

Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có hoạt tính kháng *Erwinia carotovora* từ đất trồng sâm Ngọc Linh tại Quảng Nam

Trương Thị Chiên¹, Nguyễn Thị Thanh Mai¹, Nguyễn Xuân Cảnh²,
Nguyễn Ngọc Lan³, Nguyễn Thị Hiền¹, Trần Bảo Trâm^{1*}

¹Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ

²Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³Viện Nghiên cứu Hệ gen

Ngày nhận bài 6/5/2019; ngày chuyển phản biện 10/5/2019; ngày nhận phản biện 13/6/2019; ngày chấp nhận đăng 24/6/2019

Tóm tắt:

Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Erwinia carotovora* gây bệnh thối nhũn ở cây trồng từ các mẫu đất trồng sâm Ngọc Linh thu tại huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam. Bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch đã sàng lọc và xác định được 8 chủng trong số 65 chủng vi khuẩn phân lập có khả năng đối kháng với vi khuẩn *E. carotovora* gây bệnh thối nhũn. Chủng K29 được xác định là vi khuẩn gram dương, có khả năng sinh enzyme và đồng hóa/lên men được nhiều nguồn cacbon, có hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất với đường kính vòng kháng *E. carotovora* lên tới 27 mm và có quan hệ với loài *Bacillus amyloliquefaciens* ở mức độ tương đồng 99,44%.

Từ khóa: bệnh thối nhũn, *Erwinia carotovora*, kháng khuẩn, vi khuẩn đất.

Chỉ số phân loại: 4.1

Đặt vấn đề

Việc sử dụng các vi sinh vật có lợi là một trong những phương pháp an toàn nhất trong việc kiểm soát sinh học mầm bệnh ở thực vật. Phần lớn các chủng vi khuẩn được khai thác làm thuốc trừ sâu sinh học thuộc chi *Agrobacterium*, *Pseudomonas* và *Bacillus* [1]. Vi khuẩn sản xuất kháng sinh có thể được phân lập từ nhiều nguồn khác nhau như đất, nước biển, thực vật, địa y và cả động vật. Theo Bubnoff và cs (2006) [2], các nhà khoa học đang liên tục tìm kiếm các loại kháng sinh mới từ vi sinh vật ở những nơi có điều kiện đặc biệt như bùn, biển sâu và rong biển. Tuy nhiên, đất vẫn là mục tiêu quan trọng nhất đối với hầu hết các nhà nghiên cứu trong nỗ lực tìm ra các loại kháng sinh mới có giá trị [3] bởi nhiều vi sinh vật, đặc biệt là vi khuẩn sống trong đất có khả năng chuyển hóa các chất thứ cấp và hoạt động như một kháng sinh hữu ích.

Thối rễ là một trong những bệnh gây tổn thất lớn về năng suất và chất lượng của nhân sâm [4, 5]. Việc trồng nhân sâm liên tục dễ gây cho rễ bị các bệnh rỉ sắt và thối nhũn [6, 7]. Kiểm soát sinh học bằng cách sử dụng các chất đối kháng vi sinh vật đã thu hút sự quan tâm của các nhà khoa học và được coi như một phương pháp hiệu quả để giảm sự phát triển của mầm bệnh thực vật. Cơ chế đối kháng với vi sinh vật gây bệnh có thể ở các dạng như tiết ra chất kháng sinh,

cạnh tranh về dinh dưỡng hoặc tấn công trực tiếp lên vi sinh vật gây bệnh hay tiết ra những chất kích thích sinh trưởng giúp cho cây trồng tăng khả năng kháng bệnh... Tuy nhiên, các chất đối kháng vi khuẩn chống thối rễ được tìm thấy ở đất trồng nhân sâm rất hiếm [8], mới chỉ có trong nghiên cứu của Dong và cs (2018) đã xác định một số chủng thuộc chi *Bacillus* là tác nhân kiểm soát sinh học mạnh trong đất trồng tam thất (*Panax notoginseng*) ở Trung Quốc như *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium* (B5), *B. cereus sensulato* (B25) và *Bacillus sp.* (B35), chủng *B. subtilis* 50-1 được xác định là vi khuẩn kháng nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh với hiệu quả kiểm soát sinh học lên tới 67,8%.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm kiếm các chủng vi khuẩn từ đất trồng sâm có hoạt tính kháng vi khuẩn *E. carotovora* gây bệnh thối củ. Đây là vấn đề có ý nghĩa thực tế và có tiềm năng ứng dụng sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh cho cây sâm Ngọc Linh phục vụ phát triển bền vững sản phẩm quốc gia.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Mẫu đất sâm Ngọc Linh được lấy ở 3 khu trồng sâm với các độ tuổi khác nhau, thuộc Trung tâm sâm Ngọc Linh (xã Trà Linh, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam). Mẫu đất

*Tác giả liên hệ: Email: trantram_74@yahoo.com

Isolation and selection of bacterial strains with bioactivity against *Erwinia carotovora* from Ngoc Linh ginseng cultivated soil in Quang Nam

Thi Chien Truong¹, Thi Thanh Mai Nguyen¹,
Xuan Canh Nguyen², Ngoc Lan Nguyen³,
Thi Hien Nguyen¹, Bao Tram Tran^{1*}

¹Center for Experimental Biology,
National Center for Technological Progress

²Vietnam National University of Agriculture

³Institute of Genome Research

Received 6 May 2019; accepted 24 June 2019

Abstract:

This study aims to isolate and select bacterial strains that are antagonistic to *Erwinia carotovora* causing the soft rot disease on plants from the Ngoc Linh ginseng cultivated soil in Nam Tra My district, Quang Nam province. Eight out of 65 bacterial strains that were screened and identified by the agar diffusion plate method exhibited their resistance to *E. carotovora*. The K29 strain was determined as a Gram-positive bacterium, having the capability of producing enzymes and assimilating/fermenting different carbon sources, having the strongest anti-bacterial activity with a resistant zone diameter of 27 mm to *E. carotovora* and relating closely to *Bacillus amyloliquefaciens* with 99.44% similarity.

Keywords: antibacterial, *Erwinia carotovora*, soft rot disease, soil bacteria.

Classification number: 4.1

được dán nhãn, để trong túi nilon đã khử trùng và bảo quản ở 4°C trước khi tiến hành thí nghiệm.

Chủng vi khuẩn kiểm định *E. carotovora* M5.2 do Bộ môn Công nghệ vi sinh, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam cung cấp.

Phương pháp nghiên cứu

Tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng vi khuẩn *E. carotovora*:

Việc sàng lọc và tuyển chọn các chủng vi khuẩn được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa

thạch [9]: vi khuẩn được cấy đều trên đĩa petri chứa môi trường R2A ở 37°C. Sau 2 ngày nuôi cấy, chủng vi khuẩn được cấy vào đĩa petri chứa môi trường MPA đã được cấy trải vi khuẩn, ủ ở 4°C trong 2 giờ để các hoạt chất từ đĩa thạch khuếch tán vào môi trường, sau đó cho vào tủ ẩm 37°C. Đường kính vòng ức chế sinh trưởng được xác định sau một ngày nuôi cấy. Đối chứng dương là kháng sinh gentamycin 80 µg/g.

Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn tuyển chọn:

- Quan sát đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của vi khuẩn trên môi trường R2A sau nuôi cấy 2 ngày ở 37°C.

- Kiểm tra các phản ứng sinh hóa của chủng vi khuẩn tuyển chọn bằng kit API 50E (Biomérieux).

- Xác định khả năng sinh tổng hợp một số enzyme (amylase, protease, cellulase) bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch.

Định danh chủng K29:

DNA tổng số được tách chiết bằng GeneJET Genomic DNA purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). Phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen 16S rRNA sử dụng cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'). Phản ứng khuếch đại gen 16S rRNA được xác nhận bằng điện di trên gel agarose 1,0%. Sản phẩm PCR được làm sạch và giải trình tự sử dụng mồi 27F trên máy giải trình tự gen tự động ABI 3500 Bio system (USA). Dữ liệu giải trình tự 16S rRNA của chủng K29 được phân tích BLAST để so sánh sự tương đồng với các trình tự sẵn có trên ngân hàng gen GenBank. Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên phương pháp khoảng cách (Neighbor-joining) trên phần mềm MEGA 7 [10].

Kết quả nghiên cứu

Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng với vi khuẩn E. carotovora

Nghiên cứu đặc điểm của 65 chủng vi khuẩn phân lập được từ đất trồng sâm Ngoc Linh cho thấy khuẩn lạc của hầu hết các chủng có màu trắng, trắng trong hoặc trắng sữa, chỉ một số ít có màu vàng, vàng nhạt, hồng và hồng đỏ. Hình thái các khuẩn lạc chủ yếu có dạng tròn, bề mặt nhẵn, bóng, viền trơn hoặc nhẵn.

Kết quả sàng lọc trong số 65 chủng vi khuẩn có 8 chủng có hoạt tính đối kháng với vi khuẩn *E. carotovora*. Kết quả được trình bày ở bảng 1.

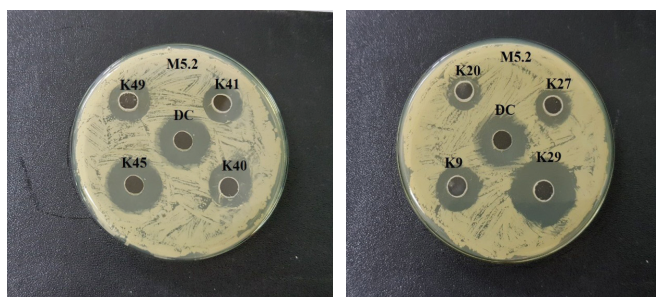
Bảng 1. Đặc điểm khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng.

Chủng	Đặc điểm khuẩn lạc của chủng vi khuẩn phân lập			
	Màu sắc	Hình dạng	Bề mặt	Mép
K9	Trắng sữa	Tròn đều	Nhẵn, bóng	Nhẵn
K20	Trắng sữa	Tròn đều	Không lồi, bóng	Trơn
K27	Trắng trong	Tròn	Nhẵn, bóng	Trơn
K29	Trắng trong	Tròn đều	Nhẵn, lồi bóng	Nhẵn
K40	Trắng	Tròn đều	Nhẵn	Nhẵn
K41	Trắng sữa	Tròn đều	Nhẵn, bóng	Nhẵn
K45	Trắng trong	Tròn	Nhẵn, bóng	Nhẵn
K49	Trắng trong	Tròn méo	Nhẵn, lồi	Nhẵn

Kết quả đánh giá hoạt tính kháng vi khuẩn kiểm định của các chủng sàng lọc với đối chứng dương là kháng sinh gentamicin bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch được thể hiện ở bảng 2 và hình 1.

Bảng 2. Hoạt tính kháng khuẩn của các chủng vi khuẩn phân lập.

Chủng	D - d (mm)	Chủng	D - d (mm)
ĐC	13±0,76	ĐC	13±0,76
K9	10±1,00	K40	10±0,87
K20	7±0,87	K41	10±1,00
K27	8±0,58	K45	19±0,50
K29	27±0,58	K49	12±0,76



Hình 1. Hoạt tính kháng vi khuẩn *E. carotovora* của các chủng vi khuẩn đất.

Kết quả cho thấy, trong số 8 chủng vi khuẩn có khả năng kháng *E. carotovora* thì chủng K29 có hoạt tính mạnh nhất với đường kính vòng kháng khuẩn đạt 27 mm, các chủng khác (K9, K20, K27, K40, K41, K49) đều có hoạt tính nhưng thấp hơn so với đối chứng (<13 mm) hoặc không cao như chủng K45 (19 mm) so với các công bố trước của nhóm tác giả Nguyễn Xuân Cảnh và cs (2017) [9] đã phân lập được chủng L2.5 (*Streptomyces psammoticus*) có hoạt

tính kháng vi khuẩn *E. carotovora* mạnh nhất (vòng kháng khuẩn đạt 23 mm).

Đặc điểm sinh học của chủng vi khuẩn K29

Về đặc điểm hình thái, chủng K29 được xác định là vi khuẩn Gram dương, hình que kết chuỗi, kích thước 0,7-0,8 x 2,5-3,0 μm . Kết quả nghiên cứu một số đặc điểm sinh hóa của chủng vi khuẩn K29 được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Một số đặc điểm sinh hóa của chủng vi khuẩn K29.

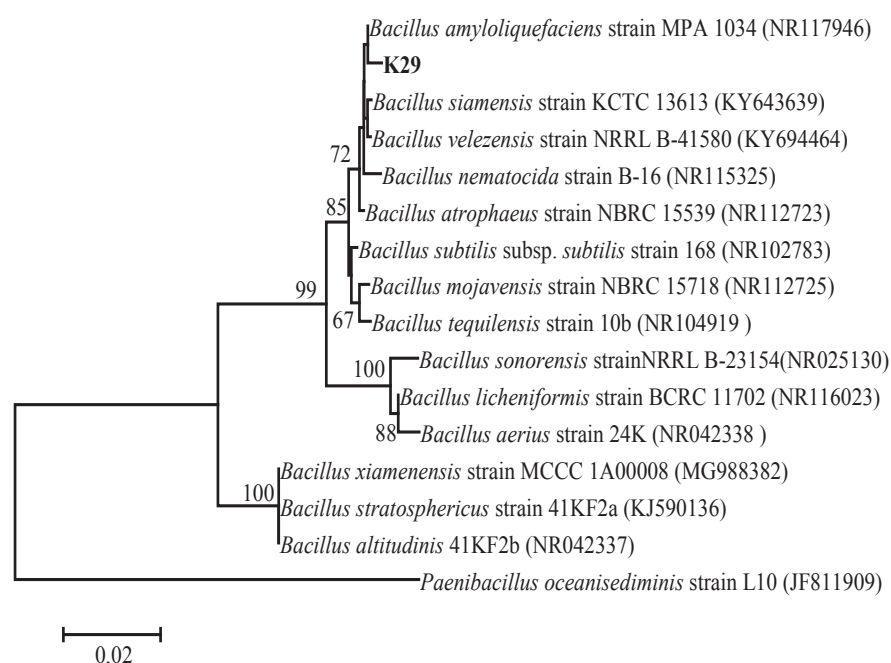
	Hoạt tính	Hoạt tính	Hoạt tính
Khả năng đồng hóa/lên men nguồn cacbon			
Glycerol	+	Sorbitol	-
Erythritol	-	Adonitol	-
D-Arabinose	-	Galactose	+
L-Arabinose	+	Glucose	+
Ribose	+	Amygdalin	+
D-Xylose	+	Arbutin	+
L-Xylose	-	Esculin	+
Methyl- β -D-Xylopyranside	-	Salicin	+
Methyl- α -D-Mannopyranside	-	Cellobiose	+
Methyl- α -D-Glucoside	+	Maltose	+
N-Acethyl-glucosamine	-	Lactose	+
Xylitol	-	Melibiose	+
Dulcitol	-	Sorbose	-
Inositol	+	Sucrose	+
Mannitol	+	Tinh bột	+
Khả năng sinh enzyme			
Amylase	+	Protease	+
		Cellulase	+

Ghi chú: +: có hoạt tính, -: không có hoạt tính.

Đánh giá các đặc điểm sinh hóa cho thấy, chủng K29 có khả năng đồng hóa/lên men nhiều nguồn cacbon khác nhau như glycerol, glucose, inositol, mannitol, methyl- α -D-glucoside, galactose, amygdalin, arbutin, esculin, salicin, cellobiose, maltose, lactose, melibiose, sucrose, fructose, raffinose, tinh bột. Kết quả này cung cấp thông tin quan trọng làm căn cứ để tiến hành phân loại vi khuẩn theo loài.

Định danh chủng vi khuẩn K29

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên phương pháp khoảng cách bằng phần mềm MEGA 7 với độ tin cậy là 1.000 lần lặp lại. Trình tự 16S rRNA của chủng *Paenibacillus oceanisediminis* strain L10 được lựa chọn để làm nhóm ngoài. Phân tích cây phát sinh chủng loại dựa trên một phần trình tự gen 16S rRNA (hình 2) cho thấy, chủng phân lập K29 hình thành nhóm với *Bacillus amyloliquefaciens* strain MPA 1034. Nhóm này phân nhánh rõ rệt so với các loài *Bacillus* khác.



Hình 2. Cây phân loại dựa trên trình tự 16S rRNA của chủng K29.

Kết quả phân tích các đặc điểm hình thái, đặc điểm sinh hóa và dựa trên trình tự 16S rRNA của K29 cho thấy, chủng này thuộc chủng *Bacillus amyloliquefaciens* với mức độ tương đồng 99,44%.

Bacillus sp. có tiềm năng ứng dụng trong ngành nông nghiệp, dược phẩm và công nghệ sinh học bởi chúng có khả năng chống lại các bệnh nấm gây thối rễ như *F. oxysporum*, *F. solani* [1] và một số bệnh về vi khuẩn như *X. oryzae* pv. *oryzae*, *B. plantarii*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *R. solanacearum*, và có khả năng chống lại vi khuẩn *E. carotovora* [11]. Trong đó, *Bacillus amyloliquefaciens* có hơn 8% bộ gen tìm thấy có khả năng tổng hợp chuỗi polyketide và các loại kháng sinh.

Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập được 65 chủng vi khuẩn từ đất trồng sâm Ngọc Linh, trong đó có 8 chủng có khả năng đối kháng *E. carotovora* gây bệnh thối nhũn. Chủng K29 được xác định là vi khuẩn gram dương, có khả năng sinh enzyme và đồng hóa/lên men được nhiều nguồn cacbon khác nhau, có hoạt tính kháng khuẩn mạnh nhất với đường kính vòng kháng *E. carotovora* lên tới 27 mm và có quan hệ với loài *Bacillus amyloliquefaciens* ở mức độ tương đồng 99,44%.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ nhiệm vụ KH&CN của Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ KH&CN. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] T. Berić, M. MilanKojić, S. Stanković, L. Topisirović, G. Degraasi, M. Myers, V. Venturi, D. Fira (2012), "Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria", *Food Technol. Biotechnol.*, **50**(1), pp.25-31.
- [2] N.V. Bubnoff, P.W. Manley, J. Mestan, J. Sanger, C. Peschel, J. Duyster (2006), "Bcr-Abl resistance screening predicts a limited spectrum of point mutations to be associated with clinical resistance to the Abl kinase inhibitor nilotinib (AMN107)", *Blood*, **108**(4), pp.1328-1333.
- [3] S.A. Hassan, E. Hanif, R.R. Zohra (2014), "Isolation and screening of soil bacteria for potential antimicrobial activity", *Fuust J. Biol.*, **4**(2), pp.217-219.
- [4] L. Dong, J. Xu, G. Feng, X. Li, S. Chen (2016), "Soil bacterial and fungal community dynamics in relation to *Panax notoginseng* death rate in a continuous cropping system", *Sci. Rep.*, **6**, p.31802.
- [5] Z. Miao, S. Li, X. Liu., Y. Chen, Y. Li, Y. Wang (2006), "The causal microorganisms of *Panax notoginseng* root rot disease", *Sci. Agric. Sin.*, **39**, pp.1371-1378.
- [6] C. Xiao, L. Yang, L. Zhang, C. Liu, M. Han (2016), "Effects of cultivation ages and modes on microbial diversity in the rhizosphere soil of *Panax ginseng*", *Journal of Ginseng Research*, **40**, pp.28-37.
- [7] L.X. Zhang, C.B. Chen, Y.P. Wang, S.Q. Xu, C. Chang (2008), "Study on discontinuous cultivating of *Panax ginseng* and its workable solution", *J. Jilin. Agric. Univ.*, **30**, pp.481-485.
- [8] L. Dong, J. Xu, L. Zhang, R. Cheng, G. Wei, H. Su, J. Yang, J. Qian, R. Xu, S. Chen (2018), "Rhizospheric microbial communities are driven by *Panax ginseng* at different growth stages and biocontrol bacteria alleviates replanting mortality", *Acta Pharm. Sin. B*, **8**(2), pp.272-282.
- [9] Nguyễn Xuân Cảnh, Nguyễn Thị Khánh, Phạm Hồng Hiền (2017), "Nghiên cứu chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Erwinia carotovora* gây bệnh thối nhũn trên một số loại cây trồng", *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, **7**(80), tr.41-46.
- [10] S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura (2016), "MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets", *Mol. Biol. Evol.*, **33**, pp.1870-1874.
- [11] A. Sarwar, G. Brader, E. Corretto, G. Aleti, M.A. Ullah, A. Sessitsch, F.Y. Hafeez (2018), "Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity", *PLOS ONE*, **13**(6), p.e0198107.