نشریه دانش آب و خاک / جلد ۲۷ شماره ۲ صفحه‌های ۲۴۹ تا ۲۶۶ / سال ۱۳۹۶

نقش اسیدهیومیک در پالایش سبز سرب توسط گونه مرتعی طوق (*Xeanthium vetelus*)

میرحسن رسولی صدقیانی[۱*]، حسن کریمی[۲]، حبیب خداوردیلو[۱]، ندا مرادی[۳]، محسن برین[٤]

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۳/۲٦ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۵

۱- دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۳- دانشجوی دکتری علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

٤- استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.rsadghiani@urmia.ac.ir

چکیده

یکی از روش‌های نوین افزایش کارآیی پالایش سبز فلزات سنگین در خاک‌های آلوده، استفاده از عوامل کمپلکس‌کننده در خاک است. بدین‌منظور برای بررسی اثر کاربرد اسید هیومیک بر افزایش انحلال سرب در خاک و جذب آن توسط گیاه طوق آزمایشی در شرایط گلخانه‌ای اجرا گردید. فاکتورهای آزمایش شامل: ۱) سرب (صفر، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از منبع نیترات سرب) و ۲) اسید هیومیک (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بودند. به‌همین منظور در پایان دوره رشد گیاه طوق برخی پارامترهای بیولوژیک خاک شامل تنفس میکروبی (*BR*)، کربن زیست‌توده میکروبی خاک (*MBC*)، محتوای نسبی آب برگ (*RWC*)، میزان پرولین و غلظت سرب در ریشه و شاخساره گیاه، فاکتور انتقال گیاهی(*TF*)، فاکتور انباشت شاخساره و ریشه (*BAF*) اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که افزایش شدت آلودگی سربی خاک، *BR*، *MBC*، زیست‌توده خشک ریشه و شاخساره، *RWC*، *BAF* شاخساره و ریشه و *TF* را کاهش داد و باعث افزایش مقدار پرولین، غلظت سرب شاخساره و غلظت سرب ریشه در گیاه طوق گردید. همچنین افزودن اسید هیومیک باعث کاهش پرولین گردید که مقدار پرولین در تیمارها بدین‌ترتیب بود ($HA_{۲۰۰} < HA_{۱۰۰} < HA_{۰}$). همچنین نتایج حاکی از تأثیر مثبت اسید هیومیک بر غلظت سرب زیست‌فراهم، *BR* و *MBC* بود و غلظت سرب زیست‌فراهم در $HA_{۲۰۰}$ در مقایسه با $HA_{۰}$، ٦۲/۳۵ درصد افزایش یافت. به‌طورکلی علیرغم تأثیر مثبت اسید هیومیک در افزایش جذب سرب توسط گیاه طوق، این گیاه نمی‌تواند برای پالایش سبز سرب مناسب باشد، زیرا این گیاه نتوانسته است بیش از ۱۰۰۰ میلی‌گرم سرب در کیلوگرم ماده خشک اندام هوایی اندوزش نماید.

واژه‌های کلیدی: آلودگی خاک، اسید هیومیک، پالایش سبز، سرب، گیاه طوق (*Xeanthium vetelus*)

The Role of Humic Acid on Phytoremediation of Pb through a Pasture Collar Plant (*Xeanthium vetelus*)

MH Rasouli-Sadaghiani[1*], H Karimi[2], H Khodaverdiloo[1], N Moradi[3], M Barin[4]

Received: 15 June 2016 Accepted: 04 January 2017

1- Assoc. Prof., Dept. of Soil Science, Urmia University, Iran
2- M.Sc. Graduate, Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Iran
3- PhD Student of Soil Science, Dept. of Soil Science, Urmia University, Iran
4- Assoc. Prof., Dept. of Soil Science, Urmia University, Iran
* Corresponding Author, Email: m.rsadaghiani@urmia.ac.ir

Abstract

One of the new approaches for increasing phytoremediation efficiency of heavy metals in contaminated soils is using soil chelating agents. In order to evaluate the effect of humic acid (HA) application on elevating the solubility of lead (Pb) in the soil and its uptake by the collar plant (*Xeanthium vetelus*), an experiment was carried out under greenhouse conditions. The factors included: 1) lead (Pb_0, Pb_{250}, Pb_{500} and Pb_{1000} mg kg^{-1} from $Pb(NO_3)_2$) and 2) humic acid (HA_0, HA_{100} and HA_{200} mg kg^{-1}. At the end of growing period selected soil biological parameters including basal respiration (*BR*), microbial biomass carbon (*MBC*), relative water content (*RWC*), proline amount and lead concentration in roots and shoots of plant, plant transfer factor (*TF*), Bio-concentration factor roots and shoots (*BAF*) were measured. Results showed that increasing the intensity of soil lead contamination decreased microbial respiration, microbial biomass carbon, relative water content of plant tissue, biological concentration factor of shoot, root bio-concentration factor and transfer factor plant, however increased proline, the concentration of lead in shoot and root at the collar plant. Furthermore, the application of humic acid reduced proline amount in treatments as follows: $HA_0 > HA_{100} > HA_{200}$. Also, results suggested that humic acid showed a positive effect on bioavailable *Pb*, *BR* and *MBC* and bioavailable Pb in HA_{200} increased by 62.35 percent compared to HA_0. Generally, despite of positive effect of HA on Pb uptake, collar plant couldn't be suitable for Pb phytoremediation as it accumulated Pb < 1000 mg kg^{-1} leaf dry weight.

Keywords: Collar plant (*Xeanthium vetelus*), Humic acid, Lead, Phytoremediation, Soil contamination

مقدمه

آلودگی خاک‌ها به سرب یکی از مشکلات بزرگی است که کشورهای در حال توسعه و صنعتی با آن مواجه هستند. از منابع آلوده‌کننده سرب خاک‌ها می‌توان به فعالیت‌های صنعتی مانند معادن، فعالیت‌های کشاورزی مانند کاربرد آفت‌کش‌ها و کاربرد لجن فاضلاب و فعالیت‌های شهری مانند کاربرد سرب در بنزین و رنگ‌ها اشاره کرد (شن و همکاران ۲۰۰۲). فلزهای سنگین عموماً پس از ورود به خاک بی‌جنبش شده و در محیط زیست انباشته می‌شوند، بنابراین آسیب-های احتمالی فلزات سنگین بر سلامتی انسان و دام در درازمدت تشدید می‌شود (گیسبرت و همکاران ۲۰۰۳) آلودگی خاک با فلزهای سنگین می‌تواند منجر به کاهش کارکرد گیاهان و کیفیت محصولات کشاورزی شود. سرب کارکرد زیستی ویژه‌ای ندارد و در غلظت‌های کم برای جانداران بسیار سمّی هست. این عنصر با ورود به زنجیره غذایی، در بدن انسان و جانوران انباشته شده و ممکن است سبب ایجاد سرطان شود. سرب به‌طور طبیعی در تمامی گیاهان ولی با غلظت متفاوت وجود دارد. غلظت طبیعی سرب در برگ‌ها و شاخه‌های کوچک گیاهان چوبی ۲/۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن خشک گیاه گزارش شده است. همچنین برای سبزیجات و حبوبات

میزان طبیعی سرب را ۱-۰/۱ میکروگرم بر کیلوگرم بیان نموده‌اند (صاحب‌قدم لطفی ۱۳٦۷). با توجه به تأثیر سرب بر میکروارگانیسم‌های خاکزی، به‌نظر می‌رسد که میکروارگانیسم‌ها بیشتر از گیاهان به آلودگی سرب در خاک حساس باشند. از آنجا که بیشتر بافت‌های فعال فیزیولوژیک گیاهان در رشد، تکامل و فتوسنتز نقش دارند، می‌توان انتظار داشت که سرب ممکن است در یک یا چند تا از این فرآیندها اختلال ایجاد نماید (مریان ۱۹۹۱). پاسخ گیاهان به سرب شامل کاهش وزن خشک و طویل شدن ریشه، ممانعت از بیوسنتز کلروفیل ممانعت از عمل چند آنزیم می‌باشد (فارگاسوو ۱۹۹٤).

با گسترش آلودگی فلزات سنگین، پژوهش‌ها در زمینه روش‌های اصلاح و پاک‌سازی خاک‌های آلوده به آن‌ها نیز توسعه یافته است. با توجه به اینکه در میان جانداران عالی، تنها گیاهان مکانیسم‌ها و استراتژی‌های مؤثری را به‌منظور حفظ بقای خود در مکان‌های آلوده توسعه داده‌اند و قادرند با شیوه‌های مختلف از جمله دفع کردن، سم‌زدایی و انباشت نمودن یون‌های فلزی در سلول‌ها یا اجزای سلولی تخصصی شده خود (نظیر واکوئل‌ها و دیواره‌های سلولی) حضور فلزات سمّی را تحمل کنند. لذا امکان بهره‌برداری از توانایی عظیم گونه-های گیاهی خاص در علم نو ظهور پالایش سبز به‌منظور زدایش فلزات سمّی از مکان‌های آلوده وجود دارد (گاورنسکی و گاورونسکا ۲۰۰۷). استخراج سبز[1] شامل جذب آلاینده‌های فلزی از خاک توسط گیاه و انتقال آن به بخش قابل برداشت گیاه می‌باشد. در برخی موارد استخراج و پالایش سبز[2] را به یک معنا به‌کار می‌برند که نادرست است. استخراج سبز یک روش از پالایش سبز محسوب می‌شود. گیاهان مورد استفاده در این روش، گیاهان فلزاندوز یا بیش‌اندوز نامیده می‌شوند. در استخراج سبز، فراهمی فلز در خاک بیش از هر چیزی اهمیت دارد. یکی از راه‌های افزایش فراهمی، ترشح سیدروفورهای گیاهی[3] به ریزوسفر و تشکیل کمپلکس با فلزات است. با افزایش فراهمی فلز در خاک، جذب آن توسط ریشه افزایش می‌یابد. در ابتدا فلزات با دیواره سلول پیوند برقرار نموده، سپس از طریق کانال‌ها و حامل‌های پروتئینی از غشای سلولی عبور می‌کند. همچنین کی‌لیت‌ها مانند اسید هیومیک ترکیباتی هستند که از طریق ایجاد کمپلکس با فلزات باعث افزایش فراهمی آنها در محیط می‌شوند. پایداری کلات بستگی به نوع لیگاند دارد. اسیدهای هیومیک ماکرومولکول‌های هتروژنی‌اند که از تجزیه شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی موادآلی به‌وجود می‌آیند (استیونسون ۱۹۹۲). وزن مولکولی آن‌ها از چندهزار تا بالای یک میلیون دالتون متغیر است. اسید هیومیک عمدتاً شامل گروه‌های اسیدی مانند گروه‌های عاملOH کربوکسیل و فنولی می باشد و مشخصات شیمیایی و خواص بیولوژیکی و پایداری مختلف در اختیار دارد. این خصوصیت آن‌ها را قادر به تعامل با یون‌های فلزی به هر دو شکل ترکیبات یون‌های محلول در آب و نامحلول در آب می‌نماید (هافریچر و استین بوچل ۲۰۰۱). طبق گزارش رشید (۱۹۸۵) گروه-های عاملی اکسیژن‌دار در اسید هیومیک مطالعه شده یک چهارم وزن مولکولی اسید هیومیک را به‌خود اختصاص می‌دهند و فراوانی کربوکسیل با فرآیند هیومیکی شدن افزایش می‌یابد. هر چه فراوانی گروه‌های کربوکسیل در مواد هیومیکی بیشتر باشد واکنش‌پذیری آن‌ها با فلزات بیشتر خواهد بود (اسپارک و همکاران ۱۹۹۷). بنابراین این مولکول‌های بزرگ آلی، نقش مهمی در حمل و نقل، زیست فراهمی و حل‌پذیری فلزات سنگین ایفا می‌کنند (لاژیر و همکاران ۲۰۰۰).

کاهش در میزان غلظت کل فلزات سنگین در خاک را می‌توان به‌دلیل نقش اسید هیومیک در فراهم کردن مولکول‌های آلی و نقش مهم آنها در حمل و نقل، زیست فراهمی و حل‌پذیری فلزات سنگین در خاک دارند دانست

[1] Phytoextraction
[2] Phytoremediation
[3] Phytosidophores

(لاگیر و همکاران ۲۰۰۰)، با افزایش میزان انحلال فلزات سنگین توسط کمپلکس‌های فلزی با اسید هیومیک، میزان دسترسی گیاه و جذب آنها توسط ریشه افزایش می‌یابد. افزایش در میزان فلز قابل استخراج با DTPA را می‌توان به‌دلیل ایجاد کمپلکس‌های موقت فلز با اسید هیومیک و جلوگیری از تثبیت آنها به‌وسیله رس خاک و تبدیل به شکل‌های محلول دانست (اوانگلو و همکاران ۲۰۰۷). با توجه آلودگی‌های سربی معدنی در ایران، بررسی روش-های اصلاح و پاک‌سازی این آلاینده ضروری می‌باشد. بنابراین این پژوهش با هدف بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف اسیدهیومیک بر کارآیی پالایش سبز، آلودگی سربی خاک توسط گیاه طوق (*Xeanthium vetelus*) اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

خاک مورد مطالعه در این پژوهش از سری خاک اردوشاهی متعلق به رده Inceptisols در استان آذربایجان‌غربی نمونه‌برداری شد (قائمیان ۱۳۷۹). نمونه خاک مورد مطالعه پس از هوا خشک شدن به دو بخش تقسیم گردید. یک بخش برای انجام آزمایشات فیزیکی و شیمیایی از الک دو میلی‌متری عبور داده شد. سپس برخی ویژگی‌های فیزیک و شیمیایی خاک‌ها مانند بافت خاک به‌روش هیدرومتری (گی و بادر ۱۹۸٦)، pH خاک در عصاره گل اشباع توسط pH متر (تاندون ۱۹۹۸)، کربن آلی با روش والکی و بلک اصلاح شده (نلسون و سامرز ۱۹۹٦)، کربنات کلسیم معادل (CCE) به روش تیتراسیون (آلیسون و مودی ۱۹٦٥) و ظرفیت تبادلی کاتیونی (CEC) به‌روش استات سدیم نرمال (چپمن ۱۹٦٥) اندازه‌گیری شدند.

بخش دیگر خاک به‌منظور حفظ شرایط طبیعی خاک و افزایش میزان خاکدانه‌های مؤثر، به گلخانه پژوهشی گروه علوم‌خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، انتقال داده شدند و پس از عبور از الک ٥ میلی-متری با غلظت‌های مختلف سرب آلوده شدند. اعمال تیمارهای آلودگی سرب با توجه به حدود غلظت مجاز آن در خاک و بیشترین غلظت سرب مشاهده شده در لجن فاضلاب (۸٤۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) انتخاب گردید. به گونه‌ای که دامنه‌ای از غلظت صفر آن فلز تا چندین برابر غلظت مجاز را بپوشاند. بنابراین، غلظت‌های سرب صفر، ۲٥۰، ٥۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک انتخاب شد. برای آلوده کردن خاک، ابتدا مقدار لازم نیترات‌سرب $Pb(NO_3)_2$ برای آلوده کردن جرم مشخصی از خاک محاسبه شد. سپس، جرم محاسبه شده نمک به یک کیلوگرم از خاک افزوده شد و کاملاً با آن مخلوط گردید تا پیش‌ماده‌ای همگن به‌دست آید. نیتروژن افزوده شده به خاک توسط نمک نیترات سرب، با افزودن مقادیر محاسبه‌شده اوره به تیمارهای مختلف تصحیح شد. این پیش‌ماده‌ی آلوده سپس به‌طور کامل با توده خاک مخلوط گردید. سپس خاک‌های آلوده در جعبه‌های پلاستیکی بدون زهکش در معرض دوره‌های متناوب تر تا حد ظرفیت زراعی و خشک شدن قرار گرفتند. خاک‌ها در چهار چرخه به همین روش تر و خشک شدند که هر چرخه حدود ٤۰ روز به درازا انجامید که تا حدّ امکان برهم‌کنش‌های آلاینده و خاک تکوین یافته و شرایط آلودگی طبیعی‌تر باشد. سپس، خاک‌های آلوده با غلظت-های یاد شده در ۳ تکرار برای هر غلظت در گلدان‌هایی با ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر (عمق ریشه‌دوانی گیاه) ریخته شد. برای اعمال تیمارهای اسید هیومیک، ابتدا میزان اسید هیومیک (Sigma-Aldrich) برحسب وزن خاک گلدان در سه غلظت صفر ، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک محاسبه و همراه با آب آبیاری گیاهان استفاده شد. در این پژوهش از گیاه *Xeanthium vetelus* (طوق) از گیاهان مرتعی بومی استان آذربایجان‌غربی استفاده گردید.

پس از رساندن رطوبت گلدان‌ها به ظرفیت مزرعه و اعمال تیمارها در هر گلدان ٦ تا ۸ بذر با فواصل منظم در گلدان‌ها کشت گردید. پس از جوانه‌زدن بذرها، بوته-های سالم‌تر و قوی‌تر نگه‌داری شدند. در پایان ماه پنجم رشد، شاخساره گیاهان از سطح خاک بریده شدند،

ریشه‌های گیاهان نیز به آرامی از خاک گلدان‌ها جدا شدند. نمونه‌ها پس از خشک شدن آسیاب گردیدند. خاک نمونه‌برداری شده به آزمایشگاه منتقل و برای بررسی تأثیر آلودگی سربی خاک بر شاخص‌های جمعیت میکروبی خاک در یخچال نگه‌داری شد. برای اندازه‌گیری تنفس میکروبی از روش اندرسون (۱۹۸۲) استفاده شد. بدین‌ترتیب که ۱۰ گرم از خاک هر نمونه توزین کرده و به درون ظروف شیشه‌ای درب‌دار ویژه‌ی اندازه‌گیری تنفس ریخته شد. سپس لوله آزمایشی حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محلول NaOH ۰/۱ نرمال در درون ظروف قرار داده شد. درب ظرف‌ها به‌طور محکم بسته شد و نمونه‌ها به‌مدت ۳ روز در دمای ۲۵ درجه نگه‌داری شدند. تیتراسیون نمونه‌ها با HCl ۰/۱ نرمال پس از ۳ روز انجام شد. در پایان مقدار CO_2 آزاد شده با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد:

$$BR = \frac{(V_b - V_s) \times 2.2}{W_s} \qquad [۱]$$

که در آن BR تنفس میکروبی پایه ($mg\ CO_2\text{-}C\ g^{-1}\ day^{-1}$)، V_b حجم اسید کلریدریک مصرفی برای نمونه شاهد، V_b حجم اسید کلریدریک مصرفی برای هر نمونه، W_S وزن اولیه خاک (g) و ۲/۲ فاکتور تبدیل (یک میلی‌لیتر HCl ۰/۱ نرمال معادل ۲/۲ میلی‌گرم CO_2 می‌باشد) است.

اندازه‌گیری کربن زیست‌توده میکروبی (MBC) با روش تدخین- استخراج انجام گردید (جنکینسون و لاد ۱۹۸۱). بدین‌ترتیب ۱۰۰ گرم از هر نمونه خاک ریزوسفری با کلروفرم به‌مدت ۲٤ ساعت تدخین (گازدهی) شده و با محلول سولفات پتاسیم، استخراج شد. خاک تدخین شده (یک قسمت) با محلول سولفات پتاسیم (پنج قسمت) مخلوط شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه تکان داده شد و صاف شد. مقدار کربن آلی در عصاره‌ها به‌روش اکسایش تر اندازه‌گیری شد. این روش برای خاک شاهد (بدون تدخین) نیز انجام شد. برای اندازه-گیری کربن آلی در عصاره‌های خاک، ۵ میلی‌لیتر از عصاره‌های خاک را برداشته و ۱۰ میلی‌لیتر دی کرومات پتاسیم ۱ نرمال و ۲۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به آن‌ها افزوده شد. نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه به‌حال خود رها شدند. سپس ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰ میلی‌لیتر اسید اورتو فسفریک غلیظ به به هریک از نمونه‌ها افزوده شد. ۰/۳ میلی‌لیتر شناساگر دی فنیل آمین به هریک از نمونه‌ها اضافه شد و در پایان تیتراسیون با محلول فرو آمونیوم سولفات انجام شد. از اختلاف مقادیر محاسبه شده برای نمونه‌های تدخین شده و تدخین نشده مقدار کربن زیست‌توده میکروبی محاسبه شد:

$$MBC = F_C - uF_C \qquad [۲]$$

که در آن MBC کربن زیست‌توده میکروبی ($mg\ kg^{-1}$)، F_C کربن معدنی شده یا CO_2 متصاعد شده در نمونه‌های تدخین شده با کلروفرم ($mg\ kg^{-1}$) و uF_C کربن معدنی شده یا CO_2 متصاعد شده در نمونه‌های تدخین نشده با کلروفرم ($mg\ kg^{-1}$) است.

ضریب متابولیکی (qCO_2) میزان تنفس خاک (کربن تجزیه شده برای تولید انرژی) به ازای هر واحد کربن زیست‌توده میکروبی (کربن مصرف شده برای رشد و تشکیل سلول‌های جدید در واحد زمان) است. بنابراین برای ارزیابی تأثیر تنش آلودگی سربی خاک بر نیاز انرژی میکروب‌های خاک، ضریب متابولیکی با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (چنگ و همکاران ۱۹۹۳):

$$qCO_2 = \frac{BR}{MBC} \qquad [۳]$$

که درآن qCO_2 ضریب متابولیکی ($mg\ CO_2\text{-}C\ mg^{-1}\ MBC\ day^{-1}$)، BR تنفس میکروبی پایه ($mg\ CO_2\text{-}C\ g^{-1}\ day^{-1}$) و MBC کربن زیست‌توده میکروبی ($mg\ CO_2\text{-}C\ kg^{-1}$) است.

به‌منظور بررسی تأثیر آلودگی سربی خاک بر گیاهان و همچنین تاثیر اسید هیومیک در این زمینه،

محتوای نسبی آب برگ (RWC)[4] و میزان پرولین برگ‌ها اندازه‌گیری شدند. برای اندازه‌گیری RWC از آخرین برگ توسعه یافته گیاه نمونه‌برداری و توزین شد. سپس برگ-ها به‌مدت ٦ ساعت در آب مقطر و در شرایط تاریکی درون یخچال قرار داده شدند. پس از آن برگ‌ها از آب خارج و آب سطح برگ‌ها خشک شد و وزن برگ‌ها در حالت تورژسانس تعیین شد. در نهایت نمونه‌ها را در داخل آون در دمای ٦٥ درجه سلسیوس به‌مدت ٢٤ ساعت قرار داده شد تا خشک شوند. پس از خشک شدن نمونه‌ها وزن آن‌ها تعیین شد و با استفاده از رابطه زیر برای محاسبه مقدار RWC استفاده شد (یانو ملو و همکاران ۲۰۰۳):

$$RWC = \frac{FW - DW}{TW - DW} \times 100 \qquad [٤]$$

که در آن FW وزن تر برگ، DW وزن برگ پس از تورژسانس، TW وزن خشک برگ و RWC محتوای نسبی آب برگ بر حسب درصد می‌باشد.

برای اندازه‌گیری مقدار پرولین از روش باتس و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد. بر این اساس به ۰/۰٤ گرم پودر خشک برگ از هر نمونه، ۱۰ میلی‌لیتر از محلول سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد افزوده و با کاغذ صافی صاف شد. سپس یک میلی‌لیتر از محلول نمونه در لوله سانتریفوژ ریخته شد و به آن ابتدا یک میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و یک میلی‌لیتر اسید استیک خالص اضافه شد. لوله‌ها به‌مدت یک ساعت در حمام آبی (دمای ۱۰۰ درجه) قرار داده شدند تا رنگ آجری تثبیت شود. پس از آن بلافاصله لوله‌ها در یک بستر یخی قرار داده شدند (برای توقف واکنش‌ها). سپس به هریک از لوله‌ها ۲ میلی-لیتر تولوئن افزوده شد. بدین ترتیب دو فاز تشکیل شده که از فاز قرمز رویی نمونه‌برداری شده و میزان جذب در طول موج ٥٢٠ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار پرولین نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد پرولین برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد.

برای ارزیابی توانایی گیاهان و نیز تأثیر اسید هیومیک در پالایش سطوح مختلف آلودگی سربی در هر سطح آلودگی سربی خاک، فاکتور انباشت زیستی سرب در ریشه و شاخساره گیاهان تعیین شد:

$$BAF = \frac{C_p}{C_s} \qquad [٥]$$

که در آن BAF، فاکتور انباشت زیستی برای پالایش سطوح مختلف آلودگی سربی، C_P غلظت سرب در گیاه و C_S غلظت سرب در خاک است.

برای ارزیابی توانایی گیاهان و نیز تأثیر اسید هیومیک در انتقال سرب از ریشه به شاخساره گیاهان فاکتور انتقال گیاهی سرب تعیین شد:

$$TF = \frac{C_p^{shoot}}{C_p^{root}} \qquad [٦]$$

که در آن C_P^{Shoot} و C_P^{root} به‌ترتیب غلظت سرب در شاخساره و ریشه گیاه و TF فاکتور انتقال سرب از ریشه به شاخساره است.

برای عصاره‌گیری سرب زیست‌فراهم از خاک ، مقدار ۸ گرم خاک هواخشک توزین و در ظرف‌های شیشه‌ای درب‌دار ۱۲۰ میلی‌لیتری ریخته و به آن ۲۰ میلی‌لیتر محلول نیترات‌آمونیم ۱ نرمال افزوده شد. نمونه‌ها به مدت دو ساعت در تکان‌دهنده‌ای با دور ۳۰۰ دور در دقیقه تکان داده شدند (یور ۱۹۹٦). سپس، نمونه-ها با کاغذ صافی واتمن ٤٢ صاف گردیدند. پس از به هم زدن نمونه‌ها غلظت سرب با دستگاه جذب اتمی (Shimadzu 6300 AA) اندازه‌گیری شد. در این پژوهش از روش اکسیداسیونِ تر برای عصاره‌گیری سرب از گیاه استفاده شد. برای اکسیداسیونِ تر، آمیزه‌ی اسیدنیتریک، اسیدپرکلریک و اسیدسولفوریک با نسبت حجمی ٤٠، ٤

[4] Relative water capacity

و ۱ به کار رفت. استفاده از اسیدسولفوریک در این روش برای رقیق‌تر شدن اسیدپرکلریک در مرحله آخر هضم است تا از رخ دادن انفجار احتمالی دوری شود (بروکس ۱۹۹۹) و با دستگاه جذب اتمی (Shimadzu 6300 AA) اندازه‌گیری شد.

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی برای غلظت‌های مختلف اسید هیومیک و سرب در گیاه طوق اجرا گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به‌دست آمده از این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS انجام شد و مقایسه میانگین داده‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

الف) ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک

نتایج برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. با توجه به جدول ۱ خاک مورد مطالعه دارای بافتی متوسط، pH و ظرفیت تبادل کاتیونی بالا است که ویژگی‌های مذکور باعث کاهش انحلال و در نتیجه آبشویی فلزات سنگین در خاک می‌گردد (دماتوس و همکاران ۲۰۰۱). مقدار نسبتاً زیاد آهک نیز ظرفیت بافری زیادی به خاک داده است (پلسارد و همکاران ۲۰۰۰) و با توجه به حدود مجاز گزارش شده (کارینی ۱۹۹۵)، غیرآلوده به فلزات سنگین بود.

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

شن ($g\ kg^{-1}$)	سیلت ($g\ kg^{-1}$)	رس ($g\ kg^{-1}$)	کلاس بافتی خاک	مواد آلی ($g\ kg^{-1}$)	CEC ($cmol_c\ kg^{-1}$)
۳۲۳	٤۰۳	۲۷٤	لوم	۲٦/۹	۲۲/۱

EC_e ($dS\ m^{-1}$)	ESP (%)	CCE (%)	pH	سرب کل ($mg\ kg^{-1}$)	کادمیم کل ($mg\ kg^{-1}$)
۲/۵	۳	۳۰/۵	۸/۱	۲۱/٤۲	۱/٤۷

CEC: ظرفیت تبادل کاتیونی؛ EC_e : هدایت الکتریکی عصاره اشباع خاک؛ ESP: درصد سدیم تبادلی؛ CCE: کربنات کلسیم معادل.

ب) تأثیر اسید هومیک بر زیست‌فراهمی سرب در خاک

جدول ۲ نتایج مقایسه میانگین اثر سطوح سرب و اسید هیومیک را بر مقدار سرب زیست‌فراهم خاک تحت کشت گیاه طوق نشان می‌دهد. نتایج نشان داد در هر سطح از اسید هیومیک، با افزایش غلظت سرب کل در خاک، غلظت سرب زیست‌فراهم به‌طور معنی‌دار افزایش یافت. کمترین مقدار سرب زیست‌فراهم در غلظت صفر سرب (۱/۰۷ میلی گرم بر کیلوگرم) مشاهده گردید که درمقایسه با غلظت‌های دیگر سرب دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P\leq ۰/۰۵$). همچنین مشاهده گردید که در هر سطح سرب افزوده شده به خاک با افزایش میزان اسید هیومیک در خاک، مقدار سرب زیست‌فراهم خاک به‌طور معنی‌دار افزایش یافت (جدول ۲). اختلاف غلظت سرب زیست‌فراهم خاک بین تیمارهای $HA_{۱۰۰}$ و $HA_{۲۰۰}$ با تیمار شاهد (HA_0) نیز معنی‌داری بود ($P\leq ۰/۰۵$). کمترین مقدار سرب زیست‌فراهم خاک در غلظت صفر اسید هیومیک (به‌طور متوسط ٤/۲۷ میلی گرم بر کیلوگرم) و بیشترین مقدار آن در غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم اسیدهیومیک (به‌طور متوسط ۹/۰٦ میلی گرم بر کیلوگرم) به‌دست آمد.

افزایش میزان سرب زیست‌فراهم در خاک را می‌توان به‌دلیل نقش مهم اسید هیومیک در کی‌لیت کردن فلزات سنگین و افزایش انحلال آن در خاک نسبت داد (لاژیر ۲۰۰۰). با افزایش انحلال فلزات سنگین توسط کمپلکس‌های فلز-اسید هیومیک، میزان دسترسی گیاه به فلز و جذب فلز توسط ریشه افزایش می‌یابد. بلی لوک و همکاران (۱۹۹۷) در پژوهشی اثر غلظت ۵ میلی‌مولار EGTA، CDTA و DTPA را بر غلظت سرب محلول در

خاک بررسی کردند. نتایج آنان نشان داد که مقدار سرب محلول برای گیاه در حضور این کی‌لیت‌ها بیش از ۱۰۰ برابر افزایش یافت. بنابراین DTPA خود به عنوان یک کی‌لیت باعث افزایش زیست‌فراهمی سرب در خاک می‌گردد. در غلظت ۳ و ۵ میلی‌مولار غلظت سرب محلول در خاک به‌ترتیب ۲۳ و ٤۹٦ برابر افزایش نشان داد (اوانگلو و همکاران ۲۰۰۷). اوانگلو و همکاران (۲۰۰۷) در تحقیقات خود نشان دادند که افزایش مقدار فلز قابل استخراج با DTPA در اثر افزودن اسید هیومیک را می‌توان به‌دلیل ایجاد کمپلکس‌های موقت فلز با اسید هومیک و جلوگیری از تثبیت آنها به‌وسیله رس خاک و تبدیل به شکل‌های محلول دانست.

جدول ۲- غلظت سرب زیست‌فراهم در خاک تحت کشت گیاه طوق درسطوح مختلف سرب در خاک در تیمارهای شاهد، HA_{100} و HA_{200}.

کل سرب افزوده شده به خاک ($mg\ kg^{-1}$)	سرب زیست‌فراهم ($mg\ kg^{-1}$)		
	HA(0 $mg\ kg^{-1}$)	HA(100 $mg\ kg^{-1}$)	HA(200 $mg\ kg^{-1}$)
۰	۱/۰۷^{c,c}	۲/۰۰^{b,d}	۲/۱۱^{a,c}
۲۵۰	۳/۹٤^{c,b}	٦/۰۳^{b,c}	٦/۳۹^{a,b}
۵۰۰	۵/۹۷^{c,a}	۸/۸۳^{b,b}	۹/۹٤^{a,a}
۱۰۰۰	٦/۱۳^{c,a}	۹/۱۲^{b,a}	۹/۳۲^{a,a}

حروف بالانویس اول و دوم بر روی هر عدد به‌ترتیب نشان‌دهنده اختلاف آماری ($P\leq۰/۰۵$) در هر ردیف و هر ستون می‌باشند.
میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ($P\leq۰/۰۵$) ندارند.

حلیم و همکاران (۲۰۰۳) نیز گزارش کردند که با افزودن ۲۰ گرم اسید هومیک به هر کیلوگرم خاک، کادمیوم قابل عصاره‌گیری با DTPA تغییر نکرد، در حالی‌که افزودن اسید هومیک منجر به افزایش مقدار قابل عصاره‌گیری با DTPA روی و سرب در خاک گردید. به‌طورکلی اسیدهای آلی با وزن مولکولی کم با افزایش تحرک فلزات‌سنگین از جمله سرب، زیست‌فراهمی آن‌ها را برای گیاهان افزایش می‌دهند (وو و همکاران ۲۰۰٦).

ج) تأثیر آلودگی سربی بر فعالیت میکروب‌ها در خاک

شدت تنفس میکروبی (*BR*)

مقایسه میانگین اثر سطوح سرب و اسید هومیک بر تنفس میکروبی پایه خاک تحت کشت گیاه طوق (جدول ۳) نشان داد بین مقادیر تنفس میکروبی پایه در سطوح سرب و اسیدهیومیک اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($P\leq۰/۰۵$)، به‌گونه‌ای‌که با افزایش غلظت سرب در خاک تنفس میکروبی پایه کاهش یافت. کاهش شدت تنفس میکروبی پایه در تیمار .HA نسبت به تیمارهای HA_{100} و HA_{200}، بیشتر بود اما میان تیمار HA_{100} و HA_{200} اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. شدت تنفس میکروبی پایه در تیمارهای Pb_{50} و Pb_{100} با .Pb در تیمارهای HA_{100} و HA_{200} اختلاف معنی‌دار نشان دادند ($P\leq۰/۰۵$). به‌طورکلی با افزایش میزان اسید هومیک شدت تنفس میکروبی افزایش یافت. میزان افزایش *BR* در تیمارهای .Pb، Pb_{250}، Pb_{50} و Pb_{100} به‌ترتیب ۱/۲، ۱/۱٤، ۲/۱۹ و ۲/۳۷ برابر بود. این پدیده احتمالاً به دلیل خاصیت کمپلکس‌کنندگی اسید هومیک باشد. فلزات‌سنگین با ایجاد کمپلکس با سوبسترای مورد نیاز آنزیم‌ها و خارج نمودن سوبسترا از دسترس میکروارگانیسم‌ها و یا با ازبین بردن میکروارگانیسم‌ها سبب کاهش تنفس خاک می‌شوند (لندی و همکاران ۲۰۰۰). با افزایش غلظت سرب در خاک، رشد و زیست‌توده گیاهان کاهش یافته و به‌همین دلیل ترشحات ریشه‌ای آن‌ها نیز کاهش می‌یابد. بنابراین جمعیت باکتری‌های خاک کمتر می‌گردد (مایر و همکاران ۲۰۰۰). کاهش فراوانی باکتری‌ها در اثر آلودگی سربی خاک را می‌توان به تخریب DNA و RNA، مهار سنتز

پروتئین، جلوگیری از فرآیندهای آنزیمی و مهار تقسیم سلولی و فرآیندهای سلولی باکتری‌ها نسبت داد (مایر و همکاران، ۲۰۰۰). دولمن و هانسترا (۱۹۹۷)، گزارش کردند باکتری‌هایی که در شرایط آلودگی سربی باشند، پس از گذشت ۲سال، می‌توانند حتی در غلظت‌های بیش از ۱۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب در خاک بردبار باشند. انیانو و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند آلودگی سربی خاک، تنوع و فراوانی باکتری‌های خاک را به‌گونه‌ای چشم‌گیر کاهش می‌دهد.

جدول ۳- مقادیر تنفس میکروبی پایه در خاک تحت کشت گیاه طوق در سطوح مختلف سرب و تیمار شاهد و HA۱۰۰ و HA۲۰۰.

کل سرب افزوده شده به خاک ($mg\ kg^{-1}$)	تنفس میکروبی ($mg\ CO_2\text{-}C\ g^{-1}\ day^{-1}$)		
	HA(0 $mg\ kg^{-1}$)	HA(100 $mg\ kg^{-1}$)	HA(200 $mg\ kg^{-1}$)
۰	۰/٤^{b,a}	۰/٤۲^{ab,a}	۰/٤۸^{a,a}
۲۵۰	۰/۲۸^{a,ab}	۰/۳۰^{a,b}	۰/۳۲^{a,b}
۵۰۰	۰/۲۱^{b,b}	۰/۲٤^{ba,c}	۰/٤٦^{a,cb}
۱۰۰۰	۰/۰۸^{b,c}	۰/۱۲^{ab,d}	۰/۱۹^{a,c}

حروف بالانویس اول و دوم بر روی هر عدد به‌ترتیب نشان‌دهنده اختلاف آماری ($P\leq$۰/۰۵) در هر ردیف و هر ستون می‌باشند.
میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ($P\leq$۰/۰۵) ندارند.

سرب یکی از خطرسازترین فلزات‌سنگین است که عملکرد بیولوژیکی حیاتی ندارد و حتی در غلظت‌های کم برای میکروارگانیسم‌های خاک سمّی است (کامالودین و همکاران ۲۰۰۳). کاهش تنفس میکروبی توسط برخی پژوهشگران گزارش شده است. ورما و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند آلودگی سربی خاک، فعالیت میکروارگانیسم‌های خاک از جمله تنفس میکروبی خاک را کاهش می‌دهد. به‌طور مشابه گای و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند سمیت سرب در خاک سبب کاهش تنفس میکروبی خاک می‌شود. ناچوکیو و پالفورد (۲۰۱۱)، نیز نشان داد تنفس میکروبی خاک در خاک‌های آلوده به سرب، مس و روی کاهش می‌یابد.

مقدار کربن زیست‌توده میکروبی (*MBC*)

کربن زیست توده میکروبی بخشی از کربن آلی خاک است که در بدن و دیواره سلولی میکروارگانیسم‌های خاک به‌ویژه باکتری‌ها متمرکز است. جدول ٤ نتایج مقایسه میانگین اثر سطوح سرب و اسید هومیک را بر کربن زیست‌توده میکروبی (*MBC*) خاک تحت کشت گیاه طوق نشان می‌دهد. کربن زیست‌توده میکروبی با افزایش سطوح سرب در سطوح مختلف اسید هومیک بطور معنی‌داری کاهش یافت ($P\leq$۰/۰۵). اما بین سطوح ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم سرب اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. کاهش *MBC* در تیمار Pb۱۰۰۰ در مقایسه با Pb. در سطوح اسید هومیک HA.، HA۱۰۰ و HA۲۰۰ به‌ترتیب ٤۹، ۵۰ و ٤۸ درصد بود. در تمام غلظت‌های سرب، افزایش میزان اسید هومیک، کربن زیست‌توده میکروبی (*MBC*) را افزایش داد. میزان افزایش MBC در تیمارهای Pb.، Pb۲۵۰، Pb۵۰۰ و Pb۱۰۰۰ در تیمار HA۲۰۰ نسبت به HA. به‌ترتیب ۱۱، ۲۰، ۷ و ۱۳ درصد بود. کربن زیست‌توده میکروبی یکی از شاخص‌های میکروبی حساس به تنش فلزات‌سنگین است (وانگ و همکاران ۲۰۰۷). مقادیر این شاخص با افزایش غلظت سرب در خاک کاهش یافت (جدول ٤). این کاهش احتمالاً به این دلیل است که میکروارگانیسم‌های خاک در شرایط آلودگی سربی خاک به انرژی بیش‌تری برای بردباری به شرایط نامطلوب ایجاد شده دارند. به‌همین دلیل درصد بیش‌تری از انرژی

به‌صورت تنفس هدر می‌رود و کربن کم‌تری در ترکیبات آلی ساخته می‌شود، که سهم میکروب‌های فعال از زیست‌توده کل میکروبی با افزایش غلظت سرب در خاک کاهش یافته و به بیان ساده‌تر میکروارگانیسم‌های جوان خاک به‌دلیل حساسیت بیش‌تر و بردباری کم‌تر در غلظت‌های بالای سرب زودتر از بین می‌روند (پاپا و همکاران ۲۰۱۰).

جدول ۴- مقادیر کربن زیست‌توده میکروبی (*MBC*) در خاک تحت کشت گیاه طوق در سطوح مختلف سرب درخاک در تیمارهای شاهد ، $HA_{۱۰۰}$ و $HA_{۲۰۰}$.

کل سرب افزوده شده به خاک ($mg\ kg^{-1}$)	کربن زیست‌توده میکروبی ($mg\ CO_2\text{-}C\ kg^{-1}$)		
	HA(0 $mg\ kg^{-1}$)	HA(100 $mg\ kg^{-1}$)	HA(200 $mg\ kg^{-1}$)
۰	۳/۳۲^{c,a}	۳/۵۲^{b,a}	۳/۶۹^{a,a}
۲۵۰	۲/۴۴^{c,b}	۲/۶۰^{b,b}	۲/۹۵^{a,b}
۵۰۰	۱/۷۶^{c,c}	۱/۸۱^{b,c}	۱/۹۰^{a,c}
۱۰۰۰	۱/۶۸^{c,c}	۱/۷۴^{b,c}	۱/۹۰^{a,c}

حروف بالانویس اول و دوم بر روی هر عدد به‌ترتیب نشان‌دهنده اختلاف آماری ($P\leq۰/۰۵$) در هر ردیف و هر ستون می‌باشند.
میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ($P\leq۰/۰۵$) ندارند.

شاخص ضریب متابولیکی (qCO_2)

مقایسه میانگین اثر سطوح سرب و اسید هومیک بر ضریب متابولیکی (qCO_2) خاک نشان داد (جدول ۵) که شاخص ضریب متابولیکی با افزایش سطوح سرب کاهش یافت. افزودن اسید هومیک در خاک مقادیر ضریب متابولیکی (qCO_2) را تغییر داد هرچند این تغییرات از روند قابل قبولی تبعیت ننمود. خدایی (۱۳۹۲) نشان داد که علیرغم اینکه qCO_2 به‌عنوان یکی از شاخص‌های ارزیابی کیفیت خاک‌های آلوده مبتلا به تنش به‌حساب می‌آیند، لیکن نمی‌توان به‌طور قطع از این شاخص برای بیان تأثیر سوء تنش‌ها استفاده نمود. qCO_2 در خاک‌های آلوده و شرایط تنش افزایش می‌یابد، بعبارت دیگر میزان تنفس به‌ازاء واحد میکروارگانیسم‌های خاک افزایش می‌یابد و میکروب‌ها بیشتر کربن جذب شده را به‌صورت تنفس برای بقاء خود و نه برای افزایش بیوماس مصرف می‌نمایند.

اندرسون و دومچ (۱۹۹۳) شاخص ضریب متابولیکی (qCO_2) را برای مطالعه تأثیر تنش ناشی از آلودگی‌های مختلف بر نیاز انرژی میکروارگانیسم‌های خاک ارائه کردند. این شاخص در خاک‌های آلوده به فلزات‌سنگین تغییر می‌کند زیرا در این خاک‌ها فعالیت متابولیکی و بازده مصرف کربن توسط میکروب‌ها تغییر می‌کند (باث ۱۹۸۹). بدین ترتیب که میکروب‌های خاک در شرایط تنش به‌ازای هر واحد سوبسترای اضافه شده کربن کم‌تری را صرف تشکیل زیست‌توده جدید می‌کنند و اغلب آن را برای تامین انرژی لازم برای ادامه حیات در تنفس مصرف می‌کنند (لندی و همکاران ۲۰۰۰).

جدول ۵- مقادیر شاخص ضریب متابولیکی (qCO_2) در خاک تحت کشت گیاه طوق در سطوح مختلف سرب در خاک در تیمارهای شاهد ، $HA_{۱۰۰}$ و $HA_{۲۰۰}$.

کل سرب افزوده شده به خاک (mg kg^{-1})	qCO_2 (mg CO_2 -C mg^{-1} MBC day^{-1})		
	HA(0 mg kg^{-1})	HA(100 mg kg^{-1})	HA(200 mg kg^{-1})
۰	۰/۱۲^{b,a}	۰/۱۲^{b,b}	۰/۱۳^{a,b}
۲۵۰	۰/۱۱۵^{a,a}	۰/۱۱۷^{a,b}	۰/۱۰۸^{a,bc}
۵۰۰	۰/۱۲۲^{b,a}	۰/۱۳۵^{b,a}	۰/۲٤٥^{a,a}
۱۰۰۰	۰/۰۵۱^{b,a}	۰/۰۷٤^{b,c}	۰/۱۰۲^{a,c}

حروف بالانویس اول و دوم بر روی هر عدد به‌ترتیب نشان‌دهنده اختلاف آماری (P≤۰/۰۵) در هر ردیف و هر ستون می‌باشند.
میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری (P≤۰/۰۵) ندارند.

پرولین برگ

جدول ٦ نتایج مقایسه میانگین اثر سطوح سرب و اسید هومیک را بر مقادیر پرولین گیاه طوق نشان می‌دهد. مقادیر پرولین برگ گیاه طوق در با افزایش غلظت سرب در همه سطوح اسید هیومیک، افزایش یافت. مقدار پرولین برگ گیاه طوق در تیمار $Pb_{۱۰۰۰}$ در مقایسه با Pb. در سطوح اسید هومیک HA.، $HA_{۱۰۰}$ و $HA_{۲۰۰}$ به ترتیب ٦/۲۲، ٦/٦٥ و ۸/۷ برابر افزایش نشان داد. همچنین با افزودن اسید هومیک به خاک میزان پرولین برگ در هر سطح کاهش یافت اما این کاهش معنی‌دار نبود (P≤۰/۰۵). میزان پرولین گیاه طوق در تیمارهای Pb.، $Pb_{۲۵۰}$، $Pb_{۵۰۰}$ و $Pb_{۱۰۰۰}$ در سطح $HA_{۲۰۰}$ در مقایسه با HA. به ترتیب ٦۲، ۳۱، ۵۱ و ٤۷ درصد کاهش نشان داد. در شرایط تنش فلزات سنگین مقدار آمینواسیدهای گیاه به‌ویژه پرولین تغییر می‌کند (زانگ و همکاران ۲۰۱۰). پرولین در بهبود تنش‌های محیطی، از جمله تنش فلزات سنگین نقش مهمی را ایفا می‌کند. پرولین احتمالاً در سلول‌های تحت تنش نقش آنتی اکسیدانی دارد (زانگ و همکاران ۲۰۱۰). راه-کار بیشتر گیاهان در واکنش به تنش فلزات‌سنگین افزایش تولید پرولین می‌باشد که با پراکسیداسیون لیپیدها خطر گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش داده و موجب کاهش آسیب به غشا می‌گردد (اسچالر ۲۰۰۳). تحریک تولید پرولین از اسید گلوتامیک و افزایش مقدار آن در گیاه در خاک‌های آلوده به سرب توسط پژوهش‌گران مختلفی گزارش شده است (اندرادو همکاران، ۲۰۰۹ و زانگ و همکاران ۲۰۱۰). برای مثال اوایس (۱۹۹۷) افزایش مقدار پرولین را در چندین گیاه مرتعی در خاک‌های آلوده به سرب گزارش کرد.

جدول ۶- مقدار پرولین گیاه طوق در تیمارهای شاهد ، $HA_{۱۰۰}$ و $HA_{۲۰۰}$ در سطوح مختلف سرب در خاک.

کل سرب افزوده شده به خاک (mg kg^{-1})	پرولین (mg g^{-1}DW)		
	HA(0 mg kg^{-1})	HA(100 mg kg^{-1})	HA(200 mg kg^{-1})
۰	۰/٤٥^{a,c}	۰/۲٦^{ab,c}	۰/۱۷^{b,b}
۲۵۰	۱/۱۹^{a,ab}	۰/۹٤^{a,b}	۰/۸۲^{a,ab}
۵۰۰	۱/۸۵^{a,ab}	۱/۲٤^{a,b}	۰/۸۹^{a,ab}
۱۰۰۰	۲/۸۰^{a,a}	۱/۷۳^{a,a}	۱/٤۸^{a,b}

حروف بالانویس اول و دوم بر روی هر عدد به‌ترتیب نشان‌دهنده اختلاف آماری (P≤۰/۰۵) در هر ردیف و هر ستون می‌باشند.
میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری (P≤۰/۰۵) ندارند.

محتوای نسبی آب برگ (*RWC*)

جدول ۷ نتایج مقایسه میانگین اثر سطوح سرب و اسید هومیک را بر مقادیر محتوای نسبی آب برگ (*RWC*) خاک تحت کشت گیاه طوق نشان می‌دهد. با افزایش غلظت سرب مقدار محتوای نسبی آب برگ (*RWC*) در تمام سطوح اسید هومیک کاهش یافت اما این کاهش در سطح ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم سرب معنی‌دار نبود (P≤۰/۰۵). میزان این کاهش در گیاه طوق در سطوح اسید هومیک $HA_{۰}$، $HA_{۱۰۰}$ و $HA_{۲۰۰}$ به ترتیب ۲۸، ۲۹ و ۲۶ درصد بود. مقدار *RWC* در تیمارهای $Pb_{۵۰۰}$ و $Pb_{۱۰۰۰}$ با $Pb_{۰}$ در تمام سطوح اسید هومیک اختلاف معنی‌داری نشان داد (P≤۰/۰۵). با افزودن اسید هومیک مقادیر محتوای نسبی آب برگ (*RWC*) افزایش یافت. مقدار *RWC* گیاه طوق در تیمارهای $Pb_{۰}$، $Pb_{۲۵۰}$، $Pb_{۵۰۰}$ و $Pb_{۱۰۰۰}$ در سطح $HA_{۲۰۰}$ نسبت به $HA_{۰}$ به ترتیب ۹، ۱۵، ۱۶ و ۱۳ درصد افزایش یافت. سرب در گیاه می‌تواند با کاهش اندازه و تعداد سلول‌های نگهبان روزنه (برگمن ۲۰۰۴)، کاهش انتقال آب به برگ‌ها و کاهش سطح برگ، آسیب دیواره سلولی و در نتیجه اختلال در سرعت تعرق برگ و بروز تغییرات فراساختاری در اندامک‌های سلول‌های گیاه، *RWC* برگ را کاهش دهد (چنکی و همکاران ۲۰۱۰).

جدول ۷- محتوای نسبی آب برگ (*RWC*) گیاه طوق در تیمارهای شاهد، $HA_{۱۰۰}$ و $HA_{۲۰۰}$ در سطوح مختلف سرب در خاک.

کل سرب افزوده شده به خاک (mg kg^{-1})	*RWC* (%)		
	HA(0 mg kg^{-1})	HA(100 mg kg^{-1})	HA(200 mg kg^{-1})
۰	۴۷/۶۳^{a,a}	۵۰/۹^{a,a}	۵۲/۰۵^{a,a}
۲۵۰	۴۳/۰۰^{a,ab}	۴۸/۷۹^{a,a}	۴۹/۵۳^{a,ab}
۵۰۰	۳۴/۰۸^{a,b}	۳۶/۷۹^{a,b}	۳۹/۵۵^{a,b}
۱۰۰۰	۳۳/۸۲^{a,b}	۳۵/۸۹^{a,b}	۳۸/۲۵^{a,b}

حروف بالانویس اول و دوم بر روی هر عدد به‌ترتیب نشان‌دهنده اختلاف آماری (P≤۰/۰۵) در هر ردیف و هر ستون می‌باشند.
میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری (P≤۰/۰۵) ندارند.

غلظت سرب در شاخساره

نتایج مقایسه میانگین اثر سطوح سرب و اسید هومیک بر مقادیر غلظت سرب در شاخساره گیاه طوق در جدول ۸ نشان داده شده است. با افزایش غلظت سرب در خاک مقادیر سرب در شاخساره به‌طور معنی‌دار افزایش یافت (P≤۰/۰۵). با افزایش غلظت سرب از صفر به ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مقدار آن در شاخساره گیاه طوق در سطوح اسید هومیک $HA_{۰}$، $HA_{۱۰۰}$ و $HA_{۲۰۰}$ به‌ترتیب ۳۵/۱، ۹/۸۴ و ۵/۰۵ برابر افزایش نشان داد. همچنین با افزایش میزان اسید هومیک در تمام تیمارها مقادیر سرب در شاخساره گیاه افزایش یافت. میزان سرب در شاخساره گیاه طوق در تیمارهای $Pb_{۰}$، $Pb_{۲۵۰}$، $Pb_{۵۰۰}$ و $Pb_{۱۰۰۰}$ در سطح $HA_{۲۰۰}$ نسبت به $HA_{۰}$ به‌ترتیب ۸/۳۴، ۲/۳، ۱/۴ و ۱/۲ برابر بالاتر بود. غلظت سرب در شاخساره گیاه طوق در تیمارهای مختلف بدین‌ترتیب بود: ($HA_{۰} < HA_{۱۰۰} < HA_{۲۰۰}$). پالایش سبز مؤثر خاک‌های آلوده به فلزات سنگین به قابلیت فراهمی عناصر برای جذب توسط گیاه بستگی دارد.

از راه‌کارهای افزایش دسترسی گیاه به فلزات سنگین، استفاده از ترکیبات آلی کمپلکس کننده، از جمله اسید هیومیک است. اوانگلو و همکاران (۲۰۰۴) اعلام نمودند که افزودن اسید هیومیک افزایش قابل توجهی در جذب کادمیوم توسط تنباکو (تا ۶۵٪) نشان داد. استفاده از اسید هیومیک در خاک انتقال سرب از خاک به اندام هوایی را افزایش داده است، هر چند این افزایش در برخی موارد قابل توجه نبود، اسید هیومیک با دارا بودن گروه‌های عاملی مختلف در سطوح خود می‌تواند با فلزات سنگین ایجاد کی‌لیت نموده و آنها را به صورت‌های قابل دسترس برای گیاهان تبدیل نماید (اوانگلو و همکاران ۲۰۰۴).

جدول ۸- غلظت سرب شاخساره گیاه طوق در تیمارهای شاهد، HA_{100} و HA_{200} در سطوح مختلف سرب در خاک.

کل سرب افزوده شده به خاک ($mg\ kg^{-1}$)	غلظت سرب شاخساره ($mg\ kg^{-1}$)		
	HA(0 $mg\ kg^{-1}$)	HA(100 $mg\ kg^{-1}$)	HA(200 $mg\ kg^{-1}$)
۰	۰/۵۸^{b,d}	۲/۴۵^{b,d}	۴/۸۴^{a,d}
۲۵۰	۶/۹۲^{b,c}	۱۵/۷۴^{a,c}	۱۶/۰۲^{a,c}
۵۰۰	۱۴/۸۵^{c,b}	۱۹/۹۳^{b,b}	۲۰/۷۲^{a,b}
۱۰۰۰	۲۰/۳۶^{b,a}	۲۴/۱۲^{a,a}	۲۴/۴۹^{a,a}

حروف بالانویس اول و دوم بر روی هر عدد به‌ترتیب نشان‌دهنده اختلاف آماری ($P\leq۰/۰۵$) در هر ردیف و هر ستون می‌باشند.
میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ($P\leq۰/۰۵$) ندارند.

غلظت سرب در ریشه

با توجه به جدول ۹ مشاهده شد که با افزایش غلظت سرب در خاک، غلظت سرب در ریشه بطور معنی-دار افزایش یافت ($P\leq۰/۰۵$). گیاه طوق در سطوح اسید هومیک .HA، HA_{100} و HA_{200} به ترتیب ۱۲/۵۵، ۱۱/۴۱ و ۱۲/۰۲ برابر افزایش سرب در ریشه را نشان دادند. غلظت سرب ریشه در تیمارهای .Pb_{250}، Pb_{500} و Pb_{1000} با تیمار .Pb در تمام سطوح اسید هومیک اختلاف معنی‌داری داشتند ($P\leq۰/۰۵$). با افزایش میزان اسید هومیک در هر سطح سرب غلظت سرب در ریشه افزایش یافت. میزان سرب در ریشه گیاه طوق در تیمارهای .Pb، .Pb_{250}، Pb_{500} و Pb_{1000} در سطح HA_{200} نسبت به .HA به‌ترتیب ۲۹، ۳۳، ۴۲ و ۲۳ درصد افزایش نشان داد. غلظت سرب در ریشه گیاه طوق در سطوح مختلف اسیدهیومیک بدین‌ترتیب بود: .HA < HA_{100} < HA_{200}. وایدرایت و همکاران (۱۹۹۶) نیز بیان کردند که افزایش سرب و بر در خاک، غلظت سرب و بر در ساقه و ریشه را بیشتر می‌کند. مواد هومیکی باعث افزایش ویژگی‌های حاصلخیزی و فیزیکوشیمیایی خاک می گردند. این ترکیبات ممکن است رشد گیاه را در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین، بهبود ببخشند، حتی در مکان‌های که هم‌زمان به فلزات سنگین و هیدروکربن‌های نفتی آلوده می‌باشد. مواد هیومیکی گروه‌های عامل واکنشی و فعل و انفعالی گوناگونی از قبیل ترکیبات کربوکسیل و فنولی دارد (هیز و ملکوم ۲۰۰۱).

جدول ۹- غلظت سرب در ریشه گیاه طوق در تیمارهای شاهد، HA_{100} و HA_{200} در سطوح مختلف سرب در خاک.

کل سرب افزوده شده به خاک ($mg\ kg^{-1}$)	غلظت سرب در ریشه ($mg\ kg^{-1}$)		
	HA(0 $mg\ kg^{-1}$)	HA(100 $mg\ kg^{-1}$)	HA(200 $mg\ kg^{-1}$)
۰	۳/۴^{b,d}	۴/۲۷^{a,d}	۴/۴^{a,d}
۲۵۰	۲۵/۸۵^{b,c}	۳۳/۴۵^{a,c}	۳۴/۴^{a,c}
۵۰۰	۳۱/۰۹^{c,b}	۴۱/۰۳^{b,b}	۴۴/۲۱^{a,b}
۱۰۰۰	۴۲/۷^{c,a}	۴۸/۷۳^{b,a}	۵۲/۹۲^{a,a}

حروف بالانویس اول و دوم بر روی هر عدد به‌ترتیب نشان‌دهنده اختلاف آماری ($P\leq۰/۰۵$) در هر ردیف و هر ستون می‌باشند.
میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ($P\leq۰/۰۵$) ندارند.

فاکتور انباشت زیستی شاخساره (*BAF*)

جدول ۱۰ نتایج مقایسه میانگین اثر سطوح سرب و اسید هومیک را بر مقادیر فاکتور انباشت زیستی شاخساره گیاه طوق نشان می‌دهد. مقادیر فاکتور انباشت

زیستی شاخساره با افزایش غلظت سرب خاک در سطوح اسید هومیک HA.، $HA_{۱۰۰}$ و $HA_{۲۰۰}$ به ترتیب ۲۳، ۸۲ و ۹۰ درصد کاهش یافت. در شرایط بدون کاربرد اسید هومیک، با افزایش سرب خاک، تغییر معنی‌داری در *BAF* شاخساره طوق مشاهده نگردید (جدول ۱۰). مقادیر فاکتور انباشت زیستی شاخساره با افزایش سطوح اسید هومیک تقریباً روند افزایشی داشت. مقدار افزایش *BAF* شاخساره گیاه طوق در تیمارهای Pb.، $Pb_{۲۵۰}$ و $Pb_{۵۰۰}$ در سطح $HA_{۲۰۰}$ نسبت به HA. به ترتیب ۸/٤٦، ۲/٦ و ۱/۳ برابر بود. ترتیب مقادیر فاکتور انباشت زیستی شاخساره در سطوح اسید هومیک بدین ترتیب $HA_{۲۰۰} >$ HA. $< HA_{۱۰۰}$ بود. گیاه مناسب برای انباشتن فلزات باید فاکتور انباشت زیستی بیشتر از ۱ داشته باشد و این بدان معناست که غلظت فلز در گیاه بیشتر از غلظت فلز در خاک باشد (زاید و همکاران ۱۹۹۸). مطابق با نتایج مارچیول و همکاران (۲۰۰۷) و نیو و همکاران (۲۰۰۷)، میزان فاکتور انباشت زیستی برای سرب و کادمیوم در گیاهان آفتابگردان، کرچک، خردل و یونجه کمتر از ۱ می‌باشد که با نتایج تحقیق حاضر همسو می‌باشد. علت آن می‌تواند خصوصیات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی گیاهان، غلظت فلز و یا شرایط کشت باشند. به‌طور کلی افزودن اسید هومیک در تمامی سطوح سرب در خاک سبب افزایش فاکتور انباشت زیستی شاخساره نسبت به تیمار شاهد شد.

جدول۱۰- مقادیر فاکتور انباشت زیستی شاخساره (*BAF*) طوق در تیمارهای شاهد،HA۱۰۰ و HA۲۰۰ در سطوح مختلف سرب در خاک.

کل سرب افزوده شده به خاک($mg\ kg^{-1}$)	*BAF* شاخساره		
	HA(0 $mg\ kg^{-1}$)	HA(100 $mg\ kg^{-1}$)	HA(200 $mg\ kg^{-1}$)
۰	۰/۰۲٦^{b,a}	۰/۱۱۳^{b,a}	۰/۲۲^{a,a}
۲۵۰	۰/۰۲۳^{b,a}	۰/۰٦^{a,ab}	۰/۰٦^{a,b}
۵۰۰	۰/۰۳^{b,a}	۰/۰٤^{a,b}	۰/۰٤^{a,cb}
۱۰۰۰	۰/۰۲^{a,a}	۰/۰۲^{a,b}	۰/۰۲^{a,c}

حروف بالانویس اول و دوم بر روی هر عدد به‌ترتیب نشان‌دهنده اختلاف آماری ($P\leq$۰/۰۵) در هر ردیف و هر ستون می‌باشند.
میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ($P\leq$۰/۰۵) ندارند.

فاکتور انباشت زیستی ریشه (*BAF*)

جدول۱۱ نتایج مقایسه میانگین اثر سطوح سرب و اسید هومیک را بر مقادیر فاکتور انباشت زیستی ریشه گیاه طوق نشان می‌دهد. در گیاه طوق با افزایش غلظت سرب در خاک مقادیر فاکتور انباشت زیستی ریشه به‌طور معنی‌دار در سطوح مختلف اسید هومیک HA.، $HA_{۱۰۰}$ و $HA_{۲۰۰}$ به ترتیب ۷۳، ۷۵/۰ و ۷۵/۷ کاهش نشان داد. با افزودن اسید هومیک مقادیر فاکتور انباشت زیستی ریشه بالا رفت اما این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. در کل مقادیر فاکتور انباشت زیستی ریشه گیاه در سطوح اسید هومیک بدین‌ترتیب: $HA_{۱۰۰} < HA_{۲۰۰}$ $>$ HA. بود.

جدول ۱۱- فاکتور انباشت زیستی (*BAF*) ریشه گیاه طوق در تیمارهای شاهد، HA_{100} و HA_{200} در سطوح مختلف سرب در خاک.

کل سرب افزوده شده به خاک($mg\ kg^{-1}$)	*BAF* ریشه		
	HA(0 $mg\ kg^{-1}$)	HA(100 $mg\ kg^{-1}$)	HA(200 $mg\ kg^{-1}$)
۰	۰/۱۵^{b,a}	۰/۲^{a,a}	۰/۲۰۶^{a,a}
۲۵۰	۰/۰۹^{b,b}	۰/۱۲^{a,b}	۰/۱۳^{a,b}
۵۰۰	۰/۰۶^{a,c}	۰/۰۸^{a,c}	۰/۰۸۶^{a,c}
۱۰۰۰	۰/۰۴^{a,d}	۰/۰۵^{a,d}	۰/۰۵^{a,d}

حروف بالانویس اول و دوم بر روی هر عدد به‌ترتیب نشان‌دهنده اختلاف آماری ($P\leq۰/۰۵$) در هر ردیف و هر ستون می‌باشند.
میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ($P\leq۰/۰۵$) ندارند.

فاکتور انتقال گیاهی (*TF*)

جدول۱۲ نتایج مقایسه میانگین اثر سطوح سرب و اسید هومیک را بر مقادیر فاکتور انتقال گیاهی (*TF*) از ریشه به شاخساره گیاه طوق نشان می‌دهد. با افزایش غلظت سرب در خاک مقدار فاکتور انتقال گیاهی (*TF*) روند منظمی نداشت. در گیاه طوق تیمارهای Pb_{500} و Pb_{1000} با Pb. در سطوح اسید هومیک HA. و HA_{200} اختلاف معنی‌داری داشتند ($P\leq۰/۰۵$). تاثیر افزودن اسید هومیک به خاک نیز روند منظمی نشان نداد. فاکتور انتقال گیاهی در تیمار Pb. تیمار HA_{200} در مقایسه با HA. اختلاف معنی‌داری نشان دادند ($P\leq۰/۰۵$). فاکتور انتقال گیاهی (*TF*) یک شاخص ساده برای ارزیابی کمی انتقال عناصر از خاک به گیاه می‌باشد و عبارتست از نسبت غلظت عنصر فلزی در اندام هوایی گیاه به غلظت همان عنصر در ریشه می‌باشد (آلووی ۱۹۹۵). فاکتور انتقال گیاهی (*TF*) بیشتر از ۱ در حقیقت بیان‌کننده انتقال آسان فلز از ریشه به اندام هوایی و در نتیجه انباشتگی زیاد فلزات سنگین در اندام هوایی گیاه بوده و یکی از فاکتورهایی مؤثر برای شناسایی گیاهان مناسب در استخراج گیاهی می‌باشد و فاکتور انتقال کمتر ار ۱ نشانه غیرانباشت‌گر بودن آن گیاه است (مک گراث و همکاران ۲۰۰۱).

جدول ۱۲- فاکتور انتقال گیاهی (*TF*) گیاه طوق در تیمارهای شاهد، HA_{100} و HA_{200} در سطوح مختلف سرب در خاک.

کل سرب افزوده شده به خاک($mg\ kg^{-1}$)	فاکتور انتقال گیاهی (*TF*)		
	HA(0 $mg\ kg^{-1}$)	HA(100 $mg\ kg^{-1}$)	HA(200 $mg\ kg^{-1}$)
۰	۰/۱۷^{b,b}	۰/۵۷^{b,a}	۱/۰۹^{a,a}
۲۵۰	۰/۲۷^{b,b}	۰/۴۷^{a,a}	۰/۴۵^{a,b}
۵۰۰	۰/۴۷۶^{a,a}	۰/۴۸۳^{a,a}	۰/۴۷^{a,b}
۱۰۰۰	۰/۴۷۳^{a,a}	۰/۴۹۶^{a,a}	۰/۴۶^{a,b}

حروف بالانویس اول و دوم بر روی هر عدد به‌ترتیب نشان‌دهنده اختلاف آماری ($P\leq۰/۰۵$) در هر ردیف و هر ستون می‌باشند.
میانگین‌های دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ($P\leq۰/۰۵$) ندارند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج کلی این پژوهش نشان داد که افزایش شدت آلودگی سربی خاک، شدت تنفس میکروبی و کربن زیست‌توده میکروبی، محتوای نسبی آب بافت گیاهی (*RWC*)، فاکتور انباشت زیستی (*BAF*) شاخساره، فاکتور انباشت زیستی ریشه را کاهش داد و باعث افزایش مقدار

شاخص ضریب متابولیکی (qco_2)، پرولین، سرب زیست-فراهم در خاک، غلظت سرب در شاخساره و غلظت سرب در ریشه گیاه طوق گردید. کاربرد اسید هومیک باعث افزایش شدت تنفس میکروبی، کربن زیست‌توده میکروبی، زیست‌توده خشک ریشه و شاخساره، محتوای نسبی آب بافت گیاهی (RWC)، فاکتور انباشت زیستی شاخساره، فاکتور انباشت زیستی ریشه، سرب زیست-فراهم در خاک، غلظت سرب در شاخساره و غلظت سرب در ریشه گردید. اسید هومیک با کمپلکس نمودن زیست-فراهمی آن را افزایش می‌دهد و موجب بالا رفتن جذب و اندوزش سرب در ریشه و شاخساره گیاه شده است. اما علیرغم تأثیر مثبت اسید هیومیک در افزایش جذب سرب توسط گیاه طوق، این گیاه نمی‌تواند برای پالایش سبز سرب مناسب باشد. زیرا این گیاه نتوانسته است بیش از ۱۰۰۰ میلی گرم سرب در کیلوگرم ماده خشک اندام هوایی اندوزش نماید.

منابع مورد استفاده

صاحبقدم لطفی ع، ۱۳٦۷. متابولیسم سرب و مسمومیتهای ناشی از آن. انتشارات دانشگاه تربیت مدرس .تهران .ایران.

قائمیان ن، ۱۳۷۹. بازنگری و بهنگام کردن مطالعات خاکشناسی نیمه‌تفصیلی جنوب ارومیه و بررسی پیشروی آب دریاچه ارومیه. سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. مرکز تحقیقات کشاورزی آذربایجان‌غربی.

خدایی پ، ۱۳۹۲. تأثیر کمپوست حاصل از فعالیت قارچ‌های تجزیه‌کننده و کرمهای خاکی بر برخی شاخص‌های میکروبی در یک خاک آلوده به سرب. پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه.

Allison LE and Moodie CD, 1965. Carbonates. Pp. 1379-1396. In: Black CA (eds). Methods of Soil Analysis. Pares, ASA: Madison, WI.

Alloway BJ, 1995. Heavy metals in soils, 2nd edition. Blackie Academic and professional, London, England.

Anderson TH and Domsch KH, 1993. The metabolic quotient for CO_2 /qCO_2 as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. Soil Biology and Biochemistry 25: 393-395.

Andrade SAL, Gratao PL, Schiavinato MA, Silveira APD, Azevedo RA and Mazzafera P, 2009. Zn uptake, physiological response and stress attenuation in mycorrhizal jack bean growing in soil with increasing Zn concentrations. Chemosphere 75: 1363-1370.

Anyanwu CU and Nwachukwu ON, 2011. Heavy Metal Resistance in Bacteria Isolated from Contaminated and Uncontaminated Soils. International Journal of Research in Chemistry and Environment 1:173-178.

Anderson JPE, 1982. Soil respiration. Pp. 831-871. In: Page AL, Miller RH and Keeney DR (eds). Methods of Soil Analysis. Part 2, Chemical and Micro Biological Properties, American Society of Agronomy, Madison, WI.

Baath E, 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations. Water, Air and Soil Pollution 47: 335-379.

Bates lS, Waldern RP and Teare ID, 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.

Bergmann DC, 2004. Integrating signals in stomatal development. Current Opinion in Plant Biology 7: 26–32.

Blaylock MJ, Salt DE, Dushenkov S, Zakharova O, Gussman C, Kapulink Y, Ensley BD and Raskin I, 1997. Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil applied chelating agents. Environmental Science and Technology 31: 860-865.

Brooks RR, 1999. Phytochemistry of hyperaccumulators. In: Plants that hyperaccumulate heavy metals. University Press, Cambridge 261-289.

Cariny T, 1995. The reuse of contaminated land. John Wiley and Sons Ltd. Publisher. 219p.

Cenkci S, Cioerci IH, Yildiz M, Oezay C, Bozdao A and Terzi H, 2010. Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa* L. Environmental and Experimental Botany 67: 467-473.

Chapman HD, 1965. Cation Exchange Capability. In lack CA *et al*. (eds). Methods of Soil Analysis. Soil Science Society of America Journal 891- 901.Cheng W, Coleman DC, Carroll CR and Hoffman CA, 1993. In situ measurements of root respiration and soluble carbon concentrations in the rhizosphere. Soil Biology and Biochemistry 25: 1189-1196.

Cheng W, Coleman DC, Carroll CR and Hoffman CA, 1993. In situ measurements of root respiration and soluble carbon concentrations in the rhizosphere. Soil Biology and Biochemistry 25: 1189-1196.

De Matos A T, Fontes MPF, da Costa L M and Martinez M A, 2001. Mobility of heavy metals as related to soil chemical and mineralogical characteristics of Brazilian soils. Environmental Pollution 111:429-435.

Doelman P and Haanstra L, 1997. Effects of lead on the soil bacterial microflora. Soil Biology and Biochemistry 11: 487-91.

Ewaise EA, 1997. Effects of cadmium, nickel and lead on growth, chlorophyll content and proteins of weed. Biologica Plantarum 39: 403-410.

Evangelou MWH, Daghan H and Schaeffer A, 2004. The influence of humic acids on the phytoextraction of cadmium from soil. Chemosphere 57:207-213.

Evangelou M, Ebel M and Schaeffer A, 2007. Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity and fate of chelating agents. Chemosphere 68:989-1003.

Fargasova A, 1994. Effect of Pb, Cd, Hg, As and Cr on germination and root growth of *Sinpas alba* seeds. Bulletion of Environmental contamination and toxicology 52: 452-456.

Gai N, Yang Y, Li T, Yao J, Wang F and Chen H, 2011. Effect of Lead Contamination on Soil Microbial Activity. Measured by Microcalorimetry. Chinese Journal of Chemistry 29: 1541-1547.

Gawronski SW and Gawronska H, 2007. Plant taxonomy for phytoremediation. Pp. 79-88. In: Marmiroli N et al. (eds). Advanced Science and Technology for Biological Decontamination of Sites Affected by Chemical and Radiological Nuclear Agents. Springer.

Ge GH and Bauder JW, 1986. Particle size analysis. Pp. 383-411. In: Klute A (eds). Methods of Soil Analysis. Physical Properties. Soil Science Society of America, Madison, WI.

Gisbert C, Ros R, Haro A, Walker DJ, Bernal MP, Serrano R and Navarro-Avino J, 2003. A plant genetically modified accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. Biochemical and Biophysical Research Communications 303: 440-445.

Halim M, Conte P and Piccolo A, 2003.Potential availability of heavy metals to phytoextraction from contaminated soils by exogenous humic substances. Chemosphere 52: 265-275.

Hayes MHB and Malcolm RL, 2001. Consideration of compositions and aspects of structures of humic substances. Pp. 33-39. In: Humic substances and chemical contaminants, Clapp CE, Hayes MHB, Sensi N, Bloom BR, and Jardine PM (eds). Proceedings Workshop and Symposium International. Humic Substances Soil Science Society of America and American Society Agronomy, Anaheim CA, 1997. October 26-27. Soil Science Society of America. Inc., Madison, WI.

Hofrichter M and Steinbuchel A, 2001. Biopolymers. Lignin, humic substances and coal, Vol. 1, Wiley Europe-VCH,Weinheim, New York.

Jenkinson DS and Ladd JN, 1981. Microbial biomass in soil measurement and turnover. Pp: 415-471. In: Paul EA and Ladd JN (eds). Soil Biochemistry, Marcel Dekker, Inc., NY.

Kamaludeen SPB, Megharaj M, Naidu R, Singleton I, Juhasz A, Hawke BG and Sethunathan N, 2003. Microbial activity and phospholipids fatty acid pattern in long-term tannery waste contaminated soils. Ecotoxicology and Environmental Safety 56: 302–310.

Lagier T, Feuillade G and Matejka G, 2000. Interactions between copper and organic macromolecules: determination of conditional complexation constants. Agronomie 20:537-546.

Landi L, Renella G, Moreno JL, Falchini L and Nannipieri P, 2000. Influence of cadmium on the metabolic quotient, l-D-glutamic acid respiration ratio and enzyme activity: microbial biomass ratio under laboratory conditions. Biology and Fertility of Soils 32: 8-16.

Maier RM, Papper LL and Gebra CP, 2000. Environmental Microbiology. Academic Press, Chapter 17: 403-423.

Marchiol L, Fellet G, Perosa D and Zerbi G, 2007. Removal of trace metals by Sorghum bicolor and Helianthus annuus in a site polluted by industrial wastes: a field experience. Plant physiology and biochemistry 45(5): 379-387.

Merian E, 1991. Metals and their compounds in the environment. VHC. Inc. New York.

McGrath SP, Zhao FJ and Lombi E, 2001. Plant and rhizosphere processes involved in phytoremedition of metal-contaminated soils. Advances in Agronomy 75: 1-56.

Nelson DW and Sommers LE, 1996. Total carbon, organic carbon, and organic matter. Pp. 961-1010In: Methods of Soil Analysis, Part 2, Page AL *et al.* (eds). American Society of Agronomy, Inc. Madison, WI.

Niu Z, Sun T, Li Y and Wang H, 2007. Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by Sunflower, Ricinus, Alfalfa and Mustard in hydroponic culture. Environmental Sciences 19: 961-967.

Nwachukwu OI and Pulford ID, 2011. Microbial respiration as an indication of metal toxicity in contaminated organic materials and soil. Hazardous Materials 185: 1140–1147.

Papa S, Bartoli, Pellegrino G and Fioretto AA, 2010. Microbial activities and trace element contents in an urban. Soil and Environment 165:193–203.

Plassard F, Winiarski T and Petit-Ramel M, 2000. Retention and distribution of three heavy metals in a carbonated soil: Comparison between batch and unsaturated column studies. Journal of Contaminant Hydrology 42: 99-111.

Rashid MA, 1985. Geochemistry of marine humic compounds. Springer-Verlag, New York, pp.300.

Schaller H, 2003. The role of sterolsin plant growth and development.Progrss in Lipid Res. Planta 42: 63-175.

Shen ZG, Li XD, Wang CC, Chen H M and Chua H. 2002. Lead phytoextraction from contaminated soils with high-biomass plant species. Journal of Environmental Quality 31:1893-1900.

Spark KM, Wells JD and Johnson BB, 1997. The interaction of a humic acid with heavy metals. Australian Journal of Soil Research 35:80-101

Stevenson FJ, 1992. Humus chemistry. Genesis, composition and reactions, 2nd, wiley, New York.

Tandon HLS, 1998. Method of analysis of soil, Plant, Waters and Fertilizer Development and Consultation Organization. New Delhi, India. pp. 144.

Ure AM, 1996. Single extraction schemes for soil analysis and related applications. Science of the Total Environment 178: 3–10.

Valdrighi MM, Pera A, Agnolucci M, Frassinetti S, Lunardi D and Vallini G, 1996. Effects of compostderived humic acids on vegetable biomass production and microbial growth within a plant (*Cichorium intybus*) - Soil system: A comparative study. Journal of Agriculture. Ecosystems and Environment 58:133-144.

Verma RK, Yadav DV, Singh CP, Suman A and Gaur A, 2010. Effect of heavy metals on soil respiration during decomposition of sugarcane *(Saccharum officinarum* L.*)* trash in different soils. Plant, Soil and Environment 56: 76–81.

Wang HH, Shan XQ, Wen B, Owens G, Fang J and Zhang SZ, 2007. Effect of indole-3-acetic acid on lead accumulation in maize (*Zea mays L.*) seedlings and the relevant antioxidant response. Journal of Experimental Botany 61: 246-253.

Wu SC, Luo YM, Cheung KC and Wong MH, 2006. Influence of bacteria on Pb and Zn speciation, mobility and bioavailability in soil: a laboratory study. Environmental Pollution 144:765–773.

Yano-melo AM, Sanggin OJ and Maia LC, 2003. Tolerance of mycorrhized banana to saline stress. Agriculture, Ecosystems and Environment 95: 343-348.

Zayed A, Gowthaman S and Terry N, 1998. Phytoaccumulation of toxic trace elements by wetland plants: I. Duckweed (*Lemna minor* L.). Environment Quality 27: 715-721.

Zhang HH, Tang M and Zheng C, 2010. Effect of inoculation with AM fungi on lead uptake, translocation and stress alleviation of *Zea mays L.* seedlings planting in soil with increasing lead concentrations. European Journal of Soil Biology 46: 306-311.