

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 6167:1996

PHÂN BÓN VI SINH VẬT PHÂN GIẢI HỢP CHẤT PHOTPHO KHÓ TAN

Phosphat-solubilizing microbial fertilizer.

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này áp dụng cho các loại phân bón chứa các chủng vi sinh vật sống có khả năng phân giải hợp chất photpho khó tan và qui định các yêu cầu kỹ thuật; phương pháp kiểm tra đánh giá đối với phân bón vi sinh vật phân giải hợp chất photpho khó tan.

2. Tiêu chuẩn trích dẫn

TCVN 4833-89 (ISO 4833-1987) 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 các dung dịch pha loãng để kiểm nghiệm vi sinh vật

TCVN 5815-1994 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 hợp chất photpho khó tan (tên thường gọi : phân lân vi sinh) là sản phẩm chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật đã được tuyển chọn với mật độ đạt tiêu chuẩn hiện hành, có khả năng chuyển hoá hợp chất photpho khó tan thành dạng dễ tiêu cung cấp cho đất và cây trồng, tạo điều kiện nâng cao năng suất và (hoặc) chất lượng nông sản. Phân lân vi sinh và các chủng vi sinh vật không gây 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 hợp chất khó tan phải chứa một hoặc nhiều chủng vi sinh vật có khả năng tạo yng phân giải trên môi trường chứa nguồn photpho duy nhất là tricanxi photphat [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] hoặc lixitin.

4.2 Phân bón vi sinh vật phân giải hợp chất photpho khó tan phải 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. Vísinh vật phân giải hợp chất photpho khó tan, không nhỏ hơn	$1.0 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^7$	$1,0 \cdot 10^6$
2. Vi sinh vật tạp, không lớn hơn	$1.0 \cdot 10^6$	$1.0 \cdot 10^6$		

*CFU – đơn vị hình thành khuẩn lạc

4.3 Phân bón vi sinh vật phân giải hợp chất photpho khó tan phải có tác dụng tốt đối với cây trồng và đất. Hiệu quả của phân bón phải đạt được các chỉ tiêu chuẩn lượng như đã ghi trong nhãn và được xác định tại phụng thử nghiệm được công nhận hay chỉ định

4.4 Độ am toàn của các chủng vi sinh vật chứa trong phân bón phải được xác định và công nhận tại các phụng thí nghiệm được công nhận hay chỉ định

4.5 Thời hạn bảo hành của phân bón vi sinh vật phân giải hợp chất photpho khó tan không ít hơn 6 tháng

4.6 Thành phần các chất dinh dưỡng và độ ẩm của phân bón phải được đăng ký tại các cơ quan quản lý nhà nước về chất lượng và được xác định, đánh giá tại các phụng thí nghiệm được công nhận hay 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 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 h 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 hợp chất photpho khó tan 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 vào 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 cấy 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 Xác định hiệu quả của phân bón vi sinh vật phân giải hợp chất khó tan

Hiệu quả của phân bón vi sinh vật phân giải hợp chất photpho khó tan đối với đất và cây trồng được xác định theo đúng qui trình về khảo nghiệm phân bón đã qui định trong các văn bản của cơ quan có thẩm quyền.

Chú thích – trong khảo nghiệm diện hẹp cần thêm một công thức đối chứng với nền phân vi sinh vật đã được diệt hết tế bào vi sinh vật sống có trong phân

6.2 Kiểm tra mật độ vi sinh vật

6.2.1 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 ấm, có thể điều chỉnh được ở 30°C ± 1°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 mm x 180 mm;
- bình tam giác có dung tích thích hợp;
- ống đông và các dụng cụ thủy tinh khác.

Ngoài các dụng cụ đã khử trùng sẵn, tất cả các dụng cụ dùng trong kiểm tra vi sinh vật phải khử trùng bằng cách:

- giữ ở 170 đến 175 °C không ít hơn 1 h trong tủ sấy, hoặc
- giữ ở áp suất 1,0 atm (121 °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 vng/ 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 dùi 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 là dung dịch muối ăn NaCl 0,85 %, không chứa các hợp chất photpho, có độ pH là 7,0 sau khi khử trùng ở 25 °C.

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 các dịch pha loãng thập phân). Nút lại bằng bông mỡ, khử trùng trong nồi hấp áp lực, ở 121°C trong 30 min.

Nếu chưa sử dụng ngay, dịch pha loãng cần được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ từ 0 đến 5 °C, thời gian bảo quản không quá 1 tháng kể từ ngày chuẩn bị

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

6.2.1.3 Chuẩn bị môi trường kiểm tra

Môi trường dùng để kiểm tra mật độ phân vi sinh vật phân giải hợp chất photpho khó tan được sử dụng là môi trường chứa nguồn photpho duy nhất là tricanxi photphat [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] hoặc Lexitin. 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 vào các dụng cụ thủy tinh đã chuẩn bị trước rồi khử trùng ở điều kiện 1 atm (121°C) trong 30 min. Phần 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 chứa các loại vi sinh vật dưới dạng tiềm sinh, trước khi kiểm tra cần phải hoạt hoá.

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 hút, lấy ra 10 ml mẫu để 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, nhíp 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: 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 theo 6.1.1.2. 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 phần 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 theo 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 1 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 lập lại liên tục để có dịch mẫu có nồng độ pha loãng theo qui định sau:

- đối với phân vi sinh 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 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 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 là 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 2 hộp lồng.

Lắc nhẹ hộp lồng mẫu dần 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 ấm, điều chỉnh nhiệt độ tủ ấm cho phù hợp với yêu cầu của từng loại vi sinh vật. Thời gian nuôi từ 48 đến 72 h.

6.2.3 Đọc kết quả

Vi sinh vật phân giải hợp chất photpho khó tan được tính là số khuẩn lạc trong lồng hộp tạo nên phân giải (năng trùn trong suốt) bao quanh khuẩn lạc.

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

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

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

$$A = \frac{a \cdot 20}{D}$$

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 có chứa từ 20 đến 300 khuẩn lạc;

2) Số lượng khuẩn lạc trung bình cũng có thể được tính từ trung bình cộng số khuẩn lạc trung bình ở 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 hai. Nếu tỷ số này lớn hơn hai thì lấy giá trị nhỏ làm kết quả;

3) Mật độ vi sinh trên một đơn vị kiểm tra được biểu thị bằng một 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 quy định hiện hành

6.3.5 Xác định độ ẩm: tiến hành theo TCVN 5815-1994

6.4 Báo cáo kết quả kiểm tra

Trong 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 ý lựa 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 hợp chất photpho khó tan được bao gói bằng các chất liệu không độc hại tới vi sinh vật, người, động, thực vật và môi trường sinh thái : đảm bảo thời hạn bảo hành của phân trước các điều kiện bất lợi từ bên ngoài.

7.2 Trên mỗi bao gói sản phẩm phân bón vi sinh vật phân giải hợp chất photpho khó tan phải có nhãn ghi 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 chất dinh dưỡng và độ ẩm;
- công dụng;
- ngày sản xuất và thời hạn 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 quy 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 kiểm tra vi sinh vật phân giải các hợp chất photpho vô cơ khó tan

Glucoza	10,0 g
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5,0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5 g
KCl	0,2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g
MnSO_4	vết
FeSO_4	vết
Nấm men	0,5 g
Thạch	20,0 g
Nước cất	1000 ml
pH	6,8 - 7,0

A 2 Môi trường kiểm tra vi sinh vật phân giải các hợp chất photpho hữu cơ khó tan

Glucoza	10,0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5 g
KCl	0,2 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g
MnSO_4	vết
FeSO_4	vết
Nấm men	0,5 g
Lexitin	5,0 g
Thạch	20,0 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	6,8 – 7,0