

Effect of microbial organic fertilizer types on growth and development of Shan tea variety in Thuan Chau, Son La

Duong Trung Dung, Tran Xuan Hoang

Abstract

Planting area of Shan tea in Thuan Chau district, Son La province has been decreasing due to inappropriate cultivation practices and therefore the yield and quality have been decreasing in recent years. However, there has not been any study on the procedures of Shan tea production toward protecting soil while increasing tea productivity and quality in Thuan Chau district, Son La province. To solve this situation, the authors studied the effect of microbial organic fertilizer types on growth and development of Shan tea variety in this area. The results showed that supplementing with microbial organic fertilizer, the number of litter picking reached from 6.7 - 8 litters per year, the average time interval between 2 litter picking ranged from 28.7 - 36 days, the density of buds reached 506.22 - 536.44 buds/m², the weight of buds was recorded at 0.42 - 0.51 g/bud and the yield was of 2.73 - 3.13 tons/ha. On the other hand, applying microbial organic fertilizer could improve the soil as increasing porosity and humus content in the soil; NTT treatment had porosity from 67.26 - 67.63% and it was the best fertilizer treatment.

Key words: Microbial organic fertilizer, Shan tea, growth, development

Ngày nhận bài: 6/7/2017

Người phản biện: PGS.TS. Lê Như Kiều

Ngày phản biện: 14/7/2017

Ngày duyệt đăng: 27/7/2017

NGHIÊN CỨU CHŨNG XẠ KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG VỚI VI KHUẨN *Erwinia carotovora* GÂY BỆNH THỐI NHŨN TRÊN MỘT SỐ LOẠI CÂY TRỒNG

Nguyễn Xuân Cảnh¹, Nguyễn Thị Khánh¹, Phạm Hồng Hiến²

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích tuyển chọn, nghiên cứu đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Erwinia carotovora* gây bệnh thối nhũn trên một số loại cây trồng. Bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch đã sàng lọc và xác định được 05 chủng trong số 192 chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Erwinia carotovora*. Chủng L2.5 thể hiện hoạt tính kháng khuẩn rất mạnh với đường kính vòng kháng khuẩn đạt 23 mm. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng này cho thấy chủng L2.5 có khả năng tạo chuỗi bào tử dạng thẳng sau 03 ngày nuôi cấy, không sinh sắc tố tan trên môi trường ISP-6, sinh trưởng tốt ở ngưỡng nhiệt độ 30°C- 35°C, pH trung tính và chịu được nồng độ muối thấp dưới 1%. Chủng L2.5 có khả năng sử dụng một số nguồn các bon và ni tơ khác nhau bao gồm sucrose, fructose, cellulose, raffinose, cao thịt bò, pepton và KNO₃. Phân tích trình tự 16S rRNA cho thấy chủng L2.5 và chủng *Streptomyces psammotiscus* KP1404 có độ tương đồng cao tới 99%. Kết hợp các đặc điểm hình thái, nuôi cấy, sinh lý, sinh hóa và phân tích sinh học phân tử đã xác định chủng xạ khuẩn L2.5 thuộc vào loài *Streptomyces psammotiscus*.

Từ khóa: *Erwinia carotovora*, *Streptomyces* sp., bệnh thối nhũn, xạ khuẩn

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Thối nhũn (Soft rot) là một trong số các bệnh gây thiệt hại lớn cho ngành trồng trọt, bệnh này phổ biến trên toàn thế giới có thể xảy ra trên nhiều đối tượng cây trồng quan trọng như các loại cây họ cải (*Brassicaceae*), họ cà (*Solanaceae*) ... và một số loại hoa cây cảnh. Triệu chứng của bệnh thối nhũn có thể bắt gặp trong hầu hết các giai đoạn của quá trình sản xuất bao gồm cả trong giai đoạn trên đồng

ruộng, trong vận chuyển, bảo quản và bày bán nông sản (Bhat *et al.*, 2010). Ước tính thiệt hại do bệnh này gây ra vào khoảng 15 - 30% giá trị cây trồng mỗi năm (FAOSTAT data, 2012). Nguyên nhân của bệnh được xác định là do nhiều loài vi khuẩn khác nhau, trong đó *Erwinia carotovora* (*E. carotovora*) được xem là tác nhân chính và gây thiệt hại lớn hơn cả (Bhat *et al.*, 2010; Prombelom *et al.*, 2002). Hiện nay chưa có biện pháp nào thực sự hiệu quả để phòng trừ

¹ Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

bệnh này, mặc dù một số hóa chất đã được sử dụng tuy nhiên chúng cũng bị hạn chế do giá thành cao, ảnh hưởng đến sức khỏe con người và gây ô nhiễm môi trường. Việc sử dụng các vi sinh vật đối kháng để kiểm soát các tác nhân gây bệnh trên cây trồng trong đó có vi khuẩn *Erwinia carotovora* đang được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi (Abd-El-Khair *et al.*, 2007; Doolotkeldieva *et al.*, 2016; Tao *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 1986). Do các vi sinh vật và sản phẩm tự nhiên của chúng là tiềm năng quan trọng cho kiểm soát sinh học bệnh cây mà không gây ảnh hưởng tới môi trường.

Xạ khuẩn (Actinomyces) là tác nhân được nghiên cứu và ứng dụng nhiều nhất trong kiểm soát sinh học (Mittra *et al.*, 2008; Watve *et al.*, 2001). Trên thế giới, các nghiên cứu về xạ khuẩn có khả năng đối kháng với vi khuẩn *E.carotovora* đã được công bố từ lâu (Kondo *et al.*, 1975). Năm 2005 nhóm nghiên cứu của Zamanian đã xác định loài *Streptomyces plicatus* có khả năng đối kháng với vi khuẩn *E.carotovora* subsp.*carotovora* gây hại cây trồng trong điều kiện in vitro (Zamanian *et al.*, 2005). Khi đã khảo sát hoạt tính của chất kháng sinh neomycin từ chủng *Streptomyces fradiae* HTP, nhóm nghiên cứu của Tao cũng đã ghi nhận chủng xạ khuẩn này có khả năng đối kháng với *E.carotovora* subsp. *carotovora* (Tao *et al.*, 2011). Nghiên cứu này được thực hiện với mong muốn phát hiện và xác định được những chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng vi khuẩn *E.carotovora* trong điều kiện Việt Nam. Từ đó tìm kiếm các hoạt chất mới, an toàn, hiệu quả và thân thiện với môi trường để ứng dụng trong nông nghiệp nói chung và nghề trồng trọt nói riêng.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng vi khuẩn *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* ATCC15713 được cung cấp bởi Viện Di truyền Nông nghiệp. Các chủng xạ khuẩn phân lập từ nhiều nguồn khác nhau được lưu trữ tại phòng thí nghiệm Bộ môn Công nghệ Vi sinh, Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Tuyển chọn các chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng vi khuẩn *Erwinia carotovora*

Việc sàng lọc và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch theo các phương pháp đã mô tả chi tiết trong các công bố trước đây (Nguyen *et al.*, 2016;

Nguyễn Xuân Cảnh và *ctv.*, 2016). Xạ khuẩn được cấy đều trên đĩa petri chứa môi trường Gause-1 ở 30°C. Sau 7 ngày nuôi cấy, thời thạch xạ khuẩn được cấy vào đĩa petri chứa môi trường MPA (Meat Peptone Agar) đã được cấy trải vi khuẩn, ủ ở 4°C trong 2 giờ để các hoạt chất từ thời thạch khuếch tán vào môi trường, sau đó cho vào tủ nuôi. Đường kính vòng ức chế sinh trưởng được xác định sau một ngày nuôi cấy ở 30°C.

2.2.2. Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn (L2.5)

Các nghiên cứu nhằm xác định một số đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn tiếp tục được thực hiện bao gồm: Xác định hình thái, kích thước khuẩn lạc; Xác định hình thái chuỗi sinh bào tử và bề mặt bào tử; Kiểm tra khả năng sinh sắc tố melanin; Kiểm tra khả năng đồng hóa các nguồn các bon và ni tơ; Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ, pH, nồng độ NaCl tới sinh trưởng và phát triển. Các nghiên cứu này được thực hiện theo các phương pháp đã mô tả chi tiết trong các công bố trước đây (Nguyen *et al.*, 2016; Nguyễn Xuân Cảnh và *ctv.*, 2016).

2.2.3. Định danh chủng xạ khuẩn L2.5

Các đặc điểm như hình thái khuẩn lạc, màu sắc khuẩn ty cơ chất, khuẩn ty khí sinh, cuống sinh bào tử và bề mặt bào tử trên môi trường nuôi cấy. So sánh các đặc điểm này với các chủng xạ khuẩn đã biết trong hệ thống phân loại quốc tế (Internatinal Streptomyces Project, ISP) (Shirling and Gottlieb, 1966). ADN từ chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn được tách chiết theo phương pháp mô tả bởi Marmur (1961). Phản ứng PCR khuếch đại vùng bảo thủ của 16S rRNA với cặp mồi 27F và 1492R lần lượt có trình tự: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' và 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1% sau đó gửi đi đọc trình tự tại công ty 1tsBASE (Malaysia). Mức độ tương đồng về trình tự gen mã hóa 16S rRNA của chủng nghiên cứu được so sánh với các chủng đã công bố trên ngân hàng gen thế giới sử dụng công cụ tra cứu Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Phần mềm MEGA6 được dùng để xây dựng cây xác định mối quan hệ di truyền.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại phòng thí nghiệm Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam từ 2014 - 2016.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Erwinia carotovora*

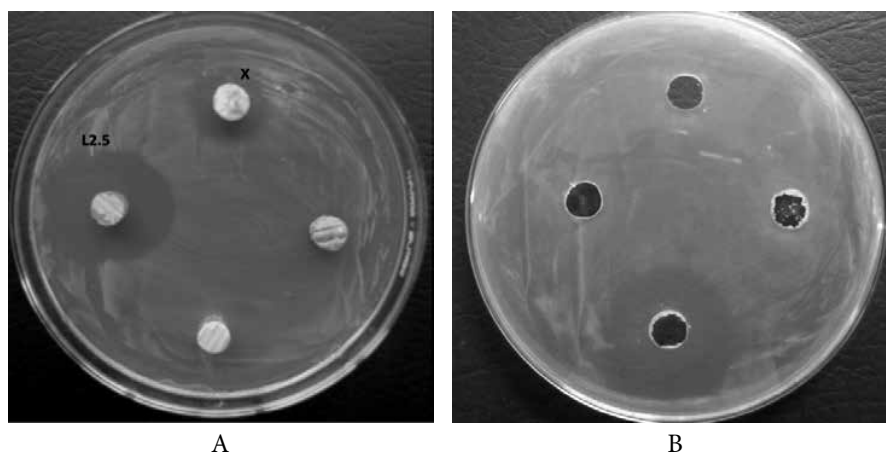
Trong quá trình nuôi cấy xạ khuẩn sẽ tiết vào môi trường một số các hợp chất có hoạt tính sinh học khác nhau, vì vậy phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch được sử dụng để tuyển chọn và đánh giá hoạt tính kháng vi khuẩn của các chủng xạ khuẩn. Tiến hành nuôi cấy các chủng xạ khuẩn trên môi trường Gause-1, chủng vi khuẩn kiểm định *Erwinia carotovora subsp. carotovora* ATCC15713 được nuôi trên môi trường MPA, việc sàng lọc các chủng xạ khuẩn có hoạt tính được thực hiện như mô tả trong nội dung phương pháp. Sau quá trình sàng lọc, 05 trong số 192 chủng xạ khuẩn nghiên cứu được xác định có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Erwinia carotovora* (Bảng 1).

Trong số 05 chủng xạ khuẩn có hoạt tính thì chủng L2.5 thể hiện khả năng đối kháng mạnh nhất với đường kính vòng vô khuẩn là 21 mm khi sử dụng thạch và 23 mm khi sử dụng giếng thạch (Hình 1). Một số công bố trên thế giới đã tìm ra các chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Erwinia carotovora* gây bệnh thối nhũn trên

cây trồng (Doolotkeldieva *et al.*, 2016; Zamanian *et al.*, 2005). So sánh với những kết quả trước đây, nhận thấy rằng 02 chủng L2.4 và L2.5 có hoạt tính tương đối mạnh. Hơn thế nữa trong một nghiên cứu trước đây, chủng L2.5 đã được xác định là có hoạt tính mạnh đối với nấm *Rhizoctonia solani* gây bệnh khô vằn trên lúa (Nguyễn Hoài Nam và *ctv.*, 2015). Chính vì thế chủng xạ khuẩn L2.5 có khả năng sinh ra một số hoạt chất có hoạt tính sinh học khác nhau và có tiềm năng để phát triển ứng dụng.

Bảng 1. Hoạt tính kháng vi khuẩn *Erwinia carotovora* của một số chủng xạ khuẩn được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch

Chủng xạ khuẩn	Đường kính vòng vô khuẩn (D-d, mm)	
	Khuếch tán qua sỏi thạch	Khuếch tán qua giếng thạch
C4.1	11±2	5±2
L2.4	17±2	14±2
L2.5	21±2	23±2
L3.10	6±2	4±2
X	12±2	10±2



Hình 1. Hoạt tính kháng vi khuẩn *Erwinia carotovora* của chủng xạ khuẩn L2.5 được xác định bằng phương pháp khuếch tán sử dụng sỏi thạch (A) và phương pháp khuếch tán sử dụng giếng thạch (B)

3.2. Đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn L2.5

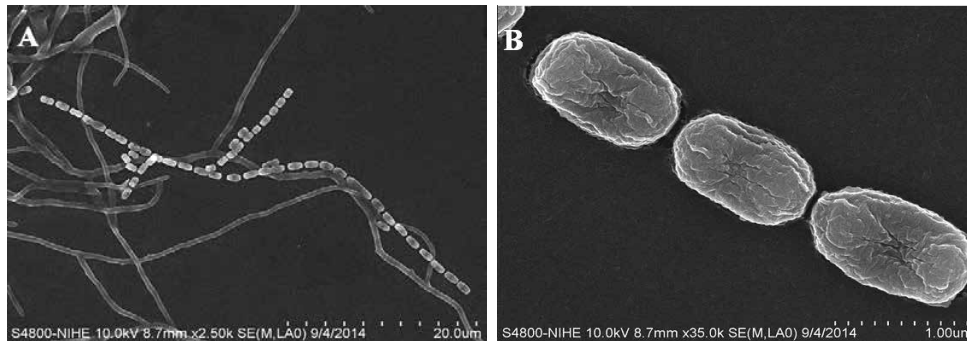
3.2.1. Đặc điểm hình thái

Căn cứ đầu tiên thường được sử dụng để nghiên cứu đặc điểm sinh học và phân loại xạ khuẩn là các đặc điểm hình thái (Miyadoh *et al.*, 2016). Chủng xạ khuẩn L2.5 được nuôi trên các môi trường khác nhau và quan sát các đặc điểm màu sắc, kích thước, hình dạng của khuẩn lạc. Trên môi trường Gause-1 khi nuôi ở 30°C sau 05 ngày khuẩn lạc chủng L2.5 có dạng tròn, bề mặt thô ráp, màu xám với viền

khuẩn lạc màu nhạt hơn. Màu sắc khuẩn lạc thay đổi theo thời gian nuôi cấy, ở 1-2 ngày nuôi cấy đầu khuẩn lạc màu trắng, khi nuôi cấy được 4 - 5 ngày thì khuẩn lạc chuyển sang màu nâu xám với đường kính khoảng 1,5 - 2 mm. Tiếp theo tiến hành các nghiên cứu xác định hình dạng cuống sinh bào tử, chuỗi bào tử và bề mặt bào tử của chủng L2.5. Chủng L2.5 được nuôi trên môi trường Gause-1 ở 30°C, tiến hành làm tiêu bản và quan sát sơ bộ hình thái sợi xạ khuẩn bằng kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000 lần, kết quả cho thấy sau 72 h nuôi

cấy chủng xạ khuẩn L2.5 bắt đầu hình thành bào tử. Các bào tử được sắp xếp thành từng chuỗi thẳng và dài, trên mỗi chuỗi chính có sự phân nhánh. Sau 90 h nuôi cấy các bào tử bắt đầu phân cắt tách rời khỏi chuỗi và phát tán vào môi trường. Việc xác định chính xác hơn hình thái chuỗi bào tử và bề mặt bào tử là điều kiện quan trọng nhằm phân nhóm xạ khuẩn, tiếp tục quan sát hình thái chuỗi sinh bào tử và bề mặt bào tử của chủng xạ khuẩn L2.5 dưới kính

hiện vi điện tử quét (SEM). Ở độ phóng đại 2500 lần có thể dễ dàng quan sát thấy chuỗi bào tử dạng thẳng, trên mỗi chuỗi chính có khoảng 30-50 bào tử, ở một số chuỗi chính xuất hiện sự phân nhánh, các nhánh này cũng có dạng thẳng mỗi nhánh có khoảng 08-15 bào tử (Hình 2 A). Bào tử chủng L2.5 có dạng hình bầu dục, trơn, kích thước dao động từ 1,2 - 1,6 × 6,0 - 7,0 μm (Hình 2 B).



Hình 2. Hình thái chuỗi sinh bào tử và bề mặt bào tử của chủng L2.5 dưới kính hiển vi điện tử quét (SEM) ở độ phóng đại 2.500 lần (A) và 35.000 lần (B)

3.2.2. Khả năng hình thành sắc tố Melanin

Rất nhiều chủng xạ khuẩn được xác định là có khả năng sinh sắc tố melanin trong quá trình nuôi cấy, vì thế đây cũng là một trong những tiêu chí trong việc phân nhóm xạ khuẩn (Shirling and Gottlieb, 1966). Chủng L2.5 được nuôi cấy trên môi trường ISP-6 ở 30°C và quan sát sự thay đổi màu sắc môi trường trong 21 ngày nuôi cấy. Kết quả cho thấy sau 21 ngày nuôi cấy màu của môi trường không có sự thay đổi đáng kể, điều này chứng tỏ chủng L2.5 không có khả năng sinh sắc tố melanin.

3.2.3. Khả năng sử dụng các nguồn đường và ni tơ của chủng L2.5

Theo Shirling và Gottlieb (1966), khả năng đồng hóa và sử dụng các nguồn các bon khác nhau được đánh giá theo 04 mức. Chủng L2.5 được nuôi cấy trên môi trường ISP-9 có bổ sung các nguồn đường khác nhau sau đó kiểm tra khả năng phát triển của chủng này. Kết quả cho thấy chủng L2.5 có khả năng đồng hóa tốt các nguồn đường như sucrose, fructose, cellulose, raffinose nhưng không đồng hóa các nguồn đường D-xylose, L-arabinose và inositol (Bảng 2). Tiếp đó nghiên cứu xác định khả năng sử dụng các nguồn ni tơ khác nhau của chủng L2.5 cũng đã thực hiện. Chủng này được nuôi trên môi trường Starch Nitrate với nguồn NaNO₃ được thay thế bằng các nguồn ni tơ khác nhau như mô tả trong phần phương pháp. Kết quả cho thấy chủng L2.5 có khả năng sử dụng nguồn ni tơ từ các nguồn khác nhau như cao thịt bò, pepton, KNO₃ (Bảng 2). Kết quả khảo sát này

đã cung cấp thông tin quan trọng làm căn cứ để tiến hành phân loại xạ khuẩn theo hệ thống ISP, đồng thời cung cấp thông tin về dinh dưỡng của chủng L2.5 phục vụ quá trình lên men sau này.

Bảng 2. Khả năng sử dụng các nguồn cacbon và ni tơ khác nhau của chủng L2.5

Nguồn cacbon	Khả năng phát triển của chủng L2.5 sau 05 ngày nuôi cấy	Nguồn nitrogen	Khả năng phát triển của chủng L2.5 sau 05 ngày nuôi cấy
Sucrose	+	NaNO ₃	++
R-Hannose	±	KNO ₃	++
Cellulose	++	Cao thịt bò	++
Fructose	++	NH ₄ Cl	-
L-arabinose	-	Pepton	++
Raffinose	+	(NH ₄) ₂ SO ₄	-
D-xylose	-	NH ₄ NO ₃	±
Inositol	-		
D-manitol	±		

Ghi chú: (++) Chủng L2.5 có khả năng sử dụng tốt nguồn các bon hoặc ni tơ; (+) Chủng L2.5 có khả năng sử dụng nguồn các bon hoặc ni tơ; (±) Không xác định được khả năng sử dụng nguồn các bon hoặc ni tơ cho chủng L2.5; (-) Chủng L2.5 không có khả năng sử dụng nguồn các bon hoặc ni tơ

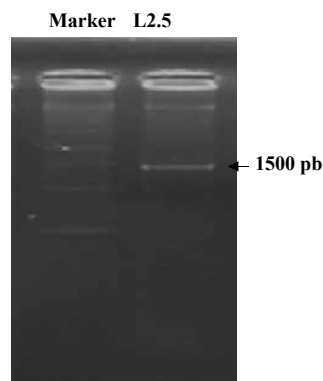
3.2.3. Khả năng thích nghi với một số điều kiện môi trường của chủng L2.5

Điều kiện môi trường có ảnh hưởng rất lớn đến quá trình trao đổi chất và sinh trưởng của các loài vi sinh vật. Các loài vi sinh vật khác nhau sẽ có khả năng thích nghi với các điều kiện môi trường khác nhau. Nhằm mục đích cung cấp thông tin về điều kiện nuôi cấy của chủng L2.5 phục vụ các nghiên cứu sau này các nghiên cứu khảo sát các yếu tố môi trường đến sự sinh trưởng và phát triển của chủng xạ khuẩn này đã được thực hiện. Chủng xạ khuẩn L2.5 được nuôi trên môi trường Gause-1 ở các điều kiện nhiệt độ, pH và các nồng độ muối khác nhau. Khả năng sinh trưởng và phát triển của chủng này sau 05 ngày nuôi cấy đã được kiểm tra, kết quả được tổng hợp trong bảng 2. Kết quả cho thấy chủng xạ khuẩn L2.5 có khả năng phát triển tốt trong điều kiện nhiệt độ từ 30°C - 35°C, thích hợp với môi trường trung tính hoặc hơi kiềm với khoảng pH từ 6 - 8 và nồng độ NaCl 1%. So với các nghiên cứu trước đây, nhận thấy chủng L2.5 có khả năng thích ứng với môi trường tương đối kém đặc biệt là khả năng chịu muối, do vậy có thể xếp chủng xạ khuẩn này vào nhóm có khả năng chịu muối kém.

3.3. Định danh chủng xạ khuẩn L2.5

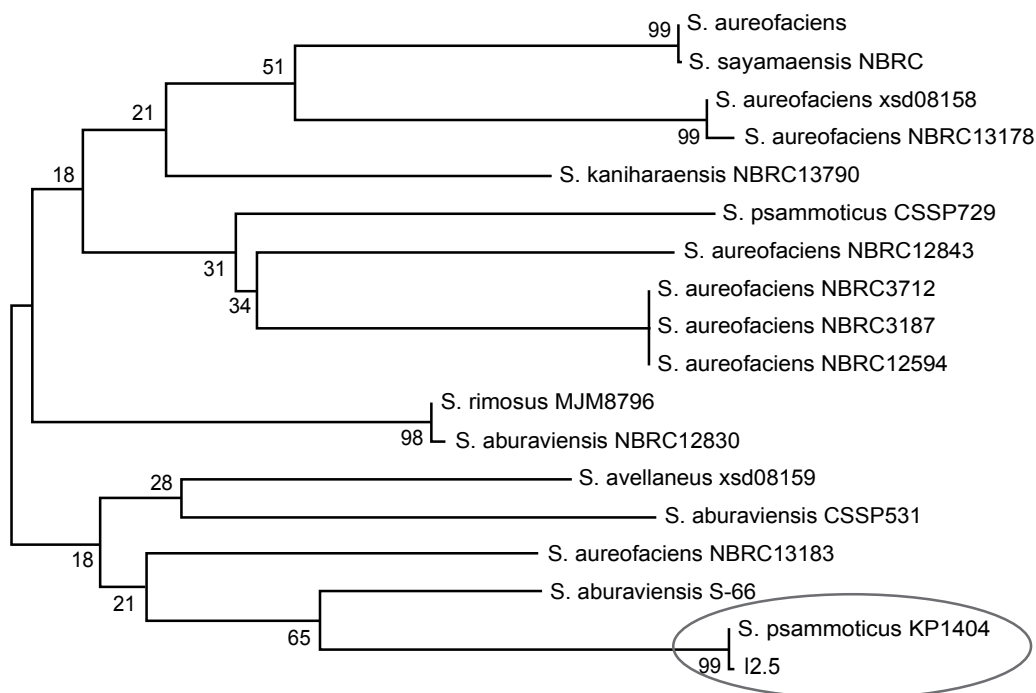
Sử dụng phương pháp sinh học phân tử dựa trên việc so sánh độ tương đồng của đoạn gen 16S rARN của chủng L2.5 với các chủng xạ khuẩn đã công bố trên ngân hàng gen để định danh chủng xạ khuẩn

này. ADN tổng số của chủng xạ khuẩn L2.5 được tách chiết theo phương pháp của Marmur (1961). Phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi 27F và 1492R nhằm khuếch đại đoạn gen 16S rARN của chủng L2.5. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%, kết quả điện di cho thấy có 01 băng ADN kích thước khoảng 1500 bp phù hợp với kích thước lý thuyết có thể đạt được khi nhân gen bằng cặp mồi này (Hình 3).



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1%, marker 1kb

Sau khi kiểm tra sản phẩm PCR được gửi tới công ty 1stBASE (Malaysia) để tinh sạch và giải trình tự. Tiến hành so sánh trình tự thu được với các trình tự khác trên ngân hàng gen nhờ công cụ blast, xây dựng cây phân loại cho chủng L2.5 bằng phần mềm MEGA6. Kết quả được thể hiện ở hình 4.



Hình 4. Cây phân loại dựa trên trình tự 16S rARN của chủng xạ khuẩn L2.5

Kết quả xây dựng cây phả hệ dựa trên trình tự gen 16S rRNA cho thấy chủng L2.5 nằm ở cùng nhánh với chủng *Streptomyces psammoticus* KP1404 với giá trị bootstrap 99. Giá trị bootstrap này nằm khoảng trong tin cậy, cùng với kết quả căn trình tự nucleotide cho thấy mức tương đồng của 2 trình tự 16S rRNA của chủng L2.5 với *Streptomyces psammoticus* KP1404 là 99%, hoàn toàn đảm bảo mức tin cậy về mối quan hệ loài. Vì vậy có thể khẳng định chủng L2.5 là *Streptomyces psammoticus* và được đặt tên là *Streptomyces psammoticus* L2.5.

IV. KẾT LUẬN

Từ 192 chủng xạ khuẩn phân lập đã xác định được 05 chủng có khả năng đối kháng lại vi khuẩn *Erwinia carotovora* gây bệnh thối nhũn trên cây trồng, trong đó chủng L2.5 có hoạt tính mạnh nhất.

Đã thực hiện nghiên cứu các đặc điểm sinh học của chủng xạ khuẩn L2.5 bao gồm đặc điểm về hình thái, nuôi cấy, sinh lý và sinh hóa.

Sử dụng phương pháp sinh học phân tử để định danh chủng xạ khuẩn L2.5 cho thấy chủng xạ khuẩn này là loài là *Streptomyces psammoticus*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Xuân Cảnh, Hồ Tú Cường, Nguyễn Thị Định, Phạm Thị Hiếu, 2016. Nghiên cứu chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* gây bệnh trên tôm. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam* 14(11): 1809-1816.

Nguyễn Hoài Nam, Nguyễn Minh Trang, Đặng Phú Hoàng, Nguyễn Văn Hùng, Nguyễn Xuân Cảnh, Tống Văn Hải, Nguyễn Đức Bách, 2015. Sàng lọc xạ khuẩn *Actinomyces* sp. Có khả năng đối kháng với nấm gây bệnh khô vằn lúa *Rhizoctonia solani*. *Tạp chí Khoa học và Phát triển* 13(8): 1474-1480.

Abd-El-Khair, H. and Karima, H.E.H., 2007. Application of Some Bactericides and Bioagents for Controlling the Soft Rot Disease in Potato. *Research Journal of Agricultural and Biological Science*, 3: 463-473.

Bhat K.A., Masoodi S.D., Bhat N.A., Ahmad M., Zargar M.Y., Mir S.A., and Ashraf B. M., 2010. Studies on the Effect of Temperature on the Development of Soft Rot of Cabbage (*Brassica oleracea* var. *Capitata*) Caused by *Erwinia carotovora* sub Sp. *Carotovora*. *J Phytol* Vol. 2; 64-67.

Doolotkeldieva, T., Bobusheva, S. and Suleymankisi, A., 2016. Biological Control of *Erwinia carotovora*

ssp. *carotovora* by *Streptomyces* Species. *Advances in Microbiology* 6: 104-114.

FAOSTAT data, 2012. The Top 5 Potato Producing Countries; *Potato World*, Commodity report.

Kondo H., Honke T., Hasegawa R., Shimoda T., Nakamura S., 1975. Isolation of maltotetraose from *Streptomyces* as an antibiotic against *Erwinia carotovora*. *Journal of Antibiotic* (Tokyo) 28(2): 157-60.

Miyadoh S., Tsuchizaki N., Ishikawa J., Hotta K., 2016. *Digital Atlas of Actinomycete*. The Society for Actinomycetes Japan, Asakura Co.

Mitra, A., S.C. Santra and J. Mukharjee., 2008. Distribution of actinomycetes, the antagonistic behavior and the Physio-chemical characteristic of the world's largest tidal mangrove forest. *Applied Microbial Biotechnology* 80: 685 - 695.

Nguyen X.C., Phan Thi T.T., Tran T.T.H., 2016. Isolation and identification of an actinomycete strain with biocontrol effect against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing bacterial blight disease in rice. *Vietnam Journal of Agriculture Science* 14(10): 1564 -1572.

Shirling, E.B. & Gottlieb D., 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 16, 313 - 340.

Perombelon M.C.M., van der Wolf J.M., 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, Revised Version 2002.

Tao K., Fan J., Shi G., Zhang X., Zhao H., Hou T., 2011. *In vivo* and *in vitro* antibacterial activity of neomycin against plant pathogenic bacteria. *Academic Journals*, 6(34): 6829-6834.

Xu, G.W. and Gross, D.C., 1986. Selection of Fluorescent *Pseudomonads* Antagonistic to *Erwinia carotovora* and Suppressive of Potato Seed Piece Decay. *Phytopathology* 76: 414-422.

Watve M. G., Tickoo R., Jog M. M., Bhole B. D., 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*, 176(5): 386 - 390.

Zamanian S., Shahidi Bonjar G.H., Saadoun I., 2005. First report of antibacterial properties of a new (strain 101) against *Erwinia carotovora* from Iran. *Biotechnology*, 4: 114-120.

Characterization of actinomyces strain with bioactivity against *Erwinia carotovora* causing soft rot disease on some crops

Nguyen Xuan Canh, Nguyen Thi Khanh, Pham Hong Hien

Abstract

In this study experiments were performed to screen and identify the actinomyces strains that were capable of antagonism to *Erwinia carotovora* causing the soft rot disease on plants. Using the agar diffusion plate method, 05 strains that were capable of antagonism to *Erwinia carotovora* were obtained. The strain number L2.5 had strongest activity with a diameter of 23 mm clear zone of bacteria. The L2.5 strain was capable to produce the straight spore chains after 03 days of culture, non-induced the soluble pigments on ISP-6 medium, growing well at temperatures between 30 - 35 °C and neutral pH, and adapting to low salt concentration medium. It could be used some carbon and nitrogen sources including sucrose, fructose, cellulose, raffinose, meat extract, peptone and KNO₃. Results of 16S rRNA sequence analysis showed that strain L2.5 had a similarity of 99% comparing to *Streptomyces psammotiscus* KP1404. Based on morphology, culture, physiological, biochemical characteristics and molecular biological analyzes we have identified the strain L2.5 belonging to *Streptomyces psammotiscus* species.

Key words: Actinomyces, *Erwinia carotovora*, *Streptomyces* sp., soft rot

Ngày nhận bài: 7/6/2017

Người phản biện: TS. Trần Thị Mỹ Hạnh

Ngày phản biện: 14/6/2017

Ngày duyệt đăng: 25/6/2017

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY, MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN GL30

Nguyễn Văn Giang¹, Đinh Văn Lợi¹, Phạm Hồng Hiến²

TÓM TẮT

Mục đích của thí nghiệm này là khảo sát ảnh hưởng của trạng thái nuôi (tĩnh, lắc) và các nguồn carbon, nitơ, nhiệt độ, pH môi trường nuôi cấy tới khả năng sinh trưởng và khả năng kháng khuẩn của chủng xạ khuẩn GL30. Chủng xạ khuẩn GL30 đối kháng mạnh nhất với 3 chủng vi sinh vật gây bệnh là *Bacillus cereus* ATCC-11778, *Escherichia coli* VTCC-B-482, *Staphylococcus aureus* VTCC-B-658. Khi nuôi chủng xạ khuẩn GL30 trong bình tam giác (V=250 ml) với các nguồn carbon và nitơ khác nhau, giá trị pH môi trường nuôi ban đầu từ 3 - 11, tại các nhiệt độ (25, 30, 40, 50°C), kết quả cho thấy hoạt tính kháng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* VTCC-B-658 của chủng GL30 đạt cao nhất sau 4 ngày nuôi cấy ở điều kiện lắc. Chủng GL30 sinh tổng hợp chất kháng khuẩn và sinh trưởng tốt tại pH 6 - 8, nhiệt độ 30°C, lắc 150 vòng/phút, thể tích dịch nuôi cấy/thể tích môi trường là 20%. Bọt ngô 2%, pepton 2% là nguồn cacrbon và nitơ tốt nhất cho chủng GL30 sinh trưởng và sinh chất kháng khuẩn.

Từ khóa: Trạng thái nuôi cấy, môi trường dinh dưỡng, khả năng đối kháng, *Streptomyces*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ô nhiễm môi trường sống đang tác động trực tiếp đến sức khỏe con người, đặc biệt làm gia tăng rất nhiều bệnh truyền nhiễm do vi sinh vật gây ra. Hơn nữa, các vi sinh vật gây hại không ngừng biến đổi để thích nghi với môi trường và có khả năng kháng lại chất diệt khuẩn. Điều này đã đặt ra thách thức trong nghiên cứu phát hiện và phân tích những loại hợp chất kháng khuẩn mới. Trong số các vi sinh vật sinh chất kháng khuẩn đã biết, xạ khuẩn, đặc biệt là các loài thuộc chi *Streptomyces*, đóng vai trò hàng đầu và được xem là nguồn sản xuất chất kháng khuẩn nhiều nhất (Intra *et al.*, 2011). Tuy nhiên, hàm lượng

kháng khuẩn thu được phụ thuộc rất nhiều vào điều kiện nuôi cấy và môi trường dinh dưỡng (Gesheva *et al.*, 2004).

Quá trình tổng hợp các hợp chất trao đổi chất thứ cấp chịu tác động rất lớn bởi thành phần môi trường (nguồn C, N và P), tốc độ sinh trưởng, nhiệt độ, pH và tốc độ cung cấp ôxi (Sánchez *et al.*, 2010). Trong đó, C và N có vai trò quan trọng trong quá trình nuôi cấy vi sinh vật, chúng cung cấp năng lượng và các tiền chất để vi sinh vật trao đổi chất, tạo sinh khối và sinh tổng hợp các hợp chất trao đổi thứ chất (Wang *et al.*, 2010). Trong nghiên cứu này, một số chủng xạ khuẩn có khả năng sinh chất diệt khuẩn đã được

¹ Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam