نشریه دانش آب و خاک / جلد ۳۲ شماره ۳ صفحه‌های ۶۱ تا ۷۵/ سال ۱۴۰۱

مقاله پژوهشی

تأثیر کرم خاکی گونه *Eisenia fetida* در فراهمی زیستی خاک‌های آلوده به سرب در حضور ماده آلی

قاسم رحیمی[1*]، فیروزه نوروزی گلدره[2]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۱

۱- دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
۲- فارغ التحصیل کارشناس ارشد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: g.rahimi@basu.ac.ir

چکیده

در زمینه ارزیابی خطرات زیست محیطی، کرم‌های خاکی جزء مهمی از خاک هستند و از لحاظ اکولوژیکی به عنوان یک شاخص بیولوژیکی برای حفظ سلامت و کیفیت خاک درنظر گرفته می‌شوند. مطالعه حاضر با هدف کارایی کرم‌های خاکی *Eisenia fetida* در پالایش زیستی خاک‌های آلوده به سرب در حضور ماده‌ی آلی انجام شد. در این مطالعه ٦ نمونه خاک از عمق صفر تا ۱۵ سانتی متری در فواصل متفاوت اطراف معدن آهنگران و یک نمونه خاک (نمونه شاهد) از منطقه غیر آلوده جمع آوری شد. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با عامل اول نوع کودهای آلی (کود گاوی، پوره‌ی هویج، ورمی کمپوست و شاهد) و عامل دوم وجود یا عدم وجود کرم خاکی مورد بررسی قرار گرفت. دوازده عدد کرم خاکی با وزن بین ۰/۳ تا ۰/٦ گرم برای هر نمونه خاک (۳۰۰ گرم)، انتخاب شدند. کرم‌ها به مدت ٤۲ روز در معرض خاک‌های آلوده به سرب با غلظت ۱۳۳/۱۹ تا ۱۳۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم قرار گرفتند. در پایان آزمایش غلظت سرب در خاک و بدن کرم‌های خاکی اندازه گیری شد. بیشترین غلظت سرب در بافت کرم‌های خاکی، در نقاطی که نسبت به سایر نقاط نمونه‌برداری دارای بیشترین غلظت فلز مورد نظر، S2 و S3 (نقاط نمونه برداری دوم و سوم) بودند یافت شد. غلظت کم فلز سرب در خاک منجر به بالا بودن فاکتور تجمع زیستی فلزات برای کرم‌های خاکی می‌شود، بنابراین در این پژوهش مقدار فاکتور تجمع زیستی برای فلز سرب در نقطه‌ی S7 بر خلاف سایر نقاط، برای تمام تیمارها بیشتر از یک بدست آمد. افزایش معنی‌داری در بخش سرب تبادلی به میزان ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در تیمار کود گاوی بدون کرم خاکی نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد. کاربرد تیمارهای کود گاوی و ورمی کمپوست به ترتیب باعث کاهش معنی‌دار ٦۵٦ و ٦۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به نمونه‌ی شاهد (۲۳۵٤ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در بخش کربناته شد. همچنین افزایش معنی‌داری در بخش باقی‌مانده فلز سرب (به میزان ۸۵٦ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در حضور کرم خاکی مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: بخش بندی فلز، جذب سرب، فاکتور تجمع زیستی، *Eisenia fetida*

The Effect of *Eisenia fetida* Eearthworm on Bioavailability of Lead-Contaminated Soils in the Presence of Organic Matter

G. Rahimi*[1], F. Noruzi Goldareh[2]

Received: August 15, 2020 Accepted: March 1, 2021
1 Assoc. Prof., Soil Science Dept., Bou-Ali Sina University, Hamedan, Iran
2 M.Sc. Graduated, Soil Science Dept., Bou-Ali Sina University, Hamedan, Iran
*Corresponding Author, E-mail: g.rahimi@basu.ac.ir

Abstract

In assessing environmental hazards, earthworms are an important component of soil and are considered ecologically as a biological indicator for maintaining soil health and quality. The aim of this study was to evaluate the efficiency of *Eisenia fetida* earthworms in bioremediation of lead-contaminated soils in the presence of organic matter. In this study, 6 soil samples were collected from a depth of 0 to 15 cm at different distances around Ahangaran mine and a soil sample (control sample) was collected from a non-contaminated area. This experiment was investigated as a factorial experiment in a randomized complete block design with the first factor of organic fertilizers (bovine manure, carrot puree, vermicompost and control) and the second factor the presence or absence of earthworms. Twelve earthworms weighing between 0.3 and 0.6 g were selected for each soil sample (300 g). The worms were exposed to lead-contaminated soils with a concentration of 133.19 to 13250 mg kg^{-1} for 42 days. At the end of the experiment, the concentration of lead in the soil and body of earthworms was measured. The highest concentration of lead in earthworm tissue was found in the points that had the highest concentration of metal S2 and S3 (Second and third sampling points) compared to other sampling points. Low concentration of lead metal in soil leads to high bioaccumulation factor of metals for earthworms. In this study, the amount of bioaccumulation factor for lead metal at point S7, unlike other points, was more than one for all treatments. A significant increase in exchange lead (50 mg kg^{-1}) was observed in the treatment of manure without earthworm compared to other treatments. Application of cattle manure and vermicompost significantly reduced 656 and 680 mg kg^{-1}, respectively, compared to the control sample (2354 mg kg^{-1}) in the carbonate section. Also, a significant increase was observed in the residual lead metal (856 mg kg^{-1}) in the presence of earthworms.

Keywords: Bioaccumulation factor, *Eisenia fetida*, Fractionation of metals, Lead uptake

مقدمه

فلزات سنگین که در نقاط مختلف دنیا به شکل‌های گوناگون از لحاظ فیزیکی و شیمیایی و در عین حال در غلظت‌های مختلف به عنوان آلوده کننده محیط‌زیست وارد اکوسیستم می‌شوند تاکنون اثرات زیانباری را بوجود آورده‌اند. این فلزات سمی معمولا در فرایند ضایعات حاصل از استخراج معدن، آبکاری فلزات، تجهیزات تولید برق، دستگاه‌های الکترونیکی واحدهای تولیدی و دباغ خانه‌ها وجود دارند (وانگ ۲۰۰۹). صنعتی شدن جوامع بشر منجر به آزاد سازی مقادیر قابل توجهی از عناصر فلزی به زیست کره گردیده است (لست و همکاران ۱۹۸۸).در مناطق متعددی که تحت تاثیر فعالیت‌های معدن هستند همواره غلظت بالایی از عناصر سمی تولید می‌کنند که اثرات سوء بر اکوسیستم دارند (ویگلب و فلینکف

۲۰۰۱). بنابراین فعالیت معدن یکی از خطرناک‌ترین فعالیت‌های انسان در جهان (آدرینو ۱۹۸٦) و یکی از بزرگترین منابع آلودگی زیست محیطی ناشی از فلزات سنگین است که محیط زیست را در معرض خطر قرار می‌دهد. فلزات سنگین دارای ویژگی‌هایی نظیر: تجمع پذیری زیستی، سمیت بالا، ثبات شیمیایی، تجزیه پذیری ضعیف و نیز قابلیت انحلال زیاد در آب هستند که سبب آلودگی‌های وسیع در سطح خاک می‌شوند (سیزمور و هادسون ۲۰۰۹). فلزات سنگین به دلیل سمیت و ماندگاری آنها در محیط زیست تهدیدی جدی برای سلامت جامعه بحساب می‌آیند (لی و همکاران ۲۰۱٤). از جمله فلزات سنگین موجود در خاک می‌توان به سرب اشاره کرد، سرب فلزی است که بیشترین عوارض را بر روی سلامتی انسان دارد و بسیار سمی می‌باشد، اختلال بیوسنتز هموگلوبین و کم خونی، افزایش فشارخون، آسیب به کلیه، اختلال سیستم عصبی، آسیب به مغز، کاهش قدرت یادگیری و اختلالات رفتاری در کودکان از عوارض افزایش غلظت سرب در بدن است (برلین ۱۹۸۵). کرم های خاکی موجودات زنده خاک هستند که به طور معمول در مطالعات زیست محیطی و سمیت شناسی زیستی استفاده می‌شوند (دای و همکاران ۲۰۰٤؛ هابلن و همکاران ۲۰۰٦). این موجودات یکی از بهترین اجزای خاک می‌باشند که نقش اساسی در حفظ ساختمان خاک، توسعه‌ی خاک و اثرات کلیدی در فرایندهایی مانند تجزیه مواد آلی و مواد مغذی معدنی دارند (دای و همکاران ۲۰۰٤). این موجودات زنده خاک اطلاعات مهمی برای ارزیابی خطرات زیست محیطی را تامین می‌کنند و به دلیل ارتباط نسبتا مداوم بین غلظت برخی از آلوده کننده‌ها در بافت‌شان و در بخش‌های خاک یک شاخص مفید بیولوژیکی جهت ارزیابی آلودگی به حساب می‌آیند (لنو و همکاران ۲۰۰٤). استفاده از کرم‌های خاکی در پالایش زیستی خاک یک روش زیستی است، به طوری که غلظت آلاینده‌ها در خاک از طریق مکانیسم تجمع زیستی در بدن کرم‌های خاکی کاهش پیدا می‌کند (سایزوسکی و کلسی ۲۰۱۰). مطالعات آسمان و همکاران (۲۰۱۵)، نشان داد که ارتباط معنی داری بین میزان کاهش غلظت فلزات از خاک و تجمع این فلزات در بدن کرم خاکی وجود دارد. در مطالعه ای که توسط شاه منصوری و همکاران (۲۰۰۵) در خصوص تجمع زیستی فلزات سنگین در بدن کرم خاکی در طی فرآیند ورمی کمپوست صورت گرفت، مشخص گردید غلظت فلزات سنگین از جمله سرب با گذشت زمان در ورمی کمپوست کاهش و در بدن کرم خاکی افزایش یافته است.

حضور کرم‌های خاکی در محیط خاک می‌تواند قابلیت دسترسی زیستی آلاینده‌ها و فعالیت میکروبی را بهبود ببخشدکه منجر به تجزیه میکروبی بیشتر آلاینده‌های خاک می‌شود، همچنین از جمله مهم‌ترین موارد کاربرد این موجودات شامل تصفیه در مدیریت مواد زاید، به عنوان جاذب بیولوژیک در سمیت‌زدایی و پالایش خاک از فلزات سنگین و برخی از آفت کش‌های آلی، افزایش جمعیت و تقویت فعالیت‌های آنزیمی میکروارگانیسم‌های مفید خاک، بهبود کیفیت خاک و توسعه کشاورزی است (زالتوسکیت و سدین ۲۰۱۰؛ سان و همکاران ۲۰۱۱). کرم‌های خاکی به طور گسترده در فرآوری طیف وسیعی از ضایعات آلی مثل لجن فاضلاب، بقایای گیاهی، ضایعات صنعتی و کودهای حیوانی استفاده میشوند. مواد آلی پس از بلعیده شدن و عبور از دستگاه گوارش کرم‌ها دستخوش تغییرات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی زیادی می‌شوند، از جمله این تغییرات، افزایش قابلیت دسترسی فلزات می‌باشد (مارتین ۱۹۹۱). گزارش‌های زیادی مبنی بر تاثیر فعالیت کرم‌های خاکی بر تغییر توزیع فلزات در بخش‌های مختلف خاک وجود دارد (ما و همکاران ۲۰۰۲).

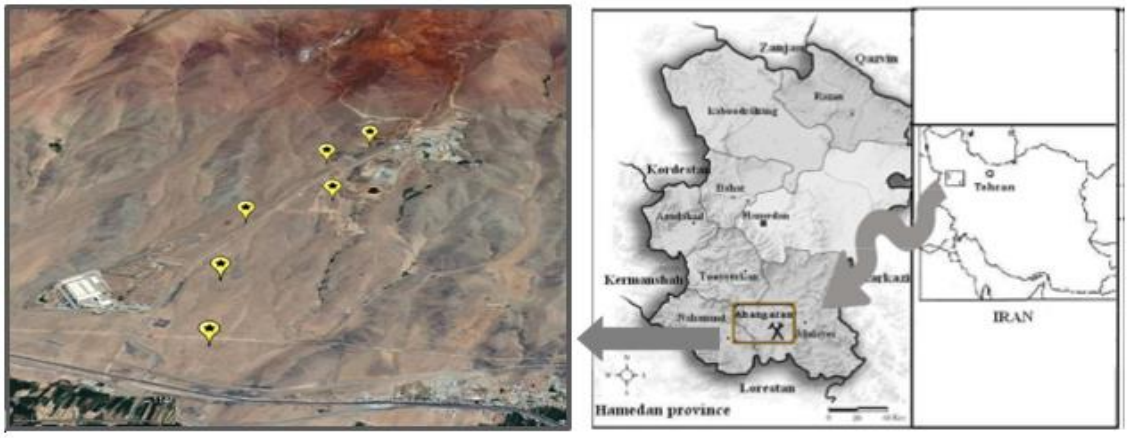
ون و همکاران (۲۰۰۶) افزایش بخش محلول، تبادلی و کربناته و کاهش در بخش مواد آلی را گزارش کردند. این نتایج توسط یودوک و لستن (۲۰۱۰) نیز گزارش شده است. چنگ و وانگ (۲۰۰۲) نیز طی مطالعه ای نشان دادند که روی پیوند شده با مواد آلی در اثر فعالیت کرم‌های خاکی به طور قابل توجهی افزایش یافت.

با توجه به اینکه امروزه یکی از مهم‌ترین مشکلات زیست محیطی در سراسر دنیا آلودگی خاک‌های مناطق صنعتی و معادن و به ویژه زمین‌های کشاورزی اطراف این معادن، به فلزات سنگین می‌باشد و به دلیل اینکه استفاده از کرم‌های خاکی روش بیولوژیکی مناسبی برای حذف این فلزات از محیط خاک بشمار می‌آید، این مطالعه به منظور تعیین کارایی کرم خاکی *Eisenia fetida* در پالایش زیستی خاک‌های کشاورزی آلوده اطراف معدن آهنگران و فراهمی زیستی سرب اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه

این تحقیق روی یک خاک آلوده طبیعی که از معدن سرب و روی آهنگران و زمین‌های اطراف آن نمونه برداری شده بود، انجام شد. معدن سرمک آهنگران در ۲۶ کیلومتری شهرستان ملایر، به سمت شهرستان اراک در استان همدان، به ترتیب با طول و عرض جغرافیایی "٤٤ '٥٩ °٤٨ و "٢٠ '١٠ °٣٤ واقع شده است (شکل ۱)، آب و هوای این منطقه معتدل مدیترانه‌ای است.



شکل۱- موقعیت منطقه مورد مطالعه.

نمونه‌برداری و اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک

برای پژوهش حاضر شش نمونه مرکب خاک از عمق صفر تا ۱۵ سانتیمتری از شش نقطه متفاوت از معدن در جهت شیب برداشت شد و یک نمونه خاک به عنوان نمونه شاهد (S7) از مناطق غیرآلوده (اطراف دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا) با طول و عرض جغرافیایی "٥٣.٨٥ '٢٨ °٤٨ و "٥٨.٨١ '٤٨ °٣٤ نیز جمع‌آوری شد. موقعیت قرارگیری نقاط به این صورت بود که نقطه S1 و S6، به ترتیب در نزدیک‌ترین و دورترین فاصله (یک کیلومتری معدن سرمک آهنگران در نزدیکی جاده) از معدن قرار گرفته بودند و سایر نقاط نمونه‌برداری S2، S3، S4 وS5 ما بین این دو نقطه قرار گرفتند. نمونه‌های خاک هوا خشک و از الک (<۲mm) عبور داده شدند. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک‌ها مانند هدایت

الکتریکی (EC) در عصاره اشباع (رادس ۱۹۹۶)، pH خاک با نسبت ۱:۵ خاک به آب (رینیک ۱۹۹۲)، کربن آلی خاک با روش والکلی- بلک (والکی و بلک ۱۹۳٤)، بافت خاک با روش هیدرومتری (بایاکاس۱۹٦۲) و ظرفیت تبادل کاتیونی (CEC) به روش استات آمونیوم (راول۱۹۹٤)، مورد بررسی قرار گرفت (جدول۲). اندازه‌گیری غلظت کل سرب در خاک به روش اسپوزیتو و همکاران (اسپوزیتو و همکاران ۱۹۸۲)، با هضم اسیدی خاک انجام شد. همچنین عصاره‌گیری فلز سنگین از بخش‌های مختلف خاک برای تعیین غلظت سرب در بخش‌های مختلف از روش عصاره‌گیری پی در پی لوند و همکاران (لوند و همکاران ۱۹۸۰)، استفاده شد. که مراحل انجام آن در جدول ۱ آورده شده است. بنابراین غلظت سرب در نمونه‌های به دست آمده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی مدل Varian 220 اندازه‌گیری شد (جدول۱).

جدول۱- عصاره‌گیرها و شرایط آزمایش برای تعیین سرب خاک به روش لوند.

شکل فلزات سنگین	مدت زمان تکان دادن	عصاره گیر
بخش تبادلی	۱٦ساعت (در دمای آزمایشگاه)	۲۵ میلی لیتر نیترات پتاسیم ۰/۵ مولار
بخش پیوند به مواد آلی	۱٦ساعت (در دمای آزمایشگاه)	۲۵ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۰/۵ مولار
بخش پیوند به کربنات	٦ ساعت (در دمای آزمایشگاه)	۲۵ میلی‌لیتر EDTA ۰/۰۵ مولار
بخش باقی‌مانده	۱٦ساعت (در دمای آزمایشگاه)	۲۵ میلی‌لیتر HNO_3 ٤ مولار

آماده سازی تیمارها و اجرای آزمایش

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی عبارت بودند از نوع کودهای آلی و وجود کرم خاکی (WE) یا عدم وجود کرم خاکی (NE). کودهای آلی شامل کود گاوی (T1)، پوره‌ی هویج (T2) و ورمی کمپوست (T3)، با نسبت ۵۰ درصد و یک نمونه شاهد (T0)، همراه با حضور یا عدم حضور کرم خاکی به ظروف حاوی ۳۰۰ گرم خاک مورد بررسی قرار داده شد. به منظور هوا دهی کرم‌های خاکی، چهار طرف ظرف‌ها با حفره کوچک سوراخ شد و برای جلوگیری از خروج کرم‌ها از داخل ظرف، از توری‌های ریزی استفاده شد. رطوبت نمونه‌ها توسط آب مقطر به رطوبت مورد نیاز (۷۰ درصد) برای زنده ماندن کرم خاکی رسانده شد. سپس نمونه‌های مورد آزمایش به مدت سه روز به منظور ایجاد تعادل بین رطوبت خاک و تیمارهای مورد استفاده در داخل انکوباتور در دمای ۲±۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند.

روش استفاده از کرم خاکی

کرم‌های خاکی مورد استفاده، ایزینیا فتیدا، از شرکت ورمی‌کمپوستینگ که تولید کننده و عرضه کننده کرم *Eisenia fetida* واقع در استان البرز می‌باشد، تهیه شد. همه کرم‌های خاکی به مدت دو ماه قبل از آزمایش در شرایط آزمایشگاهی در داخل انکوباتور کشت شدند (نانونا و همکاران ۲۰۱۱).

آماده جهت اندازه گیری سرب در بدن کرم خاکی سازی

سه روز بعد از ایجاد تعادل رطوبت بین مخلوط نمونه‌های خاک با هر یک از تیمارهای مورد استفاده، دوازده عدد کرم خاکی بالغ با میانگین وزن ۰/۳ تا ۰/٦ گرم انتخاب و با آب مقطر شسته شدند و سپس به مدت ٤۸ ساعت روی کاغذ صافی مرطوب در پلیت شیشه‌ای بدون هیچ مواد غذایی قرار داده شدند تا محتویات روده

آن‌ها تخلیه شود. برای جلوگیری از مدفوع خواری، کاغذ واتمن هر ۱۲ ساعت عوض می‌شد (آرنلد و هادسون ۲۰۰۷). پس از تخلیه‌ی روده، ۱۲ عدد کرم خاکی به هفت نمونه خاک مخلوط شده با تیمارها اضافه شد. پس از گذشت ٤٢ روز از شروع آزمایش، تمام کرم‌های خاکی باقی‌مانده برای آنالیز عنصر سرب برداشت شدند. کرم‌های خاکی زنده با آب مقطر شسته شدند و مجدداً پس از تخلیه‌ی روده، کرم‌های خاکی در دمای ٦٠ درجه سانتی‌گراد در آون به مدت یک شب کشته شدند (نهمنی و همکاران ۲۰۰۷). برای اندازه‌گیری سرب از روش هضم با اسید (لی و همکاران ۲۰۱٤) استفاده شد. در این روش ۰/۱ گرم وزن خشک پودر شده‌ی کرم‌های خاکی در داخل لوله‌های آزمایش ریخته شد و به هر یک از نمونه‌ها ۱۲/۵ میلی‌لیتر نیتریک اسید غلیظ (HNO_3) اضافه شد و به مدت هشت ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری قرار داده شد. پس از گذشت زمان یاد شده و سرد شدن نمونه‌ها، عصاره‌گیری شدند، سپس غلظت فلز سنگین سرب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی مدل ۲۲۰ اندازه‌گیری شد.

فاکتور تجمع زیستی (BAF)

در این مطالعه، فاکتور تجمع زیستی به منظور برآورد فراهمی زیستی سرب در گونه‌ی کرم خاکی مورد استفاده قرار گرفت؛ که از طریق نسبت غلظت فلز در کرم خاکی (میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک) به غلظت کل عنصر خاک (میلی‌گرم در کیلوگرم وزن خشک) محاسبه شد.

$$BAF = \frac{[metd]_{earthworm}}{[metd]_{soil}}$$

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه آماری داده‌ها برای خصوصیات اولیه‌ی خاک‌ها از طرح کامل تصادفی و تجزیه واریانس داده‌ها برای بررسی تاثیر تیمارها بر فراهمی زیستی سرب از فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی و مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام شد. برای رسم نمودارها از برنامه Excel، نرم افزار MS Office استفاده شد.

نتایج و بحث

خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و غلظت فلزات سنگین در خاک‌های مورد مطالعه

نتایج تجزیه خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و میانگین غلظت فلزات سنگین خاک‌های مورد مطالعه در جدول ۲ آورده شده است. بیشترین مقدار میانگین سرب در نقطه‌ی S2 که برابر ۱۳۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود یافت شد که نشان‌دهنده‌ی آلوده بودن این نقطه به فلز سرب است و کمترین مقدار میانگین آن در نقطه‌ی S6 برابر ٤٠٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم به دست آمد. اختلاف غیر معنی‌داری بین نقاط S1، S4، S5، S6 با نقطه‌ی غیر آلوده وجود داشت؛ اما مقدار میانگین سرب در نقاط S2،S4 با سایر نقاط معنی‌دار بود (جدول۲). بر اساس استاندارد اتحادیه اروپا (EU) حد مجاز بحرانی سرب در خاک ۳۰۰ میلیگرم بر کیلوگرم است (بی‌نام ۲۰۰٦). چن و همکاران (۲۰۰۳) نیز حد مجاز سرب در خاک را ٤٠٠ میلیگرم بر کیلوگرم تعیین نموده‌اند. براساس نتایج این پژوهش غلظت سرب در خاک‌ها (به جزS6 وS7) فراتر از حد بحرانی بودند. بیشترین و کمترین مقدار میانگین فلز روی به ترتیب در نقاط S3 (٥٥٦ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و S6 (۲۱۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم) یافت شد. غلظت فلز روی در نقطه‌ی S3 با نقطه‌ی S2 تفاوت معنی‌داری را نشان نداد در صورتی که تفاوت معنی‌داری در نقطه‌ی S3 با سایر نقاط

برای غلظت فلز روی دیده شد. اختلاف معنی‌داری بین تمام نقاط برای فلز کادمیوم با نقطه‌ی غیر آلوده وجود داشت و نقاط S3، S2 نسبت به سایر نقاط بالاترین مقدار فلز را دارا بودند.

تجمع سرب در بدن کرم خاکی

نتایج جدول تجزیه واریانس سرب در نقاط نمونه برداری در جدول۳ ارائه گردید. غلظت سرب انباشته شده در بافت کرم‌های خاکی (در سطح پنج درصد) معنی‌دار شد. کرم‌های خاکی به طور قابل توجهی توانسته‌اند سرب را از تمامی خاک‌های آلوده جذب کنند، بیشترین غلظت سرب در بافت کرم‌های خاکی *Eisenia fetida*، در نقاطی که نسبت به سایر نقاط نمونه‌برداری دارای بیشترین غلظت فلز مورد نظر (S2 و S3) بودند یافت شد (جدول٤). بیشترین غلظت سرب در بافت کرم‌های خاکی در تمام تیمارها در نقطهS2 یافت شد که این نقطه نسبت به سایر نقاط به این فلز آلوده‌تر بود. غلظت سرب در بافت کرم-های خاکی در تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت (p<۰/۰۱)، تفاوت در تیمارها به احتمال زیاد به علت اجزای عوامل مختلف، از جمله تحرک کرم‌های خاکی، ناهمگنی خاک و نوع تغذیه می‌باشد (نانونا و همکاران ۲۰۱۱).

بنابراین کرم‌های خاکی *Eisenia fetida* به طور قابل توجهی توانسته‌اند فلز سرب را از تمام خاک‌های آلوده جذب کنند که غلظت بالای سرب در کرم خاکی را می‌توان به تحرک بالای آن در خاک نسبت داد. در حالی که نانونا و همکاران (۲۰۱۱) غلظت کم سرب را در کرم خاکی گونه‌ی *Allolobophora rosea* و *Nicodrilus caliginosus* گزارش کردند که علت آن را تحرک کم سرب در خاک‌های آلوده دانستند.

فاکتور تجمع زیستی سرب در بدن کرم خاکی

یکی از روش‌های بررسی جذب فلزات توسط موجودات زنده، ارزیابی فراهمی زیستی فلزات در عصاره‌های خاک است که توسط فاکتور تجمع زیستی (BAF)، تعیین می-شود (نانونا و همکاران ۲۰۱۱). جدول٥ میانگین فاکتور تجمع زیستی فلز سرب کرم‌های خاکی را نشان می‌دهد. تفاوت آماری معنی‌داری (p <۰/۰۱) در مقدار فاکتور تجمع زیستی فلزات سنگین بین نقاط نمونه‌برداری در تمام تیمارها وجود داشت. حداقل تفاوت ایجادشده در درجه‌بندی فاکتور تجمع زیستی فلزات سنگین را می‌توان به نوع رژیم غذایی مورد استفاده شده در آزمایش و فراهمی زیستی فلزات سنگین در جزهای مختلف خاک نسبت داد (میگل ۲۰۱۲؛ لینگشیانگو ۲۰۱۰). فرض بر این است که مقادیر BAF بیشتر نشان‌دهنده‌ی سطح تجمع بافت بالاتر است . برای مقادیر سرب، فاکتور تجمع زیستی برای هر کود گاوی، پوره هویج، ورمی کمپوست و شاهد کمتر از یک بود به جز نقطه‌یS7، با توجه به اینکه غلظت کل سرب، نسبت به سایر نقاط پایین‌تر بود بیشترین میزان فاکتور تجمع زیستی را به خود اختصاص داد. چاپمن و همکاران (۱۹۹٦)، گزارش کردند که غلظت کم سرب در خاک منجر به بالا بودن فاکتور تجمع زیستی این فلز برای کرم‌های خاکی می‌شود که این گزارش‌ها با نتایج این مطالعه مطابقت داشت. بنابراین توانایی کرم‌های خاکی برای جمع آوری فلز سرب، بستگی به فلز موجود برای جذب دارد. فاکتورهای زیستی فلزات سنگین ممکن است در رابطه با مقدار فلز خاک و گونه‌ی کرم خاک در طیف گسترده (از بیش از ۱۰ تا کمتر از۰.۱) متفاوت باشد (لینگشیانگو۲۰۱۰)

اثر کرم خاکی بر فراهمی زیستی سرب

فلزات سنگین در خاک به چهار بخش شامل بخش محلول و تبادلی، بخش متصل به مواد آلی، بخش متصل به کربناته و بخش باقی‌مانده تقسیم بندی می‌شوند. قابلیت جذب و فراهمی هر یک از این بخش‌ها متفاوت بوده و فراهمی زیستی فلزات سنگین در خاک نه تنها به میزان حلالیت آنها، بلکه به سرعت تبدیل بخش‌های مختلف فلزات

جدول۲ - خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و میانگین (± اشتباه معیار) غلظت سرب، روی و کادمیوم (میلی‌گرم بر کیلوگرم) خاک نمونه‌برداری شده از نقاط مختلف.

نقاط نمونه- برداری	pH	هدایت الکتریکی ($dS\ m^{-1}$)	کربن آلی(%)	ظرفیت تبادل کاتیونی ($cmolc\ kg^{-1}$)	سرب ($mg\ kg^{-1}$)	روی	کادمیوم	رس(%)	سیلت(%)	شن(%)	بافت
S1	۸/۲۳^{ab}	۰/۲۰^{a}	۰/۰٤^{d}	۱۷/۳^{d}	۵۱٦/۲۵ ±۵۱/ ۱^{d}	٤٤۲±۵۳/۸^{b}	۳/۹۲۵±۰/۰٦^{c}	۱٤/۸	۳۱/٤	۵۳/۸	لوم شنی
S2	۸/۰۹^{ab}	۰/۱٤^{b}	۰/۹۷^{b}	۲۸/۷^{a}	۱۳۲۵۰±۹۵۳^{a}	۵۱۹±۳۳/۷^{ab}	٤/۹۸۵±۰/۱۵^{b}	۳۰/۸	۳٦	۳۳/۲	لوم رسی
S3	۸/۵۰^{a}	۰/۲۰^{a}	۲/۲٦^{a}	۲۹/۸^{a}	۸۱۹۳/۷۵±۱۸٦^{b}	۵۹٦±۳۲/۷^{a}	٦/٦۵۸±۰/۰۳^{a}	۲٦/۸	۳۲	٤۱/۲	لوم رسی
S4	۸/۲۵^{ab}	۰/۱۱^{c}	۰/٦۸^{c}	۲۲/۹^{c}	٦۱۸/ ۷۵±۱۸/ ۸^{d}	۲۸٦±٦/۹^{c}	۲/۲٤۸±۰/۰۱^{d}	۳٦/۸	۳٦	۲۷/۲	لوم رسی
S5	۸/۱۵^{ab}	۰/۱۱^{c}	۰/۵٦^{c}	۳۰/۳^{a}	۱۷۲۵±۰/۰۸ ^{c}	۲۳۲±۱۰/٤^{c}	۲/۳٦۸±۰/۰۸^{d}	۲۳/۸	۲۹/٤	٤۳/۸	لوم
S6	۸/۲۳^{ab}	۰/۱۱^{c}	۰/٦٦^{c}	۲۹/٤^{a}	٤۰۰±۷۳/٦^{d}	۲۱۷± ۸/۷^{c}	۱/۸۷۵±۰/۰۳^{e}	٤۲/۲	۳٦/٦	۲۱/۲	رس
S7	۸/۸۵^{b}	۰/۱۳^{b}	۰/۸۵^{c}	۲٦ /٤^{b}	۱۳۳/۱۹±٦۰/۹^{e}	۱۵/٤۵±۰/۵^{d}	۱/۱۵۹±۰/۰۳^{f}	۲٤/۸	۲۰	۵۵/۲	لوم رسی شنی

حروف مختلف در هر ستون حاکی از تفاوت معنی داری بین نقاط نمونه برداری با استفاده از تحلیل مقایسه‌ای دانکن ($p<۰/۰۱$) است.

جدول۳- تجزیه واریانس غلظت سرب در بافت کرم‌های خاکی پس از ۴۲ روز قرار گرفتن در معرض خاک آلوده.

منبع تغییرات	مقادیر f	درجه‌ی آزادی	میانگین مربعات
نقاط نمونه برداری (S)	٦٤/٨٥	٦	۱۹۳۲۸۹**
تیمارها (T)	۱۰/۱۵	۳	۳۰۲۵٤**
S×T	۱۰/۷۱	۱۳	۳۱۱۹۳**
خطا	–	٦٨	۱۸۲۰٦۲۰

** نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشد.

جدول۴- میانگین غلظت کل سرب (میلی‌گرم بر کیلوگرم) در بافت کرم‌های خاکی پس از ۴۲ روز قرار گرفتن در معرض خاک آلوده.

تیمارها	نقاط نمونه برداری						
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
کود گاوی	۱۸۷/ ۱^{b}	۲۸٦/۲ ^{a}	۲۷۸/۲^{a}	۲۰٤/ ۲^{b}	۱۹۹/۹^{b}	۲۰٤/۲^{b}	۲۰۵/۸^{b}
پوره هویج(*)	_	٦۱۵/۸^{a}	۳۲۹/۲^{b}	۱٤۹/۲^{d}	۱۹۸/۸^{c}	۱۹۲/۹^{c}	۱۸۲/۹^{cd}
ورمی کمپوست(*)	_	_	۲٦۷/۵^{a}	_	_	۲۰۷/۵^{b}	۱۹۰/۰^{b}
شاهد	۱۹۸/۱^{c}	۸٤۱/۲^{a}	۳۹۱/۲^{b}	۲۱۵/۲^{c}	۱۸۱/۲^{c}	۱۹۹/٤^{c}	۱۸۲/۵^{c}

حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده‌ی وجود تفاوت معنی‌دار بین نقاط نمونه‌برداری در هر تیمار با استفاده از آنالیز مقایسه میانگین دانکن (P< ۰/۰۵) می‌باشد. (*) به دلیل عدم مشاهده‌ی کرم خاکی در بعضی از نقاط نمونه برداری در تیمار پوره‌ی هویج (S1) و ورمی کمپوست (S1، S2، S4، S5)، این نقاط فاقد عدد بودند.

جدول۵ - میانگین فاکتور تجمع زیستی غلظت کل سرب (میلی‌گرم بر کیلوگرم) در بافت کرم‌های خاکی پس از ۴۲ روز قرار گرفتن در معرض خاک آلوده.

تیمارها	نقاط نمونه برداری						
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
کود گاوی	۳٦۲/۰^{c}	۰/۰۲۱^{g}	۰/۰۳٤^{f}	۰/۳۳^{d}	۰/۱۱٦^{e}	۰/۵۱۰^{b}	۱/۵٤^{a}
پوره هویج(*)	_	۰/٤۸۲^{b}	۰/۲٤۱^{c}	۰/۱۳۷^{d}	۰/۰٤٦^{e}	۰/۰٤۲^{f}	۱/۳۷^{a}
ورمی کمپوست(*)	_	_	۰/۳۳^{c}	_	_	۰/۵۱۸^{b}	۱/٤۲^{a}
شاهد	۰/۳۸^{b}	۰/۰٦^{c}	۰/۰۵^{c}	۰/۳٤^{b}	۰/۲۹^{b}	۰/۱۱^{c}	۱/۳۷^{a}

حروف کوچک متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده‌ی وجود تفاوت معنی‌دار بین نقاط نمونه‌برداری در هر تیمار با استفاده از آنالیز مقایسه میانگین دانکن (P< ۰/۰۵) می‌باشد. (*) به دلیل عدم مشاهده‌ی کرم خاکی در بعضی از نقاط نمونه برداری در تیمار پوره‌ی هویج (S1) و ورمی کمپوست (S1، S2، S4، S5)، این نقاط فاقد عدد بودند.

جدول۶ - نتایج تجزیه واریانس اثر کود آلی و کرم خاکی بر روی بخش‌بندی فلز سرب.

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		بخش تبادلی	بخش آلی	بخش کربناته	بخش باقی‌مانده
کودآلی (O)	۳	۸۷۹/۳۷*	۷۱۴۳/۴۹^{ns}	۲۷۴۶۳۸۹۱*	۸۶۱۰۹۳*
کرم خاکی (E)	۱	۱۶۷۸/۱۹*	۱۲۶/۲۲^{ns}	۳۲۹۹۳۰۵۵^{ns}	۱۰۶۱۰۹*
O×E	۳	۹۲۱۴/۳۴**	۴۴۰۶۹/۰۴**	۵۲۴۷۶۴۲^{ns}	۵۵۷۸۶۷^{ns}
خطا	۱۰۸	۸۲	۷۷۴۲	۵۹۱۸۳	۱۶۳۸۶

^{ns} ،* ، ** به ترتیب نشان‌دهنده معنی‌دار نبودن و معنی‌دار بودن در سطح ۵ درصد می‌باشد.

به شکل محلول بستگی دارد. بخش محلول و تبادلی، بخش قابل استفاده زیستی هر فلز می‌باشد، در حالی که بخش کربناته، بخش غیر متحرک و غیر قابل جذب می‌باشد. فلزهای متصل به بخش آلی می‌تواند با ریخت‌های مواد آلی از طریق فرآیندهای کمپلکس شدن و تجمع زیستی همراه باشند و با تجزیه مواد آلی آزاد شوند، بنابراین تحرک بالایی دارند. بخش باقی‌مانده، بخشی از فلزها هستند که به شکل پیوندهای محکم اکسیدی، رسوب و کمپلکس‌های قوی به صورت نسبتاً پایدار هستند و در شرایط گوناگون تغییرات قابل چشمگیری پیدا نمی‌کنند این بخش غیر متحرک بوده و غیر قابل جذب می‌باشد (فنگ پنگ و همکاران ۲۰۰۹؛ فنگ و همکاران ۲۰۱۲).

نتیجه تجزیه واریانس تاثیر کود آلی بر بخش‌بندی سرب (جدول٦) نشان داد که به علت استفاده از کودهای آلی، بخش‌های تبادلی، کربناته و باقی‌مانده تغییر کرد. کرم خاکی تأثیر معنی‌داری در سطح ۵ درصد بر بخش‌بندی سرب در بخش تبادلی و باقی‌مانده داشت. همچنین برهمکنش دوجانبه کود آلی و کرم خاکی تأثیر چندانی در بخش کربناته و باقی‌مانده نداشتند در صورتی که این برهمکنش در بخش تبادلی و آلی در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد؛ بنابراین برای مقایسه میانگین سرب در بخش تبادلی و آلی تنها برهمکنش دوطرفه مورد بررسی قرار گرفت. تحرک بالقوه فلزات سنگین در خاک می‌شود (لیپوت و شوونو ۲۰۰۷).

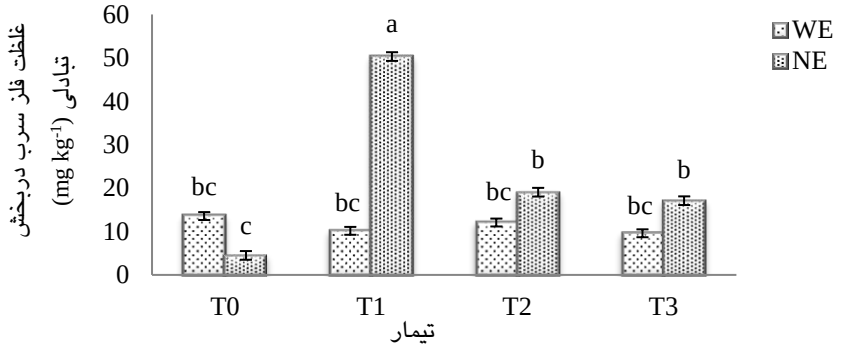
بخش تبادلی فلز سرب

غلظت فلز سرب در بخش تبادلی در تیمار شاهد تلقیح شده با کرم خاکی نسبت به شاهد بدون کرم خاکی افزایش یافت هرچند این افزایش معنی‌دار نبود؛ که علت آن را می‌تواند افزایش کربن آلی و در نتیجه افزایش در بخش تبادلی در اثر فعالیت کرم خاکی در نمونه تلقیح شده دانست (شکل۲). افزایش قابل توجهی در سطح ۵ درصد در تیمار کود گاوی بدون تلقیح شده با کرم خاکی در مقدار سرب تبادلی مشاهده شد. سطح بالای کود گاوی، به طور قابل توجهی می‌تواند زیست توده‌ی میکروارگانیسم‌های خاک را افزایش دهد که این منجر به معدنی شدن مواد آلی می‌شود، در نتیجه باعث افزایش

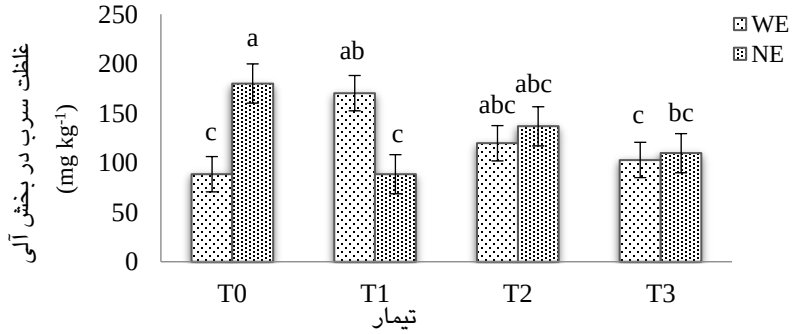
بخش آلی فلز سرب

کاهش چشمگیری (در سطح ۵ درصد) در سرب پیوند یافته به ماده‌ی آلی در تیمار شاهد تلقیح شده با کرم خاکی نسبت به تیمار شاهد بدون کرم خاکی مشاهده شد. در نمونه‌ی شاهد بدون کرم خاکی فلز سرب در

بخش آلی وجود دارد، بنابراین فلز سرب می‌تواند به طور بالقوه برای موجودات زنده قابل دسترس باشد بنابراین در تیمار شاهد تلقیح شده با کرم خاکی احتمال می‌رود که کرم خاکی باعث جذب سرب و کاهش آن در بخش آلی شده باشد (شکل۳).



شکل۲- اثر متقابل کود آلی و کرم خاکی بر فلز سرب در بخش تبادلی خاک. T0، T1، T2، T3 به ترتیب نشان‌دهنده تیمار شاهد، تیمار کود گاوی، تیمار پوره هویج، تیمار ورمی کمپوست و WE، NE به ترتیب نشان‌دهنده تیمار دارای کرم خاکی و بدون کرم خاکی می‌باشد. حروف مشابه بر روی هر یک ستون‌ها نشان‌دهنده‌ی عدم تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد آزمون دانکن می‌باشد. خطوط عمودی بر روی هر ستون نشان‌دهنده‌ی انحراف استاندارد داده‌ها است.

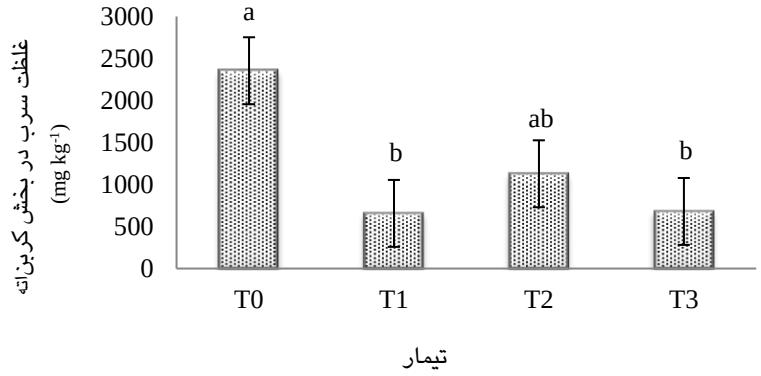


شکل 3- اثر متقابل کود آلی و کرم خاکی بر فلز سرب در بخش آلی خاک. T0، T1، T2، T3 به ترتیب نشان‌دهنده تیمار شاهد، تیمار کود گاوی، تیمار پوره هویج، تیمار ورمی کمپوست و WE، NE به ترتیب نشان‌دهنده تیمار دارای کرم خاکی و بدون کرم خاکی می‌باشد. حروف مشابه بر روی هر یک ستون‌ها نشان‌دهنده‌ی عدم تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد آزمون دانکن می‌باشد. خطوط عمودی بر روی هر ستون نشان‌دهنده انحراف استاندارد داده‌ها است.

بخش کربناته فلز سرب

میانگین بخش کربناته سرب نشان داد که تیمار ورمی کمپوست و کود گاوی باعث کاهش معنی‌دار در سطح ۵ درصد آماری غلظت سرب در بخش کربناته نسبت به نمونه‌ی شاهد شد (شکل٤). عباسپور و گلچین

(۲۰۱۱)، گزارش کردند که کاربرد ورمی کمپوست باعث افزایش غلظت سرب در بخش کربناته و آلی می‌شود که با نتایج ما مطابقت ندارد. به طورکلی، خواص شیمیایی و فیزیکی مختلف ورمی کمپوست شامل pH، ظرفیت تبادل کاتیونی، هدایت الکتریکی، قدرت یونی، ظرفیت جذب عناصر از اجزای معدنی و آلی به طور مستقیم و یا غیرمستقیم، قابل دسترس بودن فلزات خاک را تحت تأثیر قرار می‌دهد (باشتا و همکاران ۲۰۰۱؛ بلن و همکاران ۲۰۰۳).

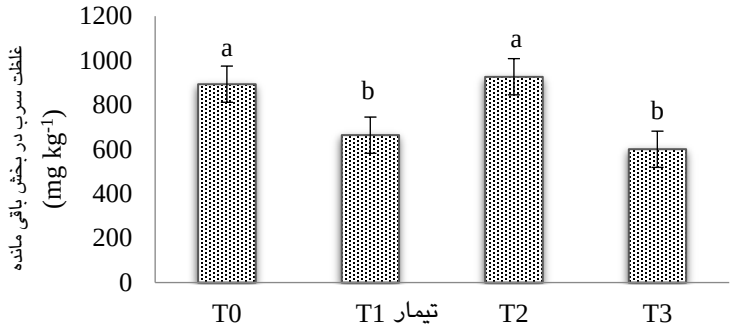


شکل۴- اثر کود آلی بر فلز سرب در بخش کربناته خاک. T0، T1، T2، T3 به ترتیب نشان‌دهنده تیمار شاهد، تیمار کود گاوی، تیمار پوره هویج و تیمار ورمی کمپوست می‌باشد. حروف مشابه بر روی هر یک ستون‌ها نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد آزمون دانکن می‌باشد. خطوط عمودی بر روی هر ستون نشان‌دهنده انحراف استاندارد داده‌ها است.

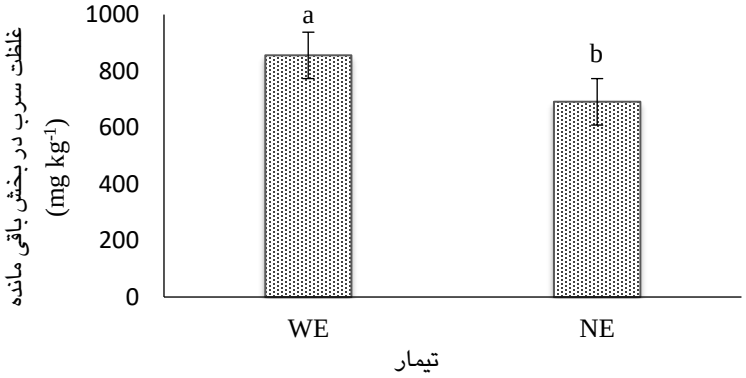
بخش باقی‌مانده فلز سرب

شکل ۵ و ٦، به ترتیب اثر کودهای آلی و کرم خاکی بر بخش بندی فلز سرب در بخش باقی مانده را نشان می‌دهد. کود گاوی (T1) و ورمی کمپوست (T3) سبب کاهش معنی دار فلز سرب در بخش باقی مانده نسبت به شاهد (T0) و پوره هویج (T2) شد (شکل۵). والکر و همکاران (۲۰۰۳)، در تحقیقی که تاثیر کود گاوی را بر توزیع مس بررسی کردند به این نتیجه رسیدند که افزایش کود گاوی باعث افزایش مس در بخش متصل به اکسید آهن-منگنز و بخش متصل به ماده آلی گردید و کاهش بخش باقیمانده فلز مس شده است که با نتایج حاصل از بخش باقی مانده فلز سرب در این مطالعه مطابقت داشت. در مطالعه حاضر بخش باقی مانده‌ی فلز سرب در حضور کرم خاکی افزایش پیدا کرد (شکل٦)؛ در صورتی که ون و همکاران (۲۰۰٤)، افزایش فلز کادمیوم در بخش باقی مانده را در حضور کرم خاکی *Eisenia fetida* گزارش کرد. در مقابل حضور کرم خاکی گونه‌ی *Lumbricus terrestris* باعث افزایش فلزات مس و روی در بخش باقی مانده با استفاده از روش عصاره گیری پی در پی BCR[1] گردید (زالتوسکیت و سدین ۲۰۱۱). این نتایج متناقض میتواند به دلیل تفاوت در ویژگی‌های خاک، حالت آلودگی، روش عصاره گیری متوالی، نوع فلز و حتی تفاوت فیزیولوژیکی و زیست محیطی در میان گونه‌های کرم خاکی دانست (آقابابایی و همکاران ۲۰۱۱).

[۱] Community Bureau of Reference



شکل ۵- اثر کود آلی بر فلز سرب در بخش باقی مانده خاک. T0، T1، T2، T3 به ترتیب نشان‌دهنده تیمار شاهد، تیمار کود گاوی، تیمار پوره هویج و تیمار ورمی کمپوست می‌باشد. حروف مشابه بر روی هر یک ستون‌ها نشان‌دهندهی عدم تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد آزمون دانکن می‌باشد. خطوط عمودی بر روی هر ستون نشان‌دهنده انحراف استاندارد داده‌ها است.



شکل۶- اثر کرم خاکی بر فلز سرب در بخش باقی مانده خاک. WE، NE به ترتیب نشان‌دهنده تیمار دارای کرم خاکی و بدون کرم خاکی می‌باشد. حروف مشابه بر روی هر یک ستون‌ها نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد آزمون دانکن می‌باشد. خطوط عمودی بر روی هر ستون نشان‌دهنده انحراف استاندارد داده‌ها است.

نتیجه گیری کلی

بیشترین غلظت سرب در بافت کرم‌های خاکی، در نقاطی که نسبت به سایر نقاط نمونه‌برداری دارای بیشترین غلظت فلز مورد نظر بودند یافت شد. کرم‌های خاکی دارای ظرفیت‌های متفاوت برای جذب و تجمع سرب دارند، که این رفتار کرم‌های خاکی حاصل از نوع رژیم غذایی می‌باشد. از آنجایی که غلظت کم فلز سنگین در خاک منجر به بالا بودن فاکتور تجمع زیستی فلزات برای کرم‌های خاکی می‌شود مقدار فاکتور تجمع زیستی برای فلز سرب در نقطه‌ی شاهد بیشتر از یک بدست آمد که مشابه با مطالعات قبلی بود. افزایش معنی‌داری در بخش سرب تبادلی به میزان ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در تیمار کود گاوی بدون کرم خاکی نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد. سطح بالای کود گاوی، به طور قابل توجهی می‌تواند زیست توده‌ی میکروارگانیسم‌های خاک را افزایش دهد که این منجر به معدنی شدن مواد آلی می‌شود، در نتیجه باعث افزایش تحرک بالقوه فلزات سنگین در خاک می‌شود. کاربرد تیمارهای کود گاوی و ورمی کمپوست به ترتیب باعث کاهش معنی‌دار ٦٥٦ و ٦٨٠ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به نمونه‌ی شاهد (٢٣٥٤ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در بخش کربناته شد. . خصوصیات شیمیایی و فیزیکی ورمی کمپوست شامل pH، ظرفیت تبادل کاتیونی، هدایت الکتریکی، قدرت یونی، ظرفیت جذب عناصر از اجزای معدنی و آلی به طور مستقیم و یا غیرمستقیم، می‌تواند قابل دسترس بودن فلز سرب را تحت تاثیر قرار دهد همچنین افزایش معنی‌داری در بخش باقی‌مانده فلز سرب (به میزان ٨٥٦ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در حضور کرم خاکی مشاهده شد.

منابع مورد استفاده

Abbaspour A and Golchin A, 2011. Immobilization of heavy metals in a contaminated soil in Iran using di-ammonium phosphate, vermicompost and zeolite. Environmental Earth Sciences 63: 935-943.

Adriano D, 1986. Heavy Metals in the Environment. Springer-Verlag. New York.

Aghababaei F, Raiesi F and Hosseinpur A, 2014. The combined effects of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi on microbial biomass and enzyme activities in a calcareous soil spiked with cadmium. Applied Soil Ecology 75: 33-42.

Arnold R and Hodson M, 2007. Effect of time and mode of depuration on tissue copper concentrations of the earthworms *Eisenia andrei*, *Lumbricus rubellus* and *Lumbricus terrestris*. Environmental Pollution. 148:21-30.

Aseman E, Mostafaei G, Sayaf H, Asgharnia H, Akbari H and Iranshahi L, 2015. Investigation of bioremediation of soils contaminated with chromium and cadmium by earthworms *Eisenia fetida*. Health and the Environment. 8:357-366 (In Persian with English abstract).

Basta N, Gradwohl R, Snethen K and Schroder J, 2001. Chemical immobilization of lead, zinc, and cadmium in smelter-contaminated soils using biosolids and rock phosphate. Journal of Environmental Quality. 30: 1222-1230.

Basta NT, Gradwohl R, Snethen KL and Schroder JL, 2001. Chemical immobilization of lead, zinc, and cadmium in smelter-contaminated soils using biosolids and rock phosphate. Journal of Environmental Quality, 30(4), 1222-1230.

Bauycos G. J, 1962. Hydrometer methods improved for making particle size of soils. Agronomy Journal 56: 464-465.

Berlin M, 1985. Handbook of the Toxicology of Metals. Elsevier Science Publishers, 2nd ed. London.

Bolan NS, Adriano D, Mani P and Duraisamy A, 2003. Immobilization and phytoavailability of cadmium in variable charge soils. Effect of lime addition. Plant and Soil. 251: 187-198.

Chapman P M, Allen H E, Godtfredsen K and Z'Graggen MN, 1996. Evaluation of Bioaccumulation Factors in Regulating Metals. Environmental Science &Technology. 30: 448A-452A.

Chen M, Ma LQ, Cao RX, Melamed R and Singh SP, 2003. Field demonstration of in situ immobilization of soil Pb using Pamendments. Journal of Advances in Environmental Health Research 8: 93-102.

Cheng J and Wong MH, 2002. Effects of earthworms on Zn fractionation in soils. Biology and Fertility of Soils 36:72–78.

Dai J, Becquer T, Rouiller JH, Reversat G, Bernhard-Reversat F, Nahmani J and Lavelle P. 2004. Heavy metal accumulation by two earthworm species and its relationship to total and DTPA-extractable metals in soils. Soil Biology and Biochemistry. 36: 91-98.

Feng Peng F, Hui Song Y, Yuan P, Cui X and Qiu G, 2009. The remediation of heavy metals contaminated sediment. Journal of Hazardous Materials. 161: 633–640.

Feng W, Banner JL, Guilfoyle AL, Musgrove M and James EW, 2012. Oxygen isotopic fractionation between drip water and speleothem calcite: A 10-year monitoring study, central Texas, USA. Chemical Geology 304–305: 53-67.

Hobbelen P, Koolhaas J and Van Gestel C, 2006. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* in relation to total and available metal concentrations in field soils. Journal of Environmental Pollution. 144: 639-646.

Lanno R, Wells J, Conder J, Bradham K and Basta N, 2004. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. Ecotoxicology and Environmental Safety. 57: 39-47.

Lasat MM, Baker AJM and Kochian LV, 1998. Altered Zn compartmentation in the root symplasm and stimulated Zn absorbtion into the leaf as mechanisms involved in Zn hyperaccumulation in thlaspi caerulescens. Plant Physiology 112:1715-1722

Li Z, Ma Z, van der Kuijp T J, Yuan Z and Huang L, 2014. A review of soil heavy metal pollution from mines in China: pollution and health risk assessment. Science of the Total Environment 468: 843-853.

Lingxiangyu L, Zhenlan X, Jianyang W and Guangming T, 2010. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworm Eisenia fetida in relation to bioavailable metal concentrations in pig manure. Bioresource Technology 101: 3430–3436.

Lipoth SL and Schoenau JJ, 2007. Copper, zinc, and cadmium accumulation in two prairie soils and crops as influenced by repeated applications of manure. Plant Nutrition and Soil Science 170: 378–386.

Lund LJ, Page A L and Sposito G, 1980. Determination and prediction of chemical forms of trace matal in sewage sluges and sluge-amended soils. Final technical report, Grant no. R804516010, USEPA,Cincinnati, Ohio.

Ma Y, Dickinson NM and Wong MH, 2002. Toxicity of Pb/Zn mine tailings to the earthworm Pheretima and effects of burrowing on metal availability. Biology and Fertility of Soils 36: 79-86.

Martin A, 1991. Short and long term effects of the endogenic earthworms *Millsonia anomala* of tropical savannas, on soil organic matter. Biology and Fertility of Soils 11: 234-238.

Nahmani J, Hodson ME and Black S, 2007. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. Juornal of Environmental Pollution. 145: 402-424.

Nannoni F, Protano G and Riccobono F, 2011. Fractionation and geochemical mobility of heavy elements in soils of a mining area in northern Kosovo. Geoderma 161:63-73.

Nannoni F, Protano G and Riccobono F, 2011. Uptake and bioaccumulation of heavy elements by two earthworm species from a smelter contaminated area in northern Kosovo. Soil Biology and Biochemistry. 43(12): 2359-2367.

Reinecke AJ, 1992. A review of ecotoxicological test methods using earthworms. Pp.7–19, In: Greig-Smith PW, Becker H, Edwards PJ and Heimbach F, (Eds.), Ecotoxicology of Earthworms. Intercept, Hants.

Roades JD, 1996. Salinity: electrical conductivity and and total dissolved solids. Pp.417-436, Method of Soil Analysis, Part 2, Chemical Methods, Madison, Wisconsin, USA.

Rowell DL, 1994. Soil ScienceMethods and Application. Part7, P.146, Mesurement of the Composition of Soil Solution.

Shahmansouri M, Pourmoghadas H, Parvaresh A and Alidadi H, 2005. Heavy metals bioaccumulation by Iranian and Australian earthworms (*Eisenia fetida*) in the sewage sludge vermicomposting. Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering, 2(1): 28-32 (in Persian with English abstract).

Sizmur T and Hodson ME, 2009. Do earthworms impact metal mobility and availability in soil?–A review. Environmental Pollution 157(7):1981-89.

Slizovskiy IB and Kelsey JW. 2010. Soil sterilization affects aging-related sequestration and bioavailability of p, p′-DDE and anthracene to earthworms. Environmental Pollution 158(10):3285-89.

Sposito G, Lund LJ and Chang AC, 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. Journal of Soil Science Society of America. 46: 260-264.

Sun H, Li J, Wang C, Wang L and Wang Y, 2011. Enhanced microbial removal of pyrene in soils in the presence of earthworms. Soil and Sediment Contamination 20(6):617-30.

Udovic M and Lestan D, 2010. Fractionation and bioavailability of Cu in soil remediated by EDTA leaching and processed by earthworms (*Lumbricus terrestris* L.). Environmental Science and Pollution Research. 17: 561-570.

Walker DJ, Clemente R and Bernal MP, 2004. Contrasting effects of manure and compost on soil pH, heavy metal availability and growth of *Chenopodium album* L. in a soil contaminated by pyritic mine waste. Chemosphere 57(3): 215-224.

Walkey A and Black IA, 1934. An Examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. Journal of Soil Science 37:29–38.

Wang XS, 2009. Antimony in urban roadside surface soils: concentration, sourceand mode of occurrence. Journal of Open Environmental Pollution & Toxicology 1: 89–92.

Wen B, Hu XY, Liu Y, Wang WS, Feng MH and Shan XQ, 2004. The role of earthworms (*Eisenia fetida*) in influencing bioavailability of heavy metals in soils. Biology and Fertility of Soils 40: 181-187.

Wen B, Liu Y, Hu X and Shan X, 2006. Effect of earthworms (*Eisenia fetida*) on the fractionation and bioavailability of rare earth elements in nine Chinese soils. Chemosphere 63: 1179-1186.

Wiegleb G and Felinks B, 2001. Predictability of early stages of primary succession in post-mining landscapes of Lower Lusatia, Germany. Applied Vegetation Science. 4: 5-18.

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(1-2):10-16.