



Publisher: Soil Science Society of Iran

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

Research Article

Study of *Serendipita indica* and *Sinorhizobium meliloti* on Concentration and Kinetics of Zinc Release in Alfalfa Rhizosphere Contaminated with Zinc Oxide Nanoparticles

Leila Tabande¹, Vahid Mohasseli^{2*}  and Sohrab Sadeghi³

1-Researcher, , Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Shiraz, Iran. ltabande@gmail.com

2-Assistant Professor, , Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Shiraz, Iran. v.mohasseli@areeo.ac.ir

3-Member of Scientific Board, respectively, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Shiraz, Iran. sadeghi0917@gmail.com

Article Info

Extended Abstract

Received: 2025-05-26**Accepted:** 2025-09-09**Keywords:**

Alfalfa, Kinetic equations, Microbial inoculation, Rhizosphere, Zinc oxide nanoparticles, Zinc release kinetics.

Corresponding author's email:

v.mohasseli@areeo.ac.ir

DOI:

10.22092/SBJ.2025.369537.279

Background and Objectives: The application of nano-fertilizers, such as zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs), is an emerging strategy to improve micronutrient efficiency in sustainable agriculture. However, the overuse of ZnO-NPs, particularly in calcareous soils with low zinc availability, risks soil contamination and subsequent toxicity to plants and soil biota. The bioavailability of zinc from these nanoparticles is governed by complex interactions within the rhizosphere, involving the soil matrix, plant roots, and plant growth-promoting microorganisms (PGPMs). While PGPMs like fungi and bacteria can alter metal bioavailability, their combined effects and the resulting release dynamics are not fully understood. Therefore, this study aimed to investigate the effect of inoculating the fungus *Serendipita indica* and the bacterium *Sinorhizobium meliloti*, both individually and in combination, on the release kinetics of zinc in the rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.) grown in soil contaminated with different levels of ZnO-NPs.

Materials and Methods: This study was conducted as a factorial experiment based on a completely randomized design with three replications on alfalfa (*Medicago sativa* L.) cv. Hamedani in a greenhouse. The soil used was a loamy-clay collected from the 0-30 cm layer of Chitgaran station in Shiraz, Iran, with a pH of 8.3, 0.71% organic matter, and 42.5% calcium carbonate equivalent. The soil was autoclaved at 121°C for 25 minutes before use. Treatments included three levels (0, 400, and 800 mg kg⁻¹ soil) of ZnO-NPs (average diameter of 10 nm, sourced from Pishgaman Nano Mavadd-e Iran Co.) and four levels of microbial inoculation (a non-inoculated control, *S. indica* alone, *S. meliloti* alone, and co-inoculation of the fungus and bacterium). Soils were incubated for three months at field capacity to allow for equilibration reactions. The *S. indica* inoculum was prepared by collecting spores from a 4-week-old culture, with the final concentration adjusted to 5×10⁵ spores mL⁻¹. The *S. meliloti* strain, selected for its high N-fixation and PGP traits (including possession of *nfe*, *putA*, and *acdS* genes), was cultured for 48 hours, and the inoculum was adjusted to 5×10⁷ cells mL⁻¹. In order to find the best model to describe the zinc release pattern, time-dependent release data were fitted to nine kinetic equations (zero-, first-, second-, third-order, parabolic diffusion,

power function, simplified Elovich, pseudo-first-order, and pseudo-second-order). For each experimental treatment, the best kinetic equation was selected based on the highest coefficient of determination (R^2) and the lowest standard error (SE). Zinc concentrations were measured using an atomic absorption spectrophotometer (Shimadzu AA 670). Statistical analysis was performed using SAS 9.1, and means were compared using the LSD test at $P \leq 0.05$.

Results: The results showed that co-inoculation of the fungus and bacterium at 400 and 800 mg Zn kg⁻¹ had the lowest rhizosphere pH value, resulting in a decrease of 15.25% and 6.81%, respectively, compared to the zero-Zn level. Also, at the 800 mg Zn kg⁻¹ level, inoculation with the fungus alone and co-inoculation with the bacterium were equally effective, showing the highest ability to release zinc from the rhizosphere soil; these treatments led to an increase of 27.79% and 26.42%, respectively, in the amount of cumulative zinc released compared to the uninoculated condition. The study of the zinc release pattern under the influence of different zinc levels and microbial inoculation showed that the process of zinc release in all treatments followed a two-stage kinetic process that starts with a fast release step and then reaches equilibrium after a slow step. In the initial rapid phase, zinc release corresponds to mobile forms with low bond energy, and in the second stage, to forms with less mobility. This was confirmed by the observation that approximately 68-76% of the total desorbed zinc was released within the first two hours of extraction. Analysis of the kinetic models showed that the pseudo-second-order ($R^2 > 0.995$) and power function ($R^2 > 0.94$) equations provided the best fit for the zinc release data in all experimental treatments, while the simplified Elovich equation was also suitable only at the control (zero Zn) level. The superiority of the pseudo-second-order model was further validated by the positive and significant correlation between its calculated equilibrium zinc concentration (q_e) and the plant-available zinc concentrations (extracted by DTPA in 2 hours), as well as the zinc concentrations in the root and shoot tissues of the alfalfa plants.

Conclusion: The present study demonstrated that microbial inoculation, particularly co-inoculation with *S. indica* and *S. meliloti*, is an effective strategy for acidifying the rhizosphere and increasing the release of zinc from soil contaminated with ZnO-NPs. The highest efficacy was observed at high contamination levels, where fungal inoculation (alone or combined) enhanced cumulative zinc release by approximately 27%. The kinetics of zinc release in the calcareous soil followed a two-stage process, dominated by an initial rapid release of weakly bound zinc forms. Among the nine models tested, the pseudo-second-order kinetic model proved to be the most robust descriptor of the zinc release process across all treatments, which was confirmed by its strong correlation with plant-available zinc. These findings highlight the potential of using synergistic microbial partnerships to manipulate the bioavailability of nanoparticle-derived contaminants in the rhizosphere and underscore the importance of kinetic modeling in predicting nutrient and contaminant release patterns in complex soil systems.

Cite this article: Tabande, L., Mohasseli, V., Sadeeghi, S., 2025. Study of *Serendipita indica* and *Sinorhizobium meliloti* on Concentration and Kinetics of Zinc Release in Alfalfa Rhizosphere Contaminated with Zinc Oxide Nanoparticles. *Journal of Soil Biology*, 13 (2), 127-146 .



DOI: 10.22092/SBJ.2025.369537.279

Publisher: Soil Science Society of Iran



مقاله پژوهشی

اثر قارچ *Serndipita indica* و باکتری *Sinorhizobium meliloti* بر غلظت و سینتیک رهاسازی

روی در فرا ریشه یونجه آلوده به نانو اکسید روی

لیلا تابنده^۱، وحید محصلی^{۲*} و سهراب صادقی^۳

- ۱- محقق مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران. ltabande@gmail.com
- ۲- استادیار آموزشی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران. v.mohasseli@areeo.ac.ir
- ۳- مربی آموزشی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران. sadeghi0917@gmail.com

دریافت: ۱۴۰۴/۳/۵ پذیرش: ۱۴۰۴/۶/۱۸

چکیده

در این تحقیق، در سطوح مختلف آلودگی به نانو اکسید روی، اثر تیمارهای میکروبی بر میزان آزادسازی روی در خاک‌های ریزوسفری تحت کشت یونجه، با استفاده از معادلات سینتیکی منتخب بررسی گردید. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بر روی گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.) در گلخانه اجراء گردید. تیمارها شامل سه سطح (۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم در کیلوگرم خاک) نانو اکسید روی و چهار سطح مایه‌زنی میکروبی (شاهد، قارچ *S. indica*، باکتری *S. meliloti* و تلقیح توأم قارچ و باکتری) در نظر گرفته شد. به منظور انتخاب بهترین مدل توصیف الگوی انتشار روی، از معادلات سینتیکی متعددی استفاده و برای هر یک از تیمارهای آزمایشی، مدل‌های مذکور برازش و بهترین معادله سینتیکی انتخاب گردید. نتایج نشان داد که تلقیح توأم قارچ و باکتری در سطح ۴۰۰ و در رتبه بعدی در سطح ۸۰۰ میلی گرم روی در کیلوگرم، کمترین مقدار pH را به خود اختصاص دادند که به ترتیب کاهشی برابر با ۱۵/۲۵ و ۶/۸۱ درصد را نسبت به سطح صفر روی نشان می‌دهد. همچنین در سطح ۸۰۰ میلی گرم روی در کیلوگرم، تلقیح انفرادی قارچ و توأم با باکتری با ارجحیت یکسان، بیشترین توانایی را در آزاد سازی روی خاک ریزوسفری نشان دادند بطوریکه به ترتیب منجر به افزایش ۲۷/۷۹ و ۲۶/۴۲ درصدی مقدار روی تجمعی آزاد شده نسبت به شرایط بدون تلقیح شدند. بررسی الگوی آزاد سازی روی تحت تأثیر سطوح مختلف روی و تلقیح میکروبی نشان داد که روند آزاد سازی روی در تیمارهای مختلف خاک ریزوسفری، یک فرآیند انتشار دو مرحله‌ای است. بررسی مقدار ضرایب تبیین و خطای استاندارد معادلات سینتیکی نشان داد که به ترتیب معادلات شبه مرتبه دوم و تابع توانی در کلیه تیمارهای آزمایشی و معادله الویج ساده شده تنها در سطح صفر روی، برآورد خوبی از آزاد سازی روی خاک ریزوسفری دارند.

واژه‌های کلیدی: آزادسازی روی، تلقیح میکروبی، ریزوسفر، معادلات سینتیک، نانو اکسید روی و یونجه.

مقدمه

فناوری نانو از طریق تولید کودهای نانو و افزایش کارایی مصرف عناصر کم مصرف برای گیاه، به عنوان راه کاری جدید در کشاورزی پایدار مطرح می باشد. ویژگی های مختلف نانوکودها مانند تحرک بالا در خاک به دلیل اندازه بسیار کوچک (کمتر از ۱۰۰ نانومتر) و حلالیت زیاد در آب، سبب افزایش کارایی و در نتیجه دسترسی بهتر گیاه به عناصر غذایی موجود در نانو کودها در خاک اطراف ریشه شده است (He et al., 2019; Khoshru et al., 2025). بطور مثال نانو اکسید روی (ZnO) از جمله منابع کودی تأمین کننده روی مورد نیاز گیاه در خاک های فقیر از نظر عنصر روی می باشد. با این حال، استفاده زیاد از این کودها در خاک هایی با قابلیت استفاده پایین روی مانند خاک های آهکی، سبب تجمع زیاد روی و در نتیجه آلودگی خاک شده که با تجمع مقادیر زیاد این عنصر بر سطح ریشه و ورود مقادیر زیاد آن به بافت های گیاهی، سبب بروز سمیت در گیاهان، انسان، دام و همچنین ریزجانداران مفید خاکزی شده است (Chai et al., 2015).

فرآیند پیچیده انتقال این قبیل فلزات سنگین از خاک به گیاه، متأثر از عوامل مختلفی مانند نوع، اندازه، تراکم و مدت زمان تماس نانو ذرات با خاک، نوع گیاه، خاک و ریزجانداران خاکزی می باشد که نقش موثری در رفتار این فلزات در خاک ریزوسفری به عهده داشته و در نهایت بر مقدار جذب آنها توسط گیاهان موثر می باشند (Bandyopadhyay et al., 2015). باکتری ها و قارچ های محرک رشد گیاه در محیط فرا ریشه (ریزوسفر)، از طریق بهبود رشد گیاهان در خاک های آلوده به فلزات سنگین و تولید زیست توده گیاهی بیشتر، سبب کاهش اثرات سمی این فلزات بر گیاه می شوند (Kidd et al., 2017). تحقیقات نشان داده است که اجزای سیستم همزیستی گیاه _ ریزجانداران خاکزی، نقش مهمی بر مقدار قابلیت جذب عناصر سنگین موجود در خاک توسط گیاه دارند. بدین صورت که گیاهان از طریق ترشحات ریشه ای خود و تغییر pH خاک در ناحیه فرا ریشه و ریزجانداران ریزوسفری به

خصوص انواع دارای خاصیت تحریک کنندگی رشد ریشه، از طریق آزادسازی مواد مختلف در منطقه ریزوسفر و تأثیر بر رشد و مورفولوژی ریشه، در این فرآیند مؤثر می باشند (Motaghian and Hosseinpur, 2013). لذا، مطالعه سینتیک آزادسازی فلزات سنگین در منطقه ریزوسفر که متأثر از فعالیت سیستم ریشه ای گیاه و ریزجانداران ریزوسفری می باشد، در بررسی مقدار جذب این فلزات توسط گیاه از اهمیت بسزایی برخوردار است.

یونجه (*Medicago sativa* L.) یک گیاه لگوم چند ساله با ریشه های عمیق بوده که به طور گسترده در جهان رشد می نماید و عمدتاً توانایی بالایی در رشد و جذب فلزات سنگین دارا می باشد. یکی از عوامل کارایی مؤثر این گیاه در همزیستی آن با ریزوبیوم است (Peralta-Videa et al., 2004). ریزجانداران مفید خاکزی شامل قارچ ها و باکتری های محرک رشد گیاه با تأثیر بر بیوشیمی ریزوسفر و اثر بر فرآیندهای فیزیولوژیک و مولکولی گیاهان، بر جذب عناصر مختلف از جمله عناصر فلزی سمی توسط گیاهان میزبان، اثر می گذارند (Vimal et al., 2017). ریزوبیوم ها از مهم ترین جنس های باکتری های محرک رشد گیاهی موجود در منطقه فرا ریشه می باشند که از طریق برقراری رابطه همزیستی با گیاهان خانواده لگوم و تثبیت زیستی نیتروژن اتمسفری، در بهبود شرایط حاصلخیزی خاک نقش مهمی بر عهده دارند (Fagorzi et al., 2018). علاوه بر این، قارچ اندوفیت *Serndipita indica* به عنوان یکی از مهم ترین قارچ های محرک رشد گیاه نقش مهمی در توسعه سیستم ریشه ای گیاه و جذب عناصر مختلف موجود در خاک نشان داده است (Sepehri and Khatabi, 2021). در تحقیقات پیشین گزارش هایی از همزیستی مؤثر بین لگوم و ریزوبیوم به عنوان یک روش جدید و مؤثر در بکارگیری فعل و انفعالات گیاه و میکروب برای تثبیت گیاهان انجام گرفته است (Hao et al., 2014; Safari Sinegani and Karami, 2025). ولی باید در نظر گرفته شود که استفاده ترکیبی از ریزوبیوم با سایر باکتری ها و قارچ های محرک رشد گیاه، می تواند اثرات

الکترونی عبوری (EM208S - فیلیپین) و پراش پرتو ایکس (EQUINOX 3000- فرانسه)، میانگین قطری ۱۰ نانومتر داشته که از شرکت پیشگامان نانو مواد ایران واقع در شهرستان مشهد تهیه گردید. خاک‌ها به مدت ۳ ماه در دمای اتاق و با آب مقطر در حد رطوبت ظرفیت زراعی، جهت تکمیل واکنش بین روی و خاک نگهداری شدند. کشت خالص قارچ *Serendipita indica* از محیط کشت کمپلکس استفاده شد و از آنجا که برای تهیه مایه تلقیح قارچ جهت کلنیزاسیون ریشه یونجه نیاز به تعدادی کافی اسپور بود، لذا از تعداد زیادی پتری دیش محتوی محیط کشت کمپلکس استفاده شد. جدایه قارچ مذکور در این محیط کشت و به مدت ۴ هفته در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس جهت تکثیر قارچ و تولید کافی اسپور نگهداری شد. سپس، با محلول آب-توئین ۲۰، یک درصد اسپورهای قارچی هر پتری را جمع‌آوری و پس از انجام مراحل شست و شو و سانتیفریوژ طی سه مرتبه، تعداد اسپورها در مایه تلقیح با لام ثوبار شمارش شد و در حدود 5×10^5 اسپور در هر میلی‌لیتر محلول آب توئین ۲۰ درصد تنظیم شد (Ghabooli et al., 2013). پس از آماده‌سازی بذرهای جوانه زده، جهت اعمال تیمار قارچ، بذرهای محلول سوسپانسیون اسپور قارچ (5×10^7 اسپور در هر میلی‌لیتر) به مدت سه ساعت و با ۷۵ دور در دقیقه، بطور آرام تکان داده شده تا بذرهای جوانه زده کاملاً تلقیح یابند. جهت ایجاد شرایط یکنواخت، به ریزوباکس‌های شاهد (غیر تلقیحی)، مقدار مساوی محیط باکتریایی و قارچی استریل اضافه شد. سپس ۴ عدد بذر جوانه زده تلقیحی با قارچ و بدون تلقیح به ریزوباکس‌های مربوطه منتقل شدند. همچنین جهت تلقیح باکتری، یک میلی‌لیتر از محیط کشت باکتریایی مربوط به ۴۸ ساعت قبل (5×10^7 سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت مایع) به خاک اطراف ۴ عدد بذر جوانه زده اضافه شد. همچنین برای تلقیح توأم قارچ و باکتری، پس از گذشت سه روز و اطمینان از نفوذ اسپورهای قارچ به درون ریشه، اعمال تیمار باکتری (5×10^7 سلول

هم‌افزایی بر بهبود عملکرد گیاه داشته باشد (Dary et al., 2025; Ansari et al., 2010). همچنین ممکن است بدلیل رقابت بین مایه تلقیح‌ها و جمعیت بومی، اثر تقویتی بر رشد گیاه را کاهش دهد. بنابراین چالش چگونگی ترکیب مایه تلقیحی از ریزوبیوم با سایر ریزجانداران محرک رشد گیاه، باید به نحوی باشد که بدون ایجاد مشکلات زیست محیطی دیگر، منجر به حداکثر کارایی گردد (Hao et al., 2014). بنابراین، لازم است که در سطوح مختلف آلودگی به نانو اکسید روی، با استفاده از معادلات سینتیکی منتخب (بیشترین ضریب تبیین و کمترین خطای استاندارد) به بررسی اثر تیمارهای میکروبی بر میزان آزادسازی روی در خاک‌های ریزوسفری تحت کشت یونجه، توجه ویژه‌ای صورت پذیرد.

مواد و روش‌ها

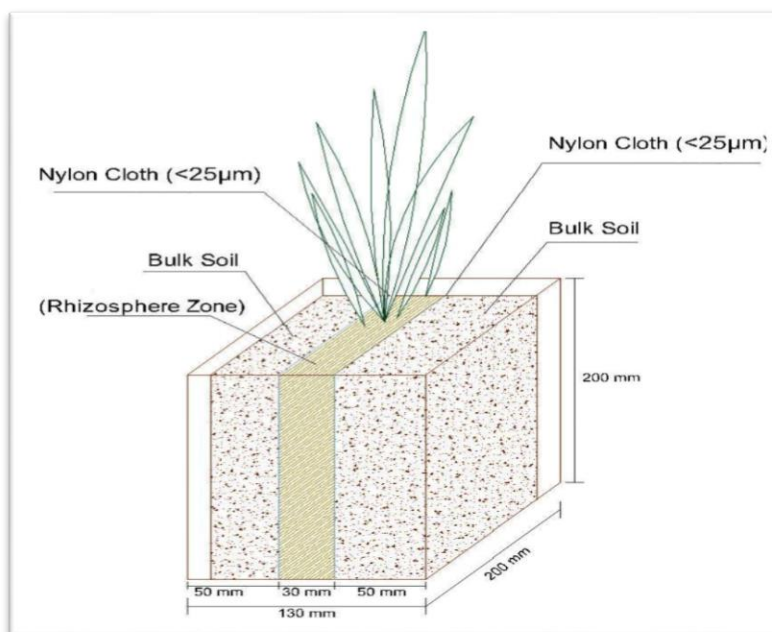
نمونه خاک از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری لایه سطحی خاک مزارع ایستگاه چیتگران در منطقه باجگاه شیراز جمع‌آوری و پس از هوا خشک و عبور از الک ۲ میلی‌متری، غلظت روی قابل استخراج با عصاره‌گیر $DTPA^1$ که به مدت ۲ ساعت شیک گردید برابر با ۰/۹۸ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک (Lindsay and Norvell, 1978)، pH ۸/۳ (Peech, 1965)، قابلیت هدایت الکتریکی ۰/۳۵ دسی‌زیمنس بر متر، ماده آلی ۰/۷۱ درصد (Walkley and Black, 1934)، کربنات کلسیم معادل ۴۲/۵ درصد (Allison and Moodie, 1965)، فسفر قابل استخراج با بی‌کربنات سدیم ۸/۸ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک (Olsen et al., 1954) و بافت خاک از نوع لوم رسی (Bouyoucos, 1962) اندازه‌گیری شد. جهت حذف هر گونه جمعیت میکروبی، خاک‌ها در اتوکلاو به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس استریل شدند (Farzaneh et al., 2009). قبل از کشت، تلقیح میکروبی و سطوح مختلف روی از منبع نانو اکسید به خاک‌ها اضافه گردید. نانو ذرات اکسید روی در زیر میکروسکوپ

¹ Diethylenetriaminepentaacetic acid

بطور پیوسته با شیکر هوادهی شدند. پس از رشد کامل باکتری‌ها در محیط کشت، جمعیت آن‌ها در حدود 5×10^7 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر محیط کشت تنظیم شد (Saleem et al., 2017).

تحقیق فوق به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز اجراء گردید. تیمارها شامل سه سطح (۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) نانوآکسید روی و چهار سطح مایه‌زنی میکروبی (شاهد، قارچ *S. indica*، باکتری *S. meliloti* و تلقیح توأم قارچ و باکتری) در نظر گرفته شد. آزمایش در ۳۶ ریزوباکس با ابعاد $200 \times 130 \times 200$ میلی‌متر بر اساس طرح یوسف و چینو (۱۹۸۹) با تغییرات جزئی انجام گردید (شکل ۱). ریزوباکس‌ها با استفاده از نایلون با قطر منافذ کمتر از ۲۵ میکرومتر به ۳ قسمت تقسیم گردید که در قسمت مرکزی با ۳۰ میلی‌متر پهنا، به کشت یونجه اختصاص داده و بصورت یکنواخت با ۳ کیلوگرم خاک (تیمار شده و نشده با نانوآکسید روی) پر شدند.

در هر میلی‌لیتر محیط کشت مایع) انجام گرفت. بدین صورت که ریشه گیاهچه را از بستر خاک خارج نموده و یک میلی‌لیتر از مایه تلقیح به آنها تزریق شد. در شرایط گلخانه، کلیه ریزوباکس‌ها به مدت ۹ هفته، رطوبت آنها با آب مقطر در حد ظرفیت زراعی نگهداری شدند. پس از گذشت یک هفته از کاشت، نمونه برداری از ریشه گیاهان تلقیح شده با قارچ جهت اطمینان از برقراری همزیستی و تعیین میزان کلنیزاسیون ریشه صورت گرفت. جدایه باکتری در بین سویه‌های برتر *S. meliloti* که قبلاً بر اساس توانایی تولید آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلات (ACC^+) دی‌آمین‌از، اسید ایندول-۳-استیک اسید (IAA)، تثبیت نیتروژن و تولید سیدروفور غربال شده بودند، انتخاب گردید، بطوریکه سویه انتخاب شده دارای ژن‌های *nfe*، *acdS*، *putA* در گره بندی و تثبیت زیستی نیتروژن بود (Sepehri and Khatabi, 2021). برای تهیه مایه تلقیح باکتری، یک لوپ از باکتری رشد یافته در محیط جامد با رعایت شرایط کامل استریل به محیط کشت منتقل و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه



شکل ۱- شماتیک ریزوباکس

Figure 1- Rhizobox schematic

گیری با DTPA تفکیک شد. جهت بررسی رفتار رها سازی روی در خاک ریزوسفری، ۱۰ گرم از هر نمونه خاک ریزوسفری (تیمار شده با سطوح مختلف روی و تلقیح میکروبی) در سه تکرار با استفاده از ۲۰ میلی‌لیتر عصاره‌گیر DTPA در دوره‌های زمانی ۰/۰۸، ۰/۲۵، ۰/۵، ۲، ۴، ۱۶ و ۳۲ ساعت در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس توسط شیکر (Lindsay and Norvell, 1978). در پایان هر دوره زمانی، خاک تعلیق شده به مدت ۱۵ دقیقه سانتیفریوژ شده و پس از عبور از کاغذ صافی واتمن ۴۲، غلظت روی در محلول جمع‌آوری و با دستگاه جذب اتمی (Kyoto, 670 Shimadzu AA Japan) اندازه‌گیری شد. برای تفسیر داده‌ها و به منظور پیدا کردن بهترین مدل توصیف الگوی انتشار روی، از معادلات سینتیکی متعددی از قبیل معادله مرتبه صفر، اول، دوم، سوم، تابع توانی، پخشیدگی پارابولیکی، الویج ساده شده، شبه مرتبه اول و دوم استفاده گردید (جدول ۱). برای هر یک از تیمارهای آزمایشی، مدل‌های مذکور برازش و بهترین معادله سینتیکی با بیشترین ضریب تبیین و کمترین خطای استاندارد انتخاب و سپس اثر هر یک از تیمارهای اعمال شده بر الگوی انتشار روی بررسی گردید (Chien and Clayton, 1980).

پس از آماده‌سازی بذره‌های جوانه زده یونجه (*Medicago sativa* L.) رقم همدانی، جهت اعمال تیمار قارچ، بذرها در محلول سوسپانسیون اسپور قارچ ($10^7 \times$ ۵ اسپور در هر میلی‌لیتر) به مدت سه ساعت و با ۷۵ دور در دقیقه، بطور آرام تکان داده شده تا بذره‌های جوانه زده کاملاً تلقیح یابند و به منظور تلقیح باکتری، یک میلی‌لیتر از محیط کشت باکتریایی مربوط به ۴۸ ساعت قبل ($10^7 \times 5$ سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت مایع) به خاک اطراف بذره‌های جوانه زده اضافه شد. همچنین برای تلقیح توأم قارچ و باکتری، پس از گذشت سه روز و اطمینان از نفوذ اسپورهای قارچ به درون ریشه، اعمال تیمار باکتری ($10^7 \times 5$ اسپور در هر میلی‌لیتر) انجام گرفت. لازم به ذکر است، جهت ایجاد شرایط یکنواخت، به ریزوباکس‌های شاهد (غیر تلقیحی)، مقدار مساوی محیط باکتریایی و قارچی استریل اضافه شد. در شرایط گلخانه، کلیه ریزوباکس‌ها به مدت نه هفته، رطوبت آنها با آب مقطر در حد ظرفیت زراعی نگهداری شدند. ۱۴ روز پس از کاشت، نمونه برداری از ریشه گیاهان تلقیح شده با قارچ جهت اطمینان از برقراری همزیستی و تعیین میزان کلنیزاسیون ریشه صورت گرفت (Dickson and Smith, 1998). پس از پایان رشد رویشی گیاه (۹ هفته)، خاک ریزوسفری از خاک توده به منظور اندازه‌گیری pH و مقدار روی قابل عصاره

جدول ۱- انواع مختلف معادلات سینتیکی

Table 1- Different types of kinetic equations

معادله سینتیکی Kinetic models	معادله Equation	ضرایب معادلات Equation coefficients
مرتبه صفر (Martin and Sparks, 1983)	$q_t = q_0^* + k_0 t$	k_0 ثابت معادله مرتبه صفر ($\text{mg Zn Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
مرتبه اول (Martin and Sparks, 1983)	$\ln q_t = \ln q_0 + k_1 t$	k_1 ثابت معادله مرتبه اول (h^{-1})
مرتبه دوم (Martin and Sparks, 1983)	$1/q_t = 1/q_0 - k_2 t$	k_2 ثابت معادله مرتبه دوم ($\text{mg Zn Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
مرتبه سوم (Martin and Sparks, 1983)	$1/q_t^2 = 1/q_0^2 - k_3 t$	k_3 ثابت معادله مرتبه سوم ($\text{mg Zn Kg}^{-1} \text{ h}^{-2}$)
مضاعف پخشیدگی (Havlin et al., 1985)	$q_t = q_0 + k_p t^{0.5}$	k_p ثابت سرعت پخشیدگی روی ($\text{mg Zn Kg}^{-1} \text{ h}^{-0.5}$)
تابع توانی (Havlin et al., 1985)	$q_t = a t^b$	a ثابت سرعت آزادسازی اولیه روی ($\text{mg Zn Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) b ضریب سرعت آزادسازی (mg Zn Kg^{-1})
الویج ساده شده (Havlin et al., 1985)	$q_t = a_e + 1/\beta \ln t$	$1/\beta$ ضریب سرعت آزادسازی روی ($\text{mg Zn Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) a_e ثابت سرعت آزادسازی اولیه روی (mg Zn Kg^{-1})
شبه مرتبه اول (Chen and Li, 2010)	$\log (q_e^* - q_t) = \log q_0 - (k_1/2.303) t$	k_1 ثابت سرعت معادله شبه مرتبه اول (h^{-1})
شبه مرتبه دوم (Chen and Li, 2010)	$(t/q_t) = (1/k_2 q_{e2}) + t/q_e$	k_2 ثابت سرعت معادله شبه مرتبه دوم ($\text{mg Zn Kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$)

q_t : مقدار روی آزاد شده از خاک با عصاره‌گیر DTPA (mg Zn Kg^{-1}) در مدت زمان t

q_0 : مقدار روی آزاد شده از خاک با عصاره‌گیر DTPA (mg Zn Kg^{-1}) در مدت زمان $t=0$

q_e : مقدار تجمعی روی آزاد سازی شده در مدت زمان t

q_t : Amount of zinc released from soil with DTPA extractant (mg Zn Kg^{-1}) at time t

q_0 : Amount of zinc released from soil with DTPA extractant (mg Zn Kg^{-1}) at time $t=0$

q_e : Cumulative amount of zinc released at time t

ضمناً خطای استاندارد از رابطه زیر (معادله ۱) محاسبه شد که در این معادله Zn و Zn^* به ترتیب مقدار اندازه‌گیری شده و برآورد شده روی در زمان t و n تعداد مشاهدات است (Steel and Torrie, 1960). همچنین، در معادلات سینتیکی شبه مرتبه اول و دوم، علاوه بر ضریب تبیین (R^2)، مربع کای (χ^2) طبق رابطه زیر (معادله ۲) محاسبه شد که در این معادله $qe.exp$ و $qe.cal$ به ترتیب مقدار روی آزاد

شده از طریق اندازه‌گیری و برازش داده شده با داده‌های آزمایشگاهی است و بهترین معادله در توصیف رهاسازی روی، با بیشترین ضریب تبیین و کمترین مربع کای انتخاب شدند. در پایان، تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد از نظر آماری انجام شد.

$$SE = \left[\sum (Zn - Zn^*)^2 / n - 2 \right]^{0.5} \quad \text{رابطه (۱)}$$

$$\chi^2 = \sum \frac{(qe.exp - qe.cal)^2}{qe.cal} \quad \text{رابطه (۲)}$$

نتایج و بحث

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر آلودگی به نانو اکسید روی، تلقیح میکروبی و اثر متقابل

آنها بر pH و مقدار روی تجمعی آزاد شده از خاک ریزوسفری، در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر آلودگی روی و تلقیح میکروبی بر pH و مقدار روی تجمعی آزاد شده از خاک ریزوسفری تحت کشت یونجه
Table 2- Analysis of variance of the effect of zinc contamination and microbial inoculation on pH and the amount of cumulative zinc released from rhizosphere soil under alfalfa cultivation

Mean squares					متغیرها Variables
Sources of changes					
ضریب تغییرات Coefficient of variation	خطا Error	آلودگی روی*تلقیح میکروبی Zn contamination*Microbial inoculation	تلقیح میکروبی Microbial inoculation	آلودگی روی Zn contamination	
0.6	0.0023	0.04**	0.17**	0.3**	pH
2.1	23.7	2874.6**	7485.6**	670249**	روی تجمعی آزاد شده Released accumulative Zn

** نشان دهنده معنی‌دار بودن اثر عوامل آزمایشی در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد

** Indicates that the effect of the experimental factors is significant at the 1% probability level

براساس نتایج مقایسه میانگین داده‌ها، علیرغم تفاوت غیر معنی‌دار بین مقادیر pH خاک گیاهان تلقیحی و غیرتلقیحی در سطح صفر روی، از بین تیمارهای میکروبی، تلقیح توأم قارچ و باکتری در سطح ۴۰۰ و در رتبه بعدی در سطح ۸۰۰ میلی گرم روی در کیلوگرم، کمترین مقدار pH را به خود اختصاص دادند که به ترتیب کاهشی برابر با ۱۵/۲۵

و ۶/۸۱ درصد را نسبت به سطح صفر روی نشان می‌دهد (جدول ۳). با توجه به میانگین داده‌ها بیشترین اثر در کاهش pH خاک ریزوسفری به ترتیب مربوط به تلقیح توأم قارچ و باکتری، قارچ و باکتری بدست آمد. همچنین پایین‌ترین میزان pH خاک در سطح مصرفی ۴۰۰ میلی گرم در کیلوگرم مشاهده گردید.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات اصلی و متقابل سطوح مختلف نانو اکسید روی و تلقیح میکروبی بر pH خاک ریزوسفری
Table 3 - Comparison of the average main and interaction effects of different levels of nano zinc oxide and microbial inoculation on rhizosphere soil pH

pH					سطوح روی - نانو اکسید روی (میلی گرم در کیلوگرم) Zinc levels - nano zinc oxide (mg kg ⁻¹)
میانگین Average	قارچ و باکتری Fungi and bacteria	باکتری Bacteria	قارچ Fungi	شاهد Witness	
8.18 A	8.16 ab	8.19 ab	8.16 ab	8.22 a	0
7.82 B	7.08 f	8.10 bc	7.97 d	8.11 bc	400
7.87 B	7.64 e	8.06 c	7.66 e	8.12 bc	800
	7.63 C	8.15 A	7.93 B	8.15 A	میانگین Average

* اعداد دارای یک حرف مشترک کوچک یا بزرگ از لحاظ آماری با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد، فاقد اختلاف آماری معنی‌داری هستند.

* Numbers with a common lowercase or uppercase letter are statistically not statistically significant with Duncan's test at the 5% probability level.

اسیدی شدن خاک ریزوسفری با تلقیح این ریزجانداران محرک رشد گیاه شناخته شود (Hinsinger et al., 2003). مطالعات نشان داد که pH به عنوان یک عامل مهم، نقش موثری بر قابلیت دسترسی فلزات سنگین از جمله روی به عهده دارد (Pikuła and Stępień, 2007). علاوه بر این، محققان متعددی گزارش کردند که تلقیح ریزجانداران محرک رشد گیاه از قبیل قارچ میکوریزآربسکولار باعث کاهش pH خاک شده که می‌توان آن را معلول تولید اسیدهای آلی و سایر متابولیت‌های ثانویه ناشی از تلقیح میکروبی دانست. آنان نشان دادند که تغییرات pH خاک ریزوسفری مربوط به تعادل کاتیونی، جذب آنیونی و یا انتشار همزمان یون هیدروکسید و هیدروژن و همچنین انتشار اسیدهای آلی است (Sandilya et al., 2017).

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها در جدول شماره ۴ حاکی از آن است که تلقیح میکروبی در سطوح ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم روی در کیلوگرم منجر به افزایش معنی‌داری در میزان روی تجمعی آزاد شده از خاک ریزوسفری گردید. در سطح ۴۰۰ میلی‌گرم روی در کیلوگرم از میان تیمارهای میکروبی، تلقیح انفرادی باکتری و توأم با قارچ به ترتیب کمترین و بیشترین آزاد سازی روی را به خود اختصاص دادند اما در سطح ۸۰۰ میلی‌گرم روی در کیلوگرم، تلقیح انفرادی قارچ و توأم با باکتری با ارجحیت یکسان، بیشترین توانایی را در آزاد سازی روی خاک ریزوسفری نشان دادند بطوریکه به ترتیب منجر به افزایش ۲۷/۷۹ و ۲۶/۴۲ درصدی مقدار روی تجمعی آزاد شده نسبت به شرایط بدون تلقیح شدند و تحت این شرایط، تلقیح انفرادی باکتری تنها توانست

محققان متعددی نشان دادند که کاهش بیشتر pH خاک آلوده به کلرید روی و در رتبه بعدی نانو اکسید روی، احتمالاً به دلیل زیادی یون‌های روی در محلول خاک بوده که با آزاد شدن پروتون‌ها از سایت‌های جذبی خاک، به عنوان یک اسید لوئیس قوی عمل کرده و در نهایت منجر به کاهش pH خاک ریزوسفری می‌گردد (Garcia-Gomez et al., 2015). کاهش pH ناشی از تلقیح میکروبی و متعاقباً افزایش مقدار روی تجمعی آزاد شده از خاک ریزوسفری را می‌توان به ترشحات ریشه‌ای گیاه از قبیل آمینواسیدها و اسیدهای آلی نسبت داد که منجر به تحریک بیشتر ریزجانداران محرک رشد به سمت ریشه گیاه شده که نهایتاً منجر به تقویت برهمکنش فعل و انفعالات بین گیاه و میکروب در فضای ریزوسفری خاک می‌شود (Sasse et al., 2018). تحقیقات نشان داده است که قارچ *S.indica* بطورمستقیم با تولید ایندول-۳-استیک اسید، منجر به افزایش بایومس ریشه شده که با افزایش سطح ریشه گیاه برای ترشحات ریشه‌ای از قبیل اسیدهای آلی در منطقه ریزوسفری خاک، علاوه بر کاهش pH، گیاه را در برابر شرایط تنش‌زای محیطی محافظت می‌کند (Strehmel et al., 2016). از طرف دیگر، افزایش تولید اتیلن در ریشه گیاهان تلقیحی با قارچ *S.indica* به عنوان یک عامل موثر دیگر در کاهش pH خاک شناخته شده است (Khatabi et al., 2012). علاوه بر این، جذب بیشتر آمونیوم نسبت به نیترات بوسیله گیاهان با تلقیح توأم قارچ *S.indica* و باکتری *S.meliloti* منجر به افزایش سطح تثبیت بیولوژیکی نیتروژن شده که در نهایت می‌تواند به عنوان دلیلی دیگر بر

منجر به افزایش غیر معنی‌دار ۴/۴۹ درصدی مقدار روی آزاد شده از خاک شود.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثرات اصلی و متقابل سطوح مختلف نانو اکسید روی و تلقیح میکروبی بر مقدار روی تجمعی آزاد شده از خاک ریزوسفری (میلی گرم در کیلوگرم) بوسیله عصاره گیر DTPA در مدت ۳۲ ساعت

Table 4- Comparison of the average main and interaction effects of different levels of nano zinc oxide and microbial inoculation on the amount of cumulative zinc released from rhizosphere soil (mg kg^{-1}) by DTPA extractant over a period of 32 hours

Released accumulative Zn روی تجمعی آزاد شده				
Microbial inoculation تلقیح میکروبی				
میانگین	قارچ و باکتری	باکتری	قارچ	شاهد
Average	Fungi and bacteria	Bacteria	Fungi	Witness
87.2 C	99.2 h	95.2 h	88.2 i	66.2 j
250.5 B	279.3 d	217.4 g	268.4 e	236.9 f
475.3 A	524.0 a	433.1 b	529.7 a	414.5 c
300.8 A	248.6 B	295.4 A	239.2 B	Average میانگین

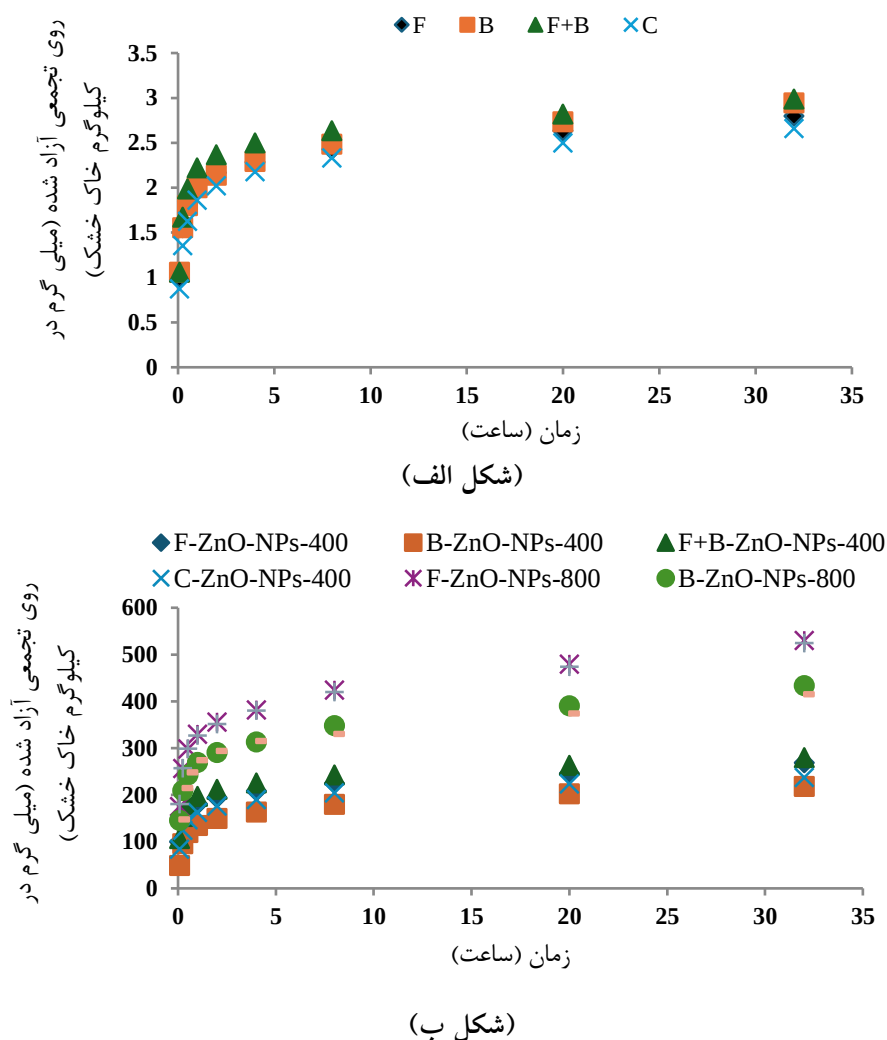
* اعداد دارای یک حرف مشترک کوچک یا بزرگ از لحاظ آماری با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد، فاقد اختلاف آماری معنی‌داری هستند.

* Numbers with a common lowercase or uppercase letter are statistically not statistically significant with Duncan's test at a probability level of 5%.

الگوی آزاد سازی روی توسط عصاره گیر

DTPA

بررسی الگوی آزاد سازی روی تحت تأثیر سطوح مختلف روی و تلقیح میکروبی در شکل ۲ (A و B) نشان داد که در تمام تیمارهای آزمایشی (تلقیح میکروبی و سطوح مختلف روی) الگوی رها سازی روی از روند مشابهی تبعیت می‌کند، بدین صورت که با یک شیب تند شروع و سپس با شیبی ملایم ادامه می‌یابد.



شکل ۲- الگوی آزاد شدن روی تحت تأثیر فعالیت میکروبی (قارچ=F، باکتری=B، قارچ+باکتری=F+B، استریل=C) در سطوح صفر (شکل الف)، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم روی در کیلوگرم

Figure 2- Zinc release pattern under the influence of microbial activity (fungus=F, bacteria=B, fungus+bacteria=F+B, sterile=C) at levels of zero (Figure A), 400 and 800 (Figure B) mg zinc kg⁻¹

معنی‌داری (۰/۹۹**) بین روی قابل استفاده گیاهی (آزاد شده در مدت ۲ ساعت) با مقدار روی آزاد شده در طی مدت زمان ۳۲ ساعت بدست آمد.

در جدول شماره ۵ نتایج مربوط به نسبت روی آزاد شده در مدت زمان ۲ به ۳۲ ساعت با عصاره‌گیر DTPA و تحت تیمارهای مختلف شامل تلقیح میکروبی (شاهد، قارچ، باکتری و قارچ + باکتری) و سطوح مختلف نانو اکسید روی (۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم روی در کیلوگرم) آورده شده است. طبق نتایج بدست آمده، در تمام تیمارهای آزمایشی، حدوداً ۶۸ الی ۷۶ درصد روی در همان مدت زمان ۲ ساعت اولیه آزاد شده است. بطوریکه همبستگی مثبت

جدول ۵- مقدار روی آزاد شده (میلی گرم در کیلوگرم) در ۲ و ۳۲ ساعت و نسبت آنها در تیمارهای آزمایشی (تلقیح میکروبی و سطوح مختلف روی)

Table 5- Amount of zinc released (mg kg^{-1}) at 2 and 32 hours and their ratio in experimental treatments (microbial inoculation and different levels of zinc)

سطوح مختلف نانو اکسید روی (میلی گرم در کیلوگرم خاک خشک) Different levels of nano zinc oxide (mg kg^{-1} dry soil)									تلقیح میکروبی
نسبت روی آزاد شده در ۲ به ۳۲ ساعت Ratio of Zn released in 2 to 32 hours			مقدار روی آزاد شده در ۳۲ ساعت Amount of Zn released in 32 hours			مقدار روی آزاد شده در ۲ ساعت Amount of Zn released in 2 hours			Microbial inoculation
800	400	0	800	400	0	800	400	0	
0.708	0.743	0.759	414.5	236.9	2.66	293.5	176.1	2.02	شاهد Witness
0.671	0.722	0.774	529.7	268.4	2.80	355.3	193.8	2.17	قارچ Fungi
0.670	0.687	0.726	433.1	217.4	2.95	290.0	149.4	2.14	باکتری Bacteria
0.671	0.757	0.792	524.0	279.3	2.99	351.4	211.5	2.37	قارچ و باکتری Fungi and bacteria
0.680	0.727	0.763							میانگین Average

(Reyhanitabar et al., 2010). بنابراین می توان چنین استنباط کرد که روی آزاد شده در ۲ ساعت اولیه، عمدتاً مربوط به شکل های قابل تبادل روی می باشد که با انرژی پیوندی ضعیف به مکان های جذبی متصل شده اند. همچنین، آزاد شدن کند عناصر بعد از مدت زمان ۲ ساعت، بیانگر آزاد شدن عناصر از مکان هایی با انرژی پیوند قوی تر و دیگر شکل های شیمیایی بوده که با شکل تبدلی ارتباط و همبستگی بالایی نشان داده اند (Kandpal et al., 2005).

برازش داده های حاصل از آزاد سازی روی بر

مدل های سینتیکی

جهت بررسی سینتیک رها سازی روی با استفاده از مدل های سینتیکی مختلف از قبیل معادلات مرتبه صفر، اول، دوم، سوم، پخشیدگی پارابولیک، تابع توانی، الویج ساده شده و شبه مرتبه اول و دوم، داده های مربوط به آزاد سازی روی در مدت زمان های ۳۲ – ۰/۰۸ ساعت در خاک ریزوسفری آلوده به تیمارهای مختلف آزمایشی (تلقیح میکروبی و سطوح نانو اکسید روی) برازش شد. ارزیابی مدل های مختلف سینتیکی با توجه به ضریب تبیین (R^2) و خطای استاندارد (SE) انجام و معادلاتی که بیشترین مقدار ضریب تبیین و کمترین خطای استاندارد برآورد شده را نشان دادند به عنوان بهترین مدل، جهت توصیف آزاد سازی

الگوی انتشار دو فازی در سایر مطالعات انجام شده در مورد فلزات سنگین مختلف در خاک و رسوبات نیز گزارش شده است (Taghipour and Jalali, 2016)؛ (Saffari et al., 2014). الگوی آزاد سازی روی در طی دو مرحله و یا در دو سطح با انرژی پیوندی متفاوت، با پژوهش های دیگر نیز منطبق است (Reyhanitabar et al., 2010). محققان روند دو مرحله ای آزاد سازی را در مورد عنصر منگنز مشاهده کردند. آنان بیان داشتند که آزاد سازی منگنز در ابتدا از خاکدانه های درشت و یا سطوح خارجی خاکدانه های ریز با سرعت بالا شروع می گردد اما با ادامه این فرآیند به دلیل آزاد شدن منگنز از سطوح داخلی خاکدانه های ریز و درشت، روند آزاد سازی این عنصر از خاک کند می گردد. آنان بیان کردند که علیرغم الگوی مشابه آزاد سازی عناصر، تنها در میزان و آهنگ آزاد سازی عناصر در تیمارهای مختلف موجب ایجاد تفاوت بین آنها می شود (Ghasemi-Fasaei et al., 2009). همانطور که قبلاً اشاره شد انتشار روی در تمام تیمارها از الگوی نسبتاً مشابهی پیروی می کند. چنین به نظر می رسد که در مرحله سریع اولیه، انتشار روی مربوط به شکل های متحرک با انرژی پیوند کم است. همچنین، روی آزاد شده در مرحله دوم، مربوط به شکل هایی با قابلیت تحرک کمتر است (Polettini et al., 2007). محققان نشان دادند که مکانیسم دو مرحله ای آزاد سازی (ابتدا سریع و در ادامه با آهنگ کندتر) به وجود مکان هایی با انرژی متفاوت مربوط می شود

روی در خاک ریزوسفری آلوده به تیمارهای مختلف آزمایشی انتخاب شدند (جدول ۶).

جدول ۶- میانگین و دامنه ضرایب تبیین (R^2) و خطای استاندارد (SE) معادلات سینتیکی تحت مطالعه
Table 6- Mean and range of coefficients of determination (R^2) and standard error (SE) of the kinetic equations under study

خطای استاندارد Standard error		ضرایب تبیین Coefficients of explanation		معادلات سینتیکی Kinetic equations
میانگین Average	دامنه Domain	میانگین Average	دامنه Domain	
45.51	32.8-95.8	0.66	0.52-0.74	مرتبه صفر Zero time
0.25	0.21-0.37	0.51	0.39-0.58	مرتبه اول First time
0.027	0.00065-0.217	0.37	0.25-0.44	مرتبه دوم Second time
0.038	0.000001-0.353	0.25	0.15-0.32	مرتبه سوم Third time
28.49	0.27-68.54	0.85	0.71-0.998	پخشیدگی پارابولیک Parabolic dispersion
8.35	0.072-14.50	0.98	0.95-0.994	الوویچ ساده شده Elovitch simplified
0.09	0.058-0.17	0.94	0.86-0.97	تابع توانی Power function
0.08	0.052-0.14	0.71	0.62-0.81	شبه مرتبه اول Pseudo-first time
0.075	0.0007-0.623	1.00	0.995-0.998	شبه مرتبه دوم Second- time pseudo

(تلقیح میکروبی و سطوح مختلف روی) را نشان دادند (جدول ۶). اما در خاک‌های ریزوسفری فاقد آلودگی روی (سطح صفر روی) و در شرایط تلقیح میکروبی علاوه بر معادلات سینتیکی مذکور (شبه مرتبه دوم و تابع توانی)، معادلات الوویچ ساده شده، توانست با توجه به ضرایب تبیین بالا و خطای استاندارد پایین، برآورد خوبی از آزاد سازی روی را نشان دهد (جدول ۷).

بررسی و مقایسه ضرایب تبیین و خطاهای استاندارد معادلات سینتیکی موجود در جدول ۶ نشان می‌دهد که در معادلات سینتیکی مرتبه‌ها با افزایش مرتبه واکنش از مرتبه صفر به مرتبه سوم، مقدار ضریب تبیین کاهش یافته است. ولیکن، معادلات شبه مرتبه دوم و پس از آن معادلات تابع توانی در مقایسه با سایر معادلات سینتیکی، بیشترین ضریب تبیین و کمترین خطای استاندارد را در خاک‌های ریزوسفری تحت تیمارهای مورد آزمایش

جدول ۷- ثابت‌های مدل‌های سینتیکی انتخابی در آزاد سازی روی خاک ریزوسفری با تلقیح انفرادی و توأم قارچ *S. indica* و باکتری *S. meliloti* در سطح صفر روی

Table 7- Constants of selected kinetic models in the release of zinc from rhizosphere soil with individual and combined inoculation of *S. indica* fungus and *S. meliloti* bacteria at zero zinc level

مدل الویچ ساده شده Simplified Elovitch model				مدل شبه مرتبه دوم Pseudo-second-time model					مدل تابع توانی Power function model				تلقیح
SE	R ²	1/a	a _e	χ ²	R ²	k	qe.cal	qe.exp	SE	R ²	b	a	میکروبی Microbial inoculation
0.096	0.975	0.281	1.75	0.0000082	0.998	0.687	2.79	2.66	0.119	0.90	0.166	1.65	شاهد Witness
0.120	0.960	0.272	1.90	0.000029	0.998	0.683	2.79	2.80	0.118	0.88	0.172	1.82	قارچ Fungi
0.072	0.987	0.291	1.92	0.000045	0.997	0.528	2.94	2.95	0.087	0.93	0.151	1.83	باکتری Bacteria
0.144	0.950	0.292	2.05	0.000025	0.999	0.707	2.98	2.99	0.127	0.86	0.148	1.96	قارچ و باکتری Fungi and bacteria

qe.exp, qe.cal, R², SE و χ² به ترتیب مقدار روی آزاد شده از طریق آزمایش، مقدار روی محاسبه شده از طریق معادله شبه مرتبه دوم، ضریب تبیین، خطای

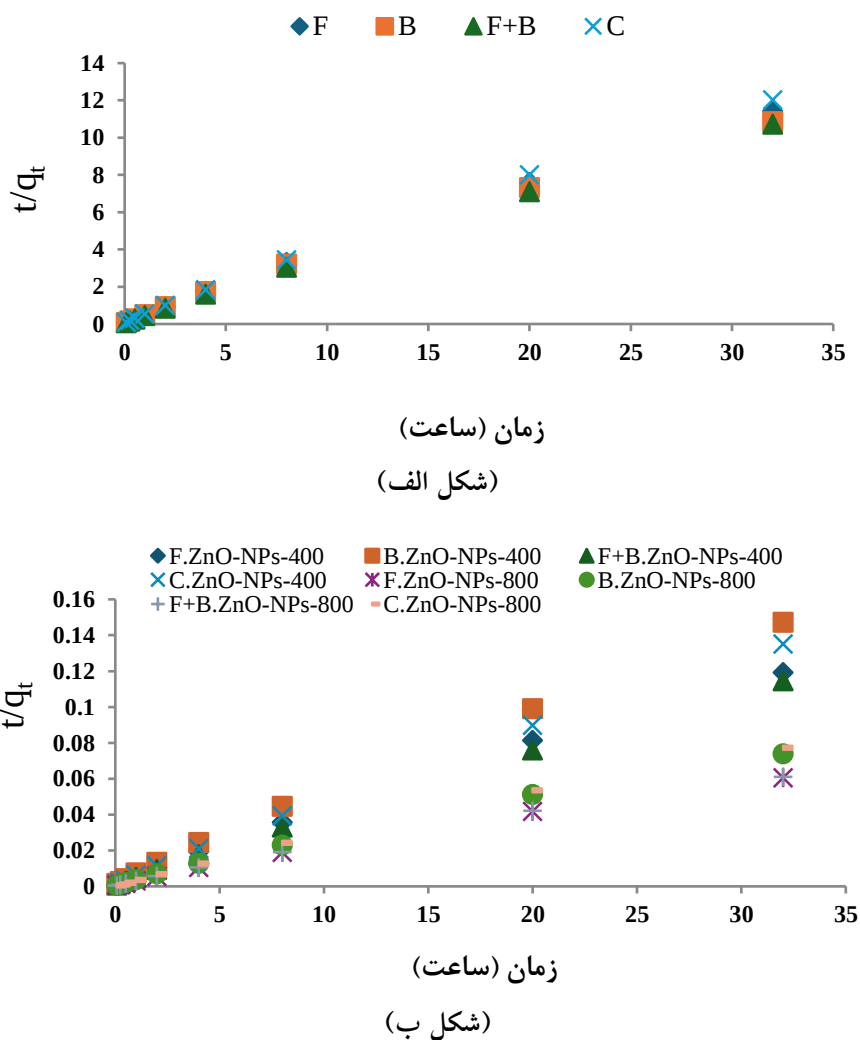
استاندارد و Statistic Chisquare

qe.exp, qe.cal, R², SE and χ² are the amount of zinc released through the experiment, the amount of zinc calculated through the pseudo-second-order equation, the coefficient of determination, the standard error and the Chisquare Statistic, respectively.

نسبت به سایر معادلات سینتیکی منتخب در کلیه تیمارهای آزمایشی بالاتر بود و نیز مقدار پایین χ² در مدل شبه مرتبه دوم نشان دهنده آن است که انتشار روی از این مدل سینتیکی تبعیت کرده و به عنوان بهترین مدل انتخاب می شود (جدول ۸). همبستگی مثبت معنی دار بین ثابت آزاد سازی روی معادله مذکور (qe) با غلظت‌های روی قابل استفاده گیاهی (عصاره‌گیری با DTPA در مدت زمان ۲ ساعت) می‌تواند از دلایل برتری این مدل نسبت به سایر معادلات سینتیکی، جهت توصیف الگوی انتشار یا آزاد سازی روی در خاک ریزوسفری باشد. این یافته با نتایج محققان دیگر در خاک‌های آهکی ایران کاملاً مطابقت دارد (Taghipour and Jalali, ; Zibaei et al., 2020). محققان، انطباق داده‌های آزاد سازی روی به مدل های الویچ ساده شده را بیانگر کنترل احتمالی آزاد سازی عناصر از خاک با پدیده پخشیدگی ناهمگن نسبت دادند (Reyhanitabar and Gilkes, 2010). پژوهشگران بهترین مدل‌های سینتیکی توصیف کننده آزاد سازی مس را در برخی خاک‌های آهکی ایران، تابع توانی و الویچ ساده (Reyhanitabar and Karimian, 2008). مطالعات دیگر نیز مدل‌های الویچ ساده شده، تابع توانی و پخشیدگی پارابولیک را مدل‌های مناسب جهت

همانطور که اشاره شد از بین معادلات سینتیکی تحت مطالعه، به دلیل بیشترین ضرایب تبیین و کمترین خطای استاندارد، معادلات شبه مرتبه دوم و تابع توانی در کلیه تیمارها (تلقیح میکروبی و سطوح مختلف روی) و معادله الویچ ساده شده تنها در سطح صفر روی، به عنوان بهترین معادلات جهت توصیف آزاد سازی روی انتخاب شدند. نتایج مربوط به ثابت‌های معادلات سینتیکی منتخب، در خاک‌های ریزوسفری تحت تیمارهای مختلف آزمایشی در جدول ۷ آورده شده است. ثابت‌های a و b در معادله تابع توانی، به ترتیب نشان دهنده ثابت آزاد سازی اولیه و ضریب آزاد سازی روی می‌باشند و در معادله الویچ ساده شده ثابت‌های ae و 1/a به ترتیب بیان کننده ثابت آهنگ آزاد سازی اولیه یا فوری و ثابت سرعت آزاد سازی روی می باشد. ثابت‌های k و qe.cal معادله شبه مرتبه دوم به ترتیب ثابت سرعت و مقدار تجمعی روی آزاد شده در مدت زمان مشخص می‌باشند که در تمام تیمارهای تحت آزمایش از طریق ارزیابی مقدار qt/t (نسبت زمان به مقدار روی آزاد شده در زمان‌های مختلف) در مقابل t (زمان) به دست می آیند (شکل ۳). نتایج نشان داد که مقدار روی بدست آمده در آزمایش (qe.exp) تفاوت چندانی با مقدار روی آزاد شده از معادله شبه مرتبه دوم (qe.cal) ندارد. علاوه بر این، ضریب تبیین (R²) برای معادله سینتیکی شبه مرتبه دوم

توصیف آزاد سازی منگنز در برخی خاک‌های آهکی ایران
 نشان دادند (Ghasemi-Fasaei et al., 2009).



شکل ۳- برازش داده‌های روی آزاد شده با مدل شبه مرتبه دوم در خاک ریزوسفری با تلقیح میکروبی (شاهد=C، قارچ=F، باکتری=B، قارچ و باکتری F+B) در سطوح صفر (شکل الف)، ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی گرم روی در کیلوگرم

Figure 3 - Fitting of released Zn data with pseudo-second-time model in rhizosphere soil with microbial inoculation (control=C, fungus=F, bacteria=B, fungus and bacteria F+B) at levels of zero (Figure A), 400 and 800 (Figure B) mg Zn kg⁻¹

جدول ۸- پارامترهای سینتیکی مدل‌های انتخابی در آزاد سازی روی خاک ریزوسفری با تلقیح انفرادی و توأم قارچ *S.indica* و باکتری *S.meliloti* در سطوح مختلف نانو اکسید روی

Table 8- Kinetic parameters of selected models in rhizosphere soil zinc release with individual and combined inoculation of *S. indica* fungus and *S. meliloti* bacteria at different levels of zinc oxide nanomaterials

Pseudo-second-time model					Power function model				
χ^2	R2	k	qe.cal	qe.exp	SE	R2	b	a	
Different levels of zinc									
۴۰۰ میلی گرم در کیلوگرم خاک 400 mg kg ⁻¹ soil									
تلقیح میکروبی									
Microbial inoculation									
0.006	0.998	0.0071	238.1	236.9	0.096	0.92	0.156	148.2	شاهد Witness
0.104	0.997	0.0058	263.2	268.4	0.080	0.94	0.148	167.2	قارچ Fungi
0.000	0.997	0.0057	217.4	217.4	0.169	0.88	0.214	116.5	باکتری Bacteria
0.008	0.998	0.0065	277.8	279.3	0.090	0.92	0.144	180.8	قارچ و باکتری Fungi and bacteria
۸۰۰ میلی گرم در کیلوگرم خاک 800 mg kg ⁻¹ soil									
0.011	0.995	0.0032	416.7	414.5	0.084	0.94	0.150	252.1	شاهد Witness
0.022	0.995	0.0023	526.3	529.7	0.076	0.96	0.165	306.3	قارچ Fungi
0.007	0.995	0.0026	438.8	433.1	0.070	0.96	0.163	251.0	باکتری Bacteria
0.010	0.995	0.0023	526.3	524.0	0.069	0.96	0.159	306.7	قارچ و باکتری Fungi and bacteria

qe.exp, qe.cal, R2, SE و χ^2 به ترتیب مقدار روی آزاد شده از طریق آزمایش، مقدار روی محاسبه شده از طریق معادله شبه مرتبه دوم، ضریب تبیین، خطای استاندارد و Statistic Chisquare

qe.exp, qe.cal, R2, SE and χ^2 are the amount of zinc released through the experiment, the amount of zinc calculated through the pseudo-second-order equation, the coefficient of determination, the standard error and the Chisquare Statistic, respectively

نتیجه گیری

پژوهش، دلیل همبستگی مثبت معنی دار بین مقدار روی آزاد شده در طی ۲ ساعت با ۳۲ ساعت را می توان به نگهداشت بخش عمده روی در مکان‌های جذب سطحی با انرژی پیوند ضعیف و یا متصل به فاز جامد با حلالیت بسیار بالا نسبت داد. بنابراین آزاد سازی سریع روی در مدت زمان ۲ ساعت اولیه و سپس ادامه روند کند رها سازی روی، دور از انتظار نیست. لذا به نظر می رسد که احتمالاً رها سازی روی از دو مکانیسم متفاوت تبعیت می کند. بررسی مقدار ضرایب تبیین و خطای استاندارد معادلات سینتیکی این پژوهش نشان داد که به ترتیب معادلات شبه مرتبه دوم و تابع توانی در کلیه تیمارهای آزمایشی و معادله الویچ ساده شده، تنها در سطح صفر روی، برآورد خوبی از آزاد سازی روی خاک ریزوسفری دارد.

در بررسی اثر تیمارهای میکروبی، تلقیح انفرادی باکتری در کلیه سطوح مختلف روی همانند شرایط بدون تلقیح (شاهد)، تأثیر چندانی بر مقدار pH خاک ریزوسفری نشان نداد ولیکن کاربرد کلیه تیمارهای میکروبی منجر به افزایش آزاد سازی روی خاک شد و تلقیح انفرادی قارچ و توأم با باکتری و در برخی موارد با برتری یکسان، بیشترین کارایی را در کاهش pH خاک و افزایش آزاد سازی روی از خاک ریزوسفری آلوده با نانو اکسید روی نشان دادند. نتایج پژوهش حاضر نشان می دهد که روند آزاد سازی روی در تیمارهای مختلف خاک ریزوسفری، یک فرآیند انتشار دو مرحله ای است که با یک مرحله سریع شروع و پس از طی یک مرحله آهسته، به تعادل می رسد. طبق نتایج این

References

- Allison, L.E., and Moodie, C.D. (1965). Carbonate. In C. A. Black et al. (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2* (pp. 1379-1396). Monograph No. 9, American Society of Agronomy, Madison, WI.
- Ansari, M., Malakouti, M. J., Rejali, F., Mokhtassi Bidgoli, A., & Golkari, S. (2025). Screening and identification of the most effective rhizobial isolate (*Mezorhizobiumciceri*) and investigating its interaction with arbuscular mycorrhizal fungus in the yield and quality of chickpea seeds of Anna. *Journal of Soil Biology*, 12(2), 261-277. DOI: <https://doi.org/10.22092/sbj.2025.367013.270>
- Bandyopadhyay, S., Plascencia-Villa, G., Mukherjee, A., Rico, C. M., José-Yacamán, M., Peralta-Videa, J. R. and Gardea-Torresdey, J. L. (2015). Comparative phytotoxicity of ZnO NPs, bulk ZnO, and ionic zinc onto the alfalfa plants symbiotically associated with *Sinorhizobium meliloti* in soil. *Science of the Total Environment*, 515-516, 60-69. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.10.027
- Bouyoucos, C.J. (1962). Hydrometer method improved for making particle-size analysis of soils. *Agronomy Journal*, 54(5), 464-465. doi: 10.2134/agronj1962.00021962005400050028x
- Chai, H., Yao, J., Sun, J., Zhang, C., Liu, W., Zhu, M. and Ceccanti, B. (2015). The effect of metal oxide nanoparticles on functional bacteria and metabolic profiles in agricultural soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 94(4), 490-495. doi: 10.1007/s00128-015-1518-2
- Chen, Y.H. and Li, F.A. (2010). Kinetic study on removal of copper (II) using goethite and hematite nanophotocatalysts. *Journal of Colloid and Interface Science*, 347(2), 277-281. doi: 10.1016/j.jcis.2010.04.003
- Chien, S.H. and Clayton, W.R. (1980). Application of Elovich equation to the kinetics of phosphate release and sorption in soils. *Soil Science Society of America Journal*, 44(2), 265-268. doi: 10.2136/sssaj1980.03615995004400020013x
- Dary, M., Chamber-Pérez, M.A., Palomares, A. J. and Pajuelo, E. (2010). "In situ" phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1-3), 323-330. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.12.037
- Dickson, S. and Smith, S.E. (1998). Evaluation of vesicular-arbuscular mycorrhizal colonisation by staining. In A. Varma (Ed.), *Mycorrhiza Manual* (pp. 77-83). Springer-Verlag, Berlin.
- Fagorzi, C., Checcucci, A., DiCenzo, G.C., Debiec-Andrzejewska, K., Dziewit, L., Pini, F., & Mengoni, A. (2018). Harnessing rhizobia to improve heavy-metal phytoremediation by legumes. *Genes*, 9(11), 542. doi: 10.3390/genes9110542
- Farzaneh, M., Wichmann, S., Vierheilig, H. and Kaul, H.P. (2009). The effects of arbuscular mycorrhiza and nitrogen nutrition on growth of chickpea and barley. *Pflanzenbauwissenschaften (German Journal of Agronomy)*, 13, 15-22.
- Garcia-Gomez, C., Babin, M., Obrador, A., Alvarez, J.M. and Fernandez, M.D. (2015). Integrating ecotoxicity and chemical approaches to compare the effects of ZnO nanoparticles, ZnO bulk, and ZnCl₂ on plants and microorganisms in a natural soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(21), 16803-16813. doi: 10.1007/s11356-015-4927-4
- Ghabooli, M., Khatabi, B., Ahmadi, F.S., Sepehri, M., Mirzaei, M., Amirkhani, A. and Salekdeh, G.H. (2013). Proteomics study reveals the molecular mechanisms underlying water stress tolerance induced by *Piriformospora indica* in barley. *Journal of Proteomics*, 94, 289-301. doi: 10.1016/j.jprot.2013.09.027

14. Ghasemi-Fasaei, R., Maftoun, M., Olama, V., Molazem, B. and Tavajjoh, M. (2009). Manganese-Release Characteristics of Highly Calcareous Soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 40(7-8), 1171-1182. doi: 10.1080/00103620902724838
15. Hao, X., Taghavi, S., Xie, P., Orbach, M.J., Alwathnani, H.A., Rensing, C. and Wei, G. (2014). Phytoremediation of heavy and transition metals aided by legume-rhizobia symbiosis. *International Journal of Phytoremediation*, 16(2), 179-202. doi: 10.1080/15226514.2013.793767
16. He, X., Deng, H. and Hwang, H.M. (2019). The current application of nanotechnology in food and agriculture. *Journal of Food and Drug Analysis*, 27(1), 1-21. doi: 10.1016/j.jfda.2018.12.002
17. Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C. and Jaillard, B. (2003). Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant and Soil*, 248(1), 43-59. doi: 10.1023/A:1022371130513
18. Kandpal, G., Srivastava, P.C. and Ram, B. (2005). Kinetics of desorption of heavy metals from polluted soils: Influence of soil type and metal source. *Water, Air, and Soil Pollution*, 161(1), 353-363. doi: 10.1007/s11270-005-4309-8
19. Khatabi, B., Molitor, A., Lindermayr, C., Pfiffli, S., Durner, J., Von Wettstein, D. and Schäfer, P. (2012). Ethylene supports colonization of plant roots by the mutualistic fungus *Piriformospora indica*. *PLoS One*, 7(4), e35502. doi: 10.1371/journal.pone.0035502
20. Khoshru, B., Fallah Nosratabad, A., Khosravi, H., Asgharzadeh, A., & Faridian, L. (2025). Enhancing agricultural productivity using PGPR and nanoparticles: mechanisms, challenges, and future directions. *Journal of Soil Biology*, 12(2), 279-313. DOI: <https://doi.org/10.22092/sbj.2025.368425.277>
21. Kidd, P.S., Alvarez-Lopez, V., Becerra-Castro, C., Cabello-Conejo, M. and Prieto-Fernandez, A. (2017). Potential role of plant-associated bacteria in plant metal uptake and implications in phytotechnologies. *Advances in Botanical Research*, 83, 87-126. doi: 10.1016/bs.abr.2016.12.003
22. Lindsay, W.L. and 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. doi: 10.2136/sssaj1978.03615995004200030009x
23. Martin, H.W. and Sparks, D.L. (1983). Kinetics of nonexchangeable potassium release from two coastal plain soils. *Soil Science Society of America Journal*, 47(5), 883-887. doi: 10.2136/sssaj1983.03615995004700050013x
24. Motaghian, H.R. and Hosseini, A.R. (2013). Zinc desorption kinetics in wheat (*Triticum aestivum* L.) rhizosphere in some sewage sludge amended soils. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(3), 664-678. doi: 10.4067/S0718-95162013005000053
25. Olsen, S.R., Cole, C.V., Watanabe, F.S. and Dean, L.A. (1954). *Estimation of available phosphorus in soil by extraction with sodium bicarbonate*. USDA Circular No. 939, US Government Printing Office, Washington, DC.
26. Peech, M. (1965). Hydrogen ion activity. In C.A. Black et al. (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2* (pp. 922-923). American Society of Agronomy, Madison, WI.
27. Peralta-Videa, J.R., De la Rosa, G., Gonzalez, J.H. and Gardea-Torresdey, J.L. (2004). Effects of the growth stage on the heavy metal tolerance of alfalfa plants. *Advances in Environmental Research*, 8(3-4), 679-685. doi: 10.1016/S1093-0191(03)00067-2
28. Piłkuła, D. and Stępień, W. (2007). Effect of soil pH on the uptake of heavy metals by plants. *Fragmenta Agronomica*, 24(2), 227-237.

29. Polettini, A., Pomi, R. and Rolle, E. (2007). The effect of operating variables on chelant-assisted remediation of contaminated dredged sediment. *Chemosphere*, 66(5), 866-877. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.05.053
30. Reyhanitabar, A. and Gilkes, R.J. (2010). Kinetics of DTPA extraction of zinc from calcareous soils. *Geoderma*, 154(3-4), 289-293. doi: 10.1016/j.geoderma.2009.10.013
31. Reyhanitabar, A. and Karimian, N. (2008). Kinetics of copper desorption of selected calcareous soils from Iran. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 4(3), 287-293.
32. Reyhanitabar, A., Ardalani, M., Gilkes, R.J. and Savaghebi, G. (2010). Zinc sorption characteristics of some selected calcareous soils of Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 12(1), 99-110.
33. Safari Sinegani, A. A., & Karami, L. (2025). The effect of the application of coal ash in soil on the symbiotic indices of white pea inoculated with *Mesorhizobium* and mycorrhizal fungi. *Journal of Soil Biology*. Advance online publication. DOI: <https://doi.org/10.22092/sbj.2025.368447.278>
34. Saffari, M., Karimian, N., Ronaghi, A., Yasrebi, J. and Ghasemi-Fasaei, R. (2014). Reduction of chromium toxicity by applying various soil amendments in artificially contaminated soil. *Journal of Advances in Environmental Health Research*, 2(4), 251-262.
35. Saleem, M., Meckes, N., Pervaiz, Z.H. and Traw, M.B. (2017). Microbial interactions in the phyllosphere increase plant performance under herbivore biotic stress. *Frontiers in Microbiology*, 8, 41. doi: 10.3389/fmicb.2017.00041
36. Sandilya, S.P., Bhuyan, P.M., Nageshappa, V., Gogoi, D.K. and Kardong, D. (2017). Impact of *Pseudomonas aeruginosa* MAJ PIA03 affecting the growth and phytonutrient production of castor, a primary host-plant of *Samia ricini*. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 17(2), 499-514. doi: 10.4067/S0718-95162017005000041
37. Sasse, J., Martinoia, E. and Northen, T. (2018). Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome? *Trends in Plant Science*, 23(1), 25-41. doi: 10.1016/j.tplants.2017.09.008
38. Sepehri, M. and Khatabi, B. (2021). Combination of Siderophore-Producing Bacteria and *Piriformospora indica* Provides an Efficient Approach to Improve Cadmium Tolerance in Alfalfa. *Microbial Ecology*, 81(3), 717-730. doi: 10.1007/s00248-020-01614-7
39. Seshadri, B., Bolan, N.S. and Naidu, R. (2015). Rhizosphere-induced heavy metal (loid) transformation in relation to bioavailability and remediation. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15(2), 524-548. doi: 10.4067/S0718-95162015005000051
40. Sirrenberg, A., Göbel, C., Grond, S., Czempinski, N., Ratzinger, A., Karlovsky, P. and Pawlowski, K. (2007). *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. *Physiologia Plantarum*, 131(4), 581-589. doi: 10.1111/j.1399-3054.2007.00973.x
41. Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. (1960). *Principles and Procedures of Statistics*. McGraw-Hill Book Company, Inc.
42. Strehmel, N., Mönchgesang, S., Herklotz, S., Krüger, S., Ziegler, J. and Scheel, D. (2016). *Piriformospora indica* stimulates root metabolism of *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7), 1091. doi: 10.3390/ijms17071091
43. Taghipour, M. and Jalali, M. (2016). Influence of organic acids on kinetic release of chromium in soil contaminated with leather factory waste in the presence of some adsorbents. *Chemosphere*, 155, 395-404. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.04.095
44. Vimal, S.R., Singh, J.S., Arora, N.K. and Singh, S. (2017). Soil-plant-microbe interactions in stressed agriculture management: a review.

- Pedosphere*, 27(2), 177-192. doi: 10.1016/S1002-0160(17)60317-1
45. Walkley, A. and Black, T.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(1), 29-38. doi: 10.1097/00010694-193401000-00003
46. Youssef, R.A. and Chino, M. (1989). Root-induced changes in the rhizosphere of plants. II. Distribution of heavy metals across the rhizosphere in soils. *Soil Science and Plant Nutrition*, 35(4), 609-621. doi: 10.1080/00380768.1989.10434857
47. Zibaei, Z., Ghasemi-Fasaei, R., Ronaghi, A., Zarei, M. and Zeinali, S. (2020). Improvement of biochar capability in Cr immobilization via modification with chitosan and hematite and inoculation with *Pseudomonas putida*. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 51(7), 963-975. doi: 10.1080/00103624.2020.1738744.