

DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.056

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH CÁC CHỦNG VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG TRONG ĐẤT CÓ KHẢ NĂNG PHÒNG TRỊ BỆNH THỐI CỦ HÀNH TÍM DO VI KHUẨN *Pseudomonas aeruginosa*

Nguyễn Thị Mai Trinh, Trương Tô Quyên và Nguyễn Đắc Khoa*

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

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Đắc Khoa (email: ndkhoa@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 22/03/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

Title:

Isolation, testing for the disease-reducing effects and identification of antagonistic soil bacteria against shallot soft rot caused by *Pseudomonas aeruginosa*

Từ khóa:

Bacillus safensis, *Bacillus stratosphericus*, hành tím, *Pseudomonas aeruginosa*, thối củ, vi khuẩn đối kháng

Keywords:

Antagonistic bacteria, *Bacillus safensis*, *Bacillus stratosphericus*, *Pseudomonas aeruginosa*, shallot, soft rot

ABSTRACT

Soft rot caused by *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most destructive diseases of shallot in Vĩnh Châu district, Sóc Trăng province. This study aims at isolating, testing for disease-reducing effects and identifying the antagonistic soil bacteria against the disease. Among the 133 bacterial isolates obtained from shallot fields of Vĩnh Châu, four isolates 2C, 3A, 3B and 4A exhibited their antagonistic effects against the pathogen. The isolate 3B was the strongest antagonist among those tested (inhibition zone radii = 6 mm). Using cell-free suspensions, that of the isolate 4A performed the strongest inhibition (inhibition zone radii = 6 mm). Under greenhouse conditions, seed soaking using 10^8 CFU/mL suspensions of the isolates 3B and 4A and soil drenching using 10^9 CFU/mL suspension of 3B and 10^8 CFU/mL suspension of 4A showed strong disease-reducing effects until 12 days after inoculation. Based on the 16S rRNA gene sequences combined with the morphological and biochemical characteristics of the bacterial strains, 3B was identified as *Bacillus safensis* and 4A as *Bacillus stratosphericus*.

TÓM TẮT

Thối củ do vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* gây ra là một trong những bệnh gây thiệt hại năng suất và chất lượng hành tím tại thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng. Mục tiêu của nghiên cứu là phân lập, tuyển chọn và định danh được các chủng vi khuẩn đối kháng trong đất có khả năng phòng trị bệnh. Trong số 133 chủng vi khuẩn phân lập được từ đất ruộng hành tại thị xã Vĩnh Châu, bốn chủng 2C, 3A, 3B và 4A có khả năng đối kháng với vi khuẩn *P. aeruginosa* trên đĩa thạch. Chủng 3B có khả năng đối kháng mạnh nhất với bán kính vòng vô khuẩn là 6 mm. Khi sử dụng dịch nuôi cấy không chứa tế bào vi khuẩn, dịch nuôi cấy của chủng 4A có khả năng ức chế mầm bệnh mạnh nhất với bán kính vòng vô khuẩn là 6 mm. Trong điều kiện nhà lưới, các nghiệm thức áo củ với huyền phù 10^8 CFU/mL của hai chủng vi khuẩn 3B và 4A và chủng vào đất với huyền phù vi khuẩn 4A (10^8 CFU/mL) và 3B (10^9 CFU/mL) có hiệu quả giúp giảm bệnh thối củ, hiệu quả này duy trì đến thời điểm 12 ngày sau chủng bệnh. Kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA kết hợp với khảo sát các đặc điểm hình thái và sinh hóa của vi khuẩn cho thấy chủng 3B là *Bacillus safensis* và chủng 4A là *Bacillus stratosphericus*.

Trích dẫn: Nguyễn Thị Mai Trinh, Trương Tô Quyên và Nguyễn Đắc Khoa, 2019. Phân lập, tuyển chọn và định danh các chủng vi khuẩn đối kháng trong đất có khả năng phòng trị bệnh thối củ hành tím do vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(2): 151-157.

1 GIỚI THIỆU

Hành tím là loại rau ăn củ có giá trị quan trọng về mặt ẩm thực và dược liệu nên được trồng ở nhiều nơi. Thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng được xem là “thủ phủ hành tím”, với sản lượng hàng năm có thể lên đến 100.000 tấn (Phòng Kinh tế Thị xã Vĩnh Châu, 2015). Thối củ hành tím là một trong những bệnh gây hại nghiêm trọng, ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng hành tím tại thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng. Bệnh thối củ do nhiều tác nhân gây ra gồm có nấm *Fusarium oxysporum* (Assefa *et al.*, 2010; Sintayehu *et al.*, 2014), nấm *Collectotrichum gloeosporioides* (Võ Hoàng Nghiệm, 2012; IFAD, 2013), nấm *Aspergillus niger* (Conn *et al.*, 2012; IFAD, 2013), vi khuẩn *Erwinia carotovora* (Võ Hoàng Nghiệm, 2012; Hong *et al.*, 2013; IFAD, 2013) và vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* (Nguyễn Thị Nguyệt, 2014; Nguyễn Thái Học, 2016). Trong đó, vi khuẩn *P. aeruginosa* là một trong những mầm bệnh gây thối củ hành tím phổ biến, gây hại ở cả hai điều kiện tồn trữ và ngoài đồng (Nguyễn Thái Học, 2016).

Thuốc hóa học là biện pháp được sử dụng phổ biến để phòng trị bệnh thối củ trên hành tím. Tuy nhiên, phương pháp này vừa làm tăng chi phí sản xuất, vừa gây ô nhiễm môi trường và ảnh hưởng đến sức khỏe con người, đồng thời làm tăng khả năng kháng thuốc của mầm bệnh. Phòng trừ sinh học bệnh cây bằng vi khuẩn đối kháng với mầm bệnh được xem là biện pháp hiệu quả và bền vững, thân thiện với môi trường và an toàn cho sức khỏe con người. Tại Đồng bằng Sông Cửu Long, sử dụng vi khuẩn đối kháng trong đất có nguồn gốc bản địa là hướng phòng trừ bệnh cây tiềm năng và cho kết quả cao trong phòng trị bệnh trên nhiều loại cây trồng như bệnh cháy bìa lá lúa (Võ Thị Phương Trang, 2013; Nguyễn Đặng Ngọc Giàu, 2014; Trần Kim Thoa, 2015; Khoa *et al.*, 2016), bệnh đốm lá trên hoa hồng (Lê Hùng Cường, 2017), bệnh thối đồng tiền (Trần Thị Bích Thảo, 2017) và chạy dây trên khoai lang (Nguyễn Hoàng Minh Sang, 2017) và bệnh lúa von (Nguyễn Thị Kiều My, 2017; Nguyễn Thị Ngọc Ngân, 2017). Trên hành tím, Quyên *et al.* (2017) đã phân lập được 3 chủng vi khuẩn (ATA 33, ATB 32 và ATB 24) tại đất ruộng hành tím ở thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng có hiệu quả làm giảm bệnh thối củ do nấm *F. oxysporum* gây ra. Nghiên cứu này được hiện nhằm phân lập, tuyển chọn các chủng vi khuẩn đối kháng trong đất có khả năng phòng trị bệnh thối củ hành tím do vi khuẩn *P. aeruginosa* gây ra.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Vi khuẩn *P. aeruginosa* gây bệnh thối củ hành tím được cung cấp bởi Nhóm Nghiên cứu Bệnh cây

thuộc Phòng thí nghiệm Sinh học Phân tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ. Hành giống và hành tồn trữ (giống địa phương) được Chi cục Bảo vệ Thực vật tỉnh Sóc Trăng cung cấp.

2.2 Phân lập vi khuẩn trong đất

Mẫu đất được thu thập ở các ruộng trồng hành tím nhiễm bệnh ít hoặc không nhiễm bệnh trong khu vực bị nhiễm bệnh thối củ ở thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng. Tại mỗi ruộng, mẫu đất được thu tại 9 điểm ở độ sâu 0-20 cm theo đường chéo góc, trộn đều và cho vào túi nhựa. Lắc đều 10 g mẫu đất với 90 mL nước cất vô trùng trong 30 phút trên máy lắc ngang. Dung dịch được pha loãng 1.000 lần với nước cất vô trùng và được trải đều 50 μ L lên môi trường nutrient agar (NA) [5 g peptone, 3 g beef extract, 5 g NaCl, 20 g agar, thêm nước cất vừa đủ 1.000 mL, pH 6,8 (Shivaji *et al.*, 2006)]. Sau 48 giờ nuôi cấy, chọn các khuẩn lạc vi khuẩn có hình thái khác nhau trên bề mặt môi trường NA để cấy chuyển sang môi trường NA mới cho đến khi rỗng. Các chủng vi khuẩn được bảo quản trong glycerol 15% để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.3 Khảo sát khả năng đối kháng của vi khuẩn phân lập từ đất đối với vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* trên đĩa thạch

Trải đều 50 μ L huyền phù vi khuẩn *P. aeruginosa* (đã được nuôi cấy 48 giờ, mật số 10^9 CFU/mL) lên đĩa môi trường NA. Sau đó, chấm sinh khối khuẩn lạc vi khuẩn phân lập (đã được nuôi cấy 48 giờ trên đĩa thạch NA) lên đĩa NA mới tại 3 điểm cách đều nhau, ở nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 48 giờ trong tủ ủ. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần trên 3 đĩa khác nhau cho mỗi chủng vi khuẩn phân lập. Sau khi ủ, tiến hành chọn các chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng và đo bán kính vòng vô khuẩn (từ điểm ngoài cùng khuẩn lạc đến vị trí điểm lan cuối cùng của vòng vô khuẩn). Các chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng được sử dụng các cho thí nghiệm tiếp theo.

2.4 Khảo sát khả năng ức chế vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* của dịch nuôi cấy vi khuẩn đối kháng

Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch của Harris *et al.* (1989). Chuẩn bị đĩa môi trường có trải vi khuẩn *P. aeruginosa* như Mục 2.2 và tạo 4 giếng (đường kính 6 mm) đối xứng và cách đều nhau bằng ống đục vô trùng. Giếng được đánh số theo chiều kim đồng hồ từ 1 đến 4. Các chủng vi khuẩn đối kháng được nuôi trong 10 mL môi trường nutrient broth (NB) (môi trường NA không bổ sung agar). Tại thời điểm 2, 4, 6 và 8 ngày sau nuôi cấy, lấy 1 mL huyền phù vi khuẩn và ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong

15 phút để được dịch nuôi cấy không có tế bào vi khuẩn (gọi tắt là dịch nuôi cấy); hút 20 μ L dịch nuôi cấy cho vào giếng 1 và 3; tiếp theo hút 20 μ L môi trường NB cho vào giếng 4 và 20 μ L nước cất thanh trùng vào giếng 2, ủ ở nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$ trong 48 giờ trong tủ ủ. Mỗi chủng vi khuẩn được lặp lại 3 lần trên 3 đĩa khác nhau. Quan sát khả năng tạo vòng vô khuẩn của dịch nuôi cấy và đo bán kính vòng vô khuẩn (được tính từ rìa ngoài của giếng đến điểm lan cuối cùng của vòng vô khuẩn).

2.5 Khảo sát khả năng làm giảm bệnh thối củ hành tím của vi khuẩn đối kháng trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại cho mỗi nghiệm thức, gồm 3 nhân tố (1) chủng vi khuẩn đối kháng được tuyển chọn từ Mục 2.3 và 2.4, (2) mật số vi khuẩn đối kháng (10^9 , 10^8 và 10^7 CFU/mL) và (3) phương pháp xử lý vi khuẩn đối kháng (chúng vào đất và áo củ). Nghiệm thức đối chứng âm được xử lý với nước cất thanh trùng và nghiệm thức đối chứng dương được xử lý với thuốc hóa học Starnet 20WP 1%. Hành sau khi trồng được tưới nước và bón phân theo khuyến cáo của Chi cục Bảo vệ Thực vật Sóc Trăng.

Đất phù sa được phơi khô, băm nhỏ, xử lý phen bằng vôi bột. Sau đó, đất được trộn với trấu và cát theo tỉ lệ 3:1:2 theo khối lượng, cho hỗn hợp vào chậu nhựa (25x17 cm) và tưới nước cho mềm đất. Hành giống được tách bỏ một phần lớp vỏ ngoài và khử trùng bề mặt với ethanol 70%, ủ với trấu ẩm cho ra rễ trước khi đem trồng vào chậu (10 củ/chậu).

Các chủng vi khuẩn đối kháng được nuôi trên môi trường NA trong 48 giờ và pha loãng với nước cất vô trùng để đạt mật số 10^9 , 10^8 và 10^7 CFU/mL. Nghiệm thức chúng vào đất, mỗi chậu được tưới đều với 5 mL huyền phù vi khuẩn đối kháng đã được chuẩn bị trước tương ứng với các nồng độ vi khuẩn khác nhau tại thời điểm 24 giờ trước khi trồng. Nghiệm thức áo củ, hành giống được áo với huyền phù vi khuẩn đối kháng trong 1 giờ trước khi trồng vào đất.

Củ hành được chúng bệnh bằng cách tạo vết thương sâu khoảng 5 mm xung quanh củ củ và bơm 500 μ L huyền phù vi khuẩn *P. aeruginosa* (10^9 CFU/mL) tại thời điểm 30 ngày sau khi trồng. Ghi nhận phần trăm mức độ bệnh (tỉ lệ thể tích củ nhiễm bệnh/tổng thể tích củ của mỗi củ hành) tại thời điểm 4, 8 và 12 ngày sau chúng bệnh (NSCB).

2.6 Định danh vi khuẩn đối kháng

Vi khuẩn đối kháng được định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử giải trình tự gen 16S rRNA kết hợp với Hệ thống phân loại vi khuẩn Bergey's (Holt *et al.*, 1994). Trình tự gen 16S rRNA của các

chủng vi khuẩn đối kháng được giải trình tự tại Công ty Sinh hóa Phù Sa, Việt Nam và so sánh với cơ sở dữ liệu GenBank trên NCBI bằng công cụ Blastn để tìm ra các chủng vi khuẩn có trình tự gen 16S rRNA tương đồng. Sau đó, dựa vào sự khác nhau về đặc điểm sinh lý và sinh hóa của các chủng vi khuẩn này như thành tế bào – nhuộm Gram (Nguyễn Lâm Dũng và Đinh Thúy Hằng, 2006), khả năng sinh nội bào tử (Schaeffer and Fulton, 1933), khả năng di động (Nguyễn Lâm Dũng *et al.*, 2007), khả năng tổng hợp enzyme catalase (McLeod *et al.*, 1923), khả năng chịu nhiệt (phát triển được ở nhiệt độ 45°C), sự mẫn cảm đối với các loại kháng sinh như ampicillin và lincomycin (Nguyễn Thanh Hà, 1991) để định danh vi khuẩn.

2.7 Xử lý số liệu

Các số liệu thu thập được phân tích phương sai ANOVA bằng phần mềm SPSS 20, sự khác biệt giữa các nghiệm thức được so sánh bằng kiểm định Duncan ở độ tin cậy 95%.

3 KẾT QUẢ

3.1 Khả năng đối kháng của huyền phù và dịch nuôi cấy tế bào vi khuẩn phân lập từ đất

Tổng số có 133 chủng được phân lập từ bốn mẫu đất ruộng hành tím tại thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng. Các chủng vi khuẩn có hình dạng khuẩn lạc phổ biến là tròn, rìa có khía hoặc không khía, màu trắng trong hoặc trắng đục, kích thước không đồng đều.

Trong các chủng vi khuẩn được phân lập, có 4 chủng vi khuẩn (2C, 3A, 3B và 4A) có khả năng đối kháng cao với vi khuẩn *P. aeruginosa*, tạo vòng vô khuẩn có bán kính từ 5-6 mm sau 24 giờ nuôi cấy. Trong đó, chủng 3B có khả năng đối kháng cao nhất (bán kính vòng vô khuẩn = 6 mm). Ở thí nghiệm khảo sát khả năng ức chế mầm bệnh bằng dịch tế bào cho thấy chỉ có dịch nuôi cấy của hai chủng 2C và 4A có khả năng ức chế vi khuẩn *P. aeruginosa* với bán kính vòng vô khuẩn lần lượt là 5,6 mm và 6,0 mm tại thời điểm sau 2 ngày nuôi cấy. Tuy nhiên, khả năng ức chế của dịch nuôi cấy bị mất đi sau 4 ngày nuôi cấy. Dựa vào kết quả này, hai chủng vi khuẩn 3B và 4A được tuyển chọn để khảo sát khả năng làm giảm bệnh thối củ trong điều kiện nhà lưới.

3.2 Hiệu quả giảm bệnh của các chủng vi khuẩn đối kháng trong điều kiện nhà lưới

Hiệu quả làm giảm bệnh thối củ hành tím của hai chủng vi khuẩn 3B và 4A được thực hiện bằng hai phương pháp xử lý gồm áo củ và chúng vào đất với 3 mật số 10^9 , 10^8 và 10^7 CFU/mL. Kết quả khảo sát hiệu quả giảm bệnh thối củ hành tím do vi khuẩn *P. aeruginosa* của hai chủng vi khuẩn 4A và 3B trong điều kiện nhà lưới được trình bày trong Bảng 1. Các

nghiệm thức áo củ với vi khuẩn đối kháng đều cho hiệu quả làm giảm bệnh thối củ, mức độ bệnh ở các nghiệm thức này dao động từ 5-95%, mặc dù vẫn cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng dương (dao động từ 1,00-1,67%), nhưng thấp hơn và hầu hết khác biệt có ý nghĩa thống kê với nghiệm thức đối chứng âm (dao động từ 65-98,33%). Trong đó, áo củ với chủng vi khuẩn 3B ở mật số 10^8 CFU/mL cho hiệu quả giảm bệnh cao nhất. Ở tất cả các nghiệm thức chủng vi khuẩn bằng phương pháp áo củ, hiệu quả giảm bệnh kéo dài đến thời điểm 12 NSCB ngoại trừ nghiệm thức áo củ với chủng vi khuẩn 4A ở mật số 10^7 CFU/mL chỉ cho hiệu quả giảm bệnh đến thời điểm 8 NSCB. Đối với phương pháp chủng vi khuẩn đối kháng vào đất, chỉ có nghiệm thức xử lý với chủng vi khuẩn 4A ở mật số 10^8 CFU/mL và 3B ở mật số 10^9 và 10^7 CFU/mL có hiệu quả giảm bệnh và kéo

dài đến thời điểm 12 NSCB. Trong đó, nghiệm thức với chủng vi khuẩn 3B ở mật số 10^9 CFU/mL cho hiệu quả giảm bệnh cao nhất đến 12 NSCB với mức độ bệnh thối củ là 49,33%. Mặc dù ở nghiệm thức này mức độ bệnh còn cao hơn so với nghiệm thức đối chứng dương (1,67%), nhưng thấp hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng âm (98,33%).

Theo các tiêu chí đặt ra gồm hiệu quả giảm bệnh cao và kéo dài cùng với mật số huyền phù vi khuẩn thấp, các nghiệm thức áo củ với chủng 4A và 3B ở mật số 10^8 CFU/mL và chủng vào đất với 4A ở mật số 10^8 CFU/mL và 3B ở mật số 10^9 CFU/mL là các nghiệm thức có tiềm năng cao nhất được tuyển chọn để triển khai nghiên cứu khảo sát khả năng phòng trị bệnh thối củ hành tím do vi khuẩn *P. aegurinos* trong điều kiện ngoài đồng.

Bảng 1: Hiệu quả làm giảm bệnh thối củ hành tím do vi khuẩn *Pseudomonas aegurinos* gây ra của hai chủng 4A và 3B trong điều kiện nhà lưới tại thời điểm 4, 8 và 12 NSCB

Chủng vi khuẩn	Mật số (CFU/mL)	Mức độ bệnh (%)					
		Áo củ			Chủng và đất		
		4 NSCB	8 NSCB	12 NSCB	4 NSCB	8 NSCB	12 NSCB
3B	10^9	9,33 ^{bcd}	12,33 ^{cd}	59,33 ^b	20,00 ^{bc}	25,00 ^c	49,33 ^d
	10^8	5,00 ^{bcd}	13,50 ^{cd}	21,67 ^e	75,00 ^a	79,50 ^a	78,33 ^{ab}
	10^7	15,00 ^{cd}	36,17 ^b	46,67 ^c	26,00 ^{bc}	56,67 ^b	72,50 ^{bc}
4A	10^9	7,00 ^{bcd}	20,00 ^c	33,33 ^d	36,67 ^b	83,67 ^a	91,00 ^{ab}
	10^8	8,00 ^{bcd}	16,67 ^c	40,00 ^{cd}	22,67 ^{bc}	26,50 ^c	55,00 ^{cd}
	10^7	21,00 ^b	40,00 ^b	95,00 ^a	60,00 ^a	66,67 ^{ab}	93,33 ^{ab}
Starter 20WP		1,00 ^d	1,67 ^d	1,67 ^f	1,00 ^c	1,67 ^d	1,67 ^e
Nước cất		65,00 ^a	89,33 ^a	98,33 ^a	65,00 ^a	89,33 ^a	98,33 ^a
F-ratio		24,15	47,83	125,41	11,01	20,57	21,86
P-value		<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
%CV		20,56	26,39	32,54	27,08	32,49	32,06

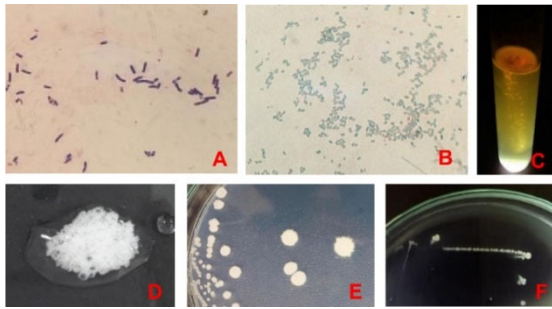
Các số trung bình trong cùng một thời điểm khảo sát theo sau bởi một hoặc các chữ cái giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa ở mức 5% bằng phép thử Duncan. NSCB: ngày sau chủng bệnh

3.3 Định danh vi khuẩn đối kháng

Trình tự gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn 4A (1.418 nucleotide) và 3B (1.431 nucleotide) được so sánh với trình tự gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn khác trên cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI). Trình tự gen của chủng 3B có độ tương đồng 99% với trình tự gen của 7 loài trong chi *Bacillus* [*Bacillus aerius* (KY818962.1), *B. aerophilus* (KC172020.1), *B. altitudinis* (KC172026.1), *B. pumilus* (KY621522.1), *B. safensis* (KR063199.1), *B. stratosphericus* (KC172037.1) và *B. subtilis* (JQ039972.1)] và trình tự gen của chủng 4A có độ tương đồng 99% với trình tự gen của 5 loài vi khuẩn trong chi *Bacillus* [*B. aerius* (KR708841.1), *B. aerophilus* (KY124216.1), *B. altitudinis*

(KU955326.1), *B. pumilus* (KU962124.1) và *B. stratosphericus* (KT986099.1)]. Vì đều có độ tương đồng bằng nhau, hai chủng vi khuẩn tiếp tục được khảo sát các đặc điểm sinh lý sinh hóa để xác định tên loài.

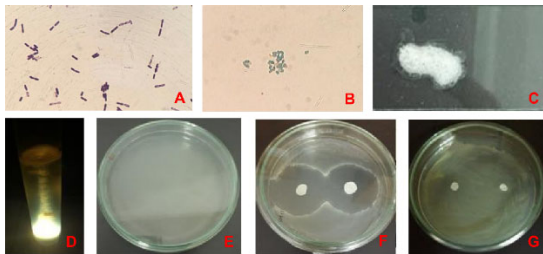
Chủng vi khuẩn 3B là vi khuẩn Gram dương, hình que (Hình 1A), hiếu khí (phát triển được trên bề mặt môi trường thạch), có khả năng sinh nội bào tử (Hình 1B) và di động (Hình 1C), tổng hợp được enzyme catalase (Hình 1D), có khả năng phát triển ở nhiệt độ 45°C (Hình 1E) và không có khả năng phân giải tinh bột (Hình 1F). Vì vậy, chủng 3B được xác định là vi khuẩn *B. safensis* (Holt *et al.*, 1994, Shivaji *et al.*, 2006).



Hình 1: Các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của chủng vi khuẩn 3B.

[A: Gram dương; B: Sinh nội bào tử; C: Di động (+); D: Tổng hợp enzyme catalase (+); E: Phát triển ở 45°C (+); F: Không phân giải tinh bột (-)]

Chủng 4A là vi khuẩn Gram dương, hình que (Hình 2A), hiếu khí (phát triển được trên bề mặt môi trường thạch), có khả năng sinh nội bào tử (Hình 2B) và di động (Hình 2D), tổng hợp được enzyme catalase (Hình 2C), không phát triển được ở nhiệt độ 45°C (Hình 2E), mẫn cảm với kháng sinh ampicillin (Hình 2F) nhưng không mẫn cảm với lincomycin (Hình 2G). Vì vậy, chủng 4A được xác định là vi khuẩn *B. stratosphericus* (Holt *et al.*, 1994, Shivaji *et al.*, 2006).



Hình 2: Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của chủng vi khuẩn 4A.

[A: Gram dương; B: Sinh nội bào tử; C: Tổng hợp enzyme catalase (+); D: Di động (+); E: Không phát triển ở nhiệt độ 45°C (-); F: Mẫn cảm với ampicillin (+); G: Không mẫn cảm với lincomycin (-)]

4 THẢO LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy hầu hết các nghiệm thức sử dụng vi khuẩn đều có hiệu quả giảm bệnh thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với đối chứng dương (sử dụng thuốc hóa học). Tuy nhiên, sử dụng thuốc hóa học làm tăng chi phí sản xuất, ảnh hưởng đến sức khỏe con người, gây ô nhiễm môi trường và chỉ có tác dụng trị bệnh trong giai đoạn bệnh đã phát triển. Phòng trừ sinh học bằng vi khuẩn đối kháng là phương pháp thay thế thân thiện với môi trường, giúp giảm chi phí phòng trị bệnh thối củ trong quá trình canh tác và có hiệu quả lâu dài từ phòng bệnh cho đến trị bệnh. Biện pháp này có thể kết hợp với

biện pháp hóa học và canh tác để phòng trị bệnh thối củ hiệu quả và bền vững. Bên cạnh, khả năng đối kháng trực tiếp với mầm bệnh, vi khuẩn đối kháng còn có khả năng nhân mật số nhanh, kích thích sinh trưởng và tính kháng bệnh của cây trồng (Kloepper, 1993; Pieterse *et al.*, 2003; Saharan and Nehra, 2011; Ahemad and Kibret, 2014).

Trước khi triển khai ngoài đồng, các vi sinh vật đối kháng được xác định loài nhằm loại bỏ các loài có khả năng gây hại đến môi trường, con người, động vật và cây trồng. Trong nghiên cứu này, hai chủng vi khuẩn 4A và 3B được định danh bằng phương pháp giải trình tự 16S rRNA, đây là kỹ thuật cho kết quả định danh nhanh hơn so với phương pháp truyền thống (Janda and Abbott, 2002; Woo *et al.*, 2008). Tuy nhiên, kỹ thuật này có điểm hạn chế là không thể phân biệt các chủng vi khuẩn trong cùng phân nhóm khi chúng có độ tương đồng cao hoặc giống nhau về trình tự gen 16S rRNA. So sánh trình tự gen 16S rRNA của 2 chủng 3B và 4A cho thấy chúng có cùng độ tương đồng (99%) với 12 loài vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*. Kết quả này không thể xác định được tên loài của 2 chủng 3B và 4A nếu chỉ dựa vào độ tương đồng. Ngoài ra, dựa vào độ tương đồng cao nhất để định danh vi khuẩn sẽ cho kết quả không chính xác và đáng tin cậy vì gen 16S rRNA chỉ chiếm một phần nhỏ trong bộ gen vi sinh vật (Janda and Abbott, 2002; Drancourt and Raoult, 2005; Petti *et al.*, 2007). Do đó, bổ sung các khảo sát dựa trên sự khác nhau về đặc điểm sinh lý, sinh hóa của vi khuẩn vào quá trình định danh là điều cần thiết, giúp kết quả định danh được chính xác và đáng tin cậy hơn. Bằng cách kết hợp phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA với khảo sát sinh lý sinh hóa theo Hệ thống phân loại vi khuẩn Bergey's, chủng 3B được định danh là vi khuẩn *B. safensis* và chủng 4A là vi khuẩn *B. stratosphericus*.

Vi khuẩn *B. safensis* được xem là tác nhân phòng trừ sinh học hữu ích trong canh tác nông nghiệp theo hướng bền vững. Bên cạnh khả năng phân giải lân, tiết indole-3-acetic acid (IAA) và 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase kích thích sinh trưởng và sức khỏe của cây (Yadav *et al.*, 2011; Chakraborty *et al.*, 2013; Kavamura *et al.*, 2013), *B. safensis* còn có khả năng đối kháng với nhiều mầm bệnh trên nhiều loại cây trồng như *Phytophthora capsici* trên bí đao (Zhang *et al.* 2010), mầm bệnh gây mốc xám cà chua (Berrada *et al.*, 2012) và các mầm bệnh thuộc bộ nấm nấm Oomycetes (Bibi *et al.*, 2012) và các loài nấm như *Cryptococcus neoformans* và *Candida albicans* gây bệnh trên người (Mayer and Kronstad, 2017). Vi khuẩn *B. stratosphericus* có khả năng tạo ra điện trực tiếp từ quá trình oxy hóa có chất xúc tác các hợp chất hữu cơ nên được nghiên cứu chế tạo pin nhiên

liệu vi khuẩn (microbial fuel cells) (Zhang *et al.* 2012). Hiện nay, chưa có các báo cáo đề cập đến khả năng gây hại đến môi trường, con người, động vật và cây trồng của hai loài vi khuẩn này. Vì vậy, hai chủng vi khuẩn *B. stratosphericus* 4A và *B. safensis* 3B có tiềm năng ứng dụng phòng trừ sinh học bệnh thối củ hành tím trong điều kiện ngoài đồng.

5 KẾT LUẬN

Trong 133 chủng vi khuẩn được phân lập từ bốn mẫu đất ruộng hành tím tại thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng, 4 chủng vi khuẩn (2C, 3A, 3B và 4A) có khả năng đối kháng với vi khuẩn *P. aeruginosa* trên đĩa thạch, trong đó chủng 3B có khả năng đối kháng mạnh nhất (bán kính vòng vô khuẩn = 6 mm). Bên cạnh đó, chỉ có dịch nuôi cấy của hai chủng 2C và 4A có khả năng ức chế vi khuẩn *P. aeruginosa* tại thời điểm 2 ngày sau nuôi cấy, trong đó dịch nuôi cấy của chủng 4A có hiệu quả ức chế cao nhất (bán kính vòng vô khuẩn = 6 mm).

Trong điều kiện nhà lưới, áo củ với chủng 4A và 3B (10^8 CFU/mL) và chủng vào đất với chủng 4A (10^8 CFU/mL) và chủng 3B (10^9 CFU/mL) cho hiệu quả giảm bệnh cao nhất và kéo dài đến thời điểm 12 NSCB.

Kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA kết hợp với khảo sát các đặc điểm hình thái và sinh hóa của vi khuẩn cho thấy chủng 3B là *B. safensis* và chủng 4A là *B. stratosphericus*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ahemad, M. and Kibret, M., 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University – Science*. 26(1): 1-20.

Assefa, S., Ahmed, S., Sakhuja, P.K. and Chemed, F., 2010. Management of Fusarium basal rot (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*) on shallot through fungicidal bulb treatment. *Crop Protection*. 30(5): 560-565.

Berrada, I., Benkhemmar, O., Swings, J., Bendaou, N. and Amar, M., 2012. Selection of halophilic bacteria for biological control of tomato gray mould caused by *Botrytis cinerea*. *Phytopathologia Mediterranea*. 51(3): 625-630.

Bibi, F., Yasir, M., Song, G.C., Lee, S.Y. and Chung, Y.R., 2012. Diversity and characterization of endophytic bacteria associated with tidal flat plants and their antagonistic effects on Oomycetous plant pathogen. *The Plant Pathology Journal*. 28(1): 20-31.

Chakraborty, U., Chakraborty, B.N., Chakraborty, A.P. and Dey, P.L., 2013. Water stress amelioration and plant growth promotion in wheat plants by osmotic stress tolerant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 29(5): 789-803.

Conn, K.E., Lutton, J.S. and Rosenberger, S.A., 2012. *Onion Disease Guide : A Practical Guide for Seedsmen, Growers and Agricultural Advisors*. Senminis Vegetable Seeds. Woodland, 71 pages.

Drancourt, M. and Raoult, D., 2005. Sequence-based identification of new bacteria: A proposition for creation of an orphan bacterium repository. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(9): 4311-4315.

Harris, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.E. and Klaenhammer, T.R., 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 52(6): 384-387.

Holt G.J., Peter, H.S. and Noel, R.K., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, 754 pages.

Hong T.T.B., Xuan N.T., Nghia N.T. *et al.*, 2013. The effect of planting density on growth attributes and major pests of violet onion *Allium ascalonicum* (L.) in Vinh Chau. *Omonrice*. 19: 180-184.

IFAD (Ban điều phối dự án hỗ trợ Tam Nông tỉnh Ninh Thuận), 2013. *Sổ tay Khuyến nông - Khuyến ngư*, Ninh Thuận, trang 64-71.

Janda, J.M. and Abbott, S.L., 2002. Bacterial identification for publication: when is enough enough?. *Journal of Clinical Microbiology*. 40(6): 1887-1891.

Kavamura, V.N., Santos, S.N., Silva, J.L. *et al.*, 2013. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiology Research*. 168(4): 183-191.

Khoa, N.Đ., Giàu, N.Đ.N., and Tuấn, T.Q., 2016. Effects of *Serratia nematodiphila* CT-78 on rice bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biological Control*. 103: 1-10.

Kloepper, J.W., 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological agents. *In: Metting, F.B. (Ed.) Soil Microbial Ecology Applications in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Dekker. New York, pp. 254-274.

Lê Hùng Cường, 2017. *Xác định mầm bệnh gây đốm lá trên hoa hồng tại Đồng Tháp và tuyển chọn vi khuẩn đối kháng trong đất để phòng trị bệnh*. Luận văn Cao học. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.

Mayer, F.L., and James, W., 2017. Disarming fungal pathogens: *Bacillus safensis* inhibits virulence factor production and biofilm formation by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *mBio*. 8(5): e01537-17.

McLeod, J.W. and Gordon, J., 1923. Catalase production and sensitiveness to hydrogen peroxide amongst bacteria: with a scheme for classification based on these properties. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 26(3): 326-331.

- Nguyễn Đăng Ngọc Giàu, 2014. Phân lập, định danh và khảo sát khả năng phòng trừ bệnh cháy bìa lá của vi khuẩn trong đất ở thành phố Cần Thơ và tỉnh Hậu Giang. Luận văn Cao học. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.
- Nguyễn Hoàng Minh Sang, 2017. Tuyển chọn vi khuẩn đối kháng trong đất để phòng trị bệnh cháy dây trên khoai lang tím tại huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long. Luận văn Cao học. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.
- Nguyễn Lâm Dũng và Đinh Thúy Hằng, 2006. Phương pháp thực nghiệm dùng để định tên các loài vi khuẩn, ngày truy cập 28/6/2018. <http://vietsciences2.free.fr/khaoctu/nguyenlandung/03-phuongphapthucnghiem-inhtenvk03.html>.
- Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyển và Phạm Văn Ty, 2007. Vi sinh vật học. Nhà xuất bản Giáo Dục. Hà Nội, 520 trang.
- Nguyễn Thái Học, 2016. Phân lập và xác định các mầm bệnh phổ biến trên hành tím (*Allium ascalonicum*) tại thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng. Luận văn Cao học. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.
- Nguyễn Thanh Hà, 1991. Kỹ thuật xét nghiệm vi sinh vật y học. Nhà xuất bản Y học. Hà Nội, trang 329-338.
- Nguyễn Thị Kiều My, 2017. Xác định mầm bệnh trên hạt lúa giống tại An Giang và tuyển chọn vi khuẩn đối kháng trong đất để phòng trị bệnh. Luận văn Cao học. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.
- Nguyễn Thị Ngọc Ngân, 2017. Xác định mầm bệnh trên hạt lúa giống tại Hậu Giang và tuyển chọn vi khuẩn đối kháng trong đất để phòng trị bệnh. Luận văn Cao học. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.
- Nguyễn Thị Nguyệt, 2014. Phòng trừ một số sâu bệnh hại củ hành tím dịp Tết, ngày truy cập 20/6/2018. <http://www3.skhn.bentre.gov.vn/Pages/ChuyenMuc.aspx?ID=278&CategoryId=Nghi%u00ean+c%u1ee9u++Tri%u1ec3n+khai&InitialTabId= Ribbon.Read&PageIndex=8>
- Petti, C.A., Reller, L.B. and Weinstein, M.P., 2007. Detection and identification of microorganism by gene amplification and sequencing. *Clinical Infectious Diseases*. 44(8): 1108-1114.
- Phòng Kinh tế thị xã Vĩnh Châu, 2015. Phân khai chi tiêu kế hoạch phát triển kinh tế các xã, phường năm 2015 của thị xã Vĩnh Châu.
- Pieterse, C.M.J., Pelt, J.A., Verhagen, B.W.M., et al., 2003. Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Symbiosis*. 35(1-3): 39-54.
- Quyển, T.V., Tín, C.H.T and Khoa, N.Đ., 2017. Disease-reducing effects of antagonistic soil bacteria on *Fusarium* basal rot of shallot caused by *Fusarium oxysporum* in Vinh Chau, Soc Trang. *Can Tho University Journal of Science*. 6: 31-37.
- Saharan, B.S. and Nehra, V., 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. *Life Sciences and Medicine Research*. 21(1): 1-30.
- Schaeffer, A.B., and Fulton, M.D., 1933. A simplified method of staining endospores. *Science*. 77: 194-194.
- Shivaji, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., et al., 2006. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 1456-1473.
- Sintayehu, A., Ahmed, S., Fininsa, C. and Sakhuja, P.K., 2014. Evaluation of green manure amendments for the management of *Fusarium* basal rot (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*) on shallot. *International Journal of Agronomy*. ID 150235, 6 pages.
- Trần Kim Thoa, 2015. Phân lập, định danh và khảo sát khả năng phòng trừ bệnh cháy bìa lá lúa của vi khuẩn đối kháng trong đất hai tỉnh Tiền Giang và Sóc Trăng. Luận văn cao học. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.
- Trần Thị Bích Thảo, 2017. Xác định mầm bệnh thối đống tiền trên khoai lang tím tại huyện Bình Tân, Vĩnh Long và tuyển chọn vi khuẩn đối kháng trong đất để phòng trị bệnh. Luận văn cao học. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.
- Võ Hoàng Nghiệm, 2012. Điều tra giám định bệnh trên hành tím (*Allium ascalonicum* L.) trong vụ hành giống năm 2012 tại thị xã Vĩnh Châu, tỉnh Sóc Trăng. Luận văn đại học. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.
- Võ Thị Phương Trang, 2013. Phân lập, định danh và khảo sát khả năng phòng trừ bệnh cháy bìa lá của vi khuẩn trong đất tỉnh An Giang. Luận văn cao học. Trường Đại học Cần Thơ. Thành phố Cần Thơ.
- Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Teng, J.L.L., Tse, H. and Yuen, K.Y., 2008. Then and now: Use of 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*. 14(10): 908-934.
- Yadav, S., Kaushik, R., Saxena, A.K. and Arora, D.K., 2011. Genetic and functional diversity of *Bacillus* strains in the soils longterm irrigated with paper and pulp mill effluent. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 57(4): 183-195.
- Zhang, J., Zhang, E., Scott, K. and Burgess, J.G., 2012. Enhanced electricity production by use of reconstituted artificial consortia of estuarine bacteria grown as biofilms. *Environmental Science and Technology*. 46(5): 2984-2992.
- Zhang, S., White, T.L., Martinez, M.C., McInroy, J.A., Kloepper, J.W. and Klassen, W., 2010. Evaluation of plant growthpromoting rhizobacteria for control of phytophthora blight on squash under greenhouse conditions. *Biological Control*. 53(1): 129-135.