نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 30، شماره 6، بهمن – اسفند 1395، ص. 2045-2032

Journal of Water and Soil
Vol. 30, No. 6, Jan.-Feb. 2017, p. 2032-2045

اثر کاربرد EDTA و اسیدسیتریک بر تغییرات فعالیت آنزیمی خاک، تنفس میکروبی برانگیخته و فراهمی سرب در خاک

سیدسجاد حسینی[1]- امیر لکزیان[2*]- اکرم حلاج نیا[3]

تاریخ دریافت: 1394/08/16
تاریخ پذیرش: 1395/02/08

چکیده

افزودن EDTA به عنوان یک عامل کلات کننده به خاک‌های آلوده به فلزات سنگین ممکن است فراهمی و استخراج گیاهی فلزات را از خاک افزایش دهد اما می‌تواند اثرات منفی بر ویژگی‌های بیولوژیکی خاک داشته باشد. به منظور بررسی اثر کاربرد EDTA و اسید سیتریک بر فراهمی سرب، فعالیت دهیدروژناز، اوره‌آز و فسفومونواستراز قلیایی و همچنین تنفس میکروبی برانگیخته (SIR)، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل و سه تکرار در شرایط گلخانه اجرا گردید. تیمارهای آزمایش شامل EDTA و اسید سیتریک در دو سطح 3 و 5 میلی‌مول بر کیلوگرم به همراه شاهد و زمان (7، 14، 21 و 28 روز) بودند. نتایج نشان داد که به طور میانگین تیمارهای EDTA3 و EDTA5 به ترتیب سبب افزایش 2/17 % و 10 % غلظت فراهم سرب نسبت به شاهد شدند. این در حالی است که بررسی اثر زمان نشان داد که فراهمی سرب برای تیمار EDTA3 در زمان 28 در مقایسه با اولین زمان نمونه‌برداری (روز هفتم) 12/3 % کاهش یافت در حالی که برای تیمار EDTA5 تغییر معنی‌داری در طی زمان مشاهده نشد. همچنین به طور میانگین تیمارهای CA3 و CA5 به ترتیب سبب کاهش 8/3 % و 15/7 % غلظت فراهم سرب نسبت به شاهد شدند به طوری‌که در آخرین زمان نمونه‌برداری فراهمی سرب به ترتیب 15/9 % و 12/8 % نسبت به اولین زمان کاهش پیدا کرد. نتایج نشان دهنده اثر منفی EDTA بر فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز و اوره‌آز خاک بود. از طرف دیگر افزودن اسیدسیتریک اثر مثبتی بر فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز، اوره‌آز و فسفومونواستراز قلیایی خاک داشت. در تمام تیمارها به جز تیمار شاهد فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه با گذشت زمان افزایش پیدا کرد که این افزایش در تیمارهای اسید سیتریک بیشتر بود. افزودن EDTA و اسیدسیتریک مقدار SIR خاک را در همه زمان‌های مورد مطالعه افزایش دادند که این افزایش برای تیمارهای اسیدسیتریک بیشتر از EDTA بود.

واژه‌های کلیدی: اسیدسیتریک، سرب، فعالیت آنزیم، EDTA، SIR

مقدمه

سمیت فلزات سنگین به طور منفی بر کیفیت بیولوژیکی خاک، رشد گیاه و سلامت انسان اثر می‌گذارد. سرب عمدتاً در خاک‌های آلوده شده توسط ضایعات معدنی و فعالیت‌های کشاورزی و صنعتی در سراسر جهان یافت می‌شود. گیاه‌پالایی به عنوان روشی جدید، مقرون به صرفه و بسیار امید بخش برای پاکسازی خاک‌های آلوده مورد بررسی قرار گرفته است (36). هرچند کارایی این روش اصلاحی به دلیل حلالیت و آزادسازی کم فلزات سنگین به ویژه سرب در خاک و درنتیجه جذب محدود آنها به وسیله گیاه می‌تواند کم باشد. از این‌رو گیاه‌پالایی به کمک عوامل کلات کننده یا استفاده از کلات‌های شیمیایی از قبیل EDTA[4] در جهت افزایش مصنوعی حلالیت فلزات سنگین در خاک و بنابراین افزایش فراهمی آنها برای گیاه پیشنهاد شده است (9 و 32).

EDTA یکی از قویترین کلات کننده فلزات بوده و به شدت بر روی گونه‌بندی شیمیایی فلزات و متعاقباً تحرک، حلالیت و فراهمی زیستی آنها در فاز محلول خاک تأثیرگذار است (28). پژوهش‌ها نشان داده است که EDTA می‌تواند سرب را از بخش‌های مختلف خاک بخصوص اکسیدهای آهن و منگنز و مواد آلی خاک آزاد کند (34). در واقع زمانی که EDTA به خاک افزوده می‌شود به دلیل ثابت کمپلکس‌کنندگی بالای EDTA با سرب (pK=17/8)، تشکیل کمپلکس‌های سرب با EDTA تعادل رسوب و جذب را به سمت

1، 2 و 3- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: (Email: alakzian@yahoo.com
DOI: 10.22067/jsw.v30i6.50232

4- Ethylenediaminetetraacetic acid

Archive of SID
www.SID.ir

افزایش حلالیت سرب در خاک تغییر می‌دهد (39). وو و همکاران (39) و ناسکیمنتو (23) به ترتیب افزایش 600 و 217 برابری غلظت سرب در محلول خاک را به وسیله EDTA گزارش کردند.

فلزات به صورت محلول در خاک نسبت به زمانی که به صورت کمپلکس با ترکیبات آلی یا اکسیدهای آهن و منگنز در خاک هستند، اثر سمی بیشتری برای ریزجانداران خاک دارند (41). همچنین EDTA و کمپلکس‌های EDTA با فلز تجزیه‌پذیری زیستی، نوری و شیمیایی کم و حلالیت و سمیت زیادی در محیط خاک دارند و ممکن است برای چندین ماه در خاک باقی بمانند (27). ژانگ و همکاران (42) گزارش کردند که EDTA برای تشکیل کمپلکس با فلزات سنگین اختصاصی عمل نمی‌کند و در معرض واکنش‌های متعددی با دیگر کاتیون‌های حاضر در خاک قرار دارد و از این طریق می‌تواند اثر سوء بر ویژگی‌های شیمیایی خاک (مثل تغییر در وضعیت عناصر غذایی پرمصرف و کم‌مصرف) داشته باشد. بنابراین این نگرانی مطرح می‌شود که EDTA نمی‌تواند گزینه مناسبی برای گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به سرب باشد. بنابراین امروزه توجه به اسیدهای آلی با وزن مولکولی کم (LMWOAs)[1] افزایش پیدا کرده است زیرا این اسیدهای آلی تجزیه‌پذیری بالا، سمیت کمتر و همچنین از قدرت کلات‌کنندگی بالایی برخوردار هستند و در نتیجه اثرات سوء کمتری برای محیط زیست دارند. در میان اسیدهای آلی، اسیدسیتریک ضمن تشکیل کمپلکس‌های تجزیه‌پذیر با فلزات سنگین (28) به طور قابل توجهی حلالیت و جذب فلزات را به وسیله گیاه افزایش می‌دهد (7) و می‌تواند به طور غیر مستقیم فعالیت میکروبی خاک و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی ریزوسفر را بهبود بخشد (39).

در این میان ریزجانداران خاک اولین موجودات زنده‌ای هستند که اثرات منفی آلاینده‌ها را تجربه می‌کنند و می‌توان از تنوع و جمعیت آنها به عنوان شاخصی برای ارزیابی درجه آلودگی محیط زیست استفاده کرد (35). در طی سال‌های گذشته پژوهشگران زیادی به بررسی اثر کاربرد کلات‌ها بر ریزجانداران خاک پرداخته اند (20، 35 و 36) الترا و همکاران (35) گزارش کردند که EDTA فعالیت میکروبی و مصرف سوبسترا را کاهش داد. مولباچوا (20) نشان داد که کاربرد EDTA فعالیت میکروبی خاک را به طور قابل توجهی کاهش می‌دهد. عثمان و همکاران (36) گزارش کردند که افزودن EDTA و NTA[2] به خاک، تنفس میکروبی، DOC[3](کربن آلی محلول) و فراهمی فلزات سنگین را افزایش و کربن بیومس میکروبی و معدنی شدن نیتروژن را کاهش می‌دهد. اما اطلاعات کمی در مورد اثر این کلات‌ها بر فعالیت آنزیم‌های خاک وجود دارد. فعالیت آنزیم‌های خاک ممکن است شاخص مناسبی از کیفیت خاک باشد زیرا این ویژگی‌ها پویاتر و اغلب حساس‌تر از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک هستند و می‌توانند شرایط محیطی را منعکس کنند (36). ریزجانداران خاک منبع اصلی آنزیم‌ها در خاک هستند، و با وجود مقدار نسبتا کم آنزیم‌ها در خاک نقش اساسی در چرخه عناصر غذایی اصلی در خاک دارند.

با توجه به موارد گفته شده پژوهش حاضر با هدف بررسی تغییرات فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز، اوره‌آز، فسفومونواستراز قلیایی و SIR[4] بعد از افزودن EDTA و اسید سیتریک به خاک آلوده به سرب و همچنین بررسی تغییرات فراهمی سرب بعد از افزودن EDTA و اسید سیتریک و رابطه آن با فعالیت آنزیم‌های خاک و SIR انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

خاک مورد مطالعه از عمق 20-0 سانتی‌متری یک نوع خاک با رده‌بندی *Typic haplocalsids* واقع در منطقه مشهد جمع‌آوری و پس از هوا خشک شدن و عبور از الک 2 میلی‌متری جهت آنالیزهای اولیه به آزمایشگاه منتقل گردید. pH خاک با استفاده از دستگاه pH متر در گل اشباع، قابلیت هدایت الکتریکی در عصاره گل اشباع توسط دستگاه هدایت سنج الکتریکی، کربن آلی به روش والکلی- بلاک (38)، نیتروژن کل به روش کجلدال (2)، فسفر فراهم خاک به روش اولسن و سامرز (25)، پتاسیم قابل دسترس به روش استات آمونیوم (3)،کربنات کلسیم معادل به روش تیتراسیون برگشتی (15)، رطوبت ظرفیت مزرعه به روش گلدانی و بافت خاک به روش هیدرومتری (8) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین به منظور آگاهی از آلودگی اولیه خاک به سرب مقدار کل سرب خاک با روش هضم به وسیله تیزاب سلطانی (مخلوط اسید نیتریک و اسید کلریدریک) تعیین شد (18).

در مرحله بعد خاک با سرب با غلظت 500 میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک از منبع کلرید سرب به صورت جامد آلوده شد. برای اینکه خاک آلوده شده به تعادل برسد، به وسیله آب مقطر تا 70% ظرفیت مزرعه مرطوب و برای یک ماه در این حد رطوبتی ثابت نگه داشته شد. پس از یک ماه خاک‌ها هوا خشک شدند و پس از کوبیدن به گلدان‌های 4 کیلویی منتقل شدند و برای دو ماه در گلخانه در 70 % ظرفیت مزرعه و دمای 20 درجه سانتی‌گراد نگه داشته شدند.

پس از این مدت 5 تیمار مورد نظر که شامل بدون کلات (شاهد)، کلات EDTA به مقدار 3 میلی‌مول در کیلوگرم خاک (EDTA3)، کلات EDTA به مقدار 5 میلی‌مول در کیلوگرم خاک (EDTA5)، اسیدسیتریک به مقدار 3 میلی‌مول در کیلوگرم خاک (CA3) و

1- Low Molecular Weight Organic Acids
2- Nitrilotriacetic acid
3- Dissolve organic carbon
4- Substrate-Induced Respiration

Archive of SID

www.SID.ir

اسیدسیتریک به مقدار 5 میلی‌مول در کیلوگرم خاک (CA5) به صورت محلول در یک حجم مشخص به گلدان‌ها اضافه شد. نمونه‌های خاک به مدت یک ماه در شرایط گلخانه در دمای 20 درجه سانتی‌گراد و رطوبت 70 % ظرفیت مزرعه انکوباسیون شدند. در زمان‌های 7، 14، 21 و 28 روز پس از اضافه کردن کلات‌ها جهت آنالیزهای بیولوژیکی و شیمیایی از خاک گلدان‌ها نمونه‌برداری شد. نمونه‌های خاک جهت آنالیزهای بیولوژیکی از الک 2 میلی‌متری عبور داده شد و تا زمان اندازه‌گیری در یخچال در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. همچنین جهت آنالیزهای شیمیایی نمونه‌های خاک پس از هوا خشک شدن از الک 2 میلی‌متری عبور داده شد.

برای اندازه‌گیری فعالیت اوره‌آز از روش طباطبایی و برمنر (31)، فعالیت فسفومونواستراز قلیایی از روش طباطبایی و برمنر (30) و فعالیت دهیدروژناز خاک از روش اصلاح‌شده تالمان (33) استفاده شد. برای اندازه‌گیری SIR از روش توضیح داده شده توسط آلف و نانی‌پیری (1) استفاده شد. همچنین برای تعیین مقدار سرب فراهم خاک از روش لیندزی و نورول (14) استفاده شد.

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل در 3 تکرار انجام گرفت. تجزیه آماری داده‌ها با نرم افزار JMP مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال 5 درصد و رسم نمودارها در محیط Excel انجام گرفت.

نتایج و بحث

برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک در جدول 1 آورده شده است. نتایج آزمایش‌های خاک نشان داد که بافت خاک مورد مطالعه لوم و غلظت اولیه سرب در خاک 25/55 میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک بود. pH آن در محدوده خاک‌های خنثی، و کمی شور و کربنات کلسیم معادل 14 درصد و خاک از نظر کربن آلی و عناصر غذایی ضروری در سطح ضعیفی قرار داشت.

جدول 1- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه

Table 1- Some physical and chemical properties of studied soil

بافت خاک Soil texture	آهک Calcium carbonate (%)	کربن آلی Organic carbon (%)	پتاسیم Potassium (mg kg^{-1})	فسفر Phosphorus (mg kg^{-1})	نیتروژن Nitrogen (mg kg^{-1})	سرب کل Total lead (mg kg^{-1})	EC (dS m^{-1})	pH (-)	FC (%)
لوم Loam	14.06	0.195	100.51	11.25	315	25.55	2.52	7.4	24

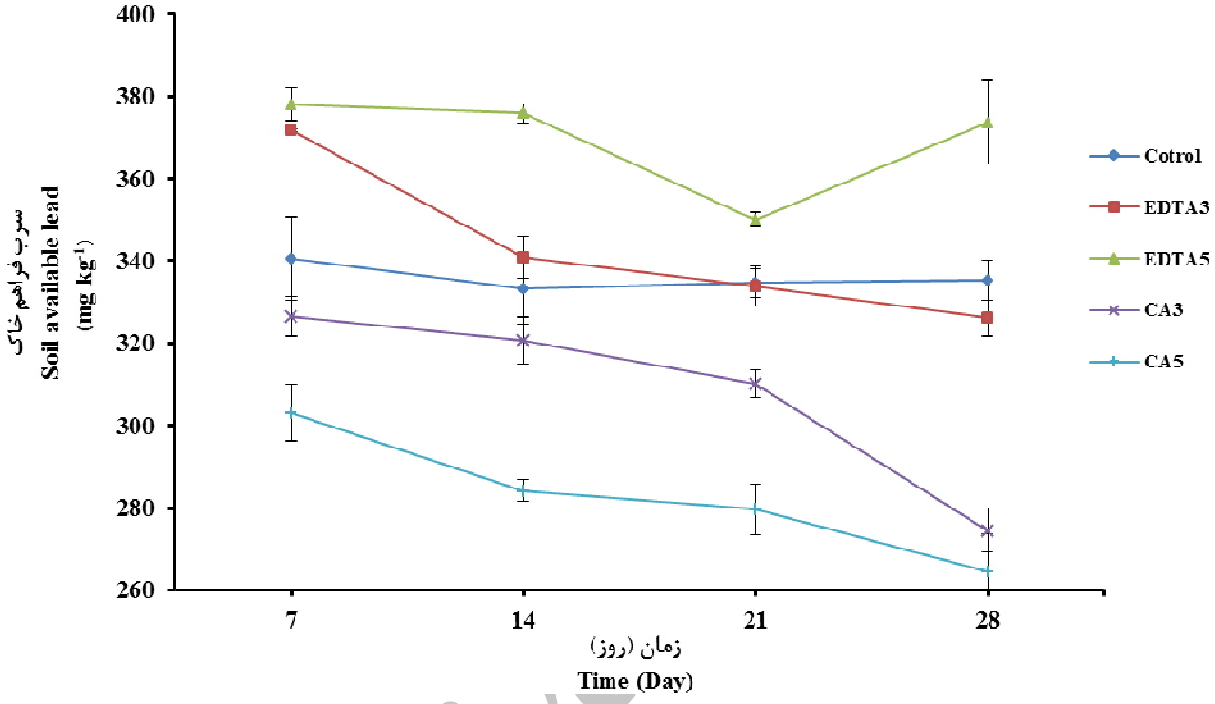
نتایج نشان داد که کاربرد کلات‌ها سبب تغییر معنی‌داری در غلظت سرب فراهم خاک نسبت به تیمار شاهد شد (شکل 1). به طوری‌که کاربرد EDTA سبب افزایش غلظت سرب فراهم خاک شد ولی برخلاف انتظار کاربرد اسیدسیتریک غلظت سرب فراهم خاک را کاهش داد. بالاترین مقدار غلظت سرب فراهم خاک مربوط به تیمار EDTA5 در روز هفتم و کمترین مقدار آن مربوط به تیمار CA5 در روز 28م بود. نتایج نشان داد که با افزایش سطح EDTA غلظت سرب فراهم خاک افزایش یافت ولی در مورد اسیدسیتریک این روند برعکس بوده به طوری‌که با افزایش سطح اسیدسیتریک غلظت سرب فراهم خاک کاهش پیدا کرد (شکل 1). نتایج نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین سطوح EDTA و همچنین سطوح اسیدسیتریک است.

پژوهش‌های زیادی نشان داده‌اند که کاربرد کلات‌های شیمیایی از قبیل EDTA غلظت سرب فراهم خاک را افزایش می‌دهد (17 و 40). بسیاری از پژوهش‌ها افزایش چند برابری غلظت سرب فراهم خاک نسبت به شاهد را در اثر کاربرد EDTA گزارش کردند (40). به هر حال در این پژوهش هر چند EDTA غلظت سرب را افزایش داد ولی در مقایسه با سایر پژوهش‌ها از کارایی کمتری برخوردار بود. وو و همکاران (40) گزارش کردند که کاربرد 3 میلی‌مول در کیلوگرم از کلات EDTA در یک خاک آلوده به سرب (500 میلی‌گرم سرب در کیلوگرم خاک) حلالیت سرب را 6 برابر نسبت به شاهد افزایش داد در حالی که در این پژوهش کاربرد همین سطح از EDTA سبب افزایش تنها 0/09 برابر غلظت سرب فراهم نسبت به شاهد در روز هفتم شد. همچنین لو و همکاران (17) گزارش کردند که افزودن 5 میلی‌مول در کیلوگرم EDTA به یک خاک آلوده به فلزات سنگین حلالیت سرب را 496 برابر نسبت به شاهد افزایش داد. خاک سیستم پیچیده‌ای است و عوامل گوناگونی می‌توانند کارایی EDTA را تحت تأثیر قرار دهند. به هر حال در این پژوهش احتمالاً بالا بودن غلظت سرب فراهم در خاک قبل از افزودن EDTA سبب شده است که مقدار کمتری سرب به وسیله EDTA وارد فاز محلول شود. همچنین برخی پژوهش‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

نشان داده‌اند که در pH های بالای 6 کارایی EDTA برای افزایش حلالیت سرب به دلیل حضور کلسیم تا 50 % کاهش می‌یابد (17). مرس و همکاران (19) بیان کردند اگرچه کلسیم نسبت به سرب کمپلکس‌های ضعیف‌تری با EDTA تشکیل می‌دهد (Log $K_{Ca-EDTA}$= 10/6 و Log $K_{Pb-EDTA}$= 17/8) ولی این ثابت تشکیل کمتر برای کلسیم، می‌تواند به وسیله غلظت بیشتر آن در خاک جبران شود. پاپاسیوپی و همکاران گزارش کردند که در خاک‌های آهکی آلوده به فلزات سنگین، تشکیل کمپلکس‌های کلسیم با EDTA بیشتر از کمپلکس‌های فلز با EDTA می‌باشد.



شکل 1- تغییرات غلظت فراهم سرب در اثر کاربرد EDTA و اسیدسیتریک با گذشت زمان انکوباسیون

Figure 1- The effects of EDTA and citric acid on concentration of available lead with incubation time

بر خلاف نتایج ما پژوهشگران گزارش نمودند که اسیدسیتریک می‌تواند غلظت فلزات سنگین و حتی اورانیوم را در محلول خاک افزایش دهد (6 و 7). هرچند اکثر پژوهش‌ها نشان دادند که اسیدسیتریک در مقایسه با EDTA به دلیل ثابت تشکیل کمتری که با سرب دارد، کارایی کمتری در افزایش حلالیت سرب در خاک دارد (6). به هرحال ثابت تشکیل نمی‌تواند کارایی کمتر اسیدسیتریک در مقایسه با آب مقطر را در این پژوهش توضیح دهد. بررسی‌ها نشان داد اسیدسیتریک در غلظت‌های کم مثل غلظت‌های استفاده شده در این پژوهش نمی‌تواند غلظت سرب فراهم خاک را افزایش دهد (40) ولی در غلظت‌های زیاد مثل 10 و 40 میلی‌مول در کیلوگرم خاک اثر قابل توجهی بر غلظت سرب فراهم در خاک دارد (7). فاین و همکاران (6) بیان کردند با افزایش غلظت اسیدسیتریک حلالیت فلزات افزایش یافت و در غلظت‌های کم اسیدسیتریک خیلی مؤثر نبود. از طرف دیگر به دلیل تجزیه‌پذیری بالای اسیدسیتریک در خاک و در نتیجه نیمه عمر کم آن (1/5 تا 5/7 روز) اثر آن در افزایش حلالیت فلزات محدود به ساعات اولیه و روز اول بعد از کاربرد اسیدسیتریک می‌باشد (4). چراکه فلزاتی که در ابتدا به وسیله اسیدسیتریک به محلول خاک آورده می‌شوند به دلیل تجزیه سریع اسیدسیتریک مجدداً رسوب کرده یا روی سطح ذرات جذب می‌شود (4). پس اگر افزایشی هم در غلظت سرب در محلول خاک در اثر کاربرد اسیدسیتریک اتفاق افتاده مربوط به روزهای اول افزودن اسیدسیتریک می‌شود در صورتی که در این پژوهش غلظت فراهم سرب 7 روز بعد از کاربرد اسیدسیتریک در خاک اندازه‌گیری شد.

بررسی روند تغییرات غلظت سرب فراهم خاک با زمان (شکل 1) نشان داد که در تیمار شاهد غلظت سرب فراهم با گذشت زمان انکوباسیون تقریبا ثابت و تفاوت معنی‌داری در زمان‌های مختلف مشاهده نشد. با توجه به مقدار کل سرب در خاک (500 میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) در تیمار شاهد در کل مدت انکوباسیون نزدیک به 67 % سرب به صورت فراهم بود. همچنین در تیمار EDTA5 غلظت سرب فراهم در ابتدا و انتهای مدت انکوباسیون تفاوت معنی‌داری

Archive

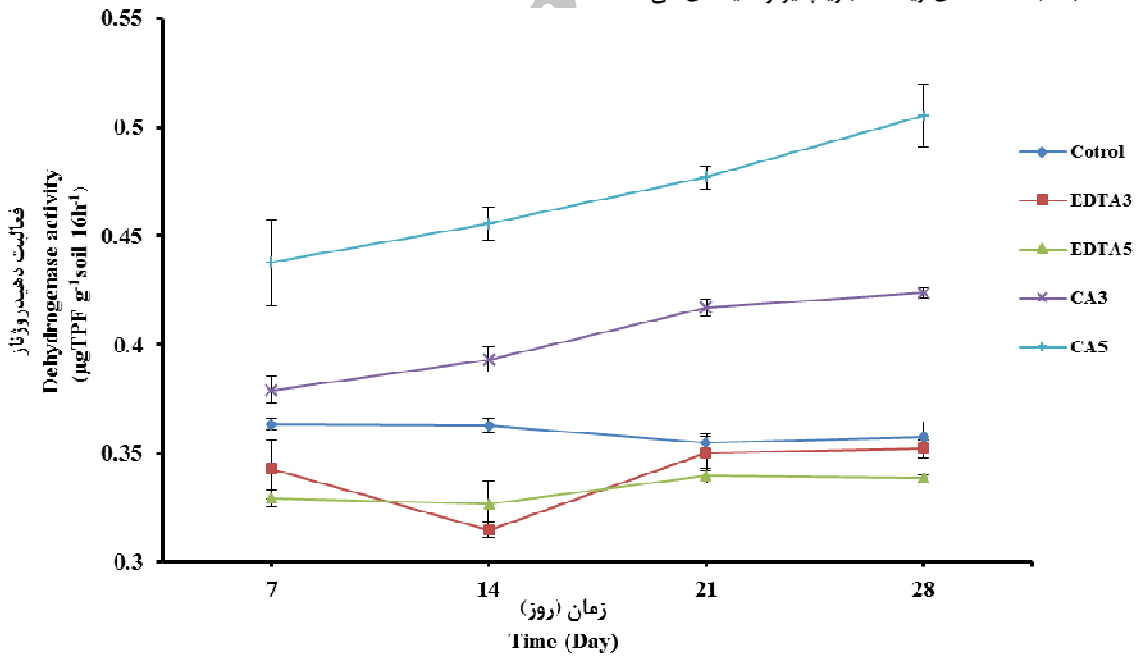
www.SID.ir

نداشت ولی در زمان 21ام به طور معنی‌داری کاهش و مجدداً در زمان 28ام افزایش یافت. لو و همکاران (17) نشان دادند که در طی 14 روز بعد از کاربرد 5 میلی‌مول در کیلوگرم خاک از کلات EDTA غلظت سرب محلول تغییری نکرد و ثابت ماند.

در تیمارهای EDTA3، CA3 و CA5 با گذشت زمان انکوباسیون غلظت سرب فراهم کاهش پیدا کرد. بیشترین مقدار کاهش به ترتیب مربوط به تیمارهای CA3 با 15/9 %، CA5 با 12/8 % و EDTA3 با 12/3 % کاهش بود. برخی پژوهشگران گزارش نمودند که در غلظت‌های کم EDTA با گذشت زمان حلالیت سرب کاهش یافت ولی در غلظت‌های بالا EDTA هیچ گونه کاهشی در حلالیت سرب مشاهده نشد (24). فریتاس و همکاران (7) کاهش قابل توجهی در غلظت سرب محلول با گذشت زمان بعد از کاربرد اسیدسیتریک گزارش کردند که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. آنها دلیل این کاهش را تجزیه زیستی سریع اسیدسیتریک در خاک دانستند و احتمالا دلیل کاهش بیشتر غلظت فراهم سرب در تیمارهای اسیدسیتریک نسبت به EDTA3 همین باشد. لو و همکاران (16) بیان کردند که کاهش غلظت سرب محلول در خاک در تیمار EDDS[1] بیشتر از EDTA بود. آنها بیان کردند که میزان کاهش غلظت سرب در طی 21 روز در تیمار EDDS 44 % و در تیمار EDTA 36 % بود. علت این امر پایداری و تجزیه‌پذیری کم EDTA نسبت به کلات‌های زیست تجزیه‌پذیر و اسیدهای آلی است (4).

کاربرد کلات‌ها سبب تغییرات معنی‌داری در فعالیت آنزیم دهیدروژناز خاک نسبت به تیمار شاهد شد (شکل 2). نتایج نشان داد کاربرد EDTA فعالیت آنزیم دهیدروژناز را نسبت به شاهد به طور معنی‌داری کاهش داد به طوری‌که تیمارهای EDTA3 و EDTA5 به ترتیب سبب کاهش 5/57 % و 7/24 % فعالیت آنزیم دهیدروژناز نسبت به تیمار شاهد شدند. به هر حال تفاوت معنی‌داری بین سطوح مختلف EDTA مشاهده نشد. به طور مشابه لی و سونگ (13) و ایپلد و همکاران (5) نشان دادند که کاربرد EDTA در خاک آلوده به فلزات سنگین فعالیت آنزیم دهیدروژناز را به طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش داد.

برعکس کاربرد اسیدسیتریک فعالیت آنزیم دهیدروژناز را افزایش داد به طوری که تیمارهای CA3 و CA5 به ترتیب سبب افزایش 12/2 % و 36/3 % فعالیت آنزیم دهیدروژناز نسبت به تیمار شاهد شدند. با افزایش سطح کاربرد اسیدسیتریک فعالیت آنزیم دهیدروژناز به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل 2). همانند نتایج این آزمایش، لی و سونگ (13) نشان دادند که کاربرد EDDS به عنوان یک کلات زیست تجزیه‌پذیر و همچنین اسید هومیک به عنوان یک کلات آلی در یک خاک آلوده به فلزات سنگین فعالیت آنزیم دهیدروژناز را افزایش می‌دهد.



شکل 2- تغییرات فعالیت آنزیم دهیدروژناز خاک در اثر کاربرد EDTA و اسیدسیتریک با گذشت زمان انکوباسیون

Figure 2- The effects of EDTA and citric acid on dehydrogenase activity with incubation time

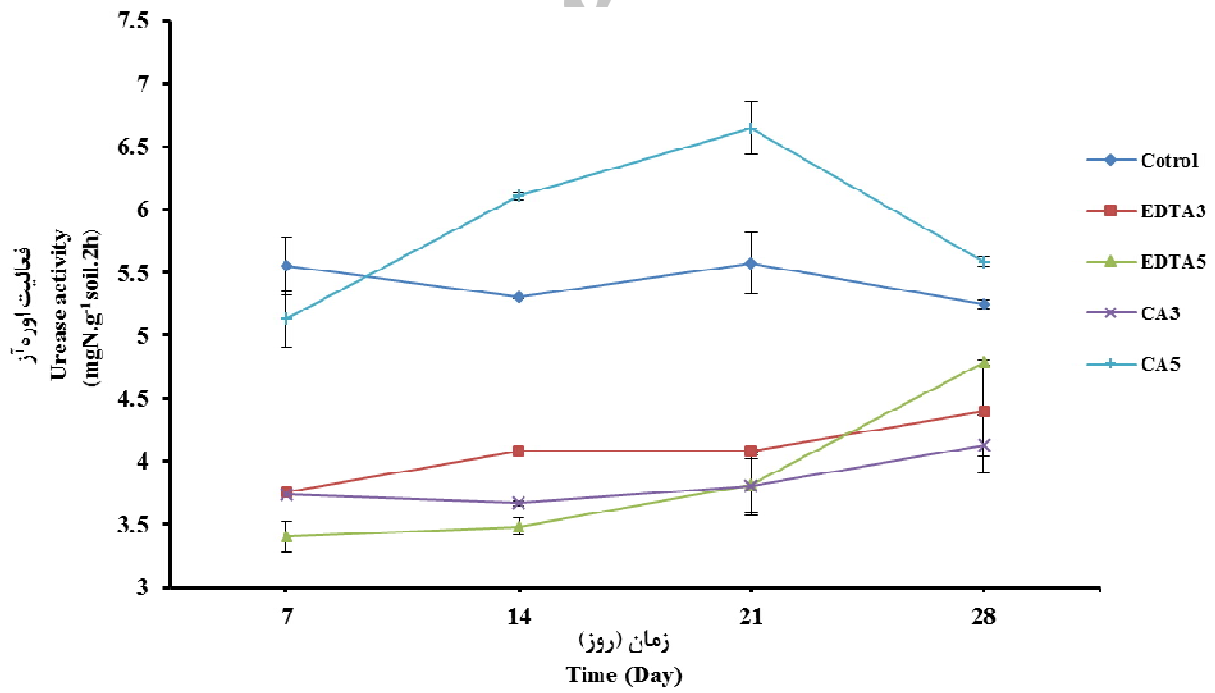
1- Ethylenediamine-*N*,*N*′-disuccinic acid

www.SID.ir

بررسی تغییرات فعالیت دهیدروژناز خاک با گذشت زمان انکوباسیون (شکل 2) نشان داد که فعالیت این آنزیم در تیمار شاهد تقریبا ثابت بود و تفاوت معنی‌داری بین زمان‌های مختلف مشاهده نشد. در تیمارهای EDTA و اسیدسیتریک با گذشت زمان فعالیت دهیدروژناز افزایش یافت به طوری‌که بیشترین مقدار آن در روز 28ام بود. نتایج نشان داد که تیمارهایی که EDTA دریافت کرده بودند در روزهای 21ام و 28ام، فعالیت دهیدروژناز هنوز کمتر از فعالیت آنزیم در تیمار کنترل بود ولی بین آنها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. واگلر و همکاران (37) گزارش کردند که کاربرد EDTA منجر به تأخیر در افزایش فعالیت دهیدروژناز می‌شود. با توجه به اینکه EDTA مقاومت و پایداری زیادی در خاک دارد، احتمالا از فعالیت آنزیمی برای مدت طولانی از زمان افزودن کلات به خاک جلوگیری می‌شود (13).

کاربرد کلات‌ها سبب تغییرات معنی‌داری در فعالیت آنزیم اوره‌آز خاک نسبت به تیمار شاهد شد (شکل 3). فعالیت اوره‌آز خاک در تیمارهایی که EDTA دریافت کرده بودند به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد کمتر بود به طوری‌که تیمارهای EDTA3 و EDTA5 به ترتیب سبب کاهش 24/5 % و 28/4 % فعالیت اوره‌آز خاک نسبت به تیمار کنترل شدند. بنابراین با افزایش سطح کاربرد EDTA فعالیت اوره‌آز به مقدار بیشتری کاهش یافت. عثمان و همکاران (36) در آزمایش انکوباسیون اثر کاربرد EDTA و NTA را بر معدنی شدن نیتروژن بررسی کردند. آنها نتیجه گرفتند که EDTA به طور معنی‌داری معدنی شدن نیتروژن را در مقایسه با تیمار شاهد و NTA کاهش داد.

در مقابل افزودن اسید سیتریک در سطوح مختلف نتایج متناقضی داشت (شکل 3). زیرا کاربرد اسیدسیتریک در سطح 3 میلی‌مول در کیلوگرم سبب کاهش 29/2 % و در سطح 5 میلی‌مول در کیلوگرم سبب افزایش 8/3 % فعالیت اوره‌آز نسبت به کنترل شد. به نظر می‌رسد که نحوه تأثیر کلات‌ها بر فعالیت‌های آنزیمی و حتی هر یک از آنزیم‌ها به غلظت فلز و همچنین غلظت کلات بستگی دارد و با تغییر هر یک از آنها می‌تواند این تأثیر متفاوت باشد به طوری‌که رنلا و همکاران (26) گزارش کردند که در خاک آلوده با 20 میلی‌گرم کادمیوم کاربرد اسیدسیتریک فعالیت آنزیم اوره‌آز را افزایش داد ولی در خاک آلوده با 40 میلی‌گرم کادمیوم کاربرد اسیدسیتریک، اگزالیک اسید، گلوکز و ترکیب آنها اثر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم اوره‌آز نداشت. این نتیجه نشان می‌دهد که در دو غلظت متفاوت فلز اثر اسید سیتریک متفاوت بوده است از این جهت می‌توان گفت در غلظت یکسان فلز تغییر غلظت کلات می‌تواند تأثیر متفاوت بر فعالیت هر یک از آنزیم‌ها داشته باشد. با این حال تحقیقات بیشتر در این خصوص لازم است.



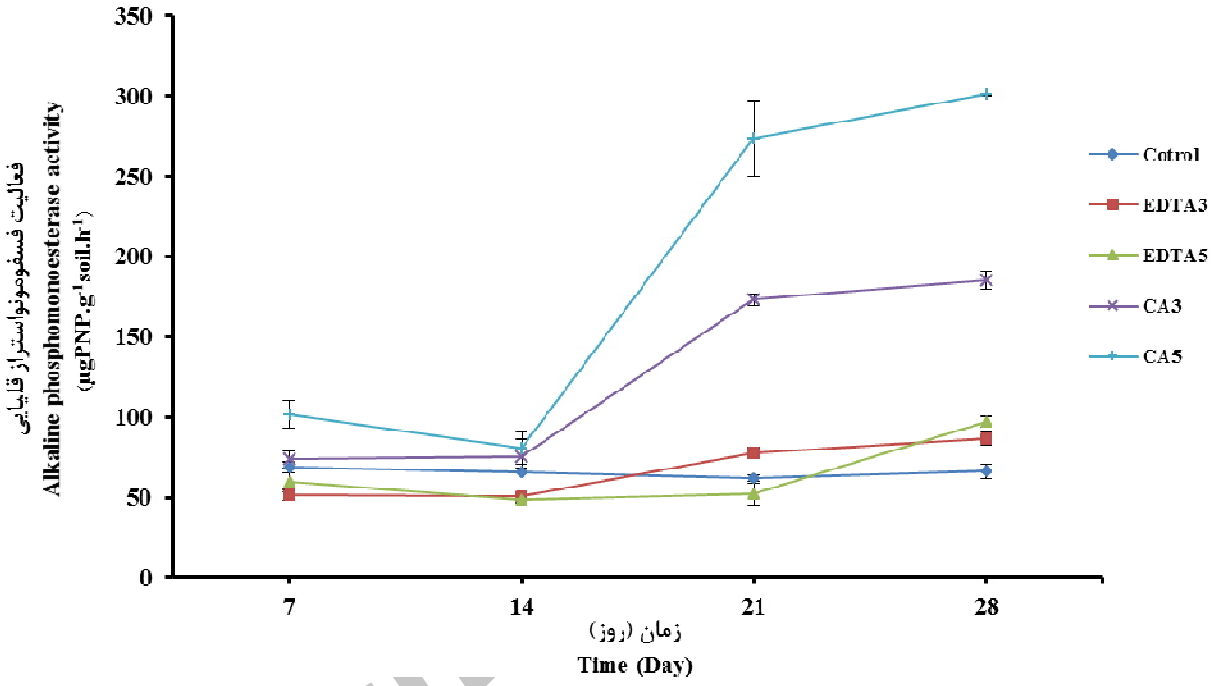
شکل 3- تغییرات فعالیت آنزیم اوره‌آز خاک در اثر کاربرد EDTA و اسیدسیتریک با گذشت زمان انکوباسیون

Figure 3- The effects of EDTA and citric acid on urease activity with incubation time

www.SID.ir

بررسی تغییرات فعالیت اوره‌آز خاک با گذشت زمان انکوباسیون (شکل 3) نشان داد که تغییرات فعالیت اوره‌آز در تیمار شاهد با گذشت زمان تقریبا ثابت و بین زمان‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. نتایج نشان داد در تیمارهای EDTA3، EDTA5، CA3 و CA5 با گذشت زمان انکوباسیون فعالیت اوره‌آز به طور معنی‌داری افزایش یافت. در زمان‌های مورد مطالعه فعالیت آنزیم اوره‌آز در تیمارهای EDTA3، EDTA5 و CA3 به طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بود.

در بین کلات‌های اعمال شده تنها اسیدسیتریک سبب تغییرات معنی‌داری در فعالیت آنزیم فسفومونواستراز قلیایی نسبت به تیمار شاهد شد (شکل 4). نتایج نشان داد که تفاوت معنی‌داری در فعالیت آنزیم فسفومونواستراز قلیایی بین تیمارهای EDTA3، EDTA5 و تیمار شاهد وجود نداشت.



شکل 4- تغییرات فعالیت آنزیم فسفومونواستراز قلیایی خاک در اثر کاربرد EDTA و اسیدسیتریک با گذشت زمان انکوباسیون

Figure 4-The effects of EDTA and citric acid on alkaline phosphomonoesterase activity with incubation time

ایپلد و همکاران (5) گزارش کردند که کاربرد EDTA و EDDS اثری بر فعالیت آنزیم فسفومونواستراز اسیدی نداشت که با نتایج این مطالعه مشابه است. البته ژلوسیک و لستان (10) نشان دادند که فرآیند آبشویی خاک با EDTA فعالیت آنزیم فسفومونواستراز قلیایی و اسیدی را کاهش داد. احتمالا دلیل این نتایج متناقض متفاوت بودن روش‌های اصلاحی و غلظت‌های استفاده شده EDTA باشد. زیرا در پژوهش ژلوسیک و لستان (10) علاوه بر استفاده از غلظت‌های بالاتر EDTA از فرآیند آبشویی استفاده شده است که این روش می‌تواند با تغییر ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی موجب کاهش فعالیت‌های آنزیمی شود.

در مقابل تیمارهای CA3 و CA5 به ترتیب سبب افزایش 95/7 % و 186/7 % فعالیت فسفومونواستراز قلیایی نسبت به تیمار شاهد شدند (شکل 4). بنابراین همانند فعالیت دهیدروژناز با افزایش سطح اسیدسیتریک فعالیت فسفومونواستراز قلیایی نیز به طور معنی‌داری افزایش یافت. رنلا و همکاران (26) گزارش کردند که کاربرد اسیدسیتریک در خاک آلوده با 20 میلی‌گرم کادمیوم فعالیت آنزیم‌های فسفومونواستراز قلیایی و فسفودی استراز را افزایش داد که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد.

بررسی تغییرات فعالیت فسفومونواستراز قلیایی با گذشت زمان انکوباسیون (شکل4) نشان داد که فعالیت آنزیم فسفومونواستراز قلیایی در تیمار شاهد تقریبا ثابت و بین زمان‌های مختلف تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. در سایر تیمارها با گذشت زمان انکوباسیون فعالیت فسفومونواستراز قلیایی به طور معنی‌داری افزایش یافت. به طوری‌که در تیمارهای EDTA3 و EDTA5 در روز 28م

Archive

www.SID.ir

انکوباسیون فعالیت فسفومونواستراز قلیایی بیشتر از تیمار شاهد بود.

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم‌های خاک با گذشت زمان نشان دهنده روند افزایشی برای تمام تیمارها به جز تیمار شاهد بود. این افزایش برای تیمارهای اسیدسیتریک بیشتر از EDTA بود چراکه اسیدسیتریک تجزیه‌پذیری سریع‌تر و در نتیجه پایداری کمتری نسبت به EDTA دارد. به هرحال در مورد آنزیم فسفومونواستراز قلیایی، مقادیر بیشتر از شاهد در روز 28ام انکوباسیون مشاهده شد. دلیل این افزایش احتمالا بخاطر اثر EDTA بر غلظت فسفر فراهم در خاک باشد چراکه در تیمارهای EDTA کاربرد EDTA3 و EDTA5 غلظت فسفر فراهم خاک را در روز 28ام نسبت به روز هفتم انکوباسیون به ترتیب به مقدار 91/5 % و 31 % و نسبت به تیمار شاهد 42/2 % و 25/7 % افزایش داد.

همان طور که به وسیله تعداد زیادی از پژوهشگران نشان داده شده است آنزیم‌های خاک می‌توانند به عنوان شاخصی برای تخمین اثرات سوء آلاینده‌ها بر کیفیت خاک مورد استفاده قرار گیرند. بنابراین از تغییرات فعالیت‌های آنزیمی خاک می‌توان به عنوان شاخصی برای ارزیابی کارایی کلات‌ها در فرآیندهای گیاه‌پالایی استفاده کرد (5، 13 و 36). در اکثر پژوهش‌ها در رابطه با اثر EDTA بر ریزجانداران خاک از پارامتر کربن بیومس میکروبی یا پارامترهایی نظیر PLFAs[1] که تخمینی از بیومس میکروبی هستند استفاده شده است (20 و 36).

با توجه به این واقعیت که ریزجانداران خاک به طور مستقیم برای جذب آب و عناصر غذایی به محلول خاک وابسته هستند و از طرفی افزودن EDTA و اسیدسیتریک بر حلالیت فلزات سنگین در محلول خاک تأثیرگذار است، می‌توان نتیجه گرفت که کاربرد EDTA و اسیدسیتریک می‌تواند بر موجودات زنده خاک تأثیر داشته باشد. بنابراین EDTA و اسیدسیتریک احتمالا از دو طریق بر فعالیت آنزیم‌های خاک تأثیر می‌گذارند: 1- به صورت غیرمستقیم از طریق تأثیری که بر رشد جمعیت قارچ‌ها و باکتری‌های خاک دارند. 2- به صورت مستقیم از طریق برهمکنش سرب با کمپلکس آنزیم-سوبسترا، تخریب ساختمان پروتئین آنزیم و برهمکنش با جایگاه‌های فعال آنزیم، فعالیت آنزیم دستخوش تغییر می‌شود (22) که هرچه غلظت سرب فراهم بیشتر باشد فعالیت آنزیم کمتر است و برعکس (شکل 5-A، B، C).

لی و سونگ (13) و صفری سنجانی و طهماسبیان (29) گزارش کردند که EDTA جمعیت باکتری‌ها و قارچ‌های خاک را کاهش می‌دهد. احتمالا EDTA می‌تواند از طریق افزایش غلظت سرب فراهم و کاهش کیفیت خاک اثر منفی بر رشد جمعیت میکروبی خاک داشته باشد ولی در مقابل اسیدسیتریک می‌تواند به عنوان منبع کربن به وسیله ریزجانداران خاک استفاده شود و در نتیجه جمعیت آنها را افزایش دهد. رنلا و همکاران (26) بیان کردند که افزایش فعالیت آنزیم‌ها در اثر اسیدسیتریک احتمالا ناشی از افزایش فعالیت ریزجانداران خاک می‌باشد. به نظر می‌رسد که دلیل اصلی تغییرات فعالیت آنزیم دهیدروژناز در اثر کلات‌ها همین مورد باشد زیرا این گروه از آنزیم‌ها درون سلولی بوده و در ریزجانداران فعال خاک وجود دارند (21).

نتایج نشان دهنده همبستگی بالا ولی منفی بین غلظت سرب فراهم در خاک با فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز (r=-0/906 ، P<0/05) فسفومونواستراز قلیایی (r=-0/747 ، P<0/05) و اوره‌آز خاک (r=-0/539 ، P<0/05) بود (شکل 5-A، B، C). رابطه منفی بین غلظت سرب فراهم و فعالیت آنزیم‌ها پیشنهاد می‌کند که غلظت سرب فراهم می‌تواند اثر قابل توجهی بر کاهش فعالیت آنزیم‌های خاک داشته باشد. مولباچوا (20) همبستگی منفی بین غلظت فراهم فلزات سنگین و کربن بیومس میکروبی و همبستگی مثبت بین غلظت فراهم فلزات سنگین و بهر متابولیک را در نتیجه کاربرد EDTA گزارش کردند.

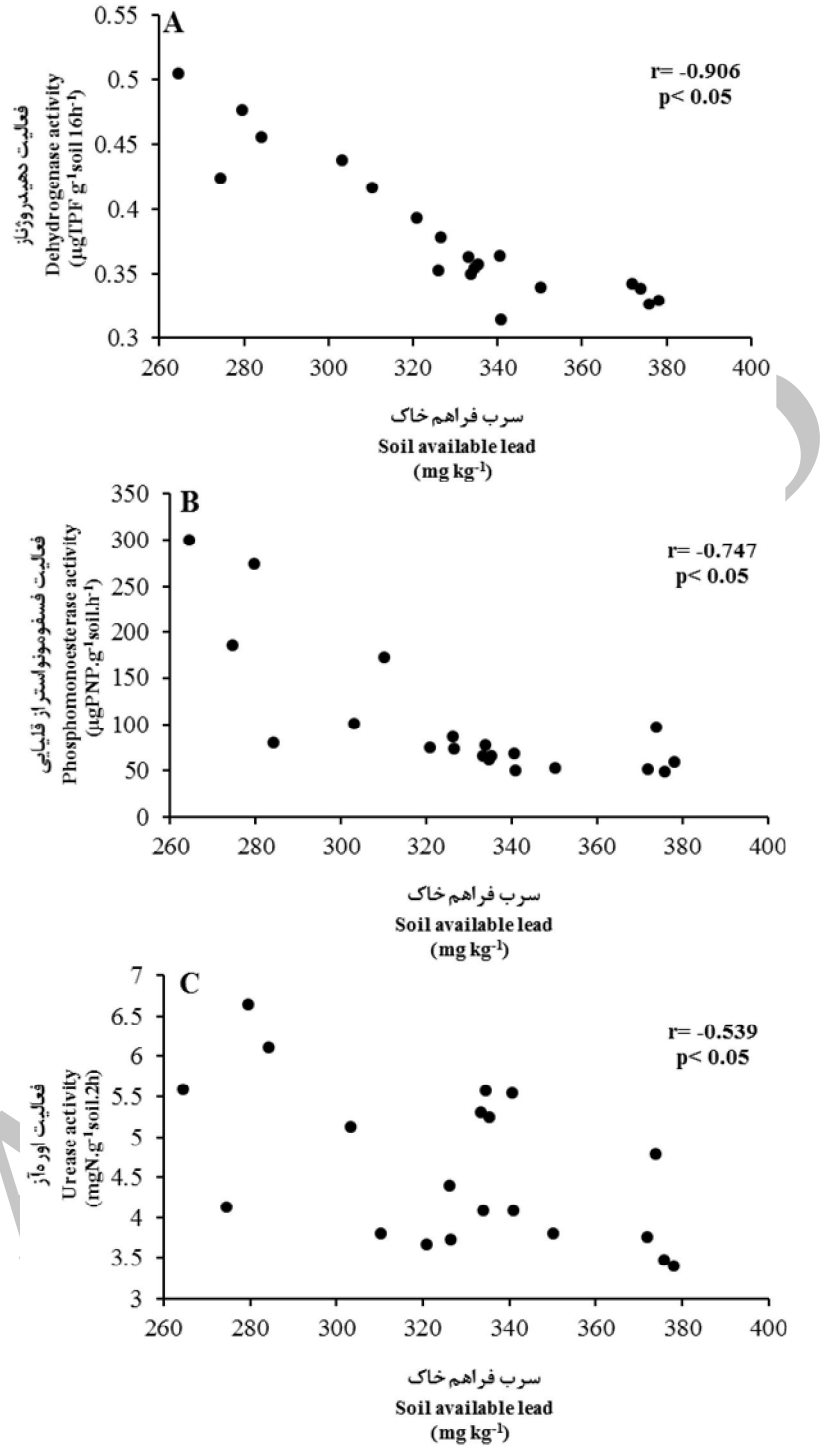
کاربرد کلات‌ها سبب تغییرات معنی‌داری در SIR نسبت به تیمار شاهد شد (شکل 6). نتایج نشان داد که SIR در تمام تیمارها از شاهد بیشتر بود. نتایج این پژوهش نشان داد که تیمارهای CA3 و CA5 به ترتیب سبب افزایش 60/14 % و 60/5 % SIR نسبت به تیمار کنترل شدند. احتمالاً ریزجانداران خاک از اسیدسیتریک به عنوان کربن اضافی و منبع انرژی استفاده می‌کنند (12). کاس و لستان (12) افزایش SIR را در اثر کاربرد سیترات گزارش کردند که با نتایج این مطالعه مشابه است. اندازه‌گیری SIR در خاک‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف EDTA نشان داد که غلظت‌های مختلف اثر متفاوتی بر SIR دارند به طوری‌که تیمارهای EDTA5 و EDTA3 به ترتیب سبب افزایش 3/64 % و 22/11 % SIR نسبت به تیمار کنترل شدند. اما تفاوت معنی‌داری بین تیمار EDTA5 و شاهد مشاهده نشد.

بررسی سایر پژوهش‌ها نشان داد که اثرات EDTA بر پارامترهای تنفسی خاک متفاوت است. اکثر پژوهش‌ها گزارش نمودند که سطح 3 و 5 میلی‌مول در کیلوگرم EDTA تنفس میکروبی پایه خاک را نسبت به شاهد افزایش داد (20 و 36). اما ایپلد و همکاران (5) بیان کردند که افزودن EDTA در سطح معادل 3 میلی‌مول در کیلوگرم به طور معنی‌داری تنفس میکروبی پایه و SIR را کاهش داد. یودویچ و لستان (34) بیان کردند که شستشوی خاک با EDTA تنفس میکروبی برانگیخته خاک را افزایش داد که با نتایج این مطالعه مشابه است.

1- Phospholipid-derived fatty acids

Archive of SID

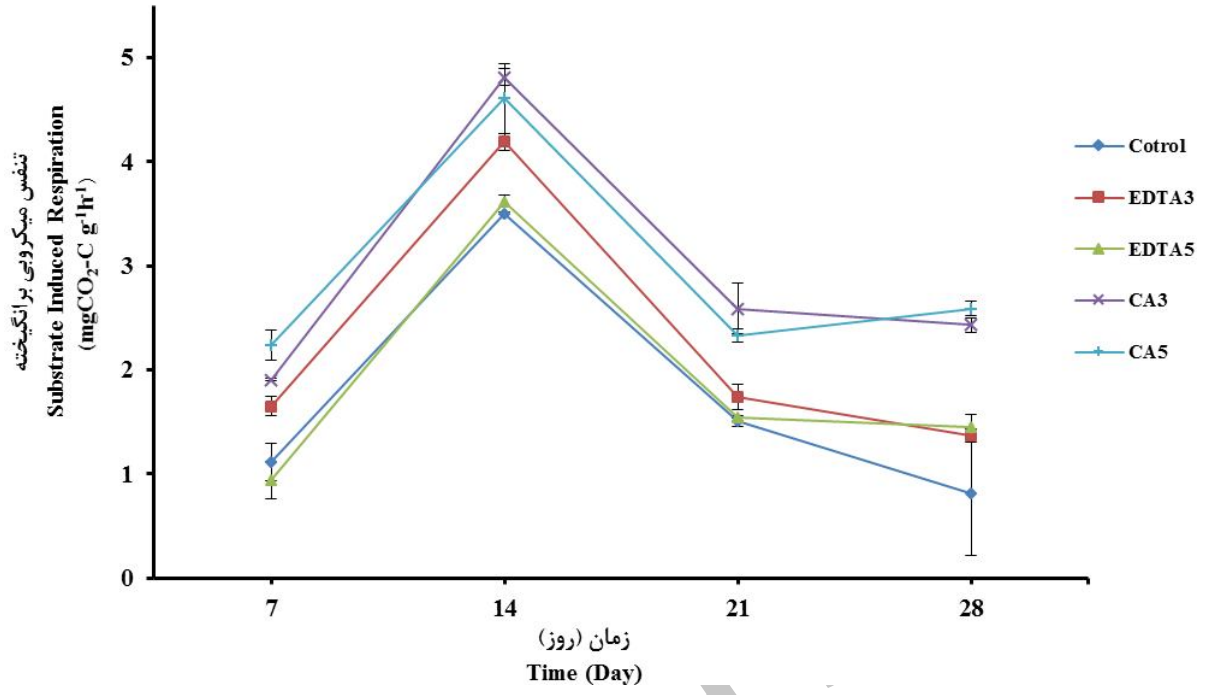
www.SID.ir



شکل 5- همبستگی بین غلظت سرب فراهم خاک با (A) فعالیت آنزیم دهیدروژناز، (B) فعالیت آنزیم فسفومونواستراز قلیایی و (C) فعالیت آنزیم اوره‌آز خاک

Figure 5- Correlation between lead availability concentrations with (A) dehydrogenase activity, (B) alkaline phosphomonoesterase activity and (C) urease activity

www.SID.ir



شکل 6- تغییرات SIR خاک در اثر کاربرد EDTA و اسیدسیتریک با گذشت زمان انکوباسیون
Figure 6- The effects of EDTA and citric acid on SIR with incubation time

بررسی تغییرات SIR خاک با زمان انکوباسیون (شکل 6) نشان داد که در تمام تیمارها در روز 14ام انکوباسیون مقدار SIR به طور معنی‌داری افزایش یافت ولی همچنان مقدار SIR در تیمارهای EDTA و اسیدسیتریک بیشتر از تیمار شاهد بود. افزایش مقدار SIR در روز 14ام احتمالا می‌تواند به دلیل افزایش فعالیت‌های بیولوژیکی به دلیل بهم‌خوردگی خاک و افزایش تهویه بعد از نمونه‌برداری باشد. پس از روز 14ام تا روز 21ام مقدار SIR روند نزولی شدید داشت و از روز 21ام تا 28ام به صورت جزئی کاهش در SIR مشاهده شد. مولباچوا (20) نشان داد که با گذشت زمان فعالیت تنفسی در تیمارهای EDTA، EDDS و شاهد کاهش یافت. به هر حال در طول مدت انکوباسیون SIR در تیمار شاهد کمتر از سایر تیمارها بود و فقط در روز هفتم مقدار SIR بیشتر از تیمار EDTA5 بود.

نکته قابل توجه در مورد اثر EDTA بر پارامترهای تنفسی (تنفس پایه و برانگیخته) این است که اکثر پژوهشگران افزایش تنفس میکروبی ناشی از کاربرد EDTA را نشانه مثبتی از بهبود شرایط بیولوژیکی خاک نمی‌دانند (20 و 36). عثمان و همکاران (36) بیان کردند که تنفس میکروبی بیشتر در خاک‌ها و محیط‌های آلوده اغلب به وسیله نیاز به انرژی بیشتر برای بقای ریزجانداران خاک توضیح داده می‌شود. به عبارت دیگر ریزجانداران خاک این توانایی را دارند که در شرایط نامناسب انرژی را از مسیر رشد به سمت عمل حفظ سلول منحرف کنند (5). به هرحال باید به این نکته توجه شود که استفاده از تنفس میکروبی به تنهایی برای ارزیابی تنش‌های محیطی ممکن است تفسیر نتایج را با مشکل روبه‌رو کند.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج بدست آمده از این پژوهش کاربرد EDTA غلظت سرب فراهم را در خاک افزایش داد ولی در مقابل اسیدسیتریک نه تنها غلظت سرب فراهم را افزایش نداد بلکه نسبت به کنترل آن را کاهش داد. اگرچه EDTA کارایی بیشتری در افزایش حلالیت سرب داشت اما کاربرد آن به دلیل افزایش بیش از حد غلظت سرب فراهم خاک، فعالیت آنزیمی و میکروبی خاک را به طور قابل توجهی کاهش داد. ولی اسیدسیتریک احتمالاً به دلیل تجزیه‌پذیری زیستی سریع به عنوان یک منبع کربن برای ریزجانداران خاک عمل کرده و فعالیت آنزیمی و میکروبی خاک را افزایش داد. بنابراین EDTA گرچه غلظت سرب فراهم خاک را افزایش داد اما به دلیل اثرات منفی که بر ویژگی‌های شیمیایی و بیولوژیکی خاک دارد کیفیت خاک را کاهش داده و احتمال موفقیت فرآیند گیاه‌پالایی را کم می‌کند زیرا با ضعیف شدن خاک هم گیاه توانایی استخراج کمتری خواهد داشت و هم اینکه فرآیند گیاه‌پالایی در نهایت نمی‌تواند کیفیت خاک را نسبت به قبل بهبود بخشد. در نتیجه پیشنهاد می‌شود در صورت نیاز به استفاده

Archive of SID

www.SID.ir

از EDTA از غلظت‌های کم آن مثل 3 میلی‌مول در کیلوگرم یا کمتر استفاده شود. همچنین پیشنهاد می‌شود در پـژوهش‌هـای بعـدی اثـر سطوح بالاتر اسیدسیتریک بر غلظت فراهم سرب و فعالیـت آنزیمـی خاک مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

1- Alef K., and Nannipieri P. 1995. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic press.
2- Bremner J. M., and Mulvaney C. S. 1982. Nitrogen total. Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties, (methods of soil an2), 595-624.
3- Chapman H. D. 1965. Total exchangeable bases. Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties, (methods of soil anb), 902-904.
4- Do Nascimento C. W. A., Amarasiriwardena D., and Xing B. 2006. Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil. Environmental Pollution, 140(1), 114-123.
5- Epelde L., Hernández-Allica J., Becerril J. M., Blanco F., and Garbisu C. 2008. Effects of chelates on plants and soil microbial community: comparison of EDTA and EDDS for lead phytoextraction.Science of the total environment, 401(1), 21-28.
6- Fine P., Paresh R., Beriozkin A., and Hass A. 2014. Chelant-enhanced heavy metal uptake by Eucalyptus trees under controlled deficit irrigation. Science of the Total Environment, 493, 995-1005.
7- Freitas E. V., Nascimento C. W., Souza A., and Silva F. B. 2013. Citric acid-assisted phytoextraction of lead: A field experiment. Chemosphere, 92(2), 213-217.
8- Gee G. W., Bauder J. W., and Klute A. 1986. Particle-size analysis. P. 383- 411. In Klute, A (ed.) Methods of soil analysis. Part 1. Physical and mineralogical methods. 2nd ed. American Society of Agronomy, Inc.
9- Huang J. W., Chen J., Berti W. R., and Cunningham S. D. 1997. Phytoremediation of lead-contaminated soils: role of synthetic chelates in lead phytoextraction. Environmental Science & Technology, 31(3), 800-805.
10- Jelusic M., and Lestan D. 2014. Effect of EDTA washing of metal polluted garden soils. Part I: toxicity hazards and impact on soil properties. Science of the Total Environment, 475, 132-141.
11- Kos B. 2003. Influence of a biodegradable ([S, S]-EDDS) and nondegradable (EDTA) chelate and hydrogel modified soil water sorption capacity on Pbphytoextraction and leaching. Plant and Soil, 253(2), 403-411.
12- Kos B., and Leštan D. 2004. Chelator induced phytoextraction and in situ soil washing of Cu. Environmental Pollution, 132(2), 333-339.
13- Lee J., and Sung K. 2014. Effects of chelates on soil microbial properties, plant growth and heavy metal accumulation in plants. Ecological Engineering, 73, 386-394.
14- 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(3), 421-428.
15- Loeppert R. H., and Suarez L. 1996. Carbonate and gypsum. In 'Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods. (Ed. DL Sparks) pp. 437–474. Soil Science Society of America: Madison, WI.
16- Luo C. L., Shen Z. G., Baker A. J., and Li X. D. 2006. A novel strategy using biodegradable EDDS for the chemically enhanced phytoextraction of soils contaminated with heavy metals. Plant and soil, 285(1-2), 67-80.
17- Luo C., Shen Z., and Li X. 2005. Enhanced phytoextraction of Cu, Pb, Zn and Cd with EDTA and EDDS. Chemosphere, 59(1), 1-11.
18- Mc Grath S.P., and Cunliffe C.H. 1985. A simplified method for the extraction of the metals Fe, Zn, Cu, Ni, Cd, Pb, Cr, Co and Mn from soils and sewage sludges. Journal of the Science of Food and Agriculture, 36(9), 794-798.
19- Meers E., Ruttens A., Hopgood M., Lesage E., and Tack F. M. G. 2005. Potential of Brassicrapa, Cannabis sativa, *Helianthus annuus* and *Zea mays* for phytoextraction of heavy metals from calcareous dredged sediment derived soils. Chemosphere, 61(4), 561-572.
20- Mühlbachová G. 2011. Soil microbial activities and heavy metal mobility in long-term contaminated soils after addition of EDTA and EDDS. Ecological Engineering, 37(7), 1064-1071.
21- Nannipieri P., Grego S., Ceccanti B., Bollag J. M., and Stotzky G. 1990. Ecological significance of the biological activity in soil. Soil biochemistry, 6, 293-355.
22- Nannipieri P., Pankhurst C. E., Doube B. M., Gupta V. V. S. R., and Grace P. R. 1994. The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution. In (Ed. CE Pankhurst et al.) pp. 238- 244. Soil biota: management in sustainable farming systems. CSIRO Publications.
23- Nascimento C. W. A. D. 2006. Organic acids effects on desorption of heavy metals from a contaminated soil. Scientia Agricola, 63(3), 276-280.
24- Neugschwandtner R. W., Tlustoš P., Komárek M., and Száková J. 2008. Phytoextraction of Pb and Cd from a contaminated agricultural soil using different EDTA application regimes: laboratory versus field scale measures of efficiency. Geoderma, 144(3), 446-454.
25- Olsen S. R., Sommers L. E., and Page A. L. 1982. Methods of soil analysis. Part 2. Agron.Monogr, 9, 403-430.

Archive of SID

www.SID.ir

26- Renella G., Egamberdiyeva D., Landi L., Mench M., and Nannipieri P. 2006. Microbial activity and hydrolase activities during decomposition of root exudates released by an artificial root surface in Cd-contaminated soils. Soil Biology and Biochemistry, 38(4), 702-708.
27- Saifullah Sabir M., and Ahmad H. R. 2014. Phytoremediation of Pb-Contaminated Soils Using Synthetic Chelates. In (Ed. K Hakeem et al.) pp. 397- 414. Soil Remediation and Plants: Prospects and Challenges. Academic Press.
28- Shahid M., Pinelli E., and Dumat C. 2012. Review of Pb availability and toxicity to plants in relation with metal speciation; role of synthetic and natural organic ligands. Journal of hazardous materials, 219, 1-12.
29- Sinegani A. A. S., and Ghahfarokhi I. T. The effect of application of electrokinetic and chelating agents on substrate induced respiration and bacterial and fungal populations in a multi-metal contaminated soil. 1st International Conference on Environmental Crisis and its Solutions, 13-14 Feb. 2013. Scientific and Research Branch, Khouzestan, Islamic Azad University., Kish Island-Iran
30- Tabatabai M. A., and Bremner J. M. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity.Soil biology and biochemistry, 1(4), 301-307.
31- Tabatabai M. A., and Bremner J. M. 1972. Assay of urease activity in soils. Soil Biology and Biochemistry, 4(4), 479-487.
32- Tandy S., Schulin R., and Nowack B. 2006. Uptake of metals during chelant-assisted phytoextraction with EDDS related to the solubilized metal concentration. Environmental science & technology, 40(8), 2753-2758.
33- Thalmann A. 1966. The determination of the dehydrogenase activity in soil by means of TTC (triphenyltetrazolium). Soil Biol, 6, 46-49.
34- Udovic M., and Lestan D. 2009. Pb, Zn and Cd mobility, availability and fractionation in aged soil remediated by EDTA leaching. Chemosphere, 74(10), 1367-1373.
35- Ultra Jr V. U., Yano A., Iwasaki K., Tanaka S., Kang Y., and Sakurai K. 2005. Influence of chelating agent addition on copper distribution and microbial activity in soil and copper uptake by brown mustard (*Brassica juncea*). Soil Science & Plant Nutrition, 51(2), 193-202.
36- Usman A. R., Almaroai Y. A., Ahmad M., Vithanage M., and Ok Y. S. 2013. Toxicity of synthetic chelators and metal availability in poultry manure amended Cd, Pb and As contaminated agricultural soil. Journal of hazardous materials, 262, 1022-1030.
37- Vogeler I., Vachey A., Deurer M., and Bolan N. 2008. Impact of plants on the microbial activity in soils with high and low levels of copper. European journal of soil biology, 44(1), 92-100.
38- Walkley A., and Black I. A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method.Soil science, 37(1), 29-38.
39- Wu L. H., Luo Y. M., Christie P., and Wong M. H. 2003. Effects of EDTA and low molecular weight organic acids on soil solution properties of a heavy metal polluted soil. Chemosphere, 50(6), 819-822.
40- Wu L. H., Luo Y. M., Xing X. R., and Christie P. 2004. EDTA-enhanced phytoremediation of heavy metal contaminated soil with Indian mustard and associated potential leaching risk. Agriculture, Ecosystems & Environment, 102(3), 307-318.
41- Zhang F., Zhu Z., Dong Z., Cui Z., Wang H., Hu W., Zhao P., Wang P., Wei S., Li R., and Ma J. 2011. Magnetically recoverable facile nanomaterials: Synthesis, characterization and application in remediation of heavy metals. Microchemical Journal, 98(2), pp.328-333.
42- Zhang H., Zhao F.J., Sun B., Davison W., and Mcgrath S.P. 2001. A new method to measure effective soil solution concentration predicts copper availability to plants. Environmental Science & Technology, 35(12), pp.2602-2607.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Water and Soil
Vol. 30, No. 6, Jan.-Feb. 2017, p. 2032-2045

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 30، شماره 6، بهمن – اسفند 1395، ص. 2045-2032

The Effect of EDTA and Citric acid on Soil Enzymes Activity, Substrate Induced Respiration and Pb Availability in a Contaminated Soil

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

Received: 07-11-2015
Accepted: 27-04-2016

Introduction: Application of EDTA may increase the heavy metal availability and phytoextraction efficiency in contaminated soils. In spite of that, it might also have some adverse effects on soil biological properties. Metals as freeions are considered to be severely toxic, whereas the complexed form of these metalswith organic compounds or Fe/Mn oxides may be less available to soil microbes. However, apart from this fact, some of these compounds like EDTA and EDTA-metal complexes have low bio- chemo- and photo-degradablity and high solubility in their own characteristics andable to cause toxicity in soil environment. So more attentions have been paid to use of low molecular weight organic acids (LMWOAs) such as Citric acid because of having less unfavorable effects to the environment. Citric acid increases heavy metals solubility in soils and it also improves soil microbial activity indirectly. Soil enzymes activity is a good indicator of soil quality, and it is more suitable for monitoring the soil quality compared to physical or chemical indicators. The aims of this research were to evaluate the changes of dehydrogenase, urease and alkaline phosphomonoesterase activities, substrate-induced respiration (SIR) and Pb availability after EDTA and citric acid addition into a contaminated soil with $PbCl_2$.

Materials and Methods: An experiment was conducted in a completely randomized design with factorial arrangement and three replications in greenhouse condition. The soil samples collected from surface horizon (0-20 cm) of the *Typic haplocalsids*, located in Mashhad, Iran. Soil samples were artificially contaminated with $PbCl_2$ (500 mg Pb per kg of soil) and incubated for one months in 70 % of water holding capacity at room temperature. The experimental treatments included control, 3 and 5 mmol EDTA (EDTA3 and EDTA5) and Citric acid (CA3 and CA5) per kg of soil. Soil enzymes activity, substrate-induced respiration and Pb availability of soil samples were determined by standard methods after 7, 14, 21 and 28 days of chelates addition.

Results and Discussion: The soil texture was loam and the indigenous Pb content was 25.55 mg kg^{-1}. The soil pH was 7.4 and electrical conductivity of saturated extraction measured 2.5 dS m^{-1}. The soil carbonate calcium was 14% and the content of organic carbon and essential nutrients were low. The results showed that EDTA3 and EDTA5 treatments increased Pb availability by 2.17% and 10% compared to control treatment but CA3 and CA5 treatments decreased it by 3.8% and 15.7% respectively. The Pb availability in control and EDTA5 treatments did not change during the incubation time. The available Pb concentration dropped sharply during the incubation time in EDTA3, CA3 and CA5 treatments. The reduction rates in CA3 and CA5 treatments were more than EDTA3 treatment. This may be due to the high stability and low biodegradability of EDTA than biodegradable chelators and low molecular weight organic acids. The results showed that urease and dehydrogenase activities were significantly reduced in EDTA3 and EDTA5 treatments compared to control treatment. Urease and dehydrogenase activities were decreased with the increase of EDTA concentration. Alkaline phosphomonoesterase activity was not affected by the EDTA3 and EDTA5 treatments. In CA3 and CA5 treatments, dehydrogenase and alkaline phosphomonoesterase activities significantly increased with increasing the concentration of citric acid. CA5 treatment showed a prominent effect on urease activity compare to CA3 treatment. The soil enzyme activities increased with incubation time. It seems that reduction in Pb availability causes an increase of soil enzymes activities. Significant negative relationships were found between soil enzymes activities and available Pb concentration (dehydrogenase activity ($r=-0.906$, $P<0.05$), alkalinephosphomonoesterase activity ($r=-0.747$, $P<0.05$) and urease activity ($r=-0.539$, $P<0.05$)). The results showed that soil enzyme activities were affected by Pb availability. The results also revealed that substrate induced respiration enhanced by adding EDTA and Citric acid but additive effect of Citric acid was more than EDTA. The CA3 and CA5 treatments increased substrate induced respiration by 60.14% and 60.5% compared to control treatment, respectively. The effects of EDTA on substrate induced respiration depended on the EDTA

1, 2 and 3- Master Student, Professor and Assisstant Professor of Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Respectively
(*- Corresponding Author Email: alakzian@yahoo.com)

www.SID.ir

concentration. The application of 5 mmol EDTA per kg of soil did not significantly effect substrate induced respiration but the 3 mmol EDTA per kg of soil incresead it by 22.11% compared to control treatment.

Conclusion: Based on our finding, EDTA application increased Pb availability as compared to control. In comparison with EDTA, Citric acid did not have ability to increase Pb availability. Activity of soil enzymes significantly were reduced by EDTA application. On the contrary, soil enzymes and microbial activity improved significantly by Citric acid applications. It is suggested that lower EDTA application and higher Citric acid concentrations can be considered for futures studies.

Keywords: Citric acid, EDTA, Enzyme activity, Pb, SIR

Archive of SID

www.SID.ir