

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG KHÁNG VI KHUẨN GÂY BỆNH THỐI NHŨN *Erwinia carotovora* CỦA CHỦNG *Bacillus amyloliquefaciens* B45 PHÂN LẬP TỪ ĐẤT TRỒNG ĐÌNH LĂNG

Nguyễn Thị Thanh Mai*, Trương Thị Chiên, Vũ Xuân Tạo,
Phan Xuân Bình Minh, Ngô Thị Hoa, Trần Bảo Trâm

Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ

TÓM TẮT

Vi khuẩn *Erwinia carotovora* là tác nhân chính gây ra bệnh thối nhũn ở rễ và củ cây Đình lăng. Hiện nay, nghiên cứu ứng dụng chế phẩm sinh học trong kiểm soát, phòng trừ vi khuẩn gây hại đang ngày càng được quan tâm trong chiến lược phát triển nông nghiệp bền vững. Nhiều loài vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* được đánh giá là an toàn, có khả năng đối kháng chống lại nhiều loài vi khuẩn gây bệnh ở cây trồng. Trong nghiên cứu này, 89 chủng vi khuẩn đã được phân lập từ đất trồng Đình lăng tại huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định, trong đó chủng vi khuẩn B45 được đánh giá có khả năng kháng mạnh với vi khuẩn gây bệnh thối nhũn *E. carotovora*. Dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự 16S rRNA, chủng vi khuẩn B45 được xác định thuộc loài *Bacillus amyloliquefaciens*. Trên môi trường LB, sau 24 - 48 giờ nuôi cấy ở 30°C, dịch nuôi cấy chủng vi khuẩn B45 thể hiện hoạt tính kháng *E. carotovora* mạnh nhất. Đồng thời dịch nuôi cấy chủng B45 có đặc tính bền nhiệt, giữ được hoạt tính cao ở 60°C. Với các đặc tính này, chủng *B. amyloliquefaciens* B45 có tiềm năng ứng dụng vào sản xuất chế phẩm sinh học kháng vi khuẩn gây bệnh thối nhũn *E. carotovora* dùng cho cây Đình lăng.

Từ khóa: *Bacillus amyloliquefaciens*, bệnh thối nhũn, Đình lăng, *Erwinia carotovora*, kháng khuẩn.

MỞ ĐẦU

Chi *Bacillus* gồm các vi khuẩn gram dương, hình que, hiếu khí. Chi này chiếm ưu thế trong đất do có khả năng cạnh tranh với các vi sinh vật khác, hình thành nội bào tử và sản sinh ra các chất chuyển hóa có tác dụng đối kháng. Nhiều chủng vi khuẩn *Bacillus* có khả năng đối kháng các loại vi khuẩn, vi nấm gây bệnh với phổ tác dụng rộng, không gây hại cho con người và cây trồng. Nhiều loài *Bacillus* có khả năng sinh kháng sinh được sử dụng rộng rãi trong ngành y dược và kiểm soát các bệnh khác nhau ở con người, động vật và thực vật (Amin *et al.*, 2015). Trong các vi sinh vật đối kháng, vi khuẩn *Bacillus* được chứng minh có khả năng đối kháng với nhiều loại nấm như *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Pythium*, *Phytophthora* và một số vi khuẩn khác nhờ vào khả năng sinh ra các chất kháng sinh. Ngoài ra, các vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* còn có khả năng sinh các chất kích thích sinh trưởng thực vật và các enzyme làm tăng khả năng cung cấp chất dinh dưỡng cho cây trồng (Shafi *et al.*, 2017).

Hiện nay, để phòng và trị các bệnh do vi sinh vật gây ra trên cây trồng, người dân chủ yếu vẫn dùng các loại thuốc bảo vệ thực vật được tổng hợp hóa học. Việc sử dụng nhiều loại hóa chất bảo vệ thực vật đã để lại nhiều hệ quả nguy hại trong sản xuất và môi trường. Do vậy, vấn đề nghiên cứu ứng dụng chế phẩm sinh học trong kiểm soát, phòng trừ vi sinh vật gây hại đang ngày càng được quan tâm trong chiến lược phát triển nông nghiệp sạch và bền vững. Xuất phát từ nhu cầu thực tiễn, nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm kiếm các chủng vi khuẩn *Bacillus* từ đất trồng Đình lăng có hoạt tính kháng vi khuẩn *E. carotovora* gây bệnh thối nhũn ở rễ và củ cây Đình lăng. Kết quả của nghiên cứu là cơ sở khoa học cho sản xuất chế phẩm vi sinh thay thế thuốc bảo vệ thực vật hóa học dùng cho cây Đình lăng, góp phần bảo vệ môi trường và nâng cao chất lượng sản phẩm.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mẫu đất trồng Đình lăng được thu thập tại xã Hải Thanh, huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định dùng cho phân lập các chủng vi khuẩn *Bacillus*.

Chủng vi khuẩn gây bệnh thối nhũn rễ và củ cây Đình lăng *E. carotovora* M4 được cung cấp bởi Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ.

Phương pháp

Thu mẫu đất

Thu mẫu đất vùng rễ của các cây khỏe mạnh, phát triển tốt. Mỗi điểm thu đào xuống từ mặt đất 10 - 15 cm và lấy khoảng 100g đất xung quanh vùng rễ của cây. Mẫu được đựng trong túi polyetylen riêng biệt, ghi thời gian và địa điểm thu mẫu. Mẫu được bảo quản mát và được sử dụng để phân lập các chủng vi khuẩn *Bacillus*.

Phân lập các chủng vi khuẩn *Bacillus*

Môi trường LB được sử dụng để phân lập các chủng vi khuẩn *Bacillus*. Các mẫu đất được pha loãng bằng nước cất khử trùng ở các nồng độ khác nhau từ 10^{-1} đến 10^{-5} . Các mẫu đã pha loãng được tiến hành sốc nhiệt ở 100°C trong 10 phút nhằm tìm kiếm các chủng vi khuẩn có khả năng sinh nội bào tử (thường là *Bacillus*). Cây trái mẫu ở các nồng độ pha loãng trên môi trường LB. Các đĩa được ủ ở 30°C cho đến khi thu nhận các khuẩn lạc riêng rẽ (Vaseeharan, Ramasamy, 2003). Các khuẩn lạc được tách riêng, làm thuần và giữ trong ống nghiệm để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Tuyển chọn các chủng vi khuẩn *Bacillus* 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 (Balcázar *et al.*, 2006). Chủng vi khuẩn *Bacillus* được nuôi trong môi trường LB lỏng, lắc 150 vòng/phút ở 30°C trong 48 giờ. Bổ sung 50 μL dịch nuôi cấy mỗi chủng vi khuẩn vào mỗi lỗ trên đĩa thạch LB đã được cấy trái 50 μL dịch *E. carotovora* (10^6 cfu/mL), ủ ở 4°C trong 2 giờ để dịch nuôi vi khuẩn khuếch tán vào môi trường, sau đó giữ trong tủ ẩm 30°C . Đường kính vòng kháng khuẩn được xác định sau 24 giờ nuôi cấy.

Định danh chủng B45 dựa trên trình tự 16S rRNA

Định danh chủng vi khuẩn B45 được thực hiện bằng cách giải trình 16S rRNA. 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' GGTTACCTGTTACGACTT-3'). Phản ứng khuếch đại gen 16S rRNA được xác nhận bằng điện di trên gel agarose 1,0%. Sản phẩm PCR được tinh sạch và giải trình tự trên máy giải trình tự gen tự động ABI 3500 Bio system (USA). Dữ liệu giải trình tự 16S rRNA của chủng B45 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 phần mềm MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016).

Đánh giá ảnh hưởng của môi trường và thời gian nuôi cấy tới hoạt tính kháng *E. carotovora* của chủng B45

Các môi trường dùng để khảo sát là các môi trường thường được sử dụng trong các nghiên cứu về vi khuẩn gồm LB, NB, PCB, PDB và KB ở dạng dịch thể. Các khoảng thời gian nuôi cấy được đánh giá là sau 24, 48, 72 và 96 giờ. 0,5 mL dịch vi khuẩn chủng B45 (10^6 cfu/mL) được nuôi trong 50 mL dịch môi trường, pH7, lắc 150 vòng/phút ở 30°C . Hoạt tính kháng khuẩn được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (Balcázar *et al.*, 2006).

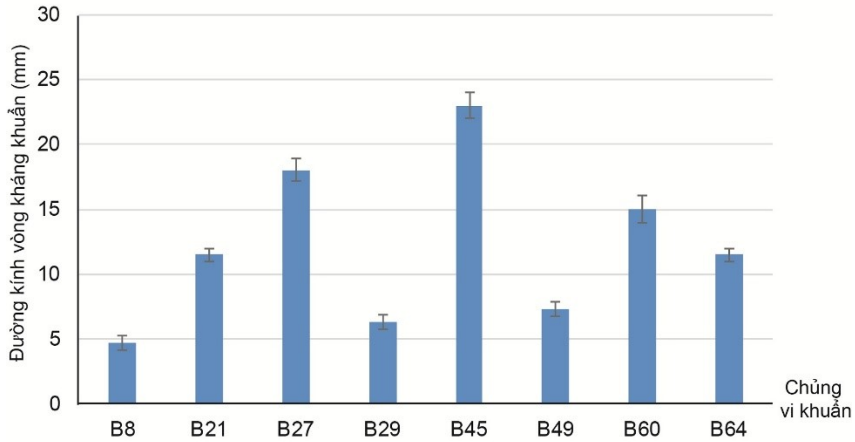
Đánh giá độ bền nhiệt của dịch nuôi chủng vi khuẩn B45

Dịch nuôi chủng vi khuẩn B45 được tiến hành xử lý nhiệt ở 30, 40, 50, 60 và 70°C trong thời gian 30 phút. Độ bền nhiệt của dịch nuôi chủng vi khuẩn B45 được đánh giá thông qua khả năng kháng vi khuẩn *E. carotovora*. Hoạt tính kháng khuẩn được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (Balcázar *et al.*, 2006).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn *Bacillus* kháng *E. carotovora*

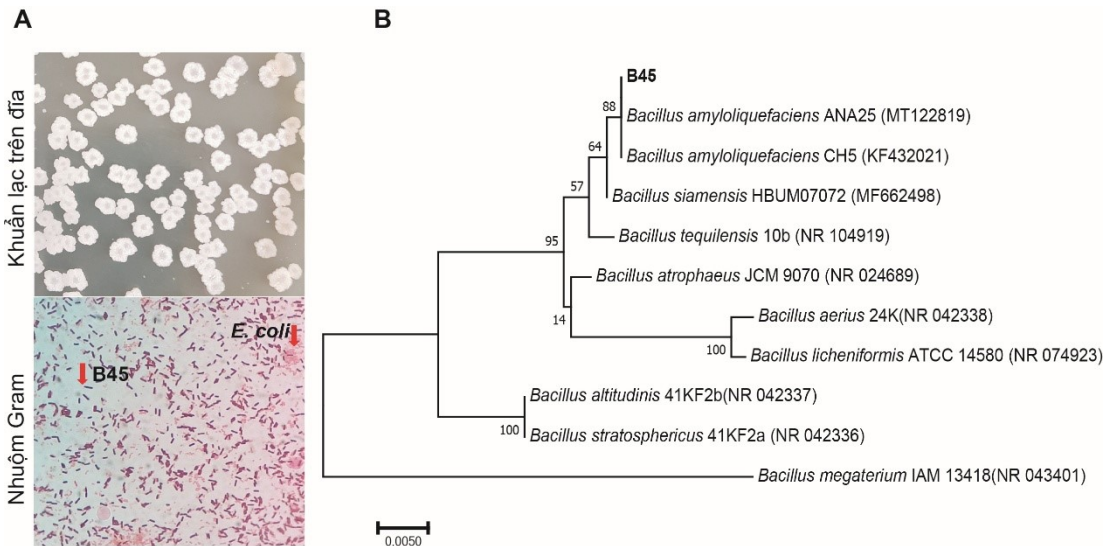
Đất là môi trường phổ biến để nghiên cứu phân lập được các chủng *Bacillus* có hoạt tính kháng vi sinh vật gây bệnh và các chủng này thường là các loài như *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus* và *B. licheniformis* (Al-Ajlani, Hasnain, 2010). Trong nghiên cứu này, 89 chủng vi khuẩn đã được phân lập từ 15 mẫu đất trồng Đinh lăng thu thập tại huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định theo phương pháp xử lý nhiệt trên môi trường LB. Các chủng vi khuẩn được đánh giá khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh thối nhũn *E. carotovora* bằng phương pháp khuếch tán trên thạch. Kết quả sàng lọc trong số 89 chủng vi khuẩn có 8 chủng kháng với vi khuẩn *E. carotovora*. Đặc biệt, chủng vi khuẩn B45 có hoạt tính kháng vi khuẩn *E. carotovora* mạnh nhất (Hình 1). Do vậy, chủng vi khuẩn B45 có tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát *E. carotovora* gây bệnh thối nhũn củ và rễ Đinh lăng.



Hình 1. Khả năng kháng vi khuẩn *E. carotovora* của các chủng vi khuẩn *Bacillus*

Định danh chủng vi khuẩn B45

Để có thể sử dụng chủng B45 trong việc sản xuất chế phẩm vi sinh kháng *E. carotovora* gây bệnh thối nhũn ở cây Đinh lăng, chúng tôi tiến hành định danh chủng vi khuẩn B45 thông qua đặc điểm hình thái tế bào và giải trình tự gen 16S rRNA. Chủng B45 là chủng vi khuẩn Gram dương, tế bào hình que, khuẩn lạc tròn màu trắng đục, mép khuẩn lạc nhẵn (Hình 2A). Đây là những đặc điểm đặc trưng của chi vi khuẩn *Bacillus* (Stein, 2005). Như vậy có thể sơ bộ kết luận chủng B45 thuộc chi *Bacillus*. Để xác định chính xác đến loài cho chủng B45, chúng tôi tiến hành giải trình tự 16S rRNA. 16S rRNA ở vi khuẩn có mức độ biến đổi cao giữa các loài gần gũi. Do đó trình tự 16S rRNA được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu phân loại vi khuẩn (Weisburg *et al.*, 1991). DNA tổng số của chủng vi khuẩn B45 được tách chiết để sử dụng cho phản ứng PCR khuếch đại 16S rRNA với cặp mồi 27F/1492R. Kết quả giải trình tự, so sánh trình tự 16S rRNA với dữ liệu trong GenBank và xây dựng cây phát sinh chủng loại sử dụng phần mềm MEGA7 cho thấy chủng B45 thuộc loài *Bacillus amyloliquefaciens* với độ tương đồng về trình tự 16S rRNA từ 99%(Hình 2B).



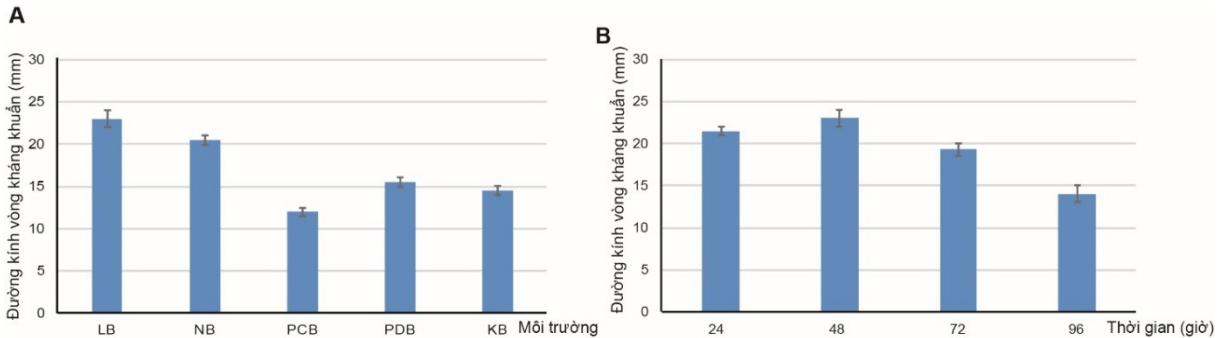
Hình 2. Định danh chủng B45 dựa trên đặc điểm hình thái và trình tự 16S rRNA

(A) Hình thái khuẩn lạc trên đĩa và kết quả nhuộm Gram; (B) Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự 16S rRNA

Ảnh hưởng của môi trường và thời gian nuôi cấy tới hoạt tính kháng *E. carotovora* của chủng B45

Các điều kiện nuôi cấy là những yếu tố quan trọng ảnh hưởng tới hoạt tính của các chủng vi khuẩn *Bacillus* (Bajagai *et al.*, 2016). Trong nghiên cứu này, hoạt tính kháng vi khuẩn *E. carotovora* gây bệnh thối nhũn của chủng *B. amyloliquefaciens* B45 được xác định ở các điều kiện môi trường và thời gian nuôi cấy khác nhau. Kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường LB và NB là những môi trường cho hoạt tính kháng khuẩn của chủng B45 mạnh, trong đó môi trường LB là môi trường thích hợp nhất cho nuôi cấy chủng B45 đạt hiệu quả kháng vi khuẩn *E. carotovora* mạnh nhất (Hình 3A). Môi trường LB là môi trường thường được sử dụng trong các nghiên cứu

nuôi cấy, lên men vi khuẩn *Bacillus* (Han *et al.*, 2014). Thời gian nuôi cấy là một trong những thông số chính của quá trình sản xuất chế phẩm vi sinh vì nó liên quan trực tiếp tới hoạt tính của vi sinh vật và quá trình vận hành máy móc thiết bị. Chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* B45 cho hoạt tính kháng vi khuẩn *E. carotovora* mạnh sau khoảng thời gian nuôi cấy từ 24-48 giờ (Hình 3B). Đây cũng là khoảng thời gian nuôi cấy thích hợp của nhiều chủng *Bacillus* để đảm bảo cho sinh khối thu được với tỷ lệ cao là các tế bào sinh dưỡng trẻ, khỏe (Sreekumar, Krishnan, 2010; Han *et al.*, 2014).

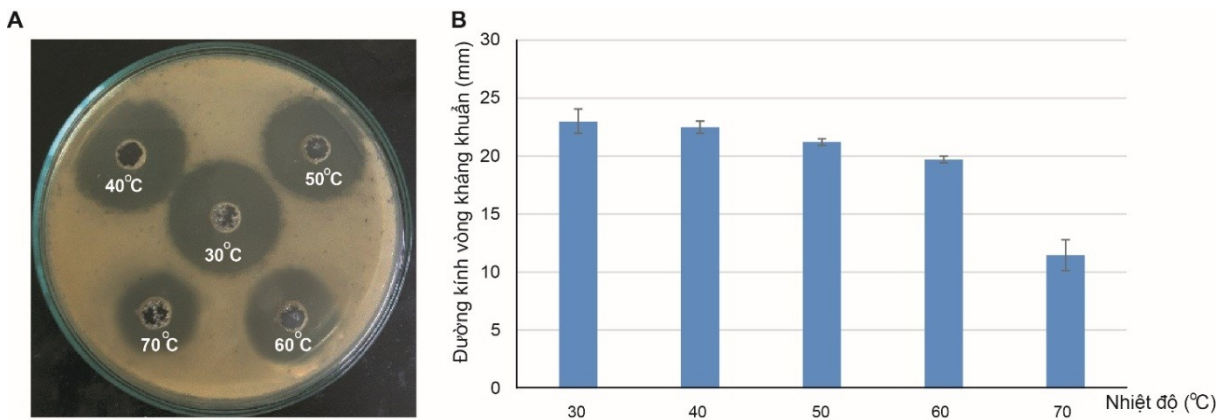


Hình 3. Hoạt tính kháng *E. carotovora* của chủng B45 ở các môi trường và thời gian nuôi cấy khác nhau

(A) Ở điều kiện các môi trường nuôi cấy khác nhau; (B) Ở điều kiện các khoảng thời gian nuôi cấy khác nhau

Độ bền nhiệt của dịch nuôi chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* B45

Dịch nuôi của chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* B45 được xử lý nhiệt 30 phút tại các nhiệt độ 30, 40, 50, 60, 70°C và sau đó được tiến hành xác định hoạt tính kháng vi khuẩn *E. carotovora* bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (Balcázar *et al.*, 2006). Kết quả nghiên cứu cho thấy, dịch nuôi vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* B45 khá bền nhiệt trong dải nhiệt độ từ 30 - 60°C. Hoạt tính kháng khuẩn *E. carotovora* của dịch nuôi chủng B45 giảm mạnh khi được xử lý ở 70°C, tuy nhiên hoạt tính kháng khuẩn vẫn đạt 50% so với khi không xử lý nhiệt (Hình 4). Khả năng giữ được hoạt tính ở nhiệt độ cao là căn cứ quan trọng trong việc ứng dụng chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* B45 trong việc kiểm soát vi khuẩn gây bệnh ở cây trồng ngoài thực tế.



Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ tới hoạt tính kháng khuẩn của dịch nuôi chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* B45

(A) Khả năng kháng *E. carotovora* của dịch nuôi chủng B45 sau khi được xử lý nhiệt; (B) Kích thước vòng kháng *E. carotovora* của dịch nuôi chủng B45 sau khi được xử lý nhiệt

KẾT LUẬN

Đã phân lập được 89 chủng vi khuẩn từ đất trồng Đinh lăng thu thập tại huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định, trong đó chủng vi khuẩn B45 được đánh giá có khả năng kháng mạnh với vi khuẩn gây bệnh thối nhũn *E. carotovora*. Chủng vi khuẩn B45 được xác định là vi khuẩn Gram dương. Dựa trên trình tự 16S rRNA, chủng vi khuẩn B45 được xác định thuộc loài *Bacillus amyloliquefaciens*. Trên môi trường LB, sau 24-48 giờ nuôi cấy ở 30°C, dịch nuôi cấy chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* B45 thể hiện hoạt tính kháng *E. carotovora* mạnh nhất, đồng thời dịch nuôi cấy chủng B45 có đặc tính bền nhiệt.

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

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Al-Ajlani MM, Hasnain S (2010). Bacteria exhibiting antimicrobial activities; screening for antibiotics and the associated genetic studies. *Open Conf Proc J* 1: 230-238.
- Amin M, Rakhisi Z, Ahmady AZ (2015). Isolation and identification of *Bacillus* species from soil and evaluation of their antibacterial properties. *Avicenna J Clin Microb Infec* 2(1): 1-4.
- Bajagai Y, Klieve A, Dart P, Bryden W (2016) Probiotics in animal nutrition: Production, impact and regulation. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- Balcázar JL, De Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Cunningham D, Vendrell D, Muzquiz JL (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol* 114(3-4), 173-186.
- Han D, San N, Angun P, Onarman U, Demirci A, Tekinay T (2014). Response surface optimization of the cultivation conditions and medium composition a novel probiotic strain *Bacillus pumilus* STF26. *Int Food Res J* 21(4): 1355-1361.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger dataset. *Mol Biol Evol* 33: 1870-1874.
- Shafi J, Tian H, Ji M (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnol Biotechnol Equip*, 31(3): 446-459.
- Sreekumar G, Krishnan S (2010) Enhanced biomass production study on probiotic *Bacillus subtilis* SK09 by medium optimization using response surface methodology. *Afr J Biotechnol* 9(47): 8078-8084.
- Stein T (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol* 56(4), 845-857.
- Vaseeharan B, Ramasamy P (2003). Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letts Appl Microbiol* 36(2): 83-87.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173(2): 697-703.

STUDYING THE ANTAGONISTIC CAPACITY TO SOFT ROT DISEASE PATHOGEN IN PLANTS *Erwinia carotovora* OF THE STRAIN *Bacillus amyloliquefaciens* B45 ISOLATED FROM *Polyscias fruticosa*-CULTIVATING SOIL

Nguyen Thi Thanh Mai*, Truong Thi Chien, Vu Xuan Tao, Phan Xuân Bình Minh, Ngo Thi Hoa, Tran Bao Tram

Center for Experimental Biology, National Center for Technological Progress, Ministry of Science and Technology

SUMMARY

The bacterium *Erwinia carotovora* is the main cause of the soft rot disease in roots and tubers of *Polyscias fruticosa*. Nowadays, researches in application of probiotics in control and prevention of harmful bacteria are gaining more attention in terms of sustainable agricultural development strategy. Plenty bacteria of the genus *Bacillus* are considered to be safe and capable of antagonism to different plant pathogenic species. In this research, 89 bacterial strains were isolated from the *Polyscias fruticosa*-cultivating soil in Hai Hau district, Nam Dinh province, among which the strain B45 was evaluated to obtain the strongest resistance to the bacterium causing the soft rot disease in plants *E. carotovora*. Based on morphological characteristics and 16S rRNA sequence, the strain B45 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. On LB medium, after 24 - 48 hours of cultivation at 30°C, B45 bacterial culture fluid demonstrated the strongest activity against *E. carotovora*. At the same time, B45 bacterial culture fluid exhibited high thermal stability and could remain its performance up to 60°C. With all these features, the strain *B. amyloliquefaciens* B45 had the potential to be applied in the production of probiotics against the bacteria causing soft rot disease *E. carotovora* used for *Polyscias fruticosa*.

Keywords: Bacillus amyloliquefaciens, soft rot disease, Polyscias fruticosa, Erwinia carotovora, antibacterial.

* Author for correspondence: Tel: +84-984326754; Email: thanhmai193@yahoo.com