

Lời nói đầu

TCVN 8566:2010 được chuyển đổi từ 10 TCN 867:2006 theo quy định tại khoản 1 Điều 69 của Luật Tiêu chuẩn và Quy chuẩn kỹ thuật và điểm a khoản 1 Điều 7 Nghị định số 127/2007/NĐ-CP ngày 1/8/2007 của Chính phủ quy định chi tiết thi hành một số điều của Luật Tiêu chuẩn và Quy chuẩn kỹ thuật.

TCVN 8566:2010 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 đánh giá hoạt tính đối kháng nấm gây bệnh vùng rễ cây trồng cạn

Biofertilizer – Determination of antagonistic activity of microbes to fungi causing soilborn diseases of upland plant

1 Phạm vi áp dụng

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

2 Tài liệu viện dẫn

TCVN 7185:2002, *Phân hữu cơ vi sinh vật*.

3 Thuật ngữ, định nghĩa

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

3.1 Vi sinh vật đối kháng nấm gây bệnh vùng rễ cây trồng cạn (antagonistic microbes to fungi causing soilborn diseases 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 của nấm gây bệnh vùng rễ cây trồng cạn.

3.2 Hoạt tính đối kháng của vi sinh vật đối kháng nấm gây bệnh vùng rễ cây trồng cạn (antagonistic activity microbes to fungi causing soilborn diseases of upland plant)

Khả năng của vi sinh vật:

- tạo được vòng đối kháng (vòng tròn trong suốt) bao quanh khuẩn lạc/cụm khuẩn lạc của nấm gây bệnh khi nuôi cấy trên môi trường nhân tạo và
- làm giảm được tỷ lệ cây bị bệnh do nấm bệnh vùng rễ gây ra không ít hơn 20 %.

4 Lấy mẫu

6 Môi trường nuôi cấy

- Môi trường PDA;
- Môi trường Thạch – Thịt – Pepton;
- Môi trường Czapeck hoặc Czapeck Dox;
- Môi trường Gauze hoặc ISP-4.

(xem Phụ lục A)

7 Cách tiến hành

7.1 Chuẩn bị thử

7.1.1 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 1 trong 2 cách sau:

- giữ ở nhiệt độ 180 °C không ít hơn 1 h trong tủ sấy (5.1.3) hoặc;
- giữ ở nhiệt độ 121 °C không ít hơn 30 min trong nồi hấp áp lực (5.1.2).

7.1.2 Vật tư

- Đất được khử trùng bằng phương pháp khử trùng ngưng đoạn [khử trùng 3 ngày liên tiếp ở 121 °C không ít hơn 20 min trong nồi hấp áp lực (5.1.2)].
- Hạt, củ giống được khử trùng bề mặt bằng cách ngâm trong dung dịch H₂O₂ 4 %, thời gian từ 3 min đến 4 min, sau đó rửa sạch 2 - 3 lần bằng nước vô trùng.

7.1.3 Dịch pha loãng

- Dung dịch pha loãng là nước muối sinh lý (NaCl 0,85 %), không chứa các hợp chất nitơ, sau khi khử trùng có độ pH là 7,0;
- Lấy dịch pha loãng cho vào các ống nghiệm, bình tam giác có dung tích thích hợp với một lượng sao cho sau khi khử trùng, mỗi ống nghiệm chứa 9 ml, mỗi bình tam giác chứa 90 ml. Làm nút bông và khử trùng ở 121 °C không ít hơn 20 min trong nồi hấp áp lực;

CHÚ THÍCH 1: Để tránh làm ảnh hưởng đến các vi sinh vật do thay đổi nhiệt độ đột ngột, nên điều chỉnh nhiệt độ của dịch pha loãng đến nhiệt độ phòng thử nghiệm trước khi sử dụng.

7.1.4 Dịch nấm gây bệnh

- Cây giống: Lựa chọn những bào tử của chủng nấm gây bệnh có độc tính đã được kiểm tra khả năng gây bệnh vùng rễ cây trồng, cấy trên thạch đĩa chứa môi trường PDA đã chuẩn bị

sẵn (xem Phụ lục A). Nuôi cấy trong thời gian khoảng 3 ngày đến 5 ngày ở nhiệt độ trong khoảng 28 °C đến 30 °C cho đến khi bào tử nấm mọc đầy trên đĩa thạch.

- Pha mẫu: Dùng que cấy vô trùng lấy bào tử nấm gây bệnh vùng rìa đưa vào dịch pha loãng đã chuẩn bị sẵn (xem 7.1.3), trộn kỹ bằng máy lắc hay máy trộn Vortex (5.1.9); mật độ bào tử không nhỏ hơn 10^8 CFU/ml.

7.1.5 Dịch mẫu

- Đối với mẫu dạng đặc: Cân 10 g mẫu chính xác đến 0,01 g và cho vào bình tam giác có sẵn 90 ml dịch pha loãng (7.1.3). Trộn kỹ bằng máy lắc hay máy trộn Vortex (5.1.9) từ 5 min đến 10 min sao cho vi sinh vật trong dung dịch phân bố đồng đều. Để cho các phần tử nặng lắng xuống trong thời gian không quá 15 min, gạn được dung dịch huyền phù ban đầu (a);
- Đối với mẫu dạng-lỏng: dùng pipet đã khử trùng lấy 10 ml mẫu cho vào bình tam giác có sẵn 90 ml dịch pha loãng (7.1.3), tránh chạm pipet vào dịch pha loãng. Trộn kỹ bằng máy lắc hay máy trộn Vortex (5.1.9) từ 5 min đến 10 min sao cho vi sinh vật trong dung dịch phân bố đồng đều. Dung dịch tạo ra được gọi là dung dịch huyền phù ban đầu (b);
- Dùng một micropipet đã vô trùng lấy 1 ml dịch huyền phù ban đầu (a hoặc b) cho vào ống nghiệm có sẵn chứa 9 ml dịch pha loãng (7.1.3), tránh chạm pipet vào dịch pha loãng, trộn đều bằng máy trộn Vortex (5.1.9) để có dịch pha loãng mẫu có nồng độ pha loãng là 10^{-2} . Quá trình này được lặp lại liên tục để có dịch mẫu có nồng độ pha loãng 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} .

7.2 Xác định mật độ vi sinh vật đối kháng

7.2.1 Cấy mẫu

- Dùng micropipet đã vô trùng hút 0,1 ml dịch nấm gây bệnh (7.1.4) cấy vào đĩa petri (5.2.4) chứa 30 ml môi trường PDA (lớp thạch thứ nhất) đã chuẩn bị sẵn;
- Lắc nhẹ đĩa petri cho dịch nấm gây bệnh tràn đều trên bề mặt thạch, dùng que gạt vô trùng gạt đều cho đến khi dịch nấm gây bệnh thấm hoàn toàn trên bề mặt thạch. Chú ý không để dịch nấm gây bệnh dính vào thành đĩa petri;
- Sau khi bề mặt thạch khô (khoảng 4 h), phủ tiếp khoảng 15 ml đến 20 ml môi trường thích hợp với vi sinh vật đối kháng (lớp thạch thứ hai) lên lớp thạch thứ nhất đã cấy nấm gây bệnh. Các đĩa thạch được để khô trong 45 min;

CHÚ THÍCH 2 Nhiệt độ của môi trường khi phủ lên trên lớp thạch thứ nhất từ 35 °C đến 45 °C. Độ dày của lớp thạch thứ hai từ 2 mm đến 3 mm

- Dùng micropipet đã vô trùng hút 0,1 ml dịch mẫu (xem 7.1.5) cấy lên bề mặt lớp thạch thứ hai. Lắc nhẹ đĩa petri cho dịch mẫu tràn đều trên bề mặt thạch, dùng que gạt vô trùng gạt đều cho

đến khi dịch mẫu thấm hoàn toàn trên bề mặt lớp thạch thứ hai. Chú ý không để dịch mẫu dịch vào thành đĩa petri;

- Các đĩa thạch được nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ khoảng 28 °C đến 32 °C trong thời gian từ 3 ngày đến 5 ngày;
- Mỗi mẫu lặp lại từ 3 đến 5 lần.

7.2.2 Tính kết quả

- Vi sinh vật có hoạt tính đối kháng được tính là số khuẩn lạc tạo được vòng đối kháng (vòng trong suốt) bao quanh khuẩn lạc;
- Mật độ vi sinh vật đối kháng trong một đơn vị kiểm tra được tính bằng gam hay mililit, theo công thức (1).

$$N = \frac{\sum C}{d(n_1 + 0,1n_2)} \quad (1)$$

trong đó:

- N là số vi sinh vật đối kháng trong một đơn vị kiểm tra (được tính bằng CFU trên gam hay mililit);
- $\sum C$ là tổng số khuẩn lạc đặc trưng đếm được trên tất cả các đĩa petri được giữ lại;
- n_1 là số đĩa được giữ lại ở độ pha loãng thứ nhất;
- n_2 là số đĩa được giữ lại ở độ pha loãng thứ hai;
- d là hệ số pha loãng tương ứng với độ pha loãng thứ nhất.

CHÚ THÍCH 3:

- 1) Giữ lại các đĩa có chứa không quá 300 khuẩn lạc ở hai độ pha loãng kế tiếp nhau và điều cần thiết là một trong các đĩa này có chứa ít nhất 15 khuẩn lạc;
- 2) Làm tròn kết quả đến hai chữ số có nghĩa;
- 3) Biểu thị mật độ vi sinh vật trên một đơn vị kiểm tra bằng cách lấy một trong các giá trị từ 1,00 đến 9,99 nhân với 10^x , trong đó x là số mũ của 10.

7.3 Xác định hoạt tính đối kháng của vi sinh vật đối kháng

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

7.3.1.1 Cấy mẫu (xem 7.2.1)

7.3.1.2 Tính kết quả

Hoạt tính đối kháng của vi sinh vật đối kháng thể hiện thông qua kích thước vòng đối kháng (vòng tròn trong suốt bao quanh khuẩn lạc), tính bằng mm theo công thức (2):

$$\text{Kích thước vòng đối kháng} = D - d \quad (2)$$

trong đó

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

d là đường kính khuẩn lạc, tính bằng mm.

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

7.3.2 Xác định hoạt tính đối kháng của vi sinh vật đối kháng thông qua tỷ lệ cây bệnh

7.3.2.1 Tiến hành thử nghiệm

- Thử nghiệm được tiến hành với 2 công thức: Đối chứng (nhiễm nấm gây bệnh), thí nghiệm (nhiễm phân bón vi sinh vật và nấm gây bệnh). Mỗi công thức được lặp lại không ít hơn 3 lần với tổng số cây không ít hơn 50 cây;
- Phân bón vi sinh vật được bón vào đất vô trùng trước khi gieo trồng, đảm bảo mật độ vi sinh vật đối kháng đạt 10^6 CFU/g đất;
- Ngâm hạt hoặc củ giống trong dịch nấm gây bệnh mật độ 10^8 CFU/ml trong thời gian 30 min;
- Gieo (trồng) hạt (hoặc củ) đã nhiễm nấm gây bệnh vào đất đối với công thức đối chứng và đất đã được nhiễm phân bón vi sinh vật 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 nhiệt độ đạt từ 25 °C đến 30 °C;
- Trong thời gian từ 30 đến 45 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).

CHÚ THÍCH 4 Thử nghiệm phải bảo đảm hạn chế tối đa ảnh hưởng của các yếu tố phi thí nghiệm.

7.3.2.2 Tính kết quả

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

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

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
1. Không lớn hơn 30	1	Cao
2. Từ 31 đến 50	2	Khá
3. Từ 51 đến 70	3	Trung bình
4. Từ 71 đến 80	4	Yếu
5. Không nhỏ hơn 80	5	Không có

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;
- 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
(Tham khảo)

Môi trường nuôi cấy

A.1 Môi trường nuôi cấy nấm bệnh: Môi trường PDA

Dextrose	20,0 g
Khoai tây	20,0 g
Thạch	20,0 g
Nước	1000 ml
pH	6,7 đến 6,8

CHÚ THÍCH A 1:

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

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

A.2.1 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.

A.2.2 Trường hợp chưa biết chính xác vi sinh vật cần xác định thì lựa chọn một trong các môi trường nuôi cấy như sau.

A.2.2.1 Môi trường nuôi cấy vi khuẩn

Môi trường Thạch- Thịt-Pepton

Pepton	10,0 g
Các thịt	3,0 g
Thạch	20,0 g
Nước	1000 ml
pH	6,5 đến 7,5

CHÚ THÍCH A.2: pH môi trường được điều chỉnh bằng HCl 1N hoặc NaOH 1N

A.2.2.2 Môi trường nuôi cấy nấm

A.2.2.2.1 Môi trường Czapek

NaNO ₃	3,0 g
Sacaroza	30,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Thạch	20,0 g
Nước	1000 ml
pH	6,0 đến 6,5

CHÚ THÍCH A.3: pH môi trường được điều chỉnh bằng HCl 1N hoặc NaOH 1N

A.2.2.2.2 Môi trường Czapek-Dox

NaNO ₃	2,0 g
KCl	1,0 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
Thạch	20,0 g
Nước	1000 ml
pH	6,0 đến 6,5

A.2.2.3 Môi trường nuôi cấy xạ khuẩn

A.2.2.3.1 Môi trường Gauze

Tinh bột tan	20,0 g
KNO ₃	1,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
NaCl	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g

Thạch	20,0 g
Nước	1000 ml
pH	7,0 đến 7,2

CHÚ THÍCH A.4: pH môi trường được điều chỉnh bằng HCl 1N hoặc NaOH 1N.

A.2.2.3.2 Môi trường ISP-4

Tinh bột tan	10,0 g
KH_2PO_4	1,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0 g
NaCl	1,0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0 g
CaCO_3	1,0 g
Thạch	15,0 g
Nước	1000 ml
pH	7,0 đến 7,2

CHÚ THÍCH A.5: 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.