

## TUYỂN CHỌN CHỦNG *Streptomyces* CÓ KHẢ NĂNG KIỂM SOÁT VI KHUẨN *Erwinia carotovora* GÂY BỆNH THỐI NHŨN

Nguyễn Thị Ngọc Bích<sup>1,2</sup>, Lê Thị Mai Châm<sup>1</sup>, Hà Thị Loan<sup>1</sup>, Nguyễn Vũ Phong<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

<sup>2</sup> Bộ môn Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

### TÓM TẮT

Bệnh thối nhũn là bệnh thường gặp trên nhiều đối tượng cây trồng khác nhau. Một trong những tác nhân gây bệnh chính được biết đến là vi khuẩn *Erwinia carotovora*. Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích phân lập và tuyển chọn các chủng *Streptomyces* có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Erwinia carotovora* gây bệnh thối nhũn trên cây rau cải. Từ các mẫu cải bệnh đã phân lập được một chủng vi khuẩn có đặc điểm tương tự với chủng vi khuẩn *Erwinia carotovora*. Thông qua lây bệnh nhân tạo trong phòng thí nghiệm, chủng vi khuẩn này đã gây bệnh thối nhũn trên rau cải ngọt. Bằng kỹ thuật PCR với cặp primer đặc hiệu Ec001 đã xác định được chủng vi khuẩn này mang gen gây độc giống với *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Bên cạnh đó, 82 chủng *Streptomyces* được phân lập từ các vườn trồng rau ở khu vực huyện Củ Chi, Thành Phố Hồ Chí Minh. Trong số đó, bằng phương pháp giếng khuếch tán đã xác định được 03 chủng *Streptomyces* có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Erwinia carotovora*. Chủng CC3.2 có hoạt tính kháng khuẩn cao được xác định bằng giải trình tự gen 16S rRNA với cặp Primer 27F/ 1492R tương đồng 100% với loài *Streptomyces diastaticus*. Khi nuôi cấy trên 9 môi trường lỏng, chủng CC3.2 thể hiện khả năng kháng khuẩn cao nhất ở môi trường ISP3 sau 5 ngày khi nuôi lắc 200 vòng/phút ở nhiệt độ 30°C.

*Từ khóa:* Bệnh thối nhũn, *Erwinia carotovora*, khuếch tán giếng thạch, *Streptomyces diastaticus*.

### MỞ ĐẦU

Bệnh thối nhũn do vi khuẩn gây ra là một trong những bệnh gây thiệt hại lớn cho ngành trồng trọt. Bệnh này phổ biến trên toàn thế giới vì gây hại trên nhiều loại cây trồng quan trọng như các loại cây họ cải (Brassicaceae), họ cà (Solanaceae) và một số loài khác. Bệnh gây hại nghiêm trọng giai đoạn đồng ruộng và cũng gây ra tổn thất đáng kể trong quá trình bảo quản, vận chuyển và bày bán nông sản (Bhat, 2010). Trong số những tác nhân gây bệnh thối nhũn thì vi khuẩn *Erwinia carotovora* phổ biến hơn cả (Bhat, 2010; Perombelom, Van Der Wolf, 2002). Bệnh thối nhũn gây thiệt hại ước tính mỗi năm khoảng 15 - 30% giá trị cây trồng (FAOSTAT data, 2012). Hiện nay, để phòng trừ các bệnh do vi sinh vật gây nên, nông dân ngày càng phụ thuộc nhiều hơn vào hóa chất chất nông nghiệp, sử dụng thuốc hóa học với liều lượng cao hơn so với khuyến cáo. Điều này dẫn đến dễ hình thành tính kháng và phát sinh loài mới, gây ô nhiễm môi trường, làm mất cân bằng sinh thái, tác động trực tiếp đến sức khỏe con người. Vì vậy, việc giảm sử dụng thuốc hóa học trong phòng trừ bệnh và sử dụng những biện pháp sinh học thân thiện với môi trường ngày càng trở nên cấp thiết hơn. Xạ khuẩn là một trong những tác nhân phòng trừ sinh học được nghiên cứu rộng rãi, có nhiều ưu điểm đối kháng với mầm bệnh thông qua như khả năng tiết enzyme ngoại bào, tiết kháng sinh, cạnh tranh dinh dưỡng và kích thích sinh trưởng cây trồng tăng sức đề kháng với mầm bệnh và góp phần tăng năng suất cây trồng. Đặc biệt là các loài thuộc chi *Streptomyces* được xem là nguồn sản sinh chất kháng khuẩn nhiều nhất (Qin *et al.*, 1994). Các nghiên cứu về xạ khuẩn có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Erwinia carotovora* đã được công bố từ lâu (Kondo, 1975). Việc tìm kiếm và sử dụng các vi sinh vật có lợi và các chất có hoạt tính sinh học do vi sinh vật sinh ra để kiểm soát vi khuẩn gây bệnh cây là một phương pháp an toàn nhất trong việc kiểm soát sinh học mầm bệnh thực vật và góp phần định hướng sử dụng các chất có nguồn gốc tự nhiên thay thế dần các thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc hóa học, độc hại với môi trường và sức khỏe con người vào công tác bảo vệ cây trồng và xây dựng nền nông nghiệp an toàn và bền vững. Nghiên cứu này trình bày kết quả chọn lọc chủng *Streptomyces* bản địa có khả năng kiểm soát vi khuẩn *Erwinia carotovora* gây bệnh trên cây cải nhằm phát triển chế phẩm sinh học ứng dụng trong nông nghiệp.

### NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Chủng vi sinh vật và môi trường nuôi cấy

Các mẫu cải có các triệu chứng đặc trưng của bệnh thối nhũn thu tại vườn rau ở Lâm Đồng, Hóc Môn - Thành phố Hồ Chí Minh được sử dụng để phân lập vi khuẩn *Erwinia carotovora* trên môi trường chuyên biệt Crystal Violet Pectate.

Các chủng *Streptomyces* được phân lập từ các mẫu đất thu tại các vườn trồng rau tại Củ Chi - Thành phố Hồ Chí Minh.

Môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Erwinia carotovora* gồm môi trường CVP (Crystal violet pectate) chứa 18g sodium polypectate, 0,36g sodium hydroxide, 2g sodium nitrate, 0,6g calcium chloride dihydrate, 0,0015g Crystal violet, 0,1g sodium lauryl sulphate, 4g agar, pH 7,2 ± 0,2 và môi trường MHA (Mueller Hinton Agar) gồm 5g cao thịt, 10g pepton, 5g NaCl, 20g agar.

Môi trường nuôi cấy *Streptomyces* gồm: Gause I (5g tinh bột, 0,5g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1g KNO<sub>3</sub>, 0,5g MgSO<sub>4</sub>, 0,5g NaCl, 0,001g FeSO<sub>4</sub>, agar 15g); Gause (5g tinh bột, 0,5g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1g KNO<sub>3</sub>, 0,5g MgSO<sub>4</sub>, 0,5g NaCl, 0,001g FeSO<sub>4</sub>); ISP1 (5g trypton, 3g cao nấm men); ISP2 (5g Pepton from meat, 3g cao nấm men, 10g dextrose); ISP3 (20g oat meal, 0,001g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,001g MnCl<sub>2</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,001g ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O); ISP6 (15g Peptone from meat, 5g proteose peptone, 1g cao nấm men, 0,5g Ferric ammonium citrate, 1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,08g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>); MT1 (0,9g L-Asparagine, 1,5g manitol, 1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5g KNO<sub>3</sub>, 0,2g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1g CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, 0,1g NaCl, 0,01g FeCl<sub>3</sub>); MT2 (10g bột đậu nành, 10g glucose, 1g CaCO<sub>3</sub>, 1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>); MT3 (10g sucrose, 0,5g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,01g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5g NaCl); MT4 (30g glucose, 2g cao nấm men, 1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1g NaCl, 0,5g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5g KCl, 0,01g FeSO<sub>4</sub>).

### Phân lập vi khuẩn *Erwinia carotovora* gây bệnh thối nhũn trên rau cải

Vi khuẩn gây thối nhũn được phân lập trên môi trường chọn lọc Crystal Violet Pectate (CVP). Đầu tiên khử trùng bề mặt mẫu thân rau bị bệnh bằng cồn 70% để loại bỏ các sinh vật biểu sinh. Cắt những phần thân rau bị bệnh thành các đoạn nhỏ tại điểm tiếp giáp giữa mô bệnh và mô khỏe, chọn các mô bệnh còn mới và cho vào cối sứ và nghiền nát bằng chày sứ, thêm vào cối khoảng 2ml nước cất khử trùng. Hút phần dịch nghiền cho vào ống nghiệm và để yên khoảng 5 - 10 phút cho lắng bớt cặn. Sử dụng 100 µl dung dịch pha loãng ở nồng độ 10<sup>-2</sup> - 10<sup>-3</sup> để cấy trang trên đĩa petri có chứa môi trường chọn lọc CVP, ủ ở 30°C, sau 3 - 5 ngày quan sát hình thái khuẩn lạc và tế bào vi khuẩn thông qua nhuộm Gram. Thu nhận các khuẩn lạc có màu sắc, hình dạng, độ lồi lõm đặc trưng của *Erwinia carotovora* trên môi trường CVP được chọn để thực hiện cấy thuần sang môi trường MPA với các đặc điểm bao gồm các khuẩn lạc có màu vàng hoặc trắng, tròn, lồi nhày, bóng, mép khuẩn lạc tròn nhẵn, tế bào bắt màu thuốc nhuộm Gram âm.

Phương pháp gây bệnh nhân tạo được thực hiện theo hướng dẫn của Perombelon và Van Der Wolf (2002) để khẳng định khả năng gây bệnh của vi khuẩn. Chúng vi khuẩn phân lập được cấy trên môi trường MPA ở 24 - 48 giờ. Thu nhận khuẩn lạc và pha loãng đạt nồng độ khoảng 10<sup>7</sup> tế bào/ml. Các mẫu thân rau sạch bệnh được rửa sạch, ngâm 10 phút trong 0,1% nước Javel, sau đó rửa lại 3 lần với nước cất vô trùng. Đặt cố định các mẫu vào đĩa Petri có giấy thấm ướt đã được khử trùng. Dùng pipet cấy trích 10 µl dịch vi khuẩn thử nghiệm lên mẫu vật. Nước cất vô trùng được sử dụng làm đối chứng âm. Các đĩa Petri được ủ ở nhiệt độ phòng, quan sát và kiểm tra sự hình thành vết bệnh sau 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

### Định danh chủng vi khuẩn *Erwinia carotovora* bằng sinh học phân tử

Phương pháp được thực hiện theo mô tả trong nghiên cứu trước đây (Maitham, Ehab, 2013) và với cặp mỗi Ec001 chuyên biệt cho vi khuẩn *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* với mỗi xuôi (5'-CGGTTACGATCAGCGTCTCG-3') và mỗi ngược (5'-GATGTGCCGATGCCGATAC-3'). Phản ứng PCR được thực hiện với bước biến tính 5 phút ở 94°C, tiếp theo 30 chu kỳ với 94°C trong 1 phút, bắt cặp ở 62°C trong 30 giây, kéo dài ở 72°C trong 30 giây, cuối cùng kéo dài ở 72°C trong 5 phút và giữ ở 10°C đến khi điện di kiểm tra kết quả. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%.

### Phân lập, sàng lọc và định danh được một số chủng *Streptomyces* sinh hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn cao

Từ các mẫu đất vườn trồng rau ở Củ Chi, xạ khuẩn *Streptomyces* được phân lập trên môi trường Gause I theo phương pháp của Vinogradki (1952) (trích theo Nguyễn Thành Đạt, 2000). Các đặc điểm hình thái, màu sắc khuẩn lạc, cuống bào tử và bề mặt bào tử trên môi trường nuôi cấy được nhận diện dựa trên phương pháp Tresner and Backus (1963).

### Đánh giá khả năng đối kháng vi khuẩn *Erwinia carotovora* của các chủng xạ khuẩn

Khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn với vi khuẩn *E. carotovora* được tiến hành dựa theo phương pháp khuếch tán giếng thạch. Xạ khuẩn được nuôi trên môi trường Gause, lắc 200 vòng/phút ở 30°C trong 7 ngày. Dịch nuôi cấy được li tâm 10.000 vòng trong 10 phút, thu lấy dịch nổi được dịch chiết thô. Vi khuẩn gây bệnh được nuôi cấy rìa trên môi trường MPA và được pha loãng, điều chỉnh mật độ 10<sup>6</sup> CFU/ml. Dùng tăm bông trải 100µl vi khuẩn vào đĩa petri chứa môi trường MPA. Hút 100µl dịch chiết thô cho vào giếng thạch đã được tạo sẵn trên các đĩa đã được cấy vi khuẩn gây bệnh, ủ trong 24 giờ ở nhiệt độ 30°C. Dịch xạ khuẩn có khả năng ức chế sinh trưởng của vi khuẩn được thể hiện thông qua đường kính vòng vô khuẩn quanh giếng thạch (D - d) (mm) trong đó D là đường kính vòng kháng khuẩn và đường kính lỗ thạch (mm), d là đường kính lỗ thạch (mm). Thí nghiệm được lặp lại ba lần, dịch môi trường nuôi cấy không bổ sung xạ khuẩn được làm đối chứng âm.

### Định danh chủng xạ khuẩn dựa vào vùng 16S rRNA chọn lọc

Chủng *Streptomyces* chọn lọc được ly trích DNA tổng số theo phương pháp mô tả bởi Marmur (1961). Khuếch đại đoạn gen 16S rRNA của chủng *Streptomyces* bằng phản ứng PCR từ DNA tổng số sử dụng cặp primer 27F và 1492R lần lượt có trình tự: 5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3' và 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'. Phản ứng PCR được sử dụng một chu kỳ biến tính 5 phút ở 94°C, 30 chu kỳ với 94°C trong 1 phút, bắt cặp ở 62°C trong

30 giây, kéo dài ở 72°C trong 45 giây, cuối cùng kéo dài ở 72°C trong 5 phút và giữ lạnh ở 10°C đến khi chạy điện di kiểm tra kết quả. Sản phẩm PCR được điện di phân tách trên gel agarose 1% ở 100V sau 30 phút, chụp ảnh gel ghi nhận kết quả, giải trình tự sản phẩm sau PCR. Mức độ tương đồng về trình tự gen mã hóa 16S rRNA của chúng nghiên cứu được so sánh với các chủng đã công bố trên ngân hàng gen bằng công cụ BLAST.

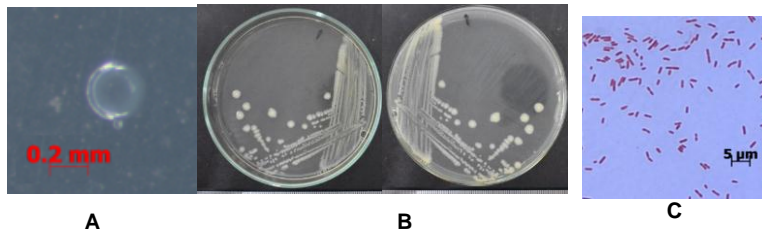
**Khảo sát môi trường và thời gian nuôi cấy ảnh hưởng đến mức độ kháng khuẩn của chủng *Streptomyces* chọn lọc**

Chủng *Streptomyces* chọn lọc được nuôi trên 9 loại môi trường lỏng gồm: GAUSE, ISP1, ISP2, ISP3, ISP6, MT1, MT2 và MT3, MT4. Hút 2ml dịch xạ khuẩn cho vào 200ml môi trường chứa trong chai (V = 500ml). Các chai được nuôi trong điều kiện lắc 200 vòng/phút, 30°C trong 4 ngày. Dịch khuẩn được li tâm ở 10.000 vòng trong 10 phút ở 4°C. Mức độ kháng khuẩn được xác định bởi đường kính vòng đối kháng với *Erwinia carotovora*. Khi xác định môi trường dinh dưỡng thích hợp, thời gian tăng sinh thích hợp để thu được dịch xạ khuẩn kháng khuẩn tốt nhất cũng cần xác định. Dịch nuôi cấy (2ml) được trích ra ở các thời điểm 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ngày nuôi cấy và đánh giá mức độ kháng khuẩn thông qua đường kính vòng đối kháng với *Erwinia carotovora*. Đồng thời kiểm tra số lượng tế bào sống thông qua phương pháp cấy trên bề mặt đĩa thạch Gause I. Ở mỗi thời điểm khảo sát và môi trường nuôi cấy, thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên và lặp lại 3 lần.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

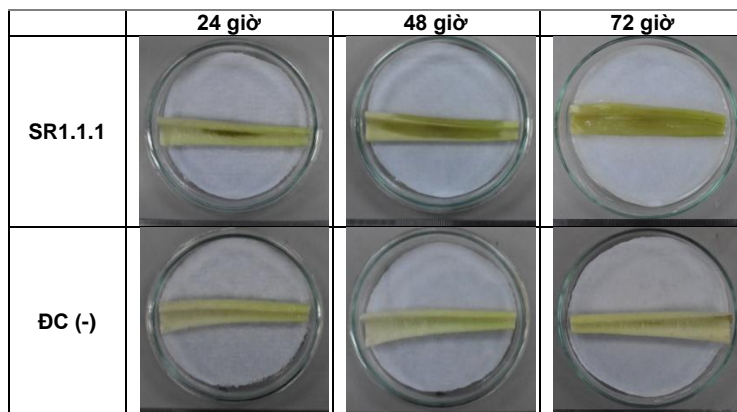
**Phân lập vi khuẩn gây bệnh thối nhũn**

Từ các mẫu cải bị bệnh thu tại Lâm Đồng, Hóc Môn - Thành phố Hồ Chí Minh, chủng vi khuẩn SR1.1.1 được phân lập trên môi trường chọn lọc CVP. Khuẩn lạc có màu trắng xám, hình dạng tròn, bề mặt lõm (Hình 1A). Trên môi trường MPA khuẩn lạc có màu vàng, tròn, lồi nhầy, bóng, mép khuẩn lạc tròn nhẵn (hình 1B), tế bào bắt màu nhuộm Gram âm, tế bào hình que ngắn, xếp riêng lẻ (Hình 1C). Hình thái của vi khuẩn quan sát được tương đồng với những mô tả của Doolotkeldieva và đồng tác giả (2016) và Perombelon và Van Der Wolf (2002) về *Erwinia*.



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc vi khuẩn SR1.1.1 trên môi trường CPV (A), MPA (B) và hình thái vi khuẩn sau khi nhuộm Gram (100X).

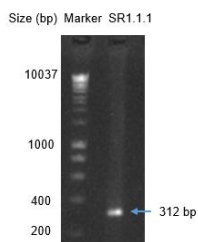
Chủng vi khuẩn SR1.1.1 được sử dụng lây bệnh nhân tạo trên thân cây cải ngọt. Khu vực nhiễm khuẩn trở nên mềm và ẩm ướt, bề mặt ít bị biến dạng và qua thời gian vết bệnh trở nên nhầy nhụa, lan rộng khắp mặt thân cây và có mùi khó chịu (Hình 2). Triệu chứng này tương đồng với mô tả của Walker và đồng tác giả (1994); Agrios (2006). Nghiên cứu của Perombelon và Van Der Wolf (2002) cho biết, tính độc của vi khuẩn *Erwinia* sp. gây bệnh trên cây trồng được xác định là do các enzyme phá vỡ thành tế bào của cây, gây tổn thương và giải phóng chất dinh dưỡng cho sự phát triển của vi khuẩn.



Hình 2. Lây bệnh nhân tạo chủng vi khuẩn SR1.1.1 trên cây cải ngọt

### Định danh chủng vi khuẩn gây bệnh

Để xác định chủng vi khuẩn SR1.1.1 có phải là *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, trong nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng cặp mồi Ec001 nhằm khuếch đại một đoạn DNA chuyên biệt kích thước 312 bp.

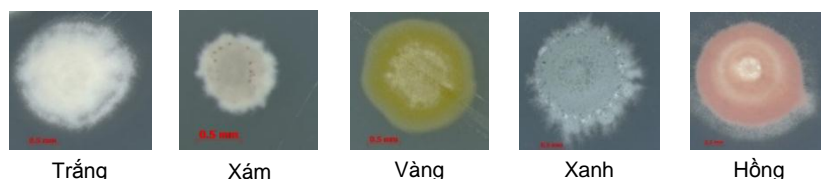


Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR với cặp primer Ec001

Kết quả điện di sản phẩm PCR chủng SR1.1.1 cho sản phẩm là 1 đoạn DNA duy nhất và cặp mồi Ec001 đã khuếch đại một đoạn gen chuyên biệt có kích thước khoảng 312 bp. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Maitham và Ehab (2013) (Hình 3). Từ kết quả này chúng tôi khẳng định rằng, chủng SR1.1.1 phân lập được là vi khuẩn *Erwinia carotovora* gây bệnh thối nhũn trên cây cải ngọt.

### Phân lập, nhận diện sơ bộ được một số chủng *Streptomyces*

Từ các mẫu đất thu thập ở các vườn trồng rau tại Củ Chi - Thành phố Hồ Chí Minh đã phân lập được 82 chủng *Streptomyces* với đặc điểm hình thái và màu sắc khuẩn lạc khác nhau. Màu sắc của hệ sợi khí sinh được xác định dựa vào bảng màu chi *Streptomyces* của Tresner and Backus (1963). Trong số 82 chủng *Streptomyces* phân lập được có 5 nhóm màu xuất hiện với số lượng và tỉ lệ khác nhau gồm màu trắng (39,02%), màu vàng (21,95%), màu xám (20,73%), màu xanh (15,85%), màu hồng (2,44%) (Hình 4).



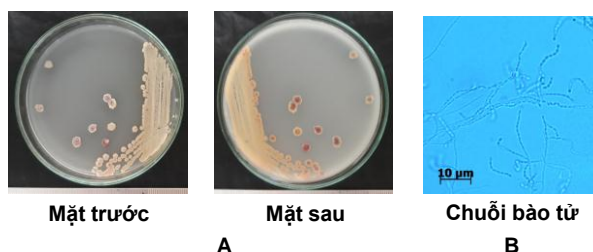
Hình 4. Ảnh đại diện các nhóm màu *Streptomyces* phân lập được

### Sàng lọc chủng *Streptomyces* có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Erwinia carotovora*

Kết quả thí nghiệm bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch đã thu được 3 chủng CC3.2, CC12.3, CC13.2 có khả năng đối kháng vi khuẩn tương đối mạnh với đường kính vòng vô khuẩn đạt lần lượt là  $11,5 \pm 0,07$ ;  $8,12 \pm 1,04$ ;  $6,64 \pm 0,53$ . Chủng CC3.2 có biểu hiện hoạt tính mạnh nhất nên được lựa chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

### Đặc điểm hình thái của chủng CC3.2

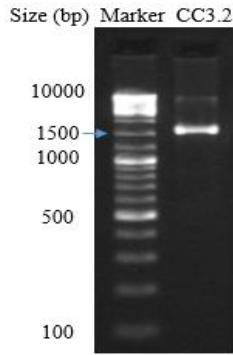
Chủng CC3.2 được cấy trên môi trường Gause I và nuôi trong 7 ngày ở  $30^{\circ}\text{C}$  tạo thành khuẩn lạc có dạng tròn, bề mặt xù xì. Màu sắc khuẩn lạc thay đổi theo thời gian nuôi cấy, ở 1 - 5 ngày đầu nuôi cấy khuẩn lạc có màu trắng, hình tròn, kích thước 2 - 3 mm bề mặt khô, xù xì, từ ngày thứ 5 trở đi khuẩn lạc bắt đầu chuyển dần sang màu hồng hoặc xám với đường kính khoảng 2 - 4 mm, trung tâm khuẩn lạc lõm lên, viền ngoài có màu trắng. Mặt dưới khuẩn lạc phẳng, khuẩn ti cơ chất ban đầu có màu vàng và dần chuyển sang màu hồng. Quan sát sơ bộ hình thái sợi *Streptomyces* bằng kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000 lần, kết quả cho thấy sau 72 giờ nuôi cấy chủng CC3.2 bắt đầu hình thành bào tử. Chuỗi bào tử ngắn, có 3 đến 10 bào tử cho mỗi chuỗi, trên mỗi chuỗi chính có sự phân nhánh dạng chùm 2 - 5 nhánh, các chuỗi bào tử thẳng, uốn cong, một số có dạng xoắn không đều cho thấy có đặc điểm điển hình của chi *Streptomyces* (hình 5).



Hình 5. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc (A) và chuỗi bào tử (B) của chủng CC3.2

**Định danh chủng *Streptomyces* CC3.2**

Phản ứng PCR được thực hiện với cặp primer 27F và 1492R nhằm khuếch đại vùng 16S rRNA của chủng CC3.2. Kết quả điện di cho thấy phản ứng PCR đã khuếch đại 1 băng DNA kích thước khoảng 1500 bp (Hình 6).



**Hình 6. Kết quả điện di sản phẩm PCR vùng 16S rRNA chủng CC3.2**

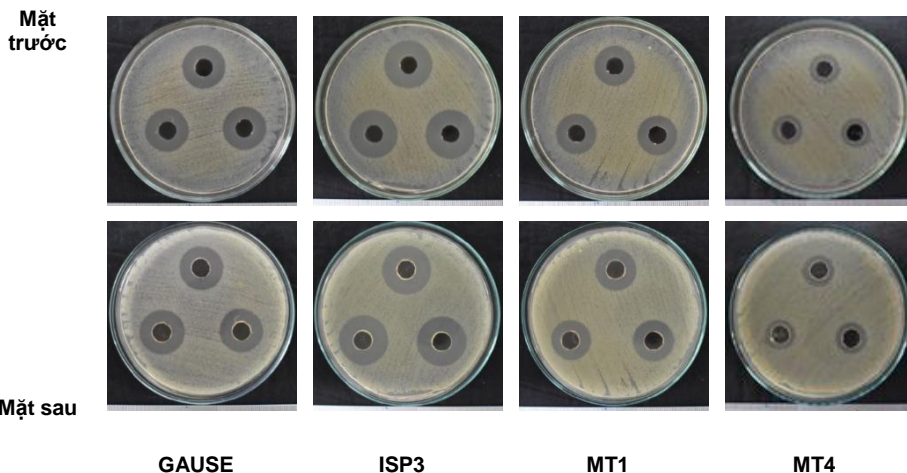
Trình tự DNA được xử lý nhờ chương trình GENE DOC, và so sánh với trình tự có sẵn từ Genbank, cho thấy chủng CC3.2 tương đồng hoàn toàn với loài *Streptomyces diastaticus* với tỉ lệ 100%. Các loài thuộc chi *Streptomyces* được biết là các nhân tố kiểm soát sinh học ức chế nguồn vi sinh vật gây bệnh từ đất. Xạ khuẩn *Streptomyces diastaticus* là loài được phân lập từ đất, sản sinh enzyme  $\alpha$ -L-Arabinofuranosidase, hai loại kháng sinh polyene macrolide, rimocindin và CE-108 và chất kháng nấm gồm olidomycin A và C.

**Môi trường nuôi cấy thích hợp cho chủng CC3.2 phát huy khả năng đối kháng vi khuẩn**

Trong quá trình lên men, việc lựa chọn môi trường thích hợp đóng vai trò hết sức quan trọng đối với sự phát triển của vi sinh vật để thu nhận hoạt chất kháng khuẩn. Để chọn được môi trường lên men đáp ứng yêu cầu trên, chủng *Streptomyces* CC3.2 được nuôi trên 9 loại môi trường cơ bản. Sau 4 ngày nuôi, mức độ kháng khuẩn được đánh giá bằng kích thước vòng vô khuẩn trình bày ở Hình 7 và Bảng 1.

**Bảng 1. Đường kính vòng vô khuẩn của chủng CC3.2 trên các môi trường khác nhau sau 4 ngày nuôi cấy**

STT	Môi trường	Đường kính vòng vô khuẩn <i>Erwinia carotovora</i> (mm)
1	GAUSE	12,47 ± 0,22
2	ISP3	15,22 ± 0,28
3	MT1	9,18 ± 0,41
4	MT4	4.84 ± 0,38



**Hình 7. Vòng vô khuẩn của chủng CC3.2 trên các môi trường khác nhau sau 4 ngày nuôi cấy**

Từ kết quả trên cho thấy, trong 09 môi trường nuôi cấy, chủng CC3.2 sinh trưởng và kháng khuẩn trên 4 môi trường gồm GAUSE, ISP3, MT1, MT4. Chủng CC3.2 có hoạt tính cao nhất khi nuôi cấy trên môi trường ISP3 với

đường kính vòng vô khuẩn đạt 15,2 mm cao hơn so với ba môi trường còn lại. Từ kết quả này đã chứng tỏ rằng chủng CC3.2 có khả năng sản sinh các chất chuyển hóa có hoạt tính sinh học trong điều kiện môi trường khác nhau, các thành phần môi trường lên men cũng có ảnh hưởng nhiều đến khả năng hình thành chất đối kháng của xạ khuẩn như nhiều nghiên cứu đã khẳng định. Cơ chế kích hoạt sản sinh hợp chất kháng khuẩn trong môi trường chưa được tìm hiểu rõ ở vi khuẩn, tuy nhiên có thể các thành phần khác nhau trong các môi trường hoạt động như các tín hiệu hóa học. Các tín hiệu này gắn vào các thụ thể tương ứng với tế bào vi khuẩn dẫn đến sự thay đổi nồng độ Ca<sup>2+</sup>, các hormon, các gốc tự do nội bào. Sự thay đổi này kiểm soát sự phiên mã các nhóm gene chịu trách nhiệm sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp và tác động thông qua nhân tố kích hoạt phiên mã của các nhóm gene này (Abdelmohsen *et al.*, 2015). Với mục đích lựa chọn môi trường lên men thích hợp cho quá trình sinh tổng hợp hoạt chất kháng vi khuẩn, căn cứ vào kết quả này nhận thấy môi trường ISP3 là môi trường tương đối đơn giản và thích hợp nhất nên được sử dụng để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.

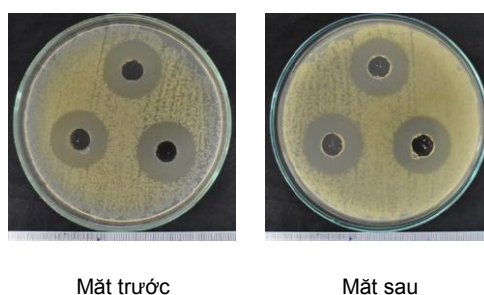
### Thời gian nuôi cấy thích hợp cho chủng CC3.2 đạt khả năng kháng khuẩn cao nhất

Từ kết quả thu được ở trên, môi trường ISP3 được sử dụng nuôi cấy chủng CC3.2 và xác định thời điểm kết thúc lên men thu hồi hợp chất kháng khuẩn cao nhất. Chủng *Streptomyces* CC3.2 được nuôi lắc trong bình chứa môi trường lên men ISP3 với tỉ lệ giống 2% (v/v) và thực hiện khảo sát thời gian lên men trong 7 ngày để sinh hợp chất kháng khuẩn cao nhất, đồng thời xác định số lượng tế bào sống trong môi trường thông qua số lượng khuẩn lạc hình thành (Hình 8 và Bảng 2).

**Bảng 2.** Đường kính vòng vô khuẩn và số lượng tế bào của chủng CC3.2 nuôi trong môi trường ISP3 theo thời gian

Thời gian (ngày)	Đường kính vòng vô khuẩn <i>Erwinia carotovora</i> (mm)	Số lượng tế bào chủng CC3.2 (CFU/ml)
0	0	1.93 x 10 <sup>7</sup>
1	0	2.02 x 10 <sup>6</sup>
2	10,19 ± 0,15	2.46 x 10 <sup>6</sup>
3	12,98 ± 0,25	2.19 x 10 <sup>9</sup>
4	15,04 ± 0,28	2.91 x 10 <sup>9</sup>
5	16,91 ± 0,32	1.35 x 10 <sup>9</sup>
6	15,71 ± 0,40	2.46 x 10 <sup>8</sup>
7	15,15 ± 0,27	2.89 x 10 <sup>7</sup>

Sau 2 ngày nuôi cấy, khả năng kháng khuẩn của chủng CC3.2 đã xuất hiện và tăng dần đạt cao nhất ở 5 ngày sau nuôi cấy (16.91 mm) và giảm dần ở ngày thứ 6 và 7. Ở *Streptomyces*, các hợp chất kháng khuẩn thường do các nhóm gene trong nhóm chịu kiểm soát bởi các nhân tố bên trong và bên ngoài cluster. Việc sinh hợp chất kháng khuẩn thường xảy ra ở giai đoạn sau quá trình tăng trưởng khi có sự thay đổi về mặt hình dạng khuẩn ty sơ cấp sang khuẩn ty thứ cấp và hình thành bào tử. Hợp chất kháng khuẩn do chủng CC3.2 sản sinh ra thể hiện rõ do sự tăng giảm số lượng tế bào. Do vậy, có thể dừng lên men sau 5 ngày nuôi để đạt hiệu quả kháng khuẩn cao nhất.



**Hình 8.** Vòng vô khuẩn của chủng CC3.2 sau 05 ngày nuôi cấy

### KẾT LUẬN

Từ 82 chủng *Streptomyces* phân lập đã xác định được 3 chủng *Streptomyces* có khả năng đối kháng vi khuẩn *Erwinia carotovora* gây bệnh thối nhũn trên cây rau cải ngọt, trong đó, chủng CC3.2 có hoạt tính mạnh nhất. Kết quả định danh trình tự vùng 16S rRNA cho thấy chủng CC3.2 tương đồng với loài *Streptomyces diastaticus*. Chủng CC3.2 phát triển và kháng khuẩn tốt nhất khi nuôi cấy trên môi trường IPS3 sau 5 ngày nuôi trong điều kiện nuôi lắc 200 vòng/phút tại nhiệt độ 30°C. Kết quả trong nghiên cứu cho thấy chủng CC3.2 (*Streptomyces diastaticus*) có tiềm năng ứng dụng trong kiểm soát sinh học bệnh thối nhũn trên cây cải. Chính vì vậy, để đạt được những kết quả cao hơn các nghiên cứu tiếp theo sẽ tập trung khảo sát các điều kiện lên men khác như tỉ lệ

tiếp giống, pH, nhiệt độ, và tối ưu các điều kiện nuôi cấy để tăng khả năng sinh hoạt chất kháng vi khuẩn *Erwinia carotovora*, xác định hợp chất kháng khuẩn sinh ra từ chủng này.

**Lời cảm ơn:** Cảm ơn Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ toàn bộ kinh phí và máy móc, trang thiết bị để chúng tôi có thể hoàn thành nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdelmohsen UE, Grkovic T, Balasubramanian S, Kamel MS, Quinn RJ, Hentschel U (2015). Elicitation of secondary metabolites in actinomycetes. *Biotechnol Adv* 33: 798-811.
- Agrios GN. (2006). Bacterial Soft Rots. 5<sup>th</sup> Edition. Eacademic Press. San Diego.
- Bhat KA, Masoodi SD, Bhat NA, Ahmad M, Zargar MY, Mir SA, Ashraf BM (2010). Studies on the effect of temperature on the development of soft rot of cabbage (*Brassica oleracea* var. Capitata) cause by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J Phytopathol* 2: 64-76.
- Doolotkeldieva T, Bobusheva S, Suleymankisi A (2016). Biological Control of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* by *Streptomyces* Species. *Adv Microbiol* 6: 104-114.
- Kondo H, Honke T, Hasegawa R, Shimoda T, Nakamura S (1975). Isolation of maltoetraose from *Streptomyces* as an antibiotic against *Erwinia carotovora*. *J Antibiotic* (Tokyo) 28(2): 157-160.
- Maitham JM, Ehab DS (2013). Detection of local *Erwinia* Isolates Causing Diseases in Potato by Using DNA Amplification by Polymerase Chain Reaction Technique (PCR). *J Al-Nahrain University* 16/3: 224-229.
- Marmur J (1961). A Procedure for the Isolation of Deoxiribonucleic Acid from Microorganisms. *J Mol Biol* 3: 208-218.
- Nguyễn Thành Đạt (2000). *Sinh học vi sinh vật*, Nhà xuất bản Giáo dục.
- Perombelon MCM, Van Der Wolf JM (2002). Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual. Scottish Crop Research Institute Occasional Publication No.10.
- Qin Z, Peng V, Zhou X, Liang R, Zhou Q, Chen H, Hopwood DA, Keiser T, Deng Z (1994). Development of a gene cloning system for *Streptomyces hygrosopicus* varying chengensis, a producer of three useful antifungal compounds by elimination of three barriers to DNA transfer. *J Bacteriol* 176: 2090-2095.
- Tresner HD, Backus EJ (1963). System of color wheels for *Streptomyces taxonomy*. *Appl Microbiol* 11: 335-338.
- Walker DS, Reeves PJ, Salmond GPC. (1994). The major secreted cellulase, CelV, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* is an important soft rot virulence factor. *Mol. Plant-Microbe Interact* 7: 425-431.

## SCREENING FOR *Streptomyces* STRAINS HAVE THE ABILITY TO ANTAGONIZE *Erwinia carotovora* CAUSING SOFT ROT DISEASE

Nguyen Thi Ngoc Bich<sup>1,2</sup>, Le Thi Mai Cham<sup>1</sup>, Ha Thi Loan<sup>1</sup>, Nguyen Vu Phong<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

<sup>2</sup> Department of Biotechnology, Nong Lam University Ho Chi Minh City

### SUMMARY

Soft rot disease is a common disease in almost vegetable species. The *Erwinia carotovora* bacteria is known as one of the major pathogens. This study was aimed to isolate and screen for *Streptomyces* strains possessed the antagonism capacity against *Erwinia carotovora* causing soft rot disease in vegetables. From infected vegetable samples, one isolated bacterial strain that has characteristics similar to *Erwinia carotovora*. Through the *in vitro* test, it was shown that this strain causes soft rot disease to the host plant *Brassica integrifolia*. Using a specific primer for molecular identification, this isolated strain was confirmed that is *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* due to the presence of a pathogenic gene in its genome. Besides, 82 *Streptomyces* strains were isolated from vegetable farming sites in Cu Chi district, Ho Chi Minh City. Among them, three *Streptomyces* strains showed the antagonist ability towards *Erwinia carotovora* through the well diffusion method. The highest antibacterial activity CC3.2 strain was homogeneous 100% with *Streptomyces diastaticus* by sequencing the 16S rRNA gene with primers 27F/1492R. By culturing on nine liquid media, the CC3.2 strain possessed the highest antibacterial activity in the ISP3 medium, shaking 200 rpm at 30°C after five days.

**Keywords:** Soft rot disease, *Erwinia carotovora*, well diffusion method, *Streptomyces diastaticus*.