ارزیابی زیست فراهمی روی در ریزوسفر گیاه سورگوم *Sorghum bicolor* (L.) Moench

حسین میر سید حسینی[1] و سپیده باقری نویر

دانشیار دانشگاه تهران؛ mirseyed@ut.ac.ir

دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه تهران؛ sep.bagheri@ut.ac.ir

دریافت: 93/1/24 و پذیرش: 94/1/26

چکیده

این پژوهش با هدف ارزیابی اثرات ریزوسفر سورگوم بر روی قابل استفاده با چهار عصاره‌گیر انفرادی در ریشه‌دان اجرا شد. دو نمونه خاک با خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نسبتا مشابه و از دو منطقه، نمونه اول از منطقه بدون آلودگی و نمونه دوم ازمجاورت کارخانه کنسانتره روی و سرب تهیه شد. در هر نمونه خاک سه سطح غلظتی روی ($mg\ kg^{-1}$ 250، 375 و 500) با توجه به مقدار روی اولیه موجود در خاک اعمال گردید. فضای داخلی ریشه‌دان با صفحات توری نایلونی (40 مش) به سه منطقه S_1 (منطقه ریزوسفری)، S_2 (مجاور به ریزوسفر) و S_3 (فواصل دورتر از ریزوسفر) جداسازی شدند و گیاه سورگوم در منطقه S_1 کاشته شد. اثر فعالیت ریشه گیاه بر اشکال زیست فراهم روی شامل قابل عصاره‌گیری با آب مقطر، نیترات کلسیم و DTPA معنی‌دار بود. مقدار روی به شکل‌های (قابل عصاره گیری با DTPA، نیترات کلسیم، آب مقطر) در ریزوسفر (S_1) خاک غیرآلوده به ترتیب 8/6، 100% و 130% بیش از توده خاک در سه هفته ابتدایی بود. اگرچه روی قابل استخراج با HNO_3 در این ناحیه تفاوتی با توده خاک نداشت اما در زمان هفت هفته به طور معنی‌داری به میزان 10% کاهش یافت. این امر نشان دهنده اثرگذاری فعالیت ریشه سورگوم بر اشکال غیر زیست فراهم‌تر در فواصل زمانی بیشتر (هفت نسبت به سه هفته) می‌باشد. افزایش زیست‌فراهمی روی در زمان سه هفته در خاک غیرآلوده به طور معنی داری ($p<0/01$) موجب جذب بیشتر آن توسط گیاه تا 30% شده است. نتایج نشان داد که غلظت و جذب روی در سورگوم با روی عصاره‌گیری شده توسط اسید نیتریک در خاک ریزوسفری همبستگی معنی‌داری ($p<0/01$) داشت. بنابراین، روش عصاره‌گیری اسید نیتریک می‌تواند برآوردی مناسب از روی قابل استفاده سورگوم در شرایط افزایش سطوح غلظتی آن باشد.

واژه‌های کلیدی: اشکال شیمیایی، ریشه‌دان، عصاره‌گیرهای انفرادی

---

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: کرج، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، دانشکده فناوری کشاورزی، گروه مهندسی علوم خاک

مقدمه

ریزوسفر حجمی از خاک اطراف ریشه‌های زنده گیاهان است که تحت تأثیر فعالیت‌های ریشه می‌باشد و ویژگی‌های آن با توده‌خاک متفاوت است. افزایش تولیدات کشاورزی، گسترش راهکارهای مدیریت تنش درگیاهان به درک بهتر فرآیندهای ریزوسفری (به عنوان منطقه‌ای جهت جذب عناصر غذایی) بستگی دارد (فاجریا و موریرا، 2011). غلظت بالای عنصر روی در خاک ناشی از منابع مختلف آلودگی مانند اتمسفر، رسوب نزدیک کارخانجات صنعتی، عملیات ذوب، سیلاب خاک‌های رسوبی، آب رودخانه‌ها و رسوبات آلوده به این عنصر می‌باشد (آلووی، 2008). تعیین مقدار کل عناصر در خاک در برخی فرآیندهای شیمیایی قابل استفاده است، اما اغلب درگونه‌بندی آنها فرم قابل دسترس اندازه‌گیری می‌شود که کاربردهای بیشتری دارد. عصاره‌گیری‌های انفرادی[1] و یا تک‌مرحله‌ای درباره شکل‌های شیمیایی متحرک فلز و در خصوص اشکال پایدار و ناپایدار آن اطلاعاتی را فراهم می‌سازد. نوع و هدف انتخاب عصاره‌گیرها به چگونگی بررسی فازهای ژئوشیمیایی از ناپایدار[2] تا فازهای باقیمانده[3] بستگی دارد (آنجو و بارنجی، 2011). این روش‌ها برای تعیین گونه‌ی زیست فراهم عناصر سنگین و تشخیص همبستگی بین غلظت عنصر قابل استخراج خاک، جذب و غلظت آن در گیاه به کار می‌رود. مطالعاتی نیز توانایی این روش‌ها را در تخمین جذب فلزات توسط خاک تایید نموده است (فنگ، 2005). زیست فراهمی فلز به عنوان بخشی از مقدار کل آن در خاک که می‌تواند با یک هدف مشخص و زیستی اثرات متقابل داشته باشد تعریف می‌شود (کید و همکاران، 2009).

تعیین شکل‌های عناصر، شاخص‌های مشخصی دارد به طور مثال نمک‌های ضعیف یون‌های تبادلی را جایگزین و مقدار آنها را مشخص می‌سازند. اسیدها شکل کربناتی را محلول می‌کنند، ترکیبات احیا کننده برای جداسازی اکسیدهای آهن و آلومینیوم به کار می‌روند. شکل پیوند-خورده با مواد آلی به وسیله اسیدنیتریک غلیظ یا پرکلریک اسید همراه با گرم کردن در محلول آب اکسیژنه در یک اسید متوسط اکسید می‌شوند (ونزل و همکاران، 2001). یور (1996) گزارش کرد که عناصر فلزی قابل استخراج با اسید قوی نشانگر اشکال نزدیک به کل آنها می‌باشد. مطالعه وی در خاک‌های با مقدار آلاینده‌های انباشته شده در مدت زمان طولانی می‌باشد. برای تعیین اشکال محلول فلزات در خاک از عصاره‌گیری با آب دوبار تقطیر استفاده می‌شود (ساوونینا و همکاران، 2005). اشکال قابل تبادل فلزات در خاک توسط عصاره‌گیری با نیترات کلسیم تعیین می‌شوند. ونگ و همکاران (2006) از عصاره‌گیر TEA+ DTPA0/005 مولار جهت تعیین اشکال قابل جذب گیاه استفاده کردند. توزیع روی بین اشکال مختلف به ویژگی-های خاک وابسته است. ریحانی تبار و همکاران (1385) گزارش کردند که تمام شکل‌های روی توسط گیاه ذرت قابل جذب می‌باشد. اشکال محلول، تبادلی در منطقه ریزوسفر و مجاور ریشه بیشتر از توده خاک است.

روی عصاره‌گیری شده با DTPA با شکل‌های محلول+تبادلی، کربناتی و متصل به اکسیدهای آهن بی‌شکل و متبلور همبستگی معنی‌دار نشان داد. نتایج حاکی از آن است که یکی از عوامل مؤثر جهت تغییر اشکال شیمیایی روی در ریزوسفر گیاه، تفاوت در نوع خاک‌های مورد استفاده می‌باشد (تائو و همکاران، 2003). برخی از پژوهشگران نیز به اهمیت فرآیندهای ریزوسفری بر جذب روی در گیاه و مقدار آن در خاک تأکید داشتند (حسین پور و متقیان، 2013). به منظور مطالعه دقیق‌تر فرایندهای ریزوسفری، محدود کردن رشد ریشه‌ها به حجم معینی از خاک سبب افزایش تراکم ریشه شده و نمونه‌برداری از خاک ریزوسفری را تسریع می‌نماید.

یک صفحه با منافذ ریز از جنس نایلون یا دیگر مواد مصنوعی و یا استیل ضدزنگ نیز می‌تواند برای محدود-کردن رشد ریشه گیاه استفاده گردد. این صفحات اجازه عبور آب، گاز و پخشیدگی مواد غذایی را می‌دهند به گونه‌ای که رشد گیاه تا حد زیادی تحت تأثیر قرار نگیرد. این اطلاعات در ساخت ظروفی به نام ریشه‌دان[4] مورد استفاده قرار گرفته است (ونزل و همکاران، 2001). برخی محققان نیز از ریشه‌دان جهت مطالعه تغییرات (شامل فیزیکی، شیمیایی و زیستی) ناشی از ریشه بر خصوصیات خاک استفاده کردند (ونزل و همکاران، 2001; لیو و همکاران، 2012).

سورگوم (*sorghum bicolor* L.) یکی از با ارزش-ترین گیاهان زراعی است که بعد از گندم، برنج، ذرت و جو بیشترین سطح زیر کشت را در بین غلات به خود اختصاص داده است و در بین گیاهان علوفه‌ای یکساله پنجمین گیاه مهم محسوب می‌شود (المدرس، 1387). تحقیقات نشان می‌دهد که که این گیاه از زمان‌های بسیار قدیم در ایران وجود داشته است و نسبت به شرایط خاک بسیاری از مناطق سازگار می‌باشد. دارای سیستم ریشه‌ای افشان و بسیار توسعه یافته‌ای است. توانایی رشد در

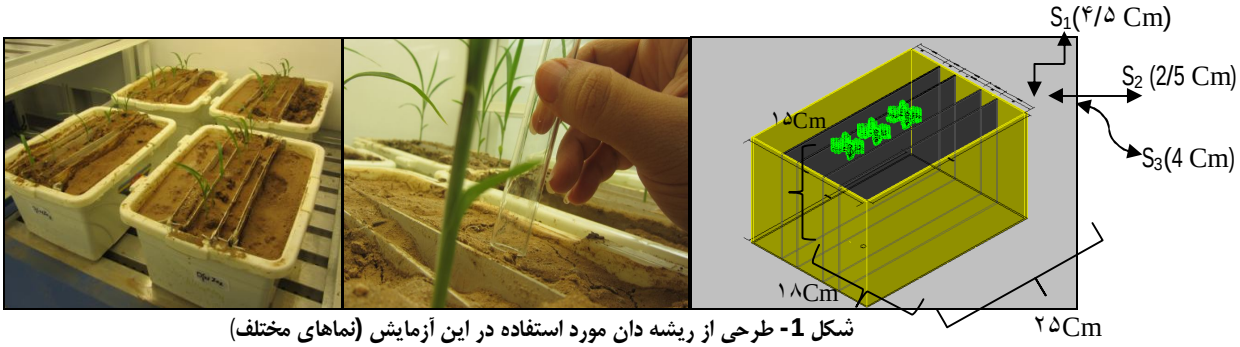
1. Single extractor
2. labile
3. Residual
4. Rhizobox

غلظت بالای عنصر روی را به خوبی دارا می‌باشد (بهاراگاوا و همکاران، 2008). بانک و همکاران (2003) عنوان‌کردند که گیاه سورگوم (*sorghum bicolor* L.) از طریق افزایش فعالیت‌های میکروبی اطراف ریشه توانایی برداشت و حذف آلاینده‌های صنعتی را دارا می‌باشد. برخی دیگر از تحقیقات نشان می‌دهند که گیاه سورگوم با بهبود محیط اطراف ریشه توانایی رشد و سازش در مناطقی با خاک آلوده را دارد (بنشی و همکاران، 2014). موراتوا و همکاران (2009) گزارش کردند که ترشحات ریشه‌ای و فعالیت ریزجانداران در ریزوسفر خاک تحت کشت گیاه سورگوم Moench (*sorghum bicolor* L.) در خاک با آلودگی صنعتی افزایش می‌یابد. ترشحات ریشه‌ای گیاهان از طریق انحلال، کلاته شدن، اکسیداسیون/کاهش، جذب و واجذب بر تغییر اشکال فلزات سنگین اثرگذار می‌باشد (هونگ و همکاران، 2007) اما در بسیاری از این تحقیقات به اهمیت چگونگی اثر توزیع مکانی عناصر در اطراف ریشه این گیاهان پرداخته نشده است.

این پژوهش با هدف مقایسه زیست‌فراهمی روی در خاک تحت تأثیر ریشه گیاه سورگوم Moench (*sorghum bicolor* L.) از طریق جداسازی مکانی ناحیه اطراف ریشه با توده خاک در دو نوع خاک (مجاور و با فاصله دورتر از کارخانه صنعتی) صورت پذیرفت. اثر افزایش غلظت روی در خاک بر غلظت و جذب آن در گیاه سورگوم و تأثیر در زیست‌فراهمی روی در ریزوسفر نیز مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور از چند عصاره-گیر تک‌مرحله‌ای استفاده شده که تعیین مناسب‌ترین عصاره‌گیر برای مقدار روی زیست فراهم نیز از اهداف پیش رو می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جهت انجام این پژوهش دو نمونه خاک با خصوصیات فیزیکی و شیمیایی تقریباً مشابه به صورت مرکب از لایه ی سطحی و از عمق 0 تا 20 سانتی‌متر تهیه گردید. نمونه اول از منطقه بدون آلودگی از شهرستان طالقان با مشخصات: طول جغرافیایی ″21 ′5/3 °36 شمالی و عرض جغرافیایی ″12′9/ 50°28 شرقی، و نمونه ی دوم از مجاورت شرکت صنعتی روی زنگان و پارس روی واقع در جاده‌ی بیجار- زنجان با مشخصات جغرافیایی: طول جغرافیایی ″18/8 ′40 °36 شمالی و عرض جغرافیایی ″3 ′21 °48 شرقی تهیه شد. برخی خصوصیات خاک از جمله بافت (بایوکاس،1962)، pH عصاره اشباع (توماس، 1996)،EC عصاره اشباع (روآدس، 1996) و کربن آلی (نلسون و سامرز،1982) غلظت فلزات سنگین شامل آهن، روی، مس، منگنز و سرب قابل استخراج با HNO_3 4 نرمال (چانگ و همکاران، 1984) اندازه‌گیری شدند. خاک‌های مورد نظر با استفاده از نمک سولفات روی ($ZnSO_4.H_2O$) در سه سطح غلظت ($mg\ kg^{-1}$ 250، 375 و500) و با توجه به مقدار روی اولیه موجود (قابل استخراج با اسید نیتریک) رسانده شد. سطوح غلظتی اعمال گردیده بر مبنای نتایج افزایش غلظت روی تحت تأثیر فعالیت‌های صنعتی این منطقه در چند سال اخیر و محدوده مجاز روی ($mg\ kg^{-1}$ 250-300) در خاک‌ها بوده است (میرشکالی و همکاران، 2012). پس از افزودن نمک سولفات روی، جعبه‌های کشت به مدت سه ماه در دمای 25°C و رطوبت خاک 70 درصد ظرفیت زارعی و رطوبت هوای60 درصد در گرمخانه نگهداری و در این مدت هر هفته آبیاری انجام شد و به املاح درون خاک فرصت داده شد تا با آبیاری به عمق گلدان رفته و با انجام عمل تبخیر به سطح خاک بیایند و بدین ترتیب در کل خاک به طور یکنواخت توزیع شوند (تالوکدر و همکاران، 2011). پس از این مدت و قبل از کشت گیاه اشکال روی با عصاره‌گیرهای موردنظر اندازه‌گیری شدند (جدول 3). برای انجام آزمایش جعبه های کشت پلاستیکی با ابعاد 18×15×25 سانتیمتر (حاوی 8 کیلو خاک) بر اساس تحقیقات گذشته (لینگ و همکاران، 2012)، به منظور بررسی کامل تر فواصل مختلف از ریشه به سه منطقه تقسیم‌بندی شد. این عمل در هر جعبه با استفاده از ورقه‌های مشبک نایلونی (40 مش) سه ناحیه با توجه به امکان تأثیرپذیری از ریشه (ناحیه S_1، S_2 و S_3) جداسازی شدند (شکل1). منطقه بندی مجاور ریشه جهت جلوگیری از نفوذ مستقیم ریشه با این فرضیه که S_1 (تحت تأثیر مستقیم ریشه)، S_2 (متأثر از ترشحات و فعالیت‌های میکروبی ناشی از ریشه‌ها) و S_3 (فقدان اثرات ریشه و ترشحات گیاه) و بر اساس اثر-گذاری ریشه گیاهان علوفه‌ای و تک‌لپه‌ای در فواصل مجاور ریشه در تحقیقات گذشته صورت پذیرفت (ضیایی و میر سید حسینی، 1392).



شکل 1- طرحی از ریشه دان مورد استفاده در این آزمایش (نماهای مختلف)

طرح آزمایشی مورد استفاده طرح آشیانه‌ای-فاکتوریل بر پایه کاملاً تصادفی به صورت گلدانی بود. بذر سورگوم رقم کیمیا به تعداد 10 عدد (تنک شده به 3 عدد) در منطقه میانی هر جعبه کشت (S_1) گردید.

جعبه‌های کشت در دمای 25 درجه سلسیوس، رطوبت هوا 70% و شدت نور 14000LUX به مدت 7 هفته در اتاقک رشد نگهداری شدند. در طول دوره داشت نمونه‌برداری از خاک جعبه‌ها در دو زمان سه و هفت هفته با استفاده از لوله آزمایش[1] به طریقی که در شکل (1) مشاهده می‌گردد، از هر سه منطقه (S_1،S_2،S_3) انجام شد. پس از 7 هفته اندام هوایی و ریشه بوته‌های سورگوم برداشت و جهت تجزیه‌های آزمایشگاهی آماده‌سازی شدند. اندازه‌گیری قابلیت هدایت الکتریکی (روآدس، 1996) از عصاره 1:5 (نسبت وزنی- حجمی خاک به آب) استفاده شد. در نمونه‌های خاک مقادیر روی قابل استخراج با HNO_3 4 نرمال (غیر قابل دسترس و نزدیک به کل) (چانگ و همکاران، 1984)، قابل استخراج با $0/1Ca(NO_3)_2$ نرمال (تبادلی و جذب سطحی) (منچ و همکاران، 1994)، قابل استخراج باDTPA+TEA 0/005 مولار (قابل جذب گیاه) (لیندزی و نورول، 1978) و قابل استخراج با آب مقطر (محلول در آب) (آبرئو و همکاران، 2006) اندازه‌گیری گردید. ارزیابی مقدار روی در نمونه-های گیاهی توسط هضم به روش سوزاندن خشک[2] و ترکیب با HCl یک نرمال صورت گرفت (والینگ و همکاران، 1989). غلظت روی در عصاره‌های به دست آمده به روش اسپکتروسکوپی، با دستگاه جذب اتمی مدل Schimadzo AA-670 قرائت گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط نرم افزار SAS 9.2، مقایسات میانگین با آزمون LSD در سطح 5%و رسم نمودارها نیز با برنامه Sigma Plot 11.0و Excel 2010 صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک‌های مطالعه شده در جدول (1) آورده شده است. اگر چه اغلب خصوصیات فیزیکی، شیمیایی خاک‌ها قبل از اعمال تیمارها (مانند مقدار pH، ماده آلی، EC، بافت، رطوبت اشباع و جرم مخصوص ظاهری) برای هر دو خاک مشابه، اما غلظت عناصر سنگین شامل روی، سرب، منگنز (با توجه به مکان نمونه‌برداری خاک) در خاک آلوده هرکدام به ترتیب 6، 13 و 15 برابر بیشتر از خاک غیرآلوده بودند (جدول1). غلظت فلزات سنگین عامل مهمی جهت تغییر فعالیت ریزجانداران موجود خاک در شرایط کشت یکسان می‌باشد (سندا و همکاران، 1999). به طورکلی، هر دو خاک از لحاظ خصوصیات مهم جهت قابلیت کشت گیاهان زراعی محدودیتی نداشتند (فاجریا و موریرا، 2011).

[1] Test tube
[2] Dry ashing

جدول 1- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک ها قبل از اعمال تیمارها

شاخص ها	خاک (1)	خاک (2)
pHe	8/4	8/2
ECe($dS\ m^{-1}$)	1/1	1/3
بافت خاک	لوم رسی شنی	لوم رسی شنی
% رس	26	31/8
% سیلت	27/6	22
% شن	46/4	46/2
جرم مخصوص ظاهری ($g\ Cm^{-3}$)	1/11	1/21
% رطوبت گل اشباع	34/68	35/38
Fe-HNO_3($mg\ kg^{-1}$)	242/5	220/7
Zn-HNO_3($mg\ kg^{-1}$)	38/26	223/7
Cu-HNO_3($mg\ kg^{-1}$)	18/8	21/97
Mn-HNO_3($mg\ kg^{-1}$)	25/8	327/5
Pb-HNO_3($mg\ kg^{-1}$)	15/5	227

با توجه به اینکه طرح مورد نظر آشیانه‌ای- فاکتوریل می‌باشد، بررسی اثر ریشه گیاه به صورت منطقه (گیاه) بیان گردید. بدین مفهوم که ریشه گیاه در داخل فواصل جداسازی شده اطراف ریشه، از نظر آماری قابلیت ایجاد تغییر را دارد یا خیر. اثرگذاری ریشه گیاه بر اشکال روی قابل استخراج با آب مقطر در سطح ($p<0/01$) و نیترات کلسیم و DTPA در سطح ($p<0/05$) معنی‌دار بوده، در حالی که بر اشکال قابل استخراج با اسیدنیتریک معنی‌دار نبوده است. اما تأثیر آن در روی قابل استخراج با اسیدنیتریک در طول زمان معنی‌دار ($p<0/05$) شد. معنی‌داری سطوح غلظتی روی و نوع خاک بر این اشکال در سطح احتمال ($p<0/01$) می‌باشد. اثر زمان و همچنین زمان در منطقه بر تغییر اشکال روی قابل استخراج با HNO_3، DTPA و H_2O در سطح ($p<0/01$) معنی‌دار بوده است. اثر مناطق جداسازی شده بر تغییر اشکال روی قابل استخراج با HNO_3، DTPA نیز معنی‌دار بوده است.

نتایج این مطالعه نشان داده است که افزایش غلظت اعمال شده روی در دو خاک آلوده و غیر آلوده موجب افزایش معنی‌دار ($p<0/05$) غلظت این عنصر در تمام اشکال عصاره‌گیری شده پس از سه ماه دوره انکوباسیون می‌گردد (جدول 3).

جدول 2- خلاصه جدول تجزیه واریانس اشکال شیمیایی روی در خاک

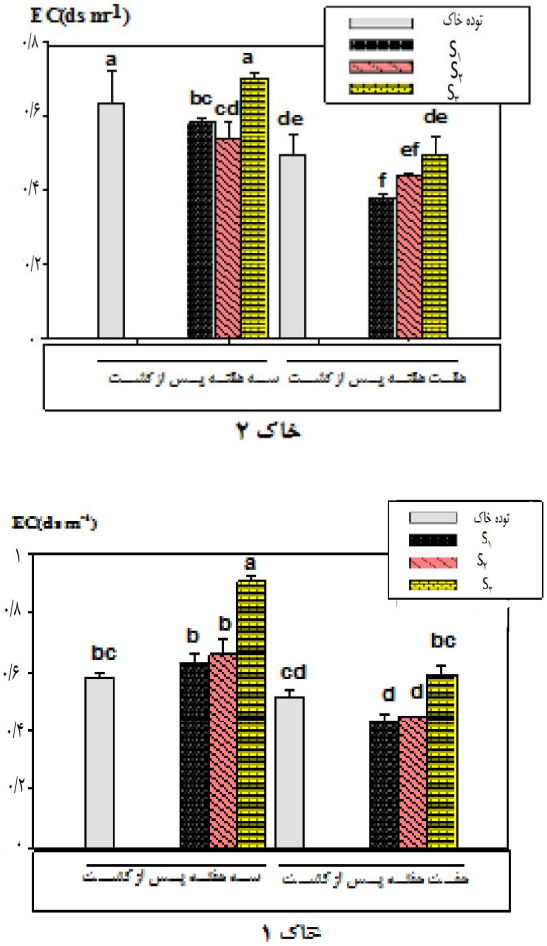
	میانگین مربعات					
منابع تغییرات	درجه آزادی	HNO_3	DTPA	$Ca(NO_3)_2$	H_2O (d.w)
منطقه	2	$3814/06^{**}$	$38/6^{*}$	$0/0021^{ns}$	$0/00095^{ns}$
منطقه (گیاه)	3	$1350/3^{ns}$	$40/6^{*}$	$0/15^{*}$	$0/012^{**}$
زمان	1	$14457/06^{**}$	$777/4^{**}$	$0/007^{ns}$	$0/28^{**}$
زمان* منطقه	2	$394/046^{**}$	64^{**}	$0/05^{ns}$	$0/02^{**}$
زمان * منطقه (گیاه)	3	$1967/25^{*}$	48^{*}	$0/045^{ns}$	$0/0155^{**}$
خطای (الف)	12	511/78	9	0/456	0/002
روی	2	$679443/6^{**}$	49169^{**}	$2/95^{**}$	$0/53^{**}$
خاک	1	171114^{**}	442^{**}	$0/28^{**}$	$0/0144^{**}$
خطای (ب)	60	419	9/1	0/031	0/021

** ، * و ns به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال 99 درصد ($p<0/01$)، 95 درصد ($p<0/05$) و عدم معنی‌داری می‌باشد.

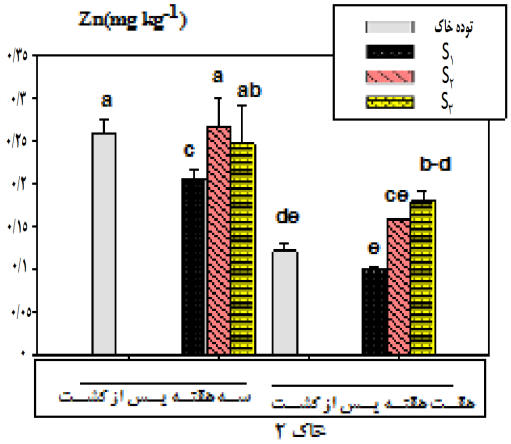
جدول 3- میانگین غلظت روی قابل استخراج با عصاره گیرها پس از سه ماه انکوباسیون (قبل از کشت)

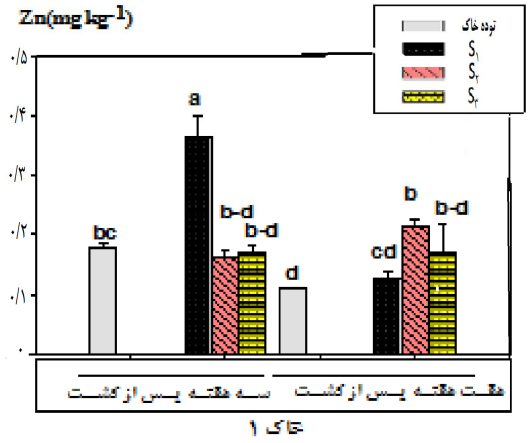
H_2O ($mgkg^{-1}$)	$Ca(NO_3)_2$ ($mgkg^{-1}$)	DTPA+TEA ($mgkg^{-1}$)	HNO_3 ($mgkg^{-1}$)		
$0/015^{c}$	$0/165^{b}$	$20/7^{b}$	244^{b}	Zn_1	خاک(1)
$0/199^{b}$	$0/249^{ab}$	$27/22^{b}$	$358/5^{ab}$	Zn_2	
$0/38^{a}$	$0/457^{a}$	$59/025^{a}$	472^{a}	Zn_3	
$0/111^{b}$	$0/215^{b}$	$23/015^{b}$	301^{c}	Zn_1	خاک(2)
$/113^{b}$	$0/225^{b}$	$27/838^{b}$	398^{b}	Zn_2	
$0/205^{a}$	$0/42^{a}$	59^{a}	565^{a}	Zn_3	

*حروف مشترک در هر ستون خاک (به طور جداگانه در دو خاک) نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌داری در سطح پنج درصد می‌باشد. سطوح غلظتی روی در جدول فوق (Zn_1=250mg kg^{-1}، Zn_2=375mg kg^{-1} و Zn_3=500mg kg^{-1}) می‌باشد.

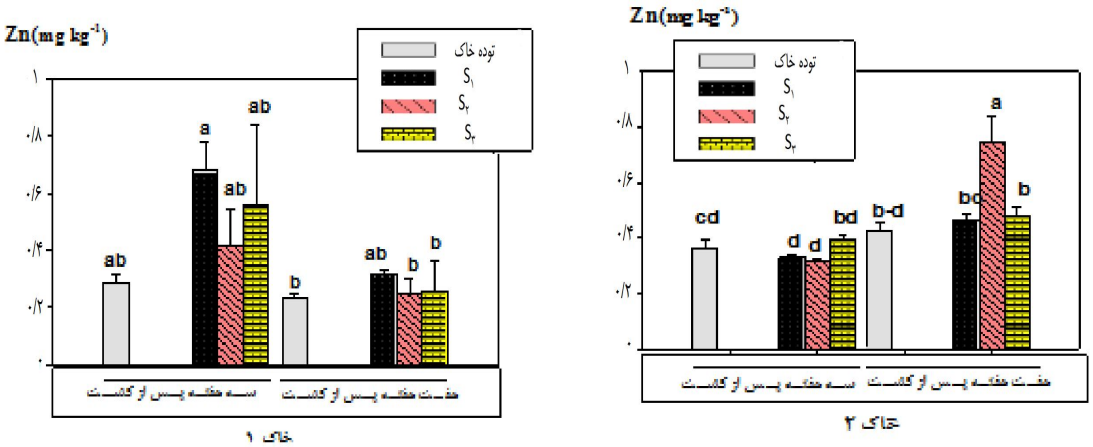


شکل 2- میانگین هدایت الکتریکی ($dS\ m^{-1}$) در نقاط نمونه‌برداری خاک (S_1،S_2،S_3) در محیط کشت و خاک شاهد (توده خاک) (تفاوت معنی‌داری در سطح پنج درصد می‌باشد)

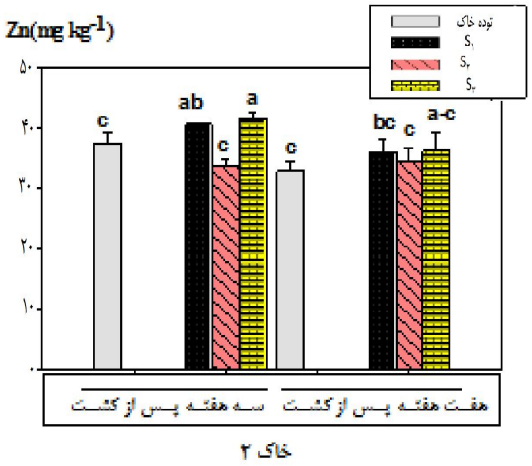


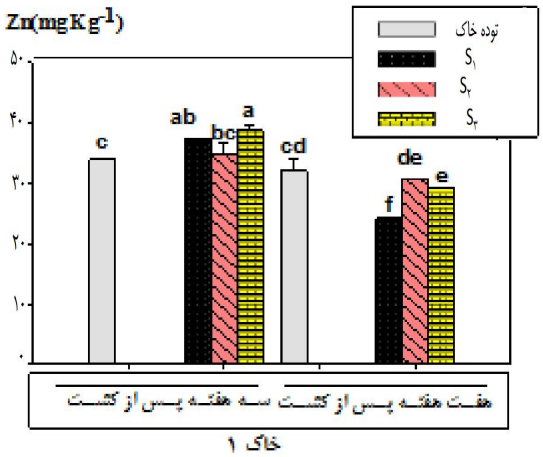


(الف)- میانگین غلظت روی قابل استخراج با آب مقطر ($mg\ kg^{-1}$)

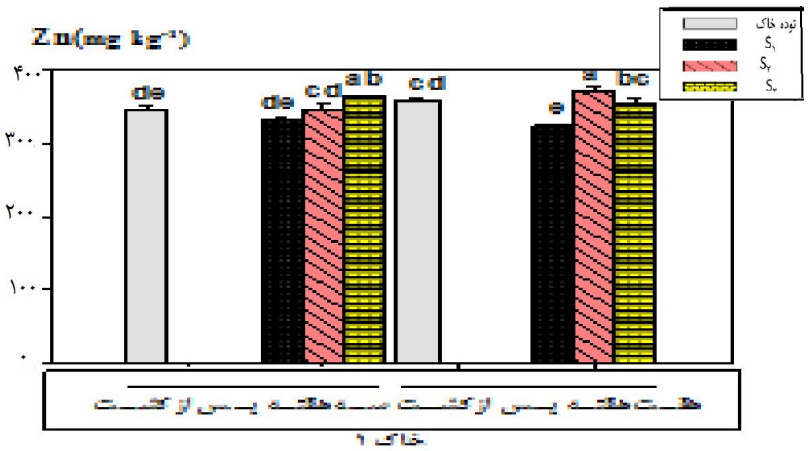


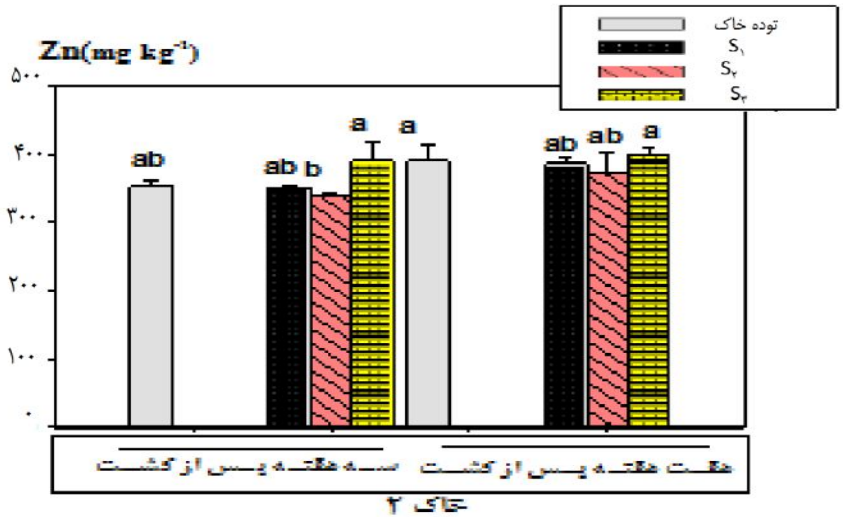
(ب)- میانگین غلظت روی قابل استخراج با نیترات کلسیم ($mg\ kg^{-1}$)





(پ)- میانگین غلظت روی قابل استخراج با DTPA+TEA (mg kg^{-1})





(ت)- میانگین غلظت روی قابل استخراج با HNO_3 ($mg\ kg^{-1}$)

شکل 3- تغییر زیست فراهمی روی در مناطق مختلف جداسازی شده خاک (S_1،S_2،S_3) سه و هفت هفته پس از کشت برای عصاره گیرهای مختلف (تفاوت معنی‌داری در سطح پنج درصد می‌باشد)

قابلیت هدایت الکتریکی

مقایسه قابلیت هدایت الکتریکی ($dS\ m^{-1}$) (شکل 2) زمان سه و هفت هفته، اختلاف معنی‌دار ($p<0/05$) در مناطق جداسازی شده از هر دو خاک را نشان می‌دهد. این مقادیر در خاک تحت کشت سورگوم (مناطق S_1 و S_2) کمتر از فواصل دورتر از ریشه (S_3) می‌باشد. در واقع هدایت‌الکتریکی به عنوان شاخصی از قدرت یونی محلول خاک و غلظت عناصر محلول در فاصله 7 سانتیمتری اطراف ریشه تغییر معنی‌داری داشته است. این موضوع در جهت تأیید انتخاب مناسب فواصل جداسازی شده اطراف کشت گیاه می‌باشد.

روی قابل استخراج با آب مقطر

مقایسه روی قابل استخراج با آب مقطر ($mg\ Kg^{-1}$) (شکل 3- الف) زمان سه و هفت هفته، اختلاف معنی‌دار ($p<0/05$) در مناطق جداسازی شده از هر دو خاک را نشان می‌دهد. سه هفته پس از کشت، غلظت روی در ریزوسفر (منطقه S_1) خاک غیرآلوده تقریباً دو برابر توده خاک و سایر مناطق جداسازی شده (S_2 و S_3) می‌باشد درحالی که درخاک آلوده 20% کاهش مشاهده شد. به طور کلی روی قابل استخراج با آب مقطر در هفت هفته نسبت به سه هفته در مناطق ریزوسفر، مجاور آن و توده خاک کاهش یافت.

روی قابل استخراج با نیترات کلسیم

مقایسه روی قابل استخراج با نیترات کلسیم ($mg\ Kg^{-1}$) (شکل 3- ب) در زمان سه و هفت هفته، اختلاف معنی‌داری ($p<0/05$) در مناطق جداسازی شده از خاک آلوده را نشان می‌دهد. سه هفته پس از کشت، غلظت روی در ریزوسفر (منطقه S_1) خاک غیرآلوده 130% توده‌خاک افزایش یافته است. در هفت هفته، غلظت روی در مجاور ریزوسفر (منطقه S_2) خاک آلوده 67% نسبت به توده خاک افزایش یافته است.

روی قابل استخراج با DTPA+TEA

مقایسه روی قابل استخراج با DTPA+TEA ($mg\ Kg^{-1}$) (شکل 3- پ) زمان سه و هفت هفته، اختلاف معنی‌دار ($p<0/05$) در مناطق جداسازی شده از هر دو خاک را نشان می‌دهد. روند تغییر روی قابل جذب گیاه برای دو خاک در زمان سه هفته مشابه می‌باشد. در سه هفته، هر دو خاک در منطقه ریزوسفری (S_1) نسبت به توده خاک افزایش مشاهده شد (خاک آلوده 40 در مقابل ($mg\ Kg^{-1}$) 37/53 و خاک غیر آلوده 37 در مقابل ($mg\ Kg^{-1}$) 33/8).

روی قابل استخراج با اسید نیتریک

مقایسه روی قابل استخراج با اسیدنیتریک ($mg\ Kg^{-1}$) (شکل 3- ت) زمان سه و هفت هفته، اختلاف معنی‌دار ($p<0/05$) در مناطق جداسازی شده از هر دو خاک را نشان می‌دهد. سه هفته پس از کشت، غلظت روی در ریزوسفر (منطقه S_1) خاک غیرآلوده از ($mg\ Kg^{-1}$) 358 به ($mg\ Kg^{-1}$) 325 به طور معنی‌داری ($p<0/05$) کاهش می‌یابد.

با توجه به تغییر محسوس اشکال زیستفراهم روی در دو زمان ابتدا و سه هفته پس از کشت، تغییرات آن به طور نسبی در مجموع خاک‌ها در جدول (4) ارائه گردید.

با توجه به نتایج، سهم روی قابل استخراج با اسیدنیتریک 0/46 درصد در توده خاک افزایش و در منطقه ریزوسفری (S_1) 0/65 درصد کاهش یافته است. بعلاوه، تغییر در سهم سایر اشکال زیست‌فراهم در توده خاک شامل قابل استخراج با آب مقطر (0/005% افزایش)، نیترات کلسیم (0/014% افزایش) و DTPA (0/52% کاهش) نیز مشاهده شده است. در حالی که در ریزوسفر (S_1) سهم هر یک از اشکال زیست فراهم فوق شامل قابل استخراج با آب مقطر (0/017%) و نیترات کلسیم (0/046%) و DTPA (0/6%) افزوده شده است (جدول4).

جدول تجزیه واریانس خصوصیات گیاه به شرح زیر می‌باشد (جدول 5). نوع خاک بر غلظت و جذب روی شاخساره اثر معنی‌دار ($p<0/01$) دارد، در حالی که این تفاوت معنی‌دار در ریشه مشاهده نشد. نوع خاک در انتقال عنصر روی از ریشه به شاخساره اثرگذار بوده است. افزایش سطوح روی بر غلظت و جذب روی در ریشه ($p<0/01$) و شاخساره ($p<0/05$) گیاه به طور معنی‌داری تأثیر داشته است.

همانطور که از شکل (4) مشاهده می‌شود با افزایش غلظت روی در خاک ها، غلظت آن در ریشه و شاخساره نیز از سطح اول تا سوم به طور معنی‌داری ($p<0/01$) افزایش یافته است. بیشترین غلظت روی در ریشه خاک آلوده در سطح سوم روی ($673 mg\ kg^{-1}$) و کمترین آن در شاخساره همین خاک در سطح اول روی ($166\ mg\ kg^{-1}$) می‌باشد. به طور کلی، غلظت روی در ریشه دو برابر آن در شاخساره می‌باشد. همچنین، در خاک غیرآلوده مقدار جذب در ریشه 80% بیشتراز شاخساره است، در حالی که در خاک آلوده این مقدار 168% در ریشه بیشتر از شاخساره می‌باشد.

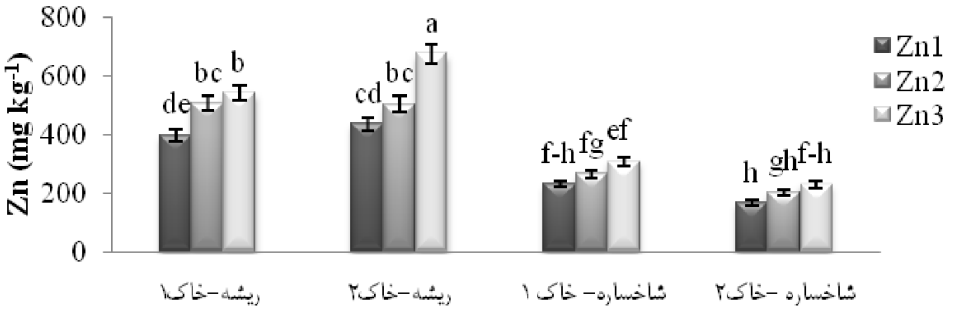
جدول 4- سهم نسبی روی قابل استخراج با هر یک از عصاره گیرها در دو زمان ابتدای کشت و هفت هفته پس از آن

	$Zn(HNO_3)$	Zn (DTPA+TEA)	$Zn(Ca(NO_3)_2)$	$Zn(H_2O)$
ابتدای کشت	91/74%	8/15%	0/065%	0/037%
توده خاک (پایان کشت)	92/2%	7/63%	0/079%	0/042%
ریزوسفر (S_1) (پایان کشت)	91/07%	8/75%	0/111%	0/054%

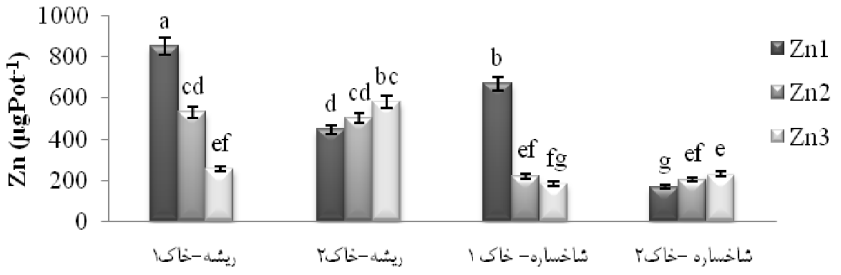
جدول 5- خلاصه جدول تجزیه واریانس روی در گیاه

		میانگین مربعات			
		غلظت روی		جذب روی	
	درجه آزادی	ریشه	شاخساره	ریشه	شاخساره
خاک	1	9271ns	14057/5**	4034/1ns	62229/4**
روی	2	36616/1**	4903/4*	53778/2**	31140/03**
خاک^{x}روی	2	4844/89ns	78/2ns	133460**	135592/8**
خطا	6	3115	810	3643	4884

** ، * و ns به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال 99 درصد ($p<0/01$)، 95 درصد ($p<0/05$) و عدم معنی‌داری می‌باشد.



شکل 4- غلظت روی در ریشه و شاخساره (تفاوت معنی‌داری در سطح پنج درصد می‌باشد)



شکل 5- جذب روی در ریشه و شاخساره در دو خاک (تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد می‌باشد)

با توجه به شکل (5)، نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت در خاک، جذب روی در ریشه و شاخساره خاک غیرآلوده روند کاهش معنی‌داری ($p<0/01$) دارا می‌باشد. این موضوع می‌تواند مربوط به تأثیر منفی روی بر زیست توده گیاهی در آزمایش باشد. در حالی‌که، در همین خاک با افزایش غلظت روی جذب نیز به طور معنی‌داری در ریشه و شاخساره ($p<0/01$) افزایش می‌یابد. بیشترین مقدار جذب در ریشه خاک غیرآلوده ($853\ \mu g\ pot^{-1}$) و کمترین آن در شاخساره خاک آلوده ($166\ \mu g\ pot^{-1}$) می‌باشد.

نتایج جدول (6) نشان می‌دهد که در خاک غیرآلوده روی قابل جذب گیاه در تمام سطوح آن در منطقه ریزوسفر کاهش می‌یابد. ریزوسفر خاک غیرآلوده در سطح اول، دوم و سوم 5، 43 و 18 درصد غلظت روی قابل جذب گیاه کاهش یافته است.

جدول 6- تغییرات روی قابل استفاده گیاه (عصاره گیری شده با DTPA+TEA) در پایان کشت ($mg\ kg^{-1}$)

	خاک (1)		خاک (2)	
	منطقه ریزوسفر (S_1)	توده خاک	منطقه ریزوسفر (S_1)	توده خاک
Zn_1	11/2*	11/83	30/6**	13/96
Zn_2	16/5**	28/95	$21/6^{ns}$	23/43
Zn_3	45/15**	55/2	56/8*	61/16

** ، * و ns به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال 99 درصد ($p<0/01$)، 95 درصد ($p<0/05$) و عدم معنی‌داری می‌باشد.

نتایج همبستگی شاخص‌های غلظت و جذب با اشکال مختلف آن در خاک نشان داد که بیشترین همبستگی در اشکال قابل استخراج با اسیدنیتریک، غلظت و جذب آن در ریشه و شاخساره ($p<0/01$) وجود داشت. البته این همبستگی در خاک آلوده تحت تأثیر افزایش غلظت روی برهمکنش منفی با جذب آن در ریشه و شاخساره ($r_{root}=-0/97^{**}$ و $r_{shoot}=-0/92^{**}$)($p<0/01$) داشت (جدول7).

جدول 7- ضرایب همبستگی پیرسون بین روی قابل استخراج با اسیدنیتریک و جذب و غلظت آن در ریشه و شاخساره

	خاک 1				خاک 2			
	غلظت		جذب		غلظت		جذب	
	ریشه	شاخساره	ریشه	شاخساره	ریشه	شاخساره	ریشه	شاخساره
$Zn(HNO_3)$	$0/94^{**}$	$0/95^{**}$	$-0/97^{**}$	$-0/92^{**}$	$0/99^{**}$	$0/97^{**}$	$0/999^{**}$	$0/94^{**}$

** ، * و ns به ترتیب معنی‌داری در سطح 0/01 ، 0/05و عدم معنی‌داری می‌باشد.

افزایش غلظت اعمال شده روی در دو خاک آلوده و غیرآلوده موجب افزایش غلظت این عنصر در تمام اشکال قابل استخراج پس از سه ماه دوره انکوباسیون شد. این نتایج با نتایج هونگ و همکاران (2007) در دامنه غلظت-

های مشابه روی مطابقت دارد. قابلیت هدایت‌الکتریکی در ریزوسفر و مجاور ریزوسفر (S_1 و S_2) نسبت به فواصل دورتر (S_3) در هر دو خاک کاهش یافت. نتایج مشابهی توسط برخی پژوهشگران نیز گزارش شده است (مارشنر، 1995; فیتز، 2003). آنها علت کاهش غلظت عناصر از منابع محلول در آب و ناپایدار را به جذب توسط گیاه نسبت دادند و این امر موجب کاهش قابلیت هدایت الکتریکی شد. روند جذب گیاه از منابع محلول در هر دو خاک مشابه بود.

در خاک غیرآلوده و در زمان سه هفته، اشکال ضعیف پیوندشده (زیست‌فراهم‌تر) شامل محلول، قابل استخراج با نیترات کلسیم و DTPA در ریزوسفر (منطقه S_1) افزایش یافت. این نتایج با نتایج هونگ و همکاران (2007) در یک خاک مشابه و غیرآلوده هماهنگی دارد. لینهان و همکاران (1989) و زو و همکاران (2007) عنوان کردند که غنی‌سازی ریزوسفر در مراحل اولیه رشد بیشتر از زمان‌های پس از آن می‌باشد. زو و همکاران (2007) گزارش کردند که افزایش غلظت روی در خاک ریزوسفری ناشی از افزایش ترشح ترکیبات آلی ریشه‌های گیاه چاودار می‌باشد. این مواد از طریق کلات کردن و انحلال موجب رهاسازی روی فعال در خاک شده و در نتیجه زیست فراهمی آن را افزایش می‌دهند. در خاک غیرآلوده، غلظت روی قابل استخراج با اسید نیتریک از روند $S_1<S_2<S_3$ پیروی نمود. در واقع غلظت آن در خاک ریزوسفری (منطقه S_1) نسبت به سایر مناطق (S_2 و S_3) کاهش یافت. همچنین، این اشکال در هفت هفته پس از شروع کشت در ریزوسفر (منطقه S_1) نسبت به توده خاک کاهش یافت. فلزات موجود در بخش باقی‌مانده معمولا در طول دوره‌های زمانی کوتاه مدت و تحت وضعیت طبیعی موجود در خاک رها نمی‌شوند (گوپتا و سینها، 2006).

در خاک آلوده روند مشابهی از افزایش اشکال محلول، قابل استخراج با نیترات کلسیم در زمان سه و هفت هفته و اشکال قابل استخراج با اسید نیتریک در منطقه ریزوسفری (S_1) مشاهده نشد. این نتیجه مربوط به کاهش فعالیت ریشه و ترشحات آن در شرایط غلظت بالای سایر فلزات سنگین است، که با نتایج باقری و میرسیدحسینی (1393) مطابقت دارد. در هفت هفته، غلظت روی در مجاور ریزوسفر (منطقه S_2) خاک آلوده نسبت به توده خاک افزایش یافت. این امر حاکی از آن است که بخش قابل توجهی روی از سطوح تبادلی در منطقه ریزوسفر (S_1) جذب شد. نتایج مشابهی در مورد تغییر غلظت اشکال عناصر فلزی در ریزوسفر توسط سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است (یانگ و همکاران، 2010؛ حسین پور و متقیان،2013). تفاوت در خصوصیات خاک‌ها به‌عنوان عامل مؤثر در غلظت اشکال روی شناخته می‌شود. محیط هر خاک شامل عوامل فیزیکی، شیمیایی و زیستی است که می‌توانند بر رشد ریشه گیاهان مؤثر باشد (ضیایی و میرسیدحسینی، 1392). یانگ و همکاران (2010) گزارش کردند که تحرک و غلظت روی در ریزوسفر خاک‌های آلوده کاهش و در خاک غیرآلوده افزایش یافت. در خاک غیرآلوده به علت بهبود شرایط کشت میزان ترشحات ریشه و فعالیت‌های میکروبی افزایش می‌یابد. در نتیجه، موجب انحلال روی از فازهای باقیمانده به اشکال قابل‌دسترس و زیست‌فراهم تر می‌گردد. ترشحات ریشه از طریق کلات کردن، اکسیداسیون و احیا می‌توانند حلالیت، جذب، واجذب، جزءبندی و انتقال فلزات‌سنگین در خاک را تغییر دهند (کوآنگ و همکاران، 2003). اما قرار گرفتن این گیاه در شرایط آلودگی سایر فلزات‌سنگین از این نقش آنها می‌کاهد.

در مجموع با توجه به نتایج، اگرچه به علت جذب اشکال زیست‌فراهم (عصاره‌گیری شده با DTPA، نیترات کلسیم و آب مقطر) در ریزوسفر کاهش غلظت روی زیست‌فراهم مشاهده شد، اما اثر کشت گیاه موجب افزایش سهم نسبی این اشکال گردید. این نتایج با نتایج (لینهان و همکاران، 1989) هماهنگی دارد. همچنین با توجه به نتایج بانک و همکاران (2003) و باقری و میر-سیدحسینی (1393) گیاه سورگوم با بهبود فعالیت زیستی در منطقه ریشه تحت شرایط غلظت بالای فلزات‌سنگین بر ترشحات ریشه‌ای و فعالیت میکروبی می‌افزاید. این اثر با افزایش سهم نسبی اشکال قابل دسترس و جذب آن در منطقه ریزوسفر همراه بوده است.

سورگوم در شرایط بدون آلودگی به مقدار بیشتری روی (30 درصد) را از محدوده اطراف ریشه‌های خود جذب می‌کند. این موضوع با کاهش غلظت روی قابل جذب گیاه (عصاره‌گیری شده با DTPA) در ریزوسفر خاک غیرآلوده هماهنگی دارد. به نظر می‌رسد فراهمی بیشتر روی در منطقه ریزوسفر شرایط جذب بهتر آن توسط گیاه را فراهم ساخته است. غلظت روی در ریشه، شاخساره و همچنین با توجه به نوع خاک متفاوت بود. عوامل مؤثر در نسبت‌های متفاوت فلزات‌سنگین بین خاک و بافت‌های مختلف گیاه می‌تواند ناشی از دسترسی زیستی، ضروری و غیرضروری بودن عنصر برای گیاه باشد (عین الهی،1391). غلظت روی در ریشه بیش از بخش هوایی بوده است. روی از جمله فلزات‌سنگینی می‌باشد که تحرک بالایی در گیاه ندارد. بنابراین غلظت

زیادی از آن در ریشه تجمع می‌یابد (یانگ و همکاران، 2010). افزایش غلظت روی در خاک غیرآلوده، موجب کاهش جذب در شاخساره گیاه سورگوم گردید. این نتایج با نتایج اسنی (2009) مطابقت دارد. در حالی که در خاک آلوده با وجود غلظت بالای برخی از سایر فلزات سنگین این موضوع مشاهده نگردید. کاهش تأثیر روی در برهمکنش با سایر عناصر در خاک آلوده تا حدی موجب تعدیل اثر منفی افزایش غلظت آن بر زیست توده شده است، که توسط سایر محققین از جمله آلووی (2008) نیز گزارش شده است. مشاهده همبستگی معنی‌دار بین روی قابل استخراج با HNO_3 با مقدار جذب و غلظت آن در گیاهی که تحت‌تأثیر افزایش سطوح غلظتی روی می‌باشد، دلیل مناسبی برای استفاده از این عصاره‌گیر جهت تخمین مقدار روی در خاک می‌باشد.

به عبارت دیگر، این گیاه در خاک غیر آلوده توانایی افزایش فراهمی روی از بخش‌های کم‌فراهم تر و به دنبال آن جذب بیشتر آن را دارد. این نتایج با نتایج گلستانی‌فرد و همکاران (1393) مطابقت دارد. آنها بیان نمودند که روندکلی تغییرشکل‌های شیمیایی روی بیانگر تمایل سیستم خاک-ریشه به افزایش فراهمی روی در ریزوسفر می‌باشد یعنی کاهش از بخش‌های کربناتی، اکسیدهای آهن، منگنز و مواد آلی (با پتانسیل فراهمی متوسط تا کم) و افزایش به بخش تبادلی و محلول با پتانسیل فراهمی زیاد.

نتیجه‌گیری

در منطقه ریزوسفر، اشکال مختلف روی شامل قابل استخراج با آب مقطر، نیترات کلسیم و DTPA در فواصل زمانی سه هفته افزایش و اشکال روی پیوند خورده با کربنات‌ها و زیست فراهمی کمتر شامل قابل استخراج با اسید نیتریک در هفت هفته پس از شروع کشت در خاک غیرآلوده کاهش یافت. در هر سطح غلظتی روی و در هر خاک روند مشابهی از تغییر غلظت اشکال روی در فواصل جداسازی شده مجاور ریشه مشاهده نشد. این امر ناشی از تفاوت در فعالیت زیستی تأثیرگذار بر تغییر اشکال در هر سطح غلظتی می‌باشد. متوسط درصد کاهش سهم روی استخراجی‌با عصاره‌گیرهای مختلف در ریزوسفر به ترتیب $Zn > Zn(DTPA+TEA) > Zn(Ca(NO_3)_2) > Zn(H_2O)$ (HNO_3) بود. با افزایش غلظت روی در هر دو خاک، غلظت‌آن در ریشه و شاخساره نیز از سطح اول تا سوم به طور معنی‌داری افزایش یافت. افزایش غلظت روی در خاک غیرآلوده، به دلیل تأثیر منفی بر زیست توده گیاهی با روندکاهشی در جذب روی در ریشه و شاخساره همراه بود. در حالی که، در خاک آلوده با افزایش غلظت روی، جذب در ریشه و شاخساره افزایش نشان داد. با توجه به همبستگی معنی‌دار غلظت و جذب روی در گیاه با روی قابل استخراج با اسید نیتریک در خاک ریزوسفری، توصیه می‌شود که این عصاره‌گیر در برآورد روی قابل استفاده گیاه تحت تأثیر سطوح غلظتی آن ($250\ mg\ kg^{-1}$، 375 و 500)، مورد استفاده بیشتری قرار گیرد.

کشت گیاه سورگوم *sorghum bicolor* (L.) Moench می‌تواند باعث افزایش فراهمی فلز روی در ریزوسفر و به تبع آن افزایش جذب آن توسط گیاه شود. با توجه به اینکه غلظت بحرانی روی در گیاه سورگوم بین (8 تا 25 میلی‌گرم بر کیلوگرم ماده خشک) می‌باشد، کشت این گیاه در این سطوح غلظتی (250- 500 میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک خشک) ممکن است برای استفاده آن بعنوان خوراک دام و انسان مشکل‌ساز باشد (برنان و همکاران، 1993). نتایج این پژوهش، ضرورت توجه به انتخاب صحیح روش‌های نمونه‌برداری و عصاره‌گیری از خاک برای ارزیابی مقدار عناصر قابل جذب گیاه را تأیید می‌نماید. همچنین روش‌های مورد استفاده در این مطالعه از جمله ریشه‌دان و جداسازی منطقه ریزوسفری می‌تواند در ارزیابی فراهمی عناصرفلزی یا مطالعات آلودگی و تجمع فلزات سنگین در خاک‌ها بکار گرفته شود.

فهرست منابع:

1. المدرس، ع.، ر. طاهری و صفوی. و.1387. سورگوم (گیاهشناسی، زراعت و بیوتکنولوژی). جهاد دانشگاهی واحد اصفهان.
2. باقری، س، و ح، میرسیدحسینی. 1393. بررسی اثر کشت گیاه سورگوم در تغییر برخی شاخص‌های زیستی گیاه در سطوح مختلف روی. نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی). جلد 28، شماره 6، ص 1217-1227.

3. ریحانی تبار، ع ، ن.ع.کریمیان، م. اردلان، غ. ر. ثواقبی و م. ر. قنادها. 1385. توزیع شکل‌های مختلف روی و ارتباط آنها با ویژگی‌های خاک در برخی خاک‌های آهکی استان تهران. نشریه علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. جلد 10، شماره 3، ص 135-125.
4. ضیایی، م، و ح، میرسیدحسینی. 1392. بررسی تغییرات مقادیر سرب قابل استخراج با عصاره‌گیرهای مختلف در ریزوسفر و توده خاک ذرت و کلزا و مقادیر سرب در دو گیاه. نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار. جلد 3، شماره اول، ص59-75.
5. عین الهی پیر، ف. 1391. بررسی میزان تجمع فلزات سنگینCd,Cu,Ni,Zn در رسوبات و بافت‌های درخت حرا در Avicennia marina خلیج گواتر، دریای عمان. نشریه اقیانوس شناسی. جلد11، شماره3، ص73-82.
6. گلستانی فرد، ع. ر.، میرسیدحسینی، ح.، آرین، آ.، عباس زاده دهجی، و پ، تفویضی. 1393. تغییرات شکل‌های شیمیایی روی در ریزوسفر برخی از ارقام ترب و شلغم. نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار. جلد 4، شماره 4، ص 193-214.
7. Abreu, C.A., Angela, A.M., Furlani C., Furlani P.RAbreu, M.F.,andO.C.Bataglia. 2006. Quest of water extract analysis of micronutrients in soilless organic substrates. Comm. Soil Sci. Plant Anal.J. 37: 2327–2338.
8. Alloway, B.J. 2008. Zinc in soils and crop nutrition. International Zinc Association. Brussels, Belgium.
9. Anju, M. and D.K.Banerjee. 2011. Associations of cadmium, zinc, and lead in soils from a lead and zinc mining area as studied by single and sequential extractions. Environ..Monit.Assess.176:67-85.
10. Baneshi, M.M. Rezaei Kalantary, R. Jonidi Jafari, A. Nasseri, S. Jaafarzadeh, N and A. Esrafili. 2014. Effect of bioaugmentation to enhance phytoremediation for removal of phenanthrene and pyrene from soil with Sorghum and Onobrychis sativa. J Environ Health Sci. Eng. (1)12-24.
11. Banks, M.K., Kulakow, P., Schwab, A.P., Chen, Z., Rathbone, K. 2003. Degradation of crude oil in the rhizosphere of Sorghum bicolor. See comment in PubMed Commons belowInt J Phytoremediation. 5(3):225-34.
12. Bhargava, A., Shukla, S., Srivastava, J., Singh, N and D.Ohri. 2008. Chenopodium: aprospective plant for phytoextraction. ActaPhysiol. Plant. J. 30: 111–120.
13. Bouyoucos, C.J. 1962. Hydrometer method improved for making particle-size analysis of soil. Agron.J. 54:464-465.
14. Brennan, R.F., Armour, J.D., and D.J., Reuter. 1993. Diagnosis of zinc deficiency, Chap 12 in Roboson, A.D. (ed) Zinc in Soils and Plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Pp206.
15. Chang, A.C., Warneke, J.E., Page, A.L. and L.J. Lund. 1984. Accumulationof heavy metals in sewage sludge- treated soils. Environ. Qual. J. 13: 87-91.
16. Fageria, N. K. and A .Moreira. 2011. The role of mineral nutrition on root growthof crop plants. In Donald L. Sparks, editor: Adv. in Agron.. 110.Burlington. Academic Press. 251-331.
17. Feng, M. H., Shan, X. Q, Zhang, Sh. Zh and B. Wen. 2005. Comparison of a rhizosphere-based method with other one-step extraction methods for assessing the bioavailability of soil metals to wheat. Chemosphere. 59:939-949.
18. Fitz, W.J., Wenzel, W.W., Zhang, H., Nurmi, J., Stipek, K., Fischerova, Z., Schweiger, P.,Kollensperger, G., Ma, L.Q.,and G .Stingeder. 2003.Rhizosphere characteristics ofthe arsenic hyperaccumulatorPterisvittata L. and monitoring of phytoremovalefficiency. Environ. Sci. Technol. J.37: 5008–5014.
19. Gupta, A.K., and Sinha, S. 2006. Chemical fractionation and Heavy metal accumulation in the plant of Sesamum indicum (L.) var. T55 grown on soil amended with tannery sludge: Selection of single extractants. Chemosphere, 64: 161-173.

20. Hosseinpur, A.R. and H.R. Motaghian. 2013. Zinc fractionation in the rhizosphere of wheat (Triticumaestivum L.) plant in soils treated with sewage sludge. E3S Web of Conferences. 1,04004.
21. Kidd, P., Barcelo, 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. Environ. Ex. Bot. 67: 1.243-59.
22. Kuang,Y.W., Wen, D.Z., Zhong, C.W. and G.Y. Zhou.2003. Root exudates and their roles in phytoremdiation. ActaPhyloecologicaSinica (in Chinese). 27: 709-717.
23. Lindsay, W.L., and Norvell, W.A. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. Soil Sci.Soc. Am. J. 42: 421-428.
24. Linehan, D.J., Sinclair, A. H., and M.C. Mitchell. 1989.Seasonal changesin Cu, Mn, Zn and Co concentrations in soil in the root-zone ofbarley (Hordeumvulgare L.). Soil Sci. J. 40:103–115.
25. Ling, N., Zhang, W., Tan,sh.,Huang,Q., and Q. Shen. 2012. Effect of the nursery application of bioorganic fertilizer on spatial distribution of Fusariumoxysporum f. sp. niveum and its antagonistic bacterium in the rhizosphere of watermelon. Appl. Soil Ecolo. J. 59:13–19.
26. Liu, D., Fang, Sh.,Tian, Y.and X. Dun. 2012.Variation inrhizosphere soil microbial index of tree species on seasonal floodingland: An in situ rhizobox approach. Appl. Soil Ecolo. J. 59: 1– 11.
27. Marschner, H. 1995 .Mineral nutrition of higher plants. AcademicPress, London, England.
28. Mench, M., Vangronsveld, J., Didier, V.,and H. Clijsters. 1994. Evaluation of metal mobility, plant availability and immobilization by chemical agents in a limed-silty soil. Environ. Pollut. 86: 279-286.
29. Mirshekali, H., Hadi, H., Amirnia, R., and Khodaverdiloo, H. 2012. Effect of zinc toxicity on plant productivity, chlorophyll and Zn contents of Sorghum (*sorghum bicolor*) and common lambsquarter (*chenopodium album*). J Agric Res Rev,2:247-254.
30. Muratova, A., Pozdnyakova, N., Golubev, S., Wittenmayer, L., Makarov, O., Merbach, W., and O Turkovskaya. 2009. Oxidoreductase activity of sorghum root exudates in a phenanthrene-contaminated environment. Chemosphere. 74:1031–1036.
31. Nelson, D.W., and L.E. Sommers. 1982. Total carbon, organic carbon, and organic matter.p. 539-580.In A.L. Page et al. (ed.) Methods of soil analysis, Part 2. 2nd ed. Chemical and microbiological properties. Agronomy monograph no.9. SSSA and ASA, Madison, WI. USA.
32. Oseni, T.O. 2009. Growth and zinc uptake of sorghum and cowpea in response to phosphorus and zinc fertilization. World J .Agri Sci. 5: 670-674.
33. Rhoades, J.D. 1996. Salinity: Electrical conductivity and total dissolved solids. In D.L. Sparks (ed.) Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods. SSSA. Book series no. 5. Madison. WI. USA.
34. Sandaa, R.A., Torsvik, V., Enger, Ø., Daae, F.L., Castberg T., and D Hahn. 1999. Analysis of bacterial communities in heavy metal-contaminated soils at different levels of resolution. FEMS Microbiol Ecol. 30:237–251.
35. Savonina, E.Y., Chernova, R.K., Kozlova, L.M. and P.S.Fedotov. 2005. Fractionation and determination of different lead species in contaminated soils. Anal. Chem. J. 60:874-879.
36. Talukder, K .H., Ahmed, I.U., Islam, M.S., Asaduzzaman , M., and Hossain., M D. 2011. Incubation studies on exchangeable Zn for varying levels of added Zn under aerobic and an aerobic conditions in grey terrace soils, non-calcareous flood plain soils and calcareous soils. J. Sci. Foundation, 9(1&2): 9-14.
37. Tao, S., Chen, Y.J., Xu, F.L., Cao, J., and B.G. Li. 2003. Changes of copper speciation in Maize rhizosphere soil. Environ. Pollut. 122: 477-454.

38. Thomas, G.W. 1996. Soil pH and soil acidity. In D.L. Sparks (ed.) Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods. SSSA. Book series no. 5. Madison. WI. USA.
39. Ure, A.M. 1996.Single extraction schemes for soil analysis and related applications. Sci Total Environ. 78 -10.
40. Waling, I., Van vark, W., Houba, V.J.G.,and J.J. Der lee. 1989. Soil and plant analysis.A series of sillabi. Part 7. Plant analy proc. Wageningen Agricultural University.
41. Wang, G., Su, M. Y., Chen, Y.H., Lin, F.F., Luo, D., and S. F. Gao. 2006. Transfer characteristics of cadmium and lead from soil to the edible parts of six vegetable species in southeastern China. Environ. Pollu.144: 127–135.
42. Wang,Zh., Shan, X. and Zhang, Sh. 2002. Comparison between fractionation and bioavailability of trace elements in rhizosphere and bulk soils. Chemosphere. 46: 1163-1171.
43. Wenzel, W.W., Wieshammer, G., Fitz, W.J., and M. Puschenreiter.2001. Novel Rhizobox Design to Asses Rhizosphere Characteristics at High Spatial Resolution. Plant Soil. 237: 37-45.
44. Xu.,W.H., Huai, L.I.U., Qi-Fu, M.A., Zhi-Ting, and Xiong, H. 2007. Root exudates, rhizospherezn fractions, and Znaccumulation of Ryegrass at different soil Zn levels. Pedosphere.17: 389-396.
45. Yang, J., Ma, Z., Ye, Z., Guo, X and R.Qiu. 2010. Heavy metal (Pb, Zn) uptake and chemical changes in rhizosphere soils of four wetland plants with different radial oxygen loss. Environ Sci. (China)J. 22:696-702.