

## ISOLATION AND SELECTION OF *Bacillus* ISOLATES WITH ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST *Colletotrichum* sp. CAUSING ANTHRACNOSE DISEASE ON POST-HARVEST NAM ROI POMELO IN VINH LONG PROVINCE

Quach Van Cao Thi, Nguyen Thi Hong Gam, Nguyen Trung Truc\*

Vinh Long University of Technology Education

ARTICLE INFO		ABSTRACT
Received:	30/9/2024	<i>Colletotrichum</i> sp. causes anthracnose disease that has greatly affected the yield and quality of many fruit trees in the world as well as in Vietnam. Therefore, this study aimed to isolate and select <i>Bacillus</i> that exhibit inhibition <i>Colletotrichum</i> sp. causing anthracnose disease on post-harvest Nam Roi pomelo in Binh Minh district, Vinh Long province. The result isolated nine <i>Bacillus</i> isolates from Nam Roi pomelo trees' rhizospheric soils. The antagonistic ability of <i>Bacillus</i> bacterial strains against <i>Colletotrichum</i> sp. was carried out by the method of antagonism of fungal hyphae and spores. The findings showed that eight out of nine strains of <i>Bacillus</i> showed the ability to resist fungal diseases, of which strain BDB3_TR showed the highest antifungal ability with an inhibitory rate of 37.98%. The gene sequencing results showed that the BDB3_TR strain was 100% similar to the <i>Bacillus thuringiensis</i> on NCBI database. The fungal inhibitory activity of <i>Bacillus</i> strains in the study shows their potential for application in combination with edible coatings to preserve post-harvest Nam Roi pomelo in the future.
Revised:	08/5/2025	
Published:	08/5/2025	

### KEYWORDS

Anthracnose  
Antifungal activity  
*Bacillus*  
*Colletotrichum*  
Nam Roi pomelo

## PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CÁC CHỦNG VI KHUẨN *Bacillus* CÓ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤM *Colletotrichum* sp. GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN TRÁI BƯỚI NĂM ROI SAU THU HOẠCH Ở TỈNH VĨNH LONG

Quách Văn Cao Thi, Nguyễn Thị Hồng Gấm, Nguyễn Trung Trục\*

Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long

THÔNG TIN BÀI BÁO		TÓM TẮT
Ngày nhận bài:	30/9/2024	Nấm <i>Colletotrichum</i> sp. gây bệnh thán thư đã ảnh hưởng lớn đến năng suất và chất lượng của nhiều loại cây ăn trái trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Vì vậy, nghiên cứu nhằm mục đích phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn <i>Bacillus</i> có khả năng ức chế nấm <i>Colletotrichum</i> sp. gây bệnh thán thư trên trái bưởi Năm Roi sau thu hoạch ở thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long. Chín chủng vi khuẩn <i>Bacillus</i> đã được phân lập từ đất vùng rễ cây bưởi Năm Roi. Khả năng đối kháng của các chủng vi khuẩn <i>Bacillus</i> đối với nấm <i>Colletotrichum</i> sp. được thực hiện bằng phương pháp đối kháng sợi nấm và bào tử. Kết quả nghiên cứu cho thấy 8/9 chủng <i>Bacillus</i> thể hiện khả năng kháng nấm bệnh, trong đó chủng BDB3_TR thể hiện hoạt tính ức chế nấm bệnh mạnh nhất với tỷ lệ đối kháng là 37,98%. Kết quả định danh cho thấy chủng BDB3_TR tương đồng 100% với vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i> . Hoạt tính đối kháng nấm bệnh của các chủng <i>Bacillus</i> phân lập được cho thấy tiềm năng ứng dụng của chúng trong việc phối hợp với các loại màng bao ăn được (edible coatings) để bảo quản trái bưởi Năm Roi sau thu hoạch.
Ngày hoàn thiện:	08/5/2025	
Ngày đăng:	08/5/2025	

### TỪ KHÓA

Bệnh thán thư  
Hoạt tính kháng nấm  
*Bacillus*  
*Colletotrichum*  
Bưởi Năm Roi

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.11200>

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

## 1. Giới thiệu

Cây có múi họ cam quýt (citrus) là một trong những loại trái cây được trồng rộng rãi trên thế giới và Việt Nam [1]. Nguyễn Thị Duyên [2] cho thấy cam, bưởi, chanh, quýt thuộc nhóm 15 loại quả chủ lực, có diện tích lớn nhất (trên 18 nghìn ha mỗi loại). Đặc biệt, ở Đồng bằng sông Cửu Long và nhiều khu vực châu Á, bưởi là một trong những loại cây ăn quả được trồng phổ biến [3]. Trái bưởi không những có giá trị dinh dưỡng cao do có chất chống oxy hóa, giàu chất xơ và các chất dinh dưỡng khác mà còn mang lại nhiều giá trị kinh tế [4].

Nấm *Colletotrichum* sp. gây ra bệnh thán thư (anthracnose) trên trái cây sau thu hoạch thường làm trái nhanh thối, mau hư hỏng và gây ảnh hưởng lớn đến chất lượng cũng như năng suất của trái. Ngoài ra, bệnh thán thư còn ảnh hưởng đến thu nhập của người nông dân do giảm giá trị kinh tế của trái bưởi [5]. Để kiểm soát nấm bệnh thì phương pháp thường được sử dụng là diệt nấm [6]. Tuy nhiên, việc sử dụng thuốc bảo vệ thực vật không theo khuyến cáo dẫn đến sự kháng thuốc của nấm bệnh [7]. Bên cạnh đó, thuốc bảo vệ thực vật cũng ảnh hưởng xấu đối với sức khỏe con người và môi trường xung quanh [8]. Vì vậy, việc tìm kiếm các giải pháp diệt nấm an toàn thay thế thuốc bảo vệ thực vật là rất cần thiết.

Kiểm soát sinh học (biocontrol) là một phương pháp lành mạnh và hiệu quả về môi trường thông qua việc sử dụng các loài thiên địch, nấm hoặc các vi sinh vật để kiểm soát các loài dịch hại. Một số mầm bệnh được kiểm soát nhờ các hoạt chất sinh học từ vi sinh vật, trong đó có vi khuẩn *Bacillus* [9], [10] đã được chứng minh. Nhiều nghiên cứu cho thấy vi khuẩn *Bacillus* có khả năng đối kháng nấm gây bệnh thán thư trên trái dâu tây [11], óc chó [12], ớt [13], đu đủ [14] và cây cà phê [15]. Tuy nhiên, trên đối tượng bưởi Năm Roi thì chưa có nghiên cứu nào được công bố. Vì vậy, nghiên cứu này được tiến hành nhằm mục đích phân lập và tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên trái bưởi Năm Roi sau thu hoạch.

## 2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Vi khuẩn *Bacillus* được phân lập từ đất vùng rễ của cây bưởi Năm Roi và các chủng nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư được phân lập trên trái bưởi Năm Roi sau thu hoạch ở thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long.

### 2.2. Phương pháp thu mẫu đất và phân lập vi khuẩn *Bacillus*

Đất vùng rễ của cây bưởi Năm Roi được sử dụng để phân lập vi khuẩn *Bacillus*. Mẫu đất được thu từ cây bưởi khỏe ở các vườn bưởi trồng chuyên canh ở thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long. Mẫu đất vùng rễ được thu ngẫu nhiên ở 5 vị trí trong vườn, độ sâu khoảng 10-15 cm, mỗi vị trí từ 0,5 kg đến 1 kg.

Môi trường Nutrient Agar (NA, Himedia, Ấn Độ) được sử dụng để phân lập vi khuẩn *Bacillus*. Trái mẫu đất vào khay inox đã được khử khuẩn bằng cách xịt cồn và lau sạch, trộn đều các mẫu đất của cùng 1 vườn với nhau. Cân 10 g đất đã trộn hòa tan với 90 mL nước cất đã tiệt trùng. Cho hỗn hợp vào bình tam giác và lắc với vận tốc 150 vòng/phút trong 30 phút. Mẫu đất được tiếp tục ủ ở nhiệt độ 80 °C trong 20 phút để loại bỏ tế bào sinh dưỡng. Pha loãng mẫu đến nồng độ  $10^{-6}$  bằng nước muối sinh lý 0,85%. Hút 100  $\mu$ L và trải mẫu ở mỗi độ pha loãng trên đĩa môi trường NA, sau đó ủ đĩa ở 37 °C trong 24 giờ. Khuẩn lạc vi khuẩn được cấy chuyển nhiều lần để thu được vi khuẩn thuần [16].

Vi khuẩn *Bacillus* phân lập được xác định đặc điểm hình thái khuẩn lạc và sinh hóa cơ bản (nhuộm Gram (100X), nhuộm bào tử (100X), hoạt tính oxidase và catalase) [17]. Ngoài ra, chủng *Bacillus* phân lập có khả năng ức chế nấm bệnh mạnh nhất được chọn để giải trình tự đoạn gen 16S rRNA với cặp mồi 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' và 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' [18]. Đầu tiên, DNA vi khuẩn được ly trích theo phương pháp của More và cộng sự [19] có hiệu chỉnh và bổ sung. Sau đó, đoạn gene 16S rRNA của vi khuẩn

được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi 27F/1492R. Thể tích của phản ứng PCR được thực hiện là 25  $\mu$ L, bao gồm: 2,5  $\mu$ L PCR Buffer (10X); 2,0  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM); 4,0  $\mu$ L dNTPs (200  $\mu$ M); 1,0  $\mu$ L mồi 27F (20 pmol); 1,0  $\mu$ L mồi 1492R (20 pmol); 0,25  $\mu$ L *Taq* DNA polymerase (2,5 UI); 2,0  $\mu$ L DNA mẫu (40 ng); thêm 12,25  $\mu$ L nước cất hai lần (BiH<sub>2</sub>O) cho đủ 25  $\mu$ L. Sản phẩm PCR (dự kiến 1.500 bp) được điện di trên gel agarose 1,5% và được giải trình tự bằng phương pháp Sanger.

### 2.3. Phương pháp phân lập, lây nhiễm và định danh nấm *Colletotrichum* sp.

#### 2.3.1. Phân lập nấm bệnh

Môi trường Potato Dextrose Agar (PDA, Himedia, Ấn Độ) được sử dụng để phân lập nấm bệnh từ trái bưởi bị nhiễm bệnh thán thư ở các hộ trồng bưởi chuyên canh thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long. Đầu tiên, khử trùng bề mặt mẫu bằng nước cất và cồn 70°, mẫu bệnh được cắt thành dạng hình vuông kích thước khoảng 1 cm<sup>2</sup>. Cho mẫu bệnh vào giữa đĩa môi trường PDA, ủ đĩa trong thời gian 5-7 ngày ở nhiệt độ 25-28 °C. Khi sợi nấm phát triển trên đĩa thạch, tiếp tục cắt khối thạch có sợi nấm với kích thước khoảng 1 cm<sup>2</sup>, cấy chuyển sang đĩa có chứa môi trường PDA mới. Các bước trên được lặp lại cho đến khi sợi nấm phát triển thuần. Chúng nấm sau khi làm thuần được định danh sơ bộ bằng cách quan sát các đặc điểm hình thái khuẩn ty và bào tử nấm bằng mắt thường và quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 40X [20].

#### 2.3.2. Khảo sát khả năng gây bệnh của chủng nấm phân lập

Trái bưởi được lây nhiễm với chủng nấm phân lập ở mật số bào tử 10<sup>6</sup> CFU/mL. Chọn ba trái bưởi không có dấu hiệu bị bệnh, không bị tổn thương về mặt cơ học, đồng đều về màu sắc và kích thước. Trái bưởi được rửa sạch dưới vòi nước chảy, được rửa thêm hai lần nước cất tiệt trùng và làm khô bằng bông gòn vô trùng. Mỗi trái bưởi được tạo bốn vết thương bằng tăm vô trùng (đường kính 2 mm), các vết thương cách đều nhau. Bào tử của nấm bệnh được thu bằng cách: cào lấy bào tử nấm cho vào 500  $\mu$ L nước cất, đếm mật số bào tử nấm và hiệu chỉnh về mật số 10<sup>6</sup> bào tử/mL. Dịch huyền phù được tiêm vào các vết thương vừa tạo (10  $\mu$ L/vết thương). Mẫu đối chứng được tiêm nước cất vô trùng. Các mẫu sau khi lây nhiễm được ủ kín ở độ ẩm 85%, 28 °C và theo dõi vết bệnh trong 5-7 ngày [21].

#### 2.3.3. Định danh chủng nấm phân lập

Chủng nấm sau khi lây nhiễm cũng được định danh bằng phương pháp giải trình tự vùng gen ITS với cặp mồi ITS1/ITS4 (mồi xuôi ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' và mồi ngược ITS4: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' [22]. DNA nấm bệnh được ly trích theo phương pháp của Trần Nhân Dũng và cộng sự [23]. Sau đó, vùng gen ITS của nấm bệnh được khuếch đại bằng PCR với thể tích của phản ứng là 25  $\mu$ L, bao gồm: 2,5  $\mu$ L PCR Buffer (10X); 2,0  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM); 4,0  $\mu$ L dNTPs (200  $\mu$ M); 1,0  $\mu$ L mồi ITS1 (20 pmol); 1,0  $\mu$ L mồi ITS4 (20 pmol); 0,25  $\mu$ L *Taq* DNA polymerase (2,5 UI); 2,0  $\mu$ L DNA mẫu (40 ng); thêm 12,25  $\mu$ L nước cất hai lần (BiH<sub>2</sub>O) cho đủ 25  $\mu$ L. Sản phẩm PCR (dự kiến 600 bp) được điện di trên gel agarose 1,5% và gửi giải trình tự bằng phương pháp Sanger.

### 2.4. Khảo sát khả năng đối kháng của vi khuẩn *Bacillus* với nấm *Colletotrichum* sp.

Hoạt tính đối kháng sợi nấm của vi khuẩn *Bacillus* được thực hiện theo Touré và cộng sự [24]. Các bước thực hiện gồm: khối nấm được cắt có diện tích khoảng 1 cm<sup>2</sup> và đặt ở giữa đĩa môi trường PDA. Sau đó, vi khuẩn được cấy hai đường song song, dài khoảng 2 cm cách khối nấm khoảng 5-10 mm (khối nấm nằm giữa). Sau 5 ngày quan sát, hiệu suất ức chế sự phát triển nấm của vi khuẩn được tính theo công thức:

$$I = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100 \quad (1)$$

Trong đó: I: hiệu suất ức chế của vi khuẩn (%);  $R_1$ : đường kính của hệ sợi nấm đối chứng (cm);  $R_2$ : đường kính của hệ sợi nấm trên đĩa có cấy vi khuẩn (cm).

Hoạt tính ức chế bào tử nấm của vi khuẩn *Bacillus* được thực hiện theo Dhanasekaran và cộng sự [25]. Các bước thực hiện bao gồm: chủng *Bacillus* được tăng sinh 24 giờ trong môi trường NB trên máy lắc với vận tốc 120 vòng/phút. Sau đó, dịch tăng sinh được ly tâm với vận tốc 8.000 vòng/phút trong 5 phút (lấy phần trong). Bào tử của nấm bệnh được thu bằng cách: cào lấy bào tử nấm cho vào 500  $\mu$ L nước cất. Sau đó, hút 100  $\mu$ L dịch bào tử nấm (mật số  $10^6$  bào tử/mL) và trải đều trên bề mặt thạch môi trường PDA. Tiếp đến, hút 80  $\mu$ L dịch trong của vi khuẩn *Bacillus* (đối chứng: môi trường không có chủng vi khuẩn) cho vào các giếng và ủ ở 30 °C. Cuối cùng, đường kính vòng ức chế (d) được đo sau mỗi 24 giờ (đến ngày 5). Hoạt tính ức chế của vi khuẩn *Bacillus* được xác định theo công thức:

$$\text{Kích thước vòng đối kháng} = D - d \quad (2)$$

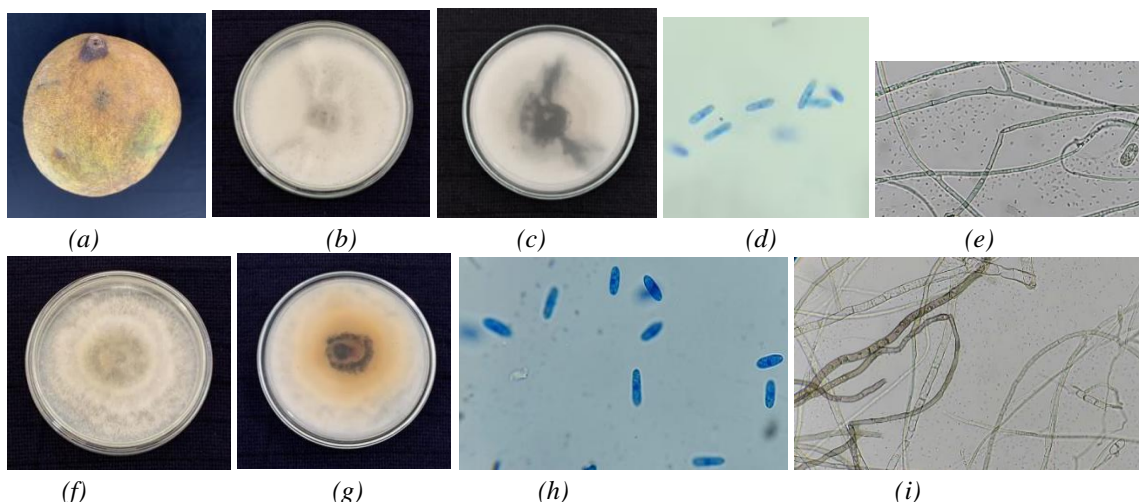
Trong đó, D: đường kính vòng ức chế (mm); d: đường kính các giếng (mm),  $d = 8$  mm.

## 2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được phân tích phương sai (ANOVA) một nhân tố với độ tin cậy 95% bằng phần mềm Minitab 20. Độ tương đồng trình tự DNA của chủng nấm và vi khuẩn phân lập trong nghiên cứu được so sánh với trình tự trên cơ sở dữ liệu NCBI bằng công cụ BLASTn. Cây phả hệ (phylogenetic tree) thể hiện mối quan hệ di truyền giữa các chủng nấm và vi khuẩn được xây dựng bằng phần mềm MEGA5 dựa trên thuật toán Neighbour-joining với giá trị bootstrap là 1.000 lần lặp lại.

## 3. Kết quả và bàn luận

### 3.1. Kết quả phân lập, lây nhiễm và định danh nấm *Colletotrichum*

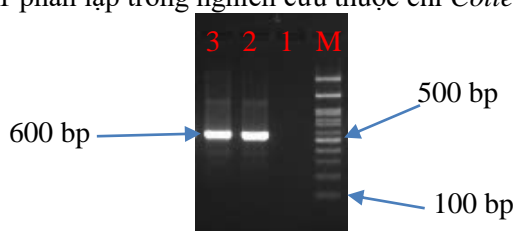


**Hình 1.** Chủng nấm B1 (b, c, d, e) và B2 (f, g, h, i) trên môi trường PDA: a) Biểu hiện nhiễm bệnh thán thư trên trái chuối; b và f) Mặt trước của nấm; c và g) Mặt sau của nấm; d và h) Bào tử nấm (100X); e và i) Sợi nấm (40X)

Từ các mẫu bươi có dấu hiệu nhiễm bệnh thán thư, nghiên cứu đã thu thập được 02 chủng nấm (kí hiệu B1 và B2) trên môi trường PDA (Hình 1a). Kết quả quan sát cho thấy chủng nấm B1 có màu xám trắng, sợi nấm mọc cao khoảng 1-2 mm, có lông tơ, mép gợn sóng. Sau 5 ngày, chủng nấm B1 đạt kích thước 50-60 mm, sau 7 ngày sợi nấm mọc dày ngả màu xám, có vòng tròn đồng tâm ở giữa (Hình 1b,c). Quan sát dưới kính hiển vi ở vật kính 40X cho thấy bào tử chủng B1 không có vách ngăn, có dạng hình trụ và hai đầu tròn (Hình 1d) và sợi nấm có vách ngăn (Hình 1e). Trong khi, chủng B2 có dạng bụi trắng, mịn, bám sát vào bề mặt môi trường. Sau 4 ngày, nấm B2 đạt kích thước 50-60 mm, sau 6 ngày nấm ngả màu hơi ngả (Hình 1f,g). Quan sát dưới vật kính 40X cho thấy bào tử có dạng hình trụ, không có vách ngăn và hai đầu tròn (Hình 1h) và sợi nấm có vách ngăn (Hình 1i). Như vậy, 2 chủng nấm phân lập có các đặc điểm hình thái sợi nấm và bào tử tương

tự một số loài nấm thuộc chi *Colletotrichum* đã được báo cáo trước đây. Nghiên cứu của Cruz-Lagunas và cộng sự [21] cho thấy nấm *Colletotrichum* sp. được phân lập từ cây bưởi (*Citrus paradisi*) có sợi nấm màu trắng, sau đó chuyển sang màu xám nhạt và bào tử hình trụ thuôn dài.

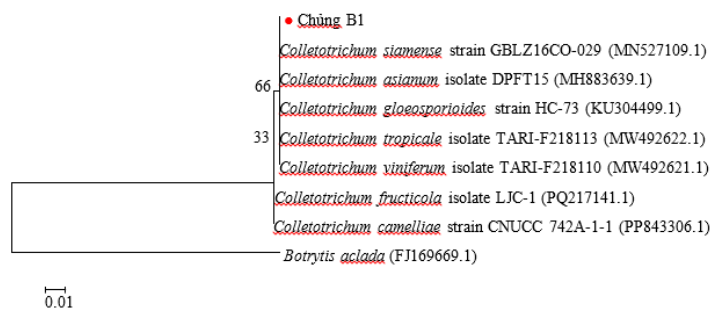
Chủng B1 sau khi lây nhiễm cho thấy vết bệnh có đốm nhỏ, màu sẫm, vỏ bị khô và sần sùi. Kết quả này tương tự với nghiên cứu của Cruz-Lagunas và cộng sự [21]. Tuy nhiên, chủng B2 không thể hiện độc lực gây bệnh trên trái bưởi. Từ kết quả lây nhiễm, chủng B1 có độc lực gây bệnh nên được chọn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo. Hai chủng nấm phân lập trong nghiên cứu đều khuếch đại được vùng ITS với kích thước là 600 bp (Hình 2) qua phản ứng PCR. Ngoài ra, kết quả trình tự vùng ITS cho thấy trình tự của chủng B1 tương đồng 100% với chủng nấm *C. siamense* chủng GBLZ16CO-029 (MN527109.1) trên ngân hàng Gene (Hình 3). Kết quả xây dựng cây phả hệ cho thấy chủng B1 phân lập thuộc cùng nhóm với các loài *Colletotrichum* trên ngân hàng Gene (Hình 4). Như vậy, dựa trên đặc điểm hình thái sợi nấm, bào tử và kết quả giải trình tự cho thấy chủng B1 phân lập trong nghiên cứu thuộc chi *Colletotrichum*.



**Hình 2.** Kết quả khuếch đại vùng ITS của các chủng nấm phân lập *M. Thang chuẩn 100 bp; Giếng 1: đối chứng âm (nước); Giếng 2-3: thứ tự 2 chủng nấm B1 và B2*

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
Colletotrichum siamense strain GBLZ16CO-029 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal tra...	Colletotrichum si...	979	979	100%	0.0	100.00%	589	MN527109.1
Colletotrichum asianum isolate DPFT15 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gen...	Colletotrichum as...	979	979	100%	0.0	100.00%	551	MH883639.1
Colletotrichum siamense isolate DPFT16 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA ge...	Colletotrichum si...	979	979	100%	0.0	100.00%	556	MH883641.1
Colletotrichum gloeosporioides strain HC-73 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spa...	Colletotrichum gl...	977	977	99%	0.0	100.00%	587	KU304499.1
Colletotrichum sp. strain ICMP 5139 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed sp...	Colletotrichum sp.	977	977	99%	0.0	100.00%	613	OR543652.1

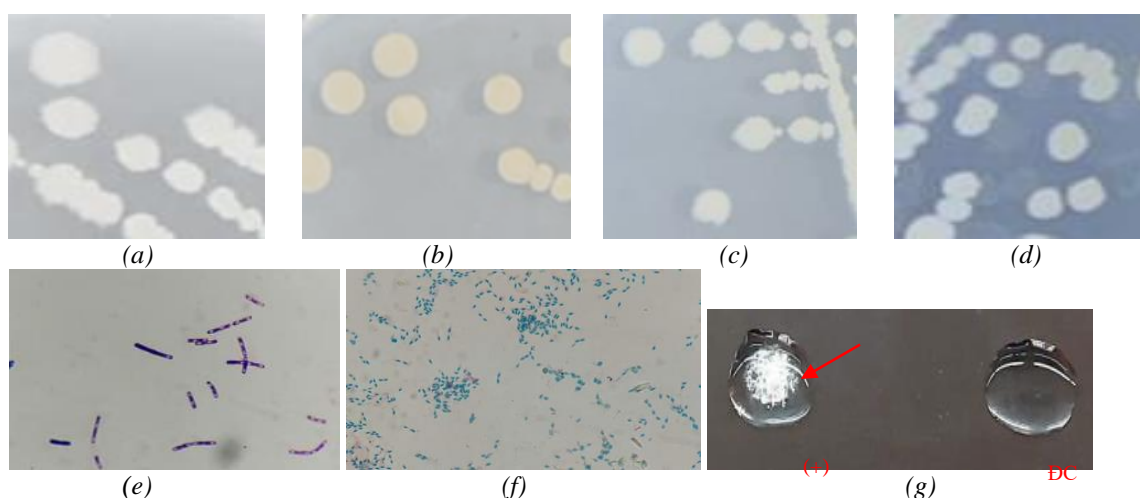
**Hình 3.** Kết quả so sánh mức độ tương đồng của chủng nấm B1 bằng công cụ BLASTn



**Hình 4.** Kết quả xây dựng cây phả hệ thể hiện mối quan hệ di truyền của chủng nấm B1 với các loài *Colletotrichum* trên ngân hàng Gene (Giá trị bootstrap 1.000 lần lặp lại và *Botrytis aclada* chủng *OnionBC-18* (FJ169669.1) được sử dụng như nhóm ngoại)

### 3.2. Kết quả phân lập vi khuẩn Bacillus

Từ 03 mẫu đất vùng rễ cây bưởi Năm Roi ở thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long, nghiên cứu đã phân lập được 09 chủng vi khuẩn (kí hiệu là BDB1\_T, BDB1\_TR, BDB2\_T, BDB2\_TR, BDB2\_TR, BDB2\_V, BDB3\_TR, BDB3\_V và BDB3\_VN). Khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn này có màu trắng đục hoặc vàng và có bìa răng cưa không đều hoặc tròn đều (Bảng 1, Hình 5a, b, c,d). Tất cả các chủng phân lập thuộc nhóm vi khuẩn Gram dương, có bào tử, dương tính với catalase (Hình 5e, f, g) và oxidase. Qua Hình 5 cho thấy các chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập trong nghiên cứu có các đặc điểm hình thái khuẩn lạc và sinh hóa tương tự với báo cáo của Holt và cộng sự [26]. Như vậy, dựa vào các đặc điểm trên, các chủng vi khuẩn có thể xếp vào chi *Bacillus*.



**Hình 5.** Đặc điểm hình thái, tế bào và sinh hóa các chủng vi khuẩn phân lập: a) Chủng BDB1\_T có màu trắng đục, răng cưa không đều; b) Chủng BDB1\_V có màu hơi vàng, tròn đều; c) Chủng BDB1\_TR có màu trắng, răng cưa không đều; d) Chủng BDB2\_T có màu trắng, răng cưa; e) Kết quả nhuộm gram (100X); f) Nhuộm bào tử (chủng BDB1\_TR); g) Chủng BDB1\_TR phản ứng catalase dương tính (sủi bọt khí, mũi tên, ĐC: đối chứng)

**Bảng 1.** Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập

Chủng vi khuẩn	Nguồn phân lập	Đặc điểm hình thái khuẩn lạc	Đặc điểm tế bào, sinh hóa
BDB1_T	Mỹ Hòa, Bình Minh, Vĩnh Long	Khuẩn lạc dạng hình tròn, màu trắng đục, răng cưa không đều, đường kính khuẩn lạc 6 mm.	Gram dương, que dài, catalase và oxidase dương tính.
BDB1_TR	Mỹ Hòa, Bình Minh, Vĩnh Long	Khuẩn lạc dạng hình tròn, màu trắng đục, răng cưa không đều, đường kính khuẩn lạc 5 mm.	Gram dương, que dài, catalase và oxidase dương tính.
BDB1_V	Mỹ Hòa, Bình Minh, Vĩnh Long	Khuẩn lạc dạng hình tròn đều, màu hơi vàng, không răng cưa, đường kính khuẩn lạc 6 mm.	Gram dương, que ngắn, catalase và oxidase dương tính.
BDB2_T	Đông Thành, Bình Minh, Vĩnh Long	Khuẩn lạc dạng hình tròn, màu trắng, răng cưa đều, đường kính khuẩn lạc 6 mm.	Gram dương, que dài, catalase và oxidase dương tính.
BDB2_TR	Đông Thành, Bình Minh, Vĩnh Long	Khuẩn lạc dạng hình tròn, màu trắng, răng cưa không đều, đường kính khuẩn lạc 5 mm.	Gram dương, que dài, catalase và oxidase dương tính.
BDB2_V	Đông Thành, Bình Minh, Vĩnh Long	Khuẩn lạc dạng hình tròn đều, màu vàng, không răng cưa, đường kính khuẩn lạc 5 mm.	Gram dương, que ngắn, catalase dương tính.
BDB3_TR	Đông Bình, Bình Minh, Vĩnh Long	Khuẩn lạc dạng hình tròn, màu trắng, răng cưa không đều, đường kính khuẩn lạc 6 mm.	Gram dương, que dài, catalase và oxidase dương tính.
BDB3_V	Đông Bình, Bình Minh, Vĩnh Long	Khuẩn lạc dạng hình tròn đều, màu vàng lớn, không răng cưa, đường kính khuẩn lạc 6 mm.	Gram dương, que dài, catalase và oxidase dương tính
BDB3_VN	Đông Bình, Bình Minh, Vĩnh Long	Khuẩn lạc dạng hình tròn, màu vàng nhỏ, không răng cưa, đường kính khuẩn lạc 5 mm.	Gram dương, que ngắn, catalase và oxidase dương tính.

### 3.3. Hoạt tính ức chế nấm *Colletotrichum* của các chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập

#### 3.3.1. Hoạt tính ức chế sợi nấm

Kết quả khảo sát khả năng đối kháng cho thấy có 8/9 chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập có khả năng đối kháng với chủng nấm B1 (Bảng 2). Nhìn chung, khả năng đối kháng tăng dần, tuy nhiên

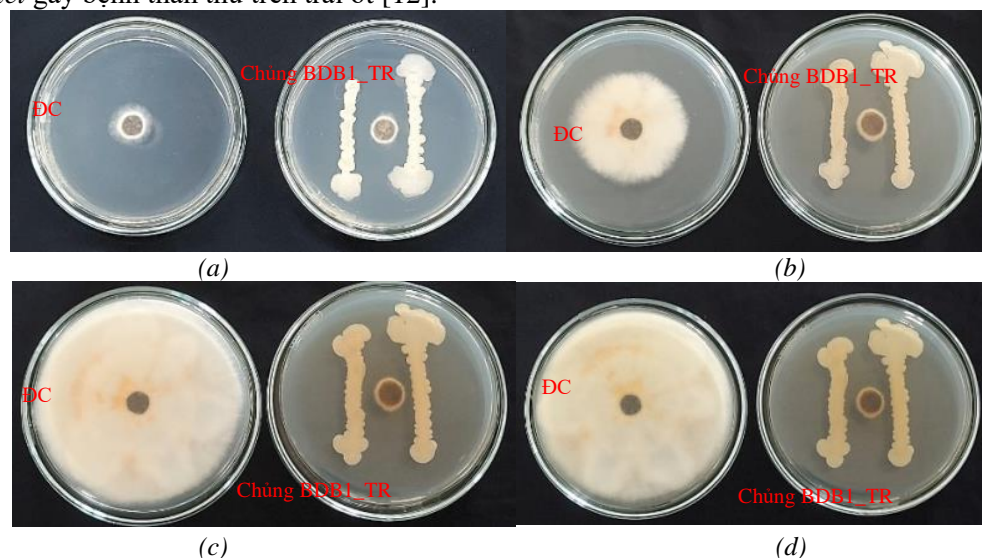
hoạt tính ức chế của mỗi chủng vi khuẩn khác nhau qua từng ngày, cụ thể: khả năng ức chế của các chủng BDB1\_T, BDB2\_TR, BDB2\_V, BDB3\_TR tăng dần theo thời gian; khả năng đối kháng của chủng BDB1\_TR, BDB1\_V và BDB3\_V tăng cao nhất ở ngày 3 và giảm dần ở ngày 4, 5; chủng BDB3\_VN kháng nấm cao nhất ở ngày 2 và giảm dần từ ngày 3 (Hình 6). Kết quả này có thể được giải thích là do sự cạnh tranh dinh dưỡng nên hoạt tính vi khuẩn yếu đi, trong khi sự phát triển của nấm càng mạnh [27].

**Bảng 2.** Hiệu suất đối kháng của các chủng vi khuẩn phân lập đối với chủng nấm B1 (%)

Chủng vi khuẩn	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5	Trung bình
BDB1_T	-	12,13 <sup>c</sup> ± 2,39	12,65 <sup>c</sup> ± 7,61	13,92 <sup>d</sup> ± 6,19	15,05 <sup>cd</sup> ± 5,93	13,44 <sup>d</sup> ± 1,31
BDB1_TR	-	25,18 <sup>ab</sup> ± 1,13	26,73 <sup>abc</sup> ± 4,88	24,40 <sup>bcd</sup> ± 2,76	21,11 <sup>bcd</sup> ± 7,70	24,36 <sup>bc</sup> ± 2,37
BDB1_V	-	25,01 <sup>ab</sup> ± 3,33	27,87 <sup>ab</sup> ± 6,19	26,01 <sup>bc</sup> ± 3,46	21,67 <sup>bcd</sup> ± 6,01	25,14 <sup>bc</sup> ± 2,60
BDB2_TR	-	19,32 <sup>abc</sup> ± 7,52	27,25 <sup>ab</sup> ± 7,37	27,91 <sup>b</sup> ± 7,02	30,12 <sup>abc</sup> ± 8,15	26,15 <sup>b</sup> ± 4,72
BDB2_V	-	23,56 <sup>ab</sup> ± 1,90	25,34 <sup>abc</sup> ± 4,15	28,52 <sup>b</sup> ± 5,57	30,18 <sup>ab</sup> ± 4,52	26,90 <sup>b</sup> ± 3,00
BDB3_TR	-	29,26 <sup>a</sup> ± 2,95	36,70 <sup>a</sup> ± 1,80	41,85 <sup>a</sup> ± 1,39	44,13 <sup>a</sup> ± 0,84	37,98 <sup>a</sup> ± 6,59
BDB3_V	-	17,14 <sup>bc</sup> ± 4,26	20,89 <sup>bc</sup> ± 1,90	15,12 <sup>cd</sup> ± 1,15	14,53 <sup>d</sup> ± 2,58	16,92 <sup>cd</sup> ± 2,87
BDB3_VN	-	22,88 <sup>abc</sup> ± 3,50	22,16 <sup>bc</sup> ± 1,23	14,54 <sup>cd</sup> ± 1,09	14,52 <sup>d</sup> ± 1,86	18,52 <sup>bcd</sup> ± 4,62

Các giá trị trong bảng là trung bình của ba lần lặp lại và độ lệch chuẩn; Các số có ký tự theo sau khác nhau trong cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ); “-”: vi khuẩn không có khả năng ức chế chủng nấm B1

Sau 24 giờ đồng nuôi cấy, nấm phát triển bình thường và các chủng *Bacillus* chưa thể hiện khả năng ức chế. Từ ngày 2, các chủng *Bacillus* bắt đầu thể hiện hoạt tính ức chế. Trong đó, chủng BDB3\_TR thể hiện hoạt tính ức chế nấm bệnh mạnh nhất, với tỷ lệ ức chế trung bình là 37,98%. Như vậy, kết quả nghiên cứu cho thấy chủng BDB3\_TR có hoạt tính ức chế nấm *Colletotrichum* sp. cao hơn vi khuẩn *B. subtilis* chủng PY-1 trong nghiên cứu của Gong và cộng sự [28] với hoạt tính ức chế nấm *Fusarium oxysporum* là 32%. Tuy nhiên, khả năng kháng nấm của chủng BDB3\_TR thấp hơn so hoạt tính ức chế của *Bacillus* chủng BHL21 đối với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên trái đu đủ [13] và chủng BHCM9.3 đối với nấm *C. scovillei* gây bệnh thán thư trên trái ớt [12].



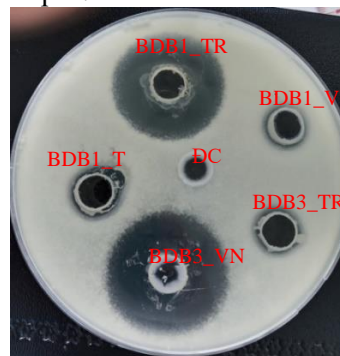
**Hình 6.** Hoạt tính ức chế sợi nấm *Colletotrichum* của vi khuẩn *Bacillus* phân lập ở các ngày 1 (a), 3 (b), 5 (c) và 7 (d)

### 3.3.2. Hoạt tính ức chế bào tử nấm

Kết quả khảo sát đã xác định 8/9 chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập có khả năng ức chế chủng nấm B1 (Bảng 3, Hình 7). Nhìn chung, hoạt tính ức chế của vi khuẩn *Bacillus* giảm nhẹ theo thời gian, tuy nhiên mỗi chủng có mức độ đối kháng khác nhau. Ở ngày 1, nấm chưa phát triển nên chưa quan sát

được hoạt tính ức chế bào tử nấm của vi khuẩn *Bacillus*. Từ ngày 2, vi khuẩn *Bacillus* thể hiện hoạt tính ức chế bào tử nấm với sự xuất hiện của vòng ức chế. Chủng vi khuẩn BDB3\_TR thể hiện khả năng ức chế nấm cao nhất, với đường kính vòng ức chế trung bình là 0,9 cm ( $p < 0,05$ ). Tuy nhiên, chủng BDB3\_TR có đường kính vòng ức chế bào tử nấm *Colletotrichum* phân lập từ trái bưởi nhỏ hơn so nghiên cứu của Nguyễn Bá Thọ và cộng sự [15] cho thấy *B. subtilis* chủng ĐR2B1 ức chế bào tử nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh khô cành khô quả trên cây cà phê.

Như vậy, kết quả khảo sát bằng phương pháp đối kháng sợi nấm và ức chế bào tử cho thấy chủng vi khuẩn BDB3\_TR thể hiện khả năng kháng nấm cao nhất, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng vi khuẩn còn lại. Phương pháp đối kháng sợi nấm chỉ cho biết vi khuẩn *Bacillus* có khả năng đối kháng hay không nhưng không xác định được khả năng đối kháng là do sự cạnh tranh dinh dưỡng hay do vi khuẩn *Bacillus* sinh các hợp chất kháng nấm. Tuy nhiên, phương pháp đối kháng bào tử cho biết vi khuẩn *Bacillus* có khả năng sinh các chất kháng khuẩn, thể hiện qua các vòng vô khuẩn, đường kính vòng vô khuẩn càng lớn thì khả năng sinh chất kháng nấm càng cao [15].



**Hình 7.** Hoạt tính ức chế bào tử nấm *Colletotrichum* của các chủng vi khuẩn *Bacillus* phân lập

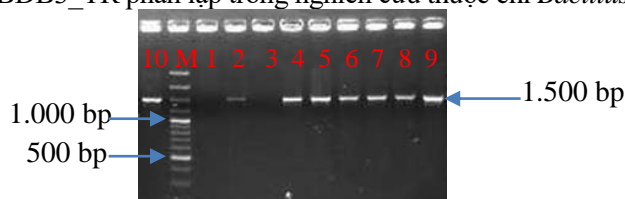
**Bảng 3.** Đường kính vòng kháng khuẩn của vi khuẩn *Bacillus* đối với chủng nấm B1 (mm)

Chủng vi khuẩn	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5	Trung bình
BDB1_T	-	2,3 <sup>b</sup> ± 0,06	2,3 <sup>b</sup> ± 0,06	2,3 <sup>b</sup> ± 0,06	2,3 <sup>b</sup> ± 0,06	2,3 <sup>c</sup> ± 0,00
BDB1_TR	-	6,3 <sup>ab</sup> ± 0,15	6,3 <sup>ab</sup> ± 0,15	6,3 <sup>ab</sup> ± 0,15	6,3 <sup>ab</sup> ± 0,15	6,3 <sup>ab</sup> ± 0,15
BDB1_V	-	3,7 <sup>b</sup> ± 0,06	3,3 <sup>b</sup> ± 0,12	3,3 <sup>b</sup> ± 0,12	3,3 <sup>b</sup> ± 0,12	3,4 <sup>cd</sup> ± 0,02
BDB2_TR	-	5,3 <sup>ab</sup> ± 0,15	4,0 <sup>b</sup> ± 0,00	4,0 <sup>b</sup> ± 0,00	3,3 <sup>b</sup> ± 0,06	4,2 <sup>c</sup> ± 0,08
BDB2_V	-	6,3 <sup>ab</sup> ± 0,25	6,3 <sup>ab</sup> ± 0,25	6,3 <sup>ab</sup> ± 0,25	6,0 <sup>ab</sup> ± 0,27	6,2 <sup>b</sup> ± 0,02
BDB3_TR	-	9,7 <sup>a</sup> ± 0,25	9,0 <sup>a</sup> ± 0,30	8,7 <sup>a</sup> ± 0,31	8,7 <sup>a</sup> ± 0,31	9,0 <sup>a</sup> ± 0,05
BDB3_V	-	3,3 <sup>b</sup> ± 0,12	3,3 <sup>b</sup> ± 0,12	3,3 <sup>b</sup> ± 0,12	2,7 <sup>b</sup> ± 0,06	3,2 <sup>de</sup> ± 0,03
BDB3_VN	-	3,0 <sup>b</sup> ± 0,10	3,0 <sup>b</sup> ± 0,10	2,7 <sup>b</sup> ± 0,10	2,7 <sup>b</sup> ± 0,06	2,8 <sup>de</sup> ± 0,02

Các giá trị trong bảng là trung bình của ba lần lặp lại và độ lệch chuẩn; Các số có ký tự theo sau khác nhau trong cùng một cột thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ); “-“: vi khuẩn không có khả năng ức chế chủng nấm B1.

### 3.4. Kết quả định danh vi khuẩn *Bacillus*

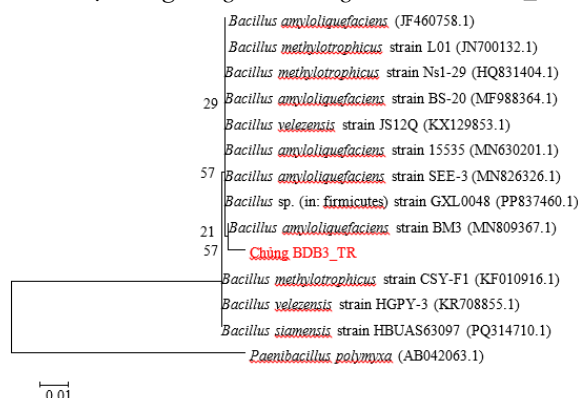
Tám chủng vi khuẩn phân lập có hoạt tính ức chế nấm bệnh trong nghiên cứu được chọn để thực hiện phản ứng PCR và đều khuếch đại được đoạn gen 16S rRNA với kích thước là 1,500 bp (Hình 8). Bên cạnh đó, kết quả giải trình cho thấy chủng BDB3\_TR tương đồng 100% với vi khuẩn *Bacillus* chủng BMr201 (MK294321.1) và *B. cereus* chủng 38 (MT783982.1) trên cơ sở dữ liệu NCBI (Hình 9). Cây phả hệ (Hình 10) cho thấy chủng BDB3\_TR phân lập thuộc cùng nhóm với các loài *Bacillus* trên ngân hàng Gene (Hình 4). Như vậy, dựa trên đặc điểm hình thái, sinh hóa và giải trình tự có thể khẳng định chính chủng BDB3\_TR phân lập trong nghiên cứu thuộc chi *Bacillus*.



**Hình 8.** Kết quả khuếch đại đoạn gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn phân lập. M. Thang chuẩn 100 bp; Giếng 1: đối chứng âm (nước); Giếng 3: mẫu âm tính; Giếng 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 và 10: thử tự các chủng vi khuẩn BDB1\_T, BDB1\_TR, BDB1\_V, BDB2\_TR, BDB3\_TR, BDB3\_V và BDB3\_VN

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus sp. (in: Bacteria) strain BMr201 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus sp. (in: firmicutes)</a>	1423	1423	100%	0.0	100.00%	1443	<a href="#">MK294321.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus cereus strain 38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus cereus</a>	1423	1423	100%	0.0	100.00%	1430	<a href="#">MT783982.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacterium B5(2013) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">bacterium B5(2013)</a>	1423	1423	100%	0.0	100.00%	1544	<a href="#">KF114443.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus cereus strain NIOCC_TW161 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus cereus</a>	1423	1423	100%	0.0	100.00%	1400	<a href="#">KY196516.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus cereus strain LJO5L 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus cereus</a>	1423	1423	100%	0.0	100.00%	1446	<a href="#">MH793361.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bacillus thuringiensis strain AFS094487 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus thuringiensis</a>	1423	1423	100%	0.0	100.00%	1544	<a href="#">QP986408.1</a>

Hình 9. Kết quả so sánh mức độ tương đồng của chủng vi khuẩn BDB3\_TR bằng công cụ BLASTn



Hình 10. Cây phả hệ thể hiện mối quan hệ di truyền của chủng vi khuẩn BDB3\_TR với các loài Bacillus trên ngân hàng Gene

#### 4. Kết luận

Dựa trên đặc điểm hình thái, kết quả lây nhiễm và giải trình tự đoạn gen ITS, nghiên cứu đã phân lập và xác định được nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên trái bưởi Năm Roi sau thu hoạch ở thị xã Bình Minh, tỉnh Vĩnh Long. Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu cũng đã phân lập và xác định được 8/9 chủng vi khuẩn *Bacillus* từ đất vùng rễ cây bưởi Năm Roi có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* bằng phương pháp ức chế sợi nấm và bào tử. Trong đó, chủng BDB3\_TR thể hiện khả năng kháng nấm cao nhất với hiệu quả đối kháng sợi nấm là 37,98% và đường kính vòng ức chế bào tử là 9,0 mm ( $p < 0,05$ ). Dựa trên đặc điểm hình thái, sinh hóa, chủng BDB3\_TR được xác định thuộc chi *Bacillus* do tương đồng 100% với loài *B. thuringiensis* chủng SXFB8 trên ngân hàng Gen.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] V. L. Nguyen, *Citrus trees: varieties and growing techniques*, Agricultural Publishing House, 2006.
- [2] T. D. Nguyen, "Minimize the increase in area and rapid development of orange and pomelo trees, especially in unsuitable areas," 2023. [Online]. Available: <https://vukehoach.mard.gov.vn/News.aspx?id=3124>. [Accessed October 27, 2024].
- [3] T. L. P. Nguyen, and T. V. Tran, "Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of peels' essential oils of different pomelo varieties in the south of Vietnam," *International Food Research Journal*, vol. 22, no. 6, pp. 2426-2431, 2015.
- [4] T. D. Nguyen, V. Q. Pham, and T. K. Le, "A study into the effects of fruit covering time and cover materials on pest, disease, appearance and quality of Dien pomelo," (in Vietnamese), *Vietnam Journal of Science and Technology*, vol. 58, no. 8, pp. 13-16, 2016.
- [5] V. Guarnaccia, J. Z. Groenewald, G. Polizzi, et al., "High species diversity in *Colletotrichum* associated with citrus diseases in Europe," *Persoonia*, vol. 39, no. 1, pp. 32-50, 2017.
- [6] V. T. Pham, "The situation of pesticide use and several of reduced measures for improper pesticide use in rice production in the Mekong Delta," (in Vietnamese), *CTU Journal of Science*, vol. 28, no. 1, pp. 47-53, 2013.
- [7] N. Patel, P. Desai, N. Patel, et al., "Agronanotechnology for plant fungal disease management: a review," *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, vol. 3, no. 10, pp. 71-84, 2014.
- [8] P. Mishra, A. Sharma, and D. Sharma, "A study on harmful effects of pesticide residue in vegetables," *International Journal of Recent Research and Review*, vol. 7, no. 1, pp. 45-48, 2014.

- [9] S. Parthasarathy, J. Rajalakshmi, P. Narayanan, *et al.*, "Bio-control potential of microbial antagonists against post-harvest diseases of fruit crops: A review," *Research and Reviews: Journal of Botanical Sciences*, vol. 6, no. 1, pp. 17-23, 2017.
- [10] Q. Fadhilah, I. Santoso, A. Maryanto, *et al.*, "Antifungal potential from *Bacillus* sp. against phytopathogenic fungus *Colletotrichum* sp.," *AIP Conference Proceedings*. AIP Publishing, vol. 2374, no. 1, pp. 1-8, 2021.
- [11] W. Jumpathong, B. Intra, J. Euanorasetr, *et al.*, "Biosurfactant-producing *Bacillus velezensis* PW192 as an anti-fungal biocontrol agent against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum musae*," *Microorganisms*, vol. 10, no. 5, pp. 1-5, 2022.
- [12] V. Choub, S. J. Won, H. B. Ajuna, *et al.*, "Antifungal activity of volatile organic compounds from *Bacillus velezensis* CE 100 against *Colletotrichum gloeosporioides*," *Horticulturae*, vol. 8, no. 6, pp. 1-5, 2022.
- [13] T. T. Tran, T. A. N. Nguyen, T. M. C. Le, *et al.*, "Isolation and selection of a strain of *Bacillus subtilis* group for high antagonistic activity against *Colletotrichum scovillei* causing chilli anthracnose disease in Ho Chi Minh City," (in Vietnamese), *Ho Chi Minh City Open University Journal of Science - Engineering and Technology*, vol. 15, no. 1, pp. 72-86, 2020.
- [14] T. N. H. Nguyen, V. C. T. Quach, T. T. Nguyen, *et al.*, "Isolation of *Bacillus* with active anti-fishing collections *Colletotrichum* spp. causes anthracnose on papaya fruit postharvest," (in Vietnamese), *TNU Journal of Science and Technology*, vol. 228, no. 1, pp. 357-363, 2023.
- [15] B. T. Nguyen, T. L. Nguyen, and D. Q. Vo, "Isolation of several antagonistic *Bacillus* sp. species against coffee berry disease by *Colletotrichum* sp. in Dak Nong province," (in Vietnamese), *Journal of Science Technology & Food*, vol. 20, no. 3, pp. 94-102, 2020.
- [16] N. Ashwini and S. J. B. Srividya, "Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1," *3 Biotech*, vol. 4, no. 2, pp. 127-136, 2014.
- [17] M. 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. 12, no. 51, pp. 7124-7132, 2013.
- [18] W. G. Weisburger, 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.
- [19] E. Moore, A. Arnscheidt, A. Kruger, C. Strompl, and M. Mau, "Simplified protocols for preparation of genomic DNA from bacterial cultures," *Molecular Microbial Ecology Manual*, vol. 1, no. 1, pp. 3-18, 2004.
- [20] M. A. Klich, *Identification of common Aspergillus species*, CBS, 2002.
- [21] B. Cruz-Lagunas, S. Á. Ortega-Acosta, G. Reyes-García, *et al.*, "*Colletotrichum gloeosporioides* causes anthracnose on grapefruit (*Citrus paradisi*) in Mexico," *Australasian Plant Disease Notes*, vol. 15, no. 1, pp. 1-4, 2020.
- [22] T. J. White, T. Bruns, S. Lee, *et al.*, "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.
- [23] N. D. Tran, "Handbook of Molecular Biology Practice," *Can Tho University Publishing House*, 2011.
- [24] Y. Touré, M. Ongena, P. Jacques, *et al.*, "Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple," *Journal of Applied Microbiology*, vol. 96, no. 5, pp. 1151-1160, 2004.
- [25] D. Dhanasekaran, A. Panneerselvam, and N. Thajuddin, "Applications of actinobacterial fungicides in agriculture and medicine," *IntechOpen*, vol. 2012, pp. 29-54, 2012.
- [26] J. G. Holt, N. R. Krieg, P. H. Sneath, *et al.*, *Bergey's Manual of determinate bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, 1994, pp. 786-788.
- [27] T. L. Nguyen, T. Y. N. Nguyen, T. P. Nguyen, *et al.*, "Isolation and selection of antagonistic bacteria from rhizosphere soil against *Colletotrichum* sp. causing anthracnose on chilli," (in Vietnamese), *CTU Journal of Science*, vol. 47, no. 1, pp. 16-23, 2016.
- [28] M. Gong, J. D. Wang, J. Zhang, H. Yang, X. F. Lu, Y. Pei, and J. Q. Cheng, "Study of the antifungal ability of *Bacillus subtilis* strain PY-1 in vitro and identification of its antifungal substance (iturin A)," *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, vol. 38, no. 4, pp. 233-240, 2006.