مجلة المثنى للعلوم الزراعية المجلد (8) العدد(4) لسنة 2021
Al-Muthanna J. For Agric Sci. Print ISSN: 2226-4086 Online ISSN:2572-5149
DOI 10.52113/mjas04/8.4/16
مجلة المثنى للعلوم الزراعية
https://muthjas.mu.edu.iq/

Effect of EDTA chelating on bioccmulation of lead ion in alfalfa plant (*medicago astiva* L.)

Nadia M. al-Abbasi Luma Abdul-Qadir Hussein Al-Kaaby
Basrah Environment Directorate
Department of Biology , College of Education for pure sciences , University of Basrah , Iraq

Article Info.
Received
2019 / 12 / 15
Accepted date
2020 / 1 / 28
Keywords
Medicago sativa
EDTA
lead ion

Abstract

The study was conducted at plant physiology laboratory, department of biology, college of education for pure sciences, university of Basrah, at the period from 2/6/2019 till 1/11/2019 in order to evaluate the efficiency of alfalfa plant (*Medicago sativa* L.) for bioaccumulation of lead ions and to study the role of the chelating agent ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) in the accumulation process.Seeds of local variety of alfalfa plant were planted in plastic pots (16x16) filled with a mixture of sand and peat moss at ratio of 1:1 on volume basis. Lead as lead nitrate ($Pb(NO_3)_2$) was added alone to the pots at concentrations of 0 (full strength Hoagland nutrient solution), 0.25, 0.5 and 0.75 mM or in interaction with EDTA at concentrations of 0, 5 and 10 mM. The experiment continued for sixteen weeks after which the following results were estimated:Increasing lead nitrate concentrations or its interactions with EDTA cased a significant increase in lead ions accumulation in alfalfa plant roots, the same results were estimated in plant shoots.There were no significant changes in chlorophyll a and b resulting from increasing lead nitrate concentrations or its interaction with EDTA. A significant increase in proline (free amino acid) concentrations were seen regarding to increasing lead nitrate concentrations or its interactions with EDTA, the highest proline concentration was at 0.5 mM of lead nitrate alone, and in interaction with 10mM EDTA x 0.5 lead nitrate. The results showed that increasing lead nitrate concentrations or its interactions with EDTA caused a significant increase in the values of translocation factor (TF) and in bio-concentration factor (BCF) comparing with control..

Corresponding author: E-mail ( ) Al- Muthanna University All rights reserved

دراسة حول دور المادة المخلبية EDTA في التراكم الحيوي لأيونات الرصاص في نبات الجت *Medicago sativa* L.

*نادية محمد مهودر و **لمى حسين عبد القادر و **حسين خلف زاير
*مديرية بيئة البصرة
**قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة البصرة/العراق

المستخلص

أجريت الدراسة في مختبر فسلجة النبات في قسم علوم الحياة /كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة البصرة للمدة من 2018/11/1 الى 2019/6/2 وذلك للتعرف على كفاءة نبات الجت في المراكمة الحيوية لأيونات الرصاص ودراسة دور المادة المخلبية Ethylene (EDTA Diamine Tetra Acetic acid) في عملية التراكم. زرعت بذور نبات الجت في سنادين بلاستيكية مثقبة (قطر 16 سم) وضع فيها وزن 2 كغم خليط من البتموس والرمل بنسبة 1:1 حجما. اضيف الى مجموعة من السنادين مادة نترات الرصاص فقط بالتراكيز (0 و0.25 و0.5 و0.75) مليمول/لتر كما اضيف الى مجموعة أخرى من السنادين مادة نترات الرصاص بالتراكيز السالفة متداخلا مع المادة المخلبية EDTA بالتراكيز (0 و5 و10) مليمول /لتر. تم سقي السنادين بالماء النقي مضافا اليه محلول هوكلاند المغذي بالقوة الكاملة مع نترات الرصاص او نترات الرصاص وEDTA استمرت التجربة لمدة 16 أسبوع. أظهرت النتائج عند زيادة تراكيز نترات الرصاص او عند تداخلها مع مادة EDTA أدت الى زيادة معنوية في تراكم ايونات الرصاص في المجموعين الخضري والجذري لنبات الجت اذ بلغ اعلى تراكم لأيونات الرصاص عند المعاملة 0.75 مليمول/لتر بينما تحقق اعلى قيمة للتراكم عند التداخل بين 10 مليمول EDTA×0.75 مليمول نترات الرصاص.لم تسبب زيادة تراكيز نترات الرصاص او عند تداخلها مع المادة المخلبية EDTA أي تأثير معنوي في محتوى أوراق نبات الجت من كلوروفيل a وb بالمقارنة مع السيطرة.كما أوضحت النتائج ان زيادة تركيز نترات الرصاص قد أدت الى زيادة معنوية في تركيز الحامض الاميني البرولين لاسيما عند التركيز 0.5 مليمول عند التداخل بين 10 مليمول EDTA×0.5 مليمول نترات الرصاص.واشارت النتائج كذلك الى ان إضافة نترات الرصاص اوعند تداخلها مع مادة EDTA سببت زيادة معنوية في معامل الانتقالTranslocation Factor (TF) ومعامل التراكم الحيوي Bio Concentration Factor (BCF) بالمقارنة مع معاملة السيطرة.

الكلمات المفتاحية : نبات الجت ، المادة المخلبية EDTA **، ايونات الرصاص ،.**

المقدمة

.يُعد التلوث بالعناصر الثقيلة واحدا من اهم التهديدات التي تواجه التربة والموارد المائية فضلا عن صحة الانسان (Yoon *et al*.,2006). ونظرا للتقدم الحضاري واتساع العمليات الصناعية فقد أصبحت الأراضي الزراعية ملوثة بملوثات عضوية وغير عضوية ومعدنية مما انعكس سلبا " على النظام البيئي والمياه الجوفية وجودة الأغذية (Sivarajasekar and Baskar.,2015). وتعد العناصر الثقيلة مكونات طبيعية في التربة، بعضها من المغذيات الصغرى الضرورية لنمو النبات مثل الزنك والنحاس والنيكل بينما البقية غير معروفة الوظيفة الحيوية مثل الكادميوم والرصاص والفضة (Gaur and Adholeya,. 2004).

يعد الرصاص من الملوثات البيئية الشائعة وتشمل مصادره منشآت صناعة البطاريات والاسلاك الكهربائية والانابيب المصنوعة من الرصاص وتحلل الطلاء الرصاصي في التربة والبنزين الحاوي على الرصاص وزيوت المحركات والمبيدات الزراعية ومواقع طمر النفايات الملوثة ومحطات معالجة مياه الصرف الصحي وعمليات التعدين ومصادر الاحتراق (WHO,2018).

تشمل الطرق التقليدية في معالجة التربة والمياه الملوثة بالعناصر الثقيلة عمليات حفر وازالة التربة الملوثة سطحيا فضلا عن انشاء العديد من الوحدات

لإزالة الملوثات المختلفة، و تعد هذه المعالجات مكلفة وتستغرق وقتا طويلا وتحتاج الى اياد عاملة فضلا عن انتاجها لمخلفات ثانوية خطرة على البيئة قد تتطلب معالجات اخرى ، لذا التجا الباحثون الى استخدام النباتات لغرض التراكم الحيوي لأيونات العناصر الثقيلة وذلك بواسطة عملية المعالجة النباتية Phytoremediation وهي تقانة استعمال نباتات معينة لتنظيف الترب و المياه من الملوثات سواء كانت عضوية اوغير عضوية ، وهذه الطريقة تعد اكثر قبولا من الطرائق التقليدية واقل دمارا منها (Mandakini *et al*, 2016).

نبات الجت (alfalfa) من النباتات الزهرية الدائمية من ذوات الفلقتين وينتمي الى العائلة البقولية Fabeaceae، ويزرع على نطاق واسع في العالم وله قيمة اقتصادية كبيرة (Quan *et al*.,2015). وهو من المحاصيل العلفية المهمة التي تراكم العناصر الثقيلة مثل الكادميوم والنيكل والنحاس والخارصين والرصاص (Carrasco and Gil., 2012) .

ان من بين العوامل المخلبية الصناعية المختلفة الأكثر شيوعا هو Ethylene Diamine Tetra Acetic acid (EDTA) والذي يشكل معقد قوي مع العناصر من خلال مجموعتي الأمين وأربع مجاميع من الكاربوكسيل (Kumar *et al*.,2011). ومن صفاته انه قابل للذوبان في الماء ولا لون له، وتأتي أهميته بسبب دوره كعامل مخلبي أي أنه قادر على خلب الأيونات المعدنية وطريقة الخلب هي معادلة الشحنة الكهربائية فتفقد الايونات خواصها الايونية ولا تتفاعل مع أي عنصر اخر (Revathi and Venugopal ,2013).

لذا فقد استهدفت الدراسة :

التعرف على كفاءة نبات الجت في المراكمة الحيوية لأيونات الرصاص، ودراسة دور المادة المخلبية EDTA في مراكمة ايونات الرصاص عند تداخلها مع نترات الرصاص.

2- المواد وطرائق العمل:

اجريت الدراسة في مختبرفسلجة النبات التابع لقسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة / جامعة البصرة للمدة من 2018/11/1 لغاية 2019/6/2. اذ زرعت بذور نبات الجت *Medicago sativa* L. الصنف المحلي في سنادين بلاستيكية مثقبة (قطر 16 سم) تحتوي كل سندانه على 2 كغم من خليط من البتموس والرمل بنسبة 1:1على أساس الوزن وبواقع ثلاث مكررات لكل معاملة اضافة الى معاملة السيطرة، سقيت المنادين باستعمال محلول الهوكلاند المغذي بالقوة الكاملة مع المحافظة على المحتوى الرطوبي عند مستوى السعة الحقلية، وتضمنت التراكيز معاملة السنادين بنترات الرصاص المضاف الى محلول السقي بالتراكيز 0 و 0.25 و0.5 و0.75 مليمول /لتر والمجموعة الثانية من السنادين عوملت بمادتي EDTA بالتراكيز (5 و10 مليمول /لتر) ونترات الرصاص بالتراكيز السالفة الذكر بعد تعديل الرقم الهيدروجيني (pH) إلى الحامضية وترك النبات لينمو تحت ظروف اضاءة 8000 لوكس (مصابيح فلورسنت) وفترة ضوئية 8/16 ساعة وتحت معدل درجة حرارة 25 ±2 درجة مئوية ولمدة 16 أسبوع .

وبعد انتهاء التجربة تم قياس تراكيز ايونات الرصاص في المجموعين الخضري والجذري اذ تم استخلاص الرصاص حسب طريقة (Mihaylova *et al*.,2013) ثم قدر الرصاص بواسطة طريقة

Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry ICP-MS.

- كما تم قياس محتوى الكلوروفيل a وb في الأوراق وذلك حسب طريقة (Arnon, (1949
- تم تحديد محتوى البرولين في المجموع الخضري لنبات الجت تبعا لطريقة Bates *et al*,(1973) .
- حسب معامل التركيز الحيوي (BCF) Bio Concentration Factorباستعمال المعادلة

معامل التركيز الحيوي BCF=تركيز العنصر في جذور النبات /التركيز الاولي للعنصر في التربة.

- كما حسب معامل حركة العناصر من المجموع الجذري الى المجموع الخضري في النبات Translocation Factor (TF) = تركيز العنصر في المجموع الخضري /تركيز العنصر في الجذور.(2006) Yoon *et al.,*

التصميم الاحصائي:

نفذت تجارب الدراسة كتجربة عامليه بعاملين وبتوزيع عشوائي كامل للمعاملات (CRD) Complete Randomized Design اذ يمثل العاملان تراكيز نترات الرصاص × تراكيز EDTA بثلاثة مكررات لكل معاملة. وحُللت النتائج باستعمال البرنامج الاحصائي(SPSS) بعد الحصول على تحليل التباين ANOVA تمت المقارنة بين المتوسطات باختبار اقل فرق معنوي معدل (R.L.S.D) وعند مستوى معنوية 0.05 P≤(Dehlert,2010).

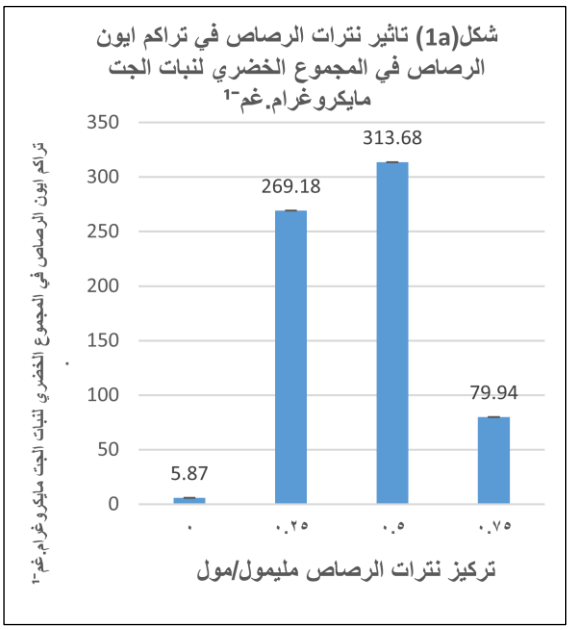
3- النتائج والمناقشة:

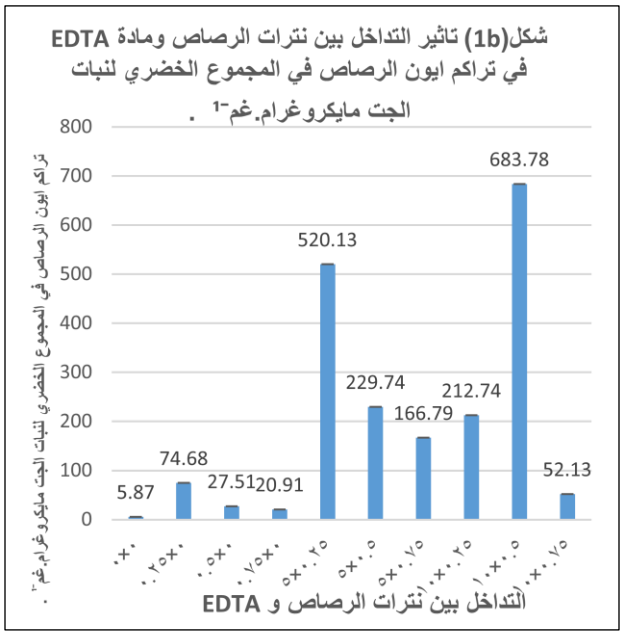
1- تأثير نترات الرصاص وتداخلها مع EDTA في تراكم ايونات الرصاص في المجموع الخضري: -

يوضح الشكل (1a) وجود زيادة معنوية في تراكم ايونات الرصاص في المجموع الخضري لنبات الجت وتفوق التركيز 0.5 مليمول /لتر وبمعدل 313.68 مايكروغرام.غم$^{-1}$ بالمقارنة مع مجاميع السيطرة ويعتقد ان نبات الجت اظهر تحملا للتراكيز قيد الدراسة ولاسيما عند التركيز 0.5 مليمول /لتر وهذا يعكس محاولة نبات الجت في التكيف ومقاومة الاجهاد. اذ ان مسارات ايونات العناصر الثقيلة في خلايا الجذور اشبة بالاشارات المفتاحية التي تحدد نقل العناصر الثقيلة الى الأجزاء الهوائية للنبات (Singh *et al* .2015).

وفيما يخص حالة التداخل بين نترات الرصاص ومادة EDTA كما موضح في الشكل(1b) لوحظ ان اعلى تراكم لأيونات الرصاص في المجموع الخضري عند التداخل بين 0.5 ×10mM-EDTA mM-$Pb(NO_3)_2$ وبمعدل683.78 مايكروغرام.غم$^{-1}$. ان التركيز 10 مليمول من EDTA أدى الى زيادة الجاهزية الحيوية للعنصر الثقيل وعلى الأرجح دفع هذا الايون الى الأجزاء الهوائية لنبات الجت ولاسيما النباتات التي تمتلك كتلة حيوية عالية وهذا يتفق مع كل من (Shahid *et al* ; 2012- ; (Meers *et al*.,(2005) من ان الجاهزية الحيوية لأيونات PbوCdوZnوCu تزداد مع زيادة تركيز EDTA وان هناك علاقة خطية بين تركيزEDTA وزيادة ذوبانية وجاهزية العناصر الثقيلة وكما اكد (Blaylock *et al* 1997) ان اضافة العامل المخلبي EDTA يحسن من امتصاص العناصر الثقيلة لاسيما الرصاص في نبات

Brassica juncea فهو قادر على امتصاص العناصر بتركيزات من 1000 الى 10000 مره اعلى من مجموعات السيطرة كما ان مجرى العامل المخلبي المرتبط بالمعدن يتجه من الجذور الى الأجزاء الخضرية ويعتمد على النتح .و استعمال العامل المخلبي يساعد على نقل العناصر وزيادة تركيزها في الأجزاء الخضرية (Awokunmi *et al* 2012).





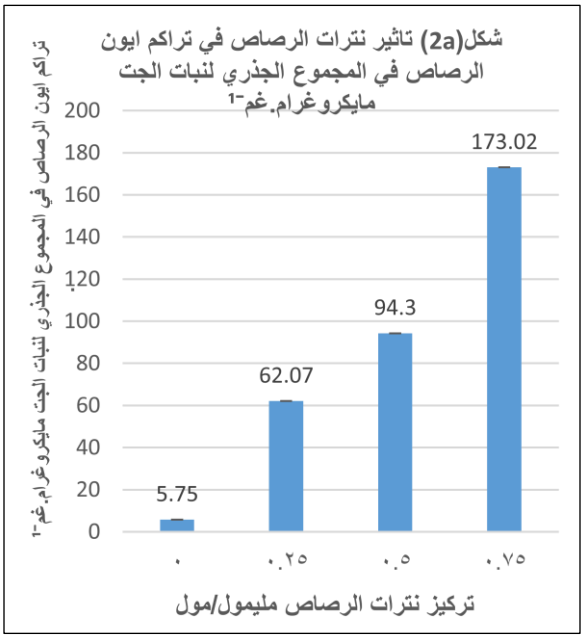
2

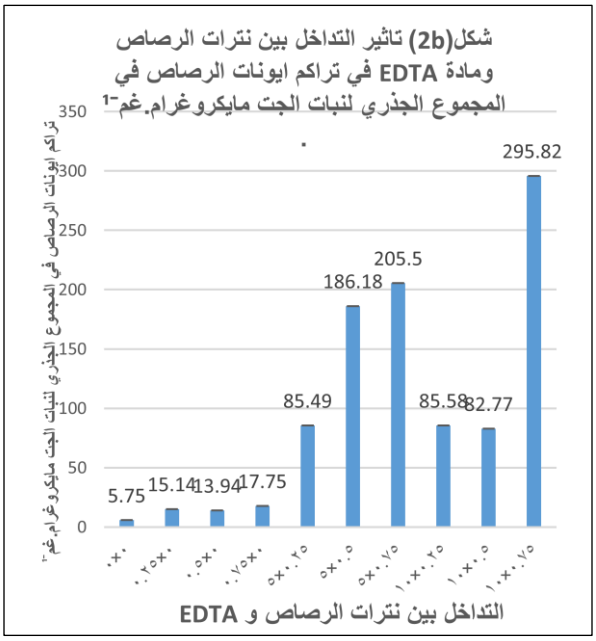
- تأثير نترات الرصاص وتداخلها مع EDTA في تراكم ايونات الرصاص في المجموع الجذري :-

وفيما يخص تراكم ايونات الرصاص في المجموع الجذري عند إضافة نترات الرصاص فقط الى محلول السقي كما موضح في الشكل (2a) وجد ان اعلى تراكم لأيونات الرصاص عند التركيز 0.75 مليمول/لتر وبمعدل 173.02 مايكروغرام.غم$^{-1}$ وبفارق معنوي عن معاملة السيطرة ويعزى السبب في ذلك لامتلاك نبات الجت مجموع جذري متفرع معقد وقدرة على الامتداد في التربة عميقا (USDA 2002) وان زيادة المجموع الجذري يساعد في زيادة امتصاص ايونات الرصاص من التربة وتجمعها في الجذور وهذا يتفق مع ما توصل الية Saifullah *et al* (2015) الي ان زيادة المجموع الجذري تعمل على زيادة الافرازات من الجذور التي تلعب دورا في انخفاض حامضية التربة PH وزيادة جاهزية الرصاص في التربة مما يتيح للنبات امتصاص كمية كبيرة من المعدن وتجمعه في الجذور.

اما بالنسبة الى نتائج التداخل الموضحة في الشكل (2b) بينت وجود فروق معنوية وان اعلى تراكم لأيونات الرصاص في المجموع الجذري عند التداخل 0.75 mM-Pb(NO$_3$)$_2$ ×10mM-EDTA وبمعدل 295.82 مليمول/لتر،ان وجود المادة المخلبية EDTA تعمل على تيسير ادخال الايونات الثقيلة من وسط النمو الى جذور النبات من خلال زيادة ذوبانية هذه العناصر في وسط التربة من خلال تكوين معقدات بين العنصر الثقيل وEDTA (metal-EDTA complexs) وعند هذه النقطة سوف تمتز هذه العناصر على دقائق الـ EDTA وبالتالي اضعاف وتفكيك ارتباط العناصر مع

العناصر الأخرى وزيادة حريتها في محلول التربة (Zhang *et al.*,2010;Luciano *et al.*,2013) . اشارت Iqbal (2012) ان صورة المعقد بين العنصر الثقيل والمادة المخلبية هي الصورة الكيميائية الأكثر سهولة وامتصاص من قبل اغلب الأنواع النباتية.



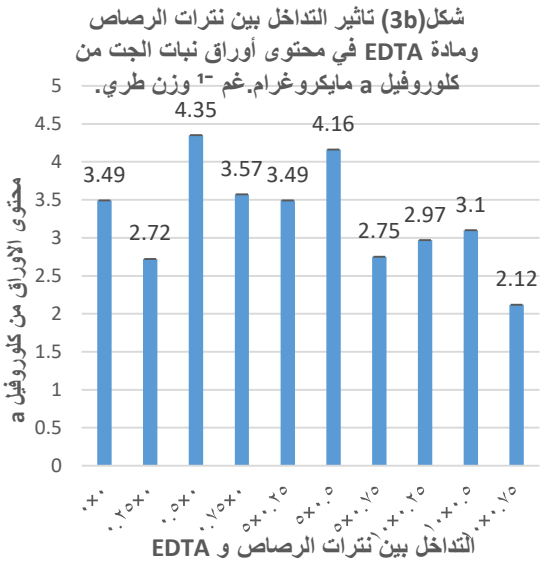


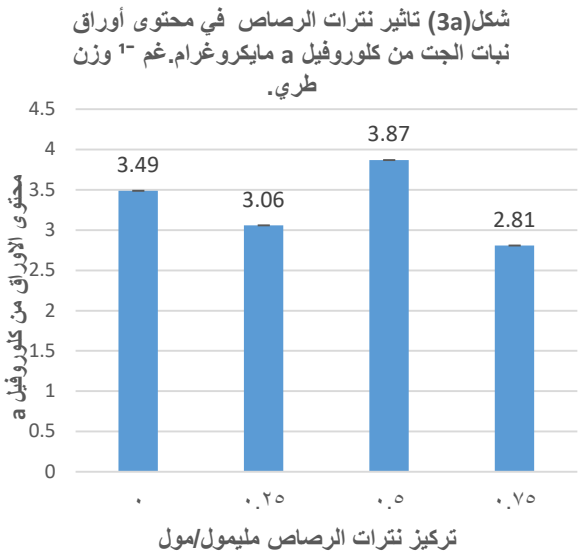
3- محتوى أوراق نبات الجت من كلوروفيل a وb

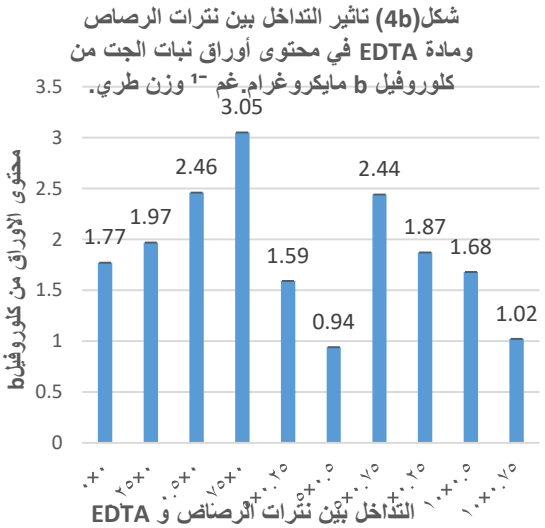
من استقراء نتائج التحليل الاحصائي في الشكل (3a و3b و4a و4b) لـ كلوروفيل a وكلوروفيل b وبالنظر للتأثيرات غير المعنوية لنترات الرصاص بالمقارنة مع نباتات معاملة السيطرة ، اذ يمكن القول ان نبات الجت اظهر تحملا للتراكيز قيد الدراسة ولاسيما عند التركيز 0.5 مليمول في حالة كلوروفيل a والتركيز 0.75 مليمول في حال كلوروفيل b وقد تماثلت هذه النتائج مع نتائج الحامض الاميني البرولين وبالأخص عند التركيز 0.5 مليمول لاسيما وان زيادة تراكمه كانت معنوية مقارنه مع نباتات مجاميع السيطرة ،ربما يعزى ذلك الى قدرة جذور نبات الجت على اقتناص ايونات الرصاص وحجزها في الجدر الخلوية او داخل الفجوات من خلال قناة Pb^{++} /H^{+} ، اذ انه وحسب دراسة Singh *et al.*,(2015) فان مسارات ايونات العناصر الثقيلة في خلايا الجذور اشبه بالإشارة المفتاحية التي تحدد معدل النقل (TF) الى الأجزاء الهوائية للنبات، في نفس الوقت الذي يتم فيه تخليق البرولين في العصير الخلوي Cytosol للمساعدة في التنظيم الازموزي (Ashraf and Foolad. 2007) وهذا يتفق مع نتائج دراسات (Junaid *et al.*,2013) على نباتات الجت والحمص *Cicer Arietinum* والخردل الهندي و(Borah and Devi.2012) على نبات البزاليا*Pisum sativum* .

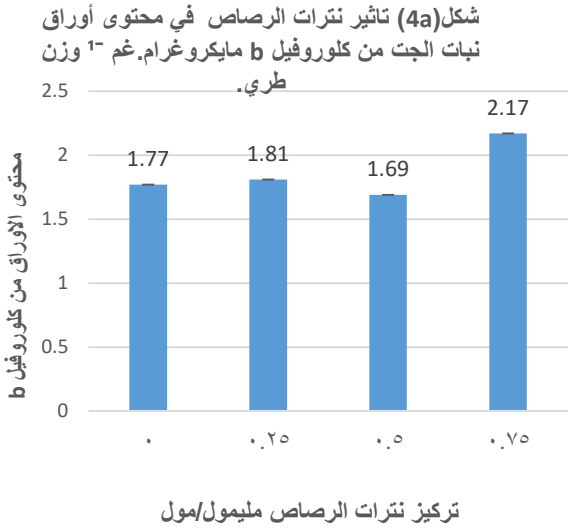
وفيما يخص حالة التداخل بين مادة EDTA ونترات الرصاص لوحظ ان محتوى الكلوروفيل وبعد اكثر من 90 يوما اخذ بالتزايد على الرغم من وجود مادة EDTA والتي تعمل على زيادة نقل ايونات الرصاص الى النبات (وبالأخص في حالة كلوروفيل a) وهذا يعكس محاولة نبات الجت في التكيف ومقاومة حالة الاجهاد التي تعرض لها في وسط النمو الملوث بهذا العنصر الثقيل وفي هذا السياق فأننا نميل الى فرضية تفعيل وتخليق الجزيئات المضادة للأكسدة ومنها البرولين والذي تعكس نتائجه في هذا الاتجاه اذ يلاحظ انه في بعض التراكيز هنالك تراكم عال جدا لهذا الحامض الاميني بلغ 44.12 ميكروغرام/غم عند التداخل (0.5$Pb(NO_3)_2$×10 EDTA)مليمول مقارنة بنباتات السيطرة (9.27 ميكروغرام/غم) على

سبيل المثال ، وربما يعزى هذا التباين في تركيز الكلوروفيل في المعاملات ما هو الا حالة متميزة من التكيف والتحمل لهذه الظروف المجهدة ونتفق بهذا مع دراسة Agnello(2014) حول كفاءة استعمال نبات الجت المعالجة الحيوية للأراضي الملوثة بالعناصر الثقيلة التي اشارت الى ان تراكيز الكلوروفيل شهدت تزايدا مع زيادة تراكيز العناصر الثقيلة ومنها الرصاص ولعل هذه الدراسة الوحيدة التي جاءت متوافقة مع نتائج هذه الدراسة.





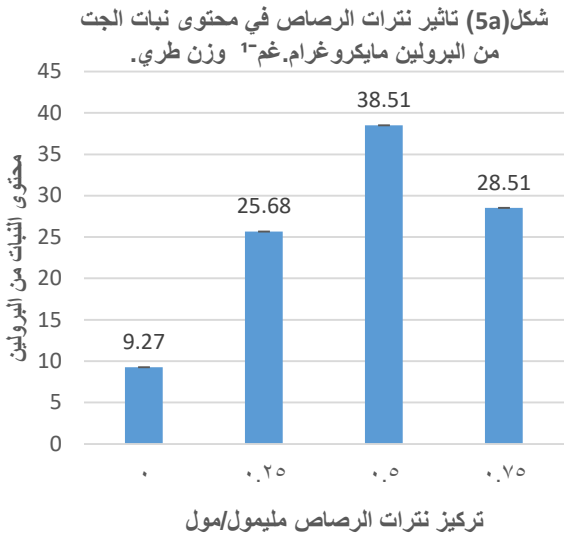


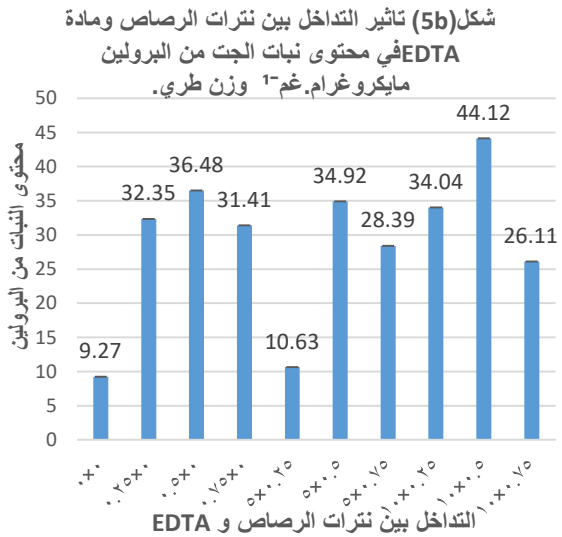


4- محتوى نبات الجت من البرولين

ومن ملاحظة نتائج محتوى المجموع الخضري من البرولين مبينة بالشكل (5a و5b) يمكن القول ان معدلات تراكمه كانت عالية سواء كان بوجود او عدم وجود المادة المخلبية EDTA وان معدلات تخليق الحامض الاميني في حالة التداخل (بين نترات الرصاص والمادة المخلبية) اعلى منها في حالة عدم وجود EDTA . ان تواجد العناصر الثقيلة وبتراكيز متزايدة سوف تعرض النبات للإجهاد الذي يتبعهُ اضطرابات فسلجية وتركيبية وبالمقابل فان النباتات تدافع عن نفسها في محاوله منها للتكيف او تحمل مثل هذا الاجهاد من خلال العديد من الاليات منها مراكمة

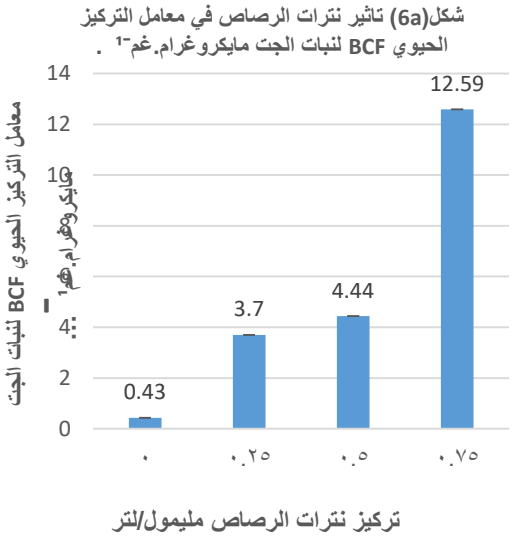
كميات كبيره من البرولين (Bassi and Sharma.1993; Costa and Morel.1994) الى جانب عمله كواقي ازموزي ومزيل لسمية الجذور الحرة. فان البرولين يعمل كعامل مخلبي للعناصر الثقيلة وهو بهذا يعمل على التخفيف من اثار الاجهاد بالعناصر الثقيلة وبذلك حسب (Farago and Mullen.1979)، حيث يعمل البرولين على استحثاث تكوين المخلبيات النباتية (Phytochelatins) والتي تعمل على تكوين معقد مع العنصر الثقيل وبهذه الطريقة تقلل من سميته (Deknecht *et al.*,1994). كما جاءت نتائج هذه الدراسة متفقة مع Odjegba and Fasidi,(2006) على نبات زهرة النيل*Eichhornia crassipes* و Hayat *et al.*,(2013) على نبات الحمص.

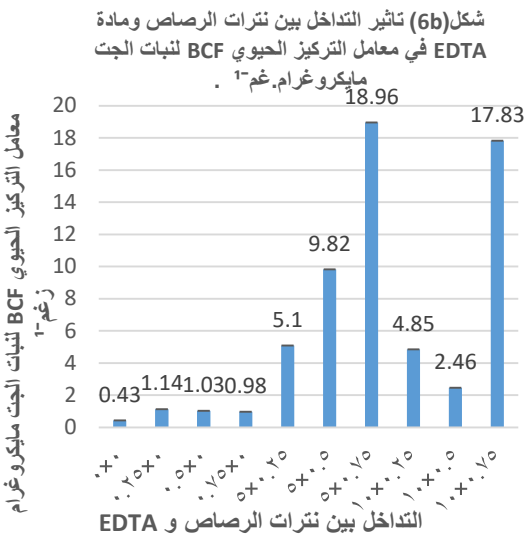




5- معامل التركيز الحيوي في نبات الجت BCF

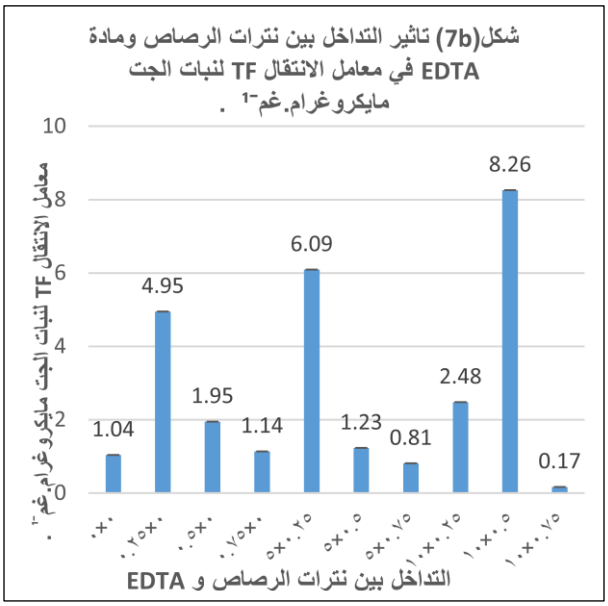
معامل التركيز الحيوي لنبات الجت يمثل العلاقة بين تركيز العنصر في جذور النبات مقسوم على تركيز نفس العنصر في التربة Yoon *et al.*,2006 اذ تشير النتائج الى وجود حركة انتقال الايون اما يدخل بطريقة الانتشار السالب ويتحرك مع تيار الماء الصاعد الا ان(2004)., Seregin et al افترض ان ايون الرصاص يتم ادمصاصه ودخوله الى الجذر بمعدل اعلى في منطقة معينة من الجذر وهي منطقة القمة النامية ذات الجدران الخلوية الرقيقة اذ ان هذه المنطقة وحسب هذا الباحث تكون فيها قيمة الرقم الهيدروجيني واطئة وبالتالي تكون ذوبانية ايون الرصاص عالية في محلول التربة . او ربما يتم دخول ايون الرصاص بوساطة مضخات الـ H^+/ATP ase في منطقة بشرة الجذر (Wang *et al.*,2007) وبعد دخوله الى خلايا الجذر فان جزءا كبيرا منه سوف يرتبط مع مواضع التبادل الايوني في جدران الخلية وبعدها يترسب بشكل كاربونات او مركبات فوسفاتية (Sharma and Dubey.2005) اما ايونات الرصاص غير المرتبطة فأنها سوف تتراكم بالقرب من طبقة البشرة الداخلية endodermis (Pourrut *et al.*,2008). وهذا ما يفسر تراكم هذا الايون في جذور نبات الجت

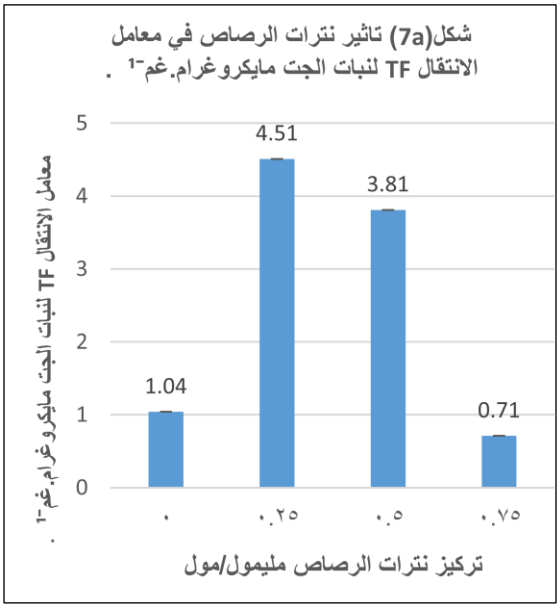




6- معامل الانتقال الموقعي لنبات الجت TF

بين الشكل (7a) و(7b) ان معامل الانتقال الموقعي TF لأيونات الرصاص في نبات الجت والذي يمثل حركة انتقال ايونات الرصاص من المجموع الجذري الى المجموع الخضري ومن خلاله يتم الاستدلال على نسبة او كمية ايون ايونات الرصاص المنقولة. وهي في الاغلب قيمة واطئة لأغلب النباتات عدا التي تمتلك القدرة على المراكمة والتحمل وحسب القيمة القياسية لهذا العامل، فان النبات يعد متحملا ويمتلك صفة المراكمة الحيوية اذا كانت قيمة هذا العامل واحد او اكثر (Uzu et al.,2009).و لذا تعزى قدرة هذة النباتات على التحمل للإجهاد الناتج عن تراكم ايونات العناصر الثقيلة الى قدرتها على حجز هذه العناصر في العضيات الخلوية مثل الفجوات او الترايكومات او الجدران الخلوية فضلا عن القدرة على حجز كميات منها في الجذور(Revathi. and Venugopal ,2013).





المصادر: -

Agnello, A. C. (2014). Potential of alfalfa for use in chemically and biologically assisted phytoremediation of soil co-contaminated with petroleum hydrocarbons and metals, PhD thesis, 'Univer. Paris-Est. France.,180-193.

Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol., 24: 1-15.

Ashraf, M. F. M. R. and Foolad, M. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance, Env. Exp. bot, 59(2); 206-216.

Awokunmi, E. E., Asaolu, S. S., Ajayi, O. O. and Adebayo, O. A. (2012). The role of EDTA on heavy metals phytoextraction by *Jatropha gossypifolia* grown on soil collected from dumpsites in Ekiti state Nigeria. Int. J. Env. Clim Change, 153-162.

Bareen, F. and Tahira, S. A. (2010). Efficiency of seven different cultivated plant species for phytoextraction of toxic metals from Tannery effluent contaminated soil using EDTA. Soil and Sed. Cont., 19(2): 160-173.

Bassi, R. and Sharma, S. S. (1993). Proline accumulation in wheat seedlings exposed to zinc and copper, Phytochemis., 33(6): 1339-1342.

Bates, L. S.; Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies, Plant and soil, 39(1): 205-207.

Blaylock, M.J.; Salt, D.E.; Dushenkov, S.; Zakharova, O.; Gussman, C.; Kapulnik, Y.; Ensley, B.D. and Raskin,I.; (1997). Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. Env. Sci. Technol., 31: 860–865.

Borah, M. and Devi, A. (2012). Effect of heavy metals on *Pisum sativum* Linn, Inter. J. Agri. Biol. Rech.; Vol. 2(2): 314-321.

Carrasco-Gil, S.; Estebaranz-Yubero, M.; Medel-Cuesta, D.; Millán, R. and Hernández, L. E. (2012). Influence of nitrate fertilization on Hg uptake and oxidative stress parameters in alfalfa plants cultivated in a Hg-polluted soil, Env. Exp. Bot., 75, 16-24.

Costa, G. and Morel, J. L. (1994). Water relations, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce. Plant Physiol. Bioch.

De Knecht, J. A.; Van Dillen, M.; Koevoets, P. L. M.; Schat, H.; Verkleij, J. A. C.; Ernst and W.H.O. (1994). Phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*, Plant Physiol., 104: 255–261.

Dehlert, D. G. (2010). Desing and analysis of experiments.Stat-Esae, Inc.

Dushenkov, V.; Kumar, P. N.; Motto, H. and Raskin, I. (1995). Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams, Env. Scie. Techn., 29(5): 1239-1245.

Farago, M. E. and Mullen, W. A. (1979). Plants which accumulate metals. Part IV. A possible copper-proline complex from the roots of *Armeria maritima*. Inorganica. Chimica. Acta., 32, 93-94.

Gaur, A. and Adholeya, A. (2004). "Prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of heavy metal contaminated soils", Curr. Scie., 86 (4): 528–534.

Hayat, S.; Hayat, Q.; Alyemeni, M. N. and Ahmad, A. (2013). Proline enhances antioxidative enzyme activity, photosynthesis and yield of *Cicer arietinum* L. exposed to cadmium stress, Acta. Bot. Croatica., 72(2): 323-335.

Iqbal, M. (2012). Effect of heavy metal and EDTA application on heavy metal uptake and geneexpression in different Brassica species, Afr. J. Biotech., 11: 7649–7658.

Junaid, M.; Adnan, M.; Khan, N.; Khan, N. and Ali, N. (2013). plant growth, biochemical characteristics and heavy metals contents of *Medicago Sativa* L.; *Brassica Juncea* (L.). AND *Cicer Arietinum* L, FUU. J.Biol., 3(2): 95-103.

Kumar, N. V. and Rao, G. N. (2011). Effect of dielectric constant of medium on protonation equilibria of ethylenediamine, Chemi. Spe. Bioavail. 23(3): 170-174.

Luciano, A.; Viotti, P.; Torretta, V. and Mancini, G. (2013). Numerical approach to modelling pulse-mode soil flushing on a Pb-contaminated soil, J. Soil. Sed. 13: 43–55.

Mandakini, L. I. U.; Bandra, N. J. G. J. and Gunawardana, D. (2016). A study on the Phytoremediation Potential of *Azolla pinnata* under laboratory conditions, J. Tropi. Fores. Env., 6 (1): 36-49.

Meers, E.; Ruttens, A.; Hopgood, M.; Lesage, E. and Tack, F. M. G. (2005). Potential of *Brassic rapa*, *Cannabis sativa*, *Helianthus annuus* and *Zea mays* for phytoextraction of heavy metals from calcareous dredged sediment derived soils, Chemosph., 61: 561–572

Mihaylova, V.; Lyubomirova, V. and Djingova, R. (2013). Optimization of sample preparation and ICP-MS analysis for determination of 60 elements for characterization of the plant ionome, Internatio. J. Env. Analy. Chem., 93(13): 1441-1456.

Odjegba, V. J. and Fasidi, I. O. (2006). Effects of heavy metals on some proximate composition of *Eichhornia crassipes*. J.Appl . Sci. Env. Manag.,10(1), 83-87.

Pourrut, B.; Perchet, G.; Silvestre, J.; Cecchi, M.; Guiresse, M. and Pinelli, E. (2008). Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots. J. Plant Physiol., 165(6): 571-579.

Quan, W.; Liu, X.; Wang, H. and Chan, Z. (2015). Comparative physiological and transcriptional analyses of two contrasting drought tolerant alfalfa varieties, Front. in Plant Sci., 6: 1256.

Revathi, S. and Venugopal, S. (2013). Physiological and biochemical mechanisms of heavy metal tolerance. Inter. J. Env. Sci., 3(5): 1339.

Saifullah, U.; Shahid, S.; Zia-Ur-Rehman, M.; Sabir, M. and Raza Ahmad, A. (2015). Phytoremediation of Pb-contaminated soils using synthetic chelates, Soil Remediat. Plants. Elsevier Inc.

Seregin, I. V.; Shpigun, L. K. and Ivanov, V. B. (2004). Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize roots. Russian J. Plant Physiol., 51(4), 525-533.

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, J. Haz. Mater., 219–220: 1–12.

Sharma, P. and Dubey, R. S. (2005). Lead toxicity in plants, Braz. J. plant physiol., 17(1): 35-52.

Singh, M.; Singh, V. P.; Dubey, G. and Prasad, S. M. (2015). Exogenous proline application ameliorates toxic effects of arsenate in *Solanum melongena* L. seedlings, Ecotox. Env. Saf., 117: 164-173.

Sivarajasekar, N. and Baskar, R. (2015). Agriculture waste biomass valorisation for cationic dyes sequestration: a concise review. J. Chem. Pharm. Res., 7(9): 737-748.

USDA "United States Department of Agriculture". (2002). Plant Fact Sheet. Alfalfa (*Medicago sativa* L.). in: Service., U.S.D.O.A.N.R.C. (Ed.).

Uzu, G.; Sobanska, S.; Aliouane, Y.; Pradere, P. and Dumat, C. (2009). Study of lead phytoavailability for atmospheric industrial micronic and sub-micronic rticles in relation with lead speciation, Env. Poll., 157: 1178–1185.

Wang, G.; Koopmans, G. F.; Song, J.; Temminghoff, E. J.; Luo, Y.; Zhao, Q. and Japenga, J. (2007). Mobilization of heavy metals from contaminated paddy soil by EDDS, EDTA, and elemental sulfur, Env. Geoche. Heal., 29(3): 221-235.

WHO "World Health Organization". (2018). Global Alliance to Eliminate Lead Paint/Lead Paint Alliance Advisory Council Meeting

Yoon, J.; Cao, X.; Zhou, Q. and Ma, L. Q. (2006). Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site, Sci. total Env., 368(2-3): 456-464.

Zhang, W.; Huang, H.; Tan, F.; Wang, H. and Qiu, R. (2010). Influence of EDTA washing on the species and mobility of heavy metals residual in soils. J. Hazard. Mater., 173: 369–376.