

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN

TUYỂN TẬP
TIÊU CHUẨN NÔNG NGHIỆP
VIỆT NAM

PROCEEDINGS OF VIETNAM AGRICULTURAL STANDARDS

TẬP III
TIÊU CHUẨN PHÂN BÓN

HÀ NỘI, 2001

BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN

TUYỂN TẬP
TIÊU CHUẨN NÔNG NGHIỆP
VIỆT NAM

PROCEEDINGS OF VIETNAM AGRICULTURAL STANDARDS

TẬP III
TIÊU CHUẨN PHÂN BÓN

HÀ NỘI, 2001

LỜI NÓI ĐẦU

Để phục vụ kịp thời nhu cầu quản lý, nghiên cứu và sản xuất, Vụ Khoa học công nghệ và Chất lượng sản phẩm ban hành Tuyển tập tiêu chuẩn Nông nghiệp Việt Nam, gồm các Tiêu chuẩn Việt Nam và Tiêu chuẩn Ngành về lĩnh vực Nông nghiệp đang được áp dụng ở Việt Nam.

Tuyển tập tiêu chuẩn Nông nghiệp Việt Nam được sắp xếp theo từng tập, mỗi tập là một chuyên đề, như: trồng trọt, bảo vệ thực vật, phân bón, chăn nuôi...

Đây là lần đầu tiên Tuyển tập tiêu chuẩn Nông nghiệp Việt Nam được ban hành, do vậy không thể tránh khỏi những thiếu sót, chúng tôi mong nhận được các ý kiến đóng góp của các đơn vị và cá nhân để lần xuất bản sau được hoàn thiện hơn. Mọi ý kiến góp ý xin gửi về Vụ Khoa học công nghệ và Chất lượng sản phẩm - Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn - Số 2 Ngọc Hà, Ba Đình, Hà Nội.

Vụ Khoa học công nghệ và Chất lượng sản phẩm

MỤC LỤC

Trang

PHẦN I: CÁC VẤN ĐỀ CHUNG

1	Nhà ủ phân chuồng-Yêu cầu thiết kế. TCVN 3775-83.	9
2	Phân khoáng-Danh mục, chỉ tiêu chất lượng. TCVN 4727-89.	13
3	Phân khoáng-Phương pháp xác định độ bền tĩnh của các hạt. TCVN 4852-89.	15
4	Phân khoáng-Phương pháp xác định thành phần cỡ hạt. TCVN 4853-89.	17
5	Quy phạm khảo nghiệm trên đồng ruộng. Hiệu lực các loại phân bón đối với năng suất cây trồng, chất lượng, nông sản. 10TCN 216-95.	19

PHẦN II: CÁC DẠNG PHÂN BÓN VÀ PHÂN TÍCH

1	Phân lân Can xi Magiê (Phân lân nung chảy). TCVN 1078-99.	23
2	Urê nông nghiệp-Yêu cầu kỹ thuật. TCVN 2619-94.	29
3	Urê nông nghiệp-Phương pháp thử. TCVN 2620-94.	31
4	Supe Photphát đơn. TCVN 4440-87.	43
5	Phân hỗn hợp NPK-Phương pháp thử. TCVN 5815-94	48

PHẦN III: PHÂN TÍCH PHÂN BÓN

1	Phân tích phân bón-Phương pháp lấy mẫu và chuẩn bị mẫu. 10TCN 301-97.	67
2	Phân tích phân bón-Phương pháp xác định độ ẩm. 10TCN 302-97.	69
3	Phân tích phân bón-Phương pháp xác định axit tự do. 10TCN 303-97.	71
4	Phân tích phân bón-Phương pháp xác định nitơ tổng số. 10TCN 304-97.	73
5	Phân tích phân bón-Phương pháp xác định Biuret. 10TCN 305-97.	76
6	Phân tích phân bón-Phương pháp xác định photpho tổng số. 10TCN 306-97.	79
7	Phân tích phân bón-Phương pháp xác định photpho hữu hiệu. 10TCN 307-97.	85
8	Phân tích phân bón-Phương pháp xác định Kali hòa tan. 10TCN 308-97.	87
9	Phân tích phân bón-Phương pháp xác định Kali hữu hiệu. 10TCN 360-99.	89
10	Phân tích phân bón-Phương pháp xác định Nitơ hữu hiệu. 10TCN 361-99.	91
11	Phân tích phân bón-Phương pháp xác định một số nguyên tố vi lượng. 10TCN 362-99.	94
12	Phân tích phân bón-Phương pháp xác định lưu huỳnh. 10TCN 363-99.	96
13	Phân tích phân bón-Phương pháp xác định clorua hoà tan trong nước. 10TCN 364-99.	98
14	Phân tích phân bón-Phương pháp xác định axit Humic và axit Fulvic. 10TCN 365-99.	100
15	Phân tích phân bón-Phương pháp xác định tổng số cacbon hữu cơ. 10TCN 366-99.	103

PHẦN IV.1: PHÂN VI SINH VẬT

1	Phân bón vi sinh vật cố định Nitơ. TCVN 6166-1996.	107
2	Phân bón vi sinh vật phân giải hợp chất Photpho khó tan. TCVN 6167-1996.	115
3	Phân bón vi sinh vật phân giải xenluloza. TCVN 6168-1996.	123
4	Phân bón vi sinh-Thuật ngữ. TCVN 6169-1996.	132
5	Phân vi sinh vật cố định Nitơ (yêu cầu KT, PP kiểm tra, nhãn, bao bì đóng gói). 10TCN 208-95	136
6	Phân vi sinh vật (Thuật ngữ, định nghĩa). 10TCN 254-96.	141
7	Phân hữu cơ vi sinh vật (Yêu cầu KT, PP kiểm tra, bao bì, ghi nhãn). 10TCN 255-96.	144
8	Phân bón vi sinh vật phân giải hợp chất photpho khó tan. 10TCN 298-97.	147
9	Phân vi sinh vật cố định Nitơ-Phương pháp xác định hoạt tính. 10TCN 299-97.	150
10	Phương pháp kiểm tra phân vi sinh vật kị khí nitơ và phân giải xenlulo. 10TCN 445-2001.	153

PHẦN IV.2: NGUỒN GIEN VI SINH VẬT

1	Quy định về công tác thu thập, tuyển chọn nguồn gien vi sinh vật nông nghiệp. 10TCN 300-97.	163
2	Bảo quản ngắn hạn nguồn gien vi sinh vật nông nghiệp. 10TCN 348-99.	168
3	Bảo quản dài hạn nguồn gien vi sinh vật nông nghiệp bằng phương pháp đông khô. 10 TCN 349-99.	173
4	Phương pháp bảo quản dài hạn nguồn gien vi sinh vật nông nghiệp bằng nitơ lỏng. 10TCN 416-2000.	179

PHẦN V: PHÂN TÍCH CÂY TRỒNG

1	Phân tích cây trồng. Nguyên tắc chung về lấy mẫu và chuẩn bị mẫu để xác định một số nguyên tố. 10TCN 449-2001.	187
2	Phân tích cây trồng. Phương pháp phân huỷ mẫu để xác định một số nguyên tố. 10TCN 450-2001.	189
3	Phân tích cây trồng. Phương pháp xác định nitơ tổng số. 10TCN 451-2001.	193
4	Phân tích cây trồng. Phương pháp xác định hàm lượng nitrat và nitrit. 10TCN 452-2001.	197
5	Phân tích cây trồng. Phương pháp xác định phot pho tổng số. 10TCN 453-2001.	201
6	Phân tích cây trồng. Phương pháp xác định Kali tổng số và natri tổng số. 10TCN 454-2001.	205
7	Phân tích cây trồng. Phương pháp xác định canxi tổng số và magiê tổng số. 10TCN 455-2001.	208
8	Phân tích cây trồng. Phương pháp xác định lưu huỳnh tổng số. 10TCN 456-2001.	211
9	Phân tích cây trồng. Phương pháp xác định sắt tổng số. 10TCN 457-2001.	216

TIÊU CHUẨN PHÂN BÓN
PHẦN I: CÁC VẤN ĐỀ CHUNG

NHÀ Ủ PHÂN CHUÔNG YÊU CẦU THIẾT KẾ

Chrestomathy nave - Requirements of project

Tiêu chuẩn này được áp dụng để thiết kế xây dựng nhà ủ phân chuồng khô của gia súc như lợn, trâu, bò... ở các trại chăn nuôi quốc doanh.

Tiêu chuẩn này chỉ để tham khảo đối với ngành ủ phân chuồng của các gia đình xã viên, các trại chăn nuôi tập thể và các đội sản xuất của hợp tác xã nông nghiệp.

1. Bố trí mặt bằng công trình và yêu cầu khu đất xây dựng

1.1. Việc lựa chọn địa điểm xây dựng nhà ủ phân chuồng phải đạt những yêu cầu sau:

- 1) Phù hợp với qui hoạch sản xuất nông nghiệp.
- 2) Gần các cơ sở chăn nuôi và đất canh tác.
- 3) Tận dụng được những nơi đất xấu, đất không canh tác, đất hoang.
- 4) Nơi để thoát nước và không bị ngập nước.
- 5) Giao thông thuận tiện, đảm bảo tốt việc vận chuyển phân chuồng và các chất độn khác.
- 6) Nơi khuất gió và ở cuối hướng gió chính đối với các khu dân cư và các công trình xây dựng công cộng khác.

1.2. Hướng nhà ủ phân chuồng được xác định tùy thuộc vào hướng gió chính của vùng khí hậu để tránh nắng chiếu trực tiếp vào nhà và tạo điều kiện thoáng mát cho người sản xuất.

1.3. Việc lựa chọn khu đất xây dựng nhà ủ phân chuồng phải bảo đảm những quy định về vệ sinh phòng dịch; khoảng cách cách ly nhỏ nhất của nhà ủ phân chuồng đối với các công trình khác lấy theo bảng 1.

m **Bảng 1**

Đối tượng cách ly	Khoảng cách cách ly nhỏ nhất
Nhà ủ phân với khu dân cư	100
Nhà ủ phân với trại chăn nuôi	30
Nhà ủ phân với đường giao thông:	
- Đường cấp IV trở lên	100
- Đường cấp IV trở xuống	50

Quyết định ban hành số: 99/QĐ ngày 23 tháng 4 năm 1983 của Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước. Có hiệu lực từ 1-7-1984.

2. Yêu cầu thiết kế

2.1. Thiết kế nhà ủ phân chuồng phải bảo đảm những yêu cầu sau:

- Đáp ứng được những yêu cầu của quy trình sản xuất, chế biến, bảo quản phân chuồng của ngành nông nghiệp.
- Sử dụng và thao tác thuận tiện nhất.
- Sử dụng hệ thống môđun thống nhất trong xây dựng và phù hợp với cấp công trình.

Áp dụng các giải pháp kiến trúc và kết cấu đơn giản, tận dụng việc dùng các nguyên vật liệu tại chỗ.

2.2. Mặt bằng nhà ủ phân chuồng bố trí sao cho đường vận chuyển phân vào và phân ra có thể đi dọc nhà. Nền nhà ủ phân được chia thành hai khu vực lớn dọc theo chiều dài của nhà: khu vực ủ nóng và khu vực ủ nguội. Mặt bằng khu ủ nóng cao hơn khu ủ nguội từ 0,50 đến 0,60 m; chiều rộng khu ủ nguội lớn hơn chiều rộng khu ủ nóng từ 35 đến 40 phần trăm.

2.3. Nền nhà ủ phân lấy ở cao trình +0,15 đến +0,20 so với cao trình đất tự nhiên.

2.4. Nền nhà ủ phân chuồng làm bằng vật liệu chống thấm để không bị mất nước phân, có thể cấu tạo bằng lớp bê tông đá dăm hoặc sỏi mác từ 50 đến 75, dày từ 10 đến 12 cm hoặc lát bằng gạch chỉ với vữa xi măng mác từ 50 đến 75.

Độ dốc ngang của nền nhà lấy bằng 0,03m/m nghiêng về phía mặt sau bên phía khu ủ nguội.

Chú thích: Trường hợp khó khăn về nguyên vật liệu nền khu ủ nguội có thể cấu tạo bằng lớp đất sét ẩm dày 30 cm đầm nện tốt.

2.5. Mặt trước nhà ủ phân chuồng bên khu ủ nóng để trống với tường xây lưng cao 0,50m; mặt sau bên khu ủ nguội có tường dọc xây cao 1,50 đến 1,80m có từ hai đến ba cửa bằng ván lùa rộng ít nhất 0,90m bố trí ở những gian giữa để tránh phân ra ngoài. Tường dọc có thể xây dựng bằng gạch chỉ, đá hoặc bằng tường trình (tường đất nện)

2.6. Hai đầu hồi nhà có bố trí những cửa để xe vận chuyển phân vào và ra. Kích thước cửa ra vào phụ thuộc vào phương tiện vận chuyển.

2.7. Cột nhà có thể xây bằng gạch, đá, bằng gỗ hoặc tre già ngâm; chiều cao của cột phụ thuộc vào phương tiện vận chuyển, ít nhất lấy bằng 2,10m.

2.8. Mái nhà có thể lợp ngói, phibê xi măng, tranh hay các loại lá thường dùng. Để chống mưa hắt, nắng xuyên vào nhà. Mái nên đưa ra từ 0,75 đến 1,00m; chiều cao giọt giang lấy từ 1,50m đến 1,80m.

2.9. Vì kèo nhà có thể làm bằng gỗ, tre, bê tông...

2.10. Khẩu độ và bước cột nhà tùy theo khả năng của vật liệu để chọn thích hợp. Khẩu độ nhà lấy từ 5,40 đến 7,50m.

- 2.11. Trong nhà ủ phân có thể bố trí một hay hai ngăn để nguyên liệu chế biến (như vôi bột, lân...) diện tích lấy bằng năm phần trăm diện tích xây dựng nhà ủ phân và một ngăn để dụng cụ lao động diện tích bằng ba phần trăm diện tích xây dựng nhà ủ phân.
- 2.12. Nhà ủ phân chuồng được thiết kế theo nhà cấp 4 theo TCVN 2748-78. Trường hợp nhà ủ phân của đội sản xuất được phép làm theo cấp tạm thời.
- 2.13. Diện tích xây dựng nhà ủ phân chuồng.
- 2.13.1. Diện tích xây dựng nhà ủ phân chuồng của trại chăn nuôi được tính theo công thức sau:

$$S_{1xd} = \frac{n.k.Q}{4.q_1}$$

Trong đó:

S_{1xd} - diện tích xây dựng nhà ủ phân của trại chăn nuôi (m²);

n - số đầu con gia súc bình quân trong năm của trại chăn nuôi (con);

Q- tổng lượng phân bình quân do một đầu con gia súc thải ra trong một năm lấy theo bảng 2.

Bảng 2

Loại gia súc	Trâu	Bò	Lợn
Q(t)	2,0	1,2	1,0

k- hệ số thu hồi phân lấy theo bảng 3

Bảng 3

Loại gia súc	Lợn	Trâu bò	
		chăn thả kết hợp với nuôi ở chuồng	nuôi ở chuồng kết hợp với chăn thả
k	0,60 đến 0,65	0,15 đến 0,20	0,65 đến 0,70

q₁- sức chứa của nhà ủ phân chuồng trên một đơn vị diện tích xây dựng (t/m²) lấy theo bảng 4.

Bảng 4

Loại phân	Phân không độn	Phân độn tỷ lệ 1:1	Phân độn tỷ lệ 1:2
q ₁ (t/m ²)	1,5	0,9	0,6

Chú thích: Tỷ lệ độn 1:1, 1:2 tính theo trọng lượng. Số trước là phân gia súc, số sau là chất độn.

- 2.13.2. Diện tích xây dựng nhà ủ phân chuồng của đội sản xuất được tính theo công thức sau:

$$S_{2xd}=q.S$$

Trong đó:

S_{2xd} - diện tích xây dựng nhà ủ phân của đội sản xuất (m²);

q - diện tích xây dựng nhà ủ phân cho một đơn vị diện tích canh tác (m^2/ha canh tác) lấy theo bảng 5;
 S- diện tích canh tác của đội sản xuất (ha).

Bảng 5

Loại cây trồng	Cây công nghiệp	Hoa màu	Lúa	Lúa giống
q (m^2/ha canh tác)	2,0	2,5	3,0	4,0

Chú thích: Trong trường hợp cho phép có thể ủ người đóng phân 30 ngày trong nhà ủ phân sau đó chuyển phân ra đóng đánh thành những đống nhỏ (khoảng bốn đến năm tấn) tiếp tục ủ người 30 ngày nữa thì diện tích xây dựng nhà ủ phân chuồng tính theo hai công thức trên có thể giảm đi một nửa.

3. Cấp nước thoát nước

- 3.1. Để tưới ẩm cho phân bảo đảm độ ẩm thường xuyên của đống phân từ 60 đến 70 phần trăm trong giai đoạn ủ nóng cần xây dựng hố chứa nước để tưới. Trường hợp có thể nên tận dụng nước rửa chuồng, nước tiêu để làm nước tưới.
- 3.2. Hố chứa nước tưới bố trí ngầm ở giữa khu ủ nóng thông ra hai máng rãnh dẫn nước bên ngoài đến tận các dãy chuồng nuôi gia súc. Dung tích hố chứa nước tưới phụ thuộc vào công suất của nhà ủ phân và được tính theo công thức sau:

$$V = \frac{6.P}{1.000}$$

Trong đó:

V - dung tích hố chứa nước tưới (m^3);
 P - công suất của nhà ủ phân (t).

- 3.3. Cấu tạo của hố chứa nước tưới được phép lấy như sau: đáy bằng bê tông đá dăm hay sỏi mác 100 dày 20cm, thành bên xây bằng gạch chỉ dày 22 đến 33cm với mác vữa xi măng từ 75 đến 100, nắp đáy hố bằng tấm đan bê tông cốt thép mác 200. Đáy và thành hố láng bằng vữa xi măng mác từ 75 trở lên.
- 3.4. Để thu lại nước phân thừa cần bố trí ở phía sau sát khu vực ủ người hai hố thu ở hai đầu nhà, dung tích một hố thu lấy từ 0,30 đến 0,50 m^3 .
- 3.5. Phải thiết kế hệ thống thoát nước cho nhà ủ phân chuồng để bảo đảm cho nhà ủ phân không bị nước xâm nhập vào nền nhà theo những tiêu chuẩn thiết kế tạm thời hệ thống thoát nước cho những công trình sản xuất.

PHÂN KHOÁNG

DANH MỤC CHỈ TIÊU CHẤT LƯỢNG

Mineral fertilizers - Nomenclature of quality indices

Tiêu chuẩn này qui định danh mục các chỉ tiêu chất lượng các loại phân (khoáng) đạm, lân, kali và hỗn hợp NPK dạng khoáng.

Danh mục các chỉ tiêu chất lượng và tính chất đặc trưng của phân khoáng được ghi trong bảng sau:

Tên chỉ tiêu	Đơn vị	Dạng phân khoáng		
		Bột	Hạt	Lông
1	2	3	4	5
1. Thành phần hóa học				
1.1. Hàm lượng đạm tổng số theo gốc khô (đạm toàn phần)	%	±	±	±
1.2. Hàm lượng đạm amoniac	%	±	±	±
1.3. Hàm lượng đạm amit	%	±	±	±
1.4. Hàm lượng đạm nitrit	%	±	±	±
1.5. Hàm lượng P_2O_5 tổng	%	±	±	±
1.6. Hàm lượng P_2O_5 dễ tiêu	%	±	±	±
1.7. Hàm lượng P_2O_5 tan trong nước	%	±	±	±
1.8. Hàm lượng P_2O_5 tan trong axit vô cơ	%	±	±	±
1.9. Hàm lượng kali tổng	%	±	±	±
1.10. Hàm lượng kali tan trong nước	%	±	±	±
1.11. Hàm lượng kali tan trong axit	%	±	±	±
1.12. Hàm lượng magiê	%	±	±	±
1.13. Hàm lượng lưu huỳnh	%	±	±	±
1.14. Hàm lượng sắt	%	±	±	±
1.15. Hàm lượng mangan	%	±	±	±
1.16. Hàm lượng molipden	%	±	±	±
1.17. Hàm lượng kẽm	%	±	±	±
1.18. Hàm lượng đồng	%	±	±	±
1.19. Hàm lượng bo	%	±	±	±

Quyết định ban hành số 345/QĐ ngày 04 tháng 07 năm 1989 của Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước.

1.20. Hàm lượng coban	%	±	±	±
1.21. Hàm lượng biure	%	±	±	±
1.22. Hàm lượng axit tự do	%	±	±	±
1.23. Hàm lượng kiềm tự do	%	±	±	±
1.24. Hàm lượng chất không tan trong nước	%	±	±	±
1.25. Hàm lượng natriclorua	%	±	±	±
1.26. Hàm lượng nước	%	±	±	±
2. Chỉ tiêu hóa lý				
2.1. Độ pH của dung dịch ở nồng độ qui định	pH	+	+	+
3. Chỉ tiêu cơ lý				
3.1. Thành phần hạt	%	±	+	-
3.2. Tỷ khối	kg/m ³	-	-	±
3.3. Độ nhớt động học	μs/m ²	-	-	±
4. Chỉ tiêu độ bền vững				
4.1. Chỉ tiêu bảo quản		+	+	+
4.1.1. Thời gian bảo quản	tháng	+	+	+
4.1.2. Thời gian đảm bảo chất lượng sản phẩm	tháng	+	+	+
4.1.3. Độ bền va đập	%	-	±	-
4.1.4. Độ bền tĩnh	MPa	-	±	-
4.1.5. Nhiệt độ kết tinh	°C	-	-	+
4.2. Chỉ tiêu tái sinh				
5. Chỉ tiêu đồng nhất				
5.1. Sai số trung bình các chỉ tiêu thành phần hóa học và hóa lý trong lô hàng		±	±	±
6. Chỉ tiêu an toàn				
6.1. Cấp nguy hiểm		+	+	+
6.2. Nồng độ giới hạn cho phép của hơi độc do các bụi phân khoáng trong vùng làm việc	mg/m ³	±	±	±
6.3. Nhiệt độ tự cháy	°C	±	±	-
7. Chỉ tiêu sinh thái				
7.1. Độ axit sinh học của phân	-	±	±	±
7.2. Độ kiềm sinh học của phân	-	±	±	±

Chú thích:

- Dấu +: Chính thức áp dụng
- Dấu -: Không áp dụng
- Dấu ±: Áp dụng hạn chế.

PHÂN KHOÁNG PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỘ BỀN TĨNH CỦA CÁC HẠT

Mineral fertilizers - Method for determination of granules static strength

Tiêu chuẩn này áp dụng cho các loại phân khoáng các dạng hạt.

Tiêu chuẩn này phù hợp với ST SEV 2527-80.

1. Bản chất phương pháp

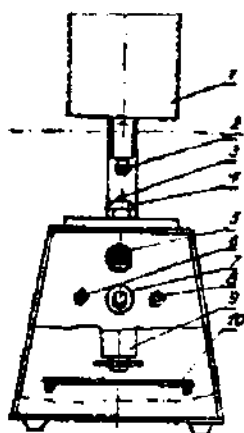
Phương pháp dựa trên việc xác định lực giới hạn cần thiết để phá huỷ hạt của phân mẫu thử khi nén một lực giữa hai mặt song song.

2. Mẫu thử

Chuẩn bị mẫu thử theo các qui định hiện hành.

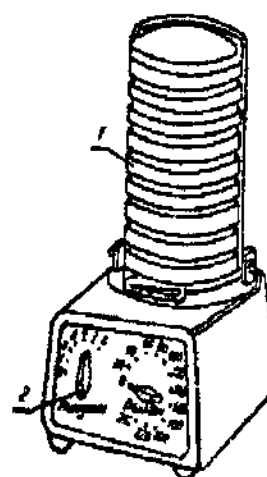
3. Thiết bị

Để tiến hành thử sử dụng:



- | | |
|----------------------|---------------------|
| 1. Cơ cấu dẫn động | 6 và 8. Công tắc |
| 2. Chầy | 7. Phím bấm |
| 3. Hạt mẫu thử | 9. Biến thế vi phân |
| 4. Bàn làm việc | 10. Thanh nhún |
| 5. Chỉ thị đóng mạch | |

Hình 1



1. Bộ sàng
2. Rơ le

Hình 2

Quyết định ban hành số 702/QĐ ngày 25 tháng 12 năm 1989 của Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước.

1) Máy để xác định độ bền tĩnh của các hạt như trên hình 1 hoặc các máy tương tự có vùng đo độ bền từ 0,1 đến 10MPa với sai số tương đối không lớn hơn $\pm 4\%$ và tốc độ dịch chuyển của bàn làm việc từ 0,8 đến 1mm/s.

Cho phép qui định trong tiêu chuẩn SEV tốc độ dịch chuyển của bàn làm việc đối với các dạng phân bón cụ thể;

2) Máy sàng như trên hình 2;

3) Sàng có lỗ tròn hoặc vuông.

4. Tiến hành thử

Dùng máy sàng (hình 2) tách riêng phần chính của mẫu để chọn lấy những hạt (20 hạt) có kích thước như qui định trong tiêu chuẩn SEV đối với từng loại phân bón cụ thể. Sai số xác định kích thước hạt là $\pm 0,1\text{mm}$.

Sai số đo kích thước hạt qui định trong tiêu chuẩn SEV được phép khác nhau đối với các dạng phân bón cụ thể.

Cho hạt vào cốc cân có nắp đậy kín để độ ẩm của hạt trong quá trình thử không thay đổi. Tất cả các hạt lần lượt bị phá huỷ trên máy và lực phá huỷ đọc trên thang đo.

5. Tính toán kết quả

Độ bền tĩnh trung bình của hạt (X) được tính bằng MPa theo công thức:

$$X = \frac{\sum P_i}{20.S} = \frac{\sum P_i}{20 \frac{\pi d_b^2}{4}} = 0,063 \cdot \frac{\sum P_i}{d_b^2}$$

Trong đó:

P_i - Lực cần thiết để phá huỷ một hạt, N_2 ;

S - Diện tích mặt cắt ngang của hạt, cm^2 ;

d_b - Đường kính trung bình của hạt được xác định bằng giá trị trung bình cộng đường kính các hạt có trong phần chính của mẫu, cm.

Kết quả thử nghiệm được làm tròn đến phần mười.

Chú thích: Cho phép biểu diễn độ bền hạt ra Niuton trên một hạt ($N/\text{hạt}$), đó là giá trị trung bình cộng của 20 kết quả đo riêng biệt.

PHỤ LỤC TCVN 4852-89

Tiêu chuẩn quốc tế có liên quan

ST SEV 2525-80. Phân khoáng. Phương pháp chuẩn bị mẫu.

TCVN 2230-77 Sàng và rây. Lưới đan và lưới đục lỗ. Kích thước lỗ.

1) Máy để xác định độ bền tĩnh của các hạt như trên hình 1 hoặc các máy tương tự có vùng đo độ bền từ 0,1 đến 10MPa với sai số tương đối không lớn hơn $\pm 4\%$ và tốc độ dịch chuyển của bàn làm việc từ 0,8 đến 1mm/s.

Cho phép qui định trong tiêu chuẩn SEV tốc độ dịch chuyển của bàn làm việc đối với các dạng phân bón cụ thể;

2) Máy sàng như trên hình 2;

3) Sàng có lỗ tròn hoặc vuông.

4. Tiến hành thử

Dùng máy sàng (hình 2) tách riêng phần chính của mẫu để chọn lấy những hạt (20 hạt) có kích thước như qui định trong tiêu chuẩn SEV đối với từng loại phân bón cụ thể. Sai số xác định kích thước hạt là $\pm 0,1$ mm.

Sai số đo kích thước hạt qui định trong tiêu chuẩn SEV được phép khác nhau đối với các dạng phân bón cụ thể.

Cho hạt vào cốc cân có nắp đậy kín để độ ẩm của hạt trong quá trình thử không thay đổi. Tất cả các hạt lần lượt bị phá huỷ trên máy và lực phá huỷ đọc trên thang đo.

5. Tính toán kết quả

Độ bền tĩnh trung bình của hạt (X) được tính bằng MPa theo công thức:

$$X = \frac{\sum P_i}{20.S} = \frac{\sum P_i}{20 \frac{\pi d_{tb}^2}{4}} = 0,063 \cdot \frac{\sum P_i}{d_{tb}^2}$$

Trong đó:

P_i- Lực cần thiết để phá huỷ một hạt, N₂;

S- Diện tích mặt cắt ngang của hạt, cm²;

d_{tb}- Đường kính trung bình của hạt được xác định bằng giá trị trung bình cộng đường kính các hạt có trong phần chính của mẫu, cm.

Kết quả thử nghiệm được làm tròn đến phần mười.

Chú thích: Cho phép biểu diễn độ bền hạt ra Niuton trên một hạt (N/hạt), đó là giá trị trung bình cộng của 20 kết quả đo riêng biệt.

PHỤ LỤC TCVN 4852-89

Tiêu chuẩn quốc tế có liên quan

ST SEV 2525-80. Phân khoáng. Phương pháp chuẩn bị mẫu.

TCVN 2230-77 Sàng và rây. Lưới đan và lưới đục lỗ. Kích thước lỗ.

PHÂN KHOÁNG PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH THÀNH PHẦN CỖ HẠT

Mineral fertilizers - Method for determination of grainsize analysis

Tiêu chuẩn này áp dụng cho phân khoáng dạng hạt, dạng tinh thể và dạng viên.
Tiêu chuẩn này hoàn toàn phù hợp với ST SEV 2526-80.

1. Bản chất phương pháp

Phương pháp dựa trên việc xác định hàm lượng các phần nhận được khi sàng mẫu.

2. Mẫu thử

Chuẩn bị mẫu theo ST SEV 2526-80 các qui định hiện hành.

3. Thiết bị

Để tiến hành thử sử dụng:

1) Máy sàng kiểu RKF-24 như hình vẽ hoặc thiết bị tương tự có biên độ rung của giá rung từ 1,5 đến 2,5mm và tần số dao động từ 13 đến 17 Hz.

Tuỳ thuộc vào máy sàng sử dụng mà có thể qui định trong các tiêu chuẩn SEV tần số và biên độ dao động đối với từng dạng phân bón cụ thể;

2) Sàng có lỗ tròn hoặc lỗ vuông;

3) Cân kỹ thuật sai số không quá 0,1g.

4. Tiến hành thử

Cân khoảng 200g mẫu với sai số không quá 0,1 g và cho vào sàng trên của máy, tiến hành sàng trong khoảng thời gian đã qui định trong tiêu chuẩn cho từng dạng phân bón cụ thể.

Chú thích:

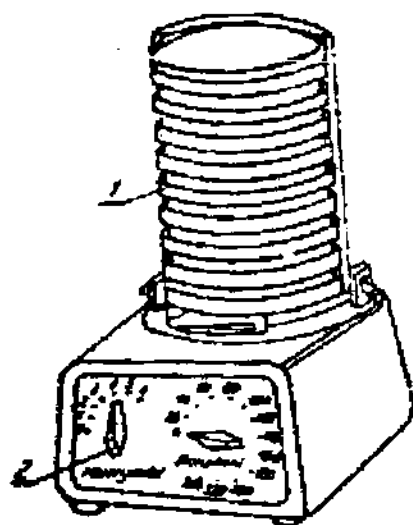
Khối lượng mẫu cân được qui định trong các tiêu chuẩn cho các dạng phân bón cụ thể.

Sau khi sàng, lấy riêng các phần trên mỗi sàng và cân với sai số không quá 0,1g.

Cho phép gộp chung các phần trên sàng trong giới hạn của phần. Các hạt nhỏ làm tắc lỗ gộp chung vào phần bên sàng. Không cho phép làm vỡ các hạt.

Mất mát khi sàng không được vượt quá 1% (tuyệt đối).

5. Tính toán kết quả



Máy lắc để xác định thành phần cỡ hạt của phân bón loại RKF-24

1 Bộ rây

2 Rơ le

- 5.1. Hàm lượng của phân (X) được tính toán bằng % theo công thức:

$$X = \frac{m_1 \cdot 100}{m}$$

Trong đó:

m_1 - khối lượng mẫu, g;

m - khối lượng phân, g.

- 5.2. Kết quả cuối cùng của phép thử là giá trị trung bình cộng của hai lần xác định song song có độ lệch không quá 1% tuyệt đối.
Làm tròn kết quả thành giá trị nguyên.

PHỤ LỤC

Tiêu chuẩn có liên quan

ST SEV 2525-80 Phân khoáng. Phương pháp chuẩn bị mẫu.

TCVN 2230-77. Sàng và rây. Lưới đan và lưới đục lỗ. Kích thước lỗ.

- 2.1.2. Đối với các loại phân chứa các chất dinh dưỡng NPK rất ít hoặc lượng bón tính cho một đơn vị diện tích là không đáng kể (ví dụ: các loại phân vi sinh, phân vi lượng, phân bón lá).
- 2.1.2.1. Công thức đối chứng: là công thức phân bón phổ biến ở địa phương.
- 2.1.2.2. Công thức khảo nghiệm:
- *Trên nền là công thức đối chứng bón bổ sung phân khảo nghiệm (hoặc phun nếu là phân bón lá).
 - *Bón theo khuyến cáo của cơ sở sản xuất về liều lượng, tỷ lệ, cách bón của phân khảo nghiệm và các loại phân thông thường khác.
- 2.2. Phương pháp bố trí:
- Theo phương pháp khối ngẫu nhiên hoàn chỉnh (RCB), ngẫu nhiên hoàn chỉnh (CBD) hoặc tuần tự bậc thang.
- 2.3. Kích thước ô khảo nghiệm và số lần nhắc:
- 2.3.1. Khảo nghiệm diện hẹp:
- Đối với cây hàng năm diện tích ô tối thiểu 20 m², phải có bờ, rãnh phân định ô rõ ràng.
 - Đối với cây lâu năm khoảng cách cây, hàng lớn thì ô thí nghiệm tính theo luống, hàng, số cây, diện tích ô 200 - 300 m².
 - Số lần nhắc lại: Tối thiểu 4 lần.
- 2.3.2. Khảo nghiệm diện rộng:
- Diện tích khảo nghiệm ít nhất 10.000 m² (01 ha).
- Trong khảo nghiệm diện rộng các công thức không cần nhắc lại, nhưng trên một mảnh ruộng phải được chia đôi: một nửa được bón phân khảo nghiệm, một nửa làm đối chứng.
- 2.4. Tiến hành bón phân: Liều lượng, tỷ lệ, thời gian, thời kỳ và kỹ thuật bón phân khảo nghiệm phải tuân thủ theo khuyến cáo của cơ sở sản xuất, kinh doanh phân.
- 3. Thu thập số liệu**
- 3.1. Phương pháp thu thập số liệu:
- 3.1.1. Thu thập mẫu đất: Lấy mẫu đất theo phương pháp đường chéo.
- 3.1.2. Thu thập các chỉ tiêu sinh trưởng phát triển:
- * Đối với cây hàng năm mỗi ô chọn 10 cây.
 - * Đối với cây lâu năm khoảng cách cây, hàng lớn thì mỗi ô chọn từ 3 cây trở lên tùy theo mật độ.
- 3.1.3. Thu thập số liệu năng suất: Thu cả ô hoặc 5 m²/ô.
- 3.2. Nội dung thu thập:
- 3.2.1. Tính chất đất thí nghiệm.
- 3.2.2. Các chỉ tiêu sinh trưởng phát triển đặc trưng của cây.
- 3.2.3. Các yếu tố cấu thành năng suất và năng suất.

TIÊU CHUẨN PHÂN BÓN

**PHẦN II: CÁC DẠNG PHÂN BÓN
VÀ PHÂN TÍCH**

PHÂN LÂN CANXI MAGIÊ (Phân lân nung chảy)

Calcium magnesium phosphate fertilizer

Soát xét lần 2

TCVN 1078: 1999 thay thế cho TCVN 1078 - 85.

TCVN 1078: 1999 do Tiểu ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC134 "Phân vô cơ" biên soạn, trên cơ sở dự thảo đề nghị của Công ty Phân lân Văn Điển thuộc Tổng công ty Hoá chất Việt Nam, Tổng cục Tiêu chuẩn - Đo lường - Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường ban hành.

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này áp dụng cho phân lân canxi magiê sản xuất theo phương pháp nhiệt với nguyên liệu chính là apatit cục, serpentin, than Vàng Danh hoặc than khác có chất lượng tương đương.

2. Tiêu chuẩn trích dẫn

TCVN 4851-89 Nước dùng để phân tích trong phòng thí nghiệm. Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.

3. Yêu cầu kỹ thuật

Các chỉ tiêu hoá lý của phân lân canxi ma giê phải phù hợp với các yêu cầu qui định trong bảng 1.

Bảng 1

Tên chỉ tiêu	Loại đặc biệt		Loại thông dụng	
	Mức 1	Mức 2	Mức 1	Mức 2
1. Hàm lượng diphospho pentoxit (P_2O_5) hữu hiệu, tính bằng %, không nhỏ hơn	20	17,5	15	13,5
2. Độ ẩm, tính bằng %, không lớn hơn	1	1	1	1
3. Độ mịn - cỡ hạt				
3.1 Dạng hạt				
Lượng qua rây 3 mm, tính bằng % khối lượng, không nhỏ hơn	95	95	95	95
3.2. Dạng bột				
Lượng qua rây 0,25 mm, tính bằng % khối lượng, không nhỏ hơn	80	80	80	80

4. Phương pháp thử.

4.1. Qui định chung.

4.1.1. Chất lượng của lô hàng được xác định trên cơ sở phân tích mẫu đại diện lấy ở mỗi lô hàng. Lô hàng là lượng phân lân canxi ma giê được sản xuất trong cùng một thời gian, có cùng một mức chất lượng, cùng một loại bao bì, giao nhận cùng một lúc, có cùng một giấy xác nhận chất lượng và không quá 500 tấn.

4.1.2. Lấy mẫu thử ở 1% số bao của lô hàng, nhưng không được ít hơn 5 bao đối với lô hàng nhỏ. Các bao được chỉ định lấy mẫu tại các vị trí khác nhau: trên, dưới, trong, ngoài của lô hàng. Từ mỗi bao lấy mẫu riêng tại các điểm trên, dưới, giữa bao và không được nhỏ hơn 0,1 kg.

Thành lập mẫu chung bằng cách trộn đều tất cả mẫu riêng. Rút gọn mẫu chung theo phương pháp chia tư cho đến khi còn lại khoảng 2 kg để có mẫu trung bình. Mẫu trung bình là mẫu đại diện cho lô hàng. Chia mẫu đại diện làm hai phần, cho vào hai bao bằng chất dẻo PE hoặc bằng giấy xi măng chống ẩm, gói kín lại. Bên ngoài bao có nhãn ghi:

- Tên cơ sở sản xuất;
- Số hiệu của lô hàng được lấy mẫu;
- Ngày tháng năm sản xuất;
- Tên người lấy mẫu.

Lấy một bao đem phân tích còn một bao dùng để lưu. Lưu mẫu trong 6 tháng để khi cần thiết phân tích lại.

4.1.3. Hoá chất dùng để phân tích phải là loại hoá chất tinh khiết phân tích.

4.1.4. Nước dùng để phân tích phải phù hợp với TCVN 4851 - 89.

4.1.5. Trường hợp kết quả phân tích chỉ tiêu P_2O_5 hữu hiệu không đạt yêu cầu thì phải lấy lượng mẫu thử gấp đôi tại chính lô hàng đó để phân tích lại. Kết quả lần này là kết quả cuối cùng.

4.2. Xác định hàm lượng diphospho pentoxit (P_2O_5) hữu hiệu bằng phương pháp khối lượng (phương pháp trọng tài).

4.2.1. Nguyên tắc của phương pháp

Hoà tan phân lân canxi magiê bằng dung dịch axit xitric 2%. Kết tủa ion photphat bằng amoni molipdat trong môi trường axit nitric được kết tủa màu vàng, dùng amoni hydroxit với lượng dư để hoà tan kết tủa vàng, sau đó dùng hỗn hợp magiê kết tủa ion photphat dưới dạng NH_4MgPO_4 . Từ lượng cân $Mg_2P_2O_7$ thu được sau khi lọc, rửa, nung kết tủa và cân, tính ra hàm lượng P_2O_5 hữu hiệu.

4.2.2. Hóa chất.

- Axit xitric, dung dịch 2%;

- Axit nitric, dung dịch 6 N, 25%, 1%;
- Amoni hydroxit, dung dịch 25%, 2,5%;
- Amoni nitrat, dung dịch 35%;
- Amoni molipdat, dung dịch 3%;
- Axit clohydric, dung dịch 6N;
- Dung dịch hỗn hợp ma giê ($55\text{g MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} + 70\text{g NH}_4\text{Cl} + 250\text{ ml NH}_4\text{OH } 10\%$ và thêm nước cất cho vừa đủ 1000 ml. Dung dịch được lọc trước khi dùng);
- Bạc nitrat, dung dịch 1 %;
- Phenolphtalein, dung dịch 1% pha trong rượu etylic.

4.2.3 Cách tiến hành

Cân khoảng 0,5 g (chính xác đến 0,0002g) phân lân canxi magiê đã được nghiền mịn và rây qua rây 0,08 mm. Cho mẫu cân vào bình nón đã được sấy khô, dung tích 250 ml, có nút nhám. Dùng pipet hút 50 ml dung dịch axit nitric 2% cho vào bình. Dùng máy hoặc tay lắc kỹ, ít nhất trong 30 phút, sao cho toàn bộ mẫu tan hết. Chú ý không để mẫu vón cục hoặc dính lên thành bình. Lọc dung dịch qua phễu khô và giấy lọc mịn vào bình khô có dung tích 100 ml.

Hút 10 ml dung dịch đã lọc trong bình cho vào cốc dung tích 250 ml, thêm vào 20 giọt axit nitric 6N. Đun nóng dung dịch đến khoảng 80°C . Dùng dung dịch amoni hydroxit 25% trung hoà cho đến khi bắt đầu xuất hiện kết tủa trắng. Dùng axit nitric 6N nhỏ từ từ vào hỗn hợp dung dịch cho tới khi kết tủa trắng hoà tan hết. Pha loãng hỗn hợp bằng nước cất đến khoảng 100 ml. Thêm vào hỗn hợp 30 ml dung dịch amoni nitrat 35% và 20 ml dung dịch axit nitric 25%, đun nóng hỗn hợp dung dịch đến nhiệt độ $70-80^\circ\text{C}$. Giữ ở nhiệt độ này, vừa khuấy vừa cho từ từ 50 ml dung dịch amoni molipdat 3% sao cho nhiệt độ của hỗn hợp hầu như không thay đổi. Khuấy mạnh dung dịch rồi để yên cho tới khi kết tủa lắng xuống hoàn toàn. Lọc dung dịch qua giấy lọc có tàn (giấy lọc thường). Rửa kết tủa 3 -4 lần bằng dung dịch axit nitric 1%. Dùng 15 ml dung dịch amoni hydroxit 25% để hoà tan kết tủa, rửa giấy lọc bằng nước cất cho đến khi hết phản ứng kiềm. Thêm vào dung dịch thu được vài giọt phenolphtalein 1% và trung hoà bằng axit clohydric 6N cho tới khi mất màu chỉ thị. Thêm vào 15ml dung dịch amoni nitrat 35% và cho từng giọt amoni hydroxit 25% cho đến khi dung dịch hỗn hợp có màu hồng. Cho từ từ 35 ml dung dịch hỗn hợp magiê vào dung dịch hỗn hợp trên, vừa đổ vừa khuấy đến khi xuất hiện kết tủa. Sau vài phút thêm 25 ml dung dịch amoni hydroxit 25%, khuấy liên tục trong 30 phút và sau đó để lắng kết tủa khoảng 2 giờ. Lọc kết tủa bằng giấy lọc không có tàn (băng xanh). Rửa kết tủa lọc được bằng dung dịch amoni hydroxit 2,5% cho đến khi hết phản ứng của ion clorua (Cl^-). Kiểm tra sự hiện diện của ion clorua bằng dung dịch bạc nitrat. Chuyển kết tủa và giấy lọc vào chén sứ (trước đó đã được nung đến khối lượng không đổi). Sấy khô, tro hoá giấy lọc và nung ở nhiệt độ $950 - 1000^\circ\text{C}$ cho tới khi có khối lượng không đổi (khoảng 2 giờ). Để nguội đến nhiệt độ phòng và cân.

4.2.4. Tính kết quả

Hàm lượng diphospho pentoxit (P_2O_5) hữu hiệu (X_1) tính bằng phần trăm, theo công thức:

$$X_1 = \frac{a \times 0,6379 \times 50}{10 \times m}$$

Trong đó:

- a là khối lượng kết tủa sau khi nung, tính bằng gam;
- m là khối lượng mẫu, tính bằng gam;
- 0,6379 là hệ số tính chuyển ra P_2O_5 từ lượng $Mg_2P_2O_7$ thu được sau khi nung.

Chênh lệch cho phép giữa hai kết quả xác định song song không quá 0,3% giá trị tuyệt đối.

4.3 Xác định hàm lượng diphospho pentoxit (P_2O_5) hữu hiệu bằng phương pháp thể tích (phương pháp nhanh).

4.3.1 Nguyên tắc của phương pháp

Hoà tan phân lân canxi magiê bằng dung dịch axit xitric 2%. Kết tủa ion photphat bằng amoni molipdat trong môi trường axit nitric. Hoà tan kết tủa bằng natri hydroxit dư, từ lượng natri hydroxit sử dụng để hoà tan kết tủa tính ra hàm lượng diphospho pentoxit (P_2O_5) hữu hiệu.

4.3.2 Hóa Chất.

- Axit xitric, dung dịch 2%;
- Axit nitric dung dịch 6N;
- Axit sunfuric, dung dịch 0,1N;
- Kali nitrat, dung dịch 1%;
- Amoni hydroxit, dung dịch 6N;
- Natri hydroxit, dung dịch 0,3 N;
- Phenolphthalein, dung dịch 1% trong rượu etylic.

Hỗn hợp amoni milipdat: cân 27g amoni nitrat, 26,3g axit xitric, 34 g amoni molipdat, hòa tan vào 832 ml nước. Khuấy đều để hỗn hợp trên tan hoàn toàn, sau đó cho 127 ml axit nitric đặc ($d=1,4$) vào đun sôi, nhỏ 1-2 giọt diamoni hydrophotphat 10% để gây mầm kết tủa. Để nguội và lắng trong 24 giờ, lọc qua phễu khô bằng giấy lọc băng đỏ (hoặc bông sạch).

4.3.3. Cách tiến hành

Cân khoảng 0,5 g (chính xác đến 0,0002g) phân lân canxi magiê đã được nghiền mịn và rây qua rây 0,08 mm. Cho mẫu cân vào bình nón đã được sấy khô, dung tích 250ml, có nút nhám. Dùng pipet hút 50 ml dung dịch axit xitric 2% cho vào bình.

Dùng máy hoặc tay, lắc kỹ ít nhất trong 30 phút sao cho toàn bộ mẫu tan hết. Lọc dung dịch qua phễu khô và giấy lọc nhanh vào bình khô có dung tích 100 ml.

Hút 10 ml dung dịch lọc cho vào cốc dung tích 250 ml thêm vào 5 ml axit nitric 6N, đun nóng đến 80°C trên bếp điện, sau đó lấy cốc ra dùng dung dịch amoni hydroxit 6N nhỏ vào cho đến khi xuất hiện kết tủa. Dùng dung dịch axit nitric 6N nhỏ vào đến khi kết tủa tan hết. Thêm vào 20 ml nước cất, đun dung dịch đến sôi rồi cho từ từ 40 ml dung dịch hỗn hợp amoni molipdat, khuấy đều và giữ nhiệt độ này trong 2 - 3 phút, lấy cốc ra để nguội đến nhiệt độ phòng, lọc kết tủa bằng giấy lọc băng đỏ hoặc bằng bông thấm nước. Rửa kết tủa bằng dung dịch kali nitrat 1% đến khi hết ion H^+ (cách thử: lấy 3 giọt dung dịch natri hydroxit 0,3 N và 1 giọt phenolphthalein cho vào 25 ml dung dịch nước rửa, nếu dung dịch không mất màu là được).

Cho kết tủa vào cốc vừa kết tủa, dùng pipet hoặc buret nhỏ từ từ một lượng chính xác dung dịch natri hydroxit 0,3N để hoà tan kết tủa. Khi tan hết thêm dư 5 ml dung dịch natri hydroxit 0,3 N nữa để hoà tan hoàn toàn. Ghi thể tích natri hydroxit sử dụng (V_1). Sau đó cho vào 50 ml nước cất đã đun sôi để nguội, thêm 6 giọt phenolphthalein 1%. Dùng dung dịch axit sunfuric 0,1N chuẩn độ đến khi mất màu hồng của chỉ thị. Ghi thể tích axit sunfuric sử dụng (V_2).

4.3.4 Tính kết quả

Hàm lượng diphospho pentoxit (P_2O_5) hữu hiệu (X_1), tính bằng phần trăm, theo công thức:

$$X_1 = \frac{(N_1 V_1 - N_2 V_2) \times 0,003086 \times 50}{10 \times m} \times 100$$

Trong đó:

- N_1 là nồng độ của dung dịch natri hydroxit đã dùng để hoà tan kết tủa;
- V_1 là thể tích dung dịch natri hydroxit 0,3 N đã sử dụng khi hoà tan kết tủa, tính bằng mililit;
- N_2 là nồng độ dung dịch axit sunfuric;
- V_2 là thể tích dung dịch axit sunfuric 0,1 N đã sử dụng khi chuẩn độ, tính bằng mililit;
- m là khối lượng mẫu, tính bằng gam;
- 0,003086 là lượng P_2O_5 tương ứng với 1 ml dung dịch natri hydroxit 0,1N, tính bằng gam.

4.4 Xác định độ ẩm.

4.4.1. Cách tiến hành

Cân khoảng 5g mẫu phân lân canxi magiê (chính xác đến 0,01g) trong chén cân đã sấy khô đến khối lượng không đổi. Sấy trong tủ sấy ở 105-110°C đến khối lượng không đổi (khoảng 1 giờ). Lấy ra để nguội trong bình hút ẩm đến nhiệt độ phòng và đem cân.

4.4.2 Tính kết quả

Độ ẩm W , tính bằng phần trăm, theo công thức:

$$W = \frac{m - m_1}{m} \times 100$$

Trong đó:

m là khối lượng ban đầu của mẫu trước khi sấy, tính bằng gam;

m_1 là khối lượng của mẫu sau khi sấy, tính bằng gam.

4.5. Xác định độ mịn - cỡ hạt

4.5.1 Cách tiến hành

Cân khoảng 250 g mẫu đã sấy khô (chính xác đến 0,1 g). Đổ mẫu lên rây lỗ vuông có cạnh 0,25 mm đối với sản phẩm dạng bột hoặc rây lỗ vuông có cạnh 3 mm đối với sản phẩm dạng hạt. Đẩy nắp rây lại và tiến hành rây đến khi nào không thấy mẫu lọt qua rây thì thôi.

Cân chính xác phần còn lại trên rây.

4.5.2. Tính kết quả

Độ mịn - cỡ hạt (X_2), tính bằng phần trăm, theo công thức:

$$X_2 = \frac{m - m_1}{m} \times 100$$

Trong đó:

m là khối lượng mẫu, tính bằng gam;

m_1 là khối lượng phần còn lại trên rây, tính bằng gam.

5. Bao gói, ghi nhãn, vận chuyển và bảo quản.

5.1. Bao gói.

Phân lân canxi magiê phải được đóng vào bao giấy Kraft hoặc bao PP có tráng PE.

Khối lượng mỗi bao: 20 - 25 - 50 kg hoặc có thể lớn hơn theo yêu cầu của khách hàng.

5.2 Ghi nhãn

Trên mỗi bao phải có nhãn ghi:

- Tên cơ sở sản xuất;
- Tên sản phẩm;
- Dạng sản phẩm;
- Hàm lượng P_2O_5 hữu hiệu;
- Khối lượng bao;
- Số hiệu tiêu chuẩn này.

5.3. Vận chuyển và bảo quản

Khi vận chuyển cũng như khi bảo quản, phải che mưa, nắng cho phân lân. Không được làm rách bao bì.

Kho chứa phân lân phải cao ráo, sạch sẽ.

URÊ NÔNG NGHIỆP - YÊU CẦU KỸ THUẬT

Urea for agriculture- Technical requirements

Soát xét lần 1

TCVN 2619-1994 thay thế cho TCVN 2619 - 78;

TCVN 2619-1994 được xây dựng trên cơ sở tham khảo IS 5406-1979 và IOCT 2081-75;

TCVN 2619-1994 do Trung tâm Tiêu chuẩn - Đo lường - Chất lượng biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn - Đo lường - Chất lượng đề nghị và được Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường ban hành.

Tiêu chuẩn này áp dụng cho urê tổng hợp, dùng làm phân bón trong nông nghiệp.

1. Yêu cầu kỹ thuật

Các chỉ tiêu hoá lý của urê phải phù hợp với các yêu cầu và mức quy định trong bảng sau :

Bảng 1

Tên chỉ tiêu	Mức 1
1. Dạng bên ngoài.	Hạt màu trắng, hoặc hơi ngả vàng không có tạp chất bẩn nhìn thấy được, hoà tan tốt trong nước.
2. Hàm lượng nitơ tính bằng phần trăm khối lượng, không nhỏ hơn	46,0
3. Hàm lượng biurét, tính bằng phần trăm, khối lượng, không lớn hơn	1,5
4. Độ ẩm, tính bằng phần trăm, khối lượng, không lớn hơn	1,0
5. Độ hạt, cỡ từ 1 ÷ 2,5mm, tính bằng phần trăm, không nhỏ hơn	90

2. Bao gói, ghi nhãn, bảo quản và vận chuyển

2.1. Bao bì : Urê được đựng trong các bao bì bằng các loại chất dẻo tổng hợp, đảm bảo giữ được độ ẩm và chịu lực không làm rách vỡ khi vận chuyển.

Khối lượng không bì đựng trong mỗi bao 50 ± 1 kg.

2.2. Nhãn được in trên bao bì, bằng mực không phai, có nội dung sau:

Tên cơ sở sản xuất;

Nhãn hiệu hàng hóa của cơ sở sản xuất và tên giao dịch;

Tên sản phẩm;

Hàm lượng nitơ;

Khối lượng không bì.

- 2.3. Bảo quản urê trong kho khô, sạch, được che mưa nắng.

Bao urê được xếp theo từng lô, khoảng cách giữa các lô không được nhỏ hơn 0,5m, chiều cao không quá 8 bao và không được xếp lẫn với các loại phân bón và hoá chất khác.

- 2.4. Vận chuyển trên các phương tiện phổ thông, được che, phủ mưa, nắng, không được để trực tiếp với sàn ẩm ướt.

URÊ NÔNG NGHIỆP- PHƯƠNG PHÁP THỬ

Urea for agriculture - Method of test

Soát xét lần 1

TCVN 2620-1994 thay thế TCVN 2620-78;

TCVN 2620-1994 được xây dựng trên cơ sở tham khảo ISO 1592-1977, ISO 2754-1973 và SI SEV 2526-80;

TCVN 2620-1994 do Trung tâm Tiêu chuẩn - Đo lường - Chất lượng biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn - Đo lường - Chất lượng đề nghị và được Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường ban hành.

1. Lấy mẫu

1.1. Tuỳ theo yêu cầu cụ thể, có thể lấy mẫu ở kho, trên toa xe, trên dây chuyền sản xuất hoặc tại các điểm bán sản phẩm. Mẫu được lấy theo lô hàng.

1.2. Lấy mẫu trong kho.

Dụng cụ lấy mẫu là một ống kim loại không gỉ, có dạng lòng máng. Dụng cụ lấy mẫu không được làm ảnh hưởng đến chất lượng của urê và có thể lấy được mẫu ở các vị trí tuỳ ý trong bao.

Chọn ngẫu nhiên 1% số bao ở các lớp trên, giữa và dưới lô và tiến hành lấy mẫu ở từng bao với một lượng mẫu sao cho tổng lượng mẫu lấy được ở tất cả các bao không được ít hơn 7kg.

1.3. Lấy mẫu trên toa xe.

Chọn ngẫu nhiên 4-5 toa xe, mỗi toa lấy 3% số bao. Tiến hành lấy mẫu ở từng bao với một lượng mẫu lấy được không ít hơn 7kg.

1.4. Lấy mẫu trên dây chuyền sản xuất.

Mẫu được lấy tự động theo các khoảng thời gian bằng nhau với một lượng mẫu bằng nhau sao cho lượng mẫu lấy được trong một giờ đạt từ 1-3kg.

1.5. Lấy mẫu tại điểm bán sản phẩm.

Tiến hành theo điều 1.2 của tiêu chuẩn này.

- 1.6. Mẫu lấy được đem trộn đều sau đó nhanh chóng rút gọn theo phương pháp chia tư. Bỏ hai phần đối diện, hai phần còn lại trộn đều và lặp lại quá trình trên cho đến khi lượng mẫu hai phần còn lại khoảng 1-2 kg.
- 1.7. Cho mẫu vào hai lọ thủy tinh khô, sạch hoặc bao chất dẻo dán kín. Một lọ hoặc bao đem phân tích, lọ hoặc bao còn lại để lưu. Trên lọ hoặc bao phải dán nhãn ghi rõ:
- Tên cơ sở sản xuất;
Tên sản phẩm;
Lượng mẫu;
Nơi lấy mẫu;
Số hiệu mẫu và lô hàng;
Ngày, tháng lấy mẫu;
Tên và chữ ký người lấy mẫu.
- 1.8. Lô hàng là lượng sản phẩm có cùng chỉ tiêu chất lượng, được chứa trong cùng một loại bao gói và giao nhận trong cùng một đợt. Mỗi lô hàng không quá 200T và phải kèm theo một giấy chứng nhận chất lượng do phòng KCS của cơ sở sản xuất cấp.
- 1.9. Giấy chứng nhận chất lượng phải bao gồm các nội dung sau:
- Tên cơ sở sản xuất;
Tên sản phẩm;
Các chỉ tiêu chất lượng;
Khối lượng lô hàng;
Ngày tháng sản xuất;
Số hiệu tiêu chuẩn.
- 2. Phương pháp thử.**
- 2.1. Quy định chung
- 2.1.1. Nếu không có chỉ dẫn nào khác thuốc thử dùng trong các phép phân tích phải là loại T.K.P.T hoặc tương đương.
- 2.1.2. Nước cất theo TCVN 2117-77 hoặc nước có độ tinh khiết tương đương.
- 2.1.3. Mỗi phép thử phải tiến hành song song trên hai mẫu cân, sai số giữa hai lần xác định song song không được lớn hơn 0,2% giá trị tuyệt đối.
- 2.1.4. Sau khi thử, nếu một trong các chỉ tiêu không đạt tiêu chuẩn thì phải tiến hành phân tích lại với lượng mẫu gấp đôi lấy ở cùng lô hàng, kết quả phân tích lại là kết quả cuối cùng.
- 2.2. Xác định các chỉ tiêu ngoại quan
- Các chỉ tiêu ngoại quan của urê được kiểm tra bằng phương pháp trực quan theo các yêu cầu qui định trong điểm 1 bảng 1 TCVN 2619-1994.

2.3. Xác định hàm lượng nitơ.

2.3.1. Phương pháp thể tích sau khi chưng cất (phương pháp trọng tài).

2.3.1.1. Nguyên tắc của phương pháp.

Biến đổi nitơ trong mẫu thử thành nitơ dưới dạng amoni khi có mặt chất xúc tác bằng cách đun nóng trong dung dịch axit sunfuric đậm đặc. Chưng cất và hấp thụ amoni trong một lượng dung dịch axit sunfuric chuẩn dư và chuẩn độ ngược bằng dung dịch natri hidroxit chuẩn với sự có mặt của chất chỉ thị.

2.3.1.2. Thuốc thử.

- Nước cất;
- Đồng(II) sunfat kết tinh ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$);
- Axit sunfuric, $d = 1,84\text{g/ml}$ tương đương với dung dịch 96% hoặc khoảng 36N;
- Natri hidroxit, dung dịch 450g/l;
- Axit sunfuric, dung dịch chuẩn 0,5N;
- Natri hidroxit, dung dịch chuẩn 0,5N;
- Hỗn hợp chỉ thị trong etanol: Hoà tan 0,1g metyl đỏ trong khoảng 50ml etanol 95% (V/V) và thêm 0,05g metylen xanh. Sau khi hoà tan, pha loãng bằng etanol đến 100ml và khuấy đều.

2.3.1.3. Dụng cụ.

Các dụng cụ trong phòng thí nghiệm và

Bình Kendan, dung tích 500ml có nút đậy thích hợp.

Dụng cụ chưng cất với phần nối được mài hoặc là một dụng cụ bất kỳ đảm bảo chưng cất và hấp thụ một cách định lượng. Ví dụ như dụng cụ đã cho trên hình 1 gồm:

- Bình cất (A) dung tích 1000ml có phần nối được mài
- Đầu tránh bắn (B) có phần nối và có đầu vào và đầu ra song song được lắp với phễu nhỏ giọt (C) dạng hình trụ, dung tích 50ml.
- Ống sinh hàn Libic (D), chiều dài sử dụng khoảng 40mm, khớp với van khoá không mài ở đầu vào và van mài ở đầu ra.
- Bình nón (E) dung tích 500ml, có đui nối được lắp với hai bầu quả lê.
- Kẹp lò xo (F).

2.3.1.4. Chuẩn bị thử.

a) Mẫu thử

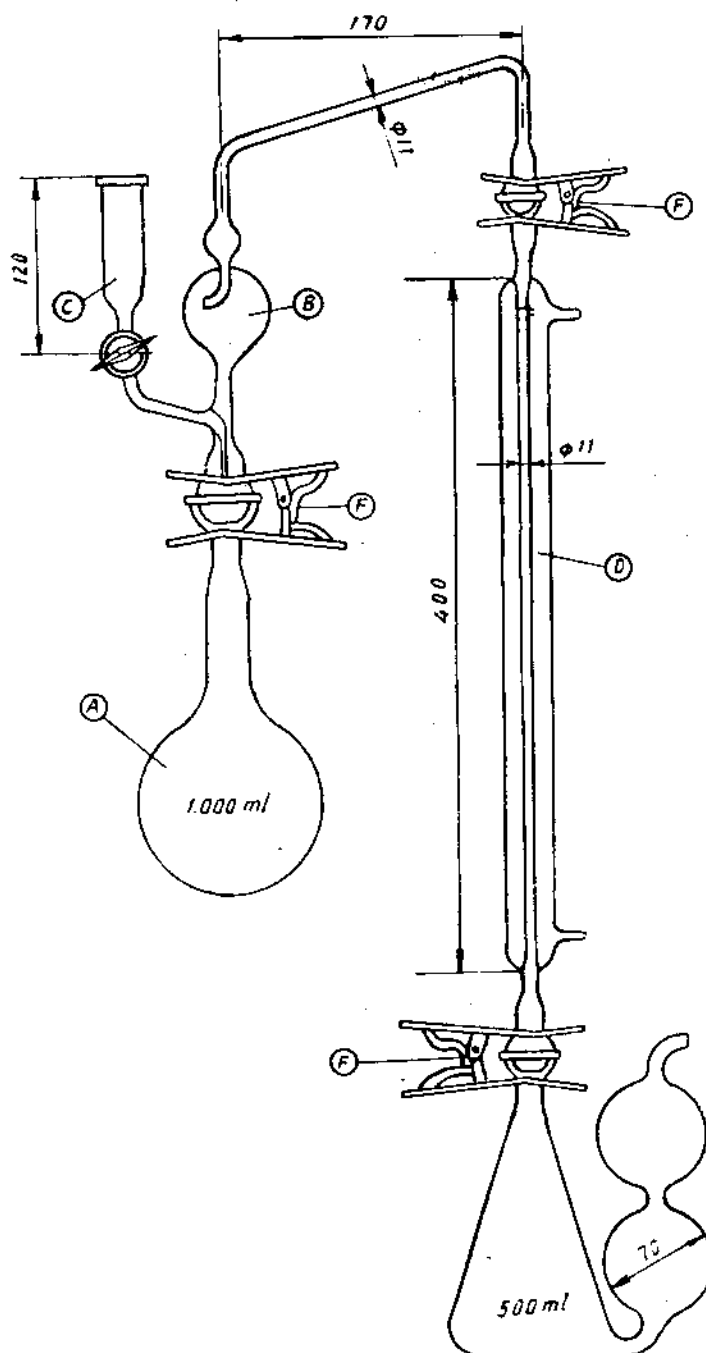
Cân khoảng 5g mẫu thử với độ chính xác 0,001g và cho vào bình Kendan.

b) Mẫu trắng

Tiến hành làm mẫu trắng đồng thời trong cùng một thời gian làm mẫu thử, theo cùng một trình tự và sử dụng cùng một lượng tất cả các thuốc thử như đã sử dụng khi làm mẫu thử, nhưng không có mẫu thử.

c) Tiến hành xác định.

- Chuẩn bị dung dịch mẫu.



Bình Kendan

Thêm vào bình Kendan (2.3.1.3) chứa mẫu thử (a) 25ml nước, 50 ml dung dịch axit sunfuric ($d=1,84 \text{ g/ml}$) và 0,75 g đồng sunfat. Đặt bình Kendan bằng nút hình quả lê và cẩn thận đun nóng cho đến khi hoà tan toàn bộ cacbon dioxit.

Tăng dần việc đun nóng cho đến khi khói trắng bay lên và tiếp tục đun nóng thêm 20 phút. Để nguội, thêm cẩn thận 300 ml nước, làm nguội và lắc trong suốt quá trình thêm.

Chuyển định lượng dung dịch vào bình định mức dung tích 500ml, pha loãng đến vạch mức và lắc đều.

- Chung cất

Chuyển 50 ml dung dịch mẫu thử trên vào bình chung cất (A). Thêm khoảng 300 ml nước, một vài giọt hỗn hợp chỉ thị và vài viên bi thủy tinh.

Bôi mỡ vào phần nối của dụng cụ. Lắp ống chung cất (B) vào bình (A) và nối với ống sinh hàn (D).

Cho 40ml dung dịch axit sunfuric chuẩn 0,5N, khoảng 80ml nước và vài giọt dung dịch chỉ thị hỗn hợp vào bình (E). Nối bình (E) với ống sinh hàn (D), và đảm bảo rằng tất cả phần nối đều không bị dò khí. Sử dụng kẹp lò xo (F) đối với dụng cụ có ống nối hình cầu.

Dùng phễu nhỏ giọt (C) thêm vào bình (A) một lượng dung dịch natri hidroxit vừa đủ để trung hoà và sau đó thêm dư 25 ml nữa, (giữ lại ít nhất một vài mililít dung dịch trên).

Sau khi sử dụng dụng cụ như đã mô tả ở trên, cất vào bình (E) một lượng dung dịch cất khoảng 250-300ml. Ngừng đun nóng, mở nút phễu nhỏ giọt (C), tháo ống dẫn (B) ra và cẩn thận rửa ống sinh hàn (D), thu nước rửa vào bình (E). Cuối cùng, tháo bình thu hồi (E) ra.

- Chuẩn bị

Lắc cẩn thận dung dịch chứa trong bình thu hồi (E) và trong hai bầu quả lê ở bên và chuẩn độ ngược lượng dư dung dịch axit sunfuric chuẩn với dung dịch natri hidroxit chuẩn 0,5 N cho đến lúc chỉ thị chuyển màu.

Trong suốt quá trình chuẩn độ phải cẩn thận lắc bình để đảm bảo rằng dung dịch hoàn toàn được lắc đều.

2.3.1.5. Tính toán kết quả

Hàm lượng nitơ (X_1) được tính bằng phần trăm khối lượng theo công thức:

$$X_1 = (V_1 - V_2) \times 0,007004 \times \frac{500}{50} \times \frac{100}{m}$$

$$X_1 = \frac{7,004(V_1 - V_2)}{m}$$

Trong đó:

V_1 - thể tích dung dịch natri hidroxit chuẩn dùng để chuẩn độ ngược lượng dư dung dịch axit sunfuric chuẩn đã cho vào bình (E) để thử nghiệm mẫu trắng, tính bằng ml;

V_2 - thể tích dung dịch natri hidroxit chuẩn dùng để chuẩn độ ngược lượng dư dung dịch axit sunfuric chuẩn đã cho vào bình (E) để xác định, tính bằng ml;

m - khối lượng mẫu thử, tính bằng g;

0,007004- khối lượng nitơ tương ứng với 1ml dung dịch axit sunfuric đúng 0,5 N, tính bằng g.

Chú thích: Nếu nồng độ của dung dịch natri hidroxit chuẩn không đúng với qui định về thuốc thử, phải tiến hành điều chỉnh lại nồng độ cho thích hợp.

2.3.2. Phương pháp thể tích sử dụng foxmandehyt

2.3.2.1. Dung dịch và thuốc thử

Axit sunfuric, dung dịch 0,5 N;

Foxmandehyt, dung dịch 25%;

Phenolphtalein, dung dịch 1% trong etanol;

Metyl đỏ, dung dịch 0,1%.

2.3.2.2. Tiến hành thử

Cân 5g mẫu với độ chính xác đến 0,0001g, hoà tan trong bình định mức 250ml với một ít nước cất, thêm đến vạch mức, lắc đều. Dùng pipet lấy 20 ml cho vào bình nón dung tích 250ml thêm 3ml axit sunfuric đậm đặc, lắc đều. Đặt bình bằng phễu lọc đuôi ngắn và đặt lên bếp điện có lưới amiăng, đun cẩn thận cho đến khi bọt khí CO_2 ngừng bay ra và đồng thời xuất hiện khí lưu huỳnh trioxit bay ra.

Để yên 5-10 phút, lấy bình ra để nguội đến nhiệt độ phòng rồi thêm 2-3 giọt chỉ thị metyl đỏ, lắc nhẹ bình, dùng natri hidroxit 5N trung hoà cho đến khi dung dịch chuyển sang màu vàng. Sau đó dùng axit sunfuric 0,5N chuẩn độ ngược cho đến khi dung dịch chuyển sang màu hồng nhạt. Thêm vào 15 ÷ 20ml dung dịch foxmandehyt trung tính và 5 giọt chỉ thị phenolphtalein, lắc đều và để yên 1-2 phút.

Dùng natri hidroxit 0,5N chuẩn độ cho đến khi dung dịch có màu hồng nhạt không biến mất sau 5 phút.

Hàm lượng nitơ (X_1) qui ra gốc khô, tính bằng phần trăm khối lượng theo công thức:

$$X_1 = \frac{V.N.0,01401.250.k}{G.20 \frac{100 - X_3}{100}}$$

Trong đó:

V - thể tích natri hidroxit 0,5N tiêu hao khi chuẩn độ;

k - hệ số hiệu chỉnh nồng độ của natri hidroxit theo 0,5N;

0,01401- lượng nitơ tương ứng với 1ml dung dịch natri hidroxit 0,5N;

G- lượng mẫu thử, tính bằng gam;

X₃- độ ẩm của urê, tính bằng %.

2.4. Xác định hàm lượng biuret.

2.4.1. Nguyên tắc của phương pháp.

Tạo phức màu tím đỏ giữa biuret và đồng sunfat khi có mặt dung dịch bazơ kali- natri tactrat. Đo màu của phức chất tạo thành ở bước sóng 550 nm.

Nếu trong phần dung dịch lấy để thử có một lượng muối amoni tính chuyển ra NH₃ lớn hơn 15mg; phải tiến hành loại nó trước khi xác định.

2.4.2. Thuốc thử

- Nước cất mới đun sôi và để nguội;
- Đồng sunfat, dung dịch 15g/l;
- Hoà tan 15g đồng (II) sunfat ngậm 5 phân tử nước (CuSO₄.5H₂O) vào nước; pha loãng tới 1000ml và lắc đều.
- Kali-natri tactrat, dung dịch bazơ 50g/l: hoà tan 50,0g kali-natri tactrat ngậm 4 phân tử nước (NaKH₄O₆.4H₂O) vào nước; thêm 40 g natri hidroxit đã rửa sơ bộ lớp ngoài, pha loãng tới 1000ml và lắc đều.
- Axit sunfuric, dung dịch 0,1N;
- Natri hidroxit, dung dịch 0,1N;
- Biuret, dung dịch tiêu chuẩn 2,00g/l.

a) Làm sạch biuret:

Rửa biuret bằng dung dịch amoni hidroxit 100g/l và bằng nước cho đến khi ion amoni được khử; loại nước bằng cách rửa axeton và cuối cùng sấy khô biuret ở khoảng 105 °C.

b) Chuẩn bị dung dịch tiêu chuẩn.

Cân 1g biuret đã được làm sạch ở mục a) với độ chính xác 0,001g. Hoà tan vào 450ml nước và điều chỉnh pH của dung dịch đến 7 bằng cách thêm hoặc là dung dịch axit sunfuric 0,1N hoặc là dung dịch natri hidroxit 0,1N. Dùng giấy chỉ thị để kiểm tra độ pH. Chuyển hết dung dịch vào bình định mức dung tích 500ml, pha loãng tới vạch mức, lắc đều.

1ml dung dịch tiêu chuẩn này chứa 2,00mg biuret.

- Giấy chỉ thị xanh bromothymol hoặc giấy chỉ thị có pH trong khoảng 6-8.

2.4.3. Dụng cụ.

Các dụng cụ thường dùng trong phòng thí nghiệm và:

- Bình cách thủy đã được điều chỉnh nhiệt độ ở 25 ± 1°C;

- Máy so màu đơn sắc hoặc
- Máy so màu thường.

2.4.4. Quá trình xác định

2.4.4.1. Mẫu thử

Cân 50g mẫu thử với độ chính xác 0,01g.

2.4.4.2. Mẫu trắng

Là một mẫu trắng song song với mẫu thử, sử dụng lượng thuốc thử và thứ tự cho các thuốc thử như đối với mẫu thử.

2.4.4.3. Chuẩn bị đường cong chuẩn

a) Chuẩn bị dung dịch tiêu chuẩn để so màu với cuvet 4 hoặc 5cm.

Cho vào 6 bình định mức dung tích 100ml một lượng dung dịch biuret tiêu chuẩn như đã cho trong bảng 1.

Bảng 1

Lượng dung dịch biuret tiêu chuẩn, ml	Khối lượng biuret tương đương, mg
0*	0
0,50	1
5,0	10
15,0	30
25,0	50
40,0	80

Chú thích:* Dung dịch so sánh.

Thêm vào mỗi bình trước hết là một lượng nước cần thiết để có thể tích khoảng 50ml; thêm 20 ml dung dịch kali-natri tetrat và 20ml dung dịch đồng sunfat. Pha loãng tới vạch mức và lắc đều. Nhúng bình vào bình cách thủy đã được điều chỉnh nhiệt độ ở $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ và giữ ở đó khoảng 20 phút và thỉnh thoảng lại lắc đều.

b) Tiến hành so màu

Sau khi để không quá 30 phút, tiến hành so màu trên máy so màu thường ở bước sóng khoảng 550nm hoặc trên máy so màu đơn sắc với kích lọc thích hợp, sau khi đã điều chỉnh thiết bị trên về vị trí 0 so với dung dịch so sánh.

c) Xây dựng đồ thị chuẩn.

Lập đồ thị, đặt trên trục hoành số mg biuret có trong 100ml dung dịch biuret tiêu chuẩn, còn đặt trên trục tung giá trị tương ứng của mật độ quang.

d) Tiến hành xác định

- Chuẩn bị dung dịch thử

Cho mẫu thử vào cốc có dung tích thích hợp (ví dụ, 400ml) và hoà tan mẫu trong khoảng 100ml nước. Điều chỉnh pH đến 7 bằng cách thêm hoặc là dung dịch axit sunfuric 0,1N hoặc là dung dịch natri hidroxit 0,1N và dùng giấy chỉ thị để kiểm tra độ pH.

Chuyển định lượng dung dịch vào bình định mức dung tích 250ml, pha loãng đến vạch mức và lắc đều.

- Hiện màu

Lấy chính xác một lượng dung dịch thử có chứa khoảng 10-80 mg biuret vào bình định mức dung tích 100ml. Sau đó thêm vào 20ml dung dịch kali-natri tactrat và 20 ml dung dịch đồng sunfat, sau mỗi lần thêm phải lắc đều dung dịch chứa trong bình. Pha loãng tới vạch mức và lắc đều. Nhúng bình vào bình cách thuỷ đã được điều chỉnh nhiệt độ ở $25 \pm 1^\circ\text{C}$ và giữ ở nhiệt độ đó trong khoảng 20 phút.

- So màu

Tiến hành so màu với mẫu thử và mẫu trắng theo qui trình của mục b) sau khi đã điều chỉnh thiết bị đo tới điểm 0 so với nước.

Chú thích:

- Nếu dung dịch thử bị đục hoặc có màu, lấy một lượng dung dịch thích hợp để hiện màu và thực hiện quá trình như đã nêu trên nhưng không thêm đồng sunfat. Sử dụng dung dịch này để điều chỉnh thiết bị đo về điểm 0 và tiến hành so màu dung dịch thử.

- Nếu dung dịch thử bị đục thì trước khi điều chỉnh pH, tiến hành xử lý như sau:

Thêm vào dung dịch 2ml dung dịch axit clohidric nồng độ N, lắc thật mạnh và lọc dưới điều kiện áp suất thấp (chân không) qua phễu thuỷ tinh xốp (kích thước lỗ giữa 5 và 15 μm). Rửa giấy lọc và cốc bằng một ít nước, thu định lượng dịch lọc vào cốc và tiến hành điều chỉnh pH và pha loãng như đã nêu ở trong mục 2 của phần "chuẩn bị dung dịch thử".

2.4.5. Tính toán kết quả

Dựa vào đồ thị chuẩn (mục c), tìm hàm lượng biuret tương ứng với giá trị mật độ quang đo được.

Hàm lượng biuret $[(\text{NH}_2\text{CO})_2\text{NH}](\text{X}_2)$ được tính bằng phần trăm khối lượng, theo công thức:

$$X_2 = \frac{(m_1 - m_2) \times D \times 100}{m_0}$$

Trong đó:

D- tỷ số giữa thể tích dung dịch thử và thể tích dung dịch lấy để xác định;

m_0 - khối lượng mẫu thử, tính bằng g;

m_1 - khối lượng biuret có trong dung dịch lấy để thử, tính bằng g;

m_2 - khối lượng biuret tương ứng với lượng dung dịch lấy để làm mẫu trắng, tính bằng g.

2.4.6. Trường hợp đặc biệt

Khi trong phần dung dịch lấy để thử có chứa một lượng muối amoni tính chuyển ra NH_3 lớn hơn 15 mg.

Chú thích: Có thể xác định hàm lượng muối amoni bằng cách đo sự biến đổi giá trị pH với sự có mặt foxmandehyt. Nếu phép đo tiêu tốn hết hơn 90 ml dung dịch natri hidroxit 0,05N và lượng urê chứa trong phần dung dịch lấy để thử lớn hơn 10g, phải tiến hành xử lý theo các qui định ở điều 2.4.6.

2.4.6.1. Nguyên tắc

Loại amoniac bằng cách trao đổi cation trên nhựa ion.

Xác định hàm lượng biuret trong nước giải hấp theo phương pháp đã nêu trên.

2.4.6.2. Thuốc thử

Theo điều 2.4.2 và nhựa trao đổi cation loại mạnh, ví dụ các loại nhựa DOWEX 50 và AMBERLITE I-R 120 hoặc tương đương là hoàn toàn thích hợp với yêu cầu trên.

2.4.6.3. Dụng cụ

Theo điều 2.4.3. và cột trao đổi có lắp khoá ở phía cuối, cao 320 mm; đường kính ngoài 8mm.

2.4.6.4. Quá trình xác định

a) Mẫu thử

Cân 20g mẫu thử chính xác đến 0,01g

b) Mẫu trắng

Tiến hành theo mục 2.4.4.2

c) Chuẩn bị đường cong chuẩn

Tiến hành theo mục 2.4.4.3.

d) Tiến hành xác định

- Xử lý nhựa trao đổi

Chế hoá 100g nhựa trao đổi (2.4.6.2) bằng cách gạn 4 lần với axit clohidric 4N, mỗi lần 250ml và sau đó rửa lại với 1000ml nước.

- Chuẩn bị cột trao đổi

Cho lượng nhựa trao đổi trên vào cột (2.4.6.3) đến chiều cao 200mm, rửa và nạp nước vào cột cho đến khi mực nước cao hơn nhựa 5mm.

- Chuẩn bị dung dịch thử

Cho mẫu thử a) vào cốc có dung tích thích hợp (ví dụ 200ml), hoà tan vào khoảng 50ml nước.

Cho dung dịch chảy qua cột đã chuẩn bị ở mục d) với tốc độ 150ml/h. Thu lấy dịch giải hấp vào bình định mức dung tích 250ml. Dùng nước rửa nhựa cho đến khi tổng thể tích thu được khoảng 220ml. Khử axit trong dung dịch giải hấp bằng cách thêm vào dung

địch natri hidroxít 0,1N cho đến pH=7 thử theo giấy chỉ thị. Pha loãng bằng nước đến vạch mức, lắc đều.

- Hiện màu.

Tiến hành theo mục d) của điều 2.4.4.3 (phần hiện màu):

- So màu

Tiến hành theo mục d) của điều 2.4.4.3 (phần so màu).

- Tính toán kết quả

Theo điều 2.4.5.

2.5. Xác định độ ẩm.

2.5.1. Dụng cụ và thiết bị.

- Tủ sấy, điều chỉnh được nhiệt độ 50-110°C;
- Cân phân tích có độ chính xác đến 0,0002g;
- Bình hút ẩm;
- Chén cân.

2.5.2 Tiến hành thử.

Cân 5g mẫu thử với độ chính xác đến 0,0002g cho vào chén thuỷ tinh hoặc chén sứ có nắp đã được sấy ở nhiệt độ 105-110°C đến khối lượng không đổi và cân chính xác đến 0,0002g.

Cho chén có chứa mẫu vào tủ sấy, sấy ở nhiệt độ 70±2°C đến khối lượng không đổi (khoảng 2 giờ). Đậy nắp chén, lấy chén ra cho vào bình hút ẩm để nguội đến nhiệt độ phòng rồi đem cân với độ chính xác.

2.5.3 Tính kết quả

Độ ẩm của urê (X₃), được tính bằng phần trăm khối lượng, theo công thức:

$$X_3 = \frac{m_1 - m_2}{m} \times 100$$

Trong đó:

m₁- khối lượng của mẫu và chén trước khi sấy, tính bằng g;

m₂- khối lượng của mẫu và chén sau khi sấy, tính bằng g;

m- khối lượng mẫu thử, tính bằng g.

2.6. Xác định cỡ hạt

Tiến hành xác định theo TCVN 4853- 89 và thêm các qui định sau:

2.6.1. Mẫu thử

Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu theo phần 1 TCVN 2620-1994

2.6.2. Thiết bị thử

- Máy sàng theo TCVN 4853-89;
- Sàng có lỗ vuông kích thước lỗ 1,0mm và 2,5mm;
- Cân kỹ thuật sai số không quá 0,1g.

2.6.3. Tiến hành thử

Cân khoảng 200g mẫu với sai số không quá 0,1g và cho vào sàng trên máy, hoặc bằng tay. Tiến hành sàng trong khoảng thời gian 30s trên máy hoặc cho đến khi hết bụi nếu sàng bằng tay. Sau khi sàng, cân phần mẫu đã lọt qua sàng kích thước lỗ 2,5mm và còn lại trên sàng kích thước lỗ 1,0mm, với sai số không quá 0,1g.

2.6.4. Tính toán kết quả

Cỡ hạt của urê từ 1,0÷2,5mm (X_4) được tính bằng phần trăm khối lượng theo công thức:

$$X_4 = \frac{m_1 \cdot 100}{m}$$

Trong đó:

m- khối lượng mẫu thử, g;

m_1 - khối lượng mẫu thử lọt qua sàng kích thước lỗ 2,5mm và còn lại trên sàng kích thước lỗ 1,0mm.

2.6.5. Kết quả cuối cùng của phép thử là giá trị trung bình cộng của hai lần xác định song song có độ lệch không quá 1% giá trị tuyệt đối.

SUPE PHOT PHÁT ĐƠN*Simple superphosphate*

Tiêu chuẩn này thay thế cho TCVN 1447-73 và TCVN 1448-73, áp dụng cho supe phot phát đơn, sản xuất bằng phương pháp phân hủy quặng apatit (theo TCVN 4296-86) với axit sunfuric, dùng làm phân bón trong nông nghiệp.

1. Yêu cầu kỹ thuật

Các chỉ tiêu hóa lý của supe phot phát đơn phải phù hợp với các mức qui định trong bảng:

Tên chỉ tiêu	Mức
1. Dạng bề ngoài	Khô, mịn, không kết khối thành cục
2. Hàm lượng anhydrit photphoric (P_2O_5) hữu hiệu (gồm phần tan trong nước và trong xitrat), tính bằng %, không nhỏ hơn....	16,5
3. Hàm lượng axit tự do (tính chuyển ra P_2O_5), tính bằng %, không lớn hơn...	4,0
4. Độ ẩm, tính bằng %, không lớn hơn...	13,0

2. Phương pháp thử**2.1. Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu**

Tiến hành lấy mẫu tại lô hàng, ô tô hoặc toa tàu hỏa theo TCVN 1694-75, với hệ số chính xác $a=0,32$.

Dùng xiên để tiến hành lấy mẫu. Trên mỗi lô hàng, toa, hoặc mỗi ô tô lấy mẫu không ít hơn 7 điểm.

Khối lượng tổng cộng của mẫu lấy được ở mỗi lô hàng, toa hoặc ô tô ít nhất là 3,5 kg.

Gộp chung các mẫu đã lấy được. Trộn đều và rút gọn theo phương pháp chia tư đến khoảng 600-700g (mẫu trung bình). Trộn đều mẫu trung bình chia thành ba phần bằng nhau rồi cho vào ba lọ thủy tinh khô, sạch, có nút đậy kín hoặc túi polyetylen dán kín để phân tích; để đưa cho khách hàng và để lưu ít nhất ba tháng, lúc cần đưa ra phân tích trọng tài. Nhãn trên lọ, túi đựng mẫu trung bình được ghi theo TCVN 1694-75.

Quyết định ban hành số: 370/QĐ ngày 1 tháng 8 năm 1987 của Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước. Có hiệu lực từ 1-7-1988.

SUPE PHOT PHÁT ĐƠN*Simple superphosphate*

Tiêu chuẩn này thay thế cho TCVN 1447-73 và TCVN 1448-73, áp dụng cho supe phot phát đơn, sản xuất bằng phương pháp phân hủy quặng apatit (theo TCVN 4296-86) với axit sunfuric, dùng làm phân bón trong nông nghiệp.

1. Yêu cầu kỹ thuật

Các chỉ tiêu hóa lý của supe phot phát đơn phải phù hợp với các mức qui định trong bảng:

Tên chỉ tiêu	Mức
1. Dạng bề ngoài	Khô, mịn, không kết khối thành cục
2. Hàm lượng anhydrit photphoric (P_2O_5) hữu hiệu (gồm phần tan trong nước và trong xitrat), tính bằng %, không nhỏ hơn....	16,5
3. Hàm lượng axit tự do (tính chuyển ra P_2O_5), tính bằng %, không lớn hơn...	4,0
4. Độ ẩm, tính bằng %, không lớn hơn...	13,0

2. Phương pháp thử**2.1. Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu**

Tiến hành lấy mẫu tại lô hàng, ô tô hoặc toa tàu hỏa theo TCVN 1694-75, với hệ số chính xác $a=0,32$.

Dùng xiên để tiến hành lấy mẫu. Trên mỗi lô hàng, toa, hoặc mỗi ô tô lấy mẫu không ít hơn 7 điểm.

Khối lượng tổng cộng của mẫu lấy được ở mỗi lô hàng, toa hoặc ô tô ít nhất là 3,5 kg.

Gộp chung các mẫu đã lấy được. Trộn đều và rút gọn theo phương pháp chia tư đến khoảng 600-700g (mẫu trung bình). Trộn đều mẫu trung bình chia thành ba phần bằng nhau rồi cho vào ba lọ thủy tinh khô, sạch, có nút đậy kín hoặc túi polyetylen dán kín để phân tích; để đưa cho khách hàng và để lưu ít nhất ba tháng, lúc cần đưa ra phân tích trọng tài. Nhãn trên lọ, túi đựng mẫu trung bình được ghi theo TCVN 1694-75.

Quyết định ban hành số: 370/QĐ ngày 1 tháng 8 năm 1987 của Ủy ban Khoa học và Kỹ thuật Nhà nước. Có hiệu lực từ 1-7-1988.

- 2.2. Các thuốc thử dùng để phân tích, nếu không có qui định gì khác, thì phải dùng loại tinh khiết hóa học (TKHH) hoặc tinh khiết để phân tích (TKPT).
- 2.3. Nước cất theo TCVN 2117-77.
- 2.4. Các phép xác định phải tiến hành song song trên hai lượng cân mẫu thử. Sai lệch cho phép giữa hai kết quả thử không được quá 0,2%. Nếu sai lệch vượt quá qui định cho phép phải tiến hành xác định lại lần thứ hai.
- 2.5. Xác định dạng bề ngoài
Dùng mắt thường để xác định dạng ngoài của supe photphat đơn.
- 2.6. Xác định hàm lượng anhydrit photphoric hữu hiệu.
- 2.6.1. Dung dịch và thuốc thử
Axit xitric;
Amoni clorua tinh thể theo TCVN 2841-79;
Amoni hydroxit, dung dịch: 2,5%; 10%; và 25%, chuẩn bị theo TCVN 1055-86;
Axit clohydric, $d=1,19$ theo TCVN 2298-78;
Magie clorua tinh thể, theo TCVN 3739-82;
Axit sunfuric, dung dịch 0,1 N, chuẩn bị theo TCVN 1055-85;
Metyla da cam, dung dịch 0,1%;
Phenolftalein, dung dịch 1% trong etanola.
- 2.6.2. Chuẩn bị dung dịch

Dung dịch Petecman (thuốc thử 1), trong mỗi lít dung dịch Petecman cần phải có 173g axit xitric và 42 g nitơ dưới dạng amoni (NH_4^+), chuẩn bị như sau:

Dung dịch amoni hydroxit 10-12% (dung dịch 1) được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch amoni hydroxit 25% thành hai lần. Dùng phương pháp chuẩn độ để xác định hàm lượng nitơ trong dung dịch 1. Dùng pipet lấy 10ml dung dịch 1 cho vào bình định mức 500ml đã chứa sẵn 400-450ml nước cất; thêm nước cất đến vạch mức và lắc đều (dung dịch 2). Lấy vào 3 bình nón dung tích 250 ml mỗi bình 25ml dung dịch thêm vào mỗi bình 25ml nước cất và dùng dung dịch axit sunfuric 0,1 N chuẩn độ với chỉ thị metyla da cam cho đến khi xuất hiện màu hồng.

Lượng dung dịch amoni hydroxit 10-12% (X_1) cần thiết để chuẩn bị V_1 lít dung dịch Petecman (thuốc thử 1) tính bằng lít, xác định theo công thức:

$$X_1 = \frac{42.10.V_1}{V.0,0014.20.1000} = \frac{15.V_1}{V}$$

Trong đó:

V- thể tích dung dịch axit sunfuric 0,1N đã dùng để chuẩn độ 25ml dung dịch 2, tính bằng ml;

V_1 - lượng dung dịch Petecman định chuẩn bị, tính bằng lít;

0,0014 - hệ số tính chuyển dung dịch amoni hydroxit 0,1N ra Nito.

Hòa tan $V_1.173$ g axit xitric với một lượng nước tương ứng (200-300) ml. Làm lạnh dung dịch rồi rót vào X_1 dung dịch 1, vừa rót vừa làm lạnh sao cho nhiệt độ dung dịch xấp xỉ nhiệt độ phòng. Thêm nước cất vào dung dịch vừa nhận được đến V_1 lít, lắc đều; để yên hai ngày rồi lọc. Dung dịch hỗn hợp magiê (thuốc thử 2); chuẩn bị như sau:

Cân 55 g magiê clorua và 70 g amoni clorua với độ chính xác đến 0,01g, hòa tan vào 500ml nước cất, thêm 250ml dung dịch amoni hydroxit 10%; sau đó thêm nước cất đến 1 lít, lắc đều và lọc.

Amoni xitrat, dung dịch 50% (thuốc thử 3), chuẩn bị như sau:

Cân 500g axit xitric với độ chính xác đến 0,01 g, hòa tan vào 500ml dung dịch amoni hydroxit 25% đến phản ứng trung tính, thêm nước cất đến 1lít, lắc đều và lọc.

2.6.3. Tiến hành xác định

Cân 2,5 g mẫu với độ chính xác đến 0,0002 g cho vào cối sứ hoặc cối thủy tinh, nghiền nhỏ. Thêm vào 25ml nước cất và nghiền tiếp. Để lắng, sau đó gạn phần lỏng ở trên lên giấy lọc dày vào bình định mức dung tích 250ml (bình A) đã chứa sẵn 5-6ml axit clohydric. Phân bã tiếp tục nghiền như trên khoảng 3-4 lần nữa. Sau mỗi lần nghiền, tiến hành gạn và lọc như trên. Cuối cùng chuyển toàn bộ phần bã trong cối lên giấy lọc và dùng nước cất để rửa (lượng nước cất rửa khoảng 100ml). Thêm nước cất đến vạch mức (dung dịch A)

Chuyển phân bã và giấy lọc vào một bình định mức khác dung tích 250ml (bình B). Thêm vào đó 100ml dung dịch Petecman (thuốc thử 1). Đậy nút kín và lắc đều cho đến khi giấy lọc nát vụn ra thành từng sợi. Đặt bình B vào máy điều hòa nhiệt có nhiệt độ $60 \pm 1^\circ\text{C}$ trong 30 phút. Trong quá trình gia nhiệt cần phải lắc hoặc khuấy dung dịch chứa trong bình. Nếu không có điều kiện lắc hoặc khuấy thì sau 15 phút, lấy bình ra lắc kỹ và lại tiếp tục gia nhiệt thêm khoảng 15 phút nữa. Sau đó lấy bình ra, để nguội, thêm nước cất đến vạch mức, lắc đều và lọc qua giấy lọc khô và gấp nhiều lần. Bỏ phần lọc đầu đi.

Dùng pipet lấy ở bình A và bình B mỗi bình 50ml, cho vào cốc dung tích 250ml, thêm vào 25ml dung dịch petecman (thuốc thử 1) hoặc 8-10ml dung dịch amoni xitrat (thuốc thử 3), khuấy đều. Dùng dung dịch amoni hydroxit 25% trung hòa với chỉ thị phenolftalein. Sau đó thêm vào 25-30ml dung dịch hỗn hợp magiê (thuốc thử 2) và 10ml dung dịch amoni hydroxit 25%. Khuấy đều dung dịch trong 30 phút và để yên dung dịch từ 30-60 phút, rồi lọc.

Lọc kết tủa qua giấy lọc dày không tàn và rửa bằng dung dịch amoni hydroxit 2,5% (lượng dung dịch rửa khoảng 100ml). Chuyển kết tủa và giấy lọc vào chén nung, sấy, tro hóa và nung ở nhiệt độ $950-1000^\circ\text{C}$ đến khối lượng không đổi.

2.6.4. Tính kết quả

Hàm lượng anhydrit photphoric hữu hiệu (X_2), tính bằng %, theo công thức:

$$X_2 = \frac{m_1 \cdot 0,6379 \cdot 100}{m \cdot 100} = \frac{319 \cdot m_1}{m}$$

Trong đó:

m_1 - khối lượng kết tủa magiê pirôphôtphat ($Mg_2P_2O_7$) sau khi nung, tính bằng g;

m - khối lượng mẫu cân, tính bằng g;

0,6379- hệ số tính chuyển magiê pirôphôtphat ($Mg_2P_2O_7$) ra diphotpho pentoxit (P_2O_5).

2.7. Xác định hàm lượng axit tự do

2.7.1. Thuốc thử và dung dịch

Natri hydroxit, dung dịch 0,1N hoặc kali hydroxit, dung dịch 0,1N chuẩn bị theo TCVN 1055-86;

Nước cất trung tính (kiểm tra theo chỉ thị dimetyla vàng);

Dimetyla vàng, dung dịch 0,04% trong etanola.

2.7.2. Tiến hành xác định

Cân 10g mẫu với độ chính xác đến 0,01g, cho vào cốc sứ có đường kính 5-7cm, tắm ướt bằng nước cất, nghiền nhỏ. Thêm 10ml nước cất, lại nghiền và gạn phần nước bên trên phễu lọc, cho chảy vào bình định mức dung tích 500ml, làm lại ba mức; tráng phễu, cối bằng nước cất, thêm nước cất đến thể tích khoảng 400-450ml, đậy nút và lắc đều trong 30 phút. Sau đó thêm nước cất đến vạch mức, lắc đều, rồi lọc qua giấy lọc khô. Bỏ phần dung dịch lọc lúc đầu, còn phần sau thu vào bình nón và lấy ra 50ml cho vào bình nón khác có dung tích 250ml đã chứa sẵn 100-150 ml nước cất. Chuẩn độ bằng dung dịch kiềm 0,1N với chỉ thị dimetyla vàng cho đến khi dung dịch chuyển màu vàng sáng.

2.7.3. Tính kết quả

Hàm lượng axit tự do tính chuyển ra P_2O_5 (X_3) tính bằng %, theo công thức:

$$X_3 = \frac{V \cdot 0,0071 \cdot 500 \cdot 100}{m \cdot 50} = \frac{7,1}{m}$$

Trong đó:

V - lượng dung dịch kiềm 0,1N dùng khi chuẩn độ, tính bằng ml;

m - khối lượng mẫu cân, tính bằng g;

0,0071- lượng P_2O_5 tương ứng với 1ml dung dịch natri hydroxit 0,1N, tính bằng g;

2.8. Xác định độ ẩm

2.8.1. Dụng cụ

Chén thủy tinh có nắp, cao 30mm, đường kính 35mm hoặc lớn hơn:

Tủ sấy;

Bình hút ẩm;

Cân phân tích với độ chính xác đến 0,0002g.

2.8.2. Tiến hành xác định

Cân 10g mẫu với độ chính xác đến 0,01 g và cho vào chén thủy tinh có nắp, đã được sấy ở nhiệt độ 100-105⁰ C và cân đến khối lượng không đổi với độ chính xác đến 0,0002g. Mở nắp chén, để chén và nắp vào tủ sấy có nhiệt độ 100-105⁰ C. Sau 3 giờ, đậy nắp chén lại, lấy ra và làm nguội trong bình hút ẩm đến nhiệt độ phòng rồi đem cân.

2.8.3. Tính kết quả

Độ ẩm của supe photphát đơn (X_d), tính bằng %, theo công thức:

$$X_d = \frac{m - m'}{m} \cdot 100$$

Trong đó:

m- khối lượng mẫu cân trước khi sấy, tính bằng g;

m'- khối lượng mẫu cân sau khi sấy, tính bằng g.

3. Bao gói, vận chuyển và bảo quản.

3.1. Supe photphát đơn cân phải được để ở nơi khô ráo, có mái che.

3.2. Khi bốc dỡ, vận chuyển, cần phải có biện pháp bảo vệ để supe photphát khỏi bị ẩm.

3.3. Supe photphát đơn phải được vận chuyển bằng các phương tiện có che chắn.

3.4. Mỗi lô hàng xuất xưởng cần phải kèm theo một giấy xác nhận chất lượng phù hợp với yêu cầu của tiêu chuẩn này.

Giấy xác nhận chất lượng phải ghi rõ:

Tên nhà máy sản xuất;

Tên sản phẩm;

Các chỉ tiêu hóa lý;

Số hiệu lô hàng;

Khối lượng tịnh và thô;

Ký hiệu và số hiệu tiêu chuẩn này.

PHÂN HỖN HỢP NPK

Phương pháp thử

Mixed fertilizer NPK- Test methods

TCVN 5815-1994 được xây dựng trên cơ sở tham khảo các tiêu chuẩn: ISO 5315-1984 (E), ISO 5318-1983 (E), ST SEV 3369-81; STSEV 1941-79; IOCT 11365-75; IOCT 19691- 84.

TCVN 5815-1994 do Trung tâm Tiêu chuẩn - Đo lường - Chất lượng khu vực I biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn - Đo lường - Chất lượng đề nghị và được Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường ban hành.

1. Qui định chung

1.1. Lấy mẫu

1.1.1. Lấy mẫu và xử lý mẫu theo TCVN 1694-75.

1.1.2. Mẫu gửi đi phân tích và mẫu lưu đóng trong các túi PE dán kín hoặc đựng trong các lọ thủy tinh, lọ nhựa có nút kín, kèm theo phiếu với nội dung:

- Tên sản phẩm;
- Cơ sở sản xuất, địa chỉ;
- Số hiệu lô hàng;
- Nguyên liệu dùng để sản xuất;
- Ngày lấy mẫu.

1.2. Hoá chất dùng để phân tích phải là loại “TKHH” hoặc “TKPT”. Nước dùng để pha chế dung dịch và thử nghiệm phải là nước cất theo TCVN 2717-77 hoặc nước có độ sạch tương đương.

1.3. Các dung dịch nếu không có qui định gì khác là dung dịch trong nước.

2. Xác định hàm lượng nitơ

2.1. Nguyên tắc.

Khử nitơ dạng nitrat chứa trong phân NPK thành amoni bằng bột kim loại crom trong môi trường axit. Chuyển hoá nitơ dạng hữu cơ và urê thành amoni sunfat bằng axit sunfuric và chất xúc tác. Cất amoniac từ dung dịch kiềm và hấp thụ vào một lượng dư

dung dịch chuẩn axit sunfuric. Chuẩn độ lượng axit dư bằng dung dịch chuẩn natri hidroxit với sự có mặt của chất chỉ thị mẫu.

2.2. Hoá chất và thuốc thử.

- Bột kim loại crom, kích thước hạt nhỏ hơn hoặc bằng 250 μ m;
- Đá bọt;
- Chất chống tạo bọt: paraffin hoặc dầu silicon;
- Hỗn hợp xúc tác gồm: 1000g kali sunfat (K_2SO_4) và 100 g đồng (II) sunfat ngâm 5 phân tử nước trộn lẫn, nghiền nhỏ;
- Axit sunfuric, đậm đặc tỷ trọng =1,84 và các dung dịch chuẩn: 0,1N; 0,2N; 0,5N.
- Axit clohidric, tỷ trọng 1,18;
- Natri hidroxit, dung dịch 400g/l và dung dịch chuẩn 0,1N;
- Hỗn hợp chỉ thị: hoà tan 0,1g metyl đỏ vào 50ml cồn etylic thêm 0,05g metylen xanh, lắc cho tan hết, thêm cồn etylic cho đủ 100ml và lắc đều;
- Giấy chỉ thị pH.

2.3. Dụng cụ và thiết bị

Dụng cụ và thiết bị thí nghiệm thông thường;

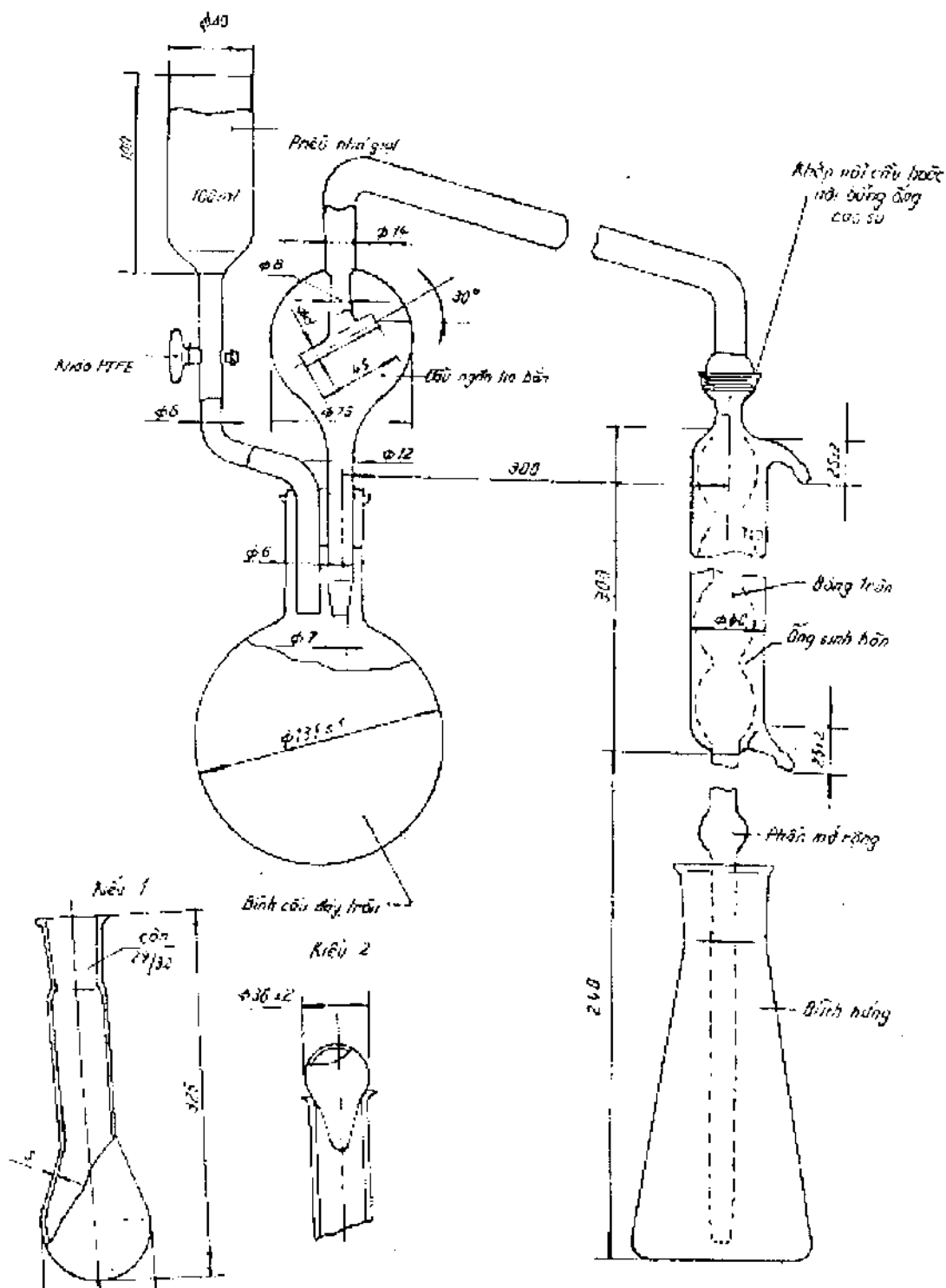
Bình phân hủy mẫu: bình kendan (Kjeldahl) dung tích 500 hoặc 800ml có nút thuỷ tinh rộng hình quả lê hoặc phễu thuỷ tinh nhỏ, khi không dùng bình kendan làm bình chưng cất có thể dùng bình kendan với dung tích nhỏ hơn;

Thiết bị chưng cất, theo hình 1 hoặc một thiết bị tương đương gồm các chi tiết:

- Bình kendan 500-800 ml hoặc bình đáy cầu dung tích 1000ml;
- Đầu thuỷ tinh hình cầu để ngăn tia bắn;
- Phễu nhỏ giọt dung tích 100ml;
- Ống sinh hàn làm nguội bằng nước;
- Bình hứng: bình tam giác hoặc cốc thuỷ tinh dung tích 500ml;
- Buret 50ml;
- Bì thuỷ tinh đường kính 2-3mm.

2.4. Tiến hành thử

2.4.1. Lượng mẫu thử: cân từ 0,5g đến 2,0g mẫu đã nghiền nhỏ chính xác đến 0,001g sao cho trong đó chứa không quá 60mg nitơ dạng nitrat và 235mg nitơ tổng.



Hình 1

- 2.4.2. Khử nitơ dạng nitrat thành amoni (bước này không cần thực hiện nếu biết trước trong mẫu thử không chứa nitơ dạng nitrat).

Chuyển lượng mẫu đã cân vào bình Kendan, thêm 35ml nước, để 10 phút, thỉnh thoảng lắc đều cho các muối nitrat tan hết. Thêm 1,2 g bột kim loại crom, 7ml axit clohidric đặc, để yên 5-10 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó đun nóng bình trong khoảng 4-5 phút trên bếp điện đã được điều chỉnh ở mức có thể đun 250ml nước từ nhiệt độ ban đầu là 25°C đến sôi trong khoảng 7-7,5 phút.

Lấy bình ra, để nguội.

- 2.4.3. Thủy phân mẫu (bước này có thể thay cho bước phân huỷ mẫu (2.4.4.) nếu biết trước trong mẫu thử chỉ chứa nitơ hữu cơ dạng urê).

Đặt bình vào tủ hút, thêm vài viên đá bọt, cẩn thận thêm vào 25ml axit sunfuric đặc, đáy bình bằng nút thủy tinh rộng hình quả lê hoặc phễu thủy tinh nhỏ. Đặt bình lên bếp điện đã được điều chỉnh ở mức có thể đun sôi 250ml nước từ 25°C trong khoảng 20-30 phút. Đun đến sôi nhẹ, và tiếp tục đun đến khi hết khói trắng thải ra. Sau đó đun thêm 15 phút nữa. Tắt bếp điện, để cho nguội. Cẩn thận thêm vào 250 ml nước và lại để nguội đến nhiệt độ phòng.

- 2.4.4. Phân huỷ mẫu (bước này chỉ cần thiết khi trong mẫu thử có chứa nitơ hữu cơ ở các dạng khác với urê hoặc mẫu thử không biết rõ thành phần).

Đặt bình vào tủ hút, thêm vào 22 g hỗn hợp xúc tác và vài viên đá bọt. Cẩn thận thêm vào 30ml axit sunfuric đặc và 0,5 g chất chống tạo bọt. Đậy nút thủy tinh rộng hình quả lê hoặc phễu thủy tinh nhỏ. Đặt bình lên bếp điện đã được điều chỉnh ở mức có thể đun sôi 250ml nước từ 25°C trong khoảng 7-7,5 phút. Nếu bọt tạo ra nhiều thì giảm bớt nhiệt. Khi hết bọt lại tăng nhiệt và đun cho đến khi hết khói trắng thải ra. Lắc bình theo kiểu quay tròn và tiếp tục đun thêm 60 phút nữa hoặc cho đến khi dung dịch trong bình hoàn toàn sáng mẫu. Ngừng đun, để nguội, cẩn thận thêm vào 250ml nước và lại để nguội đến nhiệt độ phòng.

- 2.4.5. Chung cất và chuẩn độ

Giữ nguyên dung dịch sau khi thủy phân hay phân huỷ trong bình kendan hoặc chuyển toàn bộ chúng sang bình đáy cầu (nếu dùng bình đáy cầu để chung cất). Đối với mẫu thử chỉ chứa nitơ dưới dạng amoni thì chuyển thẳng lượng mẫu đã cân (2.1.4.1.) vào bình chung cất và thêm vào đó 250ml nước. Cho vào bình vài viên bi thủy tinh và lắp bộ chung cất như hình 1.

Dùng buret cho vào bình hứng một lượng dung dịch axit sunfuric chuẩn với khối lượng và nồng độ phụ thuộc vào tổng hàm lượng nitơ trong mẫu thử, được xác định theo bảng sau:

Bảng 1

Lượng nitơ dự kiến có trong mẫu thử, mg	Nồng độ dung dịch axit sunfuric, N	Thể tích axit sunfuric, ml	K
Dưới 30	0,1	25	1
Từ 30 đến 50		40	
Từ 50 đến 65		50	
Từ 65 đến 80		35	
Từ 80 đến 100	0,2	40	2
Từ 100 đến 125		50	
Từ 125 đến 170		25	
Từ 170 đến 200	0,5	30	3
Từ 200 đến 235		35	

Thêm vào bình hứng 4-5 giọt hỗn hợp chỉ thị và lắp bình vào bộ chưng cất sao cho đầu ra của ống sinh hàn thấp hơn bề mặt dung dịch axit, nếu cần, cho thêm nước.

Qua phễu nhỏ giọt rót vào bình chưng cất 100ml dung dịch natri hidroxit 400g/l hoặc 20 ml nếu là mẫu không qua thủy phân hoặc phân huỷ, giữ lại trên phễu 2ml dung dịch này. Tiến hành chưng cất đến khi thu được khoảng 200ml dung dịch sang bình hứng. Ngừng đun. Tháo ống sinh hàn, dùng bình tia tráng rửa ống sinh hàn, thu nước rửa vào bình hứng.

Dùng dung dịch natri hidroxit 0,1N để chuẩn độ lượng axit dư trong bình hứng đến khi màu dung dịch chuyển từ xanh tím sang xanh lá cây.

Tiến hành thử đồng thời một mẫu trắng trong cùng một điều kiện, cùng lượng các loại thuốc thử nhưng không có mẫu phân tích. Dùng axit sunfuric 0,1N hấp thụ amoniac.

2.4.6. Tính kết quả

Tổng hàm lượng nitơ (X_1), được tính bằng phần trăm theo công thức:

$$X_1 = \frac{[(KV_1 - V_2) - (V_3 - V_4)]0,001401.100}{m}$$

Trong đó:

K - hệ số phụ thuộc vào nồng độ axit sunfuric sử dụng để hấp thụ;

V_1 - thể tích dung dịch axit sunfuric lấy để hấp thụ, ml;

V_2 - thể tích dung dịch natri hidroxit 0,1N dùng để chuẩn lượng axit dư trong mẫu phân tích, ml;

V_3 - thể tích dung dịch axit sunfuric 0,1 N sử dụng để kiểm tra mẫu trắng, ml;

V_4 - thể tích dung dịch natri hidroxit 0,1 N sử dụng để chuẩn lượng axit dư trong mẫu trắng, ml;

m- khối lượng mẫu thử, g;

0,001401 - khối lượng nitơ tương ứng với 1ml dung dịch axit sunfuric 0,1N.

Kết quả phép thử là giá trị trung bình số học các kết quả của hai lần thử tiến hành song song, sai lệch cho phép giữa chúng không được vượt quá 0,36% giá trị tương đối.

3. Xác định hàm lượng P_2O_5 hữu hiệu

3.1. Phân huỷ mẫu bằng dung dịch axit xitric 2% (phương pháp phân huỷ này áp dụng cho các loại phân hỗn hợp sản xuất từ phân lân canxi magiê).

3.1.1. Thuốc thử, dung dịch và thiết bị

Axit xitric, dung dịch 2%;

Cối chày sứ;

Bình định mức dung tích 250ml;

Máy lắc.

3.1.2. Tiến hành phân huỷ

Cân 2g mẫu chính xác đến 0,001g, cho vào cối sứ nghiền nhỏ, thêm vào cối 25 ml dung dịch axit xitric và tiếp tục nghiền. Sau đó để cho lắng rồi gạn phần dịch trong vào bình định mức dung tích 250 ml qua phễu thuỷ tinh. Tiếp tục nghiền như thế với dung dịch axit xitric (mỗi lần 25 ml) hai lần nữa rồi chuyển toàn bộ cặn vào bình, tráng chày cối bằng dung dịch axit xitric. Toàn bộ lượng axit được dùng là 100ml. Đậy kín bình và lắc trên máy lắc 30 phút sau đó thêm nước đến vạch, lắc đều và lọc qua giấy lọc băng xanh, đổ bỏ phần đầu dịch lọc. Dịch lọc dùng để xác định hàm lượng P_2O_5 hữu hiệu.

3.2. Phân huỷ mẫu bằng dung dịch petecman (phương pháp phân huỷ này áp dụng cho các loại phân hỗn hợp sản xuất từ supe photphat).

3.2.1. Thuốc thử, dung dịch và thiết bị

Amoniac, dung dịch 10%;

Axit xitric, tinh thể;

Axit sunfuric dung dịch 0,1N;

Metyl đỏ, dung dịch 0,1% trong rượu etilic;

Dung dịch petecman chứa 173 gam axit xitric và 42 gam nitơ dạng amoni trong 1 lít dung dịch; chuẩn bị như sau:

Chuẩn bị dung dịch amoniac 10%. Để xác định hàm lượng nitơ trong dung dịch này, dùng pipet lấy 10ml dung dịch vào bình định mức dung tích 500ml đã chứa sẵn 400-450ml nước, thêm nước đến vạch, lắc đều. Dùng pipet lấy 25ml dung dịch này cho vào

bình tam giác dung tích 200-250ml đã có sẵn 25-50ml nước và chuẩn độ bằng dung dịch axit sunfuric 0,1N với 2-3 giọt chỉ thị metyl đỏ đến khi xuất hiện màu hồng.

Lượng amoniac cần thiết để chuẩn bị một lít dung dịch petecman (X), tính bằng ml theo công thức:

$$X = \frac{42.10.25}{V.0,0014.500}$$

Trong đó:

V- thể tích dung dịch axit sunfuric chính xác 0,1N tiêu tốn để chuẩn độ, ml;

0,0014- lượng nitơ tương ứng 1ml dung dịch axit sunfuric chính xác 0,1N, g;

42- lượng nitơ dạng amoni chứa trong 1ml dung dịch petecman, g.

Rót vào bình thủy tinh có vạch đánh dấu thể tích dung dịch petecman cần chuẩn bị lượng amoniac đã tính. Mỗi lít dung dịch petecman cần 173g axit xitric. Axit xitric sau khi cân cho vào bình hoặc cốc, hoà tan bằng 200-250ml nước nóng. Làm nguội cả hai dung dịch đến 15-20°C, sau đó rót từ từ từng ít một dung dịch axit xitric qua phễu vào bình chứa dung dịch amoniac. Bình chứa dung dịch phải thường xuyên làm lạnh để nhiệt độ không vượt quá 20°C. Sau khi thêm axit xitric, dùng nước tráng rửa phễu, nước tráng thu vào bình đựng dung dịch petecman, lắc đều. Sau khi làm nguội đến 20°C thêm nước đến vạch, lắc đều và để yên hai ngày trước khi sử dụng.

Bình định mức dung tích 250ml;

Cối chà sứ;

Bếp cách thủy.

3.2.2 Tiến hành phân huỷ

Cân 2,0 đến 2,5g mẫu chính xác đến 0,001g cho vào cối sứ nghiền nhỏ, thêm vào 25ml dung dịch petecman và tiếp tục nghiền. Sau đó để cho lắng rồi gạn phần dịch trong vào bình định mức dung tích 250ml qua phễu thủy tinh. Cạn trên cối tiếp tục nghiền như thế thêm ba lần nữa mỗi lần với 25ml dung dịch petecman. Sau đó chuyển toàn bộ cân trên cối vào bình định mức. Tráng rửa chày, cối và phễu bằng dung dịch petecman. Toàn bộ lượng dung dịch petecman được dùng là 200ml. Nhúng bình vào bếp cách thủy đã được ổn nhiệt ở 60±1°C. Sau 15 phút lấy bình ra lắc đều và tiếp tục để thêm 15 phút nữa trong bếp cách thủy. Sau đó lấy ra để nguội đến nhiệt độ phòng, thêm nước đến vạch, lắc đều và lọc qua giấy lọc băng xanh khô, đổ bỏ phần dịch lọc đầu. Dịch lọc dùng để xác định hàm lượng P₂O₅ hữu hiệu.

3.3. Phân huỷ mẫu theo phương pháp hai bước (phương pháp này áp dụng cho các loại phân hỗn hợp không biết rõ thành phần hoặc chứa nhiều dạng lân khác nhau).

3.3.1. Thuốc thử, dung dịch và thiết bị.

Axit xitric dung dịch 2%;

Dung dịch petecman; chuẩn bị theo mục 3.2;

Bình định mức dung tích 250ml;

Bếp cách thủy.

3.3.2. Tiến hành phân huỷ

Cân 2,5g mẫu chính xác đến 0,001g cho vào cối sứ, nghiền nhỏ, thêm 20ml axit xitric 2% và tiếp tục nghiền. Sau đó để lắng rồi gạn phần dịch trong qua phễu thủy tinh vào bình định mức dung tích 250ml. Cạn trên cối tiếp tục nghiền như thế hai lần nữa, mỗi lần với 15-20ml axit xitric 2%. Sau đó chuyển toàn bộ cạn trên cối vào bình định mức, tráng rửa chày, cối và phễu bằng dung dịch axit xitric 2%. Toàn bộ lượng axit xitric được dùng là 100ml. Đậy nút bình, lắc trên máy lắc 30 phút, để lắng và lọc qua giấy lọc băng xanh vào một bình định mức dung tích 250ml khác. Tráng rửa cạn bằng 30-50ml nước, hứng nước rửa vào bình định mức đựng dịch lọc. Khi nước trên giấy lọc chảy hết, thêm nước vào bình đựng dịch lọc đến vạch và lắc đều. (dung dịch A).

Chuyển cạn và giấy lọc trở lại bình định mức đã dùng để phân huỷ, thêm 100ml dung dịch petecman, đậy nút bình, lắc mạnh cho giấy lọc tan thành sợi. Đặt bình vào bếp cách thủy đã được ổn nhiệt ở $60 \pm 1^\circ\text{C}$. Sau 15 phút lấy bình ra, lắc đều và tiếp tục để thêm 15 phút nữa. Sau đó lấy ra, để nguội, thêm nước đến vạch, lắc đều và lọc qua giấy lọc băng xanh khô, đổ bỏ phần dịch lọc đầu. (dung dịch B).

Khi định lượng lấy từ dung dịch A và B những lượng bằng nhau.

3.4. Xác định hàm lượng P_2O_5 hữu hiệu bằng phương pháp khối lượng (phương pháp trọng tài)

3.4.1. Nguyên tắc.

Phương pháp dựa trên việc kết tủa ion photphat bằng hỗn hợp muối magie dưới dạng magie- amoni photphat và nung kết tủa ở nhiệt độ cao.

3.4.2. Thuốc thử và dung dịch

Amoni hidroxit, dung dịch 2,5; 10 và 25%;

Amoni clorua, tinh thể;

Magie clorua, tinh thể;

Axit clohidric, dung dịch 20%;

Phenolphthalien, dung dịch 1% trong cồn etylic;

Hỗn hợp magie kiểm tính: chuẩn bị như sau: hoà tan 70g amoni clorua và 55 g magie clorua trong 500ml nước, thêm 250 ml dung dịch amoni hidroxit 10%, thêm nước đến 1 lít, lắc đều, để qua đêm rồi lọc.

Amoni xitrat, dung dịch 50%: chuẩn bị như sau: hoà tan 500 g axit xitric trong 600 ml dung dịch amoni hidroxit 25%. Dung dịch phải trung tính theo metyl đỏ, thêm nước đến 1 lít, lắc đều rồi lọc.

3.4.3. Tiến hành thử

Dùng pipet lấy 50ml dung dịch đã chuẩn bị theo một trong các mục: 3.1; 3.2 hoặc 50 ml dung tích A và 50 ml dung dịch B nếu chuẩn bị theo mục 3.3 cho vào cốc dung dịch 250ml, thêm 20ml axit clohidric và đun sôi 15 -20 phút. Sau đó thêm nước đến 50ml (trong trường hợp dung dịch chuẩn bị theo mục 3.3 thì không cần thêm nước). Thêm vào 10ml amoni xitric và trung hoà bằng dung dịch amoni hidroxit 10% với chỉ thị phenolphtalein. Vừa khuấy vừa từ từ thêm vào 35ml hỗn hợp magiê. Sau 10-15 phút thêm vào 20ml dung dịch amoni hidroxit 25% và tiếp tục khuấy thêm 30 phút nữa hoặc để yên không ít hơn 4 giờ nhưng không quá 18 giờ. Nếu khuấy liên tục 30 phút thì sau đó để yên 30-40 phút rồi lọc qua giấy lọc không tàn, băng xanh đường kính 9-11cm.

Chuyển toàn bộ kết tủa lên giấy lọc, đổ mỗi lần vào cốc 8-10ml dung dịch amoni hidroxit 2,5% và tráng kỹ thành và đáy cốc để thu hết các tinh thể đang còn dính ở đó. Rửa kết tủa trên giấy lọc 3-4 lần bằng dung dịch amoni hidroxit 2,5%. Tổng số dung dịch rửa phải là 100-125ml.

Chuyển giấy lọc và kết tủa vào chén nung đã được nung đến khối lượng không đổi và biết trước khối lượng, tro hoá ở 700-800°C đến khi giấy lọc bị cháy hoàn toàn và tiếp tục nung trong lò nung ở nhiệt độ 1000-1050°C cho đến khi kết tủa trắng hoàn toàn. Lấy chén ra, để nguội trong bình hút ẩm và cân chính xác đến 0,0002g.

Đồng thời tiến hành một mẫu trắng trong cùng một điều kiện, cùng lượng thuốc thử nhưng không có mẫu phân tích.

3.4.4. Tính kết quả.

Hàm lượng P_2O_5 hữu hiệu (X_1), tính bằng phần trăm theo công thức:

$$X_1 = \frac{(m - m_1) \cdot 250 \cdot 0,638 \cdot 100}{50 \cdot m_2}$$

Trong đó:

m- khối lượng kết tủa của mẫu phân tích, g;

m_1 - khối lượng kết tủa của mẫu trắng, g;

m_2 - khối lượng mẫu cân, g;

0,638 - hệ số chuyển đổi từ $Mg_2P_2O_7$ ra P_2O_5 .

Kết quả của phép thử là giá trị trung bình số học các kết quả của hai lần thử tiến hành song song, sai lệch cho phép giữa chúng không được vượt quá 0,2% giá trị tuyệt đối.

3.5 Xác định hàm lượng P_2O_5 hữu hiệu bằng phương pháp thể tích (phương pháp nhanh).

3.5.1. Nguyên tắc

Phương pháp dựa trên việc kết tủa ion photphat dưới dạng photpho molipdat sau đó dùng natri hidroxit hoà tan kết tủa và chuẩn độ lượng natri hidroxit dư bằng dung dịch axit.

3.5.2. Thuốc thử và dung dịch

Natri hidroxit, dung dịch 0,2N;

Axit nitric, tỷ trọng 1,4 và dung dịch 6N;

Axit sunfuric hoặc axit nitric, dung dịch 0,2N;

Phenolphthalein, dung dịch 1% trong rượu etilic;

Kali nitrat, dung dịch 1%;

Amoni hidroxit, dung dịch 10%;

Điamoni photphat, dung dịch 10%;

Amoni molipdat, dung dịch 3%; chuẩn bị như sau: Hoà tan 27g amoni nitrat; 26,3g axit xitric và 34g amoni molipdat trong 832ml nước, khuấy cho tan hết, thêm 127ml axit nitric tỷ trọng 1,4, đun sôi, thêm 2 giọt diamoni photphat, khuấy đều, để nguội và để qua đêm sau đó lọc qua giấy lọc băng đỏ.

3.5.3. Tiến hành xác định

Hút 50ml dung dịch đã chuẩn bị theo một trong các mục 3.1 hoặc 3.2 hoặc 50 ml dung dịch A và 50ml dung dịch B nếu chuẩn bị theo mục 3.3 cho vào cốc dung tích 250 ml, thêm 5 ml axit nitric tỷ trọng 1,4, đun sôi nhẹ 5 phút, để nguội dung dịch, nhỏ từng giọt amoni hidroxit 10% đến khi bắt đầu kết tủa. Dùng axit nitric 6N hoà tan kết tủa. Đun sôi trên bếp điện có lưới amiăng, vừa khuấy vừa thêm từ từ 50ml dung dịch amoni molipdat 3%, đun sôi 3 phút, để lắng kết tủa từ 30 phút đến 2 giờ. Lọc kết tủa qua giấy lọc băng vàng, rửa kết tủa bằng dung dịch kali nitrat 1% đến hết axit (thử bằng 3 giọt natri hidroxit 0,2N, 1 giọt phenolphthalein và 25 ml nước rửa, nếu không mất màu phenolphthalein là được). Chuyển giấy lọc có kết tủa vào cốc đã dùng để kết tủa. Dùng buret nhỏ từ từ, một lượng natri hidroxit 0,2 N vào cốc để hoà tan hoàn toàn kết tủa. Cho dư thêm 5ml nữa. Ghi thể tích natri hidroxit đã dùng (V_1 ml). Dùng bình tia rửa xung quanh thành cốc, thêm vào 3 - 5 giọt phenolphthalein và chuẩn độ bằng dung dịch axit sunfuric hoặc axit nitric 0,2N đến khi mất màu hồng. Ghi thể tích axit đã dùng (V_2 ml).

3.5.4. Tính kết quả.

Hàm lượng P_2O_5 hữu hiệu (X_2), được tính bằng phần trăm theo công thức:

$$X_2 = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0,0006174 \cdot 250 \cdot 100}{50 \cdot m}$$

Trong đó:

V_1 - thể tích dung dịch natri hidroxit chính xác 0,2N đã dùng hoà tan kết tủa, ml;

V_2 - thể tích axit sunfuric hoặc axit nitric chính xác 0,2N đã dùng để chuẩn độ, ml;

0,0006174 - lượng P_2O_5 tương ứng 1ml natri hidroxit chính xác 0,2N, g;

m- lượng mẫu cân, lấy để phân tích, g.

Kết quả phép thử là giá trị trung bình số học các kết quả của hai lần thử tiến hành song song, sai lệch cho phép giữa chúng không được vượt quá 0,2% giá trị tuyệt đối.

3.6. Xác định hàm lượng P_2O_5 hữu hiệu bằng phương pháp đo quang.

3.6.1. Nguyên tắc.

Phương pháp dựa trên việc đo mật độ quang của dung dịch phức chất photpho molipdat đã được khử sang dạng molipdat xanh.

3.6.2. Thiết bị, thuốc thử và dung dịch

Máy đo quang, bất kỳ loại nào;

Axit clohidric, dung dịch 20%;

Axit sunfuric, tỷ trọng 1,84 và dung dịch 10N;

Kali hydro photphat (KH_2PO_4);

Metol (parametylaminophenol sunfat);

Natri sunfit, tinh thể;

Kali hoặc natri metabisunfit;

Amoni molipdat, dung dịch 5%; chuẩn bị như sau: hoà tan 50 g amoni molipdat bằng 500ml dung dịch axit sunfuric 10N trong một bình hoặc cốc thủy tinh dung tích 700-800ml. Chuyển toàn bộ dung dịch vào bình định mức dung tích 1 lít, thêm nước đến vạch, lắc đều và lọc.

Dung dịch khử, chuẩn bị như sau: cho 5 gam natri sunfit, cân chính xác đến 0,01g, vào cốc dung tích 500-600ml, hoà tan bằng 400ml nước thêm 1g metol đã cân chính xác đến 0,01g, khuấy cho tan, sau đó thêm vào 150g natri hoặc kali bisunfit. Sau khi đã tan hết, chuyển toàn bộ dung dịch vào bình định mức dung tích 500ml, thêm nước đến vạch, lắc đều rồi lọc.

Natri axetat, dung dịch 30%; chuẩn bị như sau: hoà tan 600g natri axetat trong 2 lít nước và lọc.

Kali hydro photphat, dung dịch chứa 1mg P_2O_5 trong một ml; chuẩn bị như sau: cân 1,9175 g KH_2PO_4 , đã sấy khô ở 105^0C trong 2 giờ, chính xác đến 0,0002g, hoà tan bằng nước trong bình định mức dung tích 1 lít, thêm 10ml axit sunfuric đặc, thêm nước đến vạch và lắc kỹ, (dung dịch A). Chuẩn độ của dung dịch được xác định theo phương pháp khối lượng.

Lấy 50ml dung dịch chuẩn A cho vào bình dung tích 1 lít, pha loãng bằng nước đến vạch, lắc đều (dung dịch B).

1ml dung dịch B chứa 0,05mg P_2O_5 .

3.6.3. Xây dựng đồ thị chuẩn

Chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn trong 9 bình định mức dung tích 100ml: Dùng buret tuân tự cho vào các bình 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40 và 45 ml dung dịch B tương ứng với 0,25; 0,5; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75; 2,0 và 2,25mg P_2O_5 , thêm nước vào các bình đến thể tích 50ml, thêm 5ml dung dịch khử, 10 ml dung dịch amoni molipdat và để yên 10 phút. Sau đó thêm 20 ml dung dịch natri axetat 30%, thêm nước đến vạch và lắc đều. Đồng thời trong một bình định mức dung tích 100ml khác chuẩn bị dung dịch so sánh chứa tất cả các loại thuốc thử kể trên trừ dung dịch B. Đo mật độ quang của các dung dịch chuẩn so với dung dịch so sánh ở bước sóng 660nm (dùng kính lọc đỏ) trong cuvet dày 10mm. Theo số liệu thu được dựng đồ thị chuẩn, trong đó trục hoành đặt nồng độ của các dung dịch chuẩn tính ra mg P_2O_5 , trên trục tung đặt các giá trị mật độ quang tương ứng. Đồ thị chuẩn phải được kiểm tra hàng ngày ít nhất ở ba điểm.

3.6.4. Tiến hành thử

Dùng pipet lấy 5ml dung dịch đã được chuẩn bị theo một trong các mục 3.1 hoặc 3.2 hoặc 5ml dung dịch A và 5ml dung dịch B nếu chuẩn bị theo mục 3.3 cho vào bình định mức dung tích 100ml. Sau đó thêm vào bình: 2 ml dung dịch axit clohidric 20%; 5-10ml nước, đun sôi 5-10 phút, làm nguội. Thêm vào bình 5ml dung dịch khử, 10ml dung dịch amoni molipdat lắc đều và để yên 10 phút. Sau đó thêm 20ml dung dịch natri axetat, thêm nước đến vạch và lắc đều. Đo mật độ quang của dung dịch và theo đồ thị tìm ra lượng P_2O_5 tương ứng (a).

3.6.5. Tính kết quả

Hàm lượng P_2O_5 hữu hiệu (X_3), được tính bằng phần trăm theo công thức:

$$X_3 = \frac{a.V.100}{m.V_1.1000}$$

Trong đó:

a- khối lượng P_2O_5 tìm được theo đồ thị, mg;

V- thể tích dung dịch đã chuẩn bị ở mục 3.1; 3.2 hoặc 3.3, ml;

V_1 - thể tích dung dịch lấy để phân tích, ml;

m- khối lượng mẫu cân, g;

Kết quả phép thử là giá trị trung bình số học các kết quả của hai lần thử tiến hành song song, sai số cho phép giữa chúng không được vượt quá 0,2% giá trị tuyệt đối.

4. Xác định hàm lượng kali

4.1. Xác định hàm lượng kali bằng quang kế ngọn lửa (Phương pháp trọng tài).

4.1.1. Nguyên tắc.

Phương pháp dựa trên việc đo cường độ phát quang của kali khi được phun qua ngọn lửa dưới dạng sương mù.

4.1.2. Thiết bị, thuốc thử và dung dịch:

Quang kế ngọn lửa;

Kali clorua, TKHH;

Axit clohidric, dung dịch 2N;

Dung dịch kali chuẩn (dung dịch A) chứa 1mg kali trong 1ml; chuẩn bị như sau: cân 1,5835 g kali clorua đã sấy khô ở 110⁰C chính xác đến 0,0002g, hoà tan bằng nước trong bình định mức dung tích 1000ml, thêm nước đến vạch, lắc đều.

Dung dịch chuẩn, chuẩn bị như sau: cho vào các bình định mức dung tích 200ml một lượng dung dịch A và axit clohidric 2N theo qui định trong bảng 2. Thêm nước đến vạch và lắc kỹ.

Bảng 2

Hàm lượng kali trong dung dịch so sánh, mg/ml	Thể tích dung dịch A, ml	Thể tích dung dịch axit clohidric 1N, ml
0,00	0	10
0,01	2	10
0,02	4	10
0,03	6	10
0,04	8	10
0,05	10	10

4.1.3. Dụng đồ thị chuẩn

Đo cường độ phát quang của dung dịch chuẩn trên quang kế ngọn lửa. Dụng đồ thị chuẩn, trên trục hoành đặt các giá trị nồng độ của dung dịch chuẩn, mg/ml. Trên trục tung là các số đo tương ứng của máy. Mỗi điểm trên đồ thị là giá trị trung bình số học của 3 lần đo.

4.1.4. Tiến hành thử

Cân 5g sản phẩm đã nghiền nhỏ, chính xác đến 0,001g, cho vào bình định mức dung tích 500ml, thêm vào 400-450ml nước, lắc kỹ. Sau đó thêm nước đến vạch, lắc kỹ và lọc, đổ bỏ phần dịch lọc đầu.

Lấy 5ml dịch lọc cho vào bình định mức dung tích 250ml, thêm 12,5ml dung dịch axit clohidric 2N, thêm nước đến vạch và lắc đều. Đo cường độ phát quang của dung dịch nhận được trên quang kế ngọn lửa, theo đồ thị tìm nồng độ kali trong dung dịch đó. Lập lại phép đo để thu được kết quả thứ hai.

4.1.5. Tính kết quả

Hàm lượng kali chuyển đổi ra K₂O (X₁) được tính bằng phần trăm theo công thức:

$$X_4 = \frac{C_1 + C_2}{2} \cdot \frac{500.250.1,205.100}{m.5}$$

Trong đó:

C_1 và C_2 - hàm lượng kali tìm được trên đồ thị qua hai lần đo, mg/ml;

m- khối lượng mẫu cân, mg;

1,205 - hệ số chuyển đổi từ K^+ sang K_2O .

Kết quả phép thử là giá trị trung bình số học các kết quả của hai lần thử tiến hành song song, sai số cho phép giữa chúng không vượt quá 5% giá trị tương đối.

4.2. Xác định hàm lượng kali bằng phương pháp khối lượng (phương pháp nhanh).

4.2.1. Nguyên tắc

Phương pháp dựa trên việc kết tủa kali bằng natri tetraphenylborat trong môi trường kiềm sau khi đã loại trừ các nguyên tố ảnh hưởng bằng foocmalin và trilon B.

4.2.2. Dụng cụ, thuốc thử và dung dịch

Cốc lọc xốp;

Natri hidroxit, dung dịch 0,2N và 1N;

Foocmalin (andehit foocmic) kỹ thuật;

Phenolphtalein, dung dịch 1% trong rượu etilic;

Trilon B (muối dinatri etylendiainin tetraxetat), dung dịch 0,2N; chuẩn bị như sau: cân 37,2g trilon B chính xác đến 0,1g hoà tan trong bình định mức dung tích 1lít, thêm nước đến vạch, lắc đều và lọc.

Natri tetraphenyl borat, dung dịch 3,5%; chuẩn bị như sau: cân 35g natri tetraphenyl borat chính xác đến 0,05g, hoà tan bằng nước trong bình định mức dung tích 500ml, thêm nước đến vạch và lắc trong 30 phút, sau đó lọc dung dịch qua giấy lọc bằng xanh vào bình định mức 1 lít, thêm 10ml natri hidroxit 0,2N, thêm nước đến vạch và để yên 3 ngày. Nếu dung dịch vẫn đục thì phải lọc lại.

Nước rửa: dung dịch natri tetraphenyl borat 0,05%; chuẩn bị như sau: lấy 1,5ml dung dịch natri tetraphenyl borat 3,5% thêm vào 100ml nước.

4.2.3. Tiến hành thử

Cân 5g sản phẩm chính xác đến 0,001g, cho vào bình định mức dung tích 500ml, thêm vào bình 400-450 ml, lắc trên máy lắc 30 phút, sau đó thêm nước đến vạch, lắc đều và lọc qua phễu lọc khô, đổ bỏ phần dịch lọc đầu. Lấy 10ml dịch lọc cho vào cốc dung tích 150ml, thêm 20ml foocmalin 40% (nếu nồng độ foocmalin thấp hơn thì phải tính số lượng foocmalin cần lấy để bảo đảm có 8g foocmalin trên mẫu thử); 10ml dung dịch trilon B; 2-3 giọt phenolphtalein và trung hoà bằng dung dịch natri hidroxit 1N đến khi xuất hiện màu hồng. Sau đó vừa khuấy vừa cho vào 20ml dung dịch natri tetraphenyl

borat, lúc này kết tủa tinh thể màu trắng. Để yên 15 phút sau đó lọc qua chén lọc xốp đã được sấy khô và biết trước khối lượng. Rửa kết tủa trên chén lọc 4-5 lần, mỗi lần bằng 5-6ml nước rửa, sau đó rửa bằng 10-15ml nước cất và sấy trong tủ sấy ở 120°C đến khối lượng không đổi, cân chính xác đến 0,0002g.

4.2.4. Tính kết quả

Hàm lượng kali qui ra K_2O (X_5), được tính bằng phần trăm theo công thức:

$$X_5 = \frac{m \cdot 0,1314 \cdot 500 \cdot 100}{m_1 \cdot 10}$$

Trong đó:

m - khối lượng kali tetraphenyl borat đã kết tủa, g;

m_1 - khối lượng mẫu cân, g;

0,1314 - hệ số chuyển đổi kali tetraphenyl borat ra K_2O .

Kết quả phép thử là trung bình số học các kết quả của hai lần thử tiến hành song song, sai số cho phép giữa chúng không được vượt quá 5% giá trị tương đối.

5. Xác định hàm lượng nước.

5.1. Xác định hàm lượng nước bằng phương pháp sấy trong tủ sấy (phương pháp trọng tài).

5.1.1. Thiết bị, dụng cụ và thuốc thử.

Tủ sấy, cho phép điều chỉnh nhiệt độ chính xác đến $\pm 2,5^\circ\text{C}$;

Bình hút ẩm;

Chén sấy có nắp đường kính từ 30 đến 60mm cao $30 \pm 2\text{mm}$;

Cân phân tích.

5.1.2. Tiến hành thử.

Cho 2-3g sản phẩm vào chén sấy đã được sấy trước ở 105°C đến khối lượng không đổi và cân chính xác đến 0,0002g. Đặt chén vào tủ sấy, mở nắp và sấy trong 3 giờ ở nhiệt độ 65-70°C. Sau đó đậy nắp chén và làm nguội trong bình hút ẩm không ít hơn 30 phút trước khi cân. Tiếp tục tiến hành như trên với thời gian sấy thêm mỗi lần 1 giờ đến khi mẫu có khối lượng không đổi.

5.1.3. Tính kết quả

Hàm lượng nước (X_6), được tính bằng phần trăm theo công thức:

$$X_6 = \frac{(m - m_1) \cdot 100}{m_2}$$

Trong đó:

m - khối lượng mẫu và chén cân trước khi sấy, g;

m_1 - khối lượng mẫu và chén cân sau khi sấy, g;

m_2 - khối lượng mẫu cân, g;

Kết quả phép thử là giá trị trung bình số học các kết quả của hai lần thử tiến hành song song, sai số cho phép giữa chúng không được vượt quá 5% giá trị tương đối.

5.2. Xác định hàm lượng nước bằng thuốc thử Fise

Theo TCVN 2309-78. Lượng mẫu cân cần lấy để thử là: 0,3- 0,5g.

TIÊU CHUẨN PHÂN BÓN
PHẦN III: PHÂN TÍCH PHÂN BÓN

PHÂN TÍCH PHÂN BÓN PHƯƠNG PHÁP LẤY MẪU VÀ CHUẨN BỊ MẪU (Yêu cầu kỹ thuật)

1. Phạm vi áp dụng:

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp lấy mẫu và chuẩn bị mẫu cho các loại phân bón thể rắn để kiểm nghiệm chất lượng trong phòng thí nghiệm.

2. Nguyên tắc:

- Lấy mẫu là khâu có ý nghĩa quyết định độ chính xác của công việc phân tích. Mẫu trung bình phải đại diện được tính chất của khối lượng sản phẩm trong phạm vi lô mẫu chung và được xử lý, bảo quản đúng quy cách, không làm thay đổi hàm lượng cần kiểm nghiệm của sản phẩm.

3. Các thuật ngữ:

- 3.1. Lô mẫu chung là số lượng sản phẩm cùng một loại được xác định để lấy một mẫu chung làm đại diện.
- 3.2. Mẫu ban đầu là mẫu lấy đầu tiên trên một đơn vị bao gói hay tại một vị trí của khối sản phẩm để rời.
- 3.3. Mẫu chung hay mẫu hỗn hợp là sản phẩm gộp tất cả các mẫu ban đầu thuộc phạm vi lô mẫu chung.
- 3.4. Mẫu trung bình là mẫu được chuẩn bị từ mẫu chung, trộn đều và tách dần theo nguyên tắc đường chéo góc đến một khối lượng quy định.
- 3.5. Mẫu trung bình thí nghiệm là mẫu được chuẩn bị từ mẫu trung bình đáp ứng được các yêu cầu của công tác phân tích trong phòng thí nghiệm.

4. Thiết bị và dụng cụ:

- 4.1. Ống thăm mẫu có thể kéo dài để xuyên hết đường kính bao hoặc độ sâu của đồng sản phẩm. Đường kính rãnh ống thăm phải tối thiểu gấp 3 lần đường kính phổ biến của hạt hoặc viên sản phẩm.
- 4.2. Bao và bình đựng mẫu sạch, khô, kín.

Ban hành kèm theo Quyết định số 1894 - NN.KHCN/QĐ ngày 5 tháng 8 năm 1997 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

- 4.3. Rây cỡ lỗ 0,5mm (hoặc cỡ số tương đương) làm bằng kim loại không rỉ hoặc bằng nhựa.
- 4.4. Chày, cối tán bằng sứ hoặc máy nghiền chuyên dụng.

5. Phương pháp lấy mẫu:

5.1. Mẫu ban đầu:

- 5.1.1. Các mẫu ban đầu phải được lấy ngẫu nhiên đại diện cho các vị trí trên, dưới, giữa, trong, ngoài. Tránh các bao hoặc vị trí đặc thù (như bao bị rách, vị trí sản phẩm bị ẩm...)
- 5.1.2. Số lượng tối thiểu mẫu ban đầu lấy cho một lô mẫu chung là 5 mẫu, khối lượng mỗi mẫu tối thiểu là 200g.

* Các trường hợp cỡ hạt lớn, độ đồng đều cỡ hạt thấp, hàm lượng thành phần xác định nhỏ cần thiết phải tăng số mẫu ban đầu và khối lượng của mẫu ban đầu.

** Nếu khối lượng bao sản phẩm nhỏ hơn khối lượng tối thiểu mẫu ban đầu thì lấy toàn bộ khối lượng sản phẩm của 1 bao làm 1 mẫu ban đầu.

5.2. Mẫu chung:

- 5.2.1. Khối lượng tối đa quy định cho một lô mẫu chung là 100 bao cho sản phẩm đóng bao và 10 tấn cho sản phẩm đẽ rời.
- 5.2.2. Khối lượng tối thiểu của mẫu chung là 1000g. Trường hợp chưa đủ cần lấy thêm mẫu ban đầu cho đủ khối lượng.

5.3. Mẫu trung bình:

- 5.3.1. Sau khi có mẫu chung cần tiến hành lấy mẫu trung bình theo nguyên tắc đường chéo góc, trộn đều và loại bỏ dần cho đến khi được mẫu trung bình đồng nhất có khối lượng tối thiểu là 500g.
- 5.3.2. Mẫu trung bình được đóng thành 2 mẫu như nhau, mỗi mẫu 250g đựng trong bình hoặc túi sạch, khô, kín có nhãn ghi các ký hiệu và các yêu cầu cần thiết. Bảo quản mẫu nơi khô mát, sạch (một mẫu gửi phòng thí nghiệm, một mẫu lưu)

6. Chuẩn bị mẫu trong phòng thí nghiệm để phân tích:

- 6.1. Nghiền nhanh toàn bộ mẫu và rây nhanh qua rây có cỡ lỗ 0,5mm. Nghiền hết toàn bộ và rây qua rây 0,5mm.
- 6.2. Trộn nhanh thật kỹ càng (hàng chục lần theo đủ các phía). Tiến hành lấy mẫu trung bình thí nghiệm như 5.3.1. Cho đến khi còn lại khối lượng khoảng 100g. Cho mẫu vào bình khô, sạch, kín. Dán nhãn có ghi ký hiệu như 5.3.2.

PHÂN TÍCH PHÂN BÓN PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỘ ẨM (Yêu cầu kỹ thuật)

1. Phạm vi áp dụng:

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định độ ẩm cho tất cả các loại phân thể rắn.

2. Nguyên tắc:

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định độ ẩm cho các loại phân bón dựa trên nguyên lý làm khô mẫu trong tủ sấy ở 50°C , có hút chân không.

Khối lượng mẫu mất khi sấy khô tuyệt đối là lượng nước có trong mẫu.

Phương pháp này loại trừ được các sai số do các phản ứng xảy ra với phân bón khi nhiệt độ cao, được chọn là phương pháp trọng tài.

3. Thiết bị và dụng cụ:

3.1. Tủ sấy chân không, có thể điều chỉnh nhiệt độ chính xác ở $50^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ và điều chỉnh áp suất.

3.2. Tháp làm khô không khí chứa magie clorat.

3.3. Chén lấy mẫu bằng sứ hoặc thủy tinh có đường kính 3-5cm, có nắp.

3.4. Bình hút ẩm.

3.5. Cân phân tích có độ chính xác tối thiểu 0,0002g.

4. Cách xác định:

4.1. Cân chính xác 2-3g mẫu phân đã được chuẩn theo 10TCN 301 -97 trên cân phân tích cho vào chén sấy mẫu đã được sấy khô tuyệt đối và cân trên cân phân tích chính xác đến 0,0002g.

4.2. Đặt chén có mẫu vào tủ sấy đã có nhiệt độ $50^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$. Mở nắp chén.

4.3. Hút chân không và cấp không khí khô vào để luôn giữ độ chân không ở khoảng 48-53 mm Hg.

4.4. Sấy mẫu trong điều kiện trên 2-3 giờ cho đến khối lượng mẫu không đổi.

4.5. Đóng nắp chén sấy khô và đưa vào bình hút ẩm, để nguội mẫu đến nhiệt độ trong phòng (không ít hơn 1 giờ).

4.6. Cân chén có mẫu với độ chính xác 0,0002g.

Ban hành kèm theo quyết định số: 1894-NN. KHCN/QĐ ngày 5 tháng 8 năm 1997 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

5. Cách tính:

Tính % độ ẩm theo khối lượng

$$\text{Độ ẩm (\% khối lượng)} = \frac{m_1 - m_2}{m} \times 100$$

Trong đó:

m_1 : Khối lượng chén và mẫu trước khi sấy (g)

m_2 : Khối lượng chén và mẫu sau khi sấy (g)

m : Khối lượng mẫu phân tích (g)

Kết quả phân tích là giá trị trung bình số học các kết quả của 2 lần phân tích lặp lại song song.

6. Ghi chú:

* Các loại phân không bị thay đổi thành phần khi sấy trên 50°C có thể sấy ở tủ sấy thông thường ở nhiệt độ $65-70^\circ\text{C}$.

** Các loại phân bền ở nhiệt độ cao như phân lân nung chảy, các loại đá photphat ... có thể sấy ở $100-105^\circ\text{C}$ trong tủ sấy thông thường.

PHÂN TÍCH PHÂN BÓN

PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH AXIT TỰ DO

(Yêu cầu kỹ thuật)

1. Phạm vi áp dụng:

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định độ axit tự do cho các loại phân có dư axit (như supephotphat, amon sunfat...).

2. Nguyên tắc:

Hoà tan mẫu phân trong nước và xác định lượng a xít tự do bằng phương pháp chuẩn độ trung hoà.

3. Thiết bị và thuốc thử:

3.1. Thiết bị:

3.1.1. Cân có độ chính xác 0,001 g

3.1.2. Bình định mức 50ml

3.1.3. Microburet

3.2. Thuốc thử:

3.2.1. Dung dịch tiêu chuẩn NaOH 0,02N

3.2.2. Hỗn hợp chỉ thị màu metyl đỏ - metylen xanh: Trộn thể tích bằng nhau 2 dung dịch metyl đỏ 0,2% và metylen xanh 0,1 % trong etanol.

3.2.3. Nước có độ dẫn điện $< 2\mu\text{S/cm}$, pH = 5,6 - 7,0.

4. Cách xác định:

4.1. Cân chính xác đến 0,001 g khoảng 2g mẫu phân đã được chuẩn bị theo 10TCN 301-97, hoà tan bằng 50ml nước cất trong bình tam giác có dung tích 250ml. Lọc nếu đục.

4.2. Cho vào 2-3 giọt hỗn hợp chỉ thị màu.

4.3. Chuẩn độ bằng dung dịch chuẩn NaOH 0,02N từ microburet cho đến khi màu từ tím đỏ chuyển qua xanh lục.

5. Cách tính:

Ban hành kèm theo quyết định số: 1894-NN.KIICN/QĐ ngày 5 tháng 8 năm 1997 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

$$\text{Axit tự do (\% khối lượng qui về H}_2\text{SO}_4\text{)}^* = \frac{4,904.a.N}{P}$$

Trong đó:

a: Số ml dung dịch NaOH chuẩn đã sử dụng

N: Nồng độ đương lượng dung dịch NaOH chuẩn

P: Khối lượng mẫu phân tích (g)

6. Chú thích:

* Sử dụng với phân supephotphat và amon sunfat.

Trường hợp phân amon nitrat qui về HNO_3 , thay hệ số 4,904 bằng 6,302.

PHÂN TÍCH PHÂN BÓN

PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH NITƠ TỔNG SỐ

(Yêu cầu kỹ thuật)

1. Phạm vi áp dụng:

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định nitơ tổng số cho các loại phân không có nitrat.

2. Nguyên tắc:

Tiêu chuẩn này tiến hành dựa theo phương pháp Kjeldhal. Chuyển toàn bộ nitơ trong mẫu thành dạng amon sunfat, giải phóng NH_3 bằng kiềm, hấp thu NH_3 bằng dung dịch axit boric và xác định N bằng phương pháp trung hoà dung dịch chuẩn HCl hoặc H_2SO_4 .

3. Thiết bị và thuốc thử

3.1. Thiết bị:

3.1.1. Bình đốt mẫu và bếp đốt.

3.1.2. Bộ cất Kjeldhal dung tích bình cất 250ml hoặc 500ml.

Bình tam giác để hấp thu NH_3 tương ứng có dung tích 250ml hoặc 500ml.

3.1.3. Buret 50ml, độ chính xác 0,1 ml.

3.1.4. Bình định mức 100 ml, 50 ml, 25 ml.

3.1.5. Cân phân tích độ chính xác đến 0,0002g.

3.1.6. Rây cỡ lỗ 0,5mm (hoặc cỡ số tương đương) bằng kim loại không rỉ hoặc bằng nhựa.

3.2. Thuốc thử:

3.2.1. Axit sunfuric tinh khiết (pa), không N đậm đặc (93-98%).

3.2.2. Hỗn hợp muối: 100g muối kali hoặc natri sunfat, 10g sắt II sunfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 5g đồng sunfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) hoặc hỗn hợp 100g K_2SO_4 và 1g Se. Nghiền nhỏ, trộn đều đựng trong lọ kín, khô.

3.2.3. Hỗn hợp chỉ thị màu: Có thể sử dụng 1 trong 2 loại hỗn hợp:

Ban hành kèm theo quyết định số: 1894-NN. KHCN/QĐ ngày 5 tháng 8 năm 1997 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

- Hỗn hợp Bromocresol xanh và metyl đỏ: Hoà tan 0,1g Bromocresol xanh và 0,7g metyl đỏ trong 100ml etanol 95% (chuyển xanh- tím nhạt)
 - Hỗn hợp metylen xanh và metyl đỏ: Hoà tan 0,05g metylen xanh vào 5ml nước cất không N, cho vào đó 100ml etanol 95% và hoà tan thêm 0,15g metyl đỏ. Khuấy cho tan hết, đựng trong lọ màu (chuyển xanh lục - tím đỏ).
- 3.2.4. Dung dịch tiêu chuẩn H_2SO_4 hoặc HCl : 0,1N-0,5N (tuỳ theo lượng N trong mẫu chuẩn độ), pha từ ống tiêu chuẩn hoặc được xác định từ tiêu chuẩn.
- 3.2.5. Dung dịch NaOH khoảng 40%: Pha 450g NaOH công nghiệp vào nước, để nguội, thêm nước đủ 1 lít. Để lắng, sử dụng phần dung dịch trong.
- 3.2.6. Dung dịch axit boric bão hoà ở 20°C : Hoà tan 50g axit boric trong nước nóng và thêm nước cất không chứa amoniac đến 1 lít.
- 3.2.7. Nước có độ dẫn điện $< 2\mu\text{S}/\text{cm}$ không có NH_4^+ .
- 3.2.8. Dung dịch N tiêu chuẩn (để kiểm tra thiết bị chung cất): Cân chính xác 0,2360g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ khô, tinh khiết. Hoà tan thành 1 lít trong bình định mức với nước cất không chứa amoniac. Dung dịch có 0,05mgN/l. Bảo quản dung dịch ở chỗ lạnh.
- 4. Cách xác định.**
- 4.1. Phân huỷ mẫu.
- 4.1.1. Cân chính xác trên cân phân tích từ 0,35 - 0,70g mẫu phân đã được chuẩn bị theo 10TCN 301-97 cho vào bình đốt (không để dính mẫu ở cổ và thành bình). Tuỳ theo hàm lượng N dự đoán, tính toán cho có lượng N thích hợp của mẫu từ 30-200mg.
- 4.1.2. Thêm khoảng 1g hỗn hợp muối và 25ml H_2SO_4 đậm đặc.
- 4.1.3. Chuẩn bị đồng thời 2 mẫu trắng không mẫu thử, tiến hành và đồng nhất điều kiện như mẫu thử.
- 4.1.4. Đun nóng từ từ mẫu trên bếp cho đến khi hết sủi bọt (có thể cho một chút parafin cho giảm bớt bọt).
- 4.1.5. Sau đó tăng nhiệt độ và đun sôi hỗn hợp cho đến khi dung dịch trắng trong. Tuyệt đối không được để mẫu bắn ra ngoài. Không được để khô mẫu (luôn luôn dư một lượng axit ít nhất khoảng 2ml, nếu không phải cho axit bổ sung).
- 4.1.6. Sau khi mẫu đã trắng, đun tiếp 30 phút và kết thúc.
- 4.1.7. Để nguội và thêm khoảng 100ml nước cất không chứa amoniac (kết hợp rửa và lôi cuốn mẫu từ thành bình xuống). Trường hợp trích một phần dung dịch để xác định thì dồn mẫu qua định mức 200ml. Rửa bình và dồn qua bình định mức, thêm nước cất không chứa amoniac cho đến vạch. Lắc đều dung dịch.
- 4.2. Chung cất NH_3 .
- 4.2.1. Lắp bộ cất NH_3 (tuỳ theo thực tế thiết bị) đạt yêu cầu: kín, sạch, có khả năng điều chỉnh tốc độ cất và khả năng ngưng.
- 4.2.2. Kiểm tra thiết bị bằng cách cất 14ml dung dịch N tiêu chuẩn 0,05mg N/ml với kiểm, chuẩn độ N trong bình hứng hết $5 \pm 0,1$ ml dung dịch H_2SO_4 0,01N hoặc HCl 0,01N là

đạt yêu cầu. Nếu nhỏ hơn là do thiết bị cất bị hở, nếu lớn hơn có thể là do bị bắn kiềm từ bình cất hoặc do thiết bị không sạch. Cần kiểm tra và khắc phục.

- 4.2.3. Dùng bình tam giác 250ml chứa sẵn 50ml dung dịch axit boric bão hoà (nếu lượng N nhỏ hơn 100mg). Uống 1mg N phải đảm bảo ít nhất 0,5ml dung dịch axit boric bão hoà. Cho 10 giọt hỗn hợp chỉ thị màu. Đặt bình hứng dưới đuôi ống sinh hàn.
- 4.2.4. Cho toàn bộ hoặc trích 1 phần dung dịch xác định có chứa 30mg đến 200mg N (nếu bộ cất có dung tích 500ml và bình hứng 500ml), 30mg đến 100mg N (nếu bộ cất có dung tích 250ml và bình hứng 250ml). Tráng phễu và dụng cụ đựng bằng nước cất không chứa amoniac, dồn toàn bộ vào bình cất.
- 4.2.5. Cho 2-3 hạt thủy tinh vào bình cất để tránh bắn mẫu.
- 4.2.6. Cho nước chảy để bộ phận sinh hàn làm việc.
- 4.2.7. Cho qua phễu 50ml dung dịch NaOH 40%. Khi dung dịch NaOH chảy xuống bình cất còn lại khoảng 1ml thì khoá phễu. Cho vào phễu khoảng 50ml nước cất không N để làm loãng NaOH. Mở khoá phễu cho nước xuống bình cất và đến khi còn khoảng 1ml thì khoá phễu lại.
- 4.2.8. Tiến hành cất NH_3 , điều chỉnh nước chảy qua ống sinh hàn và tốc độ sôi đảm bảo nhiệt độ nước sau khi ngưng lạnh khoảng 25-30°C.
- 4.2.9. Chưng cất cho đến hết NH_3 (thử bằng thuốc thử Nessler). Thường dung dịch ngưng khoảng 75-100ml, nếu dưới 100mg và 150-200ml nếu có 100-250mg N.
- 4.2.10. Sau khi cất hết NH_3 , hạ thấp bình hứng, tia rửa đuôi ống sinh hàn (dồn nước rửa vào bình hứng). Ngừng cất.

4.3. Chuẩn độ:

- Chuẩn độ amon bằng dung dịch H_2SO_4 hoặc HCl cho đến khi chuyển màu.

* Nếu dùng hỗn hợp Bromocresol xanh- metyl đỏ, chuyển từ màu xanh sang tím nhạt.

Nếu dùng metylen xanh- metyl đỏ, chuyển từ xanh lục sang tím đỏ.

** Nếu lượng N dự kiến trong mẫu cất dưới 30mg sử dụng axit 0,1 N

Nếu lượng N dự kiến trong mẫu cất dưới 30-50mg sử dụng axit 0,2N

Nếu lượng N dự kiến trong mẫu cất > 50mg sử dụng axit 0,5N

5. Cách tính.

Tính % khối lượng N trong mẫu

$$\text{N}\% = \frac{(a - b) \cdot N \cdot 0,01401 \cdot 100}{m}$$

Trong đó:

a: Thể tích dung dịch axit chuẩn sử dụng cho mẫu thử (ml)

b: Thể tích dung dịch axit chuẩn sử dụng cho mẫu trắng (ml)

N: Nồng độ đương lượng axit chuẩn

m: Khối lượng mẫu tương ứng với mẫu chuẩn độ (g)

0,01401: Mili đương lượng gam N (g)

PHÂN TÍCH PHÂN BÓN PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH BIURET (Yêu cầu kỹ thuật)

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng biuret trong phân ure.

2. Nguyên tắc:

Trong dung dịch không có CO_2 và đã được tách các ion như amon bằng cột trao đổi ion, biuret sẽ tạo phức với đồng sunfat trong môi trường tartrat kiềm cho màu đặc trưng. Đo cường độ màu ở 550nm bằng phổ quang kế sẽ xác định được hàm lượng biuret.

3. Thiết bị và thuốc thử.

3.1. Thiết bị:

3.1.1. Phổ quang kế (spectrophotometer)

3.1.2. Bếp cách thủy có khả năng điều chỉnh và giữ nhiệt độ ổn định ở $30 \pm 5^\circ\text{C}$ và $50 \pm 5^\circ\text{C}$.

3.1.3. Cột trao đổi cation có độ cao 50cm, đáy lót bằng bông thủy tinh và đựng đầy nhựa trao đổi cation.

3.1.4. Cân phân tích có độ chính xác 0,0002g và cân kỹ thuật chính xác đến 0,1g.

3.2. Thuốc thử.

3.2.1. Nước cất không có CO_2 ($\text{pH} = 6,5$ ở 25°C): đun sôi nước cất, để nguội và đựng nước trong bình kín, sử dụng trong ngày.

3.2.2. Dung dịch tartrat kiềm: hoà tan 40g NaOH trong 500ml nước cất, đầy bình lại và để nguội. Thêm 50g Natri kali tartrat (pa), lắc đều cho hoà tan hết rồi thêm nước cho đến 1 lít. Lắc kỹ. Để yên dung dịch một ngày trước khi sử dụng

3.2.3. Dung dịch đồng sunfat: Hoà tan 15g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (pa) trong nước cất không CO_2 và pha loãng thành 1 lít.

3.2.4. Dung dịch tiêu chuẩn biuret 1mg/ml: Cân chính xác 250mg biuret (pa), hoà tan vào nước cất không CO_2 và pha loãng đến vạch trong bình định mức 250ml.

3.2.5. Chỉ thị màu metyl đỏ: Hoà tan 0,5g metyl đỏ trong 100ml etanol 95%.

Ban hành kèm theo quyết định số: 1894-NN.KHCN/QĐ ngày 5 tháng 8 năm 1997 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

2.6. Dung dịch H_2SO_4 (1:9) hoặc HCl (1:4) để xử lý cột trao đổi cation sau mỗi lần sử dụng. Cho 100ml dung dịch axit chảy qua cột với tốc độ 5ml/phút, sau đó rửa bằng nước cho đến khi pH của nước rửa > 6 .

4. Cách xác định.

4.1. Chuẩn bị dãy tiêu chuẩn biuret và lập đồ thị.

4.1.1. Lần lượt lấy 2; 10; 20; 30; 40 và 50ml dung dịch tiêu chuẩn biuret cho vào 6 bình định mức 100ml. Lượng biuret chứa trong các bình là 2; 10; 20; 30; 40 và 50mg.

4.1.2. Cho vào các bình nước cất không CO_2 cho dung dịch trong bình đến 50ml.

4.1.3. Cho vào mỗi bình 1-2 giọt chỉ thị màu metyl đỏ và cho từng giọt dung dịch H_2SO_4 0,1 N cho đến khi chuyển sang màu hồng.

4.1.4. Cho vào mỗi bình 20ml dung dịch kali natri tartrat và cho tiếp 20ml dung dịch đồng sunfat.

4.1.5. Cho thêm nước cất không CO_2 đến vạch định mức. Lắc 10 giây.

4.1.6. Để bình 15 phút trong bình cách thuỷ có nhiệt độ $30^\circ \pm 5^\circ C$.

4.1.7. Tiến hành mẫu trắng theo thủ tục như bình có biuret tiêu chuẩn

4.1.8. Cho mẫu trắng vào cuvet và đo trên phổ quang kế tại bước sóng 550nm.

4.1.9. Cho các dung dịch tiêu chuẩn vào cuvet và đo trên quang phổ kế tại bước sóng 550nm.

4.1.10. Đo lặp lại các dung dịch tiêu chuẩn. Sự đo phải đảm bảo không quá 30 phút sau khi đã để mẫu ở $30^\circ C$ trong bình cách thuỷ.

4.1.11. Xây dựng đồ thị chuẩn mối quan hệ giữa số đo trên phổ quang kế với hàm lượng biuret trong các dung dịch chuẩn.

4.2. Xác định mẫu.

4.2.1. Cân 10,0g mẫu (chính xác đến 0,1 g) cho vào cốc 150ml hoà tan bằng 50ml nước cất không CO_2 đã đun ấm ở $50 \pm 5^\circ C$.

4.2.2. Khuấy 30 phút và giữ ở nhiệt độ $50^\circ \pm 5^\circ C$.

4.2.3. Lọc qua giấy lọc và thu dung dịch vào bình định mức 100ml. Rửa cốc và que khuấy bằng một ít nước cất không CO_2 và lọc qua giấy lọc, thu dung dịch vào bình. Thêm nước cất không có CO_2 vào bình định mức cho đến vạch.

4.2.4. Trích 25ml dung dịch lọc cho chảy qua cột trao đổi cation (đã được xử lý, xem 5.7) với tốc độ 4-5ml/phút và thu dịch lọc vào bình định mức 100ml.

4.2.5. Sau khi dung dịch lọc đã rút hết trong ống, rửa bằng 25ml nước cất không CO_2 với tốc độ 4-5 ml/phút, thu nước rửa vào bình định mức.

- 4.2.6. Cho vào bình 1-2 giọt metyl đỏ. Dùng dung dịch NaOH trung hoà cho đến khi chuyển màu vàng, axit hoá bằng dung dịch H_2SO_4 0,1N cho đến khi trở lại màu hồng. Thêm nước cất không CO_2 cho đến vạch định mức. Lắc đều.
- 4.2.7. Dùng pipet lấy 50ml dung dịch cho vào bình định mức 100ml và tiến hành theo các bước như 4.1.4 đến 4.1.9.

5. Tính kết quả.

- 5.1. Dựa vào đồ thị chuẩn và căn cứ số đo trên máy suy ra số mg biuret trong mẫu so màu.
- 5.2. Tính % khối lượng biuret trong mẫu phân:

$$\text{Biuret (\%)} = \frac{m_1 \cdot 100}{m \cdot 1,25}$$

Trong đó:

m_1 : Khối lượng biuret trong mẫu so màu (mg)

m : Khối lượng mẫu phân (g)

$$1,25 = 1000\text{mg} \cdot \frac{25}{100} \cdot \frac{50}{100}$$

PHÂN TÍCH PHÂN BÓN PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH PHOTPHO TỔNG SỐ (Yêu cầu kỹ thuật)

1. Phạm vi áp dụng:

Các tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định photpho tổng số cho các loại phân như supe photphat, các loại phân phức hợp như amophot, nitrophot, các loại phân hỗn hợp hữu cơ - khoáng, các loại nguyên liệu làm phân như apatit, photphorit...

2. Nguyên tắc:

Nguyên tắc chung là đun ướt mẫu với hỗn hợp cường thủy và xác định hàm lượng photpho trong dung dịch bằng 2 phương pháp:

- Phương pháp đo màu áp dụng cho các trường hợp dung dịch mẫu không màu và không có các ion khác tạo màu vàng với molypdovanat.
- Phương pháp thể tích dựa theo nguyên lý của phương pháp Lorent-Shoffer ứng dụng cho mọi trường hợp.

3. Thiết bị và thuốc thử.

Theo từng phương pháp.

4. Các phương pháp xác định.

4.1. Phương pháp thể tích.

4.1.1. Nguyên tắc: Trong môi trường axit nitric, axit photphoric tạo thành với amon molupdat kết tủa dạng muối phức dị đa amon photpho molypdat. Kết tủa không hòa tan trong HNO_3 nhưng tan 1 phần trong HCl và H_2SO_4 và hoà tan hoàn toàn trong kiềm.

Sau khi kết tủa hoàn toàn H_3PO_4 , lọc và rửa sạch kết tủa rồi hoà tan kết tủa với 1 thể tích dung dịch chuẩn NaOH dư và chuẩn độ ngược lượng dư NaOH bằng dung dịch chuẩn axit.

4.1.2. Thiết bị và thuốc thử.

4.1.2.1. Thiết bị:

Ban hành kèm theo quyết định số: 1894-NN.KHCN/QĐ ngày 5 tháng 8 năm 1997 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

- I. Cân phân tích chính xác đến 0,0002g
- II. Bếp và bình đốt
- III. Bếp cách thuỷ có khả năng điều chỉnh nhiệt độ
- IV. Máy lắc hoặc khuấy
- V. Cốc lọc sứ dung tích 30ml lỗ tổ ong mịn hoặc chén Gooch 25ml có khả năng lọc kết tủa mịn.
- VI. Buret độ chính xác 0,01 ml
- VII. Máy ly tâm

4.1.2.2. Thuốc thử.

- I. Dung dịch amon molybdat trong axit nitric: Pha 125g amon molybdat ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (pa) vào 1563ml nước đun nóng đến khoảng 50°C , sau đó cho thêm 489ml HNO_3 đậm đặc. Để lắng và gạn lấy phần trong. Đựng trong lọ thuỷ tinh nút kín.
Trước khi sử dụng cứ 100ml dung dịch molybdat cho thêm 5ml axit nitric đặc rồi lọc nhanh lấy phần trong.
- II. Dung dịch NaOH chuẩn không có cacbonat 0,324N (được xác định nồng độ chính xác bằng dung dịch chuẩn axit).
- III. Dung dịch chuẩn HCL hoặc HNO_3 0,324N (khi chuẩn độ 20ml dung dịch axit phải bảo đảm tốn $20 \pm 0,02\text{ml}$ dung dịch tiêu chuẩn kiềm).
- IV. Hỗn hợp cường thuỷ: Trộn tỉ lệ v/v (1:3) axit nitric đặc và axit clohydric đặc. Chuẩn bị ngay trước khi sử dụng.
- V. Dung dịch amon nitrat: Hoà tan 100g amon nitrat (pa) không P trong nước thành 1 lít dung dịch.
- VI. Dung dịch amon hydroxit đặc (pa)
- VII. Dung dịch axit nitric pha loãng từ HNO_3 đặc (pa) với nước theo tỉ lệ 1:3 v/v.
- VIII. Dung dịch chất chỉ thị màu metyl đỏ: Hoà tan 0,2g metyl đỏ trong 100ml etanol 95%.
- IX. Dung dịch chất chỉ thị màu phenolphthalein: 1g phenolphthalein trong 100ml etanol 95%.
- X. Nước cất có độ dẫn điện $< 2 \mu\text{s/cm}$, pH không quá 6,5.

4.1.3. Cách xác định.

4.1.3.1. Đun mẫu và chuẩn bị dung dịch mẫu.

- Cân chính xác đến 0,0002g một khối lượng mẫu khoảng 2g cho vào bình đốt (đồng thời tiến hành mẫu trắng).

- Đối với tất cả các loại mẫu: Cho 20-30ml HNO₃ đặc (pa) và đun một cách cẩn thận, đun sôi nhẹ khoảng 30-45 phút cho oxy hoá toàn bộ các chất có thể oxy hoá.
- Để nguội bình và cho thêm 10-20ml hỗn hợp cường thủy. Đun nhẹ một cách cẩn thận cho đến khi dung dịch không có màu hoặc gần như hết màu và trong bình xuất hiện khói trắng đậm đặc.

* Những mẫu ít hoặc không có chất hữu cơ chỉ cần cho 35ml hỗn hợp cường thủy (không cần cho HNO₃ lúc đầu).

** *Chú ý: Tuyệt đối không được để khô mẫu. Đối với các mẫu có nhiều chất hữu cơ, khi đun đến mẫu bốc khói trắng (khoảng 170°C) cần thiết phải đun tiếp ít nhất 1 giờ.*

- Mẫu sau khi đốt xong, để hơi nguội, thêm vào 50ml nước cất và đun sôi ít phút.
- Chuyển toàn bộ dung dịch và cặn trong bình công phá sang bình định mức 200ml, thêm nước cất đến 200ml (V). Lắc đều. Lọc hoặc để lắng trong.

4.1.3.2. Xác định P₂O₅ trong dung dịch mẫu.

- Dùng pipet lấy 1 thể tích chính xác mẫu (V₁):
 - Tương ứng với 0,4g mẫu nếu dự đoán mẫu chứa dưới 5% P₂O₅
 - Tương ứng với 0,2g mẫu nếu dự đoán mẫu chứa dưới 20% P₂O₅
- Thêm 7ml hỗn hợp cường thủy. Thêm từng giọt dung dịch amon hydroxit cho đến khi xuất hiện tủa ở mức có thể hoà tan khi lắc mạnh. Nếu loại dung dịch không tạo tủa với amon hydroxit thì cho amon hydroxit cho đến khi chuyển kiềm nhẹ (thử giấy quì thấy chuyển màu xanh), sau đó axit hoá bằng vài giọt dung dịch axit nitric loãng.
- Pha loãng dung dịch đến 70-100ml và điều chỉnh mẫu ở khoảng 30-40°C (trên bếp cách thủy).
- Cho vào dung dịch 25-30ml dung dịch amon molypdat.
- Lắc hoặc khuấy 30 phút ở nhiệt độ trong phòng.
- Để lắng và sau đó gạn phần nước trong qua cốc lọc sứ.
- Rửa lắng cặn mỗi lần 25-30ml nước amon nitrat, để lắng hoặc ly tâm và gạn nước rửa qua phễu lọc. Rửa nhiều lần cho đến khi nước rửa chảy ra dưới phễu hết axit (thử bằng chỉ thị màu metyl đỏ).
- Cuối cùng cho toàn bộ phễu lọc vào cốc 250ml và cho vào một thể tích dung dịch kiềm chuẩn (dư tối thiểu 3ml). Lắc cốc cho tan hết kết tủa. Ghi chính xác thể tích dung dịch kiềm tiêu chuẩn (chính xác đến 0,01ml).
- Thêm nước cho đến khoảng 100ml, thêm 2-3 giọt chỉ thị màu phenolphthalein và chuẩn độ lượng kiềm dư bằng dung dịch chuẩn axit cho đến khi hết màu hồng. Ghi chính xác thể tích đến 0,01 ml.

4.1.4. Cách tính

Tính % khối lượng P_2O_5 tổng số trong mẫu:

$$\%P_2O_5 = \frac{(a - b).V.100}{m.V_1.1000}$$

Trong đó:

a : Thể tích dung dịch chuẩn NaOH 0,324N đã sử dụng

b : Thể tích dung dịch chuẩn axit 0,324N đã sử dụng

V: Thể tích toàn bộ dung dịch mẫu (ml)

V_1 : Thể tích dung dịch mẫu trích để chuẩn độ (ml)

m: Khối lượng mẫu phân (g)

* Trong công thức này 1ml NaOH 0,324N ứng với 1mg P_2O_5

Nếu sử dụng kiềm và axit không đúng 0,324N cần tính trên cơ sở 1mili đương lượng gam NaOH tương ứng 3,1mg P_2O_5 và sử dụng công thức:

$$\%P_2O_5 = \frac{(aN_1 - bN_2).3,1.V.100}{m.V_1.1000}$$

4.2. Phương pháp đo màu.

4.2.1. Nguyên tắc: Hợp chất photpho trong dung dịch tạo thành với molipđovanadat phức chất màu vàng. Dùng phổ quang kế đo cường độ màu và từ đó suy ra hàm lượng P_2O_5

4.2.2. Thiết bị và thuốc thử

4.2.2.1. Thiết bị:

- Phổ quang kế (spectrophotometer)
- Bình định mức 50ml và 100ml
- Cân phân tích có độ chính xác 0,0002g.

4.2.2.2. Thuốc thử:

I. Dung dịch tiêu chuẩn P:

- Cân chính xác 1,5340g kali dihydro photphat (KH_2PO_4) tinh khiết (pa) đã sấy 2 giờ ở $105^\circ C$ và để nguội trong bình hút ẩm.
- Hoà tan lượng cân vào nước cất sau đó thêm nước cho đủ 200ml trong bình định mức. Lắc đều. Dung dịch có chứa 4mg P_2O_5 /ml.

II. Dung dịch molipđovanadat:

- Hoà tan 40g amon molipđat (pa) trong 400ml nước nóng. Để nguội.
- Hoà tan 2g amon metavadanat (pa) trong 250ml nước nóng. Để nguội và cho thêm 450ml axit pecloric 70%.

- Cho dung dịch amon molyphđat vào dung dịch amon vafđanat. Lắc nhẹ, sau đó thêm nước cất đến 2 lít và lắc đều.

4.2.3. Cách xác định.

4.2.3.1. Đun mẫu và chuẩn bị dung dịch mẫu (như 4.1.3.1.)

4.2.3.2. Chuẩn bị thang tiêu chuẩn và đồ thị chuẩn:

- Chuẩn bị các dung dịch tiêu chuẩn có nồng độ 0,4mg/ml-1,0mg P_2O_5 /ml. Chuẩn bị 7 bình định mức 100ml và lần lượt cho vào mỗi bình số ml dung dịch tiêu chuẩn 4mg P_2O_5 /ml thứ sau:

Số TT dung dịch	Nồng độ dung dịch sau khi pha (mg P_2O_5 /ml)	Thể tích dung dịch tiêu chuẩn 4mg P_2O_5 /ml (ml)
1	0,4	10,00
2	0,4	12,50
3	0,6	15,00
4	0,7	17,50
5	0,8	20,00
6	0,9	22,50
7	1,0	25,00

Sau đó thêm nước cho đến vạch mỗi bình và lắc đều.

- Xây dựng thang tiêu chuẩn: Chuẩn bị 7 bình định mức 100ml. Dùng pipet lần lượt lấy 5ml dung dịch của 7 dung dịch tiêu chuẩn đã chuẩn bị cho vào 7 bình định mức theo thứ tự. Những bình định mức này có chứa: 2; 2,5; 3,0; 4,0; 4,5 và 5,0 mg P_2O_5 .

Thêm vào mỗi bình 45ml nước cất và trong vòng 5 phút thêm 20ml dung dịch molyphđovanadat bằng pipet hoặc biuret và sau đó thêm nước cho đến vạch. Lắc đều. Để yên 10 phút.

- Đo màu trên quang phổ kế từng tiêu chuẩn tại bước sóng 400-420nm.
- Lập đồ thị chuẩn tương quan giữa số đo trên máy với lượng chứa P_2O_5 trong các bình tiêu chuẩn.

4.2.3.3. Xác định hàm lượng P_2O_5 trong dung dịch mẫu:

- Dùng pipet lấy V_1 dung dịch mẫu có chứa khoảng 2-3mg P_2O_5 .
- Tiến hành tạo màu và đo màu trên máy như với dãy tiêu chuẩn (4.2.3.2.)

4.2.3.4. Căn cứ số đo trên máy và dựa vào đồ thị chuẩn suy ra số mg P_2O_5 trong thể tích mẫu so màu.

4.2.4. Cách tính:

Tính % khối lượng P_2O_5 tổng số trong mẫu:

$$\%P_2O_5 = \frac{m_1 \cdot V \cdot 100}{m \cdot V_1 \cdot 1000}$$

Trong đó:

m_1 : Khối lượng P_2O_5 xác định được trong phần trích so màu (mg)

V_1 : Thể tích dung dịch mẫu trích để so màu (ml)

m : Khối lượng mẫu cân phân tích (g)

V : Thể tích toàn bộ dung dịch mẫu (ml)

1000: Hệ số quy mg thành g

100: Hệ số tính %.

PHÂN TÍCH PHÂN BÓN

PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH PHOTPHO HỮU HIỆU (Yêu cầu kỹ thuật)

1. Phạm vi áp dụng:

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định photpho hữu hiệu cho các loại phân có chứa hợp chất photpho.

2. Nguyên tắc:

Phương pháp dựa trên cơ sở hoà tan các hợp chất của photpho bằng dung dịch amon xitrat. Xác định các hợp chất photpho tổng số. Hiệu của hàm lượng photpho tổng số và hàm lượng photpho không tan trong amon xitrat là photpho hữu hiệu tan trong xitrat.

3. Thiết bị và thuốc thử.

3.1. Thiết bị:

3.1.1. Phễu lọc

3.1.2. Máy lắc

3.1.3. Các dụng cụ và thiết bị phân tích P tổng số (theo 10TCN-306-97)

3.2. Thuốc thử.

3.2.1. Dung dịch amon xitrat: Hoà tan 370g tinh thể axit xitric (pa) trong khoảng 1,5 lít nước cất, sau đó trung hoà bằng amon hydroxit đặc (pa) cho đến khi pH = 7,0, dùng chỉ thị bằng pH met (tốn khoảng 380ml amon hydroxit 25%). Sau đó thêm nước cất cho đủ 2 lít.

Bảo quản trong bình nút chặt và kiểm tra lại độ pH trước khi sử dụng, điều chỉnh đúng pH = 7,0 bằng dung dịch amon hydroxit hoặc bằng dung dịch axit xitric.

3.2.2. Các thuốc thử để xác định photpho tổng số (theo 10TCN-306-97).

4. Cách xác định.

4.1. Hoà tan các hợp chất photpho bằng amon xitrat và chuẩn bị dung dịch xác định hợp chất photpho không hoà tan trong amon xitrat.

4.1.1. Cân chính xác đến 0,0002g khoảng 2,5g mẫu phân được chuẩn bị theo 10TCN 301-97.

- 4.1.2. Chuyển toàn bộ mẫu lên trên phễu có giấy lọc gấp và rửa bằng 225ml nước. Mỗi lần cho một lượng ít nước, hết nước lần trước trên phễu mới cho tiếp lần sau. Đảm bảo rửa trong 1 giờ. Nếu sau 30 phút dự tính trong 1 giờ không hết lượng nước thì lập tức phải dùng lọc hút chân không để hoàn thành việc rửa lọc trong 1 giờ.
- 4.1.3. Chuyển giấy lọc có chứa cặn không hoà tan trong nước qua bình định mức 250ml và cho vào 100ml dung dịch amon xitrat đã đun nóng đến 65°C. Đậy nút bình định mức và lắc mạnh cho tan tở giấy lọc. Mở nút cho giảm áp suất trong bình.
- 4.1.4. Nút bình lại và cho vào máy lắc và lắc mạnh 1 giờ trong điều kiện dung dịch giữ ở nhiệt độ 65°C, dung dịch luôn luôn tiếp xúc với thành bình và cổ bình, lõi cuốn và trộn đều toàn bộ cặn.
- 4.1.5. Sau khi lắc xong, lập tức lọc nhanh qua phễu với giấy lọc băng xanh. Sử dụng phễu Buchner nối liền bộ hút chân không là tốt nhất. Rửa cặn trên phễu bằng khoảng 350ml nước ở 65°C. Hết nước trên phễu lần trước mới cho tiếp lần sau. Nếu cặn bị lọt khi rửa thì dùng dung dịch amoni nitrat 5% thay nước nóng để rửa.
- 4.1.6. Làm khô cặn thật cẩn thận, không được để mất cặn. Chuyển giấy lọc sạch sang 1 cốc đốt sạch và đốt cháy hết toàn bộ chất hữu cơ. Sau đó đun với khoảng 10-15ml axit clohydric đậm đặc cho hoà tan toàn bộ photphat.
- 4.1.7. Nếu tiến hành xác định photpho bằng phương pháp đo màu thì dùng nước cất pha loãng đến 100-150ml, trộn đều dung dịch. Sau đó lọc qua giấy lọc khô và tốt. Thu dịch lọc vào bình định mức 200ml và thêm nước đến vạch định mức.
- 4.1.8. Nếu tiến hành xác định photpho bằng phương pháp thể tích thì cô cạn dung dịch axit đến còn thể tích nhỏ (tránh làm bắn mẫu ra ngoài và không được cô đến khô). Pha loãng với khoảng 10ml nước cất.

Tiến hành xác định photpho tổng số và photpho không hoà tan trong xitrat theo phương pháp đo màu hoặc phương pháp thể tích (xem 10TCN 306-97, phương pháp phân tích tổng số photpho).

5. Cách tính.

Tính % khối lượng P_2O_5 hữu hiệu:

$$\% P_2O_5 \text{ hữu hiệu} = \% P_2O_5 \text{ tổng số} - \% P_2O_5 \text{ không hoà tan trong xitrat}$$

6. Ghi chú:

Có thể tiến hành xác định photpho hữu hiệu hoà tan trong dung dịch lọc bằng cách gom dung dịch lọc bằng nước và bằng amon xitrat vào bình định mức 1000ml, thêm nước đến vạch và lắc trộn đều. Sau đó trích một thể tích chính xác 50 hoặc 100ml cho vào cốc. Thêm 10 hoặc 20ml HNO_3 đậm đặc và đun cách thủy cho đến khi oxy hoá hết chất hữu cơ (không được để cặn khô dung dịch).

Sau khi đã loại bỏ chất hữu cơ, thêm nước và chuyển sang bình định mức 100ml, thêm nước cho đến vạch. Lắc đều.

Dung dịch thu được sử dụng xác định photpho theo phương pháp thể tích hoặc phương pháp trắc quang (theo 10TCN 306-97).

PHÂN TÍCH PHÂN BÓN

PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH KALI HOÀ TAN

(Yêu cầu kỹ thuật)

1. Phạm vi áp dụng:

Tiêu chuẩn này quy định xác định kali trong các loại phân có dạng muối kali hoà tan trong nước như KCl , K_2SO_4 ...

2. Nguyên tắc:

Hoà tan mẫu trong nước cất và xác định hàm lượng kali trong dung dịch bằng quang kế ngọn lửa.

3. Thiết bị và thuốc thử:

3.1. Thiết bị:

3.1.1. Máy quang kế ngọn lửa.

3.1.2. Máy lắc.

3.1.3. Các bình định mức.

3.1.4. Cân phân tích có độ chính xác 0,0002g.

3.2. Thuốc thử:

3.2.1. Dung dịch axit clohydric 2N

3.2.2. Dung dịch tiêu chuẩn kali: Cân chính xác 1,5835g kali clorua tinh khiết (pa) đã sấy khô ở 110°C, hoà tan bằng nước trong bình định mức dung tích 1000ml và thêm nước cho đến vạch.

Dung dịch có chứa 1mg K/1ml.

4. Cách xác định:

4.1. Chuẩn bị dãy tiêu chuẩn:

Sử dụng định mức 200ml, lần lượt cho vào các bình số ml dung dịch tiêu chuẩn 1mg K/1ml và số ml HCl 2N theo bảng dưới đây rồi thêm nước đến vạch.

Ban hành kèm theo quyết định số: 1894-NN.KHCN/QĐ ngày 5 tháng 8 năm 1997 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

Nồng độ K trong dung dịch tiêu chuẩn mg/ml	Số ml dung dịch tiêu chuẩn 1mg/ml	Số ml HCl 2N
0,00	0	10
0,01	2	10
0,02	4	10
0,03	6	10
0,04	8	10
0,05	10	10
0,06	12	10

4.2. Chuẩn bị dung dịch mẫu phân tích.

4.2.1. Cân chính xác đến 0,0002g một khối lượng phân kali đã chuẩn bị theo TCN 301-97 có 0,6g-1,0g K_2O cho vào bình định mức 500ml.

4.2.2. Thêm 300ml nước và lắc 30 phút .

4.2.3. Thêm nước cho đến vạch định mức. Lắc đều.

4.2.4. Lọc qua phễu lọc khô, bỏ phần nước lọc đầu và hứng dung dịch lọc vào bình khô và sạch.

4.2.5. Lấy 5ml dung dịch mẫu cho vào bình định mức 250ml.

4.2.6. Cho thêm 12,5ml HCl 2N và thêm nước đến vạch. Lắc đều.

4.3. Đốt các dung dịch dãy tiêu chuẩn và đốt các dung dịch mẫu trên máy quang kế ngọn lửa tại bước sóng 768nm (hoặc kính lọc tương ứng).

4.4. Lập đồ thị chuẩn tương quan giữa nồng độ kali trong dung dịch tiêu chuẩn và số đo trên máy.

5. Cách tính:

Tính % khối lượng K_2O trong mẫu:

$$K_2O\% = \frac{C.500.250.1,205.100}{m.5.1000}$$

Trong đó:

C: Nồng độ kali của mẫu đốt xác định được bằng đồ thị (mg/ml)

m: Khối lượng mẫu cân (g)

1,205: Hệ số chuyển từ K sang K_2O .

PHÂN TÍCH PHÂN BÓN

PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH KALI HỮU HIỆU

(Yêu cầu kỹ thuật)

1. Phạm vi áp dụng:

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định kali hữu hiệu áp dụng cho các loại phân hữu cơ, phân hỗn hợp hữu cơ-khoáng.

2. Nguyên tắc:

Hoà tan các dạng kali hữu hiệu trong phân bằng dung dịch HCl 0,05N. Xác định hàm lượng kali trong dung dịch bằng quang kế ngọn lửa.

3. Thiết bị và thuốc thử :

3.1. Thiết bị:

3.1.1. Quang kế ngọn lửa

3.1.2. Máy lắc

3.1.3. Bình định mức 200ml

3.1.4. Pipet 10ml, 20ml

3.1.5. Bình tam giác 250ml

3.2. Thuốc thử:

3.2.1. Dung dịch HCl 1N

Hoà tan 82ml HCl đặc (1,19) thành 1000ml dung dịch bằng nước

3.2.2. Dung dịch HCl 0,05N: Hoà tan 4,1ml HCL đặc ($d=1,19$) pha trong nước thành 1000ml.

3.2.3. Dung dịch tiêu chuẩn 1000ppm K: Hoà tan 1,5835g KCl (tinh khiết) đã sấy khô ở 110 °C bằng nước thành 1000ml trong bình định mức.

3.2.4. Nước có độ dẫn điện < 2 $\mu\text{S}/\text{cm}$

4. Cách tiến hành:

4.1. Chiết mẫu

4.1.1. Cân chính xác một khối lượng mẫu phân (có chứa khoảng 100-200mg K) đã được chuẩn bị theo 10TCN-301-97 cho vào bình tam giác có dung tích 200-250ml.

4.1.2. Cho thêm 50ml dung dịch HCl 0,05N.

4.1.3. Lắc 30 phút, sau đó lọc.

4.1.4. Rửa cặn trên phễu 5 lần, mỗi lần 10ml dung dịch HCl 0,05N.

4.1.5. Gom dung dịch lọc và dung dịch rửa vào bình định mức có dung tích 200ml và thêm dung dịch HCl 0,05N cho đến vạch định mức. Lắc trộn đều dung dịch.

4.1.6. Tiến hành đồng thời mẫu trắng.

4.2. Lập thang tiêu chuẩn kali:

Sử dụng các bình định mức 200ml, lần lượt cho vào các bình số ml dung dịch tiêu chuẩn 1000ppm K và số ml dung dịch HCl 1N theo bảng dưới đây rồi thêm nước đến vạch định mức. Lắc trộn đều dung dịch.

Nồng độ K (ppm) trong dung dịch tiêu chuẩn	Số ml dung dịch tiêu chuẩn 1000ppm K	Số ml dung dịch HCl 1N
0	0	10
10	2	10
20	4	10
30	6	10
40	8	10
50	10	10
60	12	10

4.3. Xác định hàm lượng kali trong dung dịch.

4.3.1. Pha loãng dung dịch chiết mẫu bằng dung dịch HCl 0,05N theo hệ số thích hợp.

4.3.2. Đốt các dung dịch dây tiêu chuẩn, dung dịch mẫu trắng và các dung dịch mẫu trên quang kế ngọn lửa tại bước sóng 768nm (hoặc kính lọc màu tương ứng).

4.3.3. Lập đồ thị chuẩn tương quan giữa nồng độ kali trong các dung dịch tiêu chuẩn và số đo trên máy.

Căn cứ vào số đo trên máy và đồ thị chuẩn suy ra nồng độ K trong dung dịch tương ứng với số đo trên máy.

5. Cách tính kết quả:

Tính % khối lượng kali của mẫu:

$$K\% = \frac{C.f.200.100}{10^6.m}$$

Trong đó:

C: Nồng độ K trong dung dịch tương ứng số đo trên máy (ppm)

f: Hệ số pha loãng

m: Khối lượng mẫu (g)

Chú thích: $K_2O\% = K\% \cdot 1,205$

PHÂN TÍCH PHÂN BÓN PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH NITƠ HỮU HIỆU (Yêu cầu kỹ thuật)

1. Phạm vi áp dụng:

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định ni tơ hữu hiệu áp dụng cho các loại phân hữu cơ, phân hỗn hợp hữu cơ-khoáng.

2. Nguyên tắc:

Hoà tan các dạng hợp chất ni tơ dễ tiêu trong phân bằng dung dịch H_2SO_4 0,5N.

Cô cạn dung dịch thu được và công phá cạn bằng H_2SO_4 đậm đặc dựa theo phương pháp Kjeldhal.

Xác định hàm lượng nitơ trong dung dịch bằng phương pháp cất theo Kjeldhal.

3. Thiết bị và thuốc thử:

3.1. Thiết bị:

3.1.1. Cân phân tích có độ chính xác 0,2mg.

3.1.2. Bếp công phá mẫu

3.1.3. Bộ cất Kjeldhal có dung tích 100ml-200ml

3.1.4. Buret có độ chính xác 0,1 ml

3.1.5. Pipet 10ml, 20ml, 50ml

3.1.6. Bình tam giác 250ml

3.1.7. Phễu lọc đường kính 8cm

3.1.8. Cốc 250ml

3.2. Thuốc thử:

3.2.1. Dung dịch H_2SO_4 0,5N

Hoà tan 14ml H_2SO_4 đặc ($d = 1,84$) thành 1000ml dung dịch bằng nước

3.2.2. Hỗn hợp Se và K_2SO_4

Nghiền nhỏ 1g Selen và 100g K_2SO_4 . Trộn đều hỗn hợp, đựng trong lọ kín.

3.2.3. Dung dịch NaOH 10N.

Hoà tan 400g NaOH thành 1000ml dung dịch bằng nước.

3.2.4. Hỗn hợp Devarda

Nghiền nhỏ qua rây 0,20mm và trộn đều các kim loại Cu, Al, Zn theo tỉ lệ khối lượng 50:45:5. Bảo quản hỗn hợp trong bình khô, kín.

3.2.5. Dung dịch chỉ thị màu hỗn hợp

Hòa tan 0,099g bromocresol xanh lục và 0,066g metyl đỏ trong 100ml etanol

3.2.6. Dung dịch axit boric bão hoà và chỉ thị màu

Hoà tan 50g H_3BO_3 trong khoảng 900ml nước nóng. Để nguội và thêm 20ml dung dịch chỉ thị màu hỗn hợp. Cho thêm từng giọt dung dịch NaOH 0,1 N cho đến khi dung dịch có màu đỏ tía nhạt. Thêm nước cho đủ 1000ml.

3.2.7. Dung dịch chuẩn HCl hoặc H_2SO_4 0,1N

3.2.8. Nước không N có độ dẫn điện $< 0,2 \mu S/cm$

4. Cách tiến hành:

4.1. Chiết mẫu

4.1.1. Cân chính xác một khối lượng mẫu phân (có chứa khoảng 30-200mg N hữu hiệu) đã được chuẩn bị theo 10TCN-301-97 cho vào bình tam giác có dung tích 200-250ml.

4.1.2. Cho thêm 30ml dung dịch H_2SO_4 0,5N, lắc vài phút và để ngâm qua đêm (16- 18 giờ)

4.1.3. Sau khi ngâm qua đêm, lắc lại vài ba phút và lọc. Dung dịch lọc ban đầu có thể đục, cần lọc lại.

4.1.4. Rửa cặn trên phễu 5 lần, mỗi lần 10ml dung dịch H_2SO_4 0,5N.

4.1.5. Gom dung dịch lọc và dung dịch rửa vào bình định mức 100ml, thêm dung dịch H_2SO_4 0,5N cho đến vạch định mức. Trộn đều dung dịch.

4.1.6. Tiến hành đồng thời mẫu trắng, không có mẫu phân.

4.2. Cô cạn dung dịch và công phá mẫu.

4.2.1. Dùng pipet lấy 1 thể tích chính xác dung dịch có chứa khoảng 30-60mg N cho vào cốc có dung tích 250ml.

4.2.2. Cô cho dung dịch đến gần khô (còn khoảng 1ml dung dịch).

4.2.3. Cho thêm 1g hỗn hợp xúc tác Se- K_2SO_4 và 5ml H_2SO_4 đặc ($d= 1,84$)

4.2.4. Đun sôi cho đến khi xuất hiện khói trắng và trắng mẫu.

4.2.5. Để nguội mẫu và chuyển mẫu qua bình định mức 100ml. Thêm nước cho đến vạch định mức.

4.2.6. Tiến hành đồng thời mẫu trắng .

4.3. Xác định NH_4^+ trong dung dịch bằng phương pháp cất.

4.3.1. Chuẩn bị bộ cất Kjeldhal, bình hứng đựng 20ml axit boric bão hoà đặt dưới ống sinh hàn.

4.3.2. Dùng pipet lấy một thể tích xác định dung dịch (4.2.5.) có chứa 15-20mg N cho vào bình cất.

4.3.3. Cho vào bình cất 0,2g hỗn hợp Devarda và sau đó cho ngay 20ml dung dịch NaOH 10N vào bình cất.

4.3.4. Tiến hành cất cho đến khi hết NH_3 (thử bằng thuốc thử Nesler), thường có dung dịch ngưng được khoảng 75-100ml.

4.4. Chuẩn độ.

Sau khi cất xong, lấy bình hứng ra và chuẩn độ hàm lượng N trong bình hứng bằng dung dịch chuẩn H_2SO_4 0,1N cho đến khi màu dung dịch chuyển từ xanh sang đỏ tía nhạt.

5. Cách tính kết quả:

Tính % khối lượng N trong mẫu phân:

$$\text{N}\% = \frac{(a - b).N.14.V.f.100}{v.1000.m}$$

$$\text{N}\% = \frac{(a - b).N.1,4.V.f}{v.m}$$

Trong đó:

a: Thể tích dung dịch chuẩn axit chuẩn độ mẫu (ml)

b: Thể tích dung dịch chuẩn axit chuẩn độ mẫu trắng (ml)

N: Nồng độ đương lượng axit chuẩn

V: Thể tích dung dịch mẫu ban đầu (ml)

v: Thể tích dung dịch mẫu lấy để cất (ml)

f: Hệ số trích và pha loãng

14: Đương lượng gam nitơ.

PHÂN TÍCH PHÂN BÓN

Phương pháp xác định một số nguyên tố vi lượng (Yêu cầu kỹ thuật)

1. Phạm vi áp dụng:

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định các nguyên tố Cu, Zn, Mo, Co, Fe, Mn trong các loại phân vi lượng và các loại phân hỗn hợp đa nguyên tố.

2. Nguyên tắc:

Phân huỷ và hoà tan các nguyên tố vi lượng trong các mẫu phân bằng hỗn hợp HNO_3 và HCl đậm đặc, xác định hàm lượng các nguyên tố trong dung dịch bằng máy quang phổ hấp thụ nguyên tử (AAS).

3. Thiết bị và thuốc thử:

3.1. Thiết bị:

3.1.1. Máy hấp thụ nguyên tử (AAS) và các đèn catốt rỗng Cu, Zn, Mo, Co.

3.1.2. Các bình định mức 100ml, 50ml, 25ml.

3.1.3. Các pipet 10ml, 5ml, 2ml, 1ml

3.1.4. Cân phân tích có độ chính xác 0,0002g.

3.1.5. Bình công phá

3.1.6. Bếp công phá.

3.1.7. Phễu lọc có đường kính 8 cm

3.1.8. Bình định mức 50ml

3.2. Thuốc thử:

3.2.1. Axit nitric

3.2.2. Axit clohydric (PA)

3.2.3. Dung dịch axit clohydric 6M

3.2.4. Hỗn hợp 2 axit HNO_3 đặc và HCl đặc tỉ lệ thể tích 1:3 (sử dụng ngay).

Ban hành kèm theo quyết định số: 41/QĐ-BNN-KHCN ngày 24 tháng 2 năm 1999 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

3.2.5. Nước cất 2 lần hoặc nước lọc siêu sạch có độ dẫn điện $< 0,01 \mu\text{S/cm}$

3.2.6. Các dung dịch tiêu chuẩn 1000ppm Cu, Zn, Mo, Co, Fe, Mn.

4. Cách tiến hành:

4.1. Công phá mẫu

4.1.1. Cân chính xác 2-3g mẫu phân đã được chuẩn bị theo 10TCN 301- 97 và nghiền nhỏ qua rây 0,20mm cho vào bình công phá.

4.1.2. Cho 10ml hỗn hợp 2 axit HNO_3 và HCl đặc.

4.1.3. Đun nhẹ cho đến khi trắng mẫu và xuất hiện khói trắng, tiếp tục cô cạn mẫu.

4.1.4. Để nguội và hoà tan với 5ml dung dịch HCl 6M, đun sôi 5 phút.

4.1.5. Để nguội và lọc, sau đó chuyển dung dịch lọc qua bình định mức 50ml và thêm nước đến vạch.

4.1.6. Tiến hành đồng thời mẫu trắng

4.2. : Xác định hàm lượng các nguyên tố bằng AAS

4.2.1: Sử dụng AAS theo chỉ dẫn do hãng chế tạo cung cấp

4.2.2. Thành lập dãy tiêu chuẩn của các nguyên tố Cu, Zn, Mo, Co, Fe, Mn trong dung dịch HCl 0,5M nồng độ phù hợp với khoảng đo của AAS.

4.2.3. Pha loãng dung dịch xác định bằng dung dịch HCl 0,5M cho phù hợp với khoảng xác định.

4.2.4. Đốt dãy tiêu chuẩn, mẫu trắng và các dung dịch xác định trên AAS.

- Xác định Cu tại bước sóng 324,7nm ngọn lửa $\text{C}_2\text{H}_2/\text{KK}$
- Xác định Zn tại bước sóng 213,9nm ngọn lửa $\text{C}_2\text{H}_2/\text{KK}$
- Xác định Mo tại bước sóng 313,3nm ngọn lửa $\text{C}_2\text{H}_2/\text{N}_2\text{O}$
- Xác định Co tại bước sóng 240,7nm ngọn lửa $\text{C}_2\text{H}_2/\text{KK}$
- Xác định Fe tại bước sóng 248,4nm ngọn lửa $\text{C}_2\text{H}_2/\text{KK}$
- Xác định Mn tại bước sóng 279,5nm ngọn lửa $\text{C}_2\text{H}_2/\text{KK}$

5. Cách tính kết quả:

Tính hàm lượng khối lượng các nguyên tố vi lượng theo $10^4 \%$ (ppm)

$$10^4\%X = \frac{C.f.V}{m}$$

C: Nồng độ của nguyên tố trong dung dịch xác định (ppm)

f: Hệ số pha loãng.

V: Thể tích dung dịch định mức (ml)

m: Khối lượng mẫu (g)

$$10^4 : \frac{10^6}{10^2}$$

PHÂN TÍCH PHÂN BÓN

PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH LƯU HUỖNH

(Yêu cầu kỹ thuật)

1. Phạm vi áp dụng:

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định lưu huỳnh tổng số của các loại có chứa lưu huỳnh bằng phương pháp khối lượng.

2. Nguyên tắc:

Thủ tục này dựa trên nguyên lý phân huỷ và hoà tan lưu huỳnh dưới dạng sunfat bằng hỗn hợp HCl và HNO₃, xác định sunfat trong dung dịch bằng phương pháp khối lượng với kết tủa BaSO₄.

3. Thiết bị và thuốc thử:

3.1. Thiết bị:

3.1.1. Lò nung

3.1.2. Tủ sấy

3.1.3. Cân phân tích có độ chính xác 0,0002g

3.1.4. Bình hút ẩm

3.1.5. Bình công phá

3.1.6. Chén chịu nhiệt

3.1.7. Phễu có đường kính 4cm

3.1.8. Cốc 500 ml

3.1.9. Bếp điện có điều chỉnh nhiệt độ

3.2. Thuốc thử:

3.2.1. Axit nitric đặc (69-71%)

3.2.2. Dung dịch HCl 1:1

3.2.3. Dung dịch bari clorua 10% trong nước

Ban hành kèm theo quyết định số: 41/QĐ-BNN-KHCN ngày 24 tháng 2 năm 1999 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

3.2.4. Nước có độ dẫn điện < 2 $\mu\text{S}/\text{cm}$ và pH từ 5,6-7,0

4. Cách tiến hành:

- 4.1. Cân chính xác 1-2g mẫu phân đã được chuẩn bị theo 10TCN-301-97 cho vào bình công phá.
- 4.2. Thêm 20ml dung dịch HCl (1:1) và 30ml dung dịch HNO_3 đặc. Đậy bình công phá bằng một phễu nhỏ. Đun sôi cho hết khối đỏ và dung dịch trong suốt.
- 4.3. Lọc và sử dụng nước nóng rửa 5-6 lần cho đến khi dung dịch thu được trong cốc hứng đến 250ml.
- 4.4. Đun nóng đến gần sôi và thêm 10ml dung dịch BaCl_2 10%, lắc nhẹ.
- 4.5. Giữ nhiệt độ gần sôi và để yên cho lắng khoảng 30 phút.
- 4.6. Lọc gạn và kết hợp rửa kết tủa bằng nước nóng 5-6 lần, cuối cùng chuyển toàn bộ kết tủa lên giấy lọc.
- 4.7. Chuyển giấy lọc vào chén chịu nhiệt đã biết khối lượng. Sấy khô và sau đó nung ở nhiệt độ 700-800°C cho đến khi kết tủa hoàn toàn trắng.
- 4.8. Để nguội chén trong bình hút ẩm, cân khối lượng chén và BaSO_4 .
- 4.9. Tiến hành đồng thời mẫu trắng.

5. Cách tính kết quả:

$$\%S = \frac{(a - b - c) \cdot 0,1374}{m} \cdot 100$$

a: Khối lượng cốc và BaSO_4 sau khi nung (g).

b: Khối lượng cốc khô không có BaSO_4 (g)

c: Khối lượng BaSO_4 xác định mẫu trắng (g)

m: Khối lượng mẫu phân (g).

0,1374: Hệ số chuyển đổi BaSO_4 thành S

PHÂN TÍCH PHÂN BÓN

Phương pháp xác định clorua hoà tan trong nước (Yêu cầu kỹ thuật)

1. Phạm vi áp dụng:

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định clorua (Cl^-) hoà tan trong nước của các loại phân có chứa Cl^- như NH_4Cl , KCl ...

2. Nguyên tắc:

- Hoà tan clorua trong mẫu phân vào nước và xác định hàm lượng clorua bằng phương pháp chuẩn độ với dung dịch chuẩn bạc nitrat sử dụng chỉ thị màu kali cromat.

3. Thiết bị và thuốc thử:

3.1. Thiết bị:

3.1.1. Buret

3.1.2. Bình định mức 250ml

3.1.3. Phễu đường kính 8cm

3.1.4. Pipet 25ml hoặc 50ml

3.1.5. pH met

3.2. Thuốc thử:

3.2.1. Dung dịch chuẩn NaCl 0,02N: Cân chính xác 1,1689g NaCl tinh khiết đã sấy khô ở 140°C , hoà tan vào nước thành 1 lít trong bình định mức bằng nước không có Cl^- .

3.2.2. Dung dịch chuẩn AgNO_3 0,02N: Hoà tan 3,397g AgNO_3 thành 1 lít dung dịch bằng nước. Chuẩn hoá nồng độ bằng cách chuẩn độ với dung dịch chuẩn NaCl 0,02N (như 4.6 - 4.7). Dung dịch đựng trong lọ màu tối, để chỗ tối. Trước khi sử dụng phải chuẩn hoá nồng độ.

3.2.3. Dung dịch sắt kali cromat 5% pha trong nước.

3.2.4. Nước có độ dẫn điện $< 2\mu\text{S}/\text{cm}$ và pH từ 5,6-7,0.

4. Cách tiến hành:

Ban hành kèm theo quyết định số: 41/QĐ-BNN-KHCN ngày 24 tháng 2 năm 1999 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

- 4.1. Cân chính xác khoảng 2g mẫu phân đã được chuẩn bị theo 10TCN-301-97 cho vào bình tam giác 250ml.
- 4.2. Cho 50ml nước đun sôi vào bình và lắc cho hoà tan clorua trong mẫu. Để lắng nếu còn cặn không tan.
- 4.3. Lọc, gạn dung dịch trong lên phễu và hứng dung dịch vào bình định mức 250ml.
- 4.4. Tiếp tục hoà tan cặn với 50ml nước sôi và lọc. Làm như vậy ít nhất 3 lần, sau đó dồn toàn bộ cặn lên giấy lọc.
- 4.5. Để nguội dung dịch và thêm nước cất đến định mức. Lắc đều.
- 4.6. Dùng pipet lấy 50ml dung dịch lọc cho vào bình tam giác, điều chỉnh pH của dung dịch đến trung tính bằng dung dịch NaOH 0,1N và thêm 3-4 giọt dung dịch kali cromat.
- 4.7. Chuẩn độ với dung dịch chuẩn bạc nitrat cho đến dung dịch chuyển màu đỏ.
- 4.8. Tiến hành đồng thời mẫu trắng.

5. Cách tính kết quả:

$$\%Cl = \frac{(a - b).N.35,45.250/50.100}{1000.m}$$

$$\%Cl = \frac{(a - b).N.17,725}{m}$$

a: Thể tích dung dịch chuẩn $AgNO_3$ chuẩn độ mẫu (ml)

b: Thể tích dung dịch chuẩn $AgNO_3$ chuẩn độ mẫu trắng (ml)

N: Nồng độ đương lượng dung dịch chuẩn $AgNO_3$

m: Khối lượng mẫu (g)

35,45: Đương lượng gam Cl^-

250/50: Hệ số trích .

PHÂN TÍCH PHÂN BÓN

Phương pháp xác định axit humic và axit fulvic (Yên cầu kỹ thuật)

1. Phạm vi áp dụng:

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định axit humic và axit fulvic áp dụng cho than bùn và các loại phân hỗn hợp hữu cơ-khoáng.

2. Nguyên tắc:

Hoà tan axit humic và axit fulvic bằng dung dịch kiềm, xác định tổng số axit humic và axit fulvic hoà tan trong kiềm bằng phương pháp xác định cacbon hữu cơ Walkley-Black.

Dựa vào tính chất không tan trong axit của axit humic có thể tách riêng axit humic và xác định hàm lượng bằng phương pháp Walkley-Black.

3. Thiết bị và thuốc thử.

3.1. Thiết bị:

3.1.1. Cân phân tích có độ chính xác 0,0002g.

3.1.2. Buret có độ chính xác 0,1 ml.

3.1.3. Pipet 5ml, 10ml.

3.1.4. Cốc 250ml.

3.1.5. Phễu lọc đường kính 8cm.

3.1.6. Bếp cách thủy.

3.2. Thuốc thử:

3.2.1. Dung dịch chuẩn kali bicromat M/6: Cân chính xác 49,04g $K_2Cr_2O_7$ (TK) đã sấy khô ở $105^\circ C$, hoà tan vào nước thành 1 lít trong bình định mức.

3.2.2. Axit sunfuric đặc TK ($d = 1,84$)

3.2.3. Dung dịch muối Mhor 0,5M: Cân 196g muối Mo $FeSO_4 \cdot (NH_4)_2 \cdot 6H_2O$ vào 50ml H_2SO_4 đặc và thêm nước đến 1 lít. Để lắng trong. Lọc nếu đục.

Ban hành kèm theo quyết định số: 41/QĐ-BNN-KHCN ngày 24 tháng 2 năm 1999 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

3.2.4. Hỗn hợp natri hydroxit-pyrophotphat pH=13:

Hoà tan 44,6g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ và 4g NaOH thành 1 lít dung dịch bằng nước cất (dung dịch có nồng độ 0,1 M cho mỗi loại)

3.2.5. Dung dịch H_2SO_4 1N**3.2.6. Dung dịch H_2SO_4 0,05N.****3.2.7. Dung dịch NaOH 0,05N****3.2.8. Các chỉ thị màu**

- Chỉ thị màu Ferroin: Hoà tan 0,695g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và 1,485g o.phenaltroline monohydrat ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) trong 100ml nước cất.
- Chỉ thị màu Barri diphenyl amin sunfonat nồng độ 0,16% trong nước
- Chỉ thị màu axit N.diphenyl anthranilic 0,1% cũng 0,1% Na_2CO_3 trong nước.

3.2.9. Nước có độ dẫn điện < $2\mu\text{S}/\text{cm}$.**4. Cách tiến hành:****4.1. Chiết mẫu.**

4.1.1. Cân chính xác 3-5g mẫu phân đã được chuẩn bị theo 10 TCN-301-97 và nghiền nhỏ qua rây 0,20mm, cho vào bình tam giác 250ml.

4.1.2. Rửa và gạn nhiều lần bằng nước nóng cho hoà tan các hợp chất hoà tan trong nước (các loại phân khoáng, các chất khử vô cơ như Fe^{+2} , Mn^{+2} , S^{2-} ...)

4.1.3. Cô mẫu cho đến gần khô (không để cháy).

4.1.4. Rót vào 100ml hỗn hợp natri hydroxit-pyrophotphat pH=13.

4.1.5. Lắc đều và để qua đêm

4.1.6. Lọc qua giấy lọc mịn, nếu đục cần lọc lại.

4.2. Xác định tổng số axit humic và axit fulvic.

4.2.1. Dùng pipet lấy 5ml hoặc 10ml dung dịch lọc (5ml với than bùn và 10ml với hỗn hợp hữu cơ-khoáng) cho vào cốc chịu nhiệt 250ml.

4.2.2. Trung hòa bằng dung dịch H_2SO_4 1N cho đến khi xuất hiện kết tủa.

4.2.3. Cô cạn đến gần khô trên bếp cách thuỷ.

4.2.4. Dùng pipet cho vào cốc 10ml dung dịch chuẩn $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ M/6, lắc trộn đều cạn vào dung dịch.

4.2.5. Thêm nhanh 20ml H_2SO_4 đậm đặc. Lắc trộn đều hỗn hợp.

4.2.6. Để yên 30 phút.

4.2.7. Thêm 100ml nước và 10ml H_3PO_4 và để thật nguội.

4.2.8. Cho 0,3ml một trong chỉ thị màu và chuẩn độ bằng muối Mhor đến khi màu chuyển.

- * Chỉ thị màu Bari diphenyl sunfonal chuyển từ màu tím sang màu xanh lá cây
- * Chỉ thị màu axit N.penyl anthranilic chuyển từ màu tím sang màu xanh lá cây
- * Chỉ thị màu Ferroin chuyển từ màu tối sang màu đỏ.

4.2.9. Tiến hành đồng thời mẫu trắng (10ml $K_2Cr_2O_7$ M/6)

4.3. Xác định axit humic.

4.3.1. Dùng pipet lấy 5-10ml dung dịch chiết rút cho vào cốc.

4.3.2. Cho từng giọt H_2SO_4 1N và khuấy đều. Sự kết tủa sẽ hoàn toàn khi dung dịch có pH=1,0 (kiểm tra bằng pH met).

4.3.3. Đun cốc trên bếp cách thủy 1-2 giờ để thúc đẩy keo tụ axit humic.

4.3.4. Để nguội và lọc. Vớt bỏ dung dịch lọc.

4.3.5. Kết tủa trên giấy lọc được hoà tan bằng dung dịch NaOH 0,05N nóng và chuyển dung dịch lọc vào cốc 250ml.

4.3.6. Trung hoà dung dịch bằng H_2SO_4 0,05N

4.3.7. Cô cạn đến gần khô trên bếp cách thủy

4.3.8. Tiến hành xác định axit humic theo Walkley-Black (từ 4.2.4 đến 4.2.8)

5. Cách tính kết quả:

Tính % khối lượng quy về C của tổng số axit humic và axit fulvic (hoặc của riêng phần axit humic)

$$\%C = \frac{(a - b).4}{a.m}$$

a: Thể tích dung dịch muối Mhor chuẩn độ mẫu trắng (ml)

b: Thể tích dung dịch muối Fhor chuẩn độ mẫu trích (ml)

m: Khối lượng mẫu tương ứng với mẫu trích (g)

Chú thích:

$\%(axit\ fulvic) = \%C\ tổng\ số\ (axit\ humic\ và\ axit\ fulvic) - \%C\ (axit\ humic).$

PHÂN TÍCH PHÂN BÓN

PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH TỔNG SỐ CACBON HỮU CƠ (Yêu cầu kỹ thuật)

1. Phạm vi áp dụng:

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định tổng số cacbon hữu cơ áp dụng cho than bùn và các loại phân hỗn hợp hữu cơ - khoáng theo phương pháp bicromat.

2. Nguyên tắc:

Oxy hoá hoàn toàn các bon hữu cơ bằng $K_2Cr_2O_7$ dư trong H_2SO_4 ở nhiệt độ ổn định 145-155°C trong thời gian chính xác 30 phút theo Nelson và Somers (1975), Anderson và Ingram (1989). Sau đó chuẩn độ lượng dư $K_2Cr_2O_7$ bằng dung dịch $FeSO_4$.

3. Thiết bị và thuốc thử:

3.1. Thiết bị:

3.1.1. Bếp công phá có điều khiển và ổn định nhiệt độ

3.1.2. Cân phân tích có độ chính xác 0,0002g

3.1.3. Buret có độ chính xác 0,1 ml

3.1.4. Bình tam giác có dung tích 250ml.

3.2. Thuốc thử:

3.2.1. Dung dịch chuẩn kali bicromat M/6 (1N): Cân chính xác 49,04g kali bicromat (TK) đã sấy khô ở 105°C, hoà tan vào nước thành 1 lít trong bình định mức.

3.2.2. Axit sunfuric đặc ($d=1,84TK$)

3.2.3. Dung dịch sắt II amon sunfat $Fe_2SO_4 \cdot (NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ (muối Mhor) 0,5M: Cân 196g muối Mhor, hoà tan vào 50ml H_2SO_4 đặc và thêm nước đến 1 lít. Để cho lắng trong. Lọc nếu đục. Đựng trong lọ kín tránh oxy của không khí.

3.2.4. Các chỉ thị màu:

Có thể sử dụng các chỉ thị màu sau:

- Dung dịch bari diphenylamin sunfonat 0,16% trong nước.

- Dung dịch axit N-phenylanthranilic: Trộn đều 0,1g axit N- phenylantranilic và 0,1 g Na_2CO_3 với một ít nước, sau đó hoà tan thành 100ml nước.
- Dung dịch chỉ thị Ferroin: pha 0,695g sắt II sunfat $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và 1,485g o.phenaltrolin monohydrat ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) trong 100ml nước.

3.2.5. Nước có độ dẫn điện $< 2\mu\text{S}/\text{cm}$

4. Cách tiến hành

- 4.1. Cân chính xác một khối lượng mẫu phân đã được chuẩn bị theo 10 TCN-301- 97 và nghiền nhỏ qua rây 0,20mm có chứa không quá 20mg cacbon hữu cơ cho vào bình công phá.
- 4.2. Rửa và gạn nhiều lần bằng nước nóng cho hoà tan các hợp chất hoà tan trong nước (các loại phân khoáng, các chất khử vô cơ như Fe^{+2} , Mn^{+2} , S^{2-} ...)
- 4.3. Cô mẫu cho đến gần khô (không để cháy).
- 4.4. Thêm chính xác 10,00ml dung dịch $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ M/6 và 15ml H_2SO_4 đặc.
- 4.5. Đặt bình công phá trong bếp công phá và đun bình ở nhiệt độ $145-155^\circ\text{C}$ trong thời gian chính xác 30 phút (bấm đồng hồ).
- 4.6. Chuyển toàn bộ hỗn hợp công phá sang bình tam giác 250ml và thêm 100ml nước cất, 10ml H_3PO_4 . Để thật nguội.
- 4.7. Cho 0,3ml chỉ thị màu và chuẩn độ lượng dư $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ bằng dung dịch muối Mhor 0,5M.
 - * Chỉ thị màu Bari diphenyl sunfonat, màu chuyển từ xanh tím sang xanh lá cây.
 - * Chỉ thị màu axit N.phenylanthranilic, màu chuyển từ tím sang xanh lá cây
 - * Chỉ thị màu Ferroin, màu chuyển từ xanh tối sang đỏ
- 4.8. Tiến hành đồng thời mẫu trắng.

5. Cách tính kết quả:

Tính % khối lượng cacbon hữu cơ (OC) trong

$$\% \text{OC} = \frac{(a - b) \cdot 3}{a \cdot m}$$

$$\% \text{OM} = \frac{(a - b) \cdot 5,172}{a \cdot m}$$

Trong đó:

a: Thể tích dung dịch muối Mhor chuẩn độ mẫu trắng (ml)

b: Thể tích dung dịch muối Mhor chuẩn độ mẫu (ml)

m: Khối lượng mẫu xác định (g)

3: đương lượng gam C.

TIÊU CHUẨN PHÂN BÓN

PHẦN IV.1: PHÂN VI SINH VẬT

PHÂN BÓN VI SINH VẬT CỐ ĐỊNH NITƠ

Nitrogen-fixing microbial fertilizer

TCVN 6166-1996 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN /TC 134 B - "Phân bón vi sinh vật" biên soạn. Tổng cục Tiêu chuẩn - Đo lường - Chất lượng đề nghị. Bộ Khoa học Công nghệ & Môi trường ban hành.

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 và qui định các yêu cầu kỹ thuật; phương pháp kiểm tra đánh giá đối với phân bón vi sinh vật cố định nitơ.

2. Tiêu chuẩn trích dẫn

TCVN 1694-75 Lấy mẫu các sản phẩm hoá học.

TCVN 4833-89 (ISO 4833-1978) 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 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 cố định nitơ (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 sống đã được tuyển chọn với mật độ đạt tiêu chuẩn hiện hành, có khả năng cố định nitơ (sống tự do, hội sinh hoặc cộng sinh) cung cấp các hợp chất chứa nitơ cho đất và cây trồng; tạo điều kiện nâng cao năng suất và (hoặc) chất lượng nông sản, tăng độ màu mỡ của đất. Các chủng vi sinh vật này 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 cố định nitơ phải chứa một hoặc nhiều chủng vi sinh vật có khả năng cố định nitơ, sống cộng sinh hay hội sinh với cây trồng hoặc sống tự do trong đất, nước và không khí.

- 4.2. Phân bón vi sinh vật cố định nitơ phải có mật độ vi sinh vật sống phù hợp với qui 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. Vi sinh vật cố định nitơ, không nhỏ hơn	$1,0 \times 10^9$	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^6$
2. Vi sinh vật tạp, không lớn hơn	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	-	-

*CFU: Đơn vị hình thành khuẩn lạc.

- 4.3. Phân bón vi sinh vật cố định nitơ phải có tác dụng tốt đối với đất và cây trồng. Phân bón vi sinh vật cố định nitơ phải đạt được các chỉ tiêu chất lượng như đã ghi trong nhãn và được xác định tại phòng thử nghiệm được công nhận hoặc chỉ định.
- 4.4. Độ an toàn của các chủng vi sinh vật chứa trong phân bón vi sinh vật cố định nitơ phải được xác định và công nhận tại phòng thí nghiệm được công nhận hay chỉ định.
- 4.5. Thời hạn bảo quản của phân bón vi sinh vật cố định nitơ không ít hơn 6 tháng kể từ ngày xuất xưởng.
- 4.6. Hàm lượng các chất dinh dưỡng và độ ẩm của phân bón vi sinh vật cố định nitơ được đăng ký tại các cơ quan quản lý nhà nước về chất lượng và được xác định, đánh giá tại các phòng thử nghiệm được công nhận hoặc chỉ định.

5. Lấy mẫu.

5.1 Qui 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 phải 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 bảo đảm tránh sự lây 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.
- 5.1.3. Không được bổ sung thêm bất cứ một tác nhân bảo quản, diệt khuẩn hoặc diệt nấm nào 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 mẫu được đưa ngay vào các dụng cụ chứa.
- 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 gỉ 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 170⁰C trong thời gian không ít hơn 1h hoặc trong nồi hấp ở nhiệt độ 121⁰C 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 cố định nitơ 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 qui 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 cây trồng được sử dụng;
- Tên cơ sở sản xuất, tên khoa học của 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. Tiến hành kiểm tra và xác định

- 6.1. Xác định hiệu quả của phân bón vi sinh vật cố định nitơ.

Hiệu quả của phân bón vi sinh vật cố định nitơ 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 VSV 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 $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- Hộp lồng thuỷ tinh hoặc chất dẻo, đường kính từ 90 đến 100mm;
- Pipet thuỷ tinh có dung tích 1,0ml; 5,0ml; 10,0ml;
- 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 thuỷ ổn nhiệt;
- Ống nghiệm thuỷ tinh 18mm x 180mm;
- Bình tam giác có dung tích thích hợp;
- Ống đong và các dụng cụ thuỷ tinh khác.

Các dụng cụ dùng trong xác định vi sinh vật phải khử trùng bằng cách:

- Giữ ở từ 170 đến 175°C không ít hơn 1 h trong tủ sấy, hoặc
- Giữ áp suất ở 1,0 atmophe (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 vòng/min, có bình chứa bằng kim loại hoặc thuỷ tinh, chịu được các điều kiện tiệt trùng;
- Dụng cụ trộn nhu động (stomacher) với các túi chất dẻo đã vô trùng;
- Dụng cụ trộn: có thể trộn từ 1ml đến 2ml mẫu thử;
- Cân kỹ thuật có độ chính xác tới 0,01g.

6.2.1.2. Dịch pha loãng là dung dịch muối ăn (NaCl) 0,85%, không chứa các hợp chất nitơ, có độ pH là 7,0 sau khi khử trùng ở 25°C .

Lấy 90 ml dịch pha loãng vào 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 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.

6.2.1.3. Chuẩn bị môi trường kiểm tra

Môi trường dùng để kiểm tra phân vi sinh vật cố định nitơ được sử dụng là môi trường không có hợp chất nitơ 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 chia vào các dụng cụ thuỷ tinh đã chuẩn bị, rồi khử trùng ở điều kiện 1atmotphe (121°C) trong 30 min. Phân 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 cố định nitơ chứa các 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, 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, nhịp quay của dụng cụ này được chọn sao cho mẫu trộn như cuộn xoáy dâng lên cách mép lọ chứa khoảng 2 đến 3cm. Dung dịch tạo ra được gọi là dung dịch huyền phù ban đầu;

b) Đối với mẫu dạng đặc: cân 10g 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 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 (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 một pipet khác có nút bông ở đầu hút đã vô trùng, 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 quy định sau:

- Đối với phân vi sinh vật trên nền chất mang thanh trùng sử dụng nồng độ pha loãng 10^{-7} ;
- Đối với phân vi sinh vật trên nền chất mang không thanh trùng sử dụng nồng độ pha loãng 10^{-5} .

6.2.2.2. Cấy mẫu

Dùng pipet vô trùng riêng cho từng độ pha loãng lấy ra từ các dịch mẫu có nồng độ pha loãng $10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}$ đối với mẫu phân vi sinh vật 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 mẫu là 0,05ml, cấy vào 1 hộp lồng chứa môi trường đã chuẩn bị sẵn trong 6.2.1.3. Mỗi mẫu được cấy lập lại 2 hộp lồng.

Lắc nhẹ hộp lồng để dịch mẫu dàn 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 là 48 - 72 h cho vi sinh vật mọc nhanh, 120 h cho loại mọc chậm.

6.2.3. Đọc kết quả

Vi sinh vật cố định nitơ được tính là số khuẩn lạc có tính đặc trưng mọc trên môi trường nuôi cấy.

Vi sinh vật tạp là tất cả các khuẩn lạc không có tính đặc trưng mọc trên môi trường nuôi cấy.

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

Mật độ vi sinh vật trong 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 5 đến 50 khuẩn lạc;

2) Số lượng khuẩn lạc trung bình cũng có thể được tính là trung bình cộng số lượng khuẩn lạc của các hộp lồng được cấy từ hai độ pha loãng kế tiếp nhau bằng cách tính số khuẩn lạc trung bình cộng 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 2. Nếu tỷ số này lớn hơn 2 thì lấy giá trị nhỏ làm kết quả;

3) Mật độ vi sinh vật trên một đơn vị kiểm tra được biểu thị bằng một số 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 qui 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 kiểm tra (tất cả 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 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. Yêu cầu bao gói, ghi nhãn, bảo quản và hướng dẫn sử dụng

7.1 Phân vi sinh vật cố định nitơ phải được bao gói bằng các chất liệu bảo đảm không gây độc hại tới vi sinh vật, người, động, thực vật và môi trường sinh thái, đồng thời đảm bảo thời hạn bảo quản của phân bón trước điều kiện bất lợi từ bên ngoài.

7.2 Trên mỗi bao (gói) sản phẩm phân vi sinh vật cố định nitơ 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 mang 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 qui 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

(Qui định)

A.1. Môi trường kiểm tra vi sinh vật cố định nitơ sống cộng sinh

K_2HPO_4	0,5g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2g
NaCl	0,1g
Mannitol	10,0g
Cao nấm men	0,5g
Aga	20,0g
Dung dịch Công gô đỏ 1%	2,5ml
Nước cất vừa đủ	1000ml
pH	6,8 - 7,0

A.2. Môi trường kiểm tra vi sinh vật cố định nitơ sống tự do

Mannitol	20,0g
K_2HPO_4	0,2g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2g
NaCl	0,2g
K_2SO_4	0,1g
$CaCO_3$	5,0g
Aga	20,0g
Nước cất vừa đủ	1000ml
pH	6,8 - 7,0

A.3. Môi trường kiểm tra vi sinh vật cố định nitơ sống hội sinh.

Axit malic	5,0g
KOH	4,0g
K_2HPO_4	0,5g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0,01g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1g
NaCl	0,02g
$CaCl_2$	0,01g
Na_2MoO_4	0,002g
Bromotymol blue 0,5% (cồn etylic)	2ml
Aga	20,0g
Nước cất vừa đủ	1000ml

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

Phosphat-solubilizing microbial fertilizer

TCVN 6167:1996 do Ban Kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC 134 B-"Phân bón vi sinh vật" biên soạn. Tổng cục Tiêu chuẩn - Đo Lường - Chất lượng đề nghị. Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường ban hành.

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 4833-1978) 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 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 sống 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 photpho khó tan phải chứa một hoặc nhiều chủng vi sinh vật có khả năng tạo vòng phân giải trên môi trường chứa nguồn photpho duy nhất là tricanxi photphat $[Ca_3(PO_4)_2]$ hoặc lexitin.
- 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 qui 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. Vi sinh vật phân giải hợp chất photpho khó tan, không nhỏ hơn	$1,0 \times 10^9$	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^6$
2. Vi sinh vật tạp, không lớn hơn	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	-	-

*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 phòng thử nghiệm được công nhận hay chỉ định.
- 4.4. Độ an toàn của các chủng vi sinh vật chứa trong phân bón phải được xác định và công nhận tại các phòng 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 phòng thí nghiệm được công nhận hay chỉ định.

5. Lấy mẫu

5.1. Qui 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 sung thêm bất cứ một tác nhân bảo quản, diệt khuẩn hoặc diệt nấm nào 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 bằng thép không gỉ 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 1h 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 qui 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 cây 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 photpho 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 $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- Hộp lồng thủy tinh hoặc chất dẻo, đường kính từ 90 đến 100mm;
- Pipet thủy tinh có dung tích 1,0ml; 5,0ml; 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 18mmx180mm;
- Bình tam giác có dung tích thích hợp;
- Ống đong 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 1h trong tủ sấy, hoặc
- Giữ ở áp suất 1,0 atm (121 $^{\circ}\text{C}$) 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 vòng/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 chất dẻo đã vô trùng;
- Dụng cụ trộn: có thể trộn từ 1ml đến 2ml 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 90ml dịch pha loãng vào các bình cầu hoặc lọ bằng chất dẻo (cho dịch huyền phù ban đầu), hoặc

Lấy 9ml 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 30min.

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 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.

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 phân vào các dụng cụ thuỷ tinh đã chuẩn bị trước rồi khử trùng ở điều kiện 1atmotphe (121°C) trong 30 min. Phân 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 10ml mẫu để trộn đều bằng lắc tay hay thiết bị lắc cơ học và đưa vào 90ml 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 5-10s, nhịp 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 10g mẫu có độ chính xác tới 0,01g 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 1ml dịch huyền phù ban đầu (a hoặc b) cho vào ống nghiệm chứa 9ml 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 một 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 lặp lại liên tục để có dịch mẫu có nồng độ pha loãng theo qui định sau:

- Đối với phân vi sinh vật 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 vật 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 0,05ml, cấy vào 1 hộp lồng chứa môi trường đã chuẩn bị sẵn theo 6.2.1.3. Mỗi mẫu được cấy lặp lại 2 hộp lồng.

Lắc nhẹ hộp lồng để dịch mẫu dàn 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 hộp lồng tạo vòng phân giải (vòng tròn 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 trong 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 của các hộp lồng được cấy từ hai độ pha loãng kế tiếp nhau bằng cách tính 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 vật trên một đơn vị kiểm tra được biểu thị bằng một số 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 qui định hiện hành.

6.2.5. 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 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. 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 qui 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

(Qui định)

A.1. Môi trường kiểm tra vi sinh vật phân giải các hợp chất photpho vô cơ khó tan

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

PHÂN BÓN VI SINH VẬT PHÂN GIẢI XENLULOZA*Cellulose-degrading microbial fertilizer*

TCVN 6168-1996 do Ban Kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC 134 B-"Phân bón vi sinh vật" biên soạn. Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường - Chất lượng đề nghị. Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường ban hành.

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 xenluloza và qui định các yêu cầu kỹ thuật, phương pháp kiểm tra đánh giá đối với phân bón vi sinh vật phân giải xenluloza.

2. Tiêu chuẩn trích dẫn

TCVN 4833-89 (ISO 4833-1978) 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 dung dịch pha loãng để kiểm nghiệm vi sinh vật.

TCVN 5814-1994 Phân 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 xenluloza là sản phẩm chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật sống đã được tuyển chọn với mật độ đạt tiêu chuẩn hiện hành có khả năng phân giải xenluloza, qua đó cung cấp chất dinh dưỡng cho đất và cây trồng, tạo điều kiện nâng cao năng suất và (hoặc) chất lượng nông sản, tăng độ màu mỡ của đất. Phân vi sinh vật phân giải xenluloza và các chủng vi sinh vật này 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 xenluloza phải chứa một hoặc nhiều chủng vi sinh vật có khả năng phát triển trên môi trường chứa nguồn cacbon duy nhất là xenluloza tự nhiên.
- 4.2. Phân bón vi sinh vật phân giải xenluloza phải có mật độ vi sinh vật sống phù hợp với qui 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. Vi sinh vật phân giải xenluloza, không nhỏ hơn	$1,0 \times 10^9$	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^6$
2. Vi sinh vật tạp, không lớn hơn	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	-	-

*CFU: Đơn vị hình thành khuẩn lạc.

- 4.3. Phân vi sinh vật phân giải xenluloza phải có tác dụng tốt đối với đất và cây trồng. Hiệu quả của phân bón phải đạt các chỉ tiêu chất lượng đã ghi trên nhãn và được xác định tại phòng thử nghiệm được công nhận hoặc chỉ định.
- 4.4. Độ an toàn của các chủng vi sinh vật chứa trong phân phải được xác định và công nhận tại các phòng thử nghiệm được công nhận hoặc chỉ định.
- 4.5. Thời gian bảo hành của phân bón vi sinh vật phân giải xenluloza không ít hơn 6 tháng kể từ ngày xuất xưởng.
- 4.6. Hàm lượng các chất dinh dưỡng và độ ẩm của phân bón vi sinh vật phân giải xenluloza phải được đăng ký tại các cơ quan quản lý nhà nước về chất lượng và được xác định đánh giá tại các phòng thí nghiệm được công nhận hoặc chỉ định.

5. Lấy mẫu

5.1. Qui 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 phải 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 sung thêm bất cứ một tác nhân bảo quản, diệt khuẩn hoặc diệt nấm nào 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 gỉ 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 1h 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 xenluloza 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 qui 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 cây 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 xenluloza

Hiệu quả của phân vi sinh vật phân giải xenluloza 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 $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- Hộp lồng thuỷ tinh hoặc chất dẻo, đường kính từ 90 đến 100 mm;
- Pipet thuỷ tinh có dung tích 1,0 ml; 5,0ml; 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 thuỷ ổn nhiệt;
- Ống nghiệm thuỷ tinh 18 mm x 180 mm;
- Bình tam giác có dung tích thích hợp;
- Ống đồng và các dụng cụ thuỷ tinh khác.

Các dụng cụ dùng trong xác định vi sinh vật phải khử trùng bằng cách:

- Giữ ở từ 170 đến 175°C không ít hơn 1h trong tủ sấy, hoặc
- Giữ ở áp suất 1,0 atm (121 $^{\circ}\text{C}$) không ít hơn 30min trong nồi hấp.

Các thiết bị pha trộn.

- Máy trộn quay có tần số quay từ 8000 đến 45000 vòng/min, có bình chứa bằng kim loại hoặc thuỷ tinh, chịu được các điều kiện tiệt trùng;
- Dụng cụ trộn nhu động (stomacher) với các túi chất dẻo 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 được dùng là dung dịch muối ăn (NaCl) 0,85%, không chứa các hợp chất cacbon, 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 9ml 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 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.

6.2.1.3. Chuẩn bị môi trường kiểm tra

Môi trường dùng để kiểm tra phân vi sinh vật phân giải xenluloza được sử dụng là môi trường chứa nguồn cacbon duy nhất là xenluloza tự nhiên, 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 chia vào các dụng cụ thủy tinh đã chuẩn bị trước rồi khử trùng ở điều kiện 1 atmophe (121°C) trong 30 min. Phân 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 phân giải xenluloza chứa các vi sinh vật dưới dạng tiềm sinh, trước khi kiểm tra cần phải hoạt hóa.

6.2.1.4. Chuẩn bị dịch huyền phù xenluloza

Cân 30g giấy lọc loại định lượng (thí dụ Whatman 1) xé thành mảnh nhỏ cho vào bình thủy tinh có dung tích 4lít, thêm một lít nước cất và một ít viên bi thủy tinh sao cho đủ ngập giấy. Lắp bình vào máy lắc, lắc cơ học với tốc độ 74 lần/min trong khoảng 30 min, để lắng sau 24h chất lấy dung dịch huyền phù xenluloza.

6.2.1.5. Chuẩn bị dung dịch chỉ thị Benedict

Thành phần dung dịch Benedict:

- Natri xitrat 17,3g
- Na₂CO₃ 10,0 g
- CuSO₄.7H₂O 1,73 g
- Hòa tan natri xitrat và Na₂CO₃ vào 80 ml nước ấm. Bổ sung nước cất vừa đủ để đạt 85ml (dung dịch A);
- Hoà tan CuSO₄ vào 10 ml nước (dung dịch B);
- Trộn đều dung dịch A và dung dịch B;
- Bổ sung nước vừa đủ để đạt 100 ml.

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 trong 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 - 10s, nhịp 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 trong 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 1ml dịch huyền phù ban đầu (a hoặc b) cho vào ống nghiệm chứa 9 ml dịch pha loãng (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 một 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 lặp lại liên tục để có dịch mẫu có nồng độ pha loãng theo qui định sau:

- Đối với phân vi sinh vật 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 riêng 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 vật 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 mẫu 0,05 ml, cấy vào 1 hộp lồng chứa môi trường đã chuẩn bị sẵn theo 6.2.1.3. Mỗi mẫu được cấy lặp lại 2 hộp lồng.

Lắc nhẹ hộp lồng để dịch mẫu dàn 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 là 48-72 h.

6.2.2.3. Phát hiện vòng phân giải

Lấy 1 ml huyền phù xenluloza và 1 ml dung dịch chỉ thị Benedict nhỏ lên bề mặt thạch đã cấy mẫu (6.2.2.2) để ở nhiệt độ 30 đến 35°C trong 10 đến 15 min.

Quan sát vòng phân giải trong suốt bao quanh các khuẩn lạc phân giải xenluloza.

6.2.3. Đọc kết quả

Vi sinh vật phân giải xenluloza được tính là số khuẩn lạc trong hộp lồng tạo vòng phân giải (vòng tròn trong suốt) bao quanh khuẩn lạc.

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

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

Mật độ vi sinh vật trong 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 lỏng;

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 lỏng được cấy từ cùng một độ pha loãng, trong đó chỉ tính các hộp lỏng chứa từ 5 đến 50 khuẩn lạc;

2) Số lượng khuẩn lạc trung bình cũng có thể được tính từ trung bình cộng số khuẩn lạc của các hộp lỏng được cấy từ hai độ pha loãng kế tiếp nhau bằng cách tính số khuẩn lạc trung bình của 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 2. Nếu tỷ số này lớn hơn 2 thì lấy giá trị nhỏ làm kết quả;

3) Mật độ vi sinh vật trên một đơn vị kiểm tra được biểu thị bằng một số 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 qui định hiện hành.

6.3.5. Xác định độ ẩm

Tiến hành theo TCVN 5815-1994.

6.4. Báo cáo kết quả kiểm tra

Báo cáo kết quả kiểm tra phải mô tả lại tình trạng mẫu trước khi tiến hành kiểm tra (các chi tiết cân 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 qui định trong tiêu chuẩn này hoặc được coi là tùy ý 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 xenluloza phải được bao gói bằng các chất liệu bảo đảm không gây độc hại tới vi sinh vật, người, động, thực vật và môi trường sinh thái, đồng thời đảm bảo thời hạn bảo hành của phân bón trước các điều kiện bất lợi từ bên ngoài.
- 7.2. Trên mỗi bao (gói) sản phẩm phân vi sinh vật phân giải xenluloza 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 gian 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 qui 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 nuôi cấy để kiểm tra nấm phân giải xenluloza

Glucosa	10,0 g
Pepton	5,0 g
KH_2PO_4	1,0 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,5 g
Rose bengal	33 mg
Streptomycin sulphar (10%)	3 ml
Aga	20,0 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	6,5 - 7,0

A.2. Môi trường nuôi cấy để kiểm tra vi khuẩn, xạ khuẩn phân giải xenluloza

Pepton	5,0 g
Cao thịt bò	3,0 g
NaCl	5,0 g
Aga	20,0 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	6,8 - 7,0

A.3. Môi trường nuôi cấy để kiểm tra vi khuẩn, xạ khuẩn phân giải xenluloza

Glucosa	1,0 g
K_2HPO_4	0,5 g
Aga	20,0 g
Nước chiết đất*	100 ml
Nước cất vừa đủ	900 ml
pH	6,5 - 7,0

*Chuẩn bị nước chiết đất:

- 1 kg đất vườn tốt + 1 lít nước sạch;
- Hấp khử trùng 30 phút trong nồi hấp;
- Bổ sung 1 g $CaCO_3$ rồi lọc lấy nước trong.

PHÂN BÓN VI SINH VẬT - THUẬT NGỮ

Microbial fertilizer - Terms

TCVN 6169-1996 do Ban Kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC 134 B-"Phân bón vi sinh vật" biên soạn.
Tổng cục Tiêu chuẩn - Đo lường - Chất lượng đề nghị. Bộ Khoa học Công nghệ và Môi trường
ban hành.

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định các thuật ngữ sử dụng trong việc nghiên cứu, sản xuất, sử dụng và lưu thông sản phẩm phân bón có chứa các loại vi sinh vật sống; đã được tuyển chọn, có lợi cho đất và cây trồng.

2. Thuật ngữ, định nghĩa

2.1. Phân bón vi sinh vật

Phân bón vi sinh vật (gọi tắt là phân vi sinh) là sản phẩm chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật sống, đã được tuyển chọn có mật độ đạt theo tiêu chuẩn hiện hành. Thông qua các hoạt động của chúng sau quá trình bón vào đất tạo nên các chất dinh dưỡng mà cây trồng sử dụng được (N, P, K,...) hay các hoạt chất sinh học, góp phần nâng cao năng suất và (hoặc) chất lượng nông sản. Phân vi sinh bảo đảm không gây ảnh hưởng xấu đến người, động thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.

2.2. Hoạt chất sinh học

Hoạt chất sinh học là các sản phẩm của vi sinh vật có trong phân vi sinh, được tạo ra thông qua các hoạt động sống của chúng sau khi bón vào đất, có tác dụng tốt đến sự sinh trưởng phát triển của cây trồng, năng suất, chất lượng nông sản hoặc hệ sinh học của đất.

2.3. Phân bón vi sinh vật cố định nitơ

2.3.1. Phân bón vi sinh vật cố định nitơ (tên thường gọi: phân đạm vi sinh, phân vi sinh vật cố định đạm) là sản phẩm chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật sống, đã được tuyển chọn với mật độ đạt theo tiêu chuẩn hiện hành, có khả năng cố định nitơ từ không khí cung cấp các hợp chất chứa nitơ cho đất và cây trồng, tạo điều kiện nâng cao năng suất và (hoặc) chất lượng nông sản, tăng độ màu mỡ của đất. Phân vi sinh vật cố định nitơ và các chủng vi sinh vật này không gây ảnh hưởng xấu đến người, động thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.

2.3.2. Vi sinh vật cố định nitơ là vi sinh vật sống cộng sinh hay hội sinh với cây trồng, hoặc vi sinh vật sống tự do trong đất, nước, không khí, có khả năng tạo khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường nuôi cấy không chứa hợp chất nitơ (môi trường NfM, YMA, Ashby...)

2.4. Phân bón vi sinh vật phân giải hợp chất photpho khó tan

- 4.1 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 sống đã được tuyển chọn với mật độ tế bào 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 này không gây ảnh hưởng xấu đến người, động thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.
- 4.2. Vi sinh vật phân giải hợp chất photpho khó tan là vi sinh vật, thông qua hoạt động của chúng, với các hợp chất photpho khó tan được chuyển hoá thành dễ tiêu đối với cây trồng. Vi sinh vật phân giải hợp chất photpho khó tan tạo vòng tròn trong suốt bao quanh khuẩn lạc (vòng phân giải) trên môi trường chứa nguồn photpho duy nhất là $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ hoặc lơ-xi-tin.
5. Phân bón vi sinh vật phân giải xenluloza
- 5.1. Phân bón vi sinh vật phân giải xenluloza (tên thường gọi: phân vi sinh phân giải xenluloza) là sản phẩm chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật sống, đã được tuyển chọn với mật độ đạt theo tiêu chuẩn hiện hành có khả năng phân giải xenluloza, để cung cấp chất dinh dưỡng cho đất và cây trồng, tạo điều kiện nâng cao năng suất và (hoặc) chất lượng nông sản, tăng độ màu mỡ của đất. Phân vi sinh vật phân giải xenluloza và các chủng vi sinh vật này không ảnh hưởng xấu đến người, động thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.
- 5.2. Vi sinh vật phân giải xenluloza có khả năng phát triển trên môi trường chứa nguồn cacbon duy nhất là xenluloza tự nhiên.
6. Chất mang
Chất mang là chất để vi sinh vật được cấy tồn tại và (hoặc) phát triển, tạo điều kiện thuận lợi cho vận chuyển, bảo quản và sử dụng phân vi sinh. Chất mang không được chứa chất có hại cho người, động thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.
7. Phân bón vi sinh vật trên nền chất mang thanh trùng
Phân bón vi sinh vật trên nền chất mang thanh trùng là sản phẩm, trong đó chất mang được tiệt trùng trước khi cấy vi sinh vật hữu ích. Phân vi sinh loại này có mật độ tế bào vi sinh hữu ích không thấp hơn $1,0 \times 10^8$ tế bào/g (ml) phân, tế bào vi sinh vật tạp không lớn hơn $1,0 \times 10^6$ tế bào/g (ml) phân. Phân vi sinh loại này có thời gian bảo quản không ít hơn 6 tháng.
8. Phân bón vi sinh vật trên nền chất mang không thanh trùng.
Phân bón vi sinh vật trên nền chất mang không thanh trùng là sản phẩm, trong đó chất mang không được tiệt trùng trước khi cấy vi sinh vật hữu ích, có mật độ tế bào vi sinh hữu ích từ $1,0 \times 10^6$ đến $1,0 \times 10^7$ tế bào/g (ml) phân.
9. Vi sinh vật được tuyển chọn
Vi sinh vật được tuyển chọn là vi sinh vật đã được nghiên cứu, đánh giá hoạt tính sinh học và hiệu quả đối với đất, cây trồng, dùng để sản xuất phân vi sinh vật.

2.10. Vi sinh vật tạp

Vi sinh vật tạp theo qui định này là vi sinh vật có trong phân nhưng không thuộc loại vi sinh vật được tuyển chọn.

2.11. Phân bón hữu cơ vi sinh vật

Phân bón hữu cơ vi sinh vật (tên thường gọi : phân hữu cơ vi sinh) là sản phẩm được sản xuất từ các nguồn nguyên liệu hữu cơ khác nhau, nhằm cung cấp chất dinh dưỡng cho cây trồng, cải tạo đất, chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật sống được tuyển chọn với mật độ đạt tiêu chuẩn qui định, góp phần nâng cao năng suất, chất lượng nông sản. Phân hữu cơ vi sinh vật không gây ảnh hưởng xấu đến người, động vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.

2.12. Mật độ vi sinh vật

Mật độ vi sinh vật là số lượng vi sinh vật sống có trong một đơn vị khối lượng (thể tích) vật chất chứa vi sinh vật.

2.13. Mật độ vi sinh vật hữu ích

Mật độ vi sinh vật hữu ích là số lượng vi sinh vật sống đã được tuyển chọn theo một mục đích nhất định có lợi cho cây trồng và đất canh tác có trong 1g hay 1 ml phân vi sinh vật.

2.14. Mật độ vi sinh vật tạp

Mật độ vi sinh vật tạp là số lượng vi sinh vật không phải vi sinh vật đã được tuyển chọn nhưng không gây ô nhiễm môi trường, không ảnh hưởng xấu đến con người, động và thực vật, có trong 1 g hay 1 ml phân vi sinh vật.

2.15. Pha loãng

Pha loãng là việc làm giảm mật độ vi sinh vật trong mỗi đơn vị thể tích. Sử dụng cho việc đếm số lượng vi sinh vật trong môi trường. Chất pha loãng không làm giảm hoặc tăng số vi sinh vật sống có sẵn trong môi trường.

2.16. Dịch huyền phù ban đầu

Dịch huyền phù ban đầu hay còn gọi là dịch pha loãng đầu tiên có dạng dung dịch hay nhũ tương, thu được sau khi pha loãng 10 lần mẫu kiểm tra.

2.17. Dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo

Dung dịch pha loãng thập phân tiếp theo là các dung dịch hoặc huyền phù được tạo ra khi trộn đều một thể tích dịch huyền phù ban đầu với chín thể tích của chất pha loãng. Quá trình này được lặp lại liên tục cho tới khi đạt được độ pha loãng thích hợp cho việc xác định mật độ vi sinh vật.

2.18. Chất pha loãng

Chất pha loãng là dung dịch để pha loãng mật độ vi sinh vật trong mẫu kiểm tra. Chất pha loãng không được chứa các chất ảnh hưởng xấu đến sự sinh trưởng phát triển của vi sinh vật. Thông thường chất pha loãng có thành phần như sau:

NaCl:	8,5g
Nước cất:	1000 ml

2.19. Môi trường dinh dưỡng

Môi trường dinh dưỡng là hỗn hợp có chứa đủ các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự sinh trưởng, phát triển của vi sinh vật và không làm ảnh hưởng đến khả năng di truyền của vi sinh vật. Các loại vi sinh vật khác nhau có nhu cầu khác nhau về thành phần dinh dưỡng và tạo nên các đặc điểm hình thái học khác nhau trên môi trường nuôi cấy.

2.20. Khuẩn lạc

Khuẩn lạc được hình thành từ một cơ thể vi sinh vật (tế bào) ban đầu trên môi trường nuôi cấy trong điều kiện phù hợp mà mắt thường có thể quan sát được.

PHỤ LỤC A

(Tham khảo)

TÊN THUẬT NGỮ TIẾNG ANH TƯƠNG ĐƯƠNG

- 2.1. Microbial fertilizer
- 2.2. Biological substances
- 2.3. Fertilizer effectivity
- 2.4. Nitrogen fixing microbial fertilizer
- 2.5. Phosphat solubilizing microbial fertilizer
- 2.6. Cellulose degrading microbial fertilizer
- 2.7. Carrier
- 2.8. Steril carrier based microbial fertilizer (Inoculants)
- 2.9. Non steril carrier based microbial fertilizer
- 2.10. Selected microorganism
- 2.11. Contaminated microorganism
- 2.12. Inoculated compost
- 2.13. Microbial density
- 2.14. Density of selected microorganisms
- 2.15. Density of contaminated microorganisms
- 2.16. Dilution
- 2.17. First tenfold dilution
- 2.18. Serial tenfold dilution
- 2.19. Diluent
- 2.20. Nutrient medium.
- 2.21. Colony

PHÂN VI SINH VẬT CỐ ĐỊNH NI TƠ
Yêu cầu kỹ thuật, phương pháp kiểm tra,
nhãn, bao bì đóng gói

Tiêu chuẩn này áp dụng cho việc xác định, kiểm tra phân vi sinh vật cố định ni tơ

1. Định nghĩa:

Phân vi sinh vật cố định ni tơ (Phân đạm vi sinh) là sản phẩm chứa một hoặc nhiều chủng vi sinh vật cố định ni tơ (VSVCDN) tồn tại trên nền chất mang thanh trùng hay không thanh trùng.

2. Tiêu chuẩn chất lượng:

2.1. Yêu cầu chung:

- Phân vi sinh vật cố định ni tơ phải có hiệu quả trên đồng ruộng như đã ghi trên nhãn giới thiệu, gồm cả mức tăng năng xuất nông phẩm hay tiết kiệm phân bón hữu cơ và vô cơ.
- Phân vi sinh vật cố định ni tơ không gây độc hại cho người, động vật, thực vật và môi trường sinh thái.

2.2. Yêu cầu kỹ thuật (chỉ tiêu chất lượng)

Các chỉ tiêu kỹ thuật của phân vi sinh vật cố định ni tơ phải phù hợp với các mức quy định trong các bảng quy định sau:

Bảng 1: Phân vi sinh vật cố định ni tơ trên nền chất mang thanh trùng

Số TT	Chỉ tiêu	Đơn vị đo	Mức	
			Sau khi sản xuất 15 ngày	Cuối thời hạn bảo quản
1	Số lượng VSVCDN	Tế bào/gr hoặc ml	Trên 1.10^8	Trên 1.10^8
2	Dạng sinh dưỡng tiềm sinh			
3	Số lượng vi sinh tạp	Tế bào/gr hoặc ml	Dưới 1.10^6	Dưới 1.10^6
4	Độ ẩm (phân dạng rắn)			
	Thời hạn bảo quản trong điều kiện bình thường kể từ ngày sản xuất	Tháng	6	Trên 35

Ban hành kèm theo quyết định số: 87/NN-KHKT-QĐ ngày 15 tháng 2 năm 1995 của Bộ Nông nghiệp và Công nghiệp thực phẩm.

Bảng 2: Phân vi sinh vật cố định ni tơ trên nền chất mang không thanh trùng

Số TT	Chỉ tiêu	Đơn vị đo	Mức	
			Sau khi sản xuất 15 ngày	Cuối thời hạn bảo quản
1	Số lượng VSVCDN (dạng sinh dưỡng tiềm sinh)	Tế bào/gr hoặc ml	Trên $1. 10^7$	Trên $1. 10^6$
2	Thời hạn bảo quản trong điều kiện bình thường kể từ ngày sản xuất	Tháng		6

3. Phương pháp kiểm tra:

3.1. Lấy mẫu:

Lấy ngẫu nhiên 10 gói, mỗi gói 25-30g hay 25-30ml đối với phân vi sinh vật cố định ni tơ trên nền chất mang thanh trùng hoặc 500-600g phân vi sinh vật cố định ni tơ trên nền chất mang không thanh trùng trong một đợt sản xuất của nhà máy hay các cửa hàng bán lẻ, trong đó 5 gói dùng để kiểm tra chất lượng hiện tại và 5 gói khác được bảo quản trong điều kiện bình thường dùng để kiểm tra chất lượng lúc cuối thời hạn sử dụng.

3.2. Kiểm tra:

3.2.1. Thiết bị dụng cụ kiểm tra:

- Bình tam giác 250ml.
- Ống nghiệm 15x 150mm, 18x 180mm.
- Pipét 1ml, 5ml, 10ml.
- Hộp lồng.
- Nồi hấp khử trùng, tủ sấy, tủ ẩm.
- Buồng cấy vô trùng.

3.2.2. Chuẩn bị môi trường:

- Môi trường nuôi cấy VSVCDN cộng sinh (môi trường YMA)

Manitol	10,0g
K ₂ HPO ₄	0,5g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2g
NaCl	0,1g
Cao nấm men	1,0g
Nước cất vừa đủ	1000ml
Thạch	20g
Congo đỏ 1%	2,5ml
pH	6,8

- Môi trường nuôi cấy VSVCDN hội sinh và tự do (môi trường Ashby)

Manitol	20,0g
---------	-------

K_2HPO_4	0,2g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2g
NaCl	0,2g
K_2SO_4	0,1g
$CaCO_3$	5,0g
Nước cất vừa đủ	1000ml
Thạch	20g
pH	6,5-7,0

- Môi trường Glucose peptone (môi trường GP)

Glucose	5,0g
Pepton	10,0g
Thạch	20,0g
Bromocresol 1% trong cồn	10,0ml

- Môi trường trồng cây chỉ thị (môi trường Jensen)

$CaHPO_4$	1,0g
K_2HPO_4	0,2g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2g
NaCl	0,2g
$FeCl_3$	0,1 g
Nước cất vừa đủ	1000ml
Thạch	8,0g
Dung dịch vi lượng *	1,0ml
pH	6,5-7,0

* Dung dịch vi lượng có thành phần như sau:

Bo ⁺ : 0,05%	Mn ⁺ : 0,05%
Zn ⁺ : 0,005%	Mo ⁺ : 0,05 %
Cu ⁺ : 0,02%	

Cân và hoà tan các thành phần môi trường trong nước theo thứ tự như trên. Phân môi trường vào các bình tam giác, làm nút bông đậy kín và đem khử trùng. Lấy ra để nguội tới nhiệt độ 40-45°C rồi đổ vô trùng vào các hộp lồng đã khử trùng. Đối với môi trường trồng cây chỉ thị cũng làm như trên nhưng đổ môi trường vào các ống nghiệm 18 x 180mm (khoảng 1/3 ống). Làm nút bông và khử trùng như trên, sau đó lấy ra và đặt nghiêng ống thạch với góc 45°.

3.2.3. Tiến hành kiểm tra:

3.2.3.1. Xác định mật độ vi sinh vật cố định ni tơ sống tự do và hội sinh:

Mật độ VSVCDN sống tự do và hội sinh được xác định theo phương pháp cấy trên thạch đĩa với môi trường Ashby (Phương pháp Koch). Cách tiến hành như sau:

Cân 10 g hay 10 ml phân cho vào bình tam giác 250ml chứa 90ml nước cất vô trùng, vô đạm. Đậy kín nút bông rồi đưa lên máy lắc, lắc với tốc độ 200 vòng/ phút trong thời gian 15 phút. Sau đó dùng pipét vô trùng lấy 1ml dung dịch cho vào 1 ống nghiệm chứa 9ml nước cất vô trùng, vô đạm lắc, khuấy ống nghiệm để trộn đều dung dịch. Dùng pipét vô trùng khác lấy từ ống nghiệm này ra 1ml dung dịch và đưa vào ống nghiệm khác cũng chứa 9ml nước cất vô trùng, vô đạm như trên. Trộn đều hỗn hợp. Quá trình này được tiếp tục tiến hành đến ống nghiệm thứ 7. Từ ống nghiệm thứ 5, thứ 6 và thứ 7 lấy ra mỗi ống 3 giọt dung dịch (mỗi giọt tương đương với 0,04ml) cho vào 3 hộp lồng chứa môi trường thạch đã chuẩn bị sẵn, mỗi hộp lồng 1 giọt. Dùng que gạt thuỷ tinh vô trùng dàn đều dung dịch trên bề mặt đĩa thạch. Để hộp lồng vào tủ ẩm ở nhiệt độ 28°C và tiến hành nuôi trong thời gian 48 giờ. Sau thời gian nuôi cấy lấy hộp lồng ra và tiến hành đếm số khuẩn lạc mọc trên đĩa thạch (chú ý chỉ đếm hộp lồng có chứa số khuẩn lạc từ 30-300).

Số lượng VSVCDN được tính theo công thức sau:

$$N = \frac{a \cdot 10^{n+1}}{0,04}$$

N: Số lượng VSVCDN/g hay ml

a: Số lượng khuẩn lạc trung bình/ hộp lồng

n: Số thứ tự ống nghiệm pha loãng

* Đối với loại phân vi sinh vật cố định ni tơ dạng tiềm sinh trước tiên cần hoạt hoá tế bào trong môi trường Ashby lỏng chứa 2% rỉ đường trong thời gian 2 giờ, sau đó tiến hành kiểm tra bình thường như trên.

3.2.3.2. Xác định số lượng VSVCDN sống cộng sinh với cây họ đậu (Rhizobium)

Đối với tất cả VSVCDN sống cộng sinh có thể dùng phương pháp cấy pha loãng trên môi trường YMA. Phương pháp được tiến hành như phần 3.2.3.1. Riêng đối với phân VSVCDN dùng cho cây đậu đen, đậu xanh, lạc và đậu tương có thể dùng phương pháp nhiễm lên cây chỉ thị, trong đó dùng hạt Sirato (*Macroptilium atropurpureus*) cho cây đậu xanh, đậu đen, lạc và hạt đậu tương đại (*Glycine ussuriensis*) dùng cho đậu tương. Phương pháp được tiến hành như sau:

Pha loãng phân như phần 3.2.3.1

Hạt Sirato ngâm trong H₂SO₄ đặc trong 4 phút sau đó rửa sạch nhanh bằng nước cất 4-5 lần. Hạt cây chỉ thị khác được thanh trùng 3-4 phút trong dung dịch HgCl₂ 1/1000 hay cồn etylic 90°C trong 2 phút và rửa sạch bằng nước cất vô trùng nhiều lần. Ngâm hạt trong nước cất vô trùng cho đến khi bắt đầu nảy mầm (khoảng 24-36 giờ) rồi đặt vào ống thạch đã được chuẩn bị với môi trường Jensen như phần 3.2.3. Rót 1ml dịch kiểm tra có độ pha loãng 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹ 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 10-15 ngày kiểm tra sự hình thành nốt sần và xác định mật độ tế bào có trong phân bằng cách kiểm tra như bảng 3 (trang bên).

3.2.3.3. Xác định vi sinh vật tạp:

Số lượng vi sinh vật tạp được xác định bằng phương pháp nuôi cấy trên thạch đĩa với môi trường GP. Phương pháp được tiến hành như phần 3.2.3.1.

3.2.3.4. Xác định độ ẩm:

Độ ẩm của phân được xác định bằng phương pháp sấy khô ở nhiệt độ 105°C tới khi trọng lượng mẫu không thay đổi (cân 3 lần).

4. Bao bì, ghi nhãn:

Phân VSVCDN phải được bảo quản trong các bao gói tốt chống được các ảnh hưởng bất lợi bên ngoài. Nhãn hiệu phải có đầy đủ các nội dung sau:

- Đối tượng sử dụng
- Tên vi sinh vật hữu ích có chứa trong sản phẩm
- Mật độ VSVCDN
- Khối lượng tịnh, khối lượng bao
- Phương pháp, kỹ thuật sử dụng và bảo quản
- Người và ngày kiểm tra chất lượng xuất xưởng
- Ngày và địa điểm sản xuất
- Thời hạn sử dụng

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

PHÂN VI SINH VẬT

Thuật ngữ, định nghĩa

1. Phạm vi áp dụng:

Tiêu chuẩn này áp dụng cho việc xác định phân vi sinh vật

2. Thuật ngữ, định nghĩa:

2.1. Phân vi sinh vật .

Phân vi sinh vật (gọi tắt là phân vi sinh) là sản phẩm có chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật sống đã được tuyển chọn có mật độ đạt theo tiêu chuẩn đã ban hành. Thông qua các hoạt động của chúng sau quá trình bón vào đất tạo nên chất dinh dưỡng mà cây trồng có thể sử dụng được (N,P,K) hay các hoạt chất sinh học, góp phần nâng cao năng suất hoặc chất lượng nông sản. Phân vi sinh bảo đảm không gây ảnh hưởng xấu đến người, động, thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.

2.2. Hoạt chất sinh học:

Hoạt chất sinh học theo quy định này là các sản phẩm của vi sinh vật có trong phân vi sinh được tạo ra thông qua các hoạt động sống của chúng sau khi bón vào đất, có tác dụng tốt đến sự sinh trưởng, phát triển của cây trồng hoặc hệ sinh học đất.

2.3. Hiệu quả của phân bón vi sinh vật:

2.3.1. Phân vi sinh vật phải có tác dụng tốt đối với cây và đất trồng. Hiệu quả này được xác định trực tiếp trên cây trồng theo quy phạm 10 TCN 216-95 về khảo nghiệm phân bón do Bộ Nông nghiệp và Công nghiệp thực phẩm ban hành (nay là Bộ NN-PTNT), hay gián tiếp thông qua mật độ và hoạt tính sinh học mỗi chủng vi sinh có trong phân. Việc xác định hiệu quả của phân vi sinh được thực hiện và công nhận tại các phòng thí nghiệm do Bộ NN-PTNT chỉ định.

3.2.2. Phân vi sinh vật phải an toàn với người, động, thực vật và môi trường sinh thái. Mức độ an toàn này được thực hiện và công nhận tại các phòng thí nghiệm được công nhận hay chỉ định.

2.4. Phân vi sinh vật cố định ni tơ:

2.4.1. Phân vi sinh vật cố định ni tơ (phân đạm vi sinh, phân vi sinh vật cố định đạm) là sản phẩm chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật sống, đã được tuyển chọn với mật độ đạt

Ban hành kèm theo quyết định số: 193/NN-KHKT-QĐ ngày 13 tháng 2 năm 1996 của Bộ Nông nghiệp và Công nghiệp thực phẩm.

theo tiêu chuẩn đã ban hành có khả năng cố định nitơ từ không khí cung cấp các độ đạt theo tiêu chuẩn đã ban hành có khả năng cố định ni tơ từ không khí cung cấp các hoạt chất chứa nitơ cho đất và cây trồng, tạo điều kiện nâng cao năng suất hoặc chất lượng sản phẩm, tăng độ màu mỡ của đất. Các chủng vi sinh vật này không ảnh hưởng xấu đến người, động, thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.

2.4.2. Vi sinh vật có khả năng cố định nitơ là vi sinh vật sống cộng sinh với cây họ đậu hoặc vi sinh vật sống tự do hay hội sinh, tạo khuẩn lạc đặc trưng trên môi trường nuôi cấy vô đạm (môi trường NFM, YMA, Ashby...)

2.5. Phân vi sinh vật phân giải hợp chất phot pho khó tan:

2.5.1. Phân vi sinh vật phân giải hợp chất phot pho khó tan là sản phẩm chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật sống đã được tuyển chọn với mật độ tế bào đạt tiêu chuẩn có khả năng chuyển hoá hợp chất phot pho khó tan thành dễ tiêu cho cây trồng sử dụng, tạo điều kiện nâng cao năng suất hoặc chất lượng nông sản. Các chủng vi sinh vật này không ảnh hưởng xấu đến người, động, thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.

2.5.2. Vi sinh vật phân giải hợp chất phot pho khó tan là vi sinh vật thông qua hoạt động của chúng hợp chất phot pho khó tan chuyển hoá thành dễ tiêu đối với cây trồng. Vi sinh vật phân giải hợp chất phot pho khó tan tạo vòng tròn trong suốt bao quanh khuẩn lạc (vòng phân giải) trên môi trường chứa nguồn phot pho duy nhất là $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ hoặc lexitin.

2.6. Phân vi sinh vật phân giải xellulo

2.6.1. Phân vi sinh vật phân giải xellulo là sản phẩm chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật sống đã được tuyển chọn với mật độ tế bào đạt tiêu chuẩn có khả năng phân giải xellulo, tạo điều kiện nâng cao năng suất hoặc chất lượng nông sản, tăng màu mỡ của đất. Các chủng vi sinh vật này không ảnh hưởng xấu đến người, động, thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản

2.6.2. Vi sinh vật phân giải xellulo có khả năng phát triển trên môi trường có nguồn cacbon duy nhất là xellulo tự nhiên.

2.7. Phân vi sinh vật trên nền chất mang thanh trùng:

Phân vi sinh vật trên nền chất mang thanh trùng là sản phẩm trong đó chất mang được tiệt trùng trước khi cấy vi sinh vật. Phân vi sinh vật loại này có mật độ tế bào vi sinh hữu ích không thấp hơn 1×10^9 tế bào/g (ml) phân, tế bào vi sinh vật tạp không lớn hơn 1×10^6 tế bào/g (ml) phân. Phân vi sinh vật loại này có thời gian bảo quản không ít hơn 6 tháng.

2.8. Phân vi sinh vật trên nền chất mang không thanh trùng:

Phân vi sinh vật trên nền chất mang không thanh trùng là sản phẩm, trong đó chất mang không được tiệt trùng trước khi cấy vi sinh, có mật độ tế bào vi sinh hữu ích từ 10^6 đến 10^7 tế bào/g (ml) phân.

2.9. Chất mang:

Chất mang là chất để vi sinh vật được cấy tồn tại phát triển, tạo điều kiện thuận lợi cho vận chuyển, bảo quản, sử dụng. Chất mang không được chứa chất có hại cho vi sinh vật, người, động, thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.

2.10. Vi sinh vật đã được tuyển chọn:

Vi sinh vật đã được tuyển chọn là vi sinh vật đã được nghiên cứu, đánh giá hoạt tính sinh học và hiệu quả đối với đất, cây trồng dùng để sản xuất phân vi sinh vật.

2.11. Vi sinh vật tạp:

Vi sinh vật tạp theo quy định này là vi sinh vật có trong phân nhưng không thuộc loại vi sinh vật đã được tuyển chọn.

PHÂN HỮU CƠ VI SINH VẬT**Yêu cầu kỹ thuật, phương pháp kiểm tra, bao bì, ghi nhãn****1. Phạm vi áp dụng:**

Tiêu chuẩn này áp dụng cho việc xác định, kiểm tra phân hữu cơ có chứa vi sinh vật sống có ích.

2. Thuật ngữ, định nghĩa:

Phân hữu cơ vi sinh vật (gọi tắt là phân hữu cơ vi sinh) là sản phẩm được sản xuất từ các nguồn nguyên liệu hữu cơ khác nhau nhằm cung cấp chất hữu cơ cho cây trồng, cải tạo đất, chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật sống đã được tuyển chọn với số lượng đạt tiêu chuẩn, góp phần nâng cao năng suất hoặc chất lượng nông sản. Phân hữu cơ vi sinh vật không gây ảnh hưởng xấu đến người, động, thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.

3. Yêu cầu kỹ thuật:

- 3.1. Phân hữu cơ vi sinh phải có tác dụng tốt đối với cây và đất trồng như đã ghi trên nhãn. Hiệu quả này được xác định và công nhận trên cơ sở kết quả khảo nghiệm phù hợp với tiêu chuẩn 10 TCN 216-95 về khảo nghiệm phân bón do Bộ Nông nghiệp và Công nghiệp thực phẩm ban hành nay là Bộ NN - PTNT.
- 3.2. Các loài vi sinh vật chứa trong phân hữu cơ vi sinh phải được đăng ký và kiểm tra số lượng phù hợp với các tiêu chuẩn về phân vi sinh vật trên nền chất mang không thanh trùng đã ban hành.
- 3.3. Hàm lượng hữu cơ chứa trong phân hữu cơ vi sinh không nhỏ hơn 10%.
- 3.4. Phân hữu cơ vi sinh không gây ảnh hưởng xấu đến người, động, thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản. Mức độ an toàn này được xác định và công nhận tại các phòng thí nghiệm được Bộ Nông nghiệp và PTNT công nhận hay chỉ định.
- 3.5. Thời hạn bảo hành của phân hữu cơ vi sinh không ít hơn 6 tháng
- 3.6. Thành phần dinh dưỡng và độ ẩm của phân hữu cơ vi sinh phải được đăng ký với cơ quan quản lý Nhà nước về quản lý chất lượng

4. Lấy mẫu:

Ban hành kèm theo quyết định số: 193/NN-KHKT-QĐ ngày 13 tháng 2 năm 1996 của Bộ Nông nghiệp và Công nghiệp thực phẩm.

4.1. Yêu cầu chung:

- Việc lấy mẫu phải được tiến hành sao cho mẫu kiểm tra phải là mẫu đại diện cho cả lô hàng cần kiểm tra. Cán bộ lấy mẫu phải là người được huấn luyện và có kinh nghiệm trong việc lấy mẫu.
- Trong quá trình lấy mẫu, vận chuyển mẫu và xử lý mẫu phải tuyệt đối tránh sự lây nhiễm từ bên ngoài, bảo đảm mẫu trong điều kiện ban đầu của mẫu cho tới khi 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 được lấy nên là các bao gói nguyên vẹn và gửi về phòng thí nghiệm.
- Mẫu được lấy ở những nơi không có hơi nước nóng, không có ánh sáng chói chang hoặc bụi bặm và được đưa ngay vào các dụng cụ chứa mẫu vô trùng .
- Các dụng cụ chứa mẫu phải sạch sẽ và vô trùng.
- Trong quá trình lấy mẫu, vận chuyển và xử lý mẫu phải dùng mọi biện pháp bảo vệ nhằm bảo đảm mẫu không bị lây nhiễm từ bên ngoài.

4.2. Tiến hành.

Dụng cụ lấy mẫu phải sạch sẽ và vô trùng bằng cách giữ trong tủ sấy ở nhiệt độ 160°C trong thời gian không ít hơn 2 giờ hoặc trong nồi hấp ở nhiệt độ 120°C trong thời gian không ít hơn 15 phút và được bảo quản trong các dụng cụ phù hợp bảo đảm tránh lây nhiễm từ bên ngoài.

4.3. Số lượng mẫu.

- Lô hàng được tạo thành từ các bao (túi) được sản xuất cùng một đợt trong nhà máy với cùng nguồn nguyên liệu.
- Nhằm bảo đảm chỉ tiêu chất lượng phải kiểm tra mẫu cho từng lô hàng.
- Số lượng bao, túi cần kiểm tra cho mỗi lô hàng phụ thuộc vào độ lớn của lô hàng đó phù hợp với quy định trong bảng 1

Bảng 1: Số lượng bao túi cần thiết cho kiểm tra.

Số lượng bao túi của lô hàng	Số lượng bao túi cần kiểm tra
Tới 100	7
101-1000	11
1001-10000	15
trên 10000	19

- Các bao túi mẫu được lựa chọn ngẫu nhiên theo TCVN 1694 (IS 4950-1968: Phương pháp lấy mẫu).

Tiến hành lấy mẫu trung bình từ mẫu chung của 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 dùng để lưu và bảo quản trong điều kiện

quy định mà mỗi loại sản phẩm yêu cầu dùng để khi phân tích trọng tài. Trên mỗi phân phải ghi rõ:

- Tên mẫu và đối tượng cây trồng được sử dụng
- Tên cơ sở sản xuất
- Thời gian sản xuất
- Thời gian và địa điểm lấy mẫu
- Người lấy mẫu

5. Kiểm tra:

5.1. Hiệu quả của phân hữu cơ vi sinh đối với đất và cây trồng

Hiệu quả của phân hữu cơ vi sinh đối với đất và cây trồng được kiểm tra theo quy phạm 10 TCN 216-95 về khảo nghiệm phân bón do Bộ NN-CNTP ban hành nay là Bộ Nông nghiệp và PTNT.

5.2. Vi sinh vật:

Việc kiểm tra vi sinh vật chứa trong phân hữu cơ vi sinh được tiến hành phù hợp với các tiêu chuẩn về phân vi sinh vật đã ban hành.

5.3. Thành phần dinh dưỡng và độ ẩm:

Các chất hữu cơ, N, P, K và độ ẩm của phân hữu cơ vi sinh vật được kiểm tra theo TCVN 5815-94

6. Yêu cầu bao gói, ghi nhãn:

6.1. Phân hữu cơ vi sinh vật phải được bao gói bằng các chất liệu không độc hại đối với người sử dụng, môi trường sinh thái và bảo đảm cho sản phẩm không suy giảm về chất lượng do các điều kiện bất lợi từ bên ngoài.

6.2. Phân hữu cơ vi sinh phải có nhãn ghi với đầy đủ các nội dung sau:

- Tên cơ sở sản xuất.
- Tên sản phẩm và tên loài vi sinh vật sử dụng (tên khoa học).
- Thành phần và độ ẩm.
- Công dụng.
- Ngày sản xuất và thời gian bảo hành.
- Khối lượng tịnh.
- Số đăng ký chất lượng.

6.3. Sản phẩm phải có hướng dẫn bảo quản và 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 với đất và cây trồng hay khả năng thay thế các loại phân bón khác.

PHÂN VI SINH VẬT

PHÂN GIẢI HỢP CHẤT PHOT PHO KHÓ TAN

Phương pháp định lượng hoạt tính phân giải

1. Phạm vi áp dụng:

Tiêu chuẩn này hướng dẫn phương pháp định lượng khả năng phân giải hợp chất phot pho khó tan của chủng vi sinh vật hay phân bón vi sinh vật phân giải lân.

2. Nội dung của phương pháp

2.1. Thiết bị dụng cụ hoá chất:

- Thiết bị khử trùng: nồi hấp khử trùng, tủ sấy
- Thiết bị nuôi cấy vi sinh vật: tủ ấm, buồng cấy vi sinh vật
- Thiết bị phân tích lân tan: máy so màu, máy ly tâm
- Thiết bị đo lường: cân phân tích, cân kỹ thuật
- Dụng cụ thuỷ tinh: bình thuỷ tinh ml, ống nghiệm 180 x 15mm, pipet 1ml, 5ml, 10ml, ống đong, cốc thuỷ tinh, hộp lồng, bình định mức.
- Hoá chất làm môi trường: Đường sacarosa, $\text{Ca}(\text{PO}_4)_2$ lexitin, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl, MgSO_4 , KCl, MnSO_4 , FeSO_4 , cao nấm men.
- Hoá chất phân tích: $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, HCl, $\text{ZnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 , KH_2PO_4
- Nước cất

2.2. Chuẩn bị:

2.2.1 Môi trường nuôi cấy:

Pha chế môi trường nuôi cấy có thành phần dưới đây và chia vào 8 ống nghiệm, mỗi ống 15 ml, khử trùng môi trường ở điều kiện 121°C trong thời gian 15 phút.

Thành phần môi trường nuôi cấy vi sinh vật phân giải lân (môi trường pikovskaya)

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	5,0g
Sacaroza	10,0g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5g

Ban hành kèm theo quyết định số 807/NN-KHKT-QĐ ngày 9 tháng 5 năm 1997 của Bộ Nông nghiệp và Công nghiệp thực phẩm.

NaCl	0,2g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1g
KCl	0,2g
Cao nấm men	0,5g
MnSO ₄	vết
FeSO ₄	vết
Nước cất	1000 ml
pH	7,0 ± 0,2

Chú ý: Đối với chủng vi sinh vật hoặc phân vi sinh vật phân giải hợp chất phot pho hữu cơ khó tan trong thành phần môi trường nuôi cấy cần thay thế 5g Ca(PO₄)₂ bằng 2g lexitin.

2.2.2. Xây dựng đường chuẩn nồng độ phot pho

2.2.2.1. Chuẩn bị dung dịch:

2.2.2.1.1. Dung dịch axit clo molybdic

Cân chính xác 15g (NH₄)₆Mo₇O₂₄ vào 400ml nước cất nóng, lọc trong nếu cần và bổ sung thêm 400ml HCl 10N hoặc 342ml HCl 12N, lắc đều. Để nguội và cho thêm nước cất để thể tích dung dịch đạt 1000ml. Bảo quản dung dịch trong lọ thủy tinh màu đến khi sử dụng.

2.2.2.1.2. Dung dịch thiếc - axit clo hydric

Dung dịch gốc: hoà tan 10g tinh thể SnCl₂.2H₂O vào 25ml HCl đậm đặc bảo quản trong bình kín.

Dung dịch pha loãng: Lấy 1ml dung dịch gốc hoà đều vào 132ml nước cất. Dung dịch này phải pha lại thường xuyên cho mỗi lần thí nghiệm.

2.2.2.1.3. Dung dịch phot pho chuẩn :

Cân chính xác 0,4390g KH₂PO₄ khô cho vào 400ml nước cất, bổ sung 25ml H₂SO₄ 7N và cho thêm nước cất để đạt 1000ml ta có dung dịch phot pho 100ppm. Dùng nước cất pha loãng tiếp, ta sẽ có các dung dịch phot pho với nồng độ thấp hơn (0, 1, 2, 4, 10, 15 ppm).

2.2.2.2. Xây dựng nồng độ phot pho chuẩn

Lấy 10ml từ mỗi dung dịch phot pho pha loãng (2.2.2.1.3) cho vào các bình định mức 50ml. Bổ sung thêm 10ml dung dịch axit clo molybdic (2.2.2.1.1). Pha loãng tiếp dung dịch bằng nước cất sao cho thể tích đạt 40ml. Nhỏ vào đó 5 giọt dung dịch thiếc axit clo hydric (2.2.2.1.2) pha loãng và thêm nước cất đến vạch. Trộn đều dung dịch và đo trên máy so màu ở bước sóng 600nm. Xác định mật độ quang của mỗi dung dịch.

Lập đồ thị tương quan giữa nồng độ phot pho và mật độ quang.

2.2.3. Lấy mẫu:

Mẫu phân vi sinh vật phân giải lân được lấy theo TCVN 6167-96. Phân bón vi sinh vật phân giải hợp chất phot pho khó tan.

2.2.4. Tiến hành:

Cân chính xác và cho vào mỗi ống nghiệm đựng môi trường được chuẩn bị ở trên (2.2.2) 1g mẫu trong điều kiện vô trùng (cấy chủng vi sinh cần xác định vào mỗi ống nghiệm, nếu xác định khả năng phân giải của chủng vi sinh vật), trong đó 4 ống đối chứng được tiệt trùng nhiệt ngay sau khi cho mẫu vào. Giữ các ống nghiệm trong điều kiện nhiệt độ phù hợp. Sau 10-14 ngày nuôi cấy, tiến hành ly tâm các ống nghiệm trên máy ly tâm với tốc độ 6000 vòng/ phút trong thời gian 20 phút, gạn lấy phần nước trong và tiến hành xác định mật độ quang của mẫu như phân 2.2.2.2. Đối chiếu với đồ thị chuẩn để xác định nồng độ phot pho tan của mẫu.

2.2.5. Đánh giá kết quả:

Chênh lệch giữa mẫu đối chứng đã tiệt trùng và mẫu xác định là số lượng lân tan mà vi sinh vật đã phân giải được, số lượng này có thể biểu thị bằng tỷ lệ % hoặc bằng mg lân tan trong số lượng P_2O_5 tổng số, kết quả được tính là trung bình cộng của cả 4 ống nghiệm.

PHÂN BÓN VI SINH VẬT CỐ ĐỊNH NITƠ

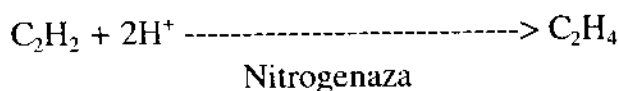
Phương pháp xác định hoạt tính

1. Phạm vi áp dụng:

Tiêu chuẩn này hướng dẫn phương pháp định lượng khả năng cố định nitơ của phân vi sinh vật cố định ni tơ bằng kỹ thuật đo hoạt tính khí axetylen trên máy sắc ký khí.

2. Nguyên tắc:

Enzyn nitrogenaza có vai trò quyết định trong quá trình cố định nitơ của vi sinh vật. Enzyn này không chỉ khử N_2 thành NH_3 , mà còn khử được axetylen thành etylen theo sơ đồ:



Axetylen và etylen có thể định lượng được dễ dàng trên máy sắc ký khí, nguyên tắc của phương pháp là định lượng etylen tạo thành phản ứng khử axetylen trên máy sắc ký khí và qua đó gián tiếp xác định hoạt tính cố định nitơ của vi sinh vật, phân bón vi sinh vật.

3. Nội dung của phương pháp

3.1. Thiết bị dụng cụ hoá chất:

- Thiết bị khử trùng: nồi hấp khử trùng, tủ sấy
- Thiết bị nuôi cấy vi sinh vật: tủ ẩm
- Thiết bị phân tích: máy sắc ký khí
- Thiết bị đo lường: cân phân tích
- Dụng cụ, hoá chất: Bình tam giác 250-300ml với nút cao su, nút bông, kim tiêm, xi lanh 1ml, 10ml, 30ml, 50ml, giấy thấm, khí etylen chuẩn, axetylen, đường glucoza.

3.2. Chuẩn bị:

- Dụng cụ: bình tam giác có thể tích 120ml, 250-300ml, được rửa sạch, làm nút bông nút kín. Rửa sạch nút cao su, kim tiêm, xi lanh và các dụng cụ khác. Khử trùng dụng cụ ở điều kiện phù hợp.

Lấy mẫu phân vi sinh vật như TCVN 6166-96. Phân vi sinh vật cố định nitơ (Mục 5: lấy mẫu).

3.3. Tiến hành:

Ban hành kèm theo quyết định số: 807/NN - KHKT - QĐ ngày 9 tháng 5 năm 1997 của Bộ Nông nghiệp và Công nghiệp thực phẩm.

3.3.1. Xử lý mẫu:

3.3.1.1. Phân vi sinh vật cố định nitơ sống cộng sinh:

Phân vi sinh vật cố định nitơ sống cộng sinh với cây họ đậu chỉ có hoạt tính khi được nhiễm vào cây chủ, do vậy sau khi lấy mẫu phân phải tiến hành trồng cây và bón phân theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đợi cây trồng phát triển đến khi nở hoa rõ tiến hành lấy mẫu rễ cây. Chú ý trong khi thu thập mẫu không được nhổ cây mà dùng xẻng, thuổng hoặc mai đào xung quanh để có thể lấy được toàn bộ rễ của cây. Sau đó cắt rễ cây có nốt sần ra khỏi thân cây, rửa bằng nước sạch nhiều lần, dùng giấy thấm, thấm khô bộ rễ. Cho rễ vào bình thủy tinh đã chuẩn bị ở trên. Thay nút bông bằng nút cao su. Dùng xi lanh lấy khí axetylen từ bình đựng khí và bơm vào bình đựng mẫu theo tỷ lệ 10% so với thể tích. Tiến hành ủ mẫu ở nhiệt độ 32°C trong thời gian 1-24 giờ (tùy theo yêu cầu thí nghiệm)*.

3.3.1.2. Phân vi sinh vật sống hội sinh hoặc tự do

Cân chính xác 2g phân bón và 1g glucoza cho vào bình tam giác 120ml đã chuẩn bị ở trên, bổ sung thêm 7ml nước cất. Nút kín bình bằng nút cao su. Dùng xi lanh thay thế 10 ml khí trong bình bằng 10ml axetylen. Tiến hành ủ mẫu ở điều kiện phù hợp với yêu cầu của chủng vi sinh vật được sử dụng sản xuất phân bón trong thời gian 7 ngày.

3.3.2. Đo mẫu trên máy sắc ký khí:

Tùy theo cấu trúc và tính năng tác dụng của từng loại sắc ký khí mà chế độ đo của các máy khác nhau là khác nhau. Nguyên tắc chung có thể tiến hành như sau:

- Bật máy đo cho máy đạt chế độ làm việc (lưu ý chế độ đo, nhiệt độ detector và lưu lượng không khí phải đạt theo chỉ số yêu cầu)
- Xác định pec chuẩn etylen.
- Dùng xi lanh lấy 5ml mẫu khí từ bình ủ ở trên đưa vào máy.
- Theo dõi đồ thị biểu diễn pec mà máy ghi được, điều chỉnh độ nhạy nếu cần.

Giải thích:

**Nếu vì một lý do nào đấy mà không đo được mẫu ngay trong thời gian ủ có thể chuyển hỗn hợp khí trong bình đựng mẫu vào một dụng cụ chứa có nút kín và bảo quản ở nhiệt độ 4°C cho tới khi đo.*

3.4. Tính kết quả:

Hoạt tính khử axetylen được tính theo công thức sau:

$$A = \frac{(I_1 - I_2) \cdot V_1 \cdot L}{I_3 \cdot V_2}$$

A: Hoạt tính khử axetylen: nMol/h

I_1 : Chiều cao pec etylen của mẫu thí nghiệm

I_2 : Chiều cao pec etylen của mẫu đối chứng (mẫu chứa có axetylen)

I_3 : Chiều cao pec etylen chuẩn

V_1 : Thể tích bình đựng mẫu ủ

V_2 : Thể tích mẫu khi được đưa vào máy

L: Số lượng nMol đo mẫu etylen chuẩn

Kết quả được tính là trung bình cộng của ít nhất 5 lần lặp lại đối với phân vi sinh vật cố định nitơ cộng sinh và 10 lần đối với các loại phân cố định nitơ khác.

PHƯƠNG PHÁP KIỂM TRA**Phân vi sinh vật kỵ khí cố định nitơ và phân giải xenlulo**

*Anaerobic nitrogen fixing and cellulosic degradating biofertilizer
Method for quality control*

1. Phạm vi áp dụng:

Tiêu chuẩn này áp dụng cho việc kiểm tra mật độ các vi sinh vật có khả năng cố định nitơ hoặc phân giải xenlulo kỵ khí trong phân bón vi sinh vật.

2. Thuật ngữ, định nghĩa:

- 2.1. Phân vi sinh vật (gọi tắt là phân vi sinh) là sản phẩm chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật sống hữu ích đã được tuyển chọn có mật độ đạt theo tiêu chuẩn hiện hành thông qua các hoạt động sống của chúng trong đất tạo nên chất dinh dưỡng mà cây trồng có thể sử dụng được (N, P, K) hay các hoạt chất sinh học, góp phần nâng cao năng suất và chất lượng nông sản. Phân vi sinh vật không gây ảnh hưởng xấu đến chất lượng nông sản, người, động vật, thực vật và môi trường sinh thái.
- 2.2. Phân vi sinh vật kỵ khí cố định nitơ là sản phẩm chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật sống, đã được tuyển chọn với mật độ đạt theo tiêu chuẩn hiện hành, có khả năng cố định nitơ trong điều kiện kỵ khí, tạo điều kiện nâng cao năng suất hoặc chất lượng sản phẩm. Các chủng vi sinh vật này không ảnh hưởng xấu đến người, động vật, thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.
- 2.3. Phân vi sinh vật kỵ khí phân giải xenlulo là sản phẩm chứa một hay nhiều chủng vi sinh vật sống, đã được tuyển chọn với mật độ đạt theo tiêu chuẩn hiện hành, có khả năng phân giải xenlulo trong điều kiện kỵ khí, tạo điều kiện nâng cao năng suất hoặc chất lượng sản phẩm. Các chủng vi sinh vật này không ảnh hưởng xấu đến người, động vật, thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.
- 2.4. Vi sinh vật đã được tuyển chọn là vi sinh vật đã được nghiên cứu, đánh giá hoạt tính sinh học và hiệu quả đối với đất, cây trồng dùng để sản xuất phân vi sinh vật.
- 2.5. Vi sinh vật tạp là vi sinh vật có sẵn trong phân vi sinh vật nhưng không thuộc loại vi sinh vật đã được tuyển chọn.

Ban hành kèm theo quyết định số: 16-2001/QĐ-BNN-KHCN ngày 23 tháng 2 năm 2001 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

3. Nội dung, phương pháp:

3.1. Trang thiết bị:

- Tủ sấy (thiết bị tiệt trùng khô) và nồi hấp áp lực (thiết bị tiệt trùng ướt)
- Tủ ẩm
- Tủ cấy vô trùng
- Cân kỹ thuật có độ chính xác tới 0,01g
- Que cấy
- Que gạt thủy tinh
- Ống nghiệm thủy tinh
- Ống đông
- Bình tam giác
- Đĩa petri (hộp lồng)
- Pipet chia độ, pipetman
- Đèn cồn hoặc đèn gas
- Dụng cụ lấy mẫu phải là loại thép không gỉ hoặc bằng thủy tinh.
- Dụng cụ nuôi cấy kỵ khí: có thể sử dụng một trong các dụng cụ sau:
 - + Tủ nuôi kỵ khí
 - + Bình chân không
 - + Bình nuôi kỵ khí: Gas Pak

3.2. Tiến hành:

3.2.1. 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 160 - 175⁰C không ít hơn 2 giờ.
- Trong nồi hấp áp lực 1 at (121⁰C) không ít hơn 20 phút.

3.2.2. Chuẩn bị môi trường:

3.2.2.1. Môi trường dùng để kiểm tra phân vi sinh vật kỵ khí cố định nitơ, phân giải xenlulo 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 (phụ lục kèm theo).

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 phù hợp. Để nguội môi trường đến 45-50⁰C 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 đến 30⁰C. Chỉ sử dụng các đĩa petri chứa các môi trường nuôi cấy vi sinh vật không phát hiện thấy tạp nhiễm.

3.2.2.2. 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 9ml, mỗi bình tam giác chứa 90ml. Làm nút bông và khử trùng ở 1 at (121⁰C) trong 30 phút.

Nếu chưa sử dụng ngay, dịch pha loãng cần được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4-10⁰C, thời gian bảo quản không quá 1 tháng kể từ ngày chuẩn bị.

Ghi chú: 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.

3.2.3. Lấy mẫu:

3.2.3.1. Qui định 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 huấn luyện và có kinh nghiệm trong việc lấy mẫu.

Trong quá trình lấy mẫu, vận chuyển và xử lý mẫu, phải đảm bảo tránh sự lây nhiễm từ bên ngoài và phải đảm bảo là mẫu phải được giữ 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 được lấy phải từ các bao nguyên gói.

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 dụng cụ chứa mẫu.

Các dụng cụ lấy mẫu và chứa mẫu phải vô trùng.

3.2.3.2. Số lượng mẫu:

Lô hàng bao gồm các bao (túi) được sản xuất cùng một đợt với cùng một nguồn nguyên liệu.

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 qui định trong bảng 1.

Bảng 1: 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

Các bao (túi) mẫu được lựa chọn ngẫu nhiên theo TCVN 1964-75

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 cây 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.

3.2.4. Kiểm tra:

3.2.4.1. Mật độ vi sinh vật kị khí cố định nitơ:

3.2.4.1.1. Pha loãng mẫu:

a) Đối với mẫu dạng lỏng: Dùng pipet vô trùng lấy 10ml mẫu cho vào 90ml dịch pha loãng đã chuẩn bị sẵn (xem 3.2.2.2), tránh chạm pipet vào dịch pha loãng. Trộn kỹ bằng cách dùng một pipet vô trùng khác hút lên xuống 10 lần hoặc bằng dụng cụ trộn cơ học trong 5-10 giây. Dung dịch tạo ra được gọi là dung dịch huyền phù ban đầu.

b) Đối với mẫu dạng bột: Cân 10g mẫu có độ chính xác tới 0,01g và cho vào 90ml dịch pha loãng đã chuẩn bị sẵn (xem 3.2.2.2). Trộn kỹ bằng dụng cụ trộn cơ học từ 5 đến 10 phút sao cho có được một dung dịch có phân bố đồng đều, để lắng các phần tử nặng trong khoảng 15 phút, gạn được dung dịch huyền phù ban đầu.

c) Dùng pipet đã vô trùng hút 1ml dịch huyền phù ban đầu (a hoặc b) cho vào 9 ml dịch pha loãng, tránh chạm pipet vào dịch pha loãng. Trộn kỹ bằng cách dùng một pipet vô trùng khác hút lên xuống 10 lần hoặc bằng dụng cụ trộn cơ học trong 5-10 giây, để có dịch pha loãng mẫu có nồng độ là 10^{-2} . Lặp lại các thao tác này để thu được dịch pha loãng đối với phân vi sinh vật trên nền chất mang khử trùng là 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} và đối với phân vi sinh vật trên nền chất mang không khử trùng là 10^{-3} , 10^{-4} và 10^{-5} .

3.2.4.1. 2. Cấy mẫu:

Dùng pipet vô trùng lấy từ dịch mẫu pha loãng 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} đối với phân vi sinh vật trên nền chất mang khử trùng và 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} đối với phân vi sinh vật trên nền chất mang không khử trùng một lượng dịch là 0,05 ml (1 giọt) cấy vào 1 đĩa petri chứa môi trường đã chuẩn bị sẵn (xem 3.2.2.1). Mỗi mẫu pha loãng được cấy lặp lại trên 3 đĩa petri.

Dùng que gạt vô trùng gạt đều dịch mẫu trên bề mặt thạch, đợi khô và úp ngược hộp petri sau đó đưa vào nuôi ở điều kiện kị khí (*) trong thời gian và nhiệt độ thích hợp với từng loại vi sinh vật.

Đếm số lượng khuẩn lạc đặc trưng của mẫu giống vi sinh vật trên mỗi đĩa petri.

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

$$A = \frac{ax20}{d}$$

Trong đó:

A: Mật độ vi sinh vật cố định nitơ trên đơn vị kiểm tra (g hoặc ml)

a: số khuẩn lạc trung bình có trong đĩa petri

d: nồng độ dịch pha loãng

Ghi chú:

Số lượng khuẩn lạc trung bình được tính là trung bình cộng số khuẩn lạc của các đĩa petri được cấy từ cùng một độ pha loãng, trong đó chỉ tính các đĩa petri chứa từ 5-50 khuẩn lạc. Số lượng khuẩn lạc trung bình cũng có thể được tính là trung bình.

Cộng số lượng khuẩn lạc của các đĩa petri được cấy từ hai độ pha loãng kế tiếp nhau bằng cách tính số khuẩn lạc trung bình cộng 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 trên nếu tỷ số giữa giá trị lớn và giá trị nhỏ không lớn hơn 2. Nếu tỷ số này lớn hơn 2 thì lấy giá trị nhỏ làm kết quả. Mật độ vi sinh vật trên một đơn vị kiểm tra được biểu thị bằng một số giữa 1,00 và 9,99 nhân với 10^n , n là số mũ thích hợp.

(*): Có thể sử dụng một trong các phương pháp tạo điều kiện kị khí sau:

- Loại bỏ oxy bằng phương pháp vật lý:

+ Tủ nuôi kị khí hoặc

+ Bình hút ẩm có vòi hút chân không, hàn kín bằng vadolin, không khí trong bình được hút ra và thay bằng hỗn hợp khí CO_2 , N_2 , H_2 (bình chân không). 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... 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 hoá học:

+ Bình nuôi kị khí Gas Pak.

+ Sử dụng dung dịch xanh metylen-NaOH-glucosa: Trộn đều 3 dung dịch với 1 lượng bằng nhau (6ml NaOH 10N trong 100ml nước cất; 3,0ml xanh metylen 5% trong 100ml nước cất và 6g glucosa trong 100ml nước cất có bổ sung một chút thymol kết tinh) rồi cho vào ống nghiệm và đun cách thuỷ đến mất màu. Đặt ống chỉ thị này vào thiết bị nuôi cấy kín. Ống chỉ thị sẽ tạo ra tình trạng yếm khí trong thiết bị (oxy được khử hoàn toàn khi màu xanh của dung dịch chỉ thị bị biến mất và không tái hiện trở lại).

- Nuôi cấy trong môi trường làm ngập kép: Dịch pha loãng mẫu được trộn với môi trường thạch dinh dưỡng phù hợp với từng loại vi sinh vật sau khi khử trùng đã để nguội đến 40 - 45°C và đổ vào đĩa petri. Sau khi thạch đông đổ thêm một lớp thạch - nước vô trùng (nguội đến 40 - 45°C). Ủ các đĩa thạch ở nhiệt độ thích hợp.

3.2.4.2. Kiểm tra mật độ vi sinh vật kị khí phân giải xenlulo:

3.2.4.2.1. Pha loãng mẫu:

Xem 3.2.4.1.1

3.2.4.2.2. Cấy mẫu:

Xem 3.2.4.1.2

- Phát hiện vòng phân giải: Sau khi khuẩn lạc vi sinh vật đã phát triển trên đĩa petri chứa môi trường kiểm tra, để đĩa petri vào tủ lạnh trong 12 giờ. Sau đó cho vào tủ ấm 40°C trong 6 giờ. Lấy ra, cho vào mỗi đĩa petri 5ml thuốc thử lugon, tráng đều khắp mặt thạch, để trong 15 phút rồi gạn bỏ hết thuốc thử lugon đi. Đếm số khuẩn lạc trong đĩa petri tạo vòng phân giải (vòng trong suốt) bao quanh khuẩn lạc.

- Tính toán kết quả: xem 3.2.4.1.2.

PHỤ LỤC

I. MÔI TRƯỜNG KIỂM TRA VI SINH VẬT CỐ ĐỊNH NITƠ KỊ KHÍ:

1. Môi trường 1:

Nước cất	1000ml
Glucosa	20,0g
K_2HPO_4	1,0g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5g
NaCl	vết
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	vết
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	vết
CaCO_3	40,0g
Axit ascobic	1,0g
E.D.T.A. (Trilon B)	1,0g
Thạch bột	15,0g

2. Môi trường 2:

Nước chiết khoai tây ^(*)	1000ml
Glucosa	20,0g
K_2HPO_4	0,2g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2g
Axit ascobic	1,0g
CaCO_3	3,0g
Thạch bột	15,0g

(*) Nước chiết khoai tây: Khoai tây: 200,0g

Nước cất: 500ml

Khoai tây gọt vỏ, cắt nhỏ, đun sôi trong 15 phút, lọc trong, bổ sung đủ 1000ml.

II. MÔI TRƯỜNG KIỂM TRA VI SINH VẬT PHÂN GIẢI XENLULO KỊ KHÍ:

1. Môi trường 3:

Nước máy	1000ml
$\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$	1,5g
KH_2PO_4	0,5g
NaCl	0,1g
K_2HPO_4	0,5g
$\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$	0,4g
Pepton	5,0g
CaCO_3	2,0g
Dung dịch $\text{MnSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$ 1%	1 giọt
Dung dịch $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ 1%	1 giọt
CMC	20,0g
Thạch bột	15,0g

pH: 7,0-7,4

2. Môi trường 4:

Nước máy	500ml
Nước thịt-pepton	500ml
CaCO_3	2,0g
CMC	15,0g
Thạch bột	15,0g

pH: 7,0-7,4

3. Môi trường 5:

Nước máy	900ml
Nước chiết nấm men	100ml
Glucosa	0,5g
Pepton	5,0g
CMC	3,0g
Thạch bột	15,0g

pH: 7,4

TIÊU CHUẨN PHÂN BÓN

PHẦN IV.2: NGUỒN GIEN VI SINH VẬT

QUY ĐỊNH VỀ CÔNG TÁC THU THẬP, TUYỂN CHỌN, LƯU GIỮ VÀ BẢO QUẢN NGUỒN GIEN VI SINH VẬT NÔNG NGHIỆP

1. Phạm vi áp dụng:

Quy định này đưa ra các hướng dẫn chung cho việc thực hiện công tác thu thập, tuyển chọn, lưu giữ và bảo quản nguồn gen vi sinh vật nông nghiệp (trừ vi sinh vật trong lĩnh vực thú y).

2. Thuật ngữ và định nghĩa:

Trong quy định này các thuật ngữ dưới đây được hiểu như sau:

- 2.1. Nguồn gen vi sinh vật nông nghiệp: Là nguồn tài nguyên di truyền công nghệ bao gồm các nguồn gen vi sinh vật khác nhau như vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm men, nấm mốc vi khuẩn lam hay các vật liệu di truyền khác đang là đối tượng được nghiên cứu và sử dụng trong nông nghiệp (trừ vi sinh vật trong lĩnh vực thú y), bao gồm cả các chủng đang được khai thác để lai tạo và các nguồn gen có tiềm năng đã được kiểm định, được Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn cho phép sử dụng.
- 2.2. Giống chuẩn: Là giống đã được định loại và thông tin đầy đủ, đã được công bố và thường được lấy từ bảo tàng giống khác.
- 2.3. Giống gốc (giống tác giả): Là giống do tác giả chọn lọc lai tạo hay lấy từ quỹ gen có tính di truyền ổn định, được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn cho phép sử dụng trong sản xuất.
- 2.4. Giống cơ bản: Là tập đoàn các mẫu giống vi sinh vật chứa đựng các thông tin di truyền khác nhau của mỗi loài, được bảo quản dài hạn, chỉ được sử dụng trong những điều kiện cần thiết, nhằm bảo tồn tính trạng ban đầu.
- 2.5. Giống hoạt động: Là tập đoàn các mẫu giống vi sinh vật tương tự tập đoàn cơ bản, được nhắc lại với số lượng lớn hơn để có thể cung cấp cho người sử dụng vào các mục đích như mô tả, phục tráng v.v..

Ban hành kèm theo quyết định số 807/INN-KHKT-QĐ ngày 9 tháng 5 năm 1997 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

- 2.6. Giống công tác: Là tập đoàn các mẫu giống phục vụ cho công tác nghiên cứu, chỉ cần giữ một lượng mẫu đủ để phục vụ cho chương trình nghiên cứu được bảo quản ngắn hạn 1-2 năm.
- 2.7. Bảo quản nguồn gen vi sinh vật: Là bảo quản các mẫu giống thuần khiết sau khi chọn lọc trong điều kiện phù hợp đảm bảo độ sống sót cao để sử dụng trong các trường hợp cần thiết và bảo tồn tính trạng ban đầu.
- 2.8. Hoạt tính sinh học: Là khả năng của vi sinh vật được tạo ra trong quá trình hoạt động sống có tác dụng trực tiếp đối với quá trình sinh trưởng, phát triển của cây trồng, vật nuôi, kiểm soát sinh học và sinh thái môi trường.
- 2.9. Thuần hoá giống: Là công việc lựa chọn những khuẩn lạc vi sinh vật đồng nhất, giữ lại những gen tốt, thuần khiết hay những bào tử gen đồng nhất có tính di truyền trội cũng như các khuẩn sinh dưỡng trẻ của xạ khuẩn, nấm mốc.
- 2.10. Phục tráng giống: Là công việc sử dụng các tác nhân vật lý, hoá học hoặc các môi trường, phương pháp nuôi dưỡng nhằm tái tạo, duy trì và nâng cao hoạt tính sinh học của các nguồn gen vi sinh vật trong quá trình lưu giữ và bảo quản.
- 3. Nội dung công tác thu thập, tuyển chọn lưu giữ, bảo quản nguồn gen vi sinh vật nông nghiệp.**
 - 3.1. Điều tra các nguồn gen vi sinh vật từ các mẫu cây, mẫu đất, mẫu nước hoặc một cơ chất nào đó tùy thuộc vào mục đích nghiên cứu và ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp.
 - 3.2. Tuyển chọn các nguồn gen vi sinh vật có hoạt tính sinh học cao, có tác động trực tiếp hoặc gián tiếp đến đất đai, cây trồng, vật nuôi và môi trường sinh thái.
 - 3.3. Xác định đặc điểm sinh học và vị trí phân loại của các nguồn gen vi sinh vật được nghiên cứu và lưu giữ.
 - 3.4. Thu thập và nhập nội nguồn gen có hoạt tính sinh học đặc biệt và các nguồn gen mới cho các sản phẩm có giá trị.
 - 3.5. Nghiên cứu xác định các phương pháp bảo quản phù hợp đảm bảo duy trì sức sống và hoạt tính của các nguồn gen vi sinh vật. Tùy theo mục đích bảo quản, điều kiện trang thiết bị, trình độ cán bộ và khả năng sinh trưởng, sự ổn định di truyền của nguồn gen vi sinh vật có thể bảo quản vi sinh vật ngắn hạn hoặc dài hạn.
 - 3.6. Định kỳ kiểm tra độ sống sót, kiểm tra đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hoá, hoạt tính sinh học trong quá trình lưu giữ, bảo quản.
 - 3.7. Phục tráng các nguồn gen bị thoái hoá. Chọn tạo các nguồn gen mới có giá trị.
 - 3.8. Khai thác, sử dụng các nguồn gen có lợi, tạo các sản phẩm sinh học có giá trị, trong đó chú ý đảm bảo tính nguyên vẹn của nguồn gen ban đầu và sự tồn tại của loài.
 - 3.9. Xây dựng tư liệu thông tin dưới các hình thức như các loại catalogue, ấn phẩm thông tin, phiếu lý lịch và cất giữ các thông tin trên máy vi tính. Hai loại tư liệu hoá bắt buộc đối với công tác lưu trữ nguồn gen vi sinh vật là:

+ Tư liệu nguồn gen VSV (phụ lục 1)

+ Tư liệu cho việc nhận và chuyển nhượng nguồn gen VSV (phụ lục 2)

4. Trách nhiệm của chủ thể nguồn gen VSV:

- 4.1. Bộ nông nghiệp - PTNT khuyến khích các tổ chức, cá nhân có nguồn gen VSV nông nghiệp (chủ thể nguồn gen) có ích tham gia xây dựng bảo tàng quỹ gen.
- 4.2. Chủ thể các nguồn gen vi sinh vật đều có thể gửi nguồn gen vào bảo tàng quỹ gen, được đảm bảo quyền lợi và có trách nhiệm như nhau.
- 4.3. Các chủ thể nguồn gen VSV khi muốn gửi vào bảo tàng quỹ gen, phải cung cấp đầy đủ các tư liệu thông tin có liên quan đến nguồn gen (theo phụ lục 1).
- 4.4. Các chủ thể nguồn gen vi sinh vật gửi vào quỹ gen phải có trách nhiệm đóng lệ phí bảo quản tùy theo từng chủng loại, thời gian, điều kiện và số lượng nguồn gen VSV.

5. Trách nhiệm của bảo tàng quỹ gen:

- 5.1. Bộ Nông nghiệp - PTNT giao cho Viện Khoa học Kỹ thuật nông nghiệp Việt Nam chịu trách nhiệm bảo quản nguồn gen VSV nông nghiệp (bảo tàng quỹ gen), trừ VSV thú y.
- 5.2. Bảo tàng quỹ gen có trách nhiệm thu thập, tuyển chọn, lưu giữ, bảo quản nguồn gen VSV không được để lẫn tạp, mất mát các nguồn gen đã có, không được gây khó khăn cho các chủ thể VSV gửi vào bảo tàng quỹ gen. Khi chưa được chủ thể nguồn gen cho phép thì không được tự tiện trao cho bất kỳ ai có nhu cầu về nguồn gen đó.
- 5.3. Khi xảy ra mất mát, lẫn tạp hoặc làm ảnh hưởng xấu đến chất lượng nguồn gen VSV, đơn vị và cá nhân trực tiếp bảo quản quỹ gen phải chịu trách nhiệm trước Bộ Nông nghiệp - PTNT, tùy theo mức độ, Bộ sẽ có hình thức kỷ luật thích đáng.

PHỤ LỤC 1**PHIẾU LÝ LỊCH NGUỒN GIEN VI SINH VẬT**

1. Chủ thể nguồn gien VSV
2. Phân loại nguồn gien VSV
3. Tên khoa học của nguồn gien VSV
4. Ký hiệu nguồn gien VSV
5. Nguồn gốc
6. Môi trường giữ giống
7. Tài liệu ghi công thức môi trường giữ giống
8. Điều kiện nuôi cấy
 - 8.1. Môi trường nuôi cấy
 - 8.2. Nhiệt độ thích hợp
 - 8.3. pH thích hợp
 - 8.4. Các yêu cầu đặc biệt
9. Đặc điểm nguồn gien VSV
 - 9.1. Thuần hay không thuần
 - 9.2. Các hoạt tính sinh học đã biết
 - 9.3. Phạm vi áp dụng
10. Tài liệu nghiên cứu có liên quan

Chủ thể nguồn gien**Đại diện bảo tàng quỹ gien**

PHỤ LỤC 2

PHIẾU CHUYỂN NHẬN NGUỒN GIEN VSV

- 1. Đơn vị cá nhân yêu cầu chuyển nhượng
- 2. Tên khoa học nguồn gen VSV
- 3. Tên khác
- 4. Lịch sử nguồn gen VSV
 - 4.1. Chủ thể nguồn gen
 - 4.2. Nguồn phân lập
 - 4.3. Người, cơ quan phân lập
 - 4.4. Người, cơ quan bảo quản
- 5. Đặc điểm của nguồn gen VSV
 - 5.1. Các hoạt tính sinh học
 - 5.2. Phạm vi sử dụng
 - 5.3. Tính chất độc hại
- 6. Điều kiện bảo quản
 - 6.1. Môi trường nuôi cấy
 - 6.2. Nhiệt độ thích hợp
 - 6.3. pH thích hợp
 - 6.4. Phương pháp bảo quản
- 7. Phương pháp tạo đột biến (đối với nguồn gen đột biến)
- 8. Số paten (đối với nguồn gen đã đăng ký paten)
- 9. Mục đích chuyển nhận

Đơn vị, cá nhân
nhận nguồn gen VSV

Đại diện
Bảo tàng quỹ gen

BẢO QUẢN NGẮN HẠN NGUỒN GIEN VI SINH VẬT NÔNG NGHIỆP

1. Phạm vi áp dụng:

Tiêu chuẩn này áp dụng cho việc bảo quản ngắn hạn nguồn gien vi sinh vật dị dưỡng hiếu khí sử dụng trong nông nghiệp với nguồn vật liệu di truyền là tế bào sinh dưỡng, bào tử trong điều kiện vô trùng bằng phương pháp bảo quản trên môi trường thạch nghiêng và dưới lớp dầu khoáng.

2. Thuật ngữ, định nghĩa:

- 2.1. Nguồn gien vi sinh vật nông nghiệp được hiểu là nguồn tài nguyên di truyền công nghệ bao gồm các nhóm chủng vi sinh vật khác nhau như vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm men, nấm mốc, vi khuẩn lam đang là đối tượng được nghiên cứu và sử dụng trong nông nghiệp (trừ vi sinh vật trong lĩnh vực thú y, bao gồm cả các chủng đang được khai thác để lai tạo và các chủng có tiềm năng đã được kiểm định, được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn cho phép sử dụng).
- 2.2. Bảo quản nguồn gien vi sinh vật là bảo quản các mẫu giống thuần khiết sau khi đã chọn lọc, trong điều kiện phù hợp bảo đảm độ sống sót cao và bảo tồn các tính trạng ban đầu để sử dụng trong các trường hợp cần thiết.
- 2.3. Bảo quản ngắn hạn là bảo quản các mẫu giống trong thời gian dưới 2 năm. Trong đó áp dụng một số yếu tố làm giảm tốc độ sinh trưởng của nguồn vật liệu di truyền như hạ thấp nhiệt độ nuôi cấy, đưa thêm các chất ức chế sinh trưởng v.v...
- 2.4. Đặc tính sinh học là khả năng của vi sinh vật thông qua hoạt động sống của chúng có tác dụng đến quá trình sinh trưởng, phát triển của cây trồng, vật nuôi, kiểm soát sinh học và sinh thái môi trường.
- 2.5. Môi trường nuôi cấy chọn lọc là môi trường phù hợp cho sự phát triển của một loài hay một nhóm vi sinh vật nào đó nhưng ít thuận lợi hay hoàn toàn bất lợi đối với sự phát triển của loài hay nhóm vi sinh vật khác.
- 2.6. Môi trường chẩn đoán phân biệt (môi trường chỉ thị) là môi trường cho phép phân biệt nhanh chóng một loài vi sinh vật này với một loài vi sinh vật khác.

Ban hành kèm theo quyết định số: 03-1999/QĐ-BNN-KHCN ngày 6 tháng 1 năm 1999 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

2.7. Mẫu giống:

Mẫu giống là giống do tác giả chọn lọc, lai tạo hay lấy từ quỹ gen có tính di truyền ổn định.

- Một mẫu giống vật liệu cần giữ một lượng mẫu lặp lại ít nhất ba lần.
- Không được chọn những khuẩn lạc riêng biệt trong các lần cấy chuyển để làm giống (tránh đột biến sinh trưởng).
- Việc lấy mẫu được tiến hành sao cho mẫu kiểm tra phải là mẫu thuần.

Người lấy mẫu phải được huấn luyện và có kinh nghiệm trong việc lấy mẫu.

- Trong quá trình lấy mẫu, vận chuyển và xử lý mẫu phải đảm bảo tránh sự tạp nhiễm từ bên ngoài và đảm bảo được tính nguyên trạng ban đầu.

2.8. Thời gian cấy chuyển là khoảng thời gian các mẫu giống được lưu giữ trước khi cấy chuyển, phụ thuộc vào đặc điểm sinh học mẫu vật liệu, phương tiện và kinh nghiệm người giữ mẫu giống.

2.9. Độ phần trăm sống sót của mẫu giống là tỷ lệ phần trăm giữa lượng tế bào sống sót trong các mẫu giống bảo quản và mẫu giống gốc mới được nuôi cấy và phát triển ổn định. Độ phần trăm sống sót của mẫu giống cho phép định thời gian cấy chuyển mẫu giống.

2.10. Hồi phục là quá trình cấy chuyển mẫu bảo quản trên môi trường dinh dưỡng chọn lọc sau khi đã loại bỏ chất ức chế sinh trưởng (dầu parafin).

3. Nội dung:

3.1. Phương pháp bảo quản trên môi trường thạch nghiêng:

3.1.1. Chuẩn bị:

3.1.1.1. Trang thiết bị:

- Tủ sấy (thiết bị tiệt trùng khô) và nồi hấp (thiết bị tiệt trùng ướt).
- Tủ ẩm.
- Cân kỹ thuật có độ chính xác tới 0,01g.
- Que cấy.
- Que gạt thủy tinh.
- Ống nghiệm thủy tinh.
- Ống đong: 100ml, 500ml, 1000ml
- Bình tam giác: 250ml, 500ml.
- Đĩa petri (hộp lồng).
- Pipet chia độ: chuyên dùng cho vi sinh có dung tích 1ml; 5ml, 10ml.
- Đèn cồn hoặc đèn gas.

3.1.1.2. Chuẩn bị dụng cụ:

Các 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 từ 160-175°C trong ít nhất 2 giờ.
- Trong nồi hấp 121°C (1 atmophe) không ít hơn 20 phút.

3.1.1.3. Môi trường nuôi cấy:

Môi trường nuôi cấy là môi trường nuôi cấy chọn lọc (xem mục 3.6).

Cân và hoà tan các thành phần môi trường trong nước cất theo thứ tự đã cho. Phân môi trường vào các ống nghiệm (5-6ml/ống nghiệm). Đậy nút bông, tiệt trùng ở 121°C trong 30 phút. Để nguội môi trường đến 45-50°C, đặt nghiêng ống nghiệm khoảng 45°. Đợi bề mặt thạch khô tiến hành cấy giống.

3.1.2. Tiến hành:

Cấy giống: Từ các mẫu giống gốc, bằng thao tác vô trùng cấy ria trên môi trường nuôi cấy thích hợp. Sau khi tế bào đã phát triển ổn định, tiến hành cất giữ trong tủ lạnh hay phòng (có thể dùng giấy bạc hoặc túi plastic bao đầu ống giống để tránh sự mất nước của môi trường)

Nhiệt độ cất giữ 4-10°C. Định kỳ cấy chuyển. Tùy từng loại giống mà qui định thời gian phải cấy chuyển lại có thể sau 5-7 ngày, 2-4 tuần hay 3-4 tháng.

3.1.3. Kiểm tra mẫu giống:

Định kỳ sau 12 tháng kiểm tra độ phần trăm sống sót và đặc tính sinh học của mẫu giống.

3.1.3.1. Độ phần trăm sống sót của mẫu giống :

- Môi trường để kiểm tra:

Môi trường để kiểm tra được sử dụng là môi trường nuôi cấy chọn lọc. Môi trường được pha chế theo thứ tự các hoá chất trong thành phần đã cho, sau đó phân phối vào các dụng cụ thuỷ tinh đã chuẩn bị trước rồi khử trùng ở 121°C trong 30 phút. Để nguội môi trường đến 45-50°C, phân phối môi trường vào các đĩa petri đã khử trùng ở điều kiện vô trùng.

- Dịch pha loãng là dung dịch muối sinh lý (NaCl 0,85%), không chứa các hợp chất nitơ, có độ pH là 7,0 sau khi khử trùng ở 121°C trong 30 phút.

Phân phối dịch pha loãng vào các ống nghiệm hoặc các bình tam giác có dung tích thích hợp với một lượng sao cho sau khi khử trùng, mỗi ống nghiệm chứa 9 ml và mỗi bình tam giác chứa 90ml. Làm nút bông và khử trùng ở 121 °C trong 30 phút.

Nếu chưa sử dụng ngay, dịch pha loãng cần được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4-10°C, thời gian bảo quản không quá 1 tháng kể từ ngày chuẩn bị.

Ghi chú: 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.

- Chuẩn bị dịch huyền phù vi khuẩn (suspension): Lấy ống giống bảo quản cần kiểm tra ra khỏi nhiệt độ bảo quản, để nhiệt độ của ống giống bảo quản bằng nhiệt độ phòng thí nghiệm bắt đầu tiến hành kiểm tra. Lấy sinh khối vi sinh từ một ống giống đưa vào bình tam giác chứa 90ml dịch pha loãng, trộn đều bằng lắc tay hay thiết bị lắc cơ học để đảm bảo các vi sinh vật được phân bố đồng đều. Dung dịch tạo ra được gọi là dịch huyền phù vi khuẩn ban đầu.

Dùng pipet đã vô trùng lấy 1 ml dịch huyền phù ban đầu cho vào 9 ml dịch pha loãng, tránh chạm pipet vào dịch pha loãng. Trộn kỹ bằng cách dùng một pipet vô trùng khác hút lên xuống 10 lần hoặc bằng dụng cụ trộn cơ học trong 5-10 giây, tần số quay của dụng cụ này sẽ được chọn sao cho chất lỏng khi cuộn xoáy dâng lên cách mép lọ chứa khoảng 2-3 cm để có được dung dịch pha loãng 10^{-2} . Lặp lại các thao tác này để thu được dịch pha loãng 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} .

Cấy mẫu: dùng pipet vô trùng riêng cho từng độ pha loãng, lấy ra từ dịch mẫu một lượng mẫu dịch 0,05 ml (1 giọt) cấy vào 1 đĩa petri chứa môi trường đã chuẩn bị sẵn (xem 3.1.3.1). Mỗi mẫu được cấy lặp lại 3 đĩa petri.

Dùng que gạt vô trùng gạt đều để dịch mẫu dàn trải trên bề mặt thạch, đợi khô bề mặt thạch, úp ngược đĩa petri, nuôi trong tủ ẩm ở nhiệt độ và thời gian thích hợp.

Đếm số lượng khuẩn lạc đặc trưng của mẫu giống các chủng giống vi sinh vật trên mỗi đĩa petri.

Mật độ vi sinh vật trên một đơn vị kiểm tra (gam hay ml) được tính theo công thức sau:

$$A = \frac{ax20}{d}$$

Trong đó:

A: số khuẩn lạc/ml dịch

a: số khuẩn lạc trung bình có trong đĩa petri

d: nồng độ dịch pha loãng

20: số giọt dịch trong 1 ml dịch

Ghi chú:

Số lượng khuẩn lạc trung bình được tính là trung bình cộng số khuẩn lạc của các đĩa petri được cấy từ cùng một độ pha loãng, trong đó chỉ tính các đĩa petri chứa 30-300 khuẩn lạc. Số lượng khuẩn lạc trung bình cũng có thể được tính là trung bình cộng số lượng khuẩn lạc của các đĩa petri được cấy từ hai độ pha loãng kế tiếp nhau bằng cách tính số khuẩn lạc trung bình cộng 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 trên nếu tỷ số giữa giá trị lớn và giá trị nhỏ không lớn hơn 2. Nếu tỷ số này lớn hơn 2 thì lấy giá trị nhỏ làm kết quả.

Mật độ vi sinh vật trên một đơn vị kiểm tra được biểu thị bằng một số giữa 1,00 và 9,99 nhân với 10^n , n là số mũ thích hợp.

$$\% \text{ độ sống sót} = \frac{\text{Số lượng tế bào mẫu giống bảo quản}}{\text{Số lượng tế bào mẫu giống gốc}} \times 100$$

3.1.3.2. Xác định đặc tính sinh học:

Tiến hành theo những phương pháp cụ thể (phụ thuộc vào khả năng sinh hoạt tính của từng nhóm các chủng vi sinh vật)

3. 2. Phương pháp bảo quản dưới lớp dầu khoáng

3.2.1. Chuẩn bị:

3.2.1.1. Trang thiết bị, dụng cụ : xem 3.1.1.1

3.2.1.2. Chuẩn bị dụng cụ : xem 3.1.1.2

3.2.1.3. Môi trường nuôi cấy:

- Chuẩn bị môi trường : xem 3.1.1.3
- Dầu parafin có tỷ trọng 0,865-0,890 được khử trùng ở 121°C trong 30 phút, sau đó để nhiệt độ phòng cho bay hết nước lẫn trong dầu.

3.2.2. Tiến hành:

Cấy giống: xem 3.1.2

Khi tế bào đã phát triển ổn định, bằng thao tác vô trùng đổ parafin đã chuẩn bị ở 3.2.1.3 lên bề mặt thạch nghiêng đã cấy giống sao cho khi dựng đứng ống thạch lên thì bề mặt lớp dầu khoáng cách mép trên của lớp thạch khoảng 1 cm. Ống giống khi đưa vào bảo quản phải đạt độ thuần khiết 100%.

Nhiệt độ cất giữ 4 - 10°C, định kỳ cấy chuyển sau 12 tháng

3.2.3. Kiểm tra mẫu giống.

Định kỳ sau 12 tháng kiểm tra độ phần trăm sống sót và đặc tính sinh học của mẫu giống.

3.2.3.1. Độ phần trăm sống sót của mẫu giống: xem 3.1.3.1

Trước khi lấy sinh khối vi sinh vật để chuẩn bị dịch huyền phù vi khuẩn cần loại bỏ toàn bộ lớp dầu khoáng bằng cách dùng pipét hút hết dầu khoáng, sau đó dùng giấy lọc thấm khô hết dầu khoáng dính trên bề mặt ống giống.

3.2.3.2 Xác định đặc tính sinh học của mẫu giống: xem 3.1.3.2

Ghi chú: Chỉ cho phép giữ lại các mẫu giống có phần trăm độ sống sót cao, có hoạt tính sinh học ổn định như mẫu giống gốc. Các mẫu giống này sẽ được cấy chuyển lại trên môi trường nuôi cấy và tiếp tục bảo quản.

BẢO QUẢN DÀI HẠN NGUỒN GIEN VI SINH VẬT NÔNG NGHIỆP BẰNG PHƯƠNG PHÁP ĐÔNG KHÔ

1. Phạm vi áp dụng:

Tiêu chuẩn này áp dụng cho việc bảo quản dài hạn nguồn gien vi sinh vật dị dưỡng hiếu khí và vi hiếu khí sử dụng trong nông nghiệp với nguồn vật liệu di truyền là tế bào sinh dưỡng, bào tử trong điều kiện vô trùng bằng phương pháp đông khô.

2. Thuật ngữ, định nghĩa:

- 2.1. Nguồn gien vi sinh vật nông nghiệp được hiểu là nguồn tài nguyên di truyền công nghệ bao gồm các nhóm chủng vi sinh vật khác nhau như vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm men, nấm mốc, vi khuẩn lam khác đang là đối tượng được nghiên cứu và sử dụng trong nông nghiệp (trừ vi sinh vật trong lĩnh vực thú y), bao gồm cả các chủng đang được khai thác để lai tạo và các chủng có tiềm năng đã được kiểm định, được Bộ Nông nghiệp - PNTN cho phép sử dụng.
- 2.2. Bảo quản nguồn gien vi sinh vật là bảo quản các mẫu giống thuần khiết sau khi đã chọn lọc, trong điều kiện phù hợp bảo đảm độ sống sót cao và bảo tồn các tính trạng ban đầu để sử dụng trong các trường hợp cần thiết.
- 2.3. Bảo quản dài hạn là bảo quản các mẫu giống trong thời gian trên 2 năm.
- 2.4. Đặc tính sinh học là khả năng của vi sinh vật thông qua hoạt động sống của chúng có tác dụng đến quá trình sinh trưởng, phát triển của cây trồng, vật nuôi, kiểm soát sinh học và sinh thái môi trường.
- 2.5. Môi trường nuôi cấy chọn lọc là môi trường phù hợp cho sự phát triển của một loài hay một nhóm vi sinh vật nào đó nhưng ít thuận lợi hay hoàn toàn bất lợi đối với sự phát triển của loài hay nhóm vi sinh vật khác.
- 2.6. Môi trường chẩn đoán phân biệt (môi trường chỉ thị) là môi trường cho phép phân biệt nhanh chóng một loài vi sinh vật này với một loài vi sinh vật khác.
- 2.7. Mẫu giống:
 - Mẫu giống là giống do tác giả chọn lọc, lai tạo hay lấy từ quỹ gien có tính di truyền ổn định.

Ban hành kèm theo quyết định số: 03-1999/QĐ - BNN - KHICN ngày 6 tháng 1 năm 1999 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

- Một mẫu giống vật liệu cần giữ một lượng mẫu lặp lại ít nhất ba lần.
- Không được chọn những vi khuẩn lạc riêng biệt trong các lần cấy chuyển làm giống (tránh đột biến sinh trưởng).
- Việc lấy mẫu được tiến hành sao cho mẫu kiểm tra phải là mẫu thuần.
- Người lấy mẫu phải được huấn luyện và có kinh nghiệm trong việc lấy mẫu.
- Trong quá trình lấy mẫu, vận chuyển và xử lý mẫu phải đảm bảo tránh sự tạp nhiễm từ bên ngoài và đảm bảo được tính nguyên trạng ban đầu.

2.8. Thời gian cấy chuyển là khoảng thời gian các mẫu giống được lưu giữ trước khi cần cấy chuyển, phụ thuộc vào đặc điểm sinh học mẫu vật liệu, phương tiện và kinh nghiệm người giữ mẫu giống.

2.9. Độ phần trăm sống sót của mẫu giống là tỷ lệ phần trăm giữa lượng tế bào sống sót trong các mẫu giống bảo quản và mẫu giống gốc mới được nuôi cấy và phát triển ổn định. Độ phần trăm sống sót của mẫu giống cho phép định thời gian cấy chuyển mẫu giống.

2.10. Hồi phục là quá trình cấy chuyển mẫu đông khô trên môi trường dinh dưỡng chọn lọc.

3. Nội dung:

3.1. Chuẩn bị:

3.1.1. Trang thiết bị:

- Tủ sấy (thiết bị tiệt trùng khô) và nồi hấp (thiết bị tiệt trùng ướt)
- Tủ ấm
- Máy đông khô
- Cân kỹ thuật có độ chính xác tới 0,01g
- Que cấy
- Que gạt thủy tinh
- Lọ đông khô (có nút cao su) hoặc ampul bằng thủy tinh trung tính
- Ống nghiệm thủy tinh
- Ống đong: 100ml, 500ml, 1000ml
- Bình tam giác: 250ml, 500ml
- Đĩa petri (hộp lồng)
- Pipet chia độ: chuyên dùng cho vi sinh có dung tích 1ml, 5ml, 10ml
- Đèn cồn hoặc đèn gas

3.1.2. Chuẩn bị dụng cụ:

- Các 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 từ 160- 175 °C trong ít nhất 2 giờ.

+ Trong nồi hấp 121°C (1 atmolphe) không ít hơn 20 phút.

- Chuẩn bị lọ đông khô (hoặc ampul): ngâm trong HCl 2% trong 12 giờ. Sau đó rửa lại bằng nước máy 3-4 lần và tráng lại bằng nước cất vô trùng.

3.1.3. Chuẩn bị môi trường:

- Môi trường nuôi cấy sinh khối và kiểm tra độ phần trăm sống sót của mẫu giống là môi trường nuôi cấy chọn lọc (xem mục 2.5).

Cân và hoà tan các thành phần môi trường trong nước cất theo thứ tự đã cho. Phân phối môi trường vào các bình tam giác. Đậy nút bông, tiệt trùng ở 121°C trong 30 phút.

- Môi trường bảo vệ: có thành phần như sau: sữa tách bơ 20%, hoặc Saccharoza 10%, hoặc Gelatin 1%. Môi trường bảo vệ cần được tiệt trùng bằng phương pháp Pasteur, hoặc màng lọc vi khuẩn hoặc ở 121°C trong 15 phút.

3.2. Tiến hành:

3.2.1. Tạo sinh khối vi sinh vật:

Các mẫu giống được nuôi cấy trên môi trường nuôi cấy thích hợp (dạng dịch thể hay thạch nghiêng). Sau khi tế bào phát triển tốt, ổn định, thu sinh khối vi sinh vật để tiến hành đông khô.

3.2.2. Chuẩn bị dịch huyền phù cho đông khô:

- Cho sinh khối vi sinh vật vào môi trường bảo vệ. Trộn đều để thu được dịch huyền phù đồng nhất, đảm bảo ít nhất là 10^8 tế bào/ml.

- Dùng pipet vô trùng hút 1 ml dịch huyền phù nhỏ dưới đáy lọ đông khô (hoặc ampul). Tiến hành thao tác trong điều kiện vô trùng, không để rây vi sinh vật lên mép hoặc thành lọ đông khô (hoặc ampul).

3.2.3. Quá trình đông khô: được tiến hành như sau:

- Pha 1: Hạ băng: Từ 20°C xuống -35 °C trong 3 giờ

- Pha 2: Đông khô: Từ -35 °C đến -10 °C trong 18 giờ.

Từ -10 °C đến 25 °C trong 4 giờ.

- Pha 1: Làm kiệt: Duy trì ở 25 °C trong 4 giờ.

3.2.4. Qui định chất lượng đông khô

- Vùng nhiệt sử dụng (từ -35°C đến -25°C): nằm trong vùng cho phép, các vi sinh vật

không bị tổn thương. Sau mỗi mẻ đông khô cần kiểm tra độ sống sót của vi sinh vật, độ tạp nhiễm trước và sau khi đông khô.

- Ống đông khô có độ chân không gần tuyệt đối (kiểm tra bằng đèn cực tím)
- Ẩm độ của sản phẩm sau đông khô nhỏ hơn 4%.
- Cấu trúc vật lý: xốp, không vỡ.
- Tan ngay khi cho dung môi vào sản phẩm đã đông khô.
- Không bị biến màu.

3.2.5. Bảo quản:

Mẫu đông khô được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4-10°C hoặc ở chỗ tối và mát.

3.3. Kiểm tra mẫu giống:

Định kỳ sau 1-5 năm kiểm tra độ phần trăm sống sót và đặc tính sinh học của mẫu giống.

3.3.1. Độ phần trăm sống sót của mẫu giống:

3.3.1.1. Môi trường để kiểm tra:

Môi trường để kiểm tra được sử dụng là môi trường nuôi cấy chọn lọc. Môi trường được pha chế theo thứ tự các hoá chất trong thành phần đã cho. Sau đó được phân phối vào các dụng cụ thuỷ tinh đã chuẩn bị trước rồi khử trùng ở 121°C trong 30 phút. Để nguội môi trường đến 45-50°C, phân phối môi trường vào các đĩa petri đã khử trùng ở điều kiện vô trùng.

3.3.1.2. Dịch pha loãng, dung dịch muối sinh lý (NaCl 0,85%), không chứa các hợp chất nitơ, có độ pH là 7,0 sau khi khử trùng ở 121°C trong 30 phút.

Phân phối dịch pha loãng vào các ống nghiệm có dung tích thích hợp với một lượng sao cho sau khi khử trùng, mỗi ống nghiệm chứa 9ml. Làm nút bông và khử trùng ở 121°C trong 30 phút.

Nếu chưa sử dụng ngay, dịch pha loãng cần được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4-10°C, thời gian bảo quản không quá 1 tháng kể từ ngày chuẩn bị.

Ghi chú: 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.

3.3.1.3. Chuẩn bị dịch huyền phù vi khuẩn (suspension):

Lấy ống giống bảo quản cần kiểm tra ra khỏi nhiệt độ bảo quản, tiến hành kiểm tra khi nhiệt độ của ống giống bảo quản bằng nhiệt độ phòng thí nghiệm.

+ Từ ống nghiệm đông khô dạng ampul:

- Sát trùng ampul bằng gạc tẩm cồn

- Cưa ngang ampul vào chỗ giữa nút bên trong
 - Dùng đầu đũa thủy tinh nóng đỏ để bẻ ampul, hoặc bọc cái gạc quanh ampul giống và bẻ gãy ở vị trí đã cưa. Phải cẩn thận tránh gạc quá ướt, còn có thể bị sộc vào chủng giống khi ống chân không bị bẻ ra.
 - Cho phép không khí vào ống nghiệm từ chỗ bẻ. Nếu mở không tốt, cái nút có thể bị đẩy sát vào đáy ống giống và phần tinh khiết của dịch đông khô bị lộ ra không khí.
 - Bỏ đầu ampul giống và cái nút bằng kẹp vô trùng. Nếu không lấy cẩn thận, cái nút có thể gây nhiễm trùng ống giống đông khô.
 - Đốt nóng đầu mở của ampul.
 - Dùng bơm tiêm vô trùng thêm 1 ml môi trường dinh dưỡng dịch thể tương ứng vào ampul giống để hydrat hoá chủng giống. Lắc kỹ trong 20 phút để đảm bảo các tế bào được phân bố đồng đều. Dung dịch được tạo ra gọi là dịch huyền phù ban đầu.
- + Từ ống đông khô dạng lọ có nút cao su:
- Sát trùng lọ bằng gạc tẩm cồn
 - Dùng bơm tiêm vô trùng thêm 1 ml môi trường dinh dưỡng dịch thể tương ứng vào lọ giống (qua nút cao su) để hydrat hoá chủng giống. Lắc kỹ trong 20 phút để đảm bảo các tế bào được phân bố đồng đều. Dung dịch được tạo ra gọi là dịch huyền phù ban đầu.
 - Dùng bơm tiêm đã vô trùng hút toàn bộ dịch huyền phù ban đầu (1ml) cho vào 9 ml dịch pha loãng, tránh chạm bơm tiêm vào dịch pha loãng. Trộn kỹ bằng cách dùng một pipet vô trùng khác hút lên xuống 10 lần hoặc bằng dụng cụ trộn cơ học trong 5-10 giây, tần số quay của dụng cụ này sẽ được chọn sao cho chất lỏng khi cuộn xoáy dâng lên cách mép lọ chứa khoảng 2-3cm để có được dung dịch pha loãng 10^{-2} . Lặp lại các thao tác này để thu được dịch pha loãng 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} .
- Cấy mẫu: dùng pipet vô trùng riêng cho từng độ pha loãng, lấy ra từ dịch mẫu một lượng mẫu dịch 0,05 ml (1 giọt) cấy vào 1 đĩa petri chứa môi trường đã chuẩn bị sẵn (xem 3.3.1). Mỗi mẫu được cấy lặp lại 3 đĩa petri.
- Dùng que gạt vô trùng gạt đều để dịch mẫu dàn trải trên bề mặt thạch, đợi khô bề mặt thạch, úp ngược đĩa petri, nuôi trong tủ ẩm với nhiệt độ và thời gian thích hợp.
- Đếm số lượng khuẩn lạc đặc trưng của mẫu giống các chủng giống vi sinh vật trên mỗi đĩa petri.
- Mật độ vi sinh vật trên một đơn vị kiểm tra (gam hay ml) được tính theo công thức sau:

$$A = \frac{ax20}{d}$$

Trong đó:

A: số khuẩn lạc/ml dịch

a: số khuẩn lạc trung bình có trong đĩa petri

d: nồng độ dịch pha loãng

20: số giọt dịch trong 1 ml dịch.

Ghi chú:

Số lượng khuẩn lạc trung bình được tính là trung bình cộng số khuẩn lạc của các đĩa petri được cấy từ cùng một độ pha loãng, trong đó chỉ tính các đĩa petri chứa từ 30-300 khuẩn lạc.

Số lượng khuẩn lạc trung bình cũng có thể được tính là trung bình cộng số lượng khuẩn lạc của các đĩa petri được cấy từ hai độ pha loãng kế tiếp nhau bằng cách tính số khuẩn lạc trung bình cộng 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 trên nếu tỷ số giữa giá trị lớn và giá trị nhỏ không lớn hơn 2. Nếu tỷ số này lớn hơn 2 thì lấy giá trị nhỏ làm kết quả.

Mật độ vi sinh vật trên mỗi đơn vị kiểm tra được biểu thị bằng một số giữa 1,00 và 9,99 nhân với 10^n , n là số mũ thích hợp.

$$\% \text{ độ sống sót} = \frac{\text{Số lượng tế bào mẫu giống bảo quản}}{\text{Số lượng tế bào mẫu giống gốc}} \times 100$$

3.3.2. Xác định đặc tính sinh học:

Tiến hành theo những phương pháp cụ thể (phụ thuộc vào khả năng sinh hoạt tính của từng nhóm các chủng vi sinh vật).

Ghi chú: Chỉ cho phép giữ lại các mẫu giống có phần trăm độ sống sót cao, có hoạt tính sinh học ổn định như mẫu giống gốc. Các mẫu giống này sẽ được cấy chuyển lại trên môi trường nuôi cấy và tiếp tục bảo quản.

PHƯƠNG PHÁP BẢO QUẢN DÀI HẠN NGUỒN GEN VI SINH VẬT NÔNG NGHIỆP BẰNG NITƠ LỎNG

1. Phạm vi áp dụng:

Tiêu chuẩn này áp dụng cho việc bảo quản dài hạn vi sinh vật dị dưỡng hiếu khí và vi hiếu khí sử dụng trong nông nghiệp (trừ vi sinh vật trong lĩnh vực thú y) dưới dạng là tế bào sinh dưỡng và bào tử trong điều kiện vô trùng bằng phương pháp nitơ lỏng.

2. Thuật ngữ, định nghĩa:

- 2.1. Vi sinh vật nông nghiệp: là các loại vi sinh vật khác nhau thuộc vi khuẩn, xạ khuẩn, vi khuẩn lam, nấm men, nấm mốc đang là đối tượng được nghiên cứu và sử dụng trong nông nghiệp, được Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn cho phép.
- 2.2. Bảo quản vi sinh vật: là bảo quản các mẫu giống thuần khiết sau khi đã chọn lọc, trong điều kiện phù hợp để bảo đảm độ sống sót cao và bảo tồn các tính trạng ban đầu.
- 2.3. Bảo quản dài hạn: là bảo quản các mẫu giống trong thời gian trên 2 năm.
- 2.4. Đặc tính sinh học: là khả năng của vi sinh vật thông qua hoạt động sống của chúng có tác dụng đến quá trình sinh trưởng, phát triển của cây trồng, vật nuôi, kiểm soát sinh học và sinh thái môi trường.
- 2.5. Môi trường nuôi cấy chọn lọc: là môi trường chỉ phù hợp cho sự sinh trưởng, phát triển của một loài hay một nhóm vi sinh vật nào đó.
- 2.6. Môi trường chẩn đoán phân biệt (môi trường chỉ thị): là môi trường cho phép phân biệt nhanh chóng một loại vi sinh vật này với các loại vi sinh vật khác.
- 2.7. Mẫu giống: là giống do tác giả thu thập, chọn lọc, lai tạo hay lấy từ quỹ gen có tính di truyền ổn định.
- 2.8. Thời gian cấy chuyển: là khoảng thời gian giữa 2 lần cấy để duy trì các tính trạng của vi sinh vật.
- 2.9. Độ phần trăm sống sót của mẫu giống: là tỷ lệ phần trăm của số lượng tế bào sống sót trong các mẫu giống bảo quản so với mẫu giống gốc khi mới được nuôi cấy và phát triển ổn định.
- 2.10. Hồi phục giống: là quá trình cấy chuyển vi sinh vật từ mẫu bảo quản vào môi trường dinh dưỡng thích hợp để vi sinh vật khôi phục lại các tính trạng ban đầu.

Ban hành kèm theo quyết định số: 54/2000/QĐ-BNN-KHCN ngày 15 tháng 5 năm 2000 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

3. Nội dung:

3.1. Trang thiết bị:

- Tủ sấy (thiết bị tiệt trùng khô) và nồi hấp áp lực (thiết bị tiệt trùng ướt)
- Tủ ẩm
- Tủ cấy vô trùng
- Tủ lạnh sâu
- Bình để mẫu vi sinh vật có chứa nitơ lỏng
- Bình trữ nitơ lỏng
- Găng tay (Poleyolefin)
- Ống nghiệm polypropylen có nút xoáy, dung tích 2ml, chịu nhiệt độ thấp, khử trùng được hoặc ampul thủy tinh trung tính
- Cân kỹ thuật có độ chính xác tới 0,01g
- Que cấy
- Que gạt thủy tinh
- Ống nghiệm thủy tinh
- Ống đong
- Bình tam giác
- Đĩa petri (hộp lồng)
- Pipet chia độ, pipetman
- Đèn cồn hoặc đèn gas

3.2. Tiến hành:

3.2.1. Chuẩn bị dụng cụ:

- Các 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 160 - 175⁰C không ít hơn 2 giờ.
 - + Trong nồi hấp áp lực 1atmophe (121⁰C) không ít hơn 20 phút.
- Chuẩn bị ống nghiệm polypropylen (hoặc ampul): ngâm trong dung dịch HCl 2% trong 12 giờ. Sau đó rửa lại bằng nước máy 3 - 4 lần và tráng lại bằng nước cất rồi khử trùng trong nồi hấp áp lực 1atmophe (121⁰C) không ít hơn 20 phút.

3.2.2. Chuẩn bị môi trường:

- Môi trường nuôi cấy sinh khối và kiểm tra độ phần trăm sống sót của mẫu giống là môi trường nuôi cấy chọn lọc (mục 2.5).
- Cân và hoà tan các thành phần môi trường trong nước cất theo thứ tự đã cho. Phân phối môi trường vào các bình tam giác. Đậy nút bông, khử trùng ở điều kiện phù hợp cho từng loại môi trường.

- Môi trường bảo vệ: có tỷ lệ sữa tách bơ 10% (w/v), hoặc glycerol 10% (v/v), hoặc Dimetyl sunfoxide (DMSO) 5% (v/v). Môi trường bảo vệ cần được tiệt trùng bằng phương pháp Pasteur, hoặc màng lọc vi khuẩn hoặc ở 121°C trong 15 phút.

3.2.3. Chuẩn bị mẫu giống:

- Một mẫu giống vật liệu cần giữ một lượng mẫu lặp lại không ít hơn ba lần.
- Không được chọn những khuẩn lạc riêng biệt trong các lần cấy chuyển làm giống (tránh đột biến sinh trưởng).
- Việc lấy mẫu được tiến hành sao cho mẫu kiểm tra phải là mẫu thuần. Người lấy mẫu phải được huấn luyện và có kinh nghiệm trong việc lấy mẫu.
- Trong quá trình lấy mẫu, vận chuyển và xử lý mẫu phải đảm bảo tránh sự tạp nhiễm từ bên ngoài và đảm bảo được tính nguyên trạng ban đầu.

3.2.4. Chuẩn bị dịch huyền phù: theo 2 cách

3.2.4.1. Chuẩn bị dịch huyền phù từ mẫu giống nuôi cấy trên môi trường thạch nghiêng:

- Các mẫu giống được nuôi cấy trên môi trường thạch nghiêng thích hợp. Sau khi tế bào phát triển tốt, ổn định (pha sinh trưởng), thu sinh khối vi sinh vật để tiến hành bảo quản.
- Dùng pipet vô trùng hút 5ml môi trường dinh dưỡng (NB) chứa 10% (v/v) glycerol hoặc 5% (v/v) DMSO hoặc 10% (w/v) sữa tách bơ vào mỗi ống thạch nghiêng.
- Dùng pipet vô trùng hút 5ml môi trường dinh dưỡng (NB) chứa 10% (v/v) glycerol hoặc 5% (v/v) DMSO hoặc 10% (w/v) sữa tách bơ vào mỗi ống thạch nghiêng.
- Dùng dụng cụ vô trùng đánh tan toàn bộ sinh khối trên bề mặt thạch nghiêng vào môi trường, sau đó hút toàn bộ dịch huyền phù tế bào, đảm bảo mật độ tế bào ít nhất là 10^8 tế bào/ml.
- Dùng pipet vô trùng phân 1ml của dịch huyền phù tế bào vào ống nghiệm polypropylen, vặn chặt nút. Có thể sử dụng ampul thủy tinh, gắn đầu ampul bằng đèn khò. Không để rây dịch vi sinh lên mép hoặc thành ống nghiệm polypropylen hoặc ampul.
- Đặt ampul trong tủ lạnh 5°C trong 30 phút để đạt được sự ổn định giữa tế bào và môi trường.

3.2.4.2. Chuẩn bị dịch huyền phù từ mẫu giống nuôi cấy trên môi trường dịch thể:

- Các mẫu giống được nuôi cấy trên môi trường dịch thể thích hợp. Sau khi tế bào phát triển tốt, ổn định, tiến hành bảo quản bằng nitơ lỏng.
- Dùng pipet vô trùng bổ sung một lượng 20% (v/v) glycerol hoặc 10% (v/v) DMSO hoặc 20% sữa tách bơ đã khử trùng bằng thể tích của dịch vi sinh vật để đạt nồng độ glycerol cuối cùng 10% (v/v) hoặc DMSO 5% (v/v) hoặc sữa tách bơ 10% (w/v).
- Lắc nhẹ để thu được dịch huyền phù tế bào đồng đều, đảm bảo mật độ tế bào ít nhất là 10^8 tế bào/ml. Nếu giống vi sinh vật mọc thành viên nhỏ hay thành đám lớn, có thể dùng máy nghiền mô nhỏ hoặc cối sứ vô trùng để nghiền nát.
- Dùng pipet vô trùng phân 1ml của dịch huyền phù tế bào vào ống nghiệm polypropylen, vặn chặt nút. Có thể sử dụng ampul thủy tinh, gắn đầu ampul bằng đèn khò.

khò. Không để rây dịch vi sinh lên mép hoặc thành ống nghiệm polypropylen hoặc ampul.

- Đặt ampul trong tủ lạnh 5°C trong 30 phút để đạt được sự ổn định giữa tế bào và môi trường.

3.2.5. Quá trình bảo quản bằng nitơ lỏng: được tiến hành như sau:

- Đặt ống nghiệm polypropylen (ampul) vào trong khay nhôm. Sau đó đặt vào buồng làm lạnh của máy làm lạnh.
- Điều chỉnh tốc độ làm lạnh 1-2°C/phút đến khi nhiệt độ đạt âm 30°C. Sau đó tiếp tục điều chỉnh tốc độ làm lạnh 1°C/phút đến khi nhiệt độ đạt không nhỏ hơn âm 50°C.
- Nhanh chóng chuyển ống nghiệm polypropylen (ampul) đến vị trí bảo quản cuối cùng trong bình nitơ lỏng (nhiệt độ từ âm 156°C đến âm 196°C).

Ghi chú: Cần đi găng tay polyolefin khi thao tác để tránh bị bỏng tay.

3.3. Kiểm tra giống:

Định kỳ hàng năm kiểm tra độ sống sót và đặc tính sinh học của giống. Chỉ cho phép giữ lại các giống có độ sống sót và có hoạt tính sinh học ổn định như giống gốc.

3.3.1. Kiểm tra độ sống sót của giống:

3.3.1.1. Môi trường để kiểm tra:

Dùng môi trường nuôi cấy chọn lọc là môi trường để kiểm tra. 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 phù hợp. Để nguội môi trường đến 45-50°C rồi phân phối vào các đĩa petri vô trùng. Thao tác này được thực hiện trong điều kiện vô trùng.

3.3.1.2. Dịch pha loãng: 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 có dung tích thích hợp với một lượng sao cho sau khi khử trùng, mỗi ống nghiệm chứa 9ml. Làm nút bông và khử trùng ở 1 atmophe (121°C) trong 30 phút.

Nếu chưa sử dụng ngay, dịch pha loãng cần được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4-10°C, thời gian bảo quản không quá 1 tháng kể từ ngày chuẩn bị.

Ghi chú: 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.

3.3.1.3. Chuẩn bị dịch huyền phù tế bào (suspension):

- Lấy ống giống bảo quản cần kiểm tra ra khỏi bình nitơ lỏng, cho băng tan tự nhiên (trong điều kiện phòng thử nghiệm).
- Lau bên ngoài của ống nghiệm polypropylen (ampul) bằng gạc vô trùng có thấm etanol 70% (v/v), đặc biệt chú ý đến vùng giữa nút và thân ống.
- Mở nút ống nghiệm polypropylen (ampul) trong điều kiện vô trùng. Dùng bơm tiêm đã vô trùng hút 1ml dịch huyền phù trong ống nghiệm cho vào 9 ml dịch pha loãng, tránh chạm bơm tiêm vào dịch pha loãng. Trộn kỹ bằng cách dùng một pipet vô trùng khác hút lên xuống 10 lần hoặc bằng dụng cụ trộn cơ học trong 5-10 giây. Lập lại các thao tác này để thu được dịch pha loãng 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} .

- Cấy mẫu: dùng pipet vô trùng lấy từ dịch mẫu pha loãng một lượng 0,05 ml mẫu (1 giọt) cấy vào 1 đĩa petri chứa môi trường đã chuẩn bị sẵn (xem 3.3.1). Mỗi mẫu pha loãng được cấy vào 3 đĩa petri (mỗi độ pha loãng sử dụng 1 pipet vô trùng riêng).
- Dùng que gạt vô trùng gạt đều dịch mẫu trên bề mặt thạch, đợi khô bề mặt thạch, úp ngược đĩa petri, để trong tủ ẩm với nhiệt độ và thời gian thích hợp.
- Đếm số lượng khuẩn lạc đặc trưng của mẫu giống vi sinh vật trên mỗi đĩa petri.
- Mật độ vi sinh vật trên một đơn vị kiểm tra (ml) được tính theo công thức sau:

$$A = \frac{ax20}{d}$$

Trong đó:

A: Số khuẩn lạc/ml dịch;

a: Số khuẩn lạc trung bình có trong đĩa petri;

d: Nồng độ dịch pha loãng;

20: Số giọt dịch trong 1 ml dịch.

Ghi chú:

Số lượng khuẩn lạc trung bình được tính là trung bình cộng số khuẩn lạc của các đĩa petri được cấy từ cùng một độ pha loãng, trong đó chỉ tính các đĩa petri chứa từ 30-300 khuẩn lạc. Số lượng khuẩn lạc trung bình cũng có thể được tính là trung bình cộng số lượng khuẩn lạc của các đĩa petri được cấy từ hai độ pha loãng kế tiếp nhau bằng cách tính số khuẩn lạc trung bình cộng 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 trên nếu tỷ số giữa giá trị lớn và giá trị nhỏ không lớn hơn 2. Nếu tỷ số này lớn hơn 2 thì lấy giá trị nhỏ làm kết quả. Mật độ vi sinh vật trên một đơn vị kiểm tra được biểu thị bằng một số giữa 1,00 và 9,99 nhân với 10^n , n là số mũ thích hợp.

$$\% \text{ sống sót} = \frac{\text{Mật độ tế bào mẫu giống bảo quản}}{\text{Mật độ tế bào mẫu giống gốc}} \times 100$$

3.3.2. Xác định đặc tính sinh học:

Tiến hành theo những phương pháp cụ thể phụ thuộc vào đặc tính sinh học của từng chủng vi sinh vật.

TIÊU CHUẨN PHÂN BÓN
PHẦN V: PHÂN TÍCH CÂY TRỒNG

PHÂN TÍCH CÂY TRỒNG

Nguyên tắc chung về lấy mẫu và chuẩn bị mẫu để xác định một số nguyên tố

1. Phạm vi áp dụng.

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp lấy mẫu và chuẩn bị mẫu cây trồng để xác định các nguyên tố N, P, K, Ca, Mg, S, Fe... cho các khảo nghiệm chuẩn đoán dinh dưỡng cây trồng và hiệu lực phân bón.

2. Nguyên tắc chung.

Mẫu phân tích phải điển hình, phản ánh thực tế thành phần các nguyên tố của cây trồng trong phạm vi nghiên cứu hoặc sản xuất. Lấy mẫu đúng có ý nghĩa quyết định độ chính xác của số liệu phân tích.

Do đặc điểm cây trồng đa dạng, mẫu phân tích cây trồng cần thoả mãn các điều kiện sau:

- 2.1. Mẫu phân tích cây trồng phải đại diện và phù hợp với mục đích phân tích. Ví dụ: mẫu chẩn đoán dinh dưỡng cây trồng lấy ở một bộ phận nhất định trong thời kỳ thích hợp (tuỳ từng loại cây); còn mẫu xác định tổng lượng hút của cây ngắn ngày cần lấy toàn bộ cây với lượng lớn...
- 2.2. Mẫu phân tích cây trồng phải phù hợp với đặc điểm sinh lý của cây. Những quy định về thời kỳ lấy mẫu, bộ phận lấy mẫu của từng loại cây được hướng dẫn trong các quy trình chuyên môn (như lấy lá thứ bao nhiêu, ở loại cành nào và thời điểm nào).
- 2.3. Mẫu phân tích cây trồng cần được lấy trong điều kiện môi trường đồng nhất (nhiệt độ, ẩm độ...), cùng một thời điểm (Thường vào buổi sáng đã hết sương, không mưa, nhiệt độ không khí và cường độ ánh sáng ở mức trung bình...)
- 2.4. Chú ý đến các yếu tố canh tác như thời kỳ bón phân, thời kỳ tưới nước ... để chọn thời điểm lấy mẫu thích hợp.
- 2.5. Các mẫu riêng biệt phải được lấy ngẫu nhiên rải đều trên toàn bộ diện tích khảo sát. Số lượng và khối lượng mẫu ban đầu tuỳ theo yêu cầu khảo sát và mức độ đồng đều để xác định. Các mẫu ban đầu được tập hợp thành một mẫu chung.

Ban hành kèm theo quyết định số: 48-2001/QĐ-BNN-KHCN ngày 26 tháng 4 năm 2001 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

- 2.6. Quá trình bảo quản, vận chuyển, xử lý mẫu phải đảm bảo không làm thay đổi thành phần các nguyên tố hoặc hợp chất cần xác định của mẫu – Không mốc, ẩm...

3. Thiết bị

- 3.1. Bao gói đựng mẫu
- 3.2. Tủ lạnh bảo quản mẫu
- 3.3. Tủ sấy có thông gió
- 3.4. Máy nghiền thực vật khô
- 3.5. Máy nghiền thực vật tươi
- 3.6. Cối và chày mã não

4. Cách tiến hành

- 4.1. Công việc lấy mẫu ngoài đồng theo các quy trình dành riêng cho từng đối tượng cây trồng và yêu cầu khảo sát.
- 4.2. Toàn bộ mẫu lấy ngoài đồng phải được làm sạch bằng cách lau bằng giấy lọc ẩm, những mẫu bị bám bẩn đất cần rửa bằng nước, sau đó thấm khô bằng giấy lọc.
- 4.3. Mẫu sau khi đã làm sạch cần lập tức cho vào túi đựng mẫu, đóng kín và vận chuyển về phòng thí nghiệm ngay trong ngày.
- 4.4. Nhanh chóng sấy khô mẫu ở nhiệt độ $70 \pm 5^{\circ}\text{C}$ trong tủ sấy thông gió, không được sấy đến 80°C sẽ có sự phân huỷ làm mất một số nguyên tố. Cần rải mỏng và đều mẫu trên sàn tủ sấy có lót giấy. Có thể làm khô mẫu bằng cách phơi nắng. (*)
- 4.5. Mẫu sau khi sấy, được cắt nhỏ trộn đều và chọn mẫu trung bình theo nguyên tắc "đường chéo góc", loại bỏ cho đến khi được mẫu trung bình đồng nhất có khối lượng từ 30-300g.
- 4.6. Mẫu trung bình được nghiền nhỏ qua rây 1mm bằng máy nghiền thực vật. Nếu phân tích các nguyên tố vết cần nghiền mẫu bằng cối chày mã não và rây qua rây nhựa.
- 4.7. Mẫu cây đã nghiền được trộn đều đựng trong giấy chống ẩm hoặc bình khô đóng kín, bảo quản nơi khô, mát, sạch.
- 4.8. Sấy mẫu lần thứ hai ở 70°C tới khô tuyệt đối, để mẫu nguội cân nhanh, tránh hút ẩm vào mẫu. Hoặc xác định độ ẩm mẫu và hệ số khô tuyệt đối.

Ghi chú:

* Những mẫu có yêu cầu phân tích các hợp chất dễ biến đổi như protein, axit hữu cơ, nitrat nitrit, vitamin... cần bảo quản mẫu tươi ở 5°C trong suốt quá trình vận chuyển lưu giữ, không được sấy mà phải phân tích ngay mẫu tươi. Trường hợp không phân tích ngay cần cố định mẫu bằng các thủ tục diệt enzin trước khi chọn mẫu trung bình.

** Trước lúc sấy mẫu cần cân khối lượng mẫu tươi để xác định hàm lượng chất khô trong cây.

PHÂN TÍCH CÂY TRỒNG

Phương pháp phân huỷ mẫu để xác định một số nguyên tố

1. Phạm vi áp dụng:

Tiêu chuẩn này quy định các phương pháp phân huỷ mẫu cây trồng khô đã được chuẩn bị theo 10TCN 449-2001 để xác định hàm lượng các nguyên tố P, K, Ca, Mg, S, Fe... (trừ N).

2. Nguyên tắc:

Sử dụng phương pháp phân huỷ khô hoặc phân huỷ ướt (đốt khô hoặc đốt ướt) để phân huỷ các hợp chất chứa các nguyên tố tùy theo tính chất của mẫu và yêu cầu xác định các nguyên tố.

3. Các phương pháp phân huỷ mẫu cây trồng.

3.1. Phương pháp phân huỷ khô.

3.1.1. Phạm vi áp dụng.

Phương pháp phân huỷ khô áp dụng để xác định tất cả các nguyên tố trừ nitơ và lưu huỳnh.

3.1.2. Nguyên tắc:

Tro hoá mẫu ở nhiệt độ $500 \pm 50^{\circ}\text{C}$ trong lò nung, sau đó hòa tan tro trong dung dịch axit.

3.1.3. Thiết bị, thuốc thử.

3.1.3.1. Thiết bị:

- Cân phân tích độ chính xác 0,0002g
- Lò nung
- Cốc đốt (chịu nhiệt) 100ml
- Bếp điện
- Bình định mức 50ml
- Nồi đun cách thuỷ

Ban hành kèm theo quyết định số: 48-2001/QĐ-BNN-KHCN ngày 26 tháng 4 năm 2001 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

3.1.3.2. Thuốc thử

- Dung dịch HCl 1N: Hoà tan 82ml HCl đặc ($d=1,19$) thành 1 lít dung dịch.
- Nước có độ dẫn điện nhỏ hơn $2 \mu\text{S/cm}$, pH 5,6-7,0

3.1.4. Cách tiến hành.

- 3.1.4.1. Cân chính xác 1,0000g mẫu đã được chuẩn bị theo 10TCN 449-2001 cho vào chén nung bằng sứ.
- 3.1.4.2. Tro hoá sơ bộ trên bếp điện, tránh để ngọn lửa cháy bùng, sau đó cho vào lò nung ở nhiệt độ khoảng $450-550^{\circ}\text{C}$ đến khi cháy hết chất hữu cơ, mẫu chuyển sang màu trắng (thời gian nung khoảng 4-5 giờ). (Ghi chú 1)
- 3.1.4.3. Chuyển tro qua cốc đốt 100ml với 10ml dung dịch HCl 1N và đun cốc trên bình cách thuỷ khoảng 30 phút (đậy bằng mặt kính đồng hồ).
- 3.1.4.4. Lọc qua giấy lọc, thu dung dịch lọc vào bình định mức 50ml. Rửa qua giấy lọc 3-4 lần, mỗi lần khoảng 10ml nước nóng, sau khi nguội thêm nước đến vạch định mức. Lắc trộn đều dung dịch lọc.
- 3.1.4.5. Dung dịch lọc có nồng độ HCl khoảng 0,2N được sử dụng để xác định các nguyên tố trừ Nitơ và Lưu huỳnh.

Ghi chú 1:

1. Trường hợp một số mẫu thực vật có nhiều silic, phân huỷ theo thủ tục trên sẽ chưa hoà tan được hoàn toàn các hợp chất chứa các nguyên tố. Trong trường hợp này cần phân huỷ mẫu bằng HF theo thủ tục sau:

- Cân chính xác 1,0000g mẫu cho vào chén bạch kim, sơ bộ tro hoá trên bếp điện, sau đó nung trong lò nung ở nhiệt độ khoảng $450-550^{\circ}\text{C}$ trong 2 giờ. Lấy chén ra và để nguội.
- Làm ẩm tro bằng một vài giọt nước và 0,5ml HCl đặc.
- Đun cẩn thận trên bếp điện cho đến khi bắt đầu xuất hiện khói
- Lọc rửa qua phễu lọc và hứng nước lọc vào bình định mức 50ml, rửa 3-4 lần mỗi lần khoảng 5ml nước nóng.
- Chuyển giấy lọc và cặn vào chén bạch kim, cho vào lò nung, tro hoá ở 550°C khoảng 30 phút. Lấy chén bạch kim ra khỏi lò nung, để nguội.
- Cẩn thận thêm 5ml HF và cô cạn trên bếp ở nhiệt độ 250°C , sau đó thêm 1ml HCl đặc và khoảng 5ml nước cất, đun nhẹ cho tan và lọc.
- Tiếp tục lọc rửa bằng nước nóng 3-4 lần, hứng dung dịch lọc vào bình định mức 50ml trên. Sau khi để nguội thêm nước đến vạch định mức.
- Dung dịch lọc thu được có nồng độ HCl khoảng 1%, sử dụng để xác định các nguyên tố trừ Nitơ và lưu huỳnh.

2. Trường hợp một số mẫu sau khi nung theo 3.1.4 còn lại một ít các bon -mẫu chưa hoàn toàn trắng (hoặc có yêu cầu phân tích các nguyên tố vết), cần tiến hành phân huỷ bổ sung bằng HNO_3 .

Sau khi tro hoá mẫu bằng lò nung đến 3.1.4.2 rồi tiếp tục các bước sau:

- Thêm 3ml HNO_3 5N vào mẫu sau khi tro hoá trong lò nung đã nguội
- Cọ cạn khô trên bếp điện (mẫu có axit nitric không được đổ vào lò nung vì ở 200°C HNO_3 đã bị phân huỷ mạnh)
- Cho mẫu đã cô khô vào lò nung đang nguội và tăng nhiệt độ lên 400°C khoảng 15 phút (bằng phương pháp này chất hữu cơ sẽ cháy hết và các nguyên tố sẽ giải phóng hoàn toàn. Nếu mẫu chưa trắng là do màu của Mangan).
- Lấy chén ra khỏi lò nung, để nguội, cho thêm 3ml HCl đậm đặc và cô trên bếp cách cát cho đến khô.
- Để nguội và thêm 5ml HCl 2N, lắc cho tan cạn
- Lọc và rửa bằng nước nóng 3-4 lần, hứng dung dịch vào bình định mức 50ml, sau khi để nguội thêm nước cho đến vạch định mức.
- Dung dịch lọc thu được dùng để xác định các nguyên tố trừ N và S.
- Khi phân tích các nguyên tố vết phải sử dụng nước siêu sạch ($<0,2 \mu\text{S/cm}$)

3. Trường hợp mẫu xác định Bo cần được tẩm ướt bằng dung dịch NaOH 5% trước khi phân huỷ - Khoảng 0,5-1ml cho 1gam mẫu.

3.2. Phương pháp phân huỷ ướt bằng HNO_3

3.2.1. Phạm vi áp dụng

Phương pháp phân huỷ ướt bằng HNO_3 áp dụng cho các mẫu cây khô để xác định các nguyên tố P, K, S, Ca, Mg, Fe...trừ nitơ.

3.2.2. Nguyên tắc

Sử dụng axit nitric oxy hoá mẫu, hoà tan các hợp chất.

Phương pháp sử dụng axit nitric không bảo đảm sự oxy hoá hoàn toàn, tuy nhiên mức độ sai số thấp, có thể sử dụng thay thế phương pháp phân huỷ khô.

3.2.3. Thiết bị, thuốc thử.

3.2.3.1. Thiết bị:

- Cân phân tích độ chính xác 0,0002g
- Bình phân huỷ mẫu và bếp phân huỷ mẫu có điều khiển nhiệt độ.
- Bình định mức 50ml

3.2.3.2. Thuốc thử

- HNO_3 tinh khiết (70%)
- Nước có độ dẫn điện nhỏ hơn $0,2 \mu\text{S/cm}$ pH 5,6-7,0

3.2.4. Cách tiến hành.

- Cân chính xác 0,2500g mẫu cây đã được chuẩn bị theo 10TCN 449-2001 cho vào bình phân huỷ.
- Cho 5ml HNO_3 tinh khiết (70%) vào bình phân huỷ, lắc nhẹ. (Khi cho axit chú ý lõi cuốn mẫu bám ở thành bình xuống đáy)
- Nhiệt độ phân huỷ ban đầu ở 50°C trong 2 giờ (hoặc ngâm mẫu qua đêm ở nhiệt độ trong phòng). Sau đó phân huỷ ở nhiệt độ 80°C trong 30 phút. Tiếp tục phân huỷ ở nhiệt độ 125°C trong 260 phút (kể cả thời gian làm tăng nhiệt độ). Trong suốt quá trình phân huỷ cần chú ý theo dõi nhiệt độ, để phòng phản ứng quá mạnh sủi bọt, trào mẫu ra ngoài. Tuyệt đối không được để nhiệt độ lên trên 130°C sẽ làm sai kết quả phân tích một số nguyên tố như lưu huỳnh...
- Để nguội mẫu đã phân huỷ, chuyển sang bình định mức 50ml bằng dung dịch HNO_3 1% hoặc HCl 1% đến vạch định mức. (Ghi chú 2)

Ghi chú 2:

Ngoài phương pháp phân huỷ ướt bằng HNO_3 còn có thể sử dụng các phương pháp:

a) Sử dụng hỗn hợp hai axit HNO_3 70% + HClO_4 70% tỉ lệ thể tích 2:1 phân huỷ mẫu xác định P, K, S, Ca, Mg, Fe...

Tiến hành theo thủ tục sau:

- Cân chính xác 0,2500g mẫu cho vào bình phân huỷ.
- Thêm 5ml hỗn hợp 2 axit
- Phân huỷ ban đầu ở nhiệt độ 50°C trong 2 giờ, hoặc ngâm mẫu qua đêm ở nhiệt độ trong phòng.
- Tiếp tục phân huỷ ở nhiệt độ 150°C trong 1 giờ, sinh ra khí nitơ oxit màu nâu.
- Tăng nhiệt độ phân huỷ lên 200°C , duy trì nhiệt độ này trong 2 giờ. Tại nhiệt độ này sẽ có khói trắng do sự phân huỷ axit pecloric. Mẫu chuyển thành trắng hoặc màu vàng rơm là kết thúc.
- Để nguội mẫu, cho thêm 1ml HCl đặc, tiếp tục phân huỷ ở 200°C trong 30 phút.
- Để nguội bình phân huỷ và chuyển qua bình định mức 50ml, bằng dung dịch HCl 1% đến vạch định mức.

b) Sử dụng H_2SO_4 và H_2O_2 phân huỷ một mẫu đồng thời xác định N, P, K

- Cân chính xác 0,2500g mẫu cho vào ống phân huỷ
- Thêm 5ml H_2SO_4 đặc tinh khiết ($d = 1,84$)
- Thêm 1ml H_2O_2 30%
- Để mẫu qua đêm, sau đó phân huỷ ở nhiệt độ 225°C cho đến khi axit còn lại chỉ khoảng 2ml.
- Lấy bình ra để nguội, sau đó cho 4 giọt H_2O_2 30%, lắc nhẹ và tiếp tục đun trên bếp khoảng 4-5 phút
- Lấy bình ra để nguội, tiếp tục xử lý lặp lại H_2O_2 như trên cho đến khi mẫu chuyển sang màu vàng rơm (có thể đến 10-15 lần xử lý H_2O_2).
- Để nguội mẫu và chuyển qua bình định mức 100ml, thêm nước đến vạch
- Dung dịch thu được để xác định hàm lượng N, P, K. (Lưu ý mẫu có hàm lượng N cao dễ mắc sai số lớn).

PHÂN TÍCH CÂY TRỒNG

Phương pháp xác định nitơ tổng số

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định ni tơ tổng số cho tất cả các loại cây trồng.

2. Nguyên tắc

Sử dụng H_2SO_4 đặc, axit salisilic, natri thiosunfat, hỗn hợp xúc tác ($\text{K}_2\text{SO}_4 + \text{Se}$) chuyển toàn bộ các dạng nitơ trong mẫu thành dạng amoni (NH_4^+), sau đó cất amoni nhờ dung dịch kiềm, thu khí NH_3 bằng dung dịch axit boric, chuẩn độ amoni tetraborat bằng dung dịch axit tiêu chuẩn, từ đó suy ra hàm lượng nitơ trong mẫu (Dựa theo nguyên tắc của phương pháp Kjeldhal cải tiến).

3. Thiết bị và thuốc thử

3.1. Thiết bị

3.1.1. Bình phân huỷ và bếp phân huỷ mẫu.

3.1.2. Bộ cất amoni Kjeldhal dung tích 250ml

3.1.3. Bình tam giác dung tích 250ml

3.1.4. Buret 25-50ml độ chính xác đến 0,1ml

3.1.5. Cân phân tích độ chính xác 0,0002g

3.2. Thuốc thử

3.2.1. Axit sunfuric đậm đặc tinh khiết ($d=1,84$, không NH_4^+)

3.2.2. Hỗn hợp xúc tác: Nghiền nhỏ từng loại 100g K_2SO_4 và 1g Se, trộn đều, nghiền lại một lần nữa hỗn hợp, đựng hỗn hợp trong lọ khô.

3.2.3. Dung dịch NaOH 10M

Hoà tan 420g NaOH bằng nước thành 1 lít dung dịch. Để yên dung dịch hai ba ngày cho lắng hết cặn cacbonat. Bảo quản trong bình chống xâm nhập CO_2 từ không khí.

Ban hành kèm theo quyết định số: 48-2001/QĐ-BNN-KHCN ngày 26 tháng 4 năm 2001 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

3.2.4. Dung dịch chỉ thị màu hỗn hợp bromocresol xanh - metyl đỏ

Hoà tan 0,099g bromocresol xanh lục và 0,066g metyl đỏ trong 100ml etanol 95%.

3.2.5. Hỗn hợp axit sunfuric-axit salisilic: Hoà tan 50g axit salisilic trong 1000 ml H_2SO_4 đậm đặc, tinh khiết.

3.2.6. Natri thiosunfat, tinh khiết.

3.2.7. Dung dịch axit boric 4% có chỉ thị màu hỗn hợp.

Hoà tan 40g axit boric tinh khiết vào 900ml nước nóng. Để nguội, thêm 20ml dung dịch chỉ thị màu hỗn hợp. Trộn đều, sau đó nhỏ từng giọt dung dịch NaOH 0,1M cho đến khi toàn bộ dung dịch có màu đỏ tía nhạt (pH khoảng 5,0). Thêm nước cho đến đủ 1 lít, lắc trộn đều. Hỗn hợp này có nồng độ axit boric 4% được chuẩn bị trước khi sử dụng.

3.2.8. Dung dịch axit tiêu chuẩn H_2SO_4 hoặc HCl 0,05N

3.2.9. Nước không có N, độ dẫn điện nhỏ hơn $2 \mu S/cm$ pH 5,6-7,0.

4. Cách tiến hành

4.1. Phân huỷ mẫu

4.1.1. Cân chính xác 0,2000g-0,2500g mẫu thực vật đã được chuẩn bị theo 10TCN 449-2001 cho mẫu xuống đáy bình phân huỷ. Chú ý không để mẫu bám vào thành bình. Đồng thời tiến hành mẫu trắng.

4.1.2. Làm ẩm mẫu bằng ít giọt nước, khoảng 30 phút rồi thêm vào 10ml hỗn hợp axit sunfuric- axit salisilic.

4.1.3. Sau 30 phút cho thêm 5g natri thiosunfat tinh khiết, lắc đều.

4.1.4. Sau 15 phút cho thêm 1g hỗn hợp xúc tác.

4.1.5. Phân huỷ mẫu trên bếp cho đến khi còn lại khoảng 2ml dung dịch và hết màu đen cacbon. Tuyệt đối không được để cạn dung dịch phân huỷ. Nếu khi còn lại 2ml dung dịch phân huỷ mà mẫu chưa hết màu đen cần bổ sung H_2SO_4 , tiếp tục phân huỷ cho đến khi hoàn toàn không còn sản phẩm của cacbon. (*)

4.1.6. Để nguội bình phân huỷ, cho khoảng 50ml nước cất - mỗi lần khoảng 10ml - vừa cho nước vừa lắc chuyển toàn bộ dung dịch và cạn qua bình cất Kjeldhal, tráng bình bằng 40- 50ml nước và dồn tất cả vào bình cất để cất amoni (Hoặc lên định mức 100ml để trích dịch cất amoni **)

4.2. Cất amoni

4.2.1. Sử dụng bộ cất Kjeldhal. Kiểm tra thiết bị trước khi sử dụng, yêu cầu thiết bị kín và sạch.

4.2.2. Đặt bình hứng - bình tam giác có chứa 20ml dung dịch axit boric 4% + chỉ thị màu dưới đuôi ống sinh hàn của bộ cất - nhúng sâu vào dung dịch axit boric khoảng 2mm.

(Trường hợp có máy làm lạnh bộ sinh hàn thì không cần nhúng đuôi sinh hàn vào dung dịch axit boric).

- 4.2.3 Cho dung dịch đã phân huỷ vào bình cất. Cho toàn bộ hoặc trích một phần tùy theo lượng NH_4^+ có trong mẫu, yêu cầu ít nhất có 2,8mg N- NH_4 trong mẫu cất.
- 4.2.4. Cho hoạt động hệ thống sinh hàn.
- 4.2.5. Cho 25ml NaOH 10M qua phễu vào bình cất, giữ lại 1ml trên phễu sau đó dùng nước tráng phễu, cho nước tráng vào bình cất và giữ lại trên phễu 1ml, khoá phễu và cho nước đầy phễu.
- 4.2.6. Cho hoạt động hệ thống đun bình cất để cất NH_4^+ , điều chỉnh sinh hàn sao cho nước ngưng sau sinh hàn có nhiệt độ khoảng 35°C.
- 4.2.7. Kết thúc cất amon khi bình hứng có khoảng 150ml và hết amoni trong dịch ngưng cuối ống sinh hàn, thử hết Amoni bằng thuốc thử Nessler.
- 4.2.8. Rửa đuôi sinh hàn bằng một ít nước và đổ vào bình hứng. Lấy bình hứng ra ngoài, để nguội.
- 4.2.9. Chuẩn độ dung dịch hứng bằng dung dịch axit tiêu chuẩn H_2SO_4 hoặc HCl 0,05N cho đến khi dung dịch chuyển màu đỏ tía nhạt.

5. Cách tính kết quả

Công thức tính hàm lượng N trong mẫu khô tuyệt đối như sau:

$$\%N = \frac{(a - b) \cdot N_{tc} \cdot 14 \cdot 100 \cdot k}{1000 \cdot m}$$

Trong đó:

- a: Thể tích dung dịch axit tiêu chuẩn tiêu tốn khi chuẩn độ mẫu (ml);
- b: Thể tích dung dịch tiêu chuẩn axit tiêu tốn khi chuẩn độ mẫu trắng(ml);
- N_{tc} : Nồng độ axit tiêu chuẩn sử dụng chuẩn độ;
- 14: Đương lượng gam của nitơ;
- m: Khối lượng mẫu tương ứng với thể tích dung dịch trích (g);
- k: Hệ số chuyển đổi khô kiệt.

Ghi chú:

(*) Quá trình phân huỷ mẫu phải đảm bảo không bị mất mẫu-bắn té ra ngoài, nhất thiết không được để thiếu H_2SO_4 . Với 1g hỗn hợp xúc tác $\text{K}_2\text{SO}_4 + \text{Se}$ nhất thiết phải còn dư 1,5ml H_2SO_4 nếu không nhiệt độ phân huỷ sẽ lên cao và làm mất nitơ.

(**) Để đảm bảo độ chính xác, tốt nhất là cất toàn bộ lượng mẫu đã phân huỷ. Tuy nhiên nếu hàm lượng nitơ cao có thể định mức thể tích dung dịch mẫu, sau đó trích một phần thể tích xác định để cất. Trong trường hợp này cần bảo đảm mỗi mẫu cất tối thiểu có 2,8mgN- NH_4^+ và sử

dùng dung dịch tiêu chuẩn axit 0,02N để chuẩn độ - tiêu tốn khoảng 10ml sẽ hạn chế được sai số.

(***) Trường hợp hàm lượng NO_3^- và NO_2^- không đáng kể so với N tổng số có thể tiến hành phân huỷ mẫu theo các phương pháp sau:

1. Phương pháp sử dụng H_2SO_4 đặc có hỗn hợp $\text{K}_2\text{SO}_4 + \text{Se}$ (tỷ lệ khối lượng 100:1) làm xúc tác.

- Cân chính xác 0,2000-0,2500g mẫu cho vào bình phân huỷ.
- Thêm 1g xúc tác và 5ml H_2SO_4 đặc.
- Lắc nhẹ và để qua đêm, sau đó đun ở nhiệt độ 250°C khoảng 20 phút, rồi nâng nhiệt độ lên 360°C cho tới khi hết màu đen.
- Để nguội bình phân huỷ, tiếp tục như 4.1.6

2. Phương pháp sử dụng H_2SO_4 và H_2O_2 .

- Phương pháp phân huỷ mẫu theo 10TCN 450- 2001
- Dung dịch thu được sau phân huỷ có thể sử dụng để xác định N,P,K tổng số.

PHÂN TÍCH CÂY TRỒNG

Phương pháp xác định hàm lượng nitrat và nitrit

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định hàm lượng nitrat và nitrit tổng số cho các mẫu cây trồng tươi.

2. Nguyên tắc.

Sử dụng lò vi sóng hoà tan nhanh (chiết) nitrat và nitrit (NO_3^- NO_2^-) trong mẫu tươi bằng nước, đun vi sóng ở mức năng lượng cao.

Xác định hàm lượng nitrat bằng phương pháp trắc quang, dựa trên phản ứng của nitrat với axit disunfophenol tạo thành nitrofenoldisunfonic trong môi trường kiềm có màu vàng đặc trưng, đo tại bước sóng 410nm.

Xác định hàm lượng nitrit bằng phương pháp trắc quang, dựa trên phản ứng của nitrit với axit sunfanilic và α naphtylamin trong môi trường axit có màu hồng, đo tại bước sóng 540nm.

3. Thiết bị và thuốc thử

3.1. Thiết bị.

3.1.1. Máy quang phổ kế (Spectrophotometer).

3.1.2. Máy nghiền mẫu thực vật tươi.

3.1.3. Cân phân tích độ chính xác 0,0002g.

3.1.4. Lò vi sóng (Công suất 850w, tần số hoạt động 2450MHz).

3.1.5. Nồi cách thuỷ.

3.1.5. Các loại cốc, bình định mức 50ml, 100ml, 250ml, 1000ml.

3.2. Thuốc thử.

3.2.1. Dung dịch axit phenoldisunfonic (*) .

(*) Có thể tự chế tạo dung dịch axit phenoldisunfonic bằng cách: Hoà tan 25g phenol tinh khiết vào 150ml H_2SO_4 đặc ($d=1,84$), thêm 75ml axit H_2SO_4 bốc khói. Đun nóng 2 giờ trong nước sôi, bảo quản trong lọ mẫu tối. Cũng có thể hoà tan 30g phenol tinh khiết vào 200ml H_2SO_4

Ban hành kèm theo quyết định số: 48-2001/QĐ-BNN-KHCN ngày 26 tháng 4 năm 2001 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

đặc ($d = 1,84$), lắc đều. Sau đó nối bình với ống sinh hàn hồi lưu và đun trong 6 giờ, bảo quản trong lọ mẫu tối.

3.2.2. Dung dịch thuốc thử Griss (**).

(**) Thuốc thử Griss kiểu cũ-1: Pha dung dịch axit Sunfanilic: hoà tan 0,5g axit sunfanilic trong 150ml axit acetic 10%. Pha dung dịch α naphthylamin: hoà tan 0,1g α naphthylamin vào 20ml nước cất, khuấy đều, đun sôi dung dịch thu được, để lắng trong, lọc lấy phần trong và thêm vào phần trong 150ml axit acetic 10% lắc đều, bảo quản trong lọ mẫu tối.

Hoặc kiểu cũ -2: Hoà tan 150ml axit acetic 99% với 350ml nước, tiếp đó hoà tan thêm 0,10g Naphthylamin và sau đó 0,30g axit Sunfanilic, khuấy tan và trộn đều.

(**) Thuốc thử Griss cải tiến: Gồm 2 dung dịch Sunfanylamit và $N(1\text{-naphthyl})$ etylen diamine dihydrochlorua (NED)

1/ Sunfanylamit: Cân 5g Sunfanylamit hoà tan trong bình định mức 500ml có chứa 50ml HCl đặc và 300ml nước cất. Pha loãng đến 500ml bằng nước cất, lắc kỹ. Dung dịch ổn định trong nhiều tháng.

2/ $N(1\text{-naphthyl})$ etylen diamine dihydrochlorua(NED): Cân 0,5g NED hoà tan trong 500ml nước cất, bảo quản trong bình tối mẫu. Dung dịch không bền, thay thế hàng tháng hoặc khi chuyển sang mẫu nâu.

3.2.3. Dung dịch tiêu chuẩn nitrat 10ppm

Cân chính xác 0,1631g KNO_3 khô tinh khiết, hoà tan bằng nước và thêm nước đến 1000 ml trong bình định mức. Trộn đều dung dịch, thu được dung dịch tiêu chuẩn có nồng độ 100mg/lít (100ppm), hoà loãng tiếp 10 lần có dung dịch tiêu chuẩn nitrat 10ppm.

3.2.4. Dung dịch tiêu chuẩn nitrit 5ppm

Cân chính xác 0,375g NaNO_2 tinh khiết và khô, hoà tan bằng nước thành 1 lít dung dịch, thu được dung dịch tiêu chuẩn 250ppm NO_2^- . Pha loãng 50 lần để có dung dịch tiêu chuẩn 5 ppm NO_2^- .

3.2.5. Dung dịch $\text{NH}_4\text{OH}(1:1)$. Hoặc NaOH 10%

3.2.6. Nước không có NO_3^- và NO_2^- , độ dẫn điện nhỏ hơn $2\mu\text{S/cm}$ pH 5,6 -7,0

4. Phương pháp chiết nitrat và nitrit bằng lò vi sóng(***)

Chiết NO_3^- và NO_2^- bằng lò vi sóng có thể loại trừ được hầu hết các ảnh hưởng xấu tới kết quả phân tích nitrat và nitrit. Cách làm như sau:

- 4.1. Thái nhỏ trộn đều mẫu, cân 10g mẫu cho vào cốc 250ml, thêm nước cất đến khoảng 200ml.
- 4.2. Cho cốc vào lò vi sóng và tiến hành đun vi sóng ở mức năng lượng cao 100% trong thời gian 7 phút (Cũng có thể đun ở mức năng lượng 70% với thời gian 12 phút).
- 4.3. Lấy ra để nguội, lọc bỏ bã và định mức dịch lọc bằng nước cất đến 200ml. Lấy 10ml để xác định NO_3^- và 10ml để xác định NO_2^- .

(***) Tham khảo tài liệu "Nghiên cứu xác định hàm lượng NO_3 , NO_2 " của Phạm Huy Đồng, Trần Tử Hiếu, Ngô Huy Du-2000.

5. Phương xác định nitrat:

5.1. Xây dựng đường chuẩn NO_3 . Dãy tiêu chuẩn 0-1ppm NO_3

5.1.1 Chuẩn bị một dãy cốc 250ml, thêm vào mỗi cốc một lượng dung dịch nitrat tiêu chuẩn nồng độ 10mg/l theo thứ tự lần lượt 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 ml.

5.1.2 Đun cách thủy cho bay hơi đến khô cạn không cháy, để nguội(***)

(****) Có thể cô cạn bằng lò vi sóng ở mức năng lượng thấp 30%, thời gian mất khoảng 7-10 phút.

5.1.3 Thêm vào mỗi cốc 1ml dung dịch axit phenoldisunfonic và lắc mạnh để cho phản ứng xảy ra nhanh chóng.

5.1.4 Để yên trong 10 phút, sau đó thêm mỗi cốc khoảng 20ml nước.

5.1.5 Cẩn thận thêm vào mỗi cốc 8ml dung dịch NH_4OH (1:1) để cho pH nằm trong khoảng 10-11. (****)

(*****) Có thể trung hoà dung dịch bằng cách nhỏ từng giọt dung dịch NaOH 10% (thử bằng giấy quỳ tím). Dung dịch sẽ chuyển màu vàng (dư một ít NaOH không ảnh hưởng đến màu của dung dịch).

5.1.6 Chuyển dung dịch trong cốc vào bình định mức 50ml và định mức đến vạch, lắc kỹ.

5.1.7 Đo độ hấp thụ quang của dung dịch ở bước sóng 410nm. Sau đó biểu diễn lên đồ thị ta được đường chuẩn có NO_3 có nồng độ từ 0-1ppm NO_3

5.2. Đo mẫu:

5.2.1 Chuẩn bị cốc 250ml, lấy vào mỗi cốc 10ml dung dịch mẫu đã chiết bằng lò vi sóng (4.3.)

5.2.2 Tiếp tục các bước 5.1.2 ... 5.1.6 như với dãy tiêu chuẩn

5.2.3 Đo độ hấp thụ quang của dung dịch mẫu ở bước sóng 410nm.

5.2.4 Đồng thời tiến hành mẫu trắng với 10ml nước, như với dung dịch mẫu.

5.2.5 Đo dung dịch mẫu đồng nhất điều kiện với đo dung dịch tiêu chuẩn.

5.2.6 Căn cứ vào đồ thị tiêu chuẩn và số đo mẫu trên máy xác định nồng độ ppm NO_3 trong dung dịch đo, từ đó suy ra hàm lượng NO_3 trong mẫu

5.3. Công thức tính toán:

$$\text{mg NO}_3^- / \text{kg mẫu tươi} = \frac{a \cdot V \cdot 1000}{v' \cdot m}$$

Trong đó:

a : Hàm lượng NO_3^- trong thể tích trích (mg);

V : Thể tích dung dịch mẫu sau khi chiết (ml);
 v' : Thể tích dung dịch trích ra để xác định (ml);
 m : Khối lượng mẫu tươi (g).

6. Phương xác định nitrit:

6.1. Xây dựng đường chuẩn NO_2^- . Dãy tiêu chuẩn 0 - 0,5ppm NO_2^- sử dụng thuốc thử Griss kiểu cũ.

6.2. Chuẩn bị một dãy bình định mức 50ml, lần lượt thêm vào mỗi bình một lượng dung dịch nitrit tiêu chuẩn nồng độ 5ppm theo thứ tự ...0,0 ; 0,5 ; 1,0; 2,0 ; 3,0 ; 4,0 ; 5,0 ml.

6.1.1 Thêm vào mỗi bình 1ml thuốc thử Sunfanilic và 1ml thuốc thử α naphtylamin.

6.1.2 Lên định mức bằng nước đến vạch và lắc kỹ.

6.1.3 Sau 20 phút đo độ hấp thụ quang của dung dịch ở bước sóng 520nm. Sau đó biểu diễn lên đồ thị ta được đường chuẩn có nồng độ NO_2^- trong dung dịch từ 0 - 0,5ppm NO_2^- .

(Có thể dùng thuốc thử Griss cải tiến: Mục 6.1.2 thay bằng thêm vào mỗi bình 1ml thuốc thử Sunfanylamit và 1ml thuốc thử N(1-naphtyl) etylen diamine dihydrochlorua (NED).

6.2 Đo mẫu:

6.2.1 Chuẩn bị một dãy bình định mức 50ml, lần lượt thêm vào mỗi bình 10ml dung dịch mẫu

6.2.2 Thêm vào mỗi bình 1ml thuốc thử Sunfanilic và 1ml thuốc thử α naphtylamin.

6.2.3 Lên định mức bằng nước cất đến vạch và lắc kỹ.

6.2.4 Sau 20 phút đo độ hấp thụ quang của dung dịch ở bước sóng 520nm.

6.2.5 Đồng thời tiến hành mẫu trắng với 10ml nước, tiến hành như với dung dịch mẫu.

6.2.6 Đo dung dịch mẫu đồng nhất điều kiện với đo dung dịch tiêu chuẩn.

6.2.7 Căn cứ vào đồ thị tiêu chuẩn và số đo mẫu trên máy xác định nồng độ ppm NO_2^- trong dung dịch đo, từ đó suy ra hàm lượng NO_2^- trong mẫu

(Có thể dùng thuốc thử Griss cải tiến: Mục 6.2.2 thay bằng thêm vào mỗi bình 1ml thuốc thử Sunfanylamit và 1ml thuốc thử N(1-naphtyl) etylen diamine dihydrochlorua (NED)

6.3 Công thức tính toán:

$$\text{mg NO}_3^- / \text{kg mẫu tươi} = \frac{a \cdot V \cdot 1000}{v' \cdot m}$$

Trong đó:

a : Hàm lượng NO_3^- trong thể tích trích (mg);

V: Thể tích dung dịch mẫu sau khi chiết (ml);

v': Thể tích dung dịch trích ra để xác định (ml);

m: Khối lượng mẫu tươi (g).

PHÂN TÍCH CÂY TRỒNG

Phương pháp xác định photpho tổng số

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định photpho tổng số áp dụng cho tất cả các loại mẫu cây trồng.

2. Nguyên tắc

Chuyển toàn bộ các hợp chất photpho của mẫu cây trồng thành photpho dưới dạng orthophotphat, xác định hàm lượng photpho trong dung dịch mẫu theo phương pháp trắc quang, phức chất màu vàng tạo thành giữa orthophotphat và vanadomolypdat.

Phương pháp này thích hợp cho các dung dịch mẫu có nồng độ photphat cao.

3. Thiết bị và thuốc thử

3.1. Thiết bị.

3.1.1. Thiết bị phân huỷ mẫu (theo 10TCN 450-2001).

3.1.2. Máy quang phổ (Spectrophotometer).

3.1.3. pH met.

3.1.4. Bình định mức 50ml.

3.2. Thuốc thử.

3.2.1. Dung dịch vanadomolypdat.

Hoà tan 25g amonimolypdat $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ bằng nước nóng 60°C , lên thể tích 500ml.

Hoà tan 1,25g amonivanadat (NH_4VO_3) trong 500ml dung dịch axit nitric 1N.

Trộn 2 dung dịch trên với thể tích bằng nhau trước khi sử dụng.

3.2.2. Dung dịch axit nitric 2N.

3.2.3. Dung dịch photpho tiêu chuẩn 25ppmP.

Hoà tan 0,4400g Kali dihydro photphat (KH_2PO_4) trong nước và lên thể tích 1000ml trong bình định mức, dung dịch này có nồng độ 100ppm P, pha loãng 4 lần có nồng độ 25ppmP sử dụng để lập dãy tiêu chuẩn.

Ban hành kèm theo quyết định số: 48 - 2001/QĐ-BNN-KHCN ngày 26 tháng 4 năm 2001 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

3.2.4. Nước cất không photpho, độ dẫn điện nhỏ hơn $2\mu\text{S/cm}$, pH 5,6 -7,0

4. Cách tiến hành

4.1. Chuẩn bị dãy tiêu chuẩn

4.1.1. Sử dụng bình định mức 50ml, cho vào các bình theo thứ tự số ml dung dịch tiêu chuẩn 25ppm P theo bảng sau:

Tiêu chuẩn P (ppm) (0-15 ppmP)	Số ml dung dịch tiêu chuẩn 25ppm P cho vào bình định mức 50ml
0	0
2,5	5
5,0	10
7,5	15
10,0	20
12,5	25
15,0	30

4.1.2. Thêm 10ml dung dịch HNO_3 2N vào mỗi bình, và thêm nước cất đến 40ml.

4.1.3. Thêm 5ml dung dịch vanadomolyphat và thêm nước cất đến vạch định mức 50ml, lắc trộn đều.

4.1.4. Để yên 20 phút

4.1.6. Đo trên máy quang phổ kế tại bước sóng 420nm

4.1.7. Lập đồ thị dãy tiêu chuẩn (hoặc phương trình) biểu diễn tương quan giữa số đo trên máy và nồng độ dung dịch tiêu chuẩn.

4.2. Đo mẫu

4.2.1. Dùng pipet lấy 5ml dung dịch xác định photpho đã được chuẩn bị theo 10TCN 450-2001 cho vào bình định mức 50ml.

4.2.2. Thêm 10ml dung dịch HNO_3 2N và thêm nước cất đến 40ml.

4.2.3. Thêm 5ml dung dịch vanadomolyphat và thêm nước cất đến vạch định mức 50ml, lắc trộn đều.

4.2.4. Để yên 20 phút

4.2.5. Đo trên máy quang phổ kế tại bước sóng 420nm.

4.2.6. Căn cứ vào đồ thị tiêu chuẩn và số đo mẫu trên máy xác định nồng độ ppmP trong dung dịch mẫu, từ đó suy ra khối lượng mgP của thể tích dung dịch trích.

5. Cách tính kết quả

Công thức tính hàm lượng P trong mẫu khô tuyệt đối như sau:

$$\text{ppmP (trong cây)} = \frac{a \cdot V \cdot 10^3 \cdot k}{v' \cdot m}$$

$$\%P \text{ (trong cây)} = \frac{\text{ppm}P(\text{trong cây})}{10^4} = \frac{a \cdot V \cdot k}{v' \cdot m \cdot 10}$$

Trong đó:

m: Khối lượng mẫu phân huỷ(gam);

V: Toàn bộ thể tích dung dịch mẫu (ml);

v': Thể tích dung dịch trích (ml);

a: Khối lượng P tìm thấy trong thể tích dung dịch trích (mg);

k: Hệ số quy về khô kiệt.

Ghi chú:

* Phương pháp vanadomolypdat có độ nhạy thấp, thích hợp cho những mẫu có hàm lượng P cao - dung dịch đo có nồng độ lớn hơn 5ppmP.

*** Nhiệt độ và nồng độ axit của dung dịch đo ảnh hưởng đến khả năng tạo màu. Do đó cần lưu ý:

- Nhiệt độ khi đo dung dịch dãy tiêu chuẩn và các dung dịch mẫu không được chênh lệch nhau quá 10°C
- Theo thủ tục này nồng độ HNO₃ trong dung dịch đo là 0,4M. Nếu khi công phá mẫu còn dư axit (đặc biệt khi sử dụng H₂SO₄) nhất thiết phải trung hoà dung dịch mẫu bằng NH₄OH (sử dụng chỉ thị màu 2,4 dinitrophenol hoặc giấy congô đỏ). Có thể thay thế HNO₃ 2N bằng HClO₄ 2N nhưng cần tiến hành đồng nhất cùng một loại axit trong dãy thiêu chuẩn và trong các dung dịch mẫu.

*** Những mẫu có hàm lượng P thấp có thể sử dụng phương pháp tạo mẫu xanh Molypden do phản ứng của Photphat với Molypdat tạo thành phức đa dị vòng có màu xanh khi bị khử.

GIỚI THIỆU PHƯƠNG PHÁP TẠO MẪU XANH MOLYPDEN:

1. Thuốc thử: Hỗn hợp khử và tạo mẫu:

- + Dung dịch amonmolypdat 1,25% trong H₂SO₄ 5 N (dung dịch 1)
- Hoà tan 12,5g amonmolypdat (NH₄)₆ Mo₇ O₂₄ . 4H₂O trong 200ml nước cất đã đun nóng đến 60°C. Để nguội và lọc nếu đục (ddịch a).
- Hoà tan từ từ 140ml H₂SO₄ đặc (d=1,84) vào 500ml nước. để nguội (dung dịch b).
- Rót từ từ dung dịch b vào dung dịch a rồi thêm nước cất cho đủ 1 lít, lắc trộn đều đựng trong lọ mẫu nâu. - Được dung dịch 1 .
- + Dung dịch kali antimoamtatrat 0,06% W/v trong nước (dung dịch 2)
- + Dung dịch axit ascorbic 2% W/V trong nước (d.dịch 3) pha dùng trong ngày.
- + Hỗn hợp 3 dung dịch 1, 2, 3 theo tỷ lệ 2:1:1 (V/V) - Được hỗn hợp khử và tạo mẫu.

2. Chuẩn bị dãy tiêu chuẩn:

- Sử dụng các bình định mức 50ml, lần lượt cho vào các bình theo thứ tự số ml dung dịch tiêu chuẩn 10ppm P theo bảng sau.

Số TT	Nồng độ dãy tiêu chuẩn lân (ppmP)	Số ml dung dịch tiêu chuẩn 10ppm P/ mỗi bình
1	0,00	0,00
2	0,10	0,50
3	0,20	1,00
4	0,40	2,00
5	0,60	3,00
6	0,80	4,00
7	1,00	5,00

- Thêm khoảng 30ml nước cho mỗi bình.
- Thêm 8ml hỗn hợp khử tạo màu - (Hỗn hợp 3 dung dịch 1, 2, 3 theo tỷ lệ 2:1:1) và thêm nước tới vạch. Lắc trộn đều dung dịch.
- Sau khi cho hỗn hợp khử tạo màu 20 phút, tiến hành đo màu trên máy quang phổ kế tại bước sóng 882nm (ở 20°C mẫu bền 24 giờ)
- Lập đồ thị dãy tiêu chuẩn (hoặc phương trình) biểu diễn tương quan giữa số đo trên máy và nồng độ dung dịch tiêu chuẩn.

3. Đo mẫu:

- Lấy chính xác 2ml các dung dịch mẫu cần xác định cho vào bình định mức 50ml.
- Thêm khoảng 30 ml nước và 2 giọt chỉ thị α dinitrophenol.
- Trung hoà axit dư bằng từng giọt NH_4OH 10% cho đến khi dung dịch chuyển màu vàng, sau đó axit hoá bằng vài giọt H_2SO_4 10% cho hết màu vàng.
- Thêm 8ml hỗn hợp khử tạo màu - (Hỗn hợp 3 dung dịch 1, 2, 3 theo tỷ lệ 2:1:1) và thêm nước tới vạch. Lắc trộn đều dung dịch.
- Sau khi cho hỗn hợp khử tạo màu 20 phút, tiến hành đo màu trên máy quang phổ kế tại bước sóng 882nm (ở 20°C mẫu bền 24 giờ)

4. Tính toán kết quả:

Lập đồ thị tương quan giữa số đo trên máy với nồng độ ppmP trong các bình thang chuẩn. Dựa vào đồ thị (hoặc phương trình) và số đo trên máy của các dung dịch mẫu suy ra nồng độ ppmP trong dung dịch mẫu, hàm lượng P trong mẫu.

PHÂN TÍCH CÂY TRỒNG

Phương pháp xác định kali tổng số và natri tổng số

1. Phạm vi áp dụng.

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định kali tổng số, natri tổng số bằng phương pháp quang kế ngọn lửa, áp dụng cho tất cả các mẫu cây trồng.

2. Nguyên tắc.

Hoà tan các dạng kali và natri của cây theo 10TCN 450-2001. Xác định hàm lượng K, Na trong dung dịch bằng quang kế ngọn lửa.

3. Thiết bị và thuốc thử

3.1. Thiết bị.

3.1.1. Thiết bị phân huỷ mẫu theo 10TCN 450-2001.

3.1.2. Quang kế ngọn lửa.

3.1.3. Bình định mức 500ml, 1000ml.

3.1.4. Cân phân tích có độ chính xác 0,0002g.

3.2. Thuốc thử.

3.2.1. Dung dịch kali tiêu chuẩn 1000ppm K.

Cân 1,9067g KCl tinh khiết đã sấy khô ở 110°C. Hoà tan bằng nước định mức đến 1000ml, dung dịch này có nồng độ 1000ppm K, pha loãng 10 lần được dung dịch 100ppmK dùng để chuẩn bị các dãy tiêu chuẩn xác định K.

3.2.2. Dung dịch tiêu chuẩn natri 1000ppm Na.

Cân 1,8482g NaNO₃ tinh khiết đã sấy khô ở 110°C. Hoà tan bằng nước định mức đến 1000ml, dung dịch này có nồng độ 1000ppm Na, pha loãng 10 lần được dung dịch 100ppmNa dùng để chuẩn bị các dãy tiêu chuẩn xác định Na.

3.2.3. Nước cất có độ dẫn điện nhỏ hơn 2μS/cm, pH 5,6-7,0.

4. Cách tiến hành

4.1. Chuẩn bị dãy tiêu chuẩn

4.1.1. Dãy tiêu chuẩn K: Sử dụng bình định mức 50ml cho vào các bình theo thứ tự số ml dung dịch tiêu chuẩn 100ppmK và thêm nước cho đến vạch định mức theo bảng sau:

Ban hành kèm theo quyết định số 48-2001/QĐ-BNN-KHCN ngày 26 tháng 4 năm 2001 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

Nồng độ của dung dịch K tiêu chuẩn (0-50ppm K)	Số ml dung dịch K tiêu chuẩn 100ppm
0	0
5	2,5
10	5,0
20	10,0
30	15,0
40	20,0
50	25,0

4.1.2. Dây tiêu chuẩn Na: Sử dụng bình định mức 50ml cho vào các bình theo thứ tự số ml dung dịch tiêu chuẩn 100ppm Na và thêm nước cho đến vạch định mức theo bảng sau:

Nồng độ của dung dịch Na tiêu chuẩn (0-40ppm Na)	Số ml dung dịch Na tiêu chuẩn 100ppm
0	0
5	2,5
10	5,0
20	10,0
30	15,0
40	20,0

4.2. Chuẩn bị mẫu: theo 10TCN 449-2001.

4.3. Đo dung dịch tiêu chuẩn và dung dịch mẫu.

4.3.1 Đo các dung dịch tiêu chuẩn trên quang kế ngọn lửa với K tại bước sóng 768nm, với Na tại bước sóng 589nm (hoặc kính lọc tương ứng). Lập đồ thị tiêu chuẩn biểu thị tương quan của nồng độ K (hoặc Na) trong các dung dịch tiêu chuẩn với số đo tương ứng trên máy.

4.3.2. Đo dung dịch mẫu trên quang kế ngọn lửa đồng nhất với điều kiện đo dây tiêu chuẩn. Thường xuyên đo kiểm tra bằng các dung dịch tiêu chuẩn*

4.3.3. Căn cứ vào đồ thị tiêu chuẩn và số đo trên máy xác định nồng độ dung dịch mẫu (ppm).

5. Cách tính kết quả

Công thức tính hàm lượng K (Na) trong mẫu khô tuyệt đối như sau:

$$\%K(Na)^* = \frac{a.V.k}{m.10^4}$$

Trong đó:

m : Khối lượng mẫu phân huỷ (g);

V: Thể tích dung dịch mẫu (ml);

a: Nồng độ nguyên tố trong dung dịch mẫu (ppm);

k: Hệ số chuyển về khô kiệt.

Ghi chú:

* Có thể xác định K,Na bằng AAS ở chế độ phát xạ hoặc chế độ đo hấp thụ sử dụng đèn HCl tương ứng tại bước sóng 766,6 nm với Kali và 589,0nm với Na trên ngọn lửa C_2H_2/KK

** Hiệu chỉnh quang kế ngọn lửa hoạt động ở trạng thái ổn định mới tiến hành đo dãy tiêu chuẩn. Trong quá trình đo mẫu cần thường xuyên kiểm tra bằng các dung dịch tiêu chuẩn và hiệu chỉnh (ít nhất 10 mẫu phải kiểm tra 1 lần). Kỹ thuật sử dụng theo hướng dẫn của hãng sản xuất.

*** Để khắc phục ảnh hưởng của Canxi, cần cho thêm tỷ lệ thể tích 1:1 dung dịch 0,2% Cs + 0,36% Al pha từ CsCl và $Al(NO_3)_3$ vào dung dịch mẫu.

PHÂN TÍCH CÂY TRỒNG

Phương pháp xác định canxi tổng số và magiê tổng số

1. Phạm vi áp dụng.

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định canxi tổng số và magiê tổng số cho tất cả các loại mẫu cây trồng.

2. Nguyên tắc.

Hoà tan các hợp chất Canxi và Magie trong mẫu theo 10TCN 450-2001 và xác định chúng trong dung dịch bằng phương pháp chuẩn độ tạo phức với EDTA tiến hành 2 mẫu song song.

Xác định tổng số Canxi + Magie tại pH bằng 10 với chỉ thị mẫu Eriochrom -đen T.

Xác định Canxi tại pH bằng 13 với chỉ thị màu fluorexon.

3. Thiết bị và thuốc thử

3.1. Thiết bị.

3.1.1. Các thiết bị phân huỷ mẫu theo 10TCN 450-2001.

3.1.2. Buret có độ chính xác 0,05ml.

3.1.3. Pipet.

3.1.4. Bình tam giác 125ml.

3.1.5. pH met.

3.2. Thuốc thử.

3.2.1. Chỉ thị màu fluorexon.

Hỗn hợp 40g K_2SO_4 nghiền nhỏ với 1gam bột fluorexon.

3.2.2. Dung dịch KOH 10%.

Hoà tan 100g tinh khiết, khô vào nước, sau đó thêm nước cho đủ 1000ml.

3.2.3. Dung dịch tiêu chuẩn trilonB 0,020N (muối dinatri của axit etylen diamin tetra axetic).

Cân chính xác 3,722g trilonB ($Na_2H_2(CH_3COO)_4N_2(CH_2)_2 \cdot 2H_2O$) tinh khiết hoà tan vào nước, sau đó thêm nước cho đủ 1000ml trong bình định mức.

Ban hành kèm theo quyết định số 48-2001/QĐ-BNN-KHCN ngày 26 tháng 4 năm 2001 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

- 3.2.4. Dung dịch đệm pH bằng 10: Hoà tan 67,5g NH_4Cl trong 200ml -250ml nước, thêm vào đó 570ml NH_4OH 25%. Kiểm tra độ pH của dung dịch, điều chỉnh đến pH bằng 10, thêm nước cho đủ 1000ml. Dung dịch được kiểm tra lại trước khi sử dụng.
- 3.2.5. Chỉ thị màu eriochrom đen T: Hoà tan 0,2g eriochrom đenT trong 50ml etanol có chứa 2g hydroxyamin clorua. Đựng dung dịch trong lọ màu. (Có thể sử dụng hỗn hợp khô 0,2g eriochrom đen T với 40g bột K_2SO_4 nghiền nhỏ).
- 3.2.6. Dung dịch KCN 1%.
- 3.2.7. Nước có độ dẫn điện nhỏ hơn $2\mu\text{S}/\text{cm}$, pH 5,6-7,0

4. Cách tiến hành

4.1. Chuẩn bị 2 mẫu song song:

4.1.1. Dùng pipet trích một thể tích chính xác dung dịch mẫu có chứa ít nhất 2mg Ca và 1mg Mg cho vào bình tam giác 150ml.

4.1.2. Trung hoà dung dịch mẫu bằng KOH 10% cho đến trung tính (pH=7)

4.1.3. Thêm nước cho đến khoảng 50ml

4.2. Xác định Canxi tổng số trong bình thứ nhất

4.2.1. Cho thêm 2ml KOH 10% (pH = 13)

4.2.2. Cho thêm 50mg hỗn hợp chỉ thị màu Fluorexon K_2SO_4 . Lắc trộn đều.

4.2.3. Chuẩn độ bằng dung dịch tiêu chuẩn TrilonB cho đến khi tắt huỳnh quang lục sang màu hồng trên nền đen...

4.4.4. Tính kết quả:

Công thức tính hàm lượng Ca trong mẫu khô tuyệt đối như sau:

$$\% \text{Ca} = \frac{(a - b) \cdot N \cdot 20 \cdot V \cdot k}{v' \cdot m \cdot 10}$$

Trong đó:

m : Khối lượng mẫu (g);

V: Thể tích dung dịch mẫu sau phân huỷ (ml);

v': Thể tích dung dịch mẫu trích (ml);

a: Thể tích dung dịch tiêu chuẩn Trilon B chuẩn độ mẫu (ml);

b: Thể tích dung dịch tiêu chuẩn TrilonB chuẩn độ mẫu trắng (ml);

N: Nồng độ đương lượng dung dịch tiêu chuẩn TrilonB;

k: Hệ số chuyển về khô kiệt;

20: Đương lượng gam Canxi.

4.2. Xác định tổng Canxi và Magie trong bình thứ 2

4.2.1. Cho thêm 5ml dung dịch đệm pH bằng 10

4.2.2. Thêm 1ml dung dịch KCN và 8 giọt chỉ thị màu Eriochrom đen T

4.2.3. Chuẩn độ bằng dung dịch chuẩn TrilonB cho đến khi dung dịch chuyển từ màu mận chín sang màu xanh biển.

4.5.4. Tính kết quả:

Công thức tính hàm lượng Mg tổng số trong mẫu khô tuyệt đối như sau:

$$\%Mg = \frac{C.N.12,6.V.k}{v \cdot m.10}$$

Trong đó:

C: Thể tích dung dịch chuẩn tương ứng với chuẩn độ Magie (ml)

(là hiệu số của tổng Ca + Mg với thể tích chuẩn độ riêng Ca);

m: Khối lượng mẫu (g);

V: Thể tích dung dịch mẫu sau phân huỷ (ml);

v': Thể tích dung dịch mẫu trích xác định (ml);

N: Nồng độ đương lượng dung dịch tiêu chuẩn TrilonB;

12,6 : Đương lượng gam của Mg;

k : Hệ số chuyển về khô kiệt.

Ghi chú:

* TrilonB nguyên chất và khô có thể pha dung dịch đạt nồng độ chính xác từ lượng cân. Tuy nhiên trong đa số trường hợp cần kiểm tra lại nồng độ TrilonB bằng dung dịch tiêu chuẩn Magiê hoặc Canxi... để xác định nồng độ chính xác trước khi sử dụng.

** Dung dịch KOH và NaOH cần đảm bảo không có Cacbonat, cần sử dụng hoá chất tinh khiết khô, dung dịch cần được bảo quản trong các bình chống xâm nhập CO₂.

*** Trường hợp dung dịch xác định Caxi có nhiều Photphat sẽ ảnh hưởng sai đến sự chuẩn độ Canxi, có thể khắc phục bằng phương pháp chuẩn độ ngược GEDTA (Tham khảo "Sổ tay phân tích đất nước phân bón cây trồng" trang 459).

**** Có thể sử dụng một số chỉ thị mẫu khác để xác định Ca bằng TrilonB:

- Chỉ thị Pattonreeder xác định Ca⁺⁺ tại pH=12, dạng liên kết với Ca⁺⁺ có màu đỏ nâu, dạng tự do có màu xanh biển.
- Chỉ thị Murexit xác định Ca⁺⁺ tại pH=12, dạng kết hợp với Ca⁺⁺ có màu hồng, dạng tự do có màu tím.

***** Có thể xác định Ca⁺⁺ bằng quang kế ngọn lửa tại bước sóng 422,7nm hoặc kính lọc mẫu tương ứng. Cũng có thể xác định Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ bằng AAS sử dụng đèn HCl tương ứng tại bước sóng 422,7nm với Ca⁺⁺, 202,6nm với Mg⁺⁺ trên ngọn lửa C₂H₂/KK. Lưu ý nồng độ Ca trong dung dịch xác định phải >0,5%.

PHÂN TÍCH CÂY TRỒNG

Phương pháp xác định lưu huỳnh tổng số

1. Phạm vi áp dụng.

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định lưu huỳnh tổng số cho tất cả các loại mẫu cây trồng.

2. Nguyên tắc.

Chuyển toàn bộ các dạng hợp chất lưu huỳnh trong mẫu thành SO_4^{-2} , xác định hàm lượng SO_4^{-2} trong dung dịch bằng phương pháp khối lượng (nếu hàm lượng SO_4^{-2} cao) hoặc bằng phương pháp so độ đục (nếu hàm lượng SO_4^{-2} thấp)

3. Phương pháp phân huỷ mẫu.

Các phương pháp phân huỷ ướt sử dụng HNO_3 hay hỗn hợp HNO_3 và HClO_4 trong 10TCN 450-2001 đều có thể sử dụng để phân huỷ mẫu cây xác định lưu huỳnh, song quá trình phân huỷ dễ mất lưu huỳnh dưới dạng $\text{SO}_2\uparrow$ do khống chế nhiệt độ phân huỷ từng giai đoạn khó chặt chẽ theo thủ tục.

Hai thủ tục sau đây thường được sử dụng riêng cho việc phân huỷ mẫu cây để xác định lưu huỳnh.

3.1. Phương pháp phân huỷ sử dụng $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ có thiết bị hồi lưu:

- Cân chính xác 1,0000 g mẫu đã được chuẩn bị theo 10TCN 449-2001 cho vào đáy bình phân huỷ cổ dài.
- Cho 15ml HNO_3 đặc, tinh khiết vào bình.
- Lắp bộ sinh hàn hồi lưu vào cổ bình.
- Ngâm mẫu 2-3 giờ.
- Sau đó đun sôi nhẹ đến khi có khói màu nâu đỏ bay ra thì thêm qua ống sinh hàn một số giọt H_2O_2 30%.
- Tiếp tục đun nhẹ, nếu dung dịch trong bình cạn cần bổ sung thêm HNO_3 qua ống sinh hàn. Quá trình phân huỷ mẫu kéo dài cho đến khi dung dịch trong và không màu (thường có thể kéo dài 6 đến 10 giờ).
- Để nguội thêm nước và định mức 50ml.

Ban hành kèm theo quyết định số 48-2001/QĐ-BNN-KHCN ngày 26 tháng 4 năm 2001 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

3.2. Phương pháp phân huỷ sử dụng HNO_3 và $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$

- Cân chính xác 1,0000g mẫu cho vào chén sứ
- Cho 2ml dung dịch magie nitrat (*Dung dịch magie nitrat: hoà tan 25g magie nitrat tinh khiết vào 400ml HNO_3 đặc sau đó pha loãng đến 500ml bằng nước*)
- Cô cách thuỷ cho đến khô ở 70°C trong tủ hốt.
- Nung ở 300°C qua đêm.
- Để nguội, thêm 5ml HNO_3 25% và đun cách thuỷ khoảng 150 phút
- Để nguội thêm nước và định mức 50ml

4. Tách silic

- Dung dịch thu được sau khi phân huỷ mẫu cần được tách silic trước khi xác định SO_4^{2-} bằng cách:
- Cô cách thuỷ cho đến khô dung dịch mẫu trong bát sứ (toàn bộ hoặc trích một thể tích chính xác dung dịch mẫu có chứa ít nhất 2mg S)
- Hoà tan cặn khô bằng HCl 10%, tiến hành 3-4 lần kết hợp gạn lọc thu nước lọc vào bình, rửa cặn và giấy lọc 3-4 lần bằng nước nóng, thu nước rửa vào bình, lên lại thể tích dung dịch mẫu để xác định SO_4^{2-}

5. Hai phương pháp xác định hàm lượng SO_4^{2-}

4.1 Phương pháp khối lượng

4.1.1. Thiết bị và thuốc thử

4.1.1.1. Thiết bị:

- Cân phân tích có độ chính xác 0,0002g;
- Phễu lọc;
- Bát sứ;
- Bình hút ẩm;
- Lò nung.

4.1.1.2. Thuốc thử

- Dung dịch HCl 10% và HCl 0,1%;
- Dung dịch BaCl_2 10%;
- Nước cất có độ dẫn điện nhỏ hơn $2\mu\text{S}/\text{cm}$ pH 5,6-7,0.

4.1.2. Cách tiến hành:

4.1.2.1. Lấy vào cốc chính xác một thể tích dung dịch để xác định SO_4^{2-}

4.1.2.2. Cho thêm 1ml dung dịch HCl 10% và đun sôi.*

- 4.1.2.3. Cho thêm 10ml dung dịch BaCl_2 10% vào dung dịch đang sôi và tiếp tục đun sôi 2-3 phút. Kết tủa BaSO_4 sẽ hình thành.**
- 4.1.2.4. Để yên 4 giờ trong tủ ấm 80°C cho lắng kết tủa.
- 4.1.2.5. Thử kết tủa hoàn toàn SO_4^{2-} bằng dung dịch BaCl_2 , nếu còn kết tủa tiếp cần cho thêm 2ml BaCl_2 10%, tiếp tục như trên cho đến khi kết tủa hoàn toàn.
- 4.1.2.6. Sau khi đã kết tủa hoàn toàn, tiến hành lọc qua giấy lọc mịn không tro. Kết hợp gạn lọc và rửa sạch kết tủa trong cốc 2-3 lần bằng dung dịch HCl 0,1% nóng.
- 4.1.2.7. Đồn toàn bộ kết tủa lên giấy lọc, tráng rửa cốc 2-3 lần bằng dung dịch HCl 0,1% nóng.
- 4.1.2.8. Để ráo giấy lọc, gói kết tủa cho vào chén sứ chịu nhiệt khô đã xác định chính xác khối lượng.
- 4.1.2.9. Nung kết tủa ở nhiệt độ sắp xỉ 750°C cho đến khi hết màu đen. (Không được quá 750°C vì khoảng 800°C BaSO_4 bị phân huỷ).
- 4.1.2.10. Để nguội chén trong bình hút ẩm, cân khối lượng lần thứ nhất
- 4.1.2.11. Tiếp tục nung thêm 30 phút, để nguội chén trong bình hút ẩm cân khối lượng lần thứ hai. Lặp lại như vậy cho đến khi khối lượng cân 2 lần liên tiếp không thay đổi.
- 4.1.3.12. Đồng thời tiến hành mẫu trắng chỉ có giấy lọc.
- 4.1.3. Cách tính kết quả

Công thức tính hàm lượng S tổng số trong mẫu khô tuyệt đối như sau:

$$\%S = \frac{(m_2 - m_1 - m_0) \cdot 0,137 \cdot 100 \cdot k}{m}$$

Trong đó:

m: Khối lượng mẫu tương ứng với thể tích dung dịch trích (g);

m_1 : Khối lượng chén (g);

m_2 : Khối lượng chén và kết tủa sau khi nung (g);

m_0 : Khối lượng mẫu trắng (tro giấy lọc) (g);

0,137: Hệ số quy từ BaSO_4 ;

k: Hệ số quy về khô kiệt.

Ghi chú:

* BaSO_4 kết tủa chọn lọc tốt trong môi trường HCl tối thiểu 0,05N do đó cần thiết cho thêm HCl

** Kết tủa nóng làm tăng quá trình phản hấp phụ và tạo tinh thể lớn, dễ làm sạch kết tủa và dễ lọc.

*** Cần đảm bảo lượng mẫu phá huỷ đủ khối lượng S để có khối lượng cân BaSO_4 tối thiểu 30mg, tránh sai số do cân. Các mẫu cây nghèo lưu huỳnh như rơm rạ.... cần tăng lượng mẫu phân huỷ và xác định toàn bộ dung dịch phân huỷ.

4.2. Phương pháp so độ đục

4.2.1. Thiết bị và thuốc thử

4.2.1.1. Thiết bị:

- Máy phổ quang kế (Spectrophotometer);
- Bình định mức 25ml.

4.2.1.2. Thuốc thử:

- Hỗn hợp axit: Hoà tan 50ml axit axetic đặc, 20ml HCl 10N, 20ml H_3PO_4 đặc 85% và 6ml H_2SO_4 1:1000 vào 800ml nước cất, thêm nước cho đủ 1 lít. Lắc trộn đều.
- Hỗn hợp bariclorua- polyvinylalcol (PVA): Hoà tan 60g $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ trong 500ml nước; hoà tan 2g PVA trong 400ml nước nóng. Sau khi để nguội trộn đều 2 dung dịch và thêm nước cho đủ 1 lít. Lọc qua giấy lọc mịn. Dung dịch sử dụng ngay, nếu bảo quản lạnh hạn sử dụng trong vòng 1 tháng.

Dung dịch tiêu chuẩn 100ppmS: Cân chính xác 0,5434g K_2SO_4 tinh khiết đã sấy khô ở $105^{\circ}C$ hoà tan trong nước thành 1000ml, pha loãng 4 lần có nồng độ 25ppmS sử dụng để lập dãy tiêu chuẩn.

4.2.2. Cách tiến hành

4.2.2.1. Lập dãy tiêu chuẩn: Cho vào bình định mức 25ml theo thứ tự số ml dung dịch tiêu chuẩn 25ppmS và tiến hành tạo độ đục như với mẫu.

Dãy tiêu chuẩn S (0-5ppmS)	Số ml dung dịch tiêu chuẩn 25 ppmS
0	0
1	1
2	2
3	3
4	4
5	5

4.2.2.2. Xác định hàm lượng:

- Định mức dung dịch mẫu thu được sau phân huỷ.
- Dùng pipet trích một thể tích chính xác dung dịch có chứa khoảng 0,10-0,50 mg S cho vào bình định mức 25ml.
- Thêm chính xác bằng pipet 10ml hỗn hợp axit, lắc đều.
- Thêm 10ml hỗn hợp Bariclorua- PVA(***) .
- Thêm tiếp nước cho đến vạch định mức và lắc trộn đều ít nhất 5 lần.
- Để yên 30 phút, từng mẫu một lắc lại 20 lần và đo ngay trên máy trắc quang tại bước sóng 420-490nm.
- Tiến hành đồng thời như trên với dãy tiêu chuẩn và mẫu trắng.

4.2.3. Cách tính kết quả

4.2.3.1. Lập đồ thị chuẩn tương quan giữa số đo trên máy và hàm lượng S của dung dịch dãy tiêu chuẩn

4.2.3.2. Căn cứ số đo trên máy của dung dịch đo và dựa vào đồ thị chuẩn suy ra hàm lượng S trong dung dịch đo.

4.2.3.3. Tính kết quả:

Công thức tính hàm lượng S tổng số trong mẫu khô tuyệt đối như sau:

$$\%S = \frac{(a - b) \cdot V \cdot k}{v' \cdot m \cdot 10}$$

Trong đó:

a : Khối lượng S xác định được trong bình đo (mg);

b : Khối lượng S xác định được trong bình mẫu trắng (mg);

V: Thể tích toàn bộ dung dịch mẫu (ml);

v' : Thể tích dung dịch trích xác định (ml);

m : Khối lượng mẫu (g);

k : Hệ số quy về khô kiệt.

Ghi chú:

* Nếu dung dịch sau phân huỷ có màu vàng cần cô cách thủy cạn đến khi còn khoảng 5ml. Cho thêm 5ml H_2O_2 30-40% (hoặc $HClO_4$ 50-70%) và tiếp tục cô cách thủy cho đến khi hết màu.

** Thể tích 10ml hỗn hợp axit cho vào từng mẫu và dãy tiêu chuẩn (4.2.2.2.) cần chính xác để đồng nhất lượng SO_4^{2-} làm môi kết tủa giữa các mẫu.

*** PVA là chất ổn định trạng thái có nhiều ưu điểm, đặc biệt với những mẫu có hàm lượng SO_4^{2-} cao và có nhiều yếu tố ảnh hưởng. Đối với mẫu thực vật có hàm lượng SO_4^{2-} thấp và ít yếu tố ảnh hưởng có thể thay thế PVA bằng Glycerin, tiến hành theo thủ tục sau:

1.Thuốc thử:

- Dung dịch $BaCl_2$ 10%: Hoà tan 25gam $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ trong 200ml nước, thêm 12,5ml HCl đặc, sau đó thêm nước cho đủ 250ml
- Dung dịch glycerin 1:1 trong nước
- Dung dịch S tiêu chuẩn: Như 4.2.1.2
- Lập thang chuẩn: Như 4.2.2.1

2.Cách tiến hành:

- Trích chính xác một thể tích dung dịch mẫu có chứa khoảng 0,03 - 0,20 mgS cho vào cốc 50ml. Thêm 10ml nước và lắc đều.
- Thêm 10ml dung dịch glycerin 1:1 và khuấy 15 giây.
- Để vào buồng lạnh ở $15^\circ C$ trong 1 giờ.
- Lấy ra khỏi buồng lạnh, tức khắc vừa lắc vừa thêm 2ml dung dịch $BaCl_2$ 10%.
- Để yên ở nhiệt độ phòng 30 phút
- Lắc lại bằng tay 20 lần từng mẫu một và đo ngay trên máy trắc quang tại bước sóng 420-490nm
- Tiến hành đồng thời đo các dung dịch tiêu chuẩn đồng nhất với điều kiện đo mẫu.
- Lập đồ thị tiêu chuẩn, xác định hàm lượng S trong mẫu theo 4.2.3.3.

PHÂN TÍCH CÂY TRỒNG

Phương pháp xác định sắt tổng số

1. Phạm vi áp dụng.

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định sắt tổng số cho tất cả các loại mẫu cây trồng.

2. Nguyên tắc.

Hoà tan các hợp chất sắt trong mẫu theo 10TCN 450-2001 và xác định sắt trong dung dịch theo phương pháp trắc quang, khử toàn bộ $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ và xác định Fe^{2+} dựa trên phản ứng tạo màu đỏ với o.phenanthrolin.

3. Thiết bị và thuốc thử

3.1. Thiết bị

3.1.1. Các thiết bị phân huỷ mẫu (theo 10TCN 450-2001)

3.1.2. Máy trắc quang (Spectrophotometer)

3.1.3. Bình định mức 25ml, 100ml, 1000ml

3.2. Thuốc thử

3.2.1. Dung dịch hydroxiamin hydroclorua 5%

Hoà tan 5g hydroxiamin hydroclorua trong 100ml nước.

3.2.2. Dung dịch natri axetat 3N

Hoà tan 408g natri axetat trihydrat trong nước và pha loãng đến 1 lít.

3.2.3. Dung dịch o.phenanthrolin 0,1% trong nước.

3.2.4. Dung dịch axit nitric 0,1%

Hoà tan 6ml HNO_3 đặc thành 50ml bằng nước.

3.2.5. Dung dịch sắt tiêu chuẩn 25ppm Fe

- Cân chính xác 0,100g sắt nguyên chất cho vào cốc 100ml

- Thêm 50ml dung dịch HNO_3 5N và đầy cốc bằng mặt kính đồng hồ

Ban hành kèm theo quyết định số 48-2001/QĐ-BNN-KHCN ngày 26 tháng 4 năm 2001 của Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.

- Đun (trong hốt) cho đến khi hết khói nâu của nitơ oxit
- Làm lạnh và thêm nước đến 1 lít trong bình định mức, trộn đều. Dung dịch này có nồng độ 100ppm Fe.
- Pha loãng 4 lần có nồng độ 25ppm Fe sử dụng để lập-dãy tiêu chuẩn.

3.2.6. Nước cất có độ dẫn điện nhỏ hơn $2\mu\text{S/cm}$, pH 5,6-7,0

4. Cách tiến hành

4.1. Chuẩn bị dãy tiêu chuẩn

4.1.1. Sử dụng bình định mức 25ml, cho vào các bình theo thứ tự số ml dung dịch tiêu chuẩn 25ppm Fe theo bảng sau.

Nồng độ dung dịch Fe tiêu chuẩn (ppm)	Số ml dung dịch tiêu chuẩn 25ppm
0	0
1	1
2	2
3	3
4	4

4.1.2. Cho thêm 1ml dung dịch hydroxiamin hydroclorua và thêm nước đến khoảng 15ml, lắc trộn đều.

4.1.3. Thêm 2,5ml dung dịch natri axetat, lắc trộn đều.

4.1.4. Thêm 2,5ml dung dịch o.phenanthrolin và thêm nước đến vạch định mức, lắc trộn đều.

4.1.5. Để yên 30 phút, đo trên máy phổ quang kế tại bước sóng 510nm.

4.1.6. Lập đồ thị tiêu chuẩn biểu diễn tương quan giữa nồng độ Fe của dung dịch tiêu chuẩn và số đo trên máy.

4.2. Đo mẫu

4.2.1. Trích chính xác bằng pipet một thể tích dung dịch mẫu có chứa khoảng 10-40 μg Fe cho vào bình định mức 25ml.

4.2.2. Tiến hành các thủ tục như với dãy tiêu chuẩn (từ 4.1.2. đến 4.1.5.)

5. Cách tính kết quả

5.1. Căn cứ vào đồ thị tiêu chuẩn và số đo trên máy của dung dịch đo xác định nồng độ Fe (ppm) của dung dịch đo và từ đó suy ra số mgFe có trong phần dung dịch trích xác định. Công thức tính hàm lượng Fe trong mẫu khô tuyệt đối như sau:

$$\text{ppm Fe (trong cây)} = \frac{X.V.10^3.k}{v'.m}$$

$$\% \text{ Fe} = \frac{\text{ppm Fe(trong cây)}}{10^4} = \frac{X.V.k}{v'.m.10}$$

Trong đó:

m: Khối lượng mẫu (g)

V: Thể tích dung dịch mẫu (ml)

v': Thể tích dung dịch trích (ml)

x: Khối lượng Fe trong thể tích dung dịch trích (mg)

k: Hệ số chuyển về khô kiệt.

Ghi chú:

* Có thể xác định hàm lượng Fe trong dung dịch bằng AAS sử dụng đèn HCl tương ứng tại bước sóng 248,3nm... trên ngọn lửa C_2H_2/KK .

TUYỂN TẬP
TIÊU CHUẨN NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM

TẬP III
TIÊU CHUẨN PHÂN BÓN

Chịu trách nhiệm xuất bản:

VỤ KHOA HỌC CÔNG NGHỆ VÀ CHẤT LƯỢNG SẢN PHẨM

Cơ quan xuất bản

TRUNG TÂM THÔNG TIN NÔNG NGHIỆP VÀ PTNT

