

LỰA CHỌN MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY CHŨNG *PSEUDOMONAS SP. DA3.1* SINH CHẤT KHÁNG NẤM NGOẠI BÀO

NGUYỄN THỊ QUỲNH MAI, NGUYỄN THU HIỀN,
NGUYỄN HUY HOÀNG, NGUYỄN NGỌC DŨNG
Viện Công nghệ Sinh học

Chế phẩm sinh học từ vi sinh vật sử dụng trong phòng chống bệnh nấm gây hại cây trồng, thay thế một phần thuốc hoá học gây độc hại nghiêm trọng tới sức khoẻ con người, vật nuôi và môi trường sinh thái ngày càng được quan tâm. Một số chủng vi sinh vật thuộc giống *Bacillus*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* huỳnh quang,... được coi là tác nhân đối kháng nấm bệnh rất hiệu quả. Chủng *Pseudomonas* GRC2 được phân lập từ rễ khoai tây có khả năng chống lại tác nhân gây bệnh thực vật như nấm *Fusarium oxysporum* và *Rhizoctonia solani*.

Vi khuẩn thuộc giống *Pseudomonas* huỳnh quang được đánh giá có nhiều tiềm năng trong phòng chống các nấm gây bệnh cây trồng có nguồn gốc từ đất và hạt. Những chủng vi sinh vật này có khả năng ức chế rất mạnh sinh trưởng của nấm bệnh cây, nhưng đồng thời rất có thể là tác nhân gây bệnh cho con người, như những chủng thuộc loài *Pseudomonas aeruginosa*. Chính vì vậy, các vi khuẩn có khả năng đối kháng nấm gây bệnh cây trồng cần được xác định chính xác về phân loại học trước khi tiếp tục nghiên cứu ứng dụng chúng. Bài báo này trình bày các kết quả nghiên cứu lựa chọn môi trường phù hợp cho sinh trưởng và sinh chất kháng nấm ngoại bào của chủng *Pseudomonas sp. DA3.1*, cùng với vị trí phân loại của chủng này đã được xác định trên cơ sở phân tích trình tự gen 16S-ARN ribosom (16S-rRNA).

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Chủng vi khuẩn *Pseudomonas sp. DA3.1* thuộc bộ sưu tập chủng vi khuẩn có khả năng cao sinh chất kháng nấm ngoại bào của Phòng Vi sinh vật đất, Viện Công nghệ Sinh học. Chủng này được phân lập trên môi trường S1. Nấm gây bệnh cây trồng *F. oxysporum* và *R. solani* do Bộ môn Bệnh cây - Viện Bảo vệ thực vật cung cấp. Chủng DA3.1 được phân loại bằng kiểu hình, hoá sinh theo hệ thống API 20NE và bằng kiểu gen theo tiến hóa phân tử đoạn gen 16SrRNA.

DNA tổng số được tách chiết từ vi khuẩn theo Masterson và cộng sự. Nhân bản đoạn gen 16S rRNA bằng kỹ thuật PCR sử dụng cặp mồi 16S-F: 5'-CGGAATTCATT GCTGGACCTG-3' và 16S-R: 5'-GTCCTAGAGCTTTGTCTTTAGG-3'. Chu trình nhiệt PCR: 95°C - 5 phút; tiếp theo 30 chu kỳ: 95°C - 1 phút, 55°C - 1 phút, 72°C - 1 phút 30 giây; 72°C - 10 phút. Sản phẩm PCR được phân tách trên gel agarose 1% và tinh sạch bằng kit Wizard SV Gel and PCR clean -up system (Promega). Xác định trình tự đoạn gen đích bằng bộ hóa chất chuyên dụng cùng máy đọc trình tự ABI PRISM 3100 Avant. Cây phát sinh chủng loại được thiết lập dùng phần mềm *Bitit*.

Các môi trường dinh dưỡng được sử dụng để đánh giá gồm: NB: môi trường cao thịt - pepton lỏng: 0,3% cao thịt; 1% pepton; 0,5% NaCl; MT1 (*Môi trường 1*): 1% saccharose; 0,1% cao nấm men; 0,05% K₂HPO₄; 0,1% NH₄Cl; 0,02% MgSO₄; MT2 (*Môi trường 2*): 2% ri đường; 0,1% cao nấm men; 0,05% K₂HPO₄; 0,1% NH₄Cl; 0,02% MgSO₄; MT3 (*Môi trường 3*): 1% bột đậu tương; 0,1% cao nấm men; 0,05% K₂HPO₄; 0,1% NH₄Cl; 0,02% MgSO₄; MT4 (*Môi trường 4*): 1% bột đậu tương; 2% ri đường; 0,1% cao nấm men; 0,05% K₂HPO₄; 0,1% NH₄Cl; 0,02% MgSO₄; MT5 (*Môi trường 5*): 1% bột tiết lợn; 2% ri đường; 0,1% cao nấm men; 0,05% K₂HPO₄; 0,1% NH₄Cl; 0,02% MgSO₄.

Đánh giá khả năng đối kháng nấm bệnh theo phương pháp Weller và cs. (1988). Dịch lọc được trộn với môi trường PDA với tỷ lệ 20%, được đổ vào các đĩa petri. Nấm *F. oxysporum* và

R. solani được đặt ở giữa đĩa thạch. Nuôi ở 28 -30⁰C và thu kết quả sau 2 ngày đối với nấm *R. solani* và sau 5 ngày đối với nấm *F. oxysporum*. Khả năng kháng nấm của dịch lọc được tính theo công thức:

$$\% \text{ Ức chế} = \left[1 - \frac{(r1 \times r1)}{(r2 \times r2)} \right] \times 100\%$$

Trong đó:

r1: Bán kính khuẩn lạc nấm trên đĩa thí nghiệm.

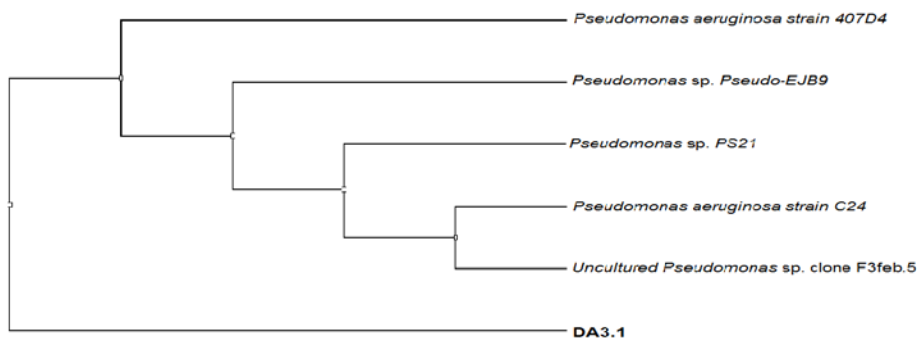
r2: Bán kính khuẩn lạc nấm trên đĩa đối chứng.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Phân loại chủng DA3.1

Chủng DA3.1 là vi khuẩn hiếu khí, khuẩn lạc mọc lan trên bề mặt môi trường thạch S1, sinh sắc tố màu xanh lá cây, tế bào hình que nhỏ, thuộc nhóm gram âm. Theo hệ thống API 20NE cho mã ô 1354575, đối chiếu với Bảng chỉ số Analytical Profile Index, 5th edition, BioMerieux S.A, 1992, chủng DA3.1 thuộc loài *Pseudomonas aeruginosa* với độ tin cậy được đánh giá tốt (%id = 99).

So sánh, phân tích trình tự đoạn 16S rRNA có độ dài 1007 bp đã xác định được từ chủng vi khuẩn DA3.1 với các trình tự tương đồng trong Ngân hàng trình tự ADN của Genbank, cho thấy đoạn gen này có độ tương đồng trình tự đến 98% với chủng *Pseudomonas aeruginosa* 407D4 (Hình 1), nên được đặt tên là *P. aeruginosa* DA3.1

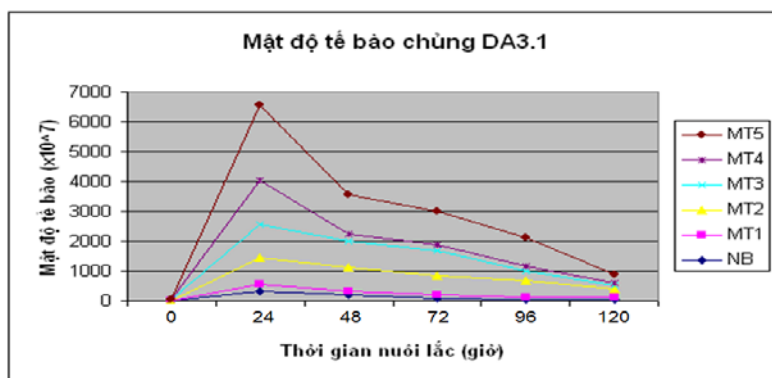


Hình 1: Cây phả hệ của chủng DA3.1 và một số loài thuộc *Pseudomonas*

Phân loại sinh hoá và phân tử cho cùng một kết quả thể hiện kết quả phân loại có độ tin cậy cao, vì một số công trình đã công bố cho thấy kết quả phân loại sinh hoá không phải luôn luôn trùng với kết quả phân loại phân tử.

2. Khả năng sinh trưởng của chủng DA3.1 trên các nguồn dinh dưỡng khác nhau

Đã thiết lập 6 công thức môi trường để nghiên cứu khả năng sinh trưởng và sinh tổng hợp chất kháng nấm ngoại bào của chủng DA3.1. Đường cong sinh trưởng của chủng trên các môi trường nghiên cứu sau 5 ngày nuôi lắc được thể hiện trong Hình 2. Chủng DA3.1 sinh trưởng tốt trong cả 6 môi trường đã sử dụng và đều đạt cực đại sau 1 ngày nuôi lắc. Điều này phù hợp với một số nghiên cứu trước đây cho thấy chủng *Pseudomonas* sinh trưởng đạt cực đại sau 1 ngày nuôi. Mật độ tế bào của chủng DA3.1 khá cao, thấp nhất đạt xấp xỉ 10⁹ cfu/ml dịch nuôi sau 4, 5 ngày trong môi trường có nguồn cacbon saccharose. Trong môi trường có nguồn cacbon ri đường, mật độ tế bào cao trên 10⁹ đến 10¹⁰ cfu/ml. Mật độ cao nhất đạt được khi nuôi trên môi trường có bổ sung tiết lỵn là trên 10¹⁰ cfu/ml và duy trì trong thời gian dài hơn.



Hình 2: Đường cong sinh trưởng của chủng DA3.1 trên các môi trường dinh dưỡng khác nhau

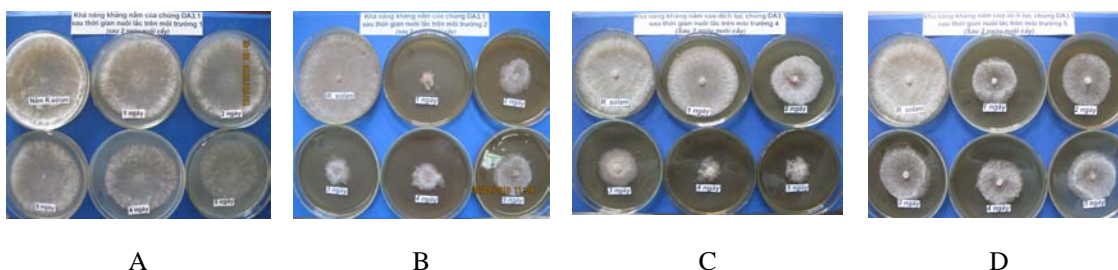
3. Khả năng kháng 2 loài nấm gây bệnh cây của dịch lọc chủng DA3.1

Khả năng kháng nấm gây bệnh cây *R. solani* của dịch lọc tế bào chủng DA3.1 nuôi trên các môi trường dinh dưỡng khác nhau (lấy dịch lọc cùng thời điểm xác định mật độ tế bào), được thể hiện trong Bảng 1, Hình 3.

Bảng 1

Khả năng kháng nấm *R. solani* của chủng DA3.1 trong các môi trường nuôi khác nhau

Thời gian nuôi (giờ)	Khả năng kháng nấm <i>R. solani</i> của dịch lọc vi khuẩn (%)						
	Đ/C	NB	MT1	MT2	MT3	MT4	MT5
24	0	50,17	22,14	87,54	82,06	36,00	71,97
48	0	58,13	32,17	77,85	85,82	69,42	69,42
72	0	62,57	36,00	80,01	89,91	82,06	62,57
96	0	65,39	50,17	77,85	87,54	90,64	73,20
120	0	69,42	55,03	71,97	84,00	92,02	71,97



Hình 3: Khả năng kháng nấm *R. solani* của dịch lọc chủng DA3.1 khi nuôi trên các môi trường khác nhau

A. Môi trường 1, B. Môi trường 2, C. Môi trường 4, D. Môi trường 5

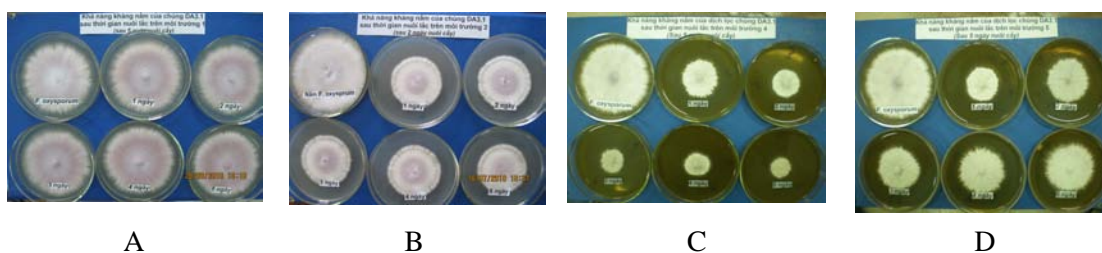
Chủng DA3.1 có khả năng sinh chất kháng nấm ngoại bào trong tất cả các môi trường. Khả năng sinh chất kháng nấm *R. solani* thấp nhất khi nuôi ở môi trường có nguồn cacbon schacarose, chỉ đạt 55%, trên môi trường có nguồn cacbon là ri đường cho khả năng kháng nấm cao và cao nhất (đạt 92,02 %) sau 5 ngày nuôi trong môi trường gồm các loại muối khoáng, ri đường và bột đậu tương. Kết quả kháng nấm *F. oxysporum* của dịch lọc chủng DA3.1 được thể

hiện trong Bảng 2 và Hình 4. Khả năng kháng nấm *F. oxysporum* của chủng DA3.1 khi nuôi trên các môi trường cũng cho hoạt tính khác nhau. Với nồng độ dịch lọc bổ sung 20% trên môi trường NB, khả năng kháng nấm của dịch lọc chỉ đạt trên 50% (sau 1 ngày) và trên 55% (sau 4 ngày). Với môi trường có chứa bột đậu tương và một số muối khoáng thì ngược lại, hoạt tính giảm theo thời gian nuôi. Khả năng kháng nấm *F. oxysporum* của chủng DA3.1 cao hơn rất nhiều so với chủng *Pseudomonas* huỳnh quang Ps 7-1 và Ps 9-1 (chỉ đạt 73%). Khi nuôi trên môi trường bổ sung nguồn cacbon ri đường cho hoạt tính kháng nấm cao nhất, tối ưu sau 5 ngày nuôi (đạt 91,30% so với nấm đối chứng).

Bảng 2

Khả năng kháng nấm *F. oxysporum* của chủng DA3.1 trong các môi trường nuôi khác nhau

Thời gian nuôi (giờ)	Khả năng kháng nấm <i>F. oxysporum</i> của vi khuẩn (%)						
	Đ/C	NB	MT1	MT2	MT3	MT4	MT5
24	0	50,27	58,90	66,71	91,30	73,70	77,49
48	0	52,07	57,24	78,69	82,10	85,20	62,13
72	0	53,82	58,90	88,01	79,86	87,11	57,24
96	0	55,55	57,24	87,11	78,69	87,11	50,27
120	0	53,82	60,53	72,37	66,71	91,30	48,45



Hình 4: Khả năng kháng nấm *F. oxysporum* của dịch lọc chủng DA3.1 nuôi trên các môi trường khác nhau
(A: Môi trường 1, B: môi trường 2, C: môi trường 4, D: môi trường 5)

III. KẾT LUẬN

Phân loại bằng phương pháp hoá sinh và phân tích trình tự gen 16S rRNA đều cho kết quả chủng vi khuẩn DA3.1. thuộc loài *Pseudomonas aeruginosa* và được đặt tên là *P. aeruginosa* DA3.1. Chủng DA3.1 sinh trưởng tốt trên các môi trường dinh dưỡng khác nhau đã được sử dụng trong thí nghiệm và đạt mật độ cao nhất khi nuôi trên môi trường có bổ sung tiết lỵn. Chủng DA3.1 có khả năng sinh chất ngoại bào kháng 2 loại nấm bệnh *F. oxysporum* và *R. solani* khi nuôi trên các môi trường thử nghiệm. Chủng này sinh chất kháng nấm ngoại bào cao nhất sau 5 ngày nuôi trên môi trường có nguồn dinh dưỡng gồm các loại muối khoáng, ri đường và bột đậu tương, ức chế sinh trưởng nấm bệnh đạt trên 90% so với đối chứng,

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Balcht Aldona, Smith Raymond, 1994: Pseudomonas aeruginosa: Infections and Treatment. Informa Health Care, p. 83-84.*
2. *Berg G. et al., 2000: J. microbial., 46: 1128- 1137.*

3. **Gould W.D. et al.**, 1985: *Appl. Env. Microbiol.*, 49: 28- 32.
4. **Gupta C.P., R.C. Dubey, S.C. Kang, D.K. Maheshwari**, 2001: *Cur. Sci.*, 81: 91-94.
5. **Lê Đình Quyền, Đỗ Thị Tuyên, Quyền Đình Thi, Nguyễn Ngọc Dũng**, 2010: Hội nghị khoa học kỷ niệm 35 năm Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, tr. 233-238.
6. **Masterson R.V. et al.**, 1985: *J. Bacteriol.*, 163: 2-25.
7. **Misaghi I., R.G. Grogan**, 1969: *Phytopath.*, 59: 1436-1450.
8. **Nguyễn Thị Quỳnh Mai, Nguyễn Huy Hoàng và Nguyễn Ngọc Dũng**, 2010: Hội nghị khoa học kỷ niệm 35 năm Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, tr. 352-358.
9. **Nguyễn Thị Tuyết Nhung, Nguyễn Minh Anh, Lê Thanh Hoà, Nguyễn Ngọc Dũng**, 2004: *Tạp chí Di truyền học & Ứng dụng*, 3: 10-15.
10. **Nguyễn Thị Tuyết Nhung, Nguyễn Minh Anh, Lê Thanh Hoà và Nguyễn Ngọc Dũng**, 2007: *Tạp chí Di truyền học & Ứng dụng*, 2: 6-15.
11. **Nguyễn Thị Tuyết Nhung, Nguyễn Minh Anh, Nguyễn Thị Quỳnh Mai, Phạm Thanh Hà, Nguyễn Ngọc Dũng**, 2004: *Tạp chí Sinh học*, 26(1): 67-71.
12. **Nielsen M.N. et al.**, 1998: *Appl Env. Microbiol.*, 3563- 3569.
13. **Nishiyama M. et al.**, 1999: *Soil. Sci. Plant nutr.*, 45: 79- 87.
14. **Nowak - Thompson B. et al.**, 1995: *Can. J. Microbiol.*, 49: 1064- 1066.
15. **Osullivan D.J., F. Ogara**, 1992: *Microbiol. Rev.*, 56: 662- 672.
16. **Sawada H., T. Takeuchi, I. Matsuda**, 1997: *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 282- 288.
17. **Shiomi Y. et al.**, 1999: *Appl. Env. Microbiol.*, 65: 3996- 4001.

Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành nhờ sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài cấp Bộ NN&PTNT “Nghiên cứu công nghệ sản xuất chế phẩm BCF phòng chống bệnh cây trồng do nấm *Fusarium* sp. và *Rhizoctonia solani*”.

SELECTION OF CULTURE MEDIUM FOR *PSEUDOMONAS* SP. DA3.1 STRAIN PRODUCING EXTRACELLULAR ANTIFUGAL FILTRATE

**NGUYEN THI QUYNH MAI, NGUYEN THU HIEN,
NGUYEN HUY HOANG, NGUYEN NGOC DUNG**

SUMMARY

A microorganism strain (DA3.1) isolated from vegetable soil in Dong Anh, Hanoi which has the activity against plant pathogenic fungi has been studied. Morphological and DNA molecular characters of the DA3.1 strain indicate that it belongs to *Pseudomonas aeruginosa* strain 407D4. Extracellular filtrates from DA3.1 strain in the culture mediums are highly resistant to plant pathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*. In medium with added mineral nutrients of soybean meal and molasses, anti-fulgal activity of extracellular filtrate from DA3.1 against *R. solani* and *F. oxysporum* reaches over 90% compared to control samples