

TIÊU CHUẨN NGÀNH

10TCN 867:2006

VI SINH VẬT - PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ĐỐI KHÁNG NẤM GÂY BỆNH VÙNG RỄ CÂY TRỒNG CẠN

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này áp dụng cho việc xác định, kiểm tra mật độ và hoạt tính đối kháng của các vi sinh vật đối với nấm gây bệnh vùng rễ cây trồng cạn (cây hàng năm)

2. Thuật ngữ, định nghĩa

2.1. Vi sinh vật đối kháng nấm gây bệnh vùng rễ cây trồng cạn là các vi sinh vật:

- Có khả năng tiêu diệt hoặc ức chế sự phát triển hay làm mất hoặc giảm độc tính gây bệnh vùng rễ cây trồng
- Tạo được vòng đối kháng (vòng tròn trong suốt) bao quanh khuẩn lạc/cụm khuẩn lạc của vi sinh vật đó khi tiếp xúc với nấm bệnh trên môi trường nuôi cấy nhân tạo
- Làm giảm được tỷ lệ bệnh do nấm gây ra trên cây chủ

2.2. Hoạt tính đối kháng của vi sinh vật đối kháng nấm gây bệnh vùng rễ cây trồng là khả năng tiêu diệt hoặc ức chế sự phát triển hay làm mất hoặc giảm độc tính gây bệnh vùng rễ cây trồng

3. Nội dung, phương pháp

3.1. Xác định hoạt tính đối kháng trong điều kiện phòng thí nghiệm

3.1.1. Thiết bị và dụng cụ

3.1.1.1. Thiết bị khử trùng:

- Nồi hấp khử trùng: Áp suất tối thiểu 1 at (tương đương nhiệt độ khử trùng 121°C)
- Tủ sấy: Nhiệt độ từ 40 đến 260°C

3.1.1.2. Thiết bị nuôi cấy vi sinh vật:

- Tủ ấm: Nhiệt độ tối đa 60°C
- Tủ ấm lạnh: Nhiệt độ 20- 60°C
- Bường cấy vô trùng
- Máy lắc ổn nhiệt: Tốc độ 150 vòng/phút, nhiệt độ tối đa 60°C

3.1.1.3. Thiết bị đo lường:

- Cân phân tích ($d=0,001$)
- Cân kỹ thuật ($d=0,1$)
- Máy đo pH
- Máy đếm khuẩn lạc
- Micropipet: 50-200 μ l; 200-1000 μ l; 500-5000 μ l

3.1.1.4. Máy cất nước 2 lần

3.1.1.5. Dụng cụ thủy tinh:

- Bình tam giác: 100, 250, 500 ml
- Cốc thủy tinh: 100, 250, 500, 1000 ml
- Cốc định lượng: 50, 100, 500 ml
- Petri: đường kính 90mm
- Ống nghiệm: 18x180mm

3.1.2. Môi trường nuôi cấy và hoá chất khác

3.1.2.1. Môi trường nuôi cấy

- Môi trường PDA
- Môi trường Thạch-Thịt-Pepton
- Môi trường Czapek
- Môi trường Gauze

3.1.2.2. Hoá chất khác

- HCl
- NaOH
- Kháng sinh (Streptomycin, Rifamycin, Spectamycin)

3.1.3. Chuẩn bị

3.1.3.1. Khử trùng dụng cụ và đất

- Các dụng cụ sử dụng trong nuôi cấy, nhiễm vi sinh vật và xác định hoạt tính của vi sinh vật phải được khử trùng bằng 1 trong 2 cách: Sấy ở nhiệt độ 180°C không ít hơn 1 giờ trong tủ sấy hoặc giữ ở áp suất 1,0 atm (tương đương 121°C) không ít hơn 30 phút trong nồi hấp khử trùng
- Đất được sử dụng trong phép thử nghiệm trên cây trồng được giữ ở áp suất 1,5 atm không ít hơn 1 giờ trong nồi hấp khử trùng

3.1.3.2. Dịch vi sinh vật

a. Dịch nấm bệnh vùng rễ

- Cấy giống: Lựa chọn những bào tử của chủng nấm bệnh có độc tính đã được kiểm tra khả năng gây bệnh vùng rễ cây trồng, cấy chuyển vào môi trường PDA. Nuôi cấy trên môi trường thạch đĩa trong thời gian 3-5 ngày ở nhiệt độ 28-30°C cho đến khi bào tử nấm mọc đầy trên đĩa thạch
- Pha mẫu: Dùng que cấy vô trùng lấy bào tử nấm bệnh đưa vào ống nghiệm thuỷ tinh đã chứa 5ml nước cất vô trùng, trộn đều bằng thiết bị lắc cơ học

b. Dịch vi sinh vật đối kháng

Vi sinh vật đối kháng được nuôi cấy trong môi trường (xem phần phụ lục) ở điều kiện nhiệt độ, pH và thời gian thích hợp với từng loài sao cho mật độ sau nuôi cấy đạt 10^8 - 10^{10} CFU/ml

3.1.4. Tiến hành

3.1.4.1. Cấy mẫu nấm bệnh

- Dùng micropipet vô trùng hút 0,10ml dịch nấm bệnh (phần a mục 3.1.3.2) cấy vào đĩa petri chứa 30ml môi trường PDA (lớp thạch thứ nhất) đã chuẩn bị sẵn
- Lắc nhẹ đĩa petri cho dịch nấm bệnh tràn đều trên bề mặt thạch, dùng que gạt vô trùng gạt đều cho đến khi dịch nấm bệnh thấm hoàn toàn trên bề mặt thạch. Chú ý không để dịch nấm bệnh dính vào thành đĩa petri
- Sau khi bề mặt thạch khô (khoảng 4 giờ), phủ tiếp 20 ml môi trường thích hợp phụ thuộc vào vi sinh vật đối kháng (lớp thạch thứ hai) lên lớp thạch thứ nhất đã cấy nấm bệnh. Các đĩa thạch được để khô trong 45 phút. Lưu ý: nhiệt độ của môi trường khi phủ lên trên lớp thạch thứ nhất từ 35° đến 45°C, độ dày của lớp thạch thứ hai dày 2 đến 3mm
- Mỗi mẫu lặp lại 3 lần

3.1.4.2. Cấy mẫu vi sinh vật đối kháng

a. Pha loãng mẫu

- Dùng micropipet vô trùng lấy ra 10ml dịch vi sinh vật đối kháng đưa vào bình thuỷ tinh chứa 90ml dung dịch muối sinh lý vô trùng (0,85% NaCl trong nước cất), trộn đều bằng thiết bị trộn cơ học
- Dùng micropipet vô trùng tiếp tục lấy 1ml dịch cho vào ống nghiệm chứa 9ml nước muối sinh lý vô trùng, trộn đều bằng thiết bị lắc cơ học. Quá trình này được lặp lại cho đến khi được dịch vi sinh vật đối kháng có mật độ thích hợp có thể đếm được khuẩn lạc trên đĩa thạch

b. Cấy mẫu

Dùng micropipet vô trùng hút 0,05ml dịch vi sinh vật đối kháng (phần a mục 3.1.4.2) cấy vào lớp thạch thứ hai. Lắc nhẹ đĩa petri cho dịch vi sinh vật đối kháng tràn đều trên bề mặt thạch, dùng que gạt vô trùng gạt đều cho đến khi dịch vi sinh vật đối kháng thấm hoàn toàn trên bề mặt lớp thạch thứ hai. Chú ý không để dịch vi sinh vật đối kháng dính vào thành đĩa petri. Các đĩa thạch được nuôi cấy giữ ở điều kiện nhiệt độ và thời gian thích hợp

3.1.5. Đọc kết quả

Hoạt tính đối kháng của vi sinh vật đối kháng được thể hiện thông qua vòng đối kháng (vòng tròn trong suốt bao quanh khuẩn lạc của vi sinh vật đối kháng), được tính bằng trung bình cộng giá trị kích thước vòng vô khuẩn của 3 lần lặp lại, biểu thị bằng công thức:

$$\text{Kích thước vòng đối kháng (mm)} = D-d$$

Trong đó:

- D là đường kính vòng vô khuẩn (mm)
- d là đường kính khuẩn lạc (mm)

Số lượng tế bào vi sinh vật có hoạt tính đối kháng trong 1ml dịch được thể hiện thông qua số lượng khuẩn lạc tạo được vòng đối kháng bao quanh khuẩn lạc và được tính bằng công thức:

$$A = a \times c \times 20$$

Trong đó:

- A là số lượng vi sinh vật đối kháng/ml
- a là số lượng khuẩn lạc có vòng đối kháng
- c là tỉ lệ nghịch đảo của nồng độ pha loãng
- 20 là hệ số quy đổi về 1ml

3.2. Xác định hoạt tính đối kháng trên cây trồng

3.2.1. Dụng cụ, thiết bị, vật tư

- Dụng cụ và thiết bị: Như mục 3.1.1.
- Vật tư: Đất trồng, hạt hoặc củ giống, phân bón, nước vô trùng, v.v...

3.2.2. Chuẩn bị vật liệu

3.2.2.1. Đất trồng, hạt giống, phân bón

- Thử nghiệm được tiến hành trên đất khử trùng tơi xốp, có hàm lượng hữu cơ không nhỏ hơn 1,5% và pH từ 6,0 đến 6,5. Đất trồng được đựng trong các chậu vại hoặc khay với lượng đất phù hợp cho từng đối tượng cây chủ
- Hạt hoặc củ giống sử dụng là hạt hoặc củ giống sạch, giống mẫn cảm và được khử trùng bề mặt bằng dung dịch 4% H₂O₂
- Phân bón được sử dụng với liều lượng và chủng loại theo qui trình chung đối với từng loại cây trồng

3.2.2.2. Dịch vi sinh vật

a. Dịch nấm gây bệnh

- Nấm gây bệnh được nuôi cấy trên môi trường thạch đĩa (môi trường PDA). Chọn những ống giống thuần, cấy truyền trên môi trường thạch đĩa PDA và nuôi ở nhiệt độ 28-30°C.
- Sau 4-5 ngày, chuyển toàn bộ sinh khối từ đĩa thạch vào 5ml nước cất vô trùng; trộn đều để đạt được mật độ 10⁸CFU/ml.

b. Dịch vi sinh vật đối kháng

Vi sinh vật đối kháng được chuẩn bị theo phần b mục 3.1.3.2

3.2.3. Tiến hành thử nghiệm

3.2.3.1. Bố trí thử nghiệm

- Thử nghiệm được tiến hành với 2 công thức: Đối chứng (nhiễm nấm bệnh), thí nghiệm (nhiễm hỗn hợp vi sinh vật đối kháng với nấm bệnh). Mỗi công thức được lặp lại không ít hơn 3 lần với tổng số cây ít nhất là 50 cây
- Thí nghiệm được thực hiện trong buồng sinh trưởng, bảo đảm hạn chế tối đa ảnh hưởng của các yếu tố phi thí nghiệm

3.2.3.2. Tiến hành thử nghiệm

- Vi sinh vật đối kháng được nhiễm vào đất trước khi gieo trồng với mật độ vi sinh vật 10⁸CFU/ml đối với công thức thí nghiệm
- Ngâm hạt hoặc củ giống trong dịch nấm bệnh mật độ 10⁸CFU/ml đã được chuẩn bị trong thời gian 30 phút
- Gieo trồng hạt hoặc củ đã nhiễm nấm bệnh vào đất vô trùng đối với công thức đối chứng và đất đã được nhiễm vi khuẩn đối kháng đối với công thức thí nghiệm
- Thí nghiệm được chăm sóc theo qui trình phù hợp với từng đối tượng cây chủ; đảm bảo sự phát triển, phát sinh của nấm bệnh. Sử dụng nước vô trùng để giữ ẩm độ tương đối (RH) không nhỏ hơn 70% và điều khiển nhiệt độ đạt từ 25 đến 30°C
- Trong thời gian 30-45 ngày kể từ khi gieo trồng, phải quan sát và ghi nhận hàng ngày tình trạng sức khoẻ của cây trồng (không có triệu chứng bệnh hoặc có triệu chứng bệnh)

3.2.4. Tính toán kết quả

Tỉ lệ cây bệnh được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ cây bị bệnh (\%)} = \frac{\text{Trung bình cộng số cây bị bệnh}}{\text{Trung bình cộng số cây điều tra}} \times 100$$

So sánh tỷ lệ cây bị bệnh giữa công thức thí nghiệm với công thức đối chứng và đánh giá hoạt tính đối kháng của vi sinh vật theo các cấp độ sau:

STT	Tỷ lệ cây bệnh (%)	Mức độ hoạt tính đối kháng
1	<30	Hoạt tính cao
2	31-50	Hoạt tính khá
3	51-70	Hoạt tính trung bình
4	71-90	Hoạt tính yếu
5	>90	Không có hoạt tính

PHỤ LỤC B

B.1. Môi trường nuôi cấy nấm bệnh

Thành phần môi trường PDA (gam/lít)

- Dextrose:	20,00
- Khoai tây:	20,00
- Thạch:	15,00
- pH:	6,7-6,8

Ghi chú:

- Khoai tây thái nhỏ, cho vào 1 lít nước và đun sôi trong 20 phút, sau đó lọc lấy nước trong để sử dụng làm môi trường

- Bổ sung 0,2% kháng sinh trong 100 ml môi trường đã khử trùng trước khi đổ ra đĩa petri

B.2. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật đối kháng

- Trong trường hợp đã biết rõ loài vi sinh vật đối kháng cần xác định, môi trường được sử dụng để nuôi cấy là môi trường đặc hiệu hoặc môi trường có thành phần thích hợp cho sự sinh trưởng phát triển của loài vi sinh vật đã biết.

- Trường hợp chưa biết chính xác vi sinh vật cần xác định thì lựa chọn một trong các môi trường nuôi cấy như sau:

B. 2.1. Môi trường cho vi khuẩn: Môi trường Thạch-Thịt-Pepton

Thành phần môi trường (gam/lít):

- Pepton:	10,0
- Cao thịt:	3,0
- Thạch:	15,0
- Nước cất:	1 lít
- pH:	6,5-7,5

(pH môi trường được điều chỉnh bằng HCl 1N hoặc NaOH 1N)

B.2.2. Môi trường nuôi cấy nấm: Môi trường Czapek

Thành phần môi trường (gam/lít):

- NaNO ₃ :	3,0
- Sacarosa:	30,0
- KH ₂ PO ₄ :	1,0
- MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,5
- Thạch:	15,0
- Nước cất:	1 lít
- pH:	6,0-6,5

(pH môi trường được điều chỉnh bằng HCl 1N hoặc NaOH 1N)

B.2.3. Môi trường cho xạ khuẩn: Môi trường Gauze

Thành phần môi trường (gam/lít):

- Tinh bột tan:	20,00
- KNO ₃ :	1,00
- KH ₂ PO ₄ :	0,50
- MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,50
- NaCl:	0,50
- FeSO ₄ :	0,01
- Thạch:	15,00
- Nước cất:	1 lít
- pH:	7,0

(pH môi trường được điều chỉnh bằng HCl 1N hoặc NaOH 1N)

Ngoài ra trong điều kiện hạn hẹp có thể sử dụng môi trường PDA cho sự phát triển của đa số vi khuẩn, hầu hết nấm và một số xạ khuẩn.

TaiLieu.vn