



Original Article

Isolation, Selection and Cultivation of Antagonistic Lactic Acid Bacteria Against Postharvest Pathogenic Fungi in Grapes

Ngo Thi Tuong Chau^{1,*}, Nguyen Nhu Yen², Nguyen Thi Tu Le¹,
Phan Thi Thao Ly³, Le Van Thien¹

¹VNU University of Science, 334 Nguyen Trai, Thanh Xuan, Hanoi, Vietnam

²Hanoi University of Natural Resources and Environment,
41A Phu Dien, Phu Dien, North Tu Liem, Hanoi, Vietnam

³The University of Danang, Hoa Quy, Ngu Hanh Son, Da Nang, Vietnam

Received 19 August 2023

Revised 19 October 2023; Accepted 21 November 2023

Abstract: Incorporation of probiotics with edible coatings to preserve and improve the shelf life of fresh fruits has gained more popularity in the food industry. This study aimed to isolate, select lactic acid bacteria (LAB) that are antagonistic to postharvest pathogenic fungi in grapes (*Vitis vinifera* L.), and determine the optimal conditions for their biomass production. Fungi were isolated from decaying grapes on Potato Dextrose Agar medium (PDA) supplemented with 1% Chloramphenicol at 25 °C for five to seven days. LAB were isolated on MRS agar medium at 37 °C for two to three days. Isolates with antifungal capability were selected using the overlay technique. LAB were cultured in MRS broth at pH 4-8, 25-40 °C for two to five days. Effects of pH and temperature on the antifungal activity of cell-free supernatant (CFS) were investigated at respectively pHs of 4.5 to 6.5 and temperatures of 60, 80 and 100 °C for 2 hours. We identified and selected the fungal strain Nn4 with high infection density (1.5×10^5 CFU/g) to be the grape postharvest pathogenic fungus of interest. For antagonistic bacteria, we selected the lactic acid bacterial strain Ln9 with the highest antifungal activity against strain Nn4 (37.9 mm in diameter). The suitable cultivation conditions for biomass production of strain Ln9 were at pH 5.0, 30 °C for 2 days. The antifungal activity of CFS was drastically reduced when the medium pH was adjusted to 6.5 but not reduced after heat treatment. It is evidential that the antifungal properties of probiotics can be related to the production of organic acids.

Keywords: Antifungal activity, probiotics, postharvest pathogenic fungi, grapes, lactic acid bacteria.

* Corresponding author.

E-mail address: ngotuongchau@hus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1094/vnuces.4996>

Phân lập, tuyển chọn và nuôi cấy chủng vi khuẩn lactic đổi kháng với chủng nấm mốc gây thối hỏng quả nho

Ngô Thị Tường Châu^{1,*}, Nguyễn Như Yên², Nguyễn Thị Tú Lệ¹,
Phan Thị Thảo Ly³, Lê Văn Thiện¹

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội,
334 Nguyễn Trãi, Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Tài nguyên và Môi trường Hà Nội, 41A Phú Diễn, Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

³Đại học Đà Nẵng, Hòa Quý, Ngũ Hành Sơn, Đà Nẵng, Việt Nam

Nhận ngày 19 tháng 8 năm 2023

Chỉnh sửa ngày 19 tháng 10 năm 2023; Chấp nhận đăng ngày 21 tháng 11 năm 2023

Tóm tắt: Kết hợp lợi khuẩn vào lớp phủ ăn được nhằm bảo quản và cải thiện thời hạn sử dụng của quả tươi đã trở nên phổ biến hơn trong công nghiệp thực phẩm. Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập, tuyển chọn vi khuẩn lactic (LAB) đổi kháng với nấm mốc gây thối hỏng quả nho (*Vitis vinifera* L.) sau thu hoạch, và xác định các điều kiện thích hợp cho quá trình tạo sinh khối của chúng. Nấm mốc được phân lập trên môi trường Potato Dextrose Agar (PDA) có bổ sung 1% Chloramphenicol ở 25 °C trong 5-7 ngày. LAB được phân lập trên môi trường thạch de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) ở 37 °C trong 2-3 ngày. Các chủng vi khuẩn được phân lập có khả năng đổi kháng cao với nấm mốc đã được tuyển chọn bằng phương pháp đĩa thạch 2 lớp. LAB được nuôi cấy trong MRS dịch thể ở pH 4,0-8,0, 20-40 °C trong 1-5 ngày. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến hoạt tính kháng nấm của dịch nổi vô bào (CFS) được khảo sát ở các mức pH tương ứng từ 4,5 đến 6,5, nhiệt độ 60, 80 và 100 °C trong 2 giờ. Chúng tôi đã xác định và tuyển chọn được chủng Nn4 với mật độ nhiễm cao ($1,5 \times 10^5$ CFU/g) là chủng nấm mốc gây thối hỏng quả nho sau thu hoạch được quan tâm. Đối với vi khuẩn đổi kháng, chúng tôi đã tuyển chọn được chủng Ln9 có khả năng đổi kháng cao nhất với chủng Nn4 (đường kính vòng ức chế đạt 37,6 mm). Các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho quá trình tạo sinh khối của chủng Ln9 là ở pH 5,0, 30 °C trong 2 ngày. Hoạt tính kháng nấm của CFS giảm đáng kể khi pH môi trường được điều chỉnh đến 6,5 nhưng không giảm sau xử lý nhiệt. Điều này cho thấy đặc tính kháng nấm của lợi khuẩn có thể liên quan đến sự sản xuất các acid hữu cơ.

Từ khoá: Hoạt tính kháng nấm, lợi khuẩn, nấm mốc gây thối hỏng sau thu hoạch, nho, vi khuẩn lactic.

1. Mở đầu

Nho (*Vitis vinifera* L.) là một trong số các loại quả được tiêu thụ nhiều nhất trên thế giới [1]. Nho tươi rất giàu khoáng chất, vitamin, carbohydrate và chất chống oxy hóa [2]. Do có vỏ mỏng và độ pH tương đối thấp, nho rất dễ bị

thương tổn và xâm chiếm bởi nấm mốc [3]. Ước tính lên đến 40% tổng sản lượng nho sau thu hoạch đã bị mất đi bởi sự thối hỏng do nấm mốc [4]. Hiện nay, chống nấm mốc bằng xông khí sulfur dioxide (SO₂) vẫn là phương pháp phổ biến để hạn chế tổn thất sau thu hoạch trên nho, tuy nhiên có nguy cơ gây độc cho nho cũng như

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: ngotuongchau@hus.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1094/vnuees.4996>

gặp phải sự lo ngại ngày càng tăng từ người tiêu dùng không dung nạp sulfite [5]. Vì vậy, vài năm gần đây, lớp phủ ăn được đã thu hút sự quan tâm trên toàn cầu như là một kỹ thuật bảo quản quả tươi đầy hứa hẹn [6]. Đặc biệt, sự kết hợp lợi khuẩn vào lớp phủ ăn được nhằm cải thiện chất lượng, chức năng và thời hạn sử dụng quả tươi là một trong những giải pháp mới nhất của ngành công nghiệp thực phẩm [7].

Trong số các lợi khuẩn, vi khuẩn lactic (LAB) đã thể hiện những tiềm năng nổi trội như: i) Sản có trong một số thực phẩm; ii) Thường được công nhận là an toàn (GRAS); iii) Được sử dụng phổ biến trong ngành công nghiệp thực phẩm; và iv) Hoạt động như một tác nhân kiểm soát sinh học do khả năng sản xuất các hợp chất kháng vi sinh vật. Trong đó, các dẫn xuất hydroxy của các acid béo (như acid palmitic, stearic, oleic và linoleic), các acid hữu cơ (như acid phenyllactate, lactic, acetic và propionic) và các di-peptide mạch vòng (diketopiperazine) do LAB sản xuất có hiệu quả cao trong chống lại một số nấm bệnh [8]. LAB đã được sử dụng thay thế cho hoá chất chống nấm mốc ở quả tươi, tuy nhiên việc phun trực tiếp LAB lên bề mặt quả có thể ảnh hưởng xấu đến một số đặc tính vật lý hoặc cảm quan, giảm khả năng chấp nhận sản phẩm của người tiêu dùng và thậm chí làm giảm sự tồn tại của LAB trong quá trình bảo quản [8]. Do đó, việc kết hợp lợi khuẩn vào lớp phủ ăn được được coi là một giải pháp khả thi để khắc phục các hạn chế này [9]. Marín và cộng sự (2019) cũng đã chỉ ra rằng việc kết hợp *L. plantarum* vào các lớp phủ ăn được từ tinh bột khoai tây biến tính và sodium caseinate (với acid oleic là chất hoạt động bề mặt) đã làm giảm sự phát triển của nấm mốc *Botrytis cinerea* trên bề mặt quả nho [10]. Ngoài ra, sự kết hợp của lợi khuẩn vào lớp phủ ăn được cho phép chúng tiếp cận với đường ruột của người tiêu dùng và hiện diện với một mật độ thích hợp để có thể mang lại các lợi ích về sức khỏe (như hỗ trợ tiêu hóa, tăng cường hệ miễn dịch, phòng ngừa nhiễm khuẩn và tổng hợp vitamin,...) do đó tạo ra giá trị gia tăng cho sản phẩm thực phẩm [7]. Tuy nhiên vẫn chưa có một công trình nghiên cứu nào ở nước ta tiến hành theo hướng này.

Ninh Thuận là tỉnh ven biển thuộc vùng duyên hải Nam Trung Bộ, có khí hậu rất khắc nghiệt, ít mưa, nhiều nắng và nhiều gió. Thế nhưng sự khắc nghiệt của vùng đất này lại là lợi thế để phát triển các loại cây trồng đặc thù, nhất là cây nho. Cây nho ở Ninh Thuận nổi tiếng cả nước với cái tên sản vật gắn liền với địa danh “Nho Ninh Thuận” và cũng được xem là cây có giá trị kinh tế nhất trong các loại cây trồng, đem lại nguồn thu nhập lớn cho nông dân Ninh Thuận. Năm 2022 diện tích trồng nho trên địa bàn toàn tỉnh là 1.052,8 ha, sản lượng đạt 25.705 tấn [11].

Để tạo nguồn LAB cho sản xuất lớp phủ ăn được ứng dụng trên quả nho tươi Ninh Thuận sau thu hoạch, nghiên cứu này đã tiến hành phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn lactic có khả năng đối kháng với chủng nấm mốc gây thối hỏng quả nho. Đồng thời xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp cho quá trình tạo sinh khối và ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến hoạt tính kháng nấm của dịch nổi vô bào (CFS).

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các quả nho tươi thuộc giống nho đỏ (Red Cardinal) phục tráng, là giống nho ăn tươi chủ lực chiếm 63,36% ở tỉnh Ninh Thuận, đã được thu thập tại bốn vườn trồng nho thuộc các huyện Ninh Phước, Ninh Hải, Thuận Bắc và Phan Rang (tỉnh Ninh Thuận) vào mùa thu hoạch vụ Xuân-Hè (tháng 4/2022) (50 quả/vườn) theo phương pháp lấy mẫu quả tươi trên vườn sản xuất [12]. Mỗi vườn lấy một mẫu thử nghiệm (mẫu hỗn hợp) theo hình zigzag với 5 điểm lấy mẫu đơn (10 quả/điểm). Lựa chọn các quả có cùng kích cỡ, hình dạng bình thường, không có dấu hiệu thối hỏng do vi sinh vật hoặc tổn thương vật lý và chín đỏ đều, sau đó xếp mẫu vào các hộp nhựa, bảo quản ở nhiệt độ 10 °C-15 °C sử dụng thùng cách nhiệt có chứa đá lạnh và nhanh chóng vận chuyển (trong vòng 24 giờ) về Phòng thí nghiệm Nghiên cứu Môi trường và Thực phẩm

của Khoa Môi trường, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phân lập nấm mốc gây thối hỏng quả nho

Lấy ngẫu nhiên 25 quả nho từ mỗi mẫu, đặt trong các hộp nhựa, giữ ở nhiệt độ thường (30-32 °C). Khi triệu chứng bệnh xuất hiện rõ ràng (sau 5-7 ngày), mỗi nhóm chọn ra 5 quả mới nhiễm bệnh để xác định mức độ nhiễm nấm mốc theo TCVN 82751: 2010 [13] và tiến hành phân lập. Trước tiên, các quả bị thối hỏng được khử trùng bề mặt bằng dung dịch sodium hypochlorite 1% trong 1 phút và rửa lại bằng nước cất 3 lần nhằm loại bỏ các vi sinh vật bên ngoài vỏ quả, hạn chế sự tạp nhiễm trong quá trình phân lập nấm gây bệnh, đồng thời không ảnh hưởng đến sự hiện diện của các chủng nấm mốc một khi đã xâm nhập vào quả. Sau đó những phần bị thối hỏng được đặt trên các đĩa môi trường Potato Dextrose Agar (PDA) (HiMedia, Ấn Độ) có bổ sung 1% Chloramphenicol để ức chế sự phát triển của vi khuẩn và ủ ở 25 °C, trong 5-7 ngày. Chọn các khuẩn lạc nấm mốc có hình thái đặc trưng và cấy chuyển sang các đĩa môi trường PDA bằng phương pháp cấy điểm để thu các chủng nấm thuần khiết và đơn khuẩn lạc.

2.2.2. Thử nghiệm khả năng gây bệnh của nấm

Thử nghiệm lặp lại 3 lần độc lập trên quả nho khỏe với các chủng nấm được phân lập. Đầu tiên, khử trùng bề mặt quả bằng cách rửa với dung dịch sodium hypochlorite 0,1% trong 1 phút, rửa lại với nước máy và để khô không khí ở nhiệt độ thường. Sau đó, tạo một vết thương (đường kính 3 mm, sâu 3 mm) trên bề mặt quả bằng một kim giải phẫu vô trùng [14]. Để đánh giá khả năng gây bệnh của nấm, nấm được nuôi cấy 7-15 ngày trước đó ở 25 °C trên môi trường PDA. Bào tử được cạo ra khỏi môi trường thạch bằng cách sử dụng một vòng đầu que cấy vô trùng và chuyển vào nước cất vô trùng chứa 0,01% Tween 85. Huyền phù bào tử được phân tán khoảng 5 phút trong một bể siêu âm và nồng độ cuối cùng được điều chỉnh đến 10^4 bào tử/ml bằng một buồng đếm tế bào. Cấy 10 μ l dịch huyền phù bào tử vào

vết thương của các quả nho và các quả được cấy với 10 μ l nước vô trùng vào vết thương được sử dụng làm đối chứng. Các quả sau khi cấy được giữ trong các hộp nhựa đậy kín để duy trì độ ẩm cao và ủ ở 25 °C trong 5-7 ngày. Kiểm tra vết bệnh và phân lập nấm từ các vết bệnh trên quả nho. Xác nhận các đặc điểm hình thái tương tự như các chủng phân lập ban đầu. Các chủng nấm đạt tiêu chuẩn theo định đề của Koch (liên quan đến bệnh và các tổn thương đặc trưng của bệnh; được phân lập từ vật chủ nhiễm bệnh, sinh trưởng và phát triển trong môi trường nuôi cấy; có khả năng gây bệnh khi gây nhiễm vào vật chủ mẫn cảm; và được tái phân lập từ vật chủ bị gây nhiễm bệnh) [15, 16] được chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.2.3. Phân lập LAB từ quả nho

Chọn các quả nho tươi không bị dập nát hoặc nhiễm bệnh và bỏ làm bốn bằng dao vô trùng. Cân 10 g mẫu và cho vào một túi dập mẫu, thêm 90 ml dung dịch nước muối pepton vô trùng và đặt túi vào trong máy dập mẫu để đồng nhất mẫu trong khoảng 2 phút. Dịch huyền phù được pha loãng theo dãy thập phân và cấy trên đĩa môi trường thạch de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (Merck, Đức) bằng phương pháp hộp đổ [17]. Các đĩa được nuôi cấy ở 37 °C, trong 2-3 ngày. Quan sát hình thái khuẩn lạc và tế bào, nhuộm Gram, kiểm tra hoạt tính catalase dựa vào khả năng tạo bọt hay không tạo bọt khi nhỏ dung dịch H₂O₂ 3% lên khuẩn lạc [18] và hoạt tính oxidase dựa vào khả năng làm thay đổi màu Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride 1% của các chủng vi khuẩn [19]. Các chủng LAB được cấy chuyển sang môi trường thạch MRS bằng phương pháp cấy rìa để thu được các chủng thuần khiết. Lưu giữ các chủng LAB trên môi trường thạch nghiêng MRS ở 4 °C.

2.2.4. Tuyển chọn vi khuẩn lactic đối kháng với nấm mốc gây thối hỏng quả nho

Các chủng LAB đối kháng với nấm được tuyển chọn bằng phương pháp đĩa thạch 2 lớp (đường kính đĩa thạch là 90 mm) [20]. Trước thử nghiệm, các chủng LAB được nuôi cấy 24 giờ trong môi trường MRS dịch thể (Merck, Đức) ở 37 °C và nấm mốc được nuôi cấy trên môi trường

PDA ở 25 °C trong 72 giờ. Dịch huyền phù bào tử nấm được chuẩn bị bằng cách phân tán bào tử trong 10 ml dung dịch NaCl 0,9% chứa 0,2% Tween 80. Trước tiên, nhỏ 20 µl dịch vi khuẩn ($OD_{600} = 0,5$) vào chính giữa bề mặt của đĩa chứa một lớp môi trường thạch MRS và ủ ở 30 °C trong 2-3 ngày. Sau đó, đổ thêm một lớp môi trường PDA chứa khoảng 10^4 bào tử nấm/ml lên trên bề mặt của đĩa và ủ ở 25 °C trong 3-5 ngày. Kiểm tra sự hình thành các vòng ức chế sự phát triển của nấm xung quanh khuẩn lạc vi khuẩn. Khả năng đối kháng được đánh giá thông qua đường kính của vòng ức chế.

2.2.5. Định danh chủng vi khuẩn lactic được tuyển chọn

i) Tách chiết DNA tổng số của vi khuẩn

Thu sinh khối tế bào bằng cách ly tâm dịch nuôi cấy với vận tốc 6.000 vòng/phút ở 4 °C trong 10 phút. Hòa tan mẫu trong 400 µl dung dịch đệm ly giải rồi lắc kỹ cho tan tủa. Bổ sung 50 µl lysozyme và ủ ở 37 °C trong 30 phút. Bổ sung 20 µl proteinase K rồi ủ ở 56 °C trong 2 giờ. Bổ sung phenol (tỷ lệ 1:1, v/v), lắc đều và ly tâm 12.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4 °C. Hút pha trên chuyển sang eppendorf mới, bổ sung dung dịch chứa chloroform: isoamyl alcohol (24:1) với tỷ lệ 1:1 (v/v) lắc nhẹ sau đó ly tâm 12.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4 °C. Hút pha trên chuyển sang eppendorf mới và tủa DNA bằng cồn tuyệt đối, giữ ở -20 °C trong 2-3 giờ. Ly tâm 12.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4 °C, thu tủa DNA. Rửa tủa bằng cồn 70%, ly tâm 12.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4 °C. Làm khô kết tủa và hòa tan kết tủa trong nước khử ion vô trùng [21];

ii) Nhân đoạn gen mã hóa 16S rRNA bằng kỹ thuật PCR

Thành phần của phản ứng PCR để nhân đoạn gen mã hóa 16S rRNA bao gồm: buffer taq (10 X) 2,5 µl, $MgCl_2$ (25 mM) 3 µl, dNTPs (10 mM) 0,625 µl, mỗi 341F (20 µM) 1,4 µl, mỗi 907R (20 µM) 1,4 µl, Taq (5 U/µl) 0,3 µl, DNA tổng số 0,5 µl và bổ sung nước đến 25 µl. Chu trình nhiệt của phản ứng: bước 1: 95 °C-5 phút, bước 2: 95 °C-1 phút, bước 3: 58 °C-55 giây, bước 4: 72 °C-1 phút, lặp lại 35 chu kỳ từ bước 2 đến 4, bước 5: 72 °C-7 phút và bước 6: 4 °C-∞.

Sản phẩm PCR được làm sạch bằng kit Qiaquick® Mini Columns (Qiagen-Đức);

iii) Xác định và phân tích trình tự đoạn gen mã hóa 16S rRNA

Trình tự của đoạn gen mã hóa 16S rRNA được xác định theo phương pháp của Sanger sử dụng máy đọc trình tự tự động ABI PRISM 3100 Avant Data Collection v1.0 và Sequence Analysis. Sau đó, trình tự của đoạn gen mã hóa 16S rRNA được so sánh với các đoạn gen mã hóa 16S rRNA đã được công bố trên cơ sở dữ liệu GenBank-NCBI sử dụng công cụ BLAST. Công việc này được tiến hành tại Công ty Trách nhiệm Hữu hạn T&N Biosolution (Thủ Đức, thành phố Hồ Chí Minh).

2.2.6. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến quá trình tạo sinh khối của LAB

Hoạt hóa các chủng LAB bằng cách cấy chuyển vào môi trường MRS dịch thể và nuôi cấy ở 37 °C trong 24 giờ. Cấy dịch nuôi cấy LAB vào các bình tam giác chứa 100 ml môi trường MRS dịch thể ở pH 4,0-8,0 và nuôi cấy ở nhiệt độ 20-40 °C trong 1-5 ngày. Đo mật độ OD tại bước sóng 600 nm.

2.2.7. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến hoạt tính kháng nấm của CFS

Thu hồi CFS của LAB bằng cách loại bỏ các tế bào sau khi ly tâm dịch nuôi cấy ở 4 °C, tốc độ 5.000 vòng/phút, trong 15 phút và lọc qua màng lọc có kích thước lỗ 0,45 µm. Để kiểm tra ảnh hưởng của pH đến hoạt tính kháng nấm, pH của CFS (pH 4,0) đã được điều chỉnh đến pH 4,5, pH 5,5 và pH 6,5 bằng dung dịch NaOH 1M. Để kiểm tra ảnh hưởng của nhiệt độ pH đến hoạt tính kháng nấm, CFS đã được đặt trong các bể ổn nhiệt tại 60, 80 hoặc 100 °C trong 2 giờ. Xác định hoạt tính kháng nấm bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Theo đó, các đĩa thạch PDA chứa 10^4 bào tử nấm/ml đã được chuẩn bị và các giếng (đường kính 5 mm) được tạo ra trên đĩa thạch. Nhỏ 100 µl CFS vào giếng và ủ ở 25 °C trong 2 ngày. Kiểm tra sự hình thành các vòng ức chế nấm xung quanh giếng. Hoạt tính kháng nấm của CFS được đánh giá thông qua kích thước đường kính vòng ức chế (mm) [20]. Hoạt tính tại pH và nhiệt độ tối ưu được xác định là 100%.

2.2.8. Phương pháp xử lý số liệu

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được phân tích thống kê bằng phân tích phương sai

một chiều (ANOVA) và các giá trị trung bình được so sánh bởi Duncan's test sử dụng SPSS 17.0. Sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các giá trị trung bình được xác định với $p < 0,05$.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của nấm mốc phân lập từ quả nho bị thối hỏng

Mẫu	Ký hiệu chủng	Màu sắc (mặt trước/sau)
Ninh Phước-Ninh Thuận	Nn1	Tán nấm màu vàng, mọc tạo vòng, có những sợi cam, sợi khuẩn ty không mọc bông xốp.
	Nn2	Tán nấm đều, màu xanh đen, vòng ngoài màu trắng, sợi khuẩn ty không mọc bông xốp trên bề mặt.
	Nn3	Tán nấm màu xanh trắng, mọc đều, vòng rìa ngoài trắng, không tạo bông xốp trên bề mặt.
Ninh Hải-Ninh Thuận	Nn4	Tán nấm màu xanh, tạo bông xốp trên bề mặt.
	Nn5	Tán nấm màu đều, màu đen, vòng ngoài màu trắng, không tạo bông xốp trên bề mặt.
	Nn6	Tán nấm đều, màu trắng, không tạo bông xốp trên bề mặt.
Thuận Bắc-Ninh Thuận	Nn7	Tán nấm đều, màu trắng sữa, không tạo bông xốp trên bề mặt.
	Nn8	Tán nấm màu xanh, tâm nấm xanh đậm, viền ngoài màu trắng, không tạo bông xốp trên bề mặt.
	Nn9	Tán nấm màu vàng chanh, vòng ngoài màu trắng, sợi khuẩn ty mọc bông xốp trên bề mặt.
Phan Rang-Ninh Thuận	Nn10	Tán nấm màu trắng, rìa ngoài tán nấm màu xanh, sợi khuẩn ty tạo bông trắng xốp, mặt sau tán nấm màu xanh đen.
	Nn11	Mặt trước tán nấm màu trắng, mặt sau rìa ngoài màu trắng, vòng giữa có màu vàng, tâm nấm màu xanh.
	Nn12	Tán nấm màu xanh, rìa ngoài tán nấm trắng, không tạo bông xốp trên bề mặt, mặt sau tán nấm màu trắng.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Phân lập các chủng nấm mốc trên quả nho

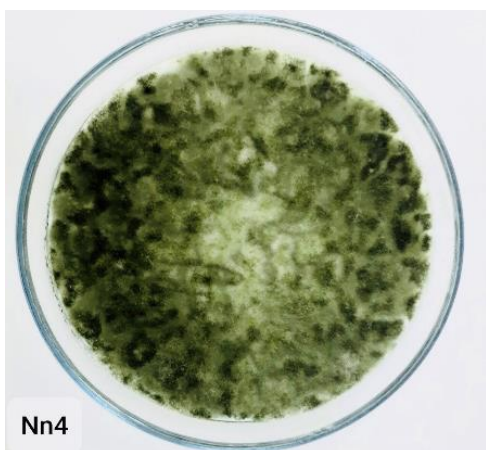
Tất cả quả nho bị thối hỏng ($n = 20$) của các mẫu thu từ các vườn khác nhau đã được sử dụng để phân lập nấm. Bước đầu thu được 12 khuẩn lạc khác nhau về hình thái trên các đĩa môi trường PDA có bổ sung 1% Chloramphenicol (Bảng 1). Các chủng phân lập được phân nhóm theo các đặc điểm hình thái như màu sắc của sợi nấm, kết cấu và rìa của khuẩn lạc. Điều này cho thấy nho bị thối hỏng chứa nhiều loại nấm khác nhau. Theo Lorenzini và cộng sự (2018), hệ nấm bao gồm cả loại nấm gây bệnh sau thu hoạch và không gây bệnh nên cần kiểm tra khả năng gây bệnh của các chủng phân lập được để loại trừ các chủng không gây bệnh [22].

3.2. Sàng lọc các chủng nấm có khả năng gây bệnh từ các chủng nấm được phân lập

Từ thử nghiệm gây bệnh ban đầu, trong số 12 chủng được phân lập, chỉ có 03 chủng (ký hiệu là Nn2, Nn4, Nn9) (Hình 1) tạo ra các triệu chứng bệnh có thể được phát hiện sau gây nhiễm 6 ngày. Tiếp tục đánh giá khả năng gây bệnh của chúng bằng cách tái phân lập từ quả nho bị gây nhiễm, kết quả đã xác định và phân lập được chủng nấm mốc Nn4 trên môi trường PDA có bổ sung 1% Chloramphenicol sau 5 ngày nuôi cấy ở 25 °C. Chủng nấm mốc Nn4 gây thối hỏng quả nho cũng được xác định có mật độ nhiễm cao ($1,5 \times 10^3$ CFU/g).

Để định danh chủng nấm mốc Nn4, trình tự nucleotide của đoạn gen ITS được khuếch đại sử

dụng cặp mồi ITS1/ITS4. Kết quả cho thấy, trình tự đang khảo sát tương đồng cao (100%) với trình tự trên GenBank-NCBI của chủng *Alternaria alternata* F6110. Vì vậy, chủng Nn4 được định tên là *A. alternata* Nn4.



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc của chủng nấm mốc Nn4 gây bệnh được phân lập từ quả nho.

3.3. Phân lập và tuyển chọn LAB từ quả nho

Từ các mẫu nho tươi không bị dập nát hoặc nhiễm bệnh ($n = 20$) đã bước đầu phân lập được 15 khuẩn lạc khác nhau về hình thái trên các đĩa môi trường MRS (ký hiệu từ Ln1 đến Ln15) (Bảng 2). Với kết quả là trực khuẩn, Gram dương, catalase và oxidase âm tính, tất cả các chủng vi khuẩn này được giả định là LAB [23]. Tiếp tục đánh giá hoạt tính đối kháng với nấm của các chủng LAB theo phương pháp đĩa thạch 2 lớp. Kết quả cho thấy chủng Ln9 có khả năng đối kháng với chủng nấm Nn4 là cao nhất (đường kính vòng ức chế đạt đến 37,6 mm) (Hình 2). Tiến hành khuếch đại vùng gen 16S rRNA với cặp mồi 27F/1492R và giải trình tự bằng phương pháp Sanger và BLAST đối chiếu trên NCBI, kết quả cho thấy trình tự gen 16S rRNA của chủng Ln9 tương đồng 99,93% so với trình tự vùng gen tương ứng của của chủng *Lactobacillus plantarum* NWL22 (HQ293045) và *L. plantarum* MGC11-4 (HM058409). Vì vậy, chủng Ln9 được định tên là *L. plantarum* Ln9.

Bảng 2. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và khả năng đối kháng với chủng nấm Nn4 của vi khuẩn lactic phân lập từ quả nho

STT	Nguồn gốc phân lập	Kí hiệu chủng	Đặc điểm khuẩn lạc					Đường kính vòng ức chế (mm)
			Màu sắc	Hình dạng	Bề mặt	Viền	Kích thước (mm)	
1	Ninh Phước-Ninh Thuận	Ln1	Trắng	Tròn	Nổi, nhẵn	Trơn	4	31,2
2		Ln2	Trắng	Tròn	Nổi, nhẵn	Trơn	3	29,7
3		Ln3	Trắng sữa	Tròn	Đẹt, nhẵn	Trơn	3	32,1
4	Ninh Hải-Ninh Thuận	Ln4	Vàng	Tròn	Đẹt, nhẵn	Trơn	3	27,8
5		Ln5	Vàng nhạt	Tròn	Lồi, nhẵn	Trơn	2	35,4
6		Ln6	Vàng nhạt	Chuôi	Lồi, nhẵn	Trơn	15	28,0
7	Thuận Bắc-Ninh Thuận	Ln7	Vàng nhạt	Vô định	Đẹt, nhậy nhót	Răng cưa	1,5	34,3
8		Ln8	Vàng nhạt	Tròn	Lồi, nhẵn	Trơn	2	32,7
9	Phan Rang-Ninh Thuận	Ln9	trắng sữa	tròn	Đẹt, nhẵn	trơn	3,5	37,6
10		Ln10	Vàng	Tròn	Đẹt, nhẵn	Trơn	3,5	31,8
11		Ln11	Vàng nhạt	Tròn	Lồi, nhẵn	Trơn	2	36,2
12		Ln12	Trắng	Vô định	Có máu lồi, nhẵn	Trơn	1	21,7
13		Ln13	Trắng sữa	Tròn	Lồi, nhẵn	Trơn	1,5	35,1
14		Ln14	Vàng nhạt	Vô định	Gói	Trơn	2	29,0
15		Ln15	Trắng sữa	Tròn	Đẹt, nhẵn	Trơn	2,5	32,5



Hình 2. Hoạt tính đối kháng với chủng Nn4 gây thối hồng quả nho của chủng Ln9.

3.4. Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến quá trình tạo sinh khối của chủng *L. plantarum* Ln9

3.4.1. pH ban đầu của môi trường

Tiến hành nuôi cấy chủng *L. plantarum* Ln9 trong môi trường MRS dịch thể với pH 4,0–8,0, ở nhiệt độ 30 °C, trong 2 ngày, kết quả cho thấy sinh khối đạt cao nhất ở pH 6,0 (Bảng 3). Tương tự, chủng *L. plantarum* ZZUA493 đối kháng với nấm có khả năng sinh trưởng và phát triển trong môi trường MRS dịch thể với pH 3-10, tối ưu ở pH 5,5 và 6,0 [24].

3.4.2. Nhiệt độ nuôi cấy

Tiến hành nuôi cấy chủng *L. plantarum* Ln9 trong môi trường MRS dịch thể (pH 6,0), ở nhiệt độ 25-40 °C trong 2 ngày, kết quả cho thấy sinh khối đạt cao nhất tại 30 °C (Bảng 4). Trong khi đó, chủng *L. plantarum* ZZUA493 đối kháng với

Bảng 3. Ảnh hưởng của pH đến quá trình tạo sinh khối của chủng *L. plantarum* Ln9

pH	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0
OD ₆₀₀	1,970 ^e	2,335 ^c	2,530 ^a	2,445 ^b	2,225 ^d
Sinh khối (g/l)	0,541 ^e	0,648 ^c	0,705 ^a	0,680 ^b	0,615 ^d

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một hàng chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test).

Bảng 4. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi cấy đến quá trình tạo sinh khối của chủng *L. plantarum* Ln9

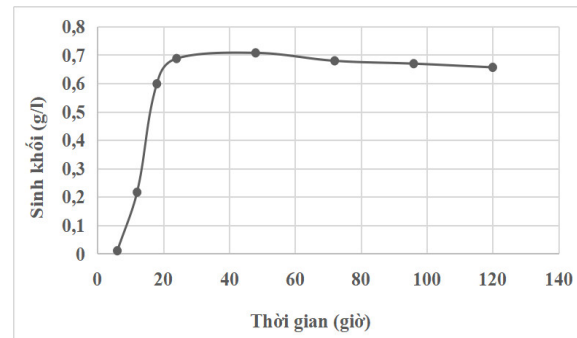
Nhiệt độ (°C)	20	25	30	35	40
OD ₆₀₀	1,974 ^c	2,204 ^d	2,536 ^a	2,476 ^b	2,31 ^c
Sinh khối (g/l)	0,542 ^c	0,609 ^d	0,707 ^a	0,689 ^b	0,64 ^c

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng một hàng chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test).

nấm, khi nuôi cấy trong môi trường MRS dịch thể, có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt trong khoảng nhiệt độ 10-40 °C [24].

3.4.3. Thời gian nuôi cấy

Tiến hành nuôi cấy chủng *L. plantarum* Ln9 trong môi trường MRS dịch thể ở pH 6,0 và nhiệt độ 30 °C trong 2-5 ngày, kết quả cho thấy sinh khối đạt cao nhất sau 2 ngày (Hình 3). So với chủng *L. plantarum* ZZUA493 đối kháng với nấm có thời gian sinh trưởng và phát triển tối ưu là sau 12 giờ [24], chủng *L. plantarum* Ln9 có thời gian nuôi cấy tối ưu cho khả năng tạo sinh khối là dài hơn.



Hình 3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến quá trình tạo sinh khối của chủng *L. plantarum* Ln9.

Ngoài ra, tại thời điểm nuôi cấy tối ưu, pH của môi trường giảm nhanh chóng. Điều này có thể là do các axit hữu cơ được vi khuẩn lactic sản xuất và tích lũy vào trong môi trường. Đồng thời đây còn được xem là một trong số cơ chế kháng nấm gây bệnh của vi khuẩn lactic.

3.5. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến hoạt tính kháng nấm của CFS

Để xác định bản chất của các hợp chất chuyển hoá kháng nấm, tiến hành thu hồi CFS của chủng *L. plantarum* Ln9 sau nuôi cấy trong môi trường MRS dịch thể ở điều kiện tối ưu và khảo sát ảnh hưởng của pH và nhiệt độ đến hoạt tính kháng nấm của CFS, kết quả cho thấy hoạt tính kháng nấm của CFS giảm đáng kể khi được điều chỉnh đến giá trị pH gần trung tính (pH 6,5) (Bảng 5) nhưng không giảm sau xử lý nhiệt. Tương tự, CFS từ hai chủng *L. plantarum* UM55 và *L. buchneri* mất hoạt tính kháng nấm *Penicillium nordicum* ở pH 7,0 (mức độ phát triển của nấm tương tự với đối chứng MRS), tuy nhiên không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa CFS sau xử lý nhiệt ở 121 °C và đối chứng CFS không xử lý nhiệt [9]. Vì pH ảnh hưởng rất

lớn đến hoạt tính của CFS, các acid hữu cơ hiện diện trong CFS có thể đóng một vai trò quan trọng trong tác dụng kháng nấm của chủng *L. plantarum* Ln9. Cho đến nay, các acid hữu cơ vẫn được coi là chất chuyển hóa kháng nấm chính của vi khuẩn lactic thông qua việc ức chế sự phát triển của sợi nấm. Các acid hữu cơ ở dạng proton hóa có bản chất là ưa béo, dễ dàng khuếch tán qua màng tế bào nấm và được tích lũy trong tế bào chất. Trong đó, acid lactic thường được sản xuất với lượng lớn nhất so với các acid hữu cơ khác. Tuy nhiên, acid lactic được biết là có hoạt động ức chế sự phát triển của nấm thấp hơn so với các acid hữu cơ khác như acid acetic và acid propionic. Do acid lactic có hằng số phân ly (pKa) thấp hơn so với acid acetic và acid propionic (có giá trị tương tự nhau), acid lactic khử proton dễ dàng hơn so với acid acetic [25].

Bảng 5. Hoạt tính kháng nấm của CFS ở các giá trị pH khác nhau

pH	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5
Đường kính vòng ức chế (mm)	37,6 ^a ± 1	37,6 ^a ± 1	33,5 ^b ± 2	27 ^c ± 1	20 ^d ± 2
Hoạt tính còn lại (%)	100	100	89	71,8	53,2

Ghi chú: các chữ cái khác nhau trên cùng một hàng chỉ sự sai khác trung bình mẫu có ý nghĩa thống kê với $p < 0,05$ (Duncan's test). M ± SD: trung bình mẫu ± độ lệch chuẩn.

4. Kết luận

Từ các mẫu quả nho, trên môi trường MRS agar, đã phân lập được các chủng vi khuẩn lactic. Trong số các chủng phân lập được, bằng phương pháp đĩa thạch 2 lớp, đã tuyển chọn được chủng vi khuẩn lactic *L. plantarum* Ln9 có khả năng đối kháng cao với chủng nấm mốc *A. alternata* Nn4 gây thối hỏng quả nho. Đồng thời đã xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp cho quá trình tạo sinh khối của chủng *L. plantarum* Ln9 là môi trường MRS dịch thể có pH 6,0, nhiệt độ 30 °C và thời gian 2 ngày. Ngoài ra, hoạt tính kháng nấm của CFS từ chủng *L. plantarum* Ln9 được ghi nhận giảm đáng kể ở pH 6,5 nhưng không giảm so với đối chứng sau xử lý nhiệt. Các kết quả đạt được sẽ là tiền đề cho hướng nghiên cứu sản xuất lớp phủ ăn được kết hợp với lợi khuẩn *L. plantarum* Ln9 nhằm ức chế sự phát triển của

nấm mốc và cải thiện chất lượng quả nho sau thu hoạch.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được tiến hành trong khuôn khổ đề tài QG.22.19 của Đại học Quốc gia Hà Nội.

Tài liệu tham khảo

- [1] K. Ghafoor, J. Park, Y. Choi, Optimization of Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds from Grape (*Vitis labrusca* B.) Peel by using Response Surface Methodology, Innovative Food Science and Emerging Technologies, Vol. 11, No. 3, 2010, pp. 485-490, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.01.013>.

- [2] H. S. Mengal, M. A. Abro, G. H. Jatoi, L. Nawab, G. B. Poussio, N. Ahmed, A. Q. Zehri, A. Ali, Efficacy of Different Fungicides, Botanical Extracts and Bio-Control Agents Against *Cladosporium Cladosporioides*, the Causal Agent of Cladosporium Rot in Grapes, *Acta Ecologica Sinica*, Vol. 40, No. 4, 2020, pp. 300-305, <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2019.08.002>.
- [3] H. Aloui, K. Khwaldia, L. S. Gonzalez, L. Muneret, C. Jeandel, M. Hamdi, S. Desobry, Alginate Coatings Containing Grapefruit Essential Oil or Grapefruit Seed Extract or Grapes Preservation, *International Journal of Food Science and Technology*, Vol. 49, No. 4, 2014, pp. 952-959, <https://doi.org/10.1111/ijfs.12387>.
- [4] A. F. Stocco, M. E. Diaz, M. C. R. Romera, L. A. Mercado, M. L. Rivero, M. L. Ponsone, Biocontrol of Postharvest *Alternaria* Decay in Table Grapes from Mendoza Province, *Biological Control*, Vol. 134, 2019, pp. 114-122, <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.03.019>.
- [5] L. Palou, M. Serrano, D. M. Romero, D. Valero, New Approaches for Postharvest Quality Retention of Table Grapes, *Fresh Produce*, Vol. 4, 2010, pp. 103-110.
- [6] B. Yousuf, O. S. Qadri, A. K. Srivastava, Recent Developments in Shelf-Life Extension of Fresh-Cut Fruits and Vegetables by Application of Different Edible Coatings: A Review, *LWT- Food Science and Technology*, Vol. 89, 2018, pp. 198-209, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.051>.
- [7] F. Pavli, C. Tassou, G. J. E. Nychas, N. Choriantopoulos, Probiotic Incorporation in Edible Films and Coatings: Bioactive Solution for Functional Foods, *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 19, No. 1, 2018, pp. 150, <https://doi.org/10.3390/ijms19010150>.
- [8] R. Massoud, D. Khodaeii, Z. H. Esfahani, K. Khosravi-Darani, The Effect of Edible Probiotic Coating on Quality of Fresh Fruits and Vegetables: Fresh Strawberries as a Case Study, *Biomass Conversion and Biorefinery*, Vol. 4, 2021, pp. 2517-2526, <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01332-0>.
- [9] A. Guimarães, A. Venancio, L. Abrunhosa, Antifungal Effect of Organic Acids from Lactic Acid Bacteria on *Penicillium nordicum*, *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, Vol. 35, No. 9, 2018, pp. 1803-1818, <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1500718>.
- [10] A. Marín, A. Plotto, L. Atarés, A. Chiralt, Lactic Acid Bacteria Incorporated into Edible Coatings to Control Fungal Growth and Maintain Postharvest Quality of Grapes, *HortScience*, Vol. 54, No. 2, 2019, pp. 337-343, <https://doi.org/10.21273/HORTSCI13661-18>.
- [11] DARD, The Situation of Grape Development in Ninh Thuan Province, April 2023 (in Vietnamese).
- [12] MOST, TCVN 9017: 2011-Vietnamese Standard on Fresh Fruits: Sampling Method on the Field (in Vietnamese).
- [13] MOST, TCVN 82751: 2010 (ISO 21527-2: 2008)-Vietnamese Standard on Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs: Horizontal Method for The Enumeration of Yeasts and Moulds - Part 1: Colony Count Technique In Products With Water Activity Less Than or Equal to 0,95 (in Vietnamese).
- [14] D. Solairaj, N. N. G. Legrand, Q. Yang, H. Zhang, Isolation of Pathogenic Fungi Causing Postharvest Decay in Table Grapes and In Vivo Biocontrol Activity of Selected Yeasts Against Them, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Vol. 110, 2020, pp. 101478, <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101478>.
- [15] R. Koch, Investigations into Bacteria: V. The Etiology of Anthrax, Based on the Ontogenesis of *Bacillus anthracis*, *Cohns Beitrage zur Biologie der Pflanzen* (in German), Vol. 2, No. 2, 1876, pp. 277-310.
- [16] E. B. Breitschwerdt, K. L. Linder, M. J. Day, R. G. Maggi, B. B. Chomel, V. A. J. Kempf, Koch's Postulates and the Pathogenesis of Comparative Infectious Disease Causation Associated with *Bartonella* Species, *Journal of Comparative Pathology*, Vol. 148, No. 2, 2013, pp. 115-125, <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.12.003>.
- [17] R. Trias, L. Baneras, E. Montesinos, E. Badosa, Lactic Acid Bacteria From Fresh Fruit and Vegetables As Biocontrol Agents of Phytopathogenic Bacteria and Fungi, *International Microbiology*, Vol. 11, No. 4, 2008, pp. 231-236, <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.66>.
- [18] American Society for Microbiology, Catalase Test Protocol, <https://asm.org/Protocols/Catalase-Test-Protocol>, 2010 (accessed on: August 1st, 2023).
- [19] American Society for Microbiology, Oxidase Test protocol, <https://asm.org/Protocols/Oxidase-Test-Protocol>, 2010 (accessed on: August 1st, 2023).
- [20] B. Taroub, L. Salma, Z. Manel, H. I. Ouzari, Z. Hamdi, H. Moktar, Isolation of Lactic Acid Bacteria From Grape Fruit: Antifungal Activities, Probiotic Properties, and In Vitro Detoxification of Ochratoxin A, *Annals of Microbiology*, Vol. 69, No. 3, 2019, pp. 17-27, <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-018-1359-6>.

- [21] J. Sambrook, D. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [22] M. Lorenzini, B. Simonato, F. Favati, P. Bernardi, A. Sbarbati, G. Zapparoli, Filamentous Fungi Associated with Natural Infection of Noble Rot on Withered Grapes, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 272, 2018, pp. 83-86, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.004>.
- [23] U. Schillinger, F. K. Lüke, Identification of Lactobacilli From Meat and Meat Products, *Food Microbiology*, Vol. 4, No. 3, 1987, pp. 199-208, [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(87\)90002-5](https://doi.org/10.1016/0740-0020(87)90002-5).
- [24] S. Zhao, X. Hao, F. Yang, Y. Wang, X. Fan, Y. Wang, Antifungal Activity of *Lactobacillus plantarum* ZZUA493 and Its Application to Extend The Shelf Life of Chinese Steamed Buns, *Foods*, Vol. 11, No. 2, 2022, pp. 195, <https://doi.org/10.3390/foods11020195>.
- [25] F. A. Sadiq, B. Yan, F. Tian, J. Zhao, H. Zhang, W. Chen, Lactic Acid Bacteria as Antifungal and Anti-Mycotoxigenic Agents: a Comprehensive Review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 18, No. 5, 2019, pp. 1403-1436, <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12481>.