نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۵، آذر – دی ۱۳۹۶، ص. ۱۳۷۰-۱۳۵۵

Journal of Water and Soil
Vol. 31, No. 5, Nove.-Dec. 2017, p. 1355-1370

پاسخ کرم خاکی *Eisenia fetida* به تنش شوری و آلودگی سرب در خاک تیمار شده با کود گاوی

مینا نظری‌زاده[1*]- فایز رئیسی[2]- حمیدرضا متقیان [3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۲۱

چکیده

شوری و آلودگی ناشی از فلزات سمی به‌عنوان دو تنش زیست‌محیطی می‌توانند به‌صورت هم‌زمان رشد و فعالیت کرم‌های خاکی را تحت تأثیر قرار دهند. اثر مشترک این دو تنش غیرزیستی بر کرم‌های خاکی، به‌ویژه در نواحی خشک و نیمه‌خشک، کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به اهمیت کرم‌های خاکی در زیست‌بوم، بررسی اثرمتقابل عوامل تنش‌زا بر رشد و فعالیت این جانداران ضروری است. در این پژوهش اثر مشترک شوری ناشی از نمک کلرید سدیم و آلودگی سرب بر جمعیت و فعالیت کرم‌های خاکی *Eisenia fetida* در شرایط گلخانه مطالعه شد. این آزمایش با ۳ فاکتور شامل آلودگی (شاهد و ۳۰ میلی‌گرم سرب بر کیلوگرم خاک)، شوری (شاهد، ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر) و کود گاوی (شاهد و ۴ درصد وزنی)، به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه‌ی کاملاً تصادفی با ۴ تکرار اجرا گردید. نتایج نشان داد که افزایش سطوح شوری خاک قابلیت دسترسی سرب را افزایش می‌دهد و سمیت این فلز را برای کرم‌های خاکی تشدید می‌کند. در مقابل افزودن کود گاوی در همه‌ی سطوح شوری، قابلیت دسترسی این فلز را کاهش می‌دهد. جمعیت، وزن مرطوب و خشک کرم و وزن مرطوب و خشک فضولات تولید شده توسط کرم‌های خاکی به‌صورت معنی‌دار ($p<0/05$) تحت تأثیر برهمکنش شوری و آلودگی قرار گرفتند. این شاخص‌ها در خاک آلوده و مبتلا به شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر کمترین مقادیر را دارا بودند، به طوری‌که جمعیت کرم‌های خاکی ۵۹ درصد، وزن مرطوب و خشک کرم‌های خاکی به‌ترتیب ۲۸ و ۱۸ درصد و وزن مرطوب و خشک فضولات تولیدشده به‌ترتیب ۱۸ و ۱۰ درصد کاهش داشتند. ماهیت اثر مشترک دو تنش شوری و آلودگی بر شاخص‌های رشد و فعالیت کرم‌های خاکی در غیاب کود گاوی اغلب به‌صورت هم‌افزا تا هم‌کرداری بود. کاربرد کود گاوی ضمن بهبود شاخص‌های رشد و فعالیت کرم‌های خاکی، آثار منفی شوری را در خاک‌های آلوده تعدیل نمود و اثرات مشترک این دو تنش را به پادکرداری تغییر داد. به‌طور خلاصه، جمعیت، وزن و فعالیت این گونه‌ی کرم خاکی نسبت به برهمکنش دو تنش شوری و آلودگی بسیار حساس می‌باشند و محیط‌های آلوده و شور پتانسیل بیشتری برای آسیب‌رسانی به این جانداران خاکزی دارند ولی افزایش ماده آلی خاک این اثر زیان‌بار را کاهش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: اثر مشترک، تنش زیست‌محیطی، تولید فضولات، قابلیت دسترسی سرب

مقدمه

کرم‌های خاکی جزء مهمی از زیست‌بوم خاک هستند و فعالیت آن‌ها برای افزایش حاصلخیزی خاک در انواع زیست‌بوم‌های کشاورزی، جنگل و مرتع ضروری است (۷). به دلیل اثرات بسیار مثبت، این جانداران روده زمین و معماران زیست‌بوم محسوب می شوند (۶). نقش مفید این جانداران به عواملی چون کیفیت و کمیت مواد غذایی، دما، رطوبت و pH خاک بستگی دارد (۶ و ۷) و تنش‌های معمول در خاک مانند شوری، خشکی و آلودگی نیز شرایط زندگی آن ها را تغییر می‌دهد (۲۰، ۲۱ و ۲۲). در شرایط طبیعی اغلب موجودات زنده به‌ویژه کرم‌های خاکی هم‌زمان در معرض چندین تنش غیرزیستی قرار دارند، درحالی‌که تأثیر هم‌زمان تنش‌ها متفاوت از اثر هرکدام به‌تنهایی است (۱۰، ۲۰، ۲۱ و ۲۲). به عبارت ساده‌تر، یک تنش ممکن است اثر تنش دیگر را تشدید، خنثی یا تعدیل نماید (۳۷)، چنانچه اثر مشترک و متقابل تنش‌ها ممکن است به‌صورت هم‌افزا یا بدون اثر متقابل (Additive)، پادکرداری (Antagonistic) و یا هم‌کرداری (Synergistic) باشد (۱۰ و ۳۷). شوری و آلودگی خاک از جمله تنش‌های غیرزیستی رایج در نواحی خشک و نیمه‌خشک هستند (۲۰ و ۲۱) که هر کدام از این تنش‌ها منجر به کاهش فعالیت، رشد و زیست‌توده‌ی کرم‌های خاکی می‌شوند (۳، ۹، ۲۰ و ۲۷)، با این وجود

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانش‌آموخته‌ی کارشناسی ارشد، استاد و استادیار گروه خاکشناسی، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
(*- نویسنده‌ی مسئول: Email: mina.nazarizadeh@yahoo.com)
DOI: 10.22067/jsw.v31i5.61802

اثر تنش هم‌زمان آن‌ها بر کرم‌های خاکی به ندرت مورد بررسی قرار گرفته است. مطالعات نشان می‌دهد که شوری می‌تواند تحرک و زیست‌فراهمی عناصر سمی از جمله سرب و کادمیم را در خاک‌های آلوده افزایش دهد (۱، ۳۲ و ۳۴)، بنابراین انتظار می‌رود اثر مسمومیت ناشی از فلزات سنگین بر فعالیت کرم‌های خاکی در شرایط شور تشدید گردد. در مطالعه‌ی اووجوری و همکاران (۲۰) اثر هم‌زمان شوری ناشی از نمک کلرید سدیم و فلز روی بر کرم خاکی *E. fetida* هم‌افزا تا هم‌کرداری بود. در این پژوهش برهمکنش دو تنش، کاهش قابل توجه وزن و مرگ‌ومیر کرم‌های خاکی را سبب گردید. این محققین اظهار کردند که شوری خاک شکل‌های قابل‌دسترس روی را برای کرم‌های خاکی افزایش می‌دهد، بنابراین منجر به افزایش سمیت این فلز برای کرم می‌شود. در مطالعه‌ی دیگر اووجوری و همکاران (۲۱) اثر مشترک شوری و فلز مس بر کرم خاکی *E. fetida* هم‌افزا یا بدون اثر متقابل بوده و سمیت ناشی از این دو تنش برای این کرم‌های خاکی به غلظت‌های جداگانه این دو عامل تنش‌زا بستگی داشت. اووجوری و رینک (۲۲) مشاهده کردند که بین تنش شوری و فلز مس بر پارامترهای رشد کرم خاکی *Aporrectodea caliginosa* در زمستان اثر متقابل وجود ندارد، درصورتی‌که در فصل بهار برهمکنش این دو عامل تنش‌زا بر رشد و زنده‌مانی این گونه‌ی کرم ماهیت هم‌کرداری داشت. نظر به آثار منفی تنش شوری و آلودگی بر کرم‌های خاکی و ضرورت کاهش این اثرات، کاربرد مواد آلی به‌عنوان یک روش مدیریتی ممکن است اثر بازدارندگی شوری و آلودگی را کاهش و یا تعدیل نماید (۳ و ۱۳). استفاده از مواد آلی در خاک‌های شور از طریق افزایش مقدار ماده آلی، افزایش تعداد و زیست‌توده‌ی جانداران خاک، افزایش غلظت اسیدهای هیومیک و فلویک و جذب سدیم، کلسیم و منیزیم توسط آنیون‌های آلی خاک، کاهش درصد سدیم تبادلی و بهبود ویژگی‌های فیزیکی خاک، فعالیت کرم‌های خاکی را افزایش می‌دهد (۱۳) و یکی از شیوه‌های مؤثر در افزایش فعالیت کرم‌های خاکی در خاک‌های شور و یا آلوده است (۳ و ۳۳). یون‌های آزاد فلزات سمی نیز که بخش قابل‌دسترس این عناصر برای گیرنده‌های زیستی به‌ویژه کرم خاکی هستند، تمایل بسیاری برای برقراری پیوند کوالانسی با گروه‌های عامل مواد آلی دارند. مواد آلی خاک با جذب یون‌های آزاد فلزات سمی آن‌ها را از دسترس خارج می‌کنند (۱، ۳۰ و ۳۲). آویلا و همکاران (۳) مشاهده کردند که کاربرد بقایای آلی با کاهش قابلیت دسترسی فلزات، سمیت آن‌ها را برای کرم خاکی *E. fetida* کاهش می‌دهد. با توجه به اهمیت کرم‌های خاکی در زیست‌بوم و ضرورت حفظ جمعیت و فعالیت آن‌ها در راستای حفاظت از ساختار بیولوژیکی و باروری خاک، در این مطالعه اثر تنش هم‌زمان شوری ناشی از نمک کلرید سدیم و آلودگی سرب بر کرم خاکی گونه‌ی *E. fetida* و نقش احتمالی کود گاوی در تعدیل اثرات منفی این دو تنش، مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش اثر هم‌زمان یا مشترک تنش‌های آلودگی سرب ناشی از مصرف نیترات سرب و شوری ناشی از مصرف کلرید سدیم بر کرم‌های خاکی *E. fetida* در شرایط کنترل شده‌ی گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. بدین‌منظور یک آزمایش فاکتوریل با ۳ فاکتور شامل آلودگی (شاهد و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب)، شوری (شاهد، ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر) و کود گاوی (۰ و ۲/۵ درصد وزنی)، در قالب طرح پایه‌ی کاملاً تصادفی با ۴ تکرار در گلدان‌های ۳ کیلوگرمی (در مجموع ۴۸ گلدان) اجرا شد. خاک لازم از اراضی زراعی دانشگاه شهرکرد (عرض جغرافیایی ″۱۸/۲ ′۱۲ °۳۲ و طول جغرافیایی ″۲۹/۹ ′۴۹ °۵۰) از عمق ۰ تا ۲۰ سانتی‌متری برداشت شد. خاک هواخشک و از الک ۲ میلی‌متر عبور داده شد. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن مانند بافت به روش هیدرومتری (۱۱)، قابلیت هدایت الکتریکی (EC) با استفاده از هدایت‌سنج الکتریکی (۲۶)، pH با استفاده از pHمتر (۱۴)، رطوبت ظرفیت مزرعه با استفاده از دستگاه صفحات فشاری و فشار ۰/۳ اتمسفر (۲۵)، سرب کل با اسید نیتریک ۴ مولار (۲۹) و قابل دسترس با عصاره‌گیر DTPA-TEA (۱۵)، کربنات کلسیم معادل به روش خنثی کردن کربنات کلسیم با اسیدکلریدریک و تیتراسیون اسید اضافی با سود (۱۶)، کربن آلی به روش اکسایش تر (۱۸) و نیتروژن کل به روش کجلدال (۴) اندازه گیری شد. کود گاوی از دامداری دانشگاه شهرکرد تهیه و هوا خشک گردید. سپس از الک ۱ میلی‌متر عبور داده شد و به‌مدت یک ساعت در دستگاه اتوکلاو (دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۲ اتمسفر) سترون گردید. ویژگی‌هایی شامل قابلیت هدایت الکتریکی (۲۶)، pH (۱۴)، کربن آلی (۱۸) و نیتروژن کل (۴) در کود گاوی اندازه‌گیری شد. برخی ویژگی‌های اندازه‌گیری شده در خاک و کود گاوی مورد استفاده در جدول ۱ ارائه شده است.

برای اعمال تیمارهای آلودگی در سطح ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، مقادیر لازم سرب از نمک نیترات سرب به خاک اضافه و به‌طور کامل با خاک مخلوط گردید (با توجه به وزن مولکولی نمک نیترات سرب مورد استفاده ($۳۳۱/۲ \ g \ mol^{-1}$) با رسیدن به آلودگی ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب، حدود ۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم آنیون نیترات به خاک افزوده شد که قادر به ایجاد سمیت برای کرم‌های خاکی نیست).

مقادیر نمک کلرید سدیم (NaCl) جهت رسیدن به سطوح قابلیت هدایت الکتریکی ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر از طریق معادله‌ی رگرسیون خطی برازش شده بین مقدار نمک (mg) و قابلیت هدایت الکتریکی عصاره‌ی اشباع خاک بر حسب $dS \ m^{-1}$ برآورد گردید و به خاک اضافه شد.

جدول ۱- برخی خواص فیزیکی و شیمیایی خاک و کود گاوی مورد استفاده

Table 1- Some physical and chemical properties of the soil and manure used

ویژگی (Variable)	شن Sand	سیلت Silt	رس Clay	بافت Texture	θ_{FC}	Pb_t	Pb_{acc}	$CaCO_3$	pH	EC	OC	N_t
		(%)		-	(%)	(mg kg^{-1})		(g kg^{-1})	-	(dS m^{-1})	(g kg^{-1})	
خاک (Soil)	29	42	29	لوم‌رسی Clay loam	23.7	9.47	1.19	353	$7.6_{(1:2)}$	$0.36_{(1:2)}$	5.7	0.54
کود گاوی (Cow manure)	-	-	-	-	-	-	-	-	$8.0_{(1:20)}$	$2.4_{(1:20)}$	462	19.9

θ_{FC}: رطوبت ظرفیت مزرعه، Pb_t: سرب کل، $Pb_{ava.}$: سرب قابل دسترس (DTPA)، OC: کربن آلی، N_t: نیتروژن کل

θ_{FC}: field capacity, Pb_t: total Pb, $Pb_{acc.}$: accessible Pb (DTPA), OC: organic carbon, and N_t: total nitrogen

کود گاوی (۲/۵ درصد وزنی) نیز به تیمارهای حاوی کود افزوده شد. ۴۵ روز پس از شروع آزمایش نیز به‌منظور تأمین غذای کرم‌های خاکی مجدداً ۱/۵ درصد کود گاوی به تیمارهای حاوی کود اضافه شد (مصرف بالای کود گاوی صرفاً به‌منظور مشاهده‌ی اثر کود بر پاسخ کرم خاکی *E. fetida* به تنش هم‌زمان شوری و آلودگی طی کوتاه مدت و تأمین نیاز غذایی بالای این گونه‌ی کرم بود.) و جهت نزدیک شدن خاک آزمایش به شرایط طبیعی، پس از اعمال تیمار، خاک در گلدان‌های ۱۵ کیلوگرمی به‌مدت یک ماه در رطوبت ۷۰ درصد ظرفیت مزرعه در شرایط گلخانه خوابانده شد. کرم‌های خاکی مورد نیاز به روش دستی از یک باغ گردو در شهرستان هرچگان استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری و با انتقال به آزمایشگاه، ویژگی‌های مرفولوژیکی آن‌ها شناسایی شد. با استفاده از کلیدهای شناسایی مشخص شد که کرم‌های خاکی به خانواده‌ی *Lumbricide* جنس *Eisenia* و گونه‌ی *fetida* تعلق دارند (۷). کرم‌های خاکی، گونه‌ی *Eisenia fetida* نه‌تنها در تولید ورمی‌کمپوست در سراسر جهان کاربرد فراوانی دارد؛ بلکه با دارا بودن تغییرات قابل اندازه‌گیری سلولی، بیوشیمیایی، ساختاری یا عملکردی در برخورد با تنش‌های محیطی به‌ویژه آلودگی، به‌عنوان شاخص زیستی پایش آلودگی فلزات سنگین همچون سرب و کادمیم در خاک محسوب می‌شوند و به موجودات استاندارد آزمایشی جهت مطالعات بوم‌شناسی آلاینده‌ها تبدیل شده‌اند (۲۴). با توجه به اهمیت این گونه‌ی کرم خاکی مطالعه‌ی اثر تنش‌های غیرزیستی چندگانه بر آن‌ها ضروری است. با اتمام زمان انکوباسیون، خاک هواخشک هر تیمار درون گلدان‌های سه کیلوگرمی با ارتفاع ۲۵ و قطر ۲۰ سانتی‌متر ریخته شد. قبلاً کف هر گلدان دو سانتی‌متر شن و یک توری دو لایه به‌منظور جلوگیری از خروج کرم‌های خاکی قرار گرفته بود. قبل از تلقیح، جهت تخلیه‌ی محتویات سیستم گوارشی (gut)، کرم‌های خاکی به‌مدت ۲۴ ساعت در ظروف پلاستیکی دردار روی کاغذ صافی مرطوب به‌حالت نیمه‌شناور (Half-immersed) قرار داده شدند. آنگاه ۵ عدد کرم بالغ (معادل ۱۵۹ عدد کرم در هر متر مربع) به هر گلدان اضافه و به‌منظور جلوگیری از خروج کرم‌های خاکی و کاهش تبخیر آب، سطح گلدان با توری‌های نازک پوشانده شد. گلدان‌ها به‌مدت ۱۳ هفته در گلخانه تحت شرایط کنترل‌شده قرار گرفتند و در پایان این مدت جمعیت، وزن و شاخص‌های فعالیت کرم‌های خاکی شامل فضولات (Cast) مرطوب و خشک تولید شده اندازه‌گیری گردید.

جهت آنالیز آماری ابتدا داده‌ها برای تأمین پیش‌شرط‌های تجزیه واریانس و استفاده از ANOVA (توزیع نرمال و همگنی واریانس باقی‌مانده‌ها) مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های برخی ویژگی‌ها که فاقد توزیع نرمال بودند با کمک روش آماری Box-Cox تبدیل شدند. مقایسه میانگین‌ها به روش Fisher's LSD در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم‌افزار STATISTICA 8 انجام گرفت. میزان اثرگذاری یک فاکتور یا تیمار در تغییرات مشاهده شده با پارامتر اندازه‌ی اثر جزئی (Partial Effect Size, Eta^2_p) نمایش داده شد (۳۱). ماهیت اثر متقابل دو تنش شوری و آلودگی با استفاده از مدل مستقل آماری بلیس (Bliss Independence Model) تعیین شد (۳۷). مدل بلیس به‌صورت زیر توصیف می‌گردد:

$$(Y_{sp})_p = Y_s + Y_p - (Y_s \times Y_p) \quad (۱)$$

که در آن $(Y_{sp})_p$ اثرات پیش‌بینی شده در حضور دو تنش شوری (S) و آلودگی (P)، Y_s اثر مشاهده‌شده در حضور تنش شوری و Y_p اثر مشاهده شده در حضور تنش آلودگی می‌باشد. در این مدل اثرات پیش‌بینی شده $(Y_{sp})_p$ با اثرات مشاهده شده $(Y_{sp})_o$ در حضور دو تنش مقایسه و نوع اثرات متقابل مطابق رابطه‌ی ۲ مشخص می‌گردد. (۲)

$(Y_{sp})_o = (Y_{sp})_p$ هم‌افزا

$(Y_{sp})_o > (Y_{sp})_p$ هم‌کرداری

$(Y_{sp})_o < (Y_{sp})_p$ پادکرداری

پس از محاسبه‌ی اثرات مشاهده شده و پیش‌بینی شده، به‌منظور بررسی آماری اختلاف معنی‌دار بین مقادیر مشاهده شده و پیش‌بینی شده از آزمون t-test جفت نشده (Unpaired) استفاده شد تا پس از تأیید اختلاف معنی‌دار بین مقادیر مشاهده‌شده و پیش‌بینی شده به

لحاظ آماری، ماهیت اثر متقابل تنش‌ها با استفاده از رابطه‌ی بلیس تعیین گردد.

نتایج و بحث

تغییرات EC، pH و $Pb_{acc.}$ خاک

شوری خاک در سطح احتمال ۵ درصد، تحت تأثیر برهمکنش سطوح نمک کلرید سدیم با کود گاوی و آلودگی با کود گاوی قرار گرفت (جدول ۲). این ویژگی پس از افزودن نمک کلرید سدیم در مرحله‌ی اعمال تیمار به سطوح مورد نظر (۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر) رسید. نمک کلرید سدیم عامل شوری اغلب خاک‌ها و یکی از طبیعی‌ترین و شاخص‌ترین ترکیبات زمین‌شناسی موجود در خاک است (۲۳) و در مقایسه با انواع نمک‌های کلرید سمیت بیشتری برای کرم‌های خاکی *E. fetida* دارد (۹). از طرفی سطوح شوری ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر بنابر رده‌بندی کلاس‌های شوری خاک، به‌ترتیب در کلاس شوری متوسط و زیاد قرار دارند (۲۳) که در حد مقادیر EC50 (غلظت مؤثری که منجر به ۵۰ درصد کاهش در پارامتر اندازه‌گیری شده می‌شود.) برای رشد و تولیدمثل کرم خاکی *E. fetida* بوده و می‌توانند برای فعالیت این گونه‌ی کرم خاکی آثار زیان‌باری داشته باشند (۲۰ و ۲۱).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر شوری، آلودگی سرب و کود گاوی بر قابلیت هدایت الکتریکی (EC)، pH و سرب قابل دسترس ($Pb_{acc.}$) خاک

Table 2- ANOVA results (mean square values) for the effect of salinity, Pb pollution and manure on soil electrical conductivity (EC), pH and accessible Pb ($Pb_{acc.}$)

منابع تغییر Sources of variation	df	EC	pH	$Pb_{acc.}$ Ω
Pollution (P)	1	0.223^{**}(0.21)	0.003^{*}(0.16)	47.8^{***}(0.99)
Salinity (S)	2	210^{***}(0.99)	0.014^{***}(0.66)	0.391^{***}(0.71)
Pollution (P)	1	8.90^{***}(0.91)	0.366^{***}(0.96)	0.580^{***}(0.64)
P×S	2	0.01^{ns}(0.01)	0.001^{ns}(0.09)	0.152^{***}(0.48)
P×M	1	0.151^{*}(0.15)	0.001^{ns}(0.05)	0.695^{***}(0.68)
S×M	2	0.090^{*}(0.125)	0.002^{*}(0.19)	0.038^{*}(0.19)
P×S×M	3	0.002^{ns}(0.01)	0.001^{*}(0.15)	0.188^{***}(0.54)
خطا (Error)	36	2.30×10^{-2}	4.14×10^{-4}	9.00×10^{-3}
C.V. (٪)	-	3.22	1.26	5.82
مدل (R^2)	-	99.8	96.4	99.4

اعداد داخل پرانتز مقدار Eta^2_p {$SS_{effect}/(SS_{effect} + SS_{error})$} را نشان می‌دهند. ^{ns}، *، ** و *** به ترتیب به مفهوم غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطوح ۵، ۱ و ۰/۱ درصد می‌باشد

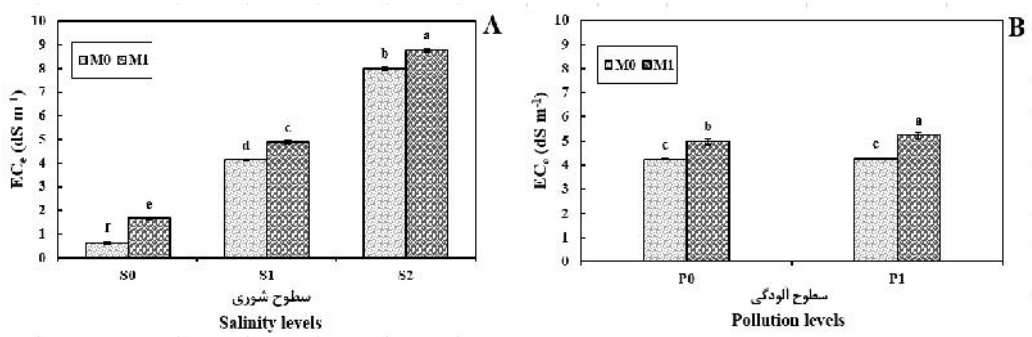
The numbers in parentheses indicate the amount of Eta^2_p {$SS_{effect}/ (SS_{effect} + SS_{error})$}. ^{ns}, *, ** and *** indicate non-significance and significance at levels 5, 1 and 0.1% respectively.

Ω Data were normalized

مصرف کود گاوی نیز در تمامی سطوح شوری، منجر به افزایش معنی‌دار ($p<0/05$) قابلیت هدایت الکتریکی خاک شد (شکل ۱-A). در خاک غیرشور، EC خاک در مقایسه با تیمار بدون کود ۲/۶ برابر شد و از ۰/۶۳ به ۱/۶۶ دسی‌زیمنس بر متر رسید. در سطوح شوری ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر نیز این ویژگی به‌ترتیب ۱۸/۴ و ۱۰ درصد افزایش داشت. شوری کود گاوی مورد استفاده در این پژوهش بیشتر از خاک بود (جدول ۱)، لذا افزایش شوری خاک با کاربرد کود طبیعی است. مصرف کود گاوی در خاک‌های غیرآلوده، ۱۷/۷ درصد و در خاک‌های آلوده، ۲۲/۹ درصد شوری خاک را افزایش داده است (شکل ۱-B). کود گاوی به‌عنوان یک منبع غذایی برای موجودات زنده‌ی خاک سرشار از یون‌های غیرآلی محلول هم‌چون Na^+، Mg^{2+}، Ca^{2+} و K^+ می‌باشد که این یون‌ها به‌نوبه‌ی خود قادر به افزایش شوری خاک هستند، لذا کاربرد کود گاوی در خاک افزایش قابلیت هدایت الکتریکی را به‌همراه دارد (۱۷).

نتایج نشان می‌دهند اثر (Eta^2_p) افزودن نمک به خاک (۰/۹۹) در تغییرات قابلیت هدایت الکتریکی خاک نسبت به کود گاوی (۰/۹۱) بیشتر می‌باشد و آلودگی به‌عنوان کم تأثیرترین فاکتور در تغییرات EC خاک، تنها ۰/۲۱ سهم داشته است.

واکنش خاک یکی از عوامل مؤثر بر فعالیت کرم‌های خاکی است، این جانداران زندگی در pH خنثی را ترجیح می‌دهند (۷). در این پژوهش pH خاک در سطح احتمال پنج درصد تحت تأثیر برهمکنش سه عامل شوری، آلودگی و کود گاوی قرار گرفت (جدول ۲). کود گاوی بیشترین سهم (Eta^2_p=۰/۹۶) را در تغییرات pH خاک داشته است. اگرچه فاکتورهای آزمایش از نظر آماری بر pH خاک اثر معنی دار داشته‌اند، اما مصرف نمک کلرید سدیم خاک را قلیایی نکرده و لذا تأثیرات مشاهده شده بر کرم‌های خاکی صرفاً ناشی از اثر سوء نمک و آلودگی می‌باشد (جدول ۳).



شکل ۱- برهمکنش شوری و کود گاوی (A) و آلودگی و کود گاوی (B) بر قابلیت هدایت الکتریکی خاک (EC_e). میانگین‌ها (n_A=۸ و n_B=۱۶) با حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار ($p>۰/۰۵$) براساس آزمون LSD می‌باشند. S0، S1 و S2 به‌ترتیب شاهد، قابلیت هدایت الکتریکی ٤ و ٨ دسی زیمنس بر متر، P0 شاهد، P1 آلودگی ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب، M0 شاهد و M1 حاوی ٤ درصد کود گاوی. مقادیر خطای استاندارد (SE) به‌صورت خط عمودی روی هر ستون نمایش داده شده است

Figure 1- The interaction effect of salinity and manure (A) and Pb pollution and manure (B) on soil electrical conductivity (EC_e). Means (n_A=8 and n_B=16) followed by the same letter are not significantly ($P<0.05$) different between salinity, pollution and manure levels according to the LSD's test. S0, S1 and S2 are control, 4 and 8 dS m^{-1}, respectively. P0, control; P1, 30 mg kg^{-1} Pb, M0, control and M1 with 4 % (w/w) manure. Error bars indicate SE of the mean

آلودگی ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب با توجه به آستانه‌ی شروع سمیت این فلز برای کرم‌های خاکی *E. fetida* بر اساس نتایج ارائه شده از سوی محققین انتخاب گردید (۲۷، ۳۵ و ۳۶). برهمکنش سه عامل شوری، آلودگی و کود گاوی در سطح احتمال ۰/۱ درصد سرب قابل‌دسترس خاک را تحت تأثیر قرار داد، در حالی‌که سهم این برهمکنش در تغییرات سرب قابل دسترس خاک ۰/۵۴ بود (جدول ۲). در تیمارهای فاقد کود گاوی افزایش شوری خاک به ۴ دسی‌زیمنس بر متر، افزایش سرب قابل دسترس خاک‌های آلوده را منجر نشد ولی در شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر این ویژگی تا ۲۴ درصد افزایش یافت. این سطوح شوری در خاک‌های غیرآلوده بین ۲۴ تا ۲۷ درصد افزایش سرب قابل دسترس خاک را منجر گردید (جدول ۳). در خاک‌های تیمار شده با کود گاوی غلظت سرب قابل دسترس تیمارهای آلوده در شوری ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر به‌ترتیب ۱/۸ و ۲/۲ برابر تیمار شاهد (غیرشور) بود، ولی سرب قابل دسترس تیمارهای غیرآلوده در این سطوح شوری با تیمار شاهد اختلاف معنی دار نداشت ($p>۰/۰۵$). افزایش سرب قابل‌دسترس خاک با افزایش سطوح شوری را می‌توان به تشکیل کمپلکس‌های محلول $PbCl_n^{2-n}$، جایگزینی یون سدیم به‌جای سرب بر مکان‌های تبادلی ذرات خاک و افزایش غلظت این فلز در فاز محلول خاک و همچنین افزایش قدرت یونی نسبت داد (۱، ۲ و ۳۴). افزودن کود گاوی در خاک‌های آلوده، سرب قابل دسترس خاک را کاهش داد (جدول ۳)، در خاک غیرشور سرب قابل دسترس خاک تا ۵۰ درصد کاهش یافت و در سطوح ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر به‌ترتیب کاهش ۲۶ و ۲۲ درصدی این شاخص را در مقایسه با تیمارهای فاقد کود گاوی سبب گردید (هر چند مقدار سرب در کود گاوی مورد مطالعه تعیین نشد، اندازه‌گیری سرب در خاک‌های تیمار شده با کود گاوی نشان می‌دهد که مقدار این فلز در کود ناچیز بوده است. از نظر تغذیه‌ای غلظت سرب نباید در کود دامی بالا باشد؛ زیرا سلامت دام به خطر می‌افتد.).

احتمالاً کاهش سرب قابل‌دسترس در تیمارهای حاوی کود گاوی به علت جذب اختصاصی سرب می‌باشد (۳۰). مواد آلی از طریق جذب سطحی (Adsorption) به‌صورت تشکیل کمپلکس پایدار (Stable and inner-sphere complexes) با اجزای محلول فلزات سمی، آن‌ها را از محلول خاک و دسترس گیرنده‌های زیستی خارج می‌کنند، به‌عبارت‌دیگر جذب اختصاصی Pb^{+2} روی گروه‌های عامل مواد آلی، کاهش قابلیت دسترسی این فلز را سبب می‌شود (۲۸). کاهش قابلیت دسترسی سرب با کاربرد مواد آلی توسط محققین زیادی نیز گزارش شده است (۱، ۳۰ و ۳۲).

برهمکنش آلودگی سرب، شوری و کود گاوی بر شاخص‌های رشد و فعالیت کرم‌های خاکی

نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که برهمکنش شوری، آلودگی و کود گاوی به‌صورت معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) تمامی شاخص‌های رشد و فعالیت کرم خاکی *E. fetida* را (به غیر از تعداد کرم‌های خاکی بالغ) تحت تأثیر قرار داده است. مقادیر اندازه‌ی اثر جزئی (Eta^2_p) نیز نشان می‌دهد که کود گاوی با سهم بیش از ۰/۹۰ در تغییرات شاخص‌های مذکور در زندگی کرم خاکی مورد مطالعه بسیار حائز اهمیت است.

جدول ۳- برهمکنش شوری، آلودگی سرب و کود گاوی بر pH و سرب قابل‌دسترس ($Pb_{acc.}$) خاک

Table 3- The interaction effect of salinity, Pb pollution and manure on soil pH and accessible Pb

تیمار کودی Manure treatment (%)	سطوح سرب Pb levels (mg kg^{-1})	سطوح شوری Salinity levels (dS m^{-1})	pH	$Pb_{acc.}$ (mg kg^{-1})
بدون کود گاوی Without cow manure	0	Control	7.53±0.008G	1.240.05F
		4	7.56±0.015EF	1.47±0.05E
		8	7.57±0.006EF	1.56±0.07E
	30	Control	7.54±0.007FG	12.07±0.39B
		4	7.55±0.017FG	12.79±0.39B
		8	7.58±0.011E	15.01±0.43A
با کود گاوی With cow manure	0	Control	7.70±0.006D	1.46±0.07E
		4	7.73±0.013C	1.42±0.02E
		8	7.74±0.008BC	1.48±0.12E
	30	Control	7.69±0.006D	5.34±0.37D
		4	7.77±0.133C	9.41±0.07C
		8	7.79±0.004A	11.70±0.74B

اعداد میانگین (n=۴) به‌همراه خطای استاندارد (SE) می‌باشند. میانگین‌ها (n=۴) با حروف مشابه بزرگ بین سطوح مختلف شوری، آلودگی و کود گاوی براساس آزمون LSD تفاوت معنی‌دار ندارند (p>۰/۰۵)

The numbers are mean with standard error (SE). Means (n=4) followed by the same letter are not significantly between salinity, pollution and cow manure levels according to the LSD test (P<0.05)

شوری نیز سهم عمده‌ای بر تغییرات این شاخص‌ها داشته (۰/۶۰<) ولی سهم عامل آلودگی (۰/۷۲- ۰/۰۱) کمتر بوده است (جدول ۴). کرم‌های خاکی *E. fetida* به‌عنوان کرم‌های اپی‌ژئیک وابسته به مواد آلی هستند و تأمین این مهم در زندگی و فعالیت آن‌ها تأثیر بسزایی دارد (۶). هرچند در این مطالعه علی‌رغم آثار مفید کود گاوی، کاهش شاخص‌های رشد و فعالیت کرم‌های خاکی در تیمارهای حاوی کود گاوی محسوس‌تر بود. اووجوری و همکاران (۲۰) اظهار کردند که کرم‌های خاکی نسبت به تنش شوری بسیار حساس هستند و خاک‌هایی با شوری کمتر از ۲ دسی‌زیمنس بر متر که برای گیاهان غیرشور و اصطلاحاً "ایمن" است، قادر به کاهش فعالیت و جمعیت آن‌ها است، با این وجود در خاک‌های آلوده و شور، سمیت فلزات تشدید شده و رشد و فعالیت این کرم خاکی به‌میزان بیشتری تحت تأثیر قرار می‌گیرد. از طرفی آلودگی سرب آثار منفی زیادی بر کرم خاکی *E. fetida* دارد، به‌طوری‌که بررسی‌ها حاکی است که غلظت‌های اندک ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب به‌میزان زیادی شاخص‌های رشد و تولید مثل کرم‌های خاکی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳۵ و ۳۶). ساینت‌دنیس و همکاران (۲۷) نیز مشاهده کردند که ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب کل در یک خاک با pH ۵/۸ تا ۶/۲، بر رشد و فعالیت این جانداران اثر سمی دارد و این مقدار آستانه‌ی حساسیت گونه‌ی *E. fetida* به آلودگی سرب است.

تعداد کرم‌های خاکی بالغ

برهمکنش آلودگی و کود گاوی در سطح احتمال یک درصد و شوری و کود گاوی در سطح احتمال پنج درصد، تعداد کرم‌های خاکی بالغ را تحت تأثیر قرار داد. اندازه‌ی اثر جزئی (Eta^2_p) کود گاوی و شوری در تغییرات این شاخص به‌ترتیب ۰/۹۴ و ۰/۶۰، ولی اثر آلودگی (۰/۰۱) ناچیز بود. به عبارتی کود گاوی و شوری به‌میزان بیشتری شاخص‌های فعالیت این کرم خاکی را تحت تأثیر قرار داده است (جدول ۴). بدون کود گاوی، در خاک‌های آلوده ۵۵ درصد و در خاک‌های غیرآلوده ۴۸ درصد کاهش در تعداد اولیه‌ی کرم‌های بالغ افزوده شده به هر گلدان (۵ کرم خاکی بالغ) مشاهده گردید ولی با افزودن کود گاوی به خاک‌های آلوده و یا غیرآلوده هر ۵ کرم خاکی زنده ماندند (شکل ۲-A).

زالتاسکیت و سودین (۳۵) مشاهده کردند که ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب در خاک طی ۲۸ روز، زنده‌مانی کرم‌های خاکی *E. fetida* را ۱۰ درصد کاهش می‌دهد. کود گاوی در خاک‌های آلوده ۱۲۱ درصد و در خاک‌های غیرآلوده ۸۰ درصد نسبت به تیمارهای بدون کود گاوی در زنده‌مانی کرم‌های خاکی بالغ مؤثر بود، بنابراین کود گاوی تا حد زیادی اثر منفی آلودگی را بر تعداد کرم‌های خاکی بالغ کاهش داده است. از طرفی آثار مثبت کود گاوی بر زنده‌مانی کرم‌های بالغ به سطوح شوری خاک بستگی داشت (شکل ۲-B).

جدول ٤- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر آلودگی سرب، شوری و کود گاوی بر تعداد کرم‌های بالغ، جمعیت کرم‌های خاکی، وزن مرطوب و خشک و وزن مرطوب و وزن خشک فضولات کرم‌های خاکی

Table 4- ANOVA results (mean square values) for the effect of Pb pollution, salinity and manure on number of adult earthworm, earthworm population, wet and dry body weights, and wet and dry weights of worms casts

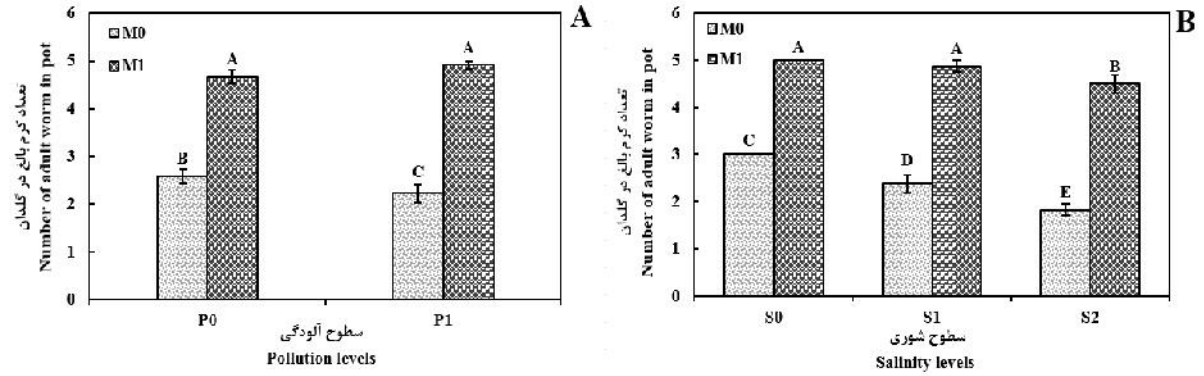
منابع تغییر Sources of variation	df	تعداد کرم‌های بالغ Number of adult worms Ω	جمعیت کرم‌های خاکی Earthworm population Ω	وزن مرطوب Wet weight Ω	وزن خشک Dry weight Ω	وزن مرطوب فضولات Cast wet weight Ω	وزن خشک فضولات Cast dry weight Ω
Pollution (P)	1	0.04^{ns}(0.01)	0.04^{**}(0.18)	0.02^{***}(0.33)	0.11^{***}(0.72)	2.5×10^{-6ns}(0.01)	3.3×10^{-7ns}(0.01)
Salinity (S)	2	2.78^{***}(0.60)	2.43^{***}(0.96)	0.37^{***}(0.94)	0.23^{***}(0.91)	0.005^{***}(0.95)	0.004^{***}(0.91)
Pollution (P)	1	68.5^{***}(0.94)	49.0^{***}(0.99)	26.0^{***}(0.99)	31.1^{***}(0.99)	0.134^{***}(0.99)	0.126^{***}(0.99)
P×S	2	0.12^{ns}(0.06)	0.05^{**}(0.33)	0.03^{***}(0.56)	0.13^{***}(0.85)	$6.0\times10^{-5*}$(0.21)	3.8×10^{-5ns}(0.08)
P×M	1	1.12^{**}(0.23)	0.16^{***}(0.46)	0.31^{***}(0.87)	0.33^{***}(0.88)	0.001^{***}(0.73)	$3.2\times10^{-4**}$(0.28)
S×M	2	0.48^{*}(0.20)	0.06^{***}(0.39)	0.06^{***}(0.73)	0.05^{***}(0.70)	0.001^{***}(0.75)	0.002^{***}(0.80)
P×S×M	3	0.28^{ns}(0.13)	0.03^{**}(0.23)	0.11^{***}(0.83)	0.13^{***}(0.85)	$3.4\times10^{-4***}$(0.59)	$1.0\times10^{-4*}$(0.20)
(Error) خطا	36	1.02×10^{-2}	5.2×10^{-3}	1.25×10^{-3}	1.23×10^{-3}	1.29×10^{-5}	2.33×10^{-5}
(٪) C.V.	-	8.9	2.29	5.6	2.8	1.6	2.0
(٪) مدل R^2	-	95.5	99.7	99.8	99.8	99.6	99.3

اعداد داخل پرانتز مقدار Eta^2_p {$SS_{effect}/(SS_{effect} + SS_{error})$} را نشان می‌دهند. ^{ns} ، * ، ** و *** به ترتیب به مفهوم غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح ۵، ۱ و ۰/۱ درصد می‌باشند.

Ω داده‌ها نرمال شده‌اند

The numbers in parentheses indicate the amount of Eta^2_p {$SS_{effect}/(SS_{effect} + SS_{error})$}. ^{ns}, *, ** and *** indicate non-significance and significance at levels 5, 1 and 0.1% respectively.

Ω Data were normalized



شکل ۲- برهمکنش آلودگی و کود گاوی (A) و شوری و کود گاوی (B) بر تعداد کرم‌های خاکی بالغ در گلدان. میانگین‌ها (n_A=۱۲ و n_B=۸) با حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار (p>۰/۰۵) براساس آزمون LSD می‌باشند. S0، S1 و S2 به‌ترتیب شامل شاهد، قابلیت هدایت الکتریکی ٤ و ٨ دسی‌زیمنس بر متر، P0 شاهد، P1 آلودگی ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب، M0 شاهد و M1 حاوی ٤ درصد کود گاوی. مقادیر خطای استاندارد (SE) به‌صورت خط عمودی روی هر ستون نمایش داده شده است

Figure 2- The interaction effect of Pb pollution and manure (A) and salinity and manure (B) on the number of adult worms in pot. Means (n_A=8 and n_B=16) followed by the same letter are not significantly (P<0.05) different between salinity, pollution and manure levels according to the LSD' test. S0, S1 and S2 are control, 4 and 8 dS m^{-1}, respectively. P0, control; P1, 30 mg kg^{-1} Pb, M0, control and M1 with 4 % (w/w) cow manure. Error bars indicate SE of the mean

به‌طوری‌که در خاک غیرشور و دارای شوری ۴ دسی‌زیمنس بر متر، تقریباً هر ۵ کرم بالغ زنده ماندند و با افزایش شوری خاک به ۸ دسی‌زیمنس بر متر ۱۰ درصد تلفات داشتند. بدون کود گاوی در تیمارهای غیرشور و مبتلا به شوری ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر به ترتیب کاهش ۴۰، ۵۲ و ۶۳ درصدی تعداد کرم‌های بالغ نسبت به تعداد اولیه‌ی کرم‌های خاکی مشاهده شد. مقایسه‌ی تعداد کرم‌های بالغ در خاک‌های بدون کود و حاوی کود با سطوح شوری مختلف حاکی است، کود گاوی در خاک غیرشور ۶۷ درصد و در خاک‌های دارای سطوح شوری ۴ و ۸ دسی‌زیمنس به‌ترتیب ۱۰۵ و ۱۴۵ درصد زنده‌مانی کرم‌های خاکی بالغ را افزایش داده است.

بنابراین اثر مثبت کود گاوی بر زنده‌مانی کرم‌های خاکی در تیمارهای شور بیشتر بوده است. جان و همکاران (۱۳) نیز مشاهده کردند که تأثیر مثبت کاربرد بقایای ذرت به‌منظور کاهش آثار سوء شوری بر زنده‌مانی کرم‌های خاکی *A. trapezoids* با افزایش سطوح شوری خاک بیشتر شد. از آنجاکه در خاک‌های غیرشور و غیرآلوده نیز تعداد کرم‌های خاکی بالغ کاهش یافت، می‌توان استنباط نمود که کمبود غذا سهم عمده‌ای در مرگ‌ومیر کرم‌های خاکی در تیمارهای فاقد کود گاوی داشته است. منبع غذایی کرم‌های خاکی *E. fetida* مواد آلی خاک می‌باشد و نبود غذای کافی قدرت زنده‌مانی آن‌ها را کاهش می‌دهد (۷). همچنین این انتظار وجود دارد که در تیمارهای حاوی کود گاوی تعداد کرم‌های خاکی بالغ نسبت به تعداد اولیه (۵ کرم بالغ) بیشتر شده باشد، ولی در این پژوهش چنین نتیجه‌ای دیده نشد. شاید بتوان گفت که تأمین شرایط بهینه برای سپری شدن چرخه‌ی زندگی کرم‌های خاکی *E. fetida* تنها با وجود کود گاوی و عدم وجود تنش در بستر پرورش تأمین نمی‌شود و در شرایط طبیعی چرخه‌ی زندگی آن‌ها بدون تأخیر سپری می‌شود.

جمعیت کرم‌های خاکی

افزایش سطوح شوری در خاک‌های آلوده و غیرآلوده جمعیت کرم‌های خاکی را کاهش داد (جدول ۵). به‌طوری‌که در خاک‌های فاقد کود گاوی افزایش سطوح شوری خاک به ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر در تیمارهای آلوده به‌ترتیب ۳۴ و ۵۹ درصد تعداد کل کرم‌های خاکی را نسبت به تیمار شاهد کاهش داد و در تیمارهای غیرآلوده نیز به‌ترتیب کاهش ۲۷ و ۵۰ درصدی این شاخص را نسبت به تیمار شاهد به‌همراه داشت.

بدین‌ترتیب، اثر شوری بر جمعیت کرم‌های خاکی در خاک‌های آلوده محسوس‌تر از خاک‌های غیرآلوده است که دلیل آن افزایش قابلیت دسترسی و سمیت بیشتر سرب با افزایش سطوح شوری در خاک‌های آلوده می‌باشد. شوری خاک قابلیت دسترسی سرب را افزایش داد (جدول ۳) و لذا سمیت این فلز برای کرم‌های خاکی تشدید شد. با این حال ماهیت اثر مشترک تنش شوری و آلودگی بر جمعیت کرم‌های خاکی در خاک‌های بدون کود گاوی به‌صورت هم‌افزا بود (جدول ۶).

جدول ۵- برهم‌کنش آلودگی سرب، شوری و کود گاوی بر جمعیت، وزن مرطوب و خشک کرم‌های خاکی و وزن مرطوب و خشک فضولات کرم های خاکی

Table 5- The interaction effect of salinity, Pb pollution and cow manure on earthworm population, wet and dry weights of earthworm and wet and dry weights of earthworm cast

تیمار شوری Salinity treatment (dS m^{-1})	سطوح سرب Pb levels (mg kg^{-1})		سطوح سرب Pb levels (mg kg^{-1})	
	0	30	0	30
	بدون کود گاوی Without cow manure		با کود گاوی With cow manure	
	جمعیت کرم‌های خاکی در گلدان Earthworm population in pot			
Control	14.0±0.40F	11.8±0.47G	117±6.70A	101±0.62B
4	10.3±0.25H	9.3±0.25H	58.0±2.08D	72.0±2.67C
8	7.00±1.75I	5.7±0.23J	45.2±1.79E	49.8±2.17E
	وزن مرطوب کرم‌های خاکی Earthworm wet weight (g pot^{-1})			
Control	1.00±0.01F	0.93±0.01GH	4.84±0.06A	4.73±0.03A
4	0.97±0.01FG	0.92±0.01GH	3.74±0.08D	4.43±0.13B
8	0.91±0.03H	0.72±0.01I	2.49±0.04E	3.96±0.09C
	وزن خشک کرم‌های خاکی Earthworm dry weight (g pot^{-1})			
Control	0.14±0.001E	0.13±0.001FG	0.78±0.005A	0.74±0.005AB
4	0.14±0.002EF	0.13±0.007 GH	0.60±0.008C	0.71±0.016B
8	0.12±0.002H	0.11±0.001I	0.38±0.006D	0.74±0.021AB
	وزن فضولات مرطوب Cast wet weight (g pot^{-1})			
Control	13.57±0.2E	13.32±0.2E	43.67±0.4A	42.43±1.4A
4	13.45±0.1E	11.77±0.2F	28.54±0.5C	34.45±0.5B
8	11.83±0.1F	11.18±0.2G	22.62±0.1D	27.19±0.4C
	وزن فضولات خشک Cast dry weight (g pot^{-1})			
Control	11.79±0.1F	11.55±0.1F	35.52±0.4A	34.03±1.4A
4	11.38±0.1FG	10.75±0.1H	24.36±0.3C	27.11±0.5B
8	10.93±0.1GH	10.63±0.3H	19.32±0.6E	20.93±0.4D

اعداد میانگین (n=۴) به‌همراه خطای استاندارد (SE) می‌باشند. میانگین‌ها (n=۴) با حروف مشابه بین سطوح مختلف شوری، آلودگی و کود گاوی براساس آزمون LSD تفاوت معنی‌دار ندارند (p>۰/۰۵)

The numbers are mean with standard error (SE). Means (n=4) followed by the same letter are not significantly (P<0.05) different between salinity, pollution and cow manure levels according to the LSD's test

با افزودن کود گاوی، خلاف این روند مشاهده گردید به‌طوری‌که در تیمارهای غیرآلوده اثر شوری محسوس‌تر از تیمارهای آلوده بود. در سطوح شوری ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر در خاک‌های غیرآلوده به ترتیب ۵۰ و ۶۱ درصد و در خاک‌های آلوده به‌ترتیب ۳۸ و ۵۷ درصد نسبت به تیمار شاهد کاهش در این شاخص مشاهده گردید (جدول ۵). بنابراین می‌توان استنباط نمود که اثر مواد آلی بر جمعیت کرم‌های خاکی، در خاک‌های شور و آلوده بیشتر از خاک‌های شور غیرآلوده است. نتایج جدول ۳ نشان داد که با افزودن کود گاوی قابلیت دسترسی و سمیت سرب کاهش می‌یابد و مکانیسم تأثیر شوری بر فراهمی سرب تغییر می‌کند. لذا اثر متقابل شوری و آلودگی بر شاخص تعداد کل کرم‌های خاکی با وجود کود گاوی ماهیت پادکرداری داشته و بر کاهش اثر منفی دو تنش به‌صورت هم‌زمان دلالت می‌کند (جدول ۶).

تعداد کرم‌های خاکی *E. fetida* تا زمانی افزایش می‌یابد که غذا یک عامل محدودکننده نباشد (۶). منبع غذایی این جانداران مواد آلی خاک می‌باشد و عدم وجود غذای کافی از جمعیت آن‌ها می‌کاهد (۷)، بنابراین تأمین غذای لازم برای کرم‌های خاکی با افزودن کود گاوی، با وجود تنش شوری و آلودگی جمعیت کرم‌های خاکی را افزایش داد. وانگ و همکاران (۳۳) اظهار کردند که مدیریت مواد آلی یکی از شیوه‌های بسیار مؤثر برای افزایش جمعیت کرم‌های خاکی در خاک‌های شور است.

جدول ٦- ماهیت اثرمتقابل تنش شوری و آلودگی بر جمعیت، وزن و فعالیت کرم خاکی *E. fetida*

Table 6- The nature of interaction effect of salinity and Pb pollution on population, weight and activity of the earthworm *E. fetida*

تیمار Treatment	تیمار کودی Manure treatment (%)									
	0	4	0	4	0	4	0	4	0	4
	جمعیت population		وزن مرطوب Wet weight		وزن خشک Dry weight		وزن مرطوب فضولات Cast wet weight		وزن خشک فضولات Cast dry weight	
S1	0.27	0.51	0.03	0.23	0.03	0.23	0.01	0.03	0.03	0.31
P	0.16	0.13	0.07	0.02	0.07	0.04	0.02	0.35	0.02	0.04
$(Y_{sp})_o$	0.34	0.39	0.08	0.09	0.08	0.08	0.13	0.21	0.09	0.24
$(Y_{sp})_p$	0.39	0.57	0.10	0.24	0.09	0.26	0.03	0.36	0.05	0.34
t statistics	-1.72	-6.45	-3.72	-5.04	0.54	-7.62	4.20	-4.62	1.65	-2.79
p value	$p>0.05$	$p<0.001$	$p>0.05$	$p<0.01$	$p>0.05$	$p<0.001$	$p<0.01$	$p<0.01$	$p>0.05$	$p<0.05$
$CI_{95\%}$	0.057	0.073	0.022	0.088	0.017	0.068	0.042	0.035	0.037	0.059
Interaction	ADD	ANT	ADD	ANT	ADD	ANT	SYN	ANT	ADD	ANT
S2	0.50	0.61	0.09	0.49	0.12	0.51	0.13	0.48	0.07	0.46
P	0.16	0.13	0.07	0.02	0.07	0.04	0.02	0.03	0.02	0.04
$(Y_{sp})_o$	0.60	0.58	0.28	0.18	0.18	0.05	0.18	0.38	0.10	0.41
$(Y_{sp})_p$	0.58	0.67	0.15	0.50	0.18	0.53	0.14	0.50	0.09	0.48
t statistics	-1.31	-2.22	4.47	-1.03	-1.33	-16.62	0.42	-6.39	0.09	-2.13
p value	$p>0.05$	$p<0.05$	$p<0.01$	$p<0.01$	$p>0.05$	$p<0.001$	$p>0.05$	$p<0.001$	$p>0.05$	$p<0.05$
$CI_{95\%}$	0.054	0.059	0.033	0.058	0.089	0.087	0.054	0.031	0.084	0.37
Interaction	ADD	ANT	SYN	ANT	ADD	ANT	ADD	ANT	ADD	ANT

اعداد داخل جدول نسبت بازدارندگی (Inhibitory ratio) هستند ($IR = \frac{\text{شاهد} - \text{تیمار}}{\text{شاهد}}$). S1 و S2 سطوح شوری ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر، P: آلودگی ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب، $(Y_{sp})_o$: اثر مشاهده‌شده، $(Y_{sp})_p$: اثر پیش‌بینی شده، $CI_{95\%}$: حد اطمینان، Interaction: نوع برهمکنش، ADD: بدون اثر متقابل (هم‌افزا)، ANT: پادکرداری، SYN: هم‌کرداری

The numbers are inhibitory ratio ($IR = \frac{blank - treatment}{blank}$). S1 and S2 are 4 and 8 dS m^{-1}; P, 30 mg kg^{-1} Pb; $(Y_{sp})_o$: observed effect; $(Y_{sp})_p$: predicted effect; $CI_{95\%}$: confidence interval; ADD: Additive; ANT: Antagonism and SYN: Synergism

در پژوهش نعمتی و همکاران (۱۹) مواد اصلاحی آلی شامل بقایای یونجه، ذرت و کود گاوی، جمعیت کرم‌های خاکی *L. terrestris* L. را تحت سطوح مختلف شوری، بین ۱۲ تا ۸۵ درصد بهبود بخشید. جان و همکاران (۱۳) گزارش کردند که کاربرد بقایای ذرت با بهبود کیفیت خاک و تأمین مواد غذایی جمعیت کرم‌های خاکی *A. trapezoids* را در محیط‌های شور افزایش می‌دهد. همچنین آویلا و همکاران (۳) گزارش کردند که کاربرد مواد آلی تا حد زیادی سمیت مس را برای کرم‌های خاکی *E. fetida* کاهش داده و منجر به افزایش جمعیت آن‌ها می‌شود.

وزن مرطوب و خشک کرم‌های خاکی

نتایج (جدول ۵) نشان می‌دهد با افزایش سطوح شوری خاک، وزن مرطوب کرم‌های خاکی کاهش یافت، ولی بدون افزودن کود گاوی کاهش این شاخص در خاک‌های آلوده بیشتر بود. در تیمارهای آلوده افزایش سطوح شوری خاک به ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر به ترتیب کاهش ۸ و ۲۸ درصدی وزن مرطوب کرم‌های خاکی مورد مطالعه را سبب شد، در حالی‌که در تیمارهای غیرآلوده افزایش سطوح شوری تا ۴ دسی‌زیمنس بر متر اثر معنی‌داری بر وزن مرطوب کرم های خاکی نداشت ($p>0.05$) و زمانی که شوری خاک به ۸ دسی‌زیمنس بر متر افزایش یافت، این شاخص ۹ درصد کاهش نشان داد. همان‌طور که قبل از این نیز عنوان شد کاهش محسوس‌تر وزن مرطوب کرم‌های خاکی با افزایش سطوح شوری در تیمارهای آلوده به دلیل افزایش قابلیت دسترسی سرب در خاک‌های شور است (جدول ۳). شریف و همکاران (۲۸) نشان دادند که شوری کاهش وزن گونه های مختلف کرم‌های خاکی را سبب می‌شود. گازیت و همکاران (۱۲) اظهار کردند که هرچه شوری خاک بیشتر می‌شود، وزن مرطوب کرم-های خاکی به‌میزان بیشتری کاهش می‌یابد. از طرفی زالتاسکیت و سودین (۳۶) مشاهده کردند که وزن مرطوب کرم‌های خاکی *E. fetida* در خاک‌های آلوده به ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب به‌مدت ۲۸ روز، بیش از ۳۰ درصد کاهش داشت. با افزودن کود گاوی این

سطوح شوری در خاک‌های آلوده به‌ترتیب ۸ و ۱۸ درصد و در خاک غیرآلوده به‌ترتیب ۲۳ و ۴۸ درصد کاهش وزن مرطوب کرم‌های خاکی را به‌همراه داشت. می‌توان گفت که اثر کود گاوی بر وزن مرطوب کرم‌های خاکی در تیمارهای آلوده بیشتر از غیرآلوده بوده است. چراکه مواد آلی ضمن کاستن از قابلیت دسترسی سرب (جدول ۳)، به‌عنوان بستره‌ی غذایی توسط کرم‌های خاکی مصرف می‌شوند و از سویی افزایش جمعیت و زیست‌توده‌ی میکروبی به دنبال افزایش مواد آلی خاک، به‌صورت غیرمستقیم نیز این جانداران را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۳)، لذا وزن کرم‌های خاکی افزایش می‌یابد.

ماهیت اثر مشترک دو تنش آلودگی و شوری بر وزن مرطوب کرم‌های خاکی در خاک‌های بدون کود گاوی به سطوح شوری خاک بستگی داشت (جدول ۶)؛ به‌طوری‌که در شوری ۴ دسی‌زیمنس بر متر دو تنش اثر متقابل نداشتند و ماهیت برهمکنش هم‌افزا بود، ولی افزایش شوری خاک به ۸ دسی‌زیمنس بر متر ماهیت اثر متقابل دو تنش را به هم‌کرداری تغییر داد و اثر منفی دو تنش بر وزن مرطوب کرم‌های خاکی بیشتر شد. در خاک‌های حاوی کود گاوی دو تنش ماهیت پادکرداری داشتند. در پژوهش اووجوری و همکاران (۲۰) تغییرات وزن کرم‌های خاکی *E. fetida* تحت تأثیر برهمکنش شوری و آلودگی روی قرار گرفت و ماهیت اثر متقابل دو تنش به‌صورت هم افزا تا هم‌کرداری بود. این محققین اظهار کردند که افزایش سطوح شوری خاک، منجر به افزایش یون Cl^- و تشکیل $ZnCl_2$ شده که ضمن افزایش قابلیت دسترسی این فلز در خاک، جذب آن را توسط کرم‌های خاکی افزایش می‌دهد و کاهش وزن این جاندار بیشتر می شود.

کاهش وزن خشک کرم‌های خاکی نیز در تیمارهای آلوده و فاقد کود گاوی محسوس‌تر بود. به‌طوری‌که در تیمارهای آلوده افزایش شوری خاک به ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر به‌ترتیب کاهش ۸ و ۱۸ درصدی وزن خشک کرم‌های خاکی را به‌همراه داشت. در تیمارهای غیرآلوده شوری ۴ دسی‌زیمنس بر متر منجر به کاهش این شاخص نشد ولی با افزایش شوری خاک به ۸ دسی‌زیمنس بر متر وزن خشک کرم‌های خاکی ۱۲ درصد کاهش پیدا کرد. با افزودن کود گاوی در سطوح ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر در خاک‌های غیرآلوده به‌ترتیب وزن خشک کرم‌های خاکی ۲۳ و ۵۱ درصد کاهش یافت ولی در خاک‌های آلوده در این سطوح شوری کاهش این شاخص مشاهده نگردید و اختلافی بین وزن خشک کرم‌های خاکی در تیمارهای مبتلا به شوری با شاهد دیده نشد (جدول ۵). اثر مشترک تنش شوری و آلودگی بر وزن خشک کرم‌های خاکی در خاک‌های بدون کود به‌صورت هم‌افزا بود و بین دو تنش اثر متقابل وجود نداشت. با افزودن کود گاوی ماهیت برهمکنش دو تنش به پادکرداری تغییر یافت (جدول ۶).

وزن مرطوب و خشک فضولات کرم‌های خاکی

فضولات مرطوب تولیدشده در تیمارهای آلوده و فاقد کود گاوی، با افزایش سطوح شوری خاک به ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر به‌ترتیب ۱۳ و ۱۸ درصد کاهش یافت. در تیمارهای غیرآلوده با افزایش شوری خاک به ۴ دسی‌زیمنس بر متر تولید فضولات کاهش نداشت ولی در شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر این شاخص ۱۳ درصد کمتر شد. با افزودن کود گاوی وزن مرطوب فضولات تولیدشده در سطوح شوری خاک به ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر، در خاک‌های غیرآلوده به‌ترتیب ۳۵ و ۴۸ درصد و در خاک‌های آلوده ۲۱ و ۳۸ درصد کاهش داشت (جدول ۵). ماهیت برهمکنش شوری و آلودگی بر وزن مرطوب فضولات در خاک فاقد کود گاوی با شوری ۴ دسی‌زیمنس برمتر به‌صورت هم‌کردای بود ولی در شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر به هم‌افزا و یا بدون اثر متقابل تغییر یافت. در خاک‌های حاوی کود گاوی، برهمکنش دو تنش ماهیت پادکرداری داشت و تأثیر منفی برهمکنش دو تنش تعدیل شد (جدول ۶)، چراکه افزودن بقایای آلی در خاک‌های شور، می‌تواند تولید فضولات و توانایی حفر خاک را توسط کرم‌های خاکی افزایش دهد (۱۳).

وزن خشک فضولات تولیدشده در تیمارهای آلوده و مبتلا به شوری ۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر به‌طور یکسان و بین ۹ تا ۱۰ درصد کاهش یافت. در تیمارهای غیرآلوده این شاخص تنها در شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر ۷ درصد کاهش داشت. در خاک‌های حاوی کود گاوی تیمارهای غیرآلوده در این سطوح شوری به‌ترتیب ۳۱ و ۴۶ درصد و تیمارهای آلوده به‌ترتیب ۲۴ و ۴۱ درصد، کاهش وزن خشک فضولات تولید شده را منجر شدند (جدول ۵). ماهیت اثر مشترک تنش شوری و آلودگی بر وزن خشک فضولات تولید شده بدون کود گاوی به‌صورت هم‌افزا بود و با افزودن کود گاوی به پادکرداری تغییر یافت (جدول ۶). همان‌گونه که نتایج نشان داد شاخص‌های رشد و فعالیت کرم‌های خاکی *E. fetida* با افزایش سطوح شوری خاک کاهش می‌یابند و تولید فضولات نیز به‌عنوان نشانگر رفتاری کرم‌های خاکی در محیط‌های آشفته، از این قاعده مستثنی نیست و حتی به‌طور مشابه با سایر شاخص‌های رشد و فعالیت این کرم خاکی، افزایش شوری تیمارهای آلوده اثر محسوس‌تری بر کاهش تولید فضولات داشته است. شاید بتوان کاهش تولید فضولات توسط کرم‌های خاکی را مربوط به کاهش جمعیت، تضعیف و کاهش وزن آن‌ها دانست. شریف و همکاران (۲۸) گزارش کردند که با افزایش سطوح شوری خاک، ضمن کاهش جمعیت و وزن گونه‌های مختلف کرم خاکی، تولید فضولات نیز توسط آن‌ها کاهش می‌یابد. این محققان بیشترین تولید فضولات را در تیمار شاهد مشاهده کردند و این موضوع را مربوط به سلامت کرم‌های خاکی در خاک‌های غیرشور دانستند. کاپوویز و همکاران (۵) مشاهده کردند که تولید فضولات توسط

کرم‌های خاکی در خاک‌های آلوده کاهش می‌یابد، لذا این شاخص نیز می‌تواند به‌عنوان نشانگر رفتاری کرم‌های خاکی در برخورد با آلودگی به کار رود، ولی یکی از ضعف‌های استفاده از شاخص تولید فضولات به‌عنوان نشانگر رفتاری کرم خاکی به هنگام آلودگی خاک، این است که با کاهش تولید فضولات به‌وضوح مشخص نیست که آیا بر اثر آسیب به سلامتی کرم خاکی تولید فضولات کاهش یافته و یا وجود آلودگی در خاک مانع مصرف آن توسط کرم شده است.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش حاکی است شوری قابلیت دسترسی سرب (سرب عصاره‌گیری‌شده با DTPA) خاک را افزایش می‌دهد و از این طریق در کنار تنش شوری، سمیت سرب برای کرم‌های خاکی *E. fetida* تشدید می‌گردد. اثر نمک بر افزایش قابلیت دسترسی سرب به مقدار نمک و سطح ماده‌ی آلی خاک بستگی دارد، چنان‌که در خاک های آلوده و مبتلا به شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر افزایش سرب قابل دسترس محسوس‌تر بود. از طرف دیگر، مصرف کود گاوی در تمامی سطوح شوری قابلیت دسترسی سرب را کاهش داد. احتمالاً کود گاوی با جذب اختصاصی سرب قابل‌دسترس این فلز را از محلول خاک خارج می‌کند، با این وجود اثر افزودن کود در خاک غیرشور محسوس‌تر بود. جمعیت، وزن و فعالیت کرم خاکی *E. fetida* نسبت به برهمکنش دو تنش شوری و آلودگی بسیار حساس می‌باشند. به‌عبارتی محیط‌های آلوده و شور پتانسیل بیشتری برای آسیب‌رسانی به این جانداران دارند، به‌طوری‌که کمترین جمعیت، وزن مرطوب و خشک و همچنین وزن مرطوب و خشک فضولات تولیدشده در خاک‌های آلوده و مبتلا به شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر مشاهده گردید. در غیاب کود گاوی ماهیت اثر مشترک این دو تنش بر شاخص‌های رشد و فعالیت کرم‌های خاکی اغلب هم‌افزا و به‌ندرت به صورت هم‌کرداری بود درحالی‌که در حضور کود گاوی اثر مشترک دو تنش شوری و آلودگی بر کرم‌های خاکی به پادکرداری تغییر یافت، می‌توان گفت که مصرف کود گاوی در خاک‌های آلوده‌ی شور به کاهش اثر مشترک این دو تنش بر این گونه‌ی کرم خاکی کمک می کند.

تشکر و سپاسگزاری

بدین‌وسیله از حمایت‌های مالی دانشگاه شهرکرد تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1- Abbaspour A., Kalbasi M., Hajrasuliha Sh., and Fotovat A. 2007. Effect of plant residue and salinity on fractions of cadmium and lead in three soils. Soil and Sediment Contamination, 16:539-555.
2- Acosta J.A., Jansen B., Kalbitz K., Faz A., and Martinez S. 2011. Salinity increases mobility of heavy metals in soils. Chemosphere, 85:1318-1324.
3- Avila G.G., Gaete H.H., Sauve S.S., and Neaman A.A. 2009. Organic matter reduces copper toxicity for the earthworm *Eisenia fetida* in soils from mining areas in central Chile. Chilean Journal of Agricultural Research, 69:252-259.
4- Bremner J.M., and Mulvaney R.L. 1982. Nitrogen. P. 595-622. In Page A.L. et al. (eds.) Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin.
5- Capowiez Y., Dittbrenner N., Rault M., Triebskorn R., Hedde M., and Mazzia C. 2010. Earthworm cast production as a new behavioural biomarker for toxicity testing. Environmental Pollution, 158:388-393.
6- Edwards C.A. 2004. Earthworm Ecology. CRC Press, Boca Raton.
7- Edwards C.A. and Bohlen P.J. 1996. Biology and Ecology of Earthworms. Springer, London.
8- Falahati Marvast A., Hosseinpur A., and Tabatabaei S.H. 2013. Effect of salinity and sewage sludge on heavy metal availability and uptake by Barley plant. Journal of Water and Soil, 27(5):985-997. (in Persian with English abstract)
9- Ficher E., and Molnar L. 1997. Growth and reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae) in semi-natural soil containing various metal chlorides. Soil Biology and Biochemistry, 29:667-670.
10- Folt C.L., Chen C.Y., Moore M.V., and Burnaford J. 1999. Synergism and antagonism among multiple stressors. Limnology and Oceanography, 44:864-877.
11- Gee G.W., and Bauder J.W. 1986. Particle size analysis. p. 383-411. In Klute A. (ed.) Methods of Soil Analysis. Part 1. Physical and mineralogical methods. Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin.
12- Guzyte G., Sujetoviene G., and Zaltauskaite J. 2011. Effects of salinity on earthworm (*Eisenia fetida*). Environmental Engineering, 3:19-20.

13- Jun T., Wei G., Griffiths B., Xiaojing L., Yingjun X., and Hua Z. 2011. Maize residue application reduces negative effects of soil salinity on the growth and reproduction of the earthworm Aporrectodea trapezoides, in a soil mesocosm experiment. Soil Biology and Biochemistry, 49:46-51.
14- Klute A. 1982. Soil pH lime requirement. p. 199-223. In Mclean E.O. (ed.) Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin.
15- Lindsay W.L., and Norvell W.A. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese and copper. Soil Science Society of America Journal, 42:421- 428.
16- Loeppert R.H., and Suarez D.L. 1996. Carbonate and gypsum. p. 437-474. In: Suarez D.L. (ed.) Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical properties. Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin.
17- Mufwanzala N., and Dikinya O. 2010. Impact of poultry manure and its associated salinity on the growth and yield of spinach (*Spinacea oleracea*) and carrot (*Daucus carota*). International Journal of Agriculture and Biology, 12:489-494.
18- Nelson D.W., and Sommers L.E. 1996. Total carbon, organic carbon, and organic matter. p. 961-1011. In Sparks D.L. et al. (eds.) Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical methods. Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin.
19- Nemati F., Raiesi F., and Hosseinpur A.R. 2010. The study of population and growth characteristics of earthworm (*Lumbricus terrestris* L.) in a soil salinized with NaCl and the importance of organic amendments in alleviating salinity effects. Journal of Water and Soil, 24(6):1097-1108. (in Persian with English abstract)
20- Owojori O.J., Reinecke A.J., and Rozanov A.B. 2008. Effects of salinity on partitioning, uptake and toxicity of zinc in the earthworm *Eisenia fetida*. Soil Biology and Biochemistry, 40:2385-2393.
21- Owojori O.J., Reinecke A.J., and Rozanov A.B. 2009. The combined stress effects of salinity and copper on the earthworm *Eisenia fetida*. Applied Soil Ecology, 41:277–285.
22- Owojori O.J., and Reinecke A.J. 2010. Effects of natural (flooding and drought) and anthropogenic (copper and salinity) stressors on the earthworm *Aporrectodea caliginosa* under field conditions. Applied Soil Ecology, 44:156-163.
23- Qadir M., Qureshi A.S. and Cheraghi S.A.M. 2008. Extent and characterisation of salt-affected soils in Iran and strategies for their amelioration and management. Land Degradation and Development, 19:214-227.
24- Reinecke A.J., and Reinecke S.A. 2004. Earthworm as test organisms in ecotoxicological assessment of toxicant impacts on ecosystems. p. 299-310. In: Edwards C.A. (ed.) Earthworm Ecology. Part 8. Earthworms and environmental pollution. CRC Press. Boca Raton. Florida.
25- Reynolds W.D., and Clarke-Topp G. 2008. Soil water desorption and imbibition: tension and pressure techniques. p. 981-998. In Carter M.R. and Gregorich E.G. (eds.) Soil Sampling and Methods of Analysis. CRC Press, Boca Raton, Florida.
26- Rhoades J.D. 1996. Salinity: electrical conductivity and total dissolved solids. p. 417–435. In Sparks D.L. et al. (eds.) Methods of soil Analysis. Part 3: Chemical properties. Soil Science Society of America. Madison, Wisconsin.
27- Saint-Denis M., Narbonne G.F., Arnaud C., and Ribera D. 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida* andrei exposed to contaminated artificial soil: effects of lead acetate. Soil Biology and Biochemistry, 33:395-404.
28- Sharif F., Danisha M.U., Ali A.S., Khan A.U., Shahzad L., Ali H., and Ghafoor A. 2016. Salinity tolerance of earthworms and effects of salinity and vermi amendments on growth of sorghum bicolor. Archives of Agronomy and Soil Science, 62: 1169-1181.
29- Sposito G., Lund L.J., and Chang A.C. 1982. Trace metal chemistry in arid-zone field soils amended with sewage sludge: I. Fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd, and Pb in solid phases. Soil Science Society of America Journal, 46:260-264.
30- Strawn D.G., Bohn H.L., and Ocnnor G.A. 2015. Soil Chemistry. Wiley Blackwell. Hoboken, New Jersey.
31- Tabachnick B.G., and Fidell L.S. 2012. Using Multivariate Statistics (6th ed.). Pearson Publisher. Upper Saddle River, New Jersey.
32- Violante A., Cozzolino V., Perelomov L., Caporale A.G., and Pigna M. 2010. Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 10:268-292.
33- Wang Y., Chen J., Gu W., Xu Y., Gu J., and Tao J. 2016. Earthworm activities increase the leaching of salt and water from salt-affected agricultural soil during the wet–dry process under simulated rainfall conditions. Biology and Fertility of Soils, 52:323-330.

34- Xiong T.Z., and Feng T. 2001. Enhanced accumulation of lead in *Brassica pekinensis* by soil-applied chloride salts. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 67:67-74.
35- Zaltauskaite J., and Sodiene I. 2010. Effects of total cadmium and lead concentrations in soil on the growth, reproduction and survival of earthworm *Eisenia fetida*. Ekologija, 56:10-16.
36- Zaltauskaite J., and Sodiene L. 2014. Effects of cadmium and lead on the life-cycle parameters of juvenile earthworm *Eisenia fetida*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 103:9-16.
37- Zhao W., Sachsenmeier K., Zhang L., Sult E., Hollingsworth R.E., and Yang H. 2014. A new bliss independence model to analyze drug combination data. Journal of Biomolecular Screening, 19:817-821.

Journal of Water and Soil
Vol. 31, No. 5, Nove.-Dec. 2017, p. 1355-1370

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۵، آذر –دی ۱۳۹۶، ص. ۱۳۷۰-۱۳۵۵

Response of Earthworm *Eisenia fetida* to the Stresses Induced by Salinity and Lead Pollution in a Soil Amended with Cow Manure

M. Nazarizadeh[1*]- F. Raiesi[2]- H. Motaghian[3]

Received: 24-01-2017
Accepted: 12-08-2017

Introduction: Salinity and pollution are two environmental stresses that individually influence the population, growth and activity of earthworms as soil bioengineers. It is well-known that the population and activity of these organisms are mostly reduced or even their activity and growth can be stopped in polluted and saline soils. The individual effects of these abiotic stresses on earthworms, however, depend on the level of salinity, pollution and organic matter. Nonetheless, the joint or combined effect of these stresses on earthworms, especially in arid and semi-arid areas, is poorly known. Because of the importance of earthworms in soil ecosystem, the study of salinity and pollution interactions on earthworm population and activity to reduce their detrimental effects using organic materials is essential. The aim of this study was to examine how salinity and lead (Pb) stresses simultaneously affect the earthworms in soil ecosystem.

Materials and Methods: In this research, the interaction effect of salinity stress using sodium chloride (NaCl) and Pb stress using lead nitrate **(**$PbNO_3$) on the population, weight and activity of the earthworm *Eisenia fetida* was studied under greenhouse conditions. This factorial experiment was carried out using 3 factors, including Pb pollution (control and 30 mg kg^{-1} Pb), salinity (control, 4 and 8 dS m^{-1}) and cow manure (control and 4% by weight) arranged in a completely randomized design with four replicates. The experiment lasted 13 weeks and earthworm's population and activity including the number of adult worms, total earthworms, wet and dry weights, and wet and dry weights of casts produced by earthworm were measured at the end of the experiment. Concentration of DTPA (di-ethylene-triamine-pentaacetic acid) extractable Pb was also determined to assess how salinity influences the accessibility of this metal in the soil. The Fisher's least significant difference test was used to determine the significance of any difference between the means values at 5% level with the STATISTICA 8 software. The Bliss Independence Model was used to determine the type of interaction between salinity and Pb pollution for each manure treatment.

Results and Discussion: The current results showed that increasing salinity level enhanced the accessibility of Pb and subsequently its toxicity for earthworms. In contrast, addition of cow manure reduced the accessibility of Pb by 22-50% at all salinity levels. Earthworm population, wet and dry body weights, and wet and dry weights of casts produced by worms were all significantly (p<0.05) influenced by the interaction of salinity, Pb pollution and manure application. Earthworm characteristics in Pb-polluted soils had the lowest values in the presence of 8 dS m^{-1} salinity. Compared with the control, earthworm population tended to decline by 59%, wet weight by 28%, dry weight by 18%, cast wet weight by 18% and cast dry weight by 10% in Pb-polluted soils spiked with the highest salinity level. However, a reverse trend was observed with addition of cow manure, and the effect of salinity was greater in polluted than unpolluted treatments. In polluted soils amended with cow manure, 8 dS m^{-1} salinity reduced earthworm population (57%), wet weight (18%), and cast wet (38%) and dry (41%) weights compared with non-saline soils. The nature of interaction between salinity and Pb pollution on earthworm characteristics was often additive or synergistic in the absence of cow manure, but antagonism in the presence of cow manure. Manure addition to this calcareous soil reduced to a large extent the harmful effect of Pb pollution and soil salinization on survival of adult earthworms.

Conclusions: The earthworm species *E. fetida* was very sensitive to the interaction between salinity and Pb stresses. The harmful effect of Pb pollution on earthworm depended largely on the salinity level and manure addition. Salinity could synergistically increase the mobility, bio-availability and toxicity of soil Pb. Polluted and

1, 2 and 3- M.Sc. Student, Professor and Assistant Professor, Department of Soil Science, College of Agriculture, University of Sharekord, Respectively
(*- Corresponding Author Email: mina.nazarizadeh@yahoo.com)

saline environments have a great potential to damage this earthworm species, however, manure addition could reduce the positive interaction of salinity and pollution on *E. fetida*, and improve its population and activity. It is concluded that the type of interaction between salinity and Pb pollution on *E. fetida* was additive or synergism in manure-unamended soils, but was changed to antagonism in manure-amended soils.

Keywords: Casting activity, Environmental stresses, Joint effect, Pb accessibility