

## LACTIC ACID BACTERIA WITH ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST *Colletotrichum* spp. CAUSING ANTHRACNOSE DISEASE IN HARVESTED MANGOES CULTIVAR CAT HOA LOC

Nguyen Anh Linh, Quach Van Cao Thi, Nguyen Trung Truc\*

Nguyen Thi Nhu Huynh, Nguyen Thi Yen Nhi

Vinh Long University of Technology Education

| ARTICLE INFO                                                                                                                                                      | ABSTRACT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Received:</b> 07/12/2022</p> <p><b>Revised:</b> 09/4/2023</p> <p><b>Published:</b> 13/4/2023</p>                                                            | <p>This study aims to isolate and select lactic acid bacteria from 'kimchi' fermented food that had the ability to inhibit the fungus <i>Colletotrichum</i> spp. causing anthracnose disease in 'Cat Hoa Loc' mangoes after harvest. As a result, 6 strains of lactic acid bacteria were isolated from 'kimchi' samples from Vinh Long market. The study used the dual-culture overlay method and the double transplanting method to investigate the antagonistic activity of bacteria. The results showed that there were 3 strains LKC1, LKC2, and LKC3 indicating antagonistic activity against <i>Colletotrichum</i> spp. Bacterial strain LKC1 exhibited the highest antagonistic activity against <i>Colletotrichum</i> spp. with 60.41% at day 2 by the dual-culture overlay method and 64.86% at day 3 by the double transplanting method. The LKC1 strain was 100% similar to that of <i>Lactobacillus plantarum</i> based on morphological observations and gene sequencing.</p> |
| <p><b>KEYWORDS</b></p> <p>Anthracnose</p> <p>Cat Hoa Loc mango</p> <p><i>Colletotrichum</i> spp.</p> <p>Lactic bacteria</p> <p><i>Lactobacillus plantarum</i></p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

## HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM *Colletotrichum* spp. GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN TRÁI XOÀI CÁT HÒA LỘC SAU THU HOẠCH CỦA VI KHUẨN LACTIC

Nguyễn Ánh Linh, Quách Văn Cao Thi, Nguyễn Trung Trục\*

Nguyễn Thị Như Huỳnh, Nguyễn Thị Yến Nhi

Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long

| THÔNG TIN BÀI BÁO                                                                                                                                                 | TÓM TẮT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Ngày nhận bài:</b> 07/12/2022</p> <p><b>Ngày hoàn thiện:</b> 09/4/2023</p> <p><b>Ngày đăng:</b> 13/4/2023</p>                                               | <p>Mục đích của nghiên cứu này nhằm thu thập và sàng lọc các chủng vi khuẩn lactic từ thực phẩm lên men kim chi có khả năng ức chế nấm <i>Colletotrichum</i> spp. gây bệnh thán thư trên quả xoài Cát Hòa Lộc sau thu hoạch. Sáu chủng vi khuẩn lactic được phân lập từ mẫu sản phẩm lên men kim chi thu được từ chợ Vĩnh Long. Hoạt tính kháng nấm bệnh của vi khuẩn lactic được thực hiện bằng phương pháp nuôi cấy kép (dual-culture overlay method) và phương pháp cấy kép (double transplanting method). Hoạt tính đối kháng nấm <i>Colletotrichum</i> spp. trong quả nghiên cứu được tìm thấy ở 3 chủng LKC1, LKC2 và LKC3. Chủng LKC1 cho kết quả đối kháng cao nhất, cụ thể là 60,41% ở ngày thứ 2 bằng phương pháp lớp phủ nuôi cấy kép và 64,86% ở ngày thứ 3 bằng phương pháp cấy kép. Chủng vi khuẩn LKC1 tương đồng 100% với loài <i>Lactobacillus plantarum</i> trên ngân hàng Genbank qua kết quả kiểm tra hình thái khuẩn lạc và giải trình tự nucleotide của đoạn gen 16S rRNA.</p> |
| <p><b>TỪ KHÓA</b></p> <p>Bệnh thán thư</p> <p>Xoài Cát Hòa Lộc</p> <p><i>Colletotrichum</i> spp.</p> <p>Vi khuẩn lactic</p> <p><i>Lactobacillus plantarum</i></p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.7069>

\* Corresponding author. Email: [trucnt@vlute.edu.vn](mailto:trucnt@vlute.edu.vn)

## 1. Giới thiệu

Xoài thuộc nhóm trái cây nhiệt đới được trồng cho mục đích thương mại ở nhiều quốc gia trên thế giới. Xoài chứa nhiều chất xơ, vitamin, carotenoids và nhiều chất có hoạt tính chống oxy hóa [1], [2]. Tuy nhiên, xoài sau khi thu hoạch dễ bị bệnh và hư hỏng. Bệnh thán thư (anthracnose) do nấm *Colletotrichum* spp. là nguyên nhân chính dẫn đến sự hư hỏng của trái xoài sau thu hoạch. Bệnh này thường gặp trong suốt quá trình vận chuyển và tồn trữ ở tất cả các khu vực sản xuất xoài trên thế giới [3]. Để duy trì chất lượng và kéo dài thời gian tồn trữ của xoài Cát Hòa Lộc sau thu hoạch, việc áp dụng các phương pháp xử lý sau thu hoạch là điều cần thiết. Nhiều biện pháp được áp dụng nhằm làm giảm thiệt hại do bệnh thán thư gây ra như sử dụng thuốc hóa học nhưng tồn dư thuốc có thể tác động xấu đến sức khỏe người tiêu dùng và gây ô nhiễm môi trường. Một biện pháp khác được áp dụng là xử lý hơi nước nóng nhưng việc kiểm soát đồng nhất nhiệt độ gặp khó khăn nên xoài thường bị tổn thương do nhiệt [4]. Do đó, các biện pháp khác được khuyến cáo đó là khai thác tiềm năng của vi sinh vật đối kháng. Do tính an toàn và khả năng đối kháng cao nên hiện nay bacteriocin do vi khuẩn lactic sinh ra đang được nghiên cứu rộng rãi [5]. Bacteriocin là những protein hoặc phức hợp protein có hoạt tính kháng nấm [6]. Những nghiên cứu về vi khuẩn lactic kháng bệnh trên quả đã được công bố như sử dụng *Lactobacillus plantarum* chống lại sự phát triển của nấm *Penicillium Expansum* trên trái táo (*in vitro*) [7], *Lactococcus lactis* subsp. đối kháng nấm bệnh *Rhizopus stolonifer* VBAM1 trên trái mít (*in vitro*) [8]. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào ứng dụng vi khuẩn lactic để kiểm soát bệnh thán thư trên xoài. Do vậy, việc nghiên cứu hoạt tính kháng nấm của vi khuẩn lactic phân lập từ thực phẩm lên men truyền thống sẽ là hướng đi mới nhằm kiểm soát bệnh thán thư gây ra bởi nấm *Colletotrichum* spp. trên trái xoài sau thu hoạch. Đồng thời, phương pháp này có tiềm năng thay thế cho phương pháp sử dụng thuốc hóa học truyền thống.

## 2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Phân lập nấm *Colletotrichum* spp. từ trái xoài Cát Hòa Lộc

Trái xoài Cát Hòa Lộc với các dấu hiệu của bệnh thán thư như các chấm tròn li ti, màu nâu nhạt hoặc đốm tròn lớn màu nâu đậm, nhiều vết bệnh liên kết lại tạo thành vết bất dạng [9] được dùng cho việc phân lập nấm *Colletotrichum* spp. Nấm được phân lập theo quy trình của Araújo và cộng sự (2001) [10] có chỉnh sửa và bổ sung. Trái xoài được khử trùng bề mặt bằng cồn 70%. Cắt mẫu bệnh (chọn vị trí bao gồm cả mô bệnh và mô khỏe) với kích thước 5 x 5 mm cho vào Javel 2%, để yên 2-3 phút, rửa mẫu với nước cất tiệt trùng 3 lần (mỗi lần 1 phút), đặt mẫu lên giấy vô trùng để khô. Sau đó, đặt mẫu lên thạch PDA (Potato Dextrose Agar, dịch chiết khoai tây (200 g/L nước), 20 g/L glucose và 20 g agar/L, pH 7.0), trữ mẫu ở nhiệt độ 25 - 30°C. Các mẫu nấm sau khi phân lập được lây bệnh nhân tạo trên trái xoài theo quy trình Koch để xác định khả năng gây bệnh của chủng nấm. Các bước thực hiện gồm: chuẩn bị trái xoài không bị bệnh, vệ sinh sạch sẽ, sau đó để khô rồi gây vết thương lên 3 vị trí của trái. Dịch bào tử *Colletotrichum* spp. ( $10^6$  bào tử/mL) được phun lên 3 vị trí vết thương. Trái xoài sau khi lây nhiễm sẽ được bảo quản trong thời gian 14 ngày ở nhiệt độ phòng. Đối với nghiệm thức đối chứng thì không phun dịch bào tử nấm mà được thay bằng nước cất vô trùng. Các biểu hiện bệnh trên trái xoài được quan sát hàng ngày và chọn mẫu nấm có khả năng gây bệnh tương tự ngoài tự nhiên để tiếp tục nghiên cứu.

### 2.2. Xác định nấm *Colletotrichum* spp.

Nấm *Colletotrichum* spp. được định danh sơ bộ dựa vào các đặc điểm hình thái khuẩn ty và bào tử của Sutton (1980) [11]. Từ kết quả gây nhiễm, lựa chọn chủng nấm có hoạt lực gây bệnh cao nhất để định danh nấm *Colletotrichum* spp. bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự đoạn gen 5,8S với cặp mồi ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3' và ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3' [12]. Sản phẩm PCR (kích thước đoạn gen trong khoảng

350-880 bp) sau khi khuếch đại được điện di trên gel agarose 1,5% và chụp hình bằng hệ thống chụp hình gel, sau đó được gửi giải trình tự để xác định loài nấm.

### 2.3. Phân lập vi khuẩn lactic từ thực phẩm lên men kim chi

Các mẫu thực phẩm lên men kim chi được sử dụng để phân lập vi khuẩn lactic. Mẫu được pha loãng thành các độ pha loãng từ  $10^{-1}$  cho đến  $10^{-4}$ . Sau đó, hút 100  $\mu$ L mẫu đã pha loãng trải đều lên đĩa petri đã đổ môi trường MRS (glucose (20 g/L),  $\text{CaCO}_3$  (5 g/L), meat extract (8 g/L), yeast extract (4 g/L), pepton from casein (10 g/L), tween 80 (1 mL/L),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (2 g/L), sodium acetat (5 g/L), triamonium citrate (2 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2 g/L),  $\text{MnSO}_4$  (0,05 g/L), agar (20 g/L), pH 6,5). Ủ mẫu ở nhiệt độ 25 - 30°C. Các điểm hình thái khuẩn lạc vi khuẩn lactic sau khi tách rỗng như hình dạng, màu sắc, độ nổi, bìa và sinh hóa cơ bản như nhuộm Gram, kiểm tra hoạt tính catalase được xác định dựa theo CoWan và cộng sự (1965) [13].

### 2.4. Đánh giá hoạt tính kháng nấm *Colletotrichum* spp. của vi khuẩn lactic (In vitro test)

#### 2.4.1. Phương pháp nuôi cấy kép (Dual-culture overlay method)

Nghiên cứu sử dụng phương pháp nuôi cấy kép (Dual-culture overlay method) của Magnusson và Schnurer (2001) [14] để đánh giá hoạt tính kháng nấm *Colletotrichum* spp. của vi khuẩn lactic. Cây vi khuẩn lactic thuần thành hai đường song song dài 2-3 cm trên môi trường MRS (không chứa  $\text{CaCO}_3$ , có bổ sung dịch chiết khoai tây), ủ ở nhiệt độ 30°C trong 24 giờ. Sau đó tiến hành đổ kép môi trường PDA bán rắn (0,7% agar) đã được bổ sung bào tử nấm *Colletotrichum* spp. (mật số  $10^6$  bào tử/mL) lên các đĩa thạch đã cấy vi khuẩn, ủ ở nhiệt độ 30°C, 24 giờ. Khả năng kháng nấm được xác định bằng cách đo (chiều ngang, chiều dọc) vùng kháng nấm qua các ngày quan sát và ghi nhận kết quả. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

#### 2.4.2. Phương pháp cấy kép (Double transplanting method)

Các bước tiến hành theo phương pháp của Sertaç và cộng sự (2014) [15] có điều chỉnh như sau: Cấy vi khuẩn lactic thuần lên môi trường MRS thành hai đường song song có độ dài từ 2-3 cm và cách nhau từ 2-3 cm. Sau đó cấy sợi nấm *Colletotrichum* spp. được đục bằng ống cork borer có đường kính 8 mm vào giữa hai đường cấy, ủ ở nhiệt độ 30°C, 24 giờ. Khả năng kháng nấm của vi khuẩn lactic được ghi nhận qua các ngày quan sát. Các thí nghiệm lặp lại 3 lần.

### 2.5. Định danh vi khuẩn lactic

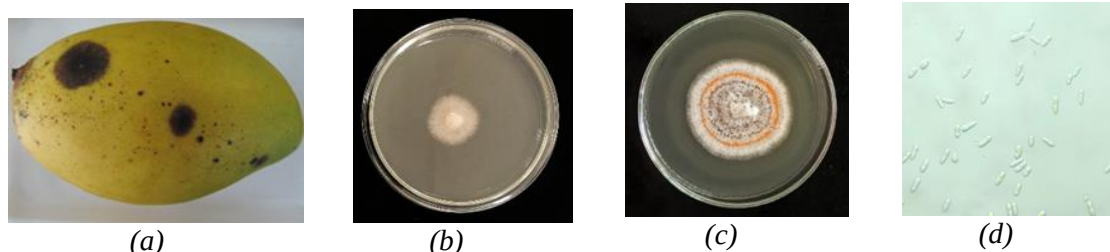
Các chủng vi khuẩn lactic có hoạt tính ức chế nấm *Colletotrichum* spp. cao nhất được chọn để định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử PCR và giải trình tự gen 16S rRNA với cặp mồi gồm 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3') và 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTACGACT-3').

## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Kết quả phân lập nấm *Colletotrichum* spp. từ trái xoài Cát Hòa Lộc

Từ trái xoài Cát Hòa Lộc bị bệnh thán thư (Hình 1a), phân lập được 3 mẫu nấm có đặc điểm giống với *Colletotrichum* spp. trên môi trường PDA. Sau 3 ngày nuôi cấy, nhiệt độ 25 - 30°C, các mẫu nấm phân lập đạt kích thước 20-30 mm có các đặc điểm như sợi nấm mảnh, màu trắng, bám chặt bề mặt thạch, tản nấm màu trắng đến trắng xám, mọc thành hình tròn đều (Hình 1b). Sau 6 ngày, trên bề mặt tản nấm xuất hiện giọt dầu màu cam mọc thành đường tròn, mọc vòng thành những đường tròn đồng tâm (Hình 1c). Quan sát bào tử bằng kính hiển vi ở vật kính 40X cho thấy bào tử nấm hình trụ, có dạng thắt eo, hai đầu tròn hoặc một đầu tròn một đầu hơi nhọn (Hình 1d). Từ kết quả quan sát cho thấy, những đặc điểm về hình thái khuẩn ty, bào tử nấm giống với kết quả của các nghiên cứu đã được công bố trước đây về nấm *Colletotrichum* spp. trên trái măng cầu [16], trái xoài [17], [18], trái thanh long [19].

Kết quả gây nhiễm cho thấy, các chủng nấm phân lập được là nấm *Colletotrichum* spp. do sau khi lây nhiễm các vết bệnh có các đặc điểm như vết thương tạo thành trũng lớn, có hình tròn, màu nâu sẫm đến đen, các đặc điểm trên giống với các nghiên cứu về triệu chứng của bệnh thán thư trên trái ổi [20], trái thanh long [21], trái dâu tây [22], trái xoài [23]. Kết quả gây nhiễm cho thấy chủng nấm *Colletotrichum* TX1 có hoạt lực gây bệnh cao nhất nên được chọn để thực hiện thí nghiệm.



**Hình 1.** Kết quả phân lập nấm *Colletotrichum* spp.: (a). Trái xoài bị bệnh thán thư được chọn để phân lập nấm *Colletotrichum* spp.; (b). Chủng nấm TX1 sau 3 ngày nuôi cấy; (c). Chủng nấm TX1 xuất hiện giọt dầu sau 6 ngày nuôi cấy; (d). Bào tử của chủng nấm TX1 được xem ở kính 40X

### 3.2. Kết quả định danh nấm

Kết quả giải trình tự cho thấy chủng nấm TX1 tương đồng 97,30% với loài *Colletotrichum gloeosporioides* strain m111013-4-1 (KC816041.1), *Colletotrichum gloeosporioides* strain m110801-3-4 (KC816034.1) và *Colletotrichum gloeosporioides* isolate JA.I.TA113 (HQ874882.1) (Hình 2).

|                                     | Description                                                                                                     | Scientific Name      | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession  |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Colletotrichum gloeosporioides strain m111013-4-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcr... | Colletotrichum gl... | 893       | 893         | 94%         | 0.0     | 97.30%     | 574      | KC816041.1 |
| <input type="checkbox"/>            | Colletotrichum gloeosporioides strain m110801-3-4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcr... | Colletotrichum gl... | 893       | 893         | 94%         | 0.0     | 97.30%     | 574      | KC816034.1 |
| <input type="checkbox"/>            | Colletotrichum gloeosporioides isolate JA.I.TA113 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcr... | Colletotrichum gl... | 893       | 893         | 94%         | 0.0     | 97.30%     | 560      | HQ874882.1 |
| <input type="checkbox"/>            | Colletotrichum gloeosporioides isolate wm10 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal tra... | Colletotrichum gl... | 891       | 891         | 94%         | 0.0     | 96.94%     | 544      | MH744668.1 |

**Hình 2.** Kết quả đối chiếu trình tự gen của chủng nấm TX1 với ngân hàng gen

### 3.3. Kết quả phân lập vi khuẩn lactic từ thực phẩm lên men kim chi

Từ các mẫu thực phẩm lên men kim chi, phân lập được 6 chủng vi khuẩn trên môi trường phân lập MRS. Kết quả quan sát cho thấy các chủng vi khuẩn phân lập được phát triển mạnh sau 36-48 giờ nuôi cấy, ở nhiệt độ 25 - 30°C và có khả năng phân giải  $\text{CaCO}_3$  trên môi trường phân lập MRS. Hình dạng khuẩn lạc của vi khuẩn lactic phân lập được thể hiện ở bảng 1.

**Bảng 1.** Kết quả phân lập vi khuẩn lactic từ mẫu thực phẩm lên men kim chi

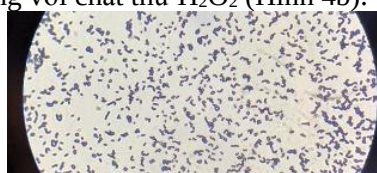
| STT | Kí hiệu chủng | Hình dạng khuẩn lạc                                      |
|-----|---------------|----------------------------------------------------------|
| 1   | LKC1          | Tròn nhỏ, trơn nhẵn, trắng sữa, bìa nguyên, nổi mô       |
| 2   | LKC2          | Tròn lớn, trơn nhẵn, trắng sữa, bìa nguyên, không nổi mô |
| 3   | LKC3          | Tròn nhỏ, trơn nhẵn, trắng ngà, bìa nguyên, nổi mô       |
| 4   | LKC4          | Tròn lớn, trơn nhẵn, trắng sữa, bìa nguyên, nổi mô       |
| 5   | LKC5          | Tròn lớn, trơn nhẵn, trắng ngà, bìa nguyên, nổi mô       |
| 6   | LKC6          | Tròn nhỏ, trơn nhẵn, trắng ngà, bìa nguyên, không nổi mô |

Kết quả Bảng 1 cho thấy, qua quá trình phân lập thu được 6 dạng khuẩn lạc có đặc điểm giống với vi khuẩn lactic ở các nghiên cứu trước đây [24], [25]. Trong đó, 3 chủng LKC1, LKC2, LKC3 được thể hiện trên hình 3 như các đại diện về hình dạng khuẩn lạc của các chủng đã phân lập được.



**Hình 3.** Kết quả phân lập 3 chủng vi khuẩn lactic trên môi trường MRS

Kết quả nhuộm Gram cho thấy chủng vi khuẩn phân lập được là Gram dương do bắt màu xanh tím của thuốc nhuộm (Hình 4a) và catalase âm tính do không có hiện tượng sủi bọt khí khi phản ứng với chất thử  $H_2O_2$  (Hình 4b).



(a)



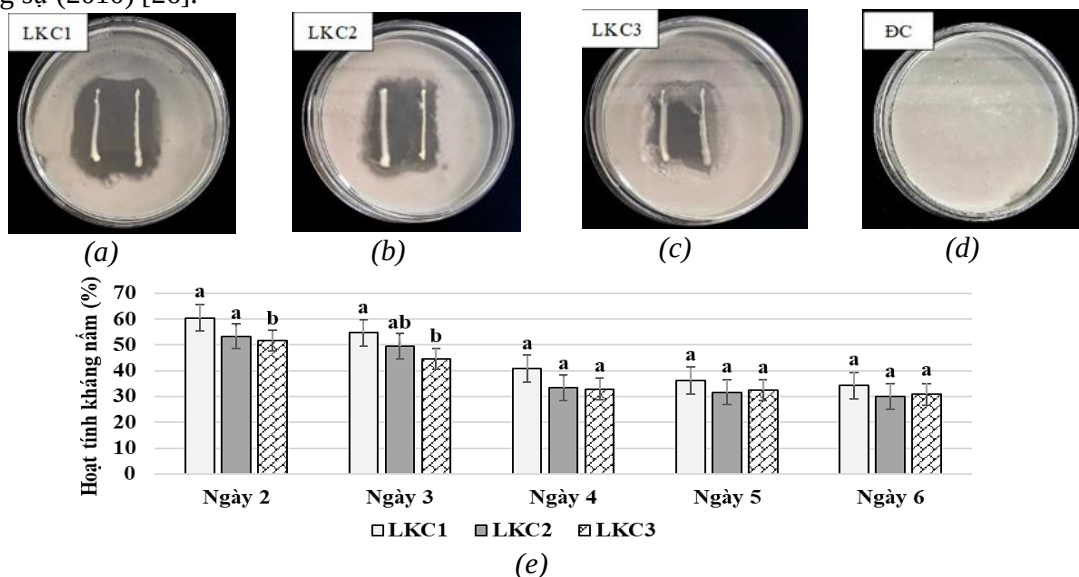
(b)

**Hình 4.** Kết quả nhuộm Gram và thử Catalase vi khuẩn lactic: (a). Kết quả nhuộm Gram có màu xanh tím; (b) Kết quả thử nghiệm catalase không có hiện tượng sủi bọt. Chú thích: VK: vi khuẩn, ĐC: đối chứng

### 3.4. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng nấm *Colletotrichum* spp. của vi khuẩn lactic (In vitro test)

#### 3.4.1. Phương pháp lớp phủ nuôi cấy kép (Dual-culture overlay Method)

Kết quả khảo sát bằng phương pháp lớp phủ nuôi cấy kép cho thấy, 3 trong 6 chủng vi khuẩn phân lập được từ mẫu thực phẩm lên men kim chi có hoạt tính đối kháng nấm *Colletotrichum* spp. trên trái xoài (Hình 5). Kết quả ở hình 5 cho thấy hoạt tính kháng nấm của vi khuẩn lactic giảm dần qua các ngày quan sát. Trong đó, chủng LKC1 có khả năng kháng nấm mạnh nhất, cụ thể ở ngày thứ 2 kể từ khi cấy là 60,41%, các chủng còn lại có hoạt tính thấp hơn lần lượt là LKC2 và LKC3 chỉ có 52,33% và 51,67%. Ở ngày cuối, hoạt tính kháng nấm của vi khuẩn giảm, cụ thể chủng LKC1 chỉ còn 34,16% do vi khuẩn yếu đi, lượng acid sinh ra giảm dần. Điều này cho thấy độ pH có ảnh hưởng đáng kể đến hoạt động kháng nấm, cho thấy tầm quan trọng của acid trong việc ức chế nấm, điều này đã được minh chứng trong nghiên cứu của Schillinger và cộng sự (2010) [26].



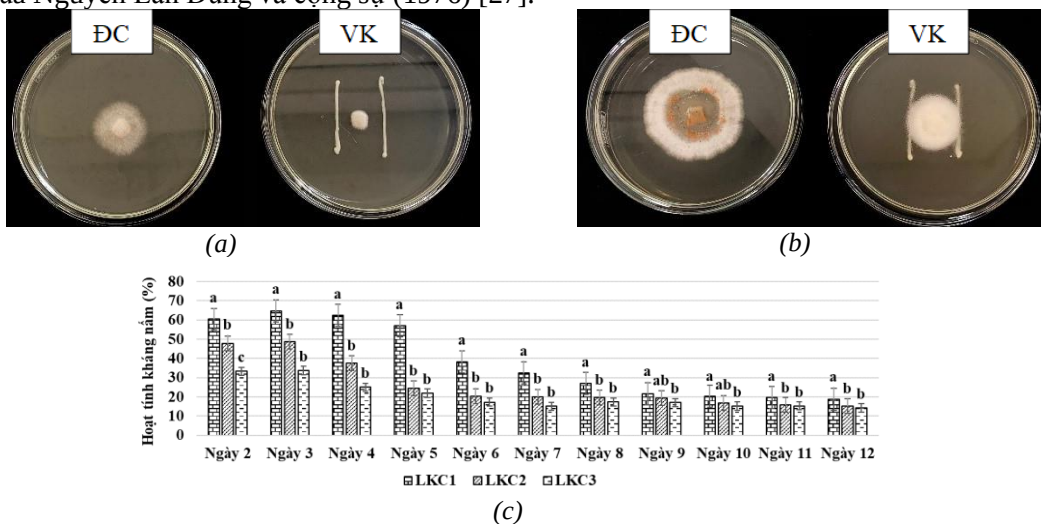
**Hình 5.** Kết quả đối kháng của 3 chủng vi khuẩn bằng phương pháp lớp phủ nuôi cấy kép: (a) Chủng



LKC1; (b) *Chủng LKC2*; (c) *Chủng LKC3*; (d) *Đối chứng*; (e) *Biểu đồ thể hiện hoạt tính kháng nấm của 3 chủng vi khuẩn LKC1, LKC2, LKC3*. *Chủ thích: ĐC: đối chứng*

### 3.4.2. Phương pháp cấy kép (Double Transplanting Method)

Kết quả khảo sát bằng phương pháp cấy kép cho thấy, 3 trong 6 mẫu vi khuẩn lactic phân lập từ mẫu thực phẩm lên men kim chi có hoạt tính đối kháng nấm *Colletotrichum* spp. trên xoài (Hình 6). Kết quả hình 6 cho thấy, hoạt tính kháng nấm của vi khuẩn lactic cao nhất ở ngày 3 và giảm dần qua các ngày quan sát. Trong đó, chủng LKC1 có hoạt tính đối kháng cao nhất, cụ thể ở ngày thứ 3 kể từ khi cấy là 64,86%, LKC2 và LKC3 chỉ có 48,64% và 33,78%. Ở ngày cuối, hoạt tính kháng nấm giảm, cụ thể ở mẫu LKC1 hoạt tính chỉ còn 18,78%. Điều này cho thấy, các chủng vi khuẩn lactic phân lập được đều có hàm lượng acid tổng số cao nhất sau 72 giờ. Nguyên nhân hàm lượng acid tăng theo thời gian do sau 24 giờ số lượng vi khuẩn tăng sinh chưa đủ nên hàm lượng acid lactic sinh ra ít, sau 48 giờ và 72 giờ số lượng vi khuẩn tăng lên nhiều hơn, do đó lượng acid sinh ra cao hơn. Yếu tố thời gian nuôi cấy sẽ có ảnh hưởng đến việc tăng số lượng tế bào vi khuẩn. Để chuyển hóa được hết nguồn dinh dưỡng thành acid lactic vi khuẩn cần phải có thời gian nhất định và đủ lượng vi khuẩn nhưng khoảng thời gian này quá dài sẽ tác động ngược lại làm giảm số lượng vi khuẩn và lượng acid sinh ra, điều này đã được minh chứng qua nghiên cứu của Nguyễn Lâm Dũng và cộng sự (1976) [27].



**Hình 6.** Kết quả đối kháng của 3 chủng vi khuẩn bằng phương pháp cấy kép: (a) Kết quả đối kháng của chủng LKC1 ở ngày 3; (b) Kết quả đối kháng của chủng LKC1 ở ngày 6; (c) Biểu đồ thể hiện hoạt tính kháng nấm của chủng LKC1. *Chủ thích: VK: đĩa có vi khuẩn đối kháng, ĐC: đĩa đối chứng*

### 3.5. Kết quả định danh vi khuẩn

Vì chủng vi khuẩn LKC1 có hoạt tính đối kháng cao nhất nên được sử dụng để giải trình tự. Kết quả cho thấy chủng LKC1 tương đồng 100% với loài *Lactobacillus plantarum* strain 1929 (MT597746.1), *Lactobacillus plantarum* strain 4715 (MT545131.1), *Lactobacillus plantarum* strain OL122 (MT359247.1), *Lactobacillus plantarum* strain LNL 2-5 (MN022564.1) và *Lactobacillus plantarum* strain XCT-1 (KX538913.1) (Hình 7).

| Description                                                                                                      | Scientific Name      | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain 1929 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Lactiplantibacill... | 1053      | 1053        | 99%         | 0.0     | 100.00%    | 1474     | MT597746.1 |
| <input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain 4715 16S ribosomal RNA gene, partial sequence            | Lactiplantibacill... | 1053      | 1053        | 99%         | 0.0     | 100.00%    | 1459     | MT545131.1 |
| <input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain 4711 16S ribosomal RNA gene, partial sequence            | Lactiplantibacill... | 1053      | 1053        | 100%        | 0.0     | 99.83%     | 1464     | MT545128.1 |
| <input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain OL122 16S ribosomal RNA gene, partial sequence           | Lactiplantibacill... | 1053      | 1053        | 99%         | 0.0     | 100.00%    | 1447     | MT359247.1 |
| <input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain LNL 2-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence         | Lactiplantibacill... | 1053      | 1053        | 99%         | 0.0     | 100.00%    | 1472     | MN022564.1 |
| <input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain XCT-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence           | Lactiplantibacill... | 1053      | 1053        | 99%         | 0.0     | 100.00%    | 1472     | KX538913.1 |
| <input type="checkbox"/> Lactobacillus plantarum strain 2025 16S ribosomal RNA gene, partial sequence            | Lactiplantibacill... | 1050      | 1050        | 100%        | 0.0     | 99.65%     | 1456     | MT604618.1 |

Hình 7. Kết quả so sánh trình tự gen của chủng vi khuẩn LKC1 trên ngân hàng gen

#### 4. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập và tuyển chọn được 3 chủng vi khuẩn lactic từ mẫu thực phẩm lên men kim chi có hoạt tính kháng với nấm *Coletotrichum* gây bệnh thán thư trên trái xoài Cát Hòa Lộc sau thu hoạch.

Chủng vi khuẩn LKC1 thể hiện hoạt tính kháng nấm cao nhất và tương đồng 100% với vi khuẩn *Lactobacillus plantarum*.

#### Lời cảm ơn

Xin cảm ơn sự hỗ trợ của Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long về kinh phí, vật tư và trang thiết bị để thực hiện đề tài này.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] D. Sivakumar, Y. Jiang, and E. M. Yahia, "Maintaining mango (*Mangifera indica* L.) fruit quality during the export chain," *Food Research International*, vol. 44, no. 5, pp. 1254-1263, 2011.
- [2] J. Bompard, "Taxonomy and systematics," *The mango: Botany, production and uses. Wallingford: CAB International*, 2009, pp. 19-41.
- [3] R. Litz, "The Mango: Botany, Production and Uses. CAB International," *Wallingford. UK*, 1997, p. 7.
- [4] L. F. Arauz, "Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management," *Plant disease*, vol. 84, no. 6, pp. 600-611, 2000.
- [5] R. Bromberg, I. Moreno, C. L. Zaganini, R. R. Delboni, and J. d. Oliveira, "Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity," *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 35, pp. 137-144, 2004.
- [6] L. De Vuyst, "Nisin production variability between natural *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains," *Biotechnology letters*, vol. 16, no. 3, pp. 287-292, 1994.
- [7] N. Qiao, L. Yu, C. Zhang, C. Wei, J. Zhao, and H. Zhang, "A comparison of the inhibitory activities of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* against *Penicillium expansum* and an analysis of potential antifungal metabolites," *FEMS Microbiology Letters*, vol. 367, no. 18, pp. 1-10, 2020.
- [8] R. Ghosh, S. Barman, A. Mukhopadhyay, and N. C. Mandal, "Biological control of fruit-rot of jackfruit by rhizobacteria and food grade lactic acid bacteria," *Biological control*, vol. 83, pp. 29-36, 2015.
- [9] D. C. Nguyen, "Techniques for growing oranges, tangerines and pomelos," *Hanoi Science and Technology Publishing House*, no. 1, pp. 57-66, 2010.
- [10] 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.
- [11] B. C. Sutton, *The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata*, Commonwealth Mycological Institute, 1980.
- [12] T. J. White, T. Bruns, S. 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.
- [13] S. T. Cowan and K. J. Steel, *Manual for the identification of medical bacteria*, Manual for the identification of medical bacteria, 1965.
- [14] J. Magnusson and J. Schnürer, "*Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound," *Applied and environmental microbiology*, vol. 67, no. 1, pp. 1-5, 2001.
- [15] S. A. Kivanc, M. Takim, M. Kivanc, and G. Güllülü, "*Bacillus* spp. isolated from the conjunctiva and their potential antimicrobial activity against other eye pathogens," *African Health Sciences*, vol. 14, no. 2, pp. 364-371, 2014.
- [16] T. L. A. Doan, T. H. H. Nguyen, and D. D. Le, "Morphological, biological, and molecular characteristics of *Coletotrichum* spp. causing anthracnose disease on custard apple (*Annona squamosa* L.) in Binh Thuan and Tay Ninh provinces," (in Vietnamese), *Journal of Plant Protection*, no. 2, pp. 25-33, 2019.

- 
- [17] H. L. T. Le, "The subspecies of the fungus *Colletotrichum* causes anthracnose on mango and durian in the Mekong Delta and the efficacy of six drugs against these fungi was tested," (in Vietnamese), *Science magazine*, vol. 10, pp. 31-40, 2008.
- [18] D. T. Tran, U. T. D. Dao, N. L. Nguyen, and D. D. Le, "Research on the fungus *Colletotrichum* spp. causing anthracnose disease on mango," (in Vietnamese), *Plant Protection Magazine*, vol. 6, pp. 24-31, 2019.
- [19] M. Balendres and J. Bengoa, "Diseases of dragon fruit (*Hylocereus species*): Etiology and current management options," *Crop protection*, vol. 126, 2019, Art. no. 104920.
- [20] O. A. Abdul Wahid, "Occurrence of *Colletotrichum* anthracnose disease of guava fruit in Egypt," *International Journal of pest management*, vol. 47, no. 2, pp. 147-152, 2001.
- [21] M. Masyahit, "The first report of the occurrence of anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. on dragon fruit (*Hylocereus* spp.) in Peninsular Malaysia," *American Journal of Applied Sciences*, vol. 6, pp. 902-912, 2009.
- [22] Z. J. Jeleu, S. G. Bobev, D. Minz, M. Maymon, and S. Freeman, "Characterization of *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose in Bulgaria," *Journal of phytopathology*, vol. 156, no. 11-12, pp. 668-677, 2008.
- [23] W. A. Vieira, S. J. Michereff, M. A. de Moraes, K. D. Hyde, and M. P. Câmara, "Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil," *Fungal diversity*, vol. 67, no. 1, pp. 181-202, 2014.
- [24] T. M. H. Nguyen and M. T. Nguyen, "Isolation and selection of some lactic acid bacteria strains capable of synthesizing amylase and bacteriocin," (in Vietnamese), *Journal of Forestry Science and Technology*, vol. 3, pp. 3-10, 2013.
- [25] N. T. T. Huynh, Q. N. Le, T. T. Nguyen, and T. K. D. Le, "Selection and application of lactic acid bacteria strains fermented with pickles (*Typha orientalis*) with sour salt," (in Vietnamese), *Journal of Science Can Tho University*, vol. 56, no. 6, pp. 153-163, 2020.
- [26] U. Schillinger and J. V. Villarreal, "Inhibition of *Penicillium nordicum* in MRS medium by lactic acid bacteria isolated from foods," *Food control*, vol. 21, no. 2, pp. 107-111, 2010.
- [27] L. D. Nguyen, D. D. Nguyen, H. N. Dang, V. T. Pham, V. P. Nguyen, and P. T. Nguyen, *Some methods of microbiology research*, vol. 2. Science and Technology Publishing House, pp. 36-54, 1976.