

Phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn từ vùng rễ cây trồng có khả năng kháng phổ rộng các nấm gây bệnh thực vật

Nguyễn Thị Hồng¹, Phạm Đức Ngọc^{2,*}

¹Viện Nghiên cứu ứng dụng Công nghệ cao Đông Dương, Số 6 M6B Bắc Linh Đàm, Hà Nội, Việt Nam

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 20 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: Sản xuất nông nghiệp hiện nay bị ảnh hưởng nghiêm trọng bởi các vi sinh vật gây bệnh trong đó có vi nấm. Việc sử dụng các hóa chất để diệt nấm gây bệnh thực vật đã ảnh hưởng tiêu cực đến chất lượng nông sản và gây môi trường. Biện pháp kiểm soát sinh học sử dụng các chế phẩm vi sinh vật chống nấm là một trong những ưu tiên hàng đầu trong sản xuất các sản phẩm nông nghiệp an toàn hiện nay. Trong nghiên cứu này, 254 chủng vi khuẩn đã được phân lập từ vùng rễ cây trồng, trong đó 11 chủng có đặc tính đối kháng chống lại nhiều loài nấm gây bệnh gồm *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Sclerotium hydrophila*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Aspergillus flavus* và *Aspergillus niger*. Các chủng này được định danh là *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* và *Burkholderia vietnamiensis* bằng giải trình tự gen 16S rRNA. Các chủng thuộc chi *Bacillus* đều có khả năng sinh enzyme ngoại bào mạnh để phân giải cơ chất tinh bột, casein, chitin có trong môi trường. Các chủng vi khuẩn thu được trong nghiên cứu này có thể sử dụng để bổ sung vào các chế phẩm vi sinh hoặc phân bón hữu cơ nhằm thay thế thuốc bảo vệ thực vật hóa học, góp phần bảo vệ môi trường và nâng cao chất lượng sản phẩm nông nghiệp.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, *Burkholderia vietnamiensis*, vi khuẩn đối kháng, vi nấm gây bệnh thực vật.

1. Đặt vấn đề

Bệnh hại cây trồng hàng năm gây thiệt hại lớn cho sản xuất và bảo quản nông sản, trong đó các tác nhân là vi nấm như *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Sclerotium hydrophila*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Aspergillus flavus* giữ vai trò chủ chốt. Các loài nấm này có thể phá hủy một phần hoặc toàn bộ

vụ thu hoạch của cây trồng quan trọng như tiêu, cà phê, thanh long, cà chua [1]...

Sử dụng thuốc hóa học mặc dù hiệu quả cao trong phòng chống nấm nhưng lại gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng và ảnh hưởng xấu đến sức khỏe con người. Sử dụng các chế phẩm vi sinh chứa các chủng vi sinh vật đối kháng để chống lại các nấm gây bệnh đang là ưu tiên hàng đầu trong sản xuất các sản phẩm nông nghiệp hữu cơ [2]. Do đó, việc tuyển chọn được các chủng vi khuẩn từ chính vùng rễ cây trồng với khả năng đối kháng phổ rộng các nấm gây bệnh thực vật để phục vụ sản xuất các chế phẩm

*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-24-38588856.

Email: ngoc46a@yahoo.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4573>

vi sinh bảo vệ thực vật là có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Các chủng nấm *F. oxysporum*, *P. capsici*, *S. hydrophila*, *A. flavus*, *A. niger* do TS. Trần Văn Tuấn, Phòng Genomic, thuộc Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Enzym và Protein, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQGHN cung cấp. Nấm gây bệnh đốm nâu ở thanh long là *Neoscytalidium dimidiatum* do Giáo sư Phạm Văn Ty cung cấp và được định danh bởi nhóm nghiên cứu của TS. Trần Văn Tuấn. Các chủng vi khuẩn phân lập được trong nghiên cứu này ở dạng thuần khiết được bảo quản trong glycerol ở -30°C sau khi đã được làm đông trong nitơ lỏng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập vi khuẩn vùng rễ

Cân 1 g mẫu đất thu từ vùng rễ cho vào 9 ml nước cất vô trùng, mẫu được trộn đều bằng máy vortex để thu được mẫu đồng nhất. Pha loãng mẫu bằng nước cất khử trùng ở các nồng độ khác nhau. Cây trái mẫu ở các nồng độ này trên môi trường LB để thu được những khuẩn lạc riêng rẽ. Các khuẩn lạc có hình dạng màu sắc khác nhau được tách riêng, thuần khiết và giữ trong ống nghiệm để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo [3].

2.2.2. Xác định hoạt tính đối kháng

Để tuyển chọn vi khuẩn có khả năng đối kháng nấm gây bệnh thực vật, mỗi chủng nấm 4 ngày tuổi được cấy ở vị trí trung tâm của đĩa môi trường PDA, sau đó dùng que cấy vô trùng

để cấy 3 chủng vi khuẩn phân lập được cách chủng nấm khoảng cách tương đương nhau. Sau 5 ngày kết quả đối kháng với từng loài nấm được xác định dựa vào khoảng cách hình thành từ mép hệ sợi nấm tới khuẩn lạc vi khuẩn [3].

2.2.3. Định danh các chủng vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn phân lập được được quan sát hình thái tế bào, nhuộm Gram và nhuộm nội bào tử [4]. Sau đó thực hiện giải trình tự gen 16S rRNA: ADN hệ gen của các chủng được tách chiết, gen 16S rRNA được khuếch đại bằng PCR và được tinh sạch bằng kit thương mại của hãng Promega. Sản phẩm PCR sau tinh sạch được gửi đi giải trình tự tại Singapore. Các trình tự gen 16S rRNA sau đó được so sánh với ngân hàng dữ liệu GenBank sử dụng công cụ BLAST.

2.2.4. Xác định khả năng sinh enzyme ngoại bào của các chủng vi khuẩn

Khả năng sinh các enzyme ngoại bào gồm amylase, cellulase, protease, chitinase được thử theo phương pháp khuếch tán trên thạch chứa 1% cơ chất tương ứng là tinh bột tan, CMC, casein và chitin [5].

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập và xác định khả năng đối kháng nấm bệnh cây trồng của các chủng vi khuẩn

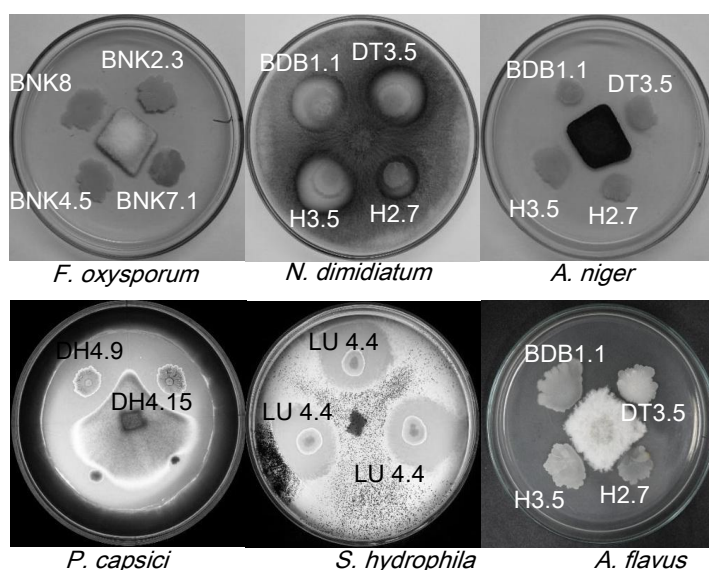
Từ các mẫu đất khác nhau, 254 chủng vi khuẩn đã được phân lập trên môi trường LB. Để tuyển chọn các chủng vi khuẩn có hoạt tính kháng nấm cao, chúng tôi tiến hành kiểm tra hoạt tính kháng nấm của các chủng bằng phương pháp đồng nuôi cấy. Kết quả thu được 11 chủng có hoạt tính kháng mạnh nhiều loài nấm gây bệnh thực vật (Bảng 1).

Bảng 1. Các chủng vi khuẩn có hoạt tính kháng nấm phổ rộng

Chủng	<i>P. capsici</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>S. hydrophila</i>	<i>N. dimidiatum</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>
BDB 1.1	+++	+++	++++	++++	++++	+++
BNK8	+++	+++	++++	++++	++++	+++
BNK2.3	+++	++++	++++	++++	++++	+++

DH4.9	+	+++	+++	+++	-	-
DH4.15	+	+++	+++	+++	-	-
LU4.4	+	+	+++	+++	++++	+++
BNK 7.1	+++	+++	+++	+++	+++	+++
BRK4.5	+++	+++	++++	+++	+++	++
H2.7	++++	+++	+++	+++	++++	+++
H3.5	+++	+++	+++	+++	++++	+++
DT3.5	+++	+++	+++	++++	++++	+++

Ghi chú: (-) không kháng, (+) kháng yếu, (++) kháng trung bình, (+++) kháng mạnh, (++++) kháng rất mạnh



Hình 1. Khả năng kháng nấm của 11 chủng vi khuẩn đại diện.

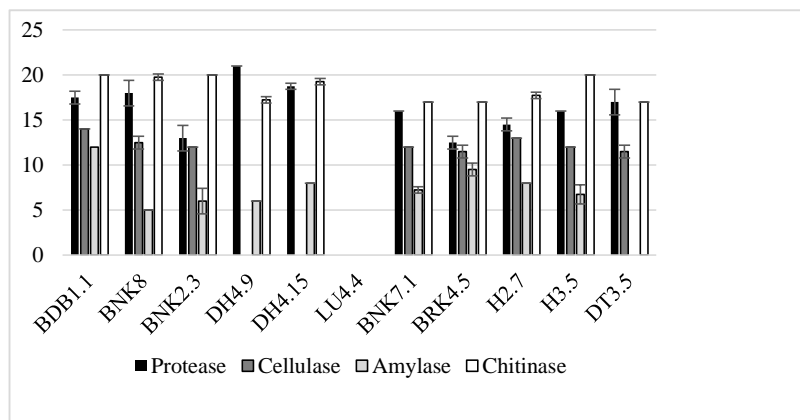
Các chủng với khả năng kháng nấm mạnh đều được phân lập từ đất vùng rễ của nhiều loại cây trồng khác nhau như đậu tương, lạc, lúa. Kết quả trong Bảng 1 cho thấy 11 chủng vi khuẩn tuyển chọn thể hiện khả năng kháng rất mạnh nấm *N. dimidiatum* gây bệnh đốm nâu trên cây thanh long và nấm *S. hydrophila* gây bệnh trên cây cà chua. Đặc biệt có đến 9 chủng kháng lại hai loài nấm gây hỏng nông sản sau thu hoạch là *A. niger* và *A. flavus*. Các chủng vi khuẩn thu được trong nghiên cứu này có tiềm năng ứng dụng vào bảo vệ cây trồng cũng như nông sản sau thu hoạch.

3.2. Định danh các chủng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng nấm

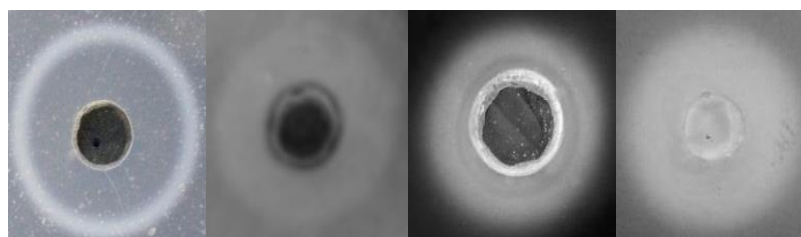
Cả 11 chủng với hoạt tính kháng nấm đều được tiến hành phân loại đến loài dựa vào đặc điểm hình thái và giải trình tự gen 16S rRNA. Trong số 11 chủng được nhuộm Gram và quan sát dưới kính hiển vi thì có 10 chủng là Gram dương với tế bào dính thành chuỗi, hình que và có nội bào tử. Như vậy có thể sơ bộ kết luận rằng 10 chủng này thuộc chi *Bacillus*. Riêng chủng LU4.4 là vi khuẩn Gram âm, tế bào hình que. Để phân loại chính xác đến loài, trình tự gen 16S rRNA của cả 11 chủng được giải trình tự và so sánh độ tương đồng với dữ liệu của GenBank bằng công cụ BLAST. Kết quả thu được trình bày trong Bảng 2.

Bảng 2. So sánh trình tự gen 16S rRNA của 11 chủng đối kháng nấm bệnh với dữ liệu GenBank

Chủng	Mức độ tương đồng với dữ liệu GenBank	Tên loài trên GenBank với mã số gen tương ứng
BDB1.1	99%	<i>Bacillus subtilis</i> (KX608731.1)
BNK8	100%	<i>Bacillus subtilis</i> (MF403067.1)
BNK2.3	100%	<i>Bacillus subtilis</i> (GU122961.1)
DH4.9	100%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (KM117160.1)
DH4.15	100%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (KU922934.1)
LU4.4	99%	<i>Burkholderia vietnamiensis</i> (AB568311.1)
BNK7.1	100%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (MF171193.1)
BRK4.5	100%	<i>Bacillus subtilis</i> (MF403067.1)
H2.7	100%	<i>Bacillus subtilis</i> (MF073326.1)
H3.5	99%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (KU922448.1)
DT3.5	100%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (KY886133.1)



(A)



(B)

Hình 2. (A) Khả năng phân giải các cơ chất khác nhau của 11 chủng nghiên cứu (đơn vị mm).
 (B) Khả năng sinh enzyme ngoại bào của chủng *B. subtilis* BDB1.1:
 (a) Protease, (b) Cellulase, (c) Amylase, (d) Chitinase

Hầu hết các chủng đều thuộc chi *Bacillus*, trong đó các chủng BDB1.1, BNK8, BNK2.3, BRK4.5 và H2.7 thuộc loài *Bacillus subtilis*, chủng DH4.9, DH4.15, BNK7.1, H3.5 và DT3.5 thuộc loài *Bacillus amyloliquefaciens*. Loài *B. subtilis* có khả năng sản sinh nhiều enzyme ngoại bào như amylase, protease, phytase và sinh tổng hợp các kháng sinh chống nấm như kanosamine, lipopeptides (LP). Loài *B. amyloliquefaciens* có quan hệ di truyền rất gần gũi với *B. subtilis* và có khả năng sinh auxin, là chất có khả năng kích thích sự kéo dài rễ, thúc đẩy tăng trưởng cây trồng [6]. Chủng LU4.4 là chủng Gram âm, sau khi phân tích trình tự nhận thấy chủng LU4.4 thuộc chi *Burkholderia*, gần gũi với loài *Burkholderia vietnamiensis* với độ tương đồng về trình tự gen 16S rRNA là 99%. Trong một số các công bố trước đây cho thấy, chủng *B. vietnamiensis* có khả năng cố định nitơ giúp tăng năng suất trên 20% ở cây trồng và sinh tổng hợp các chất kích thích tăng trưởng thực vật như IAA, NAA [7].

3.3. Khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào

Các enzyme ngoại bào đóng vai trò quan trọng trong việc phân giải nhiều hợp chất cao phân tử thành những phân tử nhỏ giúp cây dễ dàng hấp thụ do đó kích thích sinh trưởng ở cây [2]. Vì vậy, khả năng phân giải nhiều cơ chất khác nhau là một tiêu chí quan trọng khi chọn các chủng vi khuẩn làm probiotic cho thực vật.

Kết quả từ Bảng 2 cho thấy, 10 chủng *Bacillus* đều có khả năng sinh enzyme protease, amylase, cellulase, và chitinase, đặc biệt chủng *B. subtilis* BDB1.1 có khả năng phân giải mạnh nhiều cơ chất. Chủng LU 4.4 không có khả năng phân giải cơ chất nào.

4. Kết luận

1. Đã phân lập được 254 chủng vi khuẩn từ mẫu đất vùng rễ cây trồng và xác định được 11 chủng có hoạt tính kháng nấm gây bệnh thực vật. Trong đó 10 chủng là vi khuẩn Gram dương và 1 chủng Gram âm dựa trên kết quả nhuộm Gram.

2. Đã phân loại đến loài 11 chủng có hoạt tính kháng nấm mạnh bằng giải trình tự gen 16S rRNA và so sánh với dữ liệu GenBank.

3. Đã khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào gồm protease, amylase, chitinase, cellulase của các chủng nghiên cứu.

Tài liệu tham khảo

- [1] Webster., John., and Roland Weber., Introduction to fungi. Cambridge University Press, (2007).
- [2] Avis., and Tyler J., Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity, Soil Biology and Biochemistry 40.7 (2008) 1733-1740.
- [3] Petatán-Sagahón., Iván., Isolation of bacteria with antifungal activity against the phytopathogenic fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*, International journal of molecular sciences 12.9 (2011) 5522-5537.
- [4] Trần Linh Thuộc, Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm, NXB Giáo dục, TP. HCM (2010).
- [5] Phạm Văn Ty, Công nghệ sinh học – công nghệ vi sinh và môi trường, NXB Giáo dục, TP. HCM, 2006
- [6] Trịnh Trung Thành., Đặc điểm sinh học và tiềm năng ứng dụng của chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum* sp 1901 phân lập tại Rừng Quốc gia Hoàng Liên, VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology, (2013) 29(3).
- [7] Ly Ngọc Thanh Xuan, Isolation and characterization of rice endophytic bacteria in acid sulphate soil of Mekong Delta, Viet Nam, (2016).

Isolation and Characterization of Bacterial Strains Isolated from Crop Rhizosphere, which Exhibit Antagonistic Activity against Fungal Plant Pathogens

Nguyen Thi Hong¹, Pham Duc Ngoc²

¹*Indochina Research Institute of Applied Advanced Technology, 6 M6B Bac Linh Dam, Hanoi, Vietnam*

²*Faculty of Biology, VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Hanoi, Vietnam*

Abstract: Agricultural production is now severely affected by pathogenic microorganisms including molds. The use of chemical fungicides for controlling plant pathogens has negatively influenced on the quality of agricultural products and the environment. Currently, biological control using antifungal preparations is one of the top priorities in the production of safe agricultural products. In this study, 254 bacterial strains were isolated from the plant rhizosphere, of which 11 isolates exhibited antagonistic properties against several fungal pathogens including *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Sclerotium hydrophila*, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. These bacterial strains were identified as *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* and *Burkholderia vietnamienis* by sequencing of 16S rRNA genes. The *Bacillus* isolates are capable of producing extracellular enzymes to decompose starch, casein and chitin. The strains obtained in this study could be used to supplement microbial preparations or organic fertilizers to replace pesticides, contribute to environmental protection and improve quality of agricultural products.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Burkholderia vietnamienis*, biocontrol, fungal plant pathogens.