

TCVN

TIÊU CHUẨN VIỆT NAM

TCVN 7185 : 2002

PHÂN HỮU CƠ VI SINH VẬT

Microbial organic fertilizer

HÀ NỘI - 2002

Phân hữu cơ vi sinh vật

Microbial organic fertilizer

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn áp dụng cho các loại phân hữu cơ bón vào đất, có chứa vi sinh vật sống đã được tuyển chọn.

2 Tiêu chuẩn viện dẫn

TCVN 4050 - 85 Đất trồng trọt – Xác định hàm lượng chất hữu cơ tổng số.

TCVN 4829 : 2001 Vi sinh vật học – Hướng dẫn chung về các phương pháp phát hiện *Salmonella*.

TCVN 5815 : 2001 Phân hỗn hợp NPK – Phương pháp thử.

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

TCVN 5989 : 1995 (ISO 5666/1 : 1983) Chất lượng nước – Xác định thủy ngân tổng số bằng quang phổ hấp thụ nguyên tử không ngọn lửa – Phương pháp sau khi vô cơ hoá với pemanganat-pesunfat.

TCVN 6166 : 2002 Phân bón vi sinh vật cố định nitơ.

TCVN 6167 : 1999 Phân bón vi sinh vật phân giải hợp chất phospho.

TCVN 6496 : 1999 (ISO 11047 : 1995) Chất lượng đất – Xác định cadimi, crom, coban, đồng, chì, mangan, niken và kẽm trong dịch chiết đất bằng cường độ quang phổ hấp thụ nguyên tử ngọn lửa và không ngọn lửa.

3 Thuật ngữ, định nghĩa

3.1 **Phân hữu cơ vi sinh vật** (Microbial organic fertilizer) (gọi tắt là phân hữu cơ vi sinh) là sản phẩm được sản xuất từ các nguồn nguyên liệu hữu cơ khác nhau, chứa một hoặc nhiều chủng vi sinh vật sống đã được tuyển chọn (vi sinh vật tuyển chọn) đạt tiêu chuẩn hiện hành; nhằm cung cấp chất hữu cơ và dinh dưỡng cho cây trồng, cải tạo đất, góp phần nâng cao năng suất cây trồng

và/hoặc chất lượng nông sản, đồng thời không gây ảnh hưởng xấu đến người, động vật, thực vật, môi trường sống và chất lượng nông sản.

3.2 **Vi sinh vật tuyển chọn** (selected micro-organisms): là vi sinh vật đã được nghiên cứu, đánh giá hoạt tính sinh học; an toàn, có hiệu quả đối với đất và cây trồng; dùng để sản xuất phân hữu cơ vi sinh vật.

4 Yêu cầu chung

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

5 Yêu cầu kỹ thuật

Các chỉ tiêu kỹ thuật đối với phân hữu cơ vi sinh vật được quy định trong bảng 1.

Bảng 1 - Chỉ tiêu kỹ thuật

Tên chỉ tiêu	Mức	Phương pháp thử / điều
1. Độ chín (hoai) cần thiết	Tốt	7.2
2. Kích thước hạt	Đồng đều	7.3
3. Độ ẩm, %, không lớn hơn	35	TCVN 5815 : 2000
4. pH	6,0 - 8,0	TCVN 5979:1995
5. Mật độ vi sinh vật tuyển chọn, CFU/gam mẫu, không nhỏ hơn	10 ⁶	7.6
6. Hàm lượng chất hữu cơ tổng số, %, không nhỏ hơn	22	TCVN 4050 : 85
7. Hàm lượng nitơ tổng số, %, không nhỏ hơn	2,5	TCVN 5815 : 2001
8. Hàm lượng lân hữu hiệu, %, không nhỏ hơn	2,5	TCVN 5815 : 2001
9. Hàm lượng kali hữu hiệu, %, không nhỏ hơn	1,5	TCVN 5815 : 2001
10. Mật độ <i>Salmonella</i> trong 25 gam mẫu, CFU	0	TCVN 4829 : 2001
11. Hàm lượng chì, mg/kg khối lượng khô, không lớn hơn	200	TCVN 6496 : 1999
12. Hàm lượng cadimi, mg/kg khối lượng khô, không lớn hơn	2,5	TCVN 6496 : 1999
13. Hàm lượng crom, mg/kg khối lượng khô, không lớn hơn	200	TCVN 6496 : 1999
14. Hàm lượng niken, mg/kg khối lượng khô, không lớn hơn	100	TCVN 6496 : 1999
15. Hàm lượng thủy ngân, mg/kg khối lượng khô, không lớn hơn	2	TCVN 5989 : 1995

Chú thích - CFU (colony forming unit): đơn vị hình thành khuẩn lạc.

6 Lấy mẫu

6.1 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, hoá chất độc hại, ánh nắng gay gắt hoặc bụi và sau đó mẫu được đưa ngay vào các dụng cụ chứa;
- Các dụng cụ lấy mẫu và chứa mẫu phải sạch và vô trùng.

6.2 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 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.

6.3 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

Độ lớn của lô hàng (đơn vị bao gói)	Số lượng mẫu (đơn vị bao gói)
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 mẫu dù sản phẩm chứa trong đó là tốt hay xấu;
- Các mẫu ban đầu (500 gam) phải được lấy từ các đơn vị bao gói 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.
- 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 qui 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.

7 Phương pháp thử

7.1 Hiệu quả của phân hữu cơ vi sinh vật đối với đất, cây trồng được xác định theo đúng qui định hiện hành về khảo nghiệm phân bón của cơ quan có thẩm quyền.

7.2 Độ chín (hoai) của phân hữu cơ vi sinh vật được xác định bằng phương pháp đo nhiệt độ của đơn vị bao gói phân hữu cơ vi sinh vật. Cách tiến hành như sau: Sử dụng nhiệt kế có mức đo nhiệt độ từ 0 °C đến 100 °C, cắm sâu 50 cm đến 60 cm vào trong đơn vị bao gói có khối lượng không nhỏ hơn 10 kg. Sau 15 phút, đọc nhiệt độ lần thứ nhất. Đo, ghi chép và theo dõi sự thay đổi nhiệt độ trong 3 ngày liên tiếp, mỗi ngày đo 1 lần (nên đo vào 9 giờ đến 10 giờ). Phân hữu cơ vi sinh vật bảo đảm độ chín (hoai) khi nhiệt độ của đơn vị bao gói phân bón không thay đổi trong suốt thời gian theo dõi.

7.3 Độ đồng đều của hạt phân hữu cơ vi sinh vật được xác định bằng cách rây 100,00 g phân hữu cơ vi sinh vật qua rây có đường kính lỗ rây phù hợp với độ lớn của hạt phân. Độ đồng đều của phân hữu cơ vi sinh vật được xác định khi ít nhất 95 % hạt phân bón lọt qua rây.

7.4 Độ ẩm của phân hữu cơ vi sinh vật được xác định theo TCVN 5815 : 2001.

7.5 pH của phân hữu cơ vi sinh vật được xác định theo TCVN 5979 : 1995 (ISO 10390 : 1994).

7.6 Mật độ vi sinh vật tuyển chọn

7.6.1 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 7.6.4.c)

7.6.2 Thiết bị, dụng cụ:

Các thiết bị, dụng cụ thông thường trong phòng thí nghiệm vi sinh vật.

7.6.3 Chuẩn bị thử

a) Chuẩn bị dụng cụ

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

- trong tủ sấy ở nhiệt độ $170\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 180\text{ }^{\circ}\text{C}$ không ít hơn 1 giờ;
- trong nồi hấp áp lực 1 atmophe ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$) không ít hơn 15 phút.

b) Chuẩn bị môi trường

- Môi trường dùng để kiểm tra phân hữu cơ vi sinh vật phụ thuộc vào chủng loại vi sinh vật mà nhà sản xuất sử dụng. Nếu không có yêu cầu của nhà sản xuất, thì khi kiểm tra sử dụng môi trường theo TCVN 6166 : 1996 và TCVN 6167 : 1996.
- Môi trường được pha chế theo thứ tự các hoá chất trong thành phần đã cho. Sau đó phân phối vào các dụng cụ thủy tinh đã chuẩn bị trước rồi khử trùng ở những điều kiện được xác định trong các tiêu chuẩn phương pháp thử. Để nguội môi trường đến $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Chỉ sử dụng các đĩa Petri chứa các môi trường nuôi cấy vi sinh vật mà trong đó không phát hiện thấy tạp nhiễm.

Chú thích – Đối với phân hữu cơ vi sinh vật chứa các vi sinh vật dưới dạng tiềm sinh, trước khi kiểm tra cần phải hoạt hoá theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

c) Dịch pha loãng

- Dùng 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 atmophe (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 để cho nhiệt độ của dịch pha loãng đạt đến nhiệt độ phòng thử nghiệm trước khi sử dụng.

7.6.4 Cách tiến hành

a) Pha loãng mẫu

- Cân 10 g mẫu chính xác đến 0,01 g và cho vào bình chứa 90 ml dịch pha loãng đã chuẩn bị sẵn (xem 7.6.3.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 khoảng 15 phút, gạn được dung dịch huyền phù ban đầu;
- Dùng một pipet vô trùng lấy 1 ml dịch huyền phù ban đầu cho vào ống nghiệm chứa 9 ml dịch pha loãng đã chuẩn bị sẵn (xem 7.6.3.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 xoay 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 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} .

b) Cấy mẫu

- Dùng pipet vô trùng riêng cho từng độ pha loãng, lấy ra một 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 7.6.3.b). Mỗi độ pha loãng được cấy vào ít nhất 2 đĩa Petri.
- Sử dụng que gạt vô trùng dàn 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 vào yêu cầu của từng loại vi sinh vật.

c) Tính kết quả

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

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

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.

7.7 Hàm lượng chất hữu cơ tổng số được xác định theo TCVN 4050 - 85.

7.8 Hàm lượng nitơ tổng số, hàm lượng lân hữu hiệu, hàm lượng kali hữu hiệu được xác định theo TCVN 5815 : 2001.

7.9 Mật độ Salmonella được xác định theo TCVN 4829 : 2001.

7.10 Hàm lượng chì, cadimi, crom và niken được xác định theo TCVN 6496 : 1999 (ISO 11047 : 1995).

7.11 Hàm lượng thủy ngân được xác định theo TCVN 5989 : 1995 (ISO 5666/1 : 1983).

7.12 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.

8 Bao gói, ghi nhãn, bảo quản, vận chuyển

8.1 Bao gói, ghi nhãn

Phân hữu cơ vi sinh vật 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 hữu cơ vi sinh vật trước các ảnh hưởng bất lợi bên ngoài. Nhãn hiệu trên bao bì phân bón 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 hoá:

- 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;

8.2 Bảo quản

8.2.1 Phân hữu cơ vi sinh vật phải được bảo quản ở nơi khô, sạch, râm, mát và tránh ánh nắng trực tiếp từ mặt trời.

8.2.2 Thời hạn sử dụng không ít hơn 6 tháng kể từ ngày sản xuất.

8.3 Vận chuyển

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