

**TCVN 6859 - 2 : 2001**

**ISO 11268 - 2 : 1998**

**CHẤT LƯỢNG ĐẤT –  
ẢNH HƯỞNG CỦA CÁC CHẤT Ô NHIỄM LÊN GIUN ĐẤT  
(*Eisenoa fetida*) –  
Phần 2: XÁC ĐỊNH ẢNH HƯỞNG ĐỐI VỚI SỰ SINH SẢN**

*Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida) –  
Part 2: Determination of effects on reproduction*

**HÀ NỘI - 2001**

## **Lời nói đầu**

TCVN 6859 - 2 : 2001 hoàn toàn tương đương với ISO 11268 -2 : 1998.

TCVN 6859 - 2 : 2001 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC190 Chất lượng đất biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường ban hành.

# Chất lượng đất – Ảnh hưởng của các chất ô nhiễm lên giun đất (*Eisenia fetida*) –

## Phần 2: Xác định ảnh hưởng đối với sự sinh sản

*Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (Eisenia fetida) –  
Part 2 : Determination of effects on reproduction*

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này mô tả phương pháp xác định những ảnh hưởng của các chất lên sự sinh sản, tử vong và sự sinh trưởng của loài giun *Eisenia fetida fetida* và *Eisenia fetida andrei* thông qua da và thức ăn của chúng khi sử dụng nền đất 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 phần không khí / nước lớn hơn 1, hoặc cho các chất có áp suất hơi lớn hơn 0,0133 Pa ở 25°C.

Chú thích 1 - Không có điều khoản nào trong phương pháp thử này dành cho việc giám sát độ bền của các chất trong quá trình thử nghiệm.

Chú thích 2 - Những đề nghị làm cho phương pháp này thích ứng để so sánh hoặc giám sát chất lượng đất hoặc hoạt động nông nghiệp, thí dụ đánh giá ảnh hưởng của thuốc bảo vệ thực vật, được trình bày ở phụ lục D và E.

### 2 Tiêu chuẩn trích dẫn

TCVN 5979:1995 (ISO 10390:1974), Chất lượng đất - Xác định pH.

TCVN 5961:1995 (ISO 11268-1:1993), Chất lượng đất - Ảnh hưởng của các chất ô nhiễm lên giun đất (*Eisenia fetida*) - Phần 1: Xác định độ độc cấp tính bằng cách sử dụng nền đất nhân tạo.

## **TCVN 6859 - 2 : 2001**

TCVN 6651:2000 (ISO 11274:1998), Chất lượng đất - Xác định đặc tính giữ nước - Phương pháp phòng thí nghiệm.

TCVN 6648:2000 (ISO 11465:1986) Chất lượng đất - Xác định chất khô và hàm lượng nước trên cơ sở khối lượng - Phương pháp khối lượng.

### **3 Định nghĩa**

Các định nghĩa sau được sử dụng đối với tiêu chuẩn này:

#### **3.1 Sự sinh trưởng**

Sự tăng sinh khối, (nghĩa là khối lượng tươi của cơ thể sống) được biểu thị bằng phần trăm khối lượng tươi của cơ thể sống ở thời điểm bắt đầu thử.

#### **3.2 Sự sinh sản**

Sự tăng số lượng trung bình của giun con trong một bình thử sau tám tuần ấp ở những điều kiện thử nhất định.

#### **3.3 Tỷ lệ sinh sản**

Số trung bình của giun con nở từ ổ trứng và sống đến thời điểm kết thúc phép thử trên một giun trưởng thành còn sống sót sau bốn tuần.

#### **3.4 Nồng độ thấp nhất quan sát thấy hiệu ứng**

##### **LOEC**

Nồng độ thấp nhất của chất thử quan sát thấy có hiệu ứng đáng kể khi so sánh với phép thử đối chứng, nồng độ này được biểu thị bằng khối lượng chất thử trên khối lượng khô của chất nền.

#### **3.5 Nồng độ không quan sát thấy hiệu ứng**

##### **NOEC**

Nồng độ cao nhất của chất thử mà ở đó không quan sát thấy hiệu ứng gây chết giun hoặc các hiệu ứng khác (như làm thay đổi khối lượng) nồng độ này được biểu thị bằng khối lượng chất thử trên khối lượng khô của chất nền.

#### **3.6 EC 50**

Nồng độ được ước tính là làm giảm tỷ lệ sinh sản 50% ở thời điểm kết thúc phép thử so sánh với đối chứng, biểu thị bằng khối lượng chất thử trên khối lượng khô của chất nền.

## 4 Nguyên tắc

Xác định được những ảnh hưởng đối với sinh sản, sinh trưởng và tỷ lệ tử vong của giun trưởng thành (loài *Eisenia fetida fetida* hay *Eisenia fetida andrei*) trong mẫu đất nhân tạo đã xác định, có chứa chất thử ở các nồng độ khác nhau. Sau một lần sử dụng chất thử xác định ảnh hưởng đối với tỉ lệ tử vong và sinh khối sau bốn tuần. Ảnh hưởng đối với sinh sản được tính bằng cách đếm số giun nở từ ổ trứng sau bốn tuần tiếp theo.

Tất cả các nồng độ thử cao hơn LOEC phải có hiệu ứng xấu bằng hoặc lớn hơn hiệu ứng quan sát được ở LOEC. Nếu không biết trước nồng độ của chất thử có ảnh hưởng thì nên tiến hành thử theo hai bước:

- tiến hành thử sơ bộ xác định độc tính cấp như mô tả ở TCVN 5961:1995 (ISO 1268-1:1993) để có những chỉ dẫn về nồng độ gây ảnh hưởng và nồng độ làm chết toàn bộ giun, sau đó thử các nồng độ sử dụng trong lần thử cuối có thể lựa chọn.
- thử lần cuối đối với sinh sản của giun xác định được nồng độ hoá chất, khi trộn đều với đất nhân tạo, không gây ảnh hưởng đáng kể đối với số giun nở từ ổ trứng so với nồng độ đối chứng (NOEC), và xác định được nồng độ thấp nhất gây ảnh hưởng (LOEC).

## 5 Thuốc thử

### 5.1 Nguyên liệu sinh vật

Nguyên liệu sinh vật là giun đất trưởng thành thuộc loài *Eisenia fetida fetida* hoặc *Eisenia fetida andrei* (xem tài liệu tham khảo ở phụ lục F), có độ tuổi từ 2 tháng đến 1 năm có búi tuyến da (clitellum) và khối lượng tươi giữa 300 mg đến 600 mg.

Tiến hành đồng thời việc sinh sản bằng cách để giun trưởng thành vào hộp nuôi giun (xem phụ lục A) và lấy chúng ra sau bốn tuần. Còn giun con ở lại sẽ đạt tuổi trưởng thành sau ít nhất 2 tháng.

Trước khi tiến hành thử, giun phải có thời gian lưu trong nền đất nhân tạo khoảng 1 đến 7 ngày. Nguồn thức ăn được sử dụng làm thức ăn trong khi thử (5.3) phải được cung cấp đầy đủ (xem 5.2.1).

### 5.2 Chất nền thử

#### 5.2.1 Chất nền đất

Chất nền dùng để chế tạo đất nhân tạo (5.2.2) phải có những thành phần sau:

Thành phần đất nhân tạo	Phần trăm được tính theo khối lượng khô
Than bùn, phơi khô trong không khí, xay mịn không thấy vết tích thực vật (nhìn bằng mắt)	10%

## TCVN 6859 - 2 : 2001

Đất sét caolinit, phơi khô trong không khí, chứa ít nhất là 30% caolinit 20%

Cát thạch anh công nghiệp, phơi khô trong không khí, (phần lớn là cát mịn có hơn 50% khối lượng loại hạt có kích thước 0,05 mm đến 0,2 mm), phụ thuộc vào lượng  $\text{CaCO}_3$  cần có 70%

Trước khi tiến hành thử, trộn chất thử vào thức ăn. Nếu dùng phân bò phơi khô (xem 5.3), thì nên dùng một lượng là 5g trên 500g khối lượng khô của đất .

Bổ sung đủ lượng canxi cacbonat (khoảng 0,5%), được xay thành bột mịn, và có độ tinh khiết phân tích, để điều chỉnh pH của nền đất ướt đến  $6,0 \pm 0,5$  ở thời điểm bắt đầu phép thử.

Chú thích - Lượng  $\text{CaCO}_3$  cần phụ thuộc vào các thành phần của chất nền đất bao gồm cả thức ăn và phải được xác định ngay trước khi thử bằng cách sử dụng các mẫu phụ.

Sử dụng từ 500 g đến 600g chất đất khô cho một thùng thử (6.1) để chế tạo đất nhân tạo.

### 5.2.2 Đất nhân tạo

Để tạo thành đất nhân tạo, dùng nước loại ion hoặc nước cất làm ẩm chất nền đất (5.2.1) để hàm lượng nước đạt khoảng 40% đến 60% khối lượng của khả năng chứa nước toàn phần, xác định theo TCVN 6651 : 2000 (ISO 11274 :1998).

Chú thích - Đất nhân tạo phải được làm ẩm cho tới khi không có nước tự do hoặc nước chảy ra khi nén đất. Sử dụng phương pháp trình bày ở phụ lục C để xác định đặc tính giữ nước.

Xác định hàm lượng nước và pH với sự có mặt của dung dịch KCl 1 mol/lit của đất nhân tạo trong mẫu hỗn hợp, ngay trước khi thử và ở thời điểm kết thúc phép thử trong mẫu đối chứng và trong mẫu của mỗi nồng độ thử (khi thử chất axit hoặc bazơ thì không điều chỉnh pH), theo TCVN6648:2000 (ISO 11465 :1998) và TCVN 5979 :1995 (ISO 10390 :1994).

### 5.3 Thức ăn

Bất kỳ nguồn thức ăn nào với chất lượng ít nhất có thể duy trì quần thể giun, đều có thể được sử dụng trong khi thử.

Để đạt được sự sinh sản đầy đủ cần phải cho giun ăn trong thời gian thử. Phân bò đã khô trong không khí được nghiền mịn, là nguồn thức ăn thích hợp cho giun đất. Mỗi lần cho thức ăn phải được kiểm tra để xác định xem giun có ăn không, hoặc phải xem có ảnh hưởng xấu nào không (thí dụ do amoniac

hoặc chất phụ gia có tiềm ẩn gây hại). Sự sinh trưởng và lượng trứng giun không được giảm so với giun nuôi trong chất nền không có thức ăn [điều kiện đã được mô tả ở TCVN 5961:1995 (ISO11268- :1993)].

## **6 Thiết bị, dụng cụ**

Các thiết bị phòng thí nghiệm chuẩn, và:

**6.1 Các thùng chứa**, có dung tích 1 lít đến 2 lít có mặt cắt chéo với diện tích khoảng 200 cm<sup>2</sup>, loại thùng có chiều sâu của lớp đất nền từ 5 cm đến 6 cm chứa 500 g đến 600g khối lượng khô. Những thùng chứa này phải có quá trình trao đổi khí giữa môi trường bên trong thùng và không khí bên ngoài, phải có ánh sáng lọt vào (thí dụ bằng cách sử dụng lớp phủ trong suốt và có lỗ) và phải có những biện pháp ngăn ngừa giun chui ra (thí dụ dùng băng cố định lớp phủ).

**6.2 Thiết bị**, đo pH và hàm lượng nước của chất nền.

### **6.3 Môi trường thử**

**6.3.1 Phòng thử có bao che**, có thể kiểm soát nhiệt độ đến 20°C ± 2°C.

**6.3.2 Nguồn sáng**, có khả năng cung cấp một cường độ ánh sáng ổn định từ 400 lx đến 800 lx trên các thùng chứa và kiểm tra chu kỳ sáng / tối giữa 12 h :12 h và 16 h : 8 h.

## **7 Cách tiến hành**

### **7.1 Thử sơ bộ**

Nếu như cần phải xác định khoảng của nồng độ sử dụng trong phép thử chính, thì phải tiến hành thử sơ bộ theo TCVN 5961 :1995 (ISO 11268 -1 :1993) cho bốn nồng độ của chất thử và một đối chứng (thí dụ 0mg/kg, 1 mg/kg, 10 mg/kg, 100 mg/kg và 1000 mg/kg). Nồng độ được biểu thị bằng miligam chất thử trên kilogam nền đất khô (5.2.1), sử dụng 10 con giun cho một nồng độ trên một thùng.

### **7.2 Phép thử cuối cùng**

#### **7.2.1 Đưa chất thử vào chất nền**

Sử dụng hoặc phương pháp a) hoặc b) hoặc c), nếu thích hợp.

a) 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 yêu cầu của 5.2.2 và trộn kỹ với nền đất trước khi đưa vào thùng thử.

b) Các chất không tan trong nước nhưng tan trong dung môi hữu cơ.

Hoà tan lượng chất thử cần thiết để thu được nồng độ mong muốn trong dung môi bay hơi (axeton hoặc hexan) và trộn dung dịch trên với một phần cát thạch anh theo yêu cầu. Sau khi làm bay hơi dung môi bằng cách để thùng chứa dưới tủ hốt, bổ sung phần còn lại của chất nền với nước và trộn thật kỹ trước khi cho chúng vào thùng thử. Tiếp tục làm như đã mô tả ở 7.2.3.

Chú thích - Có thể dùng siêu âm, dung môi hữu cơ, chất tạo huyền phù hoặc chất phân tán để phân tán các chất ít tan trong nước. Khi sử dụng các chất phụ trợ đó, thì tất cả các nồng độ thử và một đối chứng bổ sung phải chứa cùng một lượng nhỏ nhất chất phụ trợ đó.

**Cảnh báo: Phải có biện pháp thích hợp khi tiếp xúc với hơi dung môi để tránh nguy hiểm do bị hít phải hoặc nổ, và tránh làm thiệt hại cho thiết bị chiết, bơm...**

c) Các chất không tan trong nước hoặc trong dung môi hữu cơ

Đối với chất không tan trong dung môi bay hơi, thì điều chế một hỗn hợp gồm 10g cát thạch anh công nghiệp nghiền mịn (xem 5.2.1) và một lượng cần thiết chất thử để thu được nồng độ mong muốn. Cho hỗn hợp trên phần còn lại của chất nền đất (5.2.1) và nước vào thùng thử (6.1) và trộn thật đều.

Trộn chất thử vào nền đất nhân tạo theo TCVN 5961:2000 (ISO 11268-1:1993) trước khi bổ sung giun đất.

Trên cơ sở các kết quả của phép thử sơ bộ, đặt các nồng độ đã chọn để đưa ra LOEC/NOEC. Để cách các nồng độ bằng cơ số không lớn hơn 2.

Các chất trộn vào chất nền không cần thử ở nồng độ lớn hơn 1000 mg/kg khối lượng chất thử.

Tiến hành đồng thời ít nhất bốn mẫu lặp lại cho một nồng độ và cho các đối chứng.

### **7.2.2 Thùng đối chứng**

Chuẩn bị thùng đối chứng giống như cách chuẩn bị thùng thử nhưng không có chất thử bên trong. Nếu quá trình thử yêu cầu có các chất phụ trợ (xem 8.2.1), thì sử dụng thêm một thùng đối chứng tương tự như thùng thử nhưng không có chất thử.

### **7.2.3 Bổ sung vật liệu sinh vật**

Chuẩn bị, rửa sạch và lau (sử dụng giấy thấm) 10 con giun (5.1) cho mỗi thùng thử (6.1) và thùng đối chứng. Để tránh sai số hệ thống khi phân phối giun vào các thùng phải tiến hành xác định độ đồng đều của giun được thử bằng cách cân mẫu gồm 20 con giun riêng biệt. Khi đã chắc chắn đạt độ đồng đều, các mẻ gồm 10 con giun sẽ được chọn, cân và cho vào mỗi thùng. Các mẻ giun sẽ được phân chia sử dụng theo quy luật ngẫu nhiên.

Đặt các thùng như đã chỉ dẫn ở 6.1.



Đặt các thùng vào buồng thử hoặc phòng thử có bao che (6.3.1).

#### 7.2.4 Tiến hành thử

Sau khi cho giun vào thùng thử một ngày, rắc 5 g thức ăn khô nghiền mịn phơi khô trong không khí vào mỗi thùng thử trên bề mặt đất và làm ẩm đất bằng nước uống được, (khoảng từ 5 đến 6 ml cho một thùng). Cho ăn một lần trong một tuần trong suốt thời gian thử. Nếu nhu cầu tiêu thụ thức ăn chậm thì giảm lượng thức ăn đến mức thấp nhất. Ghi lại hành vi giun ăn, cho ăn, lượng thức ăn đã dùng trong thời gian thử đối với mỗi thùng.

Duy trì hàm lượng nước của chất nền đất trong thùng thử (6.1) trong thời gian thử bằng cách cân chúng trong khoảng thời gian nhất định và bổ sung lượng nước mất nếu cần. Ở thời điểm kết thúc thử, hàm lượng nước không được thay đổi quá 10% hàm lượng nước lúc bắt đầu thử.

Giữ những con giun trưởng thành trên 4 tuần lễ trong chất nền thử. Khi thời gian này kết thúc, lấy giun trưởng thành ra và ghi lại tổng số và khối lượng giun sống ở mỗi thùng. Giữ các thùng thêm 4 tuần nữa trong môi trường thử (6.3) để cho giun con phát triển. Khi bắt đầu thời kỳ này, cho giun con ăn một lần bằng cách trộn bằng tay 5g thức ăn vào chất nền ở một thùng. Sau thời kỳ đã định, dùng phương pháp thích hợp đếm số giun con được nở từ ổ trứng.

Chú thích - Phụ lục B cho thí dụ của hai phương pháp thích hợp bao gồm cả phương pháp đếm trứng.

### 7.3 Chất đối chiếu

Carbendazim được chọn làm chất đối chiếu. Nếu như hợp chất này được trộn vào chất nền, thì tiến hành quan sát các ảnh hưởng đối với quá trình sinh sản ( $\alpha = 0,05$ ) ở nồng độ từ 1 mg đến 5 mg ai carbendazim trên kilôgam khối lượng chất nền khô. (Đối với áp dụng trên bề mặt xem phụ lục D).

## 8 Tính toán và biểu thị kết quả

### 8.1 Tính toán

Đối với mỗi nồng độ, xác định phần trăm tử vong, phần trăm tăng / giảm sinh khối của giun trưởng thành và số lượng giun con được sinh ra trong phép thử sau cùng.

So sánh các giá trị trung bình với đối chứng bằng phương pháp thống kê thích hợp thí dụ như phương pháp William, Dunnet' hoặc Student' với mức ý nghĩa ( $\alpha = 0,05$ ).

### 8.2 Biểu thị kết quả

Chỉ rõ, ở nồng độ thử cao nhất không tử vong, tính theo miligam trên kilogam khối lượng của chất nền đất khô, sự thay đổi sinh khối của giun trưởng thành, nồng độ thấp nhất có ảnh hưởng (LOEC) và nếu có thể thì tính tỷ lệ LC/EC 50.

## **9 Tính đúng đắn của phép thử**

Các kết quả được coi là đúng nếu:

- a) tỷ lệ sinh sản giun con ít nhất là 30 con trong một thùng đối chứng;
- b) hệ số biến thiên sinh sản trong phép thử đối chứng không vượt quá 30% ;
- c) phần trăm tử vong trong thùng đối chứng của giun trưởng thành  $\leq 10\%$ .

## **10 Báo cáo thử nghiệm**

Báo cáo kết quả sẽ dựa theo tiêu chuẩn này và phần bổ sung cho các kết quả nêu ở 8.2 sẽ cung cấp những thông tin sau.

- mô tả cụ thể về chất thử và thông tin về tính chất hoá học, lý học để giúp hiểu rõ kết quả thử;
- mô tả toàn bộ nguyên liệu sinh vật đã dùng (loài, độ tuổi, khoảng khối lượng, điều kiện sinh sản, người cung cấp);
- phương pháp điều chế chất thử và bất kỳ chất phụ trợ nào được dùng cho những chất thử tan chậm, hoặc không tan trong nước;
- kết quả đạt được với chất đối chiếu nếu sử dụng;
- điều kiện chi tiết của môi trường thử;
- bảng ghi chép phần trăm tử vong đối với mỗi thùng và đối với mỗi nồng độ và đối với phép thử đối chứng;
- tổng số khối lượng giun trưởng thành lúc bắt đầu thử, tổng số khối lượng giun trưởng thành còn sống trong thùng thử sau 4 tuần;
- số lượng giun con trong mỗi thùng thử khi kết thúc phép thử;
- nồng độ cao nhất không gây ảnh hưởng (NOEC) và nồng độ thấp nhất gây ảnh hưởng (LOEC);
- mô tả các triệu chứng bệnh lý hoặc thay đổi bản năng quan sát được (thí dụ: giảm độ ăn) trong các cơ thể thử trên một thùng thử;
- hàm lượng nước và pH của đất nhân tạo ở thời điểm bắt đầu và kết thúc phép thử đối với mỗi nồng độ thử và thử đối chứng;
- tất cả những thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này và bất kỳ sự cố nào có ảnh hưởng đến kết quả thử.

## Phụ lục A

(tham khảo)

### Thí dụ về kỹ thuật nuôi giun *Eisenia fetida fetida* và *E. fetida andrei*

Phụ lục này đưa ra những chỉ dẫn về nuôi những sinh vật thử được sử dụng để xác định độc tính tối đa.

Cả hai loài đều có thể nuôi bằng chất thải của động vật. Môi trường nuôi thích hợp là hỗn hợp phân ngựa hoặc phân bò với than bùn trộn theo tỷ lệ 50:50. Môi trường nuôi có pH khoảng 6 đến 7 (được điều chỉnh bằng canxi cacbonat), có độ dẫn điện thấp (nhỏ hơn 6mg hoặc nồng độ muối nhỏ hơn 0,5%) và không bị quá nhiễm bả amoniac hoặc nước giải gia súc. Chất nền phải ẩm nhưng không quá ướt. Thùng nuôi giun có dung tích 10 lít đến 50 lít đều thích hợp.

Để có được những con giun với khối lượng và độ tuổi đủ tiêu chuẩn, tốt nhất nên bắt đầu nuôi từ trứng. Đặt giun đã trưởng thành vào hộp nuôi chứa chất nền mới để nó đẻ trứng và lấy chúng ra sau 14 đến 28 ngày. Giun này có thể sử dụng cho đợt sinh sản tiếp. Những con giun con nở ra từ ổ trứng được dùng để thử khi đã trưởng thành (sau ít nhất là 2 tháng, nhưng phải ít hơn 12 tháng tuổi).

Thực hiện nuôi trong phòng điều hoà ở nhiệt độ  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  là thích hợp nhất. Ở nhiệt độ này giun sẽ trưởng thành sau 2 tháng đến 3 tháng.

## Phụ lục B

(tham khảo)

### Các kỹ thuật đếm giun con nở từ trứng

Việc đếm giun con bằng tay rất tốn phí thời gian. Có hai phương pháp tách giun con khỏi chất nền đất khá nhanh được giới thiệu.

- a) Thùng thử được đặt vào nồi cách thủy, ở nhiệt độ 50°C đến 60°C. Sau khoảng 20 phút giun con xuất hiện trên bề mặt của chất nền và có thể dễ dàng tách chúng ra và đếm. Phải kiểm tra hiệu quả của phương pháp. Nếu như giun con được thu nhặt bằng tay, thì cần phải kiểm tra lại.
- b) Nếu như than bùn và phân bò được nghiền thành bột mịn, đất thử có thể được rửa trên rây sử dụng phương pháp sau [9], phương pháp này cho phép xác định số lượng trứng cũng như số lượng giun con nếu cần đếm.

Dùng 2 rây có lỗ là 0,5 mm (đường kính 30 cm) chồng lên nhau. Các vật bên trong thùng thử được rửa trên rây bằng tia nước mạnh, giun con và trứng ở lại trên rây. Cần phải lưu ý để cho bề mặt phía trên của rây lúc nào cũng ướt trong suốt quá trình này, để cho giun con bò trên lớp nước mỏng, tránh cho chúng không chui vào các lỗ rây. Kết quả tốt nhất nếu dùng vòi hoa sen. Sau khi đất nền trôi hết, giun con và trứng được tráng bằng nước và cho vào hộp riêng.

Các trứng rỗng sẽ nổi lên trên mặt nước, giun con sẽ chìm phía đáy hộp. Khi đã chắt hết nước, giun con được chuyển vào đĩa Petri với một chút nước. Dùng kim hoặc kẹp để nhặt giun ra và đếm từng con một.

## **Phụ lục C**

(tham khảo)

### **Xác định khả năng giữ nước của đất nhân tạo**

Xác định khả năng giữ nước của đất nhân tạo theo TCVN 6651:2000 (ISO 11274:1998), Chất lượng đất- Xác định đặc tính giữ nước - Phương pháp phòng thí nghiệm.

## Phụ lục D

(tham khảo)

### Thử ảnh hưởng chưa tử vong của thuốc bảo vệ thực vật đối với giun đất *Eisenia fetida fetida* hoặc *E. fetida andrei*

#### D.1 Khái quát

Phương pháp này có thể thích hợp đối với việc nghiên cứu trong phòng thử các hiệu ứng phụ đối với giun đất. Chú ý các ảnh hưởng chưa gây tử vong, bằng cách sử dụng nồng độ thuốc phù hợp với thực tế canh tác. Mức độ áp dụng trên từng vùng được điều chỉnh, có lưu ý đến chiều sâu đất sử dụng trong khi thử, sao cho nồng độ của chất thử trong đất thường cao hơn nồng độ áp dụng trên thực tế.

Khi thử thuốc bảo vệ thực vật, phương thức áp dụng sao cho giống với thực tế canh tác, thí dụ sử dụng bình phun đối với ruộng được thử cho các ô nhỏ. Số lượng chất sử dụng phải được kiểm tra bằng kỹ thuật hiệu chuẩn (thí dụ bằng cách cân).

Đối với thuốc bảo vệ thực vật, phép thử cuối cùng phải được tiến hành đối với một hoặc nhiều tỷ lệ được dựa trên tính toán sử dụng thuốc đã dự định trước với lượng nước từ 600l/ha đến 800l/ha.

Các dạng đặc biệt của thuốc bảo vệ thực vật như bột, hạt hoặc viên phải được dùng theo cách phù hợp với sử dụng thông thường trong nông nghiệp.

Không được dùng thuốc bảo vệ thực vật khi giun còn trên mặt đất!

Sau khi cho thuốc bảo vệ thực vật, để thùng thử ở trạng thái hở trong vòng 1 giờ để cho dung môi bay hơi.

#### D.2 Chất đối chiếu (xem 7.3)

Một lượng 250g ai/ha đến 500g ai/ha chất carbendazim được khuyến cáo để sử dụng như chất độc chuẩn. Chất độc chuẩn phải được kiểm tra 2 lần trong 1 năm.

#### D.3 Biểu thị kết quả

Chỉ rõ bằng đơn vị miligam trên mét vuông mặt đất, tỷ lệ sử dụng cao nhất mà không gây tử vong, sự thay đổi đáng kể trong sinh khối của giun trưởng thành, và sự giảm đáng kể số giun con.

## Phụ lục E

(tham khảo)

### Xác định những ảnh hưởng đối với sinh sản của giun trong đất ô nhiễm

#### E.1 Giới thiệu

Phương pháp được mô tả trong tiêu chuẩn này có thể thích hợp để so sánh sinh sản của giun trong một số loại đất.

#### E.2 Nguyên tắc

Những ảnh hưởng đối với sự tăng trưởng và sinh sản của giun trưởng thành (*Eisenia fetida fetida* hoặc *E. fetida andrei*) và tỷ lệ sống khi trứng nở được xác định trong các đất thử và đất đối chứng. Nếu như mục đích là đánh giá ảnh hưởng của đất bị nghi là ô nhiễm, thì tất cả tính chất của đất đối chứng phải gần giống đến mức tối đa với đất thử, chỉ khác là không có các chất ô nhiễm.

#### E.3 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị được mô tả ở điều 6.

#### E.4 Cách tiến hành

##### E.4.1 Chuẩn bị đất thử

Nếu một mẫu đất đã được chọn thì các tính chất sau phải được xác định và báo cáo.

- a) pH, theo TCVN 5979:1995 (ISO 10390);
- b) Khả năng trao đổi cation, theo TCVN 6646:2000 (ISO 11260);
- c) Hàm lượng chất hữu cơ, theo TCVN 6642:2000 (ISO 10694);
- d) Phân bố kích thước hạt, theo TCVN 6862 : 2001 (ISO 11277);
- e) Tỷ khối, theo TCVN 6860 : 2001 (ISO 11272);
- f) Hàm lượng nước, theo TCVN 6648:2000 (ISO 11465);
- g) Khả năng giữ nước, theo TCVN 6651:2000 (ISO 11274);
- h) Sinh khối vi sinh, theo TCVN 6856 - 2 : 2001 (ISO 14240);

Phải sử dụng ít nhất 5 mẫu lặp lại đối với mỗi loại đất và đất đối chứng. Đất được sử dụng phải đạt khả năng giữ nước từ 40% đến 60%.

## **TCVN 6859 - 2 : 2001**

Ít nhất phải xác định và ghi lại pH và hàm lượng nước trong đất ở thời điểm bắt đầu và kết thúc phép thử.

### **E.4.2 Tiến hành thử**

Cho giun vào mỗi thùng theo 7.2.3 và đặt các thùng vào phòng thử có bao che (6.3.1) và tiến hành xác định theo 7.2.4.

### **E.5 Biểu thị kết quả**

Đối với mỗi mẫu đất, xác định phần trăm tử vong, phần trăm tăng/giảm trong sinh khối của giun trưởng thành và số giun con sinh ra.

So sánh các giá trị trung bình với đối chứng bằng phương pháp thống kê thích hợp với mức ý nghĩa ( $\alpha=0,05$ ).



## Phụ lục F

(tham khảo)

### Cách thực hiện hoàn chỉnh phương pháp

#### F.1 Khái quát

Tóm tắt việc hoàn chỉnh phương pháp dựa trên kết quả của 30 công trình được tiến hành trên 9 loại phương tiện thử được trình bày trong các bảng dưới đây. Phương pháp được sử dụng phù hợp với thử các hiệu ứng phụ của thuốc bảo vệ thực vật như đã trình bày ở phụ lục D.

#### F.2 Chỉ tiêu hợp lệ

**Bảng F.1 - Chỉ tiêu hợp lệ và phần trăm của các phép thử đáp ứng các chỉ tiêu đó**

Chỉ tiêu	Giá trị giới hạn	Phù hợp với % công trình (n = 30)
Tỷ lệ giun chết trong phép thử đối chứng	$\leq 10\%$	100
Tỷ lệ sinh sản giun con trong thùng đối chứng	$\geq 30$	83
CV của giun con trong thùng đối chứng	$\leq 30\%$	67(33 giữa 30 và 50)

#### F.3 Độ nhạy của hệ thống thử

Độ nhạy của hệ thống thử được đo bằng cách tính toán tất cả kết quả của các lần thử khác nhau, nó sẽ chỉ ra sự khác biệt đáng kể về số giun con so với phép thử đối chứng. Để sự so sánh tốt hơn thì tỷ lệ % giảm sẽ được chia làm 8 loại. Bảng F.2 chỉ ra kết quả của tất cả các phép thử với những liều khác nhau đáp ứng được chỉ tiêu hợp lệ.

Bảng này chỉ rõ sự khác biệt từ 30% đến 40% giảm số giun con của hệ thống thử so với phép thử đối chứng là đạt yêu cầu.

**Bảng F.2 - Độ nhạy của hệ thống thử nghiệm dựa trên 45 kết quả  
của 19 phép thử đáp ứng được chỉ tiêu hợp lệ**

<b>% giun con giảm so với đối chứng</b>	<b>Số kết quả</b>	<b>Kết quả quan trọng, tính bằng % của các kết quả (phương pháp William)</b>
<5	6	0
5 – 10	2	0
10 – 20	10	30
20 – 30	5	60
30 – 40	4	100
40 – 50	2	100
50 – 60	1	100
>60	15	100

**F.4 Kết quả của phép thử sử dụng chất hoạt động benomyl và carbendazim làm chất đối chứng.**

**Bảng F.3 - Kết quả của 11 phép thử sử dụng hoặc benomyl hoặc carbendazim làm chất đối chứng**

<b>Chất đối chứng</b>	<b>Tỷ lệ sử dụng g ai/ha</b>	<b>% sinh sản của đối chứng</b>
Benomyl	125	39*
	625	36*
	625	0*
	625	4*
	750	0*
	850	0*
	1000	10*
	1000	8*
Carbendazim	900	5*
	1260	19*
	2520	5*

\* Khác biệt tin cậy so với đối chứng

Bảng F.3 chỉ rõ hơn 30% giảm sinh sản đối với tất cả tỷ lệ sử dụng. So sánh với đối chứng thì ảnh hưởng đối với số giun con là đáng kể trong tất cả mọi trường hợp. Kết quả cho thấy liều 750g ai/ha có thể được giảm bằng hệ số 2 hoặc lớn hơn.

## Phụ lục G

(tham khảo)

### Tài liệu tham khảo

- [1] Bouches, M.B.1972: omboucien (giun của Pháp) Môi trường học và hệ thống, NXB Viện Quốc Gia nông nghiệp.
- [2] Edwards, C. A, 1993 Xây dựng phương pháp tiêu chuẩn để đánh giá độc tính của hoá chất đối với giun đất. Báo cáo EUR 8714 EN, tiểu ban Hội đồng châu Âu.
- [3] Edwards, C .A. và Bohlen P. J., 1996 Sinh học về giun đất, XB lần thứ 3.Chapman và Hall, London.
- [4] Jaenicke, J "Eisenea foetida " hai loài sinh học, Megaclri logcea, 4 1982, trang 6-8.
- [5] Kokta, C., 1992. Phương pháp thử nghiệm trong phòng thử về các ảnh hưởng gây tử vong của thuốc bảo vệ thực vật đối với giun đất *Eisenea fetida*, độc tính môi trường của giun đất NXB P.W Greing - Smith, . H.Becker, P.J. Edwards và F. Heimbach: Intercept, Andover, Hants, Vương quốc Anh UK, trang 213 - 216.
- [6] OECD chỉ dẫn để kiểm tra hoá chất 207 g giun đất và thử nghiệm độc tính cấp. Nhân 4: tháng 4, 1984.
- [7] Oien, N và J. Stenersen, Esterases của giun đất - III phương pháp điện tử phát hiện rằng *Eisenea foetida* (Savigny) là 2 loài Comp. Biochem. Physiol., 78c, (2) 1984 trang 277 - 282.
- [8] Chỉ 87/302/CEE-18, tháng 11, 1987.
- [9] Van Gestel, C.A.M, Van Dis, W.A. Van Breemen, E.M. và P.M Sparenburg:  
So sánh hai phương pháp xác định độ nở của trứng giun trong thử độc tính đối với giun đất *Pedoliologia*, 32, 1998, trang 367 - 371.
- [10] Van Gesdtel, C. A. M, Van Dis, W. A, van Hreemen, E.M vaf P.M Sparenburg:  
Triển khai thử nghiệm độc tính tái tạo (sinh sản) tiêu chuẩn với loài giun đất *Eisenia fetida andrei* có sử dụng đồng, Pentaclo phenol và 2, 4 Diclo roanitine, an toàn môi trường và độc tính mới sinh , 18, 1989, trang 305 - 312.
- [11] Neuhauser, E.F. và C.A Callahan.  
Tăng trưởng và sinh sản của giun đất *Eisenia fetida* khi tiếp xúc với những nồng độ chưa gây tử vong của hoá chất hữu cơ. Sinh hoá và sinh học của đất, 22. (2), 1990, trang 175 - 179.