



# KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG BỆNH THÁN THƯ DO *Colletotrichum fructicola* CL5 TRÊN ỚT CỦA B-1,3-GLUCANASE SINH TỔNG HỢP TỪ *Bacillus* spp.

Nguyễn Thị Thanh Huyền<sup>1,2</sup>, Nguyễn Đức Huy<sup>1</sup>, Nguyễn Bảo Hưng<sup>1</sup>, Lê Thị Nhật Anh<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thị Minh Nga<sup>1</sup>, Trần Quốc Dung<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Nguyễn Đình Tú, Huế, Việt Nam

<sup>2</sup> Trường THPT chuyên Lê Quý Đôn, 106 Hùng Vương, Đông Hà, Quảng Trị, Việt Nam

<sup>3</sup> Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế, 34 Lê Lợi, Huế, Việt Nam

\* Tác giả liên hệ: Trần Quốc Dung <tranquocdung@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 8-12-2023; Ngày chấp nhận đăng: 7-1-2024)

**Tóm tắt.**  $\beta$ -1,3-glucanase tham gia vào quá trình phân chia tế bào, hình thành hoa và sự trưởng thành của hạt. Ngoài ra,  $\beta$ -1,3-glucanase cũng bảo vệ thực vật chống lại sự tấn công của các loại nấm bệnh. Hai chủng vi khuẩn có khả năng sinh tổng hợp  $\beta$ -1,3-glucanase được chọn nghiên cứu là *Bacillus* sp. 4 và *Bacillus* sp. 41 có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum fructicola* CL5 gây bệnh thán thư trên cây ớt. Kết quả nghiên cứu cho thấy khả năng tích lũy enzyme đạt cực đại của chủng *Bacillus* sp. 41 ( $1,202 \pm 0,04$  U/mL cao nhất tại thời điểm 12 giờ) cao hơn so với chủng *Bacillus* sp. 4 ( $0,85379 \pm 0,04$  U/mL cao nhất tại thời điểm 15 giờ). Hiệu quả kiểm soát nấm bệnh *C. fructicola* CL5 trong điều kiện *in vitro* của hai chủng *Bacillus* spp. thu được rất cao (*Bacillus* sp. 4: 50,73% sau 6 ngày và *Bacillus* sp. 41: 57,39% sau 12 ngày). Trong nghiên cứu này,  $\beta$ -1,3-glucanase ngoại bào từ hai chủng vi khuẩn có tiềm năng trở thành nhân tố kiểm soát sinh học thân thiện với môi trường nhờ hiệu suất ức chế *C. fructicola* CL5 tương đương với thuốc trừ nấm hóa học Ridomil.

**Từ khoá:**  $\beta$ -1,3-glucanase, *Bacillus*, *Colletotrichum fructicola*, đối kháng sinh học

## Evaluation of antagonistic ability against by *Colletotrichum fructicola* CL5 causing anthracnose disease on chilli by $\beta$ -1,3-glucanase producing *Bacillus* spp.

Nguyen Thi Thanh Huyen<sup>1,2</sup>, Nguyen Duc Huy<sup>1</sup>, Nguyen Bao Hung<sup>1</sup>, Le Thi Nhat Anh<sup>1</sup>,  
Nguyen Thi Minh Nga<sup>1</sup>, Tran Quoc Dung<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biotechnology, Hue University, Nguyen Dinh Tu St., Hue, Vietnam

<sup>2</sup>Le Quy Don High School for the Gifted, 106 Hung Vuong St., Dong Ha, Quang Tri, Vietnam

<sup>3</sup>University of Education, Hue University, 34 Le Loi St., Hue, Vietnam

\* Correspondence to Tran Quoc Dung <tranquocdung@hueuni.edu.vn>

(Submitted: December 18, 2023; Accepted: January 7, 2024)

**Abstract.**  $\beta$ -1,3-glucanase is a crucial enzyme for the development of plants. It is involved in the maturation of seeds, floral development, and cell division. Furthermore,  $\beta$ -1,3-glucanase prevents the spreading of diseases by fungal pathogens to plants. This study chose two bacterial strains that produced  $\beta$ -1,3-glucanases, including *Bacillus* sp. 4 and *Bacillus* sp. 41 to attract fungus pathogen *C. fructicola* CL5 in chili inhibition ability. The results indicated *Bacillus* sp. 41. (secreted highest enzyme activity of  $1,202 \pm 0,04$  U/mL after 12 hours of culture), higher than that of *Bacillus* sp. 4 (enzyme reached maximal of  $0,85379 \pm 0,04$  U/mL after 15 hours of culture). Two strains of *Bacillus* spp. achieved high control of *C. fructicola* CL5 under *in vitro* conditions. (*Bacillus* sp. 4: 50.73% after 6 days and *Bacillus* sp. 41: 57.39% after 12 days). In this result,  $\beta$ -1,3-glucanase was produced by *Bacillus* spp. positively contributed to the control of *C. fructicola* CL5 causing anthracnose disease in chili, which is equal to the commercial fungal pesticide Ridomil.

**Keywords:**  $\beta$ -1,3-glucanase, *Bacillus*, *Colletotrichum fructicola*, biocontrol

## 1 Đặt vấn đề

Việc diện tích canh tác được mở rộng nhằm cung cấp đủ sản phẩm cho thị trường đã gia tăng sự lạm dụng các hoá chất bảo vệ thực vật gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến đa dạng sinh học, môi trường thổ nhưỡng, sức khoẻ người nông dân và người tiêu dùng nông sản [1]. Kiểm soát bệnh hại từ nấm bằng các biện pháp sinh học được xem là một giải pháp thay thế tiềm năng với nhiều lợi ích: an toàn, bền vững, chủ động, thân thiện với môi trường. Các nhân tố được sử dụng thay thế cho thuốc trừ nấm tổng hợp bao gồm: tinh dầu, chiết xuất các hợp chất kháng nấm từ thực vật, vi sinh vật đối kháng. Quần thể vi sinh vật có mối quan hệ chặt chẽ đến cộng đồng thực vật trong việc hỗ trợ, ngăn chặn dịch bệnh lan rộng.

Chi *Bacillus* chiếm ưu thế trong các quần thể vi khuẩn trong đất (36%) và có ý nghĩa quan trọng với các loài thực vật phân bố xung quanh [2]. Trong nghiên cứu của Cui và cs. [3], *Bacillus velezensis* 8–4 phân lập từ khoai tây có khả năng đối kháng mạnh với *Phoma foveat*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium avenaceum* và *Colletotrichum coccodes*, các nấm bệnh gây ảnh hưởng đến chất lượng khoai tây, đồng thời năng suất của khoai tây được xử lý bằng chủng 8–4 cao hơn  $19,91 \pm 3,56\%$ . *B. subtilis* JN032305, phân lập từ thân, rễ ớt có khả năng đối kháng phổ rộng chống lại các mầm bệnh thực vật do vi khuẩn và nấm dựa vào khả năng sinh tổng hợp chitinase, glucanase và cellulase [4]. Ngoài ra, các chủng *Bacillus* có khả năng tạo ra nhiều hợp chất khác nhau trong quá trình sinh trưởng: kháng sinh [5], lipopeptide [6], các chất hữu cơ bay hơi, hỗ trợ cho các hoạt động ức chế mầm bệnh cũng như tăng tính kháng toàn thân cho cây trồng.

Thành tế bào nấm được cấu tạo chủ yếu từ glucan và chitin, các polymer này liên kết với nhau bằng các liên kết cộng hoá trị tạo thành một hệ thống mạng lưới bền vững.  $\alpha$ -glucan và  $\beta$ -glucan là hai nhóm chính có trong thành tế bào nấm, trong đó  $\beta$ -1,3-glucan chiếm từ 65% đến 90% toàn bộ hàm lượng  $\beta$ -glucan [7]. Các liên kết 1,3- $\beta$ -D-glucoside trong  $\beta$ -1,3-glucan được xúc tác thủy phân bởi  $\beta$ -1,3-glucanase. Sử dụng  $\beta$ -1,3-glucanase để bảo vệ thực vật chống lại sự lây nhiễm của nấm bệnh và tăng cường giải phóng các chất kích thích miễn dịch liên quan đến thành tế bào trong quá trình phòng vệ đã được đề xuất trong nhiều nghiên cứu [8]. Dựa trên tiềm năng ứng dụng và tầm quan trọng của các biện pháp kiểm soát sinh học thân thiện với môi trường, nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát khả năng kiểm soát nấm gây bệnh thực vật của  $\beta$ -1,3-glucanase sản xuất từ các chủng *Bacillus* spp.. Kết quả của nghiên cứu là cơ sở cho các thử nghiệm, nghiên cứu sản xuất các chế phẩm sinh học có chứa  $\beta$ -1,3-glucanase an toàn với sức khoẻ người nông dân và nông sản; đồng thời cung cấp dẫn liệu khoa học về quá trình sinh tổng hợp enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase bởi vi khuẩn *Bacillus* spp. tạo tiền đề cho việc sản xuất enzyme ở quy mô công nghiệp.

## 2 Phương pháp

### 2.1 Vật liệu nghiên cứu

Hai chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. 4 và *Bacillus* sp. 41 được phân lập và lưu trữ tại Phòng thí nghiệm Công nghệ enzyme và protein, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế.

Chủng nấm *Colletotrichum fructicola* CL5 gây bệnh thán thư trên ớt được cung cấp bởi Phòng thí nghiệm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế.

### 2.2 Xác định hoạt độ $\beta$ -1,3-glucanase

*Bacillus* sp. 4 và *Bacillus* sp. 41 được nuôi cấy trong môi trường LB. Sau 16 giờ nuôi cấy, huyền phù tế bào (1%, v/v) được chuyển sang nuôi lỏng trên môi trường sản xuất  $\beta$ -1,3-glucanase (0,5 g lúa mì; 0,1 g  $K_2HPO_4$ ; 0,3 g  $NaNO_3$ ; 0,05 g KCl; 0,05 g  $MgSO_4$ ; 0,05 g  $FeSO_4$  trong 100 mL) pH 7, trong 24 giờ ở tốc độ lắc 180 vòng/phút, nhiệt độ 37 °C [9, 10].

$\beta$ -1,3-glucanase ngoại bào được thu sau mỗi 3 giờ bằng cách ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút. Hoạt độ  $\beta$ -1,3-glucanase được xác định bằng cách đo lượng đường khử được giải phóng từ hoạt động của  $\beta$ -1,3-glucanase trên cơ chất curdlan bằng thuốc thử 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS). Thành phần phản ứng bao gồm 0,5 mL dịch enzyme và 0,5 mL sodium acetate 0,1 M chứa 0,5% curdlan; pH 5,5. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 40 °C trong 30 phút. Ly tâm thu 0,5 mL dịch nổi, sau đó thêm vào 0,5 mL DNS 1%; đun sôi trong 10 phút. Sự giải phóng đường khử từ phản ứng enzyme cơ chất sẽ được xác định bằng 1% dinitrosalicylate và đo độ hấp thụ ở bước sóng 540 nm [11].

Glucose tinh khiết sẽ được sử dụng để xây dựng đường chuẩn. Một đơn vị hoạt độ của  $\beta$ -1,3-glucanase được xác định bằng lượng enzyme cần thiết để tạo ra 1  $\mu$ mol đường khử trong thời gian một phút ở điều kiện thí nghiệm [12, 13].

### 2.3 Đánh giá khả năng đối kháng nấm *C. fructicola* CL5

Kỹ thuật đồng nuôi cấy được sử dụng để phát hiện hoạt tính đối kháng *in vitro* của các chủng *Bacillus* sp. 4 và *Bacillus* sp. 41 với nấm *C. fructicola* CL5. Nấm *C. fructicola* CL5 được đặt tại trung tâm đĩa môi trường PDA, cách vị trí trung tâm 3 cm; vi khuẩn được cấy theo đường thẳng. Mẫu đối chứng chỉ cấy nấm. Các đĩa được nuôi cấy ở 30 °C và theo dõi trong 14 ngày. Sự phát triển của sợi nấm *C. fructicola* CL5 được đo và so sánh với mức tăng trưởng trung bình của đĩa nấm đối chứng [14]. Mỗi thí nghiệm được thực hiện ba lần. Tỷ lệ ức chế tăng trưởng (GIR) được tính bằng công thức sau [15].

$$GIR (\%) = (C-T) / C \times 100$$

trong đó, C là đường kính sợi nấm trên mẫu đối chứng không cấy vi khuẩn (mm); T là đường kính sợi nấm ở nghiệm thức (mm).

Các giá trị được ghi lại là giá trị của ba lần đo trên các mẫu khác nhau và các thí nghiệm được lặp lại ba lần.

#### 2.4 Khảo sát khả năng đối kháng *C. fructicola* CL5 gây bệnh thán thư trên ớt

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, gồm tám nghiệm thức, mỗi nghiệm thức ba quả ớt, lặp lại ba lần:

– Nghiệm thức 1 (Đối chứng dương): Xử lý với thuốc diệt nấm hóa học Ridomil Gold 68WG (Syngenta, Thụy Sĩ), với các thành phần: Metalxyl M 40g/kg, Mancozeb 640g/kg.

– Nghiệm thức 2 (Đối chứng âm): Tạo vết bệnh, xử lý với nước cất.

– Nghiệm thức 3: Không tạo vết bệnh, xử lý với nước cất.

– Nghiệm thức 4: Tạo vết bệnh, lây nhiễm với nấm.

– Nghiệm thức 5-6: Xử lý với dịch chiết enzyme thu từ các chủng 4 và 41 trước 24 giờ lây nhiễm.

– Nghiệm thức 7-8: Xử lý với dịch chiết enzyme thu từ các chủng 4 và 41 sau 24 giờ lây nhiễm.

**Phương pháp thí nghiệm:** Dùng dao lam tạo các vết thương ở các vị trí khác nhau trên quả ớt. Sau đó phun 0,1 mL dịch enzyme ngoại bào (0,5 U/mL) thu từ các chủng vi khuẩn đã nuôi cấy trước đó một ngày. Quá trình phun dịch enzyme được thực hiện năm lần/quả để dịch enzyme phủ đều quả ớt. Các nghiệm thức đối chứng phun 0,5 mL nước và 0,5 mL thuốc diệt nấm hóa học Ridomil Gold 68WG (2%) cho nghiệm thức đối chứng dương. Sau đó đặt quả ớt vào đĩa petri có giấy thấm để tạo độ ẩm và đặt trong điều kiện 25 °C [16].

**Lây nhiễm nhân tạo:** 24 giờ sau khi xử lý với enzyme ngoại bào được sinh tổng hợp từ các chủng *Bacillus* spp., tất cả các quả ớt được lây nhiễm bằng cách phun 0,1 mL huyền phù nấm *C. fructicola* CL5 với mật độ  $10^6$  bào tử/mL vào từng quả ớt tại vị trí tạo vết thương, phun năm lần/quả, đặt trong điều kiện 25 °C. Tái phân lập, so sánh để xác định chính xác nấm gây bệnh thán thư trên ớt đúng là nấm *C. fructicola*. Lựa chọn 10 vết bệnh nặng nhất trên mỗi công thức để tính khả năng ức chế nấm bệnh. Đường kính vết bệnh trên quả được đo hàng ngày, bắt đầu từ ngày thứ 6 đến ngày thứ 12 sau khi thực hiện thí nghiệm. Sự ức chế *C. fructicola* được xác định bằng cách so sánh đường kính của tổn thương theo ZhouA và cs. [17].

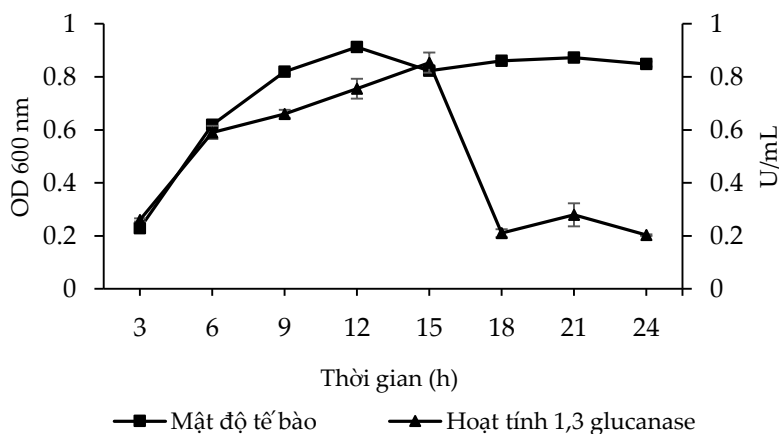
### 3 Kết quả và thảo luận

#### 3.1 Khả năng tích lũy $\beta$ -1,3-glucanase của các chủng vi khuẩn đối kháng

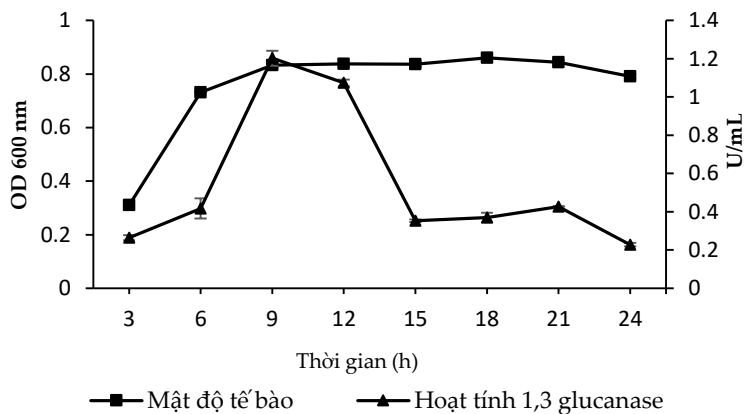
Kết quả nghiên cứu được trình bày ở Hình 1 cho thấy chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. 4 ở pha log từ 3–12 giờ, mật độ tế bào cao nhất ở 12 giờ với  $OD_{600\text{ nm}} = 0,912 \pm 0,003$ . Tại pha log sinh khối tế bào tăng nhanh, đây cũng là khoảng thời gian  $\beta$ -1,3-glucanase tích lũy dần, hoạt tính enzyme từ 3–12 giờ tăng từ 0,26 đến 0,75 U/mL và lượng  $\beta$ -1,3-glucanase đạt cực đại tại thời điểm 15 giờ là  $0,85379 \pm 0,04$  U/mL. Như vậy, ở đây có sự tương quan thuận giữa sinh khối tế bào và quá trình sản sinh  $\beta$ -1,3-glucanase ngoại bào. Sau thời điểm đó, lượng enzyme không còn được tăng thêm, điều này là hợp lý với mật độ tế bào sau thời điểm 12 giờ bắt đầu ổn định do vi khuẩn bước vào pha cân bằng, enzyme không còn được các tế bào sinh tổng hợp mạnh và hoạt tính giảm dần theo thời gian nuôi cấy chỉ còn lại 0,20–0,21 U/mL sau 18 giờ nuôi cấy.

Hình 2 chỉ sự tương quan giữa mật độ tế bào và khả năng sinh hoạt tính  $\beta$ -1,3-glucanase của *Bacillus* sp. 41 theo thời gian. Đường cong sinh trưởng cũng chỉ ra rằng, sinh khối của chủng *Bacillus* sp. 41 đạt cực đại tại thời điểm chín giờ nuôi cấy với  $OD_{600\text{ nm}} = 0,832 \pm 0,009$ . Tương ứng với việc tăng sinh khối thì khả năng tích lũy enzyme  $\beta$ -1,3-glucanase cũng diễn ra nhanh hơn và hoạt tính enzyme đạt cực đại ( $1,202 \pm 0,04$  U/mL) sau chín giờ nuôi cấy, nhanh hơn khoảng 1,5 lần so với chủng *Bacillus* sp. 4. Sau pha tăng sinh, các tế bào duy trì ở pha cân bằng đến lúc kết thúc quá trình nuôi 24 giờ. Tuy nhiên, hoạt tính enzyme có sự suy giảm rõ rệt sau 15 giờ nuôi cấy chỉ còn khoảng 0,25–0,42 U/mL. Đến 24 giờ, enzyme giảm mạnh về  $0,228 \pm 0,01$  U/mL.

So sánh với các nghiên cứu trước đó cho thấy chủng *Bacillus* sp. 41 có tốc độ sinh trưởng nhanh, hoạt tính  $\beta$ -1,3-glucanase cao hơn so với *Bacillus* sp. 215 đạt tại 25 giờ nuôi cấy (0,26 U/mL), *B. subtilis* strain J9 (0,74 U/mL) [18, 19]. Tuy nhiên, một số báo cáo cho thấy các chủng *Bacillus* khác có khả năng sinh  $\beta$ -1,3-glucanase cao hơn như *B. siamensis* tại 72 giờ nuôi cấy (79,5 U/mL), *B. safensis*



**Hình 1.** Khả năng sinh  $\beta$ -1,3-glucanase của *Bacillus* sp. 4 theo thời gian



**Hình 2.** Khả năng sinh  $\beta$ -1,3-glucanase của *Bacillus* sp. 41 theo thời gian

NAIMCC-B-02323 STJP (220,36 U/mL) [20, 21]. Sự khác biệt nguồn mẫu phân lập có thể là nguyên nhân dẫn đến sự khác biệt về thời gian sản xuất enzyme giữa các chủng *Bacillus* spp..

### 3.2 Khả năng đối kháng với nấm *C. fructicola* CL5 *in vitro*

Khả năng đối kháng của hai chủng *Bacillus* sp. 4 và *Bacillus* sp. 41 với nấm *C. fructicola* CL5 được trình bày ở Bảng 1. Sau sáu ngày nuôi cấy, cả hai chủng vi khuẩn đều có khả năng ức chế nấm *C. fructicola* CL5.

Kết quả ở Bảng 1 và khả năng đối kháng qua Hình 3 cho thấy, chủng *Bacillus* sp. 41 có hiệu quả đối kháng *C. fructicola* CL5 cao hơn, tương đương với nghiên cứu của Aiting Z [22]. Quan sát và theo dõi tốc độ phát triển của hệ sợi nấm, nhận thấy mật độ hệ sợi tăng dần và mọc chồng lên nhau, nấm không di chuyển khỏi vị trí lan sợi trước đó mà tiến về phía không có sự hiện diện của vi khuẩn. Quần thể vi khuẩn *Bacillus* sp. 41 vẫn phát triển tốt và ngày càng mở rộng diện tích theo thời gian. Đến ngày thứ 14, hiệu suất ức chế đạt cao nhất với  $57,39 \pm 0,83$ .

**Bảng 1.** Hiệu suất đối kháng với *C. fructicola* CL5 của các chủng *Bacillus* spp. theo thời gian sinh trưởng

Chủng <i>Bacillus</i>	Hiệu suất ức chế nấm theo thời gian (%)				
	6 ngày	8 ngày	10 ngày	12 ngày	14 ngày
4	50,73 $\pm$ 6,53	42,19 $\pm$ 0,68	40,63 $\pm$ 2,07	37,54 $\pm$ 4,19	34,23 $\pm$ 3,07
41	49,12 $\pm$ 1,16	50,62 $\pm$ 1,64	50,41 $\pm$ 2,06	54,45 $\pm$ 1,27	57,39 $\pm$ 0,83



**Hình 3.** Khả năng đối kháng với *C. fructicola* CL5 sau 14 ngày của hai chủng *Bacillus* spp. phân lập.

*Chú thích:* ĐCT: Mặt trước của tàn nấm đối chứng, ĐCS: Mặt sau của tàn nấm đối chứng *C. fructicola* CL5 được cấy trên môi trường PDA; 4: *Bacillus* sp. 4 cấy đối kháng với *C. fructicola* CL5 trên môi trường PDA; 41: *Bacillus* sp. 41 cấy đối kháng với *C. fructicola* CL5 trên môi trường PDA.

Trong sáu ngày nuôi cấy đầu tiên, chủng *Bacillus* sp. 4 cho hiệu quả ức chế khá cao đạt  $50,73 \pm 6,53$ . Tuy nhiên, sự phát triển của hệ sợi nấm bắt đầu mạnh dần kể từ ngày thứ 8 nên hiệu suất chỉ còn lại  $34,23 \pm 3,07$  vào ngày thứ 14. Kết quả này cũng tương đương với nghiên cứu của Chen [23], tỉ lệ ức chế trung bình *in vitro* khoảng 33,8% giữa các chủng *Bacillus* với nấm *C. fructicola* trên môi trường PDA. Hiệu quả đối kháng *C. fructicola* CL5 của chủng *Bacillus* sp. 41 khá mạnh, tương đương với nghiên cứu của Trần Thùy Trang và cs. [24], chủng *Bacillus* BHCM8.3 có hiệu suất đối kháng đạt 81,58% sau 15 ngày đối với *Colletotrichum scovillei*. Li và cs. [25] đã sàng lọc 175 vi khuẩn nội sinh thu được chủng *B. licheniformis* YB128 có hiệu suất ức chế 86,1%. *Bacillus* BHL21 đạt hiệu suất ức chế 79% trong điều kiện phòng thí nghiệm [26]. Hoạt tính kháng nấm của chủng vi khuẩn *B. tequilensis* YYC 155 đạt 56% sau chín ngày đồng nuôi cấy kép với *C. fructicola* [17].

### 3.3 Khả năng kiểm soát bệnh thán thư *in vivo* gây ra bởi *C. fructicola* CL5 trên quả ớt

Kết quả từ các nghiệm thức 2, 3, 4 cho thấy, nấm phát triển tốt trên quả ớt có tạo vết thương; quả ớt không tạo vết thương từ trước thì không bị nhiễm nấm (chi tiết tại Hình 4). Các nghiệm thức xử lý với enzyme từ vi khuẩn đối kháng trước khi lây nhiễm nấm *C. fructicola* CL5 mang lại hiệu quả cao trong vai trò phòng và điều trị bệnh. Cả hai chủng vi khuẩn thử nghiệm đều có khả năng kiểm soát được vết bệnh gây ra bởi *C. fructicola* CL5. Trong đó, hiệu quả của chủng *Bacillus* sp. 4 xử lý trước khi cấy nấm đạt  $50,94\% \pm 7,1\%$  sau 6 ngày lây nhiễm, tiếp tục phun enzyme đến ngày thứ 8, 10, 12 cho thấy hiệu quả kiểm soát giảm dần chỉ còn  $28,07\% \pm 7,96\%$  vào ngày thứ 12. Đối với chủng *Bacillus* sp. 41, xử lý trước và sau khi tạo vết đều đạt hiệu quả cao ( $79,17\% \pm 27,78\%$  xử lý sau cấy và  $69,08\% \pm 5,2\%$  xử lý trước khi cấy nấm) (chi tiết tại Bảng 2). So với thuốc diệt nấm hóa học Ridomil thì chủng *Bacillus* sp. 4 có khả năng diệt nấm tương đương trong khi chủng *Bacillus* sp. 41 cho kết quả cao hơn Ridomil khoảng 9% đã cho thấy khả năng kiểm soát bệnh hại sau khi quả ớt bị tổn thương bởi nấm đạt hiệu quả cao hơn hẳn so với việc phun phòng bệnh cũng như sử dụng thuốc diệt nấm hóa học Ridomil. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu



**Bảng 2.** Hiệu suất ức chế nấm bệnh *C. fructicola* CL5 theo thời gian bằng enzyme ngoại bào

Công thức	Chủng <i>Bacillus</i>	Hiệu suất ức chế nấm theo thời gian (%)			
		6 ngày	8 ngày	10 ngày	12 ngày
Xử lý bằng enzyme trước khi nhiễm nấm	<i>Bacillus</i> sp. 4	50,9 ± 7,1	38,47 ± 9,91	34,70 ± 4,32	28,07 ± 7,96
	<i>Bacillus</i> sp. 41	69,08 ± 5,2	67,76 ± 5,94	65,07 ± 4,32	46,57 ± 6,05
Xử lý bằng enzyme sau khi nhiễm nấm	<i>Bacillus</i> sp. 4	50,02 ± 5,57	39,15 ± 5,01	32,72 ± 4,32	30,94 ± 7,45
	<i>Bacillus</i> sp. 41	64,10 ± 23,93	79,71 ± 27,05	79,49 ± 4,32	79,14 ± 27,78
Xử lý bằng thuốc diệt nấm Ridomil Gold 68WG (2%)	Không bổ sung	56,94 ± 6,05	48,8 ± 3,55	40,52 ± 8,28	38,86 ± 5,67

của Fang và cs. [27],  $\beta$ -1,3-glucanase bgls27 có khả năng phá vỡ màng tế bào *A. flavus* và *A. fumigatus* bằng cách thủy phân 1,3- $\beta$ -glucan thành glucose làm sợi nấm biến dạng, dễ bị tổn thương và gây chết tế bào nấm.

**Hình 4.** Khả năng ức chế *C. fructicola* CL5 trên quả ớt của hai chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. sau 7 ngày

*Chú thích:* A: Đối chứng dương (Ridomil Gold 68WG); B: Đối chứng có tạo vết bệnh và phun nước cất; C: Đối chứng không tạo vết bệnh, phun nước cất; D: Đối chứng tạo vết bệnh và phun bào tử; E: Đối chứng tạo vết bệnh và phun bào tử lên vết thương; F, H: Ớt xử lý bằng dịch nuôi cấy ngoại bào chủng *Bacillus* sp. 4, *Bacillus* sp. 41 trước khi cấy nấm; G, I: Ớt xử lý bằng dịch nuôi cấy ngoại bào chủng *Bacillus* sp. 4, *Bacillus* 41 sau 24 giờ cấy nấm.

## 4 Kết luận

Hai chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. 4 và *Bacillus* sp. 41 sản sinh  $\beta$ -1,3-glucanase cao nhất tại thời điểm tương ứng lần lượt là 15 giờ và 12 giờ; trong đó, chủng *Bacillus* sp. 41 có hoạt tính cao hơn chủng *Bacillus* sp. 4. Enzyme ngoại bào từ hai chủng vi khuẩn này có khả năng ngăn chặn sự phát triển của *C. fructicola* CL5 với mức tương đương hoặc cao hơn so với thuốc diệt nấm hóa học như Ridomil Gold 68WG ở nồng độ 2%. Khả năng sinh  $\beta$ -1,3-glucanase có hoạt tính mạnh của hai chủng *Bacillus* sp. 4 và *Bacillus* sp. 41 là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo.

## Thông tin tài trợ

Nghiên cứu được tài trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số VINIF.2022.TS056; Chương trình Nhóm Nghiên cứu mạnh của Đại học Huế, mã số NCM.DHH.2020.11 và Đề tài cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo, mã số CT2022.09.DHH.05.

## Tài liệu tham khảo

1. Kilani-Feki, O., Ben Khedher, S., Dammak, M., Kamoun, A., Jabnoun-Khiareddine, H., Daami-Remadi, M., Tounsi, S. (2016), Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease, *Biological Control*, (95), 73–82.
2. Baysal, O., Caliscan, M., Yesilova, O. (2008), An inhibitory effect of a new *Bacillus subtilis* strain (EU07) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicislycopersici*, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 73(1–3), 25–32.
3. Cui, L., Yang, C., Wei, L., Li, T., Chen, X. (2020), Isolation and identification of an endophytic bacteria *Bacillus velezensis* 8-4 exhibiting biocontrol activity against potato scab, *Biological Control*, (141), 104–156.
4. Srividya, S., Sasirekha, B., Ashwini, N. (2012), Multifarious antagonistic potentials of rhizosphere associated bacterial isolates against soil borne diseases of Tomato, *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2(2), 180–186.
5. Leifertl, C., Li, H., Chidbureel, S., Hampson, S., Workman, S., Sigege, D. (1995), Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45, *J Appl Bacteriol*, 78(2), 97–108.
6. Ahimou, F., Jacques, P., Deleu, M. (2000), Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity, *Enzyme Microb. Technol.*, 27, 749–754.
7. Bowman, S. (2006), Free The structure and synthesis of the fungal cell wall, *BioEssays*, 28(8), 799–808.

8. Perrot, Thomas, Markus, P., Vicente, R. (2022), Emerging Roles of  $\beta$ -Glucanases in Plant Development and Adaptive Responses, *Plants*, 11(9), 1119.
9. Sapirstein, H. (2016), Bioactive Compounds in Wheat Bran, *Encyclopedia of Food Grains*, 268–276.
10. Wu, Q., Dou, X., Wang, Q., Guan, Z., Cai, Y., Liao, X. (2018), Isolation of  $\beta$ -1,3-Glucanase-Producing Microorganisms from *Poria cocos* Cultivation Soil via Molecular Biology, *Molecules*, 23(7), 1555.
11. Burner, R. (1964), Determination of reducing sugar value 3,5-dinitrosalicylic acid method, *Methods Carbohydr Chem*, 4, 67–71.
12. Wood, I., Elliston, A., Ryden, P., Bancroft, I., Roberts, I., Waldron, K. (2012), Rapid quantification of reducing sugars in biomass hydrolysates: Improving the speed and precision of the dinitrosalicylic acid assay, *Biomass and Bioenergy*, (44), 117–21.
13. Bai, L., Kim, J., Son, K., Shin, D., Ku, B., Kim, D., Park, H. (2021), Novel Anti-Fungal D-Laminaripentaose-Releasing Endo- $\beta$ -1,3-glucanase with a RICIN-like Domain from *Cellulosimicrobium funkei* HY-13, *Biomolecules*, 11(8), 1080.
14. Kruijt, M., Tran, H., Raaijmakers, J. (2009), Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant growth-promoting *Pseudomonas putida* 267, *J. Appl. Microbiol.*, 107(2), 546–556.
15. Li, X., Zhang, Y., Wei, Z., Guan, Z., Cai, Y., Liao, X. (2016), Antifungal Activity of Isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the Biocontrol of Peach Gummosis, *PLoS One*, 11(9).
16. Fan, H., Ru, J., Zhang, Y., Wang, Q., Li, Y. (2017), Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease, *Microbiological Research*, 199, 89–97.
17. Zhou, A., Wang, F., Yin, J., Peng, R., Deng, J., Shen, D., Wu, J., Liu, X., Ma, H. (2022), Antifungal action and induction of resistance by *Bacillus* sp. strain YYC 155 against *Colletotrichum fructicola* for control of anthracnose disease in *Camellia oleifera*, *Front Microbiol.*, 25, 13, 956642.
18. Bertram P., Chen P., Buller C., Akagi J., Endo-(1,3)- $\beta$ -D-glucanase activity secreted by *Bacillus* sp., (1994), *Letters in Applied Microbiology*, 19(5), 349–352.
19. Badiaa, E., Abdeljabbar, H., Mohamed, R. H., Abdellatif, B., Najla S. (2012), *In vivo* and *in vitro* evaluation of antifungal activities from a halotolerant *Bacillus subtilis* strain J9, *African Journal of Microbiology Research*, 6(19), 4073–4083.
20. You, W., Ge, C., Jiang, Z., Chen, M., Li, W. (2021), Shao Y. Screening of a broad-spectrum antagonist-*Bacillus siamensis*, and its possible mechanisms to control postharvest disease in tropical fruits, *Biological Control*, 157.
21. Prakash, J., Egamberdieva, D., Arora, N. (2022), A Novel *Bacillus safensis*-Based Formulation along with Mycorrhiza Inoculation for Controlling *Alternaria alternata* and Simultaneously

Improving Growth, Nutrient Uptake, and *Steviol Glycosides* in *Stevia rebaudiana* under Field Conditions, *Plants (Basel)*, 11(14), 1857.

21. Aiting, Z., Fang, W., Jiabi, Y., Ruiqi, P., Jia, D., Dezhou, S., Jianrong, W., Xiaoyun, L., Huancheng, M. (2022), Antifungal action and induction of resistance by *Bacillus* sp. strain YYC 155 against *Colletotrichum fructicola* for control of anthracnose disease in *Camellia oleifera*, *Frontiers in Microbiology*, 13, 1–15.
22. Xiaolin, C., Miaomiao, Z., Lihua, T., Suiping, H., Tangxun, G., Qili, L. (2023), Screening and characterization of biocontrol bacteria isolated from *Ageratum conyzoides* against *Collectotrichum fructicola* causing Chinese plum (*Prunus salicina* Lindl.) anthracnose, *Front. Microbiol., Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*, (14).
23. Trần Thùy Trang, Nguyễn Thị Ánh Nguyệt, Lê Thị Mai Châm, Nguyễn Tấn Đức, Phạm Nguyễn Đức Hoàng, Dương Hoa Xô (2020), Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn thuộc nhóm *Bacillus subtilis* có khả năng đối kháng tốt với nấm *Colletotrichum scovillei* gây bệnh thán thư trên ớt ở Thành phố Hồ Chí Minh, *Tạp chí khoa học Đại học Mở thành phố Hồ Chí Minh*, 15(1), 72–86.
24. Li, H., Zhou, G., Liu, J. (2009), Isolation and identification of endophytic bacteria antagonistic to *Camellia oleifera* leaf blight base on informatics, *2009 2nd International Conference Biomedical Engineering Informatics*, 3(6), 315–318.
25. Nguyen Thi Nhu Huynh, Quach Van Cao Thi, Nguyen Trung Truc, Tran Quoc Dung (2022), Isolation of bacillus with active anti-fishing collections *Colletotrichum* spp. causes anthracnose on papaya fruit postharvest, *TNU Journal of Science and Technology*, 228(01), 357–363.
26. Fang, G., Xiaoqing, L., Ruyue, D., Min, L., Xing, Q., Xiaolu, W., Wei, Z., Huoqing, H., Huiying, L., Bin, Y., Yuan, W., Tao, T. (2023), Exploring the antifungal mechanism of  $\beta$ -1,3-glucanase for effectively inhibiting the food contamination by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus*, *Food Science and Technology*, 187.