

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG KIỂM SOÁT SINH HỌC CỦA MỘT SỐ CHỦNG VI KHUẨN *BACILLUS SUBTILIS* ĐỐI VỚI *RHIZOPUS* SP. VÀ *MUCOR* SP. GÂY BỆNH THỐI MỀM TRÊN QUẢ DÂU TÂY TRONG ĐIỀU KIỆN *IN VITRO* VÀ *IN VIVO*

Trần Kim Diệp^{1*}, Võ Hoài Hiếu², Hồ Sỹ Quang¹, Phan Ngọc Diễm Quỳnh¹,
Nguyễn Thị Tâm¹, Nguyễn Võ Duy Tuấn¹, Lê Thị Kim Anh¹

¹ Khoa Sinh học - Môi trường, Trường Đại học Yersin Đà Lạt

² Trung tâm Thí nghiệm - Thực hành, Trường Đại học Yersin Đà Lạt

TÓM TẮT

Bệnh thối mềm do *Rhizopus* sp. và *Mucor* sp. gây ra trên quả dâu tây bắt đầu từ giai đoạn thành thực, bệnh phát triển và lây lan nhanh, khó kiểm soát gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sản lượng cũng như chất lượng quả dâu tây. Nhằm mục tiêu nâng cao giá trị, chất lượng quả dâu tây thương phẩm gắn liền với phát triển nông nghiệp bền vững, cung cấp nguồn nông sản sạch và an toàn, một số nghiên cứu về khả năng kiểm soát sinh học của *Bacillus subtilis* đối với sự sinh trưởng và phát triển của nhiều loài vi sinh vật ký sinh gây bệnh đã được tiến hành. Khảo sát này nghiên cứu khả năng kiểm soát sinh học *Rhizopus* sp. và *Mucor* sp. gây bệnh thối mềm trên quả dâu tây sau thu hoạch của một số chủng *B. subtilis* trong điều kiện *in vitro* và *in vivo*. Kết quả cho thấy chủng *B. subtilis* B1S có khả năng ức chế tốt nhất sự sinh trưởng và phát triển của chủng *Rhizopus* sp. với tỷ lệ 56,10% và *Mucor* sp. với tỷ lệ 57,66% trong điều kiện *in vitro*. Trong điều kiện *in vivo*, chủng *B. subtilis* B1S làm giảm tỷ lệ mắc bệnh từ 95,83% xuống còn 66,71% đối với chủng *Rhizopus* sp. và từ 64,58% xuống chỉ còn 30,74% đối với chủng *Mucor* sp. Đồng thời, hiệu quả kiểm soát bệnh của chủng *B. subtilis* này lần lượt đạt 30,39% đối với *Rhizopus* sp. và 52,40% đối với *Mucor* sp.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, quả dâu tây, kiểm soát sinh học, *Mucor* sp., *Rhizopus* sp.

MỞ ĐẦU

Dâu tây chứa hàm lượng lớn cacbohydrate, vitamin, các hợp chất chống oxy hóa tự nhiên (pelargonidin, acid ellagic, ellagitannin, procyanidin...) có lợi cho sức khỏe nên được ưa chuộng tại nhiều quốc gia trên thế giới: Nhật Bản, Mỹ, Hàn Quốc, Việt Nam... Tuy nhiên, đây là loại quả mọng nước và thường xuyên hư hỏng do tổn thương vật lý. Đồng thời, thời gian bảo quản sau thu hoạch khá hạn chế, dễ dàng xuất hiện hiện tượng thối mềm trên quả trong thời gian ngắn bởi các tác nhân gây bệnh tồn dư trên quả từ đồng ruộng trong giai đoạn trồng trọt, thu hoạch đến giai đoạn vận chuyển, bảo quản và tiêu thụ (Feliziani, Romanazzi, 2016).

Hiện tượng mốc và thối mềm quả kèm theo rỉ dịch, nhũn nước do *Rhizopus* sp. và *Mucor* sp. gây ra rất phổ biến, đặc biệt là trong giai đoạn bảo quản sau thu hoạch. Những ảnh hưởng tiêu cực đến năng suất cũng như chất lượng của quả dâu tây thương phẩm gây ra bởi nguyên nhân này đã được báo cáo trong nhiều nghiên cứu gần đây (Feliziani, Romanazzi, 2016; Cloutier *et al.*, 2019; Lima *et al.*, 2020). Tốc độ phát triển bệnh nhanh, mầm bệnh tồn tại lâu dài và lây lan rộng trên phạm vi đồng ruộng với nhiều nguyên nhân (gió, nước, côn trùng, con người...), để lại tồn dư trên quả sau thu hoạch gây ảnh hưởng và làm sụt giảm nghiêm trọng chất lượng quả dâu tây.

Phương pháp quản lý dịch hại tổng hợp kết hợp kiểm soát sinh học các tác nhân gây bệnh trước và sau thu hoạch bằng nhóm vi sinh vật đối kháng tự nhiên đang là một trong những hướng đi tiềm năng có nhiều triển vọng với mục đích cung cấp nguồn nông sản an toàn, chất lượng cao cũng như hướng đến phát triển nền nông nghiệp sạch và bền vững (Feliziani, Romanazzi, 2016). Vi khuẩn *Bacillus subtilis* với khả năng sinh tổng hợp nhiều loại enzyme, kháng sinh tự nhiên phổ rộng, các hợp chất chuyển hóa hữu cơ dễ bay hơi,... cũng như khả năng tồn tại và sinh trưởng mạnh mẽ trong điều kiện tự nhiên đã trở thành đối tượng được nghiên cứu (Badiia *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2018; Radovanovic *et al.*, 2018; Lastochkina *et al.*, 2019) nhằm ứng dụng trong công tác bảo vệ cây trồng và nông sản chống lại nhiều loại mầm bệnh khác nhau.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu khả năng kiểm soát sinh học của một số chủng vi khuẩn *B. subtilis* nhằm ức chế sự sinh trưởng và phát triển của *Rhizopus* sp. và *Mucor* sp. gây bệnh thối mềm trên quả dâu tây trong điều kiện *in vitro* và *in vivo*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Chủng *Rhizopus* sp. và *Mucor* sp. có khả năng gây bệnh thối mềm trên quả dâu tây, chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* (B1S, B1R, B2S, B3S, ĐK1, PH1, PH2, PL1) được lưu giữ tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Vi sinh, Trung tâm Thí nghiệm - Thực hành, Trường Đại học Yersin Đà Lạt.

Phương pháp nghiên cứu

Hoàn nguyên chủng vi sinh vật trên môi trường Yeast Mold Broth/YM-Broth (Yeast extract: 3 g/L, Malt extract: 3 g/L, Peptone: 5 g/L, Dextrose: 10 g/L), nuôi cấy 12 giờ ở nhiệt độ $37 \pm 2^\circ\text{C}$ đối với các chủng *B. subtilis* và $26 \pm 2^\circ\text{C}$ đối với chủng *Rhizopus* sp. và *Mucor* sp. Các khoanh môi trường chứa hệ khuẩn ty (đường kính 8 mm) thu nhận từ rìa khuẩn lạc đặc trưng của *Rhizopus* sp. và *Mucor* sp. (nuôi cấy từ dịch hoàn nguyên trên môi trường Yeast Mold Agar/YM-Agar: YM bổ sung 20 g/L Agar) được đặt vào chính giữa đĩa Petri chứa cùng loại môi trường nhằm chuẩn bị cho thí nghiệm.

Khả năng ức chế sự sinh trưởng và phát triển chủng *Rhizopus* sp. và *Mucor* sp. của *B. subtilis* được xác định bằng phương pháp nuôi cấy kép theo công bố của Nguyen và đồng tác giả (2005), Essghaier và đồng tác giả (2012), Shi và Sunb (2017): 20 μL dịch huyền phù của các chủng *B. subtilis* được cấy đối xứng cách đều hai bên khoanh môi trường chứa hệ khuẩn ty *Rhizopus* sp. và *Mucor* sp. 2,5 cm trên đĩa Petri đã được chuẩn bị. Nước cất vô trùng được sử dụng thay thế cho dịch huyền phù vi khuẩn trong các nghiệm thức đối chứng, các thí nghiệm được nuôi cấy ở nhiệt độ $28 \pm 2^\circ\text{C}$, theo dõi trong vòng 3 ngày, tiến hành đo đạc và thu nhận các số liệu sau mỗi 24 giờ.

Tỷ lệ đối kháng (GI) được tính theo công thức: $GI = [(R_1 - R_2)/(R_1 - R_0)] \times 100\%$; trong đó: R_1 , R_2 lần lượt là bán kính khuẩn lạc *Rhizopus* sp. và *Mucor* sp. ở nghiệm thức đối chứng và thí nghiệm (mm), R_0 là bán kính khoanh môi trường chứa hệ khuẩn ty ban đầu (4 mm). Tỷ lệ đối kháng được quy ước bởi Nasibe và cộng sự (2019): tỷ lệ đối kháng rất cao ($>75\%$: ++++), cao ($>60\%$ đến $\leq 75\%$: +++), trung bình (>50 đến $\leq 60\%$: ++), thấp ($\leq 50\%$: +).

Chủng vi khuẩn *B. subtilis* có khả năng ức chế *Rhizopus* sp. và *Mucor* sp. tốt nhất trong điều kiện *in vitro* được lựa chọn cho thí nghiệm nghiên cứu khả năng kiểm soát sinh học trong điều kiện *in vivo* theo phương pháp được đề xuất bởi Diguta và đồng tác giả (2016), Feliziani và Romanazzi (2016), Shi và Sunb (2017), Gao và đồng tác giả (2018), Chen và đồng tác giả (2019): 20 quả dâu tây (*Fragaria ananassa*) khỏe mạnh và đồng nhất (14 - 18 g/quả) thu nhận từ vườn trồng dâu tây tại Tp. Đà Lạt được khử trùng bề mặt với NaClO 0,1% (v/v) trong vòng 1 phút, rửa sạch bằng nước cất vô trùng ba lần, làm khô tự nhiên trong không khí ở nhiệt độ phòng. Tiến hành tạo một vết thương nhân tạo (0,3 cm x 0,3 cm) trên đường xích đạo của mỗi quả, 10 μL (10^5 CFU/mL) *Rhizopus* sp. và *Mucor* sp. được tiêm vào các vết thương, làm khô trong 2 giờ; sau đó 10 μL (10^5 CFU/mL) vi khuẩn *B. subtilis* tiếp tục được tiêm vào mỗi vết thương, nước muối sinh lý được sử dụng cho nghiệm thức đối chứng. Sau khi xử lý, quả dâu tây được bảo quản riêng rẽ trong túi polyetylen ở $26 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm tương đối 90 - 95% trong 2 - 3 ngày (kết quả được tính khi xuất hiện hiện tượng tổn thương $> 50\%$ diện tích bề mặt quả trong nghiệm thức đối chứng).

Chỉ số bệnh (DI) và hiệu quả kiểm soát bệnh (CE) được tính toán theo các công thức được công bố bởi Shi và Sunb (2017), Chen và đồng tác giả (2019): $DI = [\sum(\text{Số quả bị tổn thương ở từng mức độ tổn thương} \times \text{Giá trị đại diện mức độ tổn thương}) / \sum(\text{Tổng số quả} \times \text{Giá trị đại diện cao nhất})] \times 100\%$; $CE = [(DI_{\text{Đối chứng}} - DI_{\text{Thí nghiệm}}) / DI_{\text{Đối chứng}}] \times 100\%$. Mức độ tổn thương trên bề mặt quả do *Rhizopus* sp. và *Mucor* sp. gây ra được tính trên tỷ lệ phần trăm tổn thương diện tích bề mặt theo quy ước của Shi và Sunb (2017): 0 (không có tổn thương), 1 ($< 5\%$); 3 (6 - 10%), 5 (11 - 25%), 7 (26 - 50%) và 9 ($> 50\%$).

Các thí nghiệm được tiến hành lặp lại 3 lần cho mỗi nghiệm thức. Số liệu sau khi thu nhận tương ứng với từng chỉ tiêu theo dõi, được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS 20.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khả năng kiểm soát *Rhizopus* sp. của vi khuẩn *B. subtilis* trong điều kiện *in vitro*

Sau 3 ngày theo dõi, kích thước bán kính khuẩn lạc *Rhizopus* sp. trong tất cả các nghiệm thức nghiên cứu đều nhỏ hơn so với nghiệm thức đối chứng (Bảng 1).

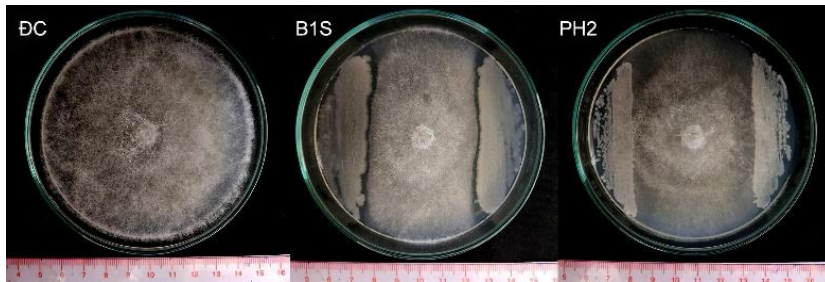
Mặc dù bán kính khuẩn lạc *Rhizopus* sp. trong nghiệm thức PH1 và PH2 đều nhỏ hơn so với nghiệm thức đối chứng, đồng thời theo quy ước Nasibe và đồng tác giả (2019), tỷ lệ đối kháng trong hai nghiệm thức này đạt mức độ thấp. Tuy nhiên, đối với nghiệm thức *B. subtilis* PH1: hệ khuẩn ty dinh dưỡng của *Rhizopus* sp. không phát triển lên trên bề mặt khuẩn lạc *B. subtilis* PH1 nhưng hệ khuẩn ty khí sinh vẫn tiếp tục phát triển, lan qua phần không gian phía trên bề mặt khuẩn lạc này. Đối với nghiệm thức *B. subtilis* PH2: hệ khuẩn ty dinh dưỡng và hệ khuẩn ty khí sinh tiếp tục phát triển lan trên bề mặt khuẩn lạc PH2 (Hình 1-PH2). Do vậy, chủng *B. subtilis* PH1 và PH2 không có khả năng ức chế sự sinh trưởng và phát triển của *Rhizopus* sp. trong điều kiện *in vitro* sau 3 ngày theo dõi.

Bảng 1. Khả năng kiểm soát của *B. subtilis* lên sự sinh trưởng và phát triển *Rhizopus* sp. sau 3 ngày theo dõi

Nghiệm thức	Bán kính TB (mm) (Mean±SD)	Tỷ lệ đối kháng GI (%)	Hiệu quả ức chế
Đối chứng	45,00 ^e ± 0,00	00,00	-
B1S	22,00 ^a ± 0,40	56,10	++
B1R	24,25 ^{bc} ± 0,49	50,61	++
B2S	24,50 ^{bc} ± 0,00	50,00	++
B3S	24,38 ^{bc} ± 0,47	50,30	++
ĐK1	23,75 ^b ± 0,49	51,83	++
PH1	24,75 ^c ± 0,49	49,36	+
PH2	32,50 ^d ± 1,27	30,49	+
PL1	24,00 ^{bc} ± 0,40	51,22	++

Ghi chú: Các chữ cái a, b, c,... biểu thị sự khác biệt ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức theo phép thử Duncan ($\alpha = 0,05$); Dấu ++, +, ... biểu hiện cho mức độ hiệu quả ức chế theo quy ước Nasibe và đồng tác giả (2019).

Nghiệm thức *B. subtilis* B1R, B2S, B3S, ĐK1, PL1 có kích thước bán kính khuẩn lạc và tỷ lệ đối kháng không quá khác biệt, đạt tỷ lệ đối kháng trên 50%. Nghiệm thức B1S cho kích thước bán kính khuẩn lạc bé nhất, đồng thời hệ khuẩn ty của *Rhizopus* sp. bị khống chế sự sinh trưởng và phát triển về mặt không gian trong và trên môi trường nuôi cấy, không thể phát triển về phía *B. subtilis* B1S (Hình 1-B1S). Tỷ lệ đối kháng với *Rhizopus* sp. của nghiệm thức này cũng đạt tỷ lệ cao nhất: GI = 56,10%. Thí nghiệm này cho kết quả tỷ lệ đối kháng cao hơn so với nghiên cứu của Cloutier và đồng tác giả (2019) trên cùng đối tượng: GI = 43%; Lastochkina và đồng tác giả (2019) đối với *Rhizopus stolonifer* gây thối mềm trên quả đào: GI = 48,9%.



Hình 1. Khả năng ức chế sự sinh trưởng và phát triển *Rhizopus* sp. của *B. subtilis* sau 3 ngày theo dõi

Khả năng kiểm soát *Mucor* sp. của vi khuẩn *B. subtilis* trong điều kiện *in vitro*

Tương tự kết quả xác định khả năng ức chế *Rhizopus* sp., sau 3 ngày theo dõi, bán kính khuẩn lạc *Mucor* sp. trong tất cả các nghiệm thức đều nhỏ hơn so với nghiệm thức đối chứng (Bảng 2).

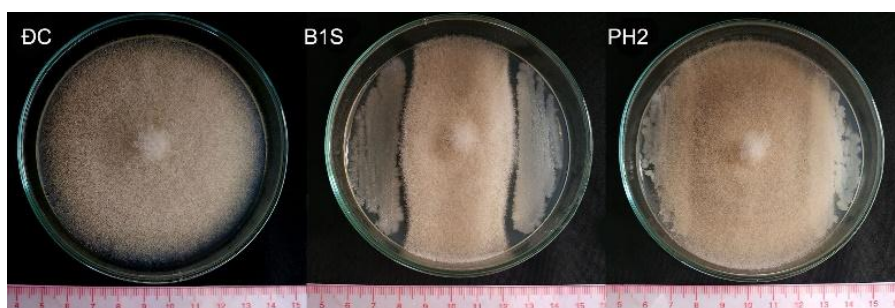
Bảng 2. Khả năng kiểm soát của *B. subtilis* lên sự sinh trưởng và phát triển *Mucor* sp. sau 3 ngày theo dõi

Nghiệm thức	Bán kính TB (mm) (Mean±SD)	Tỷ lệ đối kháng GI (%)	Hiệu quả ức chế
Đối chứng	40,31 ^e ± 0,83	00,00	-
B1S	19,38 ^a ± 0,24	57,66	++
B1R	21,38 ^b ± 0,84	52,15	++
B2S	21,50 ^b ± 0,57	51,81	++
B3S	21,00 ^b ± 0,69	53,18	++
ĐK1	20,00 ^a ± 0,40	55,94	++
PH1	24,63 ^c ± 0,24	43,20	+
PH2	27,62 ^d ± 0,73	34,94	+
PL1	19,88 ^a ± 0,24	56,28	++

Ghi chú: Các chữ cái a, b, c,... biểu thị sự khác biệt ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức theo phép thử Duncan ($\alpha = 0,05$); Dấu ++, +, ... biểu hiện cho mức độ hiệu quả ức chế theo quy ước Nasibe và đồng tác giả (2019).

Mặc dù bán kính khuẩn lạc *Mucor* sp. trong nghiệm thức PH1 và PH2 nhỏ hơn so với nghiệm thức đối chứng, đồng thời chỉ đạt mức độ đối kháng thấp (Nasibe *et al.*, 2019), hệ khuẩn ty dinh dưỡng và hệ khuẩn ty khí sinh của *Mucor* sp. tiếp tục phát triển, lan rộng trên bề mặt khuẩn lạc PH1 và PH2 (Hình 2-PH2). Do vậy, chủng *B. subtilis* PH1 và PH2 cũng không có khả năng ức chế sự sinh trưởng và phát triển của *Mucor* sp. trong điều kiện *in vitro* sau 3 ngày theo dõi.

Các nghiệm thức B1R, B2S, B3S có kích thước bán kính khuẩn lạc không quá khác biệt và sự sai khác này không có ý nghĩa thống kê, tỷ lệ đối kháng lần lượt đạt 52,15%; 51,81% và 53,18%. Nghiệm thức B1S, ĐK1 và PL1 cũng cho kết quả kích thước bán kính khuẩn lạc không quá khác biệt và sự sai khác này cũng không có ý nghĩa thống kê, tỷ lệ đối kháng đạt lần lượt 57,66%; 55,94% và 56,28%. Mặc dù hệ khuẩn ty dinh dưỡng bị ức chế sự sinh trưởng và phát triển, hệ khuẩn ty khí sinh của *Mucor* sp. vẫn tiếp tục phát triển lan qua phần không gian phía trên khuẩn lạc *B. subtilis* ĐK1. Nghiệm thức *B. subtilis* B1S và PL1, hệ khuẩn ty dinh dưỡng và khí sinh của *Mucor* sp. bị khống chế sự sinh trưởng và phát triển về mặt không gian trong và trên môi trường nuôi cấy, không thể phát triển lan rộng (Hình 2-B1S). Theo báo cáo của Radovanovic và đồng tác giả (2018), ngoài khả năng ức chế sự sinh trưởng và phát triển hệ khuẩn ty, *Bacillus* sp. còn có khả năng ức chế sự nảy mầm của bào tử *Mucor* sp. gây bệnh trên cây ngô lên đến 97,5% trong điều kiện *in vitro*.



Hình 2. Khả năng ức chế sự sinh trưởng và phát triển *Mucor* sp. của *B. subtilis* sau 3 ngày theo dõi

Từ kết quả của hai thí nghiệm trên, chủng *B. subtilis* B1S được lựa chọn cho thí nghiệm nghiên cứu khả năng kiểm soát sinh học *Rhizopus* sp. và *Mucor* sp. trên quả dâu tây sau thu hoạch trong điều kiện *in vivo*.

Khả năng kiểm soát *Rhizopus* sp. của vi khuẩn *B. subtilis* B1S trong điều kiện *in vivo*

Sau 2 ngày theo dõi, nghiệm thức không xử lý xuất hiện đồng loạt hiện tượng tổn thương bề mặt ở mức độ > 50% diện tích quả với số lượng rất lớn (93,33%), hệ khuẩn ty của *Rhizopus* sp. bao phủ từ 25% đến 100% bề mặt quả ở hầu hết các mẫu thí nghiệm, thịt quả thối nhũn, chảy dịch trong suốt màu hồng đặc trưng với mức độ từ trung bình đến nặng (Hình 3-ĐC). Nghiệm thức xử lý với B1S xuất hiện hiện tượng tổn thương rải rác ở các mức độ khác nhau, từ không tổn thương đến trung bình và nặng (mức độ 3 - 9), tuy nhiên diện tích bao phủ của hệ khuẩn ty *Rhizopus* sp. trên mặt quả cũng như mức độ chảy dịch giảm đáng kể so với không xử lý (Hình 3-TN).



Hình 3. Khả năng kiểm soát sinh học *Rhizopus* sp. của *B. subtilis* B1S trên quả dâu tây sau 2 ngày theo dõi

Kết quả trong Bảng 3 cho thấy chủng *B. subtilis* B1S có khả năng kiểm soát sinh học *Rhizopus* sp. tương đối cao trong điều kiện *in vivo*: chỉ số bệnh (DI) giảm từ 95,83% xuống còn 66,71%. Trong công bố của Lastochkina và đồng tác giả (2019), chủng *Bacillus* sp. có khả năng làm giảm 26,7% tỷ lệ mắc bệnh thối quả trên đào do *Rhizopus stolonifer* gây ra, đồng thời làm giảm tỷ lệ bệnh thối quả trên cà chua do *Penicillium* sp. và *Rhizopus stolonifer* từ 20% xuống chỉ còn 2% trong điều kiện *in vivo*.

Sau 3 ngày theo dõi, nghiệm thức không xử lý bắt đầu xuất hiện hiện tượng tổn thương bề mặt ở mức độ >50% diện tích quả với số lượng tương đối lớn (40,00%), hệ khuẩn ty *Mucor* sp. không xuất hiện trên các mẫu thí nghiệm, thịt quả thối mềm, rỉ giọt dịch màu hồng trong suốt đặc trưng với mức độ thấp (Hình 4-ĐC). Nghiệm thức xử lý với B1S có tỷ lệ quả không tổn thương chiếm tỷ lệ cao (36,67%), mức độ tổn thương chủ yếu phân bố ở mức nhẹ đến trung bình (mức 1 - 5), bề mặt vết thương khô ráo, thịt quả cứng không rỉ dịch (Hình 4-TN).

Bảng 3. Khả năng kiểm soát sinh học *Rhizopus* sp. của *B. subtilis* B1S trên quả dâu tây sau 2 ngày theo dõi

Nghiệm thức	Chỉ số bệnh (DI) (Mean $\pm$ SD)	Hiệu quả kiểm soát bệnh (CE) (Mean $\pm$ SD)
Không xử lý	95,83 $\pm$ 5,89%	30,39 $\pm$ 2,12%
Xử lý với B1S	66,71 $\pm$ 2,03%	

Khả năng kiểm soát *Mucor* sp. của vi khuẩn *B. subtilis* B1S trong điều kiện *in vivo*



Hình 4. Khả năng kiểm soát sinh học *Mucor* sp. của *B. subtilis* B1S trên quả dâu tây sau 3 ngày theo dõi

Tương tự kết quả nghiên cứu khả năng kiểm soát sinh học *Rhizopus* sp., chủng *B. subtilis* B1S có khả năng kiểm soát sinh học *Mucor* sp. rất tốt trong điều kiện *in vivo*: chỉ số bệnh (DI) giảm từ 64,58% xuống chỉ còn 30,74%. Bên cạnh đó, trong báo cáo Lastochkina và đồng tác giả (2019) cũng cho kết quả việc xử lý khoai tây với các chủng *B. subtilis* 10-4 và 26D có khả năng ngăn chặn hoàn toàn sự phát triển của *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., và *Mucor* sp. sau khi thu hoạch và trong quá trình bảo quản.

Bảng 4. Khả năng kiểm soát sinh học *Mucor* sp. của *B. subtilis* B1S trên quả dâu tây sau 3 ngày theo dõi

Nghiệm thức	Chỉ số bệnh (DI) (Mean $\pm$ SD)	Hiệu quả kiểm soát bệnh (CE) (Mean $\pm$ SD)
Không xử lý	64,58 $\pm$ 2,95%	52,40 $\pm$ 0,06%
Xử lý với B1S	30,74 $\pm$ 0,04%	

Mặc dù kết quả theo dõi cho thấy chủng *Rhizopus* sp. có khả năng gây bệnh mạnh trong thời gian ngắn hơn so với chủng *Mucor* sp. trong cùng điều kiện khảo sát, chủng *B. subtilis* B1S vẫn có khả năng kiểm soát sinh học rất tốt hai chủng *Rhizopus* sp. và *Mucor* sp. ký sinh gây bệnh này trên đối tượng quả dâu tây sau thu hoạch, với hiệu quả kiểm soát bệnh (CE) lên đến 30,39% đối với *Rhizopus* sp. (Bảng 3) và 52,40% đối với *Mucor* sp. (Bảng 4). Cùng với công bố từ những nghiên cứu gần đây về khả năng kiểm soát sinh học *Rhizopus* sp. và *Mucor* sp. của vi khuẩn *B. subtilis*, kết quả này cho thấy tiềm năng ứng dụng chủng vi khuẩn này nhằm mục tiêu kiểm soát sinh học các đối tượng vi sinh vật gây bệnh thối quả trên các đối tượng khác nhau, hướng đến mục tiêu nâng cao chất lượng và giá trị nông sản nói chung và quả dâu tây thương phẩm nói riêng.

KẾT LUẬN

Trong điều kiện *in vitro*, chủng *B. subtilis* B1S có khả năng ức chế sự sinh trưởng và phát triển của *Rhizopus* sp. và *Mucor* sp. tốt nhất trong các chủng được khảo sát, đạt mức độ trung bình với tỷ lệ đối kháng lần lượt là 56,10% và 57,66%. Khả năng kiểm soát sinh học của chủng *B. subtilis* này trên quả dâu tây sau thu hoạch trong điều kiện *in vivo* làm giảm chỉ số bệnh (DI) từ 95,83% xuống còn 66,71% và hiệu quả kiểm soát bệnh (CE) đạt 30,39% đối với *Rhizopus* sp.; giảm DI từ 64,58% xuống chỉ còn 30,74% và CE lên đến 52,40% đối với *Mucor* sp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Chen X, Wang Y, Gao Y, Gao T, Zhang D (2019). Inhibitory abilities of *Bacillus* isolates and their culture filtrates against the gray mold caused by *Botrytis cinerea* on postharvest fruit. *Plant Pathol J* 35(5): 425-436.
- Cloutier A, Tran S, Avis TJ (2019). Suppressive effect of compost bacteria against grey mould and *Rhizopus* rot on strawberry fruit. *Biocontrol Sci Technol* 30(2): 143-159.
- Badiaa E, Abdeljabbar H, Mohamed RH, Abdellatif B, Najla S (2012). *In vivo* and *in vitro* evaluation of antifungal activities from a halotolerant *Bacillus subtilis* strain J9. *Afr J Microbiol Res* 6 (19): 4073-4083.
- Diguta CF, Matei F, Cornea CP (2016). Biocontrol perspectives of *Aspergillus carbonarius*, *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum* on grapes using epiphytic bacteria isolated from Romanian vineyards. *Rom Biotech Lett* 21(1): 11126-11132.
- Feliziani E, Romanazzi G (2016). Postharvest decay of strawberry fruit: Etiology, epidemiology, and disease management. *J Berry Res* 6(1):47-63.
- Gao H, Li P, Xu X, Zeng Q, Guan W (2018). Research on volatile organic compounds from *Bacillus subtilis* CF-3: Biocontrol effects on fruit fungal pathogens and dynamic changes during fermentation. *Front Microbiol* 9(456):1-15.
- Lastochkina O, Seifikalhor M, Aliniaiefard S, Baymiev A, Pusenkova L, Garipova S, Kulabuhova D, Maksimov I (2019). *Bacillus* Spp.: Efficient biotic strategy to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Plant Basel* 8(4): 97.
- Lima DX, Cordeiro TRL, Lima CLF, Souza CAF, Santiago ALCM, Motta CMS (2020). A new occurrence of *Mucor nidicola* (Madden, Stchigel, Guarro, Sutton & Starks) (Mucorales, Mucoromycota) in the Upland Rainforest of the Brazilian Northeast and first report as a saprobe in soil. *Check List* 16(1): 163-167.
- Nasibe T, Recep K, Elif T, Fatih D (2019). Determination of some biological control agents against alternaria fruit rot in quince. *Alinteri J of Agr Sci* 34(1): 25-31.
- Nguyen TTH, Oh SO, Kim GH, Hur JS, Koh YJ (2005). *Bacillus subtilis* S1-0210 as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in strawberries. *Plant Pathol J* 21(1) 59-63.
- Radovanovic N, Milutinovic M, Mihajlovski K, Jovic J, Nastasijevic B, Stojanovic MR, Brankovic SD (2018). Biocontrol and plant stimulating potential of novel strain *Bacillus* sp. PPM3 isolated from marine sediment. *Microb Pathog* 120: 71-78.
- Shi JF, Sunb CQ (2017). Isolation, identification, and biocontrol of antagonistic bacterium against *Botrytis cinerea* after tomato harvest. *Braz J Microbiol* 48: 706-714.

ANTAGONISTIC ACTIVITY AND BIOLOGICAL CONTROL OF *RHIZOPUS* SP. AND *MUCOR* SP. CAUSAL AGENTS OF STRAWBERRY FRUIT ROT BY *BACILLUS SUBTILIS*

Tran Kim Diep^{1*}, Vo Hoai Hieu², Ho Sy Quang¹, Phan Ngoc Diem Quynh¹,
 Nguyen Thi Tam¹, Nguyen Vo Duy Tuan¹, Le Thi Kim Anh¹

¹ Biology - Environment Faculty, Yersin University

² Experiment Practice Center, Yersin University

SUMMARY

Fruit rot disease caused by *Rhizopus* sp. and *Mucor* sp. on strawberries, which develop and spread rapidly, control difficultly, affect yield and quality of strawberries fruit. Several studies in biocontrol of antagonistic *Bacillus* sp. against of many disease fungi has been conducted for increasing the value and quality of strawberries fruit, providing safe agricultural produce and developing sustainable agriculture. The aim of this study was to evaluate the abilities and effects inhibitory of some *B. subtilis* strains against *Rhizopus* sp. and *Mucor* sp. on strawberries post-harvest. The results revealed that *B. subtilis* B1S showed the strongest *in vitro* biocontrol activity against *Rhizopus* sp. at 56.10% and *Mucor* sp. at 36.26%. By using *in vivo* inoculation method, *B. subtilis* B1S reduce the incidence of diseases from 95.83% to 66.71% for *Rhizopus* sp. and from 66.58% to 30.74% for *Mucor* sp.. Therefore, the control efficiency reached up 30.39% on *Rhizopus* sp. and 52.40% on *Mucor* sp., respectively.

Keywords: *Bacillus subtilis*, biocontrol, *Mucor* sp., *Rhizopus* sp., strawberries fruit.

* Author for correspondence: Tel: + 84-975079953; Email: kdieptran@gmail.com