

Chọn lọc và nhận diện vi khuẩn đối kháng nấm bệnh gây hư hỏng quả dâu tây sau thu hoạch

Nguyễn Kim Nữ Thảo¹, Đinh Thị Ngọc Mai², Võ Hoài Hiếu³, Lê Thị Hương¹, Phạm Thị Huệ¹, Ninh Thị Hạnh⁴, Lê Vinh Hoa⁴, Phạm Văn Quân⁴, Nguyễn Hồng Minh^{2*}

¹Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, Việt Nam

²Trung tâm nghiên cứu nguồn gen, Trường Đại học Phenikaa, Hà Nội, Việt Nam

³Trung tâm Thí nghiệm - Thực hành, Trường Đại học Yersin Đà Lạt, Việt Nam

⁴Khoa Vi sinh và GMO, Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia, Hà Nội, Việt Nam

(Ngày đến tòa soạn: 14/01/2022; Ngày chấp nhận đăng: 01/03/2022)

Tóm tắt

Dâu tây là loại quả có giá trị kinh tế với hương vị thơm ngon, giá trị dinh dưỡng cao và có lợi cho sức khỏe con người. Hiện nay, phương pháp hiệu quả nhất để kiểm soát chất lượng sản phẩm sau thu hoạch là bảo quản dâu tây trong điều kiện lạnh kết hợp với sử dụng thuốc hóa học. Tuy nhiên, việc sử dụng thuốc hóa học trong thời gian dài không chỉ dẫn đến khả năng kháng thuốc của mầm bệnh mà còn gây hại cho sức khỏe con người và môi trường. Quản lý bệnh nấm trên quả dâu tây sau thu hoạch bằng phương pháp kiểm soát sinh học có ý nghĩa thực tiễn rất lớn. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành sàng lọc hoạt tính kháng nấm bệnh gây hư hỏng quả dâu tây của 200 chủng vi khuẩn và chọn lọc được chủng VK199. Chủng VK199 có khả năng kháng đồng thời 5 chủng nấm bệnh. Chủng này được định danh là *Bacillus siamensis* dựa trên phân tích trình tự 16S rDNA. Chủng *Bacillus siamensis* VK199 có khả năng sinh các enzyme phân giải như cellulase, amylase, protease và chitinase. Thêm vào đó, các thử nghiệm *in vivo* cũng cho thấy, chủng *Bacillus siamensis* VK199 có hiệu quả làm giảm triệu chứng bệnh do nấm *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Mucor nidicola* và *Rhizopus delemar* gây ra trên quả dâu tây trong quá trình bảo quản.

Từ khóa: vi khuẩn đối kháng, hoạt tính kháng nấm, kiểm soát sinh học, dâu tây.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm nấm bệnh là nguyên nhân hàng đầu dẫn đến hư hỏng trái cây sau thu hoạch trong quá trình phân phối và bảo quản. Ngoài sự suy giảm chất lượng và thiệt hại về kinh tế, trái cây bị nhiễm nấm còn gây ra một số nguy cơ đối với sức khỏe người tiêu dùng do một số chi nấm như *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium* sản sinh ra các độc tố.

*Điện thoại: 0919341956

Email: minh.nguyenhong@phenikaa-uni.edu.vn

Ví dụ, *Penicillium expansum*, một tác nhân gây mốc xanh ở nhiều loại trái cây sau thu hoạch có khả năng sản sinh các chất gây ung thư như citrinin, patulin và chaetoglobosins. Các độc tố khác như aflatoxin, haratoxins, alternaria và fumonisin cũng có mặt trong các loại trái cây bị nhiễm nấm thuộc các chi *Aspergillus*, *Alternaria* và *Fusarium*. Thông thường, các chất diệt nấm hóa học được sử dụng để kiểm soát sự hư hỏng của trái cây sau thu hoạch. Tuy nhiên, việc sử dụng thuốc diệt nấm tổng hợp đã bị hạn chế trong những năm gần đây do nhiều chủng nấm gây bệnh đã đề kháng với thuốc diệt nấm, dư lượng thuốc trừ nấm ngày càng tăng trong nông sản, ô nhiễm môi trường và các vấn đề liên quan đến sức khỏe con người. Do đó, xu hướng toàn cầu hiện nay là hướng tới sử dụng một giải pháp thay thế an toàn hơn để giảm thiểu sự hư hỏng của trái cây sau thu hoạch [1]. Trong số các cách tiếp cận khác nhau, kiểm soát sinh học thông qua vi sinh vật đối kháng là một phương pháp đầy hứa hẹn và đang dần trở nên phổ biến.

Kiểm soát sinh học là sự ức chế sự phát triển, lây nhiễm hoặc sinh sản của một sinh vật bằng cách sử dụng một sinh vật khác. Cho đến nay, một số lượng lớn các chủng vi sinh vật thuộc các nhóm khác nhau bao gồm nấm men, vi khuẩn, xạ khuẩn và nấm đã được sử dụng làm tác nhân kiểm soát sinh học, trong đó vi khuẩn là phổ biến nhất do chúng có số lượng lớn, sinh trưởng nhanh và các chất chuyển hóa rất đa dạng. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh được hiệu quả của việc sử dụng vi khuẩn trong quản lý bệnh nấm sau thu hoạch. Trong nghiên cứu của Wang và cộng sự (2021), chủng *Bacillus halotolerans* có khả năng ức chế sự phát triển của sợi nấm và nảy mầm bào tử của *Botrytis cinerea* gây bệnh mốc xám trên quả dâu tây. Quả dâu tây sau thu hoạch khi được xử lý với *Bacillus halotolerans* có biểu hiện bệnh mốc xám thấp hơn so với đối chứng [2]. Ye và cộng sự (2021) đã chứng minh chủng *Bacillus amyloliquefaciens* có khả năng kháng nhiều loại nấm gây bệnh trên quả sơn trà. Quả sơn trà khi được xử lý với chủng *Bacillus amyloliquefaciens* có tỷ lệ thối hỏng là 62,5 % sau 20 ngày ở 25°C, trong khi đó lô đối chứng bị hư hỏng hoàn toàn [3]. Trong nghiên cứu của Aiello và cộng sự (2019), chủng *Pseudomonas synxantha* thể hiện đặc tính đối kháng mạnh với hai loại nấm *Monilinia fructicola* và *Monilinia fructigena* gây bệnh thối nâu trên quả đào sau thu hoạch. *Pseudomonas synxantha* làm giảm đáng kể tỷ lệ và mức độ nghiêm trọng của bệnh thối nâu trên quả đào được lây nhiễm *Monilinia fructicola* sau 5 ngày ở 25°C, 10 ngày ở 10°C và 20 ngày ở 0°C. Tương tự, đối với quả đào được lây nhiễm *Monilinia fructigena*, *Pseudomonas synxantha* thể hiện hoạt tính bảo vệ tốt trong điều kiện bảo quản 10°C và 0°C nhưng kém hơn ở 25°C [4].

Như vậy, nhiều chủng vi khuẩn đã được công bố là tác nhân kiểm soát sinh học hiệu quả nấm bệnh trên trái cây sau thu hoạch. Tuy nhiên số lượng chủng được nhận dạng vẫn là rất ít so với các lĩnh vực khác của kiểm soát sinh học trong nông nghiệp. Trong nghiên cứu này, 5 chủng nấm gây hư hỏng quả dâu tây sau thu hoạch bao gồm *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium proliferatum*, *Mucor nidicola* và *Rhizopus*

delemar được sử dụng làm đối tượng đích để sàng lọc và tuyển chọn chủng vi khuẩn đối kháng hiệu quả. Chủng vi khuẩn tiềm năng được định tên bằng so sánh trình tự 16S rDNA và xác định khả năng tiết các enzyme phân hủy. Đây là một trong những cơ sở quan trọng để đánh giá đặc tính kháng nấm của chủng vi khuẩn. Ngoài ra, các thử nghiệm bước đầu về khả năng kiểm soát bệnh nấm trên quả dâu tây sau thu hoạch của chủng vi khuẩn tiềm năng này cũng được trình bày.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng/vật liệu nghiên cứu

Trong nghiên cứu này, các chủng nấm gây bệnh cho quả dâu tây sau thu hoạch bao gồm *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium proliferatum*, *Mucor nidicola* và *Rhizopus delemar* được phân lập từ các quả dâu tây giống Mỹ Đá bị bệnh tại vườn trồng dâu tây trên địa bàn thành phố Đà Lạt. Các chủng nấm được nuôi cấy trên môi trường PDA (HiMedia, India). 200 chủng vi khuẩn được sử dụng để khảo sát hoạt tính đối kháng được phân lập từ bề mặt quả dâu tây khỏe mạnh và nuôi cấy trên môi trường LB (g/l: cao nấm men – 5, pepton – 10, NaCl – 10, agar – 15). Hiện tại, các chủng nấm và vi khuẩn được lưu giữ tại Trung tâm nghiên cứu nguồn gen, Trường Đại học Phenikaa.

Quả dâu tây sử dụng trong nghiên cứu được thu hái tại các vườn trồng dâu trên địa bàn thành phố Đà Lạt. Quả được khử trùng bề mặt bằng 2 % NaClO trong 5 phút, rửa lại với nước vô trùng và làm khô tự nhiên trước khi sử dụng.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát hoạt tính đối kháng nấm bệnh của các chủng vi khuẩn

Khả năng kiểm soát nấm bệnh của các chủng vi khuẩn được sàng lọc bằng phương pháp nuôi cấy kép [5]. Thỏi thạch ($\Phi = 5$ mm) của chủng nấm được đặt vào tâm đĩa petri chứa môi trường PDA. Sau đó, một thỏi thạch ($\Phi = 5$ mm) của từng chủng vi khuẩn đã được nuôi cấy trên môi trường LB được đặt vào vị trí cách tâm đĩa 2 cm, ủ đĩa trong 2 ngày ở 25°C. Tỷ lệ kháng của các chủng vi khuẩn đối với nấm được tính theo công thức: $S = (R-r)/R \times 100$ %. Trong đó, S: Phần trăm ức chế, R: bán kính khuẩn lạc nấm ở phía đối diện vị trí đặt khoanh vi khuẩn, r: bán kính khuẩn lạc nấm ở phía đặt khoanh vi khuẩn. Mỗi thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần.

2.2.2. Xác định hoạt tính enzyme của chủng vi khuẩn

Khả năng sinh cellulase, amylase, protease của chủng vi khuẩn được kiểm tra bằng cách bổ sung 1 % cơ chất: CMC, tinh bột và sữa gầy vào môi trường thạch nước. Sau 24 giờ ủ ở 37°C, đĩa nuôi cấy được nhuộm với thuốc thử congo đỏ 0,1 % để xác định hoạt tính cellulase, lugol 1 % để kiểm tra hoạt tính amylase và đo vòng phân giải đối với hoạt tính protease. Khả năng phân giải chitin được xác định bằng cách cấy vạch chủng vi khuẩn trên môi trường chitin agar chứa chitin từ vỏ tôm là nguồn duy nhất (g/l: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,3;

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3; KH_2PO_4 - 1; Citric acid – 1; Tween 80 – 200 μl ; Colloidal chitin – 4,5; Bromocresol purple – 0,15; Agar – 15; pH 4,7). Đĩa nuôi cấy được ủ ở 37°C trong 3 ngày. Chúng vi khuẩn được xác định là có khả năng sinh chitinase khi môi trường nuôi cấy chuyển sang màu tím.

2.2.3. Thử nghiệm khả năng ức chế nấm bệnh của chủng vi khuẩn

Các quả dâu tây khỏe mạnh và đồng nhất (14-18 g/quả) được thu hái và khử trùng bề mặt bằng 2 % NaClO. Một vết thương có kích thước 3 mm x 3 mm được tạo ra ở trung tâm của mỗi quả. Dịch vi khuẩn đối kháng nuôi cấy trong môi trường LB, lắc 160 rpm ở 37°C trong 24 giờ được ly tâm loại bỏ môi trường, rửa với NaCl 0,85 % và pha loãng tới nồng độ 10^9 CFU/ml. Các bào tử nấm *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium proliferatum*, *Mucor nidicola* và *Rhizopus delemar* được thu nhận từ đĩa nuôi cấy PDA ở 25°C trong 7 ngày, đếm mật độ bằng buồng đếm Burkert-Turk và điều chỉnh về mật độ 10^4 - 10^5 bào tử/mL. 10 μL dịch chứa bào tử nấm bệnh được tiêm vào các vết thương, làm khô trong 2 giờ. Sau đó, 10 μL dịch vi khuẩn đối kháng tiếp tục được tiêm vào mỗi vết thương, lô đối chứng được tiêm thay thế bằng nước cất vô trùng. Quả dâu tây sau xử lý được bảo quản riêng rẽ trong túi polyetylene ở 25°C, độ ẩm tương đối 90-95 % trong 7 ngày. Mức độ tổn thương trên bề mặt quả do nấm bệnh gây ra được tính trên tỷ lệ phần trăm tổn thương diện tích bề mặt theo quy ước: 0 (không có tổn thương), 1 (< 5 %), 3 (6 – 10 %), 5 (11 – 25 %), 7 (26 – 50 %) và 9 (> 50 %). Chỉ số bệnh (DI) và hiệu quả kiểm soát bệnh (CE) được tính theo công thức [6]:

Chỉ số bệnh = $\sum(\text{số quả bị tổn thương ở tất cả các mức độ} \times \text{mức độ tổn thương đại diện}) / (\text{tổng số quả} \times \text{mức độ tổn thương cao nhất}) \times 100$.

Hiệu quả kiểm soát bệnh = $(\text{chỉ số bệnh đối chứng} - \text{chỉ số bệnh thí nghiệm}) / \text{chỉ số bệnh đối chứng} \times 100$.

Thí nghiệm được lặp lại 03 lần và sử dụng 20 quả dâu tây/lô thí nghiệm.

2.2.4. Định danh dựa trên so sánh trình tự 16S rDNA

Đoạn gen 16S rDNA được khuếch đại bằng PCR từ DNA tổng số với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) và 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3). Sản phẩm PCR sau khi được kiểm tra trên gel 1 % agarose được tinh sạch bằng PCR Purification Kit (Bioneer, Hàn Quốc) và đọc trình tự. Kết quả giải trình tự gen được xử lý bằng phần mềm MEGA7.

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

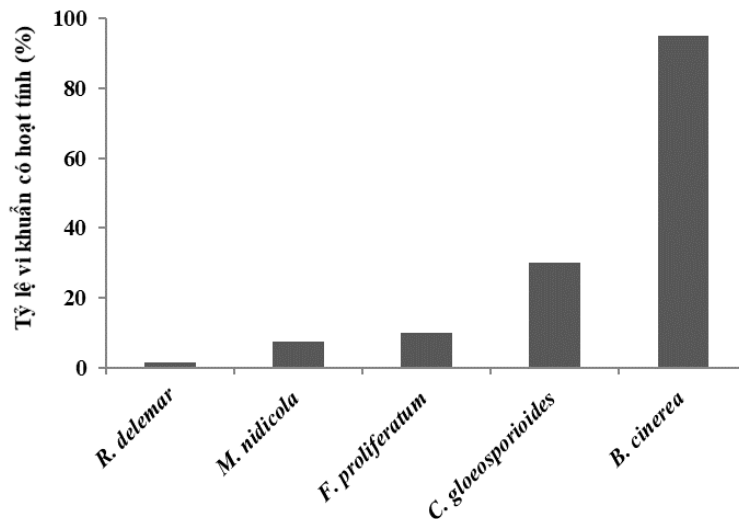
Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel. Các nghiệm thức được lặp lại ba lần để tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn. Sự khác biệt có ý nghĩa giữa các mẫu thí nghiệm được xác định bằng phương pháp thống kê ANOVA. Giá trị $p < 0,05$ được xem là sai khác có ý nghĩa.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

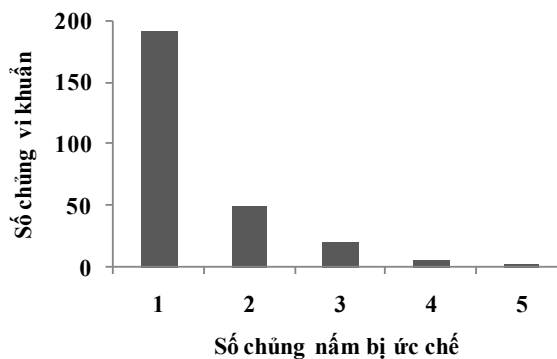
3.1. Hoạt tính kháng nấm bệnh của 200 chủng vi khuẩn

Trong nghiên cứu này, 200 chủng vi khuẩn phân lập từ quả dâu tây tươi được sàng lọc khả năng đối kháng với 05 chủng nấm gây thối hỏng quả bao gồm *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium proliferatum*, *Mucor nidicola* và *Rhizopus delemar*. Kết quả thí nghiệm được chỉ ra trên Hình 1 cho thấy, vi khuẩn có hoạt tính kháng *Botrytis cinerea* chiếm tỷ lệ cao nhất (95 %), trong khi đó vi khuẩn kháng *Rhizopus delemar* có tỷ lệ thấp nhất (1,5 %). Tỷ lệ vi khuẩn kháng *Mucor nidicola*, *Fusarium proliferatum*, *Colletotrichum gloeosporioides* lần lượt là 7,5 %, 10 % và 30 %.

Số lượng chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng nấm được thể hiện trong Hình 2. Trong đó, 192 chủng có khả năng kháng 1 loại nấm, 50 chủng kháng được 02 loại nấm, 20 chủng kháng được 03 loại nấm, 05 chủng kháng được 4 loại nấm và đặc biệt, 03 chủng kháng được cả 05 loại nấm. Ba chủng vi khuẩn kháng được đồng thời 05 loại nấm gây thối hỏng quả dâu tây là chủng VK180, VK195 và VK199.

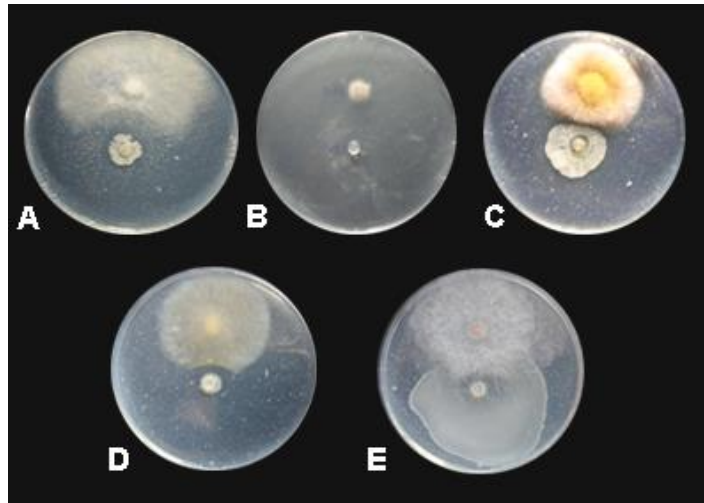


Hình 1. Tỷ lệ vi khuẩn được khảo sát có hoạt tính đối kháng với 5 chủng nấm gây bệnh



Hình 2. Khả năng kháng 5 chủng nấm gây bệnh của 200 chủng vi khuẩn

Trong số 3 chủng vi khuẩn được xác định có khả năng đối kháng đồng thời 5 chủng nấm bệnh, chủng vi khuẩn VK199 có khả năng kháng mạnh và ổn định. Tỷ lệ ức chế *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium proliferatum*, *Mucor nidicola* và *Rhizopus delemar* của chủng VK199 đạt lần lượt là 75 %, 84 %, 52 %, 45 % và 53 % (Hình 3).

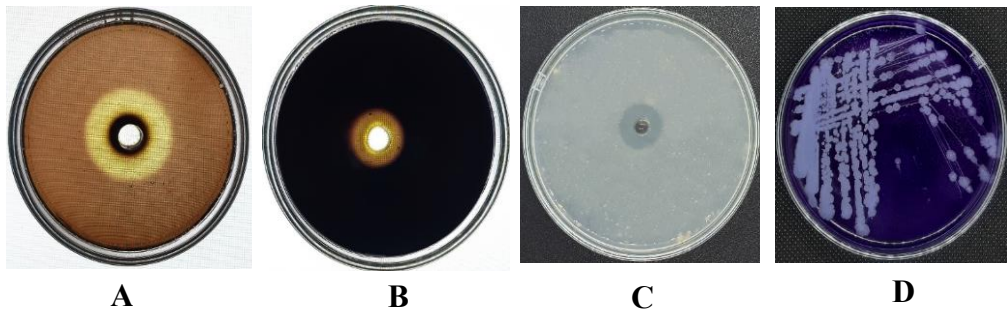


Hình 3. Khả năng ức chế của chủng VK199 đối với *Botrytis cinerea* (A), *Colletotrichum gloeosporioides* (B), *Fusarium proliferatum* (C), *Mucor nidicola* (D) và *Rhizopus delemar* (E)

Vi khuẩn đối kháng có thể tồn tại tự nhiên trên bề mặt trái cây và việc phân lập, sử dụng các chủng đối kháng này để kiểm soát nấm bệnh trên trái cây sau thu hoạch được gọi là đối kháng tự nhiên. Trong nghiên cứu của Chalutz và Wilson (1990), nước rửa bề mặt trái cây họ cam quýt khi được cấy trên môi trường thạch thì chỉ có vi khuẩn và nấm men xuất hiện. Khi pha loãng nước rửa này thì mới quan sát thấy sự xuất hiện của nấm. Điều đó cho thấy, nấm men và vi khuẩn có thể đã ngăn chặn sự phát triển của nấm [7]. 200 chủng vi khuẩn sử dụng cho thí nghiệm sàng lọc có tỷ lệ đối kháng nấm bệnh rất cao. Điều đó cho thấy, việc phân lập vi khuẩn đối kháng từ chính bề mặt quả dâu tây khỏe mạnh đã làm tăng đáng kể cơ hội tìm kiếm được các chủng đối kháng hiệu quả.

3.2. Khả năng sinh các enzyme phân giải của chủng vi khuẩn VK199

Vi khuẩn thể hiện các cơ chế kháng đa dạng đối với nấm bệnh như cạnh tranh không gian, chất dinh dưỡng, tiết các enzyme thủy phân, sản xuất kháng sinh và tạo biofilm [1]. Các enzyme thủy phân có thể kể đến như chitinase, protease, cellulase,... có thể phá hủy cấu trúc của các hợp chất cao phân tử như chitin, protein, cellulose, hemicellulose,... từ đó ngăn chặn sự phát triển và hoạt động của nấm bệnh. Kết quả khảo sát khả năng sinh cellulase, amylase, protease, chitinase được chỉ ra trên Hình 4.

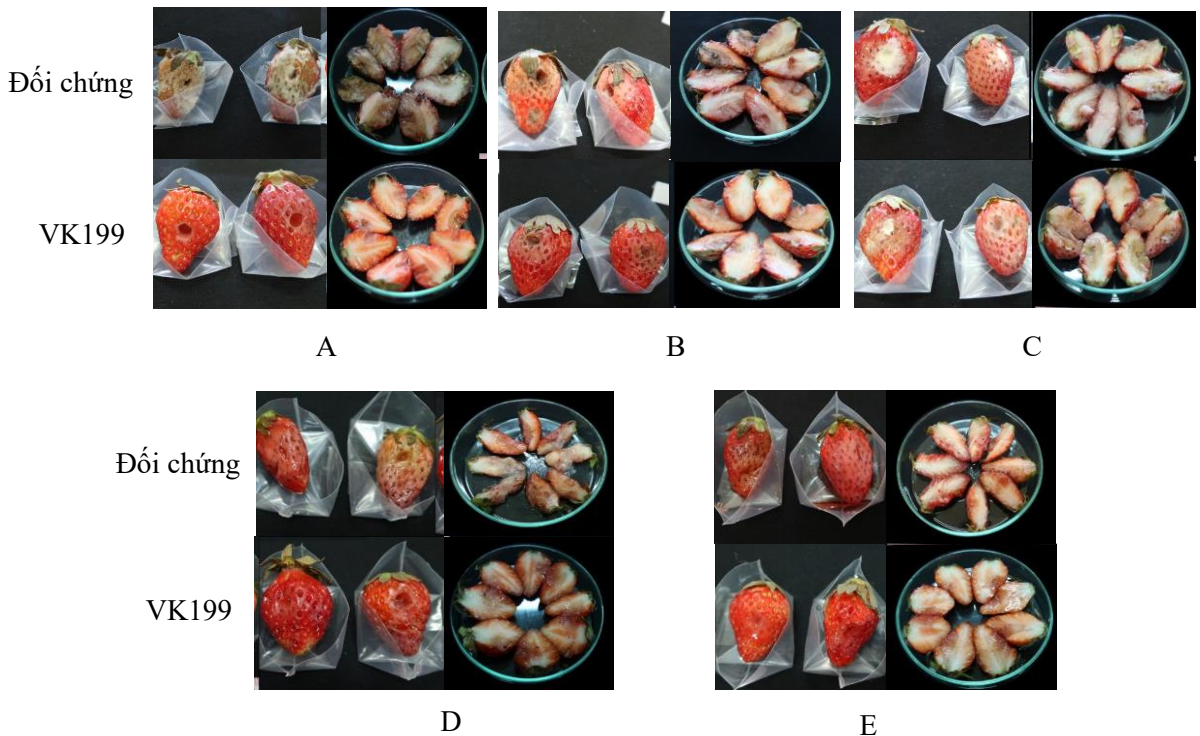


Hình 4. Hoạt tính cellulase (A), amylase (B), protease (C) và chitinase (D) của chủng VK199

Vòng phân giải CMC, tinh bột, sữa gầy của chủng VK199 đạt lần lượt là 20, 11 và 11 mm. Môi trường nuôi cấy VK199 với chitin là nguồn cacbon duy nhất chuyển sang màu tím sau 3 ngày ủ ở 37°C chứng tỏ chủng VK199 có khả năng sinh chitinase. Khả năng sinh các enzyme phân giải như cellulose, amylase, protease, chitinase chính là đặc tính quan trọng để xác định cơ chế kháng nấm của chủng vi khuẩn VK199.

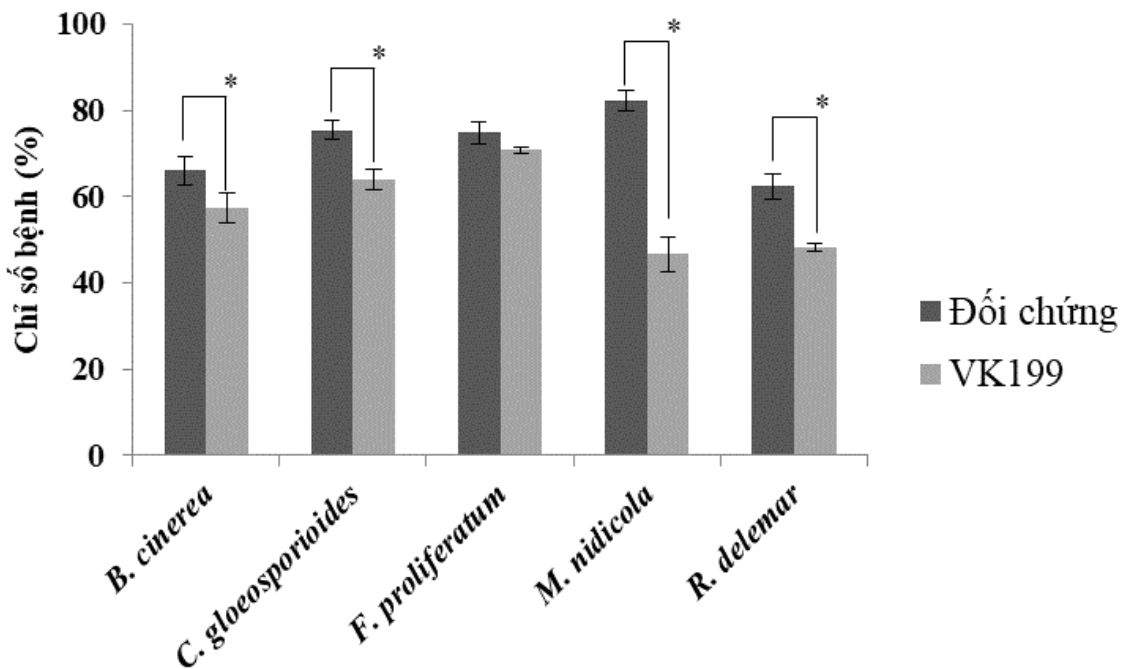
3.3. Kết quả thử nghiệm khả năng ức chế nấm bệnh của chủng vi khuẩn VK199 trên quả dâu tây sau thu hoạch

Hiệu quả kiểm soát sinh học của chủng VK199 trên quả dâu tây sau thu hoạch được kiểm tra lần lượt với 05 loại nấm bệnh. Kết quả thí nghiệm được chỉ ra trên Hình 5, 6 và 7.

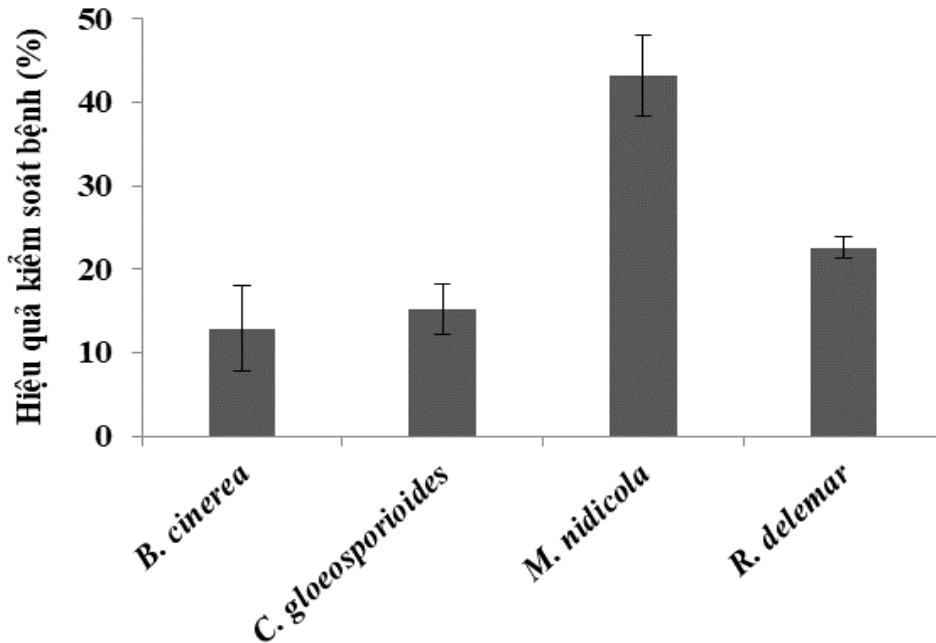


Hình 5. Mức độ tổn thương của quả dâu tây khi bị lây nhiễm nấm *Botrytis cinerea* (A), *Colletotrichum gloeosporioides* (B), *Fusarium proliferatum*(C), *Mucor nidicola* (D) và *Rhizopus delemar* (E) ở lô đối chứng và lô được xử lý với VK199

Chủng VK199 có khả năng làm giảm chỉ số bệnh của quả dâu tây bị nhiễm nấm *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Mucor nidicola* và *Rhizopus delemar*. Trong đó, nghiệm thức lây nhiễm *Mucor nidicola* có chỉ số bệnh giảm mạnh nhất, từ 82,22 % ở lô đối chứng xuống còn 42,22 % ở lô thí nghiệm (Hình 6). Theo đó, hiệu quả kiểm soát nấm *Mucor nidicola* của chủng VK199 cũng đạt cao nhất 43,24 %, tiếp theo là nấm *Rhizopus delemar* đạt 22,62 %, *Colletotrichum gloeosporioides* đạt 15,22 % và *Botrytis cinerea* đạt 12,92 % (Hình 7). Riêng đối với nghiệm thức lây nhiễm *Fusarium proliferatum*, chỉ số bệnh của quả dâu tây xử lý với VK199 giảm không đáng kể so với lô đối chứng và sự khác biệt về chỉ số bệnh giữa lô đối chứng và thí nghiệm không có ý nghĩa thống kê. Mặc dù, chủng VK199 có khả năng đối kháng nấm *Fusarium proliferatum* trên đĩa PDA với tỷ lệ ức chế là 52 % (Hình 3) nhưng khi xử lý với quả dâu tây thì chủng này thể hiện khả năng đối kháng kém. Việc sàng lọc các chủng vi khuẩn đối kháng nấm bệnh trên đĩa thạch sẽ nhanh chóng thu được những chủng kháng tốt. Tuy nhiên, các chủng có hoạt tính ức chế ở điều kiện *in vitro* có thể không có hoạt tính ức chế tương tự khi thử nghiệm *in vivo*. Do đó, việc kết hợp phương pháp *in vitro* và *in vivo* là rất cần thiết để chọn lọc được các chủng đối kháng hiệu quả.



Hình 6. Chỉ số bệnh do nấm *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium proliferatum*, *Mucor nidicola* và *Rhizopus delemar* gây ra trên quả dâu tây ở lô đối chứng và lô được xử lý với vi khuẩn VK199 (*: $p < 0,05$)



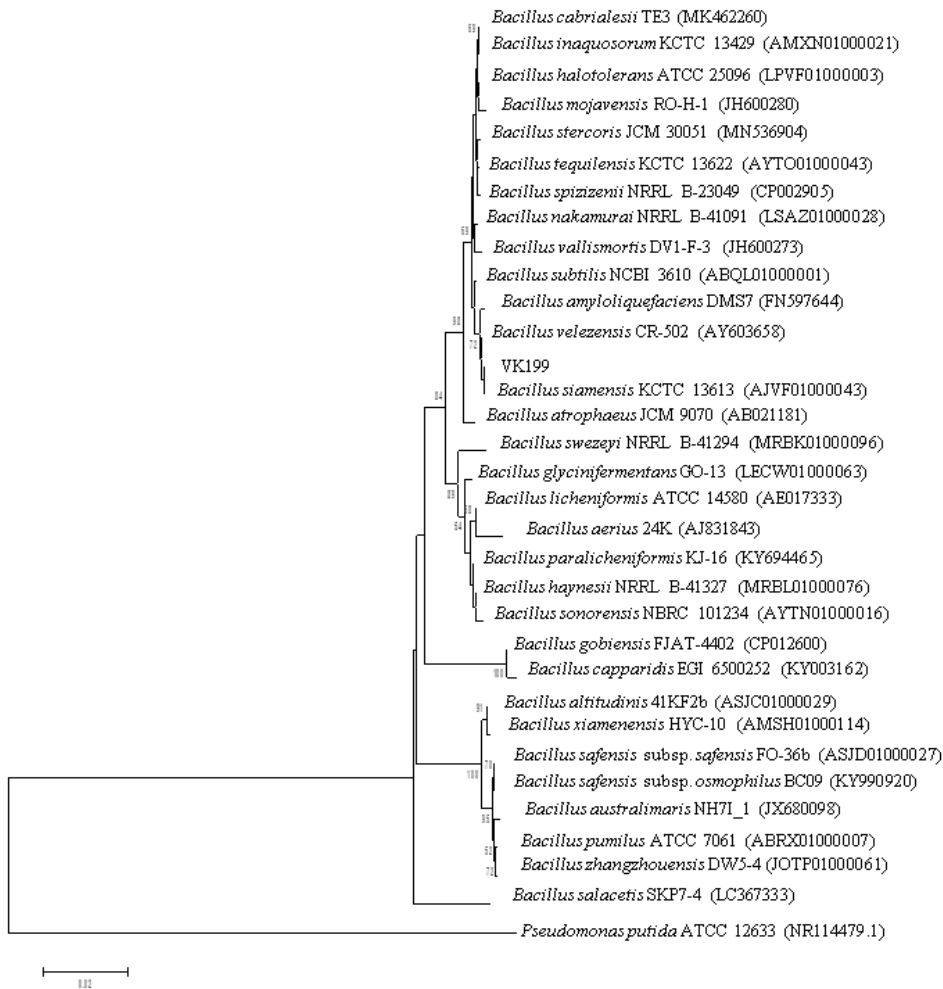
Hình 7. Hiệu quả kiểm soát nấm bệnh gây hư hỏng quả dâu tây sau thu hoạch của chủng VK199

3.3. Định danh chủng vi khuẩn VK199 bằng phân tích trình tự gen 16S rDNA

Trình tự nucleotit thu được của chủng VK199 được đăng ký trên ngân hàng dữ liệu DNA của Nhật Bản (www.ddjb.nig.ac.jp) với mã số đăng ký LC669913 và được so sánh với 31 trình tự gen 16S rDNA của các loài *Bacillus* trên EZBiocloud (<https://www.ezbiocloud.net/>). Kết quả cho thấy chủng VK199 có độ tương đồng cao nhất với *Bacillus siamensis* KCTC 13613 với hệ số tương đồng là 100 %, tiếp đó là *Bacillus velezensis* CR-502 với hệ số tương đồng là 99,63 % (kết quả chi tiết không được chỉ ra ở đây). Dựa vào khoảng cách di truyền của đoạn gen 16S rDNA của các loài *Bacillus* khác nhau và bằng chương trình MEGA 7, cây phát sinh chủng loại của các loài *Bacillus* đã được xây dựng (Hình 8). Có thể thấy rằng, VK199 nằm ngay cạnh loài *Bacillus siamensis*. Như vậy, dựa vào bảng hệ số tương đồng và cây phát sinh chủng loại, chủng VK199 được định danh là loài *Bacillus siamensis*.

Bacillus siamensis đã được nhóm tác giả You và cộng sự (2021) chứng minh là có hiệu quả làm giảm khả năng nhiễm bệnh của một số hoa quả nhiệt đới như xoài, vải trong quá trình bảo quản [8]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, chủng *Bacillus siamensis* VK199

cũng có vai trò kiểm soát bệnh trên quả dâu tây sau thu hoạch. Những kết quả này cho thấy rằng, *Bacillus siamensis* là tác nhân kiểm soát sinh học tiềm năng và có thể được ứng dụng để kiểm soát mầm bệnh trên trái cây sau thu hoạch.



Hình 8. Cây phát sinh chủng loại dựa trên so sánh vùng trình tự 16S rDNA. Giá trị bootstrap xuất hiện ở mỗi nhánh được thiết lập từ sau 1000 lần lặp lại

4. KẾT LUẬN

Từ 200 chủng vi khuẩn phân lập trên trái dâu tây khỏe mạnh, chúng tôi đã chọn lọc được chủng vi khuẩn VK199 có khả năng kháng đồng thời 05 chủng nấm bệnh gây hư hỏng quả là *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium proliferatum*, *Mucor nidicola* và *Rhizopus delemar*. Chủng VK199 được định danh là *Bacillus siamensis*. Chúng có khả năng tiết các enzyme phân giải như cellulase, amylase, protease và chitinase. Đây chính là một cơ chế kháng nấm quan trọng của vi khuẩn. Các thử nghiệm kiểm tra khả

năng kiểm soát nấm bệnh trên quả dâu tây sau thu hoạch cũng cho thấy, chủng VK199 có khả năng giảm bệnh do nấm *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Mucor nidicola* và *Rhizopus delemar*, trong đó hiệu quả nhất là với nấm *Mucor nidicola*.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106-NN.04-2016.44.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. A. S. Dukare, S. Paul, V. E Nambi, R. K. Gupta, R. Singh, K. Sharma, and R. K. Vishwakarma, "Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review," *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, vol. 59, no. 9, pp. 1-16, 2018.
- [2]. F. Wang, J. Xiao, Y. Zhang, R. Li, L. Liu, and J. Deng, "Biocontrol ability and action mechanism of *Bacillus halotolerans* against *Botrytis cinerea* causing grey mould in postharvest strawberry fruit," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 174, 111456, 2021.
- [3]. W. Q. Ye, Y. F. Sun, Y. J. Tang, and W. W. Zhou, "Biocontrol potential of a broad spectrum antifungal strain *Bacillus amyloliquefaciens* B4 for postharvest loquat fruit storage," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 174, 111439, 2021.
- [4]. D. Aiello, C. Restuccia, E. Stefani, A. Vitale, and G. Cirvilleri, "Postharvest biocontrol ability of *Pseudomonas synxantha* against *Monillinia fructicola* and *Monillinia fructigena* on stone fruit," *Postharvest Biology and Technology*, vol. 149, pp. 83-89, 2021.
- [5]. D. Romero, A. Pérez-García, M. E. Rivera, F. M. Cazorla, and A. De Vicente, "Isolation and evaluation of antagonistic bacteria towards the cucurbit powdery mildew fungus *Podosphaera fusca*," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 64, no. 2, pp. 263-269, 2004.
- [6]. J. F. Shi and C. Q. Sun, "Isolation, identification, and biocontrol of antagonistic bacterium against *Botrytis cinerea* after tomato harvest." *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 48, no.4, pp. 706-714, 2017.
- [7]. E. Chalutz and C. L. Wilson, "Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii*," *Plant disease*, vol. 74, no.2, pp. 134-137, 1990.
- [8]. W. You, C. Ge, Z. Jiang, M. Chen, W. Li, and Y. Shao, "Screening of a broad-spectrum antagonist *Bacillus siamensis*, and its possible mechanisms to control postharvest disease in tropical fruits," *Biological Control*, vol. 157, 104584, 2021.

Selection and identification of potential bacteria against postharvest fungal pathogens on strawberry fruit

Nguyen Kim Nu Thao¹, Dinh Thi Ngoc Mai², Vo Hoai Hieu³, Le Thi Huong¹,
Pham Thi Hue¹, Ninh Thi Hanh⁴, Le Vinh Hoa⁴, Pham Van Quan⁴, Nguyen Hong Minh²

¹*Faculty of Biology, Hanoi University of Science, VNU, Hanoi, Vietnam*

²*Bioresource Research Center, Phenikaa University, Hanoi, Vietnam*

³*Experiment Center-Practice, Yersin University, Lam Dong, Vietnam*

⁴*Laboratory of food microbiology and genetically modified food, National Institute for Food Control, Hanoi, Vietnam*

Abstract

Strawberries are economically important owing to their unique flavour, health benefits, and nutritional aspects. Decay after harvest is a major issue in the development of strawberry industry. Currently, the most effective method for controlling decay after harvest is storage of strawberries at low temperature combined with usage of chemical fungicides. However, long-term usage of chemical fungicides not only causes pathogen resistance but also is harmful for human health and environment. Biocontrol method for the management of disease after strawberry harvest has great practical significance. In this study, totally 200 bacterial strains isolated from the surface of healthy strawberry fruit were tested for antagonistic activity against five fungal pathogens. Among them, VK199 strain was potent against all five postharvest spoilage fungi on strawberry fruit and then utilized for further study. This strain was identified as *Bacillus siamensis* based on sequence analysis of 16S rDNA. The extracellular lytic enzymes, including cellulase, amylase, protease and chitinase released by *B. siamensis* VK199 were detected. Furthermore, in vivo, the results of biological control efficacy test showed that *B. siamensis* VK199 suppressed the occurrence of diseases caused by *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Mucor nidicola* and *Rhizopus delemar* of strawberry during storage.

Keywords: *Antagonistic bacterium, antifungal activity, biological control, strawberry.*