

# Chất lượng đất - Xác định ảnh hưởng của các tác nhân ô nhiễm đến thảm thực vật đất – Phương pháp đo sự ức chế phát triển rễ.

*Soil quality - Determination of effects of Pollutants on soil flora – Method for measurement of inhibition of root growth.*

## 1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này trình bày một thí nghiệm sơ bộ để đánh giá nhanh chất lượng đất bằng cách so sánh tốc độ phát triển rễ của một thực vật đã quy định trồng trong đất thử nghiệm dưới điều kiện môi trường tiêu chuẩn.

Phương pháp thử nghiệm này áp dụng cho tất cả các loại đất, cho các chất tạo thành đất, cho bã thải hoặc các hoá chất có thể dùng trong đất, trừ các chất gây nhiễm bản đất là các chất dễ bay hơi hoặc chỉ làm ảnh hưởng đến quá trình quang hợp. Phương pháp thử nghiệm này áp dụng cho việc xác định ảnh hưởng của các chất được bổ sung một cách có chú ý vào đất để so sánh chất lượng đất đã biết và chất lượng đất chưa biết.

Phương pháp này không dùng để xác định khả năng của đất duy trì sự phát triển của thực vật.

## 2. Tiêu chuẩn trích dẫn.

Tiêu chuẩn sau đây được sử dụng cùng với TCVN 5962: 1995 (ISO 11269/1: 1993)

ISO 11274 - Chất lượng đất - Xác định đặc tính giữ nước. Các phương pháp phòng thí nghiệm.

## 3. Nguyên lí

Sự phát triển của các hạt đã cho nảy mầm dưới điều kiện được kiểm soát trong một thời kì đã định phụ thuộc vào loại thực vật sử dụng thử nghiệm. Hai môi trường đối chứng là đất và cát. Sau thời kì phát triển, đo chiều dài của rễ được trồng trong môi trường đất đối chứng và trong môi trường đất chưa biết chất lượng hoặc trong môi trường chất được thử nghiệm. Sự ảnh hưởng được biểu thị bởi các sai khác thống kê có ý nghĩa của chiều dài rễ qua sự phát triển cây non trong mỗi môi trường thử nghiệm được so với đối chứng.

*Chú thích:* Chiều dài lá mầm cũng là một thông số hữu ích, và thông số này có thể được đo đạc phối hợp với độ dài rễ để đưa ra các dữ liệu bổ sung hoặc kiểm chứng.

## 4. Vật liệu và thực vật thử nghiệm

### 4.1. Thực vật

Thực vật thử nghiệm cần được gieo từ các hạt chưa qua xử lí.

*Chú thích:*

1) Lúa mạch (*Hordeum Vulgare L*) thuộc chủng "CV Triumph" đã được sử dụng làm thử nghiệm một vài năm nay và hiện nay được kiến nghị áp dụng.

2) Phương pháp luận của thử nghiệm này cũng có thể được sửa lại cho phù hợp để áp dụng với loài cây hai lá mầm rễ thẳng có thể đo dễ dàng.

#### 4.2. Lọ dùng thử nghiệm

Lọ nên là hình trụ, đường kính khoảng 8 cm và cao khoảng 11 cm có thành song song để đảm bảo cho rễ cuống cây non không bị hạn chế và không bị chạm vào thành lọ đáy lọ cần được khoan lỗ và phủ giấy lọc nếu thấy cần thiết.

**Chú thích:** Khi đổ đất vào lọ đến chiều cao 10 cm thì lúc đó lọ sẽ chứa được khoảng 500g đất khô (loại đất tự khô trong không khí)

#### 4.3. Môi trường nuôi trồng

Môi trường nuôi trồng là đất thử nghiệm, đất đối chứng (là đất đã biết có chất lượng tốt) và cát đối chứng.

Cát đối chứng là cát công nghiệp đã được rửa sạch hoặc là cát sạch tương tự khác có kích thước hạt phân bố như sau:

Lớn hơn 0,6mm:	10%
Từ 0,2mm - 0,6mm:	80%
Nhỏ hơn 0,2mm:	10%

**Chú thích:**

Đất đối chứng và đất thử nghiệm là loại giống nhau về mọi phương diện ngoại trừ sự có mặt của hoá chất gây nhiễm bản đang được xem xét

### 5. Phương pháp

#### 5.1. Thiết kế thử nghiệm

Trồng vào trong ba môi trường nuôi trồng (4.3), một là môi trường cát đối chứng, một là môi trường đất chất lượng tốt đã biết có cùng lớp kết cấu như đất được thử nghiệm và một là môi trường đất chưa biết chất lượng, mỗi môi trường làm ba lần.

Môi trường cát đối chứng được sử dụng để khẳng định độ tái lớp của thử nghiệm được tiến hành ở các trường hợp khác nhau, trong khi đó mức độ phát triển ở trong hai môi trường kia là để so sánh thống kê.

Phương pháp này cũng có thể được sử dụng để xác định các ảnh hưởng độc hại có thể có của đất hoặc hoá chất lỏng hòa tan vào trong đất (xem phụ lục A)

**Chú thích:**

Nếu thử nghiệm được tiến hành để xác định ảnh hưởng của các chất bổ sung vào trong đất, lúc đó loại đất được sử dụng không phải là yêu cầu chính, mà phải chọn loại đất sao cho không cản trở hoặc làm giảm ảnh hưởng của các chất được bổ sung vào đất.

#### 5.2. Chuẩn bị các lọ thử nghiệm (4.2)

##### 5.2.1. Công việc chung

Sấy khô cát công nghiệp, đất thử nghiệm hoặc đất sẽ được bổ sung các chất thử nghiệm vào ở nhiệt độ  $(30 + 2)^{\circ}\text{C}$  trong 16 giờ sau đó sàng qua rây cỡ lỗ 4 mm. Chuẩn bị vật liệu cho các lọ đối chứng (5.2.2) hoặc là đất chưa biết chất lượng (5.2.4) tương ứng.

##### 5.2.2. Lọ đối chứng.

Đổ cát công nghiệp vào ba lọ đã được cân, đảm bảo rằng cát không bị lèn chặt.

##### 5.2.3. Đất chứa các chất thử nghiệm (nếu phù hợp)

Sấy khô và sàng đất đối chứng vào trong các lọ đã được cân, cẩn thận khỏi làm đất bị nén chặt. Chuẩn bị đủ số lọ cho ba thử nghiệm lặp lại của đất đối chứng và cho tất cả các đất được xử lí.

Chọn tỉ lệ hoá chất cho thử nghiệm sơ bộ và thử nghiệm kết thúc theo phụ lục A.

Đưa các chất thử nghiệm bổ sung vào đất theo một trong các phương pháp được mô tả ở phụ lục B.

- 5.2.4. Đất chưa biết chất lượng (nếu phù hợp với yêu cầu của thử nghiệm). Sấy khô và sàng đất chưa biết chất lượng. Đổ vào ba lọ đã cân, cẩn thận để tránh làm đất bị nén. Để chuẩn bị mẫu pha loãng có chứa các nồng độ khác nhau của các chất trong đất chưa biết chất lượng, đổ vào các bộ ba lọ bổ sung hỗn hợp của đất chưa biết chất lượng, đất đối chứng đã được làm khô và sàng hoặc cát công nghiệp.

5.3. Chuẩn bị gieo hạt.

Trong thời gian tiến hành thử nghiệm, phải đảm bảo đất chứa một lượng nước bằng 70% khả năng giữ nước của nó (viết tắt là WHC - Water Holding Capacity), bằng một trong hai phương pháp sau:

- a. Đựng ba lọ chứa mẫu vào trong một máng nước được lấp chặt có mức nước sâu từ 5 – 10 cm được duy trì ổn định.

Đến khi lớp bề mặt trong lọ bị ẩm thì lấy lọ ra, đập lọ bằng kính đồng hồ và xếp lọ lên giá và để qua đêm cho rỏ bớt nước. Lúc đó đất được coi là có lượng nước gần bằng 100% WHC. Cạn lại lọ và bay hơi nước cho đến lúc lọ chỉ còn chứa bằng 70% WHC và duy trì mức khối lượng này trong suốt quá trình thử nghiệm.

- b. Xác định khối lượng nước yêu cầu ở mức 70% WHC theo tiêu chuẩn ISO 11274 với các mẫu đất riêng rẽ. Thêm nước vào các lọ cho đủ 70% WHC (thông qua đáy lọ hoặc qua miệng lọ) , cẩn thận để giảm đến mức ít nhất việc làm cho bề mặt đất bị nén chặt, và duy trì mức khối lượng nước đó trong suốt quá trình thử nghiệm.

**Chú thích:**

1) Ưu tiên dùng nước đã được loại ion .

2) Phương pháp "b" đặc biệt có ích khi nghiên cứu các hoá chất tan được trong nước.

5.4. Chuẩn bị hạt

Làm nảy mầm các hạt trong đĩa Petri, rải đều các hạt trên nền giấy lọc đã thấm nước cất và để cho đến lúc rễ vừa nhú ra. Ví dụ: Thông thường là 36 đến 48 giờ đối với lúa mạch ở 20°C ở nơi có ánh sáng. Khi rễ vừa nhú ra nhưng ngắn hơn 2mm thì trồng sáu hạt vào môi trường đất thử nghiệm, rễ hướng về phía dưới và nằm ở độ sâu khoảng 10mm.

5.5. Điều kiện phát triển

Để các lọ vào một phòng có điều kiện ngày và đêm đã được định thước. Hàng ngày cân các lọ và bổ sung nước đã khử ion để duy trì đất ở 70% WHC, chú ý tránh làm đất bị nén, và xếp các lọ theo cách ngẫu nhiên.

**Chú thích:** Các điều kiện thực nghiệm sau đây được kiến nghị áp dụng và phù hợp đối với lúa mạch:

Điều kiện	Ngày	Đêm
Quãng thời gian (n)	12 đến 16	8 đến 12
Chiếu sáng	25000 1m/m <sup>2</sup>	Bóng đèn điện nung sáng 45W

Nhiệt độ ( $^{\circ}C$ )	$20 \pm 2$	$16 \pm 2$
Độ ẩm (%)	$60 \pm 5$	$60 \pm 5$
Lượng nước trong đất (% WHC)	$70 \pm 5$	$70 \pm 5$

Nếu lúa mạch được sử dụng là thực vật thử nghiệm (4.1) thì thời gian phát triển là năm ngày. Nếu không dùng lúa mạch thì trước tiên trồng loại thực vật được chọn làm thử nghiệm vào cát để xác định chiều dài rễ lớn nhất sẽ có thể có được từ các hạt chưa gieo trồng. Phải đảm bảo rằng độ dài rễ không vượt quá 80% bề dày của đất trong lọ thử nghiệm bằng cách lựa chọn cỡ lọ và thời gian phát triển phù hợp.

Nên chọn thời gian phát triển mà được biết là rễ phát triển không dài hơn 80% bề dày lớp đất ở trong lọ thử nghiệm.

*Chú thích:* Nếu phương pháp này được sử dụng để nghiên cứu sự phát triển của thực vật ngoài lúa mạch, thì thời gian phát triển có thể cần là trên dưới năm ngày.

Sau thời kỳ phát triển thích hợp, đặt từng lọ nằm nghiêng trong một máng nước mức nước sâu 5cm và rửa nhẹ nhàng cho đất trong lọ trôi ra khỏi lọ.

Rửa từng cây non một và đo chiều dài rễ dài nhất với độ chính xác 0,5mm.

*Chú thích:* Có thể đo cả chiều dài chồi cây nếu thấy cần

## 6. Thể hiện kết quả (xem phụ lục D)

### 6.1. Số liệu

Đo chiều dài của chiếc rễ dài nhất của từng cây và xác định chiều dài trung bình của các rễ dài nhất cho từng môi trường phát triển hoặc từng mức độ xử lý đã được thử nghiệm. So sánh chiều dài rễ trung bình trồng trong đất thử nghiệm với chiều dài rễ trung bình trồng trong đất ở lọ đối chứng. Đánh giá kết quả bằng cách sử dụng một phép thử thống kê thích hợp.

*Chú thích:*

Ví dụ: Phép thử Student (Student's - test) hoặc phép thử Dunnent (Dunnent's-test) là các phương pháp phù hợp (xem phụ lục C).

Đất có chất lượng kém gây ra sự giảm đáng kể chiều dài rễ khi so sánh với đất có chất lượng tốt hoặc với các đối chứng.

### 6.2. Độ chính xác của phương pháp.

Trong một thử nghiệm liên phòng thí nghiệm gồm sáu phòng thí nghiệm tham gia, tất cả các phòng thí nghiệm đã có thể xác định được ở độ tin cậy 95% rằng 10mm khác nhau ở độ dài trung bình của rễ (tức gần 10% ) là trị số có ý nghĩa (xem phụ lục E).

## 7. Báo cáo thử nghiệm.

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm các thông tin sau

- Tiến hành thử nghiệm theo TCVN 5962: 1995 (ISO 11269/1: 1993) ;
- Một phương pháp nhận dạng thống nhất để nhận biết đất dùng thử nghiệm nguồn gốc của nó (ví dụ: đất gò, lấy mẫu ở đâu v.v... ) ;
- Loại hạt hoặc các chi tiết về loài cây đã sử dụng vào thử nghiệm;
- Điều kiện phát triển (điều kiện trồng thử nghiệm);
- Chiều dài của rễ dài nhất của từng cây trong các lọ có chứa ;

l - cát;

- 2 - đất;
- 3 - mẫu thử;
- f) Lời mô tả hình dạng bề ngoài trông thấy được của đất và vị trí lấy mẫu, nếu có;
- g) Bất cứ ảnh hưởng nào khác đã quan sát thấy;
- h) Kết quả thử nghiệm (lập thành bảng) bao gồm xử lí, số mẫu lập và chiều dài của rễ dài nhất của từng cây, có hay không có sự ức chế sự phát triển của cây hoặc mức độ các trị số thống kê của sự ức chế lên sự phát triển của cây đã quan sát thấy.

### Phụ lục A

#### Điều chỉnh các phương pháp để áp dụng cho các chất được bổ sung vào đất

##### A.1 Thử nghiệm sơ bộ

Thử nghiệm ban đầu được sử dụng để tìm ra dãy nồng độ làm ảnh hưởng lên chất lượng đất.

Hoá chất được trộn vào trong đất theo như phụ lục B với các nồng độ 100 mg/kg, 100 mg/kg và 1000 mg/kg đất đã được sấy khô trong lò sấy.

##### A.2 Thử nghiệm kết thúc

Chọn các nồng độ theo cấp số nhân với công bội không vượt quá 2 để xác định nồng độ thấp nhất gây ra sự giảm phát triển. Với mọi chất không cần thiết phải thử ở nồng độ lớn hơn 1000mg/kg đất đã được làm khô trong lò sấy.

Lặp lại thử nghiệm ba lần với các lọ chứa đất đối chứng và các lọ chứa từng mức nồng độ hoá chất.

#### **Chú thích:**

*Cấp số nhân là dãy các số mà trong đó mỗi số hạng được xác định bằng cách nhân số hạng đứng trước nó với một thừa số không đổi gọi là công bội. Ví dụ 1,3, 9, 27, 81.*

### Phụ lục B

##### B.1 Hoá chất tan được trong nước

Hoà hoá chất vào nước và trộn trực tiếp với đất. Nhưng phải đảm bảo rằng cùng một khối lượng nước được dùng cho từng lô đất và cho từng mức nồng độ hoá chất.

##### B.2 Hóa chất ít tan trong nước

Hoà hoá chất vào nước và trộn với cát. Trong trường hợp này nên dùng một cái tang quay

Trộn cát đã được xử lí với đất. Nếu phải cần đến khối lượng nước nhiều thì cát có thể được làm khô trong tang quay bằng một luồng không khí trước khi trộn với đất. Hoá chất tan trong dung môi.

Hoà hoá chất vào trong một dung môi bay hơi thích hợp và trộn với cát. Làm khô cát bằng một luồng khí trong lúc trộn (ví dụ: trong khi quay tang quay như nói ở trên), Trộn cát đã xử lí với đất. Phải đảm bảo rằng cùng một khối lượng dung môi và cùng một khối lượng cát được dùng như nhau cho tất cả các mẫu thử, kể cả đối chứng.

**Phụ lục C**

**Các ví dụ về xử lý kết quả thống kê**

**C.1 Phép thử Student**

Chiều dài rễ đo được

Lọ A 27.6; 23.8; 22.9; 28.2; 22.5: Trung bình 25.0

Lọ B 28.3; 33.5; 27.2; 81.1; 29.9: Trung bình 30.2

Để tính các giới hạn tin cậy cho các giá trị trung bình, dùng các giá trị ứng với 4 bậc tự do đã cho trong bảng (nghĩa là = 2.776). Trong trường hợp này

$$\begin{aligned} \text{Giới hạn trên} &= \text{Trung bình} + t \times \frac{S}{\sqrt{n}} \\ &= 28.3 \text{ (đối với lọ A)} \\ &= 32.3 \text{ (đối với lọ B)} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Giới hạn dưới} &= \text{Trung bình} - t \times \frac{S}{\sqrt{n}} \\ &= 21.7 \text{ (đối với lọ A)} \\ &= 27.7 \text{ (đối với lọ B)} \end{aligned}$$

Trong đó: s là độ lệch chuẩn

n là số các phép đo

Để đánh giá sự khác biệt có ý nghĩa giữa các lọ, dùng phương trình:

$$t = \frac{X_A - X_B}{\frac{S_A^2}{n_A} + \frac{S_B^2}{n_B}} = 3,25$$

Trong ví dụ này, giá trị của t vượt quá giá trị trong bảng là 0,02 tương ứng với 8 bậc tự do

Vì thế, các mẫu là sai lệch có ý nghĩa với độ tin cậy 98%

**C.2 Phép thử Dunnett**

Các chiều dài của rễ đo được:

Lọ A: 7,6 ; 23,8 ; 22,9 ; 28,2 ; 22,5 ; trung bình 25,0.

Lọ B: 25,2 ; 29,9 ; 26,4 ; 28,7 ; 27,3 ; trung bình 27,5.

Lọ C: 25,3 ; 33,5 ; 27,2 ; 31,1 ; 29,9 ; trung bình 30,0

Số bậc tự do v

v = số các phép xử lý x (các phép đo - 1)

$$= 3(5 - 1) = 12$$

$$\begin{aligned} S^2 &= \frac{\sum X_i^2 - n \sum \bar{X}_i^2}{v} \\ &= \frac{11473,25 - 11406,25}{12} = \frac{67,04}{12} = 5,58 \end{aligned}$$

$$S = \sqrt{5,58} = 2,362$$

Trong đó:

$n \sum \bar{X}_i^2$  là số của các phép đo trong từng lọ nhân với tổng của bình phương của giá trị trung bình;

$\sum \bar{X}_i^2$  là tổng của bình phương các giá trị đo được.

Sai số chuẩn (SE)

$$SE = S \sqrt{\frac{T-1}{N}}$$

$$= 2,362 \times \sqrt{\frac{2}{5}}$$

Trong đó:

T là các phép xử lí.

N là số của các phép đo của từng phép xử lí,

Sai lệch có ý nghĩa = t x SE

trong đó t (lấy từ bảng 2 Dunnett) = 2,50

Sai lệch có ý nghĩa = 2,5 x 1,494 = 3,735

Bởi vậy lọ A là sai lệch một cách có ý nghĩa với lọ C (lọ đối chứng) với độ tin cậy 95%. Tuy nhiên lọ B sai lệch một cách không có ý nghĩa với lọ đối chứng.

### Phụ lục D

#### Ví dụ về cách thể hiện kết quả thử nghiệm

Nồng độ Nikel, mf/kg	Chiều dài rễ, mm						Chiều dài trung bình, mm
0	98	99	105	100	100	101	101
	102	103	97	101	104	102	
	97	100	99	96	102	105	
50	96	104	99	101	102	97	99
	102	100	97	98	98	100	
	99	97	96	100	103	98	
100	85	91	93	92	88	87	88
	90	84	89	90	87	93	
	88	87	85	86	82	84	
500	17	9	8	11	16	13	12
	11	12	9	15	15	7	
	8	15	17	10	12	9	
1000	9	3	4	11	3	7	6
	7	5	8	7	4	5	
	5	6	9	7	6	8	

**Phụ lục E**  
**Kết quả của thử nghiệm độ dài rễ**  
**trong phép thử liên các phòng thí nghiệm**

Phương pháp luận cho phép thử liên phòng thí nghiệm nhằm hiệu lực hoá phương pháp chuẩn được đề ra, đã được gửi tới các cơ quan tổ chức tiêu chuẩn của các nước thành viên chính thức của ISO hoặc gửi tới thành viên của nhóm công tác đại diện cho nước thành viên.

Kết quả thử nghiệm chỉ nhận được từ ba nước, gồm liên hiệp Anh với bốn phòng thí nghiệm tiến hành thử nghiệm. Đức với ba phòng thí nghiệm và Pháp một phòng thí nghiệm. Không phải cả tám phòng thí nghiệm trên đều tiến hành được phép thử đúng đắn hoặc cung cấp đầy đủ số liệu thô. Tuy nhiên có sáu phòng thí nghiệm đã hoàn thành tất cả các khía cạnh của phép thử như đã được vạch ra.

Các kết quả về chiều dài rễ của từng nhóm kết quả thử nghiệm đều tiến hành theo một hình thức chuẩn, trong đó sai số trung bình, sai số chuẩn và sai lệch có ý nghĩa theo phép thử Dunnett (Dunnett's test) đã được tính toán hoàn chỉnh. Sai số chuẩn được tính toán như chỉ ra ở C.2 và sai lệch có nghĩa, thể hiện chiều dài rễ tính bằng milimét được sắp xếp trong Bản E1

**Bảng E1 – Số liệu thống kê**

Sai số chuẩn	Sai lệch có ý nghĩa
16,5	8,3
18,3	9,8
6,4	37,5(2)
3,1	2,9
7,2	6,7
6,3	5,9
10,3	9,6
10,8	8,7
<i>(1) Không có số liệu thô, chỉ cung cấp các giá trị trung bình</i>	

Bản thân các sai lệch có ý nghĩa chỉ là sự chỉ thị tính chính xác của phép thử, nhưng khi so sánh với chiều dài rễ chính của đối chứng thì sai lệch có ý nghĩa luôn luôn bằng 10% của chiều dài rễ. Cho nên, bất cứ hoá chất nào có trong đất mà tạo ra 15% sự giảm sút của chiều dài rễ thì hầu như chắc chắn nó có ảnh hưởng đáng kể lên sự phát triển của rễ cây. Bởi vậy phép thử rễ đơn giản này có thể được sử dụng để đánh giá nhanh sự có mặt của các yếu tố trong đất ức chế sự tăng trưởng tối đa của mùa màng.



**Phụ lục F****Biên bản cho phép thử vòng**

Biên bản này nhằm thiết lập độ chính xác của phép thử nghiệm này đối với sự phát triển của chiều dài rễ cây khi tiến hành phép thử mang tính quốc tế.

- a) Phải tuân theo TCVN 5962: 1995 này;
- b) Chỉ thử nghiệm trên lúa mạch ;
- c) Nền thử chỉ là cát (như quy định trong TCVN 5962:1995);
- d) Khả năng giữ nước (WHC) bước đầu cần phải được xác định trên từng mẫu cát riêng rẽ. Từ đó, lượng nước cần có cho từng lọ mới được tính ra.
- e) Chuẩn bị dung dịch niken sunfat tinh khiết phân tích chứa 50ppm, 100 ppm, 500 ppm và 1000ppm Ni;
- f) Chuẩn bị các lọ cát chứa đối chứng nước và bốn mức nồng độ niken sunfat để có được 70% WHC, thêm vào cho mỗi lọ trong ba lọ một lượng vừa đủ hoặc nước hoặc dung dịch chứa một trong bốn mức nồng độ khác nhau của niken sunfat;
- g) Tiếp tục các bước thử nghiệm như mô tả ở 5.4 của tiêu chuẩn TCVN 5962: 1995 này. Duy trì mức 70% WHC với nước đã loại ion trong mọi trường hợp.