Study on treating of black soldier fly feces for bio-organic fertilizer and its impact on improving pH, soil humidity

Lam Van Ha, Ha Tu Van, Huynh Hoang Giang,
Vo Van Ai Vy, Nguyen Ha Linh, Dang Ngo Nhat Anh

Abstract

The process of treating black soldier fly feces in combination with biochar to produce bio-organic fertilizer was carried by mixing 70% of black soldier fly feces with 30% biochar from rice husk and *Bacillus subtilis, Streptomyces* sp. All of the above ingredients were mixed and semi-aerobic incubation for 21 days with temperature controlling at (65 - 75°C), humidity (50%). The final products after incubating were assessed for quality based on QCVN 01-189:2019/BNN&PTNT for fertilizer quality. Black soldier fly feces after composting had the following qualities: pH: 7.23; OM: 57.07 (%); Nts: 2.46 (%); Humic acid: 3.79 (%); fulvic acid: 3.55 (%); K_2Ots: 6.94 (%); P_2O_5ts: 5.34 (%) and C/N ratio: 11.74. The heavy metals (Cd, Pb, As and Hg) and harmful microorganisms (*salmonella* and *E.coli*) were not detected. By assessing quality of black soldier fly feces for improving pH and moisture retention on gray soil, the experimental results showed that the black soldier fly feces when applying 6.000 kg/ha in 14 days without watering the soil enhanced moisture retention and improved soil pH better than treated chicken and worm feces with the same amount.

Keywords: Black soldier fly feces, bio-organic fertilizer, soil pH, soil moisture

Ngày nhận bài: 15/4/2020 — Người phản biện: PGS. TS. Hồ Quang Đức
Ngày phản biện: 23/4/2020 — Ngày duyệt đăng: 29/4/2020

NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH KHÁNG MỘT SỐ VI KHUẨN GÂY BỆNH THỰC VẬT CỦA CÁC CHỦNG XẠ KHUẨN PHÂN LẬP Ở VIỆT NAM

Phạm Thị Huệ[1], Đinh Thị Ngọc Mai[1], Nguyễn Thị Vân[1],
Nguyễn Hồng Minh[1], Nguyễn Kim Nữ Thảo[1]

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành trên 500 chủng xạ khuẩn được phân lập ở Việt Nam, hiện đang được bảo quản tại Bảo tàng Giống chuẩn Vi sinh vật (VTCC) với mục tiêu chọn lọc được các chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với một số vi khuẩn gây bệnh thực vật. Kết quả tuyển chọn được 18 chủng có khả năng kháng *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh bạc lá lúa, 4 chủng kháng *Dickeya zeae* gây bệnh thối gốc và 7 chủng kháng *Pseudomonas syringae* gây bệnh đốm lá. Đặc biệt, hai chủng *Streptomyces nanspiriensis* VTCC 40895 và *Streptomyces griseus* VTCC 41724 có hoạt tính đối kháng với đồng thời 3 loài vi khuẩn gây bệnh đã được nghiên cứu sâu hơn. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian và môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh tổng hợp chất kháng khuẩn cho thấy chủng VTCC 40895 sinh chất kháng khuẩn cao nhất sau 6 ngày nuôi cấy trong môi trường SKS, trong khi đó, chủng VTCC 41724 sinh chất kháng khuẩn tốt nhất trong môi trường ISP4 sau 6 ngày nuôi. Ngoài ra, các đặc tính sinh lý, sinh hóa của hai chủng VTCC 40895 và VTCC 41724 cũng được xác định.

Từ khóa: *Dickeya zeae, Pseudomonas syringae, Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, xạ khuẩn, kháng vi khuẩn gây bệnh thực vật

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Các bệnh do vi sinh vật gây ra trên cây trồng là một mối đe dọa rất lớn đối với sản xuất nông nghiệp. Trong công tác bảo vệ thực vật hiện nay, phòng trị bệnh bằng biện pháp hóa học là phổ biến, nhưng các chất hóa học lại thường có hại cho con người, vật nuôi cũng như các vi sinh vật có lợi khác, dẫn đến nguy cơ ô nhiễm môi trường, đe dọa sức khỏe con người và gây thiệt hại kinh tế do phải sinh chi phí liên quan đến xử lý môi trường. Để kiểm soát được dịch bệnh do vi sinh vật gây ra trên cây trồng, tiềm năng sử dụng vi khuẩn, xạ khuẩn và vi nấm tự nhiên đối kháng để thay thế hoặc bổ sung kết hợp với các thuốc trừ sâu hóa học được đề cập đến trong nhiều nghiên cứu (Medeiros *et al.*, 2012).

[1] Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

Xạ khuẩn được biết là nguồn sinh các chất có hoạt tính sinh học lớn nhất trong số tất cả các nhóm vi sinh vật. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh xạ khuẩn có khả năng ức chế hiệu quả sinh trưởng của các tác nhân gây bệnh thực vật (Evangelista-Martinez, 2014). Trong đó phải kể đến *Streptomyces rochei* kết hợp với *Trichoderma harzianum* được sử dụng để kiểm soát bệnh thối rễ trên cây ớt do *Phytophthora* sp. (Ezziyyani *et al.*, 2007). *Streptomyces lavendulae* và *Streptomyces coelicolor* kháng vi khuẩn *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* gây bệnh thối củ hành (Abdallah *et al.*, 2013). Trong nghiên cứu của Hop và cộng tác viên (2014), *Streptomyces taxytricini* được chứng minh là có khả năng ức chế 10 nòi *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh bạc lá lúa. Nghiên cứu của Aeny và cộng tác viên (2018) khi sàng lọc các chủng xạ khuẩn có khả năng kháng *Dickyea zeae* gây bệnh thối gốc trên cây dứa cũng chọn lọc được hai chủng tiềm năng là *Streptomyces parvulus* và *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus*.

Triển vọng tìm kiếm các chủng xạ khuẩn và các chất có hoạt tính sinh học đo chúng sinh ra làm tác nhân không chế sinh học là rất lớn thông qua quá trình sàng lọc. Nhóm nghiên cứu đã tiến hành điều tra hoạt tính kháng một số tác nhân gây bệnh thực vật của 500 chủng xạ khuẩn được phân lập tại Việt Nam. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng nấm gây bệnh thực vật đã được nhóm nghiên cứu công bố (Nguyễn Thị Vân và *ctv.*, 2019; Lưu Trần Đông và *ctv.*, 2019). Trong bài báo này, các kết quả sàng lọc hoạt tính đối kháng với các chủng vi khuẩn gây bệnh thực vật gồm *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Dickyea zeae* và *Pseudomonas syringae* được trình bày. Bệnh bạc lá lúa do *X. oryzae* pv. *oryzae* được coi là một trong những dịch bệnh phổ biến ở các vùng trồng lúa trên thế giới và các giống lúa kháng bệnh vẫn là giải pháp chủ yếu. *D. zeae* gây bệnh thối gốc trên nhiều loài thực vật như lúa, hành, khoai tây nhưng vẫn còn ít được quan tâm nghiên cứu. *P. syringae* gây bệnh đốm lá trên nhiều loại cây như cà chua, đậu nành, cây quả hạch và gây thiệt hại đáng kể cho ngành trồng trọt. Bên cạnh đó, các nghiên cứu sâu hơn về đặc điểm sinh học và ảnh hưởng của môi trường và thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh chất kháng khuẩn của hai chủng xạ khuẩn tiềm năng cũng được mô tả.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

500 chủng xạ khuẩn được sử dụng để khảo sát hoạt tính kháng khuẩn và 03 chủng vi khuẩn gây bệnh thực vật *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* VTCC 12268, *Dickyea zeae* VTCC 12262 và *Pseudomonas syringae* VTCC 12250 được cung cấp từ Bảo tàng Giống chuẩn Vi sinh vật (VTCC) - Viện Vi sinh vật và Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội. Thông tin về các chủng xạ khuẩn này có thể được tìm thấy trên trang web vtcc.imbt.vnu.edu.vn. Các chủng xạ khuẩn này được phân lập ở Việt Nam, chủ yếu từ các Vườn Quốc gia như Cúc Phương, Ba Bể, Phong Nha-Kẻ Bàng, Bạch Mã, Xuân Thủy và Cát Tiên.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn bằng phương pháp khuếch tán kháng sinh trên đĩa thạch

Các chủng xạ khuẩn được nuôi trên môi trường thạch YS (g/L: tinh bột- 10; cao men- 2; thạch- 16) trong 7 ngày ở 30°C. 02 chủng vi khuẩn *D. zeae* VTCC 12262 và *P. syringae* VTCC 12250 được nuôi trên môi trường lỏng LB (g/l: cao nấm men - 5, pepton - 10, NaCl - 10) và 01 chủng vi khuẩn *X. oryzae* pv. *oryzae* VTCC 12268 được nuôi trên môi trường lỏng PSA (g/l: khoai tây - 300, 2 $Na_2HPO_4.12H_2O$ - 2, $Ca(NO_3)_2$ - 0.5, pepton - 5, sucrose - 15) ở 30°C trong 24 h. Dịch nuôi vi khuẩn kiểm định được thêm vào môi trường đã khử trùng, để nguội đến 40 - 45°C và đổ ra đĩa petri. Sau đó, các thỏi thạch với kích thước 5 mm có xạ khuẩn được đặt lên đĩa. Với các mẫu thử hoạt tính là dịch nuôi cấy hoặc dịch tách chiết thì tiến hành tạo các lỗ trên đĩa thạch kiểm định bằng ống nhựa và nhỏ 50 µl mẫu vào các lỗ. Ủ đĩa ở 30°C trong 24 giờ. Hoạt tính kháng sinh được xác định bằng đường kính của vòng vô khuẩn trên đĩa thạch (Egorov, 1985).

2.2.2. Đánh giá ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh chất kháng khuẩn của chủng xạ khuẩn

Chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng khuẩn được nuôi cấy trong các bình tam giác 250 mL chứa 75 mL môi trường YS lỏng ở 30°C, tốc độ lắc 160 v/p. 1 mL dịch nuôi cấy được lấy ra theo ngày và tiến hành ly tâm 7000 v/p trong 10 phút để loại bỏ sinh khối. Dịch nuôi cấy không chứa tế bào xạ khuẩn được sử dụng để thử hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch.

2.2.3. Đánh giá ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng sinh chất kháng khuẩn của chủng xạ khuẩn

Chủng xạ khuẩn được nuôi cấy trong 5 loại môi trường lỏng khác nhau bao gồm: YS (g/L: tinh bột - 10,

cao men- 2), SKS (g/L: tinh bột- 10, glucose- 10, soybean meal- 10, peptone- 5, $CaCO_3$- 3), 301 (g/L: tinh bột- 20, glucose- 1, peptone- 3, cao thịt- 3, cao men- 5, $CaCO_3$- 4), ISP2 (g/L: cao malt- 10, cao men- 4, glucose- 4), ISP4 (g/L: tinh bột- 10, NaCl- 1, K_2HPO_4- 1, $(NH_4)_2SO_4$- 2, $MgSO_4.7H_2O$- 1, cao men- 2, $CaCO_3$- 2, trace salts solution- 1ml). Sau 6 ngày nuôi lắc ở 30°C, 160 v/p, dịch nuôi cấy (đã loại tế bào bằng ly tâm) ở các môi trường khác nhau được thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch.

2.2.4. Nghiên cứu đặc điểm sinh học của các chủng xạ khuẩn tiềm năng

Khả năng sử dụng các nguồn cacbon khác nhau được xác định bằng cách bổ sung 1% các loại đường vào môi trường bao gồm (g/L) Bacto yeast nitrogen base w/o amino acid- 6.7; Bacto casamino acid- 0.01; K_2HPO_4 - 10; thạch- 15). Môi trường chứa D-glucose được xem là đối chứng dương và môi trường không chứa loại đường nào là đối chứng âm. Ảnh hưởng của nhiệt độ (20, 25, 30, 37 và 45°C) và nồng độ muối khác nhau (NaCl 0, 3 , 5 và 7%) lên sự sinh trưởng của chủng xạ khuẩn được xác định trên môi trường thạch YS sau 5 ngày nuôi. Ảnh hưởng của pH khác nhau được kiểm tra bằng cách nuôi cấy chủng xạ khuẩn ở 30°C trên môi trường YG (g/L: cao men- 10; glucose- 10; thạch- 15) với các nồng độ pH thay đổi từ 3 đến 9. Khả năng sinh enzyme amylase, protease, cellulase của chủng xạ khuẩn được kiểm tra bằng cách bổ sung 1% cơ chất tương ứng là tinh bột, casein và CMC vào môi trường thạch nước. Sau 5 ngày ủ ở 30°C, đĩa nuôi cấy được nhuộm với thuốc thử Lugol 1% để kiểm tra hoạt tính amylase, congo đỏ 0,1% để xác định hoạt tính cellulase và amido black 0,1% đối với hoạt tính protease. Khả năng phân giải urea được quan sát qua khả năng đổi màu vàng sang hồng trên môi trường gồm (g/L): KH[illegible] 1- 10, Na_2HPO_4- 9.5, cao men- 1, phenol đỏ (0.1% 2ml/ml, pH 7). Khả năng hóa lỏng gelatin được kiểm tra bằng cách cấy vạch xạ khuẩn trên ống thạch nghiêng chứa môi trường (g/L): pepton- 5, gelatin 100, pH 7, sau đó ống thạch được giữ ở 4°C trong 2 giờ. Chủng có khả năng hóa lỏng gelatin khi môi trường trong ống có dạng lỏng (Berd, 1973).

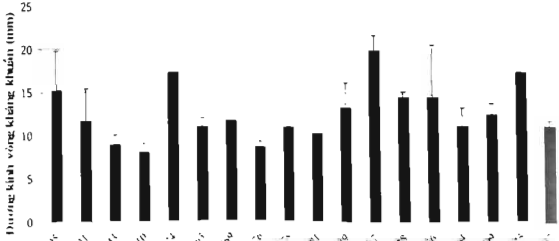
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 6 năm 2017 đến tháng 4 năm 2020 tại Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội.

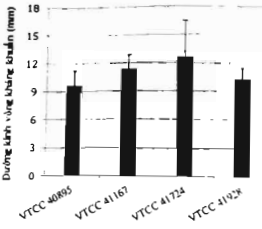
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Sàng lọc hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh thực vật của 500 chủng xạ khuẩn

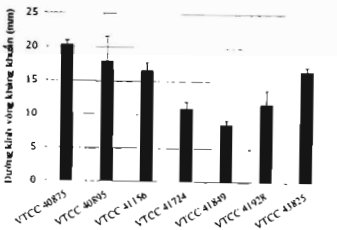
Bằng phương pháp đặt thỏi thạch, 500 chủng xạ khuẩn được phân lập ở Việt Nam đã được sàng lọc về khả năng đối kháng với 3 chủng vi khuẩn gây bệnh trên cây trồng bao gồm *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Dickyea zeae* và *Pseudomonas syringae*. Kết quả chỉ ra trên hình 1, 2 và 3 cho thấy tỷ lệ xạ khuẩn kháng với các chủng vi khuẩn gây bệnh là rất thấp so với tỷ lệ kháng vi nấm của các chủng xạ khuẩn này đã được nhóm nghiên cứu công bố (Nguyễn Thị Vân và *ctv.*, 2019; Lưu Trần Đông và *ctv.*, 2019). Đối với *X. oryzae* pv. *oryzae*, chỉ có 18/500 chủng, tương ứng 3,6% xạ khuẩn có khả năng kháng. Tương tự, tỷ lệ xạ khuẩn đối kháng với *D. zeae* và *P. syringae* tương ứng là 0,8% (4/500 chủng) và 1,4% (7/500 chủng). Việc sàng lọc một lượng lớn mẫu xạ khuẩn làm tăng cơ hội tìm kiếm được các chủng kháng tiềm năng. Đây cũng là lợi thế của nhóm nghiên cứu khi có sẵn một bộ sưu tập giống với quy mô đáng kể.



Hình 1. Hoạt tính kháng *X. oryzae* pv. *oryzae* của một số chủng xạ khuẩn đã được sàng lọc



Hình 2. Hoạt tính kháng *D. zeae* của một số chủng xạ khuẩn đã được sàng lọc

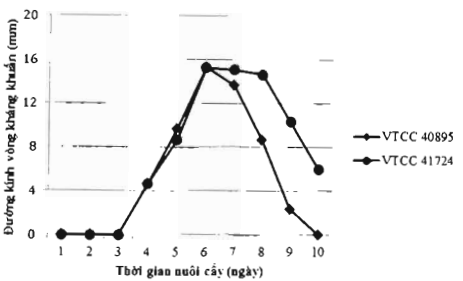


Hình 3. Hoạt tính kháng *P. syringae* của một số chủng xạ khuẩn đã được sàng lọc

Trong số các chủng có hoạt tính kháng với vi khuẩn gây bệnh thực vật, đáng chú ý là chủng *Streptomyces manipurensis* VTCC 40895 và *Streptomyces griseus* VTCC 41724 có khả năng đối kháng với đồng thời 3 chủng vi khuẩn kiểm định. Tiếp theo là chủng *Streptomyces polymachus* VTCC 40875 có hoạt tính kháng *P. syringae* cao nhất với đường kính vòng kháng khuẩn đạt 20,5 mm và chủng *Streptomyces lutosisoli* VTCC 41167 có hoạt tính kháng tốt với *D. zeae* với đường kính vòng kháng khuẩn đạt 11,5 mm. Đặc tính kháng nhiều vi khuẩn gây bệnh là hiếm gặp ở xạ khuẩn, do vậy hai chủng VTCC 40895 và VTCC 41724 được chúng tôi lựa chọn để tiến hành các nghiên cứu chi tiết về các đặc điểm sinh lý và một số yếu tố ảnh hưởng đến sinh tổng hợp hoạt chất kháng khuẩn.

3.2. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh chất kháng khuẩn của chủng xạ khuẩn

Ở *Streptomyces*, các hợp chất kháng khuẩn thường được sản sinh ở giai đoạn sau của quá trình sinh trưởng khi có sự thay đổi về cấu trúc tế bào và hình thức sinh trưởng từ dạng khuẩn ty sơ cấp sang khuẩn ty thứ cấp và hình thành bào tử (Trương Minh Phụng và *ctv.*, 2017). Để xác định thời điểm sinh chất kháng khuẩn cao nhất, hai chủng VTCC 40895 và VTCC 41724 được nuôi cấy trong môi trường YS lỏng trong thời gian 10 ngày, tiến hành thu mẫu hàng ngày và kiểm tra hoạt tính đại diện với chủng kiểm định *X. oryzae* pv. *oryzae*. Kết quả hoạt tính kháng khuẩn theo thời gian nuôi cấy được thể hiện trong hình 4.

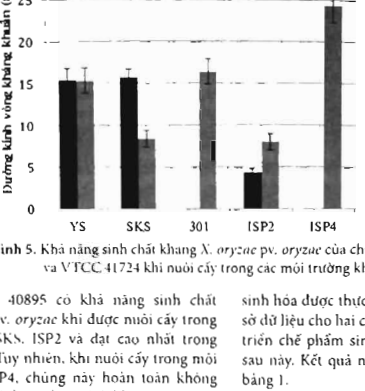


Hình 4. Khả năng sinh chất kháng *X. oryzae* pv. *oryzae* của chủng VTCC 40895 và VTCC 41724 theo thời gian nuôi cấy

Cả hai chủng VTCC 40895 và VTCC 41724 đều bắt đầu xuất hiện hoạt tính từ ngày nuôi thứ 4 và đạt cực đại sau 6 ngày nuôi cấy. Từ ngày nuôi thứ 6, hoạt tính kháng khuẩn giảm dần. Tuy nhiên, đến ngày nuôi thứ 10, hoạt tính của chủng VTCC 40895 biến mất hoàn toàn, trong khi đó chủng VTCC 41724 vẫn giữ được 39% hoạt tính so với thời điểm đạt cực đại.

3.3. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến khả năng sinh chất kháng khuẩn của chủng xạ khuẩn

Khả năng sinh chất kháng khuẩn của hai chủng VTCC 40895 và VTCC 41724 được khảo sát trên 5 loại môi trường dinh dưỡng được sử dụng phổ biến cho nuôi cấy *Streptomyces* là YS, SKS, 301, ISP2 và ISP4. Kết quả được chỉ ra trên hình 5.



Hình 5. Khả năng sinh chất kháng *X. oryzae* pv. *oryzae* của chủng VTCC 40895 và VTCC 41724 khi nuôi cấy trong các môi trường khác nhau

Chủng VTCC 40895 có khả năng sinh chất kháng *X. oryzae* pv. *oryzae* khi được nuôi cấy trong môi trường YS, SKS, ISP2 và đạt cao nhất trong môi trường SKS. Tuy nhiên, khi nuôi cấy trong môi trường 301 và ISP4, chủng này hoàn toàn không có khả năng sản sinh các hợp chất kháng *X. oryzae* pv. *oryzae*. Chủng VTCC 41724 thể hiện hoạt tính kháng *X. oryzae* pv. *oryzae* ở tất cả 5 loại môi trường khảo sát. Trong đó, môi trường ISP4 cho kết quả đối kháng mạnh nhất. Tiếp theo là môi trường 301, YS và thấp nhất là môi trường SKS và ISP2 (Hình 5). Kết quả trên cho thấy thành phần môi trường ảnh hưởng đến con đường sinh tổng hợp hoạt chất kháng khuẩn ở xạ khuẩn. Đặc biệt, môi trường với nhiều thành phần như 301 và ISP4 khiến quá trình tổng hợp hoạt chất kháng *X. oryzae* pv. *oryzae* bị dừng lại ở chủng VTCC 40895. Trong khi đó, môi trường ISP4 với thành phần có nhiều hợp chất vô cơ lại kích hoạt quá trình sinh tổng hợp hoạt chất kháng *X. oryzae* pv. *oryzae* tốt nhất. Tuy nhiên, cơ chế của sự kích thích hoặc kìm hãm này còn cần được nghiên cứu sâu hơn.

3.4. Đặc tính sinh lý, sinh hóa của chủng xạ khuẩn

Chủng *Streptomyces manipurensis* VTCC 40895 được phân lập từ mẫu lá ở Vườn Quốc gia Ba Bể, trong khi đó, chủng *Streptomyces griseus* VTCC 41724 được phân lập từ mẫu lá ở Vườn Quốc gia Phong Nha - kẻ Bàng. Hai chủng này đang được lưu giữ tại VTCC. Các nghiên cứu về đặc tính sinh lý, sinh hóa được thực hiện nhằm mục tiêu bổ sung cơ sở dữ liệu cho hai chủng xạ khuẩn này, phục vụ phát triển chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh thực vật sau này. Kết quả nghiên cứu được trình bày trong bảng 1.

Về khả năng đồng hóa nguồn cacbon, chủng VTCC 40895 sinh trưởng tốt nhất trong môi trường chứa L- arabinose, cellulose và không có khả năng đồng hóa D- lactose, D- sorbitol, D- xylose. Chủng VTCC 41724 có khả năng đồng hóa tất cả các nguồn cacbon khảo sát, trong đó tốt nhất là D- xylose, D- fructose, D- galactose, D- glucose, D- mannitol và D- ribose. Hai chủng VTCC 40895 và VTCC 41724 đều sinh trưởng tốt ở điều kiện pH từ 7 đến 9 và không sinh trưởng trong môi trường axit. Về khả năng chịu nhiệt, hai chủng VTCC 40895 và VTCC 41724 đều sinh trưởng tốt khi nhiệt độ nuôi cấy là 25-30°C và không sinh trưởng khi nhiệt độ nuôi cấy tăng lên 37-45°C. Về khả năng chịu muối, chủng VTCC 40895 sinh trưởng tối ưu ở nồng độ muối 0% và không sinh trưởng khi nồng độ muối vượt quá 3%. Trong khi đó, chủng VTCC 41724 có khả năng chịu muối ở nồng độ 5% và không sinh trưởng khi nồng độ muối tăng lên đến 7%. Chủng chuẩn của loài *S. manipurensis* MBRL 201[T] đồng hoá được các nguồn đường bao gồm L- arabinose, D- cellobiose fructose, D- galactose, D- mannose, raffinose, sodium malate và succinic acid, không đồng hóa được trehalose. Chủng chuẩn chịu được pH 6- 10, pH thích hợp nhất

là 8 (Nimaichand *et al.*, 2012). Trong khi đó, chủng chuẩn của loài *S. griseus* ISP 5236 có khả năng đồng hoá D-glucose, D- xylose, D- mannitol, D- fructose nhưng không có khả năng đồng hoá L- arabinose, sucrose, i- inositol, rhamnose và raffinose (Shirling *et al.*, 1968). Như vậy, khả năng đồng hoá đường là đặc tính riêng của từng chủng, không phải đặc trưng cho hai loài *S. manipurensis* và *S. griseus*.

Bảng 1. Đặc tính sinh lý, sinh hóa của hai chủng xạ khuẩn VTCC 40895 và VTCC 41724

Đặc tính	Điều kiện	Khả năng sinh trưởng	
		S. manipurensis VTCC 40895	*S. griseus* VTCC 41724
Nguồn hydrat cacbon	Cellulose	++++	+++
	D- lactose		+
	D- raffinose	+	++
	D- sorbitol		+
	D- xylose		++++
	D- fructose	+	++++
	D- galactose	+	++++
	D- glucose	++	++++
	D- mannitol	+	++++
	D- ribose	++	+++
	L- arabinose	++++	+
	L- rhamnose	+	+
	Melibose	+	+
	Salicin	+	+
pH	5		
	7	++++	++++
	9	+++	++++
Nhiệt độ (°C)	25	++++	++++
	30	++++	++++
	37		
	45		
Nồng độ muối NaCl (%)	0	++++	++++
	3	+	++
	5		+
	7		
Khả năng sinh enzyme	Amylase	+	+
	Cellulase	+	+
	Protease		
Hóa lỏng gelatin	Gelatin		

Ghi chú: - không sinh trưởng và sinh trưởng rất yếu so với đối chứng; + sinh trưởng yếu; ++ sinh trưởng mức trung bình; +++ sinh trưởng tốt; ++++ sinh trưởng rất tốt

Kết quả kiểm tra khả năng tiết enzyme ngoại bào của các chủng xạ khuẩn nghiên cứu cho thấy, chủng VTCC 40895 và VTCC 41724 đều có khả năng sinh hai enzyme ngoại bào là amylase, cellulase và không tiết protease. Chủng VTCC 41724 có khả năng phân giải urea, trong khi chủng VTCC 40895 không phân giải. Ngoài ra, hai chủng này đều không có khả năng hóa lỏng gelatin.

Khả năng kháng 3 loài vi khuẩn gây bệnh thực vật *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Dickeya zeae* và *Pseudomonas syringae* của các chủng xạ khuẩn đã được đề cập đến trong một số nghiên cứu. Trong công bố của Hwang và cộng tác viên (2001), *Streptomyces humidus* sinh ra hợp chất phenylacetic acid và sodium phenylacetate có hoạt tính kháng *Saccharomyces cerevisiae* và *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Muangham và cộng tác viên (2014) đã chứng minh rằng *Streptomyces bungoensis* TY68-3 có khả năng ức chế sinh trưởng của *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* và *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. Nghiên cứu của Aeny và cộng tác viên (2018) cũng xác định được khả năng kháng *Dickeya zeae gây bệnh thối gốc trên cây dứa* của hai chủng *Streptomyces parvulus* và *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus*. Trong nghiên cứu của chúng tôi, *Streptomyces manipurensis* và *Streptomyces griseus* có khả năng kháng đồng thời cả 3 loài vi khuẩn gây bệnh thực vật. Theo công bố mới nhất của Tamreihao và cộng tác viên (2019), *Streptomyces manipurensis* MBRL 201 có khả năng kháng 6 loài nấm gây bệnh trên lúa và sản sinh các enzyme phân hủy thành tế bào nấm như chitinase, β-1-4-glucanase, lipase, protease và chất bay hơi như ammonia. *Streptomyces griseus* cũng được Nguyen và cộng tác viên (2012) chứng minh khả năng kháng hiệu quả *Phytophthora capsici* gây thối rễ trên cây tiêu. Khả năng kháng đồng thời 3 loài vi khuẩn gây bệnh thực vật của *Streptomyces manipurensis* và *Streptomyces griseus* trong nghiên cứu của chúng tôi là những kết quả mới thu nhận từ hai loài xạ khuẩn này. Các nghiên cứu sâu hơn về hợp chất kháng khuẩn và hiệu quả giảm bệnh ở quy mô đồng ruộng cần thiết được tiến hành để phát triển chế phẩm vi sinh phòng trừ bệnh thực vật từ hai loài xạ khuẩn tiềm năng này.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Từ 500 chủng xạ khuẩn trong bộ sưu tập giống của Bảo tàng Giống chuẩn Vi sinh vật, chúng tôi đã chọn lọc được 18 chủng có khả năng kháng *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, 4 chủng kháng *Dickeya zeae* và 7 chủng kháng *Pseudomonas syringae*. Trong đó có 2 chủng có khả năng kháng đồng thời 3 loài vi sinh

vật kiểm định là VTCC 40895 và VTCC 41724. Chủng VTCC 40895 sinh chất kháng khuẩn tốt nhất trong môi trường SKS sau 6 ngày nuôi cấy. Trong khi đó môi trường dinh dưỡng và thời gian tốt nhất cho khả năng sinh chất kháng khuẩn của chủng VTCC 41724 là ISP4 sau 6 ngày nuôi.

4.2. Đề nghị

Các chủng xạ khuẩn triển vọng đã được tuyển chọn cần được nghiên cứu sâu hơn để phát triển thành các dạng chế phẩm sinh học phục vụ cho sản xuất nông nghiệp.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Nhiệm vụ điều tra cơ bản năm 2019 "Điều tra tiềm năng hoạt tính sinh học của nguồn gen xạ khuẩn của Việt Nam nhằm khai thác phục vụ nền nông nghiệp hữu cơ: điều tra trên 200 chủng xạ khuẩn, hoàn thiện cơ sở dữ liệu online và xây dựng hồ sơ của 5 chủng xạ khuẩn có tiềm năng".

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Lưu Trần Đông, Vũ Sơn Tùng, Nguyễn Thị Vân, Đinh Thị Ngọc Mai, Nguyễn Hồng Minh, Nguyễn Kim Nữ Thảo. 2019. Sàng lọc các chủng kháng nấm gây bệnh thực vật và mô tả chi tiết chủng *Streptomyces hydrogenans* VTCC 4117 có hoạt tính cao. *Tạp chí Khoa học và công nghệ nhiệt đới*, 18: 70-81.

Trương Minh Phụng, Lê Thị Thúy Hằng, Phạm Thị Hảo, Nguyễn Thị Huỳnh My, Nguyễn Hoàng Chương. 2017. Nghiên cứu hoạt tính kháng khuẩn của các chủng xạ khuẩn nội sinh trong cây Trinh nữ hoàng cung (*Crinum latifolium*). *Tạp chí Phát triển KH&CN*, 20: 69-77.

Nguyễn Thị Vân, Đinh Thị Ngọc Mai, Lê Thị Hoàng Yến, Nguyễn Hồng Minh, Nguyễn Kim Nữ Thảo. 2019. Khảo sát khả năng đối kháng với bốn loại nấm gây bệnh trên thực vật của xạ khuẩn được phân lập từ Vườn quốc gia Cúc Phương và Ba Bể. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 17 (1): 1-9.

Abdallah M.E., Haroun S.A., Gomah A.A., El-Naggar N.E. and Badr H.H., 2013. Application of actinomycetes as biocontrol agents in the management of onion bacterial rot disease. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46 (15): 1797-1808.

Acny T.N., Prasetyo J., Suharjo R., Dirmawati S.R., Efri, Niswati A., 2018. Isolation and identification of actinomycetes potential as the antagonist of *Dickeya zeae* pineapple soft rot in Lampung, Indonesia. *Biodiversitas*, 19: 2052-2058.

Berd D., 1973. Laboratory identification of clinically important aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.*, 25(4): 665-68.

Egorov N.S., 1985. In: *Antibiotic, a Scientif[illegible] approach* (N. s. EGOROV, Editor), English Ed[illegible] MIR Publisher, Moscow.

Evangelista-Martinez Z., 2014. Isol[illegible] and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. *World J. Microbiol Biotechnol.*, 30: 1639-1647.

Ezziyyani M., Requena M.E., Egea-Gilabert C. and Candela M.E., 2007. Biological control of Phytophthora root rot of pepper using *Trichoderma harzianum* and *Streptomyces rochei* in combination. *J. Phytopathol.*, 155: 342-349.

Hop D.V., Hoa P.T.P., Quang N.D., Ton P.H., Ha T.H., Hung N.V., Van N.T., Hai T.V., Quy N.T.K., Dao N.T.A. and Thom V.T., 2014. Biological Control of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Causing Rice Bacterial Blight Disease by *Streptomyces toxytricini* VN08-A-12, Isolated from Soil and Leaf-litter Samples in Vietnam. *Biocontrol Science*, 19 (3): 103-111.

Hwang B.K., Lim S.W., Kim B.S., Lee J.Y., Moon S.S., 2001. Isolation and in vivo and in vitro antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 3739-3745.

Medeiros F.H.V., Martins S.J., Zucchi T.D., Melo I.S., Batista L.R., Machado J.C., 2012. Biological control of mycotoxin-producing molds. *Ciênc. Agrotec.*, 36: 483-497.

Muangham S., Pathom-aree W., Duangmal K., 2014. Melanogenic actinomycetes from rhizosphere soil -antagonistic activity against *Xanthomonas oryzae* and plant-growth-promoting traits. *Can J Microbiol*, 61: 164-170.

Nimaichand S., Zhu W.Y., Yang L.L., Ming H., Nie G. X., Tang S. K., Ningthoujam D. S. and Li W.J., 2012. *Streptomyces manipurensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a limestone deposit site in Manipur, India. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102: 133-39.

Nguyen X.H., Naing K.W., Lee Y.S., Tindwa H., Lee G.H., Jeong B.K., Ro H.M., Kim S.J., Jung W.J. and Kim K.Y., 2012. Biocontrol Potential of *Streptomyces griseus* H7602 Against Root Rot Disease (*Phytophthora capsici*) in Pepper. *Plant Pathol. J.*, 28 (3): 282-289.

Shirling E. B. and Gottlieb D., 1968. Cooperative Description of Type Cultures of STREPTOMYCES III. Additional Species Descriptions from First and Second Studies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 18: 279-392.

Tamreihao K., Nimaichand S., Chanu S. B., Devi K.A., Lynda R., Jeeniita N., Ningthoujam D.S. and Roy S.S., 2019. *Streptomyces manipurensis* [illegible] 2001 as potential candidate for biocontro[illegible] plant growth promoting agent for rice. *Indian Journal of Experimental Biology*, 57: 741-749.

Study on the antagonistic activity against several bacterial plant pathogens of actinomycete strains isolated in Vietnam

Phan Thi Hue, Dinh Thi Ngoc Mai, Nguyen Thi Van,
Nguyen Hong Minh, Nguyen Kim Nu Thao

Abstract

A total of 500 actinomycete strains isolated in Vietnam and preserved at the Vietnam Type Culture Collection was tested for antagonistic activity against three plant pathogenic bacteria. The result showed that 18 strains could inhibit *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, 4 strains could inhibit *Dickyea zeae* and 7 strains could inhibit *Pseudomonas syringae*. Among them, *Streptomyces manipurensis* VTCC 40895 and *Streptomyces griseus* VTCC 41167 were potent against all three plant pathogenic bacteria and then utilized for further study. The antibacterial activity was highest when VTCC 40895 strain was cultivated in SKS medium for 6 days while the maximum antibacterial activity of VTCC 41724 strain was obtained in ISP4 medium after 6 days. Physiological, biochemical properties, cultivation conditions of two *Streptomyces* strains were also identified in this study.

Keywords: *Dickyea zeae*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, actinomycetes, antibacterial activity

Ngày nhận bài: 22/4/2020
Ngày phản biện: 7/5/2020

Người phản biện: TS. Đinh Thúy Hằng
Ngày duyệt đăng: 20/5/2020

ĐỊNH DANH VÀ HIỆU QUẢ CỦA MỘT SỐ THUỐC HÓA HỌC ĐỐI VỚI TÁC NHÂN GÂY THỐI CUỐNG TRÁI CAM SÀNH

Lê Thanh Toàn[1], Trần Thành Đạt[1]

TÓM TẮT

Trong vài năm gần đây, bệnh thối cuống trên cây có múi nói chung, cam sành nói riêng xuất hiện và gây thiệt hại nặng nề cho các hộ sản xuất. Kết quả nghiên cứu cho thấy trong 10 mẫu nấm phân lập, làm thuần từ vết bệnh thối cuống trái cam sành thu tại 2 huyện Tam Bình và Trà Ôn, tỉnh Vĩnh Long, mẫu nấm TB2 có độc tính cao nhất và được định danh là *Colletotrichum gloeosporioides*, với tỉ lệ trùng hợp 100% dựa theo NCBI. Kết quả đánh giá hiệu quả *in vitro* của các loại thuốc hóa học với nấm *C. gloeosporioides* ghi nhận nghiệm thức xử lí Azoxystrobin + Fosetyl Aluminium + Dimethomorph cho hiệu quả ức chế nấm *C. gloeosporioides* cao hơn có ý nghĩa với nghiệm thức đối chứng. Hiệu quả *in vivo* của Azoxystrobin + Fosetyl Aluminium + Dimethomorph đối với bệnh thối cuống trái cam cho thấy nghiệm thức có xử lí thuốc tại thời điểm 1 và 5 ngày trước khi lây bệnh đã ức chế sự phát triển của vết bệnh.

Từ khóa: Cam sành, thán thư, thuốc hóa học

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cam là một trong những loại trái cây phổ biến trên thế giới, được trồng ở nhiều nơi và được tiêu thụ như trái cây ăn tươi hoặc dùng làm nước ép. Trái cam không chỉ ngon, dễ ăn mà còn mà còn chứa nhiều chất xơ, vitamin C, thiamin, folate và chất chống oxi hóa (Chung Thị Thanh Hồng, 2015). Ở ĐBSCL, cam sành được trồng ở nhiều nơi nhưng nổi tiếng nhất là trái cam sành Tam Bình (Vĩnh Long), hàng năm ước tính cung cấp cho thị trường hàng chục ngàn tấn và đem lại nguồn thu nhập lớn cho bà con nông dân (Bùi Triệu Thương và *ctv.*, 2018). Cam sành là một trong những cây trồng chủ lực của tỉnh Vĩnh Long, được trồng tập trung chủ yếu ở 2 huyện Tam Bình và Trà Ôn. Trong quá trình canh tác, người nông dân phải đối mặt nhiều loại sâu bệnh hại khác nhau, gây thiệt hại không nhỏ về năng suất và chất lượng trái khi thu hoạch. Hiện nay, một bệnh mới xuất hiện khiến cho nông dân lo lắng. Đó là bệnh thối cuống gây rụng trái cam sành. Khi trái cam gần thu hoạch thì cuống bị thối sau đó trái bị rụng, người trồng cam vô cùng lo lắng. Vì vậy, nghiên cứu đã được thực hiện nhằm xác định tác nhân gây hại và tìm ra loại thuốc hóa học có hiệu quả ức chế sự phát triển nấm bệnh *in vitro*, sự phát triển vết bệnh *in vivo*.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nguồn nấm *Coletotrichum* sp. được thu thập ở hai huyện Tam Bình và Trà Ôn, tỉnh Vĩnh Long và

[1] Trường Đại học Cần Thơ