

**NGHIÊN CỨU KÍCH THÍCH XẠ KHUẨN SINH KHÁNG SINH  
DIỆT VI KHUẨN *XANTHOMONAS ORYZAE* PV. *ORYZAE*  
GÂY BỆNH BẠC LÁ LÚA Ở VIỆT NAM**

**PHAN THỊ PHƯƠNG HOA, DƯƠNG VĂN HỢP, NGUYỄN THỊ VÂN,  
NGUYỄN HỒNG ANH, NGUYỄN THỊ ANH ĐÀO,  
NGUYỄN THỊ KIM QUY, NGUYỄN HUỖNH MINH QUYÊN**

*Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội*

**NGUYỄN VĂN TĂNG**

*Trường Đại học Kỹ thuật Y tế Hải Dương*

Vấn đề lương thực luôn là mối quan tâm hàng đầu của nhiều nước, đặc biệt là các nước sử dụng lúa gạo làm nguồn lương thực chính. Việt Nam hiện là nước xuất khẩu gạo lớn trên thế giới nhưng sản lượng lúa gạo luôn bị ảnh hưởng nghiêm trọng bởi các dịch bệnh bệnh bạc lá, sâu cuốn lá, héo vằn, tungro virus... Trong đó, bệnh bạc lá lúa do vi khuẩn *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* làm giảm 6 - 60% tổng năng suất lúa gạo hàng năm [Dai *et al.*, 2007]. Việt Nam là nước nằm trong khu vực nhiệt đới gió mùa, nên có điều kiện thuận lợi cho sự phát triển của bệnh bạc lá lúa. Bệnh gây hại trong cả hai vụ lúa xuân, hè và hại trên nhiều giống khác nhau, đặc biệt là các giống lúa thuần, lúa lai nhập nội từ Trung Quốc [Thanh, 2006]. Để điều trị và chống lại sự bùng phát của căn bệnh này, có thể dùng thuốc hoá học hoặc chọn lọc các dòng lúa mang gen kháng bệnh bạc lá. Tuy nhiên, chưa có biện pháp nào có thể diệt được vi khuẩn bạc lá lúa một cách hiệu quả. Việc sàng lọc xạ khuẩn và các chất có hoạt tính sinh học do chúng sinh ra làm tác nhân khống chế sinh học là một biện pháp có triển vọng và thân thiện với môi trường. Trong nghiên cứu này, chúng tôi dùng 90 chủng xạ khuẩn phân lập từ đất để chọn lọc các chủng có khả năng diệt được 10 nòi *X. oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh phổ biến ở Việt Nam và Nhật Bản và nghiên cứu nhằm tăng khả năng sinh kháng sinh của chúng đã được chọn lọc.

## **I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

### **Môi trường nuôi cấy:**

\* *Môi trường SPA (Wakimoto Medium, 1995), 1 L*

Khoai tây gọt vỏ	300 g
NaHPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	2 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,5 g
Peptone	5 g
Đường Saccarose	15 g
Agar	15 g
pH	7,0

\* *Môi trường APM (Antibiotic Producing Medium), 1 L*

Tinh bột	10 g
Glucose	10 g
Soybean meal	10 g
CaCO <sub>3</sub>	3 g
Peptone	10 g
Agar	20 g
Tween 80	1 giọt
pH	7,0

\* *Môi trường YS (Yeast - Starch Medium), 1 L*

Tinh bột	10 g
Cao nấm men	2 g
Agar	17 g
pH	7,0

\* *Môi trường YM (Yeast Malt Medium), 1 L*

Cao malt	3 g
Cao nấm men	3 g
Glucose	10 g
Peptone	5 g
Agar	17 g
pH	7,0

Hoạt tính kháng sinh của các chủng xạ khuẩn được xác định bằng phương pháp đặt thỏi thạch như sau: Các chủng vi khuẩn *X. oryzae* pv. *oryzae* được nuôi riêng biệt trong môi trường sinh kháng sinh dịch thể lắc 150 vòng/phút, ở nhiệt độ 29 - 30°C trong 2 ngày. Đun sôi môi trường SPA thạch lỏng (agar 1%) rồi để nguội đến 40 - 50°C. Sau đó trộn các chủng vi khuẩn với môi trường rồi đổ lên đĩa petri. Từ 90 chủng xạ khuẩn thuộc bộ giống VN10, sử dụng các ống nhựa có đường kính 0,5cm khoan 1 lỗ các thỏi thạch. Đặt các thỏi thạch lên môi trường thạch, ủ ấm ở 30°C. Sau 2 - 3 ngày tiến hành đọc kết quả. Hoạt tính kháng sinh được xác định bằng đường kính của vòng vô khuẩn trên đĩa thạch.

**Kiểm tra khả năng sinh độc tố của xạ khuẩn theo hai hướng**

\* *Kiểm tra khả năng kháng các chủng vi sinh vật kiểm định:* Nuôi 3 chủng vi khuẩn (*Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* và *Escherichia coli*) trong môi trường YS dịch thể và 1 chủng nấm (*Saccharomyces cerevisiae*) trong môi trường YM dịch thể, lắc 200 vòng/phút, sau 1 ngày trộn vào môi trường thạch thích hợp. Dùng các ống nhựa vô trùng có đường kính 0,5cm đục các thỏi thạch trên đĩa petri cấy chủng VN10-A44 rồi đặt các thỏi thạch lên môi trường chứa các chủng kiểm định. Sau 2 ngày, đọc kết quả vòng kháng trên các đĩa thạch.

\* *Kiểm tra khả năng thay đổi màu phụ thuộc vào pH:* Nhỏ dung dịch HCl (1N) hoặc NaOH (2N) lên bề mặt xạ khuẩn và quan sát sự thay đổi màu sau từ 10 - 20 phút. Các chủng xạ khuẩn thay đổi màu theo pH là các chủng có khả năng sinh độc tố [Chung, 2011].

Kích thích chủng VN10-A44 tăng khả năng sinh kháng sinh: Sau khi đã chọn được chủng VN10-A44 có hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh bạc lá lúa cao nhất, sử dụng chính các chủng vi khuẩn gây bệnh để kích thích khả năng sinh kháng sinh của chủng xạ khuẩn này theo phương pháp: Từng chủng vi khuẩn được nuôi cùng chủng VN10-A44 trong môi trường APM dịch thể lắc 150 vòng/phút, ở nhiệt độ 29 - 30°C trong 7 ngày. Các chủng vi khuẩn *X. oryzae* pv. *oryzae* được nuôi riêng biệt trong môi trường dịch thể lắc 150 vòng/phút, ở nhiệt độ 29 - 30°C trong 2 ngày. Đun sôi môi trường SPA thạch lỏng (agar 1%) rồi để nguội đến 40 - 50°C. Sau đó trộn các chủng vi khuẩn với môi trường rồi đổ lên đĩa petri. Đục lỗ các đĩa thạch bằng ống nhựa có đường kính 0,5 cm. Nhỏ dịch xạ khuẩn nuôi lắc với vi khuẩn vào trong các lỗ trên môi trường thạch. Đặt vào tủ ấm 30°C. Hoạt tính kháng sinh được xác định bằng công thức D-d (D là đường kính vòng vô khuẩn, d là đường kính lỗ khoan tính bằng mm). Phân tích các đặc điểm của chất kháng sinh từ VN10-A44: Cấy 2,5 ml dịch xạ khuẩn vào trong 50 ml môi trường APM dịch thể (5% chất cấy truyền). Nuôi lắc trong 7 ngày ở 28 - 30°C. Ly tâm dịch xạ khuẩn sau khi nuôi lắc

ở 8000 rpm trong 15 phút để tách riêng phần dịch và phần tế bào xạ khuẩn. Phần dịch sau ly tâm được xác định hoạt tính sinh kháng sinh bằng phương pháp đục lỗ thạch. Tách chiết chất kháng sinh từ phần tế bào xạ khuẩn như sau:

Bổ sung cùng một thể tích acetone 50% (50 ml) vào ống chứa lớp tế bào thu được, lắc trên máy lắc trong 1 h, ly tâm hỗn hợp và thu phần dịch nổi ở trên, cô đặc bằng máy cô quay cho tới khi thể tích còn khoảng 6 ml.

Xử lý 1 ml dịch ở 100°C để kiểm tra độ bền của kháng sinh.

Cho 1,5 ml dịch vào 3 ống nghiệm, chỉnh pH mỗi ống lần lượt là 2, 7 và 10. Từ mỗi ống hút 0,7ml sang ống khác rồi thay thế bằng ethyl-acetate với cùng thể tích đó, lại hút 0,7 ml sang ống khác rồi thay thế bằng 1-butanol với cùng thể tích, đem ly tâm 3000 rpm trong 2 phút. 0,1 ml còn lại trong mỗi ống được dùng để thử hoạt tính kháng sinh.

Sau khi ly tâm, hút 0,1 ml trong mỗi ống vào ống nghiệm riêng, tiếp tục cô chân không, sau đó bổ sung 0,1 ml Methanol để hoà tan trở lại rồi đem thử khả năng kháng chủng chỉ thị *X. oryzae* pv. *Oryzae* R2. Đọc kết quả thử nghiệm sau 2 - 3 ngày.

\* *Định tên vi khuẩn bằng đặc điểm hình thái học*: Chủng xạ khuẩn được cấy trên đĩa petri chứa môi trường YS, gài lamel vào thạch chéo 45°, soi dưới kính hiển vi sau khi ủ 4 - 5 ngày ở 30°C [Shirling, 1966], kết hợp chụp ảnh.

ADN tổng số của xạ khuẩn được tách theo phương pháp mô tả bởi Sakiyama và cộng sự (2009). Nhân đản trình tự đích bằng kỹ thuật PCR cùng cặp mồi xuôi 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3' và mồi ngược 1525R: 5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3'. Chu trình nhiệt PCR: Biến tính: 95°C - 3 phút. Tiếp theo 30 chu kỳ: 95°C - 30 giây, 56°C - 15 giây, 72°C - 1 phút. Chu kỳ cuối: 72°C - 5 phút 4°C - ∞. Tinh sạch sản phẩm PCR sử dụng bộ kit QIAgen theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Phản ứng giải trình tự sử dụng bộ kit thương phẩm Bigdye Ready Reaction premix cùng mồi 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1525R: 5'-AAAGGAGGTGATCCAGCC-3'; 780F: 5'-GAATTGATACCCTGGTAG-3'; 350R: 5'-CTGCTGCCTCCCGTAG-3'; 1100F: 5'-GCAACGAGCGCAACCC-3' và 920R: 5'-GTCAATTCCTTTGAGTTT-3'. Đọc trình tự bằng máy ABI 3100 Avant Genetic Analyzer. Phân tích độ tương đồng giữa trình tự đích (đoạn DNA 16S) với các trình tự tương đồng đã công bố trên ngân hàng gen sử dụng công cụ BLAST trực tuyến (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Đối chiếu trình tự bằng công cụ ClustalW trong phần mềm Mega 5.1. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng theo phương pháp Neighbor-joining (NJ) sử dụng phép toán Jukes-Cantor với độ lặp lại 1.000 lần. Các trình tự tham khảo dùng xây dựng cây phát sinh chủng loại được lấy từ dữ liệu của DDBJ, EMBL, GenBank... (Kim *et al.*, 1999).

## II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 1. Sàng lọc các chủng xạ khuẩn sinh kháng sinh

Kết quả sàng lọc để chọn chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng vi khuẩn *X. oryzae* pv. *oryzae* cao nhất từ 90 chủng trong bộ giống VN10 của chúng tôi được trình bày trong Bảng 1 và Bảng 2 cho thấy: Số chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng vi khuẩn gây bệnh bạc lá lúa là tương đối ít, chỉ có 12 trên 90 chủng (14,4%). Trong đó, chỉ có 3 chủng xạ khuẩn (VN10-A23, VN10-A44, VN10-A58) có khả năng kháng cả 10 chủng vi khuẩn. Tỷ lệ chủng xạ khuẩn có khả năng diệt hai chủng vi khuẩn R2 và R9 là thấp nhất (3,3% và 4,4%).

Bảng 1

Tỷ lệ (%) các chủng xạ khuẩn kháng vi khuẩn gây bệnh bạc lá lúa

Chủng vi khuẩn	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Tỷ lệ chủng xạ khuẩn kháng vi khuẩn	14,4	3,3	14,4	13,3	13,3	6,7	12,2	12,2	4,4	14,4

Bảng 2

Hoạt tính kháng *X. oryzae* pv. *oryzae* của một số chủng xạ khuẩn (VN10 A-) (hoạt tính đo bằng D - d, đơn vị tính bằng mm)

Chủng	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
A-15	20	-	+	28	35	-	20	26	-	20
16	9	-	+	12	19	2	3	12	1	1
19	9	-	+	4	3	-	-	-	-	-
23	9	3	+	11	18	1	9	12	1	2
24	24	-	+	25	17	1	10	15	-	20
30	11	-	+	11	15	-	7	5	-	10
38	18	-	+	15	17	-	13	13	-	13
39	11	-	+	7	13	-	8	8	-	+
44	25	1	25	15	25	2	19	19	3	20
58	26	1	+	18	18	5	17	13	1	1
74	5	-	+	-	-	-	-	-	-	-
76	35	-	+	11	9	1	15	8	-	9
77	20	-	+	18	23	-	11	11	-	+

2. Kiểm tra khả năng sinh độc tố của xạ khuẩn

Để có thể ứng dụng xạ khuẩn trên đồng ruộng thì mức độ an toàn của chủng xạ khuẩn là rất quan trọng. Khả năng sinh độc tố của 3 chủng xạ khuẩn có khả năng kháng vi khuẩn *X. oryzae* pv. *oryzae* mạnh nhất được kiểm định khả năng kháng lại 3 chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* và 1 chủng nấm *Saccharomyces cerevisiae*. Kết quả cho thấy chủng A23 và A58 có khả năng kháng cả 4 vi sinh vật kiểm định và chỉ có chủng VN10-A44 là kháng chọn lọc một số ít vi khuẩn (Bảng 3). Kết quả này gợi ý chủng VN10-A44 không sinh độc tố

Bảng 3

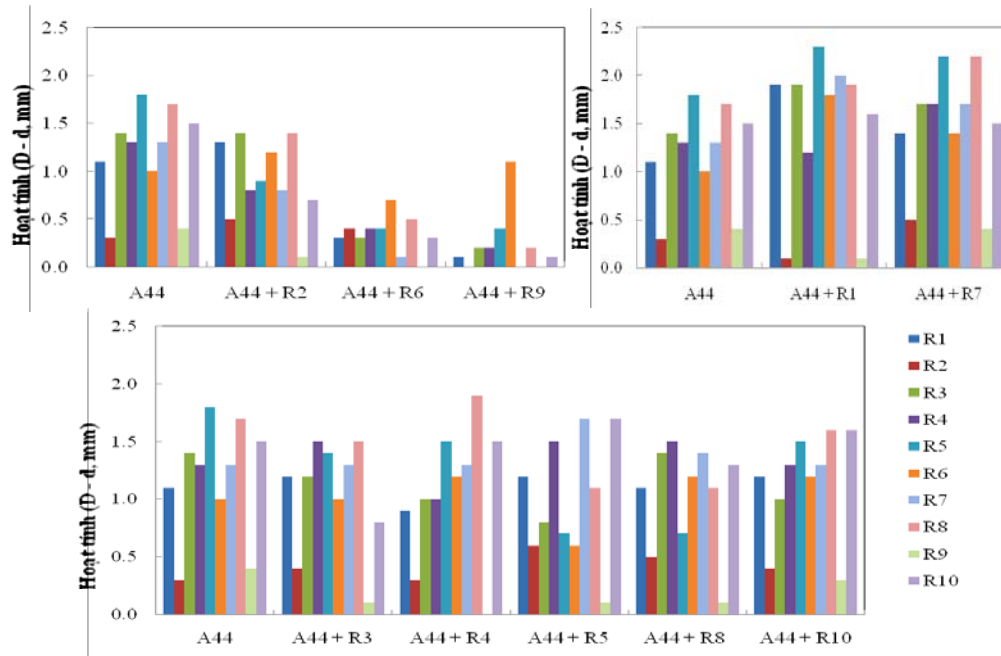
Hoạt tính kháng các chủng VSV kiểm định (D-d= mm)

Xạ khuẩn	VN10-A44	VN10-A23	VN10-A58
<i>B. subtilis</i>	14	13	21
<i>E. coli</i>	-	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	-	47	9
<i>M. luteus</i>	-	+	30

Kiểm tra sự thay đổi màu của chủng xạ khuẩn phụ thuộc vào pH môi trường, trên cơ sở chủng vi sinh vật sinh độc tố sẽ làm thay đổi màu của môi trường ở pH 2 và pH 10, cho kết quả chủng VN10-A44 không sinh độc tố.

### 3. Kích thích khả năng sinh kháng sinh của chủng VN10-A44

Sử dụng chính các chủng vi khuẩn *X. oryzae* pv. *oryzae* làm tác nhân kích thích chủng VN10-A44 sinh ra kháng sinh diệt *X. oryzae* pv. *oryzae*. Trong số 10 chủng vi khuẩn *X. oryzae* pv. *oryzae* gây bệnh, chủng R2 có phân bố rộng nhất và khó diệt nhất, chủng xạ khuẩn VN10-A44 cũng kháng chủng R2 thấp. Vì vậy chủng R2 được sử dụng làm chủng chỉ thị cho việc nâng cao khả năng kháng R2 của chủng VN10-A44. Chủng VN10-A44 được nuôi lắc với từng nòi vi khuẩn *X. oryzae* pv. *oryzae* (từ R1 đến R10) trong thời gian 7 ngày ở 30°C. Sau đó dịch nuôi được sử dụng để kiểm tra khả năng kháng chủng R2 và kết quả trình bày trong Hình 1 cho thấy: Chủng R2, R6, R9 làm giảm hoạt tính sinh kháng sinh của xạ khuẩn; Các chủng R3, R4, R5, R8 và R10 ít làm thay đổi hoạt tính; Chủng R1 và R7 làm tăng hoạt tính kháng khuẩn của chủng VN10-A44. Như vậy, không phải tất cả các nòi *X. oryzae* pv. *oryzae* đều có thể kích thích VN10-A44 sinh kháng sinh mạnh hơn.



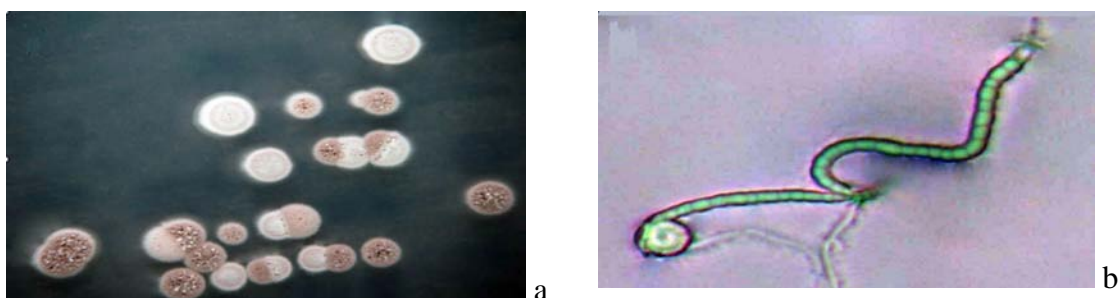
Hình 1: Hoạt tính kháng R2 của chủng VN10-A44 nuôi cùng các chủng *X. oryzae* pv. *Oryzae*

### 4. Tách hoạt chất kháng khuẩn bằng dung môi hữu cơ

Chất kháng sinh được tách chiết từ xạ khuẩn sau 7 ngày bằng các dung môi hữu cơ 1-butanol và ethylacetate. Chất kháng sinh thu được nhiều hơn tại pH 2 so với ở pH 7 và 10. Tách chiết bằng 1-butanol là tốt hơn so với ethylacetate. Chất kháng sinh bị mất hoạt tính khi xử lý nhiệt ở 100°C.

### 5. Đặc điểm sinh học và phân loại xạ khuẩn

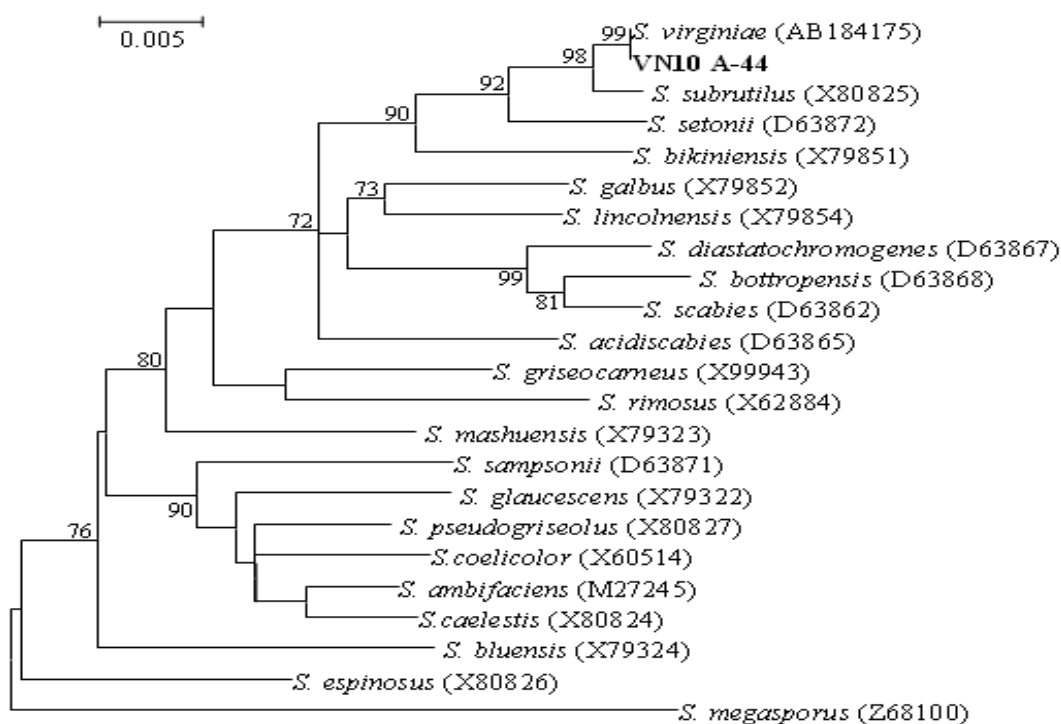
Chủng VN10-A44 tạo khuẩn lạc chắc, xù xì, màu nâu, có các nếp toả ra theo hình phóng xạ và ăn sâu vào môi trường nuôi, trên bề mặt khuẩn lạc hình thành những giọt tiết nhỏ (Hình 2a). Tế bào VN10-A44 tạo chuỗi bào tử ngắn, có dạng xoắn, mỗi chuỗi bào tử gồm từ 3 -5 vòng xoắn (Hình 2b).



Hình 2: Khuẩn lạc (a) và tế bào (b) của chủng VN10-A44

### 6. Định loại chủng xạ khuẩn dựa trên trình tự 16S DNAr

Cây phả hệ được xây dựng từ tiến hóa trình tự DNAr 16S của các chủng nghiên cứu với 22 loài có quan hệ họ hàng gần thuộc chi *Streptomyces* (Hình 3) cho thấy chủng VN10-A44 nằm cùng nhánh với các loài *Streptomyces virginiae*, *S. subrutilus*, *S. setonii* và *S. bikiniensis* (giá trị lặp lại 90-99%). Chủng VN10-A44 có mức độ tương đồng 100% với loài *Streptomyces virginiae*, 99,3% với *S. subrutilus*, 98,5% với *S. setonii* và tương đồng 98% với *S. bikiniensis*. Như vậy, có thể xếp chủng xạ khuẩn VN10-A44 thuộc loài *Streptomyces virginiae*.



Hình 3: Cây phát sinh chủng loại của một số loài thuộc chi *Streptomyces* và vị trí của chủng VN10 A- 44

### III. KẾT LUẬN

Từ 90 chủng xạ khuẩn trong bộ sưu tập VN, đã chọn lọc được 3 chủng xạ khuẩn (VN10-A23, VN10-A44 và VN10-A58) kháng được cả 10 chủng vi khuẩn *X. oryzae* pv. *oryzae*, trong đó có chủng VN10-A44 không sinh độc tố. Nuôi cấy chủng xạ khuẩn VN10 A-44 cùng 10 chủng vi

khuẩn *X. oryzae* pv. *oryzae* (mã hiệu từ R1 đến R10) cho thấy chủng vi khuẩn R1 và R7 kích thích chủng xạ khuẩn sản sinh nhiều kháng sinh, làm tăng hoạt tính kháng vi khuẩn *X. oryzae* pv. *oryzae* (chủng R2), nhưng chủng R2, R6 và R9 lại làm giảm hoạt tính kháng vi khuẩn của VN10-A44. Trên cơ sở đặc điểm hình thái kết hợp với đặc điểm phân tử, có thể định dạng chủng xạ khuẩn VN10-A44 là *Streptomyces virginiae*.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Chung L.P.**, 2011: Biodiversity and antibiotic activity of Actinomycetes isolated from Catba island, Vietnam. University of Liege.
2. **Dai L.Y., X.L. Liu, Y.H. Xiao, G.L. Wang**, 2007: *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(1): 112-119.
3. **Kim B., E.D. Minnikin, J. Zakrzewska-Czerwinska, M. Mordarski, A.M. Goodfellow**, 1999: *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 7-17.
4. **Sakiyama Y., K.N.T. Nguyen, M.G. Nguyen, S. Miyadoh, V.H. Duong & K. Ando**, 2009: *Int J Syst Evol Microbiol*, 59: 550-554.
5. **Shirling E.B.G.**, 1966: *Int J. Syst Bacteriol*, 16: 313-340.
6. **Thanh D.T.**, 2006: Identification of rice bacterial leaf blight *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by PCR. <http://www.ppd.gov.vn/tapsanbvtv/2006/so1/bai%206.htm>

#### A STUDY ON STIMULATING ANTIBIOTICS PRODUCING ACTINOMYCETES FOR BIOLOGICAL CONTROL OF *XANTHOMONAS ORYZAE* PV. *ORYZAE* CAUSING RICE BACTERIAL BLIGHT DISEASE IN VIETNAM

PHAN THI PHUONG HOA, DUONG VAN HOP,  
NGUYEN THI VAN, NGUYEN HONG ANH,  
NGUYEN THI ANH DAO, NGUYEN THI KIM QUY,  
NGUYEN HUYNH MINH QUYEN, NGUYEN VAN TANG

#### SUMMARY

From 90 actinomycete strains that have been isolated from soil and preserved at Vietnam type culture collection, Institute of Microbiology and Biotechnology, Vietnam National University, Hanoi, we have screened for their antagonistic activities against *X. oryzae* pv. *Oryzae*, which causes rice bacterial blight disease in Vietnam. Among these 3-selected strains, we found that VN10-A44 strain did not produce toxic compounds and used for other studies that attempt to improve their antibiotic-producing abilities. We co-cultured VN10 A-44 with each *X. oryzae* pv. *oryzae* races (one by one from race R1 to R10) and considered them as if they were agents to active antibiotic-producing genes of VN10 A-44. Results showed that not all of *X. oryzae* pv. *oryzae* races are able to improve the activity of VN10 A-44; for example, races R1 and R7 have made VN10 A-44 having higher antagonistic activities against race R2 than it has; whereas races R2, R6 and R9 have made it depressed its antagonistic activities. Morphological and molecular characters of VN10-A44 strain indicated that it is *Streptomyces virginiae* species.