

# NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP CHỦNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG ĐA NẤM GÂY BỆNH Ở THỰC VẬT

Phạm Hồng Hiến<sup>1</sup>, Trần Thị Bảo Yến<sup>2</sup>, Đặng Thị Thanh Tâm<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Ban Khoa học và Hợp tác quốc tế, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

<sup>2</sup>Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

\*Tác giả liên hệ: thanhtam@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 12.07.2024

Ngày chấp nhận đăng: 15.09.2024

## TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành với mục đích tìm kiếm các chủng vi khuẩn có hoạt tính kháng đa nấm gây bệnh thực vật. Từ các mẫu đất rễ thu thập, 43 chủng vi khuẩn phân lập được sàng lọc hoạt tính kháng nấm. Kết quả đã chọn lọc được 03 chủng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng mạnh với các chủng nấm *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* và *Alternaria alternata*. Bên cạnh đó, đặc điểm sinh học của ba chủng vi khuẩn này cũng được đánh giá. Dựa trên phân tích trình tự 16S rRNA và gen đặc hiệu, cả ba chủng vi khuẩn được xác định là *Bacillus* sp. TV1.1, *B. amyloliquefaciens* TV2.5 và *B. subtilis* TV2.12. Kết quả cho thấy đây là ba chủng vi khuẩn đối kháng tiềm năng cho phát triển các chế phẩm phòng trừ bệnh do nấm gây nên ở thực vật.

Từ khóa: Vi khuẩn *Bacillus* sp., *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* và *Alternaria alternata*.

## Isolation of Broad-Spectrum Antifungal Bacteria against Phytopathogenic Fungi

### ABSTRACT

The research aimed to identify potential antifungal bacteria against phytopathogenic fungi. From rhizosphere soil samples, 43 bacterial isolates were collected and screened. The results indicated that there were three strains with strong antifungal activity against fungal phytopathogens, including *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, and *Alternaria alternata*. In addition, the biological characteristics of three potential bacterial strains were evaluated. Based on analysis of 16S rRNA sequence and specific genes, all three bacterial strains were identified and named as *Bacillus* sp. TV1.1, *B. amyloliquefaciens* TV2.5, and *B. subtilis* TV2.12. The results indicate that all three antagonistic bacterial strains could be potential biocontrol agents to control fungal diseases in plants.

Keywords: *Bacillus* sp., *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh hại thực vật trong đó có nấm bệnh là mối đe dọa lớn đối với sản xuất nông nghiệp vì chúng gây ra các bệnh có tác động quan trọng về kinh tế và môi trường (Chatterjee & cs., 2016). Hiện nay, tác động của chúng ngày càng trở nên mạnh mẽ, lây lan nhanh chóng do sự toàn cầu hóa các sản phẩm thương mại và sự biến đổi khí hậu toàn cầu (Li & cs., 2023). Để kiểm soát nấm bệnh trong sản xuất nông nghiệp, sử dụng thuốc bảo vệ thực vật là

phương pháp phổ biến. Tuy nhiên, việc sử dụng thuốc hóa học kiểm soát nấm bệnh đang bị lạm dụng và tác động tiêu cực đến môi trường, hệ sinh thái và sức khỏe của con người (Bardin & cs., 2015). Hiện nay, xu hướng mới trong bảo vệ cây trồng là ứng dụng các chủng vi sinh vật có trong tự nhiên như vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm để thay thế sử dụng thuốc hóa học hoặc hỗ trợ hiệu quả cho hướng áp dụng thuốc bảo vệ thực vật (Gwiazdowski & cs., 2024). Hướng ứng dụng này tạo nên sự kiểm soát bền vững, an toàn và hạn chế được sự phụ thuộc với thuốc hóa học

bảo vệ thực vật. Các chủng vi sinh vật có khả năng kháng nấm có thể bảo vệ cây trồng khỏi tác nhân nấm gây bệnh và tác động trực tiếp hoặc gián tiếp đến sự sinh trưởng, phát triển của cây trồng (El-Baky & Amara, 2021). Chính vì vậy, việc phân lập các chủng vi sinh vật mới có khả năng đối kháng với nấm bệnh thực vật để phát triển phương thức kiểm soát sinh học và hạn chế bệnh trên cây trồng là điều cần thiết. Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, có rất nhiều chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* như *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. pumilus* và *B. thuringiensis* có khả năng ức chế nấm bệnh thực vật và có thể được sử dụng làm tác nhân kiểm soát sinh học (Choudhary & Johri, 2009; Kim & cs., 2010; Chakraborty & cs., 2022). Hiệu quả của các tác nhân sinh học là vi khuẩn với bệnh thực vật phụ thuộc vào đặc tính của chủng, điều kiện môi trường, tác nhân gây bệnh thực vật. Chính vì vậy, để áp dụng trong điều kiện hệ sinh thái Việt Nam, phân lập các chủng *Bacillus* sp. có khả năng kháng nấm là điều quan trọng và có ý nghĩa để phát triển hướng ứng dụng các tác nhân sinh học quản lý nấm bệnh ở cây trồng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập và chọn lọc các chủng vi khuẩn có trong các mẫu đất trồng thu thập ở miền Bắc Việt Nam có khả năng kháng nấm và đánh giá mức độ ức chế một số chủng nấm bệnh thực vật có phổ kí chủ rộng như *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* và *Alternaria alternata*. Kết quả của nghiên cứu là các chủng vi khuẩn chọn lọc tiềm năng có thể được ứng dụng để nghiên cứu, phát triển các chế phẩm sinh học trong kiểm soát nấm bệnh trên cây trồng trong tương lai.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

- Mẫu đất vùng rễ của cây màu thu thập tại các vùng đất không thâm canh, trồng theo hướng hữu cơ tự nhiên tại Hà Nội, Phú Yên, Thái Bình.

- Chủng nấm gây bệnh thực vật: *Fusarium solani* (VCM-1147), *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* (VCM-1078) dùng trong

nghiên cứu là các chủng được phân lập trên các cây bị bệnh thu thập ở miền Bắc, Việt Nam (Thị Thanh Dang & cs., 2024). Các chủng này được định danh dựa trên hình thái hệ sợi, bào tử và trình tự gen ITS.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng kháng nấm

Từ 06 mẫu đất thu thập ở các tỉnh Gia Lâm - Hà Nội, Tuy An - Phú Yên, Đông Hưng - Thái Bình, vi khuẩn có khả năng kháng nấm được phân lập trên môi trường Nutrient agar (NA). Quá trình phân lập được tiến hành như sau: Cân 1g mẫu đất và pha loãng trong 99ml dung dịch NaCl 0,85% và lắc đều trong vòng 2 phút để tạo dung dịch pha loãng  $10^{-2}$ . Sau đó mẫu tiếp tục được pha loãng đến nồng độ  $10^{-3}$  và  $10^{-4}$ . Sau đó, 100 $\mu$ l dịch pha loãng ở hai nồng độ  $10^{-3}$  và  $10^{-4}$  được hút và cấy trải trên môi trường NA. Đĩa cấy sau đó được ủ trong điều kiện 30°C trong 48 giờ. Sau 24-48 giờ, quan sát bề mặt thạch đĩa phân lập, các khuẩn lạc xuất hiện vòng kháng nấm (nấm tồn tại trong mẫu đất) sẽ được tách và nuôi cấy làm thuần trên môi trường NA mới. Các chủng này sẽ được sử dụng để đánh giá hoạt tính ức chế nấm bệnh ở thí nghiệm sau.

#### 2.2.2. Đánh giá hoạt tính kháng nấm của các chủng vi khuẩn chọn lọc

Thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp cải tiến dựa trên phương pháp của Milijasevic-Marcic & cs. (2018). Cụ thể ba chủng nấm gây bệnh ở thực vật bao gồm *Fusarium solani*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* được nuôi cấy trên môi trường PDA trong 7 ngày ở 30°C và điều kiện tối. Sau đó, khi nấm đã phát triển kín bên mặt sẽ được cắt với dạng hình tròn có đường kính 5 mm. Quá trình đồng nuôi cấy vi khuẩn và nấm được tiến hành trên môi trường PDA ở 30°C trong 3-15 ngày. Vi khuẩn trước khi bố trí thí nghiệm được nuôi cấy khởi động trên đĩa môi trường NA trong 24 giờ. Trên đĩa đồng nuôi cấy, mẫu nấm bệnh được đặt vào đĩa môi trường

PDA sao cho khoảng cách từ vị trí đặt nấm đến thành đĩa là 3cm. Sau đó, cấy từng chủng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng trên đĩa petri vuông góc và cách vị trí đặt nấm là 3cm, chiều dài đường cấy khuẩn là 4,5cm (Hình 1). Các đĩa nấm được cấy không có vi khuẩn sẽ được sử dụng là mẫu đối chứng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần với mỗi chủng vi khuẩn và bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên. Khả năng ức chế nấm bệnh (Percent of growth inhibition - PGI) so với đối chứng được tính theo công thức như sau:  $PGI (\%) = (R1 - R2)/R1 \times 100\%$  (Milijasevic-Marcic & cs., 2018).

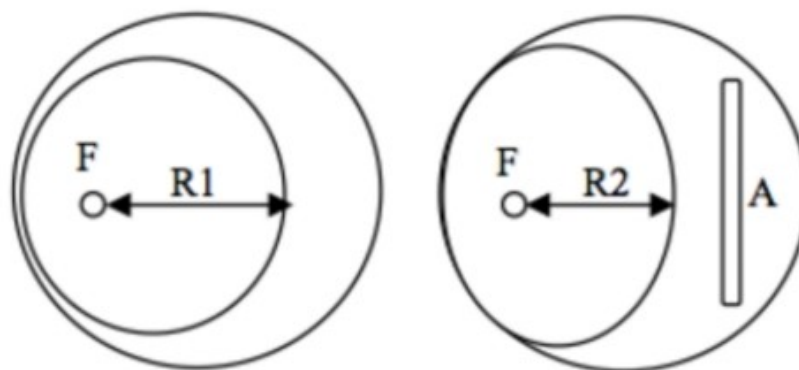
### 2.2.3. Xác định đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn chọn lọc

Các chủng vi khuẩn tuyển chọn được nghiên cứu đặc điểm hình thái khuẩn lạc, nhuộm gram, kiểm tra các đặc tính sinh lý, hóa sinh như thử nghiệm khả năng sản sinh catalase, amylase, cellulase và IAA (Rasul & cs., 2015; Herlina & cs., 2017). Nồng độ IAA được sản sinh bởi các chủng chọn lọc được định lượng theo phương pháp mô tả của TCVN 10784:2015, trong đó dịch khuẩn được nuôi từ 1 khuẩn lạc đơn trong 10ml dung dịch LB có bổ sung tryptophan trong 3 ngày ở điều kiện tối, lắc 150 vòng/phút, nhiệt độ 30°C. Dịch khuẩn được ly tâm loại bỏ cặn tế bào và bổ sung thuốc thử Salkowski theo tỷ lệ 1:2 và ủ ở 30°C trong 30 phút. Hàm lượng IAA sản sinh của các chủng được đo bằng máy quang phổ ở bước sóng

530nm. Định lượng được tính dựa trên phương trình đường chuẩn IAA xây dựng.

### 2.2.4. Định danh các chủng vi khuẩn chọn lọc

Để định danh các chủng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng mạnh với các nấm gây bệnh, chúng tôi tiến hành phân tích trình tự 16S rRNA. DNA tổng số của các chủng vi khuẩn tuyển chọn được tách chiết theo phương pháp của Farhad & cs. (2016). Trình tự 16S rRNA được nhân lên bằng phản ứng PCR với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') ở nhiệt độ gắn mồi  $T_m = 53^\circ\text{C}$ . Sản phẩm PCR (1465bp) được tinh sạch và giải trình tự tại công ty 1<sup>st</sup> BASE Singapore. Kết quả giải trình tự 16S rRNA của chủng tuyển chọn được căn trình tự trên ngân hàng gen nhờ công cụ Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Bên cạnh đó, để xác định được loài cụ thể thuộc nhóm *Bacillus subtilis*, hai cặp mồi đặc hiệu cho gen *gyrA* của vi khuẩn *Bacillus subtilis* và *Bacillus amyloliquefaciens* được sử dụng (Borshchevskaya & cs., 2013). Trình tự mồi cho gen *gyrA* của vi khuẩn *Bacillus subtilis* - 268bp (Bsub-F: CAAGAATGTCTAAGATCTCG; Bsub-R: CAGTCGGGAAATCAGGC). Trình tự mồi cho gen *gyrA* của vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* - 747bp (Bamy-F: AAATCTGCCCGTATCGTCGGT; Bamy-R: GTGAGCATTGGCGTCACGGCG).



Ghi chú: R1: Bán kính khuẩn lạc nấm bệnh trong công thức đối chứng (cm); R2: Bán kính khuẩn lạc nấm bệnh khi được nuôi cùng với vi khuẩn (cm).

Hình 1. Bố trí thí nghiệm đồng nuôi cấy giữa vi khuẩn và nấm bệnh

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Chọn lọc các chủng vi khuẩn có khả năng ức chế nấm bệnh thực vật từ mẫu đất thu thập

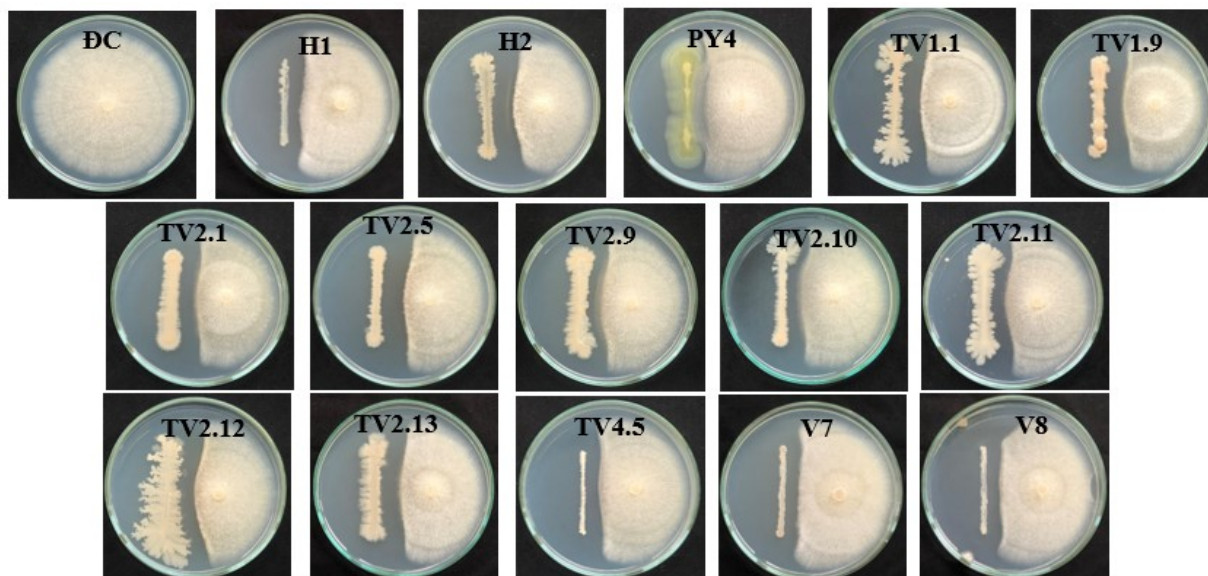
Từ 06 mẫu đất vùng rễ cây màu thu từ các tỉnh Hà Nội, Thái Bình và Phú Yên, 43 chủng vi khuẩn có khả năng ức chế nấm trên đĩa phân lập được làm thuần và đánh giá khả năng kháng nấm bệnh thực vật trong điều kiện *in vitro*. Ba chủng nấm gây bệnh thực vật được sử dụng lần lượt để đánh giá khả năng đối kháng của các chủng vi khuẩn nghiên cứu bao gồm *F. solani*, *F. oxysporum* và *A. alternata*. Sau quá trình sàng lọc, 15 chủng vi khuẩn được lựa chọn có khả năng ức chế mạnh sự phát triển hệ sợi của nấm *Fusarium solani* (Bảng 1, Hình 2). Nấm *F. solani* là nhóm nấm tồn tại trong đất với gần 60 loài khác nhau, có thể gây bệnh trên nhiều cây ký chủ (Coleman, 2016). Kết quả cho thấy, 15 chủng tuyển chọn thể hiện khả năng ức chế khác nhau đến sự phát triển hệ sợi của nấm *F. solani*, dao động trong khoảng 38,47-65,99% sau 7 ngày đồng nuôi cấy. Có 10

chủng có khả năng ức chế lớn hơn 50% so với đối chứng là: H2, TV1.1, TV1.9, TV2.1, TV2.5, TV2.9, TV2.11, TV 2.12, TV2.13 và TV4.5. Chủng PY4 là chủng có khả năng ức chế nấm *F. solani* thấp nhất đạt  $38,47 \pm 0,24\%$ . Quan sát sự phát triển hệ sợi của nấm *F. solani* theo thời gian cho thấy các chủng có hoạt tính kháng nấm mạnh sẽ biểu hiện sự ức chế sau 3 ngày nuôi cấy. Sự ức chế hệ sợi nấm *F. solani* rõ ràng hơn sau 5 ngày đồng nuôi cấy và tiếp tục tăng sau 7 ngày đồng nuôi cấy với các chủng vi khuẩn (Bảng 1).

Kết quả sau 15 ngày hệ số ức chế nấm bệnh tăng so với thời gian 7 ngày. Khi đĩa đồng nuôi cấy được tiếp tục nuôi giữ ở 28°C trong 15 ngày, các chủng vi khuẩn có khả năng ức chế sợi nấm phát triển một cách rõ rệt, màu sắc sợi nấm có màu nâu hoặc xám nhạt, quan sát có đường ranh giới giữa nấm *F. solani* và vi khuẩn (Hình 2). Trong khi đó nấm ở đĩa đối chứng phát triển hệ sợi kín bề mặt đĩa. Như vậy, có thể thấy các chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng mạnh có khả năng tiết ra các chất ức chế nấm trên môi trường PDA làm cho sợi nấm không thể kéo dài và bị đổi màu so với đối chứng.

**Bảng 1. Khả năng ức chế sự phát triển nấm *Fusarium solani* của các chủng vi khuẩn tiềm năng theo thời gian**

Kí hiệu chủng	Nguồn gốc	Khả năng ức chế hệ sợi so với đối chứng (%)		
		Sau 3 ngày	Sau 5 ngày	Sau 7 ngày
H1	Thái Bình	11,16 ± 0,03	32,55 ± 0,07	45,86 ± 0,06
H2	Thái Bình	33,31 ± 0,05	51,37 ± 0,05	59,96 ± 0,09
PY4	Phú Yên	9,21 ± 0,03	28,03 ± 0,06	38,47 ± 0,24
TV1.1	Hà Nội	32,04 ± 0,04	50,18 ± 0,08	57,98 ± 0,16
TV1.9	Hà Nội	22,72 ± 0,01	44,59 ± 0,02	54,35 ± 0,05
TV2.1	Hà Nội	21,29 ± 0,01	47,34 ± 0,11	57,16 ± 0,10
TV2.5	Hà Nội	35,91 ± 0,04	57,29 ± 0,05	65,99 ± 0,10
TV2.9	Hà Nội	20,67 ± 0,05	45,82 ± 0,12	56,70 ± 0,12
TV2.10	Hà Nội	23,48 ± 0,02	41,21 ± 0,03	47,72 ± 0,09
TV2.11	Hà Nội	17,58 ± 0,01	43,92 ± 0,01	52,47 ± 0,07
TV2.12	Hà Nội	36,32 ± 0,03	52,86 ± 0,03	63,41 ± 0,13
TV2.13	Hà Nội	21,16 ± 0,01	45,15 ± 0,03	55,04 ± 0,12
TV4.5	Hà Nội	4,53 ± 0,07	38,66 ± 0,15	51,96 ± 0,17
V7	Thái Bình	4,96 ± 0,04	35,19 ± 0,14	49,05 ± 0,06
V8	Thái Bình	1,19 ± 0,01	33,00 ± 0,13	44,03 ± 0,18



**Hình 2. Sự ức chế nấm *Fusarium solani* của các chủng vi khuẩn tiềm năng sau 15 ngày đồng nuôi cấy**

**Bảng 2. Khả năng ức chế sự phát triển nấm *Fusarium oxysporum* của các chủng vi khuẩn tiềm năng theo thời gian**

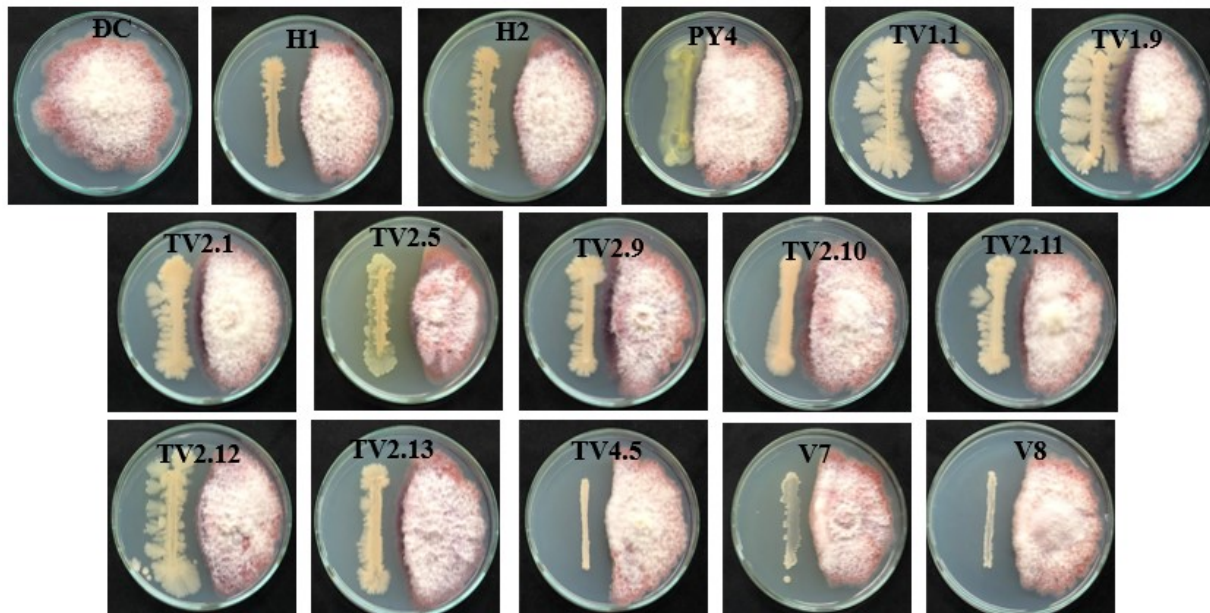
Kí hiệu chủng	Khả năng ức chế hệ sợi so với nấm đối chứng (%)		
	Sau 3 ngày	Sau 5 ngày	Sau 7 ngày
H1	11,52 ± 0,14	28,00 ± 0,11	49,98 ± 0,06
H2	10,30 ± 0,05	37,54 ± 0,01	56,47 ± 0,04
PY4	4,86 ± 0,03	7,73 ± 0,18	33,57 ± 0,06
TV1.1	5,61 ± 0,02	33,83 ± 0,09	54,40 ± 0,11
TV1.9	16,56 ± 0,03	36,21 ± 0,20	43,40 ± 0,16
TV2.1	12,97 ± 0,08	36,71 ± 0,04	43,33 ± 0,17
TV2.5	25,37 ± 0,14	42,53 ± 0,02	59,34 ± 0,03
TV2.9	11,62 ± 0,03	28,98 ± 0,04	40,86 ± 0,09
TV2.10	14,34 ± 0,04	27,69 ± 0,04	39,96 ± 0,16
TV2.11	11,75 ± 0,03	35,10 ± 0,10	44,86 ± 0,15
TV2.12	5,11 ± 0,03	32,71 ± 0,08	51,78 ± 0,15
TV2.13	13,44 ± 0,03	36,12 ± 0,12	46,66 ± 0,16
TV4.5	10,48 ± 0,02	27,33 ± 0,15	49,42 ± 0,17
V7	17,04 ± 0,03	32,67 ± 0,02	44,09 ± 0,07
V8	11,25 ± 0,02	18,12 ± 0,07	45,20 ± 0,10

Mười lăm chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng mạnh tiếp tục được sàng lọc với nấm *F. oxysporum* và *A. alternata*. Đối với nấm *F. oxysporum*, đây cũng là loài nấm bệnh thực vật tồn tại lâu dài trong đất có thể gây chết héo

nhiều cây trồng (Edel-Hermann & Lecomte, 2018). Trong thí nghiệm này, khi đồng nuôi cấy 15 chủng vi khuẩn và nấm *F. oxysporum*, tất cả các chủng đều thể hiện khả năng ức chế nấm sau 3 ngày (Hình 3). Khả năng ức chế hệ

sợi nấm *F. oxysporum* tăng theo thời gian. Sau 7 ngày đồng nuôi cấy, khả năng ức chế nấm của 15 chủng vi khuẩn tăng đạt 33,57-59,34%. Bốn chủng vi khuẩn có khả năng ức chế hệ sợi

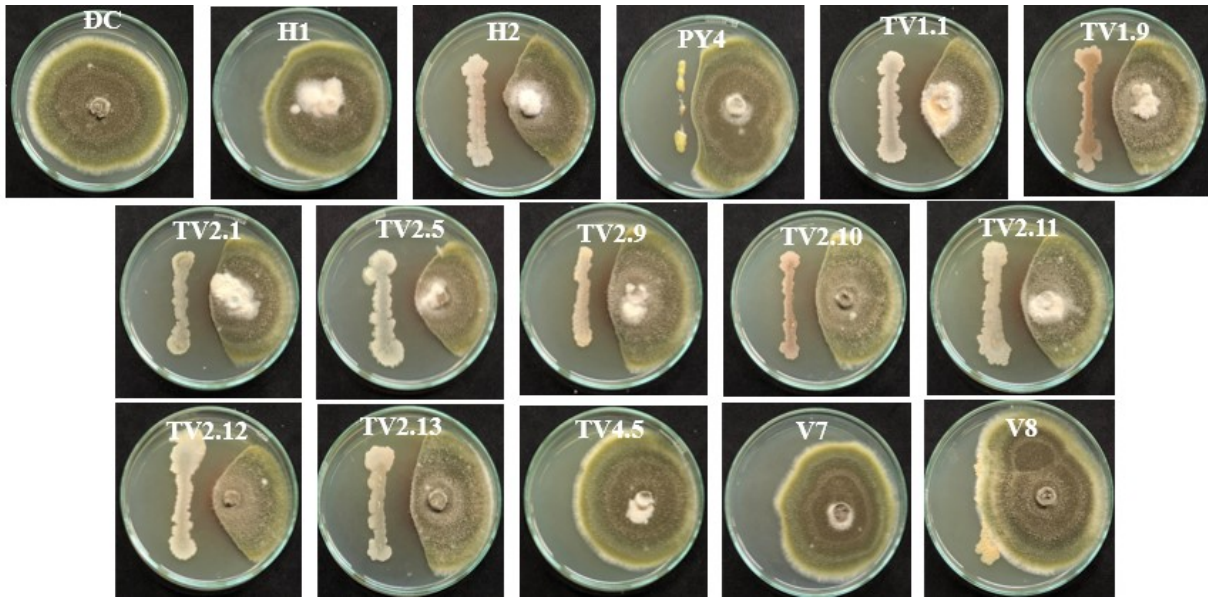
> 50% là H2, TV1.1, TV2.5 và TV2.12. Các chủng còn lại có ức chế tuy nhiên khả năng ức chế < 50% so với đối chứng sau 7 ngày đồng nuôi cấy.



**Hình 3. Sự ức chế nấm *Fusarium oxysporum* của các chủng vi khuẩn tiềm năng sau 15 ngày đồng nuôi cấy**

**Bảng 3. Khả năng ức chế sự phát triển nấm *A. alternata* của các chủng vi khuẩn tiềm năng theo thời gian**

Kí hiệu chủng	Khả năng ức chế hệ sợi so với đối chứng (%)		
	Sau 3 ngày	Sau 5 ngày	Sau 7 ngày
H1	0	0	0
H2	36,58 ± 0,24	56,15 ± 0,22	64,12 ± 0,12
PY4	15,01 ± 0,27	29,56 ± 0,21	47,82 ± 0,12
TV1.1	44,04 ± 0,16	60,66 ± 0,12	68,08 ± 0,07
TV1.9	28,32 ± 0,07	47,46 ± 0,14	61,14 ± 0,13
TV2.1	38,82 ± 0,08	52,24 ± 0,20	63,29 ± 0,10
TV2.5	40,24 ± 0,07	58,09 ± 0,03	66,39 ± 0,11
TV2.9	23,48 ± 0,10	45,67 ± 0,13	60,66 ± 0,18
TV2.10	28,84 ± 0,08	47,04 ± 0,16	61,31 ± 0,08
TV2.11	26,11 ± 0,10	49,98 ± 0,10	61,31 ± 0,14
TV2.12	42,42 ± 0,09	60,79 ± 0,14	67,27 ± 0,09
TV2.13	28,82 ± 0,19	49,18 ± 0,18	62,11 ± 0,33
TV4.5	6,11 ± 0,10	1,26 ± 0,18	2,97 ± 0,21
V7	13,27 ± 0,08	4,32 ± 0,17	0
V8	2,47 ± 0,26	3,48 ± 0,18	9,50 ± 0,11



**Hình 4. Sự ức chế nấm *A. alternata* của các chủng vi khuẩn tiềm năng sau 15 ngày đồng nuôi cấy**

Nấm *A. alternata* loài nấm có khả năng gây bệnh trên thân lá của nhiều cây kí chủ, tồn tại trên đồng ruộng trên những tàn dư thực vật theo thời gian (Demers, 2022). Để sàng lọc được chủng vi khuẩn kháng đa nấm, chúng tôi tiếp tục đánh giá khả năng đối kháng *in vitro* với *A. alternata* của 15 chủng vi khuẩn. Kết quả thể hiện trong bảng 3 và hình 3 cho thấy, chỉ có 11/15 chủng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng với nấm *A. alternata* đạt giá trị 47,82-68,08%. Bốn chủng vi khuẩn còn lại là H1, TV4.5, V7 và V8 không thể hiện sự đối kháng với nấm *A. alternata* sau 7 ngày đồng nuôi cấy. Quan sát bề mặt đĩa đồng nuôi cấy sau 15 ngày cho thấy, các chủng có hoạt tính đối kháng mạnh làm thay đổi đường biên phát triển của hệ sợi nấm (Hình 4). Bên cạnh đó, quan sát mặt dưới của vị trí cấy vi khuẩn cho thấy môi trường nuôi cấy cũng bị đổi màu sang màu nâu nhạt do các chất vi khuẩn tiết ra. Qua đây có thể thấy khi kéo dài thời gian đồng nuôi cấy lên 15 ngày khả năng phát triển hệ sợi nấm bệnh trên đĩa đồng nuôi cấy hầu như không thay đổi (Hình 4).

Như vậy, qua thí nghiệm sàng lọc khả năng đối kháng với 3 nấm bệnh thực vật *F. solani*, *F. oxysporum* và *A. alternata*, chúng tôi nhận thấy 15 chủng có hoạt tính kháng nấm khác nhau trên từng loại nấm khác nhau. Một số

chủng vi khuẩn chỉ có hoạt tính kháng nấm < 50% sẽ biểu hiện khả năng yếu trên cả 3 nấm bệnh thực vật khảo sát. So sánh hoạt tính kháng đa nấm của 15 chủng vi khuẩn, chúng tôi lựa chọn được 03 chủng vi khuẩn có hoạt tính kháng đa nấm cao nhất (> 50%) từ 15 chủng tiềm năng là TV1.1, TV2.5 và TV2.12.

### **3.2. Đánh giá đặc điểm hình thái, sinh hóa và định danh các chủng vi khuẩn chọn lọc**

Ba chủng vi khuẩn chọn lọc TV1.1, TV2.5 và TV2.12 được tiếp tục đánh giá các đặc điểm sinh hóa và định danh thông qua phân tích trình tự 16S rRNA và kiểm chứng thông qua nhân gen đặc hiệu (Bảng 4, Bảng 5). Về đặc tính hóa sinh, cả ba chủng vi khuẩn đều là vi khuẩn Gram dương, hình thái khuẩn lạc có màu trắng đục, bề mặt lồi/phẳng, có khả năng sản sinh catalase, cellulase và IAA. Kết hợp với kết quả phân tích trình tự gen 16S rRNA cho thấy, cả 3 chủng đều có sự tương đồng cao với các loài trong chi *Bacillus* sp. Đặc biệt cả ba chủng thể hiện tương đồng cao với một số loài như *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*. Kết quả nghiên cứu của Borshchevskaya & cs. (2013) chỉ ra rằng trình tự gen 16S rRNA của các loài trong nhóm *Bacillus subtilis* bao gồm *B. subtilis*,

*B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. vallismortis*, *B. atrophaeus*, *B. sonorensis* và *B. mojavensis* có sự tương đồng cao lớn hơn 99% (Borshchevskaya & cs., 2013). Chính vì vậy nếu chỉ dựa vào phân tích trình tự gen 16S rRNA thì không thể định danh chính xác. Do đó, để có thể xác định được loài của các chủng vi khuẩn chọn lọc này, chúng tôi tiếp tục sử dụng hai trình tự mỗi đặc hiệu của gen *gyrA* cho hai loài *Bacillus subtilis* và *Bacillus amyloliquefaciens* để đánh giá (Borshchevskaya & cs., 2013). Kết quả cho thấy chủng TV1.1 không có sản phẩm gen đặc hiệu cho cả hai loài thử nghiệm nên chủng này được xác định là loài thuộc chi *Bacillus* sp. Bên cạnh đó, chủng vi khuẩn TV2.5 cho sản phẩm gen đặc hiệu của loài *B. amyloliquefaciens* và chủng TV2.12 được xác định có mặt gen đặc hiệu cho loài *B. subtilis*. Vì vậy ba chủng này được đặt tên là *Bacillus* sp. TV1.1, *B. amyloliquefaciens*

TV2.5 và *B. subtilis* TV2.12.

Các nghiên cứu khác chỉ ra rằng, các loài vi khuẩn trong chi *Bacillus* là tác nhân sinh học quan trọng và được phát triển thành các chế phẩm thương mại trong phòng trừ bệnh ở thực vật bởi khả năng sản sinh hoạt chất kháng vi sinh vật, tương tác trực tiếp với tác nhân bệnh hoặc kích thích sinh trưởng phát triển ở cây trồng (Fira & cs., 2018). Ba chủng vi khuẩn chọn lọc của nghiên cứu này được đánh giá là các chủng thuộc chi *Bacillus* tiềm năng khi có khả năng kháng nấm cao và có khả năng sản sinh các enzyme ngoại bào như amylase, catalase, cellulase cũng như hoóc môn kích thích sinh trưởng ở thực vật IAA. Các chủng *Bacillus* này sẽ là các chủng được tiếp tục đánh giá *in vivo* về khả năng ức chế nấm bệnh và tương tác với cây trồng nhằm phát triển các tác nhân sinh học tiềm năng.

**Bảng 4. Đặc điểm hình thái, sinh hóa của các chủng vi khuẩn chọn lọc**

Đặc điểm	Kí hiệu chủng		
	TV1.1	TV2.5	TV2.12
Hình thái khuẩn lạc	Trắng, bề mặt phẳng	Trắng đục, bề mặt lồi	Trắng đục, bề mặt lồi
Nhuộm Gram, hình thái tế bào	+, hình que	+, hình que	+, hình que
Khả năng sản sinh enzyme ngoại bào amylase (đường kính vòng phân giải - mm)	12,9	-	-
Khả năng sinh catalase	+	+	+
Khả năng sản sinh cellulase (đường kính vòng phân giải - mm)	15,6	12,6	13,3
Hàm lượng sản sinh IAA ( $\mu\text{g/ml}$ )	13,32	11,64	17,17

Chú thích: (+) Kết quả dương tính; (-): Kết quả âm tính.

**Bảng 5. Phân tích trình tự gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn chọn lọc trên cơ sở dữ liệu ngân hàng gen và gen đặc hiệu**

Kí hiệu	Loài tương đồng gần nhất	Mã số trên ngân hàng GeneBank NCBI	Tỷ lệ tương đồng (%)	Gene đặc hiệu cho vi khuẩn <i>B. subtilis</i> (268bp)	Gene đặc hiệu cho vi khuẩn <i>B. amyloliquefaciens</i> (747bp)	Kết luận
TV1.1	Các loài trong nhóm <i>Bacillus subtilis</i>	OR142836.1 OK067286.1 MT052342.1	98,39-99,44	-	-	<i>Bacillus</i> sp. TV1.1
TV2.5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SRND	PP496223.1	100	-	+	<i>B. amyloliquefaciens</i> TV2.5
TV2.12	<i>Bacillus subtilis</i> strain HSY21	MT513998.1	99	+	-	<i>B. subtilis</i> TV2.12



#### 4. KẾT LUẬN

Từ các mẫu đất thu thập, nghiên cứu đã đánh giá và tuyển chọn được 03 chủng vi khuẩn có khả năng ức chế tốt đối với các loài nấm bệnh thực vật *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* và *Alternaria alternata*. Hiệu quả ức chế nấm bệnh của ba chủng vi khuẩn tiềm năng dao động trong khoảng 51,78-68,08% ở điều kiện 30°C. Ba chủng này được định danh là các chủng thuộc chi *Bacillus* lần lượt là *Bacillus* sp. TV1.1, *B. amyloliquefaciens* TV2.5 và *B. subtilis* TV2.12. Các chủng này là nguồn vật liệu có giá trị cho hướng nghiên cứu phát triển các tác nhân kiểm soát bệnh ở thực vật do nấm gây ra.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bardin M., Ajouz S., Comby M., Lopez-Ferber M., Graillot B., Siegwart M. & Nicot P.C. (2015). Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? *Frontiers in Plant Science*. 6.
- Borshchevskaya L.N., Kalinina A.N. & Sineokii S.P. (2013). Design of a PCR test based on the *gyrA* gene sequence for the identification of closely related species of the *Bacillus subtilis* group. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 49: 646-655.
- Chakraborty S., Islam T. & Mahapatra S. (2022). Antifungal Compounds of Plant Growth-Promoting *Bacillus* Species. *In: Antifungal Metabolites of Rhizobacteria for Sustainable Agriculture*. Sayyed R. Z., Singh A. & Ilyas N. (eds.). Springer International Publishing Cham. pp. 135-155.
- Chatterjee S., Kuang Y., Splivallo R., Chatterjee P. & Karlovsky P. (2016). Interactions among filamentous fungi *Aspergillus niger*, *Fusarium verticillioides* and *Clonostachys rosea*: fungal biomass, diversity of secreted metabolites and fumonisin production. *BMC Microbiology*. 16(1): 83.
- Choudhary D.K. & Johri B.N. (2009). Interactions of *Bacillus* spp. and plants - With special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*. 164(5): 493-513.
- Coleman J. J. (2016). The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Molecular Plant Pathology*. 17(2): 146-158.
- Demers M. (2022). *Alternaria alternata* as endophyte and pathogen. *Microbiology (Reading)*. 168(3).
- Edel-Hermann V. & Lecomte C. (2018). Current Status of *Fusarium oxysporum* Formae Speciales and Races. *Phytopathology®*. 109(4): 512-530.
- El-Baky N. A. & Amara A. (2021). Recent Approaches towards Control of Fungal Diseases in Plants: An Updated Review. *J Fungi (Basel)*. 7(11).
- Farhad M.-A., Leila J., Reza K. N. & Ali A. (2016). A Simple and Rapid System for DNA and RNA Isolation from Diverse Plants Using Handmade Kit. *Research square*. doi. 10.21203/rs.2.1347/v2.
- Fira D., Dimkić I., Berić T., Lozo J. & Stanković S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*. 285: 44-55.
- Gwiazdowski R., Kubiak K., Juś K., Marchwińska K. & Gwiazdowska D. (2024). The Biocontrol of Plant Pathogenic Fungi by Selected Lactic Acid Bacteria: From Laboratory to Field Study. *Agriculture*. 14(1): 61.
- Herlina L., Pukan K. & Mustikaningtyas D. (2017). The endophytic bacteria producing IAA (Indole Acetic Acid) in *Arachis hypogaea*. *Cell Biology and Development*. 1: 31-35.
- Kim P., Ryu J., Kim Y. & Chi Y.-T. (2010). Production of Biosurfactant Lipopeptides Iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for Control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20: 138-45.
- Li P., Tedersoo L., Crowther T. W., Wang B., Shi Y., Kuang L., Li T., Wu M., Liu M., Luan L., Liu J., Li D., Li Y., Wang S., Saleem M., Dumbrell A. J., Li Z. & Jiang J. (2023). Global diversity and biogeography of potential phytopathogenic fungi in a changing world. *Nature Communications*. 14(1): 6482.
- Milijasevic-Marcic S., Todorovic V., Stanojevic O., Berić T., Stanković S., Todorovic B. P. & Potocnik I. (2018). Antagonistic potential of *Bacillus* spp. isolates against bacterial pathogens of tomato and fungal pathogen of pepper. *Pesticidi I Fitomedicina*. 33: 9-18.
- Rasul F., Afroz A., Rashid U., Mehmood S., Sughra K. & Zeeshan n. (2015). Screening and characterization of cellulase producing bacteria from soil and waste (molasses) of sugar industry *International Journal of Biosciences*. 6: 230-238.
- Thi Thanh Dang T., Thi Thanh Nguyen M., Thi Nguyen T., Hong Pham H., Tran V.-T., Tran D. T. & Nguyen C. X. (2024). Characterisation of *Streptomyces* sp. VNUA116 with strong antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense tropical race 4. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 57(4): 315-330.