

Đặc điểm sinh học và khả năng ức chế của chủng xạ khuẩn *Streptomyces rochei* BT02 đối với vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh

Nguyễn Hoàng Nhật Tân, Hà Thị Trúc Mai, Lương Thị Thùy Dương, Nguyễn Vũ Phong*

Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 16/9/2022; ngày chuyển phản biện 20/9/2022; ngày nhận phản biện 13/10/2022; ngày chấp nhận đăng 17/10/2022

Tóm tắt:

Trong lĩnh vực nông nghiệp, xạ khuẩn là tác nhân phòng trừ sinh học vượt trội trong ức chế sự phát triển các vi sinh vật (VSV) gây bệnh. Dựa vào sổ tay phân loại xạ khuẩn của Dự án Streptomyces Quốc tế (ISP) và trình tự gen 16S-rRNA, chủng xạ khuẩn BT02 được đặt tên là *Streptomyces rochei* BT02. Chủng xạ khuẩn này chứa 2 gen polyketide synthase loại I (*pks-I*) và polyketide synthase loại II (*pks-II*) liên quan đến sự tổng hợp kháng sinh. Kết quả thực nghiệm cho thấy, xạ khuẩn *S. rochei* BT02 phát triển tốt ở nhiệt độ 31°C, 1% muối, pH 7,0, đồng hóa được nhiều nguồn carbon và nitơ khác nhau. *S. rochei* BT02 thể hiện hoạt tính kháng khuẩn đối với 3 chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* thử nghiệm (nồng độ ức chế tối thiểu - MIC là 15 mg/ml). Trong điều kiện nhà lưới, chủng này làm giảm 43,5% chỉ số bệnh héo xanh. Điều đó chứng tỏ *S. rochei* BT02 có thể là một nguồn nguyên liệu đầy hứa hẹn để sản xuất chế phẩm sinh học.

Từ khóa: hoạt tính kháng khuẩn, nồng độ ức chế tối thiểu, polyketide synthase, *Ralstonia solanacearum*, *Streptomyces rochei*.

Chỉ số phân loại: 4.6

Mở đầu

Tại Việt Nam, tính đến năm 2021 giá trị toàn ngành nông nghiệp tăng 2,9%, kim ngạch xuất khẩu đạt 48,6 tỷ USD. Vì vậy, sản xuất nông nghiệp đóng một vai trò vô cùng quan trọng trong nền kinh tế quốc dân với định hướng trở thành một nước nông nghiệp hàng đầu thế giới vào năm 2050. Ở nước ta, ngành rau quả là một trong những nguồn thu nhập chính của nhiều hộ nông dân, trong đó các loại rau họ cà (cà chua, ớt, khoai tây, cà tím) được chú trọng và khuyến khích trồng ở nhiều nơi do nguồn lợi về sức khỏe cũng như giá trị kinh tế mà nó đem lại. Tuy nhiên, nông dân phải đối mặt với nhiều khó khăn liên quan đến bệnh hại như héo rũ gốc mốc trắng (*Sclerotium rolfsii*), bệnh thán thư ớt do nhiều loài thuộc chi *Colletotrichum* và bệnh héo xanh do vi khuẩn *R. solanacearum* - bệnh đặc trưng của các cây họ cà. Tại các khu vực Đồng bằng sông Cửu Long như huyện Chợ Mới và An Phú tỉnh An Giang, huyện Châu Thành và Chợ Gạo tỉnh Tiền Giang..., bệnh héo xanh gây thiệt hại nặng nề trên các giống ớt trồng và là một trong những vấn đề nan giải đối với người nông dân [1]. Bệnh xuất hiện trên diện rộng và lan ra nhiều vùng gây chết đến hơn 50%, các khoảng không gian bảo của vỏ rễ và các nhu mô mạch trở thành nơi khu trú của chúng làm phá vỡ thành tế bào, tạo điều kiện cho sự lây lan qua hệ thống các mạch dẫn trong cây [2]. Trong mạch xylem, quần thể vi khuẩn nhanh chóng đạt đến mức rất cao, đồng thời với hiện tượng héo và chết cây.

Các nghiên cứu cho thấy, VSV có khả năng sinh kháng sinh - tuy nhiên chất kháng sinh này chỉ có tác dụng chọn lọc với các VSV nhất định, trong đó xạ khuẩn là nhóm những VSV được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi do các chất kháng sinh có nguồn gốc từ xạ khuẩn có phổ kháng khuẩn rộng. Đặc biệt là các loài thuộc chi *Streptomyces* được xem là nguồn sản sinh chất kháng khuẩn nhiều nhất và gần 80% kháng sinh trên thế giới có nguồn gốc từ xạ khuẩn. Trong đất, xạ khuẩn chiếm khoảng 20-40% tổng số VSV, tập trung nhiều ở lớp đất bề mặt. Xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp nhiều loại enzyme thủy phân có hoạt tính cao, có tiềm năng rất lớn trong việc sinh tổng hợp nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học, phân giải nhiều hợp chất phức tạp, kích thích sự phát triển của cây trồng. Tại Việt Nam đã có một số nghiên cứu sử dụng xạ khuẩn kiểm soát vi khuẩn và nấm bệnh gây hại cây trồng [3, 4], nhưng còn hạn chế đối với vi khuẩn héo xanh. Nghiên cứu này trình bày kết quả định danh, xác định gen liên quan đến khả năng sinh kháng sinh và đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh của chủng xạ khuẩn BT02.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Chủng xạ khuẩn BT02 và 3 chủng vi khuẩn *R. solanacearum* (07, 08, 13) gây bệnh héo xanh trên cây ớt được phân lập và lưu trữ ở Phòng Thí nghiệm Sinh học tích hợp thực vật, Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm TP Hồ Chí Minh.

*Tác giả liên hệ: Email: nvphong@hcmuaf.edu.vn

Biological characteristics and ability of *Streptomyces rochei* BT02 to inhibit the *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt disease

Hoang Nhat Tan Nguyen, Thi Truc Mai Ha,
Thi Thuy Duong Luong, Vu Phong Nguyen*

Department of Biological Sciences, Nong Lam University Ho Chi Minh City

Received 16 September 2022; accepted 17 October 2022

Abstract:

In the agricultural field, actinomycetes are outstanding biological control agents to inhibit the growth of pathogenic microorganisms. Based on the manual of bacterial classification of the International Streptomyces Project (ISP) and the 16S-rRNA gene sequence, the actinomycete BT02 strain was named *Streptomyces rochei* BT02. This strain contains two polyketide synthase type I (*pks-I*) and polyketide synthase type II (*pks-II*) genes related to antibiotic synthesis. The result showed that the actinomycetes *S. rochei* BT02 grow well at 31°C, 1% salt, pH 7.0, and assimilate different carbon and nitrogen sources. The *S. rochei* BT02 showed antibacterial activity against three tested strains of *Ralstonia solanacearum* (Minimum inhibitory concentration =15 mg/ml). In greenhouse conditions, this strain reduced 43.5% the wilt disease index. That demonstrated that *S. rochei* BT02 could be a promising source for the production of bioproducts.

Keywords: antibacterial activity, minimum inhibitory concentration, polyketide synthase, *Ralstonia solanacearum*, *Streptomyces rochei*.

Classification number: 4.6

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát các điều kiện nuôi cấy ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của chủng xạ khuẩn BT02: Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 4 đĩa petri ở 2 nồng độ pha loãng xạ khuẩn. Ở mỗi nồng độ pha loãng 10^{-3} , 10^{-4} , cấy trải lần lượt trên 2 đĩa môi trường Gause 1 đã điều chỉnh theo yêu cầu từng thí nghiệm [5]. Cấy trải 100 µl dịch xạ khuẩn pha loãng trên môi trường Gause 1, điều chỉnh pH (5, 6, 7, 8, 9 và 10), nồng độ muối (0, 1, 2, 3, 4 và 5%), nhiệt độ (25, 28, 31, 34 và 37°C). Sau 5 ngày ủ mẫu, ghi nhận số lượng khuẩn lạc hình thành (CFU/ml).

Cấy trải 100 µl dịch xạ khuẩn pha loãng trên môi trường ISP9 bổ sung 1% các nguồn carbon gồm D - glucose, D

- maltose, D - sorbitol, D - xylose, D - mannitol, lactose, sucrose hoặc bổ sung 0,1% các nguồn nitrogen gồm NH_4NO_3 , L - tyrosin, peptone, yeast extract. Sau 7 ngày cấy, ghi nhận số lượng khuẩn lạc hình thành và tính mật số xạ khuẩn [6].

Định danh dòng xạ khuẩn dựa vào trình tự gen 16S rRNA: DNA tổng số của xạ khuẩn được tách theo phương pháp [7], đoạn gen 16S-rRNA được khuếch đại bằng PCR sử dụng cặp primer 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' và 1492R 5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3' [8]. Chu trình nhiệt gồm các bước 94°C trong 5 phút, 35 chu kỳ (94°C trong 30 giây, 55°C trong 30 giây, 72°C trong 1 phút), 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Kích thước của đoạn DNA thu được sau phản ứng PCR được so sánh với thang DNA chuẩn 1 kb (Thermo Scientific). Sản phẩm PCR được tinh sạch, giải trình tự hai chiều (First Base, Malaysia), hiệu chỉnh và so sánh với trình tự gen sẵn có trên Genbank nhờ công cụ BLAST (www.ncbi.nih.gov) và 16S-based ID (<https://www.ezbiocloud.net>). Phân tích quan hệ di truyền bằng phần mềm MEGAX [9].

Xác định sự hiện diện gen mã hóa *pks-I* và *pks-II* của xạ khuẩn: DNA tổng số của 2 dòng xạ khuẩn được dùng làm khuôn cho phản ứng PCR với các cặp mồi suy biến của PKS-I (K1F 5'-TSA AGT CSA ACA TCG GBC A-3' và M6R 5'-CGC AGG TTS CSG TAC CAG TA-3') [10]; PKS-II (KsaF 5'-TSG CST GCT TGG AYG CSA TC-3' và KsaR 5'-TGG AAN CCG CCG AAB CCG CT-3') [11]. Chu trình nhiệt gồm 95°C trong 5 phút, 35 chu kỳ (95°C trong 60 giây, 64°C (KsaF/KsaR) và 59°C (K1F/M6R) trong 60 giây, 72°C trong 1 phút), chu kỳ cuối ở 72°C trong 7 phút và giữ mẫu ở 4°C; sản phẩm của phản ứng PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1,0%.

Khảo sát khả năng ức chế vi khuẩn *R. solanacearum* của xạ khuẩn: Xạ khuẩn được cấy thành đường giữa đĩa petri trên môi trường NA (peptone 5 g, NaCl 5 g, yeast extract 3 g, agar 20 g), ủ 28°C trong 5 ngày. Sau 5 ngày, cấy 3 chủng vi khuẩn *R. solanacearum* vuông góc với đường cấy xạ khuẩn. Ủ 28°C, trong 24 giờ [12]. Theo dõi sự phát triển của vi khuẩn *R. solanacearum*, xác định khả năng đối kháng của xạ khuẩn BT02.

Đánh giá khả năng sinh enzyme ngoại bào: Cấy xạ khuẩn vào tâm đĩa petri chứa môi trường bổ sung các cơ chất tương ứng (tinh bột tan, CMC, casein agar, Tween 20, huyền phù chitin). Các đĩa petri được đặt ở nhiệt độ phòng. Xác định hoạt tính enzyme bằng cách cho thuốc nhuộm TCA, lugol 1% vào đĩa, sau 2 phút đổ bỏ phần dung dịch thừa và tráng bề mặt agar với nước. Quan sát và đo đường kính vòng phân giải ở các thời điểm 48, 72, 96 và 120 giờ sau cấy. Thí nghiệm kiểm tra khả năng sinh enzyme được tiến hành 2 lần.

Xác định MIC và nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC) của dịch kháng sinh thô: Xạ khuẩn được nuôi trên môi trường R2YE (sucrose 10,3 g, K₂SO₄ 0,025 g, MgCl₂.6H₂O 1,012 g, glucose 1,0 g, yeast extract 0,5 g) ở 28°C, lắc 150 vòng/phút. Sau 7 ngày, dịch nuôi cấy được ly tâm ở 4.000 vòng/phút, trong 10 phút để loại bỏ sinh khối xạ khuẩn, thu dịch nổi. Dịch nổi được trộn đều với dung môi hữu cơ ethyl acetate tỷ lệ 1:2 trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó cô quay thu nhận cặn. Sau khi cân khối lượng, cặn được pha trong DMSO tạo dung dịch gốc 120 mg/ml, từ đó pha loãng thành các nồng độ khác nhau với môi trường Mueller-Hinton broth (MHB). Kháng sinh streptomycin (Sigma) được chuẩn bị theo cách tương tự với nước cất vô trùng.

Thí nghiệm được thực hiện trên đĩa 96 giếng. 100 µl nước vô trùng, DMSO, kháng sinh Streptomycin và dịch kháng sinh thô xạ khuẩn BT02 với nồng độ giảm dần được phân phối vào các giếng. Tiếp theo 100 µl dịch vi khuẩn *R. solanacearum* (mật độ 10⁸ CFU/ml) được thêm vào các giếng. Đĩa thử nghiệm được ủ ở 28°C trong 18 giờ. Sau đó thêm 20 µl dung dịch resazurin 0,01% vào các giếng và ủ tiếp ở 28°C trong 30 phút. Nếu có sự tăng trưởng của vi khuẩn, các giếng sẽ chuyển từ màu vàng sang màu hồng. Giá trị MIC được định nghĩa là nồng độ thấp nhất của dịch kháng sinh thô có thể ức chế hoàn toàn sự tăng trưởng của vi khuẩn [11].

Để xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu (MBC), 100 µl mẫu từ các giếng không chuyển sang màu hồng sẽ được trải trên môi trường King' B (peptone 20 g, K₂HPO₄ 1,5 g, MgSO₄.7H₂O 1,5 g, glycerol 10 ml, agar 20 g), ủ ở 28°C. Nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của dịch kháng sinh thô được xác định dựa vào sự không xuất hiện của vi khuẩn trên đĩa thạch [13]. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *R. solanacearum* của xạ khuẩn: Chuẩn bị cây cà chua và vi khuẩn theo mô tả của N. Singh và cs (2018) [14]. Dịch vi khuẩn *R. solanacearum* có mật độ xấp xỉ 10⁸ CFU/ml (OD₆₀₀=1,0) và dịch chiết thô (30 mg/ml) từ xạ khuẩn được sử dụng thử nghiệm.

- Thử nghiệm *in vitro*: Rễ cây cà chua 7 ngày tuổi được lây nhiễm dịch vi khuẩn, sau đó cây con được chuyển vào một ống 1,5 ml. Sau khoảng 5 phút, 1 ml nước cất vô trùng được thêm vào ống. Sự tiến triển của bệnh trên cây cà chua con được theo dõi trong 7 ngày. Các nhóm nghiệm thức gồm (1) Lây nhiễm vi khuẩn; (2) Xử lý dịch chiết xạ khuẩn trước hoặc sau lây nhiễm vi khuẩn 24 giờ; (3) Xử lý bằng nước vô trùng; (4) Xử lý streptomycin trước và sau lây nhiễm vi khuẩn. Mỗi nghiệm thức thực hiện trên 3 cây con, thí nghiệm được lặp lại 2 lần.

- Thử nghiệm nhà lưới: Cây cà chua 28 ngày tuổi được trồng trong chậu với đất khử trùng. 6 nghiệm thức gồm NT1 (lây nhiễm RS13), NT2 (RS13, DITACIN 8SL (chứa

ningnanmycin 1 ml/l), NT3 (RS13, dịch chiết thô), NT4 (nước vô trùng), NT5 (dịch chiết thô, lây nhiễm RS13), NT6 (DITACIN 1 ml/l, RS13). Các nghiệm thức được lặp lại 3 lần với 6 cây mỗi lần lặp lại. Theo dõi tỷ lệ cây bệnh (%) và chỉ số bệnh (%) sau lây nhiễm 7, 14, 21 và 28 ngày. Phân cấp bệnh theo thang đánh giá: cấp 0: không bệnh; cấp 1: có 1-10% lá héo; cấp 2: có 11-30% lá héo; cấp 3: 31- 60%; cấp 4: >60%; cấp 5: tất cả các lá đều héo [15-16].

$$\text{Chỉ số bệnh (\%)} = (x \times nx) / (5 \times N)$$

trong đó nx: số cây nhiễm bệnh cấp x tương ứng; N: tổng số cây điều tra.

Hiệu lực phòng trừ tính theo công thức: [(chỉ số bệnh NT1 - chỉ số bệnh xử lý)/chỉ số bệnh NT1] x 100% [17].

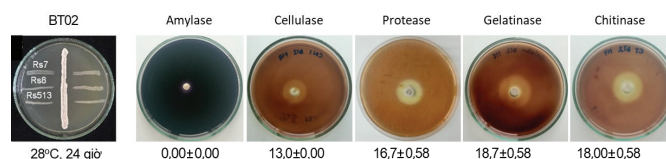
Phân tích số liệu

Sử dụng phần mềm Microsoft Excel 2016 để tổng hợp số liệu, phân tích thống kê theo ANOVA, trắc nghiệm phân hạng bằng XLSTAT 2016 (nếu có). Số liệu được chuyển đổi (nếu cần thiết) đảm bảo phân phối chuẩn trước khi phân tích thống kê.

Kết quả và bàn luận

Khả năng ức chế vi khuẩn *R. solanacearum* và sinh enzyme của *Streptomyces* sp. BT02

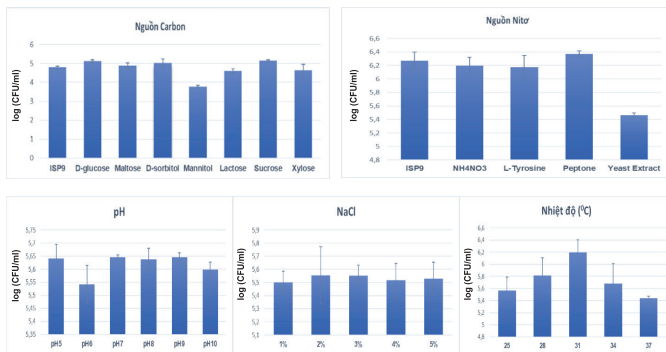
Với phương pháp cấy chữ thập trên môi trường NA, BT02 có khả năng ức chế sự phát triển cả 3 chủng vi khuẩn *R. solanacearum* 07, 08, 13 sau 24 giờ. Bên cạnh đó, BT02 có khả năng sản sinh cellulase (13 mm), protease (16,7 mm), gelatinase (18,7 mm) và chitinase khá cao (18 mm) ở thời điểm 120 giờ sau cấy (hình 1).



Hình 1. Khả năng ức chế vi khuẩn *R. solanacearum* và sinh enzyme của chủng BT02.

Các điều kiện nuôi cấy ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của xạ khuẩn

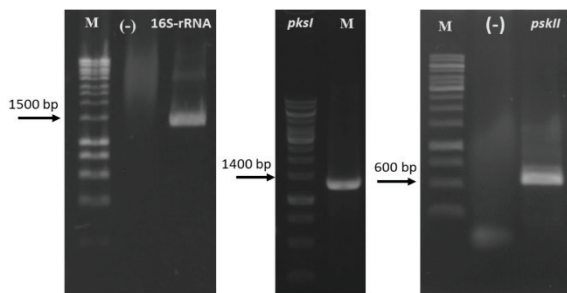
Chủng xạ khuẩn BT02 có khả năng đồng hóa hầu hết các nguồn carbon, trong đó khả năng sử dụng D-glucose, sucrose tốt nhất (kích thước khuẩn lạc lớn và mật độ khuẩn cao), phát triển kém nhất trên môi trường bổ sung mannitol ($p < 0,05$). Chủng xạ khuẩn BT02 có khả năng sử dụng hầu hết các nguồn nitrogen như L-tyrosin, yeast extract, NH₄NO₃ và tốt nhất là peptone ($p < 0,05$). Dòng xạ khuẩn phát triển tốt trong khoảng nhiệt độ 25-34°C (tốt nhất ở 31°C), trong khoảng pH 5,0-10,0 (tốt nhất ở pH 7,0-8,0) và nồng độ muối 1-5% (tốt nhất ở 1%) (hình 2).



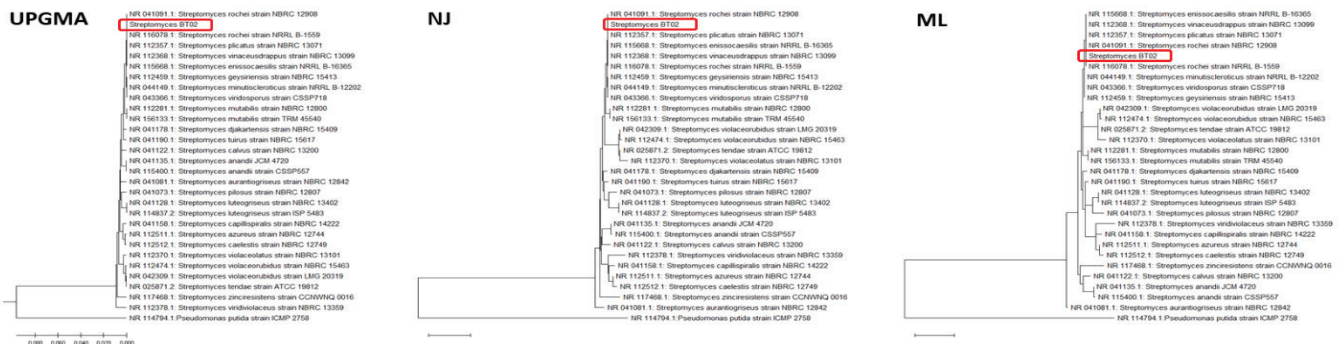
Hình 2. Các điều kiện nuôi cấy ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của xạ khuẩn BT02. Giá trị thể hiện là trung bình của 3 lần lặp lại và độ lệch chuẩn, mỗi thí nghiệm được lặp lại 2 lần.

Định danh dòng xạ khuẩn dựa vào trình tự gen 16S rRNA

Kích thước sản phẩm khuếch đại vùng trình tự 16S-rRNA của dòng xạ khuẩn BT02 khoảng 1.500 bp (hình 3). Trình tự 16S-rRNA của dòng BT02 được so sánh với các loài *Streptomyces* hiện diện trong Genbank bằng BLAST (NCBI) và 16S-based ID (<https://www.ezbiocloud.net>). Kết quả phân tích bằng 3 phương pháp UPGMA, Neighbor Joining và Maximum Likelihood cho thấy BT02 tương đồng 99,97% với *S. rochei* (hình 4). Kết hợp với kết quả so sánh các đặc điểm hình thái, sinh lý theo khóa phân loại ISP và Bergey [5], chủng xạ khuẩn này được đặt tên là *S. rochei* BT02.



Hình 3. Sản phẩm PCR gen 16S rRNA, *pks-I*, *pks-II* của chủng xạ khuẩn BT02. M: ladder 1,5 kb; (-): đối chứng âm.



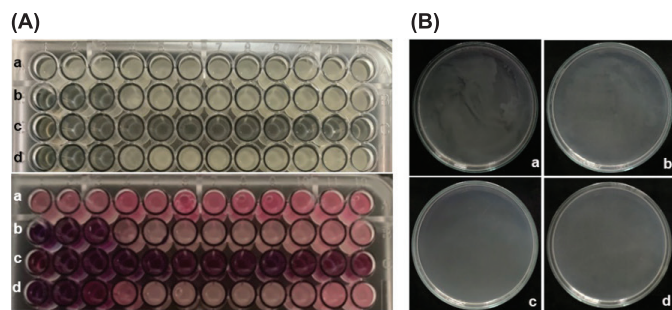
Hình 4. Mối quan hệ di truyền giữa chủng BT02 và các loài *Streptomyces* hiện diện trên Genbank. UPGMA, NJ: Neighbor Joining; ML: Maximum Likelihood. Giá trị bootstrap 1000. *Pseudomonas putida* được sử dụng làm outgroup.

Xác định gen mã hóa *pks-I* và *pks-II* của BT02

Kết quả khuếch đại gen *pks* bằng phản ứng PCR cho một băng DNA duy nhất có kích thước khoảng 1400 bp (*pks-I*) và 600 bp (*pks-II*) (hình 3).

MIC và MBC đối với *R. solanacearum* của dịch chiết sinh thô BT02

Kết quả thử nghiệm MIC đối với 3 chủng *R. solanacearum* 07, 08 và 13 cho thấy, ở nồng độ 15 mg/ml dịch chiết sinh thô của BT02 đã ức chế sự phát triển của vi khuẩn. Tuy vậy, kết quả MBC có sự khác biệt giữa 3 chủng vi khuẩn *Ralstonia* 07, 08, 13 với giá trị lần lượt là 120, 60, 30 mg/ml (hình 5 trình bày kết quả với *R. solanacearum* 13).



Hình 5. Kết quả MIC (A) và MBC (B) của chủng xạ khuẩn BT02 đối với chủng *Ralstonia solanacearum* 13. (A) Nước cất vô trùng (a), DMSO (b), *R. solanacearum* và Streptomycin (c), *R. solanacearum* và BT02 (d); (B) *R. solanacearum* 13 (a), DMSO (b), Streptomycin (c), xạ khuẩn BT02 (d).

Khả năng ức chế in vitro của dịch chiết xạ khuẩn đối với vi khuẩn *R. solanacearum*

Sau khi nhiễm vi khuẩn 72 giờ, cây cà chua con xuất hiện triệu chứng bệnh và héo hoàn toàn ở 7 ngày sau khi chủng bệnh. Ở các nghiệm thức xử lý dịch chiết xạ khuẩn trước (BT02-RS07, BT02-RS08, BT02-RS13) và sau (RS07-BT02, RS08-BT02, RS13-BT02) lây nhiễm vi khuẩn, cây vẫn phát triển bình thường sau 7 ngày lây nhiễm, tương đồng với các nghiệm thức đối chứng Streptomycin (30 mg/ml) (RS07-Streptomycin, RS08-Streptomycin, RS13-

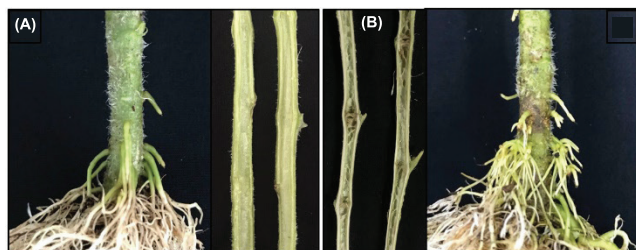
Streptomycin, Streptomycin-RS07, Streptomycin-RS08, Streptomycin-RS13). Kết quả thí nghiệm cho thấy, dịch chiết xạ khuẩn có khả năng hạn chế sự phát triển của vi khuẩn trong điều kiện *in vitro*, tạo tiền đề cho nghiên cứu đối kháng trên cây cà chua điều kiện nhà lưới (hình 6).



Hình 6. Ảnh hưởng của dịch chiết xạ khuẩn BT02 đối với cây cà chua sau 7 ngày lây nhiễm vi khuẩn *R. solanacearum* 13.

Hiệu quả giảm bệnh héo xanh của dịch chiết xạ khuẩn BT02 điều kiện nhà lưới

Bệnh héo xanh xuất hiện ở nghiệm thức đối chứng dương ở 3 ngày sau nhiễm (NSN) vi khuẩn, sớm hơn so với các nghiệm thức xử lý dịch chiết xạ khuẩn và thuốc bảo vệ thực vật sau (7 NSN) hoặc trước (14 NSN) lây nhiễm vi khuẩn. Các cây xanh tươi bị héo đột ngột vào ban ngày nhất là buổi chiều, vào ban đêm và đầu buổi sáng cây xanh lại nếu bệnh còn nhẹ (7 và 14 NSN), nhưng các nhánh lá sẽ chết héo khi đã bị nặng. Từ thời điểm 21 NSN (cây 49 ngày tuổi - đang thời kỳ ra hoa) biểu hiện bệnh của cây xuất hiện một cách rõ ràng hơn. Thân thối mềm vì bó mạch đã bị tắc nghẽn và phân hủy thúc đẩy hình thành nhiều rễ phụ khí sinh mọc ra dọc trên thân và rễ (hình 7).



Hình 7. Rễ và bó mạch cây cà chua ở 28 NSN. (A) Cây bình thường; (B) Cây bị héo xanh vi khuẩn.

Ở 28 NSN, các chỉ tiêu bao gồm chiều cao cây, đường kính cây, số lá, số nhánh và số hoa đều không có khác biệt (số liệu không trình bày). Riêng sinh khối rễ trung bình của cây cà chua ở nghiệm thức lây nhiễm vi khuẩn thấp nhất (11,07 g/cây). Tỷ lệ bệnh và chỉ số bệnh ở các nghiệm thức xử lý dịch chiết xạ khuẩn và thuốc bảo vệ thực vật đều thấp có ý nghĩa so với đối chứng dương lây nhiễm xạ khuẩn. Hiệu quả giảm bệnh của dịch chiết thô xạ khuẩn đạt 43,5 và 28,3% trước và sau khi lây nhiễm vi khuẩn *R. solanacearum* 13 (bảng 1).

Bảng 1. Hiệu quả giảm bệnh héo xanh trên cây cà chua của dịch chiết xạ khuẩn BT02 ở 28 NSN.

Nghiệm thức	Sinh khối rễ tươi (g/cây)	Tỷ lệ bệnh (%)	Chỉ số bệnh (%)	Hiệu quả giảm bệnh (%)
Rs13 (+)	11,07±4,64 ^b	36,39±21,28 ^a	51,11	-
Rs13-DITACIN	14,88±7,63 ^{ab}	15,99±20,49 ^b	24,44	52,2
Rs13-BT02	14,82±7,73 ^{ab}	20,56±11,41 ^b	36,67	28,3
Nước (-)	15,44±6,85 ^{ab}	0,00±0,00 ^c	0,0	-
BT02-Rs13	14,73±6,42 ^{ab}	12,22±11,78 ^{bc}	28,89	43,5
DITACIN-Rs13	18,20±6,57 ^a	17,62±13,34 ^b	32,22	40,0

Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có kí tự theo sau khác nhau thì có sự khác biệt về mặt thống kê ($p < 0,05$).

Trong nghiên cứu này, chủng xạ khuẩn BT02 ức chế sinh trưởng 3 chủng *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh trên ớt [18] ở điều kiện *in vitro*. Chủng xạ khuẩn này cũng thể hiện khả năng sinh các enzyme phân giải như cellulase, protease, gelatinase và chitinase ở mức khá cao. Đây là những enzyme có khả năng tác động đến màng tế bào vi khuẩn gây bệnh thực vật, giảm tỷ lệ bệnh và thúc đẩy tăng trưởng thực vật [19]. Polyketide là những chất chuyển hóa thứ cấp đa dạng về cấu trúc đã được ứng dụng rộng rãi trong dược phẩm, đặc biệt là kháng sinh. Theo O. Cédric và cs (2013) [20], enzyme polyketide synthase II (PKS-II) tham gia tổng hợp cấu trúc cơ bản chuỗi polyketide và polyketide synthase I (PKS-I) chịu trách nhiệm tạo khung polyketide hoàn chỉnh. Chủng BT02 mang 2 gen *pkcs-I* và *pkcs-II* qua kết quả phân tích PCR, điều này chứng tỏ chủng vi khuẩn này có tiềm năng trong tổng hợp các chất kháng sinh, cần được nghiên cứu làm rõ.

Sự tổng hợp các chất cao phân tử ngoại bào (Extracellular polymeric substances) và các protein khác nhau của *R. solanacearum* được cho là nguyên nhân hình thành màng gây tắc nghẽn xylem thực vật, là một trong những yếu tố có lợi cho độc lực gây bệnh [21]. Một nghiên cứu báo cáo các chất chuyển hóa từ *Streptomyces californicus* đã ức chế hơn 90% màng sinh học từ *S. aureus* [22] và 4 chủng *Streptomyces* sp. ức chế hơn 80% màng sinh học từ *R. solanacearum* giúp giảm tỷ lệ bệnh trên cây cà chua [23].

Trong nghiên cứu này, dịch kháng sinh thô BT02 đã làm chậm thời gian xuất hiện triệu chứng héo xanh và giảm đến 43,5% chỉ số bệnh héo xanh vi khuẩn khi xử lý trước khi nhiễm vi khuẩn cây cà chua, tương đương với đối chứng là hoạt chất sinh học ningnanmycin. Xạ khuẩn *S. rochei* được xếp vào nhóm VSV có độ an toàn sinh học mức 2/4 theo Hướng dẫn số 90/679/EWG của Cộng đồng châu Âu về an toàn sinh học. Kết quả này hứa hẹn khả năng phòng ngừa bệnh héo xanh vi khuẩn trên các loại cây trồng, cần có các nghiên cứu ở quy mô đồng ruộng và trên các loại cây trồng khác.

Kết luận

Chủng xạ khuẩn BT02 có khả năng sinh các enzyme ngoại bào như lipase, protease, chitinase cao. Chủng xạ khuẩn sinh trưởng tốt ở 31°C, 1% muối, pH 7-10, có khả năng đồng hoá nhiều nguồn carbon và nitrogen khác nhau. Dựa vào trình tự 16S-rRNA, đặc điểm hình thái, đặc điểm hóa sinh, chủng xạ khuẩn BT02 được xác định thuộc loài *S. rochei*. Chủng BT02 mang 2 gen *pks-I* và *pks-II* có nồng độ ức chế tối thiểu MIC là 15 mg/ml đối với 3 dòng vi khuẩn *R. solanacearum*. Chủng BT02 có khả năng giúp giảm 43,5% bệnh héo xanh trên cây cà chua trong điều kiện nhà lưới, cho thấy xạ khuẩn rất có tiềm năng phát triển chế phẩm sinh học bảo vệ thực vật. Cần nghiên cứu khả năng thúc đẩy tăng trưởng thực vật, các hợp chất có hoạt tính diệt khuẩn và khả năng phòng trừ bệnh điều kiện đồng ruộng để phát triển sản phẩm sinh học quản lý bệnh héo xanh vi khuẩn trên cây trồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Võ Thị Bích Thủy, Trần Thị Ba, Lê Thị Bích Trâm (2016), “Khảo sát đặc điểm hình thái, năng suất và khả năng chống chịu bệnh héo xanh vi khuẩn (*Ralstonia solanacearum*) trên 12 giống ớt (*Capsicum* spp.)”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, **11**, tr.117-125.
- [2] J. Vasse, P. Frey, A. Trigalet (1995), “Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*”, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **8**(2), pp.241-251.
- [3] Nguyễn Thị Phong Lan, Võ Thị Thu Ngân, Trần Phước Lộc, Trần Hà Anh (2015), “Tuyển chọn các chủng xạ khuẩn (*Streptomyces* spp.) đối kháng nấm *Pyricularia grisea* gây bệnh đạo ôn hại lúa”, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, **13**(8), tr.1442-1451.
- [4] Lê Minh Tường, Ngô Thành Trí, Nguyễn Hồng Quý (2018), “Định danh xạ khuẩn có khả năng ức chế nấm *Fusarium solani* gây bệnh vàng lá thối rễ cây có mùi”, *Tạp chí Bảo vệ Thực vật*, **4**, tr.38-42.
- [5] T. Stanley, M.E. Williams, J.G. Sharpe (1989), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, pp.2452-2492.
- [6] L. Maturin, J.T. Peeler (2001), *BAM: Aerobic Plate Count Bacteriological Analytical Manual Chapter 3 Aerobic Plate Count*, 8th Edition, Silver Spring.
- [7] J. Sambrook, D. Russell (2001), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd, Cold Spring Harbor Laboratory.
- [8] J. Li, G.Z. Zhao, H.Y. Huang, et al. (2012), “Isolation and characterization of culturable endophytic actinobacteria associated with *Artemisia annua* L.”, *Antonia Van Leeuwenhoek*, **101**(3), pp.515-527.
- [9] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, et al. (2018), “MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms”, *Molecular Biology and Evolution*, **35**(6), pp.1547-1549.
- [10] A.A. Sacido, O. Genilloud (2005), “New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: Detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups”, *Microb. Ecol.*, **49**(1), pp.10-24.
- [11] M.M. Ketela, V. Salo, L. Halo, et al. (1999), “An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces* FEMS Microbiol. Lett., **180**(1), pp.1-6.
- [12] T.D. Brock, M.T. Madigan, J.M. Martinko, J. Parker (1994), *Biology of Microorganisms*, 7th Edition, Englewood Cliffs, Prentice, Hall, International Inc.
- [13] I. Wiegand, K. Hilpert, R.E. Hancock (2008), “Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances”, *Nature Protocols*, **3**(2), pp.163-175.
- [14] N. Singh, R. Kumar, S.K. Ray (2018), “An innovative approach to study *Ralstonia solanacearum* pathogenicity in 6 to 7 days old tomato seedlings by root dip inoculation”, *Bio-Protocol*, **8**(21), DOI: 10.21769/BioProtoc.3065.
- [15] E.M. Ateka, A.W. Mwang'ombe, J.W. Kimenju (2001), “Reaction of potato cultivars to *Ralstonia solanacearum* in Kenya”, *African Crop Science Journal*, **9**(1), pp.251-256.
- [16] J. Arwiyanto, M. Goto, S. Tsuyumu, Y. Takikawa (1994), *Biological Control of Bacterial Wilt of Tomato (*Lycopersicon esculenta*) by an Avirulent Strain of *Pseudomonas solanacearum* Isolated from *Strelitzia reginae**, Annals of The Phytopathological Society of Japan.
- [17] X. Zhuang, C. Gao, C. Peng, et al. (2020), “Characterization of a novel endophytic actinomycete, *Streptomyces physcomitrii* sp. nov., and its biocontrol potential against *Ralstonia solanacearum* on tomato”, *Microorganisms*, **8**(12), DOI: 10.3390/microorganisms8122025.
- [18] Đỗ Thị Thanh Trang, Nguyễn Thanh Phong, Châu Thị Thanh Thảo và cs (2021), “Đặc điểm vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* Smith gây bệnh héo xanh trên cây ớt”, *Kỷ yếu Hội thảo quốc gia bệnh hại thực vật Việt Nam*, tr.124-132.
- [19] N. Amaresan, V. Jayakumar, K. Kumar, N. Thajuddin (2019), “Biocontrol and plant growth-promoting ability of plant-associated bacteria from tomato (*Lycopersicon esculentum*) under field condition”, *Microbial pathogenesis*, **136**, DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103713.
- [20] O. Cédric, S. Carlson, B. Kaushal, et al. (2013), “Tool for characterizing bacterial protein synthesis inhibitors”, *Antimicrob Agent Chemother*, **57**(12), pp.5994-6004.
- [21] P. Saxena, Y. Joshi, K. Rawat, R. Bisht (2019), “Biofilms: Architecture, resistance, quorum sensing and control mechanisms”, *Indian J. Microbiol.*, **59**, pp.3-12.
- [22] R. Singh, A.K. Dubey (2020), “Isolation and characterization of a new endophytic actinobacterium *Streptomyces californicus* strain adr1 as a promising source of anti-bacterial, anti-biofilm and antioxidant metabolites”, *Microorganisms*, **8**(6), DOI: 10.3390/microorganisms8060929.
- [23] M. Kaari, J. Joseph, R. Manikkam, et al. (2022), “Anti-biofilm activity and biocontrol potential of *Streptomyces* cultures against *Ralstonia solanacearum* on tomato plants”, *Indian Journal of Microbiology*, **62**(1), pp.32-39.