



DOI:10.22144/ctu.jvn.2018.181

## SO SÁNH HIỆU QUẢ GIẢM BỆNH CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN *Bacillus* sp. VÀ *Serratia nematodiphila* ĐỐI KHÁNG VỚI VI KHUẨN *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* GÂY BỆNH CHÁY BÌA LÁ LÚA

Nguyễn Huỳnh Nhã Uyên<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Cẩm Vân<sup>2</sup> và Nguyễn Đắc Khoa<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Học viên cao học ngành Công nghệ sinh học, Khóa 23, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Sinh viên ngành Công nghệ sinh học, Khóa 40, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>3</sup>Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Nguyễn Đắc Khoa (email: ndkhoa@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 12/03/2018

Ngày nhận bài sửa: 09/05/2018

Ngày duyệt đăng: 28/12/2018

### Title:

Comparison of the disease-reducing effects of the antagonistic *Bacillus* sp. and *Serratia nematodiphila* against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing rice bacterial leaf blight

### Từ khóa:

*Bacillus* sp., cháy bìa lá, lúa, *Serratia nematodiphila*, vi khuẩn đối kháng, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

### Keywords:

Antagonistic bacteria, *Bacillus* sp., bacterial leaf blight, rice, *Serratia* sp., *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

### ABSTRACT

This study was conducted to compare the disease-reducing effects of the six antagonistic bacteria, i.e., *Bacillus aerophilus* HG33, *B. pumilus* TG71, *B. stratosphericus* AG621, *B. subtilis* ST115 and *Serratia nematodiphila* CT78, against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing rice bacterial leaf blight and to screen for the lowest density of the most effective antagonistic bacterial suspension at which the effects were remained under greenhouse conditions. A standard curve for the densities of the six bacteria was made to prepare bacterial suspensions. Seed soaking with the 10<sup>7</sup>-CFU/mL suspensions of *B. aerophilus* HG33, *B. subtilis* ST115 and *S. nematodiphila* CT78 and soil drenching with those of *B. pumilus* TG71, *B. safensis* AG131 and *B. stratosphericus* AG62 were used in the experiments. Results from the two independent replications of this experiment showed that *B. stratosphericus* AG62 provided the strongest effects among the six bacteria. Therefore, lower suspension densities of this bacterium were tested including 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup> and 10<sup>4</sup> CFU/mL. Soil drenching with the 10<sup>6</sup>-CFU/mL suspension showed similar effects as those of the 10<sup>7</sup>-CFU/mL suspension at all disease assessment time points (5, 10 and 15 days after inoculation).

### TÓM TẮT

Đề tài được thực hiện nhằm so sánh hiệu quả giảm bệnh của sáu chủng vi khuẩn đối kháng với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) bao gồm *Bacillus aerophilus* HG33, *B. pumilus* TG71, *B. safensis* AG131, *B. stratosphericus* AG62, *B. subtilis* ST115 và *Serratia nematodiphila* CT78, từ đó tìm ra mật số thấp nhất mà chủng vi khuẩn tốt nhất còn duy trì hiệu quả giảm bệnh trong điều kiện nhà lưới. Đường chuẩn tương quan giữa mật số và giá trị hấp thụ quang phổ của sáu chủng vi khuẩn đối kháng được xây dựng để chuẩn bị huyền phù vi khuẩn. Sáu chủng vi khuẩn trên được so sánh hiệu quả giảm bệnh cháy bìa lá lúa ở mật số 10<sup>7</sup> CFU/mL, trong đó biện pháp ngâm hạt được áp dụng cho ba chủng *B. aerophilus* HG33, *B. subtilis* ST115 và *S. nematodiphila* CT78 còn biện pháp chôn vào đất được áp dụng cho ba chủng *B. pumilus* TG71, *B. safensis* AG131 và *B. stratosphericus* AG62. Qua hai thí nghiệm độc lập, chủng *B. stratosphericus* AG62 cho thấy hiệu quả giảm bệnh tốt nhất. Chủng *B. stratosphericus* AG62 được tuyển chọn để khảo sát hiệu quả giảm bệnh ở những mật số thấp hơn gồm 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup> và 10<sup>4</sup> CFU/mL. Nghiệm thức chôn huyền phù vi khuẩn vào đất ở mật số 10<sup>6</sup> CFU/mL giúp giảm chiều dài vết bệnh so với đối chứng qua cả ba thời điểm 5, 10 và 15 ngày sau chôn bệnh; hiệu quả giảm bệnh tương đương khi xử lý với mật số 10<sup>7</sup> CFU/mL.

Trích dẫn: Nguyễn Huỳnh Nhã Uyên, Nguyễn Thị Cẩm Vân và Nguyễn Đắc Khoa, 2018. So sánh hiệu quả giảm bệnh của các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. và *Serratia nematodiphila* đối kháng với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh cháy bìa lá lúa. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(9B): 59-66.

## 1 GIỚI THIỆU

Bệnh cháy bìa lá do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) gây ra là một trong những bệnh nghiêm trọng nhất ảnh hưởng đến năng suất lúa. Ở Việt Nam, theo Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, tính đến tháng 03/2017, diện tích trồng lúa bị nhiễm bệnh cháy bìa lá là 7.125 ha, thường tập trung tại các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. Do điều kiện thời tiết thất thường, nhiệt độ cao, mưa nhiều và tình hình canh tác thâm canh tăng vụ thay đổi thường xuyên tạo điều kiện cho mầm bệnh phát triển; gây ảnh hưởng nặng nề đến năng suất và hệ sinh thái tự nhiên. Nhằm đảm bảo năng suất và chất lượng của lúa, các biện pháp phòng trừ tổng hợp đã và đang được sử dụng. Trong đó, sử dụng thuốc bảo vệ thực vật để phòng trị bệnh là biện pháp xử lý phổ biến và có xu hướng ngày càng tăng.

Tuy nhiên, sử dụng thuốc bảo vệ thực vật làm tăng tính kháng của mầm bệnh; gây ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng sức khỏe con người, giảm giá trị thương phẩm do lượng hóa chất tồn dư trên nông sản. Biện pháp sử dụng giống kháng bệnh gặp trở ngại do tốn thời gian, kinh phí trong việc tuyển chọn và lai tạo, các nòi vi khuẩn Xoo lại có thể biến đổi rất nhanh dẫn đến phá vỡ tính kháng và giống kháng không còn hiệu quả nữa (Khoa, 2005; Gnanamanickam, 2009). Vì vậy, việc sử dụng các biện pháp sinh học để xử lý bệnh cây ngày càng được đẩy mạnh. Do biện pháp phòng trị sinh học làm tăng năng suất cây trồng, thân thiện với môi trường và có tác dụng tích cực trong phát triển nông nghiệp, cụ thể như sử dụng vi khuẩn đối kháng hiện diện trong đất làm ức chế khả năng phát triển của mầm bệnh, làm giảm mật số vi khuẩn gây bệnh trên lúa, duy trì hiệu quả lâu dài (Agrios, 1988; Weger *et al.*, 1995). Các chủng vi khuẩn *Bacillus aerophilus* HG33, *B. pumilus* TG71, *B. subtilis* ST115, *B. safensis* AG131, *B. stratosphericus* AG62 và *Serratia nematodiphila* CT78 có khả năng đối kháng mạnh với vi khuẩn Xoo (Võ Thị Phương Trang, 2013; Nguyễn Đặng Ngọc Giàu, 2014; Trần Kim Thoa, 2015). Các chủng vi khuẩn này có khả năng làm giảm bệnh cháy bìa lá lúa hiệu quả nhất ở mật số  $10^7$  CFU/mL trong điều kiện nhà lưới với cách xử lý khác nhau. Trong đó, ba chủng vi khuẩn *B. pumilus* TG71, *B. safensis* AG131, *B. stratosphericus* AG62 cho hiệu quả tốt nhất khi chủng huyền phù vào đất; ba chủng vi khuẩn *B. aerophilus* HG33, *B. subtilis* ST115, *S. nematodiphila* CT78 cho hiệu quả tốt khi xử lý bằng cách ngâm hạt với huyền phù vi khuẩn.

Đề tài được thực hiện nhằm so sánh khả năng hạn chế bệnh của các chủng vi khuẩn đối kháng tương ứng với cách xử lý hiệu quả nhất ở mật số  $10^7$

CFU/mL nhằm tìm ra chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng làm giảm bệnh cháy bìa lá tốt nhất; khảo sát khả năng làm giảm chiều dài vết bệnh của chủng vi khuẩn có hiệu quả tốt nhất ở những mật số thấp để tiết kiệm chi phí nuôi cấy. Đề tài là tiền đề để tạo chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh cháy bìa lá lúa có thể được áp dụng trên diện rộng, góp phần nâng cao năng suất canh tác và bảo vệ môi trường sinh thái.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Xây dựng đường chuẩn mật số của các chủng vi khuẩn đối kháng

Mật số vi khuẩn cần được xác định một cách chính xác để thực hiện những thí nghiệm tiếp theo, nên đường chuẩn được xây dựng. Các chủng vi khuẩn được tăng sinh khối trên môi trường NA, ở nhiệt độ 28°C. Sau 48-72 giờ, dùng que cấy lấy vi khuẩn trên bề mặt agar, vi khuẩn được làm đầy trên que cấy và cho vào 10 mL nước cất vô trùng. Sử dụng máy vortex đồng nhất mẫu để thu huyền phù vi khuẩn.

Đo độ hấp thụ quang phổ (OD): Huyền phù vi khuẩn ở ống gốc được pha loãng ở các độ pha loãng 2, 4, 8, 10, 16, 20. Các dung dịch này cùng với huyền phù ở ống gốc được đo OD (3 lần lặp lại) ở bước sóng 600 nm và ghi nhận số liệu.

Đếm số vi khuẩn trên môi trường NA: Huyền phù vi khuẩn ở ống gốc được pha loãng ở các độ pha loãng  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ; dùng micropipette hút 50  $\mu$ L huyền phù vi khuẩn ở các độ pha loãng này trải đều lên đĩa petri (bán kính 4,5 cm) có chứa môi trường NA đã chuẩn bị sẵn bằng que tam giác (mỗi độ pha loãng lặp lại 3 lần); sau đó, ủ đĩa ở 28°C; sau 48 giờ, đếm số khuẩn lạc được hình thành.

Cách đếm khuẩn lạc: Đếm tất cả khuẩn lạc đơn mọc trên môi trường; chọn những đĩa petri có số lượng khuẩn lạc từ 30-300 để tính ra mật số vi khuẩn có trong huyền phù gốc ban đầu theo công thức:

$$M = \frac{D \times A \times 1000}{V}$$

Chú thích:

M: mật số vi khuẩn (CFU/mL)

D: độ pha loãng

A: số khuẩn lạc trung bình trên một đĩa petri

V: thể tích huyền phù vi khuẩn cho vào mỗi đĩa (V = 50  $\mu$ L)

1000: chuyển đổi đơn vị (1mL = 1000  $\mu$ L)

Từ mật số của huyền phù gốc suy ra mật số vi khuẩn trong huyền phù ở các độ pha loãng 2, 4, 8, 10, 16 và 20. Sau đó, dựa vào giá trị OD và mật số

tế bào vi khuẩn ở các độ pha loãng này để xây dựng đường chuẩn thể hiện sự tương quan giữa giá trị OD và mật số vi khuẩn, từ đó có thể xác định được mật số vi khuẩn mong muốn ở các thí nghiệm sau.

## 2.2 So sánh khả năng làm giảm chiều dài vết bệnh cháy bìa lá của các chủng vi khuẩn đối kháng trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm có 8 nghiệm thức được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Mỗi cây lúa tương đương một lần lặp lại. Mỗi chủng vi khuẩn đối kháng (tương ứng với phương pháp xử lý được chọn tốt nhất ở mật số  $10^7$  CFU/mL) là một nghiệm thức. Sử dụng phương pháp chùng vào đất đối với các chủng vi khuẩn *B. safensis* AG131, *B. stratosphericus* AG62 (Võ Thị Phương Trang, 2013) và *B. pumilus* TG71 (Trần Kim Thoa, 2015); phương pháp ngâm hạt đối với các chủng vi khuẩn *B. aerophilus* HG33, *S. nematodiphila* CT78 (Nguyễn Đặng Ngọc Giàu, 2014) và *B. subtilis* ST115 (Trần Kim Thoa, 2015). Mật số vi khuẩn trong thí nghiệm được xác định bằng phương pháp đo OD. Nghiệm thức đối chứng dương: xử lý với thuốc hóa học Starner 20WP (1 mg/mL, hoạt tính oxolinic acid 20), được phun vào 3, 8 và 13 ngày sau chùng bệnh (NSCB) (trước mỗi lần ghi nhận chỉ tiêu 2 ngày). Nghiệm thức đối chứng âm: xử lý với nước cất thanh trùng. Thực hiện toàn bộ thí nghiệm 2 lần.

Xử lý đất: Đất được phơi khô, băm nhỏ và trộn với vôi bột. Sau đó, đất được cho vào chậu (bán kính 17,5 cm) khoảng 3/4 chiều cao của chậu, ngâm nước từ 3-4 ngày, làm nhuyễn đất. Tiếp theo, nước được tháo và làm ráo mặt trước khi gieo.

Xử lý hạt giống: Hạt lúa giống Jasmine 85 sau khi loại bỏ hạt lép, được ngâm trong nước khoảng 55°C trong 20-30 phút để hạn chế mầm bệnh. Tiếp theo, hạt được ngâm nước trong 24 giờ và ủ 48 giờ để hạt nảy mầm trước khi gieo.

Bón phân: theo công thức 100-40-30 kg/ha (N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O) và được chia thành 4 đợt bón.

Đợt 1 (1 ngày trước khi gieo): 100% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (2,4 g/chậu).

Đợt 2 (10 ngày sau khi gieo): 1/5 N (0,5 g/chậu) + 1/4 K<sub>2</sub>O (0,12 g/chậu).

Đợt 3 (18 ngày sau khi gieo): 2/5 N (1 g/chậu) + 1/4 K<sub>2</sub>O (0,12 g/chậu).

Đợt 4 (40 ngày sau khi gieo): 1/5 N (0,5 g/chậu) + 1/4 K<sub>2</sub>O (0,12 g/chậu).

Xử lý vi khuẩn đối kháng: Phương pháp chùng huyền phù vi khuẩn đối kháng vào đất áp dụng đối với 3 chủng vi khuẩn *B. pumilus* TG71, *B. safensis* AG131 và *B. stratosphericus* AG62. Vi khuẩn đối

kháng được nuôi trên môi trường NA 48-72 giờ và được pha loãng thành huyền phù ở mật số  $10^7$  CFU/mL. Sau đó, chùng 40 ml huyền phù vi khuẩn vào đất 24 giờ trước khi gieo hạt. Phương pháp ngâm hạt với huyền phù vi khuẩn đối kháng được áp dụng đối với 3 chủng vi khuẩn *B. aerophilus* HG33, *B. subtilis* ST115 và *S. nematodiphila* CT78. Hạt lúa sau khi ủ nảy mầm được ngâm với huyền phù vi khuẩn đối kháng ở mật số  $10^7$  CFU/mL trong khoảng 2 giờ trước khi gieo (Khoa *et al.*, 2016).

Chùng bệnh: Chuẩn bị huyền phù vi khuẩn *Xoo*: Vi khuẩn *Xoo* được nuôi trên môi trường Wakimoto cải tiến trong 48-72 giờ ở 28°C. Sau đó, vi khuẩn được cho vào ống nghiệm chứa 10 mL nước cất đã thanh trùng và đồng nhất hỗn hợp để tạo huyền phù vi khuẩn bằng máy vortex. Huyền phù này được đo quang phổ ở bước sóng 600 nm, điều chỉnh chỉ số OD = 0,3 tương ứng mật số vi khuẩn *Xoo* khoảng  $10^9$  CFU/mL (Trần Kim Thoa, 2015).

Thao tác chùng bệnh: Sử dụng kéo vô trùng nhúng vào huyền phù vi khuẩn *Xoo* đã chuẩn bị và cắt 8-10 chóp lá trưởng thành tính từ chóp lá sao cho tạo tiết diện 1 cm ở giai đoạn đẻ nhánh (45 ngày sau khi gieo) (Kauffman *et al.*, 1973).

Thu thập và xử lý số liệu: Quan sát và đo chiều dài vết bệnh cháy bìa lá của 5 lá/cây lúa vào 3 thời điểm 5, 10 và 15 NSCB. Chiều dài vết bệnh cháy bìa lá được tính từ vết cắt đến vị trí lan cuối cùng của vết bệnh.

## 2.3 Khảo sát khả năng làm giảm chiều dài vết bệnh cháy bìa lá của chủng vi khuẩn *Bacillus stratosphericus* AG62 ở những mật số thấp trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Mỗi cây lúa tương ứng 1 lần lặp lại. Gồm 6 nghiệm thức lần lượt là: Mật số của chủng vi khuẩn *B. stratosphericus* AG62  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  và  $10^4$  CFU/mL, đối chứng âm (xử lý với nước cất thanh trùng), đối chứng dương (xử lý với thuốc hóa học Starner 20WP) phun vào thời điểm 3, 8, 10 NSCB. Xử lý vi khuẩn đối kháng *B. stratosphericus* AG62 bằng phương pháp chùng vào đất, xử lý đất, hạt giống, bón phân, chùng bệnh, thu nhận và ghi số liệu được thực hiện như mục 2.2.

## 2.4 Xử lý số liệu

Đường chuẩn mật số của các chủng vi khuẩn đối kháng được xây dựng bằng phương pháp hồi quy tuyến tính sử dụng phần mềm Microsoft Excel 2013.

Số liệu ở các thí nghiệm trong điều kiện nhà lưới được tính trung bình bằng phần mềm Microsoft Excel 2013, phân tích phương sai một chiều (One-way ANOVA) bằng phần mềm SPSS 22.0, kiểm

định Duncan ở mức ý nghĩa 5% để so sánh các trung bình nghiệm thức.

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Đường chuẩn mật số của các chủng vi khuẩn đối kháng

Phương trình đường chuẩn tương quan giữa mật

số và giá trị OD của 6 chủng vi khuẩn đối kháng được thể hiện trong Bảng 1.

Do kích thước, hình dạng, tốc độ sinh trưởng, mật độ tế bào giữa từng loại vi khuẩn khác nhau nên khả năng hấp phụ quang phổ sẽ khác nhau. Kết quả cho thấy mỗi chủng vi khuẩn khác nhau có phương trình đường chuẩn riêng biệt.

**Bảng 1: Phương trình đường chuẩn của các chủng vi khuẩn đối kháng**

Chủng vi khuẩn	Phương trình đường chuẩn	R <sup>2</sup>
<i>B. aerophilus</i> HG33	$y = 3.10^{-9}x + 0,0058$	0,9989
<i>B. pumilus</i> TG71	$y = 8.10^{-9}x + 0,0035$	0,9982
<i>B. safensis</i> AG131	$y = 2.10^{-9}x + 0,011$	0,9948
<i>B. stratosphericus</i> AG62	$y = 8.10^{-9}x - 0,0507$	0,9942
<i>B. subtilis</i> ST115	$y = 2.10^{-9}x + 0,0019$	0,9997
<i>S. nematodiphila</i> CT78	$y = 4.10^{-10}x + 0,006$	0,9997

x: mật số vi khuẩn đối kháng (CFU/mL)

y: giá trị OD đo được

Hệ số R<sup>2</sup> của các phương trình đường chuẩn đều cao (từ 0,9942 đến 0,9997), cho thấy có sự tương quan tuyến tính giữa giá trị OD và mật số vi khuẩn. Vì vậy, có thể dựa vào phương trình đường chuẩn để xác định mật số vi khuẩn theo giá trị OD để thực hiện các thí nghiệm sau.

#### 3.2 So sánh khả năng hạn chế bệnh cháy bìa lá của các chủng vi khuẩn đối kháng trong điều kiện nhà lưới

Thí nghiệm được thực hiện để so sánh khả năng làm giảm bệnh cháy bìa lá của các chủng vi khuẩn đối kháng trong điều kiện nhà lưới nhằm chọn ra chủng vi khuẩn có khả năng làm giảm bệnh cháy bìa

lá tốt nhất. Chủng vi khuẩn được chọn dựa trên 2 tiêu chí:

(1) Chủng vi khuẩn cần duy trì khả năng hạn chế bệnh tốt qua 2 lần khảo sát.

(2) Ở mỗi thí nghiệm, chủng vi khuẩn cho chiều dài vết bệnh trên lá ngắn nhất, khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng qua các thời điểm khảo sát.

Chiều dài vết bệnh cháy bìa lá của các nghiệm thức qua 3 thời điểm khảo sát trong thí nghiệm 1 (từ tháng 3 đến tháng 5) được trình bày ở Bảng 2.

**Bảng 2: Chiều dài vết bệnh trên lá lúa tại thời điểm 5, 10 và 15 NSCB khi xử lý vi khuẩn đối kháng ở mật số 10<sup>7</sup> CFU/mL (từ tháng 3 đến tháng 5)**

Chủng vi khuẩn và cách xử lý	Chiều dài vết bệnh (mm)			
	5 NSCB	10 NSCB	15 NSCB	
Chung vào đất	<i>B. stratosphericus</i> AG62	36,47 <sup>a</sup>	186,27 <sup>a</sup>	292,07 <sup>a</sup>
	<i>B. pumilus</i> TG71	46,27 <sup>c</sup>	258,53 <sup>c</sup>	321,20 <sup>c</sup>
	<i>B. safensis</i> AG131	41,00 <sup>b</sup>	257,80 <sup>c</sup>	374,53 <sup>c</sup>
Ngâm hạt	<i>B. aerophilus</i> HG33	44,20 <sup>bc</sup>	225,20 <sup>c</sup>	333,27 <sup>cd</sup>
	<i>B. subtilis</i> ST115	45,27 <sup>c</sup>	209,53 <sup>b</sup>	298,13 <sup>ab</sup>
	<i>S. nematodiphila</i> CT78	48,13 <sup>c</sup>	248,33 <sup>de</sup>	350,00 <sup>d</sup>
Đối chứng âm		46,00 <sup>c</sup>	243,93 <sup>d</sup>	352,47 <sup>d</sup>
Đối chứng dương		40,33 <sup>b</sup>	185,87 <sup>a</sup>	316,07 <sup>bc</sup>
CV(%)		4,95	3,28	3,85

Trong cùng một cột, các trung bình được theo sau bởi một hay những chữ cái giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% trong phép thử Duncan

NSCB: ngày sau chủng bệnh

Đối chứng âm: nước cất vô trùng

Đối chứng dương: phun Starner 20 WP

Ở thời điểm 5 NSCB, nghiệm thức xử lý với chủng vi khuẩn *B. stratosphericus* AG62 cho chiều dài vết bệnh ngắn nhất và khác biệt có ý nghĩa so với các nghiệm thức còn lại. Nghiệm thức xử lý với chủng vi khuẩn *B. safensis* AG131 có khả năng làm giảm chiều dài vết bệnh tương đương với đối chứng dương và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng âm.

Ở thời điểm 10 NSCB, nghiệm thức xử lý với chủng vi khuẩn *B. stratosphericus* AG62 cho chiều dài vết bệnh ngắn tương đương với đối chứng dương và khác biệt so với các nghiệm thức còn lại. Nghiệm thức xử lý với các chủng vi khuẩn *B. subtilis* ST115, *B. aerophilus* HG33 cho chiều dài vết bệnh ngắn và khác biệt so với đối chứng âm.

Thời điểm 15 NSCB, nghiệm thức xử lý với chủng vi khuẩn *B. stratosphericus* AG62 tiếp tục cho thấy khả năng hạn chế bệnh tốt nhất và khác biệt có ý nghĩa so với cả 2 đối chứng. Nghiệm thức xử

lý với các chủng vi khuẩn *B. subtilis* ST115 và *B. pumilus* TG71 cho chiều dài vết bệnh ngắn và khác biệt so với đối chứng âm.

Tóm lại, nghiệm thức xử lý với chủng vi khuẩn *B. stratosphericus* AG62 cho khả năng hạn chế bệnh tốt ở cả 3 thời điểm khảo sát. Ngược lại, nghiệm thức xử lý với chủng vi khuẩn *S. nematodiphila* CT78 không cho khả năng giảm chiều dài vết bệnh ở cả 3 thời điểm. Những nghiệm thức khác có sự biến động trong chiều dài vết bệnh giữa các thời điểm.

Để tăng độ tin cậy khi chọn chủng vi khuẩn đối kháng có khả năng làm giảm bệnh cháy bìa lá tốt nhất, thí nghiệm trong điều kiện nhà lưới được lặp lại từ tháng 6 đến tháng 8. Chiều dài vết bệnh cháy bìa lá của các nghiệm thức qua 3 thời điểm khảo sát trong thí nghiệm 2 được trình bày ở Bảng 3. Kết quả cho thấy tất cả các nghiệm thức xử lý vi khuẩn đối kháng đều cho khả năng hạn chế bệnh khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng âm tại cả 3 thời điểm.

**Bảng 3: Chiều dài vết bệnh trên lá lúa tại thời điểm 5, 10 và 15 NSCB khi xử lý vi khuẩn đối kháng ở mật số 10<sup>7</sup> CFU/mL (từ tháng 6 đến tháng 8)**

Chủng vi khuẩn và cách xử lý	Chiều dài vết bệnh (mm)			
	5 NSCB	10 NSCB	15 NSCB	
Chung vào đất	<i>B. stratosphericus</i> AG62	17,20 <sup>ab</sup>	91,00 <sup>ab</sup>	253,07 <sup>a</sup>
	<i>B. pumilus</i> TG71	15,67 <sup>a</sup>	104,87 <sup>ab</sup>	242,87 <sup>a</sup>
	<i>B. safensis</i> AG131	19,20 <sup>abc</sup>	100,20 <sup>ab</sup>	259,53 <sup>ab</sup>
Ngâm hạt	<i>B. aerophilus</i> HG33	22,13 <sup>bc</sup>	88,87 <sup>ab</sup>	265,67 <sup>ab</sup>
	<i>B. subtilis</i> ST115	23,07 <sup>c</sup>	110,80 <sup>b</sup>	325,07 <sup>c</sup>
	<i>S. nematodiphila</i> CT78	15,13 <sup>a</sup>	82,33 <sup>a</sup>	288,07 <sup>b</sup>
Đối chứng âm		35,60 <sup>d</sup>	155,60 <sup>c</sup>	382,07 <sup>d</sup>
Đối chứng dương		15,60 <sup>a</sup>	97,40 <sup>ab</sup>	245,73 <sup>a</sup>
CV(%)		15,01	11,32	6,19

Trong cùng một cột, các trung bình được theo sau bởi một hay những chữ cái giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% trong phép thử Duncan

NSCB: ngày sau chủng bệnh

Đối chứng âm: nước cất vô trùng

Đối chứng dương: phun Starner 20 WP

Tại thời điểm 5 NSCB, nghiệm thức xử lý với chủng vi khuẩn *S. nematodiphila* CT78, *B. pumilus* TG71, *B. stratosphericus* AG62, *B. safensis* AG131 cho khả năng làm giảm chiều dài vết bệnh tương đương với đối chứng dương và tiếp tục duy trì đến thời điểm 10 NSCB. Trong đó, chủng *S. nematodiphila* CT78 cho khả năng hạn chế bệnh tốt nhất qua cả 2 thời điểm. Hai chủng *B. aerophilus* HG33 và *B. subtilis* ST115 làm giảm chiều dài vết bệnh nhưng thấp hơn đối chứng dương là thuốc hóa học. Đến thời điểm 10 NSCB, *B. aerophilus* HG33 làm giảm chiều dài vết bệnh tương đương với thuốc hóa học; *B. subtilis* ST115 vẫn cho khả năng hạn chế bệnh thấp nhất trong số 6 chủng vi khuẩn.

Tại thời điểm 15 NSCB, nghiệm thức xử lý với chủng vi khuẩn *B. pumilus* TG71, *B. stratosphericus* AG62, *B. safensis* AG131, *B. aerophilus* HG33 tiếp tục cho chiều dài vết bệnh tương đương nhau và tương đương đối chứng dương, thấp hơn và khác biệt ý nghĩa so với đối chứng âm như ở thời điểm 10 NSCB. Trong đó, 2 chủng *B. pumilus* TG71 và *B. stratosphericus* AG62 có khả năng làm giảm chiều dài vết bệnh tốt nhất. Đối với chủng vi khuẩn *S. nematodiphila* CT78, khả năng hạn chế bệnh ở thời điểm này thấp hơn hai thời điểm trước, vì đây là vi khuẩn Gram âm có thể không có khả năng lưu tồn trong đất trong điều kiện bất lợi so với các chủng *Bacillus* vi không tạo được nội bào tử.

Tóm lại, có 3 nghiệm thức xử lý với chủng vi khuẩn *B. pumilus* TG71, *B. stratosphericus* AG62 và *B. safensis* AG131 đều duy trì khả năng hạn chế bệnh tương đương với đối chứng dương trong suốt 3 thời điểm khảo sát. Các nghiệm thức còn lại cũng cho kết quả giảm bệnh nhưng không bằng đối chứng dương ở một số thời điểm. So sánh với kết quả thí nghiệm lần 1, nghiệm thức xử lý với chủng vi khuẩn *B. pumilus* TG71, *B. safensis* AG131 không duy trì khả năng làm giảm chiều dài vết bệnh qua 2 thí nghiệm độc lập.

Vậy căn cứ vào tiêu chí tuyển chọn ban đầu, chủng vi khuẩn *B. stratosphericus* AG62 được tuyển chọn là chủng vi khuẩn có khả năng làm giảm bệnh cháy bìa lá tốt nhất.

Khả năng làm giảm bệnh giữa các chủng vi khuẩn có sự khác biệt do sự tiết các chất khác nhau để ức chế mầm bệnh. Chẳng hạn, các chủng *Bacillus* có khả năng tiết ra các polypeptide khác nhau. Vi khuẩn *B. pumilus* có khả năng sản xuất ra surfactin, *B. subtilis* sản xuất ra fengycin nhưng lại ít sản xuất ra iturin. Các polypeptide này đóng vai trò quan trọng trong hoạt động kiểm soát sinh học bệnh cây. Đồng thời, các chất này còn tham gia kích thích tính kháng bệnh của cây (Marc *et al.*, 2007).

Sự khác biệt về chiều dài vết bệnh giữa hai thí nghiệm độc lập và so với các nghiên cứu của Võ Thị Phương Trang (2013), Nguyễn Đặng Ngọc Giàu (2014), Trần Kim Thoa (2015) là do các nghiên cứu được tiến hành ở những khoảng thời gian khác nhau nên ảnh hưởng của nhiệt độ và độ ẩm lên kết quả thí nghiệm khác nhau. Nhiệt độ và độ ẩm có liên quan đến sự phát triển và mức độ gây hại của bệnh (Lê Lương Tê, 2000). Bệnh cháy bìa lá phát triển mạnh

và lan truyền nhanh ở nhiệt độ từ 26-30°C, ẩm độ cao từ 90% trở lên. Cụ thể ở thí nghiệm 1 trong nghiên cứu này (tháng 3 đến tháng 5), thời tiết nắng nóng nên độ ẩm cao, vì vậy bệnh phát triển khá nhanh chóng và chiều dài vết bệnh cao hơn so với thí nghiệm 2.

### 3.3 Khả năng hạn chế bệnh của chủng vi khuẩn *Bacillus stratosphericus* AG62 ở những mật số thấp trong điều kiện nhà lưới

Kết quả khảo sát khả năng giảm chiều dài vết bệnh của chủng vi khuẩn *B. stratosphericus* AG62 ở những mật số thấp được trình bày trong Bảng 4.

Nghiệm thức xử lý với chủng vi khuẩn *B. stratosphericus* AG62 ở những mật số  $10^7$  và  $10^6$  CFU/mL cho khả năng hạn chế bệnh ở cả 3 thời điểm. Trong đó, tại thời điểm 10 và 15 NSCB nghiệm thức xử lý  $10^6$  CFU/mL không khác biệt so với nghiệm thức xử lý  $10^7$  CFU/mL. Nghiệm thức xử lý  $10^5$  CFU/mL cho chiều dài vết bệnh tương đương nghiệm thức xử lý  $10^7$  CFU/mL tại thời điểm 5 và 15 NSCB nhưng không làm giảm bệnh ở thời điểm 10 NSCB. Nghiệm thức xử lý  $10^4$  CFU/mL làm giảm chiều dài vết bệnh tại thời điểm 5 và 10 NSCB nhưng lại không duy trì đến thời điểm 15 NSCB.

Chủng vi khuẩn *B. stratosphericus* AG62 khi được xử lý ở các mật số  $10^9$ ,  $10^8$  và  $10^7$  CFU/mL đều cho khả năng hạn chế bệnh nhưng ở mật số  $10^7$  CFU/mL cho chiều dài vết bệnh ngắn và khác biệt so với hai mật số còn lại (Võ Thị Phương Trang, 2013). Trong thí nghiệm này, vi khuẩn *B. stratosphericus* AG62 khi được xử lý ở mật số  $10^6$  CFU/mL cho khả năng hạn chế bệnh tương đương ở mật số  $10^7$  CFU/mL tại thời điểm 10 và 15 NSCB.

**Bảng 4: Chiều dài vết bệnh trên lá lúa tại thời điểm 5, 10 và 15 NSCB khi xử lý với chủng vi khuẩn *B. stratosphericus* AG62 ở những mật số thấp**

Mật số (CFU/mL)	Chiều dài vết bệnh (mm)		
	5 NSCB	10 NSCB	15 NSCB
$10^7$	7,13 <sup>a</sup>	87,47 <sup>a</sup>	226,40 <sup>a</sup>
$10^6$	10,53 <sup>b</sup>	114,80 <sup>ab</sup>	273,20 <sup>ab</sup>
$10^5$	7,33 <sup>a</sup>	132,07 <sup>bc</sup>	256,40 <sup>ab</sup>
$10^4$	9,33 <sup>ab</sup>	114,87 <sup>ab</sup>	277,60 <sup>bc</sup>
Đối chứng âm	14,80 <sup>c</sup>	144,40 <sup>c</sup>	321,47 <sup>c</sup>
Đối chứng dương	6,67 <sup>a</sup>	122,27 <sup>bc</sup>	261,93 <sup>ab</sup>
CV(%)	18,41	12,61	9,44

Trong cùng một cột, các trung bình được theo sau bởi một hay những chữ cái giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 5% trong phép thử Duncan

NSCB: ngày sau chủng bệnh

Đối chứng âm: nước cất vô trùng

Đối chứng dương: phun Starner 20 WP

Ở những mật số quá cao như  $10^9$  và  $10^8$  CFU/mL, dinh dưỡng trong đất có thể không đủ để vi khuẩn đối kháng phát triển. Sự cạnh tranh dinh dưỡng có thể diễn ra giữa các loài khác nhau, giữa các dòng trong cùng một loài hoặc giữa các cá thể trong một dòng thông qua việc tiết kháng sinh (Hibbing *et al.*, 2010). Chẳng hạn, vi khuẩn *B. subtilis* có thể tiết ra enzyme protease và kháng sinh để tiêu diệt đồng loại lấy chất dinh dưỡng khi môi trường dinh dưỡng bị cạn kiệt và khi sự cạn kiệt dinh dưỡng kéo dài chúng sẽ hình thành bào tử để có thể tồn tại trong môi trường khắc nghiệt (Leendert *et al.*, 2003). Còn ở những mật số quá thấp như  $10^5$  và  $10^4$  CFU/mL, có thể vi khuẩn không đủ số lượng cần thiết để cạnh tranh với mầm bệnh và các vi sinh vật khác có trong đất. Do đó, xử lý ở các mật số trung gian như  $10^7$  và  $10^6$  CFU/mL là thích hợp trong phòng trừ bệnh. Tóm lại, có thể sử dụng  $10^6$  CFU/mL đối với chủng vi khuẩn *B. stratosphericus* AG62 trong phòng trị bệnh cháy bìa lá lúa để tiết kiệm chi phí nuôi cấy.

Đối với phương pháp chủng vi khuẩn vào đất tạo điều kiện cho vi khuẩn đối kháng lan truyền trong môi trường nước và lưu tồn trong đất, từ đó có khả năng xâm nhập và sống nội sinh trong cây hay kích hoạt và khởi động cơ chế tự bảo vệ của cây, còn gọi là kích kháng (Hammerschmidt, 2007). Khi đó, nếu vi khuẩn *Xoo* xâm nhập vào cây có thể sẽ bị các chủng vi khuẩn đối kháng này ức chế và tiêu diệt bằng cơ chế kích kháng, kháng sinh hoặc cạnh tranh trực tiếp.

Trong vài thập niên gần đây, nhiều chủng *Bacillus* đã được sử dụng để kiểm soát các bệnh trên cây trồng. Chẳng hạn, vi khuẩn *B. oryzicola* YC7007 được xem là một tác nhân kiểm soát sinh học, giúp phòng chống bệnh lúa von do *Fusarium fujikuroi* gây ra. Nghiên cứu này cũng cho thấy cần ít nhất  $10^6$  CFU/mL vi khuẩn *B. oryzicola* YC7007 mới có khả năng duy trì hiệu quả giảm bệnh (Mohammad *et al.*, 2016). Chủng vi khuẩn *B. stratosphericus* có khả năng sản xuất nhiều chất như amylase, chitinase, lipase, phosphatase, HCN, protease, siderophore, IAA không những có khả năng đối kháng với một số mầm bệnh trên cây trồng như bệnh héo rũ trên cây cà chua (Kaliannan *et al.*, 2017), bệnh cháy bìa lá trên lúa mà còn kích thích sự sinh trưởng của cây.

#### 4 KẾT LUẬN

Đề tài đã xây dựng được đường chuẩn mật số của các chủng vi khuẩn đối kháng (*B. aerophilus* HG33, *B. pumilus* TG71, *B. safensis* AG131, *B. stratosphericus* AG62, *B. subtilis* ST115, *S. nematodiphila* CT78). Trong số 6 chủng vi khuẩn này, chủng vi khuẩn *B. stratosphericus* AG62 ở mật

số  $10^7$  CFU/mL với cách xử lý chủng vào đất cho khả năng hạn chế bệnh tốt nhất trong điều kiện nhà lưới. Khi khảo sát khả năng làm giảm chiều dài vết bệnh của chủng vi khuẩn *B. stratosphericus* AG62 ở những mật số thấp, nghiệm thức ở mật số  $10^6$  CFU/mL cho chiều dài vết bệnh ngắn tương đương nghiệm thức được xử lý ở mật số  $10^7$  CFU/mL ở thời điểm 10 và 15 NSCB và duy trì khả năng giảm chiều dài vết bệnh qua các thời điểm 5, 10 và 15 NSCB. Vì vậy, có thể sử dụng vi khuẩn *B. stratosphericus* AG62 mật số  $10^6$  CFU/mL trong phòng trị bệnh cháy bìa lá lúa để tiết kiệm chi phí nuôi cấy; và có thể tiếp tục nghiên cứu tạo chế phẩm sinh học cho chủng vi khuẩn này để áp dụng trên diện rộng.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Agrios, G.N., 1988. Plant pathology, third edition. Academic press. Inc., New York. 845 pages.
- Gnanamanickam, S.S., 2009. Biological control of rice diseases, third edition. Spinger. Netherlands, 114 pages.
- Hammerschmidt, R., 2007. Introduction definitions and some history department of Plant Pathology. In: Walters D., Newton A. and Lyon G. (Eds.). Induced resistance for plant defence a sustainable approach to crop protection. Blackwell Publishing. USA, pp. 258.
- Hamoen, L.W., Venema, G. and Kuipers, O.P., 2003. Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. Microbiology. 149(1): 9-17.
- Hibbing, M.E., Fuqua C, Parsek, M.R. and Peterson, S.B., 2010. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. Nature Reviews Microbiology. 8(1):15-25.
- Kaliannan, D., Palanivel V, Hee P.J, Suk, et al., 2017. Characterization and assessment of two biocontrol bacteria against *Pseudomonas syringae* wilt in *Solanum lycopersicum* and its genetic responses. Microbiological Research. 206(8): 43-49.
- Kauffman, H.E., Reddy, A.P.K., Hsieh, S.P.Y. and Nera, S.D., 1973. An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Plant disease reporter. 57(4): 537-543.
- Khoa, N.D., 2005. Effect of single resistance genes and their pyramid on the diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* population under field conditions as revealed by insertion sequece-polymerase chain reaction (IS-PCR). Master thesis. College of Arts and Sciences, University of Philippines, Los Baños, Philippines.
- Khoa, N.D., Giau, N.D.N. and Tuan, T.Q., 2016. Effects of *Serratia nematodiphila* CT-78 on rice bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Biological Control. 103: 1-10.
- Lê Lương Tề, 2000. Trồng trọt (Tập II). Nhà xuất bản Giáo Dục, Hà Nội, 100-147.

- Mohammad, T.H., Ajmal K., Eu C.J., Rashid, Md.H. and Young, C.R., 2016. Biological Control of Rice Bakanae by an Endophytic *Bacillus oryzicola* YC7007. The Plant Pathology Journal. 2(3): 228-241.
- Nguyễn Đặng Ngọc Giàu, 2014. Phân lập, định danh và khảo sát khả năng phòng trừ bệnh cháy bìa lá lúa của vi khuẩn trong đất ở thành phố Cần Thơ và tỉnh Hậu Giang. Luận văn tốt nghiệp Cao học. Ngành Công nghệ Sinh học. Trường Đại học Cần Thơ.
- Nguyễn Văn Hậu, 2017. Báo cáo kết quả thực hiện kế hoạch tháng 3 năm 2017 ngành nông nghiệp và phát triển nông thôn, ngày truy cập 15/07/2017. Địa chỉ [http://www.mard.gov.vn/Lists/appsp01\\_statistic/Attachments/117/Baocao\\_T03\\_2017.pdf](http://www.mard.gov.vn/Lists/appsp01_statistic/Attachments/117/Baocao_T03_2017.pdf).
- Ongena, M. and Jacques, P., 2007. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology. 16(3): 115-125.
- Trần Kim Thoa, 2015. Phân lập, định danh và khảo sát khả năng phòng trừ bệnh cháy bìa lá lúa của vi khuẩn trong đất hai tỉnh Tiền Giang và Sóc Trăng. Luận văn tốt nghiệp Cao học. Ngành Công nghệ Sinh học. Trường Đại học Cần Thơ.
- Võ Thị Phương Trang, 2013. Phân lập, định danh và khảo sát khả năng phòng trừ bệnh cháy bìa lá lúa của vi khuẩn đối kháng trong đất tỉnh An Giang. Luận văn Thạc sĩ chuyên ngành Công nghệ Sinh học. Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.
- Weger, D., Van der Bij, A.J., Dekkers, L. C., Simons, M., Wijffelman, C.A. and Lugtenberg, B. J. J., 1995. Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant-beneficial pseudomonads. FEMS Microbiology Ecology. 17(7): 221-228.