

TIÊU CHUẨN NGÀNH

10 TCN 299:1997

TIÊU CHUẨN NGÀNH

PHÂN BÓN VI SINH VẬT CỐ ĐỊNH NITƠ

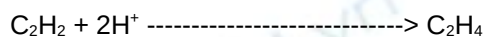
Phương pháp xác định hoạt tính

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:



Nitrogenaza

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:

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 rồi 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 thuỷ 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 $32^\circ C$ trong thời gian 1-24 giờ (tuỳ 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:

Tuỳ 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 khí 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 nito cộng sinh và 10 lần đối với các loại phân cố định nito khác.