

PHÂN LẬP, TUYỂN CHỌN VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN *Bacillus* TỪ ĐẤT TRỒNG ĐÌNH LĂNG CÓ HOẠT TÍNH ĐỐI KHÁNG VI KHUẨN *Erwinia carotovora* GÂY BỆNH THỐI NHŨN

Nguyễn Thị Thanh Mai^{1*}, Đỗ Thị Kim Trang¹, Trương Thị Chiên¹,
Trần Bảo Trâm¹, Hoàng Quốc Chính¹, Ngô Thị Hoa¹,
Mai Thị Đàm Linh², Vũ Xuân Tạo¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm phân lập, tuyển chọn và định danh vi khuẩn *Bacillus* từ đất trồng Đình lăng có khả năng đối kháng vi khuẩn *Erwinia carotovora* gây bệnh thối nhũn. Từ 30 mẫu đất vùng rễ cây Đình lăng trồng tại huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định đã phân lập được 189 chủng vi khuẩn có khả năng tồn tại ở nhiệt độ 100°C trong 10 phút. Trong đó đã tuyển chọn được 9 chủng có khả năng đối kháng vi khuẩn *Erwinia carotovora* M4 gây thối rễ, củ cây Đình lăng với đường kính vòng vô khuẩn lớn hơn 16 mm. Cả 9 chủng vi khuẩn tuyển chọn

¹ Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ

² Khoa Sinh học, Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

* Tác giả chính

đều có khả năng tổng hợp enzyme amylase, protease và cellulase. Trên cơ sở kết quả đánh giá các đặc điểm sinh học và giải trình tự 16S rRNA đã xác định 7 chủng vi khuẩn tuyển chọn thuộc loài *Bacillus amyloliquefaciens*, 01 chủng thuộc loài *Bacillus subtilis* và 01 chủng thuộc loài *Bacillus cereus*. Chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* K29 có tiềm năng sử dụng cho sản xuất chế phẩm sinh học kiểm soát bệnh thối nhũn trên cây Đinh lăng do *E. carotovora* gây ra.

Từ khóa: Vi khuẩn *Bacillus*, vi khuẩn *Erwinia carotovora*, định danh, đối kháng, bệnh thối nhũn trên cây Đinh lăng

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh thối nhũn được coi là một trong số các bệnh gây thiệt hại lớn trong nông nghiệp. Bệnh phổ biến và thường gặp ở một số nhóm cây trồng như cây họ cải (*Brassicaceae*), họ cà (*Solanaceae*) và một số loại hoa, cây cảnh. Bệnh gây hại nghiêm trọng trong giai đoạn trồng ngoài đồng ruộng, đặc biệt là khi thời tiết ẩm, sau mưa. Nguyên nhân của bệnh được xác định là do nhiều loài vi khuẩn khác nhau, trong đó vi khuẩn *E. carotovora* được xem là tác nhân chính và gây thiệt hại lớn hơn cả (Bhat *et al.*, 2010; Perombelon and Wolf, 2002). Vi khuẩn *E. carotovora* có thể tồn tại trong đất một thời gian dài, sau đó tiếp tục lây nhiễm và gây bệnh cho các vụ kế tiếp. Hiện nay, các biện pháp hóa học thường được sử dụng để phòng trừ bệnh thối nhũn do *E. carotovora* gây ra. Tuy nhiên, việc dùng thuốc hóa học kéo dài dẫn đến tình trạng thoái hóa đất trồng, gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người và ô nhiễm môi trường (Elshanshoury, 1995).

Đinh lăng (*Polyscias fruticosa* (L.) Harms) là cây dược liệu có nhiều công dụng như kháng nấm, chống dị ứng, chống oxy hóa... Việc canh tác Đinh lăng hiện nay cũng gặp một số vấn đề như bệnh thối rễ củ, bệnh đóm lá, bệnh bạc lá... trong đó có bệnh thối nhũn rễ, củ do nấm *F. oxysporum* và vi khuẩn *E. carotovora* gây ra làm giảm đáng kể năng suất và chất lượng dược liệu (Dissanayake and Kumari, 2012). Đất là môi trường phổ biến cho sự sinh trưởng các chủng vi khuẩn *Bacillus* có hoạt tính kháng vi sinh vật gây bệnh, phổ biến nhất các nhóm *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* và *B. licheniformis* (Al-Ajlani and Hasnain, 2010). Tiềm năng sử dụng các chế phẩm sinh học đa chức năng trong canh tác cây trồng rất lớn, đây là một hướng đi đúng đắn, hướng tới một nền nông nghiệp hữu cơ, sinh thái bền vững và thân thiện với môi trường (Elshanshoury, 1995). Mục đích của nghiên cứu là phân lập, tuyển chọn và định danh vi khuẩn *Bacillus* từ đất trồng Đinh lăng có hoạt tính đối kháng vi khuẩn gây bệnh thối rễ, củ của loại cây này sử dụng cho sản xuất chế

phẩm sinh học để thay thế thuốc bảo vệ thực vật hóa học, góp phần bảo vệ môi trường và nâng cao chất lượng sản phẩm dược liệu.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Mẫu đất vùng rễ cây Đinh lăng được thu thập tại vùng trồng chuyên canh Đinh lăng xã Hải Thanh và xã Hải Bắc, huyện Hải Hậu, tỉnh Nam Định.

Chủng vi khuẩn gây bệnh thối nhũn rễ và củ cây Đinh lăng *E. carotovora* M4 được phân lập và lưu giữ tại Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn *Bacillus* đối kháng *E. carotovora*

Để phân lập vi khuẩn *Bacillus*, các mẫu đất vùng rễ cây Đinh lăng được thu thập, bảo quản theo Vũ Xuân Tạo và Trần Văn Tuấn (2020), được phân lập theo Vasecharan và Ramasamy (2003), thu nhận các chủng thuần khiết và lưu giữ ở điều kiện 4°C cho các nghiên cứu tiếp theo.

Các chủng vi khuẩn phân lập được đánh giá khả năng đối kháng vi khuẩn *E. carotovora* bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (Balcázar *et al.*, 2006). Chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng *E. carotovora* cao được tuyển chọn là chủng tạo vòng vô khuẩn sau 24 giờ nuôi cấy lớn hơn vòng vô khuẩn của công thức đối chứng sử dụng kháng sinh gentamycin 80 mg/mL.

Khả năng sinh tổng hợp enzyme amylase, protease, cellulase của các vi khuẩn phân lập được xác định bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch trong môi trường có bổ sung 1% các cơ chất tương ứng là tinh bột, cao thịt và carboxymethyl cellulose (Nguyễn Lâm Dũng và *ctv.*, 1982). Hoạt tính enzyme được tính dựa theo đường kính vòng phân giải cơ chất.

2.2.2. Định danh các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Đặc điểm khuẩn lạc, tế bào của các chủng vi khuẩn tuyển chọn được quan sát, đánh giá theo Nguyễn Lâm Dũng và cộng tác viên (1982) và xác định các đặc điểm sinh hóa bằng bộ kit API (Biomérieux).

DNA của các chủng vi khuẩn phân lập được tách chiết theo Tran và cộng tác viên (2017) để dùng cho phản ứng PCR khuếch đại trình tự 16S rRNA, sử dụng cặp mồi fD1/rP1 (fD1: 5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3'; rP1: 5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Weisburg *et al.*, 1991). Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%, sau đó được tinh sạch bằng kit tinh sạch DNA của hãng Promega theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mẫu DNA tinh sạch được giải trình tự bởi công ty 1st BASE (Singapore) và so sánh với dữ liệu trong Ngân hàng gen Quốc tế (GenBank) sử dụng chương trình BLAST, xây dựng

cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013).

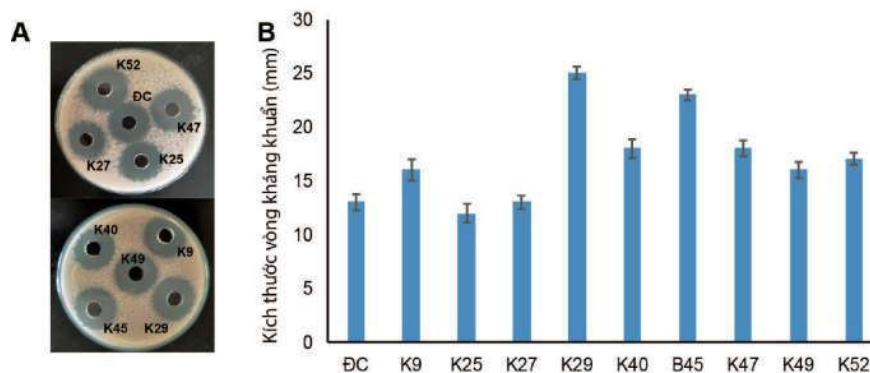
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 9 năm 2020 đến tháng 03 năm 2021 tại Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn đối kháng vi khuẩn *E. carotovora*

Từ 30 mẫu đất trồng Đỉnh lã nhóm nghiên cứu phân lập được 189 chủng vi khuẩn có khả năng tồn tại ở nhiệt độ 100°C trong 10 phút. Khảo sát khả năng đối kháng vi khuẩn gây bệnh thối nhũn *E. carotovora* M4 của các chủng vi khuẩn phân lập bằng phương pháp khuếch tán trên thạch đã xác định được 9/189 chủng kí hiệu K9, K25, K27, K29, K40, B45, K47, K49 và K52 thể hiện hoạt tính kháng *E. carotovora* M4 mạnh (Hình 1).



Hình 1. Hoạt tính kháng *E. carotovora* của các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp.

Ghi chú: (A) Khả năng kháng *E. carotovora* trên đĩa thạch; (B) Kích thước vòng kháng khuẩn.

Kết quả hình 1 cho thấy, các chủng vi khuẩn K9, K29, K40, B45, K47, K49 và K52 có đường kính vòng vô khuẩn đạt trung bình lớn hơn 16 mm, cao hơn so với đối chứng sử dụng kháng sinh gentamycin 80 mg/mL, trong đó chủng K29 thể hiện khả năng đối kháng mạnh nhất với đường kính vòng vô khuẩn đạt trên 25 mm. Nguyễn Xuân Cảnh và cộng tác viên (2017) đã tiến hành nghiên cứu tìm kiếm các chủng vi sinh vật có hoạt tính đối kháng vi khuẩn *E. carotovora* và tuyển chọn được chủng *Streptomyces psammoticus* L2.5 có đường kính vòng vô khuẩn tương đương với các chủng vi khuẩn phân lập được trong nghiên cứu này.

Theo Mishra và cộng tác viên (2020), chitinase, cellulase, glucanase và protease là các enzyme quan trọng của các vi sinh vật sử dụng làm tác nhân kiểm soát sinh học bệnh, dịch hại cây trồng. Kết quả đánh giá khả năng sinh tổng hợp amylase, protease, cellulase của các vi khuẩn phân lập được tổng hợp trong bảng 1 cho thấy cả 9 chủng vi khuẩn tuyển chọn đều có khả năng tổng hợp enzyme amylase, protease và cellulase, trong đó đường kính vòng phân giải carboxymethyl cellulose của các chủng tuyển chọn đều >16 mm và chủng K29 tạo vòng phân giải có đường kính lớn nhất đạt $28 \pm 0,17$ mm, cao hơn hoạt tính phân giải CMC của chủng *Bacillus* T20 và M27 đã được Ngô Tự Thành và cộng tác viên (2009) công bố.

Bảng 1. Hoạt tính enzyme ngoại bào của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Ký hiệu chủng	Đường kính vòng phân giải cơ chất D-d (mm)		
	<i>Amylase</i>	<i>Protease</i>	<i>Cellulase</i>
K9	10 ± 0,25	8 ± 0,13	18 ± 0,25
K25	12 ± 0,21	15 ± 0,03	16 ± 0,12
K27	11 ± 0,05	8 ± 0,15	17 ± 0,29
K29	16 ± 0,22	15 ± 0,17	28 ± 0,17
K40	10 ± 0,45	10 ± 0,11	18 ± 0,23
K47	17 ± 0,22	14 ± 0,24	22 ± 0,30
K49	9 ± 0,15	8 ± 0,05	14 ± 0,15
K52	15 ± 0,34	17 ± 0,12	25 ± 0,41
B45	12 ± 0,20	8 ± 0,05	20 ± 0,18

Ghi chú: Số liệu được biểu diễn dưới dạng: giá trị trung bình (Mean) ± sai số chuẩn (SEM); Số lần nhắc lại thí nghiệm là 3 lần.

3.2. Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Kết quả nghiên cứu đánh giá đặc điểm sinh học

các chủng vi khuẩn phân lập tổng hợp trong bảng 2 cho thấy cả 9 chủng vi khuẩn tuyển chọn đều có tế bào hình que, thuộc nhóm Gr⁺ và có khả năng sinh bào tử.

Bảng 2. Đặc điểm khuẩn lạc, tế bào của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Kí hiệu chủng	Đặc điểm khuẩn lạc	Hình dạng tế bào	Nhuộm Gram	Khả năng sinh bào tử	Khả năng di động
K9	Màu trắng sữa, tròn, nhẵn, có mép nhẵn	Hình que, xếp chuỗi dài	+	+	-
K25	Màu trắng đục, tròn, nhẵn, có mép nhẵn	Hình que, đơn hoặc chuỗi ngắn	+	+	+
K27	Màu trắng trong, tròn, bề mặt nhẵn, có mép trong	Hình que đơn hoặc chuỗi ngắn	+	+	+
K29	Màu trắng đục, tròn đều, nhẵn, có mép nhẵn	Hình que, hình chữ V	+	+	+
K40	Có màu trắng, tròn đều, bề mặt nhẵn, có mép nhẵn	Hình que đơn hoặc chuỗi ngắn	+	+	+
K47	Màu trắng trong, tròn, bề mặt nhẵn, có mép nhẵn	Hình que, đơn hoặc chuỗi ngắn	+	+	+
K49	Màu trắng trong, tròn đều, nhẵn, có mép nhẵn	Hình que, xếp chuỗi dài	+	+	-
K52	Màu trắng trong, tròn đều, lõm giữa, có mép nhẵn, nhậy	Hình que, đơn hoặc chuỗi ngắn	+	+	+
B45	Màu trắng đục, tròn đều, nhẵn, có mép nhẵn	Hình que, đơn hoặc chuỗi ngắn	+	+	+

Kết quả đánh giá phản ứng sinh học của 9 chủng vi khuẩn tuyển chọn tổng hợp trong bảng 3 cho thấy, các chủng vi khuẩn tuyển chọn có các đặc điểm sinh hóa đặc trưng của vi khuẩn *Bacillus* theo mô tả của Stein (2005).

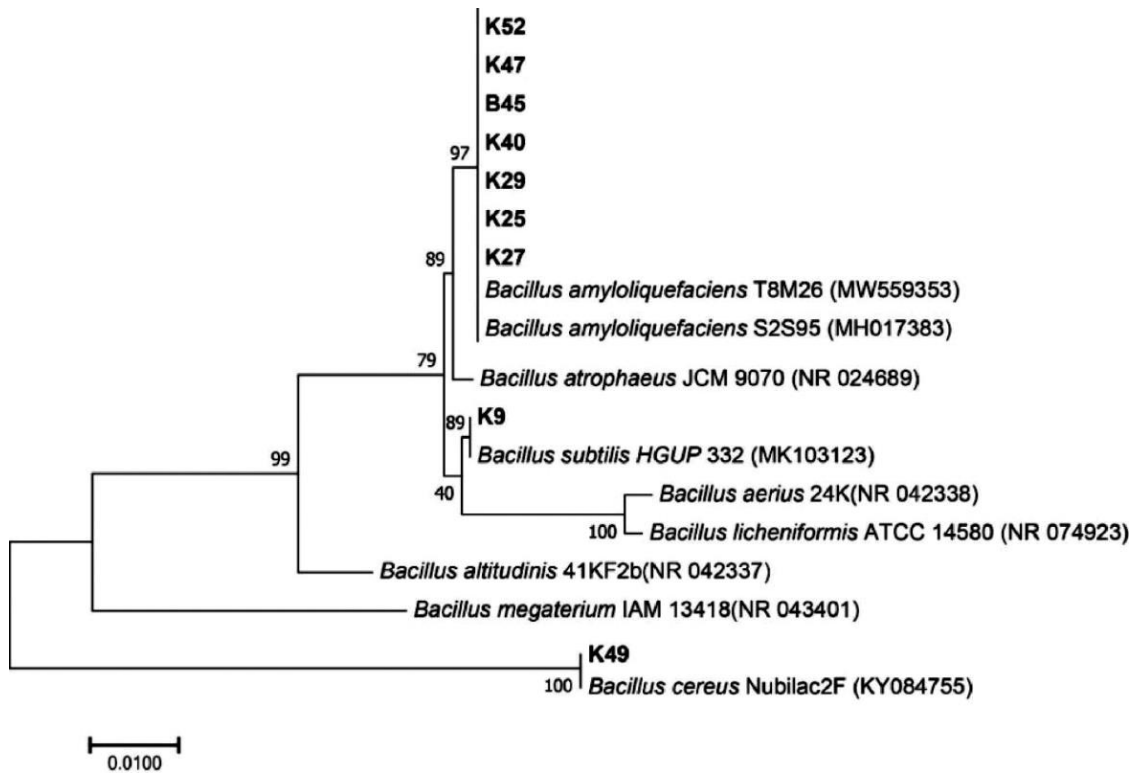
Bảng 3. Đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Đặc điểm sinh hóa	Ký hiệu chủng								
	K9	K25	K27	K29	K40	K47	K49	K52	B45
ONPG	+	+	+	+	+	+	-	+	+
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	-	+	+	+	+	+	-	+	+
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INO	-	-	+	-	-	-	-	+	-
SOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	+	+	+	-	+	-	+	+	+
MEL	-	-	-	-	-	-	-	+	-
AMY	+	+	+	-	+	-	+	-	+
ARA	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: ONPG: β -galactosidase; ADH: decarboxyl hóa axit amin arginine bởi arginine dihydrolase; LDC: decarboxyl hóa amino acid lysine bởi lysine decarboxylase; ODC: decarboxylations axit amin ornithine bởi ornithine decarboxylase; CIT: sử dụng citrate là nguồn carbon duy nhất; H2S: sản xuất hydrogen sulfide; URE: enzym urease; TDA: tryptophan deaminase; IND: Indole Test - sinh indole từ tryptophan bởi enzyme tryptophanase; VP: xét nghiệm Voges-Proskauer để phát hiện acetoin; GEL: gelatinase; GLU: lên men glucose; MAN: lên men mannose; INO: lên men inositol; SOR: lên men sorbitol; RHA: lên men rhamnose; SAC: lên men sucrose; MEL: lên men melibiose; AMY: lên men amygdalin; ARA: lên men arabinose.

3.3. Định danh các chủng vi khuẩn tuyển chọn

Kết quả phân tích, so sánh trình tự 16S rRNA với dữ liệu trong GenBank và xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm MEGA 6 các chủng vi khuẩn tuyển chọn cho thấy: 7 chủng K25, K27, K29, K40, B45, K47, K52 thuộc loài *Bacillus amyloliquefaciens* với mức độ tương đồng 99,86 - 100%, chủng K9 có mức tương đồng với loài *Bacillus subtilis* là 99,72%, chủng K49 tương đồng với loài *Bacillus cereus* là 98,94% (Hình 2).



Hình 2. Cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự 16S rRNA

Nhiều nghiên cứu đã cho thấy các chủng *Bacillus* có tiềm năng ứng dụng trong ngành nông nghiệp bởi chúng có khả năng đối kháng một số loài nấm bệnh gây hại cây trồng như *Fusarium oxysporum* và *F. solani* (Berić *et al.*, 2012; Nguyễn Thị Chúc Quỳnh và *ctv.*, 2015; Lương Hữu Thành và *ctv.*, 2020) cũng như nhiều loài vi khuẩn, trong đó có *E. carotovora* (Sarwar *et al.*, 2018). Đáng chú ý chủng K29 được xác định có hoạt tính kháng mạnh nhất thuộc loài *B. Amyloliuefaciens*, là loài vi khuẩn thuộc nhóm an toàn sinh học cấp độ 1 theo Hướng dẫn số 90/679/EWG của Cộng đồng Châu Âu về an toàn sinh học, được phép sử dụng không hạn chế trong sản xuất và đời sống với nhiều ứng dụng quan trọng không chỉ trong nông nghiệp mà còn trong các quá trình lên men công nghiệp, các sản phẩm ứng dụng trong y học. Chủng *B. amyliuefaciens* K29 có tiềm năng sử dụng cho sản xuất chế phẩm sinh học phòng, trừ bệnh thối nhũn trên cây Đinh lăng do *E. carotovora* gây ra. *Bacillus cereus* là loài vi khuẩn có khả năng sinh độc tố đường ruột gây ngộ độc ở người (Nguyễn Quốc Anh và *ctv.*, 2013), thuộc nhóm vi khuẩn an toàn sinh học cấp độ 2, do vậy chủng vi khuẩn *Bacillus cereus* K49 không được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

IV. KẾT LUẬN

Trong số 189 chủng vi khuẩn phân lập từ đất trồng Đinh lăng, đã tuyển chọn được 9 chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng mạnh với vi khuẩn gây bệnh thối nhũn *E. carotovora* M4 và có khả năng tổng hợp enzyme amylase, protease, cellulase, trong đó chủng K29 thể hiện hoạt tính đối kháng cao nhất với đường kính vòng vô khuẩn đạt trên 25 mm. Kết quả đánh giá các đặc điểm sinh học và giải trình tự 16S rRNA của 9 chủng vi khuẩn tuyển chọn, xác định 7 chủng ký hiệu K25, K27, K29, K40, B45, K47 và K52 thuộc loài *Bacillus amyliuefaciens* và chủng K9 thuộc loài *Bacillus subtilis*. Chủng *B. amyliuefaciens* K29 có tiềm năng sử dụng cho sản xuất chế phẩm sinh học phòng, trừ bệnh thối nhũn trên cây Đinh lăng do *E. carotovora* gây ra.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ nhiệm vụ khoa học và công nghệ cấp Bộ của Viện Ứng dụng Công nghệ, Bộ Khoa học và Công nghệ. Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn!

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Quốc Anh, Nguyễn Ánh Tuyết, Bùi Thị Kim Ngân, Hà Thị Tường Vân, Nguyễn Lan Phương, Bùi Thị Mai Hương, Trần Thị Vân Khánh, Trần Huy Hoàng, 2013. Ứng dụng kỹ thuật Multiplex PCR phát hiện gen độc tố của vi khuẩn *Bacillus cereus* trong một số thực phẩm chế biến từ ngũ cốc. *Tạp chí Y học Rục hành*, 859(2): 115-118.
- Nguyễn Xuân Cảnh, Nguyễn Thị Khánh, Phạm Hồng Hiền, 2017. Nghiên cứu chủng xạ khuẩn có khả năng đối kháng với vi khuẩn *Erwinia carotovora* gây bệnh thối nhũn trên một số loại cây trồng. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 7(80): 41-46.
- Nguyễn Lâm Dũng, Đoàn Xuân Mượu, Nguyễn Phùng Tiên, Đặng Đức Thanh, Phạm Văn Ty, 1982. *Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học*. NXB Khoa học và Kỹ thuật.
- Nguyễn Thị Chúc Quỳnh, Trần Văn Huy, Nguyễn Thu Hà, Lê Văn Trinh, Vũ Thị Hiền, Phạm Thị Minh Thắng, Phùng Quang Tùng, 2015. Nghiên cứu ứng dụng chế phẩm sinh học SH-BV1 phòng trừ tuyến trùng và nấm bệnh hại rễ hồ tiêu, cà phê ở Tây Nguyên. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 6: 36-44.
- Vũ Xuân Tạo, Trần Văn Tuấn, 2020. Phân lập và tuyển chọn các chủng *Trichoderma* có khả năng đối kháng vi nấm gây bệnh trên cây cam. *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 36(3): 98-104.
- Lương Hữu Thành, Vũ Thúy Nga, Đàm Trọng Anh, Nguyễn Ngọc Quỳnh, Nguyễn Thị Thu, Đàm Thị Huyền, Hứa Thị Sơn, Vũ Tiến Đức, Trần Thị Như Hằng, Nguyễn Thành Lam, 2020. Nghiên cứu khả năng sử dụng chế phẩm vi sinh vật phân hủy thuốc bảo vệ thực vật chứa gốc lân hữu cơ và kích thích sinh trưởng thực vật đối với cây chè. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 12: 56-60.
- Ngô Tự Thành, Bùi Thị Việt Hà, Vũ Minh Đức & Chu Văn Mẫn, 2009. Nghiên cứu hoạt tính enzyme ngoại bào của một số chủng *Bacillus* mới phân lập và khả năng ứng dụng chúng trong xử lý nước thải. *Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội, Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, 25: 101-106.
- Al-Ajlani M.M., Hasnain S., 2010. Bacteria exhibiting antimicrobial activities; screening for antibiotics and the associated genetic studies. *Open Conference Proceedings Journal*, 1: 230-238.
- Balcázar J.L., De Blas I., Ruiz-Zarzuola I., Cunningham D., Vendrell D., Muzquiz J.L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary microbiology*, 114(3-4): 173-186.
- Bhat K.A., Masoodi S.D., Bhat N.A., Ahmad M., Zargar M.Y., Mir S.A. and Ashraf B.M., 2010. Studies on the Effect of Temperature on the Development of Soft Rot

- of Cabbage (*Brassica oleracea* var. Capitata) Caused by *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*. *Journal of Phytology*, 2: 64-67.
- Berić T., MilanKojić M., Stanković S., Topisirović L., Degraasi G., Myers M., Venturi V., Fira D., 2012. Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. natural isolates and their potential use in the biocontrol of phytopathogenic bacteria, *Food Technology and Biotechnology*, 50(1): 25-31.
- Dissanayake, M.L.M.C.; Kumari, W.K.M.T, 2012. Efficacy of various plant extracts to control Fusarium wilt of *Polyscia balfouriana* variety Marginata, *Asian Journal of Experimental Biological Science*, 3(1): 129-135
- Elshanshoury A.R., 1995. Interactions of *Azotobacter chroococcum*, *Azospirillum brasilense* & *Streptomyces mutabilis* in relation to their effect on wheat development. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 175(2): 119-127
- Mishra P., Mishra J, Dwivedi S.K. and Arora N.K., 2020. *Microbial Enzymes in Biocontrol of Phytopathogens*. In book: *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries* ed. by N.K. Arora. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1710-5_10.
- Perombelon M.C.M., van der Wolf J.M., 2002. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes: a laboratory manual. Scottish Crop Research Institute, Dundee, Scotland.
- Sarwar A., Brader G., Corretto E., Aleti G., Abaidullah M., Sessitsch A., Hafeez F. Y., Lee S.W., 2018. Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity. *PLoS One*, 13(6): 1-15. doi: 10.1371/journal.pone.0198107.
- Stein T., 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4): 845-857.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725-2729.
- Tran V.T., Do T.B.X.L., Nguyen T.K., Vu X.T., Dao B.N., Nguyen H.H., 2017. A simple, efficient and universal method for the extraction of genomic DNA from bacteria, yeasts, molds and microalgae suitable for PCR-based applications. *Vietnam Journal of Science, Technology and Engineering*, 59(4): 66-74.
- Vaseeharan B. and Ramasamy P., 2003. Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology*, 36(2): 83-87.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A. and Lane D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2): 697-703.

Isolation, selection and identification of *Bacillus* strains from the soils growing *Ming aralia* (*Polyscias fruticosa*) with antagonistic activity against *Erwinia carotovora* causing soft rot disease

Nguyen Thi Thanh Mai, Do Thi Kim Trang, Truong Thi Chien,
Tran Bao Tram, Hoang Quoc Chinh, Ngo Thi Hoa,
Mai Thi Dam Linh, Vu Xuan Tao

Abstract

The study aims to isolate, select and identify *Bacillus* strains from the soils growing *Ming aralia* (*Polyscias fruticosa*) with antagonistic activity against *Erwinia carotovora* causing soft rot disease. 189 bacterial strains capable of surviving at a temperature of 100°C for 10 minutes were isolated from 30 samples of the soils growing *Ming aralia* in Hai Hau district, Nam Dinh province. Among them, 9 bacterial isolates showed strong antagonism to *Erwinia carotovora* M4 with diameter of clearing zone >16 mm. All 9 selected bacterial strains were able to synthesize the enzymes amylase, protease and cellulase. Based on biological characteristics and sequencing of sequence 16S rRNA, 9 selected bacterial strains were identified as *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. *B. amyloliquefaciens* K29 will be the potential strain for production of bioproduct for controlling the soft rot disease caused by *Erwinia carotovora*.
Keywords: *Bacillus* bacteria, *Erwinia carotovora* bacteria, identification, antagonisms, soft rot disease on *Ming aralia*

Ngày nhận bài: 03/7/2021
Ngày phản biện: 14/7/2021

Người phản biện: GS.TS. Phạm Văn Toàn
Ngày duyệt đăng: 30/7/2021