نشریه پژوهش‌های حفاظت آب و خاک
جلد بیست و چهارم، شماره اول، ۱۳۹۶
http://jwsc.gau.ac.ir

اثر EDTA و اسیدسیتریک بر فعالیت‌های آنزیمی خاک و استخراج سرب توسط آفتاب‌گردان و خردل هندی از یک خاک آلوده

سیدسجاد حسینی[۱]، *امیر لکزیان[۲] و اکرم حلاج‌نیا[۳]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم خاک، دانشگاه فردوسی مشهد، [۲]استاد گروه علوم خاک، دانشگاه فردوسی مشهد،
[۳]استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۳۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۱۹

چکیده

سابقه و هدف: استخراج گیاهی با استفاده از عوامل کی‌لیت‌کننده یکی از روش‌های پاکسازی خاک‌های آلوده به فلزات سنگین است که توجه بسیاری را در دهه گذشته به خود جلب کرده است. به هر حال تا به امروز بیش‌ترین توجه به اثر عوامل کی‌لیت‌کننده بر حلالیت فلزات سنگین در خاک و جذب آن‌ها به‌وسیله گیاه بوده است و کم‌تر به اثرات جانبی آن‌ها بر محیط زیست خاک و موجودات زنده پرداخته شده است. فعالیت آنزیم‌های خاک می‌توانند شاخص‌های مناسبی برای بررسی بازگرداندن محیط زیست خاک بعد از فرآیندهای پاکسازی مختلف باشند. هدف از این مطالعه بررسی اثر EDTA و اسیدسیتریک (CA) بر فعالیت‌های آنزیمی خاک و جذب سرب به‌وسیله دو گیاه آفتابگردان و خردل هندی بود.

مواد و روش‌ها: پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل و ۳ تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام گرفت. فاکتورهای آزمایشی شامل عامل کی‌لیت‌کننده و نوع گیاه بودند. تیمارهای عامل کی‌لیت‌کننده شامل شاهد (بدون عامل کی‌لیت‌کننده یا سطح صفر)، EDTA3 و EDTA5 (۳ و ۵ میلی‌مول EDTA در هر کیلوگرم خاک خشک)، CA3 و CA5 (۳ و ۵ میلی‌مول CA در هر کیلوگرم خاک خشک) بودند. گیاهان مورد استفاده نیز شامل دو گیاه خردل هندی (*Brassica juncea*) و آفتاب‌گردان (*Helianthus annus*) بود. همچنین به‌منظور بررسی اثر سرب بر وزن خشک گیاه و فعالیت‌های آنزیمی یک تیمار بدون آلودگی سرب و بدون عامل کی‌لیت‌کننده (تیمار NP) نیز در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که EDTA نسبت به CA عامل کی‌لیت‌کننده مؤثرتری برای افزایش غلظت سرب فراهم خاک در این پژوهش بود. بر خلاف انتظار افزودن CA به خاک موجب کاهش معنی‌دار غلظت سرب فراهم خاک نسبت به تیمار شاهد شد. نتایج نشان داد بین دو کی‌لیت استفاده شده EDTA برای افزایش جذب سرب در اندام هوایی و CA برای افزایش جذب سرب در ریشه مناسب بود. بیش‌ترین جذب سرب در ریشه (۲/۹۹ میلی‌گرم سرب در گلدان) توسط گیاه خردل هندی با کاربرد ۵ میلی‌مول CA در کیلوگرم خاک مشاهده شد. همچنین بیش‌ترین جذب سرب در

* مسئول مکاتبه: alakzian@yahoo.com

اندام هوایی (۱/۷٤ میلی‌گرم سرب در گلدان) توسط گیاه خردل هندی با تیمار EDTA3 حاصل شد. نتایج نشان داد خاک تیمار شده با EDTA موجب اثر هورمسیس در فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز، فسفومونواستراز قلیایی و شاخص‌های GMea و TEA شد. تیمار EDTA5 موجب کاهش شاخص‌های GMea و TEA شد در حالی‌که تیمار EDTA3 موجب افزایش این شاخص‌ها در مقایسه با تیمار شاهد شد. افزودن CA در هر دو سطح به خاک موجب افزایش معنی‌دار و قابل‌توجه فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه و همچنین شاخص‌های GMea و TEA نسبت به تیمار شاهد شد.

نتیجه‌گیری: در تیمار EDTA3 جذب سرب اندام هوایی نسبت به تیمار شاهد افزایش پیدا کرد و همچنین به‌طور معنی‌داری شاخص‌های GMea و TEA در این تیمار در مقایسه با تیمار شاهد بهبود یافت. تیمار EDTA5 کارایی کم‌تری نسبت به تیمار EDTA3 در افزایش جذب سرب اندام هوایی داشت و شاخص‌های GMea و TEA را نسبت به تیمار شاهد کاهش داد. افزودن CA به خاک احتمالاً گزینه مناسب‌تری برای تثبیت گیاهی سرب در خاک مورد مطالعه از طریق تجمع آن در ریشه بود و توانست شاخص‌های GMea و TEA را به‌طور قابل‌توجهی نسبت به تیمار شاهد و تیمار NP افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: عوامل کی‌لیت‌کننده، شاخص‌های GMea و TEA، غلظت سرب فراهم خاک، استخراج گیاهی

مقدمه

گیاه‌پالایی[1] یکی از روش‌های مؤثر، مقرون‌به‌صرفه، دوست‌دار محیط زیست و دارای مقبولیت جهانی برای پاکسازی خاک‌های آلوده به فلزات سنگین است (٤). گیاه‌پالایی به روش‌های مختلفی صورت می‌گیرد که در هر کدام از سازوکارهای متفاوتی برای پاکسازی خاک‌های آلوده استفاده می‌شود. یکی از این روش‌ها استخراج گیاهی[2] است که در آن، گیاه فلزات سنگین را از خاک خارج کرده و در قسمت‌های قابل برداشت خود ذخیره می‌کند. به هر حال انحلال‌پذیری و زیست‌فراهمی کم بعضی از فلزات سنگین مثل سرب در خاک کارایی این روش گیاه‌پالایی را کاهش می‌دهد (۱). از این‌رو استفاده از عوامل کی‌لیت‌کننده در جهت افزایش مصنوعی حلالیت و فراهمی فلزات سنگین در خاک و در نتیجه افزایش استخراج گیاهی آن‌ها از خاک پیشنهاد شده است (۳۹).

در دهه گذشته عوامل کی‌لیت‌کننده مختلفی مانند اتیلن دی‌آمین ترا استیک اسید (EDTA)[3]، اتیلن دی‌آمین دی سوکسینات (EDDS)[4]، اسیدهای آلی با وزن مولکولی کم (LMWOA)[5]، مواد هومیکی و نیتریلو تری استیک اسید (NTA)[6] به‌طور گسترده‌ای در پژوهش‌های مربوط به پاکسازی خاک‌های آلوده به فلزات سنگین مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۳۹). به هر حال تا به امروز بیش‌تر توجه‌ها به اثر عوامل کی‌لیت‌کننده بر حلالیت فلزات سنگین در خاک و جذب آن‌ها به‌وسیله گیاه بوده است و کم‌تر به اثرات جانبی آن‌ها بر محیط زیست خاک و موجودات زنده پرداخته شده است. چرا که عوامل کی‌لیت‌کننده به‌دلیل خاصیت غیرانتخابی و سمیت و تجزیه‌پذیری کم می‌توانند موجب آسیب‌های جبران‌ناپذیری بر محیط زیست خاک و موجودات زنده شوند (٤٤). از طرف

1- Phytoremediation
2- Phytoextraction
3- Ethylenediaminetetraacetic acid
4- Ethylenediamine-*N*,*N*′-disuccinic acid
5- Low molecular weight organic acid
6- Nitrilotriacetic acid

دیگر تنها بخش محدودی از فلزاتی که به‌وسیله عوامل کی‌لیت‌کننده وارد فاز محلول می‌شوند توسط گیاه جذب شده و قسمت قابل‌توجهی از آن‌ها در اثر آبشویی وارد آب‌های زیرزمینی می‌شوند (۲۶).

مولباچوا (۲۰۱۱) گزارش کرد که EDTA فعالیت میکروبی را به‌طور قابل‌توجهی کاهش داد (۳۵). عثمان و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که افزودن EDTA و NTA به خاک، تنفس میکروبی، DOC[1] (کربن آلی محلول) و فراهمی فلزات سنگین را افزایش و کربن بیومس میکروبی و معدنی‌شدن نیتروژن را کاهش داد (۵۳). یانگ و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که استخراج گیاهی مس با ذرت و لوبیا همراه با کاربرد EDDS در دو سطح ۳ و ۵ میلی‌مول در کیلوگرم فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و ساکاراز را کاهش و فعالیت آنزیم بتاگلوکوسیداز را افزایش داد (۵۹). کاربرد EDTA در عصاره‌گیر DMSO قلیایی[2] به‌منظور جلوگیری از تجزیه آنزیمی آدنیلات‌ها[3] گزارش شده است (۳۲). زیرا EDTA می‌تواند با کاتیون‌های ضروری برای آنزیم ATPase کمپلکس ایجاد کند. بنابراین حضور طولانی‌مدت EDTA در خاک ممکن است اثر منفی بر ریزجانداران خاک داشته باشد (۵).

با توجه به اثرات جانبی فرآیندهای گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده بر محیط زیست و موجودات زنده، این فرآیندها نیاز به برنامه‌های پایشی دارند که علاوه بر بررسی تحرک و زیست‌فراهمی فلزات سنگین در خاک، سمیت و اثرات زیست‌محیطی آن‌ها و مواد به‌کار رفته در این فرآیندها را نیز مورد بررسی قرار دهد. در حقیقت، تا به امروز هنگام ارزیابی موفقیت فرآیندهای استخراج گیاهی بیش‌تر به حذف فلز تأکید شده است. اما هدف نهایی از هر گونه فرآیند استخراج گیاهی تنها حذف فلزات سنگین از خاک نیست بلکه بازگرداندن کیفیت خاک به شرایط مطلوب نیز باید مورد توجه قرار گیرد (۲۱).

در این رابطه شاخص‌هایی برای ارزیابی و نظارت بر کیفیت خاک مورد نیاز است. فعالیت آنزیم‌های خاک به‌عنوان شاخص‌های بیوشیمیایی معتبر برای بررسی اثر سوء فلزات سنگین بر محیط زیست خاک (۲۲) و همچنین پایش بازگرداندن کیفیت خاک بعد از فرآیندهای پاکسازی مختلف (۸) در پژوهش‌های بسیاری مورد استفاده قرار گرفته‌اند. زیرا فعالیت آنزیم‌های خاک پاسخ سریع به درهم‌آمیختگی و یا تنش‌های موجود در خاک مثل آلودگی فلزات سنگین می‌دهند و همچنین اندازه‌گیری ساده و کم‌هزینه‌ای دارند (۹). به هر حال پژوهش‌ها نشان داده‌اند که اثر آلاینده‌ها بر فعالیت آنزیم‌های خاک ممکن است از یک آنزیم به آنزیم دیگر و حتی بسته به نوع آلاینده به‌شدت متفاوت باشد (۲۰). بنابراین، شاخص‌های مرکب با استفاده از ترکیب‌های جبری از فعالیت آنزیم‌های خاک یا آنالیزهای چندمتغیره برای حل این مشکل استفاده شده‌اند (۱۶). همچنین روشی دیگر برای یکپارچه کردن چندین فعالیت آنزیمی در یک غالب کلی استفاده از روش‌های تصویری به‌خصوص نمودارهای رادار است (۳۷).

به هر حال تاکنون پژوهش‌های کمی در مورد اثر استخراج گیاهی با عوامل کی‌لیت‌کننده بر فعالیت آنزیمی خاک صورت گرفته است و همچنین گزارش‌های کمی در مورد استفاده از نمودارهای رادار به‌منظور یکپارچه کردن چندین فعالیت آنزیمی در غالب یک شاخص کلی وجود دارد. بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر EDTA و اسیدسیتریک (CA) بر جذب سرب در دو گیاه آفتابگردان و خردل هندی از یک خاک آلوده به سرب و همچنین بررسی تغییرات فعالیت آنزیمی خاک آلوده به سرب پس از استخراج

1- Dissolve organic carbon
2- Alkaline dimethyl sulfoxide
3- Adenylates

سرب از خاک توسط شاخص آنزیمی GMea و نمودارهای رادار انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

خاک مورد مطالعه از عمق ۲۰-۰ سانتی‌متری یک نوع خاک با رده‌بندی تیپیک هاپلوکلسید[1] واقع در پردیس دانشگاه فردوسی مشهد جمع‌آوری و پس از هوا خشک شدن و عبور از الک ۲ میلی‌متری جهت آنالیزهای اولیه به آزمایشگاه منتقل گردید. pH خاک با استفاده از دستگاه pH متر در گل اشباع، قابلیت هدایت الکتریکی در عصاره گل اشباع توسط دستگاه هدایت‌سنج الکتریکی، کربن آلی به روش والکلی‌بلاک (٥٦)، نیتروژن کل به روش کجلدال (۲)، فسفر فراهم خاک به روش اولسن (٤۰)، پتاسیم قابل دسترس به روش استات آمونیوم (۷)، کربنات کلسیم معادل به روش تیتراسیون برگشتی (۲۹)، رطوبت ظرفیت مزرعه به روش گلدانی و بافت خاک به روش هیدرومتری (۱۷) اندازه‌گیری شد. همچنین به‌منظور آگاهی از آلودگی اولیه خاک به سرب مقدار کل سرب خاک با روش هضم به‌وسیله تیزاب سلطانی (مخلوط اسیدنیتریک و اسید کلریدریک) تعیین شد (۳۳).

پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل و ۳ تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام گرفت. فاکتورهای آزمایشی شامل عامل کی‌لیت‌کننده و نوع گیاه بودند. تیمارهای عامل کی‌لیت‌کننده شامل شاهد (بدون عامل کی‌لیت‌کننده یا سطح صفر کی‌لیت)، EDTA3 و EDTA5 (۳ و ٥ میلی‌مول EDTA در هر کیلوگرم خاک خشک)، CA3 و CA5 (۳ و ٥ میلی‌مول CA در هر کیلوگرم خاک خشک) بودند. سطوح مورد استفاده بر اساس مطالعه محمد و همکاران (۲۰۰۹) انتخاب گردید (۳٤). گیاهان مورد استفاده نیز شامل دو گیاه خردل هندی (*Brassica juncea*) و آفتاب‌گردان (*Helianthus annus*) بود. همچنین به‌منظور بررسی اثر سرب بر وزن خشک گیاه و فعالیت‌های آنزیمی یک تیمار بدون آلودگی سرب و بدون عامل کی‌لیت‌کننده (تیمار NP) نیز در نظر گرفته شد.

برای آلوده کردن خاک به سرب (٥۰۰ میلی‌گرم سرب در هر کیلوگرم خاک خشک) ابتدا مقادیر مناسب از نمک کلرید سرب ($PbCl_2$) محاسبه و به‌صورت جامد به خاک افزوده شد. برای این‌که خاک آلوده شده به تعادل برسد، به‌وسیله آب مقطر تا ۷۰٪ ظرفیت مزرعه مرطوب و برای یک ماه در این حد رطوبتی ثابت نگه داشته شد. پس از یک ماه خاک‌ها هوا خشک و کاملاً کوبیده و برای ریختن در گلدان آماده شدند.

قبل از افزودن خاک به گلدان‌ها کودهای پرمصرف مورد نیاز گیاه شامل نیتروژن، فسفر و پتاسیم به‌صورت کود اوره، سوپر فسفات تریپل و سولفات پتاسیم براساس توصیه کودی به مقدار ٤۰۰، ۱٥۰ و ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار به نمونه‌های خاک اضافه شد. گلدان‌ها با ۳/۸ کیلوگرم خاک آلوده به سرب پر شد و بذور دو گیاه خردل هندی و آفتاب‌گردان به تعداد ۸ عدد درگلدان‌ها کاشته شدند. پس از ظهور گیاهچه‌ها تعداد آن‌ها در هر گلدان به ۳ عدد کاهش یافت. یک هفته قبل از برداشت گیاه، تیمارهای موردنظر شامل عامل کی‌لیت‌کننده با سطح صفر (آب مقطر)، EDTA3، EDTA5، CA3، CA5 به‌صورت محلول در حجم یکسانی آب مقطر حل شده و به سطح گلدان‌ها اضافه شد و سپس گلدان‌ها تا رساندن رطوبت به ۷۰٪ ظرفیت مزرعه با آب مقطر آبیاری شد. در پایان دوره رشد (٦۰ روز) اندام هوایی و ریشه گیاه برداشت و پس از شستشو با آب مقطر،

1- *Typic haplocalsids*

به‌مدت ٤٨ ساعت در آون در دمای ٧٠ درجه سانتی‌گراد خشک و توزین شدند. پس از خشک و آسیاب کردن نمونه‌های گیاهی، یک گرم از هر نمونه درون کوره الکتریکی در دمای ٥٠٠ درجه سانتی‌گراد سوزانده شد. نمونه‌ها پس از سرد شدن از کوره خارج و مقدار ١٠ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ٢ نرمال به آن‌ها اضافه شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت نیم ساعت حرارت داده شد و پس از عبور از کاغذ صافی واتمن ٤٢، مقدار سرب موجود در نمونه‌های گیاهی به‌وسیله دستگاه جذب اتمی مجهز به کوره گرافیتی (Shimadzu AA-670) اندازه‌گیری شد (٢٤).

نمونه‌گیری از خاک نیز پس از برداشت اندام هوایی و قبل از برداشت ریشه گیاهان انجام شد. برای تعیین غلظت سرب فراهم خاک از عصاره‌گیر DTPA-TEA و روش لیندزی و نورول (١٩٧٨) استفاده شد (٢٨). فعالیت آنزیم دهیدروژناز خاک با استفاده از بستره تری‌فنیل‌تترازولیوم کلرید (TTC) ٠/٦ درصد به روش اصلاح‌شده تالمان (١٩٦٨) تعیین و به‌صورت میکروگرم تری فنیل فورمازان (TPF) به‌ازای هر گرم خاک خشک در هر ساعت انکوباسیون ($\mu g\ TPF\ g^{-1}\ soil\ h^{-1}$) گزارش شد (٥١). فعالیت آنزیم اوره‌آز خاک با استفاده از بستره اوره ٠/٢ مولار به روش طباطبایی و برمنر (١٩٧٢) و فعالیت آنزیم فسفومونواستراز قلیایی خاک با استفاده از بستره پارانیتروفنیل فسفات ٠/١١٥ مولار به روش طباطبایی و برمنر (١٩٦٩) تعیین و به‌ترتیب به‌صورت میکروگرم آمونیوم آزاد شده به‌ازای هر گرم خاک خشک در هر ساعت انکوباسیون ($\mu g\ NH_4^+\text{-}N\ g^{-1}\ soil\ h^{-1}$) و میکروگرم پارانیتروفنل به‌ازای هر گرم خاک خشک در هر ساعت انکوباسیون ($\mu g\ PNP\ g^{-1}\ soil\ h^{-1}$) گزارش شد (٤٩، ٥٠).

شاخص میانگین هندسی فعالیت آنزیم‌های اندازه‌گیری شده (GMea)[1] برای هر تیمار از فرمول زیر محاسبه شد:

$$GMea = (DH \times PHO \times URE)^{1/3}$$

که در آن، *DH*، *PHO* و *URE* به‌ترتیب فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز، فسفومونواستراز قلیایی و اوره‌آز خاک و *GMea* میانگین هندسی فعالیت آنزیمی خاک و بدون واحد می‌باشد.

همچنین شاخص فعالیت آنزیمی کل خاک (TEA)[2] به‌وسیله نمودارهای رادار به این صورت اندازه‌گیری شد که ابتدا با توجه به این‌که فعالیت آنزیم‌های مورد بررسی دارای واحدهای گوناگونی بودند، برای ارائه آن‌ها در قالب یک مقدار کلی (شاخص TEA)، بی‌بُعد شدند. برای این منظور با استفاده از روش‌های نمره‌دهی خطی مقادیر فعالیت آنزیم‌ها به مقادیر بدون بُعد بین صفر و یک تبدیل شدند. سپس نمرات فعالیت آنزیمی هر تیمار به‌صورت نمودار رادار ارائه شد. در این روش شکل چندضلعی ایجاد شده برای هر تیمار و مساحت آن به‌منظور مقایسه گرافیکی و آماری فعالیت آنزیمی خاک در هر تیمار مورد استفاده قرار گرفت. مساحت چندضلعی مربوط به هر تیمار به‌وسیله نرم‌افزار Adobe Acrobat محاسبه شده و به‌عنوان شاخص TEA بر حسب سانتی‌مترمربع گزارش شد.

در نهایت تجزیه آماری داده‌ها با نرم‌افزار JMP، مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ٥٪ و رسم نمودارها در محیط Excel انجام گرفت.

1- Geometric mean of enzyme activities
2- Total enzyme activity

نتایج و بحث

برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک در جدول ۱ آورده شده است. نتایج نشان داد که بافت خاک مورد مطالعه لوم و غلظت اولیه سرب در خاک ۲۵/۵۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک بود. pH آن در محدوده خاک‌های خنثی، کربنات کلسیم معادل ۱٤ درصد و خاک از نظر کربن آلی و عناصر غذایی ضروری در سطح ضعیفی قرار داشت.

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه.

Table 1. Some physical and chemical properties of studied soil.

بافت خاک Soil texture –	رس Clay (%)	سیلت Silt (%)	شن Sand (%)	کربن آلی Organic carbon (%)	pH –	EC (dS/m)
لوم	22	41	37	0.195	7.4	2.52

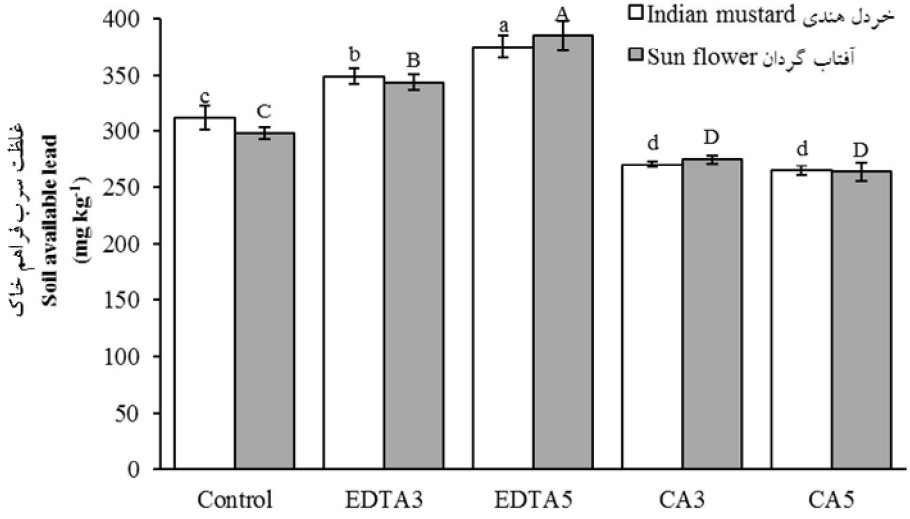
فسفرقابل دسترس Available phosphorus (mg/kg)	نیتروژن کل Total nitrogen (%)	سرب کل Total (mg/kg) lead	سرب قابل دسترس Available lead (mg/kg)	کربنات کلسیم معادل Calcium carbonate equivalent (%)	پتاسیم قابل دسترس Available potassium (mg/kg)
11.25	0.031	25.55	2.64	14.06	100.51

غلظت سرب فراهم خاک: نتایج نشان داد که تیمارهای EDTA3 و EDTA5 در خاک‌های کشت شده با خردل هندی به‌ترتیب سبب افزایش ۱۱/۸٪ و ۲۰/۱٪ و در خاک‌های کشت شده با آفتاب‌گردان به‌ترتیب سبب افزایش ۱۵/۱٪ و ۲۸/۹٪ غلظت سرب فراهم خاک نسبت به تیمار شاهد شدند (شکل ۱). این نتایج نشان داد که غلظت سرب فراهم خاک با افزایش غلظت EDTA از ۳ به ۵ میلی‌مول در کیلوگرم به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. بر خلاف EDTA تیمارهای CA3 و CA5 در خاک‌های کشت شده با خردل هندی به‌ترتیب سبب کاهش ۱۳/٤٪ و ۱۵/۲٪ و در خاک‌های کشت‌شده با آفتاب‌گردان به‌ترتیب سبب کاهش ۷/۸٪ و ۱۱/٦٪ غلظت سرب فراهم خاک نسبت به تیمار شاهد شدند (شکل ۱). آنالیزهای آماری نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای CA3 و CA5 وجود نداشت.

پژوهش‌های بسیاری نشان داده‌اند که کاربرد کی‌لیت‌های شیمیایی مانند EDTA غلظت سرب فراهم خاک را افزایش می‌دهد (۱، ۳۰، ٤۵). این افزایش می‌تواند به‌دلیل وجود کمپلکس‌های قوی و پایدار میان EDTA و سرب ($Log\ K_{Pb\text{-}EDTA}$= ۱۷/۸)، پتانسیل تحرک بالای کمپلکس‌های EDTA-Pb در خاک و مقاومت بالای EDTA نسبت به تجزیه در خاک باشد (۱۲، ۳۰).

پژوهش‌ها نشان داده‌اند که CA در مقایسه با EDTA به‌دلیل ثابت تشکیل کم‌تری که با سرب دارد ($Log\ K_{Pb\text{-}CA}$=٦/۵ و $Log\ K_{Pb\text{-}EDTA}$=۱۷/۸)، کارایی کم‌تری در افزایش حلالیت سرب در خاک دارد (۱۵). اما ثابت تشکیل نمی‌تواند کارایی کم‌تر CA در مقایسه با آب مقطر (تیمار شاهد) را در این پژوهش توضیح دهد. بررسی‌ها نشان داده است که CA در غلظت‌های کم مانند غلظت‌های استفاده شده در این پژوهش نمی‌تواند غلظت سرب فراهم خاک را افزایش دهد (۵۸). از طرف دیگر به‌دلیل تجزیه‌پذیری بالای CA در خاک و در نتیجه نیمه عمر کم آن (۱/۵ تا ۵/۷ روز) اثر آن در افزایش حلالیت فلزات محدود

به ساعات اولیه و روز اول بعد از کاربرد CA می‌باشد (۱۱). چرا که فلزاتی که در ابتدا به‌وسیله CA به محلول خاک آورده می‌شوند به‌دلیل تجزیه سریع CA مجدداً رسوب کرده و یا روی سطح ذرات خاک جذب می‌شود (۱۰).



شکل ۱- غلظت سرب فراهم خاک در تیمارهای مورد مطالعه. Control (عامل کی‌لیت‌کننده با سطح صفر یا شاهد)، EDTA3 و EDTA5 (۳ و ۵ میلی‌مول EDTA در هر کیلوگرم خاک)، CA3 و CA5 (۳ و ۵ میلی‌مول CA در هر کیلوگرم خاک).

Figure 1. Concentration of soil available lead in studied treatments. Control (without chelating agent), EDTA3 and EDTA5 (3 and 5 mmol EDTA per kg of soil) CA3 and CA5 (3 and 5 mmol CA per kg of soil).

وزن خشک ریشه و اندام هوایی: به‌طورکلی در تمام تیمارها مقدار وزن خشک گیاه آفتاب‌گردان بیش‌تر از وزن خشک گیاه خردل هندی بود. نتایج نشان داد که آلودگی خاک به سرب وزن خشک ریشه و اندام هوایی هر دو گیاه را نسبت به تیمار NP (بدون آلودگی سرب) به‌طور معنی‌داری کاهش داد (جدول ۲). کاربرد EDTA وزن خشک ریشه و اندام هوایی هر دو گیاه را به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد کاهش داد. بر خلاف EDTA، کاربرد CA سبب افزایش وزن خشک ریشه و اندام هوایی در هر دو گیاه شد. کی‌لیت CA بیش‌تر موجب افزایش وزن خشک ریشه در مقایسه با اندام هوایی در هر دو گیاه شد. نتایج نشان داد که تیمارهای CA3 و CA5 مقدار وزن خشک ریشه آفتاب‌گردان را به‌ترتیب ۲۷٪ و ۵۹٪ و وزن خشک ریشه خردل هندی را ۲۸٪ و ۶۸٪ نسبت به تیمار شاهد افزایش دادند. همچنین تیمارهای CA3 و CA5 به‌ترتیب سبب افزایش ۱۲٪ و ۱۰٪ وزن خشک اندام هوایی آفتاب‌گردان و ۱۷٪ و ۳٪ وزن خشک اندام هوایی خردل هندی شدند (جدول ۲). مشابه با نتایج این پژوهش هان و همکاران (۲۰۱۶) گزارش نمودند که کاربرد EDTA به مقدار ۰/۵ و ۲ میلی‌مول در کیلوگرم در یک خاک آلوده به سرب به‌طور معنی‌داری وزن خشک ریشه گیاه *Iris halophila* Pall. را نسبت به تیمار بدون کاربرد عامل کی‌لیت‌کننده کاهش داد در حالی‌که کاربرد CA در همین غلظت سبب افزایش وزن خشک ریشه و اندام هوایی گیاه شد (۱۹).

کاهش وزن خشک گیاه در تیمارهای EDTA احتمالاً به‌دلیل اثر سمی EDTA و همچنین غلظت بالای کمپلکس‌های Pb-EDTA در محلول خاک

باشد. زیرا EDTA می‌تواند موانع فیزیولوژیکی ریشه که جذب املاح را کنترل می‌کنند تخریب کرده (٥٤) و سبب تجمع بالای فلزات درون گیاه به مقداری بیش‌تر از توان گیاه شود و این امر سبب فعال کردن سازوکارهای دفاعی در مقابل سمیت فلزها و درنتیجه کاهش رشد گیاه می‌شود (٤۳). پژوهش‌های متعددی گزارش کرده‌اند که کاربرد CA در محیط‌های آلوده به فلزهای سنگین رشد گیاه را به‌طور قابل‌توجهی بهبود می‌دهد (۳۱، ٤۳). کی‌لیت CA احتمالاً می‌تواند متابولیسم‌های فیزیولوژیکی گیاه را بهبود بخشیده و از این طریق موجب افزایش رشد گیاه شود (٤۷). به هر حال در این پژوهش بخشی از افزایش رشد گیاه می‌تواند به‌دلیل کاهش غلظت سرب فراهم در اثر کاربرد CA در خاک باشد.

جدول ۲- اثر سرب و کی‌لیت‌های EDTA و CA بر وزن خشک ریشه و اندام هوایی (گرم بر گلدان).

Table 2. Effect of lead, EDTA and CA on root and shoot dry weight (g pot^{-1}).

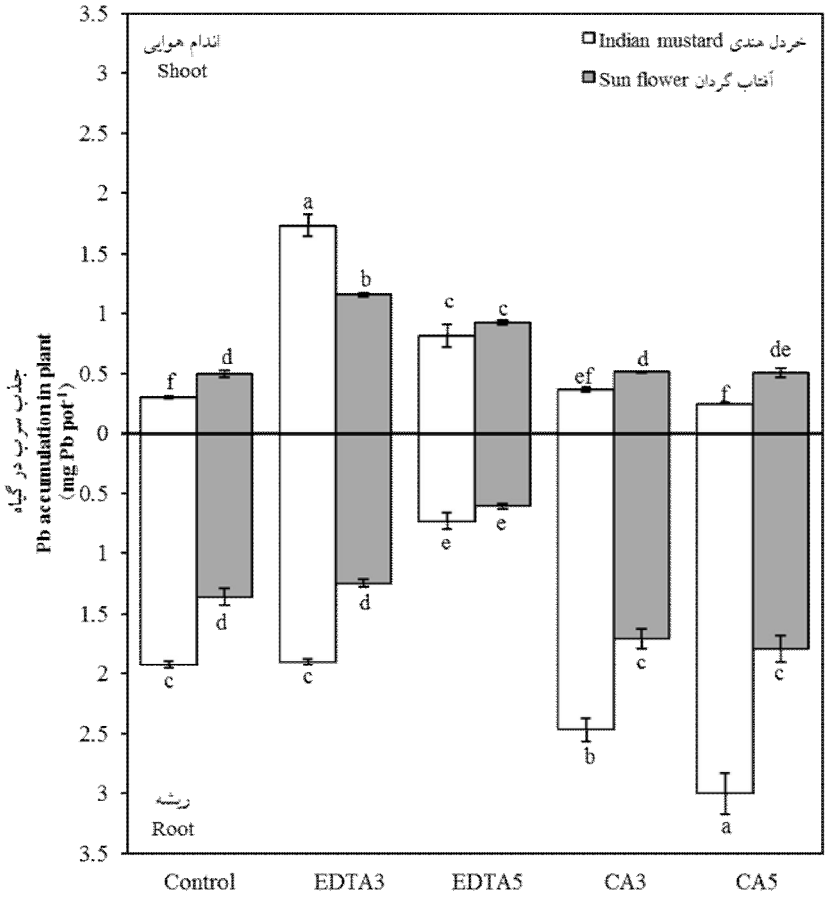
گیاه Plant	تیمار Treat	NP	Control	EDTA3	EDTA5	CA3	CA5
خردل هندی Indian mustard	ریشه Root	4.60±0.04^{a}	2.47±0.08^{d}	2.26±0.03^{e}	1.12±0.02^{f}	3.17±0.02^{c}	4.15±0.20^{b}
	اندام هوایی Shoot	9.36±0.11^{a}	7.02±0.12^{c}	6.08±0.15^{d}	5.16±0.19^{e}	8.24±0.34^{b}	7.25±0.21^{b}
آفتاب‌گردان Sun flower	ریشه Root	4.93±0.07^{A}	2.79±0.07^{D}	2.20±0.06^{D}	1.49±0.07^{E}	3.57±0.12^{C}	4.44±0.17^{B}
	اندام هوایی Shoot	10.68±0.27^{A}	8.83±0.05^{C}	8.14±0.03^{D}	7.16±0.09^{E}	9.19±0.19^{B}	9.78±0.08^{C}

NP (بدون آلودگی سرب و بدون عامل کی‌لیت‌کننده)، Control (عامل کی‌لیت‌کننده با سطح صفر یا شاهد)، EDTA3 و EDTA5 (۳ و ٥ میلی‌مول EDTA در هر کیلوگرم خاک)، CA3 و CA5 (۳ و ٥ میلی‌مول CA در هر کیلوگرم خاک). ردیف‌ها با حروف غیرمشابه دارای تفاوت معنی‌دار در سطح ٥ درصد هستند.

NP (without Pb and without chelating agent), Control (without chelating agent), EDTA3 and EDTA5 (3 and 5 mmol EDTA per kg of soil) CA3 and CA5 (3 and 5 mmol CA per kg of soil). The rows with different letters indicate significant difference at P<0.05.

جذب سرب در ریشه و اندام هوایی: در تمام تیمارها خردل هندی در مقایسه با آفتاب‌گردان توانایی بیش‌تری در جذب سرب در ریشه یا تثبیت گیاهی سرب داشت (شکل ۲). اگرچه خردل هندی زیست‌توده کم‌تری در مقایسه با آفتاب‌گردان داشت ولی به‌دلیل غلظت بیش‌تر سرب در ریشه، این گیاه مقدار جذب سرب بیش‌تری داشت. براساس نتایج حاصله تیمارهای CA5 با گیاه خردل هندی و تیمار EDTA5 با گیاه آفتاب‌گردان به‌ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار جذب سرب در ریشه را موجب شدند. نتایج نشان داد که در تیمار EDTA5 مقدار جذب سرب در ریشه خردل هندی و آفتاب‌گردان به‌ترتیب ٦۲٪ و ٥٥٪ کم‌تر از تیمار شاهد بود. در مقایسه با EDTA کاربرد CA اثر مثبتی بر مقدار جذب سرب در ریشه هر دو گیاه داشت. براساس نتایج حاصله در تیمارهای CA3 و CA5 به‌ترتیب مقدار جذب سرب در ریشه خردل هندی ۲۸٪ و ٥٦٪ و مقدار جذب سرب در ریشه آفتاب‌گردان ۲٥٪ و ۳۲٪ بیش‌تر از تیمار شاهد بود (شکل ۲).

اثر تیمار EDTA5 بر کاهش مقدار جذب سرب در ریشه احتمالاً به‌دلیل اثر منفی این سطح از EDTA بر رشد گیاه باشد که نه تنها زیست‌توده گیاه را کاهش داد بلکه سبب کم شدن غلظت سرب ریشه در مقایسه با تیمار شاهد شد. بعضی از پژوهشگران گزارش کردند که کاربرد EDTA نه تنها جذب سرب را به‌وسیله گیاه افزایش نمی‌دهد بلکه آن را کاهش هم می‌دهد (۲۳، ۵۲) در حالی‌که دیگر پژوهشگران افزایش قابل‌توجه جذب سرب را بعد از کاربرد EDTA مشاهده کردند (٤، ۱۹، ٤٥). این نتایج متناقض احتمالاً به‌خاطر تفاوت در گونه‌های گیاهی، شرایط آزمایش، غلظت و نسبت EDTA به سرب باشد (۱۸). اگرچه در این آزمایش کاربرد CA غلظت سرب فراهم خاک را افزایش نداد ولی به‌دلیل اثر مثبتی که بر عملکرد گیاه داشت توانست مقدار جذب سرب ریشه را به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد افزایش دهد. مشابه با نتایج این آزمایش هان و همکاران (۲۰۱٦) گزارش کردند که کاربرد CA به مقدار ۰/۵ و ۲ میلی‌مول در کیلوگرم مقدار جذب سرب ریشه گیاه *Iris halophila* Pall. را افزایش داد (۱۹).



شکل ۲- اثر EDTA و CA بر مقدار جذب سرب در اندام‌های گیاه. Control (عامل کی‌لیت‌کننده با سطح صفر یا شاهد)، EDTA3 و EDTA5 (۳ و ۵ میلی‌مول EDTA در هر کیلوگرم خاک)، CA3 و CA5 (۳ و ۵ میلی‌مول CA در هر کیلوگرم خاک).

Figure 2. Effect of EDTA and CA on amount of Pb accumulation in plant organs. Control (without chelating agent), EDTA3 and EDTA5 (3 and 5 mmol EDTA per kg of soil) CA3 and CA5 (3 and 5 mmol CA per kg of soil).

در تمام تیمارها به‌جز EDTA3 مقدار جذب سرب اندام هوایی یا استخراج گیاهی سرب در گیاه آفتاب‌گردان بیش‌تر از گیاه خردل هندی بود. نتایج نشان داد که کاربرد CA هیچ اثری بر جذب سرب در اندام هوایی دو گیاه نداشت (شکل ۲). مشابه با نتایج این پژوهش صبیر و همکاران (۲۰۱٤) گزارش کردند که کاربرد استیک، آسکوربیک و اگزالیک اسید اثر معنی‌داری بر مقدار جذب Pb، Cd، Cu و Mn در اندام هوایی گیاه ذرت نداشت (٤۳).

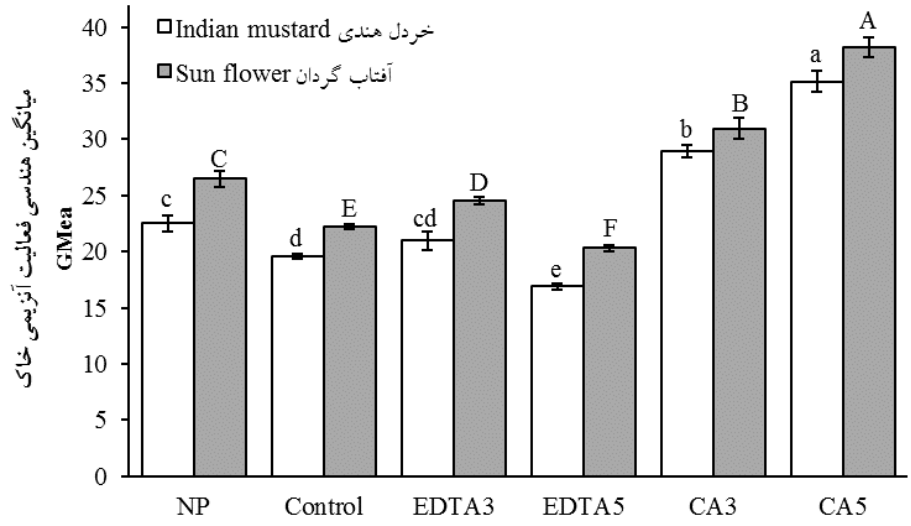
نتایج نشان داد که EDTA نسبت به CA کی‌لیت مؤثرتری برای افزایش مقدار جذب سرب اندام هوایی بود. در تیمارهای EDTA3 و EDTA5 مقدار جذب سرب در اندام هوایی گیاه خردل هندی به‌ترتیب تقریباً ٦ و ۳ برابر و در اندام هوایی گیاه آفتاب‌گردان به‌ترتیب ۲/۲۵ و ۱/۷۵ برابر نسبت به تیمار شاهد بیش‌تر بود (شکل ۲). افزایش غلظت سرب در اندام هوایی به‌وسیله EDTA می‌تواند به‌دلیل انتقال بیش‌تر کمپلکس‌های EDTA-Pb در بافت آوندچوبی باشد (٥٤). زیرا EDTA پروتونه آزاد وارد ریشه می‌شود و متعاقباً با تشکیل کمپلکس با سرب انتقال آن را به اندام هوایی افزایش می‌دهد (٥۷).

نتایج نشان داد مقدار جذب سرب با افزایش غلظت EDTA از ۳ به ٥ میلی‌مول در کیلوگرم به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد (شکل ۲). فتاحی‌کیاسری و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که افزایش مقدار EDTA از ۱/٥ به ۳ میلی‌مول در کیلوگرم باعث کاهش معنی‌داری در سرب اندام هوایی آفتاب‌گردان و ذرت شد (۱۳). مقدار کم‌تر جذب سرب در تیمار EDAT5 نسبت به EDTA3 احتمالاً به اثر بازدارندگی غلظت‌های بالای EDTA بر رشد گیاه مربوط شود که سبب کاهش زیست‌توده اندام هوایی گیاه و در نتیجه کاهش جذب فلزهای سنگین در اندام هوایی می‌شود (٤۸). همچنین واسیل و همکاران (۱۹۹۸) بیان کردند که سنتیک جذب سرب و EDTA در گیاه دو فازی است. به این معنا که برای تحریک و افزایش جذب EDTA و کمپلکس‌های EDTA-Pb در اندام هوایی گیاه به غلظت آستانه یا بحرانی از EDTA نیاز است (٥٤).

شاخص‌های فعالیت آنزیمی خاک: اگرچه تلاش‌هایی برای استفاده از آنزیم‌ها به‌منظور نشان دادن میزان کیفیت خاک در نتیجه تنش‌های محیطی مختلف از جمله آلودگی فلزات سنگین انجام شده است ولی نشان دادن وضعیت کلی تغییرات عناصر غذایی و شرایط میکروبی خاک با اندازه‌گیری فعالیت یک آنزیم مشکل است (۳٦). بنابراین نانی‌پیری (۱۹۹۰) پیشنهاد کرد که اندازه‌گیری هم‌زمان تعداد زیادی آنزیم در خاک نسبت به یک آنزیم به تنهایی، ممکن است اعتبار بیشتری برای نشان دادن فعالیت میکروبی کل خاک و همچنین پاسخ آن به انتشار آلاینده‌ها و تنش‌های محیطی داشته باشد (۳٦). به هر حال پژوهش‌ها نشان داده‌اند که اثر آلاینده‌ها بر فعالیت آنزیم‌های خاک ممکن است از یک آنزیم به آنزیم دیگر و حتی بسته به نوع آلاینده به‌شدت متفاوت باشد (۲۰). بنابراین، شاخص‌های مرکب با استفاده از ترکیبات جبری از فعالیت آنزیم‌های خاک یا آنالیزهای چندمتغیره برای حل این مشکل استفاده شده‌اند (۱٦).

شکل ۳ نشان‌دهنده اثر آلودگی سرب و کی‌لیت‌های مورد آزمایش بر شاخص میانگین هندسی فعالیت آنزیم‌های اندازه‌گیری‌شده در این پژوهش است. به‌طورکلی در تمام تیمارها مقدار GMea در خاک‌های کشت‌شده با آفتاب‌گردان بیش‌تر از خردل هندی بود. نتایج نشان داد در خاک‌های کشت شده با خردل هندی و آفتاب‌گردان آلودگی خاک به سرب (تیمار شاهد) به‌ترتیب موجب کاهش ۱۳٪ و ۱٦٪ GMea نسبت به خاک بدون آلودگی (تیمار NP) شد. تیمار EDTA3 در هر دو گیاه موجب افزایش GMea نسبت به تیمار شاهد شد ولی هنوز از تیمار NP کم‌تر بود. بر خلاف تیمار EDTA3 کاربرد EDTA با

سطح ۵ میلی‌مول در کیلوگرم به‌طور معنی‌داری موجب کاهش GMea نسبت به تیمار شاهد شد. این کاهش در خاک تحت کشت آفتاب‌گردان ۸/٦٪ و در خاک تحت کشت خردل‌هندی ۱۳٪ بود. تیمارهای CA3 و CA5 به‌طور معنی‌داری مقدار GMea را نسبت به تیمار شاهد و همچنین تیمار NP افزایش دادند. به‌طوری‌که بیش‌ترین مقدار این شاخص مربوط به تیمار CA5 با گیاه آفتاب‌گردان به مقدار ۳۸/۱۹ بود.



شکل ۳- اثر سرب و کی‌لیت‌های EDTA و CA بر شاخص میانگین هندسی فعالیت آنزیمی خاک (GMea). NP (بدون آلودگی سرب و بدون عامل کی‌لیت‌کننده)، Control (عامل کی‌لیت‌کننده با سطح صفر یا شاهد)، EDTA3 و EDTA5 (۳ و ۵ میلی‌مول EDTA در هر کیلوگرم خاک)، CA3 و CA5 (۳ و ۵ میلی‌مول CA در هر کیلوگرم خاک).

Figure 3. Effect of lead, EDTA and CA on geometric mean of enzyme activities (GMea) index. NP (without Pb and without chelating agent), Control (without chelating agent), EDTA3 and EDTA5 (3 and 5 mmol EDTA per kg of soil) CA3 and CA5 (3 and 5 mmol CA per kg of soil).

نمودار رادار به‌منظور مقایسه گرافیکی فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه در این پژوهش استفاده شد (شکل ٤). شکل و مساحت مثلث ایجاد شده برای هر تیمار این قابلیت را می‌دهد که فعالیت آنزیمی کل خاک (TEA) را در تیمارهای مختلف هم از نظر بصری و هم آماری مورد بررسی قرار داد. علاوه بر این، نمودارهای رادار بر خلاف سایر شاخص‌های مرکب این امکان را می‌دهد که فعالیت هر یک از آنزیم‌ها را به تنهایی در تیمارهای مختلف با هم مقایسه کرد. به‌طورکلی مساحت مثلث مربوط به هر تیمار در خاک‌های کشت‌شده با آفتاب‌گردان به‌طور قابل‌توجهی بیش‌تر از خاک‌های کشت شده با خردل هندی بود، به‌طوری‌که کم‌ترین و بیش‌ترین مقدار شاخص TEA در خاک‌های کشت‌شده با آفتاب گردان به‌ترتیب ۰/۸۳ و ۹/۰۳ سانتی‌مترمربع و در خاک‌های کشت‌شده با خردل هندی ۰/۷ و ٦/۹٦ سانتی‌مترمربع بود. این نتایج مطابق با نتایج به‌دست آمده از شاخص GMea بود. به‌طورکلی تغییرات شاخص TEA در اثر آلودگی خاک به سرب و همچنین کاربرد کلات‌های مورد آزمایش مشابه با تغییرات شاخص GMea بود. نتایج آنالیزهای آماری بیانگر همبستگی مثبت و قوی بین شاخص TEA و GMea بود ($P<0/05$؛ $R^2=0/96$). مقایسه مثلث مربوط به تیمار EDTA5 نسبت به تیمار شاهد در هر

دو گیاه نشان داد که کاربرد EDTA در سطح ۵ میلی‌مول در کیلوگرم بیش‌تر سبب کاهش فعالیت اوره‌آز شده است. به‌طور میانگین تیمار EDTA5 موجب کاهش ۱۷٪، ۱۹٪ و ٤۲٪ فعالیت آنزیم‌های فسفومونواستراز قلیایی، دهیدروژناز و اوره‌آز نسبت به تیمار شاهد شد. همچنین مقایسه مثلث مربوط به تیمارهای CA3 و CA5 نسبت به تیمار شاهد نشان داد که کاربرد CA بیش‌ترین اثر افزایشی را بر فعالیت آنزیم دهیدروژناز داشته است. به‌عنوان مثال تیمار CA5 به‌طور میانگین موجب افزایش ۰/٦، ۲/۸ و ۳/٦ برابری فعالیت آنزیم‌های اوره‌آز، فسفومونواستراز قلیایی و دهیدروژناز نسبت به تیمار شاهد شد.

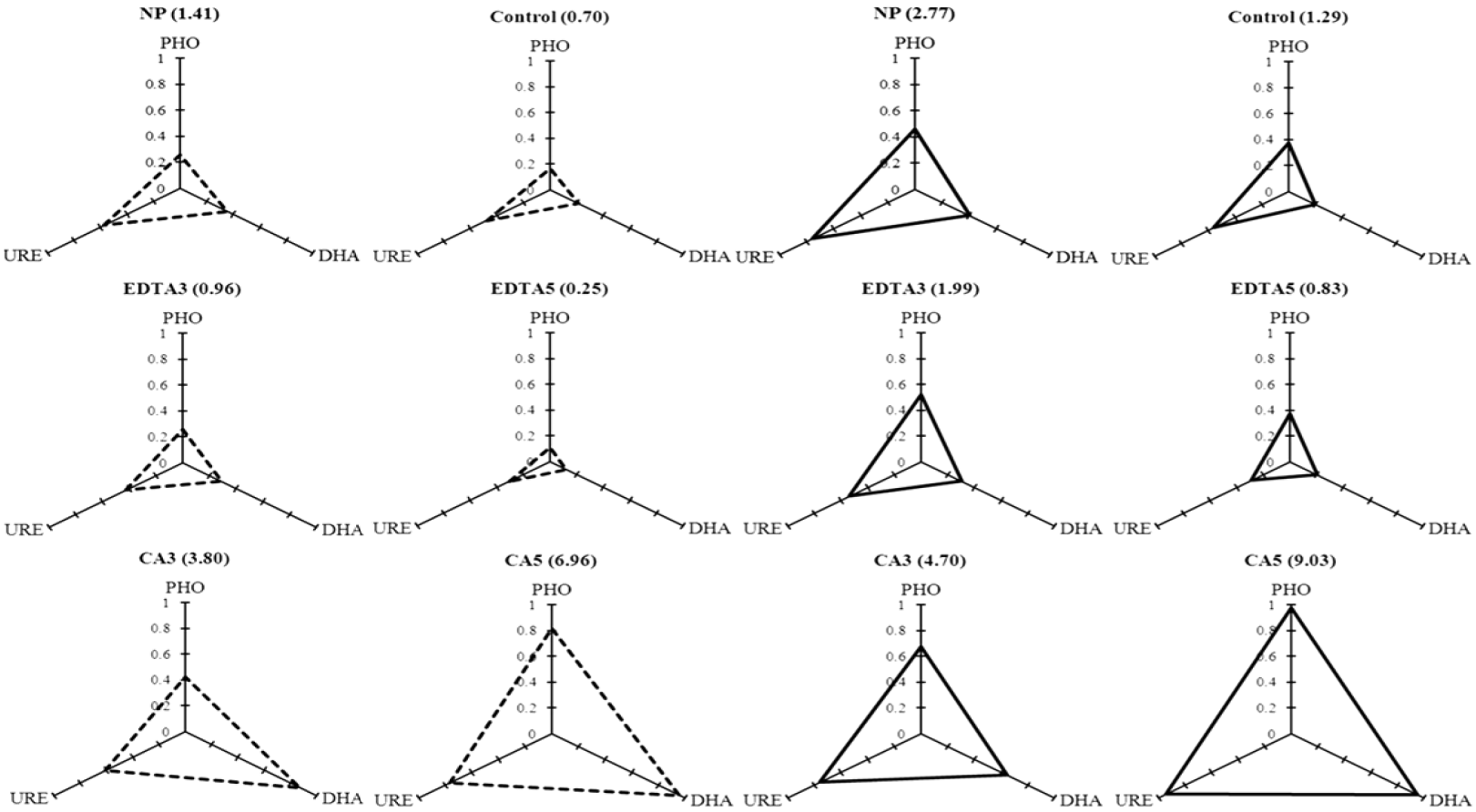
پژوهش‌ها نشان داده‌اند که آلودگی خاک با سرب می‌تواند منجر به کاهش فعالیت آنزیمی خاک شود (۱٤، ٤۱، ٦۰). فلزهای سنگین می‌توانند از طریق واکنش با کمپلکس‌های آنزیم- سوبسترا، دناتوره کردن[1] پروتئین آنزیم یا واکنش با گروه‌های فعال پروتئین فعالیت آنزیمی خاک را کاهش دهند (۳۸). همچنین آن‌ها سنتز آنزیم‌ها به‌وسیله سلول‌های میکروبی را تحت‌تأثیر قرار می‌دهند (٤۱).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که استخراج گیاهی القایی با EDTA با توجه به غلظت EDTA می‌تواند فعالیت آنزیمی خاک را افزایش و یا کاهش دهد. هورمسیس[2] به فرآیندی اطلاق می‌شود که یک سلول، جاندار یا گروهی از موجودات زنده پاسخ دوفازی (دوگانه) در برابر یک ماده یا شرایط خاص نشان می‌دهند. معمولاً تماس با غلظت‌های پایین، اثرات تحریکی یا سودمند و غلظت‌های بالا اثرات منفی یا سمی دارد (۳). نتایج نشان داد که در این پژوهش تیمار خاک با EDTA موجب اثر هورمسیس در فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز، فسفومونواستراز قلیایی و شاخص‌های GMea و TEA شد. کاس و لستان (۲۰۰۳) گزارش کردند که غلظت‌های پایین EDTA (۵ میلی‌مول در کیلوگرم) تنفس میکروبی برانگیخته خاک را افزایش و غلظت‌های بالای آن (۱۰ و ۲۰ میلی‌مول در کیلوگرم) موجب کاهش تنفس میکروبی شد (۲۵). کاهش فعالیت آنزیمی خاک در اثر کاربرد ۵ میلی‌مول در کیلوگرم از کی‌لیت EDTA در این پژوهش احتمالاً به‌دلیل افزایش غلظت فراهم سرب در خاک باشد که سمیت سرب را برای ریزجانداران خاک افزایش داده و درنتیجه موجب کاهش فعالیت آن‌ها می‌شود.

مولباچوا (۲۰۱۱) همبستگی منفی بین غلظت فراهم فلزهای سنگین و کربن زیست‌توده میکروبی و همبستگی مثبت بین غلظت فراهم فلزهای سنگین و سهم متابولیک[3] را در نتیجه کاربرد EDTA گزارش کردند (۳۵). همچنین کاهش رشد ریشه در تیمار EDTA5 می‌تواند از طریق کاهش سطوح اضافی برای کلونیزاسیون میکروبی و کاهش ترشحات ریشه موجب کاهش بیش‌تر فعالیت آنزیمی خاک در این تیمار شود. احتمالاً دلیل کاهش بیش‌تر فعالیت اوره‌آز در تیمار EDTA5 نسبت به سایر آنزیم‌ها همین موضوع باشد. زیرا اوره‌آز یک آنزیم برون‌سلولی بوده که عمدتاً از متابولیت‌های میکروبی و ترشحات ریشه منشأ می‌گیرد و بنابراین هر عاملی که از رشد گیاه و ریزجانداران خاک جلوگیری کند می‌تواند منبع و فعالیت اوره‌آز را کاهش دهد (۳۱).

اثرات EDTA بر ریزجانداران خاک متفاوت است، به‌طوری‌که بعضی پژوهشگران اثر معنی‌داری را گزارش نکردند (٤٦)، در موارد دیگر افزایش در بعضی پارامترهای میکروبی گزارش شد (٦، ۵۵) و از طرف دیگر اثرات منفی EDTA بر ویژگی‌های میکروبی خاک مشاهده شده است (۲۷، ۳۵، ۵۳). به هر حال اطلاعات کمی در مورد اثر غلظت‌های مختلف EDTA بر ویژگی‌های بیوشیمیایی خاک از جمله آنزیم‌ها وجود دارد.

1- Denaturation
2- Hormesis
3- Metabolic quotient



شکل۴- اثر سرب و کی‌لیت‌های EDTA و CA بر شاخص فعالیت آنزیمی کل خاک (TEA). PHO: فعالیت فسفومونواستراز قلیایی، DHA: فعالیت دهیدروژناز، URE: فعالیت اوره‌آز. اعداد داخل پرانتز نشان دهنده مقدار شاخص TEA است. خطوط پیوسته و خطوط ممتد به ترتیب مربوط به خاک تحت کشت آفتاب گردان و خردل هندی است.

Figure 4- Effect of lead, EDTA and CA on total soil enzyme activity (TEA) index. PHO: phosphomonoestrase activity, DHA: dehydrogenase activity, URE: urease activity. The numbers in parentheses indicate amount of TEA index. The solid lines and dash lines represent the soils were cultivated with sun flower and Indian mustard, respectively.

اگرچه در این پژوهش تیمار EDTA3 غلظت سرب فراهم خاک را افزایش و رشد گیاه را کاهش داد ولی اثر مثبتی بر فعالیت دهیدروژناز، فسفومونواستراز قلیایی و شاخص‌های GMea و TEA داشت. ویگلیوتا و همکاران (۲۰۱٦) گزارش کردند که کاربرد EDTA موجب افزایش تنوع زیستی باکتری‌های ریزوسفر خاک آلوده به فلزهای سنگین نسبت به تیمار شاهد شد (۵۵). آن‌ها بیان کردند که این افزایش احتمالاً به‌دلیل آزادسازی ترشحات ریشه و فاکتورهای رشد مورد نیاز باکتری‌ها باشد. اگرچه EDTA در غلظت ۵ میلی‌مول در کیلوگرم برای ریزجانداران خاک سمی بود، احتمالاً کمپلکس شدن سرب با EDTA در غلظت‌های پایین (۳ میلی‌مول در کیلوگرم) از سمیت سرب و EDTA برای ریزجاندارن خاک کاسته است. به هر حال عوامل مختلفی می‌توانند فعالیت آنزیم‌ها را در حضور سرب، EDTA و گیاه تحت‌تأثیر قرار دهند و در آخر سطح نهایی فعالیت آنزیم به فاکتور غالب بستگی دارد.

افزایش در فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز، فسفومونواستراز قلیایی و اوره‌آز در اثر کاربرد CA در پژوهش‌های مائو و همکاران (۲۰۱۵) و ژانگ و همکاران (۲۰۱۵) گزارش شده است (۳۱، ٦۱). ژانگ و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند که CA می‌تواند به افزایش کربن آلی، رشد گیاه و فعالیت ریزجانداران خاک و کاهش تنش فلزهای سنگین کمک کند (٦۱). در واقع CA می‌تواند به‌عنوان منبع کربن به‌وسیله ریزجانداران فعال خاک استفاده شود و در نتیجه جمعیت آن‌ها را افزایش دهد. رنلا و همکاران (۲۰۰٦) بیان کردند که افزایش فعالیت آنزیم‌ها در اثر CA احتمالاً ناشی از افزایش فعالیت رشدی ریزجانداران خاک باشد (٤۲). همچنین در این پژوهش کاهش غلظت سرب فراهم خاک و افزایش رشد گیاه در اثر کاربرد CA ممکن است اثر مثبتی در افزایش فعالیت آنزیمی خاک داشته باشد.

نتایج نشان داد که فعالیت فسفومونواستراز قلیایی، اوره‌آز و شاخص‌های GMea و TEA در خاک تحت کشت آفتاب‌گردان به‌طور قابل‌توجهی بیش‌تر از خردل هندی بود. این افزایش احتمالاً به‌دلیل رشد بیش‌تر ریشه گیاه آفتاب‌گردان نسبت به خردل هندی باشد که موجب افزایش سطوح کلونیزاسیون و ترشحات ریشه برای ریزجانداران خاک شده است.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی نتایج نشان داد که اثر EDTA بر جذب سرب اندام هوایی دو گیاه خردل هندی و آفتاب‌گردان (استخراج گیاهی سرب)و فعالیت آنزیمی خاک به غلظت EDTA به‌کار رفته بستگی داشت. در تیمار EDTA3 مقدار جذب سرب اندام هوایی نسبت به تیمار شاهد افزایش پیدا کرد و همچنین به‌طور معنی‌داری فعالیت آنزیمی خاک و شاخص‌های GMea و TEA، که شاخصی از کیفیت خاک هستند، در این تیمار بهبود یافت. تیمار EDTA5 احتمالاً به‌دلیل اثر منفی که بر رشد گیاه و ریزجانداران خاک داشت کارایی کم‌تری نسبت به تیمار EDTA3 در افزایش جذب سرب اندام هوایی داشت و شاخص‌های GMea و TEA را نسبت به تیمار شاهد کاهش داد. کاربرد CA، با توجه به اثر کاهشی بر غلظت سرب فراهم خاک و افزایش جذب سرب در ریشه هر دو گیاه مورد مطالعه گزینه مناسب‌تری برای تثبیت گیاهی سرب در خاک مورد مطالعه بود و همچنین توانست فعالیت آنزیمی خاک و شاخص‌های GMea و TEA را به‌طور قابل‌توجهی بهبود بخشد، به‌طوری‌که در پایان آزمایش فعالیت آنزیمی در تیمارهای CA از تیمار شاهد و تیمار بدون آلودگی سرب (تیمار NP) نیز بیش‌تر بود.

منابع

1.Babaeian, E., Homaee, M., and Rahnemaie, R. 2016. Chelate-enhanced phytoextraction and phytostabilization of lead-contaminated soils by carrot (*Daucus carota*). Arch. Agron. Soil Sci. 62: 3. 339-358.

2.Bremner, J.M., and Mulvaney, C.S. 1982. Nitrogen-total. P 595-624, In: A.L. Page (Ed.), Methods of Soil Analysis, American Society of Agronomy, Madison, WI.

3.Calabrese, E.J. 2008. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. Environ. Toxicol. Chem. 27: 7. 1451-1474.

4.Cay, S., Uyanik, A., Engin, M.S., and Kutbay, H.G. 2015. Effect of EDTA and tannic acid on the removal of Cd, Ni, Pb and Cu from artificially contaminated soil by *Althaearosea Cavan*. Int. J. Phytoremediation. 17: 6. 568-574.

5.Chander, K., and Joergensen, R.G. 2008. Decomposition of Zn-rich *Arabidopsis halleri* litter in low and high metal soil in the presence and absence of EDTA. Water Air Soil Pollut. 188: 1-4. 195-204.

6.Chander, K., and Joergensen, R.G. 2011. Soil microorganisms and the growth of *Lupinus albus* on a high metal soil in the presence of EDTA. Arch. Agron. Soil Sci. 57: 2. 115-126.

7.Chapman, H.D. 1965. Cation exchange capacity. P 891-901, In: C.A. Black (Ed.), Methods of Soil Analysis, American Society of Agronomy, Madison, WI.

8.Ciarkowska, K., Sołek-Podwika, K., and Wieczorek, J. 2014. Enzyme activity as an indicator of soil-rehabilitation processes at a zinc and lead ore mining and processing area. J. Environ. Manage. 132: 250-256.

9.Dick, R.P., Breakwell, D.P., Turco, R.F., Doran, J.W., and Jones, A.J. 1996. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. P 247-271, In: J.W. Doran and A.J. Jones (Ed.), Methods for assessing soil quality, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.

10.DoNascimento, C.W.A., Amarasiriwardena, D., and Xing, B. 2006. Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil. Environ. Pollut. 140: 1. 114-123.

11.Evangelou, M.W., Ebel, M., Hommes, G., and Schaeffer, A. 2008. Biodegradation: the reason for the inefficiency of small organic acids in chelant-assisted phytoextraction. Water Air soil Pollut. 195: 1-4. 177-188.

12.Evangelou, M.W., Kutschinski-Klöss, S., Ebel, M., and Schaeffer, A. 2007. Potential of *Borago officinalis*, *Sinapis alba* L. and *Phacelia boratus* for phytoextraction of Cd and Pb from soil. Water Air Soil Pollut. 182: 1-4. 407-416.

13.Fatahi, E., Fotovat, A., Astaraei, A.R., and Haghnia, G.H. 2010. The effects of H_2SO_4 and EDTA on phytoremediation of Pb in soil with three plant Sun flower, *Zea mays* and Cotton. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, Water and Soil Science. 51: 57-68. (In Persian)

14.Feng, D., Teng, Y., Wang, J., and Wu, J. 2016. The Combined Effect of Cu, Zn and Pb on Enzyme Activities in Soil from the Vicinity of a Wellhead Protection Area. Soil Sediment Contam. 25: 3. 279-295.

15.Fine, P., Paresh, R., Beriozkin, A., and Hass, A. 2014. Chelant-enhanced heavy metal uptake by eucalyptus trees under controlled deficit irrigation. Sci. Total Environ. 493: 995-1005.

16.García-Ruiz, R., Ochoa, V., Hinojosa, M.B., and Carreira, J.A. 2008. Suitability of enzyme activities for the monitoring of soil quality improvement in organic agricultural systems. Soil Biol. Biochem. 40: 9. 2137-2145.

17.Gee, G.H., and Bauder, J.W. 1986. Particle size analysis. P 383-409, In: A. Klute (Ed.), Methods of Soil Analysis, Part 2 physical properties, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.

18.Gupta, D.K., Huang, H.G., and Corpas, F.J. 2013. Lead tolerance in plants: strategies for phytoremediation. Environ. Sci. Pollut. Res. 20: 4. 2150-2161.

19.Han, Y., Zhang, L., Gu, J., Zhao, J., and Fu, J. 2016. Citric acid and EDTA on the growth, photosynthetic properties and heavy metal accumulation of *Iris halophila* Pall. cultivated in Pb mine tailings. Int. Biodeterior. Biodegrad. Pp: 1-7.
20.He, Z.L., Yang, X.E., Baligar, V.C., and Calvert, D.V. 2003. Microbiological and biochemical indexing systems for assessing quality of acid soils. Adv. Agron. 78: 89-138.
21.Hernández-allica, J., Garbisu, C., Becerril, J.M., Barrutia, O., García-plazaola, J.I., Zhao, F.J., and McGrath, S.P. 2006. Synthesis of low molecular weight thiols in response to Cd exposure in *Thlaspi caerulescens*. Plant Cell Environ. 29: 7. 1422-1429.
22.Hinojosa, M.B., Carreira, J.A., Rodríguez-Maroto, J.M., and García-Ruíz, R. 2008. Effects of pyrite sludge pollution on soil enzyme activities: ecological dose–response model. Sci. Total Environ. 396: 2. 89-99.
23.Huang, H., Li, T., Tian, S., Gupta, D.K., Zhang, X., and Yang, X.E. 2008. Role of EDTA in alleviating lead toxicity in accumulator species of *Sedum alfredii* H. Bioresource Technol. 99: 14. 6088-6096.
24.Jones Jr, J.B. 2001. Laboratory guide for conducting soil tests and plant analysis. CRC press. LLC, New York, 365p.
25.Kos, B., and Lestan, D. 2003. Influence of a biodegradable ([S, S]-EDDS) and nondegradable (EDTA) chelate and hydrogel modified soil water sorption capacity on Pb phytoextraction and leaching. Plant Soil. 253: 2. 403-411.
26.Lambrechts, T., Gustot, Q., Couder, E., Houben, D., Iserentant, A., and Lutts, S. 2011. Comparison of EDTA-enhanced phytoextraction and phytostabilisation strategies with *Lolium perenne* on a heavy metal contaminated soil. Chemosphere. 85: 8. 1290-1298.
27.Lee, J., and Sung, K. 2014. Effects of chelates on soil microbial properties, plant growth and heavy metal accumulation in plants. Ecol. Eng. 73: 386-394.
28.Lindsay, W.L., and Norvell, W.A. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. Soil Sci. Soc. Am. J. 42: 3. 421-428.
29.Loeppert, R.H., and Sparks, D.L. 1996. Carbonate and gypsum. P 437-474, In: D.L. Sparks (Ed.), Methods of Soil Analysis, Part 3 chemical methods, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.
30.Luo, C., Shen, Z., and Li, X. 2005. Enhanced phytoextraction of Cu, Pb, Zn and Cd with EDTA and EDDS. Chemosphere. 59: 1. 1-11.
31.Mao, L., Tang, D., Feng, H., Gao, Y., Zhou, P., Xu, L., and Wang, L. 2015. Determining soil enzyme activities for the assessment of fungi and citric acid-assisted phytoextraction under cadmium and lead contamination. Environ. Sci. Pollut. Res. 22: 24. 19860-19869.
32.Martens, R. 1992. A comparison of soil adenine nucleotide measurements by HPLC and enzymatic analysis. Soil Bio. Biochem. 24: 7. 639-645.
33.McGrath, S.P., and Cunliffe, C.H. 1985. A simplified method for the extraction of the metals Fe, Zn, Cu, Ni, Cd, Pb, Cr, Co and Mn from soils and sewage sludges. J. Sci. Food Agric. 36: 9. 794-798.
34.Muhammad, D., Chen, F., Zhao, J., Zhang, G., and Wu, F. 2009. Comparison of EDTA-and citric acid-enhanced phytoextraction of heavy metals in artificially metal contaminated soil by *Typha angustifolia*. Int. J. Phytoremediation. 11: 6. 558-574.
35.Mühlbachová, G. 2011. Soil microbial activities and heavy metal mobility in long-term contaminated soils after addition of EDTA and EDDS. Ecol. Eng. 37: 7. 1064-1071.
36.Nannipieri, P., Grego, S., Ceccanti, B., Bollag, J.M., and Stotzky, G. 1990. Ecological significance of the biological activity in soil. P 293-355, In: J.M. Bollag and G. Stotozky (Eds.), Soil biochemistry, Volume 6, Marcel Dekker, New York.
37.Nannipieri, P., Kandeler, E., and Ruggiero, P. 2002. Enzyme Activities and Microbiological and Biochemical Processes In Soil. P 1-33, In: R.G. Burn and R. Dick (Eds.), Enzymes in the Environment, Marcel Dekker, New York.

38. Nannipieri, P., Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R., and Grace, P.R. 1994. The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. P 238-244, In: C.E. Pankhurst, B.M. Doube, V.V.S.R. Gupta and P.R. Grace (Eds.), Soil biota: management in sustainable farming systems, CSIRO Publications, Madison.
39. Nowack, B., Schulin, R., and Robinson, B.H. 2006. Critical assessment of chelant-enhanced metal phytoextraction. Environ. Sci. Technol. 40: 17. 5225-5232.
40. Olsen, S.R., and Sommers, L.E. 1982. Phosphorus. P 4013-430, In: A. Klute (Ed.), Methods of Soil Analysis, Part1 chemical and biological properties, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.
41. Pan, J., and Yu, L. 2011. Effects of Cd or/and Pb on soil enzyme activities and microbial community structure. Ecol. Eng. 37: 11. 1889-1894.
42. Renella, G., Egamberdiyeva, D., Landi, L., Mench, M., and Nannipieri, P. 2006. Microbial activity and hydrolase activities during decomposition of root exudates released by an artificial root surface in Cd-contaminated soils. Soil Biol. Biochem. 38: 4. 702-708.
43. Sabir, M., Hanafi, M.M., Zia-Ur-Rehman, M., Saifullah, M.H., Ahmad, H.R., Hakeem, K.R., and Aziz, T. 2014. Comparison of low-molecular-weight organic acids and ethylenediaminetetraacetic acid to enhance phytoextraction of heavy metals by maize. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 45: 1. 42-52.
44. Saifullah, M.H., Ghafoor, A., Zia, M.H., Murtaza, G., Waraich, E.A., Bibi, S., and Srivastava, P. 2010. Comparison of organic and inorganic amendments for enhancing soil lead phytoextraction by wheat (*Triticum aestivum* L.). Int. J. Phytoremediation. 12: 7. 633-649.
45. Saifullah, M.H., Shahid, M., Zia-Ur-Rehman, M., Sabir, M., and Ahmad, H.R. 2014. Phytoremediation of Pb-Contaminated Soils Using Synthetic Chelates. P 397-414, In: M. Sabir and H.R. Ahmad (Eds.), Soil Remediation and Plants: Prospects and Challenges, Elsevier Inc.
46. Sapoundjieva, K., Kartalska, Y., Vassilev, A., Naidenov, M., Kuzmanova, I., and Krastev, S. 2003. Effects of the chelating agent EDTA on metal solubility in the soil, metal uptake and performance of maize plants and soil microorganisms. Bulg. J. Agric. Sci. 9: 659-663 (Bulgaria).
47. Shakoor, M.B., Ali, S., Hameed, A., Farid, M., Hussain, S., Yasmeen, T., Najeeb, U., Bharwana, S.A., and Abbasi, G.H. 2014. Citric acid improves lead (Pb) phytoextraction in *Brassica napus* L. by mitigating Pb-induced morphological and biochemical damages. Ecotoxicol. Environ. Saf. 109: 38-47.
48. Sun, Y.B., Zhou, Q.X., An, J., Liu, W.T., and Liu, R. 2009. Chelator-enhanced phytoextraction of heavy metals from contaminated soil irrigated by industrial wastewater with the hyperaccumulator plant (*Sedum alfredii* Hance). Geoderma. 150: 1. 106-112.
49. Tabatabai, M.A., and Bremner, J.M. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. Soil Biol. Biochem. 1: 4. 301-307.
50. Tabatabai, M.A., and Bremner, J.M. 1972. Assay of urease activity in soils. Soil Biol. Biochem. 4: 4. 479-487.
51. Thalmann, A. 1966. The determination of the dehydrogenase activity in soil by means of TTC (triphenyltetrazolium). Soil Biol. 6: 46-49.
52. Tian, S.K., Lu, L.L., Yang, X.E., Huang, H.G., Brown, P., Labavitch, J., Liao, H.B., and He, Z.L. 2011. The impact of EDTA on lead distribution and speciation in the accumulator *Sedum alfredii* by synchrotron X-ray investigation. Environ. Pollut. 159: 3. 782-788.
53. Usman, A.R., Almaroai, Y.A., Ahmad, M., Vithanage, M., and Ok, Y.S. 2013. Toxicity of synthetic chelators and metal availability in poultry manure amended Cd, Pb and As contaminated agricultural soil. J. Hazard. Mater. 262: 1022-1030.
54. Vassil, A.D., Kapulnik, Y., Raskin, I., and Salt, D.E. 1998. The role of EDTA in lead transport and accumulation by Indian mustard. Plant Physiol. 117: 2. 447-453.
55. Vigliotta, G., Matrella, S., Cicatelli, A., Guarino, F., and Castiglione, S. 2016. Effects of heavy metals and chelants on phytoremediation capacity and on rhizobacterial communities of maize. J. Environ. Manage. 179: 93-102.

56. Walkley, A., and 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 Sci. 37: 1. 29-38.
57. Wenzel, W.W., Unterbrunner, R., Sommer, P., and Sacco, P. 2003. Chelate-assisted phytoextraction using canola (*Brassica napus* L.) in outdoors pot and lysimeter experiments. Plant Soil. 249: 1. 83-96.
58. Wu, L.H., Luo, Y.M., Xing, X.R., and Christie, P. 2004. EDTA-enhanced phytoremediation of heavy metal contaminated soil with Indian mustard and associated potential leaching risk. Agric. Ecosyst. Environ. 102: 3. 307-318.
59. Yang, L., Wang, G., Cheng, Z., Liu, Y., Shen, Z., and Luo, C. 2013. Influence of the application of chelant EDDS on soil enzymatic activity and microbial community structure. J. Hazard. Mater. 262: 561-570.
60. Yang, Z.X., Liu, S.Q., Zheng, D.W., and Feng, S.D. 2006. Effects of cadmium, zinc and lead on soil enzyme activities. J. Environ. Sci. 18: 6. 1135-1141.
61. Zhang, H., Chen, X., He, C., Liang, X., Oh, K., Liu, X., and Lei, Y. 2015. Use of energy crop (*Ricinus communis* L.) for phytoextraction of heavy metals assisted with citric acid. Int. J. Phytoremediation. 17: 7. 632-639.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

J. of Water and Soil Conservation, Vol. 24(1), 2017
http://jwsc.gau.ac.ir

Effect of EDTA and Citric acid on soil enzyme activities and phytoextraction of lead by sun flower and Indian mustard from a contaminated soil

S.S. Hosseini[1], *A. Lakzian[2] and A. Halajnia[3]

[1]M.Sc. Graduate, Dept. of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad,
[2]Professor, Dept. of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad,
[3]Assistant Prof., Dept. of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad
Received: 10/21/2016; Accepted: 05/09/2017

Abstract

Background and Objectives: Chelate induced-phytoextraction is one of the methods for remediation of heavy metal contaminated soils that have been attracted a lot of attention in the past decade. So far more attentions have been placed to effects of chelating agents on heavy metal solubility in soil and their uptake by plants, while there are less information about their side effects on soil environment and organisms. Soil enzyme activities can be suitable indicators to assess soil recovery after different remediation processes. The aim of this study was to evaluate the effects of EDTA and Citric acid (CA) on soil enzyme activities as well as lead (Pb) uptake by Indian mustard and sun flower.

Materials and Methods: This study was conducted in a completely randomized design with factorial arrangement and three replications in greenhouse condition. The experimental factors were chelating agent treatments and plant types. The chelating agent treatments were including Control (without chelating agent), EDTA3 and EDTA5 (3 and 5 mmol EDTA per kg dry soil), CA3 and CA5 (3 and 5 mmol CA per kg dry soil). The plant species were Indian mustard (*Brassica juncea*) and sun flower (*Helianthus annus*). Also additional treatment (without Pb and without chelating agent) was considered to evaluate the effect of Pb on plant dry weight and soil enzymes activities (NP treatment).

Results: The results showed that EDTA was more effective than CA for increasing available Pb concentration. Unexpectedly, the addition of CA into soil significantly decreased available Pb concentration compared with the control treatment. The results showed that between two studied chelating agents, the EDTA was appropriate for increasing Pb uptake by shoots and CA was appropriate for increasing Pb uptake by roots. The highest Pb uptake by root (2.99 mg Pb per pot) was observed in Indian mustard using 5 mmol CA per kg dry soil. Also the highest Pb uptake by shoot (1.74 mg Pb per pot) was obtained by Indian mustard with EDTA3 treatment. The results showed that soil treated with EDTA led to hormesis effect on dehydrogenase and phosphomonoestrase activity, GMea and TEA indices. The EDTA5 treatment decreased GMea and TEA indices while, the EDTA3 treatment increased these indices compared with the control treatment. The addition of both concentration of CA into soil significantly and considerably increased the studied soil enzyme activities as well as GMea and TEA indices compared with the control treatment.

Conclusion: In EDTA3 treatment the shoot Pb uptake amount was higher than control treatment and, furthermore, it improved GMea and TEA indices. The EDTA5 treatment had lower efficiency than EDTA3 in increasing of shoot Pb uptake and also it decreased GMea and TEA indices compared with the control treatment. The addition of CA into soil was probably more suitable option for Pb phytostabilization in the studied soil and also considerably increased TEA and GMea indices compared with the control and NP treatments.

Keywords: Chelating agents, TEA and GMea indices, Available Pb concentration, Phytoextraction

* Corresponding Author; Email: alakzian@yahoo.com