

## Isolation and identification of lactic acid bacteria from vegetable-growing soils in Da Lat, Lam Dong

Vuong V. Le, Hai T. Pham, Nguyen T. T. Nguyen, Mai T. N. Dang,  
Phong V. Nguyen, & Thanh T. L. Bien\*

Department of Biotechnology, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

### ARTICLE INFO

#### Research Paper

Received: December 20, 2019

Revised: May 12, 2020

Accepted: June 25, 2020

#### Keywords

Antibacterial

Antifungi

Isolation

Lactic acid bacteria

Vegetable-growing soil

#### \*Corresponding author

Bien Thi Lan Thanh

Email: bienthilanthanh@hcmuaf.edu.vn

### ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) have been used for decades in agriculture to improve soils, control disease and promote plant growth. LAB have been isolated from fermented food, milks and plants, however, a few studies of LAB from soils have been reported. This study aimed to isolate, screen and identify LAB from vegetable-growing soils collected from Da Lat (Lam Dong province). From 33 soil samples, 25 LAB isolates were selected on MRS agar supplemented with 1% CaCO<sub>3</sub>. The LAB isolates formed small, creamy white, convex, entire margin colonies, and were Gram-positive, catalase-negative and rod-shaped bacteria. Based on the acid-producing capacity, five LAB isolates (DT2, CT3, CC2, XL7 and S2) that produced clear zones around colonies due to the solubilization of CaCO<sub>3</sub> with diameters ranged from 1.03 – 1.33 cm, and 11.8 – 14.3 mg/mL acid after 2-day incubation at 30°C. All selected LAB isolates showed the capacity to inhibit the growth of *Fusarium oxysporum* at level 1 (inhibitory rates in range of 10.66 – 19.96%), and *Phytophthora* sp. at level 3 (inhibitory rates in range of 50.86 – 57.44%) after 3 days. The isolates did not inhibit against *E. coli* and *Staphylococcus* but inhibit the growth of *Bacillus spizizenii* and *Salmonella typhi* with average inhibition diameters in range of 3.33 – 4.90 mm and 2.43 – 3.37 mm, respectively, after 1-day incubation. The five LAB isolates were molecularly determined to be *Lactobacillus plantarum* with 97 – 100% similarities.

**Cited as:** Le, V. V., Pham, H. T., Nguyen, N. T. T., Dang, M. T. N., Nguyen, P. V., & Bien, T. T. L. (2020). Isolation and identification of lactic acid bacteria from vegetable-growing soils in Da Lat, Lam Dong. *The Journal of Agriculture and Development* 19(4), 1-9.

## Phân lập và xác định vi khuẩn lactic từ đất trồng rau tại Đà Lạt, Lâm Đồng

Lê Văn Vương, Phạm Thiên Hải, Nguyễn Thị Thảo Nguyên, Đặng Thị Ngọc Mai,  
Nguyễn Vũ Phong & Biện Thị Lan Thanh\*

Bộ Môn Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

### THÔNG TIN BÀI BÁO

#### Bài báo khoa học

Ngày nhận: 20/12/2019

Ngày chỉnh sửa: 12/5/2019

Ngày chấp nhận: 25/06/2020

#### Từ khóa

Đất trồng rau  
Kháng khuẩn  
Kháng nấm  
Phân lập  
Vi khuẩn lactic

#### \*Tác giả liên hệ

Biện Thị Lan Thanh  
Email: bienthilanthanh@hcmuaf.edu.vn

### TÓM TẮT

Vi khuẩn lactic (lactic acid bacteria, LAB) được ứng dụng rộng rãi trong nông nghiệp, có tác dụng trong việc cải tạo đất, kiểm soát sinh học, phòng trừ bệnh và kích thích tăng trưởng cây trồng. LAB đã được phân lập từ nhiều nguồn khác nhau như trên thực vật và các sản phẩm lên men chua truyền thống. Tuy nhiên, các nghiên cứu về LAB trong đất còn hạn chế. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập, tuyển chọn và định danh các chủng LAB có hoạt tính sinh học cao từ mẫu đất trồng rau có tiềm năng ứng dụng sản xuất chế phẩm sinh học góp phần phát triển nền nông nghiệp bền vững. Từ 33 mẫu đất trồng rau thu thập tại thành phố Đà Lạt (Lâm Đồng) đã phân lập được 25 chủng vi khuẩn lactic. Các chủng phân lập có khuẩn lạc nhỏ, tròn, lồi, màu trắng đục, bờ đều, tế bào hình que ngắn kết đôi hoặc xếp chuỗi, Gram dương, catalase âm tính. Dựa vào khả năng sinh acid lactic, đã chọn được 05 chủng LAB (kí hiệu DT2, CT3, CC2, XL7 và S2) có khả năng sinh acid mạnh với đường kính vòng phân giải  $\text{CaCO}_3$  trên đĩa thạch MRS từ 1,03 – 1,33 cm và sinh 11,8 – 14,3 mg/mL acid sau 2 ngày ủ ở 30°C. Tất cả các dòng LAB tuyển chọn có khả năng kháng *Fusarium oxysporum* ở mức độ 1 với tỉ lệ ức chế từ 10,66 – 19,96% và kháng *Phytophthora* sp. ở mức độ 3 với tỉ lệ ức chế từ 50,86 – 57,44% sau 3 ngày. Các dòng LAB không thể hiện tính kháng với *E. coli* và *Staphylococcus aureus*, nhưng kháng với *Bacillus spizizenii* và *Salmonella typhi* với đường kính vòng vô khuẩn lần lượt 3,33 – 4,90 mm và 2,43 – 3,37 mm sau 1 ngày ủ. Các dòng LAB tuyển chọn có trình tự 16S rRNA tương đồng 97 – 100% với *Lactobacillus plantarum*.

### 1. Đặt Vấn Đề

Vi khuẩn lactic (Lactic acid bacteria, LAB) có mặt khắp nơi trong tự nhiên, có nhiều ứng dụng trong cải thiện sức khỏe con người và vật nuôi, và được xem là an toàn (generally recognized as safe, GRAS) (Stiles, 1996). Nhiều loài LAB đã được chứng minh là có khả năng sản xuất các hợp chất chống lại các vi sinh vật gây bệnh (Chaurasia & ctv., 2005). LAB trong môi trường tự nhiên được xem như là tác nhân kiểm soát sinh học, cải tạo

đất, cung cấp dinh dưỡng, chống lại các vi khuẩn và nấm gây bệnh cây trồng, kích thích nảy mầm hoặc tăng trưởng cây trồng và làm giảm stress do các yếu tố phi sinh học (abiotic stress) (Lamont & ctv., 2017). Việc sử dụng LAB trong cải tạo đất, kiểm soát bệnh hại, tăng trưởng cây trồng, tăng năng suất, bảo quản nông sản thực phẩm sau thu hoạch là xu hướng tiềm năng để làm giảm hoặc thay thế các loại phân bón, thuốc trừ sâu và các chất bảo quản hóa học ảnh hưởng sức khỏe con người và vật nuôi. Trong các nghiên cứu trước

đây, rất nhiều dòng LAB đã được phân lập từ sữa và các sản phẩm lên men chua truyền thống. Tuy nhiên, các nghiên cứu về phân lập vi khuẩn trong đất còn rất hạn chế, mặc dù đã có nhiều nghiên cứu chứng minh có sự tồn tại của LAB trong đất (Suzuki & Yamasato 1994; Yanagida & ctv., 1997; Chen & ctv., 2005).

Đề tài được tiến hành nhằm tuyển chọn các dòng LAB trong đất trồng rau có hoạt tính đối kháng đối với vi khuẩn và nấm gây bệnh gây trồng. Kết quả nghiên cứu có thể được ứng dụng để kiểm soát bệnh hại trên rau và bảo quản rau an toàn sau thu hoạch.

## 2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

### 2.1. Thu mẫu và phân lập LAB

Đất xung quanh vùng rễ cây rau được thu như sau: dùng muỗng sạch loại bỏ lớp đất mặt (khoảng 5 cm) và lấy khoảng 100 g đất, mỗi luống lấy đất ở 5 điểm khác nhau rồi trộn đều và lấy khoảng 100 g cho vào túi zip sạch và được tính là một mẫu. Ghi rõ thời gian, địa điểm và loại rau khi thu mẫu. Mẫu đất được trữ trong thùng lạnh (< 10°C, có đá gel), vận chuyển về phòng thí nghiệm và được phân tích trong vòng 2 ngày.

Vi khuẩn lactic được phân lập trên môi trường MRS agar có chứa 1% CaCO<sub>3</sub>, ủ ở 30°C trong 3 ngày. Các khuẩn lạc nghi ngờ là LAB được chọn lọc dựa vào vòng phân giải CaCO<sub>3</sub> trên đĩa môi trường.

### 2.2. Kiểm tra khả năng sinh acid lactic của các chủng LAB phân lập

#### 2.2.1. Khả năng phân giải CaCO<sub>3</sub> trên đĩa thạch

Khả năng sinh acid của các chủng LAB phân lập được sàng lọc dựa vào sự phân giải CaCO<sub>3</sub> trên đĩa thạch được thực hiện theo mô tả của Xiao & ctv. (2015). Các chủng LAB thuần được nuôi cấy trong 5 mL môi trường MRS broth ở 30°C trong 24 giờ. Hút khoảng 40 µL dung dịch vi khuẩn nhỏ vào giếng đã được tạo sẵn trên đĩa môi trường MRS agar + 1% CaCO<sub>3</sub>, mỗi đĩa 3 giếng, và ủ ở 30°C trong 2 ngày. Đo đường kính vòng phân giải CaCO<sub>3</sub> trên đĩa thạch. Đường kính vòng phân giải được tính theo công thức:  $Df = \frac{(D1 + D2 + D3) - 3d}{3}$ , trong đó, D là đường kính vòng CaCO<sub>3</sub> bị phân giải trên đĩa, d là đường kính giếng, Df là vòng phân giải (cm).

Các chủng vi khuẩn tạo vòng phân giải lớn được chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

#### 2.2.2. Định lượng khả năng sinh acid lactic của các chủng LAB tuyển chọn

Lượng acid sinh ra bởi các chủng LAB tuyển chọn được xác định theo phương pháp chuẩn độ bằng NaOH. Các chủng LAB được nuôi trong 15 mL môi trường MRS broth ở 30°C trong 48 giờ, lắc 150 vòng/phút. Ly tâm thu 10 mL dịch nổi, bổ sung 20 mL nước cất vô trùng và 1 – 2 giọt phenolphthalein 1%. Chuẩn độ bằng NaOH 0,1 N đến khi xuất hiện màu hồng nhạt bền. Ghi lại thể tích NaOH đã dùng để chuẩn độ. Lượng acid được tính theo công thức: acid lactic (mg/mL) =  $(V_{NaOH} \times 0,1 \times 90,08) / \text{thể tích mẫu}$  (Wakil & Ajayi, 2013).

#### 2.3. Khảo sát hoạt tính đối kháng của LAB tuyển chọn với vi khuẩn và nấm gây bệnh

Khả năng đối kháng của các dòng LAB chọn lọc được khảo sát với các loài nấm gây bệnh cây trồng như *Fusarium oxysporum* và *Phytophthora* sp. và các vi khuẩn gây bệnh như *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Bacillus spizizenii* và *Staphylococcus aureus*.

Xác định khả năng đối kháng nấm bệnh của LAB: cấy nấm (*F. oxysporum* và *Phytophthora* sp.) vào giữa đĩa môi trường PDA, vi khuẩn lactic (mọc trên môi trường MRS agar sau 2 ngày) được cấy thành hai đường thẳng dài khoảng 2 cm ở hai bên rìa đĩa, sau đó ủ ở 30°C trong 3 ngày. Đĩa đối chứng chỉ cấy nấm, không cấy vi khuẩn. Khả năng ức chế sự tăng trưởng của nấm bệnh (%) của vi khuẩn lactic được tính theo công thức của Whipps (1987):  $[(R1 - R2) / R1] \times 100$ , trong đó, R1 là bán kính (cm) tăng trưởng của nấm đo ngược hướng không có vi khuẩn và R2 là bán kính tăng trưởng của nấm đo theo hướng có vi khuẩn. Sự ức chế tăng trưởng (growth inhibition, GI) được tính theo thang từ 0 đến 3 (Korsten & ctv., 1995): 0 = không ức chế, 1 = 1 đến 25% GI, 2 = 26 đến 50% GI và 3 = 51 đến 75% GI.

Xác định khả năng kháng khuẩn của LAB: vi khuẩn gây bệnh (*E. coli*, *S. typhi*, *B. spizizenii* và *S. aureus*) được nuôi cấy trong 5 mL môi trường LB lỏng ở 37°C qua đêm. 0,1 mL dịch vi khuẩn (khoảng 10<sup>7</sup> tế bào/mL) được trải đều trên đĩa môi trường LB agar, sau đó tạo 3 giếng trên mỗi đĩa thạch. LAB được nuôi cấy trong môi trường MRS broth ở 30°C trong 48 giờ, sau đó ly tâm

thu dịch nổi. 50  $\mu$ L dịch nổi được đặt vào giếng đã tạo ở trên. Đĩa đối chứng làm tương tự nhưng thay dịch vi khuẩn LAB bằng nước cất vô trùng. Ủ các đĩa ở 30°C trong 24 giờ và đo đường kính vòng vô khuẩn.

#### 2.4. Định danh các chủng vi khuẩn lactic chọn lọc bằng sinh học phân tử

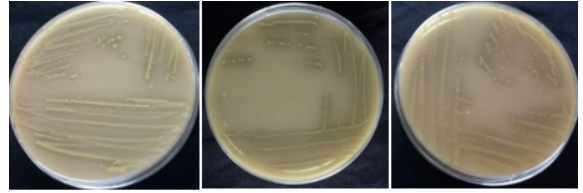
DNA tổng số của các dòng LAB tuyển chọn được ly trích với DNA Genome Extraction kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất, và được dùng làm khuôn mẫu để khuếch đại vùng gen 16S rRNA với universal primer: 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991). Thành phần cho 50  $\mu$ L phản ứng gồm 5  $\mu$ L 10  $\times$  NH<sub>4</sub> reaction buffer, 3  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>, 0,5  $\mu$ L dNTP mix, BIOTAQ DNA polymerase 1  $\mu$ L, 0,5  $\mu$ M forward primer, 0,5  $\mu$ M reverse primer, 0,5 ng genomic DNA và nước vừa đủ 50  $\mu$ L. Phản ứng PCR được thực hiện với chu trình nhiệt: tiền biến tính ở 95°C trong 3 phút, thực hiện 35 chu kỳ ở 95°C trong 15 giây, 55°C trong 45 giây, 72°C trong 1 phút 30 giây, và giai đoạn hậu kéo dài ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được phân tích trên gel agarose 1% trong dung dịch đệm TAE 0,5 X ở 100 V trong 30 phút và đọc kết quả dưới tia UV. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%, sau đó được gửi giải trình tự tại công ty CP Kỹ thuật và Sinh học ứng dụng Việt Nam. Trình tự 16S rDNA của các chủng LAB phân lập được so sánh trên ngân hàng gene (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### 3. Kết Quả và Thảo Luận

#### 3.1. Kết quả phân lập LAB từ mẫu đất trồng rau

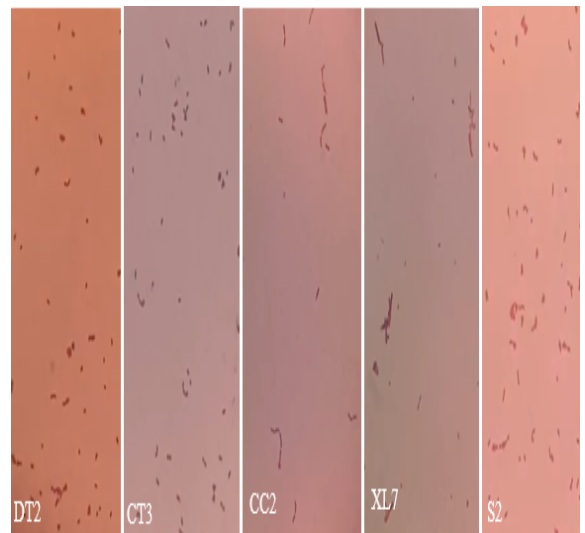
Vi khuẩn lactic (LAB) có mặt khắp nơi trong tự nhiên như đất, nước, thực vật, sữa, trong đường ruột của người và động vật. Nhiều loài LAB được phát hiện đầu tiên trên thực vật (Mundt, 1970). Đà Lạt có khí hậu miền núi ôn hòa và dịu mát quanh năm, là vùng nông nghiệp trù phú đặc biệt với những sản phẩm rau và hoa, là nơi cung cấp rau cho các khu vực phía Nam và cả nước. Do đó, các vùng đất trồng rau ở Đà Lạt có thể có hệ LAB đa dạng và phong phú.

Mẫu đất được thu thập từ các vườn trồng rau xà lách, cải thảo, súp-lơ, súp, dâu tây, cải canh,



**Hình 1.** Khuẩn lạc một số dòng vi khuẩn lactic được phân lập từ mẫu đất trồng rau.

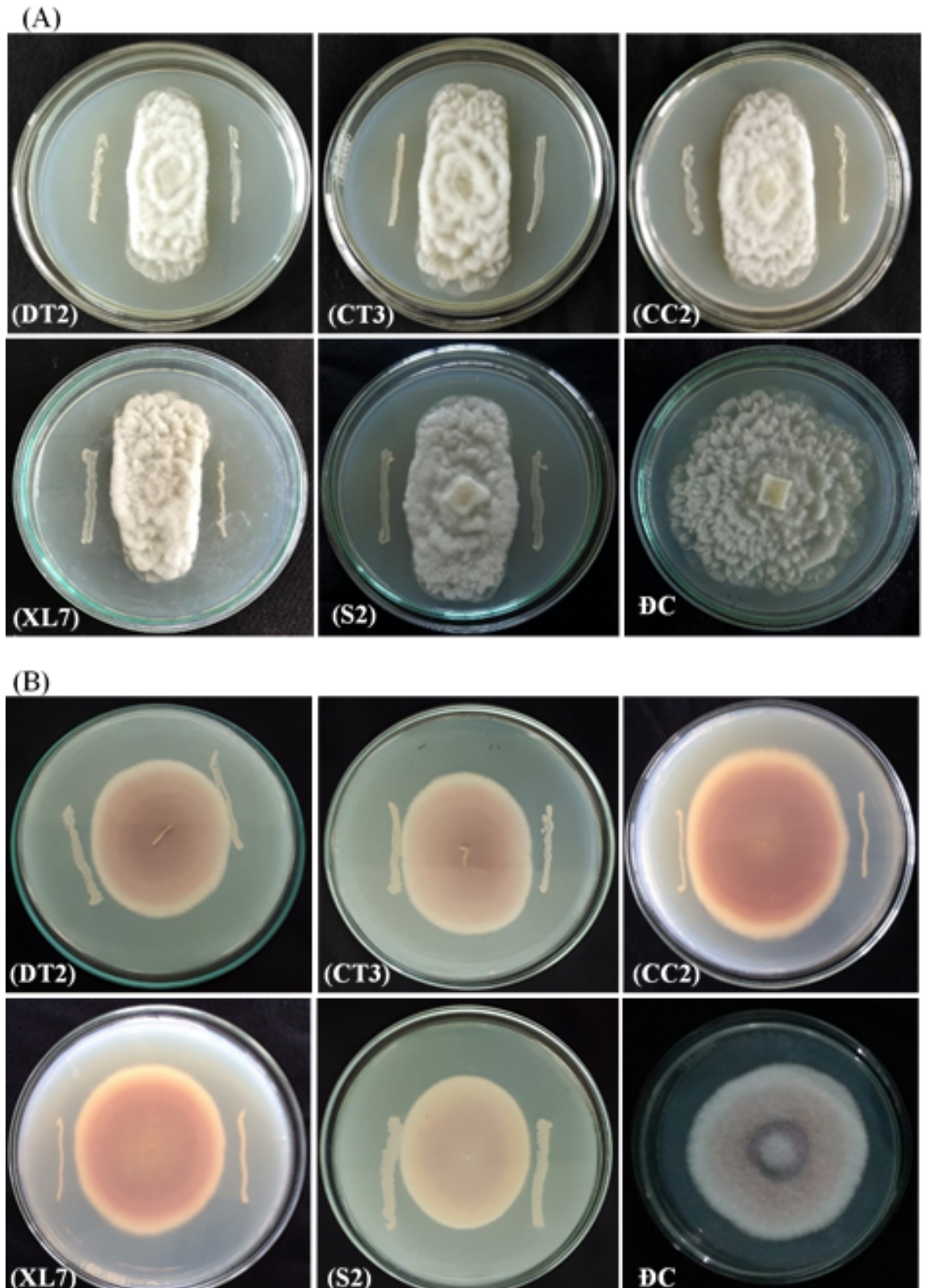
tần ô, bó xôi ở phường 5, 7, 10 và 11, thành phố Đà Lạt (Lâm Đồng). Từ 33 mẫu đất đã phân lập được 25 khuẩn lạc có vòng phân giải CaCO<sub>3</sub> xung quanh nghi ngờ là LAB (Hình 1). Các dòng LAB được tuyển chọn có khuẩn lạc nhỏ, tròn, lồi, màu trắng đục, bờ đều, đều là vi khuẩn Gram dương và cho kết quả catalase âm tính. Tế bào nhỏ, hình que, đứng thành đôi, cụm, hoặc thành chuỗi (Hình 2). Các dòng LAB phân lập có các đặc điểm tương tự với vi khuẩn lactic đã được mô tả trước đây (Chen & ctv., 2005; Ekundayo, 2014).



**Hình 2.** Hình dạng tế bào một số dòng vi khuẩn lactic phân lập.

#### 3.2. Kết quả thử nghiệm khả năng sinh acid lactic

Quá trình lên men của LAB là quá trình chuyển hóa carbohydrate tạo thành acid lactic như là sản phẩm cuối cùng của quá trình lên men (Abdel-Rahman & ctv., 2013). Acid lactic từ LAB đã được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực, đặc biệt, trong nông nghiệp acid lactic giúp đối kháng



**Hình 3.** Hoạt tính kháng nấm bệnh của các dòng vi khuẩn lactic tuyển chọn. (A) *Phytophthora* sp., (B) *Fusarium oxysporum*. DC: đối chứng.



**Bảng 1.** Khả năng sinh acid lactic của các dòng vi khuẩn lactic (LAB) tuyển chọn

Dòng LAB	Vòng phân giải CaCO <sub>3</sub> (cm)	Acid lactic (mg/mL)
DT2	1,03	11,8
CT3	1,33	14,3
CC2	1,20	13,8
XL7	1,27	13,8
S2	1,07	12,0

**Bảng 2.** Tỷ lệ ức chế nấm bệnh của các dòng vi khuẩn lactic (LAB) tuyển chọn

Dòng LAB	<i>F. oxysporum</i>		<i>Phytophthora</i> sp.	
	Tỷ lệ ức chế (%)	Mức độ ức chế	Tỷ lệ ức chế (%)	Mức độ ức chế
DT2	10,66	1	57,44	3
CT3	19,96	1	56,51	3
CC2	15,13	1	54,62	3
XL7	10,91	1	50,86	3
S2	11,73	1	56,52	3

với các mầm bệnh, cải tạo đất, giảm mùi hôi, do đó làm tăng giá trị nông nghiệp (Andreev & ctv., 2018).

Khả năng sinh acid lactic của các dòng LAB tuyển chọn được xác định dựa vào vòng phân giải CaCO<sub>3</sub> trên đĩa thạch và được định lượng dựa theo phương pháp chuẩn độ NaOH. Vòng phân giải CaCO<sub>3</sub> của các dòng LAB sau 2 ngày dao động từ 0,87 – 1,33 cm, tương ứng với hàm lượng acid sinh ra từ 11,4 – 14,3 mg/mL. Trong đó, 5 chủng có khả năng sinh acid cao nhất (Bảng 1) được tuyển chọn cho các thí nghiệm sau.

### 3.3. Kết quả khảo sát tính kháng của LAB đối với nấm và vi khuẩn gây bệnh

Hoạt tính kháng nấm của các dòng LAB tuyển chọn được khảo sát với *Phytophthora* sp. và *Fusarium oxysporum*, tính kháng khuẩn được khảo sát với vi khuẩn Gram âm gồm *E. coli* và *Salmonella typhi* và vi khuẩn Gram dương gồm *Bacillus spizizenii* và *Staphylococcus aureus*. Kết quả khảo sát tính kháng nấm được thể hiện ở Bảng 2 và Hình 3, và tính kháng khuẩn thể hiện ở Bảng 3. Các LAB tuyển chọn thể hiện tính kháng *F. oxysporum* (với tỷ lệ ức chế từ 10,66 – 19,96%, mức độ 1) thấp hơn so với *Phytophthora* sp. (với tỷ lệ ức chế từ 50,86 – 57,44%, mức độ 3).

Nhờ khả năng sản xuất các acid hữu cơ (như acid lactic hoặc probionic) và các hợp chất kháng sinh (như bacteriocin), LAB được sử dụng như là tác nhân kiểm soát mầm bệnh trên cây trồng (Daranas & ctv., 2019), mầm bệnh trong đất (Lutz & ctv., 2012) và kiểm soát các bệnh sau

**Bảng 3.** Khả năng kháng khuẩn của các dòng vi khuẩn lactic (LAB) phân lập

Dòng LAB	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)	
	<i>B. spizizenii</i>	<i>S. typhi</i>
DT2	4,90	2,43
CT3	-	3,37
CC2	3,67	3,00
XL7	3,50	3,23
S2	3,33	3,17

--: không có vòng vô khuẩn.

thu hoạch (Caplice & Fitzgerald, 1999).

Trước đó, Wang & ctv. (2012) đã thu nhận được hai hợp chất kháng nấm (Benzeneacetic acid và 2-propenyl ester) từ *Lactobacillus plantarum* IMAU10014 có hoạt tính phổ rộng kháng *Botrytis cinerea*, *Glomerella cingulate*, *Phytophthora drechsleri* Tucker, *Penicillium citrinum*, *Penicillium digitatum* và *Fusarium oxysporum*. Zeboudj & ctv. (2014) đã báo cáo rằng, 4 dòng LAB gồm *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* và *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* biovar. *dextranicum* có khả năng ức chế tăng trưởng của *F. oxysporum* f. sp. *albedinis* từ 13,51 – 40,29% trên môi trường PDA. Năm 2018, Juodeikiene & ctv. đã chứng minh các dòng LAB *Lactobacillus sakei* KTU05-6, *Pediococcus acidilactici* KTU05-7, và *Pediococcus pentosaceus* có khả năng làm giảm độc tố của *Fusarium* trong quá trình nảy mầm của hạt lúa mì lên đến 73%, đồng thời các dòng LAB này còn thể hiện tính

**Bảng 4.** Kết quả so sánh trình tự 16S rDNA của các dòng vi khuẩn lactic (LAB) tuyển chọn trên ngân hàng gene

STT	Dòng LAB	Loài tương đồng (%)	Số hiệu
1	DT2	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain T17 (100%)	MG739432.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain MKU9 (100%)	MT549143.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain MKU7 (100%)	MT549142.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain 8941 (100%)	MT539056.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain 8283 (100%)	MT538969.1
2	CT3	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain MKU9 (99%)	MT549143.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain MKU7 (99%)	MT549142.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain 8941 (99%)	MT539056.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain 8283 (99%)	MT538969.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain 8194 (99%)	MT538940.1
3	CC2	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain Sourdough_E011 (97%)	MG754687.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain Sourdough_E01 (97%)	MG754679.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain Sourdough_E9 (97%)	MG754548.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain RK37 (97%)	KF225698.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain FQ011 (97%)	KF418818.1
4	XL7	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain MKU9 (100%)	MT549143.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain MKU7 (100%)	MT549142.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain 8941 (100%)	MT539056.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain 8283 (100%)	MT538969.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain 8194 (100%)	MT538940.1
5	S2	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain IDK 120 (99%)	MT211513.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain R12 (99%)	MG841152.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain MKU9 (99%)	MT549143.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain MKU7 (99%)	MT549142.1
		<i>Lactobacillus plantarum</i> strain 8941 (99%)	MT539056.1

kháng nấm phổ rộng, đặc biệt là với *F. culmorum* và *F. poae*.

Các dòng LAB khảo sát không thể hiện tính kháng với *E. coli* và *S. aureus*, nhưng kháng với *B. spizizenii* và *S. typhi* với đường kính vòng vô khuẩn trung bình lần lượt là 3,33 – 4,90 mm và 2,43 – 3,37 mm được quan sát thông qua vòng vô khuẩn trên đĩa thạch sau 24 giờ, trong đó có dòng CC2 không thể hiện tính kháng với *B. spizizenii* (Bảng 3).

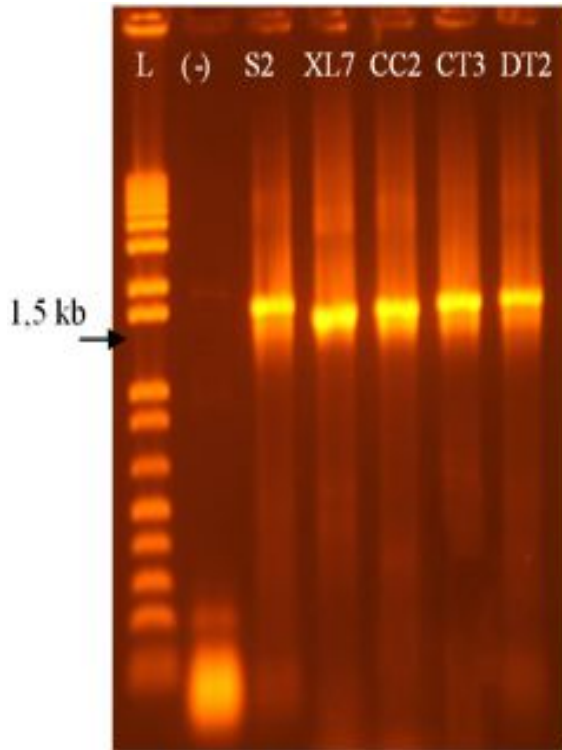
**3.4. Kết quả định danh các dòng LAB được tuyển chọn**

Các dòng LAB tuyển chọn được định danh bằng cách giải trình tự vùng gene 16S rRNA sau khi được khuếch đại với cặp universal primer 27F và 1492R bằng PCR (Hình 4). Kết quả so sánh trình tự 16S rDNA của các chủng LAB tuyển chọn được thể hiện ở Bảng 4.

Theo kết quả so sánh trên ngân hàng gen, cả năm mẫu LAB tuyển chọn đều có trình tự 16S

rDNA tương đồng với loài *Lactobacillus plantarum* từ 97 đến 100%. Kết quả này tương đồng với các đặc điểm về hình thái học của các chủng LAB tuyển chọn, là các vi khuẩn có khuẩn lạc nhỏ dạng điểm (punctiform), lồi (convex), bờ đều (entire margin), màu trắng đục (opaque) (Hình 1); bắt màu Gram dương, tế bào hình que, xếp thành từng cặp, từng cụm, hoặc thành chuỗi có chiều dài khác nhau (Hình 2). Đặc điểm hình dạng và tế bào của các chủng LAB tuyển chọn trong nghiên cứu này cũng phù hợp với mô tả về vi khuẩn *L. plantarum* của Qian & ctv. (2018) và Talashi & Sharma (2019). Trước đó, Yanagida & ctv. (2006) cũng đã phân lập được 3 chủng *L. plantarum* trong 42 mẫu vi khuẩn từ các mẫu đất có khả năng sinh acid bao gồm *L. plantarum* C072201; *L. plantarum* C101904; *L. plantarum* C121204. Một nghiên cứu khác của tác giả Ekundayo (2014) đã phân lập 11 dòng *Lactobacillus* từ đất xung quanh vùng rễ cây ổi và bắp, trong đó có 3 dòng là *L. plantarum*. *L. plantarum* thường được tìm thấy trong tự nhiên, có tầm quan trọng công nghiệp như là một yếu tố quan trọng của các

chất lên men được sử dụng trong các sản phẩm thực phẩm lên men chứa men vi sinh, được tiêu thụ trên toàn thế giới.



**Hình 4.** Kết quả khuếch đại vùng gene 16S rRNA của các dòng vi khuẩn lactic tuyển chọn. L: thang DNA, (-) đối chứng âm.

#### 4. Kết Luận

Từ 33 mẫu đất từ các vườn rau tại Đà Lạt đã tuyển được 5 dòng LAB (DT2, CT3, CC2, XL7, và S2) có khả năng kháng *Fusarium oxysporum* với tỉ lệ ức chế từ 10,66 – 19,96% và kháng *Phytophthora* sp. với tỉ lệ ức chế từ 50,86 – 57,44%. Các dòng LAB không thể hiện tính kháng với *E. coli* và *Staphylococcus*, nhưng kháng đồng thời *Bacillus spizizenii* (trừ dòng CC2) và *Salmonella typhi*. Các dòng LAB này có trình tự 16S rDNA tương đồng với chủng *Lactobacillus plantarum* từ 97 – 100%.

#### Lời Cảm Ơn

Nghiên cứu này là một phần của đề tài khoa học và công nghệ cấp cơ sở mã số CS-SV18-CNSH-03 được cấp kinh phí bởi Trường Đại học Nông Lâm TP. Hồ Chí Minh.

#### Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances* 31, 877-902.
- Andreev, N., Ronteltap, M., Boincean, B., & Lens, P. N. L. (2018). Lactic acid fermentation of human excreta for agricultural application. *Journal of Environmental Management* 206, 890-900.
- Caplice, E., & Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50, 131-149.
- Chaurasia, B., Pandey, M., & Palni, M. (2005). Diddisable and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. *Microbiology Research* 160, 75-81.
- Chen, Y. S., Yanagida, F., & Shinohara, T. (2005). Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. *Letters in Applied Microbiology* 40, 195-200.
- Daranas, N., Roselló, G., Cabrefiga, J., Donati, I., Francés, J., Badosa, E., Spinelli, F., Montesinos, E., & Bonaterra, A. (2019). Biological control of bacterial plant diseases with *Lactobacillus plantarum* strains selected for their broad-spectrum activity. *Annals of Applied Biology* 174, 92-105.
- Ekundayo, F. O. (2014). Isolation and identification of lactic acid bacteria from rhizosphere soils of three fruit trees, fish and ogi. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3(3), 991-998.
- Juodeikiene, G., Bartkiene, E., Cernauskas, D., Cizeikiene, D., Zadeike, D., Lele, V., & Bartkevicius, V. (2018). Antifungal activity of lactic acid bacteria and their application for *Fusarium* mycotoxin reduction in malting wheat grains. *LWT* 89, 307-314.
- Lamont, J. R., Wilkins, O., Bywater-Ekegard, M., & Smith, D. L. (2017). From yogurt to yield: Potential applications of lactic acid bacteria in plant production. *Soil Biology and Biochemistry* 111, 1-9.
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In Stackebrandt, E., & Goodfellow, M. (Eds.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (115-175). New York, USA: John Wiley & Sons.
- Lutz, M. P., Michel, V., Martinez, C., & Camps, C. (2012). Lactic acid bacteria as biocontrol agents of soil-borne pathogens. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens IOBC-WPRS Bulletin* 78, 285-288.
- Korsten, L., De Jager, E. S., De Villiers, E. E., Lourens, A., & Wehner, F. C. (1995). Evaluation of bacterial epiphytes isolated from avocado leaf and fruit surfaces for biocontrol of avocado postharvest diseases. *Plant Disease* 79, 1149-1156.



- Mundt, J. O. (1970). Lactic acid bacteria associated with raw plant food material. *Journal of Milk and Food Technology* 33, 550-553.
- Qian, Y., Long, X., Pan, Y., Li, G., & Zhao, X. (2018). Isolation and identification of lactic acid bacteria (*Lactobacillus plantarum* YS2) from yak yogurt and its probiotic properties. *Biomedical Research* 29(4), 815-820.
- Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 331-345.
- Suzuki, T., & Yamasato, K. (1994). Phylogeny of spore-forming LAB based on 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiol Lett* 115, 13-17.
- Talashi, S., & Sharma N. (2019). Isolation of *Lactobacillus plantarum* from human breast milk with probiotic and medical attributes. *Acta Scientific Microbiology* 2(6), 163-171.
- Wakil, S. M., & Ajayi, O. O. (2013). Production of lactic acid from starchy-based food substrates. *Journal of Applied Biosciences* 71, 5673-5681.
- Wang, H., Yan, Y., Wang, J., Zhang, H., & Qi, W. (2012). Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. *PLoS One* 7(1) e29452.
- Whipps, J. M. (1987). Effect of media on growth and interactions between a range of soil-borne glasshouse pathogens and antagonistic fungi. *New Phytologist* 107, 127-142.
- Xiao, P., Huang, Y., Yang, W., Zhang, B., & Quan, X. (2015). Screening lactic acid bacteria with high yielding-acid capacity from pickled tea for their potential uses of inoculating to ferment tea products. *Journal of Food Science and Technology* 52(10), 6727-6734.
- Yanagida, F., Chen, Y., & Shinohara, T. (2006). Searching for bacteriocin-producing lactic acid bacteria in soil. *The Journal of General and Applied Microbiology* 52, 21-28.
- Yanagida, F., Suzuki, K., Kozaki, M. & Komagata, K. (1997). Proposal of *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayamae* sp. nov., subsp. nov., *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *racemicus* subsp. nov., *Sporolactobacillus terrae* sp. nov., *Sporolactobacillus kofuensis* sp. nov., and *Sporolactobacillus lactosus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 499-504.
- Zebboudj, N., Yezli, W., Hamini-Kadar, N., Kihal, M., & Henni, J. E. (2014). Antifungal activity of lactic acid bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* isolated from diseased date palm in South Algeria. *International Journal of Biosciences* 5, 99-106.