ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY ĐẾN KHẢ NĂNG ỨC CHẾ *Fusarium oxysporum* VÀ *Fusarium equiseti* CỦA *Bacillus subtilis* NN12

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 ẨN*

Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh

** Tác giả liên hệ: nguyenngocan.cnsh@iuh.edu.vn*

DOIs: https://doi.org/10.46242/jstiuh.v59i05.4593

Tóm tắt: Nấm mốc *Fusarium* là đối tượng gây bệnh trên nhiều loại thực vật khác nhau và ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất cây trồng. Để kiểm soát nấm bệnh một cách an toàn và hiệu quả, các chủng vi khuẩn *Bacillus* đang được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi trên nhiều đối tượng thực vật khác nhau. Trong nghiên cứu này, các điều kiện nuôi cấy thích hợp để chủng *Bacillus subtilis* NN12, thuộc bộ sưu tập giống của Phòng thí nghiệm Công nghệ vi sinh, đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh, sinh tổng hợp các hợp chất kháng nấm mốc *Fusarium oxysporum* và *Fusarium equiseti* đã được xác định. Môi trường nuôi cấy được bổ sung 1% glucose, 0,5% peptone, pH ban đầu 8,0 và nhiệt độ 37°C trong 18 giờ với tốc độ lắc 150 vòng/phút cho hoạt tính kháng mốc cao nhất. Hoạt tính ức chế *F. oxysporum* của dịch nuôi cấy bị hạn chế bởi nhiệt độ cao, trong khi hoạt tính ức chế *F. equiseti* tương đối bền nhiệt lên đến 90°C. Ngoài ra, các hợp chất kháng cả 2 loại nấm mốc kiểm định đều cho thấy khả năng bền trong phổ pH rộng (3,0-11,0) và đặc biệt là không bị tác động bởi proteinase K. Các kết quả thu được tạo cơ sở cho việc ứng dụng chủng vi khuẩn *B. subtilis* NN12 trong các chế phẩm sinh học để ngăn ngừa và điều trị các bệnh do *Fusarium* trên thực vật.

Từ khóa: *Bacillus subtilis, Fusarium oxysporum, Fusarium equiseti,* kháng mốc, điều kiện nuôi cấy

1. GIỚI THIỆU

Trong khoảng một thập kỷ gần đây, bên cạnh các tác nhân thường gặp như vi khuẩn và virus, nấm mốc ngày càng cho thấy sự ảnh hưởng lớn của chúng đến đời sống con người cũng như hệ sinh thái. Với các tác động của biến đổi khí hậu, hiện tượng nóng lên của trái đất, sự phát triển của nấm mốc ngày càng trở nên mạnh mẽ và gây hại trên khắp thế giới. Nấm mốc gây bệnh trên cây trồng gây thiệt hại mùa màng, gây hư hỏng và nhiễm độc lương thực, thực phẩm; nấm ký sinh gây bệnh cho động vật nói chung, gia súc nói riêng và kể cả con người [1, 2].

Chi nấm mốc *Fusarium* thuộc ngành nấm nang Ascomycota, là tác nhân phổ biến của hầu hết các bệnh trên cây trồng quan trọng có giá trị kinh tế nằm trong danh mục của APS (The American Phytopathological Society) [3]. Một trong những loài được biết đến nhiều nhất gây bệnh héo rũ trên cây trồng là *Fusarium oxysporum*. Bệnh héo rũ ở chuối do *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, lần đầu tiên được báo cáo ở Australia vào năm 1876, và sau đó ở Panama năm 1890, được xem là một trong những bệnh trên thực vật gây thiệt hại nặng nề nhất [4, 5]. Không lâu sau đó, bệnh héo rũ do chủng *F. oxysporum* TR4 (Tropical Race 4) đã lây lan mạnh sang các nước châu Á như Indonesia, Malaysia (đầu thập kỷ 1990), Philippines và Trung Quốc (đầu thập kỷ 2000), và đã xuất hiện ở Lào và Việt Nam trong khoảng 2017-2019 [4, 6]. Ngoài ra, một số chủng *F. oxysporum* còn là tác nhân gây bệnh thối tán và rễ cà chua [7]; thối rễ ở đậu Hà Lan, đậu nành, khoai tây [8-10]. *F. oxysporum* còn có thể gây nhiễm nấm ở chuột và người bị suy giảm miễn dịch [11, 12]. Một loài nấm gây bệnh quan trọng khác trên cây trồng được báo cáo gần đây là *F. equiseti*. Các chủng nấm thuộc loài này đã được chứng minh là tác nhân gây bệnh thối quả ở dưa lưới, héo rũ ở cây chà là, và thối bẹ ở bắp [13-15]. Để kiểm soát nấm bệnh trên cây trồng, việc sử dụng nhiều loại hợp chất diệt nấm hóa học làm dấy lên các nguy cơ về ô nhiễm môi trường, gây mất cân bằng hệ sinh thái, tác động trực tiếp lẫn gián tiếp đến sức khỏe con người [16]. Thêm vào đó, cũng như vi khuẩn, việc xuất hiện ngày càng nhiều các chủng nấm bệnh kháng thuốc là mối lo ngại toàn cầu, đòi hỏi phải phát triển thêm các biện pháp kiểm soát mới và hiệu quả có bản chất sinh học [16-19].

Một trong những tác nhân kiểm soát sinh học đã và đang được nghiên cứu và sử dụng rộng rãi là các loài vi khuẩn Gram dương sinh nội bào tử thuộc chi *Bacillus*. Các loài *Bacillus* không chỉ được biết đến bởi khả năng sản xuất hệ enzyme đa dạng, hoạt tính cao mà còn được sử dụng để ức chế virus, vi khuẩn, nấm mốc

© 2022 Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh

và côn trùng gây bệnh ở cả động vật và thực vật [20, 21]. Một số chủng *B. subtilis* đã được phân lập và nghiên cứu cho thấy có tiền năng to lớn trong thực tiễn để đối kháng với các loài mốc *Fusarium* gây bệnh trên cây trồng [22-25]. Trong nghiên cứu này, điều kiện nuôi cấy thích hợp cho hoạt tính kháng *F. oxysporum* và *F. equiseti* từ chủng *B. subtilis* NN12, thuộc bộ sưu tập giống của Phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh, đại học Công nghiệp Tp. Hồ Chí Minh, đã được khảo sát, nhằm khai thác tối đa khả năng sản xuất các hợp chất kháng mốc *F. oxysporum* và *F. equiseti*, làm tiền đề cho những ứng dụng bảo vệ cây trồng trong tương lai.

2. VẬT LIỆU & PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nhân giống và bảo quản các chủng vi khuẩn, nấm mốc

Chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* NN12 được sử dụng làm đối tượng nghiên cứu và 2 chủng nấm mốc *Fusarium oxysporum* gây thối quả xoài và *Fusarium equiseti* gây bệnh trên cây đu đủ thuộc bộ sưu tập giống của Phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh, đại học Công nghiệp Tp. Hồ Chí Minh, được lưu giữ ở điều kiện -70°C. Chủng *B. subtilis* NN12 được hoạt hoá qua đêm trong môi trường Luria-Bertani broth (LB broth) ở 37°C và các chủng nấm mốc được nuôi cấy trên môi trường PGA (Potato Glucose Agar) ở 37°C trong 5 ngày trước khi thực hiện các nghiên cứu tiếp theo.

2.2. Đánh giá khả năng đối kháng nấm mốc kiểm định của *B. subtilis* NN12

Chủng vi khuẩn *B. subtilis* NN12 được sử dụng để xác định hoạt tính kháng mốc được hoạt hoá qua đêm trong môi trường Luria-Bertani broth (LB broth) (Himedia-India, tryptone 10,0 g; cao nấm men 5,0 g; NaCl 10,0 g; nước cất đủ 1000 ml; pH 7,0-7,2) ở 37°C. Các chủng mốc được nuôi cấy trên môi trường PGA (Khoai tây 200 g chiết dịch; Glucose 20,0 g; Agar 20,0 g; nước cất đủ 1000 ml; pH 7,0-7,2) ủ 3-5 ngày ở 37°C cho tơ nấm phát triển để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo [10, 14]. Phương pháp kiểm tra đối kháng nấm mốc được thực hiện theo phương pháp khuếch tán giếng thạch [26]. Giống nấm mốc kiểm định được cấy điểm trên đĩa Petri (80x15 mm) có môi trường PGA cách mép đĩa 1,0 cm và ủ ở 37°C. Sau 24 giờ, các đĩa được đục lỗ có đường kính 6 mm, 20 µl dịch vi khuẩn *B. subtilis* NN12 (thu sau 24 giờ nuôi cấy trên môi trường LB broth trong erlen 50 ml ở điều kiện lắc 150 vòng/phút, ly tâm 14.000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút, và lọc qua màng lọc 0,45 µm) được thêm vào các lỗ thạch, để yên ở 4°C trong 2 giờ. Mẫu đối chứng âm được thực hiện với môi trường LB broth vô trùng. Khả năng đối kháng nấm mốc được ghi nhận sau 5-7 ngày nuôi ủ ở 37°C dựa trên quan sát khả năng lan tơ từ tâm đĩa đến lỗ thạch chứa dịch nuôi cấy vi khuẩn so với lỗ thạch đối chứng âm.

2.3. Khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố môi trường lên khả năng đối kháng *Fusarium* spp. của *B. subtilis* NN12

Chủng vi khuẩn *B. subtilis* NN12 được nuôi trong môi trường LB lỏng ở 37°C, lắc 150 vòng/phút trong 24 giờ và được sử dụng như nguồn giống tăng sinh cho các thí nghiệm khảo sát điều kiện sinh tổng hợp các hợp chất đối kháng với các chủng nấm mốc kiểm định như ảnh hưởng của điều kiện nhiệt độ, pH, nguồn carbon, nitrogen khác nhau. Khả năng đối kháng nấm mốc *F. oxysporum* và *F. equiseti* của dịch nuôi cấy vi khuẩn được kiểm tra sau khi loại bỏ tế bào (ly tâm 14.000 vòng/phút ở 4°C và lọc qua màng lọc 0,45 µm) bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch và so sánh phần trăm ức chế tơ ([Khoảng cách từ tâm đến vùng lan tơ dài nhất - Khoảng cách từ tâm đến vùng bị ức chế]x100%) ở các điều kiện thí nghiệm khác nhau.

Để khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng mốc, chủng vi khuẩn *B. subtilis* NN12 được nuôi trong môi trường LB lỏng và được nuôi ủ ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau 25°C, 28°C, 33°C, 37°C, 45°C ± 0,1°C và kiểm tra hoạt tính đối kháng nấm mốc sau các khoảng thời gian khác nhau (3, 6, 12, 18, 24 giờ) bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch.

Kết quả chọn lọc từ các điều kiện nhiệt độ thích hợp sẽ được sử dụng trong khảo sát ảnh hưởng của pH môi trường lên sự sinh tổng hợp các hợp chất đối kháng. Môi trường LB lỏng được điều chỉnh ở các giá trị pH ban đầu khác nhau 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 ± 0,1 bằng NaOH 1N hoặc HCl 0,1N. Vi khuẩn *B. subtilis*

NN12 được nuôi ủ trong điều kiện nhiệt độ thích hợp. Dịch vi khuẩn được thu nhận và kiểm tra hoạt tính đối kháng sau khoảng thời gian chọn lọc từ kết quả trên.
Để khảo sát ảnh hưởng của các nguồn carbon, môi trường LB lỏng với thành phần bao gồm 5,0 g cao nấm men; 10,0 g pepton; 5,0 g NaCl; nước cất vừa đủ 1,0 lít; pH 7,2-7,4 và bổ sung 10,0 g một trong các nguồn carbon khác nhau như glucose, sucrose, lactose, dextrin, tinh bột. Nguồn carbon cho kết quả đối kháng cao nhất được sử dụng cho các thí nghiệm khảo sát tiếp theo.
Ảnh hưởng của nguồn nitrogen lên sự sinh tổng hợp các chất đối kháng được kiểm tra trong môi trường LB lỏng với thành phần carbon cho kết quả cao nhất trong thí nghiệm trên và bổ sung 5,0 g một trong các nguồn nitrogen bao gồm: peptone, cao nấm men, $NaNO_3$, NH_4NO_3, NH_4Cl, ure.

2.4. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ, điều kiện pH và proteinase K lên hoạt tính kháng *Fusarium* spp. của *B. subtilis* NN12

Dịch nuôi cấy của chủng *B. subtilis* NN12 trong điều kiện thích hợp đã được khảo sát và lựa chọn (mục 2.3) được loại bỏ tế bào bằng phương pháp ly tâm 14000 vòng/phút ở 4°C và lọc qua màng lọc 0,45 µm.
Độ bền nhiệt lên hoạt tính kháng mốc của dịch nuôi cấy vi khuẩn được khảo sát bằng cách ủ 1,0 ml dịch ở các mốc nhiệt độ khác nhau 5°C ± 0,1°C trong khoảng từ 60°C đến 95°C trong 15 phút, sau đó kiểm tra hoạt tính bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch.
Độ bền pH của dịch nuôi cấy vi khuẩn cũng được kiểm tra tương tự bằng các thay đổi giá trị pH của dịch nuôi cấy vô bào bằng cách điều chỉnh pH bằng dung dịch NaOH và HCl đã được hấp khử trùng sao cho pH dịch nuôi cấy đạt các mức giá trị cách nhau 1,0 ± 0,1 trong khoảng từ 1,0 đến 12,0 và ủ trong 2 giờ, sau đó kiểm tra hoạt tính bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch.
Ảnh hưởng của proteinase K lên hoạt tính kháng mốc được khảo sát bằng cách ủ dịch với proteinase K ở nồng độ 1,0 mg/ml trong 2 giờ ở 37°C, sau đó kiểm tra hoạt tính bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch [26].

Hoạt tính kháng mốc được thể hiện bằng Phần trăm hoạt tính ức chế tơ còn lại của các nghiệm thức so với hoạt tính của dịch nuôi cấy vi khuẩn ở các điều kiện thích hợp đã được chọn ở mục 2.3 và không thay đổi nhiệt độ cũng như pH của dịch sau nuôi cấy.

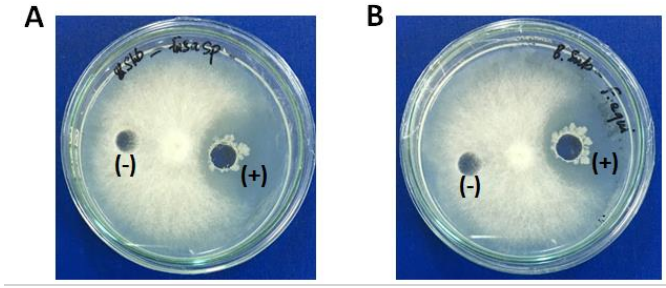
2.5. Phương pháp thống kê và xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được tính toán, vẽ biểu đồ trên Microsoft Excel 2013 và được xử lý thống kê bằng công cụ ANOVA của phần mềm Statgraphics Centurion 18.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng đối kháng F. oxysporum và F. equiseti của B. subtilis NN12

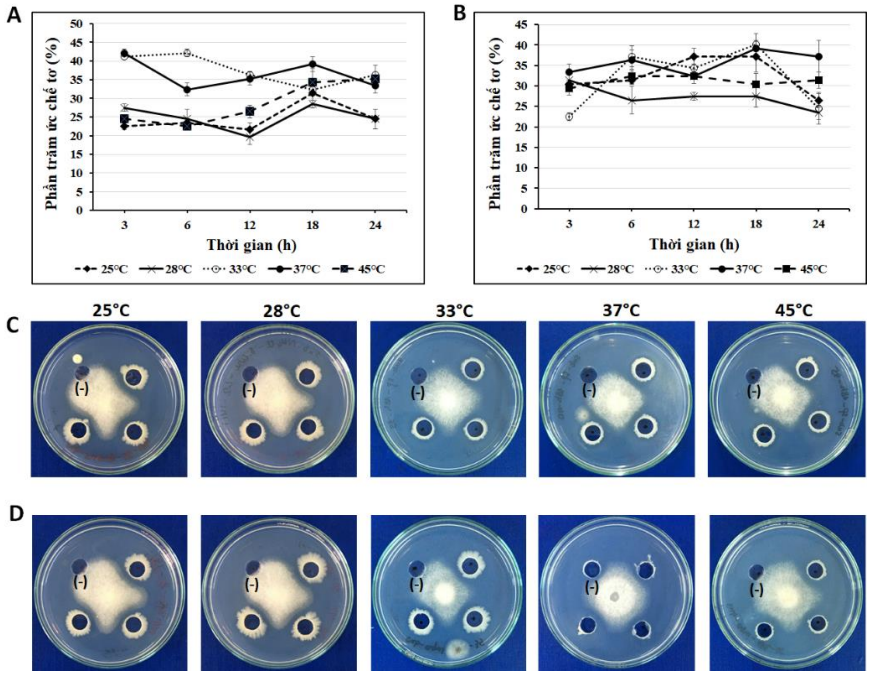
Khả năng đối kháng với 2 chủng nấm mốc gây bệnh thối nhũn trên xoài F. oxysporum và F. equiseti của B. subtilis NN12 được kiểm tra bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch với dịch vi khuẩn được nuôi ủ trong môi trường LB sau 24 giờ và kết quả được trình bày trong hình 1. Dịch nuôi cấy B. subtilis NN12 đã thể hiện khả năng đối kháng lên 2 loại nấm mốc Fusarium kiểm định với việc ức chế sự phát triển của hệ sợi tơ nấm sau 7 ngày nuôi ủ. Kết quả cho thấy tiềm năng ứng dụng chủng vi khuẩn B. subtilis NN12 trong việc ức chế nấm mốc gây bệnh thực vật này. Hoạt tính đối kháng nấm mốc Fusarium của dịch nuôi cấy B. subtilis cũng được thể hiện trong nghiên cứu của Khan và cộng sự (2018) và được sử dụng như yếu tố thúc đẩy sự phát triển của thực vật [27]. Ngoài ra, khả năng đối kháng nấm mốc gây bệnh trên thực vật của các chủng B. subtilis cũng được nghiên cứu nhiều và vận dụng trong việc sản xuất các chế phẩm vi sinh để bảo vệ cây trồng một cách an toàn và không ảnh hưởng sinh thái [27, 28]



Hình 1: Khả năng đối kháng với nấm mốc *F. oxysporum* (A) và *F. equiseti* (B) của *B. subtilis*. (-) Đối chứng với môi trường LB; (+) mẫu dịch vi khuẩn *B. subtilis* NN12.

3.2. Ảnh hưởng của điều kiện nhiệt độ nuôi cấy lên khả năng đối kháng *F. oxysporum* và *F. equiseti* của *B. subtilis* NN12

Khả năng sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp của vi sinh vật bị ảnh hưởng bởi điều kiện và môi trường nuôi cấy, do đó, các yếu tố nhiệt độ, pH, thành phần carbon và nitrogen trong môi trường nuôi cấy chủng *B. subtilis NN12* được khảo sát và kiểm tra khả năng đối kháng 2 chủng *Fusarium* kiểm định. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự sinh tổng hợp các hợp chất đối kháng *Fusarium* của chủng vi khuẩn *B. subtilis* NN12 được kiểm tra trong các điều kiện nhiệt độ 25°C, 28°C, 33°C, 37°C, 45°C ± 0,2°C. Dịch nuôi cấy được thu nhận và kiểm tra khả năng kháng khuẩn sau mỗi 3 giờ và kết quả được thể hiện trong hình 2.



Hình 2: Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm mốc *F. oxysporum* (A, C) và *F. equiseti* (B, D) của *B. subtilis* NN12. (-) Đối chứng với môi trường không nuôi cấy.

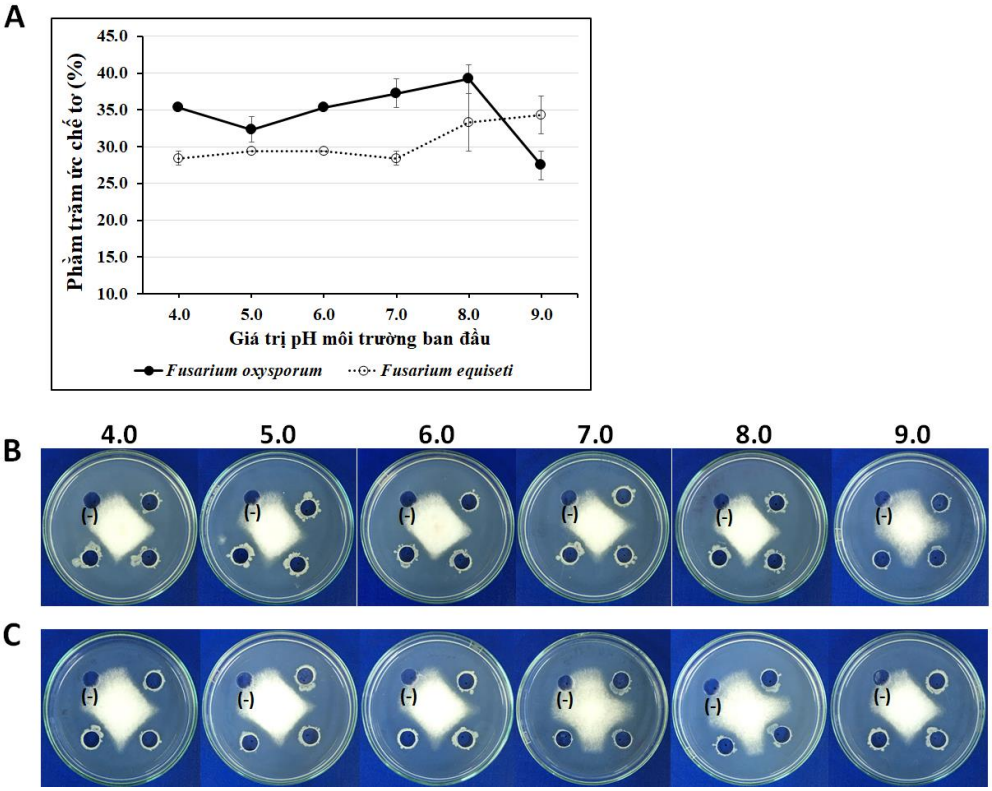
Kết quả cho thấy rằng nhiệt độ và thời gian có ảnh hưởng lớn đến khả năng sinh các hợp chất kháng mốc của *B. subtilis* NN12 lên hai chủng nấm mốc kiểm định *Fusarium*. Dịch nuôi cấy ở 5 điều kiện nhiệt độ khác nhau đều có khả năng sinh tổng hợp các chất đối kháng với *Fusarium*, tuy nhiên tùy thời điểm nuôi cấy mà có hoạt tính khác nhau. Trong thử nghiệm với chủng nấm mốc *F. oxysporum*, dịch nuôi cấy thể hiện khả năng ức chế tơ nấm cao nhất khi vi khuẩn *B. subtilis* NN12 được nuôi trong điều kiện nhiệt độ 37°C sau 18 giờ và 33°C sau 6 giờ, với hoạt tính ức chế tương ứng đạt 39,2% ± 2% và 42,2% ± 2,4% so với đối chứng. Hoạt tính kháng mốc ở các nhiệt độ 25°C, 28°C, 45°C tăng dần theo thời gian nuôi ủ và đạt tối đa ở thời điểm 18 giờ nuôi cấy (28,4%-34,3%) (hình 2C). Hoạt tính giảm dần khi được tiếp tục nuôi ủ trong điều kiện 25°C và 28°C, trong khi tại điều kiện nhiệt độ 45°C thì hoạt tính kháng mốc không thay đổi khi

được kiểm tra sau 24 giờ nuôi ủ. Hoạt tính kháng mốc ở 33°C được duy trì không đổi trong khoảng 3-6 giờ nuôi cấy và giảm dần theo thời gian khi được tiếp tục nuôi, cho thấy hoạt tính kháng mốc không ổn định trong điều kiện nhiệt độ này (hình 2A, 2C). Như vậy, dịch nuôi cấy tại thời điểm 18 giờ ở nhiệt độ 37°C cho hoạt tính kháng nấm mốc *F. oxysporum* đạt giá trị cao nhất so với các điều kiện nhiệt độ còn lại. (ANOVA, n=3, độ tin cậy 95%)

Khả năng đối kháng của dịch nuôi cấy vi khuẩn *B. subtilis* NN12 lên sự phát triển của hệ sợi tơ nấm *F. equiseti* đạt hiệu quả ức chế mạnh nhất tại nhiệt độ 33°C và 37°C sau 18 giờ nuôi ủ (40,2% ± 2,6 % và 39,2% ± 2%). Ở điều kiện nhiệt độ 25°C, hoạt tính kháng mốc của dịch nuôi cấy tăng dần và đạt giá trị cao nhất từ 12-18 giờ nuôi cấy (37,3% ± 3,9%) (hình 2D), trong khi hoạt tính tại điều kiện 28°C và 45°C thì không có sự thay đổi đáng kể khi tăng thời gian nuôi cấy từ 12 giờ đến 24 giờ (hình 2B, 2D). Kết quả phân tích thống kê cho thấy hoạt tính kháng mốc *F. equiseti* của dịch nuôi cấy vi khuẩn không có sự khác biệt khi được nuôi cấy trong điều kiện nhiệt độ 25°C, 33°C, 37°C sau thời gian 18 giờ (ANOVA, n=3, độ tin cậy 95%). Trong nghiên cứu của Asaturova và cộng sự (2015), nhiệt độ thích hợp cho khả năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng mốc của chủng *B. subtilis* BZR 336 là 30°C, trong khi chủng *B. subtilis* BZR 517 là 35°C sau 48 giờ nuôi cấy [29]. Như vậy, dựa vào các kết quả đạt được, nhiệt độ 37°C sau 18 giờ nuôi cấy được chọn là điều kiện thích hợp cho việc nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus subtilis* NN12 để sinh tổng hợp các hợp chất kháng mốc *Fusarium*.

3.3. Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy lên khả năng đối kháng *F. oxysporum* và *F. equiseti* của *B. subtilis* NN12

Ngoài việc chịu ảnh hưởng bởi điều kiện nhiệt độ, pH môi trường nuôi cấy ban đầu cũng ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng cũng như sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp. Để khảo sát ảnh hưởng của yếu tố pH lên sự sinh tổng hợp các hợp chất kháng mốc của vi khuẩn *B. subtilis* NN12, môi trường nuôi cấy được điều chỉnh ở các giá trị pH ban đầu khác nhau 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 ± 0,1 và vi khuẩn được nuôi cấy tại nhiệt độ 37°C trong điều kiện lắc 150 vòng/phút. Dung dịch nuôi cấy được thu nhận và kiểm tra khả năng đối kháng sau 18 giờ nuôi cấy.

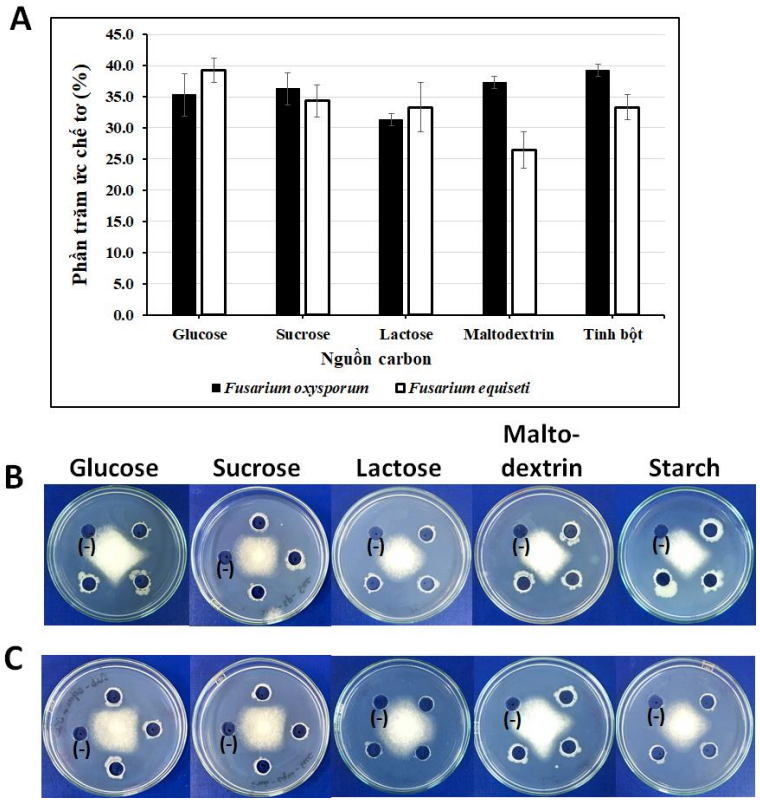


Hình 3. Ảnh hưởng của pH môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm mốc *F. oxysporum* (A, B) và *F. equiseti* (A, C) của *B. subtilis* NN12. (-) Đối chứng với môi trường không nuôi cấy.

Kết quả thể hiện ở hình 3 cho thấy chủng vi khuẩn *B. subtilis* NN12 đều thể hiện khả năng kháng mốc trong các môi trường có giá trị pH ban đầu 4,0-9,0. Hoạt tính kháng nấm mốc *F. oxysporum* tăng dần khi pH tăng từ 5,0 -8,0 và đạt được khả năng đối kháng cao nhất tại pH 8,0 với phần trăm ức chế đạt 39,6% ± 2,2% (hình 3A, 3B). Trong trường hợp nấm mốc *F. equiseti*, hoạt tính đối kháng của dịch nuôi cấy duy trì ổn định trong môi trường có pH 4,0-7,0 (28,4%-29,4%), và đạt 33,3% ± 3,9% và 34,3% ± 2,6% tương ứng tại pH 8,0 và pH 9,0 (hình 3A, 3C). Hoạt tính kháng nấm mốc *F. oxysporum* của dịch nuôi cấy giảm mạnh khi pH môi trường tăng lên pH 9,0 (27,5% ± 2,0%), trong khi hoạt tính kháng nấm mốc *F. equiseti* thì không thay đổi trong khoảng pH 8,0-9,0. Kết quả phân tích thống kê cho thấy hoạt tính kháng nấm mốc *F. oxysporum* không có sự khác biệt ý nghĩa khi môi trường có pH ban đầu 6,0-8,0. Trong khi đó, kết quả phân tích thông kê cho thấy khả năng kháng *F. equiseti* của dịch nuôi cấy từ *B. subtilis* NN12 giữ ổn định khi giá trị pH môi trường ban đầu từ 4.0-9.0 (ANOVA, n=3, độ tin cậy 95%). Như vậy, pH 6,0-8,0 là giá trị pH môi trường ban đầu phù hợp để nuôi cấy *Bacillus subtilis* NN12 sinh các hợp chất kháng mốc *F. oxysporum*, trong khi quá trình sinh tổng hợp các hợp chất kháng nấm mốc *F. equiseti* không bị ảnh hưởng bởi điều kiện pH 4,0-9,0. Kết quả tương tự cũng được quan sát thấy điều kiện nuôi cấy chủng *B. subtilis* BZR 336 để sinh tổng hợp các hợp chất kháng mốc là pH 6,0-8,0 [29]. Do đó, pH 8,0 được chọn làm điều kiện để nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus subtilis* NN12 cho quá trình sinh tổng hợp các chất kháng mốc *Fusarium*.

3.4. Ảnh hưởng của nguồn carbon trong môi trường nuôi cấy lên khả năng đối kháng *F. oxysporum* và *F. equiseti* của *B. subtilis* NN12

Thành phần carbon là thành phần không thể thiếu trong các môi trường nuôi cấy vi sinh vật và có ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp các hợp chất kháng mốc. Do đó, chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của các nguồn carbon khác nhau (glucose, sucrose, lactose, maltodextrin và tinh bột) lên quá trình sinh tổng hợp các hợp chất kháng mốc của chủng vi khuẩn *B. subtilis* NN12. Kết quả thể hiện ảnh hưởng của nguồn carbon được trình bày trong hình 4.

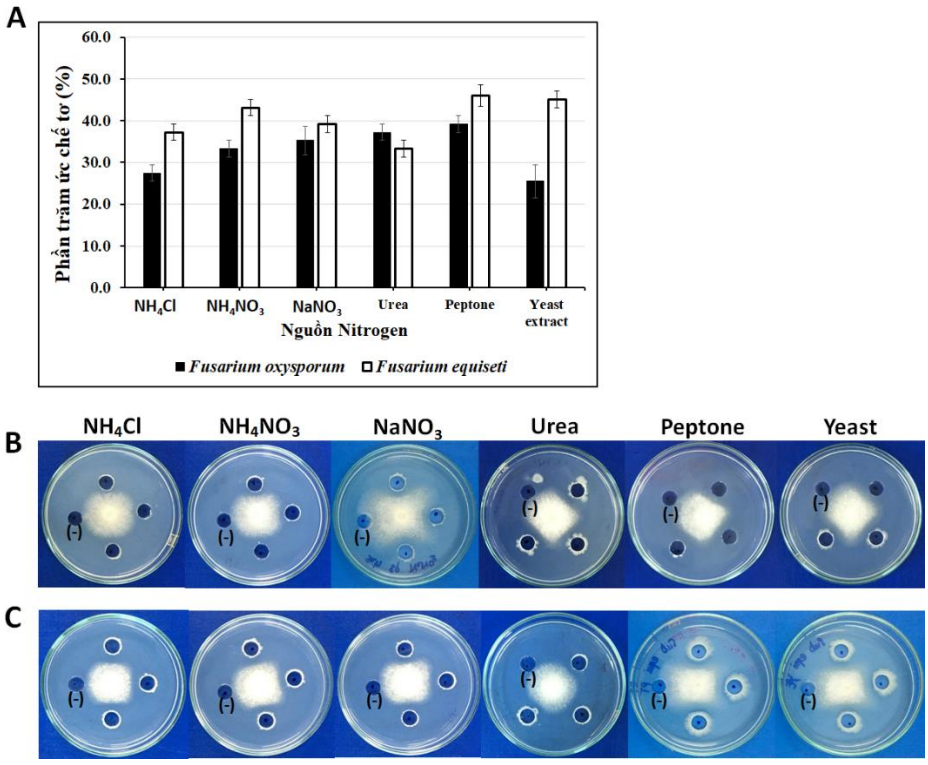


Hình 4: Ảnh hưởng của nguồn carbon trong môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm mốc *F. oxysporum* (A, B) và *F. equiseti* (A, C) của *B. subtilis* NN12. (-) Đối chứng với môi trường không nuôi cấy.

Kết quả khảo sát cho thấy *B. subtilis* NN12 có khả năng sử dụng cả 5 nguồn carbon trong khảo sát và sinh tổng hợp các hợp chất kháng hai chủng *Fusarium* kiểm nghiệm. Hoạt tính kháng mốc *F. oxysporum* được thể hiện cao nhất khi vi khuẩn được nuôi trong môi trường có bổ sung tinh bột (39,2% ± 1,0%). Tuy nhiên, môi trường nuôi cấy được bổ sung bốn nguồn carbon glucose, sucrose và maltodextrin vào môi trường nuôi cấy thì hoạt tính kháng mốc *F. oxysporum* của dịch nuôi cấy là tương đương nhau (35,3% ± 3,4% - 37,3% ± 1,0%), và không có sự khác biệt khi phân tích thống kê (ANOVA, n=3, độ tin cậy 95%). Trong khi đó, hoạt tính kháng mốc là thể hiện thấp nhất khi được nuôi trong môi trường bổ sung lactose (31,4 % ± 1,0%) (hình 4A, 4B). Bên cạnh đó, khả năng ức chế sự phát triển của nấm mốc *F. equiseti* của dịch nuôi cấy đạt cao nhất khi môi trường có bổ sung nguồn carbon là glucose (39,4% ± 2,0%). Ngoài ra, khi môi trường nuôi cấy bổ sung tinh bột, lactose hay sucrose đều cho giá trị hoạt tính tương đương nhau và không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê (hình 4B, 4C). Từ các kết quả thu nhận được, glucose được lựa chọn làm nguồn carbon thích hợp cho khả năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng mốc *Fusarium* từ *B. subtilis* NN12. Trong nghiên cứu của Shinji Mizumoto (2007), nguồn carbon là glucose cũng được chọn lựa cho môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus subtilis* RB14-CS để sinh tổng hợp các chất đối kháng nấm mốc [30].

3.5. Ảnh hưởng của nguồn nitrogen trong môi trường nuôi cấy lên khả năng đối kháng *F. oxysporum* và *F. equiseti* của *B. subtilis* NN12

Sự sinh tổng hợp các hợp chất trao đổi thứ cấp của các vi sinh vật cũng bị ảnh hưởng bởi thành phần nitrogen trong môi trường nuôi cấy. Do đó, để xác định ảnh hưởng của nitrogen lên sự sinh tổng hợp các hợp chất đối kháng *Fusarium* của *B. subtilis* NN12, chủng vi khuẩn được nuôi trong môi trường có các nguồn carbon khác nhau (NH_4NO_3, NH_4Cl, $NaNO_3$, ure, cao nấm men, peptone) và dịch nuôi cấy được kiểm tra hoạt tính sau 18 giờ. Kết quả được thể hiện ở hình 5.



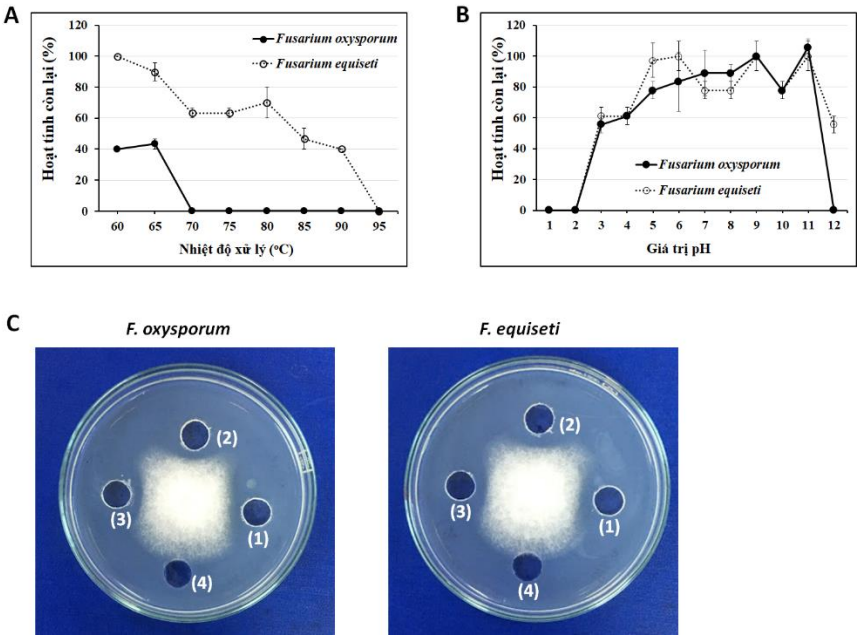
Hình 5: Ảnh hưởng của nguồn nitrogen trong môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm mốc *F. oxysporum* (A, B) và *F. equiseti* (A, C) của *B. subtilis* NN12. (-) Đối chứng.

Kết quả thể hiện ở hình 5 cho thấy chủng vi khuẩn *B. subtilis* NN12 đều có khả năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng hai chủng nấm mốc *Fusarium* trong môi trường sử dụng các nguồn carbon khác nhau. Dịch vi khuẩn ức chế mạnh sự phát triển của nấm mốc *F. oxysporum* khi được nuôi trong môi trường chứa pepton hoặc urea (37,3% - 39,2%). Hoạt tính ức chế thấp hơn được quan sát thấy khi nuôi vi khuẩn trong môi trường chứa NH_4NO_3 và $NaNO_3$. Môi trường có bổ sung cao nấm men (yeast extract) có kết quả ức chế

thấp nhất trong các môi trường thử nghiệm (25,5% ± 3,9%) (hình 5A, 5B). Bên cạnh đó, khả năng ức chế sự phát triển hệ sợi tơ *F. equiseti* của dịch vi khuẩn được quan sát thấy trong môi trường bổ sung NH_4NO_3, pepton, cao nấm men là cao nhất và tương đương nhau (43,1% ± 2,0% - 46,1% ± 2,6%), trong khi đó, hoạt tính đối kháng nấm mốc này không có sự khác biệt khi vi khuẩn được nuôi trong môi trường bổ sung các nguồn nitrogen khác NH_4Cl, $NaNO_3$, ure (ANOVA, n=3, độ tin cậy 95%) (hình 5A, 5C). Căn cứ vào kết quả đạt được, nguồn pepton được lựa chọn làm nguồn nitrogen bổ sung vào môi trường nuôi cấy vi khuẩn *B. subtilis* NN12. Kết quả tương tự cũng được quan sát thấy trong nghiên cứu của tác giả Scott W Pryor và cộng sự (2007) khi bổ sung pepton vào môi trường nuôi cấy *Bacillus subtilis* TrigoCor 1448 để tối ưu hóa quá trình sinh tổng hợp các hợp chất kháng nấm mốc *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* [31].

3.6. Ảnh hưởng của nhiệt độ, pH và proteinase K lên hoạt tính đối kháng *F. oxysporum* và *F. equiseti* của *B. subtilis* NN12

Độ bền nhiệt, độ bền pH và sự nhạy cảm với protease (proteinase K) của dịch nuôi cấy vi khuẩn cũng được kiểm tra để góp phần xác định bản chất các hợp chất kháng mốc cũng như khả năng bảo quản của dịch nuôi cấy. Dịch nuôi cấy được xử lý ở các điều kiện nhiệt độ (60-95°C), pH (1,0-12,0) khác nhau và proteinase K. Hoạt tính đối kháng nấm mốc còn lại sau xử lý được kiểm tra và thể hiện trong hình 6.



Hình 6: Ảnh hưởng của nhiệt độ (A), điều kiện pH (B) và proteinase K (C) lên khả năng kháng nấm mốc *F. oxysporum* và *F. equiseti* của *B. subtilis* NN12. (1) Dịch nuôi cấy không xử lý, (2,3) Dịch nuôi cấy xử lý với proteinase K, (4) Đối chứng.

Kết quả thu được cho thấy các hợp chất đối kháng nấm mốc *F. oxysporum* trong dịch nuôi cấy vi khuẩn có khả năng chịu nhiệt kém và chỉ còn ~40% hoạt tính ức chế sự phát triển của tơ nấm khi được xử lý ở nhiệt độ 60-65°C, và hoạt tính mất hoàn toàn khi tăng nhiệt độ xử lý lên 70°C. Tuy nhiên, khả năng đối kháng với nấm mốc *F. equiseti* của dịch nuôi cấy được duy trì 60% sau khi xử lý ở các nhiệt độ 70-80°C, và khoảng 40% tại nhiệt độ 90°C (hình 6A). Như vậy, hoạt tính đối kháng trên hai chủng nấm mốc *Fusarium* kiểm định của dịch vi khuẩn *B. subtilis* NN12 là kết quả tác động của các hợp chất có khả năng chịu nhiệt khác nhau. Độ bền nhiệt của dịch nuôi cấy đối kháng nấm mốc *A. niger* cũng được quan sát thấy trong nghiên cứu của Meng Gong và cộng sự (2006) trên chủng vi khuẩn *B. subtilis* PY-1 với hoạt tính đối kháng sau khi xử lý 121°C trong 15 phút [32] hoặc trong nghiên cứu của T. Zhang và cộng sự (2008), hoạt tính đối kháng nấm mốc *A. flavus* của dịch nuôi cấy từ *B. subtilis* B-FS06 được giữ nguyên ở 100°C trong 30 phút và giảm 30% hoạt tính khi ủ ở 121°C trong 20 phút [33]

Ngoài ra, khả năng ức chế sự phát triển của hệ sợi tơ nấm *F. oxysporum* và *F. equiseti* của dịch nuôi cấy *B. subtilis* NN12 được duy trì ổn định với 80%-100% hoạt tính ở khoảng pH 5,0-11,0. Hoạt tính không được

quan sát thấy khi dịch nuôi cấy được xử lý ở pH 1,0-2,0, tuy nhiên, khi dịch nuôi cấy được xử lý ở pH 12,0 thì mất khả năng ức chế tơ nấm với *F. oxysporum* và giảm 50% hoạt tính ức chế tơ nấm *F. equiseti*. Như vậy có thể kết luận các hợp chất kháng mốc có trong dịch nuôi cấy ổn định trong khoảng pH dịch nuôi từ 3,0-11,0 và các hợp chất đối kháng hai loại nấm mốc kiểm định là khác nhau. Khả năng ổn định của hoạt tính kháng mốc trong các điều kiện pH khác nhau của dịch nuôi cấy vi khuẩn cũng được quan sát thấy trong các nghiên cứu của Gong và cộng sự (2006) và Zhang và cộng sự (2008) với hoạt tính duy trì ~ 80% hoặc không đổi khi xử lý trong khoảng pH 5,0-12 [32, 33]. Tuy nhiên, khi xử lý dịch nuôi cấy với proteinase K, hoạt tính ức chế tơ nấm *F. oxysporum* duy trì ~80% và *F. equiseti* là 90%. Điều này phần nào cho thấy rằng các hợp chất kháng mốc có trong dịch nuôi cấy của *B. subtilis* NN12 giảm nhẹ dưới tác động của protease và có thể dự đoán bản chất của các chất kháng mốc trong dịch vi khuẩn không phải chỉ là protein hoặc peptide mà có thể là các phức hợp bao gồm nhiều chất khác.

4. KẾT LUẬN

Nấm mốc gây bệnh trên thực vật đã và đang trở nên nguy hiểm hơn, gây thiệt hại nghiêm trọng cho nền nông nghiệp trên toàn thế giới. Việc kiểm soát và phòng trừ các đối tượng gây bệnh này một cách an toàn và hiệu quả đang được tập trung nghiên cứu. Trong công trình này, *B. subtilis* NN12 đã được sử dụng để bước đầu tạo ra các hợp chất đối kháng nấm mốc *F. oxysporum* và *F. equiseti*. Thành phần môi trường nuôi cấy chủng *B. subtilis* NN12 bao gồm 1% glucose, 0,5% peptone, pH 8,0 và điều kiện nuôi cấy 37°C trong 18 giờ tại tốc độ lắc 150 vòng/phút được xác định là tốt nhất cho việc sinh tổng hợp và tiết ra môi trường các hợp chất kháng *F. oxysporum* và *F. equiseti* có hoạt tính cao. Khi xử lý nhiệt (từ 70°C trở lên) dịch nuôi cấy, hoạt tính đối kháng với *F. oxysporum* giảm mạnh. Ngược lại, hoạt tính đối kháng của dịch nuôi cấy với *F. equiseti* vẫn duy trì dù được xử lý ở 90°C trong 15 phút. pH là một tác nhân có ảnh hưởng rất lớn đến hoạt động của sinh vật cũng như hoạt tính của các hợp chất thứ cấp. Tuy nhiên, khi thay đổi giá trị pH của dịch nuôi cấy từ 3 đến 11, hoạt tính đối kháng của dịch nuôi cấy lên *F. oxysporum* và *F. equiseti* không thay đổi. Hoạt tính này cũng không thay đổi khi dịch nuôi cấy được xử lý với proteinase K. Những kết quả này củng cố thêm giá trị của *B. subtilis* cũng như cho thấy khả năng sử dụng chủng *B. subtilis* NN12 để sản xuất các chế phẩm sinh học phục vụ cho việc kiểm soát, ngăn ngừa và điều trị các bệnh do nấm mốc *Fusarium* trên thực vật. Bản chất của các hợp chất trong dịch nuôi cấy đang được làm rõ để có thể thực hiện các nghiên cứu sâu hơn và gia tăng giá trị sử dụng của các sản phẩm đối kháng nấm mốc *Fusarium* trong tương lai.

LỜI CẢM ƠN: Nghiên cứu này được thực hiện tại phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp TP. HCM. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Ban Giám hiệu Trường Đại học Công nghiệp TP. HCM, Ban lãnh đạo Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm đã tạo điều kiện thuận lợi cho chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Almeida, F., M.L. Rodrigues, and C. Coelho, *The Still Underestimated Problem of Fungal Diseases Worldwide.* Front Microbiol, 2019. **10**: p. 214.
[2] Fisher, M.C., et al., *Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health.* Nature, 2012. **484**(7393): p. 186-94.
[3] *Common Names of Plant Diseases*. [Accessed 31 May 2021] Available from: https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/default.aspx.
[4] FAO, *Food Outlook - Biannual Report on Global Food Markets*. 2019: Rome, Italy.
[5] Ordonez, N., et al., *Worse Comes to Worst: Bananas and Panama Disease--When Plant and Pathogen Clones Meet.* PLoS Pathog, 2015. **11**(11): p. e1005197.
[6] FAO, *Forecasting threats to the food chain affecting food security in countries and regions*. 2020: Rome, Italy.
[7] Can, C., et al., *First report of fusarium crown and root rot of tomato caused by Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici in Turkey.* Plant Pathology, 2004. **53**(6): p. 814-814.
[8] Arias, M.M.D., et al., *Distribution and Frequency of Fusarium Species Associated with Soybean Roots in Iowa.* Plant Dis, 2013. **97**(12): p. 1557-1562.
[9] Chittem, K., et al., *Identification and characterization of Fusarium spp. associated with root rots of field pea in North Dakota.* European Journal of Plant Pathology, 2015. **143**(4): p. 641-649.

[10] Stefańczyk, E., et al., *Diversity of Fusarium spp. associated with dry rot of potato tubers in Poland.* European Journal of Plant Pathology, 2016. **145**(4): p. 871-884.
[11] Ortoneda, M., et al., *Fusarium oxysporum as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals.* Infection and immunity, 2004. **72**(3): p. 1760-1766.
[12] Nucci, M. and E. Anaissie, *Fusarium infections in immunocompromised patients.* Clin Microbiol Rev, 2007. **20**(4): p. 695-704.
[13] Wang, W., et al., *Symptoms and pathogens diversity of Corn Fusarium sheath rot in Sichuan Province, China.* Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 2835.
[14] Nuangmek, W., et al., *First report of fruit rot on cantaloupe caused by Fusarium equiseti in Thailand.* Journal of General Plant Pathology, 2019. **85**(4): p. 295-300.
[15] Nishad, R. and T.A.-O. Ahmed, *Survey and Identification of Date Palm Pathogens and Indigenous Biocontrol Agents.* (0191-2917 (Print)).
[16] Oliver, R.P., & Hewitt, H. G., *Fungicides in crop protection*. 2014, Wallingford: CABI Publishing, United Kingdom.
[17] Chung, W.H., et al., *Nature of Resistance to Methyl Benzimidazole Carbamate Fungicides in Fusarium oxysporum f.sp. lilii and F. oxysporum f.sp. gladioli in Taiwan.* Journal of Phytopathology, 2009. **157**(11- 12): p. 742-747.
[18] Ramdial, H., K. De Abreu, and S.N. Rampersad, *Fungicide Sensitivity among Isolates of Colletotrichum truncatum and Fusarium incarnatum-equiseti Species Complex Infecting Bell Pepper in Trinidad.* The plant pathology journal, 2017. **33**(2): p. 118-124.
[19] Perlin, D.S., R. Rautemaa-Richardson, and A. Alastruey-Izquierdo, *The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management.* (1474-4457 (Electronic)).
[20] Caulier, S., et al., *Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the Bacillus subtilis Group.* Front Microbiol, 2019. **10**: p. 302.
[21] Arthurs, S. and S.K. Dara, *Microbial biopesticides for invertebrate pests and their markets in the United States.* J Invertebr Pathol, 2019. **165**: p. 13-21.
[22] Zhu, J., et al., *Biocontrol potential of Bacillus subtilis IBFCBF-4 against Fusarium wilt of watermelon.* Journal of Plant Pathology, 2020. **102**(2): p. 433-441.
[23] Zhao, Y., et al., *Antagonistic Action of Bacillus subtilis Strain SG6 on Fusarium graminearum.* PLOS ONE, 2014. **9**(3): p. e92486.
[24] Ben Khedher, S., B. Mejdoub-Trabelsi, and S. Tounsi, *Biological potential of Bacillus subtilis V26 for the control of Fusarium wilt and tuber dry rot on potato caused by Fusarium species and the promotion of plant growth.* Biological Control, 2021. **152**: p. 104444.
[25] Cavaglieri, L., et al., *Biocontrol of Bacillus subtilis against Fusarium verticillioides in vitro and at the maize root level.* Research in Microbiology, 2005. **156**(5): p. 748-754.
[26] Lim, K.B., et al., *Isolation and Characterization of a Broad Spectrum Bacteriocin from Bacillus amyloliquefaciens RX7.* Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 8521476.
[27] Khan, N., et al., *Antifungal Activity of Bacillus Species Against Fusarium and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol.* Front Microbiol, 2018. **9**: p. 2363.
[28] Ntushelo, K., et al., *The Mode of Action of Bacillus Species against Fusarium graminearum, Tools for Investigation, and Future Prospects.* Toxins (Basel), 2019. **11**(10).
[29] Asaturova A.M., et al., *Conditions for the cultivation of new bacillus bacteria being micro bioproduct producers.* Journal of Pure and Applied Microbiology, 2015. **9**(4): p. 1-9.
[30] Mizumoto, S. and M. Shoda, *Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A, production by Bacillus subtilis in solid-state fermentation by response surface methodology.* Appl Microbiol Biotechnol, 2007. **76**(1): p. 101-8.
[31] Pryor, S.W., et al., *Optimization of spore and antifungal lipopeptide production during the solid-state fermentation of Bacillus subtilis.* Appl Biochem Biotechnol, 2007. **143**(1): p. 63-79.
[32] Gong, M., et al., *Study of the antifungal ability of Bacillus subtilis strain PY-1 in vitro and identification of its antifungal substance (iturin A).* Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2006. **38**(4): p. 233-40.
[33] Ting Zhang, Z.-Q.S., Liang-Bin Hu, Luo-Gen Cheng & Fei Wang *Antifungal compounds from Bacillus subtilis B-FS06 inhibiting the growth of Aspergillus flavus.* World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008. **24**(6): p. 783–788.

EFFECTS OF GROWTH CONDITIONS ON ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *Bacillus subtilis* NN12 AGAINST *Fusarium oxysporum* AND *Fusarium equiseti*

PHAM TAN VIET, DINH THI NGOC NGAN, LE THI NGOC LY, NGUYEN THI KIM HUE, LE THI VY HIEN, NGUYEN THI DIEU HANH, NGUYEN NGOC AN*

Institute of Biotechnology and Food technology, Industrial University of Ho Chi Minh City
**Corresponding: nguyenngocan.cnsh@iuh.edu.vn*

Abstract: *Fusarium* spp. are commonly pathogenic to various plants and seriously affect crop yields. To find a safe and effective way to control these fungal pathogens, many *Bacillus* strains have been widely studied and applied on a variety of plant models. In this study, culture conditions suitable for synthesizing antifungal compounds produced by *Bacillus subtilis* NN12 strain (Laboratory of Microbiotechology, Industrial university of Ho Chi Minh city) against *Fusarium oxysporum* and *Fusarium equiseti* were identified. The culture supplemented with 1% glucose, 0.5% peptone, initial pH 8.0 and 37°C with 150 rpm shaking condition for 18 hours was recorded as the highest antifungal activity of the culture supernatant. The *F. oxysporum* inhibitory activity of the culture was reduced by high temperatures, while the inhibitory activity affected on *F. equiseti* was relatively heat-resistant up to 90°C. In addition, antifungal compounds against both *F. oxysporum* and *F. equiseti* were shown to be stable in a wide pH spectrum (3.0-11.0) and especially were not affected by proteinase K. The results obtained in this study will provide the basis for future applications of *B. subtilis* NN12 in agriculture to not only to treat but also to prevent Fusarium diseases.

Keywords: antifungal, *Bacillus subtilis*, culture condition, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium equiseti*

Ngày gửi bài: 06/05/2021

Ngày chấp nhận đăng: 07/09/2021