

PHÂN LẬP VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG SINH HOẠT CHẤT KHÁNG NẤM *ALTERNARIA* SP. CỦA *BACILLUS VEZELENSIS*

Trần Ngọc Hùng⁽¹⁾, Nguyễn Nhật Hào⁽¹⁾, Phan Ngọc Minh⁽¹⁾

(1) Trường đại học Thủ Dầu Một

Ngày nhận bài 20/01/2021; Ngày phản biện 28/01/2021; Chấp nhận đăng 30/03/2021

Liên hệ email: hungtngoc@tdmu.edu.vn

<https://doi.org/10.37550/tdmu.VJS/2021.02.169>

Tóm tắt

Nấm *Alternaria* là tác nhân chính gây bệnh đốm nâu trên cây chanh leo. Việc kiểm soát nấm bệnh bằng các biện pháp sinh học là mục tiêu nhằm nâng cao chất lượng và giá trị xuất khẩu của trái chanh leo. Nghiên cứu đã làm thuần và định danh được chủng *Bacillus velezensis* có khả năng kháng nhiều loài nấm gây bệnh thực vật như *Alternaria* sp., *Fusarium* F1, *Collectotrichum* R6 và *Pyricularia oryzae*. Trên môi trường khoai tây – glucose, chủng sinh hoạt chất kháng *Alternaria* sp. tốt nhất sau 5 ngày, với đường kính vòng kháng nấm đạt 17,5mm. Hoạt chất kháng nấm được thu nhận hiệu quả khi kết tủa với 50% ethanol trong thời gian 60 phút.

Từ khóa: *Alternaria* sp., *Bacillus velezensis*, hoạt chất kháng nấm

Abstract

ISOLATION AND ASSESSING THE ABILITY TO SYNTHESIS THE COMPOUNDS INHIBIT *Alternaria* sp. FROM *Bacillus velezensis*

Alternaria is the main agent cause the brown-spot disease on passion fruit. Controlling the disease fungi by biological solutions is necessary to improve the quality and export value of the passion fruit. The study isolated and classify the *Bacillus velezensis* has a ability to inhibit many damaging fungi species on plants such as *Alternaria* sp., *Fusarium* F1, *Collectotrichum* R6 and *Pyricularia oryzae*. On the potato – glucose medium, the bacterial strain synthesis best the anti-*Alternaria* compounds for 5 days, the diameter of antifungal zone gets 17.5mm. The antifungal compounds were precipitated effectively with ethanol 50% for 60 minutes.

1. Đặt vấn đề

Theo báo cáo của Cục trồng trọt, tính đến cuối năm 2019, diện tích trồng cây chanh leo đã đạt khoảng 10.500ha. Là cây ăn quả có giá trị của các tỉnh Tây nguyên, trồng cây chanh leo lại ít tốn công chăm sóc nên được nhiều hộ nông dân mạnh dạn mở rộng diện tích. Việc người dân ồ ạt trồng chanh leo không đúng theo quy hoạch dẫn tới dịch bệnh bùng phát gây thiệt hại cho các nhà nông, điển hình là bệnh đốm nâu do nấm

Alternaria passiflorae gây ra. Các biện pháp phòng trừ bệnh hại chủ yếu được sử dụng hiện nay là các loại thuốc hoá học có gốc Copper, Metalaxyl,... Tuy cho hiệu quả nhanh nhưng rất độc hại. Thị trường xuất khẩu chanh leo hiện nay đã mở rộng tới trên 50 nước. Do đó, nhiều biện pháp sinh học được chú trọng phát triển nhằm phục vụ nền nông nghiệp bền vững và đáp ứng các yêu cầu xuất khẩu của thị trường thế giới (Nguyễn Văn hòa và cs., 2016).

Vi khuẩn *Bacillus velezensis* (thuộc nhóm *Bacillus subtilis*) mới được phân loại gần đây, đã cho thấy nhiều ưu điểm trong việc kiểm soát các loài nấm bệnh hại cây trồng (Rooney và cs., 2009). Ở Việt Nam, những nghiên cứu sử dụng biện pháp sinh học để kiểm soát bệnh trên cây trồng chủ yếu tập trung vào xạ khuẩn, nhóm nấm đối kháng và một số loài thuộc chi *Bacillus*. Một số nghiên cứu liên quan có thể kể đến như Trần Thị Thu Thủy đã sàng lọc được một chủng *Bacillus megaterium* và ba chủng *Bacillus pumilus* từ 45 chủng ban đầu có khả năng kiểm soát nấm *Fusarium moniliforme* gây bệnh lúa von (Trần Thị Thu Thủy và cs., 2014); Trịnh Thành Trung và cs., (2017) đã phân lập được 15 chủng vi khuẩn *Bacillus velezensis* từ các vùng sinh thái khác nhau, chúng có khả năng kháng nhiều loại nấm bệnh khác nhau như *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium hydrophilum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici* và vi khuẩn gây bệnh bạc lá *Xanthomonas oryzae*. Những nghiên cứu thực hiện trên dòng vi khuẩn *Bacillus velezensis* chưa nhiều, đặc biệt là tìm hiểu về các đặc tính của hoạt chất kháng nấm *Alternaria* sp.. Trong nghiên cứu này, chủng *Bacillus velezensis* có hoạt tính kháng nấm cao được phân lập và làm thuần từ phòng thí nghiệm; khả năng kháng nấm của dịch nuôi cấy chủng *Bacillus velezensis* được đánh giá trên các chủng nấm gây bệnh thực vật khác nhau và ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên hiệu quả kháng nấm; dịch nuôi cấy tiếp tục được tinh sạch sơ bộ và đánh giá hiệu quả kháng nấm *Alternaria* sp. trong các điều kiện kết tủa khác nhau.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu và môi trường dùng trong nghiên cứu

Chủng nấm bệnh thực vật: Bao gồm *Fusarium*, *Collectotrichum truncatum*, *Pyricularia oryzae*, *Scytilidium*, *Alternaria* sp. được phân lập từ các mẫu cây trồng bị bệnh, do phòng thí nghiệm Sinh học Trường Đại học Thủ Dầu Một cung cấp. Môi trường potato glucose (PG): Khoai tây 200g/L, đun sôi 30 phút thu dịch chiết; glucose 50g/L. Môi trường LB: Pepton 10g/L; cao nấm men 5g/L; NaCl 10g/L; pH: 7,0.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp phân lập và làm thuần vi khuẩn Bacillus: Chủng vi khuẩn mục tiêu tập nhiễm trên môi trường PGA được làm thuần bằng cách trải nhiều lần trên môi trường LB. Xác định hình thái của chủng vi khuẩn phân lập bằng phương pháp nhuộm gram. Chủng được định danh loài bằng phương pháp giải trình tự gen và so sánh trình tự trên ngân hàng dữ liệu NCBI.

Phương pháp xác định khả năng kháng nấm trên thạch đĩa: Các chủng nấm bệnh thực vật được cấy điểm vào các đĩa petri chứa môi trường PGA. Khi vòng tăng trưởng của nấm đạt khoảng 2cm; khoan các giếng thạch có đường kính 0,5cm ở 4 phía của vòng tăng trưởng nấm, cách khoảng 1,5cm. Dùng 0,1ml dịch nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus velezensis* sau khi loại bỏ tế bào nhỏ vào các giếng thạch; giữ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 24 giờ rồi xác định đường kính vòng ức chế tăng trưởng nấm. Giếng đối chứng chứa 0,1ml môi trường vô trùng (Trịnh Thành Trung và cs., 2017).

Phương pháp thu nhận hoạt chất kháng nấm bệnh thực vật từ môi trường nuôi cấy lỏng *Bacillus velezensis*: Chủng *Bacillus velezensis* được nuôi cấy trên môi trường PG trong khoảng thời gian thích hợp, tốc độ lắc 120 vòng/phút trong thời gian 5 ngày; ly tâm thu dịch nuôi cấy ở tốc độ 10000 vòng/phút trong thời gian 10 phút; thu nhận hoạt chất kháng nấm bằng cách bổ sung ethanol 99,9% với tỷ lệ từ 50-85%, thời gian kết tủa thay đổi từ 30 đến 90 phút. Ly tâm thu kết tủa ở tốc độ 10000 vòng/phút trong thời gian 10 phút. Kết tủa được huyền phù lại trong 10ml nước cất vô trùng rồi tiến hành đánh giá hoạt tính kháng khuẩn bằng phương pháp đục lỗ thạch.

Xử lý thống kê: Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần. Phân tích ANOVA bằng phần mềm Stargraphic Centurion 15.

2.3. Bố trí thí nghiệm

Phân lập và định danh *Bacillus velezensis*: Chủng vi khuẩn mục tiêu tạt nhiễm trên môi trường PGA được làm thuần bằng cách trải nhiều lần trên môi trường LB. Xác định hình thái của chủng vi khuẩn phân lập bằng phương pháp nhuộm gram. Chủng được định danh loài bằng phương pháp giải trình tự gen và so sánh trình tự trên ngân hàng dữ liệu NCBI.

Khả năng đối kháng của *Bacillus velezensis* và nấm gây bệnh thực vật: Các chủng nấm *Fusarium*, *Collectotrichum* R6, *Pyricularia oryzae*, *Scytilidium*, *Alternaria* sp. được cấy vào các đĩa petri chứa môi trường PGA. Khi vòng tăng trưởng của nấm đạt khoảng 2cm; cấy điểm vi khuẩn *Bacillus velezensis* vào 4 phía của vòng tăng trưởng nấm. Giữ các đĩa môi trường ở nhiệt độ phòng trong thời gian 24-48 giờ rồi xác định đường kính vòng ức chế tăng trưởng nấm. Đối với dịch nuôi cấy chủng *Bacillus velezensis*, khoan các lỗ thạch ở 4 phía của vòng tăng trưởng nấm. Dịch nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus velezensis* sau khi loại bỏ tế bào được nhỏ 0,1ml vào các lỗ thạch; giữ ở nhiệt độ phòng trong thời gian 24 giờ rồi xác định đường kính vòng ức chế tăng trưởng nấm. Lỗ thạch đối chứng chứa 0,1ml môi trường vô trùng.

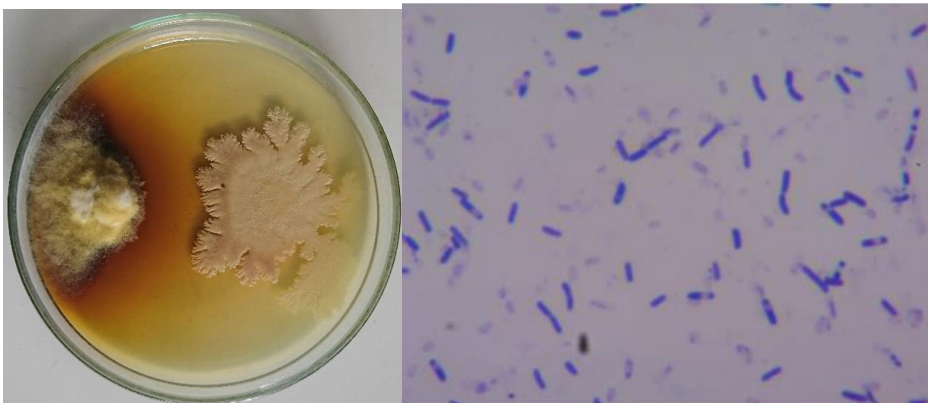
Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên khả năng sinh hoạt chất kháng nấm: Vi khuẩn *Bacillus velezensis* được cấy trên các môi trường PG; tốc độ lắc 120 vòng/phút, nhiệt độ 35°C. Sau các khoảng thời gian 2 ngày, 3 ngày, 4 ngày, 5 ngày và 6 ngày, ly tâm thu dịch nuôi cấy rồi bổ sung 0,1ml vào các giếng. Ủ ở nhiệt độ phòng (30°C) trong thời gian 24 giờ rồi xác định đường kính vòng kháng nấm của các nghiệm thức. Chọn nghiệm thức có đường kính vòng kháng *Alternaria* sp. lớn nhất để tiến hành các thử nghiệm tiếp theo.

Tinh sạch sơ bộ hoạt chất kháng nấm bệnh thực vật từ dịch nuôi cấy vi khuẩn Bacillus velezensis: Chủng *Bacillus velezensis* được nuôi cấy trên môi trường PG trong thời gian 5 ngày; ly tâm thu dịch nuôi cấy ở tốc độ 10000 vòng/phút trong thời gian 10 phút; thu nhận hoạt chất kháng nấm bằng cách bổ sung ethanol 99,9% với tỷ lệ từ 50%; 55%; 60%; 65%; 70%; 75%; 80% và 85% vào 20ml dịch ly trích, giữ ở nhiệt độ 5°C trong thời gian 60 phút. Ảnh hưởng của thời gian kết tủa được thực hiện với tỷ lệ ethanol tối ưu trong các khoảng thời gian 30; 60; 90 và 120 phút. Ly tâm thu kết tủa ở tốc độ 10000 vòng/phút trong thời gian 10 phút rồi hòa tan trong 20ml nước cất vô trùng; tiến hành đánh giá hoạt tính kháng nấm bằng phương pháp đục lỗ thạch. Chọn điều kiện kết tủa cho hiệu quả thu nhận hoạt chất kháng *Alternaria* sp. tốt nhất.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Phân lập và định danh *Bacillus velezensis*

Chủng vi khuẩn mục tiêu được làm thuần và xác định một số đặc điểm hình thái; kết quả được thể hiện trong hình 1.



Hình 1. A) hình thái khuẩn lạc chủng *Bacillus velezensis* trên môi trường PGA; B) hình thái nhuộm gram chủng *Bacillus velezensis* quan sát ở vật kính 100X

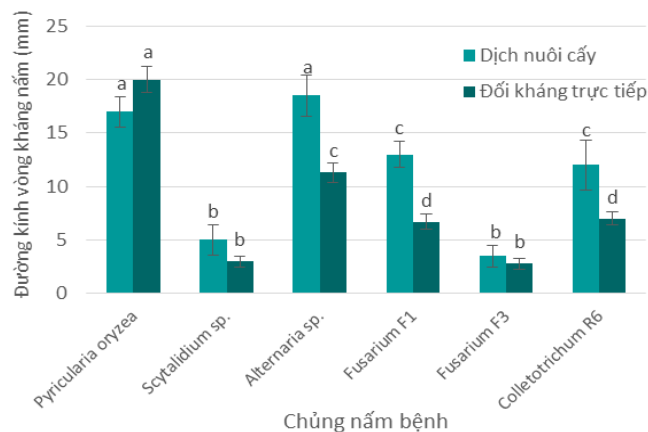
Trên môi trường PGA, chủng phát triển nhanh, khuẩn lạc màu vàng nhạt, mép xẻ thùy. Hình ảnh nhuộm gram cho thấy tế bào vi khuẩn bắt màu tím, có dạng hình que, nằm rời rạc hoặc gắn với nhau thành chuỗi. Bằng kỹ thuật PCR vùng gen 16S của chủng có trình tự như sau:

```
TAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGT
GTAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATA
CCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGA
TGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGC
CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA
AGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGC
ACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA.
```

Kết quả so sánh trên ngân hàng dữ liệu NCBI cho thấy chủng phân lập thuộc loài *Bacillus velezensis* với mức tương đồng 99,8% (E-value = 0).

3.2. Khả năng đối kháng trực tiếp của *Bacillus velezensis* và nấm gây bệnh thực vật

Các chủng nấm *Fusarium*, *Collectotrichum* R6, *Pyricularia oryzae*, *Scybalidium*, *Alternaria* sp. được cấy vào các đĩa petri chứa môi trường PGA. Khi vòng tăng trưởng của nấm đạt khoảng 2cm; vi khuẩn *Bacillus velezensis* và dịch nuôi cấy được cho vào 4 phía của vòng tăng trưởng nấm. Giữ các đĩa môi trường ở nhiệt độ phòng trong thời gian 24-48 giờ rồi xác định đường kính vòng ức chế tăng trưởng nấm. Kết quả thí nghiệm thể hiện trong hình 2.



Hình 2. Khả năng đối kháng nấm bệnh của vi khuẩn *Bacillus velezensis*.

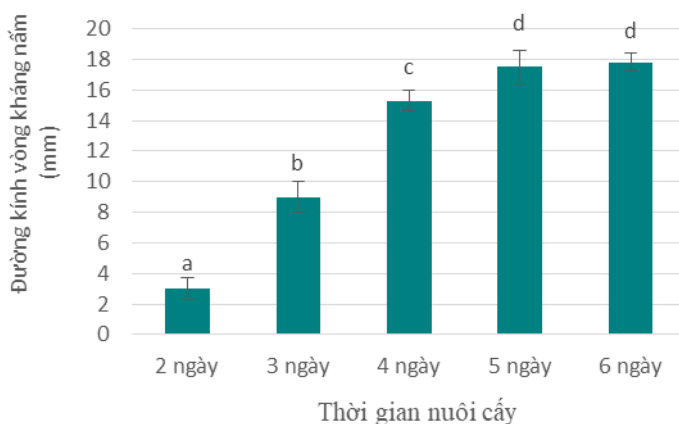
Các ký tự khác nhau trên các cột biểu thị sự sai khác ở độ tin cậy 95% ($P < 0,05$).

Vi khuẩn *Bacillus velezensis* có khả năng đối kháng với tất cả các chủng nấm bệnh khảo sát với các mức độ khác nhau. Hiệu quả đối kháng của dịch nuôi cấy trên môi trường PGA cao hơn so với khi cấy trực tiếp vi khuẩn khi khảo sát trên các chủng nấm *Alternaria* sp., *Fusarium* F1 và *Collectotrichum* R6. Đối với các chủng nấm bệnh còn lại, hiệu quả đối kháng không khác biệt khi cấy trực tiếp vào dịch nuôi cấy vi khuẩn. Khả năng kháng nấm của dịch nuôi cấy đạt cao nhất đối với chủng *Pyricularia oryzae* và *Alternaria* sp, với đường kính vòng kháng đạt 17 và 18,5mm. Những công bố trước đây như của Trịnh Thành Trung và cs., (2017) cũng đã cho thấy vi khuẩn *Bacillus velezensis* có hoạt tính kháng nhiều loại nấm bệnh khác nhau như *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium hydrophyllum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*. Nhằm khảo sát các tính chất kháng nấm của dịch nuôi cấy *Bacillus velezensis*, chủng *Alternaria* sp. được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh hoạt chất kháng *Alternaria* sp.

Vi khuẩn *Bacillus velezensis* được cấy trên các môi trường PG, sau các khoảng thời gian 2 ngày, 3 ngày, 4 ngày, 5 ngày và 6 ngày, ly tâm thu dịch nuôi cấy rồi bổ sung

0,1ml vào các giếng. Đường kính vòng kháng *Alternaria* sp. ở các nghiệm thức được thể hiện trong hình 3.



Hình 3. Đường kính vòng kháng *Alternaria* sp. của dịch nuôi cấy *Bacillus velezensis* trong thời gian nuôi khác nhau.

Các ký tự khác nhau trên các cột biểu thị mức độ sai khác ở độ tin cậy 95% ($P < 0,05$).

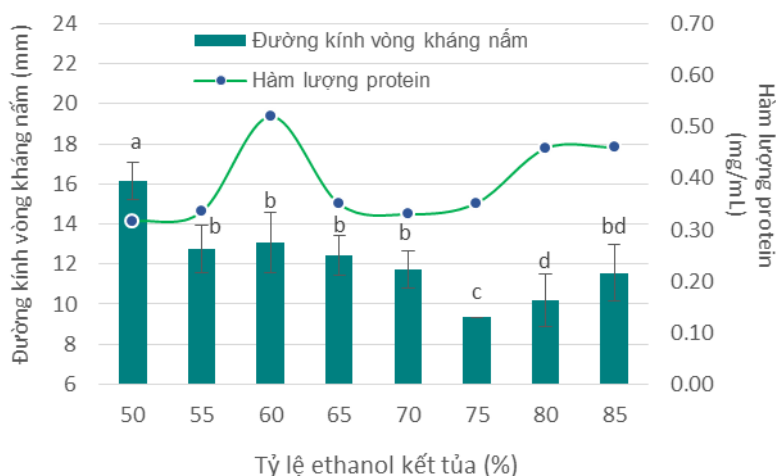
Thời gian nuôi cấy có ảnh hưởng đến khả năng sinh hoạt chất kháng nấm *Alternaria* sp. của chủng *Bacillus velezensis*. Khả năng kháng nấm của dịch nuôi cấy tăng nhanh trong khoảng thời gian từ 2 đến 5 ngày, đường kính vòng kháng nấm đạt 17,5mm. Thời gian nuôi cấy lâu không làm gia tăng khả năng kháng nấm của dịch nuôi cấy. Thêm vào đó, hoạt lực của hoạt chất có thể bị ảnh hưởng dưới các tác động của nhiệt độ và các hợp chất thứ cấp trong môi trường nuôi.

3.4. Tinh sạch sơ bộ hoạt chất kháng nấm bệnh thực vật từ dịch nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus velezensis*

Ảnh hưởng của tỷ lệ ethanol kết tủa

Chủng *Bacillus velezensis* được nuôi cấy trên môi trường PG trong thời gian 5 ngày; dịch nuôi cấy sau khi loại bỏ tế bào được bổ sung ethanol 99,9% với tỷ lệ từ 50%; 55%; 60%; 65%; 70%; 75%; 80% và 85%, giữ ở nhiệt độ lạnh trong 60 phút. Ly tâm thu kết tủa ở tốc độ 10000 vòng/phút trong thời gian 10 phút rồi tiến hành đánh giá hoạt tính kháng nấm bằng phương pháp đục lỗ thạch. Kết quả thí nghiệm được thể hiện trong hình 4.

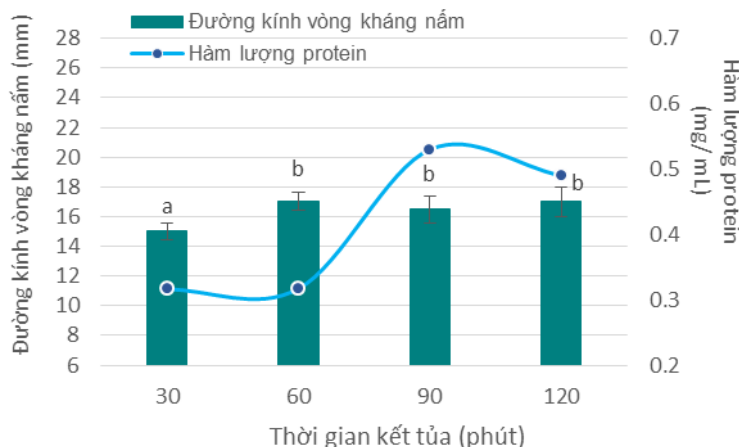
Tỷ lệ ethanol kết tủa có ảnh hưởng mạnh đến khả năng thu nhận hoạt chất kháng nấm *Alternaria* sp. có trong dịch nuôi cấy vi khuẩn *Bacillus velezensis*. Tỷ lệ ethanol thấp cho hiệu quả thu nhận hoạt chất tốt hơn. Ở tỷ lệ ethanol 50%, đường kính vòng kháng nấm của hoạt chất bán tinh sạch cao nhất, đạt 16,2mm. Bên cạnh đó, hỗn hợp protein trong dịch nuôi cấy kết tủa nhiều với 2 đỉnh ở tỷ lệ 60% và 80% ethanol. Mặc dù nghiệm thức sử dụng 50% ethanol chỉ thu được dung dịch protein có nồng độ 0,316mg/ml, tương ứng với hiệu quả thu nhận 33,4%, nhưng hiệu quả kháng nấm *Alternaria* sp. ở mức cao nhất đã cho thấy dung dịch protein thu được có tỷ lệ tinh sạch cao hơn các nghiệm thức khác.



Hình 4. Ảnh hưởng của tỷ lệ ethanol lên khả năng thu nhận hoạt chất kháng *Alternaria sp.*
Các ký tự khác nhau trên các cột biểu thị mức độ sai khác ở độ tin cậy 95% ($P < 0,05$).

Ảnh hưởng của thời gian kết tủa

Dịch nuôi cấy sau khi loại bỏ tế bào *Bacillus velezensis* được bổ sung ethanol với tỷ lệ 50%, giữ ở nhiệt độ lạnh trong các khoảng thời gian khác nhau rồi ly tâm thu kết tủa. Hoạt tính kháng nấm *Alternaria sp.* và hàm lượng protein được thể hiện trong hình 5.



Hình 5. Ảnh hưởng của thời gian kết tủa lên khả năng thu nhận hoạt chất kháng *Alternaria sp.*

Các ký tự khác nhau trên các cột biểu thị mức độ sai khác ở độ tin cậy 95% ($P < .05$).

Thời gian kết tủa có ảnh hưởng nhiều đến khả năng thu nhận protein. Sau 90 phút, lượng kết tủa thu được nhiều nhất, đạt hàm lượng 0,53mg/ml, tương ứng với hiệu suất thu nhận protein đạt 56,1%. Tuy nhiên, thời gian kết tủa lâu lại ảnh hưởng đến khả năng kháng nấm của hoạt chất thu nhận được. Hiệu quả thu nhận hoạt chất kháng *Alternaria sp.* tốt nhất được ghi nhận ở nghiệm thức 60 phút, với đường kính vòng kháng nấm đạt 17mm. Hoạt chất kháng nấm thu được ở thời điểm này cũng có độ tinh sạch tốt hơn so với các nghiệm thức khác. Thời gian kết tủa lâu làm gia tăng hiệu quả thu nhận protein nhưng khả năng kháng nấm lại không có sự thay đổi.

4. Kết luận

Nghiên cứu đã làm thuần và định danh được chủng *Bacillus velezensis* có khả năng kháng nhiều loại nấm gây bệnh thực vật khác nhau. Trên môi trường PG, chủng sinh hoạt chất kháng *Alternaria* sp. tốt nhất sau 5 ngày, với đường kính vòng kháng nấm đạt 17,5mm. Hoạt chất kháng nấm được thu nhận hiệu quả khi kết tủa với 50% ethanol trong thời gian 60 phút.

Lời cảm ơn

Tác giả xin gửi lời cảm ơn Trường Đại học Thủ Dầu Một đã hỗ trợ kinh phí và trang thiết bị để thực hiện nghiên cứu. Cảm ơn sự hỗ trợ của sinh viên Lý Đoàn Hồng Vương, Nguyễn Thị Thanh Hằng, Biện Phúc Hậu và Nguyễn Thị Ngọc Ly trong quá trình thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Alejandro P. Rooney, Neil P. J. Price, Christopher Ehrhardt, James L. Swezey¹ and Jason D. Bannan (2009). Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov., *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2429-2436, DOI 10.1099/ijs.0.009126-0.
- [2] Huỳnh Thị Cẩm Tiên, Hồ Viết Thế (2019), Phân lập và định danh một số chủng *Bacillus* spp. có hoạt tính cao trong tầng đất mặt thu được từ tỉnh Bình Thuận, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Thực phẩm*, 18(2), 48-62.
- [3] Nguyễn Đình Lạc, Trần Văn Sỹ, Võ Thị Thù (1990). *Nghiên cứu kỹ thuật sản xuất Bacitracin phục vụ chăn nuôi*. Đề tài cấp nhà nước, Mã số 52D-01-16, Chương trình Công nghệ sinh học.
- [4] Nguyễn Lâm Dũng (2019). *Vi sinh vật học, Phần I: Thế giới vi sinh vật*. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, 331-332.
- [5] Nguyễn Quang Huy (2012). Phân lập các chủng *Bacillus* có hoạt tính tạo màng sinh vật (biofilm) và tác dụng kháng khuẩn của chúng. *Tạp chí sinh học*, 1, 99-105.
- [6] Nguyễn Văn Hòa, Bùi Thị Ngọc Lan, Nguyễn Thành Hiếu (2016). Bệnh hại trên cây chanh dây và biện pháp quản lý tổng hợp. *Viện Cây ăn quả miền Nam*. Ngày truy cập 9 tháng 01 năm 2021. Nguồn: <http://sofri.org.vn>
- [7] Trần Thị Thu Thủy, Lê Thị Mai Thảo, Tsutomu Arie và Tohru Teraoka (2014). Phân lập và đánh giá khả năng đối kháng của vi khuẩn *Bacillus* đối với nấm *Fusarium moniliforme* gây bệnh lúa von tại đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ, Số chuyên đề: Nông nghiệp* (4), 204-211.
- [8] Trịnh Thành Trung, Đinh thị Tuyết Vân, Nguyễn Phương Liên, Đào Thị Lương, Dương Văn Hợp (2017). Tiềm năng ứng dụng tạo chế phẩm làm phân bón hữu cơ sinh học từ các chủng *Bacillus velezensis* phân lập tại các vùng sinh thái khác nhau của Việt Nam. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 15(1), 169-179.