

TCVN 6858 : 2001

ISO 11266 : 1994

**CHẤT LƯỢNG ĐẤT –
HƯỚNG DẪN THỬ TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM ĐỐI VỚI
QUÁ TRÌNH PHÂN HUỶ SINH HỌC CỦA CÁC CHẤT HỮU
CƠ TRONG ĐẤT Ở ĐIỀU KIỆN HIẾU KHÍ**

*Soil quality – Guidance on laboratory testing
for biodegradation of organic chemicals in soil under aerobic conditions*

Lời nói đầu

TCVN 6858 : 2001 hoàn toàn tương đương với ISO 11266 : 1994.

TCVN 6858 : 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 – Hướng dẫn thử trong phòng thí nghiệm đối với quá trình phân hủy sinh học của các chất hữu cơ trong đất ở điều kiện hiếu khí

Soil quality – Guidance on laboratory testing for biodegradation of organic chemicals in soil under aerobic conditions

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này đưa ra hướng dẫn về việc lựa chọn và tiến hành phương pháp thử thích hợp để xác định quá trình phân hủy sinh học của các chất hữu cơ trong đất hiếu khí. Tiêu chuẩn này không đưa ra bất kỳ phương pháp thử đặc thù nào.

2 Tiêu chuẩn trích dẫn

ISO 9408 : 1991 Chất lượng nước – Sự đánh giá quá trình phân hủy “hoàn toàn” của các chất hữu cơ trong môi trường nước – Phương pháp xác định nhu cầu oxy trong máy hô hấp kín.

TCVN 5960 : 1995 (ISO 10381-6 : 1993) Chất lượng đất – Lấy mẫu – Hướng dẫn về thu thập, vận chuyển và lưu giữ mẫu đất để đánh giá các quá trình hoạt động của vi sinh vật hiếu khí tại phòng thí nghiệm.

TCVN 5979 : 1995 (ISO 10390 : 1994) Chất lượng đất – Xác định pH.

TCVN 6642 : 2000 (ISO 10694 : 1995) Chất lượng đất – Xác định cacbon hữu cơ và cacbon tổng số sau khi đốt khô (“phân tích nguyên tố”)

TCVN 6646 : 2000 (ISO 11260 : 1994) Chất lượng đất – Xác định khả năng trao đổi cation thực tế và độ bão hòa bazơ bằng cách sử dụng dung dịch bari clorua.

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

TCVN 6862 : 2001 (ISO 11277 : 1998) Chất lượng đất – Xác định thành cấp hạt trong đất khoáng - Phương pháp rây và lắng đọng.

TCVN 6858 : 2001

TCVN 6498 :1999 (ISO11261: 1995) Chất lượng đất – Xác định nitơ tổng. Phương pháp Kjedahl (Kjeldahl) cải biên.

ISO 11461:-¹⁾ 1) Chất lượng đất – Xác định hàm lượng nước trong đất trên cơ sở thể tích - Phương pháp khối lượng.

3 Định nghĩa

Trong phạm vi của tiêu chuẩn này áp dụng các định nghĩa sau.

3.1 Phân hủy sinh học: Sự phân hủy phân tử hữu cơ dưới các tác động đa dạng của các sinh vật sống.

3.2 Phân hủy sinh học bậc 1: Sự phân hủy của một chất đến mức đủ để làm mất đi một vài tính chất đặc trưng của phân tử ban đầu. Trên thực tế, điều này được xác định bằng phân tích sự tiêu hao của hợp chất ban đầu hay một vài chức năng đặc thù của hợp chất ban đầu.

3.3 Phân hủy sinh học đến cùng: Sự phá hủy một hợp chất hữu cơ thành khí cacbon dioxit, nước, oxyt hoặc muối vô cơ của bất kỳ nguyên tố nào hiện hữu và sản phẩm kết hợp với các quá trình chuyển hoá bình thường của vi sinh vật.

3.4 Thời gian tồn tại: Thời gian lưu trú của các chủng loại hóa chất trong thành phần xác định một cách đặc thù của môi trường.

3.5 Thời gian phân hủy DT-50: Khoảng thời gian để nồng độ của hợp chất đã cho giảm 50% giá trị ban đầu của nó.

3.6 Thời gian phân hủy DT-90: Khoảng thời gian để nồng độ của hợp chất đã cho giảm 90% giá trị ban đầu của nó.

3.7 Cặn liên kết; cặn không chiết tách được: Các loại hóa chất trong thực vật và đất, có nguồn gốc, thí dụ từ phân tử hữu cơ không chiết tách được bằng các phương pháp không làm thay đổi bản chất hóa học của những cặn này một cách đáng kể. Các chất cặn không thể chiết tách này được xem xét để loại trừ phân tái tuần hoàn qua quá trình trao đổi chất dẫn tới các sản phẩm tự nhiên. (Xem thí dụ và các thông tin tiếp ở [3] phụ lục A).

3.8 Khoáng hóa: Sự phân hủy hoàn toàn của một chất hữu cơ thành sản phẩm vô cơ.

1) Sẽ ban hành

4 Nguyên tắc

Sau khi bổ sung hợp chất thử vào đất đã được chọn (5.1) quá trình phân hủy sinh học được đo trong điều kiện hiếu khí (xem ISO 9408). Sử dụng hợp chất đánh dấu phóng xạ cho phép xác định được tốc độ phân hủy của hợp chất thử và việc tạo thành các chất chuyển hóa, cacbon dioxide, các chất dễ bay hơi khác và các chất cặn không chiết tách được. Phải sử dụng các phương pháp phân tích thích hợp để nhận biết các chất chuyển hóa. Sự phân hủy của hợp chất thử có thể được theo dõi bằng các phương pháp phân tích đặc thù.

5 Vật liệu

5.1 Đất

Nếu có thể, đất được chọn để thử phải lấy trực tiếp từ nơi dự đoán trước là tiếp xúc với hóa chất. Tuy nhiên, nếu không lấy được mẫu sạch do sự ô nhiễm đã xảy ra từ trước đó thì đất được chọn phải có những tính chất so sánh.

Lý lịch thực địa của đất sử dụng phải được xem xét và cần phải lưu ý đến các quá trình cải tạo đất gần nhất như canh tác và sử dụng thuốc trừ sâu. Phải có các dữ liệu chính xác về nơi lấy mẫu, về vị trí của nó, về các thực vật hiện có hoặc mùa màng trước đó, thời gian lấy mẫu từ thực địa và về độ sâu khi lấy mẫu.

5.1.1 Các đặc tính của đất

Sự hiểu biết về các đặc tính của đất là điều rất cần để giải thích một cách đầy đủ các kết quả nghiên cứu. Vì vậy, ít nhất cần phải tiến hành những phép thử sau đối với mẫu đất đã lấy:

Tính chất lý học:

- 1) phân tích cấp hạt theo TCVN 6862 : 2001 (ISO 11277);
- 2) hàm lượng nước thực địa theo ISO 11461;
- 3) khả năng giữ nước toàn phần và/hoặc đặc tính giữ nước theo TCVN 6651 : 2000 (ISO 11274).

b) Tính chất hóa học:

- 1) pH của đất, theo ISO 10390, hoặc pH trong dung dịch KCl hay dung dịch CaCl_2 ;
- 2) hàm lượng chất hữu cơ theo TCVN 6642 : 2000 (ISO 10694 : 1995);
- 3) khả năng trao đổi cation (CEC) theo TCVN 6646 : 2000 (ISO 11260 : 1994);
- 4) hàm lượng nitơ, theo TCVN 6498 : 1999 (ISO 11261 : 1995).

c) Tính chất sinh học:

TCVN 6858 : 2001

Hoạt tính vi sinh vật phải được xác định hoặc bằng cách sử dụng hợp chất có thể phân hủy sinh học thích hợp hoặc bằng cách xác định sinh khối hoạt tính theo một số tiêu chuẩn sẽ được ban hành sau.

Chú thích 1 – Xác định hoạt tính vi sinh vật trước khi tiến hành thử quá trình phân hủy sinh học và xác định xem có các thay đổi của hoạt tính vi sinh vật đã xảy ra trong quá trình thử có thể có lợi hơn.

5.2 Vật liệu thử

Các chất được dùng để thử phải là các hợp chất tinh khiết (độ tinh khiết hóa học lớn hơn 98%). Cần phải xem xét đến ảnh hưởng của bất cứ chất mang hoặc thành phần tạo thành.

Các dữ liệu về các hợp chất sau đây rất quan trọng để giải thích các kết quả:

tên (IUPAC);

cấu trúc;

khối lượng tương đối của phân tử;

dữ liệu về độ tinh khiết;

tính ổn định trong nước và trong dung môi hữu cơ;

tính hòa tan trong nước;

áp suất hơi;

hệ số thành phần octanol/nước;

hằng số hấp thụ;

hằng số phân ly axit;

đối với các hóa chất được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ:

bản chất và vị trí của dấu,

hoạt tính riêng,

độ tinh khiết hóa chất phóng xạ.

Chú thích 2 – Kết quả của những nghiên cứu sử dụng các chất đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ phụ thuộc vào thứ hạng của dấu đồng vị phóng xạ. Việc đánh dấu nên định vị theo cách sao cho có thể theo dõi được quá trình chuyển đổi.

6 Thu thập, xử lý và bảo quản đất

Phải tuân thủ ISO 10381-3 để bảo đảm đạt tối đa khả năng sống của vi sinh vật trong quá trình lấy mẫu.

7 Cách tiến hành

7.1 Bổ sung chất thử

Nồng độ được sử dụng trong khi thử phụ thuộc vào đối tượng thực nghiệm. Hoá chất thử được bổ sung bằng nhiều cách:

trong nước (phụ thuộc vào độ hòa tan trong nước);

trong dung môi hữu cơ (phụ thuộc vào độ hòa tan trong dung môi). Lượng dung môi cần dùng để hoà tan hợp chất phải giữ ở mức thấp nhất. Cần phải tính đến độ độc hại và độ phân huỷ sinh học của dung môi;

cho trực tiếp vào dưới dạng rắn, thí dụ như trộn với cát thạch anh.

Phải có biện pháp ngăn ngừa việc bổ sung chất thử ở mức gây độc. Những hợp chất độc hoặc hợp chất có hiệu ứng ức chế đối với vi sinh vật trong đất ở nồng độ đó sẽ cản trở quá trình xác định độ phân huỷ sinh học. Ngoài ra, nếu chất thử bổ sung trong nước cần phải có biện pháp ngăn ngừa đất quá ướt hoặc quá chặt.

7.2 Quá trình ủ

Lượng đất đã xử lý được chia ra thành các phần nhỏ, mỗi phần ít nhất là 50 g (tương đương khối lượng khô) và được đưa vào bình ủ. Nói chung phải tiến hành ủ một lúc ít nhất hai mẫu cho một điểm lấy mẫu. Độ chính xác của phép thử càng cao nếu như ta tăng số lượng mẫu ủ .

Khi sử dụng vật liệu thử chưa được đánh dấu, nên tiến hành các mẫu đối chứng đồng thời. Các mẫu đối chứng này nên gồm đất, nước, hoặc dung môi như đã được sử dụng cho vật liệu thử trong mẫu đã được xử lý.

7.2.1 Hệ thống ủ

Hệ thống ủ được sử dụng phụ thuộc vào phương pháp phân tích và phương pháp đo. Có nhiều hệ thống ủ được dùng và một vài hệ thống trong số đó được liệt kê ở [1] và [2] phụ lục A. Hệ thống ủ được sử dụng phải bảo đảm cung cấp đầy đủ oxy để duy trì điều kiện hiếu khí. Nếu cần phân biệt giữa phân huỷ sinh học và loại phân huỷ khác thì cần phải tiến hành ủ trong điều kiện vô trùng.

Nếu việc đánh giá lượng cacbon dioxit được sử dụng để theo dõi quá trình phân huỷ thì phải có biện pháp thích hợp khi thử đất kiềm. Loại đất kiềm có thể hấp thụ cacbon dioxit và dẫn đến việc lượng cacbon dioxit được xác định thấp hơn lượng tạo ra.

Nếu việc đo quá trình khoáng hóa được tiến hành với các hợp chất không đánh dấu phóng xạ thì phải chú ý tới tốc độ khoáng hoá của mẫu đối chứng và khả năng lượng cacbon dioxit tạo thành từ một cacbonnat vô cơ.

Chú thích 3 – Một số hệ thống ủ mô tả trong [1] và [2] phụ lục A.

TCVN 6858 : 2001

7.2.2 Điều kiện ủ

7.2.2.1 Chiếu sáng

Thông thường, các quá trình ủ xảy ra trong bóng tối để ngăn ngừa việc mọc tảo trên bề mặt đất thử. Tuy nhiên, khi cần nghiên cứu về sự đóng góp của tảo trong quá trình phân huỷ sinh học thì phải chọn điều kiện chiếu sáng thích hợp. Trong những điều kiện như vậy, sự quang phân cũng góp một phần đáng kể vào việc phân huỷ và điều này phải tính đến khi tiến hành thử.

7.2.2.2 Nhiệt độ

Nhiệt độ ủ phải được chọn tùy theo mục đích nghiên cứu. Nhìn chung, hoạt tính tối đa của vi sinh vật đạt được ở khoảng từ 25°C đến 35°C. Tuy nhiên, đối với đất ở vùng khí hậu ôn hòa, nhiệt độ từ 10°C đến 25°C cũng đủ và nhiệt độ này đặc trưng hơn cho điều kiện tự nhiên. Nơi hệ thống ủ được đặt vào phải được đo và ghi lại nhiệt độ tối đa và tối thiểu với những khoảng thời gian đều đặn trong suốt quá trình ủ và nhiệt độ này không được thay đổi quá $\pm 2^\circ\text{C}$.

7.2.2.3 Hàm lượng nước

Hàm lượng nước trong đất phải thích hợp với mục đích nghiên cứu. Bằng phương pháp cân, hàm lượng nước phải được xác định ngay khi bắt đầu thử và phải được giám sát trong suốt quá trình ủ. Hàm lượng nước mất đi phải thay thế bằng một lượng nước đã loại ion hoặc nước cất thích hợp. Hàm lượng nước ban đầu phải được duy trì trong khoảng $\pm 5\%$.

Hàm lượng nước được biểu thị một cách thích hợp như là áp suất nước trong lỗ hổng. Nói chung, hoạt tính của vi sinh vật trong đất đạt tối ưu ở khoảng $- 0,01 \text{ MPa}$ đến $- 0,031 \text{ MPa}$ và sẽ giảm đi khi đất bị ngập nước (áp lực nước ở lỗ hổng gần bằng 0) hoặc khi đất quá khô, với áp lực nước trong lỗ hổng là âm.

Áp lực nước trong lỗ hổng được xác định theo TCVN 6651 : 2000 (ISO 11274).

Đôi khi, khả năng giữ nước của đất (KNGN) cũng được sử dụng nhưng không có giá trị lắm vì nó không cung cấp được sự so sánh giữa các mẫu đất khác nhau. Hoạt tính tối đa của vi sinh vật thường tìm thấy ở khoảng 40% - 60% KNGN tối đa của đất đã cho, mặc dù KNGN đạt 75% khả năng giữ nước tối đa cũng có thể sử dụng cho mục đích đặc biệt.

Chú thích 4 – Thông tin tiếp theo xem ở [4] phụ lục A.

7.2.3 Thời gian thử

Thời gian tối thiểu tiến hành thử chưa được đề xuất nhưng vì hoạt tính vi sinh trong đất giảm khi thời gian ủ kéo dài nên quá trình thử không được kéo dài quá 120 ngày.

7.2.4 Lấy mẫu

Các mẫu phải được lấy ở những khoảng thời gian đều đặn trong quá trình ủ, khoảng thời gian này tùy thuộc vào thời gian tiến hành thử và tốc độ phân hủy sinh học của vật liệu thử. Để xây dựng được đồ thị đường phân huỷ yêu cầu phải có ít nhất năm điểm lấy mẫu. Vì nhiều vật liệu phân huỷ nhanh hơn vào thời gian đầu của quá trình ủ, tần suất lấy mẫu nên như sau: 0 ngày, 2 ngày, 4 ngày, 8 ngày, 16 ngày, 32 ngày, 64 ngày và 120 ngày sau khi ủ. Đối với các phương pháp lấy mẫu phá hủy, thí dụ như khi phân tích đất trực tiếp, thì toàn bộ đất của một bình ủ riêng biệt được lấy để đo.

7.3 Phân tích

Phương pháp phân tích được chọn tùy theo mục đích nghiên cứu và yêu cầu dữ liệu về phân hủy sinh học bậc một và/hoặc phân huỷ sinh học đến cùng.

Các phân tích được chọn để theo dõi quá trình phân hủy sinh học tùy thuộc vào chính hóa chất và việc sử dụng hợp chất đánh dấu phóng xạ hay không đánh dấu phóng xạ.

Nói chung, cần phải xem xét các phân tích sau:

Đối với phân hủy bậc một (các chất không đánh dấu):

sự tiêu hao của chất ban đầu

b) Đối với phân hủy đến cùng (các chất không đánh dấu):

xác định mức tiêu thụ oxy và/hoặc sự tạo thành cacbon dioxit,

sự tiêu hao hợp chất ban đầu

c) Đối với quá trình trao đổi chất (các chất được đánh dấu)

xác định lượng cacbon dioxit đánh dấu được tạo thành,

xác định các chất bay hơi, cả chất ban đầu và chất chuyển hóa,

xác định lượng nước chiết tách được hoặc dung môi,

xác định lượng cặn liên kết không chiết tách được.

Đối với việc xác định các chất chiết tách được thì phải sử dụng loại dung môi không ảnh hưởng đến chất ban đầu hoặc chất chuyển hóa của chúng. Phải cẩn thận khi tiến hành quá trình chiết tách để lượng chiết tách đạt được tối đa. Phân tích các chất chuyển hóa và chất ban đầu có thể tiến hành trên sắc ký bản mỏng (TLC), sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), sắc ký khí (GS), khối phổ (MS) hoặc dùng các phép đo phổ.

8 Biểu thị kết quả

Tất cả các dữ liệu phải được trình bày dưới dạng đồ thị và bảng.

Giá trị DT-50 và DT-90 phải được tính toán bằng cách sử dụng, thí dụ, kiểu được mô tả ở [6] phụ lục A.

Thông tin có ích bổ sung bao gồm việc xác định các hợp chất dễ bay hơi, sự tạo thành và thời gian tồn tại của chất trao đổi và cặn không chiết tách được.

Chú thích

5) Nếu không quan sát được quá trình phân hủy sinh học, các nguyên nhân có thể là:

chất thử là độc;

chất thử không phân huỷ sinh học;

hoạt tính của vi sinh vật trong đất bằng không.

6) Để giúp cho việc đánh giá kết quả, xem ví dụ ở [5] trong phụ lục A.

9 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phân huỷ các hợp chất phải gồm những thông tin sau:

- a) áp dụng theo tiêu chuẩn này;
- b) dữ liệu về các hóa chất thử đã sử dụng, xem 5.2;
- c) dữ liệu về đất đã sử dụng, xem 5.1;
- d) dữ liệu về cách tiến hành thử, phương pháp thử đã sử dụng, nồng độ đã sử dụng, phương pháp áp dụng, dữ liệu về tính năng của phép thử, dữ liệu về lấy mẫu, v.v... , xem điều 7;
- e) dữ liệu về phương pháp phân tích đã sử dụng, thí dụ, giới hạn phát hiện, chất lượng qui trình kiểm soát chất lượng, các chất đối chứng đã phân tích;
- f) dữ liệu chưa xử lý về kết quả phân tích;
- g) đánh giá và kết luận.

Phụ lục A

(tham khảo)

Tài liệu tham khảo

- [1] GUTH, J.A Các phương pháp thực nghiệm nghiên cứu sự phân hủy thuốc trừ sâu trong đất (1981), các tiến bộ trong hóa sinh của thuốc trừ sâu, 1, trang. 85-114.
- [2] Herreken, M, Kordel, W, Kleen W, và Huber, R. (1988) Hệ thống ủ sinh học – hệ thống mới mềm dẻo và gọn nhẹ trong nghiên cứu phân hủy sinh học. Proceeding 1988 Hội nghị bảo vệ mùa màng Brighton sâu phá hoại và các bệnh, trang 669-674.
- [3] Kearney, P.C. IUPAC Báo cáo của Ủy ban về thuốc sâu, thông tin kỹ thuật (1982), Tạp chí Hiệp hội hóa học thử, 65, trang 1030, 1032.
- [4] Paul, E.A và Clark, F.E Hoá sinh và vi sinh vật học của đất (1989), NXB Academic Press, Inc.
- [5] Schinkel, K. Nolting, H.G. và Lundein, J.R. Thời gian lưu của sản phẩm bảo vệ thực vật trong đất. Phân hủy, biến đổi, chuyển hóa (tháng 12/1986). Những chỉ dẫn cho thử chính thức chất bảo vệ thực vật, Phần 4, 4-1.
- [6] Timme, G. Frehse, H. và Laska, V. Interpretation und graphische Darstellung des Abbauverhaltens von Pflanzenschutzmittel-Rückständen (1986), II. Pflanzenschutz-Nachrichten, Bayer 39, pp.188-204
-