



## Chromium (VI) Bioreduction in Contaminated Soil using Bacterium Immobilized on Algae Biochar

Maryam Khalili Rad<sup>1✉</sup>, Nazanin Esmaeili<sup>2</sup>, Mohammad Bagher Farhangi<sup>3</sup>, Nasrin Ghorbanzadeh<sup>4</sup>

1. Corresponding Author, Department of Soil Science, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran. Email: [m\\_khalilrad@guilan.ac.ir](mailto:m_khalilrad@guilan.ac.ir)
2. Department of Soil Science, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran. Email: [nazanin.es.1997@gmail.com](mailto:nazanin.es.1997@gmail.com)
3. Department of Soil Science, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran. Email: [m.farhangi@guilan.ac.ir](mailto:m.farhangi@guilan.ac.ir)
4. Department of Soil Science, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran. Email: [nghorbanzadeh@guilan.ac.ir](mailto:nghorbanzadeh@guilan.ac.ir)

Article Info	ABSTRACT
<p><b>Article type:</b> Research Article</p> <p><b>Article history:</b></p> <p><b>Received:</b> May. 11, 2022</p> <p><b>Revised:</b> July. 25, 2022</p> <p><b>Accepted:</b> Aug. 8, 2022</p> <p><b>Published online:</b> Sep. 23, 2022</p> <p><b>Keywords:</b> Accumulation factor, Bioremediation, Chromium (III), Shewanella sp., Transfer factor</p>	<p>The objective of this study was to eliminate chromium (VI) from a contaminated soil through reducing it to chromium (III) by immobilized <i>Shewanella</i> sp. bacteria on algae biochar and to investigate its accumulation in barley. A sandy loam soil was contaminated with 50 mg kg<sup>-1</sup> Cr (VI) and incubated for two weeks. Then, the barley pot experiment in the contaminated soil was performed in the autumn of 1400 in the research greenhouse of University of Guilan in a completely randomized design with three replications. Treatments included <i>Shewanella</i> sp. (S), algae biochar (B), algae biochar + <i>Shewanella</i> sp. (BS), and immobilized <i>Shewanella</i> sp. bacteria on algae biochar (IB). Soil contaminated with Cr (VI) and non-contaminated soils were also included as positive (C+) and negative (C-) controls, respectively. After 30 days, the plant was harvested and dry weight of root and shoot were measured. Total chromium and Cr (VI) contents in the root and shoot of plant and also in the soil were measured. The Cr (III) content was calculated from the difference between the total chromium and the Cr (VI) contents. Growth ratio, Cr (VI) accumulation factor in roots and shoots and the transfer factor in plants were calculated. The highest and lowest amounts of Cr (III) in roots, shoots and soil were obtained in IB and C+ treatments, respectively. In Cr (VI) contaminated treatments, the highest and the lowest values of root and shoot dry weight were obtained in IB and C+ treatments, respectively. Cr (VI) reduction in soil in BS treatment was more than S and B treatments. The lowest and the highest plant growth ratios were obtained in C+ (23.8%) and IB (60%) treatments, respectively. The BS and IB treatments further reduced the transfer factor. Therefore, immobilized bacteria on biochar can be effective in remediation of chromium contaminated soils.</p>

Cite this article: Khalili Rad, M., Esmaeili, N., Farhangi, M. B., & Ghorbanzadeh, N. (2022) Chromium (VI) bioreduction in contaminated soil using bacterium immobilized on algae biochar. *Iranian Journal of Soil and Water Research*, 53 (7), 1467-1479.

© The Author(s).

Publisher: University of Tehran Press.

DOI: <http://doi.org/10.22059/ijswr.2022.342878.669265>



## کاهش زیستی کروم شش ظرفیتی در خاک آلوده با استفاده از باکتری غیرمتحرک شده روی بیوجار جلبک

مریم خلیلی راد<sup>۱</sup>، نازنین اسماعیلی<sup>۲</sup>، محمد باقر فرهنگی<sup>۳</sup>، نسرین قربان زاده<sup>۴</sup>۱. نویسنده مسئول، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، ایمیل: [m\\_khalilrad@guilan.ac.ir](mailto:m_khalilrad@guilan.ac.ir)۲. گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، ایمیل: [nazanin.es.1997@gmail.com](mailto:nazanin.es.1997@gmail.com)۳. گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، ایمیل: [m.farhangi@guilan.ac.ir](mailto:m.farhangi@guilan.ac.ir)۴. گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران، ایمیل: [nghorbanzadeh@guilan.ac.ir](mailto:nghorbanzadeh@guilan.ac.ir)

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	هدف این پژوهش حذف کروم شش ظرفیتی (VI) از یک خاک آلوده از طریق کاهش آن به کروم سه ظرفیتی (III) توسط باکتری <i>Shewanella</i> sp. غیرمتحرک شده بر روی بیوجار جلبک و بررسی انباشتگی آن در گیاه جو بود. خاک لوم شنی با 50 mg kg <sup>-1</sup> کروم (VI) آلوده و به مدت دو هفته انکوباسیون شد. سپس آزمایش گلدانی کشت جو در پاییز ۱۴۰۰ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه گیلان در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در خاک آلوده انجام شد. تیمارها شامل باکتری <i>Shewanella</i> sp. (S)، بیوجار جلبک (B)، بیوجار جلبک + باکتری <i>Shewanella</i> sp. (BS) و باکتری <i>Shewanella</i> sp. غیرمتحرک شده بر روی بیوجار جلبک (IB) بودند. خاک آلوده به کروم (VI) و غیرآلوده نیز به ترتیب کنترل مثبت (+C) و منفی (-C) بودند. گیاه پس از ۳۰ روز برداشت و وزن خشک ریشه و اندام هوایی آن اندازه‌گیری شد. مقدار کروم کل و کروم (VI) در ریشه، اندام هوایی گیاه و خاک اندازه‌گیری شد و مقدار کروم (III) از تفاضل مقدار کروم کل و کروم (VI) به دست آمد. نسبت رشد، فاکتور انباشت کروم (VI) در ریشه و اندام هوایی و فاکتور انتقال آن در گیاه محاسبه شد. بیشترین و کمترین مقدار کروم (III) در ریشه، اندام هوایی و خاک به ترتیب در تیمارهای IB و +C به دست آمد. در تیمارهای آلوده به کروم (VI) بیشترین و کمترین مقدار وزن خشک ریشه و اندام هوایی به ترتیب در تیمارهای IB و +C مشاهده شد. در تیمار BS کاهش کروم (VI) در خاک نسبت به دو تیمار S و B بیشتر بود. کمترین و بیشترین نسبت رشد گیاه به ترتیب در تیمار +C (۲۳/۸ درصد) و IB (۶۰ درصد) مشاهده شد. تیمارهای BS و IB سبب کاهش بیشتر فاکتور انتقال شد. بنابراین غیرمتحرک کردن باکتری بر روی بیوجار می‌تواند در پالایش خاک‌های آلوده به کروم موثر باشد.
واژه‌های کلیدی: زیست‌پالایی، <i>Shewanella</i> sp. فاکتور انتقال، فاکتور انباشت، کروم (III)	
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۲/۲۱	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۵/۳	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۵/۱۰	
تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۷/۱	

استاد: خلیلی راد، مریم؛ اسماعیلی، نازنین؛ فرهنگی، محمدباقر؛ قربان زاده؛ نسرین (۱۴۰۱). کاهش زیستی کروم شش ظرفیتی در خاک آلوده با استفاده از باکتری غیرمتحرک

شده روی بیوجار جلبک. *مجله تحقیقات آب و خاک ایران*، ۵۳ (۷)، ۱۴۷۹-۱۴۶۷.DOI: <http://doi.org/10.22059/ijswr.2022.342878.669265>

© نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

## مقدمه

کروم (Cr) یکی از فراوان‌ترین فلزهای سنگین با حالت‌های اکسیداسیون متفاوت (صفر تا شش) می‌باشد که در اغلب زیست‌بوم‌ها موجود است. کروم شش (VI) و سه ظرفیتی (III) گونه‌های فراوان‌تر و نسبتاً پایدارتر کروم هستند. ویژگی‌ها و سمیت این فلز به تفاوت در حالت‌های اکسیداسیون آن مربوط است (Rajapaksha et al., 2018; Ayele and Godeto, 2021). به طوری که، حلالیت بیشتر کروم (VI) در آب سبب تشکیل اکسی‌آنیون‌های متحرک و محلول (Rajapaksha et al., 2018) با سمیت ۵۰۰ برابری برای موجودات زنده نسبت به کروم (III) می‌شود (Imran et al., 2020). فعالیت‌های صنعتی گسترده انسان مانند فرآوری فلزها، رنگرزی، تولید نمک‌های کروم، آبکاری الکتریکی، نوارهای مغناطیسی و دباغی چرم و غیره سبب تخلیه کروم (VI) به محیط زیست می‌شود (Zhang et al., 2018). قرار گرفتن انسان در معرض کروم (VI) می‌تواند سبب آلرژی، اگزما، زخم، تحریک بینی و پوست، سوراخ شدن پرده گوش، اختلالات دستگاه تنفسی و سرطان ریه شود (Focardi et al., 2013).

روش‌های معمول فیزیکی (تیمار حرارتی و جایگزینی خاک)، شیمیایی (آبشویی، رسوب، تبادل یونی و غیرمتحرک کردن) و فیزیکوشیمیایی (الکتروسینتیک، انجماد و شستشوی خاک) معمولاً برای حذف فلزهای سنگین از خاک‌های آلوده به کار برده می‌شوند. با این حال، این روش‌ها تا حدودی با محدودیت‌هایی مانند قابلیت اجرایی ضعیف، ناکارآمدی، هزینه بالا، ناپایداری و خطر تولید محصولات جانبی روبه‌رو هستند (Sharma et al., 2018; Qayyum et al., 2020). در مقابل، اخیراً زیست‌پالایی توجه بیشتری را به عنوان یک روش کم‌هزینه و دوست‌دار محیط زیست به خود معطوف داشته است. کاهش زیستی کروم (VI) به کروم (III) با سمیت کمتر توسط باکتری‌ها و قارچ‌های کاهنده کروم (VI) به عنوان روشی ارزشمند و امیدوارکننده مورد توجه قرار گرفته است (Wang and Cui, 2019). در میان باکتری‌های کاهنده کروم (VI)، *Shewanella* sp. به عنوان ریزجاندار شاخص برای کاهش برون سلولی کروم (VI) در نظر گرفته می‌شود که در محیط‌های متعدد با قابلیت رشد هوازی یا بی‌هوازی فراوان است (Ancona et al., 2020).

بیوپچار ماده‌ای است که از پیرولیز مواد اولیه مختلف که عموماً ضایعات کشاورزی و جنگلی می‌باشند تحت شرایط اکسیژن محدود تولید می‌شود (Xu et al., 2013). در دهه‌های اخیر، کاربرد بیوپچار در پالایش فلزهای سنگین از زیست‌بوم‌های خاکی و آبی آلوده به عنوان یک رویکرد امیدوارکننده به اثبات رسیده است (Sharma et al., 2018; Zheng et al., 2020). تبادل یونی، هم‌رسوبی، کمپلکس شدن، جذب سطحی فیزیکی، کاهش و رسوب سطحی به عنوان مکانیسم‌های احتمالی برای غیرمتحرک کردن فلزهای سنگین به دنبال کاربرد بیوپچار به خاک‌ها معرفی شده‌اند (Lu et al., 2012). سطح ویژه، pH، ظرفیت تبادل کاتیونی، ساختار متخلخل، پایداری نسبی و وجود گروه‌های عاملی فراوان در سطح بیوپچار، آن را برای پالایش کروم مناسب می‌سازد (Li et al., 2017; Yang et al., 2019). جذب کروم (VI) بر روی سطح بیوپچار و در ادامه کاهش آن به کروم (III) و همچنین کاهش مستقیم آن به کروم (III) توسط مواد آلی محلول ناشی از بیوپچار به عنوان دو مکانیسم ممکن برای حذف کروم (VI) پیشنهاد شده‌اند (Shi et al., 2020). تغییر شکل کروم (VI) متحرک به کروم (III) با تحرک کمتر در خاک‌های آلوده به دنبال کاربرد بیوپچار کود مرغی گزارش شده است (Choppala et al., 2012; Mandal et al., 2016). نیز بیان کردند که بیوپچار کودهای دامی اصلاح شده و نشده با آهن صفر ظرفیتی و کیتوسان می‌تواند سمیت کروم (VI) را از طریق فرایند کاهش و سپس جذب سطحی کروم (III) توسط گروه‌های عاملی متفاوت موجود در سطح بیوپچار کاهش دهند.

در میان بیوپچارهای مختلف، بیوپچار جلبک به سبب قلیایی بودن و داشتن مواد غذایی قابل استفاده کافی در مقایسه با مواد غذایی حاصل از ضایعات لیگنوسلولزی، می‌تواند شرایط مناسبی را برای بقای میکروب‌ها فراهم نماید (Sun et al., 2016; Yu et al., 2017). Chen et al., 2021 در یک آزمایش گلدانی، پالایش خاک آلوده به کروم (VI) توسط باکتری کاهنده کروم (*Bacillus cereus* WHX-) غیرمتحرک شده بر روی بیوپچار جلبک را بررسی کردند. نتایج نشان داد که ۹۴/۲۲ درصد از کروم (VI) به کروم (III) کاهش و با کم شدن تنش کروم ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه چچم کشت شده در خاک آلوده بهبود یافت. (Bashir et al., 2021) نیز گزارش کردند که کاربرد بیوپچار می‌تواند رویکردی مناسب برای کاهش سطح سمیت کروم در خاک‌های آلوده ناشی از صنعت چرم‌سازی باشد و رشد، ویژگی‌های بیوشیمیایی و عملکرد گیاه ذرت را افزایش دهد.

کروم (VI) به سستی توسط ذرات خاک جذب می‌شود و بسیار محلول است و در نتیجه می‌تواند به آسانی توسط گیاهان جذب و یا از طریق آبشویی به آب‌های زیرزمینی وارد شود. تا کنون پژوهش‌های زیادی در رابطه با پالایش خاک‌های آلوده به کروم با استفاده از بیوپچار و همچنین کاهش کروم (VI) توسط باکتری‌های کاهنده صورت گرفته است، با این حال در پژوهش‌های اندکی از بیوپچار به عنوان حامل باکتری‌های کاهنده جهت پالایش کروم استفاده شده است. بنابراین هدف اصلی این پژوهش پالایش کروم (VI) در خاک آلوده به



کروم از طریق کاهش آن به کروم (III) بود به طوری که از انباشتگی آن در گیاه کاسته شود. به این منظور در یک مطالعه گلدانی، تاثیر غیرمتحرک کردن باکتری *Shewanella* sp. بر روی بیوجار جلبک بر فراهمی کروم و پتانسیل انتقال آن به گیاه جو در خاک آلوده مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش

### تهیه و بازکشت باکتری *Shewanella* sp.

باکتری *Shewanella* sp. از بانک میکروبی ایران (مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران-کرج) به صورت کشت زنده تهیه و در محیط کشت مایع TSB<sup>۱</sup> بازکشت شد. برای استفاده از باکتری در آزمایش، ابتدا باکتری به صورت هوازی در محیط کشت مایع TSB در انکوباتور شیکردار در دمای ۲۷ درجه سلسیوس با ۱۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۶ ساعت قرار داده شد تا به مرحله فاز رشد لگاریتی میانه تا انتهایی برسد. سپس باکتری از محیط کشت جدا و با بافر PIPES<sup>۲</sup> سه بار سانتریفیوژ (دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه) و شستشو داده شد. در ادامه سوسپانسیونی از باکتری تهیه شد و تا زمان استفاده در مراحل بعدی آزمایش در یخچال (۴°C) نگاه‌داری شد. تعداد باکتری در سوسپانسیون به روش شمارش کلنی روی پلیت<sup>۳</sup> دارای محیط NA<sup>۴</sup> تعیین شد (Huang et al., 2011).

### آماده‌سازی بیوجار جلبک

زیست توده ماکروجلبک از کانال‌های محوطه فضای سبز دانشگاه گیلان جمع‌آوری و به منظور حذف کامل نمک، شن و مواد اضافی با آب شهر و سپس با آب مقطر شستشو داده شد و زیست توده حاصل در آن در دمای ۶۰ درجه سلسیوس خشک شد. سپس بیوجار از طریق پیرولیز زیست توده جلبک در شرایط اکسیژن کم و در دمای ۴۰۰ درجه سلسیوس در کوره الکتریکی با شدت گرمادهی ۱۰ درجه سلسیوس در دقیقه به مدت ۱ ساعت تهیه شد (Chen et al., 2015). پس از آن بیوجار تهیه شده در دمای اتاق خشک و با آب مقطر شسته و سپس در دمای ۶۰ درجه سلسیوس خشک شد.

ویژگی‌های بیوجار شامل pH و قابلیت هدایت الکتریکی در نسبت ۱:۲۰ بیوجار به آب مقطر (Rajkovich et al., 2012)، کربن، نیتروژن و هیدروژن با استفاده از دستگاه آنالیز عنصری کربن، نیتروژن و هیدروژن (مدل Flash EA 1112 series) اندازه‌گیری شد.

### غیرمتحرک کردن باکتری *Shewanella* sp. بر روی بیوجار جلبک

مقدار پنج گرم از بیوجار تهیه شده به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت NB<sup>۵</sup> اضافه و در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر از باکتری *Shewanella* sp. به محیط مایه‌زنی شد و در انکوباتور شیکردار (۱۴۰ دور در دقیقه) در دمای ۲۷ درجه سلسیوس و به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. مخلوط در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی دور ریخته شد. رسوب حاصل سه بار با بافر Tris-HCl (pH=9) شسته شد تا سلول‌های باکتری غیرمتحرک نشده در سطح بیوجار از محیط خارج شوند. در پایان این مرحله بیوجاری که سلول‌های باکتری *Shewanella* sp. بر روی آن غیرمتحرک شده‌اند تشکیل شد (Hale et al., 2014). ویژگی‌های ریزساختاری سطحی بیوجار حاصل با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (مدل DSM-960A) مورد بررسی قرار گرفت.

### آزمایش گلدانی

نمونه خاک از منطقه‌ای در شرق گیلان از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری تهیه و برخی ویژگی‌های آن مانند بافت (Gee and Bauder, 1986)، درصد رطوبت اشباع، pH و قابلیت هدایت الکتریکی (Page et al., 1982)، کربن آلی (Walkley and Black, 1934)، نیتروژن کل (Bremner and Mulvaney, 1982)، پتاسیم محلول و تبادل (Knudsen et al., 1982) و فسفر قابل دسترس (Olsen et al., 1954) اندازه‌گیری شد. به منظور انجام آزمایش گلدانی ابتدا خاک با افزودن ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروم (VI) از نمک دی‌کرومات پتاسیم (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>) آلوده شد. خاک‌های آلوده در گلدان‌های پلاستیکی ۵۰۰ گرمی ریخته و در رطوبت ۷۰ درصد ظرفیت زراعی و دمای ۲۵°C به مدت دو هفته انکوباسیون شدند تا برهم‌کنش آلاینده و خاک رخ دهد. تیمارها شامل خاک بدون آلودگی (شاهد منفی) (-C)، خاک با

۱ Tryptic Soy Broth

۲ Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)

۳ Plate count

۴ Nutrient Agar

۵ Nutrient Broth

آلودگی ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم کروم (VI) (شاهد مثبت) (C+)، خاک آلوده همراه با باکتری *Shewanella* sp. ( $1 \times 10^8$ ) سلول در گرم خاک)، خاک آلوده همراه با بیوچار جلبک (B) به مقدار ۱ درصد وزنی/وزنی، خاک آلوده همراه با بیوچار جلبک و باکتری *Shewanella* sp. ( $1 \times 10^8$ ) سلول در گرم مخلوط (BS) و خاک آلوده با باکتری غیرمتحرک شده بر روی بیوچار (IB) به مقدار ۱ درصد وزنی/وزنی بودند. تنظیم غلظت باکتری *Shewanella* sp. به روش شمارش کلنی روی پلیت ( $CFU mL^{-1}$ ) انجام شد. سپس غلظت مورد نظر به حجم آب مورد نیاز برای مرطوب کردن مخلوطها اضافه و مایه‌زنی شد.

آزمایش گلدانی کشت جو (*Hordeum vulgare* L.) رقم بهمن ۳۰۲۰ در پاییز ۱۴۰۰ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه گیلان انجام شد. بذرها از کلکسیون بذر آزمایشگاه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان تهیه شدند. بذرها را جو ضدعفونی (Schikora and Schmidt, 2001) و بر روی پلیتهای حاوی آب آگار (۱/۵ درصد) به مدت سه روز در دمای  $25^{\circ}C$  نگاهداری شدند تا بذرها جوانه بزنند. کوددهی خاک با توجه به دستور العمل توصیه کودی گیاه جو انجام (Malekotti and Ghayibi, 2000) و مقدار  $0.071$  گرم از کود اوره پیش از کشت و در دو سرک و مقدار  $0.009$  گرم سوپرفسفات تریپل و سولفات پتاسیم پیش از کشت به گلدانهای حاوی  $500$  گرم خاک افزوده شد. سپس بذرها در گلدانهای با تیمارهای مختلف کشت داده شدند. در هر گلدان ۴ بذر جو در فواصل منظم در عمق ۳ سانتی متری کشت و بذرها دو هفته پس از کاشت به تعداد ۲ عدد در هر گلدان تنک شدند. گلدانها در دمای  $20^{\circ}C$  در روز و  $15^{\circ}C$  در شب و رطوبت ۷۰ درصد ظرفیت مزرعه نگهداری شدند. پس از گذشت ۳۰ روز، گیاهان به طور کامل برداشت شدند، ریشه و اندام هوایی به طور جداگانه در پاکت‌های کاغذی به مدت ۴۸ ساعت در دمای  $80^{\circ}C$  خشک شدند. سپس نمونه‌ها آسیاب شدند و از الک  $0.5$  میلی متری عبور داده شدند. اندازه‌گیری کروم در نمونه‌های گیاهی پس از هضم تر انجام گرفت (Zhao and Han, 1994). غلظت کروم کل در نمونه‌های گیاه پس از تهیه استاندارد با استفاده از نمک دی‌کرومات پتاسیم به وسیله دستگاه جذب اتمی (مدل VARIAN 220) قرائت شد. غلظت کروم (VI) با استفاده از معرف S-دی‌فنیل کاربازید و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل VARIAN CARY Scan 100) در طول موج  $540$  نانومتر اندازه‌گیری شد (Clesceri et al., 1996). غلظت کروم (III) از تفاضل غلظت کروم کل و کروم (VI) محاسبه شد (Aparicio et al., 2021). از خاک درون گلدانها نیز پس از برداشت گیاه نمونه‌برداری شد و غلظت کروم کل، (VI) و (III) به روش مشابه گیاه اندازه‌گیری شد.

### محاسبه نسبت رشد، فاکتور انباشت و انتقال

نسبت رشد، فاکتور انباشت ریشه و اندام هوایی و فاکتور انتقال کروم با استفاده از روابط زیر محاسبه شد (Sidhu et al., 2017).

$$\text{نسبت رشد} = \frac{\text{زیست توده گیاه تیمار شده}}{\text{زیست توده گیاه شاهد}}$$

$$\text{فاکتور انباشت اندام هوایی} = \frac{\text{میانگین غلظت فلز در اندام هوایی}}{\text{میانگین غلظت فلز در خاک}}$$

$$\text{فاکتور انتقال از ریشه به اندام هوایی} = \frac{\text{میانگین غلظت فلز در اندام هوایی}}{\text{میانگین غلظت فلز در ریشه}}$$

$$\text{فاکتور انباشت ریشه} = \frac{\text{میانگین غلظت فلز در ریشه}}{\text{میانگین غلظت فلز در خاک}}$$

### آنالیز آماری

آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. داده‌ها با نرم افزار SAS آنالیز شدند و برای مقایسه میانگین آنها از آزمون توکی در سطح ۵ درصد استفاده شد. برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار Excel استفاده شد.

## نتایج و بحث

### ویژگی‌های خاک و بیوچار جلبک

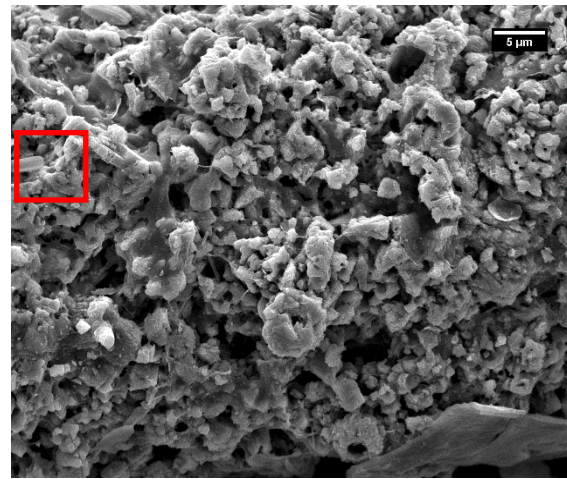
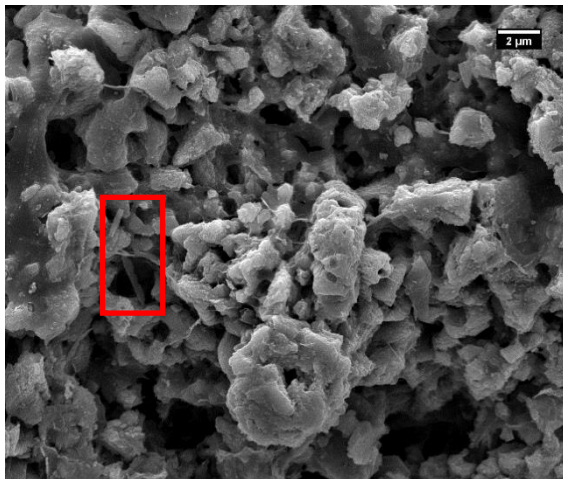
ویژگی‌های خاک مورد مطالعه و بیوچار مورد استفاده به ترتیب در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است. خاک مورد مطالعه شن لومی با pH حدود خنثی و کربن آلی کم بود (جدول ۱). بیوچار جلبک مورد استفاده نیز دارای pH قلیایی با قابلیت هدایت الکتریکی اندک بود. تصاویر SEM مربوط به غیرمتحرک شدن باکتری *Shewanella* sp. بر روی بیوچار جلبک در شکل ۱ نشان داده شده است. این تصاویر نشان می‌دهد که باکتری *Shewanella* sp. با موفقیت بر روی بیوچار غیرمتحرک شده است.

جدول ۱. ویژگی‌های خاک مورد مطالعه

بافت	رطوبت اشباع	کربن آلی	نیترژن کل	پتاسیم محلول و تبادل	فسفر قابل دسترس	EC <sub>(1:2.5)</sub>	pH <sub>(1:2.5)</sub>
	g 100g <sup>-1</sup>			mg kg <sup>-1</sup>		dS m <sup>-1</sup>	-
شن لومی	۴۰/۵	۰/۵۱	۰/۰۴	۳۷۴	۱۵	۰/۲۵	۷/۶۵

جدول ۲. ویژگی‌های بیوجار جلبک

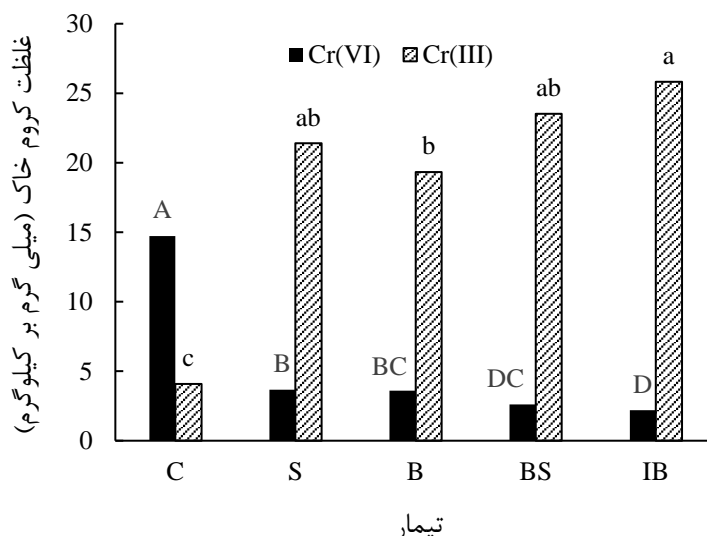
هیدروژن	نیترژن	کربن	EC <sub>(1:20)</sub>	pH <sub>(1:20)</sub>
g 100g <sup>-1</sup>			dS m <sup>-1</sup>	
۱/۳	۲/۵	۳۳/۴	۰/۵۶	۸/۹


 شکل ۱. تصاویر SEM مربوط به غیرمتحرک شدن باکتری *Shewanella sp.* بر روی بیوجار جلبک با بزرگنمایی‌های متفاوت

### غلظت کروم در خاک

در شکل ۲ غلظت کروم خاک در پایان دوره کشت نشان داده شده است. مقدار کروم (VI) در تیمار شاهد بیشترین و در تیمار IB کمترین مقدار را داشت که تفاوت معنی‌داری با تیمار BS نداشت. مقدار کروم (VI) در دو تیمار S و B اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. با این وجود کاربرد بیوجار همراه با باکتری *Shewanella sp.* سبب ایجاد اختلاف معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) بین تیمارهای S و BS شد. اگر چه بیوجار به عنوان یک دهنده الکترون یا یک واسطه انتقال الکترون برای کاهش کروم (VI) محسوب می‌شود (Xu et al., 2019)، با این حال هنگامی که باکتری به همراه بیوجار استفاده می‌شود مواد غذایی مورد نیاز برای باکتری فراهم و باکتری از عوامل تنش‌زای محیطی حفظ می‌شود و کارایی آن را افزایش می‌دهد. علاوه بر این جذب سطحی کروم (VI) توسط بیوجار سبب

افزایش برهم‌کنش بین باکتری و کروم (VI) شده و تغییر شکل کروم (VI) به کروم (III) را تسهیل می‌نماید (Jiang et al., 2022). بیشترین و کمترین مقدار کروم (III) خاک به ترتیب در تیمارهای IB و شاهد مشاهده شد که تاثیر تیمار غیرمتحرک کردن باکتری بر روی بیوجار را در کاهش سمیت کروم (VI) نشان می‌دهد. کروم (III) ناشی از فرایند کاهش کروم (VI) می‌تواند به آسانی رسوب نموده یا به سرعت با مواد آلی دارای بار منفی و کلوئیدهای خاک پیوند برقرار کند و تحرک آن به شدت کاهش یابد. این امر به پالایش خاک‌های آلوده به کروم (VI) کمک می‌نماید (Chen et al., 2021). همچنین با توجه به این که بیوجار جلبک دارای pH خنثی تا قلیایی است افزودن بیوجار به عنوان حامل باکتری، pH خاک را در سطوح بالا حفظ نموده و مانع از انحلال کروم (III) شده و تحرک کروم را محدود می‌کند (Xu et al., 2020).



شکل ۲. غلظت کروم شش (Cr(VI)) و سه (Cr(III)) ظرفیتی خاک در پایان دوره کشت. C: شاهد، S: باکتری *Shewanella sp.* B: بیوچار جلبک، BS: بیوچار به همراه باکتری *Shewanella sp.* و IB: باکتری غیرمتحرک شده بر روی بیوچار. حروف متفاوت بزرگ و کوچک روی ستون‌ها نشان دهنده بودن تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

خلاف تیمار BS نقش بیوچار و باکتری به تنهایی مطرح نیست، بلکه ترکیبی از فرایندهای جذب و کاهش رخ می‌دهد و در نتیجه کارایی تیمار افزایش می‌یابد. از طرفی، بیوچار توانایی رشد باکتری برای تحمل غلظت‌های بالای کروم (VI) را نیز افزایش می‌دهد و می‌تواند مواد غذایی و محیط رشد مناسبی را برای باکتری فراهم کند. گزارش شده است که در مقایسه با باکتری به تنهایی، باکتری غیرمتحرک شده بر روی بیوچار از سرعت رشد بالاتری نیز برخوردار است (Jiang et al., 2022). (Choppala et al., 2012) گزارش کردند که در خاک‌های آلوده به کروم (VI) کاربرد بیوچار کود مرغی از طریق کاهش کروم (VI) متحرک به کروم (III) با قابلیت تحرک کمتر سبب کاهش آبشویی کروم شد. کاهش آبشویی کروم (III) به جذب آن در مکان‌های تبادل کاتیونی و همچنین رسوب آن به صورت  $Cr(OH)_3$  در نتیجه آزادسازی یون-های  $OH^-$  طی فرایند کاهش کروم (VI) مرتبط است.

#### غلظت کروم در گیاه

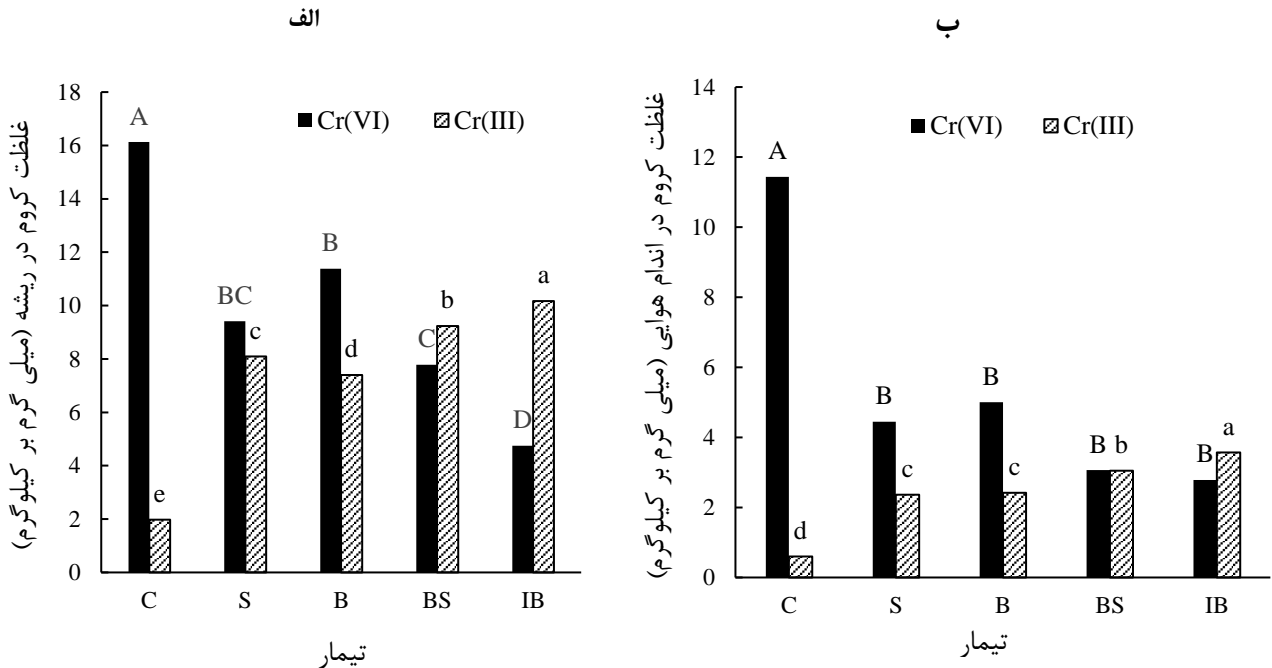
بیشترین مقدار کروم (VI) در ریشه گیاه در تیمار شاهد و کمترین مقدار آن در تیمار IB مشاهده شد. مقدار کروم (VI) در ریشه گیاه در تیمارهای S و B اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند، در حالی که کاربرد باکتری به همراه بیوچار (BS) سبب کاهش معنی-داری ( $p < 0.05$ ) در مقدار کروم (VI) ریشه گیاه شد (شکل ۳ الف). کاربرد تیمارهای S، B، BS و IB به ترتیب سبب کاهش مقدار کروم (VI) ریشه گیاه به میزان ۴۱/۶، ۲۹/۵، ۵۱/۷ و ۷۰/۵ درصد نسبت به تیمار شاهد شد. بر خلاف کروم (VI)، کروم (III) در تیمار IB بیشترین و در تیمار شاهد کمترین بود. اگرچه کاربرد همه

مقدار کروم (III) خاک در تیمار IB تفاوت معنی‌داری را با تیمار BS نشان نداد اگرچه حدود ۲/۵ واحد بیشتر بود. در حالی که در تیمار دارای باکتری (S) در مقایسه با بیوچار (B) مقدار کروم (III) حدود ۲ واحد کمتر بود. بنابراین، به نظر می‌رسد ترکیب باکتری با بیوچار در فرایند تبدیل کروم (VI) به (III) کارآمدتر از افزودن هر کدام از آنها به تنهایی در خاک بوده است و غیر متحرک کردن باکتری روی بیوچار کارایی کاهش کروم را بالاتر نیز برده است.

باکتری‌های کاهنده کروم (VI) نقش عمده‌ای در پالایش خاک‌های آلوده به کروم دارند. پذیرفته‌شده‌ترین مکانیسم حذف باکتریایی کروم (VI)، کاهش کروم (VI) توسط آنزیم‌های برون سلولی و کاهش درون سلولی آن شامل جذب زیستی، انتقال به درون سلول‌ها، کاهش سیتوزولی و انباشت کروم (III) می‌باشد (Karthik et al., 2017). با این حال بخش غیرمتحرک شده درون سلول معمولاً کمترین مقدار را دارا می‌باشد (Politi et al., 2009). به طور کلی، مکانیسم‌های حذف کروم (VI) توسط بیوچار شامل مجموعه‌ای از فرایندها مانند جذب الکترواستاتیک، جذب و کاهش توسط کمپلکس‌های آلی سطح بیوچار و کاهش توسط مواد آلی محلول حاصل از بیوچار می‌باشد (Choudhary et al., 2017). زمانی که باکتری به تنهایی به خاک آلوده افزوده می‌شود با محدودیت‌های قابل توجهی از جمله زنده‌مانی، تکثیر، محدودیت منابع غذایی، سازگاری اندک و رقابت با میکروارگانیسم‌های بومی مواجه است (Liu et al., 2018). در حالی که وقتی که از بیوچار برای غیرمتحرک کردن باکتری استفاده می‌شود مانند تیمار IB، بر

کروم (III) در این تیمارها بود که در بالا بحث شد (شکل ۲). به هر جهت، با توجه به مجموع محتوای هر دو گونه کروم در ریشه، کارایی تیمارهای ترکیبی بهتر نمایان می‌شود؛ جایی که ریشه در تیمار IB کمترین مجموع کروم را داشته است.

تیمارها سبب افزایش کروم (III) ریشه گیاه در مقایسه با تیمار شاهد اما تنها در تیمارهای کاربرد ترکیبی باکتری و بیوچار (BS و IB) محتوای کروم (III) در ریشه گیاه بیشتر از کروم (VI) بود. مهم‌ترین دلیل این امر افزایش تبدیل (کاهش) کروم (VI) به



شکل ۳. غلظت کروم شش (Cr(VI)) و سه (Cr(III)) ظرفیتی در ریشه (الف) و اندام هوایی (ب) گیاه. C: شاهد، S: باکتری *Shewanella sp.*، B: بیوچار جلبک، BS: بیوچار به همراه باکتری *Shewanella sp.* و IB: باکتری غیرمتحرک شده بر روی بیوچار. حروف متفاوت بزرگ و کوچک روی ستون‌ها نشان دهنده بودن تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

حالی که کاربرد باکتری همراه با بیوچار سبب ایجاد تفاوت معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) در مقدار کروم (III) اندام هوایی با تیمارهای بیوچار و باکتری به تنهایی شد.

همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، تجمع کروم (VI) در ریشه نسبت به اندام هوایی بیشتر می‌باشد. ریشه به عنوان اندام اولیه برای جذب مواد غذایی به طور مستقیم کروم را جذب می‌نماید و بنابراین به عنوان محل اصلی سمیت کروم در گیاهان عمل می‌کند (Srivastava et al., 2021) و جذب کروم توسط ریشه به نوع گیاه و گونه کروم وابسته است (Khalid et al., 2017). کاهش کروم (VI) به (III) در برخی گیاهان به عنوان مکانیسم سمیت‌زدایی شناخته می‌شود (Srivastava et al., 2021). تجمع مقدار بیشتری از کروم (VI) در ریشه‌ها ممکن است به غیرمتحرک شدن آن در واکنش‌های سلول‌های ریشه یا کاهش سریع آن به کروم (III) در سلول‌ها مرتبط باشد که در نتیجه سبب کاهش سمیت آن برای گیاه می‌شود (Choppala et al., 2012). بیشتر بودن مقدار کروم (VI) در ریشه نسبت به اندام هوایی در

کاهش مقدار کروم (VI) در اندام هوایی گیاه در همه تیمارها نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۳ ب). به طوری که بیشترین مقدار کروم (VI) اندام هوایی گیاه در تیمار شاهد و کمترین مقدار آن در تیمار IB مشاهده شد که اختلاف آماری معنی‌داری با سایر تیمارها نشان نداد. با وجود نبود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها، کاربرد باکتری همراه با بیوچار سبب کاهش مقدار کروم (VI) در اندام هوایی S، B، BS و IB سبب کاهش مقدار کروم (VI) اندام هوایی گیاه به ترتیب به مقدار ۶/۷۵٪ و ۲/۷۳٪، ۳/۵۶٪ و ۱/۶۱٪ درصد نسبت به تیمار شاهد شد. (Choppala et al., 2012) نیز گزارش کردند بیوچار ضایعات مرغی غلظت کروم در اندام هوایی و ریشه را به ترتیب ۵۷٪ و ۲۹٪ درصد در خاک تیمار شده با ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروم (VI) کاهش داد.

مقدار کروم (III) اندام هوایی در تیمار شاهد کمترین و در تیمار IB بیشترین مقدار را نشان داد. تفاوت معنی‌داری بین مقدار کروم (III) اندام هوایی در تیمار بیوچار و باکتری مشاهده نشد، در

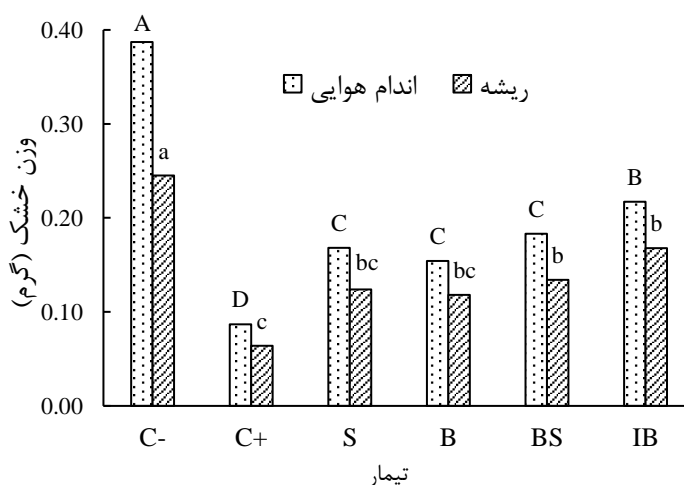


تیمار C+ نشان دادند. بین وزن خشک اندام هوایی گیاه در تیمار IB با سایر تیمارها تفاوت آماری معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) مشاهده شد. در حالی که وزن خشک اندام هوایی گیاه در تیمارهای S، B و BS اختلاف آماری معنی‌داری نشان نداد. تنش کروم سبب جلوگیری از تقسیم سلولی و رشد ریشه می‌شود. کاهش رشد ریشه و به دنبال آن کاهش جذب آب و مواد غذایی سبب کاهش رشد اندام هوایی می‌شود (Shanker et al., 2005). (Singh et al., 2021) نیز بیان کردند که کاهش طول ریشه در اثر تنش کروم می‌تواند به دلیل تجمع کروم در سلول‌های ریشه یا به دلیل آسیب به سلول‌های مریستم انتهایی ریشه باشد. در حالی که کاهش در ارتفاع طول اندام هوایی را به سبب آسیب ساختاری شدید در سلول‌های مزوفیل II برگ مرتبط دانستند که در نهایت سبب کاهش توسعه اندام هوایی می‌شود. (Sundaramoorthy et al., 2010) کاهش رشد ریشه را در زمین‌های زیر کشت برنج (*Oryza sativa* L.) که با ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کروم (VI) تیمار شده بودند گزارش کردند.

پژوهش‌های گذشته در مورد ماش (Banerjee et al., 2008)، گل کلم (Chatterjee and Chatterjee, 2000) و برنج (Zeng et al., 2010) گزارش شده است.

### وزن خشک گیاه

وزن خشک ریشه و اندام هوایی در تیمار شاهد منفی بیشترین و در تیمار شاهد مثبت کمترین بود (شکل ۴). اثرات سمی کروم (VI) بر فرایندهای فیزیولوژیک گیاهان مانند فتوسنتز، نگهداری آب و عناصر غذایی، جوانه‌زنی بذر، رشد گیاهچه، مقدار کلروفیل II و ... نشان داده شده است (Shanker et al., 2005). (Choppala et al., 2012) ارتباط منفی بین غلظت کروم و تولید زیست توده در گیاه آفتاب‌گردان را گزارش کردند که با نتایج این پژوهش هم‌سو است. اعمال تیمارها سبب افزایش وزن خشک ریشه و اندام هوایی نسبت به تیمار C+ شد. وزن خشک ریشه در تیمارهای B و S اختلاف آماری معنی‌داری با تیمار C+ و BS و IB نشان نداد. در حالی که تیمارهای BS و IB اختلاف معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) را با



شکل ۴. وزن خشک ریشه و اندام هوایی گیاه. C-: شاهد منفی، C+: شاهد مثبت، S: باکتری *Shewanella* sp.، B: بیوجار جلبک، BS: بیوجار به همراه باکتری *Shewanella* sp. و IB: باکتری غیرمتحرک شده بر روی بیوجار. حروف متفاوت بزرگ و کوچک روی ستون‌ها نشان دهنده بودن تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۵ درصد است.

(III) به مراتب بیشتر است (Singh et al., 2020). اعمال تیمارها که سبب کاهش کروم (VI) به (III) در خاک شده است، سبب کاهش جذب کروم (VI) توسط گیاه و به دنبال آن کاهش آسیب اکسیداتیو ناشی از تجمع کروم (VI) در گیاه شده است. بنابراین، وضعیت اکسیداسیون کروم یک عامل تعیین کننده بر اثرات سمی یا فیزیولوژیک آن می‌باشد.

### نسبت رشد، تجمع زیستی و فاکتور انتقال کروم

نسبت رشد گیاه به منظور ارزیابی میزان مقاومت گیاهان به تنش

سمیت کروم (VI) می‌تواند فعالیت‌های مختلف مورفولوژیک، فیزیولوژیک و متابولیک در گیاهان را مهار کرده و حتی ممکن است سبب از بین رفتن کامل آن‌ها شود (Srivastava et al., 2021). تجمع کروم در سطح سلولی سبب تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و ایجاد آسیب اکسیداتیو می‌شود (Patra et al., 2019). تشکیل ROS از طریق اختلال در سیستم دفاعی پرو-اکسیداتیو و آنتی‌اکسیدانت سبب آسیب اکسیداتیو می‌شود آسیب اکسیداتیو ناشی از سمیت کروم (VI) نسبت به سمیت کروم



رشد گیاه به نظر می‌رسد که در تیمار IB باوجود بالا بودن فاکتور انتقال نسبت به سایر تیمارها، سهم کروم (III) بیشتر است که سمیت کمتری را نیز ایجاد می‌کند. همچنین، مقادیر فاکتور انباشت کروم در ریشه و اندام هوایی گیاه نشان می‌دهد که کاربرد باکتری همراه بیوچار یا غیرمتحرک کردن باکتری بر روی بیوچار سبب کاهش معنی‌دار این فاکتورها نسبت به تیمار شاهد می‌شود که با یافته‌های مربوط به وزن خشک ریشه و اندام هوایی گیاه (شکل ۴) نیز مطابقت دارد. نتایج مشابهی در پژوهش (Chen et al., 2021) گزارش شده است.

فلزهای سنگین به کار برده می‌شود و کاهش نسبت آن تحت تنش کروم گزارش شده است (Buendia-Gonzalez et al., 2010). نسبت رشد گیاه در تیمارهای C+, S, B, SB و IB نسبت به تیمار C- به ترتیب ۲۳/۸، ۴۶/۲، ۴۳/۱، ۵۰/۲ و ۶۰/۹ درصد بود که نشان می‌دهد کاربرد تیمارها در کاهش تنش کروم در گیاه موثر بوده و نسبت رشد را افزایش داده است. به منظور ارزیابی تاثیر تیمارها بر انتقال و تجمع زیستی کروم، فاکتور انتقال و فاکتور انباشت کروم در ریشه و اندام هوایی گیاه محاسبه شد (جدول ۳). کاربرد تمامی تیمارها سبب کاهش فاکتور انتقال نسبت به تیمار شاهد شد ( $p < 0.05$ ). با توجه به نسبت

جدول ۳. تاثیر کاربرد تیمارها بر فاکتورهای انباشت و انتقال کروم

تیمار	نسبت رشد گیاه	فاکتور انباشت ریشه	فاکتور انباشت اندام هوایی	فاکتور انتقال
C+	۰/۲۴c	۰/۳۷a	۰/۲۹a	۰/۸۰a
S	۰/۴۶b	۰/۳۵a	۰/۱۴b	۰/۳۹b
B	۰/۴۳b	۰/۳۶a	۰/۱۵b	۰/۳۹b
BS	۰/۵ab	۰/۳۴ab	۰/۱۲b	۰/۳۶b
IB	۰/۶۱a	۰/۲۹b	۰/۱۲b	۰/۴۳b

C+: شاهد مثبت، S: باکتری *Shewanella sp.*، B: بیوچار جلبک، BS: بیوچار به همراه باکتری و IB: باکتری

غیرمتحرک شده بر روی بیوچار

(VI) بر رشد گیاه جو مورد بررسی قرار گرفت و نتایج با کاربرد بیوچار و باکتری به تنهایی یا همراه با هم مقایسه شد. غیرمتحرک کردن باکتری بر روی بیوچار تاثیر مثبتی بر کاهش کروم (VI) به کروم (III) در خاک داشت و سبب کاهش جذب کروم (VI) در اندام‌های گیاهی شد. همچنین نسبت رشد در تیمار دارای باکتری غیرمتحرک شده نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود. از طرفی کاربرد این تیمار سبب کاهش انباشت کروم در ریشه و اندام هوایی گیاه جو شد. بنابراین، به نظر می‌رسد غیرمتحرک کردن باکتری‌های کاهنده کروم بر روی انواع بیوچار بتواند به عنوان یک رویکرد امید بخش در پالایش خاک‌های آلوده به این فلز به کار برده شود.

### سیاس‌گذاری

نویسندگان از حمایت معنوی هسته پژوهشی تولید و فرآوری بذر گیاهان زراعی، باغی و دارویی مستقر در دانشگاه گیلان تشکر و قدردانی می‌نمایند.

فاکتور انباشت ریشه در تمامی تیمارها نسبت به فاکتور انباشت اندام هوایی بیشتر بود که با توجه به فرمول محاسبه فاکتور انباشت ریشه و همچنین کم تحرکی کروم در گیاه قابل توجیه است و سبب انباشت بیشتر کروم در ریشه می‌شود. بر اساس پژوهش‌های انجام شده نشان داده شده است که بیشترین تجمع کروم در ریشه در مقایسه با سایر بخش‌های گیاه اتفاق می‌افتد. (Zayed et al., 1998) گزارش کردند که تجمع کروم در ریشه نسبت به اندام هوایی گیاهان علفی به دلیل تشکیل ترکیب‌های نامحلول کروم در ریشه‌ها صد برابر بیشتر است. در گیاه *Iris pseudacorus* غلظت‌های بالای کروم در دیواره سلولی ریشه‌ها و همین‌طور در سیتوپلاسم و فضای بین سلولی ریزوم یافت شد (Caldelas et al., 2011).

### نتیجه‌گیری

در این پژوهش تاثیر غیرمتحرک کردن باکتری کاهنده کروم (VI) روی بیوچار جلبک به عنوان روشی جهت حذف اثرات سمی کروم

"هیچ‌گونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد"

### REFERENCES

- Alloway, B. J. (2013). Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability. 3 ed. Springer, Netherlands.
- Ancona, V., Campanale, C., Tumolo, M., De Paola, D., Ardito, C., Volpe, A. and Uricchio, V. F. (2020).

- Enhancement of chromium (VI) reduction in microcosms amended with lactate or yeast extract: A laboratory-scale study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17, 704.
- Aparicio, J. D., Lacalle, R. G., Artetxe, U., Urionabarrenetxea, E., Becerril, J. M. and Polti, M. A. (2021). Successful remediation of soils with mixed contamination of chromium and lindane: Integration of biological and physicochemical strategies. *Environmental Research*, 194, 110666.
- Ayele, A. and Godeto, Y. G. (2021). Bioremediation of chromium by microorganisms and its mechanisms related to functional groups. *Journal of Chemistry*, 7694157.
- Banerjee, A., Nayak, D., Chakraborty, D. and Lahiri, S. (2008). Uptake studies of environmentally hazardous Cr in Mung beans. *Environmental Pollution*, 151(2), 423-7.
- Bashir, M. S., Wang, X., Naveed, M., Mustafa, A., Ashraf, S., Samreen, T., Nadeem, S.M. and Jamil, M. (2021). Biochar mediated-alleviation of chromium stress and growth improvement of different maize cultivars in tannery polluted soils. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18, 4461.
- Bremner, J. M. and Mulvaney, C. S. (1982). Nitrogen-total. In: A. L. Page (Ed.), *Methods of Soil Analysis* (Part 2). (pp. 595-624). American Society of Agronomy, Madison: WI.
- Buendia-Gonzalez, L., Orozco-Villafuerte, J., Cruz-Sosa, F., Barrera-Diaz, C. E. and Vernon-Carter, E. J. (2010). *Prosopis laevigata* a potential chromium(VI) and cadmium(II) hyper accumulator desert plant. *Bioresource Technology*, 101, 5862-5867.
- Caldelas, C., Bort, J. and Febrero, A. (2011). Ultrastructure and subcellular distribution of Cr in *Iris pseudacorus* L. using TEM and X-ray microanalysis. *Cell Biology and Toxicology*, 28(1), 57-68.
- Chatterjee, J. and Chatterjee, C. (2000). Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. *Environmental Pollution*, 109, 69-74.
- Chen, W.H., Lin, B.J., Huang, M.Y. and Chang, J.S., (2015). Thermochemical conversion of microalgal biomass into biofuels: a review. *Bioresour. Technol*, 184, 314-327.
- Chen, Y., Wu, H., Sun, P., Liu, J., Qiao, S., Zhang, D. and Zhang, Z. (2021). Remediation of chromium-contaminated soil based on *Bacillus cereus* WHX-1 immobilized on biochar: Cr(VI) transformation and functional microbial enrichment. *Frontiers in Microbiology*, 12, 641913.
- Choppala, G. K., Bolan, N. S., Megharaj, M., Chen, Z. and Naidu, R. (2012). The influence of biochar and black carbon on reduction and bioavailability of chromate in soils. *Journal of Environmental Quality*, 41, 1175-1184.
- Choudhary, B., Paul, D., Singh, A., and Gupta, T. (2017). Removal of hexavalent chromium upon interaction with biochar under acidic conditions: mechanistic insights and application. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(20), 16786-16797.
- Clesceri, L. S., Greenberg, A. E. and Trussell, R.R. (1996). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington DC: APHA, AWWA and WPCF.
- Focardi, S., Pepi, M. and Focardi, E. S. (2013). Microbial reduction of hexavalent chromium as a mechanism of detoxification and possible bioremediation applications. *Biodegradation -Life of Science*, 321-347.
- Gee, G. W. and Bauder, J. W. (1986). Particle size analysis. In: A. Klute (Ed.), *Method of Soil Analysis* (Part 1). (pp. 383-411). American Society of Agronomy, Madison: WI.
- Hale, L., Luth, M., Kenney, R. and Crowley, D. (2014). Evaluation of pinewood biochar as a carrier of bacterial strain *Enterobacter cloacae* UW5 for soil inoculation. *Applied Soil Ecology*, 84, 192-199.
- Huang, J. H., Voegelin, A., Pombo, S. A., Lazzaro, A., Zeyer, J. and Kretzschmar, R. (2011). Influence of arsenate adsorption to ferrihydrite, goethite, and boehmite on the kinetics of arsenate reduction by *Shewanella putrefaciens* strain CN-32. *Environmental Science & Technology*, 45, 7701-7709.
- Imran, M., Khan, Z. U. H., Iqbal, M. M., Iqbal, J., Shah, N. S., Munawar, S., Ali, S., Murtaza, B., Naeem, M. A. and Rizwan, M. (2020). Effect of biochar modified with magnetite nanoparticles and HNO<sub>3</sub> for efficient removal of Cr(VI) from contaminated water: A batch and column scale study. *Environmental Pollution*, 261, 114231.
- Jiang, Y., Yang, F., Dai, M., Ali, I., Shen, X., Hou, X., Alhewairini, S. S., Peng, C. and Naz, I. (2022). Application of microbial immobilization technology for remediation of Cr(VI) contamination: A review. *Chemosphere*, 286, 131721.
- Karthik, C., Elangovan, N., Kumara, T. S., Govindharaju, S., Barathi, S., Oves, M. and Arulselvi, P. I. (2017). Characterization of multifarious plant growth promoting traits of rhizobacterial strain AR6 under Chromium (VI) stress. *Microbiological Research*, 204, 65-71.
- Khalid, S., Shahid, M., Niazi, N. K., Murtaza, B., Bibi, I. and Dumat, C. (2017). A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of Geochemical Exploration*, 182, 247-268.



- Knudsen, D., Peterson, G. A. and Pratt, P. F. (1982). Lithium, Sodium and potassium. In: A. L. Page et al. (Ed.) *Methods of Soil Analysis* (Part 2). (pp. 225-246). American Society of Agronomy, Madison: WI.
- Li, H., Dong, X., da Silva, E. B., de Oliveira, L. M., Chen, Y. and Ma, L.Q. (2017). Mechanisms of metal sorption by biochars: Biochar characteristics and modifications. *Chemosphere*, 178, 466-478.
- Liu, J., Pan, D., Wu, X., Chen, H., Cao, H., Li, Q. X. and Hua, R. (2018). Enhanced degradation of prometryn and other s-triazine herbicides in pure cultures and wastewater by polyvinyl alcohol-sodium alginate immobilized *Leucobacter* sp. JW-1. *Science of Total Environment*, 615, 78-86.
- Lu, H., Zhang, Y. Y., Huang, X., Wang, S. and Qiu, R. (2012). Relative distribution of Pb<sup>2+</sup> sorption mechanisms by sludge-derived biochar. *Water Resources*, 46, 854-862.
- Malekotti M. J. and Ghayibi M. N. (2000). Determining the critical level of effective nutrients in soil, plants and fruits in order to increase the quality and quantity performance of strategic products of the country. second edition. Agricultural Education Publication. (in Persian).
- Mandal, S., Sarkar, B., Bolan, N., Ok, Y. S. and Naidu, R. (2016). Enhancement of chromate reduction in soils by surface modified biochar. *Journal of Environmental Management*, 186, 277-284.
- Olsen, S. R., Cole, C. V., Watanabe, F. S. and Dean, L. A. (1954). *Estimation of Available Phosphorus in Soils by Extraction with Sodium Bicarbonate*. USDA Circular, (939): 1-19. Department of Agriculture: Washington D. C.
- Page, A. L., Miller, R. H. and Keeney, D. R. (1982). *Methods of Soil Analysis* (Part 2). American Society of Agronomy, Madison: WI
- Patra, D. K., Pradhan, C. and Patra, H. K. (2019). Chromium bioaccumulation, oxidative stress metabolism and oil content in lemon grass *Cymbopogon flexuosus* (Nees ex Steud.) W. Watson grown in chromium rich over burden soil of Sukinda chromite mine, India. *Chemosphere*, 218, 1082-1088.
- Polti, M. A., García, R. O., Amoroso, M. J. and Abate, C. M. (2009). Bioremediation of chromium (VI) contaminated soil by *Streptomyces* sp. MC1. *Journal of Basic Microbiology*, 49, 285-292.
- Qayyum, S., Khan, I., Meng, K., Zhao, Y. and Peng, C. (2020). A review on remediation technologies for heavy metals contaminated soil. *Central Asian Journal of Environmental Science and Technology Innovation*, 1(1), 21-29.
- Rajapaksha, A. U., Alam, Md. S., Chen, N. Alessi, D. S., Igalavithana, A. D., Tsang, D. C.W. and Oka, Y. S. (2018). Removal of hexavalent chromium in aqueous solutions using biochar: Chemical and spectroscopic investigations. *Science of the Total Environment*, 625, 1567-1573.
- Rajkovich, S., Enders, A., Hanley, K., Hyland, C., Zimmerman, A. R. and Lehmann, J. (2012). Corn growth and nitrogen nutrition after additions of biochars with varying properties to a temperate soil. *Biology and Fertility of Soils*, 48, 271-284.
- Schikora, A. and Schmidt, W. (2001). Iron stress-induced changes in root epidermal cell fate are regulated independently from physiological responses to low iron availability. *Plant Physiology*, 125, 1679-1687.
- Shanker, A. K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H. and Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environment International*, 31, 739-753.
- Sharma, S., Tiwari, S., Hasan, A., Saxena, V. and Pandey, L. M. (2018). Recent advances in conventional and contemporary methods for remediation of heavy metal-contaminated soils. *Biotechnology*, 8(4), 216.
- Shi, Y., Shan, R., Lu, L., Yuan, H., Jiang, H., Zhang, Y. and Chen, Y. (2020). High-efficiency removal of Cr(VI) by modified biochar derived from glue residue. *Journal of Cleaner Production*, 254, 119935.
- Sidhu, G. P. S., Singh, H. P., Batish, D. R. and Kohli, R. K. (2017). Tolerance and hyperaccumulation of cadmium by a wild, unpalatable herb *Coronopus didymus* (L.) Sm. (*Brassicaceae*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 135, 209-215.
- Singh, P., Itankar, N. and Patil, Y. (2020). Biomangement of hexavalent chromium: current trends and promising perspectives. *Journal of Environmental Management*, 279 (1), 111547.
- Srivastava, D., Tiwari, M., Dutta, P., Singh, P., Chawda, K., Kumari, M. and Chakrabarty, D. (2021). Chromium stress in plants: Toxicity, Tolerance and Phytoremediation. *Sustainability*, 13, 4629.
- Sun, D. Q., Lan, Y., Xu, E. G., Meng, J. and Chen, W. F. (2016). Biochar as a novel niche for culturing microbial communities in composting. *Waste Management*, 54, 93-100.
- Sundaramoorthy, P., Chidambaram, A., Ganesh, K. S., Unnikannan, P. and Baskaran, L. (2010). Chromium stress in paddy: (i) nutrient status of paddy under chromium stress; (ii) phytoremediation of chromium by aquatic and terrestrial weeds. *Comptes Rendus Biologies*, 333(8), 597-607.
- Walkley, A. and Black, I. A. (1934). An examination of digestion method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration. *Soil Science*, 37, 29-38.
- Wang, C. and Cui, Y. (2019). Recognition of a new Cr(VI)-reducing strain and study of the potential capacity for reduction of Cr(VI) of the strain. *BioMed Research International*, 5135017.

- Xu, X. Y., Huang, H., Zhang, Y., Xu, Z. B. and Cao, X. D. (2019). Biochar as both electron donor and electron shuttle for the reduction transformation of Cr(VI) during its sorption. *Environmental Pollution*, 244, 423–430.
- Xu, X., Cao, X., Zhao, L., Wang, H., Yu, H. and Gao, B. (2013). Removal of Cu, Zn, and Cd from aqueous solutions by the dairy manure-derived biochar. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 358–368.
- Xu, Y., Liu, J. Q., Cai, W. S., Feng, J. Y., Lu, Z. J. and Wang, H. Z. (2020). Dynamic processes in conjunction with microbial response to disclose the biochar effect on pentachlorophenol degradation under both aerobic and anaerobic conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 384, 121503.
- Yang, X. D., Wan, Y. S., Zheng, Y. L., He, F., Yu, Z. B., Huang, J., Wang, H. L., Ok, Y. S., Jiang, Y. S. and Gao, B. (2019). Surface functional groups of carbon-based adsorbents and their roles in the removal of heavy metals from aqueous solutions: A critical review. *Chemical Engineering Journal*, 366, 608-621.
- Yu, K. L., Lau, B. F., Show, P. L., Ong, H. C., Ling, T. C., Chen, W. H., Ng, N. P. and Chang, J. S. (2017). Recent developments on algal biochar production and characterization. *Bioresource Technology*, 246, 2–11.
- Zayed, A., Lytle, C. M., Qian, J. H. and Terry, N. (1998). Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops. *Planta*, 206, 293-299.
- Zeng, F., Ali, S., Qiu, B., Wu, F. and Zhang, G. (2010). Effects of chromium stress on the subcellular distribution and chemical form of Ca, Mg, Fe, and Zn in two rice genotypes. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 173, 135–148.
- Zhang, X., Lv, L., Qin, Y., Xu, M., Jia, X. and Chen, Z. (2018). Removal of aqueous Cr(VI) by a magnetic biochar derived from *Melia azedarach* wood. *Bioresource Technology*, 256, 1–10.
- Zhao, Y. and Han, G. (1994). Rapid spectrophotometric determination of chromium(III). *Talanta*, 41(8), 1247-1250.
- Zheng, C., Yang, Z., Si, M., Zhu, F., Yang, W., Zhao, F. and Shi, Y. (2020). Application of biochars in the remediation of chromium contamination: Fabrication, mechanisms, and interfering species. *Journal of Hazardous Materials*, 407, 124376.