

SELECTION AND CULTURE OF DURIAN ENDOPHYTIC BACTERIA ANTAGONISTIC TO *Phytophthora palmivora* IN CUKUIN DISTRICT DAK LAK PROVINCE

Ngo Van Anh^{1*}, Tran Thi Ha Trang¹, Vu Thi Thu Le², Nguyen Van Bon¹, Nguyen Anh Dzung¹

¹Institute of Biotechnology & Environment - Tay Nguyen University

²TNU - University of Agriculture and Forestry

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 16/5/2024	<i>Phytophthora palmivora</i> is the only currently recorded microbial disease causing death of durian trees. The study conducted the isolation, selection and cultivation of Endophytic bacterial strains with potential antifungal effect against <i>P. palmivora</i> . Using the method of isolating Endophytic bacteria from 12 durian samples in Cu Kuin district, 29 strains were cloned. The antagonistic activity of these Endophytic bacteria against <i>P. palmivora</i> was carried out using the co-culture method in vitro. Eleven strains were selected that have the ability to resist <i>P. palmivora</i> with an antagonistic effect around 50.62 - 67.41%, the EB.CK9 strain with the highest resistance to <i>P. palmivora</i> (67.41%) was identified as <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> based on the 16S rRNA gene sequencing method. Results of propagation in a conical flask showed that strain EB.CK9 grew best at 36°C, pH 7, 200rpm, after 48 hours it reached 44.5 x10 ⁸ CFU/ml. The cultivation was further conducted in a 14 L Bioreactor system, and the EB.CK9 strain reached a higher density of 8.25x10 ¹¹ CFU/ml in a shorter cultivation time (10 hours) comparing to cultivation in flasks. The research opens up application directions for developing indigenous biological products from Endophytic bacteria for effective and sustainable cultivation of durian.
Revised: 20/6/2024	
Published: 20/6/2024	
KEYWORDS	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
Bioreactor	
Durian	
Endophytic bacteria	
<i>Phytophthora palmivora</i>	

TUYỂN CHỌN VÀ NHÂN NUÔI VI KHUẨN NỘI SINH CÂY SẦU RIÊNG KHÁNG NẤM *Phytophthora palmivora* TẠI HUYỆN CƯ KUIN TỈNH ĐẮK LẮK

Ngô Văn Anh^{1*}, Trần Thị Hà Trang¹, Vũ Thị Thu Lê², Nguyễn Văn Bón¹, Nguyễn Anh Dũng¹

¹Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường - Trường Đại học Tây Nguyên

²Trường Đại học Nông Lâm – ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 16/5/2024	<i>Phytophthora palmivora</i> là nấm gây bệnh chủ yếu gây chết cây sầu riêng hiện nay. Nghiên cứu đã tiến hành phân lập, tuyển chọn và nhân nuôi các chủng vi khuẩn nội sinh kháng nấm <i>P.palmivora</i> . Sử dụng phương pháp phân lập Endophytic bacteria từ 12 mẫu sầu riêng tại huyện Cư Kuin đã đồng hoá được 29 chủng. Hoạt tính đối kháng của vi khuẩn nội sinh với <i>P. palmivora</i> được thực hiện bằng phương pháp đồng nuôi cây, các điều kiện nhân nuôi Endophytic bacteria được đánh giá trong in vitro. Tuyển chọn được 11 chủng có khả năng đối kháng <i>P. palmivora</i> với hiệu lực đối kháng khoảng 50,62 - 67,41%, chủng EB.CK9 có khả năng kháng <i>P. palmivora</i> cao nhất (67,41%) được xác định là <i>B. amyloliquefaciens</i> dựa trên phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA. Kết quả nhân nuôi trong bình tam giác, chủng EB.CK9 sinh trưởng tốt nhất ở 36°C, pH=7, 200rpm, sau 48h đạt 44,5 x10 ⁸ CFU/ml. Sản xuất chế phẩm <i>B. amyloliquefaciens</i> EB.CK9 trong hệ thống Bioreactor 14 L đạt mật độ 8,25x10 ¹¹ CFU/ml sau 10h lên men. Nghiên cứu mở ra hướng ứng dụng phát triển chế phẩm sinh học bản địa từ vi khuẩn nội sinh nhằm canh tác hiệu quả và bền vững sầu riêng.
Ngày hoàn thiện: 20/6/2024	
Ngày đăng: 20/6/2024	
TỪ KHÓA	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	
Bioreactor	
Sầu riêng	
Endophytic bacteria	
<i>Phytophthora palmivora</i>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.10404>

* Corresponding author. Email: nvanh@tnu.edu.vn

1. Giới thiệu

Sầu riêng (*Durio zibethinus*) là cây ăn quả chủ lực của huyện Cư Kuin tỉnh Đắk Lắk, chiếm 36,96% tổng diện tích cây ăn quả toàn huyện [1]. Nấm *Phytophthora palmivora* là nấm bệnh có thể lây nhiễm cho cây sầu riêng ở tất cả các giai đoạn sinh trưởng thông qua nước mưa hoặc quá trình tưới nước và gây thiệt hại nghiêm trọng về năng suất và giá trị sản phẩm [2]. Bệnh hại do *P. palmivora* là bệnh hại vi sinh vật duy nhất gây chết cây sầu riêng được ghi nhận tại thời điểm hiện tại ở Việt Nam và trên thế giới [3]. Việc nghiên cứu quản lý, kiểm soát dịch hại do nấm *P. palmivora* gây nên là rất cấp thiết và gặp nhiều khó khăn.

Kiểm soát sinh học bằng cách sử dụng các vi sinh vật có lợi đã giúp ích cho cây trồng thông qua gia tăng đối kháng trực tiếp với các tác nhân gây bệnh ở thực vật hoặc gián tiếp ức chế mầm bệnh nhờ kháng sinh hay enzyme phân huỷ vách tế bào hoặc cạnh tranh dinh dưỡng và nơi cư trú với mầm bệnh. Việc sử dụng nguồn vi sinh vật vào mục tiêu kháng *P. palmivora* trên cây sầu riêng đang là hướng đi được các nhà khoa học của nhiều nước trên thế giới cũng như Việt Nam đẩy mạnh quan tâm và nghiên cứu [4]-[8].

Vi khuẩn nội sinh (Endophytic bacteria) là vi khuẩn sống trong mô thực vật được tìm thấy ở vùng rễ, thân, lá, quả của thực vật. Sau khi xâm nhập vào cây chủ, nó có thể tập trung tại vị trí xâm nhập hoặc di chuyển đi khắp nơi trong cây đến các hệ mạch của rễ, thân, lá, hoa [9]. Endophytic bacteria là những ứng cử viên đầy hứa hẹn sử dụng trong nông nghiệp để kiểm soát sinh vật gây hại. Chúng định cư cùng một nơi sinh thái như là các mầm bệnh thực vật, vì vậy có thể cạnh tranh trực tiếp với các tác nhân gây bệnh. Mỗi liên hệ mật thiết giữa các vi khuẩn nội sinh và các tế bào thực vật có thể là một cơ chế kiểm soát sinh học quan trọng [10].

Xuất phát từ thực tế trên, nghiên cứu đã tiến hành phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn nội sinh kháng nấm *P. palmivora* tại huyện Cư Kuin, tỉnh Đắk Lắk. Đây cũng là nghiên cứu đầu tiên về sử dụng vi khuẩn nội sinh kháng nấm bệnh *P. palmivora* với mục tiêu phát triển chế phẩm sinh học bản địa nhằm góp phần canh tác sầu riêng hiệu quả và bền vững.

2. Phương pháp

2.1. Phương pháp thu thập và phân lập các chủng vi khuẩn nội sinh tại huyện Cư Kuin, tỉnh Đắk Lắk

Thu thập được 12 mẫu gồm: mẫu rễ, cành và lá cây sầu riêng đại diện cho huyện Cư Kuin, tỉnh Đắk Lắk có thể phân lập được các chủng vi khuẩn nội sinh cây sầu riêng.

Thời gian thu mẫu là tháng 5 năm 2023. Mẫu được thu thập ở đa dạng các vườn từ vườn cây khỏe đến các vườn cây đang bị bệnh với các độ tuổi cây từ 5 đến 15 năm. Mỗi vườn thu 5 mẫu rễ to, cành và lá ở 5 góc vườn, lấy vị trí dưới mép tán cây sầu riêng và các mẫu rễ, cành và lá thu được sẽ được trộn thành 1 mẫu chung (rễ riêng và cành lá riêng). Các mẫu sau khi lấy được ghi nhãn nơi thu, ngày thu và được đem tới phòng thí nghiệm và tiến hành phân lập theo phương pháp của Aravind et al (2009) [11]. Các khuẩn lạc được làm thuần, lưu giữ ở -30°C trong glycerol 10%.

2.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng nấm bệnh *Phytophthora palmivora*

Đánh giá hoạt tính kháng nấm bệnh theo phương pháp cải biên của Tran et al (2018) [12]. Cây nấm bệnh ở giữa đĩa petri, cấy chủng vi khuẩn đối kháng ở gần mép đĩa cách vị trí cấy nấm bệnh 3 cm, đường cấy vi khuẩn 1 cm, môi trường đánh giá hoạt tính là môi trường PDA, mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần. Các đĩa thí nghiệm được ủ ở nhiệt độ 30°C trong 5 ngày. Công thức đối chứng chỉ cấy nấm bệnh ở đĩa, không cấy chủng vi khuẩn. Chỉ tiêu theo dõi: đường kính tán nấm, hệ sợi nấm bệnh. Ghi nhận các trường hợp vi khuẩn có hiệu suất đối kháng *P. palmivora* $\geq 50\%$ so với đối chứng.

2.3. Phương pháp định danh 16S rDNA các chủng vi khuẩn nội sinh được tuyển chọn

Chủng vi khuẩn nội sinh cây sầu riêng có khả năng kháng nấm bệnh *Phytophthora palmivora* trong điều kiện *In Vitro* cao được gửi định danh tại Trung tâm Khoa học và Công nghệ Sinh học – Trường Đại học Khoa học Tự nhiên – Thành phố Hồ Chí Minh.

2.4. Phương pháp xác định điều kiện nuôi cấy chủng vi khuẩn nội sinh thích hợp trong bình tam giác

Chủng vi khuẩn nội sinh rễ cây sầu riêng có hoạt tính kháng nấm bệnh *Phytophthora palmivora* cao sẽ được chọn để khảo sát điều kiện nuôi cấy khác nhau trong bình tam giác trên môi trường LB (Peptone 1%; Yeast extract 0,5%; NaCl 0,5%; pH=7 đối với các thí nghiệm về nhiệt độ, tốc độ lắc và thời gian nuôi cấy).

- Khảo sát nhiệt độ nuôi cấy thích hợp: 28°C; 30°C; 32°C; 34°C; 36°C; 38°C.
- Khảo sát pH thích hợp của môi trường nuôi cấy: 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0.
- Khảo sát tốc độ lắc thích hợp: 0 rpm; 100 rpm; 150 rpm; 200 rpm; 250 rpm..
- Khảo sát thời gian nuôi cấy thích hợp: 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, 72 h nuôi cấy.

2.5. Phương pháp nhân nuôi chủng vi khuẩn đa tính năng trên hệ thống Bioreactor

Kế thừa kết quả thí nghiệm 2.4 (36°C, pH=7, 200rpm, 48h nhân nuôi) để thử nghiệm nhân nuôi trên hệ thống lên men tự động Bioreactor. Các thông số lên men trong Bioreactor 14 L, BiFlo, Brunswick, Hoa Kỳ. Chỉ tiêu theo dõi: mật độ của vi khuẩn mỗi 2 h/lần, thu sản phẩm sau 12 h nuôi cấy.

2.6. Phương pháp xử lý số liệu thống kê

Kết quả các thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Microsoft Office Excel, phân tích ANOVA bằng phần mềm SPSS 22.0. Các số liệu biểu diễn giá trị trung bình của 3 lần lặp lại \pm độ lệch chuẩn với mức ý nghĩa $p < 0,05$.

3. Kết quả

3.1. Kết quả phân lập và đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn nội sinh sầu riêng

Trong nghiên cứu này từ 12 mẫu (rễ, cành và lá cây) sầu riêng thu thập được tại huyện Cư Kuin, tỉnh Đắk Lắk đã phân lập và dòng hoá được 29 chủng vi khuẩn nội sinh cây sầu riêng. Đặc điểm khuẩn lạc sau khi quan sát được mô tả và ghi nhận, trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn nội sinh sầu riêng

TT	Chủng vi khuẩn	Đặc điểm khuẩn lạc				
		Hình dạng	Màu sắc	Bề mặt	Mặt cắt ngang	Mép
1	EB.CK1	Tròn	Trắng	Bóng khô	Lồi	Răng cưa
2	EB.CK2	Tròn đều	Trắng	Bóng khô	Lồi	Bằng phẳng
3	EB.CK3	Bầu dục	Trắng	Bóng khô	Lồi	Lượn sóng
4	EB.CK4	Tròn	Trắng	Bóng khô	Lồi	Răng cưa
5	EB.CK5	Bầu dục	Trắng	Bóng khô	Lồi	Răng cưa
6	EB.CK6	Tròn đều	Trắng	Bóng khô	Lồi	Bằng phẳng
7	EB.CK7	Tròn	Vàng nhạt	Bóng khô	Lồi	Bằng phẳng
8	EB.CK8	Tròn đều	Trắng	Bóng ướt	Lồi	Bằng phẳng
9	EB.CK9	Tròn đều	Trắng	Bóng ướt	Lồi	Lượn sóng
10	EB.CK10	Tròn	Trắng	Bóng khô	Lồi	Răng cưa
11	EB.CK11	Tròn đều	Trắng	Bóng ướt	Lồi	Bằng phẳng
12	EB.CK12	Tròn đều	Trắng	Bóng ướt	Lồi	Bằng phẳng
13	EB.CK13	Tròn	Trắng	Bóng khô	Lồi	Răng cưa
14	EB.CK14	Bầu dục	Vàng nhạt	Bóng khô	Lồi	Lượn sóng
15	EB.CK15	Bầu dục	Trắng	Bóng khô	Lồi	Lượn sóng
16	EB.CK16	Bầu dục	Trắng	Bóng khô	Bằng phẳng	Lượn sóng
17	EB.CK18	Bầu dục	Trắng	Bóng khô	Lồi	Răng cưa
18	EB.CK18	Tròn	Trắng	Bóng khô	Lồi	Bằng phẳng
19	EB.CK19	Tròn	Trắng	Bóng khô	Lồi	Răng cưa
20	EB.CK20	Bầu dục	Vàng nhạt	Bóng khô	Lồi	Răng cưa
21	EB.CK21	Tròn đều	Trắng	Bóng ướt	Lồi	Bằng phẳng
22	EB.CK22	Tròn	Trắng	Bóng khô	Lồi	Răng cưa

TT	Chủng vi khuẩn	Đặc điểm khuẩn lạc				
		Hình dạng	Màu sắc	Bề mặt	Mặt cắt ngang	Mép
23	EB.CK23	Tròn	Trắng	Bóng khô	Lồi	Bằng phẳng
24	EB.CK24	Bầu dục	Trắng	Bóng khô	Lồi	Không đều
25	EB.CK25	Tròn	Trắng	Bóng ướt	Bằng phẳng	Bằng phẳng
26	EB.CK26	Tròn	Trắng	Bóng khô	Lồi	Răng cưa
27	EB.CK27	Tròn	Trắng	Bóng ướt	Lồi	Răng cưa
28	EB.CK28	Tròn	Vàng nhạt	Bóng ướt	Lồi	Bằng phẳng
29	EB.CK29	Tròn	Trắng	Bóng ướt	Bằng phẳng	Bằng phẳng

3.2. Kết quả kháng nấm bệnh *Phytophthora palmivora* gây bệnh vàng lá thối vỏ cây sầu riêng của các chủng vi khuẩn nội sinh cây sầu riêng

Thí nghiệm đánh giá hiệu lực ức chế của 29 chủng vi khuẩn nội sinh cây sầu riêng trên chủng nấm *P. palmivora*, sau 5 ngày có 11 chủng đối kháng *P. palmivora* với hiệu lực đối kháng khoảng 50,62- 67,41%; trong đó, chủng EB.CK9 có khả năng kháng *P. palmivora* cao nhất (Bảng 2), khá tương đồng với các nghiên cứu dưới.

Một số nghiên cứu về hoạt tính kháng nấm bệnh *P. palmivora* với hiệu lực cao của các chủng vi khuẩn cây sầu riêng đã được công bố. Mười tám chủng vi khuẩn vùng rễ cây sầu riêng thể hiện khả năng ức chế nấm *P. palmivora* với phần trăm ức chế sự tăng trưởng dao động từ 36,5 - 59,7%; trong đó chủng CT7 có phần trăm ức chế cao nhất được xác định là *Bacillus siamensis* [2]. Năm loài *Pseudomonas fluorescens* được phân lập từ 70 mẫu đất và thân rễ thu thập tại 10 tỉnh trồng sầu riêng cho thấy chủng *P. fluorescens* P.f DN có khả năng ức chế *P. palmivora* với tỷ lệ ức chế sinh trưởng xuyên tâm là 51,85% [7].



Hình 1. Kết quả đánh giá khả năng ức chế nấm *P. palmivora* của chủng vi khuẩn nội sinh EB.CK9. Trong đó: A: kiểm tra kháng; B: đĩa đối chứng

Bảng 2. Hiệu lực đối kháng nấm *Phytophthora palmivora* của các chủng vi khuẩn nội sinh cây sầu riêng

STT	Chủng vi khuẩn nội sinh	Hiệu lực kháng <i>Phytophthora palmivora</i> (%)
1	EB.CK9	67,41 ± 2,70^a
2	EB.CK8	63,22 ± 1,99 ^b
3	EB.CK24	60,92 ± 1,99 ^b
4	EB.CK27	60,68 ± 2,41 ^b
5	EB.CK4	60,43 ± 2,85 ^b
6	EB.CK21	59,77 ± 1,98 ^b
7	EB.CK12	59,77 ± 1,99 ^b
8	EB.CK16	52,87 ± 1,99 ^c
9	EB.CK19	51,77 ± 1,78 ^c
10	EB.CK28	51,72 ± 2,98 ^c
11	EB.CK26	50,62 ± 2,70 ^c

Ghi chú: Các kí hiệu a-c khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P \leq 0,05$)

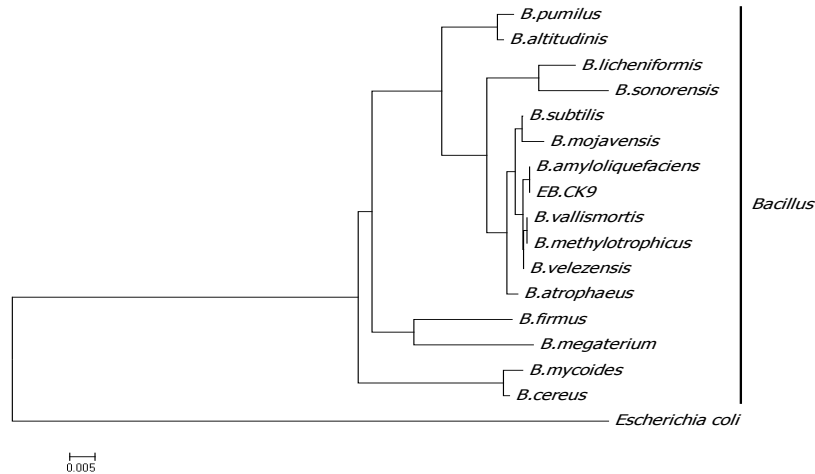
Khả năng kháng nấm bệnh của các vi sinh vật nội sinh là nhờ các cơ chế về cạnh tranh không gian, sản sinh enzyme (esterase, lipase, gelatinase, chitinase, HCN), kháng sinh và cảm ứng khả năng phòng vệ của thực vật [13], [14].

3.3. Kết quả định danh 16S rRNA của chủng vi khuẩn nội sinh cây sầu riêng được tuyển chọn

Qua kết quả sàng lọc của thí nghiệm trên, chủng VKNSCSR CK9 có hoạt tính kháng nấm *P. palmivora* cao nhất đạt 67,41%. Vì vậy, tiến hành định danh bằng phương pháp giải trình tự Nucleotic chủng EB.CK9.

Sau khi tách chiết ADN từ chủng vi khuẩn, tiến hành PCR gen 16S. Trình tự 16S rRNA được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu phân loại vi khuẩn do 16S rRNA ở vi khuẩn có mức độ biến đổi cao giữa các loài gần gũi [15]. Các mẫu PCR dương tính được tinh sạch và đọc trình tự bằng

bộ kit Bigdye 3.1. Trình tự của chủng vi khuẩn EB.CK9 được so sánh với trình tự gen có sẵn trên ngân hàng gen (NCBI); xác định được chủng vi khuẩn EB.CK9 là *Bacillus amyloliquefaciens*, với độ tương đồng 100% (Hình 2).



Hình 2. Cây phát sinh loài của chủng EB.CK9

Bacillus amyloliquefaciens là một loại vi khuẩn gram dương hiếu khí, di động, an toàn và có nhiều đặc tính quý [16]. Sinh vật đa năng này là một trong những vi khuẩn phổ biến nhất được biết đến xâm chiếm nội sinh thực vật [17]. Hơn nữa, *B. amyloliquefaciens* mang lại một số lợi thế cho các ứng dụng trong công nghệ sinh học nông nghiệp vì tạo ra các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính kháng khuẩn chống lại nhiều vi sinh vật gây bệnh thực vật, thúc đẩy sự phát triển của thực vật và tăng cường sức khỏe tổng thể của thực vật [18]. Những thuộc tính này định vị *B. amyloliquefaciens* là ứng cử viên đầy triển vọng trong phát triển nông nghiệp bền vững và thân thiện với môi trường.

3.4. Kết quả khảo sát điều kiện nuôi cấy chủng *Bacillus amyloliquefaciens* trong bình tam giác

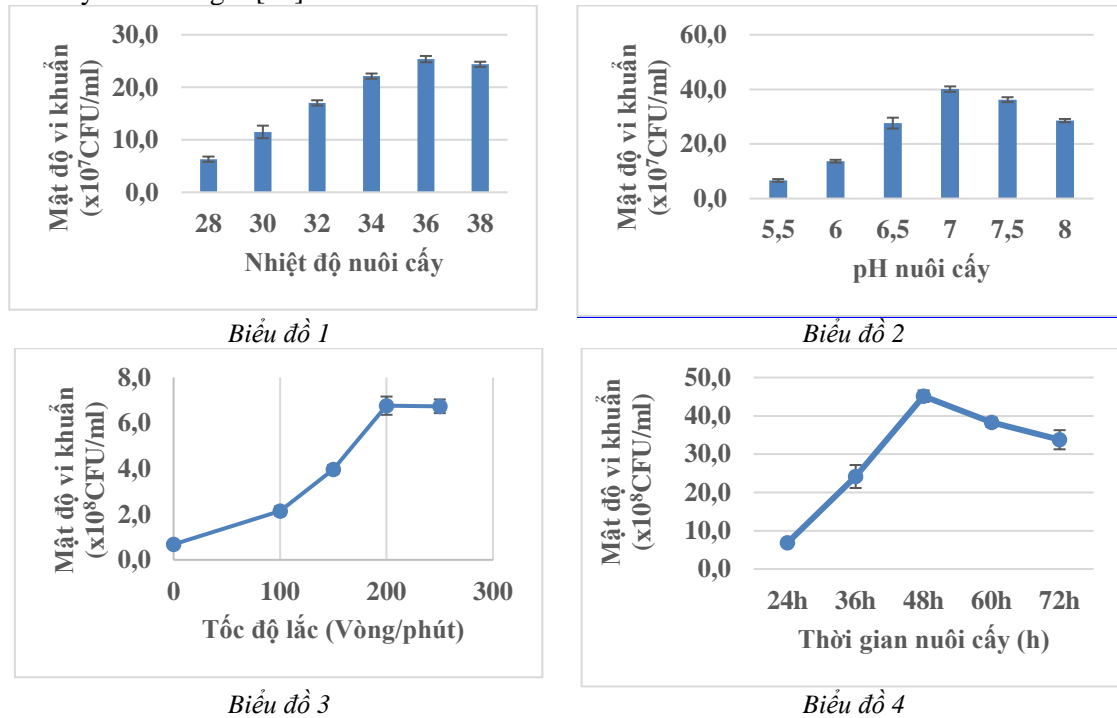
Trong quá trình lên men, các yếu tố khác như: nhiệt độ, pH, tốc độ lắc và thời gian nuôi cấy có ảnh hưởng đến tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn.

Nhiệt độ nuôi cấy được coi là nhân tố quyết định ảnh hưởng đến sự phát triển và sinh trưởng của vi sinh vật, một vài chủng vi khuẩn có thể phát triển tốt ở nhiệt độ cao [19]. *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* sp 1901 sinh trưởng tốt trong dải nhiệt độ 20°C - 55°C với khoảng nhiệt độ tối ưu là 35°C - 45°C [16]. Khảo sát các điều kiện thích hợp cho sự sinh tổng hợp cellulase của chủng *B. amyloliquefaciens* D19 thấy rằng nhiệt độ 37°C thì hoạt tính enzyme đạt cao nhất (879,47 UI/ml) [20]. Chủng *B. amyloliquefaciens* B45 khá bền nhiệt trong dải nhiệt độ từ 30-60°C [21]. Chủng *B. amyloliquefaciens* N1 (phân lập từ nem chua Huế) có hoạt độ protease đạt cao nhất ở nhiệt độ 35°C [22]. Đối với chủng *B. amyloliquefaciens* CK9 thì nhiệt độ cũng ảnh hưởng đến sự gia tăng sinh khối của chủng, mật độ vi khuẩn đạt $2,21 \times 10^8$ - $2,54 \times 10^8$ CFU/ml trong dải nhiệt độ từ 34-38°C và đạt giá trị tối ưu ở 36°C (biểu đồ 1).

Từ biểu đồ 2 thấy rằng *B. amyloliquefaciens* CK9 là chủng trung tính, sinh trưởng tối nhất ở pH 7 với mật độ đạt được $4,01 \times 10^8$ CFU/ml nên lựa chọn pH = 7 làm pH môi trường cho nghiên cứu tiếp theo. Kết quả tương đồng với nghiên cứu trên *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* sp 1901, chủng D19 này sinh trưởng tốt trong dãy pH 5,0 - 9,0 với pH tối ưu là 7,0 [16].

Chủng *B. amyloliquefaciens* CK9 là chủng hiếu khí nên hàm lượng oxy hòa tan có ảnh hưởng mật thiết đến quá trình nhân sinh khối của vi khuẩn, tốc độ lắc càng cao nghĩa là lượng oxy trao đổi càng nhiều nên mật độ càng cao (biểu đồ 3). Mật độ chủng cao nhất là $6,6 \times 10^8$ CFU/ml ở tốc độ lắc 200 rpm gấp 3,3 lần mật độ ở 100 rpm và 11 lần mật độ khi không lắc.

B.amyloliquefaciens CK9 khi được nuôi ở những thời gian nuôi cấy khác nhau sẽ có mật độ vi khuẩn khác nhau và mật độ của chúng có nhiều biến động qua các thời điểm nuôi cấy. Sau 48h nuôi cấy, mật độ trong bình tam giác đạt $44,5 \times 10^8$ CFU/ml (Biểu đồ 4). Nghiên cứu chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* B45 cho hoạt tính kháng vi khuẩn *E. carotovora* mạnh sau khoảng thời gian nuôi cấy từ 24-48 giờ [21].



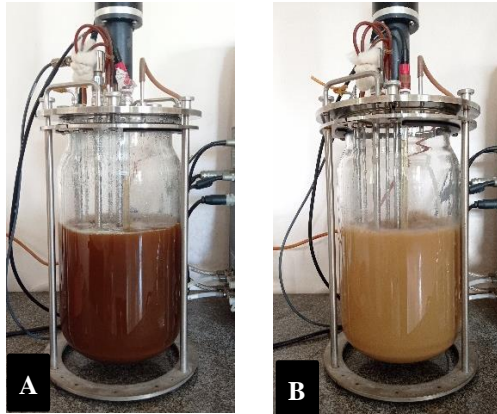
Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ (Biểu đồ 1), pH (Biểu đồ 2), tốc độ lắc (Biểu đồ 3) và thời gian nhân nuôi (Biểu đồ 4) của chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EB. CK9 trong bình tam giác

Trong nghiên cứu này, chúng tôi ghi nhận *B. amyloliquefaciens* EB. CK9 sinh trưởng tốt nhất với nhiệt độ 36°C, pH=7, tốc độ lắc 200 rpm trong 48h đạt $44,5 \times 10^8$ CFU/ml trong bình tam giác.

3.5. Nhân nuôi chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EB. CK9 trong hệ thống Bioreactor

Trong nông nghiệp, *B. amyloliquefaciens* đã chứng tỏ tiềm năng làm phân bón sinh học, tác nhân kiểm soát sinh học và chất tăng cường khả năng chống chịu stress cho nhiều loại cây trồng [23]. Nhằm hướng tới việc rút ngắn thời gian lên men, tiến hành thử nghiệm nhân nuôi thu sinh khối chủng EB. CK9 trong Bioreactor quy mô 14L từ 0h đến 12h. Khi nhân nuôi trong Bioreactor, mật độ vi khuẩn CK9 tăng dần theo thời gian. Sau 10h nhân nuôi, mật độ đạt $8,25 \times 10^{11}$ CFU/ml. Kết quả có sự khác biệt với nghiên cứu tiến hành nhân nuôi chủng *B. amyloliquefaciens* IT45 trong Bioreactor 40 L sau 48h lên men trong hệ thống Bioreactor mật độ đạt $3,0 \times 10^9$ CFU ml⁻¹ [24].

Nghiên cứu đã mở rộng hướng ứng dụng *B. amyloliquefaciens* EB. CK9 trong kiểm soát sinh học với bệnh do nấm *P. palmivora* gây hại trên sầu riêng, phục vụ sản xuất chế phẩm sinh học trong sản xuất sầu riêng an toàn, bền vững và thân thiện với môi trường.



Hình 4. Hình ảnh nhân nuôi chủng vi khuẩn

B. amyloliquefaciens EB.CK9 trong Bioreactor. Trong đó: A. Trước nuôi cấy, B. Sau 12h nuôi cấy

Bảng 3. Mật độ vi khuẩn của chủng *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 trong khoảng thời gian từ 2h-12h nuôi cấy trong Bioreactor

Thời gian nuôi cấy	Mật độ trung bình của chủng EB.CK9 (CFU/ml)
2h	$5,11 \times 10^6$
4h	$1,76 \times 10^8$
6h	$6,41 \times 10^9$
8h	$5,18 \times 10^{10}$
10h	$8,25 \times 10^{11}$
12h	$4,25 \times 10^{11}$

4. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập và dòng hoá được 29 chủng vi khuẩn từ 12 mẫu sầu riêng thu thập được tại huyện Cư Kuin, tỉnh Đắk Lắk. Tuyển chọn được chủng EB.CK9 có hoạt tính kháng nấm *P. palmivora* (67,41%). Định danh xác định được chủng EB.CK9 là *B. amyloliquefaciens* dựa trên phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA. Ghi nhận EB.CK9 sinh trưởng tốt nhất với nhiệt độ 36°C, pH=7, 200 rpm trong bình tam giác, sau 48h đạt $44,5 \times 10^8$ CFU/ml. Sản xuất chế phẩm EB.CK9 trong hệ thống Bioreactor 14 L đạt mật độ $8,25 \times 10^{11}$ CFU/ml sau 10h lên men.

Nghiên cứu đã mở rộng hướng ứng dụng vi sinh vật bản địa trong kiểm soát sinh học với bệnh vàng lá thối rễ cây sầu riêng, phục vụ sản xuất chế phẩm sinh học bản địa cho canh tác cây sầu riêng an toàn, bền vững và thân thiện với môi trường.

Lời cảm ơn

Ngô Văn Anh 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.2023.TS.02.

Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ Bộ KH&CN Việt Nam mã số đề tài: B2023-TTN-02.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] Department of Agriculture and Rural Development of Dak Lak province 2021.
- [2] T. L. Nguyen, N. Q. N. Le, T. K. Kim, T. C. T. Le, B. T. Lieu, and T. P. Nguyen, "Assessment of antagonistic activity against *Phytophthora palmivora* of bacteria isolated from durian rhizosphere soil," *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 228, no. 13, pp. 391-398, 2023.
- [3] V. T. Mai, T. H. Vu, and T. V. Nguyen, "Technology in farming and integrated pest and disease management on durian," *Proceedings of the scientific conference: Applying Science and Technology to improve value and Sustainable development of durian trees in a linked chain in Vietnam*, Hanoi, 2021b, pp. 21-33.
- [4] M. Zhang, J. Li, A. Shen, S. Tan, Z. Yan, Y. Yu, Z. Xue, T. Tan, and L. Zeng, "Isolation and Identification of *Bacillus amyloliquefaciens* IBFCBF-1 with Potential for Biological Control of *Phytophthora* Blight and Growth Promotion of Pepper," *Journal of Phytopathology*, vol. 164, no. 11-12, pp. 1012-1021, 2016.
- [5] D. H. Nguyen, V. C. Ha, V. V. Nguyen, T. T. T. Thieu, N. H. Tran, and T. D. Do, "Research on smut disease (*Phytophthora palmivora*) harming durian trees," *Proceedings of the scientific conference Study: Applying Science and Technology to enhance value and sustainably develop durian trees in a linked chain in Vietnam*, Hanoi, 2021, pp. 125-135.
- [6] H. H. Pham, T. C. Q. Nguyen, Q. T. Phung, T. D. Bach, T. H. Vu, T. M. T. Pham, and X. C. Nguyen, "Phytophthora Fungi Cause Disease in Durian in Daklak and Tien Giang," *Security Plants*, no. 1, pp. 10-14, 2021.

- [7] V. T. Tran, H. T. Nguyen, H. T. Nguyen, and D. D. Le, "Isolation and characteristics of *Pseudomonas fluorescens* to inhibit *Phytophthora palmivora* causing rot disease in durian," *The Journal of Agriculture and Development*, vol. 22, no. 3, pp. 31-38, 2023.
- [8] N. Dalila, S. Matthews, N. F. M. Amaran, and N. A. A. A. Kharim, "Assessment of *Streptomyces* sp. and *Bacillus* sp. Against *Phytophthora palmivora*, the Causal Agent of Durian Canker Disease through Different Application Methods at The Nursery Stage," *Journal of Agrobiotechnology*, vol. 15, no. S1, pp. 18-24, 2024.
- [9] D. K. Zinniel, P. Lambrecht, N. B. Harris, Z. Feng, D. Kuezmarski, P. Highley, C. Ishimaru, A. Arunakumari, G. R. Barletta, and A. K. Vidaver, "Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 59, pp. 2198-2208, 2002.
- [10] T. Mekete, J. Hallmann, S. Kiewnick, and R. Sikora, "Endophytic bacteria from Ethiopian coffee plants and their potential to antagonize," *Meloidogyne incognita*, vol.11, no. 1, pp. 117-127, 2009.
- [11] R. Aravind, A. Kumar, S. J. Eapen, and K.V. Ramana, "Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum* L.) genotype: isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsica*," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 48, pp. 58-64, 2009.
- [12] M. D. Tran, H. Sugimoto, A. D. Nguyen, T. Watanabe, and K. Suzuki, "Identification and characterization of chitinolytic bacteria isolated from a freshwater lake," *Biosci, Biotechnol, Biochem*, vol. 82, pp. 1-13, 2018.
- [13] B. Duong, H. X. Nguyen, H. V. Phan, S. Colellaa, P. Q. Trinh, G. T. Hoang, T. T. Nguyen, P. Marraccinibh, M. Lebrunab, and R. Duponnoisa, "Identification and characterization of Vietnamese coffee bacterial endophytes displaying in vitro antifungal and nematocidal activities," *Microbiological Research*, vol. Jan, no. 242, p. 126613, 2021.
- [14] T. Silva, Terrasan, and Bettiol, "Endophytic microorganisms from coffee tissues as plant growth promoters and biocontrol agents of coffee leaf rust," *Biological Control*, vol. 63, no. 1, pp. 62-67, 2012.
- [15] W. G. Weisburg, S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane, "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study," *J Bacteriol*, vol. 173, no. 2, pp. 697-703, 1991.
- [16] T. T. Trinh, L. D. Phan, T. L. Q. Tran, V. H. Duong, and T. L. Dao, "Microbiological Characterization and Potential Applications of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum sp 1901 Isolated from Soil at Hoang Lien National Park," *VNU Journal of Science*, vol. 29, no. 3, pp. 59-70, 2013.
- [17] D. K. Choudhary and B. N. Johri, "Interactions of *Bacillus* spp. and plants—With special reference to induced systemic resistance (ISR)," *Microbiol. Res.*, vol. 164, no. 5, pp. 493-513, 2009.
- [18] J. H. Han, H. Shim, J. H. Shin, and K. S. Kim, "Antagonistic Activities of *Bacillus* spp. Strains Isolated from Tidal Flat Sediment towards Anthracnose Pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea," *Plant Pathol. J.*, vol. Jun, no. 31, pp. 165-175, 2015.
- [19] T. H. C. Tran, "Factors affecting the producibility of high thermostable α -amylase from *Bacillus* spp. Class," *Industry and Trade Magazine*, no. 21, 2020.
- [20] N. A. Nguyen, L. H. H. Nguyen, N. D. L. Tran, T. L. Bui, T. H. Nguyen, T. D. H. Nguyen, and T. V. Pham, "Enhanced production of cellulase from *Bacillus amyloliquefaciens* D19," *IUH Journal of Science And Technology*, vol. 49, no. 01, pp. 67-76, 2021.
- [21] T. T. M. Nguyen, T. C. Truong, X. T. Vu, X. B. M. Phan, T. H. Ngo, and B. T. Tran, "Studying the antagonistic capacity to soft rot disease pathogen in plants *Erwinia carotovora* of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* B45 isolated from *Polyscias fruticosa* cultivating soil," *National Biotechnology Conference 2020/ Microbiology and fermentation technology*, 2020, pp. 409-413.
- [22] T. B. T. Do, "Research on factors affecting the absorption of extracellular protease preparations of *Bacillus amyloliquefacien* N1," *Hue University Journal of Science*, vol. 71, no. 2, pp. 279-290, 2012.
- [23] I. Zalila-Kolsi, A. Ben-Mahmoud, and R. Al-Barazie, "*Bacillus amyloliquefaciens*: Harnessing Its Potential for Industrial, Medical, and Agricultural Applications—A Comprehensive Review," *Icroorganisms 2023*, vol. 11, no. 9, p. 2215, 2023.
- [24] A. L. Frederico, O. S. Santos, A. W. V. Pomella, E. J. Ribeiro, and M. M. de Resende, "Culture Medium Evaluation Using Low-Cost Substrate for Biosurfactants Lipopeptides Production by *Bacillus amyloliquefaciens* in Pilot Bioreactor," *Journal of Surfactants and Detergents*, vol. 23, no. 1, pp. 91-98, 2019.