

Lời nói đầu

TCVN 8564:2010 được chuyển đổi từ 10 TCN 299-97 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 8564:2010 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 cố định nitơ của vi khuẩn nốt sần cây họ đậu

Biofertilizer – Determination of nitrogen fixing activity of nodule bacteria on legume crop

1 Phạm vi áp dụng

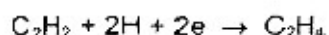
Tiêu chuẩn này quy định phương pháp định lượng khả năng cố định nitơ của vi khuẩn nốt sần cây họ đậu trong phân bón bằng phương pháp định lượng khí etylen.

2 Tài liệu viện dẫn

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

3 Nguyên tắc

Enzym nitrogenaza xúc tác cho quá trình khử nitơ thành amoniac hay còn gọi là quá trình cố định nitơ. Enzym này cũng xúc tác cho quá trình khử axetylen thành etylen. Etylen được tạo thành theo phản ứng:



Hoạt tính cố định nitơ được xác định bằng cách đo lượng etylen tạo thành. Khi etylen được định lượng bằng sắc ký khí với detector ion hóa ngọn lửa (FID – flame ionization detector).

4 Lấy mẫu

Lấy mẫu theo Điều 5 TCVN 6166.

5 Thiết bị, dụng cụ

5.1 Thiết bị

5.1.1 Nồi hấp áp lực, áp suất tối thiểu 101,3 kPa, nhiệt độ 121 °C;

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

5.1.3 Tủ ẩm, nhiệt độ từ 20 °C đến 60 °C.

5.1.4 Máy sắc ký khí, detector ion hóa ngọn lửa (FID).

5.1.5 Cân phân tích, có độ chính xác đến 0,1 mg.

5.1.6 Cân kỹ thuật, có độ chính xác đến 0,01g.

5.2 Dụng cụ

5.2.1 Bình tam giác, lọ, có nút cao su hoặc nút bông, dung tích 50, 100 ml.

5.2.2 Xylanh (bơm tiêm), dung tích 1, 30, 50 ml.

5.3 Vật tư

5.3.1 Đất, tơi xốp, có hàm lượng hữu cơ không nhỏ hơn 1,5 % và pH từ 6,0 đến 6,5 hoặc cát hoặc vermiculit.

5.3.2 Hạt giống đậu đỗ là giống sạch bệnh.

5.3.3 Chậu, vại trồng cây là nhựa trung tính hoặc gốm.

6 Hóa chất

6.1 Khí etylen chuẩn, có độ tinh khiết 99,9 %.

6.2 Khí axetylen, có độ tinh khiết 99,9 %.

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị dụng cụ

- Dụng cụ bình tam giác (5.2.1) được rửa sạch, làm nút bông nút kín. Rửa sạch nút cao su, kim tiêm, xylanh (5.2.2) và các dụng cụ khác. Khử trùng dụng cụ ở điều kiện phù hợp.
- Vật liệu trồng cây (đất, cát, vermiculit, v.v...) được khử trùng bằng phương pháp khử trùng ngưng đoạn [khử trùng 3 ngày liên tiếp ở 121 °C không ít hơn 30 min trong nồi hấp áp lực (5.1.1)].

7.2 Chuẩn bị mẫu

- Vi sinh vật cố định nitơ cộng sinh chỉ thể hiện hoạt tính sau khi được nhiễm vào cây chủ. Do vậy, sau khi lấy mẫu phân bón vi sinh vật cố định nitơ phải tiến hành trồng cây. Lượng phân bón vi sinh vật bón vào cây đảm bảo mật độ vi sinh vật không ít hơn 10^8 CFU/cây;
- Tiến hành trồng cây trong chậu (5.3.3), trên nền chất mang vô trùng (đất hoặc cát hoặc vermiculite v.v.). Sử dụng nền phân bón vô cơ (dung dịch trồng cây) tùy thuộc vào từng loại cây trồng.

Mỗi công thức được lập lại từ 3 đến 5 lần. Thí nghiệm được thực hiện trong nhà kính (hoặc buồng sinh trưởng), bảo đảm hạn chế tối đa ảnh hưởng của các yếu tố phi thí nghiệm:

- Khi cây trồng nở hoa rộ, tiến hành lấy mẫu cây để xác định khả năng cố định nitơ bằng cách đặt toàn bộ chậu vào trong hệ thống kín hoặc hàn kín miệng chậu (phần cây xanh phía trên vẫn phát triển bình thường);
- Thay thế 10 % thể tích không khí trong chậu bằng khí axetylen (6.2). Tiến hành đo mẫu sau khi ủ 15, 30, 45, 60 min.

7.3 Đo mẫu trên máy sắc ký khí

Việc định lượng khí etylen được tiến hành trên máy sắc ký khí dựa trên việc so sánh diện tích (hoặc chiều cao) pic của mẫu thí nghiệm với mẫu chuẩn.

Tùy theo cấu trúc và tính năng tác dụng của từng loại máy sắc ký khí mà chế độ đo của các máy khác nhau. Các điều kiện chạy máy cần tham khảo tài liệu như cột tách, nhiệt độ đầu bơm mẫu, detector, tốc độ khí mang, khí đốt cho detector cho phù hợp (tham khảo Phụ lục A). Nguyên tắc chung có thể tiến hành như sau:

- Bật máy sắc ký khí cho máy đạt chế độ làm việc (lưu ý chế độ đo, nhiệt độ detector và lưu lượng khí phải đạt theo chỉ số yêu cầu);
- Bơm 0,1 ml mẫu etylen chuẩn (6.1) vào máy sắc ký khí, xác định diện tích (hoặc chiều cao) pic.
- Bơm 0,1 ml mẫu thử vào máy sắc ký khí, xác định diện tích (hoặc chiều cao) pic.

CHÚ THÍCH 1: Nếu vì một lý do nào đó mà không đo được mẫu ngay, có thể chuyển hỗn hợp khí trong bình đựng mẫu vào một dụng cụ chứa có nút kín và bảo quản ở ngăn mát tủ lạnh (từ 4 °C đến 8 °C) cho tới khi đo.

CHÚ THÍCH 2: Dung dịch etylen chuẩn nên pha loãng 100 lần

8 Tính kết quả

Kết quả được tính dựa trên sự so sánh diện tích (hoặc chiều cao) pic etylen của mẫu thử và mẫu chuẩn. Lượng etylen tạo thành M_x , được tính theo công thức:

$$M_x = \frac{C_s \times L_x \times V_x \times 10^6}{L_s \times 22,4 \times T}$$

trong đó:

M_x là lượng etylen tạo thành, tính bằng nmol;

C_s là nồng độ etylen trong mẫu chuẩn;

C_x là nồng độ etylen trong mẫu thử;

L_S	là diện tích (hoặc chiều cao) pic của mẫu chuẩn;
L_x	là diện tích (hoặc chiều cao) pic của mẫu thử;
V_x	là thể tích pha khí của lọ thử nghiệm;
T	là thời gian ủ mẫu;
$22,4 \times 10^{-6}$	là hệ số để chuyển số ml khí etylen sang số nmol khí etylen.

9 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

(Tham khảo)

Chế độ đo cho máy sắc ký khí Trace™ GC Ultra

- A.1 **Cột tách:** Cột nhồi, 2 m x 2 mm
 - A.2 **Nhiệt độ detector:** 250 °C
 - A.3 **Dòng khí đốt**
 - A.3.1 **Dòng không khí:** 350 ml/min
 - A.3.2 **Dòng khí hydro:** 35 ml/min
 - A.3.3 **Dòng khí makeup (nitơ):** 30 ml/min
 - A.4 **Nhiệt độ detector:** 140 °C
 - A.5 **Nhiệt độ đầu vào:** 150 °C
-