

مطالعه اثر غلظت های مختلف کادمیوم بر رشد کرم خاکی گونه ایزنیا فتیدا در یک خاک آهکی

راحله جنایی حق پرست^{۱*} - احمد گلچین^۲ - احسان کهنه^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۸

چکیده

فلزات سنگین از راه های مختلفی همچون مصرف نهاده های شیمیایی، پساب ها و فاضلاب ها وارد زمین های کشاورزی و محیط زیست می شوند. اثرات مخرب آنها بر محیط زیست و موجودات زنده گزارش شده است. با توجه به عکس العمل سریع موجودات زنده به تغییرات اکوسیستم خود، این تحقیق به منظور بررسی اثرات آلودگی یک خاک آهکی با فلز سنگین کادمیوم بر پارامترهای رشدی کرم خاکی گونه ایزنیا فتیدا^۴ انجام شد. بدین منظور رشد کرم خاکی گونه مذکور در خاک آهکی آغشته شده با مقادیر ۰،۲۰،۴۰،۶۰،۸۰ میلی گرم عنصر در کیلوگرم خاک و دو سطح بدون ماده آلی و افزایش ۵ درصد وزنی ماده آلی در زمان های ۰،۷۵،۱،۵،۳،۰،۴۵،۶۰،۷۵ روز پس از افزایش عنصر به خاک مورد بررسی قرار گرفت. پارامترهای تغییر وزن کرم، تعداد کوکون تولید شده و درصد زندهمانی اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که افزایش ماده آلی می تواند اثرات مخرب فلزات را نسبتاً کاهش دهد. در خاک های تیمار شده با کادمیوم، با افزایش غلظت عنصر در خاک، وزن کرم ها کاهش یافت و کادمیوم بیشترین تاثیر را بر تعداد کوکون تولید شده داشته است ($P < 0.004$ خاک آهکی). در خاک های تیمار شده با افزایش عنصر به خاک درصد زندهمانی کرم ها نیز کاهش معنی دار داشته است.

واژه های کلیدی: کرم خاکی، ایزنیافتیدا، کادمیوم، زندهمانی، کوکون، ماده آلی

مقدمه

اما در خاک های خیلی اسیدی در مقایسه با خاک های کمی اسیدی با دامنه pH ۸-۶ تعداد کمتری کرم خاکی یافت می شود. گونه های لومبریکوس روبلوس^۵ و لومبریکوس فستیوس^۶ نسبت به گونه لومبریکوس ترستریس^۷ به شرایط اسیدی مقاوم ترند و ممکن است در جنگل های سوزنی برگ و حاوی هوموس مور رواج بیشتری داشته باشند (۸).

کرم های خاکی از اجزای اصلی بیوماس جانوری خاک بوده، بنابراین یکی از مهمترین منابع غذایی برای دیگر موجودات بالاتر در هرم غذایی هستند (۶). با توجه به تجمع مواد سمی از قبیل فلزات و برخی حشره کش ها در بدن کرم خاکی، موجوداتی که از آنها تغذیه می کنند مستقیماً تحت تاثیر قرار می گیرند (۲۷). کرم های خاکی در تماس مستقیم با اجزاء خاک و به ویژه آب خاک بوده، بنابراین در تغییر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک نقش با ارزشی دارند (۲۶). با توجه به دلایل فوق و همچنین در دسترس بودن آنها، حمل و نقل راحت، کاربرد در بررسی های مسمومیت و تکثیر و پرورش مناسب در آزمایشگاه، تقاضا برای استفاده از این بی مهرگان خاکزی در ارزیابی

تعداد و انواع کرم های خاکی، به مواد آلی خاک، رطوبت و سایر خواص خاک بستگی دارد. در جنگل ها و مراتع وزن آنها به ۱۰۰ تا ۲۵۰ گرم در یک متر مربع می رسد. در مزارع مقدار آنها کمتر بوده و با اضافه نمودن کودهای آلی، می توان مقدار آنها را به ۱۰۰ گرم در متر مربع افزایش داد. تکثیر و رهاسازی آنها می تواند برای بهسازی ساختمان و همچنین قدرت باروری خاک موثر واقع شود (۱). کرم های خاکی در شرایط مرطوب و در خاکی که مقدار زیادی مواد آلی و کلسیم قابل استفاده دارد فعال هستند. این جانوران به ندرت در خاک های اسیدی، شنی و حاوی مقدار کم مواد آلی فعالیت می نمایند. اگرچه کرم های خاکی ممکن است در خاک های اسیدی فعالیت کنند،

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان و کارشناس ارشد سازمان جهاد کشاورزی استان گیلان
(نویسنده مسئول: Email: r.jenabi@yahoo.com)

۲- استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

۳- کارشناس ارشد مهندسی علوم خاک، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گیلان

5- *Lumbricus rubellus*
6- *Lumbricus festivus*
7- *Lumbricus terrestris*

4- *Eisenia fetida*

سمیت کادمیوم و جهش‌زایی آن در DNA به خوبی مشخص نشده است، اما گزارش شده که کادمیوم فعالیت موتاژنی (جهش‌زایی) بالایی دارد و می‌تواند در سیستم ترمیم DNA اختلال ایجاد کند. کادمیوم در غلظت‌های پایین‌تر از ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم با اختلال در سیستم‌های DNA از ترمیم آن جلوگیری می‌کند (۱۱).

سمیت کادمیوم اثرات بیولوژیکی و بیوشیمی متفاوتی دارد. برخی از اثرات آن در انسان‌ها و دیگر پستانداران توسط والی و اولمر (۳۳) گزارش شده است. کادمیوم در اتصال با کمپکس‌کننده‌های بیولوژیکی مختلف، از قبیل گروه‌های سولفیدریل، امیدازول در آلومین، دیتیول در آنزیم‌ها یا کربوکسی در پپتیدازها، با روی رقابت کرده که منجر به ایجاد تغییراتی در فعالیت آنزیم‌ها می‌شود که برای عملکرد طبیعی بیولوژیکی بدن مهم است. همچنین کادمیوم می‌تواند با فسفولیپیدها پیوند برقرار کرده که با گسترش آنها باعث سمیت میتوکندری، کلیه‌ها و غشاء عصبی می‌شوند.

اثرات کادمیوم در کرم‌های خاکی توسط محققین بررسی شده است. به عنوان مثال کادمیوم می‌تواند بر تراکم جمعیت، رشد، بلوغ جنسی و تولید مثل کرم خاکی اثر بگذارد (۲۵ و ۳۰). بنابراین گزارش‌ها و همکاران (۱۱) کادمیوم می‌تواند باعث کاهش ایمنی بدن شود. کادمیوم در بدن کرم خاکی در گرانول‌هایی در بافت کلراگنوس^۴ (۲۰) و همچنین در نفریدی‌ها (۲۴) تجمع می‌یابد. مطالعه اسپورگئون و هویکین (۳۱) نشان داد که در خاکی که به صورت مصنوعی آلوده شده بود، کادمیوم، مس، سرب و روی باعث افزایش تلفات، کاهش رشد و تولید کرم خاکی گونه ایزینیا فتیدا شده است. طی گزارشی اسپورگئون و همکاران (۳۲) اعلام کردند که کادمیوم تا غلظت ۳۰۰ میکروگرم در گرم سوبسترا، اثر منفی داری بر زنده‌مانی کرم خاکی گونه ایزینیا فتیدا نداشت. اما مس با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در گرم سوبسترا، اثر منفی معنی‌داری بر زنده‌مانی کرم‌ها داشت. روی اثر ضعیف ولی معنی‌داری بر تلفات کرم‌ها در غلظت ۴۰۰ میکروگرم در گرم سوبسترا داشت. سرب کمترین اثر سمیت را بروز داد به طوری که در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در گرم سوبسترا، زنده مانی کاهش معنی‌داری داشت.

بررسی اثرات آلاینده‌ها با روش اندازه‌گیری غلظت آنها در محیط، به دلیل برهم‌کنش‌های موجود علاوه بر وقت گیر بودن، بیانگر پاسخ موجودات زنده به آلاینده نمی‌تواند باشد. با توجه به پاسخ سریع موجودات زنده به تغییرات محل زندگی، دسترس بودن کرم‌های خاکی، حمل و نقل راحت، کاربرد در بررسی‌های سمیوتیک، تکثیر و پرورش مناسب در آزمایشگاه، تقاضا برای استفاده از این بی‌مهرگان خاکزی در ارزیابی مخاطرات اکولوژیکی در اکوسیستم‌های خشکی رو به

مخاطرات اکولوژیکی در اکوسیستم‌های خشکی رو به افزایش است. بنابراین سازمان همکاری اقتصادی و توسعه اروپا (۲۳) و آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا (۷)، کرم‌های خاکی گونه ایزینیا فتیدا را به عنوان گونه مناسب در مطالعات آزمایشگاهی معرفی نموده‌اند.

در موجوداتی مثل کرم‌های خاکی، تجمع زیستی^۱ یک فلز در بدن موجود به عنوان شاخص سمیت شناخته می‌شود، به‌ویژه برای فلزاتی که در فرآیند متابولیسم قرار نگرفته و بدون تغییر به منطقه هدف می‌رسند (۲۰). در کرم‌های خاکی بر خلاف سایر بی‌مهرگان خاکزی، مواد شیمیایی یا سموم از دو راه جذب بدن می‌شوند:

۱- جذب پوستی ۲- جذب بلعی^۲. چون کرم‌های خاکی در تماس مستقیم با آب خاک بوده و دیواره بدن آنها نفوذپذیری زیادی دارد (برای تصفیه و تبادل گازهای تنفسی، مقدار قابل توجهی از آب و دیگر مولکول‌ها از دیواره بدن کرم مبادله می‌شوند) (۲۲ و ۳۷) مواد شیمیایی حل شده در محیط از قبیل یون‌های فلزی آزاد، می‌توانند از این طریق وارد بدن کرم خاکی شوند. در روش دوم، آلاینده‌های فلزی جذب خاک و اجزای آلی شده که به عنوان غذای کرم خاکی مورد استفاده قرار می‌گیرند یا وارد آب خاک شده که مستقیماً بلعیده می‌شوند. از نظر تئوری در جذب پوستی باید غلظت مواد شیمیایی در بافت‌ها، با غلظت آن ماده در آب نسبت مستقیم داشته باشد (۳). بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که غلظت ماده مورد نظر در آب خاک تعیین‌کننده فراهمی زیستی^۳ آن ماده برای کرم‌های خاکی می‌باشد (۱۶).

فلز کادمیوم از جمله آلاینده‌هایی است که هنگام رهاسازی فاضلاب‌ها یا اصلاح خاک با لجن‌ها باید به آن توجه کرد (۳۶). کادمیوم عنصری غیر ضروری بوده که به مرور در بدن موجودات زنده (به ویژه بافت کلیوی) تجمع می‌یابد و در بدن انسان دارای نیمه عمر بیولوژیکی طولانی ۳۳-۱۶ سال می‌باشد (۲۹). همچنین کادمیوم در اندام‌های بی‌مهرگان خاکزی از قبیل ایزوپودها و کرم‌های خاکی می‌تواند تجمع یابد که در نهایت کادمیوم در دسترس موجودات عالی‌تر که از آن گروه تغذیه می‌کنند قرار می‌گیرد (۱۲).

کادمیوم توسط آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان، در گروه یک مواد سرطان‌زای انسانی طبقه بندی شده است و تحقیقات نشان داده که برای حیوانات آزمایشگاهی و وحشی سرطان‌زا می‌باشد (۱۳ و ۳۵). به‌علاوه غلظت‌های بالای کادمیوم در خاک باعث کاهش کارایی متابولیسم، میکروارگانیسم‌های خاکزی می‌شود (۲۸). کادمیوم از طریق مصرف فاضلاب‌های آلوده، کودهای شیمیایی و آبشویی باتری‌های کادمیوم‌دار وارد محیط زیست می‌شود (۱۴). مکانیسم‌های سمیت کادمیوم مختلف و پیچیده است. اگرچه تاکنون مکانیسم

- 1- Bioaccumulation
- 2- Oral
- 3- Bioavailability

4- Chlorogogmous

برای تهیه خاک آلوده به فلز، پس از تهیه خاک‌ها، باید نمک مناسب هر عنصر تهیه می‌شد. بنابراین از سولفات کادمیوم ساخت مرک آلمان استفاده شد. برای اضافه نمودن فلز سنگین به خاک‌ها، مقدار عنصر در حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد و مقدار ۱۶۷ میلی لیتر به هر جعبه اضافه شد. برای این کار خاک هر جعبه روی صفحه پلاستیکی پخش شد و با استفاده از مه‌پاش دستی (آب‌پاش) مقدار محلول مورد نیاز به تدریج روی خاک اسپری شده و با خاک مخلوط شد. بعد از افزودن محلول، هر خاک مجدداً به جعبه برگردانده شد و اتیکت مورد نیاز روی آن نصب شد. جعبه‌ها به همراه خاک داخل آن به مدت ۱۰ روز برای برقراری تعادل بین عناصر و خاک در گلخانه نگهداری شدند. لازم به ذکر است که قبل از افزایش عنصر به خاک، برای تیمارهای حاوی ماده آلی، ۵ درصد وزنی از ماده آلی جمع‌آوری شده به هر جعبه اضافه شده و کاملاً با خاک مخلوط شده و رطوبت خاک‌ها در حدود ۵۰ درصد ظرفیت مزرعه تنظیم شد.

پس از گذشت ۱۰ روز، کرم‌ها از محیط سازگاری خارج شده و برای دقت در تعیین وزن آنها به مدت ۲۴ ساعت در پتری دیش‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب قرار داده شدند تا محتویات روده آنها تخلیه شود. بعد از این مرحله تعدادی با اندازه تقریباً یکسان انتخاب شده، و روی کاغذ صافی خشک قرار داده شدند تا آب اضافی بدن آنها گرفته شود سپس ۱۰ کرم جدا شده و توزین شدند. پس از توزین، کرم‌ها به بستر نهایی انتقال داده شدند. سعی گردید که وزن کرم‌ها در کلیه تیمارها و تکرارها تقریباً یکسان باشد. جعبه‌ها در گلخانه با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد نگهداری شدند.

در صورت لزوم رطوبت خاک جعبه‌ها تنظیم می‌شدند. بعد از گذشت پانزده روز از شروع آزمایش، کرم‌ها (کرم‌های باقی‌مانده در جعبه در هر مرحله) را با استفاده از الک از خاک جدا کرده و برای جداسازی ذرات خاک و ماده آلی از بدن آنها، کرم‌ها را داخل آب غوطه‌ور کرده سپس با کاغذ صافی آب اضافی را خشک کرده و با استفاده از ترازوی حساس آزمایشگاهی وزن کرم‌ها اندازه‌گیری و ثبت شد. خاک جعبه‌ها برای مشاهده کوکون به دقت بررسی شده هرگونه علائم مشخصه دیگر مثل ظهور اندام جنسی در کرم‌ها نیز بررسی و ثبت می‌شد. تلفات کرم‌ها هم ثبت و اندازه‌گیری شد. عمل اندازه‌گیری وزن کرم‌ها و بررسی سایر مشخصات آنها هر پانزده روز یکبار و تا ۷۵ روز بعد از شروع آزمایش تکرار شد.

در پایان آزمایش پس از توزین نهایی کرم‌ها، آنها را به مدت ۴۸ ساعت داخل پتری دیش حاوی کاغذ صافی مرطوب قرار داده تا محتویات داخل روده آنها به طور کامل تخلیه شود. پس از این مدت کرم‌ها خشک شده و مجدداً توزین شدند. برای اندازه‌گیری عناصر در بدن کرم از روش هضم با اسید (۱۵) استفاده شد. به این منظور بعد از توزین پنج کرم، آنها با ۱۰ میلی لیتر اسید نیتریک ۰.۵۵٪ به مدت

افزایش است. بنابراین این تحقیق برای ۱- بررسی میزان حساسیت کرم خاکی ایزینا فتیدا در غلظت‌های مختلف کادمیوم ۲- بررسی تاثیرگذاری میزان ماده آلی بر سمیت کادمیوم برای کرم‌ها به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

تهیه و پرورش کرم‌های خاکی مورد آزمایش

کرم خاکی گونه *ایزینا فتیدا* از مجتمع کشت و صنعت مغان تهیه شد. سپس کرم‌ها برای تکثیر در جعبه‌های چوبی قرار داده شدند. برای تغذیه کرم‌ها، کود گاوی بدون اوره (شستشوی کود با آب) هر هفته یکبار به محیط اضافه می‌شد. جعبه‌ها تا شروع آزمایش در سایه با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۵ درصد نگهداری شدند.

خاک آهکی مورد نظر از اراضی ایستگاه تحقیقات زیتون رودبار، از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری نمونه‌برداری شدند. برخی خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاکها طبق روشهای متداول در موسسه تحقیقات خاک و آب کشور اندازه‌گیری شدند (۲) که در جدول شماره ۱ ارائه شده است. پس از تهیه خاک‌ها، آنها را خشک کرده و از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شدند. خاک‌ها تا شروع آزمایش در سایه نگهداری شدند.

آزمایش بصورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی عبارت بودند از سطوح مختلف فلز سنگین، زمان تماس کرم خاکی با عنصر مورد نظر و افزایش یا عدم افزایش ماده آلی به خاک.

کادمیوم با غلظت‌های مورد بررسی برای هر عنصر در هر خاک عبارت بودند از: صفر، ده، بیست، چهل، شصت و هشتاد میلی‌گرم عنصر در هر کیلوگرم خاک. تیمار زمان هم شامل زمان‌های نمونه برداری در صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۷۵ روز پس از افزودن کرم‌های خاکی به جعبه‌های حاوی مواد آزمایشی می‌باشد.

برای تیمار افزایش یا عدم افزایش ماده آلی، لاشبرگ درختان صنوبر از اراضی ایستگاه تحقیقات صنوبر جمع‌آوری شد. تیمار افزایش ماده آلی شامل افزایش ۵ درصد وزنی ماده آلی هر جعبه بود. پس از جمع‌آوری، لاشبرگ‌ها در آون با دمای 70° سانتی‌گراد خشک شدند، سپس برای اختلاط یکنواخت‌تر با خاک، خرد شده و از الک عبور داده شدند.

برای ایجاد سازگاری کرم‌ها با محیط جدید و جلوگیری از ایجاد تنش در کرم‌ها، قبل از شروع آزمایش، مقداری از خاک مورد آزمایش در جعبه‌های چوبی ریخته شد، سپس کرم‌ها به آنها اضافه و به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند. در صورت نیاز، به خاک‌ها آب اضافه شد تا رطوبت آنها در حد ۵۰ درصد ظرفیت نگهداری حفظ شود.

شاهد و ۱۰ میلی گرم کادمیوم در کیلوگرم خاک، بیشترین میانگین وزن را داشته، و با سایر تیمارها اختلاف معنی دار دارند، تیمار ۸۰ میلی گرم کادمیوم در کیلوگرم خاک نیز با میانگین وزن ۰/۲۳۵ گرم، کمترین وزن را داشته و به جز با تیمار ۶۰ میلی گرم کادمیوم در کیلوگرم خاک، با سایر تیمارها تفاوت معنی دار دارد (شکل ۱). با گذشت زمان نیز به وزن کرمها اضافه شده به طوری که در هر مرحله وزن کرمها با مرحله دیگر تفاوت معنی دار دارد (شکل ۲). افزایش ماده آلی به خاک نیز موجب افزایش معنی دار وزن کرمها شده است (شکل ۳). مقایسه میانگین اثر متقابل زمان × غلظت نیز نشان داد که در همه غلظتها با گذشت زمان به وزن کرمها افزوده شده اما این افزایش در تیمارهای شاهد و ۱۰ میلی گرم کادمیوم در کیلوگرم خاک بیش از سایر تیمارها بوده است. اثر متقابل ماده آلی سطوح کادمیوم هم نشان داد که افزایش ماده آلی علی رغم افزایش غلظت های کادمیوم، توانسته باعث بالا رفتن وزن کرمها شود.

تعداد کوکون تولید شده

با افزایش کادمیوم به خاک، تنها اثر ساده غلظت های کادمیوم و زمان بر تعداد کوکون های تولید شده معنی دار است (جدول ۳). مقایسه میانگین کوکون تولید شده در غلظت های مختلف کادمیوم نشان داد که با افزایش غلظت کادمیوم، تعداد کوکون کاهش یافته است به طوری که بیشترین کوکون در تیمار شاهد مشاهده شده است اما این تیمار با تیمارهای ۱۰ و ۴۰ میلی گرم کادمیوم در کیلوگرم تفاوت معنی دار ندارد.

حداقل ۸ ساعت هضم شدند. سپس نمونه ها در دمای ۴۰ تا ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت دو ساعت و سپس در دمای ۱۱۰ تا ۱۲۰ درجه سانتی گراد تا زمانی که محلول به جوش آید و بخار قهوه ای از ظرف بیرون نیاید حرارت داده شدند. بعد از سرد شدن، یک میلی لیتر اسیدپرکلریک ۷۰٪ به نمونه ها اضافه شد و نمونه ها در دمای ۱۱۰ تا ۱۲۰ درجه سانتی گراد تا زمانی که دیگر بخار سفیدی از نمونه ها متصاعد نشود حرارت داده شدند. بعد از سرد شدن ۵ میلی لیتر آب مقطر به هر نمونه اضافه شد و در دمای ۱۱۰ تا ۱۲۰ درجه سانتی گراد همانند مرحله قبل حرارت داده شدند. پس از اینکه نمونه ها کاملاً سرد شدند آنها را با کاغذ صافی، فیلتر کرده و با آب مقطر به حجم ۲۰ میلی لیتر رسانده شدند و در ظرف پلاستیکی تا زمان تجزیه نگهداری شدند. برای هر عنصر، نمونه شاهد نیز همانند مرحله فوق آماده شد. تجزیه آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SAS (ورژن ۶) انجام شد. برای آنالیز از رویه ANOVA استفاده شد مقایسه میانگین ها در صورت معنی دار شدن F با آزمون دانکن انجام شد. برای رسم نمودارها از برنامه Excel، نرم افزار MS Office استفاده شد.

نتایج

تأثیر غلظت های مختلف کادمیوم، زمان و ماده آلی بر وزن کرمها

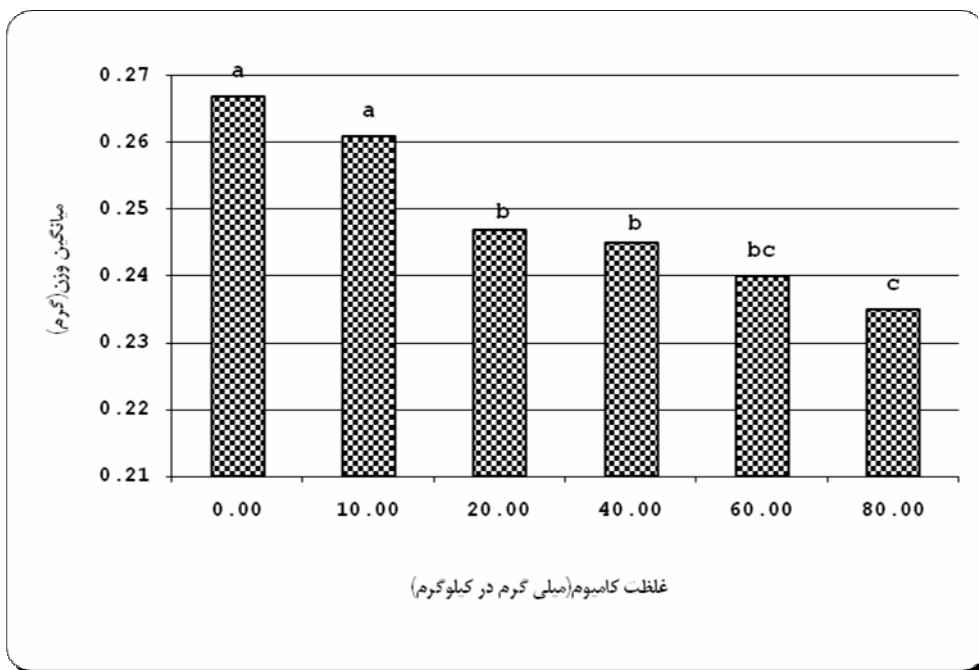
نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر وزن کرمها نشان داد که اثرات ساده و متقابل این تیمارها بر وزن کرمها معنی دار است (جدول ۲). مقایسه میانگین اثر ساده غلظت های کادمیوم نشان داد که با افزایش غلظت، وزن کرمها کاهش یافته است به طوری که تیمار

جدول ۱- برخی خصوصیات فیزیکی شیمیایی خاک مورد آزمایش

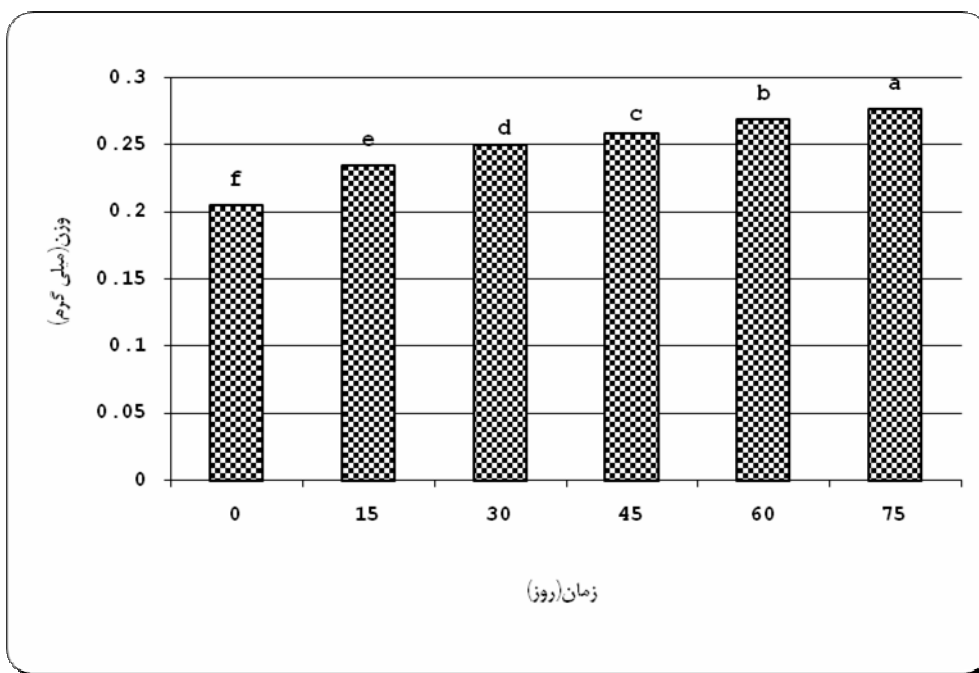
pH	EC	O.C	CaCO ₃	N	P	K	Cd	بافت
	dS/m	%				mg kg ⁻¹		
7.6	1.2	1.34	9.3	0.06	13	128	0	لوم رسی

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر وزن کرمها در خاک آهکی آغشته به کادمیوم

P	F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منبع تغییر
۰/۰۰۰۱	۱۶/۰۷	۰/۰۰۵۵	۰/۰۲۷۴	۵	کادمیوم
۰/۰۰۰۱	۷۱/۸۷	۰/۰۲۴۵	۰/۱۲۲۵	۵	زمان
۰/۰۰۰۱	۹۴/۶۳	۰/۰۳۲۳	۰/۰۳۲۳	۱	ماده آلی
۰/۰۰۰۱	۱۴/۵۱	۰/۰۰۴۸	۰/۰۲۴۷	۵	ماده آلی × کادمیوم
۰/۰۲۳۵	۱/۷۲	۰/۰۰۵۹	۰/۰۱۴۷	۲۵	کادمیوم × زمان
۰/۰۰۰۱	۱۳/۵۴	۰/۰۰۴۶	۰/۰۲۳۱	۵	ماده آلی × زمان
		۰/۰۰۰۳	۰/۰۵۷۶	۲۵	ماده آلی × زمان × کادمیوم
			۰/۳۰۲۳	۱۴۴	خطای آزمایشی
				۲۱۵	کل



شکل ۱- مقایسه میانگین وزن کرم‌ها در غلظت‌های مختلف کادمیوم در خاک آهکی



شکل ۲- مقایسه میانگین وزن کرم‌ها طی زمان در خاک آهکی آغشته به کادمیوم

درصد زنده ماننی

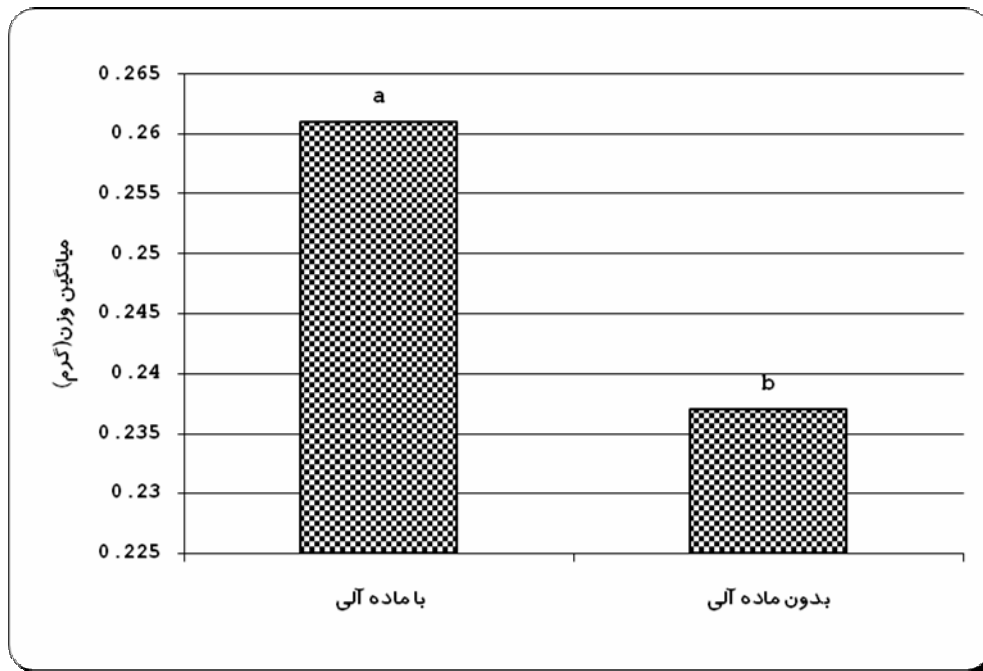
نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که درصد زنده‌مانی کرم‌ها در خاک‌های آغشته به کادمیوم تحت تأثیر سطوح کادمیوم، زمان، ماده آلی، اثر متقابل ماده آلی × کادمیوم و زمان × ماده آلی قرار دارد (جدول ۴). مقایسه میانگین درصد‌های زنده‌مانی در سطوح کادمیوم

کمترین کوکون تولیدی هم به تیمار ۸۰ میلی‌گرم کادمیوم در کیلوگرم خاک تعلق دارد (شکل ۴). تعداد کوکون تولید شده در زمان‌های ۶۰ و ۷۵ روزه هم با یکدیگر تفاوت معنی‌دار ندارند اگرچه بیشترین تعداد کوکون در ۶۰ روز مشاهده شده است (شکل ۵).

بحث

در خاک‌های تیمار شده با کادمیوم، با افزایش غلظت عنصر در خاک، وزن کرم‌ها کاهش یافت و بیشترین وزن در تیمار شاهد (صفر میلی‌گرم در کیلوگرم) ثبت شد. اسپورگئون و همکاران (۳۲) نیز اثر کادمیوم، مس، سرب و روی را بر وزن کرم خاکی ایزینیا فتیدا بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که وزن کرم‌هایی که در تیمار شاهد و غلظت‌های پایین فلزات قرار گرفته بودند پس از گذشت یک هفته افزایش کمی داشت. اما در هفته‌های بعدی وزن کرم‌ها کاهش یافت به طوری که بعد از ۵۶ روز، تفاوت معنی‌داری ($P > 0.05$) در وزن کرم‌ها بین تیمارها با شاهد وجود نداشت.

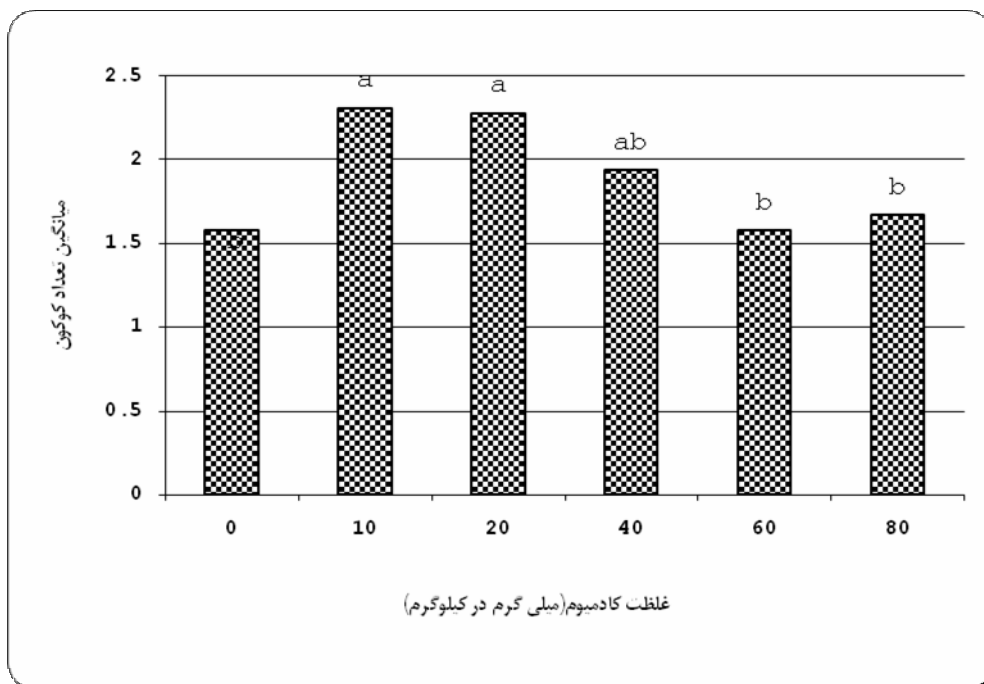
نشان داد که بیشترین درصد زنده‌مانی در تیمار صفر میلی‌گرم کادمیوم در کیلوگرم خاک مشاهده شده است و با افزایش غلظت کادمیوم در خاک، درصد زنده‌مانی روند کاهشی معنی‌داری داشته است (شکل ۶). مقایسه میانگین درصد‌های زنده‌مانی در زمان‌های مختلف نشان داد که با گذشت زمان تلفات کرم‌ها افزایش یافته به طوری که پس از گذشت ۷۵ روز، حدود ۲۷ درصد از کرم‌ها تلف شده‌اند. درصد زنده‌مانی کرم‌ها در ۱۵ و ۳۰ روز اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نداشتند (شکل ۷). افزایش ماده آلی به خاک نیز توانسته است حدود ۴ درصد از تلفات کرم‌ها نسبت به تیمارهای فاقد ماده آلی بکاهد (شکل ۸). افزایش ماده آلی به خاک توانسته در کلیه غلظت‌های کادمیوم منجر به افزایش درصد زنده‌مانی شود.



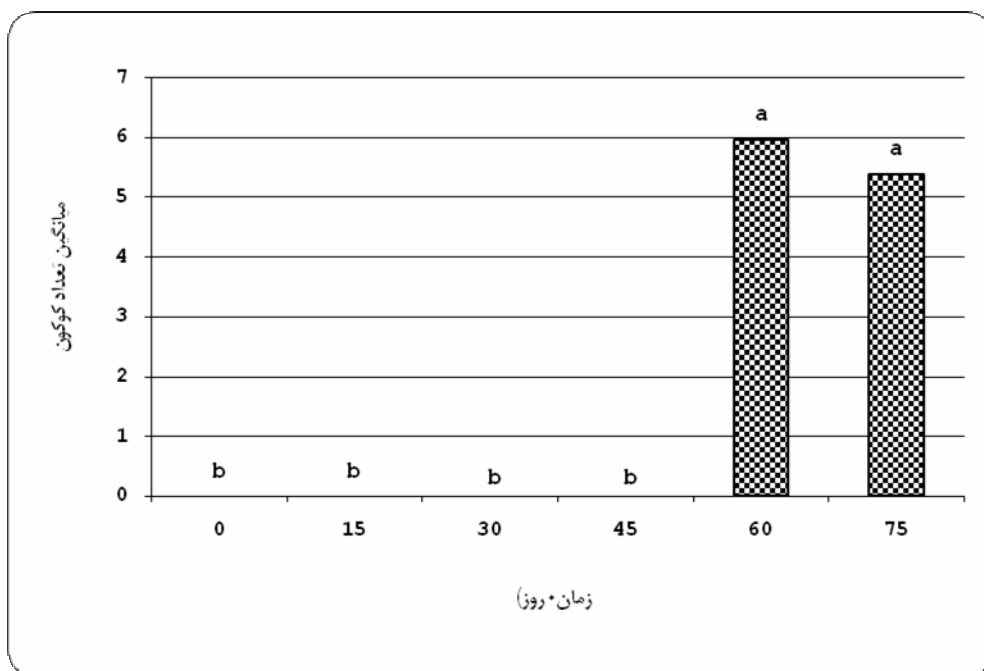
شکل ۳ - مقایسه میانگین وزن کرم‌ها در اثر افزودن ماده آلی در خاک آهکی آغشته به کادمیوم

جدول ۳ - نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر تعداد کوکون تولید شده در خاک آهکی آغشته به کادمیوم

منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	P
کادمیوم	۵	۲۰/۸۳	۴/۱۷	۳/۵۶	۰/۰۰۴۴
زمان	۵	۷۷۱/۵۵	۱۵۴/۳۱	۱۳۱/۷۳	۰/۰۰۰۱
ماده آلی	۱	۳/۱۳	۳/۱۳	۲/۶۷	۰/۱۰۴۰
کادمیوم × ماده آلی	۵	۱/۴۸	۰/۲۹	۰/۲۵	۰/۹۳۷۹
کادمیوم × زمان	۲۵	۴۴/۲۸	۱/۷۷	۱/۵۱	۰/۰۶۶۲
ماده آلی × زمان	۵	۶/۱۶	۱/۳۵	۱/۱۵	۰/۳۳۴۰
ماده آلی × کادمیوم × زمان	۲۵	۱۹۷/۹۶	۱/۱۷		
خطا	۱۴۴	۱۰۴۶/۰۰			
کل	۲۱۵				



شکل ۴- مقایسه میانگین تعداد ککون تولیدشده توسط کرم ها در غلظت‌های مختلف کادمیوم در خاک آهکی



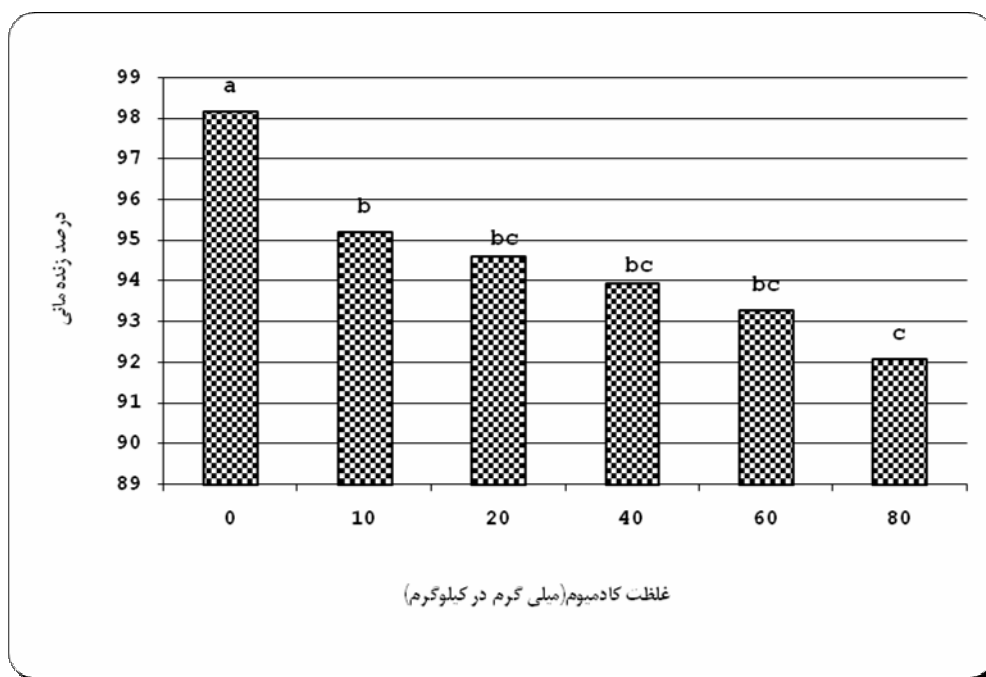
شکل ۵- مقایسه میانگین تعداد ککون تولیدشده توسط کرم‌ها طی زمان در خاک آهکی آغشته به کادمیوم

باشد که تفاوت نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج ما می‌تواند به دلیل غلظت‌های مختلف و نوع بستر کشت باشد، آنها از بستر مصنوعی شماره ۲۰۷ توصیه شده بوسیله OECD (۲۳) استفاده کردند.

به عقیده آنها افزایش وزن اولیه احتمالاً می‌تواند به دلیل بلع خاک توسط کرم‌ها باشد. شایان ذکر است که حداقل غلظت‌های مورد استفاده در آزمایش آنها، برای سرب و روی ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم و برای کادمیوم و مس به ترتیب ۵ و ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم می‌-

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر درصد زندهمانی کرمها در خاک آهکی آغشته به کادمیوم

منبع تغییر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	Pr>F
غلظت کادمیوم	۵	۷۷۵/۲۸	۱۵۵/۰۵	۴/۳۸	۰/۰۰۱۰
زمان	۵	۱۸۶۰/۷۸	۳۷۲/۱۵	۱۰/۵۰	۰/۰۰۰۱
ماده آلی	۱	۴۴۸۲/۶۷	۴۴۸۲/۶۷	۱۲۶/۵۲	۰/۰۰۰۱
ماده آلی×کادمیوم	۵	۵۲۶/۳۹	۱۰۵/۲۸	۲/۹۷	۰/۰۱۳۹
کادمیوم×زمان	۲۵	۴۳۵/۹۴	۱۷/۴۴	۰/۴۹	۰/۹۷۹۶
ماده آلی×زمان	۵	۱۲۱۱/۸۹	۲۴۲/۳۸	۶/۸۴	۰/۰۰۰۱
ماده آلی×کادمیوم×زمان	۲۵	۳۸۰/۳۹	۱۵/۲۱	۰/۴۳	۰/۹۹۲۱
خطا	۱۴۴	۵۱۰۲/۰۰	۳۵/۴۳		
کل	۲۱۵	۱۴۷۷۵/۳۳			

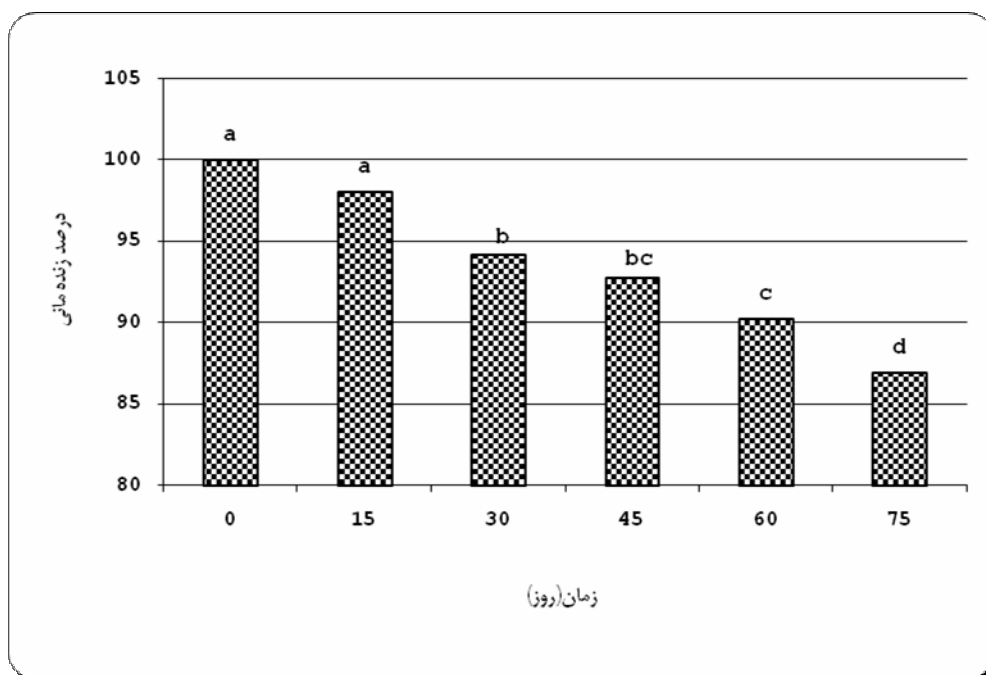


شکل ۶- مقایسه میانگین درصد زندهمانی کرمها در غلظت های مختلف کادمیوم در خاکی آهکی

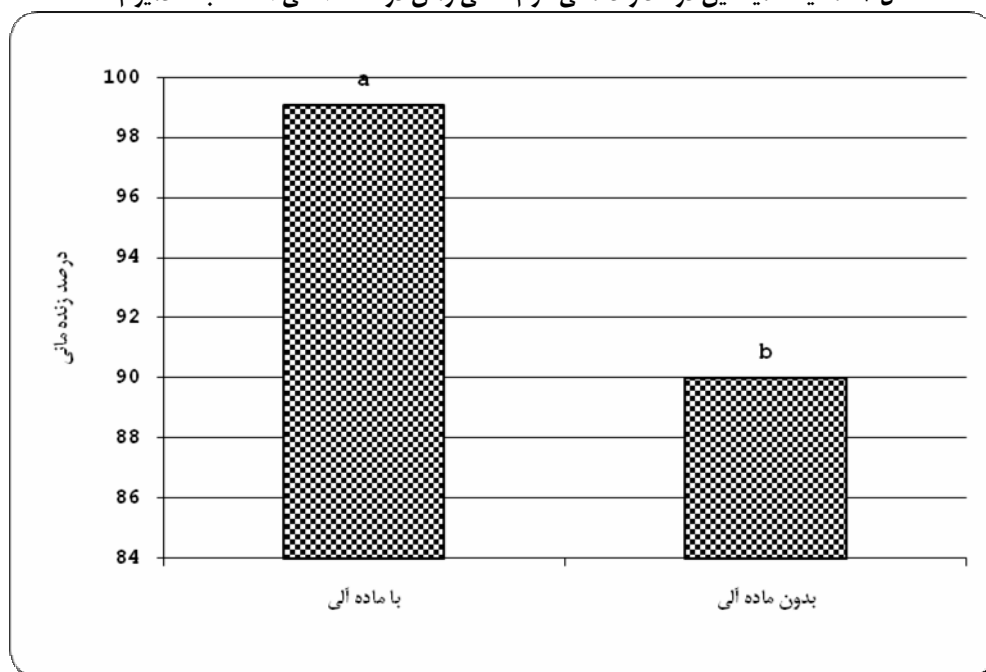
در خاکهای تیمار شده با کادمیوم، با افزایش عنصر به خاک درصد زندهمانی کرمها کاهش معنی دار داشته است. اسپورگتون و همکاران (۳۲) نیز گزارش کرده اند که غلظت های بالای کادمیوم (۳۰۰ میکروگرم) اثر معنی داری بر تلفات کرمها نداشت. به عقیده مورگان و مورگان (۲۱) مقاومت بالای کرمهای خاکی به اثرات سمی کادمیوم، احتمالاً می تواند به دلیل سم زدایی آن توسط پروتئین های متالوتیونین در کانال های غذایی پشتی^۱ باشد.

در مجموع با مقایسه شاخص های مورد بررسی مشخص شد که تغییر وزن کرمها در پاسخ به آلودگی خاک با کادمیوم سریع تر می باشد و پس از آن درصد زندهمانی کرمها می تواند به عنوان عامل تعیین کننده مورد استفاده قرار گیرد.

کادمیوم بیشترین تاثیر را بر تعداد کوکون تولید شده داشته است (P< ۰/۰۰۴ خاک آهکی)، به طوری که حتی افزایش ۱۰ میلی گرم کادمیوم در کیلوگرم خاک، منجر به کاهش تعداد کوکون تولید شده گردیده است. اسپورگتون و همکاران (۳۲) گزارش کردند که افزایش غلظت های پایین کادمیوم (۵ میکروگرم)، سرب (۱۰۰ میکروگرم) و روی (۱۰۰ میکروگرم) موجب بالارفتن تعداد کوکون تولیدی نشده است. در تحقیق ما تعداد کوکون تولید شده، نسبت به برخی گزارشات محققین کمتر بوده است که احتمالاً می تواند به دلیل در دسترس نبودن غذای مناسب برای کرمها باشد. به طوری که وان گستل و همکاران (۳۴) میزان تولید ۰/۲ کوکون/کرم/هفته را برای کرمهایی که با کود حیوانی تغذیه نشده بودند ثبت کردند در حالی که ۱/۲ تا ۲ کوکون/کرم/هفته برای کرمهای تغذیه شده با کود حیوانی گزارش کردند.



شکل ۷- مقایسه میانگین درصد زنده مانی کرم‌ها طی زمان در خاک آهکی آغشته به کادمیوم



شکل ۸- مقایسه میانگین درصد زنده مانی در اثر افزودن ماده آلی به خاک آهکی آغشته به کادمیوم

مزرعه ممکن است در طول زندگی موجود که تا حدود ۴ سال نیز می‌رسد ادامه داشته باشد (۶). غلظت کادمیوم در بدن کرم زمانی می‌تواند به حد سمیت برسد که زمان تماس کرم با آن طولانی باشد بنابراین اثرات بالقوه فلزات ممکن است در آزمایش‌های کوتاه مدت نادیده گرفته شود یا کم برآورد شود. کرم‌های خاکی نسبت به سایر

تفاوت‌های گزارش شده در مقالات از اثرات عناصر بر پارامترهای رشدی کرم خاکی می‌تواند به دلیل زمان‌های متفاوتی باشد که جانوران در تماس با آلاینده‌ها قرار می‌گیرند. به طوری که زمان‌های آزمایش از چند ساعت تا چند هفته متغیر است. البته برای موجوداتی با طول عمر زیاد مثل کرم خاکی، آلودگی به سموم موجود در خاک یا

رخ دهد، تحت تاثیر قرار می گیرد.

اسپورگئون و هویکین (۳۱) گزارش کرده اند که گونه هایی از کرم خاکی که نسبت به کادمیوم، سرب، روی و مس حساس ترند، نسبت به گونه های مقاوم تر، غده کلسیمی آن ها که کار آن تشکیل پیوند با روی و سرب و سم زدایی آن هاست، ترشحات کمتری دارد. فوریه و همکاران (۹) گزارش کرده اند که اگر چه تجمع فلز به مقدار جذب آن وابسته است اما این دو را نباید با هم اشتباه گرفت. ممکن است که بسیاری از گونه ها کادمیوم جذب شده را بدون پیوند با آن دفع کنند، اما این دفع، احتمالاً بعد از بروز اثرات تخریبی کادمیوم رخ می دهد. گونه های دیگر ممکن است با کادمیومی که جذب کرده اند پیوند تشکیل دهند. بنابراین رابطه بین تجمع و اندازه بدن به احتمال زیاد کادمیوم وارد بدن کرم می شوند، ممکن است وارد اجزاء بیولوژیکی قابل دسترس شده و اثر سمی داشته باشند یا اینکه در اجزاء بیولوژیکی غیر قابل دسترس ذخیره شده و با تشکیل پیوند غیر فعال شوند (۱۷). بنابراین تنها بخشی از کادمیومی که وارد بدن می شود ممکن است اثر سمی نداشته باشد. به طوری که مورگان و مورگان (۲۲) بیان کردند که گونه های اندوجیک نسبت به گونه های انهسیک^۴ یا اپیجیک^۵، غلظت بیشتری کادمیوم در بدن خود انباشته می کنند.

بی مهرگان خاکزی حساسیت بیشتری به آلودگی فلزات سنگین دارند (۴). غلظت های بالای فلزات سنگین در خاک بر تراکم، تولید کوکون، رشد، زنده مانی و تکامل جنسی کرم های خاکی موثر است (۳۱). غلظت های بالای یک آلاینده می تواند به طریق مستقیم و غیر مستقیم بر رشد کرم های خاکی اثر گذار باشد. آلاینده ها می توانند از طریق مستقیم بر فیزیولوژی کرم های آلوده، یا تغییر تعادل انرژی و در نتیجه تلاش کرم برای جلوگیری از تجمع آلاینده در بافت های حساس خود اثر گذار باشند. در کرم های خاکی کادمیوم، سرب و قسمت عمده روی بوسیله پیوند یا گرانول کلراگوسیت^۱ یا پروتین های شبه متالوتینین^۲ در بافت های کلروژنوس^۳ (۲۰) سم زدایی می شوند. این افزایش تقاضا برای مصرف انرژی بیشتر، قطعاً نتیجه اش کاهش انرژی قابل دسترس برای رشد و تکامل کرم است (۵). مکانیسم های فوق علاوه بر رشد، در بلوغ جنسی و تولید کوکون توسط کرم نیز موثرند.

بنابر گزارش لیانگ و زو (۱۸) تغییر وزن نسبت به درصد زنده مانی، شاخص حساس تری در شناسایی اثرات سمی آلاینده در کرم های خاکی می باشد. از آنجایی که بیوماس منعکس کننده رشد جمعیت بوده و تعداد، بیانگر تکثیر و زنده مانی است می توان چنین نتیجه گرفت که رشد کرم های خاکی قبل از اینکه تکثیر و زنده مانی

منابع

- ۱- حق پرست تنها م.ج. ۱۳۷۲. خاکزیان و خاک های زراعی، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی رشت.
- ۲- علی احمایی م. و بهبهانی زاده ع.ا. ۱۳۷۲. شرح روش های تجزیه شیمیایی خاک، جلد اول، نشریه شماره ۸۹۳، موسسه تحقیقات خاک و آب.
- 3- Allen H.E. 1997. Standards for metal should not be based on total concentrations. SETAC-Europe news, 8: 7-9.
- 4- Bengtsson G., Gunnarsson T., and Rundgren S. 1986. Effects of metal pollution on the earth-worm *Dendrobaena rubida* (Sav.) in acidified soils. Water, Air and Soil Pollution, 28:361-383.
- 5- Donker M.H., Zonneveld C., and Van Straalen N.M. 1993. Early reproduction and reproductive allocation in metal adapted populations of the terrestrial isopod *Porellio scaber*. Oecologia, 96: 316-323.
- 6- Edwards C.A., and Bohlen P.J. 1996. Biology and Ecology of Earthworms. 3rd. Chapman & Hall, London.
- 7- EPA. 1996. Ecological Effects Test Guide lines. Earthworm subchronic toxicity test. United States Environmental Protection Agency.
- 8- Fisher R. F., and D. Binkley. 2000. Ecology and management of forest soils. New York: John Wiley and Sons. 489 p.
- 9- Fourie F., Reinecke S.A., and Reinecke A.J. 2007. The determination of earthworm species sensitivity differences to Cadmium genotoxicity using the comet assay, Ecotoxicology and Environmental Safety, 67:361-368.
- 10- Hartwig A. 1998. Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. Toxicology Letters, 102-103:235-239.
- 11- Homa J., Niklinska M., and Plytycz B. 2003. Effect of heavy metals on coelomocytes of the earthworm *Allolobophora chlorotica*. Pedobiologia, 47: 640-645.
- 12- Hopkin S.P. 1989. Ecophysiology of metals in invertebrates. Elsevier Applied Science, London.
- 13- IARC. 1994. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 58. Beryllium,

- 1- Chloragocytes
- 2- Metallothionein
- 3- Chloragogenous
- 4- Anecic
- 5- Epigeic

- Cadmium, Mercury, and exposures in the glass manufacturing industry.
- 14- Irwin R. J., Vanmouwerik M., Stevens L., Seese M. D., and Basham W. 1997. Environmental contaminants encyclopedia. National Parks Service, Water Resources Division, Fort Collins, Colorado. US government.
 - 15- Katz S. A., and Jennis S. W. 1983. Regulatory compliance monitoring by Atomic Absorption Spectroscopy. VCH, Weinheim/New York.
 - 16- Kiewiet A.T., Ma W.C. 1991. Effect of pH and calcium on lead and cadmium uptake by earthworms in water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 21: 32-37.
 - 17- Lanno R.P., Leblanc S.C., Knight B.L., Tymowski R., and Fitzgerald D.G. 1998. Application of body residues as a tool in the assessment of soil toxicity. In: *Advances in earthworm Ecotoxicology*, (Eds) Sheppard, S., Bembridge, J., Holmstrup, M. and Posthuma, L., SETAC Press, Pensacola, Fl.
 - 18- Liang J., and Zhou Q. 2003. Single and Binary-Combined Toxicity of Methamidophos, Acetochlor and Copper Acting on Earthworms *Eisenia Foelide* *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 71:1158-1166.
 - 19- Luoma S.N., and Rainbow P.S. 2005. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamic as a unifying concept. *Environmental Science and Technology*, 39: 1921-1931.
 - 20- Morgan A.J., and Morris B. 1982. The accumulation and intracellular compartmentation of cadmium, lead, zinc and calcium in two earthworm species (*Dendrobaena rubida* and *Lumbricus rubellus*) living in highly contaminated soil. *Histochemistry*, 75: 269-285.
 - 21- Morgan J.E., and Morgan A.J. 1992. Heavy metal concentrations in the tissues, ingesta and faeces of ecophysiologicaly different earthworm species. *Soil Biology and Biochemistry*, 24: 1691-1697.
 - 22- Morgan J.E., and Morgan A.J. 1993. Seasonal changes in the tissue metal (Cd, Zn and Pb) concentrations in two ecophysiologicaly dissimilar earthworm species- pollution monitoring implications. *Environmental Pollution*, 82: 1-7.
 - 23- OECD. 1984. Guideline for the testing of chemicals no. 207. Earthworm, acute toxicity tests. OECD-guideline for testing chemicals. Paris, France.
 - 24- Prinsloo M.W., Reinecke S.A., Przybylowicz W.J., Mesjasz-Przybylo wicz J., and Reinecke A.J. 1999. Micro-PIXE studies of Cd distribution in the nephridia of the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Nucl. Instrum. Methods B.*, 158:317-322.
 - 25- Reinecke A.J., and Reinecke S.A. 1996. The influence of heavy metals on the growth and reproduction of the compost worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Pedobiologia*, 40: 439-448.
 - 26- Reinecke A.J., and Reinecke S.A. 2004. Earthworms as test organisms in Ecotoxicological assessment of toxicant impacts on ecosystems. In: Edwards, C.A.(ed) *Earthworm ecology*. CRC, BocaRaton, FL, Pp 299- 320.
 - 27- Reinecke A.J. 1992. A review of ecotoxicological test methods using earthworms. In: Greig-Smith, P.W., Becker, H., Edwards, P.J., Heimbach, F. (Eds.), *Ecotoxicology of Earthworms*. Intercept, Hants, Pp.7-19.
 - 28- Renella G., Mench M., Land L., and Nannipieri P. 2005. Microbial activity and hydrolase synthesis in long-term Cd-contaminated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 133-139.
 - 29- Richardson M.L., and Gangollil S. 1993. *The Dictionary of Substances and their Effects*, vol.2C. Royal Society of Chemistry, London, UK.
 - 30- Siekierska E., and Urbanska-Jasik D. 2002. Cadmium effect on the ovarian structure in earthworm *Dendrobaena veneta* (Rosa). *Environmental Pollution*, 120: 289-297.
 - 31- Spurgeon D.J., and Hopkin S.P. 1995. Extrapolation of the laboratory- based OECD earthworm toxicity test to metal-contaminated field sites. *Ecotoxicology*, 4:190-205.
 - 32- Spurgeon D.J., Hopkin S.P., and Jones D.T. 1994. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): Assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial eco -systems. *Environmental Pollution*, 84:123-130.
 - 33- Vallee B.L., and Ulmer D. 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Annual Review of Biochemistry*, 41: 91-128.
 - 34- VanGestel C.A.M. 1992. The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms: a review. In: *Ecotoxicology of Earthworms*, Greig-Smith, P.W., Becker, H., Edwards, P.J., Heimbach, F. (Eds.) Intercept, Hants.
 - 35- Waisberg M., Joseph P., Hale B., and Beyersmann D. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology*, 192: 95-117.
 - 36- Water Research Commission of South Africa. 1997. Permissible utilization and disposal of sewage sludge. 1st edn.
 - 37- Weber R.E. 1978. Respiration. In: *Physiology of Annelids*, Mill, P. J.(ed). Academic Press. London.

Effect of Different Cadmium Concentrations on Growth of *Eisenia fetida* in a Calcareous Soil

R. Jenabi Haghparast^{1*}- A. Golchin²- E. Kahneh³

Received: 16-04-2011

Accepted: 27-01-2013

Abstract

Heavy metals are entered to the environment by mining and by applying sewage sludge and agricultural inputs to soils. These metals have detrimental effects on environment and soil organisms. An experiment was conducted to determine the cadmium affects on earthworms (*Eisenia fetida*) in a calcareous soil amended with 0 and 5% organic matter. The concentrations of Cd in soils were 0,10,20,40, 60 and 80 mg kg⁻¹ and growth parameters of the earthworms were measured with 15 day intervals over 75 days. Survival, growth and cocoon production of earthworms were determined. The results showed that addition of organic matter to soils reduced the toxic effects of cadmium to earthworms. In soils contaminated with Cd the weights of the earthworms decreased with increasing the concentrations of this metal and cadmium had the highest negative effects on cocoon production. The highest earthworm's mortality was recorded in soils contaminated with cadmium.

Keywords: Earthworm, *Eisenia fetida*, Cadmium, Survival, Cocoon, Organic matter

1-Former MSc Student of Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Znanjan University and MSc of Soil Science, Jehade Agriculture Organization of Guilan Province

(*- Corresponding Author Email: r.jenabi@yahoo.com)

2- Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Znanjan University

3- MSc of Soil Science Department, Agriculture and Natural Research Center of Guilan