

ĐẶC ĐIỂM PHÂN LOẠI CỦA BA CHỦNG XẠ KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG KHÁNG VI KHUẨN GÂY BỆNH HÉO XANH Ở CÂY CÀ CHUA VÀ CÂY DƯA HẦU

TÀNG THỊ CHÍNH, LÝ KIM BẢNG

Viện Công nghệ sinh học

Ở nước ta, cà chua và dưa hấu được trồng ở hầu hết các vùng trong cả nước. Một trong những bệnh thường gặp nhất và gây thiệt hại rất lớn cho nông dân khi trồng cà chua và dưa hấu là bệnh héo xanh (bacterial wilt) do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây ra. Bệnh thường biểu hiện vào giai đoạn cây trưởng thành, khi cây bắt đầu ra hoa kết trái. Việc nghiên cứu tuyển chọn các chủng vi sinh vật có khả năng ức chế vi sinh vật gây bệnh, tạo thành một chế phẩm sinh học bón vào đất từ khi mới trồng, ức chế sự sinh trưởng của các vi sinh vật gây bệnh, hạn chế tối đa việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật hóa học trong quá trình sản xuất thực phẩm là rất cần thiết, góp phần tạo ra các sản phẩm rau sạch và an toàn.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

- Chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* N22 gây bệnh héo xanh ở cà chua do Viện Di truyền nông nghiệp Việt Nam cung cấp.
- 2 chủng vi khuẩn HDL9, HDL4, được phân lập từ mẫu cây cà chua và cây dưa hấu bị bệnh trên môi trường RE.
- Chủng vi nấm *Fusarium oxysporum* Fo47 nhận từ Bảo tàng giống vi sinh vật, trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học quốc gia Hà Nội.
- Chủng xạ khuẩn *Streptomyces rimosus* R6 nhận từ phòng Di truyền vi sinh, viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam
- Các loại đường chuẩn do hãng Merck sản xuất.

2. Phương pháp

a. Tuyển chọn chủng xạ khuẩn ức chế vi sinh vật gây bệnh

Các chủng xạ khuẩn được phân lập, tuyển chọn sơ bộ được nuôi cấy trên môi trường ISP4 hoặc Gause1, dùng que trang gạt đều trên mặt thạch, sau đó đặt trong tủ ẩm 30°C, trong 7-10 ngày. Khi khuẩn lạc phát triển tốt, dùng khoan nút cao su $d = 10$ mm để cắt thạch. Gạt đều chủng vi sinh vật kiểm định lên trên mặt đĩa thạch có môi trường RE (hoặc MPA) và môi trường Czapek Dox. Đặt các khoan thạch nuôi xạ khuẩn lên các đĩa thạch đã cấy các chủng vi sinh vật kiểm định, nuôi trong tủ ẩm ở nhiệt độ thích hợp với từng vi sinh vật kiểm định, sau 48 giờ mang ra xác định vòng vô khuẩn đối với vi khuẩn và sau 96-120 giờ đối với chủng vi nấm *Fusarium oxysporum* Fo47.

b. Phân loại xạ khuẩn

Các đặc điểm phân loại xạ khuẩn được mô tả theo Chương trình xạ khuẩn quốc tế (ISP), có so sánh với khóa phân loại Waksman, Gause và Bergey's Manual.

- Các môi trường phân loại xạ khuẩn được chuẩn bị theo ISP [3, 4] và Gause [6].

- Mô tả đặc điểm phân loại của các chủng xạ khuẩn theo Shirling và Gottlieb [5].

- Hình thái của chuỗi tế bào được quan sát dưới kính hiển vi quang học Olympus và bề mặt của bào tử được quan sát dưới kính hiển vi điện tử JEM-1010 (Nhật Bản).

- Định tên loài theo khóa phân loại xạ khuẩn của Nonomura [2] và so sánh đặc điểm của chủng nghiên cứu với chủng chuẩn theo Shirling và Gottlieb [5], Gause [6] và Bergey [1].

c. Xác định axit amin đặc trưng của típ thành tế bào

Xạ khuẩn được nuôi trong môi trường dịch thể trên máy lắc tròn 220 vòng/phút ở 37°C, trong 5 ngày. Ly tâm để lấy sinh khối và sấy khô trong 2 giờ ở 40°C; sau đó, rửa sạch bằng nước cất và cồn, làm khô ở 28°C; cân 10 mg sinh khối khô và bổ sung 1 ml dung dịch HCl.1N vào ống nghiệm, đậy kín và thủy phân ở 60°C trong 4 giờ. Dịch thủy phân được đun cách thủy để loại HCl, sau đó bổ sung nước cất đến khi độ pH của dịch đạt 5,5-6,0. Chấm dịch thủy phân lên băng sắc ký Whatman N°1 và chạy trên hệ dung môi: metanol: nước: HCl: piridin (80:75:2,5:10) trong thời gian 17 giờ. Sau đó, băng giấy được làm khô tự nhiên và hiện màu bằng dung dịch ninhydrin 0,1% trong axêton và đặt vào tủ sấy 100°C trong 2 phút. Nếu không có LL-DAP chuẩn thì có thể dùng chủng xạ khuẩn *Streptomyces rimosus* R6 là chủng có LL-DAP, dùng làm đối chứng. Dạng LL-DAP có vết màu vàng chanh, dạng meso-DAP có màu đậm và chạy chậm hơn LL-DAP.

d. Quan sát màu sắc của khuẩn ty khí sinh và khuẩn ty cơ chất và của sắc tố tan

Quan sát màu sắc của khuẩn ty khí sinh và khuẩn ty cơ chất và của sắc tố tan của các chủng xạ khuẩn theo phương pháp của Shirling và

Gottlieb trên bảng màu của Tresner và Backus.

II - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tuyển chọn các chủng xạ khuẩn có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh héo xanh

Đã tuyển chọn được 3 chủng xạ khuẩn là: HD8, HD54, HD58 từ mẫu đất xung quanh các gốc cây cà chua và cây dưa hấu không bị bệnh ở xã Gia Xuyên, huyện Gia Lộc, tỉnh Hải Dương. Khả năng ức chế vi sinh vật gây bệnh của ba chủng này được trình bày ở bảng 1.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy cả 3 chủng xạ khuẩn HD8, HD54 và HD58 đều ức chế mạnh vi khuẩn gram âm HDL4, vi khuẩn gram dương HDL9 và vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* N22 gây ra bệnh héo xanh ở cà chua. Hai chủng xạ khuẩn HD54 và HD 58 còn ức chế rất mạnh chủng vi nấm *Fusarium Oxysporum* Fo47 gây bệnh thối cổ rễ ở lúa.

2. Đặc điểm phân loại của ba chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn

Hình thái của cương sinh bào tử và bề mặt của bào tử của 3 chủng xạ khuẩn này quan sát dưới kính hiển vi quang học và kính hiển vi điện tử được thể hiện ở các hình 1- 4.

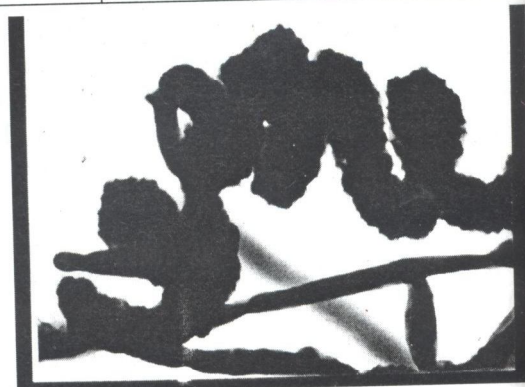
Bảng 1

Khả năng ức chế các vi sinh vật gây bệnh của ba chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn

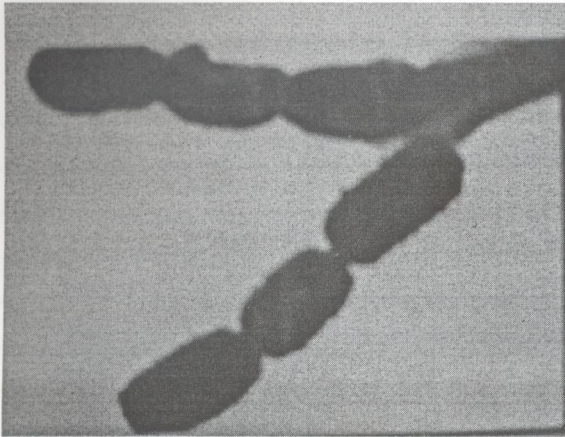
Chủng xạ khuẩn	Đường kính của vòng vô khuẩn (D-d, mm) đối với chủng vi sinh vật gây bệnh			
	<i>R.solanavearum</i> N22	HDL4(Gr ⁻)	HDL9(Gr ⁺)	<i>F.oxysporum</i> Fo47
HD8	25	17	25	15
HD54	20	27	27	20
HD58	13	15	24	27



Hình 1. Chuỗi bào tử của chủng HD58(x5000)



Hình 2. Bào tử của chủng HD58(x30.000)



Hình 3. Bào tử của chủng HD8 (x30.000)



Hình 4. Bào tử của chủng HD54 (x20.000)

Quan sát đặc điểm hình thái, màu sắc của khuẩn lạc, khuẩn ty khí sinh và khuẩn ty cơ chất của ba chủng xạ khuẩn theo Shirling và Gottlieb[4] được trình bày ở bảng 2; các đặc điểm sinh lý sinh hóa ở bảng 3 và khả năng đồng hóa nguồn cacbon ở bảng 4.

Kết quả xác định axit đặc trưng của typ thành tế bào cho thấy thành tế bào của cả 3 chủng xạ khuẩn này đều thuộc Typ1 có chứa LL-DAP. Như vậy, các chủng xạ khuẩn này

thuộc chi *Streptomyces* Waksman và Hanerici, 1943. Các chủng đều có khả năng phân giải tinh bột và dịch hóa gelatin, nhưng không có chủng nào sinh sắc tố melanin.

3. Kết quả phân loại của ba chủng xạ khuẩn

Dựa vào khóa phân loại xạ khuẩn của Bergey1989 [1], Nonomura [2], việc so sánh với các đặc điểm phân loại xạ khuẩn chuẩn thuộc chi *Streptomyces* của ISP [5] được trình bày ở bảng 5.

Bảng 2

Đặc điểm hình thái của ba chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn

Chủng	Khuẩn ty khí sinh	Khuẩn ty cơ chất	Chuỗi bào tử	Bề mặt của bào tử
HD8	3 ec (ghi sáng)	5fe (ghi xám)	RF (lượn sóng)	Nhẵn (sm)
HD54	3 ih (ghi trắng)	4gc (ghi xám)	S (xoắn)	Nhẵn (sm)
HD58	3 fe (ghi sẫm)	2 ge (ghi)	S (xoắn chặt)	Xù xì (Wa)

Bảng 3

Đặc điểm sinh lý-sinh hóa của ba chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn

Đặc điểm sinh lý-sinh hoá	Chủng xạ khuẩn		
	HD8	HD54	HD58
Typ thành tế bào	LL-DAP	LL-DAP	LL-DAP
Phân giải tinh bột	++	+	+
Hình thành melanin	-	-	-
Dịch hóa gelatin	++	+	++
Chịu muối NaCl (%)	5	5	5

Khả năng đồng hóa nguồn cacbon của ba chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn

STT	Nguồn cacbon	HD8	HD54	HD58
1	Đối chứng (-)	-	-	-
2	D-gluco	++	+++	+++
3	Arabino	++	++	+++
4	D-xylo	++	++	+++
5	I-Inositol	++	+++	+++
6	D-manmitol	++	+++	++
7	d-fructo	++	++	++
8	Rhamno	±	+	±
9	Sacaro	++	+	±
10	Rafino	±	+	±

Chú thích: -: không phát triển, ±: phát triển không rõ ràng, +: phát triển yếu, ++: phát triển trung bình, +++: phát triển tốt.

So sánh đặc điểm phân loại của ba chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn với các chủng xạ khuẩn chuẩn thuộc chi *Streptomyces* của ISP

Đặc điểm phân loại	<i>S. willmorei</i>		<i>S. cyaneogriseus</i>		<i>S. hygroscopicus</i>	
	HD8	ISP5449	HD54	ISP5534	HD58	ISP5578
Màu của khuẩn ty khí sinh	Ghi	Ghi, nâu	Ghi	Ghi	Nâu đen	Ghi, nâu
Màu của khuẩn ty cơ chất	Nâu	Nâu	Ghi	Ghi, ghi sẫm	Ghi	Ghi
Sắc tố hoà tan	-	-	-	-	-	-
Chuỗi bào tử	RF	RF	S	S	S	S
Bề mặt của bào tử	Sm	Sm	Sm	Sm	Wa	Wa
Hình thành melanin	-	-	-	-	-	-
Đồng hóa cacbon:						
- Gluco	+	+	+	+	+	+
- Arabino	+	±	+	+	+	±
- Xylo	+	+	+	+	+	±
- Inositol	+	-	+	-	+	±
- Manitol	+	+	+	-	+	+
- Fructo	±	+	+	+	+	+
- Rhamno	+	+	+	+	+	+
- Sacaro	+	-	+	±	±	-
- Rafino		-	+	-	±	-

Kết quả so sánh giữa các chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn với các chủng xạ khuẩn chuẩn ở bảng 5 cho thấy các chủng đã tuyển chọn thuộc các loài sau:

- Chủng HD8 thuộc loài *Streptomyces willmorei* Waksman and Henrici 1948, có các đặc điểm tương tự chủng chuẩn ISP 5459 = ATCC6867 = NCTC 1836

- Chủng HD54 thuộc loài *Streptomyces cyaneograceus* Pridham, 1970, có các đặc điểm tương tự chủng chuẩn ISP 5534.

- Chủng HD58 thuộc loài *Streptomyces hygrosopicus* Waksman and Henrici, 1948, có các đặc điểm tương tự chủng chuẩn ISP 5578.

III - KẾT LUẬN

1. Đã tuyển chọn được 3 chủng xạ khuẩn HD8, HD54 và HD 58 có khả năng ức chế vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh ở cây cà chua và cây dưa hấu. Hai chủng HD54 và HD58 còn ức chế mạnh vi nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh thối cổ rễ ở lúa.

2. Đã phân loại đến loài các chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn. Chúng đều thuộc chi

Streptomyces: chủng HD8 thuộc loài *Streptomyces willmorei* Waksman and Henrici, chủng HD54 thuộc loài *Streptomyces cyaneograceus* Pridham và chủng HD58 thuộc loài *Streptomyces hygrosopicus* Waksman and Henrici.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bergey's**, 1989: Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 4. Williams Wilkins.
2. **Nonomura H.**, 1974: Ferment. Technol., 52(20): 78-92.
3. **E. B. Shirling and D. Gottlieb**, 1966: International Journal of Systematic Bacteriology, 16: 313-340.
4. **E. B. Shirling and D. Gottlieb**, 1968: International Journal of Systematic Bacteriology, 18: 69-189.
5. **E. B. Shirling and D. Gottlieb**, 1972: International Journal of Systematic Bacteriology, 22: 265-394.
6. **Gause G. et al.**, 1983: Opredelitel actinomixetov, Nauka, Moskva.

TAXONOMIC CHARACTERISTICS OF THREE STREPTOMYCES STRAINS HAVING THE ANTIBIOTIC ABILITY AGAINST BACTERIAL WILD (*RALSTONIA SOLANACEARUM*) OF TOMATO PLANT AND MELON PLANT

TANG THI CHINH, LY KIM BANG

SUMMARY

Three *Streptomyces* strains HD8, HD54 and HD58 isolated from the tomato and melon soil-samples in Haiduong province have the antibiotic ability against the bacterial wild *Ralstonia solanacearum* and the fungi *Fusarium oxysporum*. The comparison of the taxonomic characteristics of these 3 strains shows that they belong to the genus *Streptomyces*: the strain HD8 belongs to the species *Streptomyces willmorei*; the strain HD54 belongs to the species *Streptomyces cyaneograceus* and the strain HD58 belongs to the species *Streptomyces hygrosopicus*.

Ngày nhận bài: 04-11-2002