

## **TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG XẠ KHUẨN (*Streptomyces* spp.) ĐỐI KHÁNG NẤM *Pyricularia grisea* GÂY BỆNH ĐẠO ÔN HẠI LÚA**

Nguyễn Thị Phong Lan\*, Võ Thị Thu Ngân, Trần Phước Lộc, Trần Hà Anh

*Bộ môn Bảo vệ thực vật, Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long*

Email\*: phonglan66@gmail.com

Ngày gửi bài: 11.05.2015

Ngày chấp nhận: 29.11.2015

### TÓM TẮT

Phòng trừ sinh học bệnh hại cây trồng đang được xem là giải pháp cần để thay thế cho việc sử dụng thuốc hóa học. Có 395 chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *Pyricularia grisea* được chọn lọc. Trong số đó có 50 chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với bốn chủng nấm *P. grisea*. Sáu chủng xạ khuẩn đã được định danh là *Streptomyces cavourensis* S27, *Streptomyces xiamenensis* S257, *Streptomyces viriabilis* S28, *Streptomyces iakyrus* S233, *Streptomyces scopuliridis* S136, *Streptomyces fulvissimus* S30 và các chủng có tiềm năng đối kháng với nấm *P. grisea*. Bên cạnh đó chúng còn có khả năng sinh trưởng tốt ở nhiệt độ cao, trên môi trường có nồng độ muối cao và có khả năng tiết IAA với nồng độ cao.

Từ khóa: Đạo ôn, *Pyricularia grisea*, phòng trừ sinh học, *Streptomyces*, xạ khuẩn.

### **Selection of *Streptomyces* spp. Isolates with Antifungal Activity against Rice Blast Fungus, *Pyricularia grisea***

#### ABSTRACT

Biological control of plant diseases including fungal pathogens has been considered as viable alternative to chemical control. A total of 395 isolates of *Streptomyces* were evaluated as antagonist agents to *Pyricularia grisea*. Of these, 50 isolates of *Streptomyces* showed high antagonistic ability to four races of *P. grisea*. Six *Streptomyces* isolates were identified as *Streptomyces cavourensis* S27, *Streptomyces xiamenensis* S257, *Streptomyces viriabilis* S28, *Streptomyces iakyrus* S233, *Streptomyces scopuliridis* S136, and *Streptomyces fulvissimus* S30, that were highly antagonistic to *P. grisea*. These isolates grew well on medium at high temperature (30°C) and fairly high salt concentration and produced high level of IAA.

Keywords: Biocontrol, rice blast, *Streptomyces*, *Pyricularia grisea*.

#### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh đạo ôn trên lúa do nấm *Pyricularia grisea* Sacc. gây ra là một trong những dịch bệnh có lịch sử lâu đời nhất với địa bàn phân bố rộng nhất và tác hại nghiêm trọng đối với tất cả các quốc gia trồng lúa trên thế giới (Ou, 1985). Tuy nhiên cho đến nay, bệnh đạo ôn vẫn là nỗi ám ảnh nặng nề nhất đối với người trồng lúa, tính kháng bệnh của giống liên tục bị phá vỡ do độc tính của nấm gây bệnh. Do vậy,

người trồng lúa chủ yếu sử dụng thuốc hóa học để đối phó với dịch hại này. Với thực trạng trên cần có giải pháp gì cho cây lúa nói riêng hay cho sản xuất nông nghiệp hướng tới nền nông nghiệp an toàn? Để giảm thiểu những tác hại này, ngày nay các nhà khoa học đang tích cực tìm kiếm những hướng nghiên cứu, công nghệ sản xuất mới nhằm tạo ra các sản phẩm mới có hiệu quả cao trong phòng trừ sâu bệnh nhưng an toàn hơn với người và môi trường-những sản phẩm thuốc BVTV thân thiện với môi

trường. Phòng trừ sinh học (PTSH) là một lĩnh vực còn rất nhiều tiềm năng cần được khai thác thêm và ứng dụng trong sản xuất nông nghiệp. Vì vậy, chúng ta cần phải nghiên cứu những mặt tích cực của nguồn tài nguyên phong phú này trên từng vùng sinh thái chuyên biệt, tái lập lại sự cân bằng vốn có của hệ sinh thái - nền tảng của nền nông nghiệp bền vững. Xạ khuẩn và vi khuẩn vùng rễ có khả năng kích thích sinh trưởng cây trồng (PGPR - Plant Growth Promoting Rhizobacteria) là nhóm tác nhân PTSH có rất nhiều triển vọng trong sản xuất nông nghiệp. Một trong những cơ chế ngăn chặn sự phát triển của mầm bệnh là cạnh tranh dinh dưỡng, tạo kháng sinh, tiết enzyme ngoại bào,... (Siddiqui, 2006). Một vấn đề quan trọng trong sự hình thành cơ chế đối kháng được trình bày ở nhiều báo cáo là tùy thuộc vào dòng vi sinh vật đối kháng, nguồn gốc của chúng và điều kiện môi trường, vì thế khi chọn một tác nhân sinh học nên quan tâm đến hướng áp dụng và nguồn gốc của mầm bệnh (Kubicek and Harman, 1998).

Vì vậy, tuyển chọn các chủng xạ khuẩn có khả năng kiểm soát các nguồn nấm gây bệnh đạo ôn (*P. grisea*) ở ĐBSCL đã được thực hiện nhằm phát huy tiềm năng của nguồn vi sinh vật bản địa trong hệ sinh thái cây lúa nước vùng ĐBSCL.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Nguồn nấm *P. grisea* gây bệnh đạo ôn được chọn cho các nghiên cứu là 4 nòi nấm phổ biến: Pg1, Pg2, Pg3 và Pg4 (tương ứng với các nòi Pg LA 87: 30-i2-k131-z00-ta633, Pg TV 22: 73- i7-k000-z00-ta733, Pg CT 89: 11-i4-k130-z00-ta612 và Pg ST 11: 30-i2-k131-z00-ta633) được cung cấp bởi Bộ môn Bảo vệ Thực vật, Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long.

- Nguồn xạ khuẩn được thu thập và phân lập từ đất trồng lúa vùng Đồng bằng sông Cửu Long

- Địa điểm và thời gian nghiên cứu: thí nghiệm được tiến hành tại Viện Lúa ĐBSCL trong năm 2012-2013

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Thu thập, phân lập và đánh giá khả năng đối kháng

- Thu thập mẫu đất: Mẫu đất được thu thập ở 10 tỉnh (Long An, Trà Vinh, Cần Thơ, Sóc Trăng, Tiền Giang, Đồng Tháp, Vĩnh Long, An Giang, Hậu Giang và Kiên Giang) trong vụ Hè Thu 2012. Mẫu đất được thu thập về để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng khoảng 7-10 ngày, sau đó được lọc qua rây (0,8 mm) để loại bỏ tạp chất, cho vào túi để phân lập vi sinh vật (Lee and Hwang, 2002).

- Phân lập xạ khuẩn: Cho 1 g đất vào ống nghiệm chứa 9 ml nước cất vô trùng, lắc 45 giây (vortexed), sau đó pha loãng bằng cách lấy 1ml dịch đất cho vào ống nghiệm chứa 9ml nước cất vô trùng, lần lượt pha loãng đến  $10^{-3}$ . Trải 50  $\mu$ l dịch đất đã pha loãng trên mặt môi trường Casein Glycerol Agar (CGA) ủ ở 28°C trong 7-20 ngày.

- Đánh giá khả năng đối kháng với nấm *Pyricularia grisea*: sơ tuyển các chủng vi sinh vật phân lập đã được tiến hành theo phương pháp đồng nuôi cấy trên môi trường PDA để chọn những chủng có khả năng ức chế sự phát triển nấm *P. grisea*.

- Đánh giá khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn chọn lọc với 4 nòi nấm phổ biến được thực hiện trên đĩa petri, bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với ba lần lặp lại, mỗi nghiệm thức là một chủng vi sinh vật trắc nghiệm theo phương pháp của Shahidi Bonjar (2003). Bán kính vòng vô khuẩn (BKVK) được đo theo phương pháp hai đường thẳng vuông góc qua tâm khuẩn lạc ở giai đoạn 14 ngày sau thí nghiệm theo thang đánh giá của Zarandi (2013).

#### 2.2.2. Khảo sát đặc điểm sinh học của các chủng xạ khuẩn triển vọng

Sáu chủng xạ khuẩn S27, S28, S257, S30, S233 và S136 có khả năng đối kháng tốt được chọn để khảo sát một số đặc điểm sinh học.

- Đặc điểm hình thái: Màu sắc khuẩn ty khí sinh (KTKS), khuẩn ty cơ chất (KTCC) và sắc tố tan (STT) được xác định khi nuôi cấy xạ khuẩn trên môi trường: ISP-1, ISP-2, ISP-3, ISP-4, ISP-5, ISP-6, ISP-7. Sau 7 đến 10 ngày quan sát màu sắc KTKS, KTCC và sắc tố tiết ra trên môi trường. Sắc tố melanin được ghi nhận với xạ khuẩn được nuôi cấy trên môi trường ISP-6, khi màu của môi trường chuyển từ màu vàng nhạt sang màu nâu nhạt đến màu nâu đậm.

- Đặc điểm sinh lý, sinh hóa:

Khả năng đồng hóa các nguồn carbon: được xác định trên môi trường ISP-9 có bổ sung 1% các nguồn đường: glucose, maltose, fructose, lactose, sucrose. Phương pháp thực hiện là cho 1 g đường khảo sát vào 100 ml môi trường ISP-9 còn nóng. Lắc cho tan đường rồi đổ vào đĩa petri và sau đó cấy xạ khuẩn lên môi trường, sau 10 ngày quan sát sự sinh trưởng của các chủng và so sánh với đối chứng. Trong đó môi trường có glucose là đối chứng dương (+) và môi trường không có đường là đối chứng âm (-).

Khả năng chịu muối: được xác định trên môi trường trên môi trường ISP-1 có bổ sung thêm NaCl với các nồng độ 0,5; 3; 7; 9; 11; 12%. Sau 7-10 ngày lấy ra quan sát sự sinh trưởng.

Khả năng sinh enzyme ngoại bào: được tiến hành bằng cách chiết dịch enzyme từ môi trường lỏng, xạ khuẩn sau khi được nuôi trên môi trường Gause lỏng (lắc ở 220 vòng/phút trong 5 ngày) dịch thể sẽ được ly tâm ở 5.000 vòng/phút trong 15 phút, chiết dịch trong thu được enzyme thô. Xác định hoạt tính các enzym ngoại bào bằng phương pháp khuếch tán trên môi trường với một trong các nguồn cơ chất sau: tinh bột (xác định hoạt tính amylase), casein (xác định hoạt tính protease) và CMC (xác định hoạt tính endoglucanase). Chuẩn bị môi trường cơ chất gồm: 20 g agar + 10 g cơ chất, pha môi trường trong 1 lít nước cất. Đổ môi trường vào các đĩa petri sao cho bề dày lớp thạch khoảng 3 mm. Đục lỗ (d = 10 mm) trên lớp agar cách nhau 40 mm. Nhỏ 0,2 ml dung dịch enzyme cần thử và 0,2 ml nước cất thành trùng làm đối chứng,

để ở tủ lạnh 4°C khoảng 4 giờ, sau đó đặt vào tủ ấm 30°C trong 24 giờ. Hoạt tính enzyme được xác định bằng vùng không bắt màu sau khi nhuộm màu bằng thuốc thử Lugol.

Khả năng tiết IAA: Ước lượng sự tiết IAA theo phương pháp Salkowski (Glickmann and Dessaux, 1995). Lấy 1 ml phần dịch trong sau khi ly tâm lạnh (4°C) dịch nuôi vi sinh vật cho vào các ống nghiệm chứa sẵn 2 ml thuốc thử Salkowski R2 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10,8M và FeCl<sub>3</sub>), trộn đều bằng vortex. Ủ hỗn hợp trên trong tối 10-15 phút để phản ứng xảy ra hoàn toàn. Đọc OD ở bước sóng 530 nm (OD<sub>530</sub> nm). Lượng IAA (µg/ml) trong dịch nuôi cấy được ước lượng dựa trên đường chuẩn IAA (Sigma).

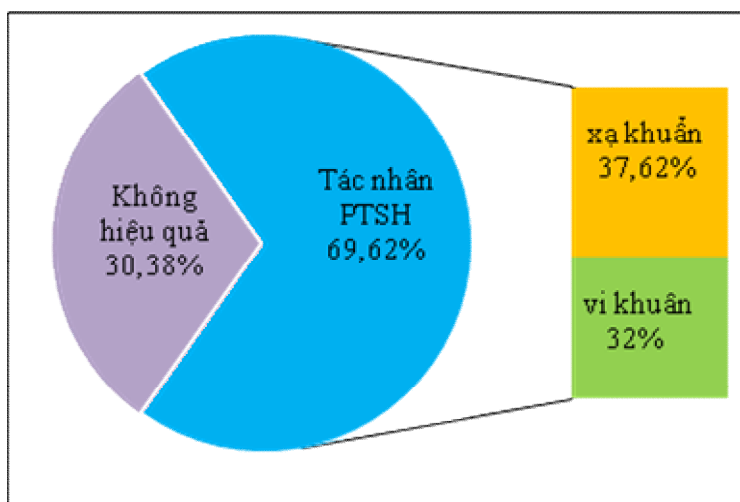
- Tính toán số liệu: Số liệu thí nghiệm được thu thập và xử lý bằng Excel, sử dụng phần mềm SAS 9.1 để phân tích phương sai ANOVA và kiểm định Duncan để so sánh sự khác biệt giữa các trung bình nghiệm thức.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Phân lập vi sinh vật và đánh giá khả năng đối kháng với nấm *Pyricularia grisea* trên môi trường dinh dưỡng

##### 3.1.1. Phân lập vi sinh vật

Tổng số 510 mẫu đất được thu thập từ 10 tỉnh trồng lúa vùng Đồng bằng sông Cửu Long (Long An, Tiền Giang, Vĩnh Long, Đồng Tháp, Trà Vinh, Cần Thơ, An Giang, Hậu Giang, Sóc Trăng, Kiên Giang) qua xử lý phân lập vi sinh vật có ích đã có 1.050 chủng vi sinh vật (vi khuẩn và xạ khuẩn) được phân lập. Từ 1.050 chủng vi sinh vật, sau khi sơ tuyển đánh giá khả năng ức chế sự phát triển nấm *P. grisea* trên môi trường đã có 395 chủng xạ khuẩn và 336 chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng. Tỷ lệ vi sinh vật có khả năng ức chế nấm chiếm 69,62%, trong đó có 37,62% là xạ khuẩn và 32% là vi khuẩn (Biểu đồ 1). Điều này cho thấy nguồn vi sinh vật là tiềm năng rất lớn trong việc phát triển thành tác nhân phòng trừ sinh học trên hệ sinh thái cây lúa nước vùng ĐBSCL.



**Biểu đồ 1. Tỷ lệ vi sinh vật phân lập từ đất có khả năng ức chế nấm *P. grisea* trên môi trường dinh dưỡng**

### 3.1.2. Khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn tuyển chọn với 4 nòi nấm *Pyricularia grisea* phổ biến ở ĐBSCL

Trong số 395 chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng, 50 chủng xạ khuẩn có mức đối kháng trung bình trở lên được chọn để khảo sát khả năng đối kháng với 4 nòi nấm *P. grisea* có độc tính cao và phổ biến.

Kết quả đánh giá với nòi nấm *Pg1* cho thấy có 24 chủng xạ khuẩn có vùng ức chế tương đương đối chứng, chủng xạ khuẩn S28 có khả năng ức chế cao (BKVK là 20,03 mm) và 23 chủng xạ khuẩn chiếm 46% có khả năng ức chế trung bình với dòng nấm *Pg1* với bán kính vòng vô khuẩn biến động từ 15,30-18,93 mm. Chủng S398 có khả năng ức chế với BKVK là 18,93mm, kể đến là chủng S136 và S123 có BKVK là 18,20mm. Khả năng ức chế nòi nấm *Pg2* của các chủng xạ khuẩn thấp hơn *Pg1*, có 13 chủng xạ khuẩn có vùng ức chế tương đương đối chứng, chủng S28 có hiệu quả ức chế cao nhất (BKVK là 20,37 mm), 12 chủng chiếm 24% có khả năng ức chế trung bình (BKVK biến động 16,47-17,67 mm). Đối với dòng nấm *Pg3*, có 10 chủng xạ khuẩn (chiếm 20%) có vùng ức chế tương đương Đối chứng, chủng S28 có hiệu quả ức chế cao nhất (BKVK là 20,37 mm) và 9 chủng xạ khuẩn có khả năng ức chế trung bình (BKVK biến động trong khoảng 16,47-19,87 mm). Kết quả ghi nhận trên nòi *Pg4* có 9 chủng xạ khuẩn

(chiếm 18%) có vùng ức chế tương đương đối chứng, trong đó các chủng S28, S256, S203, S30, S53, S 237, S136, S132, S27, S256 có khả năng ức chế cao với vùng BKVK lần lượt là 21,37; 20,83, 20,6; 20,57; 19,3; 19,03; 18,93; 18,87 và 18,8 mm. Kết quả ghi nhận cho thấy chủng xạ khuẩn S28 là chủng có khả năng ức chế mạnh nhất với cả 4 nòi nấm *P. grisea* với vùng BKVK (20,73 mm) tương đương đối chứng (Bảng 1).

Khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn phụ thuộc rất nhiều vào cơ chế và mức độ duy trì của các cơ chế khác nhau nên việc khảo sát các cơ chế đối kháng có ý nghĩa quan trọng trong việc hiểu rõ bản chất của tính đối kháng và khai thác sử dụng vi sinh vật hiệu quả hơn.

## 3.2. Khảo sát đặc điểm sinh học của các chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng nấm *Pyricularia grisea*

### 3.2.1. Đặc điểm hình thái

Màu sắc khuẩn lạc của một chủng xạ khuẩn khi nuôi trên các môi trường từ ISP1 đến ISP7 thường khác nhau và là yếu tố để phân loại xạ khuẩn (ISP, 1974; Stanley et al., 1989). Màu của khuẩn ty khí sinh và khuẩn ty cơ chất của xạ khuẩn được so với bảng màu của Tresner và Backus (Tresner, 1963), khả năng sinh sắc tố tan và sự hình thành melanin cũng là tiêu chuẩn để nhận định xạ khuẩn.

Chủng S27, S233 cho KTKS có màu trắng, hồng trên môi trường ISP1, ISP2, ISP3, ISP5, ISP6 và ISP7; có màu trắng trên môi trường ISP4. Sau 21 ngày nuôi cấy, màu sắc KTKS đều có màu hồng trên tất cả các môi trường. KTCC sau 21 ngày có màu hồng hoặc vàng, hồng trên các môi trường. Chủng S136 khi nuôi cấy được 7 ngày KTKS có màu trắng trên các môi trường ISP1, ISP2, ISP3, ISP4; màu trắng xám trên môi trường

ISP5, ISP6, ISP7. Sau 21 ngày nuôi cấy, KTKS có màu xám trên ISP2 và ISP5, trên các môi trường khác KTKS không thay đổi. Trên môi trường từ ISP2 đến ISP7, KTCC có màu vàng không thay đổi sau 21 ngày. Khi nuôi cấy trên hệ thống môi trường ISP, cả 2 chủng xạ khuẩn S28 và S136 đều không làm thay đổi màu sắc môi trường, chứng tỏ chúng không có khả năng sinh sắc tố tan và không hình thành sắc tố melanin.

**Bảng 1. Bán kính vòng vô khuẩn của 50 chủng xạ khuẩn đối với 4 nguồn nấm *P. grisea* ở 14 ngày sau thí nghiệm**

TT	Xạ khuẩn	Bán kính vòng vô khuẩn (mm)				
		Pg1	Pg2	Pg3	Pg4	TB
1	S 8	13,67 c-o	16,67 a-g	12,77 i-m	13,33 l-o	14,11 e-l
2	S 9	16,60 a-i	12,30 k-o	19,37 a-d	13,77 j-o	15,51 b-i
3	S 10	14,33 b-o	13,20 f-o	18,83 a-e	14,27 i-o	15,16 c-k
4	S 12	16,40 a-j	16,07 b-l	13,50 g-m	12,23 mno	14,55 d-l
5	S 23	15,30 a-o	14,27 c-o	13,20 h-m	12,37 mno	13,78 g-l
6	S 27	15,70 a-o	16,00 b-m	15,77 c-l	18,80 a-g	16,57 bcd
7	S 28	20,03 a	20,37 a	21,13 a	21,37 a	20,73 a
8	S 30	15,03 b-o	11,93 l-o	17,23 a-h	20,57 a-d	16,19 b-f
9	S 53	15,40 a-o	14,90 b-o	12,80 i-m	19,30 a-e	15,60 b-i
10	S 54	13,30 c-o	17,27 a-f	14,07 f-m	14,00 i-o	14,66 d-l
11	S 55	12,70 i-o	16,57 a-i	11,67 lm	13,63 l-o	13,64 h-l
12	S 78	12,20 mno	15,63 b-n	17,70 a-f	13,17 l-o	14,68 d-l
13	S 79	15,60 a-o	12,87 g-o	14,90 e-m	17,33 d-j	15,18 c-k
14	S 82	14,80 b-o	12,60 g-o	12,20 j-m	11,67 o	12,82 l
15	S 123	18,20 abc	14,33 c-o	13,70 f-m	14,60 h-o	15,21 c-k
16	S 124	12,10 no	14,50 c-o	14,53 f-m	14,13 i-o	13,82 g-l
17	S 132	16,80 a-g	15,37 b-o	12,50 i-m	18,87 a-f	15,88 b-h
18	S 136	18,20 abc	18,93 ab	14,00 f-m	18,93 a-f	17,52 b
19	S 144	13,20 d-o	13,57 d-o	13,40 h-m	13,23 l-o	13,35 i-l
20	S 146	11,30 o	15,33 b-o	14,37 f-m	12,87 mno	13,47 i-l
21	S 159	13,00 d-o	14,17 c-o	14,83 e-m	12,63 mno	13,66 h-l
22	S 164	15,73 a-o	15,40 b-o	15,97 b-k	13,57 l-o	15,17 c-k
23	S 165	17,17 a-f	14,57 c-o	19,87 ab	13,77 j-o	16,34 b-e
24	S 166	14,00 c-o	17,77 abc	14,57 f-m	17,27 d-k	15,90 b-h
25	S 178	17,57 a-e	16,03 b-m	16,00 b-j	17,43 c-i	16,76 bcd
26	S 203	17,80 a-d	17,53 a-e	13,70 f-m	20,60 a-d	17,41 bc
27	S 223	15,67 a-o	17,67 a-d	13,53 g-m	14,20 i-o	15,27 b-j
28	S 224	14,93 b-o	17,37 a-f	14,40 f-m	12,47 mno	14,79 d-l
29	S 225	12,53 j-o	16,47 a-k	12,37 i-m	14,47 h-o	13,96 f-l
30	S 227	16,03 a-m	16,63 a-h	14,87 e-m	16,57 e-l	16,03 b-g

**Bảng 1. Bán kính vòng vô khuẩn của 50 chủng xạ khuẩn đối với 4 nguồn nấm *P. grisea* ở 14 ngày sau thí nghiệm (tt)**

TT	Xạ khuẩn	Bán kính vòng vô khuẩn (mm)				
		Pg1	Pg2	Pg3	Pg4	TB
31	S 228	12,87 g-o	14,30 c-o	14,27 f-m	14,53 h-o	13,99 f-l
32	S 231	13,00 e-o	11,53 no	14,80 e-m	12,53 mno	12,97 kl
33	S 232	13,17 d-o	14,97 b-o	15,13 e-m	12,93 mno	14,05 f-l
34	S 233	16,63 a-h	14,00 c-o	17,60 a-g	14,20 i-o	15,61 b-i
35	S 235	14,53 b-o	11,23 o	16,07 b-i	12,00 no	13,46 i-l
36	S 236	15,77 a-n	14,87 b-o	15,00 e-m	13,87 i-o	14,88 d-l
37	S 237	12,90 f-o	11,87 mno	14,30 f-m	19,03 a-f	14,53 d-l
38	S 238	15,67 a-o	13,73 c-o	13,40 h-m	15,43 g-n	14,56 d-l
39	S 239	16,33 a-k	12,47 i-o	11,67 lm	13,67 l-o	13,53 i-l
40	S 243	12,77 h-o	14,37 c-o	14,80 e-m	13,87 i-o	13,95 f-l
41	S 256	14,97 b-o	13,40 e-o	15,37 d-l	20,83 abc	16,14 b-f
42	S 257	14,57 b-o	12,50 h-o	19,27 a-d	17,87 b-h	16,05 b-g
43	S 258	12,40 k-o	12,40 j-o	16,00 b-j	15,63 f-m	14,11 e-l
44	S 260	15,37 a-o	12,53 g-o	14,10 f-m	11,87 no	13,47 i-l
45	S 261	16,07 a-l	12,70 g-o	11,17 m	13,73 k-o	13,42 i-l
46	S 262	15,57 a-o	16,00 b-m	19,50 abc	12,87 mno	15,98 b-g
47	S 396	15,47 a-o	16,57 a-j	14,33 f-m	13,10 l-o	14,87 d-l
48	S 397	13,80 c-o	16,57 a-j	15,87 b-k	14,00 i-o	15,06 d-l
49	S 398	18,93 ab	14,47 c-o	19,73 abc	14,07 i-o	16,80 bcd
50	S 420	12,30 l-o	15,00 b-o	11,83 klm	13,37 l-o	13,13 jkl
51	ĐC	20,00 a	20,30 a	20,63 a	21,20 ab	20,53 a
Mức ý nghĩa		**	**	**	**	***
CV (%)		16,2	14,0	13,7	11,8	7,6

Ghi chú: Các giá trị trung bình trong cùng một cột được theo sau bởi những chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa ở mức 5% trong phép thử Duncan

**Bảng 2. Đặc điểm nuôi cấy của một số chủng xạ khuẩn S27, S28 và S257**

Môi trường	S27			S28			S257		
	KTKS	KTCC	Sắc tố	KTKS	KTCC	Sắc tố	KTKS	KTCC	Sắc tố
ISP-1	Xám nhạt	Trắng	Nâu rất nhạt	Xám	Trắng	không	Xanh lá	Trắng	Không
ISP-2	Trắng hồng	Trắng	không	-	-	không	Xanh lá	Trắng	Nâu rất nhạt
ISP-3	-	-	không	-	-	không	Trắng	Trắng	Không
ISP-4	Trắng sữa	Trắng	không	Vàng nhạt	Trắng trong	không	Trắng	Trắng	Không
ISP-5	Hồng	Trắng hơi cam	Nâu rất nhạt	Trắng	Trắng sữa	không	Trắng sữa	Trắng hồng	Không
ISP-6	Xám hơi hồng	Trắng	Nâu	Xám (tâm rắng)	Trắng	không	Xanh lá (tâm trắng)	Trắng	Nâu
ISP-7	Xám nhạt	Trắng	Nâu	Cam (tâm xám)	Trắng, hồng	không	Trắng sữa	Không	Nâu đậm

Ghi chú: KTKS: khuẩn ty khí sinh, KTCC: khuẩn ty cơ chất

**Bảng 3. Đặc điểm nuôi cấy của các chủng xạ khuẩn S30, S233 và S136**

Môi trường	S30			S233			S136		
	KTKS	KTCC	Sắc tố	KTKS	KTCC	Sắc tố	KTKS	KTCC	Sắc tố
ISP-1	Trắng sữa	Trắng	Nâu rất nhạt	Trắng hồng	Hồng	không	Xám ghi	Trắng	không
ISP-2	-	-	không	Trắng hồng	-	không	-	-	không
ISP-3	Trắng sữa	Trắng	không	Trắng sữa	-	không	-	-	không
ISP-4	Trắng sữa	Trắng sữa	không	Vàng nhạt	Trắng	không	Vàng nhạt	Trắng trong	không
ISP-5	Vàng nhạt	Trắng sữa	không	Trắng	-	không	Trắng	Trắng sữa	không
ISP-6	Trắng	Trắng	không	Tâm vàng nhạt	Trắng	Không	Xám (tâm trắng)	Trắng	không
ISP-7	Trắng	Cam nhạt	Nâu nhạt	Cam	-	Không	xám	Trắng	không

Ghi chú: KTKS: khuẩn ty khí sinh, KTCC: khuẩn ty cơ chất

### 3.2.2. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa

#### - Khả năng đồng hóa các nguồn carbon

Khả năng đồng hóa các nguồn carbon là một trong những chỉ tiêu quan trọng để phân loại xạ khuẩn sử dụng môi trường ISP. Vì vậy, chúng tôi tiến hành nuôi các chủng xạ khuẩn trên môi trường ISP9 có bổ sung các nguồn carbon khác nhau. Kết quả cho thấy, các chủng xạ khuẩn nghiên cứu đều có khả năng đồng hóa tốt các nguồn carbon khác nhau: D-glucose; saccarose; D-xylose; rhamnose; raffinose, sinh trưởng yếu trong môi trường: L-arabinose; I-inositol; mannitol; cellulose; lactose. Chủng S28 có khả năng đồng hóa tốt: D-glucose; saccarose; I-inositol; mannitol; raffinose; lactose, sinh trưởng yếu trong môi trường có chứa L-arabinose; D-xylose và không có khả năng đồng hóa 2 nguồn đường rhamnose và cellulose. Nguồn carbon cụ thể có thể được sử dụng có hiệu quả bởi chủng này nhưng không hiệu quả bởi chủng khác cho thấy nguồn carbon cụ thể này có thể không phải là nguồn carbon thích hợp hay có chứa thêm một lượng rất nhỏ (traces) các thành phần khác như Oskay (2004).

#### - Khả năng chịu nhiệt, chịu muối

Vi sinh vật luôn phải chịu tác động bởi các yếu tố môi trường, vì vậy, khảo sát khả năng phát triển ở các điều kiện nhiệt độ (25, 30, 35, 40, 45, 50°C) và nồng độ muối khác nhau (0,5; 3;

7; 9; 11; 12%) của các chủng xạ khuẩn được thực hiện. Các chủng đều sinh trưởng tốt nhất ở 30°C, có khả năng chịu mặn, phát triển tốt nhất ở nồng độ muối từ 5-7% (Bảng 5).

Vi sinh vật chịu muối có thể nhóm thành các nhóm theo nhu cầu về muối của chúng, các sinh vật chịu nồng độ muối thấp có thể sinh trưởng trong môi trường nước biển với nồng độ muối từ 2-3%; các sinh vật thuộc nhóm chịu muối trung bình có thể sinh trưởng tại nồng độ NaCl từ 5-20% (w/v). Nhóm sinh vật chịu nồng độ muối cao có thể sinh trưởng tại nồng độ muối bão hòa, không sinh trưởng khi nồng độ NaCl thấp hơn 12% (Larsen, 1986). Các chủng xạ khuẩn khảo sát chịu nồng độ muối đến 7% nên có thể xếp vào nhóm chịu muối trung bình. Đặc biệt, chủng S28 và S132 có khả năng chịu nhiệt ở 45°C, chủng S233 có khả năng chịu nhiệt ở 40°C.

#### - Khả năng sinh enzyme ngoại bào

Xạ khuẩn có khả năng tiết enzyme ngoại bào để phân giải các hợp chất hữu cơ phức tạp thành các chất hữu cơ đơn giản, hấp thụ được trong môi trường sống. Các vi sinh vật có khả năng sinh enzyme không giống nhau và ngay cả những chủng trong cùng một loài cũng không có hoạt tính như nhau. Kiểm tra khả năng tiết enzyme ngoại bào của các chủng xạ khuẩn nghiên cứu cho thấy, chủng S28 và S36 có khả năng sinh cả 3 loại enzyme ngoại bào nhưng mạnh

**Bảng 4. Khả năng đồng hóa các nguồn carbon của các chủng xạ khuẩn triển vọng**

Môi trường	Khả năng đồng hóa các nguồn carbon					
	S27	S28	S257	S30	S233	S136
Glucose	+++	+++	++++	+++	+++	+++
Saccharose	+++	+++	++++	+++	++++	+++
Fructose	++	+++	++++	++	++++	+++
Lactose	+++	++	+++	+++	+++	++
Manitol	++	+++	++++	++	+++	+++
ĐC âm (I <sub>9</sub> )	+	-	+	+	+	-

Ghi chú: ++++: Sinh trưởng rất tốt; +++: Sinh trưởng tốt; ++: Sinh trưởng yếu; +: Sinh trưởng rất yếu; -: Không sinh trưởng

**Bảng 5. Khả năng chịu muối của các chủng xạ khuẩn**

Xạ khuẩn	Nồng độ muối (%)						
	0.5	3	5	7	9	12	0
S27	+++	+++	++	++	-	-	+++
S28	++	+++	+++	+++	-	+	++
S257	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++++
S30	+++	++	+++	++	-	+	+++
S233	+++	+++	+++	+++	-	-	+++
S136	++	++	+++	+++	-	+	++

Ghi chú: ++++: Sinh trưởng rất tốt; +++: Sinh trưởng tốt; ++: Sinh trưởng bình thường; +: Sinh trưởng yếu; -: Không sinh trưởng.

nhất là protease. Chủng S30 sinh amylase và cellulase với hoạt tính cao nhưng không sinh protease ngoại bào. Chủng S30, S27 và S28 đều có khả năng sinh endoglucanase.

**- Khả năng tiết IAA**

Các chủng xạ khuẩn khảo sát đều có khả năng tiết IAA, trong đó chủng S27, S28, S30, S136, S233, S257 có khả năng tiết IAA với lượng tương đối cao lần lượt là 5,2; 55,5; 16,0; 24,8; 7,6; 6,2 µg/ml. Theo Khamna (2009, 2010) ghi nhận trên 36 chủng xạ khuẩn đều có tiết IAA với hàm lượng biến động trong khoảng 5,47-143,95 µg/ml, trong đó chủng *Streptomyces viridis* CMU-H009 có khả năng tiết IAA cao nhất 143,95 µg/ml, giúp tăng tỷ lệ nảy mầm cũng như chiều dài rễ của bắp và đậu được xử lý.

**3.2.3. Kết quả giải trình tự gen 16S một số chủng vi sinh vật triển vọng**

Mẫu S27: *Streptomyces cavourensis*

TCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAA  
CACATGCAAGTTCGAACGATGAAGCCTTTCGG  
GGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA  
CGTGGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAA  
GCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATAAT  
ACTTCTGCCTGCATGGGTGGGGTTGAAAGC  
TCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGCCTA  
TCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAA  
GGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGC  
GACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC  
CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA  
TATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGC  
GACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGG  
TTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGC  
AAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGG  
CTAACTACGTGCCAGCAGCCCGCGG

Mẫu S257: *Streptomyces xiamenensis*

CTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGT  
GCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGAACC  
GGTTTCGGCCGGGGATTAGTGGCGAACGGG  
TGAGTAACACGCTGGGCAATCTGCCCTGCAC



TCTGGGATAAGCCCGGAAACTGGGTCTAA  
TACCGGATACGACACATGAGCGCATGCTCG  
TGTGTGAAAAGTTCCGGCGGTGCAGGATGA  
GCCCGCGCCTATCAGTTTGTGGTGGGGT  
AGTGGCCTACCAAGACGACGACGGGTAGCC  
GGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGA  
CTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG  
CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGA  
AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGA  
TGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAG  
CAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGC  
AGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGC

Mẫu S28: *Streptomyces viriabilis*

GCACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGC  
AGGTACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTGCTG  
AAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATC  
CCTCACGCGCGCTCGCTGCATCAGGCTTTC  
GCCATTGTGCAATATTCCCACTGCTGCCT  
CCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCC  
CAGTGTGGCCGGTTCGCCCTCTCAGGCCGGC  
TACCCGTCGTCGCTTGGTGAGCCATTACCT  
CACCAACAAGCTGATAGGCCGCGGGCTCAT  
CCTGCACCGCCGAGCTTTCGAACCGCTTG  
GATGCCAAGCGGGTCAATATCCGGTATTA  
GACCCCGTTTCCAGGGCTTGTCCAGAGTG  
CAGGGCAGATTGCCACGTGTTACTCACCC  
GTTTCGCCACTAATCCCTCCGAAGGAGGTT  
CATCGTTGACTTGCATGTGTTAAGCACGCC  
GCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGG

Mẫu S233: *Streptomyces iakyrus*

GATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCG  
GCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATG  
AACCCTTCGGTGGGATTAGTGGCGAACG  
GGTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTGC  
ACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCT  
AATACCGGATACTGATCCTTCTGGGCATCCA  
GAGGGTTCGAAAGCTCCGGCGGTGCAGGAT  
GAGCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGAG  
GTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAG  
CCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGG  
GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA  
GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGC  
GCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGG  
GATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTC  
AGCAGGGAAGAAGCGAGAGTGACGGTACCT  
GCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGC

Mẫu S136: *Streptomyces scopuliridis*

ATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGG  
CGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGATGA  
AGCCTTTCGGGGTGGATTAGTGGCGAACGG  
GTGAGTAACACGTGGGCAATCTGCCCTTCA  
CTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTA  
ATACCGGATAATACTTCTGCCTGCATGGGTG  
GGGGTTGAAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGA  
GCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGT  
AATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCC  
GGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGA  
CTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG  
CAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGA  
AAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGA  
TGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAG  
CAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGC  
AGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGC

Mẫu S30: *Streptomyces fulvissimus*

CACGTAGTTAGCCGGCGCTTCTTCTGCA  
GGTACCGTCACTTGCCTTCTTCCCTGCTGA  
AAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCC  
CTCACGCGCGCTCGCTGCATCAGGCTTTCG  
CCATTGTGCAATATTCCCACTGCTGCCTC  
CCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCC  
AGTGTGGCCGGTTCGCCCTCTCAGGCCGGCT  
ACCCGTCGTCCTTGGTAGGCCATTACCCC  
ACCAACAAGCTGATAGGCCGCGGGCTCATC  
CTTACCGCCGAGCTTTCACCCCCACCCA  
TGCAGGCAGAAGTATTATCCGGTATTAGACC  
CCGTTTCCAGGGCTTGTCCAGAGTGAAGG  
GCAGATTGCCACGTGTTACTCACCCGTTTCG  
CCACTAATCCACCCGAAAGGCTTCATCGTT  
CGACTTGCATGTGTTAAGCACGCCGCCAGC  
GTTTCGTCCTGAGCCAGGA

#### 4. KẾT LUẬN

Trong hệ sinh thái cây lúa nước vùng ĐBSCL, nguồn vi sinh vật có ích rất đa dạng và có hiệu quả ức chế nấm *P. grisea* gây bệnh đạo ôn rất tốt.

Một số chủng có hiệu quả ức chế nấm gây bệnh đạo ôn đã được ghi nhận và định danh bao gồm: *Streptomyces cavourensis* S27, *Streptomyces xiamenensis* S257, *Streptomyces viriabilis* S28, *Streptomyces iakyrus* S233,

*Streptomyces scopuliridis* S136, *Streptomyces fulvissimus* S30 đây là nguồn vi sinh vật bản địa cần được tiếp tục khai thác phát triển thành các dạng chế phẩm sinh học phục vụ cho sản xuất.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- El-Tarabily, K.A., Soliman M.H., Nassar A.H., Al-Hassani H.A. and Sivasithamparam K. (2000). Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and Actinomycetes. *Plant Pathol.*, 49: 573-583.
- Fernando, W.G.F., Nakkeeran S. and Zhang Y. (2005). Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. *In: Siddiqui, Z.A.(Ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, Spinger, p. 67-109.
- Glickmann E., Dessaux Y. (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 793-796.
- Khamana, S., Yokota A. and S. Lumyyong S. (2009). Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizospher soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3acetic acid and siderophore productio. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(4): 649-655.
- Khamana, S., Yokota A., Peberdy J.F. and Lumyyong S. (2010). Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces* sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizospher soils. *EurAsia Journal BioSciences*, 4: 23-32.
- Kubicek C.P and Harman G.E. (1998). *Trichoderma and Gliocladium*. Basic Biology, Taxonomy and Genetics, Taylor & Francis, London. Vol. 1. 278 p.
- Larsen, H. (1986). Halophilic and halotolerant microorganism: an overview historical perspective. *FEMS Microbiol. Biotechnol.*, 24: 2235-2241.
- Lee, J.Y. and Hwang B.K. (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.*, 48: 407-417.
- Oskay, M., Tamer U.A. and Azer C. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soil of Turkey. *Afr. J. Biotechnol.*, 3: 441-446.
- Ou S.H. 1985. Fungus disease-foliage diseases. *Rice diseases*. 92: 109-201.
- Shahidi Bonjar, G.H. (2003). *In vitro* monitoring of antibacterial properties of soil *Streptomyces*. Research project report. Department of Plant Protection, College of Agriculture, Bahonar University of Kerman, Iran.
- Siddiqui Z.A. (2006). *PGPR: Biocontrol and biofertilization*. Netherlands: Springer. 318 pp.
- Tresner, H.D. and Buckus E.J. (1963). System of color wheels for *Streptomyces* taxonomy. *Appl. Microbiol.*, 11: 335-338.
- Zarandi, M.E., Shahidi Bonjar G.H. and Dehkaei F.P. (2013). *In vitro* antagonistic antifungal-activity of *Streptomyces* isolate 339 against *Magnaporthe oryzae*. *American Journal of Agricultural and Biological sciences*, 8(3): 212-216.