

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG CỦA VI KHUẨN *Bacillus* sp. VỚI NẤM *Fusarium* sp. ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ CÂY QUÝT HỒNG *Citrus Reticulata* Blanco BỊ BỆNH VÀNG LÁ THỐI RỄ TẠI HUYỆN LAI VUNG, TỈNH ĐỒNG THÁP

Phạm Thị Ái Niệm^{1*}, Nguyễn Xuân Đồng¹, Trần Tuấn Anh¹, Võ Thị Minh Thảo¹, Nguyễn Minh Khánh¹, Nguyễn Ngọc Phi¹, Trần Ngọc Quốc Trường¹, Nguyễn Lê Huy Khanh¹, Phan Thị Hồng Thanh³, Nguyễn Tử Minh³

¹Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

³Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

TÓM TẮT

Bệnh vàng lá thối rễ trên cây quýt hồng (*Citrus Reticulata* Blanco) do nhiều tác nhân gây ra, trong đó phải kể đến là dòng nấm gây bệnh thuộc chi *Fusarium*. Nấm gây bệnh có thể tồn tại trong đất, khi gặp điều kiện thích hợp sẽ xâm nhập vào bộ rễ thông qua những vết thương do côn trùng tấn công hoặc gây ra trong quá trình canh tác. Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn vùng rễ (PGPR) có khả năng ức chế đối với nấm bệnh *Fusarium* sp. và đánh giá hiệu quả đối kháng của chúng. Hoạt tính đối kháng của vi khuẩn với nấm *Fusarium* sp. được thực hiện bằng phương pháp đồng nuôi cấy. Kết quả ghi nhận 5/6 chủng phân lập có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Fusarium* sp. với hiệu lực đối kháng dao động từ 7,7 – 41,41% sau 4 ngày đồng nuôi cấy. Chủng KL6 với hiệu suất ức chế sinh trưởng đối với nấm *Fusarium* sp. cao nhất được xác định thuộc chi *Bacillus* sp., có độ tương đồng rất cao 99,79% với loài *Bacillus siamensis* KCTC 13613 (MN176482) và loài *Bacillus amyloliquefaciens* (AB325583). Khả năng sinh tổng hợp chitinase, cellulase, protease và amylase của vi khuẩn *Bacillus* sp. KL6 được đánh giá trong điều kiện *in vitro*, trong đó chủng KL6 có hoạt tính protease và chitinase mạnh nhất với đường kính vòng phân giải lần lượt đạt $2,80 \pm 0,35$ và $2,73 \pm 0,06$ cm. Bên cạnh đó, khảo sát tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy cho thấy, chủng *Bacillus* sp. KL6 có khả năng sinh trưởng và đối kháng tốt trong điều kiện pH=7, nhiệt độ đạt 37°C với nồng độ glucose bổ sung là 2 g/L. Nghiên cứu này chỉ ra tiềm năng của việc sử dụng vi khuẩn vùng rễ *Bacillus* làm tác nhân kiểm soát sinh học trong canh tác cây quýt hồng.

Từ khóa: *Bacillus siamensis*, *Fusarium*, hiệu suất đối kháng, PGPR, quýt hồng.

MỞ ĐẦU

Trong những năm vừa qua, sản lượng và chất lượng quýt hồng (*Citrus Reticulata* Blanco) tại Lai Vung (Đồng Tháp) suy giảm nghiêm trọng. Một trong những nguyên nhân dẫn đến thực trạng trên là sự phát triển, lây lan của bệnh vàng lá thối rễ do nấm *Fusarium* sp. gây ra làm giảm năng suất và chất lượng sản phẩm quýt. Bắt đầu từ khoảng năm 2012, các vùng quýt hồng truyền thống xuất hiện bệnh lý như: vàng lá, thối rễ, héo xanh với tỷ lệ bệnh tăng dần qua các năm. Đến năm 2017, tình trạng bệnh tăng vọt cả về diện tích lẫn mức độ, lan sang giống quýt đường và cam soàn. Theo thống kê, toàn huyện có 5.372 ha cây có múi nhiễm bệnh nặng, trong đó có hơn 2.500 ha không cho năng suất, nhà vườn đã đốn bỏ 1.500 ha cây có múi các loại (Cục thống kê tỉnh Đồng Tháp, 2022). Một số nghiên cứu những năm gần đây đã có đề cập tới phân lập hệ PGPR trên riêng đối tượng cây quýt như: phòng trừ bệnh phấn trắng (Lê Thị Thanh Tâm *et al.*, 2015); nghiên cứu hệ nấm *Trichoderma* để kiểm soát nấm gây bệnh *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Phytophthora*.. gây bệnh héo xanh, thối rễ trên cây có múi (Nguyễn Tiến Dũng *et al.*, 2021); phân lập dòng vi khuẩn cố định đạm và tổng hợp IAA từ rễ cây quýt (Nguyễn Quốc Khương *et al.*, 2021). Tuy nhiên, chưa tìm thấy nghiên cứu tập trung đề cập tới hiệu quả đối kháng nấm *Fusarium* gây bệnh vàng lá thối rễ trên cây quýt hồng từ hệ vi khuẩn vùng rễ thuộc chi *Bacillus* bản địa tại vùng Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp.

Ngày nay, trên thị trường đã phát triển nhiều dòng sản phẩm phân bón có hiệu quả trong việc khắc phục tình trạng bệnh lý do nấm *Fusarium* sp. gây ra cho giống cây ăn quả nói riêng và cây trồng nói chung. Tuy nhiên, các dòng phân bón hóa học trên thị trường còn nhiều hạn chế về hiệu quả khắc phục lâu dài cũng như tác động không mong muốn đối với môi trường và sức khỏe con người. Biện pháp kiểm soát sinh học được đánh giá hiệu quả trong việc kiểm soát nhiều bệnh hại trên cây trồng và góp phần nâng cao tính bền vững của hệ sinh thái nông nghiệp. Các loài *Fusarium* sp. phần lớn là các mầm bệnh tồn tại nhiều trong đất, do đó biện pháp kiểm soát mầm bệnh bằng hệ vi sinh vật vùng rễ (Plant Growth Promoting Rhizobacteria–PGPR) vùng rễ cho thấy tiềm

năng cao thông qua mối quan hệ cộng sinh, không ảnh hưởng hoặc gây hại cho cây trồng. Việc tăng cường hệ PGPR bản địa có lợi thông qua bổ sung chế phẩm sinh học giúp kích thích sinh trưởng cho cây, đối kháng trực tiếp với mầm bệnh, đồng thời kích thích tính kháng hệ thống ở cây trồng với sự hỗ trợ của nhiều hợp chất chuyển hoá từ vi khuẩn, từ đó kiểm soát, ngăn chặn sự phát triển của các mầm bệnh gây hại cho cây. Nghiên cứu được thực hiện với ba mục tiêu chính: (1) Phân lập được các chủng vi khuẩn vùng rễ bản địa trên cây quýt hồng có hoạt tính kháng nấm chống lại *Fusarium*, (2) Đánh giá được khả năng sản sinh một số enzyme thủy phân hỗ trợ phân hủy tế bào nấm bệnh của các chủng vi khuẩn phân lập, (3) Định danh phân loại chủng vi khuẩn đối kháng tiềm năng.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Hóa chất và thiết bị

Hóa chất sử dụng trong thí nghiệm gồm: Môi trường TSB - Tryptone Soy Broth (Himedia): 17 g/L Tryptone; 3 g/L soya peptone; 5 g/L NaCl; 2,5 g/L dextrose (glucose); 2,5 g/L K₂HPO₄; điều chỉnh về pH 7,3±0,2; bổ sung thêm 20 g/L agar khi chuẩn bị môi trường đĩa thạch (TSA – Tryptone Soy Broth).

Thiết bị sử dụng: Tủ an toàn sinh học cấp II AC2-4E8 (ESCO, Nhật Bản), nồi hấp khử trùng HV-110 (Hirayama, Nhật Bản), máy lắc Innova 40R (Eppendorf, Đức), tủ ủ lạnh MIR-554-PE (PHCb, Nhật Bản).

Nguyên liệu

Thu nhận mẫu đất trồng cây quýt hồng.

Chủng giống nấm *Fusarium* sp. được phân lập từ mẫu rễ cây quýt hồng bị bệnh tại huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp, sau đó được tiến hành gây nhiễm nhân tạo nhằm tái phân lập để xác định tác nhân gây bệnh. Kết quả phân lập như sau: xuất hiện tản nấm có sợi khô và mịn, ban đầu có màu trắng rồi chuyển dần sang màu cam đất nhạt sau 3 ngày nuôi cấy. Sau 6 ngày nuôi, đường kính khuẩn lạc nấm đạt 7,0 cm; khuẩn ty phân nhánh, có vách ngăn; bào tử nấm có hình dạng từ oval tới elip, thẳng hoặc hơi cong. Chủng giống nấm *Fusarium* sp. được lưu trữ tại Phòng Thí nghiệm Công nghệ sinh học Môi trường để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

Phương pháp

Sàng lọc hoạt tính đối kháng nấm bệnh của các chủng vi khuẩn

Khảo sát khả năng đối kháng nấm của vi khuẩn được tiến hành bằng phương pháp đồng nuôi cấy. Trong đó, đĩa petri chứa môi trường PDA được chia làm 4 phần bằng nhau, thỏi thạch (đường kính dài 5 mm) của chủng nấm được đặt vào tâm đĩa, dịch sinh khối vi khuẩn (10 µL) được cấy vào 3 giếng thạch (cách tâm khoảng 2 cm và phần còn lại là đối chứng. Mỗi thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần. Sau 2 ngày ủ ở nhiệt độ 28°C, tiến hành quan sát sự hình thành vùng kháng nấm và tính hiệu suất ức chế nấm bệnh của vi khuẩn được tính theo công thức (Han *et al.*, 2015): $H = (R - r) / R \times 100$.

Trong đó, H: Hiệu suất ức chế (%), R: bán kính khuẩn lạc nấm ở phía đối diện vị trí đặt khoanh vi khuẩn, r: bán kính khuẩn lạc nấm ở phía đặt khoanh vi khuẩn.

Phương pháp kiểm tra khả năng tạo bào tử của vi khuẩn

Nhuộm với lục Fuchsin Ziehl và xanh Methylene Loeffler theo phương pháp Ogietska (Nguyễn Lâm Dũng, 2003). Quan sát tiêu bản trên kính hiển vi quang học với vật kính 100X. Tiêu bản nhuộm đúng sẽ quan sát được bào tử bắt màu xanh lục, tinh thể bắt màu hồng.

Định danh chủng vi khuẩn và xác lập mô hình tiến hóa dựa trên so sánh trình tự 16S rDNA

Vùng 16S rDNA được khuếch đại bằng PCR từ DNA tổng số với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3'). Sản phẩm PCR điện di trên gel agarose 1% và tinh sạch bằng bộ kit QiAquick (Qiagen, Đức) được sử dụng làm khuôn cho phản ứng giải trình tự trực tiếp với mồi 27F/1492R.

Trình tự nucleotide của các chủng được so sánh với các trình tự đã có trên Genbank, sử dụng công cụ BLAST trong NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Cây tiến hóa được phân tích từ các mô hình trích xuất từ phần mềm Mega 7 và chúng được thực hiện với 1000 lần lặp lại để xác định giá trị bootstrap (Tamura K *et al.*, 2011).

Xác định khả năng sinh tổng hợp enzym của chủng vi khuẩn

Khả năng sinh cellulase, protease, amylase và chitinase của chủng vi khuẩn được kiểm tra bằng cách bổ sung 1% cơ chất: CMC, casein, tinh bột và chitin vào môi trường thạch nước. Sau 24 giờ ủ ở 37°C, đĩa nuôi cấy được nhuộm với thuốc thử congo đỏ 0,1% để xác định hoạt tính cellulase, lugol 1% để kiểm tra hoạt tính amylase và đo vòng phân giải đối với hoạt tính protease. Khả năng phân giải chitin được xác định bằng cách cấy vạch chủng vi khuẩn trên môi trường chitin agar chứa chitin từ vỏ tôm là nguồn duy nhất (0,3 g/L MgSO₄.7H₂O; 3 g/L (NH₄)₂SO₄; 1 g/L KH₂PO₄; 1 g/L Citric acid; 200 µL Tween 80; 4,5 g/L Colloidal chitin; 0,15 g/L Bromocresol purple; 15

g/L Agar; pH $4,7 \pm 0,2$). Đĩa nuôi cấy được ủ ở 37°C trong 3 ngày. Chúng vi khuẩn được xác định là có khả năng sinh chitinase khi môi trường nuôi cấy chuyển sang màu tím (Bùi Thị Thanh *et al.*, 2022). Sau đó, tiến hành xác định hoạt tính enzyme bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (Shimizu M, 1992): Đường kính vòng phân giải được tính theo công thức: $X=D - d$. Trong đó: X - đường kính vòng phân giải (cm); D - đường kính vòng phân giải lớn (cm); d - đường kính lỗ thạch (cm). Kết quả đánh giá dựa theo: $X \geq 25\text{mm}$: hoạt tính rất mạnh; $X \geq 20\text{mm}$: hoạt tính mạnh; $X \geq 10\text{mm}$: hoạt tính trung bình; $X \leq 10\text{mm}$: hoạt tính yếu.

Khảo sát ảnh hưởng của đơn yếu tố đến mật độ và hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. của chủng vi khuẩn phân lập

Nhân nuôi sinh khối nấm *Fusarium* sp.: Nấm *Fusarium* sp. được nhân nuôi trên môi trường thạch PDA, ở nhiệt độ 28°C trong 2-3 ngày, đảm bảo kích thước tản nấm đạt bán kính 1,5 cm trước khi đưa vào thí nghiệm đối kháng.

Chuẩn bị sinh khối vi khuẩn *Bacillus* sp.: Chủng *Bacillus* sp. được chuyển từ ống giống vào erlen chứa 100 mL môi trường LB lỏng, pH=7 đã hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút. Nuôi trên máy lắc với tốc độ 200 vòng/phút trong 24 giờ. Bổ sung 10% dịch vi khuẩn đạt mật độ 10^9 CFU/mL vào 100mL môi trường LB khi thực hiện các thí nghiệm khảo sát ngưỡng tối ưu đối với các đơn yếu tố. Thay đổi lần lượt từng yếu tố, cố định các yếu tố còn lại, kết quả nghiên cứu của yếu tố trước sẽ được sử dụng trong nghiên cứu yếu tố tiếp theo.

Nguồn carbon bổ sung: Bổ sung các nguồn carbon (2 g/L) khác nhau theo từng nghiệm thức, bao gồm: lactose, manitol, tinh bột, glucose và đối chứng (không bổ sung nguồn carbon vào môi trường).

Yếu tố nhiệt độ: Điều chỉnh mức nhiệt khác nhau ($t^{\circ}=20^{\circ}\text{C}$, $t^{\circ}=30^{\circ}\text{C}$, $t^{\circ}=34^{\circ}\text{C}$, $t^{\circ}=37^{\circ}\text{C}$ và $t^{\circ}=45^{\circ}\text{C}$) theo từng nghiệm thức.

Yếu tố pH: điều chỉnh mức pH khác nhau (5, 6, 7, 8, 9) theo từng nghiệm thức.

Thời gian nuôi cấy trong 24 giờ, lắc 200 rpm và thu được dịch vi khuẩn. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần.

Chỉ tiêu theo dõi: Tăng trưởng sinh khối thông qua độ hấp thụ Abs ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) và hiệu suất kháng nấm *Fusarium* thông qua kích thước đối kháng của chủng vi khuẩn phân lập.

Phương pháp xử lý và phân tích số liệu

Số liệu được xử lý trên phần mềm Excel và xử lý thống kê bằng phần mềm R. Các nghiệm thức được lặp lại ba lần để tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn. Sự khác biệt có ý nghĩa giữa các mẫu thí nghiệm được xác định bằng phương pháp thống kê ANOVA, phân hạng LSD, Duncan với giá trị $p < 0,05$ được xem là sai khác có ý nghĩa.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân lập và định danh hình thái chủng vi khuẩn *Bacillus*

Từ các mẫu đất vùng rễ khu vực trồng quýt hồng tại huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp đã thu được đã phân lập được 6 chủng có đặc điểm hình thái tương đồng với chi *Bacillus* như: khuẩn lạc hình tròn, hoặc có bờ rìa răng cưa, phẳng hoặc đắp nổi, bề mặt nhẵn, mờ; màu sắc khuẩn lạc có thể là trắng đục hoặc vàng kem trên môi trường dinh dưỡng LB.

Bảng 1. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng vi khuẩn phân lập

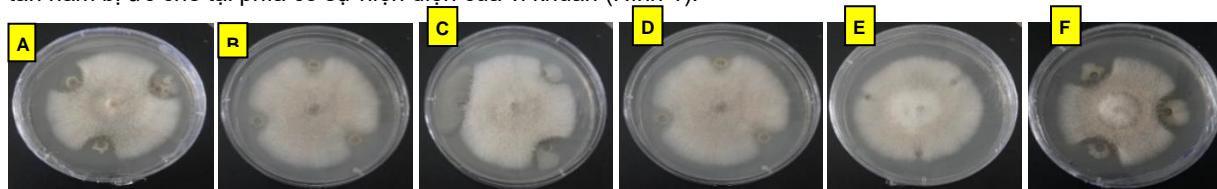
STT	Chủng	Kích thước (μm)	Khả năng di động	Khả năng sinh nội bào tử	Vị trí nội bào tử	Thử nghiệm Catalase	Thử nghiệm Oxydase
01	KL1	$0,6 \times 1,4$	+	+	Giữa	+	+
02	KL2	$0,5 \times 1,2$	+	+	Lệch tâm	+	+
03	KL3	$0,6 \times 1,8$	+	+	Giữa	+	+
04	KL4	$0,5 \times 1,7$	+	-	-	+	+
05	KL5	$0,7 \times 1,3$	+	-	-	+	+
06	KL6	$0,8 \times 2,3$	+	+	Giữa	+	+

Ghi chú: có: + không có: -

Khi quan sát bằng kính hiển vi quang học 100X ghi nhận tế bào vi khuẩn *Bacillus* có hình que, kích thước tế bào dao động trung bình từ $0,6-0,8 \times 1,4-2,6 \mu\text{m}$, gram dương, catalase và oxidase dương tính. Tất cả 6 chủng phân lập được đều cho thấy khả năng di động và có 4/6 chủng khả năng hình thành nội bào tử (KL1, KL2, KL3 và KL6); vị trí bào tử nằm giữa hoặc lệch tâm tế bào (Bảng 1). Những đặc điểm hình thái này tương đồng với mô tả về chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* sp. (Claus, Berkeley, 1986).

Khảo sát hoạt tính đối kháng nấm bệnh của các chủng vi khuẩn

Trong 6 chủng vi khuẩn được phân lập từ mẫu đất vùng rễ cây quýt hồng, có 5/6 chủng thể hiện khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Fusarium* sp.. Các chủng vi khuẩn đối kháng đều phát triển nhanh và hình thành khuẩn lạc sau 72 giờ. Đa số khuẩn lạc có màu trắng sữa hoặc trắng ngà, hình dạng không đều chiếm đa số và phần lớn có dạng rìa chia thùy, gợn sóng hoặc răng cưa; bề mặt khô và láng. Các chủng vi khuẩn cho thấy sự phát triển của tảo nấm bị ức chế tại phía có sự hiện diện của vi khuẩn (Hình 1).



Hình 1. Khả năng đối kháng nấm bệnh *Fusarium* sp. của các chủng vi khuẩn phân lập trên môi trường PDA

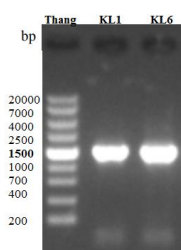
Chú thích: (A) *Fusarium*-KL1; (B) *Fusarium*-KL2; (C) *Fusarium*-KL3; (D) *Fusarium*-KL4; (E) *Fusarium*-KL5; (F) *Fusarium*-KL6

Hiệu lực đối kháng của 5/6 dòng vi khuẩn phân lập đối với nấm *Fusarium* sp. dao động từ 7,77 – 41,41% sau 4 ngày đồng nuôi cấy. Điều này cho thấy 5 dòng vi khuẩn phân lập được đều có khả năng đối kháng với nấm bệnh *Fusarium* sp.. Trong đó, dòng vi khuẩn KL6 có hiệu lực đối kháng cao nhất là $41,41 \pm 2,47\%$, kế tiếp là chủng KL1 với hiệu suất đạt $40,77 \pm 1,30\%$ và dòng vi khuẩn KL4 có hiệu lực đối kháng thấp nhất là $7,77 \pm 0,54\%$, riêng chủng KL5 không có dấu hiệu đối kháng với chủng nấm *Fusarium* sp. Từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 10 ngày nuôi cấy, hầu hết các dòng vi khuẩn vẫn duy trì được khả năng đối kháng nấm, đặc biệt là chủng KL6 có khả năng ức chế mạnh sự phát triển của nấm *Fusarium* sp. Theo kết quả nghiên cứu của Trần Thị Thuỷ và đồng tác giả (2014) về đánh giá khả năng đối kháng của vi khuẩn *Bacillus* sp. đối với nấm *Fusarium moniliforme* gây bệnh trên lúa von tại khu vực đồng bằng sông Cửu Long cho thấy, có 6 chủng *Bacillus* được phân lập từ 285 mẫu bệnh có khả năng đối kháng tốt nhưng hoạt lực thay đổi tùy thuộc vào từng loài *Fusarium* ghi nhận.

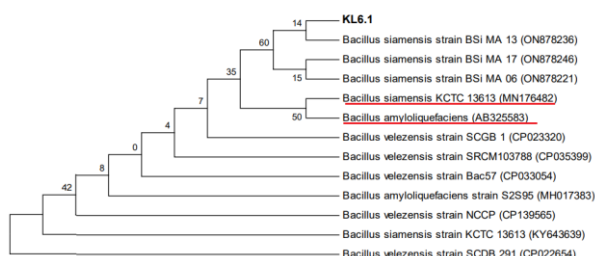
Định danh chủng vi khuẩn bằng phương pháp giải trình tự 16S rDNA

Trình tự 16S rDNA trên bộ gen được nhân bản bằng phương pháp PCR và chạy điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra kết quả (Hình 2). Kết quả cho thấy, sản phẩm PCR của chủng KL1 và KL6 đã thu nhận được có kích thước khoảng 1500 bp, tương đương kích thước đoạn 16S rDNA dự kiến.

Kết quả giải trình tự vùng 16S rDNA của dòng vi khuẩn KL6 và so sánh với các trình tự trong cơ sở dữ liệu GenBank của NCBI bằng công cụ BLAST cho thấy, chủng KL6 có độ tương đồng cao nhất với loài *Bacillus siamensis* KCTC 13613 (MN176482) và loài *Bacillus amyloliquefaciens* (AB325583) với độ tương đồng là 99,79%. Từ đó, cây phát sinh chủng loại của các loài *Bacillus* KL6 đã được xây dựng (Hình 3).



Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của chủng KL1 và KL6 trên gel agarose 1%

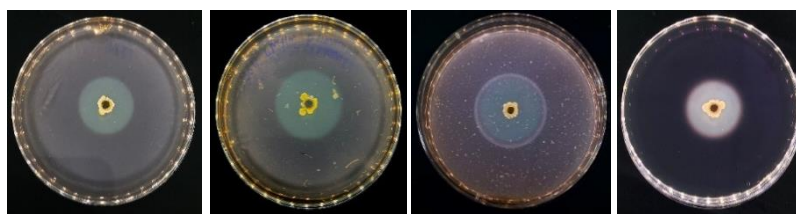


Hình 3. Cây phát sinh chủng loại của chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. KL6

Tuy nhiên, các chủng *B. siamensis*, *B. amyloliquefaciens* có sự giao thoa rất cao về mặt di truyền, vì vậy kết quả định danh xác định chủng KL6 thuộc dòng *Bacillus* sp.. Chủng *Bacillus siamensis* đã được nhóm tác giả Lê Thị Thanh Tâm và đồng tác giả (2023) chứng minh có hiệu quả trong việc ức chế nấm bệnh *Fusarium* sp. gây bệnh thối rễ trên cây cà phê. Trong nghiên cứu của chúng tôi, chủng *Bacillus* sp. KL6 cũng có vai trò kiểm soát bệnh thối rễ trên cây quýt hồng tại Lai Vung (Đồng Tháp). Những kết quả này cho thấy rằng, *Bacillus* sp. là tác nhân kiểm soát sinh học tiềm năng và có thể được ứng dụng để kiểm soát mầm bệnh trong đất trồng, đặc biệt ở vùng rễ.

Kết quả đánh giá khả năng sinh tổng hợp enzyme của chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.

Theo Mishra và đồng tác giả (2020), chitinase, cellulase, protease và amylase là các enzyme quan trọng của các vi sinh vật sử dụng làm tác nhân kiểm soát sinh học bệnh, dịch hại cây trồng. Hoạt tính enzyme của chủng KL6 được thử nghiệm theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch chứa 1% cơ chất tương ứng là casein, tinh bột, CMC và chitin (Hình 4).



(a) Cellulase (b) Chitinase (c) Protease (d) Amylase

Hình 4. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của vi khuẩn *Bacillus* sp.

Kết quả xác định *khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào của vi khuẩn Bacillus sp. KL6* sau 48 giờ cho thấy, chủng *KL6* có khả năng sinh enzyme ngoại bào rất mạnh ($D-d > 2,0$ cm). Trong đó khả năng sinh enzyme protease của chủng *Bacillus sp. KL6* đạt giá trị cao nhất là $2,80 \pm 0,35$, kế tiếp là chitinase đạt $2,73 \pm 0,05$ cm; enzyme cellulase đạt $2,30 \pm 0,10$ cm và amylase đạt $2,25 \pm 0,05$ cm. Khả năng sản sinh các enzyme hoặc các hoạt chất kháng nấm phụ thuộc vào từng chủng vi khuẩn. Các enzyme thủy phân như chitinase, protease, cellulase, amylase... tham gia phá hủy cấu trúc của các hợp chất cao phân tử (chitin, protein, cellulose, hemicellulose...); phá vỡ thành tế bào của vi nấm, làm thay đổi cấu trúc, thành phần thể của chúng, từ đó ngăn chặn sự phát triển và hoạt động của nấm bệnh (Nguyễn Kim Nữ Thảo *et al.*, 2022). Bên cạnh đó, sự tác động của nhiều cơ chế khác nhau có thể tăng cường khả năng đối kháng của các chủng vi khuẩn chống lại mầm bệnh (Nguyễn Thị Liên *et al.*, 2023).

Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đến sinh trưởng và khả năng đối kháng với nấm *Fusarium sp.* của chủng vi khuẩn *Bacillus sp.*

Ảnh hưởng nguồn carbon bổ sung

Chủng *Bacillus sp. KL6* được nuôi cấy trên môi trường có nguồn carbon thay thế (1%) gồm: lactose, maltose, tinh bột và glucose. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến sinh khối và hiệu suất đối kháng của chủng được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến sinh khối và hiệu suất đối kháng của *Bacillus sp. KL6*

Nghiệm thức	Giá trị OD _{600nm}		Hiệu suất đối kháng (H%)
	0h	24h	
NT1		0,804 ^d ± 0,02	64,64 ^c ± 2,18
NT2		1,83 ^a ± 0,05	71,21 ^a ± 0,76
NT3	0,02 ± 0,02	1,53 ^b ± 0,06	68,31 ^{ab} ± 2,10
NT4		1,05 ^c ± 0,18	65,24 ^{bc} ± 0,62
NT5		1,63 ^b ± 0,02	68,68 ^a ± 2,65
p-vaule		0,001	0,008

Chú thích: NT1: Đối chứng; NT2: Glucose; NT3: Maltose; NT4: Tinh bột; NT5: Lactose.

Ghi chú: Các giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trong cùng một cột cùng mẫu tự (a, b, c, d, e...) khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95 %, phân hạng LSD.

Kết quả cho thấy, việc bổ sung nguồn glucose vào môi trường nuôi cấy giúp vi khuẩn *Bacillus sp. KL6* sinh trưởng và đạt hiệu suất đối kháng cao nhất: sinh khối đạt OD_{600nm} = $1,83 \pm 0,05$ sau 24 giờ và hiệu suất đối kháng với *Fusarium sp.* sau 4 ngày đạt $71,21 \pm 0,76\%$. Tiếp theo là lactose, sinh khối đạt OD_{600nm} = $1,63 \pm 0,02$ và hiệu suất đối kháng là $68,68 \pm 2,65\%$. Kết quả trên cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Phạm Tấn Việt và đồng tác giả (2019), tác giả kết luận glucose là nguồn carbon thích hợp cho khả năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng *Fusarium* từ *B. subtilis* NN12. Nghiên cứu của Vijayaraghavan và đồng tác giả (2014) cũng ghi nhận, chủng *B. subtilis* nuôi cấy trong môi trường có bổ sung glucose (2 g/L) sẽ tăng hàm lượng các chất hoạt động bề mặt. Ngoài ra, nghiên cứu của Bùi Thị Thanh và đồng tác giả, (2023) cũng cho thấy, trong số bốn nguồn carbon, glucose cho hoạt tính enzyme cao nhất với 375 ± 5 FU/mL đối với các chủng *Bacillus*. Giá trị ở các nghiệm thức có sự khác biệt thống kê (p-value < 0,05).

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Kết quả khảo sát mức độ ảnh hưởng của yếu tố pH đến sinh khối và hiệu suất đối kháng của chủng *Bacillus sp. KL6* thể hiện qua Bảng 3 như sau:

Bảng 3. Ảnh hưởng của yếu tố pH đến sinh khối và hiệu suất đối kháng của chủng *Bacillus* sp. KL6

Nghiệm thức	Giá trị OD _{600nm}		Hiệu suất đối kháng (H%)
	0 giờ	24 giờ	
NT1	0,01 ± 0,007	0,633 ^c ± 0,02	54,22 ^b ± 0,39
NT2		1,123 ^b ± 0,1	55,30 ^b ± 1,31
NT3		0,801 ^c ± 0,2	56,66 ^b ± 1,03
NT4		1,857^{bc} ± 0,2	60,5^a ± 2,66
NT5		1,08 ^a ± 0,4	55,15 ^c ± 1,6
p-vaule		0,000	0,004

Chú thích: NT1: t°= 20°C; NT2: t°= 30°C; NT3 t°= 34°C; NT4: t°= 37°C, NT5: t°= 45°C.

Ghi chú: Các giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trong cùng một cột cùng mẫu tự (a, b, c, d, e...) khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95 %, phân hạng LSD.

Vi khuẩn *Bacillus* sp. KL6 thích hợp và phát triển tốt nhất ở nhiệt độ 37°C (OD_{600nm} = 1,857 ± 0,2) và hiệu suất đối kháng với nấm *Fusarium* sp. cao nhất, đạt 60,5% so với các điều kiện nhiệt độ còn lại. Các nghiên cứu trước đây cũng xác định được VK *Bacillus* H1, sinh trưởng thích hợp ở pH từ 6,5 – 7,5 và ở nhiệt độ 30 – 35°C (Nguyễn Thị Lan Phương, Đỗ Thu Hà, 2014). Giá trị ở các nghiệm thức có sự khác biệt thống kê (p-value < 0,05).

Ảnh hưởng của pH

Chủng *Bacillus* sp. KL6 tăng sinh trong môi trường LB được điều chỉnh pH ở các mức khác nhau (5, 6, 7, 8, 9) (Bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của yếu tố pH đến sinh khối và hiệu suất đối kháng của *Bacillus* sp. KL6

Nghiệm thức	Giá trị OD _{600nm}		Hiệu suất đối kháng (H%)
	0h	24h	
NT1	0,022 ± 0,12	0,46 ^c ± 0,05	55,32 ^b ± 1,43
NT2		0,75 ^b ± 0,15	60,86 ^a ± 0,87
NT3		1,34^a ± 0,10	61,16^a ± 1,07
NT4		0,84 ^b ± 0,14	52,53 ^c ± 1,90
NT5		0,40 ^c ± 0,06	51,35 ^c ± 0,53
p-vaule		0,000	0,001

Chú thích: NT1: pH=5; NT2: pH=6; NT3: pH=7; NT 4: pH=8, NT5: pH=9.

Ghi chú: Các giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trong cùng một cột cùng mẫu tự (a, b, c, d, e...) khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95 %, phân hạng LSD.

Nghiệm thức 3 (pH=7) đạt giá trị cao nhất về mức sinh trưởng sau 24 giờ nuôi cấy đạt (OD_{600nm} = 1,34 ± 0,10) cũng như hiệu suất đối kháng với nấm bệnh *Fusarium* sp. đạt 61,16%. Điều này chứng minh ở điều kiện tối ưu (pH từ 6–7) chủng *Bacillus* sp. KL6 cho sức sống và khả năng chịu đựng cao nhất. Trong điều kiện này, vi khuẩn phát triển mạnh và tăng nhanh về số lượng, đồng thời tăng hiệu quả đối kháng với nấm bệnh *Fusarium* sp.. Kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với kết quả của tác giả Phan Tấn Việt và đồng tác giả (2022) ghi nhận về hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. của dịch nuôi cấy vi khuẩn giảm mạnh khi pH môi trường tăng lên mức kiềm hóa pH=9 (27,5 ± 2,0%). Khoảng pH từ 6 đến 8 là giới hạn tối ưu để nuôi cấy *Bacillus* sp. nhằm tăng hiệu lực sinh tổng hợp các chất kháng nấm *Fusarium* sp.. Giá trị ở các nghiệm thức có sự khác biệt thống kê (p-value < 0,05).

KẾT LUẬN

Từ các mẫu đất trồng quýt hồng tại huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp đã tuyển chọn được 5/6 chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng cao với nấm bệnh *Fusarium* sp., dao động từ 7,77 – 41,41% sau 4 ngày đồng nuôi cấy. Trong đó, chủng KL6 có khả năng ức chế mạnh sự phát triển của nấm *Fusarium* sp. với hiệu lực đạt 41,41%. Mặt khác, xác định được chủng KL6 thuộc nhóm vi khuẩn *Bacillus* sp. bằng phương pháp giải trình tự 16S rDNA. Đồng thời, đánh giá khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào như chitinase, protease, cellulose và amylase. Trong đó, có hoạt tính protease và chitinase mạnh nhất với đường kính vòng phân giải lần lượt đạt 2,80 ± 0,35 và

2,73 ±0,06 cm. Đây chính là một cơ chế kháng nấm quan trọng của vi khuẩn. Chủng *Bacillus* sp. KL6 có khả năng sinh trưởng và đối kháng *Fusarium* sp. tốt trong điều kiện pH=7, nhiệt độ 37°C với nồng độ glucose bổ sung là 2 g/L. Từ đó, tạo cơ sở khoa học nhằm tiến hành một số thử nghiệm tiếp theo về tái lấy nhiễm và đánh giá hiệu quả ức chế một số loài nấm bệnh khác *Fusarium* gây hại trên cây quýt của chúng vi khuẩn phân lập.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bùi Thị Thanh, Phan Tuấn Anh, Nguyễn Lan Hương (2023). Khảo sát điều kiện nuôi cấy và nguồn dinh dưỡng ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp enzyme tiêu sợi huyết của chủng *Bacillus* sp. Es4. *Tạp chí Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh*. Số 20(3): 479-490.
- Cục Thống kê tỉnh Đồng Tháp (2016-2022). Niên giám thống kê. Phần Nông nghiệp.
- Claus D, Berkeley R (1986). The genus *Bacillus*. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, & J. G. Holt (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, DC: 1105-1139.
- Han J H, Shim H, Shin J H, Kim K S (2015). Antagonistic activities of *Bacillus* spp. strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. *The plant pathology journal*, 31(2): 165.
- Lê Thị Thanh Tâm, Phạm Thị Lương, Lê Thị Phương Thảo, Jennifer Jähne, Peter Lasch, Rainer Borriss (2023). Phân lập, tuyển chọn và xác định các chủng vi khuẩn bản địa có khả năng kích thích sinh trưởng và đối kháng chống lại nấm bệnh *Fusarium oxysporum* và tuyến trùng nốt sùng *Meloidogynesp.* ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp*. Số chuyên đề: Trồng trọt 65(9)-9.2023.
- Mishra P, Mishra J, Dwivedi S K, Arora N K (2020). Microbial Enzymes in Biocontrol of Phytopathogens. In book: *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries* ed. by N.K. Arora.
- Nguyễn Kim Nữ Thảo, Đinh Thị Ngọc Mai, Võ Hoài Hiếu, Lê Thị Hương, Phạm Thị Huệ, Ninh Thị Hạnh, Lê Vinh Hoa, Phạm Văn Quân, Nguyễn Hồng Minh (2022). Chọn lọc và nhận diện vi khuẩn đối kháng nấm bệnh gây hư hỏng quả dâu tây sau thu hoạch. *Tạp chí Kiểm nghiệm và An toàn thực phẩm*, tập 5, số 1-2022.
- Nguyễn Lâm Dũng (2003). *Giáo trình Vi sinh vật học*, NXB Giáo dục Việt Nam
- Nguyễn Quốc Khương, Lý Ngọc Thanh Xuân, Trần Ngọc Hữu, Lưu Thị Yến Nhi, Nguyễn Hồng Huệ, Trần Chí Nhân, Trần Hoài Ninh (2021). Phân lập, tuyển chọn, định danh vi khuẩn cố định đạm và tổng hợp IAA từ rễ cây quýt hồng (*Citrus reticulata* Blanco) trồng tại huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. Số 18: 21-28.
- Nguyễn Tiến Dũng, Nguyễn Thị Thúy, Cao Thị Thu Dung, Quách Thị Hạnh, Nguyễn Thị Minh Trang, Nguyễn Thị Thu Hà, Phan Lệ Nga, Trần Phú Thắng, Trương Tuấn Oanh, Nguyễn Đức Thuận (2022). Nghiên cứu kỹ thuật sản xuất chế phẩm *Trichoderma* phòng trừ bệnh vàng lá - thối rễ trên cây có múi. *Tạp chí Khoa học và công nghệ Việt Nam - Công nghệ sinh học trong nông nghiệp*, thủy sản. Số 64(9)-9.2022.
- Nguyễn Thị Lan Phương, Đỗ Thu Hà (2014). Xác định chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. phân giải protein và thử nghiệm xử lý nước thải thủy sản. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ - Đại học Đà Nẵng*, số 11, 84.1.
- Nguyễn Thị Liên, Nguyễn Thị Yến Như, Trần Thị Xuân Mai, Nguyễn Thị Pha (2016) Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn từ đất vùng rễ ớt có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên ớt, *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. Số 47: 16-23.
- Phạm Tấn Việt, Đinh Thị Ngọc Ngân, Lê Thị Ngọc Ly, Nguyễn Thị Kim Huệ, Lê Thị Vy Hiền, Nguyễn Thị Diệu Hạnh, Nguyễn Ngọc Ân (2020). Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng ức chế *Fusarium* sp. và *Fusarium equiseti* của *Bacillus subtilis* NN12. *Tạp chí Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm*, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh.
- Shimizu M (1992). Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 56(8): 1266-1269.
- Tamura K (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, *Molecular Biology and Evolution*, 2011. 28(10): 2731-2739.
- Trần Thị Thu Thủy, Lê Thị Mai Thảo, Tsutomu Arie, Tohru Teraoka (2014). Phân lập và đánh giá khả năng đối kháng của vi khuẩn *Bacillus* đối với nấm *Fusarium moniliforme* gây bệnh lúa von tại đồng bằng sông cửu long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. Số chuyên đề: Nông nghiệp (2014) (4): 204-211.
- Vijayaraghavan P, Samuel G (2014). Statistical Optimization of Fibrinolytic Enzyme Production Using Agroresidues by *Bacillus cereus* IND1 and Its Thrombolytic Activity In Vitro. *BioMed research international*, 72:50-64.

ISOLATION AND SELECTION OF *Bacillus* sp. WITH ANTI-FUNGAL ACTIVITY AGAINST *Fusarium* sp. CAUSING THE DRY ROOT ROT DISEASE OF *Citrus Reticulate* Blanco IN LAI VUNG DISTRICT, DONG THAP PROVINCE

Pham Thi Ai Niem^{1*}, Nguyen Xuan Dong¹, Tran Tuan Anh¹, Vo Thi Minh Thao¹,
Nguyen Minh Khanh¹, Nguyen Ngoc Phi¹, Tran Ngoc Quoc Tuong¹, Nguyen Le Huy Khanh¹,
Phan Thi Hong Thanh², Nguyen Tu Minh³

¹Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, Viet Nam

²Ho Chi Minh City University of Industry and Trade, Viet Nam

³University of Agriculture and Forestry, Hue University, Viet Nam

SUMMARY

The yellowing leaf and root rot disease of the Mandarin tree (*Citrus Reticulata* Blanco) is caused by many pathogens, notably fungi of the genus *Fusarium*. The fungus can exist in the soil and when conditions are right, it will penetrate the roots of plants through wounds caused by insect bites or wounds created during human cultivation. The disease appears at many different stages of development of Tangerine trees and causes serious damage to the yield and commercial value the tree brings to us. The study was conducted to select the rhizosphere bacterial strains (PGPR) with inhibitory ability against *Fusarium* sp. and evaluate their antagonistic effectiveness. The antagonistic activity of bacteria against fungi was identified using the co-culture method. The results showed that five out of six isolated strains were able to inhibit the growth of *Fusarium* sp. fungus with an antagonistic effect of 7,7 – 41,41% after 4 days of co-culture. Strain KL6 with the highest growth inhibitory efficiency against *Fusarium* sp. was identified as belonging to the genus *Bacillus* sp. and it also had a very high similarity of 99,79% with *Bacillus siamensis* KCTC 13613 (MN176482) and *Bacillus amyloliquefaciens* (AB325583). The ability to biosynthesize chitinase, cellulase, protease and amylase of *Bacillus* sp. KL6 was evaluated under in vitro conditions, in which strain KL6 had the strongest protease and chitinase activity with the diameter of the degradation zone reaching $2,80 \pm 0,35$ and $2,73 \pm 0,06$ cm. Besides, surveying the optimal conditions for cultivating strain KL6 shows that it has good growth and resistance ability under pH=7, temperature reaches 37°C with additional glucose concentration of 2 g/L. This study highlights the potential of using the rhizosphere bacterium *Bacillus* as a biological control agent for mandarin cultivation.

Keywords: *Bacillus siamensis*, *Fusarium oxysporum*, Antagonistic performance, PGPR, *Citrus Reticulata* Blanco.

* Author for correspondence: Tel: +84-4-898208086; Email: ptaniem.snn@tphcm.gov.vn