

## PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG NẤM *NEOSCYTALIDIUM* SP. GÂY BỆNH ĐÓM TRẮNG TRÊN CÂY LAN NGỌC ĐIỂM

**Đỗ Thị Huỳnh Mai, Nguyễn Thị Liên**

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

Liên hệ email: [dthmai1308@gmail.com](mailto:dthmai1308@gmail.com)

### TÓM TẮT

Bệnh đốm trắng là một trong những bệnh hại nghiêm trọng gây thiệt hại lớn trên các loài cây trồng nói chung và ở cả loài lan nói riêng. Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn các dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Neoscytalidium* sp. gây bệnh đốm trắng trên lan Ngọc điểm. Từ 7 mẫu đất vườn trồng lan Ngọc điểm được thu tại Bến Tre, Vĩnh Long và Cần Thơ, 26 dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng nấm *Neoscytalidium* sp. đã được phân lập. Hiệu lực đối kháng nấm của các dòng vi khuẩn dao động từ 62,2 – 79,2%. Kết quả khảo sát các cơ chế đối kháng của các dòng vi khuẩn cho thấy có 21/26 dòng có khả năng sản sinh siderophore, 25/26 dòng có khả năng phân giải cellulose, 25/26 dòng có khả năng phân giải chitin và 26/26 dòng có khả năng phân giải protein. Dòng vi khuẩn SH8 có hiệu lực đối kháng cao nhất được chọn để định danh truyền thống dựa vào hệ thống phân loại Bergey. Kết quả cho thấy dòng vi khuẩn SH8 có đặc điểm phù hợp với các loài thuộc chi *Bacillus*. Kết hợp định danh bằng giải trình tự vùng gen 16S rRNA và các thử nghiệm sinh hóa cho thấy dòng vi khuẩn SH8 có quan hệ gần nhất với loài *Bacillus amyloliquefaciens*.

**Từ khóa:** *Bacillus amyloliquefaciens*, định danh, đốm trắng, lan Ngọc điểm, *Neoscytalidium* sp..

Nhận bài: 28/12/2017

Hoàn thành phản biện: 24/01/2018

Chấp nhận bài: 26/01/2018

### 1. MỞ ĐẦU

Lan Ngọc điểm (*Rhynchostylis gigantea* được mô tả đầu tiên bởi Lindley vào năm 1896) hay còn được gọi là Nghinh xuân là một loại lan quý và có giá trị kinh tế cao với hương thơm đặc trưng, màu sắc đa dạng, hình dạng độc đáo (Nguyễn Công Nghiệp, 2006). Bên cạnh đó, việc sản xuất và nhân giống loài lan này gặp nhiều khó khăn do ảnh hưởng của các tác nhân gây bệnh làm giảm năng suất và chất lượng của cây. Đặc biệt là bệnh đốm trắng do nấm *Neoscytalidium* sp. gây ra (Huang và cs., 2016). Theo Nguyễn Hồng Sơn và cs. (2015), cho thấy đây là loại nấm bệnh phát triển nhanh mạnh và lan nhanh trên diện rộng. Các biện pháp phòng trừ bệnh chủ yếu hiện nay là sử dụng thuốc bảo vệ thực vật hóa học. Tuy nhiên, biện pháp này tác động xấu đến môi trường do dư lượng hóa chất sẽ tồn đọng trong đất, nguồn nước và không khí gây nguy hiểm đối với sức khỏe con người và các sinh vật khác. Phòng trừ bệnh cho cây bằng việc sử dụng vi khuẩn đối kháng với nấm bệnh là biện pháp sinh học đang rất được quan tâm nghiên cứu, nhằm mục đích nâng cao hiệu quả phòng trừ bệnh đốm trắng đồng thời tạo điều kiện cho lan Ngọc điểm phát triển tốt nhất mà không phải sử dụng thuốc bảo vệ thực vật hóa học. Vì vậy, đề tài: “Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn đối kháng nấm *Neoscytalidium* sp. gây bệnh đốm trắng trên lan Ngọc điểm” đã được thực hiện với mục đích

tìm ra các dòng vi khuẩn đối kháng nấm, làm cơ sở phát triển các biện pháp phòng trừ nấm bệnh bằng biện pháp sinh học.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Mẫu lá lan Ngọc điểm bị bệnh đốm trắng. Mẫu đất vườn trồng lan Ngọc điểm được thu tại ba tỉnh Cần Thơ, Vĩnh Long, Bến Tre vào tháng 12/2016.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phân lập nấm *Neoscytalidium* sp. gây bệnh đốm trắng trên lan Ngọc điểm

Mẫu bệnh đốm trắng có triệu chứng đặc trưng trên lá lan Ngọc điểm thu thập về, được khử trùng bằng cồn 70% (30 giây) sau đó rửa lại với nước cất vô trùng. Cắt lấy vết bệnh với kích thước khoảng  $1 \times 1$  cm đặt vào đĩa petri chứa môi trường PDA (200 g khoai tây, 20 g D-Glucose, 15 g Agar), ủ ở nhiệt độ  $37^\circ\text{C}$  đến khi khuẩn ty xuất hiện. Tiến hành phân lập nấm bệnh cho đến khi đạt độ thuần chủng. Quan sát đặc điểm hình thái của nấm dưới kính hiển vi quang học. Tiến hành lây bệnh nhân tạo trên lá lan khỏe theo quy trình Koch để xác định chính xác mầm bệnh phân lập được là nấm *Neoscytalidium* sp.. Sau đó tiến hành phân lập lại nấm bệnh từ mẫu lá lan mới bị bệnh, mẫu nấm sau khi phân lập phải giống với mẫu nấm được làm thuần ban đầu.

#### 2.2.2. Phân lập vi khuẩn có khả năng đối kháng nấm *Neoscytalidium* sp. từ đất vườn trồng lan Ngọc điểm

Phương pháp thu mẫu đất và phân lập vi khuẩn đối kháng dựa theo nghiên cứu của Abdulkadir và Waliyu (2012). Mẫu đất được lấy từ bề mặt cho đến độ sâu 2 – 3 cm. Sử dụng môi trường NA (10 g/L pepton, 5 g/L beef extract, 5 g/L NaCl, 10 g/L D-Glucose, 20 g/L agar) để phân lập vi khuẩn đối kháng. Khi đã đạt độ thuần chủng, các dòng vi khuẩn được cấy truyền trên môi trường NA (để quan sát đặc điểm khuẩn lạc và đặc điểm tế bào vi khuẩn).

#### 2.2.3. Khảo sát khả năng đối kháng nấm của các dòng vi khuẩn đã phân lập được từ đất vườn trồng lan Ngọc điểm

Khảo sát khả năng đối kháng nấm của vi khuẩn được tiến hành bằng phương pháp cấy kép. Trong đó, đĩa petri chứa môi trường PDA được chia làm 4 góc, nấm được cấy vào giữa đĩa, vi khuẩn được cấy vào 3 góc cách tâm khoảng 3 cm và góc còn lại là đối chứng. Sau 2 ngày ủ ở nhiệt độ  $30^\circ\text{C}$ , tiến hành quan sát sự hình thành vùng kháng nấm và tính hiệu lực ức chế sự phát triển của nấm bởi vi khuẩn được tính theo công thức (Han và cs., 2015):

$$I = \frac{(R - r) \times 100}{R} \% \quad (1)$$

Trong đó, I là hiệu lực đối kháng (ức chế sự phát triển của nấm bởi vi khuẩn), R là bán kính hệ sợi nấm đối chứng, r là bán kính hệ sợi nấm có chủng vi khuẩn (cm).

#### 2.2.4. Khảo sát các cơ chế đối kháng của vi khuẩn

Các cơ chế đối kháng của vi khuẩn được xác định nhờ vào khả năng phân hủy các cơ chất và làm đổi màu môi trường đặc hiệu xung quanh khuẩn lạc vi khuẩn.

Khả năng sản sinh siderophore: Thí nghiệm được thực hiện trên môi trường CAS ((60,5 mg CAS + 50 mL H<sub>2</sub>O), 10 mL Fe(III) (1 mM FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 10 mM HCl), 40 ml HDTMA (72,9 mg HDTMA + 40 mL H<sub>2</sub>O)) (Chrome Azurol S Agar) (Schwyn và Neilands, 1987). Các dòng vi khuẩn được nuôi trên môi trường CAS-blue agar, ủ ở 30°C trong 3 ngày. 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.

Xác định khả năng phân giải chitin: Thực hiện trên môi trường YEG (4 g/L Yeast extract, 20 g/L Glucose, 20 g/L Agar) bổ sung 1% dịch huyền phù chitin, ủ ở 30°C trong 3 ngày (Hsu và Lockwood, 1975). Khả năng phân giải chitin được xác định bằng cách nhuộm với dung dịch Lugol 1%. Vi khuẩn phân giải chitin sẽ tạo vòng halo không bắt màu thuốc nhuộm xung quanh khuẩn lạc, đo đường kính vòng halo để xác định khả năng phân giải chitin trong môi trường.

Xác định khả năng phân giải cellulose: Thí nghiệm được thực hiện trên môi trường CMC (10 g/L CMC, 1 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g/L MgSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,001 g/L NaCl, 15 g/L 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 và Wood, 1982).

Xác định khả năng phân giải protein: Khả năng phân giải protein của các dòng vi khuẩn được đánh giá nhờ vào khả năng tạo vòng phân giải trên môi trường SMA (28 g/L SMA, 5 g/L casein enzyme hydrolysis, 2,5 g/L Yeast Extract, 1 g/L D-Glucose, 15 g/L Agar) (Ghorbel và cs., 1993). Sau thời gian 3 ngày, tiến hành đo đường kính vòng halo không màu xung quanh khuẩn lạc để đánh giá khả năng phân giải protein của vi khuẩn.

Công thức tính khả năng phân giải: [Đường kính vòng halo (D) – Đường kính khuẩn lạc vi khuẩn (d)].

#### 2.2.5. Định danh vi khuẩn đối kháng bằng phương pháp truyền thống – Hệ thống phân loại Bergey

Chọn một dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng mạnh với nấm *Neoscytalidium* sp. để định danh bằng phương pháp truyền thống thông qua việc khảo sát các đặc điểm hình thái học kết hợp với các thử nghiệm sinh hóa như: nhuộm Gram, nhuộm bào tử, thử nghiệm catalase, thử nghiệm oxidase, thử nghiệm tính di động.

#### 2.2.6. Phương pháp hiện đại – Giải trình tự vùng gen 16S rRNA của vi khuẩn

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

Vùng gen 16S rRNA được lựa chọn khuếch đại để tiến hành định danh vi khuẩn. Sử dụng cặp mồi 27F và 1495R (Weisburg và cs., 1991) với trình tự như sau: Mồi xuôi 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC-3') và mồi ngược 1495R (5'-CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3')

Thực hiện phản ứng PCR bằng máy PCR Bio-Rad C1000 để khuếch đại đoạn gen mục tiêu theo chu kỳ nhiệt sau: phản ứng PCR được biến tính ở 94°C trong 5 phút, sau đó lặp lại 35

chu kỳ với các bước (Biến tính ở 94°C trong 1 phút 30 giây, gắn cặp mồi vào khuôn ở nhiệt độ 53°C trong 1 phút, kéo dài ở 72°C trong 1 phút 30 giây), giai đoạn ổn định được duy trì ở 72°C trong 5 phút. Cuối cùng mẫu được trữ ở 4°C.

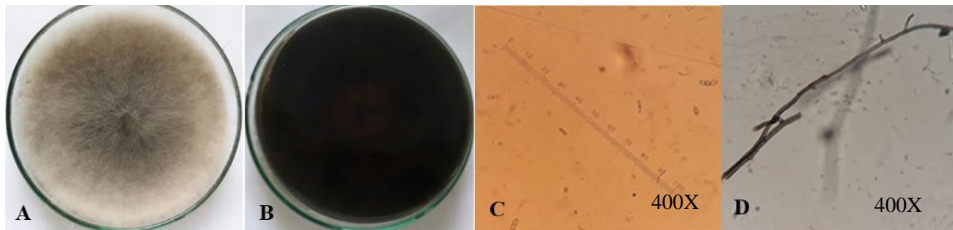
Kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose: Sau khi phản ứng PCR được thực hiện, sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% có bổ sung Safe view.

Sản phẩm PCR sau đó được gửi giải trình tự bằng máy giải trình tự tự động tại công ty TNHH MTV Sinh Hóa Phù Sa. Sử dụng chương trình BLAST để so sánh trình tự vùng gen 16S rRNA của các dòng vi khuẩn cần định danh với các trình tự 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 nấm gây bệnh

Từ mẫu lá lan Ngọc điểm bị bệnh đốm trắng đã phân lập được nấm *Neoscytalidium* sp. dựa vào đặc điểm sợi nấm, bào tử và khuẩn ty (Hình 1). Sau hai ngày cấy nấm phát triển trên hoàn toàn đĩa thạch và nấm có khuẩn lạc màu trắng. Sau 7 ngày cấy thì khuẩn lạc nấm chuyển sang màu đen. Khuẩn ty có màu nâu đến đen, có vách ngăn ngang và phân nhánh. Bào tử của nấm có nhiều hình dạng khác nhau như bào tử hình trụ (có kích thước 1,5 – 3 x 6 – 15 µm), bào tử hình elip, hình cầu (có kích thước 3 – 5 x 10 – 15 µm và có vách ngăn).



Hình 1. Đặc điểm của nấm *Neoscytalidium* sp..

(A: Khuẩn lạc nấm mặt trên, B: Khuẩn lạc nấm mặt dưới. C: Bào tử, D: Khuẩn ty)

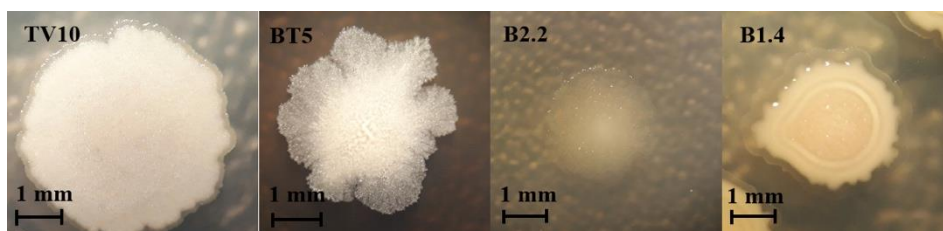
Sau khi phân lập nấm, tiến hành chủng bệnh nhân tạo vào lá lan Ngọc điểm theo quy trình Koch. Sau 7 ngày chủng bệnh, lá lan xuất hiện những triệu chứng ban đầu của bệnh đốm trắng, hình thành các bệnh màu trắng tại vị trí chủng bệnh. Tiếp tục quan sát lá lan sau 30 ngày chủng bệnh thì vết bệnh do nấm gây ra có dấu hiệu đặc trưng của bệnh đốm trắng. Điều đó chứng tỏ nấm *Neoscytalidium* sp. đã phân lập được có khả năng gây bệnh trên lan Ngọc điểm.



Hình 2. Lá lan đã chủng nấm bệnh sau 7 ngày chủng, 14 ngày chủng, 30 ngày chủng.

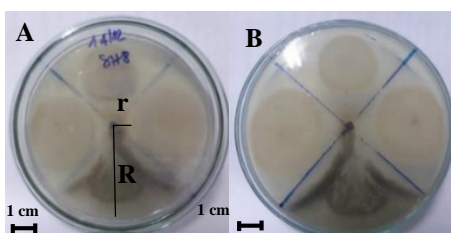
### 3.2. Kết quả phân lập và khảo sát khả năng đối kháng nấm *Neoscytalidium* sp. của vi khuẩn

Từ 7 mẫu đất khác nhau thu tại Bến Tre, Vĩnh Long và Cần Thơ, chúng tôi đã phân lập được 26 dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Neoscytalidium* sp.. Kết quả cho thấy 26 dòng vi khuẩn đều phát triển nhanh và tạo thành khuẩn lạc sau 24 giờ.



**Hình 3.** Hình dạng khuẩn lạc của một số dòng vi khuẩn đối kháng nấm *Neoscytalidium* sp..

Hiệu lực đối kháng của 26 dòng vi khuẩn phân lập được đối kháng với nấm *Neoscytalidium* sp. dao động từ 62,2 – 79,2% sau 4 ngày chủng vi khuẩn. Điều này cho thấy các dòng vi khuẩn phân lập được đều có khả năng đối kháng cao trên 60%. Trong đó, dòng vi khuẩn SH8 có hiệu lực đối kháng cao nhất là 79,2% và dòng vi khuẩn HL7 có hiệu lực đối kháng thấp nhất là 62,2%. Sau 9 ngày cấy, hầu hết các dòng vi khuẩn vẫn duy trì được khả năng đối kháng nấm, đặc biệt là dòng vi khuẩn SH8 có khả năng ức chế mạnh sự phát triển của nấm *Neoscytalidium* sp. (Hình 4).



**Hình 4.** Dòng vi khuẩn SH8 ức chế sự phát triển của nấm trên đĩa thạch.

(A: Khuẩn lạc mặt trên, B: Khuẩn lạc mặt dưới)

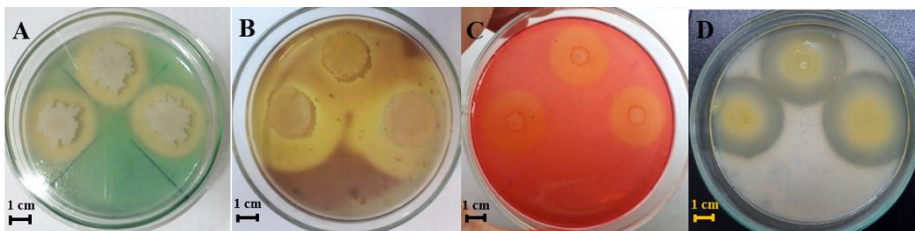
### 3.3. Kết quả khảo sát các cơ chế đối kháng

Trong 26 dòng vi khuẩn đối kháng thì có 21 dòng vi khuẩn có khả năng sản sinh siderophore (chiếm 80,8%) (Hình 5A). Khả năng sản sinh siderophore đo được xung quanh khuẩn lạc của các dòng vi khuẩn dao động từ 0,23 – 1,37 cm. Trong đó, dòng vi khuẩn có khả năng sản sinh siderophore cao nhất là SH8 (1,37 cm) và dòng vi khuẩn có khả năng sản sinh siderophore thấp nhất là BT1 (0,23 cm). Trong nghiên cứu của Hien và cs. (2017) về các dòng vi khuẩn được phân lập từ đất vùng rẫy trồng thanh long có khả năng đối kháng với nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh đốm trắng cho kết quả cao hơn với khả năng sản sinh siderophore từ 1,83 – 0,06 cm. Điều này cho thấy rằng khả năng sản sinh siderophore của các dòng vi khuẩn được phân lập từ các nguồn khác nhau thì khác nhau. Các sinh vật thường cần rất nhiều sắt để tăng trưởng nhưng sắt lại khan hiếm trong môi trường, dẫn đến sự cạnh tranh sắt của vi sinh vật (Neilands, 1981). 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.

Trong 26 dòng vi khuẩn khảo sát trên môi trường YEG bổ sung 1% chitin thì có 25 dòng vi khuẩn có khả năng phân giải chitin (chiếm khoảng 96%) (Hình 5B). Khả năng phân giải chitin của các dòng vi khuẩn đo được từ 0,60 – 2,33 cm. Trong đó, dòng BT3 có khả năng phân giải chitin cao nhất là 2,33 cm và dòng B1.8 có khả năng phân giải chitin thấp nhất là 0,60 cm. Trong nghiên cứu của Hien và cs. (2017) cho kết quả thấp hơn với khả năng phân giải chitin từ 0,13 – 1,47 cm. Điều này cho thấy hầu hết các dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm bệnh đều tiết enzyme chitinase để phân giải chitin. Vì chitin là một thành phần quan trọng cấu tạo vách tế bào nấm bệnh. Khả năng sản sinh enzyme chitinase là một trong những yếu tố quan trọng để khảo sát khả năng kháng nấm của các dòng vi khuẩn bằng việc phân giải vách tế bào nấm bệnh.

Trong 26 dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm thì có 25 dòng vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose (chiếm khoảng 96%) (Hình 5C). Khả năng phân giải cellulose của các dòng vi khuẩn dao động từ 0,20 – 1,80 cm. Trong đó, dòng vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose cao nhất là B1.4 (1,80 cm), dòng vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose thấp nhất là TV9 (0,2 cm). Trong nghiên cứu của Hien và cs. (2017) cho kết quả thấp hơn với khả năng phân giải cellulose từ 0,25 – 1,33 cm. Điều này cho thấy, cellulose là một trong những thành phần chính của vách tế bào nấm bệnh. Vi khuẩn sản sinh enzyme cellulase phân giải cellulose sẽ góp phần phân hủy vách tế bào và giúp ức chế sự phát triển của nấm bệnh.

Kết quả khảo sát khả năng phân giải protein thì 26 dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng nấm đều có khả năng phân giải (chiếm 100%) (Hình 5D). Khả năng phân giải protein của các dòng vi khuẩn do được dao động từ 0,10 – 1,17 cm. Trong đó, dòng vi khuẩn có khả năng phân giải protein cao nhất là B1.4 (1,17 cm) và thấp nhất là B2.1 (0,10 cm). Kết quả thấp hơn so với kết quả nghiên cứu của Hien và cs. (2017) với khả năng phân giải protein từ 0,37 – 2,10 cm. Từ kết quả cho thấy, các dòng vi khuẩn đối kháng với nấm bệnh đều có khả năng phân giải protein. Vì vậy, enzyme protease được tiết ra từ các dòng vi khuẩn đối kháng cũng có khả năng phân giải vách tế bào nấm bệnh.



**Hình 5.** Kết quả khảo sát các cơ chế đối kháng của một số dòng vi khuẩn.

(A: Khả năng sản sinh siderophore của dòng vi khuẩn SH8, B: Khả năng phân giải chitin của dòng vi khuẩn SH15, C: Khả năng phân giải cellulose của dòng vi khuẩn SH3, D: Khả năng phân giải protein của dòng vi khuẩn HL7)

Sau kết quả khảo sát các cơ chế đối kháng của 26 dòng vi khuẩn đã phân lập được cho thấy những dòng vi khuẩn có hiệu suất đối kháng cao nhất đều có khả năng phân giải cellulose, protein, chitin và sản sinh siderophore. Điều này cho thấy rằng các cơ chế đối kháng trên đóng vai trò quan trọng góp phần hình thành nên khả năng đối kháng nấm của vi khuẩn.

Trong 26 dòng vi khuẩn đối kháng đã phân lập được thì dòng vi khuẩn SH8 có hiệu lực đối kháng cao nhất (Bảng 1) được chọn định danh bằng phương pháp truyền thống – Hệ thống phân loại Bergey kết hợp với phương pháp định danh hiện đại giải trình tự vùng gen 16S rRNA. Do hiệu lực đối kháng là thành phần quan trọng nhất trong việc xác định khả năng đối kháng của vi khuẩn.

**Bảng 1.** Hiệu lực đối kháng và các cơ chế đối kháng của 6 dòng vi khuẩn triển vọng nhất

Dòng vi khuẩn	Hiệu lực đối kháng (%)	Các đặc tính đối kháng				Số cơ chế đối kháng
		Khả năng sản sinh siderophore (cm)	Khả năng phân giải cellulose (cm)	Khả năng phân giải chitin (cm)	Khả năng phân giải protein (cm)	
SH8	79,2 <sup>a</sup>	1,37 <sup>a</sup>	1,10 <sup>b-e</sup>	0,97 <sup>ghi</sup>	0,67 <sup>de</sup>	4
B2.9	78,5 <sup>ab</sup>	0,67 <sup>def</sup>	0,73 <sup>hij</sup>	1,17 <sup>fgh</sup>	0,33 <sup>fg</sup>	4
SH3	77,8 <sup>abc</sup>	0,60 <sup>efg</sup>	1,77 <sup>a</sup>	1,30 <sup>efg</sup>	0,57 <sup>ef</sup>	4
B1.18	77,8 <sup>abc</sup>	-	0,47 <sup>k</sup>	1,03 <sup>ghi</sup>	0,33 <sup>fg</sup>	3
VL10	77,0 <sup>abc</sup>	0,60 <sup>efg</sup>	0,87 <sup>fgh</sup>	1,80 <sup>bcd</sup>	0,27 <sup>g</sup>	4
BT11	77,0 <sup>abc</sup>	0,80 <sup>cde</sup>	1,00 <sup>def</sup>	2,07 <sup>ab</sup>	0,67 <sup>de</sup>	4
P	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
%CV	3,51	12,71	6,42	12,40	12,91	

Chú thích: Số liệu trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị theo sau có các mẫu tự giống nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5%.

### 3.4. Định danh vi khuẩn đối kháng

#### 3.4.1. Định danh vi khuẩn đối kháng bằng phương pháp truyền thống – Hệ thống phân loại Bergey

Kết quả thử nghiệm các đặc điểm sinh lý, sinh hóa của dòng vi khuẩn SH8 được mô tả qua bảng sau:

**Bảng 2.** Đặc điểm của dòng vi khuẩn SH8

	Kích thước (μm)	Hình dạng	Gram*	Khả năng sinh nội bào tử	Khả năng di động	Thử nghiệm Catalase
SH8	0,6 × 1,4	Que	+	+	+	+

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

Qua kết quả khảo sát trên (Bảng 2) có thể kết luận rằng: dòng vi khuẩn SH8 có những đặc điểm phù hợp với các loài thuộc chi *Bacillus*. Sau đó tiếp tục định danh đến loài dòng vi khuẩn SH8 bằng phương pháp định danh giải trình tự vùng gen 16S rRNA.

#### 3.4.2. Kết quả định danh bằng phương pháp hiện đại – Giải trình tự vùng gen 16S rRNA

Kết quả giải trình tự vùng gen 16S rRNA của dòng vi khuẩn SH8 có chiều dài 760 nucleotide nhưng chỉ sử dụng 638 nucleotide có tính hiệu ổn định để so sánh với các trình tự trong cơ sở dữ liệu GenBank của NCBI bằng công cụ BLAST. Kết quả so sánh cho thấy dòng vi khuẩn SH8 có độ tương đồng cao nhất là 95% với trình tự của các loài vi khuẩn như sau: *Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus axarquiensis*, *Bacillus malacitensis*, *Bacillus vallismortis*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus methylophilus*, *Bacillus siamensis*.

Theo Gatson và cs. (2006), loài *Bacillus tequilensis* có kích thước là  $0,9 \times 4 \mu\text{m}$ , lớn hơn so với dòng vi khuẩn SH8 ( $0,6 - 0,8 \times 1,4 - 1,6 \mu\text{m}$ ), do đó dòng vi khuẩn SH8 cũng không thuộc loài này. Theo nghiên cứu của Madhaiyan và cs. (2010), nêu rõ dòng vi khuẩn *Bacillus methylotrophicus* không thể phát triển được trong môi trường có sự hiện diện của NaCl lớn hơn 4,0%, tuy nhiên qua khảo sát cho thấy dòng vi khuẩn SH8 có kết quả dương tính do phát triển tốt trên môi trường NA bổ sung 6,5% NaCl. Theo Sumpavapol và cs. (2010), vi khuẩn *Bacillus siamensis* âm tính với thử nghiệm oxidase trong khi dòng SH8 thì dương tính, làm đổi màu giấy thử sang màu tím xanh.

Trong nghiên cứu của Ruiz-Garcia và cs. (2005), khi so sánh các đặc tính sinh hóa của vài loài thuộc chi *Bacillus* cho thấy, có 5 loài là *B. axarquiensis*, *B. atrophaeus*, *B. malacitensis*, *B. mojaviensis* và *B. subtilis* không có khả năng sinh ra acid trong thử nghiệm lên men lactose, phản ứng âm tính, trong khi loài *Bacillus amyloliquefaciens* thì dương tính. Bên cạnh đó, theo nghiên cứu của Roberts và cs. (1996) cũng cho thấy loài *Bacillus vallismortis* âm tính với khả năng này. Trong đó, dòng vi khuẩn SH8 cho kết quả dương tính khi làm đổi màu môi trường Phenol Red từ đỏ sang vàng sau 24 giờ. Do đó, dòng vi khuẩn SH8 không thuộc các loài trên. Điều này cho thấy, dòng vi khuẩn SH8 có quan hệ gần nhất với loài *Bacillus amyloliquefaciens*.

*Bacillus amyloliquefaciens* được mô tả đầy đủ là vi khuẩn Gram dương, hình que, kích thước tế bào vi khuẩn  $0,7 - 0,9 \times 1,6 - 3 \mu\text{m}$ , có khả năng sinh acid từ aesculin, amygdalin, arbutin,.. (Wang và cs., 2008). Loài này còn được biết đến như là một tác nhân phòng trừ sinh học bệnh cây hiệu quả với khả năng sản sinh tốt kháng sinh, các enzyme phân giải vách tế bào nấm bệnh và các hợp chất kích thích sinh trưởng cho cây trồng (McSpadden, 2004). Dòng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* CNU114001 trong nghiên cứu của Ji và cs. (2013) cho thấy khả năng đối kháng với tất cả 12 loài nấm gây bệnh trên thực vật được thử nghiệm như *Colletotrichum acutatum*, *Pyricularia grisea*, *Fusarium oxysporum*. Đến thời điểm hiện tại, chưa có báo cáo nào đề cập đến tác hại của vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens*. Cho thấy đây là loài vi khuẩn tiềm năng để sản xuất các chế phẩm sinh học.

#### 4. KẾT LUẬN

Kết quả phân lập nấm bệnh từ mẫu lá lan Ngọc điểm bị bệnh đốm trắng và thử nghiệm theo quy trình Koch đã xác định được chủng nấm phân lập được là nấm *Neoscytalidium* sp..

Phân lập được 26 dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Neoscytalidium* sp. gây bệnh đốm trắng từ vùng đất trồng lan Ngọc điểm của 7 mẫu đất được thu tại Cần Thơ, Vĩnh Long và Bến Tre. Các dòng vi khuẩn phân lập được có hiệu lực đối kháng với nấm gây bệnh dao động từ 62,2 – 79,2% sau 4 ngày chủng vi khuẩn. Dòng vi khuẩn đối kháng cao nhất là SH8 với hiệu lực đối kháng là 79,2%. Qua khảo sát các cơ chế đối kháng, kết quả thu được có 21/26 dòng vi khuẩn có khả năng sản sinh siderophore, 25/26 dòng vi khuẩn có khả năng phân giải cellulose, 25/26 dòng vi khuẩn có khả năng phân giải chitin, 26/26 dòng vi khuẩn có khả năng phân giải protein.

Kết hợp phương pháp định danh truyền thống dựa vào hệ thống phân loại Bergey và định danh bằng phương pháp giải trình tự vùng gen 16S rRNA và phân tích một số chỉ tiêu sinh hóa cho thấy dòng vi khuẩn đối kháng SH8 có quan hệ gần nhất với loài *Bacillus amyloliquefaciens*.



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### 1. Tài liệu tiếng Việt

Nguyễn Công Nghiệp, (2006). *Trồng hoa Lan*. NXB Trẻ.

Nguyễn Hồng Sơn, Nguyễn Thành Hiếu, Nguyễn Thị Bích Ngọc, Trần Minh Tiến, Nguyễn Thị Thúy Kiều và Nguyễn Thị Thu Vinh, (2015). Kết quả nghiên cứu một số biện pháp cấp bách để hạn chế sự lây lan và tác hại của bệnh đốm nâu thanh long do nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây ra. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, 9, 27-32.

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.

### 2. Tài liệu tiếng nước ngoài

Abdulkadir, M., and Waliyu, S., (2012). *Screening and isolation of the soil bacteria for ability to produce antibiotics*. BOOK OF, 76.

Gatson, J. W., Benz, B. F., Chandrasekaran, C., Satomi, M., Venkateswaran, K., & Hart, M. E., (2006). *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(7), 1475-1484.

Ghorbel, B., Sellami-Kamoun, A., & Nasri, M., (2003). Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology*, 32(5), 513-518.

Han, J. H., Shim, H., Shin, J. H., & Kim, K. S., (2015). Antagonistic activities of *Bacillus* spp. strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. *The plant pathology journal*, 31(2), 165.

Hien, O. T. M., Huyen N. T. M., Anh, T. D., & Lien, N. T., (2017). Isolation and identification of antagonistic bacteria against the causative fungus of white spot disease (*Neoscytalidium dimidiatum* (Penz.) on Dragon fruits. *Journal of science, Ha Noi Pedagogical University 2*, 49, 28-41.

Hsu, S. C., & Lockwood, J. L., (1975). Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Applied microbiology*, 29(3), 422-426.

Huang, S. K., Tangthirasunun, N., Phillips, A. J., Dai, D. Q., Wanasinghe, D. N., Wen, T. C., & Kang, J. C., (2016). Morphology and Phylogeny of *Neoscytalidium orchidacearum* sp. nov. (Botryosphaeriaceae). *Mycobiology*, 44(2), 79-84.

Ji, S. H., Paul, N. C., Deng, J. X., Kim, Y. S., Yun, B. S., & Yu, S. H., (2013). Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. *Mycobiology*, 41(4), 234-242.

Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Kwon, S. W., and Sa, T. M., (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), 2490-2495.

McSpadden Gardener, B. B., (2004). Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology*, 94(11), 1252-1258.

Neilands, J. B., (1981). Microbial iron compounds. *Annual review of biochemistry*, 50(1), 715-731.

Roberts, M. S., Nakamura, L. K., & Cohan, F. M., (1996). *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(2), 470-475.

Ruiz-Garcia, C., Quesada, E., Martinez-Checa, F., Llamas, I., Urdaci, M. C., & Béjar, V., (2005). *Bacillus axarquiensis* sp. nov. and *Bacillus malacitensis* sp. nov., isolated from river-mouth sediments in southern Spain. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(3), 1279-1285.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T., (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold spring harbor laboratory press.

Schwyn, B., & Neilands, J. B., (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, 160(1), 47-56.

- Sumpavapol, P., Tongyonk, L., Tanasupawat, S., Chokesajjawatee, N., Luxananil, P., & Visessanguan, W., (2010). *Bacillus siamensis* sp. nov., isolated from salted crab (poo-khem) in Thailand. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(10), 2364-2370.
- Teather, R. M., & Wood, P. J., (1982). Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and environmental microbiology*, 43(4), 777-780.
- Wang, L. T., Lee, F. L., Tai, C. J., & Kuo, H. P., (2008). *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(3), 671-675.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J., (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.

## ISOLATION AND SELECTION OF ANTAGONISTIC BACTERIA AGAINST *NEOSCYTALIDIUM* SP. CAUSING WHITE SPOT DISEASE ON *RHYNCHOSTYLIS GIGANTEA* ORCHID

Do Thi Huynh Mai, Nguyen Thi Lien

Biotechnology Research and Development Institute, Can Tho University

Contact email: [dthmai1308@gmail.com](mailto:dthmai1308@gmail.com)

### ABSTRACT

White spot disease is one of the serious diseases causing great damage to fruit trees in general and orchids in particular. This study was conducted with the aim to isolate and select antagonistic bacteria against *Neoscytalidium* sp. which cause white spot disease on *Rhynchostylis gigantea* orchid. From 7 soil samples collected from *Rhynchostylis gigantea* orchid gardens in Ben Tre province, Vinh Long province and Can Tho city, 26 bacterial strains showed antagonism to *Neoscytalidium* sp.. The antagonistic efficiency of all isolates ranged from 62.2 to 79.2%. Biochemical characteristics of isolates indicated that 21/26 isolates can to produce siderophores, 25/26 can decompose chitin, 25/26 can decompose cellulose and 26/26 to decompose protein. The SH8 strain which has the highest antagonistic efficiency was selected for identification based on the Bergey classification system. The results showed that the SH8 strain was similar characteristics to the *Bacillus* genus. Combination of sequencing the 16S rRNA region and biochemical tests identified that the SH8 strain was close to *Bacillus amyloliquefaciens*.

**Key words:** *Bacillus amyloliquefaciens*, identification, *Neoscytalidium* sp., *Rhynchostylis gigantea* orchid, White spot.

Received: 28<sup>th</sup> December 2017

Reviewed: 24<sup>th</sup> January 2018

Accepted: 26<sup>th</sup> January 2018