



## اثر فلزات سنگین (سرب، نیکل و کادمیوم) و کود گاوی بر تغییرات جمعیت نماتدهای بومی خاک

\*هانیه سمسار<sup>۱</sup>، امیر فتوت<sup>۲</sup>، امیر لکزیان<sup>۳</sup>، رضا خراسانی<sup>۳</sup> و عصمت مهدیخانی مقدم<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد خاکشناسی دانشگاه فردوسی مشهد، <sup>۲</sup> دانشیار گروه خاکشناسی دانشگاه فردوسی مشهد،

<sup>۳</sup> استادیار گروه خاکشناسی دانشگاه فردوسی مشهد، <sup>۴</sup> استادیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۴/۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۲۳

### چکیده

فلزات سنگین، از جمله مهم‌ترین آلاینده‌هایی هستند که اکوسیستم خاک و حیات موجودات زنده را تهدید می‌نمایند. در این راستا، شاخص‌های زیستی بسیاری وجود دارند که می‌توانند در جهت شناسایی این چنین آلودگی‌هایی مورد استفاده قرار گیرند. از جمله این شناساگرهای زیستی که به خوبی نسبت به شرایط محیطی واکنش نشان می‌دهند می‌توان به نماتدها اشاره نمود. هدف از این پژوهش، بررسی اثر فلزات سنگین (Pb، Ni، Cd) و کود گاوی بر جمعیت نماتدهای خاک با گذشت زمان است. بر این اساس، آزمایشی با طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل شامل سه سطح فلزات سنگین Ni، Cd، Pb به ترتیب به میزان ۰ (H<sub>0</sub>)؛ ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ (H<sub>1</sub>)؛ ۳۰۰، ۷۰۰ و ۲۰۰۰ (H<sub>2</sub>) میلی‌گرم بر کیلوگرم و دو سطح کود گاوی به مقدار صفر (O<sub>0</sub>) و ۱٪ (O<sub>1</sub>)، با سه تکرار اجرا شد. تیمارها در شرایط رطوبتی ۷۰ درصد ظرفیت زراعی در زمان‌های ۳۰ و ۹۰ روز نگهداری شدند. پس از این مدت و انجام خاک‌شویی، تعداد کل نماتدها، جمعیت لاروها و نماتدهای بالغ مشخص شد. پس از شناسایی نماتدها، شاخص‌های اکولوژیکی تعیین گردید. نتایج نشان داد که با افزایش میزان فلزات سنگین، جمعیت نماتدها و لاروها و نماتدهای بالغ کاهش معنی‌داری یافت و از مقدار شاخص‌های اکولوژیکی نیز کاسته شد.

واژه‌های کلیدی: نماتد، فلزات سنگین، شاخص اکولوژیکی، کود گاوی

\* مسئول مکاتبه: h\_semsar@yahoo.com

## مقدمه

حیات بر روی کره زمین به اکوسیستم خشکی و بخش ویژه آن یعنی خاک بستگی دارد. خاک محل وقوع فرآیندهای مهمی است که ویژگی قابل زیست بودن را برای آن فراهم می‌نماید. از مهم‌ترین این فرآیندها می‌توان به‌روند تجزیه مواد آلی، چرخه کانی‌ها و مواد غذایی و انتقال انرژی اشاره نمود. به جرأت می‌توان گفت که همه این فرآیندها توسط موجودات زنده انجام یا هدایت می‌شوند، به‌طوری‌که خاک را به‌محیطی پویا تبدیل می‌سازند. با وجود اهمیت این اکوسیستم، امروزه بقا و پایداری خاک با توجه به فعالیت‌های مختلف بشر و از طرفی بی‌توجهی و نظارت نداشتن کافی، تهدید می‌شود. فعالیت‌هایی مانند کشاورزی و استفاده از انواع کودها و آفت‌کش‌ها، استخراج معادن، دفع انواع زباله‌های صنعتی و غیرصنعتی، به‌صورت آگاهانه و یا ناآگاهانه، منجر به نابودی کلیدی‌ترین زیستگاه زمین، یعنی خاک می‌شود. در این راستا، حضور انواع آلاینده‌های آلی و معدنی در خاک، یکی از چالش‌هایی است که انسان با آن روبرو می‌باشد. در میان این آلاینده‌ها می‌توان به فلزات سنگین اشاره نمود که علاوه بر ایجاد شرایط محیطی نامناسب در خاک و ناکارآمد ساختن آن برای فعالیت‌های کشاورزی و از بین بردن موجودات زنده ساکن خاک (کلمنت و همکاران، ۲۰۰۷)، آلوده نمودن آب‌های سطحی و زیرزمینی، وارد شدن به زنجیره غذایی و نفوذ به بدن موجودات زنده و به‌خصوص انسان را نیز به دنبال دارند (برگویست و همکاران، ۲۰۰۵). به‌عنوان نمونه، مطالعات متعددی در رابطه با اثر فلز سنگین سرب بر انسان و دیگر حیوانات موجود است. سرب فلزی غیر فیزیولوژیکی که دارای اثرات سمیت بر بسیاری از اندام‌هاست (کوریا و همکاران، ۲۰۰۴). با توجه به مشکلات نام برده در رابطه با ورود فلزات سنگین به خاک، تدابیر مختلفی نیز جهت حفظ کیفیت خاک صورت گرفته است. یکی از این موارد، استفاده از مواد آلی به‌عنوان نمونه‌ای از اجزای خاک می‌باشد (کارپوکی و لادونین، ۲۰۰۸). مواد آلی نه تنها باعث بهبود حاصلخیزی خاک و افزایش رشد گیاه می‌شوند، بلکه فراهمی فلزات سنگین را نیز تغییر می‌دهند (کلمنت و همکاران، ۲۰۰۵). از سوی دیگر، همچنان که بیان شد، موجودات زنده نقش مهمی در اجرای وظایف خاک در سامانه محیط‌زیست به‌عهده دارند و به دنبال آن حضور فلزات سنگین و ماده آلی، می‌تواند آن‌ها را تحت تاثیر قرار دهد؛ به گونه‌ای که می‌توان از موجودات زنده به‌عنوان شاخص‌هایی از کیفیت خاک نام برده و استفاده نمود (شلوتر و همکاران، ۲۰۰۳). البته انتخاب یک موجود زنده خاص، به‌عنوان شاخص نیز بسیار مهم است. برای این منظور باید موجودی انتخاب گردد که دارای ویژگی‌هایی مانند قابلیت حضور در انواع مختلف

خاک‌ها، فراوانی و تنوع زیاد و واجد نقش مهم در فرآیندهای خاک باشد (شلوتر و همکاران، ۲۰۰۳). در این جهت، نمادهای آزادی می‌توانند گزینه مناسبی باشند (شکووا و همکاران، ۲۰۰۶). نماتدها فراوان‌ترین متازوا در خاک بوده و نقشی غیر قابل جایگزین در شبکه غذایی خاک دارند. آنها از نظر تغذیه شامل گروه‌های مختلف پارازیت گیاه، همه چیزخوار، باکتری‌خوار و قارچ‌خوار (گرازدیوا و همکاران، ۲۰۰۷) هستند و از این رو، در ارتباط نزدیک با دیگر موجودات خاک‌زی بوده و فعالیت آنها تولید اولیه، تجزیه، جریان انرژی و چرخه عناصر را تحت تأثیر قرار می‌دهد (شکووا و همکاران، ۲۰۰۶). نماتدها دارای غشای نفوذپذیری هستند که آنها را در ارتباط مستقیم با مواد موجود در آب خاک قرار می‌دهد، البته نماتدها دارای گونه‌هایی با درجات تحملی متفاوت، در برابر تنش‌ها هستند. بر اساس خصوصیات نماتدها و نقش‌هایی که در خاک دارند، شاخص‌های اکولوژیکی متعددی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (پترا و همکاران، ۲۰۰۸). در این زمینه می‌توان به شاخص‌هایی مانند شاخص غنی شدن<sup>۱</sup> (EI)، شاخص ساختار<sup>۲</sup> (SI) و شاخص بلوغ<sup>۳</sup> (MI) اشاره کرد (فریس و همکاران، ۲۰۰۱) که اطلاعات مفیدی در زمینه‌ی ساختار جمعیت نماتدها در محیط‌های غنی شده، محیط‌های با ساختار ثابت و محیط‌های تحت تنش به دست می‌دهد (بالوک و همکاران، ۲۰۰۲). به‌عنوان نمونه، پیترا ناجی و همکاران (۲۰۰۴) در آزمایشی نشان دادند که حضور فلزاتی مانند کادمیم، کروم، مس و سلنیم در خاک، منجر به کاهش تراکم جمعیت نماتدها و کاهش شاخص‌های بلوغ و ساختار می‌شود. این شاخص‌ها بر اساس نوع استراتژی زندگی نماتدها تعریف می‌شود؛ به نحوی که، نماتدهای دارای چرخه زیستی کوتاه، به سرعت تکثیر می‌یابند و احتیاجات غذایی زیادی دارند، دارای استراتژی r بوده و نماتدهایی با زندگی طولانی مدت، تکثیر کندتر و احتیاجات غذایی کمتر، دارای استراتژی k می‌باشند. بر مبنای نوع استراتژی مقدار  $c-p^4$  تعریف می‌شود که بین ۱ تا ۵ متغیر است و در نهایت با استفاده از این مقدار، شاخص‌ها محاسبه می‌شوند (بنگرز و همکاران، ۱۹۹۹). بنابراین با توجه به موارد فوق، هدف از انجام این مطالعه، بررسی اثر فلزات سنگین و مواد آلی بر جمعیت نماتدهای خاک و تعیین شاخص‌های زیستی از کیفیت خاک با استفاده از نماتدها می‌باشد.

- 
- 1- Enrichment Index
  - 2- Structure Index
  - 3- Maturity Index
  - 4- Colonizer-persister

## مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثر حضور فلزات سنگین (HMs) و ماده آلی بر جمعیت نماتدهای خاک، نمونه خاکی از منطقه کردکوی واقع در استان گلستان تهیه، به آزمایشگاه منتقل و در پلاستیک در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا رطوبت خود را حفظ نموده و از کاهش جمعیت جلوگیری شود. در این مدت خصوصیات آلی از خاک مانند بافت، اسیدیته، شوری و ماده آلی تعیین گردید. با توجه به خاک‌شویی اولیه مشخص گردید که نمونه خاک جمع‌آوری شده دارای جمعیت قابل قبولی از نماتدها می‌باشند. همچنین برای اعمال تیمارهای فلزات سنگین، عناصر سرب، کادمیم و نیکل در نظر گرفته شد. این عناصر به صورت مخلوطی از نمک‌های  $\text{Ni}_2\text{SO}_4$ ،  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  و  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  به صورت محلول و با مقادیر غلظتی مشخص در سه سطح اضافه گردید. به طوری که در مورد Pb غلظت‌ها شامل ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰؛ Ni با مقادیر ۵۰۰ و ۷۰۰ و Cd با مقادیر ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اضافه شد. به این ترتیب تیمارها به صورت  $\text{H}_0$  (سطح صفر عناصر، شاهد)،  $\text{H}_1$  (مخلوطی از سطح دوم همه عناصر) و  $\text{H}_2$  (مخلوطی از سطح سوم همه عناصر) اعمال شدند. انتخاب سطوح ذکر شده پس از انجام پیش‌آزمایشی صورت گرفت به گونه‌ای که مقادیر مختلف عناصر فوق به خاک اضافه گردید و همزمان نمونه شاهد نیز در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۳۰ روز و انجام خاک‌شویی، نماتدها استخراج و مورد شمارش قرار گرفتند. در رابطه با هر عنصر نمودار ترسیم شد و بر طبق آن غلظت مناسب از هر عنصر انتخاب گردید. برای بررسی اثر تیمار ماده آلی، از کود گاوی پوسیده شده استفاده گردید (O). که در دو سطح  $\text{O}_0$  و  $\text{O}_1$  در نظر گرفته شد، به گونه‌ای که در سطح  $\text{O}_1$ ، به نمونه‌های خاک به میزان ۱ درصد وزنی کود پودر شده اضافه گردید و در تیمار  $\text{O}_0$  کودی اضافه نشد. نمونه‌های تهیه شده به ظروف ۵۰۰ گرمی منتقل و در شرایط رطوبتی ۷۰ درصد ظرفیت زراعی نگهداری شدند. به این ترتیب، آزمایش در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل با سه تکرار و در دو بازه زمانی ۳۰ و ۹۰ روز ( $\text{T}_1$ ,  $\text{T}_2$ ) اجرا گردید. پس از سپری شدن زمان‌های عنوان شده، نماتدها با استفاده از روش تکمیل شده دگریس (۱۹۶۹) و جنکینز (۱۹۶۴) از خاک استخراج شدند. بطور اختصار در این روش مقدار ۲۵۰ گرم از خاک به ظرفی منتقل و مقداری آب به آن اضافه شد و سپس از سری الک‌های با مشخصات ۱۰، ۱۲۰، ۲۷۰ و ۴۰۰ مش عبور داده شدند. سپس محلول خاک صاف شده، طی دو مرحله سانتریفوژ گردید. در مرحله اول به مدت ۵ دقیقه و با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد در این مرحله خاک رسوب نموده و محلول رویی دور ریخته شد. در

مرحله دوم، از محلول شکر با وزن مخصوص ۱/۱۸ گرم بر سانتی متر مکعب استفاده و پس از افزودن آن، نمونه‌ها، به مدت ۱ دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. در نهایت، نمادهای روی الک ۴۰۰ مش شسته و به پتری‌دیش منتقل شدند. پس از استخراج نماتدها، برای نگهداری آن‌ها در زمان طولانی، عملیاتی در جهت کشتن و ثابت کردن آن‌ها با استفاده از محلول‌های تثبیت کننده انجام شد. در این راستا، از روش تکمیل شده‌ی دگریس (۱۹۶۹) استفاده شد. پس از طی این مراحل نمونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد شمارش قرار گرفتند و تعداد کل نماتدها در هر نمونه مشخص شد. در مرحله بعد، جهت شناسایی نماتدها، از نمونه‌ها لام تهیه گردید؛ به این شکل که روی لام حلقه پارافینی ایجاد و سپس یک قطره گلیسرین در مرکز حلقه گذاشته و نماتد توسط سوزن سر کج در گلیسرین جای گرفته و روی آن لامل قرار داده شد به این ترتیب نماتدهایی که شکل ظاهری مشابهی داشتند روی یک لام قرار گرفتند. از هر پتری‌دیش ۱۰۰ نماتد به لام منتقل و با استفاده از میکروسکوپ نوری ابتدا جنسیت نماتدها (نر، ماده و لارو) مشخص و سپس توسط کلید شناسایی در حد خانواده، شناسایی شدند. پس از شناسایی با توجه به مقادیر موجود در مورد C-P، برای هر خانواده مقدار C-P مشخص، سپس شاخص‌های زیر محاسبه شد (فریس و همکاران، ۲۰۰۱):

$$EI = 100 \times (e / (e + b))$$

$$SI = 100 \times (s / (s + b))$$

$$MI = (\sum v_i f_i) / n$$

*e*: مقدار وزنی اجزای غنی شده نماتدی خاک

*b*: مقدار وزنی اجزای پایه نماتدی خاک

*s*: مقدار وزنی اجزای ساختاری نماتدی خاک

*v<sub>i</sub>*: مقدار C-P برای خانواده‌های نماتدی آزادزی خاک

*f<sub>i</sub>*: فراوانی خانواده‌های نماتدی آزادزی خاک

*n*: تعداد کل نماتدها

سرانجام، داده‌های به دست آمده توسط نرم افزار آماری MSTATC تجزیه و با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند.

## نتایج و بحث

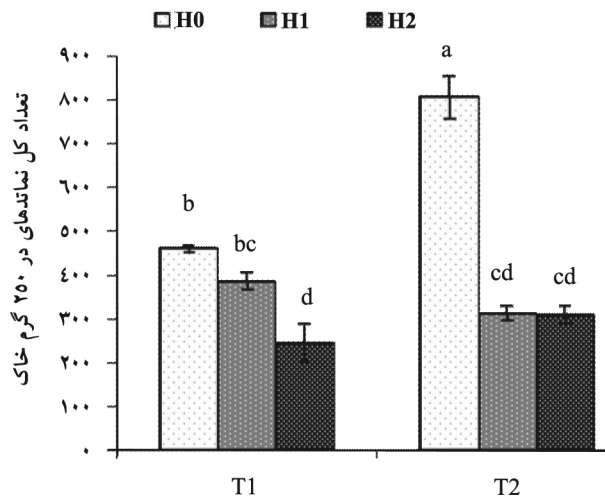
نتایج حاصل از تجزیه فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش از منطقه کردکوی گرگان در جدول ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود این خاک دارای مقدار قابل توجهی ماده آلی می‌باشد که بر این اساس حضور جمعیت قابل توجهی از نماتدها مورد انتظار است، از نظر فراهمی عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم در وضعیت خوبی قرار دارد و از طرفی شور نیز نمی‌باشد. این ویژگی‌ها خاک را به محیطی پویا از نظر فعالیت میکروبی تبدیل می‌کنند.

جدول ۱. خصوصیات شیمیایی و فیزیکی خاک مورد آزمایش.

مقادیر در خاک	خصوصیات
Fine, Smectitic, Thermic, Typic Endoaquepts	رده بندی خاک (Soil Taxonomy USDA)
Silty Clay	بافت خاک
۷/۴۴	اسیدپته
۱/۲	( $dSm^{-1}$ ) شوری
۴	(درصد) آهک
۳/۱	(درصد) ماده آلی
۰/۱۵	(درصد) نیتروژن
۴۰	(پی‌پی‌ام) فسفر
۲۳۲/۸	(پی‌پی‌ام) پتاسیم
۲۷	(%) رطوبت ظرفیت زراعی

شکل ۱ اثر سطوح مختلف فلزات سنگین بر جمعیت نماتدهای خاک با گذشت زمان را نشان می‌دهد. همان‌گونه که انتظار می‌رفت، با افزایش سطوح فلزات سنگین، جمعیت نماتدها به شکل معنی‌داری کاهش یافت. این کاهش در هر دو زمان ۳۰ و ۹۰ روز مشهود است؛ به‌گونه‌ای که در زمان ۳۰ روز تعداد کل نماتدها از ۴۶۱ در سطح  $H_0$  به میزان ۲۴۵ در سطح  $H_2$  کاهش یافته است که نمایشگر کاهش به مقدار ۴۷ درصد در تعداد کل می‌باشد و به‌خوبی اثر مقدار فلزات سنگین را بر جمعیت نماتدها آشکار می‌سازد. به‌همین ترتیب، در زمان ۹۰ روز نیز جمعیت از ۸۰۰ در سطح  $H_0$  به ۳۰۰ در سطح  $H_2$  تنزل نموده که معادل با ۶۲ درصد کاهش می‌باشد. کاهش جمعیت در زمان ۹۰ روز

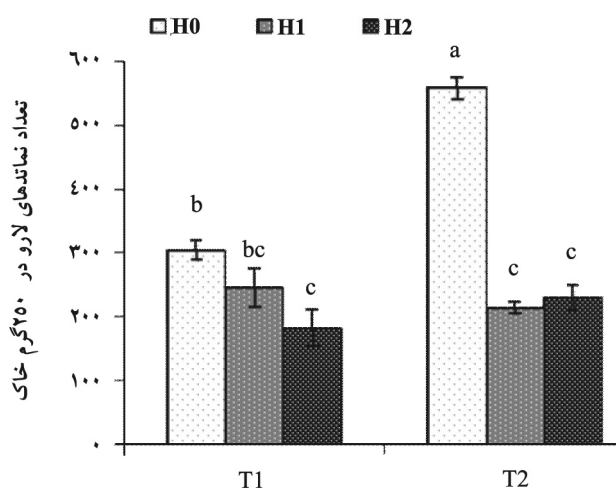
نسبت به زمان ۳۰ روز بیشتر بوده است. البته این کاهش، با شیب بیشتری همراه است. از طرف دیگر جمعیت نماتدها در سطح  $H_0$  با گذشت زمان افزایش معنی‌داری یافته است. در سطح  $H_1$  نیز نسبت به سطح  $H_0$  کاهش مشاهده شد که این کاهش در زمان ۹۰ روز بارزتر می‌باشد (شکل ۱). نتایج به‌دست آمده مشابه با گزارشی است که توسط دیچانگ و همکاران (۲۰۰۹) ارائه شده است. در مطالعه آن‌ها با فاصله گرفتن از منبع آلودگی، جمعیت نماتدها افزایش می‌یابد و کمترین تعداد نماتدها، در نزدیک‌ترین فاصله از آلودگی دیده می‌شود (دیچانگ و همکاران ۲۰۰۹). در مطالعه دیگری که خاک، آلوده به فلزاتی چون نیکل، سرب، روی و مس بود نیز کاهش فراوانی نماتدها دیده شد (سانچز مورینو و ناواس، ۲۰۰۷).



شکل ۱. اثر فلزات سنگین بر جمعیت نماتدهای خاک با گذشت زمان.

تعداد جمعیت نماتدهای لارو نیز با افزایش میزان فلزات سنگین، کاهش یافت (شکل ۲). کاهش جمعیت میان سطح  $H_0$  و  $H_2$  معنی‌دار بوده است به‌گونه‌ای که کاهشی معادل با ۴۰ درصد مشاهده می‌شود. در رابطه با لاروها نیز اختلاف معنی‌داری بین سطح  $H_0$  و  $H_1$  مشاهده نشد، درحالی که اختلاف معنی‌داری میان سطح  $H_1$  و  $H_2$  موجود است. کاسته شدن جمعیت نماتدهای لارو با افزایش میزان فلزات سنگین توسط پن ماراتوف و همکاران (۲۰۰۸) نیز گزارش شده است. روند کاهشی جمعیت لاروها در زمان ۳۰ روز شیب ملایمی دارد. در زمان دوم نسبت به ۳۰ روز، در سطح  $H_0$ .

جمعیت به میزان ۸۳ درصد افزایش یافته است. در زمان ۹۰ روز، میان سطح  $H_1$  و  $H_2$  اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود اما میان دوسطح  $H_1$  و  $H_2$  با سطح  $H_0$  تفاوت چشمگیری موجود است. شیب کاهش جمعیت در زمان دوم نسبت به زمان اول بیشتر است. ازطرفی با افزایش زمان (۹۰ روز) نسبت به زمان کوتاه‌تر (۳۰ روز) و در سطح  $H_2$ ، روند کاهش جمعیت، افزایشی بوده است. اثرات سمیت فلز سنگین سرب بر نماتدها توسط محققان بسیاری گزارش شده است. به‌عنوان نمونه محمودی و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که نماتدها نسبت به حضور سرب حساسیت زیادی دارند. با افزایش مرگ و میر گونه‌های با حساسیت بیشتر، سرب مسئول کاهش در تراکم و تنوع نماتدها بود و علاوه بر اثر مستقیم بر جمعیت نماتدها، جوامع میکروبی مرتبط با نماتدها را نیز متأثر نمود. آستن و همکاران نیز (۱۹۹۴) مشاهده نمودند که نماتدها فقط توسط مقادیر متوسط و زیاد سرب به‌صورت معنی‌دار متأثر می‌شوند و کاهش می‌یابند.

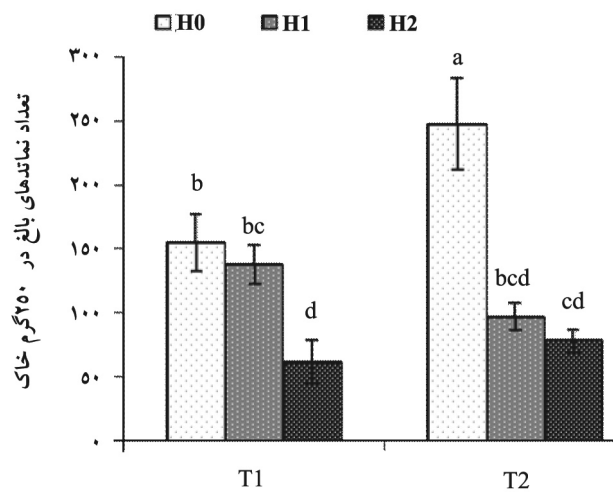


شکل ۲. اثر فلزات سنگین بر جمعیت نماتدهای لارو با گذشت زمان.

جمعیت نماتدهای بالغ نیز با افزایش مقدار فلزات سنگین کاهش یافته است. در زمان ۳۰ روز، میان سطح  $H_0$  و  $H_1$ ، اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود، اما اختلاف میان سطح  $H_1$  و  $H_2$  معنی‌دار است؛ به‌صورتی که جمعیت نماتدهای بالغ به میزان ۵۵ درصد کاهش یافته است. کاهش میان سطوح



$H_2$  و  $H_0$  نیز ۶۰ درصد می‌باشد. در زمان ۹۰ روز، اختلاف میان سطح  $H_1$  با  $H_0$  معنی دار است و کاهش جمعیت به میزان ۶۱ درصد می‌باشد؛ در حالی که میان سطح  $H_1$  و  $H_2$ ، اختلافی دیده نمی‌شود اما کاهش جمعیت در سطح  $H_2$  نسبت به سطح  $H_1$  بسیار واضح و از ۲۴۷ به ۷۹ می‌باشد (شکل ۳). پن ماراتوف و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند که با افزایش میزان فلزات سنگین از جمعیت نماتدهای لارو و بالغ کاسته می‌شود، اما کاهش جمعیت نماتدهای لارو بیشتر از نماتدهای بالغ است (پن ماراتوف و همکاران، ۲۰۰۸).



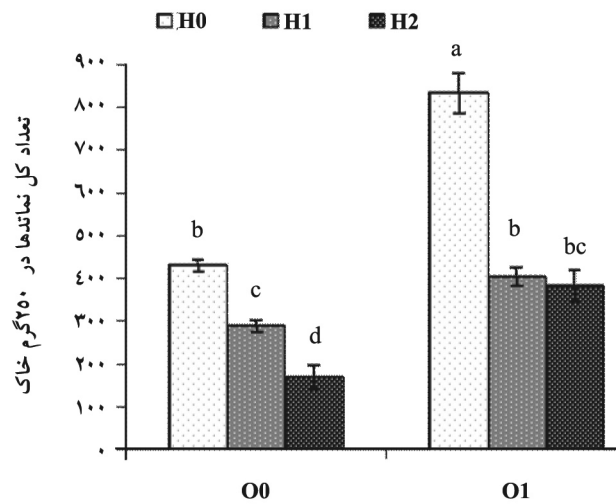
شکل ۳. اثر فلزات سنگین بر جمعیت نماتدهای بالغ خاک با گذشت زمان.

نماتدهای آزادی توانایی ویژه‌ای در تجمع فلزات سنگین در زیست بومچه (Biotope) خود دارند (فیشت و همکاران ۱۹۹۹). مکانیسم اصلی نماتدها در مقابله با فلزات سنگین، جذب فعال از طریق سطح بدن (هاول، ۱۹۸۳) و یا بلعیدن ذرات آلوده به فلزات می‌باشد (فیشت و همکاران، ۱۹۹۹). اکثر مطالعات موجود، بر اثرات جداگانه و منفرد فلزات سنگین بر نماتدها اشاره دارند و گزارش‌های اندکی در رابطه با اثر توأم فلزات سنگین بر جوامع نماتدی موجود است. بنابراین تفسیر اثرات متقابل ممکن است کمی دارای پیچیدگی بوده و در همه موارد عمومیت نداشته باشد. عوامل زیادی می‌تواند در رابطه با اثرات متقابل فلزات سنگین در نظر گرفته شود. رقابت میان فلزات برای جایگاه‌های پیوند بر ترکیبات فلزی-آلی یا پروتئین‌ها، ممکن است منجر به افزایش و یا کاهش پاسخ نسبت به تنش شود. اگر فلزی با سمیت بیشتر، تمایل زیادتری برای آنزیم‌های فلزی مهم داشته باشد و سبب اختلال

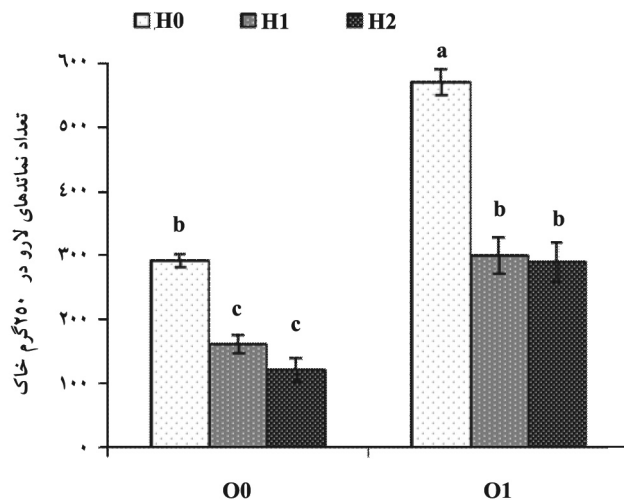
ساختاری آن‌ها شود، اثر افزایشی آلودگی دیده می‌شود (هاگوپیان-شلکات و همکاران، ۲۰۰۱). به همین ترتیب، اگر فلزی با سمیت کمتر تمایل زیادی برای تشکیل کمپلکس با ترکیبات فلزی-آلی که مسئول ذخیره فلزات در بدن موجود زنده هستند (مانند متالوتیونین‌ها؛ ساندرز، ۱۹۹۰) داشته باشد، مکان‌های پیوندی را اشباع نموده و در نهایت موجب آزاد ماندن و فراهمی بیشتر فلزات سمی در سیتوزول می‌شود (میسون و جنکینز، ۱۹۹۵). بنابراین می‌توان تغییرات جمعیت را به این اثرات نسبت داد.

در رابطه با اثر توأم فلزات سنگین و ماده آلی، مشخص گردید که با افزایش مقدار فلزات سنگین جمعیت نماتدها در سطح  $O_0$  به شکل معنی‌داری کاهش یافت. کاهش جمعیت در سطح  $H_1$  نسبت به سطح  $H_0$  به میزان ۳۳ درصد می‌باشد. هم‌چنین از جمعیت نماتدها در سطح  $H_2$  نیز نسبت به سطح  $H_1$ ، به صورت معنی‌دار کاسته شد. این کاهش حدود ۴۱ درصد می‌باشد. روند کاهش شیب ملایمی را نشان می‌دهد. با افزایش سطح فلزات سنگین ( $H_1$ ) نسبت به مقدار شاهد ( $H_0$ ) در حضور ماده آلی ( $O_1$ ) کاهش جمعیت معنی‌داری دیده می‌شود. این کاهش در مورد سطح  $H_2$  نیز صادق است. اما میان سطح  $H_1$  و  $H_2$  در حضور ماده آلی اختلاف معنی‌داری دیده نمی‌شود. البته با افزایش ماده آلی جمعیت نماتدها به میزان ۹۳ درصد نسبت به شاهد افزایش یافته است (در سطح  $H_0$ ) (شکل ۴). جمعیت لاروها نیز در هر دو مورد حضور و عدم حضور ماده آلی، با افزایش میزان فلزات سنگین کاسته شده است. افزایش جمعیت لاروها در حضور ماده آلی نسبت به عدم حضور ماده آلی، معادل با ۹۵ درصد می‌باشد (شکل ۵). جمعیت نماتدهای بالغ نیز نسبت به حضور ماده آلی و فلزات سنگین تغییراتی را نشان می‌دهد؛ به گونه‌ای که با افزایش میزان فلزات سنگین ( $H_2$ ) در مقایسه با شاهد در شرایط بدون ماده آلی، کاهش به میزان ۶۳ درصد در جمعیت مشاهده می‌شود. با افزایش ماده آلی و به دنبال افزایش سطوح فلزات سنگین، کاهش در جمعیت نماتدهای بالغ دیده می‌شود، به نحوی که کاهش در سطح  $H_1$  بسیار مشهود است و از طرفی میان سطح  $H_1$  و  $H_2$  اختلاف معنی‌داری دیده نمی‌شود (شکل ۶). مورینو و همکاران (۲۰۰۹) در آزمایشی که در محیطی با خصوصیات مختلف از نظر میزان ماده آلی، فلزات سنگین و حضور هیدرکربن‌های آروماتیک اجرا شده بود، ملاحظه نمودند که در محیط‌های دارای ماده آلی، جمعیت نماتدها بیشتر است (مورینو و همکاران ۲۰۰۹). مواد آلی علاوه بر تغذیه جوامع زیستی توانایی تغییر در فراهمی فلزات سنگین را نیز دارند، به نحوی که با افزایش بار سطحی، افزایش تشکیل کمپلکس‌های آلی، رسوب فلزات و کاهش ظرفیت فلزات به ظرفیت‌های کمتر

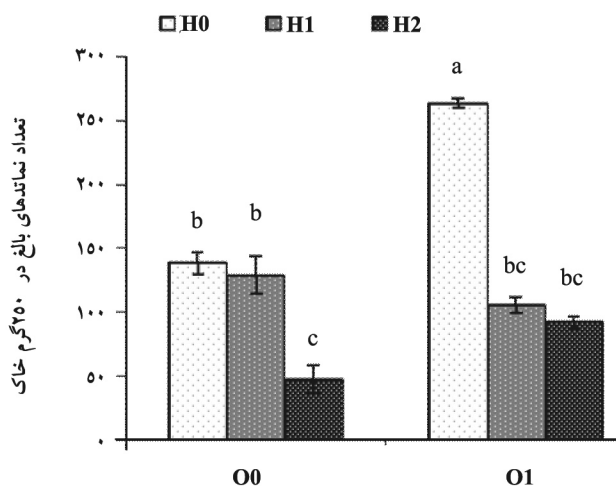
غیرمتحرک، باعث کاهش فراهمی و جذب فلزات توسط موجودات زنده می‌شوند (بالون و دیور ای‌سامی، ۲۰۰۳).



شکل ۴. اثر متقابل فلزات سنگین و ماده آلی بر جمعیت نماتدها.



شکل ۵. اثر متقابل فلزات سنگین و ماده آلی بر جمعیت نماتدهای لارو.



شکل ۶. اثر متقابل فلزات سنگین و ماده آلی بر جمعیت نماتدهای بالغ.

با توجه به داده‌های به دست آمده نسبت‌های جنسیت (نسبت تعداد نماتدهای لارو، ماده و نر به کل نماتدها) نیز تعیین شد. در تیمار  $H_0T_1$  این نسبت به شکل ۴:۱:۱ (به ترتیب نر، ماده و لارو) و در تیمار  $H_2T_1$  این نسبت به شکل ۱:۶/۵:۵ بود. این نسبت‌ها نشان می‌دهند که احتمالاً لاروها نسبت به آلودگی فلزات سنگین حساسیت کمتری دارند در حالیکه پن ماروتوف و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه خود نشان دادند که نماتدهای لارو نسبت به نماتدهای بالغ حساسیت بیشتری دارند. در حقیقت این تفاوت در حساسیت، می‌تواند ناشی از ضخامت متفاوت و وجود ترکیبات مختلف در لایه کوتیکول غشای نماتدها باشد (استپک و همکاران، ۲۰۱۰). احتمالاً تکامل نماتدها (انتقال از مرحله لاروی به مرحله بلوغ) کمتر از تکثیر آن‌ها متأثر از آلودگی شده است. از طرفی، نماتدها دارای چرخه زندگی متفاوتی از چند روز تا چند سال هستند. به عنوان مثال نماتدهای متعلق به راسته *Xiphinema* می‌توانند چرخه‌ی زندگی خود را طی ۱۲ تا ۱۴ ماه کامل نمایند (فیلیس، ۱۹۹۶). بنابراین شاید بتوان علت مشاهده تعداد بیشتر نماتدهای بالغ نسبت به لاروها را به کوتاه بودن زمان‌های در نظر گرفته شده در این آزمایش (۳۰ و ۹۰ روز) و عدم وجود فرصت کافی برای ورود لاروها به مرحله بلوغ نسبت داد. در این رابطه جمعیت غالب نماتدها نیز می‌تواند موثر باشد به طوری که غالبیت جمعیت متعلق به خانواده‌های مقاوم نسبت به تنش‌های محیطی باشد.

در رابطه با نتایج مربوط به شناسایی نماتدها، ۲۰ خانواده مشخص گردید که در این میان، بیشترین تعداد مربوط به خانواده‌های *Aphelenchoididae* و *Diplogasteridea* بود، که اولی قارچ‌خوار و دومی باکتری‌خوار می‌باشد. از نظر مقدار c-p، به ترتیب مقادیر ۲ و ۱ را شامل می‌شوند. نماتدهای با مقدار c-p ۲، نسبت به شرایط نامساعد محیطی متحمل هستند و حساسیت کمی نشان می‌دهند (فریس و همکاران، ۲۰۰۱). در این مطالعه، هرچند با افزایش میزان فلزات سنگین از مقدار شاخص MI کاسته شد، ولی این کاهش، معنی‌دار نبود (جدول ۲). مقدار شاخص بلوغ از یک تا چهار تغییر می‌کند که مقادیر یک تا ۲ نشان‌دهنده وجود تنش در محیط می‌باشد. احتمالاً به دلیل وجود جمعیت بیشتر خانواده‌های مقاوم نسبت به تنش آلودگی، تغییر در میزان شاخص MI، محسوس نبوده است. کاسته شدن از مقدار MI، به معنای شرایط نامساعد محیطی است. ناجی و همکاران (۲۰۰۴) نیز کاهش در میزان MI را در رابطه با آلودگی Cr مشاهده نمودند اما در مورد آلودگی Cd، میزان کاهش معنی‌دار نبود (ناجی و همکاران، ۲۰۰۴). پن مارتوف و همکاران (۲۰۰۸) نیز با دور شدن از منبع آلودگی، افزایش در شاخص MI را گزارش کردند. شاخص SI نیز تفاوت معنی‌داری را نشان نداد؛ هرچند با افزایش مقدار ماده آلی، کاهش یافت. شاخص ساختار پایداری و ثبات و عدم به هم خوردگی در شبکه غذایی خاک را به تصویر می‌کشد. با گذشت زمان و افزایش میزان آلودگی، مقدار شاخص EI کاهش معنی‌داری یافت. از طرفی با افزایش مقدار ماده آلی، در میزان شاخص EI، افزایش معنی‌دار مشاهده شد. شاخص غنی شدن، حاکی از غنی شدن شبکه غذایی خاک از مواد غذایی می‌باشد این مشاهدات با نتایج بولاک و همکاران (۲۰۰۲) مطابقت دارد. آن‌ها نیز افزایش مقدار EI را در خاکی که با کود حیوانی تیمار شده بود، گزارش نمودند (بولاک و همکاران، ۲۰۰۲).

جدول ۲. اثر تیمارهای آزمایشی بر شاخص‌های اکولوژیکی.

تیمارها	شاخص‌های اکولوژیکی		
	MI	SI	EI
H <sub>0</sub>	۱/۹۰۲ a	۹/۵۴۴	۹۷/۸۶۲ a
H <sub>1</sub>	۲/۰۳۴ a	۶/۶۸۰	۹۶/۱۱۱ ab
H <sub>2</sub>	۱/۸۷۹ a	۱۱/۵۹۳	۹۳/۴۲۳ b
O <sub>1</sub>	۱/۸۷۸ a	۱۰/۱۴۴	۹۵/۵۷۸ a
O <sub>1</sub>	۱/۹۹۸ a	۸/۴۰۱	۹۸/۲۲۳ b

### نتیجه گیری

به طور کلی می توان گفت نماتدها به خوبی نسبت به شرایط و تنش های محیطی واکنش نشان می دهند. حضور فلزات سنگین در خاک، نه تنها تعداد و فراوانی نماتدها را کاهش می دهد بلکه اثر منفی بر رشد و تکثیر و حتی تکامل آنها دارد، به گونه ای که بلوغ نماتدها را به تأخیر انداخته و یا موجب تسریع بلوغ می شود. مواد آلی می توانند زمینه ای را برای پویایی جمعیت آنها فراهم نمایند و از طرفی هنگامی که با فلزات سنگین توأم می شوند می توانند اثر مضر فلزات سنگین را تقلیل دهند. همان گونه که تحقیقات متعدد نشان داده است، نماتدهای مختلف، در شرایط متفاوت محیطی، واکنش های گوناگونی نشان می دهند. شاخص های اکولوژیکی، به خوبی می توانند گویای تحولات محیطی باشند. افزایش میزان شاخص EI، نمادی از پویایی شبکه غذایی خاک است. کاهش MI، مصادف با افزایش آشفستگی در اکوسیستم خاک می باشد (فریس و همکاران، ۲۰۰۱). در این مطالعه، به وضوح اثر آلودگی فلزات سنگین بر نماتدها مشاهده شد.

### منابع

1. Austen, M.C., McEvoy, A.J. and Warwick, R.M. 1994. The specificity of meiobenthic community responses to different pollutants: results from microcosm experiments, *Marine Pollution Bulletin*, 28: 557–563.
2. Bergkvist, P., Berggren, D. and Nicholas, J. 2005. Cadmium Solubility and Sorption in a Long-Term Sludge-Amended Arable Soil, *Environmental Quality*, 34: 1530–1538.
3. Bolan, N.S. and Duraisamy, V.P. 2003. Role of inorganic and organic soil amendments on immobilisation and phytoavailability of heavy metals: a review involving specific case studies, *Australian Journal of Soil Research*, 41: 533–555.
4. Bongers, T. 1999. The Maturity Index, the evolution of nematode life history traits, adaptive radiation and cp-scaling, *Plant and Soil*, 212: 13-22.
5. Bulluck III, L.R., Barker, K.R. and Ristaino, J.B. 2002. Influences of organic and synthetic soil fertility amendments on nematode trophic groups and community dynamics under tomatoes, *Applied Soil Ecology*, 21: 233–250.
6. Correa, M., Roig-Navarro, A.F. and Aragon, C.M.G. 2004. Motor behavior and brain enzymatic changes after acute lead intoxication on different strains of mice, *Life Science*, 74: 2009–2021.
7. Clemente, R., De La Fuente, C., Moral, R. and Bernal, M.P. 2007. Changes in Microbial Biomass Parameters of a Heavy Metal-Contaminated Calcareous Soil

- during a Field Remediation Experiment, Published online June 27, Environmental Quality, 36:1137–1144.
8. Clemente, R., Walker., D.J. and Bernal, M.P. 2005. Uptake of heavy metals by Brassica juncea grown in a contaminated soil in Aznalco 1lar (Spain): The effect of soil amendments, Environmental Pollution, 138: 46–58.
  9. Dechang, H., Xiaoke, Z., Vijay Vikram Singh, T., Qi, L., Dazhong, W. and Wenju, L. 2009. Effects of heavy metal pollution of highway origin on soil nematode guilds in North Shenyang, China, Journal of Environmental Sciences, 21: 193-198.
  10. De Grisse, A. 1969. Redescription on modifications de quelque techniques utilisées dans l'étude des nematodes phytoparasitaires, Meded. Ritksfac. Land wet, Gent, 34: 351-359.
  11. Ferris, H., Bongers, T. and De Goede, R.G.M. 2001. A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept, Applied Soil Ecology, 18: 13–29.
  12. Fichet, D., Boucher, G., Radenac, G. and Miramand, P. 1999. Concentration and mobilisation of Cd, Cu, Pb and Zn by meiofauna populations living in harbour sediment: their role in the heavy metal flux from sediment to food web, Science of the Total Environment, 243/244: 263–272.
  13. Gruzdeva, L.I., Matveeva, E.M. and Kovalenko, T.E. 2007. Changes in soil nematode communities under the impact of fertilizers, Eurasian soil Science, 40: 681-693.
  14. Hagopian-Schlekat, T., Chandler, G.T. and Shaw, T.J. 2001. Acute toxicity of five sediment-associated metals, individually and in a mixture, to the estuarine meiobenthic harpacticoid copepod Amphiascstenuiremis, Marine Environmental Research, 51: 247–264.
  15. Howell, R. 1983. Heavy metals in marine nematodes: uptake, tissue distribution and loss of copper and zinc, Marine Pollution Bulletin, 14: 263–268.
  16. Jenkins, W.R. 1964. A rapid centrifugal flotation technique for separation nematodes from soil. Plant Disease Reports, 48: 692.
  17. Karpukhin, M.M. and Ladonin, D.V. 2008. Effect of Soil Components on the Adsorption of Heavy Metals under Technogenic Contamination, Eurasian Soil Science, 41: 1228-1237.
  18. Mahmoudi, E., Essid, N., Beyrem, H., Hedfi, A., Boufahja, F., Vitiello, P. and Aïssa, P. 2007. Individual and combined effects of lead and zinc on a free-living marine nematode community: Results from microcosm experiments, Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 343: 217-226.
  19. Mason, A.Z. and Jenkins, K.D. 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. In: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds.), Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems, John Wiley, New York, pp. 479–608.

20. Moreno, M., Albertelli, G. and Fabiano, M. 2009. Nematode response to metal, PAHs and organic enrichment in tourist marinas of the mediterranean sea, *Marine Pollution Bulletin*, 58: 1192–1201.
21. Nagy, P., Bakonyi, G., Bongers, T., Kádár, I., Fábrián, M. and Kiss, I. 2004. Effects of microelements on soil nematode assemblages seven years after contaminating an agricultural field, *Science of the Total Environment*, 320: 131–143.
22. Pen-Mouratov, S., Shukurov, N. and Steinberger Y. 2008. Influence of industrial heavy metal pollution on soil free-living nematode population, *Environmental Pollution*, 152: 172-183.
23. Petra, C.J., Vliet, V. and Ron, G.M. 2008. Nematode-based risk assessment of mixture toxicity in a moderately polluted river flood plain in The Netherlands, *Science of the Total Environment*, 406: 449-454.
24. Philis, J. 1996. The life cycle of xiphinema index in Cyprus, *Agricultural Research institute, Nicosia, Cyprus*, 24: 215-218.
25. Sánchez-Moreno, S. and Navas, A. 2007. Nematode diversity and food web condition in heavy metal polluted soils in a river basin in southern Spain, *European Journal of Soil Biology*, 43: 166-179.
26. Sanders, B. 1990. Stress proteins: potential as multi-tiered biomarkers. In: McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 165–191.
27. Schloter, M., Dilly, O. and Munch, J.C. 2003. Indicators for evaluating soil quality, *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 98: 255-262.
28. Seinhorst, J.W. 1959. A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin, *Nematologica*, 4: 67-69.
29. Sochova, I., Hotman, J. and Holoubek, J. 2006. Using nematodes in soil ecotoxicology, *Environment International*, 32: 374-383.
30. Stepek, G., McCormack, G., and Page, A.P. 2010 The kunitz domain protein BLI-5 plays a functionally conserved role in cuticle formation in a diverse range of nematodes, *Molecular & Biochemical Parasitology*, 169: 1-11.





## The effect of heavy metals (lead, nickel and cadmium) and cow manure on population changes of indigenous soil nematodes

\*H. Semsar<sup>1</sup>, A. Fotovat<sup>2</sup>, A. Lakzian<sup>2</sup>, R. Khorassani<sup>3</sup> and  
E. Mahdikhani Moghaddam<sup>4</sup>

<sup>1</sup>MSc Student, Department of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad, <sup>2</sup>Associate Prof., Dept. of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad, <sup>3</sup>Assistant Prof., Dept. of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad, <sup>4</sup>Assistant Prof., Dept. of Plant Pathology, Ferdowsi University of Mashhad

Received: 2011-6-27 ; Accepted: 2012-1-13

### Abstract

Heavy metals are categorized as one of the most important contaminants that disturb soil environment and thus are harmful to terrestrial organisms. There are many ecological indices representing such pollutions. Nematodes as indicator organisms may be a suitable index to assess environmental conditions. The objective of this study was to investigate the impact of different levels of selected heavy metals (Cd, Ni, and Pb) and cow manure on nematode population changes of indigenous soil nematodes. A completely randomized design with factorial arrangement was carried out including three levels of heavy metals 0 (H<sub>0</sub>); 100, 500, 1000 (H<sub>1</sub>); and 300, 700, 2000 (H<sub>2</sub>) mg kg<sup>-1</sup> of Cd, Ni and Pb respectively and two levels of cow manure 0 (O<sub>0</sub>) and 1% (O<sub>1</sub>) with 3 replications. Soil moisture of all treatments was adjusted at 70% of field capacity. All treatments were incubated for 30 and 90 days. Soils were then washed and the total population, juvenile and mature numbers of nematodes was determined. All isolated nematodes were identified at the family level and ecological indices (enrichment, structure and maturity) were determined. The results showed that total population, juvenile, mature numbers of nematodes decreased significantly in all metal amended treatments. Furthermore, calculated ecological indices tended to decline by addition of heavy metals into soil samples.

**Keywords:** Nematodes; Heavy metals; Ecological Indices; Cow manure

---

\* Corresponding Author; Email: h\_semsar@yahoo.com

