

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN TỪ ĐẤT VÙNG RỄ ỚT CÓ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG VỚI NẤM *Colletotrichum* SP. GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN ỚT

Nguyễn Thị Liên, Nguyễn Thị Yên Như, Trần Thị Xuân Mai và Nguyễn Thị Pha

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 26/04/2016

Ngày chấp nhận: 23/12/2016

Title:

Isolation and selection of antagonistic bacteria from rhizosphere soil against *Colletotrichum* sp. causing anthracnose on chilli

Từ khóa:

Colletotrichum sp., đặc tính đối kháng, định danh, ớt, vi khuẩn đối kháng, vùng gen 16S-rDNA

Keywords:

Antagonistic characteristics, antagonistic bacteria, *Colletotrichum* sp., identification, 16S-rDNA region

ABSTRACT

This study was conducted with the aim to isolate bacterial strains capable of antagonism to *Colletotrichum* sp. causing anthracnose on chilli. From 18 soil samples collected in the rhizosphere of chilli grown in Can Tho, Dong Thap, and Tien Giang province, 341 bacterial strains were preliminary tested for antagonistic action. Results showed that 79 bacterial strains were found having antagonistic action. The antagonistic efficiency of all isolates ranged from 7.78 to 53.34%. Studying the biochemical characteristics of isolates showed that 47 isolates were capable to produce siderophores, 61 to decompose chitin, 55 to decompose cellulose and 68 proteolytic. Six strongest antagonists including CT6, CT10, CT15, CT17, CT21, and TG36 were identified as *Bacillus* sp. based on Bergey classification system. CT10, the best antagonistic performer, was determined as *B. amyloliquefaciens* by using both biomolecular (sequencing 16S rDNA region) and conventional methods.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập các dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên ớt. Từ 18 mẫu đất vùng rễ ớt được thu tại Cần Thơ, Đồng Tháp, Tiền Giang có 341 dòng vi khuẩn được thử sơ bộ khả năng đối kháng, kết quả tuyển chọn và phân lập được 79 dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng. Hiệu suất đối kháng của các dòng vi khuẩn dao động từ 7,78-53,34%. Khảo sát các đặc tính đối kháng của vi khuẩn cho thấy có 47 dòng có khả năng sản sinh siderophore, 61 dòng có khả năng phân hủy chitin, 55 dòng có khả năng phân hủy cellulose và 68 dòng có khả năng phân hủy protein. Chọn lọc 6 dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng mạnh nhất gồm: CT6, CT10, CT15, CT17, CT21, TG36 để thực hiện các thử nghiệm sinh hóa để phân loại theo hệ thống phân loại Bergey đã xác định được cả 6 dòng này đều thuộc chi *Bacillus*. Dòng vi khuẩn CT10 có khả năng đối kháng mạnh nhất được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử thông qua giải trình tự vùng gene 16S rDNA kết hợp với phương pháp truyền thống. Kết quả cho thấy dòng vi khuẩn CT10 được xác định là vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens*.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Liên, Nguyễn Thị Yên Như, Trần Thị Xuân Mai và Nguyễn Thị Pha, 2016. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn từ đất vùng rễ ớt có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên ớt. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 47b: 16-23.

1 GIỚI THIỆU

Ớt là một loại quả được sử dụng làm gia vị phổ biến trong bữa ăn hàng ngày ở nước ta cũng như trên toàn thế giới. Vị cay của ớt khiến người ta cảm thấy món ăn trở nên ngon miệng hơn do vị giác được kích thích mạnh. Bên cạnh đó, ớt còn có tác dụng rất tốt trong việc điều trị bệnh. Trên thực tế, từ lâu ớt đã được y học cổ truyền coi là một vị thuốc quý. Ngày nay, ớt là loại gia vị được trồng chủ yếu ở vùng nhiệt đới nhưng được tiêu thụ khắp thế giới do có giá trị cao ở thị trường trong nước và xuất khẩu, đem lại lợi nhuận kinh tế và là mặt hàng xuất khẩu đứng vị trí số một trong các loại gia vị.

Quá trình canh tác ớt không những cần phải tốn nhiều công chăm sóc mà còn bị ảnh hưởng rất lớn vì vấn đề dịch bệnh, đặc biệt là bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* sp. gây ra. Công tác phòng trừ chưa thật sự mang lại hiệu quả do hiểu biết của người trồng ớt còn hạn chế, hơn nữa việc gieo trồng liên tục trong một thời gian dài tạo điều kiện thuận lợi cho bệnh thán thư bùng phát mạnh và gây khó khăn trong việc phòng trừ. Người nông dân hiện nay thường sử dụng thuốc hóa học để phòng trị bệnh mỗi khi có dịch bệnh xảy ra. Thói quen này đã góp phần gây ô nhiễm môi trường do một lượng lớn thuốc bảo vệ thực vật được lưu tồn và tích trữ trong đất, mạch nước ngầm gây nguy hiểm cho con người và các sinh vật khác. Việc tìm kiếm một giải pháp thay thế an toàn và đạt hiệu quả trong quản lý dịch bệnh thán thư trên ớt là việc làm vô cùng cấp thiết. Dựa trên sự tương tác giữa các vi sinh vật trong hệ sinh thái nhằm phát huy vai trò của các vi sinh vật có ích nhờ khả năng đối kháng với tác nhân gây bệnh mà đề tài đặt ra mục tiêu của nghiên cứu là nhằm phân lập và tuyển chọn được một số dòng vi khuẩn từ đất vùng rễ ớt tại một số địa điểm ở Cần Thơ, Đồng Tháp, Tiền Giang có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên ớt.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Mẫu nấm *Colletotrichum* sp. được cung cấp từ Phòng Công nghệ gen thực vật, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Mẫu đất vùng rễ ớt được thu tại ba tỉnh Cần Thơ, Đồng Tháp và Tiền Giang.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

2.2.1 Phân lập vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. từ đất vùng rễ ớt

Phương pháp thu thập mẫu đất và phân lập vi khuẩn đối kháng dựa theo nghiên cứu của Abdulkadir và Waliyu (2012).

2.2.2 Khảo sát khả năng đối kháng

Tiến hành bằng phương pháp cấy kếp: Nấm được cấy vào đĩa petri chứa môi trường PDA và ủ ở nhiệt độ 30°C trong 2 ngày ở tủ ủ. Sau 2 ngày, tiến hành cấy vi khuẩn lên bề mặt đĩa nấm đã ủ. Sau 5 ngày quan sát sự hình thành vùng kháng nấm và tính hiệu suất ức chế sự phát triển của nấm bởi vi khuẩn được tính theo công thức:

$$I = \frac{R - r}{R} \times 100$$

(I: hiệu suất đối kháng của vi khuẩn; R: bán kính của hệ sợi nấm đối chứng (cm); r: bán kính của hệ sợi nấm trên đĩa có chủng vi khuẩn (cm)).

2.2.3 Khảo sát các đặc tính đối kháng

Khả năng sản sinh siderophore: Dựa theo mô tả của tác giả Schwyn và Neilands (1987). Các dòng vi khuẩn sẽ được nuôi cấy trên môi trường CAS-blue agar. Sau thời gian 3 ngày tiến hành đo đường kính vòng halo màu vàng xung quanh khuẩn lạc để đánh giá khả năng sản sinh siderophore của vi khuẩn. Công thức tính khả năng sản sinh siderophore: (Đường kính halo – Đường kính khuẩn lạc).

Xác định khả năng phân hủy chitin: Thực hiện trên môi trường YEG (4g Yeast extract, 20g Glucose, 20g Agar) bổ sung 1% dịch huyền phù chitin, ủ 3 ngày ở nhiệt độ 30°C. Xác định khả năng phân giải chitin của vi khuẩn bằng cách nhuộm với dung dịch Lugol. Vi khuẩn phân giải chitin sẽ tạo vòng halo không bắt màu xung quanh khuẩn lạc, đo đường kính vòng halo để xác định khả năng phân hủy chitin trong môi trường. Công thức tính khả năng phân hủy chitin: Đường kính halo – Đường kính khuẩn lạc.

Xác định khả năng phân hủy cellulose: Thí nghiệm được thực hiện trên môi trường CMC agar (10g CMC, 1g (NH₄)₂SO₄, 1g K₂HPO₄, 0,5g MgSO₄.H₂O, 0,001g NaCl, 15g Agar). Vi khuẩn phân giải CMC sẽ tạo vòng halo không màu xung quanh khuẩn lạc sau khi nhuộm với dung dịch Congo Red 0,1% và rửa lại bằng NaCl 1M (Teather and Wood, 1982). Công thức tính khả năng phân hủy cellulose: Đường kính halo – Đường kính khuẩn lạc.

Xác định khả năng phân hủy protein: Hoạt tính protease của các dòng vi khuẩn được đánh giá nhờ vào khả năng tạo vòng phân giải trên môi trường sữa (Priest *et al.*, 1993). Thí nghiệm được thực hiện trên môi trường SMA (Skim Milk Agar) được bổ sung 2% agar (Ghorbel *et al.*, 2003). Xác định khả năng phân giải protein của vi khuẩn bằng cách dùng thước đo đường kính vòng halo phân giải

protein. Công thức tính khả năng phân hủy protein:
Đường kính halo – Đường kính khuẩn lạc.

2.2.4 Định danh vi khuẩn đối kháng bằng phương pháp truyền thống - Hệ thống phân loại Bergey

Chọn 6 dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng mạnh với nấm *Colletotrichum* sp. để định danh bằng phương pháp truyền thống thông qua các thử nghiệm sau: Xác định đặc điểm của các dòng vi khuẩn dựa vào đặc điểm khuẩn lạc, đặc điểm hình thái tế bào, nhuộm Gram, nhuộm bào tử. Khảo sát một số đặc tính sinh lý, sinh hóa của các chủng vi khuẩn như: Thử nghiệm catalase, thử nghiệm tính di động (Nguyễn Lâm Dũng và Nguyễn Đình Quyển, 2007)), thử nghiệm KOH (3%) String Test (Davis *et al.*, 1968), khảo sát đặc tính kỵ khí và hiếu khí.

Nhận diện vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR: Chọn một dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng mạnh nhất để định danh bằng phương pháp hiện đại.

Ly trích DNA của vi khuẩn: Dựa theo quy trình chuẩn của Maniatis *et al.* (1989) và được hiệu chỉnh bởi Nguyễn Thị Liên (2013).

Định danh các dòng vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR:

Phản ứng PCR được thực hiện với các thành phần như sau: Dung dịch đệm, 25 mM MgCl₂, 1,25 mM dNTPs, 10 μM mỗi (8F và 1492R), *Taq* DNA polymerase và DNA của vi khuẩn.

Sử dụng máy PCR Bio-Rad C1000 để khuếch đại đoạn gene mục tiêu theo chu kỳ nhiệt sau: Phản ứng PCR được biến tính ở 95°C trong 3 phút, sau đó lặp lại 35 chu kỳ với các bước sau: Biến tính ở 95°C trong 1 phút, bắt cặp mỗi vào khuôn ở nhiệt độ 54°C trong 1 phút, kéo dài ở 72°C trong 2 phút, giai đoạn ổn định được duy trì ở 72°C trong 10 phút. Cuối cùng mẫu được trữ ở 4°C.

Sử dụng cặp mồi được thiết kế theo Turner *et al.* (1999) với trình tự như sau:

Mồi 8F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'

Mồi 1492R: 5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3'
Kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose: Sau khi phản ứng PCR được thực hiện, sản phẩm PCR được điện di bằng gel agarose 1,5% có bổ sung chất nhuộm DNA (Safe view).

Giải trình tự DNA để định danh dòng vi khuẩn: Sản phẩm PCR được gửi đi giải trình tự bằng máy giải trình tự tự động tại Singapore. Sử dụng chương trình BLAST để so sánh trình tự vùng gen 16S rDNA của các dòng vi khuẩn với trình tự vùng gen 16S rDNA của các loài vi khuẩn có trong ngân hàng dữ liệu của NCBI (National Center for Biotechnology Information).

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

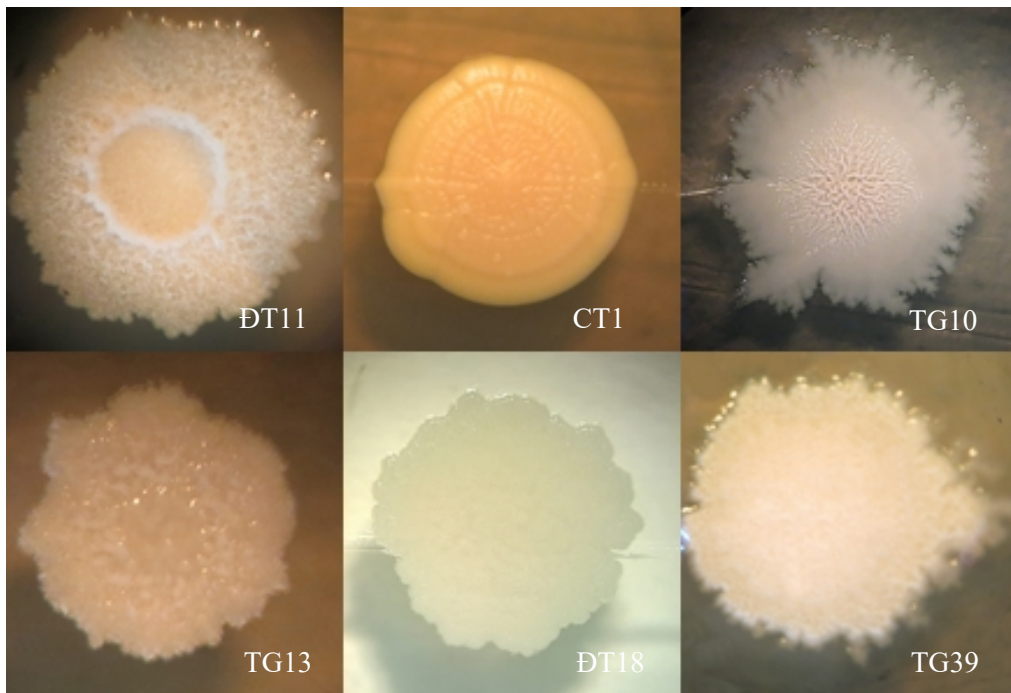
3.1 Kết quả phân lập vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp.

Từ 18 mẫu đất vùng rẫy ớt được thu thập tại ba tỉnh là Cần Thơ, Đồng Tháp và Tiền Giang, tiến hành nhận diện sơ bộ khả năng đối kháng của 341 dòng vi khuẩn trên đĩa thạch, dựa trên khả năng ngăn chặn sự phát triển của khuẩn ty nấm *Colletotrichum* sp. xung quanh khuẩn lạc vi khuẩn để chọn ra những dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng. Kết quả tuyển chọn được 79 dòng có khả năng đối kháng, trong đó, từ mẫu đất ở Cần Thơ là 23 dòng, ở Đồng Tháp là 36 dòng, ở Tiền Giang là 20 dòng.

Từ kết quả trên cũng cho thấy tỷ lệ số dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng là rất thấp (79/341 dòng). Vì vậy, việc thử đối kháng sơ bộ trước khi tiến hành phân lập để loại bỏ những dòng vi khuẩn không có khả năng đối kháng là rất cần thiết, giúp tiết kiệm rất nhiều về thời gian và chi phí.

Sau khi phân lập và tách ròng, tiến hành quan sát và mô tả tế bào, khuẩn lạc. Trong số 79 dòng vi khuẩn phân lập được, đa số khuẩn lạc có màu trắng đục (chiếm 54,4%), còn lại là màu nâu nhạt (chiếm 15,2%), màu trắng trong (chiếm 12,7%), màu vàng nhạt (chiếm 11,4%), màu vàng (chiếm 3,8%) và màu vàng cam (chiếm 2,5%) (Hình 1). Tuy nhiên, trong quá trình cấy trữ lâu ngày, khuẩn lạc của một số dòng vi khuẩn có hiện tượng chuyển từ màu trắng đục sang màu nâu nhạt. Về hình dạng khuẩn lạc: Hình dạng chủ yếu là không đều (chiếm 68,4%), còn lại là các khuẩn lạc hình tròn (chiếm 31,6%). Dạng bìa khuẩn lạc có các dạng nguyên (chiếm 32%), chia thùy (chiếm 53,2%) và răng cưa (chiếm 15,2%). Độ nổi của khuẩn lạc có các dạng lồi (chiếm 62%), phẳng (chiếm 11,4%) và mô (chiếm 26,6%).

Đường kính khuẩn lạc: Phần lớn các dòng vi khuẩn đã phân lập được có đường kính khuẩn lạc dao động từ 2-4mm sau khi cấy trên môi trường đặc trong 48 giờ.



Hình 1: Khuẩn lạc của một số dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp

3.2 Kết quả khảo sát khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp.

Hiệu suất đối kháng của 79 dòng vi khuẩn đối với nấm *Colletotrichum* sp. sau 5 ngày chủng vi khuẩn nhìn chung tăng dần, lúc đầu tăng nhanh về sau chậm lại. Kể từ ngày thứ 6 trở đi hiệu suất đối kháng của một số dòng vi khuẩn giảm xuống, điều

này thể hiện qua quan sát thấy khuẩn ty nấm bắt đầu phát triển nhanh hơn đẩy lùi sự phát triển cũng như sự ức chế của vi khuẩn. Điều này có thể do sự cạnh tranh về mặt dinh dưỡng của vi khuẩn yếu đi trong khi sự phát triển của khuẩn ty nấm càng nhanh.

Bảng 1: Hiệu suất đối kháng nấm *Colletotrichum* sp. của các dòng vi khuẩn phân lập được

Số dòng vi khuẩn	Hiệu suất đối kháng (%)					Tổng cộng
	≥ 50	40 - < 50	30 - < 40	20 - < 30	≤ 10	
	4	29	30	15	1	79

Theo kết quả được trình bày ở Bảng 1, phần lớn các dòng vi khuẩn có hiệu suất đối kháng từ 30 đến 49 %. Số dòng vi khuẩn có hiệu suất đối kháng đạt trên 50% chỉ có 4 dòng. Trong số 79 dòng vi khuẩn được khảo sát, có 2 dòng vi khuẩn là CT6 và CT10 cho kết quả cao nhất và có thể ức chế sự phát triển của nấm *Colletotrichum* sp lần lượt là 53,34% và 53,33%. Dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng yếu nhất là ĐT1 chỉ có thể ức chế sự phát triển của khuẩn ty nấm là 7,78%.

3.3 Kết quả khảo sát đặc tính đối kháng

3.3.1 Khả năng sản sinh siderophore

Siderophore đóng vai trò quan trọng trong việc cạnh tranh ion Fe, một nguyên tố cần thiết cho tế bào sống, nhưng tồn tại rất ít ở dạng dinh dưỡng. Siderophore của vi khuẩn có ái lực mạnh với ion Fe giúp vi khuẩn cạnh tranh tốt hơn nguồn dinh dưỡng này, giúp hạn chế sự phát triển của nấm bệnh.

Bảng 2: Khả năng sản sinh siderophore của các dòng vi khuẩn

Số dòng vi khuẩn	Khả năng sản sinh siderophore (cm)				Tổng cộng
	>1,5	1-1,5	0,5 - <1	<0,5	
	1	10	20	16	47

Khả năng sản sinh siderophore của các dòng vi khuẩn được thể hiện trong Bảng 2. Có 47 dòng vi khuẩn có khả năng sản sinh siderophore trong số 79 dòng vi khuẩn khảo sát trên môi trường CAS-

blue, đạt 59,5%. Có 32 dòng vi khuẩn còn lại không làm đổi màu môi trường thuốc thử CAS-blue chiếm 40,5%. Phần lớn các dòng vi khuẩn có khả năng sản sinh siderophore vào khoảng từ 0,5 -

1,5 (cm). Ba dòng vi khuẩn có khả năng sản sinh siderophore lớn nhất là TG3, TG4, TG8 (1,9 cm, 1,5 cm và 1,47 cm). Dòng vi khuẩn có khả năng sản sinh siderophore nhỏ nhất là TG26 (0,2 cm) và cho kết quả khác biệt có ý nghĩa với các dòng vi khuẩn còn lại với độ tin cậy 95%.

3.3.2 Khả năng phân hủy chitin

Kết quả khảo sát khả năng phân hủy chitin của các dòng vi khuẩn được thể hiện ở Bảng 3.

Trong 79 dòng vi khuẩn được khảo sát, có 61 dòng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase nhằm phân hủy chitin (chiếm 77,21%)

Bảng 3: Khả năng phân hủy chitin của các dòng vi khuẩn phân lập được

Số dòng vi khuẩn	Khả năng phân hủy chitin (cm)							Tổng cộng
	≥ 3	2,5 - < 3	2 - < 2,5	1,5 - < 2	1 - < 1,5	0,5 - < 1	< 0,5	
	1	3	12	17	14	6	8	61

3.3.3 Kết quả khảo sát khả năng phân hủy cellulose

Kết quả khả năng phân hủy cellulose của các dòng vi khuẩn được trình bày ở Bảng 4.

Kết quả khảo sát khả năng phân hủy cellulose của các dòng vi khuẩn được trình bày trong Bảng 4 cho thấy, trong 79 dòng vi khuẩn khảo sát có 55 dòng vi khuẩn (chiếm 69,62%) thể hiện khả năng phân hủy cellulose thông qua vòng thủy phân không màu quanh khuẩn lạc trên môi trường CMC

Bảng 4: Khả năng phân hủy cellulose của các dòng vi khuẩn

Số dòng vi khuẩn	Khả năng phân hủy cellulose (cm)							Tổng cộng
	≥ 3	2,5 - < 3	2 - < 2,5	1,5 - < 2	1 - < 1,5	0,5 - < 1	< 0,5	
	4	4	5	13	20	8	1	55

3.3.4 Khả năng phân hủy protein

Enzyme protease là một hoạt chất có khả năng phân hủy vỏ tế bào nấm bệnh. Khả năng phân hủy

Bảng 5: Khả năng phân hủy protein của các dòng vi khuẩn

Số dòng vi khuẩn	Khả năng phân hủy protein (cm)				Tổng cộng
	1,5 - 2	1 - < 1,5	0,5 - < 1	< 0,5	
	9	19	31	9	68

Khả năng phân hủy protein ở vi khuẩn là một trong những cơ sở để xác định khả năng đối kháng nấm. Từ kết quả của Bảng 5 cho thấy có 68 dòng vi khuẩn có khả năng sản sinh enzyme protease trong số 79 dòng vi khuẩn được khảo sát trên môi trường SMA. Kết quả đo đường kính vòng tròn phân hủy protein của các dòng vi khuẩn trên dao động từ 0,2-1,97 (cm), với dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy protein trung bình cao nhất là CT23 (1,97 cm) và CT20 (1,93 cm) và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các dòng vi khuẩn còn lại. Dòng TG38 có khả năng phân hủy protein thấp nhất (0,2 cm). Đa số các dòng vi khuẩn thể hiện sự phân hủy protein với giá trị từ 0,5 - 1,49 (cm).

(Bảng 3), 19 dòng còn lại không thể hiện khả năng này (chiếm 22,8%). Khả năng phân hủy chitin của các dòng vi khuẩn dao động trong khoảng 0,17 - 3,1 (cm). Hai dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy chitin mạnh nhất là CT13 (3,1 cm) và CT9 (2,63 cm), dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy chitin yếu nhất là CT18 (0,17 cm). Chitin là thành phần cấu trúc vách tế bào của tất cả các loại nấm chỉ trừ các nấm Oomycetes (Monreal và Reese, 1969). Enzyme chitinase tiết ra từ các vi khuẩn đối kháng được đặc biệt quan tâm nghiên cứu vì khả năng ngăn chặn sự phát triển của tế bào nấm bệnh.

agar khi nhuộm với Congo Red, có 24 dòng vi khuẩn (chiếm 39,38%) không thể hiện khả năng này, đường kính vòng tròn phân hủy từ 0,63 - 3,07 cm, trong đó, có bốn dòng vi khuẩn thể hiện rất tốt khả năng này là CT6 (3,23 cm), CT22 (3,07 cm), CT23 (3,0 cm), CT21 (3,0 cm) và cũng là những dòng vi khuẩn cho vòng sáng rõ nhất, các dòng còn lại có xuất hiện vòng sáng nhưng mờ hơn. Dòng vi khuẩn có khả năng phân hủy cellulose yếu nhất là TG7 (0,37 cm).

protein của các dòng vi khuẩn được đánh giá nhờ vào khả năng tạo vòng phân giải trên môi trường sữa (Priest *et al.*, 1993).

Từ kết quả khảo sát các đặc tính đối kháng của các dòng vi khuẩn trên có thể thấy, đa số các dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng đều có đầy đủ cả 4 đặc tính đối kháng (49,37%) (khả năng sản sinh siderophore; khả năng phân hủy chitin, protein và cellulose) (Bảng 6). Có 6,33% số dòng vi khuẩn chỉ có 1 trong 4 đặc tính đối kháng. Các dòng vi khuẩn không có cả 4 đặc tính đối kháng chiếm 7,59%, tuy nhiên, hiệu suất đối kháng của những dòng vi khuẩn này không cao, chỉ từ 25% - 37,5%. Như vậy, những dòng vi khuẩn không có cả 4 đặc tính đối kháng này có thể đã kháng lại nấm bệnh theo một cơ chế khác.

Bảng 6: Số đặc tính đối kháng của các dòng vi khuẩn

	Số đặc tính đối kháng*					Tổng cộng
	4	3	2	1	0	
Số dòng vi khuẩn	39	12	17	5	6	79
Tỷ lệ (%)	49,37	15,19	21,52	6,33	7,59	100

Ghi chú (*): Khả năng sản sinh siderophore; khả năng phân hủy chitin, protein và cellulose

Những dòng vi khuẩn có hiệu suất đối kháng mạnh nhất (Bảng 7) đều có ít nhất từ 3 đặc tính đối kháng trở lên. Điều này cho thấy sự kết hợp của

các đặc tính đối kháng trong cùng một dòng vi khuẩn có ảnh hưởng quan trọng đến khả năng đối kháng của chúng.

Bảng 7: Tổng hợp đặc tính đối kháng của 6 dòng vi khuẩn đối kháng mạnh

Dòng vi khuẩn	Hiệu suất đối kháng (%)	Các đặc tính đối kháng				Số đặc tính đối kháng
		Khả năng sản sinh Siderophore (cm)	Khả năng phân hủy Chitin (cm)	Khả năng phân hủy Protein (cm)	Khả năng phân hủy Cellulose (cm)	
CT6	53,34	-	1,73	1,10	3,23	3
CT10	53,33	0,57	1,23	1,53	2,67	4
TG36	52,38	0,60	1,03	0,27	1,60	4
CT17	50,43	0,50	1,63	0,97	0,70	4
CT21	49,17	0,50	0,87	1,70	3,00	4
CT15	47,50	1,33	-	0,80	1,37	3

Ghi chú: (-): không có

Định danh vi khuẩn bằng phương pháp truyền thống

mạnh nhất là CT6, CT10, CT15, CT17, CT21, TG36 để định danh theo hệ thống phân loại của Bergey. Kết quả khảo sát các đặc điểm của các dòng này được thể hiện tóm tắt trong Bảng 6.

Chọn 6 dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng

Bảng 8: Đặc điểm các dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng mạnh

	CT6	CT10	CT15	CT17	CT21	TG36
Kích thước (µm)	0,6-3,4	0,4-2,5	0,4-1,7	0,6-2,4	0,8-3,4	0,4-1,7
Hình dạng	Que	Que	Que	Que	Que	Que
Gram*	+	+	+	+	+	+
String test	-	-	-	-	-	-
Nội bào tử	+	+	+	+	+	+
Khả năng di động	+	+	+	+	+	+
Nhu cầu sử dụng oxy	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+

Ghi chú: có: +; không có: -; *: Gram dương (+), Gram âm (-)

Qua kết quả khảo sát trên có thể kết luận rằng: 6 dòng vi khuẩn trên đều thuộc chi *Bacillus*. Theo Paul *et al.* (2009), Quyển 3 của Hệ thống phân loại Bergey liệt kê tới 142 loài *Bacillus*, trong đó chỉ nêu phương pháp thực hiện các phản ứng sinh hóa để xác định được 95 loài. Đồng thời, số lượng loài trong chi *Bacillus* lớn nên việc xác định tên loài phải mất nhiều thời gian, công sức và chi phí. Vì vậy, đề tài kết hợp với phương pháp định danh hiện đại bằng cách giải trình tự vùng gen 16S

rDNA để đảm bảo độ tin cậy của kết quả.

3.4 Kết quả định danh bằng phương pháp sinh học phân tử

Dòng vi khuẩn có hiệu suất đối kháng mạnh (CT10) được tiến hành ly trích DNA, khuếch đại vùng gene 16S rDNA bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi 8F và 1492R, sau đó sản phẩm PCR của dòng vi khuẩn CT10 được gửi đi giải trình tự tại Singapore.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:5

Alignments						
Download ▾ GenBank Graphics Distance tree of results						
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum TriqoCor1448, complete genome	1810	14429	98%	0.0	99% CP007244.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus amyloliquefaciens strain IARI-PHM5-33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	98%	0.0	99% KT149755.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus amyloliquefaciens strain FR203A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	98%	0.0	99% KP997270.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus methylotrophicus strain HYM33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	98%	0.0	99% KT961128.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Bacillus subtilis strain NSB-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	98%	0.0	99% KR010179.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus sp. cna9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	98%	0.0	99% KT032131.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus sp. cna8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	98%	0.0	99% KT032130.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus sp. cna6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	98%	0.0	99% KT032128.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus sp. cna5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	98%	0.0	99% KT032127.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus sp. NE2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1808	1808	98%	0.0	99% KR868765.1

Hình 2: Kết quả so sánh mức độ tương đồng của dòng CT10 với các dòng vi khuẩn trên cơ sở dữ liệu NCBI

Kết quả so sánh trình tự vùng gen 16S rDNA của dòng CT10 với các trình tự trên cơ sở dữ liệu của NCBI cho thấy dòng vi khuẩn CT10 được xác định có độ tương đồng ở mức 99% với trình tự DNA của các vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* (Accession: CP007244.1, KT149755.1, KP997270.1), *Bacillus methylotrophicus* (Accession: KT961128.1) và *Bacillus subtilis* (Accession: KR010179.1) (Hình 2).

Bacillus methylotrophicus là một loài mới của chi *Bacillus* được mô tả chi tiết trong công trình nghiên cứu của Madhaiyan *et al.* (2010), trong đó có nêu rõ loài này không thể phát triển được trong môi trường có sự hiện diện của NaCl lớn hơn 4%. Tuy nhiên, qua khảo sát thì dòng CT10 lại phát triển tốt trên môi trường NaCl 6%, vì vậy, dòng CT10 không phải là *Bacillus methylotrophicus*.

Để phân biệt giữa *Bacillus amyloliquefaciens* và *Bacillus subtilis* thì thử nghiệm khả năng lên men lactose được thực hiện vì *Bacillus subtilis* âm tính với thử nghiệm này, còn *Bacillus amyloliquefaciens* có khả năng sinh ra acid từ quá trình lên men lactose (Idriss *et al.*, 2002). Tiến hành thử nghiệm cho thấy kết quả là dòng CT10 có khả năng làm đổi màu môi trường Phenol Red Broth từ màu đỏ sang màu vàng do acid được sinh ra trong quá trình lên men. Như vậy, có thể kết luận dòng CT10 là *Bacillus amyloliquefaciens*.

Bacillus amyloliquefaciens được chia thành 2 nhóm loài phụ là *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (có khả năng sống nội sinh trong

rễ thực vật) và *B. amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* (không có khả năng sống nội sinh trong rễ thực vật) (Borriss *et al.*, 2011). Cho đến thời điểm hiện tại thì chưa có báo cáo nào đề cập đến tác hại của vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens*. Mặt khác, có rất nhiều nghiên cứu cho thấy tính an toàn của nó qua nhiều năm được ứng dụng trong nông nghiệp và công nghiệp (Sietske and Diderichsen, 1991), do đó, đây là dòng vi khuẩn có tiềm năng để ứng dụng sản xuất chế phẩm sinh học.

4 KẾT LUẬN

Đề tài đã phân lập được 79 dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư từ 18 mẫu đất vùng rễ ớt thu được từ các tỉnh Cần Thơ, Đồng Tháp, Tiền Giang. Các dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng nấm bệnh phân lập được có hiệu suất đối kháng dao động từ 7,78-53,34 (%), hầu hết có các đặc tính đối kháng như: Sản sinh siderophore, phân hủy protein, cellulose và chitin.

Định danh bằng phương pháp truyền thống các dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng mạnh với nấm *Colletotrichum* sp. như: CT6, CT10, CT15, CT17, CT21, cho thấy cả 6 dòng đều thuộc chi *Bacillus*.

Kết hợp định danh bằng phương pháp truyền thống và hiện đại đã xác định được dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng nấm *Colletotrichum* sp. mạnh nhất cho kết quả: dòng CT10 là vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens*.

LỜI CẢM ƠN

Tác giả xin gửi lời cảm ơn đến Trường Đại học Cần Thơ đã cấp kinh phí để nhóm nghiên cứu hoàn thành đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdulkadir, M. and S. Waliyu. 2012. Screening and isolation of the soil bacteria for ability to produce antibiotics. *European Journal of Applied Sciences*, 4(5), pp. 211-215.
- Borriss, R., X. H. Chen, C. Rueckert, J. Blom, A. Becker, B. Baumgarth, ... and H. P. Klenk, 2011. Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7T and FZB42T: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(8), pp. 1786-1801.
- Davis, B. D., R. Dulbecco, H. N. Eiser, H. S. Ginsberg and W. B. Wood, 1968. *Microbiology*, Harper & Row, Publishers, New York. pp. 31.
- Ghorbel, B., A. Sellami-Kamoun and M. Nasri, 2003. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(5), pp. 513-518.
- Idriss, E. E., O. Makarewicz, A. Farouk., K. Rosner, R. Greiner, H. Bochow, T. Richter and R. Borriss, 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant growth-promoting effect. *Microbiology*, 148, pp. 2097-2109.
- Maniatis T., J. Sambrook and E. F. Fritsch, 1989. *Molecular, a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring harbor laboratory press, USA. 1, pp.6.5-7.34.
- Madhaiyan, M., S. Poonguzhali, S. W. Kwon and T. M. Sa, 2010. *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol-utilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(10), pp. 2490-2495.
- Monreal, J. and E. T. Reese. 1969. The chitinase of *Serratia marcescens*. *Canadian Journal of Microbiology*, 15(7), pp.689-696.
- Nguyễn Lâm Dũng và Nguyễn Đình Quyên. 2007. *Vì sinh vật học*. Nxb. Giáo dục.
- Nguyễn Thị Liên, 2013. Cải thiện quy trình nhận diện các dòng vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh bạc lá lúa. Đề tài khoa học và công nghệ cấp trường, ĐH Cần Thơ, Mã số: T. 2013-80.
- Paul, D. V., R. B. David, M. G. George, W. C. Richard, J. B. Don, R. K. Noel and T. S. S. James, 2009. *Bergey's manual of systematic bacteriology (volume 3) The Firmicutes*. Originally published by Williams & Wilkins, pp.21-128.
- Priest, F. G., 1993. Systematics and Ecology of *Bacillus*. In Sonenshein A., Hoch J., Losick R. (ed), *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria*. ASM Press, Washington, DC, pp.3-16.
- Schwyn, B. and J. B. Neilands, 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160(1), pp. 47-56.
- Sietske, A. and B. Diderichsen, 1991. On the safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*: a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 36(1), pp. 1-4.
- Teather, R. M. and P. J. Wood, 1982. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied. Environment. Microbiology*, 43, pp. 777-780.
- Turner, S., Kathleen M. Pryer, Vivian P. W. Miao and Jeffrey D. Palmer, 1999. Investigating deep Phylogenetic relationships among Cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Eukaryot. Microbiology.*, 46(4), pp. 327-338.