سیستم مدیریت ایزو

www.isomanagement.ir

تماس تلفنی جهت دریافت مشاوره:

۱. مشاور دفتر تهران (آقای محسن ممیز)

۰۹۱۲ ۹۶۳ ۹۳۳۶

۲. مشاور دفتر اصفهان (سرکار خانم لیلا ممیز)

۰۹۱۳ ۳۲۲ ۸۲۵۹

مجموعه **سیستم مدیریت ایزو** با هدف بهبود مستمرعملکرد خود و افزایش رضایت مشتریان سعی برآن داشته، کلیه استانداردهای ملی و بین المللی را در فضای مجازی نشر داده و اطلاع رسانی کند، که تمام مردم ایران از حقوق اولیه شهروندی خود آگاهی لازم را کسب نمایند و از طرف دیگر کلیه مراکز و کارخانه جات بتوانند به راحتی به استانداردهای مورد نیاز دسترسی داشته باشند.

این موسسه اعلام می دارد در کلیه گرایشهای سیستم های بین المللی ISO پیشگام بوده و کلیه مشاوره های ایزو به صورت رایگان و صدور گواهینامه ها تحت اعتبارات بین المللی سازمان جهانی IAF و تامین صلاحیت ایران می باشد.

هم اکنون سیستم خود را با معیارهای جهانی سازگارکنید...

ISO

9001
14001
18001

CE

GMP
GAP
22716

IMS
HSE-MS

22000
HACCP

45001

INSO
12773-1
1stRevision
2019
Identical with
ISO 23611-1:
2018

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران
Iranian National Standardization Organization

استاندارد ملی ایران
۱۲۷۷۳-۱
تجدیدنظر اول
۱۳۹۷

دارای محتوای رنگی

کیفیت خاک – نمونه‌برداری از بی‌مهرگان خاک – قسمت ۱: جداکردن با دست و استخراج کرم‌های خاکی

Soil quality – sampling of soil invertebrates – part 1: Hand- sorting and extraction of earthworms.

ICS: 13.080.05; 13.080.30

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران، ضلع جنوب غربی میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق‌پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران- ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)

رایانامه: standard@isiri.gov.ir

وبگاه: http://www.isiri.gov.ir

Iranian National Standardization Organization (INSO)

No. 2592 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@isiri.gov.ir

Website: http://www.isiri.gov.ir

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفهٔ تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمآن‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمآن‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین‌شده تهیه می‌کنند درکمیته ملی طرح، بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)[1]، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمآن‌ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمآن‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization
2- International Electrotechnical Commission
3- International Organization for Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)
4- Contact point
5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«کیفیت خاک – نمونه‌برداری از بی‌مهرگان خاک –

قسمت ۱: جداکردن با دست و استخراج کرم‌های خاکی»

رئیس:	**سمت و/یا محل اشتغال:**
اولادغفاری، عارف (کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی)	گروه پژوهشی مواد غذایی- پژوهشگاه استاندارد
دبیر:	
یل شرزه، لیلا (کارشناسی ارشد میکروبیولوژی)	اداره کل استاندارد آذربایجان شرقی
اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
اخیاری، شهاب (دکتری شیمی)	اداره کل استاندارد آذربایجان شرقی
بخشی‌راد، اولدوز (کارشناسی ارشد خاک شناسی)	اداره کل منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی
بقال زاده، الهه (کارشناسی میکروبیولوژی)	شرکت تجزیه و سنجش رادین شیمی
رحیم اوغلی، شاهین (کارشناسی ارشد محیط زیست)	اداره کل حفاظت محیط زیست استان آذربایجان شرقی
شاکری، مسعود (کارشناسی ارشد شیمی)	اداره کل حفاظت محیط زیست استان آذربایجان شرقی
عدلی، ساناز (کارشناسی ارشد شیمی خاک)	شرکت کیمیا گستر نوین آزما
غفاری ، زهرا (کارشناسی ارشد مدیریت کشاورزی)	اداره کل حفاظت محیط زیست استان آذربایجان شرقی
گوگانیان، امیر محمد (دکتری شیمی)	شرکت کیمیا گستر نوین آزما

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	**سمت و/یا محل اشتغال**:
ملایری، حیدر (دکتری حرفه‌ای دامپزشکی)	اداره کل استاندارد آذربایجان شرقی
نیازی، میترا (کارشناسی شیمی)	گروه پژوهشی مواد غذایی- پژوهشگاه استاندارد
یحیوی، اتابک (کارشناسی علوم تغذیه)	معاونت غذا ودارو- دانشگاه علوم پزشکی تبریز
یل شرزه، رضا (دکتری مترجمی زبان انگلیسی)	دانشگاه مراغه

ویراستار:

عدل نسب، لاله (دکتری شیمی)	گروه پژوهشی شیمی و پلیمر- پژوهشگاه استاندارد

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
پیش‌گفتار	ز
مقدمه	ح
۱ هدف و دامنهٔ کاربرد	۱
۲ مراجع الزامی	۱
۳ اصطلاحات و تعاریف	۲
۴ اصول کلی	۳
۵ مواد و/یا واکنشگرها	۴
۶ تجهیزات	۵
۷ روش کار	۵
۷-۱ نمونه‌برداری از کرم‌های خاکی	۵
۷-۲ نگهداری	۹
۷-۳ تعیین توده زیستی	۹
۸ ارزیابی داده‌ها	۱۰
۹ گزارش آزمون	۱۰
پیوست الف (آگاهی‌دهنده) روش‌های دیگر نمونه‌برداری	۱۲
پیوست ب (آگاهی‌دهنده) تعیین گونه‌ها در کرم‌های خاکی	۱۳
پیوست پ (آگاهی‌دهنده) روش اصلاح‌شده TSBF	۱۴
پیوست ت (الزامی) تعیین بیشترین ظرفیت نگهداری آب	۱۵
پیوست ث (آگاهی دهنده) مثال‌هایی از برنامه‌های پایش کرم‌های خاکی (به همراه بیان نتایج آن‌ها)	۱۷
کتابنامه	۲۲

پیش‌گفتار

استاندارد «کیفیت خاک – نمونه‌برداری از بی‌مهرگان خاک– قسمت ۱: جداکردن با دست و استخراج کرم-های خاکی» که نخستین‌بار در سال ۱۳۸۸ تدوین و منتشر شد، بر اساس پیشنهادهای دریافتی و بررسی و تأیید کمیسیون‌های مربوط بر مبنای پذیرش استانداردهای بین‌المللی به عنوان استاندارد ملی ایران به روش اشاره شده در مورد الف، بند ۷، استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ برای اولین بار مورد تجدیدنظر قرار گرفت و در دویست و چهل و چهارمین اجلاسیه کمیتهٔ ملی استاندارد محیط زیست مورخ ۹۷/۱۲/۰۷ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوهٔ نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدیدنظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

این استاندارد جایگزین استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۱-۱۲۷۷۳ : سال ۱۳۸۸ می‌شود.

این استاندارد ملی بر مبنای پذیرش استاندارد بین‌المللی زیر به روش «معادل یکسان» تهیه و تدوین شده و شامل ترجمه تخصصی کامل متن آن به زبان فارسی می‌باشد و معادل یکسان استاندارد بین‌المللی مزبور است:

ISO 23611-1:2018 Soil quality — Sampling of soil invertebrates — Part 1: Hand-sorting and extraction of earthworms

مقدمه

این استاندارد به دلیل لزوم رشد استانداردسازی روش‌های جانورشناسی خاکی در مزارع تدوین شده است. به طور کلی این روش‌ها شامل نمونه‌برداری، استخراج و نگهداری بی‌مهرگان موجود در خاک بوده و برای مقاصد زیر ضروری است:

- طبقه‌بندی زیستی خاک‌ها شامل ارزیابی کیفیت خاک [25][1]، [31] و [39]

- نشانگرهای زیستی خاک و پایش طولانی مدت [11]، [14] و [33]

- ارزیابی اثرات مواد شیمیایی بر جانوران خاک‌زی (طبق استاندارد ISO 11268-3)

به دلیل اینکه داده‌های مربوط به این مقاصد، اساس تصمیمات فراگیری است، لذا باید با روش‌های استاندارد گردآوری شود. (به عنوان مثال آیا توصیه می‌شود که یک ناحیه مورد نظر ترمیم شود یا خیر). در واقع فقدان چنین روش‌های استانداردی، یکی از مهم‌ترین دلایلی است که چرا طبقه‌بندی زیستی و زیست‌سنجشی در زیستگاه خاکی (مثل خاک) در مقایسه با نواحی آبی نسبتا به ندرت استفاده شده است.

از آنجایی که ارائه روش‌های استاندارد برای همه ارگانیسم‌های خاک نه ممکن است و نه مفید، مهم‌ترین آن‌ها انتخاب شده و در این استاندرد نمونه‌برداری از کرم‌های خاکی شرح داده شده است.

در اصل روش ارائه شده در این استاندراد برای مطالعات طبقه‌بندی و اکولوژیکی تکوین شده است و نقش کرم‌های خاکی در اکوسیستم‌های خاکی مختلف را بررسی می‌کند. این جانوران بدون شک مهم‌ترین بی‌مهرگان خاک در مناطق معتدل و با اهمیت کمتر، خاک‌های مناطق شمالی و گرمسیری است [30]، [16]، [18]. اهمیت کرم‌ها در ساختمان خاک (مثل تهویه[2] و ظرفیت نگهداری آب) و عملکردهای خاک مثل تجزیه بقایای گیاهی و جانوری و چرخه مواد مغذی به خوبی شناخته‌شده است [10]. کرم‌ها به دلیل توده زیستی بسیار زیادشان، در شبکه غذایی بسیاری از بی‌مهرگان نیز اهمیت دارد.

در ویرایش قبلی این استاندارد ماده شیمیایی فرمالین به عنوان مایع استخراج‌کننده پیشنهاد شده بود. با این حال طی سال‌های گذشته مدارک مبتنی بر خصوصیات بحرانی فرمالین و به صورت عمده در خصوص سمیت آن برای انسان افزایش یافته است. در اواخر سال ۲۰۱۲ میلادی (آذر و دی سال ۱۳۹۱) کمیته ارزیابی ریسکِ (RAC)[3] آژانس مواد شیمیایی اروپا (ECHA)[4] بیان کرد که مدارک علمی کافی برای دسته‌بندی این ماده شیمیایی به عنوان «احتمالا سرطان‌زا برای انسان‌ها» (گروه Ib) وجود دارد. به علاوه اثرات منفی آن روی ارگانیسم‌های غیرهدف (شامل میکروارگانیسم‌های خاک، مزوفون‌ها[5] و گیاهان) گزارش شده است [7]. بنابراین این ماده با مواد دیگر جایگزین شده است.

۱- اعداد داخل قلاب به شماره منبع ذکر شده در کتابنامه اشاره دارد.

2- Aeration
3- Risk Assessment Committee
4- European Chemicals Agency
5- Mesofauna

با توجه به تشدید احتیاط در مصرف فرمالین چندین جایگزین برای آن مطالعه شده است. در مرجع [40] اثربخشی آلیل‌ایزوتیوسیانات (AITC)[1] به عنوان عامل شیمیایی بیرون‌ران[2] برای نمونه‌برداری از کرم‌های خاکی آزمایش شده است. AITC محصول تجزیه طبیعی گلوکوزینولات‌ها[3] در بیشتر شب‌بویان[4] است. این ماده عامل ایجاد طعم تیز خردل می‌باشد. بر اساس نظر ECHA نگرانی خاصی از بابت استفاده از این ماده در شرایط خارج از ساختمان وجود ندارد.

در طول سال‌های گذشته مطالعاتی به منظور مقایسه اثر استخراجی فرمالین و AITC در محل‌ها و زمان‌های یکسان انجام شده است. بر اساس مرجع [22] تفاوتی در تعداد و توده‌زیستی کرم‌های خاکی استخراج‌شده از محل زمین‌های مورد آزمایش با استفاده از فرمالین یا AITC به عنوان عامل استخراج وجود ندارد. اخیرا در مقاله مروری چاپ نشده‌ای [28] عدم تفاوت معنی‌دار در تعداد/توده‌زیستی کرم‌های خاکی استخراج‌شده با دو این ماده شیمیایی استخراج‌کننده گزارش شده است. همچنین اثر متقابلی بین استخراج‌کننده و محل نمونه‌برداری پیدا نشد، که موید این نکته است که تفاوت‌های ویژه محل در ارزیابی کارایی استخراج عوامل استخراج‌کننده مشاهده نشده است. با ترسیم همبستگی بین تعداد کرم‌های استخراج‌شده با AITC در مقابل کرم‌های استخراج‌شده با فرمالین در قالب نمودار *Bland-Altman* (روش معمول برای مقایسه یک روش آزمون کاملا استاندارد[5] با یک روش جایگزینه در علوم پزشکی) سوگیری معنی‌داری برای روش AITC در مقایسه با روش فرمالین مشاهده نشده‌است که نشانگر مشابهت/تعویض‌پذیری دو روش است.

اطلاعات پایه درخصوص اکولوژی کرم‌های خاکی و کاربرد آن‌ها به عنوان نشانگرهای زیستی در محیط خاکی در مراجع فهرست شده در کتابنامه قابل دسترس است.

این استاندارد یک قسمت از مجموعه استانداردهای ملی ایران شمارهٔ ۱۲۷۷۳ است و قسمت‌های دیگر این مجموعه عبارت است از:

- قسمت ۲: نمونه‌برداری و استخراج بند پایان کوچک (پادمیان و کنه ها)
- Part 3: Sampling and soil extraction of enchytraeids
- قسمت ۴: نمونه‌برداری -عصاره گیری و معرفی نماتدهای موجود در خاک
- قسمت ۵: نمونه‌برداری و استخراج بی‌مهرگان بزرگ خاک
- قسمت ۶: طراحی برنامه های نمونه‌برداری از بی‌مهرگان خاک -راهنما

1- Allyl isothiocyanate
2- Expellant
3- Glucosinolates
4- Cruciferae
5- Gold-standard method

کیفیت خاک– نمونه‌برداری از بی‌مهرگان خاک– قسمت ۱: جداکردن با دست و استخراج کرم‌های خاکی

۱ هدف و دامنهٔ کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش‌های نمونه‌برداری و نگهداری کرم‌های خاکی از خاک‌های مزارع به‌عنوان پیش‌نیازی برای استفاده از این جانداران به عنوان نشانگرهای زیستی می‌باشد. (برای مثال در ارزیابی کیفیت خاک به عنوان زیستگاه موجودات زنده) این استاندارد برای تمام بیوتوپ‌های[1] خاکی که در آن کرم‌های خاکی وجود دارند، کاربرد دارد. کلیّات نمونه‌برداری از مزرعه در استاندارد ISO 18400-101 مشخص شده و راهنمای تعیین اثرات آلاینده‌ها بر روی کرم‌های خاکی مزارع در استاندارد ISO 11268-3 ارائه شده است. این جزئیات می توانند بر حسب الزامات ملی شرایط آب و هوایی منطقه‌ای محل نمونه‌برداری متغیر باشند. (به پیوست **پ** مراجعه کنید). این استاندارد برای خاک های نیمه‌خاکی[2] کاربرد ندارد و برای استفاده در شرایط آب و هوایی یا جغرافیایی مفرط (مثل کوهستان‌های مرتفع) مشکل می‌باشد. روش‌های مورد استفاده برای دیگر گروه‌های موجودات زنده موجود در خاک نظیر پادُمان[3] در قسمت‌های دیگر این استاندارد پوشش داده می‌شوند.

۲ مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به صورت الزامی به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین‌ترتیب، آن ضوابط جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند.

در صورتی که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام‌آور نیست. در مورد مراجعی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام‌آور است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

2-1 ISO 10390, Soil quality — Determination of pH

یادآوری– استاندارد ملی ایران شماره ۷۸۳۴: سال ۱۳۸۹، کیفیت خاک- اندازه‌گیری pH، با استفاده از استاندارد ISO 10390: 2005 تدوین شده است.

2-2 ISO 10694, Soil quality — Determination of organic and total carbon after dry combustion (elementary analysis)

1- Biotopes
2- Semi-terrestrial
3- Collembolan

2-3 ISO 11260, Soil quality — Determination of effective cation exchange capacity and base saturation level using barium chloride solution

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۱۷۴: سال ۱۳۸۶، کیفیت خاک-اندازه گیری ظرفیت موثر تبادل کاتیون و سطح اشباع پایه با استفاده از محلول باریم کلرید -روش آزمون، با استفاده از استاندارد ISO 11260: 1994 تدوین شده است.

2-4 ISO 11277, Soil quality — Determination of particle size distribution in mineral soil material — Method by sieving and sedimentation

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۷۸۳۱: سال ۱۳۸۹، کیفیت خاک- تعیین توزیع اندازه ذرات مواد معدنی-روش ته نشینی و الک کردن، با استفاده از استاندارد ISO 11277: 2009 تدوین شده است.

2-5 ISO 11465, Soil quality — Determination of dry matter and water content on a mass basis — Gravimetric method

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۷۸۳۵: سال ۱۳۸۳، خاک – تعیین ماده خشک و آب همراه بر مبنای جرم پایه روش وزن سنجی، با استفاده از استاندارد ISO 11465: 1993 تدوین شده است.

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات و تعاریف زیر به‌کار می‌رود[۱]:

۳-۱

کرم خاکی

earthworms

کرم‌های بزرگ سوراخ‌کننده و ساکن در خاک[۲] هستند که متعلق به راسته *کم‌تاران*[۳] (رده *کمربند به‌تنان*[۴]، شاخه *کرم‌های حلقوی*[۵]) می‌باشند.

یادآوری- طول کرم‌های بالغ می‌تواند از چند سانتی‌متر تا بیش از یک‌متر متغیر باشد.

مثال: گونه‌هایی از خانواده *Lumbricidae* (در مناطق هولاکتیک[۶])، *Glossoscolecidae* (در آمریکای لاتین)، *Eudrilidae* (در آفریقا) یا *Megascolecidae* (در آسیا، آمریکای شمالی، ساحل اقیانوس آرام).

گونه‌های غیربومی

peregrine species

۱- اصطلاحات و تعاریف به‌کار رفته در استانداردهای ISO و IEC در وبگاه‌های www.iso.org/obp و www.electropedia.org/ قابل‌دسترس است.

2- Megadrile soil-inhabiting earthworms
3- Order Oligochaeta
4- Class Clitellata
5- Phylum Annelida
6- Holarctic

گونه‌هایی از کرم‌های خاکی که امروزه در بسیاری از مناطق جهان مشاهده می‌شوند که به‌طور معمول توسط انسان به آن مناطق منتقل شده‌اند.

یاد آوری ۱- مثال‌های کاملا شناخته‌شده از این گونه‌ها، چندین گونه *lumbricid* مانند *Aporrectodea caliginosa* (که زیستگاه اصلی‌شان اورآسیا است ولی در حال حاضر در آمریکا و استرالیا نیز زندگی می‌کنند) یا گونه‌های موجود در مناطق استوایی[1] مانند *Pontoscolex corethrurus* (احتمالا زیستگاه اصلی آن شمال برزیل و/یا گینه است) می‌باشد.

یادآوری ۲- به مرجع [18] کتابنامه مراجعه شود.

۲-۳

زینِ جنسی

کمربند تناسلی

clitellum

روپوستی ضخیم حلقه یا زینی شکل که تنها در کرم‌های بالغ نزدیک قسمت قدامی آن‌ها بوده و در نهایت پیله را تشکیل می‌دهد.

۴ اصول کلی

کرم‌های خاکی موجود در یک ناحیه معین را می‌توان با استفاده از ترکیب دو روش مختلف زیر نمونه‌برداری کرد:

- جداکردن جانوران با دست از یک سطح معین (به‌عنوان مثال ۰٫۲۵ m^2) از اعماق مختلف بر اساس استفاده از زمین (برای مثال در منطقه زراعی ۲۰ cm)، ویژگی‌های خاک و هدف نمونه‌برداری؛

- استخراج کرم‌ها از خاک با به‌کاربردن AITC

روش اول به مدت تقریبا ۱۰۰ سال است که شناخته شده است در حالی که روش دوم با استفاده از مایع استخراج‌کننده جدید به مدت ۱۵ سال است که مطرح شده است [7]، [22]، [40]. بعد از استخراج، کرم‌های خاکی تثبیت شده و به آزمایشگاه منتقل می‌شوند. در آزمایشگاه نمونه‌ها به طریقی نگهداری می‌شوند که بتوانند به مدت نامحدود در یک مجموعه انبارش شود (برای مثال برای اهداف رده‌بندی). به علاوه تخمین توده زیستی کرم‌های خاکی تعریف و تعیین شده است. در نهایت مقادیر فراوانی و توده زیستی برای واحد سطح (معمولا یک متر مربع) یا به ندرت برای پارامترهای حجمی می‌تواند دوباره محاسبه شود.

یادآوری ۱- در شرایط خاص روش‌های دیگر می‌توانند مفید واقع شوند (برای مثال استخراج الکتریکی) اما این روش‌ها به عنوان روش عمومی پیشنهاد نمی‌شوند (به پیوست **الف** مراجعه کنید).

1- pan-tropical

یادآوری ۲- نمونه‌برداری از کرم‌های خاکی اغلب شامل برنامه‌های نظارتی گسترده است که سعی در پوشش کل جانداران خاک یا بخشی از آن‌ها (برای مثال جانداران قابل روئیت با چشم غیر مسلح) را دارد. این استاندارد طرح چنین برنامه‌هایی را در بر نمی‌گیرد.

یادآوری ۳- بعضی نکات برای رده‌بندی گونه‌های غیربومیِ کرم‌های خاکی (که در بسیاری از مناطق دنیا دیده می‌شوند) به طور عمده به خانواده *Lumbricidae* مربوط است که در پیوست **ب** آورده شده است.

۵ مواد و/یا واکنشگرها

۵-۱ آلیل ایزوتیوسیانات (AITC)، درجه خلوص سنتزی (حدود ٪ ۹۴ تا ٪ ۹۷ کسر حجمی).

۵-۲ ایزوپروپانول، ٪ ۱۰۰ (کسر حجمی).

۵-۳ اتانول، ٪ ۷۰ (کسر حجمی).

۵-۴ فرمالین، محلول فرمالدهید ٪ ۴ (کسر حجمی)، فقط برای انبارش نمونه‌ها.

۵-۵ اتانول ٪ ۹۵، (کسر حجمی)، برای اهداف نگهداری نمونه‌ها در مواقعی که روش‌های ژنتیکی مثل بارکدینگ[1] استفاده می‌شود.

۶ تجهیزات

از لوازم و تجهیزات استاندارد آزمایشگاهی و موارد زیر استفاده کنید:

۶-۱ ظروف پلاستیکی، در ظرفیت‌های ml ۲۵۰ تا ml ۵۰۰ برای نگهداری کرم‌ها.

۶-۲ دستکش پلاستیکی

۶-۳ پنس

۶-۴ تکه صفحه پلاستیکی ضخیم، m^2 ۱ تا m^2 ۲

۶-۵ بیل یا بیلچه

۶-۶ میکروسکوپ کالبد شکافی، با درشت‌نمایی کم (۱۰× تا ۴۰×).

۶-۷ ترازو، با گستره اندازه‌گیری از g ۰٫۰۱ تا g ۲۰۰.

1-Barcoding

۶-۸ ظرف آب، ترجیحا با گنجایش ۲۰ l (۲۰ l برای هر حوزه نمونه‌برداری).

۶-۹ آب پاش

۶-۱۰ خودکار، دفترچه یادداشت، ماژیک ضد آب، برچسب‌هایی که بر روی ظرف قرار می‌گیرند.

۶-۱۱ دماسنج، (برای مثال برای اندازه‌گیری دمای هوا).

۶-۱۲ محفظه خشک‌کن، برای تعیین رطوبت خاک.

۷ روش کار

۷-۱ نمونه‌برداری از کرم‌های خاکی

۷-۱-۱ کلیات

نمونه‌برداری از کرم‌های خاکی از طریق ترکیب دو روش متفاوت انجام می‌گیرد: جداکردن با دست و استخراج با AITC. بر اساس چندین مطالعه مقایسه‌ای، در مقالات متعددی که بر روی اکولوژی کرم خاکی انجام شده است، مستقل از نوع ماده شیمیایی بیرون‌ران، به‌صراحت ترکیبی از روش فیزیکی و روش شیمیایی پیشنهاد می‌شود (برای مثال در مراجع شماره [9]، [10] و [18] کتابنامه). نمونه‌برداری باید زمانی از سال انجام بگیرد که جانداران تحت فشار یا اجبار شرایط محیطی (برای مثال رطوبت کم و/یا دماهای بالا) در مرحله دیاپوز[1] (یعنی عدم واکنش به AITC) نباشند. در مناطق معتدل، زمان‌های نامساعد نمونه‌برداری زمستان و به ویژه اواسط تابستان می‌باشد [18]. کرم‌های خاکی نمونه‌برداری‌شده از زمین‌های یکسان اما با دو روش نمونه‌برداری متفاوت باید در ظروف پلاستیکی جداگانه انبارش شوند. بعد از اتمام روند نمونه‌برداری، خاک حفاری شده و آزمایش‌شده به همان منطقه اصلی نمونه‌برداری منتقل می‌شود. در بعضی موارد، تنها استفاده از یکی از دو روش مناسب می‌باشد، به‌عنوان مثال در صورتیکه در ناحیه مورد نظر، هیچ گونه جانوری در لانه های زیرزمینی در عمق زیاد وجود نداشته باشد، استخراج با AITC ضروری نیست. از طرف دیگر در مناطقی که کرم‌های خاکی عظیم‌الجثه زندگی می‌کنند (قسمت‌هایی از آمریکای جنوبی، جنوب شرقی آسیا و استرالیا) جداکردن با دست مفید نیست [26]. برای نواحی استوایی، یک روش خیلی مشابه که به‌عنوان روش TSBF اصلاح‌شده شناخته می‌شود، مناسب است (به پیوست **پ** مراجعه شود)

یادآوری- معمولا کرم‌های خاکی بعد از نگهداری مورد مطالعه قرار می‌گیرند، اما اگر طیف گونه‌ها در ناحیه نمونه‌برداری به طور کامل شناخته‌شده باشد، کرم‌ها بصورت زنده نیز می‌توانند مورد بررسی قرار گیرند. به پیوست **ب** مراجعه شود).

در مورد کرم‌های خاکی جمع‌آوری‌شده مورد استفاده جهت انجام تجزیه و آزمون‌های بیشتر، به‌عنوان مثال برای اندازه‌گیری‌های نشانگر زیستی یا استفاده در زیست‌سنجشی، توصیه می‌شود که کرم‌ها در بخش

1- Diapause

کوچکی از خاک ناحیه نمونه‌برداری انبارش یا انکوبه شوند. در مورد استخراج با AITC، شستن کرم‌ها بـا آب لوله‌کشی قبل از انکوباسیون در خاک ضروری است.

برای تفسیر نتایج، موارد زیر برای زمین مورد مطالعه باید تعیین شوند:

الف- pH مطابق با استاندارد ISO 10390؛

ب- بافت (شن[1]، لوم[2]، سیلت[3]) مطابق با استاندارد ISO 11277؛

پ- محتوی آب مطابق با استاندارد ISO 11465؛

ت- ظرفیت نگهداری آب همان‌طور که در پیوست **ت** مشخص شده است؛

ث- ظرفیت تبادل کاتیون مطابق با استاندارد ISO 11260؛

ج- کربن آلی مطابق با استاندارد ISO 10694.

۷-۱-۲ جداکردن با دست

اندازه ناحیه نمونه‌برداری باید بر طبق اندازه متوسط و تراکم کرم‌ها در منطقه انتخاب شود. معمولا در مناطق هولاکتیک که اکثر کرم‌های خاکی بالغ که طولی تقریبا به اندازه ۱ cm تـا ۲۰ cm دارنـد مربعـی بـه انـدازه ۵۰ cm در ۵۰ cm برای نمونه‌برداری کافی می‌باشد. اگرچه در مناطقی با تراکم کم کرم‌هـای خـاکی [بـرای مثال در خاک‌هایی با pH کم (کمتر از ۴٫۵) یا مناطق حضور انسان مانند مناطق حاصل‌خیز] نـواحی بـزرگ (برای مثال ۱ m^2) برای نمونه‌برداری پیشنهاد می‌شوند (به استاندارد ISO 11268-3 مراجعه کنید). از طرفی دیگر در خاک‌هایی با تراکم بالای کرم‌های خاکی (برای مثـال بسـیاری از علفزارهـا در منـاطق آب و هـوایی معتدل). ناحیه کوچک به اندازه ۱ / ۸ m^2 (یک هشتم متر مربع) کافی است [29]. در عین حال نمونه‌هـایی در اندازه‌های کوچک‌تر [برای مثال ۱ / ۶ m^2(یک ششم متر مربع)[41]] می‌تواند منجربه تعداد خیلی کـم و در نتیجه مقادیر متغیری از هر یک از کرم‌های خاکی در هر نمونه شود که در مقابل منجربه افـزایش تعـداد نمونه‌ها شود (برای مثال ۱۶ تکرار).

در هر مورد، خاک به‌وسیله بیل یا بیلچه (زیربند ۶-۵) تا عمق ۲۰ cm از آن ناحیه کنـار زده مـی‌شـود (cm ۲۰ برای بیشتر نواحی آب وهوایی معتدل مناسب است اما عمق خاک در عین حال به مشخصـات آن ناحیـه بستگی دارد). خاک حفاری‌شده روی یک تکه پلاستیک (زیربند ۶-۴) پخش می‌شود. این کـار مـی‌توانـد در همان محل انجام شود اما به خصوص در شرایط بد آب و هوایی، کل فرایند در آزمایشگاه یا گلخانه قابل اجرا می‌باشد. بعد از آن برای یافتن کرم خاکی، خاک با احتیاط مورد بررسی قرار گیرد. کرم‌های خاکی بـزرگ بـا کمک دستکش پلاستیکی (زیربند ۶-۲) و کرم‌های خاکی کوچک به کمک پـنس (زیربنـد ۶-۳) جمـع‌آوری

1- Sand
2- Loam
3- Silt

شوند. برای جلوگیری از خودبُری[1] و آسیب دیدن بیشتر کرم‌ها، بهتر است تنها قسمت قدامی بدن آن‌ها لمس شود. در صورتیکه در حین کندن خاک، کرم‌ها با بیل دو تکه شوند، برای اندازه‌گیری صحیح توده زیستی باید هر دو قسمت را جمع کرد، با در نظر گرفتن این نکته که در تعیین تعداد کرم‌ها تنها قسمت قدامی بدن آن‌ها شمارش می‌شود.

یادآوری ۱- با چشم غیر مسلح قسمت قدامی کرم های بالغ می تواند از طریق موقعیت کمربند تناسلی شناسایی شود، کمربند تناسلی همیشه به قسمت سر کرم نزدیک‌تر است تا دم آن.

کرم‌های خاکی جمع‌آوری‌شده باید بلافاصله در الکل ٪ ۷۰ (زیربند ۵-۳) در ظرف‌های پلاستیکی ۲۵۰ ml یا ۵۰۰ ml (زیربند ۶-۱) حداقل به مدت ۰٫۵ h اما نه برای بیشتر از ۲۴ hتثبیت شوند. در مواردی که محلول اتانول از طریق مایعات بدن جاندار رقیق می‌شود و/یا محلول اتانول حاوی ذرات خاک شده است. محلول اتانول باید بعد از ۲۴ h تا ۴۸ h تعویض شود. ظرف باید برچسب‌گذاری شده و بهتر است مشاهدات (برای مثال آیا کرم‌ها به فاز سکون رسیده‌اند) در دفترچه یادداشت (زیربند ۶-۱۰) ثبت شوند.

تثبیت سریع در محلول فرمالین ٪ ۴ (کسر حجمی) (زیربند ۵-۴) امکان‌پذیر است. اما این روش به دلیل اینکه بهتر است کار با این ترکیب به حداقل ممکن رسانده‌شود پیشنهاد نمی‌شود (به‌ویژه دز شرایط کار در محل).

یادآوری ۲- برای جلوگیری از تغییرات زیست‌شناسی ریخت‌شناسی (به عنوان مثال وارونگی پروستومیم[2]) ناشی از قرار دادن فوری در اتانول، هر یک از کرم‌ها را می‌توان به مدت کم (حدود یک دقیقه درون آب ولرم (برای مثال ۳۰ °C تا ۴۰ °C) قرار داد. کرم‌های خاکی درون آب شل شده و بعد از آن می‌توان آن‌ها را به محلول اتانول منتقل کرد.

۷-۱-۳ استخراج به روش AITC

همان ناحیه یا قسمت از خاک که بالای آن در روش جداسازی با دست شخم زده شده است برای روش استخراج با AITC استفاده می‌شود. پیش‌تر باید مقدار کافی آب (۵ l تا ۱۰ l برای هر قطعه زمین نمونه‌برداری) در ظروف بزرگ (زیربند ۶-۸) به محل نمونه‌برداری منتقل شود. به منظور آماده‌سازی محلول AITC مقدار ۱ g از AITC را در ۵۰ ml ایزوپروپانول حل می‌شود و محلول نهایی با افزودن آب تا رسیدن به حجم ۱۰ l تهیه می‌شود. چگالی AITC برابر با ۱٫۰۱۳ kg/l می‌باشد؛ یعنی با استفاده از کسر حجمی غلظت نهایی ۹۸٫۷ ml/l می‌باشد. محلول رقیق‌شده AITC با دقت و به‌طور مساوی به ناحیه یا قسمتی از خاک که در جداسازی دستی حفاری شده است افزوده می‌شود. محلول مورد نظر با توجه به ظرفیت نفوذپذیری خاک باید به‌صورت بخش‌ها یا قسمت‌های متعدد (معمولا ۲ تا ۳) استفاده شود به‌طوری‌که در نهایت به میزان ۵ l تا ۱۰ l از محلول AITC افزوده شود، با توجه به خصوصیات خاک (در مواردی که نواحی نمونه‌برداری از ۰٫۲۵ m^2 بزرگ‌تر است، مقدار محلول AITC باید مطابق با آن افزایش یابد). در طول این فرایند به منظور

1- Autotomy
2- Prostomium

جمع‌آوری همه کرم‌های خاکی که در سطح خاک ناحیه نمونه‌برداری ظاهر می‌شوند، ناحیه مذکور باید با دقت مورد بررسی قرار بگیرد. نمونه‌برداری بعد از آخرین آبپاشی به اتمام می‌رسد.

AITC به راحتی در آب و همچنین در محلول ذخیره ایزوپروپانول از بین میرود. این فرایند در معرض نور خورشید و گرما تشدید می‌شود. به همین دلیل محلول AITC نهایی باید درست قبل از استفاده تهیه شود.

کرم‌های خاکی بزرگ باید به‌وسیله دستکش پلاستیکی (زیربند ۶-۲) و کرم‌های خاکی کوچک با پنس (زیربند ۶-۳) جمع‌آوری شوند. مادهٔ دفع کننده AITC منجر به خروج سریع کرم خاکی از خاک می‌شود. کرم‌ها باید زمانی که بیشترین قسمت از بدن (ترجیحا کل بدن) آن‌ها مشاهده شد جمع‌آوری شوند، در غیر این صورت یا آسیب می‌بینند و/یا اینکه مجددا به داخل خاک برمی گردند. برای جلوگیری از خودبُری و آسیب به کرم‌ها، جاندار باید فقط از قسمت قدامی، معمولا از قسمت جلویی کمربند تناسلی، لمس شوند. کرم‌های خاکی جمع‌آوری‌شده باید بلافاصله در الکل ٪ ۷۰ (زیربند ۵-۳) در ظرف‌های پلاستیکی ml ۲۵۰ یا ml ۵۰۰ (زیربند ۶-۱) حداقل به مدت h ۰٫۵ اما نه برای بیشتر از h ۲۴تثبیت شوند. ظرف باید برچسب‌گذاری شده و بهتر است مشاهدات در دفترچه یادداشت (زیربند ۶-۱۰) ثبت شوند.

در مناطقی که کرم های غول‌پیکر وجود دارند (آمریکای جنوبی، جنوب شرقی آسیا، و استرالیا) و زمانی که جداسازی با دست مناسب نمی‌باشد، باید محلول AITC در منطقه ای به وسعت m^2 ۴ به‌کار برده شود (مقدار آن باید مطابق با وسعت ناحیه افزایش پیدا کند) و قبل از انجام این فرآیند باید گیاهان و بسترهای جانوری از سطح خاک زدوده شوند. بقیه مراحل نمونه‌برداری یکسان است. در صورتیکه هیچ‌گونه نقب‌زن‌های عمودی (به‌ویژه از دسته *Lumbricus terrestris* یا *Aporrectodea longa*) در ناحیه داده‌شده (به‌عنوان مثال خاک‌های خیلی اسیدی) زندگی نکنند، انجام استخراج به روش AITC لازم نیست. قبل از کندن خاک برای عمل جدا کردن با دست، وجود این کرم‌های بزرگ به‌وسیله پوسته‌های بدن انداخته‌شده روی سطح و بسترهای جانوری جمع‌آوری‌شده روی منافذ لانه‌های زیرزمینی آن‌ها (به قطر تقریبی cm ۰٫۵) به آسانی قابل تشخیص می‌باشد. بنابراین هر تصمیمی در رابطه با استفاده از AITC باید به‌صورت مورد به مورد گرفته شود.

یادآوری- در خاک‌های با محتوی رس بالا، کندن گودال نمونه‌برداری می‌تواند باعث مسدود شدن لانه‌های زیرزمینی کرم‌ها در ته گودال شده و در نتیجه از نفوذ AITC و/یا خروج کرم‌های موجود در لانه‌های زیرزمینی عمیق جلوگیری کند. در چنین شرایطی، منافذ پوشانده‌شده لانه‌های زیرزمینی می‌توانند قبل از کاربرد AITC (به عنوان مثال به کمک یک چاقو) باز شوند.

هشدار : حین استفاده از AITC به منظور اجتناب از خطرات ناشی از در معرض قرار گرفتن تنفسی یا تماس پوستی باید اقدامات احتیاطی مناسب (مثل دستکش و لباس محافظ) مدنظر باشد. بر طبق برگه داده‌های ایمنی مواد برای AITC که توسط شرکت‌های تولیدکننده منتشر شده است، ترکیب مدنظر برای پوست و چشم‌ها تحریک‌کننده و برای موجودات آبزی سمی می‌باشد. این مطلب در کشورهای صنعتی در خصوص استفاده علمی و تجاری این ماده (مثلا به عنوان تدخین‌کننده زیستی[1]) بصورت رسمی اشاره شده است.

1- Biofumigant

۷-۲ نگهداری

دو روش امکان‌پذیر است:

الف- بعد از تثبیت، کرم‌ها را می‌توان به مدت حداقل چهار روز و ترجیحا یک یا دو هفته در محلول ٪ ۴ فرمالین (کسر حجمی) (زیربند ۵-۴) نگهداشت. بعد از آن کرم‌ها را می‌توان برای یک دوره نامحدود در محلول اتانول ٪ ۷۰ (کسر حجمی) (زیربند ۵-۳) نگهداری کرد.

ب- روش دیگر تثبیت کرم‌ها بلافاصله بعد از جمع‌آوری در مخلوطی از اتانول ٪ ۷۰ (کسر حجمی) (زیربند ۵-۳) و فرمالین ٪ ۴ (کسر حجمی) (زیربند ۵-۴) با نسبت ۹۸ به ۲ می‌باشد. این مایع نگهدارنده روز بعد از آخرین نمونه‌برداری با مایع نگهدارنده تازه تعویض شود.

توصیه می‌شود از نگهداری کرم‌ها در اتانول خالص اجتناب شود، چون گاهی اوقات سطح خارجی کرم‌ها به قدری نرم می‌شود که دیگر خیلی از مشخصه‌های مهم آن‌ها قابل مشاهده نمی‌باشد.

در مواردی که باید بافت کرم برای مطالعات بیوشیمی یا ژنتیک حفظ شود، نگهداری در فرمالین توصیه نمی‌شود [15]. به جای آن کرم‌ها باید در اتانول ٪ ۹۵ تثبیت و نگهداری شوند.

۷-۳ تعیین توده زیستی

تعیین توده زیستی با استفاده از ماده نگهدارنده انجام شود. کرم‌ها باید به مدت پنج دقیقه درون آب شسته شده و سپس به سرعت روی یک صفحه کاغذ خشک شوند و متعاقبا جرم آن با استفاده از یک ترازوی مناسب (زیربند ۶-۷) تعیین شود. بعد از آن باید مجددا در اتانول ٪ ۷۰ (کسر حجمی) (زیربند ۵-۳) یا مخلوط اتانول فرمالین انبارش شوند. برای تعیین توده زیستی جانوران به خاطر تغییر جرم در طول نگهداری و میزان خاک در لوله گوارشی کرم، اندازه‌گیری‌ها با استفاده از ضرایب منتشرشده در منابع چاپی تصحیح می‌شوند. براساس مرجع [42] کتابنامه بین ٪ ۱۰ تا ٪ ۲۰ جرم کرم‌ها در حین تثبیت کاهش می‌یابد، درحالی‌که محتوای لوله گوارشی کرم‌ها بسیار متغیر بوده ولی مقادیری حدود ٪ ۲۰ تا ٪ ۲۹ گزارش شده است [43]. کاهش جرم در مرحله تثبیت تقریبا با جرم محتوای لوله گوارشی کرم‌ها یکسان است [23]، بنابراین الزامی به تصحیح تغییرات جرم نیست. سپس جرم توده تازه اندازه‌گیری‌شده با اعمال ضریب ۰٫۱۵ [23] به جرم توده خشک قابل تبدیل است. به‌هرحال این ضریب می‌تواند براساس نوع کرم خاکی موجود در نواحی چراگاه‌ها [23] و ویژهٔ هر ناحیه تعیین شده و بسته به شکل زمین به طور قابل ملاحظه‌ای متغیر باشد.

یادآوری- در صورتیکه کرم‌های خاکی به صورت زنده شناسایی شوند، می‌توان آن‌ها را مستقیما توزین کرد (یا به صورت تکی یا گروهی، برحسب گونه و سن آن‌ها)

۸ ارزیابی داده‌ها

نتایج کسب‌شده از این اندازه‌گیری را می‌توان برای طبقه‌بندی زیستی خاک، شامل نشانگری زیستی[1] یا پایش زیستی[2]، به کار برد (برای مثال بررسی تنش‌های مربوط به حضور انسان مانند مواد شیمیایی یا تغییرات کاربری زمین):

- فراوانی (تعداد کرم‌ها در سطح یا حجم)؛

- توده زیستی (جرم تازه یا خشک کرم خاکی در سطح یا حجم)؛

- تعداد گونه‌ها یا دیگر گروه‌های تعریف شده از نظر رده‌بندی یا بوم‌شناختی؛

- نسبت برتری (به‌صورت درصد جمعیت)؛

- ساختار سنی جمعیت (به‌عنوان مثال نسبت بالغ/جوان)؛

- تنوع ریخت‌شناسی در هر یک از کرم‌ها.

نخست آنکه تعداد کرم ها شمارش شده و در هر نمونه جداگانه بیان شوند (برای جداکردن با دست و استخراج با AITC به طور مجزا). دوم اینکه، به منظور تعیین کل فراوانی کرم ها باید هر دو مقدار باهم جمع شوند. سپس برای به‌دست آوردن تعداد کرم ها در هر مترمربع، این عدد باید در یک ضریب ضرب شود [این ضریب برای نمونه‌های زمینی با مساحت نمونه‌برداری $۰/۲۵\ m^2$ (معمولا با ابعاد ۵۰ cm در ۵۰cm) برابر چهار است]. علاوه بر آن ساختار سنی کرم را می‌توان به کمک یک میکروسکوپ مخصوص کالبد شکافی (زیربند ۶-۶) تعیین کرد (کرم‌های جوان و بالغ را می‌توان به کمک کمربند تناسلی از یکدیگر تشخیص داد).

۹ گزارش آزمون

نتایج آزمون باید حداقل شامل آگاهی‌های زیر باشد:

الف- ارجاع به این استاندارد؛

ب- شرح کاملی از طرح آزمون و روش‌های اجرایی؛

پ- مشخص کردن خصوصیات منطقه آزمون (مخصوصا ویژگی‌های خاک)؛

ت- روش نمونه‌برداری؛

1- Bioindication
2- Biomonitoring

ث- توضیح شرایط نمونه‌برداری، شامل تاریخ و مدت زمان نمونه‌برداری در مکان نمونه‌برداری و عوامل آب و هوایی مثل دمای هوا؛

ج- تعداد کرم‌های گرفته‌شده از خاک، به صورت متمایز براساس روش نمونه‌برداری (یعنی جداکردن با دست، استخراج با AITC)؛

چ- جزئیات تثبیت ونگهداری مواد زیستی؛

ح- در صورت مقتضی، توده زیستی کرم‌های گرفته‌شده از خاک؛

خ- در صورت نیاز، محاسبه مجدد مقادیر برای ۱ m^2 یا هر مقیاس استاندارد دیگری؛

د- تمامی اطلاعات، شامل داده‌های خام اندازه‌گیری‌شده، که در طول انجام آزمون به‌دست آمده است؛

ذ- بحث در خصوص نتایج؛

ر- تمامی جزئیاتی و مواردی که در این استاندارد به آن‌ها اشاره نشده است یا آن‌هایی که اختیاری هستند، همچنین مواردی که اتفاقی یا تصادفی پیش آمده‌اند و ممکن است نتایج آزمون را تحت تاثیر قرار بدهند.

پیوست الف

(آگاهی‌دهنده)

روش‌های دیگر نمونه‌برداری

الف-۱ روش استخراج الکتریکی

تیلمن[1] [35] علاوه بر روش جدا کردن با دست و استخراج با مواد شیمیایی بیرون‌ران، یک روش نمونه‌برداری دیگر به نام روش اُکتت[2]، معرفی کرد. این روش با استفاده از یک حلقه هشت الکترودی به قطر ۵۲ cm برای تولید میدان الکتریکی انجام می‌شود تا به‌وسیله آن کرم‌ها از درون خاک بیرون آیند. فواید این روش عبارت است از: عدم استفاده از مواد شیمیایی سمی، عدم نیاز به آب و مشکلات کمتر و سرعت بیشتر نسبت به دیگر روش ها. ضعف این روش شامل سنگینی تجهیزات و هزینه بالای آن است. مهم‌تر آنکه به نظر می‌رسد میزان موفقیت این روش به‌طور کامل به شرایط واقعی خاک بستگی دارد (به‌ویژه رطوبت). مقایسه‌های مختلف، فواید واضح روش‌های الکتریکی را در مقایسه با روش‌های شیمیایی به وضوح نشان نمی‌دهد [38]. بنابراین این روش تنها زمانی توصیه می شود که چندین قطعه نزدیک به هم وجود داشته باشد و همچنین هنگام ارزیابی اثرات مواد شیمیایی یا در نواحی حفاظت‌شده‌ای که جداکردن با دست مجاز نمی‌باشد.

الف-۲ استخراج با خردل

گان[3] [13] پیشنهاد کرد که به منظور استخراج کرم‌ها می‌توان موادی را که بالقوه سمی هستند (مثل فرمالین) با پودر خردل جایگزین کرد. خردل به این دلیل انتخاب شده بود که می توانست باعث واکنش اجتنابی[4] از طرف کرم‌های خاکی شود. به‌عنوان مثال، ۶۰ g پودر خردل مخلوط‌شده در ۱۰ l آب که برای یک سطح معین به‌کار می‌رود، دقیقا شبیه یک استخراج‌کننده عمل می‌کند. مقایسه بین روش‌های مختلف، نتایج متغیری را ارائه می‌دهد که این عمل ارزیابی را مشکل می‌کند [17]، اما به‌طور معمول بازده استخراج به روش خردل در مقایسه با روش فرمالین کمتر است [38]. مشابه دیگر روش‌های کار، باید استخراج با خردل با روش جداکردن با دست ترکیب شود چون در غیر اینصورت چگالی جمعیت کرم های خاکی (به‌ویژه گونه‌های *اِندوژئیک*[5]) کم تخمین زده شوند [21].

1- Thielemann
2- Octet
3- Gunn
4- Avoidance reaction
5- Endogeic species

پیوست ب

(آگاهی‌دهنده)

تعیین گونه‌ها در کرم‌های خاکی

شناسایی کرم‌های خاکی خانواده *Lumbricidae* نمونه‌برداری‌شده در بیشتر قسمت‌های اروپا و همچنان‌که در قسمت‌های شرقی کانادا و ایالات متحده آمریکا، از راهنماهای ارائه‌شده در مراجع [5]، [12] یا [32] کتابنامه تبعیت می‌کند. در مرجع [34] راهنمایی‌هایی دوگانه برای تعیین سن عمومی‌ترین گونه کرم‌های خاکی خانواده *Lumbricidae* ارائه شده است. یک مقدمه عالی در تعیین گونه‌های کرم‌های خاکی در مرجع [19] ارائه شده است. تاکنون هیچ‌گونه راهنمای جامعی در مورد کرم‌های خاکی از دیگر قسمت‌های دنیا در دسترس نبوده و به‌ویژه کرم‌های مناطق استوایی مثل *Glossoscolecidae* (آمریکای لاتین)، *Eudrilidae* (آفریقا) یا *Megascolecidae* [آسیا، آمریکای شمالی (کرانه اقیانوس آرام)] به کل فاقد این راهنماها هستند. به‌هرحال شرح کامل انواع گونه‌های کرم خاکی غیر بومی در دنیا، حدود ۱۰۱ گونه را شامل می‌شود (۳۶ گونه از خانواده *Megascdecidae*، ۳۴ گونه از خانواده *Lumbricidae* و ۳۱ گونه از خانواده‌های دیگر) [4].

تمام مشخصه‌های مهم داخلی و خارجی را می‌توان به راحتی با میکروسکوپ مخصوص کالبد شکافی مشاهده کرد. در مواردی که باید کرم‌ها به‌صورت زنده بررسی شوند، از نظر فنی، فرآیند تعیین می‌تواند با استفاده از لوله‌های شیشه‌ای کوچک که در آن کرم‌های خاکی زنده قرار داده شده است، تسهیل شود [36]. به دلیل ناتوانی در حرکت، خواص خارجی به آسانی قابل تشخیص هستند.

پیوست پ

(آگاهی‌دهنده)

روش اصلاح‌شده TSBF

مشخصه اصلی روش پیشنهادشده در این استاندارد، مشابه با روشی است که به‌عنوان روش اصلاح‌شده TSBF (زیست شناختی و حاصلخیزی خاک مناطق استوایی[1] [1]) شناخته شده است. بعبارت دیگر هر دو براساس ترکیبی از دو روش جدا کردن با دست و استخراج با ماده شیمیایی می‌باشند. ولی دامنه کاربرد این روش جامع‌تر بوده و نمونه‌برداری از کل جانوران بزرگ را پوشش می‌دهد. روش TSBF اصلاح‌شده که در اصل برای نواحی استوایی ایجاد شده است، برای نواحی معتدل نیز قابل اجرا است. این روش در سه مرحله انجام می‌شود:

الف- در صورت وجود بستر جانوری، آن بسترها جمع‌آوری‌شده و درون کیسه‌های پلاستیکی مقاوم و کاملا بدون منفذ قرار داده شده تا از کاهش جانوران در بستر جانوری جلوگیری به‌عمل آید. در طول این فرایند، جانوران قابل رویت نیز با دست برداشته شده و درون ظروف پلاستیکی انبارش می‌شوند.

ب- بلوک های خاک (یکپارچه) با اندازه ۱۵ cm × ۲۵ cm × ۲۵ cm درون کیسه‌های پلاستیکی قرار گرفته و به آزمایشگاهی منتقل می‌شوند که در آن‌جا جداکردن با دست انجام می‌شود.

پ- در گودال باقی مانده، محلول فرمالین [٪ ۰٫۲(کسر حجمی)] در فواصل زمانی ۱۰ min پاشیده شده تا تمام جانوران فعال باقی مانده در خاک خارج شوند.

چندان مشخص نیست که روش TSBF چه زمانی در خصوص استفاده از فرمالین اصلاح خواهد شد. در حال حاضر AITC به عنوان بخشی از روش TSBF در نظر گرفته شده است، به این معنی که تغییر در مایع استخراج‌کننده توصیه می‌شود.

معمولا در هر سطح نمونه (به‌عنوان مثال زمین مورد استفاده ویژه)، سه قطعه زمین استفاده می‌شود. در هر قطعه زمین ۸ تا ۱۰ بلوک خاک برداشته می‌شود که هر کدام با فاصله دست کم ۷ m از یکدیگر جدا شده‌اند. نمونه‌برداری از این بلوک ها به صورت برش عرضی انجام می‌شود که اگر کل قطعه زمین برای یک مقطع عرضی بزرگ، خیلی کوچک باشد، بلوک ها به بخش‌های موازی تقسیم می‌شوند.

1- Tropical Soil Biology and Fertility

پیوست ت

(الزامی)

تعیین بیشترین ظرفیت نگهداری آب

ت-۱ کلیات

روش زیر برای تعیین ظرفیت نگهداری آب (WHC)[1] توسط خاک منطقه مورد مطالعه تهیه شده است:

ت-۲ تجهیزات

ت-۲-۱ **لوله شیشه ای**، با قطر تقریبی ۲۰ mm تا ۵۰ mm با حداقل طول ۱۰۰ mm.

ت-۲-۲ **حمام آب**، در دمای اتاق.

ت-۲-۳ **کاغذ صافی**.

ت-۲-۴ **آون خشک کن**، تنظیم‌شده به °C (۵ ±۱۰۵).

ت-۲-۵ **ترازو**، با توانایی وزن کردن با دقت اندازه‌گیری g ۰٫۱±.

ت-۳ روش کار

ته لوله را با کاغذ صافی مسدود کنید، و بعد از پر کردن آن با خاک مصنوعی تا عمق ۵ cm تا ۷ cm، آن را در جا لوله ای قرار داده و در حمام آب بگذارید. به آرامی لوله را داخل حمام آب غوطه‌ور سازید تا جایی که سطح آب بالاتر از قسمت بالایی خاک اما پایین‌تر از لبه لوله باشد. بگذارید تا نمونه به مدت ۳ h در حمام آب بماند.

از آنجایی که همه آبی که توسط بستر به‌وسیله خاصیت موئینگی جذب شده نمی‌تواند حفظ شود، لوله حاوی نمونه باید به مدت ۲ h بر روی پودر ریز بسیار مرطوب بستر شن کوارتز مورد استفاده برای زهکشی قرار داده شود. شن کوارتزی که برای بستر لایه‌ای خاک مورد استفاده قرار می‌گیرد نیز مورد قبول است.

نمونه را وزن کنید، آن را در دمای °C ۱۰۵ خشک کنید تا به جرم پایدار برسد سپس آن را مجدد وزن کنید.

ت-۴ محاسبه ظرفیت نگهداری آب

$$WHC = \frac{m_S - m_T - m_D}{m_D} \times 100 \qquad (ت-۱)$$

که در آن

1- Water-holding-capacity

WHC ظرفیت نگهداری آب بر حسب در صد ماده خشک؛

m_S جرم بستر اشباع با آب به اضافه جرم لوله به اضافه جرم کاغذ صافی؛

m_T جرم خالص (جرم لوله به اضافه جرم کاغذ صافی)؛

m_D جرم بستر خشک است.

پیوست ث

(آگاهی دهنده)

مثال‌هایی از برنامه‌های پایش کرم‌های خاکی (به همراه بیان نتایج آن‌ها)

ث-۱ کلیات

به منظور بهبود عملکرد، به‌ویژه در مورد تفسیر و بیان نتایج مطالعات پایش کرم‌های خاکی، تعدادی مثال در این پیوست آورده شده است . لازم به ذکر است که اطلاعات ارائه‌شده در این مطالعه صرفا به‌عنوان پیشنهادی برای چگونگی بهره‌برداری از داده‌های مربوط به پایش کرم‌های خاکی می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد.

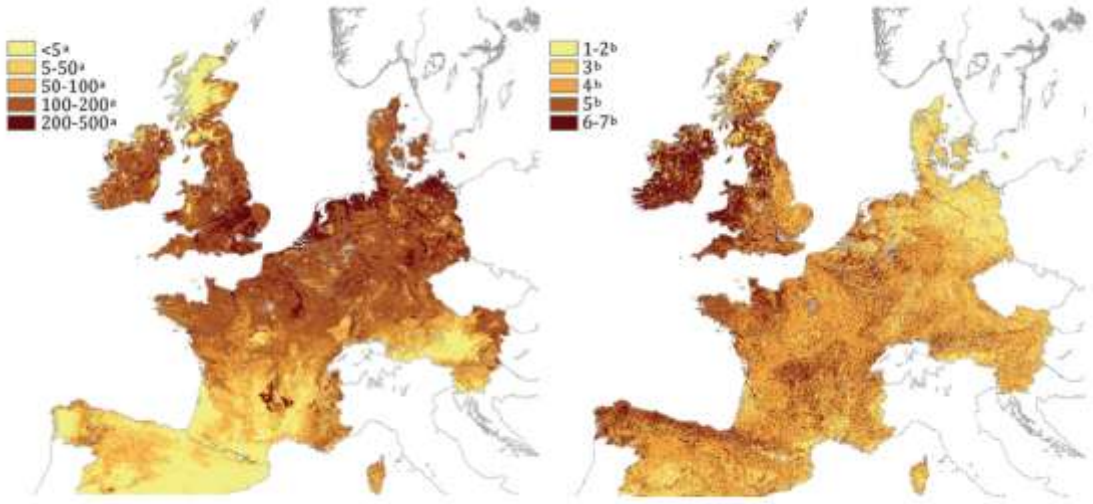
در سال‌های اخیر مشارکت اساسی برای ارزیابی زیست‌شناختی خاک در کشورهای اروپایی متعددی انجام گرفته است. اغلب نمونه‌برداری با روش باتری[1] از چندین گروه بی‌مهره متفاوت و همچنین بررسی پارامترهای میکروبی برای ارزیابی کیفیت خاک پیشنهاد می‌شود (Griffiths et al. 2016) [48]. یک تفاهم‌نامه عمومی مبنی بر اینکه نتایج حاصل از مشاهدات باید با استفاده از مقیاس‌های مرجع تعریف‌شده قبلی [که گستره عملکرد نرمال نامیده می‌شود (NORs)] ارزیابی شوند وجود دارد، که برای گونه‌های مختلف تعریف شده است (همچنین برای جمعیت‌های نهایی). به‌منظور عملی‌کردن ارزیابی تنوع زیستی، سیستم مرجع مخصوص به منطقه ایجاد شده است. در هلند، مزارعی که بر روی خاک‌های مختلف وزمین‌هایی با کاربرد متفاوت واقع شده‌اند، نمونه‌برداری شدند (برای مثال Rutgers et al. 2008) [52]. در آلمان، مناطق براساس انواع ساکنین زیستی و برپایه فاکتورهای خاک و منطقه‌ای (Riecken et al. 2006) [50] رده‌بندی شدند، در حالی که در فرانسه مناطق براساس نوع کاربری آن‌ها رده‌بندی شدند (Cluzeau et al. 2012) [46]. در هر مورد، غنای گونه‌ها[2] و فراوانی کل برای هر گروه از این مناطق محاسبه شد (همچنین لیستی تقریبی از گونه‌های مورد انتظار یا گونه‌های غایب نیز تهیه شده است). انحراف‌های معنی‌دار از این مقادیر مرجع به عنوان نشانگر عملکرد متاثرشدهٔ زیستگاه خاکی مورد مطالعه است (برای مثال Jaensch et al. 2013). در فرانسه، رده‌بندی براساس طبقه‌های بافتی خاک با استفاده از تجهیزات هیدرولیکی از خاک های اروپایی (HYPRES) مطرح شده است.

یادآوری- هر چند این اطلاعات با هدف قابلیت کاربرد به‌صورت جامع برای همه زمین‌های خاکی که زیستگاه بی‌مهرگان هستند تهیه شده‌است، با این حال اکثر اطلاعات موجود به اروپا ارجاع داده شده‌است. درعین حال ملاحظات نظری این اجازه را به ما می‌دهند که اطلاعات ارائه‌شده در این مطالعه را برای سایر مناطق مخصوصا مناطق گرمسیری آمریکای لاتین، هم معتبر بدانیم (برای مثال Gonzalez et al. 1996 [47]; Römbke et al. 2009 [51]).

1- Battery approach
2- Species richness

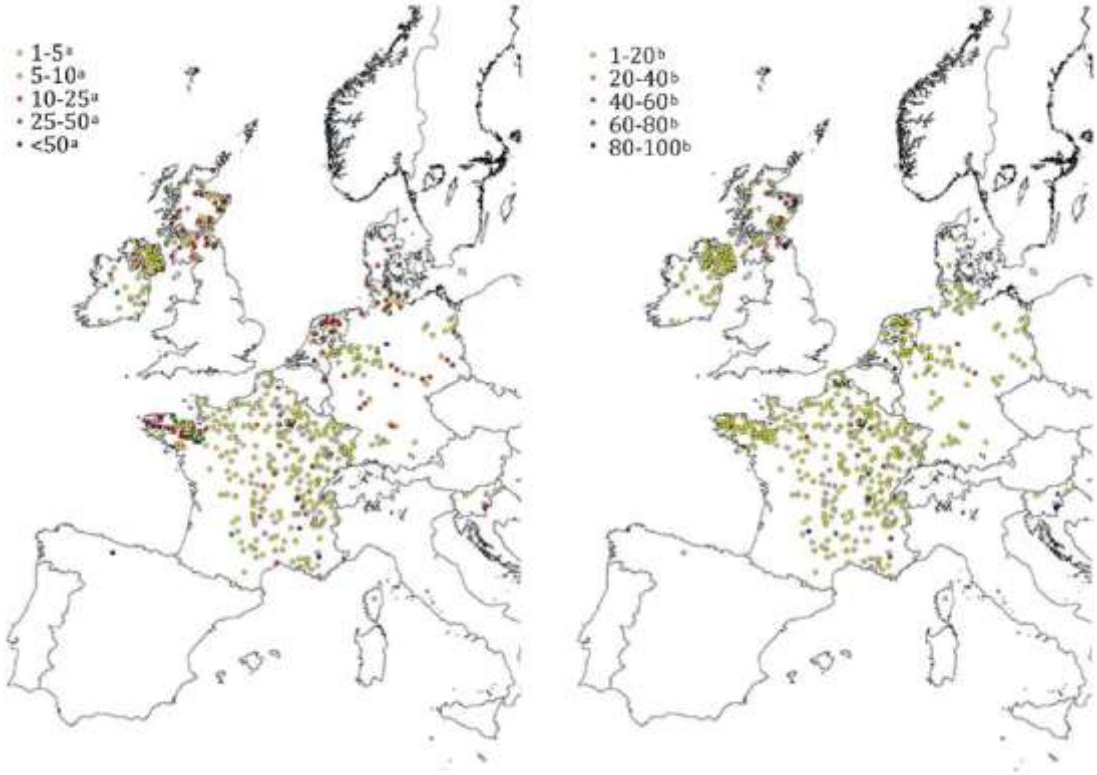
ث-۲ بیان نتایج برنامه پایش برای کرم‌های خاکی

کرم‌های خاکی بهترین گروه مورد مطالعه در زمینه بی‌مهرگان خاک هستند. آخرین گردآوری و فراتحلیل[1] در مورد برنامه‌های پایش کرم‌های خاکی توسط روتگرز وهمکارانش در سال ۲۰۱۶ انجام شده‌است [53] که داده‌ها را از سراسر اروپا به‌ویژه از فرانسه، هلند، بریتانیای کبیر، ایرلند و آلمان جمع‌آوری کرده است. همچنین داده‌های با حجم کمتر نیز توسط سایر کشورها مانند اسپانیا و دانمارک تهیه شده است. بر اساس این مطالعه می‌توان نقشه کرم‌های خاکی اروپا را ترسیم کرد، برای مثال می‌توان نقشه فراوانی کل یا تعداد گونه‌ها در هر منطقه را تهیه کرد (شکل ث-۱). به علاوه وجود گونه‌های خاص هم می‌تواند بصورت نقشه درآید برای مثال گونه‌های *Lumbricus terrestris* که ازنظر اکولوژیکی مهم هستند و لانه‌های زیرزمینی عمیقی حفر می‌کنند (شکل ث-۲).



شکل ث-۱- فراوانی پیش‌بینی‌شده (سمت چپ) و غنای پیش‌بینی‌شده جمعیت کرم‌های خاکی در اروپا (سمت راست) [53]

1- Meta-analysis



شکل ث-۲- وجود و فراوانی نسبی کرم خاکی anecic گونه *Lumbricus terrestris* [53]

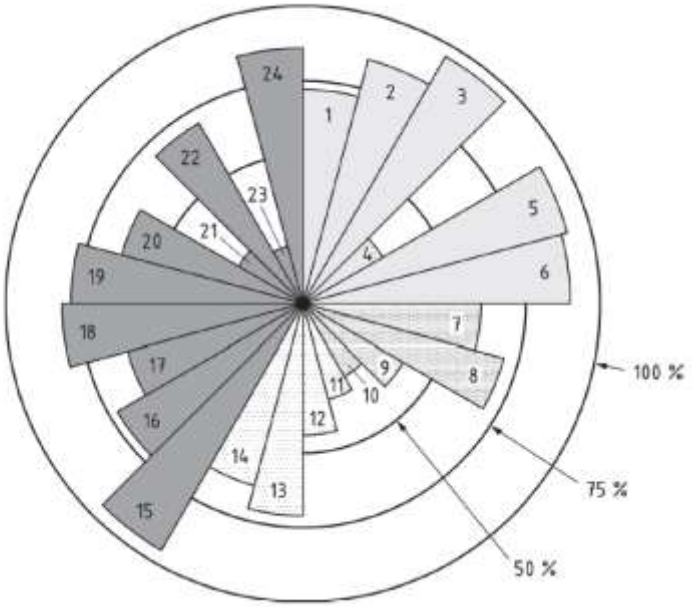
ث-۳ ارزیابی کیفیت زیست‌شناختی خاک

در قدم اول باید مشخص شود که آیا مقادیر مرجع برای هر نوع موجودات ساکن در خاک (با خصوصیات خاک و شرایط آب و هوایی مشابه) در مطالعات مختلف که در کشورهای مختلف اروپایی انجام شده اما متعلق به مناطق جرافیایی یکسانی هستند، قابل مقایسه هستند یا خیر. در جدول ث-۱، مقادیر مرجع بدست آمده به‌وسیله روش‌های متعدد، لیکن داده‌های مربوط به نمونه‌برداری‌هایی که با روش استاندارد انجام شده‌اند، مقایسه شده‌اند. فراوانی و تعداد گونه‌های کرم‌های خاکی به‌دلیل اینکه دسترسی بهتر به این موجودات در مقایسه با دیگر موجودات ساکن خاک مقدوراست، به عنوان مثال در این مطالعه استفاده شده است. چنین رویکردی در فرانسه [46] و در آلمان [44] نیز تهیه شده است. مقادیر به دست آمده به راحتی قابل مقایسه نیستند چرا که نه تنها نوع خاک در تفسیر تعداد وتنوع زیستی گونه‌ها اهمیت دارد بلکه اقدامات و زمان نمونه‌برداری نیز حائز اهمیت می‌باشد.

جدول ث-۱- مقایسه مقادیر میانگین فراوانی کرم‌های خاکی (Ind/m2) (نیمهٔ راست جدول) و تعداد گونه‌ها (نیمه چپ جدول) برای چهار نوع ریستگاه در هلند (RIVM) و آلمان (UBA) و فرانسه (RMQS/INRA/University of Rennes)

گروه‌بندی گونه ها	مرجع هلند	مرجع آلمان	مرجع فرانسه	مرجع هلند	مرجع آلمان	مرجع فرانسه
	میانگین فراوانی (Ind/m^2)			میانگین تعداد گونه ها (Ind/m^2)		
سایت‌های زراعی در خاک‌های رسی	۲۰۰	۱۰۲	۲۵۹	۴٫۲	۴٫۴	۳٫۲
سایت‌های زراعی در خاک‌های لومی/سیلتی	-	-	۲۲۴	-	-	۳٫۲
سایت‌های زراعی در خاک‌های شنی	۷۷	۳۲	۸۸	۲٫۸	۳٫۳	۳٫۶
چمنزار در خاک‌های رسی	۷۹۳	۴۲	۴۱۸	۸٫۳	۹٫۱	۸٫۰
چمنزار در خاک‌های لومی/سیلتی	-	-	۳۸۳	-	-	۸٫۷
چمنزار در خاک‌های شنی	۶۴	۱۰۴	۵۹۵	۴٫۸	۵٫۱	۸٫۵

با این حال، مقایسه و بررسی چنین اطلاعاتی دشوار است. این دشواری در مورد استفاده از شاخص‌های متنوع نیز صدق می‌کند چرا که بخش اعظمی از اطلاعات در صورتیکه تمام اطلاعات به دست آمده در مطالعه پایش در قالب یک یا تعداد محدودی مقدار بیان شوند، از بین می‌رود. بنابراین، در هلند یک شیوه گرافیکی (که *Amoebae* نامیده می‌شود) که از تصویرسازی اطلاعات گروه‌های مختلف ارگانیسمی و/یا نتایج نهایی، حاصل می‌شود پیشنهاد شده است (شکل ث-۳) [45]. این شیوه، فاصله مابین مقدار واقعی اندازه‌گیری‌شده برای یک نتیجه نهایی (مثلا فراوانی کرم خاکی) را بیان می‌کند. در این مثال، این مقادیر در یک سایت مزرعه معمول تعیین شده است. منطقه مطلوب با دایره سفید بیرونی نمایش داده شده است (بر اساس اطلاعات سایت مرجع که در اینجا یک مزرعه غیرمعمول است) و برای آن عدد ۱۰۰٪ تعیین شده است، کیفیت متوسط با دایره خاکستری (۷۵٪ مطلوبیت) و کیفیت پایین با دایره مشکی در وسط (۵۰٪ مطلوبیت) نشان داده شده است [45]. با این حال این تغییرات به طور مستقیم قابل انتقال به تصمیمات اکولوژیکی نیستند. برای مثال آیا ارزش نصف جمعیت نماتدها برابر با ارزش نصف مقدار کرم‌های *Enchtraeidae* است؟



راهنما:

میکرو ارگانیسم‌ها

1 باکتری‌های هتروتروف (۷۲٪)

2 واحدهایی که به شکل کلنی هستند (۸۵٪)

3 ظرفیت نیتریفیکاسیون (۹۶٪)

4 باکتری‌های زیست توده (۳۱٪)

5 الحاق اسید آمینه لوسین[a] (۹۲٪)

6 الحاق اسید آمینه تیمیدین[b] (۹۲٪)

کرم‌های خاکی

7 کرم‌های سطح‌زی[c] (۶۰٪)

8 کرم‌های میان‌زی[d] (۷۰٪)

9 توده زیستی کرم‌های خاکی (۳۹٪)

10 فراوانی کرم‌های خاکی (۲۸٪)

کرم‌های *Enchtraeidae*

11 تعداد گونه‌های فردریکا[e] (۳۳٪)

12 توده زیستی کرم‌های *Enchtraeidae* (۴۴٪)

13 فراوانی کرم‌های *Enchtraeidae* (۷۱٪)

14 تعداد تاکسون‌های کرم‌های *Enchtraeidae* (۶۳٪)

نماتدها

15 شاخص تغذیه‌ای نماتدها (۹۵٪)

16 تعداد تاکسون‌های نماتدها (۷۲٪)

17 فراوانی نماتدها (۶۱٪)

18 شاخص بلوغ (۸۱٪)

19 گروه‌هایی با عملکرد متنوع (۷۸٪)

20 نماتدهایی با تغذیه گیاهی متنوع (۶۳٪)

21 تنوع نماتدهای همه چیز خوار (۲۵٪)

22 تنوع نماتدهایی با تغذیه هیف قارچی (۷۰٪)

23 تنوع نماتدهای گوشت‌خوار (۲۰٪)

24 نماتدهای با تغذیه باکتریایی (۸۶٪)

یادآوری- تمامی نتایج منطقه مرجع (مزرعه زیستی) در مقیاس ٪ ۱۰۰ سنجیده شده‌اند (لایه بیرونی). لایه‌های داخلی‌تر ٪ ۷۵ و ٪ ۵۰ مقدار مرجع را دربرمی‌گیرد. نتایج پایش هر یک از مزارع در تکه‌های مختلف نمودار، برای هر نتیجه نهایی به صورت متفاوت، نشان داده شده است [45]

[a] Leucine incorporation
[b] Thymidine incorporation
[c] Epigé worms
[d] Endogé worms
[e] Friderica species

شکل ث-۳- معرفی نتایج مشاهدات گروه خاصی از گونه‌ها در مزارع به شکل آمیبی

کتابنامه

[1] Anderson J.M., & Ingram J.S.I. Tropical Soil Biology and Fertility: A Handbook of Methods. C A B International, Wallingford, UK, 1993

[2] Bartlett M.D., Briones M.J.I., Neilson R., Schmidt O., Spurgeon D., Creamer R.E. A critical review of current methods in earthworm ecology: From individuals to populations. Eur. J. Soil Biol. 2010, 46, pp. 67–73

[3] BBodSchG. 1998: Gesetz zum Schutz vor schädlichen Bodenveränderungen und zur Sanierung von Altlasten (Bundes-Bodenschutzgesetz -BBodSchG) vom 17. März 1998. BGBL I, Nr. 16, S. pp. 502–510

[4] Blakemore R. 2002: Cosmopolitan Earthworms – an Eco-Taxonomic Guide to the Peregrine Species of the World. VermEcology, P.O. Box 414 Kippax, ACT 2615, Australia. 426 pages and 80 figures

[5] Bouché M. 1972: Lombriciens de France. Ecologie et Systématique. Paris, France: INRA Publ. 72–2, Institut National de Recherches Agriculturelles. 671 pages

[6] Bretscher K. Die Oligochaeten von Zürich. Rev. Suisse Zool. 1896, **3**, pp. 499–532

[7] Coja T., Zehetner K., Bruckner A., Watzinger A., Meyer E. Efficacy and side effects of five sampling methods for soil earthworms (Annelida, Lumbricidae). Ecotoxicol. Environ. Saf. 2008, **71**, pp. 552–565

[8] Darwin C. The formation of vegetable mould through the actions of worms with observations on their habits. Murray, London, 1881, 298 p

[9] Dunger W., & Fiedler H.-J. Methoden der Bodenbiologie. Fischer Verl, Jena, 1997, 539 p

[10] Edwards C.A., & Bohlen P.R. Biology of Earthworms. Chapman and Hall, London, 1997, 276 p

[11] Graefe U., & Schmelz R.M. Indicator values, strategy types and life forms of terrestrial Enchytraeidae and other microannelids. Newsletter on Enchytraeidae. 1999, **6**, pp. 59–67

[12] Graff O. Die Regenwürmer Deutschlands. Schriftenreihe Forschungsinstitut Landwirtschaft. 1953, **7**, pp. 1–70

[13] Gunn A. The use of mustard to estimate earthworm populations. Pedobiologia (Jena). 1992, **36**, pp. 65–67

[14] Heeb J., & Vetter F. 1995: Ansatz für eine integrative Auswertung bodenbiologischer Messergebnisse. Umweltmaterialien. BUWAL (ed.), Schattweid, Switzerland

[15] Koshiba M., Ogawa K., Hamazaki S., Sugiyama T., Ogawa O., Kitajima T. The effect of formalin fixation on DNA and the extraction of high-molecular weight DNA from fixed and embedded tissues. Pathol. Res. Pract. 1993, **189**, pp. 66–72

[16] Lavelle P. The soil system in the humid tropics. Biology International. 1984, **9**, pp. 2–17

[17] Lawrence A.P., & Bowers M.A. A test of the “hot” mustard extraction method of sampling earthworms. Soil Biol. Biochem. 2002, **34** (4), pp. 549–552

[18] Lee K.E. Earthworms. Their Ecology and Relationships with Soils and Land Use. Academic Press, Sydney, 1985, 411 p

[19] Ljungström P.-O. Introduction to the study of earthworm taxonomy. Pedobiologia (Jena). 1979, **10**, pp. 265–285

[20] Nagel R. 1996: Die Bedeutung von Regenwürmern für den C- und N-Umsatz in einer heterogenen Agrarlandschaft. Dissertation University of Munich, 126 pages

[21] Nuutinen V., Pöyhönen S., Ketoja E., Pitkänen J. Abundance of the earthworm *Lumbricus terrestris* in relation to subsurface drainage pattern on a sandy clay field. Eur. J. Soil Biol. 2001, **37**, pp. 301–304

[22] Pelosi C., Bertrand M., Capowiez Y., Boizard H., Roger-Estrade J. Earthworm collection from agricultural fields: Comparisons of selected expellants in presence/absence of hand-sorting. Eur. J. Soil Biol. 2009, **45**, pp. 176–183

[23] Petersen H., & Luxton M. A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos. 1982, 39, pp. 287–388

[24] Raw F. Estimating earthworm populations by using formalin. Nature. 1959, 184, pp. 1661–1662

[25] Römbke JBeck LFörster BFründ C.-HHorak FRuf A. et al. Boden als Lebensraum für Bodenorganismen – Literaturstudie. Texte und Berichte zum Bodenschutz Nr. 4/97. Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe, 1997, 437 p

[26] Römbke J., Meller M., Garcia M. Earthworm densities in central Amazonian primary and secondary forests and a polyculture forestry plantation. Pedobiologia (Jena). 1999, **43**, pp. 518–522

[27] Römbke J., & Kalsch W. Protokoll des Internationalen Fachgesprächs über „Ansätze für biologische Bewertungsstrategien und –konzepte im Bodenschutz. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Bonn, 2000, 70 p

[28] Römbke J., & Vollmer T. 2015: Position paper of the Ad-hoc Working Group “OECD Earthworm Field Testing Group (OEFTG)”, WG 1: Modification of the extraction method. 13 pp

[29] Rundgren S. Vertical distribution of lumbricids in southern Sweden. Oikos. 1975, 26, pp. 299–30643] Satchell J.E. Earthworms. In: Methods of study in quantitative soil ecology: population, production and energy flow, (Phillipson J., ed.). Blackwell, Oxford, UK, 1971, pp. 107–27

[30] Satchell J.E. ed. Earthworm Ecology: From Darwin to Vermiculture. Chapman & Hall, London, 1983

[31] Schouten A.J., Breure A.M., Bloem J., Didden W., De Ruiter P.C., Siepel H. 1999: Life support functies van de bodem: operationalisiering t.b.v. het biodiversiteitsbeleid. RIVM Report 607601003, 55 pages

[32] Sims R.W., & Gerard B.M. Earthworms. In: Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31 (Revised). London: E.J. Brill/Dr, (Barnes R.S.K., & Crothers J.H. eds.). Backhuys, W., 1999

[33] Spurgeon D.J., Sandifer R.D., Hopkin S.P. The use of macro-invertebrates for population and community monitoring of metal contamination - indicator taxa, effect parameters and the need for a soil invertebrate prediction and classification scheme

(SIVPACS). In: Bioindicator Systems for Soil Pollution, (Van Straalen N.M., & Krivolutsky D.A. eds.). Kluwer Academic Publ, Dordrecht, 1996, pp. 95–109

[34] Stöp-Bowitz C. 1969: A contribution to our knowledge of the systematics and zoogeography of Norwegian earthworms. Nytt magasin zoologi, 17, pp. 169–280

[35] Thielemann U. Elektrischer Regenwurmfang mit der Oktett-Methode. Pedobiologia (Jena). 1986a, **29**, pp. 296–302

[36] Thielemann U Glasröhrchenmethode zur Lebendbestimmung von Regenwürmern. Pedobiologia (Jena). 1986b, **29**, pp. 341–343

[37] Van Straalen N.M., & Krivolutsky D.A. 1996: Bioindicator Systems for Soil Pollution. NATO ASI Series. 2: Environment, 16, 261 pages

[38] Vetter F. Methoden zur Regenwurm-Extraktion. Vergleich der Formalin-, Senf- und Elektromethode. Umweltmaterialien Nr. 62. BUWAL, Bern, 1996, 45 p

[39] Weeks J.M., Hopkin S.P., Wright J.F., Black H., Eversham B.C., Roy D. 1997: A Demonstration of the Feasibility of SOILPACS. Final Report HMIP/CPR2/41/1/247. 180 pages

[40] Zaborski E.R. Allyl isothiocyanate: an alternative chemical expellent for sampling earthworms. Appl. Soil Ecol. 2003, **22**, pp. 87–95

[41] Zicsi A. Determination of number and size of sampling unit for estimating lumbricid populations of arable soils. In: Progress in Soil Zoology, (Murphy P.W. ed.). Butterworth Ltd, London, 1958, pp. 68–71

[42] ISO 11268-3, *Soil quality — Effects of pollutants on earthworms — Part 3: Guidance on the determination of effects in field situations*

[43] ISO 18400-101, *Soil quality — Sampling — Part 101: Framework for the preparation and application of a sampling plan*

یادآوری- استاندارد ملی ایران شماره ۱۰۱-۱۵۷۹۶ سال ۱۳۹۷، کیفیت خاک- نمونه برداری- قسمت ۱۰۱: چارچوبی برای آماده- سازی و کاربرد طرح نمونه- برداری ISO 18400-101: 2017 تدوین شده است.

[44] Beylich A., & Graefe U. 2009): Investigations of annelids at soil monitoring sites in Northern Germany: reference ranges and time-series data. Soil Organisms, **8**: 175–196

[45] Breure A.M., Rutgers M., Bloem J., Brussaard L., Didden W. Jagers op Akkerhuis, G., Mulder, Ch., Schouten, A.J., Van Wijnen, H.J. (2003): Ecologische kwaliteit van de bodem. RIVM report 607604005 (32 pp)

[46] Cluzeau D., Guernion M., Chaussod R., Martin-Laurent F., Villenave C., Cortet J., Ruiz-Camacho N., Pernin C., Mateille T., Phillipot L., Bellido A., Rouge´ L., Arrouays D., Bispo A., Peres G. 2012): Integration of biodiversity in soil quality monitoring: Baselines for microbial and soil fauna parameters for different land-use types. Europ. J. Soil Biol. **49**: 63–72

[47] Gonzalez G., Zou X., Borges S. 1996): Earthworm abundance and species composition in abandoned tropical croplands: comparisons of tree plantations and secondary forest. Pedobiologia **40**: 385–391

[48] Griffiths B.S., Römbke J., Schmelz R., Scheffczyk A., Faber J., Bloem J., Peres G., Cluzeau D., Chabbi A., Suhadolc M., Sousa J.P., Martins da Silva P., Carvalho F.,

Mendes S., Morais P., Francisco R., Costa D., Pereira C., Bonkowski M., Geisen S., Bardgett R.D., Bolger T., Schmidt O., Winding A., Hendriksen N. B., Johansen A., Philippot L., Plassart P., Bru D., Thomson B., Griffiths R.I., Rutgers M., Mulder C., Hannula E., Creamer R., Stone D. 2016): Selecting cost effective and policy-relevant biological indicators for European monitoring of soil biodiversity and ecosystem function (EcoFINDERS). Ecol. Indicators. **69**: 213–223

[49] Jänsch S., Steffens L., Höfer H., Horak F., Ross-Nickoll M, Russell D., Toschki A., Römbke J. 2013): State of knowledge of earthworm communities in German soils as a basis for biological soil quality assessment. Soil Organisms **85**: 215–232 + Electronic Supplement

[50] Riecken U., Finck P., Raths U., Schröder E., Ssymank A. 2009): German Red Data Book on endangered habitats (short version. July 2009). – German Federal Agency for Nature Protection. Bonn-Bad Godesberg, Germany [http: //www .bfn .de/0322 biotope+M52087573ab0 .html]

[51] Römbke J., Schmitt P., Hoefer H. 2009): The earthworm fauna of forests and anthropogenic habitats in the coastal region of Paraná (southern Mata Atlântica), an example of sincere biodiversity reduction. Pesq. agropec. bras. 44: 1040–1049

[52] Rutgers M., Mulder C., Schouten A. J., Bloem J., Bogte J. J., Breure A. M., Brussaard L., de Goede R. G. M. J. H. Faber, G. A. J. M. Jagers op Akkerhuis, H. Keidel, G. W. Korthals, F. W. Smeding, C. Ter Berg and N. van Eekeren (2008): Soil ecosystem profiling in the Netherlands with 10 references for biological soil quality. – RIVM-Report 607604009: 85 pp

[53] Rutgers M., Orgiazzi A., Gardi C., Römbke J., Jänsch S., Keith A., Neilson R., Boag B., Schmidt O., Murchie A.K., Blackshaw R.P., Pérès G., Cluzeau D., Guernion M., Briones, M.J.I., Rodeiro J., Piñeiro R., Díaz-Cosin D., Sousa J.P., Suhadolc M., Kos I., Krogh P.H., Faber J., Mulder C., Bogte J.J., van Wijnen H.J., Schouten A.J., de Zwart D. 2016): Mapping earthworm communities in Europe. Applied Soil Ecology **97**: 98–111