

TƯƠNG TÁC GIỮA CHŨNG VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG *SEUDOMONAS MONTEILII* VK58 VỚI CÁC CHŨNG VI KHUẨN PHÂN LẬP TỪ ĐẤT

LÊ NHƯ KIỀU, TRẦN QUANG MINH, PHẠM CÔNG MINH,
NGUYỄN THỊ KIM THOA, NGUYỄN NGỌC CƯỜNG

I. MỞ ĐẦU

Bệnh héo xanh cà chua do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây ra, là một loại bệnh có nguồn gốc từ đất và gây hại rất nghiêm trọng cho sản xuất cà chua, phổ biến nhất ở các vùng nhiệt đới, cận nhiệt đới và nhiệt độ ẩm trên thế giới [1, 4 - 6]. Trong khi đó, việc sử dụng thuốc hoá học trong phòng trừ bệnh này không đem lại hiệu quả như mong muốn [7, 8]. Vì vậy, việc nghiên cứu vi sinh vật đối kháng với vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* là cần thiết, vì chúng rất an toàn với môi trường, có hiệu quả trong phòng trừ vi khuẩn gây bệnh héo xanh, nhưng để sử dụng các chủng vi khuẩn đối kháng có hiệu quả trên đồng ruộng, việc đánh giá sự tương tác giữa các chủng vi khuẩn đối kháng với các chủng vi khuẩn có trong đất là không thể thiếu [9 - 11].

Để giải quyết vấn đề trên, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu tương tác giữa chủng vi khuẩn đối kháng *Pseudomonas monteilii* vk58 với các chủng vi khuẩn phân lập từ đất.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

- Các chủng vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây bệnh héo xanh cà chua và các chủng vi khuẩn đối kháng với chúng do phòng Di truyền và Công nghệ vi sinh - Viện Di truyền Nông nghiệp cung cấp.

- Nguyên liệu: bột cá, bột đậu tương, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, đường, KCl, nước cất.

- Môi trường KB, PDA và một số nguyên liệu phụ khác.

2. Phương pháp nghiên cứu

- Phân lập các chủng vi khuẩn ngoài tự nhiên bằng phương pháp: Lấy 10g đất ở những vùng không xuất hiện bệnh héo xanh, khuấy đều trong 90 ml nước cất khử trùng, lắc 30 phút, để lắng tự nhiên, lấy phần dịch trong để phân lập vi khuẩn trên môi trường PDA [2, 3].

- Đánh giá sự tương tác đối kháng giữa chủng vi khuẩn vk58 với các chủng vi khuẩn được phân lập từ đất bằng cách phối trộn theo từng cặp, nuôi cấy trên môi trường KB và được trộn đều vào đất đã khử trùng, sao cho mật độ cuối của mỗi chủng đạt 10^6 tb/g, để ở nhiệt độ phòng và đánh giá hoạt lực đối kháng của chúng với vi khuẩn *R. solanacearum* sau 2 ngày.

- Chủng vi khuẩn vk58 được đưa vào đất, sau 48 giờ thu mẫu đất và phân lập lại chủng vk58 bằng phương pháp phân lập vi khuẩn truyền thống.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Tương tác giữa chủng vk58 và vi sinh vật khác

Đã thu những mẫu đất từ những vùng không xuất hiện bệnh héo xanh, để phân lập một số chủng vi khuẩn dùng cho thí nghiệm tương tác với chủng vk58.

Từ các mẫu đất đã phân lập được 6 chủng vi khuẩn có hình thái khác nhau, một số chủng có khả năng phân giải lân và cố định nitơ được ký hiệu R₁ ữ R₆. Tất cả các chủng này được phối trộn với chủng vk58 theo từng cặp, nuôi cấy đồng thời trên môi trường KB, để ở nhiệt độ phòng. Quan sát sau 48 giờ cho thấy, chủng vk58 không phát triển được khi phối trộn với chủng R₁ và phát triển yếu khi phối trộn với chủng R₆, trong khi đó lại phát triển rất mạnh khi phối trộn với các chủng còn lại. Kết quả thể hiện trên bảng 3.1.

Kết quả bảng 3.1 đã chứng minh chủng vk58 có thể sinh trưởng và phát triển đồng thời với đa số các chủng vi khuẩn khác ở trong đất (ngoại trừ với chủng R₁). Như vậy, chủng vk58 có khả năng tồn tại/trong tự nhiên, tất nhiên khi môi trường đất có mặt chủng vi khuẩn R₁ thì khả năng này của chủng vk58 sẽ bị giảm dần, điều này cũng chứng minh cho sự giảm dần số lượng cá thể của chủng vk58 trong tự nhiên theo thời gian và ở một số địa điểm nhất định, vì chủng R₁ có thể chỉ có ở nơi này mà không có ở nơi khác.

Bảng 1. Tương tác giữa chủng vk58 với các chủng R₁; R₂; R₃; R₄; R₅ và R₆

Chủng vi khuẩn	Khả năng phát triển của chủng vk58 khi phối trộn với các chủng vi khuẩn R ₁ ÷ R ₆					
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Vk58	-	+++	+++	+++	+++	+

Chú thích: - : không phát triển; +: phát triển yếu; +++: phát triển mạnh.

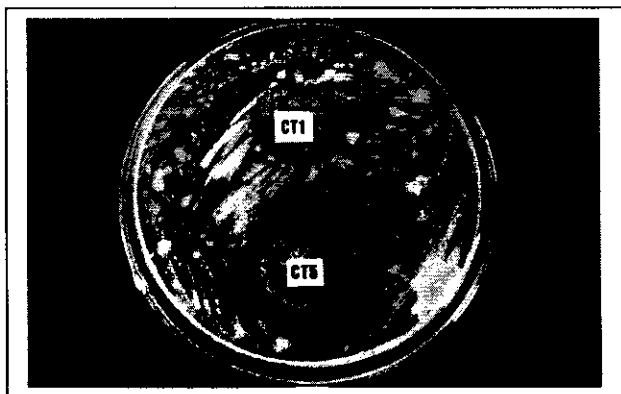
Để đánh giá hoạt lực đối kháng của các tổ hợp chủng vk58 khi phối trộn với các chủng vi khuẩn R₁ ữ R₆, tổ hợp vi khuẩn được phối trộn với đất đã khử trùng, sao cho mỗi loại vi khuẩn có mật độ đạt 10⁶tb/g, 1 g của mỗi tổ hợp được đặt tại một điểm trên thảm vi khuẩn *R. solanacearum* đã được nuôi cấy trên môi trường PDA, để ở nhiệt độ 30°C, sau 48 giờ, quan sát các vòng ức chế tạo ra bởi các tổ hợp. Các công thức và kết quả được minh họa ở bảng 2.

Bảng 2. Khả năng ức chế *R. solanacearum* của các tổ hợp chủng vk58 với các chủng R₁ ÷ R₆

Công thức	Tổ hợp chủng	Kích thước vòng ức chế <i>R. solanacearum</i> (D-d) mm
CT1	vk58 + R ₁	0
CT2	vk58 + R ₂ + R ₃ + R ₄	12
CT3	vk58 + R ₃ + R ₄ + R ₅	11
CT4	vk58 + R ₄ + R ₅ + R ₆	6
CT5	vk58 + R ₂ + R ₃ + R ₆	8
CT6	vk58 + R ₂ + R ₅ + R ₆	4
CT7	vk58 + R ₁ + R ₂ + R ₃ + R ₄ + R ₅ + R ₆	5
CT8	vk58	11

Chú thích: D: đường kính vòng ức chế; d: đường kính khuẩn lạc.

Kết quả bảng 3.2 cho thấy, công thức CT2 và CT3 ức chế *R. solanacearum* mạnh nhất với kích thước vòng ức chế là 11 ữ 12 mm, trong khi đó kết quả này ở công thức CT4, CT5, CT6 và CT7 là 4 ÷ 8 mm, công thức CT8 có vòng ức chế là 11 mm, riêng công thức CT1 không cho kết quả.



Ảnh 1. Hoạt lực đối kháng *R. solanacearum* của 2 tổ hợp vi khuẩn CT1 và CT5

Chú thích: CT1: vk58 + R₁; CT5: vk58 + R₂ + R₃ + R₆.

Bảng 2 đã chứng minh khả năng ức chế *R. solanacearum* của các tổ hợp chủng vk58 với các chủng R1 ữ R6. Với kết quả này, chứng tỏ rằng, chủng vk58 có thể tồn tại và phát triển với đa số các chủng vi khuẩn trong tự nhiên mà vẫn có khả năng ức chế *R. solanacearum* - điều này cũng đồng nghĩa: có thể sử dụng chủng vk58 để sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh héo xanh vi khuẩn ở cà chua.

2. Khả năng thích nghi và tồn tại của chủng vk58 trong tự nhiên

Chủng vk58 được đưa vào đất ruộng trồng cà chua với mật độ xác định, thu mẫu đất sau 3, 7, 15 và 30 ngày, phân lập lại và kiểm tra mật độ tế bào chủng vk58 từ các mẫu đất này nhằm đánh giá động thái sinh trưởng, phát triển và khả năng thích nghi của nó trong điều kiện tự nhiên.

Bảng 3. Biến động số lượng tế bào vk58 ở thí nghiệm trên đồng ruộng

Mẫu	Số tế bào chủng vk58/gam đất tại các thời điểm				
	0 ngày	3 ngày	7 ngày	15 ngày	30 ngày
1	2.10^5	$1,8.10^5$	3.10^3	2.10^3	$1,2.10^2$
2	2.10^5	$1,6.10^5$	3.10^4	$2,5.10^4$	$1,6.10^2$
3	2.10^5	$1,7.10^5$	$2,7.10^5$	2.10^3	$1,4.10^2$

Kết quả trình bày ở bảng 3 cho thấy, mật độ tế bào chủng vk58 ở trong đất có thay đổi theo thời gian với xu hướng giảm dần, từ 2.10^5 tb/gam lúc ban đầu xuống $1,2.10^2$ - $1,6.10^2$ tb/gam sau 30 ngày. Từ kết quả trên có thể nhận xét:

- Với điều kiện ngoài tự nhiên, sự cạnh tranh giữa các loài vi sinh vật với nhau rất mạnh, tạo nên sự thay đổi số lượng cá thể của mỗi loài. Trong thí nghiệm trên, có thể sự cạnh tranh của

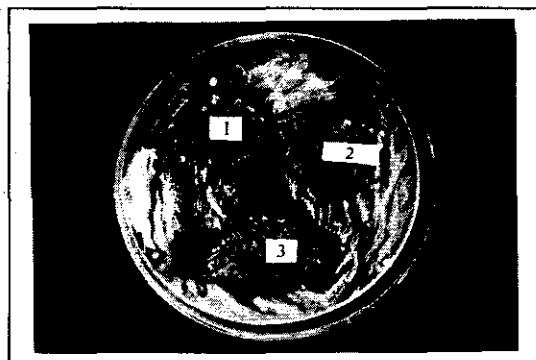
chủng vk58 yếu hơn các loài khác, dẫn đến số lượng của chúng bị giảm dần tại vùng đất thí nghiệm.

- Có thể dinh dưỡng trong điều kiện tự nhiên ở mỗi vùng khác nhau là không đầy đủ hoặc không phù hợp với sinh trưởng và phát triển của chủng vk58.

- Việc sử dụng vi khuẩn đối kháng mà khả năng tồn tại của chúng kéo dài trong 30 ngày ở điều kiện ngoài tự nhiên là điều có thể chấp nhận được.

3. Đánh giá hoạt lực của các tổ hợp chủng vi khuẩn đối kháng

Tất cả 9 chủng vi khuẩn đối kháng đã được phối trộn và đánh giá khả năng đối kháng với *R. solanacearum* nhằm tìm ra tổ hợp các chủng có tính đối kháng cao hơn đơn chủng. Kết quả bảng 4 cho thấy, tất cả các vòng ức chế được tạo ra từ các tổ hợp của các chủng vi khuẩn đối kháng đều nhỏ hơn hoặc chỉ xấp xỉ bằng vòng ức chế của công thức đơn chủng vi khuẩn.



Ảnh 2. Vòng ức chế của các tổ hợp chủng vi khuẩn đối kháng vk58 với vi khuẩn *R. solanacearum*

Chú thích: 1: tổ hợp các chủng vk58 + vk12 + vk54;

2: tổ hợp các chủng vk58 + vk75 + vk76; 3: chủng vk58.

Cụ thể, tất cả các công thức 1 ÷ 9 là tổ hợp của đa chủng (3 chủng) vi khuẩn đối kháng khi có mặt cả các chủng vk58, vk1₁, vk1₄ và vk79 (các chủng có hoạt lực đối kháng cao), nhưng kích thước đường kính vòng ức chế chỉ đạt từ 5 mm ÷ 15 mm, trong khi đó kích thước này của các đơn chủng (một) lại lớn hơn, đặc biệt là các chủng vk58 (23 mm); vk1₁ (18 mm); vk79 (17 mm) và vk75 (21 mm), hình ảnh được minh họa ở ảnh 2.

Như vậy, khi phối trộn các chủng vi khuẩn đối kháng với nhau thì khả năng ức chế *R. solanacearum* của chúng là ít thay đổi. Có thể, khi được phối trộn thì những chủng có tính đối kháng yếu không được thể hiện và đã bị các chủng có tính đối kháng mạnh ức chế hoặc có thể hiện tính đối kháng nhưng không bằng khi chúng được nuôi cấy riêng rẽ. Các chủng vi khuẩn đối kháng đã được phân lập lại từ các tổ hợp trên nhằm xác định các chủng này có đối kháng với nhau không? Kết quả cho thấy, các chủng không đối kháng với nhau vì vẫn phát hiện thấy đầy đủ các chủng trên môi trường nuôi cấy.

Kết hợp với các kết quả nghiên cứu khác cho thấy, chủng vk58 có khả năng ức chế mạnh chủng vi khuẩn *R. solanacearum* kể cả khi ở hỗn hợp và riêng rẽ, nó đáp ứng được tất cả các chỉ tiêu của một chủng vi khuẩn để sản xuất chế phẩm vi khuẩn đối kháng. Vì vậy, chủng vk58 đã được chọn để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo, nhằm đơn giản các bước của thí nghiệm.

Bảng 4. Vòng ức chế *R. solanacearum* của các tổ hợp chủng vi khuẩn đối kháng

Công thức	Tổ hợp chủng	Đường kính vòng ức chế (mm)	Công thức	Chủng	Đường kính vòng ức chế (mm)
CT1	Vk58+vk54+vk12	12	CT10	vk58	23
CT2	vk54+vk12+vk1 ₁	7	CT11	vk54	4
CT3	vk12+vk1 ₁ +vk15	5	CT12	vk12	2
CT4	vk1 ₁ +vk15+vk1 ₄	6	CT13	vk1 ₁	18
CT5	vk15+vk1 ₄ +vk79	15	CT14	vk15	2
CT6	vk1 ₄ +vk79+vk75	11	CT15	vk1 ₄	16
CT7	vk79+vk75+vk76	12	CT16	vk79	17
CT8	vk75+vk76+vk58	3	CT17	vk75	21
CT9	vk76+vk58+vk54	9	CT18	vk76	13

IV. KẾT LUẬN

Các chủng vi khuẩn đối kháng có khả năng tồn tại trong đất mà vẫn ức chế vi khuẩn *Ralstonia solanacearum*.

Ở dạng hỗn hợp các chủng vi khuẩn thể hiện tính đối kháng yếu hơn ở dạng riêng rẽ.

● Chủng vi khuẩn đối kháng vk58 có khả năng ức chế mạnh chủng vi khuẩn *R. solanacearum* kể cả khi ở dạng hỗn hợp và riêng rẽ, nó đáp ứng được tất cả các chỉ tiêu của một chủng vi khuẩn để sản xuất chế phẩm sinh học sử dụng trong phòng trừ bệnh héo xanh cà chua.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. AVRDC Internal Review and Planning Workshop at Asian Vegetable Research and Development Center, Tainan 741, Taiwan. 2000, 5-7 December.
2. I. Buddenhagen and A. Kelman - Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*, Annual Review of Phytopathology (2) (1964) 203-230.
3. Q. Emil, Javier. Foreword - Bacterial wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum* edited by Hayward, A.C. and Hartman G.L. Cab international, 1994, pp. xi.
4. A. C. Hayward - Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*, Journal of Applied Bacteriology 27 (1960) 265-277.
5. A. C. Hayward - The hosts of *Pseudomonas solanacearum* In: Bacterial Wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Ed. Hayward and Hartman. CAB International, UK, 1994, pp. 9-24.
6. A. Kelman - The Bacterial Wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. A literature review and bibliography, North Carolina Agricultural Experimental Station Bulletin 99 (1953) 194.

7. R. J. McLaughlin, L. Sequeira, and D. P. Weingartner - Biocontrol of bacterial wilt of potato with an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* interactions with root-knot nematods, *American Potato Journal* **67** (1990) 93-107.
8. A. Trigalet, P. Frey, and D. Trigalet- Demery - Biological control of Bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: State of the Art and understanding. *Bacterial wilt: The disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*, *Journal of Genral Plant Pathology* **36** (1994) 225-233.
9. A. Trigalet - Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. State of the Art and Understanding, *Journal of Genral Plant Pathology* **68** (2002) 125-231.
10. G. C. Wall and J. L. A Sanchez - Biocontrol Agent for *Pseudomonas solanacearum*, In: Hartman G. I and Hayward A.C (eds) *Bacterial Wilt*. Proceedimngs of an international sympsium, Kaoh-siung, Taiwan, ROC, 28-31 October 1992. *ASIAR Proceeding* **45** (1992) 320-321, ACIAR, Canberra.
11. Wang., J.S. Hou., and B. J. Hu - Studies on the control of bacterial wilt of peannut, *Acta phytophylactica* **10** (1983) 79-84.

SUMMARY

INTERACTION BETWEEN ANTAGONISTIC BACTERIAL ISOLATE *PSEUDOMONAS MONTEILII* VK58 TO BACTERIA ISOLATED FROM SOIL

The use chemical drugs in protect tomato from bacterial wilt disease was not fully effective, so the study microorganisms that can antagonise *Ralstonia solanacearum* - it caused bacterial wilt disease on tomato - is very necessary, because these microorganisms are safe for environment, effect in protect crops from bacterial wilt disease, but to evaluate the interaction between antagonistic bacterial isolate *Pseudomonas monteilii* vk58 to bacteria isolated from soil is needed.

The result have followed

- The *Pseudomonas monteilii* vk58 isolate can resistant in soil during 30 days and inhibit growth of *R. solanacearum*
- Bacterial isolates showed the antagonistic ability in the mix form to be weaker the single form.
- The *Pseudomonas monteilii* vk58 isolate can *R. solanacearum* strong inhibit both forms the mix and single, that can satisfy the demands of a bacterial isolate to produce the biological product to use in protect tomato from bacterial wilt disease.

These results suggested that the biological product was produced from antagonistic bacteria that can be used widely in the agricultural, to create a green, clean environment, haven't got chemical drugs.

Địa chỉ:

Nhận bài ngày 7 tháng 6 năm 2006

Bộ môn Vi sinh vật, Viện Thổ nhưỡng Nông hóa.