

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI SINH VẬT ĐỐI KHÁNG VÀ PHÂN GIẢI TINH BỘT TỪ CÁC MẪU ĐẤT THU THẬP TẠI LÀO

Lê Thị Thanh Thủy^{1, *}, Lê Như Kiều¹, Lương Đức Toàn¹,
Nguyễn Thị Thu Hằng¹, Đỗ Văn Thuân¹, Phonepasut Syha²

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu là bổ sung các vi sinh vật hữu ích cho bộ sưu tập vi sinh vật của Việt Nam và Cộng hòa Dân chủ Nhân dân (CHDCND) Lào, phục vụ công tác nghiên cứu, sử dụng trong sản xuất nông nghiệp của hai nước. Bài báo trình bày kết quả phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*, nấm *Fusarium oxysporum* và phân giải tinh bột từ 150 mẫu đất thu thập tại tỉnh Sayaboury, Luangnamtha và Bokeo, CHDCND Lào. Kết quả đã lựa chọn được 17 chủng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng, trong đó, 6 chủng ký hiệu SA21, SA35, BK50, LN06, LN07 và LN92 có hoạt tính cao nhất với đường kính vòng đối kháng đạt từ 14 - 19 mm đối với vi khuẩn *R. solanacearum* và từ 19 - 23 mm đối với nấm *F. oxysporum*. 6 chủng vi khuẩn này đồng thời có khả năng phân giải tinh bột với đường kính vòng phân giải đạt 22 - 26 mm. Các chủng vi khuẩn tuyển chọn có hiệu quả phòng trừ đạt 54,5-63,7% đối với bệnh do vi khuẩn *R. solanacearum* gây ra và 52,4 - 62% đối với bệnh do nấm *F. oxysporum* gây ra. Trong điều kiện sử dụng tổ hợp các vi sinh vật đối kháng tuyển chọn, hiệu quả phòng trừ đạt 81,8% đối với bệnh do vi khuẩn *R. solanacearum* và 71,4% đối với bệnh do nấm *F. oxysporum* gây ra. Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được định danh là *Bacillus amyloliquefaciens* BK50; *Bacillus subtilis* LN06; *Bacillus subtilis* BK98; *Bacillus siamensis* LN07; *Bacillus subtilis* SA21, *Pseudomonas fluorescens* SA35 và được xác định thuộc nhóm vi khuẩn an toàn sinh học cấp độ 1, được phóng thích không hạn chế vào môi trường.

Từ khóa: Vi sinh vật đối kháng *R. solanacearum*, vi sinh vật đối kháng *F. oxysporum*, vi sinh vật phân giải tinh bột, định danh bằng kỹ thuật giải trình tự gen, kiểm soát sinh học.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sử dụng vi sinh vật trong sản xuất phân bón hữu cơ/chế phẩm vi sinh phục vụ nông nghiệp theo hướng hữu cơ đã và đang trở thành xu hướng trên toàn cầu. Để đáp ứng nhu cầu trên, các nhà khoa học trên thế giới cũng như Việt Nam đã tập trung nghiên cứu tạo ra nhiều loại phân bón hữu cơ, chế phẩm sinh học có chất lượng tốt, an toàn sinh học, cung cấp dinh dưỡng và nhiều loại vi sinh vật có lợi cho đất, phòng trừ các tác nhân gây bệnh hại cây trồng, giúp cây phát triển tốt hơn, an

toàn với môi trường sinh thái, phù hợp với xu hướng an toàn nông nghiệp hiện nay [1-4]. Tuy nhiên, tại CHDCND Lào việc nghiên cứu, sản xuất và sử dụng phân hữu cơ còn rất hạn chế, trong khi đó nguyên liệu để sản xuất phân hữu cơ tương đối dồi dào như phân chuồng, than bùn, xác bã thực vật,... chưa được tận dụng hiệu quả. Trong sản xuất người dân thường sử dụng thuốc bảo vệ thực vật hóa học để phòng trừ bệnh cây trồng như bệnh héo dưa chuột, cà chua, ớt, dưa hấu, thối rễ cây trồng như cam, xoài.... và chưa có chế phẩm sinh học.

Những năm gần đây được sự giúp đỡ của Viện Thổ nhưỡng Nông hóa (Bộ Nông nghiệp và PTNT Việt Nam), Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Phòng thí nghiệm nghiên cứu vi sinh vật nông

¹ Viện Thổ nhưỡng Nông hóa

² Sở Nông Lâm nghiệp tỉnh Sayaboury, Lào

*Email: lethuysfri@gmail.com

ng nghiệp tại tỉnh Sayaboury, CHDCND Lào đã được xây dựng với đầy đủ máy móc, trang thiết bị. Nghiên cứu phân lập, tuyển chọn các chủng vi khuẩn đối kháng *Ralstonia solanacearum*, *Fusarium oxysporum* và vi sinh vật phân giải tinh bột từ các mẫu đất thu thập tại tỉnh Sayaboury, Luangnamtha và Bokeo, CHDCND Lào đã được thực hiện với mục tiêu nâng cao trình độ cán bộ nghiên cứu của Lào và bổ sung các chủng vi sinh vật hữu ích vào bộ sưu tập của Việt Nam cũng như Lào, phục vụ công tác nghiên cứu và sử dụng trong sản xuất nông nghiệp của hai nước.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vi khuẩn đối kháng được phân lập từ các mẫu đất trồng rau cải, cam, dưa hấu theo phương pháp 2 lớp thạch [5] và đánh giá hoạt tính đối kháng vi khuẩn *R. solanacearum* Smith theo TCVN 9300: 2014 [6], nấm *F. oxysporum* theo TCVN 8566: 2010 [7].

Hiệu quả phòng trừ bệnh được đánh giá thông qua thí nghiệm trong nhà lưới, nhắc lại 3 lần, mỗi lần nhắc 01 chậu chứa 15 kg đất đã khử trùng. Thí nghiệm gồm 8 công thức: CT1: Đối chứng (không nhiễm vi sinh vật); CT2: Nhiễm chủng SA21; CT3: Nhiễm chủng SA35; CT4: Nhiễm chủng BK50; CT5: Nhiễm chủng LN06; CT6: Nhiễm chủng LN07; CT7: Nhiễm chủng LN92; CT8: Nhiễm hỗn hợp 6 chủng SA21, SA35, BK50, LN06, LN07 và LN92. Hạt cà chua ngâm ủ đến khi nứt nanh được trộn với dịch vi khuẩn đối kháng có mật độ 10^8 cfu/ml. Gieo 10 hạt/chậu, tía bớt khi cây mọc để lại 5 cây/chậu và nhiễm bổ sung 70 ml dịch vi khuẩn đối kháng, mật độ 10^8 cfu/ml bằng cách tưới vào đất quanh vùng rễ cây. Khi cây có 4 - 5 lá thật (khoảng 20 ngày sau trồng), tiến hành lây bệnh nhân tạo bằng cách tưới 70 ml/cây dung dịch vi khuẩn *R. solanacearum*/nấm *F. oxysporum* chứa 10^8 cfu/ml vào xung quanh đất vùng rễ cây. Theo dõi, ghi chép số cây bị bệnh tại các thời điểm 15, 30, 45 và 60 ngày sau khi lây nhiễm bệnh nhân tạo và đánh giá % tỷ lệ bệnh (TLB), hiệu quả phòng trừ (HQPT) của các vi khuẩn đối kháng sau 60 ngày. Tỷ lệ bệnh và hiệu quả phòng trừ được tính theo công thức công thức dưới đây theo TCVN 12561: 2018 [8].

$$TLB (\%) = \frac{\text{Số cây bị bệnh}}{\text{Tổng số cây thí nghiệm}} \times 100$$

$$HQPT (\%) = \frac{ĐC - CT}{ĐC} \times 100$$

Trong đó: CT là TLB% ở công thức sử dụng vi sinh vật đối kháng và ĐC là TLB% ở công thức đối chứng. Số liệu thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm Excel.

Hoạt tính phân giải tinh bột của các chủng vi sinh vật được kiểm tra, đánh giá theo Hà Thanh Toàn và cs (2008) [9], trong đó các chủng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng vi khuẩn *R. solanacearum*/nấm *F. oxysporum* được nuôi cấy trên môi trường đặc có thành phần: NH_4Cl 9,0 g, K_2HPO_4 0,5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g, $CaCO_3$ 3,0 g, glucose 20,0 g, tinh bột tan 10,0 g, agar 20 g, pH = 7,0. Đánh giá và xác định hoạt tính phân giải tinh bột của các chủng vi sinh vật nghiên cứu sau 3 ngày nuôi cấy thông qua đường kính vòng phân giải (vòng trong suốt xung quanh khuẩn lạc khi được nhuộm dung dịch Gram's Iodine).

Các vi sinh vật tuyển chọn được định danh bằng kỹ thuật giải trình tự gen, theo đó 30 mg sinh khối vi khuẩn được cho vào ống eppendorf loại 2,0 ml chứa 50 μ l NaOH 0,5 M, nghiền mẫu và tách ADN [10], giải trình tự gen với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') và 1525R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') theo Weisburg (1991) [11], phân tích trình tự và phả hệ được thực hiện với các phần mềm ClustalW2 và MEGA 6.0 [12].

Cấp độ an toàn sinh học của các chủng vi khuẩn tuyển chọn được đánh giá theo hướng dẫn về an toàn sinh học của Bộ Y tế Hoa Kỳ năm 2020 [13].

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn đối kháng

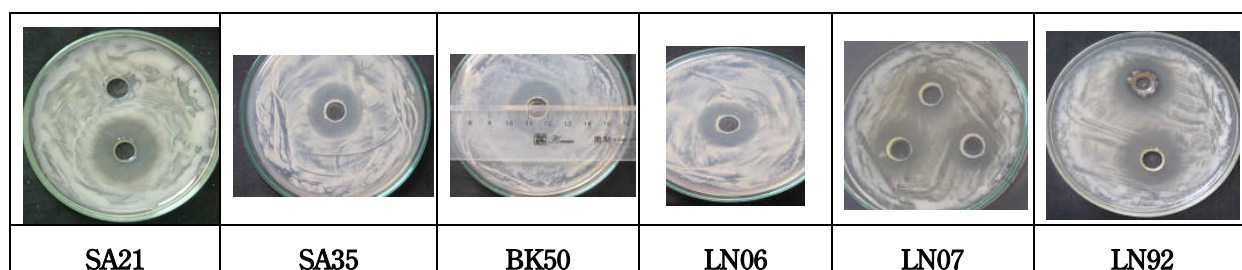
Kết quả phân lập, tuyển chọn các vi sinh vật đối kháng vi khuẩn *R. solanacearum* và nấm *F. oxysporum* từ 150 mẫu đất trồng thu thập tại 3 tỉnh Sayaboury, Luangnamtha, Bokeo, CHDCND Lào được tổng hợp trong bảng 1.

Bảng 1. Kết quả phân lập vi sinh vật đối kháng vi khuẩn, nấm bệnh từ đất trồng rau, cam và dưa hấu thu thập ở CHDCND Lào

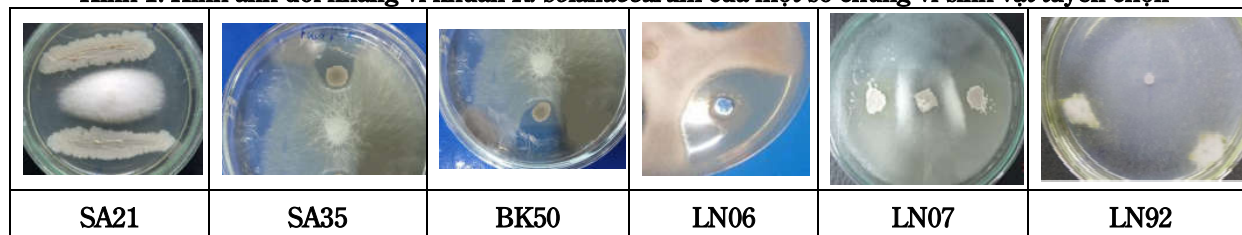
TT	Ký hiệu chủng	Địa điểm phân lập (bản, huyện, tỉnh)	Cây trồng	Đường kính vòng đối kháng (mm)	
				<i>R. solanacearum</i>	<i>F. oxysporum</i>
1	SA21	Houychuaoang, Hongsa, Sayaboury	Rau	19 ± 0,29	23 ± 0,30
2	SA26	Houydou, Hongsa, Sayaboury	Rau	18 ± 0,25	22 ± 0,15
3	SA35	Donmoune, Ngeun, Sayaboury	Rau	18 ± 0,31	22 ± 0,31
4	SA78	Nongbouaxay, Phieng, Sayaboury	Rau	18 ± 0,15	23 ± 0,21
5	SA80	Nongbouathong, Phieng, Sayaboury	Rau	18 ± 0,31	21 ± 0,26
6	SA100	Houa na, Xienghon, Sayaboury	Rau	17 ± 0,21	23 ± 0,36
7	BK50	Namxeo, Huoixai, Bokeo	Cam	18 ± 0,25	22 ± 0,15
8	BK58	Don kham, Houixai, Bokeo	Rau	18 ± 0,15	23 ± 0,29
9	BK67	Nongxai, Houixai, Bokeo	Cam	19 ± 0,21	23 ± 0,38
10	BK91	Don pao, Phaoudo, Bokeo	Rau	17 ± 0,10	22 ± 0,15
11	BK98	Mai, Phaoudo, Bokeo	Rau	18 ± 0,21	22 ± 0,29
12	LN04	Pakha, Sing, Luang Namtha	Rau	15 ± 0,15	21 ± 0,31
13	LN06	Houayluangkao, Sing, Luang Namtha	Rau	18 ± 0,10	22 ± 0,32
14	LN07	Houayluangkao, Sing, Luang Namtha	Dưa hấu	14 ± 0,25	19 ± 0,15
15	LN15	Don chai, Sing, Luang Namtha	Cam	15 ± 0,29	19 ± 0,10
16	LN59	Namkhem, Namtha, Luang Namtha	Cam	17 ± 0,15	21 ± 0,30
17	LN92	Thonglat, Viengphou, Luang Namtha	Cam	17 ± 0,31	22 ± 0,31

Số liệu ở bảng 1 cho thấy, trong tổng số 17 chủng vi sinh vật có khả năng đối kháng *R. solanacearum* và *F. oxysporum*, có 11 chủng phân lập được từ đất trồng rau cải, bao gồm các chủng ký hiệu SA21, SA26, SA35, SA78, SA80, SA100, BK58, BK91, BK98, LN04 và LN06 với đường kính vòng đối kháng đạt từ 15 ± 0,15 mm đến 19 ± 0,29 mm đối với vi khuẩn *R. solanacearum* và từ 21 ± 0,26 mm đến 23 ± 0,30 mm đối với nấm *F. oxysporum*; 01 chủng phân lập từ đất trồng dưa hấu ký hiệu LN07 với đường kính vòng đối kháng *R.*

solanacearum và *F. oxysporum* tương ứng 14 ± 0,25 mm và 19 ± 0,15 mm; 5 chủng phân lập từ đất trồng cam ký hiệu BK50, BK67, LN15, LN59 và LN92 với đường kính vòng đối kháng *R. solanacearum* và *F. oxysporum* tương ứng đạt 15 ± 0,29 mm - 19 ± 0,21 mm và 19 ± 0,10 mm - 23 ± 0,38 mm. Trong số 17 chủng vi sinh vật đối kháng phân lập, 6 chủng vi khuẩn ký hiệu SA21, SA35, BK50, LN06, LN07 và LN92 thể hiện hoạt tính đối kháng cao nhất (Hình 1, 2) và được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Hình ảnh đối kháng vi khuẩn *R. solanacearum* của một số chủng vi sinh vật tuyển chọn



Hình 2. Hình ảnh đối kháng nấm *F. oxysporum* của một số chủng vi sinh vật tuyển chọn

3.2. Khả năng phân giải tinh bột của các vi sinh vật đối kháng tuyển chọn

Bảng 2. Khả năng phân giải tinh bột của các chủng vi khuẩn đối kháng

TT	Chủng	Đường kính vòng phân giải tinh bột (mm)
1	SA21	$26 \pm 0,32$
2	SA35	$25 \pm 0,30$
3	BK50	$26 \pm 0,21$
4	LN06	$22 \pm 0,15$
5	LN07	$22 \pm 0,10$
6	LN92	$22 \pm 0,31$

Kết quả đánh giá khả năng phân giải tinh bột, nhằm lựa chọn các chủng có đa hoạt tính sinh học để sử dụng hiệu quả nhất trong sản xuất phân bón của 6 chủng vi sinh vật đối kháng tuyển chọn được tổng hợp trong bảng 2. Kết quả cho thấy, cả 6 chủng vi sinh vật đối kháng nghiên cứu đều có khả năng phân giải tinh bột với đường kính vòng phân giải đạt $26 \pm 0,32$ mm; $25 \pm 0,30$ mm; $26 \pm 0,21$ mm; $22 \pm 0,15$ mm; $22 \pm 0,10$ mm và $22 \pm 0,31$ mm, có thể sử dụng làm nguyên liệu sản xuất phân hữu cơ vi sinh vật.

3.3. Hiệu quả phòng trừ bệnh của các chủng vi sinh vật tuyển chọn

Kết quả theo dõi tỷ lệ bệnh và hiệu quả phòng trừ bệnh do vi khuẩn *R. solanacearum* và nấm *F. oxysporum* gây ra đối với cây cà chua trong thí nghiệm nhà lưới được tổng hợp trong bảng 3 và 4.

Bảng 3. Tỷ lệ bệnh và hiệu lực phòng trừ bệnh do vi khuẩn *R. solanacearum* gây ra của một số chủng vi sinh vật tuyển chọn

Công thức thí nghiệm	Số cây bị bệnh sau thời gian nhiễm bệnh nhân tạo (ngày)				Tỷ lệ bệnh và hiệu quả phòng trừ sau 60 ngày nhiễm bệnh nhân tạo (%)	
	15	30	45	60	Tỷ lệ bệnh	Hiệu quả phòng trừ
Đối chứng	-	5	7	11	73,3	-
Nhiễm chủng SA21	-	3	4	5	33,3	54,5
Nhiễm chủng SA35	-	-	3	4	26,6	63,7

KHOA HỌC CÔNG NGHỆ

Nhiễm chủng BK50	-	1	3	5	33,3	54,5
Nhiễm chủng LN06	-	2	4	5	33,3	54,5
Nhiễm chủng LN07	-	1	2	4	26,6	63,7
Nhiễm chủng LN92	-	2	3	4	26,6	63,7
Nhiễm hỗn hợp 06 chủng	-	1	2	2	13,3	81,8

Ghi chú: (-) không phát hiện.

Bảng 4. Tỷ lệ bệnh và hiệu quả phòng trừ bệnh do nấm *F. oxysporum* gây ra của một số chủng vi sinh vật tuyển chọn

Công thức thí nghiệm	Số cây bị bệnh sau thời gian nhiễm bệnh nhân tạo (ngày)				Tỷ lệ bệnh và hiệu quả phòng trừ sau 60 ngày nhiễm bệnh nhân tạo (%)	
	15	30	45	60	Tỷ lệ bệnh	Hiệu quả phòng trừ
Đối chứng	-	2	5	10	70,0	-
Nhiễm chủng SA21	-	1	3	5	33,3	52,4
Nhiễm chủng SA35	-	1	2	4	26,6	62,0
Nhiễm chủng BK50	-	-	3	5	33,3	52,4
Nhiễm chủng LN06	-	1	2	4	26,6	62,0
Nhiễm chủng LN07	-	1	4	5	33,3	52,4
Nhiễm chủng LN92	-	1	3	5	33,3	52,4
Nhiễm hỗn hợp 06 chủng	-	1	3	3	20,0	71,4

Ghi chú: (-) không phát hiện.

Kết quả tổng hợp tại bảng 3 và 4 cho thấy, tỷ lệ cây bị bệnh tại các công thức sử dụng vi sinh vật đối kháng đều thấp hơn có ý nghĩa so với đối chứng, giảm từ 73,3% xuống còn 26,6-33,3%, tương ứng với hiệu lực phòng trừ bệnh đạt 54,5-63,7% đối với bệnh do vi khuẩn *R. solanacearum* gây ra và giảm từ 70% xuống còn 26,6-33,3%, tương ứng với hiệu lực phòng trừ bệnh đạt 52,4-62% đối với bệnh do nấm *F. oxysporum* gây ra.

Kết quả thí nghiệm đồng thời cũng xác nhận công thức sử dụng hỗn hợp cả 6 chủng vi sinh vật tuyển chọn có tỷ lệ bệnh thấp nhất là 13,3% đối với vi khuẩn *R. solanacearum* và 20% đối với nấm *F. oxysporum*. Hiệu quả phòng trừ bệnh do vi

khuẩn *R. solanacearum* và *F. oxysporum* gây ra của hỗn hợp các vi sinh vật đối kháng đạt 81,8% và 71,4%.

3.4. Định danh các chủng vi khuẩn tuyển chọn

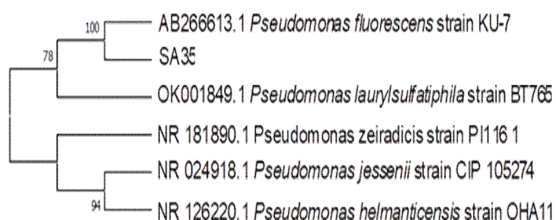
Kết quả giải trình tự gen 6 chủng vi sinh vật tuyển chọn và so sánh với ngân hàng gen quốc tế đã công bố tổng hợp trong bảng 5 xác định 5 chủng vi khuẩn ký hiệu BK50, LN06, LN92, LN07, SA21 có tỷ lệ tương đồng đạt 99% với các loài *Bacillus amyloliquefaciens* strain LSC04, *Bacillus subtilis* strain AQ1, *Bacillus subtilis* strain, *Bacillus siamensis* KCTC 13613 strain PD-A10. Chủng SA35 có tỷ lệ tương đồng đạt 100% với loài *Pseudomonas fluorescens* strain KU-7.

Bảng 5. Mức độ tương đồng của các chủng vi khuẩn lựa chọn với các loài vi sinh vật đã công bố

TT	Ký hiệu chủng	Loài vi sinh vật gần nhất	Mã số ngân hàng gen	Độ tương đồng số trình tự so sánh (%)	Độ tương đồng cao nhất (%)	Chiều dài đoạn AND (bp)
1	BK50	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain LSC04	EF176772.1	100	99	1.541
2	LN06	<i>Bacillus subtilis</i> strain AQ1	FJ644629.1	100	99	1.513
3	LN92	<i>Bacillus subtilis</i> strain EDR4	EF502020.1	100	99	1.543
4	LN07	<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613 strain PD-A10	NR 117274.1	100	99	1.427
5	SA21	<i>Bacillus subtilis</i> strain bs24	GQ213991.1	99	99	1.333
6	SA35	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain KU-7	AB266613.1	100	100	1.423

Trên cơ sở xây dựng cây phát sinh chủng loại của 6 chủng vi khuẩn tuyển chọn thể hiện tại các hình 3-8, các chủng vi sinh vật tuyển chọn được định danh là *Bacillus amyloliquefaciens* BK50;

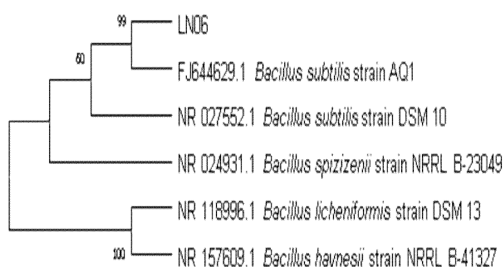
Bacillus subtilis LN06; *Bacillus subtilis* BK98; *Bacillus siamensis* LN07; *Bacillus subtilis* SA21 và *Pseudomonas fluorescens* SA35.



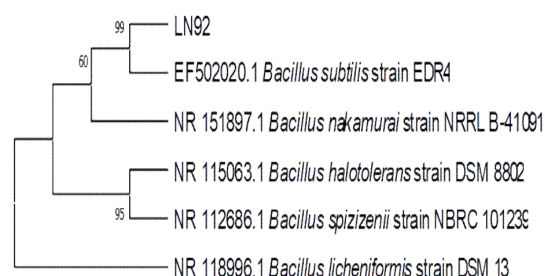
Hình 3. Cây phát sinh chủng loại vi khuẩn SA35



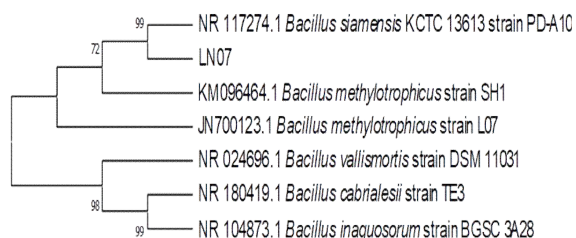
Hình 4. Cây phát sinh chủng loại vi khuẩn BK50



Hình 5. Cây phát sinh chủng loại vi khuẩn LN06



Hình 6. Cây phát sinh chủng loại vi khuẩn LN92



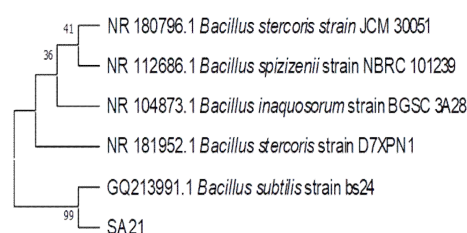
Hình 7. Cây phát sinh chủng loại vi khuẩn LN07

Kết quả đánh giá cấp độ an toàn sinh học của 6 chủng vi sinh vật tuyển chọn theo hướng dẫn về an toàn sinh học của Bộ Y tế Hoa Kỳ năm 2020 [13], xác định tất cả 6 chủng vi sinh vật tuyển chọn đều thuộc nhóm vi sinh vật an toàn sinh học cấp độ 1, được phóng thích không hạn chế vào môi trường (Bảng 6).

Bảng 6. Cấp độ an toàn sinh học của các chủng vi khuẩn lựa chọn

TT	Ký hiệu chủng	Loài gần nhất	Cấp độ an toàn
1	BK50	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1
2	LN06	<i>Bacillus subtilis</i>	1
3	BK98	<i>Bacillus subtilis</i>	1
4	LN07	<i>Bacillus siamensis</i>	1
5	SA21	<i>Bacillus subtilis</i>	1
6	SA35	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1

Nghiên cứu này đã phân lập, tuyển chọn được 6 chủng vi khuẩn đối kháng thuộc 2 chi *Pseudomonas* và *Bacillus* là những tác nhân sinh học được sử dụng phổ biến trong sản xuất thuốc bảo vệ thực vật sinh học phòng trừ bệnh hại thực vật có nguồn gốc từ đất [14], [15], [2]. Nhiều loài thuộc chi *Bacillus* như *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. pasteurii*, *B. pumilus*, *B. mycoides* và *B. sphaericus* vừa có khả năng kích thích sinh



Hình 8. Cây phát sinh chủng loại vi khuẩn SA21

trưởng thực vật, vừa có khả năng đối kháng đối với nhiều loại tác nhân gây bệnh trên nhiều loại cây trồng khác nhau [16]. Một trong những đặc điểm quan trọng của *B. subtilis* là khả năng tạo bào tử trong những điều kiện nhất định và hình thành bào tử theo chu trình phát triển tự nhiên, hoặc khi gặp điều kiện bất lợi. Trong các bào tử tự do không tồn tại sự trao đổi chất, vì vậy bào tử có thể tồn tại ở trạng thái tiềm sinh trong nhiều năm [17]. Lê Như Kiều và cs (2009) [3] cho biết, sử dụng chế phẩm chứa vi khuẩn đối kháng chi *Bacillus* và *Pseudomonas* làm giảm tỉ lệ bệnh héo xanh lác, vùng 65 - 67% so với đối chứng. Abdwareth và cs (2012) [18] đã phân lập được 200 chủng *Bacillus* từ vùng rễ cây cà chua và khoai tây có khả năng đối kháng với *R. solanacearum* T-91 và tuyển chọn được 4 chủng AM1, D16, D29, H8 có khả năng sử dụng để sản xuất chế phẩm phòng bệnh héo xanh cà chua. Mohamed A. S. và cs (2014) [19] thông qua thí nghiệm đã xác định tỷ lệ bệnh héo xanh trên cà chua đã giảm 57,9% khi sử dụng *P. fluorescens*, giảm 51,63% khi sử dụng *P. putida*, giảm 52,63% khi sử dụng *B. subtilis* và giảm 47,37% khi sử dụng *E. aerogenes*.

Kết quả nghiên cứu đã lựa chọn 6 chủng vi khuẩn vừa có khả năng đối kháng vừa có khả năng phân giải tinh bột cao, phù hợp với nhiều nghiên cứu về khả năng tổng hợp đa hoạt tính sinh học của một số chủng vi sinh vật. Choubane S. và cs (2016) [20], Geetha K. và cs (2014) [21] cho biết, nhiều vi khuẩn vùng rễ (*Bacillus* sp.) vừa có khả năng đối kháng vừa có khả năng tổng hợp enzym amylaza phân giải tinh bột, đóng vai trò quan trọng trong sự phân giải các xác bã thực vật trong đất. Kết quả nghiên cứu trình bày ở trên cho thấy, tỉ lệ bệnh héo xanh trên cây cà chua ở công thức đối

chúng không nhiễm vi sinh vật đối kháng là 73,3% sau khi lây bệnh nhân tạo 60 ngày, sử dụng đơn lẻ các chủng vi khuẩn đối kháng SA21, SA35, BK50, LN06, LN07, LN92, tỉ lệ bệnh do vi khuẩn *R. solanacearum* giảm xuống còn 26,6 - 33,3%, tương ứng hiệu quả phòng trừ đạt 54,5 - 63,7% và khi sử dụng hỗn hợp các chủng vi khuẩn, tỉ lệ bệnh chỉ còn 13,3%, tương ứng hiệu quả phòng trừ đạt 81,8%. Kết quả tương tự cũng được xác định đối với bệnh do nấm *F. oxysporum* gây ra. Kết quả này phù hợp nhiều nguyên cứu về vai trò của *Bacillus* là tác nhân kiểm soát sinh học đã làm giảm quần thể *R. solani* và một số nấm bệnh khác trong đất [22], [1], [23], [4].

4. KẾT LUẬN

Từ 150 mẫu đất thu thập tại CHDCND Lào đã tuyển chọn được 17 chủng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng vi khuẩn *R. solanacearum* và nấm *F. oxysporum*, trong đó 6 chủng ký hiệu SA21, SA35, BK50, LN06, LN07 và LN92 có hoạt tính đối kháng cao với đường kính vòng đối kháng đạt từ 14 - 19 mm đối với vi khuẩn *R. solanacearum* và từ 19 - 23 mm đối với nấm *F. oxysporum*. 6 chủng vi khuẩn này đồng thời có khả năng phân giải tinh bột với đường kính vòng phân giải đạt 22 - 26 mm. Các chủng vi khuẩn tuyển chọn có hiệu quả phòng trừ bệnh đạt 54,5 - 63,7% đối với bệnh do vi khuẩn *R. solanacearum* gây ra và 52,4 - 62% đối với bệnh do nấm *F. oxysporum* gây ra.

Trong điều kiện sử dụng tổ hợp các vi sinh vật đối kháng tuyển chọn, hiệu quả phòng trừ đạt 81,8% đối với bệnh do vi khuẩn *R. solanacearum* và 71,4% đối với bệnh do nấm *F. oxysporum* gây ra. Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được định danh là *Bacillus amyloliquefaciens* BK50; *Bacillus subtilis* LN06; *Bacillus subtilis* BK98; *Bacillus siamensis* LN07; *Bacillus subtilis* SA21, *Pseudomonas fluorescens* SA35 và được xác định thuộc nhóm vi khuẩn an toàn sinh học cấp độ 1, được phóng thích không hạn chế vào môi trường.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả xin chân thành cảm ơn Nhiệm vụ Nghị định thư: "Hợp tác nghiên cứu và hoàn thiện công nghệ vi sinh vật phục vụ sản xuất nông

ng nghiệp cho các tỉnh Sayaboury, Luang Namtha và Bokeo, Cộng hòa Dân chủ Nhân dân Lào" cung cấp kinh phí và tạo điều kiện để hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Araujo R., Dunlap C., Barnett S., and Franco C. M. M. (2019). Decoding wheat endosphere-rhizosphere microbiomes in rhizoctonia solani-infested soils challenged by streptomyces biocontrol agents. *Front. Plant Sci.* 10:1038. doi: 10.3389/FPLS.2019.01038/BIBTEX.
2. Fan H., Zhang Z., Li Y., Zhang X., Duan Y., Wang Q. (2017). Biocontrol of bacterial fruit blotch by *Bacillus subtilis* 9407 via surfactin-mediated antibacterial activity and colonization. *Front Microbiol* 8:1973. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01973>.
3. Lê Như Kiều, Lê Thị Thanh Thủy, Trần Quang Minh, Nguyễn Thị Kim Thoa, Trần Thị Lua, Nguyễn Văn Huân (2009). Ảnh hưởng của chế phẩm vi sinh đối kháng tới bệnh héo xanh và năng suất lạc, vùng trong nhà lưới và ngoài đồng ruộng. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, số 2, tr. 54-60.
4. Phạm Văn Toàn (2003). Khả năng sử dụng hỗn hợp vi sinh vật làm phân bón chức năng cho một số cây trồng nông nghiệp, công nghiệp và lâm nghiệp, *Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc*, tr. 127-131.
5. Rupela, O.P., Gopalakrishnan, S., Krajewski, M. M. Sriveni (2003). A novel method for the identification and enumeration of microorganisms with potential for suppressing fungal plant pathogens. *Biol Fertil Soils* 39, 131-134.
6. TCVN 9300: 2014: Vi sinh vật - Phương pháp đánh giá hoạt tính đối kháng của vi sinh vật đối kháng với vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith gây bệnh héo xanh trên cây trồng cạn.
7. TCVN 8566 : 2010: Phân bón vi sinh vật- Phương pháp đánh giá hoạt tính đối kháng nấm gây bệnh vùng rễ cây trồng cạn.

8. TCVN 12561 : 2018: Thuốc Bảo vệ thực vật - Khảo nghiệm hiệu lực sinh học của thuốc trên đồng ruộng. Pesticides - Bioefficacy field trials.
9. Hà Thanh Toàn, Bùi Thế Vinh, Mai Thu Thả, Nguyễn Thu Phương, Trần Lê Kim Ngân và Cao Ngọc Điệp (2008). Phân lập vi khuẩn phân giải xenlulo, tinh bột và protein trong nước rỉ từ bãi rác ở thành phố Cần Thơ. *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Cần Thơ*, tr. 195-202.
10. Wang H., Meiqing Q. and Adrian J. C. (1993). A simple method of preparing plant samples for PCR, *Nucleic Acids Research*, 21 (17): 4153-4154.
11. Weisburg W. G, Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study, *J Bacteriol*, 1991 Jan; 173(2):697-703.
12. Koichiro T., Glen S., Daniel P., Alan F., Sudhir K. (2013). MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), pp.2725-2729.
13. U.S. Department of Health and Human Services (2020). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 6th Edition, June 2020. <https://www.usa.gov>
14. Cao Y., Pi H., Chandrangsu P., Li Y., Wang Y., Zhou H. (2018). Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Sci. Rep.* 8:4360. doi: 10.1038/s41598-018-22782-z.
15. Abbas A., Khan S. U., Khan W. U., Saleh T. A., Khan M. H. U., Ullah S. (2019). Antagonist effects of strains of *Bacillus* spp. against *Rhizoctonia solani* for their protection against several plant diseases: Alternatives to chemical pesticides. *Comptes Rendus Biol.* 342, 124-135. doi: 10.1016/j.crv.2019.05.002.
16. Joseph W. K., Choong M. R., and Shouan Z. (2004). Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. *Article in Phytopathology*. December 2004 DOI: 10.1094/PHYTO.2004.94.11.1259. Source: PubMed.
17. Zaki A. S. (2006). Prospective Biocontrol Agents of Plant Pathogens In book: PGPR: *Biocontrol and Biofertilization*, pp.111-142.
18. Abdllwareth A. A., Xie1 G. L., Tian W. X., Xu L. H., Zhang G. Q. and Muhammad I. (2012). Characterization and evaluation of *Bacillus* isolates for their potential plant growth and biocontrol activities against tomato bacterial wilt, *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(28), pp. 7193-7201.
19. Mohamed A S., Kamal A A., Elyours A., Alal A., Mohamed and Hanan A A. (2014). Peroxidase and Polyphenoloxidase Activities as Biochemical Markers for Biocontrol Efficacy in the Control of Tomato Bacterial Wilt, *J Plant Physiol Pathol*, 2:1.
20. Choubane S., Cheba B.A., Benourrad A. (2016). Screening and Phenotypic Diversity of Amylase Producing Rhizospheric Bacteria from Some North African Plants. *Procedia Technology* 22 (2016) 1197-1204.
21. Geetha K., Venkatesham E., Hindumathi A., and Bhadraiah B. (2014). Isolation, screening and characterization of plant growth promoting bacteria and their effect on *Vigna radita* (L.) R. Wilczek. *Original Research Article*. 6: 799-809.
22. Hameeda B., Rupela O.P. and Reddy G. (2006). Antagonistic activity of bacteria inhabiting composts against soil-borne plant pathogenic fungi. *Indian Journal of Microbiology*, 46 (4). pp. 389-396. ISSN 0046-8991.
23. Zhiqiang H., Bowen L., Yong Y., Fang L., Deshan X., Tiantian H., Yongzeng L., Bin Y., Qian L., Yong H., Qing L. (2021). Impact of biocontrol microbes on soil microbial diversity in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Pest Manag. Sci.* 77, 5537-5546. doi: 10.1002/PS.6595.

ISOLATION, SELECTION ANTAGONISTIC AND STARCH DECOMPOSITION MICROBIAL STRAINS
FROM LAND SAMPLES COLLECTED IN LAOS

Le Thi Thanh Thuy, Le Nhu Kieu, Luong Duc Toan,
Nguyen Thi Thu Hang, Do Van Thuan, Phonepaseut Syha

¹ Soils and Fertilizers Research Institute

² Department of Agriculture and Forestry of Sayaboury province, Lao PDR

Summary

The objective of the mission is to add useful microorganisms to the collection of microorganisms of Vietnam as well as the People's Democratic Republic of Laos (PDR) for serving research and use in agricultural production of the two countries. This paper presents the results of isolation and selection of bacterial strains capable of antagonizing *Ralstonia solanacearum*, *Fusarium oxysporum* and starch degrading from 150 soil samples collected in Sayaboury, Luangnamtha and Bokeo provinces, Lao PDR. As a result, 17 strains of bacteria with antagonistic activity were selected, in which, 06 strains with symbols SA21, SA35, BK50, LN06, LN07 and LN92 had the highest activity with the antagonist ring diameter from 14 mm to 19 mm against *R. solanacearum* bacteria and from 19 mm to 23 mm against fungus *F. oxysporum*. These 6 strains of bacteria are also able to degrade starch with a resolution ring diameter of 22-26 mm. The selected bacterial strains were effective in disease control, reaching 54.5-63.7% for diseases caused by *R. solanacearum* and 52.4-62% for diseases caused by *F. oxysporum*. In the condition of using a mix of selective antagonistic microorganisms, the effectiveness of disease control reached 81.8% for diseases caused by *R. solanacearum* and 71.4% for diseases caused by *F. oxysporum*. The selected bacterial strains were identified as *Bacillus amyloliquefaciens* BK50; *Bacillus subtilis* LN06; *Bacillus subtilis* BK98; *Bacillus siamensis* LN07; *Bacillus subtilis* SA21, *Pseudomonas fluorescens* SA35 and identified as biosafety level 1 bacteria, are released unrestricted into the environment.

Keywords: *R. solanacearum* antagonistic microorganisms, *F. oxysporum* antagonistic microorganisms, starch-degrading microorganisms, identified by gene sequencing, biological control.

Người phản biện: GS.TS. Phạm Văn Toàn

Ngày nhận bài: 19/4/2023

Ngày thông qua phản biện: 10/5/2023

Ngày duyệt đăng: 18/7/2023