



DOI:10.22144/ctu.jvn.2017.118

## TUYỂN CHỌN CHẤT MANG ĐỂ TỒN TRỮ VI KHUẨN *Bacillus aerophilus* ĐỐI KHÁNG VỚI VI KHUẨN *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* GÂY BỆNH CHÁY BÌA LÁ LÚA

Đặng Hoài An<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Phi Oanh<sup>2</sup> và Nguyễn Đắc Khoa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Cần Thơ

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 20/03/2017

Ngày nhận bài sửa: 08/06/2017

Ngày duyệt đăng: 31/10/2017

### Title:

Selection of carrier materials for the antagonistic *Bacillus aerophilus* against rice bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

### Từ khóa:

*Bacillus aerophilus*, chất mang, cháy bìa lá lúa, tồn trữ, vi khuẩn đối kháng

### Keywords:

Antagonistic bacteria, *Bacillus aerophilus*, carrier, rice bacterial leaf blight, storage

### ABSTRACT

This study is aimed at evaluating effects of carrier materials on survival and biological activities of *Bacillus aerophilus* against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) causing rice bacterial leaf blight. Five carrier materials, i.e., talc, rice bran, rice kernel powder, rice grain powder and rice husk powder were used to prepare different *B. aerophilus* formulations at an initial cell concentration of  $2 \times 10^8$  CFU/mL. Talc, rice bran and rice husk formulations maintained the number of viable *B. aerophilus* cells higher than  $10^6$  CFU per gram formulation as well as its antagonistic effects against Xoo after six months of storage. Under greenhouse conditions where rice plants were inoculated at 45 days after sowing, seed soaked with these three formulations after six months of storage effectively reduced lesion lengths until 15 days after inoculation compared to the untreated control. Thus, talc, rice bran and rice husk powder show their potentials for production of bio-products to control bacterial leaf blight in rice fields.

### TÓM TẮT

Đề tài này được thực hiện nhằm tìm ra chất mang để tồn trữ vi khuẩn *Bacillus aerophilus*, làm tiền đề cho các nghiên cứu tạo chế phẩm sinh học ứng dụng trong phòng trị bệnh cháy bìa lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) gây ra. Năm loại chất mang (bột talc, cám, gạo xay, lúa xay và trấu xay) được khảo sát khả năng tồn trữ dựa vào ba tiêu chí gồm mật số, khả năng đối kháng với Xoo và hiệu quả giảm bệnh của vi khuẩn đối kháng. Kết quả cho thấy sau sáu tháng tồn trữ, mật số vi khuẩn trong 3 loại chất mang, bột talc, cám và trấu xay đạt hơn  $10^6$  CFU/g chế phẩm; trong đó chất mang cám duy trì được mật số tốt nhất. Vi khuẩn *B. aerophilus* trong ba loại chất mang này duy trì tốt khả năng đối kháng với mầm bệnh Xoo và hiệu quả giảm bệnh đến 15 ngày sau chủng bệnh trong điều kiện nhà lưới. Vì vậy cám, bột talc, trấu xay là chất mang được tuyển chọn để tồn trữ vi khuẩn *Bacillus aerophilus*.

Trích dẫn: Đặng Hoài An, Nguyễn Thị Phi Oanh và Nguyễn Đắc Khoa, 2017. Tuyển chọn chất mang để tồn trữ vi khuẩn *Bacillus aerophilus* đối kháng với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh cháy bìa lá lúa. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 52b: 8-15.

## 1 GIỚI THIỆU

Biện pháp sinh học sử dụng vi sinh vật đối kháng có thể làm giảm thiểu lượng thuốc hóa học trên đồng ruộng từ đó giảm ô nhiễm môi trường sinh thái và góp phần bảo vệ sức khỏe con người. Các nghiên cứu sản xuất sản phẩm sinh học sử dụng vi sinh vật đối kháng để quản lý bệnh hại lúa, cây ăn quả và rau màu theo hướng bền vững và không ô nhiễm môi trường đã được tập trung nghiên cứu từ những năm 1990 tại Đồng bằng sông Cửu Long (Nguyễn Đắc Khoa và *ctv.*, 2010). Trên ruộng lúa, phòng trừ sinh học bệnh cháy bìa lá là chiến lược hiệu quả về kinh tế, không gây ô nhiễm môi trường (Velusamy and Gnanamanicam, 2006; Khoa *et al.*, 2016). Ứng dụng vi khuẩn đối kháng vào đất sẽ tạo điều kiện cho vi khuẩn thích nghi với hệ sinh thái đất và tiếp tục tăng dần mật số trên đồng ruộng. Vi khuẩn đối kháng hiện diện thường xuyên trong đất sẽ ức chế khả năng phát triển của mầm bệnh, làm giảm mật số vi khuẩn gây bệnh trên lúa, mang lại hiệu quả tác động lâu dài (Agrios, 1988).

Nhóm nghiên cứu Bệnh cây Phòng Sinh học phân tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học đã thực hiện các nghiên cứu phân lập vi khuẩn đối kháng với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) gây bệnh cháy bìa lá lúa. Trong những chủng vi khuẩn phân lập được, *Bacillus aerophilus* là một trong những chủng có khả năng ức chế *Xoo* mạnh nhất. Khi được sử dụng để đánh giá khả năng giảm bệnh ngoài đồng, những chủng vi khuẩn đối kháng này có hiệu quả làm giảm tỷ lệ bệnh cao (Võ Thị Phương Trang, 2013; Nguyễn Đăng Ngọc Giàu, 2014; Khoa *et al.*, 2016). Những kết quả này có ý nghĩa quan trọng, là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về việc sử dụng các chủng vi khuẩn phân lập này để tạo chế phẩm sinh học dùng trong phòng trừ bệnh cháy bìa lá lúa.

Việc ứng dụng các vi khuẩn đối kháng vào đất có hiệu quả hay không phụ thuộc rất nhiều vào mật số của các vi khuẩn đối kháng còn sống sót trong đất (Heijnen and Van Veen, 1991). Do đó, trong các chế phẩm thương mại đòi hỏi phải duy trì được mật số vi khuẩn đối kháng cao trong thời gian dài. Các chế phẩm sinh học có duy trì được mật số các tác nhân kiểm soát sinh học hay không phụ thuộc rất lớn vào các thành phần trong chế phẩm, điển hình là chất mang (Vidhyasekaran and Muthamilan, 1995). Chất mang phải đảm bảo sự tăng trưởng và duy trì mật số mong muốn của các chủng vi sinh vật trong khoảng thời gian chấp nhận được (Smith, 1992).

Bột talc là chất mang có hiệu quả cao trong nhiều nghiên cứu về tồn trữ vi khuẩn, đặc biệt là vi

khẩn gram dương có nội bào tử. Cám, trấu xay, lúa xay, gạo xay là những chất mang rẽ tiền nếu được nghiên cứu và xử lý đúng cách sẽ là một môi trường hữu hiệu để các vi sinh vật có ích sống và phát triển, tạo tiền đề cho một chế phẩm vi sinh chất lượng tốt, giá thành thấp.

Với những lý do trên đề tài được thực hiện để tuyển chọn chất mang thích hợp tồn trữ vi khuẩn *Bacillus aerophilus* đối kháng với vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh cháy bìa lá lúa. Đề tài là tiền đề để tạo chế phẩm sinh học giúp người dân phòng trừ bệnh cháy bìa lá lúa một cách an toàn và có hiệu quả lâu dài.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1 Vi khuẩn đối kháng và chất mang

Vi khuẩn *Bacillus aerophilus* từ bộ sưu tập vi khuẩn đối kháng của Nhóm nghiên cứu bệnh cây, Phòng thí nghiệm Sinh học Phân tử, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học.

Các loại chất mang được tuyển chọn gồm có: bột talc thương mại được mua ngoài thị trường; cám, gạo xay, lúa xay, trấu xay được chuẩn bị như sau: Giống lúa IR50404 được sử dụng để xay xát tạo thành cám, gạo, vỏ trấu; lúa nguyên hạt, gạo và trấu vừa xay xát tiếp tục được xay nhuyễn để tạo thành gạo xay, lúa xay và trấu xay.

### 2.2 Tạo chế phẩm dạng bột và khảo sát mật số của vi khuẩn *Bacillus aerophilus* trong chế phẩm sau thời gian tồn trữ

#### 2.2.1 Tạo chế phẩm dạng bột

Quy trình tạo chế phẩm dạng bột được thực hiện dựa theo Vidhyasekaran và Muthamilan (1995):

Trộn riêng lẻ từng loại chất mang với CMC và CaCO<sub>3</sub> theo công thức: 1000 g chất mang + 10 g CMC + 15 g CaCO<sub>3</sub>. Sau đó, phân phối từng loại chất mang sau khi trộn vào các túi nylon (5g/túi) và được khử trùng bằng nồi khử trùng nhiệt ướt 2 lần.

Chuẩn bị huyền phù vi khuẩn *B. aerophilus*: Dùng que cấy lấy khuẩn lạc đơn từ đĩa petri sau khi nuôi 48 giờ cho vào ống Falcon chứa 10 mL môi trường nutrient broth (NB) tiếp tục nuôi lắc trong 2 ngày. Sau 2 ngày, rút 1mL huyền phù vi khuẩn cho vào bình tam giác 250 mL có chứa 100 mL môi trường NB đã khử trùng và tiếp tục nuôi lắc 150 vòng/phút trong 2 ngày.

Chủng vi khuẩn *B. aerophilus* vào chất mang: Vi khuẩn sau khi nuôi 2 ngày được đo độ hấp thụ quang phổ (OD) với bước sóng 600 nm. Sau đó, dựa vào đường chuẩn để pha huyền phù vi khuẩn về mật số 2x10<sup>8</sup> CFU/mL. Bơm 2 mL huyền phù vi

khuẩn ( $2 \times 10^8$  CFU/mL) vào mỗi túi chất mang và phối trộn để tế bào vi khuẩn phân bố đều trong chất mang.

Các túi chế phẩm được đặt vào túi nylon có gắn nút gòn lại để tránh nhiễm vi sinh vật khác và vẫn thoát hơi được khi sấy. Các thao tác này được thực hiện trong tủ cấy vô trùng. Sau đó các túi nylon được đưa vào tủ sấy và sấy ở  $40^\circ\text{C}$ . Mỗi loại chế phẩm sẽ được lấy ngẫu nhiên 3 túi đại diện để xác định ẩm độ bằng cân sấy ẩm B25 - Ohaus - Mỹ sau mỗi 6h. Chế phẩm sau khi sấy đạt ẩm độ dưới 20% thì đạt yêu cầu.

Các túi chế phẩm được ép kín, dán nhãn và trữ ở nhiệt độ phòng ( $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ).

### 2.2.2 Khảo sát mật số của vi khuẩn *Bacillus aerophilus* trong chế phẩm sau thời gian tồn trữ

Thí nghiệm được thực hiện 1 lần/tháng, tiến hành liên tục trong 6 tháng.

Pha loãng chế phẩm: Cân 1 g mẫu cho vào ống nghiệm chứa 9 mL nước cất đã khử trùng và vortex để đồng nhất mẫu (mẫu ở độ pha loãng  $10^1$ ). Mẫu được tiếp tục pha loãng thành các độ pha loãng  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ .

Trái địa: Hút 50  $\mu\text{L}$  huyền phù vi khuẩn đã được pha loãng về nồng độ thích hợp vào đĩa môi trường nutrient agar và trải đều lên bề mặt môi trường bằng que tam giác, sau đó ủ đĩa ở  $30^\circ\text{C}$ ; sau 48 giờ, đếm số khuẩn lạc được hình thành.

### 2.3 Khảo sát khả năng đối kháng trên đĩa thạch của vi khuẩn *Bacillus aerophilus* sau thời gian tồn trữ

Thí nghiệm được thực hiện sau mỗi tháng tồn trữ. Thí nghiệm này là cơ sở ban đầu để tiến hành thí nghiệm trong điều kiện nhà lưới, gồm các bước sau:

Chuẩn bị huyền phù vi khuẩn Xoo: Vi khuẩn Xoo được nuôi trên môi trường Wakimoto cải tiến trong 48-72 giờ. Sau đó, vi khuẩn được cho vào ống nghiệm chứa 10 mL nước cất đã thanh trùng và vortex hỗn hợp để tạo huyền phù vi khuẩn. Hỗn hợp này được đo OD ở bước sóng 600 nm và được điều chỉnh chỉ số OD = 0,3. Với cách chuẩn bị huyền phù như trên, mật số vi khuẩn Xoo khoảng  $10^9$  CFU/mL (Trần Kim Thoa, 2015).

Khảo sát khả năng đối kháng: Hút 50  $\mu\text{L}$  huyền phù vi khuẩn Xoo và trải đều lên trên bề mặt đĩa môi trường Wakimoto cải tiến. Sau đó, dùng que cấy lấy khuẩn lạc vi khuẩn *B. aerophilus* từ môi trường nutrient agar (từ thí nghiệm 2.2.2 sau 48 giờ) và chấm lên mặt đĩa thạch có Xoo tại 3 điểm cách đều nhau, ủ ở nhiệt độ phòng ( $28^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ).

Mỗi loại chế phẩm khác nhau được lặp lại 3 lần trên cùng 1 đĩa.

Tiêu chuẩn để khảo sát khả năng đối kháng dựa vào bán kính vòng vô khuẩn: Vi khuẩn đối kháng yếu có bán kính từ 1 đến 4 mm, vi khuẩn đối kháng trung bình có bán kính từ 5 đến 8 mm, vi khuẩn đối kháng mạnh có bán kính từ 9 đến 12 mm, vi khuẩn đối kháng rất mạnh có bán kính từ 12 mm trở lên (Ahmed and Zahran, 2006).

Quan sát khả năng tạo vòng vô khuẩn của vi khuẩn đối kháng và đo bán kính vòng vô khuẩn sau 48 giờ. Bán kính vòng vô khuẩn được đo ở mặt sau đĩa petri từ điểm ngoài cùng của bìa khuẩn lạc đến điểm lan cuối cùng của vòng vô khuẩn. Sau 2 ngày, vi khuẩn còn khả năng đối kháng với Xoo khi xuất hiện vòng vô khuẩn (Salaheddin *et al.*, 2010). Số liệu bán kính vòng vô khuẩn là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại.

### 2.4 Khảo sát khả năng làm giảm bệnh cháy bìa lá lúa trong điều kiện nhà lưới của vi khuẩn *Bacillus aerophilus* trong chế phẩm sau thời gian tồn trữ

Thí nghiệm được bố trí theo thể thức hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Mỗi cây lúa là một đơn vị thí nghiệm. Lúa giống được xử lý với mỗi loại chế phẩm chứa chất mang khác nhau được tính là một nghiệm thức. Nghiệm thức đối chứng âm, lúa giống không được xử lý vi khuẩn đối kháng và được xử lý với nước cất. Nghiệm thức đối chứng dương, lúa giống được xử lý với nước cất và xử lý với thuốc hoá học Starner 20 WP sau khi chủng bệnh.

Chuẩn bị đất: Đất được phơi khô, băm nhỏ và trộn với vôi. Sau đó, đất được cho vào chậu (đường kính 35 cm) đến khoảng 30 cm chiều cao của chậu, ngâm nước 3-4 ngày, tháo nước và làm ráo mặt trước khi gieo.

Xử lý hạt lúa: Hạt lúa giống Jasmine 85 An Giang được ngâm trong nước với tỉ lệ 3 sôi 2 lạnh trong 20 phút để loại bỏ hạt lép và mầm bệnh. Sau đó, hạt tiếp tục được ngâm nước lạnh trong 24 giờ và ủ 48 giờ trước khi gieo.

Chăm sóc lúa: Trong quá trình trồng lúa, tưới nước, đồng thời bón phân theo công thức: N (100 kg/ha) -  $\text{P}_2\text{O}_5$  (40 kg/ha) -  $\text{K}_2\text{O}$  (30 kg/ha) với 4 đợt bón như sau:

Đợt 1 (trước khi gieo): 100 %  $\text{P}_2\text{O}_5$  (2,4 g/chậu).

Đợt 2 (10 ngày sau khi gieo): 1/5 N (0,5 g/chậu) + 1/4  $\text{K}_2\text{O}$  (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).

Phương pháp ngâm hạt với huyền phù vi khuẩn đối kháng: Dựa vào mật số vi khuẩn trong chế phẩm được xác định bằng phương pháp đếm sống ở tháng 3 và 6 (thí nghiệm 2.1) để cân khối lượng chế phẩm pha vào nước cất và pha loãng về mật số 10<sup>7</sup> CFU/mL.

Hạt lúa sau khi xử lý này mầm được ngâm trong 40 mL huyền phù vi khuẩn (10<sup>7</sup> CFU/mL) trong 2 giờ trước khi gieo.

Phương pháp chủng bệnh: Chủng bệnh bằng cách sử dụng kéo vô trùng nhúng vào huyền phù vi khuẩn *Xoo* mật số khoảng 10<sup>9</sup> CFU/mL và cắt 8-10 chóp lá trưởng thành với chiều dài khoảng 2-3 cm tính từ chóp lá của cây lúa giai đoạn 45 ngày sau khi gieo (Kauffman *et al.*, 1973).

Đo chiều dài vết bệnh: Quan sát và đo chiều dài vết bệnh cháy bìa lá của 3 lá/cây lúa vào 3 thời điểm 5, 10 và 15 ngày sau khi chủng bệnh. Chiều dài vết bệnh cháy bìa lá được tính từ vết cắt đến vị trí lan cuối cùng của vết bệnh.

Xử lý số liệu: Số liệu khảo sát khả năng làm giảm bệnh trong điều kiện nhà lưới được phân tích thống kê bằng phần mềm SPSS 22.0, sử dụng phân tích phương sai một chiều (One-way ANOVA), kiểm định Duncan ở mức ý nghĩa 5% để so sánh trung bình các nghiệm thức. Mỗi cây lúa là một đơn vị thí nghiệm.

**Bảng 1: Mật số của vi khuẩn *Bacillus aerophilus* trong 5 chế phẩm chứa 5 loại chất mang khác nhau (bột talc, cám, gạo xay, lúa xay và trấu xay) trong 6 tháng tồn trữ:**

Nghiệm thức	Mật số vi khuẩn (10 <sup>6</sup> CFU/g chế phẩm)					
	Tháng 1	Tháng 2	Tháng 3	Tháng 4	Tháng 5	Tháng 6
Bột talc	41,00 <sup>a</sup>	26,00 <sup>a</sup>	6,50 <sup>c</sup>	5,40 <sup>c</sup>	5,40 <sup>c</sup>	5,30 <sup>b</sup>
Cám	33,00 <sup>b</sup>	28,00 <sup>a</sup>	13,00 <sup>a</sup>	13,00 <sup>a</sup>	12,00 <sup>a</sup>	5,80 <sup>a</sup>
Gạo xay	3,03 <sup>c</sup>	0,84 <sup>d</sup>	0,007 <sup>c</sup>	-	-	-
Lúa xay	4,40 <sup>d</sup>	1,50 <sup>c</sup>	1,10 <sup>d</sup>	0,004 <sup>d</sup>	-	-
Trấu xay	17,00 <sup>c</sup>	11,00 <sup>b</sup>	11,00 <sup>b</sup>	9,70 <sup>b</sup>	9,50 <sup>b</sup>	2,35 <sup>c</sup>
CV (%)	1,41	2,55	3,24	2,83	2,5	0

Các trung bình trong cùng một cột được theo sau bởi một hay những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở mức 5% trong phép thử Duncan. Mật số vi khuẩn được chuyển sang Log<sub>10</sub> khi phân tích thống kê. (-) Không khảo sát mật số vi khuẩn *B. aerophilus* (vì mật số quá thấp vào tháng trước)

Thời điểm 3 tháng sau thời gian tồn trữ, mật số vi khuẩn trong chất mang cám duy trì ở mức cao (1,3x10<sup>7</sup> CFU/g chế phẩm) so với các nghiệm thức còn lại. Riêng nghiệm thức trấu xay, mật số vi khuẩn gần như không giảm so với tháng thứ 2. Ngược lại, mật số vi khuẩn trong bột talc giảm mạnh (giảm 4 lần so với tháng thứ 2) và mật số vi khuẩn thấp hơn nghiệm thức cám và trấu xay tính

### 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1 Kết quả tạo chế phẩm dạng bột và khảo sát mật số của vi khuẩn *Bacillus aerophilus* trong chế phẩm sau mỗi tháng tồn trữ

Kết quả xác định mật số vi khuẩn *Bacillus aerophilus* trong chế phẩm ở các loại chất mang khác nhau theo thời gian tồn trữ được trình bày ở Bảng 1.

Thời điểm ngay sau khi đóng gói (0 tháng), mật số vi khuẩn *B. aerophilus* ở các nghiệm thức chế phẩm khác biệt không ý nghĩa về mặt thống kê, mật số đạt 1,4 - 1,6x10<sup>8</sup> CFU/g chế phẩm.

Một tháng sau thời gian tồn trữ, mật số vi khuẩn ở nghiệm thức bột talc cao nhất với mật số 4,1x10<sup>7</sup> CFU/g chế phẩm khác biệt so với các nghiệm thức chất mang còn lại. Cám, lúa xay, trấu xay, gạo xay là các nghiệm có mật số vi khuẩn giảm dần theo thứ tự.

Thời điểm 2 tháng sau thời gian tồn trữ, mật số vi khuẩn của nghiệm thức bột talc (2,6x10<sup>7</sup> CFU/g chế phẩm) và cám (2,8x10<sup>7</sup> CFU/g chế phẩm) khác biệt ý nghĩa so với các nghiệm thức chất mang còn lại. Đối với nghiệm thức trấu xay (1,1x10<sup>7</sup> CFU/g chế phẩm), mật số vi khuẩn tương đối thấp so với 2 nghiệm thức bột talc và cám. Riêng 2 nghiệm thức lúa xay và gạo xay, mật số vi khuẩn tiếp tục giảm mạnh sau 2 tháng tồn trữ (0,84x10<sup>6</sup> CFU/g chế phẩm đối với nghiệm thức gạo xay và 1,5x10<sup>6</sup> CFU/g chế phẩm đối với nghiệm thức lúa xay).

đến thời điểm này. Đối với nghiệm thức gạo xay, mật số vi khuẩn vẫn giảm mạnh và thấp hơn so với các nghiệm thức còn lại (7x10<sup>3</sup> CFU/g chế phẩm).

Thời điểm 4 tháng sau thời gian tồn trữ, nghiệm thức cám vẫn duy trì được mật số ổn định, gấp 2 lần nghiệm thức bột talc và cao hơn so với các nghiệm thức còn lại (1,3x10<sup>7</sup> CFU/g chế phẩm). Tiếp theo là nghiệm thức trấu xay vẫn duy trì mật

số và cao hơn 3 nghiệm thức bột talc, gạo xay và lúa xay. Đối với nghiệm thức lúa xay, mật số vi khuẩn giảm chỉ còn  $4 \times 10^3$  CFU/g chế phẩm. Riêng nghiệm thức gạo xay, do mật số vi khuẩn giảm thấp ở tháng thứ 3 nên không được khảo sát ở tháng 4.

Tại thời điểm tháng 5 và tháng 6 chỉ khảo sát nghiệm thức bột talc, cám và trấu do nghiệm thức gạo xay và lúa xay mật số đã giảm mạnh. Hai thời điểm này, nghiệm thức cám duy trì được mật số tốt nhất ( $5,8 \times 10^6$  CFU/g chế phẩm) kế đến là nghiệm thức bột talc ( $5,3 \times 10^6$  CFU/g chế phẩm) và trấu xay ( $2,35 \times 10^6$  CFU/g chế phẩm).

Tóm lại, nghiệm thức cám duy trì được mật số vi khuẩn tốt nhất ( $>10^7$  CFU/g chế phẩm sau 5 tháng tồn trữ và  $>10^6$  ở tháng thứ 6) và khác biệt với các nghiệm thức chất mang còn lại. Đối với các nghiệm thức trấu xay mật số  $>10^7$  CFU/g chế phẩm sau 3 tháng và giảm dần đến tháng 6 mật số còn  $2,35 \times 10^6$  CFU/g chế phẩm. Nghiệm thức bột talc đạt được mật số vi khuẩn khoảng  $10^6$  CFU/g chế phẩm sau 4 tháng. Riêng nghiệm thức lúa xay và gạo xay, mật số vi khuẩn luôn ở mức thấp so với các nghiệm thức còn lại và giảm mạnh qua mỗi tháng nên mật số vi khuẩn trong 2 nghiệm thức này chỉ khoảng  $10^3$  CFU/g chế phẩm ở tháng thứ 4.

Kết quả phân tích cho thấy mật số vi khuẩn ở tất cả các nghiệm thức chất mang giảm mạnh vào tháng thứ nhất tính từ ngày chủng vi khuẩn đối kháng vào chế phẩm và tiếp tục giảm dần qua mỗi tháng tồn trữ. Kết quả nghiên cứu của Omer (2010) cũng ghi nhận các chế phẩm chứa chất mang dạng tơ dùng để tồn trữ các vi khuẩn hình thành nội bào tử như *Bacillus* sp. đều có mật số giảm dần theo thời gian. Trong đó, mật số vi khuẩn giảm mạnh trong tháng đầu do chưa thích nghi với môi trường mới và chưa đủ thời gian hình thành nội bào tử.

Nhìn chung, qua khảo sát khả năng tồn trữ vi khuẩn cho thấy bột talc, cám và trấu xay duy trì mật số vi khuẩn ổn định ( $>10^6$  CFU/g chế phẩm sau 6 tháng tồn trữ) so với nghiệm thức lúa xay và gạo xay.

Hai loại chất mang lúa xay và gạo xay có mật số vi khuẩn thấp nhất trong số các chất mang khảo sát. Ngoài ra, hai loại chất mang này có mức độ nhiễm khuẩn cao hơn so với ba loại chất mang còn lại. Điều này có thể do hàm lượng dinh dưỡng trong hai loại chất mang này cao nên thích hợp cho các chủng vi khuẩn khác phát triển và xâm nhiễm. Bên cạnh đó, độ ẩm của 2 loại chất mang này cao dẫn đến chế phẩm bị vón cục, ẩm ướt. Độ ẩm trong các túi chất mang có thể giảm bằng cách sấy ở nhiệt độ cao trong thời gian dài nhưng việc làm này tốn kém nhiều thời gian và chi phí nên không đảm

bảo tiêu chí tuyển chọn là đơn giản và rẻ tiền. Do đó, lúa xay và gạo xay không thích hợp làm chất mang để tồn trữ *B. aerophilus*.

Kết quả đề tài nghiên cứu cho thấy bột talc là một trong các nghiệm thức có khả năng duy trì mật số vi khuẩn cao và kết quả này tương đồng với các nghiên cứu khác trong lĩnh vực này (Muis, 2006; Sallam, 2013). Bên cạnh đó, nghiệm thức cám và trấu xay là 2 loại chất mang cũng có khả năng duy trì mật số cao sau 6 tháng tồn trữ. Bột talc, cám và trấu xay chứa một lượng lớn khoáng vi lượng (Cu, Fe, Zn,...) và khoáng đa lượng (Ca, Mg, Si,...) có vai trò tăng cường quá trình hình thành nội bào tử, đó có thể là cơ chế góp phần giúp duy trì mật số vi khuẩn được ổn định sau thời gian dài tồn trữ (Omer, 2010). Nghiên cứu của Mokhtarnejad (2014) cũng cho thấy cám có khả năng kích thích tăng sinh các tế bào sinh dưỡng cũng như phá vỡ trạng thái ngủ của nội bào tử nên mật số vi khuẩn ổn định (có giảm nhưng không đáng kể). Trong trấu có chứa các thành phần chủ yếu là những hợp chất có khối lượng phân tử lớn như cellulose và lignin giúp duy trì mật số vi khuẩn (Ilyina *et al.*, 2000). Ngoài ra, cám và trấu xay là các phế phẩm nông nghiệp phổ biến ở vùng trồng lúa trọng điểm như Đồng bằng sông Cửu Long, do đó đáp ứng được tiêu chí rẻ tiền và dễ tìm.

### 3.2 Kết quả khảo sát khả năng đối kháng trên đĩa thạch của vi khuẩn *Bacillus aerophilus* trong chế phẩm sau thời gian tồn trữ

Các nghiệm thức chất mang đều được khảo sát khả năng đối kháng với vi khuẩn *Xoo* trên đĩa thạch (Hình 1) nhằm chọn ra các nghiệm thức chất mang có thể duy trì khả năng đối kháng của vi khuẩn để tiến hành khảo sát hiệu quả giảm bệnh cháy bìa lá của chế phẩm ngoài nhà lưới.



**Hình 1: Vòng vô khuẩn được tạo ra bởi vi khuẩn *Bacillus aerophilus* trong nghiệm thức bột talc với vi khuẩn *Xoo* trên đĩa thạch sau 2 ngày**

Chất mang lúa xay và gạo xay không duy trì được mật số vi khuẩn *B. aerophilus* tốt nên không được khảo sát mật số vi khuẩn trong chế phẩm kể từ tháng thứ 3 đối với gạo xay và tháng thứ 4 đối

với lúa xay, cũng như không khảo sát khả năng đối kháng trên đĩa thạch đối với vi khuẩn trong 2 nghiệm thức chất mang này.

Kết quả khảo sát tính đối kháng của vi khuẩn *B. aerophilus* trong chất mang bột talc, cám, lúa xay, trấu xay và gạo xay được trình bày ở Bảng 2 cho thấy bán kính vòng vô khuẩn của vi khuẩn *B.*

**Bảng 2: Bán kính vòng vô khuẩn (mm) do vi khuẩn *Bacillus aerophilus* tồn trữ trong chế phẩm tạo ra khi đối kháng với vi khuẩn *Xoo* sau 2 ngày nuôi trên môi trường Waikimoto cải tiến**

Nghiệm thức	Bán kính vòng vô khuẩn (mm)					
	Tháng 1	Tháng 2	Tháng 3	Tháng 4	Tháng 5	Tháng 6
Bột talc	10,7±1,5	12,7±1,5	11,7±2,3	9,3±2,1	8,3±1,5	10,3±3,1
Cám	10,3±1,5	12,3±0,6	12,3±1,2	7±1,0	7,7±1,5	9,3±2,1
Gạo xay	8,7±1,5	9,3±1,3	-	-	-	-
Lúa xay	13±1,0	13,7±1,5	7,7±1,2	-	-	-
Trấu xay	10,7±2,1	13±1,0	10,3±0,6	7,7±2,5	11±2,6	9,3±2,3

(-) Không khảo sát khả năng đối kháng

Theo kết quả nghiên cứu của Nguyễn Đăng Ngọc Giàu (2014), chủng vi khuẩn *B. aerophilus* có bán kính vòng vô khuẩn là 15,3 mm. Nhìn chung, *B. aerophilus* trong tất cả nghiệm thức chất mang vẫn còn khả năng đối kháng mạnh sau 6 tháng tồn trữ.

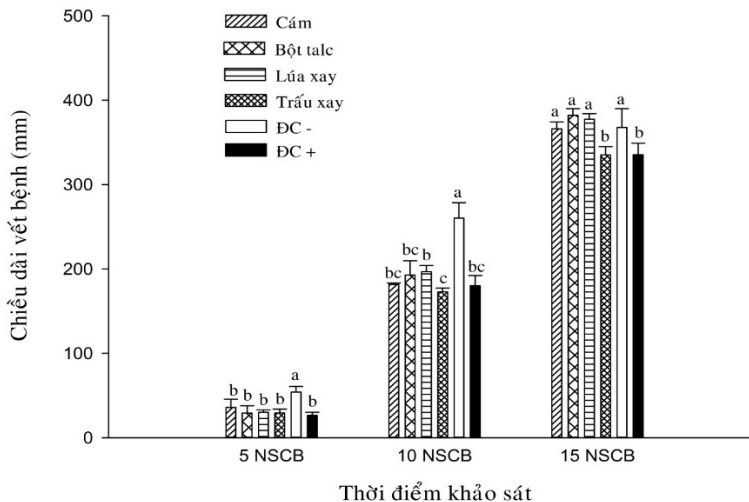
**3.3 Kết quả khảo sát khả năng làm giảm bệnh cháy bìa lá lúa ngoài nhà lưới của vi khuẩn đối kháng trong chế phẩm sau tồn trữ**

**3.3.1 Khả năng làm giảm bệnh cháy bìa lá lúa ngoài nhà lưới của vi khuẩn *B. aerophilus* trong chế phẩm sau 3 tháng tồn trữ**

Kết quả khảo sát hiệu quả giảm bệnh của chế

*aerophilus* qua 4 tháng có sự khác biệt nhưng dao động không lớn (khoảng 7-14 mm). Trong đó, ở nghiệm thức bột talc, vi khuẩn vẫn còn khả năng đối kháng mạnh đến rất mạnh (>8 mm); trong nghiệm thức trấu và cám, vi khuẩn có khả năng đối kháng ở mức trung bình đến rất mạnh.

phẩm chứa vi khuẩn *B. aerophilus* được trình bày ở Hình 2 cho thấy tất cả các nghiệm thức đều có chiều dài vết bệnh ngắn và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng âm tại thời điểm 5 và 10 NSCB. Trong đó, các nghiệm thức bột talc, cám, lúa xay và trấu xay đều cho kết quả chiều dài vết bệnh tương đương với đối chứng dương. Đến thời điểm 15 NSCB, các nghiệm thức bột talc, cám và lúa xay khác biệt không ý nghĩa về chiều dài vết bệnh so với đối chứng âm. Riêng nghiệm thức trấu xay luôn cho kết quả chiều dài vết bệnh ngắn hơn đối chứng âm tính đến thời điểm 15 NSCB và tương đương với đối chứng dương ở cả 3 thời điểm.

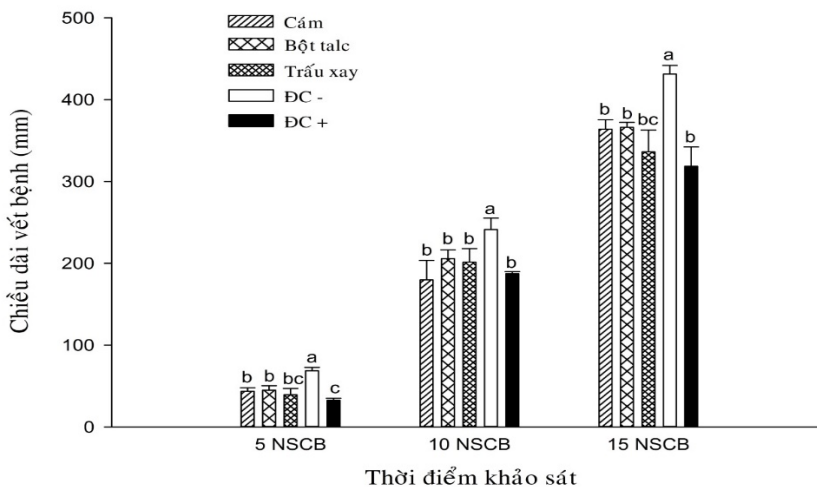


**Hình 2: Chiều dài vết bệnh (mm) trên lá lúa ở 5, 10 và 15 NSCB khi xử lý với chế phẩm bột talc, cám và trấu xay của vi khuẩn *Bacillus aerophilus* (10<sup>7</sup>CFU/g chế phẩm) sau 3 tháng tồn trữ. Trong cùng một thời điểm, các cột được ký hiệu bởi một hay nhiều chữ cái giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa ở mức 5% qua kiểm định Duncan**

3.3.2 Khả năng làm giảm bệnh của vi khuẩn *Bacillus aerophilus* trong chế phẩm sau 6 tháng tồn trữ

Kết quả khảo sát hiệu quả giảm bệnh của chế phẩm chứa vi khuẩn *B. aerophilus* sau 6 tháng tồn trữ được trình bày ở Hình 3 cho thấy, tất cả các nghiệm thức chất mang vẫn duy trì hiệu quả giảm bệnh và đều cho kết quả chiều dài vết bệnh ngắn

hơn và khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng âm ở cả 3 thời điểm 5, 10 và 15 NSCB. Tại thời điểm 5 NSCB chỉ có nghiệm thức trấu xay có hiệu quả giảm bệnh tương đương với đối chứng dương, nhưng đến thời điểm 5 và 10 NSCB thì tất cả các nghiệm thức đều có hiệu quả tương đương với đối chứng.



**Hình 3: Chiều dài vết bệnh (mm) trên lá lúa ở 5, 10 và 15 NSCB khi xử lý với chế phẩm bột talc, cám và trấu xay của vi khuẩn *Bacillus aerophilus* ( $10^7$ CFU/g chế phẩm) sau 6 tháng tồn trữ. Trong cùng một thời điểm, các cột được ký hiệu bởi một hay nhiều chữ cái giống nhau thì khác biệt không ý nghĩa ở mức 5% qua kiểm định Duncan**

Kết quả khảo sát hiệu quả giảm bệnh trong điều kiện nhà lưới ở tháng 3 và 6 cho thấy vi khuẩn vẫn còn hiệu quả giảm bệnh tốt với mầm bệnh sau thời gian tồn trữ; có thể sử dụng các loại chất mang này để tồn trữ mà không lo ngại vi khuẩn trong chế phẩm sẽ bị mất khả năng đối kháng.

4 KẾT LUẬN

Đề tài đã khảo sát được khả năng tồn trữ của *B. aerophilus* trong 5 loại chất mang bột talc, cám, gạo xay, lúa xay và trấu xay. Sau 6 tháng tồn trữ, nghiệm thức bột talc, cám và trấu xay duy trì mật số vi khuẩn  $>10^6$  CFU/g chế phẩm, trong đó nghiệm thức cám duy trì được mật số tốt nhất. Vi khuẩn tồn trữ trong 3 loại chất mang bột cám, talc, và trấu xay vẫn còn khả năng đối kháng với *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* trên đĩa thạch và có hiệu quả giảm bệnh ngoài nhà lưới. Từ 3 kết quả thí nghiệm cho thấy cám, talc, trấu xay là chất mang thích hợp nhất để tồn trữ vi khuẩn *Bacillus aerophilus*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Agrios, G.N., 1988. Plant pathology, Third edition. Academic press. New York, 845 pages.

Ahmed, N.A., Zahran, E.B., 2006. Inhibition of soil borne *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* in cotton by *Bacillus* spp. Mitt. Biol. Bundesanst. Land - Forstwirtsch. 408: 86-92.

Heijnen, C.E., Van Veen, J.A., 1991. A determination of protective microhabitats for bacteria introduced into soil. FEMS Microbiol Letters. 85(1): 73-80.

Kauffman, H.E., Reddy, A.P.K., Hsieh, S.P.Y., Nera, S.D., 1973. An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Plant disease reporter. 57: 537-543.

Khoa, N.D., Giau, N.D.N., 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.

Mokhtarnejad, L., Etebarian, H.R., Fazeli, M.R., Jamalifar, H., 2011. Evaluation of different formulation of potential biocontrol yeast isolates efficacy on apple blue mold at storage condition. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 44(10): 970-980.

Muis, A., 2006. Biomass Production and Formulation of *Bacillus subtilis* for Biological Control. Indonesian journal of agricultural science. 7(2): 51-56.

- Nguyễn Đắc Khoa, Dương Minh, Phạm Văn Kim, 2010. Sản xuất các sản phẩm sinh học để quản lý bệnh hại lúa, cây ăn quả và rau màu theo hướng bền vững và không ô nhiễm môi trường. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 16(b): 117-126.
- 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 Cao học. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.
- Omer, A.M., 2010. Bioformulations of Bacillus Spores for using as Biofertilizer. Life science journal. 7(4): 124-131.
- Salaheddin, K., Valluvaparidasan, V., Ladhakshmi, D., Velazhaha, R., 2010. Management of Bacteria Blight of Cotton Using a Mixture of Pseudomonas fluorescens and Bacillus subtilis. Plant Protection Science, 46(2): 41-50.
- Sallam, N.A., Riad, S.N., Mohamed, M.S., El-salam, A.S., 2013. Formulations of Bacillus spp. and Pseudomonas fluorescens for biocontrol of cantaloupe root rot caused by Fusarium solani. Journal of Plant Protection Research. 53(3): 295-300.
- Smith, R.S., 1992. Legume inoculant formulation and application. Canadian Journal of Microbiology. 38(6): 485-492.
- 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 Cao học. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.
- Velusamy, P., Gnanamanickam, S.S., 2006. Identification of 2,4 diacetylphloglucinol (DAPG) production by plant – associated bacteria and its role in suppression of rice bacterial blight in India. Current Science 85(9):1270-1273.
- Vidhyasekaran, P., Muthamilan M., 1995. Development of Formulation of Pseudomonas fluorescens for Control of Chickpea wilt. Plant disease. 79(8): 782-786.
- 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 Cao học. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ.