

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG PHỤ PHẨM THỦY SẢN TRONG LÊN MEN *Bacillus amyloliquefaciens* EB.CK9 VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM BỆNH THỰC VẬT

Trần Thị Hà Trang, Ngô Văn Anh*, Nguyễn Anh Dũng, Nguyễn Văn Bốn

Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên

TÓM TẮT

Vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* có nhiều ứng dụng trong quản lý dịch hại và kích thích sinh trưởng thực vật nên được quan tâm nghiên cứu. Cho đến nay đã có nhiều nghiên cứu nhằm nhân nuôi phát triển chế phẩm vi khuẩn này. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu sử dụng môi trường dinh dưỡng thương mại làm nguồn C/N cho quá trình lên men. Hướng tới giảm chi phí sản xuất và tạo ra sản phẩm thân thiện với môi trường, nguồn phụ phẩm thủy sản (FBP) được sử dụng làm nguồn cơ chất chính trong lên men *B. amyloliquefaciens* EB.CK9. Hoạt tính kháng nấm của chế phẩm *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 được đánh giá bằng phương pháp đồng nuôi cấy. Kết quả nghiên cứu điều kiện nhân nuôi thích hợp cho thấy chủng *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 sinh trưởng tốt (mật độ đạt $6,73 \times 10^9$ CFU/ml) trong môi trường chứa 1,25% bột đầu cá; 0,5% NaCl; pH=7,25; lên men ở nhiệt độ 36°C với tốc độ lắc 200 rpm trong 36 giờ. Nhằm tăng mật độ vi khuẩn trong chế phẩm và rút ngắn thời gian lên men, chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 được nhân nuôi thử nghiệm trong hệ thống Bioreactor (loại 14 lít). Kết quả thử nghiệm cho thấy mật độ vi khuẩn tăng đáng kể (đạt $9,85 \times 10^{11}$ CFU/ml) chỉ sau 8h lên men. Trong điều kiện invitro, chủng *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 có khả năng kháng nấm mạnh, với hiệu lực kháng *Phytophthora palmivora*: 69,25%; *Fusarium oxysporium*: 68,34% và *Fusarium incarnatum*: 60,50%. Kết quả nghiên cứu là minh chứng cho tiềm năng ứng dụng nguồn dinh dưỡng giá rẻ bột đầu cá trong phát triển chế phẩm sinh học *B. amyloliquefaciens* EB.CK9. Nghiên cứu mở ra hướng ứng dụng phụ phẩm thủy sản trong lên men vi sinh tạo sản phẩm an toàn giúp phát triển nền nông nghiệp sạch - hiệu quả - bền vững.

Từ khóa: *Bacillus amyloliquefaciens*, FBP, bột đầu cá, *Fusarium oxysporium*, *Fusarium incarnatum*, *Phytophthora palmivora*.

MỞ ĐẦU

Thủy sản là ngành kinh tế mũi nhọn đem lại kim ngạch xuất khẩu cao cho Việt Nam, tổng sản lượng nuôi trồng và khai thác thủy sản năm 2023 khoảng 194.648 nghìn tấn (Tổng cục thống kê, 2023). Trong đó, sản phẩm phụ của quá trình chế biến thủy sản chiếm tới 15-20% (Trần Thị Hà Trang *et al.*, 2022). Hầu hết phụ phẩm thủy sản (FBP) được thải trực tiếp ra môi trường hoặc được sử dụng tạo các sản phẩm có giá trị gia tăng thấp như phân bón và thức ăn chăn nuôi (Thị Hạnh Nguyen *et al.*, 2022). Hiện nay, các nghiên cứu tái chế phế liệu biển (mai mực, vỏ tôm, đầu tôm, vỏ cua, đầu cá...) thông qua quá trình lên men vi sinh vật tạo ra các sản phẩm giá trị cao đang được nhiều nhà khoa học quan tâm (Trần Thị Hà Trang *et al.*, 2022; Thị Hạnh Nguyen *et al.*, 2022). Do đó, tận dụng nguồn FBP trong nhân nuôi vi sinh vật tạo chế phẩm vi sinh đang là một hướng đi mới, an toàn, tiết kiệm và bền vững trong phát triển công nghệ sinh học nông nghiệp.

Vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* là ứng cử viên đầy triển vọng để phát triển các phương pháp nông nghiệp bền vững và thân thiện với môi trường. *B. amyloliquefaciens* linh hoạt, đa năng và nổi bật với nhiều đặc tính quý như: tạo ra các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính kháng khuẩn chống lại nhiều vi sinh vật gây bệnh thực vật, thúc đẩy sự phát triển của thực vật và tăng cường sức khỏe tổng thể của thực vật. Hơn nữa, *B. amyloliquefaciens* là một trong những vi khuẩn phổ biến nhất được biết đến trong xâm chiếm nội sinh thực vật, đóng một vai trò quan trọng trong việc kiểm soát sinh học các mầm bệnh thực vật có mạch (Ngô Văn Anh *et al.*, 2024). Trong nghiên cứu này, tiến hành sử dụng phụ phẩm thủy sản làm nguồn cơ chất chính để lên men vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* và đánh giá hiệu quả kháng một số loài nấm bệnh thực vật của chế phẩm lên men.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

Chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 sử dụng trong nghiên cứu là chủng vi khuẩn nội sinh cây sầu riêng (Ngô Văn Anh *et al.*, 2024) và các chủng nấm bệnh *Phytophthora palmivora*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium oxysporium* được cung cấp bởi: Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên.

Môi trường thương mại: Peptone, Yeast Extract, NaCl, PDA (Merck); Nguồn phụ phẩm thủy sản: bột đầu cá (FHP), bột vỏ tôm (SSP), bột mai mực (SPP) được cung cấp bởi Công ty Trách nhiệm hữu hạn Thương mại và Xuất nhập khẩu Minh Hoàng Phát.

Nhân nuôi vi khuẩn nội sinh *Bacillus amyloliquefaciens* EB.CK9 trong bình tam giác

Xác định nguồn cơ chất phù hợp

Tiến hành hoạt hoá và nhân nuôi chủng vi khuẩn EB.CK9 trong môi trường LB. Hút 1ml dịch nuôi cấy đã hoạt hoá cho vào các bình môi trường bổ sung các phụ phẩm thủy sản khác nhau (khử trùng ở nhiệt độ 121°C, 1atm trong 15 phút, pH=7). Nhân nuôi vi khuẩn ở 36°C, 200 rpm trong vòng 24h (Ngô Văn Anh *et al.*, 2024). Sau 24 giờ, thu dịch lên men và xác định mật độ vi khuẩn. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Từ đó chọn được nguồn cơ chất thích hợp nhất để nhân nuôi vi khuẩn.

Các công thức môi trường bổ sung các phụ phẩm thủy sản:

CT 1: 1g peptone + 0,5g yeast extract + 0,5g NaCl + 100 ml H₂O.

CT 2: 1,5g FHP + 0,5g NaCl + 100 ml H₂O.

CT 3: 1,5g SSP + 0,5g NaCl + 100 ml H₂O.

CT 4: 1,5g SPP + 0,5g NaCl + 100 ml H₂O.

Xác định tỉ lệ phế phụ phẩm thủy sản phù hợp

Tiến hành nhân nuôi chủng vi khuẩn EB.CK9 trong các môi trường thích hợp bổ sung các tỉ lệ phế phụ phẩm khác nhau. Sau 24 giờ, thu dịch lên men và xác định mật độ vi khuẩn. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Cách tiến hành: nuôi chủng vi khuẩn trong các môi trường với tỉ lệ dinh dưỡng khác nhau của FHP gồm: 1,5%; 1,25%; 1%; 0,75% và 0,5% (khử trùng ở nhiệt độ 121°C, 1atm trong 15 phút, pH=7). Hút 1ml dịch nuôi cấy đã hoạt hoá cho vào các bình môi trường trên. Tiến hành nuôi vi khuẩn ở 36°C, 200 rpm trong 24h (Ngô Văn Anh *et al.*, 2024). Dựa vào mật độ vi khuẩn chọn được tỉ lệ phế phụ phẩm thích hợp nhất để nhân nuôi vi khuẩn.

Xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp

Từ kết quả nghiên cứu nguồn cơ chất phù hợp sẽ được lựa chọn để khảo sát ở các điều kiện nuôi cấy khác lần lượt:

Khảo sát pH thích hợp của môi trường nuôi cấy: 6,5; 6,75; 7,0; 7,25; 7,5.

Khảo sát thời gian nuôi cấy thích hợp: theo dõi mật độ vi sinh vật sau 24, 36, 48, 60, 72 h nuôi cấy.

Sau khi xác định được thành phần môi trường nuôi cấy và một số thông số ảnh hưởng quan trọng đến quá trình nhân nuôi chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 trong điều kiện bình tam giác, tiến hành nhân sinh khối thử nghiệm trên hệ thống lên men tự động Bioreactor.

Phương pháp nhân nuôi chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* EB.CK9 trong hệ thống Bioreactor

Kế thừa kết quả tối ưu hoá trong bình tam giác (1% FHP; 36°C; pH=7,25; 200rpm) để thử nghiệm nhân nuôi trên hệ thống lên men tự động Bioreactor 14 L (Brunswick, Hoa Kỳ) trong 0, 2, 4, 6, 8, 10 và 12 h và theo dõi theo mật độ vi khuẩn sau nuôi cấy.

Đánh giá hoạt tính kháng một số loại nấm bệnh của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* EB.CK9

Hoạt tính kháng nấm bệnh *P. palmivora* của chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 sau khi nuôi cấy trên hệ thống Bioreactor được xác định theo phương pháp đánh giá hoạt tính kháng nấm bệnh *P. palmivora*, *F. incarnatum* và *F. oxysporum* trên môi trường PDA theo phương pháp đồng nuôi cấy (Ngô Văn Anh *et al.*, 2024).

Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả các thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Microsoft Office Excel, phân tích ANOVA bằng phần mềm SPSS 22.0. Các số liệu biểu diễn giá trị trung bình của 3 lần lặp lại ± độ lệch chuẩn với mức ý nghĩa $p < 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả nhân nuôi vi khuẩn nội sinh *Bacillus amyloliquefaciens* EB.CK9 trong bình tam giác

Kết quả xác định nguồn cơ chất phù hợp

Sự sinh trưởng của vi khuẩn là tối ưu trong môi trường nuôi cấy có tỉ lệ N cao, dựa trên cơ sở này, tiến hành khảo sát xác định nguồn protein phù hợp cho quá trình nhân nuôi chủng *B. amyloliquefaciens* EB.CK9. Kết quả thực nghiệm thấy rằng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 phát triển mạnh trên nguồn cơ chất phụ phẩm thủy sản, tạo mật độ cao. Trong đó, nguồn phụ phẩm bột đầu cá (FHP) là nguồn dinh dưỡng mang lại sự phát triển tối ưu nhất, do hàm lượng dinh dưỡng và khoáng chất trong bột đầu cá cao hơn so với bột vỏ tôm (SSP) và bột mai mực (SPP) (Thị Hạnh Nguyen *et al.*, 2022; Trần Thị Hà Trang *et al.*, 2022; Tri Yulianto *et al.*, 2021). Mật độ vi khuẩn của chủng EB.CK9 khi lên men trong FHP đạt $4,43 \times 10^8$ CFU/ml gấp 1,25 lần khi nhân nuôi trên SSP, gấp 2,3 lần khi sử dụng cơ chất SPP và 1,89 lần với môi trường thương mại LB (Hình 1). Kết quả khá tương đồng với nghiên cứu nhân nuôi *B. amyloliquefaciens* trong môi trường LB đạt mật độ $44,5 \times 10^8$ CFU/ml (Ngô Văn Anh *et al.*, 2024). Do đó, chọn bột đầu cá làm nguồn cơ chất chính trong lên men chủng EB.CK9 ở các thí nghiệm tiếp theo.

Kết quả xác định tỉ lệ phế phụ phẩm thủy sản phù hợp

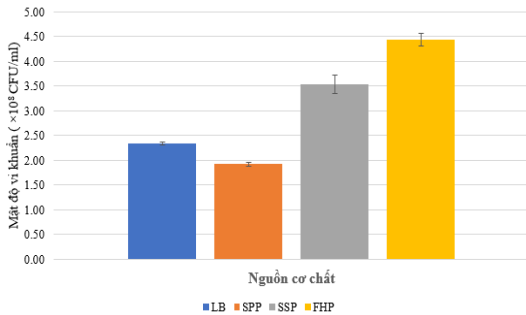
Thí nghiệm xác định tỉ lệ phế phụ phẩm thủy sản phù hợp được tiến hành nhằm giảm chi phí sản xuất đồng thời bảo vệ môi trường. Từ Hình 2 thấy rằng mật độ vi khuẩn khá cao: 4,46-4,65x10⁸ CFU/ml và gần như tương đương nhau ở 2 nghiệm thức sử dụng 1,25% FHP và 1,5% FHP. Khi giảm thành phần bột đầu cá trong môi trường thì mật độ EB.CK9 giảm tương ứng (Hình 2). Lựa chọn 1,25% FHP để sử dụng trong môi trường nhân nuôi cho các khảo sát tiếp theo.

Kết quả xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp

Nồng độ ion H⁺ hoặc OH⁻ làm thay đổi sự phân ly của các chất trong môi trường, do đó pH có nhiều tác động đến quá trình trao đổi chất, sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật (Trần Thị Hà Trang et al., 2022). *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 là chủng trung tính, sinh trưởng tốt nhất trong dải pH từ 6,5-7,5. *B. amyloliquefaciens* subsp. plantarum sp 1901 sinh trưởng tối ưu với pH là 7,0 (Ngô Văn Anh et al., 2024). Đối với chủng *B. amyloliquefaciens* EB.CK9, các điều kiện pH khác nhau có ảnh hưởng khác biệt lên mật độ vi khuẩn, với pH=7,25 vi khuẩn EB.CK9 đạt mật độ cao 5,05x10⁸ CFU/ml (Hình 3).

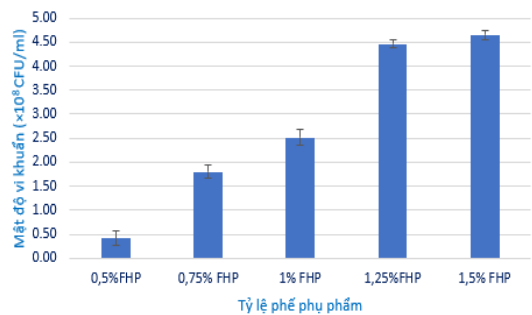
Thời gian nuôi cấy có ảnh hưởng mật thiết đến quá trình nhân nuôi vi khuẩn, mật độ của vi khuẩn có nhiều biến động qua các thời điểm nuôi cấy. *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 có sự gia tăng sinh khối mạnh sau 36 giờ nuôi cấy (6.6x10⁸ CFU/ml), gấp 7.03 lần so với mật độ ở 24 giờ nhân nuôi và có sự giảm rõ rệt về mật độ sau 48 giờ lên men (Hình 4). Hiện tượng này có thể do sự bất lợi về các yếu tố hoá lý trong môi trường nhân nuôi (Trần Thị Hà Trang et al., 2022).

Kết quả thí nghiệm xác định nguồn cơ chất phù hợp



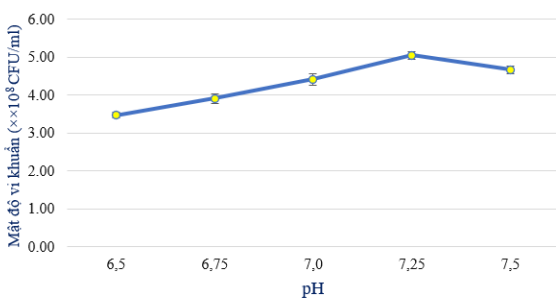
Hình 1. Ảnh hưởng của nguồn cơ chất đến mật độ vi khuẩn EB.CK9

Kết quả tỉ lệ phế phụ phẩm bột đầu cá phù hợp



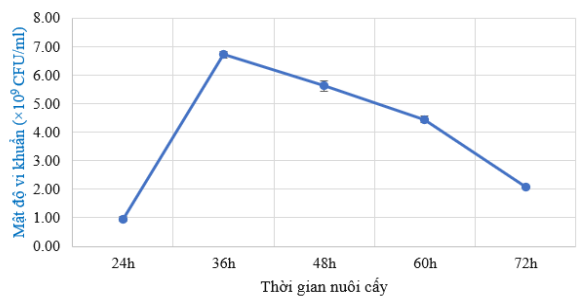
Hình 2. Ảnh hưởng của tỉ lệ phụ phẩm đến mật độ EB.CK9

Kết quả ảnh hưởng của điều kiện pH



Hình 3. Ảnh hưởng của pH đến mật độ vi khuẩn EB.CK9

Kết quả ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi đến mật độ vi khuẩn EB.CK9

Kết quả nhân nuôi chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* EB.CK9 trong hệ thống Bioreactor

Bacillus amyloliquefaciens là nguồn tài nguyên quý giá trong nông nghiệp với tiềm năng làm phân bón sinh học, tác nhân kiểm soát sinh học và chất tăng cường khả năng chống chịu stress cho nhiều loại cây trồng (Ngô Văn Anh et al., 2024). Nghiên cứu lên men thành công chế phẩm sinh học *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 trong Bioreactor quy mô 14L. Có sự gia tăng sinh khối liên tục từ 0h-8h lên men, sau 8h lên men sinh khối đạt đỉnh (9,58x10¹⁰ CFU/ml) và giảm dần sau 10 giờ nhân nuôi (Bảng 1). Khi nhân nuôi trong Bioreactor mật độ tăng nhanh trong thời gian ngắn, có sự khác biệt rõ rệt với kết quả nhân nuôi trong bình tam giác.



Hình 5. Hình ảnh nhân nuôi *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 trong Bioreactor trước và sau nuôi cấy

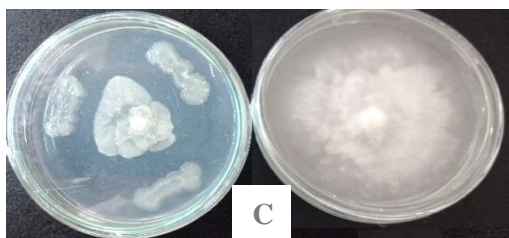
Bảng 1. Mật độ nhân nuôi *B. amyloliquefaciens* EB.CK9

Thời gian nuôi cấy	Mật độ trung bình của chủng EB.CK9 (CFU/ml)
2h	$6,76 \times 10^6$
4h	$2,45 \times 10^8$
6h	$9,02 \times 10^9$
8h	$9,58 \times 10^{10}$
10h	$5,46 \times 10^{10}$

Kết quả đánh giá hoạt tính kháng một số loại nấm bệnh của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* EB.CK9

Bacillus amyloliquefaciens có khả năng sản sinh ra nhiều loại lipopeptide kháng nấm khác nhau như iturin, surfactin, fengycin... (Dhabyan Mutar Kareem Al-Mutar *et al.*, 2023). Vì vậy, *B. amyloliquefaciens* là ứng cử viên đầy triển vọng trong kiểm soát sinh học với hiệu lực cao trong kháng nấm bệnh. Nghiên cứu của Geroche và đồng tác giả (2024) sử dụng *B. amyloliquefaciens*, T6-*Trichoderma harzianum*,... bằng kỹ thuật nuôi cấy kép trong thử nghiệm in vitro thấy rằng ức chế tăng trưởng *P. palmivora* 70,54% (Jeson Geroche *et al.*, 2024). *B. amyloliquefaciens* là tác nhân kiểm soát sinh học trong quản lý bệnh đen quả cacao (*P. palmivora*) với tỷ lệ kiểm soát bệnh dao động từ 53,33-66,67% trong mùa phụ và 40.00-66,67% trong mùa chính (Stephen Larbi-Koranteng *et al.*, 2020). Bốn chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ cây *Theobroma cacao* L. (Malaysia): *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pantoea agglomerans*, *Bacillus pumilus* và *Bacillus subtilis* đều có khả năng ức chế đối với mầm bệnh cao *P. palmivora* (Dhabyan Mutar Kareem Al-Mutar *et al.*, 2023).

Hơn nữa, *B. amyloliquefaciens* còn tạo ra các hợp chất dễ bay hơi (VOC) có tác dụng ức chế sự phát triển và nảy mầm bào tử của nấm bệnh như: *B. amyloliquefaciens* NJN-6 tạo VOC ức chế *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* (Ishak Zubir *et al.*, 2019). Bệnh héo do *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* là một trong những bệnh nấm tàn khốc nhất ảnh hưởng đến dưa hấu (*Citrullus lanatus* L.). Nghiên cứu của Al-Mutar và đồng tác giả (2023) đã phân lập được sáu chủng vi khuẩn vùng rễ dưa hấu thể hiện hoạt tính kháng nấm đáng kể, chống lại *F. oxysporum* f. sp. *niveum* cũng như các loại nấm gây bệnh thực vật khác: *Didymella bryoniae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium graminearum* và *Rhizoctonia solani*. Trong đó, chủng *B. amyloliquefaciens* DHA55 có hiệu quả cao nhất, đạt tỷ lệ ức chế bệnh cao 74,9% (Jun Yuan *et al.*, 2012). *B. amyloliquefaciens* B1408 được phân lập từ đất vùng rễ của cây dưa chuột, có thể ngăn chặn sự xâm nhập của mầm bệnh do nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum*, làm giảm tỷ lệ mắc bệnh héo *Fusarium* tới 59,00% và thúc đẩy tăng trưởng thực vật (Lingjuan Han *et al.*, 2019). Trong nghiên cứu này, chủng vi khuẩn nội sinh sâu riềng *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 có khả năng kháng nấm mạnh với tỷ lệ kháng *Phytophthora palmivora*: 69,25%; kháng *Fusarium oxysporum*: 68,34%, *Fusarium incarnatum*: 60,50% trong điều kiện in vitro (Bảng 2).



Bảng 2. Khả năng kháng nấm bệnh của chủng EB.CK9

Chủng nấm bệnh	Hiệu lực đối kháng của chủng EB.CK9 (%)
<i>Phytophthora palmivora</i>	69,25
<i>Fusarium oxysporium</i>	68,34
<i>Fusarium incarnatum</i>	60,50

Hình 6. Hình ảnh hoạt tính kháng nấm của chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EB.CK9

6A: Hình ảnh kháng nấm *Fusarium incarnatum*; 6B: Hình ảnh kháng nấm *Fusarium oxysporium*; 6C: Hình ảnh kháng nấm *Phytophthora palmivora*.

KẾT LUẬN

Sử dụng thành công nguồn phụ phẩm thủy sản trong lên men *B. amyloliquefaciens* EB.CK9, chủng EB.CK9 sinh trưởng tốt trong môi trường chứa 1,25% FHP; 0,5% NaCl ở nhiệt độ 36°C, điều kiện pH=7,25; 200 rpm trong 36 giờ đạt mật độ $6,73 \times 10^9$ CFU/ml (điều kiện bình tam giác). Sản xuất thành công chế phẩm *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 trong hệ thống Bioreactor đạt $9,85 \times 10^{11}$ CFU/ml sau thời gian lên men ngắn (8h). Chủng *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 có khả năng kháng nấm mạnh, ghi nhận kháng *P. palmivora*: 69,25%; *F. oxysporium*: 68,34% và *F. incarnatum*: 60,50%. Kết quả nghiên cứu là minh chứng cho tiềm năng ứng dụng nguồn dinh dưỡng giá rẻ bột đầu cá trong phát triển chế phẩm sinh học nông nghiệp *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 đồng thời mở ra hướng ứng dụng phụ phẩm thủy sản trong lên men vi sinh tạo sản phẩm thân thiện với môi trường.

Lời cảm ơn: Ngô Văn Anh được tài trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số: VINIF.2023.TS.02. Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số đề tài: B2023-TTN-02.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Al-Mutar D M K, Alzawar N S A, Noman M, Azizullah, Li D, Fengming Song F (2023). Suppression of *Fusarium* Wilt in Watermelon by *Bacillus amyloliquefaciens* DHA55 through Extracellular Production of Antifungal Lipopeptides, *J. Fungi* 2023, 9(3): 336.
- Zubir I Ross E E R, Hamzah A, Aqma W S (2019). Endophytic bacteria from *Theobroma cacao* L. with antifungal activities against *Phytophthora palmivora*, *Asian Journal of Agriculture and Biology*, 7(3).
- Geroche J, Macaya R D, Seprado J L (2024). Utilization of Biological Control Agents against *Phytophthora palmivora* Causing Pod Rot Disease in Cacao, *Twist* 19(1):431-438.
- Yuan J, Raza W, Shen Q, Huang Q (2012). Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*, *Appl Environ Microbiol*, 78(16):5942-4.
- Han L, Wang Z, Li N, Wang Y, Feng J, Zhang X (2019). *Bacillus amyloliquefaciens* B1408 suppresses *Fusarium* wilt in cucumber by regulating the rhizosphere microbial community, *Applied Soil Ecology*, 136: 55-66.
- Ngô Văn Anh, Trần Thị Hà Trang, Vũ Thị Thu Lê, Nguyễn Văn Bốn, Nguyễn Anh Dũng (2024). Tuyển chọn và nhân nuôi vi khuẩn nội sinh cây sấu riêng kháng nấm *Phytophthora palmivora* tại huyện Cư Kuin tỉnh Đắk Lắk, *TNU Journal of Science and Technology*, 229(09): 430 - 437.
- Thị Hanh Nguyen, San-Lang Wang, Thi Huyen Nguyen, Manh Dung Doan, Thi Ha Trang Tran, Van Anh Ngo, Nhat Duoc Ho, Thi Ngoc Tran, Chien Thang Doan, Van Chung Do, Anh Dzung Nguyen and Van Bon Nguyen (2022). Utilization of Fishery-Processing By-Product Squid Pens for Scale-Up Production of Phenazines via Microbial Conversion and Its Novel Potential Antinematode Effect, *Fishes* 2022, 7(3): 113.
- Tổng cục thống kê, 2023.
- Trần Thị Hà Trang, Ngô Văn Anh, Nguyễn Văn Bốn, Nguyễn Anh Dũng (2022). Nghiên cứu điều kiện nhân nuôi vi khuẩn *Bacillus velezensis* KN12 từ bột cá lên men và mật rỉ đường, *Tạp chí Khoa học Đại học Tây Nguyên*, 16 (54):1-10.
- Trần Thị Hà Trang, Ngô Văn Anh, Đoàn Mạnh Dũng, Nguyễn Anh Dũng, Nguyễn Văn Bốn (2022). Nghiên cứu lên men *Bacillus siamensis* CP36 bằng nguồn phụ phẩm thủy sản tạo sản phẩm chứa chất kích thích sinh trưởng thúc đẩy tăng trưởng và sản lượng ớt, *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2022*, 426-431.
- Yulianto T, Putri D S, Miranti S, Putra W K A (2021). Utilization of Shrimp Shell Waste as Alternative Raw for Mariculture, *E3S Web of Conferences* 324, 03006.
- Larbi-Koranteng S, Awuah R T, Kankam F (2020). Biological control of black pod disease of cocoa (*Theobroma cacao* L.) with *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. in vitro and in the field, *Article Number* - 8C724B764743, 12(2):52-63.

RESEARCH ON APPLICATION OF FISHERY BY-PRODUCTS FOR *Bacillus amyloliquefaciens* EB.CK9 FERMENTATION AND INVESTIGATION OF ITS ANTI-PLANT PATHOGENIC FUNGI

Tran Thi Ha Trang, Ngo Van Anh^{*}, Nguyen Anh Dzung, Nguyen Van Bon

Institute of Biotechnology and Environment, Tay Nguyen University, Dak Lak, Vietnam

SUMMARY

Bacillus amyloliquefaciens is a valuable resource in agriculture that many scientists interested study. To date, various studies on cultivation of this bacterium. However, almost studies used commercial nutrient broths as C/N sources for fermentation. Regarding the cost-effective and eco-friendly production, fishery by-products (FBP) are used as the main substrate source for *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 fermentation in this work. The antifungal of *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 was evaluated by co-culture method. Further experiments indicated that *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 growth well (the bacterial density reached 6.73×10^9 CFU/ml) in culture medium containing 1.25% fishes head powder (FHP), 0.5% NaCl, initial pH of 7.25, and fermented at 36°C with shaking speed of 200 rpm, in 36 hours of cultivation. For enhancing bacterial biomass and shortening cultivation time, *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 was cultured in a 14-L Bioreactor system. The experimental indicated that the bacterial density was significant enhance (reached 9.85×10^{11} CFU/ml) after 8 hours of fermentation. *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 has strong antifungal, resistance to *Phytophthora palmivora*: 69.25%; resistance to *Fusarium oxysporium*: 68.34%, *Fusarium incarnatum*: 60.50% (in vitro). The research results are demonstrated which using the low-cost nutritional source FBP in developing the product *B. amyloliquefaciens* EB.CK9. Research opens the way to apply aquatic by-products in microbial fermentation and create safe products to help develop clean - efficient - sustainable agriculture.

Keywords: Bacillus amyloliquefaciens, FBP, FHP, Fusarium oxysporium, Fusarium incarnatum, Phytophthora palmivora.

^{*} Author for correspondence: Tel: +84-374559085; Email: nvanh@ttn.edu.vn