

## Lời nói đầu

**TCVN 8565:2010** được chuyển đổi từ 10 TCN 298-97 theo quy định tại khoản 1 Điều 69 của Luật Tiêu chuẩn và Quy chuẩn kỹ thuật và điểm a khoản 1 Điều 7 Nghị định số 127/2007/NĐ-CP ngày 1/8/2007 của Chính phủ qui định chi tiết thi hành một số điều của Luật Tiêu chuẩn và Quy chuẩn kỹ thuật.

**TCVN 8565:2010** do Viện Thổ nhưỡng Nông hóa biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn đo lường chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

# Phân bón vi sinh vật – Phương pháp Xác định hoạt tính phân giải photphat của vi sinh vật

*Biofertilizer – Determination of phosphate solubilizing activity of microorganisms*

## 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định lượng khả năng phân giải photphat của vi sinh vật trong phân bón vi sinh vật bằng phương pháp định lượng photpho hữu hiệu.

## 2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau đây là rất cần thiết cho việc áp dụng tiêu chuẩn. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 6167:1996, *Phân bón vi sinh vật phân giải hợp chất photpho khó tan*.

TCVN 8559, *Phân bón – Phương pháp xác định photpho hữu hiệu*.

## 3 Lấy mẫu

Lấy mẫu phân bón vi sinh vật theo Điều 5 TCVN 6167.

## 4 Thiết bị, dụng cụ

### 4.1 Thiết bị

4.1.1 **Tủ cấy vô trùng (Box cấy)**, vận tốc dòng khí trung bình 0,79 m/s, lưu lượng khí 1204 m<sup>3</sup>/h, màng lọc ULPA với kích thước hạt từ 0,1 µm đến 0,3 µm.

4.1.2 **Nồi hấp áp lực**, áp suất tối thiểu 101,3 kPa, nhiệt độ 121 °C.

4.1.3 **Tủ sấy**, nhiệt độ từ 40 °C đến 260 °C.

4.1.4 **Tủ ấm**, nhiệt độ từ 20 °C đến 60 °C.

4.1.5 Máy ly tâm, đạt 6000 vòng/min.

4.1.6 Máy lắc ổn nhiệt, tốc độ lắc đạt 150 vòng/min, nhiệt độ từ 20 °C đến 40 °C.

4.1.7 Cân phân tích, chính xác đến 0,1 mg.

4.1.8 Cân kỹ thuật, chính xác đến 0.01g.

## 4.2 Dụng cụ

4.2.1 Bình tam giác, dung tích 250 ml.

4.2.2 Ống đong, dung tích 100, 500 ml.

4.2.3 Cốc thủy tinh chịu nhiệt.

4.2.4 Bình định mức, dung tích 50, 100, 1000 ml.

4.2.5 Micropipet, dung tích 100, 1000 $\mu$ l.

## 5 Môi trường nuôi cấy

Môi trường Pikovskaya (xem Phụ lục A)

## 6 Các tiến hành

### 6.1 Chuẩn bị

#### 6.1.1 Dụng cụ

– Dụng cụ sử dụng trong nuôi cấy vi sinh vật phải rửa sạch, tiệt trùng bằng một trong các phương pháp dưới đây:

+ giữ ở nhiệt độ 180 °C không ít hơn 1 h trong tủ sấy (4.1.3) hoặc;

+ giữ ở nhiệt độ 121 °C không ít hơn 30 min trong nồi hấp áp lực (4.1.2).

– Dụng cụ sử dụng trong định lượng phốt pho hữu hiệu phải rửa sạch, tráng lại bằng nước cất.

#### 6.1.2 Môi trường nuôi cấy

Môi trường nuôi cấy là môi trường Pikovskaya (phụ lục A), phân phối môi trường vào bình tam giác (4.2.1) với một lượng thích hợp, sao cho sau khi khử trùng, mỗi bình tam giác chứa 90 ml. Làm nút bông và khử trùng ở 121 °C không ít hơn 20 min trong nồi hấp áp lực (4.1.2).

#### 6.1.3 Chuẩn bị thuốc thử

Chuẩn bị thuốc thử theo TCVN 8559.

### 6.2 Xử lý mẫu

### 6.2.1 Mẫu thử

- Cân 10 g mẫu chính xác đến 0,01g, cho vào bình tam giác chứa 90 ml môi trường Pikovskaya đã chuẩn bị sẵn (6.1.2). Mỗi mẫu được lặp lại từ 3 đến 5 lần. Tiến hành cân mẫu trong tủ cấy vô trùng (4.1.1).
- Nuôi cấy trong điều kiện lắc, ở nhiệt độ phù hợp với chủng vi sinh vật, thời gian từ 7 ngày đến 10 ngày;
- Ly tâm dịch nuôi cấy bằng máy ly tâm (4.1.5) với tốc độ 6000 vòng/min trong thời gian 20 min, gạn lấy phần nước trong;
- Xác định lượng phốt pho hữu hiệu trong dung dịch theo TCVN 8559.

### 6.2.2 Mẫu đối chứng (mẫu phân bón không chứa vi sinh vật sống)

- Cân khoảng 10 g mẫu chính xác đến 0,01g, cho vào bình tam giác chứa 90ml môi trường Pikovskaya đã chuẩn bị sẵn (6.1.2). Mỗi mẫu được lặp lại từ 3 đến 5 lần. Tiến hành cân mẫu trong tủ cấy vô trùng (4.1.1).
- Diệt vi sinh vật trong mẫu bằng cách đun cách thủy ở 100 °C ngay sau khi cho mẫu vào.
- Nuôi cấy trong điều kiện lắc, ở nhiệt độ phù hợp với chủng vi sinh vật, thời gian từ 7 ngày đến 10 ngày;
- Ly tâm dịch nuôi cấy bằng máy ly tâm (4.1.5) với tốc độ 6000 vòng/min trong thời gian 20 min, gạn lấy phần nước trong;
- Xác định lượng phốt pho hữu hiệu trong dung dịch theo TCVN 8559.

## 7 Tính toán kết quả

Hiệu số giữa lượng phốt pho hữu hiệu trong mẫu thử nghiệm và mẫu đối chứng là lượng phốt pho hữu hiệu mà vi sinh vật đã phân giải được. Số lượng này có thể biểu thị bằng tỷ lệ phần trăm hoặc bằng mg  $P_2O_5$  hữu hiệu.

## 8 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin sau:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- tất cả các thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;

- các kết quả thử nghiệm thu được;

- nếu độ lặp lại được kiểm tra, thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

## Phụ lục A

(Quy định)

### Môi trường Pikovskaya

|   |             |
|---|-------------|
| Glucose                                   | 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       |
| $\text{MnSO}_4$                           | vết         |
| $\text{FeSO}_4$                           | vết         |
| Cao nấm men                               | 0,5 g       |
| Thạch                                     | 20,0 g      |
| Nước cất vừa đủ                           | 1000 ml     |
| pH  | 6,8 đến 7,0 |

Để đánh giá hoạt tính phân giải photphat của phân bón vi sinh vật chứa chủng vi sinh vật phân giải hợp chất photphat hữu cơ khó tan, trong thành phần môi trường nuôi cấy cần thay thế 5 g  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  bằng 2 g lexitin.