

# Chất lượng đất - Ảnh hưởng của các chất ô nhiễm lên giun đất (*Eisenia fetida*) - Xác định độ độc cấp tính bằng cách sử dụng nền đất nhân tạo

*Soil quality - Effects of Pollutants on earthworms (Eisenia fetida) - Determination of acute toxicity using artificial substrate.*

## 1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định độ độc tối đa của các chất đối với giun đất - (*Eisenia fetida*) qua da và qua chất dinh dưỡng bằng cách sử dụng một chất nền nhân tạo. Phương pháp này không áp dụng cho các chất dễ bay hơi tức là những chất mà giá trị H (hằng số Henry) hoặc hệ số riêng phân không khí/nước lớn hơn 1 hoặc cho các chất có áp suất hơi lớn hơn 0,0133 Pa ở 25°C.

Phương pháp này không tính đến khả năng phân huỷ của chất thử.

## 2. Tiêu chuẩn trích dẫn.

Những tiêu chuẩn sau đây sử dụng cùng với tiêu chuẩn này. Vì các tiêu chuẩn được soát xét lại một cách thường xuyên, nên khuyến khích sử dụng những tiêu chuẩn mới nhất.

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

ISO 11461: - Chất lượng đất - Xác định hàm lượng nước của đất trên cơ sở thể tích - Phương pháp khối lượng.

## 3. Định nghĩa

Tiêu chuẩn này sử dụng các định nghĩa sau đây:

- 3.1. LC 50: nồng độ gây chết trung bình: là nồng độ ban đầu của chất thử giết chết 50% số súc vật đem thử trong quá trình thử.
- 3.2. NOEC (nồng độ không quan sát thấy hiệu ứng): nồng độ cao nhất của chất thử mà tại đó không quan sát thấy hiệu ứng làm chết hoặc các hiệu ứng khác (như làm giảm trọng lượng).

*Chú thích:* Cả hai đại lượng LC 50 và NOEC đều được biểu diễn bằng miligam của chất thử trên kilogam (khối lượng khô) của chất nền đem thử (5.2).

## 4. Nguyên tắc

Xác định số phần trăm tử vong của giun đất đã trưởng thành (loài *Eisenia fetida*) trong mẫu đất xác định chứa chất thử ở các nồng độ khác nhau sau 7 ngày và 14 ngày. Chất thử được đưa vào một lần và quá trình thử được hoàn thành không cần phải bổ sung chất thử nồng độ chất thử được tính bằng miligam chất thử trên 1 kilogam chất nền khô đem thử.

Những kết quả thu được từ những phép thử được so sánh với mẫu chuẩn và được dùng để đánh giá nồng độ gây nên số tử vong 50%*r* giun đất (LC 50, 14 ngày) .

*Chú thích:* Cloaxetamit là một chất so sánh thích hợp.

Quá trình thử trải qua hai bước:

Phép thử sơ bộ: Phép thử này cho giá trị gần đúng về nồng độ tương ứng với sự tiêu diệt hoàn toàn và sự không gây tử vong. Những kết quả này được dùng để xác định khoảng nồng độ cho phép thử của.

- Phép thử của xác định những nồng độ gây tử vong giữa 10% và 90%; những số liệu này cho kết quả cuối cùng.

Không thử các chất ở nồng độ cao hơn 1000mg cho 1 kg chất nền khô.

Nếu phép thử sơ bộ chỉ rõ không có tử vong thì không cần thực hiện phép thử của cùng.

## 5. Thuốc thử

### 5.1. Nguyên liệu sinh vật

Nguyên liệu sinh vật là giun đất trưởng thành thuộc loài *Eisenia fetida* ít nhất hai tháng tuổi với khối lượng ướt giữa 300mg và 600mg.

**Chú thích:** Loài *Eisenia fetida* hiện có 2 phân loài mà một số nhà phân loại xem như là loài riêng biệt: *Eisenia fetida* và *Eisenia andrei*. Chúng giống nhau về hình thái học nhưng một loài *Eisenia fetida* (*E. fetida*) có sọc ngang hoặc dải đặc trưng trên các phân đốt còn lại *E. fetida andrei* (*E. andrei*) lại không có đặc điểm này nhưng lại có đốm màu đỏ nhạt. Có thể sử dụng được cả hai phân loài(loại).

Các con giun đất được chọn cho thử nghiệm phải đạt đến một chừng mực đồng đều về kích thước và trọng lượng. Trước khi thử cần phải rửa chúng bằng nước uống.

**Chú thích:** Kỹ thuật mẫu về nuôi dưỡng *Eisenia fetida* được chỉ ra ở phụ lục A.

### 5.2. Chất nền thử

Mỗi chậu thủy tinh (6.1) dùng một lượng chất nền là 500g (khối lượng khô) .

Chất nền được gọi là “đất nhân tạo” có các thành phần sau:

Phần trăm tính theo khối lượng khô:

- Than bùn xay mịn và không thấy vết tích thực vật: 10%
  - Đất sét Caolinit chứa không ít hơn 30% caolinit: 20%
  - Cát thạch anh công nghiệp (cát mịn là chủ yếu với trên: 70%
- 50% các hạt có kích thước 0,05 mm đến 0,2 mm);

- Thêm một lượng đủ canxi cacbonat đã được nghiền nhỏ và có độ tinh khiết phân tích để đưa pH của chất nền đã được làm ẩm đến bằng 6,0 + 0,5 (thường khoảng 0,5% khối lượng của thành phần khô).

Chất nền sẽ được làm ẩm bằng nước đã được loại ion hoặc bằng nước cất để đạt được 40% - 60% khả năng giữ nước toàn phần của đất, xác định theo ISO 11274.

Xác định hàm lượng nước chứa trong chất nền theo ISO 11461

**Chú thích:** Cho phép dùng bất kì loại nước nào để đưa chất thử vào đất.

## 6. Thiết bị

Thiết bị thông thường của phòng thí nghiệm.

6.1. Chậu thủy tinh, mỗi chậu cho mỗi thí nghiệm, dung tích khoảng 1 lít đến 2 lít, đậy không kín để đảm bảo sự trao đổi giữa mỗi trường thử và không khí

6.2. Thiết bị để xác định khối lượng khô của chất nền theo ISO 11641.

## 7. Môi trường thử

7.1. Khu đất có hàng rào vây quanh có thể kiểm soát nhiệt độ ở 20 + 2°C

- 7.2. Nguồn sáng (đèn ống phát huỳnh quang trắng) có khả năng cung cấp một cường độ sáng hằng định từ 400 Lux đến 800Lx trên các chậu và kiểm tra chu kì sáng/tối giữa 12 giờ: 12 giờ và 16 giờ, 8 giờ.

## 8. Quy trình

### 8.1. Chuẩn bị cho phép thử

Nồng độ chất thử được biểu diễn bằng khối lượng chất thử trên khối lượng khô của chất nền (mg/kg) (xem 5.2)

#### 8.1.1. Giới thiệu các chất thử.

##### 8.1.1.1. Các chất tan trong nước

Ngay trước khi bắt đầu phép thử, hoà tan một lượng chất thử cần thiết để tạo một nồng độ trong nước (hoặc lượng cần thiết để làm ẩm đất để đạt được những yêu cầu của 5.2) và trộn kỹ nó với chất nền (5.2) đã nói trên trước khi đưa chậu thuỷ tinh (6.1)

Tiếp tục như mô tả trong 8.1.2.1

##### 8.1.1.2. Các chất không tan trong nước nhưng tan trong các dung môi hữu cơ. Hoà một lượng chất thử cần thiết để thu được nồng độ mong muốn trong dung môi bay hơi (như là axeton hoặc hexan).

Cho chất thử vào chậu thuỷ tinh (6.1) với chất nền (5.2). Trộn cẩn thận và làm bay hơi dung môi bằng cách đặt chậu thuỷ tinh vào tủ hết. Sau đó thêm nước theo (5.2). Trộn cẩn thận và tiếp tục như mô tả trong 8.1.2.

*Chú ý: Cần phải cẩn thận khi tiếp xúc với hơn dung môi để tránh nguy hiểm do bị hít phải do nổ và tránh thiệt hại cho thiết bị chiết, bơm...*

##### 8.1.1.3. Các chất không tan trong nước hoặc trong dung môi hữu cơ

Đối với chất không tan trong dung môi hữu cơ thì điều chế một hỗn hợp gồm 10g cát thạch anh (xem 5.2) đã được nghiền nhỏ và một lượng cần thiết chất thử để thu được nồng độ mong muốn. Chuyển hỗn hợp, phần còn lại của chất nền (5.2) và nước (xem 5.2) vào chậu thuỷ tinh (6.1).

Trộn kỹ và tiếp tục như trình bày trong 8.1.2

### 8.1.2. Giới thiệu vật liệu sinh vật

Xác định hàm lượng nước và pH của đất nhân tạo ở đầu và của phép thử (khi chất thử là axit hoặc bazơ thì không cần điều chỉnh pH).

Lấy 10 con giun đất đã được chuẩn bị như trong 5.1, thấm khô chúng bằng giấy hết nước, cân và cho chúng vào chậu chứa mẫu, thử.

Che chậu chứa mẫu thử như đã nói ở 6.1 và đặt nó vào mảnh đất thử có rào xung quanh (7.1)

### 8.1.3. Chậu đối chứng.

Chuẩn bị chậu đối chứng giống như đối với chậu thử. Nếu quá trình thử đòi hỏi dùng dung môi (xem 8.1.1.2) thì cần chuẩn bị chậu đối chứng có dung môi nhưng không có chất thử đây chậu này như đã nói trong 6.1

### 8.2. Thử sơ bộ.

Thực hiện phép thử sơ bộ với nồng độ chất thử khác nhau [ví dụ: 0,1 mg/kg: 1 mg/kg: 10 mg/kg: 100 mg/kg và 1.000 mg/kg, các nồng độ được biểu diễn bằng miligam chất thử trên kilôgam chất nền khô (5.2)] và mỗi phép kiểm tra dùng 10 con giun đất cho mỗi nồng độ và mỗi chậu thử.

Chuẩn bị chậu thử như đã nói trong 8.1.1 và 8.1.2. Đặt chậu thử vào môi trường như đã mô tả ở điều 7.

Sau 7 ngày đếm những con giun sống và lấy ra những con giun chết nếu nhìn thấy.

Sau 14 ngày đếm những con giun sống và những con giun chết trong chậu (một con giun được coi là chết nếu nó không có phản ứng khi bị gim châm từ phía trước).

Tính phần trăm tử vong đối với mỗi chậu chứa và ở mỗi nồng độ. Ghi chép các triệu chứng quan sát thấy trên con giun.

### 8.3. Phép thử cuối cùng.

Dựa trên kết quả của phép thử sơ bộ, thực hiện phép thử cuối cùng ở 5 nồng độ chất thử theo cấp số nhân giữa nồng độ cao nhất không gây tử vong và nồng độ thấp nhất gây tử vong hoàn toàn.

Đồng thời lặp lại 4 mẫu theo mỗi nồng độ và một phép kiểm tra không có chất thử (xem 8.1.3) và nếu cần thiết một phép kiểm tra khác có dung môi đặt mỗi chậu chứa mẫu vào môi trường thử (điều 7). Trong thời gian thử và sau 14 ngày thực hiện như chỉ dẫn trong 8.2.

Khi kết thúc phép thử xác định tổng số và khối lượng giun sống trong mỗi chậu, hàm lượng nước trong một chậu kiểm tra, giá trị pH trong một chậu về nồng độ thử.

### 8.4. Chất chuẩn

Thực hiện phép thử với cloaxetamit tinh khiết phân tích theo quy trình được mô tả trong 8.1.1.1

*Chú thích:* Đại lượng LC 50 (3.1) cần phải ở trong khoảng giữa 20 mg/kg và 80 mg/kg.

## 9. Tính toán và thể hiện kết quả

### 9.1. Tính toán

Xác định phần trăm tử vong thu được từ phép thử của cùng đối với mỗi nồng độ.

*Chú thích:* Khi số liệu đầy đủ thì giá trị LC 50 - 14d (14 ngày) là độ tin cậy ( $T = 0,95$ ) được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn (Litch field and Wilcoxon hoặc các phương pháp tương đương).

Khi hai nồng độ liên tiếp ở tỉ lệ bé hơn hoặc bằng 1,8 (ví dụ 10: 18) chỉ cho duy nhất 0% và 100% tử vong thì hai giá này là đủ để chỉ khoảng trong đó LC 50.

### 9.2. Thể hiện kết quả

Kết quả được tính bằng miligam và kilogum chất nền khô, đại lượng LC 50 -14d (hoặc lâu hơn nếu phép thử được kéo dài hơn quy trình này, xem điều 9) nồng độ thử cao nhất gây tử vong 0% và nồng độ thử thấp nhất gây tử vong 100%.

## 10. Giá trị pháp lí của phép thử

Tất cả các kết quả được xem là có hiệu lực nếu:

Phần trăm tử vong quan sát được trong phép kiểm tra < 10%

Sự hao hụt trung bình sinh khối của giun trong phép kiểm tra không vượt quá 20%.

## 11. Báo cáo thử nghiệm.

Báo cáo thử nghiệm bao gồm các thông tin sau:

a) Trích dẫn tiêu chuẩn này

b) Các kết quả được trình bày như trong 9.2;

- c) Mô tả đầy đủ nguyên liệu sinh vật được dùng (loài, tuổi khoảng khối lượng điều kiện nuôi, người cung cấp)
- d) Phương pháp điều chế chất thử bao gồm cả dung môi cho chất không tan trong nước;
- e) Chỉ rõ chất chuẩn và các kết quả thu được khi sử dụng nó;
- f) Các điều kiện của môi trường thử;
- g) Phương pháp được dùng để chuẩn hoá giá trị LC 50;
- h) Bảng thống kê phân trăm tử vong của mỗi chậu, mỗi nồng độ và phép kiểm tra;
- i) Khối lượng giun còn sống vào của phép thử
- j) Nêu các số liệu có sẵn, nồng độ cao nhất không quan sát thấy hiệu ứng (NOEC)
- k) Mô tả về các triệu chứng bệnh lí hoặc các thay đổi rõ rệt được nhận thấy ở các sinh vật thử
- l) Hàm lượng nước và pH của "đất nhân tạo" ở điểm xuất phát và điểm của phép thử
- m) Tất cả các chi tiết tiến hành không ghi trong tiêu chuẩn này và bất kì quá trình tương tự nào xảy ra có ảnh hưởng đến các kết quả ;
- n) Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc giữa nồng độ và tác dụng.

#### Phụ lục A

##### Ví dụ về kĩ thuật nuôi dưỡng *Eisenia fetida*

Phụ lục này cho những chỉ dẫn về nuôi dưỡng những sinh vật thí nghiệm được dùng để xác định độc tính tối đa.

Có thể nuôi *Eisenia fetida* trong đủ loại chất thải động vật. Môi trường nuôi dưỡng thích hợp là hỗn hợp 50: 50 phân ngựa hoặc phân trâu bò và than bùn. Môi trường cần có pH khoảng từ 5 đến 7 (điều chỉnh bằng canxi cacbonat), độ dẫn điện thấp (nhỏ hơn 6mS) hoặc nồng độ muối nhỏ hơn 0,5% và không bị quá nhiễm bản amoniac hoặc nước giải gia súc. Chất nền phải ẩm nhưng không quá ướt. Có thể dùng những hộp nuôi dưỡng bằng gỗ hoặc những chậu thấp bất kì có thể có được những con giun đạt tiêu chuẩn về tuổi và khối lượng tốt nhất là nuôi từ trứng. Đặt giun trưởng thành vào hộp nuôi dưỡng chứa chất nền để sản xuất trứng và lấy chúng ra sau 14 đến 21 ngày. Có thể dùng các con giun này cho đợt sinh sản tiếp. Các con giun đất nở ra từ trứng được dùng cho phép thử khi đã trưởng thành.

Thực hiện nuôi dưỡng trong phòng điều hoà nhiệt độ ở 20 + 2<sup>0</sup>C là thích hợp nhất. Ở nhiệt độ này giun sẽ trưởng thành sau 2 đến 3 tháng.