

Dự thảo

TCVN.....:2017

**PHÂN BÓN VI SINH VẬT – PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH MẬT
ĐỘ NẤM RỄ NỘI CỘNG SINH. PHẦN 1: KỸ THUẬT ĐẾM SỐ
LƯỢNG BÀO TỬ NẤM NỘI CỘNG SINH MYCORRHIZA
(ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI) BẰNG KỸ THUẬT
SÀNG ƯỚT, LY TÂM NỔI**

*Microbial fertilizers - Method for the determination of Endomycorrhizae density.
Part 1. Count technique of endomycorrhiza spores (Arbuscular Mycorrhiza Fungi) by wet
sieving and flotating centrifugation*

HÀ NỘI – 2017

Lời nói đầu

TCVN:2017 do Viện Thổ nhưỡng Nông hóa biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Phân bón vi sinh vật – Phương pháp xác định mật độ nấm rễ nội cộng sinh. Phần 1: Kỹ thuật đếm số lượng bào tử nấm nội cộng sinh Mycorrhiza (Arbuscular Mycorrhizal Fungi) bằng kỹ thuật sàng ướt, ly tâm nổi

Microbial fertilizers - Method for the determination of Endomycorrhizae density. Part 1. Count technique of endomycorrhiza spores (Arbuscular Mycorrhiza Fungi) by wet sieving and flotating centrifugation

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp xác định mật độ bào tử nấm rễ nội cộng sinh Mycorrhiza (Arbuscular Mycorrhizal Fungi) trong phân bón vi sinh vật bằng kỹ thuật sàng ướt, ly tâm nổi trong dịch chứa sucroza.

2 Tài liệu viện dẫn

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

TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987), *Nước dùng cho phân tích trong phòng thí nghiệm - Yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử.*

3 Thuật ngữ, định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này sử dụng các thuật ngữ, định nghĩa sau.

3.1

Nấm rễ nội cộng sinh (Endomycorrhiza hoặc Arbuscular Mycorrhiza Fungi)

Là nhóm nấm thuộc họ *Glomoreace*, cộng sinh với rễ thực vật mà không làm biến đổi màu sắc và hình thái của rễ, có lông hút, không có thể sợi nấm và không có mạng lưới Hartig (nhiều sợi nấm xuyên qua biểu bì vào các gian bào của mô biểu bì, từ mặt cắt ngang của túi nấm rễ có thể thấy dạng lưới được gọi là mạng lưới Hartig), khi giải phẫu cho thấy bên trong tế bào biểu bì rễ có các chùm (Arbuscular).

3.2

Bào tử nấm rễ nội cộng sinh (Endomycorrhiza spores)

Là bào tử sinh sản vô tính, hầu hết có hình cầu, một số loài có hình thoi hoặc dạng khác, kính thước khoảng 50 – 500 μm , được tạo thành từ sợi nấm trong đất hoặc rễ. Bào tử mọc đơn lẻ, thành chùm hoặc có dạng thể quả. Thành bào tử chứa một hoặc nhiều lớp có độ dày khác nhau. Màu sắc bào tử rất đa dạng, cấu tạo với nhiều lớp thành, vách chứa vài trăm đến vài ngàn nhân. Bên trong bào tử chứa lipid và những chất khác có dạng giống như những giọt nước có kích thước khác nhau.

3.3.

Phân bón vi sinh vật chứa nấm rễ nội cộng sinh (Mycorrhizal Biofertilizer)

Là phân bón vi sinh vật có chứa một lượng lớn mầm/chồi lây nhiễm, bao gồm: Bào tử, sợi nấm và các túi bọt (thể V – vesicles) trong những mảnh rễ... của một hoặc một tổ hợp vài chủng nấm rễ nội cộng sinh, cộng sinh với rễ thực vật, giúp cây tăng cường hấp thu các chất dinh dưỡng, nước, qua đó tăng sinh trưởng và năng suất cho cây trồng. Phân bón chứa nấm rễ nội cộng sinh phải có mật độ nấm rễ cộng sinh $\geq 10^2$ IP/g mẫu.

4 Nguyên tắc

Trong quá trình sàng ướt qua rây, các bào tử nấm rễ nội cộng sinh Mycorrhiza và lượng rất nhỏ của mảnh vụn hữu cơ được giữ lại trên rây ở các kích với kích thước 50 μm (đối với bào tử kích thước nhỏ), 100 μm (bào tử kích thước trung bình), 250 μm (bào tử kích thước lớn và quả thể), ≥ 500 μm (mảnh vụn hữu cơ). Khi ly tâm trong huyền dịch sucroza 50%, dưới tác dụng của lực ly tâm, các bào tử sẽ nổi trên bề mặt và được tách trên giấy lọc Whatman số 2 hoặc màng lọc Cellulose nitrat nhờ bơm hút chân không. Đếm trực tiếp bào tử này dưới kính hiển vi nổi hoặc hiển vi thường ở độ phóng đại phù hợp trên màng lọc bằng giấy có chia ô.

5 Nước cất, dung dịch sucroza và thuốc thử

Sử dụng các loại hóa chất tinh khiết phân tích để pha các loại dung dịch, thuốc thử, chất chuẩn.

5.1 Nước cất, đáp ứng các yêu cầu nước loại 3 trong TCVN 4851:1989 (ISO 3696:1987).

5.2 Dung dịch sucroza 50 %

Cân một lượng chính xác 500 g sucroza bằng cân phân tích (6.1.2.), cho vào bình định mức 1000 ml (6.2.3), sau đó bổ sung thêm nước cất (5.1) đến vạch định mức để tạo dung dịch 50 %.

6 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ thông dụng trong phòng thí nghiệm, cụ thể như sau:

6.1 Thiết bị

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

6.1.2 Cân phân tích, có độ chính xác đến 0,001 mg.

6.1.3 Máy ly tâm, ly tâm được tốc độ không ít hơn 2.000 r/min.

6.1.4 Bơm hút chân không

6.1.5 Kính hiển vi soi nổi hoặc kính hiển vi thường, tổng độ phóng đại tối thiểu 70 lần

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

6.1.7 Tủ sấy, nhiệt độ từ 40 °C đến 260 °C

6.2 Dụng cụ

6.2.1 Bình tam giác, dung tích 250 ml, 500 ml.

6.2.2 Cốc đong thủy tinh, dung tích 250 ml, 500 ml, 1000 ml.

6.2.3 Bình định mức, dung tích 200 ml, 1000 ml.

6.2.4 Ống phancon có nắp, dung tích 25 ml hoặc 50 ml.

6.2.5 Bộ rây, với kích thước 50 µm, 100 µm, 250 µm, 500 µm, 750 µm, 1000 µm.

6.2.6 Pipet (Micropipet), dung tích 1.000 µl và 5.000 µl.

6.2.7 Bình tia, dung tích 500 ml

6.2.8 Bộ lọc hút chân không

6.2.9 Đĩa petri, đường kính 9 cm hoặc 11 cm, chất liệu bằng thủy tinh

6.2.10 Giấy lọc Whatman số 2, có chia ô hoặc **màng lọc Cellulose nitrat** có chia ô với đường kính lỗ 0,45 µm

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị

7.1.1 Dụng cụ

Các dụng cụ sử dụng trong nuôi cấy vi sinh vật phải được khử trùng bằng 1 trong 2 cách sau:

- Giữ ở nhiệt độ 121 °C không ít hơn 30 min trong nồi hấp áp lực (6.1.6) hoặc;
- Giữ ở nhiệt độ 180 °C không ít hơn 2 h trong tủ sấy (6.1.7).

7.1.2 Lấy mẫu và chuẩn bị mẫu

Cân 10 g mẫu, trộn đều, cho mẫu vào cốc đong 250 ml (6.2.2), đổ nước cất (5.1) đến vạch định mức;

Để yên trong 15 min;

Sau đó chuyển sang bình tam giác 500 ml (6.2.1), lắc trên máy lắc (6.1.1) trong 15 min, tốc độ 150 r/min

Để lắng trong 5 min sau đó gạn dịch trong lần lượt qua các sàng 1000 μm , 750 μm và 500 μm (6.2.5), các bào tử nấm lọt qua sàng (trên bề mặt sàng là các mảnh vụn hữu cơ)

Cho tiếp dịch trong qua sàng 250 μm , 100 μm , 50 μm (6.2.5), các bào tử nấm tùy kích cỡ khác nhau được giữ lại trên mặt sàng cùng với những mảnh bám hữu cơ

Dùng bình tia (6.2.7) chứa nước cất (5.1) tia đều từ 3 – 5 lần lên bề mặt sàng của từng cỡ sàng nhằm loại các mảnh bám hữu cơ với bào tử.

Lật ngược từng cỡ sàng, dùng bình tia (6.2.7) chứa nước cất (5.1) tia ngược lại để chuyển bào tử ra khỏi mặt sàng, lúc này thu được dịch trong trên từng cỡ sàng.

Hút dịch trong vào các ống ly tâm (6.2.4).

Ly tâm dịch trong này ở tốc độ 2.000 r/min (6.1.3) trong 5 min

Loại bỏ các mảnh hữu cơ nhỏ nổi trên bề mặt ống ly tâm, thu dịch bào tử.

7.2 Thực hiện

Bổ sung dịch sucroza 50 % (5.2) vào ống ly tâm (6.2.4). Lắc nhẹ để đẩy các bào tử ở dưới lên trên. Ly tâm (6.1.3) ở tốc độ 2000 r/min trong 10 min, các bào tử sẽ nổi lên trên bề mặt ống;

Hút dịch nổi trong ống ly tâm cho vào phễu lọc hút chân không (6.2.8) có chứa màng lọc chia ô (6.2.10);

Hút chân không (6.2.8) cho đến khi hết dịch cần hút;

Chuyển màng lọc chia ô lên soi trên kính (6.1.5)

7.3 Tính kết quả

Bước 1: Xác định số lượng bào tử có trong từng cỡ sàng

- Đếm số bào tử trong 5 ô ngẫu nhiên
- Tính số bào tử trung bình trong 1 ô.
- Nhân bào tử trong một ô với tổng số ô có trong 1 tờ giấy lọc

Công thức tính như sau: $m = A/5 \times n$ (bào tử/sàng)

Trong đó m: Số bào tử trên một sàng

A: Số bào tử có trong 5 ô ngẫu nhiên

5: Tổng số ô đếm bào tử ngẫu nhiên

n: Tổng số ô trong 1 tờ giấy lọc

Bước 2: Cộng tổng số bào tử có ở trong tất cả các cỡ sàng (50 μm , 100 μm , 250 μm , 500 μm)

Công thức tính như sau: $M = m_1 + m_2 + m_3 + m_4$

Trong đó M: Tổng các bào tử có trên tất cả các cỡ sàng

m_1 : Số bào tử có trong cỡ sàng 50 μm .

m_2 : Số bào tử có trong cỡ sàng 100 μm .

m_3 : Số bào tử có trong cỡ sàng 250 μm .

m_4 : Số bào tử có trong cỡ sàng 500 μm .

Bước 3: Chia tổng số bào tử có ở trong tất cả các cỡ sàng cho số gam mẫu ban đầu sẽ ra số bào tử/g mẫu (lấy số nguyên)

Công thức tính như sau: $A = M/10$

Trong đó A: Số bào tử trung bình có trong 1 g mẫu phân bón vi sinh vật thử nghiệm (tính theo số nguyên)

M: Tổng số bào tử có ở trong tất cả các cỡ sàng

10: Số g mẫu phân bón vi sinh vật thử nghiệm ban đầu.

8 Báo cáo thử nghiệm

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

- Mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- Phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- Pát cả các thao tác không qui định trong tiêu chuẩn này, cùng với các chi tiết bất thường nào khác có thể ảnh hưởng đến kết quả;
- Pác kết quả thử nghiệm thu được;
- Nếu độ lặp lại được kiểm tra, thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Draft Indian Standard. BIOFERTILIZER – MYCORRHIZAL INOCULUM – SPECIFICATION ICS No. 65.080. Doc No.: FAD 7(2421)C
 - [2] National Centre of Organic Farming Department of Agriculture and Cooperation, Ministry of Agriculture, Govt of India, CGO-II, Kamla Nehru Nagar Ghaziabad, 201 001, Uttar Pradesh. Biofertilizers and Organic Fertilizers in Fertilizer (Control) Order, 1985. pp. 34 – 38.
 - [3] Brundrett. Mark et. al - Working with Mycorrhiza in Forestry and Agriculture. Canberra, Australia 1996, pp 141-252.
-