

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 6168 : 2002

CHẾ PHẨM VI SINH VẬT PHÂN GIẢI XENLULO

Microbial preparation for cellulose degradation

Lời nói đầu

TCVN 6168 : 2002 thay thế cho TCVN 6168 : 1996.

TCVN 6168 : 2002 do Tiểu ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC134/SC3 Phân bón vi sinh vật biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ ban hành.

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

CHẾ PHẨM VI SINH VẬT PHÂN GIẢI XENLULO

Microbial preparation for cellulose degradation

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này áp dụng cho các loại chế phẩm chứa vi sinh vật sống, có khả năng phân giải xenlulo hiệu quả hoặc kỵ khí.

2 Thuật ngữ, định nghĩa

2.1 Chế phẩm vi sinh vật phân giải xenlulo (microbial preparation for cellulose degradation): 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 xenlulo hiệu quả hoặc kỵ khí thành các chất bón vào đất, tạo điều kiện nâng cao năng suất cây trồng và/hoặc chất lượng nông sản, tăng độ màu mỡ của đất, đồng thời không gây ảnh hưởng xấu đến người, động vật, thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản.

2.2 Vi sinh vật tuyển chọn (selected micro-organisms): là các vi sinh vật phân giải xenlulo hiệu quả hoặc kỵ khí, đã được nghiên cứu, đánh giá hoạt tính sinh học; an toàn đối với đất và cây trồng; dùng để sản xuất chế phẩm vi sinh vật phân giải xenlulo.

2.3 Vi sinh vật tạp (contaminated micro-organisms): là vi sinh vật có trong chế phẩm vi sinh vật phân giải xenlulo nhưng không thuộc loại vi sinh vật đã được tuyển chọn.

3 Yêu cầu chung

Chế phẩm vi sinh vật phân giải xenlulo phải an toàn đối với đất, cây trồng, con người, động vật và môi trường.

4 Yêu cầu kỹ thuật

Mật độ vi sinh vật đảm bảo theo Bảng 1.

Bảng 1 - Mật độ vi sinh vật trong chế phẩm vi sinh vật phân giải xenlulo

Đơn vị tính bằng CFU*/gam hay mililít mẫu

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

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

5 Lấy mẫu

5.1 Yêu cầu chung

Việc lấy mẫu được tiến hành sao cho mẫu kiểm tra phải là mẫu đại diện cho cả lô hàng. Người lấy mẫu phải được đào tạo và có kinh nghiệm trong việc lấy mẫu;

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

Không được bổ sung thêm bất cứ một tác nhân bảo quản, diệt khuẩn hoặc diệt nấm nào vào mẫu kiểm tra;

Mẫu phải được lấy từ các đơn vị bao gói nguyên;

Phải tiến hành lấy mẫu ở những nơi không có hơi nước nóng, hóa chất độc hại, ánh nắng gay gắt hoặc bụi và sau đó mẫu được đưa ngay vào các dụng cụ chứa;

Các dụng cụ lấy mẫu và chứa mẫu phải sạch và vô trùng.

5.2 Chuẩn bị dụng cụ lấy mẫu và chứa mẫu

Dụng cụ lấy mẫu phải là loại được làm từ thép không gỉ hoặc bằng thủy tinh;

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

5.3 Số lượng mẫu

Mẫu được lấy theo lô hàng bao gồm các đơn vị bao gói chế phẩm vi sinh vật phân giải xenlulo được sản xuất cùng một đợt với cùng một nguồn nguyên liệu;

Số lượng đơn vị bao gói cần lấy để kiểm tra đối với mỗi lô hàng phụ thuộc vào độ lớn của lô hàng đó và phù hợp với quy định trong Bảng 2;

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

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

Các đơn vị bao gói phải được lấy theo phương pháp ngẫu nhiên; độc lập với dự kiến của người lấy mẫu dù sản phẩm chứa trong đó là tốt hay xấu;

Các mẫu ban đầu (200 gam) phải được lấy từ các đơn vị bao gói có khối lượng lớn hơn 1 kg hoặc thể tích 1 lít đã được chọn một cách ngẫu nhiên trong lô. Mỗi mẫu ban đầu phải được lấy từ 5 vị trí khác nhau và phân bố đều sao cho đại diện cho toàn đơn vị bao gói. Nếu khối lượng đơn vị bao gói nhỏ hơn 1 kg hoặc 1 lít thì mẫu ban đầu được lấy là đơn vị bao gói nguyên;

Gộp tất cả các mẫu ban đầu trong đơn vị bao gói để thu được mẫu chung, sau đó gộp tất cả các mẫu chung đó để thu được mẫu chung của lô hàng;

Tiến hành trộn và rút gọn mẫu để có mẫu trung bình thí nghiệm đáp ứng phép thử quy định ở điều 6. Chia mẫu trung bình làm hai phần bằng nhau rồi bao gói phù hợp với yêu cầu của sản phẩm, một phần dùng để kiểm tra và một phần để lưu. Phần để lưu được bảo quản trong điều kiện quy định mà mỗi loại sản phẩm yêu cầu để dùng khi cần phân tích trọng tài. Trên mỗi phần phải có nhãn ghi rõ:

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

6 Phương pháp xác định mật độ vi sinh vật phân giải xenlulo

6.1 Nguyên tắc:

dựa trên phương pháp nuôi cấy môi trường thạch đĩa;

tính số lượng vi sinh vật trên mililit hoặc trên gam mẫu từ số khuẩn lạc phát triển trong các đĩa được chọn (xem 6.4.d).

6.2 Thiết bị, dụng cụ:

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

dụng cụ nuôi cấy kỵ khí (tùy thuộc vào từng phương pháp cụ thể):

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

6.3 Chuẩn bị thử

a) Chuẩn bị dụng cụ

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

trong tủ sấy ở nhiệt độ từ 170 °C đến 180 °C, không ít hơn 1 giờ;

trong nồi hấp áp lực 1 atmophe (121 °C), không ít hơn 15 phút.

b) Chuẩn bị môi trường

Môi trường dùng để kiểm tra chế phẩm vi sinh vật 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 theo Phụ lục A;

Môi trường được pha chế theo thứ tự các hóa chất trong thành phần đã cho. Sau đó phân phối vào các dụng cụ thủy tinh đã chuẩn bị trước rồi khử trùng ở những điều kiện được xác định trong các tiêu chuẩn phương pháp thử. Để nguội môi trường đến 45 °C ÷ 50 °C rồi phân phối vào các đĩa Petri vô trùng. Thao tác này được thực hiện trong điều kiện vô trùng. Kiểm tra độ sạch của môi trường sau 2 ngày ở nhiệt độ từ 28 °C đến 30 °C. Chỉ sử dụng các đĩa Petri chứa các môi trường nuôi cấy vi sinh vật mà trong đó không phát hiện thấy tạp nhiễm.

c) Dịch pha loãng

Dùng dịch pha loãng là nước muối sinh lý (NaCl 0,85 %), sau khi khử trùng có độ pH là 7,0;

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

Chú thích - Để tránh làm ảnh hưởng đến các vi sinh vật do thay đổi nhiệt độ đột ngột, nên để cho nhiệt độ của dịch pha loãng đạt đến nhiệt độ phòng thử nghiệm trước khi sử dụng.

d) Thuốc thử lugol

Cân 2 g kali iodua, hòa tan trong 300 ml nước. Sau đó bổ sung 1 g iot, lắc/hoặc đun nóng đến hòa tan hết thành dung dịch đồng đều;

Nếu chưa sử dụng ngay, thuốc thử lugol cần được bảo quản trong bình tối ở nhiệt độ phòng, thời gian bảo quản không quá 1 tháng kể từ ngày chuẩn bị.

6.4 Cách tiến hành

a) Pha loãng mẫu

Đối với mẫu dạng lỏng: dùng pipet vô trùng lấy ra 10 ml mẫu đưa vào 90 ml dịch pha loãng đã chuẩn bị sẵn (xem 6.3.c), tránh chạm pipet vào dịch pha loãng. Trộn kỹ bằng thiết bị trộn cơ học trong 5 phút đến 10 phút sao cho vi sinh vật trong dung dịch phân bố đồng đều. Dung dịch tạo ra được gọi là dung dịch huyền phù ban đầu (a);

Đối với mẫu dạng đặc: Cân 10 g mẫu (có thể được nghiền nhỏ trước) chính xác đến 0,01 g và cho vào bình chứa 90 ml dịch pha loãng đã chuẩn bị sẵn (xem 6.3.c). Trộn kỹ bằng thiết bị trộn cơ học từ 5 phút đến 10 phút sao cho vi sinh vật trong dung dịch phân bố đồng đều. Để cho các phần tử nặng lắng xuống trong thời gian không quá 15 phút, gạn được dung dịch huyền phù ban đầu (b);

Dùng một pipet đã vô trùng lấy 1 ml dịch huyền phù ban đầu (a hoặc b) cho vào ống nghiệm chứa 9 ml dịch pha loãng đã chuẩn bị sẵn (xem 6.3.c), tránh chạm pipet vào dịch pha loãng. Trộn kỹ bằng cách dùng một pipet vô trùng khác hút lên xuống 10 lần hay bằng thiết bị trộn cơ học từ 5 giây đến 10 giây (nhịp quay của thiết bị này được chọn sao cho mẫu trộn như cuộn xoáy dâng lên cách mép ống chứa từ 2 cm đến 3 cm) để có dịch pha loãng mẫu có nồng độ pha loãng là 10^{-2} . Quá trình này được lặp lại liên tục để có dịch mẫu có nồng độ pha loãng theo quy định sau:

+ Đối với chế phẩm vi sinh vật trên nền chất mang thanh trùng, sử dụng nồng độ pha loãng 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} ;

+ Đối với chế phẩm vi sinh vật trên nền chất mang không thanh trùng, sử dụng nồng độ pha loãng 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} .

b) Cấy mẫu

Dùng pipet vô trùng riêng cho từng độ pha loãng, lấy ra một lượng mẫu là 1 ml từ các dịch mẫu có các nồng độ pha loãng ở trên, cấy vào 1 đĩa Petri chứa môi trường đã chuẩn bị sẵn (xem 6.3.b). Mỗi độ pha loãng được cấy lặp lại 2 đĩa Petri;

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

Các phương pháp tạo điều kiện kỵ khí:

Loại bỏ oxy bằng phương pháp vật lý: Đặt các đĩa vào tủ nuôi kỵ khí hoặc bình hút ẩm có vòi hút chân không, hàn kín bằng vazolin, không khí trong bình được hút ra và thay bằng hỗn hợp khí CO_2 , N_2 , H_2 . Để loại bỏ oxy một cách triệt để, trước đó nên đặt vào trong bình đựng một trong các chất hấp thụ oxy như dithionit, clorua đồng, iot v.v... Có thể làm giảm tác dụng của oxy bằng cách thêm vào môi trường dinh dưỡng các chất khử oxy như axit thioglycolic (0,3 ml/l) và cystein (0,75 g/l);

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

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

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

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

c) 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 5 ml thuốc thử lugôn (xem 6.3.d), dàn đều khắp mặt thạch; để trong 15 phút rồi gạn bỏ hết thuốc thử lugôn. Đếm số khuẩn lạc trong đĩa Petri tạo vòng phân giải xenlulo (vòng trong suốt) bao quanh khuẩn lạc.

d) Tính kết quả

Vi sinh vật phân giải xenlulo được tính là số khuẩn lạc tạo vòng phân giải xenlulo trên đĩa Petri chứa môi trường nuôi cấy đã chọn.

Vi sinh vật tạp là tất cả các khuẩn lạc không tạo vòng phân giải xenlulo trên đĩa Petri chứa môi trường nuôi cấy.

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

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

trong đó:

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

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

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

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

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

Chú thích:

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

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

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

6.5 Báo cáo kết quả

Trong báo cáo kết quả phải mô tả lại tình trạng mẫu trước khi kiểm tra (tất cả các chi tiết cần và đủ để xác định mẫu), phương pháp kiểm tra và kết quả đạt được. Báo cáo cũng phải nêu tất cả các điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này hoặc được coi là tùy ý lựa chọn cũng như bất kỳ tình huống nào có thể ảnh hưởng đến kết quả.

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

7.1 Bao gói, ghi nhãn

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

tên sản phẩm;

tên khoa học và mật độ của các loài vi sinh vật sử dụng;

tên cơ sở sản xuất;

thành phần;

công dụng;

hướng dẫn sử dụng;

ngày sản xuất và thời hạn sử dụng;
quy cách bảo quản và vận chuyển;
khối lượng tịnh.

7.2 Bảo quản

7.2.1 Chế phẩm vi sinh vật phân giải xenlulo phải được bảo quản ở nơi khô, sạch, râm, mát, tránh ánh nắng trực tiếp từ mặt trời.

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

7.3 Vận chuyển

Chế phẩm vi sinh vật phân giải xenlulo phải được chuyên chở bằng các phương tiện phù hợp để đảm bảo chất lượng của chế phẩm trước các ảnh hưởng bất lợi từ bên ngoài.

Phụ lục A

(quy định)

Môi trường nuôi cấy vi sinh vật phân giải xenlulo

A.1 Môi trường nuôi cấy để kiểm tra nấm phân giải xenlulo

(môi trường Asparagine)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,5 g
L-Asparagine	0,5 g
K_2HPO_4	1,0 g
KCl	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
CaCl_2	0,1 g
Cao nấm men	0,5 g
Xenlulo tự nhiên (bột xenlulo, bột giấy v.v...)	10,0 g
Thạch bột	15,0 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml

pH: 6,2

A.2 Môi trường nuôi cấy để kiểm tra vi khuẩn phân giải xenlulo (Môi trường Hans)

K_2HPO_4	0,5 g
KH_2PO_4	0,5 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
CaCl_2	0,1 g
NaCl	6,0 g
Cao nấm men	0,1 g
Xenlulo tự nhiên (bột xenlulo, bột giấy v.v...)	10,0 g
Thạch bột	15,0 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml

pH: 7,0

A.3 Môi trường nuôi cấy để kiểm tra xạ khuẩn phân giải xenlulo

A.3.1 Môi trường Ken Knight

K_2HPO_4	1,0 g
$NaNO_3$	0,1 g
KCl	0,1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g
Xenlulo tự nhiên (bột xenlulo, bột giấy v.v...)	10,0 g
Thạch bột	15,0 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml

pH: 7,0 - 7,2

A.3.2 Môi trường Gauze

KH_2PO_4	0,5 g
KNO_3	1,0 g
NaCl	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 g
$FeSO_4$	0,01 g
Xenlulo tự nhiên (bột xenlulo, bột giấy v.v...)	10,0 g
Thạch bột	15,0 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml

pH: 7,0

A.4 Môi trường kiểm tra vi sinh vật phân giải xenlulo kị khí

A.4.1 Môi trường Imsenietxki A

$NaNH_4HPO_4$	1,5 g
KH_2PO_4	0,5 g
NaCl	0,1 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,4 g
Pepton	5,0 g
$CaCO_3$	2,0 g
Dung dịch $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 1 %	1 giọt
Dung dịch $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 %	1 giọt
Xenlulo tự nhiên (bột xenlulo, bột giấy v.v...)	10,0 g
Thạch bột	15,0 g
Nước máy vừa đủ	1000 ml

pH: 7,0 - 7,4

A.4.2 Môi trường imsenietxki B

Cao thịt - pepton	5,0 g
$CaCO_3$	2,0 g