تحقیقات آب و خاک ایران، دورهٔ ۴۸، شمارهٔ ۲، فصل ۱۳۹۲ (ص ۳۸۴-۳۶۹)

تأثیر بیوچار و تیمارهای زیستی بر غلظت عناصر غذایی (فسفر، پتاسیم، کلسیم، منیزیم، آهن و منگنز) گیاه تاج‌خروس (Amaranthus) در یک خاک آلوده به ترکیبات نفتی

حمید حبیبی[۱]، بابک متشرع زاده[۲]*، حسینعلی علیخانی[۳]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۲. دانشیار، گروه علوم و مهندسی خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۳. استاد، گروه علوم و مهندسی خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۲۳ – تاریخ بازنگری: ۲۶/ ۶/ ۱۳۹۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۷/۳)

چکیده

وجود ترکیبات نفتی در خاک سبب بروز مشکلات زیست محیطی می‌گردد، لذا تلاش برای پالایش این اراضی ضروری به نظر می‌رسد. این پژوهش با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف بیوچارهای حاصل از پسماند زباله شهری و باکتری تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی بر میزان عناصر غذایی موجود در گیاه تاج‌خروس صورت پذیرفت. تیمارها شامل نفت خام (در سه سطح: (P0) ۰، (P1) ۲/۵ و(P2) ۵ درصد وزنی)، بیوچار حاصل ازکمپوست زباله شهری(Bcm) و زباله تر شهری(BM) (در سه سطح: ۰، ۱ و ۲ درصد وزنی) و باکتری (دو سطح: بدون باکتری(Ba0) و دارای باکتری *سودوموناس فلورسنس*(Ba1)) بود. نتایج نشان داد که با افزایش میزان بیوچار، رشد گیاه بیشتر شد و همواره بیشترین میزان صفات رشدی در سطوح دارای بیوچار گزارش گردید. مقادیر وزن خشک شاخساره در تیمارهایی که دارای باکتری *سودوموناس فلوروسنس* بودند نسبت به سایر تیمارها تفاوت معناداری نشان داد. در مجموع با کاربرد بیوچار و باکتری *سودوموناس فلورسنس*، غلظت عناصر غذایی اندازه‌گیری شده افزایش یافت و بیشترین غلظت عناصر در بالاترین سطوح بیوچار گزارش شد به طوری که بیشترین غلظت فسفر با میزان ۰/۳۷ درصد در تیمار P1B0Ba1 و کمترین مقدار آن با میزان ۰/۲۳ درصد در تیمار P2BM2Ba1 مشاهده شد. همچنین بیشترین غلظت عنصر پتاسیم در تیمار P2BM2Ba1 به میزان ۵/۱۶ درصد و کمترین مقدار آن ۲/۱۵ درصد در تیمار فاقد عامل زیستی P0BM1Ba0 اندازه گیری و گزارش شد. در سطوح آلودگی یکسان، در تیمارهای حاوی بیوچار، غلظت کلسیم و منیزیم نسبت به شاهد، به میزان بیشتری بود. بیشترین غلظت آهن و منگنز در تیمار P0B0Ba1 با حضور عامل زیستی به ترتیب به میزان ۱۲۰۰/۳۳ و ۴۴۱/۵ میلی‌گرم برکیلوگرم اندازه‌گیری شد و کمترین مقادیر آن در تیمار عدم حضور باکتری سودوموناس بود. بر این اساس توصیه می‌شود برای افزایش بهره‌وری پالایش آلودگی، استفاده از مواد آلی و به طور مشخص بیوچار و تیمارهای باکتریایی مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: بیوچار، ترکیبات نفتی، زیست پالایی، *سودوموناس فلوروسنس*، فراهمی عناصر غذایی

مقدمه

آلاینده‌های نفتی به دلیل اثرات زیانبار بر سلامت انسان و محیط، به عنوان یکی از مهمترین آلوده‌کننده‌های محیط‌زیست شناخته شده‌اند (Roja, 2009). آلودگی نفتی موجب حذف پوشش گیاهی و در نتیجه فرسایش خاک و تهی شدن ساختار اجتماعات گیاهی و جانوری می‌شود. بنابراین پالایش خاک در همه مناطق به ویژه مناطق دارای فعالیت‌های کشاورزی نه تنها از نظر اکولوژیک لازم است بلکه موجب حفظ محصولات کشاورزی نیز می‌گردد (Nie *et al.*, 2011). یکی از روش‌های مهم رفع آلاینده‌ها، زیست‌پالایی است که عبارت است از استفاده گیاهان، باکتری‌ها، ریزجانداران[1] به منظور حذف و کاهش آلاینده‌ها در یک محیط آلوده. زیست پالایی خاک‌های آلوده عبارت است از کاربرد گیاهان سبز و ریزجانداران برای اصلاح خاک و حذف آلاینده‌های زیست‌محیطی که یک روش کم هزینه و بدون آسیب به موجودات زنده خاک و زیست‌بوم تلقی می‌شود (Cunningham *et al.*, 1996). پژوهش‌ها، نشان می‌دهد رعایت تغذیه و کوددهی صحیح به خاک یک عامل مهم و موثر بر تجزیه زیستی مواد نفتی توسط گیاهان و ریزجانداران

---

* نویسنده مسئول : moteshare@ut.ac.ir

[1] micro organism

وابسته به گیاه است (Merkl *et al*., 2005). مواد غذایی کافی خاک برای رشد گیاهان و ریزجانداران وابسته به آنان مورد نیاز می‌باشد. این میزان دسترسی می‌تواند در جریان زیست‌پالایی و هنگامی که گیاهان و ریزجانداران تحت تأثیر تنش آلاینده‌ها قرار دارند تغییر کند. به طورکلی نفت خام به دو طریق بر رشد گیاه تأثیر می‌گذارد یکی از طریق تماس مستقیم با گیاه که منجر به آسیب غشاءِ سلولی و مرگ سلول، کاهش سرعت فتوسنتز و تعرق گیاه، کلروز و محدودکردن جوانه‌زنی گیاه می‌گردد و دیگری به طور غیر مستقیم از طریق تغییر شرایط فیزیکی و تغذیه‌ای خاک (Bona *et al*., 2011). شرایط بی‌هوازی و آب‌گریزی خاک در نتیجه بروز آلودگی، موجب بروز مشکل در ارتباط خاک-گیاه-آب می‌گردد که همین امر موجب کاهش دریافت آب و عناصر مغذی توسط گیاه می‌گردد. برخی از اجزای نفت خام یا محصولات حاصل از تجزیه زیستی آن دارای ساختمانی مشابه هورمون‌ها بوده و اثرات هورمون‌های رشد گیاهی را بروز می‌دهند که منجر به از بین رفتن زمین‌گرایی گیاه شده و حتی ممکن است سبب افزایش رشد گیاه گردد (Bossert and Bartha, 1985). پژوهشگران نشان دادند که هیدروکربن‌های نفتی می‌توانند به مقدار زیادی دسترسی گیاهان به مواد غذایی در خاک را کاهش دهند. برخی پژوهشگران نشان داده‌اند که وجود نفت در خاک به طور معنی‌داری فراهمی فسفر و پتاسیم را برای گیاه کاهش می‌دهد و به علت اینکه نیتروژن، پتاسیم، فسفر و اکسیژن برای رشد و توسعه گیاه ضروری هستند بنابراین کاهش فراهمی آنها سبب کاهش رشد گیاه می‌شود (Dimitrow and Markow., 2000). مواد آلی یکی از اصلاح‌کننده‌های مهم خاک و بهبوددهنده خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک‌ها به شمار می‌روند. بیوچار، محصولی غنی از کربن می‌باشد که طی تجزیه حرارتیِ زیست توده‌هایی مانند انواع چوب‌ها، کودها، برگ‌ها، کاه و کلش و همچنین پسماندهای کشاورزی در شرایط بی‌هوازی یا کم‌هوازی که به آن گرماکافت (پیرولیز[1]) می‌گویند، تولید می‌گردد (Lehmann *et al*., 2007). بیوچار از طریق اثرات مستقیم و همچنین غیرمستقیم سبب افزایش عملکرد گیاه و حاصلخیزی خاک می‌گردد. بیوچار به دلیل داشتن ساختاری متخلل، سطح ویژه بالا و توانایی آن برای جذب مواد آلی محلول، گازها و مواد مغذی غیر آلی زیستگاهی مناسب برای ریز جانداران خاکزی به شمار می‌رود (Lehmann., 2009). از جمله اثرات مستقیم می‌توان به افزایش تامین و دسترسی به عناصری مانند نیتروژن، پتاسیم و فسفر در داخل خاک اشاره کرد که به تبع افزایش این عناصر، رشد در بخش‌های مختلف گیاهان در پژوهش‌های بسیاری مشاهده گردیده است. علاوه بر آزادکردن مستقیم فسفر محلول و برخی عناصر غذایی ضروری، بیوچار می‌تواند ظرفیت تبادل یونی خاک را افزایش دهد (Liang *et al*., 2006) و ممکن است قابلیت دسترسی فسفر را با مهیا کردن ظرفیت تبادل آنیونی یا با تأثیر بر فعالیت کاتیون‌هایی که در تعامل با فسفر هستند تغییر دهد. به طور کلی در هر راهکار اصلاحی، تشخیص عوامل محدود کننده سرعت پالایش مانند تعداد کم ریزجانداران، محدودیت عناصر غذایی، مقدار رطوبت، غلظت اکسیژن، دمای خاک، شوری و زیست‌فراهمی ضروری می‌باشد. برخی پژوهش‌های آزمایشگاهی، اهمیت رطوبت، واکنش خاک، عناصر غذایی و دما را برای کنترل تجزیه زیستی هیدروکربن‌ها در خاک نشان می‌دهند (Dibble and Bartha, 1976). پژوهشگران در آزمایشی تأثیر بیوچار و کربن فعال را بر رشد گیاه گندم و توانایی آن در جذب PAHs مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد بیوچار نسبت به کربن فعال در افزایش میزان جذب PAHs[2] توسط گیاه بیشتر موثر بوده است، همچنین بیوچار در افرایش وزن خشک ریشه و ساقه، نسبت به کربن فعال بیشتر موثر واقع شد (Brennan *et al*., 2014). در پژوهش دیگری، اثرات بیوچار کاه برنج در تجزیه زیستی آلاینده خاک و جمعیت میکروبی در یک دوره ۱۸۰ روزه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که خاک اصلاح شده با بیوچار نسبت به خاک فاقد بیوچار در حذف هیدروکربن های نفتی موثرتر بوده است و همچنین اثرات مثبتی بر جمعیت میکروبی داشته است (Gang *et al*., 2013). در آزمایشی رابطه گیاه‌پالایی ترکیب آلاینده پایرن درسه نوع خاک توسط گیاهان یونجه و چاودار با کاربرد مواد آلی مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد که کاربرد کمپوست، تجزیه پایرن را به‌طور معنی‌داری افزایش داد (Wang *et al*., 2012). در آزمایشی که نقش بیوچار بر زیست‌فراهمی PAHs و PTEs[3] مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد بیوچار زیست‌فراهمی PAHs را کاهش، ولی در کاهش زیست‌فراهمی فلزات سمی کمتر موثر بوده است (Gomez *et al*., 2012). در آزمایشی تأثیر کاربرد فضولات طیور (PD) در زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به TPH و PAH مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که کاربرد فضولات میزان غلظت TPH و PAH را کاهش داد (Ezenne *et al*., 2014).

---

[1] pyrolysis

[2] Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

[3] Potentially Toxic Elements

پژوهشگران در آزمایشی، نقش کمپوست زباله شهری و گیاه فسکیو در حذف PAHs از خاک را مثبت ارزیابی کردند به طوری که در خاک اصلاح‌شده حاوی تیمار ۱۰ درصد کمپوست، کمترین مقدار PAHs گزارش شد (Feng *et al.*, 2014).

تاج‌خروس از خانواده Amaranthaceae است. این خانواده شامل گیاهان پرطاقت، علف هرز، علفی، سریع الرشد و شبه غله است و ۶۰ گونه گیاهی دارد که تا به حال بیشتر آنها به عنوان گونه‌های علف هرز مطرح بوده‌اند. تاج خروس یک گیاه C_4 و از معدود گیاهان دولپه‌ای است که در آن محصول اولیه فتوسنتز یک ترکیب ۴ کربنه است و این خصوصیت باعث افزایش کارآیی آن در دامنه وسیعی از شرایط حرارتی و رطوبتی شده است به‌طوری که این گیاه با شرایط محیطی مختلفی سازگار است (Leger and Schreiber, 1989). چون منابع آب در حال کاهش هستند و توسعه اراضی در بسیاری از نقاط جهان محدود است (Momeni, 2010)، توانایی تاج‌خروس در سازش با شرایط نامناسب مثل خاک‌های فقیر از مواد مغذی و مقاومت آن در مقابل تنش‌های محیطی از جمله تنش خشکی، کاربرد آن را در مناطق نیمه خشک ممکن کرده است به گونه‌ای که دارای طبیعت رشد نامحدود و قدرت رقابت زیاد تحت شرایط درجه حرارت بالا، رطوبت پائین و نور شدید می‌باشد (Leger and Schreiber, 1989). با توجه به بروز مشکل آلودگی در برخی اراضی زراعی، مرتعی و نیز تحت بهره‌بردای منابع نفتی از یک سو و آب‌گریزی شدید خاکهای مذکور، ارائه راهکارهای جدید و منطبق با اصول زیست‌محیطی و طبیعی اهمیت زیادی دارد. بر این اساس، پژوهش حاضر، با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف بیوچارهای حاصل از پسماند زباله شهری و باکتری بومی تجزیه‌کننده هیدروکربن‌های نفتی بر میزان عناصر غذایی گیاه تاج خروس (به عنوان یک گیاه پوششی و مناسب جهت توسعه کشت در اراضی آلوده صنعتی) تحت تنش آلودگی اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در گلخانه تحقیقاتی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران در تابستان ۱۳۹۴ انجام گرفت. آزمایش با سه فاکتور شامل آلودگی در سه سطح (P0 (۰)، P1(۲/۵) و P2(۵) درصد وزنی)، بیوچار با اندازه متوسط بین ۵-۱ میلی‌متر در ۵ سطح (B0 (بدون بیوچار)، BCM1 (بیوچار حاصل از کمپوست زباله شهری در سطح ۱ درصد وزنی)، BCM2 (بیوچار حاصل از کمپوست زباله شهری در سطح ۲ درصد وزنی)، BM1 (بیوچار حاصل از زباله تر شهری در سطح ۱ درصد وزنی)، BM2(بیوچار حاصل از زباله تر شهری در سطح ۲ درصد وزنی)) و باکتری در دو سطح (Ba0 (بدون باکتری) و Ba1 (با باکتری *سودوموناس فلورسنس*)) با ۳ تکرار انجام پذیرفت.

تهیه خاک و اعمال تیمارهای آلوده

برای انجام آزمون گلخانه‌ای، از مزرعه تحقیقاتی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در محمد شهر کرج نمونه خاک تهیه شد. نمونه‌برداری خاک به روش مرکب از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری صورت گرفت و خاک به مقدار کافی به آزمایشگاه گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تهران منتقل شد. خاک پس از هوا خشک کردن، به منظور استفاده در گلدان‌ها، از الک ۴ میلی‌متر عبور داده شد. مقداری از خاک نیز قبل از آلوده‌سازی با نفت خام برای تعیین خصوصیات مهم فیزیکی، شیمیایی و زیستی از الک ۲ میلیمتری عبور داده شد. خاک مورد استفاده در کشت گلدانی، به وسیله نفت خام تهیه‌شده از پالایشگاه نفت شهید تندگویان تهران با غلظت‌های ۲/۵ و ۵ درصد وزنی آلوده‌سازی شد. این سطوح تیماری بر اساس بررسی منابع و نیز انجام پیش آزمون تعیین گردید (Valizadeh *et al.*, 2016; Shahriyari *et al.*, 2001) به گونه‌ای که امکان رشد گیاه در این سطوح فراهم شود تا زمینه انجام پالایش گیاهی و زیستی فراهم گردد. به منظور نزدیک شدن به شرایط طبیعی و ایجاد تعادل در خاک، گلدان‌های آلوده شده به مدت ۴ ماه در دمای ۳۵-۳۰ درجه سلسیوس در شرایط گرماگذاری قرار گرفتند.

تجزیه خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک

در این پژوهش، مهمترین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک براساس روش‌های استاندارد تعیین گردید. بافت خاک به روش هیدرومتری (Bouyoucos, 1962)، قابلیت هدایت الکتریکی و pH (Haluschak, 2006)، درصد ماده آلی به روش والکلی و بلک (Walkley and Black, 1934)، نیتروژن کل (Bremner, 1996)، فسفر قابل‌جذب گیاه به روش اولسن (Olsen, 1954)، پتاسیم (استات آمونیوم نرمال)، اندازه‌گیری ظرفیت تبادل کاتیونی به روش باور (Sumner and Miller, 1996)، شمارش کل باکتری‌های خاک (MPN)، غلظت قابل جذب عناصر کم‌مصرف آهن و منگنز به روش عصاره گیری با DTPA و با دستگاه جذب اتمی شیمادزو[1] مدل۶۷۰ اندازه‌گیری شدند (Lindsay and Norvell, 1978).

تهیه بیوچار

به‌منظور تهیه بیوچار، نمونه‌های کمپوست زباله شهری و زباله

---

[1] Shimadzu

تر شهری از ایستگاه حلقه دره سازمان مدیریت پسماند شهرداری کرج تهیه و پس از هوا خشک نمودن، جهت یکنواخت سازی نمونه‌ها آسیاب، و از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شدند. سپس جهت تهیه بیوچار نمونه‌ها را ابتدا در داخل ظروف درب دار ریخته و توزین شدند. سپس به‌منظور ایجاد شرایط کم یا بدون اکسیژن در داخل کوره و ظروف درب دار، تعدادی شمع روشن کرده تا اکسیژن باقی‌مانده در درون کوره و ظرف تمام شود تا شرایط برای انجام فرآیند پیرولیز فراهم شود. سپس نمونه‌ها بر اساس دستورالعمل، به مدت ۲ ساعت در دمای ۵۰۰ درجه سلسیوس در داخل کوره قرار داده شد (Kim *et al.*, 2012).

تجزیه بیوچار

کربن، نیتروژن و هیدروژن بیوچار با استفاده از دستگاه کربن آنالایزر مدل CHNS Analyzer 2400 Series ∏ از شرکت Perkin Elmer انجام شد(ASTM., 2006). قابلیت هدایت الکتریکی بیوچار موردنظر با آب مقطر با نسبت ۱:۵ (آب/ بیوچار) برای ۲۴ ساعت در آزمایشگاه نگهداری شد. بعد از صاف کردن عصاره قابلیت هدایت الکتریکی با استفاده از هدایت سنج مدل JENWAY- 4320 اندازه‌گیری و پس از انجام تصحیح دمایی، نتایج بر اساس dS/m در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گزارش شد (Haluschak, 2006). pH بیوچار موردنظر با آب مقطر با نسبت ۱:۵ (آب/ بیوچار) برای ۲۴ ساعت در آزمایشگاه نگهداری شد. سپس بعد از صاف کردن عصاره pH با استفاده از دستگاه pH متر مدل METROHM – 620 اندازه‌گیری شد (Haluschak, 2006). عملکرد بیوچار به عنوان وزن بیوچار تولیدشده در واحد وزن خشک ماده اولیه با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد(Song and Guo, 2012).

$$\text{Biochar Yeild (\%)}=\frac{\text{Biochar Weight (g)}}{\text{Organic Matter Dry Weight (g)}} \qquad \text{(رابطه ۱)}$$

جرم مخصوص ظاهری نمونه‌ها با استفاده از روش ASTM D-285 با کمی اصلاح اندازه‌گیری شد. برای این منظور بیوچار به داخل استوانه مدرج شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌متری با وزن مشخص ریخته و سپس به مدت یک دقیقه روی ویبراتور قرار داده شد تا فضای خالی پر شود. در ادامه سیلندر را توزین کرده و در نهایت با استفاده از رابطه زیر جرم مخصوص ظاهری (g/cm^3) محاسبه گردید (Song and Guo, 2012).

$$\text{Bulk Density}\left(\frac{g}{cm^3}\right)=\frac{\text{Biochar Weight (g)}}{\text{Cylinder Volum }(cm^3)} \qquad \text{(رابطه ۲)}$$

انتخاب جدایه‌ها

جدایه مورداستفاده در این پژوهش براساس توانایی تجزیه هیدروکربن‌های نفتی از بانک ژن ریزجانداران مفید خاکزی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تهران که از خاک‌های آلوده به نفت جنوب پالایشگاه نفت تهران استخراج شده بودند، انتخاب و ویژگی‌های کلی و PGPR باکتری مورد نظر بر اساس روشهای علمی و استاندارد تعیین گردید. برای آزمون سیتراتاز و کاتالاز از روش (Parry *et al.*, 1983) و برای اندازه‌گیری نیمه‌کمی توان جدایه‌ها در انحلال فسفات معدنی از محیط کشت SP استفاده شد (Sperber, 1958). تعیین توان تولید سیانیدهیدروژن با استفاده از روش (Donate-Correa *et al.*, 2004) انجام شد. به منظور انجام آزمون کمی توان تولید اکسین در جدایه‌های مورد نظر، از روش رنگ‌سنجی با معرف سالکوفسکی به روش (Patten and Glick, 2002) استفاده شد.

تهیه و آماده سازی نشاء و آزمون گلخانه‌ای

ابتدا ضدعفونی بذور انجام شد. به این طریق که بذرها به وسیله الکل و محلول هیپوکلریدسدیم ۵ درصد ضدعفونی سطحی و چند مرتبه با آب مقطر شستشو شدند و کوکوپیت نیز به مدت ۱ ساعت اتوکلاو شد. سپس سینی‌های نشاء بوسیله الکل و هیپوکلریدسدیم ۵ درصد نیز ضدعفونی و بعد از آن با آب چندین مرتبه شسته شدند. بعد از ضد عفونی‌کردن سینی‌ها و اتوکلاو کردن کوکوپیت، سینی‌ها به وسیله کوکوپیت پر شدند. بعد از چند بار آبیاری و پرکردن کامل خانه‌های سینی نشاء، بذرها کشت شدند و به وسیله آبفشان و از طریق کف سینی‌های نشاء، رطوبت مورد نیاز بذرها تامین گردید. نشاءها در گلخانه در دمای ۲۴-۲۲ درجه سلسیوس با شدت نور ۱۴۰۰۰ لوکس و مدت زمان تاریکی و روشنایی به ترتیب ۱۰ و ۱۴ ساعت به مدت ۴۵ روز در گلخانه نگهداری شدند. سپس بعد از تلقیح کردن ریشه نشاءها، به گلدان‌های سه کیلوگرمی منتقل شدند. سپس گیاهان در گلخانه در دمای بیشینه ۳۵ درجه سلسیوس و کمینه ۲۰ درجه سلسیوس و شدت نور ۱۴۰۰۰ لوکس و مدت زمان تاریکی و روشنایی به ترتیب ۱۰ و ۱۴ ساعت به مدت ۳ ماه نگهداری شدند. در طول این دوره گیاهان از نظر آفات و بیماری‌های گیاهی کنترل شدند. پس از دوره کشت ۳ ماهه، بخش هوایی در هر گلدان قطع و پس از اندازه‌گیری وزن تر به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۷۰ درجه سلسیوس خشک و وزن خشک آنها اندازه‌گیری گردید و تجزیه عناصر غذایی (فسفر، پتاسیم، آهن و منگنز) انجام پذیرفت. ریشه گیاهان نیز به دقت از خاک گلدان جدا گردید، ریشه‌ها نیز به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۷۰ درجه سلسیوس خشک و وزن خشک آنها اندازه‌گیری گردید.

تجزیه عناصرغذایی نمونه های گیاهی

برای اندازه‌گیری پتاسیم شاخساره ابتدا عصاره‌های گیاهی تهیه

شده به روش هضم تر، توسط دستگاه فلیم فتومتر مدل ELEA تعیین گردید (Ryan *et al.*, 2007). برای اندازه‌گیری فسفر از روش زرد مولیبدو وانادات استفاده شد (Ryan *et al.*, 2007). کلسیم و منیزیم به روش کلسیمتری و غلظت عناصر آهن و منگنز در عصاره‌های گیاهی تهیه شده به روش هضم تر، توسط دستگاه جذب اتمی مدل Shimadzu AA-670 اندازه‌گیری و گزارش شد. ابتدا محلول‌های استاندارد تهیه شده و با توجه به طول موج اختصاصی برای هر عنصر، منحنی کالیبراسیون رسم گردیده و سپس اقدام به قرائت نمونه‌ها شد (Ryan *et al.*, 2007). نتایج حاصل از بررسی‌های داده‌های مربوط به آزمون گلخانه‌ای براساس آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کاملا تصادفی با استفاده از نرم افزار SAS 9.2 تجزیه واریانس و با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ($P < ۰/۰۵$) مقایسه میانگین شدند و نمودارها نیز با نرم افزار Excel 2013 رسم گردید.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه برخی خصوصیات مهم فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در این پژوهش در جدول (۱)، نتایج بررسی‌های در جدول (۲) و برخی ویژگی‌های جدایه مورد استفاده در جدول (۳) ارائه شده است.

بر اساس نتایج ارائه شده، خاک مورد استفاده در کشت گلخانه‌ای از نظر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی محدودیت خاصی نداشته و مناسب بود. همچنین بیوچار کمپوست زباله (تر و معمولی) نشان می‌دهد که از نظر قابلیت هدایت الکتریکی، کمپوست/بیوچار دارای محدودیت می‌باشد.

جدول (۴) نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای آلودگی نفت‌خام، بیوچار و باکتری بر میزان جذب عناصر غذایی توسط گیاه تاج‌خروس را نشان می‌دهد. نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد اثر سه گانه آلودگی نفت‌خام در بیوچار در باکتری بر میزان جذب همه عناصر غذایی در سطح احتمال ۱ درصد ولی برای منگنز در سطح احتمال پنج درصد معنادار شده است (جدول ۴). همچنین نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد اثر سه گانه آلودگی نفت‌خام در بیوچار در باکتری بر میزان وزن خشک شاخساره در سطح احتمال ۵ درصد معنادار شد. اثر دوگانه بیوچار در باکتری بر میزان وزن خشک ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنادار شد.

جدول ۱. نتایج برخی ویژگی‌های مهم فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده

ویژگی خاک	مقدار	ویژگی خاک	مقدار
pH	۷/۹	کربنات کلسیم معادل (٪)	۸/۳
ECe (dS/m)	۳/۸	ظرفیت تبادل کاتیونی (Cmolc/kg)	۱۳/۵
نیتروژن کل (٪)	۰/۱۲۲	P (mg/kg)	۱۶/۴۹
ماده آلی (٪)	۱/۱	K (mg/kg)	۹۸
کلاس بافت	لوم رسی	Fe* (mg/kg)	۸/۳
رطوبت ظرفیت زراعی (٪)	۲۱/۷۵	Mn* (mg/kg)	۲۲/۰۳
گچ (٪)	ناچیز	Zn* (mg/kg)	۵/۲۳

*** عصاره گیری شده با DTPA**

جدول ۲. نتایج تجزیه بیوچار کمپوست زباله شهری و زباله تر شهری

ویژگی بیوچار	بیوچار کمپوست زباله شهری	بیوچار زباله تر شهری
کربن (٪)	۱۰/۸۱	۲۰/۷۷
نیتروژن (٪)	۰/۷۵	۱/۱
هیدروژن (٪)	۰/۱۹	۰/۳۵
C/N	۱۴/۴۱	۱۸/۸۸
جرم مخصوص ظاهری (g/cm^3)	۰/۹۲	۰/۴۵
درصد عملکرد	۷۲	۳۷/۷۰
pH	۹	۱۰/۴
ECe (dS/m)(عصاره ۱:۵)	۸/۲۵	۲۸/۵۰

جدول ۳. مشخصات کلی جدایه مورد استفاده در آزمون گلخانه‌ای

باکتری	*سودوموناس فلورسنس*
سیتراتاز	+
کاتالاز	+
شکل	باسیل
گرم	−
IAA	+
توان انحلال فسفات های نامحلول معدنی	−
توان تولید سیدروفور	+

تأثیر تیمارهای آلودگی نفت‌خام، بیوچار و باکتری بر میزان وزن خشک شاخساره و ریشه

شکل (۱) نتایج مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد اثر متقابل آلودگی‌نفتی در بیوچار در باکتری بر میزان وزن خشک شاخساره را نشان می‌دهد. همواره در سطوح یکسان آلودگی، وزن خشک اندام هوایی در تیمارهای دارای باکتری به میزان بیشتری است. همچنین به طورکلی در تیمارهایی که بیوچار به میزان بیشتری وجود دارد، مقدار وزن خشک به میزان بیشتری است. وزن خشک شاخساره در سطح آلودگی صفر (P0) با بیوچار کمپوست زباله شهری دو درصد (BCM2) و حاوی باکتری، دارای بیشترین میزان است.

رشد گیاه نیز با افزایش میزان بیوچار بیشتر شده و بیشترین میزان صفات رشدی در سطوح دارای بیوچار گزارش گردید. به طوری که در تیمار P0BCM2Ba1 بیشترین وزن خشک (۵/۸۳ گرم)، و در تیمار P2B0Ba0 کمترین وزن خشک (۱/۵۳ گرم) مشاهده شد. در تیمارهای حاوی بیوچار، مقدار وزن خشک و تر به میزان بیشتری مشاهده شد که این افزایش می‌تواند به علت بهبود شرایط فیزیکی و شیمیایی خاک ریزوسفر باشد که از جمله آن افزایش جذب آب، تهویه و افزایش فراهمی مواد غذایی و همین‌طور افزایش فعالیت ریزجانداران در حضور بیوچار و ترشحات گیاهی و تأثیر سینرژیک این‌ها در افزایش وزن‌تر و خشک شاخساره گیاه و تعداد ریزجانداران است. کمترین مقادیر وزن تر و خشک شاخساره گیاه در تیمارهای دارای آلودگی نفتی و بدون باکتری سودوموناس مشاهده شد. این پاسخ می‌تواند به سبب بروز تنش آلودگی و صدمات وارده به اجزای مختلف سلول‌های گیاه و در نهایت جذب کمتر عناصرغذایی و آب باشد. حضور بیوچار در تیمارهای دارای باکتری *سودوموناس فلوروسنس* به عنوان آشیانه‌های زیستی عمل کرده و شرایط را برای افزایش تعداد این ریزجانداران فراهم می‌آورد. این ریزجانداران مواد هیدروکربنی اطراف ریشه را تجزیه کرده که منجر به سمیت کمتر و رشد بهتر برای گیاه می‌شود. در بررسی اثرات متقابل مایکوریزا و بیوچار گزارش شده که کاربرد بیوچار به طور معنی‌دار سبب افزایش وزن خشک برگ و ریشه می‌شود (Rezaian, 2014). چنین به نظر می‌رسد که تلقیح مایکوریزای و کاربرد بیوچار در افزایش خاصیت گیاه پالایی نعنا فلفلی نقش موثری ایفا می‌کند. در فرایند گیاه‌پالایی، سیستم ریشه گیاه اهمیت ویژه‌ای دارد (Merkl *et al.*, 2005). آلودگی نفتی بر سیستم ریشه‌ای برخی گیاهان تاثیرگذار و بر برخی از گیاهان نظیر *Eleusine idica* بدون تاثیر است. Liste و Prutz (2006) در یک مطالعه بر روی خاک‌های آلوده به ترکیبات مشتق از نفت گزارش کردند که تعداد باکتری‌ها در خاک‌های آلوده و در ریزوسفر گیاهان ناحیه آلوده بسیار بیشتر از خاک‌های غیر آلوده است. نتایج آن‌ها نشان داد که آلودگی خاک با ترکیبات نفتی موجب کاهش زیست توده، توان جوانه‌زنی و رشد در گیاهان می‌شود، در عین حال گیاهان باعث قابل دسترس‌تر شدن ترکیبات نفتی می‌شوند و از این طریق به حذف آلودگی کمک می‌نمایند.

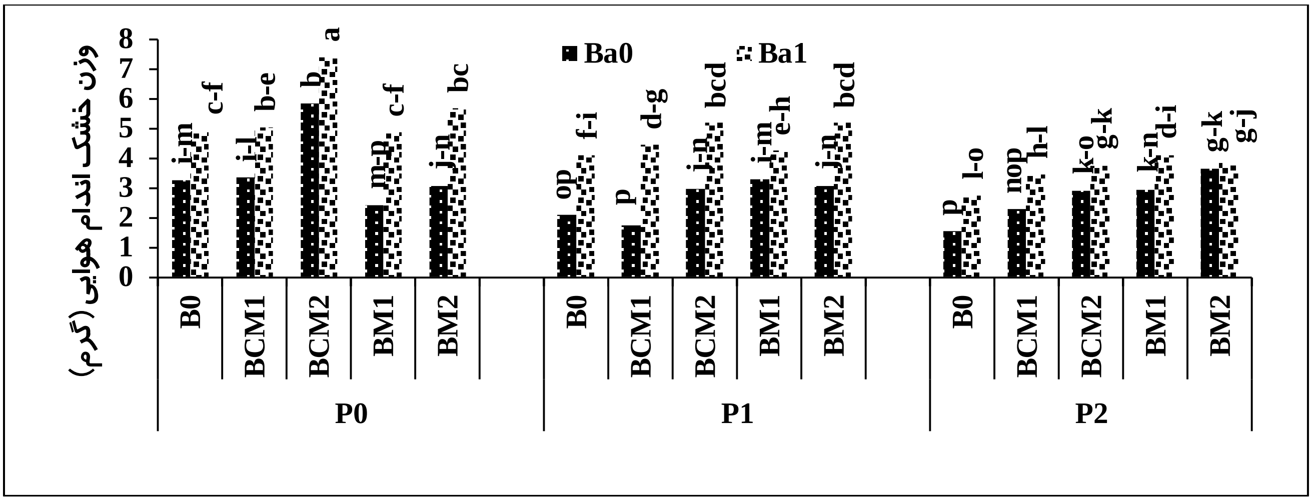
جدول ۴. نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای آلودگی نفت‌خام، بیوچار و باکتری بر میزان جذب عناصر غذایی و خصوصیات مورفولوژیک گیاه تاج‌خروس

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		فسفر	پتاسیم	کلسیم	منیزیم	آهن	وزن خشک شاخساره	وزن خشک ریشه
بلوک	۲	۰/۰۰ns	۰/۰۰ns	۰/۰۱ns	۰/۰۰ ns	۸/۳۲**	۰/۵۸ns	۰/۰۱ ns
آلودگی نفت خام	۲	۰/۰۰**	۲/۲۹**	۲/۳۱**	۰/۳۰**	۵۶۶۵۳۶/۹۱**	۱۶/۴۰**	۰/۰۶ns
بیوچار	۴	۰/۰۱**	۹/۴۲**	۱/۹۵**	۰/۲۴**	۳۵۲۰۵۶/۶۵**	۶/۸۶ **	۰/۳۷**
باکتری	۱	۰/۰۴**	۴/۸۱**	۷/۳۷**	۰/۶۹**	۶۱۵۷۰/۱۸**	۶۰/۰۳ **	۰/۵۴**
آلودگی نفت خام×بیوچار	۸	۰/۰۰**	۱/۴۲**	۱/۴۷**	۰/۱۶**	۱۵۰۰۹۰/۷۷**	۲/۶۵ **	۰/۱۴**
آلودگی نفت خام×باکتری	۲	۰/۰۰**	۰/۵۳**	۰/۱۴*	۰/۰۱ ns	۴۸۵/۲۰**	۲/۹۲ **	۰/۱۵*
بیوچار×باکتری	۴	۰/۰۰**	۰/۰۶**	۰/۲۶**	۰/۰۳**	۱۳۵۷/۰۲**	۰/۰۸ ns	۰/۴۲**
آلودگی نفت خام×بیوچار×باکتری	۸	۰/۰۰**	۰/۲۱**	۰/۱۵**	۰/۰۱**	۸۳۱/۴۸**	۰/۵۹ *	۰/۰۵ns
اشتباه	۵۸	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۴	۰/۰۰	۰/۸۰	۰/۲۱	۰/۰۳
ضریب تغییرات(٪)	-	۲/۲۵	۱/۳۷	۶/۵۶	۶/۴۹	۰/۱۰	۱۲/۲۶	۲۳/۸۶

علائم * و ** به ترتیب بیانگر معناداری تیمارها در سطوح ۵ درصد و ۱ درصد و ns بیانگر عدم وجود اختلاف معنادار بین تیمارهاست.

تأثیر تیمارهای آلودگی نفت‌خام، بیوچار و باکتری بر جمعیت باکتری‌ها

جدول (۵) نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای آلودگی نفت خام، بیوچار و باکتری بر حداکثر تعداد ممکن باکتری در گرم خاک کشت شده توسط گیاه تاج‌خروس را نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که اثر بلوک بر تعداد باکتری‌ها غیر معنادار است، در حالیکه اثرات اصلی آلودگی نفت خام، بیوچار و باکتری در سطح احتمال ۱ درصد معنادار است. همچنین نتایج نشان می‌دهد که اثرات دوگانه آلودگی نفت‌خام در بیوچار و باکتری در بیوچار در سطح احتمال ۱ درصد معنادار است در حالی‌که اثر دوگانه آلودگی نفت‌خام در باکتری غیر معنادار است (جدول۵). اثرات سه گانه آلودگی نفت‌خام در بیوچار در باکتری نیز در سطح احتمال ۱ درصد معنادار بود (جدول۵).



شکل ۱. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل آلودگی نفتی در بیوچار در باکتری بر میزان وزن خشک شاخسار

P0: آلودگی نفتی در سطح ۰ درصد
P1: آلودگی نفتی در سطح ۲/۵درصد
P2: آلودگی نفتی در سطح ۵ درصد
Ba0: تیمار بدون باکتری *سودوموناس فلورسنس*
Ba1: تیمار با باکتری *سودوموناس فلورسنس*

B0: بیوچار در سطح ۰ درصد
Bcm1: بیوچار حاصل از کمپوست زباله شهری در سطح ۱ درصد
Bcm2: بیوچار حاصل از کمپوست زباله شهری در سطح ۲ درصد
Bm1: بیوچار حاصل از زباله تر شهری در سطح ۱ درصد
Bm2: بیوچار حاصل از زباله تر شهری در سطح ۲درصد

جدول ۵. نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای آلودگی نفت خام، بیوچار و باکتری

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
		حداکثر تعداد ممکن باکتری
بلوک	۲	۵/۲×۱۰^{۱۰} ^{ns}
آلودگی نفت خام	۲	۱/۱×۱۰^{۱۲}**
بیوچار	۴	۱/۸×۱۰^{۱۳}**
باکتری	۱	۹/۳×۱۰^{۱۲}**
آلودگی نفت خام×بیوچار	۸	۱/۱×۱۰^{۱۱}**
آلودگی نفت خام×باکتری	۲	۴/۹×۱۰^{۱۰} ^{ns}
بیوچار×باکتری	۴	۲/۷×۱۰^{۱۱}**
آلودگی نفت خام×بیوچار×باکتری	۸	۱/۲×۱۰^{۱۱}**
اشتباه	۵۸	۱/۹×۱۰^{۱۰}
ضریب تغییرات (٪)	-	۵/۰۸

علائم * و ** به ترتیب بیانگر معناداری تیمارها در سطوح ۵ درصد و ۱ درصد و ns بیانگر عدم وجود اختلاف معنادار بین تیمارهاست.

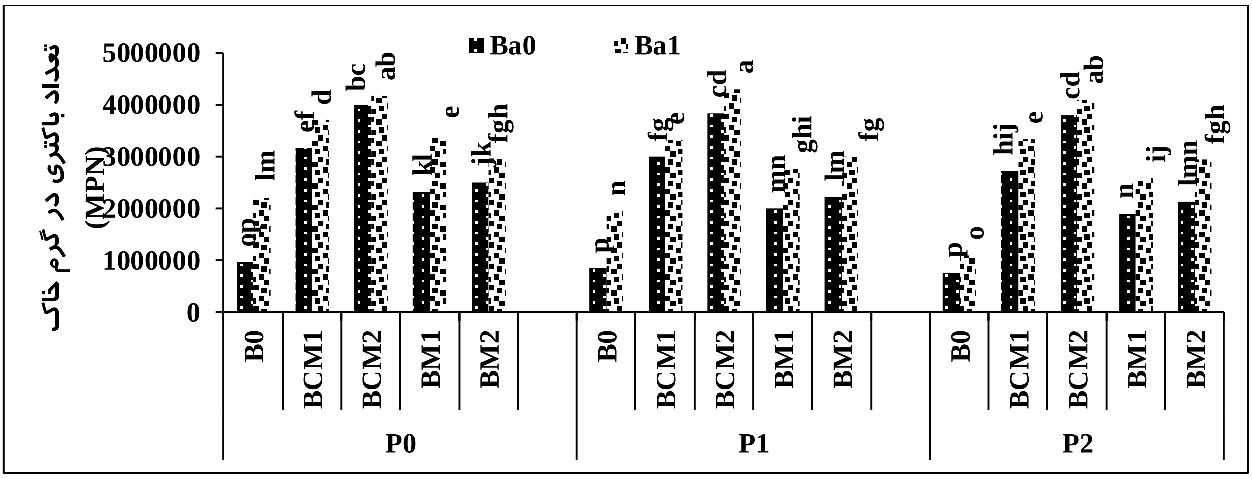
در شکل (۲) نتایج مقایسه میانگین اثرات اصلی نفت خام، بیوچار و باکتری با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد بر حداکثر تعداد ممکن باکتری در گرم خاک کشت شده توسط گیاه تاج‌خروس نشان می‌دهد که همواره در سطوح یکسان آلودگی، تعداد باکتری در تیمارهایی که دارای باکتری *سودوموناس‌فلوروسنس* هستند به میزان بیشتری است. همچنین در تمامی سطوح آلودگی، تیمارهایی که حاوی بیوچار هستند نسبت به تیمارهای شاهد، دارای تعداد باکتری بیشتری هستند و بیشترین تعداد باکتری ممکن را تیمار (P1)، حاوی بیوچار (BCM2) و باکتری دارد (شکل ۲). این امر نشان دهنده تأثیر و نقش تیمارهای حاوی ماده آلی در افزایش جمعیت ریزجانداران خاک است. براین اساس با اعمال تیمارهای بیوچار، جمعیت باکتری نسبت به شاهد تفاوت معناداری نشان داده است. Liste و Prutz (2006) در یک مطالعه بر روی خاک‌های آلوده به مشتقات نفتی گزارش کردند که تعداد باکتری‌ها در خاک‌های آلوده و در رایزوسفر گیاهان مستقر در نواحی آلوده بسیار بیشتر از خاک‌های غیر آلوده است. Petter *et al.* (2006) در پژوهشی دو ساله بیان کردند کاربرد بیوچار به‌سرعت باعث افزایش حاصلخیزی خاک شده و با فراهم کردن و حفظ مواد غذایی در خاک سبب افزایش رشد برنج در شالیزارهای برزیل می‌شود. نتایج این پژوهش تأثیر مستقیم و سریع بیوچار بر غلظت کربن آلی را در سال اول و تأثیر معنادار آن بر عملکرد و ماده خشک را در هر دو سال و همچنین بر بهبود خصوصیات فیزیکی و زیستی خاک نشان داد. در پژوهشی اثرات بیوچار کلش برنج در تجزیه زیستی آلاینده خاک و جمعیت میکروبی آن در یک دوره ۱۸۰ روزه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که خاک اصلاح شده با بیوچار نسبت به خاک فاقد بیوچار در حذف هیدروکربن‌های نفتی موثرتر بوده است و همچنین اثرات مثبتی بر جمعیت میکروبی داشته است (Gang *et al.*, 2013).

شکل (۲) نتایج مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد برای اثر متقابل آلودگی‌نفتی در بیوچار در باکتری بر حداکثر تعداد ممکن باکتری در گرم خاک را نشان می‌دهد. بر این اساس در سطوح یکسان آلودگی، بیشترین تعداد ممکن باکتری در گرم خاک، در تیمارهای حاوی بیوچار گزارش شد و بیشترین تعداد در تیمار حاوی بیوچار کمپوست زباله شهری در سطح دو درصد (BCM2) و کمترین تعداد در تیماری فاقد بیوچار گزارش شد (B0) (شکل ۲). از جمله خصوصیات فیزیکی بیوچار، میزان تخلخل و سطح ویژه بالای آن می‌باشد که علاوه بر جذب بالای آب، سبب ایجاد آشیانه‌های بیولوژیکی (Micro Habitat) برای ریز سازواره‌های خاک گردیده و به دنبال آن تنوع زیستی افزایش می‌یابد (Steiner *et al.*, 2007). از دیگر خصوصیات فیزیکی بیوچار، تأثیری است که بر مقاومت چسبندگی می‌گذارد و سبب کاهش مقدار آن می‌گردد در نتیجه حرکت در بستر را برای جمعیت بی‌مهرگان آسان‌تر می‌کند (Lehmann *et al.*, 2011). در آزمایشی تأثیر مخلوط گیاه یونجه که جزو بقولات (لگوم‌ها) می‌باشد و فسکیو که از علف‌های چمنی یا گراس‌ها است بر خاک آلوده به غلظت‌های مختلف نفت خام (۱، ۳، ۷ و ۱۰ درصد) برای مدت ۱۲۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، در غلظت بالای نفت تا ۵ درصد، تعداد کل باکتری‌ها نسبت به شاهد و غلظت‌های پایین نفت افزایش یافت ولی بین غلظت‌های ۵، ۷ و ۱۰ درصد از این نظر اختلاف معناداری دیده نشد. شمارش تعداد باکتری‌های نفت‌خوار خاک نیز نشان داد که بیشترین تعداد باکتری‌های نفت‌خوار در خاک با آلودگی ۱۰ درصد دیده شد. مقایسه کاهش نفت خام در نمونه‌های خاک دارای گیاه و غلظت متناظر آن‌ها در نمونه‌های فاقد گیاه نشان داد که در نمونه‌های دارای گیاه، کاهش نفت خام بیشتر بود. بیشترین مقدار کاهش نفت خام، در نمونه یک درصد نفت خام و حدود ۳۶/۷ درصد بود. همچنین کمترین زیست‌توده در غلظت ۱۰ درصد نفت خام مشاهده شد (Shahriyari *et al.*, 2006).

واکنش اولیه ریزجانداران خاک بعد از آلوده شدن خاک به نفت، کاهش فعالیت آنها به علت کاهش هوای خاک است و بعد از حذف باکتریها و قارچ های هوازی، گونه‌های میکروبی مقاوم و سازگار با شرایط باقی خواهند ماند. همچنین کمبود اکسیژن می‌تواند به کاهش تعداد ریزجانداران هوازی موجود در خاک منجر شود. علاوه بر بیوچار، افزودن کمپوست می‌تواند سبب افزایش جمعیت و تنوع میکروبی خاک، افزایش مواد غذایی مورد نیاز، بافر کردن pH و بهبود شرایط نگهداری آب در خاک شود و از این طریق رشد و فعالیت جامعه زیستی را زیاد کرده و سبب افزایش تجزیه ترکیبات آلی شود (Semple *et al.*, 2001).

ترشحات ریشه عمدتاً تجزیه آلاینده‌ها را در ریزوسفر خاک افزایش می‌دهند که این کار هم از طریق افزایش زیست فراهمی آلودگی و هم از طریق افزایش تعداد و فعالیت جمعیت میکروبی انجام می‌شود. در پژوهشی تأثیر حضور و عدم حضور دو گیاه با نام‌های سیرپوس ماریتیموس و جونکس ماریتیموس در خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر گرم، در محیط پالایشگاه مورد بررسی قرار گرفت.

در این پژوهش تأثیر سورفکتانت‌های غیریونی و تقویت کننده‌های زیستی که در اینجا منظور همان ریزجانداران استفاده کننده از مواد نفتی به عنوان منبع کربن است، نیز به عنوان تیمار مکمل مورد بررسی قرار گرفتند. گیاه جونکس ماریتیموس در حضور و عدم حضور این تیمارهای اضافی، تأثیری بر پالایش نداشت ولی سیرپوس ماریتیموس در حالت عادی باعث بهبود ۱۵ درصدی پالایش در لایه ۵-۱۰ سانتیمتری خاک که تجمع ریشه‌ی زیادی داشت، گردید. استفاده همزمان از هر دو تیمار مکمل، تأثیر مثبتی داشته و باعث بهبود ۲۸ درصدی پالایش خاک آلوده شد (Nazare *et al.*, 2011).



شکل ۲. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل آلودگی نفتی در بیوچار در باکتری بر حداکثر تعداد ممکن باکتری در گرم خاک

P0: آلودگی نفتی در سطح ۰ درصد
P1: آلودگی نفتی در سطح ۲/۵درصد
P2: آلودگی نفتی در سطح ۵ درصد
Ba0: تیمار بدون باکتری *سودوموناس فلورسنس*
Ba1: تیمار با باکتری *سودوموناس فلورسنس*

B0: بیوچار در سطح ۰ درصد
Bcm1: بیوچار حاصل از کمپوست زباله شهری در سطح ۱ درصد
Bcm2: بیوچار حاصل از کمپوست زباله شهری در سطح ۲ درصد
Bm1: بیوچار حاصل از زباله تر شهری در سطح ۱ درصد
Bm2: بیوچار حاصل از زباله تر شهری در سطح ۲درصد

تأثیر تیمارهای آلودگی نفت‌خام، بیوچار و باکتری بر میزان جذب عناصر غذایی فسفر و پتاسیم در گیاه تاج‌خروس

فسفر شاخساره

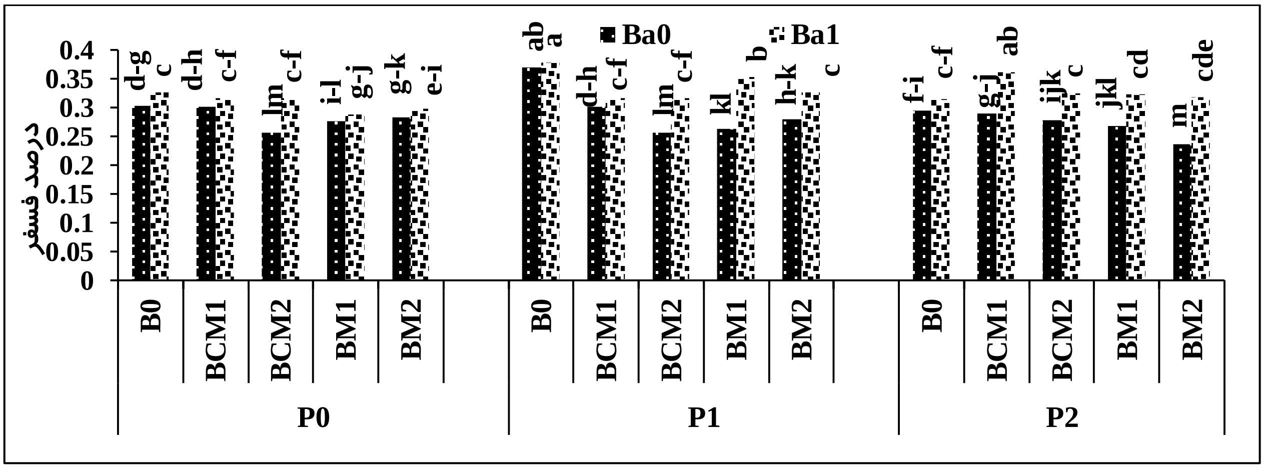
شکل (۳) نتایج مقایسه میانگین اثرات اصلی نفت خام، بیوچار و باکتری با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد بر غلظت فسفر شاخساره را نشان می‌دهد. به طور کلی در سطوح مختلف آلودگی، مقدار فسفر در تیمارهایی که دارای باکتری هستند به میزان بیشتری است. همچنین در سطوح آلودگی یکسان، مقدار فسفر در تیمارهایی که دارای بیوچار هستند، نسبت به تیمار شاهد (بدون بیوچار) به میزان کمتری است. بیشترین میزان فسفر در تیمارP1B0Ba1 به میزان ۰/۳۷ درصد و کمترین آن در تیمار P2BM2Ba0 به میزان ۰/۲۳ درصد مشاهده شد. با توجه به کاهش فسفر در حضور بیوچار، دلایل مختلفی برای این امر ارائه شده است؛ نظیر تاثیر بیوچار بر افزایش pH خاک و در نتیجه کاهش انحلال فسفر و نیز تثبیت موقت فسفر توسط بیوچار (Ma *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2014).

پتاسیم شاخساره

شکل (۴) نتایج مقایسه میانگین اثرات اصلی نفت خام، بیوچار و باکتری با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد بر غلظت پتاسیم شاخساره را نشان می‌دهد. همواره در سطوح یکسان آلودگی، مقدار پتاسیم در تیمارهای حاوی باکتری بیشتر است. همچنین در سطوح یکسان آلودگی، میزان پتاسیم در تیمارهای حاوی بیوچار (BM) نسبت به تیمارهای بدون بیوچار (BCM)، به میزان بیشتری است. بیشترین میزان پتاسیم در تیمار P2BM2Ba1 به میزان ۵/۱۶ درصد و کمترین آن در تیمار P0BM1Ba0 به میزان ۲/۱۵ درصد است.

مواد غذایی کافی خاک برای رشد گیاهان و ریزجانداران وابسته به آنان مورد نیاز می‌باشد. این میزان دسترسی می‌تواند در جریان گیاه‌پالایی و هنگامی که گیاهان و ریزجانداران تحت تأثیر تنش آلاینده‌ها قرار دارند تغییر کند. در واقع بیوچار به واسطه داشتن اثرات مفید فیزیکو-شیمیایی و زیستی، زمینه را برای پالایش آلودگی‌ها فراهم نموده و حضور باکتری نیز به

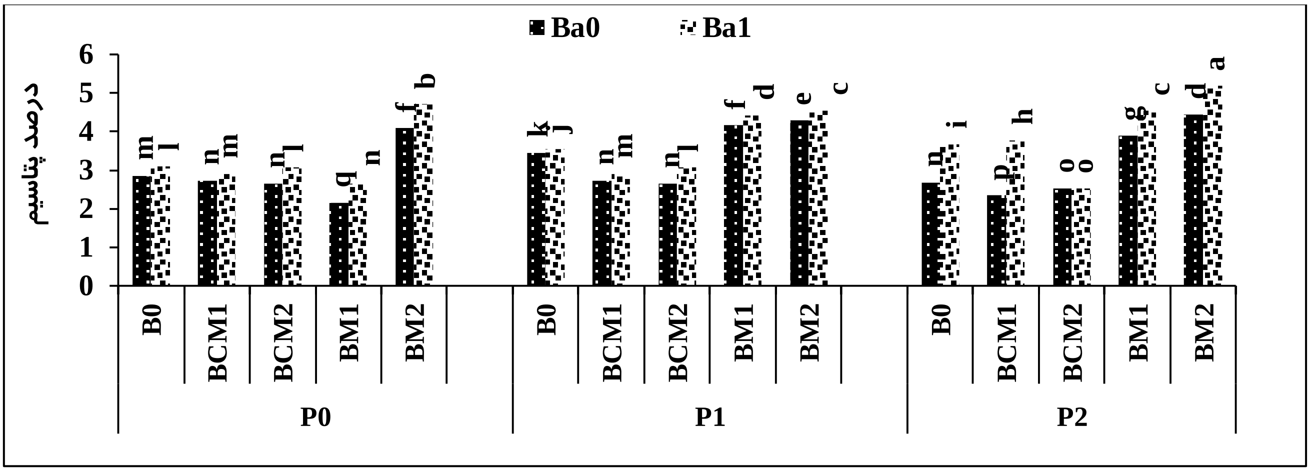
موفقیت پالایش، کمک شایانی نموده و فراهمی عناصر نیز در حضور بیوچار تا حد زیادی بهبود یافته است. پژوهشگران نشان دادند که هیدروکربن‌های نفتی می‌توانند به مقدار زیادی دسترسی گیاهان به مواد غذایی در خاک را کاهش دهند (Dimitrow and Markow, 2000). نتایج حاصل از دسترسی کم به مواد غذایی نشان داد که در حقیقت هیدروکربن‌های نفتی محتوی مقدار زیادی کربن هستند، اما از نظر داشتن نیتروژن و فسفر بسیار فقیر هستند. ریزجانداران خاکزی که هیدروکربن‌های خاک را تجزیه می‌کنند، مواد غذایی در دسترس را یا به مصرف خود می‌رسانند و یا آن‌ها (نیتروژن و فسفر) را تثبیت می‌کنند که این عمل آنها باعث کاهش مواد غذایی در خاک آلوده می‌شود. در شرایط یکسان، میزان پالایش آلاینده و نیز فراهمی عناصر عموما با حضور تیمارهای بیوچار و به خصوص باکتری، بهبود یافته است و همین امر نشان دهنده نقش بیوچار و باکتری در موفقیت زیست پالایی است. البته این نتایج با توجه به نوع بیوچار و شرایط آزمایش در پژوهش‌های مختلف ممکن است متفاوت باشد(Xu *et al*., 2013, 2014).



شکل ۳. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل آلودگی نفتی در بیوچار در باکتری بر میزان فسفر گیاه تاج خروس

P0: آلودگی نفتی در سطح ۰ درصد
P1: آلودگی نفتی در سطح ۲/۵درصد
P2: آلودگی نفتی در سطح ۵ درصد
Ba0: تیمار بدون باکتری *سودوموناس فلورسنس*
Ba1: تیمار با باکتری *سودوموناس فلورسنس*

B0: بیوچار در سطح ۰ درصد
Bcm1: بیوچار حاصل از کمپوست زباله شهری در سطح ۱ درصد
Bcm2: بیوچار حاصل از کمپوست زباله شهری در سطح ۲ درصد
Bm1: بیوچار حاصل از زباله تر شهری در سطح ۱ درصد
Bm2: بیوچار حاصل از زباله تر شهری در سطح ۲درصد



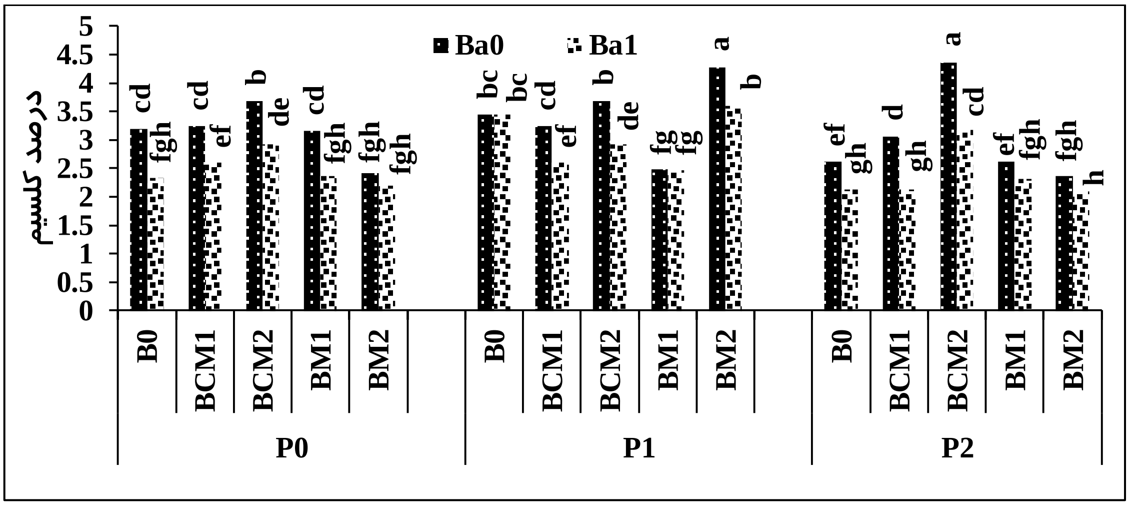
شکل ۴. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل آلودگی نفتی در بیوچار در باکتری بر میزان پتاسیم گیاه تاج خروس

P0: آلودگی نفتی در سطح ۰ درصد
P1: آلودگی نفتی در سطح ۲/۵درصد
P2: آلودگی نفتی در سطح ۵ درصد
Ba0: تیمار بدون باکتری *سودوموناس فلورسنس*
Ba1: تیمار با باکتری *سودوموناس فلورسنس*

B0: بیوچار در سطح ۰ درصد
Bcm1: بیوچار حاصل از کمپوست زباله شهری در سطح ۱ درصد
Bcm2: بیوچار حاصل از کمپوست زباله شهری در سطح ۲ درصد
Bm1: بیوچار حاصل از زباله تر شهری در سطح ۱ درصد
Bm2: بیوچار حاصل از زباله تر شهری در سطح ۲درصد

تأثیر تیمارهای آلودگی نفت‌خام، بیوچار و باکتری بر میزان جذب عناصر غذایی کلسیم و منیزیم در گیاه تاج‌خروس

شکل (۵) نتایج مقایسه میانگین اثرات اصلی نفت خام، بیوچار و باکتری با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد بر غلظت کلسیم شاخساره را نشان می‌دهد. در سطوح آلودگی یکسان در تیمارهای حاوی بیوچار، میزان کلسیم نسبت به تیمار شاهد (B0) بیشتر است. بیشترین میزان کلسیم در تیمارهای P1BM2Ba0 و P2BCM2Ba0 به ترتیب به میزان ۴/۲۸ و ۴/۳۶ درصد و کمترین میزان در تیمار P2BM2Ba1 به میزان۲/۰۹ درصد مشاهده شد.



شکل ۵. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل آلودگی نفتی در بیوچار در باکتری بر میزان کلسیم گیاه تاج خروس

P0: آلودگی نفتی در سطح ۰ درصد
P1: آلودگی نفتی در سطح ۲/۵درصد
P2: آلودگی نفتی در سطح ۵ درصد
Ba0: تیمار بدون باکتری *سودوموناس فلورسنس*
Ba1: تیمار با باکتری *سودوموناس فلورسنس*

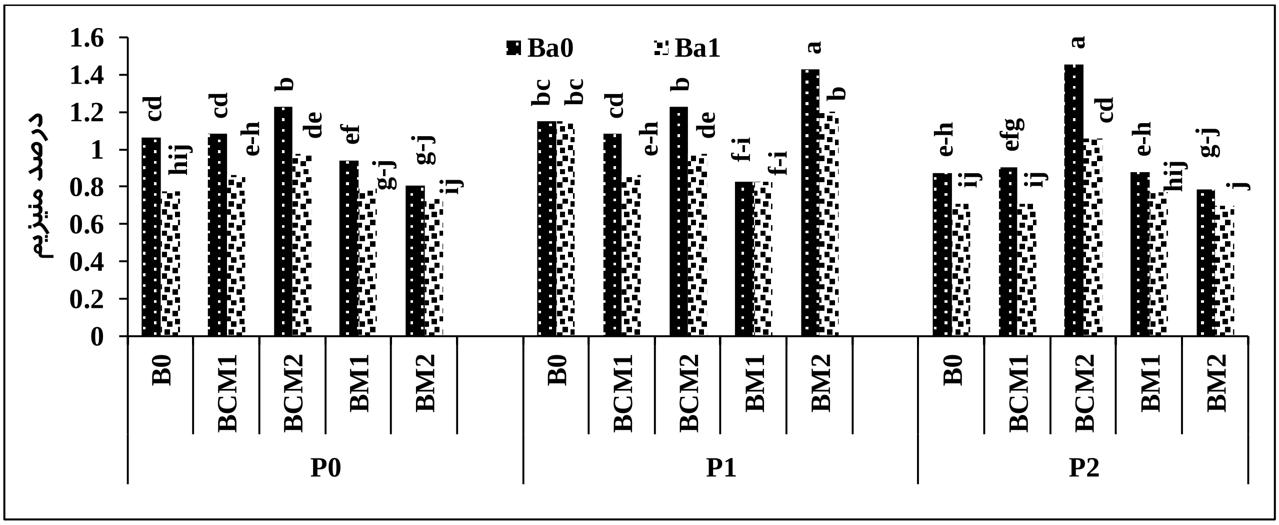
B0: بیوچار در سطح ۰ درصد
Bcm1: بیوچار حاصل از کمپوست زباله شهری در سطح ۱ درصد
Bcm2: بیوچار حاصل از کمپوست زباله شهری در سطح ۲ درصد
Bm1: بیوچار حاصل از زباله تر شهری در سطح ۱ درصد
Bm2: بیوچار حاصل از زباله تر شهری در سطح ۲درصد

شکل (۶) نتایج مقایسه میانگین اثرات اصلی نفت خام، بیوچار و باکتری با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد بر غلظت منیزیم شاخساره را نشان می‌دهد. به طورکلی در سطوح مختلف آلودگی، در تیمارهای حاوی بیوچار نسبت به تیمار شاهد، میزان منیزیم به مقدار بیشتری گزارش گردید. بیشترین میزان منیزیم در تیمارهای P1BM2Ba0 و P2BCM2Ba0 به ترتیب به میزان ۱/۴۲ و ۱/۴۵ درصد و کمترین میزان در تیمار P2BM2Ba1 به میزان ۰/۶۹ درصد مشاهده شد.

با توجه به نتایج ارایه شده در شکل‌های (۵ و ۶) به نظر می‌رسد تیمارهای باکتری در افزایش میزان کلسیم و منیزیم تاثیر چندانی نداشته‌اند. این امر می‌تواند به دلیل عدم تاثیر باکتری بر انحلال این عناصر و یا نیاز به زمان بیشتر برای پاسخ بهتر و یا ماهیت این عناصر و ارتباط آنها با باکتری و نیز عدم توانایی سویه مورد نظر در افزایش غلظت این عناصر باشد. ضمن آنکه احتمالا نقش و تاثیر سایر تیمارها نظیر بیوچار در آزادسازی و تامین کلسیم و منیزیم با توجه به تاثیر آن بر روی pH، بیش از تیمار باکتری بوده است (Van Zwieten *et al.*, 2010).

هیدروکربن‌های نفتی نیز ممکن است دسترسی گیاهان و ریزجانداران را به مواد غذایی به وسیله کاهش حلالیت آن‌ها در آب کاهش دهند. Schwendinger (1968) ثابت کرد که کمبود عناصر غذایی در خاک بر اثر هیدروکربن‌های نفتی بوجود می‌آید. بنابراین می‌توان با اضافه کردن کود یا گیاهانی به خاک مثل شبدر که باعث تقویت خاک می‌شوند این کمبود را جبران کرد. از مهمترین خصوصیات شیمیایی بیوچار، افزایش ظرفیت تبادل کاتیونی است. اکسیده شدن سطوح بیوچار سبب تشکیل گروه‌های عاملی کربوکسیل شده که علاوه بر افزایش میزان کربن آلی به نوبه خود سبب افزایش CEC می‌گردد (Cheng *et al.*, 2008). به طور کل می‌توان گفت بیوچار از طریق اثرات مستقیم و همچنین اثرات غیر مستقیم سبب افزایش عملکرد گیاه و حاصلخیزی خاک می‌گردد. از جمله اثرات مستقیم می-

توان به افزایش مستقیم عناصری مانند نیتروژن، پتاسیم و فسفر داخل خاک اشاره کرد که به تبع افزایش این عناصر، رشد در قسمت‌های مختلف گیاهان افزایش می‌یابد. در این راستا اثرات مستقیم بیوچار با استناد به نتایج پژوهش Pitter *et al.* (2006) در زمینه تأثیر مفید و معنی‌دار بیوچار بر عملکرد و میزان کربن آلی و عناصر غذایی در گیاه برنج و خاک مورد استفاده در طی دوره دو ساله قابل ذکر می‌باشد.



شکل ۶. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل آلودگی نفتی در بیوچار در باکتری بر میزان منیزیم گیاه تاج خروس

P0: آلودگی نفتی در سطح ۰ درصد

P1: آلودگی نفتی در سطح ۲/۵درصد

P2: آلودگی نفتی در سطح ۵ درصد

Ba0: تیمار بدون باکتری *سودوموناس فلورسنس*

Ba1: تیمار با باکتری *سودوموناس فلورسنس*

B0: بیوچار در سطح ۰ درصد

Bcm1: بیوچار حاصل از کمپوست زباله شهری در سطح ۱ درصد

Bcm2: بیوچار حاصل از کمپوست زباله شهری در سطح ۲ درصد

Bm1: بیوچار حاصل از زباله تر شهری در سطح ۱ درصد

Bm2: بیوچار حاصل از زباله تر شهری در سطح ۲درصد

تأثیر تیمارهای آلودگی نفت‌خام، بیوچار و باکتری بر میزان جذب عناصر غذایی آهن و منگنز در گیاه تاج‌خروس

آهن شاخساره

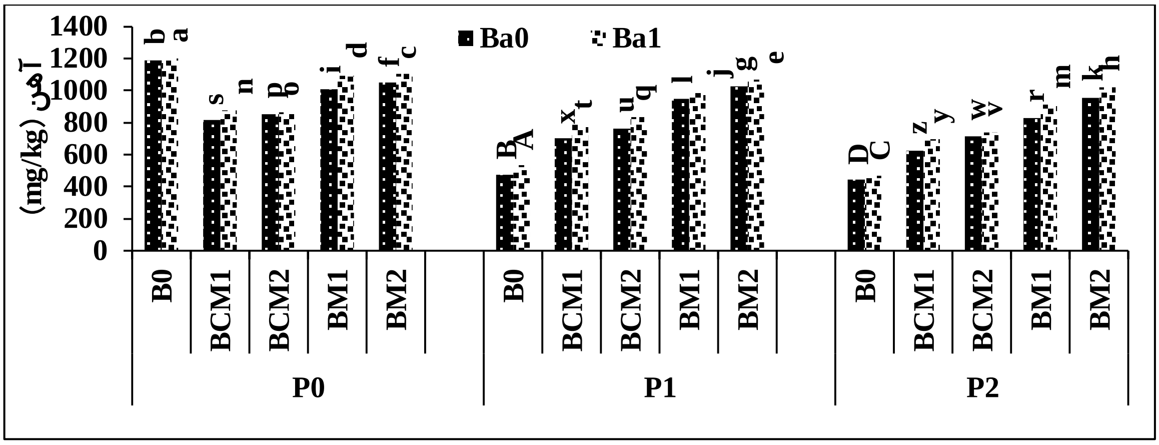
شکل (۷) نتایج مقایسه میانگین اثرات اصلی نفت خام، بیوچار و باکتری با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد بر غلظت آهن شاخساره را نشان می‌دهد. با توجه به این شکل در سطوح یکسان آلودگی، تیمارهای حاوی باکتری همواره مقدار آهن بیشتری نسبت به تیمارهای فاقد باکتری دارند. همچنین به طورکلی با افزایش مقدار آلودگی میزان آهن کاهش یافت و در سطوح یکسان آلودگی به جز تیمار شاهد (P0) در حضور بیوچار، میزان آهن نسبت به تیمار بدون بیوچار بیشتر است. بیشترین میزان آهن در تیمار P0B0Ba1 به میزان ۱۲۰۰/۳۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم و کمترین آن در تیمار P2B0Ba0 به میزان ۴۴۱/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد.

منگنز شاخساره

شکل (۸) نتایج مقایسه میانگین اثرات اصلی نفت خام، بیوچار و باکتری با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد بر غلظت منگنز شاخساره را نشان می‌دهد. این شکل نشان می‌دهد که همواره بیشترین میزان منگنز در سطوح یکسان آلودگی مربوط به تیمارهای حاوی باکتری است. همچنین در سطح یک (P1) و دو (P2) آلودگی، بیشترین میزان منگنز مربوط به تیمارهای حاوی بیوچار است، درحالیکه در سطح صفر آلودگی (P0) بیشترین میزان منگنز مربوط به تیمار بدون بیوچار است. بیشترین میزان منگنز در تیمار P0B0Ba1 به میزان ۲۷۹/۱ میلی‌گرم بر کیلو گرم و کمترین آن در تیمارهای P2BCM1Ba0 و P2BCM2Ba0 به ترتیب به میزان ۱۴۲/۰۶ و ۱۴۴/۲۶ میلی‌گرم بر کیلو گرم مشاهده شد.

به طورکلی در شرایط آلودگی، در تیمارهای بدون باکتری و بیوچار کمترین مقادیر عناصرغذایی در گیاه مشاهده شد. این پاسخ می‌تواند ناشی از تنش آلودگی و آسیب رساندن به اجزای مختلف سلول‌های گیاه و در نهایت نقصان در جذب عناصرغذایی و آب باشد. به طورکلی در تیمارهای حاوی باکتری و بیوچار، میزان عناصر غذایی (فسفر، پتاسیم، آهن، منگنز) در گیاه تاج‌خروس نسبت به تیمارهای بدون باکتری و بیوچار بیشتر

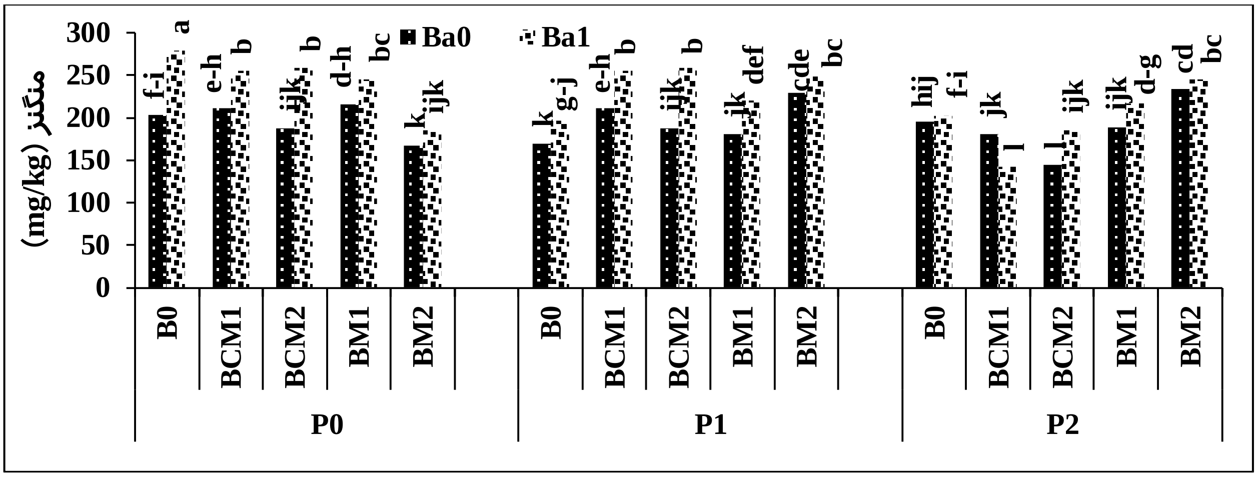
است. دلیل این امر، بهبود شرایط فیزیکی و شیمیایی خاک ریزوسفر است که از این جمله می‌توان به افزایش جذب آب، تهویه و فراهمی مواد غذایی و همین‌طور افزایش فعالیت ریزجانداران در حضور بیوچار و ترشحات گیاهی و تأثیر سینرژیک اینها در افزایش فراهمی عناصرغذایی برای گیاه و ریزجانداران اشاره کرد. باکتری‌های *سودوموناس* نیز اغلب دارای ویژگی‌های محرک رشد گیاه هستند و می‌توانند رشد گیاه را از طریق مکانیسم‌های مختلفی چون تولید سیدروفور، تولید اکسین و ... بهبود بخشند که این امر نیز می‌تواند در جهت جذب عناصر غذایی توسط گیاه موثر واقع شود. نتایج حاضر با نتایج آزمایش‌های Dimitrow and Markow, 2000، Pitter *et al.* (2006) و Valizadeh *et al.* (2016) نیز همخوانی داشت.



شکل ۷. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل آلودگی نفتی در بیوچار در باکتری بر میزان آهن گیاه تاج خروس

P0: آلودگی نفتی در سطح ۰ درصد
P1: آلودگی نفتی در سطح ۲/۵درصد
P2: آلودگی نفتی در سطح ۵ درصد
Ba0: تیمار بدون باکتری *سودوموناس فلورسنس*
Ba1: تیمار با باکتری *سودوموناس فلورسنس*

B0: بیوچار در سطح ۰ درصد
Bcm1: بیوچار حاصل از کمپوست زباله شهری در سطح ۱ درصد
Bcm2: بیوچار حاصل از کمپوست زباله شهری در سطح ۲ درصد
Bm1: بیوچار حاصل از زباله تر شهری در سطح ۱ درصد
Bm2: بیوچار حاصل از زباله تر شهری در سطح ۲درصد



شکل ۸. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل آلودگی نفتی در بیوچار در باکتری بر میزان منگنز گیاه تاج خروس

P0: آلودگی نفتی در سطح ۰ درصد
P1: آلودگی نفتی در سطح ۲/۵درصد
P2: آلودگی نفتی در سطح ۵ درصد
Ba0: تیمار بدون باکتری *سودوموناس فلورسنس*
Ba1: تیمار با باکتری *سودوموناس فلورسنس*

B0: بیوچار در سطح ۰ درصد
Bcm1: بیوچار حاصل از کمپوست زباله شهری در سطح ۱ درصد
Bcm2: بیوچار حاصل از کمپوست زباله شهری در سطح ۲ درصد
Bm1: بیوچار حاصل از زباله تر شهری در سطح ۱ درصد
Bm2: بیوچار حاصل از زباله تر شهری در سطح ۲درصد

نتیجه گیری کلی

در تیمارهای حاوی بیوچار، مقدار وزن خشک به میزان بیشتری مشاهده شد که این افزایش می‌تواند به علت بهبود شرایط فیزیکی و شیمیایی خاک ریزوسفر باشد که از جمله آن می توان به افزایش جذب آب، تهویه و افزایش فراهمی مواد غذایی و همینطور افزایش فعالیت ریزجانداران در حضور بیوچار و ترشحات گیاهی و تأثیر سینرژیک انها در افزایش وزن خشک شاخساره گیاه و تعداد ریزجانداران اشاره کرد. کمترین مقادیر وزن خشک شاخساره گیاه در تیمارهای دارای آلودگی نفتی و بدون باکتری *سودوموناس* مشاهده شد که می‌تواند ناشی از تنش آلودگی و اختلال در سلول‌های گیاه و در نهایت نقصان در جذب آب و عناصرغذایی باشد.

حضور بیوچار در تیمارهای دارای باکتری سودوموناس *فلوروسنس*، با توجه به رابطه‌ی مثبتی که بیوچار به طورکلی برای ریزجانداران دارد، می‌تواند به عنوان آشیانه‌های زیستی عمل کرده و شرایط را برای افزایش تعداد این ریزجانداران فراهم کند. با افزایش این ریزجانداران، مواد هیدروکربنی اطراف ریشه تجزیه و به دنبال آن سمیت وارده به گیاه کمتر شده و رشد بهتر گیاه و جذب بهتر عناصرغذایی فراهم می‌گردد. در مجموع تقویت گیاه از نظر عناصر غذایی در شرایط تنش یکی از سازوکارهای بروز مقاومت محسوب می‌شود. به بیان دیگر، در شرایط تنش، گیاه بیشتر در معرض تنش جذب عناصر غذایی قرار خواهد داشت.

سپاسگزاری

این پژوهش، با حمایت مالی "قطب علمی بهبود کیفیت خاک برای تغذیه متعادل گیاه دانشگاه تهران" اجرا گردیده که بدینوسیله نویسندگان، مراتب سپاسگزاری و قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

REFERENCES

ASTM, E871-82. (2006). Standard test method for moisture analysis of particulate wood fuels, ASTM International, Pennsylvania, USA.

Bona, C., Rezende, I.M.D., Santos, G.D.O., Souza, L.A.D. (2011). Effect of soil contaminated by diesel oil on the germination of seeds and the growth of Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae) Seedlings, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(6), 1379-1387.

Bossert, I. and Bartha, R. (1985), Plant growth on soil with a history of oil sludge disposal. *Soil Science*, 140, 75-77.

Bouyoucos, C.J. (1962). Hydrometer method improved for making particle size analysis of soil. *Agron. J.* 54, 464-465.

Bremner, J. M. (1996). Nitrogen-total. P. 1085-1122. In Sparks, D.L. *et al*., Method of soil analysis. Published by: Soil Science Society of America, Inc. American Society of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, USA.

Brennan, A., Moreno, E., Jose, J.N., Alburquerque, A., Knapp, C.W. and Switzer, C. (2014). Effect of biochar and activated carbon amendment on maize growth and the uptake and measured availability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and potentially toxic elements (PTEs). *Environmental Pollution*, 193, 79-87.

Cheng, C.H., J. Lehmann, *et al*. (2006). Oxidation of black carbon by biotic and abiotic processes. *Organic geochemistry*, 37(11), 1477-1488.

Cunningham, S. D., Anderson, T. A., Schwab, A. P., & Hsu, F. C. (1996). Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advances in agronomy* (USA). 56, 55-113.

Cunningham, S.D. and Ow, D.W. (1996). Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol*. 110, 715-719.

Dibble JT., Bartha R. (1976). The effect of iron on the biodegradation of petroleum in seawater. *Appl. Environ. Microb.* 31, 544-550.

Dimitrow, D.N., Markow, E., (2000), Behaviour of available forms of NPK in soils polluted by oil products. Poczwoznanie, Agrochimija I Ekologia 35(3), 3-8.

Donate-Correa J, Leon-Barrios M, Perez-Galdona R, (2004). Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in Chamaecytisus proliferus (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Island. *Plant Soil*. 266, 261 -272.

Ezenne, G.I., Nwoke, O.A., Obalum, S.E. and Ugwuishiwu, BO. (2014). Use of poultry droppings for remediation of crude-oil-polluted soils: Effects of application rate on total and poly-aromatic hydrocarbon concentrations." International Biodeterioration & Biodegradation 92, 57-65.

Feng, Lijuan, Liqiu Zhang, and Li Feng. (2014). Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil amended with sewage sludge compost. International Biodeterioration & Biodegradation, 95, 200-207.

Gang, Q., Dan, G., and Mei-Ying, F. (2013). Bioremediation of petroleum-contaminated soil by biostimulation amended with biochar, *Int. Biodeterior. Biodegrad*., 85, 150–155

Gomez-Eyles, J. L., Sizmur, T., Collins, C. D., & Hodson, M. E. (2012). Effects of biochar and the earthworm Eisenia fetida on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons and potentially toxic elements. *Environmental Pollution*, 159(2), 616-622.

Haluschak, P., 2006. Laboratory methods of soil

analysis. Canada-Manitoba soil survey, 3-133.

Kim, K.H., Kim, J.Y., Cho, T.S., Choi, J.W. (2012). Influence of pyrolysis temperature on physicochemical properties of biochar obtained from the fast pyrolysis of pitch pine (*Pinus rigida*). *Bioresource Technology*, 118, 158-162.

Lehmann, J., Gaunt, J. and Rondon, M. (2007) 'Bio-char sequestration in terrestrial ecosystems – a review', *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 11, 403–427.

Lehmann, J., Czimnik, C., Laird, D. and Sohi, S. (2009). Stability of biochar in the soil. In: Biochar for Environmental Management (edsJ. Lehmann & S. Joseph), pp. 183–205. EarthCam, London.

Leger, A. & Schreiber, M. M. (1989). Competition and canopy architecture as affected by soybean (*Glycine max*) row width and density of redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*). Weed Sci. 37, 84-92.

Liang, B., Lehmann, J., Solomon, D., Kinyangi, J., Grossman, J., O'neill, B., Skjemstad, J., Thies, J., Luizao, F., Petersen, J. (2006). Black carbon increases cation exchange capacity in soils. *Soil Science Society of America Journal*, 70, 1719-1730.

Lindsay, W., & Norvell, W. A. (1978). Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Science Society of America Journal*, 42(3), 421-428.

Liste H.H. and Prutz I. (2006). Plant performance, dioxygenase-expressing rhizosphere bacteria, and biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soil. *Chemosphere*, 62: 1411–1420.

Ma, L., and Xu, R. K. (2010). Effects of regulation of pH and application of orga nic material adsorption and desorption of phosphorus in three types of acid soils, *Journal of Ecology and Rural Environment*, 26, 596-599.

Merkl, N., Schultze-Kraft, R., & Infante, C. (2005). Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. Water, Air, and Soil Pollution, 165(1-4), 195-209.

Momeni, A. (2010). Geografical distribution and salinity levels of Iranian soil resources, Soil Research Journal, 24(3): 203-215.

Nazare, M., Couto, P.F.S., Basto, M.C.P., M.T.S.D. Vasconcelos. (2011). Suitability of different salt marsh plants for petroleum hydrocarbons remediation, *Chemosphere*, 84: 1052-1057.

Nie, M., Wang, Y., Yu, J., Xiao, M., Jiang, L., Yang, J., Fang, C., Chen, J., Li, B. (2011). Understanding plant–microbe interactions for phytoremediation of petroleum- polluted soil. *Plos One* 6, e17961.

Olsen, S., Cole, C., Watanabe, F., Dean, L. (1954) Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. USDA Circular Nr 939, US Gov.Print. Office, Washington, D.C.

Parry, J.M., Turnbull, P.C.B., Gibson, J.R. (1983). A colour atlas of Bacillus species. Wolfe Medical Publications Ltd.

Patten, C.L., and Glick, B.R. (2002). Role of Pseudomonas putida Indole acetic Acid in Development of the Host Plant Root System, *Appl Environ Microbiol*. 68(8), 3795–3801.

Petter, F.A., Madari, B.E., Soler da Silva, M.A., Carneiro, M.A.C., Thaís de Melo Carvalho, M., Júnior, B.H.M. and Pacheco, L.P. (2012). Soil fertility and upland rice yield after biochar application in the Cerrado, Pesq. Agropec. *Bras. Brasília*, 47, 699-706.

Rezaian, A. (2014). Effect of biochar and mycorrhiza on uptake, translocation and accumulation of cadmium in mint, MSc theses, Agriculture Faculty, Shahrod Technology University.

Roja, F., (2009). Degradation of alkanes by bacteria: minireview. Environmental Microbiology. 11, 2477–2490.

Ryan, J., Estefan, G., & Rashid, A. (2007). Soil and plant analysis laboratory manual. ICARDA.

Schwendinger, R. B. 1968. Reclamation of soil contaminated with oil. Journal of the Institute of Petroleum. 54, 182-197.

Semple, K. T., Reid, B. J., & Fermor, T. R. (2001). Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental pollution*, 112(2), 269-283.

Shahriyari, M.H., Savaghebi, Gh. R., Minae-Tehrani, D. and Padidaran, M. (2006). The Effect of Mixed Plants Alfalfa (*Medicago sativa*) and Fescue (*Festuca arundinacea*) on the Phytoremediation of Light Crude Oil in Soil, *Environmental Science*, 13, 33-40.

Song, W., Guo, M. (2012). Quality variations of poultry litter biochar generated at different pyrolysis temperatures. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 94, 138-145.

Sperber, J.I. (1958). The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Aust J Agr Res*, 9: 778-781.

Steiner, C., Teixeira, W.G., Lehma nn, J., Nehls, T., de Macedo, J.L.V., Blum, W.E.H., Zech, W. (2007). Long term effects of manure, charcoal and mineral fertilization on crop production and fertility on a highly weathered Central Amazonian upland soil. *Plant and Soil*, 291, 275-290.

43. Sumner, M.E. and W.P. Miller. (1996). Cation exchange capacity, and exchange coefficients. In: D.L. Sparks (ed.) Methods of soil analysis. Part 2: Chemical properties (3rd ed.). ASA, SSSA, CSSA, Madison, WI.

Valizadeh, K., Motesharezadeh, B., Alikhani, H.A. and Khazae, M. (2016). Effects of municipal solid waste compost and petroleum hydrocarbon decomposing bacteria on nutrient uptake by the Cordia myxa L. seedlings in soil contaminated with crude oil, *Journal of Water and Soil Research*, 46(4), 749-758.

Van Zwieten, L., Kimber, S., Morris, S., Chan, K., Downie, A., Rust, J., Joseph, S., Cowie, A.

(2010). Effects of biochar from slow pyrolysis of papermill waste on agronomic performance and soil fertility. *Plant and Soil*. 327, 235-246.

Walkley, A., Black, I.A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37, 29-38.

Wang, M.C., Chen, Y.T., Chen, S.H., Chang Chien, S.W and Sunkara, S.V. (2012). Phytoremediation of pyrene contaminated soils amended with compost and planted with ryegrass and alfalfa. *Chemosphere*, 87, 217–225.

Xu, G., Sun, J., Shao, H., Chang, S.X. (2014). Biochar had effects on phosphorus sorption and desorption in three soils with differing acidity. *Ecological Engineering*, 62,: 54-60.

Xu, G., Wei, L., Sun, J., Shao, H., Chang, S. (2013). What is more important for enhancing nutrient bioavailability with biochar application into a sandy soil: Direct or indirect mechanism? *Ecological Engineering* 52, 119-124.