

ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM CỦA DỊCH CHIẾT NGOẠI BÀO CHỨNG *Serratia marcescens* DT3 TRONG CÁC MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY KHÁC NHAU

EVALUATING ANTIFUNGAL ACTIVITY OF THE EXTRACELLULAR EXTRACTS FROM *Serratia marcescens* DT3 STRAIN IN THE DIFFERENT OF MEDIUMS

Trần Thị Thùy Linh¹, Nguyễn Quang Huy², Nguyễn Sỹ Lê Thanh¹, Đỗ Thị Tuyên*¹

¹ Viện Công nghệ Sinh học

² Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQGHN

*Author for correspondence: Email: dtuyen@ibt.ac.vn; ĐT: 84-4-3756-8260

ABSTRACT

The *Serratia marcescens* DT3 strain, which produced a lot of compounds with antibacterial, antifungal, anti-inflammatory such as prodigiosin, chitinase, was isolated from soil samples in Vietnam. In this paper, we studied antifungal activity from extracellular extracts of *S. marcescens* DT3 strain in different of mediums. The results showed that the extracellular extracts from *S. marcescens* DT3 strain in different of mediums including NYD, LB, NA and 2% soybean mediums was inhibited the growth and development of *R. solani* and *F. oxysporum* at concentration from 20% to 50%. Especially, the *S.marcescens* DT3 strain growing in LB medium had the strong antifungal activity. The extracellular extracts at concentration of 30% was inhibited 32% the growth and development of *R. solani* and at concentration up to 50%, was inhibited about 81%, relatively. It showed inhibitory activity of 71% for the *F. oxyporum*. At concentration of 30% extracellular extracts, the growth of sclerotium were also strongly inhibited and at concentration of 50% was almost completely suppressed. The effect of cell filtrate on the growing of *R. solani* may also depend on the age of mycelium. *R. solani* growing on PDA using concentration of 50% extracellular extracts was inability of germinated sclerotia.

Keywords: antifungal, *Fusarium oxyporum*, *Rhizoctonia solani*, *Serratia marcescens* DT3.

GIỚI THIỆU

Trong nông nghiệp các bệnh cây có liên quan đến nấm chiếm một tỷ lệ rất lớn. Hiện nay, các biện pháp hóa học vẫn được sử dụng rất phổ biến và rộng rãi với một lượng rất lớn vì nó mang lại hiệu quả phòng trừ cao, rẻ tiền. Tuy nhiên bên cạnh đó, nó cũng gây ra những tác hại nghiêm trọng đến môi trường và sức khỏe con người, tạo ra sự kháng thuốc với nhiều loại bệnh hại trên cây. Vì vậy gây nên nhiều khó khăn trong công tác phòng trừ bệnh. Chính vì thế việc sử dụng các chế phẩm sinh học để phòng trừ các bệnh cây trồng do vi sinh vật gây ra đang là xu hướng chủ yếu mà rất nhiều nước đang hướng tới để giảm thiểu tác hại do các biện pháp hóa học gây ra.

Trên thế giới đã có nhiều các nghiên cứu về các chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất kháng nấm bệnh hại cây trồng như *Bacillus*, *Serratia*, *Trichoderma*, *Pseudomonas*,... Trong đó vi khuẩn *Serratia* theo nhiều tài liệu công bố đã được biết đến với vai trò quan trọng trong việc kiểm soát bệnh cây trồng. Chúng có khả năng sinh tổng hợp nhiều hợp chất kháng nấm khác nhau như các chất chlorinated macrolide, haterumalide NA, B

and NE pyrrolnitrin, prodigiosin, chitinase, β -1,3 glucanases. Một số chủng *Serratia* đã được ứng dụng để kiểm soát bệnh cây trồng do nấm gây ra, chúng có phổ biến trong đất, chịu được nhiệt độ cao, sinh trưởng nhanh trong môi trường lỏng. Kamensky và cộng sự (2002) đã nghiên cứu và phân lập được chủng *S. plymuthica* từ mẫu đất trồng dưa và đưa ra được các thử nghiệm về hoạt tính kháng nấm *Phytopathogenic*. Wang và cộng sự (2013) đã công bố việc sử dụng chủng *Serratia marcescens* được phân lập từ vỏ lạc để sản xuất ra các chất có hoạt tính ức chế sự tăng trưởng của sợi nấm *A. parasiticus* và aflatoxin. Ở Việt Nam những nghiên cứu về khả năng sinh tổng hợp về hoạt chất kháng nấm từ chủng *S. marcescens* còn hạn chế. Năm 2015, Vũ Trọng Lượng và cộng sự đã nghiên cứu về hoạt tính kháng nấm của chủng *S. marcescens* M6 phân lập ở mẫu đất, trong khi dịch chiết ức ngoại bào chỉ ức chế nấm được 20- 30% khả năng sinh trưởng và phát triển của nấm *F. oxysporum* và *R. solani*, còn hoạt chất prodigiosin tinh sạch tách ra từ chủng này đã ức chế lên đến hơn 75% ở nồng độ hoạt chất đạt 40 μ g/ml.

Trong bài báo này bước đầu chúng tôi đánh giá hoạt tính kháng nấm từ dịch chiết ngoại bào từ chủng *S. marcescens* DT3 ở trong các môi trường khác nhau từ đó tìm ra được môi trường phù hợp để nâng cao khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất thứ cấp có hoạt tính kháng nấm *F. oxysporum* và *R. solani*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng vi khuẩn *Serratia marcescens* DT3 do phòng Công nghệ sinh học enzyme, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

Chủng nấm bệnh *F. oxysporum* và *R. solani* từ bộ sưu tập giống của phòng bệnh cây, Viện Bảo vệ thực vật, Từ Liêm, Hà Nội cung cấp.

Hóa chất

Các hóa chất sử dụng phòng thí nghiệm đều ở dạng tinh khiết. Các hóa chất như: D-glucose (Merck, Đức), màng lọc minisart (Biotech, Việt Nam), agar (Việt Nam), cao nấm men, pepton được mua từ ICN (Mỹ). Một số nguyên liệu dùng thay thế nguồn carbon và nito như tinh bột khoai tây được mua ở thị trường (Việt Nam).

Môi trường nuôi cấy

Môi trường PDA: 200 g dịch chiết khoai tây, 2 g glucose, 2 g agar.

Môi trường NYD (g/l): 8 g cao thịt, 5 g cao nấm men, 10 g D-glucose.

Môi trường LB (g/l): 10 g pepton, 10 g NaCl, 5 g cao nấm men.

Môi trường NA (g/l): 5 g pepton, 5 g NaCl, 3 g cao nấm men.

Môi trường bột đậu tương (g/l): 20 g bột đậu tương, 10 g NaCl.

Nuôi cấy vi sinh vật

Chủng giống vi khuẩn *S. marcescens* DT3 được hoạt hóa từ tủ lạnh -84°C , được nuôi vào bình 50 ml chứa 10 ml môi trường LB trong 12 giờ. Chủng giống được nuôi chuyển vào bình lên men lớn các bình 500 ml chứa 100 ml các môi trường lên men khác nhau như NYD, LB, NA và bột đậu tương 2% với tỷ lệ 3-5% (v/v), chủng giống được nuôi ở 28°C , 200 rpm. Dịch lên men của chủng *S. marcescens* DT3 sau 2 ngày nuôi cấy được ly tâm 12.000 vòng/15 phút ở 4°C . Thu dịch chiết ngoại bào rồi lọc vô trùng qua màng lọc có kích thước lỗ 0,20 μm .

Xác định hoạt tính kháng nấm của vi khuẩn

Hoạt tính ức chế tương đối sinh trưởng nấm bệnh cây của dịch lọc tế bào được tiến hành theo phương pháp Huber (1987). Sau khi thu được dịch chiết ngoại bào bằng cách ly tâm loại bỏ sinh khối tế bào ở 12.000 vòng/phút trong 15 phút, tiếp đó loại tế bào còn sót được loại sạch bằng cách lọc qua màng lọc vi khuẩn Satorrius với kích thước lỗ 0,20 μm . Dịch lọc tế bào được bổ sung vào 20 ml môi trường PDA ở 55°C, trộn đều và đổ vào mỗi đĩa Petri; nồng độ dịch lọc cuối cùng đạt từ 20- 50%. Cuối cùng một khoanh nấm bệnh cây 4 ngày tuổi được đặt ngay chính giữa mặt đĩa môi trường và ủ ở 30°C. Sinh trưởng của nấm bệnh cây được theo dõi từ ngày thứ 3 với nấm *R. solani* và ngày thứ 5 với nấm *F. oxysporum* bằng cách đo đường kính tán nấm với thước kẻ có phân độ mm. Thí nghiệm đối chứng được tiến hành song song. Mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần. Hoạt tính ức chế tương đối sinh trưởng nấm của dịch lọc tế bào được tính theo công thức sau đây:

$$I (\%) = (S_{DC} - S_{ST}) / S_{DC} \times 100$$

Trong đó:

I là phần trăm ức chế sinh trưởng nấm;

S_{DC} là diện tích tán nấm trên môi trường PDA không chứa dịch lọc tế bào;

S_{ST} là diện tích tán nấm trên môi trường PDA chứa dịch lọc tế bào.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

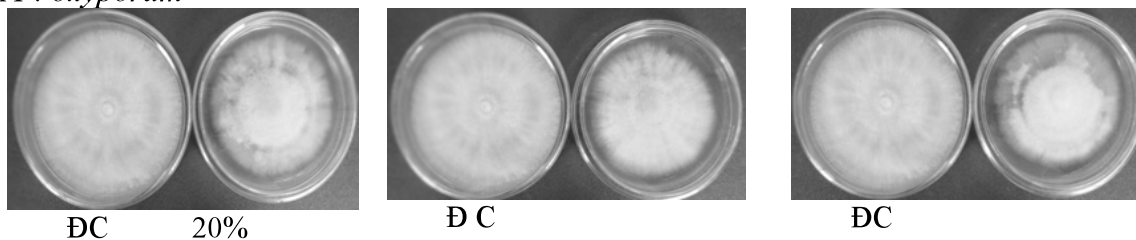
Hoạt tính kháng nấm trong môi trường NYD

Dịch chiết ngoại bào chủng *S. marcescens* DT3 ở các nồng độ 20-50% chỉ ức chế nhẹ sự sinh trưởng và phát triển của nấm *F. oxysporum* và *R. solani*. Ở nồng độ 20% ức chế 3,3% đến 11%. Khi tăng nồng độ lên 30- 50%, dịch chiết ngoại bào cũng chỉ ức chế được từ 13-15% trên hai loại nấm này (Bảng 1, Hình 1). Như vậy trên môi trường NYD bao gồm các thành phần cao thịt, cao nấm men và D-glucose dường như không phù hợp cho chủng *S. marcescens* DT3 sinh tổng hợp các hoạt chất kháng nấm. Một số nghiên cứu đã chứng minh môi trường NYD đã làm tăng khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất có tính kháng nấm khi được chọn làm môi trường lên men chủng *Bacillus* như nghiên cứu của Li và cộng sự (2007).

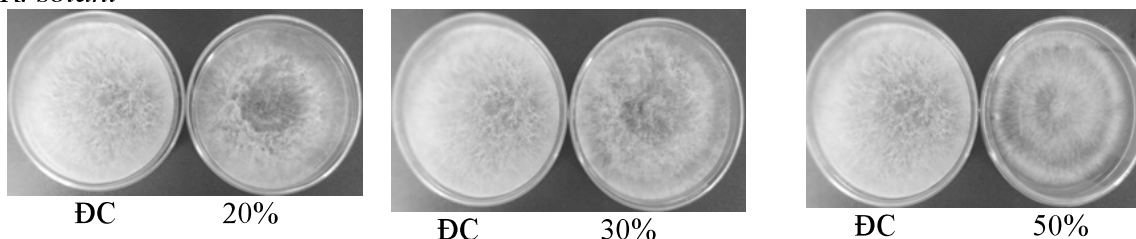
Bảng 1. Ảnh hưởng của dịch chiết ngoại bào *S. marcescens* DT3 nuôi trong môi trường NYD lên sinh trưởng của *F. oxysporum* và *R. solani*

Nồng độ dịch chiết ngoại bào (%)	Nấm <i>F. oxysporum</i>		Nấm <i>R. solani</i>	
	sinh trưởng của nấm (Φ :cm)	Hoạt tính ức chế (%)	Sinh trưởng của nấm (Φ :cm)	Hoạt tính ức chế (%)
0	9	0	9	0
20	8,7 \pm 0,13	3,3 \pm 1,4	8 \pm 0,25	11 \pm 2,7
30	8,6 \pm 0,20	4,4 \pm 2,2	8 \pm 0,2	11 \pm 2,2
50	7,8 \pm 0,15	13 \pm 1,6	7,5 \pm 0,1	15 \pm 1,1

Nấm *F. oxysporum*



Nấm *R. solani*



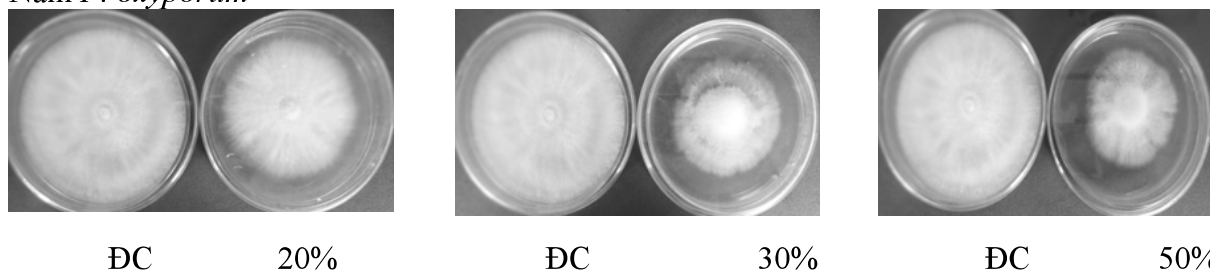
Hình 1. Hoạt tính kháng nấm của dịch chiết ngoại bào chủng *S. marcescens* DT3 nuôi trong môi trường NYD đối với nấm *F. oxysporum* và *R. solani*.

Hoạt tính kháng nấm trong môi trường NA

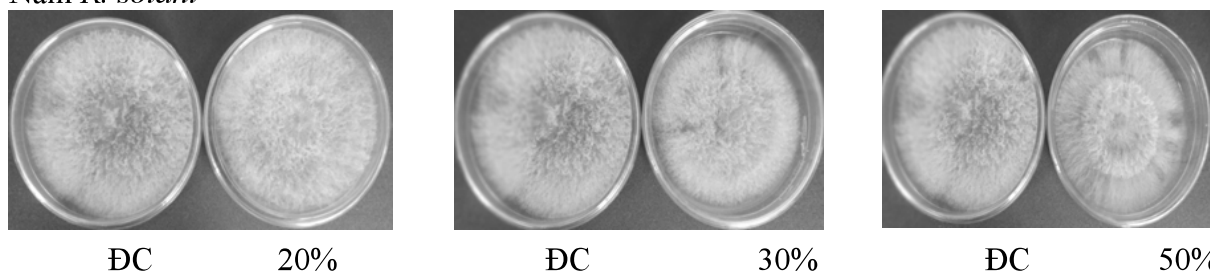
Bảng 2. Ảnh hưởng của dịch chiết tế bào *S. marcescens* DT3 nuôi trong môi trường NA lên sinh trưởng của *F. oxysporum*

Nồng độ dịch chiết ngoại bào (%)	Nấm <i>F. oxysporum</i>		Nấm <i>R. solani</i>	
	sinh trưởng của nấm (Φ:cm)	Hoạt tính ức chế (%)	sinh trưởng của nấm (Φ:cm)	Hoạt tính ức chế (%)
0	9	0	9	0
20	7±0,3	22±3,3	8,8±0,2	2±2
30	6±0,27	33±3	8,8±0,15	2±1,6
50	5,7±0,15	36±1,6	8,4±0,15	6±1,6

Nấm *F. oxysporum*



Nấm *R. solani*



Hình 2. Hoạt tính kháng nấm của dịch chiết ngoại bào chủng *Serratia marcescens* DT3 nuôi trong môi trường NA đối với nấm *F. oxysporum* và *R. solani*

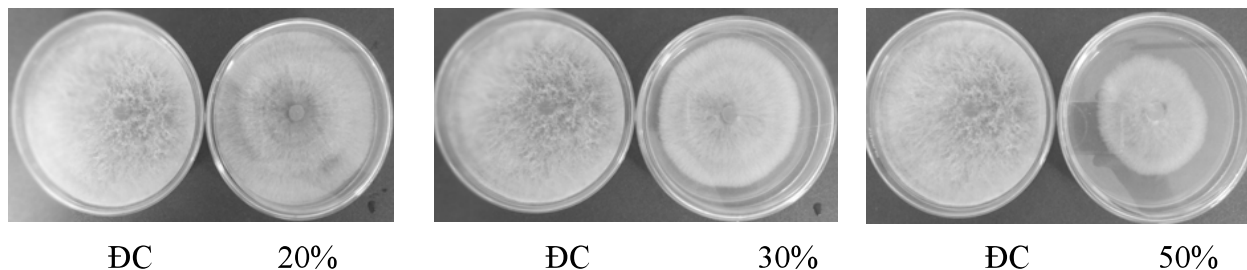
Hoạt tính kháng nấm của dịch chiết ngoại bào chủng *S. marcescens* DT3 nuôi trong môi trường NA thể hiện hoạt tính đối với nấm *F. oxysporum* mạnh hơn rất nhiều so với nấm *R. solani*. Cụ thể ở nồng độ 20% nấm *F. oxysporum* bị ức chế sinh trưởng 22% còn ở nồng độ 30% thì bị ức chế 33% nhưng đến nồng độ 50% thì nấm *F. oxysporum* cũng chỉ bị ức chế 36% (Bảng 2, Hình 2).

Hoạt tính kháng nấm trong môi trường bột đậu tương 2%

Hoạt tính kháng nấm của dịch chiết ngoại bào chủng *S. marcescens* DT3 nuôi trong môi trường bột đậu tương đối với nấm *R. solani* được thể hiện ở bảng 3 và hình 3. Trên môi trường PDA chứa 20%, 30% và 50% dịch chiết ngoại bào thì nấm *R. solani* đã bị ức chế khá mạnh. Sự gia tăng hoạt tính ức chế sinh trưởng nấm diễn ra ở góc độ lớn khi ta tăng nồng độ dịch chiết ngoại bào. Cụ thể ở nồng độ 20% thì chỉ ức chế được 2% sự sinh trưởng của nấm nhưng khi tăng lên 30% thì đã ức chế được 16% sự sinh trưởng của nấm hơn thế ở nồng độ 50% đã ức chế đến 39% sự sinh trưởng của nấm *R. solani* (Bảng 3, Hình 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của dịch chiết ngoại bào *S. marcescens* DT3 nuôi trong môi trường bột đậu tương lên sinh trưởng của *R. solani*

Nồng độ dịch chiết ngoại bào (%)	Sinh trưởng của nấm (Φ:cm)	Hoạt tính ức chế (%)	Hình thái tản nấm, đặc điểm phát triển
0	9	0	Sợi bông, màu trắng nâu
0	8,8±0,1	2±1,1	Sợi bông, màu trắng nâu
30	7,5±0,23	16±2,5	Sợi bông, màu trắng nâu
50	5,5±0,1	39±2	Sợi bông, màu trắng nâu nhạt



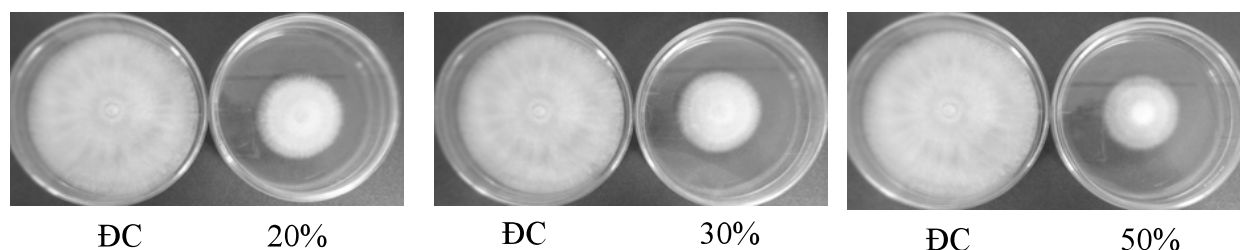
Hình 3. Hoạt tính kháng nấm của dịch chiết ngoại bào chủng *S. marcescens* DT3 nuôi trong môi trường bột đậu tương đối với nấm *R. solani*.

Hoạt tính kháng nấm trong môi trường LB

Nấm *F. oxysporum* đã bị ức chế mạnh sự sinh trưởng, màu sắc đã có sự thay đổi rõ rệt từ sợi bông màu tím nhạt sang sợi bông màu hồng nhạt. Sự gia tăng hoạt tính ức chế sinh trưởng diễn ra mạnh cụ thể là ở nồng độ 20% dịch chiết ngoại bào ức chế được 44% sự sinh trưởng của nấm *F. oxysporum* thì khi tăng nồng độ lên 50% đã ức chế được hơn 71% sự sinh trưởng của nấm. Trong khi đó nấm *R. solani* vẫn có khả năng nảy mầm, nhưng sự sinh trưởng của chúng bị ức chế khá mạnh. Ở nồng độ 20% thì chỉ ức chế được 22% sự sinh trưởng của nấm *R. solani* tuy nhiên ở nồng độ cao hơn thì dịch chiết ngoại bào lại thể hiện sự tác động khác biệt khá rõ rệt đến hoạt tính ức chế sinh trưởng của nấm. Cụ thể ở 30% nấm *R. solani* đã bị ức chế 32% nhưng khi đến nồng độ 50% thì nấm *R. solani* đã bị ức chế đến hơn 80% (Bảng 4, hình 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của dịch chiết ngoại bào *S. marcescens* DT3 nuôi trong môi trường LB lên sinh trưởng của *F. oxysporum*

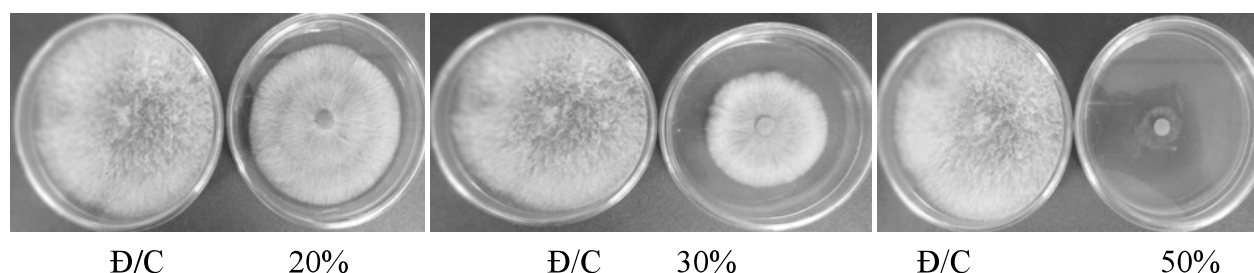
Nồng độ dịch chiết ngoại bào (%)	Sinh trưởng của nấm (Φ:cm)	Hoạt tính ức chế (%)	Hình thái tản nấm, đặc điểm phát triển
0	9	0	Sợi bông màu tím nhạt
20	5±0,35	44,4±3,9	Sợi bông màu tím nhạt
30	4,4±0,25	51±2,7	Sợi bông màu tím nhạt
50	2,6±0,2	71±2,2	Sợi bông màu tím hồng nhạt, đồ xếp



Hình 4. Hoạt tính kháng nấm của dịch chiết ngoại bào chủng *S. marcescens* DT3 nuôi trong môi trường LB đối với nấm *F. oxysporum*.

Bảng 5. Ảnh hưởng của dịch chiết ngoại bào *S. marcescens* DT3 nuôi trong môi trường LB lên sinh trưởng của *R. solani*

Nồng độ dịch chiết ngoại bào (%)	Sinh trưởng của nấm (Φ:cm)	Hoạt tính ức chế (%)	Hình thái tản nấm, đặc điểm phát triển
0	9	0	Sợi bông, màu trắng nâu
20	7±0,3	22±3,3	Sợi bông, màu trắng nâu
30	6±0,25	32±2,7	Sợi bông, màu trắng nâu nhạt
50	1,7±0,13	81±1,4	Sợi bông, màu trắng nâu nhạt, tàn lụi



Hình 5. Hoạt tính kháng nấm của dịch chiết ngoại bào chủng *S. marcescens* DT3 nuôi trong môi trường LB đối với nấm *R. solani*.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Someya và cộng sự (2005) đã nghiên cứu dịch chiết ngoại bào chủng *S. marcescens* B2 có khả năng ức chế sự sinh trưởng của các sợi nấm *R. solani* (Someya et al., 2005). Hay Okay và cộng sự (2013) đã nghiên cứu tách được chitinase từ chủng *S. marcescens* MO-1 có khả năng ức chế sự sinh trưởng bào tử của một số loại nấm như *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *F. oxysporum* (Okay et al., 2013). Gần đây nhất theo nghiên cứu của Vũ Trọng Lượng và cộng sự (2015) dịch chiết ngoại bào chủng *S. marcescens* M6 đã ức chế 21% sự sinh trưởng của nấm *F. oxysporum* và 30% sự sinh trưởng của nấm *R. solani* trên môi trường NA chứa 2% casein (Vũ

Trọng Lượng *et al.*, 2015). Như vậy tiềm năng chủng *S. marcescens* DT3 được nuôi trong môi trường LB có khả năng sinh tổng hợp các hoạt chất kháng nấm cao. Đây là cơ sở khoa học để chúng tôi tiếp tục tối ưu thành phần môi trường cũng như tách chiết hoạt chất kháng nấm chính từ chủng nghiên cứu này.

KẾT LUẬN

Trong 4 môi trường đã khảo sát môi trường NYD, LB, NA và môi trường bột đậu tương 2%, dịch chiết ngoại bào ở nồng độ từ 20% đến 50% đều ức chế được sự sinh trưởng và phát triển của nấm *F. oxysporum* và *R. solani*. Đặc biệt chủng *S. marcescens* DT3 được nuôi trong môi trường LB có hoạt tính kháng nấm mạnh. Dịch chiết ngoại bào ở nồng độ 30% chỉ ức chế được 32%, nhưng khi tăng nồng độ lên 50%, đã ức chế được 71%- 81% sự sinh trưởng và phát triển của chủng nấm *F. oxysporum* và *R. solani*. Ở nồng độ 50% sợi nấm *F. oxysporum* hình thái sợi nấm chuyển sang sợi bông màu trắng và đổ xẹp trong khi đó nấm *R. solani* mất hình thái thông thường và chuyển sang sợi bông, nâu nhạt, tàn lụi.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được hỗ trợ kinh phí của Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc gia (Nafosted): “Sàng lọc, chiết xuất, tinh sạch và xác định cấu trúc của một số hoạt chất (dẫn xuất) thứ cấp mới kháng nấm *Fusarium* và *Rhizoctonia* có nguồn gốc từ *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* và *Serratia* phân lập ở Việt Nam”. Giai đoạn 2013-2015.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Kamensky, M., Ovadis, M., Chet, I., and Chernin, L. (2003). Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of botrytis cinerea and sclerotinia sclerotiorum diseases. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 323-331.
- Lê Thị Hồng Minh, Phạm Việt Cường, and Nguyễn Thị Kim Cúc. (2005). Tách dòng và giải trình tự đoạn gen *PhlD* mã hóa cho 2,4-diacetylphloroglucinol từ *Serratia marcescens* kháng *Fusarium oxysporum*. In Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống, pp. 1315-1317.
- Okay, S., Ā-zdal, M., and KurbanoĀzLu, E.B. (2013). Characterization, antifungal activity, and cell immobilization of a chitinase from *Serratia marcescens* MO-1. *Turkish Journal of Biology* 37, 639-644.
- Someya, N., Nakajima, M., Watanabe, K.E.N., and Akutsu, K. (2005). Synergistic antifungal activity of the culture filtrates of *Serratia marcescens* strain B2 and chemical fungicides against the sclerotial viability of the rice sheath blight pathogen, *rhizoctonia solani*. *Biocontrol Science* 10, 97-100.
- Vũ Trọng Lượng, Nguyễn Sỹ Lê Thanh, Đỗ Thị Tuyên, and Nguyễn Thị Hồng Nhung. (2015). Nghiên cứu tách chiết, tinh sạch và đánh giá hoạt tính của hoạt chất chống khuẩn và chống nấm Prodigiosin từ chủng *Serratia marcescens* M6. *Tạp chí Y Học Việt Nam* 433, 190-195.
- Wang, K., Yan, P.S., Cao, L.X., Ding, Q.L., Shao, C., and Zhao, T.F. (2013). Potential of chitinolytic *Serratia marcescens* strain JPPI for biological control of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin. *BioMed research international* 2013, 397142.