نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۰، شماره ۳، مرداد – شهریور ۱۳۹۵، ص. ۸۹۱-۸۸۰

Journal of Water and Soil
Vol. 30, No. 3, Jul.-Agu. 2016, p. 880-891

اثر کرم خاکی بر سرعت نیتریفیکاسیون و آمونیفیکاسیون آرژینین در یک خاک آهکی تیمار شده با لجن فاضلاب شهری

هانیه جعفری وفا[1*]- فایز رئیسی[2] - علیرضا حسین پور[3]- زهره کریمی[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۳/۱۹

چکیده

کرم‌های خاکی یکی از مهم‌ترین جانوران خاک بوده و فعالیت آن‌ها از شاخص‌های کیفی خاک به شمار می‌رود. این جانداران ممکن است تحت تأثیر افزودن پسماندهای آلی قرار گیرند. یکی از روش‌های سریع و آسان برای پایش کیفیت خاک در هنگام کاربرد لجن فاضلاب، استفاده از شاخص-های زیستی از جمله فعالیت‌های میکروبی است. هدف این پژوهش ارزیابی اثر کرم خاکی بر سرعت نیتریفیکاسیون و آمونیفیکاسیون آرژینین به عنوان فعالیت میکروبی در خاک‌های تیمارشده با لجن فاضلاب شهری بود. تیمارهای آزمایش شامل لجن فاضلاب (بدون لجن و دارای ۱/۵ درصد لجن شهری)، و کرم خاکی (بدون کرم، آیزنیافتیدا، آلولوبوفورا کالیژینوزا و مخلوط این دو گونه) به صورت فاکتوریل (۴×۲) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بودند. لجن فاضلاب سرعت نیتریفیکاسیون و آمونیفیکاسیون آرژینین را به ترتیب به میزان ۱۶/۷ و ۶۲/۵ درصد افزایش داد که دلیل آن بالا بودن میزان مواد آلی و عناصر غذایی و همچنین غلظت پایین فلزات سنگین در پسماند آلی به کار برده شده می‌باشد. تلقیح کرم خاکی نیز این دو شاخص را تحت تأثیر قرار داد ($p<۰/۰۰۱$). به طور خلاصه، مصرف لجن فاضلاب شهری اثر تحریک‌کنندگی کرم خاکی را بر فعالیت میکروبی خاک کاهش داد که این کاهش در حضور گونه‌ی آیزنیافتیدا (اپی‌ژئیک) به دلیل تغذیه از لجن فاضلاب محسوس‌تر بود. علاوه بر این، اثر متقابل دو گونه‌ی کرم خاکی اغلب جمع‌پذیر (بدون اثر متقابل) بود.

واژه‌های کلیدی: شاخص زیستی، کیفیت خاک، معدنی شدن نیتروژن

مقدمه

اکثر خاک‌های مناطق خشک و نیمه خشک ایران به طور ذاتی حاصلخیز هستند، ولی به دلیل pH بالا ناشی ازحضور کربنات‌ها و مقادیر پایین ماده‌ی آلی با کمبود عناصر غذایی به شکل قابل جذب برای گیاه روبرو می‌باشند (۱۵). چنین خاک‌هایی معمولاً در معرض فرآیندهای تخریبی شدید نظیر فرسایش قرار دارند که سبب کاهش حاصلخیزی و کیفیت خاک، به ویژه در اراضی کشاورزی می‌شود (۱۲). یکی از شیوه‌های تقویت ماده‌ی آلی خاک و جلوگیری از فرسایش آن‌ها استفاده از اصلاح‌کننده‌های آلی ارزان قیمت و قابل دسترس مانند لجن فاضلاب شهری است که در مقایسه با کود دامی و کاه و کلش گیاهی به دلیل تولید بالا مقرون به صرفه‌تر هستند (۱۲ و ۱۵). علاوه بر این، مصرف خاکی لجن فاضلاب در کشاورزی مشکل دفن و ذخیره‌سازی آن را کاهش و یا برطرف می‌سازد (۱۵).

کرم‌های خاکی بخش عمده‌ی زیست‌توده‌ی جانوران درشت خاک را به خود اختصاص داده و نقش مهمی در این اکوسیستم دارند (۱۰). علاوه بر بهبود شرایط فیزیکی، این جانداران در تبدیل عناصر غذایی به شکل‌های قابل جذب برای گیاهان و ریزجانداران نقش داشته و فرآیندهای متعدد میکروبیولوژیکی را تحریک می‌کنند و در نهایت سبب افزایش حاصلخیزی خاک می‌شوند (۹ و۱۰). افزودن لجن فاضلاب ممکن است بر فعالیت کرم‌های خاکی مؤثر و در نهایت حاصلخیزی و کیفیت خاک را تحت تأثیر قرار دهد (۸). از یک طرف لجن فاضلاب به دلیل مواد آلی بالا، یک غذای مناسب برای کرم‌های خاکی به شمار رفته (۱۷) و مصرف آن توسط کرم خاکی به کاهش بوی نامطبوع این ترکیب کمک می‌کند (۱۹). اما از طرف دیگر خطر آلودگی فلزات سنگین نیز باید در نظر گرفته شود (۱۱).

بهترین شیوه‌ی پایش کیفیت خاک هنگام کاربرد لجن فاضلاب، استفاده از شاخص‌های زیستی می‌باشد (۱۱ و ۲۱). چرا که جامعه‌ی میکروبی یکی از حساس‌ترین اجزای خاک به شمار رفته و می‌تواند به عنوان یک شاخص برای پایش کیفیت خاک در تغییرات اندک آلودگی فلزات سنگین در نظر گرفته شود (۱۱ و ۲۳). به همین دلیل معدنی

۱، ۲، ۳ و ۴- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادان و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه شهرکرد
(*- نویسنده مسئول: Eamil: jafarivafa@stu.sku.ac.ir)

شدن میکروبی نیتروژن آلی یک شاخص برای ارزیابی کیفیت خاک به شمار می‌رود، چون هم تجمع و هم معدنی شدن نیتروژن در خاک به طور عمده فرآیندهای بیولوژیکی هستند (۱۶). تبدیل نیتروژن آلی به شکل آمونیوم توسط تعداد زیادی از ریزجانداران ارگانوتروف خاک برای کسب انرژی از ترکیبات آلی انجام می‌شود (۱۳ و ۱۴). با افزایش میزان مواد آلی خاک سرعت آمونیفیکاسیون نیز افزایش می‌یابد چرا که ماده‌ی آلی سوبسترای لازم برای این واکنش است (۱۳). بنابراین با کاربرد لجن فاضلاب، این شاخص در خاک افزایش می‌یابد (۲۶). آزادسازی آمونیوم از اسید آمینه‌ی آرژینین به عنوان یک روش بسیار ساده، سریع و ارزان قیمت برای تخمین فعالیت میکروبی و تولید نیتروژن قابل جذب در خاک استفاده می‌شود (۳). نیتریفیکاسیون نیز فرآیندی هوازی بوده که در خاک بسیار حائز اهمیت است چرا که یکی از اشکال قابل جذب نیتروژن برای گیاه نیترات می‌باشد (۷). باکتری‌های محدودی مانند نیتروزوموناس و نیتروباکتر قادر به انجام این واکنش هستند (۱۴). این باکتری‌های نیترات‌ساز به دلیل کسب انرژی از اکسیداسیون آمونیوم و استفاده از CO_2 به عنوان منبع کربن، جزء گروه باکتری‌های شیمیولیتوتروف قرار می‌گیرند (۱۴). افزودن لجن فاضلاب به خاک سبب تحریک فرآیند آمونیفیکاسیون و در پی آن افزایش سرعت نیتریفیکاسیون می‌گردد (۲۸).

هدف پژوهش حاضر بررسی اثر دو گونه کرم خاکی بر سرعت نیتریفیکاسیون (Nitrification Rate) و آمونیفیکاسیون آرژینین (Arginine Amonification) در یک خاک آهکی در حضور لجن فاضلاب شهری بود. با شناخت رابطه بین لجن فاضلاب و کرم خاکی می‌توان مدیریت صحیح را در مورد خاک‌های تحت تأثیر این نوع کود آلی و کرم خاکی به کار برد و اثرات مثبت و یا منفی به جای‌مانده بر اکوسیستم را پیش‌بینی کرد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش دو فاکتور شامل لجن فاضلاب (بدون لجن و دارای ۱/۵ درصد لجن فاضلاب شهری) و کرم خاکی (بدون کرم، با آیزنیافتیدا (*Eisenia foetida*) (اپی‌ژئیک)، با آلولوبوفورا کالیژینوزا (*Allolobophra caliginosa*) (اندوژئیک) و مخلوط این دو گونه)، تحت کشت گیاه ذرت به عنوان تیمارها انتخاب و مطالعه گردید. جایگاه اکولوژیکی این جاندار تأثیر بسیاری بر عادت‌های غذایی و نقش آن در اکوسیستم دارد (۹). بدین منظور دو گونه‌ی مختلف کرم خاکی با جایگاه اکولوژیکی اپی‌ژئیک و اندوژئیک مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین در تیمار مخلوط دو گونه اثرات متقابل حضور همزمان آن‌ها نیز بررسی شد. آزمایش به صورت فاکتوریل ۴×۲ درقالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار به اجرا درآمد. خاک مورد بررسی از اراضی دانشگاه شهرکرد، آهکی و دارای بافت لوم رسی بود. لجن فاضلاب از بخش حوضچه‌های جمع‌آوری لجن تصفیه‌خانه‌ی شهرکرد تهیه شد. این پسماند آلی تقریباً ۶۷ و ۱۱۰ برابر خاک مورد آزمایش کربن و نیتروژن داشت و با توجه به استانداردهای جهانی (۴)، در کلاس A قرار گرفته و غلظت فلزات سنگین در آن اندک بود (جدول ۱). گونه‌ی آیزنیافتیدا از لابراتوار جانورشناسی دانشکده‌ی علوم دانشگاه شهرکرد تهیه شد. گونه‌ی دیگر به روش دستی از اراضی دشت شهرکرد جمع‌آوری گردید. سپس تعدادی از این کرم‌های خاکی جهت شناسایی جنس و گونه بر مبنای ویژگی‌های مورفولوژیک توسط دستگاه بانیوکولار به آزمایشگاه انتقال یافتند. در نهایت با استفاده از کلیدهای شناسایی این کرم خاکی متعلق به خانواده *Lumbricidae*، جنس *Allolobophra* و گونه‌ی *caliginosa* بود. تکثیر کرم‌های خاکی در جعبه‌های چوبی و با بستر پرورش کود حیوانی پوسیده و الک شده به همراه خاک برگ و خاک صورت گرفت. برای مرطوب نگه داشتن این بستر هر سه روز یکبار مقداری آب اضافه شد. در نهایت کرم‌ها طی دو ماه تکثیرشدند.

جدول ۱- برخی خصوصیات شیمیایی لجن فاضلاب و خاک مورد مطالعه

Table 1- Chemical properties of sewage sludge and soil used

	بافت Texture	EC (dS m^{-1})	pH	کربن آلی Organic carbon (g kg^{-1})	نیتروژن کل Total nitrogen (g kg^{-1})	Cu* (mg kg^{-1})	Pb (mg kg^{-1})	Zn (mg kg^{-1})
لجن فاضلاب Sewage sludge	-	1.02	6.01 (1:5)	359	55.9	5.16	1.36	51.2
خاک Soil	لوم رسی Clay loam	0.167	8.34 (1:2)	5.36	0.509	0.308	0.128	0.274

*غلظت فلزات سنگین قابل دسترس عصاره‌گیری شده با DTPA-TEA

*Available heavy metals concentrations extracted with DTPA-TEA.

پس از اعمال تیمارهای لجن فاضلاب، خاک گلدان‌ها سه ماه برای رسیدن به تعادل نسبی در گلخانه‌ی دانشگاه شهرکرد آبیاری شدند. به هرگلدان تعداد ۸ عدد کرم خاکی بالغ با وزن تر حدود ۰/۵ گرم به صورت چهار تیمار بدون کرم خاکی (NE)، با آیزنیافتیدا (EF)، با آلولوبوفورا کالیژینوزا (AC)، مخلوط آیزنیافتیدا و آلولوبوفورا کالیژینوزا (EA) اضافه گردید. به منظور جلوگیری از خروج کرم‌های خاکی، سطح و کف گلدان‌ها با یک توری نازک بسته شد. پس از گذشت ۹۰ روز خاک گلدان را کاملاً مخلوط نموده و به مقدار لازم جدا شد. بخشی از این نمونه‌ها در ظرف‌های دربسته و در یخچال با دمای ۴°C به منظور اندازه‌گیری آمونیفیکاسیون آرژینین و سرعت نیتریفیکاسیون نگهداری شدند و بخش دیگر برای تجزیه‌ی شیمیایی هواخشک گردید. خصوصیات شیمیایی خاک شامل نیتروژن کل (۶) و غلظت عناصر سنگین مس، سرب و روی قابل استفاده (۱۸) در نمونه‌های هواخشک اندازه‌گیری شدند. اندازه‌گیری خصوصیات بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی شامل نیتروژن معدنی (۲)، آمونیفیکاسیون آرژینین (۱) و سرعت نیتریفیکاسیون (۲) نیز صورت گرفت. برای اندازه‌گیری آمونیفیکاسیون آرژینین، به خاک محلول آرژینین ۰/۲ درصد اضافه کرده و در دمای ۲۵°C برای مدت ۴ ساعت انکوباسیون شد. پس از افزودن ۲۰ میلی‌لیتر محلول KCl یک مولار به هر لوله و شیک کردن آن، مقدار نیتروژن حاصل از آمونیفیکاسیون آرژینین با روش رنگ‌سنجی (۲۲) توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۶۷ نانومتر قرائت گردید (۱). اندازه‌گیری سرعت نیتریفیکاسیون، با انکوباسیون نمونه‌های خاک با محلول آمونیوم سولفات ۱ درصد به مدت سه هفته انجام گرفت (۲). سپس به نمونه‌ها ۱۰۰ میلی‌لیتر پتاسیم سولفات ۱ درصد اضافه شد. میزان NO_3^- خاک به روش رنگ‌سنجی در طول موج ۴۱۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری و سرعت نیتریفیکاسیون از میزان نیترات تولید شده طی این مدت محاسبه گردید (۲).

پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس تیمارها، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از جدول تجزیه واریانس (فاکتوریل ۴×۲) و مقایسه میانگین‌ها به روش توکی در سطح احتمال ۵ درصد ($p<۰/۰۵$) توسط نرم‌افزار Minitab 16 انجام گرفت. افزون بر آن، اندازه اثر جزئی (Eta^2_p ,Partial Effect Size) برای هر منبع تغییر (لجن فاضلاب، کرم خاکی و لجن فاضلاب×کرم خاکی) به صورت زیر محاسبه گردید:

$$Eta_p^2 = \frac{SS_{effect}}{SS_{effect}+SS_{error}}$$ (رابطه‌ی ۱)

که در آن Eta^2_p اندازه اثر جزئی، SS_{effect} مجموع مربعات اثر و SS_{error} مجموع مربعات خطا می‌باشد (۲۷).

نتایج و بحث

ویژگی‌های شیمیایی خاک

نیتروژن کل خاک (TN): کاربرد لجن فاضلاب سبب افزایش (۸۰/۳ درصد) معنی‌دار ($p<۰/۰۰۱$) نیتروژن کل خاک شد (جدول۲و۳) که دلیل آن میزان بالای این عنصر در لجن فاضلاب می‌باشد (۲۸). عامل کرم خاکی و اثر متقابل آن با لجن فاضلاب نیز بر این ویژگی خاک معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) بودند (جدول ۲). میزان نیتروژن کل خاک در حضور گونه‌ی آیزنیافتیدا ۱ درصد، گونه‌ی آلولوبوفورا کالیژینوزا ۵/۴ و تیمار مخلوط دو گونه ۴/۸ درصد نسبت به شرایط بدون کرم خاکی افزایش نشان داد و در این میان تفاوت معنی‌دار بین گونه‌های کرم خاکی مشاهده شد (جدول ۳). گونه‌ی آیزنیافتیدا نسبت به گونه‌ی آلولوبوفورا کالیژینوزا کارایی جذب نیتروژن بالاتری دارد (۱۰). بنابراین افزایش میزان نیتروژن کل در حضور گونه‌ی آلولوبوفورا کالیژینوزا بارزتر می‌باشد. تیمار مخلوط دو گونه نیز هر چند از نظر آماری با تیمار آیزنیافتیدا در یک دامنه قرار گرفت اما حضور گونه‌ی آلولوبوفورا کالیژینوژا در آن سبب افزایش بیشتر این شاخص نسبت به تیمار آیزنیافتیدا شد.

اثر دو عامل کرم خاکی و لجن فاضلاب بر میزان نیتروژن آلی کل به یکدیگر وابسته بودند. در واقع در شرایط بدون لجن فاضلاب، تلقیح کرم خاکی اثر معنی‌دار بر نیتروژن کل خاک نداشت اما در تیمارهای دارای لجن فاضلاب حضور کرم خاکی سبب افزایش ۴/۸ تا ۸/۶ درصدی این ویژگی شد. با توجه به پارامتر اندازه اثر جزئی (Eta^2_p) نقش عامل لجن فاضلاب (۰/۹۹) در افزایش نیتروژن خاک تقریباً دو برابر عامل کرم خاکی (۰/۵۴) بوده و اثر بیشتری بر این ویژگی داشت.

غلظت قابل استفاده‌ی فلزات: افزودن لجن فاضلاب سبب افزایش معنی‌دار ($p<۰/۰۰۱$) غلظت مس (۷۴/۱ درصد)، سرب (۱۲۵ درصد) و روی (۳ برابر) قابل استفاده نسبت به شرایط بدون لجن فاضلاب شد (جدول ۲ و ۳). اما عامل کرم خاکی و اثر متقابل آن با لجن فاضلاب معنی‌دار ($p>۰/۰۵$) نبودند (جدول ۲). در این پژوهش، با توجه به بالا بودن pH، از خطرات فلزات سنگین در خاک کاسته شده است. به طور کلی فراهمی فلزات سنگین (Ni, Cr, Cu, Pb, Zn) با افزایش pH خاک (به دلیل رسوب این فلزات به صورت هیدروکسیدها و کربنات‌ها) کاهش می‌یابد (۵). همچنین به دلیل غلظت پایین مس و روی در لجن فاضلاب مورد استفاده و نرسیدن آن به حد بحرانی (جدول ۱)، این عناصر تنها نقش ریزمغذی در فعالیت میکروبی خاک داشته و هیچ گونه اثر منفی از حضور این فلزات مشاهده نشد.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثرات اصلی لجن فاضلاب و کرم خاکی و اثرات متقابل آن‌ها بر میزان نیتروژن کل خاک و غلظت مس، سرب و روی قابل استفاده پس از عصاره‌گیری نمونه‌ها با DTPA-TEA

Table 2- Mean squares of sewage sludge, earthworm and their interactions on the total nitrogen (TN) and available copper (Cu), lead (Pb) and zinc (Zn) extracted with DTPA-TEA

منبع تغییرات SOV	df	نیتروژن کل TN	قابل دسترس Available		
			Cu	Pb	Zn
لجن فاضلاب Sewage sludge	1	0.802(0.99)***	19.6(0.78)***	0.088(0.81)***	7.45(0.98)***
کرم خاکی Earthworm	3	0.002(0.54)**	0.359(0.16)ns	0.003(0.32)ns	0.024(0.33)ns
اثر متقابل Interaction	3	0.002(0.52)**	0.219(0.10)ns	0.0004(0.06)ns	0.009(0.16)ns
خطا Error	16	0.0003	0.350	0.001	0.009
C.V. (%)		2.61	9.67	22.9	10.1
R^2		99.2	70.1	75.2	97.3

اعداد داخل پرانتز نشان‌دهنده‌ی Eta^2 جزئی می‌باشند.

ns، ** و *** به ترتیب به مفهوم غیرمعنی‌دار و معنی‌دار بودن در سطح ۱ و ۰/۱ درصد می‌باشد.

Numbers in parentheses are the partial Eta^2.

ns, ** and *** are insignificant and significant at 1 and 0.1 percent, respectively.

جدول ۳- اثر کرم خاکی بر میزان نیتروژن کل و غلظت مس، سرب و روی قابل استفاده پس از عصاره‌گیری نمونه‌ها با DTPA-TEA در یک خاک آهکی تیمار شده با لجن فاضلاب شهری. اعداد میانگین (n=۳) به همراه انحراف معیار (SD) می‌باشند

Table 3- Effects of sewage sludge application and earthworms inoculation on the total nitrogen (TN) and available copper (Cu), lead (Pb) and zinc (Zn) extracted with DTPA-TEA. Numbers are Average (n=3) with standard deviation (SD)

تیمار Treatment	TN ($g\ N\ kg^{-1}soil$)	Cu	Pb	Zn
		($mg\ kg^{-1}$ soil)		
خاک بدون لجن فاضلاب Sewage sludge un-treated soil				
NE	0.458±0.023^{c}	0.239±0.02^{b}	0.069±0.02^{d}	0.467±0.05^{b}
EF	0.432±0.025^{c}	0.225±0.02^{b}	0.107±0.02^{bcd}	0.402±0.05^{b}
AC	0.458±0.012^{c}	0.226±0.03^{b}	0.118±0.03^{bcd}	0.322±0.04^{b}
EA	0.477±0.019^{c}	0.223±0.02^{b}	0.088±0.03^{cd}	0.363±0.03^{b}
Mean	0.456±0.024	0.228±0.20	0.096±0.30	0.388±0.07
خاک دارای لجن فاضلاب Sewage sludge treated soil				
NE	0.785±0.014^{b}	0.386±0.04^{a}	0.187±0.02^{abc}	1.49±0.11^{a}
EF	0.823±0.012^{ab}	0.432±0.05^{a}	0.251±0.05^{a}	1.61±0.2^{a}
AC	0.853±0.012^{a}	0.365±0.03^{a}	0.222±0.04^{a}	1.41±0.07^{a}
EA	0.826±0.010^{ab}	0.407±0.03^{a}	0.205±0.04^{ab}	1.50±0.10^{a}
Mean	0.822±0.027	0.397±0.04	0.216±0.04	1.50±0.13

NE بدون کرم خاکی، EF گونه‌ی آیزنیافتیدا، AC گونه‌ی آلولوبوفورا کالیژنوزا و EA مخلوط دو گونه می‌باشند. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف متفاوت، دارای اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) بر اساس آزمون توکی هستند.

NE, without earthworm; EF, *E. foetida*; AC, *A. caliginosa*; and EA, mixture of two species. In each column, mean values with different letters indicate statistical significant (Tukey's test at α=0.05).

ویژگی‌های میکروبیولوژیکی خاک

سرعت آمونیفیکاسیون آرژینین (A.A.): افزودن لجن فاضلاب، تلقیح کرم خاکی و اثر متقابل این دو عامل بر سرعت آمونیفیکاسیون آرژینین معنی‌دار ($p<۰/۰۰۱$) بودند (جدول ۴). این ویژگی با کاربرد لجن فاضلاب ۱۶/۷ درصد افزایش یافت (شکل ۱). روست و همکاران (۲۶) نیز نتایج مشابهی ارائه کردند. با توجه به

این‌که این شاخص نشانگر فعالیت زیست‌توده‌ی میکروبی می‌باشد بنابراین می‌توان گفت که با افزودن لجن فاضلاب به خاک، فعالیت زیست‌توده‌ی میکروبی افزایش یافته است (۲۸). لجن فاضلاب با افزایش میزان کربن آلی و نیتروژن کل، سوبسترای لازم برای جمعیت آمونیفیکاتورها را فراهم آورده و به جمعیت میکروب‌های عامل فرآیند آمونیفیکاسیون افزوده و از این طریق تبدیل نیتروژن آلی آرژینین به نیتروژن آمونیاکی را افزایش می‌دهد. وجود همبستگی مثبت بین میزان نیتروژن کل با آمونیفیکاسیون آرژینین نیز نشانگر این فرآیند است (جدول ۵). در خاک خارج شده از دستگاه گوارش کرم‌های خاکی فراوانی آمونیفیکاتورها افزایش می‌یابد (۱۰). بر این اساس می‌توان انتظار داشت که حضور کرم‌های خاکی فرآیند آمونیفیکاسیون را افزایش دهد. این شاخص در حضور گونه‌ی آیزنیافتیدا ۶ درصد و در گونه‌ی آلولوبوفورا کالیژینوزا ۱۸/۱ درصد نسبت به تیمارهای بدون کرم خاکی افزایش یافت (شکل ۱). گونه‌ی آیزنیافتیدا نسبت به گونه‌ی آلولوبوفورا کالیژینوزا، به دلیل تغذیه از ماده‌ی آلی، برانگیختگی کمتری در فعالیت زیست‌توده‌ی میکروبی خاک ایجاد می‌کند.

در شرایط بدون لجن فاضلاب از نظر آماری تفاوت معنی‌دار بین دو گونه‌ی کرم خاکی وجود نداشت اما در تیمار لجن فاضلاب گونه‌ی آلولوبوفورا کالیژینوزا اثر بیشتری نسبت به گونه‌ی آیزنیافتیدا داشت. افزایش منابع غذایی جامعه‌ی میکروبی در حضور لجن فاضلاب، سبب افزایش زیست‌توده‌ی میکروبی و در پی آن تشدید فعالیت تغذیه‌ای کرم خاکی آلولوبوفورا کالیژینوزا و تحریک فعالیت میکروبی می‌گردد. به همین دلیل اثر این گونه در حضور لجن فاضلاب افزایش یافت.

جدول ٤- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثرات اصلی لجن فاضلاب و کرم خاکی و اثرات متقابل آن‌ها بر سرعت آمونیفیکاسیون آرژینین (A.A.)، سرعت نیتریفیکاسیون (N.R.)، درصد نیتریفیکاسیون ((%) N.R.)، میزان نیتروژن معدنی (mineral N) و نسبت نیتروژن معدنی به نیتروژن کل (mineral N/TN)

Table 4- Mean squares of sewage sludge, earthworm and their interactions on the arginine ammonification (A.A.), nitrification rate (N.R.), nitrification percent (N.R. (%)), mineral nitrogen (mineral N) and mineral nitrogen to total nitrogen ratio (mineral N/TN)

منبع تغییرات SOV	df	آمونیفیکاسیون آرژینین A.A.	نیتریفیکاسیون N.R.	درصد نیتریفیکاسیون N.R.(%)	میزان نیتروژن معدنی mineral N	نسبت نیتروژن معدنی به نیتروژن کل mineral N/TN
لجن فاضلاب Sewage sludge	1	0.769(0.77)***	48.7(0.95)***	0.035(0.26)*	964(0.88)***	0.020(0.07)ns
کرم خاکی Earthworm	3	0.162(0.68)***	15.6(0.95)***	0.593(0.95)***	63.2(0.59)**	0.182(0.68)***
اثر متقابل Interaction	3	0.168(0.69)***	2.81(0.79)***	0.110(0.77)***	62.4(0.59)**	0.211(0.71)***
خطا Error	16	0.014	0.143	0.010	8.23	0.016
C.V. (%)		5.10	6.32	8.09	11.3	12.4
R^2		83.5	96.9	93.7	87.1	74.6

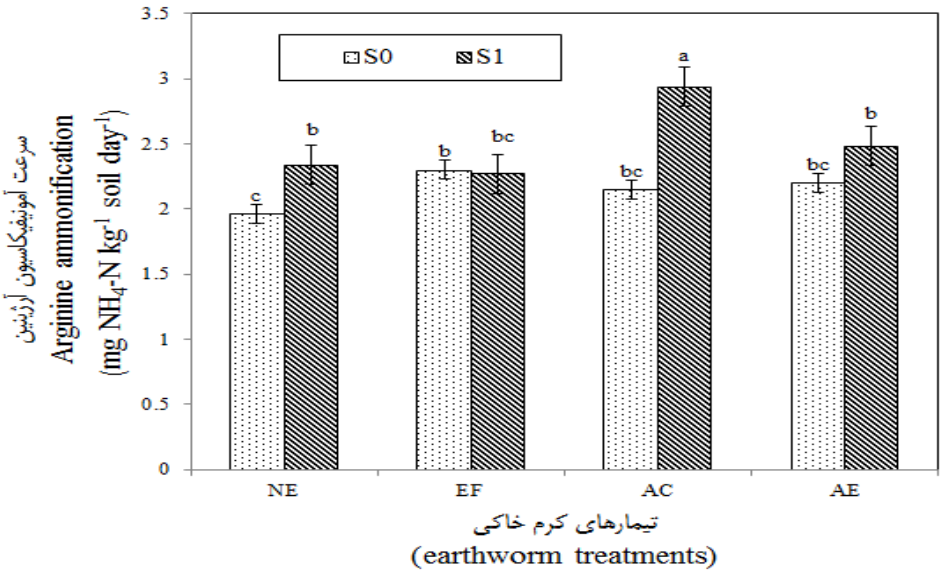
اعداد داخل پرانتز نشان‌دهنده‌ی Eta^2 جزئی می‌باشند. ns، ** و *** به ترتیب به مفهوم غیرمعنی‌دار و معنی‌دار بودن در سطح ۱ و ۰/۱ درصد می‌باشد.

Numbers in parentheses are the partial Eta^2. ns, *, ** and *** are insignificant and significant at 5, 1 and 0.1 percent, respectively.

سرعت نیتریفیکاسیون (N.R.): کاربرد لجن فاضلاب، تلقیح کرم خاکی و اثر متقابل این دو عامل بر سرعت نیتریفیکاسیون در خاک معنی‌دار ($p<۰/۰۰۱$) بودند (جدول ۴). این ویژگی با افزودن لجن فاضلاب ۶۲/۵ درصد افزایش یافت (جدول ۶). نتایج مشابهی توسط پژوهشگران دیگر گزارش شده است (۲۸). باکتری‌های محدودی مانند نیتروزوموناس و نیتروباکتر قادر به انجام این واکنش انرژی‌زا هستند. (۱۴). این باکتری‌ها محدوده‌ی غذایی اندکی داشته و از سوبستراهای محدودی استفاده می‌کنند (۷). با افزودن لجن فاضلاب میزان نیتروژن کل و همراه آن کربن آلی خاک افزایش می‌یابد.

بنابراین سوبسترای لازم برای باکتری‌های هتروتروف فراهم شده و تولید آمونیوم افزایش می‌یابد. با افزایش میزان آمونیوم، سوبسترای فرآیند نیتریفیکاسیون نیز افزایش یافته و فعالیت باکتری‌های نیترات‌ساز تحریک می‌شود. وجود همبستگی مثبت بین نیتروژن کل با آمونیفیکاسیون آرژینین و سرعت نیتریفیکاسیون (جدول ۵) نیز رخداد این فرآیند را نشان می‌دهد و تأیید می‌کند. بنابراین بر اثر افزایش نیتروژن آلی خاک در حضور لجن فاضلاب، فرآیند آمونیفیکاسیون و به دنبال آن نیتریفیکاسیون تحریک می‌گردد.

سرعت نیتریفیکاسیون در فضولات کرم خاکی بالاست (۱۰) چـرا که در فضولات خارج شده از دستگاه گوارش کرم‌های خاکی فراوانـی نیتریفیکاتورهـا افـزایش مـی‌یابـد (۲۰). در ایـن پـژوهش سـرعت نیتریفیکاسیون در حضور گونه‌ی آیزنیافتیدا ۸۸/۵ درصد و در گونـه‌ی آلولوبوفورا کالیژینوزا ۹۶/۹ درصد نسبت به تیمارهای بدون کرم خاکی افزایش یافت (جدول ۶).



شکل ۱- اثر کرم خاکی بر سرعت آمونیفیکاسیون آرژینین در یک خاک آهکی تیمار شده با لجن فاضلاب (S1) و بدون آن (S0). تیمارهای کرم خاکی شامل بدون کرم (NE)، آیزنیافتیدا (EF)، آلولوبوفورا کالیژینوزا (AC) و مخلوط دو گونه (AE) است. حروف متفاوت، دارای اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بر اساس آزمون توکی هستند. خطوط عمودی روی هر ستون خطای معیار میانگین را نشان می‌دهد

Figure 1- The earthworm effect on arginine ammonification in a calcareous soil treated and un-treated with sewage sludge. NE, without earthworm; EF, *E. foetida*; AC, *A. caliginosa*; and EA, mixture of two species. Different letters indicate statistical significant (Tukey's test at α=0.05). Vertical lines on each column show the mean standard error

جدول ۵- ضرایب همبستگی پیرسون (r) بین ویژگی‌های شیمیایی و میکروبیولوژیکی در یک خاک آهکی تیمار شده و تیمار نشده با لجن فاضلاب شهری (n=۲٤)

Table 5- Pearson correlation coefficients (*r*) for the effects of sewage sludge, earthworms and their interactions on the chemical and microbiological properties of a semi-arid calcareous soil (n=24)

ویژگی Parameter	9	8	7	6	5	4	3	2	1
1	0.66***	-0.19ns	0.80***	-0.08ns	0.73***	0.97***	0.85***	0.93***	1
2	0.50*	-0.20ns	0.72***	-0.16ns	0.62**	0.95***	0.84***	1	
3	0.61**	0.01ns	0.79***	0.06ns	0.71***	0.83***	1		
4	0.54**	-0.22ns	0.75***	-0.16ns	0.65**	1			
5	0.81***	0.24ns	0.82***	0.61**	1				
6	0.42*	0.62**	0.29ns	1					
7	0.79***	0.42*	1						
8	0.25ns	1							
9	1								

توضیحات جدول: (۱) نیتروژن کل، مس (۲)، سرب (۳) و روی (۴) قابل استفاده، (۵) سرعت نیتریفیکاسیون، (۶) درصد نیتریفیکاسیون، (۷) نیتروژن معدنی، (۸) نسبت نیتروژن معدنی به نیتروژن کل و (۹) سرعت آمونیفیکاسیون آرژنین.

ns، *، ** و *** به ترتیب به مفهوم غیرمعنی‌دار و معنی‌دار بودن در سطح ۵، ۱ و ۰/۱ درصد می‌باشد.

Description by: (1) total nitrogen, (2) copper, (3) lead, (4) and zinc extracted with DTPA-TEA, (5) nitrification rate, (6) nitrification percent, (7) mineral nitrogen, (8) mineral nitrogen to total nitrogen ratio, and (9) arginine ammonification.

ns, *, ** and *** are insignificant and significant at 5, 1 and 0.1 percent, respectively.

جدول ٦- اثر کرم خاکی بر سرعت نیتریفیکاسیون (N.R.)، درصد نیتریفیکاسیون ((%) N.R.) و میزان نیتروژن معدنی (mineral N) در یک خاک آهکی تیمار شده با لجن فاضلاب شهری. اعداد میانگین (n=۳) به همراه انحراف معیار (SD) می‌باشند.

Table 6- Effects of sewage sludge application and earthworms inoculation on the nitrification rate (N.R.), nitrification percent (N.R. (%)) and mineral nitrogen (mineral N). Numbers are Average (n=3) with standard deviation (SD).

تیمار Treatment	N.R. (mg NO_3-N kg^{-1} soil $week^{-1}$)	N.R. (%)	mineral N (mg N kg^{-1}soil)
خاک بدون لجن فاضلاب Sewage sludge un-treated soil			
NE	2.32±0.3^{e}	0.511±0.069^{c}	11.8±2.85^{d}
EF	5.84±0.3^{c}	1.35±0.127^{a}	26.5±2.87^{bc}
AC	4.61±0.3^{d}	1.0±0.048^{b}	17.9±2.57^{d}
EA	5.44±0.5^{cd}	1.14±0.088^{ab}	19.4±3.0^{cd}
Mean	4.56±1.4	1.0±0.33	18.9±6.0
خاک دارای لجن فاضلاب Sewage sludge treated soil			
NE	4.83±0.4^{cd}	0.483±0.054^{c}	29.5±3.92^{ab}
EF	7.62±0.2^{b}	0.965±0.012^{b}	30.1±2.35^{ab}
AC	9.46±0.4^{a}	1.27±0.110^{a}	34.7±3.12^{a}
EA	7.72±0.3^{b}	0.991±0.049^{b}	32.0±1.79^{ab}
Mean	7.41±1.8	0.926±0.30	31.6±3.2

NE بدون کرم خاکی، EF گونه‌ی آیزنیافتیدا، AC گونه‌ی آلولوبوفورا کالیژنوزا و EA مخلوط دو گونه می‌باشند. در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف متفاوت، دارای اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) بر اساس آزمون توکی هستند.

NE, without earthworm; EF, *E. foetida*; AC, *A. caliginosa*; and EA, mixture of two species. In each column, mean values with different letters indicate statistical significant (Tukey's test at $\alpha=0.05$).

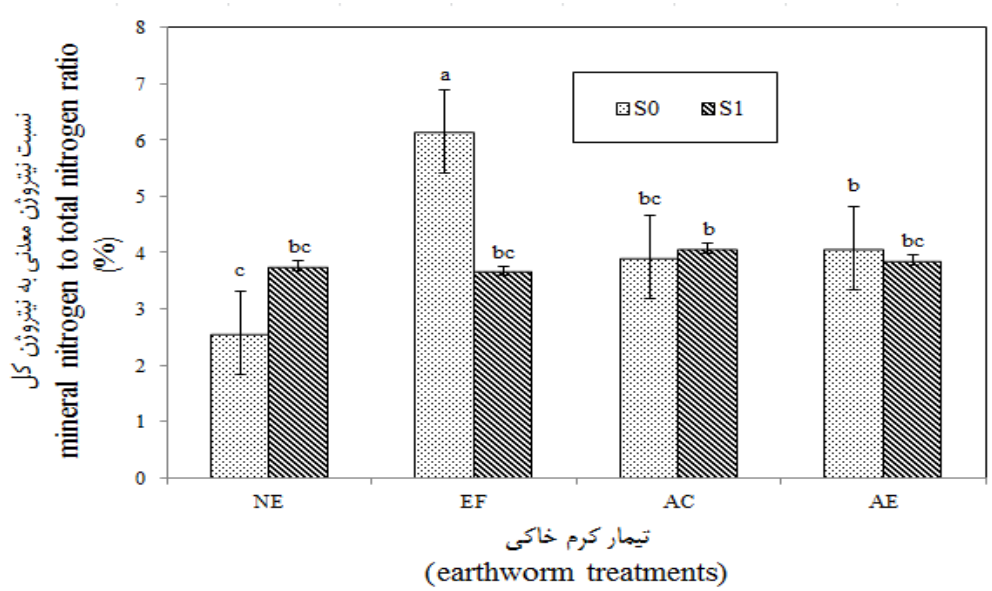
در شرایط بدون لجن فاضلاب سرعت نیتریفیکاسیون در حضور آیزنیافتیدا ۱۵۲ درصد و در گونه‌ی آلولوبوفورا کالیژینوزا ۹۷/۷ درصد افزایش یافت در حالی‌که در تیمار لجن فاضلاب این افزایش برای دو گونه به ترتیب به میزان ۵۷/۸ و ۹۵/۸ درصد بود (جدول ۶). افزودن لجن فاضلاب اثر کرم خاکی را بر برانگیختگی این شاخص کاهش داد. افزایش سوبستراهای سهل‌الوصول، از دلایل کاهش اثرگذاری کرم خاکی در لجن فاضلاب است.

درصد نیتریفیکاسیون (N.R.%): افزودن لجن فاضلاب ($p<۰/۰۵$)، تلقیح کرم خاکی و همچنین اثر متقابل این دو عامل ($p<۰/۰۰۱$) درصد نیتریفیکاسیون را تحت تأثیر قرار دادند (جدول ۴). بر اساس میزان پارامتر اندازه اثر جزئی (Eta^2_p) بیشترین تأثیر بر این شاخص مربوط به عامل کرم خاکی (۰/۹۵) بود (جدول ۴). با کاربرد لجن فاضلاب درصد نیتریفیکاسیون ۸ درصد کاهش یافت (جدول ۶). این به دلیل اثر بیشتر بر میزان نیتروژن معدنی (۶۷/۲) نسبت به سرعت نیتریفیکاسیون (۶۲/۵) است. در واقع در تیمارهای بدون لجن فاضلاب نسبت به تیمارهای دارای لجن فاضلاب درصد بیشتری از نیتروژن معدنی از شکل آمونیوم به شکل نیترات طی فرآیند نیتریفیکاسیون درمی‌آید.

درصد نیتریفیکاسیون در حضور گونه‌ی آیزنیافتیدا ۱۳۳ درصد و در گونه‌ی آلولوبوفورا کالیژینوزا ۱۲۷ درصد نسبت به تیمارهای بدون کرم خاکی افزایش یافت (جدول ۶). اثر عوامل کرم خاکی و لجن فاضلاب بر این شاخص به همدیگر وابسته بودند. در شرایط بدون لجن فاضلاب درصد نیتریفیکاسیون در حضور آیزنیافتیدا ۱۶۴ درصد و در گونه‌ی آلولوبوفورا کالیژینوزا ۹۵/۷ درصد نسبت به تیمار بدون کرم خاکی افزایش نشان داد در حالی که در تیمار لجن فاضلاب افزایش این شاخص برای این دو گونه به ترتیب به میزان ۹۹/۸ و ۱۶۳درصد بود. گونه‌ی آیزنیافتیدا در شرایط بدون لجن فاضلاب نسبت به تیمار لجن فاضلاب به میزان بیشتری به درصد نیتریفیکاسیون افزود اما در مورد گونه‌ی آلولوبوفورا کالیژینوزا شرایط معکوس بود. به دلیل افزودن لجن فاضلاب به خاک و افزایش سوبستراهای سهل‌الوصول از درصد نیتریفیکاسیون کاسته شده و در این میان گونه‌ی آیزنیافتیدا به دلیل تغذیه از مواد آلی، بیشتر تحت تأثیر قرار گرفت اما کرم خاکی آلولوبوفورا کالیژینوزا به دلیل تغذیه از منبع ثانویه (ریزجانداران) تأثیر بیشتری بر این شاخص داشت.

نیتروژن معدنی (mineral N) و نسبت نیتروژن معدنی به نیتروژن کل (mineral N/TN): کاربرد لجن فاضلاب سبب افزایش (۶۷/۲ درصد) معنی‌دار ($p<۰/۰۰۱$) میزان نیتروژن معدنی خاک شد (جدول ۴ و ۶). معمولاً افزودن لجن فاضلاب به خاک سبب افزایش معدنی شدن نیتروژن می‌شود (۲۵). عامل کرم خاکی بر این ویژگی خاک اثر معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) داشت (جدول ۴). غلظت نیتروژن معدنی در حضور آیزنیافتیدا ۳۷/۴ درصد و در گونه‌ی آلولوبوفورا کالیژینوزا ۲۷/۷ درصد نسبت به تیمارهای بدون کرم خاکی افزایش

یافت (جدول ۶). تأثیر کرم‌های خاکی بر معدنی شدن نیتروژن، به نوع گونه‌ی کرم خاکی و اثر متقابل گونه‌های موجود در خاک بستگی دارد (۲۴). به طور کلی اثرات مثبت کرم‌های خاکی بر معدنی شدن نیتروژن در گونه‌های مختلف دیده شده و در این میان نقش گونه‌های اپی‌ژئیک و پس از آن گونه‌های کرم خاکی اندوژئیک از همه پررنگ‌تر است (۲۴). اثر متقابل کرم خاکی و لجن فاضلاب برغلظت نیتروژن معدنی معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) شد (جدول ۴). این ویژگی در شرایط بدون لجن فاضلاب در حضور آیزنیافتیدا ۱۲۴ درصد و در گونه‌ی آلولوبوفورا کالیژینوزا ۵۱/۷ درصد افزایش نشان داد در حالی که در تیمار لجن فاضلاب حضور این دو از نظر آماری معنی‌دار نبودند (جدول ۶). در نتیجه اثر کرم خاکی بر معدنی شدن نیتروژن در حضور لجن فاضلاب کاهش یافت. کرم‌های خاکی در شرایط با کربن سهل‌الوصول پایین نسبت به شرایط با کربن سهل‌الوصول بالا فعالیت میکروبی را بیشتر تحریک می‌کنند (۱۰).



شکل ۲- اثر کرم خاکی بر نسبت نیتروژن معدنی به نیتروژن کل در یک خاک آهکی تیمار شده با لجن فاضلاب (S1) و بدون آن (S0). تیمارهای کرم خاکی شامل بدون کرم (NE)، آیزنیافتیدا (EF)، آلولوبوفورا کالیژینوزا (AC) و مخلوط دو گونه (AE) است. حروف متفاوت، دارای اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) بر اساس آزمون توکی هستند. خطوط عمودی روی هر ستون خطای معیار میانگین را نشان می‌دهد

Figure 2- The earthworm effect on mineral nitrogen to total nitrogen ratio in a calcareous soil treated and un-treated with sewage sludge. NE, without earthworm; EF, *E. foetida*; AC, *A. caliginosa*; and EA, mixture of two species. Different letters indicate statistical significant (Tukey's test at α=0.05). Vertical lines on each column show the mean standard error

کاربرد لجن فاضلاب در خاک اثر معنی‌دار ($p>۰/۰۵$) بر شاخص نسبت نیتروژن معدنی به نیتروژن کل نداشت اما تلقیح کرم خاکی و اثر متقابل این دو عامل دارای اثر معنی‌دار ($p<۰/۰۰۱$) بودند (جدول ۴). با افزودن لجن فاضلاب به خاک نیتروژن کل و نیتروژن معدنی به ترتیب ۸۰/۳ و ۶۷/۲ درصد افزایش یافتند. بنابراین به دلیل درصد افزایش تقریباً یکسان این دو ویژگی، این شاخص تحت تأثیر قرار نگرفت (جدول ۳). این شاخص در حضور آیزنیافتیدا ۵۴/۶ درصد و در گونه‌ی آلولوبوفورا کالیژینوزا ۲۵/۹ درصد نسبت به تیمارهای بدون کرم خاکی افزایش یافت (جدول ۶). پوستما و همکاران (۲۴) نیز بیان کردند که اثر گونه‌های اپی‌ژئیک بر معدنی شدن نیتروژن مواد آلی بیشتر از گونه‌های اندوژئیک است. اثر کرم خاکی بر نسبت نیتروژن معدنی به نیتروژن کل وابسته به حضور لجن فاضلاب است. در شرایط بدون لجن فاضلاب این شاخص در حضور آیزنیافتیدا ۱۳۹ درصد و در گونه‌ی آلولوبوفورا کالیژینوزا ۵۲/۱ درصد افزایش نشان داد در حالی که در تیمار لجن فاضلاب، تلقیح کرم خاکی از نظر آماری اختلاف معنی‌دار نشان نداد (شکل ۲). کرم خاکی نقش بارزی در افزایش سهم نیتروژن معدنی از نیتروژن کل در تیمار لجن فاضلاب نداشت. ادواردز و بوهن (۱۰) نیز بیان کردند که تحریک فعالیت میکروبی توسط کرم خاکی در خاک‌های با کربن سهل‌الوصول پایین نسبت به خاک‌های با کربن سهل‌الوصول بالا بیشتر است.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت که استفاده از لجن فاضلاب با ترکیب مشابه آنچه که در این پژوهش استفاده شده است سبب بهبود فعالیت میکروبی از جمله آمونیفیکاسیون و نیتریفیکاسیون

و در نهایت پویایی نیتروژن خاک می‌شود. اگر چه فعالیت کرم خاکی نیز افزایش این دو شاخص را به همراه داشت ولی اثر تحریک‌کنندگی کرم‌های خاکی بر شاخص‌های زیستی در حضور لجن فاضلاب کاهش یافت. این رخداد به دلیل افزایش سوبستراهای سهل‌الوصول است. علاوه بر این بر اساس میزان پایین غلظت فلزات سنگین قابل استفاده، مصرف خاکی لجن فاضلاب شهری شهرکرد در طی زمان پژوهش از لحاظ آلودگی‌های زیست محیطی نگران‌کننده نبود. هر چند اجرای تحقیقاتی در مورد اثرات باقیمانده و تجمعی فلزات سنگین لجن فاضلاب در خاک در پژوهش‌های چند ساله ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از حمایت‌های مالی دانشگاه شهرکرد جهت انجام این پژوهش تقدیر به عمل می‌آید. همچنین از سرکار خانم مهندس براتی و خانم دکتر قاسمی‌مهام به خاطر حمایت‌های بی‌دریغشان قدردانی می‌گردد.

منابع

1- Alef K., and Kleiner D. 1987. Applicability of arginine ammonification as an indicator of microbial activity in different soils. Biology and Fertility of Soils, 5: 148-151.
2- Alef K., and Nannipieri P. 1995. Enzyme activities. p. 311-373. In: K. Alef and P. Nannipieri (eds) Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press, New York.
3- Alef K., Beck T.H., Zelles L., and Kleiner D. 1988. A comparison methods to estimate microbial biomass and N-mineralization in agricultural and grassland soils. Soil Biology and Biochemistry, 20:561-565.
4- Amlinger F., Pollak M., and Favoino E. 2004. Heavy metals and organic compounds from wastes used as organic fertilizers. European Union, ANNEX2-Compost quality definition, legislation and standards.
5- Barrera I., Andres P., and Alcaniz J.M. 2001. Sewage sludge application on soil: effects on two earthworm species. Water, Air and Soil Pollution, 129: 319-332.
6- Bremner J.M. 1996. Nitrogen total. p. 1085-1121. In: D.L. Sparks (ed.) Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods. SSSA, Madison, WI.
7- Christensen B.T. 2004. Tightening the nitrogen cycle. In: Schjonning P. Elmholt S. and Christensen B.T. (eds) Managing soil quality challenges in modern agriculture. CAB International Publishing.
8- Dindar E., Sagban F.O.T., Alkan U., and Baskaya H.S. 2013. Effects of canned food industry sludge amendment on enzyme activities in soil with earthworms. Environmental Engineering and Management Journal, 12: 2407-2416.
9- Du Y.L., He M.M., Xu M., Yan Z.G., Zhou Y.Y., Guo G.L., Nie J., Wang L.Q., Hou H., and Li F.S. 2014. Interactive effects between earthworms and maize plants on the accumulation and toxicity of soil cadmium. Soil Biology and Biochemistry, 72: 193-202.
10- Edwards C.A., and Bohlen P.J. 1996. Biology and ecology of earthworms. Chapman and hall publishers, London, UK.
11- Fernandes S.A.P., Bettiol W., and Cerri C.C. 2005. Effect of sewage sludge on microbial biomass, basal respiration, metabolic quotient and soil enzymatic activity. Applied Soil Ecology, 30: 65-77.
12- Fernandez J.M., Plaza C., Garcia-Gil J.C., and Polo A. 2009. Biochemical properties and barley yield in a semiarid Mediterranean soil amended with two kinds of sewage sludge. Applied Soil Ecology, 42: 18-24.
13- Francis C.A., Beman J.M., and Kuypers M.M.M. 2007. New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. International Society for Microbial Ecology, 1: 19-27.
14- Gerardi M.H. 2002. Nitrification and denitrification in the activated sludge process. John Wiley and Sons, NewYork.
15- Karami M., Afyuni M., Rezainejad Y., and Schulin R. 2009. Heavy metal uptake by wheat from a sewage sludge-amended calcareous soil. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 83:51-61.
16- Knopp J.D., Coleman D.C., Crossley D.A., and Clark J.S. 2000. Biological indices of soil quality: an ecosystem case study of their use. Forest Ecology and Management, 138: 357-368.
17- Kocik A., Truchan M., and Rozen A. 2007. Application of willows (*Salix viminalis*) and earthworms (*Eisenia fetida*) in sewage sludge treatment. European Journal of Soil Biology, 43: 327-331.
18- 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.
19- Liu F., Zhu P., Sheng W., and Xue J. 2013. Sludge earthworm composting technology by *Eisenia fetida*. Journal of Material Cycles Waste Management, 15: 482-488.
20- McLean M.A., Migge K.S., and Parkinson D. 2006. Earthworm invasions of ecosystems devoid of earthworms:

effects on soil microbs. Biological Invasions, 8: 1257-1273.
21- Mench M., Renella G., Gelsomino A., Landi L., and Nannipieri P. 2006. Biochemical parameters and by sludge-borne metals and remediated with inorganic soil amendments. Environmental Pollution, 144: 24-31.
22- Mulvaney R.L. 1996. Nitrogen-inorganic forms. p. 1152- 1155. In: D.L. Sparks (ed.) Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods. SSSA, Madison, WI.
23- Peacock A.D., Macnaughton S.J., Cantu J.M., Dale V.H., and White D.C. 2001. Soil microbial biomass and community composition along an anthropogenic disturbance gradient within a long-leaf pine habitat. Ecological Indicator, 1: 113-121.
24- Postma-Blaauw M.B., Bloem J., Faber J.H., Groenigen J.W.V., Goede R.G.M., and Brussaard L. 2006. Earthworm species composition affects the soil bacterial community and net nitrogen mineralization. Pedobiologia, 50: 243-256.
25- Roig N., Sierra J., Marti E., Nadal M., Schuhmacher M., and Domingo J.L. 2012. Long-term amendment of Spanish soils with sewage sludge: effects on soil functioning. Agriculture, Ecosystems and Environment, 158: 41-48.
26- Rost U., Joergensen R.G., and Chander K., 2001. Effects of Zn enriched sewage sludge on microbial activities and biomass in soil. Soil Biology and Biochemistry, 33: 633-638.
27- Tabachnick B.G., and Fidell L.S. 2012. Using Multivariate Statistics. 6th ed. Pearson Publisher, New Jersey.
28- Zaman M., Matsushima M., Chang S.X., Inubushi K., Nguyen L., Goto S., Kaneko F., and Yoneyama T. 2004. Nitrogen mineralization, N_2O production and soil microbiological properties as affected by long-term applications of sewage sludge composts. Biology and Fertility of Soils, 40: 101-109.

Journal of Water and Soil
Vol. 30, No. 3, Jul.-Agu. 2016, p. 880-891

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۰، شماره ۳، مرداد – شهریور ۱۳۹۵، ص. ۸۹۱-۸۸۰

Earthworm Effects on Nitrification Rate and Arginine Amonification in a Calcareous Soil Amended with Urban Sewage Sludge

H. Jafari Vafa[1*] – F. Raiesi[2] – A.R. Hosseinpur[3] – Z. Karimi[4]

Received: 11-11-2014
Accepted: 09-06-2015

Introduction: Earthworms are among the most important organisms in soil and their activities can be an indicator of soil quality. These organisms may be influenced by organic wastes application such as sewage sludge and subsequently affect soil quality. One of the quick and easy methods for soil quality monitoring is the use of biological indicators such as microbial activity. It is due to their quick response to changes in the environment. The purpose of this study was to evaluate the effect of earthworms on nitrification rate and arginine ammonification as microbial activity in a calcareous soil amended with urban sewage sludge.

Materials and Methods: The studied soil was sampled from Shahrekord University land and sewage sludge belonged to the refinery sludge ponds of shahrekord. Based on dry weight, this organic waste had carbon and nitrogen, approximately 67 and 110 times more than tested soil, respectively. The organic waste in terms of quality and heavy metal concentrations was in class A. Experimental treatments were sewage sludge (without and with 1.5% sewage sludge) and earthworm (no earthworm, *Eiseniafoetida* from epigeic group, *Allolobophracaliginosa* from endogeic group and a mixture of the two species) as 2×4 full factorial experiment arranged in a completely randomized design with three replications. After applying sewage sludge, the pots were irrigated three months to achieve a balance in the soil. An adult earthworm per kg of soil was added and in the mixed treatments comparison species were 1:1. To prevent the exit of earthworms, the pots was closed with a thin lace. At the end of the experiment, soil was completely mixed. Part of it was stored in the refrigerator to measure the microbiological parameters. Chemical properties were measured by the air-dried soil. The effectiveness of a factor in the observed changes is shown by partial effect size (Tabachnick and Fidell 2012). So, partial effect size (Eta^2_p) for each source of variation (SS, earthworm and SS×earthworm) was calculated.

Results Discussion: According to Eta^2_p, the role of sewage sludge application to increase total nitrogen was almost twice the earthworm and had a greater effect on the property. Because of low concentrations of heavy metals and high nutrient in sewage sludge, it increased nitrification rate and arginine ammonification by 16.7 and 62.5 percent, respectively. Considering that the indices represent microbial biomass activity, so we can say sewage sludge application increased theri activities. Sewage sludge application increased total nitrogen, because provided the substrate for heterotrophic bacteria. Consequently, ammonium production improved and stimulated activity of Nitrosomonas and Nitrobacter. There was a positive and significant correlation between total nitrogen, arginine ammonification and nitrification rate, that confirmed the occurrence of this process. Earthworm inoculation affected these two indicators ($p<0.001$). In the earthworm gut, ammonificators and nitrificators increased. With application of sewage sludge, *A. caliginosa* has greater effect than *E. foetida.* Rising food source of microbial community in the presence of sewage sludge increased microbial biomass and subsequently the intensity of *A. caliginosa* feeding. So, microbial activity was more stimulated. For this reason, the effect of *A. caliginosa* on arginine ammonification was more impressive in soil treated with sewage sludge. *Eiseniafoetida* and *A. caliginosa* improved nitrification rate in soil un-treated sewage sludge to the 152 and 97.7 percent, respectively. However, increases in the soil treated sewage sludge were in order 57.7 and 95.8 percent, repectively. Sewage sludge application decreased earthworm effects on stimulation of the index. The reason for reducing the influence of earthworms in sewage sludge was the increase of available substrate. As a result, using the urban sewage sludge decreased the stimulatory effect of earthworms. Because of feeding from the sewage sludge, this decrease in the presence of *Eiseniafoetida* (Epigeic) was more tangible. In addition, the interaction of two species of earthworms was often additive (without interaction).

Conclusion: According to the results, we can say that use of sewage sludge with a composition similar to what was used in this study, improve microbial activity such as ammonification and nitrification, and finally, soil nitrogen dynamics. Although earthworm activity also increased the indices, the stimulator of earthworms on biomarkers in the presence of sewage sludge decreased. This event was due to increasing availablability

1, 2, 3 and 4- Former Graduate Student, Professors and Former Graduate Student of Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University
(*- Corresponding Author Email: jafarivafa@stu.sku.ac.ir)

substrates. In addition, sewage sludge application during the study was not alarming of environmental pollution due to the low concentration of heavy metals. However, it seems that the implemention of a long-term research is necessary.

Keywords: Arginine Amonification, Earthworm, Nitrification Rate, Sewage Sludge