PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG NẤM *Alternaria alternata* GÂY BỆNH ĐỐM LÁ TRÊN DƯA LEO

Nguyễn Thị Liên*, Nguyễn Nhựt Hào, Nguyễn Lam Minh, Nguyễn Tăng Phú

Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

**Tác giả liên hệ: ntlien@ctu.edu.vn*

Ngày nhận bài: 07.08.2023 Ngày chấp nhận đăng: 26.01.2024

TÓM TẮT

Bệnh đốm lá trên dưa leo gây thiệt hại nghiêm trọng đối với năng suất và chất lượng trái thương phẩm. Nghiên cứu được thực hiện nhằm tuyển chọn các chủng vi khuẩn trong đất vùng rễ dưa leo có khả năng đối kháng với nấm *Alternaria alternata*. Các chủng vi khuẩn phân lập được đánh giá hoạt tính kháng nấm bằng phương pháp cấy kép. Các chủng vi khuẩn đối kháng được khảo sát khả năng sản sinh một số enzyme thuỷ phân (β-1,3-glucanase, chitinase, protease) và siderophore. Hoạt tính kháng nấm của các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi được đánh giá bằng phương pháp úp đáy đĩa Petri. Mười hai chủng phân lập thể hiện khả năng đối kháng với nấm *A. alternata*. Phần trăm ức chế sự phát triển của *A. alternata* dao động từ 9,7-47,8%. Tám chủng cho thấy khả năng sinh hợp chất siderophore. Tất cả các chủng đều có khả năng sản sinh các enzyme thuỷ phân (β-1,3-glucanase, chitinase, protease). Chitinase có mối tương quan chặt với khả năng ức chế sự phát triển của nấm bệnh (P <0,05). Các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi của 12 chủng vi khuẩn đối kháng đều cho thấy khả năng ức chế sự phát triển của bào tử (61,8-95,2%) và khuẩn ty (58,9-79,7%) của *A. alternata*. Kết quả nghiên cứu chỉ ra tiềm năng của vi khuẩn vùng rễ trong kiểm soát *A. alternata* gây đốm lá trên dưa leo.

Từ khóa: *Alternaria* sp., dưa leo, đất vùng rễ, phân lập, vi khuẩn đối kháng.

Isolation and Selection of Antagonistic Bacteria Against *Alternaria alternata* Causing Leaf Spot Disease on Cucumber

ABSTRACT

Alternaria leaf spot on cucumber causes serious damage to marketable fruit yield and quality. The study was carried out to select bacterial strains from the cucumber rhizosphere soil with antagonistic activity against *Alternaria alternata*. The isolates were evaluated for their antifungal activity by dual culture method. The antagonistic isolates were investigated for their ability to produce hydrolytic enzymes and siderophore. The antifungal activity of volatile organic compounds was evaluated by the Petri dish inversion method. Twelve isolates exhibited antagonism against *A. alternata*. Growth inhibition of *A. alternata* by these isolates ranged from 9.7 to 47.8%. Eight isolates showed the ability to produce siderophore. All isolates were capable of producing hydrolytic enzymes (β-1,3-glucanase, chitinase, protease). Chitinase had a strong correlation with the ability to inhibit the growth of the pathogenic fungus (P <0.05). Volatile organic compounds of 12 antagonistic strains showed the ability to inhibit the growth of spores (61.8-95.2%) and mycelium (58.9-79.7%) of *A. alternata* The results of this study indicated the potential of rhizobacteria in controlling *A. alternata* causing leaf spot in cucumbers.

Keywords: *Alternaria alternata*, antagonistic bacteria, cucumber, rhizosphere soil.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Dưa leo (*Cucumis sativus* L.) thuộc họ bầu bí Cucurbitaceae, là loại rau ăn quả được trồng từ lâu đời ở Việt Nam, bao gồm cả vùng Đồng bằng sông Cửu Long. Dưa leo không chỉ tham gia vào bữa ăn hằng ngày với vai trò nguồn chất xơ rau quả mà còn mang giá trị thương mại quan trọng. Tuy nhiên, canh tác dưa leo còn gặp nhiều khó khăn do thời tiết, ẩm độ cao khiến nhiều loại dịch bệnh phát triển mạnh, trong đó bệnh đốm lá trên dưa leo do nấm *Alternaria* gây

ra là mối nguy hại đáng quan tâm hiện nay. Nấm *Alternaria* được xem là một trong những đối tượng dịch hại nguy hiểm hàng đầu trên thế giới làm giảm năng suất lẫn chất lượng của cây trồng, thậm chí có thể gây chết cây. Do nấm *Alternaria* là tác nhân đa ký chủ, nên bệnh phổ biến trên nhiều đối tượng: dưa leo (Vakalounakis & Malathrakis, 1988), chanh (Vicent & García-Jiménez, 2007), cà chua (Akhtar & cs., 2004), khoai tây (Van der Waals & cs., 2011)… Nấm có khả năng phát triển quanh năm, ở mọi giai đoạn phát triển của cây. Biện pháp hóa học hiện nay được áp dụng phổ biến, tuy nhiên mang lại hiệu quả không ổn định, ảnh hưởng nghiêm trọng đến hệ sinh thái nông nghiệp, chất lượng nông sản, đặc biệt là sức khỏe của con người, ngoài ra còn tăng hiện trạng kháng thuốc của mầm bệnh. Do đó, nghiên cứu và ứng dụng các tác nhân phòng trừ sinh học đang là vấn đề hiện đang được quan tâm (Trần Thị Thu Thủy, 2009). Xuất phát từ điều kiện thực tế, đề tài được thực hiện với mục tiêu phân lập một số chủng vi khuẩn đối kháng nấm bệnh từ đất vùng rễ cây dưa leo. Kết quả nghiên cứu của đề tài là tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo ứng dụng khảo sát hiệu quả giảm bệnh, tạo chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh đốm lá dưa leo.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Chủng nấm *Alternaria alternata* ATL (GenBank accession number: OR922335) (Hình 1) được phân lập từ mẫu dưa leo bệnh và được thử nghiệm tính gây bệnh bằng cách lây nhiễm nhân tạo trên cây dưa leo theo quy trình Koch. Chủng nấm được lưu trữ tại Phòng Thí nghiệm Vi sinh, Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ.

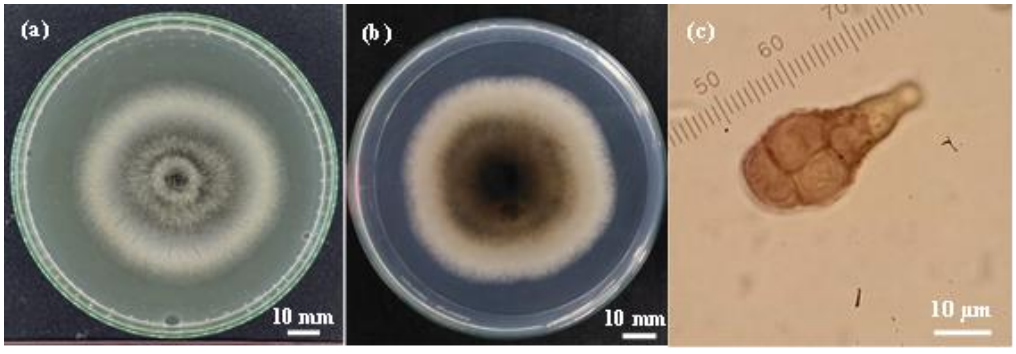
Mẫu đất vùng rễ dưa leo được thu thập tại các ruộng trồng dưa leo của nông dân thuộc các tỉnh Hậu Giang, Vĩnh Long, An Giang, Bạc Liêu, Đồng Tháp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập vi khuẩn

Thu thập mẫu đất: mẫu đất vùng rễ cây dưa leo được thu thập tại các ruộng dưa leo tại Hậu Giang, Vĩnh Long, An Giang, Bạc Liêu, Đồng Tháp, Cần Thơ. Vị trí các cây dưa leo phát triển khoẻ mạnh, ít bị sâu bệnh tấn công được chọn để thu thập mẫu đất. Lớp đất mặt được loại đi, sau đó dùng dụng cụ xới đều vùng đất quanh gốc và thu lấy mẫu đất tại vị trí rễ cây dưa leo. Mẫu đất được chứa trong các túi nylon vô trùng, ghi nhận thông tin của mẫu và vận chuyển nhanh chóng về phòng thí nghiệm.

Phân lập vi khuẩn: mỗi mẫu đất (10g) được khuấy đều với 90ml nước cất vô trùng trong 15 phút. Dịch đất được để lắng trong khoảng 15 phút. Phần dịch trong được pha loãng thành dãy nồng độ 10^{-1}-10^{-6}. Mỗi nồng độ pha loãng (100µl) được trải lên môi trường LB agar và ủ ở 30°C. Sau 48-72 giờ, chọn những khuẩn lạc có đặc điểm khác nhau để tiến hành cấy chuyển nhiều lần trên môi trường LB agar đến khi thu được các khuẩn lạc đồng nhất. Các chủng vi khuẩn thuần chủng được sử dụng cho thí nghiệm tiếp theo.



Hình 1. Khuẩn lạc (a: mặt trên và b: mặt dưới) **và bào tử** (c) **chủng nấm *A. alternata* ATL**

2.2.2. Khảo sát khả năng đối kháng nấm A. alternata của các chủng vi khuẩn phân lập trên đĩa thạch

Chuẩn bị vi khuẩn đối kháng. Các chủng vi khuẩn phân lập được nuôi cấy trên môi trường LB agar và ủ trong 24 giờ. Sinh khối vi khuẩn đối kháng được huyền phù trong 10ml dung dịch nước muối sinh lý vô trùng. Huyền phù vi khuẩn được điều chỉnh về giá trị độ hấp thụ quang ở bước sóng 600nm (OD_{600}) bằng 0,1 (mật số tương đương 10^8 tế bào/ml).

Khảo sát khả năng đối kháng. Một khối thạch nấm gây bệnh với đường kính khoảng 6mm được lấy từ phần rìa của nấm *A. alternata* đang phát triển và cấy vào tâm đĩa petri chứa môi trường PDA và ủ ở nhiệt độ 30°C trong 2 ngày. Huyền phù vi khuẩn (3 µl/vị trí) được nhỏ lên 3 điểm đối xứng nhau qua tâm và cách mép đĩa 1,5cm. Một vị trí tương tự được nhỏ với nước cất vô trùng được dùng làm đối chứng. Sau 5 ngày, quan sát sự hình thành vùng kháng nấm và tính tỷ lệ ức chế sự phát triển của nấm bởi vi khuẩn theo công thức (Han & cs., 2015):

Phần trăm ức chế tăng trưởng (%) = (R – r)/R

Trong đó: R là bán kính hệ sợi nấm đối chứng; r là bán kính hệ sợi nấm ở điểm có chủng vi khuẩn.

2.2.3. Khảo sát một số đặc tính của các chủng vi khuẩn đối kháng

Khả năng sinh β-1,3-glucanase

Khả năng sinh enzyme β-1,3-glucanase của các chủng vi khuẩn được thực hiện theo phương pháp của Kini & cs. (2000).

Chuẩn bị dịch enzyme: Huyền phù vi khuẩn (100µl) được thêm vào các ống falcon chứa 10ml môi trường LB, mỗi chủng vi khuẩn được bố trí 3 ống. Các ống thử nghiệm được ủ ở 30°C trên máy lắc ngang với tốc độ 120 vòng/phút trong 24 giờ. Dịch vi khuẩn (2ml) được ly tâm với tốc độ 13.000 vòng/phút, 10 phút, ở 4°C.

Xác định hoạt độ enzyme: Phần dịch nổi sau ly tâm (100µl) được trộn đều với 900µl laminarin (0,05% trong đệm natri acetate 0,05M; pH 5,2). Hỗn hợp được ủ ở 37°C trong 30 phút. Phản ứng được dừng bằng cách đun cách thuỷ ở 100°C trong 5 phút. Hàm lượng đường khử sinh ra từ laminarin được xác định bằng phương pháp 3,5-dinitrosalicylic acid. Glucose được sử dụng làm chất chuẩn cho thí nghiệm này. Hoạt độ enzyme được thể hiện dưới dạng µmol glucose/phút/ml.

Khả năng phân giải chitin: Huyền phù vi khuẩn (3µl) được nhỏ lên 3 điểm trên các đĩa môi trường yeast extract glucose agar (YEG agar) bổ sung 1% huyền phù chitin. Sau 72 giờ ủ, các đĩa được ngâm với dung dịch Lugol trong 5 phút. Vùng sáng màu xung quanh các khuẩn lạc cho thấy các chủng vi khuẩn có khả năng phân giải chitin.

Khả năng phân giải protein: Huyền phù vi khuẩn (3µl) được nhỏ lên 3 điểm trên các đĩa Skim milk agar (Geok & cs., 2003) và ủ ở 30°C trong 48 giờ. Vùng phân giải xung quanh khuẩn lạc cho thấy khả năng phân giải protein bởi các chủng vi khuẩn.

Khả năng sản sinh siderophore: Các đĩa thạch hai lớp được sử dụng cho thí nghiệm: lớp dưới là Chrome azurol S agar (Schwyn & Neilands, 1987) và lớp trên là YEG agar. Huyền phù vi khuẩn (3µl) được nhỏ lên 3 điểm trên các đĩa thử nghiệm và ủ ở 30°C trong 72 giờ. Vùng màu vàng xung quanh các khuẩn lạc được xác định là có sự sản xuất siderophore.

Khả năng ức chế nấm bệnh bởi các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi (volatile organic compound - VOC)

Thí nghiệm khảo sát khả năng ức chế nấm (khuẩn ty và bào tử của *A. alternata*) của các hợp chất dễ bay được thực hiện theo mô tả của Zhang & cs. (2020).

Chuẩn bị huyền phù bào tử *A. alternata.* Chủng nấm *A. alternata* được cấy trên môi trường PDA trước 7 ngày. Khuẩn lạc nấm được dàn đều với 10ml nước muối sinh lý vô trùng, sau đó hỗn hợp được lọc qua 4 lớp vải thưa vô trùng và thu lấy phần dịch lọc. Huyền phù bào tử được điều chỉnh về mật số 10^5 bào tử/ml bằng cách đếm trên buồng đếm Neubauer cải tiến.

Huyền phù các chủng vi khuẩn đối kháng (100µl) được trải lên các đĩa LB agar bằng tăm

bông vô trùng. Các khối thạch *A. alternata* (đường kính 6mm) được cấy vào trung tâm các đĩa PDA. Trong thử nghiệm ức chế sự nảy mầm của bào tử, 3µl huyền phù bào tử *A. alternaria* được nhỏ lên tâm đĩa PDA. Các đĩa petri chủng với nấm bệnh được úp trên các đĩa petri đã được chủng với vi khuẩn đối kháng. Các đĩa petri trên và dưới được quấn kín bằng parafim và ủ ở 28°C trong 5 ngày. Các đĩa thạch LB không chủng với vi khuẩn đối kháng được sử dụng làm đối chứng. Tốc độ ức chế sự phát triển của sợi nấm và sự nảy mầm của bào tử được tính theo công thức sau:

Tỷ lệ ức chế sự phát triển (%) = (đường kính khuẩn lạc ở nghiệm thức đối chứng – đường kính của khuẩn lạc ở nhóm ủ với vi khuẩn đối kháng)/đường kính khuẩn lạc đối chứng × 100%.

2.3.4. Nhận diện hai vi khuẩn tiềm năng BL1.1 và HG2.5

Hai chủng vi khuẩn BL1.1 và HG2.5 thể hiện hoạt tính kháng nấm mạnh chống lại *A. alternata* ATL được nhận diện đến cấp độ phân loại chi theo mô tả của Holt & cs. (1994). Hai chủng vi khuẩn được nhận diện bằng các đặc điểm: hình thái khuẩn lạc, đặc điểm tế bào, đặc điểm Gram, khả năng sinh bào tử, khả năng di động, kỵ khí bắt buộc và catalase. Đặc điểm tế bào và khả năng di động được quan sát với tiêu bản giọt ép trên kính hiển vi quang học. Đặc điểm Gram và khả năng sinh bào tử được thực hiện theo mô tả của bộ nhuộm Gram (Nam Khoa) và bộ nhuộm bào tử (Schaeffer and Fulton Spore Stain Kit, Merck). Khả năng sản sinh catalase được thử nghiệm với H_2O_2 3%. Khả năng phát triển trong điều kiện kỵ khí được thực hiện theo mô tả của Nguyễn Tăng Phú & Nguyễn Thị Liên (2019). Hai chủng BL1.1 và HG2.5 được cấy trên môi trường LB agar, các đĩa được ủ ở 30°C trong bình thuỷ tinh kín có đặt một ngọn nến đang cháy và điều kiện kỵ khí được tạo khi ngọn nến cháy hết.

2.3. Xử lý số liệu

Các số liệu được nhập, xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016 và được phân tích thống kê ANOVA một chiều (One-way ANOVA), kiểm định Tukey ở mức ý nghĩa 5% để so sánh các trung bình nghiệm thức bằng phần mềm thống kê Minitab 16.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn đối kháng

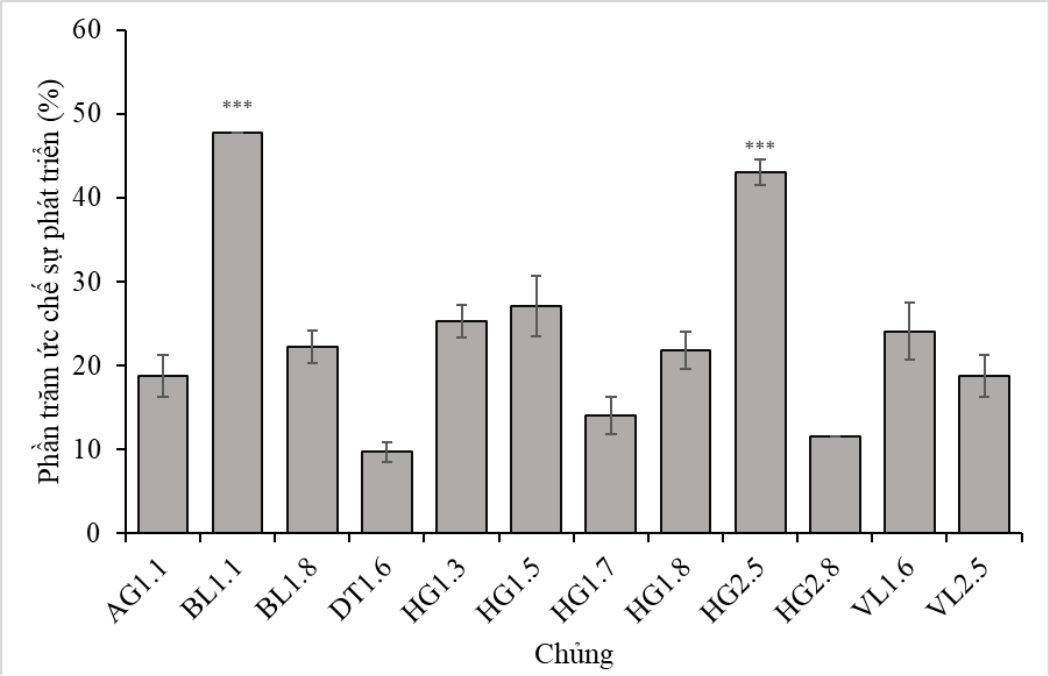
Tổng số 81 chủng vi khuẩn thuần chủng được phân lập từ 7 mẫu đất vùng rễ dưa leo. Trong đó, 12 chủng vi khuẩn thể hiện khả năng đối kháng nấm bệnh *A. alternata* trên đĩa thạch. Phần trăm ức chế sự phát triển của *A. alternata* bởi các chủng vi khuẩn đối kháng dao động từ 9,7 đến 47,8%. Hai chủng vi khuẩn BL1.1 và HG2.5 cho thấy hoạt tính kháng nấm chống lại *A. alternata* đạt cao nhất, phần trăm ức chế sự phát triển lần lượt là 47,8% và 43,0% với khác biệt không có ý nghĩa so với nhau. Kết quả chi tiết được thể hiện trong hình 2 và hình 3.

Alternaria có thể tấn công trên nhiều loại cây trồng thuộc họ Bầu bí, gây thiệt hại về năng suất và chất lượng nông sản (Daley & cs., 2017; Kwon & cs., 2021). Hiệu quả kháng nấm chống lại *Alternaria* sp. của vi khuẩn đã được báo cáo trong một số nghiên cứu. Hai chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* và *Bacillus subtilis* thể hiện khả năng ức chế sự tăng trưởng nấm *Alternaria* sp. trong điều kiện *in vitro* với phần trăm ức chế sự phát triển của khuẩn ty lần lượt là 47,9% và 34% (Win & cs., 2021). Các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* F9-2, F9-8, F9-12, *Pseudomonas arsenicoxydans* F9-7, *P. koreensis* F9-9 và *P. morcaviensis* F9-11 thể hiện khả năng ức chế khuẩn ty *Alternaria alternata* với phần trăm ức chế luôn lớn hơn 27% và đạt cao nhất là 59% (Kurniawan & cs., 2018). Kết quả của nghiên cứu một lần nữa chỉ ra tiềm năng của vi khuẩn vùng rễ trong kiểm soát nấm bệnh *Alternaria*.

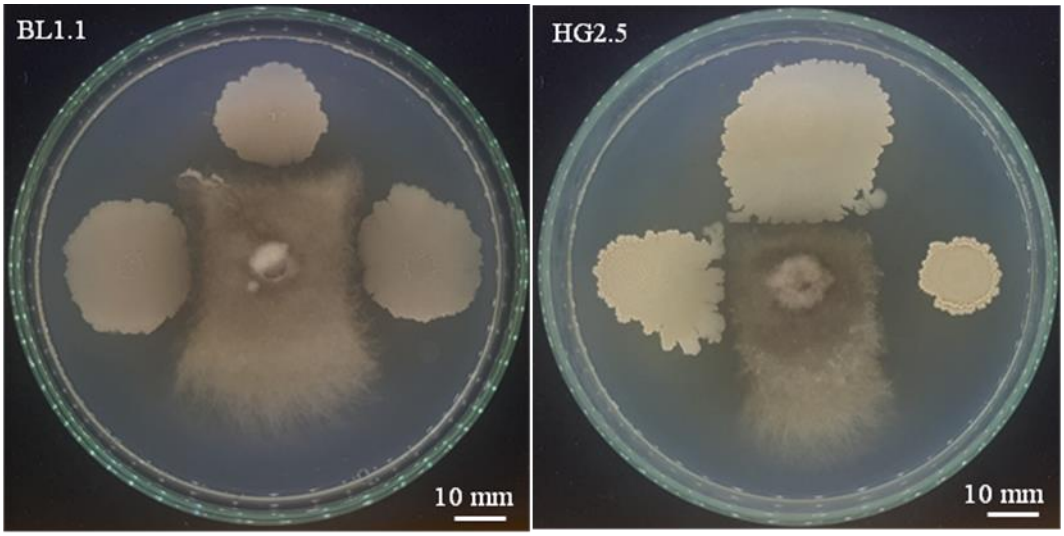
3.2. Kết quả khảo sát một số đặc tính của các chủng vi khuẩn đối kháng

Kết quả ghi nhận toàn bộ 12 chủng vi khuẩn đối kháng đều có khả năng sản sinh enzyme β-1,3-glucanase, phân giải chitin, phân

giải protein, sản sinh các hợp chất bay hơi ức chế sự phát triển của khuẩn ty và bào tử *A. alternata*. Khả năng sản sinh siderophore được ghi nhận ở 8/12 chủng vi khuẩn đối kháng. Mức độ biểu hiện của các hoạt tính khảo sát khác nhau giữa các chủng vi khuẩn. Mỗi chủng vi khuẩn chỉ cho thấy hoạt động ưu thế của một số đặc tính. Khả năng phân giải chitin có mức độ tương quan cao với hoạt tính kháng nấm của các chủng vi khuẩn (Pearson correlation = 0,622, P <0,05). Tuy nhiên, sự tổ hợp của nhiều đặc tính có thể nâng cao hoạt tính kháng nấm của các chủng vi khuẩn. Ví dụ chủng BL1.1 với hoạt tính kháng nấm cao nhất có khả năng phân giải chitin cao nhất, nhưng không có khả năng sản sinh siderophore. Chủng HG2.5 cho thấy hoạt động của các đặc tính ở mức trung bình, nhưng hoạt tính kháng nấm khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với chủng BL1.1. Kết quả chi tiết được thể hiện ở hình 2 và bảng 1.



Hình 2. Kết quả khảo sát khả năng ức chế *A. alternata* của các chủng vi khuẩn đối kháng

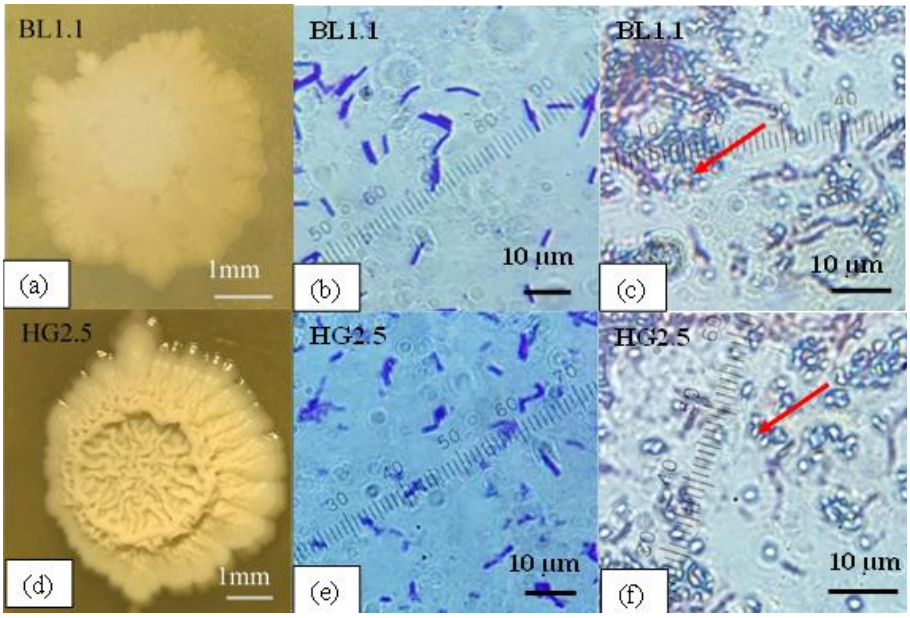


Hình 3. Hoạt tính kháng nấm chống lại *A. alternata* của hai chủng BL1.1 và HG2.5

Bảng 1. Kết quả khảo sát một số đặc tính của các chủng vi khuẩn đối kháng

Chủng	Hoạt độ enzyme β-1,3-glucanase	Đường kính vòng phân giải chitin	Đường kính vòng phân giải protein	Đường kính vòng sản sinh siderophore	Phần trăm ức chế khuẩn ty nấm bởi VOC	Phần trăm ức chế bào tử nấm bởi VOC
AG1.1	0,626^{d}	16,0^{b}	22,3^{a}	0^{e}	70,8^{ab}	82,6^{abc}
BL1.1	0,611^{d}	18,7^{a}	11,3^{c-e}	0^{e}	71,4^{ab}	78,7^{bc}
BL1.8	0,651^{bc}	12,3^{c}	9,7^{e-g}	0^{e}	75,5^{ab}	89,9^{ab}
DT1.6	0,611^{d}	1,3^{g}	14,7^{c}	17,0^{a}	77,6^{a}	91,3^{ab}
HG1.3	0,611^{d}	7,0^{de}	12,7^{c-e}	10,3^{b}	68,2^{ab}	87,9^{ab}
HG1.5	0,629^{cd}	4,3^{f}	7,0^{gh}	3,7^{d}	58,9^{b}	94,2^{a}
HG1.7	0,629^{cd}	6,3^{d-f}	18,3^{b}	0^{e}	79,7^{a}	95,2^{a}
HG1.8	0,667^{ab}	8,3^{d}	13,3^{cd}	5,7^{c}	71,9^{ab}	89,9^{ab}
HG2.5	0,598^{d}	13,3^{c}	4,7^{h}	4,7^{cd}	67,7^{ab}	86,0^{ab}
HG2.8	0,604^{d}	7,0^{de}	7,7^{f-h}	4,7^{cd}	68,3^{ab}	85,0^{ab}
VL1.6	0,658^{a-c}	5,0^{ef}	11,0^{d-f}	1,3^{e}	64,0^{ab}	61,8^{d}
VL2.5	0,692^{a}	11,3^{c}	9,7^{e-g}	4,3^{cd}	67,7^{ab}	69,6^{cd}
P	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CV(%)	1,9	9,97	10,67	6,5	8,1	5,8

Ghi chú: Trong cùng một cột có chữ cái theo sau giống nhau là khác biệt không có ý nghĩa thống kê theo phép thử Tukey ở mức ý nghĩa 5%, Các giá trị trong bảng là trung bình của ba lần lặp lại.



Hình 4. Khuẩn lạc (a và d)**, kết quả nhuộm Gram** (b và e) **và nhuộm bào tử** (c và f, mũi tên chỉ bào tử của chủng vi khuẩn) **của hai chủng BL1.1 và HG2.5**

Thành phần chitin đóng vai trò nổi bật trong trong cấu trúc thành tế bào nấm sợi. Chitinase từ vi khuẩn được báo cáo tác động gây giảm sinh khối và ức chế sự phát triển của sợi nấm (Chanworawit & cs., 2023). Đóng vai trò quan trọng ngoài chitin trên vách tế bào nấm bệnh là β-1,3-glucan. Nghiên cứu của Kumar & cs. (2018) cho thấy các chủng vi khuẩn đối kháng chủ yếu tạo ra β-1,3-glucanase (laminarinase) để phân hủy β-1,3-glucan, làm mỏng vách tế bào nấm bệnh hoặc trực tiếp làm phân rã vách tế bào nấm. Protein là phân tử

sinh học quan trọng tham gia trong cấu trúc và hoạt động sống của nấm bệnh. Hoạt tính phân giải protein có thể tác động đến các cấu trúc protein thành tế bào, hoặc các phân tử có bản chất protein của nấm bệnh. Siderophore của vi khuẩn thể hiện ái lực cao với phân tử sắt hiện diện trong môi trường, làm cho môi trường xung quanh nghèo sắt giúp hạn chế sự phát triển của tác nhân gây bệnh (Sharma & Johri, 2003).

Kết quả của nghiên cứu cho thấy sự tương đồng với các nghiên cứu trước về hoạt động của các enzyme thuỷ phân, siderophore trong hoạt tính kháng nấm của vi khuẩn vùng rễ. Lin & cs. (2014) đã báo cáo phần lớn các chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. đối kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *Rhizoctonia solani* gây bệnh trên dưa leo đều sản sinh cellulase, chitinase, protease và siderophore. Chủng *Bacillus atrophaeus* S2BC-2 phân lập từ đất vùng rễ cà chua được xác định có khả năng sản sinh siderophore, chitinase và β-1,3-glucanase. Chủng S2BC-2 được chứng minh khả năng giảm bệnh do *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* và *Alternaria solani* trên cà chua khi khảo sát trong điều kiện nhà lưới (Shanmugam & cs., 2011).

Cơ chế kháng nấm của các VOC được báo cáo là thường gây biến dạng bất thường về hình thái, bào tử dị dạng, có thành dày hoặc bị ngưng hình thành mà chỉ hình thành sợi nấm dinh dưỡng, quá trình ly giải sợi nấm cũng diễn ra, sự hình thành không bào và cấu trúc hạt chèn ép làm chết tế bào nấm (Chaurasia & cs., 2005). Sự ức chế hình thành hạch nấm và sự nảy mầm của bào tử nang cũng được ghi nhận bởi Savchuk & Dilantha (2004). Wang & cs. (2022) chỉ ra rằng 10 VOC từ chủng *Bacillus siamensis* LZ88 gồm 8 ketone và 2 acid, trong đó thử nghiệm với acid 2-metylbutanoic và acid 3-metylbutanoic thể hiện hoạt tính kháng nấm đáng kể đối với *A. alternata* với giá trị IC_{50} là 83,10 mg/ml và 104,19 mg/ml. Trong khi khả năng ức chế sự nảy mầm của bào tử bởi 2 axit với giá trị IC_{50} là 139,63 mg/ml và 88,07 mg/ml, tương ứng. Khi tiếp xúc với các hợp chất bay hơi (VOC), sợi nấm và bào tử của *A. alternata* bị biến dạng và xẹp xuống và hậu quả là sợi nấm bị đứt, teo và xoắn lại.

3.3. Kết quả phân loại hai chủng vi khuẩn BL1.1 và HG2.5

Khuẩn lạc chủng BL1.1 có dạng tròn, màu trắng ngà, bề mặt khô, trơn và dạng rìa răng cưa. Khuẩn lạc chủng HG2.5 có dạng không đều, màu vàng ngà, bề mặt khô, nhăn và dạng bìa răng cưa. Hai chủng BL1.1 và HG2.5 có đặc điểm tế bào hình que, Gram dương và sản sinh nội bào tử (Hình 4) có thể thuộc vào các chi *Amphibacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Oscillospira*, *Sporohalobacter*, *Sporolactobacillus*, *Sulfidobacillus* và *Syntrophospora* (Holt & cs., 1994). Bên cạnh đó, hai chủng BL1.1 và HG2.5 có khả năng di động, kỵ khí tuỳ nghi (có thể phát triển trong cả điều kiện hiếu khí và kỵ khí) và dương tính với catalase, phù hợp với đặc điểm của chi *Bacillus*.

4. KẾT LUẬN

Đề tài đã phân lập được 81 chủng vi khuẩn từ 7 mẫu đất vùng rễ dưa leo và tuyển chọn được 12 chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng với nấm *A. alternata* gây bệnh đốm lá từ đất vùng rễ dưa leo tại các tỉnh An Giang, Bạc Liêu, Đồng Tháp, Hậu Giang. Hiệu suất đối kháng của các chủng vi khuẩn dao động từ 9,7-47,8% với 2 chủng vi khuẩn là BL1.1 và HG2.5 cho kết quả đối kháng cao nhất lần lượt là 47,8% và 43,0%. Kết quả khảo sát các đặc tính của 12 chủng vi khuẩn đối kháng cho thấy: 8/12 chủng vi khuẩn có khả năng sinh siderophore, tất cả 12 chủng vi khuẩn đều có khả năng phân giải protein, khả năng phân giải chitin và sản sinh enzyme β-1,3-glucanase. Khả năng ức chế nấm bệnh bởi VOC của 12 chủng vi khuẩn dao động từ 61,8-95,2% (đối với bào tử) và 58,9-79,7% (đối với khuẩn ty). Kết quả nghiên cứu chỉ ra tiềm năng của vi khuẩn vùng rễ trong kiểm soát bệnh hại dưa leo do *A. alternata*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Akhtar K.P., Saleem M.Y., Asghar M. & Haq M.A. (2004). New report of *Alternaria alternata* causing leaf blight of tomato in Pakistan. Plant pathology. 53(6): 16.

Chanworawit K., Wangsoonthorn P. & Deevong P. (2023). Characterization of chitinolytic bacteria newly isolated from the termite *Microcerotermes* sp. and their biocontrol potential against plant pathogenic fungi. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 87(9): 1077-1091.

Chaurasia B., Pandey A., Palni L.M.S., Trivedi P., Kumar B. & Colvin N. (2005). Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. Microbiological research. 160(1): 75-81.

Daley J., Branham S., Levi A., Hassell R. & Wechter P. (2017). Mapping Resistance to *Alternaria cucumerina* in *Cucumis melo*. Phytopathology. 107(4): 427-432.

Geok L.P., Razak C.N.A., Rahman R.N.Z.A., Basri M. & Salleh A.B. (2003). Isolation and screening of an extracellular organic solvent-tolerant protease producer. Biochemical Engineering Journal. 13(1): 73-77.

Han J.H., Shim H., Shin J.H. & Kim K.S. (2015). Antagonistic activities of *Bacillus* spp. strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. The plant pathology journal. 31(2): 165.

Kini R.K., Vasanthi N. S., Umesh K.S. & Shetty H.S. (2000). Purification and properties of a major isoform of beta-1,3-glucanase from pearl millet seedlings. Plant Science. 150: 139-145.

Kumar K., Correia M.A.S. Correia, Pires V.M.R., Dhillon A., Sharma K., Rajulapati V., Fontes C. M. G. A., Carvalho A. L. & Goyal A. (2018). Novel insights into the degradation of β-1,3-glucans by the cellulosome of *Clostridium thermocellum* revealed by structure and function studies of a family 81 glycoside hydrolase. International journal of biological macromolecules. 117: 890-901.

Kurniawan O., Wilson K., Mohamed R. & Avis T.J. (2018). *Bacillus* and *Pseudomonas* spp. provide antifungal activity against gray mold and *Alternaria* rot on blueberry fruit. Biological Control. 126: 136-141.

Kwon O.K., Jeong A.R., Jeong Y.J., Kim Y.A., Shim J., Jang Y.J., Lee G.P. & Park C.J. (2021). Incidence of *Alternaria* Species Associated with Watermelon Leaf Blight in Korea. The plant pathology journal. 37(4): 329-338.

Lin Y., Du D., Si C., Zhao Q., Li Z. & Li P. (2014). Potential biocontrol *Bacillus* sp. strains isolated by an improved method from vinegar waste compost exhibit antibiosis against fungal pathogens and promote growth of cucumbers. Biological Control. 71: 7-15.

Nguyễn Tăng Phú & Nguyễn Thị Liên (2019). Đánh giá tiềm năng kháng khuẩn của vi khuẩn acid lactic phân lập từ sữa mẹ và phân trẻ em. Tạp chí Khoa học Đại học cần Thơ. 55(Chuyên đề Công nghệ Sinh học): 41-48.

Savchuk S. & Dilantha Fernando W.G. (2004). Effect of timing of application and population dynamics on the degree of biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* by bacterial antagonists. FEMS microbiology ecology. 49(3): 379-388.

Schwyn B. & Neilands J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical biochemistry. 160(1): 47–56.

Shanmugam V., Atri K., Gupta S., Kanoujia N. & Naruka D.S. (2011). Selection and differentiation of *Bacillus* spp. Antagonistic to *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* and *Alternaria solani* infecting Tomato. Folia microbiologica. 56(2): 170-177.

Sharma A. & Johria B.N. (2003). Growth promoting influence of siderophore-producing *Pseudomonas* strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. Microbiological Research. 158(3): 243-248.

Trần Thị Thu Thủy (2009). Kích thích tính kháng bệnh thán thư trên dưa leo. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 11: 126-134.

Vakalounakis D.J. & Malathrakis N.E. (1988). A cucumber disease caused by *Alternaria alternata* and its control. Phytopathology. 121: 325-336.

Van der Waals J.E., Pitsi B.E., Marais C. & Wairuri C.K. (2011). First report of *Alternaria alternata* causing leaf blight of potatoes in South Africa. Plant disease. 95(3): 363.

Vicent A., Armengol J. & García-Jiménez J. (2007). Rain fastness and persistence of fungicides for control of *Alternaria* brown spot of citrus. Plant Disease. 91(4): 393-399.

Wang D., Li Y., Yuan Y., Chu D., Cao J., Sun G., Ai Y., Cui Z., Zhang Y., Wang F. & Wang X. (2022). Identification of non-volatile and volatile organic compounds produced by *Bacillus siamensis* LZ88 and their antifungal activity against *Alternaria alternata*. Biological Control. 169: 104-901.

Win T.T., Bo B., Malec P. & Fu P. (2021). The effect of a consortium of *Penicillium* sp. and *Bacillus* spp. in suppressing banana fungal diseases caused by *Fusarium* sp. and *Alternaria* sp. Journal of Applied Microbiology. 131(4): 1890-1908.

Zhang D.Y., Chen H., Wu C., Zhang H., Chen L. & Chen X. (2020). Antifungal peptides produced by actinomycetes and their biological activities against plant diseases. The Journal of Antibiotics. 73(5): 265-282.