

ĐÁNH GIÁ HIỆU LỰC ỨC CHẾ CỦA CHŨNG VI KHUẨN ĐỐI KHÁNG NẤM HẠI GỖ

Nguyễn Hữu Minh¹, Bùi Thị Thủy², Đỗ Biên Cương³, Quách Đình Huy²

¹ Viện Kiểm định Quốc gia Vắc xin và Sinh phẩm y tế

² Viện Nghiên cứu Công nghiệp rừng, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

³ Trường Hóa và Khoa học sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội

TÓM TẮT

Xác định các đặc tính cơ bản của chủng vi khuẩn đối kháng nấm hại gỗ là công đoạn cần thiết để đánh giá tiềm năng ứng dụng của chúng. Trong nghiên cứu này, phương pháp cấy đôi và phương pháp đục lỗ thạch được sử dụng để đánh giá hiệu lực ức chế của 03 chủng vi khuẩn phân lập được tại địa bàn tỉnh Lạng Sơn gồm *Chitinophaga varians*, *Bacillus subtilis* và *Bacillus amyloliquefaciens* đối với 04 loại nấm hại gỗ phổ biến, đồng thời khảo sát sự ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy lên hoạt tính đối kháng của dịch ngoại bào thu được. Kết quả cho thấy cả 3 chủng vi khuẩn khảo sát đều có hoạt tính đối kháng mạnh trên các nấm *Aspergillus niger* và *Aureobasidium pullulans*, hoạt tính đối kháng yếu trên các nấm *Lasiodiplodia theobromae* và *Trichoderma atroviride*. Từ thử nghiệm đục lỗ thạch, sơ bộ đánh giá *Bacillus amyloliquefaciens* là chủng khuẩn giàu tiềm năng nhất để tiếp tục nghiên cứu và ứng dụng, trong khi *Chitinophaga varians* là một phát hiện mới dưới vai trò tác nhân vi khuẩn đối kháng nấm hại gỗ. Kết quả khảo sát cũng cho thấy việc bổ sung ion sắt (II) vào môi trường LB làm giảm hoạt tính đối kháng của dịch ngoại bào. Thời gian nuôi cấy tối ưu để thu dịch ngoại bào đối kháng *Aspergillus niger* của 03 chủng vi khuẩn là 3 ngày đối với *Chitinophaga varians*, 1 ngày đối với *Bacillus subtilis* và 1 ngày đối với *Bacillus amyloliquefaciens*.

Từ khóa: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Chitinophaga varians*, nấm hại gỗ, vi khuẩn đối kháng nấm

EVALUATING THE INHIBITORY EFFICACY OF BACTERIA STRAINS AGAINST WOOD PATHOGENIC FUNGI

Nguyen Huu Minh¹, Bui Thi Thuy², Do Bien Cuong³, Quach Dinh Huy²

¹ The National Institute for Control of Vaccines and Biologicals

² Research Institute of Forest Industry, Vietnamese Academy of Forest Sciences

³ School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology

Characterization of bacterial strains against wood pathogenic fungi is a critical step to evaluate their potential. In this study, the bi-culture and agar diffusion methods were used to evaluate the inhibitory efficacy of 03 bacterial strains isolated in Lang Son province including *Chitinophaga varians*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* against 04 common species of wood-damaging fungi and the influence of some culture conditions on the broth-derived extracellular fluid's antagonistic activity were also investigated. The results showed that all of 03 bacterial strains had strong antagonistic activity against the fungi *Aspergillus niger* and *Aureobasidium pullulans*, and weak antagonistic activity against the fungi *Lasiodiplodia theobromae* and *Trichoderma atroviride*. Based on agar diffusion test, *Bacillus amyloliquefaciens* was preliminarily assessed as the most potential bacterial strain for further research and application, whereas *Chitinophaga varians* was a new discovery as the role of biocontrol bacterial agent against wood-damaging fungi. The results also showed that adding irons (II) to LB medium reduced the extracellular fluid's antagonistic activity. The optimal culture duration to obtain antifungal extracellular fluid against *Aspergillus niger* of *Chitinophaga varians*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* were 3 days, 1 day and 1 day, respectively.

Keywords: Antifungal bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Chitinophaga varians*, wood-damaging fungi

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Gỗ là một trong những vật liệu quan trọng nhất trong tự nhiên, được khai thác và sử dụng cho nhiều mục đích khác nhau như xây dựng công trình, đường xá, làm đồ nội thất, sản xuất giấy... Là nguyên liệu giàu mật độ carbon nhất ở môi trường trên cạn, gỗ dễ dàng bị xâm nhiễm và làm hỏng bởi hàng loạt các tác nhân sinh học như nấm, vi khuẩn và mối mọt - trong đó nấm hoại sinh (gồm 3 nhóm chính: nấm mục, nấm mốc, nấm biến màu) là nguyên nhân chính gây suy giảm chất lượng và giá trị thương mại của các sản phẩm làm từ gỗ (Magdalena Woźniak *et al.*, 2022).

Trong những năm gần đây, việc tìm kiếm các giải pháp hiệu quả và bền vững để kiểm soát nấm hại trên cây trồng lâm nghiệp đang có xu hướng gia tăng. Việc lạm dụng các thuốc hóa học thông thường (chromium trioxide, pentaclorophenol, hợp chất chứa M-methylol melamin...) đã gây ảnh hưởng xấu đến môi trường cũng như tiềm ẩn nhiều rủi ro lên sức khỏe người dùng. Do đó việc phân lập, sàng lọc và ứng dụng các chủng vi khuẩn đối kháng để bảo vệ gỗ khỏi nấm hại đang trở thành xu thế mới.

Theo Bonaterra và đồng tác giả (2022), quy trình phát triển một tác nhân vi khuẩn đối kháng được chia làm 3 giai đoạn chính. Giai đoạn 1: Phân lập và lựa chọn các chủng vi khuẩn bằng phương pháp sàng lọc phù hợp. Giai đoạn 2: Xác định các đặc tính chính của chủng (gồm nhận dạng, định danh, xác định các đặc điểm về kiểu hình và kiểu gen, cơ chế tác dụng, xác định hiệu lực đối kháng bằng các thử nghiệm quy mô phòng thí nghiệm và pilot, cải thiện chủng để gia tăng hiệu lực đối kháng). Giai đoạn 3: Nghiên cứu sản xuất quy mô lớn và thiết kế công thức phù hợp, cho phép phát huy khả năng kiểm soát sinh học và đảm bảo tính ổn định của chủng (Bonaterra *et al.*, 2022). Việc xác định các đặc tính cơ bản của chủng vi khuẩn phân lập được ở giai đoạn 2 tạo cơ sở để

đánh giá tiềm năng đối kháng của chúng trước khi tiến đến giai đoạn 3.

Năm 2022, Viện Nghiên cứu Công nghiệp rừng - Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam đã xác định được một số loài nấm hại phổ biến nhất trên gỗ rừng tự nhiên bao gồm: *Lasiodiplodia theobromae* (tỷ lệ bắt gặp 21,2%), *Aspergillus niger* (11,5%), *Trichoderma atroviride* (11,5%) và *Aureobasidium pullulans* (5,8%). Trong giai đoạn 2022 - 2023, Bộ môn Bảo quản lâm sản đã tìm kiếm và phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng một hoặc nhiều loại nấm trên. Từ các mẫu thu thập ở địa bàn tỉnh Lạng Sơn, bước đầu đã phân lập, tuyển chọn và định danh được 03 chủng vi khuẩn đối kháng nấm tiềm năng. Nghiên cứu này được thực hiện để khảo sát và đánh giá hiệu lực ức chế của 03 chủng vi khuẩn đối với 04 loại nấm hại gỗ tươi phổ biến kể trên, đồng thời khảo sát ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy (sự có mặt của ion sắt (II) trong môi trường, thời gian nuôi cấy lác) đối với hoạt tính đối kháng của dịch ngoại bào thu được từ canh trường vi khuẩn.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Nghiên cứu thực hiện trên 03 chủng vi khuẩn được phân lập và tuyển chọn từ các mẫu thu thập tại địa bàn tỉnh Lạng Sơn bao gồm: *Chitinophaga varians* (Ký hiệu: ĐK-GDC-HL1-1), *Bacillus subtilis* (Ký hiệu: ĐK-LC), *Bacillus amyloliquefaciens* (Ký hiệu: ĐK-VBT-HL5-1).

- 04 chủng nấm hại gỗ chính bao gồm: *Aspergillus niger* (Ni), *Lasiodiplodia theobromae* (GB5.3), *Trichoderma atroviride* (GT22.2), *Aureobasidium pullulans* (Apu01).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp giữ giống vi sinh vật

Sau khi phân lập, các chủng vi khuẩn và nấm hại được giữ giống trên thạch nghiêng PDA -

potato dextrose agar (mỗi lít môi trường chứa: glucose 20 g, agar 20 g, nước đun 250 g khoai tây tươi). Môi trường được khử trùng ở 121°C, 1 atm trong 30 phút trước khi đổ ống thạch nghiêng. Các chủng vi sinh vật được bảo quản lạnh ở 4°C và thực hiện cấy chuyển định kỳ tại Bộ môn Bảo quản lâm sản, Viện Nghiên cứu Công nghiệp rừng, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

2.2.2. Sàng lọc vi khuẩn đối kháng bằng phương pháp cấy đôi

Cấy đồng thời vi khuẩn và nấm hại ở hai phía đối diện đĩa petri (đường kính đĩa 9 cm). Để thu được hình ảnh đối kháng rõ nét, cấy vi khuẩn theo đường cung thẳng cách mép ngoài đĩa 2 cm, ở phía đối diện cấy nấm bằng cách chấm giọt huyền phù tại điểm cách mép đĩa 2 cm. Đĩa petri đối chứng chỉ cấy nấm hại ở vị trí cấy tương tự như đĩa thử. Tất cả các đĩa được ủ ở nhiệt độ 28 ± 2°C cho đến khi nấm hại mọc kín đĩa đối chứng. Đo bán kính khuẩn lạc của nấm hại trên đĩa đối chứng và đĩa thử (Rahman *et al.*, 2009). Hiệu lực ức chế sự phát triển của nấm (percent inhibition of radical growth, PIRG) được tính theo công thức sau:

$$PIRG (\%) = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

Trong đó: R₁ là bán kính khuẩn lạc của nấm hại ở đĩa đối chứng (mm); R₂ là bán kính khuẩn lạc của nấm hại trên đĩa thử (mm).

Lặp lại thí nghiệm cấy đôi 03 lần đối với từng cặp vi khuẩn và nấm khảo sát. Lấy kết quả PIRG trung bình của 03 lần, biểu thị kết quả dưới dạng trị số trung bình ± độ lệch chuẩn (%).

Hoạt tính đối kháng của vi khuẩn được đánh giá theo các mức độ: kém (tương ứng với PIRG < 50%); trung bình (50% ≤ PIRG < 60%); mạnh (60% ≤ PIRG < 75%) và rất mạnh (PIRG > 75%). Tiêu chuẩn chấp nhận: khuẩn lạc nấm và vi khuẩn tách biệt, không mọc xen lẫn vào nhau (Soytong *et al.*, 1989).

2.2.3. Phương pháp lên men và thu dịch ngoại bào từ canh trường nuôi cấy vi khuẩn

*** Phương pháp lên men**

Thạch nghiêng chứa vi khuẩn được lấy ra khỏi tủ bảo quản lạnh và đưa về nhiệt độ phòng bên trong tủ cấy vô trùng. Hoạt hóa giống bằng cách cấy chủng lên đĩa petri chứa môi trường PDA. Cấy từng chủng vi khuẩn (ĐK-GDC-HL1-1, ĐK-LC, ĐK-VBT-HL5-1) vào bình tam giác 500 mL chứa 200 mL môi trường LB lỏng (cao nấm men 0,5%, tryptone 1,0%, NaCl 0,5% (w/v), nước 200 mL, điều chỉnh pH = 7,0) và 200 mL môi trường LB lỏng có bổ sung thêm ion sắt (II) (FeSO₄.7H₂O 4 mM). Tiến hành nuôi cấy lắc ở tốc độ 180 vòng/phút tại nhiệt độ phòng. Sau 72 giờ, tiến hành thu dịch lên men thô đối với tất cả các bình nuôi cấy.

*** Phương pháp thu dịch ngoại bào**

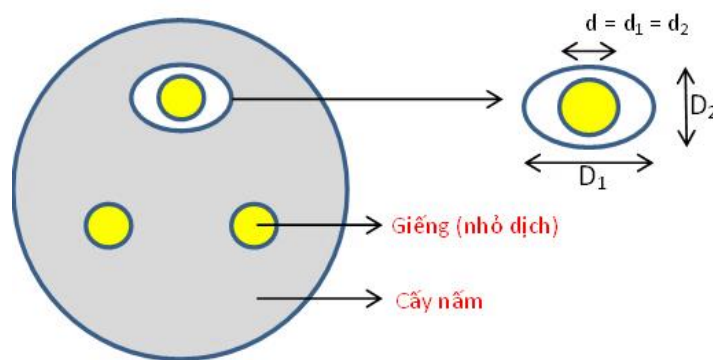
Thu dịch lên men thô (10 mL) của từng chủng vi khuẩn sau 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11 ngày nuôi cấy lắc sử dụng môi trường LB. Tiến hành ly tâm ở tốc độ 6.000 vòng/phút trong 20 phút để sinh khối lắng bớt một phần, sau đó bơm dịch nổi qua đầu lọc Syringe PTFE (đường kính 33 mm, kích thước lỗ lọc 0,22 μm) để loại bỏ toàn bộ tế bào vi khuẩn. Làm tương tự với canh trường sử dụng môi trường nuôi cấy LB có bổ sung ion sắt (II). Dịch ngoại bào (sau khi đã loại bỏ toàn bộ tế bào vi khuẩn) được sử dụng để đánh giá ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lắc và sự có mặt của ion sắt (II) trong môi trường nuôi cấy lên hoạt tính đối kháng nấm.

2.2.4. Thử hoạt tính đối kháng nấm của dịch lên men thô và dịch ngoại bào

Sử dụng phương pháp đục lỗ thạch. Đục 3 giếng (đường kính θ = 1 cm) trên mỗi đĩa thạch PDA. Nhỏ 100 μL dịch lên men thô hoặc dịch ngoại bào của từng chủng vi khuẩn (ĐK-GDC-HL1-1, ĐK-LC, ĐK-VBT-HL5-1) vào mỗi giếng trên các đĩa thạch rồi giữ 6 giờ trong tủ lạnh (4°C) để dịch khuếch tán đều. Lấy đĩa ra khỏi tủ lạnh và đưa về nhiệt độ phòng, lần lượt cấy từng loại nấm (Apu01, Ni, GB5.3,

GT22.2) rồi dùng que trang dần đều huyền dịch nấm trên bề mặt thạch. Đĩa đối chứng làm tương tự nhưng dùng nước RO thay thế dịch lên men/dịch ngoại bào nhỏ vào các giếng. Đo kết quả tại thời điểm nấm hại mọc kín đĩa đối chứng.

Cách tính kết quả: Đo hiệu số $D - d$ (mm) đối với từng giếng, trong đó, D là đường kính ngoài của vòng kháng nấm (mm), $d = 10$ (mm) là đường kính giếng. Đo hiệu số $D_1 - d_1$ và $D_2 - d_2$ (mm) theo hai chiều ngang, dọc của vòng kháng nấm



Hình 1. Cách đo $D - d$ tại các giếng trên mỗi đĩa

Sử dụng kiểm định T-test trên phần mềm SPSS 20.0 để so sánh hoạt tính đối kháng giữa dịch lên men thô và dịch ngoại bào tương ứng ở thời điểm sau 72 giờ nuôi cấy lác. Sự khác biệt về kết quả có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% ($p_1 < 0,05$).

2.2.5. Khảo sát ảnh hưởng của việc bổ sung ion sắt (II) vào môi trường nuôi cấy lên hoạt tính đối kháng của dịch ngoại bào

Sử dụng phương pháp đục lỗ thạch và cách tính kết quả tương tự như mô tả ở Mục 2.2.4. Sử dụng kiểm định T-test trên phần mềm SPSS 20.0 để so sánh hoạt tính đối kháng nấm (Apu01, Ni, GB5.3. GT22.2) giữa dịch ngoại bào thu được từ canh trường nuôi cấy 72 giờ sử dụng môi trường LB và môi trường LB có bổ sung ion sắt (II). Sự khác biệt về kết quả có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% ($p_2 < 0,05$).

2.2.6. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên hoạt tính đối kháng nấm *A. niger*

A. niger (Ni) được chọn là nấm đại diện để nghiên cứu nội dung này. Sử dụng phương pháp đục lỗ thạch và cách tính kết quả tương tự

hình elipse và tính giá trị $D - d$ trung bình của mỗi vòng (hình 1). Sau đó tính $D - d$ (mm) trung bình của cả 3 giếng trên mỗi đĩa, biểu thị kết quả này dưới dạng trị số trung bình \pm độ lệch chuẩn. Hoạt tính đối kháng của dịch được đánh giá theo các mức độ: mạnh ($D - d > 10$ mm), trung bình ($5 \text{ mm} < D - d \leq 10$ mm), yếu ($D - d < 5$ mm) và không có hoạt tính ($D - d = 0$) (Nguyễn Thị Kim Cúc *et al.*, 2014). Tiêu chuẩn chấp nhận: vòng kháng nấm không có dấu hiệu khuẩn lạc nấm mọc, các đĩa đối chứng có $D - d = 0$.

như mô tả ở Mục 2.2.4. Từ đó, rút ra kết luận về thời gian nuôi cấy tối ưu của từng chủng để thu dịch ngoại bào có hoạt tính đối kháng Ni.

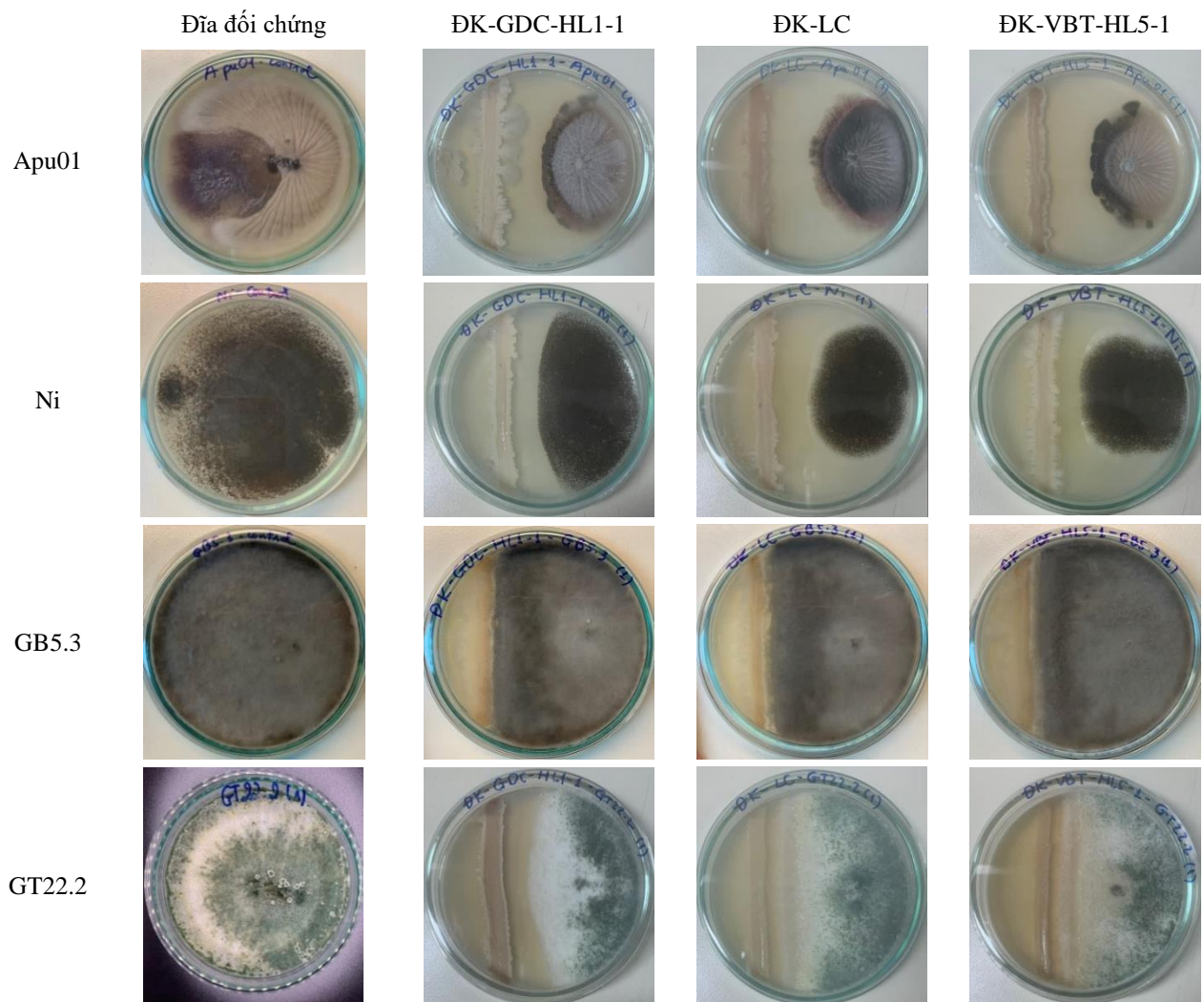
III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá hiệu lực đối kháng nấm bằng phương pháp cấy đôi

Kết quả thử nghiệm cấy đôi (bảng 1, hình 2) cho thấy, cả 3 chủng vi khuẩn khảo sát đều có hoạt tính đối kháng mạnh trên 2 chủng nấm *A. pullutans* (Apu01) và *A. niger* (Ni), trong đó chủng có hoạt tính đối kháng mạnh nhất là *C. varians* (ĐK-GDC-HL1-1) với PIRG (%) = $69,52 \pm 1,65$ trên Apu01 và PIRG (%) = $61,90 \pm 3,30$ trên Ni. Đối với 2 chủng nấm *L. theobromae* (GB5.3) và *T. atroviride* (GT22.2), cả 3 chủng vi khuẩn đều thể hiện hoạt tính đối kháng yếu với PIRG < 50%.

Bảng 1. Hiệu lực ức chế sự phát triển của nấm ở 3 chủng vi khuẩn khảo sát

Chủng vi khuẩn	Chủng nấm	PIRG (%) trung bình 3 đĩa	Đánh giá hoạt tính đối kháng
ĐK-GDC-HL1-1	Apu01	69,52 ± 1,65	MẠNH
	Ni	61,90 ± 3,30	MẠNH
	GB5.3	35,24 ± 1,65	YẾU
	GT22.2	48,10 ± 6,75	YẾU
ĐK-LC	Apu01	66,67 ± 2,65	MẠNH
	Ni	60,95 ± 0,82	MẠNH
	GB5.3	33,33 ± 0,82	YẾU
	GT22.2	41,90 ± 1,65	YẾU
ĐK-VBT-HL5-1	Apu01	67,14 ± 0,00	MẠNH
	Ni	60,00 ± 1,43	MẠNH
	GB5.3	36,19 ± 7,05	YẾU
	GT22.2	44,29 ± 2,86	YẾU



Hình 2. Hình ảnh đối kháng trong thử nghiệm cấy đôi

3.2. Thử hoạt tính đối kháng nấm của dịch lên men thô và dịch ngoại bào

Kết quả thử nghiệm đục lỗ thạch (bảng 2, hình 3) cho thấy dịch lên men thô và dịch ngoại bào thu được sau 72 giờ nuôi cấy lác của cả 3 chủng vi khuẩn đều có hoạt tính đối kháng đối với 4 loại nấm khảo sát (Apu01, Ni, GB5.3, GT22.2). Trong số 3 chủng khuẩn nghiên cứu, dịch lên men thô của ĐK-VBT-HL5-1 thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh nhất trên cả 4 loại nấm. Hiệu số D - d (mm) trung bình trên *A. pullulans* (Apu01) = $20,0 \pm 1,3$, *A. niger* (Ni) = $14,3 \pm 0,8$, *L. theobromae* (GB5.3) = $18,2 \pm 0,6$ và *T. atroviride* (GT22.2) = $14,2 \pm 1,0$. Đáng chú ý, các hiệu số D - d trung bình này đều > 10 mm tương ứng với hoạt tính đối kháng mạnh, riêng với trường hợp nấm Apu01 là ≥ 20 mm. Kết quả này gợi ý *B. amyloliquefaciens* (ĐK-VBT-HL5-1) là chủng đối kháng giàu tiềm năng nhất cần được tiếp tục nghiên cứu và ứng dụng.

Trong số các tác nhân kiểm soát sinh học từng được nghiên cứu, các vi khuẩn *Bacillus* sp. thể hiện cơ chế đối kháng nấm một cách đa dạng nhất (Bonaterra *et al.*, 2022). Các nghiên cứu đã chỉ ra loài *B. amyloliquefaciens* có khả năng cạnh tranh không gian sống và dinh dưỡng hiệu quả, chúng tiết ra các hợp chất siderophore để cạnh tranh nguồn ion sắt với tác nhân gây bệnh (Dimopoulou *et al.*, 2021), sản sinh các lipopeptide vòng có khả năng phá vỡ màng tế bào nấm như iturin A, bacillomycin D, fengycins, surfactins... (Lin Luo *et al.*, 2022), tiết ra các hợp chất hữu cơ dễ bay hơi (VOCs) đóng vai trò như những phân tử tín hiệu điều hòa sự sinh trưởng và tăng cường khả năng miễn dịch của cây trồng khi tiếp xúc với stress sinh học/phi sinh học (Wang *et al.*, 2013) và kích hoạt cơ chế kháng cảm ứng hệ thống (IRS) của cây trồng vật chủ (Gowtham *et al.*, 2018).

Khác với *Bacillus* sp., chủng *C. varians* (ĐK-GDC-HL1-1) là một phát hiện mới dưới vai trò tác nhân vi khuẩn đối kháng nấm hại gỗ và chưa có nhiều nghiên cứu tìm hiểu rõ cơ chế tác dụng. Theo một nghiên cứu năm 2020 của Sharma và đồng tác giả, chủng *Chitinophaga* sp.

S167 có khả năng tiết các enzym chitinase ngoại bào làm phân giải thành phần chitin của vách tế bào nấm, góp phần quan trọng vào cơ chế đối kháng (Sharma S. *et al.*, 2020).

3.3. So sánh hoạt tính đối kháng nấm giữa dịch lên men thô và dịch ngoại bào

Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng nấm của dịch lên men thô và dịch ngoại bào thu được từ cùng dịch canh trường sau 72 giờ nuôi cấy bằng phương pháp đục lỗ thạch (bảng 2, hình 3) cho thấy đối với chủng vi khuẩn ĐK-GDC-HL1-1, hoạt tính đối kháng nấm Apu01 của dịch lên men thô mạnh hơn dịch ngoại bào tương ứng gấp 1,3 lần (hiệu số D - d lần lượt là $16,7 \pm 1,4$ mm và $12,7 \pm 1,4$ mm; $p_1 = 0,027 < 0,05$), hoạt tính đối kháng nấm GB5.3 của dịch lên men thô mạnh hơn dịch ngoại bào tương ứng gấp 1,5 lần (hiệu số D - d lần lượt là $11,3 \pm 0,6$ mm và $7,3 \pm 0,8$ mm; $p_1 = 0,002 < 0,05$), với 2 loại nấm còn lại hoạt tính đối kháng của dịch lên men thô và dịch ngoại bào không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p_1 > 0,05$). Đối với chủng ĐK-LC, hoạt tính đối kháng của dịch lên men thô mạnh hơn dịch ngoại bào tương ứng trên các nấm Ni, GB5.3 và GT22.2 lần lượt là 1,6; 1,4 và 1,5 lần (các chỉ số $p_1 < 0,05$), riêng trường hợp nấm Apu01, hoạt tính đối kháng của hai loại dịch không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p_1 = 0,506 > 0,05$). Trường hợp chủng ĐK-VBT-HL5-1, hoạt tính đối kháng của dịch lên men thô trên cả 4 loại nấm đều mạnh hơn dịch ngoại bào tương ứng, sự khác biệt về kết quả có ý nghĩa thống kê (các $p_1 < 0,05$).

Như vậy tựu chung, dịch lên men của vi khuẩn thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh hơn so với dịch ngoại bào thu được từ cùng canh trường nuôi cấy. Trong thí nghiệm, dịch ngoại bào thu được bằng cách loại bỏ toàn bộ sinh khối khỏi dịch lên men thô, chỉ còn lại phần nước nổi chứa các chất hòa tan bao gồm sản phẩm chuyển hóa thứ cấp và dinh dưỡng dư thừa từ môi trường nuôi cấy. Cần lưu ý rằng hoạt tính đối kháng nấm của dịch lên men thô là tổng hòa của cả tế bào vi khuẩn lẫn sản phẩm

chuyển hóa thứ cấp trong canh trường với cơ chế tác dụng hết sức đa dạng, vì vậy sẽ thể hiện hoạt tính đối kháng cao hơn dịch ngoại bào.

3.4. Ảnh hưởng của ion sắt (II) trong môi trường nuôi cấy lên hoạt tính đối kháng nấm của dịch ngoại bào

Kết quả thử nghiệm đục lỗ thạch (bảng 2, hình 3) cho thấy đối với chủng vi khuẩn ĐK-LC, hiệu số D - d (mm) trung bình tương ứng giữa 2 dịch ngoại bào từ 2 canh trường sử dụng môi trường LB và LB có bổ sung ion sắt (II) không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (tất cả $p_2 > 0,05$), nghĩa là việc bổ sung ion sắt (II) vào môi trường nuôi cấy không ảnh hưởng đến hoạt tính của dịch ngoại bào thu được. Đối với chủng ĐK-GDC-HL1-1, việc bổ sung ion sắt (II) làm hoạt tính đối kháng nấm GB5.3 giảm 2,3 lần (D - d lần lượt là $3,2 \pm 1,4$ mm và $7,3 \pm 0,8$ mm; $p_2 = 0,012 < 0,05$), hoạt tính đối kháng nấm GT22.2 giảm 1,8 lần (D - d lần lượt là $3,3 \pm 1,3$ mm và $6,0 \pm 0,9$ mm; $p_2 = 0,039 < 0,05$); đối với 2 chủng nấm còn lại hoạt tính đối kháng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (các $p_2 > 0,05$). Đáng chú ý nhất là trường hợp chủng vi khuẩn ĐK-VBT-HL5-1, việc bổ sung ion sắt (II) vào môi trường nuôi cấy đã làm giảm mạnh hoặc mất hoạt tính đối kháng của dịch ngoại bào, cụ thể hoạt tính đối kháng giảm 2,1 lần đối với nấm Apu01 (D - d lần lượt

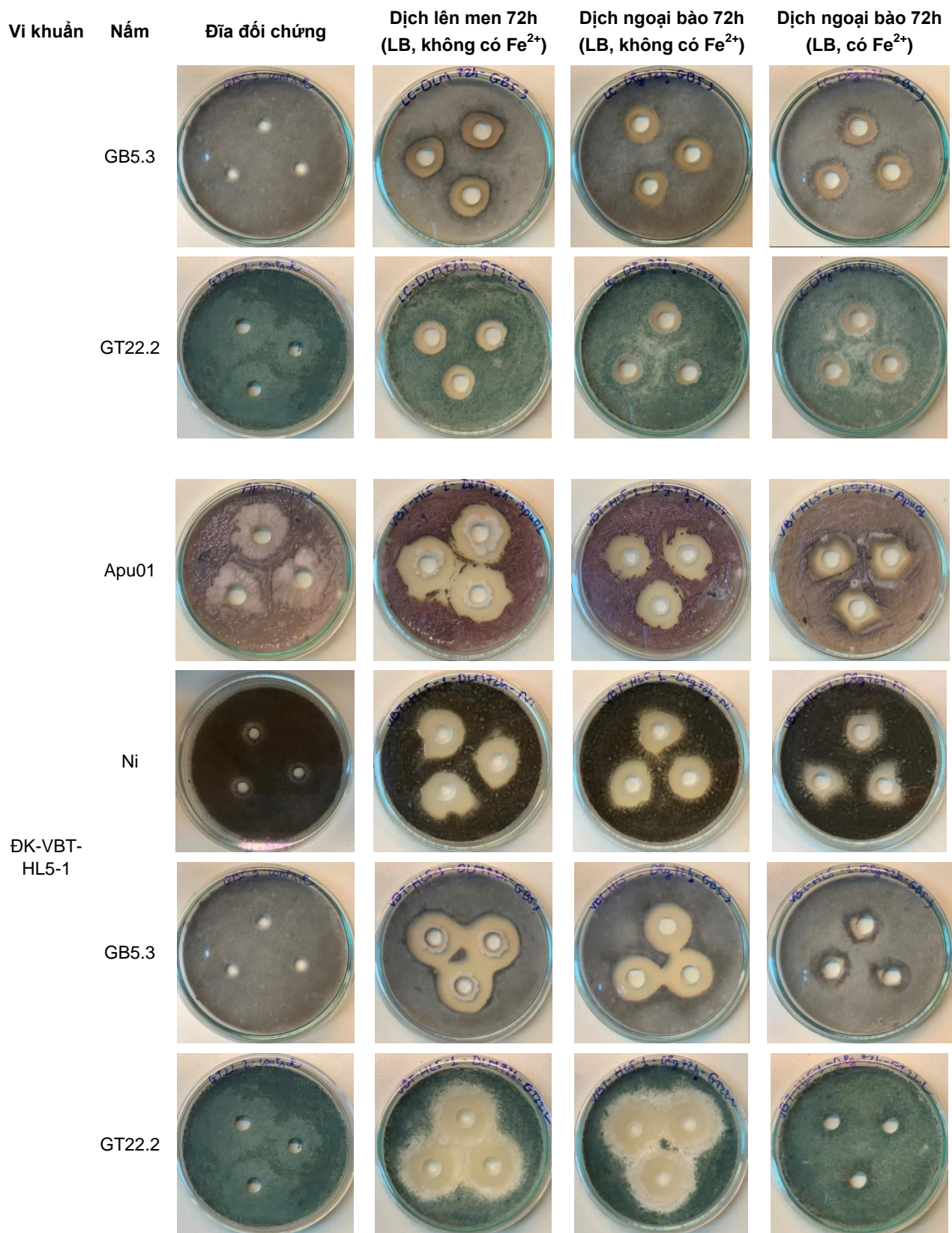
là $6,0 \pm 0,5$ mm và $12,5 \pm 1,8$ mm; $p_2 = 0,004 < 0,05$), giảm 1,9 lần đối với nấm Ni (D - d lần lượt là $6,0 \pm 0,5$ mm và $11,5 \pm 1,0$ mm; $p_2 = 0,001 < 0,05$), giảm 7,5 lần đối với nấm GB5.3 (D - d lần lượt là $2,0 \pm 0,9$ mm và $15,0 \pm 1,3$ mm; $p_2 = 0,000 < 0,05$) và đặc biệt, hoạt tính đối kháng nấm GT22.2 bị mất hoàn toàn.

Khái quát chung, kết quả cho thấy việc bổ sung ion sắt (II) vào môi trường nuôi cấy làm giảm hoạt tính đối kháng của dịch ngoại bào thu được. Kết quả này trái ngược với một số nghiên cứu tối ưu hóa thành phần nguyên tố vi lượng trong môi trường nuôi cấy lỏng trên thế giới trước đó. Ví dụ, Wei và đồng tác giả (2004) đã chỉ ra việc bổ sung sắt (II) 4,0 mM vào môi trường nuôi cấy *B. subtilis* giúp gia tăng gấp 8 lần mật độ tế bào và 10 lần sản lượng lipopeptide nhóm surfactin (Wei *et al.*, 2004). Sự không đồng thuận giữa các kết quả nghiên cứu cho thấy cơ chế đối kháng nấm của từng chủng vi khuẩn có sự đặc thù và hết sức đa dạng, phức tạp. Để có thể tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy lỏng thu chất kháng nấm, việc xác định rõ các đặc tính (ví dụ: đo lường mật độ tế bào trong canh trường nuôi cấy tại các thời điểm khác nhau, khả năng tiết enzyme phân hủy cơ chất, định tính và định lượng các sản phẩm chuyển hóa thứ cấp...) và tìm hiểu rõ hơn cơ chế tác dụng đặc thù của từng chủng vi khuẩn đóng vai trò hết sức quan trọng.

Bảng 2. Kết quả thử hoạt tính đối kháng của dịch lên men thô và dịch ngoại bào sau 72 giờ nuôi cấy

Chủng vi khuẩn	Nấm	Hiệu số (D - d) trung bình (mm)			Giá trị p_1	Giá trị p_2
		Dịch lên men thô (LB)	Dịch ngoại bào (LB)	Dịch ngoại bào (LB, ion sắt (II))		
ĐK-GDC-HL1-1	Apu01	$16,7 \pm 1,4$	$12,7 \pm 1,4$	$13,7 \pm 1,5$	0,027	0,456
	Ni	$10,2 \pm 0,3$	$9,8 \pm 0,6$	$9,3 \pm 0,8$	0,422	0,417
	GB5.3	$11,3 \pm 0,6$	$7,3 \pm 0,8$	$3,2 \pm 1,4$	0,002	0,012
	GT22.2	$5,2 \pm 1,3$	$6,0 \pm 0,9$	$3,3 \pm 1,3$	0,398	0,039
ĐK-LC	Apu01	$13,3 \pm 3,0$	$11,8 \pm 1,9$	$14,3 \pm 1,4$	0,506	0,143
	Ni	$12,3 \pm 0,6$	$7,7 \pm 0,8$	$9,7 \pm 3,1$	0,001	0,333
	GB5.3	$11,2 \pm 0,3$	$8,0 \pm 0,5$	$7,7 \pm 1,0$	0,001	0,643
	GT22.2	$7,0 \pm 1,0$	$4,7 \pm 1,3$	$6,0 \pm 0,5$	0,023	0,163
ĐK-VBT-HL5-1	Apu01	$20,0 \pm 1,3$	$12,5 \pm 1,8$	$6,0 \pm 0,5$	0,004	0,004
	Ni	$14,3 \pm 0,8$	$11,5 \pm 1,0$	$6,0 \pm 0,5$	0,018	0,001
	GB5.3	$18,2 \pm 0,6$	$15,0 \pm 1,3$	$2,0 \pm 0,9$	0,019	0,000
	GT22.2	$14,2 \pm 1,0$	$9,8 \pm 0,3$	$0,0 \pm 0,0$	0,002	0,000

Vi khuẩn	Nấm	Đĩa đối chứng	Dịch lên men 72h (LB, không có Fe ²⁺)	Dịch ngoại bào 72h (LB, không có Fe ²⁺)	Dịch ngoại bào 72h (LB, có Fe ²⁺)
ĐK-GDC-HL1-1	Apu01				
	Ni				
	GB5.3				
	GT22.2				
ĐK-LC	Apu01				
	Ni				



Hình 3. Hình ảnh đối kháng trong thử nghiệm đục lỗ thạch

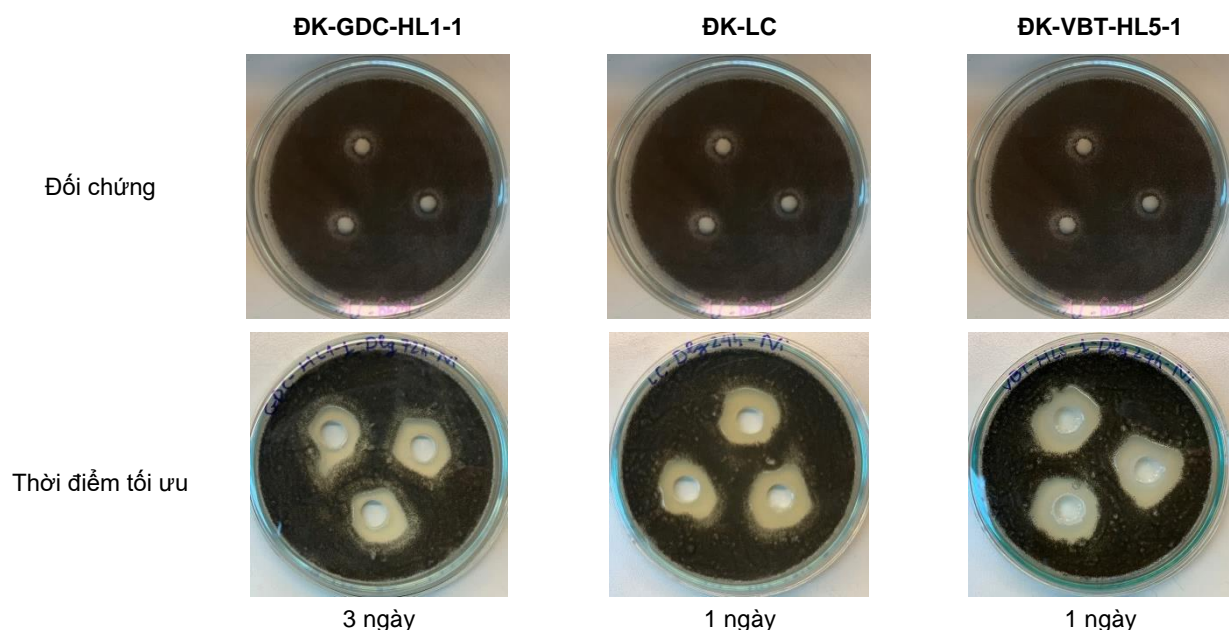
3.4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lãc lên hoạt tính đối kháng nấm của dịch ngoại bào

Kết quả khảo sát (bảng 3, hình 4) cho thấy thời gian nuôi cấy lãc để thu dịch ngoại bào có hoạt tính đối kháng nấm *A. niger* (Ni) mạnh nhất của 3 chủng vi khuẩn ĐK-GDC-HL1-1, ĐK-LC, ĐK-VBT-HL5-1 lần lượt là 3, 1 và 5 ngày (trương ứng với 72, 24 và 120 giờ). Cần lưu ý

đối với trường hợp chủng khuẩn ĐK-VBT-HL5-1, dịch ngoại bào sau 1 ngày nuôi cấy đã có hoạt tính đối kháng rõ rệt (D - d = 11,7 ± 2,1 mm), gần tương đương với thời điểm cho hoạt tính đối kháng cực đại là 5 ngày (D - d = 11,8 ± 1,2 mm). Sau khi cân nhắc tính chi phí - hiệu quả, nhóm nghiên cứu kết luận thời gian nuôi cấy tối ưu để thu dịch ngoại bào đối với chủng khuẩn ĐK-VBT-HL5-1 là 1 ngày (24 giờ).

Bảng 3. Kết quả thử hoạt tính đối kháng nấm *A. niger* (Ni) của dịch ngoại bào ở các thời gian nuôi cấy lãc khác nhau

Thời gian nuôi cấy lãc	Hiệu số D - d (mm)		
	ĐK-GDC-HL1-1	ĐK-LC	ĐK-VBT-HL5-1
1 ngày (24h)	3,8 ± 2,0	11,3 ± 1,0	11,7 ± 2,1
2 ngày (48h)	3,3 ± 1,4	4,5 ± 2,3	7,8 ± 1,4
3 ngày (72h)	9,3 ± 0,8	9,7 ± 3,1	6,0 ± 0,5
4 ngày (96h)	7,0 ± 0,9	7,0 ± 1,0	11,7 ± 1,5
5 ngày (120h)	5,8 ± 0,8	6,8 ± 1,0	11,8 ± 1,2
6 ngày (144h)	6,2 ± 0,3	5,7 ± 0,6	11,3 ± 0,8
7 ngày (168h)	5,2 ± 1,1	4,3 ± 0,3	10,3 ± 0,6
9 ngày (216h)	6,7 ± 1,0	6,0 ± 0,5	9,5 ± 1,3
11 ngày (264h)	5,5 ± 1,5	5,0 ± 1,3	11,2 ± 0,3



Hình 4. Hoạt tính kháng *A. niger* (Ni) của dịch ngoại bào thu tại thời điểm tối ưu

IV. KẾT LUẬN

Sử dụng phương pháp cấy đôi để sàng lọc, nghiên cứu cho thấy cả 3 chủng vi khuẩn được

khảo sát *C. varians* (ĐK-GDC-HL1-1), *B. subtilis* (ĐK-LC), *B. amyloliquefaciens* (ĐK-VBT-HL5-1) đều thể hiện hoạt tính đối kháng

mạnh trên 2 chủng nấm *A. pullulans* và *A. niger*, hoạt tính đối kháng yếu trên 2 chủng nấm *L. theobromae* và *T. atroviride*. Kết quả thử nghiệm đục lỗ thạch cho thấy cả dịch lên men và dịch ngoại bào thu được từ canh trường nuôi cấy lắc 72 giờ của cả 3 chủng vi khuẩn đều có hoạt tính đối kháng 4 loại nấm khảo sát; trong đó, dịch lên men của chủng ĐK-VBT-HL5-1 thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh nhất trên cả 4 chủng nấm, sơ bộ đánh giá đây là chủng vi khuẩn giàu tiềm năng nhất để tiếp tục nghiên cứu và ứng dụng cho mục đích đối kháng nấm hại gỗ. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy vi khuẩn cho thấy: việc bổ sung ion sắt (II) vào môi trường LB làm giảm hoạt

tính đối kháng của dịch ngoại bào trên nấm *A. niger*; thời gian nuôi cấy tối ưu để thu dịch ngoại bào có hoạt tính đối kháng nấm *A. niger* đối với 3 chủng vi khuẩn ĐK-GDC-HL1-1, ĐK-LC, ĐK-VBT-HL5-1 lần lượt là 3 ngày (72 giờ), 1 ngày (24 giờ) và 1 ngày (24 giờ).

Nhóm nghiên cứu khuyến nghị cần thực hiện các nghiên cứu chuyên sâu hơn để làm rõ cơ chế đối kháng đặc thù của từng chủng vi khuẩn, cũng như khảo sát toàn diện hơn sự ảnh hưởng của các điều kiện lên men lỏng chìm (thành phần môi trường, tỷ lệ cấp giống, pH, nhiệt độ, bổ sung nguyên tố vi lượng...) để tối ưu hóa hoạt tính đối kháng của dịch ngoại bào hơn nữa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bonaterra, A., Badosa, E., Daranas, N., Francés, J., Roselló, G. and Montesinos, E., 2022. Bacteria as biological control agents of plant diseases. *Microorganisms* 10(9): 1759.
2. Dimopoulou, A., Theologidis, I., Benaki, D., Koukounia, M., Zervakou, A., Tzima, A., Diallinas, G., Hatzinikolaou, D. G. and Skandalis, N., 2021. Direct antibiotic activity of bacillibactin broadens the biocontrol range of *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600. *mSphere* 6(4), e0037621.
3. Gowtham, H.G., Murali, M., Brijesh Singh, S., Lakshmeesha, T.R., Narasimha Murthy, K., Amruthesh, K.N. and Niranjana, S.R., 2018. Plant growth promoting rhizobacteria - *Bacillus amyloliquefaciens* improves plant growth and induces resistance in chilli against anthracnose disease. *Biological Control* 126: 209-217.
4. Luo, L., Zhao, C., Wang, E., Raza, A. and Yin, C., 2022. *Bacillus amyloliquefaciens* as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: An overview for its mechanisms. *Microbiological Research* (259): DOI:10.1016/j.micres.2022.127016.
5. Nguyễn Thị Kim Cúc, Trần Thị Hồng, Phạm Thị Thúy Hoài, Phạm Việt Cường, 2014. Phân lập vi sinh vật đối kháng một số nguồn nấm bệnh thực vật và đánh giá hoạt tính của chúng *in vitro* và *in vivo*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* 52(4): 419-430.
6. Rahman, M.A., Begum, M.F. and Alam, M.F., 2009. Screening of *Trichoderma* isolates as a biological control agent against *Ceratocystis paradoxa* causing pineapple disease of sugarcane. *Mycobiology* 37(4): 277-285.
7. Sharma S., Kumar S., Khajuria A., Ohri P., Kaur R. and Kaur R., 2020. Biocontrol potential of chitinases produced by newly isolated *Chitinophaga* sp. S167. *World journal of microbiology & biotechnology* 36(6): 90.
8. Soyong K., 1989. Antagonism of *Chaetomium cupreum* to *Pyricularia oryzae*: a case study to biocontrol of a rice blast disease. *Thai Phytopathol* 9: 28-33.
9. Wang B., Yuan J., Zhang J., Shen Z., Zhang M., Li R., Ruan Y. and Shen Q., 2013. Effects of novel bioorganic fertilizer produced by *Bacillus amyloliquefaciens* W19 on antagonism of *Fusarium* wilt of banana. *Biology and Fertility of Soils* 49(4): 435-446.
10. Wei Y.H., Wang L.F. and Chang J.S., 2004. Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with 6 + *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Progr* 20: 979-983.
11. Woźniak, M., 2022. Antifungal agents in wood protection - A review. *Molecules (Basel, Switzerland)* 27(19): 6392

Email tác giả liên hệ: nguyenuuminhhd91@gmail.com

Ngày nhận bài: 05/02/2024

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 21/02/2024

Ngày duyệt đăng: 28/02/2024