

تغییرات بیوژئوشیمیایی مس در ریزوسفر گیاهان غده‌ای کشت شده در یک خاک آهکی آلوده به مس

علیرضا گلستانی فرد^۱، حسین میرسیدحسینی^{۲*}، آمال آرین^۳، پیمان عباس زاده دهجی^۴، مهدی تفویضی^۵

۱. محقق گروه بیوژئوشیمی و اکولوژی ریزوسفر، دانشکده خاکشناسی و جنگل، دانشگاه بوکو، اتریش

۲. دانشیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

۳. دکتری علوم باغبانی و مدرس دانشگاه بوکو، اتریش

۴. استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولیعصر رفسنجان

۵. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۲۵ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۶/۶/۲۴ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۷/۲۲)

چکیده

فعالیت ریشه‌ها و فرآیندهای ریزوسفری بر حلالیت و زیست‌فراهمی فلزات سنگین در ریزوسفر اثر گذاشته و نقش تعیین کننده‌ای بر سرنوشت عناصر شیمیایی در اکوسیستم‌های خاکی دارند. به منظور بررسی تغییرات بیوژئوشیمیایی مس در یک خاک آلوده به مس (۸۵/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم)، یک آزمایش کشت گلدانی به مدت ۴۵ روز با ۳ رقم ترب (سفید، قرمز، سیاه) و ۲ رقم شلغم (N-135, N-180) به صورت طرح پایه کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. در خاتمه مقدار مس در شاخساره نمونه‌های گیاه اندازه‌گیری و همچنین شکل‌های شیمیایی مس در خاک‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری پس از جداسازی و به روش‌های دنباله‌ای و تک‌مرحله‌ای با DTPA ۰/۰۰۵ مولار، NH_4NO_3 یک مولار و $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ پنج میلی‌مولار اندازه‌گیری شد. غلظت مس در شاخساره ارقام مختلف بین ۶۶/۴ تا ۷۸/۴ میلی‌گرم در کیلوگرم متغیر بود. میزان مس تبدالی و محلول خاک ریزوسفری در ارقام مختلف دو گیاه افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$)، در حالی که بخش‌های کربناته و نیز مس همراه با مواد آلی کاهش معنی‌داری را داشت که نشان‌دهنده افزایش تحرک مس در ریزوسفر است. مقدار مس عصاره‌گیری شده با نیترات آمونیوم و نیترات کلسیم در ریزوسفر تمامی ارقام، افزایش معنی‌داری را در مقایسه با خاک غیرریزوسفری نشان داد ($p < 0.05$). ارقام مختلف شلغم بر خلاف ارقام ترب افزایش معنی‌داری در pH خاک ریزوسفری ایجاد کردند ($p < 0.05$) افزایش معنی‌دار در میزان کربن آلی محلول خاک ریزوسفری در مقایسه با خاک غیرریزوسفری در ارقام مختلف دو گیاه نیز مشاهده شد. علیرغم افزایش فراهمی مس در خاک ریزوسفری، مقدار جذب کل مس در کلیه ارقام ترب و شلغم کمتر از مقدار مس موجود در فاز تبدالی و محلول خاک غیرریزوسفری بود. نتایج بیانگر نقش احتمالی کربن آلی محلول در کاهش جذب مس می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ریزوسفر، زیست‌فراهمی، عصاره‌گیری دنباله‌ای، فرآیندهای بیوژئوشیمیایی و مس

مقدمه

رسوب با کربنات‌ها، هیدروکسیدها و فسفات‌ها وجود دارند (McBride, 1981; Sposito *et al.*, 1982). روش‌های مختلفی برای پاکسازی فلزات سنگین از خاک وجود دارد که عمده این روش‌ها گران، پیچیده و مخرب محیط‌زیست می‌باشند. استفاده از تکنیک‌هایی مانند گیاه‌پالایی^۱ که در مقایسه با تکنیک‌های دیگر دارای هزینه کمتر و دوست‌دار محیط‌زیست می‌باشند، اخیراً توسعه یافته است (Shutcha *et al.*, 2010). فعالیت ریشه‌ها و فرآیندهای ریزوسفری مرتبط می‌تواند به‌طور معنی‌داری بر حلالیت شیمیایی و زیست‌فراهمی عناصر غذایی و آلاینده‌ها در ریزوسفر اثر گذاشته و بنابراین یک نقش کنترلی مهمی را بر

فلزات سنگین از مهمترین آلاینده‌های زیست‌محیطی موجود در خاک هستند و سطوح سمی تعدادی از آنها مانند سرب، کادمیوم و مس می‌تواند در مناطق طبیعی و کشاورزی به دلیل فعالیت بشر ایجاد شود (Groppa *et al.*, 2007). در خاک، فلزات سنگین در شکل‌های شیمیایی مختلفی وجود دارند و به‌طور کلی در واکنش‌ها، رفتار شیمیایی و فیزیکی متفاوتی نشان می‌دهند. علاوه بر آن، تحرک، قابلیت جذب و مقدار سمیت آنها نیز متفاوت است. فلزات سنگین در خاک به‌صورت محلول، تبدالی، کمپلکس با مواد آلی، پیوسته به اکسیدهای آهن، منگنز و

EDTA ۰/۰۵ مولار، DTPA ۰/۰۰۵ مولار و یا آب ارزیابی می‌شود (Muhammad *et al.*, 2012).

تکنیک‌های عصاره‌گیری شیمیایی مرحله‌ای یا دنباله‌ای^۴ یک ابزار قدرتمند برای ارزیابی شکل‌های مختلف فلز فراهم می‌کند (Tessier *et al.*, 1979). اساس این روش‌ها متمایز کردن شکل‌های مختلف عنصر در فاز جامد خاک است. بر خلاف عصاره‌گیری تک مرحله‌ای، عصاره‌گیری دنباله‌ای، هم درباره شکل‌های شیمیایی متحرک فلز و هم در خصوص شکل‌های شیمیایی پایدارتر آن اطلاعاتی را فراهم می‌کند. لذا می‌توان میزان تحرک بالفعل و نیز بالقوه فلز را ارزیابی کرد. بنابراین شناسایی موقعیت‌های اصلی پیوند و ارتباط فلز با فازهای مختلف خاک به درک فرآیندهای ژئوشیمیایی برای ارزیابی پتانسیل تحرک فلز و خطرات مرتبط کمک می‌کند. روش‌های متعددی برای عصاره‌گیری متوالی یا دنباله‌ای در منابع ارائه شده است که از میان آنها روش تسبیح و همکاران و روش BCR مورد استفاده بسیاری از محققان قرار گرفته است (Wang *et al.*, 2002).

هدف از انجام این تحقیق بررسی تأثیر ارقام مختلف ترب و شلغم بر تغییرات بیوژئوشیمیایی مس در ریزوسفر با استفاده از گونه‌بندی این عنصر به روش عصاره‌گیر دنباله‌ای و چند عصاره‌گیر تک مرحله‌ای است. تعدادی از پارامترهایی که بر شکل‌های شیمیایی مس اثرگذار است مانند pH، کربن آلی محلول و جذب مس توسط گیاه نیز بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها

انتخاب نمونه خاک

یک خاک آلوده به مس از استان زنجان و نزدیک کارخانه روی‌سازان از عمق ۰-۲۰ سانتی‌متری تهیه (Kabata-Pendias, 2011)، هوا خشک و از الک دو میلی‌متری عبور داده شد. برخی از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک مانند بافت (Bouyoucos, 1962)، رطوبت ظرفیت مزرعه (Topp *et al.*, 1993)، ظرفیت تبادل کاتیونی (Blum *et al.*, 1996)، ماده آلی (Walkly and Loepfert and Suarez, 1934)، کربنات کلسیم معادل (Black, 1934)، عناصر کم‌مصرف قابل جذب (Lindsay and Norvell, 1978)، فسفر (Kuo, 1996) و پتاسیم قابل جذب (Helmke and Spark, 1996) اندازه‌گیری گردید. شکل‌های شیمیایی مس به روش عصاره‌گیری دنباله‌ای (Tessier *et al.*, 1979) (جدول ۱) و عصاره‌گیری تک مرحله‌ای (جدول ۲) مشخص گردید.

سرنوشت عناصر شیمیایی در اکوسیستم‌های خاکی بر عهده داشته باشند. ریزوسفر به‌طور معمول و عمومی به‌عنوان خاک احاطه‌کننده ریشه‌ها در نظر گرفته می‌شود که تحت تأثیر فعالیت ریشه قرار می‌گیرد. در اطراف ریشه‌ی جذب‌کننده ناحیه ای ایجاد می‌شود که در آن یون‌ها نسبت به توده‌ی خاک تخلیه^۱ (مثل NPK) و یا تجمع^۲ (مثل کلسیم) یافته و لذا منجر به اصلاح و تعدیل تبادلات شیمیایی بین اجزای معدنی خاک و محلول خاک می‌شود (Marschner and Romheld, 1983). فلزات مرتبط با کربنات‌ها، اکسیدها و مواد آلی با تغییر شرایط اسیدی، قلیائی و نیز اکسایش-کاهش می‌توانند آزاد شده و لذا تغییرات pH و Eh ایجاد شده توسط ریشه و ریز جانداران در ریزوسفر می‌تواند بر زیست‌فراهمی فلزات نادر تأثیرگذار باشند. به‌علاوه کاتیون‌های فلزی می‌توانند از طریق تشکیل کلات با کمپلکس‌کننده‌های آلی ترشح شده از ریشه گیاه یا ریز جانداران، آزاد و متحرک شده و یا روی ذرات باردار خاک جذب شوند (Wenzel, 2009).

مقادیر کل یک فلز در خاک می‌تواند وسعت آلاینده‌ی آن را نشان دهد ولی معرف خوبی از میزان سمیت فلز برای گیاه نخواهد بود. بنابراین در بسیاری از مطالعات اخیر شکل‌های فلز در خاک‌ها را بررسی می‌کنند (Wang and Chen, 2009). برای ارزیابی خطرات آلاینده‌ی یک فلز در یک منطقه، فهم و درک زیست‌فراهمی آن فلز (که خود بیشتر به شکل شیمیایی آن در ریزوسفر وابسته است تا به مقدار کل آن در خاک) ضروری است (Kidd *et al.*, 2009). حلالیت و زیست‌فراهمی فلزات مربوط به ویژگی‌های خاک از جمله pH، کمپلکس شدن با لیگاند‌های آلی محلول، Eh (پتانسیل ریداکس) می‌باشد (Tao *et al.*, 2003; Tao *et al.*, 2004). ریشه گیاه ۳۰ تا ۶۰٪ از کربن خالص فتوسنتز را دریافت می‌کند که حدود ۲۰ درصد را به صورت ترشحات^۳ به ریزوسفر آزاد می‌کند که می‌تواند در فراهمی عناصر مؤثر باشد (Hinsinger *et al.*, 2006). فراوانی ترکیبات آلی در ریزوسفر منجر به افزایش ریزجانداران می‌شود چرا که این مواد منبع عناصر غذایی و انرژی برای ریزجانداران محسوب می‌گردند (Grayston *et al.*, 1997). Fenn و Assadian (۱۹۹۹) دریافتند که مقدار مس محلول در ریزوسفر گیاه دائمی بیشتر از مقدار آن در توده خاک است. پتانسیل زیست‌فراهمی فلز در خاک به طور سنتی به وسیله عصاره‌گیرهای شیمیایی مثل نیترات آمونیم یک مولار، نیترات کلسیم ۵ میلی‌مولار،

1. Depletion
2. Accumulation
3. Rhizodeposition

آزمون گلخانه‌ای

گلدان‌های دو کیلوگرمی اضافه گردید. برای هر رقم تعداد چهار گلدان در نظر گرفته شد و در هر گلدان تعداد شش بذر کشت و پس از ۱۰ روز به سه گیاه کاهش داده شد. همچنین تعدادی گلدان نیز بدون کشت در نظر گرفته شد. گلدان‌ها در پاییز ۱۳۹۰ به مدت ۴۵ روز در گلخانه (گروه مهندسی علوم خاک) با دمای ۱۸-۲۱ درجه سلسیوس مقدار نور ۱۲۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. طول دوره روشنایی برای ترب و شلغم به ترتیب ۱۶ و ۱۳ ساعت بود. رطوبت خاک در طول دوره رشد به روش وزنی در حدود ظرفیت مزرعه نگهداری گردید. آزمایش به صورت طرح پایه کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد.

این آزمایش در سال ۱۳۸۹ در گلخانه‌های گروه خاکشناسی دانشگاه تهران انجام شد. به منظور انجام آزمون گلخانه‌ای تعداد سه رقم ترب (سفید، قرمز و سیاه) و دو رقم شلغم (N-135 و N-180) با توجه به سابقه کشت و سرعت رشد از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر ایران تهیه گردید. بذرها قبل از کشت ضد عفونی سطحی شدند. مقادیر ۰/۴ گرم در کیلوگرم KH_2PO_4 و NH_4NO_3 و همچنین ۰/۱۵ گرم در کیلوگرم سکوسترین آهن ۱۳۸ (بر اساس نتایج آزمون خاک) به خاک اضافه، به صورت یکنواخت درآورده و پس از خشک شدن خاک و عبور از الک دو میلی‌متری به مقدار ۱۸۰۰ گرم خاک به

جدول ۱. عصاره‌گیری دنباله‌ای به روش Tessier و همکاران (۱۹۷۹)

مرحله	جزء عصاره‌گیری شده	روش کار
F۱	تبادلی و محلول	۸ میلی‌لیتر محلول کلرید منیزیم ۱ مولار با پهاش ۷ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ ساعت تکان داده شد
F۲	کربناتی	۸ میلی‌لیتر محلول استات سدیم ۱ مولار با پهاش ۵ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ ساعت تکان داده شد
F۳	پیوند شده با اکسیدهای آهن و منگنز	۲۰ میلی‌لیتر هیدروکسیل آمین هیدروکلراید ۰/۰۴ مولار تهیه شده در اسید استیک ۲۵ درصد (v/v) با پهاش ۲ در دمای ۹۶ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت تکان داده شد
F۴	پیوند شده با ماده آلی	الف- ۳ میلی‌لیتر اسید نیتریک ۰/۰۲ مولار + ۵ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳۰ درصد در دمای ۸۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت تکان داده شد ب- ۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳۰ درصد در دمای ۸۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ ساعت تکان داده شد ج- ۵ میلی‌لیتر استات آمونیوم ۳/۲ مولار در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه تکان داده شد.
۵ F	باقیمانده	۷/۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۱۲ مولار + ۲/۵ میلی‌لیتر اسید نیتریک ۱۶ مولار در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۶ ساعت نگهداری، سپس به مدت ۲ ساعت تبخیر و تقطیر ملایم (gentle reflux) و در نهایت سرد و صاف شود (بدون سانتریفیوژ)

وزن نمونه خاک مرطوب ۱/۲ گرم کلیه سوسپانسیون‌ها پس از مرحله تکان دادن (Shaking) سانتریفیوژ و توسط سرنگ فیلتر شد (Wattman 0.45 μ m)

جدول ۲. عصاره‌گیرهای تک مرحله‌ای به کار رفته در این مطالعه

عصاره‌گیر	نسبت خاک به محلول	عنصر استخراج شده	منبع
نیترات آمونیوم مولار	نسبت ۱: ۲/۵ (v/w)	سرب و روی	(DIN, 1995)
نیترات کلسیم ۰/۰۰۵ مولار	نسبت ۱: ۵ (v/w)	سرب، روی، سدیم، پتاسیم، کلسیم و منیزیم	(Muhammad et al., 2012)
DTPA (پهاش ۷/۳) ۰/۰۰۵ مولار	نسبت ۱: ۵ (v/w)	سرب و روی	(Norvell, 1984)
کلرید باریم ۰/۱ مولار	نسبت ۱: ۲۰ (v/w)	سدیم، پتاسیم، کلسیم و منیزیم	(Blum et al., 1996)

تجزیه شیمیایی خاک و گیاه

جداسازی و به عنوان خاک ریزوسفری محسوب می‌شود و خاک خارج از محدوده ریشه به عنوان توده خاک^۱ در نظر گرفته می‌شود. این روش (تکان دادن ملایم ریشه) تفاوت‌هایی را در ویژگی‌های بیولوژیکی، فیزیکی و شیمیایی این دو خاک نشان

پس از ۴۵ روز شاخساره برداشت، پس از شستشو با آب معمولی در حمام اولتراسونیک با آب مقطر شستشو و وزن تر و خشک (۴۸ ساعت در دمای ۶۵ درجه سلسیوس) اندازه‌گیری شد. اغلب برای مطالعه ریزوسفر، پس از خارج کردن گیاه به همراه ریشه-های آن از خاک با تکان دادن ملایم، خاک اطراف ریشه

(Elan 9000 DRCE, Perkin Elmer) ICP-MS و (AA-670) غلظت مس و سایر عناصر کم مصرف اندازه گیری شد. غلظت کل مس در خاک بدون کشت با اضافه کردن ۱/۵ میلی لیتر اسید نیتریک ۶۹٪ و ۴/۵ میلی لیتر اسید کلریدریک ۳۷٪ به ۰/۵ گرم خاک نرم و یکنواخت شده اندازه گیری شد (Muhammad *et al.*, 2012). خاک های ریزوسفری و غیر ریزوسفری (بلافاصله بعد از جداسازی در حد رطوبت FC) به روش دنباله ای (جدول ۱) و تک مرحله ای با DTPA ۰/۰۰۵ مولار، NH_4NO_3 یک مولار و $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ پنج میلی مولار به منظور اندازه گیری شکل های شیمیایی مس عصاره گیری گردید (جدول ۲). به طور همزمان درصد رطوبت وزنی خاک نیز محاسبه گردید. همچنین pH، DOC (Brandstetter *et al.*, 1996)، غلظت کاتیون ها و آنیون- های محلول (هر سه به نسبت ۱:۵ (v/w) با $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ پنج میلی مولار) و ظرفیت تبادل کاتیونی با روش تک مرحله ای کلرید باریم در خاک ریزوسفری و غیر ریزوسفری اندازه گیری شد. نتایج بدست آمده با نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. مقایسه میانگین داده های آزمایشی با آزمون چند دامنه- ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد و Ttest برای مقایسه خاک ریزوسفری و غیر ریزوسفری استفاده شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده گردید.

1. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS)

داده است (Butler *et al.*, 2003). در این تحقیق به منظور جداسازی خاک ریزوسفری، ریشه ها از خاک خارج شده و بعد از چند تکان ملایم، خاک چسبیده به اطراف ریشه به عنوان خاک ریزوسفری از ریشه جدا گردید و خاک گلدان های کشت نشده (۴ گلدان) به عنوان خاک غیر ریزوسفری در نظر گرفته شد. همچنین جهت خارج کردن ریشه های ریز، خاک ریزوسفری به آرامی الک (قطر ۲ میلی متر) شد. ریشه های ریزی که از الک عبور کرده بودند تا حد امکان توسط پنس جدا شدند. پس از جداسازی خاک، کلیه ریشه ها (تا حد امکان) از درون گلدان جمع آوری، ابتدا با آب معمولی، سپس با CaCl_2 ۰/۰۵ مولار در حمام التراسونیک و در نهایت با آب مقطر شستشو شده و وزن تر و خشک ریشه تعیین شد. غلظت عناصر مس در ریشه و شاخساره به روش هضم تر اندازه گیری شد (Muhammad *et al.*, 2012). در این روش ۰/۲ گرم نمونه آسیاب شده گیاهی در داخل لوله هضم بلند قرار داده شد و سپس پنج میلی لیتر اسید نیتریک ۶۹٪ و یک میلی لیتر آب اکسیژنه ۳۰٪ اضافه شد و یک لوله شیشه ای دیگر تحت عنوان سردکننده بر لوله اول قرار داده شد. پس از یک شب ماندگاری تیوب ها روی یک گرم کننده در دمای بین ۶۵ تا ۱۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳/۵ ساعت، تیوب ها سرد شده، تکان (Vortex) داده شده، صاف شده و در نهایت با دستگاه جذب اتمی مجهز به کوره گرافیت (Shimadzu

جدول ۳. ویژگی های فیزیکوشیمیایی خاک مورد مطالعه

بافت	CEC	pH	EC	F.C	S.P	O.C	T.N.V	پتاسیم	فسفر	آهن	روی	منگنز	مس کل
	$\text{cmol}_c.\text{kg}^{-1}$		dS.m^{-1}	%				mg.kg^{-1}					
لوم	۱۳	۷/۷	۰/۷۲	۱۵/۵	۲۴	۰/۵	۱۳/۷	۳۴۳/۰	۸/۶	۲/۳	۲۸/۱	۶/۹	۲۰/۰

CEC: ظرفیت تبادل کاتیونی، SP: درصد رطوبت اشباع، O.C: کربن آلی، T.N.V: آهک معادل، F.C: ظرفیت مزرعه و E.C: قابلیت هدایت الکتریکی عصاره اشباع. مس، آهن، منگنز و روی، با استفاده از روش DTPA عصاره گیری شد.

نتایج و بحث

بالای ۷ دارد، درصد ناچیزی از مس در بخش کربناتی وجود دارد و بیشترین درصد مس به ترتیب مربوط به باقیمانده (۳۷/۱ درصد)، پیوند یافته با اکسیدهای آهن و منگنز (۳۴/۰ درصد) و همراه با مواد آلی (۲۴/۶ درصد) می باشد. Kabata-Pendias (۲۰۱۱) گزارش کرد در خاک هایی که توسط فعالیت های انسان آلودگی مس ایجاد شده است، بخش عمده مس همراه با اکسیدهای آهن و منگنز و همچنین مواد آلی می باشد. میانگین غلظت و جذب مس در ریشه و شاخساره ارقام مختلف ترب و شلغم پس از ۴۵ روز کشت در جدول (۴) نشان داده شده است. غلظت مس در شاخساره ارقام مختلف دو گیاه

ویژگی های فیزیکوشیمیایی خاک مورد نظر در جدول (۳) گزارش شده است. با توجه به غلظت کل مس اندازه گیری شده (۸۵/۵ میلی گرم در کیلوگرم خاک)، این خاک به عنوان یک خاک آلوده به مس محسوب می شود (Thayalakumaran *et al.*, 2003). با توجه به این که به طور معمول سهم شکل محلول و تبدالی مس در خاک های آهکی و pH بالا کم می باشد (Tao *et al.*, 2003)، مقدار مس محلول و تبدالی در این خاک ۴/۷ درصد می باشد که سهم قابل توجهی را به خود اختصاص داده است (شکل ۱). با توجه به اینکه خاک مورد آزمایش آهکی و pH

تفاوت معنی‌داری از نظر آماری نداشت. غلظت مس در ریشه ترب رقم ۱۳۲ با ۵۴۶/۲ میلی‌گرم در کیلوگرم تفاوت معنی‌داری با ارقام دیگر داشت. غلظت مس در ریشه هر دو گونه گیاه بیشتر از شاخساره بود که این توسط محققان مختلفی گزارش شده است (Chaignon *et al.*, 2002; Yu and Zhou, 2006). Kabata-Pendias (۲۰۱۱) گزارش کرد که متوسط غلظت مس در گیاهان زراعی بین ۵ تا ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم متغیر است. همچنین مقدار مس در اکثر گیاهانی که به عنوان علوفه استفاده می‌شوند کمتر از ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک گیاه می‌باشد در صورتی که این غلظت در تمامی ارقام ترب و شلغم بالاتر از حد گزارش شده است (European Commission, 2003) (جدول ۴). بالاتر بودن غلظت را می‌توان به بالا بودن شکل محلول و تبادلی در این خاک نسبت داد. شاخص انتقال $TF=C_{shoot}/C_{root}$ (Translocation Factor) نسبت غلظت عنصر در به غلظت عنصر در ریشه و فاکتور تجمع

تفاوت معنی‌داری از نظر آماری نداشت. غلظت مس در ریشه ترب رقم ۱۳۲ با ۵۴۶/۲ میلی‌گرم در کیلوگرم تفاوت معنی‌داری با ارقام دیگر داشت. غلظت مس در ریشه هر دو گونه گیاه بیشتر از شاخساره بود که این توسط محققان مختلفی گزارش شده است (Chaignon *et al.*, 2002; Yu and Zhou, 2006). Kabata-Pendias (۲۰۱۱) گزارش کرد که متوسط غلظت مس در گیاهان زراعی بین ۵ تا ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم متغیر است. همچنین مقدار مس در اکثر گیاهانی که به عنوان علوفه استفاده می‌شوند کمتر از ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک گیاه می‌باشد در صورتی که این غلظت در تمامی ارقام ترب و شلغم بالاتر از حد گزارش شده است (European Commission, 2003) (جدول ۴). بالاتر بودن غلظت را می‌توان به بالا بودن شکل محلول و تبادلی در این خاک نسبت داد. شاخص انتقال $TF=C_{shoot}/C_{root}$ (Translocation Factor) نسبت غلظت عنصر در به غلظت عنصر در ریشه و فاکتور تجمع

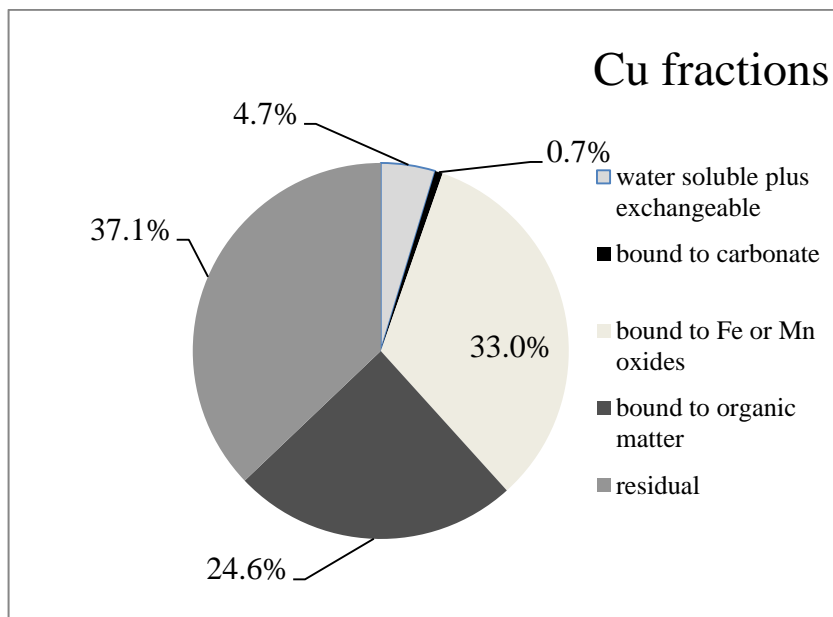
جدول ۴. متوسط غلظت و جذب مس در شاخساره و ریشه ارقام مختلف ترب و شلغم

جذب مس میلی‌گرم در گلدان	وزن خشک گرم در گلدان	غلظت مس میلی‌گرم در کیلوگرم	ارقام	
			رقم ۱۳۲	رقم ۲۴
۰/۷۱ ± ۰/۱۱ a	۱۰/۸ ± ۰/۲۲ a	۶۶/۴ ± ۵/۸ a	ترب رقم ۱۳۲	ترب رقم ۲۴
۰/۷۴ ± ۰/۰۳ a	۹/۴۸ ± ۰/۲۲ b	۷۸/۱ ± ۵/۳ a	شلغم رقم ۱۳۵	شلغم رقم ۱۸۰
۰/۶۲ ± ۰/۱۰۴ a	۸/۳۲ ± ۰/۲۴ c	۷۴/۳ ± ۴/۱ a	ترب رقم ۱۲۹	ترب رقم ۱۳۲
۰/۵۴ ± ۰/۰۳ a	۷/۴۱ ± ۰/۲۸ a	۷۳/۴ ± ۵/۵ a	ترب رقم ۱۳۲	ترب رقم ۲۴
۰/۵۸ ± ۰/۱۸ a	۷/۴۴ ± ۰/۴۹ a	۷۸/۴ ± ۰/۳۲ a	شلغم رقم ۱۳۵	شلغم رقم ۱۸۰
۰/۷۳ ± ۰/۰۶ b	۲/۲۳ ± ۰/۱۲ a	۳۲۶/۰ ± ۲۱/۱ b	ترب رقم ۱۲۹	ترب رقم ۱۳۲
۱/۴۲ ± ۰/۱۲ a	۲/۶۰ ± ۰/۱۲ a	۵۴۶/۲ ± ۲۱/۰ a	ترب رقم ۱۳۲	ترب رقم ۲۴
۰/۵۳ ± ۰/۰۶ c	۱/۷۸ ± ۰/۱۲ b	۲۹۷/۰ ± ۱۶/۱ b	شلغم رقم ۱۳۵	شلغم رقم ۱۸۰
۰/۹۳ ± ۰/۰۶ a	۳/۳۸ ± ۰/۱۴ a	۲۷۵/۰ ± ۱۱/۴ a	ترب رقم ۱۲۹	ترب رقم ۱۳۲
۰/۶۸ ± ۰/۰۴ b	۲/۴۵ ± ۰/۰۹ b	۲۷۸/۵ ± ۸/۳ a	شلغم رقم ۱۳۵	شلغم رقم ۱۸۰

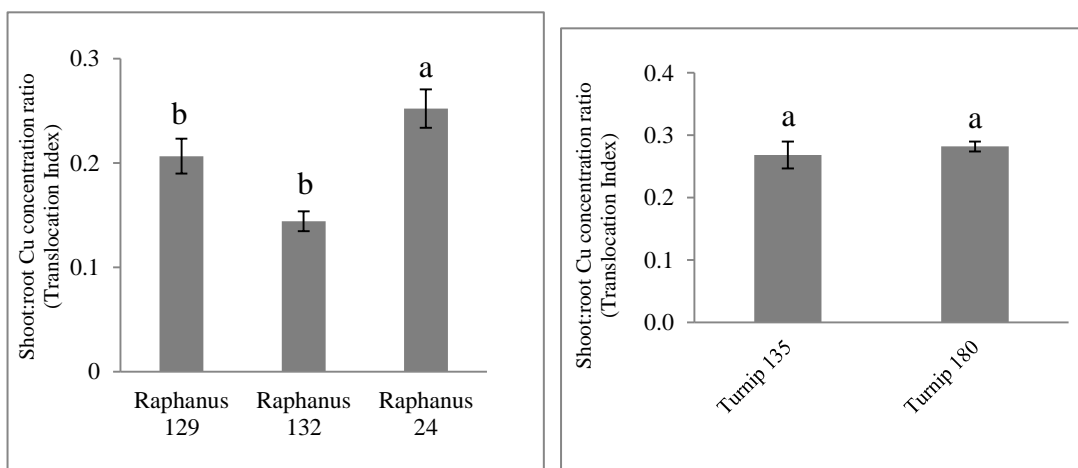
برای هرگونه گیاهی، در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشند از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند (آزمون LSD)

تغییرات pH خاک ریزوسفری در ارقام مختلف دو گونه گیاهی در شکل (۴) نشان داده شده است. ارقام مختلف ترب تغییر معنی‌داری در pH خاک ریزوسفری در مقایسه با خاک غیرریزوسفری ایجاد نکردند، درحالی که ارقام شلغم افزایش معنی‌داری در pH ایجاد کردند (Ttest p<5%). تغییرات pH و Eh ایجاد شده توسط ریشه و ریزجانداران در ریزوسفر می‌تواند بر زیست‌فراهمی فلزات نادر تأثیرگذار باشد (Wenzel, 2009). به عقیده Kochian *et al.* (2004) افزایش pH خاک ریزوسفر در

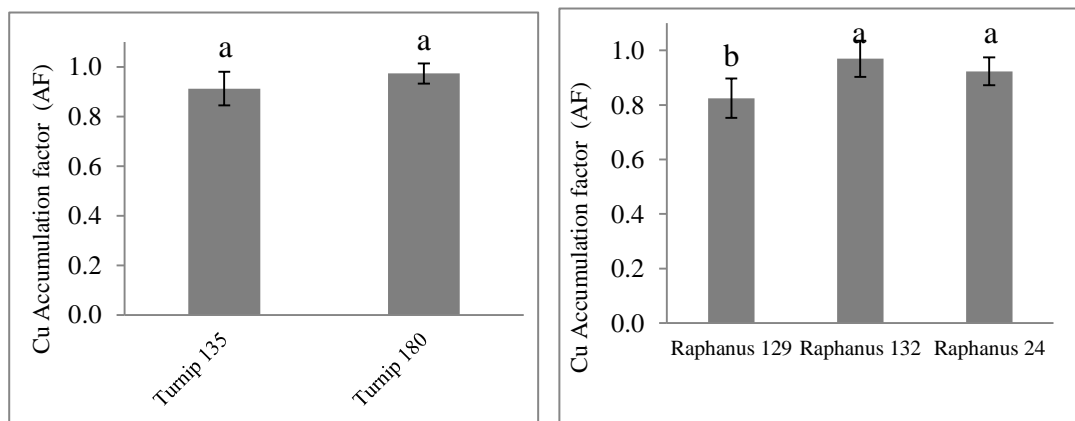
تغییرات pH خاک ریزوسفری در ارقام مختلف دو گونه گیاهی در شکل (۴) نشان داده شده است. ارقام مختلف ترب تغییر معنی‌داری در pH خاک ریزوسفری در مقایسه با خاک غیرریزوسفری ایجاد نکردند، درحالی که ارقام شلغم افزایش معنی‌داری در pH ایجاد کردند (Ttest p<5%). تغییرات pH و Eh ایجاد شده توسط ریشه و ریزجانداران در ریزوسفر می‌تواند بر زیست‌فراهمی فلزات نادر تأثیرگذار باشد (Wenzel, 2009). به عقیده Kochian *et al.* (2004) افزایش pH خاک ریزوسفر در



شکل ۱. شکل‌های مختلف شیمیایی مس شامل تبادلی و محلول، کربناتی، پیوندشده با اکسیدهای آهن و منگنز، پیوند شده با ماده آلی و باقیمانده در فاز جامد خاک غیر ریزوسفری



شکل ۲. شاخص انتقال مس در ارقام بررسی شده



شکل ۳. مقایسه فاکتور تجمع مس در ارقام بررسی شده شلغم (Turnip, ۱۳۵، ۱۸۰) و ترب (Raphanus, ۱۲۹، ۱۳۲، ۲۴)

بخش تبادلی و محلول با پتانسیل فراهمی زیاد (جدول ۵). مقدار جذب این عنصر در ارقام مختلف دو گیاه بین ۱/۴ تا ۱/۷ میلی‌گرم در گلدان متغیر بود. میزان مس تبادلی و محلول در خاک غیرریزوسفری حدود ۶/۸ میلی‌گرم در گلدان است که بیش از ۳ برابر مقدار جذب مس در ارقام مختلف دو گیاه می‌باشد (شکل ۶ و جدول ۵). محققان مختلفی نیز گزارش کردند با وجود اینکه ترشحات ریشه‌های ممکن است باعث افزایش تحرک فلز در ریزوسفر شود، الزاماً منجر به افزایش جذب فلز توسط گیاه نمی‌شود. علت عدم این افزایش می‌تواند ناشی از جذب کمپلکس لیگاند-فلز توسط گروه‌های عامل سطحی خاک باشد (Wenzel, 2009).

Chino و همکاران (۱۹۹۹) با استفاده از سیستم ریشه دان^۲ دریافتند که مس محلول در نزدیک ریشه افزایش می‌یابد. این در حالی بود که مقدار کل آن یا ثابت بود و یا تغییر کمی داشت. نتایج جدول (۵) نشان می‌دهد که شکل محلول و تبادلی در ریزوسفر افزایش پیدا کرده که با توجه به افزایش یا عدم تغییرات معنی‌دار pH در ریزوسفر (شکل ۴)، با تغییرات pH قابل توضیح نیست.

2. Rhizobox

همان طوری که شکل (۵) نشان می‌دهد، ارقام مختلف دو گیاه باعث افزایش معنی‌دار در میزان کربن آلی محلول در خاک ریزوسفری در مقایسه با خاک غیرریزوسفری شده‌اند (Ttest p<5%). این اختلاف معنی‌دار در DOC ناشی از ترشحات ریشه‌ای توسط این گیاهان می‌باشد. ریشه گیاه ۳۰ تا ۶۰٪ از کربن خالص فتوسنتز را دریافت می‌کند که حدود ۲۰ درصد را به صورت ترشحات^۱ به ریزوسفر آزاد می‌کند که می‌تواند در فراهمی عناصر مؤثر باشد (Hinsinger et al., 2006).

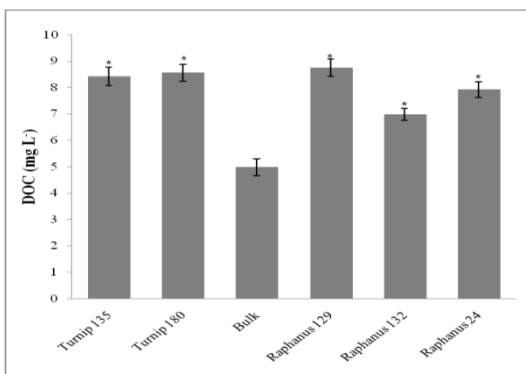
با توجه به جدول (۵) میزان مس تبادلی و محلول خاک ریزوسفری در ارقام مختلف دو گیاه افزایش معنی‌دار نشان داد، در حالی که بخش‌های کربناته و مس همراه با مواد آلی کاهش معنی‌داری را در مقایسه با خاک غیر ریزوسفری نشان داد (Ttest p<5%). افزایش مس تبادلی و محلول در مقایسه با میزان مس تبادلی و محلول در خاک غیرریزوسفری بیانگر نقش فرآیندهای ریزوسفری در افزایش فراهمی مس در ریزوسفر ارقام مختلف دو گیاه می‌باشد. روند کلی تغییر شکل‌های شیمیایی مس بیانگر تمایل سیستم خاک-ریشه به افزایش فراهمی مس در ریزوسفر می‌باشد؛ یعنی کاهش از بخش‌های کربناتی، مواد آلی و باقیمانده (با پتانسیل فراهمی متوسط تا کم) و افزایش به

1. Rhizodeposition

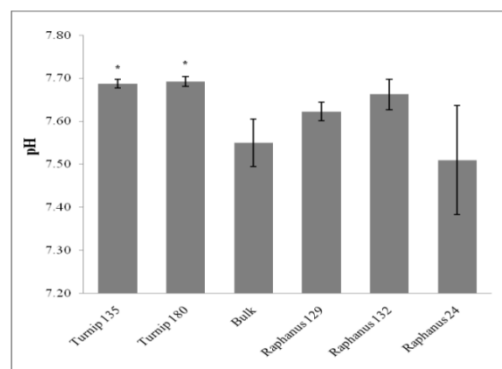
جدول ۵. مقایسه شکل‌های شیمیایی مختلف مس در ریزوسفر ارقام مختلف ترب و شلغم با خاک غیرریزوسفری (T-test)

۴F	۳F	۲F	۱F	ارقام
mg.kg⁻¹				
۱۵/۳ ^{**} ± ۰/۶۵	۳۱/۰ ± ۱/۴۴	۰/۴۵ [*] ± ۰/۰۱۷	۸/۵۰ ^{**} ± ۰/۳۹	ترب رقم ۱۲۹
۱۵/۹ ^{**} ± ۰/۶۰	۳۲/۲ ^{**} ± ۰/۸۸	۰/۴۵ [*] ± ۰/۰۱۹	۱۰/۲ ^{**} ± ۰/۷۲	ترب رقم ۱۳۲
۱۸/۱ ± ۱/۵۱	۳۳/۱ [*] ± ۲/۰۹	۰/۴۸ ± ۰/۰۲۷	۱۰/۵ ^{**} ± ۰/۶۵	ترب رقم ۲۴
۱۷/۵ [*] ± ۱/۰۵	۳۱/۴ ± ۱/۸۰	۰/۵۲ ± ۰/۰۱۲	۸/۸۳ ^{**} ± ۰/۳۲	شلغم رقم ۱۳۵
۲۳/۰ ± ۱/۲۴	۳۲/۷ [*] ± ۱/۶۶	۰/۵۱ ± ۰/۰۱۲	۱۰/۱ ^{**} ± ۰/۴۹	شلغم رقم ۱۸۰
۲۱/۴ ± ۰/۵۱	۲۷/۶ ± ۰/۵۸	۰/۵۳ ± ۰/۰۱۵	۴/۰۲ ± ۰/۳۱	خاک غیرریزوسفری

**= معنی‌دار بودن در سطح ۱ درصد، * = معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد (مقایسه خاک ریزوسفری در ارقام با خاک غیر ریزوسفری به روش T test)



شکل ۵. مقایسه تغییرات DOC در ریزوسفر ارقام بررسی شده شلغم و ترب در مقایسه با خاک غیر ریزوسفری (Ttest)



شکل ۴. مقایسه تغییرات pH در ریزوسفر ارقام بررسی شده شلغم و ترب در مقایسه با خاک غیر ریزوسفری (Ttest)

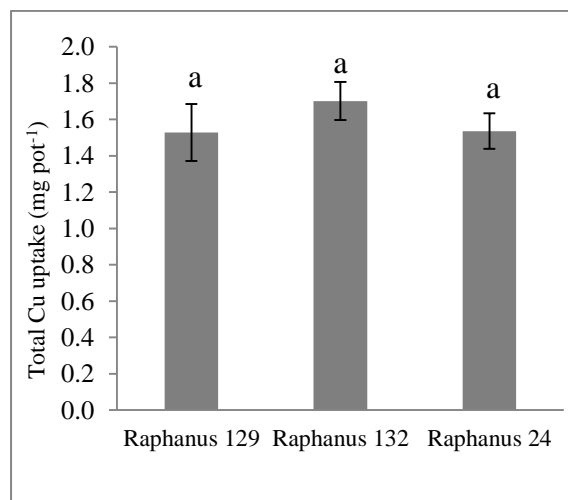
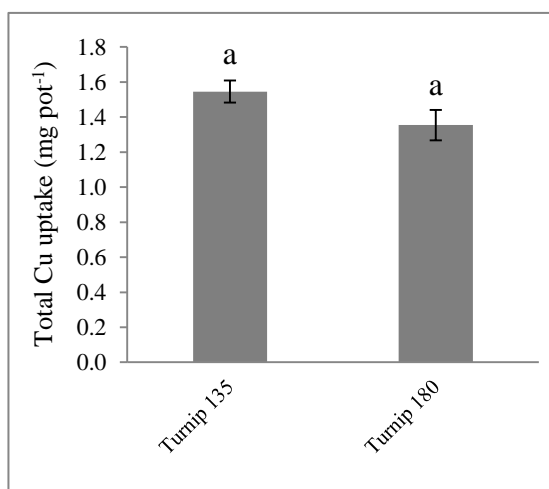
نشان داده در صورتی که انسان در افزایش آلودگی مس نقش داشته باشد، بخش عمده مس به شکل همراه با اکسیدهای آهن و منگنز و مواد آلی در می‌آید و کمتر در بخش کربناتی قرار می‌گیرد (Kabata-Pendias, 2011). از آنجا که این خاک از اطراف معادن گردآوری شده است، احتمالاً علت کم بودن بخش کربناتی به همین دلیل است. مقدار مس همراه با مواد آلی در اکثر ارقام دو گیاه کاهش داشت که در تعدادی از ارقام این کاهش معنی‌دار بود.

مقدار مس عصاره‌گیری شده با نیترات آمونیوم و نیترات-کلسیم در ریزوسفر تمامی ارقام افزایش معنی‌داری را در مقایسه با خاک غیرریزوسفری نشان داد، اما در مورد عصاره‌گیر DTPA این افزایش در ارقام ۲۴ و ۱۲۹ ترب معنی‌دار نبود. مقدار مس عصاره‌گیری شده توسط نیترات آمونیوم تقریباً ۶-۵ برابر مس عصاره‌گیری شده توسط نیترات کلسیم است (شکل‌های ۷، ۸ و ۹). مقادیر فلز قابل استخراج با نیترات آمونیوم یک مولار بسیار بالاتر از نیترات کلسیم ۵ میلی‌مولار است (معمولاً بیش از ۱۰ برابر). علت این تفاوت قدرت یونی بالای محلول نیترات آمونیوم در مقایسه با نیترات کلسیم می‌باشد، در این خاک سهم مس عصاره‌گیری شده توسط نیترات کلسیم (Soluble Cu) نسبتاً بالا است. نیترات آمونیوم یک مولار مناسب استخراج و عصاره‌گیری فلزات تبادلی و محلول می‌باشد، در صورتی که نیترات کلسیم به دلیل قدرت یونی پایین‌تر (مشابه محلول خاک) عمدتاً بخش محلول عنصر را استخراج می‌کند (Hammer and Keller, 2002).

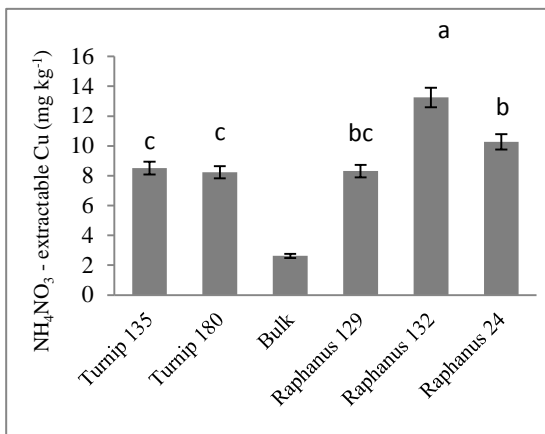
Hinsinger and Gilkes (1996) نشان دادند عدم تغییرات معنی‌دار pH در ریزوسفر نسبت به توده خاک به هیچ عنوان به معنی غیبت و عدم وقوع جریان‌های پروتونی^۱ در ریزوسفر نیست، به طوری که این پروتون‌ها ممکن است در طیف وسیعی از واکنش‌هایی که منجر به مصرف پروتون می‌شوند (مثل انحلال آهک و تبادل کاتیونی) شرکت داشته باشند و تحرک فلز را تحت تأثیر قرار دهند (بدون تغییر معنی‌دار pH). فراهمی فلز در ریزوسفر به برآیند شیب‌های بیوژئوشیمیایی pH، DOC، پتانسیل اکسید و احیا و غلظت فلز بستگی دارد (Hinsinger and Gilkes, 1996). یکی از پارامترهای مهم دیگر که علاوه بر pH بر فراهمی فلزات در ریزوسفر تأثیر می‌گذارد مقدار کربن آلی محلول است. گروهی از محققان گزارش کردند که تشکیل کمپلکس فلزاتی مانند مس، کادمیوم و روی با DOC با افزایش pH افزایش یافت (Christensen and Christensen, 2000). همچنین Reddy *et al.* (1995) گزارش کردند که بیش از ۹۰٪ مس در نزدیک pH برابر با ۷ به شکل کمپلکس شده با DOC است و مقدار شکل آزاد یون با افزایش pH به شدت کاهش می‌یابد. بنابراین در pH حدود ۷/۵ احتمال تشکیل کمپلکس‌های Cu-DOC و در نتیجه افزایش تحرک فلز در ریزوسفر بسیار زیاد است.

علیرغم آهکی بودن خاک مورد آزمایش، مقدار مس محلول و تبادلی چند برابر شکل مرتبط با آهک است. تحقیقات

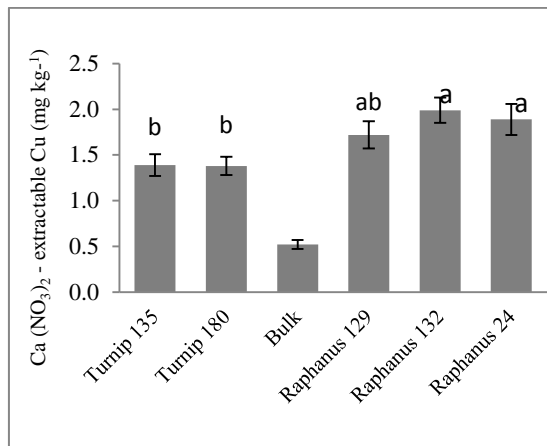
1. Efflux and Influx



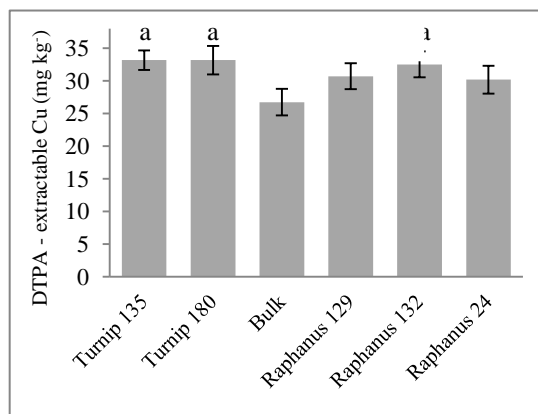
شکل ۶. مقدار جذب کل مس در ارقام بررسی شده شلغم (Turnip135, 180) و ترب (Raphanus24,132,129)



شکل ۸. مقدار مس قابل عصاره‌گیری با نیترات آمونیوم در ارقام مختلف شلغم Turnip و ترب Raphanus



شکل ۷. مقدار مس قابل عصاره‌گیری با نیترات کلسیم در ارقام مختلف شلغم Turnip و ترب Raphanus



شکل ۹. مقدار مس قابل عصاره‌گیری با DTPA در ارقام مختلف شلغم Turnip و ترب Raphanus

مقادیر استخراج شده توسط DTPA بسیار بالاتر از دو عصاره‌گیر قبلی می‌باشد. DTPA یک عامل کلات کننده‌ی قوی می‌باشد که می‌تواند فلزات را از فازهای مختلف ژئوشیمیایی شامل بخش‌های فلزی لبایل و غیر لبایل استخراج کند در صورتی که دو عصاره‌گیر قبل تنها بخش لبایل را استخراج می‌کنند (Chen et al., 2009).

همبستگی بین کربن آلی محلول، عصاره‌گیرهای مختلف و غلظت و جذب مس در گیاه تعیین شد. مس قابل استخراج توسط نیترات آمونیوم با غلظت کل مس ($r=0/59^{**}$) و جذب مس در گیاه ($r=0/54^{**}$) همبستگی مثبت و معنی‌داری نشان داد. مفید بودن هر عصاره‌گیر خاک برای پیش‌بینی زیست-فراهمی فلزات سنگین به توانایی آن عصاره‌گیر برای تخمین میزان فلز جذب‌شده و تجمع یافته در گیاهان بستگی دارد

همچنین مس قابل استخراج توسط مس در شاخساره ($r=0/58^{**}$) و غلظت کل مس توسط گیاه ($r=0/51^{**}$) همبستگی معنی‌داری نشان داد، در حالی که مس قابل استخراج با نیترات کلسیم با غلظت و جذب مس در کل گیاه و شاخساره ارقام مختلف همبستگی معنی‌داری نشان نداد. مقدار کربن آلی محلول با غلظت و جذب مس در شاخساره و غلظت و جذب کل مس در گیاه همبستگی منفی داشت و این همبستگی در غلظت ($r=-0/59^{**}$) و جذب ($r=-0/48^{*}$) کل مس در گیاه معنی‌دار بود. این نتایج بیانگر اثر منفی کربن آلی محلول در جذب مس می‌باشد. محققان مختلفی نیز گزارش کردند با وجود اینکه ترشحات ریشه‌ای ممکن است باعث افزایش تحرک فلز در ریزوسفر شود، الزاماً منجر به افزایش جذب فلز توسط گیاه نمی‌شود. علت عدم این

مقدار مس قابل استخراج با DTPA در ارقام مختلف شلغم Turnip و ترب Raphanus

خاک مانع از افزایش کلات‌های محلول فلز-ماده آلی سرب و مس در ریزوسفر می‌شود. این ترکیبات آلی ترشح شده توسط ریشه‌ها می‌تواند سریعاً توسط ذرات فاز جامد خاک جذب شوند.

سپاسگزاری

انجام این تحقیق با مساعدت قطب علمی بهبود کیفیت خاک برای تغذیه متعادل گیاه و همکاری پرفسور والتر ونزل (Walter Wenzel) و دکتر مارکوس پوشنرایتر (Markus Puschenreiter) ریاست و استاد گروه ریزوسفر در دانشکده خاکشناسی دانشگاه Bodenkulture اتریش و همچنین همکاری مؤسسه تحقیقات خاک و آب ایران جهت برخی آنالیزهای خاک و گیاه امکان‌پذیر بوده است که بدین‌وسیله از همکاری‌های علمی و اجرایی آنها تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

REFERENCES

- Blum, W.E.H., Spiegel, H. and Wenzel, W.W. (1996) Bodenzustandsinventur, Konzeption, Durchführung, Bewertung. (2nd ed.), Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Wien, pp. 56-59.
- Bouyoucos C.J. (1962) Hydrometer method improved for making particle-size analysis of soil. *Agronomy Journal*, 54, 464-465.
- Brandstetter, A., Sletten, R.S. Mentler, A., and Wenzel, W.W. (1996) Estimating dissolved organic carbon in natural waters by UV absorbance (254 Nm). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 159(6), 605-607.
- Butler, J.L., Williams, M.A. Bottomley, P.J., and Myrold, D.D. (2003) Microbial community dynamics associated with rhizosphere carbon flow. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(11), 6793-800.
- Chen, S., Sun, L. Chao, L. Zhou, Q., and Sun, T. (2009) Estimation of lead bioavailability in smelter-contaminated soils by single and sequential extraction procedure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82(1), 43-47.
- Chino, M., Goto, S. Youssef, R., and Miah, Y. (1999) Behavior of Micronutrients in the Rhizosphere. In: *Proceedings of the 5th Int. Conf. on the biogeochemistry of trace elements*, Vienna, Austria, 11-15 July.
- Christensen, J. and Christensen, T. (2000) The effect of pH on the complexation of Cd, Ni and Zn by dissolved organic carbon from leachate-polluted ground water. *Water Research*. 34 (15), 3743-3754.
- DIN 19730 (1995). Bodenbeschaffenheit, Extraktion von Spurenelementen mit Ammoniumnitratlösung. Deutsches Institut für Normierung. Beuth Verlag, Berlin.
- European Commission (2003). Opinion of the Scientific Committee for Animal Nutrition on the use of copper in feeding stuffs. Adopted on 19 February 2003.
- Fenn, L. B., and Assadian, N. (1999) *Can Rhizosphere Chemical Changes Enhance Heavy Metal Absorption by Plants Growing in Calcareous Soil?* In: *Proceedings of the 5th Int. Conf. on the biogeochemistry of trace elements*, Vienna, Austria, 11-15 July.
- Grayston, S. J., Vaughan, D., and Jones, D. (1997) Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with Annual Plants: The Importance of Root Exudation and Its Impact on Microbial Activity and Nutrient Availability. *Applied Soil Ecology*, 5(1), 29-56.
- Groppa, M.D., Tomaro, M.L. and Benarides, M.P. (2007) Polyamines and heavy metal stress: the antioxidant behavior of spermine in Cadmium and Copper treated wheat leaves. *Biometals*, 20, 185-195.
- Hammer, D., and Keller, C. (2002) Changes in the rhizosphere of metal accumulating plants evidenced by chemical extractants. *Journal of Environmental Quality*, 31, 1561-69
- Helmke P.H. and Spark D.L. (1996). Potassium. In D.L.Sparks, et al. Ed. *Methods of soil analysis*. P. 551-574. SSSA, Inc. ASA, Inc. Madison, WI.
- Hinsinger, P., and Gilkes, R. J. (1996) Mobilization of phosphate from phosphate rock and alumina-sorbed phosphate by the roots of ryegrass and clover as related to rhizosphere pH. *European Journal of Soil Science*, 47, 533-44.
- Hinsinger, P., Plassard, C., and Jaillard, B. (2006) Rhizosphere: A new frontier for soil biogeochemistry. *Journal of Geochemical Exploration*, 88(1-3), 210-213.
- Kabata-Pendias, A. (2011) *Trace Elements in Soils and Plants*. Fourth Edition. 505p.
- Kidd, P., Barceló, J., Bernal, M.P., Navari-Izzo, F., Poschenrieder, C., Shilev, S., Clemente, R., and

- Monterroso, C. (2009) Trace element behavior at the root-soil interface: implications in phytoremediation. *Environmental and Experimental Botany*, 67(1), 243-59.
- Kochian, L.V., Hoekenga, O.A., and Piñeros, M.A. (2004) How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 459-93.
- Kuo, S. (1996) Phosphorus. In D.L. Sparks *et al.* (Ed.), *Method of soil analysis*. P: 869-920. SSSA, Inc. ASA, Inc. Madison, WI.
- Lindsay W.L. and Norvell W.A. (1978) Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Science Society of America Journal*, 42, 421-428.
- Loeppert R.H. and Suarez D.L. (1996) Carbonate and Gypsum. In D.L. Sparks, *et al.* (Ed.), *Methods of Soil Analysis*. P: 437-474. SSSA, Inc. ASA, Inc. Madison, WI.
- Marschner, H., and V. Romheld. (1983) In vivo measurement of root-induced pH changes at the Soil-Root interface: effect of plant species and nitrogen source. *Z. Pflanzenphysiol* 111, 241-51.
- Martínez-Alcalá, I., Clemente R., and Bernal, M. P. (2009). Metal availability and chemical properties in the rhizosphere of *Lupinus Albus* L. growing in a high-metal calcareous soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 201(1-4), 283-93.
- McBride, M. B. (1981). *Forms and Distribution of Copper in Solid and Solution Phases of Soil.*" In In J. F. Loneragan, *et al.* (Ed.), *Copper in Soils and Plants*, P:25-45. Sydney, Australia: Academic Press.
- Muhammad, I., Puschenreiter, M., and Wenzel, W.W. (2012) Cadmium and Zn availability as affected by pH manipulation and its assessment by soil extraction, DGT and indicator plants. *Science of the Total Environment*, 416, 490-500.
- Norvell, W.A. (1984) Comparison of chelating agents as extractants for metals in diverse soil materials. *Soil Science Society of America Journal*, 48(6), 1285-92.
- Puschenreiter, M., Wiczorek, S., Horak, O., and Wenzel, W.W. (2003) Chemical changes in the rhizosphere of metal hyperaccumulator and excluder *Thlaspi* species. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 166(5), 579-84.
- Reddy, K.J., Wang, L. and Gloss, S.P. (1995) Solubility and mobility of copper, zinc and lead in acidic environments. *Plant and Soil*, 171, 53-58.
- Shutch, M.N., Mubemba, M.M., Faucon, M.P., Luhembwe, MN. Visser, M., Colinet, G. and Meerts, P. (2010) Phytostabilisation of copper-contaminated soil in katanga: an experiment with three native grasses and two amendments. *International Journal of Phytoremediation*, 2, 616-632.
- Sposito, G., L. Lund, J. and Chang, A.C. (1982). Trace Metal chemistry in arid-zone field soils amended with sewage sludge: I. Fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd, and Pb in solid phases. *Soil Science Society of America Journal*, 46, 260-64.
- Tao, S., Chen, Y.J., Xu, F.L., Cao, J., and Li, B.G. (2003). Changes of copper speciation in maize rhizosphere soil. *Environmental Pollution*, 122(3), 447-54.
- Tao, S., Liu, W.X., Chen, Y.J., Xu, F.L., Dawson, R.W., Li, B.G., Cao, J. (2004) Evaluation of factors influencing root-induced changes of copper fractionation in rhizosphere of a calcareous soil. *Environmental Pollution*, 129(1), 5-12.
- Tessier, A., Campbell, P.G.C., and Blsson, M. (1979) Sequential extraction procedure for the speciation of particulate traces metals. *Analytical Chemistry*, 51(7), 844-51.
- Thayalakumaran, I., Scotter, D.R., Percival, H.J., Robinson, B.H. and Clothier, B.E. (2003) Leaching of copper from contaminated soil following the application of EDTA. I. Repacked soil experiments and a model. *Australian Journal of Soil Research*, 41, 323-333.
- Topp G.C., Galynou B.C., Ball B.C. and Carter M.R. (1993) *Soil water adsorption curve*. P: 569-579. In Carter (ed) M.R. *Soil sampling and methods of analysis*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Walkly A., and Black I.A. (1934) Examination of the degtjareff method determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 34, 29-38
- Wang, J. and Chen, C. (2009) Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*. 27, 195- 226.
- Wang, Z., Shan, X. Q., and Zhang, S. (2002) Comparison between Fractionation and Bioavailability of Trace Elements in Rhizosphere and Bulk Soils. *Chemosphere* 46(8), 1163-71.
- Wenzel, W.W. (2009) Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant and Soil*, 321(1-2), 385-408.
- Yu, Y., and Zhou, Q. X. (2006). Impacts of soybean growth on Cu speciation and distribution in two rhizosphere soils. *Biology and Fertility of Soils*, 42(5), 450-56.