

Khả năng diệt sâu khoang *Spodoptera litura* của vi khuẩn *Serratia marcescens* phân lập từ tuyến trùng EPN và hợp chất thứ cấp prodigiosin của vi khuẩn này

- Nguyễn Hoài Hương
- Nguyễn Hoàng Anh Kha

Trường Đại học Công nghệ TP.HCM

(Bài nhận ngày 12 tháng 12 năm 2014, nhận đăng ngày 22 tháng 09 năm 2015)

TÓM TẮT

Vi khuẩn SH1 phân lập từ tuyến trùng diệt sâu (EPN) *Heterorhabditis indica* CP16 giải phóng từ xác sâu (*Spodoptera litura*) được định danh là *Serratia marcescens* bằng Kit API 20E và giải trình tự 16S rDNA. SH1 có khả năng diệt sâu khoang *Spodoptera litura*, khi tiêm 23 cfu/sâu làm sâu chết hơn 65 % sau 10 giờ; khi cho ăn theo phương pháp nhỏ

giọt trên bề mặt lá ở mật độ 170 cfu/cm² gây chết hơn 50 % sâu sau 72 giờ. Sắc tố màu đỏ của vi khuẩn được khẳng định là hợp chất thứ cấp prodigiosin qua màu sắc, phổ hấp thụ UV/VIS và ESI-MS. Khi tiêm sắc tố này vào xoang máu 422 ng/sâu gây chết hơn 65 % sâu sau 10 giờ, khi cho ăn ở nồng độ 27,66 ng/cm² gây chết 90 % sâu sau 120 giờ.

Từ khóa: Độc lực trên sâu, phương pháp nhỏ giọt trên bề mặt lá, prodigiosin, *Serratia marcescens*, tiêm xoang máu, tuyến trùng EPN.

MỞ ĐẦU

Tuyến trùng ký sinh gây bệnh côn trùng (entomopathogenic nematode – EPN) gần đây lôi cuốn nhiều quan tâm của các nhà bảo vệ thực vật do khả năng diệt sâu hoạt lực cao trong thời gian ngắn từ 24 – 48 giờ [1]. Hai chi được ứng dụng rộng rãi để sản xuất chế phẩm bảo vệ thực vật là *Steinernema* spp. và *Heterorhabditis* spp. Khả năng gây bệnh côn trùng được khám phá là do sự tồn tại của vi khuẩn cộng sinh [2]. Mỗi loài tuyến trùng có vi khuẩn cộng sinh tương ứng: *Xenorhabdus* spp. cộng sinh với *Steinernema* spp. và *Photorhabdus luminescens* cộng sinh với *Heterorhabditis* spp. [3]. Gần đây người ta còn phát hiện sự hiện diện của *Serratia marcescens* trong tuyến trùng EPN [4, 5]. Một số nghiên cứu

chứng minh rằng *S. marcescens* và *S. nematodiphila* đóng vai trò vi khuẩn cộng sinh của tuyến trùng EPN [6, 7].

Theo Grimont & Grimont, 2006 [8], *Serratia* spp. là vi khuẩn gram âm thuộc họ Enterobacteriaceae. Đại diện của chi *Serratia* là *Serratia marcescens*. Có thể phân lập *Serratia* spp. từ môi trường đất và nước, thực vật, côn trùng cũng như động vật có xương sống. *Serratia* spp. có khả năng tổng hợp enzymes DNase, lipase, protease và chitinase. Đặc biệt, *Serratia marcescens* có khả năng tổng hợp sắc tố đỏ prodigiosin, một pyrrole alkaloid (2-methyl-3-amyl-6-methoxyprodigiosene) (C₂₀H₂₅N₃O = 323,44). *Serratia marcescens* Bizio từ lâu được

biết có khả năng diệt sâu [9], *Serratia entomophila* được sử dụng như tác nhân diệt sâu sinh học ở New Zealand để tiêu diệt *Costelytra zealandica* [10]. Prodigiosin thuộc nhóm prodiginine được biết đến như một hợp chất thứ cấp vi sinh vật có tác dụng diệt khuẩn, diệt tảo, ức chế miễn dịch và tế bào ung thư [11].

Trong quá trình phân lập vi khuẩn cộng sinh từ một số chủng tuyến trùng EPN nguồn gốc Việt Nam, cụ thể chủng *Heterorhabditis indica* CP 16 của tác giả Nguyễn Ngọc Châu, 2009 [12], chúng tôi thu được vi khuẩn khác với vi khuẩn cộng sinh truyền thống. Bài báo này trình bày kết quả phân lập và khảo sát khả năng diệt sâu các chủng phân lập nhằm xác định vai trò của chúng trong hoạt lực diệt sâu của tuyến trùng EPN. Ngoài ra, nghiên cứu này còn khẳng định sắc tố do chủng phân lập sinh ra là prodigiosin cũng thể hiện độc lực trên sâu, có thể là một trong những tác nhân gây độc của vi khuẩn tổng hợp.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguồn phân lập vi khuẩn, sâu thí nghiệm

Tuyến trùng *Heterorhabditis indica* CP 16 (H.CP 16) do TS. Nguyễn Ngọc Châu, Viện Sinh thái Tài nguyên Sinh vật VN cung cấp.

Ấu trùng sâu khoang *Spodoptera litura* được nuôi trên thức ăn nhân tạo do TS. Nguyễn Thị Hai, Đại học Công nghệ TP. HCM cung cấp.

Phân lập vi khuẩn từ tuyến trùng

Heterorhabditis indica CP 16 (H. CP 16)

Phân lập vi khuẩn được tiến hành dựa vào phương pháp của Akhurst (1980) [13] và Park & Yu (1999) [14]. Tuyến trùng ở giai đoạn cảm nhiễm (IJs) trữ lạnh ở 10 °C được lấy ra để ở nhiệt độ phòng trong 30 phút để tuyến trùng hoạt động trở lại. Rửa 2 – 3 lần bằng formalin 0,1 %, sau đó rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần. Ly tâm ở 500 vòng/phút trong 2 phút hoặc để lắng tự nhiên, thu

tuyến trùng. Ngâm tuyến trùng trong dung dịch NaClO 0,5 % 10 phút, lặp lại 2 lần, rửa lại bằng nước cất vô trùng 3 lần. Ly tâm tuyến trùng ở 4000 vòng/phút trong 30 phút để giải phóng vi khuẩn. Cho vi khuẩn tăng sinh trên môi trường nutrient broth (NB) trong 48 giờ ở nhiệt độ phòng, trong tối, lắc 210 vòng/phút. Cấy trang vi khuẩn sau khi pha loãng trên môi trường MacConkey và NBTA (20 g agar, 25 mg bromothymol blue và 40 mg triphenyl tetrazolium (Sigma) trong 1 L nước cất) ủ ở nhiệt độ phòng trong bóng tối 48 giờ. Sau thời gian ủ, chọn khuẩn lạc riêng rẽ cấy thuần lại trên môi trường MacConkey và NBTA để khảo sát hình thái khuẩn lạc.

Định danh vi khuẩn phân lập

Các chủng phân lập được nhuộm Gram, thử nghiệm khả năng di động, thử nghiệm TSI, lên men lactose, và sử dụng Kit API 20E (Biomérieux) với 20 thử nghiệm cơ bản, kèm thêm thử nghiệm oxidase, khử nitrate và thử nghiệm OF được thực hiện bổ sung. Định danh được thực hiện nhờ hỗ trợ của APIWEB từ kết quả số hóa gồm 9 chữ số của các thử nghiệm sinh hóa được nhà sản xuất hướng dẫn.

Định danh bằng phương pháp giải trình tự 16S rDNA (do công ty Nam Khoa Biotek tiến hành). DNA được trích ly từ vi khuẩn phân lập thuần khiết và gene mã hóa rRNA 16S được khuếch đại bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi 16S-F: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG và 16S-R: ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT với chu kỳ luân nhiệt: 1 chu kỳ 95 °C/5 phút và 40 chu kỳ gồm 94 °C/30 giây, 56 °C/30 giây; 72 °C/1 phút; cuối cùng 1 chu kỳ 72 °C/10 phút. Điện di kiểm tra kích thước band 550 bp. Tinh sạch DNA: sử dụng enzyme exonuclease (EXO) và alkaline phosphatase (ALK). Phản ứng PCR DNA tinh sạch với chu kỳ luân nhiệt: 1 chu kỳ 96 °C/1 phút ; 25 chu kỳ gồm 96 °C/10 giây; 50 °C/5 giây; 60

°C/4 phút. Giải trình tự trên máy 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Tra cứu trên ngân hàng gene (Genbank) sử dụng BLAST search của National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Xây dựng cây phát sinh loài dựa trên so sánh trình tự 16S rDNA một số chủng *Serratia* spp., *Xenorhabdus* spp., *Photorhabdus luminescens* của ngân hàng gene.

Lên men thu vi khuẩn và sắc tố prodigiosin

Vi khuẩn SH1 tăng sinh trong môi trường NB, lắc 150 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong tối 24 giờ. Vi khuẩn được tăng sinh như nêu trên, cấy giống 1 % vào môi trường bột hạt đậu phộng [15] trong bình tam giác đặt trên máy lắc 150 vòng/phút ở nhiệt độ phòng (28-30 °C) trong tối trong 48 giờ.

Sinh khối được tách khỏi canh trường bằng ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 15 phút sau đó được chuyển vào hỗn hợp ethanol: HCl 1 M (95:5 v/v) và lắc mạnh, sau đó ly tâm lần hai như trên thu dịch trong và loại bỏ sinh khối đã mất màu. Dịch trong thu được từ hai lần ly tâm đều chứa sắc tố được hòa chung với một thể tích tương đương ether dầu hỏa. Trích ly màu trong phễu chiết, thu màu tan trong ether dầu hỏa và rửa nhiều lần bằng nước muối bão hòa và cô quay đuổi hết dung môi.

Sắc tố thu được hòa tan trong hỗn hợp ethanol: HCl 1 M (95:5 v/v) và quét phổ UV/VIS từ 400 đến 700 nm để tìm bước sóng hấp thụ cực đại λ_{max} . Độ hấp thụ tại λ_{max} được sử dụng để xây dựng đường chuẩn sắc tố. Xác định độ tinh sạch qua sắc ký bản mỏng (TLC) trong ethyl acetate 100 % hoặc ether dầu hỏa: acetone 7:3 (v/v). Khối lượng phân tử được xác định bằng phương pháp khối phổ ion hóa tia điện (ESI-MS), do phòng thí nghiệm Viện khoa học kỹ thuật nông nghiệp miền

Nam, nay thuộc Viện Thú y Nam bộ, 12 Nguyễn Chí Thanh, Q. 10, TP. HCM thực hiện.

Xác định độc lực vi khuẩn và sắc tố trên sâu

Trứng sâu khoang *Spodoptera litura* được ấp nở. Sau đó, sâu được nuôi bằng lá thầu dầu cho đến tuổi thí nghiệm. Sau đó sâu được nuôi bằng thức ăn nhân tạo trong hộp nhựa.

Vi khuẩn SH1 tăng sinh như trên. Mật độ tế bào được xác định bằng phương pháp đo mật độ quang và sử dụng đường chuẩn tế bào.

Sắc tố sau cô quay được hoà tan vào 1 mL DMSO và 15 mL PBS, pha loãng bằng PBS để được các nồng độ 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} và 10^{-6} . Xác định nồng độ hợp chất màu tương ứng ở các nồng độ pha loãng này bằng phương pháp quang phổ ở bước sóng λ_{max} xác định ở trên.

Thử nghiệm độc lực bằng phương pháp tiêm

Mỗi hộp thí nghiệm chứa 10 sâu khoang tuổi 4 (khối lượng 0,52 – 0,63 g) và mỗi sâu khoang được tiêm trên sống lưng vào xoang máu bằng kim 26 G với 5 μ L dung dịch vi khuẩn ở nồng độ pha loãng 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} và 10^{-6} của huyền phù tế bào sau tăng sinh hoặc sắc tố ở nồng độ pha loãng 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} và 10^{-4} . Mẫu đối chứng thay huyền phù tế bào bằng 5 μ L dung dịch pha loãng PBS. Sâu sau khi tiêm được nuôi trên thức ăn nhân tạo và theo dõi sâu chết theo thời gian. Xác sâu chết được sử dụng làm nguồn phân lập để khẳng định vi khuẩn bằng cách cấy ria huyết tương trên thạch MacConkey.

Thử nghiệm độc lực bằng phương pháp cho ăn

Mỗi hộp thí nghiệm chứa 30 sâu khoang tuổi 3 và 3 lá thầu dầu (kích thước lá là 100 x 60 mm²) được quét lên bề mặt mỗi lá 200 μ L huyền phù vi khuẩn ở nồng độ 10^{-1} , 10^{-2} , 10^3 , 10^{-4} , 10^{-5} và 10^{-6}

hoặc sắc tố ở nồng độ pha loãng 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} và 10^{-5} . Mẫu đối chứng thay huyền phù tế bào hoặc hợp chất thứ cấp màu bằng 600 μ L dung dịch pha loãng PBS.

Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần và theo dõi sâu chết theo thời gian đến khi hợp đối chứng chuyển sang nặng.

Xử lý số liệu

Sử dụng phần mềm Statgraphics Centurion XV để phân tích ANOVA.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập định danh vi khuẩn từ tuyến trùng *Heterorhabditis indica* CP 16 (H. CP 16)

Với mục đích phân lập vi khuẩn cộng sinh tuyến trùng EPN, các phương pháp được Arkhurst, 1980 và Park, 1999 mô tả đã được thử nghiệm. Kết quả thu được chủng vi khuẩn SH1 từ H. CP 16 trên ba môi trường MacConkey, NA và NBTA. Chủng vi khuẩn này có thể lầm lẫn với vi khuẩn cộng sinh truyền thống tuyến trùng *Xenorhabdus* spp. và *Photorhabdus luminescens* vì là vi khuẩn Gram âm, di động, nhất là có khả năng hấp thu màu xanh

từ môi trường NBTA và cho khuẩn lạc nhót. Tuy nhiên điểm khác biệt là các khuẩn lạc đều có màu đỏ thẫm, catalase dương tính và khử nitrate cho thấy chúng khác biệt rõ rệt với *Xenorhabdus* spp. và *Photorhabdus luminescens* [13].

Định danh bằng Kit API 20E cho thấy chủng phân lập SH1 là *Serratia marcescens* với tỉ lệ tương đồng là 97,4 %. Định danh bằng giải trình 16S rDNA và so sánh trên ngân hàng gene của NCBI cho thấy tỉ lệ tương đồng của SH1 với các chủng thuộc loài *Serratia marcescens* 99,7-100 %, đặc biệt tương đồng với chủng *S. marcescens* Bizio đến 100 %. *S. nematodiphila* là loài có quan hệ họ hàng gần nhất với chủng phân lập SH1 với tỉ lệ tương đồng 99,6 % cũng được phân lập từ tuyến trùng diệt sâu EPN. Các loài *Serratia* khác có tỉ lệ tương đồng khoảng 95 % với chủng SH1. So sánh với các vi khuẩn cộng sinh truyền thống của EPN là *Xenorhabdus* spp. và *Photorhabdus luminescens*, chủng phân lập có khác biệt đáng kể (gần 10 %) về trình tự 16S rDNA (Bảng 1).

Bảng 1. So sánh trình tự 16S rDNA của vi khuẩn SH1 và một số chủng khác.

STT	Chủng	Tỉ lệ	Nguồn phân lập	Mã số truy cập
-----	-------	-------	----------------	----------------

		tương đồng, %		
1	<i>S. marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> Bizio 1823 (DSM 30121)	100	Nước hồ	NR04198
2	<i>S. marcescens</i> subsp. <i>sakuensis</i> BM0527	99,8	Ruột muỗi <i>Anopheles gambiae</i>	JQ680891
3	<i>S. marcescens</i> PW180	99,7	Tuyến trùng <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	JF494825
4	<i>S. nematodiphila</i> DZ0503SBSH1-2	99,6	EPN <i>Heterorhabditoides chongmingensis</i>	EU914257
5	<i>S. entomophila</i>	96,7	Sâu <i>Heliothis</i> sp.	GU370899
6	<i>S. liquefaciens</i> CIP 103238	96,9	-	NR042062
7	<i>S. symbiotica</i>	95,7	Rệp đậu đen <i>Aphis fabae</i>	GU394001
8	<i>S. rubidaea</i> 15	94,3	Hoa tulip	KC953862
9	<i>Xenorhabdus nematophila</i> ATCC 19061	90,2	EPN <i>Steinernema</i> spp.	D78009
10	<i>Photorhabdus luminescens</i> ATCC 29304	89,6	EPN <i>Heterorhabditis</i> spp.	D78004

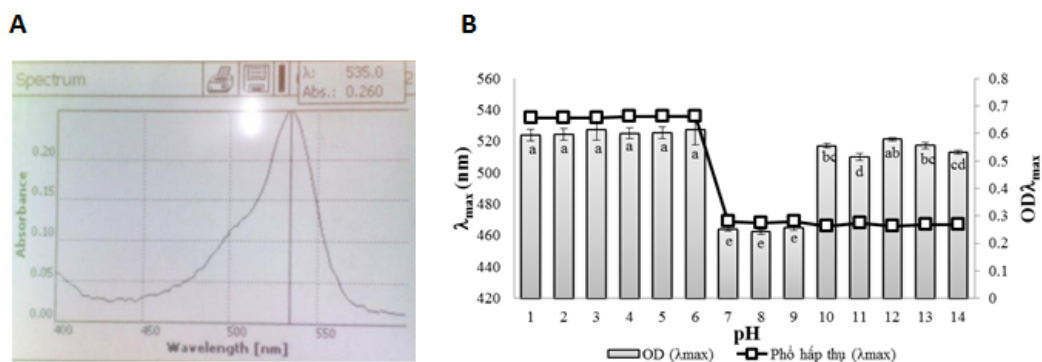
Kết quả trên cho phép kết luận chủng phân lập thuộc loài *Serratia marcescens*. Trình tự 16S rDNA của chúng SH1 (> 500 bp) có thể truy cập trên ngân hàng gene NCBI với mã số truy cập là KF534508.

Thông thường vi khuẩn cộng sinh với tuyến trùng EPN *Heterorhabditis* phải là *Photorhabdus luminescens* tương ứng. Chủng tuyến trùng H. CP 16 cho thấy khả năng diệt sâu khoang khá tốt (kết quả chưa công bố). Xác sâu chết có màu hồng đặc trưng của sắc tố prodigiosin của *Serratia marcescens*. Như vậy sắc tố này có thể có vai trò trong độc lực của tuyến trùng EPN đối

với sâu.

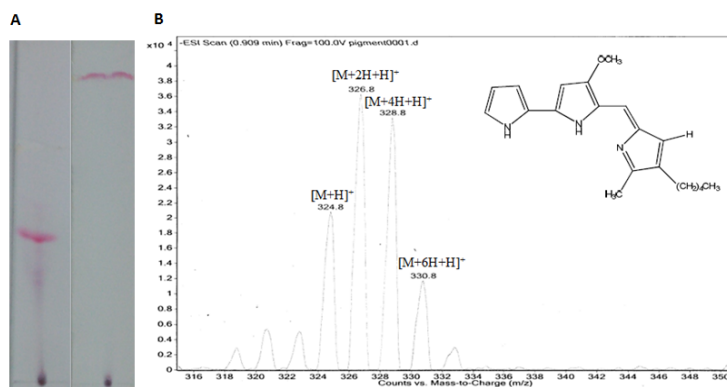
Lên men thu sắc tố prodigiosin

Sắc tố prodigiosin do nhiều vi khuẩn Gram âm tổng hợp trong đó có *Serratia marcescens*. Để khẳng định sắc tố màu đỏ do chủng SH1 sinh ra là prodigiosin, sau khi trích ly sắc tố bằng ethanol, chúng tôi quét phổ UV/VIS từ 400 nm đến 700 nm thu được phổ hấp thụ như Hình 1A. Màu và bước sóng hấp thụ cực đại của sắc tố phụ thuộc vào pH, ở pH acid (1-6), sắc tố có màu hồng và λ_{\max} là 535 nm; ở pH trung tính và kiềm, sắc tố có màu vàng cam và λ_{\max} là 469 nm (Hình 1B).



Hình 1. Khảo sát bước sóng hấp thụ cực đại của phân tử sắc tố trích ly từ tế bào SH1, A) Phổ hấp thụ UV/VIS của sắc tố trong ethanol: HCl (95:5, v/v), B) Bước sóng hấp thụ cực đại của sắc tố phụ thuộc vào pH.

Sử dụng phương pháp sắc ký bản mỏng đối với sắc tố qua hai hệ dung môi ether dầu hòa: acetone (7:3, [v/v] và ethyl acetate) chỉ thu được một vạch sắc tố hồng với R_f lần lượt là 0,68 và 0,84 (Hình 2).



Hình 2. Phân tích sắc tố do SH1 tổng hợp, A) Sắc ký bản mỏng sử dụng hệ dung môi ether dầu hòa: acetone (trái) và ethyl acetate (phải), B) Khối phổ ESI.

Phân tích sắc tố bằng phương pháp khối phổ ESI cho kết quả trên Hình 2B với peak $[M+H]^+$ là 324,8 amu, tương ứng khối lượng phân tử prodigiosin là 323,44. Các peak tiếp theo $[M+2H+H]^+ = 326,8$, $[M+4H+H]^+ = 328,8$, $[M+6H+H]^+ = 330,8$ có thể do sự hydro hóa 1, 2 hoặc 3 vòng pyrrole tạo thành các pyrrolidine. Các kết quả trên đây chứng minh sắc tố màu đỏ do *S. marcescens* SH1 tổng hợp là prodigiosin.

Độc lực vi khuẩn trên sâu

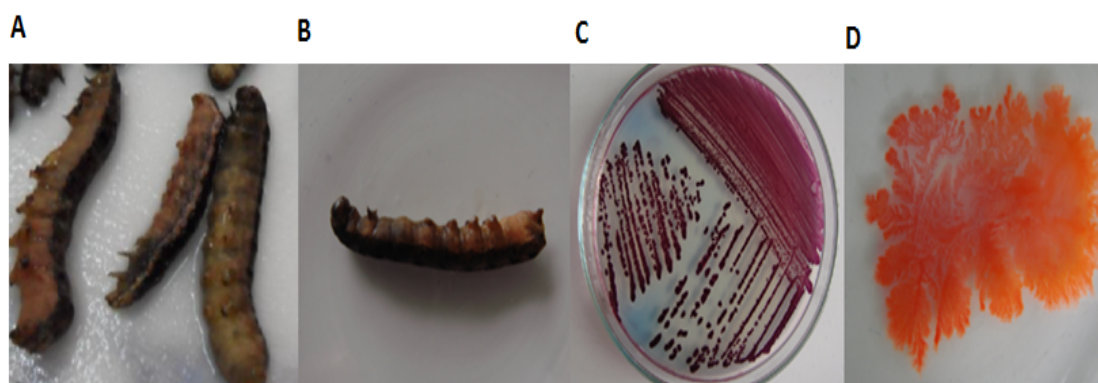
Hiệu lực diệt sâu thử nghiệm bằng phương pháp tiêm trực tiếp vào xoang máu

Chúng SH1 được phân lập từ tuyến trùng

EPN H. CP16, chúng này có thể có vai trò trong hoạt tính diệt sâu của tuyến trùng. Áp dụng phương pháp tiêm trực tiếp vào xoang máu sâu là phương pháp thường được áp dụng để xác định hiệu lực của vi khuẩn cộng sinh tuyến trùng [9]. Kết quả thí nghiệm thể hiện trên Hình 3 cho thấy dấu hiệu sâu chết do tiêm vi khuẩn SH1

trương tự như sâu chết do tuyến trùng, đó là màu đỏ đặc trưng của xác sâu. Đó cũng là màu đỏ của khuẩn lạc SH1 trên canh môi trường thạch do sắc

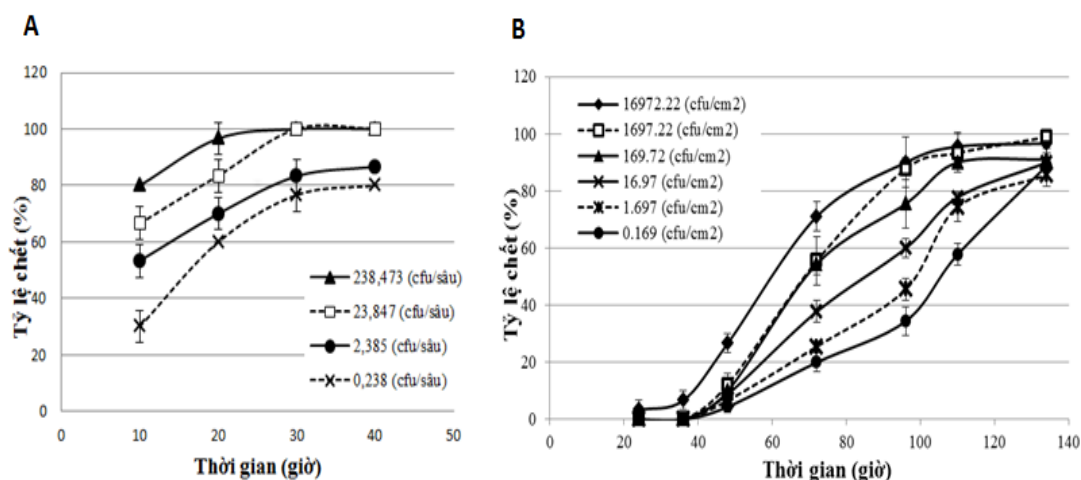
tố prodigiosin. Từ xác sâu chết do tiêm vi khuẩn, có thể tái phân lập vi khuẩn màu đỏ trên thạch NBTA (Hình 3C).



Hình 3. Thí nghiệm tiêm trực tiếp tế bào các chủng phân lập vào sâu khoang *Spodoptera litura*. A) Sâu khoang chết do tuyến trùng (H. CP16); B) Sâu khoang chết sau khi tiêm vi khuẩn (SH1); C) Vi khuẩn phân lập từ H.CP 16; D) Khả năng di động của SH1 trên thạch NA.

Hình 4A cho thấy tỉ lệ sâu chết hơn 65 % sau 10 giờ ở nồng độ 23 cfu SH1/sâu. Sau 30 giờ gần như 100 % sâu chết ở các nồng độ trên. Thời gian chết với tỉ lệ chết cao tương ứng với độc lực cao của tuyến trùng là nguồn phân lập của các vi khuẩn trên [12]. Theo Khan & Goldsworthy, 2007 [16], khi tiêm châu chấu với *E.coli* K-12 HB101 > 10⁶ cfu/con, tỉ lệ chết chỉ là 5 % sau 72 giờ. Theo Bucher (2012) [9], khi LD₅₀<10⁴ tế bào, vi khuẩn được coi là có hoạt tính diệt sâu. Vi khuẩn cộng sinh tuyến trùng có LD₅₀<10²-10³ tế bào/ lần tiêm,

và được coi là có hoạt lực diệt sâu mạnh. Gần đây Zhang et al. (2008) [6] phân lập được một số chủng vi khuẩn SBS1, SBS2, SBS3 và SBS4 định danh *Serratia nematodiphia* DZ0503SBS1 – 4 và xác định được đây là các vi khuẩn cộng sinh với tuyến trùng EPN *Heterorhabditis chongmingensis*. Khi tiêm chủng SBS1 vào *Galleria mellonella*, LD₅₀ xác định được là 50 tế bào sau 48 giờ. Như vậy từ kết quả thí nghiệm của chúng tôi có thể kết luận rằng chủng SH1 có hoạt lực diệt sâu mạnh.



Hình 4. Tỷ lệ chết của sâu khoang *Spodoptera litura*, A) khi tiêm SH1 vào xoang máu ($n = 10 \times 3$ tại mỗi mật độ tế bào), B) nhỏ giọt vi khuẩn trên mặt lá ($n = 30 \times 3$ tại mỗi mật độ tế bào).

Hiệu lực diệt sâu thử nghiệm bằng phương pháp cho ăn

Phương pháp này gần giống với các điều kiện phun thuốc trực tiếp ngoài đồng nhằm khảo sát khả năng diệt sâu qua đường tiêu hoá của chúng SH1. Sau 48 giờ thí nghiệm, sâu bắt đầu có dấu hiệu chết ở tất cả các nồng độ thử nghiệm, sau 72 giờ ở mật độ 170 cfu/cm² sâu chết hơn 50 %, 120 giờ sâu chết gần 90 % ở cùng mật độ (Hình 4B). Sau khi chết phần bụng sâu cũng chuyển sang màu đỏ đặc trưng giống với dấu hiệu sâu chết do phương pháp tiêm và do tuyến trùng. Theo phương pháp này, vi khuẩn SH1 từ thức ăn vào đường ruột của sâu khoang phá vỡ hệ thống tiêu hóa của sâu thông qua quá trình tạo màng liên kết giữa các vi khuẩn, rồi kể đến, chúng xâm nhập vào xoang máu, tại đây, chúng sẽ phát huy độc lực và gây chết nhanh do nhiễm trùng huyết. Chính vì vậy mà thời gian gây chết dài hơn nhiều so với khi tiêm trực tiếp vi khuẩn vào xoang máu. Ở Newzealand, *Serratia entomophila* sử dụng như một chế phẩm diệt sùng đất *Costelytra zealandica* với nồng độ sử dụng

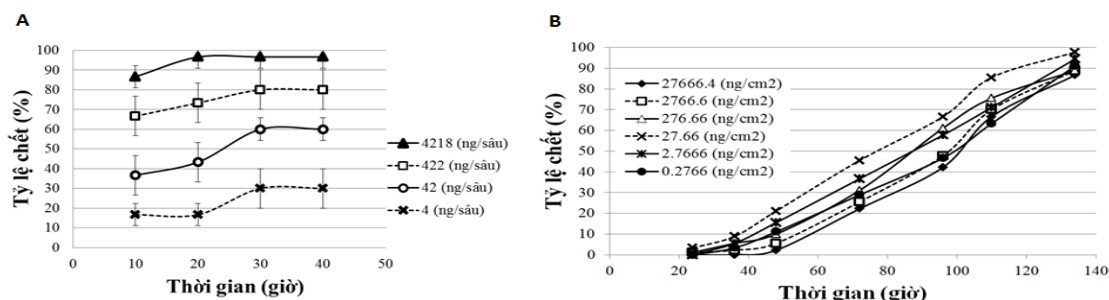
4x10¹³ cfu/ha, tương đương 4x10⁵ cfu/cm², trong khi kết quả thử nghiệm của chúng tôi với mật độ cao nhất là 1,7 x 10⁴ cfu/cm² tiêu diệt 100 % sâu khoang trong sau 4 ngày (www.nzpps.org).

Độc lực của sắc tố prodigiosin trên sâu

Xác sâu chết do tuyến trùng EPN có màu hồng dẫn đến nghi ngờ về độc lực của sắc tố prodigiosin của vi khuẩn phân lập từ tuyến trùng đối với sâu. Để khảo sát độc lực này chúng tôi cũng tiến hành tương tự như thí nghiệm với vi khuẩn, tức là bằng hai phương pháp tiêm vào xoang máu và cho ăn.

Thí nghiệm tiêm vào xoang máu

Tiêm vào xoang máu 5 μ l sắc tố prodigiosin ở nồng độ 422 ng/sâu sau 10 giờ gây chết hơn 65 % sâu khoang. Khi sâu chết, bụng của chúng cũng chuyển sang màu hồng nhạt, trong khi đó, sâu đối chứng vẫn phát triển bình thường đến giai đoạn nhộng. Kết quả được biểu diễn trong Hình 5A.



Hình 5. Tỷ lệ chết của sâu khoang *Spodoptera litura* khi tiêm hợp chất thứ cấp màu vào xoang máu A) và nhỏ giọt trên bề mặt lá B).

Phương pháp nhỏ giọt trên bề mặt lá

Khi nhỏ giọt 27,66 ng/cm² prodigiosin trên bề mặt lá có thể thấy thời gian sâu chết 50 % là 80 giờ (Hình 5B). Đây là nồng độ sâu chết mạnh nhất, mặc dù không phải là nồng độ prodigiosin cao nhất trong thí nghiệm. Đó là do tính kỵ nước của prodigiosin, ở nồng độ quá cao khó tan trong điều kiện sinh lý. Theo dõi trọng lượng sâu cho thấy ở nồng độ cao sâu có dấu hiệu chán ăn, sau 48 giờ thì tăng trọng của sâu giảm khoảng 30 % so với đối chứng. Sau khi chết, phần bụng sâu cũng chuyển sang màu đỏ đặc trưng giống với dấu hiệu sâu chết do phương pháp tiêm. Điều này có thể liên quan đến khả năng thấm và tác động vào tế bào của hợp chất màu. LC₅₀ của Cry 1C protein đối với *Spodoptera litura* mới nở là 2 – 5 ng/cm², *Spodoptera littoralis* tuổi 2 là 70 ng/cm² thử nghiệm trong 5 ngày [17]. Trong thí nghiệm của chúng tôi, sau 5 ngày ở nồng độ 27,6 ng/cm², thấp hơn rất nhiều so với tài liệu trên, *Spodoptera litura* tuổi 3 chết 90 %. Hoạt tính diệt sâu của prodigiosin đã được Wang et al., 2012 [18] thử nghiệm trên ấu trùng *Drosophila*, từ đó đề nghị chủng *Serratia marcescens* TKU011 phân lập từ đất được phát triển làm thuốc trừ sâu sinh học. Trong nghiên cứu của chúng tôi, chủng *Serratia marcescens* SH1 phân lập từ tuyến trùng EPN và hợp chất thứ cấp

prodigiosin của chủng này đều có hoạt tính diệt sâu mạnh. Điều này cho thấy có thể ứng dụng hợp chất thứ cấp prodigiosin của *S.marcescens* SH1 làm chế phẩm diệt sâu sinh học. Trên thực tế, công nghệ sản xuất và bảo quản sản phẩm trao đổi chất vi sinh vật khá thi hơn sản xuất chế phẩm tuyến trùng EPN, còn ứng dụng bản thân vi khuẩn làm tác nhân diệt sâu khó được chấp nhận hiện nay vì lý do an toàn sinh học.

KẾT LUẬN

Chủng SH1 được phân lập từ tuyến trùng EPN *Heterorhabditis indica* CP 16, định danh bằng Kit API 20E và giải trình tự 16S rDNA cho thấy thuộc loài *Serratia marcescens*. Chủng này thể hiện khả năng diệt sâu ở nồng độ thấp trong thời gian ngắn. Sắc tố đỏ do vi khuẩn tổng hợp là prodigiosin, cũng thể hiện hoạt lực diệt sâu mạnh, có thể chính là một trong những tác nhân gây độc trên sâu và thể hiện màu hồng trên xác sâu khi sâu bị lây nhiễm tuyến trùng EPN, cũng như trong các thử nghiệm độc lực của vi khuẩn và sắc tố. Những nghiên cứu tiếp theo đang tiến hành là mở rộng đối tượng sâu thử nghiệm và các ứng dụng khác của prodigiosin.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Đại học Công nghệ TP. HCM (HUTECH) trong đề tài mã số 2013/11-CNSHTPMT.

Bioefficacy of *Serratia marcescens* isolated from entomopathogenic nematodes (EPN) and their secondary metabolite prodigiosin against *Spodoptera litura*

- Nguyen Hoai Huong
- Nguyen Hoang Anh Kha

University of Science, VNU-HCM

ABSTRACT

Bacterial strain SH1 was isolated from entomopathogenic nematodes (EPN) *Heterorhabditis indica* CP16 released from insect cavaders (*Spodoptera litura*). Their identification by API 20E Kit as well as by 16S rDNA sequencing showed that it belongs to the species *Serratia marcescens*. The isolate expressed the toxicity to *Spodoptera litura*. In the injection assay more than 65 % insects were killed after 10 h at 23 cfu/insect; in the ingestion assay (droplet on leaf surface), more than 50 % insects were killed after 72 h

at 170 cfu/cm². The red pigment produced by the isolate SH1 was confirmed to be one of its secondary metabolites – prodigiosin based on its color, UV/VIS spectra và ESI-MS results. When injected to *Spodoptera litura* at a dose of 422 ng/insect, the active compound killed approximately 65 % insects after 10 h of treatment, and in the ingestion assay (droplet on the leaf surface) at a dose of 27.66 ng/cm² killed approximately 90 % insects after 120 h of treatment.

Keywords: droplet on the leaf surface, entomopathogenic nematodes (EPN), hemocoel injection, prodigiosin, *Serratia marcescens*, toxicity to insects.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. N.B. Khuong, G. C. Smart, Morphometrics of infective juveniles of *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nemata: Rhabditida), *J. Nematol*, 27, 206-212 (1995).
- [2]. E.E. Herbert, H. Goodrich-Blair, Friend and foe: the two faces of *Xenorhabdus nematophila*. *Nature Reviews Microbiology*, 5, 634–646 (2007).
- [3]. N. Boemare, A. Givaudan, M. Brehelin, C. Laumond, Symbiosis and pathogenicity of nematode-bacterium complexes, *Symbiosis*, 22, 21-45 (1997).
- [4]. D.H. Gouge, J.L. Snyder, Temporal association of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) and bacteria. *J. Invertebr. Pathol.*, 91, 147-157 (2006).

- [5]. M.J. Ortega-Estrada, C.D. Rincón-Castro, R. Basurto-Ríos, J. Toledo, J.E. Ibarra, Phoresis between *Serratia marcescens* and *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae) during infection of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Florida Entomologist*, 95, 120-127 (2012).
- [6]. C.X. Zhang, S.Y. Yang, M.X. Xu, J. Sun, H. Liu, F. Kan, J. Sun, R. Lai, K. Y. Zhang, *Serratia nematodiphila* sp. nov., associated symbiotically with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59, 1603-1638 (2008).
- [7]. E. Abebe, M. Jumba, K. Bonner, V. Gray, K. Morris, W. K.Thomas, An entomopathogenic *Caenorhabditis briggsae*. *J Exp Biol.*, 213, 3223-3229 (2010).
- [8]. F. Grimont, P.A.D. Grimont, The Genus *Serratia*. In: Dworkin M (ed) *The Prokaryotes*, 6. Springer Science and Business Media LLC, New York (2006).
- [9]. G.E. Bucher, Nonsporulating bacterial pathogens. In: Steinhaus E (ed) *Insect Pathology V2: An Advanced Treatise*, Elsevier ebook (2012).
- [10]. R.J. Townsend, T.A. Jackson, C.M. Ferguson, J.R. Proffitt, M.W.A. Slay, J. Swaminathan, S.Day, E.M. Gerard, M. O'Callaghan, V. W. Johnson, Establishment of *Serratia entomophila* after application of a new formulation for grass grub control, *NZ Plant Protection*, 57, 310-313 (2004).
- [11]. C. C. Chang, Chen W. C., Ho T. F., H.S. Wu, Y.H. Wei, Development of natural antitumor drugs by microorganisms, *J. Biosci. Bioeng.*, 111, 501-511 (2011).
- [12]. N.N. Châu, V.T. Mỹ, N.T. Duyệt, R.U. Ehlers, The evaluation of multiplication capacity in *Galleria* of entomopathogenic nematode isolates from Vietnam, *J. Biology* 31, 1-7 (2009).
- [13]. R.J. Akhurst, Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus*, bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*, *Microbiology*, 121, 303-309 (1980).
- [14]. S.H. Park, Y.S. Yu, Isolation and identification of a symbiotic bacterium from *Steinernema carpocapsae*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 4, 12-16 (1999).
- [15]. A.V. Giri, N.G. Anandkumar, G. Muthukumar, G. Pennathur, A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiol.* 4, 11 (2004).
- [16]. N.A. Khan, G.J. Goldsworthy, Novel model to study virulence determinants of *Escherichia coli* K1. *Infect Immun.*, 75, 5735-5739 (2007).
- [17]. A. Bravo, D.A. Lereclus, H. Agaisse, A. Salameitou, V. Sanchis, Strains of *Bacillus thuringiensis* and pesticide composition containing them. US patent 6096306 (2000).
- [18]. S.L. Wang, C.Y. Wang, Y.H. Yen, T.W. Liang, S.Y. Chen, C. H. Chen, Enhanced production of insecticidal prodigiosin from *Serratia marcescens* TKU011 in media containing squid pen, *Process Biochemistry*, 47, 1684-1690 (2012).