

TIÊU CHUẨN NGÀNH

10TCN 714:2006

VI SINH VẬT - PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ĐỐI KHÁNG VI KHUẨN GÂY BỆNH HÉO XANH CÂY TRỒNG CẠN *RALSTONIA SOLANACEARUM* SMITH [1]

*Method to determine the antagonistic activity of microorganism to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* Smith*

1. Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này áp dụng cho việc xác định, kiểm tra hoạt tính đối kháng của các vi sinh vật đối với vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith (*R. solanacearum*) gây bệnh héo xanh cây trồng cạn.

2. Thuật ngữ định nghĩa

- 2.1. Bệnh héo xanh (chết ẻo, héo rũ) do vi khuẩn *R. solanacearum* gây ra đối với cà chua, lạc, khoai tây, dưa, ớt, thuốc lá v.v. là loại bệnh có biểu hiện héo rũ nhanh chóng lá, cành và thân của cây bị nhiễm bệnh trong lúc các bộ phận này vẫn giữ được màu xanh. Cắt ngang thân cây bị bệnh và nhúng vào cốc nước lọc sau 1 đến 2 phút sẽ xuất hiện dòng chảy màu trắng sữa của vi khuẩn gây bệnh.
- 2.2. Quan hệ đối kháng của vi sinh vật là mối quan hệ tương tác giữa các vi sinh vật trong cùng môi trường sống, trong đó một hoặc một nhóm vi sinh vật này bị một hoặc một nhóm vi sinh vật khác kìm hãm sự phát triển hoặc bị tiêu diệt thông qua các sản phẩm trao đổi chất độc hại của chúng như chất kháng sinh, axit hữu cơ, enzym, các chất ức chế có tác động kìm hãm phản ứng trao đổi chất v.v. hoặc sự cạnh tranh về nơi cư trú, về chất dinh dưỡng.
- 2.3. Vi sinh vật đối kháng là khái niệm để chỉ một hoặc một nhóm các vi sinh vật có quan hệ đối kháng với một hoặc một nhóm vi sinh vật khác.
- 2.4. Vi sinh vật đối kháng vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh cây trồng cạn là các vi sinh vật có khả năng tiêu diệt hoặc hạn chế mật độ quần thể hoặc làm mất hay giảm độc tính gây bệnh héo xanh của vi khuẩn *R. solanacearum* trên cây trồng. Vi sinh vật đối kháng vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh cây trồng phải tạo được vòng vô khuẩn (vòng tròn trong suốt) bao quanh khuẩn lạc/cụm khuẩn lạc của vi sinh vật đó khi tiếp xúc với vi khuẩn *R. solanacearum* trên môi trường nuôi cấy đặc, đồng thời làm giảm được tỷ lệ bệnh do vi khuẩn gây ra trên cây chủ.
- 2.5. Hoạt tính đối kháng của vi sinh vật đối kháng vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh cây trồng là khả năng tiêu diệt hoặc hạn chế mật độ quần thể hoặc làm mất hay giảm độc tính gây bệnh héo xanh của vi khuẩn *R. solanacearum* trên cây trồng.

3. Nội dung của 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 1,6 bar (tương đương nhiệt độ khử trùng 121°C).
- Tủ sấy: Nhiệt độ từ 40°C đến 260°C.

3.1.1.2. Thiết bị nuôi cấy vi sinh vật:

- Tủ ấm: Nhiệt độ tối đa 60°C.
- Bồn 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: 50-200µl; 200-1000µl; 500-5000µl

3.1.1.4. Máy cất nước 2 lần.

3.1.1.5. Dụng cụ thủy tinh

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

3.1.2. Hoá chất (Đức hoặc Pháp)

- TZC (2,3,5- triphenyl tetrazolium chloride)
- Dịch thủy phân Cazein (Casein hydrolysate)
- Cao nấm men
- Cao thịt
- Pepton
- Sacharoza
- Glucoza
- Tinh bột tan
- MgSO_4
- KNO_3
- NaNO_3
- KCl
- NaCl
- FeSO_4
- K_2HPO_4
- KH_2PO_4
- HCl
- NaOH

3.1.3. Chuẩn bị

3.1.3.1. Khử trùng dụng cụ

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 cách sấy ở nhiệt độ 170°C - 175°C không ít hơn 1 giờ trong tủ sấy hoặc giữ ở áp suất 1,0 Atmophe (tương đương 121°C) không ít hơn 30 phút trong nồi hấp khử trùng.

3.1.3.2. Môi trường nuôi cấy

a. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn héo xanh (*R. solanacearum*):

- Môi trường đặc hiệu: Môi trường TZC-aga

Thành phần môi trường (gam/lít)

Pepton:	10,00
Casein hydrolysate:	1,00
Glucose:	5,00
TZC:	0,05 *
Thạch:	15,00
Nước cất:	1 lít

(* Bổ sung 1ml dịch 0,5 % TZC vô trùng trong 100 ml môi trường đã khử trùng trước khi đổ ra đĩa petri).

- Môi trường nuôi cấy tăng sinh khối: Môi trường SPA

Thành phần môi trường (gam/lít)

Pepton:	5,00
Sacharoza:	20,00
K ₂ H PO ₄ :	0,50
MgSO ₄ .7H ₂ O:	0,25
Thạch:	15,00
Nước cất:	1 lít

pH: 7,2-7,4

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

b. Môi trường nuôi cấy vi sinh vật đối kháng:

Trong trường hợp đã biết rõ loài vi sinh vật đối kháng cần xác định hoạt tính, 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 hoạt tính, lựa chọn một trong các môi trường nuôi cấy như sau:

- 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)

- Môi trường nuôi cấy nấm: Môi trường Czapek

Thành phần môi trường (gam/lít)

NaNO ₃ :	3,0
Sacharoza:	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)

- 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)

3.1.3.3. Huyền phù vi sinh vật:

a. Dịch vi khuẩn R. solanacearum:

Cấy giống: Lựa chọn những khuẩn lạc có độc tính cao trên môi trường TZC (khuẩn lạc có tâm màu hồng, mép xung quanh màu trắng đục, nhầy) từ chủng vi khuẩn có độc tính đã được kiểm tra khả năng gây bệnh héo xanh trên cây trồng, cấy chuyển vào môi trường SPA. Nuôi cấy trên máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút trong thời gian 2 ngày ở nhiệt độ 28°C -30°C. Mật độ vi khuẩn cần đạt 10⁹-10¹⁰CFU/ml.

Pha loãng mẫu: Dùng micropipet vô trùng lấy ra 10ml dịch vi khuẩn R.solanacearum đưa vào bình thủy 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 huyền phù cho vào ống nghiệm chứa 9 ml nước muối sinh lý vô trùng, trộn đều bằng thiết bị lắc cơ học. Quá trình này được lặp lại cho đến khi được huyền phù vi khuẩn có mật độ đạt 10⁶-10⁷ CFU/ml.

b. Dịch vi sinh vật đối kháng:

Vi sinh vật đối kháng được nuôi cấy trong môi trường (mục 3.1.3.2.b) ở điều kiện nhiệt độ, pH và thời gian thích hợp với từng loài sao cho mật độ sau nuôi cấy cần đạt 10⁹-10¹⁰ CFU/ml.

3.1.4. Tiến hành

3.1.4.1. Cấy mẫu vi khuẩn R. solanacearum

Dùng micropipet vô trùng hút 0,05ml từ huyền phù vi khuẩn *R. solanacearum* (mục 3.1.3.3.a) cấy vào đĩa petri chứa 20ml môi trường SPA-aga đã chuẩn bị sẵn.

Lắc nhẹ đĩa petri cho dịch vi khuẩn tràn đều trên bề mặt thạch, dùng que gạt vô trùng gạt đều cho đến khi dịch vi khuẩn thấm hoàn toàn trên bề mặt thạch. Chú ý không để dịch vi khuẩn dính vào thành đĩa petri.

Đợi 20-30 phút cho bề mặt thạch khô, dùng ống thép vô trùng đường kính khoảng 1cm khoan lỗ thạch ở phần tâm của đĩa petri, loại bỏ phần thạch vừa khoan. Lưu ý dùng que cấy vô trùng có mũi nhọn tách và gạt nhẹ nhàng thời thạch, tránh làm vỡ hoặc chạm vào bề mặt thạch xung quanh lỗ đục.

Mỗi mẫu lặp lại 3 lần.

3.1.4.2. Cấy mẫu vi sinh vật đối kháng

Dùng pipet vô trùng hút 0,05ml dịch vi sinh vật đối kháng đưa vào lỗ khoan đã chuẩn bị ở trên (mục 3.1.4.1), giữ ở điều kiện nhiệt độ từ 30°C đến 37°C và thời gian từ 48 đến 72 giờ tùy thuộc vào loài vi sinh vật cần xác định hoạt tính. Lưu ý trong quá trình chuyển dịch mẫu cần giữ cho các đĩa petri trên mặt phẳng, không để dịch vi sinh vật đối kháng tràn trên bề mặt đĩa thạch.

3.1.5. Đọc kết quả

Hoạt tính đối kháng của vi sinh vật đối kháng được thể hiện thông qua vòng vô khuẩn (vòng tròn trong suốt bao quanh lỗ khoan chứa dịch 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:

$$\text{Kích thước vòng vô khuẩn (mm)} = D-d$$

Trong đó: D là đường kính vòng vô khuẩn (mm)

d là đường kính lỗ thạch (mm)

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.

3.2.2. Chuẩn bị

3.2.2.1. Đất trồng, hạt giống, phân bón

Thử nghiệm tiến hành trên đất khử trùng tại xấp có hàm lượng hữu cơ không nhỏ hơn 1,5% và bảo đảm có độ pH trong khoảng 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, miễn nhiễm với bệnh héo xanh vi khuẩn 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 vi khuẩn gây bệnh héo xanh (*R. solanacearum*)

Vi khuẩn héo xanh (*R. solanacearum*) được nuôi cấy trên môi trường thạch đĩa đặc hiệu (môi trường TZC-aga). Chọn những khuẩn lạc có độc tính cao (như mục 3.1.3.3), cấy truyền trên môi trường thạch nghiêng SPA và nuôi ở nhiệt độ 28-30°C.

Sau 48 giờ, chuyển toàn bộ sinh khối từ ống giống vào 5 ml nước cất vô trùng. Trộn đều hỗn hợp và pha loãng trong nước cất vô trùng để đạt được mật độ 6×10^8 CFU/ml.

b. Dịch vi sinh vật đối kháng

Vi sinh vật đối kháng được chuẩn bị theo mục 3.1.3.3.b

3.2.3. Tiến hành

3.2.3.1. Bố trí thử nghiệm

Thử nghiệm được tiến hành với 2 công thức: Đối chứng (nhiễm vi khuẩn *R. solanacearum*) và thí nghiệm (nhiễm hỗn hợp vi sinh vật đối kháng với vi khuẩn *R. solanacearum*). 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 10^8 CFU/g đối với công thức thí nghiệm.

Ngâm hạt hoặc củ giống trong dịch vi khuẩn gây bệnh héo xanh (*R. solanacearum*) đã được chuẩn bị trong thời gian 30 phút.

Gieo trồng hạt hoặc củ đã nhiễm vi khuẩn gây bệnh héo xanh (*R. solanacearum*) 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 và đảm bảo sự phát triển, phát sinh của bệnh héo xanh vi khuẩn, trong đó sử dụng nước vô trùng để giữ ẩm độ tương đối (RH) không nhỏ hơn 85% và điều khiển nhiệt độ đạt từ 25°C đến 32°C.

Trong thời gian 30 ngày kể từ khi gieo trồng, phải quan sát và ghi nhận hàng ngày tình trạng sức khỏe của cây trồng (không có triệu chứng bệnh hoặc có triệu chứng bệnh từ mức có một lá héo rũ đến toàn cây bị héo rũ).

3.2.4. Tính toán kết quả

% cây bị bệnh được tính theo công thức:

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

(Số cây bị bệnh được tính là tất cả các cây có ít nhất một lá bị héo rũ)

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	10-30	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