NGHIÊN CỨU VÀ ỨNG DỤNG MÀNG BAO SINH HỌC (BIOFILM) ĐỂ HẠN CHẾ NẤM BỆNH VÀ TĂNG KHẢ NĂNG BẢO QUẢN BƯỞI DA XANH (*CITRUS MAXIMA*) BẾN TRE SAU THU HOẠCH

Thạch Thị Ngọc Yến[1*], Nguyễn Tố Nguyên[2], Phan Ngô Quốc Bảo[2]

TÓM TẮT

Nghiên cứu và ứng dụng màng bao sinh học (Biofilm) để hạn chế nấm bệnh và tăng khả năng bảo quản bưởi da xanh Bến Tre sau thu hoạch được thực hiện với mục tiêu chính là tìm ra giải pháp hợp lý để hạn chế nấm bệnh và tăng khả năng tồn trữ sau thu hoạch trên bưởi da xanh. Kết quả nghiên cứu dựa trên hình thái, cơ quan sinh bào tử và hình thức sinh sản, cũng như dựa trên kỹ thuật sinh học phân tử (giải trình tự và tra cứu trên ngân hàng gen NCBI quốc tế) đã định loại được 2 dòng nấm gây bệnh là *Phomopsis* sp. và *Phytopthora* sp. với độ tương đồng 97,74% và 97,77%. Trong điều kiện *in-vitro* cho thấy *Lactobacillus plantarum* có khả năng ức chế gần như hoàn toàn đối với 2 dòng vi nấm gây bệnh sau thu hoạch trên bưởi da xanh. Sử dụng màng bao biofilm với vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* kết hợp với alginate 0,03% có tác dụng hạn chế nấm bệnh trên bưởi sau 40 ngày bảo quản và nhờ đặc tính sinh acid lactic cũng như một số hợp chất hưu cơ của vi khuẩn làm giảm pH vỏ quả, góp phần kiểm soát sự xâm nhiễm nấm bệnh gây hại, giảm hao hụt khối lượng trái, duy trì chất lượng trái với độ Brix, vitamin C, lycopene được duy trì sau thu hoạch trên bưởi da xanh. Đánh giá cảm quan về màu sắc vỏ trái vẫn giữ được màu đẹp cũng như chất lượng thịt quả ngon và được ưa chuộng hơn so với nghiệm thức không xử lý màng bao biofilm.

Từ khóa: *Alginate, bưởi da xanh, Lactobacillus plantarum, Phomosis sp., Phytopthora sp.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tỉnh Bến Tre có nhiều loại cây ăn trái nổi tiếng. Bưởi da xanh là loại trái cây có giá trị kinh tế cao và rất được ưa chuộng bởi giá trị dinh dưỡng và giá trị kinh tế. Tuy nhiên, ở điều kiện bình thường, bưởi da xanh có thể lưu trữ được từ 10 – 15 ngày. Nhưng trong khoảng thời gian này chính là điều kiện thuận lợi cho nấm mốc phát sinh cũng như mất nước, làm giảm khối lượng của trái và gây ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm. Hiện nay ở nước ta chỉ có một số doanh nghiệp lớn và các siêu thị có phương thức tồn trữ trái cây ở nhiệt độ lạnh. Còn lại, đa số các vựa thu mua trái cây cũng như nông dân đều thu hoạch và bán trái cây theo tập quán mà không có quy trình bảo quản sau thu hoạch. Chính điều này đã gây ảnh hưởng không ít đến chất lượng sản phẩm và làm giảm đi hiệu quả kinh tế vốn có của nó. Ở một số nơi khác có các biện pháp xử lý trái sau thu hoạch được áp dụng như sử dụng thuốc diệt nấm. Những loại thuốc này rất dễ mua, dễ áp dụng, phòng trừ nấm hiệu quả cao và hơn hết là rẻ tiền. Điển hình như Chlorine - một chất hóa học có tác dụng oxy hóa và sát khuẩn cực mạnh, được dùng khá phổ biến với mục đích khử trùng và tẩy trắng. Tuy nhiên, dù đã được kiểm tra cẩn thận về tác dụng phụ và được quản lý chặt chẽ, nhưng vẫn để lại dư lượng trên trái cây cũng như trong môi trường, thậm chí chỉ với dư lượng chlorine rất nhỏ, nồng độ thấp cũng có thể gây độc hại đến cơ thể. Với những lý do này, ngày càng có nhiều sự quan tâm đến việc phát triển và thực hiện các chiến lược thay thế các phương pháp thân thiện với môi trường, hiệu quả cao, không ảnh hưởng đến sức khỏe con người mà không phải phụ thuộc vào các ứng dụng các chất hóa học, thuốc diệt nấm thông thường, để kiểm soát nấm gây hại sau thu hoạch đối với hàng tươi sống đặc biệt là đối với trái cây vùng nhiệt đới nói chung và bưởi da xanh nói riêng. *"Nghiên cứu và ứng dụng màng bao sinh học (Biofilm) để hạn chế nấm bệnh và tăng khả năng bảo quản bưởi da xanh Bến Tre sau thu hoạch"* được thực hiện với mục tiêu chính là đánh giá khả năng ức chế nấm sau thu hoạch trong điều kiện *in-vitro*; nghiên cứu sử dụng màng bao Biofilm bởi vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* với cơ chất là Alginate để

[1] Viện Nghiên cứu và Phát triển công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ
[2] Trường THPT Phan Văn Trị, Bến Tre
Email: thachyen31@gmail.com

hạn chế nấm bệnh *Phomopsis* sp. và *Phytopthora* sp. gây hại quả bưởi sau thu hoạch.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, hóa chất, phương tiện

Trái bưởi da xanh thu hoạch tại 3 địa điểm trên địa bàn tỉnh Bến Tre. Dòng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* đã được phân lập, lưu trữ nguồn tại Phòng thí nghiệm vi sinh thuộc Viện Cây ăn quả miền Nam. Đặc điểm về vi khuẩn *Lactobacillus plantarum:* khuẩn lạc có màu trắng đục, tròn đều bìa nguyên. Tế bào hình que ngắn, Gram dương, không sinh bào tử. Phân giải $CaCO_3$, oxydase và catalase âm tính (nguồn cung cấp: Thạch Thị Ngọc Yến và ctv, 2017). Môi trường PDA (Potato Dextrose Agar) và môi trường MRS. Hóa chất: Anginate, agar, khoai tây, glucose, cà rốt, cồn và các dụng cụ cần thiết khác.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập nấm mốc gây hại sau thu hoạch trên bưởi da xanh

Thí nghiệm 1: Phân lập các loại nấm gây bệnh trên bưởi da xanh sau thu hoạch.

Tại mỗi địa điểm lấy mẫu (Bảng 1), mẫu được xử lý và nuôi cấy trên môi trường PDA, 28°C, 5-7 ngày.

Bảng 1. Địa điểm thu mẫu bưởi da xanh

Mẫu	Địa điểm	Nông hộ
Mẫu 1	Xã Lương Quới, huyện Giồng Trôm, tỉnh Bến Tre	Ông Ngô Văn Hậu
Mẫu 2	Xã Lương Hòa, huyện Giồng Trôm, tỉnh Bến Tre	Ông Nguyễn Minh Anh
Mẫu 3	Xã Phước Mỹ Trung, huyện Mỏ Cày Bắc, tỉnh Bến Tre	Ông Nguyễn Hoài Nam

Thí nghiệm 2: Lây nhiễm nhân tạo nấm và vi khuẩn gây bệnh trái bưởi da xanh khỏe thí nghiệm lặp lại 3 lần độc lập trên trái khỏe với nấm được phân lập từ thí nghiệm theo quy trình Koch.

Thí nghiệm 3: Định danh các dòng nấm phân lập được.

Định danh tên nấm dựa trên hình thái và cơ quan sinh sản theo mô tả của Lane (1991).

Định danh ở mức độ phân tử với kỹ thuật: Giải trình tự gene mã hóa 28S rRNA và tra cứu bằng phần mềm BLAST N để so sánh trình tự đoạn DNA của các dòng nấm với trình tự DNA các loài nấm có trong ngân hàng dữ liệu NCBI.

Mẫu nấm được thực hiện các bước nhận diện từ ly trích DNA đến giải trình tự tại Phòng xét nghiệm Nam Khoa – TP. Hồ Chí Minh, Việt Nam theo các bước: Ly trích DNA của nấm theo phương pháp CTAB. Thực hiện phản ứng PCR, khuếch đại đoạn DNA mục tiêu. Điện di sản phẩm PCR trên agarose gel, nhằm so sánh kích thước DNA của sản phẩm PCR với thang DNA chuẩn và kiểm tra độ tinh sạch của DNA. Nhận diện nấm bằng phương pháp giải trình tự đoạn DNA.

2.2.2. Thí nghiệm ức chế nấm bệnh bởi vi khuẩn Lactobacillus plantarum.

Thí nghiệm 4: Đánh giá khả năng ức chế vi sinh vật gây bệnh của vi khuẩn Lactobacillus plantarum trong điều kiện in-vitro.

Thí nghiệm được thực hiện với 2 phương pháp:

- Phương pháp 1: nuôi cấy trên môi trường kép "dual-culture" (ức chế khuẩn ty).

Vi khuẩn kháng được cấy thành đường hoặc tiêm trên môi trường MRS, ủ từ 24 – 48 giờ. Sau đó, cấy chủng nấm lên cùng môi trường đã cấy vi khuẩn và theo dõi (Abdel-motaal *et al.*, 2010).

- Phương pháp 2: Phủ 2 lớp môi trường (Ức chế bào tử nấm).

Lấy 1 khuẩn lạc đơn, thuần của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* cấy thành một đường dài khoảng 2 cm, lặp lại một lần nữa để tạo thành 2 đường song song trên đĩa MRS agar. Sau đó gói đĩa, lật ngược đĩa và ủ kỵ khí 37°C trong 48 giờ nhằm tạo điều kiện thúc đẩy sự phát triển của vi khuẩn. Sau thời gian ủ 48 giờ, đĩa được đổ tràn với 5 ml môi trường malt extract soft agar (0,05% malt extract và 1% agar) chứa 1 x 10^6 bào tử mỗi chủng nấm gây bệnh trên đậu phộng/ml có nhiệt độ khoảng 35 - 40°C (riêng đĩa đối chứng không có khuẩn lạc vi khuẩn) và ủ hiếu khí ở 30°C trong 48 giờ (Magnusson và Schnürer, 2001). Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, lặp lại 3 lần với mỗi chủng nấm.

2.2.3. Thí nghiệm 5. Nghiên cứu màng bao biofilm từ vi khuẩn Lactobacillus plantarum và Anginate.

Thí nghiệm được bố trí với 5 nghiệm thức nồng độ anginate (0; 0,01; 0,03; 0,05 và 0,07) thực hiện

phương pháp MIC với dòng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum*. Số ngày khảo sát: 10, 20, 30 và 40 ngày. Mỗi nghiệm thức lấy chỉ tiêu 5 thời điểm, mỗi thời điểm lặp lại 3 lần đếm mật số.

2.2.4. Thí nghiệm 6: Khảo sát chất lượng trái bưởi da xanh khi xử lý bởi màng bao biofilm.

Trái bưởi da xanh được chọn, thu thập và thí nghiệm được tiến hành ngẫu nhiên với 1 nhân tố xử lý trái ở 4 nghiệm thức xử lý trái (Bảng 2), mỗi nghiệm thức 5 trái và được thực hiện với 3 lần lặp lại.

Bảng 2. Bố trí thí nghiệm xử lý màng bao biofilm trên bưởi da xanh

Ký hiệu nghiệm thức	Nghiệm thức
NT1	Alginate (nồng độ đã được lựa chọn ở thí nghiệm trên)
NT2	*L. plantarum*
NT3	*L. plantarum* + Anginate
ĐC	Đối chứng

Cách tiến hành: Trái bưởi da xanh đến điểm thu hoạch, được thu mẫu về Phòng sau thu hoạch, Viện Cây ăn quả miền Nam để xử lý với các nghiệm thức như bố trí. Bưởi được rửa với nước và để ráo tự nhiên, xử lý mẫu với các công thức khác nhau như bố trí sau đó để ráo tự nhiên, bao túi xốp. Mẫu đối chứng không xử lý. Mẫu được tồn trữ ở nhiệt độ phòng (28 ± 2°C) và 13°C được đánh giá ở các thời điểm 10, 20, 30 và 40 ngày.

Chỉ tiêu theo dõi: Các chỉ tiêu đánh giá được thực hiện theo Gustavo M C, *et al.*, 2011.

** Kiểm tra sự hiện diện của vi khuẩn Lactobacillus sp. trên vỏ trái chôm chôm*

Trái chôm chôm ở mỗi nghiệm thức đem ngâm trong dung dịch muối ở nồng độ 0,09% (W/w) trong 1 phút và pha loãng thập phân tiếp tục. Đem 100 ml dung dịch được pha loãng phủ lên môi trường nuôi cấy MRS ở 37°C. Nghiệm thức được lặp lại 5 lần. Sau khi khuẩn lạc phát triển thì nhuộm gram và quan sát dưới kính hiển vi.

** Đánh giá chất lượng trái*

Ở thời điểm ban đầu 10, 20 và 30 và 40 ngày trữ ở nhiệt độ mát (nhiệt độ phòng 28°C±2; ẩm độ: 80-85%): Độ brix, hàm lượng acid tổng số (%), pH dịch quả, hàm luợng vitamin C (mg/100 ml dịch quả), hao hụt khối lượng (%), tỷ lệ bệnh (%).

2.2.5. Phương pháp phân tích

Phương pháp phân lập vi sinh vật được mô tả theo Nguyễn Lân Dũng (2008). Xác định đặc điểm, hình thái vi sinh vật, đặc điểm hình thái nấm được xác định bằng cách soi tiêu bản dưới kính hiển vi điện tử. Tái lây nhiễm trên trái bưởi khỏe theo phương pháp tái lây nhiễm trên quả đậu phộng khỏe được mô tả theo FAO (1992).

Kết quả được phân tích thống kê dựa trên phần mềm Excel và SAS 9.1.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập nấm gây bệnh sau thu hoạch trên trái bưởi da xanh

Từ 3 địa điểm lấy mẫu xuất hiện 2 loại bệnh điển hình là bệnh mốc trắng và nấm thối nâu trên vỏ trái với các triệu chứng hoàn toàn khác nhau và được mô tả chi tiết trong bảng 3.

Bảng 3 cho thấy bệnh mốc trắng li ti, nấm mốc trắng và nấm thối nâu không những gây hư hỏng thịt quả mà còn ảnh hưởng tới cảm quan bên ngoài và triệu chứng bệnh hoàn toàn khác nhau. Từ hai dạng bệnh đã được phân loại như trên, tiến hành chọn ra từ mỗi lô mẫu, mỗi loại 3 trái mang mầm bệnh đem đi phân lập nhằm xác định thành phần nấm có trên vết bệnh.

Đặc điểm, hình thái khuẩn lạc của chúng được thể hiện trong bảng 3 và bảng 4. Nấm xâm nhập gây hại bên ngoài vỏ quả sau đó tấn công vào hạt.

Bảng 3. Triệu chứng và đặc điểm hình thái các loại nấm phân lập được từ vỏ trái bưởi da xanh

Ký hiệu mẫu bệnh	Triệu chứng	Mô tả triệu chứng	Hình thái tản nấm	Quan sát dưới kính hiển vi
N1	Mốc trắng	Không thể hiện rõ màu của nấm, vỏ trái mềm, đổi màu sậm hơn tế bào biểu bì vỏ, về sau trái bưởi da xanh mềm ra và thối nâu.	Tơ nấm có màu trắng	Bào tử dạng hình que, ngắn.
N2	Thối nâu	Trái mềm vỏ, màu thối nâu, lan rộng dần	Bào tử có màu trắng có vân	Bào tử có dạng hình quả lê.

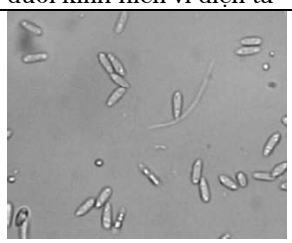
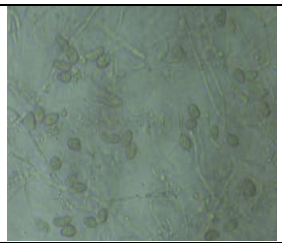
Mẫu nấm được tách ròng bằng phương pháp bắt bào tử dưới kính lúp có độ phóng đại cao và bào tử được cấy trên môi trường PDA. Quan sát dưới kính hiển vi để kiểm tra các dòng nấm dựa trên hình thái. Định loại dựa trên hình thái của nấm đã phân lập.

Đặc điểm hình thái của các chủng nấm mốc phân lập theo hướng dẫn của FAO (1992) được ghi nhận như sau:

+ Nấm N1 khi định danh dựa trên hình thái giống với nấm *Phomopsis* sp. trên môi trường PDA sau 4-7 ngày nuôi cấy, tản nấm có màu trắng, đường kính 80-90 mm. Kết quả quan sát dưới kính hiển vi mẫu nấm khi non có màu trắng tơ nhuyễn, khi già tản nấm dày. Bào tử hình que ngắn, không đều.

+ Nấm N2 khi định danh dựa trên hình thái giống với nấm *Phytopthora* sp. Tản nấm mọc theo từng vân và phát triển theo tầng. Sợi nấm phân nhánh, có vách ngăn. Bào tử hình dạng quả lê.

Bảng 4. Hình thái khuẩn ty của tản nấm và bào tử của các loại nấm gây bệnh sau thu hoạch trên bưởi da xanh

	Định danh hình thái	Mẫu bệnh	Hình dạng khuẩn ty của nấm	Bào tử của nấm quan sát dưới kính hiển vi điện tử
N1	*Pomopsis* sp.			
N2	*Phytopthora* sp.			

3.2. Lây bệnh nhân tạo trên trái bưởi da xanh

Bảng 5. Kết quả lây nhiễm nhân tạo

Mẫu nấm	Tỉ lệ bệnh sau lây nhiễm (%)	Kết quả tái phân lập (%)
Phomopsis sp.	100	100
Phitopthora sp.	90	100

Kết quả lây nhiễm nhân tạo đã phân lại đúng 100% dạng bệnh là do đúng loại nấm đã định danh sơ bộ là *Phomopsis* sp. và *Phitopthora*.

3.3. Giải trình tự và định loại nấm gây bệnh trái bưởi da xanh trên bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Mẫu tản nấm trên môi trường PDA đã được cấy thuần và định danh ở mức độ hình thái và cơ quan sinh sản sau đó được gởi giải trình tự ở Công ty Giám định mẫu NK-biotech.

Kết quả giải trình tự 2 mẫu và sau khi kiểm tra trên ngân hàng gen thế giới NCBI đã xác định được 2 dòng nấm *Phomopsis* sp, *Phytopthora* sp. Kết quả cho thấy đoạn so sánh có 90 - 100% mức độ đồng hình với các dòng nấm đã phân lập (Bảng 5). Kết quả định danh ở mức độ phân tử đã chứng minh chính xác hơn về tác nhân gây bệnh sau thu hoạch trên bưởi da xanh.

Bảng 6. Kết quả tìm kiếm trên ngân hàng gen đối với hai mẫu nấm

Mẫu nấm	Mã trình tự	Loài xác định	Phần trăm đoạn so sánh (%)	Mức đồng nhất trình tự (%)
N1	KT953322.1	*Phomopsis* sp.	100	97,74
N2	EU196370.1	*Phytopthora* sp.	100	99,77

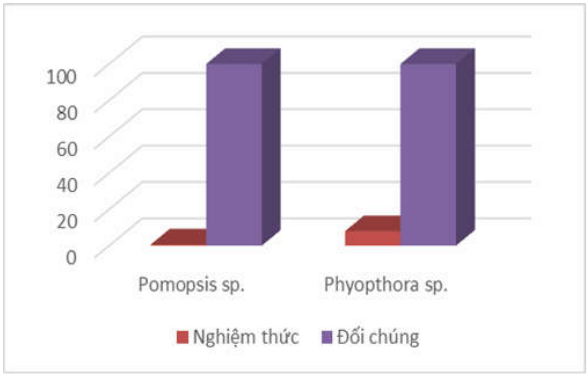
3.4. Ức chế nấm bệnh bởi vi khuẩn *Lactobacillus plantarum*

3.4.1. Ức chế khuẩn ty nấm gây bệnh thối trái bưởi da xanh bởi vi khuẩn Lactobacillus plantarum

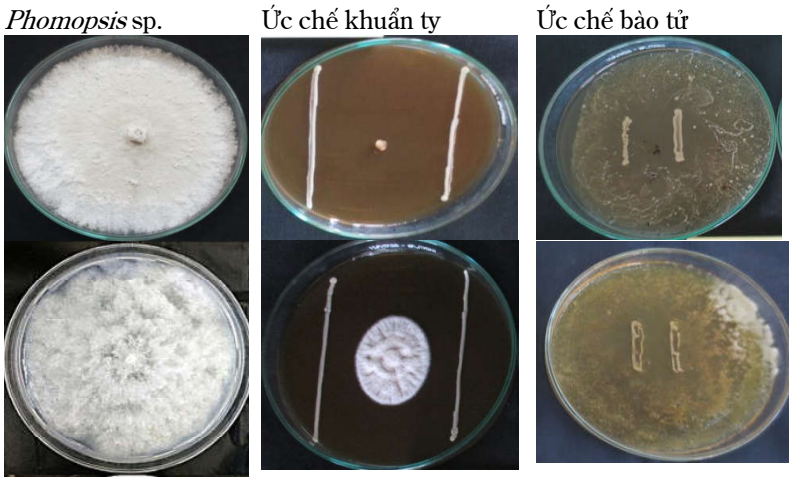
Sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường kép cho thấy trong 2 dòng nấm gây bệnh trên bưởi là *phomopsis* sp. và *phytopthora* sp. đều sinh trưởng

không tốt khi nuôi cấy trên môi trường có cấy 2 đường vi khuẩn *Lactobacillus fermentum.* Với nấm *phomopsis* sp. và *Phytopthora* sp. chỉ phát triển tương ứng 0,7% và 8% trên đĩa so với đĩa đối chứng không có cấy vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* thì trung bình sự sinh trưởng tản nấm là 100%.

Như vậy, ở điều kiện *in-vitro* với phương pháp ức chế khuẩn ty cho thấy 2 dòng nấm hầu như bị ức chế bởi vi khuẩn *Lactobacillus plantarum*. Nguyên nhân theo kết quả nghiên cứu của Magnusson, *et al.* (2003) là vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* khả năng sinh acid lactic và hoạt chất bacteriocin cũng như các hợp chất hữu cơ có khả năng ức chế sự phát triển của nấm.



Hình 1. Tỉ lệ ức chế 2 chủng nấm gây bệnh ở bưởi da xanh bởi vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* điều kiện nhiệt độ phòng



Hình 2. Sự ức chế nấm *Phomosis* sp. và nấm *Phytopthora* sp. bởi vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* so với đối chứng

3.4.2. Ức chế bào tử nấm gây bệnh thối trái bởi vi khuẩn Lactobacillus plantarum.

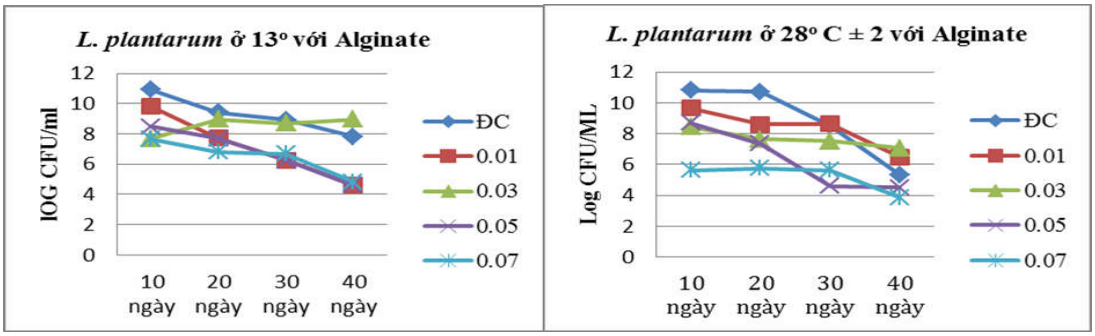
Khi phủ môi trường malt extract agar có chứa bào tử nấm *Pomopsis* sp. và *Phytopthora* sp. lên môi trường MRS đã cấy vi khuẩn *L. plantarum*, kết quả cho thấy, vi khuẩn lactic chủng *L. plantarum* có khả năng ức chế sự phát triển của bào tử nấm ở mức ức chế mạnh đối với sự phát triển của bào tử của nấm *Pomopsis* sp. và *Phytopthora* sp. (trên 75 mm).

Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* đã được chứng minh như biện pháp bảo quản sinh học (Milani *et al.*, 1998), chủ yếu ngăn ngừa hư hỏng, kéo dài thời gian sử dụng của sản phẩm thực phẩm và đảm bảo an toàn (Lowe và Arendt, 2004). *L. plantarum* thể hiện hoạt tính ức chế chống lại 3 chủng nấm trong điều kiện *in-vitro*, tuy nhiên phổ ức chế khác nhau. Kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với kết luận của Magnusson, *et al.* (2003) cho rằng các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. có khả năng ức chế nấm bệnh bởi khả năng sinh hợp chất kháng nấm của chúng như: acid hữu cơ, acid lactic, acetic, acid caproic, acid formic, propionic và diacetyl, hydrogen peroxide, cyclo (L-Phe-L-Pro), cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) và acid phenylacetic… Qua đó có thể kết luận, chủng vi khuẩn *L. plantarum* có khả năng ức chế 2 chủng nấm ở điều kiện tự nhiên.

3.5. Nghiên cứu nồng độ chất mang thích hợp tạo màng bao sinh học (Biofilm)

Qua hình 3 cho thấy, vi khuẩn tồn tại trong alginate ở các nồng độ từ 0,01 cho đến 0,07 cao nhất ở thời gian đầu sau đó giảm dần đến ngày thứ 40 thì mật số vi khuẩn giảm đều kể cả đối chứng. Tuy nhiên, kết quả cho thấy ở nồng độ 0,03% alginate thích nghi cho vi khuẩn phát triển và khi so ở 2 điều kiện nhiệt độ thì ở 13°C, vi khuẩn thích nghi hơn nên có xu hướng tăng mật số. Như vậy nồng độ alginate

0,03% được lựa chọn làm chất bổ sung để tạo màng bao biofilm xử lý trái cho thí nghiệm tiếp theo.



Hình 3. Ảnh hưởng của Alginate đến sự tăng trưởng và phát triển của vi khuẩn

3.6. Kết quả xử lý màng biofilm lên chất lượng và khả năng kháng nấm của trái bưởi da xanh sau thu hoạch

Trái bưởi da xanh sau khi thu hoạch về được rửa, làm ráo và xử lý màng bao biofilm với 4 nghiệm thức (Bảng 7) bao gồm nghiệm thức đối chứng, sau đó trữ ở điều kiện nhiệt độ phòng 28±2°C và nhiệt độ lạnh 13°C tại Phòng bảo quản sau thu hoạch, Viện Cây ăn quả miền Nam.

Kết quả thí nghiệm MIC đã xác định được *Lactobacillus plantarum* tồn tại tốt trong điều kiện có chất bổ sung với nồng độ phù hợp cho sự tồn tại và phát triển của vi khuẩn là Alginate 0,03%. Các nồng độ chọn lọc, được thực hiện xử lý bảo quản bưởi da xanh sau thu hoạch với kết quả đạt được sau:

3.6.1. Tỉ lệ hao hụt khối lượng và thành phần sinh hóa của bưởi da xanh

Bảng 7. Ảnh hưởng của màng bao đến sự hao hụt khối lượng (%) của bưởi da xanh ở điều kiện nhiệt độ phòng và nhiệt độ lạnh

Nghiệm thức	Bảo quản ở nhiệt độ phòng (28°C±2)					Bảo quản ở nhiệt độ lạnh (13°C)				
Ngày	0	10	20	30	40	0	10	20	30	40
ĐC	0	9,80	18,40	23,37	0,00	0	6,72	13,20	25,53	0,00
Alginate	-	2,01	7,97	13,40	17,00	-	3,70	7,63	13,27	22,70
L. plantarum	-	2,82	6,17	17,67	18,73	-	3,40	6,17	14,50	21,00
L. plantarum +Alginate	-	1,83	6,47	10,83	16,03	-	3,33	10,87	14,90	17,00
LSD 0,05	-	0,85*	0,58*	1,64*	1,13*	-	0,63*	0,86*	1,00*	0,87*

*Ghi chú: *khác biệt có ý nghĩa thống kê, ns khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p<0,05).*

Với điều kiện bảo quản bưởi da xanh ở 13°C, ở tất cả các nghiệm thức cho thấy sự hao hụt khối lượng của trái rất thấp và có khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức. Kết quả cho thấy, bưởi da xanh hao hụt khối lượng thấp hơn so với các nghiệm thức xử lý là 16% và 17% ở ngày thứ 40 lần lượt ở nhiệt độ phòng và nhiệt độ lạnh.

3.6.2. Các đặc tính lý hóa của bưởi da xanh sau thời gian bảo quản khi xử lý màng bao biofilm

Bảng 8. Ảnh hưởng của màng bao đến hàm lượng acid% trong thời gian bảo quản bưởi da xanh ở điều kiện nhiệt độ phòng và lạnh

Nghiệm thức	Bảo quản ở nhiệt độ phòng (28°C±2)					Bảo quản ở nhiệt độ lạnh (12°C±2)				
Ngày		10	20	30	40	0	10	20	30	40
ĐC	1,96	1,86	1,60	1,80	0,00	1,92	1,64	1,47	1,57	0,00
Alginate	1,96	1,88	1,85	1,76	1,71	1,92	1,85	1,78	1,67	1,58
L. plantarum	1,96	1,89	1,80	1,74	1,76	1,92	1,82	1,76	1,67	1,57
L. plantarum +Alginate	1,96	1,90	1,77	1,71	1,71	1,92	1,84	1,75	1,63	1,55
LSD 0,05	-	ns	ns	0,17*	1,11*	-	0,09*	0,14*	0,06*	0,08*

*Ghi chú: *khác biệt có ý nghĩa thống kê, ns khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p<0,05).*

Bảng 9. Ảnh hưởng của màng bao biofilm đến độ Brix trong thời gian bảo quản bưởi da xanh ở điều kiện nhiệt độ phòng và lạnh

Nghiệm thức	Bảo quản ở nhiệt độ phòng (28°C±2)					Bảo quản ở nhiệt độ lạnh (12°C±2)				
Ngày		10	20	30	40	0	10	20	30	40
ĐC	14,10	14,50	14,67	15,00	0,00	14,10	15,00	15,00	15,00	0,00
Alginate	14,10	15,00	15,00	15,33	15,50	14,10	15,50	15,60	14,84	15,80
L. plantarum	14,10	14,83	15,00	15,17	15,00	14,10	15,50	15,83	15,88	15,90
L. plantarum +Alginate	14,10	15,17	15,67	15,83	15,00	14,10	15,83	15,56	15,98	15,91
LSD 0,05	-	ns	ns	ns	0,49*	-	ns	ns	ns	0,37*

*Ghi chú: *khác biệt có ý nghĩa thống kê, ns khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p<0,05).*

Bảng 10. Ảnh hưởng của màng bao biofilm đến tỉ lệ độ Brix/Acid% trong thời gian bảo quản bưởi da xanh ở điều kiện nhiệt độ phòng và lạnh

Độ Brix/Acid%:

Nghiệm thức	Bảo quản ở nhiệt độ phòng (28°C±2)					Bảo quản ở nhiệt độ lạnh (12°C±2)				
Ngày		10	20	30	40	0	10	20	30	40
ĐC	7,13	8,17	9,21	10,70	0,00	7,13	9,15	10,31	9,62	0,00
Alginate	7,13	8,15	8,13	8,73	15,50	7,13	7,81	8,13	9,04	9,76
L. plantarum	7,13	17,80	8,35	8,74	15,00	7,13	7,88	8,46	8,94	9,82
L. plantarum +Alginate	7,13	7,89	8,32	8,84	15,00	7,13	8,09	8,34	9,09	9,92
LSD 0,05	-	ns	0,71*	0,92*	0,63*	-	0,40*	0,89*	0,46*	0,48*

*Ghi chú: *khác biệt có ý nghĩa thống kê, ns khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p<0,05).*

Chỉ số độ Brix, acid (%) được theo dõi, tỷ số độ Brix/Acid% được tính toán và tổng hợp ở bảng 10. Sự gia tăng của tổng hàm lượng chất khô hòa tan, độ Brix và sự suy giảm của tổng acid chuẩn độ (Acid%) được ghi nhận trong suốt thời gian khảo sát, trong đó sự thay đổi diễn ra mạnh nhất trong khoảng thời gian từ 35 đến 42 ngày; kéo theo đó là sự gia tăng của tỷ số độ Brix/Acid% (bảng 7, 8 và 9).

Sự gia tăng chỉ số độ Brix chủ yếu là do sự tích tụ đường, diễn ra dưới sự phân giải tinh bột mà quả tích trữ. Sự tích tụ đường trong thời kì chín tăng mạnh không chỉ do sự đường hóa tinh bột mà còn do sự thủy phân hemicellulose. Khi bị thủy phân, hemicellulose tạo thành các đường xilose, manose, galactose, arabinose và cấu trúc tế bào bị phá hủy (Belitz *et al.,* 1992).

Trong quá trình chín, các acid hữu cơ cũng được chuyển hóa thành đường dưới tác dụng của enzyme nên hàm lượng acid trong trái chín giảm. Sự giảm hàm lượng acid có liên quan đến sự gia tăng hoạt tính của các enzyme như succinate dehydrogenase, citrate dehydrogenase và sự giảm hoạt tính của enzyme citrate synthase (Lizara, 1993). Song song với sự thay đổi của hàm lượng acid (%) là sự thay đổi của giá trị pH.

Bảng 11. Ảnh hưởng của màng bao biofilm đến acid ascorbic % (mg/100 mL) trong thời gian bảo quản bưởi da xanh ở điều kiện nhiệt độ phòng và lạnh

Nghiệm thức	Bảo quản ở nhiệt độ phòng (28°C±2)					Bảo quản ở nhiệt độ lạnh (12°C±2)				
Ngày		10	20	30	40	0	10	20	30	40
ĐC	54,00	50,12	48,31	46,33	0,00	54,00	48,90	45,47	33,68	0,00
Alginate	54,00	52,51	50,10	47,57	15,50	54,00	49,43	49,45	47,43	45,30
L. plantarum	54,00	51,66	49,51	47,03	15,00	54,00	49,33	50,03	46,34	45,10
L. plantarum +Alginate	54,00	52,18	49,04	47,17	15,00	54,00	51,00	49,82	47,00	45,23
LSD 0,05	-	ns	ns	ns	1,15	-	ns	2,38	3,10	2,03

*Ghi chú: *khác biệt có ý nghĩa thống kê, ns khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p<0,05).*

Kết quả ở bảng 11 cho thấy, % axit ascorbic giảm khi kéo dài thời gian bảo quản trái cây. Tất cả các nghiệm thức đều giảm sự axit ascorbic trong trái cây so với đối chứng. Kết quả cho thấy sự khác biệt không đáng kể giữa các nghiệm thức trong mọi điều kiện bảo quản bưởi da xanh. Việc giữ lại % axit ascorbic trong trái cây đã xử lý có thể là do quá trình hô hấp giảm và giảm quá trình oxy hóa hàm lượng axit ascorbic trong khi giảm mức axit ascorbic trong kiểm soát có thể do tăng quá trình hô hấp. Kết quả của nghiên cứu này phù hợp với Ali, *et al.* (2013).

Bảng 12. Ảnh hưởng của màng bao biofilm đến lycopene (mg/100 mL) trong thời gian bảo quản bưởi da xanh ở điều kiện nhiệt độ phòng và lạnh

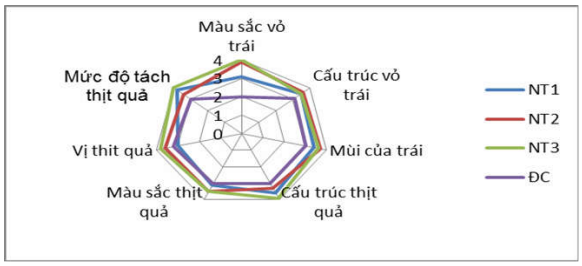
NT	Bảo quản ở nhiệt độ phòng (28°C±2)					Bảo quản ở nhiệt độ lạnh (12°C±2)				
Ngày		10	20	30	40	0	10	20	30	40
ĐC	0,015a	0,031a	0,033a	0,030a	0,00	0,015a	0,027a	0,030a	0,028a	0,00
Alginate	0,015a	0,032b	0,038c	0,041c	0,035b	0,015a	0,030b	0,035d	0,028a	0,023b
L. plantarum	0,015a	0,031b	0,037c	0,040b	0,036b	0,015a	0,031c	0,034c	0,030a	0,022b
L. plantarum +Alginate	0,015a	0,030a	0,039d	0,043d	0,038c	0,015a	0,034c	0,038c	0,031a	0,027d
LSD 0,05										

*Ghi chú: *Do giá trị của lycopene nhỏ, do đó giá trị của LSD rất rất nhỏ nên không trình bày dưới bảng. Do vậy, số liệu của các chữ cái giống nhau không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê.*

Số liệu ở bảng 12 cho thấy trong quá trình bảo quản, quả đã xử lý có hàm lượng lycopene cao nhất so đối chứng và hàm lượng lycopene cao nhất ở nghiệm thức có kết hợp giữa vi khuẩn và alginate.

Hàm lượng lycopene phụ thuộc vào giai đoạn chín và điều kiện phát triển của quả. Do đó, quá trình chín có liên quan đến sự gia tăng hàm lượng lycopene. Hơn nữa, sự thay đổi trong khí quyển (vi môi trường trên vỏ trái khi có bổ sung vi khuẩn *L. plantarum* kết hợp với alginate) có thể cản trở quá trình tổng hợp sắc tố, giảm các hoạt động trao đổi chất của trái cây dẫn đến sản xuất ethylene thấp hơn và giảm thay đổi sinh lý (Tigist *et al.,* 2015).

3.6.3. Đánh giá cảm quan của bưởi da xanh sau thời gian tồn trữ



Hình 4. Đánh giá cảm quan bưởi da xanh sau thời gian tồn trữ

Kết quả khảo sát cảm quan ở 7 chỉ tiêu: màu sắc vỏ trái, cấu trúc vỏ trái, mùi của trái, cấu trúc thịt quả, màu sắc thịt quả, vị thịt quả, mức độ tách thịt quả thì nghiệm thức 3 - xử lý bởi *Lactobacillus* kết hợp với alginate đều ở mức gần với 4 mức tốt nhất.

Hình 5. Kết quả sau 40 ngày bảo quản ở các nghiệm thức

Ghi chú: a. Xử lý Lactobacillus plantarum; b. Xử lý alginate; c. Xử lý biofilm; d. Đối chứng

Theo Arno Kroner (2020). *Lactobacillus plantarum* còn được gọi là "lợi khuẩn", có tác dụng kích thích hệ tiêu hóa, chống lại vi khuẩn gây bệnh và giúp cơ thể sản xuất vitamin. Nhiều người bổ sung

vi khuẩn này dưới dạng probiotic để điều trị hoặc ngăn ngừa các vấn đề sức khỏe như dị ứng theo mùa, hội chứng ruột kích thích… Bên cạnh đó, Alginate là một nhóm polysaccharide có tính nhớt, chiết xuất từ các loài tảo nâu được cho phép sử dụng làm màng bao thực phẩm, là chất tạo gel, chất ổn định, nhũ tương hóa (Brownlee, 2009). Do đó việc kết hợp *Lactobacillus plantarum* với Alginate tạo probiotic đã được sử dụng nhiều trong dược phẩm là hợp chất có lợi cho con người. Nên màng bao biofilm hỗ trợ cho tồn tại của vi khuẩn trên bề mặt trái bưởi tốt hơn đồng thời tạo được vi môi trường giúp hạn chế mất nước, hạn chế hao hụt khối lượng đồng thời giữ được màu sắc vỏ trái tốt hơn, là hợp chất an toàn cho sức khỏe của con người (Satyamitra, 2020).

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Đã phân lập được 2 dòng nấm gây bệnh sau thu hoạch trên trái bưởi da xanh thu thập tại 3 địa điểm ở tỉnh Bến Tre. Dựa trên hình thái, cơ quan sinh bào tử và hình thức sinh sản, cũng như dựa trên kỹ thuật sinh học phân tử, đã định loại được 2 dòng nấm gây bệnh là *Pomopsis* sp. và *Phytopthora* sp. với độ tương đồng 97,74% và 99,77%.

Trong điều kiện *in-vitro*, vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* có khả năng ức chế gần như hoàn toàn đối với 2 dòng vi nấm gây bệnh sau thu hoạch trên bưởi da xanh với đường kính trên 75 mm. Kết quả này có giá trị khoa học và có ý nghĩa thực tiễn rất lớn bởi cho đến nay chưa có thí nghiệm nào trong nước chứng minh khả năng ức chế nấm *Pomosis* sp. và *Phytopthora* sp. gây hại sau thu hoạch trên bưởi da xanh bằng vi khuẩn *Lactobacillus plantarum.*

Màng bao biofim có tác dụng hạn chế nấm bệnh trên bưởi sau 40 ngày bảo quản nhờ số vi khuẩn trên vỏ trái bưởi da xanh cao, làm giảm pH vỏ quả do đặc tính sinh acid của vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* là dữ liệu quan trọng góp phần kiểm soát sự xâm nhiễm nấm bệnh gây hại sau thu hoạch trên bưởi da xanh.

Chất lượng trái sau thu hoạch ngon hơn với chỉ tiêu sinh hóa hàm lượng đường tăng, acid giảm và hàm lượng lycopene cao. Đánh giá cảm quan và màu sắc vỏ trái vẫn giữ được màu đẹp và được ưa chuộng hơn so với nghiệm thức không xử lý màng bao biofiml.

4.2. Đề nghị

Thu thập và phân lập thêm các tác nhân gây hại sau thu hoạch trên bưởi da xanh.

Phát triển màng bao biofilm thành chế phẩm sinh học để ứng dụng trong bảo quản bưởi da xanh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ali, E., H. Mokhtar, H. D. Mohammad, T. Sadegh, 2013. Studying effects of edible coatings of Arabic gum andolive oil on the storage life and maintain quality of postharvest Sweet Lemon (Citrus Lemontta).International Journal of Agriculture and Crop Sciences. IJACS/2014/7-4/207-213.

2. Alexopoulos, C. J. (1996). *Introductory Mycology*. John Wiley & Sons, Inc. p. 869. ISBN 978-0-471-52229-4.

3. Arno Kroner, DAOM, Lac, 2020. The Benefits and Uses of Lactobacillus Plantarum. Verywellhealth, Holictic Health.

4. Belitz, H. D. and W. Grosch, 1992. Food Chemistry (second edition), Springer, p145,148, 295,391. Camelo, A. F. L., 2002.

5. Brownlee, I. A., Seal, C. J., Wilcox, M., Dettmar, P. W., & Pearson, J. P. (2009). *Applications of Alginates in Food*. In Alginates: Biology and Application (pp. 211-228).

6. FAO 1414-1992. *Manual microbiological analysis in the food control laboratory*.

7. Kim J. D., 2005. Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from Kimchi against *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiol.,* 33(4): 210-214.

8. Klaenhammer T. R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: 39-86.

9. Koch, R., 1876. *Untersuchungen über Bakterien: V. Die Ätiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des*. Bacillus anthrac. Cohns Beitrage zur Biologie der Pflanzen (bằng tiếng Đức) 2 (2): 277–310.

10. Lizara, C., 1993. Mango. In: Biochemistry of fruit ripening (Editors by G.B. Seymor, J.E. Taylor, G.A. Tucker). Springer, 255-271.

11. Lowe D., Arendt E., 2004. The use and effect of lactic acid bacteria in malting and brewing with their relationships to antifungal activity, mycotoxins and gushing: A review. *J. Inst. Brew.*, 110(3): 163-180.

12. Magnusson J. and Schnürer J., 2001. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *Coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 1-5.

13. Magnusson J., Ström K., Roos S., Sjögren J. and Schnürer J., 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.,* 219: 129-135.

14. Milani L. I. G., Fries L. I. M., Boeira L. S., Melo V. and Terra N. N., 1998. Bioprotection of frankfurter sausages. *Acta. Aliment.*, 27: 221-229.

15. Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Đình Quyến, Phạm Văn Ty. 2008. Vi sinh vật học - 3rd. - Hà Nội : Giáo dục, 2000. - 519 tr.

16. Onions, A. H. S., Allsopp, D., Eggins, H. O. W. (1981). *Smith's introduction to industrial mycology*(7th ed.). London, UK: Arnold. ISBN 978-0-7131-2811-6.

17. Pitt J. I. and Hocking A. D. (1999). *Fungi and Food spoilage*, second edition, An Aspen Publication Asoen Publishers, INC. Gaithersburg, Maryland.

18. Pitt, J. I., Hocking, A. D. (1999). *Fungi and food spoilage* (2nd ed.). Gaithersburg, Md.: Aspen Publications. ISBN 978-0834213067.

19. Thạch Thị Ngọc Yến, Nguyễn Văn Phong, Nguyễn Văn Thành, 2017. Nghiên cứu sự ức chế nấm gây thối quả chôm chôm *(Nephelium lappaceum* L.) trong điều kiện in-vitro. Tạp chí Nông nghiệp và PTNT-Kỳ 1+2-tháng 2 năm 2017. P87-94. (ISSN: 1859-4581).

20. Tigist, N. T., M. I. Ali, G. A. Wosene, 2015. Degradation and Formation of Fruit Color in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in Response to Storage Temperature. American Journal of Food Technology 10 (4)147-157, 2015 ISSN 1557-4571 / DOI: 10.3923/AJFT. 147.157.

21. Trần Linh Thước, Lê Thị Ái, Nguyễn Mỹ Phi Long (2009). Thực tập vi sinh IV. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh: 26-31.

22. Satyamitra L. Shekh, Aarti A. Boricha, Jony G. Chavda and Bharatkumar Rajiv Manuel Vyas (2020). *Probiotic potential of lyophilized Lactobacillus plantarum GP*. Annals of Microbiology (2020) 70:16

23. Viện Y học Ứng dụng Việt Nam, 2018. http://vienyhocungdung.vn/ban-biet-gi-ve-benh-do-nam-aspergillus-aspergillosis-20160322114302805.htm

RESEARCH AND APPLICATION OF BIOFILM TO LIMIT FUNGAL DISEASES AND INCREASE THE ABILITY TO PRESERVE BEN TRE POMELO (*CITRUS MAXIMA*) AFTER HARVEST

Thach Thi Ngoc Yen[1], Nguyen To Nguyen[2], Phan Ngo Quoc Bao[2]

[1]Mekong delta Development Research, Can Tho University

[2]Phan Van Tri High School, Ben Tre provine

Summary

Research and application of biofilm to limit fungal diseases and increase the ability to preserve Ben Tre pomelo (*Citrus maxima*) after harvest is carried out with the main goal of finding a reasonable solution to limit fungal diseases and increased postharvest storage in pomelo. The research results based on morphology, spore-forming organ and form of reproduction as well as based on molecular biology techniques (sequencing and lookup on the International NCBI gene bank) have identified two causitive pathogens namely *Phomopsis* sp. and *Phytopthora* sp. with 97.74% and 99.77% uniformity. In the in-vitro conditions, *Lactobacillus plantarum* was able to inhibit almost completely against 2 postharvest fungal strains on pomelo. Using biofilm envelope with *Lactobacillus plantarum* combined with alginate 0.03% has the effect of limiting fungal diseases on pomelo to 40 days of storage and thanks to lactic acid production properties as well as some bacteria's organic compounds reduces the pomelo skin PH, contributing to the control of infestation of harmful fungi, reduces fruit weight loss, maintains fruit quality in contrast with the levels of Brix, vitamin C and lycopene maintained after harvest pomelo.The sensory evaluation of the color of the skin of pomelo still retained the beautiful color as well as the quality and was preferred over the treatment without biofilm.

Keywords: *Alginate, pomelo (citrus maxima), Lactobacillus plantarum, Phomosis sp., Phytopthora sp.*

Người phản biện: GS.TS. Nguyễn Văn Tuất
Ngày nhận bài: 16/10/2020
Ngày thông qua phản biện: 17/11/2020
Ngày duyệt đăng: 24/11/2020