

کاهش خطر آبشویی فلز-کلات به آب‌های زیرزمینی در خاک‌های آلوده به سرب با استفاده از *Festuca ovina* L.

مهدیه ابراهیمی^{۱*}، محمد جعفری^۲ و عین‌الله روحی مقدم^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۱۸)

چکیده

مطالعه حاضر جهت افزایش کارایی گیاه استخراجی گونه *Festuca ovina* L. در خاک‌های آلوده به سرب با استفاده از EDTA (غلظت صفر، ۱/۵، ۳، ۱/۵+۱/۵، ۳+۳ و ۶ میلی‌مول در کیلوگرم)، تعیین بهترین زمان برداشت گیاه به منظور افزایش جذب سرب و شیوه کاربرد EDTA جهت کاهش خطر آبشویی سرب انجام شد. نتایج نشان داد که در تیمار ۳ میلی‌مول حداکثر میزان برداشت سرب صورت گرفت. بنابراین در مرحله دوم، تیمار ۳ میلی‌مول در کیلوگرم جهت ارزیابی بهترین زمان برداشت گیاه در دوره‌های زمانی ۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز استفاده شد. نتایج نشان داد که با گذشت زمان، غلظت سرب در بافت‌های گیاهی افزایش داشت و بهترین زمان جهت حداکثر جذب سرب ۶۰ روز پس از اولین برداشت است. در گام سوم جهت کاهش آبشویی سرب-کلات، غلظت ۳ میلی‌مول در کیلوگرم EDTA در پنج روش یکبار، دوبار، سه‌بار، چهار بار و پنج بار متوالی به خاک اضافه شد. نتایج نشان داد در روش پنج‌بار، میزان سرب خاک حداقل و در اندام‌های گیاهی حداکثر بود و بین غلظت فلز در اندام‌های گیاهی بین روش سه‌بار، چهاربار و پنج بار تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P < 0.05$). به‌طور کلی، حد بهینه گیاه استخراجی *F. ovina* L. و کاهش آبشویی سرب در غلظت ۳ میلی‌مول در کیلوگرم EDTA، در کاربرد به روش پنج‌بار و برداشت گیاه در انتهای رشد به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی: *Festuca ovina* L.، خطر آبشویی، سرب، آلودگی محیط زیست، EDTA

۱. گروه مرتع و آب‌خیزداری، دانشکده آب و خاک، دانشگاه زابل

۲. گروه احیا، مناطق خشک و کوهستانی، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: maebrahimi2007@uoz.ac.ir

مقدمه

تجمع درازمدت فلزات سنگین در خاک منجر به سمیت گیاهان شده که به تبع آن ورود این دسته از آلاینده‌ها به زنجیره غذایی و آب‌های زیرزمینی مشکلاتی را برای سلامت انسان‌ها ایجاد کرده است (۲۲). در این خصوص گیاه استخراجی (Phytoextraction) یکی از روش‌های دوست‌دار محیط زیست است که از گیاهان بیش‌اندوز (Hyperaccumulator) برای حذف آلاینده‌های فلزی از خاک‌های آلوده استفاده می‌کند (۱۸). در چند سال اخیر عمده مطالعات انجام شده در این زمینه بر روی کاربرد گیاهان با قدرت جذب بالای آلاینده‌ها متمرکز شده است. به‌طور مثال پارسادوست و همکاران (۲) طی بررسی که در منطقه ایران‌کوه اصفهان داشتند سه گونه *Acantholimon sp*، *Ebenus estellata* و *Astragalus glaucantus* را به‌عنوان بیش‌اندوزهای سرب معرفی کردند. در این مطالعه با توجه به زیست‌توده مناسب و بالا، شرایط سازگاری مناسب سه گونه مذکور برای پالایش خاک‌های آلوده به سرب در این منطقه و مناطق مشابه پیشنهاد شد. متشعزاده و همکاران (۳) در تحقیق خود به‌منظور شناسایی گیاهان بومی و باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین در اراضی اطراف معدن سرب و روی عمارت شازند اراک به‌منظور استفاده در گیاه‌پالایی گزارش کردند که در بین گیاهان شناسایی شده منطقه، میزان فلزات سنگین سرب، روی و کادمیوم در اندام هوایی گیاه بومادران به‌ترتیب با میانگین ۱/۱۱۰، ۶/۳۸۷ و ۳ میلی‌گرم در کیلوگرم بیشترین میزان بود و گندم آبی کشت شده بیشترین میزان نیکل را در ریشه نسبت به سایر گیاهان داشت. این محققان گزارش کردند که گیاه بومادران برای استفاده در گیاه‌پالایی به روش گیاه جذبی گزینه مناسبی است، ضمن آن‌که گندم با جلوگیری از انتقال نیکل از ریشه به اندام هوایی در تثبیت آن مؤثرتر است. اما اغلب گیاهان بیش‌اندوز دارای زیست‌توده کم و سرعت رشد پایین بوده و قابلیت پالایش نوع خاصی از آلاینده‌ها را دارا هستند، همچنین قابلیت دسترسی و انتقال کم فلزات از ریشه به اندام‌های هوایی فاکتور محدودکننده در این زمینه می‌باشد. گونه

Festuca ovina L. یکی از گیاهان بیش‌اندوز سرب می‌باشد که قابلیت تجمع مقادیر بالایی از سرب را در اندام‌های هوایی خود در حضور EDTA (Ethyleneiaminetetraacetic acid) دارد (۳۸ و ۳۷). این گیاه دارای سرعت رشد کافی و ظرفیت تولیدمثل بالا بوده که قادر به برداشت مقادیر زیادی از سرب موجود در خاک می‌باشد، اما نکته مهم در استفاده از EDTA انتخاب غلظت مناسب این ماده است، زیرا در غلظت‌های بالا، خطر آبشویی کمپلکس فلز-کلات (Metal-Chelating) به آب‌های زیرزمینی وجود دارد (۴۳).

همچنین باید به این مسئله توجه داشت که EDTA هرچند تأثیر بارزی در انحلال فلزات در خاک و افزایش قابلیت دسترسی آنها در مقایسه با سایر مواد به‌ساز در خاک دارد، ولی این ماده در مقایسه با دیگر مواد به‌ساز در خاک ماندگاری بیشتری دارد که در خاک‌های با مقادیر بالای فلزات سمی در غلظت‌های بالا EDTA این ماندگاری بیشتر است (۲۹) و ماندگاری بالای این ماده در خاک کاربرد آن را برای گیاه پالایی محدود می‌سازد، بنابراین هر چند فراهمی فلزات در خاک با افزودن EDTA افزایش می‌یابد، اما کاربرد آن در غلظت‌های بالا منجر به مخاطرات زیست‌محیطی و افزایش خطر آلودگی آب‌های زیرزمینی می‌شود (۳۵). در این زمینه گرسمن و همکاران (۲۱) گزارش کردند که ۳۸ درصد سرب بعد از انحلال EDTA در غلظت ۱۰ میلی‌مول در کیلوگرم به عمق‌های پایین خاک آبشویی می‌شود.

لومبی و همکاران (۳۳) اظهار داشتند که هرچند این ماده همواره برای گیاهان سمی نمی‌باشند، اما به‌دلیل پایداری کمپلکس فلز-کلات در خاک و خطر آبشویی آن به آب‌های زیرزمینی می‌تواند منجر به بروز مشکلات زیست‌محیطی شود، به‌طوری‌که کاربرد ۲/۷ میلی‌مول در کیلوگرم EDTA باعث افزایش غلظت فلزات در محلول خاک شده، ولی چندین هفته این ماده در محلول خاک باقی ماند.

همچنین ال‌کوترا و همکاران (۵) گزارش کردند که بعد از ۵ ماه از کاربرد EDTA، کمپلکس کلات-فلز در خاک به صورت

جدول ۱. برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده

سرب میلی گرم در کیلوگرم	اسیدیته	قابلیت هدایت الکتریکی دسی‌زیمنس بر متر	پتاسیم درصد	فسفر درصد	نیترژن درصد	CEC میلی‌اکی‌والان در ۱۰۰ گرم خاک	بافت خاک
۰/۰۲	۸/۰۰	۳/۴۳	۰/۳۷	۰/۵۱	۰/۱۵	۳۹/۰۰	شنی لومی

گلخانه (دانشگاه زابل) انجام شد که به منظور آلوده کردن خاک به سرب از نمک $Pb(NO_3)_2$ به میزان 650 میلی‌گرم در کیلوگرم استفاده گردید (۱ و ۱۳) و نمونه‌ها به مدت دو هفته در شرایط گلخانه جهت آلودگی یکنواخت خاک نگهداری شدند (۱۱ و ۳۰).

کشت بذور *F. Ovina L.* (علف گوسفندی) (۱۵ عدد) در هر گلدان (۵ کیلوگرم خاک، به ابعاد $15 \times 10 \times 60$ سانتی‌متر) در شرایط گلخانه‌ای (دمای حداکثر 26 و حداقل 21 درجه سلسیوس) صورت گرفت و آبیاری گیاهان با آب لوله‌کشی شهری (به منظور ایجاد شرایط تقریباً طبیعی) و به صورت یک روز در میان انجام شد (۴). قبل از کشت، بذور با محلول هیپرکلریت سدیم به مدت 5 دقیقه ضدعفونی و سپس با آب مقطر آبکشی شدند (۴۱). بعد از گذشت 10 روز از رشد بذور، نهال‌های گیاه تنک گردید و در هر گلدان به تعداد 4 نهال یک‌دست باقی گذاشته شد. EDTA (Na_4EDTA) قبل از رشد گیاه به صورت اسپری به خاک اضافه شد (غلظت‌های $1/5$ ، 3 ، 6 ، $1/5+1/5$ ، $3+3$ میلی‌مول در کیلوگرم). از خاک غیرآلوده بدون EDTA (C) و خاک آلوده بدون EDTA (W) به عنوان شاهد استفاده شد و در تیمارهای $1/5+1/5$ و $3+3$ میلی‌مول در کیلوگرم EDTA بعد از 10 روز از اولین اضافه کردن دوباره به خاک اضافه شد. گونه گیاهی کشت شده بعد از رسیدن به حد نصاب رشد (۲ هفته بعد از اسپری EDTA) برداشت و پس از آماده‌سازی در آزمایشگاه (شستشو با آب مقطر و خشک شدن در آون (مدل دستگاه: MEMMERT UNB 400)، غلظت سرب در اندام‌های گیاهی توسط دستگاه جذب اتمی (مدل دستگاه: KONIK (WON 300) BURKE) اندازه‌گیری شد. پس از آن نمونه‌های خاک گلدان‌ها در دمای 70 درجه سانتی‌گراد در آون

پایدار باقی می‌ماند. بنابراین روش‌های کارآمد قبل از کاربرد این ماده در افزایش کارایی پالایش خاک در مقیاس وسیع بایستی مورد توجه قرار گیرد. به همین دلیل به‌رغم کارایی EDTA در افزایش پتانسیل گیاه استخراجی، خطر آلودگی این ماده به آب‌های زیرزمینی کاربرد آن را محدود کرده است. به عبارت بهتر به منظور کاهش خطر آلودگی فلزات سنگین به آب‌های زیرزمینی و کاهش تأثیرات منفی EDTA، انتخاب غلظت مناسب و همچنین شیوه کاربرد آن فاکتورهای کلیدی در افزایش کارایی این ماده محسوب می‌شوند. هدف از تحقیق حاضر بررسی غلظت مناسب مورد استفاده EDTA، زمان مناسب برداشت گیاه و شیوه مناسب کاربرد EDTA جهت حداکثر پالایش خاک و کاهش آلودگی سرب در خاک‌های آلوده به این فلز در حضور گونه *F. ovina L.* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی گلدان‌ها

خاک مورد استفاده در این پژوهش از نمونه‌های خاک (نمونه‌برداری به صورت مرکب) مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل واقع در نزدیک سد سیستان فراهم گردید (۲۵ کیلومتری شهر زابل). نمونه‌های خاک پس از انتقال به آزمایشگاه خشک و از الک 2 میلی‌متری عبور داده شدند. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک شامل بافت (۱۲)، مقدار نیترژن کل (۸)، فسفر کل (۳۶)، پتاسیم کل (۷)، اسیدیته (مدل دستگاه: 691, Metrohm AG Herisau Switzerland) (۴۴) و هدایت الکتریکی (مدل دستگاه: DDS-307, Shanghai, China) در شرایط (۳۹) اندازه‌گیری شد (جدول ۱). آزمایشات گلدانی در شرایط

انتها) ۷ روز پس از هر بار اضافه کردن، برداشت شده و برای اندازه‌گیری مقدار سرب موجود در خاک و بافت‌های گیاهی آماده شد. هدف از انجام این مرحله این بود که مشخص شود در کدام یک از پنج روش به‌کار رفته با توجه به اپتیمم غلظت EDTA، بهترین امکان برای کاهش خطر آبشویی کلات - فلز وجود دارد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

پس از حصول اطمینان از نرمال بودن توزیع داده‌ها (آزمون Kolmogorov-Smirnov) و همگنی واریانس‌ها (آزمون Levene)، به‌منظور بررسی وجود تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های متفاوت در افزایش جذب و تفاوت بین زمان‌های برداشت و تفاوت در روش‌های کاربرد EDTA، داده‌ها مورد تجزیه واریانس چندطرفه در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تکرار با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۸ قرار گرفتند و برای مقایسات میانگین از آزمون دانکن (در سطح ۵ درصد) استفاده شد.

نتایج و بحث

غلظت سرب در اندام‌های گیاهی و خاک تحت تیمارهای

متفاوت EDTA

نتایج حاصل از تیمار خاک با EDTA (جدول ۲) نشان داد که افزایش غلظت EDTA، باعث افزایش نسبی هدایت الکتریکی خاک و افزایش قابلیت دسترسی سرب موجود در خاک گردید. همچنین افزایش غلظت EDTA باعث کاهش نسبی اسیدیته (اسیدیته اولیه خاک معادل ۸) خاک شد، ولی این افزایش همواره معنی‌دار نبود ($P < 0.05$). بارین و تهیرا (۶) در مطالعه گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به کروم توسط گونه‌های زراعی با استفاده از EDTA گزارش کردند که افزودن ۱۰ میلی‌مول EDTA تأثیر معنی‌داری در اسیدیته و قابلیت هدایت الکتریکی خاک داشت، درحالی‌که مقادیر ۱ و ۵ میلی‌مول EDTA در خاک با

خشک و از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شدند. غلظت سرب نمونه‌های گیاهی با استفاده از روش اکسایش توسط اسید نیتریک، اسید کلریدریک و آب اکسیژنه (۱۴) و غلظت سرب موجود در خاک با روش عصاره‌گیری با DTPA (۳۲) توسط دستگاه جذب اتمی (مدل دستگاه: KONIK (WON 300) (BURKE) تعیین شد. جهت تعیین بهترین غلظت EDTA در افزایش جذب سرب فاکتور پالایش (RF) (۴۵) از رابطه ۱ و شاخص تحمل (TI: Tolerance Index) (وزن خشک گیاه رشد کرده در خاک آلوده به وزن خشک گیاه رشد کرده در خاک غیرآلوده) (۴۷) محاسبه گردید.

$$RF = \frac{(Pb_{\text{plant}} \times B_{\text{plant}})}{(Pb_{\text{soil}} \times W_{\text{soil}})} \times 100 \quad [1]$$

در این رابطه Pb_{plant} : غلظت سرب در وزن خشک گیاه (میلی‌گرم در کیلوگرم)، B_{plant} : وزن خشک گیاه (گرم) Pb_{soil} : مقدار کل سرب موجود در خاک (میلی‌گرم در کیلوگرم)، W_{soil} : مقدار خاک موجود در گلدان (گرم) می‌باشد.

بعد از انجام آزمایشات مرحله اول، با توجه به فاکتورهای ماده خشک گیاه و غلظت سرب خاک و اندام‌های گیاهی، سعی شد تا در خاک‌های با شرایط قبل مناسب‌ترین زمان برداشت گیاه جهت حداکثر کاهش میزان سرب در خاک بررسی شود. بدین‌منظور کشت گیاه در خاک‌های آلوده و تیمار شده با غلظت بهینه EDTA مشخص شده از مرحله قبلی، انجام شد. سپس گیاه و خاک آلوده در هر گلدان ۱۵ روز، ۳۰ روز و ۴۵ روز بعد از کاشت برداشت شد و با توجه به غلظت سرب در اندام‌های زیرزمینی، هوایی و خاک بهترین زمان برداشت گیاه بررسی گردید. برای بررسی کاهش خطر آبشویی سرب-کلات به آب‌های زیرزمینی، با توجه به نتایج مرحله دوم، اپتیمم غلظت EDTA انتخاب و به پنج روش: یک‌بار (Single)، دوبار متوالی با غلظت یکسان (Double)، سه‌بار متوالی با غلظت یکسان (Triple)، چهاربار متوالی (Quadruplet) و پنج‌بار متوالی (Quintuplet) به خاک اضافه گردید. در این مرحله در هر بار اضافه کردن EDTA در روز مشخص شده، نمونه خاک گلدان (یک چهارم خاک گلدان از

جدول ۲. تأثیر تیمارهای متفاوت EDTA بر وزن خشک گیاه (گرم) و غلظت سرب فراهم (میلی‌گرم در کیلوگرم) در اندام‌های گیاهی و خاک

تیمار	سرب اندام زیرزمینی (میلی‌گرم در کیلوگرم)	سرب اندام هوایی (میلی‌گرم در کیلوگرم)	سرب خاک (میلی‌گرم در کیلوگرم)	وزن خشک گیاه (گرم)	pH	EC (دسی‌زیمنس بر متر)
C	-	-	۰/۰۲	۳۰/۵۰±۱/۳۳ ^a	۸/۰۰±۰/۰۳ ^a	۳/۴۳±۰/۱۰ ^a
W	۹۰۰/۴۹±۹/۶۲ ^a	۷۶۰/۱۱±۸/۱۳ ^a	۴۶۰/۲۰±۵/۸۰ ^a	۱۵/۵۷±۱/۱۱ ^b	۸/۰۰±۰/۰۳ ^a	۳/۳۰±۰/۱۰ ^a
۱/۵	۹۶۴/۲۷±۹/۷۶ ^a	۸۰۰/۰۵±۸/۲۲ ^a	۴۹۰/۷۷±۵/۸۶ ^a	۱۳/۲۳±۱/۱۰ ^b	۷/۶۰±۰/۰۲ ^b	۳/۸۳±۰/۱۰ ^a
۳	۲۶۴۷/۸۳±۱۲/۰۸ ^b	۱۶۵۰/۵۵±۱۰/۵۲ ^b	۹۹۰/۶۰±۸/۶۴ ^b	۱۲/۳۵±۱/۱۰ ^b	۷/۴۰±۰/۰۲ ^{bc}	۴/۴۱±۰/۱۰ ^b
۶	۲۸۰۰/۵۱±۱۴/۳۲ ^c	۱۸۸۵/۴۹±۱۱/۳۰ ^b	۱۱۱۰/۵۳±۹/۲۴ ^c	۷/۶۶±۰/۰۵ ^c	۷/۳۰±۰/۰۲ ^c	۴/۹۶±۰/۱۰ ^c
۱/۵+۱/۵	۲۵۵۰/۵۲±۹/۱۳ ^d	۸۱۶/۱۹±۸/۵۸ ^a	۴۸۶/۱۰±۵/۲۷ ^a	۱۱/۰۰±۱/۰۰ ^b	۷/۵۰±۰/۰۲ ^b	۳/۸۶±۰/۱۰ ^a
۳+۳	۲۷۲۱/۱۵±۱۲/۶۰ ^c	۱۷۰۰/۱۵±۹/۵۰ ^b	۹۳۲/۲۱±۵/۶۰ ^c	۱۰/۶۶±۱/۰۰ ^b	۷/۵۰±۰/۰۲ ^b	۴/۴۸±۰/۱۰ ^b

C=خاک غیرآلوده بدون EDTA، W= خاک آلوده بدون EDTA. ×حروف مشترک در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (میانگین‌ها ± انحراف معیار) (P<۰/۰۵).

Co(III) برقرار می‌سازد که منجر به آزادسازی یون‌های H⁺ می‌شود، بنابراین می‌توان کاهش اسیدیته خاک را با افزایش غلظت EDTA به دلیل رهاسازی بیشتر یون‌های هیدروژن نسبت داد.

اونگلو همکاران (۱۷) بیان کردند که وجود پیوندهای آلی-فلزی در ترکیبات کلات و فلزات سبب می‌شود فلزات کمتر در معرض کلونیدها، هیدروکسیدها و اکسیدها قرار گرفته، لذا مانع از رسوب و تثبیت آنها در خاک می‌شود. از طرفی کلات‌ها توسط ریشه گیاهان قابل جذب بوده و می‌توانند فلزات را از فاز جامد و غیرمحلول به فازهای تبادل‌پذیر انتقال داده و در نهایت میزان جذب فلزات توسط گیاهان را افزایش دهند. نتایج به‌دست آمده از این آزمایش این مطلب را تأیید می‌کند. قابلیت استخراج سرب به وسیله EDTA در غلظت‌های پایین بستگی به pH خاک دارد. هانگ و همکاران (۲۶) گزارش کردند که در خاک‌های با pH برابر ۶ رابطه قوی بین فراهمی فلز در خاک و pH وجود دارد و در pH بالا کارایی EDTA به‌خاطر رقابت با کلسیم کاهش می‌یابد که مهم‌ترین فاکتور مؤثر در افزایش

اسیدیته ۸/۲ و هدایت الکتریکی ۵/۱۹ دسی‌زیمنس بر متر تأثیر معنی‌دار در اسیدیته و هدایت الکتریکی نداشت. همچنین ابراهیمی (۱۵) در بررسی تأثیر EDTA در گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به سرب و کرم توسط گونه *Echinochloa crus galii* گزارش کرد که این ماده در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌مول در کیلوگرم باعث کاهش اسیدیته و افزایش هدایت الکتریکی خاک در مقایسه با تیمار شاهد بدون EDTA شد.

در توجیه این مسئله گاش و سینگ (۱۹) اظهار داشتند که EDTA یک آمینوپولی‌کربوکسیلیک اسید (Aminopolycarboxylic acids) است که به‌شکل وسیعی برای انحلال رسوبات آهنی ناشی از تبخیر آب مورد استفاده قرار می‌گیرد. کارایی این ماده به علت دارا بودن ساختار شش وجهی است که با یون‌های کلسیم و آهن پیوند برقرار می‌کند. به‌عبارت بهتر این ماده به دلیل داشتن چهار کربوکسیلات و دو آمینو در ساختار خود با یون‌های فلزی موجود در خاک پیوند برقرار می‌سازد (۲۳). هولمن و وبرگ (۲۴) بیان داشتند که EDTA کمپلکس‌های قوی با Cu(II)، Mn(II)، Fe(III) و Pb(II)

فراهمی سرب در خاک پیوند سرب-کلات است، به طوری که پس از افزودن EDTA به خاک با گذشت زمان، pH کاهش پیدا می کند.

غلظت سرب در اندام های گیاهی تحت تیمارهای متفاوت EDTA (جدول ۲) نشان داد که بیشترین غلظت سرب فراهم در ریشه گیاه به ترتیب در تیمار ۶ (۲۸۰۰/۵۱) میلی گرم در کیلوگرم) و ۳+۳ (۲۷۲۱/۱۵) میلی گرم در کیلوگرم) مشاهده شد و کمترین میزان غلظت سرب به ترتیب در تیمار غیرآلوده بدون EDTA و آلوده بدون EDTA اندازه گیری گردید. غلظت سرب در اندام های هوایی (ساقه و برگ) الگوی مشابه ریشه داشت، به طوری که حداکثر غلظت سرب به ترتیب در تیمار ۶ (۱۸۸۵/۴۹) میلی گرم در کیلوگرم) و ۳+۳ (۱۷۰۰/۱۵) میلی گرم در کیلوگرم) مشاهده شد، هرچند بین تیمار ۳ و ۳+۳ میلی مول و ۱/۵ و ۱/۵+۱/۵ میلی مول تفاوت معنی داری در میزان سرب اندام های هوایی و ریشه گیاه مشاهده نگردید ($P < 0/05$). جانپوری و همکاران (۲۷) در بررسی گونه *Helianthus annuus* (آفتابگردان) در محیط هیدروپونیک نشان دادند EDTA باعث افزایش قابل ملاحظه کروم و سرب در اندام های گیاهی می شود. اپستین و همکاران (۱۶)، هانگ و کانینگهام (۲۵) و بلیاک و همکاران (۹) در مطالعه گیاه پالایی *Brassica juncea* (خردل) گزارش کردند که رابطه مثبت بین میزان سرب و غلظت EDTA در برگ گیاه وجود دارد و در خاک آلوده در حضور EDTA فلز به صورت ترکیب فلز-کلات قابل استخراج است. لیم و همکاران (۳۱) یکی از مکانیسم های اثرگذار در افزایش جذب فلزات از خاک توسط گیاه را کاهش pH خاک می دانند. به عبارتی بعضی از خصوصیات خاک نظیر pH و غلظت کل فلز، کارایی مواد بهساز را مؤثر می سازد. در تحقیق حاضر، نتایج خاک تحت تیمار غلظت های متفاوت EDTA، کاهش pH خاک را نشان داد، لذا می توان کاهش pH را دلیلی بر جذب سرب در غلظت های بالا EDTA بیان کرد.

نتایج به دست آمده از مقایسه وزن خشک اندام های گیاهی

نشان داد که کاربرد EDTA باعث کاهش وزن خشک اندام های هوایی و زیرزمینی گونه گیاهی در مقایسه با تیمار بدون EDTA گردید (جدول ۲)، به گونه ای که وزن خشک اندام های هوایی و ریشه حداکثر کاهش را در تیمار EDTA ۶ نشان داد. لو و همکاران (۳۴) در آزمایشی که بر روی گیاه پالایی کادمیوم، نیکل و کروم توسط *H. annuus* انجام دادند، گزارش کردند که افزودن EDTA هرچند قابلیت دسترسی فلزات را در خاک افزایش می دهد، ولی غلظت های بالای این ماده برای گیاه سمی بوده و باعث کاهش زیست توده گیاه و در نهایت کاهش غلظت فلز در اندام های هوایی گیاه می شود.

یکی از دلایل کاهش زیست توده گیاه این است که سلول های ریشه گیاه در صورتی که مواد بهساز در غلظت های بالا استفاده شوند از بین می روند. چن و همکاران (۱۰) اعلام کردند گاهی این ماده در غلظت های کم هم برای گیاه سمی بوده و باعث کاهش زیست توده گیاه، نکروز (Necrosis) و حتی مرگ گیاه می شود. الکوئرا و همکاران (۵) گزارش کردند که EDTA از طریق ایجاد کمبود مواد غذایی باعث کاهش زیست توده گیاه می شود، زیرا این ماده با عناصر ضروری گیاه شامل کلسیم، منگنز و آهن ترکیب می شود. از طرفی کمبود عناصر غذایی ضروری در گیاه منجر به افزایش جذب فلزات در گیاه می شود.

کومرک و همکاران (۲۸) در مطالعه گونه های *Z. mays* و *Populus sp* (صنوبر) در خاک های با آلودگی کم سرب نشان دادند که این دو گیاه ۵ برابر زیست توده بیشتری نسبت به خاک های با آلودگی بالا داشتند که کاهش در آلودگی زیاد نه تنها به محتوای فلزی خاک، بلکه به pH خاک و افزایش فراهمی بالای فلزات ناشی از کاربرد EDTA و سمیت ناشی از آن مربوط می شود. هرچند بیشترین قابلیت دسترسی سرب در خاک تحت تیمار ۶ میلی مول EDTA اندازه گیری شد، اما باتوجه به خطر آیشویی کلات-فلز به آب های زیرزمینی در غلظت های زیاد ماده بهساز، به منظور بررسی چگونگی کاهش خطر آیشویی EDTA به آب های زیرزمینی و باتوجه به عدم

جدول ۳. فاکتور پالایش و شاخص بردباری *F.ovina L.* در خاک مورد مطالعه

تیما	فاکتور پالایش (RF)	شاخص تحمل (TI)
C	-	۱/۰۰±۰/۲۰ ^a
W	۰/۰۳±۰/۰۱ ^a	۰/۹۱±۰/۲۰ ^{ab}
۱/۵	۰/۰۴±۰/۰۱ ^a	۰/۸۷±۰/۱۰ ^b
۳	۰/۰۶±۰/۰۱ ^{bc}	۰/۷۲±۰/۱۰ ^c
۶	۰/۰۷±۰/۰۱ ^b	۰/۴۶±۰/۱۰ ^d
۱/۵+۱/۵	۰/۰۴±۰/۰۱ ^a	۰/۸۰±۰/۱۰ ^b
۳+۳	۰/۰۵±۰/۰۱ ^c	۰/۷۰±۰/۱۰ ^c

حروف مشترک در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (میانگین‌ها ± انحراف معیار) ($P < 0/05$).

یک می‌باشد. این مقدار در صورت وجود عامل مثبت به بیشتر از یک افزایش داشته، ولی در صورت وجود عامل منفی به زیر یک کاهش می‌یابد. حداکثر مقدار کاهش شاخص تحمل، به ترتیب در غلظت‌های ۶ و ۳+۳ میلی‌مول در کیلوگرم مشاهده شد. سیفاله و همکاران (۴۰) اظهار می‌دارند که هرچند با افزایش غلظت EDTA قابلیت دسترسی فلزات در خاک و اندام‌های گیاهی به‌خصوص ریشه افزایش داشت، ولی به دلیل تأثیر منفی بر خصوصیات گیاهی و شاخص تحمل گیاهان و خطر آبتوی آن به آب‌های زیرزمینی غلظت‌های بالای این ماده پیشنهاد نمی‌شود.

تأثیر زمان تیمار بر غلظت سرب در اندام‌های گیاهی و خاک
نتایج حاصل از بررسی بهترین زمان برداشت گیاه به‌منظور دستیابی به حداکثر کاهش سرب در خاک تحت تیمار ۳ میلی‌مول در کیلوگرم EDTA (جدول ۴) نشان داد که مقدار سرب در خاک با گذشت زمان کاهش پیدا کرد. حداکثر مقدار کاهش در روز ۴۵ام اندازه‌گیری شد و بین روزهای ۳۰ام و ۴۵ام تفاوت معنی‌دار به لحاظ مقدار سرب در خاک وجود داشت ($P < 0/05$). همچنین نتایج حاصل از تأثیر زمان برداشت گیاه بر جذب سرب در اندام‌های گیاهی (جدول ۵) نشان داد

تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای ۳ و ۳+۳ میلی‌مول، تیمار ۳ میلی‌مول انتخاب و بهترین زمان برداشت گیاه و شیوه کاربرد این ماده جهت افزایش کارایی گیاه استخراجی سرب و کاهش آبتوی فلز مذکور مورد آزمون قرار گرفت.

کارایی گیاه استخراجی *F.ovina*

بیشترین فاکتور پالایش برای گیاه رشد کرده در تیمارهای آلوده محاسبه شد (جدول ۳). حداکثر فاکتورهای پالایش (۰/۰۷ و ۰/۰۶) به ترتیب مربوط به غلظت‌های ۶ و ۳+۳ میلی‌مول در کیلوگرم به علت مقدار بیشتر سرب در اندام‌های گیاه بود. هرچند، تنها با محاسبه فاکتور پالایش و بدون در نظر گرفتن زمان لازم برای پالایش خاک و کاهش خطر آبتوی فلز-کلات به آب‌های زیرزمینی کارایی گیاه استخراجی قابل محاسبه نخواهد بود. شاخص تحمل به‌عنوان شاخص تأثیر سمیت سرب (جدول ۳) دامنه تغییرات ۱-۰/۴۶ را نشان داد. مقادیر پایین این شاخص نشان‌دهنده حداکثر تأثیر سمیت فلز و ماده به‌ساز بر رشد گیاه می‌باشد. با افزایش غلظت EDTA مقدار این شاخص کاهش داشت، به طوری که حداکثر کاهش مربوط به تیمار ۶ میلی‌مول بود. طبق نظر زیبر و همکاران (۴۹) مقدار شاخص تحمل گیاه وقتی که عامل منفی بر رشد گیاه وجود ندارد برابر

جدول ۴. تأثیر زمان تیمار EDTA (۳ میلی مول در کیلوگرم) بر غلظت سرب فراهم (میلی گرم در کیلوگرم)

	۱۵ روز	۳۰ روز	۴۵ روز
اندام زیرزمینی	۲۶۰۰/۶۹±۱۲/۰۰ ^c	۲۷۸۸/۹۳±۱۳/۵۰ ^b	۳۵۵۰/۲۱±۱۴/۰۰ ^a
اندام هوایی	۱۶۴۰/۲۵±۱۱/۴۲ ^c	۱۷۴۳/۲۰±۱۱/۷۰ ^b	۲۱۰۰/۵۵±۱۲/۲۱ ^a
خاک	۱۰۰۰/۳۱±۸/۰۰ ^a	۸۷۶/۳۳±۱۰/۵۳ ^b	۶۸۸/۱۳±۱۰/۹۸ ^c

حروف مشترک در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار بین زمان های متفاوت برداشت است (میانگین ها ± انحراف معیار) ($P < 0/05$).

جدول ۵. تأثیر روش کاربرد ۳ میلی مول EDTA در کیلوگرم بر فراهمی سرب در خاک و اندام های گیاهی

روش کاربرد	ریشه (میلی گرم در کیلوگرم)	اندام هوایی (میلی گرم در کیلوگرم)	خاک (میلی گرم در کیلوگرم)
Single	۲۶۰۰/۲۷±۱۱/۰۰ ^c	۱۷۰۰/۳۴±۹/۰۰ ^c	۹۷۳/۳۸±۸/۵۳ ^a
Double	۲۷۷۰/۱۲±۱۱/۰۰ ^b	۱۸۲۱/۴۲±۱۰/۰۰ ^b	۸۶۷/۴۵±۸/۰۰ ^b
Triple	۳۱۰۰/۴۹±۱۲/۰۰ ^a	۱۸۷۶/۰۵±۱۰/۰۰ ^a	۷۴۶/۸۹±۷/۴۴ ^c
Quadruplet	۳۱۱۲/۴۶±۱۲/۰۰ ^a	۱۸۸۸/۲۹±۱۰/۰۰ ^a	۷۳۷/۶۸±۷/۲۳ ^c
Quintuplet	۳۱۱۶/۲۰±۱۲/۰۰ ^a	۱۸۹۰/۰۰±۱۰/۰۰ ^a	۷۵۴/۱۲±۷/۲۳ ^c

حروف مشترک در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار بین روش های کاربرد EDTA است (میانگین ها ± انحراف معیار) ($P < 0/05$).

غلظت مس در اندام های هوایی *Vetiveria zizanioides* (علف ویتور) انجام دادند بیان کردند که غلظت فلز به حداکثر مقدار خود بعد از ۱۶ روز از کاربرد HEIDA (Hydroxy ethylene diamine triacetic acid) رسید. همچنین وانگ و همکاران (۴۶) در مطالعه ای دیگر نشان داده شد که با برداشت گیاه *Sedum alfredii* ۱۴ روز بعد از اضافه کردن EDDS در خاک های با غلظت پایین سرب و ۱۰ روز در خاک های آلوده به غلظت های بالای این فلز، حداکثر مقدار سرب فراهم در اندام های گیاه برداشت شد.

تأثیر روش کاربرد EDTA بر غلظت سرب در اندام های گیاهی و خاک

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نمونه های خاک (جدول ۵) نشان داد که روش های متفاوت کاربرد EDTA تأثیر معنی دار بر فراهمی سرب موجود در خاک دارد ($P < 0/05$)، به گونه ای

که حداقل سرب فراهم مربوط به دو هفته ابتدای رشد تحت تیمار ۳ میلی مول بود و غلظت سرب در کلیه اندام های گیاهی با گذشت زمان افزایش قابل ملاحظه ای داشت. حداکثر غلظت سرب فراهم در روز ۴۵ ام به دست آمد و بین دو هفته دوم و سوم دوره رشد گیاه به لحاظ آماری تفاوت معنی داری وجود داشت ($P < 0/05$).

به طور کلی با گذشت زمان مقدار سرب در خاک کاهش داشت. وانگ و همکاران (۴۶) دلیل این موضوع را به افزایش قابلیت دسترسی سرب برای گیاه با گذشت زمان و کاهش مقدار آن در خاک نسبت دادند. ویو و همکاران (۴۸) در تحقیقی که بر روی پالایش خاک های آلوده به سرب انجام دادند، گزارش کردند که سرب فراهم در خاک با گذشت زمان از ۶ ساعت به ۱۲۰ ساعت، کاهش پیدا کرد. در تحقیق حاضر با گذشت زمان غلظت سرب در اندام های گیاهی افزایش داشت (جدول ۴). در بررسی که چیو و همکاران (۱۱) بر روی

فراهمی فلز مذکور در اندام‌های گیاهی داشتند. خلاف این نتیجه را گرسمن و همکاران (۲۰) در بررسی گیاه‌پالایی *Brassica oleracea* L. گزارش کردند و اظهار داشتند که یک‌بار اضافه کردن ۲/۹ گرم در کیلوگرم EDTA باعث افزایش ۱۰۵ برابری غلظت سرب در گیاه مذکور در محیط گلخانه در مقایسه با افزایش ۴۴ برابری همین غلظت از EDTA در کاربرد به‌صورت چهار بار متوالی دارد. همچنین ابراهیمی (۱۵) در بررسی کاهش خطر آبتوی سرب و کروم در گیاه‌پالایی *E. crus galii* حداکثر کاهش خطر آبتوی کلات سرب و کروم در کاربرد غلظت ۵ میلی‌مول در کیلوگرم EDTA به‌صورت یک‌بار متوالی به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده از تحقیق حاضر نشان داد که با افزایش غلظت EDTA مقدار سرب در خاک افزایش داشت و اپتیمم فراهمی سرب در تیمار ۳ میلی‌مول در کیلوگرم مشاهده شد، ولی با توجه به این‌که این ماده در مقایسه با دیگر مواد به‌ساز در خاک ماندگاری بیشتری دارد، بنابراین هرچند فراهمی فلزات در خاک با افزودن EDTA افزایش می‌یابد، اما کاربرد آن در غلظت‌های بالا منجر به مخاطرات زیست‌محیطی و افزایش خطر آلودگی آب‌های زیرزمینی می‌شود. بنابراین در صورتی که استفاده از کلات EDTA با کاشت گیاهی چون *F. ovina* L. همراه باشد، می‌تواند برای رسیدن به هدف پاک‌سازی خاک‌های آلوده مورد توجه باشد و غلظت ۳ میلی‌مول در کیلوگرم جهت افزایش کارایی گیاه استخراجی (با در نظر گرفتن خطر آبتوی این ماده) در شرایط مشابه پیشنهاد می‌شود. بررسی بهترین زمان تیمار نشان داد که با گذشت زمان میزان سرب موجود در خاک کاهش داشت، اما بهترین زمان برداشت گیاه جهت حداکثر کارایی پالایش خاک اواخر دوره رویش است، ولی لازم است تا دوره رویشی کامل گیاه جهت حصول بهترین نتیجه مورد بررسی قرار گیرد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بین نحوه استفاده از

که در اضافه کردن EDTA به‌صورت پنج‌بار متوالی (Quintuplet) کاهش غلظت سرب مورد بررسی در خاک حداکثر (۲۶ درصد) مقدار بود و در کاربرد EDTA به‌صورت چهاربار متوالی (Quadruplet) مقدار سرب ۲۴/۲۱ درصد کاهش داشت. این کاهش در روش سه‌بار متوالی (Triple) ۲۳/۲۶ درصد محاسبه شد، ولی در کاربرد EDTA به‌صورت سه‌بار، چهاربار و پنج‌بار متوالی تفاوت معنی‌داری اندازه‌گیری نشد و حداکثر سرب موجود در خاک در روش کاربرد به‌صورت یک‌بار اندازه‌گیری شد.

نتایج حاصل از تأثیر روش‌های کاربرد متفاوت EDTA بر غلظت سرب در بخش‌های زیرزمینی و هوایی گیاه (جدول ۵) نشان داد که حداکثر مقدار سرب در اندام‌های گیاهی در کاربرد EDTA به‌صورت پنج‌بار متوالی بود و حداقل مقدار سرب بافت‌های گیاهی در کاربرد به‌صورت یک‌بار متوالی (Single) بود و بین روش کاربرد به‌صورت سه‌بار، چهاربار و پنج‌بار متوالی تفاوت قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشد ($P < 0/05$). نتایج به‌دست آمده در این بخش از تحقیق نشان داد که ارتباط قوی بین روش کاربرد EDTA و کاهش آبتوی کمپلکس فلز-کلات به آب‌های زیرزمینی وجود دارد و غلظت بهینه ماده به‌ساز و شیوه کاربرد برای افزایش کارایی پالایش خاک باید قبل از کاربرد این ماده تعیین شود. نتایج حاصل نشان داد که در شرایط مشابه تحقیق صورت گرفته، EDTA باید در غلظت ۳ میلی‌مول در کیلوگرم و به‌صورت پنج‌بار متوالی به خاک اضافه شود. نظیر این نتیجه را شن و همکاران (۴۲) در بررسی تأثیر رژیم‌ها و شیوه‌های متفاوت کاربرد EDTA جهت کاهش خطر آبتوی سرب در گیاه‌پالایی گونه *Brassica rapa* L. به‌دست آوردند و نشان دادند که کاربرد EDTA به‌صورت سه‌بار متوالی حداکثر فراهمی سرب را در اندام‌های گونه مورد بررسی و حداکثر کاهش آبتوی سرب را در مقایسه با کاربرد به‌صورت یک‌بار و دوبار متوالی داشت. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که حداکثر سرب فراهم در اندام‌های گیاهی در کاربرد به‌صورت پنج‌بار متوالی بوده و شیوه کاربرد یک‌بار و دوبار متوالی تأثیر منفی در

EDTA و کاهش سرب در خاک ارتباط قوی وجود دارد، خاک و کاهش خطر آبهشویی فلز-کلات به آب‌های زیرزمینی به طوری که افزودن EDTA در غلظت ۳ میلی‌مول در کیلوگرم و شیوه‌ی کاربرد به صورت پنج‌بار متوالی در شرایط مشابه بیشترین کارایی را دارد. به‌طور کلی به‌منظور رسیدن به حداکثر پالایش می‌شود.

منابع مورد استفاده

۱. بلادی، س. م.، ع. کاشانی، د. حبیبی و ف. پاک‌نژاد. ۱۳۸۹. ارزیابی توزیع فلز سنگین سرب و مس و نقش دو آنزیم آنتی‌اکسیدان در یونجه (*Medicago sativa*) رقم همدانی. زراعت و اصلاح نباتات ۶(۴): ۸۴-۷۳.
۲. پارسادوست، ف.، ف. بحرینی‌نژاد، ع. صفری‌سنجانی، و م. م. کابلی. ۱۳۸۶. گیاه‌پالایی عنصر سرب توسط گیاهان مرتعی و بومی در خاک‌های آلوده منطقه ایران کوه (اصفهان). پژوهش و سازندگی ۷۵: ۶۳-۵۴.
۳. متشروع‌زاده، ب.، غ. ر. ثواقبی، ح. ع. علیخانی و ح. میرسید حسینی. ۱۳۸۸. شناسایی گیاهان بومی و باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین در اراضی اطراف معدن سرب و روی عمارت شازند اراک به‌منظور استفاده در گیاه‌پالایی. تحقیقات آب و خاک ایران (علوم کشاورزی ایران) ۳۹(۱): ۱۷۴-۱۶۳.
4. Ait Ali, N., M. Pilar Bernal and A. Mohammed. 2004. Tolerance and bioaccumulation of cadmium by *Phragmites australis* grown in the presence of elevated concentrations of Cadmium, Copper, and Zinc. *Aouat Bot.* 80:163-176.
5. Alkorta, I., J. Hernández-Allica, J. M. Becerril, I. Amezaga, I. Albizu, M. Onaindia and C. Garbisu. 2004. Chelate-enhanced phytoremediation of soils polluted with heavy metals. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 3: 55-70.
6. Barea, F. and S. A. Tahir. 2010. Efficiency of Seven Different Cultivated Plant Species for Phytoextraction of Toxic Metals from Tannery Effluent Contaminated Soil Using EDTA. *Soil Sediment Contam.* 19:160-173.
7. Berry, J. W., D. G. Chappell and R. B. Barnes. 1946. Improved Method of Flame Photometry. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 18(1): 19-24.
8. Black, C. A., D. D. Evans, J. L. White, L. E. Ensminger and F. E. Clark. 1965. PP. 467-502. *In: Stevenson, F. J. (Ed.), Methods of soil chemical analysis and microbiological properties. Part 2. American Society of Agronomy, Madison, WI.*
9. Blaylock, M. J., D. E. Salt, S. Dushenkov, O. Zakharova. C. Gussman, Y. Kapulnik, B. D. Ensley and I. Raskin. 1997. Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. *Environ. Sci. Technol.* 31: 860-865.
10. Chen, Y. H., X. D. Li and Z. G. Shen. 2004. Leaching and uptake of heavy metals by ten different species of plants during an EDTA Assisted phytoextraction process. *Chemosphere* 57:187-196.
11. Chiu, K. K., Z. H. Ye and M. H. Wong. 2005. Enhanced uptake of As, Zn, and Cu by *Vetiveria zizanioides* and *Zea mays* using chelating agents, *Chemosphere* 60:1365-1375.
12. Day, P. R. 1982. Particle fractionation and particle size analysis. PP. 951-935. *In: Page, A. L. (ED.), Methods of Soil Analysis. Part1. American Society of Agronomy, Madison, WI.*
13. Diaz-Ravina, M and E. Baath. 1996. Development of metal tolerance in soil bacterial communities exposed to experimentally increased metal levels. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2970-2977.
14. Du Laing, G., F. M. G. Tack and M. G. Verloo. 2003. Performance of selected destruction methods for the determination of heavy metals in reed plants (*Phragmites australis*). *Analytica Chimica Acta.* 497(8):191-198.
15. Ebrahimi, M. 2014. The effect of EDTA addition on the phytoremediation efficiency of Pb and Cr by *Echinochloa crus galii* (L.) Beave and associated potential leaching risk. *Soil Sediment Contam.* 23:245-256.
16. Epstein, A. L., C. D. Gussman, M. J. Blaylock, U. Yermiyahu, J. W. Huang, Y. Kapulnik and C. S. Orser. 1999. EDTA and Pb-EDTA accumulation in *Brassica juncea* grown in Pb-amended soil. *Plant Physiol.* 208: 87-94.
17. Evangelou, M. W. H., E. Mathias and A. Schaeffer. 2007. Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity and fate of chelating agents. *Chemosphere.* 68: 989-1003.
18. Garbisu, C. and I. Alkorta. 2001. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technol.* 77: 229-236.
19. Ghosh, M. and S. P. Singh. 2005. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts.

- Appl Ecol Env Res. 3: 1-18.
20. Gr man, H., S. Velikonja-Bolta, D. Vodnik, B. Kos and D. Lestan. 2001. EDTA enhanced heavy metal phytoextraction: metal accumulation, leaching, and toxicity. *Plant Soil* 235:105–114.
 21. Gr man, H., D. Vodni., S. Velikonja-Bolta and D. Leštan, D. 2003. Ethylenediaminedisuccinate as a new chelate for environmentally safe enhanced lead phytoextraction. *J. Environ. Qual.* 32: 500–506.
 22. Hargreaves, J. C., M. S. Adl and P. R. Warman. 2008. A review of the use of composted municipal solid waste in agriculture. *Agr. Ecosyst .Environ.* 123: 1–14.
 23. Harris, D. C. 2007. Gas chromatography. PP. 675-712. *In: Freeman, W.H. (Ed.), Quantitative Chemical Analysis.* New York.
 24. Holleman, A. F. and E. Wiberg. 2001. *Inorganic Chemistry.* PP. 2-24. San Diego, Academic Press.
 25. Huang, J. W. and S. D. Cunningham. 1996. Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytol.* 134: 75–84.
 26. Huang, J. W., J. Chen, W.R. Berti and S.D. Cunningham. 1997. Phytoremediation of lead contaminated soils- Role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environ. Sci. Technol.* 31: 800–806.
 27. January, M. C., T. J. Cutright, H. V. Keulen and R. Wei. 2008. Hydroponic phytoremediations of Cd, Cr, Ni, As, and Fe: *Helianthus annuus* hyperaccumulate multiple heavymetal. *Chemosphere* 70: 531–537.
 28. Komárek, M., T. Pavel, S. Ji ina, C. Vladislav and E. Vojt ch, E. 2007. The use of maize and poplar in chelant-enhanced phytoextraction of lead from contaminated agricultural soils. *Chemosphere* 67: 640–651.
 29. Kos, B. and D. Leštan. 2003. Induced phytoextraction/soil washing of lead using biodegradable chelate and permeable barriers. *Environ. Sci. Technol.* 37: 624–629.
 30. Liao, M., L. Yun-kuo., Z. Xiao-min and H. Chang-yong. 2005. Toxicity of cadmium to soil microbial biomass and its activity: Effect of incubation time on Cd ecological dose in paddy soil. *J. Zhejiang Univ-Sc B.* 5: 324-330.
 31. Lim, T. T., J. H. Tay and J. Y. Wang. 2004. Chelating-agent enhanced heavy metal extraction from a contaminated acidic soil. *J. Environ. Eng. ASCE* 130: 59-66.
 32. Lindsay, W. L. and W. A. Norvell. 1978. Development of DTPA soil test for Zinc, Iron, manganese and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 42:421-428.
 33. Lombi, E. F.J.Zhao, S. J. Dunham and S. P. McGrath. 2001. Phytoremediation of heavy-metal contaminated soils: natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *J. Environ. Qual.* 30: 1919–1926.
 34. Luo, C., Z. G. Shen, X. Li and A. J. M. Baker. 2006. Enhanced phytoextraction of Pb and other metals from artificially contaminated soils through the combined application of EDTA and EDDS. *Chemosphere.*63: 1773–1784.
 35. Meers, E., A. Ruttens., M. J. Hopgood., D. Samson and F. M. G. Tack. 2005. Comparison of EDTA and EDDS as potential soil amendments for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Chemosphere* 58: 1011–1022.
 36. Olsen, S. R. and L. E. Sommers .1982. Phosphorus. Chemical and Microbiological Properties. PP. 403-430. *In: Page, A. L., Miller, R. H., Keeney, D. R. (Eds.), Methods of Soil Analysis. Part 2.* American Society of Agronomy, Madison, WI.
 37. Prasad, M. N. V. and H. M. De Oliveira-Freitas. 2003. Metal hyperaccumulation in plants-Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Nat. Biotechnol.* 6:285–321.
 38. Reeves, R. D. 2006. Hyperaccumulation of trace elements by plants. PP. 25-52. *In: Morel, J.L., Echevarria, G., Goncharova, N. (Eds.), Phytoremediation of Metal-contaminated Soils.,* Springer, New York..
 39. Rhoades, J. D. 1996. Salinity: Electrical conductivity and total dissolved solids. PP. 417-435. *In: Page, A.L. (Ed.), Methods of soil analysis.* American Society of Agronomy, Madison, WI.
 40. Saifullah, E. M., P. Meers, F. Qadir, M. G. de Caritat, G. Tack, M. Du Laing and H. Zia. 2009. Review EDTA-assisted Pb phytoextraction. *Chemosphere* 74: 1279-1291.
 41. Sharifi, M., Y. Sadeghi and M. Akbarpour. 2007. Germination and growth of six plant species on contaminated soil with spent oil , *Environ. Sci. Technol.* 4 (4): 463-470.
 42. Shen, Z. G., X. D. Li, C. C. Wang, H. M. Chen and H. Chua. 2002. Lead phytoextraction from contaminated soils with high-biomass plant species. *J. Environ. Qual.* 31: 1893-1900.
 43. Shibata, M., T. Konno, R. Akaike, Y. Xu, R. F. Shen and J.F. Ma. 2007. Phytoremediation of Pb contaminated soil with polymercoated EDTA. *Plant Soil.* 290: 201-208.
 44. Thomas, G.W.1996. Soil pH and soil acidity. PP. 475-490. *In: Sparks, D.L. (Ed.), Methods of soil analysis. Part 3.* American Society of Agronomy, Madison, Madison, WI.
 45. Vysloužilová, M., P.Tlustoš and J. Száková. 2003. Cadmium and zinc phytoextraction potential of seven clones of *Salix* spp. planted on heavy metal contaminated soils. *Plant Soil Environ.* 49: 542–547.
 46. Wang, X., Y.Wang, Q. Mahmood, E. Slam, X. Jin, T. Li, X.Yang and L. Dan. 2009. The effect of EDDS addition on the phytoextraction efficiency from Pb contaminated soil by *Sedum alfredii* Hance. *J. Hazard. Mater.* 168: 530–535.

47. Wilkins, D. A. 1978. The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth. *New Phytol.* 80:623-633.
48. Wu, J. F., C. Hua and S. D. Cunningham. 1999. Chelate-assisted Pb phytoextraction: Pb availability, uptake and translocation constraints. *Environ. Sci. Technol.* 33:1898-1904.
49. Zaier, H., G. Tahar, B. R. Kilani, L. Abdelbasset, R. Salwa and J. Fatima. 2010. Effects of EDTA on phytoextraction of heavy metals (Zn, Mn and Pb) from sludge-amended soil with *Brassica napus*. *Bioresource Technol.* 101: 3978–3983.