TUYỂN CHỌN VÀ NHÂN NUÔI VI KHUẨN NỘI SINH CÂY SẦU RIÊNG ĐỐI KHÁNG NẤM COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES TẠI ĐẮK LẮK

Trần Thị Hà Trang[1], Ngô Văn Anh[2], Nguyễn Anh Dũng[2]

Ngày nhận bài: 10/07/2026; Ngày phản biện thông qua: 25/07/2026; Ngày duyệt đăng: 07/08/2026

TÓM TẮT

Colletotrichum gloeosporioides là nấm gây bệnh thán thư trên sầu riêng. Đây là một trong những tác nhân phổ biến gây tổn thất nghiêm trọng về năng suất và chất lượng sầu riêng, đặc biệt trong điều kiện nóng ẩm của mùa mưa. Nghiên cứu được thực hiện nhằm khai thác nhóm vi khuẩn nội sinh bản địa từ hệ rễ sầu riêng có khả năng ức chế nấm bệnh. Từ 30 mẫu rễ sầu riêng, phân lập được 20 chủng vi khuẩn. Hoạt tính kháng sợi nấm được đánh giá bằng phương pháp đồng nuôi cấy, với dữ liệu được xử lý bằng phương pháp ANOVA sử dụng phép thử Duncan ($p < 0,01$). Kết quả ghi nhận 8 chủng với hiệu suất kháng nấm cao (50,88% - 66,92%). Trong đó, chủng vi khuẩn EB.KN18 thể hiện hiệu quả kháng nấm cao nhất (66,92%). Sau khi giải trình tự gen 16S rRNA, xác định được EB.KN18 là *Bacillus amyloliquefaciens*. Trong điều kiện nuôi cấy bình tam giác (36 °C, pH 7, 200 rpm), chủng EB.KN18 đạt mật độ sinh trưởng $95,0\times10^8$ CFU/mL sau 48 giờ. Khi nhân nuôi trong hệ thống bioreactor 14 L, mật độ vi khuẩn EB.KN18 đạt $7,08\times10^{11}$ CFU/mL sau 10 giờ lên men. *Bacillus amyloliquefaciens* EB.KN18 là ứng viên tiềm năng cho phát triển chế phẩm sinh học, góp phần canh tác sầu riêng an toàn và bền vững.

***Từ khóa**: Bacillus amyloliquefaciens, Colletotrichum gloeosporioides, đối kháng sinh học, lên men, vi khuẩn nội sinh, sầu riêng.*

1. MỞ ĐẦU

Thán thư là một trong những bệnh hại phổ biến và nghiêm trọng trên nhiều loại cây ăn trái ở vùng nhiệt đới. Sự xâm nhiễm của mầm bệnh biểu hiện qua các vết hoại tử lõm sâu phân bố trên nhiều bộ phận từ lá, thân, cho đến hoa và quả, có thể gây hiện tượng khô ngọn, chết chồi non hoặc thối thân, từ đó làm suy kiệt sức sống và kìm hãm sự phát triển của cây trồng. Ngoài ra, bệnh còn gây rụng hoa, rụng quả và làm giảm chất lượng thịt quả, dẫn đến năng suất và chất lượng nông sản giảm đáng kể (Mai Văn Trị, 2002; Lê Minh Tường và cộng sự, 2024; Law et al., 2025). Chi nấm *Colletotrichum* được xác định là tác nhân chính gây bệnh thán thư trên nhiều loại cây trồng. Trên cây sầu riêng, tác nhân *C. gloeosporioides* được xác định là nguyên nhân gây ra bệnh thán thư. Khi xâm nhiễm, loại nấm này làm cháy và rụng lá sớm, khiến các cành nhỏ bị khô chết, đồng thời làm hư hại cả hoa lẫn quả. Bệnh xuất hiện quanh năm và mạnh nhất trong mùa mưa với 60% cây bị nhiễm bệnh (Lê Hoàng Lệ Thủy và Phạm Văn Kim, 2008).

Việc quản lý bệnh thán thư chủ yếu dựa vào thuốc hóa học như nhóm benzimidazole (Carbendazim) và các chất ức chế sinh tổng hợp sterol (Flusilazole, Difenoconazole) (Lê Hoàng Lệ Thủy và Phạm Văn Kim, 2008). Việc phụ thuộc quá mức vào các hóa chất diệt nấm trong thời gian dài làm kích thích cơ chế kháng thuốc của quần thể vi sinh vật gây bệnh và để lại hệ lụy nghiêm trọng đối với hệ sinh thái, sức khỏe cộng đồng. Thực tế, tính kháng benzimidazole của các chủng *Colletotrichum* đã được ghi nhận trên nhiều loại cây trồng như xoài và chuối. Do đó, việc tìm kiếm các biện pháp phòng trừ an toàn và bền vững hơn đang là nhu cầu cấp thiết. Hiện nay, kiểm soát sinh học được xem là một hướng tiếp cận tiềm năng trong quản lý bệnh thán thư. Nhiều nghiên cứu đã ghi nhận hiệu quả ức chế nấm gây bệnh của các hợp chất tự nhiên, trong đó tinh dầu tràm trà và tinh dầu nghệ cho thấy khả năng ức chế sự phát triển của các loài *Colletotrichum* (Lê Thanh Khang và cộng sự, 2020; Phạm Trung Hiếu và cộng sự, 2021). Ngoài ra, các giải pháp sinh học như sử dụng xạ khuẩn, vi khuẩn lactic và nấm đối kháng (*Trichoderma* spp.) cho thấy khả năng ngăn chặn sự phát triển của sợi nấm *Colletotrichum* nhờ cơ chế cạnh tranh nguồn dinh dưỡng. Biện pháp này thậm chí còn mang lại hiệu quả bảo vệ an toàn cho cây trồng cao hơn so với một số thuốc bảo vệ thực vật hóa học (Lê Minh Tường và cộng sự, 2024; Sutthisa et al., 2023). Đặc biệt, các dòng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* được đánh giá rất tiềm năng do có sức chống chịu tốt với môi trường, đồng thời có thể tiết ra các enzyme ngoại bào hoặc độc chất sinh học làm cản trở quá trình nảy mầm của bào tử nấm *C. gloeosporioides* (Nguyễn Thị Liên và cộng sự, 2017). Trên cây sầu riêng, một số nghiên cứu đã ghi nhận sự hiện diện của vi khuẩn nội sinh trong các mô của sầu riêng, cho thấy tiềm năng ứng dụng của vi khuẩn nội sinh trong phát triển phân bón sinh học và quản lý dịch hại theo hướng nông nghiệp bền vững (Ngô Văn Anh và cộng sự, 2024; Suhandono and Utari, 2014).

Mặc dù tiềm năng của các tác nhân này đã được khẳng định trên nhiều đối tượng như xoài, hành lá hay ớt, nhưng các công bố về sự tương tác giữa vi khuẩn nội sinh bản địa và tác nhân *C. gloeosporioides* trên chính cây sầu riêng tại khu vực Đắk Lắk vẫn còn khá

[1]*Đại học Y Dược Buôn Ma Thuột;*
[2]*Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên;*
Tác giả liên hệ: Ngô Văn Anh; Email: nvanh@ttn.edu.vn.

hạn chế. Đặc biệt, việc tuyển chọn các chủng vi khuẩn nội sinh bản địa có hoạt tính cao, tối ưu hóa điều kiện nhân nuôi và đánh giá khả năng mở rộng quy mô lên men vẫn chưa được nghiên cứu toàn diện. Do đó, nghiên cứu tuyển chọn các chủng vi khuẩn nội sinh có hoạt tính đối kháng mạnh là vấn đề cấp thiết, nhằm tạo cơ sở khoa học cho việc phát triển các chế phẩm sinh học đặc hiệu trong canh tác sầu riêng an toàn và bền vững.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Phương pháp thu thập mẫu

Tiến hành lấy mẫu tại xã Krông Năng đối với giống sầu riêng Monthon từ 5–15 năm tuổi. Tổng cộng 30 mẫu rễ non đã được tập hợp từ 30 vườn có tình trạng sức khỏe khác nhau (cả vườn tốt và vườn bệnh). Tại mỗi vườn, kỹ thuật lấy mẫu 5 điểm được áp dụng: rễ được đào ở độ sâu dưới 20 cm và cách thân cây khoảng 1,5–2 m. Nhằm tránh nguy cơ lây nhiễm chéo giữa các khu vực, găng tay y tế luôn được thay mới sau mỗi lần đổi vườn. Mẫu sau khi thu sẽ được đóng gói trong túi zip tiệt trùng, ghi chú đầy đủ thông tin: địa điểm, ngày tháng, và chuyển về phòng thí nghiệm để tiến hành phân lập ngay.

2.2. Phương pháp phân lập các chủng vi khuẩn nội sinh

- Chuẩn bị môi trường nuôi cấy: Việc phân lập nhóm vi khuẩn nội sinh được thực hiện trên môi trường Luria-Bertani (LB), pH = 7,0. Sau khi phối trộn, hỗn hợp được tiệt trùng bằng nhiệt ẩm ở 121°C trong thời gian 15 phút trước khi sử dụng.

- Xử lý mẫu và khử trùng bề mặt: Quy trình phân lập được thực hiện dựa trên phương pháp của Aravind et al. (2009) có hiệu chỉnh phù hợp với mẫu rễ sầu riêng. Các đoạn rễ (dài 2–3 cm) sau khi rửa sạch tạp chất cơ học bằng nước cất được tiến hành khử trùng bề mặt qua hai giai đoạn: ngâm trong dung dịch sodium hypochlorite 2% (10 phút) và ethanol 70% (1 phút). Cuối cùng, mẫu được rửa sạch hóa chất bằng nước cất vô trùng 5 lần liên tiếp. Để kiểm tra hiệu quả khử trùng, 100 µL nước rửa lần cuối được trải lên đĩa thạch LB và ủ ở 28 °C trong 24 giờ; quy trình chỉ tiếp tục khi không có sự xuất hiện của vi khuẩn trên đĩa kiểm chứng này.

- Kỹ thuật phân lập và bảo quản: Các mẫu mẫu rễ (1 g) được nghiền trong điều kiện vô trùng với dung dịch đệm phosphate 1,5 mM, pH 7,4 và ly tâm ở tốc độ 422,6 rcf, nhiệt độ 4°C trong 1 phút. Phần dịch nổi được thu lại và pha loãng đến nồng độ 10^{-5}; sau đó, 100 µL dung dịch đã pha loãng được trải đều lên bề mặt môi trường thạch LB ủ tại 28°C. Sau 48 giờ, các khuẩn lạc có đặc điểm hình thái riêng biệt sẽ được tuyển chọn, dòng hóa và làm thuần trên môi trường mới. Các chủng thuần chủng được bảo quản dài hạn trong dung dịch glycerol 20% ở nhiệt độ -80 °C.

2.3. Phương pháp xác định khả năng đối kháng nấm bệnh Colletotrichum gloeosporioides

Hoạt tính kháng nấm của các chủng vi khuẩn được khảo sát dựa trên phương pháp đồng nuôi cấy của Ngo et al. (2020). Cụ thể, khối nấm bệnh được đặt tại vị trí trung tâm của đĩa Petri chứa môi trường PDA. Các chủng vi khuẩn đối kháng được cấy vạch (độ dài đường cấy khoảng 1 cm) tại vị trí cách tâm đĩa 3 cm. Thí nghiệm được tiến hành với 3 lần lặp lại cho mỗi chủng, song song với mẫu đối chứng chỉ cấy nấm bệnh (không có vi khuẩn). Tất cả các đĩa nuôi cấy được duy trì ở nhiệt độ 30°C trong thời gian 5 ngày, khi tản nấm ở đĩa đối chứng mọc kín đĩa. Các chỉ tiêu đánh giá bao gồm sự phát triển của hệ sợi nấm và đường kính tản nấm. Những chủng vi khuẩn thể hiện hiệu suất ức chế sự sinh trưởng của *C. gloeosporioides* ≥ 50% so với lô đối chứng sẽ được tuyển chọn, chủng vi khuẩn có hoạt tính kháng nấm mạnh nhất sẽ được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Hiệu quả ức chế sinh trưởng sợi nấm được tính theo công thức: Hiệu quả ức chế sinh trưởng sợi nấm (%) = {D1 - D2}/{D1}*100

Trong đó: D1: Bán kính nấm trên đĩa đối chứng (cm); D2: Bán kính nấm trên đĩa đối kháng với vi khuẩn (cm).

2.4. Phương pháp định danh 16S rDNA các chủng vi khuẩn nội sinh được tuyển chọn

Chủng vi khuẩn thể hiện khả năng kháng mạnh nấm *C. gloeosporioides* được tiến hành định danh dựa trên trình tự gen 16S rRNA. Đoạn gen mục tiêu được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi 27f và 1492r theo phương pháp của Weisburg et al. (1991). Chu trình nhiệt được thiết lập bao gồm: biến tính đầu (94°C/5 phút); 30 chu kỳ (95°C/30 giây, 55°C/30 giây, 72°C/2 phút) và bước kéo dài cuối (72°C/10 phút). Cuối cùng, tên loài và vị trí phân loại của các chủng nghiên cứu được xác định bằng cách so sánh mức độ tương đồng của trình tự thu được với cơ sở dữ liệu quốc tế DDBJ/Genbank/EMBL thông qua công cụ BLAST (Altschul et al., 1990).

2.5. Phương pháp nghiên cứu nhân nuôi chủng Bacillus amyloliquefaciens EB.KN18

- *Xác định mật độ vi sinh vật:* Số lượng tế bào vi khuẩn trong dịch nuôi cấy được định lượng gián tiếp thông qua phương pháp đếm khuẩn lạc (CFU) trên môi trường thạch theo quy trình của Nguyễn Lân Dũng và cộng sự (1972, 1978).

- *Khảo sát nguồn cơ chất và tỷ lệ dinh dưỡng phù hợp:* Khả năng sinh trưởng của chủng EB.KN18 được đánh giá trong môi trường bổ sung các tỷ lệ phụ phẩm hữu cơ khác nhau nhằm tìm kiếm nguồn protein thay thế với giá thành rẻ. Thí nghiệm sử dụng các phối hợp giữa bã men bia (BMB) và môi trường LB theo 5 nghiệm thức (NT) với tỷ lệ tương ứng: 0:10 (NT1 - đối chứng), 3:7 (NT2), 5:5 (NT3), 7:3 (NT4) và 10:0 (NT5). Thành phần cơ bản: Mỗi 100 mL môi trường chứa 0,5 g NaCl và hàm lượng dinh dưỡng tổng số là 1,5 g (phối trộn giữa BMB và LB theo tỷ lệ khảo sát).

Môi trường được khử trùng (121 °C, 15 phút, pH 7.0). Sau đó, 1 mL dịch vi khuẩn hoạt hóa được đưa vào các bình tam giác và nuôi lắc ở 150 rpm trong 24 giờ. Chỉ tiêu đánh giá: mật độ vi sinh vật.

Dựa trên môi trường dinh dưỡng đã lựa chọn, tiến hành khảo sát đơn yếu tố để xác định các thông số nuôi cấy thích hợp nhất, bao gồm: Nhiệt độ nuôi cấy thích hợp: 28ºC; 30ºC; 32ºC; 34ºC và 36ºC; pH thích hợp của môi trường nuôi cấy: 6.0; 6.5; 7.0; 7.5; 8.0; Tốc độ lắc thích hợp: 0 rpm, 100 rpm, 150 rpm, 200 rpm, 250 rpm; Thời gian nuôi cấy thích hợp: theo dõi mật độ vi sinh vật sau 24, 36, 48, 60, 72 h nuôi cấy.

- *Nhân sinh khối quy mô hệ thống Bioreactor 14 L:* Sau khi xác lập các thông số tối ưu từ quy mô bình tam giác, chủng EB.KN18 được đưa vào nhân nuôi trong hệ thống lên men tự động Bioreactor (BiFlo, Brunswick, Hoa Kỳ) với dung tích 14 L (tỷ lệ giống 5%). Quá trình lên men được kiểm soát chặt chẽ và thu mẫu tại các thời điểm 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 giờ để đánh giá tốc độ nhân mật độ tế bào thực tế.

2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) với 21 nghiệm thể (gồm 20 chủng vi sinh vật phân lập và 01 nghiệm thể đối chứng), mỗi nghiệm thể được thực hiện với 3 lần lặp lại (mỗi đĩa Petri đại diện cho 01 lần lặp lại, chứa 01 điểm cấy đối kháng). Số liệu thu thập được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (Mean ± SD). Sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thể được phân tích bằng phép thử Duncan ($p < 0.01$) trên phần mềm SPSS 20.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập các chủng vi khuẩn nội sinh

Kết quả khảo sát đặc điểm hình thái khuẩn lạc của 20 chủng vi khuẩn nội sinh phân lập từ rễ sầu riêng tại xã Krông Năng được trình bày ở Bảng 3.1.

Nhìn chung, các chủng vi khuẩn thể hiện sự đa dạng về đặc điểm hình thái khuẩn lạc thông qua các tiêu chí như hình dạng, màu sắc, bề mặt, mặt cắt ngang và mép khuẩn lạc. Xét về hình dạng, phần lớn các chủng có khuẩn lạc tròn, tròn đều hoặc bầu dục; ngoài ra, một số chủng có hình dạng không đều (EB.KN13, EB.KN14 và EB.KN19). Màu sắc khuẩn lạc dao động từ trắng, trắng sữa, vàng nhạt, vàng đến nâu nhạt, trong đó nhóm màu trắng và trắng sữa chiếm ưu thế. Bề mặt khuẩn lạc chủ yếu ở trạng thái bóng, bóng khô hoặc bóng ướt; một số chủng có bề mặt mờ, thô ráp hoặc có đặc tính dính. Về mặt cắt ngang, đa số các chủng có khuẩn lạc dạng lồi, trong khi một số chủng có dạng phẳng. Mép khuẩn lạc được ghi nhận với ba dạng chính gồm mép bằng phẳng, mép lượn sóng hoặc mép răng cưa.

3.2. Tuyển chọn vi khuẩn nội sinh có khả năng đối kháng nấm bệnh Colletotrichum gloeosporioides

Sau quá trình phân lập, 20 chủng vi khuẩn nội sinh được đánh giá về khả năng đối kháng với nấm bệnh. Kết quả ghi nhận 8 chủng thể hiện hoạt tính đối kháng mạnh đối với nấm *C. gloeosporioides*, với tỷ lệ ức chế dao động từ 50,83% đến 66,92% (Bảng 3.2). Trong đó, chủng EB.KN18 có hiệu lực cao nhất (66,92 ± 2,85%), tiếp theo là EB.KN6 (62,50 ± 1,99%) và EB.KN20 (60,42 ± 2,70%).

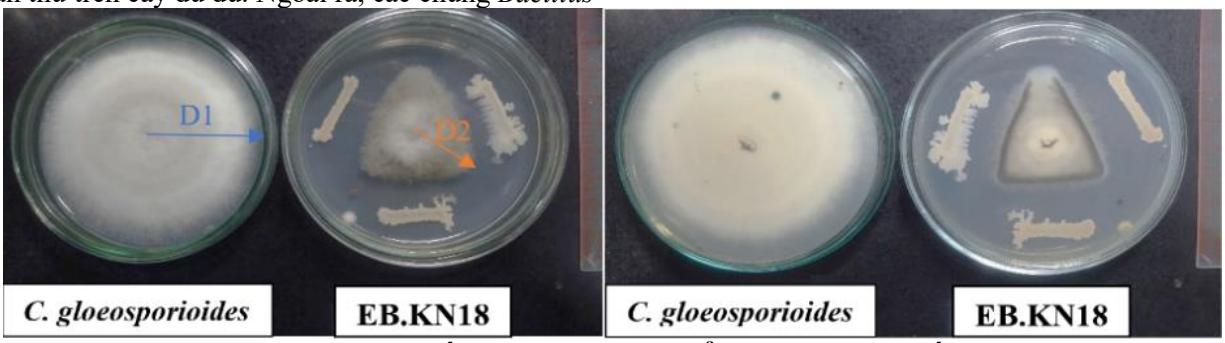
Kết quả này tương đồng với nhiều nghiên cứu đã công bố. Nghiên cứu của Holkar et al. (2024) ghi nhận các chủng vi khuẩn nội sinh phân lập từ cây nho có khả năng ức chế *C. gloeosporioides* đạt 55,6–56,1%. Tương tự, Zanudin et al. (2020) báo cáo một số chủng vi sinh vật nội sinh có hiệu lực đối kháng với tác nhân gây bệnh thán thư đạt khoảng 67,38%.

Bảng 3.1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn nội sinh sầu riêng tại xã Krông Năng

TT	Chủng vi khuẩn nội sinh	Mô tả đặc điểm khuẩn lạc				
		Hình dạng	Màu sắc	Bề mặt	Mặt cắt ngang	Mép
1	EB.KN1	Tròn	Trắng	Bóng	Lồi	Răng cưa
2	EB.KN2	Bầu dục	Trắng	Bóng khô	Lồi	Lượn sóng
3	EB.KN3	Tròn đều	Trắng	Bóng khô	Lồi	Bằng phẳng
4	EB.KN4	Tròn	Vàng nhạt	Bóng khô	Lồi	Bằng phẳng
5	EB.KN5	Tròn đều	Trắng	Bóng ướt	Lồi	Lượn sóng
6	EB.KN6	Tròn đều	Trắng	Bóng ướt	Lồi	Bằng phẳng
7	EB.KN7	Bầu dục	Vàng nhạt	Bóng khô	Lồi	Lượn sóng
8	EB.KN8	Bầu dục	Trắng sữa	Bóng khô	Phẳng	Lượn sóng
9	EB.KN9	Tròn	Trắng	Bóng khô	Lồi	Bằng phẳng
10	EB.KN10	Bầu dục	Vàng nhạt	Bóng khô	Lồi	Răng cưa
11	EB.KN11	Tròn	Trắng sữa	Mờ, thô ráp	Phẳng	Răng cưa
12	EB.KN12	Tròn	Vàng	Bóng, mờ đục	Phẳng	Bằng phẳng
13	EB.KN13	Không đều	Trắng sữa	Mờ, thô ráp	Phẳng	Răng cưa
14	EB.KN14	Không đều	Vàng	Bóng, mịn, dính	Lồi	Bằng phẳng

15	EB.KN15	Tròn	Trắng	Bóng, mịn, mờ	Phẳng	Lượn sóng
16	EB.KN16	Tròn	Vàng	Bóng, mịn, đục	Phẳng	Bằng phẳng
17	EB.KN17	Tròn	Nâu nhạt	Bóng, mịn, mờ	Lồi	Bằng phẳng
18	EB.KN18	Tròn	Vàng	Mờ, thô ráp	Phẳng	Răng cưa
19	EB.KN19	Không đều	Trắng sữa	Bóng, mịn, dính	Lồi	Răng cưa
20	EB.KN20	Tròn	Vàng	Mờ, nhẵn, trong suốt	Lồi	Bằng phẳng

Lê Minh Tường và cộng sự (2024) cũng cho thấy 6/28 chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với *Colletotrichum* sp. với tỷ lệ ức chế từ 52,64% đến 63,22%. Bên cạnh đó, vi khuẩn lactic *Lactobacillus plantarum* LKC1 phân lập từ kim chi có khả năng ức chế nấm thán thư trên xoài cát đạt 64,86% (Nguyễn Ánh Linh và cộng sự, 2023). Đối với nhóm *Bacillus*, Figueroa et al. (2022) ghi nhận *Bacillus amyloliquefaciens* ức chế *C. gloeosporioides* với hiệu lực 61,75%, đồng thời làm chậm sự xuất hiện triệu chứng và làm giảm mức độ nghiêm trọng của bệnh thán thư trên cây đu đủ. Ngoài ra, các chủng *Bacillus* sp. còn có khả năng tiết các enzyme ngoại bào như protease, cellulase, chitinase và siderophore, góp phần ức chế sự phát triển của nấm bệnh (Ajuna et al., 2023). Bên cạnh đó, nấm đối kháng *Trichoderma asperellum* MSU007 cũng đạt tỷ lệ ức chế từ 50,76% đến 74,85% và bảo vệ lá sầu riêng hiệu quả hơn thuốc hóa học carbendazim (Sutthisa et al., 2023). Nhìn chung, các chủng vi khuẩn nội sinh trong nghiên cứu này thể hiện khả năng đối kháng với *C. gloeosporioides* khá tiềm năng so với những công bố trước đây.



Hình 3.1. Hình ảnh hoạt tính kháng nấm của chủng vi khuẩn EB.KN18 với nấm *C. gloeosporioides*

Ghi chú: A. Hình ảnh mặt trước đĩa; B. Hình ảnh mặt sau đĩa. D1: Bán kính nấm trên đĩa đối chứng (cm); D2: Bán kính nấm trên đĩa đối kháng với vi khuẩn (cm).

Bảng 3.2. Hiệu lực đối kháng nấm *Colletotrichum gloeosporioides* của các chủng vi khuẩn nội sinh cây sầu riêng

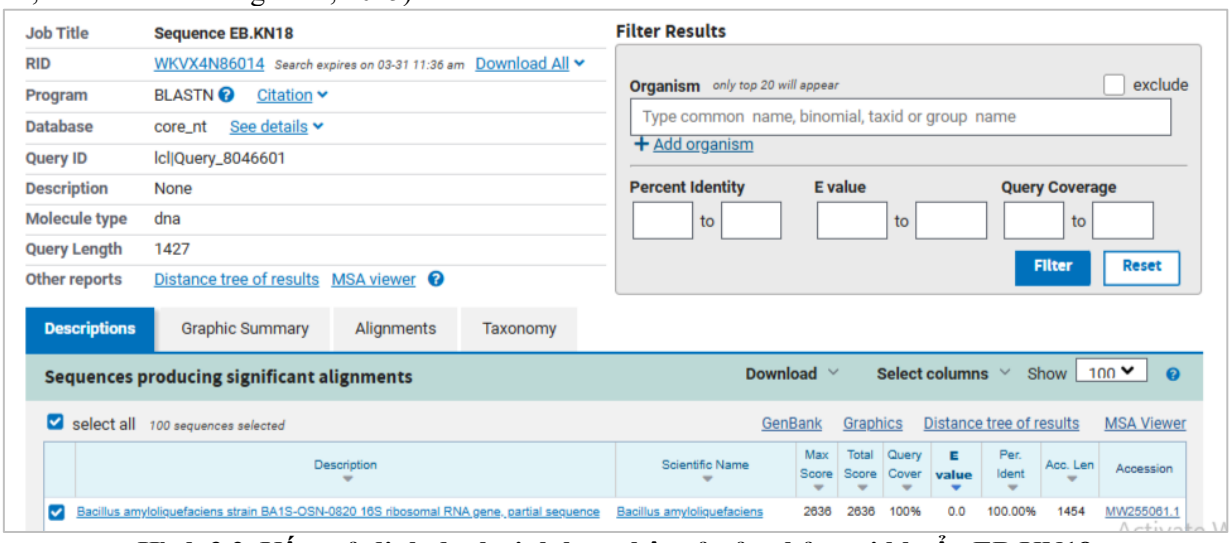
TT	Chủng vi khuẩn nội sinh	Hiệu lực kháng *C. gloeosporioides* (%)
1	EB.KN1	$51,92 \pm 1,78^{f}$
2	EB.KN4	$54,42 \pm 1,99^{e}$
3	EB.KN6	$62,50 \pm 1,99^{b}$
4	EB.KN7	$51,25 \pm 1,98^{g}$
5	EB.KN12	$50,83 \pm 1,99^{h}$
6	EB.KN18	$66,92 \pm 2,85^{a}$
7	EB.KN19	$55,83 \pm 1,99^{d}$
8	EB.KN20	$60,42 \pm 2,70^{c}$

Ghi chú: Các kí hiệu a-h khác nhau có ý nghĩa thống kê.

3.3. Kết quả định danh chủng vi khuẩn nội sinh có khả năng đối kháng cao với nấm bệnh Colletotrichum gloeosporioides

Kết quả định danh chủng EB.KN18 được xác định là *Bacillus amyloliquefaciens* (Hình 3.2). *B. amyloliquefaciens* là vi khuẩn Gram dương hiếu khí và có khả năng di chuyển linh hoạt, là tác nhân an toàn nội sinh phổ biến của thực vật. Sự hiện diện của loài vi khuẩn này mang lại nhiều giá trị thực tiễn cho sản xuất nông nghiệp thông qua việc tiết ra các chất kháng sinh sinh học đối kháng với tác nhân gây bệnh, đồng thời thúc đẩy sự phát triển toàn diện của thực vật. Trong nghiên cứu này, *B. amyloliquefaciens* EB.KN18 có khả năng ức chế *C. gloeosporioides* tới 66,92%, nhiều khả năng nhờ năng lực tổng hợp các lipopeptide kháng sinh như surfactin, iturin, fengycin (Yamamoto et al., 2015). Do đó, *B. amyloliquefaciens* EB.KN18 được xem là ứng viên tiềm năng cho việc phát triển các chế phẩm sinh học trong quản lý bệnh thán thư trên sầu riêng. Tuy nhiên, các đánh giá hiệu quả đối kháng in vivo trên cây sầu riêng trong điều kiện nhà kính và đồng ruộng cần tiếp tục được nghiên

cứu trước khi đưa vào ứng dụng thực tế (Luo et al., 2022; Tran Thi Ha Trang et al., 2025).



Hình 3.2. Kết quả định danh sinh học phân tử của chủng vi khuẩn EB.KN18

3.4. Kết quả nghiên cứu nhân nuôi chủng Bacillus amyloliquefaciens EB.KN18

Nguồn nitơ và các nguyên tố vi lượng trong môi trường nuôi cấy ảnh hưởng lớn đến sự sinh trưởng của các vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*. Trên cơ sở đó, nghiên cứu tiến hành sàng lọc nguồn protein phù hợp nhằm tối ưu quá trình tăng sinh khối chủng *B. amyloliquefaciens* EB.KN18. Bã men bia (BMB), một phụ phẩm của quá trình sản xuất bia, chiếm khoảng 1,5–2,5% tổng sản lượng bia trên quy mô toàn cầu (Bekatorou et al., 2015). Đặc biệt, hàm lượng protein trong bã men bia tương đối cao (22,18%), cùng với các thành phần khoáng và carbohydrate (Nguyen et al., 2024).

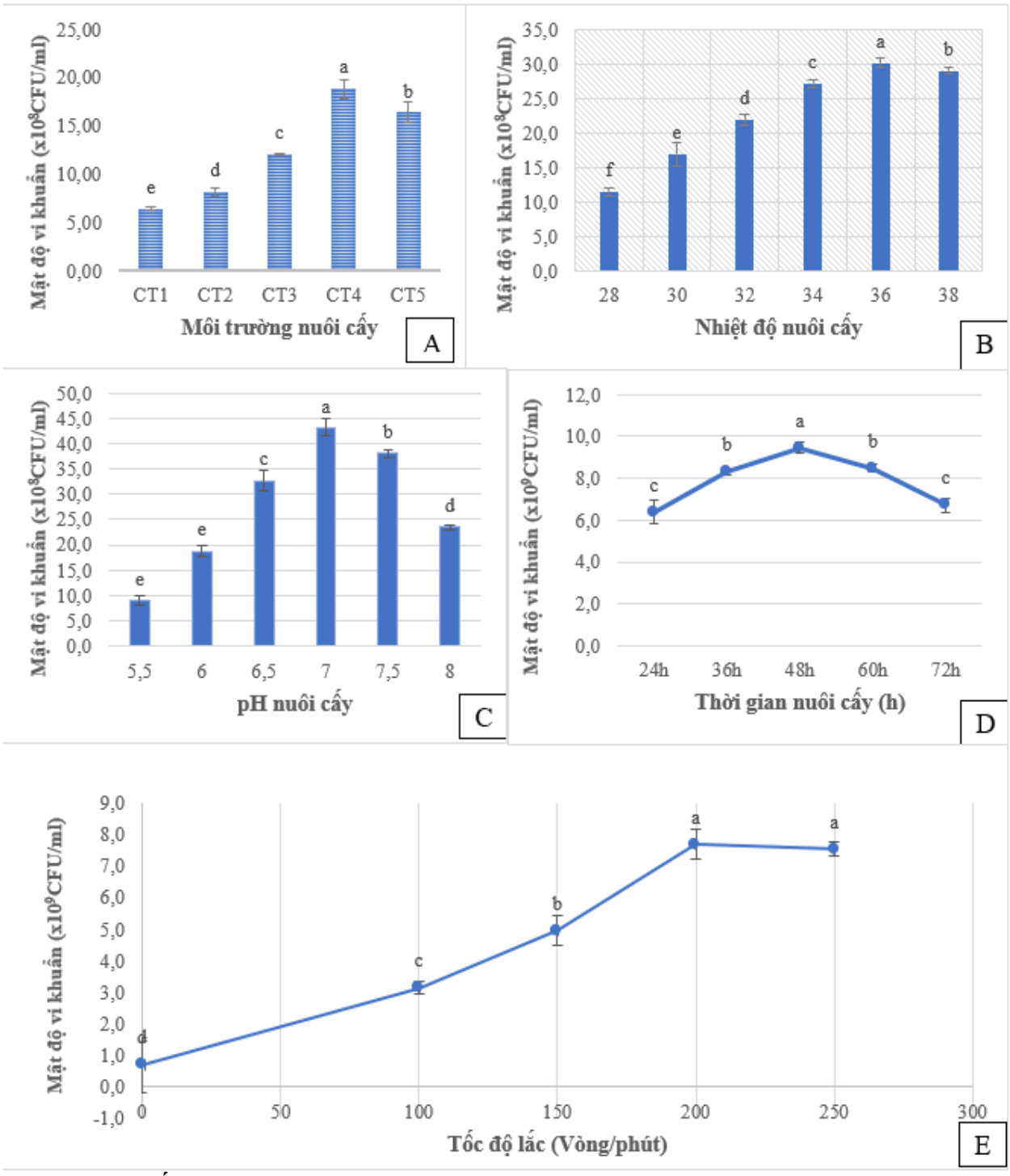
Kết quả nghiên cứu cho thấy BMB là nguồn dinh dưỡng phù hợp cho sự sinh trưởng của chủng EB.KN18 (Hình 3.3A). Mật độ tế bào đạt $18,81\times10^8$ CFU/mL ở nồng độ cơ chất BMB/LB là 7/3, cao hơn so với môi trường LB thương mại. Nồng độ BMB càng tăng, mật độ tế bào càng tăng. Kết quả này phù hợp với xu hướng tận dụng phế phụ phẩm nông nghiệp và công nghiệp làm nguồn cơ chất trong sản xuất chế phẩm sinh học (Ngô Văn Anh và cộng sự, 2024; Trần Thị Hà Trang và cộng sự, 2024). Do đó, tỷ lệ nồng độ cơ chất BMB/LB là 7/3 được lựa chọn làm nguồn dinh dưỡng chính cho các thí nghiệm tiếp theo. Việc xác định nồng độ BMB thích hợp không chỉ góp phần nâng cao hiệu suất thu sinh khối mà còn giúp giảm chi phí sản xuất và tận dụng hiệu quả nguồn phụ phẩm.

Nhiệt độ là một trong những yếu tố ảnh hưởng trực tiếp đến tốc độ sinh trưởng của vi khuẩn. Trong khoảng nhiệt độ khảo sát, chủng EB.KN18 sinh trưởng tốt nhất ở 36°C với mật độ tế bào đạt $30,02\times10^8$ CFU/mL (Hình 3.3B). Bên cạnh đó, chủng EB.KN18 sinh trưởng tốt trong khoảng pH 6,5–7,5 và đạt mật độ tế bào cao nhất tại pH 7,0 (Hình 3.3C). Kết quả khá tương đồng với kết quả nghiên cứu trên chủng *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 (Ngô Văn Anh và cộng sự, 2024). Ngoài các yếu tố môi trường, thời gian nuôi cấy và tốc độ lắc cũng ảnh hưởng đến sự tích lũy sinh khối của chủng EB.KN18 (Hình 3.3D và Hình 3.3E). Mật độ tế bào tăng nhanh và đạt giá trị cao nhất sau 48 giờ nuôi cấy, khoảng $95,0\times10^8$ CFU/mL, cao gấp khoảng 1,48 lần so với sau 24 giờ. Sau thời điểm này, mật độ tế bào giảm dần, có thể do nguồn dinh dưỡng trong môi trường suy giảm, đồng thời các sản phẩm chuyển hóa tích lũy làm ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng của vi khuẩn (Trần Thị Hà Trang và cộng sự, 2024). Dù vậy, phương pháp khảo sát đơn yếu tố còn hạn chế do chưa đánh giá được ảnh hưởng tương tác giữa các thông số nhiệt độ, pH và tốc độ lắc. Việc áp dụng phương pháp bề mặt đáp ứng sẽ được triển khai trong các nghiên cứu tiếp theo để tối ưu hóa triệt để hơn. Những kết quả này bước đầu cung cấp cơ sở quan trọng để thiết lập các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho quá trình lên men quy mô lớn hơn.

Hiện nay, *B. amyloliquefaciens* được xem là một trong những tác nhân kiểm soát sinh học có tiềm năng nhờ khả năng đối kháng với tác nhân gây bệnh và hỗ trợ tăng cường khả năng chống chịu của cây trồng (Ngô Văn Anh và cộng sự, 2024). Trong nghiên cứu này, chủng *B. amyloliquefaciens* EB.KN18 được nuôi cấy thành công trong hệ thống bioreactor 14 L và đạt mật độ $7,08\times10^{11}$ CFU/mL sau 10 giờ lên men (Hình 3.4). Hiệu quả tăng sinh khối này có thể liên quan đến việc hệ thống Bioreactor duy trì ổn định các thông số pH 7,0 ở 36°C, tốc độ khuấy (200 rpm) và tốc độ sục khí (2 vvm) trong suốt quá trình nuôi cấy. Nồng độ oxy hòa tan (DO) được duy trì tự động trên 20% thông qua việc tự động điều chỉnh tốc độ sục khí. Đồng thời, hiện tượng tạo bọt được kiểm soát bằng cách bổ sung dầu ăn thực phẩm thủ công qua cổng bơm nguyên liệu mỗi khi quan sát thấy xuất hiện bọt. So với phương pháp nuôi cấy trong bình tam giác, hệ thống bioreactor cho mật độ tế bào cao hơn đáng kể, cho

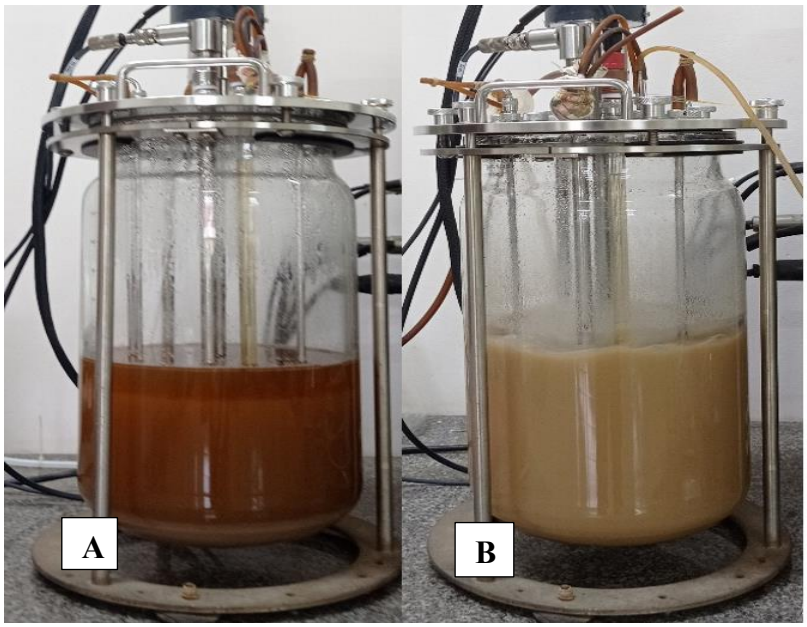
thấy chủng EB.KN18 có khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường chứa BMB và có tiềm năng ứng dụng trong sản xuất chế phẩm sinh học ở quy mô lớn.

Kết quả của nghiên cứu này khá tương đồng với các báo cáo trước đây. Frederico et al. (2019) ghi nhận chủng *B. amyloliquefaciens* IT45 đạt mật độ $3,0\times10^9$ CFU/mL sau 48 giờ lên men trong Bioreactor 40 L. Tương tự, chủng *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 đạt mật độ $9,85\times10^{11}$ CFU/mL sau 8 giờ lên men (Trần Thị Hà Trang và cộng sự, 2024) và đạt $8,25\times10^{11}$ CFU/mL sau 10 giờ (Ngô Văn Anh và cộng sự, 2024). Sự khác biệt về mật độ tế bào giữa các nghiên cứu có thể liên quan đến sự khác nhau về chủng vi khuẩn, thành phần môi trường nuôi cấy, quy mô thiết bị và điều kiện vận hành của hệ thống lên men.



Hình 3.3. Kết quả nhân nuôi chủng *Bacillus amyloliquefaciens* EB.KN18 trong bình tam giác

Ghi chú: A. Môi trường nuôi cấy; B. Nhiệt độ nuôi cấy; C. pH nuôi cấy; D. Thời gian nuôi cấy; E. Tốc độ lắc.Các kí hiệu a-f khác nhau có ý nghĩa thống kê



Hình 3.4. Nhân nuôi *B. amyloliquefaciens* EB.KN18 trong Biooreactor

Ghi chú: A. Môi trường trước nuôi cấy; B. Môi trường sau nuôi cấy 12 giờ.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được 20 chủng vi khuẩn nội sinh và tuyển chọn được 8 chủng có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên sầu riêng tại tỉnh Đắk Lắk. Trong số đó, chủng EB.KN18 thể hiện hoạt tính đối kháng cao nhất với hiệu suất ức chế đạt 66,92% và được định danh là *Bacillus amyloliquefaciens* dựa trên trình tự gen 16S rRNA.

Bã men bia được xác định là nguồn dinh dưỡng phù hợp cho quá trình tăng sinh khối chủng *B. amyloliquefaciens* EB.KN18. Điều kiện nuôi cấy thích hợp trong bình tam giác gồm nhiệt độ 36 °C, pH 7,0 và tốc độ lắc 200 rpm, cho mật độ tế bào đạt ($95,0\times10^8$) CFU/mL sau 48 giờ nuôi cấy. Khi nuôi cấy trong hệ thống Bioreactor 14 L, mật độ tế bào đạt ($7,08\times10^{11}$) CFU/mL sau 10 giờ lên men. Các kết quả nghiên cứu cho thấy chủng *B. amyloliquefaciens* EB.KN18 có tiềm năng ứng dụng trong phát triển chế phẩm sinh học phòng trừ bệnh thán thư trên sầu riêng. Tuy nhiên, cần tiếp tục đánh giá hiệu quả của chủng trong điều kiện nhà lưới và ngoài đồng ruộng trước khi triển khai ứng dụng thực tiễn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ajuna, H.B. et al. (2023). The prospect of hydrolytic enzymes from *Bacillus* species in the biological control of pests and diseases in forest and fruit tree production. *Int J Mol Sci.*, 24(23), 16889. doi: 10.3390/ijms242316889.

Altschul, S. F. et al. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410.

Aravind R. et al. (2009). Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum* L.) genotype: isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsici*. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 58–64.

Bekatorou, A., Plessas, S., and Mantzourani, I. (2015). Biotechnological exploitation of brewery solid wastes for recovery or production of value-added products. In V. R. Rai (Ed.). *Advances in Food Biotechnology*, 24, 393–414, https://doi.org/10.1002/9781118864463.ch24.

Figueroa, M.A.G. (2022). Bioefficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* strain DGA14 as potential microbial control agent against *Colletotrichum gloeosporioides* causing papaya anthracnose. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 11(3), 86-94. DOI: 10.20546/ijcmas.2022.1103.011.

Frederico A. L. et al. (2019). Culture medium evaluation using low-cost substrate for biosurfactants lipopeptides production by *Bacillus amyloliquefaciens* in pilot bioreactor. *Journal of Surfactants and Detergents*, 23(1), 91-98.

Holkar, S.M. et al. (2024). Characterization and bioefficacy of grapevine bacterial endophytes against *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose disease. *Frontiers in Microbiology*, 15, Article 1502788. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1502788.

Law, C.X. et al. (2025). A review on anthracnose disease caused by *Colletotrichum* spp. in fruits and advances in control strategies. *Int J Food Microbiol.*, 442, 111397. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2025.111397.

Lê Hoàng Lệ Thủy và Phạm Văn Kim (2008). Phân loài nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên xoài và sầu riêng tại đồng bằng sông Cửu Long và thử hiệu lực của sáu loại thuốc đối với các loài nấm này. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 2008:10, 31-40.

Lê Minh Tường và cộng sự (2024). Khả năng đối kháng của các chủng xạ khuẩn đối với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư hại sầu riêng. *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Việt Nam*, 66(2), 2.2024. DOI: 10.31276/VJST.66(2).75-80.

Lê Thanh Khang, Nguyễn Thị Thu Hương và Lê Thị Thủy Tiên (2020). Hoạt tính kháng nấm *Colletotrichum capsici* gây bệnh thán thư trên ớt sau thu hoạch của tinh dầu tràm trà (*Melaleuca alternifolia*). *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 56(CĐ Tự nhiên), 57-66.

Luo, L. et al. (2022). *Bacillus amyloliquefaciens* as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: An overview for its mechanisms. *Microbiological Research*, 259, 127016.

Mai Văn Trị (2002). Một số bệnh hại trên cây ăn trái. *Sổ tay người nông dân trồng cây ăn trái cần biết*. Công ty dịch vụ Bảo vệ Thực vật An Giang, tr. 26-27.

Ngo, V.A. et al. (2020). *Phytophthora* antagonism of endophytic bacteria isolated from roots of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Agronomy*, 10, 286. doi: 10.3390/agronomy10020286.

Ngô Văn Anh và cộng sự (2024). Nghiên cứu ứng dụng bã men bia làm nguồn C/N cho quá trình nhân nuôi vi khuẩn *Bacillus velezensis* EB.KN15. *Tạp chí Khoa học Tây Nguyên*, 18, 4-2024.

Ngô Văn Anh và cộng sự (2024). Tuyển chọn và nhân nuôi vi khuẩn nội sinh cây sầu riêng kháng nấm *Phytophthora palmivora* tại huyện Cư Kuin tỉnh Đắk Lắk. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 229, 09.

Nguyen, T.H. et al. (2024). New record of reusing brewing by-product for biosynthesis of prodigiosin and its novel anti-pathogen fungi via in vitro tests and molecular docking study. *Research on Chemical Intermediates*, 50, 925–949. https://doi.org/10.1007/s11164-023-05207-z.

Nguyễn Ánh Linh và cộng sự (2023). Hoạt tính kháng nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên trái xoài cát Hòa Lộc sau thu hoạch của vi khuẩn lactic. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 228, 05.

Nguyễn Lân Dũng và cộng sự (1972). *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học* (Tập 1). Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.

Nguyễn Lân Dũng và cộng sự (1978). *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học* (Tập 3). Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.

Nguyễn Thị Liên và cộng sự (2017). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên hành lá. *Tạp chí Khoa học*, số 26, Trường Đại học Đồng Tháp, (6-2017).

Phạm Trung Hiếu và cộng sự (2021). Thành phần hóa học và hoạt tính in vitro kháng nấm *Colletotrichum* spp. gây bệnh thán thư trên cây trồng của dầu nghệ (*Curcuma longa* L.). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 63, 6.

Qiagen (2006). *QIAquick Spin Handbook*. Qiagen, Valencia, CA.

Suhandono, S., and Utari, I. B. (2014). Isolation and molecular identification of endophytic bacteria from the arils of durian (*Durio zibethinus* Murr.) var. Matahari. *Microbiology Indonesia*, 8(4), 161–169. https://doi.org/10.5454/mi.8.4.3.

Sutthisa, W. et al. (2024). Development of *Trichoderma* formulation and application to control durian anthracnose disease. *Trends in Sciences*, 21(1), 7276. DOI: 10.48048/tis.2024.7276.

Trần Thị Hà Trang và cộng sự (2024). Nghiên cứu ứng dụng phụ phẩm thủy sản trong lên men *Bacillus amyloliquefaciens* EB.CK9 và đánh giá hoạt tính kháng nấm bệnh thực vật. *Hội nghị Khoa học Toàn quốc về Công nghệ Sinh học 2024*, 937-942.

Tran Thi Ha Trang et al. (2025). Reutilization of soybean by-product for biomass production of *Bacillus amyloliquefaciens* and evaluation of its antifungal potential against *Fusarium*. *Tạp chí Khoa học Tây Nguyên*, Tập 19, Số 2-2025.

Weisburg, W. G. et al. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703.

Yamamoto, S., Shiraishi, S., and Suzuki, S. (2015). Are cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 responsible for the plant defence response in strawberry against *Colletotrichum gloeosporioides*? *Letters in Applied Microbiology*, 60(4), 379–386.

Zanudin, N.A.B.M., Hasan, N.A., Mansor, P. (2020). Antagonistic activity of fungal endophytic isolated from *Garcinia atroviridis* against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Pathology Journal*, 27(3), 209-218.

SELECTION AND CULTIVATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA FROM DURIAN TREES ANTAGONISTIC TO COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES IN DAK LAK PROVINCE

Thi Ha Trang Tran[1], Van Anh Ngo[2], Anh Dung Nguyen[2]

Received Date: 10/07/2026; Revised Date: 25/07/2026; Accepted for Publication: 07/08/2026

ABSTRACT

Colletotrichum gloeosporioides is the causal agent of anthracnose in durian and is responsible for significant yield and quality losses, particularly under warm and humid conditions during the rainy season. This study aimed to isolate and screen indigenous endophytic bacteria from durian roots for their antagonistic activity against the pathogen. From 30 durian root samples, 20 bacterial strains were isolated. Antifungal activity was evaluated using the dual culture assay, and the data were analyzed by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test ($p < 0.01$). Eight strains exhibited high antifungal efficacy (50.88%–66.92%). Among them, strain EB.KN18 showed the highest inhibition rate (66.92%) and was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* based on 16S rRNA gene sequencing. Under flask culture conditions (36 °C, pH 7, 200 rpm), strain EB.KN18 reached a cell density of 95.0×10^8 CFU/mL after 48 h. When cultivated in a 14 L bioreactor, the bacterial density reached 7.08×10^{11} CFU/mL after 10 h. *Bacillus amyloliquefaciens* EB.KN18 is a promising candidate for the development of biological products, contributing to safe and sustainable durian cultivation.

Keywords*: Bacillus amyloliquefaciens, biocontrol, Colletotrichum gloeosporioides, durian, endophytic bacteria, fermentation.*

[1]*Buon Ma Thuot Medical University;*
[2]*Institute of Biotechnology and Environment, Tay Nguyen University;*
Corresponding author: Ngo Van Anh; Email: nvanh@ttn.edu.vn.