

بررسی تأثیر بیوچار فعال شده و هیدروچار حاصل از جلبک *Chlorella vulgaris* بر ویژگی‌های زیستی و آنزیمی خاک

چکیده

میکروارگانیسم‌های خاک نقش حیاتی در چرخه عناصر غذایی و فرایندهای بیوشیمیایی ایفا می‌کنند و فعالیت آن‌ها تا حد زیادی به درصد سترس بودن منابع کربنی بستگی دارد. در این مطالعه، تأثیر بیوچار فعال شده و هیدروچار حاصل از جلبک *Chlorella vulgaris* در دو غلظت ۰/۵ و ۱ درصد بر ویژگی‌های زیستی خاک و فعالیت آنزیمی مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش شامل سه بخش (۱) اندازه‌گیری تنفس میکروبی طی ۹۰ روز، (۲) بررسی pH خاک و جمعیت‌های میکروبی طی ۸۴ روز و (۳) ارزیابی فعالیت آنزیم‌ها (آلکالین فسفاتاز، اسید فسفاتاز، آریل سولفاتاز، β -گلوکوزیداز، اینورتاز، پروتاز و دهیدروژناز) و ویژگی‌های میکروبی در پایان هفته دوازدهم بود. تنفس میکروبی در تیمارهای بیوچار با مقدار ۳۱۵/۳۳ میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن در هر کیلوگرم خاک خشک در روز آغاز شد و تا روز یازدهم کاهش شدید و پس از آن کاهش تدریجی داشت. فعالیت آنزیم آریل سولفاتاز در تیمار ۰/۵ درصد هیدروچار بیشترین مقدار (۲۸۶ میکروگرم PNP در هر گرم خاک در ساعت) و در تیمار شاهد کمترین مقدار (۱۶۶ میکروگرم PNP در هر گرم خاک در ساعت) را نشان داد. در تیمار هیدروچار، pH خاک ابتدا افزایش یافت، در حالی که در تیمار بیوچار در پایان کاهش نشان داد. هر دو تیمار موجب افزایش کربن و فعالیت آنزیمی زیست‌توده میکروبی شدند، اما تأثیر هیدروچار چشمگیرتر بود. این نتایج نشان می‌دهند که هیدروچار می‌تواند به عنوان اصلاح‌کننده‌ای مؤثرتر نسبت به بیوچار در بهبود فعالیت آنزیمی، تنوع میکروبی و تنفس میکروبی خاک مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آریل سولفاتاز، اصلاح‌کننده خاک، اینورتاز، تنفس میکروبی، میکروارگانیسم‌های خاک

The effect of activated biochar and hydrochar produced from the algae *Chlorella vulgaris* on the biological and enzymatic properties of the soil

Abstract

Soil microorganisms play a vital role in nutrient cycling and biochemical processes, with their activity largely dependent on the availability of carbon sources. This study compared the effects of activated biochar and hydrochar derived from *Chlorella vulgaris* on soil biological properties and enzyme activities at concentrations of 0.5% and 1%. The experiment consisted of three components: (1) measurement of microbial respiration over 90 days, (2) monitoring of soil pH and microbial populations over 84 day, and (3) evaluation of enzyme activities (alkaline phosphatase, acid phosphatase, arylsulfatase, β -glucosidase, invertase, protease, and dehydrogenase) and microbial characteristics at the end of week 12. Microbial respiration in the biochar treatment began at 315.33 mg CO₂ kg⁻¹ dry soil day⁻¹, showing a sharp decline by day 11, followed by a gradual decrease. The highest arylsulfatase activity (286 μ g PNP g⁻¹ soil h⁻¹) was observed in the 0.5% hydrochar treatment, while the control exhibited the lowest value (166 μ g PNP g⁻¹ soil h⁻¹). Soil pH initially increased in the hydrochar treatment but decreased at the end of the experiment in the biochar treatment. Both amendments enhanced microbial biomass carbon and enzyme activities, with hydrochar demonstrating a more pronounced effect. These findings indicate that hydrochar may serve as a more effective soil amendment than biochar in improving microbial respiration, enzyme activities, and microbial diversity.

Keyword: Arylsulfatase, Invertase, Microbial respiration, Soil amendment, Soil microorganisms

مقدمه

میکروارگانیسم‌های خاک از اجزای کلیدی در فرایندهای بیوشیمیایی خاک و چرخه عناصر غذایی به شمار می‌روند. یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده در فعالیت میکروبی در محیط خاک، درصد سترس بودن منابع کربنی قابل استفاده است. این دسترسی با افزودن مواد آلی قابل تجزیه به خاک، مانند بقایای آلی، افزایش می‌یابد که در نتیجه آن، جمعیت میکروبی، زیست‌توده میکروبی و فعالیت برخی آنزیم‌های خاک ارتقاء می‌یابد (Rao et al., 2014; Sharma, 2022). آنزیم‌های خاک توسط پژوهشگران مختلف به عنوان شاخص‌هایی مؤثر برای ارزیابی آلودگی، حاصلخیزی، سلامت و بلوغ خاک معرفی شده‌اند (Daunoras et al., 2024). آنزیم‌ها عناصر حیاتی در چرخه غذایی اکوسیستم‌های خاکی هستند و نقش مهمی در کاتالیز واکنش‌های شیمیایی ایفا می‌کنند. این آنزیم‌ها می‌توانند از منابع مختلفی از جمله میکروارگانیسم‌ها، گیاهان و جانوران منشأ بگیرند و یا از طریق تجزیه سلول‌های مرده یا ترشح از سلول‌های زنده وارد محیط خاک شوند. پس از ورود به خاک، آنزیم‌ها می‌توانند با ذرات و ترکیبات مختلف خاک واکنش نشان دهند. برای نمونه، برخی آنزیم‌ها قادرند با کلوئیدها کمپلکس تشکیل دهند، که این فرآیند می‌تواند به تثبیت آنزیم‌ها بر سطح ذرات رسی یا مواد آلی کمک کند. آنزیم‌های خاک با تجزیه مواد آلی و تسهیل تبدیل عناصر غذایی، نقش بنیادی در حفظ سلامت و حاصلخیزی

خاک ایفا می کنند و در نتیجه، به رشد گیاه و پایداری اکوسیستم کمک می کنند. علاوه بر نقش مستقیم در چرخه عناصر غذایی، آنزیم های خاک در بهبود ساختار و عملکرد خاک نیز مؤثرند؛ آن ها با تجزیه بقایای آلی به تشکیل هوموس کمک می کنند که این ماده موجب بهبود ساختار خاک، افزایش ظرفیت نگهداری آب و تهویه می شود. همچنین، فعالیت آنزیم های خاک تحت تأثیر عوامل محیطی متعددی نظیر pH، دما، رطوبت و حضور مِهَارکننده ها یا فعال کننده ها قرار می گیرد (Nourbakhsh et al., 2002; Dotaniya et al., 2019).

بیوپچار و هیدروچار از جمله اصلاح کننده های آلی مهم خاک به شمار می روند که در سال های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده اند. بیوپچار محصولی کربنی است که از پیرولیز مواد لیگنوسلولزی نظیر بقایای گیاهی و زیست توده در شرایط دمای بالا و حضور محدود یا عدم حضور اکسیژن تولید می شود و به دلیل پایداری زیاد، ظرفیت بالای نگهداری آب و مواد غذایی و توانایی کاهش آلودگی های خاک و آب، به عنوان یک جاذب و بهبوددهنده کیفیت خاک کاربرد دارد. در مقابل، هیدروچار طی فرآیند هیدروترمال کربونیزا سیون در دما و فشار پایین تر و در محیط آبی تولید می شود و در مقایسه با بیوپچار دارای محتوای اکسیژن بالاتر و پایداری کمتر است. اما می تواند نقش مؤثری در بهبود خصوصیات شیمیایی و بیولوژیکی خاک ایفا کند. فعالیت میکروبی خاک و چرخه عناصر غذایی تا حد زیادی وابسته به آنزیم های خلکی است (Sharma et al., 2024; Silva et al., 2024; Ge et al., 2024). آنزیم آلکالین فسفاتاز و اسید فسفاتاز در کاتالیز هیدرولیز ترکیبات آلی فسفره و آزاد سازی یون فسفات نقش دارند و در تأمین فسفر گیاه بسیار اهمیت دارند. آریل سولفاتاز در چرخه گوگرد مؤثر بوده و با تجزیه ترکیبات آلی سولفات، سولفات معدنی قابل جذب را در اختیار گیاه قرار می دهد. آنزیم β -گلوکوزیداز در چرخه کربن عمل کرده و با تجزیه سلولز و مشتقات آن، قندهای ساده تری برای میکروارگانیسم ها فراهم می آورد. اینورتاز نیز با شکستن ساکارز به گلوکز و فروکتوز در دسترس بودن قندها برای میکروب ها و گیاه را افزایش می دهد. پروتئازها با هیدرولیز پروتئین های آلی و آزاد سازی اسیدهای آمینه در چرخه نیتروژن نقش کلیدی دارند. در نهایت، دهیدروژناز به عنوان شاخصی از تنفس میکروبی و فعالیت کلی زیستی خاک مطرح است و در اکسایش مواد آلی و انتقال الکترون شرکت می کند. به طور کلی، بیوپچار و هیدروچار با بهبود خصوصیات فیزیکی شیمیایی خاک می توانند فعالیت این آنزیم ها را تحریک کرده و حاصلخیزی و پایداری زیستی خاک را افزایش دهند (Chaves et al., 2024; Singh et al., 2024; Idris et al., 2024).

افزایش فعالیت آنزیمی در پی افزودن ماده آلی به خاک، عمدتاً به وابستگی فعالیت میکروبی و تولید آنزیم ها به دسترسی به منابع کربنی بازمی گردد (Liu et al., 2023). مواد آلی با تأمین منبعی حیاتی از کربن و انرژی، موجب تحریک رشد و فعالیت متابولیکی میکروارگانیسم های خاک می شوند که در نتیجه، تولید و فعالیت بسیاری از آنزیم ها افزایش می یابد (Gunina & Kuzyakov, 2022). برای آنکه آنزیم های خارج سلولی پس از ترشح به خاک پایدار و فعال باقی بمانند، ضروری است که سریعاً تجزیه نشوند. این آنزیم ها می توانند از طریق برهم کنش با ذرات خاک مانند رس و مواد آلی تثبیت شوند، که این فرآیند آن ها را در برابر تخریب محافظت کرده و طول عمر عملکردی آن ها را افزایش می دهد. پایداری این آنزیم ها برای تداوم فرآیندهای بیوشیمیایی مؤثر در حفظ سلامت و حاصلخیزی خاک، امری حیاتی است. در مقابل، کاهش ماده آلی منجر به کاهش متناسب در فعالیت آنزیمی می شود. این کاهش عمدتاً به دلیل افت زیست توده میکروبی است، زیرا میکروارگانیسم ها برای تغذیه به مواد آلی وابسته اند. علاوه بر این، کاهش ماده آلی می تواند ترکیب رشد و توسعه ریشه ها، و همچنین تنوع و کارکرد ریزندامگان خاک را تحت تأثیر قرار دهد. در نتیجه، کاهش فعالیت و تنوع میکروبی ممکن است به افت تولید آنزیم ها و تضعیف سلامت خاک منجر شود (Kotrocz et al., 2014; Merino et al., 2016).

جوامع زیستی خاک مجموعه‌ای پیچیده از باکتری‌ها، قارچ‌ها، آرکئها، جلبک‌ها، پروتوزوآها، نماتدها، بندپایان و حشرات هستند. بیوپار با تأثیرگذاری بر تعاملات میان اعضاء این جامعه و همچنین بر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک، نقش مؤثری در تعیین حاصلخیزی خاک و عملکرد کلی آن در اکوسیستم ایفا می‌کند (Li et al., 2018). بیوپار، همانند سایر اصلاح‌کننده‌های آلی خاک، شرایط فیزیکی خاک و فرایندهای شیمیایی را دگرگون می‌سازد (Herath et al., 2013) و بدین ترتیب، ویژگی‌ها و رفتار موجودات زنده خاک را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Frankenberger & Dick, 1983). فعالیت میکروبی در خاک، عملکرد کارکردهای حیاتی خاک و رشد و عملکرد گیاهان را تعیین می‌کند (Pan et al., 2021). ساختار متخلخل بیوپار، وزن مخصوص بالا و توانایی جذب مواد آلی محلول، گازها و مواد معدنی، محیطی مناسب برای استقرار، رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌ها، به‌ویژه باکتری‌ها، اکتینومیسیت‌ها و قارچ‌های میکوریز آربوسکولار فراهم می‌آورد. علاوه بر این، محتوای بالای کربن و پایداری ساختاری بیوپار سبب افزایش ماده آلی خاک شده و نقشی اساسی در چرخه عناصر غذایی، بهبود منابع آبی قابل استفاده برای گیاه، ظرفیت بافری خاک و ساختار آن ایفا می‌کند (Anderson et al., 2011). بیوپار باعث افزایش فعالیت انواع مختلفی از میکروارگانیسم‌های مفید خاک، به‌ویژه در زمینه کشاورزی، می‌شود (Palansooriya et al., 2019). وجود حفرات و توزیع اندازه آن‌ها در ساختار بیوپار، زیستگاهی مناسب برای میکروارگانیسم‌ها فراهم می‌کند که آن‌ها را از شکارشدگی و خشکیدگی محافظت کرده و منابعی از کربن، انرژی و عناصر معدنی در اختیارشان قرار می‌دهد (Adhikari et al., 2022). علاوه بر این، سطح ویژه ایجادشده در بیوپار، که بین ۱۰ تا چند ازی هر گرم متغیر است، سطح وسیعی برای استقرار میکروارگانیسم‌ها فراهم می‌سازد. اندازه منافذ مشاهده شده در بیوپار به‌گونه‌ای است که میکروفلور خاک قادر به سکونت در آن بوده و توسط موجودات دیگر مصون می‌ماند. همچنین، تخلخل بالای بیوپار منجر به افزایش ظرفیت نگهداری آب در خاک می‌شود (Krull et al., 2012).

با وجود نقش حیاتی کربن در تنظیم اقلیم، سلامت خاک و عملکرد اکوسیستم، روش‌های ناپایدار گذشته نظیر سوزاندن بقایای گیاهی، موجب تشدید گرمایش جهانی از طریق آزادسازی کربن به جو شده‌اند. در حالی که تبدیل پسماندهای آلی به بیوپار و هیدروچار به طور قابل توجهی در کاهش این مشکل مؤثر بوده است، بهره‌گیری از پسماندهای کشاورزی و ریزجلبک‌ها نیز مزایای بیشتری به همراه دارد. *Chlorella vulgaris*، یک ریزجلبک سبز، توانایی جذب فلزات سنگین و عناصر غذایی از فاضلاب، تثبیت دی‌اکسید کربن، تولید زیست سوخت، بهبود سلامت خاک، تصفیه هوا و تجزیه مواد سمی را دارد؛ ویژگی‌هایی که آن را به گزینه‌ای چندمنظوره و پایدار تبدیل می‌کنند. با این حال، تاکنون مطالعه‌ای جامع به مقایسه تأثیر بیوپار و هیدروچار فعال شده حاصل از *Chlorella vulgaris* بر ویژگی‌های زیستی خاک نپرداخته است، به‌ویژه از منظر تغییرات زمانی در فعالیت آنزیم‌های خاک. درک فعالیت آنزیم‌های خاک برای ارزیابی سلامت، حاصلخیزی و کارکرد کلی اکوسیستم خاک امری ضروری است. در راستای رفع این خلأ علمی، هدف این مطالعه بررسی و مقایسه تأثیر اصلاح‌کننده‌های بیوپار و هیدروچار تولیدشده از *Chlorella vulgaris* بر ویژگی‌های زیستی خاک و فعالیت آنزیم‌های آن در طول زمان است.

مواد و روش‌ها

میکرو جلبک *Chlorella vulgaris*

ذخایر ریز جلبک کلرلا ولگاریس از آزمایشگاه کشت جلبک گوهر سبز تهیه شده و به‌طور مداوم در شرایط آزمایشگاهی کنترل شده نگهداری شدند. فرآیند نگهداری شامل حفظ دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۲ ساعت نور و سپس ۱۲ ساعت تاریکی بود.

1 Soil communities

2 Archaea

3 Arthropods

4 Predation

5 Desiccation

6 Biofuels

در شرایط کنترل شده آزمایشگاهی، کشت ریز جلبک *Chlorella vulgaris* به صورت پیوسته تهیه و نگهداری شد. فرآیند نگهداری دقیق این کشت‌ها شامل حفظ دمای ثابت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و اعمال یک برنامه نوری منظم با تناوب ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود تا چرخه طبیعی روز و شب شبیه سازی شود. برای پرورش جلبک، از محیط کشت F/2 که محلولی غنی از مواد مغذی و مناسب برای رشد و توسعه ریز جلبک‌ها است، استفاده شد. برای آماده سازی محلول محیط کشت مورد استفاده در رشد *Chlorella vulgaris*، مقدار ۲ میلی‌لیتر از محلول‌های A و B و ۱ میلی‌لیتر از محلول‌های C و D به یک لیتر آب افزوده شد. مرحله اولیه کشت به مدت هفت روز ادامه یافت (Abdel-Aty et al., 2013). پس از این دوره، ریز جلبک‌ها به مدت دو هفته دیگر رشد داده شدند و سپس زیست‌توده آن‌ها برداشت گردید. به منظور حذف کامل نمک‌های باقی‌مانده که ممکن است در آنالیزهای بعدی اختلال ایجاد کنند، زیست‌توده برداشت‌شده تحت فرآیند شست‌وشوی دقیق شامل پنج بار آبکشی کامل با آب مقطر قرار گرفت. پس از شست‌وشو، زیست‌توده در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد تا رطوبت آن از بین برود، سپس آسیاب و الک شد تا ذراتی با اندازه یکنواخت حاصل گردد (Guillard, 1975).

تولید بیوجار

زیست‌توده خشک شده *Chlorella vulgaris* ابتدا در آسیاب خرد شد، سپس از الک با قطر چشمه دو میلی‌متر عبور داده شد تا یکنواختی ذرات تضمین گردد. برای آغاز فرآیند تولید بیوجار، نمونه‌های آماده‌شده با دقت توزین شدند و به صورت کاملاً فشرده درون سیلندر فلزی درب‌دار قرار گرفتند. این طراحی به منظور ایجاد شرایط کم‌اکسیژن ضروری برای انجام فرآیند پیرولیز صورت گرفت. پس از استقرار کامل نمونه‌ها در ظروف استوانه‌ای و اطمینان از بسته بودن درپوش‌ها، ظروف به داخل کوره الکتریکی منتقل شدند. در این مرحله، نمونه‌های جلبک به مدت دو ساعت در دمای ۴۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. با احتساب زمان گرم شدن و سرد شدن، کل فرآیند تولید بیوجار تقریباً سه ساعت به طول انجامید (Elaiwu et al., 2014).

تولید هیدروچار

زیست‌توده جلبک *Chlorella vulgaris* در گام نخست به پودر نرمی تبدیل شد و سپس برای دستیابی به اندازه ذرات دو میلی‌متر، از الک استفاده شد. در مرحله بعد، پودر حاصل با دقت به ظروف ویژه‌ای با درپوش محکم منتقل شد. این ظروف درون اتوکلاو از جنس استیل قرار گرفتند و تحت فرآیند حرارتی در دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت قرار گرفتند. در این فرآیند از آب دی‌یونیزه به عنوان محیط واکنش استفاده شد. پس از اتمام مرحله حرارت‌دهی، ظروف به دمای محیط سرد شدند. محتویات آن‌ها که اکنون به شکل هیدروچار درآمده بودند، از طریق کاغذ صافی فیلتر شدند تا ذرات جامد از مایع جدا گردد. ذرات جامد باقی‌مانده بر روی کاغذ صافی، چندین بار با آب دی‌یونیزه به خوبی شسته شدند تا هرگونه ناخالصی احتمالی حذف شود. در نهایت، ذرات شسته‌شده در آون با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت خشک شدند تا رطوبت آن‌ها به طور کامل حذف گردد (Jalilian et al., 2024).

فعال سازی بیوجار و هیدروچار

برای بهبود ویژگی‌های بیوجار و هیدروچار، فرآیند فعال سازی با استفاده از هیدروکسید پتاسیم (KOH) انجام شد. در این مرحله، بیوجار و هیدروچار با KOH به نسبت ۰/۵ به ۱ مخلوط گردیدند. نمونه‌های آغشته به محلول KOH، به مدت یک شب در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. پس از خشک سازی، نمونه‌ها با دقت توزین و درون بوتله‌های سرامیکی قرار داده شدند. بوتله‌ها سپس در شرایط خلأ و با جریان پیوسته گاز نیتروژن به منظور جلوگیری از اکسید شدن، به مدت یک ساعت در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند. پس از اتمام فرآیند فعال سازی، بیوجار و هیدروچار اجازه یافتند تا به دمای محیط برسند و سپس از درون بوتله‌ها خارج شدند. بیوجار و هیدروچار فعال‌شده و سردشده، جهت حذف باقی‌مانده‌های شیمیایی، تحت چندین مرحله شست‌وشو قرار گرفتند. در گام نخست، آن‌ها با محلول نیم‌نرمال اسید کلریدریک (HCl) شسته شدند تا مقادیر باقی‌مانده KOH خنثی گردد. در ادامه، نمونه‌ها با آب مقطر داغ شست‌وشوی کامل داده شدند تا از پاک سازی کامل اطمینان حاصل شود. در نهایت،

بیوچار و هیدروچار شسته شده به مدت یک شب در آون خشک شدند تا رطوبت باقی مانده از بین برود. نمونه های خشک شده مجدداً توزین شدند تا جرم نهایی آن ها ثبت گردد.

ویژگی های بیوچار و هیدروچار

مقدار سطح ویژه و زیست توده بیوچار و هیدروچار فعال شده با KOH با استفاده از روش جذب متیلن بلو ($C_{16}H_{18}ClN_3S$) اندازه گیری شد (Godlewska et al., 2022). برای بررسی مورفولوژی سطحی نمونه ها، از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) استفاده شد که تصاویر دقیقی از ریزساختار آن ها ارائه می دهد. برای تعیین مقدار pH، به میزان ۰/۱ گرم از هر نمونه در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر ریخته شد، سپس این مخلوط به مدت ۱/۵ ساعت تکان داده شد و در ادامه، مقدار pH آن با استفاده از دستگاه pH متر اندازه گیری شد (Godlewska et al., 2022). همچنین، به منظور اندازه گیری دقیق عناصر کربن، نیتروژن و هیدروژن در نمونه های تهیه شده، از دستگاه آنالیزگر CHN (مدل ThermoFinnigan Flash EA 1112) استفاده شد تا ترکیب عنصری این عناصر حیاتی به طور کمی تعیین گردد.

ویژگی های خاک

خاک مورد استفاده در این پژوهش از خاک اراضی کشاورزی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان از عمق ۲۰-۰ سانتی متری برداشت شد. بافت خاک با استفاده از روش های هیدرومتری و الک، مطابق با دستورالعمل ارائه شده توسط Gee و Bauder (۱۹۸۶) مورد آنالیز قرار گرفت. مقدار ماده آلی خاک با بهره گیری از روش Walkley و Black (۱۹۳۴) تعیین شد. هدایت الکتریکی خاک نیز با استفاده از روش Rhoades (۱۹۹۶) اندازه گیری شد و pH خاک در محلول آبی با نسبت ۵ به ۱ (آب به خاک) با استفاده از دستگاه pH متر مدل Orion و مطابق روش McLean (۱۹۸۲) تعیین شد. معادل کربنات کلسیم خاک به روش تیتراسیون با HCl، مطابق با دستورالعمل Sparks et al, (1996) ارزیابی گردید. کلیه این مراحل مطابق با روش های استاندارد معرفی شده توسط Alef و Nannipieri (۱۹۹۵) انجام شد. برای تحلیل های میکروبیولوژیکی، از محیط های کشت PDA، NA، LG و آگار پیکوفسکایا^۱ به منظور رشد و بررسی میکروارگانیسم های خاک استفاده شد. همچنین، برای اندازه گیری کل نیتروژن خاک، روش کج لال به کار گرفته شد تا تعیین دقیق مقدار نیتروژن موجود در نمونه ها حاصل گردد (Tabatabai & Bremner, 1969).

تیمارها

برای آماده سازی تیمارهای مورد نظر، دو کیلوگرم خاک در کیسه های پلاستیکی به ابعاد ۲۵×۲۵ سانتی متر قرار داده شد. سپس خاک با بیوچار و هیدروچار فعال شده حاصل از جلبک *Chlorella vulgaris* به نسبت های ۰/۵ و ۱ در صد مخلوط گردید. این آزمایش در قالب سه مجموعه نمونه انجام شد. در مجموعه اول، تنفس میکروبی در فواصل زمانی پنج روز، از روز نخست تا روز ۹۰ اندازه گیری شد. در مجموعه دوم، pH خاک و جمعیت های باکتریایی و قارچی در آغاز آزمایش و در هفته های ۱، ۲، ۳، ۴، ۶، ۹ و ۱۲ مورد سنجش قرار گرفت. در مجموعه سوم، فعالیت آنزیم های مختلف خاک و ویژگی های میکروبی در پایان دوره انکوباسیون (۱۲ هفته) ارزیابی شد. این سنجش ها شامل اندازه گیری فعالیت های آنزیم های فسفاتاز قلیایی، فسفاتاز اسیدی، آریل سولفاتاز، α -گلوکوزیداز، اینورتاز، پروتئاز، دهیدروژناز، تنفس برانگیخته با سوبسترا، کربن زیست توده میکروبی و ضریب تنفس میکروبی بود. نمونه ها تحت شرایط کنترل شده، با حفظ رطوبتی معادل ۷۰ درصد از ظرفیت نگهداری آب حداکثری خاک و دمای ثابت ۲۵ درجه سانتی گراد در تاریکی، انکوبه شدند. همچنین به منظور تأمین اکسیژن کافی، تیمارهای آزمایشی دو بار در هفته طی دوره انکوباسیون هم زده شدند.

اندازه گیری جمعیت باکتری و قارچ

برای اندازه گیری جمعیت باکتری ها و قارچ ها از روش رقت سازی متوالی و شمارش کلنی استفاده شد (James & Sutherland, 1939; Thomas et al., 2015; Pasrija & Kumari, 2025). بدین منظور ابتدا ۱۰ گرم نمونه در ۹۰ میلی لیتر محلول بافر فسفات یا آب نمکی استریل) قرار داده شد و پس از تکان دادن روی شیکر و همگن سازی با ورتکس، رقت های دهدهی تا $10^{-۶}$ تهیه

¹Pikovskaya's agar

گردید. از هر رقت ۰/۱ میلی لیتر به روش اسپرد روی پلیت‌های دو تایی کشت داده شد. برای شمارش باکتری‌ها از محیط‌های عمومی نظیر Nutrient Agar یا Tryptic Soy Agar و برای شمارش قارچ‌ها از Potato Dextrose Agar اسیدی‌شده یا حاوی آنتی‌بیوتیک استفاده شد تا از رشد متقابل جلوگیری شود. پلیت‌های باکتریایی در دمای ۲۸-۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۴۸ ساعت و پلیت‌های قارچی در دمای ۲۵-۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ تا ۵ روز در حالت وارونه انکوبه شدند. سپس پلیت‌هایی که تعداد کلونی آن‌ها در محدوده قابل شمارش قرار داشت انتخاب و کلونی‌ها شمارش شدند. میانگین دو پلیت برای هر رقت محاسبه و نتایج بر اساس فرمول استاندارد به صورت واحد کلونی تشکیل‌دهنده (CFU g^{-1}) بیان گردید. برای جلوگیری از آلودگی، نمونه‌های شاهد استریل کنترل و برای اطمینان از صحت آزمایش، کشت‌های مرجع استاندارد نیز به کار گرفته شدند.

تنفس میکروبی خاک

برای اندازه‌گیری تنفس میکروبی، مقدار ۳۰ گرم از نمونه در ظروف دربسته قرار داده شد و منبع قلیایی مانند محلول NaOH درون ظروف جهت جذب دی‌اکسیدکربن آزاد شده از فعالیت میکروبی تعبیه گردید. ظروف در دمای ثابت انکوبه شدند و پس از گذشت دوره زمانی مشخص، محلول قلیایی خارج و با محلول استاندارد H_2SO_4 تیترو شد تا مقدار دی‌اکسیدکربن جذب شده محاسبه گردد. میزان دی‌اکسیدکربن تولیدی به عنوان شاخصی از شدت تنفس میکروبی و فعالیت زیستی نمونه در نظر گرفته شد. در برخی موارد برای افزایش دقت، ظروف شاهد بدون نمونه نیز استفاده شد و مقدار دی‌اکسیدکربن پس‌زمینه از نتایج کسر گردید. علاوه بر روش تیتراسیون، امکان اندازه‌گیری مستقیم دی‌اکسیدکربن با دستگاه گازکروماتوگراف یا آنالیزور مادون قرمز نیز وجود دارد. داده‌های حاصل به صورت میلی گرم دی‌اکسیدکربن بر گرم نمونه در روز گزارش شدند و به عنوان شاخص معتبر برای ارزیابی سطح فعالیت میکروبی و کیفیت زیستی نمونه به کار رفتند (Karelin et al., 2024; Wang et al., 2025).

تنفس برانگیخته با سوبسترا^۱

برای اندازه‌گیری تنفس برانگیخته با سوبسترا، مقدار ۳۰ گرم از نمونه با گلوکز به عنوان منبع کربن سریع‌التجزیه تیمار شد و در ظروف دربسته قرار گرفت. گلوکز به دلیل قابلیت بالای مصرف توسط اغلب میکروارگانیسم‌های خاک انتخاب شد و موجب تحریک متابولیسم آن‌ها شد. سپس دی‌اکسیدکربن آزاد شده در مدت زمان مشخص توسط محلول قلیایی جذب و پس از انکوباسیون با تیتراسیون اسید استاندارد اندازه‌گیری شد. میزان دی‌اکسیدکربن آزاد شده بیانگر توان بالقوه میکروارگانیسم‌ها در استفاده از بسترهای کربنی و شاخصی از فعالیت زیستی نمونه محسوب شد (Lin & Brookes, 1999; Hashimi et al., 2020).

کربن زیست توده میکروبی^۲

برای اندازه‌گیری کربن زیست توده میکروبی از روش تدخین-انکوباسیون استفاده شد. برای این منظور منظور ۲۰ گرم خاک در دسیکاتور به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت کلروفرم قرار گرفت. سپس خاک‌های تدخین شده همراه با ۲۰ میلی لیتر سود ۰/۱ نرمال و ۵ میلی لیتر عصاره خاک تازه در ظروف دربسته انکوبه شدند. نمونه‌های تدخین نشده و شاهد نیز به همان روش ماده شدند. پس از ۷ روز، سود جذب کننده دی‌اکسیدکربن به بالن منتقل و با کلرید باریوم ۰/۵ مولار و فنل فتالین معرف گذاری شد. محلول‌ها با اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال تیترو گردیدند تا مقدار کربن آزاد شده تعیین شود. کربن زیست توده میکروبی بر اساس تفاوت بین کربن خاک تدخین شده و تدخین نشده و با استفاده از ضریب ۰/۴۵ محاسبه شد که نشان دهنده بخشی از کربن معدنی شده به دی‌اکسیدکربن است (Jenkinson, 1981).

فعالیت آنزیمی خاک

1 Microbial respiration

2 Substrate-induced respiration

3 Microbial biomass carbon

به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و اسیدی، از روش ارائه شده توسط Tabatabai & Bremner (۱۹۶۹) استفاده شد. در این روش، نمونه‌های خاک با بستر پارانیتروفنیل فسفات ($C_6H_5NO_6P$) به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شوند. طی این دوره انکوباسیون، آنزیم‌های موجود در خاک، واکنش هیدرولیز بستر پارانیتروفنیل فسفات را کاتالیز کرده و منجر به آزادسازی پارانیتروفنول شد. میزان پارانیتروفنول آزاد شده به صورت کمی اندازه‌گیری شده و به عنوان شاخصی از فعالیت فسفاتازی خاک تلقی می‌شود. این روش، سنجشی دقیق از فعالیت آنزیمی ارائه می‌دهد که وضعیت بیوشیمیایی خاک و توان آن در چرخه عناصر غذایی را منعکس می‌کند.

فعالیت آنزیم پروتئاز نیز براساس روش توسعه‌یافته توسط Ladd & Butler (۱۹۷۲) تعیین گردید. در این روش، نمونه‌های خاک به مدت دو ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد با بستر کازئینات سدیم^۱ انکوبه شد. طی این فرآیند، آنزیم‌های پروتئاز موجود در خاک کازئینات سدیم را تجزیه کرده و موجب آزادسازی اسیدهای آمینه شد. سپس اسیدهای آمینه آزاد شده با معرف فولین-سایوکالتو^۳ واکنش داده و تغییر رنگ حاصل شده به صورت اسپکتروفتومتریک اندازه‌گیری شد. این روش ارزیابی دقیقی از فعالیت پروتئازی خاک ارائه داده و توان خاک در تجزیه پروتئین و متابولیسم نیتروژنی را مشخص می‌سازد.

فعالیت آنزیم اینورتاز بر اساس روش پیشنهادی Schinner & Von Mersi (۱۹۹۰) اندازه‌گیری شد. در این روش، نمونه‌های خاک به مدت سه ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد با ساکارز به عنوان بستر انکوبه شد. طی این دوره، آنزیم‌های اینورتاز موجود در خاک واکنش هیدرولیز ساکارز را کاتالیز کرده و آن را به گلوکز ($C_6H_{12}O_6$) و فروکتوز ($C_6H_{12}O_6$) تجزیه می‌کنند. سپس مقدار قندهای کاهنده آزاد شده به صورت کمی اندازه‌گیری شده و به عنوان شاخصی برای تعیین فعالیت آنزیم اینورتاز مورد استفاده قرار می‌گیرد.

فعالیت آنزیم دهیدروژناز بر اساس روش ارائه شده توسط Thalmann (۱۹۶۸) اندازه‌گیری شد. این روش مبتنی بر سنجش کمی تری‌فنیل‌فورمازان^۴ ($C_{19}H_{16}N_4$) است که از طریق انکوباسیون نمونه‌های خاک با تری‌فنیل‌تترازولیوم کلراید^۵ ($C_{19}H_{15}ClN_4$) به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تشکیل شد. در طول این فرآیند، آنزیم‌های دهیدروژناز موجود در خاک، در حضور دهیدروژن آزاد شده از بسترهای مختلف خاک، عمل احیای تری‌فنیل‌تترازولیوم کلراید را کاتالیز کرده و آن را به تری‌فنیل‌فورمازان تبدیل می‌کنند. میزان تری‌فنیل‌فورمازان تولید شده به صورت کمی اندازه‌گیری شد و به عنوان شاخصی معتبر برای ارزیابی فعالیت آنزیم دهیدروژناز خاک به کار می‌رود.

فعالیت آنزیم آریل سولفاتاز بر اساس روش Tabatabai & Bremner (۱۹۷۰) اندازه‌گیری شد. در این روش، پس از انکوباسیون نمونه خاک با محلول پارانیتروفنیل سولفات^۶ ($C_{12}H_8N_2O_8S$) به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، مقدار پارانیتروفنول تولید شده به صورت کمی تعیین شد. در طی این فرآیند، آنزیم‌های آریل سولفاتاز موجود در خاک، بستر پارانیتروفنیل سولفات را هیدرولیز کرده و موجب آزادسازی پارانیتروفنول شد. سپس مقدار پارانیتروفنول آزاد شده به صورت اسپکتروفتومتریک اندازه‌گیری شده و ارزیابی کمی دقیقی از فعالیت آنزیم آریل سولفاتاز در خاک فراهم می‌سازد.

فعالیت آنزیم β -گلوکوزیداز بر اساس روش ارائه شده توسط Eivazi & Tabatabai (۱۹۸۸) اندازه‌گیری شد. در این روش، نمونه‌های خاک به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با محلول پارانیتروفنیل گلوکوزید انکوبه شد. در طول این دوره، آنزیم‌های β -گلوکوزیداز موجود در خاک، بستر پارانیتروفنیل گلوکوزید را هیدرولیز کرده و منجر به آزادسازی پارانیتروفنول می‌گردند.

1 Para-nitrophenyl phosphate

2 Sodium caseinate

3 Folin-Ciocalteu

4 Triphenylformazan

5 Triphenyltetrazolium chloride

6 P-nitrophenyl sulfate

سپس مقدار پارانیتروفنول آزاد شده به صورت اسپکتروفتومتریک اندازه گیری شده و ارزیابی کمی دقیقی از فعالیت آنزیم β -گلوکوزیداز در خاک ارائه می دهد.

آنالیز آماری

تمامی آزمایش های مورد بررسی در این مطالعه با سه تکرار انجام شد. تحلیل های آماری این پژوهش با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹٫۲ انجام گرفت. مقایسه میانگین ها از طریق آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و به دنبال آن آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت پذیرفت. ترسیم نمودارها نیز با بهره گیری از نرم افزار Excel 2016 انجام شد.

نتایج و بحث

اجزای هیدروچار و بیوچار شناسایی شده با استفاده از روش XRF

مقادیر کلسیم و پتاسیم در هر دو نمونه بیوچار و هیدروچار، همان طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، نسبت به سایر عناصر بیشتر می باشد. این امر ناشی از وفور این عناصر در ماده اولیه بیومس است. کلسیم و پتاسیم به عنوان مواد مغذی پرمصرف (ماکرونوترینت) شناخته شده و نقش حیاتی در سلامت گیاه و خاک ایفا می کنند. در مقایسه میزان آهن و آلومینیوم در بیوچار و هیدروچار، مشاهده شد که این عناصر در بیوچار نسبت به هیدروچار فراوانی بیشتری دارند. این تفاوت به تفاوت های موجود در فرایندهای تولید این دو ماده باز می گردد؛ فرایند پیرولیز مورد استفاده در تولید بیوچار معمولاً منجر به تمرکز بیشتر این عناصر می شود، در حالی که فرایند کربنیزاسیون هیدروترمال که برای تولید هیدروچار به کار می رود، ترکیب عنصری متفاوتی را حفظ می کند. میزان سیلیکون، روی و منیزیم در هر دو نمونه بیوچار و هیدروچار نسبتاً مشابه است. این عناصر که جزو ریزمغذی های (میکرونوترینت ها) ضروری به شمار می آیند، حضور پایدار آن ها در هر دو ماده نشان دهنده این است که نگهداری این عناصر کمتر تحت تأثیر تفاوت های فرآیندی قرار می گیرد نسبت به عناصری همچون آهن و آلومینیوم.

جدول ۱. ترکیب عنصری (XRF) بیوچار فعال شده و هیدروچار

Fe ₂ O ₃ (%)	Al ₂ O ₃ (%)	MgO (%)	SiO ₂ (%)	P ₂ O ₅ (%)	ZnO ₂ (%)	CaO (%)	K ₂ O (%)	مواد
۱/۲۶	۰/۷۴	۱/۱۰	۲/۲	۱/۸۶	۰/۰۰۶	۲/۹	۳/۴۲	بیوچار
۱/۱۹	۰/۲۶	۱/۰۶	۳/۳	۱/۰۶	۰/۰۰۵	۳/۷	۳/۱۲	هیدروچار

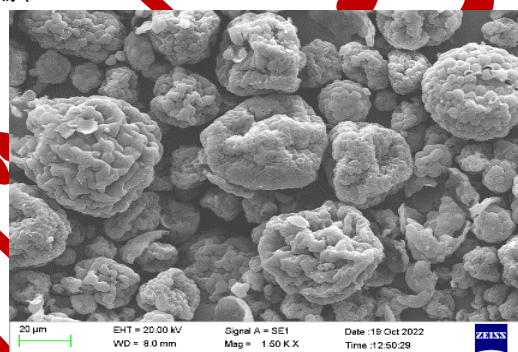
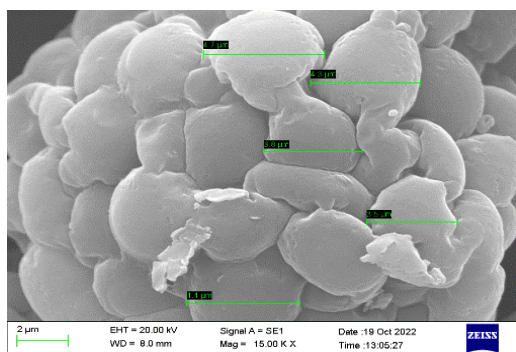
ویژگی های بیوچار و هیدروچار فعال شده

جدول ۲ نتایج آنالیز شیمیایی بیوچار و هیدروچار فعال شده را نشان می دهد. مطالعات نشان داده اند که pH بیوچار به طور قابل توجهی بالاتر از هیدروچار است. مقدار pH در بیوچار و هیدروچار می تواند تحت تأثیر عواملی مانند نوع ماده اولیه، فرآیند تولید و اصلاحات پس از تولید به طور گسترده ای متغیر باشد. به طور کلی، بیوچار تمایل به داشتن خاصیت قلیایی دارد و معمولاً دارای pH بین ۷ تا ۱۰ است، در حالی که هیدروچار می تواند دارای دامنه وسیع تری از pH باشد که بسته به ماده اولیه و شرایط فرایند کربنیزاسیون هیدروترمال، ممکن است کمی اسیدی، خنثی یا قلیایی باشد. سطح ویژه در بیوچار و هیدروچار نیز به طور قابل توجهی متفاوت است و به عواملی مانند ماده خام اولیه، نوع فرآیند و اصلاحات انجام شده بستگی دارد. به طور معمول، بیوچار دارای سطح ویژه بیشتری نسبت به هیدروچار است. ارزش حرارتی ناخالص (GCV) در بیوچار و هیدروچار نیز می تواند به طور محسوسی با توجه به نوع بیومس اولیه متفاوت باشد. بیوچار معمولاً دارای GCV کمتری نسبت به بیومس اولیه است که از آن تولید شده است. این یافته با نتایج گزارش شده توسط Suman et al, (2020) و Mukhopadhyay et al, (2024) مطابقت دارد. در طول فرآیند پیرولیز مورد استفاده برای تولید بیوچار، بخش قابل توجهی از انرژی ذخیره شده در بیومس به صورت گازهای فرار آزاد می شود. در مقابل، هیدروچار که از طریق کربنیزاسیون هیدروترمال تولید می شود، می تواند دارای GCV نزدیک تری به بیومس اولیه باشد، زیرا این فرآیند در محیطی غنی از آب انجام می گیرد که به حفظ بیشتر محتوای انرژی کمک می کند (Al-Wabel et al., 2018; Oktaviananda & Prasetya, 2019). تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از جلبک اصلاح شده، بیوچار و هیدروچار در شکل ۱ نمایش داده شده اند.

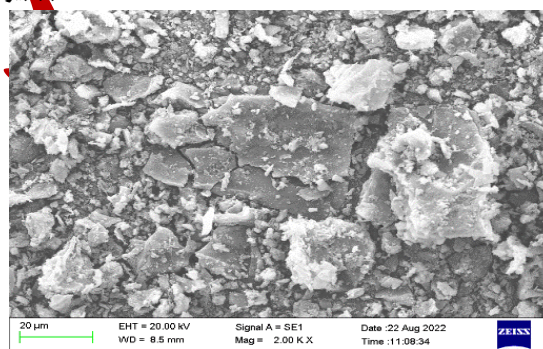
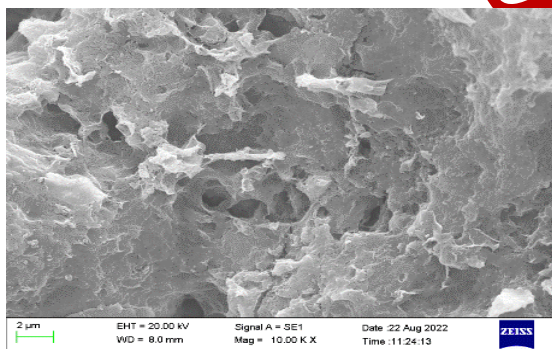
جدول ۲. ویژگی های بیوجار و هیدروچار فعال شده

مواد		ویژگی
بیوجار	هیدروچار	
۸/۱±۰/۲	۶/۹±۰/۱	pH
۴/۸±۰/۱	۳/۶±۰/۱	EC
۹۴۸/۱±۰/۲	۸۳۹/۶±۰/۳	سطح ویژه ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)
۳/۶۱±۰/۱	۳/۴۹±۰/۱	میانگین قطر منافذ (nm)
۵۲/۴±۰/۲	۵۴/۳±۰/۲	عملکرد (%)
۱۷/۲±۰/۱	۱۷/۹±۰/۲	GCV
۸۳/۶±۰/۳	۷۴/۷±۰/۱	V_{micro} (vol %)

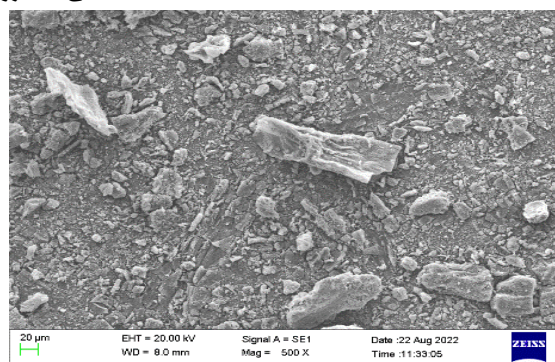
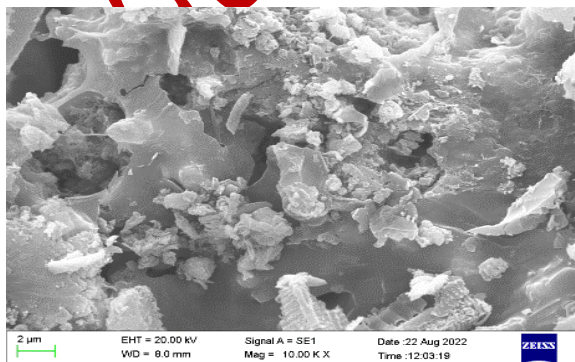
الف) بیومس



ب) بیوجار



ج) هیدروچار



شکل ۱. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از الف) بیومس، ب) بیوجار فعال شده، ج) هیدروچار فعال شده

جمعیت باکتری‌های خاک

جدول ۳ مقایسه میانگین اثر مقادیر مختلف بیوپار و هیدروچار در زمان‌های مختلف بر جمعیت باکتری‌های خاک را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج این جدول، زمان و نوع ماده مصرفی تأثیر معنی‌داری بر تغییرات جمعیت باکتریایی خاک داشتند. بیشترین جمعیت باکتریایی در تیمارهای ۰/۵ و ۱ در صد هیدروچار در هفته دوم مشاهده شد که معادل $63/33 \times 10^6$ کلنی در هر گرم خاک خشک ($CFU g^{-1}$) بود. در مقابل، کمترین جمعیت باکتریایی در تیمارهای ۰/۵ و ۱ درصد بیوپار در ابتدای آزمایش ثبت گردید که برابر با $10/00 \times 10^6$ کلنی در هر گرم خاک خشک ($CFU g^{-1}$) بود. در کلیه تیمارهای مورد بررسی، در ابتدای دوره، روند افزایشی در جمعیت باکتریایی مشاهده شد که در ادامه، این روند به تدریج کاهش یافت. دلیل این رفتار می‌تواند به دسترس‌پذیری بالاتر مواد آلی در آغاز دوره آزمایش نسبت داده شود. در تیمار ۰/۵ درصد بیوپار، روند افزایشی تا هفته سوم ادامه داشت و پس از آن کاهش یافت. در مورد تیمارهای ۰/۵ و ۱ درصد هیدروچار نیز نتایج نشان داد که روند افزایشی تا هفته سوم ادامه یافت، به‌طوری‌که جمعیت باکتریایی خاک از $13/33 \times 10^6$ کلنی در هر گرم خاک خشک ($CFU g^{-1}$) در روز اول به $30/00 \times 10^6$ کلنی در هر گرم خاک خشک ($CFU g^{-1}$) افزایش یافت. جمعیت بیشتر باکتریایی در تیمارهای با دوز بالاتر ماده آلی (۱ درصد) نسبت به تیمارهای با مقدار پایین‌تر (۰/۵ درصد)، به دلیل فراهم بودن شرایط رشدی مطلوب‌تر و دسترسی بیشتر به مواد غذایی برای باکتری‌ها است. در همین راستا، Yadav et al, (2016) گزارش کردند که افزودن کود آلی به خاک، موجب افزایش جمعیت میکروارگانیسم‌های خاک از جمله باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌شود. این پژوهشگران همچنین بیان کردند که در تیمار ورمی‌کمپوست، جمعیت باکتری‌های خاک به $35/00 \times 10^6$ کلنی در هر گرم خاک خشک ($CFU g^{-1}$) رسید. همچنین، بیوپار می‌تواند با بهبود ساختار خاک و افزایش ظرفیت نگهداری آب، به رشد بهتر میکروارگانیسم‌های خاک کمک کند (Sun et al., 2015; Ajema, 2018). افزایش جمعیت باکتریایی ناشی از فعالیت کرم خاکی نیز یکی دیگر از عوامل مؤثر در افزایش میکروارگانیسم‌های خاک است. در این زمینه، Suhane (2007) گزارش کرد که جمعیت کل باکتری‌ها در ورمی‌کمپوست به بیش از 10^{10} کلنی در هر گرم خاک خشک ($CFU g^{-1}$) می‌رسد که شامل گونه‌هایی مانند *Rhizobium*, *Nitrobacter*, *Azotobacter*، باکتری‌های حل‌کننده فسفر و *Actinomycetes* بود.

جدول ۳. تغییرات جمعیت باکتری‌ها (10^6 کلنی در گرم خاک خشک) در طول زمان در هر تیمار.

زمان	هیدروچار ۰/۵ درصد	هیدروچار یک درصد	بیوپار ۰/۵ درصد	بیوپار یک درصد
شروع	$13/33^e$	$13/33^f$	$10/00^d$	$10/00^e$
هفته اول	$40/00^b$	$53/33^b$	$13/33^c$	$36/66^a$
هفته دوم	$63/33^a$	$63/33^a$	$33/33^b$	$22/33^c$
هفته سوم	$26/66^c$	$33/33^d$	$30/00^a$	$36/66^a$
هفته ششم	$23/33^d$	$43/33^c$	$13/33^c$	$30/00^b$
هفته نهم	$13/33^e$	$33/33^d$	$13/33^c$	$23/33^c$
هفته دوازدهم	$13/33^e$	$30/00^e$	$10/00^d$	$16/66^d$

جمعیت قارچ‌های خاک

مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر جمعیت قارچ‌های خاک در جدول ۴ نشان داده شده است. الگوی تغییرات جمعیت قارچ‌های خاک مشابه تغییرات مشاهده‌شده در جمعیت باکتری‌ها بود. جمعیت قارچ‌های خاک تحت تأثیر زمان و نوع اصلاح‌کننده آلی قرار گرفت (جدول ۴). بیشترین جمعیت قارچ‌ها، معادل $66/33 \times 10^4$ کلنی در هر گرم خاک خشک ($CFU g^{-1}$)، در تیمارهای ۰/۵ و ۱ درصد هیدروچار در هفته‌های دوم و سوم مشاهده شد. کمترین جمعیت قارچ‌های خاک، معادل $10/00 \times 10^4$ کلنی در هر گرم خاک خشک ($CFU g^{-1}$)، مربوط به تیمار ۰/۵ درصد بیوپار در ابتدای آزمایش بود. در تیمارهای هیدروچار، روند افزایشی در جمعیت قارچ‌های خاک از روز اول تا هفته سوم مشاهده شد و پس از آن، از روز پانزدهم تا روز نود روند کاهشی داشت. به طور مشابه، در تیمار بیوپار نیز افزایش جمعیت قارچ‌ها تا هفته دوم ادامه داشت و سپس کاهش یافت. در کلیه تیمارها، استفاده از غلظت‌های بالاتر

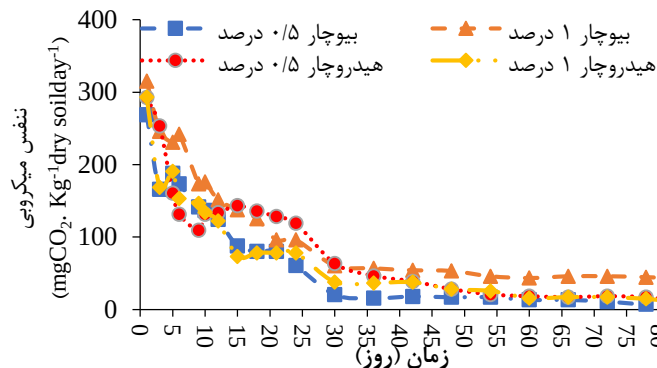
بیوچار و هیدروچار (یک درصد) باعث افزایش بیشتر جمعیت قارچ‌های خاک نسبت به تیمارهای با غلظت پایین‌تر (۰/۵ درصد) شد که احتمالاً به دلیل افزایش در دسترسی به مواد مغذی مورد نیاز قارچ‌ها بوده است. مطالعات متعددی نقش مثبت مواد آلی در افزایش جمعیت میکروبی خاک را گزارش کرده‌اند (Tandon, 1992; Subba Rao, 1993). Yadav et al, (2016) اعلام کردند که جمعیت قارچ‌های خاک در تیمار ورمی‌کمپوست معادل $10^4 \times 17/60$ کلنی در هر گرم خاک خشک (CFU g^{-1}) بوده است. همچنین Chang et al, (2007) گزارش کردند که افزودن کمپوست به خاک باعث افزایش جمعیت قارچ‌ها می‌شود که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد.

جدول ۴. تغییرات جمعیت قارچ‌ها (10^4 کلنی در گرم خاک خشک) در طول زمان در هر تیمار

زمان	هیدروچار ۰/۵ درصد	هیدروچار یک درصد	بیوچار ۰/۵ درصد	بیوچار یک درصد
شروع	۱۳/۳۳ ^e	۱۳/۳۳ ^d	۱۰/۰۰ ^e	۱۳/۳۳ ^e
هفته اول	۲۳/۳۳ ^d	۵۳/۳۳ ^b	۱۶/۶۷ ^{cd}	۲۳/۳۳ ^c
هفته دوم	۴۳/۳۳ ^a	۶۳/۳۳ ^a	۲۶/۶۷ ^b	۳۶/۶۶ ^a
هفته سوم	۲۶/۶۷ ^{cd}	۶۳/۳۳ ^a	۳۰/۰۰ ^a	۳۳/۳۳ ^{ab}
هفته ششم	۲۳/۳۳ ^d	۴۰/۰۰ ^c	۱۳/۳۳ ^d	۲۶/۶۶ ^b
هفته نهم	۳۶/۶۷ ^{ab}	۱۳/۳۳ ^d	۱۳/۳۳ ^d	۲۳/۳۳ ^c
هفته دوازدهم	۳۳/۳۳ ^b	۱۳/۳۳ ^d	۱۰/۰۰ ^e	۲۰/۰۰ ^d

تنفس میکروبی

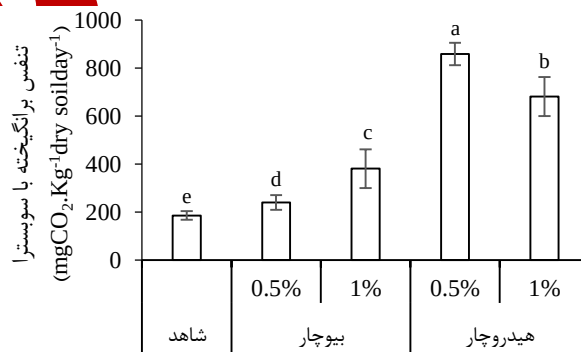
روند تغییرات تنفس میکروبی خاک در تیمارهای مختلف طی دوره انکوباسیون در شکل ۲ نشان داده شده است. به طور کلی، تنفس میکروبی در طول دوره مورد مطالعه روندی کاهشی را نشان داد. در ابتدا، تمام تیمارها با افت شدید در میزان تنفس میکروبی همراه بودند که این کاهش از اواسط دوره آزمایش به صورت ملایم‌تری ادامه یافت. این افت سریع اولیه را می‌توان به تجزیه سریع اجزای قابل‌دسترس‌تر ترکیبات آلی توسط میکروارگانیسم‌ها نسبت داد. در نیمه دوم دوره آزمایش، تنها بخش‌های مقاوم‌تر و دیرتجزیه ترکیبات آلی باقی مانده بود، به طوری که شیب تغییرات تنفس میکروبی برای تمامی تیمارها کاهش یافت. در تیمار بیوچار، تنفس میکروبی از مقدار اولیه $31533/33$ میلی‌گرم دی‌اکسیدکربن به ازای هر کیلوگرم خاک خشک در روز آغاز شد و تا روز یازدهم کاهش شدید داشت، سپس روند کاهش آن ملایم‌تر شد. واحدی و همکاران (۱۳۹۸) نشان دادند که استفاده از بیوچار ضایعات هرس درختان میوه سبب افزایش تنفس میکروبی خاک شده است و با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. کریمی و همکاران (۱۳۹۹) نشان دادند که بیوچار تهیه شده از باگاس نیشکر سبب بهبود ویژگی‌های میکروبی خاک از جمله تنفس میکروبی خاک شده است که با نتایج به دست آمده از این مطالعه در یک راستا است. همچنین جمیلی و همکاران (۱۴۰۱) نیز بیان کردند که استفاده از مقادیر مختلف بیوچار سیبوس برنج سبب افزایش معنی‌دار کربن آلی و تنفس میکروبی در خاک و بهبود عملکرد گیاه گوجه فرنگی شده است. تحقیقات نشان داده‌اند که افزایش مواد آلی و عناصر غذایی خاک موجب تحریک فعالیت زیست‌توده میکروبی شده و در نتیجه، سطح بالاتری از تنفس میکروبی خاک را به همراه دارد (Fernandes et al., 2005). (Dar et al, 1997) بیان کرد که استفاده از لجن فاضلاب باعث افزایش نیتروژن و کربن در خاک می‌شود که این امر ممکن است موجب افزایش تنفس میکروبی گردد. به طور مشابه، Fernandes et al, (2005) نیز گزارش کردند که افزودن لجن فاضلاب از طریق افزایش مواد آلی قابل استفاده، باعث افزایش تنفس پایه خاک می‌شود. افزودن کودهای آلی موجب بهبود زاد و ولد و عملکرد کرم‌های خاکی می‌شود که اثر مثبتی بر جمعیت میکروبی خاک دارد. افزایش تنفس میکروبی خاک توسط کرم‌های خاکی را می‌توان به ترشحات مخاطی آن‌ها نسبت داد که منبع کربن برای میکروارگانیسم‌های خاک فراهم می‌کند و همچنین فضولات آن‌ها که حاوی مقادیر بالای کربن، نیتروژن و فسفر لازم برای متابولیسم میکروبی است (Vafa et al., 2016). نتایج این پژوهش با یافته‌های سایر محققان نیز هم‌راستا می‌باشد (Li et al., 2002; Khatoon et al., 2017).



شکل ۲. تغییرات تنفس میکروبی در طول زمان در هر یک از تیمارها

تنفس برانگیخته با سوبسترا

شکل ۳، نتایج مقایسه‌ای اثر میانگین تیمارهای مختلف بر تنفس برانگیخته با سوبسترا را نشان می‌دهد. استفاده از بیوچار و هیدروچار فعال شده تأثیر معنی‌داری بر تنفس برانگیخته با سوبسترا داشت. بیشترین میزان تنفس برانگیخته با سوبسترا در تیمار ۰/۵ درصد هیدروچار مشاهده شد که برابر با ۸۵۸ میلی گرم دی اکسید کربن بر کیلوگرم خاک خشک در روز بود و از نظر آماری در سطح پنج درصد اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت. همچنین تیمار ۱ درصد بیوچار، در مقایسه با تیمار ۰/۵ درصد، افزایش معنی‌داری در تنفس برانگیخته با سوبسترا نشان داد. کمترین میزان تنفس برانگیخته با سوبسترا در تیمار شاهد مشاهده شد که برابر با ۱۸۶ میلی گرم دی اکسید کربن بر کیلوگرم خاک خشک در روز بود. مواد آلی منبعی در دسترس از کربن فراهم می‌کنند که یکی از منابع اصلی انرژی برای میکروارگانیسم‌های خاک به شمار می‌رود. افزودن مواد آلی، رشد و فعالیت میکروبی را تحریک کرده و در نتیجه منجر به افزایش نرخ تنفس می‌شود (Horwath, 2017). مواد آلی معمولاً حاوی عناصر مغذی ضروری نظیر نیتروژن، فسفر و عناصر کم‌مقدار هستند که متابولیسم و تکثیر میکروبی را تقویت کرده و نرخ تنفس را بیشتر افزایش می‌دهند (Stevenson & Cole, 1999; Powlson et al., 2001). سطوح بالای مواد آلی باعث افزایش فعالیت میکروارگانیسم‌های خاک و شدت تجزیه می‌شود که این امر موجب افزایش تنفس خاک و آزادسازی بیشترین کسید کربن از خاک می‌گردد (Zhang et al., 2014). همچنین Rutigliano et al, (2014) گزارش دادند که مصرف بیوچار منجر به افزایش تنفس ناشی از ۱۶ نوع سوبسترای مختلف شد، که نشان‌دهنده آن است که ترکیبات فرار و ترکیبات جذب‌شده روی سطح بیوچار پس از پیولیز می‌توانند به عنوان سوبستراهای قابل دسترس عمل کرده و موجب افزایش رشد و فعالیت میکروبی در چند ماه ابتدایی پس از کاربرد بیوچار شوند.

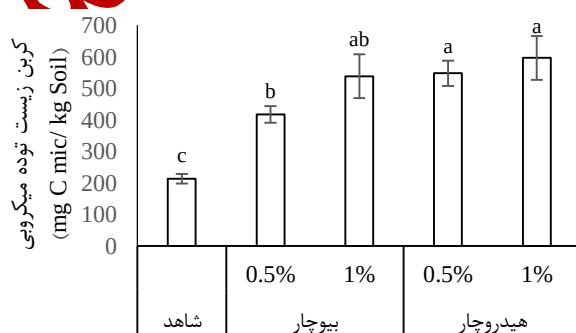


شکل ۳. تغییرات تنفس برانگیخته با سوبسترا در طول زمان در هر یک از تیمارها.

وجود حروف یکسان بر روی ستون‌ها نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است. خطوط عمودی روی هر ستون نیز انحراف معیار داده‌ها را نشان می‌دهند.

کربن زیست توده میکروبی

نتایج مقایسه میانگین اثر اصلاح پارامترهای مختلف بر کربن زیست‌توده میکروبی خاک در شکل ۴ نشان داده شده است. یافته‌ها این پژوهش نشان می‌دهد که استفاده از بیوجار و هیدروچار منجر به افزایش معنی‌دار کربن زیست‌توده میکروبی خاک شده است. بیشترین میزان کربن زیست‌توده میکروبی، معادل ۵۹۶ میلی‌گرم کربن میکروبی در هر کیلوگرم خاک، در تیمار ۱ درصد هیدروچار مشاهده شد، در حالی که کمترین مقدار آن، معادل ۲۱۳ میلی‌گرم کربن میکروبی در هر کیلوگرم خاک، در تیمار شاهد به دست آمد. در محیط خاک، یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده برای فعالیت میکروبی، توانایی دسترسی به بسترهای کربنی قابل استفاده است. ورود بسترهای قابل دسترس مانند ماده آلی به خاک، جمعیت میکروبی را افزایش داده و به دنبال آن، زیست‌توده میکروبی و برخی فعالیت‌های آنزیمی نیز افزایش می‌یابد (Wright et al., 2005). بنابراین، افزایش ماده آلی یا بقایای گیاهی یکی از شیوه‌های مدیریتی مهم برای بهبود کیفیت خاک محسوب می‌شود. بهبود ساختار خاک از طریق کاربرد کودهای آلی، با افزودن عناصر غذایی به خاک، سبب افزایش رشد و فعالیت میکروبی می‌شود (Tripathi et al., 2006). همچنین، Bhattacharyya et al, (2005) گزارش کردند که بهبود شرایط فیزیکی خاک از طریق استفاده از کودهای آلی، باعث افزایش کربن زیست‌توده میکروبی خاک می‌شود. کاهش چگالی ظاهری خاک با افزودن ماده آلی نیز موجب افزایش فعالیت و تراکم جوامع میکروبی خاک می‌گردد (Khattoon et al., 2017). Salam et al, (1998) بیان کردند که افزایش فعالیت آنزیمی در نتیجه افزایش ماده آلی، به دلیل وابستگی فعالیت میکروبی و آنزیم‌های تولید شده به تأمین بسترهای کربنی است. علاوه بر این، اغلب آنزیم‌های خارج سلولی که در خاک آزاد می‌شوند، تنها در صورتی می‌توانند پایداری خود را حفظ کنند که سریعاً تجزیه نشوند. با کاهش مقدار ماده آلی، فعالیت آنزیمی نیز به طور متناسب کاهش یافته و در نتیجه، زیست‌توده میکروبی کاهش یافته و تغییراتی در رشد و توسعه ریشه و جمعیت میکروبی خاک ایجاد می‌شود. در مطالعه‌ای توسط Paz-Ferreiro et al, (2014)، اثرات متقابل چهار نوع بیوجار (تهیه‌شده در دماهای ۴۵۰، ۶۰۰ و ۸۵۰ درجه سانتی‌گراد) و کرم‌های خاکی بر عملکرد گیاه و فعالیت آنزیم‌های خاک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که افزودن بیوجار باعث افزایش زیست‌توده میکروبی شد (این تفاوت بین تنفس پایین خاک و جمعیت میکروبی بالا، از ویژگی‌های بارز خاک‌های تراپرتا در منطقه آمازون برزیل به‌شمار می‌رود). همچنین، بیوجار منجر به افزایش ماده آلی، pH خاک و فعالیت آنزیم‌ها β -گلوکوزیداز (بین ۵۹ تا ۱۶۹ در صد)، اینورتاز (۱۱۶ در صد)، β -گلوکوز آمینیداز (۲۳۳ در صد)، اوره‌آز (۲۷ در صد) و آریل سولفاتاز (۳۵۰ در صد) شد. نتایج به دست آمده همچنین نشان دادند که میزان افزایش فعالیت آنزیم‌ها در اثر کاربرد انواع مختلف بیوجار متفاوت بوده و روند ثابتی در افزایش فعالیت آنزیم‌های مختلف مشاهده نمی‌شود.



شکل ۴. تغییرات کربن زیست‌توده میکروبی در طول زمان در هر یک از تیمارها.

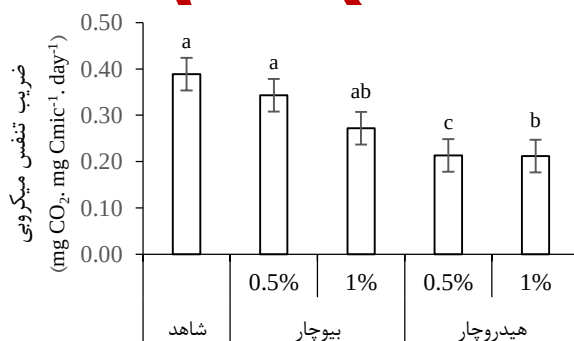
وجود حروف یکسان بر روی ستون‌ها نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است.

خطوط عمودی روی هر ستون نیز انحراف معیار داده‌ها را نشان می‌دهند.

ضریب تنفس میکروبی^۱

¹ Respiration quotient

نتایج مقایسه میانگین اثر انواع کودها بر ضریب تنفس در شکل ۵ نشان داده شده است. با افزودن مواد اصلاحی مختلف به خاک، ضریب تنفس به طور معنی داری در سطح ۵ در صد کاهش یافت. نتایج نشان می دهد که در تیمارهای بیوچار، اختلاف معنی داری در ضریب تنفس بین انواع کودها مشاهده نشد؛ با این حال، کودهای آلی کاهش بیشتری در ضریب تنفس نسبت به کودهای شیمیایی نشان دادند. به طور مشابه، در تیمارهای هیدروچار نیز تفاوت معنی داری در ضریب تنفس مشاهده نگردید. تغییر در جزء متابولیکی ممکن است نشانه ای از تغییر در جامعه میکروبی خاک باشد. بنابراین، تغییرات مشاهده شده در این شاخص بر اثر افزودن اصلاح کننده های کوتاه مدت و بلندمدت احتمالاً وابسته به تغییر در ترکیب جامعه میکروبی خاک است. از سوی دیگر، کاهش جزء متابولیکی ناشی از افزودن بلندمدت بیوچار و هیدروچار نشان می دهد که این اصلاح کننده ها با کاهش تنش در خاک، موجب بهبود کیفیت خاک شده اند. تلایج حاکی از آن است که طی دوره انکوباسیون و در حضور فعالیت کرم های خاکی، جمعیت میکروبی خاک به سمت جمعیت های کارآمدتر از نظر مصرف کربن و انرژی تغییر یافته است. جمعیت های کارآمد به آن دسته از میکروارگانیسم هایی اطلاق می شود که قادرند بخش بیشتری از کربن را به کربن زیست توده میکروبی تبدیل کنند. برای نمونه، قارچ ها از نظر مصرف کربن و انرژی نسبت به باکتری ها کارآمدتر هستند (Moscattelli et al., 2007). بنابراین، این احتمال وجود دارد که ساختار جامعه میکروبی خاک در حضور کرم های خاکی به مرور زمان دچار تغییر شده باشد؛ هرچند این فرضیه نیازمند بررسی های بیشتر در مطالعات آتی است. شاخص جزء متابولیکی به عنوان نشانگری مناسب برای تعیین وضعیت تنش در اکوسیستم خاک مورد استفاده قرار می گیرد. در شرایط تنش زا، مشاهده شده است که میکروارگانیسم ها انرژی بیشتری را برای حفظ زیست توده خود مصرف می کنند (Anderson, 2003). Nahidan & Sepahvand (2023) کاهش معنی داری در ضریب تنفس با افزایش بیوچار گزارش کردند که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد. همچنین، Khadem & Ralesi, (2017) دریافتند که افزودن بیوچار موجب کاهش این شاخص در خاک شده است. نتایج آن ها نشان داد که میزان کاهش ضریب تنفس در تیمار بیوچار بیشتر از تیمار بقایای ذرت بوده است.



شکل ۵. تغییرات ضریب تنفس میکروبی در طول زمان در هر یک از تیمارها.

وجود حروف یکسان بر روی ستون ها نشان دهنده عدم وجود تفاوت معنی دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است.

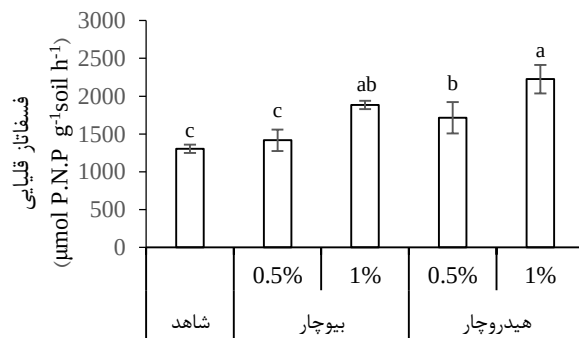
خطوط عمودی روی هر ستون نیز انحراف معیار داده ها را نشان می دهند.

فسفاتاز قلیایی^۱

نتایج مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر میزان آنزیم فسفاتاز قلیایی در خاک در شکل ۶ ارائه شده است. یافته ها نشان می دهد که افزودن بیوچار و هیدروچار موجب افزایش معنی دار فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در خاک شده است. بیشترین میزان این آنزیم در تیمار هیدروچار با غلظت ۱ در صد مشاهده شد که برابر با ۲۲۲۵ میکروگرم P.N.P بر گرم خاک در ساعت بود. در مقابل، کمترین مقدار آنزیم فسفاتاز قلیایی در تیمار شاهد به دست آمد که معادل ۱۳۰۳ میکروگرم P.N.P بر گرم خاک در ساعت بود. افزودن ۰/۵ درصد بیوچار به خاک موجب افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی گردید، اما این افزایش از نظر آماری معنی دار نبود. با این حال، زمانی که میزان بیوچار به ۱ درصد افزایش یافت، تغییرات معنی داری در فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی خاک مشاهده شد. Khademi

¹ Alkaline phosphatase

et al, (2006) گزارش کردند که افزایش ماده آلی نه تنها موجب تقویت فعالیت‌های میکروبی می‌شود، بلکه باعث پایداری بیشتر آنزیم فسفاتاز در خاک شده و در نهایت، فعالیت این آنزیم را افزایش می‌دهد. (Tian et al, (2023) در مطالعه‌ای بر خاک‌های شور ساحلی نشان دادند که استفاده از بیوپار همراه با زهکشی زیرسطحی در مقایسه با شرایط بدون زهکشی یا با زهکشی سطحی، باعث افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی می‌شود. همچنین، (Ahmad et al, (2022 گزارش کردند که کاربرد ۱۰ تن در هکتار بیوپار تهیه شده از شاخه‌های خشک شده درخت سیب، فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی را به میزان ۳۰ تا ۳۳ درصد افزایش داده است. نتایج آن‌ها نشان داد که افزودن بیوپار به‌طور مؤثری موجب افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی می‌گردد که با یافته‌های پژوهش حاضر هم‌راستا است.



شکل ۶. تغییرات فسفاتاز قلیایی در طول زمان در هر یک از تیمارها.

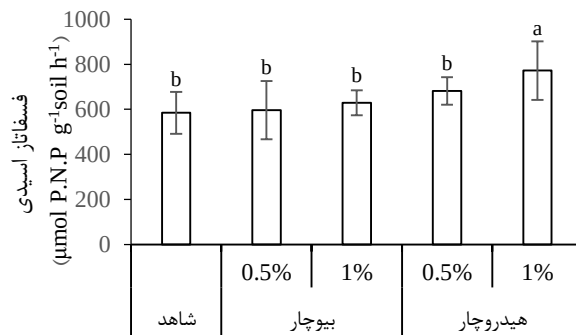
وجود حروف یکسان بر روی ستون‌ها نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است.

خطوط عمودی روی هر ستون نیز انحراف معیار داده‌ها را نشان می‌دهند.

فسفاتاز اسیدی^۱

نتایج مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی در شکل ۷ ارائه شده است. این نتایج نشان می‌دهد که تیمارهای کودی تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی نداشته‌اند. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار هیدروچار ۱ درصد مشاهده شد که معادل ۷۷۲ میکروگرم P.N.P بر گرم خاک در ساعت بود، در حالی که کمترین مقدار آن، برابر با ۴۲۷ میکروگرم P.N.P بر گرم خاک در ساعت، در تیمار شاهد ثبت گردید. افزودن بیوپار به خاک موجب افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی شد، اما تفاوت میان سطوح مختلف بیوپار (۰/۵ و ۱ درصد) از نظر آماری معنی‌دار نبود. (Leelahawonge & Pongsilp (2009) فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز در باکتری‌های گره ریشه و عوامل تغذیه‌ای مؤثر بر تولید این آنزیم‌ها را بررسی کردند. آن‌ها نتیجه گرفتند که استفاده از ماده آلی، تولید هر دو نوع آنزیم فسفاتاز قلیایی و اسیدی را در تمامی سویه‌های مورد مطالعه به‌طور قابل توجهی افزایش داده است. افزودن بیوپار در مطالعات مختلفی به‌عنوان عامل مؤثر بر فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی معرفی شده است. برای نمونه، در مطالعه‌ای بر خاک مراتع، مشاهده شد که افزودن بیوپار موجب افزایش ۴۰ تا ۴۵ درصدی در فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی نسبت به تیمار شاهد شده است (Garbuz et al, 2022). در مقابل، در مطالعه‌ای دیگر بر نهال‌های هلو، تیمارهای بیوپار منجر به کاهش معنی‌دار فعالیت این آنزیم در مقایسه با تیمار شاهد گردید (Wu et al., 2020). همچنین، (Heidari et al, 2020) به بررسی ترکیب میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات با انواع مختلف بیوپار به‌منظور بهبود عملکرد گلرنگ و افزایش فعالیت آنزیم‌های خاک پرداختند. این پژوهشگران از بیوپار تهیه‌شده از کود دامی گاوی استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که کاربرد بیوپار موجب تغییرات معنی‌دار در فعالیت آنزیم‌های دهیدروناز، اوره‌از، فسفاتاز اسیدی و فسفاتاز قلیایی گردید.

¹ Acid phosphatase

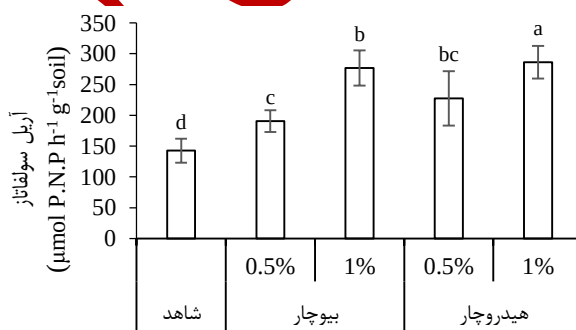


شکل ۷. تغییرات فسفاتاز اسیدی در طول زمان در هر یک از تیمارها.

وجود حروف یکسان بر روی ستون‌ها نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است. خطوط عمودی روی هر ستون نیز انحراف معیار داده‌ها را نشان می‌دهند.

آریل سولفاتاز^۱

نتایج مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر فعالیت آنزیم آریل سولفاتاز در شکل ۸ نشان داده شده است. این نتایج بیانگر آن است که در مقایسه با تیمار شاهد، افزودن بیوچار و هیدروچار موجب افزایش فعالیت آنزیم آریل سولفاتاز در خاک شده است. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار ۰/۵ درصد هیدروچار مشاهده شد که معادل ۲۸۶ میکروگرم P.N.P. بر گرم خاک در ساعت بود، در حالی که کمترین مقدار آن، معادل ۱۶۶ میکروگرم P.N.P. بر گرم خاک در ساعت، در تیمار شاهد ثبت گردید. بررسی مقایسه‌ای میانگین‌ها نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای بیوچار و هیدروچار است. همچنین، افزایش مقدار بیوچار و هیدروچار از ۰/۵ به ۱ درصد، منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم آریل سولفاتاز گردید. آنزیم آریل سولفاتاز نقش کلیدی در فرآیند تجزیه مواد آلی و معدنی شدن گوگرد در خاک ایفا می‌کند و نسبت به نوع مدیریت خاک بسیار حساس است (Bandick & Dick, 1999). به‌طور کلی، افزودن بقایای آلی به خاک موجب افزایش تکثیر میکروبی و فعالیت آنزیمی می‌شود، از طریق افزایش هوموس خاک از آنزیم‌ها محافظت کرده، ترشح آنزیم‌ها را تحریک می‌کند و همچنین با تشکیل کمپلکس‌هایی با فلزات سنگین سمی مانند سرب، نیکل و کادمیوم، به افزایش فعالیت آنزیمی در خاک کمک می‌نماید (Karami et al., 2011; Galvez et al., 2012).



شکل ۸. تغییرات آریل سولفاتاز در طول زمان در هر یک از تیمارها.

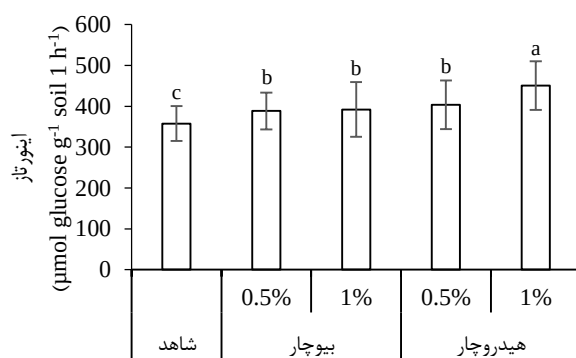
وجود حروف یکسان بر روی ستون‌ها نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است. خطوط عمودی روی هر ستون نیز انحراف معیار داده‌ها را نشان می‌دهند.

اینورتاز^۲

نتایج مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر فعالیت آنزیم اینورتاز در شکل ۹ نشان داده شده است. این نتایج حاکی از آن است که بیشترین میزان فعالیت آنزیم اینورتاز در تیمار هیدروچار ۱ درصد مشاهده شد که معادل ۴۵۰/۵ میکروگرم گلوکز بر گرم خاک در

1 Arylsulfatase
2 Invertase

ساعت بود، در حالی که کمترین میزان این آنزیم در تیمار شاهد به دست آمد و برابر با ۳۵۷ میکروگرم گلوکز بر گرم خاک در ساعت بود. یافته‌ها نشان می‌دهد که هیدروچار تأثیر بیشتری نسبت به بیوچار بر فعالیت آنزیم اینورتاز داشته است. اگرچه افزایش مقدار بیوچار از ۰/۵ به ۱ در صد منجر به تغییرات معنی‌داری در فعالیت این آنزیم نگردید، اما در مقایسه با تیمار شاهد، این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار بودند. Wang et al, (2021) گزارش کردند که افزودن ورمی‌کمپوست موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم اینورتاز در خاک شد که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. به طور مشابه، Jing et al, (2020) نشان دادند که کاربرد بیوچار حاصل از گندم، برنج و ذرت در طول زمان منجر به افزایش قابل توجهی در فعالیت آنزیم اینورتاز خاک شده است. همچنین، Chang et al, (2007) گزارش کردند که افزودن کود کمپوست آلی باعث افزایش فعالیت آنزیم اینورتاز در خاک گردیده که این نیز با نتایج مطالعه حاضر هم‌راستا است.



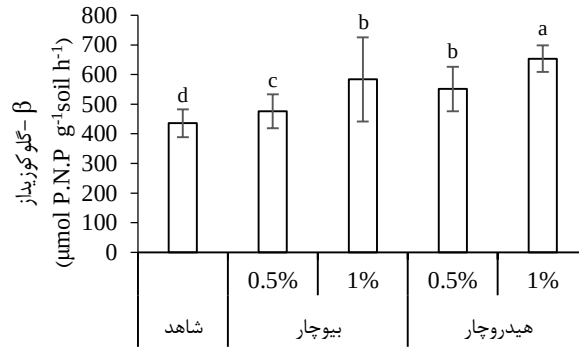
شکل ۹. تغییرات اینورتاز در طول زمان در هر یک از تیمارها.

وجود حروف یکسان بر روی ستون‌ها نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است.

خطوط عمودی روی هر ستون نیز انحراف معیار داده‌ها را نشان می‌دهند.

β-گلوکوزیداز^۱

شکل ۱۰ نتایج مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر فعالیت آنزیم β-گلوکوزیداز را نشان می‌دهد. نتایج حاکی از آن است که تیمار هیدروچار ۱ درصد بالاترین میزان فعالیت آنزیم β-گلوکوزیداز را به همراه داشته است، به طوری که مقدار آن برابر با ۶۵۳/۵ میکروگرم P.N.P بر گرم خاک در ساعت بوده که این تفاوت از نظر آماری نسبت به سایر تیمارها معنی‌دار است. کمترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار شاهد ثبت شده است، که معادل ۴۳۵ میکروگرم P.N.P بر گرم خاک در ساعت می‌باشد. مطالعه‌ای توسط Paz-Ferreiro et al, (2012) نشان داد که افزودن بیوچار تولید شده در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد، موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های β-گلوکوزیداز، سوکراز، β-گلوکوز آمینیداز، اوره‌آز و آریل سولفاتاز در خاک‌های لومی-رسی شنی شده است. دلایل افزایش فعالیت آنزیمی در این پژوهش، شامل جذب سطحی باکتری‌ها توسط بیوچار و جلوگیری از شکار آن‌ها توسط سایر موجودات، محافظت در برابر شست‌وشوی آن‌ها از خاک، و ایمنی در برابر شکار باکتری‌ها و قارچ‌ها بیان شده است. همچنین، بیوچار می‌تواند به صورت نسبی نیازهای تغذیه‌ای میکروارگانیسم‌ها را تأمین کرده و با افزایش pH خاک، اثر آهکی ایجاد نماید. یافته‌های این مطالعه با نتایج گزارش شده توسط Ouyang et al, (2014) و همچنین Akça & Namli (2015) مطابقت دارد.

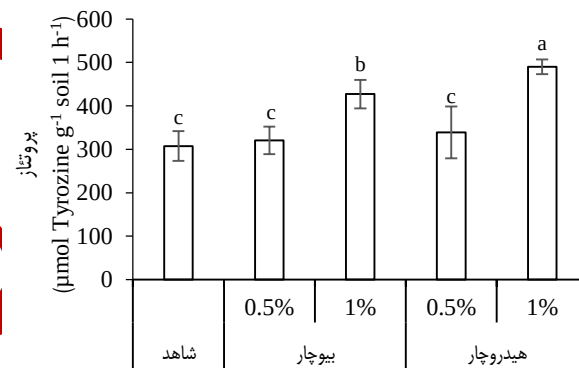


شکل ۱۰. تغییرات β-گلوکوزیداز در طول زمان در هر یک از تیمارها.

وجود حروف یکسان بر روی ستون‌ها نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است. خطوط عمودی روی هر ستون نیز انحراف معیار داده‌ها را نشان می‌دهند.

پروتئاز^۱

شکل ۱۱ مقایسه‌ای از میانگین اثر تیمارهای مختلف بر فعالیت آنزیم پروتئاز را نشان می‌دهد. نتایج بیانگر آن است که بالاترین مقادیر فعالیت آنزیم پروتئاز به ترتیب در تیمارهای هیدروچار و بیوچار ۱ درصد مشاهده شد که به ترتیب برابر با ۴۷۹/۸ و ۴۲۷/۱ میکروگرم تیروزین بر گرم خاک در ساعت بوده‌اند. در سطح ۰/۵ درصد، نتایج نشان داد که بین تیمارهای بیوچار و هیدروچار تفاوت معنی‌داری از نظر آماری وجود ندارد. (Wang et al, (2015 گزارش کردند که افزودن بیوچار به خاک باعث تغییر در فعالیت آنزیم‌های خاک می‌شود که این تغییرات به دلیل دگرگونی در ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک است. همچنین، Chang et al (2007) نشان دادند که افزودن کود کمپوست آلی موجب افزایش فعالیت آنزیم پروتئاز در خاک می‌شود که این یافته با نتایج مطالعه حاضر هم‌راستا است.



شکل ۱۱. تغییرات پروتئاز در طول زمان در هر یک از تیمارها.

وجود حروف یکسان بر روی ستون‌ها نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است. خطوط عمودی روی هر ستون نیز انحراف معیار داده‌ها را نشان می‌دهند.

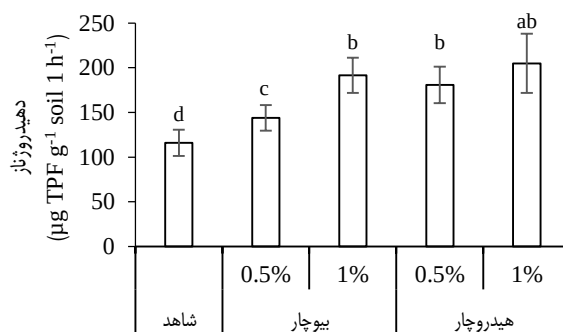
دهیدروژناز^۲

مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر فعالیت آنزیم دهیدروژناز در شکل ۱۲ نمایش داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که بالاترین میزان فعالیت آنزیم دهیدروژناز در تیمارهای هیدروچار ۱ درصد و بیوچار ۱ درصد مشاهده شد که به ترتیب برابر با ۲۰۴ و ۱۹۱ میکروگرم TPF بر گرم خاک در ساعت بوده‌اند. در مقابل، کمترین مقدار این آنزیم در تیمار شاهد ثبت شد که معادل ۱۱۵/۹ میکروگرم TPF بر گرم خاک در ساعت بود. (Manna et al, (2003 گزارش کردند که ویژگی‌های زیستی خاک از جمله تنفس

1 Protease

2 Dehydrogenase

میکروبی، زیست‌توده میکروبی و فعالیت آنزیم دهیدروژناز در خاک‌هایی که با ورمی‌کمپوست تیمار شده بودند، به‌طور معنی‌داری بیشتر از خاک‌هایی بود که با کودهای شیمیایی تیمار شده بودند. همچنین، (Chang et al, 2007) نشان دادند که افزودن کود کمپوست آلی منجر به افزایش فعالیت آنزیم دهیدروژناز در خاک می‌شود که این یافته با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد.



شکل ۱۲. تغییرات دهیدروژناز در طول زمان در هر یک از تیمارها.

وجود حروف یکسان بر روی ستون‌ها نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون دانکن است. خطوط عمودی روی هر ستون نیز انحراف معیار داده‌ها را نشان می‌دهند.

نتیجه‌گیری

این مطالعه به این نتیجه رسید که pH خاک، جمعیت میکروبی و فعالیت آنزیم‌ها به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر افزودن بیوچار و هیدروچار تهیه‌شده از *Chlorella vulgaris* قرار می‌گیرند. تیمارهای هیدروچار بالاترین مقدار pH خاک را در ابتدای دوره انکوباسیون ایجاد کردند، در حالی که تیمارهای بیوچار کمترین مقدار pH را در پایان دوره نشان دادند. هر دو نوع اصلاح‌کننده موجب افزایش کربن زیست‌توده میکروبی خاک و فعالیت آنزیم‌ها شدند، اگرچه اثر هیدروچار در اغلب موارد بارزتر و قوی‌تر بود. با افزایش غلظت این اصلاح‌کننده‌ها، فعالیت میکروبی و سطح آنزیم‌هایی نظیر فسفاتاز اسیدی، آریل سولفاتاز، اینورتاز، β -گلوکوزیداز، پروتئاز و دهیدروژناز نیز افزایش یافت. همچنین این تیمارها منجر به کاهش ضریب تنفس خاک شدند که نشان‌دهنده بهبود کیفیت خاک و کاهش تنش‌های زیستی است. این پژوهش بر تأثیرات مثبت بیوچار و هیدروچار بر سلامت خاک تأکید می‌کند. این اصلاح‌کننده‌ها با بهبود تعادل pH خاک، افزایش فعالیت میکروبی و ارتقای تولید آنزیم‌های کلیدی، نقش مهمی در حاصلخیزی خاک و رشد گیاه ایفا می‌کنند. افزایش زیست‌توده میکروبی و فعالیت آنزیمی حاکی از بهبود چرخه عناصر غذایی و ساختار خاک است. به‌ویژه، هیدروچار در بسیاری از پارامترها عملکرد بهتری نسبت به بیوچار از خود نشان داد و آن را به گزینه‌ای مؤثرتر به عنوان اصلاح‌کننده خاک تبدیل می‌کند. کاهش ضریب تنفس و افزایش بهره‌وری در استفاده از کربن و انرژی نیز حاکی از آن است که این تیمارها به ایجاد محیطی پایدارتر و مقاوم‌تر در خاک کمک می‌کنند. در مجموع، استفاده از بیوچار و هیدروچار حاصل از *Chlorella vulgaris* می‌تواند به عنوان یک راهکار مؤثر در بهبود کیفیت خاک و ارتقاء کشاورزی پایدار مورد توجه قرار گیرد.

منابع

جمیلی، تارا؛ عالی‌نژادیان بید آبادی، افسانه؛ ملکی، عباس؛ فیضیان، محمد؛ اکبرپور، امیدعلی. (۱۴۰۱). بررسی کاربرد بیوچار و سطوح مختلف آبیاری بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و تنفس میکروبی خاک آلوده به کادمیوم در کشت گوجه‌فرنگی. مجله تحقیقات آب و خاک ایران، ۵۳ (۵)، ۹۳۷-۹۵۶.

کریمی، اکبر؛ معزی، عبدالامیر؛ چرم، مصطفی؛ عنایتی ضمیر، نعیمه. (۱۳۹۹). تأثیر بیوچار باگاس نیشکر بر فراهمی عناصر غذایی و ویژگی‌های زیستی یک خاک آهکی. مجله تحقیقات کاربردی خاک، ۸ (۱)، ۱-۱۷.

واحدی، رقیه؛ رسولی صدقیانی، میرحسین؛ برین، محسن. (۱۳۹۸). تأثیر بیوچار ضایعات هرس درختان میوه بر برخی خصوصیات بیولوژیکی خاک در شرایط رایزوباکس. علوم آب و خاک، ۲۳ (۱)، ۳۳۶-۳۴۱.

REFERENCES

- Abdel-Aty, A. M., Ammar, N. S., Abdel Ghafar, H. H., & Ali, R. K. (2013). Biosorption of cadmium and lead from aqueous solution by fresh water alga *Anabaena sphaerica* biomass. *Journal of Advanced Research*, 4, 367-374. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2012.07.004>
- Adhikari, S., Timms, W., & Mahmud, M. P. (2022). Optimising water holding capacity and hydrophobicity of biochar for soil amendment—A review. *Science of The Total Environment*, 851, 158043. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158043>
- Ahmad, R., Gao, J., & Gao, Z. et al. (2022). Influence of biochar on soil nutrients and associated Rhizobacterial communities of mountainous apple trees in northern loess plateau China. *Microorganisms*, 10(10), 2078. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102078>
- Ajema, L. (2018). Effects of biochar application on beneficial soil organism. *International Journal of Scientific Research in Science, Engineering and Technology*, 5(5), 9-18.
- Akça, M. O., & Namli, A. (2015). Effects of poultry litter biochar on soil enzyme activities and tomato, pepper and lettuce plants growth. *Eurasian Journal of Soil Science*, 4(3), 161-168. <https://doi.org/10.18393/ejs.2015.3.161-168>
- Alef, K., & Nannipieri, P. (1995). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. 1nd edn. Academic Press, 576 P.
- Anderson, C. R., Condrón, L. M., & Clough, T. J. et al. (2011). Biochar induced soil microbial community change: implications for biogeochemical cycling of carbon, nitrogen and phosphorus. *Pedobiologia*, 54(5-6), 309-320. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2011.07.005>
- Anderson, T. H. (2003). Microbial eco-physiological indicators to asses Soil quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 98(1-3), 285-293. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(03\)00088-4](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00088-4)
- Bandick, A. K., & Dick, R. P. (1999). Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(11), 1471-1479. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00051-6](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00051-6)
- Berg, B., & McClaugherty, C. (2008). *Plant litter: decomposition, humus formation, carbon sequestration* (p. 338). Berlin: Springer.
- Bhattacharyya, P., Chakrabarti, K., & Chakraborty, A. (2005). Microbial biomass and enzyme activities in submerged rice soil amended with municipal solid waste compost and decomposed cow manure. *Chemosphere*, 60(3), 310-318. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.097>
- Chang, E. H., Chung, R. S., & Tsai, Y. H. (2007). Effect of different application rates of organic fertilizer on soil enzyme activity and microbial population. *Soil Science and Plant Nutrition*, 53(2), 132-140. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00122.x>
- Chaves, V. B. S., Guimarães, T. M., Bezerra, A. C. T. P., da Costa, C. H. M., & Cruz, S. C. S. (2024). Enzymatic activity in different crop succession systems in the Cerrado Region. *Agronomy*, 14(4), 810.
- Dar, G. H. (1997). Impact of lead and sewage sludge on soil microbial biomass and carbon and nitrogen mineralization. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(2). <https://doi.org/10.1007/s001289900325>
- Daunoras, J., Kačergius, A., & Gudiukaitė, R. (2024). Role of soil microbiota enzymes in soil health and activity changes depending on climate change and the type of soil ecosystem. *Biology*, 13(2), 85. <https://doi.org/10.3390/biology13020085>
- Dotaniya, M. L., Aparna, K., Dotaniya, C. K., Singh, M., & Regar, K. L. (2019). Role of soil enzymes in sustainable crop production. In *Enzymes in food biotechnology* (569-589). Academic Press, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00033-5>
- Eivazi, F., & Tabatabai, M. A. (1988). Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 20(5), 601-606. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(88\)90141-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(88)90141-1)
- Elaigwu, S. E., Rocher, V., Kyriakou, G., & Greenway, G. M. (2014). Removal of Pb²⁺ and Cd²⁺ from aqueous solution using chars from pyrolysis and microwave-assisted hydrothermal carbonization of *Prosopis Africana* shell. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 20(5), 3467-3473. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2013.12.036>
- Fernandes, S. A. P., Bettiol, W., & Cerri, C. C. (2005). Effect of sewage sludge on microbial biomass, basal respiration, metabolic quotient and soil enzymatic activity. *Applied Soil Ecology*, 30(1), 65-77. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2004.03.008>
- Frankenberger Jr, W. T., & Dick, W. A. (1983). Relationships between enzyme activities and microbial growth and activity indices in soil. *Soil Science Society of America Journal*, 47(5), 945-951. <https://doi.org/10.2136/sssaj1983.03615995004700050021x>
- Galvez, A., Sinicco, T., & Cayuela, M. L. et al. (2012). Short term effects of bioenergy by-products on soil C and N dynamics, nutrient availability and biochemical properties. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 160, 3-14. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2011.06.015>

- Garbuz, S., Mackay, A., & Camps-Arbestain, M. et al. (2022). Biochar increases soil enzyme activities in two contrasting pastoral soils under different grazing management. *Crop and Pasture Science*, 74(1), <https://doi.org/10.1071/CP21790>
- Ge, Q., Dong, C., Wang, G., Zhang, J., & Hou, R. (2024). Production, characterization and environmental remediation application of emerging phosphorus-rich biochar/hydrochar: a comprehensive review. *RSC advances*, 14(45), 33649-33665.
- Gee, G. W., & Bauder, J. W. (1986). Particle-size analysis. pp. 383-409. In Klute, A. (Ed.). *Methods of Soil Analysis. Part 1. Physical and mineralogical methods*. 2nd ed. Agron. Monogr. 9. ASA and Soil Sci. Am. J. Madison, WI.
- Godlewska, P., Joško, I., & Oleszczuk, P. (2022). Ecotoxicity of sewage sludge-or sewage sludge/willow-derived biochar-amended soil. *Environmental Pollution*, 305, 119235. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119235>
- Guillard, R. R. L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, M. L. and Chanley, M. H., Eds., *Culture of Marine Invertebrates Animals*, Plenum Press, New York, 29-60. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3
- Gunina, A., & Kuzyakov, Y. (2022). From energy to (soil organic) matter. *Global Change Biology*, 28(7), 2169-2182.
- Heidari, E., Mohammadi, K., & Pasari, B. et al. (2020). Combining the phosphate solubilizing microorganisms with biochar types in order to improve safflower yield and soil enzyme activity. *Soil Science and Plant Nutrition*, 66(2), 255-267. <https://doi.org/10.1080/00380768.2019.1704180>
- Herath, H. M. S. K., Camps-Arbestain, M., & Hedley, M. (2013). Effect of biochar on soil physical properties in two contrasting soils: an Alfisol and an Andisol. *Geoderma*, 209, 188-197. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.06.016>
- Horwath, W. R. (2017). The role of the soil microbial biomass in cycling nutrients. *Microbial Biomass: A Paradigm Shift in Terrestrial Biogeochemistry*, 41-66.
- Idris, A. D., Bello, A. B., Hussaini, I. M., Umar, U. A., & Abdulrahim, U. (2024). Soil microbial enzymes and applications. In *Soil microbiome in green technology sustainability* (pp. 429-461). Cham: Springer Nature Switzerland. 429–461
- Jalilian, M., Bissessur, R., & Ahmed, M. et al. (2024). A review: Hydrochar as potential adsorbents for wastewater treatment and CO₂ adsorption. *Science of The Total Environment*, 169823. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.169823>
- James, N., & Sutherland, M. L. (1939). The accuracy of the plating method for estimating the numbers of bacteria and fungi from one dilution and from one aliquot of a laboratory sample of soil. *Canadian Journal of Research*, 17(4), 97-108.
- Jamili, T., Alinejadian Bidabadi, A., Maleki, A., Feizian, M., & Akbarpour, O. A. (2022). Investigation of biochar application and different levels of irrigation on physico-chemical properties and microbial respiration of cadmium contaminated soil in tomato cultivation. *Iranian Journal of Soil and Water Research*, 53(5), 937- 956. (In Persian).
- Jenkinson, D. S., & Ladd, J. N. (2021). Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In *Soil biochemistry* (pp. 415-472). CRC Press.
- Jing, Y., Zhang, Y., & Han, I. et al. (2020). Effects of different straw biochars on soil organic carbon, nitrogen, available phosphorus, and enzyme activity in paddy soil. *Scientific Reports*, 10(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65796-2>
- Karami, N., Clemente, R., & Moreno-Jiménez, E. et al. (2011). Efficiency of green waste compost and biochar soil amendments for reducing lead and copper mobility and uptake to ryegrass. *Journal of Hazardous Materials*, 191(1-3), 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.04.025>
- Karelin, D. V., Zolotukhin, A. N., Ryzhkov, O. V., Lunin, V. N., Zamolodchikov, D. G., & Sukhovееva, O. E. (2024). Use of long-term soil respiration measurements for calculating the net carbon balance in ecosystems of the central chernozemic region. *Eurasian Soil Science*, 57(10), 1638-1649.
- Karimi, A., Abdolamir Moezzi, A., Chorom, M., & Naeimeh Enayatizamir, N. (2020). Influence of sugarcane bagasse biochar on nutrient availability and biological properties of a calcareous soil. *Applied Soil Research*, 8(1), 1-17. (In Persian).
- Khademi, H., Mohammadi, J., & Nael, M. (2006). Comparison of selected soil quality indicators in different land management systems in Boroojen, Chaharmahal Bakhtiari province. *Journal of Scientific Agriculture*, 39(3), 111-124.
- Khatoon, H., Solanki, P., & Narayan, M. et al. (2017). Role of microbes in organic carbon decomposition and maintenance of soil ecosystem. *International Journal of Chemical Studies*, 5(6), 1648-1656.
- Kotroczo, Z., Veres, Z., Fekete, I., Krakomperger, Z., Tóth, J. A., Lajtha, K., & Tóthmérész, B. (2014). Soil enzyme activity in response to long-term organic matter manipulation. *Soil Biology and Biochemistry*, 70, 237-243. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.12.028>

- Krull, E. S., Baldock, J. A., Skjemstad, J. O., & Smernik, R. J. (2012). Characteristics of biochar: organo-chemical properties. In *Biochar for environmental management* (85-98). Routledge.
- Ladd, J. N., & Butler, J. H. A. (1972). Short-term assays of soil proteolytic enzyme activities using proteins and dipeptide derivatives as substrates. *Soil Biology and Biochemistry*, 4(1), 19-30. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(72\)90038-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(72)90038-7)
- Leelahawong, C., & Pongsilp, N. (2009). Phosphatase activities of root-nodule bacteria and nutritional factors affecting production of phosphatases by representative bacteria from three different genera. *Current Applied Science and Technology*, 9(2), 65-83.
- Li, C. H., Ma, B. L., & Zhang, T. Q. (2002). Soil bulk density effects on soil microbial populations and enzyme activities during the growth of maize (*Zea mays* L.) planted in large pots under field exposure. *Canadian Journal of Soil Science*, 82(2), 147-154. <https://doi.org/10.4141/S01-026>
- Li, Y., Hu, S., Chen, J., & Müller, K. et al. (2018). Effects of biochar application in forest ecosystems on soil properties and greenhouse gas emissions: a review. *Journal of Soils and Sediments*, 18, 546-563. <https://doi.org/10.1007/s11368-017-1906-y>
- Liu, X., Chen, Q., Zhang, H., Zhang, J., Chen, Y., Yao, F., & Chen, Y. (2023). Effects of exogenous organic matter addition on agricultural soil microbial communities and relevant enzyme activities in southern China. *Scientific Reports*, 13(1), 8045. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33498-0>
- Manna, M. C., Jha, S., Ghosh, P. K., & Acharya, C. L. (2003). Comparative efficacy of three epigeic earthworms under different deciduous forest litters decomposition. *Bioresource Technology*, 88(3), 197-206. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00318-8](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00318-8)
- McLean, E. Q. (1982). Soil pH and lime requirement. In: Page, A. L. Miller, R. H. Keeney, D. R (Eds). *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*, 2nd Ed Agronomy, 9, 199-224. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr9.2.2ed.c12>
- Merino, C., Godoy, R., & Matus, F. (2016). Soil enzymes and biological activity at different levels of organic matter stability. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 16(1), 14-30. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162016005000002>
- Moscatelli, M. C., Di Tizio, A., Marinari, S., & Grego, S. (2007). Microbial indicators related to soil carbon in Mediterranean land use systems. *Soil and Tillage Research*, 97(1), 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.still.2007.08.007>
- Mukhopadhyay, P., Barman, S., & Chakraborty, R. (2024). Exergy-efficient sustainable production of diesel additive in infrared energized continuous flow rotating real reactor: Optimization, heterogeneous kinetics, and life cycle analyses. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 61, 103582.
- Nahidan, S., & Sepahvand, S. (2023). The effect of biochar on some biological properties and available phosphorus in cadmium-contaminated soils. *Journal of Soil and Water Conservation*, 30(3), 45-65.
- Nourbakhsh, F., Monreal, C. M., Emtiazy, G., & Dinell, H. (2002). L-asparaginase activity in some soils of central Iran. *Arid Land Research and Management*, 16(4), 377-384. <https://doi.org/10.1080/15324980290000476>
- Oktaviananda, C., & Prasetya, A. (2019). Hydrothermal Treatment, Sawdust, Corn Cob, Mixture, Solid Fuel. *Agrotechnology Innovation (Agrinova)*, 2(1), 20-25. <https://doi.org/10.22146/agrinova.51987>
- Ouyang, L., Tang, Q., Yu, L., & Zhang, R. (2014). Effects of amendment of different biochars on soil enzyme activities related to carbon mineralisation. *Soil Research*, 52(7), 706-716. <https://doi.org/10.1071/SR14075>
- Palansooriya, K. N., Wong, J. T. F., & Hashimoto, Y. et al. (2019). Response of microbial communities to biochar-amended soils: a critical review. *Biochar*, 1, 3-22. <https://doi.org/10.1007/s42773-019-00009-2>
- Pan, S. Y., Dong, C. D., & Su, J. F. et al. (2021). The role of biochar in regulating the carbon, phosphorus, and nitrogen cycles exemplified by soil systems. *Sustainability*, 13(10), 5612. <https://doi.org/10.3390/su13105612>
- Pasrija, R., & Kumari, D. (2025). Counting colony forming units (CFU) to estimate viable fungal cells in a sample. In *protocols for studying pathogenic fungi* (pp. 53-61). *Singapore: Springer Nature Singapore*, 53-61.
- Paz-Ferreiro, J., Fu, S., Méndez, A., & Gascó, G. (2014). Interactive effects of biochar and the earthworm *Pontoscolex corethrurus* on plant productivity and soil enzyme activities. *Journal of Soils and Sediments*, 14, 483-494. <https://doi.org/10.1007/s11368-013-0806-z>
- Paz-Ferreiro, J., Gasco, G., Gutiérrez, B., & Méndez, A. (2012). Soil biochemical activities and the geometric mean of enzyme activities after application of sewage sludge and sewage sludge biochar to soil. *Biology and Fertility of Soils*, 48(5), 511-517. <https://doi.org/10.1007/s00374-011-0644-3>
- Powlson, D. S., Hirsch, P. R., & Brookes, P. C. (2001). The role of soil microorganisms in soil organic matter conservation in the tropics. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 61, 41-51. <https://doi.org/10.1023/A:1013338028454>
- Rao, M. A., Scelza, R., & Gianfreda, L. (2014). Soil enzymes. *Enzymes in agricultural sciences*. *Foster City: OMICS*

- Group eBooks. 10-43.
- Rhoades, J. D. (1996). Salinity: Electrical conductivity and total dissolved solids. *Methods of soil analysis: Part 3 Chemical Methods*, 5, 417-435. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c14>
- Rutigliano, F. A., Romano, M., & Marzaioli, R. et al. (2014). Effect of biochar addition on soil microbial community in a wheat crop. *European Journal of Soil Biology*, 60, 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2013.10.007>
- Salam, A. K., Katayama, A., & Kimura, M. (1998). Activities of some soil enzymes in different land use systems after deforestation in hilly areas of West Lampung, South Sumatra, Indonesia *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 44(1), 93-103. <https://doi.org/10.1080/00380768.1998.10414429>
- Schinner, F., & Von Mersi, W. (1990). Xylanase, CM-cellulase-and invertase activity in soil: an improved method. *Soil Biology and Biochemistry*, 22(4), 511-515. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(90\)90187-5](https://doi.org/10.1016/0038-0717(90)90187-5)
- Sharma, H. B., Vanapalli, K. R., Bhatia, D., Singh, S., Arora, G., Panigrahi, S., ... & Mohanty, B. (2024). Engineered biochar/hydrochar derived from organic wastes for energy, environmental, and agricultural applications. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 26(12), 4059-4093.
- Sharma, S. N. (2022). Soil enzymes and their role in nutrient cycling. In *Structure and functions of Pedosphere*, (pp. 173-188). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Silva, J. O., Granja, H. S., Santos, J. F. D., Freitas, L. S., & Sussuchi, E. M. (2024). Biochar and hydrochar in the development and application of electrochemical devices in the sensing and degradation of target compounds: A Mini-Review of the recent contributions of 2020-2023. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 35(1), e-20230143.
- Singh, N., Asha, V. K. M., & Singh, D. (2024). Soil enzyme activities as bioindicators of soil health: Implications for sustainable agriculture. *Journal of Natural Resource Conservation and Management*, 5(2), 124-136.
- Sparks, D. L., Helmke, P., & Page, A. (1996). *Methods of soil analysis: Chemical methods*. Soil Science Society of America.
- Stevenson, F. J., & Cole, M. A. (1999). *Cycles of soils: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients*. John Wiley & Sons.
- Subba Rao, N. S. (1993). *Biofertilizers in agriculture and forestry*. New Delhi: Oxford Publishing Co. Pvt. Ltd.
- Suhane, R. K. (2007). *Vermicompost: publication of Rajendra Agriculture University*. Pusa, Bihar. 88
- Suman, S., Yadav, A. M., Tomar, N., & Bhushan, A. (2020). Combustion characteristics and behaviour of agricultural biomass: A short review. *Renewable Energy-Technologies and Applications*, 155.
- Sun, R., Zhang, X. X., & Guo, X. et al. (2015). Bacterial diversity in soils subjected to long-term chemical fertilization can be more stably maintained with the addition of livestock manure than wheat straw. *Soil Biology and Biochemistry*, 88, 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.05.007>
- Tabatabai, M. A., & Bremner, J. M. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1(4), 301-307. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(69\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(69)90012-1)
- Tabatabai, M. A., & Bremner, J. M. (1970). Arylsulfatase activity of soils. *Soil Science Society of America Journal*, 34(2), 225-229. <https://doi.org/10.2136/sssaj1970.03615995003400020016x>
- Tandon, H. L. S. (1992). Fertilizers and their integration and organics and bio-fertilizers. *Fertilizers, organic manures, recyclable wastes and bio-fertilizers*. 9, 32-36.
- Thalmann, A. (1968). Zur Methodik der Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität im Boden mittels triphenyltetrazoliumchlorid (TTC). *Landwirtsch Forsch*, 21, 249-258.
- Thomas, P., Sekhar, A. C., Upreti, R., Mujawar, M. M., & Pasha, S. S. (2015). Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse samples. *Biotechnology Reports*, 8, 45-55.
- Tian, Y., Li, D., & Wang, Y. et al. (2023). Effect of subsurface drainage combined with biochar on the bacterial community composition of coastal saline soil. *Water*, 15(15), 2701. <https://doi.org/10.3390/w15152701>
- Tripathi, S., Kumari, S., & Chakraborty, A. et al. (2006). Microbial biomass and its activities in salt-affected coastal soils. *Biology and Fertility of Soils*, 42(3), 273-277. <https://doi.org/10.1007/s00374-005-0037-6>
- Vafa, H. J., Raiesi, F., & Hosseinpour, A. (2016). Sewage sludge application strongly modifies earthworm impact on microbial and biochemical attributes in a semi-arid calcareous soil from Iran. *Applied Soil Ecology*, 100, 45-56. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.11.022>
- Vahedi, R., Rasouli Sadaghiani, M. H., & Barin, M. (2019). The effect of fruit trees pruning waste biochar on some soil biological properties under rhizobox conditions. *Journal of Water and Soil Science*, 23(1), 321-336. (In Persian).
- Walkley, A., & Black, I. A. (1934). An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37, 29-38.

- Wang, F., Zhang, W., & Miao, L. et al. (2021). The effects of vermicompost and shell powder addition on Cd bioavailability, enzyme activity and bacterial community in Cd-contaminated soil: a field study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 215, 112163. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112163>
- Wang, X., Song, D., & Liang, G. et al. (2015). Maize biochar addition rate influences soil enzyme activity and microbial community composition in a fluvo-aquic soil. *Applied Soil Ecology*, 96, 265-272. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.08.018>
- Wang, Z., Yun, S., An, Y., Shu, L., Li, S., Sun, K., & Zhang, W. (2025). Effect of fungicides on soil respiration, microbial community, and enzyme activity: A global meta-analysis (1975–2024). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 289, 117433.
- Wright, A. L., Hons, F. M., & Matocha Jr, J. E. (2005). Tillage impacts on microbial biomass and soil carbon and nitrogen dynamics of corn and cotton rotations. *Applied Soil Ecology*, 29(1), 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2004.09.006>
- Wu, C., Hou, Y., & Bie, Y. et al. (2020). Effects of biochar on soil water-soluble sodium, calcium, magnesium and soil enzyme activity of peach seedlings. In *IOP Conference Series: Environmental Earth Sciences*, 446, 3, p. 032007. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/446/3/032007>
- Yadav, S. K., Khokhar, U. U., Sharma, S. D., & Kumar, P. (2016). Response of strawberry to organic versus inorganic fertilizers. *Journal of Plant Nutrition*, 39(2), 194-203. <https://doi.org/10.1080/01904167.2015.1109115>
- Zhang, L., Ding, X., Chen, S., & He, X. et al. (2014). Reducing carbon: phosphorus ratio can enhance microbial phytin mineralization and lessen competition with maize for phosphorus. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 850-856. <https://doi.org/10.1080/17429145.2014.977831>

The effect of activated biochar and hydrochar produced from the algae *Chlorella vulgaris* on the biological and enzymatic properties of the soil

Introduction: Soil microorganisms play a vital role in nutrient cycling and biochemical processes, largely relying on available carbon sources. Organic amendments like biochar and hydrochar can enhance microbial and enzymatic activity in soils. This study evaluated the effects of activated biochar and hydrochar from *Chlorella vulgaris* at 0.5% and 1% concentrations over 90 days, aiming to compare their effectiveness in improving microbial respiration, enzyme function, biomass carbon, and microbial populations.

Materials and Methods: The microalga *Chlorella vulgaris* was cultured under controlled laboratory conditions and harvested after two weeks. The biomass was processed to produce biochar through pyrolysis at 450 °C and hydrochar via hydrothermal carbonization at 200 °C. Both biochar and hydrochar were activated using potassium hydroxide (KOH) to enhance surface characteristics. The activated materials were then mixed with soil at 0.5% and 1% concentrations. Soil incubation was conducted in a dark, controlled environment at 25 °C and 70% field capacity. Measurements included microbial respiration at set intervals, pH and microbial populations across 12 weeks, and final enzymatic assays evaluating seven key soil enzymes.

Results and Discussion: Significant shifts in soil pH were observed across treatments. Hydrochar treatments caused an initial rise in soil pH, while biochar treatments led to a gradual decline by the end of the experiment. The highest pH value of 7.82 occurred in the 1% hydrochar treatment during the first week, whereas the lowest pH of 7.53 was recorded in the 1% biochar treatment at week 12. Regarding microbial populations, both bacteria and fungi responded positively to hydrochar, particularly at higher concentrations. The bacterial population peaked at 6.33×10^6 CFU g⁻¹ dry soil in the 1% hydrochar treatment during the second week. Similarly, fungal populations reached their maximum in weeks two and three, also in hydrochar-treated soils, indicating enhanced microbial proliferation due to improved carbon and nutrient availability. All treatments exhibited an initial sharp decline in microbial respiration, which later stabilized. This rapid early drop is attributed to the consumption of readily available carbon compounds. The 0.5% hydrochar treatment showed the highest substrate-induced respiration, with a value of 858 mg CO₂ kg⁻¹ dry soil day⁻¹, significantly outperforming the control treatment, which measured only 186 mg CO₂ kg⁻¹ dry soil day⁻¹. In terms of microbial biomass carbon, the highest amount was found in the 1% hydrochar treatment at 596 mg C mic kg⁻¹ soil, while the control had the lowest at 213 mg C mic kg⁻¹ soil. These results indicate that hydrochar is particularly effective at promoting microbial growth and activity, likely due to its favorable nutrient profile and porous structure that supports microbial colonization. The study showed that both biochar and hydrochar enhanced enzyme activities in soil, with hydrochar demonstrating a stronger influence overall. Alkaline phosphatase activity was highest in the 1% hydrochar treatment, recording 2225 µg P.N.P g⁻¹ soil h⁻¹, while the control had the lowest activity at 1303 µg P.N.P g⁻¹ soil h⁻¹. Acid phosphatase activity also peaked in the hydrochar 1% treatment at 772 µg P.N.P g⁻¹ soil h⁻¹. Arylsulfatase activity was most elevated in the 0.5% hydrochar treatment at 286 µg P.N.P g⁻¹ soil h⁻¹, while the control showed only 166 µg P.N.P g⁻¹ soil h⁻¹. Invertase activity followed a similar trend, with the highest value recorded in the 1% hydrochar treatment at 450.5 µg glucose g⁻¹ soil h⁻¹. Other enzymes such as β-glucosidase, dehydrogenase, and protease also increased in activity across all treatments, with hydrochar-treated soils showing the most substantial

gains. The microbial metabolic quotient (qCO_2), an indicator of microbial efficiency in carbon use, decreased with both amendments, particularly hydrochar. Lower qCO_2 values reflect more efficient microbial communities converting carbon to biomass with less energy loss. This suggests reduced soil stress and better resource availability, likely due to a shift toward more efficient groups like fungi.

Conclusion: The results of this study clearly demonstrate that activated hydrochar derived from *Chlorella vulgaris* outperforms biochar in improving soil biological activity. It significantly boosts microbial biomass, enzyme activity, and respiration while promoting more efficient microbial carbon utilization. These findings highlight hydrochar's potential as an effective and sustainable soil amendment for improving soil fertility and ecological health, especially in agricultural systems seeking environmentally friendly management practices.

Author Contributions

For research articles with several authors, a short paragraph specifying their individual contributions must be provided. The following statements should be used "Conceptualization, J.S. and M.B.S.; methodology, J.S. and M.B.S.; software, A.A.; validation, J.S., M.B.S. and A.A.; formal analysis, J.S.; investigation, S.M.; resources, A.A.; data curation, S.M.; writing—original draft preparation, M.B.S.; writing—review and editing, J.S.; visualization, J.S.; supervision, J.S.; project administration, S.M.; funding acquisition, M.B.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

All authors contributed equally to the conceptualization of the article and writing of the original and subsequent drafts.

Data Availability Statement

Data available on request from the authors.

Ethical considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.