

TUYỂN CHỌN CHỦNG BACILLUS ĐA HOẠT TÍNH TRONG SẢN XUẤT PHÂN BÓN VI SINH VẬT CHỨC NĂNG CHO CÂY KHOAI TÂY¹

Đào Văn Thông², Nguyễn Thu Hà³,

Phạm Văn Toàn⁴, Phạm Thu Thủy⁵

Summary

Selection of *Bacillus* has multi bioactivity using production functional biofertilizer for potato

Selection *Bacillus* has multi bioactivity will play an important role in the production and application of functional biofertilizer. This paper showed that *Bacillus* B16 was selected. It can be antagonize bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* and produce plant growth promoting substance (IAA). By colony characteristic, cell morphology, and sequencing of DNA fragment of 16S rRNA gene the B16 strain was determined as *Bacillus subtilis*. According to European Community, species are selected have high biosafety and they are permission to apply in common. The *Bacillus subtilis* B16 will be continuous research to apply for production of functional biofertilizer.

Key words: *Bacillus subtilis*, *Ralstonia solanacearum*, bacterial wilt, antagonize, potato.

1. MỞ ĐẦU

Khoai tây là cây lương thực, cây thực phẩm có giá trị. Ở nhiều nước thuộc châu Âu, châu Mỹ, khoai tây được coi là một loại lương thực chính sau lúa mì, ngô. Diện tích trồng khoai tây ở Việt Nam có khoảng 35.000 – 37.000 ha và sản lượng đạt 420.000 – 450.000 tấn.

Héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* là loại bệnh nguy hiểm đối với cây khoai tây. Ở Việt Nam, mức độ phổ biến và tác hại của bệnh héo xanh có chiều hướng gia tăng, đặc biệt tại các vùng đồng bằng sông Hồng - vùng cung cấp khoai tây chính cho cả nước. Bệnh héo xanh vi khuẩn là một trong những yếu tố quan trọng làm giảm đáng kể năng suất cây khoai tây. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có biện pháp hữu hiệu nào có thể ngăn chặn và phòng trừ bệnh này.

Nghiên cứu trước đây cho thấy nhiều loài thuộc chi *Bacillus* có nhiều hoạt tính sinh học như ức chế vi sinh vật gây bệnh và sinh tổng hợp hoạt chất kích thích sinh trưởng thực vật [5, 7, 8, 9, 10, 11, 12].

¹ Bài viết do GS. TSKH. Trần Duy Quý phản biện, đã được đăng trên Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam (ISSN 1859-1558) số 3(24) 2011

² Viện Môi trường Nông nghiệp

³ Viện Thổ nhưỡng Nông hóa

⁴ Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

⁵ Trường Đại học Bách khoa Hà Nội

Trên cơ sở đòi hỏi của thực tế sản xuất và phát triển cây khoai tây ở nước ta, đề tài đã tiến hành “**Tuyển chọn chủng *Bacillus* đa hoạt tính trong sản xuất phân bón vi sinh vật chức năng cho cây khoai tây**”.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Chủng vi sinh vật: Gồm 15 chủng *Bacillus* và 01 chủng *Ralstonia solanacearum* (gây bệnh héo xanh cây khoai tây, ký hiệu VKHX) do Quỹ gen Vi sinh vật trồng trọt - Viện Thổ nhưỡng Nông hoá cung cấp.

- Giống khoai tây: Giống khoai tây Solana, là giống miễn cảm với bệnh héo xanh vi khuẩn do Trung tâm nghiên cứu cây có củ - Viện Cây lương thực và cây thực phẩm cung cấp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Xác định đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào của chủng vi sinh vật bằng các phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học thông dụng [1].

- Xác định mật độ vi sinh vật theo phương pháp nuôi cấy trên môi trường thạch đĩa theo TCVN 4884-2005 [3].

- Xác định khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh héo xanh bằng phương pháp khuếch tán trên môi trường thạch theo 10 TCN 714-2006 [4].

- Xác định khả năng sinh tổng hợp IAA thô theo phương pháp Salkowsky cải tiến: Xác định hàm lượng IAA tạo ra trong môi trường nuôi cấy có bổ sung 0,1% triptophan; so màu trên máy quang phổ ở bước sóng 530 nm với đồ thị IAA chuẩn.

- Xác định tên và mức độ an toàn sinh học của các chủng *Bacillus* bằng phương pháp phân loại sinh học phân tử, dựa trên cơ sở giải trình tự gen 16s ARN ribosome, so sánh với các trình tự có sẵn trong ngân hàng gen quốc tế EMBL bằng phương pháp FASTA 33 và xây dựng cây phát sinh chủng loại. Tên vi sinh vật được xác định với xác suất tương đồng cao nhất.

- Thí nghiệm đánh giá hoạt tính đối kháng vi khuẩn gây bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây khoai tây [4]: Đất trồng cây thí nghiệm là loại đất phù sa sông Hồng đã được khử trùng. Thí nghiệm được trồng trong nhà lưới, bố trí ngẫu nhiên, 3 lần nhắc lại, 18 cây/lần nhắc.

Công thức thí nghiệm:

CT 1: Nhiễm VKHX (10^8 CFU/củ giống)

CT 2: Nhiễm B05 và VKHX (10^8 CFU/củ giống, tỷ lệ nhiễm 1:1)

CT 3: Nhiễm B08 và VKHX (10^8 CFU/củ giống, tỷ lệ nhiễm 1:1)

CT 4: Nhiễm B16 và VKHX (10^8 CFU/củ giống, tỷ lệ nhiễm 1:1)

CT 5: Nhiễm B18 và VKHX (10^8 CFU/củ giống, tỷ lệ nhiễm 1:1)

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ cây nhiễm bệnh (%) sau trồng 30 ngày.

- Thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của *Bacillus* đến sinh trưởng của cây khoai tây: Đất trồng cây thí nghiệm là loại đất phù sa sông Hồng đã được khử trùng. Thí nghiệm được trồng trong nhà lưới, bố trí ngẫu nhiên, 3 lần nhắc lại, 10 cây/lần nhắc.

Công thức thí nghiệm:

CT 1: Đối chứng (không nhiễm vi sinh vật)

CT 2: Nhiễm *Bacillus* (10^7 CFU/củ giống)

Chỉ tiêu theo dõi: Chiều cao cây, trọng lượng tươi thân lá, trọng lượng khô thân lá của cây khoai tây sau trồng 30 ngày.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tuyển chọn chủng *Bacillus*

Từ các chủng *Bacillus* do nguồn gen vi sinh vật Nông nghiệp Viện Thổ nhưỡng Nông hóa cung cấp, đề tài tiến hành xác định hoạt tính đối kháng vi sinh vật gây bệnh héo xanh vi khuẩn đối với cây khoai tây và hoạt tính sinh tổng hợp hoạt chất kích thích sinh trưởng thực vật (IAA). Kết quả được tập hợp tại bảng 1.

Bảng 1. Hoạt tính sinh học của các chủng *Bacillus*

TT	Ký hiệu chủng <i>Bacillus</i>	Khả năng đối kháng VK gây bệnh héo xanh (Đường kính vòng ức chế vi khuẩn D-d, mm)	Khả năng sinh tổng hợp IAA thô (Hàm lượng IAA thô, µg/ml)
1	B01	-	-
2	B03.2	6	71
3	B05	15	185
4	B06	3	49
5	B07	-	157
6	B08	15	186
7	B09	6	<10
8	B10	-	257
9	B11	-	-
10	B12	-	-
11	B13.1	-	14
12	B13.2	-	71
13	B15	-	22
14	B16	22	133

15	B18	15	263
----	-----	----	-----

Ghi chú: “-” Không có hoạt tính

Kết quả bảng 1 cho thấy:

- 7/15 chủng *Bacillus* nghiên cứu có hoạt tính đối kháng vi khuẩn gây bệnh héo xanh khoai tây. Trong đó bốn chủng có đường kính ức chế vi khuẩn gây bệnh héo xanh trên 15 mm (B18, B16, B08 và B05); đặc biệt chủng B16 có đường kính ức chế vi khuẩn gây bệnh héo xanh cao nhất (đạt 22 mm).

- 12/15 chủng *Bacillus* nghiên cứu có hoạt tính sinh tổng hợp IAA. Trong đó năm chủng có hàm lượng IAA hình thành đạt tên 100 µg/ml (B18, B16, B10, B08, B07 và B05).

- Từ kết quả trên, 4 chủng B18, B16, B08 và B05 đã được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 1. Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh héo xanh của chủng B16

Với mục đích sử dụng chủng *Bacillus* trong kiểm soát bệnh héo xanh vi khuẩn đối với cây khoai tây, đề tài tiếp tục đánh giá hoạt tính đối kháng vi khuẩn gây bệnh héo xanh của các chủng *Bacillus* lựa chọn trên cây trồng. Kết quả đánh giá hoạt tính đối kháng vi khuẩn gây bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây khoai tây được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Khả năng đối kháng VKHX của các chủng *Bacillus* tuyển chọn trên cây khoai tây

<i>Chỉ tiêu theo dõi</i> <i>Công thức</i>	<i>Cây bị bệnh (%)</i>	<i>Cây bị bệnh so với đối chứng (%)</i>	<i>Mức độ hoạt tính đối kháng</i>
CT1 (ĐC nhiễm VKHX)	66,6	-	-
CT2 (B05 + VKHX)	25,7	38,6	Khá
CT3 (B08 + VKHX)	28,9	43,4	Khá
CT4 (B16 + VKHX)	16,7	25,1	Cao
CT5 (B18 + VKHX)	20,5	30,8	Khá

Kết quả bảng 2 cho thấy, 4 chủng *Bacillus* nghiên cứu đều có khả năng ức chế VKHX, tỷ lệ cây bị bệnh so với đối chứng từ 25,1 đến 38,6 %. Dựa theo 10 TCN 714-2006, chủng B16 có mức độ hoạt tính đối kháng cao (tỷ lệ cây bị bệnh so với đối chứng < 30 %).

Dựa vào kết quả đánh giá hoạt tính đối kháng VKHX cây khoai tây của các chủng *Bacillus* trong điều kiện phòng thí nghiệm và trên cây trồng, đề tài đã tuyển chọn được chủng B16 có hoạt tính đối kháng VKHX cây khoai tây cao. Ngoài ra chủng B16 còn có hoạt tính sinh tổng hợp hoạt chất kích thích sinh trưởng thực vật. Tính đa chức năng của chủng B16 có ý nghĩa trong việc nghiên cứu sử dụng để sản xuất phân bón vi sinh vật chức năng cho cây khoai tây.

3.2. Xác định tên, mức độ an toàn sinh học của chủng B16

Các chủng vi sinh vật sử dụng trong sản xuất phân bón vi sinh vật ngoài yêu cầu về hoạt tính sinh học, phải được định tên, bảo đảm an toàn đối với người, động, thực vật, môi trường sinh thái và chất lượng nông sản. Vì vậy, đề tài đã tiến hành xác định tên các chủng B16 lựa chọn.

3.2.1. Phân loại dựa trên đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào

Bảng 3. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào của chủng B16

Đặc điểm	Chủng B16
Gram	(+)
Đặc điểm khuẩn lạc	Dạng mép răng cưa, bệt, hơi nhẵn, trắng đục, kích thước khuẩn lạc 1,2-1,5 cm
Đặc điểm tế bào	Dạng hình que, bào tử hình elip
Khả năng di động	Chuyển động chậm



Hình 2. Khuẩn lạc chủng B16 trên môi trường King B sau 2 ngày nuôi cấy



Hình 3. Tế bào chủng B16 trên kính hiển vi điện tử (x10.000)

Dựa vào đặc điểm khuẩn lạc và tế bào cho thấy chủng B16 có nhiều đặc điểm giống *Bacillus subtilis*.

3.2.2. Phân loại dựa trên giải trình tự đoạn ADN 16S riboxom

Kết quả giải trình tự đoạn 16S ADN riboxom của chủng B16 có 99,3% tương đồng với *Bacillus subtilis*. Trình tự nucleotid đoạn ADN 16S ribosome của chủng B16 như sau:

ID B16_C20 PRELIMINARY; DNA; 482 BP.

SQ SEQUENCE 482 BP; 124 A; 104 C; 163 G; 91 T;

CGGCCAGAC TCCTACGGGA GGCAGCAGTA GGAATCTTC
CGCAATGGAC GAAAGTCTGA

CGGAGCAACG CCGCGTGAGT GATGAAGGTT TTCGGATCGT
AAAGCTCTGT TGTTAGGGAA

GAACAAGTGC CGTTCAAATA GGGCGGCACC TTGACGGTAC
CTAACCAGAA AGCCACGGCT

AACTACGTGC CAGCAGCCGC GGTAATACGT AGGTGGCAAG
CGTTGTCCGG AATTATTGGG

CGTAAAGGGC TCGCAGGCGG TTTCTTAAGT CTGATGTGAA
AGCCCCCGGC TCAACCGGGG

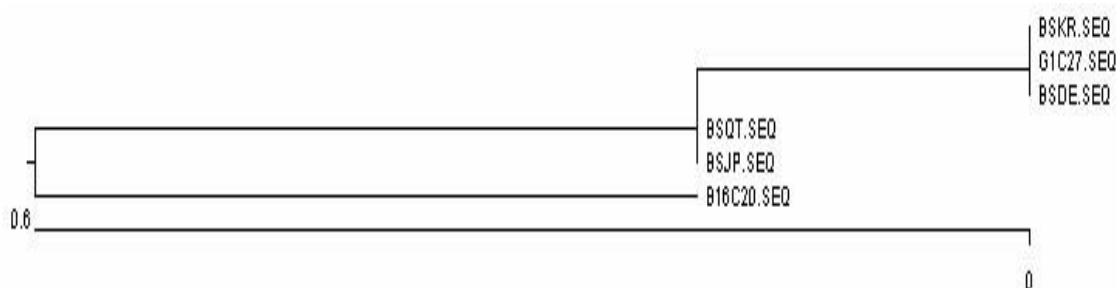
AGGGTCATTG GAAACTGGGG AACTTGAGTG CAGAAGAGGA
GAGTGGAATT CCACGTGTAG

CGGTGAAGTG CGTAGAGATG TGGAGGAACA CCAGTGGCGA
AGGCGACTCT CTGGTCTGTA

ACTGACGCTG AGGAGCGAAA GCATGGGGAG CGAACAGGAT
TAGATACCCT GGTAGTCCAC

GC

//



Hình 4: Cây phát sinh chủng loại được hình thành trên cơ sở so sánh trình tự nucleotid đoạn ADN 16S ribosome của chủng B16 với trình tự nucleotid đoạn ADN 16S ribosome của Bacillus subtilis phân lập ở các nước khác nhau trên thế giới. DE: CHLB Đức; KR: Hàn Quốc; QT: Bacillus subtilis chủng Quốc tế, được các nước hợp tác giải mã toàn bộ genôm; JP: Nhật Bản. Độ an toàn sinh học của chủng Bacillus subtilis.

3.2.3. Độ an toàn sinh học của chủng Bacillus subtilis

Độ an toàn sinh học của các chủng vi sinh vật sử dụng trong đời sống có ý nghĩa đặc biệt

quan trọng. Theo hướng dẫn số 90/679/EWG ngày 26 tháng 11 năm 1990 của cộng đồng Châu Âu về an toàn sinh học, nhóm tác nhân sinh học “Vi khuẩn” được phân làm 4 cấp độ an toàn, trong đó chỉ các vi khuẩn ở cấp độ 1 và 2 được ứng dụng trong sản xuất ở điều kiện bình thường.

- Cấp độ 1 (Risiko gruppe 1) là các vi khuẩn không có thể gây bất cứ một nguy hiểm nào đối với người và động vật

- Cấp độ 2 (Risiko gruppe 2) là các vi khuẩn có thể gây bệnh đối với người, động vật ở mức độ thấp, không có khả năng lan truyền và có thể phòng, chống và loại trừ dễ dàng trong điều kiện bình thường.

- Cấp độ 3 (Risiko gruppe 3) là các vi khuẩn có nguy cơ gây bệnh nặng đối với người, động vật và có khả năng lan truyền rộng, song vẫn có thể phòng chống và loại trừ được.

- Cấp độ 4 (Risiko gruppe 4) là các vi khuẩn có thể gây bệnh nặng đối với người, động vật, có nguy cơ lớn về mức độ lan truyền rộng và không thể phòng, chống hoặc loại trừ.

Kết quả so sánh với danh mục các vi khuẩn an toàn của CHLB Đức và Cộng đồng Châu Âu cho thấy chủng *Bacillus subtilis* B16 thuộc nhóm vi khuẩn có độ an toàn cao (cấp độ 1). Như vậy chủng B16 lựa chọn là chủng vi sinh vật bảo đảm an toàn sinh học; có thể sử dụng trong sản xuất phân bón vi sinh vật.

3.3. Đánh giá ảnh hưởng chủng B16 đến sinh trưởng và phát triển của cây khoai tây

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của chủng B16 lựa chọn đến sinh trưởng của cây khoai tây sau 30 ngày trồng được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của chủng B16 đến sinh trưởng và phát triển của cây khoai tây

<i>Công thức</i>	<i>Chiều cao cây (cm)</i>	<i>Trọng lượng tươi thân lá (g)</i>	<i>Trọng lượng khô thân lá (g)</i>
CT 1 (ĐC)	39,70	40,80	3,92
CT 2 (nhiễm B16)	43,20	44,95	4,43
CV %	4,10	4,20	4,40
LSD _{0,05}	3,867	4,097	0,419

Kết quả bảng 4 cho thấy, ở công thức nhiễm B16 (CT 2), chiều cao cây, trọng lượng tươi và trọng lượng khô thân lá đều cao hơn so với đối chứng. Điều này cho thấy, chủng B16 có ảnh hưởng tích cực đến sinh trưởng và phát triển của cây khoai tây.

Như vậy, từ các kết quả trên cho thấy chủng *Bacillus subtilis* B16 lựa chọn có khả năng kiểm soát bệnh héo xanh vi khuẩn và có ảnh hưởng tích cực đến sinh trưởng, phát triển của cây khoai tây. Chủng *Bacillus subtilis* B16 sẽ được giới thiệu cho sản xuất phân bón vi sinh vật chức năng cho cây khoai tây.

4. KẾT LUẬN

- Từ 15 chủng *Bacillus* nghiên cứu đề tài đã tuyển chọn được chủng *Bacillus subtilis* B16 có hoạt tính đối kháng vi khuẩn gây bệnh héo xanh cho cây khoai tây cao, có khả năng sinh tổng hợp chất kích thích sinh trưởng thực vật (IAA); đồng thời là chủng vi sinh vật có mức độ an toàn sinh học cao (cấp độ 1). Đây là chủng vi sinh vật có giá trị sử dụng trong sản xuất phân bón vi sinh vật chức năng.

- Thử nghiệm trên cây khoai tây cho thấy, chủng *Bacillus subtilis* B16 có khả năng hạn chế bệnh héo xanh vi khuẩn, tăng khả năng sinh trưởng và phát triển đối với cây khoai tây.

-

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty (1997), *Vi sinh vật học*. Nhà xuất bản Giáo dục.

2. Lê Minh Đức; Nguyễn Hữu Vinh, *Cây khoai tây*, Nhà xuất bản Thanh Hóa.

3. TCVN 4884-2005. Hướng dẫn chung về định lượng vi sinh vật - Kỹ thuật đếm khuẩn lạc ở 30⁰C.

4. 10 TCN 714:2006 phương pháp đánh giá hoạt tính đối kháng của vi sinh vật có khả năng đối kháng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh cây trồng cạn.

5. Bais HP, Fall R and Vivanco JM (2004), *Biocontrol of Bacillus subtilis against infection of Arabidopsis roots by Pseudomonas syringae is facilitated by biofilm formation and surfactin production*. Plant Physiol. 134, 307-319.

6. Beukema H.P., Vander Zaag D.E. (1979), *Physiological stage of the tuber potato improvement, some factors and facts*, Wageningen, the Neitherland, pp. 31-32.

7. Borriss R (2002), *Extracellular phytase activity of Bacillus amyloliquefaciens FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect*. Microbiol. 148, 2097-2109.

8. Danielsson J, Reva O and Meijer J (2007), *Protection of oilseed rape (Brassica napus) toward fungal pathogens by strains of plant-associated Bacillus amyloliquefaciens*. Microb. Ecol. 54, 134-140.

9. Idriss EE, Makarewicz O, Farouk A, Rosner K, Greiner R, Bochow H, Richter T and Jacobsen B, Zidack N and Larson B (2004), *The role of Bacillus based biological control agents in integrated pest management systems: Plant diseases*. Phytopathology 94, 1272-1275.

10. Jesper Danielsson, Oleg Reva and Johan Meijer (2006), *Protection of Oilseed Rape (Brassica napus) Toward Fungal Pathogens by Strains of Plant-associated Bacillus amyloliquefaciens*. Microbial ecology, 134-140.

11. Kloepper JW, Ryu C-M and Zhang S (2004), *Induced systemic resistance and promotion of plant growth by Bacillus spp.* Phytopathology 94, 1259-1266.

12. Xianling Ji, Guobing Lu, Yingping Gai, Chengchao Zheng & Zhimei Mu (2008), *Biological control against bacterial wilt and colonization of mulberry by an endophytic Bacillus subtilis strain*. FEMS Microbiol, 2008, 565-573.