

Phân bón vi sinh vật giải xenluloza
Cellulose-degrading microbial fertilizer

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này áp dụng cho các loại phân bón các chủng vi sinh vật sống có khả năng phân giải xenluloza và quy định các yêu cầu kỹ thuật, phương pháp kiểm tra đánh giá đối với phân bón vi sinh vật phân giải xenluloza.

2. Tiêu chuẩn trích dẫn

TCVN 4833-89 (iso 4833-1978) Hướng dẫn chung đếm vi sinh vật kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30°C

TCVN 4881-89 (ISO 6887-1983) Hướng dẫn chung về cách pha chế dung dịch pha loãng để kiểm nghiệm vi sinh vật

TCVN 5814 -1994 Phân bón hỗn hợp NPK. Phương pháp thử

TCVN 6169-1996 Phân bón vi sinh vật. Thuật ngữ

3. Thuật ngữ, định nghĩa

Phân bón vi sinh vật phân giải xenluloza là sản phẩm chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật sống đã được tuyển chọn với mật độ đạt tiêu chuẩn hiện hành có khả năng phân giải xenluloza, qua đó cung cấp chất dinh dưỡng cho đất và cây trồng, tạo điều kiện nâng cao năng suất và (hoặc) chất lượng nông sản, tăng độ màu mỡ của đất. Phân vi sinh vật phân giải xenluloza và các chủng vi sinh vật này không ảnh hưởng xấu đến người, động, thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.

4. Yêu cầu kỹ thuật

4.1 Phân bón vi sinh vật phân giải xenluloza phải chứa một hoặc nhiều chủng vi sinh vật có khả năng phát triển trên môi trường chứa nguồn cacbon duy nhất là xenluloza tự nhiên

4.2 Phân bón vi sinh vật phân giải xenluloza có mật độ vi sinh vật sống phù hợp với quy định trong bảng 1

Bảng 1 - Mật độ vi sinh vật

Tên chỉ tiêu	Mật độ vi sinh vật CFU * /g (hay ml) phân bón			
	Chất mang thanh trùng		Chất mang không thanh trùng	
	Khi xuất xưởng	Cuối hạn bảo hành	Khi xuất xưởng	Cuối hạn bảo hành
1. Vi sinh vật phân giải xenluloza, không nhỏ hơn	1.0 10 ⁹	1,0 10 ⁸	1,0 10 ⁷	1,0 10 ⁶
2. Vi sinh vật tạp, không lớn hơn	1,0 10 ⁶	1,0 10 ⁶	-	-

CFU*: Đơn vị hình thành khuẩn lạc

4.3 Phân vi sinh vật phân giải xenluloza phải có tác dụng tốt đối với đất và cây trồng. Hiệu quả của phân bón phải đạt các chỉ tiêu chất lượng đã ghi trên nhãn và được xác định tại phòng thử nghiệm được công nhận hoặc chỉ định

4.4 Độ an toàn của các chủng vi sinh vật chứa trong phân phải được xác định và công nhận tại các phòng thử nghiệm được công nhận hoặc chỉ định

4.5 Thời gian bảo hành của phân bón vi sinh vật phân giải xenluloza không ít hơn 6 tháng kể từ ngày xuất xưởng

4.6 Hàm lượng các chất dinh dưỡng và độ ẩm của phân bón vi sinh vật phân giải xenluloza phải được đăng ký tại các cơ quan quản lý nhà nước về chất lượng và được xác định đánh giá tại các phòng thí nghiệm được công nhận hoặc chỉ định

5 Lấy mẫu

5.1 Quy định chung

5.1.1 Việc lấy mẫu được tiến hành sao cho mẫu kiểm tra phải là mẫu đại diện cho cả lô hàng. Người lấy mẫu phải được huấn luyện và có kinh nghiệm trong việc lấy mẫu

5.1.2 Trong quá trình lấy mẫu, vận chuyển và xử lý mẫu, phải đảm bảo tránh sự lây nhiễm từ bên ngoài và phải bảo đảm là mẫu được nguyên trạng như ban đầu cho tới khi đem phân tích trong phòng thí nghiệm

5.1.3 Không được bổ xung thêm bất cứ một tác nhân bảo quản, diệt khuẩn hoặc diệt nấm vào mẫu kiểm tra.

5.1.4 Mẫu được lấy phải là các bao nguyên gói.

5.1.5 Phải tiến hành lấy mẫu ở những nơi không có hơi nước nóng, hoá chất độc hại, không có ánh nắng gay gắt hoặc bụi và được đưa ngay vào các dụng cụ chứa mẫu.

5.1.6 Các dụng cụ lấy mẫu và chứa mẫu phải sạch sẽ và vô trùng

5.2 Chuẩn bị dụng cụ lấy và chứa mẫu

5.2.1 Dụng cụ lấy mẫu phải là loại được làm từ thép không rỉ hoặc bằng thủy tinh

5.2.2 Các dụng cụ lấy và chứa mẫu sạch sẽ và vô trùng bằng cách sấy trong tủ sấy ở nhiệt độ 170°C trong thời gian không ít hơn 1 giờ hoặc trong nồi hấp ở nhiệt độ 121°C trong thời gian không ít hơn 30 min và được bảo quản trong các dụng cụ thích hợp, đảm bảo tránh lây nhiễm từ bên ngoài.

5.3 Số lượng mẫu

5.3.1 Lô hàng bao gồm các bao (túi) sản phẩm phân bón vi sinh vật phân giải xenluloza được sản xuất cùng một đợt với cùng một nguồn nguyên liệu.

5.3.2 Số lượng bao (túi) cần lấy để kiểm tra đối với mỗi lô hàng phụ thuộc và độ lớn của lô hàng đó và phù hợp với quy định trong bảng 2.

Bảng 2- Số lượng bao (túi) cần lấy để kiểm tra

Cả lô hàng (bao, túi)	Số lượng mẫu cần lấy (bao, túi)
đến 100	7
từ 101 đến 1000	11
từ 1001 đến 10000	15
lớn hơn 10000	19

5.3.3 Các bao (túi) mẫu được lựa chọn ngẫu nhiên theo TCVN 1694-75

Tiến hành lấy mẫu trung bình từ mẫu chung là tập hợp các mẫu ban đầu trong lô hàng kiểm tra. Chia mẫu trung bình làm 2 phần bằng nhau rồi bao gói phù hợp với yêu cầu của sản phẩm. Một phần dùng để kiểm tra và một phần để lưu và bảo quản trong điều kiện qui định mà mỗi loại sản phẩm yêu cầu để dùng khi phân tích trọng tài.

Trên mỗi gói mẫu phải có nhãn ghi rõ:

- tên mẫu và đối tượng cây trồng được sử dụng;
- tên cơ sở sản xuất;
- thời gian sản xuất;
- thời gian và địa điểm lấy mẫu;
- tên người lấy mẫu, cơ quan lấy mẫu.

6. Tiến hành kiểm tra và xác định

6.1 Chuẩn bị kiểm tra

6.2.1.1 Trang thiết bị, dụng cụ kiểm tra

Trang thiết bị của phòng kiểm nghiệm vi sinh vật thông thường bao gồm:

- thiết bị để khử trùng khô (tủ sấy) hoặc khử trùng hơi nước, (nồi hấp)
- tủ ẩm, có thể điều chỉnh được ở $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- hộp lồng thủy tinh hoặc chất dẻo, đường kính từ 90 đến 100 mm;
- pipet thủy tinh có dung tích 1,0 ml; 5,0 ml; 10,0 ml;
- máy đếm khuẩn lạc có đáy được chiếu sáng với nền tối có gắn một thấu kính phóng đại, ở độ phóng đại 1,5 lần và một dụng cụ đếm cơ học hoặc hiện số điện tử;
- máy đo độ pH có độ chính xác đến $\pm 0,1$ đơn vị đo pH
- nồi cách thủy ổn nhiệt;
- ống nghiệm thủy tinh 18 x 18 mm;
- bình tam giác có dung tích thích hợp;
- ống đong và các dụng cụ thủy tinh khác

Các dụng cụ dùng trong xác định vi sinh vật phải khử trùng bằng cách:

- giữ ở từ 170 đến 175⁰ C không ít hơn 1 h trong tủ sấy, hoặc
- giữ ở áp suất 1,0 atmophe (121⁰ C) không ít hơn 30 min trong nồi hấp

Các thiết bị pha trộn

- máy trộn quay có tần số quay từ 8 000 đến 45 000 vòng / min, có bình chứa bằng kim loại hoặc thủy tinh, chịu được các điều kiện tiệt trùng;
- dụng cụ trộn nhu động (stomacher) với các túi chất dẻo đã vô trùng;
- dụng cụ trộn : có thể trộn từ 1 ml đến 2 ml mẫu thử;
- cân kỹ thuật có độ chính xác tới 0,01 g.

6.2.1.2 Dịch pha loãng được dùng là dung dịch muối ăn (NaCl) 0,85 %, không chứa các hợp chất cacbon, có độ pH là 7,0 sau khi khử trùng ở 25 ⁰C.

Lấy 90 ml dịch pha loãng vào các bình cầu hoặc lọ bằng chất dẻo (cho dịch huyền phù ban đầu), hoặc

Lấy 9 ml dịch pha loãng vào ống nghiệm (cho ccs dịch pha loãng thập phân)

Nút lại bằng bông mỡ, khử trùng trong nồi hấp áp lực ở 121⁰C trong 30 min.

Nếu chưa sử dụng ngay, dịch pha loãng cần được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ từ 0 đến 5⁰ C, thời gian bảo quản không quá 1 tháng kể từ ngày chuẩn bị.

Chú thích - Để tránh làm ảnh hưởng đến các vi sinh vật do thay đổi nhiệt độ đột ngột, nên điều chỉnh nhiệt độ của dịch pha loãng đến nhiệt độ phòng thử nghiệm

6.2.1.3 Chuẩn bị môi trường kiểm tra

Môi trường dùng để kiểm tra phân vi sinh vật phân giải xenluloza được sử dụng là môi trường chứa nguồn cacbon duy nhất là xenluloza tự nhiên, thành phần môi trường phụ thuộc vào chủng loại vi sinh vật mà nhà sản xuất sử dụng. Nếu không có yêu cầu của nhà sản xuất, khi kiểm tra sử dụng môi trường theo phụ lục A.

Môi trường được pha chế theo thứ tự các hoá chất trong thành phần đã cho và chia vào các dụng cụ thủy tinh đã chuẩn bị trước rồi khử trùng ở điều kiện 1 atm (121°C) trong 30 min. Phan chia môi trường vào các hộp lồng đã khử trùng ở điều kiện vô trùng. Kiểm tra độ sạch của môi trường sau 2 ngày để ở nhiệt độ từ 28 đến 30°C. Chỉ sử dụng các hộp lồng chứa môi trường nuôi cấy vi sinh vật không phát hiện thấy tạp nhiễm.

Chú thích- đối với phân vi sinh vật phân giải xenluloza chứa các vi sinh vật dưới dạng tiềm sinh, trước khi kiểm tra cần phải hoạt hoá.

6.2.1.4 Chuẩn bị dịch huyền phù xenluloza.

Cân 30 g giấy lọc loại định lượng (thí dụ Whatman 1) xé thành mảnh nhỏ cho vào bình thủy tinh có dung tích 4 lit, thêm một lit nước cất và một ít viên bi thủy tinh sao cho đủ ngập giấy. Lắp bình vào máy lắc, lắc cơ học với tốc độ 74 lần/ min trong khoảng 30 min, để lắng sau 24 h, chất lấy dung dịch huyền phù xenluloza.

6.2.1.5 Chuẩn bị dung dịch chỉ thị Benedict:

Thành phần dung dịch Benedict;

Natri xitrat	17,3 g
Na_2CO_3	10,0 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,73 g

- hoà tan natri xitrat và Na_2CO_3 vào 80 ml nước ấm. Bổ xung nước cất vừa đủ để đạt 85 ml (dung dịch A)
- hoà tan CuSO_4 vào 10 ml nước (dung dịch B)
- trộn đều dung dịch A và dung dịch B;
- bổ xung nước vừa đủ để đạt 100 ml.

6.2.2 Tiến hành kiểm tra

6.2.2.1 Pha loãng mẫu

a) đối với mẫu dạng lỏng: dùng pipet vô trùng có nút bông ở phần nút lấy ra 10 ml mẫu đã trộn đều bằng lắc tay hay thiết bị lắc cơ học và đưa vào 90 ml dịch pha loãng theo 6.2.1.2. Chú ý tránh chạm pipet vào dịch pha loãng, trộn cẩn thận mẫu đã chuẩn bị bằng cách hút-thả lại 10 lần với một pipet có nút bông ở phần hút đã vô trùng khác hoặc bằng dụng cụ trộn cơ học trong 5-10 s, nhịp quay của dụng cụ này được chọn sao cho mẫu trộn như cuộn xoáy dâng lên cách mép lọ chứa khoảng 2 đến 3 cm. Dung dịch tạo ra được gọi là dung dịch huyền phù ban đầu.

b) đối với mẫu dạng đặc biệt: cân 10 g mẫu có độ chính xác tới 0,01 g và cho vào bình chứa vô trùng, thêm 90 ml dịch pha loãng trong 6.2.1.2. Đặt bình vào máy trộn trong 2 đến 5 min sao cho có được một dung dịch có phân bố đồng đều, để lắng các phân tử nặng trong khoảng 15 min, gạn được dung dịch huyền phù ban đầu.

c) dùng một pipet đã vô trùng lấy 1 ml dịch huyền phù ban đầu (a hoặc b) cho vào ống nghiệm chứa 9 ml dịch pha loãng (6.2.1.2) đã chuẩn bị sẵn ở nhiệt độ phòng, tránh chạm pipet vào dịch pha loãng. Trộn kỹ bằng cách hút - thả khoảng 10 lần với một pipet khác có

nút bông ở đầu hút đã vô trùng, để có dịch pha loãng mẫu có nồng độ là 10^{-2} . Quá trình này được lặp lại liên tục để có dịch mẫu có nồng độ pha loãng theo quy định sau:

- đối với phân vi sinh vật trên nền chất mang thanh trùng sử dụng nồng độ pha loãng là 10^{-7} .

- đối với phân vi sinh vật trên nền chất mang không thanh trùng sử dụng nồng độ pha loãng là 10^{-5} .

6.2.2.2 Cấy mẫu

Dùng pipet vô trùng riêng cho từng độ pha loãng riêng lấy ra từ dịch mẫu có nồng độ pha loãng 10^{-5} ; 10^{-6} ; 10^{-7} đối với mẫu phân vi sinh vật trên nền chất mang thanh trùng; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5} đối với mẫu phân vi sinh vật trên nền chất mang không thanh trùng, một lượng dịch mẫu 0,05 ml, cấy vào 1 hộp lồng chứa môi trường đã chuẩn bị sẵn theo 6.2.1.3. Mỗi mẫu được cấy lập lại trên hai hộp lồng.

Nhắc nhẹ hộp lồng để dịch mẫu dàn trải trên bề mặt thạch, chú ý không để dịch mẫu dính vào thành hộp lồng, đợi bề mặt thạch khô, úp ngược hộp lồng và đưa vào tủ ẩm, điều chỉnh nhiệt độ tủ ẩm cho phù hợp với yêu cầu của từng loại vi sinh vật. Thời gian nuôi là 48 -72 h.

6.2.2.3 Phát hiện vòng phân giải

Lấy 1 ml huyền phù xenluloza và 1 ml dung dịch chỉ thị Benedict nhỏ lên bề mặt thạch đã cấy mẫu (6.2.2.2) để ở nhiệt độ 30 đến 35⁰ C trong 10 đến 15 min.

Quan sát vòng phân giải trong suốt bao quanh các khuẩn lạc phân giải xenluloza

6.2.3 Đọc kết quả

Vi sinh vật phân giải xenluloza được tính là số khuẩn lạc trong hộp lồng tạo vòng phân giải (vòng tròn trong suốt) bao quanh khuẩn lạc.

Vi sinh vật tạp là tất cả các khuẩn lạc không có đặc điểm đặc trưng trên

5.2.4 Cách tính mật độ vi sinh vật trên một đơn vị kiểm tra (gam hay mililit)

Mật độ vi sinh vật trong đơn vị kiểm tra (A) được tính theo công thức:

a.20

$$A = \frac{\quad}{d}$$

trong đó

a - số khuẩn lạc theo yêu cầu có trong hộp lồng

d - nồng độ dịch pha loãng

Chú thích :

1) số lượng khuẩn lạc trung bình được tính là trung bình cộng số khuẩn lạc của các hộp lồng được cấy từ cùng một độ pha loãng, trong đó chỉ tính các hộp lồng chứa từ 5 đến 50 khuẩn lạc.

2) số lượng khuẩn lạc trung bình cũng có thể được tính từ trung bình cộng số khuẩn lạc của các hộp lồng được cấy từ hai độ pha loãng kế tiếp nhau bằng cách tính số khuẩn lạc trung bình của mỗi độ pha loãng, trong đó số khuẩn lạc ở độ pha loãng cao hơn được nhân với 10, sau đó lấy trung bình cộng của hai giá trị nêu trên nếu tỷ số giữa giá trị lớn và giá trị nhỏ không lớn hơn 2. Nếu tỷ số này lớn hơn 2 thì lấy giá trị nhỏ làm kết quả.

3) Mật độ vi sinh vật trên một đơn vị kiểm tra được biểu thị bằng một số giữa 1,00 và 9,99 nhân với 10^n , n là số mũ thích hợp.

6.3 .Xác định hàm lượng các chất dinh dưỡng

6.3.1 Xác định hàm lượng nitơ (N)

Tiến hành theo TCVN 5815 -1994.

6.3.2 Xác định hàm lượng photpho (P_2O_5 hữu hiệu)

Tiến hành theo TCVN 5815-1994

6.3.3 Xác định hàm lượng kali (K_2O)

Tiến hành theo TCVN 5815-1994.

6.3.4 Xác định hàm lượng các chất hữu cơ và vi lượng

Tiến hành theo các phương pháp và uy định hiện hành

6.3.5 Xác định độ ẩm

Tiến hành theo TCVN 5815-1994

6.4 Báo cáo kết quả kiểm tra

Báo cáo kết quả kiểm tra phải mô tả lại tình trạng mẫu trước khi tiến hành kiểm tra(các chi tiết cần và đủ để xác định mẫu), các phương pháp kiểm tra và kết quả đạt được. Báo cáo cũng phải nêu tất cả các điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được coi là tùy chọn, cũng như bất kỳ tình huống nào có thể ảnh hưởng đến kết quả.

7. Yêu cầu bao gói, ghi nhãn, bảo quản và hướng dẫn sử dụng

7.1 Phân bón vi sinh vật phân giải xenluloza phải được bao gói bằng các chất liệu bảo đảm không gây độc hại tới vi sinh vật, người, động thực vật và môi trường sinh thái, đồng thời đảm bảo thời hạn bảo hành của phân bón trước các điều kiện bất lợi từ bên ngoài.

7.2 Trên mỗi bao (gói) sản phẩm phân vi sinh vật phân giải xenluloza phải có ghi nhãn với đầy đủ các nội dung sau:

- tên cơ sở sản xuất;
- tên sản phẩm và tên khoa học của loài vi sinh vật sử dụng;
- thành phần dinh dưỡng và độ ẩm;
- công dụng
- ngày sản xuất và thời gian bảo hành
- khối lượng tịnh
- số đăng ký chất lượng

7.3 Sản phẩm phải có bản hướng dẫn sử dụng kèm theo (in trên bao bì hoặc in riêng). Nội dung hướng dẫn phải ghi đủ liều lượng và qui trình sử dụng cũng như hiệu quả của phân bón đối với cây trồng hay khả năng thay thế các loại phân bón khác.

PHỤ LỤC A

(Quy định)

A.1 Môi trường nuôi cấy để kiểm tra nấm phân giải xenluloza

Glucosa	10,0 g
Pepton	5,0 g
KH_2PO_4	1,0 g
$MgSO_4. 7H_2O$	0,5 g
Rose bengal	33 mg
Streptomycin sunphar (10%)	3 ml

Aga	20,0 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	6,5-7,0

A.2 Môi trường nuôi cấy để kiểm tra vi khuẩn, xạ khuẩn phân giải xenluloza

Peton	5,0 g
Cao thịt bò	3,0 g
NaCl	5,0 g
Aga	20,0g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	6,8 – 7,0

A.3 Môi trường nuôi cấy để kiểm tra vi khuẩn, xạ khuẩn phân giải xenluloza

Glucoza	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Aga	20,0 g
Nước chiết đất*	100 ml
Nước cất vừa đủ	900 ml
Ph	6,5 -7,0

*Chuẩn bị nước chiết đất:

- 1 kg đất vườn tơi + 1 l nước sạch;
- hấp khử trùng 30 phút trong nồi hấp;
- bổ xung 1 g CaCO₃ rồi lọc lấy nước trong.