

NGHIÊN CỨU VI KHUẨN, XẠ KHUẨN ĐỐI KHÁNG VỚI NẤM *Fusarium oxysporum* GÂY BỆNH HÉO VÀNG CÀ CHUA, DƯA CHUỘT

Lê Thu Hiền, Hà Minh Thanh,
Vũ Phương Bình, Trần Ngọc Khánh và CS
Viện Bảo vệ thực vật

SUMMARY

Studying on streptomyces and bacteria as antagonistic microorganisms to control *Fusarium oxysporum* caused wilt diseases on tomato and cucumber.

In 2011 and 2012 years, 175 isolates collected from non-pathogen and pathogen-infested soil planting cucumber and tomato at Ha noi, Hai Duong, Bac Ninh and Vinh Phuc provinces were assessed for limitation of *Fusarium oxysporum* in laboratory and greenhouse. Results showed that 10 isolated including 7 bacterial and 3 streptomyces strains were the most effective in reducing growth of *F. oxysporum* caused wilt diseases on cucumber and tomato by 80.1 to 86.7% and 57.3 to 66.8% in laboratory and greenhouse respectively. PDA and YS nutrient media were suitable for mass production of bacteria and streptomyces. The bacterial and streptomyces strains strongly grown when temperature ranged from 25 to 30°C and pH changing form 7-8. The promising microorganisms can grow and develop in anaerobic conditions, depolarize nitrate and assimilate carbon from glucose and sucrose. They also have ability to mediate amylase, chitinase, cellulase and β glucanase enzymes. The preliminary results obtained from experiments were very important to create good condition for production of biological products controlling wilt diseases on cucumber and tomato.

Keywords: *Fusarium oxysporum*, wilt diseases, streptomyces, biological, strain

I. ĐẶT VẤN ĐỀ*

Bệnh héo rũ do nấm *Fusarium oxysporum* là một trong những bệnh hại nguy hiểm, chúng có thể làm giảm năng suất cà chua và dưa chuột từ 20-30%, có khi tới trên 50% ở những nơi bị bệnh nặng. Việc phòng trừ bệnh này rất khó khăn do *Fusarium oxysporum* là loài nấm có phổ ký chủ rộng, có khả năng tồn tại lâu dài trong đất. Sử dụng nhiều thuốc hóa học làm tăng khả năng kháng thuốc của các loài nấm này, gây ô nhiễm cho môi trường. Các VSV có ích, đặc biệt là các nguồn vi khuẩn, xạ khuẩn như là tác nhân sinh học trong phòng trừ bệnh hại cây trồng hiện nay đang được quan tâm. Một số nguồn vi khuẩn, xạ khuẩn có khả năng ức chế nấm *Fusarium oxysporum* được nghiên cứu với mục đích là tác nhân chính trong chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh héo rũ cà chua, dưa chuột.

II. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương pháp phân lập vi khuẩn, xạ khuẩn đối kháng nấm *F. oxysporum*

Mẫu đất được nghiền nhỏ, rây qua rây kích thước mắt 0,5 mm, pha loãng khoảng 10^{-5} đến 10^{-7} .

Môi trường phân lập là SPA; YS; Gauze; NA; CGA. Các đĩa môi trường sau phân lập được đặt trong tủ định ôn ở 30°C trong 20 ngày.

2.2. Phương pháp đánh giá khả năng đối kháng của vi khuẩn, xạ khuẩn với nấm *F. oxysporum*

Sau một ngày cấy nấm *F. Oxysporum* vào điểm giữa, các VK, XK đánh giá được cấy truyền đối xứng trong hộp petri. Đặt các đĩa trong tủ định ôn ở nhiệt độ 28°C, nếu xuất hiện những vùng ức chế (vòng vô khuẩn), nghĩa là có sự đối kháng tại điểm đó. Dựa vào kích thước vòng ức chế (D - d, mm) để đánh giá hiệu lực đối kháng của chúng. Trong đó D là đường kính tản nấm *Phytophthora* ở công thức đối chứng, d là đường kính tản nấm *Phytophthora* ở công thức thí nghiệm. Đánh giá sự đối kháng sau 7-10 ngày nuôi cấy.

$$\text{Hiệu quả đối kháng (\%)} = \left(1 - \frac{DC}{CT}\right) \times 100$$

Trong đó: CT: Công thức thí nghiệm

DC: Đối chứng

- Kiểm tra tính kháng nấm: Lấy 1 mm³ vùng ức chế của xạ khuẩn, cấy truyền sang đĩa petri

Người phân biên: TS. Ngô Vĩnh Viễn.

có chứa môi trường PDA, đặt trong tủ định ôn ở 26°C trong 7 ngày. Theo dõi sự phát triển của nấm *F. oxysporum*, nếu nấm không phát triển lại, chứng tỏ VK, XK có khả năng kháng nấm hoàn toàn.

2.3. Nghiên cứu các phản ứng sinh lý, sinh hóa

+ Môi trường chọn lọc để xác định tính yếm khí của các nguồn vi khuẩn và xạ khuẩn đối kháng: Peptone 2g; NaCl 5g; KH₂PO₄ 0,3g; Agar 3g; Bromthymol blue (1%) 3ml; nước cất 1000 ml; pH = 7,0.

+ Môi trường chọn lọc để thử khả năng khử Nitrat: Nước thịt pepton 1000 ml; KNO₃ 10 g; pH = 7,0 - 7,6.

+ Môi trường khoáng cơ bản khả năng đồng hóa nguồn các bon từ đường Glucose và Sacarose của các nguồn vi khuẩn và xạ khuẩn có triển vọng: (NH₄)₂SO₄ 2 g MgSO₄.7H₂O 0,2 g; NaH₂PO₄.H₂O 0,5 g; CaCl₂.2H₂O 0,1 g; K₂HPO₄ 0,5 g; Nước cất 1000 ml

- Các nguồn carbon được dùng trong thí nghiệm

Đường 6C	Glucoza
Đường kép	Sacarose - Đường kính
Đường đa	Tinh bột tan (Starch)
Rượu bậc 6	Mannitol

* Phương pháp xác định tính yếm khí của các nguồn vi khuẩn và xạ khuẩn đối kháng

- Phương pháp tiến hành: Đổ 5ml môi trường vào ống nghiệm, hấp khử trùng 121°C trong 20 phút, thêm 0,5 ml Glucose 10% vào mỗi túyp, cấy mỗi nguồn vi sinh vật vào 2 túyp, bổ sung 1 lớp dày khoảng 5mm parafilm lỏng (đã hấp khử trùng) để tạo điều kiện kị khí sau đó để ở điều kiện nhiệt độ 28°C. Nếu có sự chuyển màu từ xanh sang đỏ ở cả 2 túyp thì đó là vi khuẩn yếm khí.

* Phương pháp thử khả năng khử Nitrat của vi khuẩn và xạ khuẩn đối kháng

- Chuẩn bị thuốc thử Griess:

- Dung dịch A: Acid sulfanilic 0,5 g
- Acid acetic loãng (khoảng 10%) 150 ml.
- Dung dịch B: Alpha Naphtylamin 0,1 g
- Nước cất 20 ml
- Acid acetic loãng (khoảng 10%) 150 ml.

- Chuẩn bị thuốc thử Diphenylamin: 0,5 g Diphenylamin hòa vào 100 ml H₂SO₄ đặc, thêm 20ml nước cất.

- Phương pháp tiến hành: đổ môi trường vào các ống nghiệm (4-5 ml/ống), khử trùng ở 121 °C trong 15-20 phút. Cấy vi khuẩn mới hoạt hoá vào môi trường (mỗi nguồn cấy 2 ống), đặt ở nhiệt độ thích hợp trong 1, 3, 5 ngày. Chọn 2 ống không cấy vi khuẩn để làm đối chứng. Sau đó lấy ống nghiệm sạch và bổ sung lần lượt các dung dịch như sau:

Dịch nuôi cấy vi khuẩn (hoặc môi trường ở ống đối chứng)

1 giọt dung dịch A

1 giọt dung dịch B

- Đánh giá kết quả:

Nếu dịch nuôi cấy chuyển màu (đỏ, hồng, da cam hay nâu) là biểu thị có nitorit, tức là vi khuẩn có khả năng khử Nitrat.

Nếu dịch nuôi cấy không chuyển màu, thêm 1-2 giọt thuốc thử Diphenylamin để kiểm tra sự có mặt của Nitrat (chuyển màu xanh lam là có Nitrat chứng tỏ vi khuẩn không khử Nitrat, không chuyển màu tức là Nitrat đã được khử hết và nitorit được khử tiếp tục thành các chất khác như N₂).

* Phương pháp xác định khả năng đồng hóa nguồn các bon từ đường Glucose và Sacarose của các nguồn vi khuẩn và xạ khuẩn có triển vọng

- Phương pháp tiến hành: Bổ sung nguồn carbon vào môi trường khoáng cơ bản (tinh bột 0,2%), chia môi trường vào các ống nghiệm rồi hấp khử trùng. Lấy vi khuẩn mới hoạt hoá cấy lên đĩa thạch (phương pháp thổi thạch). Sau 2-5 ngày nhỏ thuốc thử Lugol lên vết cấy để quan sát khả năng phân giải tinh bột. Nếu thuốc thử Lugol không bắt màu quanh vết cấy tức là vi khuẩn có khả năng phân giải tinh bột.

* Phương pháp xác định tính chịu muối (NaCl) của các nguồn vi khuẩn và xạ khuẩn có triển vọng

Công thức thí nghiệm: NaCl 1%, 3, 5 và 7%

Phương pháp tiến hành: sử dụng môi trường chọn lọc, bổ sung NaCl ở các nồng độ trên vào môi trường, mỗi công thức nhắc lại 3 lần, mỗi lần nhắc 3 hộp petri.

Chỉ tiêu theo dõi: số khuẩn lạc mọc trên môi trường.

* Phương pháp định tính hoạt độ enzym Amylaza, chitinase, β -glucanase và cellulase của các nguồn vi khuẩn và xạ khuẩn có triển vọng

Hoạt độ các enzym chitinase, β -glucanase và cellulase của vi khuẩn và xạ khuẩn được định tính bằng phương pháp đo đường kính vòng phân giải trên môi trường cảm ứng tổng hợp của từng loại enzym (Đánh giá theo phương pháp trong tuyển tập vi sinh vật học của Nguyễn Đức Lượng, 2004).

Phương pháp tiến hành: đổ môi trường vào đĩa Petri, cấy vi khuẩn, xạ khuẩn mới hoạt hoá

trên môi trường (phương pháp thời thạch), đặt ở nhiệt độ thích hợp trong 1- 5 ngày và quan sát vòng phân giải được tạo ra quanh vết cấy bằng dung dịch thuốc thử Lugol.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thu thập vi khuẩn, xạ khuẩn đối kháng nấm *F. oxysporum* gây bệnh héo vàng cà chua, dưa chuột

Các dòng VSV thu thập được, được thử khả năng đối kháng với hai dòng nấm *F. oxysporum* FH₀ và FH₁ gây bệnh cà chua và dưa chuột trên môi trường bằng phương pháp cấy đối xứng với.

Bảng 1. Phân lập và thử nghiệm khả năng đối kháng của các dòng VSV với nấm *F. oxysporum* (Viện BTVT, 2011)

Địa điểm thu mẫu	Cây trồng	Số mẫu phân lập	Số dòng VSV phân lập được	Khả năng đối kháng		
				+++	++	+
Hà Nội	Cà chua	20	55	3	7	45
	Dưa chuột	20	10	1	0	9
Bắc Ninh	Cà chua	20	17	2	0	15
	Vĩnh Phúc	Dưa chuột	20	3	0	0
Hải Dương	Cà chua	20	47	2	4	41
	Dưa chuột	20	26	2	3	21
Hải Phòng	Cà chua	20	5	0	2	3
	Dưa chuột	20	12	0	5	7
Tổng số mẫu phân lập		160	175	10	14	151

Ghi chú: + Đường kính vòng ức chế từ 1-5 mm.

++ Đường kính vòng ức chế từ 6-10 mm.

+++ Đường kính vòng ức chế >10 mm (Kui Ja lee và cộng sự, 2008)

Có 175 dòng vi khuẩn và xạ khuẩn đã được phân lập từ 160 mẫu đất thu thập tại các tỉnh Hà nội, Hải Phòng, Hải Dương, Bắc Ninh và Vĩnh phúc. Sau khi thử nghiệm khả năng đối kháng với nấm *F. oxysporum*, kết quả cho thấy chỉ có 10 dòng có khả năng cao trong việc hạn chế sự phát triển của nấm *F. oxysporum* (đường kính ức chế >10 mm) (bảng 1).

3.2. Khả năng đối kháng của các dòng vi khuẩn và xạ khuẩn có triển vọng

Các dòng vi khuẩn, xạ khuẩn có triển vọng đều có khả năng hạn chế sự sinh trưởng và phát triển của nấm *F. oxysporum*, hiệu quả ức chế sau 7 ngày nuôi cấy biến thiên từ 80 đến 88,9%. đường kính vòng ức chế đều >10mm, trong đó hiệu quả ức chế cao nhất là các dòng vi khuẩn VF₇ và dòng xạ khuẩn F₁₂₃.

Bảng 2. Khả năng đối kháng của các dòng VSV có triển vọng với nấm *F. oxysporum* gây bệnh héo vàng cà chua và dưa chuột theo phương pháp cấy đối xứng (Viện BVTV, 2011)

TT	Ký hiệu nguồn ¹	Giống VSV ²	Đường kính tàn nấm sau 7 ngày (cm)				HQVC (%) ⁵	
			FH ₀ ³		FH ₁ ⁴		FH ₀	FH ₁
			CT ⁶	ĐC ⁷	CT	ĐC		
1	F _{29.1}	VK	1,51	9,0	1,47	9,0	83,3	84,0
2	F _{90.1}	VK	1,70	9,0	1,67	9,0	81,1	81,4
3	F _{97.5}	VK	1,91	9,0	1,85	9,0	78,9	79,4
4	F _{100.5}	VK	1,81	9,0	1,79	9,0	80,0	80,1
5	F ₁₁₆	VK	1,80	9,0	1,82	9,0	80,0	79,8
6	VF ₆	VK	1,51	9,0	1,57	9,0	83,3	82,6
7	VF ₇	VK	1,36	9,0	1,20	9,0	85,6	85,7
8	F ₁₁₂	XK	1,37	9,0	1,35	9,0	88,9	85,0
9	F ₁₂₃	XK	1,30	9,0	1,20	9,0	85,6	86,7
10	F ₁₂₉	XK	1,60	9,0	1,51	9,0	83,3	83,2
	LSD _{0.05}		ns		0,62			
	CV (%)		4,1		3,2			

Ghi chú: ⁽¹⁾. Các dòng VSV đối kháng có triển vọng được mã hóa.
⁽²⁾. VK hay XK là vi khuẩn hay xạ khuẩn được xác định căn cứ vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên môi trường dinh dưỡng đặc hiệu.
⁽³⁾. Dòng nấm *F. oxysporum* gây bệnh trên cà chua.
⁽⁴⁾. Dòng nấm *F. oxysporum* gây bệnh trên dưa chuột.
⁽⁵⁾. Hiệu quả ức chế nấm *F. oxysporum* của các dòng vi khuẩn, xạ khuẩn có triển vọng sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA.
⁽⁶⁾. Vi khuẩn hay xạ khuẩn và nấm *F. oxysporum* cùng nuôi cấy trên môi trường PDA.
⁽⁷⁾. Nấm *F. oxysporum* nuôi cấy đơn lẻ trên môi trường PDA.

Bảng 3. Khả năng đối kháng của các dòng VSV có triển vọng với nấm *F. oxysporum* gây bệnh héo vàng cà chua và dưa chuột theo phương pháp giếng (Viện BVTV, 2011)

TT	Ký hiệu nguồn ¹	Giống VSV ²	FH ₀ ³		FH ₁ ⁴	
			Đường kính vòng ức chế (cm)	Khả năng đối kháng	Đường kính vòng ức chế (cm)	Khả năng đối kháng
1	F _{29.1}	VK	2,70 ⁵	+++ ⁶	2,75	+++
2	F _{90.1}	VK	2,10	+++	2,03	+++
3	F _{97.5}	VK	2,00	+++	1,97	+++
4	F _{100.5}	VK	2,53	+++	2,22	+++
5	F ₁₁₆	VK	2,43	+++	2,05	+++
6	VF ₆	VK	2,13	+++	2,33	+++
7	VF ₇	VK	2,50	+++	2,15	+++
8	F ₁₂₃	XK	2,93	+++	3,01	+++
9	F ₁₁₂	XK	2,87	+++	2,92	+++
10	F ₁₂₉	XK	2,07	+++	2,22	+++

Ghi chú: ⁽¹⁾. Các dòng VSV đối kháng có triển vọng được mã hóa.
⁽²⁾. VK hay XK là vi khuẩn hay xạ khuẩn được xác định căn cứ vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc trên môi trường dinh dưỡng đặc hiệu.
⁽³⁾. Dòng nấm *F. oxysporum* gây bệnh trên cà chua.
⁽⁴⁾. Dòng nấm *F. oxysporum* gây bệnh trên dưa chuột.
⁽⁵⁾. Đường kính vòng ức chế nấm *F. oxysporum* của các dòng vi khuẩn, xạ khuẩn có triển vọng sau 7 ngày nuôi cấy.
⁽⁶⁾. Đường kính vòng ức chế > 10 mm.

3.3. Đặc điểm sinh học, sinh thái, sinh lý và sinh hóa của các dòng vi khuẩn, xạ khuẩn có triển vọng

3.3.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng, phát triển của các nguồn vi khuẩn và xạ khuẩn có triển vọng

Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến sinh trưởng của các dòng VK, XK có triển vọng (Viện BTVT, tháng 9/2011)

Công thức	Số khuẩn lạc ở các ngưỡng nhiệt độ sau 7 ngày nuôi cấy									
	Vi khuẩn					Xạ khuẩn				
	F _{29.1}	F _{30.1}	F _{37.5}	F _{100.5}	F ₁₁₆	VF ₆	VF ₇	F ₁₁₂	F ₁₂₃	F ₁₂₉
25°C	20,2 ^d	44,9 ^d	20,9 ^d	24,9 ^d	12,0 ^c	20,9 ^d	24,9 ^d	32,3 ^d	44,7 ^d	36,3 ^d
30°C	28,2 ^e	54,3 ^e	28,1 ^e	32,0 ^e	13,9 ^e	32,1 ^e	32,0 ^e	52,2 ^e	48,8 ^e	40,3 ^e
35°C	16,0 ^c	20,1 ^c	16,1 ^c	12,1 ^c	12,0 ^c	20,0 ^c	18,1 ^c	28,9 ^c	32,2 ^c	32,3 ^c
40°C	4,0 ^b	8,1 ^b	12,1 ^b	8,0 ^b	8,0 ^b	4,1 ^b	4,8 ^b	8,0 ^b	8,9 ^b	8,1 ^b
45°C	0,0 ^a	4,1 ^a	3,1 ^a	4,0 ^a	2,3 ^a	0,9 ^a	0,3 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a
CV (%)	2,5	5,5	8,0	5,3	6,1	7,5	6,9	5,5	4,4	5,1

Các nguồn vi khuẩn có khả năng sinh trưởng phát triển trong điều kiện nhiệt độ cao tới 45°C, trừ nguồn F_{29.1}. Nhiệt độ 30°C là thích hợp nhất cho cả vi khuẩn và xạ khuẩn phát triển.

3.3.2. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sinh trưởng, phát triển của các nguồn vi khuẩn và xạ khuẩn có triển vọng.

Môi trường PDA và YS thích hợp nuôi cấy cả vi khuẩn và xạ khuẩn. Môi trường Gauze

thích hợp cho nuôi cấy xạ khuẩn hơn, số khuẩn lạc trên môi trường dao động từ 30,5 - 45,6 (bảng 4), trong khi vi khuẩn nuôi cấy trên môi trường này đạt tối đa 12,5 khuẩn lạc. Môi trường King'B thích hợp cho sự phát triển của vi khuẩn, số khuẩn lạc trên môi trường này biến thiên từ đạt 12 đến 110,5, trong khi xạ khuẩn gần như không thích hợp với môi trường này (số khuẩn lạc tối đa là 2,3).

Bảng 5. Ảnh hưởng của môi trường dinh dưỡng đến sinh trưởng, phát triển của các dòng vi khuẩn và xạ khuẩn có triển vọng (Viện BTVT, 2011)

Công thức	Số khuẩn lạc trên các môi trường sau 7 ngày nuôi cấy									
	Vi khuẩn					Xạ khuẩn				
	F _{29.1}	F _{30.1}	F _{37.5}	F _{100.5}	F ₁₁₆	VF ₆	VF ₇	F ₁₁₂	F ₁₂₃	F ₁₂₉
PDA	20,8 ^d	12,9 ^c	81,5 ^d	28,3 ^e	30,9 ^e	20,1 ^c	20,3 ^d	24,6 ^c	7,8 ^b	40,5 ^c
SPA	21,8 ^e	13,4 ^c	20,6 ^b	8,9 ^b	12,9 ^c	24,9 ^d	28,8 ^e	12,5 ^b	15,9 ^c	25,5 ^b
Gauze	12,5 ^a	9,0 ^a	2,5 ^a	1,3 ^a	4,0 ^a	0,0 ^a	5,12 ^a	32,5 ^d	30,5 ^d	45,6 ^d
King'B	16,5 ^b	12,0 ^b	110,5 ^e	12,6 ^d	28,1 ^d	12,0 ^b	13,87 ^b	0,0 ^a	2,3 ^a	0,6 ^a
YS	18,3 ^c	24,5 ^d	64,5 ^c	10,6 ^c	12,1 ^b	24,1 ^c	16,11 ^c	35,8 ^d	28,5 ^d	47,2 ^e
CV (%)	8,1	8,0	5,4	9,9	9,3	7,6	7,3	9,0	9,1	7,8

3.3.3. Ảnh hưởng pH môi trường đến sinh trưởng, phát triển của các nguồn VK, XK triển vọng

Bảng 6. Ảnh hưởng của pH môi trường đến sinh trưởng, phát triển của các dòng vi khuẩn, xạ khuẩn có triển vọng (Viện BTVT, 2011)

Công thức	Số khuẩn lạc VK, XK ở các ngưỡng pH sau 7 ngày nuôi cấy									
	Vi khuẩn					Xạ khuẩn				
	F _{29.1}	F _{30.1}	F _{37.5}	F _{100.5}	F ₁₁₆	VF ₆	VF ₇	F ₁₁₂	F ₁₂₃	F ₁₂₉
pH = 4	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	6,25 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
pH = 5	5,50 ^c	93,87 ^c	11,75 ^c	12,87 ^c	11,50 ^c	15,12 ^c	72,75 ^c	93,13 ^c	46,50 ^c	55,50 ^c
pH = 6	8,12 ^d	126,00 ^d	13,75 ^d	21,12 ^d	29,75 ^d	49,75 ^d	96,97 ^d	135,25 ^e	56,63 ^e	80,63 ^e
pH = 7	29,37 ^f	175,13 ^f	29,12 ^f	66,00 ^f	56,88 ^f	121,12 ^f	152,75 ^f	154,63 ^f	76,38 ^f	113,63 ^f
pH = 8	18,37 ^e	135,25 ^e	21,87 ^e	45,00 ^e	44,13 ^e	63,00 ^e	122,00 ^e	123,13 ^d	44,63 ^d	97,5 ^d
pH = 9	4,50 ^b	88,25 ^b	3,50 ^b	4,25 ^b	8,63 ^b	11,87 ^b	52,00 ^b	55,38 ^b	21,25 ^b	17,70 ^b
CV (%)	7,8	1,3	5,2	3,9	3,4	3,8	2,3	1,9	3,3	2,1

Trong số 10 nguồn VK, XK có triển vọng, thì chỉ có nguồn VF₇ có khả năng phát triển ở điều kiện pH = 4, các nguồn còn lại không có khả năng tồn tại ở ngưỡng pH này. Chúng thích hợp

nhất trong điều kiện pH từ 7 - 8, ở điều kiện pH này, số khuẩn lạc trên môi trường là nhiều nhất, như nguồn F_{90.1} và F₁₁₂ có số khuẩn lạc đạt tới 123,13 và 135,25 trên hộp petri.

3.3.4. Đặc tính sinh lý, sinh hóa của vi khuẩn và xạ khuẩn có triển vọng.

3.3.4.1. Xác định tính yếm khí

Bảng 7. Đặc tính yếm khí của các nguồn VK, XK có triển vọng

TT	Ký hiệu nguồn	VK, XK	Tính yếm khí	Phản ứng chuyển màu
1	F _{29.1}	VK	+	Xanh sang vàng
2	F _{90.1}	VK	+	Xanh sang vàng
3	F _{97.5}	VK	+	Xanh sang vàng
4	F _{100.5}	VK	+	Xanh sang vàng
5	F ₁₁₆	VK	+	Xanh sang vàng
6	VF ₆	VK	+	Xanh sang vàng
7	VF ₇	VK	+	Xanh sang vàng
8	F ₁₁₂	XK	+	Xanh sang vàng
9	F ₁₂₃	XK	+	Xanh sang vàng
10	F ₁₂₉	XK	-	Không chuyển màu

Trong số 10 nguồn VK, XK có triển vọng đối kháng, chỉ có một nguồn F₁₂₉ là không có phản ứng chuyển màu, tức là XK này thuộc nhóm hiếu khí bắt buộc. Dịch cấy các nguồn còn

lại đều chuyển màu, như vậy 9 nguồn còn lại thuộc nhóm kỵ khí không bắt buộc, có khả năng sinh trưởng, phát triển trong điều kiện có không khí và không có không khí.

3.3.4.2. Xác định khả năng khử Nitrat

Bảng 8. Khả năng khử Nitrat của các nguồn vi khuẩn và xạ khuẩn có triển vọng

TT	Ký hiệu nguồn	VK, XK	Khả năng khử Nitrat
1	F _{29.1}	VK	+
2	F _{90.1}	VK	+
3	F _{97.5}	VK	+
4	F _{100.5}	VK	+
5	F ₁₁₆	VK	+
6	VF ₆	VK	+
7	VF ₇	VK	+
8	F ₁₁₂	XK	+
9	F ₁₂₃	XK	+
10	F ₁₂₉	XK	+

Kết quả thí nghiệm cho thấy cả 10 nguồn VK, XK đều có khả năng khử Nitrat.

3.3.4.3. Khả năng đồng hóa nguồn cacbon

Trong số các nguồn cacbon thí nghiệm, cả 10 dòng VK, XK đều có khả năng đồng hóa đường Glucose. 8 dòng có khả năng đồng hóa đường Saccarose (2 dòng F₁₁₂ và F₁₂₉ không có khả năng đồng hóa đường Saccarose). Với tinh

bột, chỉ có 3 dòng là F_{100.5}; F₁₁₆ và VF₆ là có khả năng đồng hóa. Có 7 dòng có khả năng đồng hóa rượu Manitol, 3 dòng không có khả năng đồng hóa rượu manitol là F₁₁₂; F₁₂₃ và F₁₂₉ (bảng 8).

3.3.4.4. Tính chịu muối (NaCl) của các dòng vi khuẩn, xạ khuẩn triển vọng

Kết quả thí nghiệm cho thấy cả 10 nguồn vi khuẩn, xạ khuẩn đối kháng có triển vọng đều

Hội thảo Quốc gia về Khoa học Cây trồng lần thứ nhất

không phát triển được ở nồng độ NaCl 5% và 7%, chỉ có 4 nguồn vi khuẩn F_{29.1}; F_{90.1}; F_{97.5} và F_{100.5} là có khả năng phát triển ở nồng độ 5%. 3 nguồn xạ khuẩn đối kháng không có khả năng chịu mặn, số khuẩn lạc ở công thức đối chứng nhiều hơn ở các công thức có NaCl. 7 nguồn vi

khuẩn triển vọng lại thích hợp với nồng độ muối 1%, số khuẩn lạc vi khuẩn ở công thức này lại nhiều hơn hẳn công thức đối chứng và giảm đi ở công thức nồng độ muối 3% và 5%, riêng nguồn VF₆ VF₇ và F₁₁₆ lại không phát triển ở nồng độ muối 5% (bảng 9)

Bảng 9. Khả năng đồng hóa nguồn cac bon của các nguồn VK, XK có triển vọng

TT	Ký hiệu nguồn	VK, XK	Nguồn cac bon			
			Glucose	Saccarose	Tinh bột	Manitol
1	F _{29.1}	VK	+	+	-	+
2	F _{90.1}	VK	+	+	-	+
3	F _{97.5}	VK	+	+	-	+
4	F _{100.5}	VK	+	+	+	+
5	F ₁₁₆	VK	+	+	+	+
6	VF ₆	VK	+	+	+	+
7	VF ₇	VK	+	+	-	+
8	F ₁₁₂	XK	+	-	-	-
9	F ₁₂₃	XK	+	-	-	-
10	F ₁₂₉	XK	+	-	-	-

Bảng 10. Ảnh hưởng của nồng độ muối đến sinh trưởng, phát triển của các nguồn VK, XK triển vọng (Viện BTVT, 2011)

Công thức	Số khuẩn lạc VK, XK sau 7 ngày nuôi cấy									
	Vi khuẩn							Xạ khuẩn		
	F _{29.1}	F _{90.1}	F _{97.5}	F _{100.5}	F ₁₁₆	VF ₆	VF ₇	F ₁₁₂	F ₁₂₃	F ₁₂₉
NaCl 1%	171,6 ^e	20,9	44,0 ^e	118,0 ^e	40,0 ^d	56,5 ^d	33,8 ^d	88,6 ^c	67,0 ^c	138,6 ^c
NaCl 3%	41,9 ^c	13,9	32,1 ^c	35,5 ^c	35,8 ^b	45,1 ^b	22,8 ^b	78,8 ^b	55,4 ^b	125,5 ^b
NaCl 5%	22,0 ^b	7,5	20,5 ^b	10,8 ^b	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a
NaCl 7%	0,0 ^a	0,0	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a	0,0 ^a
ĐC	69,1 ^d	14,4	40,4 ^d	62,0 ^d	37,4 ^c	46,0 ^c	25,5 ^c	111,4 ^d	78,8 ^d	188,1 ^d
CV (%)	2,1	5,0	1,8	2,1	5,2	3,3	5,0	1,4	2,9	3,3

3.3.4.5. Định tính hoạt độ enzyme của các nguồn vi khuẩn, xạ khuẩn triển vọng

10 loại vi khuẩn, xạ khuẩn đều có các enzyme Cellulase, Chitinase và β - Glucanase có khả năng

phân giải tốt. Đặc biệt các nguồn F_{29.1}; F_{100.5} và F₁₂₃; F₁₂₉ hoạt độ của 4 loại enzyme đều tốt, đường kính vòng phân giải đạt 3,03 - 3,45cm.

Bảng 11. Định tính hoạt độ enzym của các nguồn vi khuẩn và xạ khuẩn triển vọng (Viện BTVT, 2011)

TT	Ký hiệu nguồn	VK, XK	Đường kính vòng phân giải		
			Cellulase	Chitinase	β - Glucanase
1	F _{29.1}	VK	3,15 ^b	3,48 ^e	3,26 ^b
2	F _{90.1}	VK	2,81 ^{ab}	2,77 ^a	2,46 ^a
3	F _{97.5}	VK	3,06 ^b	3,24 ^{ab}	3,32 ^b
4	F _{100.5}	VK	4,45 ^c	3,53 ^b	3,73 ^b
5	F ₁₁₆	VK	2,87 ^{ab}	3,35 ^{ab}	3,32 ^b
6	VF ₆	VK	3,15 ^b	2,80 ^a	3,11 ^b
7	VF ₇	VK	3,20 ^b	3,10 ^a	3,10 ^{ab}
8	F ₁₁₂	XK	2,42 ^a	3,08 ^a	3,61 ^b
9	F ₁₂₃	XK	3,03 ^b	3,51 ^b	3,28 ^b
10	F ₁₂₉	XK	3,35 ^a	3,95 ^b	3,46 ^b
Đối chứng			0,00	0,00	0,00
CV (%)			2,0	2,2	2,2

3.4. Hiệu quả ức chế của các dòng vi khuẩn và xạ khuẩn đối với bệnh héo vàng cà chua và dưa chuột trong nhà lưới

Bảng 12. Hiệu quả của các dòng vi khuẩn và xạ khuẩn đối có triển vọng với héo vàng cà chua trong nhà lưới (Viện BTVT, 2011)

TT	Công thức	Tỷ lệ cây bị bệnh (%)			HQGB (%) sau 40 ngày
		20 NST	30 NST	40 NST	
1	Đối chứng ¹	0,0	0,0 ^a	0,0 ^a	-
2	F _{29.1}	0,0	9,8 ^{bc}	24,0 ^c	61,0
3	F _{90.1}	0,0	10,7 ^{bc}	24,2 ^c	61,0
4	F _{97.5}	0,0	10,1 ^{bc}	23,7 ^c	61,8
5	F _{100.5}	0,0	9,2 ^b	22,3 ^{bc}	64,1
6	VF ₇	0,0	9,7 ^b	22,5 ^{bc}	63,8
7	VF ₆	0,0	11,0 ^c	24,4 ^c	60,7
8	F ₁₁₆	0,0	11,5 ^c	26,5 ^d	57,3
9	F ₁₁₂	0,0	8,5 ^b	21,8 ^b	64,9
10	F ₁₂₃	0,0	9,2 ^b	20,6 ^b	66,8
11	F ₁₂₉	0,0	11,0 ^c	23,5 ^{bc}	62,2
12	Đối chứng 2 ²	4,5	17,8 ^d	62,1 ^e	-
CV (%)		29,7	23,5	19,8	

Ghi chú: ⁽¹⁾. Cà chua trồng trong đất không có dung dịch nấm và vi khuẩn, xạ khuẩn.

⁽²⁾. Cà chua trồng trong đất có xử lý dung dịch nấm dòng FH₀ (1x10⁴ bào tử/g đất) và dung dịch vi khuẩn, xạ khuẩn (1x10⁹ bào tử/g đất).

Bảng 13. Hiệu quả của các dòng vi khuẩn và xạ khuẩn đối kháng có triển vọng với héo vàng dưa chuột trong nhà lưới (Viện BTVT, 2011)

TT	Công thức	Tỷ lệ cây bị bệnh (%)			HQGB (%) sau 40 ngày
		20 ngày	30 ngày	40 ngày	
1	Đối chứng 1 ¹	0,0	0,0 ^a	0,0 ^a	-
2	F _{29.1}	0,0	9,8 ^d	24,0 ^d	56,9
3	F _{90.1}	0,0	10,5 ^d	23,2 ^d	58,0
4	F _{97.5}	0,0	11,2 ^d	24,5 ^d	56,0
5	F _{100.5}	0,0	8,7 ^{bc}	18,9 ^b	66,1
6	VF ₇	0,0	8,2 ^b	18,5 ^b	66,8
7	VF ₆	0,0	10,5 ^c	24,4	56,2
8	F ₁₁₆	0,0	8,8 ^{bc}	20,7 ^{bc}	62,8
9	F ₁₁₂	0,0	8,5 ^b	19,5 ^b	65,0
10	F ₁₂₃	0,0	7,8 ^b	20,5 ^b	63,0
11	F ₁₂₉		11,0 ^d	24,0 ^d	56,9
12	Đối chứng 2 ²	5,2	23,5 ^e	55,7 ^e	-
CV (%)		33,2	28,5	21,7	

Ghi chú: ⁽¹⁾. Dưa chuột trồng trong đất không có dung dịch nấm và vi khuẩn, xạ khuẩn.

⁽²⁾. Dưa chuột trồng trong đất có xử lý dung dịch nấm dòng FH₀ (1x10⁴ bào tử/g đất) và dung dịch vi khuẩn, xạ khuẩn (1x10⁹ bào tử/g đất).

Kết quả bảng 12 và bảng 13 cho thấy, cả 10 nguồn vi khuẩn, xạ khuẩn có triển vọng đều có khả năng ức chế nấm *F. oxysporum* gây bệnh héo vàng cà chua và dưa chuột trong điều kiện nhà lưới, hiệu quả giảm bệnh sau 30 ngày đạt từ 56,0 đến 66,8%

IV. KẾT LUẬN

Phân lập và tuyển chọn được 10 dòng vi khuẩn và xạ khuẩn có khả năng đối kháng cao với nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh héo vàng cà chua, dưa chuột, trong đó dòng vi khuẩn VF₇; VF₆, dòng xạ khuẩn F₁₂₃ và F₁₁₂ có hiệu quả cao nhất. Hiệu quả ức chế nấm trong phòng thí nghiệm đạt 85 - 86%, hiệu quả ức chế bệnh héo vàng cà chua, dưa chuột trong nhà lưới đạt 65 - 67%.

Các dòng vi khuẩn và xạ khuẩn đều thuộc nhóm kỵ khí, có khả năng khử nitrat, đồng hóa đường và đều có khả năng hoạt hóa các enzyme cellulase, chitinase và β -Glucanase cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Tiến Hoàng (2007). Nghiên cứu bệnh héo vàng (*Fusarium oxysporum*) hại một số cây trồng cạn vụ Hè Thu năm 2007 tại vùng Gia Lâm - Hà Nội và thử nghiệm chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh, NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
2. Nguyễn Kim Vân (1998). " Bệnh héo vàng cà chua và một số yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển của bệnh trên đồng ruộng ", Tạp chí BVTV, tập 16 số 160, trang 8 -10.
3. Nguyễn Kim Vân, Đỗ Tấn Dũng (2006). Một số nghiên cứu về nguyên nhân gây bệnh hại cây trồng có nguồn gốc trong đất và nấm đối kháng *Trichoderma viride* trong phòng chống bệnh, báo cáo khoa học hội thảo "Khoa học công nghệ quản lý nông học vì sự phát triển nông nghiệp bền vững ở Việt Nam", Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
4. Nguyễn Văn Viên (1997). Một số kết quả nghiên cứu nấm *Fusarium oxysporum* *F.sp lycopersici* gây hại cà chua, NXB Nông nghiệp, Hà nội, trang 117-121.
5. Lemanceau, P., Bakker, P. A. H. M., Kogel, W. J., Alabouvette, C., and Schippers, B. (1993). Antagonistic Effect of Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and Pseudobactin 358 upon Pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. Appl. Environ. Microbiol. 59: 74-82.
6. Pavloua, G. C., and Vakalounakis, D. J. (2005). Biological control of root and stem rot of greenhouse cucumber, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, by lettuce soil amendment. Crop Prot. 24: 135-140.