

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường nuôi cấy *in vitro* tới khả năng kháng nấm *Neoscytalidium dimidiatum* của chủng *Bacillus velezensis* YMĐ1

Nguyễn Văn Giang*, Nguyễn Xuân Cảnh, Phùng Thị Lệ Quyên

Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 12/7/2018; ngày chuyển phản biện 17/7/2018; ngày nhận phản biện 16/8/2018; ngày chấp nhận đăng 28/9/2018

Tóm tắt:

Bệnh đốm nâu trên thân cây và quả Thanh long do nấm *Neoscytalidium dimidiatum* làm giảm khả năng sinh trưởng, phát triển của cây và chất lượng quả. Nghiên cứu ứng dụng các chủng vi sinh vật đối kháng với nấm *N. dimidiatum* hiện nay có ý nghĩa rất quan trọng để sản xuất Thanh long an toàn và bền vững. Nghiên cứu này được tiến hành với mục đích khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường nuôi cấy *in vitro* tới khả năng đối kháng nấm *N. dimidiatum* của vi khuẩn *Bacillus velezensis* YMĐ1. Kết quả nghiên cứu cho thấy, vi khuẩn *B. velezensis* YMĐ1 sinh trưởng, phát triển, đối kháng tốt với nấm *N. dimidiatum* trong điều kiện nuôi cấy ở nhiệt độ 25-40°C, pH=4-7, thời gian nuôi cấy là 48 giờ, với hoạt lực đối kháng trên 55%. Điều kiện tốt nhất để chủng *B. velezensis* YMĐ1 đối kháng với hoạt lực lên đến 64% là ở nhiệt độ 30°C, pH=6 và thời gian nuôi cấy là 48 giờ. Nguồn carbon và nitơ thích hợp lần lượt là glucose và peptone.

Từ khóa: *Bacillus velezensis*, bệnh trên Thanh long, đối kháng, *Neoscytalidium dimidiatum*.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Hiện nay, nhiều loại bệnh xuất hiện trên thân và quả Thanh long như bệnh đốm nâu do nấm *N. dimidiatum*, bệnh thối thư do nấm *Coletotrichum gloeosporioides*, bệnh thối đầu cành do nấm *Alternaria* sp.. Các bệnh này ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển của cây, làm giảm năng suất, chất lượng và giá trị thương phẩm của quả, gây thiệt hại lớn cho người trồng Thanh long. Bệnh đốm nâu do nấm *N. dimidiatum* gây ra là một trong những bệnh hại nghiêm trọng nhất. Bào tử nấm *N. dimidiatum* này mầm trên bề mặt tiếp xúc rồi xâm nhập vào trong mô gây hoại tử, bệnh gây hại cả trên thân cành và quả Thanh long. Bệnh gây hại làm cho cành Thanh long bị sần sùi, gây thối khô từng mảng. Trên quả, những đốm làm cho vỏ quả trở nên sần sùi, thối khô, làm giảm nghiêm trọng giá trị thương phẩm.

Các biện pháp phòng trừ bệnh chủ yếu hiện nay là sử dụng thuốc bảo vệ thực vật nguồn gốc hóa học. Các biện pháp này tác động xấu đến môi trường do dư lượng hóa chất tồn đọng trong đất, nguồn nước và không khí gây nguy hiểm đối với sức khỏe con người và các sinh vật khác. Phòng trừ bệnh cho cây bằng việc sử dụng vi khuẩn đối kháng với nấm bệnh là biện pháp sinh học đang rất được quan tâm

nghiên cứu. Vấn đề quan trọng sau khi tuyển chọn được chủng vi sinh vật kháng mạnh với nấm *N. dimidiatum* là xác định được các yếu tố môi trường nuôi cấy (nhiệt độ, pH, nguồn carbon và nitơ...) thích hợp để tăng cường hiệu quả đối kháng của chúng.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* YMĐ1 được phân lập và tuyển chọn từ đất vùng rễ trồng Thanh long tại xã Yên Mỹ, huyện Lạng Giang, tỉnh Bắc Giang và đang lưu giữ tại phòng thí nghiệm của Bộ môn Công nghệ vi sinh, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

Chủng nấm *N. dimidiatum* gây bệnh đốm nâu trên Thanh long được cung cấp bởi Viện Di truyền Nông nghiệp.

Phương pháp nghiên cứu

Amb ảnh hưởng của pH: vi khuẩn *B. velezensis* YMĐ1 được nuôi cấy trên môi trường LB (Luria - Bertani) lỏng trong 48 giờ (trong quá trình làm thí nghiệm, nhóm thực hiện thấy đây là thời gian chủng *B. velezensis* YMĐ1 sinh trưởng tốt nhất - mật độ cao nhất) ở điều kiện nhiệt độ 30°C, các giá

*Tác giả liên hệ: Email: nvgiang@vnua.edu.vn

Effect of *in vitro* culture conditions of the antagonistic bacterium (*Bacillus velezensis* YMD1) on its ability to protest *Neoscytalidium dimidiatum* fungus

Van Giang Nguyen*, Xuan Canh Nguyen,
Thi Le Quyen Phung

Faculty of Biotechnology,
Vietnam National University of Agriculture

Received 12 July 2018; accepted 28 September 2018

Abstract:

The fungus *Neoscytalidium dimidiatum* caused canker disease on dragon fruit, reducing the growth and development of the plants and the quality of dragon fruits. Nowadays, applications of microorganisms to control diseases on dragon fruit plants play an important role for the safe and sustainable dragon fruit production. This study was carried out with the aim to evaluate the effects of some culture conditions of antagonistic bacterium (*Bacillus velezensis* YMD1) with *N. dimidiatum* including: temperature, pH and medium compositions. The growth of *N. dimidiatum* was inhibited by *B. velezensis* YMD1 when the bacteria were cultured in 48 hours at the temperature of 25-40°C and pH=6-7 *in vitro*. The maximum inhibition activity (64%) of *B. velezensis* YMD1 with *N. dimidiatum* exhibited when the bacteria were cultured in the medium with glucose and peptone at 30°C and pH=6.

Keywords: antagonistic, *Bacillus velezensis*, canker disease on dragon fruit, *Neoscytalidium dimidiatum*.

Classification number: 4.1

trị pH khác nhau (4, 5, 6, 7 và 8). Thu dịch nuôi cấy của vi khuẩn để thử đối kháng với nấm bệnh bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch.

Ảnh hưởng của nhiệt độ: vi khuẩn *B. velezensis* YMD1 được nuôi cấy trên môi trường NA lỏng trong 48 giờ ở nồng độ pH thích hợp nhất, các điều kiện nhiệt độ khác nhau (25, 30, 37, 40 và 60°C). Thu dịch nuôi cấy của vi khuẩn để thử đối kháng với nấm bệnh bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch.

Ảnh hưởng của nguồn carbon: tiến hành nuôi lỏng vi khuẩn *B. velezensis* YMD1 trong môi trường muối khoáng cơ bản được bổ sung thêm 1% các loại đường là tinh bột, lactose, dextrin, saccarose, D-sorbitol, mantose, glucose và fructose. Các thí nghiệm được bố trí ở nhiệt độ và pH thích hợp. Sau 48 giờ nuôi cấy, thu dịch nuôi cấy của vi khuẩn để thử đối kháng với nấm bệnh bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch.

Ảnh hưởng của nguồn nitơ: tiến hành nuôi vi khuẩn *B. velezensis* YMD1 trên môi trường khoáng cơ bản với nguồn carbon thích hợp nhất và bổ sung 0,1% nguồn nitrogen vô cơ là NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 và nguồn nitơ hữu cơ là pepton, cao nấm men. Các thí nghiệm được bố trí ở nhiệt độ và pH thích hợp. Sau 48 giờ nuôi cấy, thu dịch nuôi cấy của vi khuẩn để thử đối kháng với nấm bệnh bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch.

Ảnh hưởng của nồng độ muối đến sinh trưởng của chủng *B. velezensis* YMD1: nuôi vi khuẩn trên môi trường LB được bổ sung thêm NaCl với các nồng độ khác nhau (1, 2, 3 và 4%) và quan sát khả năng sinh trưởng.

Khảo sát khả năng đối kháng của vi khuẩn *B. velezensis* YMD1 với nấm *N. Dimidiatum* được tiến hành theo mô tả của Dhanasekaran và cs (2012) [1]. Vi khuẩn được nuôi trong môi trường LB lỏng, lắc 200 vòng/phút ở 30°C. Dịch vi khuẩn được thu sau 48 giờ nuôi cấy, ly tâm với tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C. Nấm được hoạt hóa trên môi trường PDA (Potato Dextrose Agar), dùng que cấy lấy sợi nấm cho vào ống eppendorf chứa 500 μl nước cất vô trùng, vortex để bào tử nấm phát tán đều trong nước. Dùng dụng cụ đục lỗ tạo giếng thạch trên đĩa thạch PDA đã được cấy trải 50 μl dung dịch nấm. Chuyển 100 μl dịch vi khuẩn được ly tâm và 100 μl dịch vi khuẩn không ly tâm vào giếng thạch, ủ đĩa petri thí nghiệm ở 30°C. Dịch vi khuẩn có khả năng ức chế sinh trưởng của nấm được thể hiện thông qua vòng sáng xuất hiện quanh giếng thạch. Hiệu lực đối kháng của vi khuẩn với nấm *N. dimidiatum* được xác định bằng công thức sau:

$$\% \text{ Đối kháng} = [1 - (A/B)] * 100\%$$

Trong đó: A là đường kính vòng đối kháng; B là đường kính giếng thạch (18 mm).

Môi trường

Môi trường LB (g/l): peptone 10 g, cao nấm men 5 g, NaCl 10 g, agar 15 g, nước cất 1 l, pH=7,0.

Môi trường PDA (g/l): potato extract 4 g, dextrose 20 g, agar 15 g, nước cất 1 l, pH=5,6.

Môi trường khoáng cơ bản để khảo sát ảnh hưởng của nguồn carbon: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, KH_2PO_4 0,5 g và nước cất 1 l.

Môi trường khoáng cơ bản để khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitơ: KH_2PO_4 1,36 g, CaCl_2 0,03 g, NaH_2PO_4 2,13 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, glucose 10 g và nước cất 1 l.

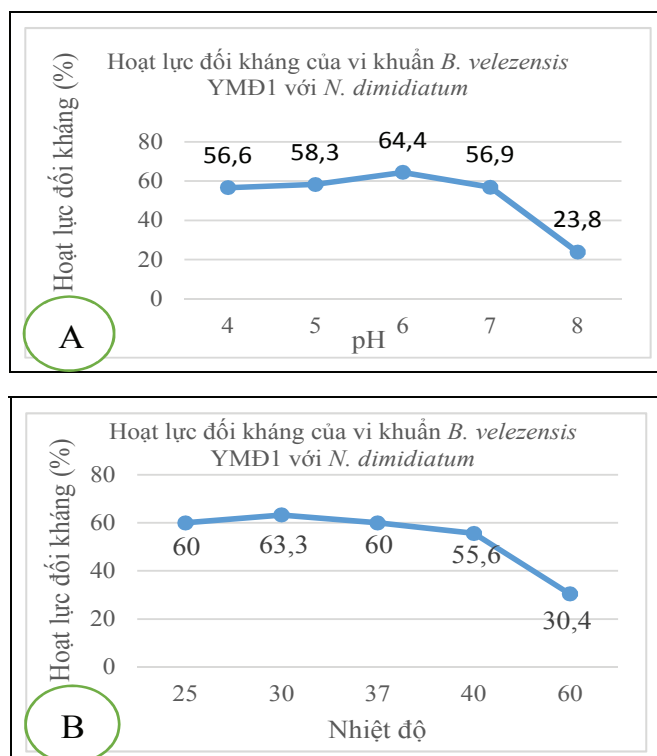
Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của pH môi trường

pH của môi trường nuôi cấy ảnh hưởng tới nhiều phản ứng được xúc tác bởi enzyme thông qua tác động tới vận chuyển một số sản phẩm qua màng tế bào. Chúng vi khuẩn *B. velezensis* YMĐ1 được nuôi trong môi trường LB lỏng ở 30°C, giá trị pH 4, 5, 6, 7 và 8. Sau 48 giờ nuôi, dịch nuôi vi khuẩn được ly tâm, thu phần dịch nổi để thử khả năng đối kháng theo phương pháp của Dhanasekaran và cs (2012) [1]. Kết quả (hình 1 A) cho thấy, hoạt lực đối kháng nấm *N. dimidiatum* của vi khuẩn *B. velezensis* YMĐ1 tăng khi pH môi trường trong khoảng 4-6 và đạt giá trị cao nhất (64,4%) tại pH=6. Hoạt lực đối kháng giảm khi pH môi trường vượt quá giá trị này, tại pH=8 hoạt lực đối kháng chỉ đạt 23,8%. Hai chủng vi khuẩn B7 và A3 kháng nấm *N. dimidiatum* được Hà Thị Thúy và cs tuyển chọn năm 2016 cũng sinh trưởng và phát triển tốt tại pH=6-7,5 [2]. Chen Jing và cs (2015) [3] công bố pH thích hợp cho chủng HTN-5 kháng nấm *N. dimidiatum* là 6,8. Điều này có thể được giải thích do các chủng vi khuẩn được phân lập từ các vùng khác nhau, do đó yêu cầu về pH môi trường nuôi cũng khác nhau.

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Mỗi loài vi sinh vật có một ngưỡng nhiệt độ thích hợp để sinh trưởng và phát triển, nếu nuôi các loài vi sinh vật ở nhiệt độ quá cao hay quá thấp so với nhiệt độ thích hợp sẽ làm chậm hay ngừng quá trình hoạt động của các phản ứng được xúc tác bởi các enzyme do enzyme bị biến tính hay tốc độ tổng hợp enzyme giảm. Vi khuẩn *B. velezensis* YMĐ1 được nuôi tại pH=6, ở các nhiệt độ khác nhau, sau 48 giờ, kiểm tra hoạt lực đối kháng với nấm *N. dimidiatum*. Kết quả thí nghiệm (hình 1 B) cho thấy, hoạt lực đối kháng của vi khuẩn *B. velezensis* YMĐ1 tăng từ 60% đến 63,3% khi tăng nhiệt độ từ 25 lên 30°C, sau đó tăng nhiệt độ đã làm giảm

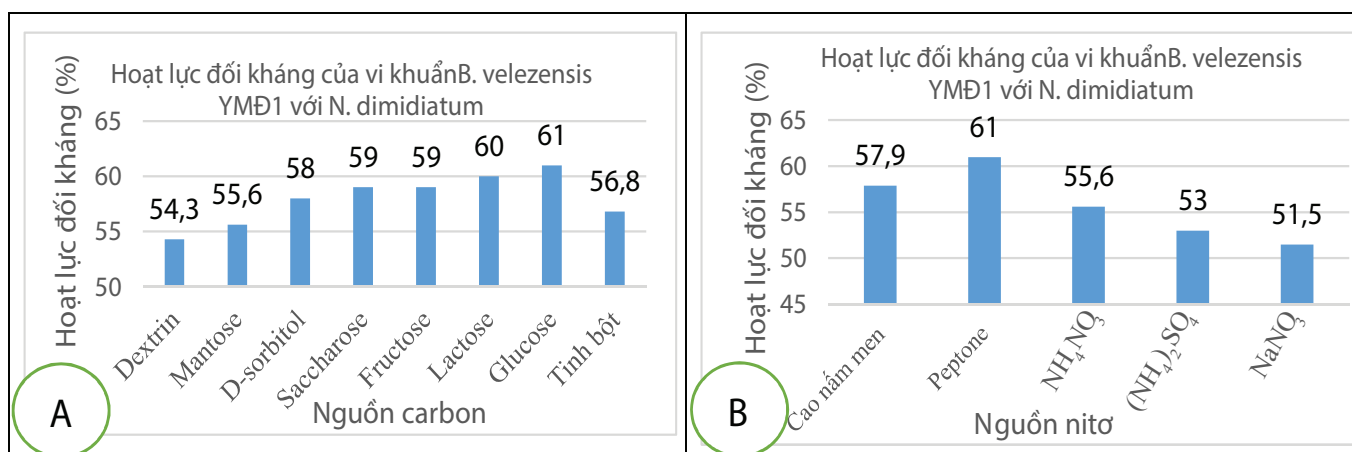


Hình 1. Ảnh hưởng của pH (A) và nhiệt độ (B) môi trường nuôi tới hoạt lực đối kháng nấm *N. dimidiatum* của vi khuẩn *B. velezensis* YMĐ1.

hoạt lực đối kháng của vi khuẩn này. Luong Huu Thanh và cs (2016) [4] đã ghi nhận 2 chủng vi khuẩn kháng *N. dimidiatum* được họ phân lập phát triển tốt tại nhiệt độ 35°C.

Ảnh hưởng của nguồn carbon và nitơ

Carbon và nitơ là hai nguồn dinh dưỡng cần thiết với vi sinh vật vì chúng tham gia vào thành phần cấu trúc của các phân tử quan trọng như nucleotide, aminoacid, protein. Chính vì vậy, đáp ứng nhu cầu về nguồn carbon, nitơ sẽ giúp cho vi sinh vật phát triển tốt hơn khi được nuôi *in vitro*. Vi khuẩn *B. velezensis* YMĐ1 đối kháng nấm *N. dimidiatum* được nuôi trong môi trường muối khoáng cơ bản được bổ sung thêm 1% các nguồn đường gồm glucose, fructose, D-sorbitol, lactose, mantose, saccarose, tinh bột và dextrin tại nhiệt độ 30°C và pH=6. Sau 2 ngày nuôi cấy, thu dịch nuôi cấy của vi khuẩn để thử đối kháng với nấm bệnh bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Kết quả hình 2A cho thấy, vi khuẩn *B. velezensis* YMĐ1 sử dụng tốt các nguồn carbon này, hoạt lực đối kháng nấm *N. dimidiatum* đạt trên 54%, đặc biệt nếu sử dụng glucose trong môi trường nuôi cấy thì hoạt lực đối kháng của *B. velezensis* YMĐ1 cao nhất (61%). Tuy nhiên, khi sản xuất công nghiệp, cần tìm nguồn carbon có giá thành thấp để thay thế glucose.



Hình 2. Ảnh hưởng của nguồn carbon (A) và nguồn nitơ (B) tới hoạt lực đối kháng nấm *N. dimidiatum* của vi khuẩn *B. Velezensis* YMD1.

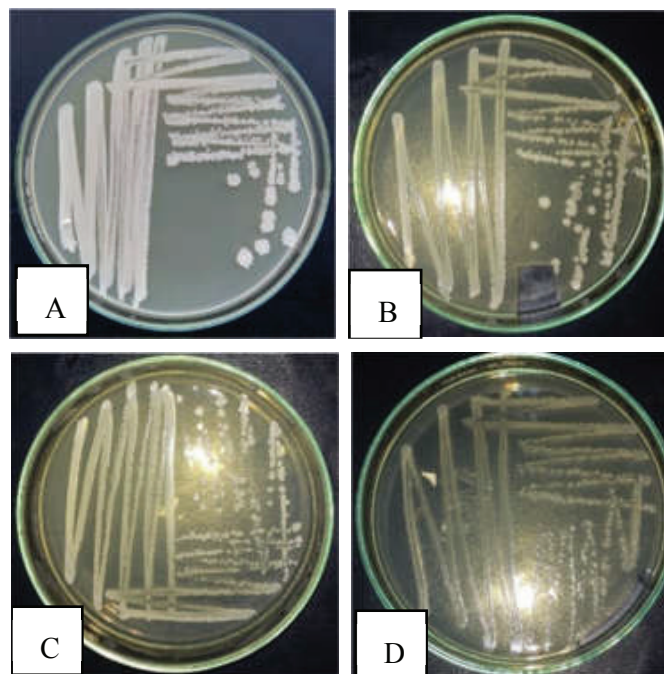
Để khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitơ tới hoạt lực kháng nấm *N. dimidiatum* của vi khuẩn *B. velezensis* YMD1, vi khuẩn được nuôi lỏng trong môi trường khoáng cơ bản có bổ sung các nguồn nitơ là cao nấm men, peptone, NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ và NaNO_3 tại 30°C , $\text{pH}=6$. Sau 48 giờ nuôi, dịch nuôi vi khuẩn được ly tâm, thu phần dịch nổi để kiểm tra hoạt lực đối kháng. Khi được cung cấp các nguồn nitơ hữu cơ, hoạt lực kháng nấm của vi khuẩn *B. velezensis* YMD1 cao hơn khi được cung cấp nguồn nitơ vô cơ (hình 2B).

Hoạt lực đối kháng nấm *N. dimidiatum* của *B. velezensis* YMD1 cao nhất khi được nuôi trong môi trường có glucose và peptone. Kết quả này tương tự kết quả thí nghiệm của Hà Thị Thúy và cs (2016) [2]. Các tác giả này khi khảo sát các nguồn carbon và nitơ trong môi trường nuôi hai chủng vi khuẩn kháng nấm *N. dimidiatum* cũng kết luận nguồn nitơ thích hợp là cao nấm men và peptone, nguồn carbon là tinh bột, ri đường, cao man, dextrose. Chen Jing và cộng sự (2015) [3] cũng công bố môi trường thích hợp để nuôi chủng vi sinh vật HTN-5 kháng nấm *N. dimidiatum* gồm cao thịt bò, peptone, glucose, lactose, cao nấm men, muối, $\text{pH}=6,8$.

Khả năng chịu mặn của *B. velezensis* YMD1

Ở Việt Nam, đất mặn có diện tích xấp xỉ 2 triệu ha, chiếm gần 6% tổng diện tích đất tự nhiên [5]. Việc khai thác phần diện tích này một cách có hiệu quả phục vụ sản xuất nông nghiệp, ngư nghiệp ngày càng trở nên cấp bách và có ý nghĩa quan trọng đối với nền kinh tế quốc dân. Những năm gần đây, người dân đã chuyển đổi cơ cấu cây trồng, trồng các loại cây thích ứng với đất nhiễm phèn, nhiễm mặn. Tại vùng đất thường bị nhiễm mặn ven sông, ven biển của huyện Gò Công Tây, tỉnh Tiền Giang, cây Thanh long phát triển tốt và cho năng suất cao [6]. Vì thế, để có thể ứng dụng

khả năng đối kháng của vi khuẩn *B. Velezensis* YMD1 với nấm *N. dimidiatum* gây bệnh trên Thanh long thì chủng vi khuẩn được tuyển chọn cũng phải có khả năng chịu mặn tương đối tốt. Vi khuẩn *B. velezensis* YMD1 được nuôi trên môi trường LB có bổ sung thêm NaCl với các nồng độ từ 1 đến 5% và quan sát sự phát triển của khuẩn lạc (hình 3). Vi khuẩn *B. velezensis* YMD1 có thể phát triển tốt trên môi trường LB được bổ sung tới 4% muối. Vì vậy, có thể ứng dụng vi khuẩn này trong sản xuất chế phẩm sinh học phục vụ sản xuất Thanh long tại các vùng đất nhiễm mặn.



Hình 3. Khả năng chịu mặn của chủng vi khuẩn *B. velezensis* YMD1 ở các nồng độ NaCl khác nhau (A: 1%; B: 2%; C: 3%; D: 4%).

Kết luận

Vì khuẩn *B. velezensis* YMĐ1 có khả năng đối kháng mạnh với nấm *N. dimidiatum* gây bệnh khi được nuôi cấy ở 30°C trong môi trường khoáng cơ bản lỏng với pH=6, thời gian nuôi cấy là 48 giờ.

Nguồn carbon và nguồn nitơ thích hợp là glucose và peptone.

Chủng *B. velezensis* có thể sinh trưởng và phát triển tốt trong môi trường LB được bổ sung muối với nồng độ lên tới 4%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] D. Dhanasekaran, N. Thajuddin, A. Panneerselvam (2012), “Applications of Actinobacterial Fungicides in Agriculture and Medicine”, *Fungicides for Plant and Animal Diseases*, <https://www.intechopen.com/books/fungicides-for-plant-and-animal-diseases/applications-of-actinobacterial-fungicides-in-agriculture-and-medicine>, IntechOpen.

[2] Hà Thị Thủy, Lương Hữu Thành, Vũ Thúy Nga, Hứa Thị Sơn, Tống Hải Vân (2016), “Tuyển chọn chủng vi sinh vật có khả năng ức

chế nấm *Neoscytalidium dimidiatum* gây bệnh đốm nâu Thanh long”, *Hội thảo quốc gia về khoa học cây trồng lần thứ 2*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, tr.1167-1172.

[3] Chen Jing, Li Shaomei, Xu Xiaoling, Su Tongjie, Xu Yaojie, Xing Yiyuan, Yi Runhua (2015), “Identification of Antagonistic Bacterium against *Neoscytalidium dimidiatum* Causing Pitaya Canker and Fermentation Medium Optimization”, *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, **10**, pp.64-68, http://caod.orioprobe.com/articles/47133557/Identification_of_Antagonistic_Bacterium_against_Neoscytalidium_dimidi.htm.

[4] Luong Huu Thanh, Nguyen Kieu Bang Tam, Vu Thuy Nga, Tong Hai Van, Hua Thi Son, Nguyen Ngoc Quynh, Nguyen Thi Hang Nga (2016), “Study on the possibility of using microorganisms as biological agents to control fungal pathogens *Neoscytalidium dimidiatum* causing disease of brown spots on the dragon fruit”, *J. Viet. Env.*, **8(1)**, pp.41-44.

[5] <http://www.sonongnghiep.hochiminhcity.gov.vn/tintuc/Lists/Posts/Post.aspx?List=f73cebc3-9669-400e-b5fd-9e63a89949f0&ID=3062>.

[6] <https://www.mard.gov.vn/Pages/trong-thanh-long-tren-dat-nhiem-man-cho-thu-nhap-cao-31446.aspx#>.