

ISOLATION OF *Bacillus* WITH ACTIVE ANTI-FISHING COLLECTIONS *Colletotrichum* spp. CAUSES ANTHRACNOSE ON PAPAYA FRUIT POSTHARVEST

Nguyen Thi Nhu Huynh¹, Quach Van Cao Thi^{1*}, Nguyen Trung Truc¹, Tran Quoc Dung²

¹Vinh Long University of Technology Education

²Party Committees of Vinh Long Province's Agencies and Enterprises

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 14/12/2022 Revised: 07/12/2022 Published: 20/12/2022	The study was conducted to isolate and select <i>Bacillus</i> strains with antifungal activity against <i>Colletotrichum</i> spp. causing anthracnose disease on papaya fruit after harvest. As a result, 12 strains of <i>Bacillus</i> were isolated from rhizospheric soil samples of papaya roots grown in Vinh Long province. The study used diffusion well method on agar and double culture method to determine antagonistic activity of isolated <i>Bacillus</i> strains on <i>Colletotrichum</i> spp. The results showed that 6/12 <i>Bacillus</i> strains showed antagonistic activity against <i>Colletotrichum</i> spp. Two bacterial strains BHL21 and BHL23 exhibited the highest antagonistic activity against <i>Colletotrichum</i> spp. with inhibition zone diameters of 20.6 mm and 18.6 mm, respectively. Based on morphological, biochemical characteristics and PCR and sequencing results of 16S rRNA gene, strain BHL21 is 100% homologous to <i>B. methylotrophicus</i> and strain BHL23 is 99.87% homologous to <i>B. amyloliquefaciens</i> on Genbank.
KEYWORDS Antifungal activity <i>Bacillus</i> <i>Colletotrichum</i> spp. Papaya fruit Postharvest	

PHÂN LẬP VI KHUẨN *Bacillus* CÓ HOẠT TÍNH ĐỐI KHÁNG NẤM *Colletotrichum* spp. GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN TRÁI ĐU ĐỦ SAU THU HOẠCH

Nguyễn Thị Như Huỳnh¹, Quách Văn Cao Thi^{1*}, Nguyễn Trung Trực¹, Trần Quốc Dũng²

¹Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long

²Đảng ủy Khối Cơ quan và Doanh nghiệp tỉnh Vĩnh Long

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 14/12/2022 Ngày hoàn thiện: 07/12/2022 Ngày đăng: 20/12/2022	Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn một số chủng vi khuẩn <i>Bacillus</i> có hoạt tính kháng nấm <i>Colletotrichum</i> spp. gây bệnh thán thư trên trái đu đủ sau thu hoạch. Kết quả nghiên cứu đã phân lập được 12 chủng vi khuẩn <i>Bacillus</i> từ mẫu đất vùng rễ cây đu đủ trồng ở tỉnh Vĩnh Long. Nghiên cứu sử dụng phương pháp giếng khuếch tán trên thạch và phương pháp cấy kép để xác định hoạt tính đối kháng của các chủng vi khuẩn <i>Bacillus</i> phân lập lên nấm <i>Colletotrichum</i> spp. Kết quả khảo sát cho thấy, có 6/12 chủng <i>Bacillus</i> thể hiện hoạt tính đối kháng với nấm <i>Colletotrichum</i> spp. Hai chủng vi khuẩn BHL21 và BHL23 thể hiện hoạt tính đối kháng cao nhất đối với nấm <i>Colletotrichum</i> spp. với đường kính vòng vô nấm lần lượt là 20,6 mm và 18,6 mm. Dựa trên kết quả quan sát các đặc điểm hình thái, sinh hóa và kết quả PCR và giải trình tự đoạn gen 16S rRNA, chủng BHL21 tương đồng 100% với vi khuẩn <i>B. methylotrophicus</i> và chủng BHL23 tương đồng 99,87% với chủng <i>B. amyloliquefaciens</i> trên ngân hàng Genbank.
TỪ KHÓA <i>Bacillus</i> <i>Colletotrichum</i> spp. Hoạt tính kháng nấm Sau thu hoạch Trái đu đủ	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6682>

* Corresponding author. Email: thiqvc@vlute.edu.vn

1. Giới thiệu

Đu đủ có tên khoa học là *Carica papaya*, thuộc họ thân thảo Caricaceae [1]. Đu đủ rất giàu vitamin A, C, polyphenol và chất chống oxy hóa nhưng rất dễ bị hỏng trong quá trình bảo quản [2]. Nấm là tác nhân gây bệnh quan trọng nhất trong quá trình thối rữa của trái cây và rau quả sau thu hoạch trong quá trình vận chuyển, bảo quản và tiếp thị [3]. Ở đu đủ, loại nấm thường tấn công trái là *C. gloeosporioides*, nấm bắt đầu lây nhiễm khi trái còn trên cây [4]. Việc sử dụng các chất đối kháng có nguồn gốc từ vi sinh vật đã được chứng minh là có thể kiểm soát một số mầm bệnh sau thu hoạch [5]. Vi khuẩn có lợi có thể đối kháng với mầm bệnh bằng cách sản xuất các hợp chất chống nấm, enzyme ly giải ngoại bào hoặc thông qua cơ chế gián tiếp kích thích hệ thống phòng thủ của vật chủ [6]. Vi khuẩn *Bacillus* được biết là có khả năng ngăn chặn các bệnh thực vật khác nhau, chẳng hạn như bệnh thán thư ở ớt đỏ [7], xoài và táo sập [8]. Nhiều nghiên cứu trên thế giới cho thấy *Bacillus* thân thiện với môi trường và có thể được kết hợp với các hệ thống kiểm soát hóa học truyền thống để giảm khả năng phát triển tính kháng của vi sinh vật [9]. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có nghiên cứu nào về khả năng ức chế bệnh thán thư trên trái đu đủ sau thu hoạch. Vì vậy, việc thực hiện nghiên cứu “Phân lập vi khuẩn *Bacillus* có hoạt tính đối kháng nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên trái đu đủ sau thu hoạch” là rất cần thiết và có ý nghĩa đối với việc bảo quản rau quả sau thu hoạch nói chung và bảo quản trái đu đủ nói riêng.

2. Nguyên liệu và phương pháp

2.1. Nguyên vật liệu

Trái đu đủ dùng để phân lập nấm *Colletotrichum* spp. và đất vùng rễ đu đủ dùng để phân lập vi khuẩn *Bacillus* được thu tại xã Phú Đức, huyện Long Hồ, tỉnh Vĩnh Long. Mẫu đất vùng rễ được thu ở 5 vị trí trong vườn và được trộn lại với nhau trước khi tiến hành phân lập vi khuẩn.

2.1.1. Phân lập và quan sát các đặc điểm hình thái nấm *Colletotrichum* spp. từ trái đu đủ

Trái đu đủ có triệu chứng điển hình của bệnh thán thư (những đốm nhỏ có màu sáng hoặc các đốm to trũng xuống như bị ngâm nước, các khối hình tròn thường tạo thành các mô hình vòng đồng tâm ở các tổn thương trũng [10]) được sử dụng để phân lập nấm *Colletotrichum* spp. Nấm *Colletotrichum* spp. được phân lập dựa theo quy trình của Araújo (2001) [11] có chỉnh sửa và bổ sung. Nấm được phân lập trên môi trường PDA (Potato Dextrose Agar, dịch chiết khoai tây (200g/L nước), 20g/L glucose và 20g agar/L, pH 7.0). Sau khi phân lập, các mẫu nấm được lây nhiễm nhân tạo trên trái đu đủ theo quy trình Koch. Các đặc điểm hình thái và bào tử của nấm được xác định theo Weir (2012) [12].

2.1.2. Định danh nấm

Nấm *Colletotrichum* spp. được định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử (PCR) và giải trình tự đoạn gen với cặp mồi ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3' và ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3' [13]. Sản phẩm PCR sẽ được gửi giải trình tự tại công ty Macrogen, Hàn Quốc (www.macrogen.com).

2.1.3. Phân lập và quan sát đặc điểm hình thái và sinh hóa vi khuẩn *Bacillus* từ đất vùng rễ cây đu đủ

Vi khuẩn *Bacillus* được phân lập trên môi trường NA (Nutrient Agar: 5g/L pepton, 5g/L NaCl, 1,5g/L beef extract, 1,5g/L yeast extract, 18g/L agar, pH 7.0). Các khuẩn lạc tiêu biểu được lựa chọn và tiến hành tách rỗng để có chủng *Bacillus* thuần. Các điểm hình thái (hình dạng, màu sắc, độ nổi, bìa) và sinh hóa cơ bản như nhuộm Gram, nhuộm bào tử, hoạt tính catalase và oxidase được xác định dựa theo tài liệu của Abussaud (2013) [14].

2.1.4. Định danh vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn có khả năng ức nấm *Colletotrichum* spp. cao nhất là BHL21 và BHL23 được chọn định danh bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự đoạn gen 16S rRNA với cặp mồi 27F: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' và 1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3' [15]. Quy trình định danh vi khuẩn được thực hiện theo phương pháp của Sanger (1975) [16]. Sản phẩm PCR sẽ được gửi giải trình tự tại công ty MacroGen, Hàn Quốc (www.macrogen.com).

2.2. Khảo sát hoạt tính kháng nấm của vi khuẩn *Bacillus*

Khảo sát khả năng đối kháng bằng phương pháp khuếch tán đĩa (Disk Diffusion Method)

Hoạt tính đối kháng của vi khuẩn *Bacillus* đối với nấm *Colletotrichum* spp. được thực hiện bằng phương pháp khuếch tán trên giềng thạch của Abussaud (2013) [14] có hiệu chỉnh và bổ sung. Các bước thực hiện bao gồm: vi khuẩn *Bacillus* được nuôi tăng sinh trong thời gian là 24 giờ trong môi trường NB (Nutrient broth: 5g/L pepton, 5g/L NaCl, 1,5g/L beef extract, 1,5g/L yeast extract, pH 7.0) ở nhiệt độ 30°C. Sau đó, dịch tăng sinh được ly tâm từ 8.000 - 10.000 vòng/phút ở 4°C trong thời gian 10 phút. Hút 80 µL dịch trong (chứa chất kháng nấm) của vi khuẩn cho vào giềng đã được đục có kích thước 8 mm trên môi trường PDA đã được trải bào tử nấm *Colletotrichum* spp. ở mật số là 10^6 bào tử/mL. Tiến hành đo đường kính vòng vô nấm và ghi nhận kết quả sau 3 ngày.

Khảo sát khả năng đối kháng bằng phương pháp cấy kép (double culture method)

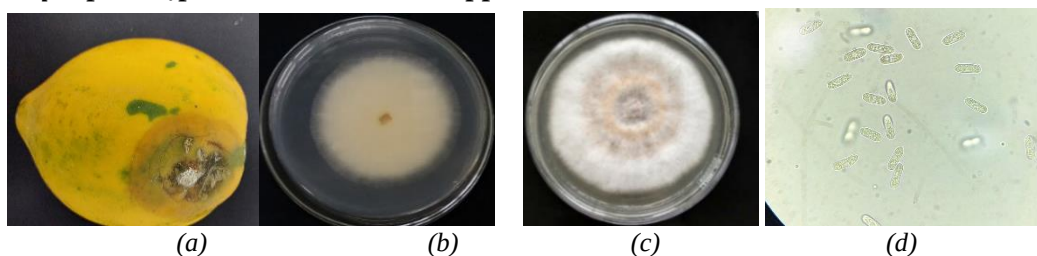
Hoạt tính đối kháng của vi khuẩn *Bacillus* được thực hiện bằng phương pháp cấy kép của Nguyễn Thị Liên (2016) [17] có hiệu chỉnh và bổ sung. Các bước thực hiện bao gồm: cấy hai đường cấy vi khuẩn *Bacillus* trên môi trường PDA có bổ sung NA thành hai đường cấy dài 2-3 cm song song và cách nhau 2-3 cm. Cắt một khối nấm có kích thước 8 mm đặt vào giữa hai đường cấy vi khuẩn. Tiến hành quan sát và ghi nhận sự phát triển của nấm trong 7 ngày.

2.3. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel và Minitab 20. Phân tích phương sai (ANOVA) một nhân tố và kiểm định LSD với độ tin cậy 95%. Sử dụng công cụ BLASTn để kiểm tra mức độ tương đồng của chủng vi khuẩn *Bacillus* và nấm trên cơ sở dữ liệu NCBI.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả phân lập nấm *Colletotrichum* spp. từ trái đu đủ



Hình 1. (a). Trái đu đủ bệnh được chọn để phân lập nấm *Colletotrichum* spp., (b). Nấm sau 5 ngày nuôi cấy, (c). Nấm xuất hiện giọt dầu sau 7 ngày nuôi cấy, (d). Bào tử nấm được xem ở vật kính 100X

Từ mẫu đu đủ bị bệnh thán thư (Hình 1a), nghiên cứu đã phân lập được 2 chủng nấm *Colletotrichum* spp. trên môi trường PDA. Kết quả quan sát nấm *Colletotrichum* spp. phân lập sau 7 ngày cho kết quả đường kính của tán nấm đạt kích thước 60-70 mm (Hình 1b), tơ nấm dày có màu trắng (Hình 1c). Sau 10 ngày nuôi cấy thì hình thành vòng tròn đồng tâm màu cam, được tạo thành bên trong tán nấm và xuất hiện những giọt dầu lẫn trong các tơ nấm (Hình 1c). Quan sát bào tử bằng kính hiển vi quang học ở vật kính 100X cho thấy bào tử nấm có dạng trụ hình trụ, một đầu nhọn một đầu tròn, màu trắng và không có vách ngăn (Hình 1d), các đặc điểm trên phù hợp với miêu tả của Damm (2012) [18] về bào tử nấm *Colletotrichum* spp. Từ kết quả quan sát đặc điểm về hình thái khuẩn ty nấm, bào tử cho thấy có sự tương đồng với các kết quả nghiên cứu đã được công bố trước đây về nấm *Colletotrichum* spp. trên trái thanh long [19], trái đu đủ [20].

Kết quả lây nhiễm cho thấy, hai chủng nấm phân lập được là nấm *Colletotrichum* spp. do sau khi lây nhiễm cho thấy các vết bệnh có các đặc điểm: vết thương hình tròn trũng lõn có màu nâu sẫm đến đen, các đặc điểm trên giống với triệu chứng của bệnh thán thư trên trái bơ [21], trái đu đủ [22]. Từ kết quả lây nhiễm cho thấy, chủng nấm TD1 có động lực gây bệnh cao nên được chọn để thực hiện thí nghiệm sau.

3.2. Kết quả định danh nấm

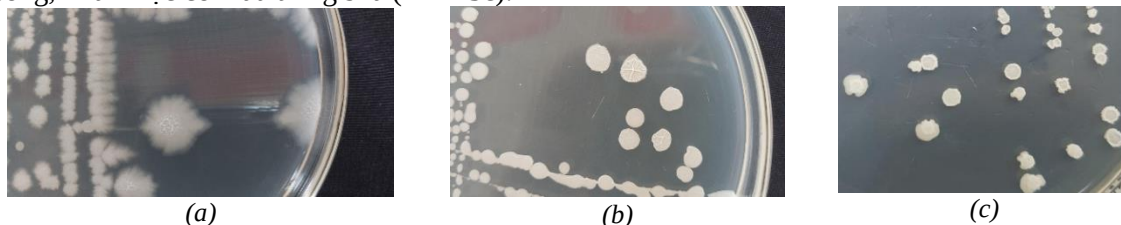
Kết quả giải trình tự cho thấy, chủng nấm TD1 tương đồng 99,25% với loài *C. fruticicola* strain YCH09 (MT579614.1), 99,06% với loài *C. fruticicola* strain YCH32 (MT626035.1) và 99,06% với loài *C. fruticicola* strain YCH23 (MT626034.1) trên ngân hàng NCBI (Hình 2).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ Colletotrichum fruticicola strain YCH09 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tra...	Colletotrichum f...	961	961	98%	0.0	99.25%	579	MT579614.1
☐ Colletotrichum fruticicola strain YCH09 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tra...	Colletotrichum f...	961	961	98%	0.0	99.25%	579	MT704607.1
☐ Colletotrichum fruticicola strain YCH32 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tra...	Colletotrichum f...	957	957	98%	0.0	99.06%	578	MT626035.1
☐ Colletotrichum fruticicola strain YCH23 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tra...	Colletotrichum f...	955	955	98%	0.0	99.06%	569	MT626034.1

Hình 2. Kết quả so sánh trình tự chủng nấm TD1 với ngân hàng gen NCBI

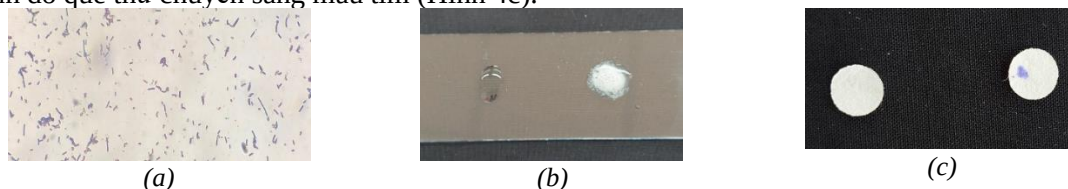
3.3. Kết quả phân lập vi khuẩn *Bacillus* từ đất vùng rễ đu đủ

Từ 3 mẫu đất vùng rễ đu đủ, nghiên cứu đã phân lập được 12 chủng vi khuẩn *Bacillus* trên môi trường NA ở huyện Long Hồ, tỉnh Vĩnh Long. Kết quả quan sát về các đặc điểm hình thái khuẩn lạc vi khuẩn cho thấy, sau khi tách rỗng các chủng *Bacillus* phát triển mạnh sau 24-36 giờ nuôi cấy. Đặc điểm hình dạng khuẩn lạc đa dạng và thường có màu trắng, các hình dạng phổ biến thường gặp là khuẩn lạc không đều, bẹp, bề mặt không bóng ướt, nhẵn nhéo, bìa lượn sóng, khuẩn lạc có màu trắng đục (Hình 3a). Chủng vi khuẩn BHL21 có dạng khuẩn lạc hình tròn, bẹp, bề mặt không bóng ướt, nhẵn nhéo, bìa nguyên, khuẩn lạc có màu trắng sữa (Hình 3b). Chủng vi khuẩn BHM5 có dạng khuẩn lạc hình tròn, lõm, bề mặt không bóng ướt, nhẵn nhéo, bìa lượn sóng, khuẩn lạc có màu trắng sữa (Hình 3c).



Hình 3. (a). Chủng BHM2, (b). Chủng BHL21, (c). Chủng BHM5

Kết quả nhuộm Gram cho thấy, vi khuẩn là Gram dương do bắt màu xanh tím của thuốc nhuộm (Hình 4a), catalase dương tính do có hiện tượng sủi bọt khí (Hình 4b) và oxidase dương tính do que thử chuyển sang màu tím (Hình 4c).

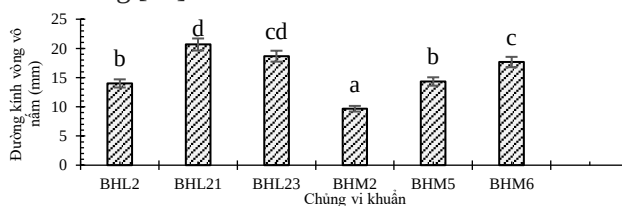
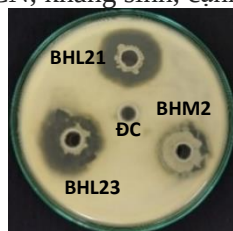


Hình 4. (a). Nhuộm Gram bắt màu xanh tím, (b). Thử nghiệm catalase dương tính, (c). Thử nghiệm oxidase dương tính

3.4. Kết quả khảo sát tính kháng nấm của vi khuẩn *Bacillus*

Khảo sát khả năng đối kháng bằng phương pháp khuếch tán đĩa

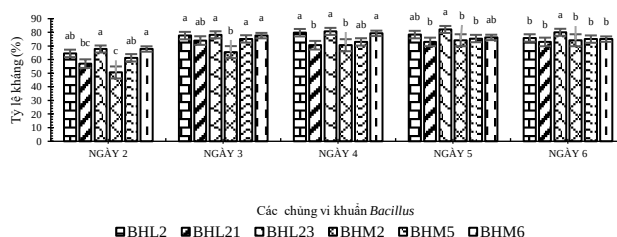
Kết quả khảo sát hoạt tính kháng nấm của vi khuẩn *Bacillus* (Hình 5) cho thấy có 6/12 chủng *Bacillus* thể hiện hoạt tính đối kháng với nấm *Colletotrichum* chủng TD1. Trong đó, có 3/12 chủng vi khuẩn *Bacillus* thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh (chiếm 25%), 2/6 chủng vi khuẩn *Bacillus* thể hiện hoạt tính đối kháng trung bình (chiếm 16,6%) và 1/6 chủng vi khuẩn *Bacillus* thể hiện hoạt tính đối kháng yếu (chiếm 8,3%). Hai chủng BHL21 và BHL23 thể hiện hoạt tính đối kháng cao nhất với đường kính vòng vô nấm lần lượt là 20 mm và 18 mm. Kết quả trên tương tự với kết quả của Hailmi và cộng sự (2017) [23]. Sự hình thành các vùng ức chế có thể là do vi khuẩn *Bacillus* sản xuất các chất kháng khuẩn như chitinolytic enzymes, laminarinase, cellulase, HCN, kháng sinh, cạnh tranh về dinh dưỡng [24].



Hình 5. Khả năng kháng nấm của vi khuẩn *Bacillus* qua phương pháp khuếch tán đĩa

Khảo sát khả năng đối kháng bằng phương pháp cấy kép

Kết quả khảo sát hoạt tính kháng nấm của vi khuẩn *Bacillus* (Hình 6) cho thấy, có 6/12 chủng *Bacillus* thể hiện hoạt tính đối kháng với nấm *Colletotrichum* spp. Trong đó, chủng BHL21 là chủng có hoạt tính đối kháng mạnh nhất với tỷ lệ kháng 79%. Kết quả trên tương tự với kết quả của Girish và Prabhavathi (2019) [25]. Kết quả cho thấy, vi khuẩn *Bacillus* có thể làm suy giảm oxalic acid bằng cách sản xuất oxalate oxidase. Nó có thể là một trong những yếu tố để ức chế sự phát triển của nấm [26].



Hình 6. Khả năng kháng nấm của chủng vi khuẩn BHL21 qua phương pháp cấy kép

3.5. Kết quả định danh vi khuẩn

Kết quả giải trình tự cho thấy, chủng BHL21 tương đồng 100% với vi khuẩn *B. methylotrophicus* strain CSY-F1 (KF010916.1), tương đồng 99,84% với *B. amyloliquefaciens* strain SEE-3 (MN826326.1) và tương đồng 99,84% với *B. velezensis* strain JS12Q với mức độ (KX129853.1) (Hình 7).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒ Bacillus methylotrophicus strain CSY-F1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus velezensis	1127	1127	98%	0.0	100.00%	1456	KF010916.1
☐ Uncultured bacterium clone L63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	uncultured bacterium	1125	1125	99%	0.0	99.84%	1450	KJ554997.1
☐ Bacillus amyloliquefaciens strain SEE-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus amyloliquefaciens	1123	1123	99%	0.0	99.84%	1065	MN826326.1
☐ Bacillus amyloliquefaciens strain BM3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus amyloliquefaciens	1123	1123	99%	0.0	99.51%	1441	MN809367.1
☐ Bacillus amyloliquefaciens strain 15535 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus amyloliquefaciens	1123	1123	99%	0.0	99.84%	1459	MN630201.1
☐ Bacillus velezensis strain JS12Q 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus velezensis	1123	1123	99%	0.0	99.84%	1453	KX129853.1

Hình 7. Kết quả đối chiếu trình chỉnh vi khuẩn BHL21 với ngân hàng gen

Trong khi đó, kết quả giải trình tự và đối chiếu với ngân hàng gen (Hình 6) cho thấy, chủng BHL23 với *B. amyloliquefaciens* strain C-2 SSK-8 mức độ tương đồng là 99,87% (MK501609.1), *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* strain Ns3-4 với mức độ tương đồng là

99,87% (HQ831407.1), *B. subtilis* strain ZWZ-19 với mức độ tương đồng là 99,87%, (MT271990.1) (Hình 8).

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Bacillus amyloliquefaciens strain C-2 SSK-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus amyloliquefaciens...	1463	1463	99%	0.0	99.87%	1020	MK501609.1
☐	Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum strain Ns3-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus velezensis	1463	1463	99%	0.0	99.87%	1450	HQ831407.1
☐	Bacillus methylotrophicus strain HGPY-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus velezensis	1461	1461	99%	0.0	99.87%	1465	KR708855.1
☐	Bacillus methylotrophicus strain L01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus velezensis	1461	1461	99%	0.0	99.87%	1453	JN700132.1
☐	Bacillus amyloliquefaciens strain A3-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus amyloliquefaciens...	1461	1461	99%	0.0	99.87%	1436	JF496342.1
☐	Bacillus subtilis strain ZWZ-19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Bacillus subtilis	1459	1459	99%	0.0	99.87%	1455	MT271990.1

Hình 8. Kết quả đối chiếu trình chỉnh vi khuẩn BHL23 với ngân hàng gen

Các kết quả đã báo cáo trước đây cho thấy vi khuẩn *Bacillus methylotrophicus* có khả năng ức chế >70% nấm *Colletotrichum lagenarium* [27] và *Bacillus amyloliquefaciens* cũng thể hiện hoạt tính kháng nấm *C. lagenarium* nhờ tạo ra enzyme β -1,3-glucanase ngoại bào [28] là một enzyme quan trọng trong việc phân hủy thành tế bào của sợi nấm [29]. *B. subtilis* đã cho thấy khả năng kháng nấm *C. acutatum* với vùng ức chế là (5 – 12 mm) [30].

4. Kết luận

Từ 2 mẫu đất vùng rễ nghiên cứu đã phân lập và tuyển chọn được 6 chủng vi khuẩn *Bacillus* có hoạt tính đối kháng với nấm *Colletotrichum* spp. Dựa trên kết quả quan sát các đặc điểm hình thái, sinh hóa và kết quả PCR và giải trình tự đoạn gen 16S rRNA, chủng BHL21 tương đồng 100% với vi khuẩn *Bacillus methylotrophicus* và BHL23 thuộc loài *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* với độ tương đồng là 99,87% trên ngân hàng Genbank.

Lời cảm ơn

Nhóm nghiên cứu xin cảm ơn Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện đề tài, cảm ơn nhà vườn đã hỗ trợ cung cấp mẫu đất để thực hiện nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] L. Tona, K. Kambu, N. Ngimbi, K. Cimanga, and A. J. Vlietinck, "Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants," *Journal of ethnopharmacology*, vol. 61, no. 1, pp. 57-65, 1998.
- [2] F. O. Adetuyi, T. A. Ayileye, and I. B. O. Dada, "Comparative study of quality changes in shea butter coated pawpaw *Carica papaya* fruit during storage," *Pakistan Journal of Nutrition*, vol. 7, no. 5, pp. 658-662, 2008.
- [3] M. A. Gatto, A. Ippolito, V. Linsalata, N. A. Cascarano, F. Nigro, S. Vanadia, and D. Di Venere, "Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 61, no. 1, pp. 72-82, 2011.
- [4] A. M. Alvarez and W. T. Nishijima, "Postharvest diseases of papaya," *Plant Disease*, vol. 71, no. 8, pp. 681-686, 1987.
- [5] S. Parthasarathy, J. Rajalakshmi, P. Narayanan, K. Arunkuma, and K. Prabakar, "Bio-control potential of microbial antagonists against post-harvest diseases of fruit crops: A review Res Rev J. Bot," *Sci.*, vol. 6, no. 1, pp. 17-23, 2017.
- [6] A. Heydari and M. Pessarakli, "A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists," *Journal of biological sciences*, vol. 10, no. 4, pp. 273-290, 2010.
- [7] G. W. Lee, M. J. Kim, J. S. Park, J. C. Chae, J. J. Soh, and K. J. Lee, "Biological control of Phytophthora blight and anthracnose disease in red-pepper using *Bacillus subtilis* S54," *Research in Plant Disease*, vol. 17, no. 1, pp. 86-89, 2011.
- [8] R. On-Uma, C. Chi-I, A. L. Senghor, and L. Wen-Jinn, "Identification of antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* LB5 with ability to control anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides*," *African Journal of Microbiology Research*, vol. 6, no. 16, pp. 3732-3738, 2012.
- [9] M. Ongena and P. Jacques, "*Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol," *Trends in microbiology*, vol. 16, no. 3, pp. 115-125, 2008.

- [10] P. John and J. Marchal, "Ripening and biochemistry of the fruit," In *Bananas and plantains*. Springer, Dordrecht, pp. 434-467, 1995.
- [11] W. L. Araújo, W. Maccheroni Jr, C. I. Aguilar-Vildoso, P. A. Barroso, H. O. Saridakis, and J. L. Azevedo, "Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks," *Canadian Journal of microbiology*, vol. 47, no. 3, pp. 229-236, 2001.
- [12] B. S. Weir, P. R. Johnston, and U. Damm, "The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex," *Stud Mycol*, vol. 73, pp. 115-180, 2012.
- [13] T. J. White, T. Bruns, S. J. W. T. Lee, and J. Taylor, "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics," *PCR protocols: a guide to methods and applications*, vol. 18, no. 1, pp. 315-322, 1990.
- [14] M. J. Abussaud, L. Alanagreh, and K. Abu-Elteen, "Isolation, characterization and antimicrobial activity of *Streptomyces* strains from hot spring areas in the northern part of Jordan," *African Journal of Biotechnology*, vol. 2, no. 51, pp. 7124-7132, 2013.
- [15] W. G. Weisburg, S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane, "16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study," *Journal of Bacteriology*, vol. 173, no. 2, pp. 697-703, 1991.
- [16] F. Sanger and Alan R. Coulson, "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase," *Journal of molecular biology*, vol. 94, no. 3, pp. 441-448, 1975.
- [17] T. L. Nguyen, T. Y. N. Nguyen, T. X. M. Tran, and T. P. Nguyen, "Isolation and selection of bacteria from the soil from the chilli rhizosphere that are resistant to *Colletotrichum* spp. causing anthracnose on chili peppers," *Can Tho University Science Book*, vol. 47b, pp. 16-23, 2016.
- [18] U. Damm, P. F. Cannon, and P. W. Crous, "*Colletotrichum*: complex species or species complexes," *Studies in Mycology*, vol. 73, pp. 1-215, 2012.
- [19] S. Pei, R. Liu, H. Gao, H. Chen, W. Wu, X. Fang, and Y. Han, "Inhibitory effect and possible mechanism of carvacrol against *Colletotrichum fruticola*," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 163, 2020, Art. no. 111126.
- [20] I. Marquez-Zequera, I. Cruz-Lachica, N. Ley-Lopez, J. A. Carrillo-Facio, L. A. Osuna-Garcia, and R. S. Garcia-Estrada, "First report of *Carica papaya* fruit anthracnose caused by *Colletotrichum fruticola* in Mexico," *Plant disease*, vol. 102, no. 12, pp. 2649-2649, 2018.
- [21] S. K. Kimaru, E. Monda, R. C. Cheruiyot, J. Mbaka, and A. Alakonya, "Morphological and molecular identification of the causal agent of anthracnose disease of avocado in Kenya," *International Journal of Microbiology*, vol. 2018, pp. 1-10, 2018.
- [22] M. Aktaruzzaman, T. Afroz, Y. G. Lee, and B. S. Kim, "Post-harvest anthracnose of papaya caused by *Colletotrichum truncatum* in Korea," *European journal of plant pathology*, vol. 150, no. 1, pp. 259-265, 2018.
- [23] M. S. Hailmi, W. N. Wahida, N. A. Badaluddin, T. A. Abdullah, Z. F. A. Aziz, and J. Kadir, "Potential of *Pseudomonas* sp.(UniSZA-MKB10) and *Bacillus* spp. (UniSZA-BK3, UniSZA-BK4 and UniSZA-DA) as biological control agent for controlling anthracnose disease of *Carica papaya* L.," *Journal of Agrobiotechnology*, vol. 8, no. 2, pp. 64-76, 2017.
- [24] Glick and R. Bernard, "The enhancement of plant growth by free-living bacteria," *Canadian Journal of microbiology*, vol. 41, no. 2, pp. 109-117, 1995.
- [25] K. Girish and H. R. Prabhavathi, "Antifungal activity of bacteria against the phytopathogens of papaya (*Carica papaya* L.)," *EurAsian Journal of BioSciences*, vol. 13, no. 1, pp. 83-91, 2019.
- [26] B. K. Sarma, U. P. Singh, and K. P. Singh, "Variability in Indian isolates of *Sclerotium rolfsii*," *Mycologia*, vol. 94, no. 6, pp. 1051-1058, 2002.
- [27] B. Ge *et al.*, "*Bacillus methylotrophicus* strain NKG-1, isolated from Changbai Mountain, China, has potential applications as a biofertilizer or biocontrol agent," *PloS one*, vol. 11, no. 11, 2016, Art. no. e0166079.
- [28] P. I. Kim and K.-C. Chung, "Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 234, no. 1, pp. 177-183, 2004.
- [29] T.-Y. Hong and M. Meng, "Biochemical characterization and antifungal activity of an endo-1, 3- β -glucanase of *Paenibacillus* sp. isolated from garden soil," *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 61, no. 5, pp. 472-478, 2003.
- [30] S. Živković *et al.*, "Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*," *Archives of Biological Sciences*, vol. 62, no. 3, pp. 611-623, 2010.