

ĐẶC ĐIỂM PHÂN LOẠI VÀ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG VI KHUẨN GÂY BỆNH HÉO XANH *RALSTONIA SOLANACEARUM* CỦA 2 CHỦNG *BACILLUS* ĐKB1 VÀ *PSEUDOMONAS* ĐKP1 PHÂN LẬP TỪ ĐẤT TRỒNG ĐẬU

Lê Thị Thanh Thủy^{1*}, Lê Như Kiều¹, Nguyễn Phương Nhu², Lại Thủy Hiền²

¹Viện Thổ nhưỡng Nông hóa, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Bệnh héo xanh vi khuẩn do *Ralstonia solanacearum* gây hại rất lớn trên cây trồng như lạc, cà chua, khoai tây, ớt tại các vùng trồng cây màu trong cả nước. Việc tuyển chọn các chủng vi sinh vật có hoạt tính đối kháng vi khuẩn *R. solanacearum* cao và ổn định nhằm ứng dụng sản xuất chế phẩm vi sinh phòng chống bệnh héo xanh cây trồng là vấn đề cấp thiết hiện nay. Từ đất trồng đậu và trồng cà đã phân lập được 2 chủng vi khuẩn ĐKB1 và ĐKP1 có khả năng phòng chống bệnh héo xanh do *Ralstonia solanacearum* gây ra trên cây lạc và cây ớt. Đặc điểm Khuẩn lạc, hình thái tế bào dưới kính hiển vi điện tử, khả năng sinh trưởng và tạo hoạt tính đối kháng trên các loại môi trường dinh dưỡng, kết chuẩn sinh hoá API (BioMérieux, Pháp) và phân tích trình tự gen 16S rRNA đã được thực hiện với 2 chủng lựa chọn. Kết quả phân loại bằng kit API 50CHB, API 20NE kết hợp trình tự gen 16S rRNA cho thấy chủng vi khuẩn ĐKB1 thuộc loài *Bacillus subtilis* với độ tương đồng 99 %; chủng ĐKP1 thuộc loài *Pseudomonas fluorescens* cũng với độ tương đồng 99 %. Ngoài ra, hai chủng vi khuẩn này đều có khả năng sinh siderophore và chủng ĐKB1 còn có khả năng phân giải chitin, sinh tổng hợp chất kích thích sinh trưởng thực vật indole-3-acetic acid (IAA) Kết quả thu được chứng tỏ 2 chủng vi khuẩn đối kháng có tiềm năng ứng dụng trong phòng chống bệnh héo xanh do vi khuẩn bại cây trồng.

Từ khóa: *Ralstonia solanacearum*, bệnh héo xanh, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, vi khuẩn đối kháng, phân loại

MỞ ĐẦU

Từ những năm 80 của thế kỷ XIX, bệnh héo xanh do vi khuẩn *Ralstonia solanacearum* gây hại nhiều loại cây thuộc họ cà đã được phát hiện. Đây là bệnh phổ biến, nguy hiểm và phân bố ở nhiều nước trên thế giới, đặc biệt ở vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Vi khuẩn này còn ký sinh trên 200 loài thực vật khác nhau, phổ biến nhất là trên cây chuối, thuốc lá, cây lạc (Butranu et al., 1995; Swanson et al., 2005; Monther et al., 2010). Hiện nay, biện pháp phòng trừ bệnh héo xanh vi khuẩn hiệu quả và an toàn nhất là sử dụng các chế phẩm sinh học chứa các chủng vi sinh vật đối kháng có khả năng ức chế, tiêu diệt hoặc làm suy giảm tính độc của vi sinh vật gây bệnh, từ đó kích thích cây sinh trưởng, phát triển và tăng năng suất cây trồng; Chính vì khả năng biến đổi tính độc của các chủng gây bệnh *R. solanacearum* và hạn chế của thuốc bảo vệ thực vật đối với loại vi khuẩn này, nên biện pháp phòng trừ sinh học bệnh héo xanh vi khuẩn bằng các vi sinh vật đối kháng được lựa chọn là rất khả quan và cần thiết để thay thế các loại thuốc hóa học (Aspiras et al., 1985; Thanh et al., 2010; Abdwarehouse et al., 2012; Lei et al., 2013). Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu phân loại các chủng vi khuẩn đối kháng tiềm năng, để làm cơ sở đánh giá mức độ an toàn sinh học của chúng và khả năng ứng dụng các chủng vi khuẩn đối kháng làm nguyên liệu sản xuất chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh héo xanh cây trồng, góp phần nâng cao năng suất và chất lượng nông sản.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chủng vi khuẩn ĐKB1 và ĐKP1 được phân lập từ đất trồng đậu và trồng cà tại Mê Linh, Hà Nội.

Các môi trường nuôi cấy vi khuẩn: (i) Môi trường MPA (g/l): Cao thịt 5,0; peptone 10,0; NaCl 5,0; glucose 2,0; thạch 20,0; nước cất 1000 ml; pH 7,8. (ii) Môi trường King B (g/l): Peptone 20; glycerin 10 ml; K₂HPO₄ 1,5; MgSO₄.7H₂O 1,5; nước cất 1000 ml; pH 7,0. (iii) Môi trường SPA (g/l): Saccharose 20, peptone 5, K₂HPO₄ 0,5, MgSO₄.7H₂O 0,25, nước cất 1000 ml; pH 7,0. (iv) Môi trường SX1 (g/l): đậu trắng 100g; K₂HPO₄ 0,5; MgSO₄.7H₂O 0,5; KH₂PO₄ 0,5; (NH₄)₂SO₄ 1,0; CaCO₃ 1,0; Glucose 5,0; nước cất 1000 ml; pH 7,0. (v) Môi trường SX2 (g/l): Rỉ đường 10; đậu 50; CaCO₃ 1,0; Cao nấm men 5,0; nước cất 1000 ml; pH 7,0. (vi) Môi trường SX3 (g/l): Rỉ đường 10; CaCO₃ 1,0; Cao nấm men 5,0; (NH₄)₂SO₄ 1,0; nước cất 1000 ml; pH 7,0. (vii) Môi trường SX4 (g/l): MgSO₄ 20; CaCO₃ 1,0; Cao nấm men 10,0; (NH₄)₂SO₄ 5,0; CaCO₃ 1,0; nước cất 1000 ml; pH 7,0. (viii) Môi trường thạch - chitin (g/l): chitin 1; thạch 12; nước cất 1000 ml.

Phương pháp

Đặc điểm sinh học và định tên 2 chủng ĐKB1 & ĐKP1 đến loài bằng kit chuẩn kết hợp trình tự gen 16S rRNA

Nghiên cứu đặc điểm hình thái chủng ĐKB1 và ĐKP1 theo khóa phân loại vi khuẩn Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Staley et al., 1989). Quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi điện tử quét SEM S4800 (Nhật Bản).

Định tên chủng ĐKB1 bằng kit API50 CHB và ĐKP1 bằng API 20 NE, đọc kết quả sau 48 giờ, so sánh với ngân hàng cơ sở dữ liệu API profile index bằng phần mềm API-WEB để xác định tên loài.

Giải trình tự gene 16S rRNA: DNA của chủng ĐKB1 và ĐKP1 được tách theo phương pháp mô tả bởi Sambrook và Russell (1989). Gen 16S rRNA được khuếch đại bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi GF1 5'-TAACACATGCAAGTCGAACG-3' và GR1 5'-GGTGTGACGGCGGTGTGA-3'. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%, tinh sạch bằng bộ kit PureLinkTM - DNA Purification (Invitrogen) và giải trình tự trên máy đọc trình tự ABI PRISM3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) tại Viện Công nghệ sinh học Viện Hàn Lâm KH&CN Việt Nam so sánh trình tự tương ứng trên cơ sở dữ liệu GenBank.

Xác định hoạt tính sinh học

Xác định khả năng sinh chất kích thích sinh trưởng thực vật (IAA) bằng phương pháp Salkowski cải tiến (Misra và Kaushik, 1989): Đo độ hấp thụ trên máy Spectrophotometre SP 30 UV, bước sóng 530 nm, xác định hoạt tính sinh IAA của các chủng dựa vào đồ thị chuẩn.

Xác định khả năng phân giải chitin bằng phương pháp khuếch tán trên môi trường thạch-chitin: Các chủng vi sinh vật sau khi nuôi lắc trong bình tam giác 48 giờ được li tâm loại bỏ sinh khối, nhờ 0,1 ml dịch vào lỗ thạch đã được đục sẵn trên các đĩa Petri chứa môi trường thạch chitin. Giữ đĩa thạch trong tủ ẩm 30 °C, sau 24 giờ lấy ra và dùng dung dịch lugol tráng bề mặt. Hoạt tính sinh học được xác định bằng kích thước vòng phân giải (vòng tròn trong suốt bao quanh lỗ thạch, mm). Kích thước vòng phân giải được tính bằng hiệu số giữa đường kính vòng tròn trong suốt (D) và đường kính lỗ thạch (d).

Xác định hoạt tính đối kháng với vi khuẩn *R.solanacearum*:

Tiến hành nuôi các chủng vi khuẩn đối kháng ĐKB1 và ĐKP1 trên các môi trường (King B, SPA, SX1, SX2, SX3, SX4), sau 48 giờ nuôi cấy xác định mật độ tế bào vi khuẩn (CFU/ml) và đánh giá hoạt tính đối kháng với vi khuẩn *R. solanacearum*

Hoạt tính đối kháng được thể hiện thông qua vòng vô khuẩn (vòng tròn trong suốt bao quanh lỗ thạch chứa dịch vi sinh vật đối kháng), được tính bằng trung bình cộng giá trị kích thước vòng vô khuẩn của 3 lần lặp lại biểu thị theo công thức: Kích thước vòng vô khuẩn (mm) = D - d. Trong đó: D là đường kính vòng vô khuẩn; d là đường kính lỗ thạch (10TCN 714 - 2006).

Xác định một số đặc điểm sinh lý, sinh hoá của các chủng vi khuẩn đối kháng theo phương pháp của N.W. Schaad (2002).

Xác định khả năng sinh siderophore theo phương pháp của Adriane M. F. Milagres và cộng sự (1996).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm sinh học và phân loại của 2 chủng vi khuẩn ĐKB1 và ĐKP1

Các chủng vi khuẩn đối kháng ĐKB1 và ĐKP1 có khả năng sinh trưởng nhanh, có hoạt tính cao và ổn định trên môi trường King B. Nuôi cấy trên môi trường này ở nhiệt độ 30°C, sau 24 - 48 giờ; chủng ĐKB1 sinh trưởng tốt tạo khuẩn lạc hình tròn, mép có răng cưa, màu trắng sữa, bề mặt nhẵn nhọc, mặt dưới có màu trắng sữa (Hình 1A). Chủng ĐKB1 không tiết sắc tố trên môi trường nuôi, sinh bào tử trên môi trường MPA bổ sung MnSO₄. Quan sát hình thái tế bào dưới kính hiển vi điện tử cho thấy đây là chủng vi khuẩn ĐKB1 có dạng hình que dài, đứng riêng rẽ và có chu mao (Hình 1C). Kết quả nhuộm Gram cho thấy đây là chủng vi khuẩn Gram (+). Chủng ĐKP1 thuộc loại Gram (-), trên môi trường King B chủng sinh trưởng tạo khuẩn lạc tròn, màu vàng, bề mặt nhẵn; tế bào hình que, không sinh bào tử, có khả năng di động bằng tiêm mao đơn ở cực (Hình 1B và 1D). Một số đặc điểm của 2 chủng vi khuẩn đối kháng *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh được trình bày trong các Bảng 1 và 2.

Bảng 1. Một số đặc điểm sinh trưởng và hoạt tính sinh học của các chủng vi khuẩn ĐKB1 và ĐKP1

Ký hiệu chủng	Nguồn phân lập	Hoạt tính sinh học	Đơn vị hoạt tính	Mức hoạt tính	Đặc điểm sinh trưởng		
					Môi trường nuôi cấy	pH thích hợp	Nhiệt độ thích hợp (°C)
ĐKB1	Đất trồng cây họ cà	Đối kháng <i>R. solanacearum</i> Sinh IAA Phân giải kitin Sinh siderophore	Đường kính vòng ức chế (D-d, mm)	15,0	King B	6,5 - 7,0	25 - 30
			Hàm lượng IAA (µg/ml) sau 4 ngày	170			
			Đường kính vòng phân giải (D-d, mm)	2,1	Gram dương, tạo bào tử Oxidase (-)		
ĐKP1	Đất trồng cây họ đậu	Đối kháng <i>R. solanacearum</i> Sinh siderophore	Đường kính vòng ức chế (D-d, mm)	16,0	KingB/SPA	6,5 - 7,0	25 - 30
			+		Gram âm, không tạo bào tử Oxidase (+)		

Chú thích: *+* có khả năng



Hình 1: Hình thái chủng vi khuẩn ĐKB1 và ĐKP1; A và B: Khuẩn lạc chủng ĐKB1 và ĐKP1 trên môi trường King B; C và D: Tế bào của chủng ĐKB1 và ĐKP1 trên kính HVĐT quét (B: x 10.000; C: x 25.000 lần).

Khả năng đối kháng *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh cây lạc của chủng ĐKB1 và ĐKP1

Tiến hành nuôi 2 chủng vi khuẩn đối kháng ĐKB1 và ĐKP1 trên các môi trường (King B, SPA, SX1, SX2, SX3, SX4), sau 48 giờ xác định mật độ tế bào vi khuẩn (CFU/ml) và đánh giá hoạt tính sinh học. Kết quả bảng 2 cho thấy, các chủng nghiên cứu đều phát triển tốt trong môi trường đặc hiệu cho từng chủng và các môi trường có nguồn gốc tự nhiên (nước chiết đậu, rỉ đường). Trên môi trường SX1 và 2, mật độ tế bào cao hoặc tương đương khi nuôi cấy các chủng trên môi trường đặc hiệu King B (cho *Bacillus subtilis*), SPA (cho *Pseudomonas fluorescens*) và cao hơn các môi trường khác. Kết quả tương tự khi so sánh hoạt tính sinh học của 2 chủng trên các môi trường nuôi cấy khác nhau

Bảng 2. Hoạt tính đối kháng *R. solanacearum* gây bệnh héo xanh cây lạc của chủng ĐKB1 và ĐKP1 trên các môi trường dinh dưỡng khác nhau

. Kí hiệu chủng	Mật độ tế bào (CFU/ml) & vòng ức chế <i>R. solanacearum</i> (Đ - đ, mm)					
	King B	SPA	SX1	SX2	SX3	SX4
ĐKB1	2,02 x 10 ⁸	1,04 x 10 ⁷	2,04 x 10 ⁸	3,34 x 10 ⁸	4,75 x 10 ⁷	4,10 x 10 ⁷
	15,0	14,5	15,0	15,0	14,0	14,0
ĐKP1	3,03 x 10 ⁸	4,16 x 10 ⁸	1,56 x 10 ⁸	5,12 x 10 ⁸	4,32 x 10 ⁷	6,52 x 10 ⁷
	16,0	16,0	15,5	16,0	15,5	15,0

Phân loại bằng kit chuẩn sinh hóa và phân tích trình tự gen 16S rDNA

Kết quả phân loại bằng kit chuẩn sinh hóa API 50 CHB và API 20 NE được trình bày trên bảng 3 và 4. Bảng 3 cho thấy chủng ĐKB1 có khả năng sử dụng nhiều nguồn cacbon khác nhau. So sánh kết quả với ngân hàng cơ sở dữ liệu bằng phần mềm API - WEB cho kết quả chủng ĐKB1 thuộc *Bacillus subtilis* với độ tương đồng 98%. Tương tự kết quả thu được trên bảng 4 cho thấy chủng ĐKP1 thuộc loài *Pseudomonas fluorescens*, với độ tương đồng 99%.

Bảng 3. Khả năng sử dụng nguồn cacbon của chủng ĐKB1 theo kit chuẩn API 50CHB

STT	Nguồn cacbon	Sinh trưởng	STT	Nguồn cacbon	Sinh trưởng
1	Glycerol	±	26	Salicin	+
2	Erythritol	-	27	Cellobiose	+
3	D-Arabinose	-	28	Maltose	+
4	L-Arabinose	±	29	Lactose	+
5	Ribose	±	30	Melibiose	+
6	D-Xylose	±	31	Saccharose	+
7	L-Xylose	-	32	Trehalose	+
8	Adonitol	-	33	Inulin	-
9	β-Methyl-D-Glucoside	-	34	Melezitose	-
10	Gelactose	-	35	Raffinose	+
11	Glucose	+	36	Tinh bột	+
12	Fructose	+	37	Glycogen	+
13	Mannose	-	38	Xylitol	-
14	Sorbose	-	39	Gentobiose	+
15	Rhamnose	-	40	D-Turanose	+
16	Dulcitol	-	41	D-Lyxose	-
17	Inositol	±	42	D-Tagatose	-
18	Mannitol	±	43	D-Fucose	-
19	Sorbitol	-	44	L-Fucose	-
20	α-Methyl-D-Mannoside	-	45	D-Arabitol	-
21	α-Methyl-D-Glucoside	+	46	L-Arabitol	-
22	N-Acetyl Glucosamine	+	47	Glucosate	-
23	Amygdalin	±	48	2-Keto-Gluconate	-
24	Arbutin	+	49	5-Keto-Gluconate	-
25	Esculin	+	50	Đổi chứng	-

Ghi chú: - : Không sinh trưởng; ± : Không rõ ràng; + : Có sinh trưởng

Bảng 4. Kết quả thử kit API 20 NE của chủng ĐKP1

STT	Chất phản ứng	Phản ứng/ Enzyme	Kết quả	STT	Chất phản ứng	Phản ứng/ Enzyme	Kết quả
1	Potassium nitrate	Khử nitrate thành nitrit	+	11	D-mannose	±	+
2	L-Tryptophane	Tạo indol	+	12	D-mannitol	±	+
3	D-Glucose	Lên men	+	13	N-acetyl-glucosamine	±	-
4	L-arginine	Arginine dihydrolase	+	14	D-maltose	±	+
5	Urea	Urease	-	15	Potassium gluconate	±	+
6	Esculin ferric citrate	Thủy phân	+	16	Capric acid	±	+
7	Gelatin	Thủy phân	-	17	Adipic acid	±	-
8	4-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside	β-galactosidase	+	18	Malic acid	±	+
9	D-glucose		+	19	Trisodium	±	+
10	L-arabinose		-	20	Phenylacetic acid	±	+

Ghi chú: + : Có phản ứng (dương tính); - : Không phản ứng (âm tính)

So sánh trình tự gene 16S rRNA * của chủng vi khuẩn ĐKB1 và ĐKP1 với các trình tự tương ứng trên ngân hàng dữ liệu cơ sở GenBank (Bảng 5) cho thấy, chúng vi khuẩn ĐKB1 có độ tương đồng cao (99 %) với loài *Bacillus subtilis* và chủng vi khuẩn ĐKP1 có độ tương đồng cao (99 %) với loài *Pseudomonas fluorescens*.

*Trình tự 16S ribosomal RNA của chủng vi khuẩn *Pseudomonas fluorescens*

```

1 catcgactcg accggtgaag aggtgcttgc accctctgag agcgccggac gggtagactaa
61 tgcctcagaa tctgctcggg agtgggggat aacgctcggg aacggacgct aataccgatc
121 acgtctccag ggagaagaac ggggaccctc gggcctctgc ctctcagatg agcctaaagt
181 ggtatagata gttgggtagg taatggctca ccaagccgac gatccgtaac tggctctgaa
241 ggtgatcagc tcaccactga actgagacac ggtccagact cctacgggag cctacgggag
301 ggaatattgg acaatggggc aaagcctgat ccagccatgc cggctgtgtg aagaagttct
361 tccgattgta aagcacttta agtggggagg aagggeagtt acctaaatg acctaaatg
421 gacgttaccg acagaataag caccggctaa ctctgtgcca gcagccgcgg taatacagag
481 ggtcgaagcg ttaatggaa ttaactgggc taagacggc gtagggtgtt cttaagtctg
541 gatgtgaaay ccccgggctc accctgggaa ctgcattcaa aactgtcgag cttagagatg
601 gttagaggtg gtggaatttc ctctgttagc gtgaaatgg tagitaagg aggaacaccc
661 agtggcgaag gacaccacct ggaactgabc tgacactgag gtccgaagc gtggggagca
721 aacagattta gataccctgg taqtccacgc cylaaccgat gtcactagc cgttgggggc
781 cttgagctct tagtgggcga gctaacgat taagttagc gectggggag tacggccgca
841 agtctaaaac tcaaatgaat tgacgggggc ccgacaaagc ggtggagcat gtggtttaa
901 togaagcaac gcgaagaacc ttaccaggcc ttgacctcaa atgaacttc cagagatgga
961 ttgttgcctt cggggcaatt gagacaggtg ctgcatggc gtctcagct cgttcagctg
1021 gatgttgggt taagtccctt aacgagcgca accctgtctc ttagttaaca gccctcaatg
1081 gtggcgactc taagafact ccgggtgaca aacggaggga agtggggat agtccaatg
1141 caatcagacc etbaagcctt gggctacaca cgtgctaca tggctggtag agaggttgc
1201 caagccgaga ggtggagcta atcccaasaa accogatgca gtcgggatcg acagctgtgc
1261 ctcgactgag tgaagtggga atcgttagta atccogactc agaatgtgc ggtgaatagc
1321 ttcccgccct ttgtacacac ccgcccgtac accatggagg tgggttgacc caagaatgag
1381 tagctaaccc ttcgggggga cgttaccacg gtgatt
    
```

*Trình tự 16S ribosomal RNA của chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis*

```

1 atcagagoga cagatggggc ctgctccct gatgttagc ggagcagggc gactaaacac
61 tgggtaacct gccgttaaga ctgggataac tccgggaaac cgggataat accggatggc
121 tctttgaacc cctcgtgtca aacttaaaag gtggcttcgg ctaccactta cagatggacc
181 cgcggcggat tagctagtty gtgagttaac ggtctaccaa gcaaaagatg cgttagccgc
241 ctgagagggat gatcggccac actggggacty agcaacggcc cagactctca cgggagggc
301 cagtgaqjaa tcttccgcaa tggagaaag tctgaccagc caacggccgc gtagctgga
361 aagttttggg atcgttaaac ttgtttgta ggaagaaca agtaccctt gnatggggc
421 gacccttagc ggtacctaac cagaaagcc cgtcttaact cgtgcocga ccgggttla
481 taagtgggtg gaaagcgttg tccggaata ttggcgttaa agggctgca ggcctttct
541 caactctgat gtyaaagccc ccggctcaac cggggagggt catggaaac cttggaaact
601 gaatccagaa gaggcagctg gaattccagc ttatdcctgt aaatcgttag agatgtggg
661 gaaccaccgt ggcgaaggcc actctctggt ctgtaactga cgtgaaagc cgaagacgtc
721 gggagcgaac aggattagat accctggtag tccacggcgt aacgctgag cctcaagtgt
781 tagggggttt cccgcccttt agtgtctgac ctacggctc aagcactccg cctggcaact
841 accgctgcaa gactgaacct caaaggaat gacgggggc ccgcaaaagc gtcggcaact
901 tggtttaatt cgaagcaagc cgaagaacct taccaggtct tgacatctct cctgactctc
961 agatagagga cgtccctctc gggggcagag tgacaggtg tgcatggtt tcttcaactc
1021 gctcgtgtag atgttgggtt aactcccgca atgagcgcga atgcatgca cttgttccg
1081 cttcagcttg gcaatttcta agtgactgc cgtgacaaa cccgaggaag gtcgggatga
1141 cgtcaaaatc tcatgcccc ttatgacctg gatcacacgc tgtcaaatg gacagacaa
1201 agcgcgcgca aaccggcggc ttaagccaat gcccaaatc tgttctcagt tctgtccca
1261 ctctgcaact cgaactcgtg aagctggaa tctcaqtaat ccggatcag catccggcg
1321 tgaatacgtt cccgggcctt gtaacaccgc cccgtccaac caagagatt tgaatacccc
1381 gaagctgggt agttaacct ttaggagccc cctcgggaag cctggacaga gttatgggg
1441 gaatcgtaac aa
    
```

Bảng 5. Kết quả so sánh trình tự gen 16S rRNA của chủng ĐKB1 và ĐKP1 với gen tương ứng của các chủng vi khuẩn được đăng ký trên GenBank

So sánh trình tự gen 16S rDNA của chủng ĐKB1			So sánh trình tự gen 16S rRNA của chủng ĐKP1		
Trình tự gen mã hóa 16S rRNA của chủng vi khuẩn được so sánh	Mã số đăng ký trên GenBank	Độ tương đồng (%)	Trình tự gen mã hóa 16S rRNA của chủng vi khuẩn được so sánh	Mã số đăng ký trên GenBank	Độ tương đồng (%)
Chủng <i>Bacillus subtilis</i> ACL12	JX042461.1	99	Chủng <i>Pseudomonas fluorescens</i> NBAll GR-3 ARS-3	HM439968.1	100
Chủng <i>Bacillus subtilis</i> B4	JX123135.1	99	Chủng <i>Pseudomonas fluorescens</i> YPB 9	JQ308613.1	99
Chủng <i>Bacillus subtilis</i> AP254	JX 094283.1	99	Chủng <i>Pseudomonas fluorescens</i> HXM-4-4	JN130387.1	99
Chủng <i>Bacillus subtilis</i> YMP8	JQ308588.1	99	Chủng <i>Pseudomonas fluorescens</i> Pa 7-12	Eu854430.1	99
Chủng <i>Bacillus subtilis</i> BY-3	KC 961634.1	99	Chủng <i>Pseudomonas fluorescens</i> J13	JX090148.1	99
Chủng <i>Bacillus subtilis</i> GTG57	JX845577.1	99	Chủng <i>Pseudomonas</i> sp. U1PP1	JQ308607	99

KẾT LUẬN

Hai chủng vi khuẩn phân lập từ đất trồng đậu ĐKB1 và chủng ĐKP1 có hoạt tính đối kháng vi khuẩn héo xanh *R. solanacearum* cao và ổn định, sinh trưởng nhanh trên môi trường King B và các môi trường có nguồn gốc tự nhiên như nước chiết đậu, ri đường. Ngoài ra, chủng ĐKB1 có khả năng phân giải chitin, sinh tổng hợp chất kích thích sinh trưởng thực vật IAA, cả 2 chủng ĐKB1 và ĐKP1 đều có khả năng sinh siderophore.

Dựa vào đặc điểm sinh học, kit chuẩn API 50CHB & API 20NE, kết hợp với trình tự gen 16S rRNA, có thể xếp chủng ĐKB1 vào loài *B. subtilis* và chủng ĐKP1 thuộc loài *P. fluorescens*, với độ tương đồng 99%.

Lời cảm ơn

Công trình được hỗ trợ kinh phí từ đề tài Khoa học công nghệ cấp thành phố Hà Nội Mã số: 01C-05/05-2009-2, giai đoạn 2009-2010 "Nghiên cứu, sản xuất và ứng dụng chế phẩm vi sinh để thay thế phân bón hóa học và phòng chống một số bệnh cho cây họ đậu"; sự cộng tác của Viện Công nghệ sinh học và Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aspiras RB, Cruz AR de la (1985). Potential biological control of bacterial wilt in tomato and potato with *Bacillus polymyxa* FUE6 and *Pseudomonas fluorescens*, *Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Proceedings of an International Workshop held at PCARRD, Los Banos, Philippines, 8-10 October* (Ed. by Perley, G.J.). *ACIAR Proceedings* 13: 89-92.
- Abdwareth A, Almonaefy, G. L., Xie, W. X., Tianf, L. H., Xu1 (2012). G. Q. Zhang1 and Muhammad Ibrahim. Characterization and evaluation of *Bacillus* isolates for their potential plant growth and biocontrol activities against tomato bacterial wilt *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(26), pp. 7193-7201, 5 April, 2012.
- Buraru W, Yinasawapun S and Srithongchai W (1995). Status of groundnut bacterial wilt research in Thailand, *Groundnut bacterial wilt in ASIA. Proceeding of the third working group meeting 4-5 Jul*. Wuhan, China (Mohan V.K and Mc. Donald D., eds), ICRISAT publication: 129-133.
- Lai Chun-xia, Feng Yun-li, Xj Jia-qin, Cao Yng-hong, Li Ping, Ma Li, Mo Ming-he, Fang Dun-huang, Yang Fa-xiang, 2013. Phylogenetic diversity of the antagonistic endophytic bacteria of tobacco against *Ralstonia solanacearum* and their chemotax analysis. *Journal of Yunnan University (Natural Sciences)*(STMOPEN.net on Tuesday, April 9, 2013).
- Miera S and Kaushik BD (1989). Growth promoting substances of cyanobacteria. I. Vitamins and their influence on rice plant. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.* 55: 295 - 300.
- Manther Mohamad Tahat and Kamaruzaman Sijam, 2010. *Ralstonia solanacearum*: The bacterial wilt causal agent. *Asia Journal of Plant Sciences* 9 (4): 385 - 393.
- Staley JT, Bryant MP, Pfennig N, Holt JG (1989). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Waverly Press, New York, Vol 2.
- Swanson J.K., Yao J., Tans-Kersten J., Allan C., 2005. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium. *Phytopathology* 95: 136-143.

CLASSIFICATION CHARACTERISTICS AND ANTAGONISTIC ACTIVITIES AGAINST BACTERIAL WILT CAUSED BY *RALSTONIA SOLANACEARUM* OF *BACILLUS* ĐKB1 AND *PSEUDOMONAS* ĐKP1 ISOLATED FROM LEGUME SOIL

Le Thi Thanh Thuy¹, Le Nhu Kleu¹, Nguyen Phuong Nhue², Lai Thuy Hien²

¹Soils and Fertilizers Research Institute, Vietnamese Academy of Agricultural Sciences

²Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

The field crops in cultivated zone of Vietnam have to face with important issue of bacterial wilt disease caused by *R. solanacearum* on crops such as groundnut, tomato, potato, pepper. Selection of microorganisms that have ability of highest antagonist to *R. solanacearum* and stability to apply for manufacture of microbial product are an imperative need in the present. Two bacterial strains ĐKB1 and ĐKP1 that have ability to inhibit *R. solanacearum* that caused the bacterial wilt diseases on groundnut and pepper are isolated from legum and solanacearum soils. Characteristics of colony and cell of bacteria under scanning electron microscope, growth and make antagonistic activity on different nutrient media, API kit (BioMérieux, French) and 16S rRNA analysis are implemented with two above strains. Results of classification by API 50CHB, API 20NE kit combined with analysis of gene 16S rRNA of these strain showed ĐKB1 has belong to *Bacillus subtilis* with high identity 99% as well as ĐKP1 has belong to *Pseudomonas fluorescens* with high identity 99%. In addition, both of ĐKB1 and ĐKP1 strains has maked siderophore and ĐKB1 had ability to decomposition of chitin (biosynthesis of enzyme chitinase) biosynthesize IAA (itidole -3-acetic-acid). Thus, illustration that two antagonistic bacterial strains have potential in biocontrol of bacterial wilt.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, antagonistic bacteria, bacterial wilt, characterization, classification

*Author for correspondence: Mobile: 0973276166; email: lethuyvasi@yahoo.com