

## Morphological and biological characteristics of mosquito bugs (*Helopeltis theivora*) causing damage on cashew in Lam Dong province

Khuc Duy Ha, Lai Tien Dung, Ho Thi Thu Giang

### Abstract

Biological characteristics of the mosquito bug (*Helopeltis theivora*) were studied in laboratory condition with an average temperature of 24.32°C to 27.86°C; average humidity from 82.45% to 84.56%, with food being young cashew shoots of AB 0508 variety. The life cycle of the mosquito bug ranged from 19.0 to 52.27 days. Fecundity of the adult female mosquito bug ranged from 17.28 to 53.96 eggs. The hatching rate at temperatures of 20.94°C; 24.32°C and 27.86°C was 62.45%, 77.28% and 84.47%, respectively. The longevity of the adult males ranged from 9.47 to 24.2 days. The longevity of adult females ranged from 15.33 to 34.63 days. Adult bugs and larvae usually feed on young parts of cashew trees such as young leaves, young shoots, flowers and young fruits.

**Keywords:** Mosquito bug (*Helopeltis theivora*), morphological characteristics, biological characteristics, cashew

Ngày nhận bài: 23/4/2024

Người phản biện: TS. Phạm Hồng Hiến

Ngày phản biện: 29/5/2024

Ngày duyệt đăng: 10/8/2024

## PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN TỪ ẤU TRÙNG RUỒI LÍNH ĐEN *Hermetia illucens* ĐỐI KHÁNG VI KHUẨN *Xanthomonas axonopodis*

Lê Ngọc Giàu<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Cẩm Giang<sup>2</sup>,  
Đặng Quốc Chương<sup>2</sup>, Phan Hà<sup>3</sup>, Trần Thị Mỹ Hạnh<sup>2\*</sup>

### TÓM TẮT

*Xanthomonas axonopodis* là tác nhân chính gây loét ở cây có múi. Hiện nay, nghiên cứu và ứng dụng chế phẩm sinh học trong kiểm soát, phòng ngừa vi khuẩn có hại ngày càng được quan tâm trong chiến lược phát triển nông nghiệp bền vững. Trong nghiên cứu này, 38 chủng vi khuẩn được phân lập từ ấu trùng ruồi lính đen, trong đó chủng RLD13 và RLD23 được đánh giá có khả năng đối kháng mạnh với *Xanthomonas axonopodis*. Dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự 16S-rRNA, chủng RLD13 được xác định là *Bacillus velezensis* và chủng RLD23 là *Pseudomonas aeruginosa*. Với đặc tính này, chủng *Bacillus velezensis* RLD13 có tiềm năng ứng dụng để sản xuất chế phẩm sinh học chống lại vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* gây loét cho cây có múi.

**Từ khóa:** *Bacillus velezensis*, đối kháng, loét, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas axonopodis*

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* là một trong những loài quan trọng của họ Pseudomonadaceae trong bộ Pseudomonadales. Đây là tác nhân gây ra một số bệnh nghiêm trọng trên cây ăn quả như bệnh loét trên cây có múi, đốm đen xì mù trên cây xoài, bệnh héo rũ trên chuối,... (Canteros, 2017). Đối với bệnh loét trên cây có múi, vi khuẩn xâm

nhập vào trong cây qua khí khổng hoặc những vết thương cơ giới do cắt tỉa, côn trùng chích hút. Khi đã xâm nhập được vào bên trong cây, vi khuẩn sinh sản rất nhanh trong các tổ chức mô cây. Lúc đầu vết bệnh chỉ là những chấm nhỏ sũng nước, màu xanh tối, rồi chuyển dần sang màu vàng nâu, sau đó do tác động sinh hóa làm cho tế bào của cây phân chia rối loạn tạo thành các vết loét sần sùi màu nâu

<sup>1</sup> Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm TP. Hồ Chí Minh

<sup>2</sup> Viện Cây ăn quả miền Nam

<sup>3</sup> Sở Khoa học và Công nghệ Tiền Giang

\* Tác giả liên hệ, email: hanhvcaq7@gmail.com

nhặt, mọc nhô lên khỏi mặt lá, cành non, xung quanh vết bệnh có quang vàng. Nếu bị hại nặng, bệnh có thể làm cho lá bị vàng, rụng sớm khiến cho cây còi cọc, suy yếu dẫn đến chết. Bệnh lở loét là bệnh nguy hiểm trên cây có múi, nhiều nước đã coi đây là một bệnh thuộc diện kiểm dịch thực vật trong việc nhập giống và quả thương phẩm.

Cho đến nay, kiểm soát bệnh giới hạn trong việc áp dụng các hoạt chất thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) gốc đồng, thuốc kháng sinh hoặc loại bỏ cây bị bệnh. Việc sử dụng thuốc BVTV hóa học có nhiều hạn chế như chi phí cao, dễ làm mầm bệnh kháng thuốc, gây ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng đến sức khỏe của con người và vật nuôi. Để giải quyết những hạn chế trên, một số nghiên cứu quản lý bệnh do vi khuẩn gây ra bằng biện pháp sinh học đã được thực hiện, điển hình là biện pháp sử dụng vi khuẩn đối kháng như các peptide kháng khuẩn trong chiết xuất ấu trùng ruồi lính đen đóng nhiều vai trò khác nhau trong hệ thống phòng vệ và có thể kiểm soát nhiều loại vi khuẩn kháng thuốc (Koczulla, 2003) đang được quan tâm vì có các ưu điểm như thân thiện với môi trường, không ảnh hưởng đến sức khỏe con người và vật nuôi, góp phần quan trọng trong việc phát triển nền nông nghiệp hữu cơ bền vững và hiệu quả.

Ruồi lính đen là loài côn trùng không có nguy cơ lây truyền mầm bệnh cho vật nuôi cũng như con người. Hệ vi khuẩn trong ấu trùng ruồi lính đen được phân lập gồm một số chi *Enterococcus* (29,1%), *Escherichia* (22,1%), *Klebsiella* (19,8%), *Providencia* (11,6%), *Enterobacter* (7,6%) và *Morganella* (4,1%) (Gorrens *et al.*, 2021); *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Providencia* và *Scrofulimicrobium* (Ijdema *et al.*, 2022); *Enterococcus* và *Lactococcus* (Kinney *et al.*, 2022). Bên cạnh đó, một số chủng vi khuẩn *Pseudomonas syringae*, *Erwinia herbicola*, *Bacillus subtilis* và *Pseudomonas* được phát hiện trong ấu trùng ruồi lính đen là đối kháng với vi khuẩn gây bệnh loét hại cây có múi (Das *et al.*, 2014). *Pseudomonas aeruginosa* làm giảm sự hình thành loét (De Oliveira *et al.*, 2016; Murate *et al.*, 2015). *Bacillus* spp. cũng được coi là một tác nhân sinh học vì chúng ức chế sự phát triển của *Xanthomonas axonopodis* (Canteros *et al.*, 2017; Daungfu *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2012; Spago *et al.*, 2014). Theo Naqvi và cộng sự (2022), *Cronobacter* và *Enterobacter* cũng có khả năng ức

chế sự phát triển của *X. axonopodis*. Để cung cấp thêm tác nhân sinh học mới trong phòng bệnh do vi khuẩn gây ra trên một số cây ăn quả, việc phân lập các vi khuẩn có lợi từ ấu trùng ruồi lính đen (*Hermetia illucens*) và đánh giá khả năng đối kháng của các vi khuẩn này với vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* là rất cần thiết.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu bệnh loét được thu thập từ vườn bưởi tại Trại thực nghiệm và ấu trùng ruồi lính đen được thu nhận từ Phòng côn trùng, Bộ môn Bảo vệ thực vật, Viện Cây ăn quả miền Nam.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phân lập vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis*

Mẫu lá bưởi bị bệnh loét sau khi thu nhận được khử trùng nhanh bề mặt bằng cồn 70°. Phần tiếp giáp giữa mô khỏe và mô bệnh được cắt nhỏ và ngâm vào ống chứa 5 mL dung dịch PBS (Phosphate Buffer Saline) vô trùng trong 30 phút ở nhiệt độ phòng. Các mẫu phân lập được pha loãng thập phân đến nồng độ  $10^{-5}$  bằng nước muối sinh lý 0,85%. Cây trang 0,1 mL dịch nồng độ  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  vào đĩa Petri chứa môi trường LB, ủ ở 28°C từ 48 đến 72 giờ, chọn những khuẩn lạc tiêu biểu cấy chuyển đến khi thu dòng thuần. Mỗi nồng độ pha loãng tiến hành lặp lại 3 lần (Janse, 2005).

Chọn các khuẩn lạc tròn, nhẵn bóng, rìa nguyên, nhẩy, màu vàng mọc nhô trên môi trường LB đặc trưng cho vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* cấy chuyển và làm thuần. Vi khuẩn sau khi làm thuần được lưu trữ trong glycerol 20% trong điều kiện -20°C để làm nguồn vật liệu cho các thí nghiệm tiếp theo.

#### 2.2.2. Phân lập vi khuẩn trong ấu trùng ruồi lính đen *Hermetia illucens*

Ấu trùng ruồi lính đen được rửa dưới vòi nước đang chảy. Sau đó rửa 1 phút ở tốc độ 200 vòng/phút trên máy lắc trong phòng thí nghiệm, lần 1 với ethanol 70%, lần 2 và 3 với nước cất vô trùng. Sau đó, ấu trùng ruồi lính đen được xay nhuyễn để thu được hỗn hợp đồng nhất. Pha loãng dung dịch đến nồng độ  $10^{-9}$  và cấy lên môi trường PCA. Tất cả các đĩa được ủ trong môi trường hiếu khí ở 37°C trong 2 - 3 ngày. Từ các đĩa đó, các khuẩn lạc khác nhau về hình thái được chọn và cấy chuyển lên các

đĩa PCA mới (Gorrens *et al.*, 2021).

Các mẫu phân lập được pha loãng thập phân đến nồng độ  $10^{-9}$  bằng nước muối sinh lý 0,85%. Dùng pipet hút 0,1 mL dịch vi khuẩn nồng độ  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  cho vào đĩa Petri chứa sẵn môi trường thạch PCA. Dùng que cấy đã khử trùng trang đều khắp bề mặt thạch cho đến khi khô rồi nuôi cấy trong điều kiện thích hợp. Mỗi nồng độ pha loãng tiến hành lặp lại 3 lần. Tiến hành cấy chuyển trên đĩa môi trường thạch PCA nhiều lần cho đến độ thuần vi khuẩn được xác định. Sau khi đã phân lập các khuẩn lạc thuần khiết, lưu trữ trong glycerol 20% trong điều kiện  $-20^{\circ}\text{C}$  để làm nguồn vật liệu cho các thí nghiệm tiếp theo.

Phương pháp định danh vi khuẩn đối kháng: Sử dụng kỹ thuật giải trình tự gen 16S và hiệu chỉnh bằng phần mềm Sequencher 4.1.4 để định danh. Kết quả được so sánh với các trình tự trên Genbank bằng chương trình BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)).

### 2.2.2. Khảo sát khả năng đối kháng của các dòng vi khuẩn phân lập từ ấu trùng ruồi lính đen đối với vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis*

#### a) Khảo sát khả năng đối kháng của dịch nuôi cấy vi khuẩn trên đĩa thạch

Thí nghiệm nhằm đánh giá những dòng vi khuẩn có lợi được phân lập từ ấu trùng ruồi lính đen có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis*. Những dòng vi khuẩn có khả năng đối kháng sẽ được lựa chọn để phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo.

Cách tiến hành: Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 38 nghiệm thức (mỗi nghiệm thức là 1 chủng vi khuẩn đối kháng) và 3 lần lặp lại. Sử dụng đầu tít đã tiệt trùng có đường kính 6 mm đục 3 giếng trên bề mặt đĩa thạch LB. Các lỗ được đục cách thành đĩa Petri khoảng 1 cm để có thể quan sát được vòng kháng khuẩn sau này. Cấy trên bề mặt thạch 0,1 mL dịch vi khuẩn *X. axonopodis* trải đều trên bề mặt thạch trước khi đục lỗ.

Cho một giọt môi trường LB vào lỗ để bịt kín đáy lỗ, hút 0,15 mL dịch vi khuẩn đối kháng được nuôi cấy trong môi trường LB cho vào mỗi lỗ. Các đĩa được bảo quản ở  $4^{\circ}\text{C}$  trong 2 giờ để ngăn cản sự phát triển của chủng chỉ thị và tạo điều kiện cho chất kháng khuẩn có thời gian thẩm thấu vào bên

trong thạch, ủ ở  $30^{\circ}\text{C}$ , trong 48 giờ. Mỗi chủng vi khuẩn được lặp lại 3 lần. Sau 2 ngày, quan sát vòng vô khuẩn tạo ra bởi các chủng vi khuẩn đối kháng và đo bán kính vòng vô khuẩn. Dựa vào kết quả khảo sát khả năng đối kháng của vi khuẩn, chọn lọc các dòng vi khuẩn đối kháng mạnh để sử dụng cho khảo sát khả năng đối kháng dịch trích của các chủng vi khuẩn này với vi khuẩn *X. axonopodis* trên đĩa thạch.

Bán kính vòng vô khuẩn xung quanh miệng lỗ thể hiện khả năng đối kháng các chủng *X. axonopodis* của các chủng vi khuẩn đối kháng phân lập từ ấu trùng ruồi lính đen có thể ở mức độ khác nhau, tùy theo khả năng đối kháng của các chủng vi khuẩn.

#### b) Khảo sát khả năng đối kháng của dịch ly tâm vi khuẩn trên đĩa thạch

Sau khi đã chọn được những dòng vi khuẩn tạo vòng vô khuẩn với vi khuẩn *X. axonopodis*, tiếp tục khảo sát khả năng đối kháng của dịch trích vi khuẩn từ ruồi lính đen đối với vi khuẩn *X. axonopodis* bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Mục đích của thí nghiệm này là để xác định khả năng đối kháng có được duy trì khi không có mặt vi khuẩn hay không.

Cách tiến hành: Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 nghiệm thức (mỗi nghiệm thức là 1 chủng vi khuẩn) và 4 lần lặp lại.

Chuẩn bị vi khuẩn đối kháng: Nuôi vi khuẩn đối kháng trong 10 mL môi trường dinh dưỡng LB trên máy lắc, 1 mL huyền phù vi khuẩn được ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút trong 15 phút. Rút phần dịch trong phía trên sang tube mới.

Chuẩn bị dịch huyền phù vi khuẩn *X. axonopodis*: Pha loãng một lúp đầy trên đầu que cấy vi khuẩn *X. axonopodis* trong ống nghiệm đựng 10 mL nước cất, sau đó rút 0,1 mL dịch huyền phù *X. axonopodis* trải đều lên đĩa Petri chứa môi trường thạch LB.

Đục 4 lỗ đường kính 6 mm trên đĩa thạch để tạo thành 4 giếng. Giếng 1 và 4 là vị trí để đưa 0,15 mL dịch trích vi khuẩn đối kháng vào, giếng 2 là vị trí để đưa 0,15 mL nước cất vào và giếng 3 là vị trí để đưa 0,15 mL môi trường LB vào.

Đề đĩa thạch ở nhiệt độ phòng, sau 48 giờ quan sát và đo vòng vô khuẩn tạo ra bởi dịch trích của

các vi khuẩn đối kháng với vi khuẩn *X. axonopodis*. Dựa trên kết quả khảo sát khả năng đối kháng của vi khuẩn và dịch trích môi trường nuôi vi khuẩn để chọn ra các chủng vi khuẩn đối kháng mạnh.

### c) Phương pháp pha loãng dịch vi khuẩn

Kiểm tra tính nhạy cảm của vi khuẩn về khả năng tồn tại và sinh trưởng của vi khuẩn. Phương pháp đo độ đục có độ chính xác tương đối cao.

Cách tiến hành: Chuẩn bị ống nghiệm đã hấp khử trùng ở 121°C trong 30 phút. Hút vào mỗi ống: Ống đối chứng: 10 mL môi trường LB + dịch vi khuẩn chỉ thị *X. axonopodis*; ống đối kháng: 10 mL môi trường LB + 0,1 mL dịch ly tâm đã lọc + dịch vi khuẩn chỉ thị *X. axonopodis*. Dịch vi khuẩn được đưa vào sao cho mật độ vi khuẩn đạt  $2 \times 10^6$  CFU/mL, sau đó ủ ở 30°C trong 24 giờ. Khả năng kháng khuẩn được xác định bằng cách đo mật độ quang ở bước sóng 550 nm. Khi tỷ lệ đối kháng lớn hơn hoặc bằng 50% thì được xem là ức chế tích cực.

Chỉ tiêu theo dõi: Khả năng kháng khuẩn được tính theo công thức:

$$\text{Phần trăm ức chế} = \frac{(\text{OD}_{550, \text{ODC}} - \text{OD}_{550, \text{ODK}})}{\text{OD}_{550, \text{ODC}}} \times 100$$

Trong đó:  $\text{OD}_{550, \text{ODC}}$  là giá trị đo mật độ quang của ống đối chứng ở bước sóng 550 nm;  $\text{OD}_{550, \text{ODK}}$  là giá trị đo mật độ quang của ống đối kháng ở bước sóng 550 nm (Choi et al., 2012).

### 2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được tổng hợp, xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel.

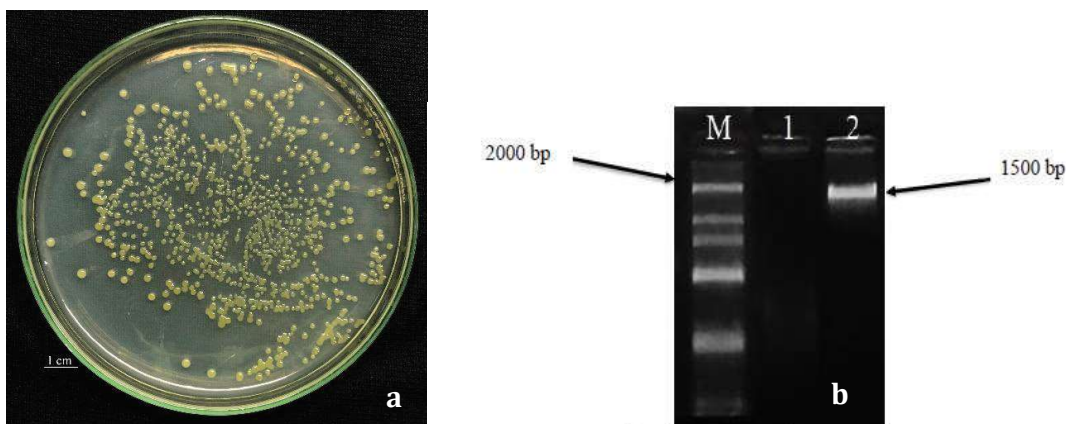
### 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thí nghiệm được thực hiện từ tháng 01 đến tháng 6 năm 2023 tại Bộ môn Bảo vệ thực vật Viện Cây ăn quả miền Nam - Long Định, Châu Thành, Tiền Giang.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn gây bệnh loét cây bưởi

Từ mẫu lá bưởi bị bệnh loét thu thập, sau khi phân lập thu được nhiều khuẩn lạc vi khuẩn khác nhau. Các khuẩn lạc có các đặc điểm như khuẩn lạc tròn, màu vàng, bóng, nhầy nhớt được chọn và làm thuần nhiều lần (Hình 1).



**Hình 1.** Hình thái khuẩn lạc vi khuẩn phân lập từ lá bưởi bị bệnh loét (a) và kết quả PCR vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* (b)

Kết hợp giữa hình thái, đặc điểm sinh lý, sinh hóa và giải trình tự 16S-rRNA xác định đây là vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis*. Kết quả này tương tự kết quả được công bố bởi Bhure và cộng sự (2018), Kumar và cộng sự (2020).

### 3.2. Kết quả phân lập vi khuẩn trong ấu trùng ruồi lính đen *Hermetia illucens*

Kết quả bảng 1 ghi nhận được 38 dòng vi khuẩn phân lập từ ấu trùng ruồi lính đen *H. illucens*. Các chủng vi khuẩn có khuẩn lạc hình tròn hoặc

không đều nhau; có màu trắng trong, trắng đục, vàng, cam và nâu nhạt; bề mặt khuẩn lạc khô, một số chủng vi khuẩn có bề mặt ướt. Mặc dù, chưa xác định được các chủng vi khuẩn này nhưng nhìn chung 38 chủng vi khuẩn trên có sự đa dạng về hình dạng, màu sắc và bề mặt khuẩn lạc. Trong đó, các chủng vi khuẩn có khuẩn lạc tròn, màu trắng đục, bề mặt khuẩn lạc khô và các chủng vi khuẩn có khuẩn lạc tròn, màu vàng, bề mặt khuẩn lạc khô phổ biến nhất.

**Bảng 1.** Hình thái khuẩn lạc các dòng vi khuẩn phân lập từ ấu trùng ruồi lính đen

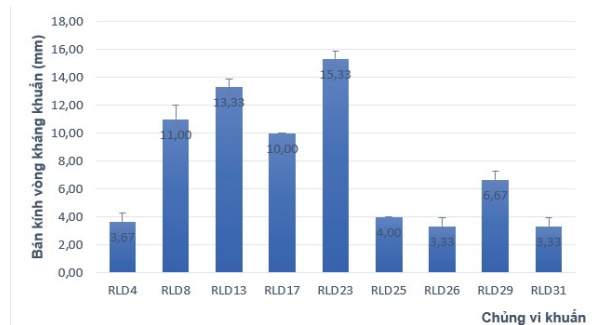
Dòng vi khuẩn	Hình thái khuẩn lạc	Dòng vi khuẩn	Hình thái khuẩn lạc
RLD1	Nhỏ, tròn, trơn, rìa răng cưa, màu trắng sữa	RLD20	Trắng trong, trơn, tâm tròn
RLD2	Nhỏ vừa, tròn, tâm tròn nhô cao, màu vàng nhạt	RLD21	Tròn, màu vàng nhạt, tâm màu vàng đậm, rìa răng cưa
RLD3	Vừa, hơi giống hình thoi, tâm tròn màu trắng nhạt, màu cam nhạt	RLD22	Hơi tròn, màu cam, trơn, tâm nhô cao
RLD4	Hơi tròn, màu cam, tâm lõm, rìa răng cưa	RLD23	Hơi tròn, nhẩy, trơn, màu nâu nhạt
RLD5	Tròn, trơn, màu cam nhạt, mép có nếp	RLD24	Tròn, trơn, tâm lõm tròn, màu cam nhạt
RLD6	Tròn, tâm tròn nhô cao, mép răng cưa màu trắng nhạt, màu trắng đục	RLD25	Tứ giác, màu trắng trong, tâm trắng đục, rìa răng cưa
RLD7	Trắng trong, trơn, tâm tròn nhô cao màu trắng đục	RLD26	Tròn, cam, có mép nhăn ở rìa
RLD8	Hơi tròn, bề mặt nhăn nheo, rìa có răng cưa, màu trắng đục	RLD27	Tròn, màu vàng trứng gà, tâm tròn màu trắng nhạt, rìa răng cưa
RLD9	Vừa, tròn, ít nhăn, lõi đỉnh, màu trắng hơi vàng	RLD28	Hơi tròn, màu cam, tâm lõm, rìa răng rưa
RLD10	Nhỏ, tròn, nhăn, lõi nhiều, màu trắng đục	RLD29	Hơi tròn, màu vàng, tâm tròn, rìa răng cưa màu vàng nhạt
RLD11	Vừa, tròn, tâm nhô cao, màu trắng ngà	RLD30	Hơi tròn, trắng đục, có mép nhăn ở rìa
RLD12	Tròn, tâm tròn màu vàng đậm, rìa răng cưa, màu vàng nhạt	RLD31	Tròn, trắng đục, trơn, rìa răng cưa
RLD13	Tròn, màu trắng đục	RLD32	Hơi tròn, màu vàng, nhăn nheo nhiều
RLD14	Vừa, tròn, tâm lõi nhiều, màu trắng sữa	RLD33	Tròn, màu vàng nhạt, trơn, tâm tròn
RLD15	Cam, nhăn, tâm nhô cao	RLD34	Tròn, trắng đục, rìa răng cưa có mép thùy
RLD16	Tròn, màu cam nhạt, trơn	RLD35	Hơi tròn, màu cam, mép nhăn
RLD17	Hơi tròn, màu vàng hột gà, trơn, tâm nhô cao	RLD36	Tròn, bề mặt nhăn nheo, mép có thùy, màu vàng
RLD18	Tròn, trắng đục, trơn	RLD37	Vừa, hơi giống hình thoi, màu cam nhạt, rìa răng cưa
RLD19	Tròn, vàng, nhăn, rìa răng cưa	RLD38	Nhỏ, tròn, tâm nhô cam, màu cam

**3.3. Kết quả khảo sát khả năng đối kháng của các dòng vi khuẩn phân lập từ ấu trùng ruồi lính đen đối với vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis***

**3.3.1. Kết quả khảo sát khả năng đối kháng của dịch nuôi cấy vi khuẩn trên đĩa thạch**

Dịch nuôi cấy vi khuẩn trong ấu trùng ruồi lính đen được thử nghiệm đối kháng với vi khuẩn *X. axonopodis* bằng phương pháp khuếch tán qua đĩa thạch LB, sau 48 giờ kiểm tra ghi nhận vòng kháng khuẩn xung quanh lỗ thạch. Trong 38 chủng vi khuẩn được khảo sát, 9 chủng có khả năng đối kháng với vi khuẩn *X. axonopodis* trên đĩa thạch là RLD4, RLD8, RLD13, RLD17, RLD23, RLD25, RLD26, RLD29 và RLD31. Trong đó, có 05 chủng vi khuẩn tạo bán kính vòng vô khuẩn lớn hơn 5

mm là RLD8, RLD13, RLD17, RLD23 và RLD29. Chủng vi khuẩn RLD23 tạo bán kính vòng vô khuẩn cao nhất là 15,33 mm, kế đến là chủng vi khuẩn RLD13 tạo bán kính vòng vô khuẩn là 13,33 mm.

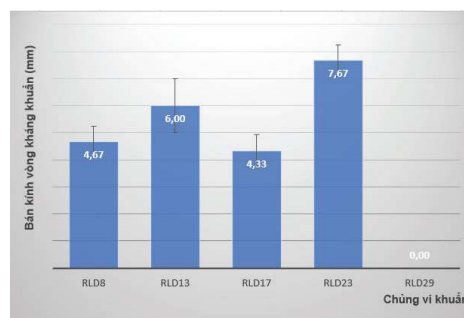


**Hình 2.** Kết quả đối kháng của vi khuẩn trong ấu trùng ruồi lính đen với *Xanthomonas axonopodis* bằng dịch nuôi cấy

### 3.3.2. Kết quả khảo sát khả năng đối kháng của dịch ly tâm vi khuẩn trên đĩa thạch

Để kiểm tra xem khi vắng mặt tế bào vi khuẩn thì các chất biến dưỡng trong vi khuẩn có khả năng đối kháng với mầm bệnh hay không, 05 chủng vi khuẩn đối kháng mạnh nhất là RLD8, RLD13, RLD17, RLD23 và RLD29 tiếp tục được khảo sát khả năng đối kháng của dịch trích vi khuẩn này với vi khuẩn *X. axonopodis*.

Các chủng vi khuẩn đối kháng mạnh có khả năng ứng dụng là các chủng vi khuẩn có khả năng tạo vòng vô khuẩn càng lớn càng tốt, đồng thời các chất biến dưỡng của vi khuẩn (đã loại bỏ vi khuẩn) duy trì được khả năng đối kháng với vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis*. Trong 05 chủng vi khuẩn đối kháng, 2 chủng RLD13 và RLD23 đối kháng tốt nhất với vi khuẩn *X. axonopodis* với kích thước bán kính vòng kháng khuẩn đạt 6 mm và 7,67 mm. Dịch ly tâm chủng RLD29 không đối kháng với *X. axonopodis* (Hình 3).



**Hình 3.** Kết quả đối kháng của dịch ly tâm vi khuẩn trong ấu trùng ruồi lính đen với vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis*

Kết quả bảng 2 cho thấy giá trị OD của 4 chủng vi khuẩn RLD8, RLD13, RLD17 và RLD23 đối kháng với *X. axonopodis* nhỏ hơn giá trị OD đối chứng. Điều này chứng tỏ 4 chủng này có khả năng đối kháng với vi khuẩn *X. axonopodis*. Trong đó hai chủng vi khuẩn RLD23 và RLD13 cho phần trăm ức chế cao hơn, lần lượt là 59,22% và 44,94%. Theo kết quả định danh ghi nhận chủng RLD13 là vi khuẩn *Bacillus velezensis* và chủng RLD23 là vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*.

**Bảng 2.** Bảng giá trị đo OD của dịch vi khuẩn đối kháng với vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* bằng phương pháp pha loãng dịch vi khuẩn

STT	Dòng phân lập	Giá trị OD ống đối chứng	Giá trị OD dịch vi khuẩn	% ức chế
1	RLD8	0,4387 ± 0,0029	0,2804 ± 0,0067	36,08%
2	RLD13	0,4387 ± 0,0029	0,2415 ± 0,0081	44,94%
3	RLD17	0,4387 ± 0,0029	0,3480 ± 0,0075	20,67%
4	RLD23	0,4387 ± 0,0029	0,1789 ± 0,0030	59,22%

Nghiên cứu đã xác định được 2 chủng vi khuẩn *bacillus velezensis* và *Pseudomonas aeruginosa* có khả năng đối kháng với chủng gây bệnh loét *Xanthomonas axonopodis*, kết quả này cũng khá phù hợp với kết quả thí nghiệm tại Viện Nghiên cứu Bảo vệ Thực vật Iran khi đánh giá các hoạt động đối kháng của vi khuẩn *Pseudomonas* spp. thông qua đo quang sáng ức chế trong đĩa Petri đã cho thấy tất cả 20 chủng *Pseudomonas* đều ức chế sự phát triển của *Xanthomonas*. Trong điều kiện *in vitro*, *Pseudomonas fluorescent* có khả năng đối kháng tốt nhất với kích thước vòng kháng khuẩn là 6,4 cm (Khodakaramian *et al.*, 2008).

Tuy nhiên căn cứ vào bảng đánh giá về cấp độ

an toàn sinh học thì chủng RLD13 có tiềm năng hơn để ứng dụng trong sản xuất chế phẩm vi sinh phòng bệnh cây trồng.

## IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

### 4.1. Kết luận

Tổng số 38 chủng vi khuẩn đã được phân lập từ mẫu ấu trùng ruồi lính đen, các chủng vi khuẩn này có sự đa dạng về hình dạng, màu sắc và bề mặt khuẩn lạc.

Kết quả khảo sát cho thấy 09 chủng có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis* trên đĩa thạch, trong đó chủng vi khuẩn RLD13 *Bacillus velezensis* có khả năng đối kháng mạnh với vi khuẩn *Xanthomonas axonopodis*.

#### 4.2. Đề nghị

Tiếp tục khảo sát khả năng đối kháng của vi khuẩn *Bacillus velezensis* (chủng RLD13) ở điều kiện ngoài đồng. Từ đó nghiên cứu quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh từ *Bacillus velezensis* có đặc tính kháng khuẩn mạnh để đưa vào sản xuất đại trà giúp cho việc phòng trị bệnh hiệu quả hơn, giảm thiểu thiệt hại do bệnh loét gây hại trên cây có múi.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Canteros B. I., Gochez A. M., & Moschini R. C.,** 2017. Management of citrus canker in argentina, a success story. *Plant Pathology Journal*, 33 (5): 441-449.
- Choi J. K., Lim Y. S., Kim H. J., Hong Y. H., Ryu B. Y., Kim G.. B.,** 2012. Screening and characterization of *Lactobacillus casei* MCL strain exhibiting immunomodulation activity. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 32: 635-643.
- Das R., Mondal B., Mondal P., Khatua D. C., & Mukherjee N.,** 2014. Biological management of citrus canker on acid lime through *Bacillus subtilis* (S-12) in West Bengal, India. *Article in Journal of Biopesticides*, 7: 38-41.
- Daungfu O., Youpensuk S., & Lumyong S.,** 2019. Endophytic bacteria isolated from citrus plants for biological control of citrus canker in lime plants. *Tropical Life Sciences Research*, 30 (1): 73-88.
- De Oliveira A. G., Spago F. R., Simionato A. S., Navarro M. O. P., Da Silva C. S., Barazetti A. R., Cely, M. V. T., Tischer C. A., San Martin J. A. B., De Jesus Andrade C. G. T., Novello C. R., Mello, J. C. P., & Andrade G.,** 2016. Bioactive organocopper compound from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Frontiers in Microbiology*, 7 (FEB).
- Gorrens E., Van Moll L., Frooninckx L., De Smet J., & Van Campenhout L.,** 2021. Isolation and identification of dominant bacteria from black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) envisaging practical applications. *Frontiers in Microbiology*, 12: 1-12.
- Huang T. P., Tzeng D. D. S., Wong A. C. L., Chen C. H., Lu K. M., Lee Y. H., Huang W. Di, Hwang B. F., & Tzeng K. C.,** 2012. DNA polymorphisms and biocontrol of *Bacillus* antagonistic to citrus bacterial canker with indication of the interference of phyllosphere biofilms. *Plos One*, 7 (7): 1-11.
- Ijdema F., De S. J., Crauwels S., Lievens B., & Van C. L.,** 2022. Meta-analysis of larvae of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) microbiota based on 16S rRNA gene amplicon sequencing. *FEMS Microbiology Ecology*, 98 (9): 1-13. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiac094>.
- Janse J.D.,** 2005. Examples of bacterial diseases of cultivated and wild plants *Xanthomonas fragariae*. In: *Phytobacteriology: principles and practice*. Chapter 7. Wallingford, UK, CABI Publishing. Pp. 224-225.
- Khodakaramian G., Heydari A., Balestra G.M.,** 2008. Evaluation of pseudomonads bacterial isolates in biological control of citrus bacterial canker disease. *International Journal of Agricultural Research*, 3 (4): 268-272.
- Kinney M., Moyet M., Bernard E. & Alyokhin A.,** 2022. Suppression of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Reduction of Other Bacteria by Black Soldier Fly Larvae Reared on Potato Substrate. *Microbiology Spectrum*, 10 (15): 13 pp. DOI:10.1128/spectrum.02321-22.
- Koczulla AR., Bals R.,** 2003. Antimicrobial peptides Current status and therapeutic potential. *Drugs*, 63: 389-406.
- Murate L. S., de Oliveira A. G., Higashi A. Y., Barazetti, A. R., Simionato A. S., Silva C. S. da, Simões G. C., Santos I. M. O. dos, Ferreira M. R., Cely M. V. T., Navarro M. O. P., Freitas V. F. de, Nogueira M. A., Mello J. C. P. de, Leite Jr. R. P. & Andrade G.,** 2015. Activity of Secondary Bacterial Metabolites in the Control of Citrus Canker. *Agricultural Sciences*, 06 (03): 295-303.
- Naqvi S. A. H., Wang J., Malik M. T., Umar U. U. D., Ateeq-Ur-rehman, Hasnain A., Sohail M. A., Shakeel M. T., Nauman M., Hafeez-Ur-rehman, Hassan M. Z., Fatima M. & Datta R.,** 2022. Citrus canker - distribution, taxonomy, epidemiology, disease cycle, pathogen biology, detection, and management: A critical review and future research agenda. *Agronomy*, 12 (5): 1-31. MDPI.
- Spago F. R., Ishii Mauro C. S., Oliveira, A. G., Beranger J. P. O., Cely M. V. T., Stanganelli M. M., Simionato A. S., San Martin J. A. B., Andrade C. G. T. J., Mello J. C. P., & Andrade G.,** 2014. *Pseudomonas aeruginosa* produces secondary metabolites that have biological activity against plant pathogenic *Xanthomonas* species. *Crop Protection*, 62: 46-54.

## Study on the antagonistic ability of isolated pathogenic bacteria from black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) against *Xanthomonas axonopodis*

Le Ngoc Giao, Nguyen Thi Cam Giang,  
Dang Quoc Chuong, Phan Ha, Tran Thi My Hanh

### Abstract

*Xanthomonas axonopodis* is the main causative agent of citrus ulcers. Currently, research and application of probiotics in the control and prevention of harmful bacteria are increasingly being interested in the strategy of sustainable agricultural development. In this study, 38 bacterial strains were isolated from black soldier fly larvae, of which RLD13 and RLD23 were evaluated for strong antagonistic ability against *Xanthomonas axonopodis*. Based on morphological characteristics and 16S rRNA sequences, the RLD13 strain was identified as *Bacillus velezensis* and the RLD23 strain was *Pseudomonas aeruginosa*. With this characteristic, the strain *Bacillus velezensis* RLD13 has the potential to be applied to the production of probiotics against the ulcer-causing bacteria *Xanthomonas axonopodis* for citrus.

**Keywords:** Antimicrobial, *Bacillus velezensis*, Citrus Canker, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas axonopodis*

Ngày nhận bài: 05/4/2024

Người phản biện: GS.TS. Nguyễn Văn Tuất

Ngày phản biện: 22/5/2024

Ngày duyệt đăng: 27/8/2024

## ĐA DẠNG DI TRUYỀN CỦA VI KHUẨN *Ralstonia solanacearum* GÂY BỆNH HÉO XANH TRÊN CÂY CÀ CHUA VÀ KHOAI TÂY TẠI LÂM ĐỒNG

Võ Thị Ngọc Hà<sup>1</sup>, Lê Khắc Hoàng<sup>1</sup>, Huỳnh Thanh Hùng<sup>1</sup>

### TÓM TẮT

Kiểm soát bệnh héo xanh trên cây họ Cà đang ngày càng khó khăn bởi sự thích nghi và thay đổi liên tục của tác nhân gây bệnh với biến đổi khí hậu, các giống cây trồng và các thuốc bảo vệ thực vật. Trong nghiên cứu này, mẫu bệnh héo xanh trên cây cà chua và khoai tây đã được thu thập tại các địa điểm khác nhau thuộc tỉnh Lâm Đồng. Tác nhân gây bệnh được phân lập trên môi trường TZCA và kiểm chứng trên cây ký chủ tương ứng theo quy tắc Koch. Vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* sau đó được xác định Biovar, được định danh bằng trình tự vùng gen 16S-rRNA và được đánh giá sự đa dạng di truyền bằng chỉ thị ISSR. Tổng cộng 32 chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* đã được phân lập đều thuộc Biovar 3 và chia thành 4 nhóm hình thái theo đặc điểm khuẩn lạc trên môi trường TZCA. Trình tự vùng gen 16S-rRNA của 10 chủng *R. solanacearum* đại diện cho từng nhóm hình thái tương đồng với các trình tự của vi khuẩn *R. solanacearum* có sẵn trên Genbank từ 94,56% đến 98,64% với độ bao phủ đạt trên 97%. Chỉ thị phân tử ISSR chỉ ra rằng các chủng vi khuẩn phân lập được có độ đa dạng di truyền cao với hệ số tương đồng di truyền biến động từ 0,43 đến 0,92.

**Từ khóa:** *Ralstonia solanacearum*, héo xanh vi khuẩn, đa dạng di truyền, cây cà chua, cây khoai tây

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* là tác nhân gây bệnh héo xanh và lây nhiễm trên 200 loài thực vật thuộc 50 họ (Caldwell *et al.*, 2017), gây thiệt hại khá nghiêm trọng đến năng suất, có khi lên

đến 95% thậm chí là mất trắng cho các vùng canh tác nông nghiệp, đặc biệt là những cây họ Cà. Mặc dù nhiều tiến bộ kỹ thuật được áp dụng vào sản xuất, song bệnh héo xanh vi khuẩn vẫn luôn hiện diện, gây hại và là mối lo ngại đối với người sản

<sup>1</sup> Khoa Nông học, Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh

\* Tác giả liên hệ, email: ha.vothingoc@hcmuaf.edu.vn