباشت یافته در ریشه نسبت به غلظت آن‌ها در خاک و میزان غلظت فلزات سنگین در ساقه به غلظت آن‌ها در ریشه، از شاخص‌های بسیار مهم در تبیین رفتار و میزان جذب فلزات سنگین در اندام گیاه می‌باشند (Yoon *et al.*, 2006). در همین راستا و بر اساس نتایج ارائه شده در جدول ۴، در تیمارهای زغال زیستی در تمام سطوح، فاکتورهای انباشت زیستی و انتقال هر سه فلز سرب، مس و کادمیوم تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها داشتند (جدول ۴).

مقایسه میانگین‌ها برای تیمارهای اعمال شده نشان داد که میزان انباشت زیستی فلز سرب (شکل ۳ الف)، مس (شکل ۳ ج) و کادمیوم (شکل ۳ ه) در اثر افزودن هر دو سطح کم و زیاد زغال زیستی (شکل ۳ الف) کاهش معنی‌دار و به‌ترتیب تا ۵۲، ۴۶ و ۴۱ درصدی داشتند. اثرات بیان شده برای کاهش زیست‌دسترسی‌پذیری فلزات برای گیاه توسط زغال زیستی، از قبیل برخورداری از بافت اسفنجی (Meng *et al.*, 2018) و افزایش قابلیت خاک (Jien & Wang, 2013)، از عوامل اصلی کاهش انباشت زیستی فلزات در تیمارهای با کاربرد زغال زیستی بود. از طرفی، به‌جزء مس، همانند انباشت زیستی، اثرگذاری مشابهی از زغال زیستی روی فاکتور انتقال سرب و کادمیوم مشاهده شد (شکل‌های ۳ ب و ۳ ه). بر خلاف نتایج به دست آمده در رابطه با اثرات زغال زیستی، تلقیح باکتری تأثیر افزایشی معنی‌داری بر میزان انباشت زیستی فلزات سرب، مس و کادمیوم داشت (شکل ۳ الف، ج و ه). هم‌چنین فاکتور انتقال فلزات سنگین فقط برای سرب دارای تفاوت معنی‌دار بود (شکل ۳ ب). با وجود کاهش فاکتورهای انباشت زیستی و انتقال با کاربرد زغال زیستی، تلقیح باکتری همراه با زغال زیستی، موجب بهبود فاکتورهای یاد شده و در نهایت تعدیل مقادیر فاکتورهای انباشت زیستی و انتقال شد که هم‌راستا با نتایج باندارا و همکاران (Bandara *et al.*, 2017) است.

در کنار فاکتور زیست‌فراهمی فلزات سنگین، کارایی حذف فلزات سنگین توسط افزودنی‌ها از جمله شاخص‌های مهم در تعیین میزان اثرگذاری تیمارها در پالایش آلاینده‌های فلزات از خاک است (Huang *et al.*, 2004). در این راستا، در پژوهش حاضر، ضریب حذف فلز سرب در تیمار شاهد ۲۴/۵۷ درصد بوده که در تمام تیمارها به‌جزء تیمار افزودن سطح پنج درصد زغال زیستی به‌تنهایی، میزان کارایی حذف این فلز از خاک به‌صورت معنی‌دار بهبود یافت. به‌گونه‌ای که بیش‌ترین مقدار کارایی حذف در تیمارهای تلقیح باکتری و افزودن زغال زیستی به‌همراه باکتری به‌ترتیب با مقادیر ۴۵/۷۱ و ۴۱ درصد اندازه‌گیری شد (شکل ۲ ب). کارایی حذف فلز مس نیز در تیمارهای مطالعاتی بعضاً رفتار مشابهی با تغییرات فاکتور زیست‌فراهمی داشت. به‌طوری‌که کارایی حذف فلز مس در تیمار شاهد ۲۷ درصد بوده که این مقدار در تیمارهای با افزودن هر دو سطح زغال زیستی به‌صورت معنی‌داری کم‌تر بود (۱۳ و ۱۴ درصد) (شکل ۲ د).

تلقیح باکتری با هر دو سطح مصرف زغال زیستی، میزان کارایی حذف مس را در حد تیمار شاهد نگه‌داشت (۲۳ و ۲۷ درصد) در حالی که تلقیح جداگانه باکتری به‌صورت معنی‌داری این ضریب را افزایش داد (۴۳/۵۵ درصد). از طرفی دیگر، کارایی حذف فلز کادمیوم در تمام تیمارها بین ۶۴/۵۰ تا ۷۲/۳۰ درصد بوده که در این بین بیش‌ترین میزان کارایی حذف در تیمار تلقیح باکتری و کم‌ترین آن در تیمار جداگانه زغال زیستی در سطح مصرف زیاد مشاهده شد. لذا تلقیح باکتری به‌همراه زغال زیستی منجر به حذف فلز کادمیوم نسبت به شرایط کاربرد جداگانه شد (شکل ۲ و).

شاخص‌های رفتارسنجی فلزات سنگین در نهال

از آن‌جایی‌که میزان کارایی حذف فلزات سنگین توسط گیاهان ارتباط مستقیمی با مقدار دسترسی گیاهان به فلزات سنگین محتوای خاک (زیست‌فراهمی) دارد (Mousavi *et al.*, 2018)، لذا فلزات سنگین مس، سرب و کادمیوم باقی‌مانده در خاک تیمارهای با مقادیر بالای زیست‌فراهمی، کم‌تر از سایر تیمارها بود. در این راستا، در تیمارهای با تلقیح به‌تنهایی باکتری با توجه به اثرات یاد شده آن موجب افزایش دسترسی زیستی فلزات سنگین در خاک شده و امکان جذب و انتقال آن‌ها به

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر اعمال سطوح زغال زیستی و تلقیح باکتری بر فاکتور تغلیظ زیستی و فاکتور انتقال فلزات مس، سرب و

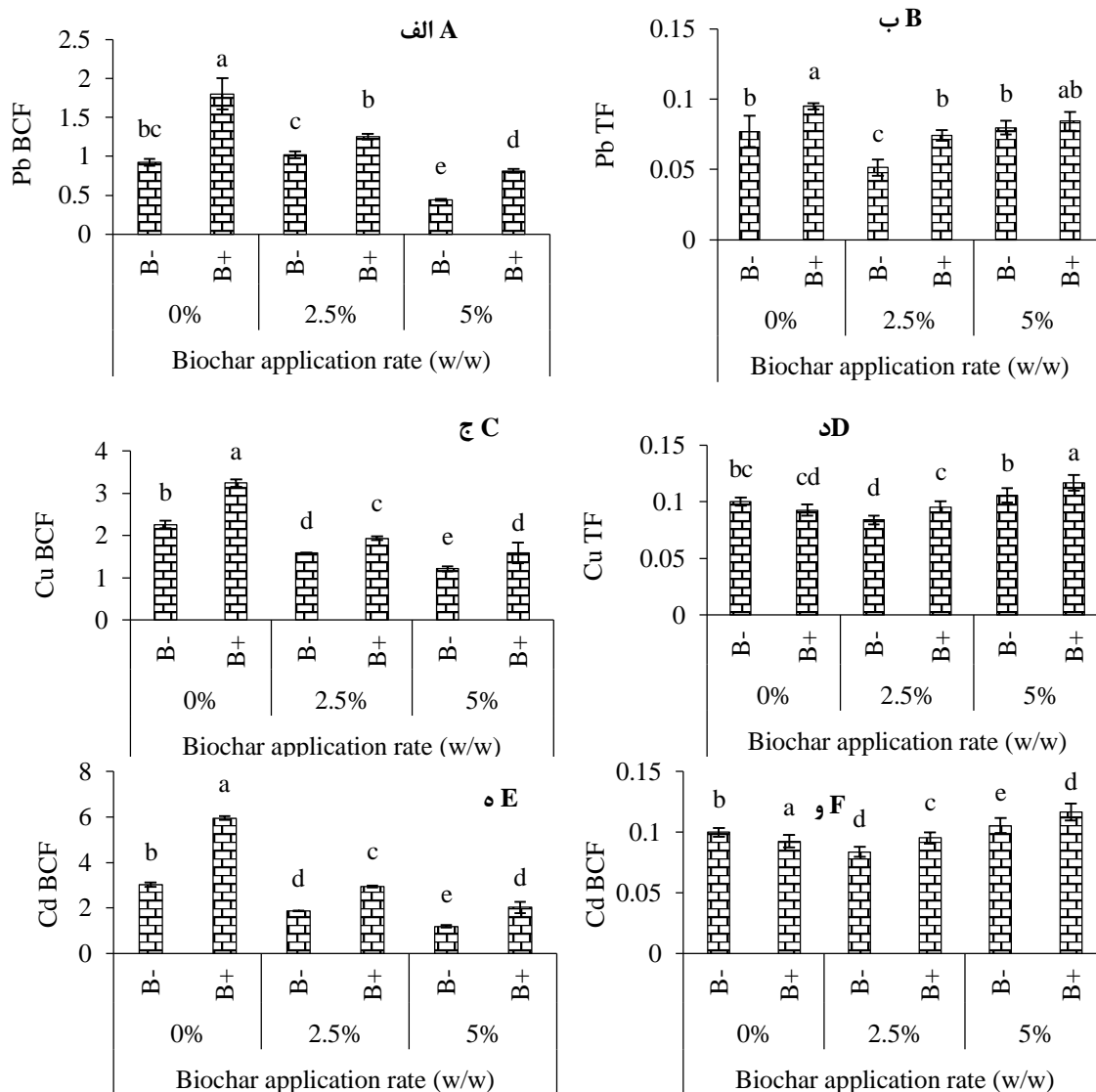
کادمیوم در نهال بید سفید

Table 4. Analysis of variance of biochar application rate and bacterial inoculation on BCF and TF of Cu, Pb, and Cd in white willow

Source of variation	df	Cu BCF	Cu TF	Pb BCF	Pb TF	Cd BCF	Cd TF
Biochar	2	2.93***	0.073***	0.85***	0.001***	13.30***	0.02***
Bacteria	1	1.47***	0.012 ^{ns}	1.11***	0.001***	11.76***	0.004 ^{ns}
Biochar×Bacteria	2	0.193***	0.018*	0.17***	0.0001 ^{ns}	1.97***	0.004*
Error	12	0.01	0.003	0.008	0.00004	0.08	0.001
Coefficient of variation (%)	-	24.59	11.51	21.95	19.07	23.45	23.451

در جدول بالا ns و *، ** و *** به ترتیب نشان دهنده عدم وجود معنی داری، وجود معنی داری در سطح پنج، یک و ۰/۱ درصد در طی تجزیه واریانس یک طرفه می باشد.

Significant F-test value was indicated by *(p<0.05), **(p<0.01), ***(p<0.001), and ns= not significant obtained by one-way ANOVA analysis.



شکل ۳- تغییرات تغلیظ زیستی (BCF) و فاکتور انتقال (TF) سرب (الف و ب)، مس (ج و د) و کادمیوم (ه و و) در تیمارهای شاهد (بدون زغال زیستی و باکتری)، افزودن زغال زیستی در سطوح مختلف (۲/۵ و پنج درصد وزنی خاک) با (B+) و بدون (B-) تلقیح باکتری در نهال بید سفید

Figure 3. Variation of bioconcentration factor and translocation factor of Pb (A and B), Cu (C and D), and Cd (E and F) in the control (without biochar and bacteria), biochar amendment at various levels (2.5 and 5% of soil weight) with (B+) and without (B-) bacteria inoculation, for white willow seedlings

که در نهایت منجر به کاهش انباشت فلزات سنگین در اندام ریشه شد. همچنین، با افزایش سطح مصرف زغال زیستی، کاهش مقادیر شاخص‌های مورد مطالعه شدت بیش‌تری داشت. با این حال، تثبیت فلزات سنگین توسط زغال زیستی و کاهش اثر سمیت آن‌ها روی نهال‌ها، شرایط برای رشد سریع و حداکثری را فراهم کرد که در نتیجه منجر به افزایش ظرفیت جذب و انباشت در اندام‌های بید سفید را در پی داشت. با این حال، تلقیح باکتری‌های ریزوسفری به محیط ریشه نهال‌ها، هرچند به‌اندازه زغال زیستی شرایط رویش حداکثری شاخسار نهال‌ها را فراهم نکرد، ولی منجر به افزایش قابل توجه و حداکثری در میزان زیست‌فراهمی، کارایی حذف، انباشت زیستی (از محیط خاک به ریشه نهال‌های بید سفید) و انتقال فلزات سنگین (از ریشه به اندام‌های هوایی نهال‌های بید سفید) شد. از طرفی، تلقیح باکتری-زغال زیستی، منجر به افزایش قابلیت زغال زیستی در دسترس‌پذیر کردن فلزات سنگین و در نتیجه، افزایش کارایی نهال‌ها در حذف فلزات سنگین شد. لذا، کاربرد ترکیبی باکتری و زغال زیستی به‌عنوان دو افزودنی زیستی خاک، ضمن بهبود مؤلفه‌های رویشی نهال‌های بید سفید و در نتیجه افزایش ظرفیت اندام‌های آن‌ها، امکان دسترس‌پذیری فلزات توسط گیاهان را تا حدودی فراهم کرد که در نهایت منجر به بهبود فرآیند گیاه‌پالایی شد. در حقیقت، دست‌آورد این پژوهش مؤید این است که یکی از محدودیت‌های (کاهش زیست‌دسترس‌پذیری و کارایی حذف فلزات سنگین) کاربرد زغال زیستی (به‌عنوان راهکاری دوست‌دار محیط زیست و ارزان در پالایش گیاهی آلودگی‌های خاک) از طریق کاربرد ترکیبی آن با تلقیح باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد در نهال بید سفید، رفع شده است. بی‌شک، انجام پژوهش‌های مشابه با دوره‌های آزمایشی طولانی به‌همراه تحلیل مؤلفه‌های فیزیولوژیکی و ریخت‌شناختی گیاهی و تغییرات فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک، منجر به صحت و قوت بیشتر پژوهش‌های آتی خواهد شد.

در نهایت تلقیح باکتری موجب افزایش شاخص‌های زیست‌فراهمی، کارایی حذف، انباشت زیستی و انتقال فلزات سنگین شده و افزودن زغال زیستی بیش‌تر منجر به کاهش شاخص‌های مذکور شد. از طرفی، زغال زیستی ماهیت و عملکردی متفاوت از باکتری در فرآیند گیاه‌پالایی داشته که بیش‌تر از طریق تعدیل‌سازی میزان سمیت در محیط ریشه و جذب و نگهداری فلزات سنگین، سلامتی ریشه و گیاه را تضمین و موجب بهبود ویژگی‌های فیزیولوژیکی و ریخت‌شناسی می‌شود (Xu et al., 2018). از این‌رو، با افزایش زی‌توده گیاه، ظرفیت حجمی گیاه برای جذب و نگهداری فلزات سنگین در اندام‌های گیاه افزایش یافته که در طولانی‌مدت منجر به حذف بخش قابل توجهی از آلاینده‌ها از خاک می‌شود. در حالی‌که، باکتری‌ها در محیط خاک نقشی در مدیریت فلزات سنگین نداشته و صرفاً با ایجاد شرایط شیمیایی و فیزیکی مناسب برای ریشه، امکان تشدید جذب و پالایش فلزات سنگین توسط گیاه را افزایش می‌دهند.

بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، کاربرد ترکیبی دو افزودنی مذکور شرایط بهینه‌تری در فرآیند پالایش آلودگی‌ها و بهبود سلامت خاک و گیاه را فراهم آورده که در نهایت ضمن بهبود ویژگی‌های رشدی گیاه (که نقش زغال زیستی بیش‌تر بوده)، امکان بهبود شاخص‌های مؤثر در جذب فلزات سنگین (که نقش باکتری‌های پر رنگ‌تر بوده) فراهم می‌شود. لذا کاربرد ترکیبی زغال زیستی و باکتری منجر به پالایش پایدار و قابل توجه فلزات سنگین در فرآیند گیاه‌پالایی مورد مطالعه در پژوهش حاضر شد.

نتیجه‌گیری کلی

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که افزودن زغال زیستی به ریزوسفر نهال‌های بید مستقر در خاک آلوده به فلزات سنگین سرب، مس و کادمیوم منجر به کاهش قابلیت دسترسی زیستی فلزات سنگین در محیط محلول خاک و در نتیجه کاهش شدت و میزان جذب آن‌ها توسط نهال‌ها شد. از این‌رو، کارایی حذف فلزات سنگین از خاک از طریق نهال بید سفید کاهش یافت

Reference

- Abbaszadeh F., Jalali, V.R. and Jafari., A. 2018. Investigating the source of some heavy metals using cluster and factor analysis techniques in soils of Hormoz Island. *Applied Soil Research*, 6(1): 13-24. (In Persian)
- Arslan M., Afzal M., Amin I., Iqbal S. and Khan Q.M. 2014. Nutrients can enhance the abundance and expression of alkane hydroxylase CYP153 gene in the rhizosphere of ryegrass planted in hydrocarbon-polluted soil. *PloS One*, 9(10): e111208.
- Balseiro-Romero M., Gkorezis P., Kidd P.S., Van Hamme J., Weyens N., Monterroso C., and Vangronsveld J. 2017. Use of plant growth promoting bacterial strains to improve *Cytisus striatus* and *Lupinus luteus* development for potential application in phytoremediation. *Science of the Total Environment*, 581-582: 676-688.
- Bandara T., Herath I., Kumarathilaka P., Seneviratne M., Seneviratne G., Rajakaruna N., Vithanage M. and Ok Y.S. 2017. Role of woody biochar and fungal-bacterial co-inoculation on enzyme activity and metal immobilization in serpentine soil. *Journal of Soils and Sediments*, 17(3): 665-673.
- Bittsánszky A., Gyulai G., Gullner G., Kiss J., Szabó Z., Kátay G., Heszky L., and Kömíves T. 2009. In vitro breeding of grey poplar (*Populus×canescens*) for phytoremediation purposes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(6): 890-894.
- Cicero-Fernández D., Peña-Fernández M., Expósito-Camargo J.A., and Antizar-Ladislao B. 2016. Role of *Phragmites australis* (common reed) for heavy metals phytoremediation of estuarine sediments. *International Journal of Phytoremediation*, 18(6), 575-582.
- Cui L., Yan J., Yang Y., Li L., Quan G., Ding C., Chen T., Fu Q. and Chang, A. 2013. Influence of biochar on microbial activities of heavy metals contaminated paddy fields. *Bioresources*, 8(4): 5536-5548.
- De Maria S., Rivelli A.R., Kuffner M., Sessitsch A., Wenzel W.W., Gorfer M., Strauss J. and Puschenreiter M. 2011. Interactions between accumulation of trace elements and macronutrients in *Salix caprea* after inoculation with rhizosphere microorganisms. *Chemosphere*, 84(9): 256-261.
- Deng Z., and Cao L. 2017. Fungal endophytes and their interactions with plants in phytoremediation: A review. *Chemosphere*, 168: 1100-1106.
- De Tender C.A., Debode J., Vandecasteele B., D'Hose T., Cremelie P., Haegeman A., Ruttink T., Dawyndt P. and Maes M. 2016. Biological, physicochemical and plant health responses in lettuce and strawberry in soil or peat amended with biochar. *Applied Soil Ecology*, 107: 1-12.
- Fahmi A.H., Samsuri A.W., Jol H. and Singh D., 2018. Bioavailability and leaching of Cd and Pb from contaminated soil amended with different sizes of biochar. *Royal Society Open Science*, 5(11): 181328.
- Goswami S., and Das S. 2016. Copper phytoremediation potential of *Calandula officinalis* L. and the role of antioxidant enzymes in metal tolerance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 126: 211-218.
- Guarino C., and Sciarrillo R. 2017. Effectiveness of in situ application of an Integrated Phytoremediation System (IPS) by adding a selected blend of rhizosphere microbes to heavily multi-contaminated soils. *Ecological Engineering*, 99: 70-82.
- Hamzenejad Taghliadab R., and Sepehr E. 2018. Heavy metals immobilization in contaminated soil by grape-pruning-residue biochar. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 64(8): 1041-1052.
- Hao Q., and Jiang C. 2015. Heavy metal concentrations in soils and plants in Rongxi Manganese Mine of Chongqing, Southwest of China. *Acta Ecologica Sinica*, 35(1): 46-51.
- Heidari A., Stahl R., Younesi H. Rashidi A. Troeger N. and Ghoreyshi A.A. 2014. Effect of process conditions on product yield and composition of fast pyrolysis of *Eucalyptus grandis* in fluidized bed reactor. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20(4): 2594-2602.
- Hussain F., Hussain I., Khan A.H.A., Muhammad Y.S., Iqbal M., Soja G., Reichenauer T.G. and Yousaf, S. 2018. Combined application of biochar, compost, and bacterial consortia with Italian ryegrass enhanced phytoremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil. *Environmental and Experimental Botany*, 153: 80-88.
- Jien S.H., and Wang C.S. 2013. Effects of biochar on soil properties and erosion potential in a highly weathered soil. *Catena*, 110: 225-233.

- Jin Z., Chen C., Chen X., Hopkins I., Zhang X., Han Z., Jiang F. and Billy G. 2019. The crucial factors of soil fertility and rapeseed yield-A five-year field trial with biochar addition in upland red soil, China. *Science of The Total Environment*, 649: 1467-1480.
- Joseph S., Graber E.R., Chia C., Munroe P., Donne S., Thomas T., Nielsen S., Marjo C., Rutledge H., Pan G.X. and Li L. 2013. Shifting paradigms: development of high-efficiency biochar fertilizers based on nano-structures and soluble components. *Carbon Management*, 4(3): 323-343.
- Karimi A., Khodaverdiloo H. and Rasouli- Sadaghiani M.H., 2018. Microbial- enhanced phytoremediation of lead contaminated calcareous soil by *Centaurea cyanus* L. *Clean-Soil, Air, Water*, 46(2): 1700665.
- Khan A.G. 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18(4): 355-364.
- Khodaverdiloo H., and Hamzenejad Taghliabad R. 2014. Phytoavailability and potential transfer of Pb from a salt-affected soil to *Atriplex verucifera*, *Salicornia europaea* and *Chenopodium album*. *Chemistry and Ecology*, 30(3): 216-226.
- Khanmohammadi Z., Afyuni M., and Mosaddeghi M.R. 2015. Effect of pyrolysis temperature on chemical properties of sugarcane bagasse and Pistachio residues biochar. *Applied Soil Research*, 3(1): 1-13. (In Persian)
- Lebrun M., Macri C., Miard F., Hattab-Hambli N., Motelica-Heino M., Morabito D. and Bourgerie S. 2017. Effect of biochar amendments on as and Pb mobility and phytoavailability in contaminated mine technosols phytoremediated by *Salix*. *Journal of Geochemical Exploration*, 182: 149-156.
- Liu B., Ai S., Zhang W., Huang D., and Zhang Y. 2011. Assessment of the bioavailability, bioaccessibility and transfer of heavy metals in the soil-grain-human systems near a mining and smelting area in NW China. *Science of the Total Environment*, 609: 822-829.
- Meng J., Tao M., Wang L., Liu X. and Xu J. 2018. Changes in heavy metal bioavailability and speciation from a Pb-Zn mining soil amended with biochars from co-pyrolysis of rice straw and swine manure. *Science of the Total Environment*, 633: 300-307.
- Miransari M. 2011. Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metals. *Biotechnology Advances*, 29(6): 645-653.
- Mousavi S.M., Motesarezadeh B., Hosseini H.M. Alikhani H., and Zolfaghari A.A. 2018. Root-induced changes of Zn and Pb dynamics in the rhizosphere of sunflower with different plant growth promoting treatments in a heavily contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147: 206-216.
- Paz-Ferreiro J., Lu H., Fu S., Méndez A. and Gascó G. 2014. Use of phytoremediation and biochar to remediate heavy metal polluted soils: A review. *Solid Earth*, 5(1): 65-75.
- Puga A.P., Abreu C.A., Melo L.C.A. and Beesley L. 2015. Biochar application to a contaminated soil reduces the availability and plant uptake of zinc, lead and cadmium. *Journal of Environmental Management*, 159: 86-93.
- Rajkumar M., Sandhya S., Prasad M.N.V. and Freitas H. 2012. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances*, 30(6): 1562-1574.
- Randolph P., Bansode R.R., Hassan O.A., Rehrah D., Ravella R., Reddy M.R., Watts D.W. Novak J.M. and Ahmedna M. 2017. Effect of biochars produced from solid organic municipal waste on soil quality parameters. *Journal of Environmental Management*, 192: 271-280.
- Safari Sinegani, A.A., and Jafari Monsef, M. 2017. Effect of cadmium pollution on soil organic carbon particle size fractions in Hamadan and Lahigan soils treated with wheat straw. *Applied Soil Research*, 5(1): 1-12. (In Persian)
- Saladin G. 2015. Phytoextraction of heavy metals: The potential efficiency of conifers, In: Heavy metal contamination of soils, soil biology, Sherameti, I., Varma, A. (Ed.). Springer International Publishing Switzerland, pp. 333-353.
- Salehi A., Tabari Kouchaksaraei M., Mohammadi-Goltapeh E. and Shirvani, A. 2014. Lead stress differently influence survival and growth of two poplar clones in association with arbuscular mycorrhizal fungi. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 5(6): 162-172.

- Sousa N.R., Franco A.R., Ramos M.A., Oliveira R.S. and Castro P.M. 2015. The response of *Betula pubescens* to inoculation with an ectomycorrhizal fungus and a plant growth promoting bacterium is substrate-dependent. *Ecological Engineering*, 81(4): 439-443.
- Wu F.B., Jing D.O.N.G., Jia G.X., Zheng S.J. and Zhang G.P. 2006. Genotypic difference in the responses of seedling growth and Cd toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). *Agricultural Sciences in China*, 5(1), 68-76.
- Xu Y., Seshadri B., Sarkar B., Wang H., Rumpel C., Sparks D., Farrell M., Hall T., Yang X. and Bolan N. 2018. Biochar modulates heavy metal toxicity and improves microbial carbon use efficiency in soil. *Science of the Total Environment*, 621, 148-159.
- Yoon J., Cao X., Zhou Q. and Ma L.Q. 2006. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Science of the Total Environment*, 368(2), 456-464.
- Zimmer D., Baum C., Leinweber P., Hryniewicz K. and Meissner, R. 2009. Associated bacteria increase the phytoextraction of cadmium and zinc from a metal-contaminated soil by mycorrhizal willows. *International Journal of Phytoremediation*, 11(2): 200-213.

Bioavailability of Soil Heavy Metals as Influenced by Biochar and Rhizosphere Bacteria in the White Willow Phytoremediation Process

Sahar Mokarram-Kashtiban¹, Seyed Mohsen Hosseini^{2*}, Masoud Tabari Kouchaksaraei³, Habibollah Younesi⁴

(Received: October 2018

Accepted: January 2019)

Abstract

Biochar is known as a widely-use amendment in improving phytoremediation efficiency through the increase of plant growth; whereas its influence (either individually or in combination with bacteria) on the reduction of heavy metals (HMs) bioavailability of soil is an important advantage. This study was planned to assess the effects of separately and combined of biochar produced by forest wood wastes of hornbeam at three levels of 0, 2.5 and 5% of soil dry weight and *Pseudomonas fluorescens* bacteria on growth properties of potted white willow (*Salix alba* L.) seedling in a HM contaminated soil (Pb, Cu, and Cd). The variation of bioavailability (BA) and removal efficiency (RE) indexes, and bioaccumulation (BCF) and translocation (TF) factors also were analyzed in the treatments. The experiment was conducted under greenhouse condition for a 160 days' period. The results showed that the variation in most growth components of seedlings was significant in the separate and combined treatments. The combined treatment of bacteria-biochar (at 5% level) increased the dry weight of leaf, shoot, root and total plant about 59, 36, 142, and 85% in comparison to the control (without the biochar and bacteria). In the biochar treatments, the BA, RE (except Pb), BCF, and TF (only in 2.5% of biochar) for Pb, Cu, and Cd were 13-57, 4-47, 29-60, and 16-33% lower than those in control, respectively. These indexes were improved by up to 191, 79, 84, and 13% in the bacteria-biochar treatment in compared to the individual application of biochar. In overall, according to our findings, the combination of biochar-bacteria led to the HMs bioavailability and improving the white willow function to eliminate soil HMs. So that, co-application of biochar and bacteria as soil amendments can increase growth parameters in white willow seedling and improve HMs bioavailability of plant in phytoremediation process.

Keywords: Bioremediation; Metal bioaccumulation; Plant growth-promoting bacteria; *Salix alba*, Soil contamination

Mokarram-Kashtiban S., Hosseini S.M., Tabari Kouchaksaraei M., Younesi H. 2019. Bioavailability of soil heavy metals as influenced by biochar and rhizosphere bacteria in the white willow (*Salix Alba* L.) phytoremediation process. *Applied Soil Research*. 7(4).196-211.

¹ . Ph.D. Graduated of Silviculture and Forest Ecology, Department of Forestry, Faculty of Natural Resources, Tarbiat Modares University, Iran

2. Professor, Department of Forestry, Faculty of Natural Resources, Tarbiat Modares University, Iran

3. Professor, Department of Forestry, Faculty of Natural Resources, Tarbiat Modares University, Iran

4. Professor, Department of Environmental Science, Faculty of Natural Resources, Tarbiat Modares University, Iran

* Corresponding Author Email: hosseini@modares.ac.ir