

Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus subtilis* có khả năng đối kháng tốt với nấm *Colletotrichum scovillei* gây bệnh thán thư trên ớt ở Thành phố Hồ Chí Minh

Isolation and selection of a strain of *Bacillus subtilis* group for high antagonistic activity against *Colletotrichum scovillei* causing chilli anthracnose disease in Ho Chi Minh City

Trần Thùy Trang^{1*}, Nguyễn Thị Ánh Nguyệt¹, Lê Thị Mai Châm¹, Nguyễn Tấn Đức¹,
Phạm Nguyễn Đức Hoàng¹, Dương Hoa Xô¹

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Tác giả liên hệ, Email: tranthuytrang213@gmail.com

THÔNG TIN

DOI:10.46223/HCMCOUJS.
tech.vi.15.1.1022.2020

Ngày nhận: 16/04/2020

Ngày nhận lại: 14/09/2020

Duyệt đăng: 20/10/2020

Từ khóa:

Bacillus subtilis, BHCM8.3,
Colletotrichum scovillei, thán thư
trên ớt

TÓM TẮT

Thán thư trên ớt do nấm *Colletotrichum* spp. là một trong những bệnh gây thiệt hại nặng đến năng suất và chất lượng ớt trên phạm vi toàn cầu. Ở Việt Nam, Thành phố Hồ Chí Minh cũng là địa điểm trồng nhiều ớt và chịu nhiều thiệt hại do bệnh này gây ra. Biện pháp sử dụng vi sinh vật đối kháng để phòng trừ bệnh hại đang là xu hướng hiện nay do tính an toàn và hiệu quả của nó. Trong số nhiều vi sinh vật đối kháng, các chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus subtilis* đã được nghiên cứu rất nhiều về khả năng đối kháng với nấm gây bệnh. Vì vậy, nghiên cứu này tiến hành phân lập, tuyển chọn chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus subtilis* có khả năng đối kháng tốt với nấm *Colletotrichum scovillei* gây bệnh thán thư trên ớt ở Thành phố Hồ Chí Minh. Sau khi thu thập được 5 mẫu đất, nghiên cứu này đã phân lập được 22 chủng nghi ngờ thuộc nhóm *Bacillus subtilis*. Trong đó, chủng vi khuẩn BHCM8.3 có khả năng đối kháng mạnh nhất với nấm *Colletotrichum scovillei* trên đĩa Petri (hiệu quả đối kháng là 81,58% sau 15 ngày khảo sát). Kết quả định danh sinh học phân tử dựa trên vùng 16 ribosomal DNA (rDNA) cho thấy trình tự chủng BHCM8.3 có độ tương đồng gần với vi khuẩn *B. subtilis* (100%).

ABSTRACT

Chilli anthracnose disease caused by *Colletotrichum* spp. has heavily damaged the quality and yield production of chili around the world. In Viet Nam, many chili growing regions namely Ho Chi Minh City have been enormously affected by the disease for many years. Nowadays, a biological control using antagonistic microorganisms to prevent plant pathogens is becoming increasingly popular due to its safety and effectiveness. In particular, bacteria belonging to *Bacillus*

subtilis group has been proven to have antagonistic ability against pathogenic fungi. Therefore, this study was conducted to isolate and select bacteria of *Bacillus subtilis* group which show high antagonistic activity against the fungus *Colletotrichum scovillei* causing Chilli anthracnose disease in Ho Chi Minh City. From five soil samples, the study isolated 22 candidate strains that initially categorized as *Bacillus subtilis* group. Out of 22 isolates, the BHCM8.3 strain showed the best inhibitory effect on the growth of *Colletotrichum scovillei* in the dual-culture agar overlay method (antagonistic effectiveness is 81.58% after 15 days). 16S ribosomal DNA (rDNA)-based molecular identification reveals that the BHCM8.3 strain is completely identical to the bacterium *Bacillus subtilis* (100%).

Keywords:

Bacillus subtilis, BHCM8.3,
Chilli anthracnose disease,
Colletotrichum scovillei

1. Đặt vấn đề

Cây ớt (*Capsicum annuum*) là một trong những cây trồng quan trọng được trồng nhiều ở vùng nhiệt đới. Tuy nhiên, việc xuất hiện rất nhiều loại dịch bệnh trong quá trình trồng làm giảm nhanh sản lượng và chất lượng quả ớt. Trong đó, bệnh thán thư do *Colletotrichum* spp. gây ảnh hưởng nghiêm trọng nhất (Isaac, 1992). Bệnh gây hại không chỉ ở giai đoạn cây trưởng thành, mà còn tác động mạnh làm giảm năng suất ở giai đoạn cây con và giai đoạn bảo quản sau thu hoạch. Ở các quốc gia đang phát triển, bệnh này làm giảm từ 10% đến 80% năng suất, gây thiệt hại lớn đến kinh tế cho người trồng ớt (Poonpolgul & Kumphai, 2007). Ở Việt Nam, Thành phố Hồ Chí Minh cũng là địa điểm trồng nhiều ớt và chịu nhiều thiệt hại do bệnh này gây ra. Hiện nay, sử dụng chế phẩm sinh học phòng ngừa bệnh hại đang được tập trung hướng đến trong nền nông nghiệp, vì vừa có hiệu quả phòng bệnh cao vừa mang lại nhiều lợi ích về môi trường và sinh thái. Nhiều chủng vi sinh vật đã được nghiên cứu về khả năng đối kháng với nấm bệnh. Trong đó, vi khuẩn *Bacillus* spp. được xem là nhóm vi sinh có nhiều ưu thế ứng dụng nhờ khả năng phân bố rộng trong đất, tốc độ phát triển nhanh, hình thành nội bào tử có sức chống chịu tốt, an toàn với người và động vật, tiết ra chất kích thích tăng trưởng cây trồng cũng như được sản xuất được nhiều hoạt chất sinh học có giá trị (Kim & Chung, 2004). Một số vi khuẩn *Bacillus* spp. có khả năng tiết ra các loại kháng sinh như surfactin, fengycin, iturin có bản chất là lipopeptide và các enzyme phân hủy vách tế bào nấm như chitinase và cellulases (β -1,3, β -1,4) vào môi trường, do đó sẽ ức chế và kìm hãm khả năng gây hại của nấm (Gisi, Chet, & Gullino, 2009; Ashwini & Srividya, 2014). Đặc biệt, các vi khuẩn thuộc nhóm *B. subtilis*, bao gồm *B. subtilis* và các loài có quan hệ gần như: *B. pumilus*, *B. atropheus*, *B. licheniformis* và *B. amyloliquefaciens*, đã được chứng minh có khả năng đối kháng với nấm bệnh. Trên thế giới và trong nước có nhiều công trình nghiên cứu về vấn đề này. Năm 2014, Ashwini và Srividya nghiên cứu sử dụng vi khuẩn *B. subtilis* làm tác nhân đối kháng sinh học phòng trừ bệnh thán thư trên ớt do nấm *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1 gây ra. Năm 2016, L. T. Nguyen, Nguyen, Tran, và Nguyen đã phân lập và tuyển chọn được chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* trong đất vùng rẫy có khả năng đối kháng tốt nhất với nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên ớt ở Cần Thơ, Đồng Tháp, Tiền Giang. Năm 2008, T. H. Nguyen phân lập 18 chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. có khả năng đối kháng với 4 chủng nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên sen ở Cần Thơ và Đồng Tháp trong điều kiện phòng thí nghiệm. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu đều được thực hiện từ lâu, trong khi đó điều kiện thời tiết ngày càng diễn biến phức tạp cộng với việc quản lý dịch hại không hợp lý có thể làm xuất hiện các loài nấm *Colletotrichum* spp. mới. Vì vậy, hệ vi sinh vật trong đất cũng thay đổi. Ngoài

ra, trên địa bàn Thành phố Hồ Chí Minh, đặc biệt là huyện Củ Chi người dân cũng đang chú trọng phát triển cây ớt, bên cạnh các loại rau, củ, quả khác. Trong khi đó, tình hình dịch bệnh thán thư ở đây đã và đang diễn biến phức tạp gây những ảnh hưởng lớn đến năng suất và kinh tế đối với trái ớt. Cụ thể, năm 2018, Tran và Nguyen đã ghi nhận ít nhất hai loài *C. capsici* và *C. gloeosporioides* gây hại chính trên ớt ở Củ Chi, Thành phố Hồ Chí Minh. Dù tình hình dịch bệnh diễn biến phức tạp nhưng hiện nay chưa có nhiều nghiên cứu về tuyển chọn vi khuẩn đối kháng trên đối tượng cây ớt tại địa bàn này. Xuất phát từ các lý do trên, nhóm nghiên cứu tiến hành “Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus subtilis* có khả năng đối kháng tốt với nấm *Colletotrichum scovillei* gây bệnh thán thư trên ớt ở Thành phố Hồ Chí Minh”.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Nấm *Colletotrichum scovillei* từ bộ sưu tập giống vi sinh vật Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

- Mẫu đất thu thập từ các vườn trồng ớt ở Củ Chi, Thành phố Hồ Chí Minh.

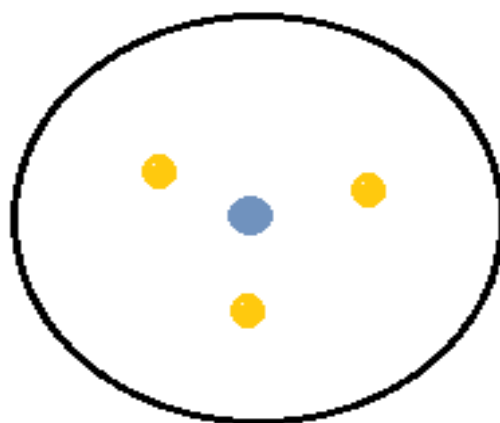
2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thu mẫu (Lamsal, Kim, Kim, & Lee, 2012; Sun, Cui, Jia, & Wang, 2017)

Mẫu đất xung quanh vùng rễ được thu thập ở độ sâu tối đa 20 cm (Lamsal et al., 2012) từ các vườn trồng ớt ở Củ Chi, Thành phố Hồ Chí Minh. Mỗi vườn thu 5 điểm, trộn đều lại thành 1 mẫu chứa trong túi nilong vô trùng, bảo quản trong thùng mát 4°C và được vận chuyển về phòng thí nghiệm cho các thí nghiệm tiếp theo (Sun et al., 2017). Ký hiệu BHCMx (x là số thứ tự vườn).

Sàng lọc nhanh các mẫu chứa các chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm bệnh

Nuôi cấy nấm *Colletotrichum scovillei* trên đĩa Petri chứa môi trường PDA trong 7 ngày. Dùng khoan thạch đường kính 5 mm ấn nhẹ lên bề mặt đã nuôi cấy nấm rồi đặt mẫu cây sang đĩa Petri chứa môi trường PDA ở vị trí tâm đĩa. Sau đó, dùng khoan thạch đường kính 5 mm đục 3 giếng xung quanh khoanh nấm *Colletotrichum scovillei* (Hình 1). Pha loãng 10 g mẫu đất với 90 ml nước muối sinh lý vô trùng, lắc 200 vòng/phút trong 30 phút, sau đó gia nhiệt 80°C trong 10 phút (Ashwini & Srividya, 2014; Dworkin, Falkow, Rosenberg, Schleifer, & Stackebrandt, 2007), hút 10 µl dịch vào mỗi giếng khoan. Đồng nuôi cấy dịch đất và nấm bệnh, theo dõi tốc độ lan toả của tản nấm sau 3, 5, 7 ngày. Mỗi mẫu đất lặp lại 3 lần, đối chứng là đĩa Petri có chứa nấm bệnh mà không có dịch đất. Lựa chọn những mẫu đất có khả năng đối kháng nấm bệnh để tiến hành phân lập vi khuẩn *Bacillus* spp.



Hình 1. Phương pháp sàng lọc nhanh các mẫu có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum scovillei*. Màu vàng: dịch đất; Màu xám: tản nấm bệnh

Phân lập (Dworkin et al., 2007; Etesami, Mirsyed, & Alikhani, 2014; Melo et al., 2016) và sàng lọc (Wattiau et al., 2001) các chủng vi khuẩn thuộc nhóm *B. subtilis*

Theo Wattiau và cộng sự (2001), các vi khuẩn thuộc nhóm *B. subtilis*, bao gồm *B. subtilis* và các loài có quan hệ gần như: *B. pumilus*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis* và *B. amyloliquefaciens*, được nhận biết dựa vào kết quả PCR khuếch đại đoạn gene 16S rDNA với cặp môi Bsub5F (5'-AAGTCGAGCGGACAGATGG-3') và Bsub3R (5'-CCAGTTTCCAATGACCCTCCCC-3').

Chọn những mẫu đất có khả năng đối kháng nấm bệnh để tiến hành phân lập vi khuẩn *Bacillus* spp. Cân 10 g đất vào bình tam giác chứa 90 ml nước cất vô trùng, lắc 250 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Gia nhiệt 80°C trong 10 phút. Pha loãng thập phân đến các nồng độ 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵. Tiến hành cấy trải 0,1 ml dịch pha loãng ở các nồng độ này trên đĩa Petri chứa môi trường TSA, nuôi ở 35°C trong 24 giờ.

Tách và làm thuần các dòng vi khuẩn. Chuyển sinh khối các dòng vi khuẩn vào 100 µL TE trong ống eppendorf. Ủ nhiệt ở 95°C trong 10 - 15 phút. Chuyển nhanh mẫu vào tủ đông -20°C để hạ nhanh nhiệt độ. Ly tâm mẫu 10.000 vòng/phút ở 4°C trong 7 phút. Thu phần dịch phía trên thực hiện phản ứng PCR với cặp môi Bsub5F và Bsub3R. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 0,8%. Các chủng cho kích thước vạch mục tiêu khoảng 595 bp được lựa chọn để quan sát hình thái vi thể.

Nhuộm Gram (L. D. Nguyen, Phan, & Nguyen, 2003)

Làm tiêu bản mẫu cần nhuộm, cố định mẫu bằng ngọn lửa đèn cồn, phủ vết bôi với crystal violet trong 30 giây, rửa nước; phủ vết bôi với lugol 30 giây, rửa nhẹ nhàng với nước và rửa bằng cồn 3 - 5 giây sau đó rửa lại nhanh với nước; nhuộm lại với safranin trong 30 giây, rửa nước, thấm khô. Quan sát dưới kính hiển vi có độ phóng đại 1000 lần. Tế bào vi khuẩn bắt màu tím là Gram dương, ngược lại bắt màu hồng là Gram âm.

Nhuộm bào tử (L. D. Nguyen et al., 2003)

Làm tiêu bản mẫu cần nhuộm, cố định mẫu bằng ngọn lửa đèn cồn, đặt mẫu giấy thấm lên phiến kính, phủ phiến kính bằng dung dịch lục malachite, giữ phiến kính trên hơi nước trong 5 phút (đặt trên một cốc thủy tinh chứa nước đun sôi); sau đó rửa với nước trong 30 giây và nhuộm lại bằng dung dịch Safranin trong 30 giây, rửa nước, thấm khô. Quan sát dưới kính hiển vi có độ phóng đại 1000 lần. Bào tử có màu lục, tế bào có màu đỏ.

Tuyển chọn chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. có khả năng đối kháng mạnh nhất với nấm *C. scovillei* trên đĩa Petri (Živković et al., 2010)

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu CRD (Completely randomized design), số nghiệm thức tương ứng với số chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. phân lập. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Đánh giá kết quả sau 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 ngày nuôi cấy.

Nuôi cấy nấm *Colletotrichum scovillei* trên đĩa Petri chứa môi trường PDA trong 7 ngày. Nuôi vi khuẩn trên môi trường TSA trong 24 giờ. Dùng khoan thạch đường kính 5 mm ấn nhẹ lên bề mặt nuôi cấy nấm gây bệnh rồi đặt mẫu cấy sang đĩa Petri chứa môi trường PDA sao cho cách mép đĩa 3 cm. Sau đó, cấy các chủng vi khuẩn đối kháng lên đĩa Petri cách mẫu cấy nấm 3 cm và chiều dài đường cấy vi khuẩn là 4,5 cm. Ủ đĩa đối kháng ở 25°C.

Chỉ tiêu theo dõi: Phần trăm ức chế nấm bệnh trên đĩa Petri (%)

$$\text{Công thức tính: } H = (A - B) / A \times 100 \quad (1)$$

H: Phần trăm ức chế nấm bệnh trên đĩa Petri (%)

A: Bán kính khuẩn lạc nấm bệnh trong công thức đối chứng (mm)

B: Bán kính khuẩn lạc nấm bệnh khi được nuôi cùng với vi khuẩn (mm)

Phương pháp định danh vi khuẩn *Bacillus* spp. bằng sinh học phân tử

Vi khuẩn *Bacillus* spp. nuôi cấy trên môi trường TSA, ở 35°C. Sau 24 giờ, dùng que cấy vô trùng chuyển sinh khối vi khuẩn cho vào 100 µL TE trong ống eppendorf. Ủ nhiệt ở 95°C trong 10 – 15 phút. Chuyển nhanh mẫu vào tủ đông -20°C để hạ nhanh nhiệt độ. Ly tâm mẫu 10.000 vòng/phút ở 4°C trong 7 phút. Thu phần dịch phía trên thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi 20F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG), 1500R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (Baliarda, Faure, & Urdaci, 2002).

Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%. Sản phẩm này sau đó được tinh sạch bằng kit Isolate II PCR và Gel Kit (Bioline) và tiến hành giải trình tự. Dữ liệu trình tự thô được xử lý bằng phần mềm ATGC, sau đó BLAST lên NCBI. Dựa vào kết quả Blast, xây dựng cây phát sinh loài và xác định danh pháp khoa học của các chủng vi khuẩn.

3. Kết quả và biện luận

Thu thập mẫu

Tất cả 10 mẫu đất vườn ốt được thu thập ở Củ Chi, Thành phố Hồ Chí Minh được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1

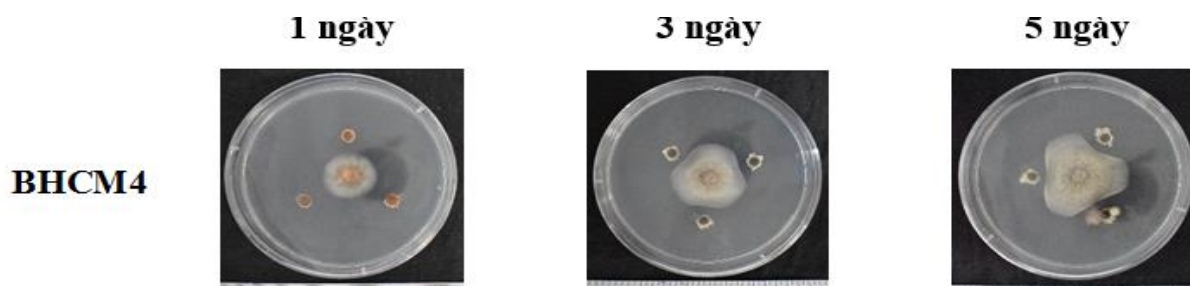
Thông tin các mẫu đất thu thập được

STT	Mã số vườn	Vị trí định vị bằng GPS	Kí hiệu mẫu vi khuẩn <i>Bacillus</i> sp.	pH đất
1	BHCM1	11.0496 N 106.4982 E	BHCM1	6,5
2	BHCM2	11.0498 N 106.4940 E	BHCM2	7
3	BHCM3	11.0496 N 106.4939 E	BHCM3	6,5
4	BHCM4	11.0529 N 106.4841 E	BHCM4.1 BHCM4.2	5,5
5	BHCM5	11.0514 N 106.4964 E	BHCM5.1 BHCM5.3	4,5
6	BHCM6	11.0417 N 106.4974 E	BHCM6.1 BHCM6.2	7
7	BHCM7	11.0961 N 106.4773 E	BHCM7.1 BHCM7.3	6,1
8	BHCM8	11.0773 N 106.4891 E	BHCM8.1 BHCM8.3	6,3
9	BHCM9	11.0470 N 106.4979 E	BHCM9.1 BHCM9.3	5,6
10	BHCM10	11.0223 N 106.5013 E	BHCM10.1 BHCM10.3	5,5

Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Sàng lọc nhanh các mẫu đất chứa các chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm bệnh *Colletotrichum scovillei*

Kết quả sàng lọc mẫu đất cho thấy, tất cả 10 mẫu đất thu thập được đều ức chế sự phát triển của nấm bệnh (Hình 2). Sau 1 ngày đồng nuôi cấy, khuẩn lạc nấm vẫn phát triển bình thường, chưa bị biến dạng so với nấm đối chứng. Tuy nhiên, sau 3 ngày khả năng ức chế sợi nấm của các chủng vi sinh vật trong dịch đất bắt đầu thể hiện rõ, khuẩn lạc nấm bắt đầu bị biến dạng so với đối chứng. Đến ngày thứ 5, khuẩn lạc nấm *Colletotrichum scovillei* bị biến dạng rõ rệt ở các nghiệm thức đồng nuôi cấy với dịch đất.



Hình 2. Kết quả đồng nuôi cấy dịch đất và nấm *Colletotrichum scovillei*

Phân lập, định danh hình thái và sàng lọc các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp.

Từ 10 mẫu đất vườn ốt đã được kiểm tra khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum scovillei*, phân lập được 22 chủng vi khuẩn. Tiến hành PCR khuếch đại đoạn 16S rDNA với cặp mồi Bsub5F (5'-AAGTCGAGCGGACAGATGG-3') và Bsub3R (5'-CCAGTTTCCAATGACCCTCCCC-3') (kích thước khoảng 595 bp) để sàng lọc nhanh những chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus subtilis*. Kết quả PCR và điện di trên gel agarose cho thấy, tất cả 22 chủng vi khuẩn phân lập được đều cho vạch sản phẩm có kích thước khoảng 595 bp như Hình 3. Như vậy, 22 chủng này có thể thuộc nhóm *B. subtilis*.



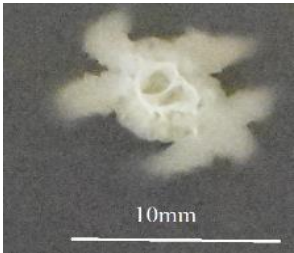
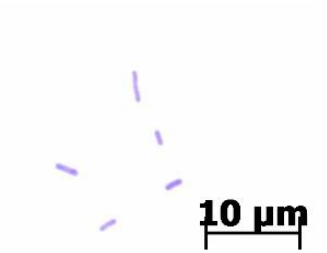
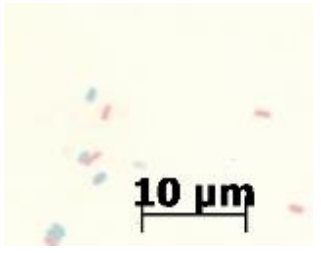
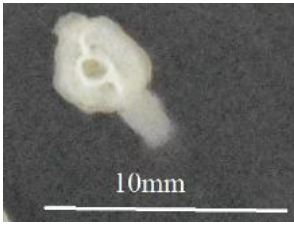

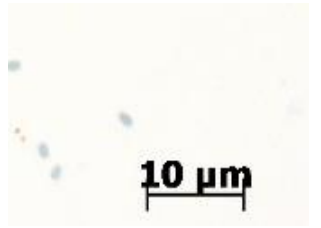
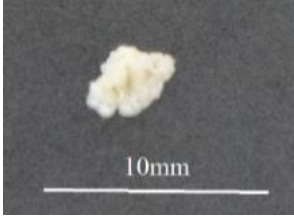
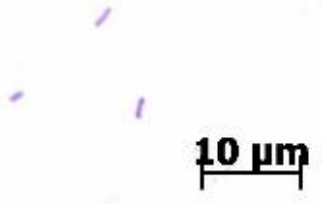

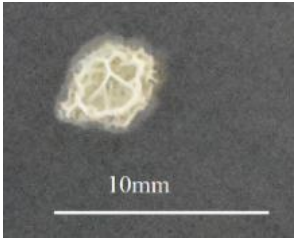


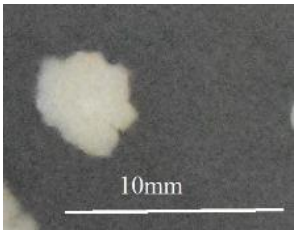

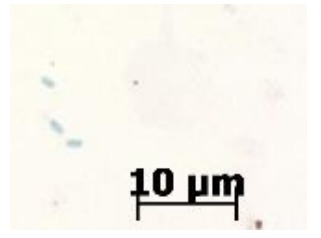
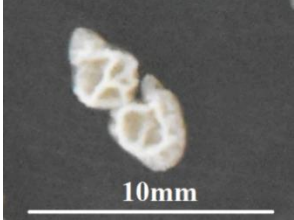

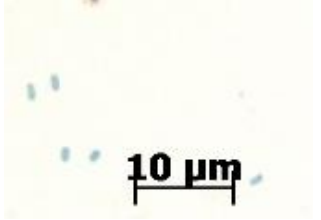
Hình 3. Kết quả PCR sàng lọc nhanh của một số chủng vi khuẩn phân lập
M: Thang DNA; 1-10: 10 chủng vi khuẩn đại diện

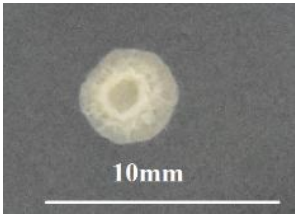

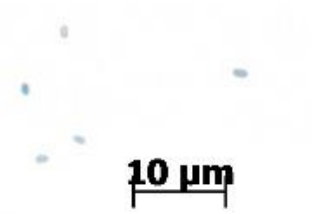
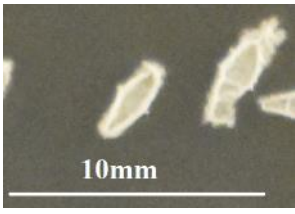

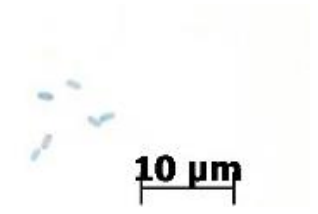
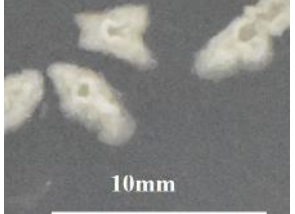

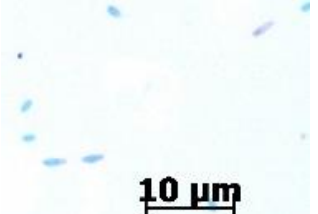
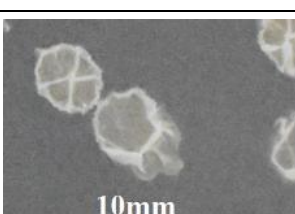
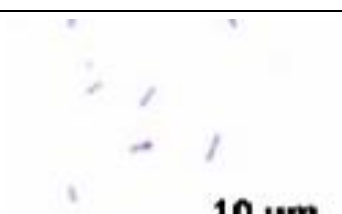


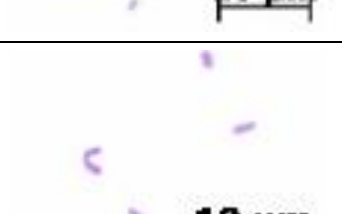

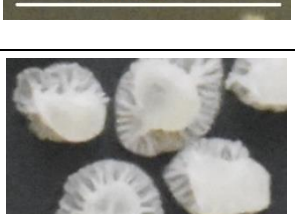


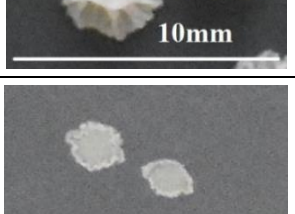

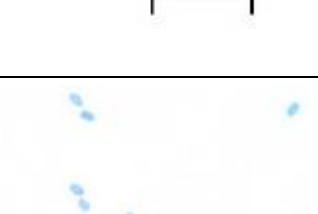
Kết quả quan sát dưới kính hiển vi độ phóng đại 1000 lần sau khi nhuộm Gram cho thấy, tất cả các chủng vi khuẩn này đều có dạng trực khuẩn, Gram (+), đứng đơn lẻ hoặc xếp theo chuỗi. 22 chủng vi khuẩn này đều có khả năng tạo bào tử bất màu với thuốc nhuộm Malachite green, phần tế bào sinh dưỡng còn lại bắt màu đỏ của Safranin. Những đặc điểm vi thể này tương đồng với mô tả về các chủng *Bacillus* spp. của Claus và Berkeley (1986). Khi nuôi trên môi trường TSA,

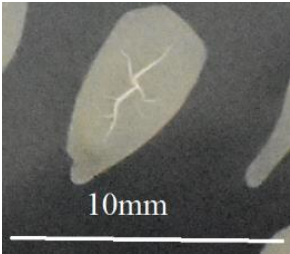


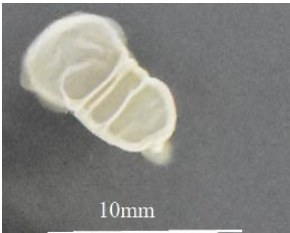

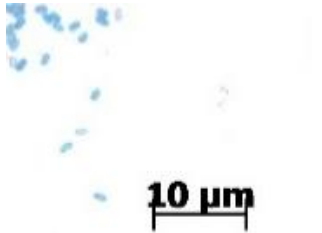
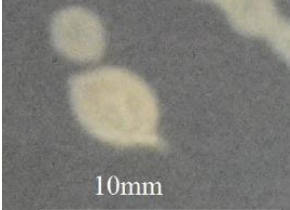

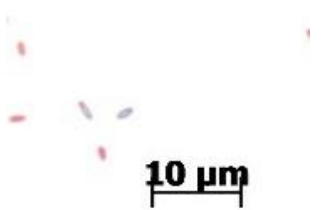
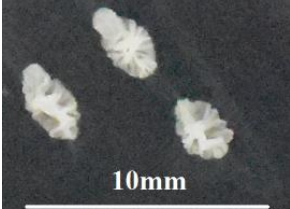


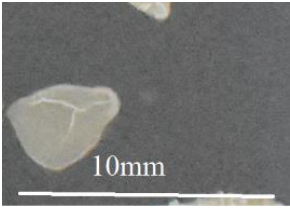

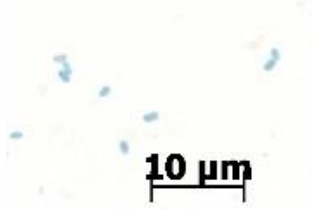
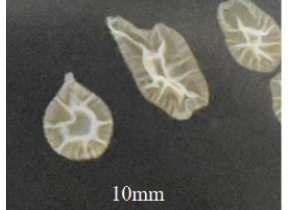


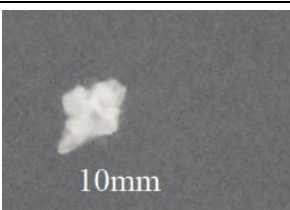

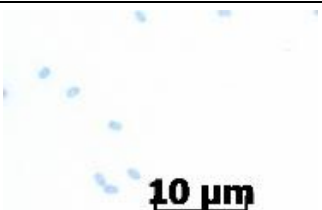
tất cả các chủng vi khuẩn này đều có khuẩn lạc màu trắng đục hoặc trắng sữa, nhẵn, có viền răng cưa không đều giống với mô tả của Holt, Krieg, Sneath, Staley, và Williams (1994) (Bảng 2).

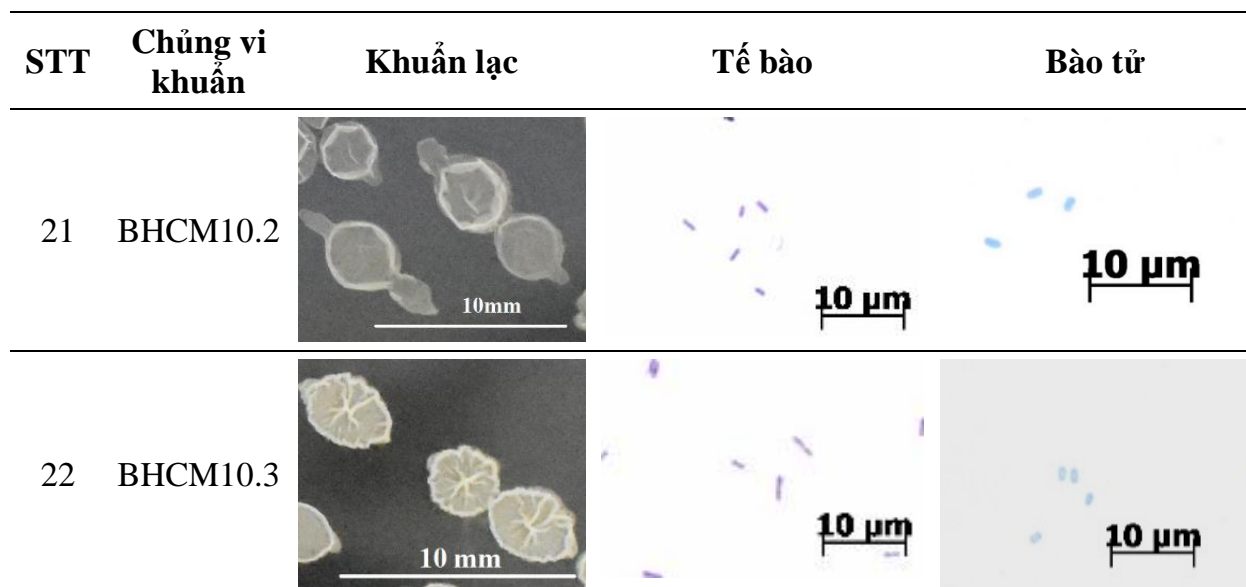
Bảng 2

Đặc điểm vi thể, đại thể các chủng vi khuẩn phân lập

STT	Chủng vi khuẩn	Khuẩn lạc	Tế bào	Bào tử
1	BHCM1			
2	BHCM2			
3	BHCM3			
4	BHCM4.1			
5	BHCM4.2			
6	BHCM5.1			

STT	Chủng vi khuẩn	Khuẩn lạc	Tế bào	Bào tử
7	BHCM5.2			
8	BHCM5.3			
9	BHCM6.1			
10	BHCM6.2			
11	BHCM7.1			
12	BHCM7.2			
13	BHCM7.3			

STT	Chủng vi khuẩn	Khuẩn lạc	Tế bào	Bào tử
14	BHCM8.1			
15	BHCM8.2			
16	BHCM8.3			
17	BHCM9.1			
18	BHCM9.2			
19	BHCM9.3			
20	BHCM10.1			



Nguồn: Kết quả phân tích dữ liệu của nhóm nghiên cứu

Sàng lọc các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. có khả năng đối kháng mạnh với chủng nấm *Colletotrichum scovillei* trên đĩa Petri

Bảng 3

Hiệu quả đối kháng với chủng nấm *Colletotrichum scovillei* của các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. phân lập ở Thành phố Hồ Chí Minh

Phần trăm đối kháng (%)

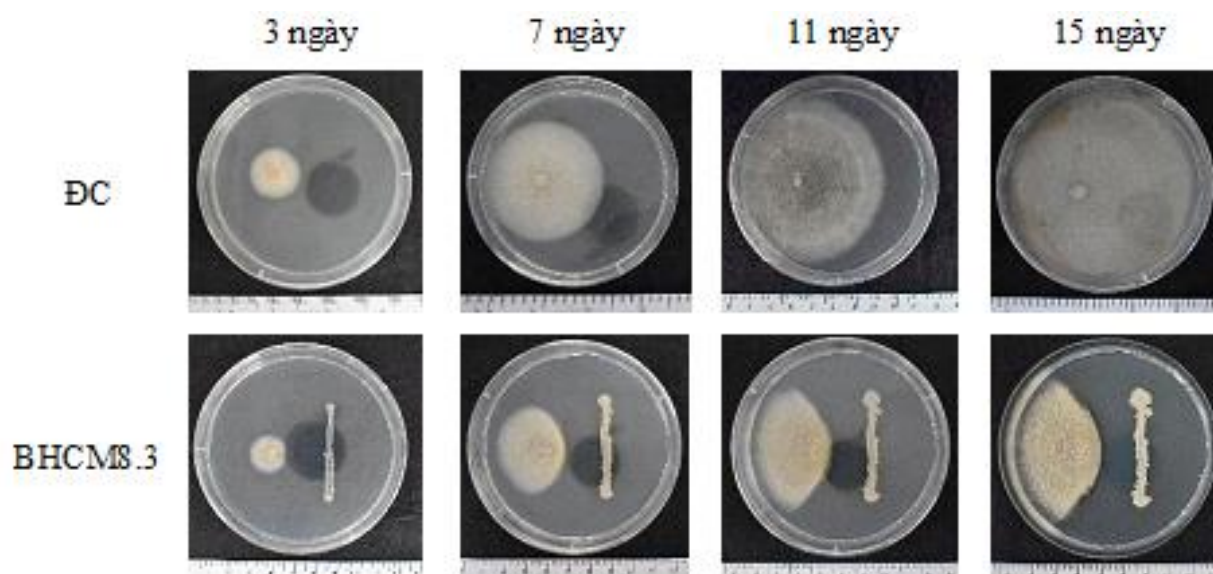
STT	Tên chủng	3 ngày	7 ngày	11 ngày	15 ngày	Trung bình
1	BHCM1	11,93 ^e	63,91 ^b	72,04 ^b	79,67 ^c	56,89
2	BHCM2	7,04 ^h	62,68 ^{cd}	70,49 ^{de}	78,28 ^{ef}	54,62
3	BHCM3	6,98 ^h	51,89 ^j	61,2 ^m	71,62 ^j	47,92
4	BHCM4.1	1,40 ^{lm}	35,92 ^o	48,8 ^r	64,23 ^m	38,14
5	BHCM4.2	0,63 ⁿ	39,82 ⁿ	51,95 ^p	66,25 ^l	39,74
6	BHCM5.1	1,79 ^{kl}	57,88 ^h	66,97 ^j	76,42 ^g	48,72
7	BHCM5.2	6,89 ^h	48,61 ^l	57,76 ^o	68,35 ^k	47,07
8	BHCM5.3	1,03 ^{mn}	56,25 ⁱ	65,33 ^l	75,01 ⁱ	49,41
9	BHCM6.1	12,63 ^d	63,06 ^{bc}	71,08 ^c	78,54 ^{def}	56,33
10	BHCM6.2	2,03 ^k	59,94 ^g	68 ^h	76,74 ^g	51,68
11	BHCM7.1	8,47 ^g	60,84 ^{fg}	70,19 ^{ef}	79,12 ^{cd}	54,66
12	BHCM7.2	0,69 ⁿ	61,91 ^{de}	69,98 ^f	78,77 ^{de}	52,84
13	BHCM7.3	16,36 ^b	67,71 ^a	73,62 ^a	80,69 ^b	59,60

STT	Tên chủng	3 ngày	7 ngày	11 ngày	15 ngày	Trung bình
14	BHCM8.1	9,35 ^f	62,33 ^{cd}	70,8 ^{cd}	78,06 ^f	55,14
15	BHCM8.2	17,72 ^a	63,13 ^{bc}	70,8 ^{cd}	78,79 ^{de}	57,61
16	BHCM8.3	17,52^a	68,45^a	73,39^a	81,58^a	60,24
17	BHCM9.1	15,09 ^c	61,52 ^{ef}	70,29 ^{ef}	79,02 ^d	56,48
18	BHCM9.2	4,07 ^j	57,83 ^h	67,49 ⁱ	76,98 ^g	51,59
19	BHCM9.3	1,03 ^{mn}	44,61 ^m	49,52 ^q	58,11 ⁿ	40,82
20	BHCM10.1	4,13 ^j	50,43 ^k	60,08 ⁿ	71,71 ^j	46,59
21	BHCM10.2	2,12 ^k	56,99 ^{hi}	65,35 ^l	75,39 ^{hi}	49,96
22	BHCM10.3	5,13 ⁱ	57,87 ^h	66,32 ^k	75,77 ^h	51,27
Trung bình		7,00	56,98	65,52	75,28	
P		< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	
CV (%)		4,90	1,07	0,35	0,45	

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau giống nhau không có sự khác biệt về mặt thống kê. ($P < 0.05$)

Nguồn: Kết quả xử lý từ dữ liệu điều tra

Dựa vào kết quả đối kháng ở Bảng 3 cho thấy, tất cả 22 chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. phân lập ở Thành phố Hồ Chí Minh đều có khả năng ức chế sự phát triển của nấm bệnh. Phần trăm đối kháng nấm của các chủng vi khuẩn cũng tăng dần theo thời gian và mức độ đối kháng cũng khác nhau giữa các chủng (sự khác biệt giữa các nghiệm thức có ý nghĩa về mặt thống kê). Sau 3 ngày đồng nuôi cấy, khả năng đối kháng nấm bệnh của các nghiệm thức đạt từ 0,63-17,52%. Trong đó, các chủng có hiệu quả đối kháng cao nhất là BHCM8.2 (17,72%), BHCM8.3 (17,52%). Sau 7 ngày, khả năng đối kháng tăng mạnh, đạt từ 35,92-68,45%, với BHCM7.3 (67,71%) và BHCM8.3 (68,45%) cho hiệu quả ức chế cao nhất. Đến ngày thứ 11, khả năng ức chế tăng chậm, đạt từ 48,8-73,62%. Trong đó, hai chủng mạnh nhất là BHCM7.3 (73,62%) và BHCM8.3 (73,39%), trong khi chủng BHCM4.1 đối kháng thấp nhất (48,8%). Ở ngày thứ 15, khuẩn lạc nấm ở nghiệm thức đối chứng phát triển kín đĩa Petri trong khi ở các nghiệm thức khác, khuẩn lạc nấm bị biến dạng rõ rệt (Hình 4), phần trăm đối kháng đạt từ 58,11-81,58%. Trong đó, chủng BHCM8.3 có hiệu quả đối kháng cao nhất (81,58%) và thấp nhất là chủng BHCM9.3 (58,11%). Như vậy, trong 22 chủng phân lập chủng BHCM8.3 là chủng có khả năng đối kháng tốt nhất với nấm *Colletotrichum scovillei* (phân hạng thống kê cao nhất ở các thời gian khảo sát).



Hình 4. Khả năng đối kháng của chủng BHCM8.3 và nghiệm thức đối chứng sau các thời gian khảo sát

Định danh vi khuẩn BHCM8.3 bằng sinh học phân tử

Sau khi tách DNA tổng số các chủng vi khuẩn, tiến hành phản ứng PCR với cặp mồi 20F, 1500R. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng bộ Isolate II PCR và Gel Kit (Bioline) và tiến hành giải trình tự. Sau khi xử lý bằng phần mềm ATGC và BLAST so sánh với ngân hàng gen NCBI thu được kết quả ở Bảng 4.

Bảng 4

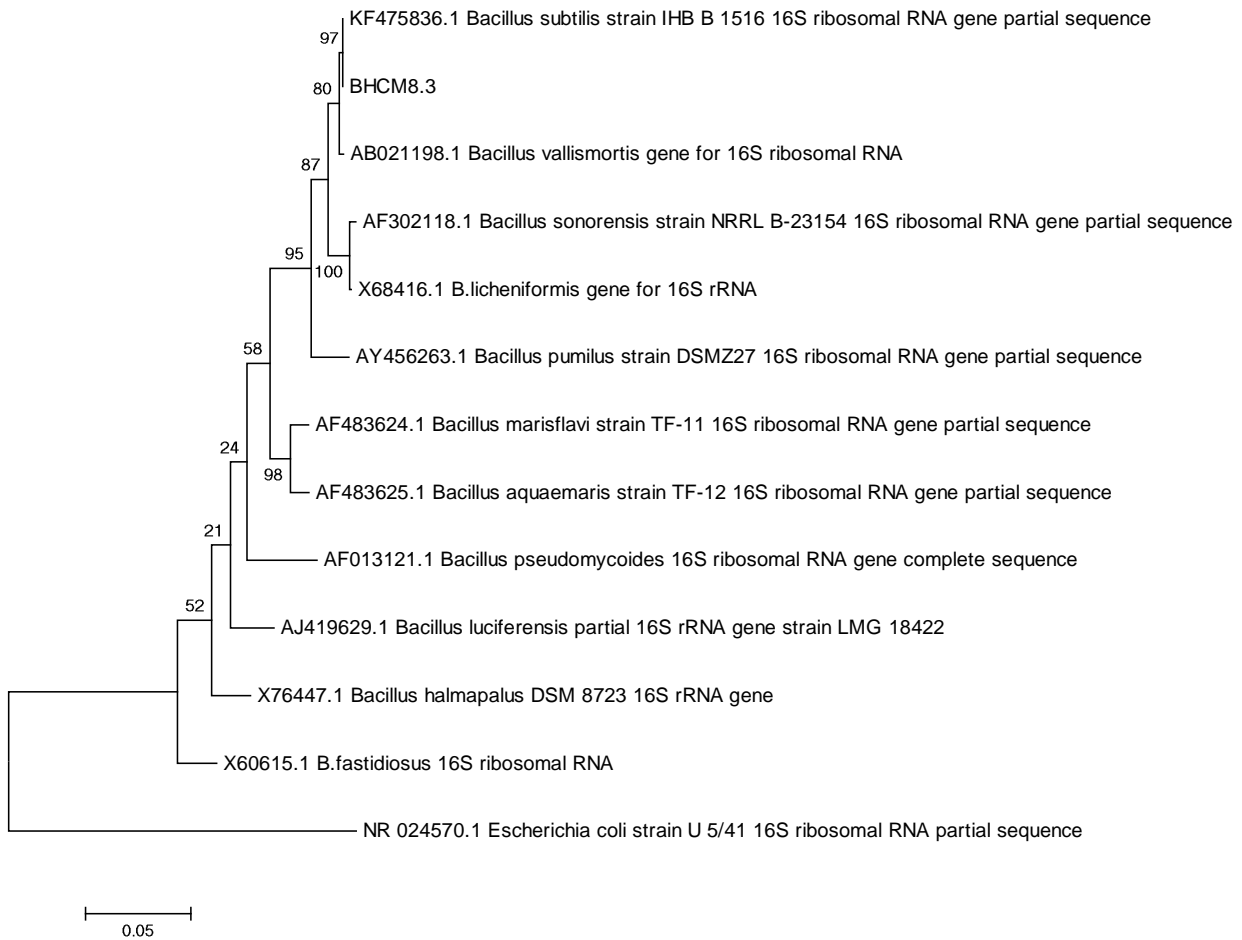
Kết quả BLAST vùng gen 16S rDNA chủng vi khuẩn BHCM8.3

Tên chủng	Mã số chủng so sánh	Mức độ tương đồng	Độ phủ	Tên loài
BHCM8.3	MH017383.1	100	100	<i>Bacillus subtilis</i>

Nguồn: Kết quả xử lý từ dữ liệu điều tra

Kết quả cho thấy trình tự chủng BHCM8.3 có độ tương đồng với vi khuẩn *B. subtilis* (100%).

Kết quả vẽ cây phát sinh loài chủng vi khuẩn BHCM8.3 với các loài tham khảo bằng phần mềm MEGA8, cho thấy chủng BHCM8.3 gần với vi khuẩn *B. subtilis*, tương tự như kết quả BLAST trên NCBI.



Hình 5. Cây phát sinh loài của chủng BHC8.3 với các nhóm vi khuẩn có quan hệ họ hàng gần dựa trên phân tích trình tự 16S rDNA

Kết luận

Từ 10 mẫu đất ở Thành phố Hồ Chí Minh, nhóm nghiên cứu đã phân lập được 22 chủng vi khuẩn có thể thuộc nhóm *B. subtilis* (BHCM5.1; BHCM5.2; BHCM5.3; BHCM6.1; BHCM6.2; BHCM7.1; BHCM7.2; BHCM7.3; BHCM8.1; BHCM8.2; BHCM8.3; BHCM9.1; BHCM9.2; BHCM9.3; BHCM10.1; BHCM10.2; BHCM10.3). Sau đó, tiến hành thực hiện đối kháng 22 chủng vi khuẩn với nấm *Colletotrichum scovillei* trên đĩa Petri. Kết quả cho thấy chủng BHC8.3 có khả năng đối kháng tốt nhất (sau 15 ngày hiệu quả đối kháng là 81,58%). Chủng vi khuẩn BHC8.3 sau khi định danh sinh học phân tử có trình tự tương đồng với *B. subtilis* (100%).

Tài liệu tham khảo

- Ashwini, N., & Srividya, S. (2014). Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1.3 *Biotech*, 4(2), 127-136. doi:10.1007/s13205-013-0134-4
- Baliarda, A., Faure, D., & Urdaci, M. C. (2002). Development and application of a nested PCR to monitor brood stock salmonid ovarian fluid and spleen for detection of the fish pathogen

Flavobacterium psychrophilum. *Journal of Applied Microbiology*, 92(3), 510-516. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01554.x

- Claus, D., & Berkeley, R. C. W. (1986). The genus Bacillus. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, & J. G. Holt (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* (pp. 1105-1139). Baltimore, MD: Williams & Wilkins.
- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., & Stackebrandt, E. (2007). *The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. New York, NY: Springer.
- Etesami, H., Mirsyed, H., & Alikhani, H. A. (2014). In planta selection of plant growth promoting endophytic bacteria for rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14, 491-503. doi:10.4067/S0718-95162014005000039
- Gisi, U., Chet, I., & Gullino, M. L. (2009). *Recent developments in management of plant diseases*. Dordrecht, Holland: Springer.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H., Staley, J. T., & Williams, S. T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore, MD: Williams & Wilkins.
- Isaac, S. (1992). *Fungal plant interactions*. London, UK: Chapman and Hall Press.
- Kim, P. I., & Chung, K. C. (2004). Production of an antifungal protein for control of Colletotrichum lagenarium by Bacillus amyloliquefaciens MET0908. *FEMS Microbiology Letters*, 234(1), 177-183. doi:10.1016/j.femsle.2004.03.032
- Lamsal, K., Kim, S. W., Kim, Y. S., & Lee, Y. S. (2012). Application of rhizobacteria for plant growth promotion effect and biocontrol of anthracnose caused by colletotrichum acutatum on pepper. *Mycobiology*, 40(4), 244-251. doi:10.5941/MYCO.2012.40.4.244
- Melo, J., Carolino, M., Carvalho, L., Correia, P., Tenreiro, R., Chaves, S., ... Ramos, A. C. (2016). Crop management as a driving force of plant growth promoting rhizobacteria physiology. *SpringerPlus*, 5(1), 1574. doi:10.1186/s40064-016-3232-z
- Nguyen, L. D., Phan, H. T., & Nguyen, T. A. (2003). *Thí nghiệm công nghệ sinh học, tập 2 [Biotechnology experiment, episode 2]*. Ho Chi Minh, Vietnam: NXB Đại Học Quốc Gia TP. Hồ Chí Minh.
- Nguyen, L. T., Nguyen, N. Y., Tran, M. T. X. M., & Nguyen, P. T. (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 [Isolation and selection of bacteria from potential chilli root soil antagonism to the fungus Colletotrichum sp. causing anthracnose on chili peppers]. *Tạp Chí Đại Học Cần Thơ*, 47, 16-23. doi:10.22144/ctu.jvn.2016.581
- Nguyen, T. H. (2008). *Khảo sát khả năng đối kháng của một số chủng vi khuẩn Bacillus Sp. đối với nấm Colletotrichum Spp. gây bệnh thán thư trên sen ở Cần Thơ và tỉnh Đồng Tháp trong điều kiện phòng thí nghiệm [Investigation of some strains of Bacillus sp.'s antagonistic ability for the fungus Colletotrichum spp. causing anthracnose on lotus in Can Tho and Dong Thap in laboratory conditions]* (Unpublished bachelor's thesis). Khoa Nông Nghiệp và Sinh học Ứng Dụng, Đại học Cần Thơ.
- Poonpolgul, S., & Kumphai, S. (2007). Chilli pepper anthracnose in Thailand. Country Report. In D. G. Oh & K. T. Kim (Eds.), *Abstracts of the first international symposium on chilli anthracnose* (p. 23). Republic of Korea: National Horticultural Research Institute, Rural Development of Administration.

- Sun, P., Cui, J., Jia, X., & Wang, W. (2017). Isolation and characterization of bacillus amyloliquefaciens 1-1 for biocontrol of Pear Ring Rot. *Horticultural Plant Journal*, 3(5), 183-189. doi:10.1016/j.hpj.2017.10.004
- Tran, M. D., & Nguyen, N. T. (2018). Đặc điểm sinh học của nấm thán thư Colletotrichum hại cây ớt tại Củ Chi, Thành phố Hồ Chí Minh [Biological characteristics of the anthracnose fungus Colletotrichum harmful to chilli in Cu Chi, Ho Chi Minh City]. *Tạp Chí Khoa Học Và Công Nghệ Đại học Nguyễn Tất Thành*, 4, 50-56.
- Wattiau, P., Renard, M. E., Ledent, P., Debois, V., Blackman, G., & Agathos, S. N. (2001). A PCR test to identify bacillus subtilis and closely related species and its application to the monitoring of wastewater biotreatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(5/6), 816-819. doi:10.1007/s002530100691
- Živković, S., Stojanović, S., Ivanović, Ž., Veljko, G., Popović, T., & Balaž, J. (2010). Screening of antagonistic activity of microorganisms against Colletotrichum acutatum and Colletotrichum gloeosporioides. *Archives of Biological Sciences*, 62(3), 611-623. doi:10.2298/ABS1003611Z