

KHẢO SÁT ĐẶC ĐIỂM ĐỐI KHÁNG *Colletotrichum siamense* CỦA CHUNG VI KHUẨN *Bacillus amyloliquefaciens* D19

NGUYỄN THỊ DIỆU HẠNH, PHẠM ĐÔNG TRIỀU, NGUYỄN HỒNG VY,
PHẠM TẤN VIỆT, NGUYỄN NGỌC AN*

Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công Nghiệp Thành phố Hồ
Chí Minh

Tác giả liên hệ: *nguyenngocan.cns@juh.edu.vn

DOIs: <https://doi.org/10.46242/jstuh.v65i05.4962>

Tóm tắt: Bệnh thán thư do nấm mốc *Colletotrichum* làm giảm năng suất thu hoạch của nhiều loại cây trồng. Việc kiểm soát loại bệnh này bằng phương pháp sinh học và giảm sử dụng các hóa chất đang ngày càng được quan tâm, trong đó các chủng vi khuẩn *Bacillus* là đối tượng tiềm năng. Trong nghiên cứu này, đặc điểm đối kháng của dịch nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* D19 lên nấm mốc *Colletotrichum siamense* đã được khảo sát. Kết quả cho thấy chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 có khả năng sinh tổng hợp các enzyme như chitinase, protease, cellulase, và dịch nuôi cấy của chủng này đã tác động lên vách tế bào của hệ sợi tơ nấm *C. siamense* với các biểu hiện như trương phình, đứt gãy, gấp khúc, phân hủy tế bào của hệ sợi tơ nấm *C. siamense*. Hoạt tính kháng nấm của dịch nuôi cấy vi khuẩn cũng thể hiện khả năng bền nhiệt với hoạt tính đối kháng còn 66,4%-76,9% khi xử lý ở 60°C-80°C trong 15 phút, và 43,6% khi xử lý ở 90°C trong 15 phút. Ngoài ra, dịch nuôi cấy cũng cho thấy khả năng bền pH với hoạt tính còn lại 75,0%-93,0% sau khi xử lý ở pH 5,0-10,0 trong 2 giờ. Thử nghiệm khả năng đối kháng trên mô hình quả xoài cho thấy dịch nuôi cấy (sau ly tâm) vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 làm giảm hơn 98,7% mức độ biểu hiện bệnh gây ra bởi nấm mốc *C. siamense*. Như vậy, chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 là đối tượng tiềm năng cho việc kiểm soát sinh học đối với nấm mốc *C. siamense*, hạn chế bệnh thán thư trên nhiều loại cây trồng.

Từ khóa: *Bacillus amyloliquefaciens*, bệnh thán thư, *Colletotrichum siamense*, kháng mốc, xoài

1. GIỚI THIỆU

Anthracnose hay còn gọi là bệnh thán thư, là một loại bệnh thường gặp ở cây trồng và nhất là các loại cây ăn quả như xoài, dâu tây, quýt, thanh long,... và một số cây gia vị như ớt, điều,... Theo Mertely và cộng sự (2018), đặc điểm của bệnh thán thư trên quả dâu tây là những tổn thương có dạng đốm đen hoặc nâu, trùng tại vị trí bệnh và thường xuất hiện trong thời tiết ẩm ướt [1]. Đây cũng là triệu chứng chung cho sự nhiễm bệnh thán thư ở hầu hết các loại cây trồng khi bị nhiễm bệnh. Tại Trung Quốc, Diao và cộng sự (2017) đã báo cáo về các loài nấm gây bệnh thán thư đã làm tổn hại đến hơn 30 chi thực vật, trong đó có ớt, làm tổn hại tới 40% năng suất [2].

Tại Việt Nam, Nguyễn Duy Hưng (2017) cũng đã phân loại các chi nấm *Colletotrichum* gây tổn hại đến ớt ở đồng bằng sông Hồng trong đó có 5 loài là *C. truncatum*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides*, *C. aeschynomenes* và *C. siamense* [3], do Việt Nam có khí hậu nhiệt đới ẩm, tạo điều kiện thuận lợi cho nấm mốc phát triển nên bệnh thán thư xuất hiện khá nhiều, theo như Lê Hoàng Lê Thủy báo cáo vào năm 2008 về 2 loài gây hại trên xoài và sầu riêng tại đồng bằng sông Cửu Long là *C. acutatum* gây hại trên lá, hoa và quả xoài và *C. gloeosporioides* gây hại trên xoài lẫn sầu riêng [4]. Ngoài ra, bệnh thán thư tại Việt Nam còn gây hại trên cà phê, theo như báo cáo của Nguyễn Thanh Hà năm 2011 [5]. Vy Thế Vũ và cộng sự năm 2014 cũng đã báo cáo về đặc điểm *Colletotrichum musae* gây bệnh thán thư trên chuỗi giả Laba được trồng tại Lâm Đồng với triệu chứng bệnh là các đốm đen nổi trên mặt vỏ trái khi chín. Nấm phát triển nhanh ở nhiệt độ vào khoảng 25-30°C trên PGA có bào tử không màu, hình trụ dài, hai đầu tròn. Vết thương là yếu tố thuận lợi giúp cho nấm gây bệnh và các mẫu nấm có khả năng gây bệnh khác nhau, tùy vào khả năng hình thành sắc tố mà có triệu chứng nặng hay nhẹ [6]. Các loài cây được mô tả trên đều là những loại cây chủ chốt trong nền nông nghiệp của nước Việt Nam, sự ảnh hưởng của bệnh thán thư làm ảnh hưởng rất

lớn đến năng suất cũng như ảnh hưởng ít nhiều đến nền kinh tế, chính vì vậy việc tìm ra các biện pháp nhằm ngăn ngừa và điều trị bệnh thán thư ở cây trồng là vô cùng cần thiết.

Đối với các phương pháp phòng bệnh thông thường như tia cảnh chỉ có thể giảm bớt phần nào thiệt hại do bệnh gây ra nhưng không triệt để vì mầm bệnh có thể lan nhanh và rộng khi gặp điều kiện ẩm ướt. Bên cạnh đó, khi phát hiện bệnh, nhiều nông dân đã sử dụng các biện pháp dùng thuốc trừ sâu và diệt cỏ dại mà không biết rõ nguồn gốc gây bệnh là do nấm mốc nên ít hiệu quả. Các thuốc diệt nấm thường khó phân hủy tích tụ, gây ô nhiễm môi trường sinh thái, ảnh hưởng đến sức khỏe con người và động vật. Ngoài ra, các thuốc diệt nấm có bản chất hóa học khi bị lạm dụng cũng gây nên sự đột biến và sự kháng thuốc ở các chủng nấm mốc [7, 8]. Trong những năm gần đây, các chế phẩm sinh học trong kiểm soát bệnh thực vật đang được quan tâm nhằm bảo vệ, phòng và diệt trừ nấm bệnh trong trồng trọt vì lợi ích thân thiện môi trường, ít ảnh hưởng đến sức khỏe và có hiệu quả cao. Nhiều nghiên cứu đã được thực hiện để ứng dụng vi sinh vật ức chế bệnh thán thư do *Colletotrichum* gây ra như Wilasinee Konsue đã nghiên cứu việc sử dụng nấm men trong điều trị bệnh thán thư trên xoài, hay ứng dụng chủng vi khuẩn *B. licheniformis* OE-04 đối kháng *C. gossypii* gây bệnh trên cây bông, *Bacillus velezensis* CE 100 ức chế bệnh do *C. gloeosporioides* trên cây óc chó, *B. safensis* sp. QN1NO-4 chống lại bệnh thán thư trên cây dâu tây do *C. fragariae*, hay *B. subtilis* HM1 trong kiểm soát sau thu hoạch táo để ngăn ngừa nấm mốc *C. acutatum*, hay vi khuẩn *B. methylotrophicus*, *B. thuringiensis* ức chế sự phát triển của *Fusarium oxysporum*, *Botryosphaeria* sp., *Trichoderma atroviride*, *C. gloeosporioides*, and *Penicillium expansum* trên sơn trà [9-14]. Đối với loại trái cây như quả xoài, nhiều chủng vi sinh vật mới như vi khuẩn, nấm men cũng được tìm kiếm để ức chế sự phát triển của *Colletotrichum* trên xoài, bảo vệ loại nông sản này [15, 16]. Như vậy, qua các báo cáo được ghi nhận, chi vi khuẩn *Bacillus* đã được nghiên cứu và ứng dụng nổi bật trong việc ức chế các loại bệnh do nấm mốc gây ra, đặc biệt là *Colletotrichum*.

Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát đặc điểm đối kháng của chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 lên chủng nấm mốc gây bệnh *C. siamense*. Kết quả thu được sẽ là tiền đề cho việc ứng dụng chủng vi khuẩn này vào việc sản xuất các chế phẩm sinh học để phòng trừ nấm mốc *C. siamense* gây hại trên cây trồng một cách có hiệu quả và phát triển nền nông nghiệp thân thiện với môi trường.

2. VẬT LIỆU & PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

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

Các chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* D19, 3 chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* (*Bacillus* sp. D14, *Bacillus* sp. R19, *Bacillus* sp. R20) và chủng nấm mốc *Colletotrichum siamense* gây bệnh thán thư được sử dụng làm đối tượng nghiên cứu và được lưu trữ trong bộ sưu tập giống của Phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh, đại học Công nghiệp Tp. Hồ Chí Minh, ở điều kiện -70°C . Các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. 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 , 150 vòng/phút và chủng nấm mốc kiểm định 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) ở nhiệt độ phòng 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. amyloliquefaciens* D19

Khả năng đối kháng nấm mốc kiểm định *C. siamense* của vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 và các chủng vi khuẩn đối sánh (3 chủng vi khuẩn *Bacillus* D14, R19, R20) được đánh giá dựa trên phương pháp khuếch tán trên giếng thạch [17]. Chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 được phân lập từ đất ở Thành phố Hồ Chí Minh và đã được định danh ở mức phân tử bằng phương pháp giải trình tự đoạn gen 16S rRNA [18]. Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường LB broth, lắc 150 vòng/phút, 37°C trong 16 giờ để chuẩn bị cho việc đánh giá khả năng đối kháng

nấm mốc. Bên cạnh đó, chủng nấm mốc *C. siamense* được nuôi cấy trên môi trường PGA ở nhiệt độ phòng. Các mảnh thạch có chứa hệ sợi tơ nấm mốc 6 ngày tuổi có đường kính 5,0 mm được đặt vào tâm đĩa Petri có chứa môi trường PGA. Sau 2 ngày, trên các đĩa Petri này được đục các giếng thạch cách mép đĩa 1,0 cm (4 giếng thạch cho mỗi đĩa) và nhỏ 100 μ L dịch nuôi cấy của các chủng vi khuẩn đã được tăng sinh đến OD_{600nm} đạt 0,6. Các đĩa tiếp tục được ủ ở nhiệt độ phòng và quan sát sự phát triển của hệ sợi tơ nấm sau 5 ngày nuôi ủ. Khả năng đối kháng của các chủng vi khuẩn được đánh giá thông qua khả năng ức chế sự phát triển của hệ sợi tơ nấm dựa trên sự quan sát hệ sợi tơ nấm từ tâm đĩa Petri đến lỗ thạch chứa dịch nuôi cấy vi khuẩn so với các vị trí khác.

2.3. Khảo sát khả năng sinh các enzyme liên quan hoạt tính đối kháng nấm của *B. amyloliquefaciens* D19

Khả năng sản sinh ra enzyme ngoại bào chitinase, cellulase và proteinase được kiểm tra thông qua vòng phân giải cơ chất trên môi trường thạch tương ứng. Các đĩa môi trường LB có chứa 10g/lít cơ chất chitin, CMC (carboxymethyl cellulose), casein được sử dụng để kiểm tra khả năng sinh tổng hợp các enzyme tương ứng như chitinase, cellulase, và proteinase. Chúng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 được tăng sinh trong môi trường lỏng LB qua đêm và cấy sinh khối vi khuẩn vào giữa các đĩa môi trường kiểm định. Sau 3 ngày ủ tại 37°C, vòng phân giải cho hoạt tính cellulase và chitinase được kiểm tra bằng thuốc thử lugol, trong khi vòng phân giải casein đặc trưng cho hoạt tính protease được nhận diện bằng dung dịch TCA 10% (trichloroacetic acid) [19].

2.4. Khảo sát ảnh hưởng của dịch nuôi cấy *B. amyloliquefaciens* D19 lên hệ sợi tơ nấm mốc

Ảnh hưởng của dịch nuôi cấy vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 lên hệ sợi tơ nấm mốc được kiểm tra bằng cách ủ hệ sợi tơ nấm đã được nuôi trong môi trường PGB (Khoai tây 200 g, chiết dịch; Glucose 20,0 g; nước cất đủ 1000 ml; pH 7,0-7,2) trong thời gian 5 ngày với dịch vi khuẩn đã được tăng sinh tại 37°C, 150 vòng/phút trong 16 giờ (dịch tăng sinh vi khuẩn đã được ly tâm ở 4000 vòng trong 15 phút, thu dịch nổi, và dịch nổi sau đó được lọc qua màng lọc 0,45 µm). Sự phát triển của hệ sợi tơ nấm mốc trong môi trường PGB có hoặc không có dịch vi khuẩn được kiểm tra sau 5 ngày ủ bằng cách quan sát dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000 lần [20]. Ảnh hưởng của dịch nuôi cấy vi khuẩn lên hệ sợi tơ nấm mốc được đánh giá thông qua các tổn thương trên cấu trúc của hệ sợi tơ như: tơ biến dạng, trương phình, gấp khúc, gãy đứt, xuất hiện cấu trúc lạ... khi so sánh với tơ đối chứng.

2.5 Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và điều kiện pH lên hoạt tính kháng *C. siamense* của *B. amyloliquefaciens* D19

Độ bền nhiệt của dịch nuôi cấy vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 lên hoạt tính kháng mốc *C. siamense* được khảo sát bằng cách ủ dịch nuôi cấy vi khuẩn ở các nhiệt độ khác nhau 60°C, 70°C, 80°C và 90°C trong các khoảng thời gian 5 phút, 10 phút và 15 phút, sau đó kiểm tra hoạt tính kháng mốc còn lại của dịch nuôi cấy vi khuẩn bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch [17].

Độ bền pH của dịch nuôi cấy vi khuẩn cũng được kiểm tra tương tự bằng cách điều chỉnh pH của dịch nuôi cấy bằng dung dịch NaOH và HCl đã được hấp khử trùng sao cho pH dịch nuôi cấy đạt các giá trị 3,0 đến 10,0 và ủ trong 2 giờ, sau đó kiểm tra hoạt tính kháng mốc còn lại của dịch nuôi cấy vi khuẩn bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch. 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 ban đầu [21].

2.6. Khảo sát khả năng đối kháng *C. siamense* của vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 trên quả xoài

Khả năng đối kháng của vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 lên nấm mốc *C. siamense* trên thực vật được kiểm tra với mô hình quả xoài. Quả xoài cát được lựa chọn vừa chín và không có vết thương. Các quả xoài được rửa sạch bằng nước cất vô trùng, rửa với clorin 100 ppm, rửa lại với nước cất vô trùng và sát trùng bằng cồn 70°. Các quả xoài được tạo vết thương tại 3 vị trí bằng kim tiêm trên thân quả xoài với độ sâu 0,2-0,3 cm. Dịch huyền phù sợi nấm *C. siamense* được chuẩn bị bằng cách nuôi hệ sợi tơ nấm trong môi trường PGB sau 5 ngày, phối trộn với môi trường LB vô trùng theo tỷ lệ 1:1 và tiêm 10 µl vào quả xoài tạo mẫu đối chứng (+). Hỗn hợp của dịch huyền phù sợi nấm và dịch nuôi cấy vi khuẩn sau ly tâm 4000 vòng trong 15 phút (tăng sinh tại 37°C, 150 vòng/phút trong 16 giờ) được phối trộn theo tỷ lệ 1:1 và được tiêm 10 µl vào quả xoài tạo mẫu thử nghiệm. Mẫu đối chứng (-) sẽ được thực hiện bằng cách tiêm 10µl môi trường LB vô trùng. Quả xoài sau đó sẽ được để khô dịch tiêm và đặt vào trong buồng ẩm đã được khử trùng

trước đó. Kết quả được theo dõi từ 4-6 ngày và quan sát mức độ biểu hiện bệnh. Mức độ biểu hiện bệnh được tính toán bằng cách đo diện tích bề mặt mẫu có biểu hiện bệnh bằng phần mềm QuPath v0.4.0 [22].

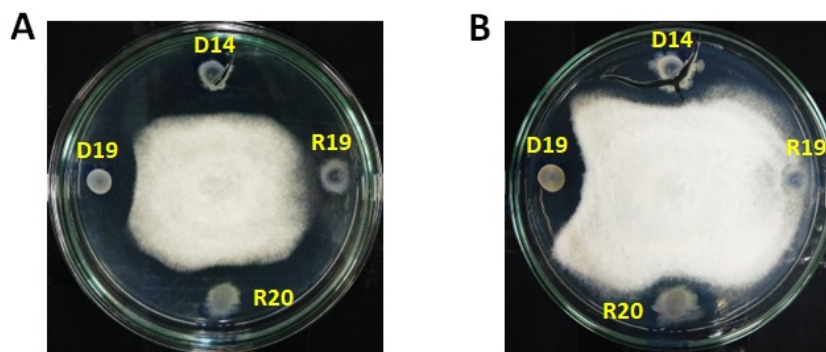
2.7. Phương pháp thống kê và xử lý số liệu

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 *C. siamense* của *B. amyloliquefaciens* D19

Khả năng đối kháng nấm mốc *C. siamense* của chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 được kiểm tra cùng với 3 chủng *Bacillus* sp. D14, *Bacillus* sp. R19, *Bacillus* sp. R20. Kết quả về khả năng ức chế sự phát triển hệ sợi tơ nấm *C. siamense* của các chủng vi khuẩn được thể hiện ở Hình 1.

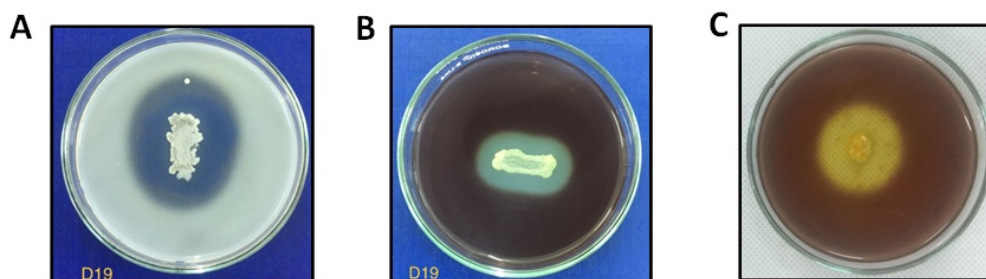


Hình 1: Khả năng đối kháng *Colletotrichum siamense* của các chủng vi khuẩn kiểm định sau các khoảng thời gian. (A) 3 ngày và (B) 5 ngày

Sau 3 ngày nuôi ủ, chủng vi khuẩn D19 đã thể hiện khả năng ức chế sự phát triển của tơ nấm kiểm định với vùng ức chế thể hiện rõ xung quanh giếng thạch được bổ sung dịch nuôi cấy D19 trong khi chủng D14 và R20 cho kết quả không rõ ràng và chủng R19 gần như không ức chế sự phát triển của hệ sợi tơ nấm *C. siamense* (Hình 1A). Khả năng ức chế của các chủng vi khuẩn được quan sát rõ hơn sau 5 ngày nuôi ủ với vùng ức chế hoàn toàn xung quanh giếng thạch D19, đồng thời dịch nuôi cấy chủng vi khuẩn D14, R20 cũng cho thấy hiệu quả ức chế sự phát triển của tơ nấm nhưng vẫn có sự hiện diện của một phần nhỏ hệ sợi tơ nấm phát triển gần giếng thạch, trong khi chủng R19 hoàn toàn không thể hiện khả năng ức chế hệ sợi tơ nấm *C. siamense* với phần tơ nấm bao phủ cả giếng thạch có dịch nuôi cấy R19 (Hình 1B). Như vậy, chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 đã thể hiện hoạt tính đối kháng nấm mốc *C. siamense* mạnh và là đối tượng cho các nghiên cứu ứng dụng để ức chế chủng nấm mốc này.

3.2. Khả năng sản xuất các enzyme liên quan hoạt tính kháng nấm của *B. amyloliquefaciens* D19

Khả năng sản sinh các enzyme liên quan đến hoạt tính đối kháng nấm như chitinase, protease và cellulase của chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 được kiểm tra trên môi trường có chứa cơ chất tương ứng. Kết quả cho thấy chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 có khả năng sinh tổng hợp mạnh các enzyme liên quan đến sự phân hủy vách tế bào của hệ sợi tơ nấm với đường kính vòng phân giải được ghi nhận là $3,1 \pm 0,2$ cm, $1,5 \pm 0,2$ cm và $2,2 \pm 0,1$ cm tương ứng cho protease, cellulase và chitinase (Hình 2).



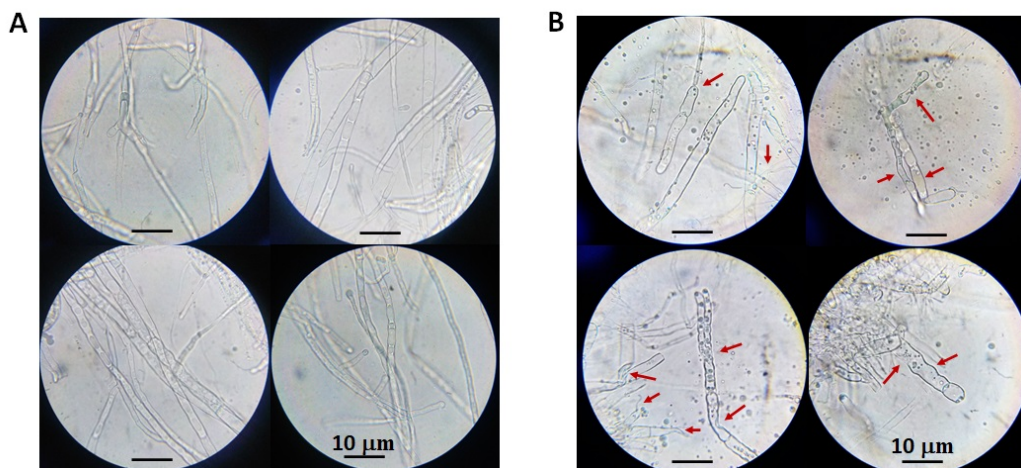
Hình 2: Khả năng sinh protease (A), cellulase (B) và chitinase (C) của *B. amyloliquefaciens* D19 sau 3 ngày nuôi ủ.

Kết quả sơ bộ cho thấy chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 sinh protease có hoạt tính cao hơn so với chủng vi khuẩn *B. cereus* GVK 21 trong nghiên cứu của nhóm tác giả Keshavamurthy (2018) [23], sinh tổng hợp cellulase cao tương tự chủng *B. subtilis* THVK22 và *B. subtilis* THVK24 của Nguyễn Ngọc Ân và cộng sự (2020) [24] và sinh chitinase cao hơn các chủng vi khuẩn sinh chitinase trong nghiên cứu của nhóm tác giả Verma (2019) [25]. Điều này phần nào cho thấy chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 có tiềm năng phân hủy vách tế bào của hệ sợi tơ nấm, từ đó thể hiện hoạt tính đối kháng với nấm mốc kiểm định.

3.3. Ảnh hưởng của dịch nuôi cấy *B. amyloliquefaciens* D19 lên hệ sợi tơ *C. siamense*

Sự sinh trưởng và phát triển mạnh mẽ của hệ sợi tơ nấm được đánh giá qua cấu trúc và mật độ của hệ sợi tơ khi nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng. Các tổn hại lên tơ nấm sẽ ảnh hưởng đến sự phát triển của hệ sợi tơ. Ảnh hưởng của dịch nuôi cấy vi khuẩn lên hệ sợi tơ nấm *C. siamense* được kiểm tra bằng cách ủ tơ nấm với dịch nuôi cấy của vi khuẩn và quan sát sự biến đổi hình thái hệ sợi tơ nấm dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 1000X. Kết quả được so sánh với mẫu đối chứng của hệ sợi tơ được ủ trong môi trường dinh dưỡng LB vô trùng không có vi khuẩn (Hình 3A). Sau thời gian ủ 5 ngày, kết quả bằng hình ảnh kính hiển vi với độ phóng đại 1000X đã cho thấy sự tác động mạnh mẽ của dịch nuôi cấy vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 đến hệ sợi tơ nấm, làm thay đổi cấu trúc cũng như hình dạng của hệ sợi hệ sợi tơ nấm với các biểu hiện tổn thương trên hệ sợi tơ không như đối chứng. Các mũi tên chỉ các vị trí có cấu trúc bị tổn thương như trương phình, đứt gãy, gấp khúc, phân hủy tế bào của hệ sợi tơ nấm (Hình 3B).

Trong nghiên cứu của nhóm tác giả Choub (2021), dịch nuôi cấy của chủng vi khuẩn *B. velezensis* CE 100 cũng tác động lên hệ sợi tơ nấm *C. gloeosporioides* với các biểu hiện tương tự như trương phồng, phân hủy vách tế bào [10], nhóm tác giả Rosa (2008) đã kiểm tra hoạt tính đối kháng của nấm men *Torulasporea globosa* đối với nấm mốc *C. sublineolum* cũng cho thấy hệ sợi tơ nấm mốc bị tác động với các tổn thương như đứt gãy, gấp khúc, trương phình khi được nuôi cấy chung với *Torulasporea globosa* [26]. Ngoài ra, nhóm tác giả Prapagdee (2022) đã báo cáo về sự tác động của 2 enzyme chitinase và β -1,3-glucanase từ *Streptomyces hygroscopicus* tác động đến hệ sợi tơ nấm *C. gloeosporioides* và *Sclerotium rolfsii* với các hiện tượng trương phồng và làm tiêu giảm vách tế bào của sợi nấm, điều này sẽ ức chế sự sinh trưởng của hệ sợi tơ nấm [27].



Hình 3. Ảnh hưởng của dịch nuôi cấy *B. amyloliquefaciens* D19 lên hệ sợi tơ nấm *C. siamense*. (A) Đối chứng; (B) Mẫu thực nghiệm; scale bar: 10 μ m; mũi tên: vị trí tơ nấm bị tổn thương

Như vậy, khả năng ức chế sự phát triển hệ sợi tơ nấm *C. siamense* của *B. amyloliquefaciens* D19 có thể được giải thích một phần do sự hiện diện của enzyme chitinase được sinh tổng hợp từ chủng vi khuẩn đã tác động lên vách tế bào của hệ sợi tơ nấm, từ đó phân hủy vách tế bào tơ nấm tạo hiện tượng trương phồng và đứt gãy.

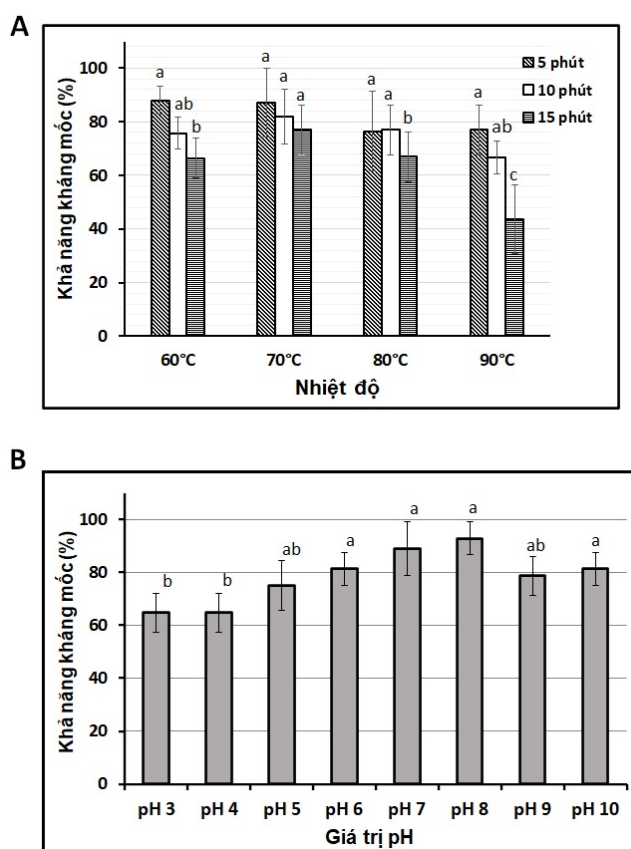
3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH lên hoạt tính đối kháng *C. siamense* của *B. amyloliquefaciens* D19

Độ bền nhiệt và độ bền pH của dịch nuôi cấy vi khuẩn lên hoạt tính đối kháng nấm mốc cũng được kiểm tra để góp phần xác định bản chất các hợp chất kháng nấm mốc cũng như khả năng bảo quản của dịch nuôi cấy. Dịch nuôi cấy được xử lý ở các điều kiện nhiệt độ (60-90°C) và pH (3,0-10,0) khác nhau. Hoạt tính đối kháng nấm mốc còn lại sau xử lý được kiểm tra và thể hiện trong Hình 4.

Kết quả sơ bộ ban đầu cho thấy dịch nuôi cấy vi khuẩn thể hiện hoạt tính đối kháng nấm suy giảm theo thời gian xử lý ở các nhiệt độ khác nhau, trong đó, ở điều kiện xử lý nhiệt độ 90°C mặc dù dịch nuôi cấy vi khuẩn vẫn duy trì hoạt tính đối kháng nhưng vẫn thấp hơn đáng kể so với mẫu xử lý ở nhiệt độ thấp hơn. Kết quả được phân tích thống kê đã cho thấy khả năng đối kháng nấm mốc của dịch nuôi cấy của chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 có sự khác biệt ở điều kiện xử lý 90°C trong 15 phút so với các điều kiện xử lý tại 60°C, 70°C, 80°C trong 5 phút và 10 phút (ANOVA, n=3, độ tin cậy 95%). Cụ thể tại điều kiện xử lý ở 90°C trong 15 phút, hoạt tính đối kháng nấm mốc giảm còn 43,59%±12,71% so với đối chứng không xử lý nhiệt. Ngoài ra, trong điều kiện xử lý ở nhiệt độ 60°C, 70°C, 80°C trong 5 phút và 10 phút, hoạt tính đối kháng nấm mốc *C. siamense* của dịch nuôi cấy vi khuẩn duy trì trong khoảng 76,41%-88,05% so với đối chứng và không có sự khác biệt khi phân tích thống kê. Khi tăng thời gian xử lý lên 15 phút ở các điều kiện nhiệt độ này, hoạt tính đối kháng giảm còn 66,41%-76,92% (Hình 4A). Kết quả này cho thấy khả năng bền nhiệt của các hợp chất kháng nấm mốc có trong dịch nuôi cấy của *B. amyloliquefaciens* D19. Độ bền nhiệt của dịch nuôi cấy một số vi khuẩn lên khả năng đối kháng nấm mốc cũng được quan sát thấy trong các nghiên cứu trước đây như dịch nuôi cấy vi khuẩn *B. subtilis* NN12 duy trì 60% hoạt tính sau khi xử lý ở các nhiệt độ 70-80°C, và khoảng 40% hoạt tính sau xử lý tại nhiệt độ 90°C trên nấm mốc *Fusarium equiseti* [21], hoạt tính đối kháng nấm mốc *A. niger* của dịch vi khuẩn *B. subtilis* PY-1 duy trì sau khi xử lý 121°C trong 15 phút [28], và dịch nuôi cấy từ *B. subtilis* B-FS06 vẫn ức chế *A. flavus* sau khi xử lý ở nhiệt độ 100°C và 121°C [29].

Bên cạnh đó, sau khi được xử lý ở các điều kiện pH khác nhau, dịch nuôi cấy của chủng *B. amyloliquefaciens* D19 đã thể hiện khả năng ức chế sự phát triển của hệ sợi tơ nấm *C. siamense* trong khoảng pH 5,0-10,0 với 75%-93% so với đối chứng và kết quả phân tích cho thấy không có

sự khác biệt về hoạt tính đối kháng khi xử lý dịch nuôi cấy trong khoảng pH này (ANOVA, n=3, độ tin cậy 95%). Trong điều kiện pH 3,0-4,0, khả năng ức chế tơ nấm bị ảnh hưởng và giảm còn 65% (Hình 4B).



Hình 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ (A) và điều kiện pH (B) lên khả năng kháng nấm mốc *C. siamense* của *B. amyloliquefaciens* D19. ^{a,b,c} các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0.05$)

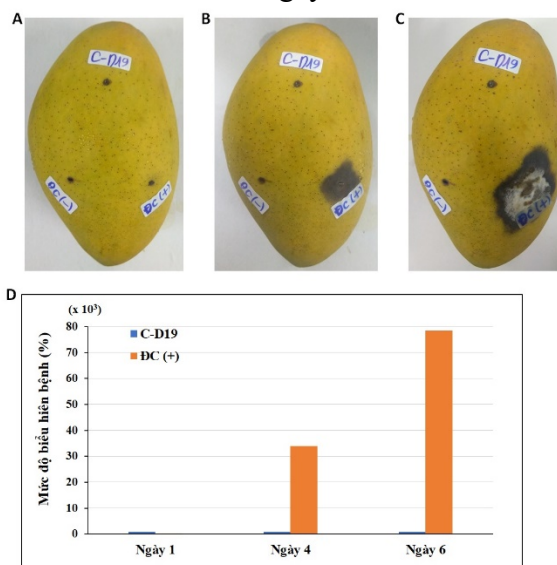
Các kết quả tương tự cũng được quan sát thấy trong nghiên cứu về khả năng đối kháng *C. gossypii* của vi khuẩn *B. licheniformis* OE4 với khả năng bền pH trong khoảng pH 5,0-9,0 [11]. Ngoài ra, trong nghiên cứu của Zhang và cộng sự (2008) và Gong và cộng sự (2006), hoạt tính kháng mốc tương ứng của *B. subtilis* B-FS06 và *B. subtilis* PY-1 trên *A. flavus* và *A. niger* duy trì ở khoảng 80% hoặc không đổi khi xử lý trong khoảng pH 5,0-12,0 [28, 29].

3.5. Khả năng đối kháng *C. siamense* của *B. amyloliquefaciens* D19 trên mô hình quả xoài

Khả năng đối kháng nấm mốc *C. siamense* của dung dịch nuôi cấy *B. amyloliquefaciens* D19 được kiểm tra trong điều kiện in situ với mô hình quả xoài. Các mức độ biểu hiện bệnh ở các nghiệm thức khác nhau được quan sát và xác định sau 1, 4 và 6 ngày. Kết quả được thể hiện ở Hình 5. Trong các điều kiện thí nghiệm được quan sát ở ngày thứ nhất, biểu hiện bệnh ở các vết tiêm trên quả xoài là tương tự (Hình 5A). Mức độ biểu hiện bệnh được xác định với diện tích tổn thương trên quả xoài khi so sánh với đối chứng (-) cho thấy biểu hiện bệnh ở mẫu đối chứng (+) mà được tiêm bởi chủng nấm mốc là 12% và ở mẫu có xử lý với *B. amyloliquefaciens* D19 là 79%. Tuy nhiên, kết quả quan sát ở ngày thứ 4 và thứ 6 cho thấy mức độ biểu hiện bệnh ở mẫu đối chứng (+) tăng cao đáng kể tương ứng với 3386% và 7853%, trong khi mẫu nấm mốc được xử lý với vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 thì thể hiện mức độ biểu hiện bệnh là 79% và 88% khi so với

KHẢO SÁT ĐẶC ĐIỂM ĐỐI KHÁNG...

mẫu đối chứng (-) (Hình 5B, C, D). Với các kết quả đạt được, chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 đã giảm hơn 98,7% mức độ biểu hiện bệnh gây ra bởi nấm mốc.



Hình 5. Khả năng đối kháng *C. siamense* của chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 trên quả xoài sau 1 ngày (A), 4 ngày (B), 6 ngày (C) và đồ thị thể hiện mức độ biểu hiện bệnh (D). DC (-): mẫu đối chứng (-) với môi trường LB vô trùng; DC (+): mẫu đối chứng (+) với dịch huyền phù *C. siamense*; C-D19: mẫu thử nghiệm với dịch phối trộn nấm mốc và vi khuẩn

Trong nghiên cứu của nhóm tác giả Liang (2022), dịch lên men của chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* PMB04 đã giảm khả năng biểu hiện bệnh thán thư gây ra bởi *C. gloeosporioides* trên quả xoài ở mức 85% [30]. Điều này cho thấy khả năng giảm biểu hiện bệnh trên quả xoài của chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* D19 trong nghiên cứu này là rất cao và có tiềm năng ứng dụng chủng vi khuẩn này trong bảo quản và kinh doanh quả xoài.

4 KẾT LUẬN

Bệnh thán thư gây ra bởi chi nấm mốc *Colletotrichum* ảnh hưởng nghiêm trọng đến chất lượng và năng suất của nhiều loại cây trồng. Để kiểm soát căn bệnh này, đồng thời phát triển nền nông nghiệp xanh bền vững, việc ứng dụng các phương pháp kiểm soát sinh học trong trồng trọt được quan tâm và các vi khuẩn đối kháng là đối tượng tiềm năng để ngăn ngừa các bệnh do nấm mốc gây ra. Trong đề tài này, chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* D19 đã được xác định có khả năng ức chế sự phát triển của hệ sợi tơ nấm *Colletotrichum siamense* trong môi trường đĩa thạch và trên quả xoài, và là ứng cử viên cho các chế phẩm sinh học để bảo quản trái cây cũng như ngăn ngừa bệnh thán thư do *C. siamense* gây ra.

LỜI CẢM ƠN: Chúng tôi chân thành cảm ơn Trường Đại học Công nghiệp Tp. Hồ Chí Minh đã cấp kinh phí để thực hiện đề tài nghiên cứu có mã số 21.2SHTP01. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Ban giám hiệu và Ban lãnh đạo Viện Công nghệ sinh học và Thực phẩm đã tạo điều kiện thuận lợi cho chúng tôi thực hiện đề tài này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Mertely, J.C., B.B. Forcelini, and N.A. Peres, *Anthracoze Fruit Rot of Strawberry*. Plant Pathology Department PP-207, 2018. 1-5.
- [2] Diao, Y.Z., et al., *Colletotrichum species causing anthracnose disease of chili in China*. Persoonia, 2017. 38: p. 20-37.

- [3] Hung, N.D., et al., *Xác định nấm Colletotrichum gây bệnh thán thư ớt ở đồng bằng sông Hồng*. Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam - số 12(85)/2017, 2017.
- [4] Thủy, L.H.L. and P.V. Kim, *Phân loài nấm Colletotrichum gây bệnh thán thư trên xoài và sầu riêng tại đồng bằng sông Cửu Long và thử hiệu lực của sáu loại thuốc đối với các loài nấm này*. Tạp chí Khoa học, 2008. **10**: 31-40.
- [5] Nguyen, T.H., et al., *Study on pathogenicity of Colletotrichum gloeosporioides on coffee in north of VietNam*. Tạp chí SINH HỌC, 2011. **33(1)**: 67-73.
- [6] Vũ, V.T., et al., *Đặc điểm Colletotrichum musae gây bệnh thán thư trên trái chuối già laba trồng tại Lâm Đồng*. Khoa học công nghệ, 2014. **49-52**.
- [7] Woodward, J.E., T.B. Brenneman, and R.C. Kemerait Jr, *Chemical control of peanut diseases: targeting leaves, stems, roots, and pods with foliar-applied fungicides*. Fungicides—showcases of integrated plant disease management from around the world. Rijeka, Croatia: InTech, 2013: p. 55-76.
- [8] Ma, Z., Y. Luo, and T.J. Michailides, *Resistance of Botryosphaeria dothidea from pistachio to iprodione*. Plant disease, 2001. **85(2)**: p. 183-188.
- [9] Konsue, W., T. Dethoup, and S. Limtong, *Biological Control of Fruit Rot and Anthracnose of Postharvest Mango by Antagonistic Yeasts from Economic Crops Leaves*. Microorganisms, 2020. **8(3)**: 317.
- [10] Choub, V., et al., *Antifungal activity of Bacillus velezensis CE 100 against anthracnose disease (Colletotrichum gloeosporioides) and growth promotion of walnut (Juglans regia L.) trees*. International journal of molecular sciences, 2021. **22(19)**: p. 10438.
- [11] Nawaz, H.H., et al., *Evaluation of antifungal metabolites activity from Bacillus licheniformis OE-04 against Colletotrichum gossypii*. Pesticide biochemistry and physiology, 2018. **146**: p. 33-42.
- [12] Li, X., et al., *Biocontrol ability and mechanism of a broad-spectrum antifungal strain Bacillus safensis sp. QNINO-4 against strawberry anthracnose caused by Colletotrichum fragariae*. Frontiers in microbiology, 2021. **12**.
- [13] He, C.-N., et al., *Antifungal activity of volatile organic compounds produced by Bacillus methylotrophicus and Bacillus thuringiensis against five common spoilage fungi on loquats*. Molecules, 2020. **25(15)**: p. 3360.
- [14] Kim, H.-M., K.-J. Lee, and J.-C. Chae, *Postharvest biological control of Colletotrichum acutatum on apple by Bacillus subtilis HMI and the structural identification of antagonists*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015. **25(11)**: p. 1954-1959.
- [15] Konsue, W., T. Dethoup, and S. Limtong, *Biological control of fruit rot and anthracnose of postharvest mango by antagonistic yeasts from economic crops leaves*. Microorganisms, 2020. **8(3)**: p. 317.
- [16] Taïbi, A., et al., *New bacterial agents to limit Colletotrichum gloeosporioides development on mango*. 2020.
- [17] Lim, K.B., et al., *Isolation and Characterization of a Broad Spectrum Bacteriocin from Bacillus amyloliquefaciens RX7*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 8521476.
- [18] An, N.N., et al., *Isolation, identification and characterization of bacterial antagonists of the dragon fruit fungal pathogen Neoscytalidium dimidiatum*. Journal of Science and Technology - Industrial University of HCMC, 2020. **In Press Accepted Manuscript**.
- [19] Han, J.-H., et al., *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, 2015. **31(2)**: p. 165.
- [20] An, N.N., et al., *Isolation, identification and characterization of bacterial antagonists of the dragon fruit fungal pathogen Neoscytalidium dimidiatum*. Journal of Science and Technology-IUH, 2020. **44(02)**.
- [21] Pham, T.V., et al., *Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng ức chế Fusarium oxysporum và Fusarium equiseti của Bacillus subtilis NN12*. Journal of Science and Technology-IUH, In Press.
- [22] Bankhead, P., et al., *QuPath: Open source software for digital pathology image analysis*. Scientific Reports, 2017. **7(1)**: p. 16878.
- [23] M, K., et al., *Enhanced production of alkaline protease from novel bacterium Bacillus cereus GVK21 under submerged fermentation*. Bioscience Biotechnology Research Communications, 2018.
- [24] Ân, N.N., et al., *Phân lập và khảo sát điều kiện sinh tổng hợp cellulase của hai chủng vi khuẩn TH-VK22 và TH-VK24*. Journal of Science and Technology-IUH, 2019. **39(03)**.
- [25] Verma, K. and N. Garg. *Detection of Chitinase on Chitin Agar Plates*. 2019.
- [26] Rosa, M.M., et al., *Evaluation of the biological control by the yeast Torulaspora globosa against Colletotrichum sublineolum in sorghum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010. **26(8)**: p. 1491-1502.
- [27] Prapagdee, B., C. Kuekulvong, and S. Mongkolsuk, *Antifungal potential of extracellular metabolites produced by Streptomyces hygroscopicus against phytopathogenic fungi*. Int J Biol Sci, 2008. **4(5)**: p. 330-7.
- [28] 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.
- [29] 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. .

[30] Liang, Y.-S., et al., *Postharvest Application of Bacillus amyloliquefaciens PMB04 Fermentation Broth Reduces Anthracnose Occurrence in Mango Fruit*. Agriculture, 2022. 12(10): p. 1646.

ANTAGONISTIC CHARACTERISTICS OF *Bacillus amyloliquefaciens* D19 AGAINST *Colletotrichum siamense*

HANH THI DIEU NGUYEN, DONG TRIEU PHAM, HONG VY NGUYEN, TAN VIET PHAM, NGOC AN NGUYEN*

Institute of Biotechnology and Food Technology, Industrial University of Ho Chi Minh City

*nguyenngocan.cns@iuh.edu.vn

Abstract: Anthracnose disease caused by the fungus *Colletotrichum* affects many crops and reduces crop yields. Controlling this disease by biological methods and reducing the use of chemicals is of increasing interest, in which *Bacillus* strains are potential candidates. In this study, the antagonistic characteristics of *Bacillus amyloliquefaciens* D19 on *Colletotrichum siamense* were investigated. The obtained results showed that the *B. amyloliquefaciens* D19 was able to biosynthesize enzymes such as chitinase, protease, cellulase, and the bacterial suspension negatively affect the fungal cell wall which led to swelling, breakage, folding, and cell lysis of the fungal mycelia. The activity of the bacterial culture also showed heat stability with 66.4%-76.9% remaining antifungal activity after 15 minutes of incubation at 60°C-80°C and 43.6% after 15 minutes of incubation at 90°C. In addition, the bacterial culture also showed pH stability with 75,0%-93,0% of residual activity after 2 hours treatment at pH 5.0-10.0. Furthermore, *in vivo* antagonistic test on mango fruit model showed that *B. amyloliquefaciens* D19 reduced more than 98.7% of the disease severity caused by *C. siamense*. Thus, *B. amyloliquefaciens* D19 is a potential candidate for biological control of *C. siamense*, which help to prevent anthracnose disease on many crops.

Keywords: Antifungal, anthracnose, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Colletotrichum siamense*, mango

Ngày nhận bài: 16/12/2022

Ngày chấp nhận đăng: 14/03/2023