

## PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG XẠ KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG SINH CHẤT KHÁNG NẤM *PYTHIUM* SP.

TRỊNH THỚI AN\*

### TÓM TẮT

*Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập và tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng sinh chất kháng nấm Pythium sp. trên đất trồng rau tại xã Phước Hậu, huyện Cần Giuộc, tỉnh Long An. Đồng thời, chúng tôi tiến hành tối ưu hóa các điều kiện nuôi cấy để thu nhận chất kháng nấm của chủng xạ khuẩn và bước đầu tìm hiểu ảnh hưởng của chất kháng nấm đến sự nảy mầm của hạt và sự sinh trưởng phát triển của cây cải xanh.*

**Từ khóa:** xạ khuẩn, *Pythium* sp., chất kháng nấm.

### ABSTRACT

#### *Isolating and selecting of actinomycetes strains capable of producing antifungal Pythium sp.*

*In this study, we isolated and selected strains of actinomycetes that are capable of producing antifungal Pythium sp. on vegetables planting soil in Phuoc Hau, Can Giuoc district, Long An province. At the same time, we carried out the optimization of culture conditions to obtain antifungal strains of actinomycetes and initialli investigated the effects of antifungal substances to the germination and the growth and development of mustard plants.*

**Keywords:** Actinomyces, *Pythium* sp., antifungal.

### 1. Mở đầu

Việt Nam là một nước nông nghiệp, có khí hậu nhiệt đới nóng ẩm, mưa nhiều rất thuận lợi cho các vi sinh vật (VSV) phát triển, trong đó có các VSV gây hại trên nông phẩm nói chung và rau màu nói riêng.

Huyện Cần Giuộc - tỉnh Long An - là một huyện trồng rất nhiều loại rau màu cung cấp cho các chợ đầu mối ở Thành phố Hồ Chí Minh và các chợ nhỏ lân cận. Để phòng trừ các bệnh do VSV gây nên, người nông dân thường sử dụng thuốc hóa học với liều lượng cao. Điều này một mặt sẽ dẫn đến việc nhờn thuốc ở các loài VSV gây bệnh, mặt khác sẽ dẫn đến việc ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe con người và các động vật khác, làm mất cân bằng sinh thái.

Hiện nay, trên thế giới và ở Việt Nam, đang hướng tới một nền nông nghiệp sạch bằng cách sử dụng các biện pháp sinh học. Biện pháp sử dụng các tác nhân sinh học thay thế các tác nhân hóa học được xem là một chiến lược của tổ chức lương nông FAO (1992) vì nó an toàn cho con người và cho môi trường. Một trong những biện pháp được thực hiện đó chính là việc sử dụng các VSV đối kháng với các VSV gây bệnh. Trong các nhóm VSV có khả năng sinh chất đối kháng, xạ khuẩn là nhóm được

\* HVCH, Trường Đại học Sư phạm TPHCM

quan tâm nghiên cứu nhiều nhất vì xạ khuẩn có khả năng sinh chất đối kháng với tỉ lệ cao, trong đó có nhiều chất kháng mạnh các nấm gây bệnh trên thực vật.

Từ những lí do trên, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu: “Phân lập, tuyển chọn chủng xạ khuẩn có khả năng sinh chất kháng nấm *Pythium* sp.”

## 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Vật liệu

#### 2.1.1. Đối tượng

Nghiên cứu được thực hiện trên các đối tượng:

- Các chủng xạ khuẩn phân lập trên đất trồng rau màu tại xã Phước Hậu, huyện Cần Giuộc, tỉnh Long An.
- Vi sinh vật kiểm định: nấm *Pythium* sp. nhận từ bộ sưu tập giống của Viện Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nông lâm TP Hồ Chí Minh.
- Hạt cải xanh do ông Đặng Văn Đờm (ấp Long Giêng, xã Phước Hậu, huyện Cần Giuộc, tỉnh Long An) cung cấp.

#### 2.1.2. Môi trường nuôi cấy

**Môi trường Gause I:** tinh bột tan 20g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,5g,  $KNO_3$  1g, NaCl 0,5g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,01g,  $K_2HPO_4$  0,5g, agar 20g, nước cất đủ 1000ml. pH = 7,2 - 7,4.

**Môi trường Gause II:** cao thịt 4g, peptone 5g, glucose 10g, agar 20g, nước cất đủ 1000ml. pH = 7,2 - 7,4

**Môi trường A-H4:** glucose 15g, bột đậu tương 15g, NaCl 5g,  $CaCO_3$  1g, nước cất đủ 1000ml. pH = 7,0.

**Môi trường ISP4:** tinh bột tan 10g,  $K_2HPO_4$  1g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1g,  $CaCO_3$  2g, NaCl 1g,  $(NH_4)_2SO_4$  2g, agar 20g, nước cất đủ 1000ml. pH = 7,2 - 7,4.

**Môi trường PGA:** khoai tây 300g, glucose 50g, agar 20g, nước cất đủ 1000ml.

Cách chế dịch khoai tây: khoai tây gọt vỏ, rửa sạch. Cân 300g, thái nhỏ, thêm 1000ml nước, đun sôi, nhỏ lửa trong 30 phút, lọc lấy dịch trong.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

Thu các mẫu đất rồi tiến hành phân lập xạ khuẩn trên môi trường Gause I. Sau đó, tuyển chọn chủng xạ khuẩn có hoạt tính kháng nấm *Pythium* sp. bằng phương pháp cấy chấm điểm. Mô tả đặc điểm chủng xạ khuẩn được tuyển chọn bằng quan sát đại thể và quan sát vi thể. [2], [5]

Khảo sát các điều kiện lên men: chủng xạ khuẩn đã tuyển chọn được nuôi cấy trong bình tam giác 250ml chứa 50ml môi trường và bổ sung 2% giống, lần lượt thay đổi các điều kiện như: loại môi trường (Gause I, Gause II, A-H4, ISP4), nguồn carbon (tinh bột tan, glucose, maltose, sucrose, ri đường), nguồn nitrogen (bột đậu tương, pepton, cao thịt, cao nấm men,  $NH_4NO_3$ ), pH (6, 6.5, 7, 7.5, 8), nhiệt độ (25°C, 30°C, 35°C, 40°C), nuôi trên máy lắc với tốc độ 180 vòng /phút trong vòng 72 giờ. Sau đó, thử hoạt tính kháng nấm bằng phương pháp khoan lỗ thạch. [3]

Định danh đến loài bằng phương pháp giải trình tự r-RNA 16S. [3]

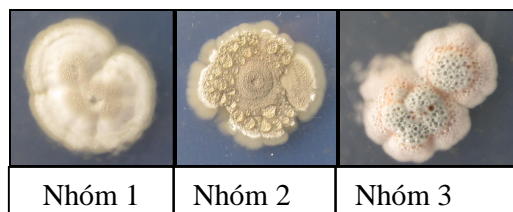
Tách chiết thu nhận dịch kháng nấm và bước đầu xác định khả năng ảnh hưởng của chất này đến khả năng nảy mầm của hạt và sự sinh trưởng, phát triển của cây. [3]

### 3. Kết quả và biện luận

#### 3.1. Phân lập và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh chất kháng mạnh nấm *Pythium* sp.

Từ các mẫu đất thu nhận được, chúng tôi đã phân lập được 30 kiểu khuẩn lạc xạ khuẩn (tạm gọi là chủng) khác nhau được kí hiệu từ A1 đến A30. Chúng tôi tiến hành phân nhóm các chủng xạ khuẩn dựa vào các đặc điểm sau: màu sắc khuẩn lạc, màu sắc mép khuẩn lạc, hình dạng mép khuẩn lạc sắc tố tan. 30 chủng xạ khuẩn phân lập được phân chia thành nhóm sau (hình 3.1):

- Nhóm 1: trắng, gồm 14 chủng (46,7%)
- Nhóm 2: xám- đen, gồm 8 chủng (26,7%)
- Nhóm 3: đỏ - hồng - nâu, gồm 8 chủng (26,6%).



**Hình 3.1.** Ảnh đại diện các nhóm xạ khuẩn phân lập được

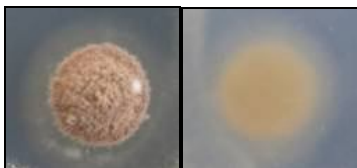
Khảo sát sơ bộ khả năng kháng nấm *Pythium* sp. của các chủng xạ khuẩn phân lập được bằng phương pháp cấy chấm điểm. Kết quả cho thấy, trong 30 chủng phân lập được có 6 chủng có khả năng tổng hợp chất kháng nấm *Pythium* sp. Trong đó có 1 chủng kháng nấm mạnh, 3 chủng kháng nấm trung bình và 2 chủng kháng nấm yếu (bảng 3.1). Chủng A25 có khả năng sinh chất kháng nấm *Pythium* sp. mạnh nên được chúng tôi lựa chọn sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

**Bảng 3.1.** Các chủng xạ khuẩn có khả năng kháng nấm *Pythium* sp.

TT	Chủng xạ khuẩn	Hoạt tính kháng nấm <i>Pythium</i> sp. (D - d, cm)
1	A5	0,6
2	A7	1,6
3	A10	0,8
4	A19	1,2
<b>5</b>	<b>A25</b>	<b>2,1</b>
6	A26	1,6

**3.2. Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn A25**

Chủng xạ khuẩn A25 được cấy chấm điểm trên môi trường Gause I và nuôi trong 7 ngày tạo thành khuẩn lạc có đường kính khoảng 7mm. Mặt trên khuẩn lạc sần sùi, màu nâu đỏ. Mép khuẩn lạc màu nâu đỏ hình răng cưa. Mặt dưới khuẩn lạc nhẵn (hình 3.2.).



Hình 3.2. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của chủng xạ khuẩn A25

**3.3. Khảo sát các điều kiện lên men ảnh hưởng đến khả năng tổng hợp chất kháng nấm *Pythium sp.* của chủng xạ khuẩn A25**

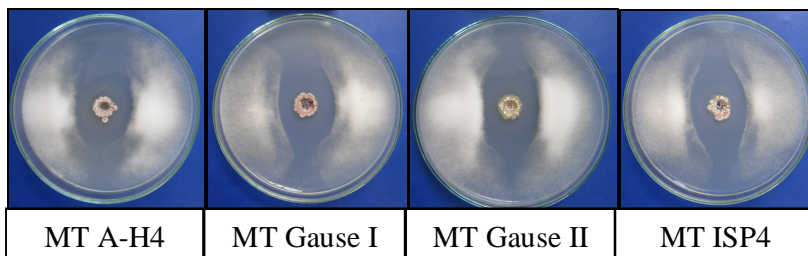
**3.3.1. Lựa chọn môi trường lên men thích hợp**

Chủng A25 được khảo sát trên 4 loại môi trường khác nhau: Gause I, Gause II, A-H4, ISP4 rồi thử hoạt tính kháng nấm bằng phương pháp khoan lỗ thạch. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.2.

**Bảng 3.2. Hoạt tính kháng nấm *Pythium sp.* của chủng xạ khuẩn A25 trên các môi trường lên men khác nhau**

STT	Môi trường	Hoạt tính kháng nấm <i>Pythium sp.</i> (D - d, cm)
1	Gause I	2,0 ± 0,23
2	Gause II	2,1 ± 0,29
<b>3</b>	<b>A-H4</b>	<b>2,2 ± 0,15</b>
4	ISP4	1,9 ± 0,20

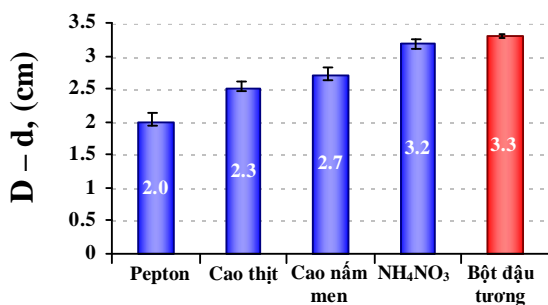
Từ kết quả trên cho thấy, chủng xạ khuẩn A25 có thể sinh trưởng và tổng hợp chất kháng nấm *Pythium sp.* trong 4 loại môi trường. Trong đó, khi nuôi cấy trong A-H4 chủng xạ khuẩn A25 đã thể hiện hoạt tính cao nhất và đây cũng là môi trường tương đối đơn giản nên được chúng tôi sử dụng để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3.3. Hoạt tính kháng nấm *Pythium sp.* của chủng A25 trên bốn loại môi trường

3.3.2. *Khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitrogen đến khả năng tổng hợp chất kháng nấm Pythium sp. của chủng xạ khuẩn A25*

Chúng tôi tiến hành nuôi chủng xạ khuẩn A25 trong môi trường A-H4 và thay thế N tổng số lần lượt bằng peptone, cao thịt, cao nấm men, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, bột đậu tương với lượng tương đương. Kết quả được thể hiện ở hình 3.4.



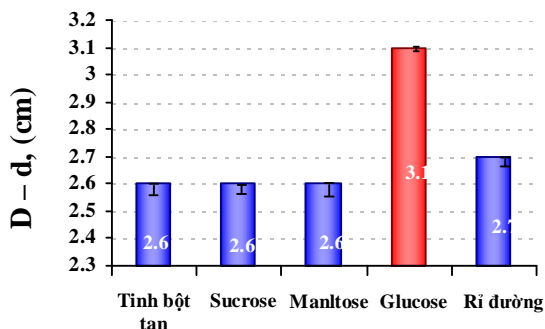
**Nguồn Nitrogen**

**Hình 3.4.** *Biểu đồ ảnh hưởng của nguồn nitrogen lên khả năng tổng hợp chất kháng nấm Pythium sp. của chủng xạ khuẩn A25*

Từ kết quả trên cho thấy, chủng xạ khuẩn A25 có khả năng tổng hợp chất kháng nấm mạnh ở nhiều nguồn nitrogen khác nhau. Tuy nhiên, nguồn đạm thực vật lại được sử dụng tốt hơn cho sự tổng hợp chất kháng nấm của chủng A25. Từ kết quả trên, chúng tôi sử dụng môi trường A-H4 với nguồn nitrogen là bột đậu tương cho nghiên cứu tiếp theo.

3.3.3. *Khảo sát ảnh hưởng của nguồn carbon đến khả năng tổng hợp chất kháng nấm Pythium sp. của chủng xạ khuẩn A25.*

Chúng tôi tiến hành nuôi chủng xạ khuẩn A25 trong môi trường A-H4 với nguồn nitrogen là bột đậu tương và thay thế C tổng số lần lượt bằng tinh bột tan, sucrose, maltose, glucose, ri đường với lượng tương đương. Kết quả được thể hiện ở hình 3.5.



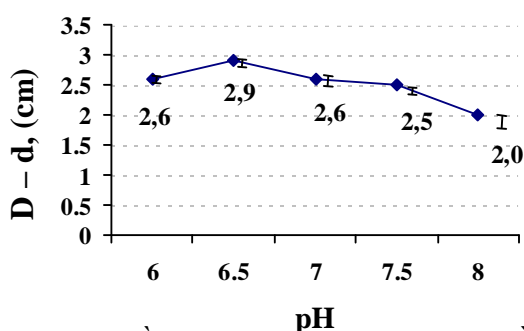
**Nguồn Carbon**

**Hình 3.5.** *Biểu đồ ảnh hưởng của nguồn carbon lên khả năng tổng hợp chất kháng nấm Pythium sp. của chủng xạ khuẩn A25*

Từ kết quả trên cho thấy, chủng xạ khuẩn A25 có khả năng sinh trưởng, phát triển và tổng hợp chất kháng nấm mạnh ở các nguồn carbon khác nhau. Điều đó cũng giải thích được vì sao xạ khuẩn có khả năng tồn tại ở nhiều môi trường khác nhau. Trong đó, nguồn carbon được chủng xạ khuẩn A25 sử dụng cho việc tổng hợp chất kháng nấm tốt nhất là glucose. Đó cũng là nguồn carbon được chúng tôi lựa chọn cho nghiên cứu tiếp theo.

3.3.4. *Khảo sát ảnh hưởng của pH ban đầu đến khả năng tổng hợp chất kháng nấm Pythium sp. của chủng xạ khuẩn A25*

Kết quả được thể hiện ở hình 3.6

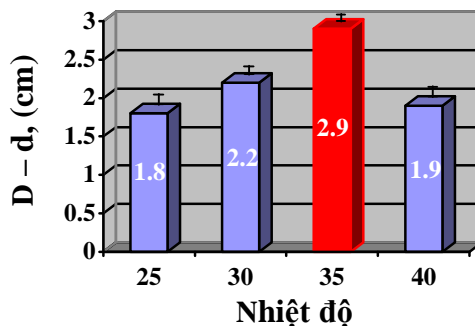


**Hình 3.6.** Đồ thị ảnh hưởng của pH ban đầu của môi trường lên khả năng tổng hợp chất kháng nấm Pythium sp. của chủng xạ khuẩn A25

Từ đồ thị trên cho thấy, chủng xạ khuẩn A25 có thể sinh trưởng, phát triển và tổng hợp chất kháng nấm tốt trong tất cả các pH thí nghiệm. Tuy nhiên, pH để chủng xạ khuẩn A25 sinh chất kháng nấm tốt nhất là 6,5.

3.3.5. *Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng tổng hợp chất kháng nấm Pythium sp. của chủng xạ khuẩn A25.*

Để tìm ra nhiệt độ tối ưu cho việc tổng hợp chất kháng nấm ở chủng xạ khuẩn A25, chúng tôi tiến hành khảo sát ở 4 nhiệt độ: 25°C, 30°C, 35°C, 40°C. Kết quả được thể hiện ở hình 3.7.



**Hình 3.7.** Biểu đồ ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng tổng hợp chất kháng nấm Pythium sp. của chủng xạ khuẩn A25

Từ biểu đồ trên ta thấy, chủng xạ khuẩn A25 sinh tổng hợp chất kháng nấm mạnh ở 30-35°C và nhiệt độ tối ưu là 35°C, thích hợp cho việc ứng dụng trên đồng ruộng.

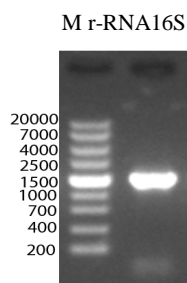
### 3.3. Định danh đến loài chủng xạ khuẩn A25 bằng sinh học phân tử

Trình tự DNA của r-RNA 16S được thu nhận bằng PCR với cặp mồi

27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'

1492R 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT'-3'

Sản phẩm gen mã hóa r-RNA được phân tích trên điện di agarose 1%. Kết quả điện di được thể hiện trên hình 3.8.



**Hình 3.8.** Kết quả điện di sản phẩm gen của chủng xạ khuẩn A25

Trình tự DNA được phân tích và sắp giống, giống cột với các trình tự đã công bố trên NCBI. Kết quả so sánh cho thấy chủng xạ khuẩn A25 có trình tự tương đồng 100% với trình tự gen của chủng xạ khuẩn *Streptomyces pseudogriseolus* về trình tự của vùng 16S-rRNA. Kết quả này cho phép kết luận chủng xạ khuẩn A25 là chủng xạ khuẩn *Streptomyces pseudogriseolus* và chúng tôi gọi chủng này là *S. pseudogriseolus* A25.

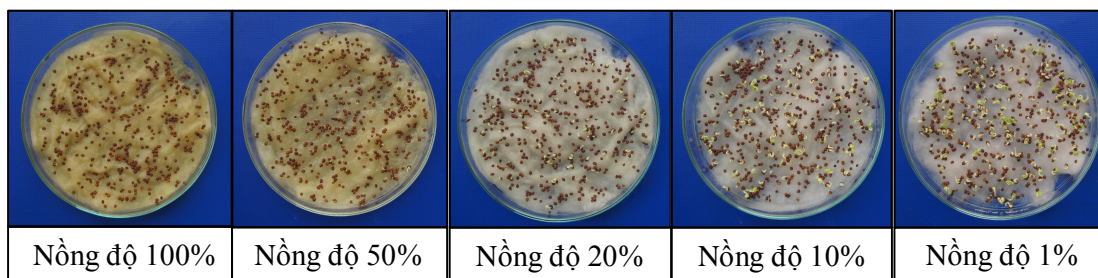
### 3.4. Tách chiết và thu nhận chất kháng nấm

Sau khi nuôi sinh khối, dịch nuôi cấy được thu nhận bằng cách li tâm. Dịch nuôi cấy sau khi loại bỏ sinh khối được tách chiết bằng etyl acetate, tỉ lệ giữa dịch nuôi cấy và dung môi là 1:1. Hỗn hợp dịch nuôi cấy và dung môi được lắc với trong 30 phút ở nhiệt độ phòng.

Sau đó, sử dụng dịch thu nhận được thử hoạt tính kháng nấm *Pythium* sp. bằng phương pháp khoan lỗ thạch.

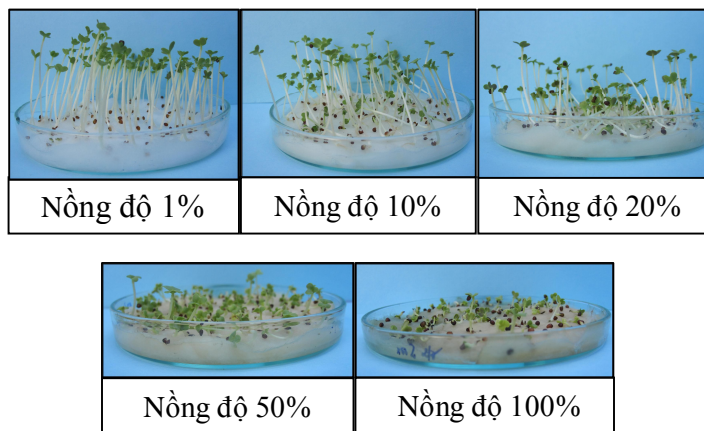
### 3.5. Xác định khả năng ảnh hưởng của dịch kháng nấm đến khả năng nảy mầm của hạt và sự sinh trưởng, phát triển của cây

Dịch kháng nấm sau khi đã được kiểm tra tính kháng nấm được pha loãng đến các nồng độ 1%, 10%, 20%, 50%, 100%. Ngâm hạt cải xanh vào trong vòng 20 phút. Sau đó, lấy hạt ra và để vào đĩa Petri có lót bông thấm nước đã tẩm ướt các dịch có nồng độ tương ứng, hàng ngày bổ sung các dịch pha loãng có nồng độ tương ứng. Quan sát sự nảy mầm của hạt sau 3 ngày và sự sinh trưởng của cây sau 7 ngày. Kết quả được thể hiện trên hình 3.9.



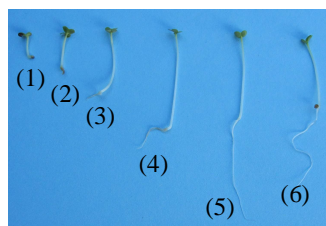
**Hình 3.9.** Ảnh hưởng của nồng độ dịch kháng nấm lên khả năng nảy mầm của hạt cải xanh

Sau 3 ngày gieo hạt, chúng tôi quan sát thấy dịch kháng nấm khi pha loãng có tác dụng kích thích sự nảy mầm của hạt, nồng độ dịch kháng nấm càng cao sự nảy mầm của hạt càng kém. Trong đó, dịch kháng nấm không pha loãng (100%) thì gần như ức chế sự nảy mầm của hạt (hình 3.10).



**Hình 3.10.** Ảnh hưởng của nồng độ dịch kháng nấm lên sự sinh trưởng, phát triển của cây cải xanh

Quan sát sự sinh trưởng của cây sau 7 ngày gieo, chúng tôi nhận thấy dịch kháng nấm cũng có tác dụng kích thích sự sinh trưởng, phát triển của cây con. Khi ở nồng độ thấp, dịch kháng nấm kích thích sự sinh trưởng, phát triển của cây con. Khi ở nồng độ cao, dịch kháng nấm đã kìm hãm sự phát triển của hệ rễ từ đó kìm hãm sự sinh trưởng phát triển của cây con (hình 3.11).



- (1): Nồng độ 100%.
- (2): Nồng độ 50%.
- (3): Nồng độ 20%.
- (4): Nồng độ 10%.
- (5): Nồng độ 1%.
- (6) Nước cất.



**Hình 3.11.** So sánh ảnh hưởng của dịch kháng nấm lên sự phát triển của hệ rễ

#### 4. Kết luận

Sau quá trình nghiên cứu, chúng tôi đã thu được kết quả như sau:

- Đã phân lập được 30 chủng xạ khuẩn từ đất trồng rau màu tại xã Phước Hậu, huyện Cần Giuộc, tỉnh Long An, trong đó có 1 chủng sinh chất kháng nấm *Pythium* sp. mạnh.
- Xác định được điều kiện lên men thích hợp cho việc thu nhận chất kháng nấm *Pythium* sp.: MT A-H4 (glucose 15g, bột đậu tương 15g, NaCl 5g, CaCO<sub>3</sub> 1g, nước cất đủ 1000ml), pH=6,5, nhiệt độ 35°C, nuôi lắc 180 vòng/phút, trong 72 giờ.
- Chủng xạ khuẩn tiềm năng đã được định danh là *Streptomyces pseudogriseolus* bằng phương pháp giải trình tự của vùng 16S-rRNA.
- Ở nồng độ pha loãng (1%), dịch kháng nấm kích thích sự nảy mầm của hạt và sự sinh trưởng, phát triển của cây.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyển, Phạm Văn Ty (2009), *Vi sinh vật học*, Tái bản lần 8, Nxb Giáo dục, tr 39-41, tr 63-71, tr 148-157.
2. Nguyễn Thành Đạt (2007), *Cơ sở sinh học vi sinh vật*, tập 1, Nxb Đại học Sư phạm, tr.102-106.
3. Bùi Thị Việt Hà (2006), *Nghiên cứu xạ khuẩn sinh chất kháng sinh chống nấm gây bệnh thực vật ở Việt Nam*, Luận án Tiến sĩ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, tr 3-48.
4. Lester W. Burgess, Timothy E. Knight, Len Tesoriero, Phan Thúy Hiền (2009), *Cẩm nang đoán bệnh cây trồng ở Việt Nam*, Trung tâm nghiên cứu Nông nghiệp Quốc tế Australia.
5. Trần Thanh Thủy (1999), *Hướng dẫn thực hành vi sinh vật học*, Nxb Giáo dục.
6. Hopwood. D.A. and MJ Merrick (1977), *Genetics of antibiotic production*, Bacteriol. Rev.
7. Waksman, S.A. (1961), *The Actinomycetes. Classification, identification and descriptions of genera and species*, Vol 2, The William & Wilkins Co., Bantimore, USA.

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 21-7-2014; ngày phản biện đánh giá: 15-8-2014;  
ngày chấp nhận đăng: 20-8-2014)

Long An

SĐT: 0122.88.321.88

Email: [trinhthoian@gmail.com](mailto:trinhthoian@gmail.com)

GVHD: TS. Trần Thanh Thủy, Trường ĐHSPTPHCM