

Phân lập, tuyển chọn chủng *Bacillus* có khả năng phòng trừ sâu đầu đen (*Opisina arenosella* Walker) gây hại trên cây dừa tại tỉnh Bến Tre

Đỗ Thị Mai Trinh^{1*}, Lê Thanh Bình¹, Hồ Thị Nguyệt¹, Nguyễn Đào Thanh Hương¹,
Nguyễn Thị Liên¹, Đặng Ngọc Tân², Trương Minh Ngọc¹

¹Chi nhánh Viện Ứng dụng Công nghệ tại TP Hồ Chí Minh, 366A Trường Chinh, phường 13, quận Tân Bình, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường Đại học Bách khoa - Đại học Quốc gia TP Hồ Chí Minh, 268 Lý Thường Kiệt, phường 14, quận 10, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 31/7/2024; ngày chuyển phân biện 8/8/2024; ngày nhận phân biện 26/8/2024; ngày chấp nhận đăng 30/8/2024

Tóm tắt:

Tỉnh Bến Tre có diện tích trồng dừa lớn nhất cả nước, hơn 79.000 hecta. Tuy nhiên, loài cây này đang bị gây hại bởi sâu đầu đen (*Opisina arenosella* Walker), ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất cây dừa tại tỉnh Bến Tre. Trong nghiên cứu này, từ 32 mẫu đất được thu thập ở khu vực đất vườn dừa và đất không canh tác lâu năm tại tỉnh Bến Tre đã phân lập được 96 chủng vi khuẩn *Bacillus*, và đã sàng lọc được 30 chủng sinh chất hoạt động bề mặt sinh học. Trong đó, chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10 và *Bacillus velezensis* D13 có khả năng gây chết sâu đầu đen với hiệu lực lần lượt là 100,00 và 86,67% sau 24 giờ theo dõi. Phân tích hàm lượng surfactin bằng phương pháp sắc ký lỏng khối phổ UPLC-MS/MS cho thấy, cả hai chủng vi khuẩn *Bacillus* đều có sự xuất hiện của hoạt chất surfactin, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10 đạt hàm lượng surfactin là 0,60 mg/g và chủng *Bacillus velezensis* D13 đạt hàm lượng surfactin là 0,42 mg/g.

Từ khóa: *Bacillus*, cây dừa, chất hoạt động bề mặt sinh học, *Opisina arenosella* Walker, sâu đầu đen, surfactin.

Chỉ số phân loại: 1.6, 4.1, 4.6

Isolation and selection of active *Bacillus* strains that have the ability to control black-headed insect (*Opisina arenosella* Walker) causing damage to coconut trees in Ben Tre province

Thi Mai Trinh Do^{1*}, Thanh Binh Le¹, Thi Nguyet Ho¹, Dao Thanh Huong Nguyen¹,
Thi Lien Nguyen¹, Ngoc Tan Dang², Minh Ngoc Truong¹

¹Branch of National Center for Technological Progress in Ho Chi Minh City, 366A Truong Chinh Street, Ward 13, Tan Binh District, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Ho Chi Minh City University of Technology, Vietnam National University - Ho Chi Minh City, 268 Ly Thuong Kiet Street, Ward 14, District 10, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 31 July 2024; revised 26 August 2024; accepted 30 August 2024

Abstract:

Ben Tre province has the largest coconut growing area in the country, more than 79,000 hectares. However, this tree species is being damaged by the black-headed caterpillar (*Opisina arenosella* Walker), seriously affecting coconut tree productivity in Ben Tre province. In this study, from 32 soil samples collected in coconut garden areas and perennial uncultivated land in Ben Tre province, 96 *Bacillus* spp. strains were isolated and 30 biosurfactant strains were screened. Among them, the bacterial strain *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10 and *Bacillus velezensis* D13 are capable of killing black-headed worms with an effectiveness of 100.00% and 86.67%, respectively, after 24 hours of monitoring. Analysis of surfactin content using ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS) showed that both strains of *Bacillus* spp. all have the presence of the active ingredient surfactin, strain *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10 reached a surfactin content of 0.60 mg/g and strain *Bacillus velezensis* D13 reached a surfactin content of 0.42 mg/g.

Keywords: *Bacillus*, biosurfactant, black-headed caterpillar, coconut tree, *Opisina arenosella* Walker, surfactin.

Classification numbers: 1.6, 4.1, 4.6

*Tác giả liên hệ: Email: dothimaitrinh24@gmail.com

1. Đặt vấn đề

Tỉnh Bến Tre có diện tích trồng dừa lớn nhất cả nước, tính đến hết quý I/2024, tổng diện tích dừa toàn tỉnh khoảng 79.078 hecta, tăng 1,36% so với cùng kỳ. Tuy nhiên, nhiều vườn dừa ở tỉnh Bến Tre đang bị thiệt hại rất nặng bởi sâu đầu đen (*Opisina arenosella* Walker), từ đầu năm đến nay tổng diện tích vườn dừa bị nhiễm sâu đầu đen trên 388 ha. Lũy kế diện tích nhiễm sâu đầu đen trên vườn dừa từ trước đến nay trên 2.680 ha [1].

Sâu đầu đen có tên khoa học là *Opisina arenosella* Walker là loài sâu bản địa và có thể được tìm thấy rộng rãi ở khu vực Nam Á và Đông Nam Á [2]. Sâu ẩn mình dưới bề mặt lá để ăn chất diệp lục của lá và tạo thành màng tơ ở mặt dưới của lá, dẫn đến việc phun thuốc bảo vệ thực vật không đạt hiệu quả [3]. Bên cạnh đó, việc dùng thuốc bảo vệ thực vật nguồn gốc hoá học còn ảnh hưởng đến sức khỏe con người, gây hiện tượng kháng thuốc, ảnh hưởng đến môi trường, gây mất cân bằng sinh thái.

Ngày nay, việc sử dụng các chủng vi sinh vật có khả năng diệt sâu được xem là một biện pháp hiệu quả và có tiềm năng trong tương lai. Trong đó, những loài vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học có tác dụng kiểm soát côn trùng hoặc đối kháng với một số nấm bệnh, vi khuẩn gây hại cho cây trồng. Các chất hoạt động bề mặt sinh học được hình thành bởi một số lipopeptide và polyketide bao gồm iturin, fengycin, surfactin, bacillomycin, bacillaene, macrolactin và difficidin. Trong tất cả các lipopeptide, surfactin có hoạt tính diệt côn trùng mạnh nhất có thể ảnh hưởng đến các bộ khác nhau như bộ cánh đều Homoptera; bộ cánh vảy Lepidoptera, và bộ ruồi Diptera [4-8]. Một số nghiên cứu ngoài nước cũng đã công bố một số loài vi khuẩn *Bacillus* sinh tổng hợp chất surfactin đều có tác dụng kiểm soát sâu hại cây trồng. Theo nghiên cứu của L. Assié và cs (2002) [7] cho thấy, hoạt chất surfactin C14 và C15 được chiết xuất từ chủng *Bacillus subtilis* S499 với nồng độ 100 ppm đã gây tỷ lệ tử vong ở ruồi đục quả trưởng thành tương ứng là 85,4 và 92,6% sau một ngày tiếp xúc; khả năng ức chế xuất hiện ruồi con F1 của surfactin C14 và C15 lần lượt là 79,8 và 91,3%. Hoạt chất surfactin được chiết xuất từ chủng *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (VCRC B471), có hiệu quả diệt muỗi *Anopheles stephensi* ở giai đoạn ấu trùng và nhộng [8].

Do vậy, mục tiêu nghiên cứu này là phân lập và tuyển chọn được một số chủng vi khuẩn *Bacillus* sinh hoạt chất surfactin có khả năng gây chết sâu đầu đen. Kết quả nghiên cứu này là tiền đề để tạo chế phẩm sinh học phòng trị sâu đầu đen gây hại cây dừa tại tỉnh Bến Tre.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

- Sâu đầu đen được thu thập tại vườn dừa tại tỉnh Bến Tre.
- 32 mẫu đất được thu thập ở khu vực đất vườn dừa và đất không canh tác lâu năm tại tỉnh Bến Tre. Dùng túi nilon khử trùng sẵn thu mẫu đất ở những gốc dừa phát triển khỏe mạnh trong những

vườn dừa bị dịch hại sâu đầu đen và đất thuộc vùng đất tự nhiên trên địa bàn tỉnh Bến Tre, vị trí lấy mẫu: 0-10 cm lớp đất bề mặt dưới lớp lá mục. Ngoài túi ghi rõ các thông tin: mẫu, ngày lấy mẫu, nơi lấy mẫu. Mẫu được mang về phòng thí nghiệm, bảo quản trong điều kiện lạnh 4°C cho đến khi sử dụng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phân lập các chủng vi khuẩn *Bacillus* từ mẫu đất thu thập được tại tỉnh Bến Tre: Cân 10 g đất mẫu cho vào bình thủy tinh chứa 90 g nước cất vô trùng (thực hiện trong tủ cấy vô trùng) lắc đều. Sau đó, bình thủy tinh chứa mẫu đất được đun cách thủy ở nhiệt độ 80°C trong 15 phút để loại bỏ tế bào sinh dưỡng chỉ giữ lại những chủng có sinh bào tử để chọn lọc và làm thuần *Bacillus*. Phân lập bằng phương pháp pha loãng và cấy trái trên đĩa petri có chứa môi trường Luria Bertani (LB) agar, nuôi cấy 37°C trong vòng 24 giờ. Chọn khuẩn lạc đặc trưng *Bacillus* và cấy chuyển nhiều lần để làm thuần. Các chủng thuần được bảo quản ở nhiệt độ -80°C. Các chủng vi khuẩn được định danh sơ bộ dựa trên đặc điểm hình thái (khuẩn lạc và tế bào), đặc điểm sinh lý, sinh hóa [9].

Sàng lọc các chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng sinh chất hoạt động bề mặt sinh học: Định tính khả năng tạo chất hoạt động bề mặt sinh học được thử nghiệm bằng cách sử dụng môi trường Nutrient Broth (NB). Các chủng *Bacillus* được nuôi cấy trong bình nuôi cấy có chứa 20 ml NB và được ủ trong 48 giờ mà không cần lắc, nhiệt độ 37°C. Sự hình thành màng sinh học trên bề mặt của môi trường là dấu hiệu của quá trình sản xuất chất hoạt động bề mặt sinh học [10].

Đánh giá khả năng phòng trị sâu đầu đen của các chủng vi khuẩn *Bacillus* riêng lẻ ở quy mô phòng thí nghiệm: Bỏ sung 5 ml dịch tăng sinh vi khuẩn *Bacillus* đạt mật độ 10⁵ CFU/ml (OD 600 nm=0,1) vào 95 ml môi trường LB lỏng và được nuôi cấy lắc (250 rpm) ở 37°C trong 48 giờ. Sau 48 giờ dịch lên men được thu nhận bằng ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong 15 phút [11].

Sâu đầu đen 2-5 ngày tuổi được khử trùng sơ bộ bằng nước cất vô trùng và phân vào các hộp nhựa, mỗi hộp 15 con, các hộp nhựa có chứa lá dừa tươi và sâu đầu đen, dịch nuôi cấy các chủng vi sinh đã loại tế bào được phun lên bề mặt sâu đầu đen với thể tích 2,0 ml/hộp. Mẫu được để ở điều kiện nhiệt độ 28-30°C và theo dõi tình trạng sâu đầu đen sau 6, 12, 18, 24 giờ. Mỗi hộp nhựa tương ứng với 01 nghiệm thức thí nghiệm (01 chủng vi khuẩn), mỗi nghiệm thức được lặp lại 03 lần. Thí nghiệm đối chứng được xử lý bằng nước cất vô trùng.

Hiệu lực tiêu diệt sâu đầu đen của chủng vi nấm được tính theo công thức W. Abbott (1925) [12]:

$$E(\%) = \frac{C - T}{C} \times 100$$

trong đó: E: hiệu lực của dịch chiết tính theo (%); C: số côn trùng sống ở nghiệm thức đối chứng; T: số côn trùng sống ở nghiệm thức có xử lý vi khuẩn.

Định danh chủng vi khuẩn đã được tuyển chọn: Các chủng vi khuẩn có khả năng phòng trị sâu đầu đen được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử. Các mẫu DNA chiết xuất từ vi khuẩn được sử dụng để khuếch đại trình tự gen 16S rRNA bằng PCR với cặp mồi 27F: 5'-GAGAGTTTGATCCTGGGCTCAG-3 và 1492R: 5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3. Chu trình phản ứng PCR gồm: Biến tính ban đầu ở 94°C trong 4 phút, 30 chu kỳ 94°C trong 40 giây, bắt cặp 56°C trong 50 giây, kéo dài 72°C trong 100 giây và bước cuối cùng ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit thương mại và được giải trình tự bằng phương pháp Sanger [13]. Trình tự gen 16S rRNA được phân tích so sánh với dữ liệu có trên GenBank sử dụng công cụ BLAST.

Xác định hoạt chất surfactin có trong chủng vi khuẩn tuyển chọn: Mẫu dịch vi khuẩn *Bacillus* tuyển chọn sau khi tăng sinh trong 48 giờ, nhiệt độ 37°C được ly tâm ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong 15 phút để thu phần dịch nổi không có tế bào (CFS). Một phần của CFS được axit hóa đến pH 2,0 bằng HCl 6 N trong các ống nhựa đã được cân trước, để qua đêm ở 4°C, sau đó ly tâm ở 6.000 vòng/phút trong 15 phút. Sau khi ly tâm, phần nổi phía trên được loại bỏ và kết tủa được hòa tan trong metanol nguyên chất tỷ lệ (1:10) (w/v). Dịch chiết metanol được lọc qua giấy lọc whatman (11µm), sau đó làm bay hơi đến cạn bằng thiết bị cô quay chân không. Cặn được hòa tan trong metanol và được đo bằng hệ thống sắc ký lỏng khối phổ UPLC-MS/MS. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần, mỗi lần tương ứng 01 mẫu [14].

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Dùng phần mềm excel để xử lý các số liệu. Các số liệu ghi nhận được xử lý thống kê bằng phương pháp One-Way ANOVA trên phần mềm Statgraphics phiên bản 19.

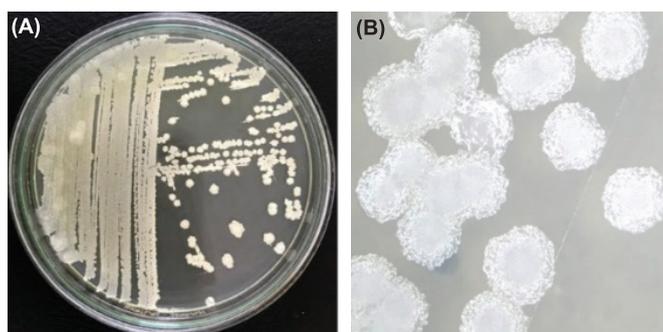
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả phân lập và sàng lọc các chủng vi khuẩn có tiềm năng phòng trị sâu đầu đen hại cây dưa

Phân lập và làm thuần: Sau khi phân lập 32 mẫu đất trồng dưa và đất không canh tác lâu năm lấy tại 16 điểm trên địa bàn tỉnh Bến Tre thu được 96 chủng vi khuẩn phân lập được có đặc điểm hình thái khuẩn lạc giống với vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* như: khuẩn lạc tròn, có các màu như trắng ngà, trắng sữa, trắng đục, vàng, vàng ngà, xám, rìa tròn đều, lượn sóng hoặc răng cưa (hình 1). Trong 96 chủng vi khuẩn phân lập được có 30 mẫu có khuẩn lạc màu trắng ngà (chiếm 31,25%), 15 mẫu có khuẩn lạc màu trắng sữa (chiếm 15,63%), 22 mẫu có khuẩn lạc màu trắng đục (chiếm 22,92%), 10 mẫu có khuẩn lạc màu vàng (chiếm 10,42%), 17 mẫu có khuẩn lạc màu vàng ngà (chiếm 17,71%) và 2 mẫu có khuẩn lạc màu xám (chiếm 2,08%). Mật độ vi khuẩn *Bacillus* phân lập trong hai nhóm đất có sự chênh lệch lớn (đất canh tác dưa: $1,8 \times 10^3$ - $2,7 \times 10^5$ CFU/g đất; đất không canh tác lâu năm: $2,1 \times 10^5$ - $5,6 \times 10^7$ CFU/g đất) (bảng 1).

Bảng 1. Mật độ vi khuẩn trong mẫu đất thu nhận tại tỉnh Bến Tre.

Thứ tự	Địa điểm lấy mẫu	Loại đất	Mật độ vi khuẩn (CFU/g đất)	Số chủng phân lập được
1	Xã An Ngãi Trung, Ba Tri 10°04'28.3"N 106°31'43.9"E	Đất trồng dưa	$1,8 \times 10^3$	3
2	Xã An Ngãi Trung, Ba Tri 10°04'31.6"N 106°31'35.4"E	Đất không canh tác lâu năm	$2,1 \times 10^5$	6
3	Xã Phú Phụng, Chợ Lách 10°16'24.2"N 106°02'45.9"E	Đất trồng dưa	$2,6 \times 10^3$	4
4	Xã Vĩnh Thành, Chợ Lách 10°12'03.4"N 106°13'11.7"E	Đất không canh tác lâu năm	$3,7 \times 10^6$	7
5	Xã Phú Đức, Châu Thành 10°17'39.9"N 106°18'47.0"E	Đất trồng dưa	$5,9 \times 10^4$	6
6	Xã Tường Đa, Châu Thành 10°17'39.9"N 106°18'47.0"E	Đất không canh tác lâu năm	$4,1 \times 10^5$	8
7	Xã Thanh An, Mỏ Cày Bắc 10°10'54.3"N 106°18'06.5"E	Đất trồng dưa	$5,2 \times 10^3$	5
8	Xã Phước Mỹ Trung, Mỏ Cày Bắc 10°11'02.1"N 106°16'07.2"E	Đất không canh tác lâu năm	$6,4 \times 10^6$	6
9	Xã Thuận Điền, Giồng Trôm 10°11'05.2"N 106°24'40.7"E	Đất trồng dưa	$2,7 \times 10^5$	8
10	Xã Phước Long, Giồng Trôm 10°08'48.0"N 106°24'50.8"E	Đất không canh tác lâu năm	$4,9 \times 10^7$	8
11	Xã Lộc Thuận, Bình Đại 10°13'11.8"N 106°34'25.6"E	Đất trồng dưa	$7,1 \times 10^4$	7
12	Xã Thới Lai, Bình Đại 10°12'58.0"N 106°31'50.9"E	Đất không canh tác lâu năm	$3,9 \times 10^7$	8
13	Xã An Điền, Thạnh Phú 9°56'00.0"N 106°35'17.5"E	Đất trồng dưa	$7,6 \times 10^4$	3
14	Xã Bình Thạnh, Thạnh Phú 9°54'53.9"N 106°30'37.6"E	Đất không canh tác lâu năm	$5,6 \times 10^7$	6
15	Xã Bình Phú, TP. Bến Tre 10°14'25.2"N 106°21'12.4"E	Đất trồng dưa	$3,6 \times 10^3$	4
16	Xã Mỹ Thạnh, TP. Bến Tre 10°11'53.7"N 106°24'48.1"E	Đất không canh tác lâu năm	$4,5 \times 10^6$	7
Tổng cộng				96



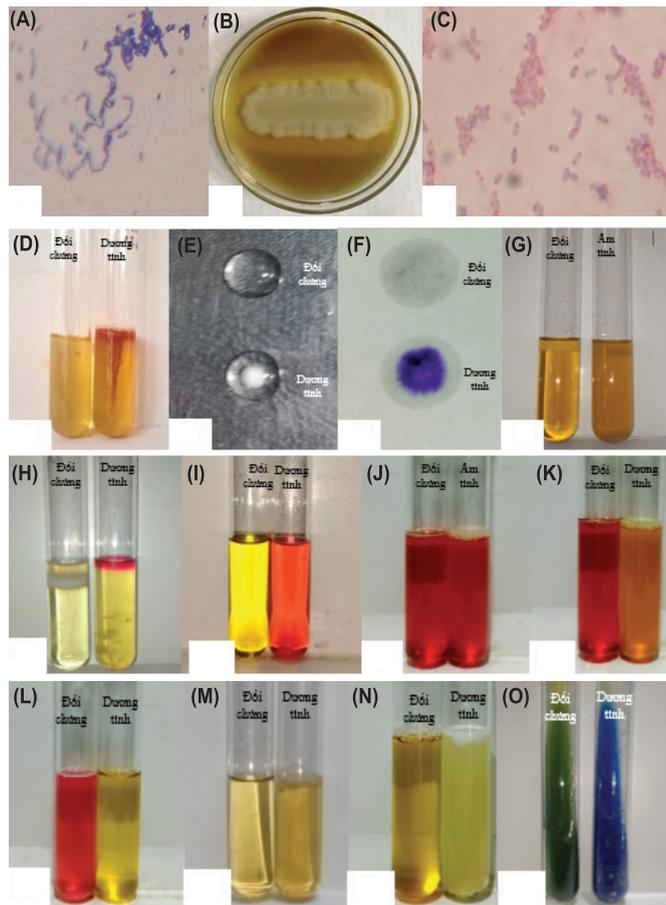
Hình 1. Khuẩn lạc chủng vi khuẩn *Bacillus* B9.10. (A) Trên môi trường LB-Agar sau 48 giờ nuôi cấy; **(B)** Đại thể ở vật kính 10X.

Để xác định các chủng có khả năng là *Bacillus*, 96 chủng vi khuẩn sau khi làm thuần được kiểm tra các đặc tính sinh hóa. Kết

Bảng 2. Kết quả thử nghiệm sinh hóa của các chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập từ mẫu đất.

Thứ tự	Thử nghiệm sinh hóa	Các chủng vi khuẩn phân lập
1	Gram	+
2	Sinh nội bào tử (endospore)	+
3	Voges-Proskauer	+
4	Methyl Red	+
5	Sinh oxidase	+
6	Sinh catalase	+
7	Sinh indole	-
8	Sinh citrate	+
9	Lên men đường Lactose	-
10	Lên men đường Saccharose	+
11	Lên men đường Maltose	+
12	Tăng trưởng trong môi trường NaCl 7%	+
13	Phát triển ở 50°C	+
14	Khả năng di động	+
15	Phân giải tinh bột	+

Ghi chú: (+): dương tính; (-): âm tính.



Hình 2. Kết quả kiểm tra sinh hóa của chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập từ mẫu đất. (A) Nhuộm gram; **(B)** Phân giải tinh bột; **(C)** Khả năng hình thành nội bào tử; **(D)** Khả năng di động; **(E)** Sinh catalase; **(F)** Sinh oxidase; **(G)** Sinh indole; **(H)** Voges-Proskauer; **(I)** Methyl Red; **(J)** Lên men đường lactose; **(K)** Lên men đường maltose; **(L)** Lên men đường saccharose; **(M)** Sinh trưởng ở 50°C; **(N)** Sinh trưởng trong môi trường chứa 7% NaCl; **(O)** Sinh citrate.

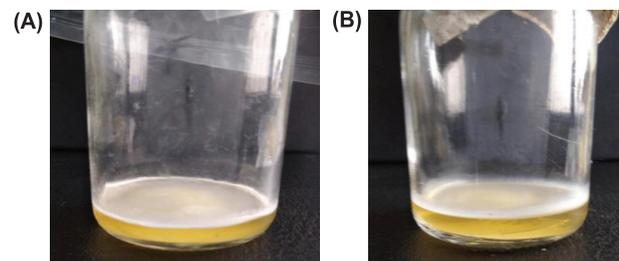
qua ở bảng 2 cho thấy, 96 chủng vi khuẩn bắt màu tím chứng tỏ các chủng vi khuẩn gram dương, có khả năng sinh bào tử, có enzyme catalase giúp phân giải H₂O₂ thành H₂O và O₂, xuất hiện phức hợp màu tím hoặc xanh đậm ở thử nghiệm oxidase, có khả năng di động trong môi trường thạch mềm có 50 ppm TTC (Triphenyl tetrazolium chloride), các chủng đều có khả năng sử dụng saccharose và maltose làm nguồn carbon đồng thời không thể lên men đường lactose. Trong thử nghiệm Voges-Proskauer và các thử nghiệm còn lại cho kết quả các chủng vi khuẩn đều có khả năng tạo ra acetoin trong môi trường glucose-phosphate, tăng trưởng tốt ở nhiệt độ 50°C, chịu được nồng độ muối 7% và phân hủy tinh bột đồng thời biến dưỡng citrate.

Dựa theo khóa phân loại Bergey cho thấy 96 chủng vi khuẩn phân lập từ các mẫu đất có đặc điểm thuộc chi vi khuẩn *Bacillus* (hình 2) [15]. Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu đã công bố về đặc điểm hình thái và đặc tính sinh hóa của các chủng vi khuẩn *Bacillus* [16, 17].

Khả năng sinh tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học của các chủng Bacillus: Toàn bộ 96 chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập được tăng sinh trong môi trường NB lỏng không lắc ở nhiệt độ 37°C trong vòng 48 giờ để đánh giá khả năng sinh tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học. Kết quả cho thấy, có 30 chủng vi khuẩn *Bacillus* có xuất hiện lớp màng màu trắng đục trên bề mặt môi trường (hình 3, bảng 3) tương đồng với kết quả nghiên cứu của Y. Yanti và cs (2017) [10]. Do vậy, có thể kết luận 30 chủng vi khuẩn này có khả năng sinh tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học.

Bảng 3. Các chủng *Bacillus* phân lập từ mẫu đất có khả năng sinh tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học.

Thứ tự	Chủng	Thứ tự	Chủng	Thứ tự	Chủng
1	B2.1	11	D2.2	21	D12.1
2	B9.9	12	D3	22	D10
3	B9.10	13	D4.1	23	D13
4	B14.3	14	D5.3	24	D14.2
5	B22.4	15	D6.2	25	D15
6	BA	16	D6.3	26	D18.5
7	BT411	17	D7	27	D22.4
8	BTN25	18	D8.10	28	D25.6
9	BTD	19	D11.10	29	D27.1
10	D1.1	20	D11.12	30	D32.5



Hình 3. Màng sinh học của chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập từ mẫu đất. (A) Chủng B9.10; **(B)** Chủng D13.

Do đó, từ kết quả sàng lọc khả năng sinh tổng hợp chất hoạt động bề mặt sinh học trong môi trường NB lỏng, chọn 30 chủng vi khuẩn *Bacillus* tiến hành thí nghiệm khảo sát khả năng gây chết sâu đầu đen gây hại trên cây dứa.

3.2. Nghiên cứu khả năng phòng trừ sâu đầu đen của các chủng vi khuẩn *Bacillus* riêng lẻ ở quy mô phòng thí nghiệm

Từ 30 chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng sinh tổng hợp chất hoạt động bề mặt, tiến hành đánh giá khả năng gây chết sâu đầu đen của các chủng vi khuẩn *Bacillus* riêng lẻ ở quy mô phòng thí nghiệm.

Bảng 4. Hiệu lực phòng trừ sâu đầu đen của 30 chủng *Bacillus* tăng sinh 48 giờ trên môi trường LB lỏng.

Thứ tự	Ký hiệu	Hiệu lực diệt sâu sau 8 giờ theo dõi (%)	Hiệu lực diệt sâu sau 16 giờ theo dõi (%)	Hiệu lực diệt sâu sau 24 giờ theo dõi (%)
1	DC	0,00	0,00	0,00
2	B2.1	26,67 ^{defg}	57,78 ^{hi}	66,67 ^{efg}
3	B9.9	37,78 ^{hijk}	60,00 ^{ij}	73,33 ^{fe}
4	B9.10	62,22^m	66,67^k	100,00ⁱ
5	B14.3	24,44 ^{def}	40,00 ^{de}	66,67 ^{efg}
6	B22.4	20,00 ^{bode}	60,00 ^{ij}	53,33 ^{bcd}
7	BA	22,22 ^{cde}	33,33 ^{cd}	62,22 ^{def}
8	BT411	11,11 ^{ab}	31,11 ^{bc}	60,00 ^{bode}
9	BTN25	13,33 ^{abc}	31,11 ^{bc}	53,33 ^{bcd}
10	BTD	6,67 ^a	24,47 ^{ab}	48,89 ^c
11	D1.1	17,78 ^{bcd}	33,33 ^{cd}	71,11 ^{efg}
12	D2.2	40,00 ^{jk}	53,33 ^{ghi}	73,33 ^{fe}
13	D3	37,78 ^{hijk}	51,11 ^{gh}	75,56 ^{gh}
14	D4.1	44,44 ^{kl}	68,89 ^k	75,56 ^{gh}
15	D5.3	51,11 ^l	60,00 ^{ij}	73,33 ^{fe}
16	D6.2	40,00 ^{ijk}	53,33 ^{ghi}	73,33 ^{fe}
17	D6.3	37,78 ^{hijk}	42,22 ^{ef}	51,11 ^{bc}
18	D7	35,56 ^{ghij}	42,22 ^{ef}	71,11 ^{efg}
19	D8.10	37,778 ^{hijk}	48,89 ^{fg}	66,67 ^{efg}
20	D10	44,44 ^{ijkl}	57,78 ^{hi}	73,33 ^{fe}
21	D11.10	42,22 ^{ijkl}	57,78 ^{hi}	64,44 ^{defg}
22	D11.12	33,33 ^{fghi}	48,89 ^{fg}	68,89 ^{efg}
23	D12.1	35,56 ^{ghil}	46,67 ^{fg}	66,67 ^{efg}
24	D13	37,78^{hijk}	46,67^{fg}	86,67ⁿ
25	D14.2	37,78 ^{hijk}	46,67 ^{fg}	73,33 ^{fe}
26	D15	26,67 ^{defg}	40,00 ^{de}	51,11 ^{bc}
27	D18.5	33,33 ^{fghi}	42,22 ^{ef}	51,11 ^{bc}
28	D22.4	4,44 ^a	22,22 ^a	33,33 ^a
29	D25.6	22,22 ^{cde}	31,11 ^{bc}	60,00 ^{bode}
30	D27.1	28,89 ^{efgh}	42,22 ^{ef}	64,44 ^{defg}
31	D32.5	26,67 ^{defg}	33,33 ^{cd}	48,89 ^b

abcdefghijkl: các ký tự theo hàng dọc khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa $p \leq 0,05$.

Dịch lên men của 30 chủng vi khuẩn *Bacillus* nuôi cấy trong môi trường LB lỏng được thu nhận sau tăng sinh 48 giờ, ly tâm với tốc độ 6.000 vòng/phút để loại bỏ sinh khối và được phun trực tiếp trên sâu đầu đen đã tuyển chọn. Kết quả phòng trừ sâu đầu đen thể hiện qua bảng 4 cho thấy, hiệu lực gây chết sâu đầu đen của các chủng vi khuẩn có sự khác biệt có ý nghĩa. Sau 8 giờ theo dõi, chỉ có duy nhất chủng B9.10 đạt hiệu lực gây chết sâu đầu đen trên 50%, các chủng vi khuẩn còn lại có hiệu lực diệt sâu dưới 50%. Sau 24 giờ theo dõi, hiệu lực gây chết sâu đầu đen đã tăng số lượng chủng đạt hiệu quả trên 50%, trong đó có 27/30 chủng, tỷ lệ gây chết từ 50,00% đến 100,00% chiếm 90% số chủng phân lập có khả năng sinh tổng hợp chất hoạt động bề mặt. Trong đó, có 2 chủng có hiệu lực gây chết sâu đầu đen mạnh trên 85% sau 24 giờ theo dõi là chủng *Bacillus* B9.10 và chủng *Bacillus* D13. Chủng *Bacillus* B9.10 đạt hiệu quả gây chết sâu đầu đen cao nhất là 100,00% và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại, tiếp đến là chủng *Bacillus* D13 có hiệu lực gây chết sâu đầu đen đạt 86,67% sau 24 giờ theo dõi (hình 4).



Hình 4. Kết quả thử nghiệm khả năng phòng trừ sâu đầu đen sau 48 giờ tăng sinh. (A) Chủng B9.10; (B) Chủng D13; (C) Đối chứng.

So sánh kết quả của các nghiên cứu khác cho thấy khả năng phòng trừ sâu đầu đen của các chủng vi khuẩn *Bacillus* có thể thông qua cơ chế tác động của chất hoạt động bề mặt sinh học được hình thành bởi một số lipopeptide và polyketide bao gồm surfactin, iturin, fengycin, bacylomycin, bacillaene, macrolactin, difficidin; được tổng hợp trong quá trình lên men vi khuẩn [8, 11, 18]. Một số nghiên cứu cho thấy các lipopeptide trực tiếp gây phá vỡ và phân hủy lớp biểu mô, gây tổn thương mô ruột giữa của ấu trùng, dẫn đến ấu trùng bị chết [19-21].

Như vậy, trong 30 chủng vi khuẩn *Bacillus*, chủng *Bacillus* B9.10 có hiệu lực phòng trừ sâu đầu đen cao nhất (100,00%), kể đến là chủng *Bacillus* D13 có hiệu lực phòng trừ sâu đầu đen đạt 86,67% sau 24 giờ theo dõi. Do đó, hai chủng *Bacillus* này được tuyển chọn và định danh bằng phương pháp sinh học phân tử.

3.3. Kết quả định danh

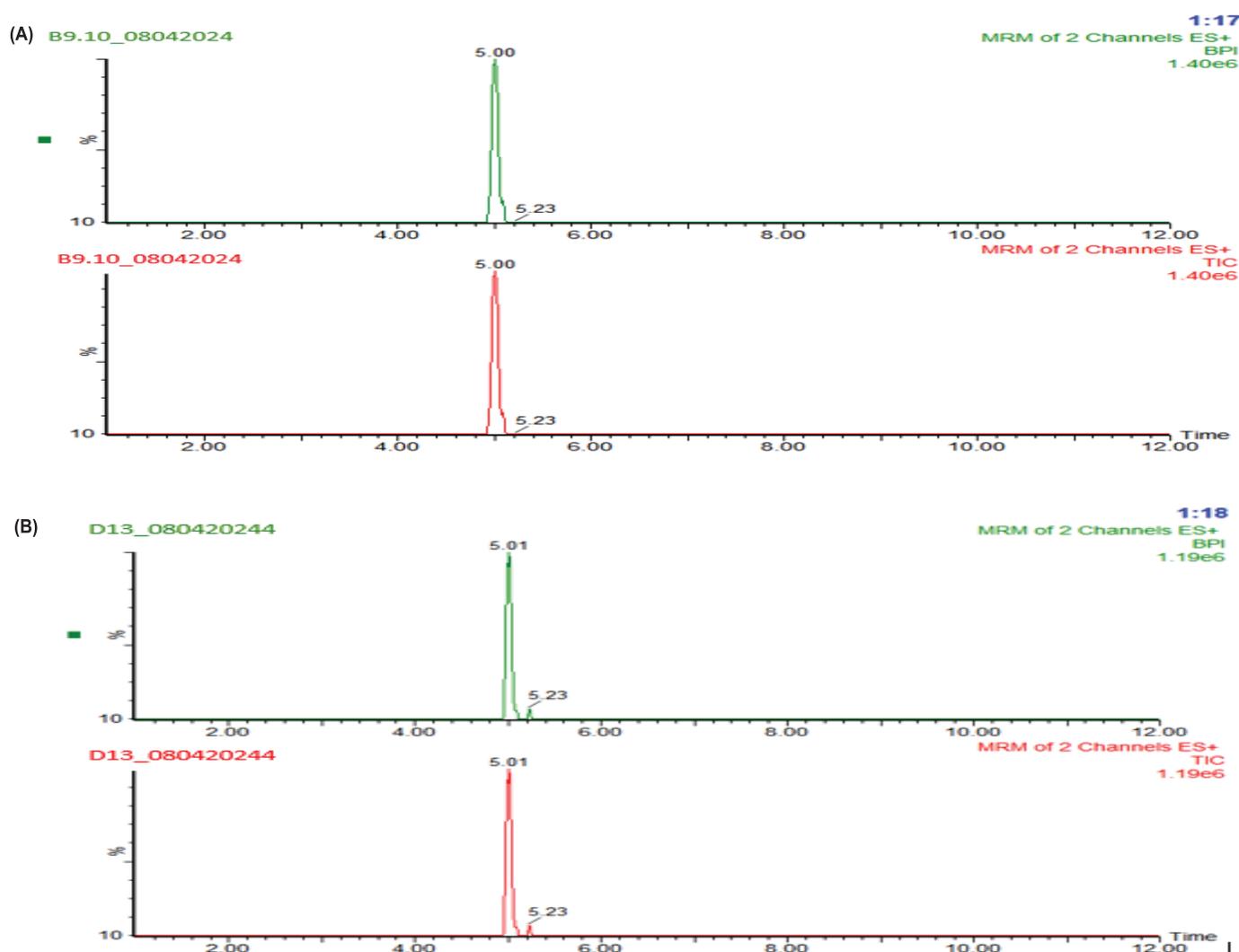
Kết quả điện di sản phẩm PCR cho thấy đã khuếch đại thành công đoạn gen có kích thước 1.500 bp ở 2 chủng vi khuẩn *Bacillus* B9.10 và D13. Để xác định danh pháp đến mức loài, các chủng vi khuẩn sau khi thực hiện phản ứng PCR sẽ tiến hành giải trình tự nucleotide ở đoạn gen 16S rRNA. Trình tự nucleotide của 02 chủng vi khuẩn được chọn sau khi giải mã tiến hành so sánh trình tự trên ngân hàng dữ liệu NCBI-Blast cho thấy chủng B9.10 là chủng *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* độ tương đồng 99,86% và chủng D13 là chủng *Bacillus velezensis* độ tương đồng 99,93%.

3.4. Phân tích hàm lượng surfactin có trong dịch vi khuẩn *Bacillus*

Mẫu dịch vi khuẩn *Bacillus* B9.10 và D13 được tăng sinh trong 48 giờ ở nhiệt độ 37°C, sau đó tiến hành chiết tách bằng dung môi và làm sạch, làm giàu qua cột chiết pha rắn SPE C18 trước

khi phân tích bằng hệ thống sắc ký lỏng ghép 02 lần khối phổ UPLC-MS/MS. Phân tích dữ liệu được thực hiện bằng cách so sánh với chất chuẩn. Đối với chủng *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10, surfactin được phát hiện ở thời gian lưu là 5,00 phút (hình 5A). Cấu hình tương tự thu được đối với chủng *Bacillus velezensis* D13 ở thời gian lưu là 5,01 phút (hình 5B).

Kết quả ở bảng 5 cho thấy, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10 và *Bacillus velezensis* D13 có khả năng diệt sâu đầu đen đạt trên 85% đều có sự xuất hiện hoạt chất surfactin. Trong đó, chủng *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10 có hàm lượng surfactin đạt 0,60 mg/g và chủng *Bacillus velezensis* D13 có hàm lượng surfactin đạt 0,42 mg/g. Kết quả này tương đồng với nhiều nghiên cứu đã chứng minh các chủng vi khuẩn *Bacillus* có sự hiện diện của chất hoạt động bề mặt sinh học, điển hình là hoạt chất surfactin đều có khả năng gây độc cho côn trùng [7, 8, 22].



Hình 5. Sắc ký đồ phân tích UPLC-MS/MS của dịch vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10 (A) và vi khuẩn *Bacillus velezensis* D13 (B) có chứa surfactin.

Bảng 5. Hàm lượng surfactin trong dịch vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10 và vi khuẩn *Bacillus velezensis* D13.

Thứ tự	Tên chủng	Hàm lượng surfactin (mg/g)
1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i> B9.10	0,60
2	<i>Bacillus velezensis</i> D13	0,42

Từ những nghiên cứu trên cho thấy chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10 và chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* D13 được đánh giá là 02 chủng vi khuẩn tiềm năng trong việc sản xuất chế phẩm sinh học phòng trị sâu đục đẹn gây hại trên cây dứa tại tỉnh Bến Tre.

4. Kết luận

Từ 32 mẫu đất được thu thập ở khu vực đất vườn dứa và đất không canh tác lâu năm tại tỉnh Bến Tre đã phân lập được 96 chủng vi khuẩn *Bacillus*, sàng lọc được 30 chủng tạo chất hoạt động bề mặt sinh học. Trong đó, chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10 và *Bacillus velezensis* D13 có khả năng gây chết sâu đục đẹn với hiệu lực lần lượt là 100,00 và 86,67% sau 24 giờ theo dõi. Kết quả phân tích hàm lượng hoạt chất surfactin của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9.10 và chủng *Bacillus velezensis* D13 lần lượt là 0,60 và 0,42 mg/g.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Ben Tre Province (2024), *Report on The Socio-Economic Situation in April 2024*, <https://www.thongkebentre.gov.vn/Bao-cao-tinh-hinh-Kinh-te-Xa-hoi-thang-4-nam-2024-post102>, accessed 5 May 2024 (in Vietnamese).

[2] M. Cock, P. Perera (1987), "Biological control of *Opisina arenosella* Walker (Lepidoptera, Oecophoridae)", *Biocontrol News and Information*, **4(8)**, pp.283-310.

[3] B. Sathiamma, C. Mohan, M. Gopal (2001), "Biocontrol potential and its exploitation in coconut pest management", *Biocontrol Potential and Its Exploitation in Sustainable Agriculture*, **2**, pp.261-283, DOI: 10.1007/978-1-4615-1377-3_16.

[4] D. Yun, S. Yang, Y. Kim, et al. (2013), "Identification of surfactin as an aphicidal metabolite produced by *Bacillus amyloliquefaciens* G1", *Journal of The Korean Society for Applied Biological Chemistry*, **56**, pp.751-753, DOI: 10.1007/s13765-013-3238-y.

[5] D. Guo, B. Wan, S. Xiao, et al. (2015), "Cyclic lipopeptides with herbicidal and insecticidal activities produced by *Bacillus clausii* DTM1", *Natural Product Communications*, **10(12)**, pp.2151-2153, DOI: 10.1177/1934578X1501001235.

[6] S. Yang, D. Lim, M. Noh, et al. (2017), "Characterisation of biosurfactants as insecticidal metabolites produced by *Bacillus subtilis* Y9", *Entomological Research*, **47(1)**, pp.55-59, DOI: 10.1111/1748-5967.12200.

[7] L. Assié, M. Deleu, L. Arnaud, et al. (2002), "Insecticide activity of surfactins and iturins from a biopesticide *Bacillus subtilis* Cohn (S499 strain)", *Mededelingen van de Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen*, **67(3)**, pp.647-655.

[8] I. Geetha, K. Paily, A. Manonmani (2012), "Mosquito adulticidal activity of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*", *Pest Management Science*, **68(11)**, pp.1447-1450, DOI: 10.1002/ps.3324.

[9] N. Dung, N. Quyen, P. Ty (2010), *Experimental Method Used to Identify Bacterial Strains*, Vietnam Educational Publishing House, pp.162-218 (in Vietnamese).

[10] Y. Yanti, T. Habazar, R. Refinaldon, et al. (2017), "Indigenous *Bacillus* spp. ability to growth promoting activities and control bacterial wilt disease (*Ralstonia solanacearum*)", *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, **18(4)**, pp.1562-1567, DOI: 10.13057/biodiv/d180435.

[11] S. Khedher, H. Boukedi, O.K. Feki, et al. (2015), "*Bacillus amyloliquefaciens* AG1 biosurfactant: Putative receptor diversity and histopathological effects on *Tuta absoluta* midgut", *Journal of Invertebrate Pathology*, **132**, pp.42-47, DOI: 10.1016/j.jip.2015.08.010.

[12] W. Abbott (1925), "A method of computing the effectiveness of an insecticide", *J. Econ. Entomol.*, **18(2)**, pp.265-267, DOI: 10.1093/jee/18.2.265a.

[13] Y. Chen, S. Liu, H. Mou, et al. (2017), "Characterisation of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus licheniformis* mb01 from marine sediments", *Frontiers in Microbiology*, **8**, pp.1-11, DOI: 10.3389/fmicb.2017.00871.

[14] N. Allioui, F. Driss, H. Dhoubi, et al. (2021), "Two novel *Bacillus* strains (*subtilis* and *simplex* species) with promising potential for the biocontrol of *Zymoseptoria tritici*, the causal agent of septoria tritici blotch of wheat", *Bio. Med. Research International*, **2021(1)**, pp.1-10, DOI: 10.1155/2021/6611657.

[15] P. Vos, G. Garrity, D. Jones, et al. (2009), "Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes", *Springer Science & Business Media*, **3**, pp.21-128, DOI: 10.1007/b92997.

[16] M. Abuzeid, M. Khalif, E. Mohamed, et al. (2022), "Isolation and identification of microbes (fungi and bacillus species) from soil and evaluation of their antimicrobial properties", *Journal of Medical Sciences*, **17(2)**, pp.29-36, DOI: 10.51984/JOMS.V17I2.220.

[17] P. Nhut, V. Huong, D. Trinh (2019), "Isolation, screening and investigation of biological activity of bioflocculating bacteria in whiteleg shrimp ponds in Tra Vinh province", *Can Tho University Journal of Science*, **55(1)**, pp.270-276, DOI: 10.22144/ctu.jsi.2019.035 (in Vietnamese).

[18] A.A.E. Salam, A. Nemat, A. Magdy (2011), "Potency of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus subtilis* against the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Bosid.) larvae", *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, **44(3)**, pp.204-215, DOI: 10.1080/03235400902952129.

[19] S. Khedher, H. Boukedi, M. Dammak, et al. (2017), "Combinatorial effect of *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 biosurfactant and *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa16 toxin on *Spodoptera littoralis* larvae", *Journal of Invertebrate Pathology*, **144**, pp.11-17, DOI: 10.1016/j.jip.2017.01.006.

[20] M. Torres, V. Rocha, G. Petroselli, et al. (2022), "Entomopathogenic potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* strains against *Musca domestica* under controlled conditions", *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **170(7)**, pp.584-592, DOI: 10.1111/eea.13186.

[21] D. Ramesar, C. Hunter (2023), "First reported incidence of *Bacillus velezensis* exhibiting effective antagonism against a blowfly species, *Lucilia cuprina*", *Bio. Control*, **68(1)**, pp.25-37, DOI: 10.1007/s10526-022-10172-4.

[22] T. Denoirjean, A. Ameline, A. Couty, et al. (2022), "Effects of surfactins, *Bacillus* lipopeptides, on the behavior of an aphid and host selection by its parasitoid", *Pest Management Science*, **78(3)**, pp.929-937, DOI: 10.1002/ps.6702.