



جمهوری اسلامی ایران

Islamic Republic of Iran

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

Institute of Standards and Industrial Research of Iran



استاندارد ملی ایران

۱۲۷۷۳-۱

چاپ اول

ISIRI

12773-1

1st.Edition

کیفیت خاک – نمونه برداری از بی مهرگان

موجود در خاک

قسمت اول: جدا کردن کرم خاکی با دست و

استخراج آن با فرمالین

Soil quality – sampling of soil invertebrates
– part1: Hand- sorting and formalin
extraction of earthworms.

ICS:13.080.30;13.080.05

به نام خدا

آشنایی با مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

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

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه* صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف-کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود. پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادات در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذیصلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند در کمیته ملی طرح و بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که مؤسسه استاندارد تشکیل می دهد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)^۱ کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)^۲ و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)^۳ است و به عنوان تنها رابط^۴ کمیسیون کدکس غذایی (CAC)^۵ در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بینالمللی بهره گیری می شود. مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و / یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. مؤسسه می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سا زمانها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، مؤسسه استاندارد این گونه دام سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آنها نظارت می کند. ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این مؤسسه است.^۶

* مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

1. International organization for Standardization

2. International Electro technical Commission

3. International Organization for Legal Metrology (Organization International de Metrology Legal)

4. Contact point

5. Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

" کیفیت خاک – نمونه برداری از بی مهرگان موجود در خاک
قسمت اول: جدا کردن کرم خاکی با دست و استخراج آن با فرمالین "

رئیس :

سمت و / یا نمایندگی

عطروش، محمدصادق
(لیسانس شیمی)
(فوق لیسانس مدیریت، گرایش صنعتی)

سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

دبیر :

گوهری، اختراسادات
(لیسانس مهندسی شیمی)

انجمن دارندگان نشان استاندارد ایران

اعضاء : (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

ابراهیم، الهام
(لیسانس شیمی)
ارسالی، سارا
(فوق لیسانس شیمی تجزیه)

انجمن دارندگان نشان استاندارد ایران

انجمن دارندگان نشان استاندارد ایران

اسماعیل بیگی، زهره
(لیسانس شیمی)
امیری، ندا
(فوق لیسانس بیوفیزیک)
قزاقی، سارا
(فوق لیسانس مهندسی کشاورزی)

شرکت بازرسی مهندسی معیارگران جهان

شرکت بازرسی مهندسی معیارگران جهان

انجمن دارندگان نشان استاندارد ایران

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
ب	آشنایی با موسسه استاندارد
ج	کمیسیون فنی تدوین استاندارد
د	پیش گفتار
ه	مقدمه
۱	۱ هدف و دامنه کاربرد
۱	۲ مراجع الزامی
۲	۳ اصطلاحات و تعاریف
۳	۴ اصول کلی
۳	۵ معرف ها
۴	۶ دستگاه ها
۴	۷ روش آزمون
۵	۸ ارزیابی داده ها
۹	۹ گزارش تحقیقات
۱۰	پیوست الف(اطلاعاتی)روش های دیگر نمونه برداری
۱۱	پیوست ب (اطلاعاتی)تعیین گونه ها در کرم خاکی غیر بومی
۱۲	پیوست پ(اطلاعاتی)روش اصلاح شده TSBF
۱۳	پیوست ت(اطلاعاتی)کتابنامه
۱۴	

پیش‌گفتار

استاندارد « کیفیت خاک – نمونه برداری از بی مهرگان موجود در خاک قسمت اول: جدا کردن با دست کرم خاکی و استخراج آن با فرمالین » ، که پیش نویس آن در کمیسیون های مربوط توسط انجمن دارندگان نشان استاندارد در ۲۵۵ اجلاس کمیته ملی استاندارد میکرو بیولوژی مورخ ۸۸/۱۲/۵مورد تصویب قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع ، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع 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 استفاده کرد. منبع و مأخذی که برای تدوین این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است :

ISO 23611-1:2006- Soil quality – sampling of soil invertebrates – part1: Hand-sorting and formalin extraction of earthworms.

این استاندارد بدلیل لزوم رشد استانداردسازی روش های جانورشناسی خاکی در مزارع تدوین شده است. بطور کلی این روش ها شامل نمونه برداری، استخراج و نگهداری بی مهرگان موجود در خاک بوده و می دهد، برای مقاصد زیر ضروری هستند:

- طبقه بندی زیستی^۱ خاک ها شامل ارزیابی کیفیت خاک
- نشانگرهای زیستی^۲ خاک و نظارت طولانی مدت
- ارزشیابی اثرات مواد شیمیایی موجود در حیوانات خاکی (به استاندارد ملی ایران شماره^۳..... مراجعه شود)

بدلیل اینکه داده های مربوط به این مقاصد، اساس تصمیمات فراگیری هستند، باید با روش های استاندارد گرد آوری شوند. (به عنوان مثال آیا توصیه می شود که یک ناحیه مورد نظر درمان شود یا خیر). در واقع فقدان چنین روش های استاندارد، یکی از مهمترین دلایلی است که چرا طبقه بندی زیستی و زیست سنجشی^۴ در زیستگاه خاکی (مثل خاک) در مقایسه با نواحی آبی نسبتاً به ندرت استفاده شده است.

در ابتدا روش های فوق برای مطالعات آرایه بندی و بوم شناختی، تحقیق در مورد نقش کرم های خاکی در اکوسیستم های مختلف خاک توسعه یافتند. بدون تردید، این حیوانات مهمترین بی مهرگان موجود در خاک در نواحی معتدل و به میزان کمتر در نواحی استوایی می باشند.

چندی پیش (سال ۱۸۸۱)، داروین تاثیر این جانوران را در ساختار خاک (بعنوان مثال هوادهی، گنجایش نگهداری آب) و عملکرد خاک شبیه تجزیه بستر جانور و چرخه مواد مغذی آن به خوبی شناخته بود. بخاطر توده زیستی^۵ خیلی بالای اغلب آن ها، می توانند در بسیاری از شبکه های غذایی خاکی مهم باشند.

از آنجایی که این روش های استاندارد شده برای تمام موجودات زنده درون خاک امکان پذیر و یا مفید نمی باشد، مهمترین آن ها انتخاب شده اند.

1-Bioclasiication

2-Bioindicator

۳-تا تدوین استاندارد ملی به استاندارد بین المللی ISO1126-3 مراجعه شود.

4-Bio-assesment

5-Biomass

کیفیت خاک – نمونه برداری از بی مهرگان موجود در خاک

قسمت اول: جدا کردن با دست کرم خاکی و استخراج آن با فرمالین

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش های نمونه برداری و نگهداری کرم های خاکی از خاک های مزارع بعنوان پیش نیازی برای استفاده از این حیوانات به عنوان نشانگرهای زیستی می باشد. (برای مثال در ارزیابی کیفیت یک خاک به عنوان زیستگاه موجودات زنده)

این استاندارد برای تمام بیوتوپ های^۱ خاکی که در آن کرم های خاکی وجود دارند، کاربرد دارد. بطور کلی روش نمونه برداری از مزرعه مطابق با استاندارد ملی ایران شماره^۲..... مشخص شده و راهنمای تعیین اثرات مواد آلوده کننده بر روی کرم های خاکی موجود در مزارع مطابق استاندارد ملی ایران شماره^۳..... ارائه شده است. این جزئیات می توانند بر حسب الزامات ملی شرایط آب و هوایی/ منطقه ای ناحیه نمونه برداری شده متغیر باشند. (به پیوست پ مراجعه شود).

این استاندارد برای محیط های شبیه خاک کاربرد ندارد و برای استفاده در شرایط آب و هوایی یا جغرافیایی سخت (مثل کوهستان های مرتفع) مشکل می باشد. روش های مورد استفاده برای دیگر گروههای موجودات زنده موجود در خاک نظیر *collembolan* (کلمبولان ها) در قسمت های دیگر این استاندارد پوشش داده می شوند.

این استاندارد، برای توصیف ویژگی های خاکشناسی^۴ ناحیه ای از خاک که از بی مهرگان آن نمونه برداری شده است، کاربرد ندارد.

برای اندازه گیری PH، توزیع اندازه ذرات، نسبت C/N، میزان کربن آلی و گنجایش نگهداری آب استانداردهای ملی ایران شماره^۵.....پیشنهاد می شوند.

1-biotope.

۲- تا تدوین استاندارد ملی به استاندارد بین المللی ISO1038-1مراجعه شود

۳- تا تدوین استاندارد ملی به استاندارد بین المللی ISO112683-3مراجعه شود

4-pedological.

۵- تا تدوین استاندارد های ملی به استاندارد های بین

المللی ISO11461,ISO11465,ISO10390,ISO10694,ISO11274,ISO11277مراجعه شود

۲ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد بین‌المللی به آن‌ها ارجاع داده شده است بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد بین‌المللی محسوب می‌شوند. در صورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن مورد نظر این استاندارد نیست. در مورد مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده‌است همواره آخرین تجدیدنظرها و اصلاحیه‌های بعدی آن‌ها موردنظر است. استفاده از مراجع الزامی زیر برای این استاندارد الزامی است:

- 2-1 ISO 10381-1, *Soil quality _ Sampling _ Part 1: Guidance on the design of sampling programmes*
- 2-2 ISO 10390, *Soil quality _ Determination of pH*
- 2-3 ISO 10694, *Soil quality _ Determination of organic carbon and total carbon after dry combustion (elementary analysis)*
- 2-4 ISO 11268-3, *Soil quality _ Effects of pollutants on earthworms _ Part 3: Guidance on the determination of effects in field situations*
- 2-5 ISO 11272, *Soil quality _ Determination of dry bulk density*
- 2-6 ISO 11274, *Soil quality _ Determination of the water-retention characteristic _ Laboratory methods*
- 2-7 ISO 11277, *Soil quality _ Determination of particle size distribution in mineral soil material _ Method by sieving and sedimentation*
- 2-8 ISO 11461, *Soil quality _ Determination of soil water content as a volume fraction using coring sleeves _ Gravimetric method*
- 2-9 ISO 11465, *Soil quality _ Determination of dry matter and water content on a mass basis _ Gravimetric method*

۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد تعاریف و اصطلاحات زیر بکار می‌رود.

۳-۱ کرم خاکی

کرم‌های خاکی ساکن در سوراخ‌های بزرگی هستند که طول کرم‌های بالغ از چند سانتی متر تا حدود یک متر بوده و متعلق به راسته کم‌تاران، رده مژه‌داران، شاخه کرم‌های حلقوی می‌باشند.

۳-۲ گونه های غیربومی (خارجی)^۱

کرم های خاکی موجود در بسیاری از مناطق جهان است که بطور معمول توسط انسان شناسایی شده اند.

یادآوری ۱- مثال های کاملاً شناخته شده از این گونه ها، چندین گونه لومبرسید^۲ مانند *aporrectodea caliginosa* (در ابتدا از آسیا- اروپا آمده اند ولی در حال حاضر در آمریکا و استرالیا نیز زندگی می کنند) یا گونه های موجود در مناطق استوایی مانند *ponto scolex corethrurus* (احتمالاً از شمال برزیل و / یا گینه آمده است) می باشد.

یادآوری ۲- به پیوست ت، بند ت-۱۵ مراجعه شود.

۳-۳ زین جنسی^۳

حلقه یا زینی از روپوستی ضخیم که تنها در کرم های بالغ نزدیک به شکم آن ها بوده و در آخر پيله را تشکیل می دهد.

۴ اصول کلی

کرم های خاکی موجود در یک ناحیه معین را می توان با استفاده از ترکیب دو روش مختلف زیر نمونه برداری کرد:

- جدا کردن با دست جانوران از یک سطح معین (بعنوان مثال 25cm^2 /۰/۰۰۰۰۰۰) یا حجم معین (بعنوان مثال $20\text{cm} \times 50\text{cm} \times 50\text{cm}$)
- استخراج کرم ها از خاک با بکاربردن فرمالین

هر دو روش از مدت ها قبل به خوبی شناخته شده اند. بعد از استخراج، کرم های خاکی مرتب شده و به آزمایشگاه منتقل شوند. در آنجا طوری نگهداری شوند که بتوانند بطور نامحدود در یک مجموعه انبارش شوند. (بعنوان مثال به منظور رده بندی). علاوه بر آن تعیین توده زیستی کرم های خاکی نیز توضیح داده شود. در پایان، فراوانی و مقادیر توده زیستی می توانند مجدداً برای سطح (معمولاً 1000cm^2) یا به ندرت برای کمیت های حجم محاسبه شوند.

یادآوری ۱- در شرایط ویژه (مثل استخراج الکتریکی یا استفاده از خردل بعنوان یک استخراج کننده شیمیایی)، روش های دیگر مفید بوده اما بعنوان یک روش معمول توصیه نمی شوند. (به پیوست الف مراجعه شود). علاوه بر آن، به نظر می رسد که استخراج با استفاده از مواد شیمیایی دیگر به جز فرمالین دارای بازده کمتری خواهد بود.

1-peregrine

2-Lumbricid

گونه ای از کرم خاکی

3- clitellum

یادآوری ۲- نمونه برداری از کرم های خاکی اغلب شامل برنامه های کنترلی گسترده با تلاش بر پوشش دادن کل جانوران موجود در خاک یا قسمتهایی از آن می باشد. (بعنوان مثال جانوران بزرگ)

یادآوری ۳- بیشتر اشاره هادر مورد رده بندی کرم های خاکی غیر بومی متعلق به خانواده لومبرسید ها بوده که در پیوست ب ارائه شده است.

۵ معرف ها

۵-۱ فرمالین [محلول ۴٪ فرمالدئید (درصد حجمی)]

۵-۲ فرمالین [محلول ۳۷٪ فرمالدئید (درصد حجمی)]

۵-۳ اتانول، ۷۰٪ (درصد حجمی)

۶ دستگاه ها

از تجهیزات آزمایشگاهی استاندارد و وسایل زیر استفاده می شود.

۶-۱ ظروف پلاستیکی: برای انبارش کرم ها از ظروفی با گنجایش ۲۵۰ ml و ۵۰۰ ml استفاده می شود

۶-۲ دستکش های پلاستیکی

۶-۳ پنس ها

۶-۴ قطعه ای از روکش های پلاستیکی ضخیم، ۱ m^۲ تا ۲ m^۲

۶-۵ بیل یا بیلچه

۶-۶ میکروسکوپ مخصوص کالبد شکافی با بزرگنمایی کم (۱۰ تا ۴۰ برابر)

۶-۷ ترازو که قادر به توزین از ۰/۰۱ g تا ۲۰۰ g باشد.

۶-۸ ظرف فلزی برای آب با گنجایش ترجیحاً ۲۰ L همراه با آب (۲۰ L در هر قطعه زمین نمونه برداری)

۶-۹ آب پاش

۶-۱۰ خودکار، دفتر یادداشت، ماژیک ضد آب و برچسب هایی که روی ظرف قرار می گیرند.

۶-۱۱ دماسنج، بعنوان مثال برای اندازه گیری دمای هوا

۶-۱۲ محفظه خشک کن برای تعیین رطوبت خاک

۷ روش آزمون

۷-۱ نمونه برداری

۷-۱-۱ کلیات

نمونه برداری از کرم های خاکی با ترکیب دو روش مختلف انجام می شود: جدا کردن با دست و استخراج با فرمالین.

براساس چندین مطالعات تحقیقات سنجی انجام شده و بررسی های مختلف که در مورد شناخت محیط زیست کرم های خاکی صورت گرفته ، این ترکیب به وضوح توصیه شده است.

بهتر است نمونه برداری در مواقعی از سال انجام شود که جانوران تحت تاثیر شرایط محیطی (یعنی رطوبت کم خاک و /یا دماهای بالا) در مرحله دیپاز^۱ نباشند (یعنی با فرمالین واکنش ندهند). زمان نامطلوب برای نمونه برداری در نواحی معتدل، زمستان و به ویژه وسط تابستان می باشد. بهتر است کرم های خاکی نمونه برداری شده از زمین های مشابه اما با دو روش نمونه برداری متفاوت در ظروف پلاستیکی جداگانه انبارش شوند. توصیه می شود بعد از پایان فرآیند نمونه برداری، خاک کنده شده و مورد بررسی به حالت اولیه و اصلی آن برگردانده شود. در بعضی موارد، تنها استفاده از یکی از دو روش مناسب می باشد، بعنوان مثال در صورتیکه در ناحیه مورد نظر، هیچ گونه حیوانی در لانه های زیرزمینی در عمق زیاد وجود نداشته باشد، استخراج با فرمالین ضروری نیست. هم چنین ، در نواحی که کرم های خاکی عظیم الجثه زندگی می کنند (قسمت هایی از آمریکای جنوبی، آسیای جنوب شرقی و استرالیا) جدا کردن با دست مفید نیست. برای نواحی استوایی، یک روش خیلی مشابه که بعنوان روش TSBF^۲ اصلاح شده شناخته می شود، مناسب است (به پیوست پ مراجعه شود)

یادآوری- معمولاً کرم های خاکی بعد از نگهداری مورد مطالعه قرار می گیرند، اما اگر طیف گونه ها در ناحیه نمونه برداری به طور کامل شناخته شده باشد، کرم ها بصورت زنده نیز می توانند مورد بررسی قرار گیرند (به پیوست ب مراجعه شود).

در مورد کرم های خاکی جمع آوری شده مورد استفاده جهت انجام تجزیه و آزمون های بیشتر، بعنوان مثال برای اندازه گیری های نشانگر زیستی^۳ یا استفاده در زیست سنجشی ، توصیه می شود که کرم ها در بخش کوچکی از خاک ناحیه نمونه برداری انبارش یا انکوبه شوند. در مورد استخراج با فرمالین، شستن کرم ها با آب لوله کشی قبل از انکوباسیون در خاک ضروری است.

۷-۱-۲ جدا کردن با دست

بدلیل اندازه منحصر به فرد کرم ها، باید قطعه بزرگی از زمین شناسایی شود. اغلب یک مربع به ابعاد ۵۰cm×۵۰cm مناسب است، چون بالغ ترین کرم های خاکی تقریباً طولی بین ۱cm تا ۲۰cm دارند.

1- diapause

2-Tropical soil Biology and fertility

3-Bio marker

دوره ای از تکامل و یا رشد بعضی حشرات که با کاهش قابل ملاحظه متابولیسم همراه است

بهرحال در محل هایی که چگالی کرم های خاکی کم است (بعنوان مثال خاک هایی با $PH < 4.5$ یا نواحی خرمن ها) بهتر است از قطعه های بزرگتری از زمین نمونه برداری شود (100 cm^2) (مطابق با استاندارد ملی ایران شماره^۱.....). عبارت دیگر در نواحی با چگالی بالای کرم های خاکی (بعنوان مثال بیشتر مراتع موجود در مناطق معتدل)، قطعه کوچکی از زمین با مساحت $1/8 \text{ m}^2$ کافی است. حتی نمونه های کوچکتر (مثل $1/6 \text{ m}^2$) باعث کم شدن زیاد تعداد هر یک از کرم های خاکی و بنابراین متغیر بودن آن ها شده که می تواند منجر به افزایش تعداد نمونه ها شود (به عبارت دیگر ۱۶ بار تکرار نمونه برداری).

در هر حالت، بوسیله یک بیل یا بیلچه تا عمق 20 cm از قطعه زمین کنده شود (برای بیشتر نواحی معتدل، عمق 20 cm مناسب است ولی عمق به خصوصیت آن ناحیه نیز بستگی دارد). خاک حفر شده روی یک قطعه پلاستیکی پخش شود، این عمل در مزارع انجام می شود ولی در مناطقی با آب و هوای بد، کل روش انجام آزمون در آزمایشگاه یا گلخانه انجام شود. بعد از آن برای یافتن کرم خاکی، خاک با احتیاط مورد بررسی قرار گیرد. کرم های خاکی بزرگ با کمک دستکش های پلاستیکی و کرم های خاکی کوچک به کمک پنس جمع آوری شوند. برای جلوگیری از آسیب دیدن بیشتر کرم ها، بهتر است تنها قسمت شکمی بدن آن ها لمس شود. در صورتیکه در حین کندن خاک، کرم ها با بیل دو تکه شوند، برای اندازه گیری توده زیستی در دست باید هر دو قسمت را جمع کرد، چون در تعیین تعداد کرم ها تنها قسمت قدامی بدن آن ها شمارش می شود.

یادآوری ۱- با یک چشم غیرمسطح، انتهای قسمت قدامی یک کرم بالغ با موقعیت زین جنسی شناسایی می شود که این محل بیشتر به سر آن نزدیک است تا دم.

بهتر است کرم های خاکی جمع آوری شده بلافاصله در محلول اتانول ۷۰٪ در ظروف پلاستیکی با گنجایش 250 ml یا 500 ml بمدت دست کم نیم ساعت و حداکثر ۲۴ ساعت قرار گیرند. این ظروف باید دارای برچسب بوده و بهتر است کلیه مشاهدات در دفتر یادداشت ثبت شوند. (مثل غیرفعال بودن کرم ها)

قرار دادن فوری در محلول ۴٪ فرمالین (درصد حجمی) امکان پذیر است اما بدلیل اینکه تماس با این ترکیب تا حد ممکن باید به حداقل برسد، توصیه نمی شود (بویژه در شرایط مزارع).

یادآوری ۲- برای جلوگیری از تغییرات زیست شناسی ریخت شناسی^۲ (بعنوان مثال وارونگی پروستومیم^۳) ناشی از قرار دادن فوری در اتانول، هر یک از کرم ها می توانند به مدت کم (حدود یک دقیقه) درون آب گرم گذاشته شوند. کرم های خاکی درون آب شل شده و بعد از آن می توانند به محلول اتانول منتقل شوند.

۱- تا تدوین استاندارد ملی به استاندارد بین المللی ISO112683-3 مراجعه شود

2-morphological
3-prostomium

۷-۱-۳ استخراج با فرمالین

در طول مدت جدا کردن با دست، همان قطعه زمینی که خاک روی آن برداشته شده است برای استخراج با فرمالین مورد استفاده قرار گیرد. قبل از آن به کمک آب پاش های بزرگ باید میزان کافی آب به قطعه زمین مورد نظر منتقل شود (حدود ۲۰L در هر قطعه زمین نمونه برداری). برای آماده سازی محلول فرمالین (با درصد حجمی ۵/۵ درصد)، در یک آب پاش ۲۵L فرمالین ۳۷٪ (درصد حجمی) را در تقریباً ۵L آب رقیق کنید. رقیق کردن ۲۵L فرمالین ۳۷٪ در ۵L آب منجر به تولید محلولی حدود ۰/۲٪ می شود. محلول فرمالین رقیق شده با دقت و بطور مساوی به داخل قطعه زمینی که خاک روی آن برداشته شده است، ریخته شود. این مرحله باید تا زمانی تکرار شود که ۲۰L محلول فرمالین به خاک اضافه شود و میزان محلول فرمالین به خصوصیت خاک نیز بستگی دارد. در طول این مرحله، برای جمع آوری تمام کرم های خاکی ظاهر شده بر روی سطح خاک باید قطعه مورد نمونه برداری مورد مشاهده قرار گیرد. نمونه برداری ۳۰ min بعد از کاربرد آخرین مرحله آب پاشی به پایان میرسد.

بهتر است کرم های بزرگ با دست و به کمک دستکش های پلاستیکی و کرم های کوچک با پنس جمع آوری شوند. قدرت دفع کنندگی فرمالین باعث نمایان شدن سریع کرم های خاکی بر روی خاک می شود. بهتر است زمانی کرم ها جمع آوری شوند که بزرگترین بخش بدن آن ها (ترجیحاً تمام آن) قابل رویت باشد در غیراینصورت به آن ها آسیب رسیده یا مجدداً به درون خاک پس کشیده می شوند. برای جلوگیری از خودبری و آسیب رسیدن به کرم ها، بهتر است تنها به قسمت شکمی بدن آن ها معمولاً جلوی زین جنسی دست زد. توصیه می شود کرم های خاکی جمع آوری شده بلافاصله در محلول اتانول ۷۰٪ در ظروف پلاستیکی با گنجایش ۲۵۰ml یا ۵۰۰ml بمدت حداقل ۳۰ min و حداکثر ۲۴ h قرار گیرند. این ظروف باید دارای برچسب بوده و بهتر است کلیه مشاهدات در آن دفتر یادداشت ثبت شوند. در نواحی که کرم های خاکی عظیم الجثه وجود دارند (آمریکای جنوبی، آسیای جنوب شرقی و استرالیا) و نیز در صورت مناسب نبودن روش جدا کردن با دست، توصیه می شود که فرمالین روی سطح ۴m² بکار رود. قبل از انجام این کار باید تمام گیاهان و بسترهای جانوری روی سطح خاک برداشته شوند. در بقیه مراحل، فرایند نمونه برداری یکسان است.

در صورتیکه هیچ گونه نقب زن های عمودی (بویره از دسته *Lumbricus terrestris* یا *Aporrectodea longa*) در ناحیه داده شده (بعنوان مثال خاک های خیلی اسیدی) زندگی نکنند، استخراج با فرمالین ضروری نیست.

قبل از کندن خاک برای عمل جدا کردن با دست، وجود این کرم های بزرگ بوسیله پوسته های بدن انداخته شده روی سطح و بسترهای جانوری جمع آوری شده روی منافذ لانه های زیرزمینی آنها (به قطر تقریبی ۵/۵cm) به آسانی قابل تشخیص می باشد. بعد از آن باید هرگونه تصمیم گیری در مورد استفاده از فرمالین مرحله به مرحله انجام شود.

یادآوری ۱- استفاده از فرمالین در غلظت های کم، برای دیگر موجودات زنده خاک شبیه بند پایان مشکلاتی را بوجود نمی آورد و اثرات منفی طولانی مدت نیز بر روی کمیت های میکروبی ندارد.

ارزش این ترکیب از نظر میکروبی در بعضی روزها برای چند هفته کاهش می یابد و می تواند رشد قسمت های معینی از علف ها را با همان درجه اهمیت به تاخیر بیاندارد

یادآوری ۲- در خاک های حاوی خاک رس بالا، کندن گودال نمونه برداری می تواند باعث مسدود شدن لانه های زیرزمینی کرم ها در ته گودال شده و در نتیجه از نفوذ فرمالین ویا پیدایش کرم های موجود در لانه های زیرزمینی عمیق جلوگیری کند. در چنین شرایطی، منافذ پوشانده شده لانه های زیرزمینی می توانند قبل از کاربرد فرمالین باز شوند. (به عنوان مثال به کمک یک چاقو)

هشدار- هنگام استفاده از فرمالین جهت جلوگیری از استنشاق یا تماس آن با پوست باید احتیاط لازم را بعمل آورد (بعنوان مثال استفاده از دستکش). براساس برگه داده های ایمنی مواد که توسط شرکت تولید کننده محلول ۳۷٪ فرمالدئید منتشر شده است، این ترکیب تحریک کننده پوست بوده و می تواند سرطان زا باشد (در این رابطه برای انسانها شواهد محدود و برای حیوانات شواهد کافی در دسترس است). این مطلب بطور قانونی به اطلاع کشورهای صنعتی جهت استفاده علمی رسیده است.

۲-۷ نگهداری

به دو روش امکان پذیر است:

الف) بعد از تثبیت، کرم ها باید به مدت حداقل چهار روز و ترجیحاً یک یا دو هفته در محلول ۴٪ فرمالین (درصد حجمی) نگهداشته شوند. بعد از آن باید برای یک دوره نامحدود در محلول اتانول ۷۰٪ (درصد حجمی) انبارش شوند.

ب) روش دیگر قرار گیری کرم ها بلافاصله بعد از جمع آوری در مخلوطی از اتانول ۷۰٪ (درصد حجمی) و فرمالین ۴٪ با نسبت ۹۸٪ به ۲٪ می باشد. این مایع نگهدارنده روز بعد از آخرین نمونه برداری با مایع نگهدارنده تازه تعویض شود.

توصیه می شود از نگهداری کرم ها در اتانول خالص اجتناب نمود، چون گاهی اوقات سطح خارجی کرم ها به قدری نرم می شود که دیگر خیلی از مشخصه های مهم آن ها قابل دید نمی باشد. در مواردی که باید بافت کرم برای مطالعات بیوشیمی یا ژنتیک حفظ شود، نگهداری در فرمالین توصیه می شود.

۳-۷ تعیین توده زیستی

تعیین توده زیستی با استفاده از ماده نگهدارنده انجام شود. کرم ها باید به مدت پنج دقیقه درون آب شسته شده و سپس به سرعت روی یک صفحه کاغذ خشک شده و جرم آن با استفاده از یک ترازوی مناسب تعیین شود. بعد از آن باید مجدداً در اتانول ۷۰٪ یا مخلوط اتانول/فرمالین انبارش شوند. به خاطر تغییر جرم در طول نگهداری و میزان خاک در دل و روده کرم، اندازه گیری ها با استفاده از ضرایب منتشر شده در کتابچه و برای تعیین توده زیستی جانوران تصحیح می شوند. به نظر می رسد کرم ها در طول تثبیت حدود ۱۰٪ تا ۲۰٪ جرم خود را از دست می دهند. بنابراین هیچ جبرانی ضروری نیست. بعد

از آن برای بدست آوردن جرم خشک می توان آخرین جرم اندازه گیری شده را در ضریب ۰/۱۵ ضرب کرد.

بهرحال این ضریب می تواند براساس مواد معدنی موجود در نواحی چراگاه ها و به ویژه ناحیه ای تعیین شده و بسته به شکل زمین به طور قابل ملاحظه ای متغیر باشد. یادآوری- در صورتیکه کرم های خاکی به صورت زنده شناسایی شوند، می توانند مستقیماً توزین شوند (یا به صورت جداگانه یا گروهی ، برحسب قسمت ها و سن آن ها)

۸ ارزیابی داده ها

اندازه گیری زیر در نقاط پایانی می تواند برای طبقه بندی زیستی خاک شامل نشان گر زیستی یا نظارت زیستی استفاده شود:

- فراوانی (تعداد کرم ها در سطح یا حجم)
 - توده زیستی (جرم تازه یا خشک کرم خاکی در سطح یا حجم)
 - تعداد گونه ها یا دیگر گروه های تعریف شده از نظر رده بندی یا بوم شناختی
 - نسبت برتری (در درصد جمعیت)
 - ساختار سنی جمعیت (بعنوان مثال نسبت بالغ / جوان)
 - تنوع ریخت شناسی در هر یک از کرم ها
- نخست آنکه تعداد کرم ها شمارش شده و در هر نمونه جداگانه بیان شوند (برای جداکردن با دست و استخراج با فرمالین بطور مجزا). دوم اینکه، به منظور تعیین کل فراوانی کرم ها باید هر دو مقدار با هم جمع شوند. برای بدست آوردن تعداد کرم ها در هر متر مربع، این عدد باید در یک ضریب ضرب شود (این ضریب برای نمونه های ۵۰cm×۵۰cm یا ۰/۲۵m^۲ ، چهار می باشد). علاوه بر آن ساختار سنی کرم را می توان به کمک یک میکروسکوپ مخصوص کالبد شکافی تعیین کرد (کرم های جوان و بالغ را می توان به کمک زین جنسی از یکدیگر تشخیص داد)

۹ گزارش تحقیقات

- گزارش تحقیقات باید شامل اطلاعات زیر باشد:
- الف) مرجعی برای این استاندارد
 - ب) شرح کاملی از طرح تحقیقاتی و روش اجرای آن
 - پ) توصیف ویژگی های ناحیه مورد تحقیق (بویژه خصوصیت های خاک)
 - ت) روش نمونه برداری
 - ث) شرح شرایط نمونه برداری شامل تاریخ و مدت زمان نمونه برداری در مراتع و کمیت های آب و هوایی شبیه دمای هوا
 - ج) تعداد کرم های گرفته شده، برای تشخیص بین دو روش (جدا کردن با دست و استخراج با فرمالین)
 - چ) جزئیات تثبیت و نگهداری توده زیستی

- ح) در صورت مناسب بودن، توده زیستی کرم های بدست آمده.
- خ) برای نمونه های با ابعاد 1 m^2 یا دیگر ابعاد استاندارد (در صورت نیاز) مجدداً مقادیری محاسبه شده اند.
- د) تمام اطلاعات، شامل تمام داده های خام اندازه گیری شده و تمام مشکلات موجود در پیشرفت آن ها در طول تمام مراحل تحقیق
- ذ) بحث در مورد نتایج

پیوست الف

(اطلاعاتی)

روش های دیگر نمونه برداری

الف-۱ روش استخراج الکتریکی

تیلمن علاوه بر روش جدا کردن با دست یا استخراج با فرمالین، یک روش نمونه برداری دیگر به نام روش اکت، معرفی کرد. این عمل با استفاده از یک حلقه هشت الکترودی به قطر ۵۲cm برای تولید میدان الکتریکی انجام می شود تا بوسیله آن کرم ها 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 و هزینه بالای تجهیزات آن است. مهمتر آنکه به نظر می رسد میزان موفقیت این روش بطور کامل به شرایط واقعی خاک بستگی دارد (بویژه رطوبت). مقایسه های مختلف، فواید واضح روش های الکتریکی را در مقایسه با روش های شیمیایی به وضوح نشان نمی دهد (بعنوان مثال به پیوست (ت) مراجعه شود). بنابراین این روش تنها زمانی توصیه می شود که چندین قطعه نزدیک به هم وجود داشته باشد و هنگام ارزیابی اثرات شیمیایی یا در نواحی حفاظت شده ای که جدا کردن با دست مجاز نمی باشد.

الف-۲ استخراج با خردل

گان پیشنهاد کرد که موادی که بالقوه سمی هستند (مثل فرمالین) را می توان با پودر خردل جایگزین کرد. خردل به این دلیل انتخاب شده بود که می توانست باعث واکنش اجتناب پذیر با کرم های خاکی شود. بعنوان مثال، ۶۰g پودر خردل مخلوط شده در ۱۰L آب که برای یک سطح معین بکار می رود، دقیقاً شبیه یک استخراج کننده عمل می کند. مقایسه بین روش های مختلف، نتایج مختلفی را ارائه می دهد که این عمل ارزیابی را دچار مشکل می کند، اما بطور معمول بازده استخراج به روش خردل در مقایسه با روش فرمالین کمتر است، یک پیشنهاد جالب استفاده از الیل ایزوتیوسیانات است که یکی از اجزای تشکیل دهنده خردل با طعم تیز و تند است، چون متغیرپذیری ایجاد شده با فرمولاسیون های مختلف خردل کاهش می یابد. بهر حال داده های در دسترس اجازه تصمیم گیری در مورد اینکه آیا این روش، یک روش فرعی برای استفاده از فرمالین می باشد یا خیر، را نمی دهد. در مورد دیگر روش های رفتاری، بهتر است استخراج با خردل با روش جدا کردن با دست ترکیب شود چون در غیر اینصورت چگالی جمعیت کرم های خاکی (بویژه *lumbricus terrestris*) دست کم گرفته می شوند.

پیوست ب

(اطلاعاتی)

تعیین گونه ها در کرم های خاکی غیر بومی

شناسایی کرم های خاکی لومبرسید نمونه برداری شده در بیشتر قسمت های اروپا همانند قسمت های شرقی کانادا و ایالات متحده آمریکا، از راهنماهای ارائه شده در پیوست ت بند ت-۴، ت-۱۰ یا بند ت-۲۷ تبعیت می کند. در پیوست ت بند ت-۲۹ راهنمایی هایی دوگانه برای تعیین سن عمومی ترین گونه لومبرسیدها ارائه شده است. یک مقدمه عالی در تعیین گونه های کرم های خاکی در ت-۱۶ ارائه شده است. تاکنون هیچگونه راهنماهای جامعی در مورد کرم های خاکی از دیگر قسمت های دنیا در دسترس نبوده و بویژه در مورد کرم های مناطق استوایی شبیه *Glossoscolecidae* (آمریکای لاتین)، *Eudrilidae* (آفریقا) یا *Megascolecidae* (آسیا، آمریکای شمالی (کرانه اقیانوس آرام)) اصلاً فاقد این راهنماها هستند. بهرحال شرح کامل انواع گونه های کرم خاکی غیر بومی در دنیا، حدود ۱۰۱ گونه را شامل می شود. (۳۶ گونه *megascolecidae*، ۳۴ گونه *lumbricid* و ۳۱ گونه از خانواده های دیگر). (به پیوست ت بند ۳-مراجعه شود). تمام مشخصه های مهم، داخلی و خارجی را می توان به آسانی با میکروسکوپ مخصوص کالبد شکافی دید. از نظر فنی، فرآیند تعیین می تواند با استفاده از لوله های شیشه ای کوچک که در آن کرم های خاکی زنده گذاشته می شود، آسان شود. به دلیل ناتوانی در حرکت، خواص خارجی به آسانی قابل پی بردن هستند.

پیوست پ

(اطلاعاتی)

روش اصلاح شده¹ TSBF

مشخصه اصلی روش پیشنهاد شده در این استاندارد، مشابه با روشی است که بعنوان روش اصلاح شده TSBF (زیست شناختی خاک مناطق استوایی و حاصلخیزی) شناخته شده است.

بعبارت دیگر هر دو براساس ترکیبی از دو روش جدا کردن با دست و استخراج با فرمالین می باشند. ولی هدف این روش جامع تر بوده و نمونه برداری از کل جانوران بزرگ را پوشش می دهد. در ابتدای توسعه برای نواحی استوایی، روش TSBF اصلاح شده برای نواحی معتدل نیز قابل اجرا بود. این روش در سه مرحله انجام می شود:

الف) در صورت وجود بستر جانوری، آن ها جمع آوری شده و درون کیسه های پلاستیکی مقاوم و کاملاً بدون منفذ قرار داده شده تا از کاهش جانوران در بستر جانوری جلوگیری بعمل آید. در طول این فرایند، جانوران قابل رویت نیز با دست برداشته شده و درون ظروف پلاستیکی انبارش شوند.

ب) بلوک های خاک (سنگ یکپارچه) با اندازه ۲۵cm×۲۵cm×۱۵cm درون کیسه های پلاستیکی قرار گرفته و به آزمایشگاهی که آن ها با دست جدا شده اند ، منتقل شوند.

پ) در گودال باقی مانده، محلول فرمالین ۰/۲٪ (درصد حجمی) در فواصل زمانی ده دقیقه ای پاشیده شده تا تمام جانوران فعال باقی مانده در خاک خارج شوند.

معمولاً در هر سطح نمونه (بعنوان مثال زمین مورد استفاده ویژه) ، سه قطعه زمین استفاده می شود. در هر قطعه زمین ۸ تا ۱۰ بلوک خاک وجود دارد که هر کدام با فاصله دست کم هفت متر از یکدیگر جدا شده اند. نمونه برداری از این بلوک ها به صورت برش عرضی انجام می شود که اگر کل قطعه زمین برای یک مقطع عرضی بزرگ، خیلی کوچک باشد، بلوک ها به بخش های موازی تقسیم می شوند.

¹ Tropical soil Biology and Fertility

پیوست ت

(اطلاعاتی)

کتابنامه

- ت-۱ ANDERSON, J.M., INGRAM, J.S.I., 1993: Tropical Soil Biology and Fertility: A Handbook of Methods.
C A B International, Wallingford, UK
- ت-۲ 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
- ت-۳ 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
- ت-۴ BOUCHÉ, M., 1972: Lombriciens de France. Ecologie et Systématique. Paris, France: INRA Publ. 72-2,
Institut National de Recherches Agricoles. 671 pages
- ت-۵ BRETSCHER, K., 1896: Die Oligochaeten von Zürich. *Revue Suisse Zoologie*, 3, pp. 499-532
- ت-۶ DARWIN, C., 1881: The formation of vegetable mould through the actions of worms with observations
on their habits. Murray, London. 298 pages
- ت-۷ DUNGER, W. and FIEDLER, H.-J., 1997: Methoden der Bodenbiologie. Fischer Verl., Jena. 539 pages
- ت-۸ EDWARDS, C.A. and BOHLEN, P.R., 1997: Biology of Earthworms. London: Chapman and Hall.
276 pages
- ت-۹ [9] GRAEFE, U. and SCHMELZ, R.M., 1999: Indicator values, strategy types and life forms of terrestrial
Enchytraeidae and other microannelids. *Newsletter on Enchytraeidae*, 6, pp. 59-67
- ت-۱۰ GRAFF, O., 1953: Die Regenwürmer Deutschlands. *Schriftenreihe Forschungsinstitut Landwirtschaft* 7,
pp. 1-70
- ت-۱۱ GUNN, A. 1992: The use of mustard to estimate earthworm populations. *Pedobiologia*, 36, pp. 65-67
- ت-۱۲ HEEB, J. and VETTER, F., 1995: Ansatz für eine integrative Auswertung bodenbiologischer
Messergebnisse. Umweltmaterialien. BUWAL (ed.), Schattweid, Switzerland

- ت-١٣ LAVELLE, P. 1984: The soil system in the humid tropics. *Biology International*, 9, pp. 2-17
- ت-١٤ LAWRENCE, A.P. and BOWERS, M.A., 2002: A test of the _hot_ mustard extraction method of sampling earthworms. *Soil Biology & Biochemistry*, 34 (4), pp. 549-552
- ت-١٥ LEE, K.E., 1985: Earthworms. Their Ecology and Relationships with Soils and Land Use. Academic Press, Sydney. 411 pages
- ت-١٦ LJUNGSTRÖM, P.-O., 1979: Introduction to the study of earthworm taxonomy. *Pedobiologia*, 10, pp. 265-285
- NAGEL, R., 1996: Die Bedeutung von Regenwürmern für den C- und N-Umsatz in einer heterogenen Agrarlandschaft. Dissertation University of Munich, 126 pages
- ت-١٨ NUUTINEN, V., PÖYHÖNEN, S., KETOJA, E. and PITKÄNEN, J., 2001: Abundance of the earthworm *Lumbricus terrestris* in relation to subsurface drainage pattern on a sandy clay field. *Eur. J. Soil Biol.*, 37, pp. 301-304
- ت-١٩ PETERSEN, H. and LUXTON, M., 1982: A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos*, 39, pp. 287-388
- ت-٢٠ RAW, F., 1959: Estimating earthworm populations by using formalin. *Nature*, 184, pp. 1661-1662
- ت-٢١ RÖMBKE, J., BECK, L., FÖRSTER, B., FRÜND, C-H., HORAK, F., RUF, A., ROSCICZEWSKI, K., SCHEURIG, M. and WOAS, S., 1997: Boden als Lebensraum für Bodenorganismen _ Literaturstudie. Texte und Berichte zum Bodenschutz Nr. 4/97, Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe. 437 pages
- ت-٢٢ RÖMBKE, J., MELLER, M. and GARCIA, M., 1999: Earthworm densities in central Amazonian primary and secondary forests and a polyculture forestry plantation. *Pedobiologia*, 43, pp. 518-522
- ت-٢٣ RÖMBKE, J. and KALSCH, W., 2000: Protokoll des Internationalen Fachgesprächs über _Ansätze für biologische Bewertungsstrategien und _konzepte im Bodenschutz_. Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Bonn, 70 pages
- ت-٢٤ RUNDGREN, S., 1975: Vertical distribution of lumbricids in southern Sweden. *Oikos*, 24, pp. 1-10
- ت-٢٥ SATCHELL, J.E. (ed.), 1983: Earthworm Ecology: From Darwin to Vermiculture. London: Chapman & Hall. 495 pages
- ت-٢٦ SCHOUTEN, A.J., BREURE, A.M., BLOEM, J., DIDDEN, W., DE RUITER, P.C. and SIEPEL, H., 1999: Life

- support functies van de bodem: operationalisering t.b.v. het biodiversiteitsbeleid.
RIVM Report
607601003, 55 pages
- ت-٢٧ SIMS, R.W. and GERARD, B.M., 1999: Earthworms. In: BARNES, R.S.K. and CROTHERS, J.H. (eds.):
Synopsis of the British Fauna (New Series) No. 31 (Revised). London: E.J. Brill/Dr. W. Backhuys,
169 pages
- ت-٢٨ SPURGEON, D.J., SANDIFER, R.D. and HOPKIN, S.P., 1996: 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. and Krivolutsky, D.A. (eds.). Kluwer Academic Publ., Dordrecht. pp. 95-109
- ت-٢٩ STÖP-BOWITZ, C., 1969: A contribution to our knowledge of the systematics and zoogeography of
Norwegian earthworms. *Nytt magasin zoologi*, 17, pp. 169-280
- ت-٣٠ THIELEMANN, U., 1986a: Elektrischer Regenwurmfang mit der Oktett-Methode. *Pedobiologia*, 29,
pp. 296-302
- ت-٣١ THIELEMANN, U., 1986b: Glasröhrchenmethode zur Lebendbestimmung von Regenwürmern.
Pedobiologia, 29, pp. 341-343
- ت-٣٢ VAN STRAALen, N.M. and KRIVOLUTSKY, D.A., 1996: Bioindicator Systems for Soil Pollution. NATO ASI
Series. 2: Environment, 16, 261 pages
- ت-٣٣ VETTER, F., 1996: Methoden zur Regenwurm-Extraktion. Vergleich der Formalin-, Senf- und
Elektromethode. Umweltmaterialien Nr. 62. BUWAL, Bern. 45 pages
- ت-٣٤ WEEKS, J.M., HOPKIN, S.P., WRIGHT, J.F., BLACK, H., EVERS HAM, B.C., ROY, D. and SVENDSEN, C.,
1997: A Demonstration of the Feasibility of SOILPACS. Final Report HMIP/CPR2/41/1/247. 180 pages
- ت-٣٥ ZABORSKI, E.R., 2003: Allyl isothiocyanate: an alternative chemical expellent for sampling earthworms.
Applied Soil Ecology, 22, pp. 87-95
- ت-٣٦ ZICSI, A., 1958: 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.,
- ت-٣٧ KOSHIBA, M., OGAWA, K., HAMAZAKI, S., SUGIYAMA, T., OGAWA, O., and KITAJIMA, T., 1993: The effect of
formalin fixation on DNA and the extraction of high-molecular weight DNA from fixed and embedded