

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VI KHUẨN *Bacillus* spp. TỪ DẠ CỎ BÒ CÓ KHẢ NĂNG SINH ENZYME β -GLUCANASE VÀ BƯỚC ĐẦU XÁC ĐỊNH ĐẶC TÍNH CỦA ENZYME

Nguyễn Hoàng Anh *, Nguyễn Thị Thanh Thủy, Nguyễn Vĩnh Hoàng

Khoa Công nghệ thực phẩm, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Email**: hoanganhcntp@vnua.edu.vn

Ngày gửi bài: 19.10.2016

Ngày chấp nhận: 20.02.2017

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, 221 khuẩn lạc đã được phân lập từ 3 mẫu dạ cỏ bò thu nhận ở 3 vùng: Lệ Chi - Gia Lâm, Khoái Châu - Hưng Yên, Phú Xuyên - Hà Nội. Trong đó, 94 chủng xác định là *Bacillus* spp. được dùng để kiểm tra khả năng sinh enzyme β -glucanase. Kết quả cho thấy, đa số các chủng *Bacillus* spp. phân lập được đều có khả năng sinh enzyme β -glucanase ngoại bào, trong đó chủng PX.07 có hoạt độ enzyme cao nhất đạt 6,8 U/l. Enzyme β -glucanase từ dịch nuôi cấy của chủng này được tinh sạch bằng $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50% nồng độ bão hòa để xác định đặc tính. Nhiệt độ và pH tối ưu của enzyme tương ứng là 60°C và pH 6. Enzyme bền trong khoảng nhiệt độ 30 - 60°C và pH từ 3 - 6.

Từ khóa: *Bacillus* spp., β -glucanase, dạ cỏ bò, enzyme.

Isolation, Selection of β -Glucanase Producing *Bacillus* spp. from Cow Rumens and Primary Characterization of Enzyme

ABSTRACT

In this study, 221 colonies have been isolated from 3 samples of cow rumens collected from Le Chi - Gia Lam, Khoai Chau - Hung Yen, and Phu Xuyen - Ha Noi. 94 strains primarily identified as *Bacillus* spp. were used to determine β -glucanase activity. Results indicated that most of them produced extracellular β -glucanase and the strain PX.07 secreted enzyme with highest enzyme activity at 6.8 U/ml. The enzyme was purified from medium culture using 50% saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and then used for further characterization. Optimal temperature and pH of the purified enzyme were 60°C and pH 6, respectively. The enzyme is stable when incubated at temperature range of 30-60°C and pH of 3 - 6.

Keywords: *Bacillus* spp., β -glucanase, cow rumen.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

β -glucanase là đại diện cho một nhóm các enzyme thủy phân carbohydrate, cắt các liên kết β -glycoside trong phân tử β -glucan. Trong cơ thể, β -glucanase là một enzyme quan trọng giúp tiêu hóa chất xơ, khắc phục các vấn đề về tiêu hóa và dinh dưỡng mà cơ thể không thể tự sản sinh được (Quyên Đình Thi và cs., 2014). β -glucanase có thể được tổng hợp từ nhiều nguồn khác nhau trong tự nhiên như động vật, thực vật và vi sinh vật. Các enzyme có nguồn gốc

khác nhau sẽ có cấu trúc khác nhau. Điều này dẫn tới sự khác nhau về hoạt tính xúc tác và điều kiện phản ứng tối ưu (Meena *et al.*, 1999).

Vi sinh vật là nguồn cung cấp enzyme với nhiều ưu điểm nổi bật so với enzyme có nguồn gốc khác. Một số chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. an toàn trong thực phẩm có khả năng sinh enzyme cao và enzyme có khả năng chịu nhiệt (Quyên Đình Thi và cs., 2014). Tuy nhiên, việc nghiên cứu sử dụng enzyme β -glucanase từ vi khuẩn *Bacillus* spp. đến nay vẫn còn hạn chế và cần được quan tâm phát triển.

Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* spp. từ dạ cỏ bò có khả năng sinh enzyme β -glucanase và bước đầu xác định đặc tính của enzyme

Dạ cỏ bò là phần túi lớn nhất của dạ dày bò, chiếm 85 - 90% dung tích dạ dày, 75% dung tích đường tiêu hóa, có tác dụng tích trữ, nhào trộn và lên men phân giải thức ăn (Nguyễn Xuân Trạch, 2004). pH và nhiệt độ trong dạ cỏ tương ứng khoảng 6,5 và 38 - 42°C (Trần Cừ, 1979). Hệ vi sinh vật dạ cỏ rất phức tạp và phụ thuộc nhiều vào khẩu phần thức ăn. Hệ vi sinh vật dạ cỏ gồm có 3 nhóm chính: Vi khuẩn với số lượng 10^{10} - 10^{11} tế bào/ml, động vật nguyên sinh là 10^5 - 10^6 tế bào/ml và nấm 10^3 - 10^4 tế bào/ml. Hệ vi sinh vật có khả năng tiết ra hệ enzyme để giúp bò có thể tiêu hóa nguồn chất xơ trong đó có enzyme β -glucanase.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Mẫu dạ cỏ thu nhận từ ba vùng Lệ Chi - Gia Lâm - Hà Nội (ký hiệu LC), Khoái Châu - Hưng Yên (ký hiệu KC) và Phú Xuyên - Hà Nội (ký hiệu PX) được sử dụng để phân lập các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập và định danh sơ bộ các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp.

Bacillus spp. được phân lập trên môi trường NA theo mô tả bởi Nguyễn Lâm Dũng và Đinh Thúy Hằng (2006) và định danh sơ bộ dựa trên đặc điểm hình thái (khuẩn lạc và tế bào), đặc tính sinh lý, sinh hóa (nhuộm Gram, hoạt tính catalase, phản ứng MR) (Garrity *et al.*, 2004; Nguyễn Lâm Dũng và Đinh Thúy Hằng, 2006).

2.2.2. Xác định khả năng sinh enzyme β -glucanase của vi khuẩn *Bacillus* spp.

Khả năng sinh enzyme β -glucanase của vi khuẩn *Bacillus* spp. được xác định theo phương pháp của Quyên Đình Thi và Đỗ Thị Tuyên (2014) dựa trên nguyên tắc: CMC có trong đĩa thạch bị endo- β -1,4-glucanase thủy phân sẽ không bắt màu với lugol.

Môi trường thử hoạt tính enzyme được hấp khử trùng ở 121°C, 20 phút và đổ vào đĩa peptri với độ dày ~ 4 mm. Mỗi đĩa thạch được đục 4 lỗ tròn đường kính 7 mm. 100 μ l dịch khuẩn lạc từ

môi trường MT2 đã li tâm được nhỏ vào lỗ thạch đục sẵn. Mẫu đối chứng được tiến hành tương tự, trong đó 100 μ l dịch khuẩn được thay thế bằng 100 μ l nước cất đã khử trùng. Ủ ở 4°C trong 30 phút để dịch enzyme khuếch tán vào các lỗ thạch, ủ tiếp ở 37°C trong 24 h. Sử dụng lugol 1% tráng đều trên bề mặt thạch trong 30 phút và quan sát. Vùng CMC bị phân giải xung quanh lỗ sẽ có màu trong suốt do không bắt màu lugol. Đường kính vòng phân giải D - d (mm) (D là đường kính vòng ngoài và d là đường kính lỗ) càng lớn thì hoạt tính enzyme càng cao.

2.2.3. Xác định hoạt độ của enzyme β -glucanase

Hoạt độ của enzyme β -glucanase được xác định thông qua nhuộm sản phẩm thủy phân bằng DNS như mô tả bởi Saowapar Khianggam *et al.*, 2014.

2.2.4. Tinh sạch enzyme β -glucanase

Enzyme β -glucanase được kết tủa bằng muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ như mô tả bởi Nguyễn Thị Uyên Thảo (2007).

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30, 40, 50, 60 và 70% bão hòa được cho từ từ vào dịch nuôi cấy sau khi đã ly tâm 6.000 vòng/phút ở 4°C trong vòng 15 phút để loại bỏ tế bào, khuấy cho tan hết. Sau đó, protein trong dịch nuôi cấy được kết tủa ở 4°C trong vòng 1 giờ trước khi ly tâm 6.000 vòng/phút ở 4°C trong vòng 30 phút để lấy tủa. Phần dịch tủa được hòa tan bởi đệm phosphate pH = 6,5. Dịch enzyme β -glucanase tinh sạch được dùng để xác định hoạt độ và hoạt độ riêng từ đó xác định độ tinh sạch của enzyme và hiệu suất thu hồi của enzyme

2.2.5. Xác định protein tổng số

Protein tổng số được xác định theo phương pháp của Bradford (1976).

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập *Bacillus* spp. từ dạ cỏ bò

Từ các mẫu dạ cỏ được lấy ở 3 vùng: Lệ Chi - Gia Lâm; Khoái Châu - Hưng Yên và Phú Xuyên - Hà Nội, đã phân lập được 221 loại khuẩn lạc khác

Bảng 1. Kết quả phân lập *Bacillus* spp. của các mẫu dạ cỏ bò

Kí hiệu mẫu	Tổng số khuẩn lạc thu được	Tổng số <i>Bacillus</i> spp. thu được	Ký hiệu các chủng <i>Bacillus</i> spp.
LC	39	20	LC.01 đến LC.20
KC	106	41	KC.01 đến KC.41
PX	76	33	PX.01 đến PX.33
Tổng số 221		94	

nhau. Dựa vào đặc điểm hình thái và một số đặc tính sinh lý sinh hóa trên môi trường phân lập như được mô tả ở mục 2.2.1, 94 chủng *Bacillus* spp. đã được thu nhận (Bảng 1).

Kết quả cho thấy, số lượng khuẩn lạc thuộc chi *Bacillus* tương đối cao (94/221) so với tổng số loại khuẩn lạc thu được. Mẫu dạ cỏ bò thu nhận từ Khoái Châu có số lượng khuẩn lạc *Bacillus* cao nhất (41/94), tiếp đến là Phú Xuyên (33/94) và thấp nhất là Lệ Chi (20/94). Đa số khuẩn lạc phân lập được có dạng tròn, màu trắng ngà, một số màu vàng nhạt, rìa răng cưa, bề mặt khuẩn lạc lồi, nhẵn bóng, khô, ứt. Chủng lựa chọn được bảo quản trong glycerol 50% ở -80°C để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Khả năng sinh enzyme β -glucanase và hoạt độ enzyme β -glucanase của vi khuẩn *Bacillus* spp. phân lập được

3.2.1. Khả năng sinh enzyme β -glucanase của vi khuẩn *Bacillus* spp.

Khả năng sinh enzyme được xác định thông qua việc đo vòng phân giải trên môi trường thạch CMC (Bảng 2, Hình 1). Từ 94 chủng *Bacillus* spp. phân lập được, có 46 chủng thể hiện khả năng sinh enzyme ở nhiều mức độ khác nhau trong đó có 12 chủng có đường kính vòng phân giải lớn hơn 15mm. Các chủng được phân lập từ dạ cỏ bò thu nhận tại Khoái Châu thể hiện khả năng sinh enzyme cao, đồng đều hơn so với các nguồn khác.

Bảng 2. Khả năng sinh enzyme β -glucanase của 12 chủng *Bacillus* spp. phân lập được

STT	Ký hiệu khuẩn lạc	Đường kính vòng phân giải (mm)	STT	Ký hiệu khuẩn lạc	Đường kính vòng phân giải (mm)
1	KC.04	19	7	KC.30	19
2	KC.06	16	8	KC.31	20
3	KC.15	17	9	KC.33	18
4	KC.17	17	10	KC.34	19
5	KC.23	18	11	PX.02	19
6	KC.25	16	12	PX.07	21



KC.04



PX.07



KC.31

Hình 1. Vòng phân giải thể hiện khả năng sinh enzyme của 3 chủng *Bacillus* spp.

Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* spp. từ dạ cỏ bò có khả năng sinh enzyme β -glucanase và bước đầu xác định đặc tính của enzyme

12 chủng có đường kính vòng phân giải lớn hơn 15 mm được tiếp tục sử dụng để xác định hoạt độ của enzyme nhằm tìm ra chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. có khả năng sinh enzyme β -glucanase với hoạt độ cao nhất để định hướng cho các nghiên cứu tiếp theo.

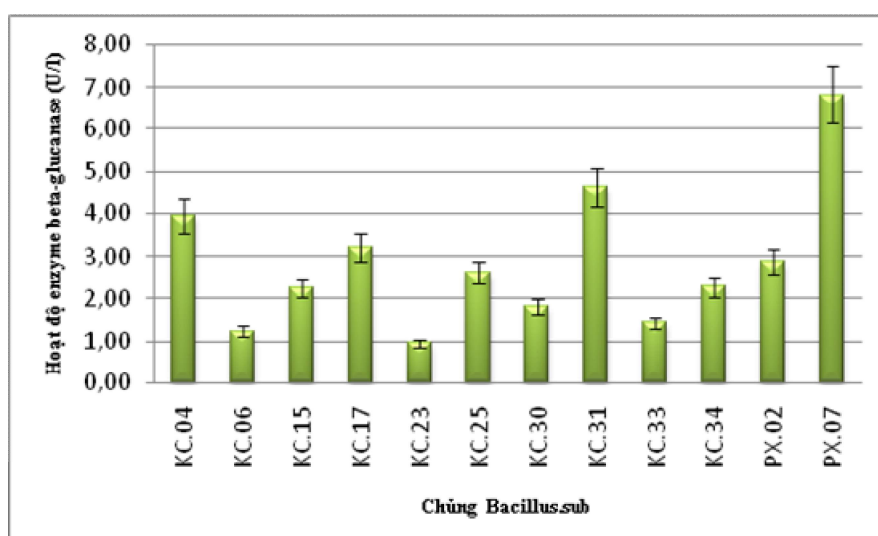
3.2.2. Hoạt độ của enzyme β -glucanase của vi khuẩn *Bacillus* spp.

Hoạt độ của enzyme β -glucanase của 12 chủng có vòng phân giải lớn nhất được thể hiện ở hình 2. Từ hình 2 cho thấy trong số 12 chủng vi khuẩn được chọn để xác định hoạt độ enzyme β -glucanase thì có 3 chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. cho hoạt độ tốt nhất là: PX.07 (6,8 U/l); KC.31 (4,63 U/l) và KC.04 (3,93 U/l). Kết quả này phù hợp với kết quả khảo sát khả năng sinh enzyme β -glucanase của 12 chủng *Bacillus* spp. phân lập được bằng phương pháp đục lỗ thạch (Bảng 2), chủng PX.07 có hoạt độ enzyme cao nhất trong số 12 chủng *Bacillus* spp. sẽ được tiếp tục nghiên cứu.

3.3. Điều kiện tinh sạch enzyme β -glucanase bằng muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Dịch enzyme thô của chủng PX.07 được tinh sạch bằng cách kết tủa ở các nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ khác nhau. Hiệu quả tinh sạch được xác định thông qua hoạt độ chung, hoạt tính riêng và hiệu suất thu hồi của enzyme. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Hoạt độ riêng của enzyme β -glucanase được lựa chọn để xác định khả năng kết tủa enzyme β -glucanase, hoạt độ riêng càng cao chứng tỏ độ sạch của enzyme càng cao. Kết quả tinh sạch enzyme ở bảng 3 cho thấy hoạt độ riêng của enzyme khi tinh sạch cao nhất ở nồng độ 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hòa và bằng 0,1199 so với trước tinh sạch là 0,0263. Ngoài ra, tại nồng độ 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bão hòa cũng cho hiệu suất thu hồi cao nhất đạt 22%. Điều kiện tinh sạch này được áp dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 2. Hoạt độ enzyme β -glucanase của 12 chủng *Bacillus* spp.

Bảng 3. Kết quả tinh sạch enzyme ở các nồng độ muối $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ khác nhau

Nồng độ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Thể tích (ml)	Hoạt độ chung (U)	Protein tổng số (mg)	Hoạt độ riêng (%)	Hiệu suất thu hồi (%)
Trước khi tủa	80	0,6064 ± 0,0004	14,2954 ± 0,0005	0,0424	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40%	20	0,0703 ± 0,0003	0,1793 ± 0,0005	0,3920	12
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50%	20	0,1341 ± 0,0003	0,1076 ± 0,0005	1,2467	22
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60%	20	0,1224 ± 0,0005	0,2869 ± 0,0004	0,4267	20
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 70%	20	0,1164 ± 0,0005	0,3122 ± 0,0004	0,3727	19

3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ và pH đến hoạt tính của enzyme β -glucanase

3.4.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hoạt tính của enzyme β -glucanase

- Nhiệt độ tối thích của enzyme β -glucanase

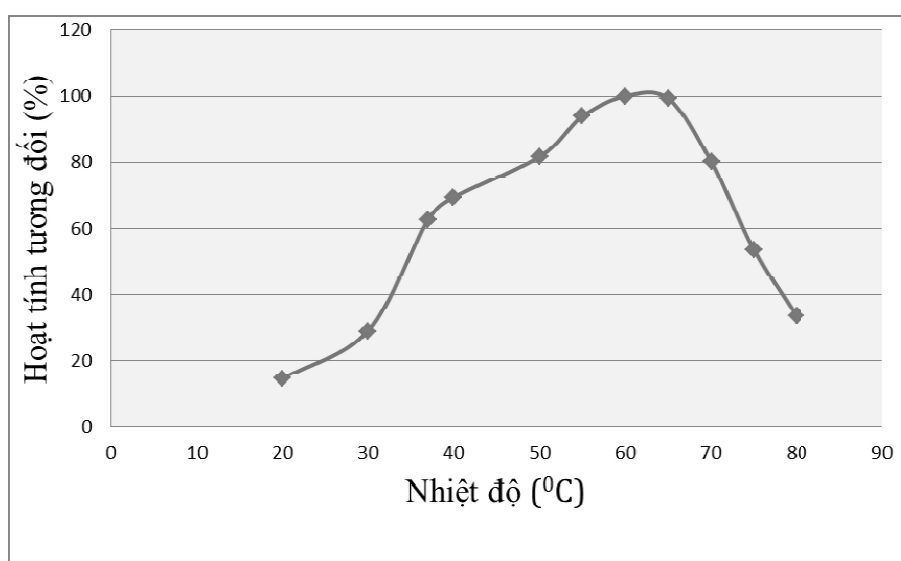
Tiến hành xác định hoạt tính của enzyme tại dải nhiệt độ từ 20- 80°C. Kết quả ở hình 3 cho thấy, hoạt tính tương đối của enzyme β -glucanase tinh sạch cao nhất trong khoảng nhiệt độ từ 60 - 65°C trong điều kiện thí nghiệm 10 phút, sử dụng CMC làm cơ chất.

Tuy nhiên, hoạt tính tương đối của enzyme bắt đầu giảm khi nhiệt độ tiếp tục tăng và chỉ còn lại 53% ở 75°C và 34% ở 80°C. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Li *et al.* (2010).

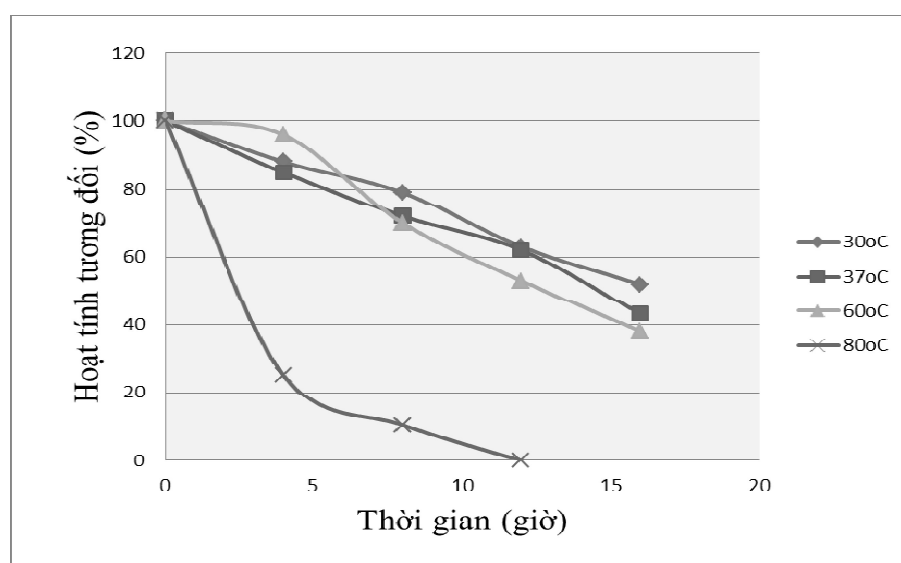
- Độ bền nhiệt của enzyme β -glucanase

Nghiên cứu độ bền nhiệt của enzyme β -glucanase tại các nhiệt độ 30°C, 37°C, 60°C, 80°C. Kết quả được thể hiện ở hình 4.

Qua hình 4 nhận thấy, hoạt tính enzyme β -glucanase từ chủng vi khuẩn *Bacillus spp.* tương



Hình 3. Nhiệt độ tối ưu của enzyme β -glucanase



Hình 4. Độ bền nhiệt của enzyme β -glucanase

Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* spp. từ dạ cỏ bò có khả năng sinh enzyme β -glucanase và bước đầu xác định đặc tính của enzyme

đổi bền trong khoảng nhiệt độ 30 - 60°C. Sau 16 giờ, hoạt tính còn lại của enzyme ở nhiệt độ 30°C, 37°C và 60°C tương ứng là 52%, 43% và 38%. Trong khi đó ở nhiệt độ 80°C hoạt tính enzyme giảm đi nhanh chóng, sau 4 giờ hoạt tính chỉ còn lại hơn 20% và sau 12 h enzyme bị mất hoàn toàn hoạt tính. Kết quả bền nhiệt của enzyme tinh sạch có thể so sánh với kết quả enzyme β -glucanase từ *Aspergillus niger* VTCC-F021, sau 8 giờ ủ ở 30 và 37°C hoạt tính còn lại khoảng 80%, ở 60°C hoạt tính giảm mạnh chỉ còn 34% sau 8 giờ ủ (Quyên Đình Thi và Đỗ Thị Quyên, 2014). Như vậy, enzyme nghiên cứu khá bền ở dải nhiệt độ 30 - 60°C.

3.5. Xác định ảnh hưởng của pH đến hoạt tính enzyme β -glucanase

3.5.1. pH tối ưu của enzyme β -glucanase

Xác định hoạt tính tương đối của enzyme β -glucanase tại các giá trị pH từ 3 - 8 ở nhiệt độ 37°C. Kết quả được thể hiện ở hình 5.

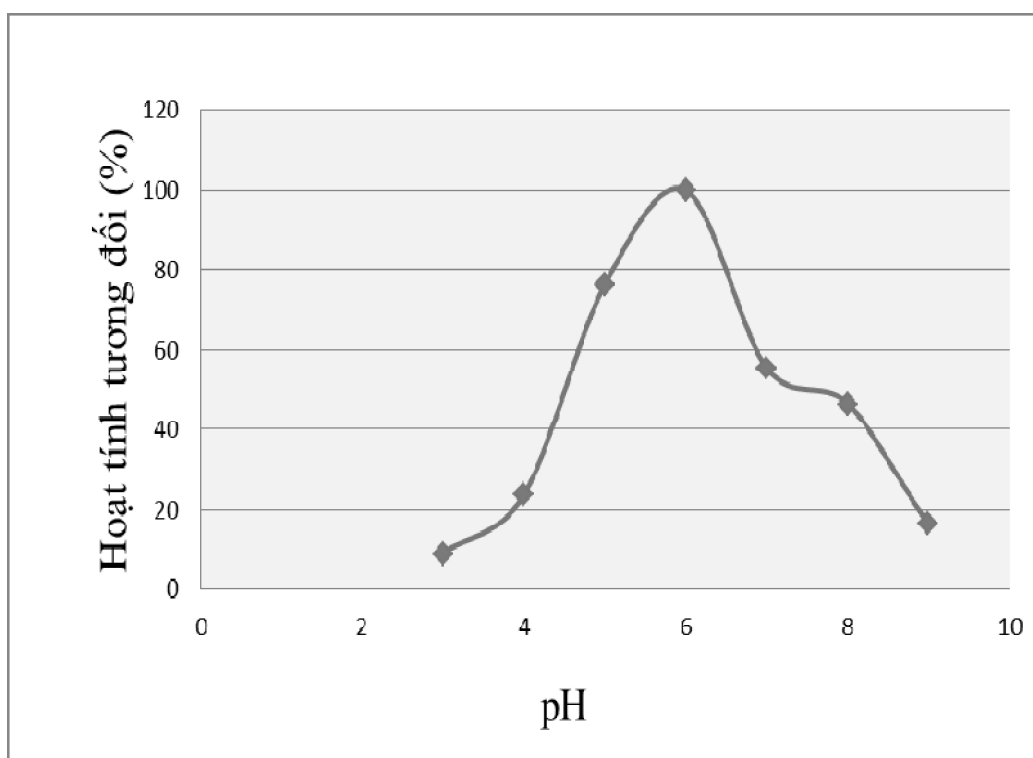
Từ hình 5 cho thấy hoạt tính tương đối của

enzyme β -glucanase tăng lên khi pH tăng từ 3 và đạt cực đại tại pH 6. Hoạt tính tương đối của enzyme giảm mạnh xuống còn 57%, 45%, 18% khi tăng pH lên 7, 8, 9 tương ứng. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả nghiên cứu của Yin *et al.* (2010) là enzyme từ *Bacillus* spp. YJ1 có hoạt tính cao nhất ở pH 6.

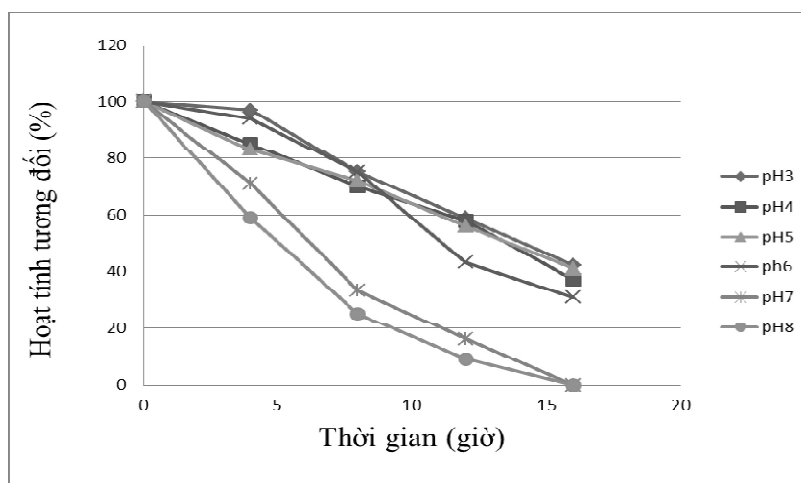
3.5.2. Độ bền pH của enzyme β -glucanase

Enzyme được giữ ở trong dung dịch đệm với pH là 3, 4, 5, 6, 7 và 8 ở 37°C, sau mỗi khoảng thời gian xác định hoạt tính enzyme và so sánh hoạt tính này với hoạt tính enzyme ban đầu, kết quả được thể hiện trong hình 6.

Enzyme β -glucanase có giảm nhẹ và vừa theo thời gian ở dải pH từ 3 - 6. Ở pH 7 - 8 hoạt tính enzyme giảm đi nhanh chóng, chỉ sau 8 giờ hoạt tính enzyme đã mất đi khoảng 70% hoạt tính so với ban đầu. Qua kết quả trên cho ta thấy, β -glucanase của vi khuẩn này là enzyme bền trong môi trường axit yếu, đây là một tính chất quan trọng khi ứng dụng enzyme trong sản xuất thức ăn chăn nuôi.



Hình 5. pH tối ưu của enzyme β -glucanase



Hình 6. Ảnh hưởng của pH đến độ bền của enzyme β -glucanase

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, 12/94 chủng *Bacillus* spp. phân lập từ dạ cỏ bò có hoạt độ enzyme β -glucanase cao. Trong đó, chủng *Bacillus* spp. PX.07 có hoạt độ enzyme cao nhất (6,8 U/l) đã được sử dụng để nuôi cấy, tinh sạch và xác định một số đặc tính chính của enzyme. Kết quả chỉ ra rằng enzyme β -glucanase có nhiệt độ tối thích, bền nhiệt ở 60°C và bền pH từ 3 - 6. Kết quả này bước đầu mở ra định hướng ứng dụng của enzyme trong thực phẩm, thức ăn chăn nuôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Cao Cường, Nguyễn Đức Lượng (2003). Khảo sát quá trình cảm ứng enzyme chitinase và cellulase của *Trichoderma harzianum* ảnh hưởng của hai enzyme này lên nấm bệnh *Sclerotium rolfsii*, Báo cáo khoa học, Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 321-324.

Trần Cừ (1979). Sinh lý và hóa sinh tiêu hóa của động vật nhai lại. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.

Nguyễn Lâm Dũng, Đoàn Xuân Mượu, Nguyễn Phùng Tiến, Đặng Đức Trạch, Phạm Văn Ty (1978). Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học, Nhà xuất bản Khoa học kỹ thuật, Hà Nội, Tập 3.

Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Đình Quyền, Phạm Văn Ty (2001). Vi sinh vật học, Nhà xuất bản giáo dục.

Nguyễn Lâm Dũng, Đình Thủy Hằng (2006). Phương

pháp thực nghiệm dùng để định tên các loài vi khuẩn, Nhà xuất bản giáo dục.

Nguyễn Thị Uyên Thảo (2007). Nghiên cứu tạo chế phẩm xylanase từ nấm *Trichoderma*, luận văn thạc sĩ, trường Đại học Khoa học tự nhiên, thành phố Hồ Chí Minh.

Quyền Đình Thi, Đỗ Thị Quyền (2014). Enzyme bổ sung thức ăn chăn nuôi: tự nhiên và tái tổ hợp, Nhà xuất bản Khoa học tự nhiên và Công nghệ.

Nguyễn Xuân Trạch (2004). Sử dụng phụ phẩm nuôi gia súc nhai lại. Nhà xuất bản Nông Nghiệp, Hà Nội.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical biochemistry*, 72(1-2): 248-254.

Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T.G. (2004). Taxonomic Outline of the Prokaryotes, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition, Release 5.0. Springer-Verlag, New York, pp. 1-399.

Li-Jung Yin, H. H. L, and Zheng, R.X (2010). Purification and characterization of a cellulase from *Bacillus subtilis* YJ1, *Journal of Marine Science and Technology*, 18(3): 466-471.

Saowapar, K., Yupa Pootaeng-on, TT., Somboon., T (2014). Screening and identification of cellulase producing bacteria isolated from oil palm meal, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(04): 090-096.

Meena, B., Radhajejalakshmi, Vidhyasekaran, P., and Velazahan, R (1999). Foliar application of *Pseudomonas fluorescens* on activities of phenylalanine ammonia lyase, chitinase and beta-1,3-glucanase and accumulation of phenolics in rice. *Actaphytopathol. Entomol. Hunga.*, 34: 307-315.