

SỰ TÁC ĐỘNG TƯƠNG TÁC GIỮA CHỦNG *BACILLUS* SP. TD67 VÀ NẤM GÂY BỆNH CÂY *FUSARIUM OXYSPORUM* TRONG ĐIỀU KIỆN *IN VITRO*

Trần Phương Thảo, Nguyễn Minh Anh, Nguyễn Ngọc Dũng

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Trong môi trường khoai tây lỏng - môi trường thường được sử dụng để thu nhận sinh khối sợi nấm *Fusarium oxysporum*, chủng *Bacillus* sp. TD67 thể hiện sự sinh trưởng tương đương sự sinh trưởng trong môi trường LB, tuy pha tiềm sinh kéo dài hơn khoảng 1 h; cạnh tranh có thể đạt $2,0 \cdot 10^9$ tế bào/ml. Khi cùng sống chung trong môi trường khoai tây lỏng, sự sinh trưởng của chủng TD67 và nấm *F. oxysporum* trong môi trường quan hệ tỷ lệ giống khác nhau đã được xác định. Đối với chủng TD67, trong điều kiện với tỷ lệ mật độ giống $1,0 \cdot 10^4$ tế bào vi khuẩn/ml (tương đương 0,001% v/v) và 0,0010 mg sinh khối nấm khô/ml (tương đương 0,1% v/v), sinh trưởng của nó hầu như không chịu sự tác động bởi sự có mặt của nấm *F. oxysporum*, đạt $1,0 \cdot 10^9$ tế bào/ml. Riêng với mật độ dịch nuôi ban đầu có giá trị $1,0 \cdot 10^2$ tế bào/ml, đường cong sinh trưởng của chủng TD67 vẫn thể hiện bình thường, tuy mật độ cạnh tranh của nó chỉ đạt khoảng $1,0 \cdot 10^8$ tế bào/ml. Trong khi đó, sự sinh trưởng của nấm *F. oxysporum* thể hiện bị ức chế khá rõ bởi sự có mặt của chủng TD67: trong điều kiện tỷ lệ 0,1% (v/v) giống nấm và $1,0 \cdot 10^2$ tế bào TD67/ml (tương đương 0,00001% v/v), sự sinh trưởng của nấm luôn thấp hơn so với đối chứng và bắt đầu biểu hiện bị giảm theo thời gian, ngay khi chủng TD67 có mặt với mật độ $1,0 \cdot 10^4$ tế bào/ml. Hình thái sợi nấm dưới kính hiển vi quang học thể hiện khá rõ sự tác động của chủng TD67: khi không có mặt vi khuẩn, sau 48 h *F. oxysporum* hầu như chỉ tồn tại ở dạng sợi; khi có mặt vi khuẩn với mật độ $1,0 \cdot 10^2$ tế bào/ml, nấm tồn tại chủ yếu ở dạng bào tử, số ít ở dạng sợi, nhưng sợi nấm biểu hiện không bình thường, bị xẹp lại; và với mật độ $1,0 \cdot 10^8$ tế bào/ml, sợi nấm và có thể cả bào tử đã bị tổn thương. Dịch lọc tế bào của chủng TD67 được nuôi trong môi trường LB có hoạt tính kháng sinh đối với nấm *F. oxysporum*, và bền vững với proteinase K, với pH 10,0 và với nhiệt độ 100°C trong 10 phút.

Từ khóa: *Bacillus* sp. TD67, *Fusarium oxysporum*, kháng sinh, sinh trưởng, tác động tương tác, ức chế sinh trưởng

ĐẶT VẤN ĐỀ

Mối quan hệ tương tác có đặc tính đối kháng giữa vi sinh vật và nấm gây bệnh cây trồng là một vấn đề được nhiều nhà vi sinh vật học quan tâm nghiên cứu và cho rằng vi sinh vật có thể là những tác nhân sinh học tiềm năng trong việc phòng chống nấm gây bệnh cây. Tuy vậy, số sản phẩm có thể thương mại hóa trên lĩnh vực này còn ít, mặc dù có gia tăng trong thời gian vừa qua. Một trong những nguyên nhân được đề cập tới cho rằng đó là do mối quan hệ tương tác giữa chủng vi sinh vật chọn lọc và chủng nấm bệnh cây trong các điều kiện khác nhau chưa được làm sáng tỏ, đặc biệt trong điều kiện tự nhiên trên đồng ruộng.

Chủng *Bacillus* sp. TD67 là một chủng có khả năng phân hủy sợi nấm *Phytophthora* sp. gây bệnh thối nõn dưa và một số loài nấm gây bệnh cây trồng khác (Nguyễn Ngọc Dũng *et al.*, 2005). Chính vì

những đặc tính như vậy, nó đã được lựa chọn làm một thành phần của chế phẩm Antiforhis có tác dụng phòng chống bệnh thối cổ rễ và thối rễ do nấm *Fusarium oxysporum* và *Rhizoctonia solani* gây nên.

Trong bài báo này, mối quan hệ tương tác giữa chủng *Bacillus* sp. TD67 và nấm *Fusarium oxysporum* trong điều kiện *in vitro* được theo dõi và đánh giá nhằm thiết lập cơ sở cho nghiên cứu sự tương tác giữa chúng với nhau trong điều kiện tự nhiên.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng giống vi sinh vật

Chủng *Bacillus* sp. TD67 là chủng chọn lọc có khả năng phân hủy sợi nấm *F. oxysporum*, *R. solani*, *Aspergillus niger*, *A. flavus* và *Phytophthora* sp. gây

thời nồn dừa do Phòng Vi sinh vật đất, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam phân lập từ đất trồng dừa (Nguyễn Ngọc Dũng *et al.*, 2005).

Nấm *F. oxysporum* do Trung tâm Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội cung cấp.

Các môi trường LB, khoai tây PD bổ sung saccharose và môi trường khoáng theo Schlegel đã được sử dụng.

Sinh trưởng của chủng TD67 trong môi trường lỏng được xác định bằng phương pháp đo mật độ quang của dịch nuôi ở bước sóng 580 nm trên máy đo quang phổ kế Pharmacia Biotech-NovaspecII, Phòng Quang sinh học, Viện Công nghệ sinh học và bằng phương pháp đếm số đơn vị khuẩn lạc trên môi trường LB thạch rắn.

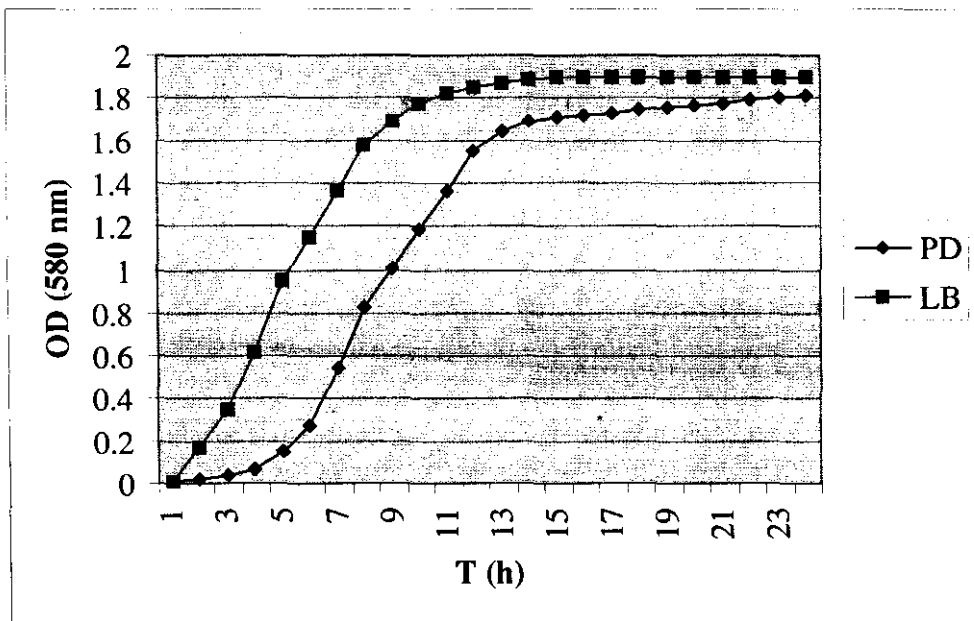
Trong một dịch nuôi hỗn hợp vi khuẩn và nấm, sinh trưởng của chủng TD67 được xác định bằng phương pháp đếm số đơn vị khuẩn lạc trên môi trường LB thạch rắn; đối với nấm *F. oxysporum*, phương pháp xác định sinh khối nấm khô bằng cân phân tích Sartorius BP221S (Đức) đã được sử dụng.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Sinh trưởng của chủng TD67 trong môi trường khoai tây lỏng

Môi trường khoai tây bổ sung đường thường được dùng để nuôi cấy nấm *F. oxysporum* và nhiều loài nấm khác. Chính vì vậy, môi trường này đã được lựa chọn để tiếp cận vấn đề, phải chăng trong một môi trường tương đối tối ưu cho sinh trưởng của vi nấm sự có mặt của chủng TD67 sẽ tác động như thế nào lên sự sinh trưởng của nấm *F. oxysporum*.

Sau khi được cấy 1% (v/v) dịch nhân giống chủng TD67 lắc 200 vòng/phút qua đêm ở nhiệt độ 30°C trong môi trường khoáng Schlegel vào 100 ml môi trường khoai tây lỏng hoặc 100 ml môi trường LB lỏng trong bình tam giác thể tích 500 ml, dịch tế bào được nuôi trong các điều kiện như vừa nêu và sau mỗi 1 h nuôi, mật độ tế bào dịch nuôi được xác định bằng phương pháp xác định độ đục ở bước sóng 580 nm. Mỗi thí nghiệm được lập lại 3 lần. Căn cứ vào số đo thu được, đường cong sinh trưởng của chủng TD67 trong môi trường khoai tây lỏng đã được thiết lập (Hình 1).



Hình 1. Đường cong sinh trưởng của TD67 trong môi trường PD và LB.

Sự diễn biến của đường cong sinh trưởng trong điều kiện đã nêu cho thấy, trong môi trường LB lỏng chủng TD67 chỉ phải trải qua pha tiềm sinh kéo dài khoảng 2 h, rồi sau đó chuyển sang pha sinh trưởng

cơ số mũ kéo dài khoảng hơn 10 h, tiếp đó tốc độ sinh trưởng giảm dần và chuyển sang pha cân bằng sau khoảng 20 h nuôi. Nếu so sánh với điều kiện sử dụng môi trường LB làm môi trường dinh dưỡng thì

tốc độ sinh trưởng của chủng TD67 trong môi trường khoai tây lỏng có phần yếu hơn, pha tiềm sinh kéo dài khoảng xấp xỉ 3 h, nghĩa là sự sinh trưởng phát triển của nó bước sang giai đoạn cơ sở muộn hơn 1 h, nhưng dịch nuôi đều đạt xấp xỉ $1,0 \cdot 10^9$ tế bào/ml sau 24 h nuôi.

Sự sinh trưởng của chủng TD67 và nấm *F. oxysporum* trong cùng môi trường khoai tây lỏng

Sự sinh trưởng của chủng TD67 được đánh giá thông qua xác định mật độ tế bào dịch nuôi bằng phương pháp đếm số khuẩn lạc trên môi trường LB rắn. Sự sinh trưởng của nấm *F. oxysporum* được xác định thông qua xác định sự tích lũy sinh khối trong dịch nuôi. 5 ml dịch nuôi được lọc qua giấy thấm chày chày (và dịch lỏng được kiểm tra dưới kính hiển vi, bảo đảm không có bào tử xuất hiện), sau đấy được rửa 3 lần với nước vô trùng, tiếp đó được làm khô ở nhiệt độ 100°C cho đến khi trọng lượng sinh khối không đổi, cuối cùng được cân trên cân phân tích.

Chủng TD67 được nhân giống trong môi trường Schlegel lỏng, lắc qua đêm ở nhiệt độ 30°C, sau đó mật độ tế bào dịch nhân giống được xác định bằng phương pháp đếm số khuẩn lạc trên đĩa môi trường LB thạch rắn; nấm *F. oxysporum* được nhân giống trong môi trường khoai tây lỏng, lắc ở 30°C trong 96 h và sau đó cân xác định sinh khối nấm.

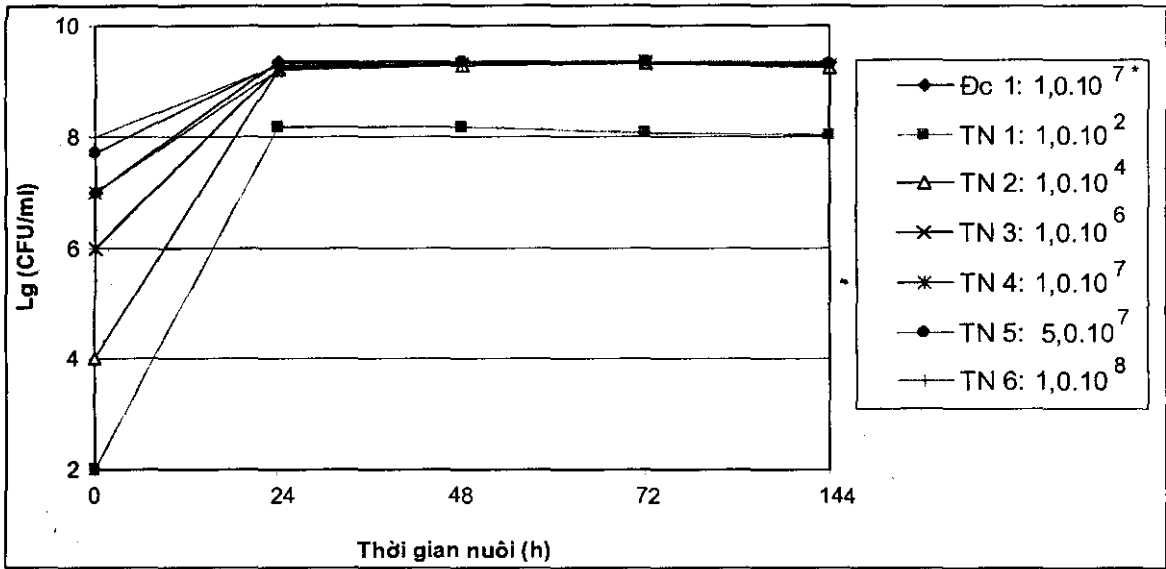
Các dịch nuôi hỗn hợp chứa chủng TD67 với các mật độ giống ban đầu khoảng $1,0 \cdot 10^2$; $1,0 \cdot 10^4$; $1,0 \cdot 10^6$; $1,0 \cdot 10^7$; $5 \cdot 10^7$ và $1,0 \cdot 10^8$ tế bào/ml, tương đương 0,00001%; 0,001%, 0,1%; 1,0%; 5,0% và 10,0% dịch giống được cấy và nấm với mật độ giống ban đầu như nhau (0,0010 mg khô/ml, tương đương 0,1% v/v). Kết quả được trình bày trong hình 2 và hình 3. Số liệu cho thấy, trong 24 h đầu tiên sống chung, ở tất cả các tỷ lệ giống được thiết lập, chủng TD67 và nấm đều thể hiện gia tốc sinh trưởng với giá trị dương tính khá rõ, mặc dù có sự khác nhau tùy theo điều kiện. Trong điều kiện có mặt của *F. oxysporum* với mật độ 0,0010 mg khô trong 1 ml dịch nuôi, sinh trưởng của chủng TD67 vẫn diễn ra bình thường ở tất cả các mật độ giống ban đầu được thí nghiệm, đều đạt mật độ cực đại sau 24 h sống chung, tương đương với điều kiện không có mặt nấm; trong trường hợp với mật độ giống ban đầu 10^2 tế bào/ml dịch nuôi, giá trị mật độ cực đại thấp hơn so với các trường hợp còn lại và có biểu hiện giảm theo thời gian. Về nguyên nhân, có thể là do điều kiện dinh dưỡng không còn đủ cho nó, bởi đã bị nấm sử dụng, hoặc do sản phẩm trao đổi chất ngoại bào của nấm được tích lũy quá cao không có lợi cho vi khuẩn.

Các đường cong sinh trưởng của nấm trong điều kiện chủng TD67 tồn tại với mật độ vi khuẩn ban đầu khác nhau trong dịch nuôi ở hình 3 là sự phản chiếu sự tác động khá rõ của chủng TD67 lên sinh trưởng của nấm *F. oxysporum*. Trong điều kiện đã nêu, với mật độ ban đầu $1,0 \cdot 10^2$ tế bào TD67/ml (0,00001% v/v), sự sinh trưởng của nấm đã bị ức chế; với mật độ $1,0 \cdot 10^4$ tế bào/ml sự tích lũy sinh khối nấm trong dịch nuôi có biểu hiện giảm dần sau 24 h sống chung, và mạnh nhất trong dịch nuôi hỗn hợp với $1,0 \cdot 10^8$ tế bào trong 1 ml dịch nuôi.

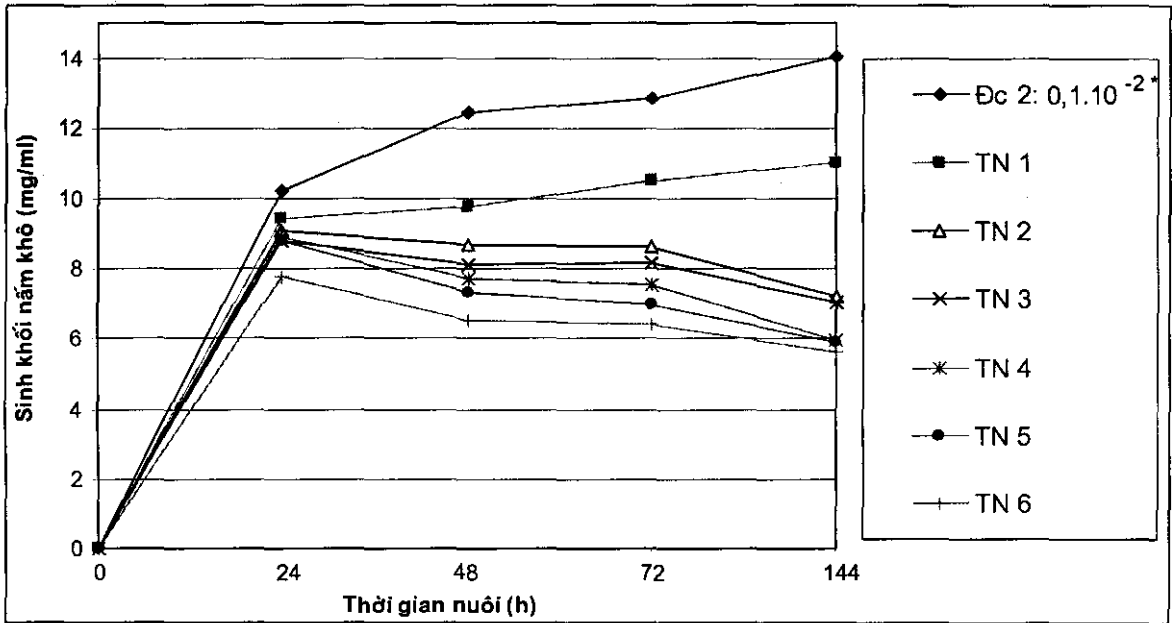
Hình thái sợi nấm trong dịch nuôi hỗn hợp với chủng TD67 đã được quan sát và chụp ảnh dưới kính hiển vi quang học; kết quả được thể hiện ở hình 4. Hình ảnh cho thấy, ngay khi có mặt chủng TD67 trong dịch nuôi chung với mật độ giống ban đầu $1,0 \cdot 10^2$ tế bào/ml, sợi nấm đã bị biến dạng khá nhiều về hình thái và ít gặp, tổ chức bào tử xuất hiện là chủ yếu, còn trong trường hợp với mật độ $1,0 \cdot 10^8$ tế bào TD67 trong 1 ml dịch nuôi hỗn hợp, sợi nấm và bào tử biểu hiện bị tổn thương, phân cắt. Rất có thể là trong trường hợp này, enzyme thủy phân ngoại bào từ chủng TD67 đã được tích lũy trong môi trường khi môi trường trở nên cạn kiệt cơ chất và đã tác động lên sợi hoặc bào tử nấm.

Ảnh hưởng của dịch nuôi lọc sạch tế bào TD67 lên sinh trưởng của *F. oxysporum*

Thí nghiệm ảnh hưởng của dịch nuôi lọc sạch tế bào TD67 lên sinh trưởng của *F. oxysporum* được tiến hành theo phương pháp của Huber (1987). Trước hết, chủng TD67 được nuôi lắc 200 vòng/phút trong môi trường LB lỏng ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 72 h. Sau đó, dịch nuôi được lọc qua màng lọc vi khuẩn Sartorius. Môi trường khoai tây rắn được chuẩn bị làm sao sau khi 5 ml dịch nuôi lọc sạch tế bào được bổ sung vào 15 ml môi trường khoai tây gốc mà vẫn bảo đảm giá trị dinh dưỡng và độ rắn. Tùy theo mục đích thí nghiệm, dịch lọc tế bào được xử lý nhiệt độ 100°C trong 10 phút, hoặc với dung dịch NaOH 1 N để có giá trị pH 10,0 và xử lý với protease K ở 37°C trong 7 h. 5 ml môi trường LB lỏng được bổ sung vào 15 ml môi trường khoai tây gốc được sử dụng làm đối chứng; riêng ở thí nghiệm ảnh hưởng dịch lọc sạch tế bào TD67 lên sinh trưởng của *F. oxysporum*, môi trường đối chứng được xử lý với NaOH 1 N sao cho có giá trị pH 10. Mỗi thí nghiệm 3 lần lặp lại và tỷ lệ sinh trưởng của nấm được xác định theo diện tích khuẩn lạc nấm so với đối chứng sau 6 ngày ủ ở 30°C. Kết quả được trình bày trong bảng 1.



Hình 2. Sinh trưởng của TD67 với lượng giống khác nhau khi có mặt nấm. *: Chỉ có mặt vi khuẩn, không có nấm.



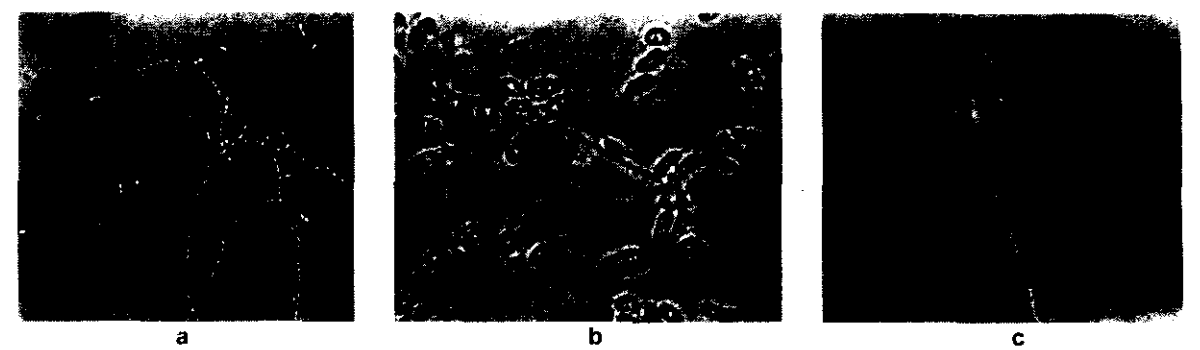
Hình 3. Sự biến động sinh khối nấm với lượng giống TD67 khác nhau. *: Chỉ có mặt nấm (mg sinh khối khô/ml), không có vi khuẩn.

Trước hết, số liệu trong bảng 1 cho thấy, dịch lọc sạch tế bào chủng TD67 sau 3 ngày nuôi trong môi trường LB chưa qua xử lý với bất kỳ yếu tố nào có tác dụng ức chế sinh trưởng của nấm, nó có thể làm cho sinh trưởng của nấm chỉ còn đạt 77% so với đối chứng. Trong trường hợp này, sự ức chế sinh trưởng

của *F. oxysporum* do sản phẩm trao đổi chất được chủng TD67 bài tiết ra môi trường ngoại bào có đặc tính kháng sinh. Người ta cũng đã chứng minh được rằng, các enzyme ngoại bào, chẳng hạn như chitinase, glucanase, lipase hay enzyme thủy phân protein có tác dụng ức chế sinh trưởng của nấm.

Số liệu trong bảng 1 cũng cho thấy, chất ức chế sinh trưởng của nấm *F. oxysporum* có trong dịch nuôi lọc sạch tế bào chủng TD67 thể hiện khá bền vững với nhiệt độ cao; mặc dù trong điều kiện đã nêu, sinh trưởng của nấm đã tăng khoảng 10% so với dịch lọc chưa qua xử lý nhiệt. Dịch lọc sạch tế bào thể hiện bền vững hoạt lực ức chế sinh trưởng của nấm *F. oxysporum* khi chịu tác động của dung dịch NaOH 1 N ở giá trị pH 10,0 và enzyme Proteinase K. Chủng *B. subtilis* PY-1 có khả năng đối kháng mạnh chống lại nhiều loài nấm bệnh cây trong điều kiện *in vitro* và dịch tế bào của chủng này thể hiện bền vững với nhiệt độ rất cao, 121°C,

15 phút và với phổ pH rộng từ 5,0 tới 13,0 (Gong *et al.*, 2006). Bằng các kỹ thuật tách chiết và làm sạch, nhóm tác giả này đã thu nhận được chất iturin A từ dịch nuôi của chủng PY-1; iturin là một lipopeptide. Ngoài iturin A, macrolactin A là sản phẩm trao đổi chất có hoạt tính kháng nấm được tách chiết từ chủng *Bacillus* sp. sunhua (Han *et al.*, 2005). *B. pumilus* (MSH) cho một chất ức chế nảy mầm của bào tử và sinh trưởng của sợi nấm *Mucor* và *Aspergillus*; chất này có thể là một peptide, bền vững với sự tác động của Pronase, chỉ mất một phần hoạt lực khi được xử lý với chloroform và ở pH 5,6 (Bottone, Peluso, 2002).



Hình 4. Sợi nấm khi sống chung với TD67 trong PD sau 48 h. a. sợi nấm đối chứng, b. sợi nấm trong dịch nuôi có mật độ ban đầu $1,0.10^2$; c. sợi nấm trong dịch nuôi có mật độ ban đầu $1,0.10^8$.

Bảng 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ cao, NaOH 1 N và Proteinase K lên hoạt lực ức chế sinh trưởng nấm *F. oxysporum* của dịch nuôi lọc sạch tế bào TD67.

STT	Thí nghiệm	Mức độ sinh trưởng (%)
1	PDA	100
2	PDA + dịch nuôi lọc sạch tế bào	77
3	PDA + dịch nuôi lọc sạch tế bào qua xử lý 100 ^o C, 10 phút	87
4	PDA + dịch nuôi lọc sạch tế bào qua xử lý NaOH 1N, pH 10,0	69
5	PDA + dịch nuôi lọc sạch tế bào qua xử lý Proteinase K	77

KẾT LUẬN

Mối quan hệ tương tác giữa chủng *Bacillus* sp. TD67 và nấm *F. oxysporum* gây bệnh thối rễ cây trồng trong môi trường khoai tây lỏng - môi trường thường được sử dụng để nuôi loài nấm này, đã được xác định. Trong môi trường này, với sự có mặt của nấm *F. oxysporum*, sinh trưởng của chủng TD67 hầu như diễn ra bình thường, dịch nuôi đạt mật độ tương

đương khi nó sinh trưởng trong môi trường LB lỏng. Với sự có mặt của chủng TD67, ngay ở mật độ $1,0.10^2$ tế bào/ml, sinh trưởng của nấm *F. oxysporum* đã bị ức chế; với mật độ vi khuẩn cao hơn, sự sinh trưởng của nấm bị ức chế mạnh hơn sau 24 h sống chung. Hình thái sợi nấm cũng bị biến đổi khi có mặt của chủng TD67 trong môi trường. Dịch lọc tế bào chủng TD67 có hoạt tính kháng sinh đối với *F. oxysporum* và khá bền vững với proteinase K, pH

10,0 và nhiệt độ cao.

Lời cảm ơn: Công trình này được tài trợ bởi Chương trình Nghiên cứu Cơ bản trong Khoa học Tự nhiên, tài khóa 2006.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bottone EJ, Peluso RW (2003) Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an antifungal compound that is active against Mucoraceae and *Aspergillus* species: preliminary report. *J Med Microbiol* 52: 69-74.

Gong M, Wang JD, Zhang J, Yang H, Lu XF, Pei Y,

Cheng JQ (2006) Study of the antifungal ability of *Bacillus subtilis* strain PY-1 *in vitro* and identification of its antifungal substance (Iturin A). *Acta Biochim Biophys Sin* 38: 233-240.

Huber J, Bochow H, Jung H (1987) Selection und biologische Herstellung von Kulturloesungen mikrobieller Antagonisten zur Unterdrueckung phytopathogener Bodenpilze. *J Bas Microbiol* 27: 497-503.

Nguyễn Ngọc Dũng, Nguyễn Minh Anh, Lê Mạnh Cường (2005) Xác định đặc điểm của chủng *Bacillus* sp. TD67. *Tuyển tập Báo cáo Hội nghị Toàn quốc: Những vấn đề Nghiên cứu Cơ bản trong Khoa học Sự sống*: 106-108.

INTERACTION OF THE *BACILLUS* SP. TD67 STRAIN WITH THE PLANT PATHOGEN *FUSARIUM OXYSPORUM* IN *IN VITRO* CONDITION

Tran Phuong Thao, Nguyen Minh Anh, Nguyen Ngoc Dung*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

In the fluid potato medium, a nutrient medium used to obtain the high *F. oxysporum* biomass, the *Bacillus* sp. TD67 strain appeared to have an equivalent growth as it was held in LB medium, its culture could reach a density of $2,0 \cdot 10^9$ cells/ml, although its lag phase took one hour longer than in LB. As they were held to be common living in the fluid potato medium, the growth of the TD67 strain and of the *F. oxysporum* with the different ratios of the inoculation was followed. For the TD67 strain, in condition of the inoculation with the density $1,0 \cdot 10^4$ bacterial cells/ml (equivalent 0.001% v/v) and with 0.0010 mg of dried *F. oxysporum* biomass/ml of culture (equivalent 0.1% v/v), its growth appeared almost to be not affected by the presence of *F. oxysporum* and could get a density of $1,0 \cdot 10^9$ cells/ml. In the case of the inoculation with $1,0 \cdot 10^2$ cells/ml, the growth curve of the TD67 strain showed to be not changed, nevertheless its culture only could reach a density of $1,0 \cdot 10^8$ cells/ml. But the growth of *F. oxysporum* appeared to be rather strongly suppressed by the presence of the TD67 strain, event at $1,0 \cdot 10^2$ cells/ml and at the time point of 24 hours common living with $1,0 \cdot 10^4$ bacterial cells/ml, the accumulation of the fungal biomass began to be decreased. A morphological change of the fungal mycellia was observed under the light microscope: as the TD67 strain was not present in the culture medium, the *F. oxysporum* mycellia looked to be normal; but in the occurrence with $1,0 \cdot 10^2$ of TD67 cells/ml, the *F. oxysporum* occurred mostly in the spore form, some else in mycel form, but those mycellia looked not to be normal, and with the inoculation of $1,0 \cdot 10^8$ bacterial cells/ml, both mycellia and spores showed to be some destroyed. The in LB cultured TD67 filtrate possessed the antibiotic activity against the growth of *F. oxysporum*, and showed that it is rather stable with the proteinase K, pH 10,0 and high temperature 100°C for 10 minutes.

Keywords: Antibiotic, *Bacillus* sp. TD 67, *Fusarium oxysporum*, interaction, growth, growth suppression

* Author for correspondence: Tel: 84-4-7565633; Fax: 84-4-8363144; E-mail: ngocdungibt@yahoo.com