

ISOLATION OF LACTIC ACID BACTERIA WITH ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST *Colletotrichum* sp. CAUSING ANTHRACNOSE ON POSTHARVEST CAPSICUM FRUITS

Nguyen Thi Hong Gam^{1*}, Tran Quoc Dung², Nguyen Tri Yen Chi¹, Quach Van Cao Thi¹

¹Vinh Long University of Technology Education, ²Party Committees of Vinh Long Province's Agencies and Enterprises

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Received: 13/10/2022</p> <p>Revised: 07/12/2022</p> <p>Published: 20/12/2022</p>	<p>Anthraco-nose caused by <i>Colletotrichum</i> sp. appear more popular, causing much damage to the yield and quality of many crops. Therefore, this study was conducted to isolate and select lactic acid bacteria against <i>Colletotrichum</i> sp. causing anthracnose on postharvest capsicum fruits in Binh Tan district, Vinh Long province. As the results, 7 strains of lactic acid bacteria were isolated from traditional fermented products such as kimchi, sauerkraut, and sour shrimp. Antagonistic activity of isolated lactic acid bacteria against <i>Colletotrichum</i> sp. was carried out by antagonistic mycelia and spore methods. The results showed that 7/7 strains of lactic acid bacteria performed the antifungal activity <i>Colletotrichum</i> sp., including 6/7 strains with the well resistance and 1/7 strains with moderate resistance. KC2R strain was noted with the significantly highest antibacterial activity to <i>Colletotrichum</i> sp., with an antagonistic efficiency by the mycelium method of 25.40%, and average inhibition zone by spore method is 5.62 cm. Based on the results of morphological characteristics, the 16S rRNA gene sequencing showed that the KC2R strain were classified belonging to the species of <i>Lactobacillus plantarum</i> with 100% similarity. Research results showed that KC2R strain has the high application potential to post-harvest chili storage.</p>
<p>KEYWORDS</p> <p>Anthraco-nose disease</p> <p>Antifungal activity</p> <p><i>Capsicum annuum</i> L.</p> <p><i>Colletotrichum</i> sp.</p> <p>Lactic acid bacteria</p>	

PHÂN LẬP VI KHUẨN LACTIC CÓ HOẠT TÍNH ĐỐI KHÁNG NẤM *Colletotrichum* sp. GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN TRÁI ỚT SỪNG SAU THU HOẠCH

Nguyễn Thị Hồng Gấm^{1*}, Trần Quốc Dũng², Nguyễn Trí Yên Chi¹, Quách Văn Cao Thi¹

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
<p>Ngày nhận bài: 13/10/2022</p> <p>Ngày hoàn thiện: 07/12/2022</p> <p>Ngày đăng: 20/12/2022</p>	<p>Bệnh thán thư do nấm <i>Colletotrichum</i> sp. xuất hiện ngày càng phổ biến, gây nhiều thiệt hại đến năng suất và chất lượng của nhiều loại cây trồng. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn vi khuẩn lactic có hoạt tính đối kháng nấm <i>Colletotrichum</i> sp. gây bệnh thán thư trên trái ớt sừng sau thu hoạch ở huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long. Kết quả nghiên cứu đã phân lập được 7 chủng vi khuẩn lactic từ các sản phẩm lên men truyền thống là kim chi, dưa cải và tôm chua. Hoạt tính đối kháng của các chủng vi khuẩn lactic phân lập được đối với nấm <i>Colletotrichum</i> sp. được thực hiện bằng phương pháp đối kháng sợi nấm và phương pháp đối kháng bào tử. Kết quả cho thấy 7/7 chủng vi khuẩn lactic có hoạt tính đối kháng với nấm <i>Colletotrichum</i> sp., trong đó có 6/7 chủng đối kháng mạnh và 1/7 chủng đối kháng trung bình. Kết quả nghiên cứu chọn được chủng vi khuẩn lactic KC2R có hoạt tính đối kháng mạnh nhất với nấm <i>Colletotrichum</i> sp., với hiệu suất đối kháng bằng phương pháp sợi nấm là 25,40% và trung bình đường kính vòng vô nấm bằng phương pháp bào tử là 5,62 cm. Dựa vào kết quả quan sát đặc điểm hình thái, giải trình tự đoạn gen 16S rRNA cho thấy, chủng vi khuẩn KC2R tương đồng 100% với loài <i>Lactobacillus plantarum</i>. Kết quả nghiên cứu cho thấy, chủng vi khuẩn KC2R có tiềm năng ứng dụng cao trong việc bảo quản ớt sừng sau thu hoạch.</p>
<p>TỪ KHÓA</p> <p>Bệnh thán thư</p> <p><i>Capsicum annuum</i> L.</p> <p><i>Colletotrichum</i> sp.</p> <p>Hoạt tính kháng nấm</p> <p>Vi khuẩn lactic</p>	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6669>

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

1. Giới thiệu

Ớt (*Capsicum annuum* L.) là một trong những loại rau quả được sử dụng làm gia vị phổ biến trong bữa ăn của con người. Trái ớt chứa nhiều loại vitamin, chất khoáng và một số loại acid amin, protein, chất béo [1]. Sản lượng ớt xuất khẩu chiếm khoảng 97,5%, trong đó thị trường chính là Trung Quốc với 80% tổng lượng ớt [2]. Bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* sp. gây ra làm trái nhanh thối, ảnh hưởng lớn đến năng suất và chất lượng trái [3]. Hiện nay, công tác quản lý và phòng trừ bệnh, nhất là bệnh thán thư do nấm *Colletotrichum* sp. ở các vùng trồng ớt chuyên canh đang gặp nhiều khó khăn và chưa mang lại hiệu quả.

Cho đến nay, đã có các nghiên cứu phân lập lợi khuẩn có hoạt tính đối kháng với nấm bệnh trên nhiều loại cây trái [4]-[8]. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu về việc phân lập vi khuẩn lactic có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum* sp. trên trái ớt sừng sau thu hoạch ở huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long. Vì vậy, nghiên cứu phân lập vi khuẩn lactic có hoạt tính đối kháng nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên trái ớt sừng sau thu hoạch là rất cần thiết và có ý nghĩa. Kết quả của nghiên cứu là cơ sở khoa học cho việc ứng dụng vi khuẩn lactic để bảo quản trái ớt sừng sau thu hoạch.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu

Vi khuẩn lactic được phân lập từ các sản phẩm lên men truyền thống gồm kim chi, dưa cải và tôm chua tại chợ Vĩnh Long. Nấm *Colletotrichum* sp. được phân lập từ các trái ớt sừng mắc bệnh thán thư tại hộ trồng ớt chuyên canh huyện Bình Tân, tỉnh Vĩnh Long.

2.2. Phương pháp phân lập vi khuẩn lactic

Các bước phân lập vi khuẩn lactic được thực hiện theo mô tả trong nghiên cứu của Ngô Thị Phương Dung và cộng sự (2011) có điều chỉnh và bổ sung [9]. Các bước thực hiện gồm: pha loãng mẫu đến nồng độ thích hợp (10^{-3} - 10^{-6}) bằng nước cất. Hút 100 μ L mẫu ở các nồng độ pha loãng, trải lên đĩa petri có chứa môi trường MRS, ủ kỵ khí ở 37°C trong 48 giờ. Tiến hành chọn vi khuẩn lactic là các khuẩn lạc có vòng sáng (phân giải CaCO₃). Cây tách ròng nhiều lần để được các chủng vi khuẩn thuần. Các chủng vi khuẩn sau khi phân lập được xác định một số đặc điểm hình thái và sinh lí, sinh hóa cơ bản của vi khuẩn lactic như nhuộm Gram, nhuộm bào tử, hoạt tính oxidase, catalase.

Phương pháp nhuộm Gram (Sử dụng bộ nhuộm Gram của Công ty TNHH dịch vụ và thương mại Nam Khoa): Làm một vết bôi vi khuẩn trên lame sạch. Để khô và cố định vi khuẩn bằng cách hơi nóng qua ngọn lửa của đèn cồn. Nhỏ vài giọt crystal violet lên bề mặt vết bôi và để yên 1 phút. Rửa nhanh bằng nước. Nhỏ vài giọt lugol lên bề mặt phết nhuộm và để yên 1 phút. Rửa nhanh bằng nước. Tẩy màu bằng cách nghiêng lame và nhỏ từ từ alcohol lên phết nhuộm, khi giọt alcohol rời khỏi lame không có màu tím thì ngưng. Rửa nhanh bằng nước. Nhỏ vài giọt safranin lên bề mặt phết nhuộm và để yên 1 phút. Rửa nhanh bằng nước. Thấm khô phết nhuộm và quan sát dưới kính hiển vi. Kết quả: Vi khuẩn Gram dương (+) có màu tím xanh. Vi khuẩn Gram âm (-) có màu hồng đỏ.

Phương pháp nhuộm bào tử: Làm vết bôi vi khuẩn lên lame sạch. Để khô và cố định vi khuẩn bằng ngọn lửa đèn cồn. Đặt mẫu giấy thấm lên vết bôi. Phủ vết bôi thuốc nhuộm lục malachite, hơi hơi nước 5 phút. Rửa nhanh bằng nước. Phủ lên vết bôi thuốc nhuộm safranin trong 30 giây. Rửa lại nhanh bằng nước. Thấm khô phết nhuộm và quan sát dưới kính hiển vi. Kết quả: Bào tử có màu xanh, tế bào có màu hồng.

2.3. Phương pháp phân lập và định danh nấm *Colletotrichum* sp.

Các bước phân lập nấm *Colletotrichum* sp. được thực hiện theo nghiên cứu của Lê Thanh Khang và cộng sự (2020) có điều chỉnh và bổ sung [10]. Các bước phân lập gồm: Khử trùng bề

mặt mẫu bằng nước cất và cùn 70°, cắt mẫu bệnh thành hình vuông với kích thước khoảng 1cm². Cho khối ốt chứa nấm bệnh vào giữa đĩa petri có chứa môi trường PDA, ủ đĩa ở nhiệt độ 37°C trong 5-7 ngày. Sau đó, tiến hành tuyển chọn các dòng có các đặc điểm hình thái của nấm *Colletotrichum* sp.

Nấm *Colletotrichum* sp. được định danh dựa vào các đặc điểm hình thái, kỹ thuật sinh học phân tử (PCR) và giải trình tự với cặp mồi ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' và ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' [11]. Sản phẩm PCR sẽ được gửi giải trình tự tại công ty Macrogen, Hàn Quốc (www.macrogen.com).

2.4. Khảo sát hoạt tính đối kháng của vi khuẩn lactic với nấm *Colletotrichum* sp.

Hoạt tính đối kháng được thực hiện bằng phương pháp đối kháng sợi nấm theo nghiên cứu của Nguyễn Thị Liên và cộng sự (2016) [3]. Các bước thực hiện gồm: Chuẩn bị môi trường MRS khoai tây, cho khối nấm có diện tích khoảng 1cm² vào giữa đĩa, ủ 37°C. Khi nấm bắt đầu hình thành sợi nấm, tiến hành cấy 2 đường vi khuẩn song song, có chiều dài khoảng 2 cm, khối nấm nằm giữa 2 đường vi khuẩn. Tiến hành quan sát và đo đường kính nấm phát triển qua từng ngày và ghi nhận kết quả. Hiệu suất ức chế sự phát triển của nấm được tính theo công thức (1):

$$I_1 = \frac{R - r}{R} \times 100 \quad (1)$$

Trong đó: I₁: hiệu suất đối kháng của vi khuẩn (%); R: bán kính của hệ sợi nấm đối chứng (cm); r: bán kính của hệ sợi nấm trên đĩa có chủng vi khuẩn (cm).

Phương pháp đối kháng bào tử thực hiện theo nghiên cứu của Magnusson cùng cộng sự (2003) và Muhialdin cùng cộng sự (2018) [12], [13]. Các bước thực hiện gồm: Cấy 2 đường vi khuẩn song song (dài khoảng 2 cm, cách nhau 1 cm) trong môi trường MRS khoai tây, ủ 37°C trong 24 giờ. Bỏ sung nấm *Colletotrichum* sp. vào môi trường PDA 0,7% agar (nhiệt độ khoảng 30 - 40°C). Đổ nhẹ môi trường chứa bào tử nấm với mật số ở 10⁵ CFU/mL vào đĩa petri đã cấy vi khuẩn trước đó, ủ đĩa ở 37°C trong 48 giờ. Quan sát và tiến hành đo đường kính vòng vô nấm (d) mỗi ngày, ghi nhận kết quả.

Hoạt tính đối kháng được quy ước bằng đường kính vòng vô nấm (d). Trong đó, vi khuẩn lactic có hoạt tính kháng khuẩn yếu (d ≤ 2 cm), kháng trung bình (2,1 ≤ d ≤ 4 cm), kháng mạnh (4,1 ≤ d ≤ 6 cm) và kháng rất mạnh (d > 6,1 cm) [13].

2.5. Định danh vi khuẩn lactic

Nghiên cứu chọn 1 chủng vi khuẩn lactic có hoạt tính đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. cao nhất, tiến hành định danh bằng kỹ thuật PCR và giải trình tự với cặp mồi 27F: 5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3' và 1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' [14]. Sản phẩm PCR sẽ được gửi giải trình tự theo phương pháp của Sanger tại công ty Macrogen, Hàn Quốc (www.macrogen.com).

2.6. 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 lactic và nấm trên cơ sở dữ liệu NCBI.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn lactic

Kết quả đã phân lập được 7 chủng vi khuẩn lactic từ các mẫu dưa cải, kim chi và tôm chua ở chợ Vĩnh Long (Bảng 1).

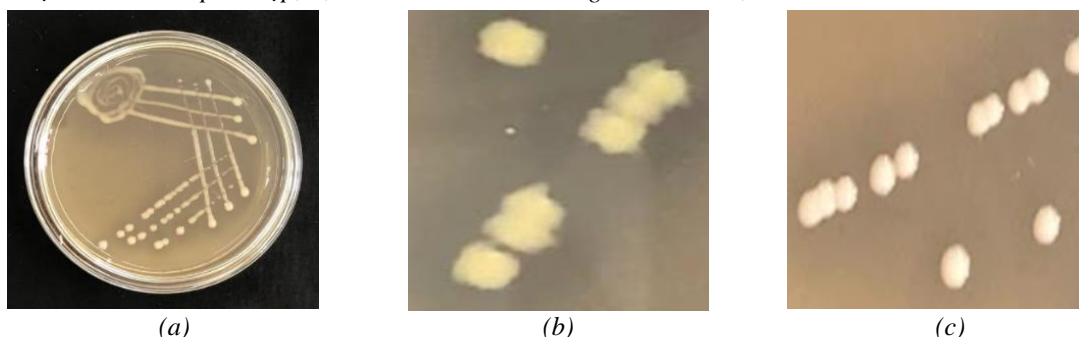
Kết quả chọn các khuẩn lạc có dạng hình tròn hoặc có rìa, lồi, kích thước khác nhau (dao động từ 0,5-2,0 mm), với màu vàng nhạt hoặc trắng sữa, có vòng trong suốt xung quanh do khuẩn lạc tạo acid lactic phân giải CaCO₃ (Hình 1). Kết quả nhuộm Gram, nhuộm bào tử, hoạt tính oxidase,

catalase cho thấy vi khuẩn thuộc nhóm Gram dương (+), không sinh bào tử, phản ứng catalase âm tính và oxidase âm tính. Qua kết quả phân lập cho thấy các đặc điểm hình thái của các chủng vi khuẩn phân lập tương tự với các nghiên cứu trước đây. Trong nghiên cứu [9] cho thấy, vi khuẩn lactic đã phân lập có các hình thái: trắng đục, bề mặt trơn lồi, bìa nguyên hoặc bìa chia thùy. Trong nghiên cứu [15] cho thấy, vi khuẩn lactic có dạng hình tròn, mép trơn, lồi lên, màu trắng sữa hoặc màu kem.

Bảng 1. Kết quả phân lập vi khuẩn lactic từ sản phẩm lên men truyền thống

Nguồn phân lập	Số mẫu phân lập	Số chủng vi khuẩn	Địa điểm	Kí hiệu
Dưa cải	3	3	Chợ Phường 1, tỉnh Vĩnh Long	DC1, DC2, DC3
Kim chi	2	3	Chợ Long Hồ, tỉnh Vĩnh Long	KC1, KC2L, KC2R
Tôm chua	1	1	Chợ Long Hồ, tỉnh Vĩnh Long	TC1
Tổng	6	7		

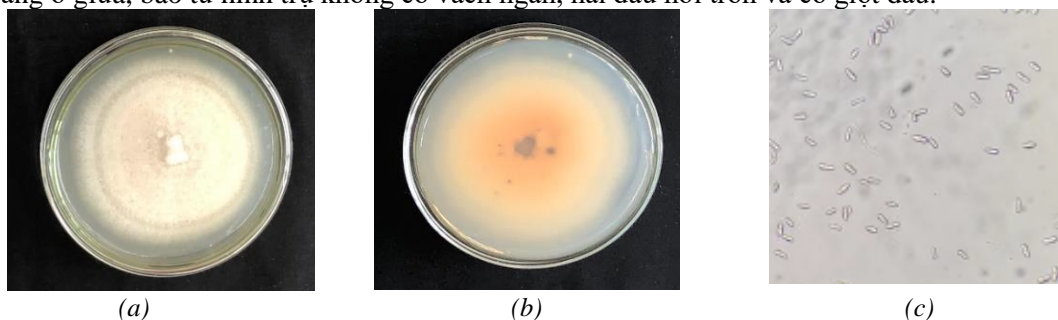
Ghi chú: DC, KC, TC lần lượt là nguồn gốc của vi khuẩn trong mẫu dưa cải, kim chi, tôm chua; 1, 2, 3 là số hiệu cho các lần phân lập; L, R là hình thái của chủng vi khuẩn lớn, rìa.



Hình 1. Vi khuẩn lactic phân lập trên môi trường MRS: (a) Vi khuẩn lactic có vòng trong suốt xung quanh; (b) Khuẩn lạc lactic màu vàng nhạt, có rìa, tròn; (c) Khuẩn lạc lactic có màu trắng sữa, tròn

3.2. Kết quả phân lập và định danh nấm *Colletotrichum* sp.

Kết quả nghiên cứu đã phân lập được 3 chủng nấm bệnh khác nhau (kí hiệu OT1, OT2 và OT3). Kết quả chọn chủng nấm OT1 có màu cam nhạt, sợi nấm mọc sát thạch, có lông tơ, mép gọn sóng. Sau 6 ngày đạt kích thước 45-55 mm, sau 10 ngày sợi nấm mọc dày và sát thạch, ngả màu nâu, bào tử có dạng hình trụ, không có vách ngăn (Hình 2). Nấm sau khi phân lập có đặc điểm hình thái và bào tử tương tự với các nghiên cứu trước đó. Trong nghiên cứu [16] cho thấy, nấm *Colletotrichum* sp. phát triển trên môi trường PDA hình thành các sợi nấm trên không, lông tơ, màu xám nhạt đến màu cam nhạt, bào tử có thành nhẵn, hình trụ thẳng, có vách ngăn với một đầu tròn một đầu nhọn hoặc cả hai đầu nhọn. Trong nghiên cứu [1] cho thấy, nấm *Colletotrichum* sp. có màu trắng đến xám nhạt, vòng tròn đồng tâm màu hồng cam, hạt li ti màu đen trên thạch, tơ trắng ở giữa, bào tử hình trụ không có vách ngăn, hai đầu hơi tròn và có giọt dầu.



Hình 2. Nấm và bào tử của nấm *Colletotrichum* sp. trên môi trường PDA sau 6 ngày: (a) Mặt trước của nấm *Colletotrichum* sp. trên đĩa có môi trường PDA; (b) Mặt sau của nấm

Colletotrichum sp. trên đĩa có môi trường PDA; (c) Bào tử nấm *Colletotrichum sp.* được quan sát dưới kính hiển vi với vật kính x40

Kết quả giải trình tự chủng nấm OT1 và so sánh bằng công cụ BLASTn trên cơ sở dữ liệu NCBI cho thấy, chủng nấm được phân lập tương đồng 99,34% với chủng nấm *Colletotrichum scovillei* 20CDJ6 (OL774513.1), tương đồng 98,10% với chủng nấm *Colletotrichum scovillei* 20JDS8 (OL774514.1), tương đồng 97,81% với chủng nấm *Colletotrichum scovillei* CsT3 (ON182069.1) (Hình 3).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Colletotrichum scovillei isolate CsT3 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and...	Colletotrichum sc...	556	556	98%	5e-154	97.81%	518	ON182069.1
Colletotrichum scovillei strain 20JDS8 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed sp...	Colletotrichum sc...	556	556	97%	5e-154	98.10%	555	OL774514.1
Colletotrichum scovillei strain 20CDJ6 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed sp...	Colletotrichum sc...	553	553	94%	7e-153	99.34%	549	OL774513.1

Hình 3. Kết quả so sánh mức độ tương đồng của chủng nấm OT1 bằng công cụ BLASTn

3.3. Kết quả khảo sát hoạt tính đối kháng của vi khuẩn lactic với chủng nấm OT1

Kết quả khảo sát cho thấy, có 7/7 chủng vi khuẩn lactic có hoạt tính đối kháng với chủng nấm OT1. Nhìn chung, các chủng vi khuẩn thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh ở những ngày đầu, cao nhất là ngày 3 (Bảng 2). Ở ngày 4, 5 nấm bắt đầu phát triển nhanh hơn, vi khuẩn suy yếu dần, hoạt tính ức chế nấm giảm do sự cạnh tranh chất dinh dưỡng. Kết quả này được ghi nhận tương tự theo nghiên cứu [3].



Hình 4. Đối kháng sợi nấm của vi khuẩn lactic và chủng nấm OT1 ở ngày 4:
(a) Mẫu đối chứng; (b) Mẫu xử lý với vi khuẩn lactic

Bảng 2. Kết quả khảo sát hoạt tính đối kháng chủng vi khuẩn lactic đối với chủng nấm OT1 bằng phương pháp đối kháng sợi nấm

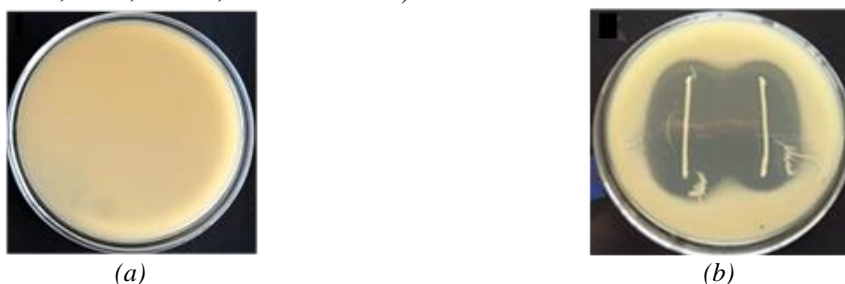
STT	Chủng vi khuẩn	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5	Trung bình
1	DC1	8,79 ^d ±1,91	10,00 ^{ab} ±1,43	11,11 ^b ±0,00	9,62 ^{bc} ±0,00	6,35 ^b ±0,10	9,17
2	DC2	10,61 ^{cd} ±7,20	5,71 ^b ±10,30	10,00 ^b ±5,56	6,73 ^c ±2,88	5,57 ^b ±0,88	7,72
3	DC3	19,28 ^{abcd} ±1,42	20,00 ^{ab} ±0,00	25,56 ^a ±3,33	20,19 ^{ab} ±2,88	13,49 ^{ab} ±0,58	19,70
4	KC1	28,03 ^{ab} ±3,02	21,43 ^{ab} ±1,43	24,44 ^a ±0,00	14,42 ^{abc} ±0,96	20,62 ^a ±1,26	21,79
5	KC2L	15,79 ^{bcd} ±3,05	17,14 ^{ab} ±7,56	19,26 ^{ab} ±5,59	18,59 ^{abc} ±8,67	14,82 ^{ab} ±1,85	17,12
6	KC2R	24,61 ^{abc} ±3,94	25,71 ^a ±5,71	28,89 ^a ±4,44	25,00 ^a ±7,69	22,80 ^a ±8,84	25,40
7	TC1	30,92 ^a ±9,51	24,76 ^a ±7,19	24,44 ^a ±5,88	16,67 ^{abc} ±2,94	22,74 ^a ±2,19	23,91
Trung bình		19,72	17,82	20,53	15,89	15,20	

Ghi chú: - Số liệu thể hiện là giá trị trung bình của ba lần lặp lại và độ lệch chuẩn.

- Các giá trị trong cùng một cột, các số có ký tự theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Kết quả xác định hoạt tính đối kháng bằng phương pháp sợi nấm (Hình 4a, b, Bảng 2) cho thấy, từ ngày 0 đến ngày 5, hoạt tính ức chế của chủng vi khuẩn KC1, KC2R và TC1 giảm nhưng vẫn thể hiện khả năng ức chế chủng nấm OT1 tốt, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng vi khuẩn còn lại, cụ thể: hiệu suất ức chế của chủng vi khuẩn KC1 từ 28,03% còn 20,62%; chủng vi khuẩn KC2R từ 24,61% còn 22,80%; chủng vi khuẩn TC1 từ 30,92% còn 22,74%. Trong đó, trung bình hiệu suất ức chế qua năm ngày của chủng vi khuẩn KC2R là cao nhất với 25,40%. Chủng vi khuẩn KC2R thể hiện hoạt tính ức chế chủng nấm OT1 tương tự chủng vi khuẩn LB54 và LB24 trong nghiên cứu [17].

Kết quả xác định hoạt tính đối kháng bằng phương pháp bào tử (Hình 5a, b, Bảng 3) cho thấy, tỷ lệ phần trăm kháng nấm của các chủng vi khuẩn khác biệt có ý nghĩa thống kê. Trong 7 chủng vi khuẩn đã phân lập, có 1/7 chủng đối kháng trung bình (KC1: 2,79 cm), 6/7 chủng đối kháng mạnh (DC1, DC2, DC3, KC2L, KC2R và TC1).



Hình 5. Đối kháng sợi nấm của vi khuẩn lactic và chủng nấm OT1 ở ngày 4:
(a) Mẫu đối chứng; (b) Mẫu xử lý với vi khuẩn lactic KC2R

Trong Bảng 3, đường kính vòng vô nấm ở ngày 2 của chủng vi khuẩn DC2 (5,20 cm), KC2L (5,40 cm), KC2R (5,67 cm) và TC1 (5,27 cm) khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Ở ngày 3, 4, hoạt tính đối kháng của chủng vi khuẩn KC2R khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các chủng còn lại, cụ thể đường kính vòng vô nấm của ngày 3 là 5,67 cm, ngày 4 là 5,53 cm. Như vậy, chủng vi khuẩn KC2R có hoạt tính ức chế nấm *Colletotrichum* sp. cao hơn so với chủng vi khuẩn C5 và G7 ($d > 2$ cm) trong nghiên cứu [5].

Bảng 3. Kết quả khảo sát hoạt tính đối kháng chủng vi khuẩn lactic đối với chủng nấm OT1 bằng phương pháp đối kháng bào tử

STT	Chủng vi khuẩn	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Trung bình
1	DC1	4,53 ^c ±0,06	4,43 ^c ±0,06	4,20 ^c ±0,10	4,39
2	DC2	5,20 ^{ab} ±0,20	5,00 ^{bc} ±0,27	4,73 ^{bc} ±0,25	4,98
3	DC3	4,57 ^{bc} ±0,06	4,43 ^c ±0,06	4,23 ^c ±0,06	4,41
4	KC1	2,90 ^d ±0,36	2,87 ^d ±0,32	2,60 ^d ±0,20	2,79
5	KC2L	5,40 ^a ±0,17	5,17 ^{ab} ±0,15	4,93 ^{ab} ±0,21	5,17
6	KC2R	5,67 ^a ±0,29	5,67 ^a ±0,29	5,53 ^a ±0,32	5,62
7	TC1	5,27 ^a ±0,31	5,17 ^{ab} ±0,31	4,97 ^{ab} ±0,25	5,14
Trung bình		4,79	4,68	4,46	

Ghi chú: - Số liệu thể hiện là giá trị trung bình của ba lần lặp lại và độ lệch chuẩn.

- Trong cùng một cột, các số có ký tự theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

3.4. Kết quả định danh vi khuẩn lactic

Chủng KC2R có hoạt tính đối kháng mạnh nhất đối với nấm *Colletotrichum* sp. được chọn để giải trình tự.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc Len	Accession
Lactobacillus plantarum strain 2880 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactiplantibacillu...	817	817	99%	0.0	100.00%	1472	MT611842.1
Lactobacillus plantarum strain 2666 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactiplantibacillu...	817	817	99%	0.0	100.00%	1469	MT611686.1
Lactobacillus plantarum strain 2213 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactiplantibacillu...	817	817	99%	0.0	100.00%	1465	MT604710.1
Lactobacillus plantarum strain 2206 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactiplantibacillu...	817	817	99%	0.0	100.00%	1475	MT604704.1
Lactobacillus plantarum strain 2184 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactiplantibacillu...	817	817	99%	0.0	100.00%	1469	MT604684.1

Hình 6. Kết quả so sánh mức độ tương đồng của chủng vi khuẩn KC2R bằng công cụ BLASTn

Kết quả giải trình tự chủng vi khuẩn KC2R và so sánh bằng công cụ BLASTn trên cơ sở dữ liệu NCBI cho thấy, chủng vi khuẩn KC2R tương đồng 100% với các chủng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* 2880 (MT611842.1), *Lactobacillus plantarum* 2666 (MT611686.1), *Lactobacillus plantarum* 2213 (MT604710.1), *Lactobacillus plantarum* 2206 (MT604704.1), *Lactobacillus plantarum* 2184 (MT604684.1) (Hình 6).

4. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập và tuyển chọn được 7 chủng vi khuẩn lactic có hoạt tính đối kháng nấm *Colletotrichum* sp. từ các sản phẩm lên men truyền thống như kim chi, dưa cải và tôm chua ở tỉnh Vĩnh Long. Trong đó, chủng vi khuẩn KC2R có khả năng đối kháng mạnh nhất với chủng nấm OT1. Kết quả định danh cho thấy, chủng vi khuẩn lactic KC2R trong nghiên cứu tương đồng 100% với loài vi khuẩn *Lactobacillus plantarum*.

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 các tiểu thương và hộ trồng ớt đã hỗ trợ cung cấp mẫu thực phẩm lên men và mẫu ớt để nhóm thực hiện nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] D. M. Tran and T. N. Nguyen, "Biological characteristics of the anthracnose fungus *Colletotrichum* sp. harmful to chili plants in Cu Chi, Ho Chi Minh City," *Journal of Science and Technology - Nguyen Tat Thanh University*, vol. 1, no. 4, pp. 50-56, 2018.
- [2] Q. K. Huynh, V. C. Nguyen, D. K. L. Le, and P. H. Le, "Studying the chili fruit processing process and proposing the operating principle of the fresh chili stem separation system," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 55, no. 2, pp. 9-16, 2019.
- [3] 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* sp. causing anthracnose on chili peppers," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 47b, pp. 16-23, 2016.
- [4] A. Husain, Z. Hassan, N. Huda-Faujan, and M. N. Lani, "Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from soil rhizosphere on *Fusarium* species infected chilli seeds," *American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS)*, vol. 29, no. 1, pp. 182-202, 2017.
- [5] A. S. W. El-Mabrok, Z. Hassan, A. M. Mokhtar, K. M. A. Hussain, and F. K. S. B. A. Kahar, "Screening of lactic acid bacteria as biocontrol against (*Colletotrichum capsici*) on chilli Bangi," *Research Journal of Applied Sciences*, vol. 7, no. 9, pp. 466-473, 2012.
- [6] S. E. Oirdi, T. Lakhliifi, A. A. Bahar, M. Yatim, Z. Rachid, and A. Belhaj, "Isolation and identification of *Lactobacillus plantarum* 4F, a strain with high antifungal activity, fungicidal effect, and biopreservation properties of food," *Journal of Food Processing and Preservation*, vol. 45, no. 6, pp. 1-11, 2021.
- [7] A. Yépez, C. Luz, G. Meca, G. Vignolo, J. Manes, and R. Aznar, "Biopreservation potential of lactic acid bacteria from Andean fermented food of vegetal origin," *Food Control*, vol. 78, pp. 393-400, 2017.
- [8] A. Nasrollahzadeh, S. Mokhtari, M. Khomeiri, and P. E. J. Saris, "Antifungal preservation of food by lactic acid bacteria," *Foods*, vol. 11, no. 3, p. 395, 2022.

- [9] T. P. D. Ngo, T. Y. L. Huynh, and X. P. Huynh, "Isolation and selection of lactic acid bacteria capable of producing antibacterial substances," (in Vietnamese), *Can Tho University Journal of Science*, vol. 19a, pp. 176-184, 2011.
- [10] T. K. Le, T. T. H. Nguyen, and T. T. T. Le, "Antifungal activity of *Colletotrichum capsici* causing anthracnose on postharvest chili peppers of tea tree oil (*Meleleuca alternifolia*)," *Can Tho University Journal of Science*, vol. 56, pp. 57-66, 2020.
- [11] T. J. White, T. Bruns, S. Lee, and J.W. 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.
- [12] J. Magnusson, K. Ström, S. Roos, J. Sjögren, and J. Schnürer, "Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria," *FEMS microbiology letters*, vol. 219, no. 1, pp. 129-135, 2003.
- [13] B. J. Muhialdin, Z. Hassan, and N. Saari, "In vitro antifungal activity of lactic acid bacteria low molecular peptides against spoilage fungi of bakery products," *Annals of Microbiology*, vol. 68, no. 9, pp. 557-567, 2018.
- [14] 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.
- [15] Y. Ismail, C. Yulvizar, and B. Mazhitov, "Characterization of lactic acid bacteria from local cow's milk kefir," in *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, IOP Publishing, vol. 130, no. 1, pp. 1-8, 2018.
- [16] M. M. Oo, G. Lim, H. A. Jang, and S. K. Oh, "Characterization and pathogenicity of new record of anthracnose on various chili varieties caused by *Colletotrichum scovillei* in Korea," *Mycobiology*, vol. 45, no. 3, pp. 184-191, 2017.
- [17] N. Laref, B. Guessas, and M. Kihal, "Antifungal compounds production in different temperatures, pH and on modified MRS agar by *Lactobacillus* strains," *Journal of Biological Sciences*, vol. 13, no. 2, pp. 94-99, 2013.