

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 9300:2014**

Xuất bản lần 1

**VI SINH VẬT – PHƯƠNG PHÁP ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ĐỐI  
KHÁNG CỦA VI SINH VẬT ĐỐI KHÁNG VỚI VI KHUẨN  
RALSTONIA SOLANACEARUM SMITH GÂY BỆNH HÉO  
XANH TRÊN CÂY TRỒNG CẠN**

*Microorganisms – Determination of the antagonistic activity to Ralstonia solanacearum  
Smith causing bacteria wilt disease of upland plant*

**HÀ NỘI – 2014**



## Lời nói đầu

TCVN 9300:2014 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.



**Vi sinh vật – Phương pháp đánh giá hoạt tính đối kháng của  
vi sinh vật đối kháng với vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*  
Smith gây bệnh héo xanh trên cây trồng cạn**

*Microorganisms – Determination of the antagonistic activity to *Ralstonia solanacearum*  
Smith causing bacteria wilt disease of upland plant*

## 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này áp dụng cho việc xác định hoạt tính đối kháng của các vi sinh vật đối kháng (được phân lập từ các nguồn khác nhau) với vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith gây bệnh héo xanh trên cây trồng cạn.

## 2 Thuật ngữ, định nghĩa

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

### 2.1

**Vi sinh vật đối kháng với vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith gây bệnh héo xanh trên cây trồng cạn** (antagonistic microorganisms to *Ralstonia solanacearum* Smith causing bacteria wilt disease of upland plant)

Các vi sinh vật có khả năng tiêu diệt hoặc ức chế sự phát triển hay làm mất hoặc giảm độc tính gây bệnh héo xanh của vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith trên cây trồng cạn.

### 2.2

**Hoạt tính đối kháng của vi sinh vật đối kháng với vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith gây bệnh héo xanh trên cây trồng cạn** (antagonistic activity microorganisms to *Ralstonia solanacearum* Smith causing bacteria wilt disease of upland plant)

Khả năng của vi sinh vật:

- tạo được vòng đối kháng (vòng trong suốt) bao quanh khuẩn lạc/cụm khuẩn lạc của vi sinh vật đó khi tiếp xúc với vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith gây bệnh héo xanh khi nuôi cấy trên môi trường nhân tạo và
- làm giảm được tỷ lệ cây trồng bị bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith gây ra.

**2.3**

**Cây bị bệnh (disease plant)**

Cây có ít nhất một lá cây bị bệnh héo xanh vi khuẩn

**3 Môi trường nuôi cấy**

Có thể sử dụng các môi trường có bán sẵn trên thị trường hoặc môi trường dưới đây:

**3.1 Thành phần môi trường**

**3.1.1 Môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Rastonia solanacearum* Smith**

Môi trường SP (Sucrose Peptone)

Xem A.1 của Phụ lục A.

**3.1.2 Môi trường nuôi cấy vi sinh vật đối kháng**

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.

**3.1.2.1 Môi trường nuôi cấy vi khuẩn**

Môi trường Thịt – Pepton

Xem A.2 của Phụ lục A.

**3.1.2.2 Môi trường nuôi cấy nấm sợi**

- Môi trường Czapeck – Dox

Xem A.3 của Phụ lục A.

- Môi trường PD (Potato Dextrose)

Xem A.4 của Phụ lục A.

**3.1.2.3 Môi trường nuôi cấy xạ khuẩn**

- Môi trường Gauze

Xem A.5 của Phụ lục A.

- Môi trường ISP – 4 (Inorganic Salts Starch – 4)

Xem A.6 của Phụ lục A.

**3.2 Cách chuẩn bị**

Cân và hòa tan các thành phần môi trường trong nước cất theo thứ tự đã cho (3.1).

### 3.2.1 Môi trường dịch thể

Phân phối môi trường (3.1) vào bình tam giác (4.2.1), đậy nút bông, khử trùng 30 min ở 121 °C trong nồi hấp áp lực (4.1.2).

### 3.2.2 Môi trường thạch đĩa

Phân phối môi trường (3.1) vào bình tam giác (4.2.1), đậy nút bông, khử trùng 30 min ở 121 °C trong nồi hấp áp lực (4.1.2), làm nguội đến 50 °C, phân phối các lượng từ 15 ml đến 20 ml môi trường vào các đĩa Petri (4.2.4) đã chuẩn bị sẵn (4.4); tiến hành trong tủ cấy vô trùng (4.1.1).

### 3.3 Dung dịch pha loãng

Dung dịch pha loãng là nước muối sinh lý (NaCl 0,85 %), pH = 7, không chứa các hợp chất nitơ;

Lấy 9 ml dịch pha loãng cho vào các ống nghiệm (4.2.5) hoặc 90 ml dịch pha loãng cho vào các bình tam giác (4.2.1), đậy nút bông và khử trùng ở 121 °C không ít hơn 20 min trong nồi hấp áp lực (4.1.2).

## 4 Thiết bị, dụng cụ và vật tư

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ, vật tư thông thường trong phòng thí nghiệm, nhà lưới và cụ thể như sau:

### 4.1 Thiết bị

4.1.1 Tủ cấy vô trùng, vận tốc dòng khí trung bình 0,79 m/s, lưu lượng khí 1204 m<sup>3</sup>/h, màng lọc ULPA với kích thước hạt từ 0,1 µm đến 0,3 µm.

4.1.2 Nồi hấp áp lực, giữ được áp suất ổn định ở 101,3 kPa, nhiệt độ 121 °C.

4.1.3 Tủ sấy, nhiệt độ từ 40 °C đến 260 °C.

4.1.4 Tủ ấm, nhiệt độ từ 20 °C đến 60 °C.

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

4.1.6 Cân phân tích, có độ chính xác đến 0,1 mg.

4.1.7 Cân kỹ thuật, có độ chính xác đến 0,01 g.

4.1.8 Máy đo pH, từ 0 pH đến 14 pH.

4.1.9 Máy trộn Vortex, tốc độ lắc đạt 1000 r/min.

### 4.2 Dụng cụ

4.2.1 Bình tam giác, dung tích 250 ml.

4.2.2 Cốc thủy tinh, dung tích 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml.

4.2.3 Cốc định lượng, dung tích 100 ml và 500 ml.

4.2.4 Đĩa Petri, đường kính 90 mm.

## TCVN 9300:2014

4.2.5 Ống nghiệm, 18 mm x 180 mm.

4.2.6 Que cấy.

4.2.7 Que gạt mẫu (bàn trang).

4.2.8 Pipet (Micropipet), có thể lấy các thể tích 0,1 ml và 1 ml.

### 4.3 Vật tư

4.3.1 Đất, tơi xốp, có hàm lượng hữu cơ không nhỏ hơn 1,5 % và pH từ 6,0 đến 6,5.

4.3.2 Hạt hoặc củ giống, là hạt hoặc củ giống sạch, giống miễn cảm trung bình với bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith gây ra.

4.3.3 Chậu vại trồng cây, là nhựa trung tính hoặc gốm.

### 4.4 Chuẩn bị dụng cụ

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 một trong hai phương pháp sau:

+ Khử trùng khô: Giữ ở nhiệt độ 180 °C không ít hơn 1 h trong tủ sấy (4.1.3) hoặc;

+ Khử trùng ướt: Giữ ở nhiệt độ 121 °C không ít hơn 30 min trong nồi hấp áp lực (4.1.2).

### 4.5 Chuẩn bị vật tư

4.5.1 Đất: Tiệt trùng bằng phương pháp khử trùng ngưng đoạn [khử trùng 3 ngày liên tiếp ở 121 °C, mỗi lần không ít hơn 20 min trong nồi hấp áp lực (4.1.2)].

4.5.2 Chậu vại: Tiệt trùng bằng cồn 96°.

4.5.3 Hạt giống: Khử trùng bề mặt bằng cách ngâm trong dung dịch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 %, thời gian từ 3 min đến 4 min, sau đó rửa sạch từ 2 lần đến 3 lần bằng nước vô trùng.

4.5.4 Chủng vi sinh vật kiểm định: Chủng *Ralstonia solanacearum* Smith gây bệnh héo xanh cây trồng cạn.

## 5. Tiến hành

### 5.1 Nuôi cấy vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith gây bệnh héo xanh

Lấy một vòng que cấy vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith gây bệnh héo xanh (4.5.4) cấy vào môi trường dịch thể SP đã chuẩn bị sẵn (3.2.1). Nuôi cấy lắc trong thời gian 48 h, ở nhiệt độ từ 28 °C đến 30 °C; đảm bảo mật độ tế bào vi khuẩn không nhỏ hơn 10<sup>8</sup> CFU/ml.

Dùng pipet vô trùng lấy 10 ml dịch vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith gây bệnh héo xanh cho vào bình tam giác chứa 90 ml dung dịch pha loãng đã chuẩn bị sẵn (3.3), trộn kỹ bằng máy lắc (4.1.5) hay máy trộn Vortex (4.1.9). Dùng pipet vô trùng tiếp tục lấy 1 ml dung dịch huyền phù cho vào ống nghiệm



chứa 9 ml dung dịch pha loãng đã chuẩn bị sẵn (3.3), trộn kỹ bằng máy trộn Vortex (4.1.9). Tiếp tục pha loãng để thu được dịch huyền phù có mật độ tế bào vi khuẩn đạt  $10^6$  CFU/ml.

Tiến hành trong tủ cấy vô trùng (4.1.1).

## 5.2 Nuôi cấy vi sinh vật đối kháng

Lấy một vòng que cấy vi sinh vật cho vào bình tam giác chứa môi trường dịch thể thích hợp đã chuẩn bị sẵn (3.2.1).

Nuôi cấy trong điều kiện thích hợp (từ 28 °C đến 30 °C không ít hơn 2 ngày đối với vi khuẩn, từ 28 °C đến 30 °C không ít hơn 3 ngày đối với nấm sợi và từ 35 °C đến 37 °C không ít hơn 5 ngày đối với xạ khuẩn); đảm bảo mật độ tế bào vi khuẩn không nhỏ hơn  $10^8$  CFU/ml.

## 5.3 Xác định hoạt tính đối kháng của vi sinh vật đối kháng

### 5.3.1 Xác định hoạt tính đối kháng của vi sinh vật đối kháng thông qua kích thước vòng đối kháng

#### 5.3.1.1 Cấy mẫu

Dùng pipet vô trùng lấy 0,1 ml dịch vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith gây bệnh héo xanh (5.1) cấy vào đĩa Petri chứa môi trường SP đã chuẩn bị sẵn (3.2.2). Dùng que gạt vô trùng gạt đều cho đến khi dung dịch huyền phù vi khuẩn thấm đều trên bề mặt thạch. Đợi từ 20 min đến 30 min cho bề mặt thạch khô, dùng ống thép vô trùng đường kính khoảng 1 cm đục lỗ thạch ở phần tâm của đĩa Petri. Dùng que cấy vô trùng có mũi nhọn loại bỏ phần thạch vừa đục.

Dùng pipet vô trùng lấy 0,1 ml dịch vi sinh vật đối kháng (5.2) đưa vào các giếng đã được loại bỏ thỏi thạch, giữ ở điều kiện thích hợp tùy thuộc từng chủng giống vi sinh vật đối kháng (từ 28 °C đến 30 °C không ít hơn 2 ngày đối với vi khuẩn, từ 28 °C đến 30 °C không ít hơn 3 ngày đối với nấm sợi và từ 35 °C đến 37 °C không ít hơn 5 ngày đối với xạ khuẩn).

Mỗi mẫu được cấy lặp lại không ít hơn 3 lần. Tiến hành trong tủ cấy vô trùng (4.1.1).

#### CHÚ THÍCH:

- 1) Không để dịch vi khuẩn dính vào thành đĩa Petri
- 2) Cần giữ cho các đĩa Petri trên mặt phẳng để tránh dịch vi sinh vật đối kháng tràn trên bề mặt đĩa thạch.

#### 5.3.1.2 Tính kết quả

Hoạt tính đối kháng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith gây bệnh héo xanh của vi sinh vật thể hiện thông qua kích thước vòng đối kháng (vòng trong suốt bao quanh giếng chứa dịch vi sinh vật đối kháng).

Kích thước vòng đối kháng (mm) của vi sinh vật được tính theo công thức (1):

$$\text{Kích thước vòng đối kháng (mm)} = D - d \quad (1)$$

## TCVN 9300:2014

trong đó:

D là đường kính vòng đối kháng, tính bằng milimet (mm);

d là đường kính lỗ giếng, tính bằng milimet (mm).

Kết quả là giá trị trung bình cộng của các lần lặp lại.

### 5.3.2 Xác định hoạt tính đối kháng của vi sinh vật thông qua tỷ lệ cây trồng bị bệnh

#### 5.3.2.1 Bố trí thử nghiệm

Thử nghiệm được tiến hành trong chậu vại (4.5.2) với 2 công thức:

Công thức đối chứng: Nhiễm vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith gây bệnh héo xanh

Công thức thí nghiệm: Nhiễm vi sinh vật đối kháng và vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith gây bệnh héo xanh.

Mỗi công thức được lặp lại không ít hơn 3 lần với tổng số cây không ít hơn 50 cây.

#### 5.3.2.2 Tiến hành thử nghiệm

Bước tiến hành	Công thức đối chứng	Công thức thí nghiệm
Bước 1	Nhiễm môi trường dịch thể đã chuẩn bị sẵn (3.2.1) 30 min trước khi gieo (trồng), lượng tương đương với lượng nhiễm vi sinh vật đối kháng (5.2) ở công thức thí nghiệm.	Nhiễm dịch vi sinh vật đối kháng (5.2) vào đất đã được khử trùng (4.5.1) 30 min trước khi gieo (trồng); đảm bảo mật độ tế bào vi sinh vật không nhỏ hơn $10^6$ CFU/g đất.
Bước 2	Ngâm hạt hoặc củ giống (4.5.3) trong dịch vi khuẩn <i>Ralstonia solanacearum</i> Smith gây bệnh héo xanh (5.1) có mật độ tế bào không nhỏ hơn $10^8$ CFU/ml trong thời gian 30 min.	Ngâm hạt hoặc củ giống (4.5.3) trong dịch vi khuẩn <i>Ralstonia solanacearum</i> Smith gây bệnh héo xanh (5.1) có mật độ tế bào không nhỏ hơn $10^8$ CFU/ml trong thời gian 30 min.
Bước 3	Gieo/trồng hạt/củ đã nhiễm vi khuẩn <i>Ralstonia solanacearum</i> Smith gây bệnh héo xanh vào đất đã chuẩn bị.	Gieo/trồng hạt/củ đã nhiễm vi khuẩn <i>Ralstonia solanacearum</i> Smith gây bệnh héo xanh vào đất đã chuẩn bị.

Thí nghiệm được chăm sóc theo qui trình phù hợp với từng đối tượng cây chủ; đảm bảo sự phát sinh, phát triển của vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith gây bệnh héo xanh, độ ẩm tương đối (RH) không nhỏ hơn 70 % (sử dụng nước vô trùng để giữ ẩm độ) và nhiệt độ đạt từ 25 °C đến 30°C;

Quan sát và theo dõi triệu chứng héo của cây sau 5 ngày đến 21 ngày gieo trồng, ghi lại những đánh giá về tình trạng mắc bệnh héo xanh của cây trồng (có hoặc không có triệu chứng mắc bệnh).

CHÚ THÍCH: Thử nghiệm phải bảo đảm hạn chế tối đa ảnh hưởng của các yếu tố phi thí nghiệm.

### 5.3.2.3 Tính kết quả

Tỷ lệ cây bị bệnh (%) được tính theo công thức (2):

$$\text{Tỷ lệ cây bị bệnh (\%)} = \frac{\text{Số cây bị bệnh}}{\text{Số cây điều tra}} \times 100 \quad (2)$$

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 nêu trong Bảng 1.

**Bảng 1 – Mức độ hoạt tính đối kháng của vi sinh vật**

Tỷ lệ cây bị bệnh (%)	Cấp độ đối kháng	Mức độ hoạt tính đối kháng
Không lớn hơn 30	1	Cao
Từ 31 đến 50	2	Khá
Từ 51 đến 70	3	Trung bình
Từ 71 đến 80	4	Yếu
Không nhỏ hơn 81	5	Không có

## 6 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm cần bao gồm đầy đủ 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;
- tất 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;
- các kết quả thử nghiệm thu được;
- nếu độ lặp lại được kiểm tra, thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

## Phụ lục A

(Qui định)

## Thành phần môi trường nuôi cấy

## A.1 Môi trường SP (Sucrose – Peptone)

Sacaroza ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ )	20,0 g
Pepton	5,0 g
Dikali hydro phosphat ( $K_2HPO_4$ )	0,5 g
Magie sulphat ngậm bảy phân tử nước ( $MgSO_4.7H_2O$ )	0,25 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	6,8 đến 7,0

CHÚ THÍCH: Nếu môi trường thạch đĩa thì bổ sung 20,0 g thạch.

## A.2 Môi trường Thịt – Pepton

Chất chiết thịt bò	5,0 g
Pepton	10,0 g
Natri clorua ( $NaCl$ )	5,0 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	6,8 đến 7,0

## A.3 Môi trường Czapek – Dox

Sacaroza ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ )	30,0 g
Natri nitrat ( $NaNO_3$ )	2,0 g
Kali clorua ( $KCl$ )	1,0 g
Kali dihydro phosphat ( $KH_2PO_4$ )	1,0 g
Magie sulphat ngậm bảy phân tử nước ( $MgSO_4.7H_2O$ )	0,5 g
Sắt sulphat ngậm bảy phân tử nước ( $FeSO_4.7H_2O$ )	0,01 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	6,0 đến 6,5

CHÚ THÍCH:

- 1) pH môi của trường được điều chỉnh bằng axit axetic 1N
- 2) Nếu môi trường thạch đĩa thì bổ sung 20,0 g thạch.

**A.4 Môi trường PD (Potato Dextrose)**

Dextrose ( $C_6H_{12}O_6$ )	20,0 g
Khoai tây*	200,0 g
Thạch	20,0 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	6,0 đến 6,5

**CHÚ THÍCH:**

- 1) Khoai tây thái nhỏ, cho vào 1 lít nước và đun sôi trong 20 min; sau đó lọc lấy nước trong để sử dụng làm môi trường;
- 2) pH môi của trường được điều chỉnh bằng axit axetic 1N;
- 3) Nếu môi trường thạch nghiêng hoặc thạch đĩa thì bổ sung 20,0 g thạch.

**A.5 Môi trường Gauze**

Tinh bột tan ( $C_6H_{10}O_5$ ) <sub>n</sub> )	20,0 g
Kali nitrat ( $KNO_3$ )	1,0 g
Kali dihydro phosphat ( $KH_2PO_4$ )	0,5 g
Magie sulphat ngậm bảy phân tử nước ( $MgSO_4.7H_2O$ )	0,5 g
Natri clorua ( $NaCl$ )	0,5 g
Sắt sulphat ngậm bảy phân tử nước ( $FeSO_4.7H_2O$ )	0,01 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	7,0 đến 7,2

CHÚ THÍCH: Nếu môi trường thạch nghiêng hoặc thạch đĩa thì bổ sung 20,0 g thạch.

**A.6 Môi trường ISP- 4 (Inorganic Salts Starch – 4)**

Tinh bột tan ( $C_6H_{10}O_5$ ) <sub>n</sub> )	10,0 g
Kali dihydro phosphat ( $KH_2PO_4$ )	1,0 g
Magie sulphat ngậm bảy phân tử nước ( $MgSO_4.7H_2O$ )	1,0 g
Natri clorua ( $NaCl$ )	1,0 g
Amoni sulphat ( $(NH_4)_2SO_4$ )	2,0 g
Canxi cacbonat ( $CaCO_3$ )	1,0 g
Nước cất vừa đủ	1000 ml
pH	7,0 đến 7,2

CHÚ THÍCH: Nếu môi trường thạch nghiêng hoặc thạch đĩa thì bổ sung 20,0 g thạch.

**Thư mục tài liệu tham khảo**

- [1] 10 TCN 714:2006. Vi sinh vật - Phương pháp đánh giá hoạt tính đối kháng vi khuẩn gây bệnh héo xanh cây trồng cận *Ralstonia solanacearum* Smith.
-