

CHỌN LỌC VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG CỦA VI KHUẨN *BACILLUS SPP.* VỚI VI KHUẨN *XANTHOMONAS* GÂY BỆNH ĐÓM LÁ TRÊN CẢI NGỌT

Hoàng Xuân Quang, Vũ Thị Thanh Hoàn, Nguyễn Hiếu Hạnh

1. DẪN NHẬP

Bệnh đốm lá trên nhóm rau họ thập tự với triệu chứng bệnh điển hình là đốm xanh giot dầu, sưng nước, hơi lõm so với bề mặt lá do vi khuẩn *Xanthomonas* sp. gây ra. Bệnh là một trong những nguyên nhân làm giảm năng suất và chất lượng sản phẩm đáng kể, đặt biệt trong giai đoạn mùa mưa. Thuốc hóa học thường được sử dụng trong phòng trừ bệnh do có hiệu quả cấp tính cao nhưng có nhiều rủi ro cho sức khỏe con người, suy thoái môi trường sinh thái, hình thành tính kháng của các tác nhân gây bệnh và để lại tồn dư trong sản phẩm. Sử dụng các vi sinh vật đối kháng trong việc phòng trừ có nhiều triển vọng, đáp ứng với yêu cầu sản xuất rau an toàn và hướng đến một nền nông nghiệp phát triển bền vững.

Trong các vi sinh vật đối kháng, vi khuẩn *Bacillus* được chứng minh có khả năng đối kháng với nhiều loại nấm như: *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *pythium* và *Phytophthora* và một số vi khuẩn khác nhờ vào khả năng sinh ra các chất kháng sinh như: *Bacillus cereus* sinh ra kháng sinh cerexin và Zwittermicin; *B. circulans* sinh ra Circulin; *B. licheniformis* sinh ra bacitracin; riêng *B. subtilis* có khả năng sinh ra 4 loại kháng sinh polymycin, difficidin, subtilin và mycobacilin.

Mục tiêu: Chọn lọc những dòng vi khuẩn *Bacillus* spp. đối kháng mạnh với vi khuẩn *Xanthomonas* ứng dụng trong phòng trừ bệnh đốm lá vi khuẩn trên cây rau họ thập tự.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phân Lập Vi Khuẩn *Bacillus* Trên Một Số Cây Rau ở Một Số Vùng Rau Tại Tp.HCM

Trên vườn chọn cây phát triển tốt nhất không bị bệnh, thu mẫu rễ và đất vùng rễ. Lấy 1 gram rễ và đất nghiền nhỏ cho thêm vào 10ml nước cất. Lắc mẫu với tốc độ 150 vòng/phút trong 30 phút. Để lắng trong 5 phút, lấy phần dung dịch trong và xử lý nhiệt ở 80⁰C trong 30 phút. Cây trang trên môi trường NA (Nutrient broth 8g, Agar 20g, nước cất 1L), ủ đĩa ở 30⁰C trong 48 giờ. Chọn khuẩn lạc phát triển mạnh, cấy riêng ra 1 đĩa khác. Các khuẩn lạc được tạo thuần và cấy đối kháng với vi khuẩn gây bệnh

Ký hiệu mẫu: Chữ cái viết hoa như B cho biết dòng *Bacillus*, chữ cái đầu tiên của tên cây ký chủ cho biết nguồn gốc vi khuẩn được phân lập và số thứ tự theo sau chỉ vị trí mẫu trong bộ mẫu lưu trữ. Ví dụ BCN16 cho biết dòng *Bacillus* được phân lập trên cây cải ngọt ở vị trí 16 trong bộ mẫu.

2.2 Chọn Lọc Và Đánh Giá Tính Đối Kháng Của Các Dòng Vi Khuẩn *Bacillus*

Sử dụng phương pháp nuôi cấy trên đĩa petri, cùng điều kiện giống nhau giữa dòng vi khuẩn đánh giá đối kháng và tác nhân gây hại. Trên đĩa petri trang đều dung dịch vi khuẩn gây bệnh, sau đó nhỏ 1 giọt dung dịch vi khuẩn *Bacillus* lên trên tại 5 điểm của đĩa petri (theo hình 1). Mỗi dòng test đối kháng được lập lại 3 lần, mỗi lần 1 đĩa petri. Đặt đĩa ở 30⁰C, sau 48 giờ quan sát và đánh giá khả năng đối kháng dựa vào vòng đối kháng mà vi khuẩn *Bacillus* sinh ra trên môi trường. Vòng đối kháng là khoảng cách giữa rìa của khuẩn lạc vi khuẩn *Bacillus* và rìa khuẩn

lạc vi khuẩn gây bệnh. Dựa vào kích thước vòng đối kháng ta chia mức độ kháng theo các cấp sau: Không đối kháng (-): 0mm; Đối kháng yếu (+): >0 - <2mm; Đối kháng trung bình (++) : 2-<4mm; Đối kháng mạnh (+++): >=4mm

2.3 Đánh Giá Độc Tính Của Các Dòng *Bacillus* Trong Invitro

Thí nghiệm nhằm loại bỏ những dòng vi khuẩn gây hại có thể có, mặc dù chúng có tính đối kháng cao đã được chọn lọc. Thiết lập phương pháp đánh giá độc tính trong invitro, sử dụng cây cải ngọt con làm cây thử nghiệm. Hạt cải ngọt được xử lý bề mặt với cồn 70⁰ trong 1 phút, rửa lại bằng nước cất, hong khô và ủ cho tới khi nảy mầm. Chuẩn bị dung dịch vi khuẩn đối kháng ở nồng độ 10⁸ – 10⁹CFU/ml. Ngâm hạt với vi khuẩn trong 30phút, hong khô và đặt hạt vào ống nghiệm có môi trường WA (Agar 18g, nước cất 1L). Ống nghiệm đặt ở điều kiện 12 giờ sáng, 12 giờ tối. Theo dõi tỷ lệ cây chết, biến dị và bị bệnh ở 7 ngày sau khi xử lý và so sánh với đối chứng không xử lý với vi khuẩn.

2.4 Định Danh Các Dòng Vi Khuẩn Đối Kháng Theo Khóa Phân Loại Của Schaad (1988).

Các phản ứng sinh hóa định danh vi khuẩn *Bacillus* gồm: thủy phân tinh bột, sự di động (Motility), phát triển trong điều kiện yếm khí, phát triển trong môi trường NaCl 7%, phát triển ở 45⁰C, 50⁰C và 55⁰C, utilization of citrate, tạo acid từ carbohydrat, phát triển trong môi trường pH 5.7, phản ứng VP test.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân Lập Vi Khuẩn *Bacillus*

125 dòng vi khuẩn *Bacillus* được phân lập từ 6 loại rau khác nhau ở các vùng rau tại Tp. HCM.

3.2 Chọn Lọc Và Đánh Giá Tính Đối Kháng Của Các Dòng Vi Khuẩn *Bacillus*

Trắc nghiệm tính kháng của 125 dòng *Bacillus* với vi khuẩn *Xanthomonas* kết quả cho thấy có 18 dòng đối kháng mạnh, 31 dòng đối kháng trung bình, 28 dòng đối kháng yếu và 48 dòng không có khả năng đối kháng với vi khuẩn *xanthomonas*.

3.3 Đánh Giá Độc Tính Của Các Dòng *Bacillus* Trong Invitro

Đánh giá tính gây độc hay các ảnh hưởng có hại của các dòng vi khuẩn đối kháng *Bacillus* đến cây cải ngọt trong invitro là phương pháp chủng trực tiếp vi khuẩn lên hạt nảy mầm và theo dõi sự gây hại của vi khuẩn. Kết quả cho thấy các dòng vi khuẩn đối kháng mạnh đều không gây hại đối với cây cải ngọt trong invitro.

3.4 Định Danh Các Dòng Vi Khuẩn Đối Kháng Theo Khóa Phân Loại Của Schaad (1988)

Định danh các dòng *Bacillus* đối kháng mạnh bằng các phản ứng sinh hóa theo khóa phân loại của Schaad (1988), kết quả thể hiện ở bảng 1:

Từ kết quả các đặc tính sinh lý và các phản ứng sinh hóa (bảng 1) của 10 dòng *Bacillus* đối kháng đã xác định được 2 dòng vi khuẩn *B. subtilis* trên cây Cải Ngọt và cây Rau Dền, 3 dòng *B. licheniformis* trên Cải Ngọt, Cải Xanh và Rau Muống. Còn 5 dòng chưa xác định được tên loài. Như vậy trên các vùng rau tại Tp. HCM có ít nhất 3 loài vi khuẩn *Bacillus*. Với cấu trúc hình thành nội bào tử trong tế bào dinh dưỡng giúp cho vi khuẩn *Bacillus* có khả năng chịu nhiệt cao, có hệ thống enzym phong phú và thích nghi với khoảng pH rộng. Vì thế khả năng tồn tại trong điều kiện khắc nghiệt tốt hơn so với vi khuẩn gây bệnh và với đặc tính sinh ra nhiều loại kháng sinh vi khuẩn *Bacillus* là đối tượng rất thích hợp cho nghiên cứu trong phòng trừ sinh học.

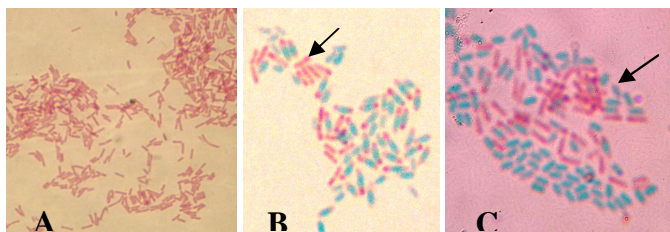
Bảng 1. kết quả phản ứng sinh lý và sinh hóa của các dòng vi khuẩn *Bacillus* đối kháng với vi

stt	Các phản ứng	Dòng <i>Bacillus</i>
-----	--------------	----------------------

	sinh lý sinh hóa	BCXC 23	BCX C78	BRMC 12	BCNC9 0	BCNC 89	BRMC 40	BDC 54	BDQ 83	BDC 19	BCNC 24
1	Phản ứng Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Vị trí bào tử Ở giữa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	Thủy phân tinh bột	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
4	Khả năng di chuyển	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	Sinh trưởng yếm khí	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
6	Sinh trưởng NaCl 7%	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
7	Sinh trưởng ở 45°C	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
8	Sinh trưởng ở 50°C	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
9	Sinh trưởng ở 55°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Sử dụng Citrate	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
11	Sinh trưởng ở pH=5.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	Tạo axit từ Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	Tạo axit từ Xylose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
14	Tạo axit từ Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	Phép thử VP	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
	Kết quả định danh	<i>Bacillus</i> s sp.	<i>B.</i> <i>lichenifor</i> <i>mis</i>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> <i>subtilis</i>	<i>B.</i> <i>lichenifo</i> <i>rmis</i>	<i>B.</i> <i>lichenifor</i> <i>mis</i>	<i>Bacillus</i> s sp	<i>B.</i> <i>subtilis</i>	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus</i> s sp.

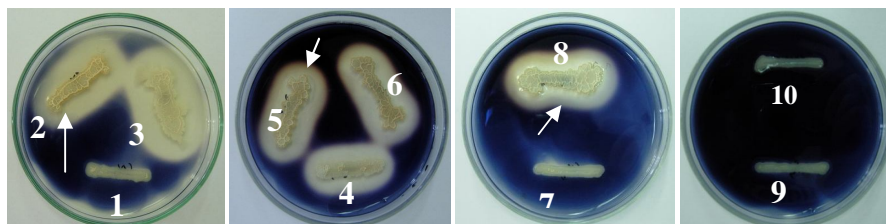
Một số hình ảnh phản ứng sinh hóa của các dòng *Bacillus*

Phản ứng 1&2: Nhuộm gram và xác định vị trí bào tử trong tế bào



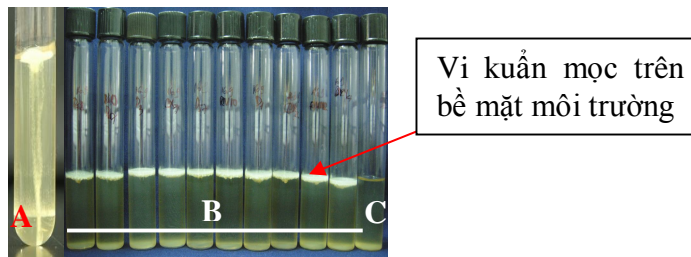
Hình 1: Phản ứng bắt màu của bào tử *Bacillus* spp. (A) phản ứng Gram(+) của tế bào vi khuẩn; (B) tế bào chưa phóng thích bào tử, bào tử nằm ở giữa tế bào; (C) Tế bào đã phóng thích bào tử, bào tử bắt màu xanh, tế bào dinh dưỡng bắt màu tím

Phản ứng 3: Thủy phân tinh bột (starch hydrolysis)



Hình 2: Sự thủy phân tinh bột của các dòng *Bacillus* (1): BCXC23 (-); (2): BCXC78 (+); (3): BRMC12 (+); (4): BCNC90 (+); (5): BCNC89 (+) 6: BRMC40 (+); (7): BDC54 (-); (8): BDQ83 (+); (9): BDC19 (-); (10): BCNC24(-). (+) Phản ứng dương tính; (-). Phản ứng âm tính

Phản ứng 4: Sự di chuyển của vi khuẩn (Motility)



Hình 3: phản ứng về sự di động của các dòng *Bacillus*
A: vi khuẩn không di động; B: vi khuẩn có di động; C: Đôi chứng

4. KẾT LUẬN

- 125 dòng vi khuẩn *Bacillus* được phân lập từ các loại rau họ thập tự, trong đó có 18 dòng *Bacillus* đối kháng mạnh với vi khuẩn *Xanthomonas* gây bệnh đốm lá trên rau họ thập tự.
- Xác định được 2 dòng *B.subtilis* trên Cải Ngọt và Rau Dền, 3 dòng *B. licheniformis* trên Cải Xanh, Cải Ngọt và Rau Muống.

5. ĐỀ NGHỊ

Xây dựng quy trình lên men tạo chế phẩm từ vi khuẩn *Bacillus subtilis* ứng dụng trong phòng trừ bệnh trên rau họ thập tự và một số loại rau khác.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Backman, P. A., Wilson, M., and Murphy, J. F., 1997. Bacteria for control plant diseases. In *Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control*. CRC Press: 95-109.
2. Besson, F., Peypoux, F., Michel, G., and Delcambe, L., 1978. Identification of antibiotics of iturin group in various strains of *Bacillus subtilis*. *The Journal of Antibiotic* 4: 284-288.
3. Cục Bảo Vệ Thực Vật, 2007. *Danh mục thuốc Bảo Vệ Thực Vật được phép sử dụng ở Việt Nam*, trang 72-98.
4. Laura A, S-S., Eric, V.S., Sandra, J.R., Jo, H., 1998. Target range of Zwittermicin A, and amipoly antibiotic from *Bacillus cereus*. *Current Microbiology* 37: 6-11.

5. Massomo, S. M. S., Mortensen, C. N., Mabagala, R. B., and Hockenhul, J., 2004. Biocontrol black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*) of cabbage in Tanzania with *Bacillus* strains. *Phytopathology* 152: 98-105.
6. Mizumoto, S., Hirai, M., Shoda, M., 2007. Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in Solid-state fermentation. *Biotechnological Products and Process Engineering*.
7. Nguyễn Trọng Thê, 2004. Chọn lọc và sử dụng vi khuẩn đối kháng *Pseudomonas fluorescens* để phòng trừ bệnh do nấm *Rhizoctonia solani* và nấm *Sclerotium rolfsii* gây hại trên cây bông vải và cây cà chua. *Luận văn Thạc sỹ Khoa học Nông nghiệp Đại học Nông Lâm Tp.HCM*, 52-53.