

# TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

## TCVN 6166 : 2002

### PHÂN BÓN VI SINH VẬT CỐ ĐỊNH NITƠ

#### *Microbial nitrogen fixing fertilizer*

#### Lời nói đầu

TCVN 6166 : 2002 thay thế cho TCVN 6166 : 1996.

TCVN 6166 : 2002 do Tiểu ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC134/SC3 Phân bón vi sinh vật biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ ban hành.

Tiêu chuẩn này được chuyển đổi năm 2008 từ Tiêu chuẩn Việt Nam cùng số hiệu thành Tiêu chuẩn Quốc gia theo quy định tại khoản 1 Điều 69 của Luật Tiêu chuẩn và Quy chuẩn kỹ thuật và điểm a khoản 1 Điều 6 Nghị định số 127/2007/NĐ-CP ngày 1/8/2007 của Chính phủ quy định chi tiết thi hành một số điều của Luật Tiêu chuẩn và Quy chuẩn kỹ thuật.

### PHÂN BÓN VI SINH VẬT CỐ ĐỊNH NITƠ

#### *Microbial nitrogen fixing fertilizer*

#### 1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này áp dụng cho các loại phân bón chứa vi sinh vật sống, có khả năng cố định nitơ hiệu quả hay kỵ khí.

#### 2. Thuật ngữ, định nghĩa

**2.1. Phân bón vi sinh vật cố định nitơ** (Microbial nitrogen fixing fertilizer) (tên thường gọi: phân vi sinh vật cố định đạm, phân đạm vi sinh) là sản phẩm chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật (tự do, hội sinh, cộng sinh, kỵ khí hoặc hiếu khí) sống đã được tuyển chọn với mật độ đạt tiêu chuẩn hiện hành, có khả năng cố định nitơ cung cấp các hợp chất chứa nitơ cho đất và cây trồng; tạo điều kiện nâng cao năng suất cây trồng và/hoặc chất lượng nông sản, tăng độ màu mỡ của đất, đồng thời không gây ảnh hưởng xấu đến người, động vật, thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.

**2.2. Vi sinh vật tuyển chọn** (selected micro-organisms): là các vi sinh vật cố định nitơ (tự do, hội sinh, cộng sinh, kỵ khí hoặc hiếu khí), đã được nghiên cứu, đánh giá hoạt tính sinh học; an toàn và có hiệu quả đối với đất, cây trồng; dùng để sản xuất phân bón vi sinh vật cố định nitơ.

**2.3. Vi sinh vật tạp** (contaminated micro-organisms): là vi sinh vật có trong phân bón vi sinh vật cố định nitơ nhưng không thuộc loại vi sinh vật đã được tuyển chọn.

#### 3. Yêu cầu chung

Phân bón vi sinh vật cố định nitơ phải có hiệu quả tốt đối với đất và cây trồng, đồng thời phải đảm bảo an toàn đối với người, động vật và môi trường.

#### 4. Yêu cầu kỹ thuật

Mật độ vi sinh vật sống đảm bảo theo bảng 1.

**Bảng 1 - Mật độ vi sinh vật trong phân bón vi sinh vật cố định nitơ**

Đơn vị tính bằng CFU\*/gam hay mililit mẫu hoặc tế bào/gam hay mililit mẫu

Tên chỉ tiêu	Chất mang thanh trùng	Chất mang không thanh trùng	Dạng lỏng
1. Vi sinh vật tuyển chọn, không nhỏ hơn	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^8$
2. Vi sinh vật tạp, không lớn hơn	$1,0 \times 10^5$	-	$1,0 \times 10^5$

\*CFU (colony forming unit): đơn vị hình thành khuẩn lạc.

#### 5. Lấy mẫu

##### 5.1. Yêu cầu chung

- 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 đào tạo và có kinh nghiệm trong việc lấy mẫu;

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

- Không được bổ sung thêm bất cứ một tác nhân bảo quản, diệt khuẩn hoặc diệt nấm nào vào mẫu kiểm tra;
- Mẫu phải được lấy từ các đơn vị bao gói nguyên;
- Phải tiến hành lấy mẫu ở những nơi không có hơi nước nóng, hóa chất độc hại, ánh nắng gay gắt hoặc bụi và mẫu được đưa ngay vào các dụng cụ chứa;
- Các dụng cụ lấy mẫu và chứa mẫu phải sạch và vô trùng.

## 5.2. Chuẩn bị dụng cụ lấy mẫu và chứa mẫu

- Dụng cụ lấy mẫu phải là loại được làm từ thép không gỉ hoặc bằng thủy tinh;
- Các dụng cụ lấy và chứa mẫu phải sạch và được tiệt trùng bằng cách sấy trong tủ sấy ở nhiệt độ từ 170°C đến 180°C trong thời gian không ít hơn 1 giờ hoặc trong nồi hấp áp lực 1 atm (nhiệt độ 121°C) trong thời gian không ít hơn 15 phút và được bảo quản trong các điều kiện thích hợp; đảm bảo vô trùng.

## 5.3. Số lượng mẫu

- Mẫu được lấy theo lô hàng bao gồm các đơn vị bao gói sản phẩm phân hữu cơ vi sinh vật được sản xuất cùng một đợt với cùng một nguồn nguyên liệu;
- Số lượng đơn vị bao gói cần lấy để kiểm tra đối với mỗi lô hàng được quy định trong bảng 2;

**Bảng 2 - Số lượng đơn vị bao gói cần lấy để kiểm tra**

<b>Độ lớn của lô hàng (đơn vị bao gói)</b>	<b>Số lượng mẫu (đơn vị bao gói)</b>
Đến 100	7
Từ 101 đến 1000	11
Từ 1001 đến 10000	15
Lớn hơn 10000	19

- Các đơn vị bao gói phải được lấy theo phương pháp ngẫu nhiên; độc lập với dự kiến của người lấy dù sản phẩm chứa trong đó là tốt hay xấu;
- Các mẫu ban đầu (200 gam) phải được lấy từ các đơn vị bao gói có khối lượng lớn hơn 1 kg hoặc thể tích lớn hơn 1 lít đã được chọn một cách ngẫu nhiên trong lô. Mỗi mẫu ban đầu phải được lấy từ 5 vị trí khác nhau và phân bố đều sao cho đại diện cho toàn đơn vị bao gói. Nếu khối lượng đơn vị bao gói nhỏ hơn 1 kg hoặc 1 lít, mẫu ban đầu được lấy là đơn vị bao gói nguyên;
- Gộp tất cả các mẫu ban đầu trong đơn vị bao gói để thu được mẫu chung, sau đó gộp tất cả các mẫu chung đó để thu được mẫu chung của lô hàng;
- Tiến hành trộn và rút gọn theo phương pháp chia tư để có mẫu trung bình thí nghiệm với khối lượng đáp ứng yêu cầu thí nghiệm. 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.

Phần để lưu được bảo quản trong điều kiện quy định mà mỗi loại sản phẩm yêu cầu để dùng khi cần phân tích trọng tài. Trên mỗi phần phải có nhãn ghi rõ:

- tên mẫu và đối tượng cây trồng được sử dụng;
- tên cơ sở sản xuất, tên khoa học của các loài vi sinh vật sử dụng;
- thời gian sản xuất;
- thời gian và địa điểm lấy mẫu;
- tên người lấy mẫu và cơ quan lấy mẫu.

## 6. Phương pháp thử

6.1. Hiệu quả của phân bón vi sinh vật cố định nitơ đối với đất, cây trồng được xác định theo quy định về khảo nghiệm phân bón của cơ quan có thẩm quyền.

6.2. Xác định mật độ vi sinh vật được tuyển chọn.

### 6.2.1. Nguyên tắc

- Dựa trên phương pháp nuôi cấy trên môi trường thạch đĩa;
- Tính số lượng vi sinh vật trên mililit hoặc trên gam mẫu từ số khuẩn lạc phát triển trong các đĩa được chọn (xem 6.2.4.1.c).

### 6.2.2. Thiết bị, dụng cụ:

- các thiết bị, dụng cụ thông thường trong phòng thí nghiệm vi sinh vật;

- dụng cụ nuôi cấy kỵ khí: tùy thuộc vào từng phương pháp cụ thể;
- + loại bỏ oxy bằng phương pháp vật lý: tủ nuôi kỵ khí hoặc bình hút ẩm có vòi hút chân không;
- + loại bỏ oxy bằng phương pháp hóa học: bình nuôi kỵ khí Gas Pak hay dung dịch xanh metylen - NaOH - glucoza.

### 6.2.3. Chuẩn bị thử

#### a) Chuẩn bị dụng cụ

Các dụng cụ lấy mẫu và dụng cụ dùng để xác định vi sinh vật phải tiệt trùng bằng một trong các phương pháp dưới đây:

- trong tủ sấy ở nhiệt độ 170°C - 180°C, không ít hơn 1 giờ;
- trong nồi hấp áp lực 1 atm (121°C), không ít hơn 15 phút.

#### b) Chuẩn bị môi trường

- Môi trường dùng để kiểm tra phân vi sinh vật cố định nitơ 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 hóa chất trong thành phần đã cho. Sau đó phân phối vào các dụng cụ thủy tinh đã chuẩn bị trước rồi tiệt trùng ở những điều kiện phù hợp. Để nguội môi trường đến 45°C ÷ 50°C rồi phân phối vào các đĩa Petri vô trùng. Thao tác này được thực hiện trong điều kiện vô trùng. Kiểm tra độ sạch của môi trường sau 2 ngày ở nhiệt độ từ 28°C đến 30°C chỉ sử dụng các đĩa Petri chứa các môi trường nuôi cấy vi sinh vật không phát hiện thấy tạp nhiễm;

- Đối với môi trường trồng cây chỉ thị, cũng làm như trên nhưng đổ môi trường vào các ống nghiệm 18 mm x 180 mm (khoảng 1/3 ống). Làm nút bông và khử trùng như trên, sau đó lấy ra và đặt nghiêng ống thạch với góc 45°.

Chú thích - Đối với phân vi sinh vật cố định nitơ chứa các vi sinh vật dưới dạng tiềm sinh trước khi kiểm tra cần phải hoạt hóa theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

#### c) Dịch pha loãng

- Dung dịch pha loãng là nước muối sinh lý (NaCl 0,85%), không chứa các hợp chất nitơ, sau khi khử trùng có độ pH là 7,0;

- Phân phối dịch pha loãng vào các ống nghiệm, bình tam giác có dung tích thích hợp với một lượng sao cho sau khi khử trùng, mỗi ống nghiệm chứa 9 ml, mỗi bình tam giác chứa 90 ml. Làm nút bông và khử trùng ở 1 atm (121°C) không ít hơn 15 phút;

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 trước khi sử dụng.

### 6.2.4. Cách tiến hành

#### 6.2.4.1. Mật độ vi sinh vật cố định nitơ tự do và hội sinh hiếu khí

##### a) Pha loãng mẫu

- Đối với mẫu dạng lỏng: dùng pipet vô trùng lấy ra 10 ml mẫu đưa vào 90 ml dịch pha loãng đã chuẩn bị sẵn (xem 6.2.3.c), tránh chạm pipet vào dịch pha loãng. Trộn kỹ bằng thiết bị trộn cơ học trong 5 phút - 10 phút sao cho vi sinh vật trong dung dịch phân bố đồng đều. Dung dịch tạo ra được gọi là dung dịch huyền phù ban đầu (a);

- Đối với mẫu dạng đặc: Cân 10 g mẫu (có thể được nghiền nhỏ trước) chính xác đến 0,01 g và cho vào bình chứa 90 ml dịch pha loãng đã chuẩn bị sẵn (xem 6.2.3.c). Trộn kỹ bằng thiết bị trộn cơ học từ 5 phút đến 10 phút sao cho vi sinh vật trong dung dịch phân bố đồng đều. Để cho các phần tử nặng lắng xuống trong thời gian không quá 15 phút, gạn được dung dịch huyền phù ban đầu (b);

- Dùng một pipet vô trùng lấy 1 ml dịch huyền phù ban đầu (a hoặc b) cho vào ống nghiệm chứa 9 ml dịch pha loãng đã chuẩn bị sẵn (xem 6.2.3.c), tránh chạm pipet vào dịch pha loãng. Trộn kỹ bằng cách dùng 1 pipet vô trùng khác hút lên xuống 10 lần hay bằng thiết bị trộn cơ học từ 5 giây đến 10 giây (nhịp quay của thiết bị này được chọn sao cho mẫu trộn như cuộn xoáy dâng lên cách mép ống chứa từ 2 cm đến 3 cm) để có dịch pha loãng mẫu có nồng độ pha loãng là  $10^{-2}$ . Quá trình này được lặp lại liên tục để có dịch mẫu có nồng độ pha loãng theo qui định sau:

+ Đối với phân bón vi sinh vật cố định nitơ trên nền chất mang thanh trùng hoặc phân bón vi sinh vật cố định nitơ dạng lỏng, sử dụng nồng độ pha loãng  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ;

+ Đối với phân bón vi sinh vật cố định nitơ trên nền chất mang không thanh trùng, sử dụng nồng độ pha loãng  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ .

##### b) Cấy mẫu

- Dùng pipet vô trùng riêng cho từng độ pha loãng, lấy ra lượng mẫu là 1ml từ các dịch mẫu có các nồng độ pha loãng ở trên, cấy vào 1 đĩa Petri chứa môi trường đã chuẩn bị sẵn (xem 6.2.3.b). Mỗi độ pha loãng được cấy vào ít nhất 2 đĩa Petri;

- Dùng que gạt vô trùng gạt đều dịch mẫu trên bề mặt thạch (không để dịch mẫu dính vào thành đĩa Petri), đợi bề mặt thạch khô, úp ngược đĩa Petri, nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ và thời gian tùy thuộc yêu cầu của từng loại vi sinh vật.

#### c) Tính kết quả

- Vi sinh vật cố định nitơ được tính là số khuẩn lạc có tính đặc trưng mọc trên đĩa Petri chứa môi trường nuôi cấy đã chọn.

- Vi sinh vật tạp là tất cả các khuẩn lạc không có tính đặc trưng mọc trên đĩa Petri chứa môi trường nuôi cấy đã chọn.

- Mật độ vi sinh vật trong một đơn vị kiểm tra được tính bằng gam hay mililit, theo công thức:

$$N = \frac{\sum C}{d(n_1 + 0,1n_2)}$$

Trong đó:

N là số vi sinh vật trong một đơn vị kiểm tra (được tính bằng CFU trên gam hay mililit);

$\sum C$  là tổng số khuẩn lạc đếm được trên tất cả các đĩa Petri được giữ lại;

$n_1$  là số đĩa được giữ lại ở độ pha loãng thứ nhất;

$n_2$  là số đĩa được giữ lại ở độ pha loãng thứ hai;

d là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất.

Chú thích:

1) Giữ lại các đĩa có chứa không quá 300 khuẩn lạc ở hai độ pha loãng kế tiếp nhau và điều cần thiết là một trong các đĩa này có chứa ít nhất 15 khuẩn lạc;

2) Làm tròn kết quả đến hai chữ số có nghĩa;

3) Biểu thị mật độ vi sinh vật trên một đơn vị kiểm tra bằng cách lấy một trong các giá trị từ 1,00 đến 9,99 nhân với  $10^x$ , trong đó x là số mũ của 10.

#### 6.2.4.2. Mật độ vi sinh vật cố định nitơ cộng sinh cây họ đậu

- Đối với tất cả vi sinh vật cố định nitơ sống cộng sinh có thể dùng phương pháp cấy pha loãng trên môi trường YMA. Phương pháp được tiến hành như phần 6.2.4.1;

- Đối với phân bón vi sinh vật cố định nitơ dùng cho cây đậu đen, đậu xanh, lạc và đậu tương có thể dùng phương pháp nhiễm lên cây chỉ thị tương ứng hoặc hạt Sirato (*Macroptilum atropurpureum*) cho cây đậu xanh, đậu đen, lạc và hạt đậu tương dại (*Glycine ussuriensis*) dùng cho cây đậu tương.

a) Pha loãng mẫu (xem 6.2.4.1.a).

b) Nhiễm dịch

- Hạt chỉ thị được ngâm trong  $H_2SO_4$  đặc trong 4 phút sau đó rửa sạch nhanh bằng nước cất 4 lần - 5 lần. Hạt cây chỉ thị khác được thanh trùng 3 phút - 4 phút trong dung dịch  $HgCl_2$  1/1000 hay rượu etylic 90% trong 2 phút và rửa sạch bằng nước cất vô trùng nhiều lần. Ngâm hạt trong nước cất vô trùng cho đến khi hạt nảy mầm (khoảng 24 giờ ÷ 36 giờ) rồi đặt vào ống chứa môi trường trồng cây chỉ thị đã được chuẩn bị sẵn (xem 6.2.3.b).

- Rót 1 ml dịch kiểm tra có độ pha loãng  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ , vào mỗi ống thạch. Mỗi độ pha loãng làm 3 ống. Đậy kín nút bông và đặt vào phòng sinh trưởng có nhiệt độ 28°C. Sau 10 ngày ÷ 15 ngày, kiểm tra sự hình thành nốt sần và xác định mật độ tế bào có trong mẫu bằng cách kiểm tra như bảng 3.

**Bảng 3 - Xác định mật độ vi khuẩn nốt sần bằng cây chỉ thị**

Số TT	Số lượng ống có nốt sần ở các độ pha loãng				Mật độ tế bào (triệu TB/g)
	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	
1	3	3	3	3	2300,0
2	3	3	3	2	919,0
3	3	3	3	1	424,0
4	3	3	3	0	230,0
5	3	3	2	1	147,0

6	3	3	2	0	91,8
7	3	3	1	0	42,8
8	3	3	0	0	23,0
9	3	2	1	0	14,7
10	3	2	0	0	9,2
11	3	1	0	0	4,2
12	3	0	0	0	2,3
13	2	1	0	0	1,5
14	2	0	0	0	0,9
15	1	0	0	0	0,4

#### 6.2.4.3. Mật độ vi sinh vật cố định nitơ kỵ khí

Các bước tiến hành như ở 6.2.4.1, nhưng nuôi cấy trong điều kiện kỵ khí.

Các phương pháp tạo điều kiện kỵ khí:

- Loại bỏ oxy bằng phương pháp vật lý: Đặt các đĩa vào tủ nuôi kỵ khí hoặc bình hút ẩm có vòi hút chân không, hàn kín bằng vazơlin, không khí trong bình được hút ra và thay bằng hỗn hợp khí CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>. Để loại bỏ oxy một cách triệt để, trước đó nên đặt vào trong bình các cốc đựng chất hấp thụ oxy như dithionit, clorua đồng, iot v.v... Có thể làm giảm tác dụng của oxy bằng cách thêm vào môi trường dinh dưỡng các chất khử oxy như axit thioglycolic (0,3 ml/l) và cystein (0,75 g/l).

- Loại bỏ oxy trong không khí bằng phương pháp hóa học theo 2 cách:

+ Đặt các đĩa vào bình nuôi kỵ khí Gas Pak.

+ Sử dụng dung dịch xanh metylen - NaOH - glucoza: 6 ml NaOH 10 N pha trong 100 ml nước cất; 3,0 ml xanh metylen 5% pha trong 100 ml nước cất; 6 g glucoza trong 100 ml nước cất có bổ sung một lượng nhỏ thymol kết tinh. Trộn ba dung dịch trên với một lượng bằng nhau. Cho vào ống nghiệm và đun cách thủy đến mất màu. Đặt ống chỉ thị này vào thiết bị nuôi cấy, ngay lập tức tạo ra tình trạng yếm khí trong thiết bị. Nếu thiết bị được khử oxy hoàn toàn thì màu xanh của dung dịch chỉ thị sẽ không tái hiện nữa. Nếu thiết bị không được loại bỏ oxy một cách hoàn toàn thì màu xanh xuất hiện trở lại.

- Nuôi cấy trong môi trường làm ngập kép: Dịch pha loãng mẫu hoặc dịch đã làm giàu tế bào được trộn với thạch dinh dưỡng vô khuẩn trước khi đông (nguội đến 45°C - 50°C) và đổ vào đĩa Petri. Sau khi thạch đông đổ thêm một lớp thạch - nước vô trùng (nguội đến 45°C - 50°C). Ủ các đĩa thạch ở nhiệt độ thích hợp.

### 6.3. Báo cáo kết quả

Trong báo cáo kết quả phải mô tả lại tình trạng mẫu trước khi kiểm tra (tất cả các chi tiết cần và đủ để xác định mẫu), phương pháp kiểm tra và kết quả đạt được. Báo cáo cũng phải nêu tất cả các điều kiện thao tác không qui 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. Bao gói, ghi nhãn, bảo quản, vận chuyển

### 7.1. Bao gói, ghi nhãn

Phân bón vi sinh vật cố định nitơ phải được bao gói bằng các chất liệu không gây độc hại tới vi sinh vật, người, động vật, thực vật và môi trường sinh thái; đồng thời đảm bảo chất lượng của phân bón trước các ảnh hưởng bất lợi bên ngoài. Nhãn hiệu trên bao bì phân bón vi sinh vật cố định nitơ phải có đầy đủ các thông tin đảm bảo các nội dung sau, đồng thời theo qui định pháp lý hiện hành về ghi nhãn hàng hóa:

- tên sản phẩm;
- tên khoa học và mật độ của các loài vi sinh vật sử dụng;
- tên cơ sở sản xuất;
- thành phần chất dinh dưỡng;
- công dụng;
- hướng dẫn sử dụng;
- ngày sản xuất và thời hạn sử dụng;
- qui cách bảo quản và vận chuyển;

- khối lượng tịnh;

## 7.2. Bảo quản

7.2.1. Phân bón vi sinh vật cố định nitơ phải được bảo quản ở nơi khô, sạch, râm, mát, tránh ánh nắng trực tiếp từ mặt trời.

7.2.2. Thời hạn sử dụng của phân bón vi sinh vật cố định nitơ không ít hơn 6 tháng kể từ ngày sản xuất.

## 7.3. Vận chuyển

Phân bón vi sinh vật cố định nitơ phải được chuyên chở bằng các phương tiện phù hợp để đảm bảo chất lượng của phân bón trước các ảnh hưởng bất lợi bên ngoài.

## Phụ lục A

(qui định)

### Môi trường kiểm tra vi sinh vật cố định nitơ

#### A.1. Môi trường kiểm tra vi sinh vật cố định nitơ sống tự do

##### A.1.1. Môi trường cho *Azotobacter*

Manitol	20,0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2g
NaCl	0,2g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1g
CaCO <sub>3</sub>	5,0g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
Thạch bột	15,0g

pH: 6,8 - 7,0

##### A.1.2. Môi trường cho *Arthrobacter*

Sacaroza	5,0g
Glucoza	5,0g
Nước chiết đậu*	1000 ml
Thạch bột	15,0g

pH: 6,8 - 7,0

\* Nước chiết đậu: Cho 50 g đậu trắng vào 200 ml nước cất, đun sôi 15 phút, lọc nước trong, bổ sung nước cất cho đủ 1000 ml.

##### A.1.3. Môi trường cho *Enterobacter*

K <sub>2</sub> PHO <sub>4</sub>	0,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2g
NaCl	0,1g
Glucoza	10,0g
Cao nấm men	0,5g
CaCO <sub>3</sub>	0,5g
Dung dịch công gô đơ 1%	2,5 ml
Nước cất vừa đủ	1000 ml
Thạch bột	15,0g

pH: 6,8 - 7,0

##### A.1.4. Môi trường cho *Klebsiella*

Sacaroza	20,0g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,4g

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,4g
Dung dịch vi lượng*	1 ml
Nước cất vừa đủ	1000 ml
Thạch bột	15,0g

pH: 6,8 - 7,0

\*Dung dịch vi lượng:

MgSO <sub>4</sub> :	3,6%
Na <sub>2</sub> EDTA:	3,0%
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O:	2,6%
MnSO <sub>4</sub> :	0,3%
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O:	7,6%

## **A.2. Môi trường kiểm tra vi sinh vật cố định nitơ sống hội sinh (cho Azospirillum)**

Axit malic	5,0 g
KOH	4,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,01 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 g
NaCl	0,02 g
CaCl <sub>2</sub>	0,01 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,002 g
Dung dịch Bromotymol xanh (5% pha trong cồn)	2,0 ml
Hoặc dung dịch công gô đỏ 1%	2,5 ml
Nước cất vừa đủ	1000 ml
Thạch bột	15,0 g

pH: 6,8 - 7,0

## **A.3. Môi trường kiểm tra vi sinh vật cố định nitơ sống cộng sinh (cho Bradyrhizobium, Rhizobium)**

A.3.1. K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol	10,0 g
Cao nấm men	0,5 g
CaCO <sub>3</sub>	0,5 g
Dung dịch công gô đỏ 1%	2,5 ml
Nước cất vừa đủ	1000 ml
Thạch bột	15,0 g

pH: 6,8 - 7,0

### **A.3.2. Môi trường cho trồng cây chỉ thị**

CaHPO <sub>4</sub>	1,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,2 g
FeCl <sub>3</sub>	0,1 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml

Thạch bột	8,0 g
Dung dịch vi lượng*	1,0 ml

pH: 6,5 - 7,0

\* Dung dịch vi lượng:

Bo: 0,05 %	Mn: 0,05%
Zn: 0,05%	Mo: 0,05%
Cu: 0,05%	

#### **A.4. Môi trường kiểm tra vi sinh vật cố định nitơ kị khí (cho Clostridium)**

##### **A.4.1. Môi trường nước chiết gan**

Nước chiết gan*	1000 ml
Pepton	10,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g

pH: 8,0

\* Nước chiết gan: Cân 500 g gan, cắt nhỏ, cho vào 500 ml nước cất ngâm qua đêm trong tủ lạnh, bỏ váng mỡ. Khử trùng ở 121°C trong 10 phút, lọc trong, bổ sung đủ 1000 ml.

##### **A.4.2. Môi trường Vinogradski**

Glucose	20,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
NaCl	vết
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	vết
MnSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	vết
CaCO <sub>3</sub>	40,0g
axit ascorbic	1,0 g
dịch tự phân nấm men	1,0 ml
E.D.T.A. (Trilon B)	1,0 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
Thạch bột	15,0 g

##### **A.4.3. Môi trường khoai tây - glucose**

Nước chiết khoai tây*	1000 ml
Glucose	20,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
Axit ascorbic	1,0 g
Dịch tự phân nấm men	1,0 ml
CaCO <sub>3</sub>	3,0 g
Thạch bột	15,0 g

\* Nước chiết khoai tây: Cân 200 g khoai tây, gọt vỏ, cắt nhỏ, cho vào 500 ml nước cất, đun sôi trong 15 phút, lọc trong, bổ sung đủ 1000 ml.