

SỰ HIỆN DIỆN CỦA VI KHUẨN PSEUDOMONAD SINH HUỖNH QUANG TRONG CÁC MẪU KHÁC NHAU VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM GÂY BỆNH Ở CÂY TRỒNG *FUSARIUM OXYSPORUM* CỦA CHÚNG

NGUYỄN THỊ TUYẾT NHUNG, NGUYỄN MINH ANH,
NGUYỄN THỊ QUỲNH MAI, PHẠM THANH HÀ,
NGUYỄN NGỌC DŨNG

Viện Công nghệ sinh học

Xác định số lượng vi khuẩn nhóm pseudomonad từ các nguồn khác nhau là hết sức cần thiết bởi vai trò quan trọng của nhóm vi khuẩn này đối với nhiều lĩnh vực khác nhau, chẳng hạn như sinh thái học vi khuẩn, môi trường, nông nghiệp và sức khỏe con người. Vi khuẩn pseudomonad sinh huỳnh quang là đối tượng được đặc biệt quan tâm bởi một số loài là tác nhân gây bệnh ở cây trồng [5] và gây bệnh mụn xanh ở người. Vi khuẩn pseudomonad sinh huỳnh quang cũng được đánh giá như là một thể đấu tranh sinh học nhiều tiềm năng trong phòng chống các nấm gây bệnh ở cây trồng có nguồn gốc từ đất và từ hạt [1, 2, 10].

Trong bài báo này, sự hiện diện của vi khuẩn pseudomonad sinh huỳnh quang trong các mẫu vật nông nghiệp khác nhau và khả năng kháng nấm gây bệnh ở cây trồng *Fusarium oxysporum* của chúng được trình bày.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguồn mẫu bao gồm các mẫu liên quan tới nông nghiệp; đó là đất từ các chân ruộng khác nhau và đất rẫy, rẫy cây trồng ở các địa điểm khác nhau (bảng 1).

Nấm gây bệnh ở cây trồng *F. oxysporum* do Trung tâm Bảo tồn giống chuẩn, Trường đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội cung cấp.

Các môi trường cao thịt-peptôn-thạch, S1 [3], khoai tây và khoai tây bổ sung glucoza [6]

đã được sử dụng.

Phương pháp xác định khả năng kháng *F. oxysporum* của các chủng pseudomonad phân lập được tiến hành theo Nielsen và cs. [6] có cải biên trong đó trên một đĩa môi trường chỉ có một chủng vi khuẩn được thử và nấm gây bệnh được đặt cách mép đĩa khoảng 1,5 cm. Vi sinh vật được nuôi ở 28° C trong 4 ngày, sau đó quan sát và xác định khả năng kháng của chúng bằng cách đo khoảng cách giữa các mép khuẩn lạc vi khuẩn và nấm.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Sự hiện diện của vi khuẩn pseudomonad sinh huỳnh quang

Theo Gould và cs. [3], môi trường S1 thể hiện tính chọn lọc cao trong việc phân lập và xác định số lượng vi khuẩn nhóm pseudomonad sinh huỳnh quang có trong các mẫu tự nhiên. Như vậy, kết quả xác định mật độ vi khuẩn trên môi trường S1 (bảng 1) cho thấy số lượng vi khuẩn pseudomonad sinh huỳnh quang trong các mẫu được phân tích dao động khá lớn; với độ pha loãng 10^{-1} , các mẫu số 12, 19, 22, 24 và 25 không cho bất cứ khuẩn lạc nào trên môi trường S1, trong khi đó có mẫu cho tới khoảng 5×10^5 cfu/g mẫu trọng lượng tươi, chẳng hạn như mẫu số 16 và 44. Mẫu số 36 là một trường hợp ngoại lệ bởi nó không phải là đất mà là than bùn đã qua xử lý thành chế phẩm phân bón hữu cơ - một sản phẩm của Công ty mía đường Lam

Sơn, Thanh Hóa. Trong số 5 mẫu không cho thấy sự hiện diện của vi khuẩn pseudomonad sinh huỳnh quang, nguyên nhân ở mẫu số 19 có thể là do không tồn tại oxy, bởi ở độ sâu 30 cm dưới lớp cát hạt mịn được nén chặt bởi nước

mưa lâu ngày; ở các mẫu còn lại, các yếu tố sinh thái thể hiện phong phú hơn, đa dạng hơn nên khó có thể trả lời cho câu hỏi đầu là nguyên nhân cho sự vắng mặt vi khuẩn pseudomonad sinh huỳnh quang.

Bảng 1

Mật độ vi khuẩn pseudomonad của các mẫu trên môi trường MPA và S1 (cfu/g tươi)

STT	Mẫu	Đặc điểm mẫu	Địa điểm	Thời gian lấy mẫu	Mật độ	
					MPA	S1
1	đất	luân canh lúa+mẫu	Hoài Đức, Hà Tây	3-2001	$2,7 \times 10^6$	$1,9 \times 10^4$
2	“	chuyên canh mẫu	“	“	$1,9 \times 10^7$	$1,8 \times 10^4$
3	“	chuyên canh lúa	“	“	$3,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^3$
4	“	bỏ hoang, cạn	“	“	$6,3 \times 10^6$	$3,0 \times 10^4$
5	“	phù sa ngập nước	“	“	$1,9 \times 10^7$	$2,1 \times 10^4$
6	“	bám rễ lúa, ngập nước	Đông Anh, Hà Nội	“	$6,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^2$
7	“	bám rễ lúa, ngập nước	“	“	$1,6 \times 10^6$	$8,5 \times 10^3$
8	rễ l.	ngập nước	“	“	$2,2 \times 10^6$	$2,0 \times 10^3$
9	rễ l.	“	“	“	$8,7 \times 10^6$	$9,8 \times 10^3$
10	đất	vùng rễ cây nhãn	“	“	$1,7 \times 10^6$	$5,7 \times 10^3$
11	“	ruộng lúa	Đắc Lắc	4-2001	$3,2 \times 10^7$	$2,4 \times 10^4$
12	“	ruộng lúa	“	“	$3,2 \times 10^7$	0
13	“	ruộng lúa	“	“	$2,1 \times 10^7$	$2,0 \times 10^2$
14	“	cây cà phê, 10cm sâu	“	“	$7,4 \times 10^7$	$4,4 \times 10^4$
15	“	cây cà phê, 30cm sâu	“	“	$1,8 \times 10^7$	$2,1 \times 10^4$
16	“	cây tiêu, 10cm sâu	“	“	$3,2 \times 10^7$	$4,3 \times 10^5$
17	“	cây tiêu, 30cm sâu	“	“	$1,4 \times 10^7$	$2,5 \times 10^4$
18	cát	savan, cỏ thưa, 10cm	Gio Linh, Quảng Trị	6-2001	kxd	$2,0 \times 10^2$
19	cát	cỏ thưa, 30cm sâu	“	“	“	0
20	cát	cỏ thưa, 10cm sâu	“	“	“	$1,0 \times 10^2$
21	cát	cỏ thưa, 30cm sâu	“	“	“	$2,6 \times 10^2$
22	đất	cây tiêu	“	“	“	0
23	“	rừng philao	Triệu Phong, Quảng Trị	“	“	$1,6 \times 10^2$
24	“	cây bạch đàn	Quảng Ninh, Quảng Bình	“	“	0
25	“	rừng philao	“	“	“	0
26	“	nhiễm phèn nặng	Ph. Hiệp, Cần Thơ	7-2001	$1,1 \times 10^6$	$2,0 \times 10^2$
27	rễ	lúa ma, đất phèn	“	“	$9,2 \times 10^7$	$1,7 \times 10^3$
28	đất	nhiễm phèn nhẹ	“	“	$3,8 \times 10^7$	$1,8 \times 10^3$

29	“	phù sa, ruộng lúa	ngoại ô Cần Thơ	“	$3,5 \times 10^6$	$1,4 \times 10^3$
30	“	trại thử nghiệm	Viện lúa, Cần Thơ	“	$8,8 \times 10^6$	$1,6 \times 10^4$
31	“	cây dưa hấu	Gia Lộc, Hải Dương	8-2001	$1,6 \times 10^7$	$3,0 \times 10^2$
32	rễ	cây dưa hấu	“	“	$1,7 \times 10^8$	$1,0 \times 10^3$
33	đất	rừng thông nhựa	Tam Đảo, Vĩnh Phúc	1-2002	$4,7 \times 10^6$	$1,6 \times 10^3$
34	“	cây nhãn	“	“	$7,3 \times 10^6$	$1,0 \times 10^4$
35	“	cây vải	“	“	$1,2 \times 10$	$3,9 \times 10^3$
36	mùn	than bùn	Lam Sơn, Thanh Hóa	2. 2002	$1,6 \times 10^8$	$7,3 \times 10^5$
37	“	than bùn chưa xử lý	“	“	$5,9 \times 10^8$	$4,0 \times 10^3$
38	“	than bùn đã xử lý	“	“	$1,7 \times 10^8$	$1,7 \times 10^5$
39	“		“	“	$3,2 \times 10^8$	$1,5 \times 10^2$
40	đất	rừng dương xỉ	Tam Đảo, Vĩnh Phúc	5. 2002	$4,1 \times 10^7$	$5,9 \times 10^3$
41	“	“	“	“	$3,0 \times 10^7$	$8,0 \times 10^2$
42	“	tâm ma mọc	“	“	$1,1 \times 10^7$	$1,6 \times 10^4$
43	“	rừng sặt	“	“	$4,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^4$
44	“	keo mỡ + muông đen	Lập Thạch, Vĩnh Phúc	“	kxd	$4,8 \times 10^5$
45	“	chân núi, bạch đàn	gần Phúc Yên	“	“	$3,8 \times 10^4$
46	đất	đồi trắng cỏ, khô cần	“	“	“	$1,4 \times 10^4$
47	“	rừng nguyên sinh	Tam Đảo, Vĩnh Phúc	“	“	$3,6 \times 10^4$
48	“	lau lách, cỏ tranh	“	“	“	$1,4 \times 10^5$

Như đã được đề cập ở trên, số mẫu được phân tích cho mật độ vi khuẩn sinh huỳnh quang đạt khoảng 10^5 cfu/g tươi chiếm tỷ lệ khá thấp (3/47). Theo Gould và cs. [3], 3 trong số 6 mẫu đất ở các bang khác nhau của nước Mỹ cho mật độ vi khuẩn pseudomonad sinh huỳnh quang trên 10^5 cfu/g tươi, 1 mẫu đạt xấp xỉ 10^5 cfu/g; chỉ có 1 mẫu cho $9 \cdot 10^2$ cfu/g. Xác định mật độ vi khuẩn pseudomonad trong hai mẫu đất ở Nhật Bản trên môi trường King B, Shiomi và cs. (1999) cho biết một mẫu đạt trên 10^5 cfu/g tươi, mẫu còn lại đạt xấp xỉ 10^3 cfu/g. Số mẫu cho mật độ đạt khoảng 10^4 cfu/g chiếm 30% (15/47); số mẫu còn lại cho khoảng $10^2 - 10^3$ cfu/g, trong số này có cả mẫu rễ cây lúa nước và cây dưa hấu. Mật độ vi khuẩn pseudomonad sinh huỳnh quang của các mẫu rễ cây trồng đạt giá trị thấp cần được làm sáng tỏ bởi nó có thể liên quan tới bệnh và phòng chống bệnh ở cây trồng do vi nấm gây nên [7].

So sánh mật độ vi khuẩn pseudomonad sinh

huỳnh quang trong mối tương quan địa lý cho thấy mẫu ở vùng Quảng Bình, Quảng Trị đạt giá trị thấp nhất, không quá 10^3 cfu/g; các mẫu có nguồn gốc ở đồng bằng sông Cửu Long nhìn chung cho mật độ cao hơn, nhưng cũng chỉ có một trong số bốn mẫu được phân tích đạt giá trị khoảng 10^4 cfu/g. Mẫu có nguồn gốc ở Đắc Lắc đạt 10^4 cfu/g trở lên chiếm tỷ lệ lớn hơn, đạt tới 70% (5/7). Mẫu đất rừng hoặc đồi trọc ở Vĩnh Phúc cho giá trị tương đương với mẫu ở Đắc Lắc (8/12).

Trừ ở một số mẫu mật độ vi khuẩn dị dưỡng tổng số không được xác định, nhìn chung tỷ lệ giữa vi khuẩn pseudomonad sinh huỳnh quang và vi khuẩn dị dưỡng tổng số đạt giá trị thấp, khoảng 0,001% - 1%. Có điều cần lưu ý là giá trị tỷ lệ thấp ngay cả đối với mẫu là rễ cây trồng. Cụ thể, ở mẫu rễ cây dưa hấu trồng tại Gia Lộc, Hải Dương, tỷ lệ này đạt 0,001%; ở rễ cây lúa nước tại Đông Anh, Hà Nội cho giá trị cao hơn, khoảng 0,1% và 0,01% ở rễ cây lúa hoang dại

tại Cần Thơ.

So sánh mật độ vi khuẩn pseudomonad sinh huỳnh quang của rễ lúa và đất vùng rễ lúa ở Đông Anh, Hà Nội cho thấy không có sự khác nhau, nhưng có sự khác nhau giữa rễ cây dưa hấu và đất trồng dưa hấu trồng tại Gia Lộc, Hải Dương ($1,0.10^3 / 3,0.10^2$). Theo Shiomi và cs. [9], tỷ lệ này ở cây cà chua là khác nhau, tùy thuộc vào chân đất.

2. Khả năng kháng *F. oxysporum* của các chủng pseudomonad phân lập

Fusarium spp. là một trong những nhóm vi nấm gây bệnh ở cây trồng phổ biến [4], bởi vậy *F. oxysporum* được lựa chọn làm đối tượng để xác định khả năng kháng nấm của các chủng phân lập. Kết quả được trình bày trong bảng 2. Theo đó, trong tổng số 170 chủng pseudomonad được thử, có 129 chủng biểu hiện khả năng kháng *F. oxysporum*, 41 chủng phân lập bị sợi nấm sinh trưởng phủ tràn. Khả năng kháng *F. oxysporum* của các chủng phân lập được biểu hiện dưới hai dạng chủ yếu. Một là giá trị khoảng cách trống giữa mép sợi nấm và mép

sinh khối tế bào của chủng phân lập; dạng thứ hai là biểu hiện sợi nấm bị thủy phân khi tiếp xúc trực tiếp với tế bào vi khuẩn. Tỷ lệ số chủng phân lập biểu hiện khả năng kháng *F. oxysporum* thuộc dạng một là khá cao, chiếm tới 93% (120/129). Tuy vậy, như đã được trình bày trong bảng 2, khả năng kháng *F. oxysporum* của 120 chủng này là khác nhau. Sự khác nhau này có thể liên quan tới cơ chế kháng, một vấn đề đã được đề cập trong nhiều công bố [6, 8]. Hiện tượng sợi nấm bị thủy phân khi tiếp xúc trực tiếp với tế bào chủng phân lập được quan sát ở các chủng M1, M4, XL2, XL4, CXL1, CXL2, CXL4, DV2 và KT1. Trừ chủng DV2 có nguồn gốc từ đất trồng cây vải tại Tam Đảo, Vĩnh Phúc, 8 chủng còn lại được phân lập từ mẫu than bùn (mẫu số 36, 37, 38 và 39). Như đã biết, thành tế bào sợi nấm được cấu tạo chủ yếu bởi kitin hoặc glucan và ở những vi khuẩn pseudomonad sinh huỳnh quang nhất định tồn tại enzym thủy phân các hợp chất này [6]. Do đó, không loại trừ ở các chủng này tồn tại enzym cần thiết cho thủy phân các hợp chất cấu tạo nên thành tế bào nấm *F. oxysporum*.

Bảng 2

Khả năng kháng *F. oxysporum* của các chủng *Pseudomonas* phân lập

Khả năng kháng	Số chủng
1. Khoảng trống d giữa 2 mép khuẩn lạc (mm)	
d = 0	41
$0 < d \leq 5$	36
$5 < d \leq 10$	72
$10 < d \leq 15$	6
$15 < d \leq 20$	6 (Ps7-1; Ps9-1; Ps9-4; DT3; DTM2; DDX2-2)
2. Sợi nấm bị thủy phân	9

III. KẾT LUẬN

Nhìn chung, mật độ vi khuẩn pseudomonad sinh huỳnh quang của 47 mẫu đất các loại và rễ cây trồng khác nhau đã được xác định cho giá trị thấp. Tỷ lệ chủng *Pseudomonas* phân lập có khả năng kháng *F. oxysporum* đạt giá trị khá cao, chiếm tới 73 % số chủng được thử và đã chọn được 6

chủng pseudomonad có khả năng kháng cao đối với *F. oxysporum*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Berg G.**, 1996: Rhizobacteria of oilseed rape antagonistic to *Verticillium dahliae* var. *longisporum* STARK. Zeitschrift fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz,

- 103: 20-30.
2. **Berg G. et al.**, 2000: *J. Microbil.*, 46: 1128-1137.
 3. **Gould W. D. et al.**, 1985: *Appl. Env. Microbiol.*, 49: 28-32.
 4. **Hussein S. I., Noorjehan I.**, 1992: Biological control of plant pathogenic Fungi. In: A. Ghaffar & S. Shahzad (eds): *Status of Plant Pathology in Pakistan*. Shamim Printing Press, Karachi, Pakistan.
 5. **Misaghi I., R. G. Grogan**, 1969: *Phytopath.*, 59: 1436-1450.
 6. **Nielsen M. N. et al.**, 1998: *Appl. Env. Microbiol.*, 64: 3563-3569.
 7. **Nishiyama M. et al.**, 1999: *Soil. Sci. Plant Nutr.*, 45: 79-87.
 8. **Nowak-Thompson B. et al.**, 1995: *Can. J. Microbiol.*, 49: 1064-1066.
 9. **Shiomi Y. et al.**, 1999: *Appl. Env. Microbiol.*, 65: 3996-4001.
 10. **Weller D. M.**, 1988: *Ann. Rev. Phytopathol.*, 26: 379-407.

**THE OCCURENCE OF FLUORESCENT PSEUDOMONAD BACTERIA IN
DIFFERENT SAMPLES AND THEIR ANTAGONISM TOWARD
*FUSARIUM OXYSPORUM***

NGUYEN THI TUYET NHUNG, NGUYEN MINH ANH, NGUYEN THI QUYNH MAI,
PHAM THANH HA, NGUYEN NGOC DUNG

SUMMARY

The density of fluorescent pseudomonad bacteria in 47 soil and plant root samples from different places in Vietnam had been investigated. The obtained results showed that, in comparison with the reported date, the number of the fluorescent pseudomonad bacteria in the most samples was low; there were only four natural samples with about 10^5 cfu/g wet weight. 129 among 170 tested isolated *Pseudomonas* strains appeared to be antagonistic toward *F. oxysporum*, but with different activities; 6 isolated *Pseudomonas* strains have been selected.

Ngày nhận bài: 13-8-2002