

KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA NỒNG ĐỘ CARBOXYMETHYL CELLULOSE ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG, TỒN TẠI VÀ KHÁNG NẤM CỦA VI KHUẨN *LACTOBACILLUS* TRÊN CHỦNG NẤM MỐC *LASIODIPLODIA PSEUDOTHEOBROMAE*

• Nguyễn Thị Ngọc Trúc^(*), Đỗ Thị Hiền^(**), Nguyễn Phan Thảo^(***)

Tóm tắt

CMC (Carboxymethyl cellulose) được sử dụng tạo màng bao gói để bảo quản trái cây, nhằm giữ được độ tươi mà không ảnh hưởng đến chất lượng của thực phẩm. Các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. đặc biệt là *L.plantarum* CC6, *L.fermentum* DC2 và *L.fermentum* DG2 được chứng minh có hoạt tính kháng nấm cao. Nghiên cứu đã sử dụng kết hợp CMC và ba chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. nhằm tăng hoạt tính kháng nấm *Lasioidiplodia pseudotheobromae* gây bệnh trên trái cây đặc biệt chôm chôm sau thu hoạch để kéo dài thời gian bảo quản. Kết quả khảo sát cho thấy các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. ở 13°C phát triển tốt hơn nhiệt độ phòng. Kết hợp với 1% CMC ở nhiệt độ phòng và 1,5% CMC ở 13°C vi khuẩn *L.fermentum* DC2 và *L.plantarum* CC6 có khả năng phát triển và kháng nấm bệnh tốt nhất.

Từ khóa: Trái cây bị hư hỏng, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, Carboxymethyl cellulose, *Lasioidiplodia pseudotheobromae*.

1. Đặt vấn đề

Nấm *Lasioidiplodia pseudotheobromae* thường gây ra sự thối rữa, mất nước và biến màu của vỏ các loại trái cây mà nó có mặt. Bệnh xảy ra trên một vùng nhỏ vỏ quả, bệnh thường xuất hiện vào ngày thứ 3, thứ 4 trong quá trình bảo quản. Ban đầu, trên vỏ quả chỉ xuất hiện một vết màu nâu rất nhạt, rất mờ có đường kính khoảng 0,8 cm. Vết bệnh tiếp tục phát triển lan dần ra bề mặt vỏ quả với tốc độ khá nhanh. Sau khi xuất hiện 1 đến 2 ngày vết bệnh chuyển sang màu nâu đậm, chảy nước và trái cây bắt đầu hỏng. Phần bị nhiễm nấm có màu đen và xuất hiện các khuẩn ty nấm [7].

Ở nhiệt độ cao và ẩm độ thấp trái cây dễ bị hư hỏng do sự phát triển của nấm bệnh. Do vậy, trái cây có thời gian bảo quản ngắn. Việc sử dụng thường xuyên thuốc diệt nấm để kiểm soát bệnh sẽ ảnh hưởng xấu đến môi trường và ít được người tiêu dùng chấp nhận [5]. Ngoài ra, sau thu hoạch, trái

cây còn được bảo quản bằng phương pháp xử lý hóa chất hoặc kiểm soát khí quyển nhưng kết quả thu được chưa thực sự khả quan [10].

CMC (carboxymethyl cellulose) được ứng dụng phổ biến trong tạo màng bao gói để bảo quản trái cây, nhằm giữ được độ tươi lâu mà không ảnh hưởng đến chất lượng của thực phẩm. Trong [11], Yinzhe và cộng sự đã nghiên cứu sử dụng màng bao CMC bảo quản quả hồ đào ở nhiệt độ thường. Kết quả việc sử dụng các màng CMC hạn chế quá trình oxy hóa chất béo mà không ảnh hưởng đến cấu trúc của quả. Kết quả nghiên cứu bảo quản cam



Hình 1. Triệu chứng bệnh thối lan mờ do *Lasioidiplodia pseudotheobromae* gây ra trên chôm chôm

mật cho thấy có thể làm giảm tổn thất khối lượng của cam mật và kéo dài thời gian tồn trữ cam đến 9 tuần bằng biện pháp xử lý ozone kết hợp với bao màng CMC (hoặc màng pectin) và bảo quản trong bao bì PE (hoặc PP) không đục lỗ ở nhiệt độ 10°C [9]. Theo [11] đã nghiên cứu ảnh hưởng của CMC và alginate kết hợp với men bia về bảo quản nho sau thu hoạch. Việc sử dụng 2%

của alginate và 3% CMC kết hợp với nấm men bia giúp cho việc mất trọng lượng và tổng chất rắn hòa tan hạn chế.

Hiện nay, việc nghiên cứu, phân lập các chủng

^(*) Viện Cây ăn quả Miền Nam.

^(**) Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh.

^(***) Sinh viên, Trường Đại học Công nghiệp Thực phẩm Thành phố Hồ Chí Minh.

vi sinh vật có hoạt tính đối kháng chống lại một số bệnh sau thu hoạch trên trái cây tươi nói chung và chôm chôm nói riêng cũng đang được quan tâm và ứng dụng vào thực tế [6], [4], [8]. Có thể kể đến 3 chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. (CC6, DC2 và DG2) được phân lập và tuyển chọn từ 56 chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. có hoạt tính đối kháng chống lại nấm *Lasiodiplodia pseudotheobromae* và *Phomopsis mali* gây bệnh thối trên chôm chôm. Nghiên cứu này kết hợp những đặc tính ưu việt của chất mang CMC với 3 chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. nhằm tăng hoạt tính đối kháng chống lại nấm *Lasiodiplodia pseudotheobromae* gây bệnh trên trái cây để có thể kéo dài thời gian bảo quản và xuất khẩu.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Hai giống vi khuẩn *L.plantarum* CC6 (phân lập từ chôm chôm), *L.fermentum* DC2 (phân lập từ dưa cải) và *L.fermentum* DG2 (phân lập từ dưa gang) được thực hiện bởi tác giả Nguyễn Thị Ngọc Trúc và cộng tác viên (2013). Nấm *Lasiodiplodia pseudotheobromae* được phân lập bởi tác giả Trần Thụy Ái Tâm (Luận văn Thạc sỹ, năm 2012) tại Viện Nghiên cứu và Phát triển công nghệ Sinh học, Đại học Cần Thơ. Môi trường MRS để nuôi cấy, môi trường PDA khảo sát hoạt tính kháng nấm của hai vi khuẩn trên. Chất mang CMC mua tại Công ty Trách nhiệm hữu hạn Phương Duy (Suntze Chemical Co. Ltd). Dung dịch đối kháng là dung dịch tăng sinh vi khuẩn *Lactobacillus* spp. có bổ sung CMC với các nồng độ khác nhau. Đối tượng đối kháng là nấm *Lasiodiplodia pseudotheobromae* được phân lập từ chôm chôm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thí nghiệm 1: khảo sát khả năng sinh trưởng và tồn tại của vi khuẩn *Lactobacillus* spp. kết hợp CMC trên MRS

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 3 nhân tố với 42 nghiệm thức, lặp lại ngẫu nhiên 3 lần. Nhiệt độ: nhiệt độ phòng (khoảng $25\pm 2^\circ\text{C}$) và 13°C (nhiệt độ bảo quản các loại trái cây xuất khẩu). Nồng độ CMC: 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5 (%). Ba chủng vi khuẩn: *L.plantarum* CC6, *L.fermentum* - DG2, *L.fermentum* - DC2.

Phương pháp thực hiện: Hút 1 ml dung dịch vi khuẩn *Lactobacillus* spp. mật độ 10^8 CFU/ml,

tăng sinh trong môi trường MRS lỏng trong 24 giờ. Sau đó, bổ sung lần lượt các dung dịch CMC có nồng độ 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5 (%) vào dịch tăng sinh vi khuẩn; tiến hành pha loãng mẫu từ nồng độ 10^{-1} đến 10^{-8} CFU/ml. Dùng micropipet hút 0,01 ml từ mỗi nồng độ pha loãng mẫu như trên vào đĩa môi trường MRS agar đã chuẩn bị trước (mỗi nồng độ lặp lại 3 lần). Đợi khô, đậy đĩa, úp ngược lại và ủ kỵ khí ở nhiệt độ phòng (khoảng $25\pm 2^\circ\text{C}$) và nhiệt độ 13°C . Đếm mật độ vi khuẩn *Lactobacillus* spp. ở 6 khoảng thời gian (1, 3, 5, 7, 14, 21 ngày).

Chỉ tiêu theo dõi: Số khuẩn lạc rời hiện diện trên đĩa đếm mật độ trong môi trường MRS agar từ những nồng độ pha loãng ở các nghiệm thức khảo sát.

2.2.2. Thí nghiệm 2: Khảo sát ảnh hưởng nồng độ CMC đến hoạt tính kháng nấm các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp.

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 3 nhân tố với 42 nghiệm thức, lặp lại ngẫu nhiên 3 lần. Nhiệt độ: nhiệt độ phòng (khoảng $25\pm 2^\circ\text{C}$) và 13°C . Nồng độ CMC 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5 (%). Sinh khối của các giống vi khuẩn: *L.plantarum* CC6, *L.fermentum* DG2, *L.fermentum* DC2.

Phương pháp thực hiện: Tăng sinh vi khuẩn *Lactobacillus* spp. trong môi trường MRS lỏng trong 24 giờ. Sau đó, bổ sung lần lượt CMC với các nồng độ 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25; 1,5 (%) vào dịch tăng sinh vi khuẩn (dung dịch đối kháng). Hút 1 ml dung dịch đối kháng phủ lên môi trường PDA. Tiến hành cấy nấm *Lasiodiplodia pseudotheobromae* lên môi trường PDA phủ dịch đối kháng đã được để khô, kích thước nấm ở các nghiệm thức khảo sát như nhau. Đậy kín và úp ngược đĩa ủ kỵ khí ở 13°C và nhiệt độ phòng. Theo dõi hoạt tính đối kháng của dung dịch kết hợp ở nhiệt độ phòng sau 40 giờ và 13 ngày ở nhiệt độ 13°C .

Chỉ tiêu theo dõi: Đo đường kính nấm phát triển trên bề mặt đĩa thạch PDA. Đường kính nấm của vi khuẩn được tính từ điểm to nấm hiện trên đĩa đo đối xứng qua tâm là thạch nấm *Lasiodiplodia pseudotheobromae* cấy trên môi trường PDA. Kết quả đo đường kính là trung bình của 3 lần lặp lại. Khả năng ức chế của vi khuẩn đối với nấm được xác định như sau:

Khả năng kháng nấm (%) = $[(\bar{A} - \bar{a}) / \bar{A}] \times 100$.

Trong đó: \bar{A} : đường kính trung bình ba lần lặp lại của đĩa nấm đối chứng; \bar{a} : đường kính trung bình ba lần lặp lại của các nghiệm thức khảo sát.

2.2.3. Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần, kết quả được ghi nhận và xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphic Centurion XVI, Excel 2013 với mức độ tin cậy 95%.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Khảo sát ảnh hưởng nồng độ CMC đến khả năng sinh trưởng, tồn tại và hoạt tính kháng nấm của các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. ở nhiệt độ phòng

3.1.1. Ảnh hưởng của nồng độ CMC đến khả năng sinh trưởng và tồn tại của các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. ở nhiệt độ phòng

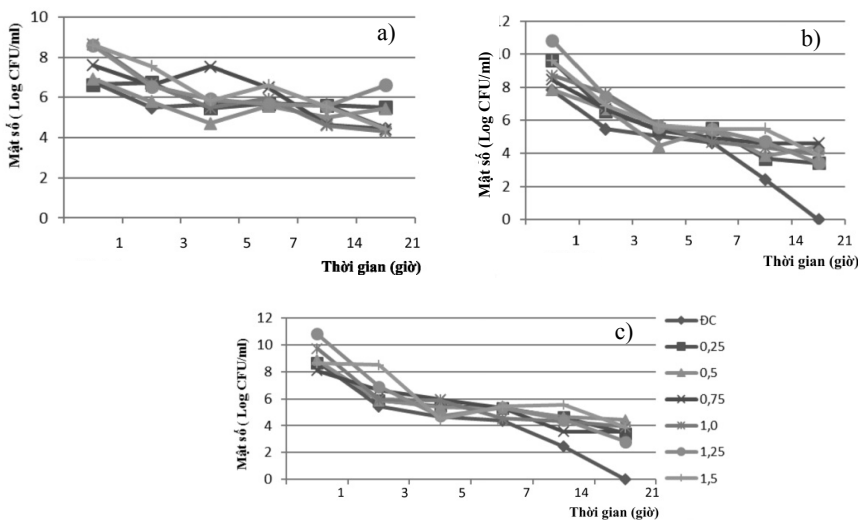
Kết quả khảo sát ảnh hưởng CMC đến khả năng sinh trưởng và tồn tại của các chủng vi khuẩn, cho thấy: thời gian tồn tại của các chủng vi khuẩn *L.fermentum* DC2, *L.fermentum* DG2 và *L.plantarum* CC6 trong môi trường MRS đến ngày 21 còn tồn tại. Các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. mật độ tương đối cao khi kết hợp với CMC ở những nồng độ khác nhau. Giữa các nghiệm thức không có sự chênh lệch lớn về mật độ. Điều này thể hiện cụ thể ở từng chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. (Hình 2).

Ở nhiệt độ phòng, sự phát triển của vi khuẩn

L.fermentum DC2 kéo dài đến hơn 21 ngày. Khi kết hợp với CMC trong các nghiệm thức khảo sát nồng độ từ 0,25% đến 1,5%, vi khuẩn *L.fermentum* DC2 vẫn phát triển tốt với đường sinh trưởng tương đương với nghiệm thức đối chứng (Hình 2a). Trong số các nghiệm thức kết hợp CMC, nghiệm thức với nồng độ 0,75% CMC có mật độ vi khuẩn cao nhất là 10^7 CFU/ml sau 5 ngày, trong khi các nghiệm thức khác hầu như giảm. Ở nồng độ 1%, 1,25% và 1,5% CMC, vi khuẩn *L.fermentum* DC2 có đường sinh trưởng tương đồng, mật độ cao nhất sau 1 ngày là 10^8 CFU/ml, trong khi nghiệm thức đối chứng chỉ đạt khoảng 10^6 CFU/ml.

Vi khuẩn *L.fermentum* DG2 chỉ tồn tại được khoảng 14 ngày trong môi trường MRS. Khi kết hợp với CMC, vi khuẩn *L.fermentum* DG2 có thể kéo dài thời gian tồn tại hơn 21 ngày ở các nghiệm thức có nồng độ từ 0,25% đến 1,5% (Hình 2b). Kết quả thu được ở Hình 2b cho thấy khả năng tồn tại của vi khuẩn *L.fermentum* DG2 ở các nghiệm thức tương đương nhau, gần như không có sự khác biệt. Mật độ vi khuẩn giảm dần theo thời gian. Tuy nhiên, đến ngày thứ 21 vẫn duy trì được ở mức khá cao khoảng 10^4 CFU/ml. Có thể thấy, nồng độ CMC tuy có ảnh hưởng đến sự phát triển của vi khuẩn *L.fermentum* DG2 nhưng không lớn.

Tương tự như vi khuẩn *L.fermentum* DG2, ở những độ CMC khác nhau vi khuẩn *L.plantarum* CC6 không có sự khác biệt nhiều (Hình 2c). Kết quả thu được ở Hình 2c cho thấy vi khuẩn *L.plantarum* CC6 có thể tồn tại trong môi trường MRS có bổ sung CMC với nồng độ khảo sát từ 0,25% đến 1,5%, thời gian tồn tại kéo dài đến ngày thứ 21. Song ở nghiệm thức ĐC, thời gian tồn tại của vi khuẩn *L.plantarum* CC6 ngắn hơn, khoảng 14 ngày. Nghiệm thức với nồng độ 1,5% có mật độ 10^7 CFU/ml gần như không biến động sau 3 ngày đầu tiên. Trong khi đó các nghiệm thức kết hợp khác đều giảm mạnh sau 1 ngày (trung bình khoảng 10^2 CFU/ml). Nồng



Hình 2. Khả năng sinh trưởng và tồn tại của vi khuẩn DC2, DG2 và CC6 kết hợp CMC ở nhiệt độ phòng

Ghi chú: ĐC = đối chứng; 0,25 = DC2 + 0,25% CMC; 0,5 = DC2 + 0,5% CMC; 0,75 = DC2 + 0,75% CMC; 1,0 = DC2 + 1,0% CMC; 1,25 = DC2 + 1,25% CMC; 1,5 = DC2 + 1,5% CMC.

độ 0,5%, vi khuẩn phát triển ổn định nhất và đạt mật độ cao nhất so với các nghiệm thức còn tồn tại vi khuẩn. Trong đó, nồng độ 0,75% vi khuẩn *L.plantarum* CC6 đạt mật độ cao nhất (10^7 CFU/ml) sau 7 ngày, gấp 103 lần so với nghiệm thức đối chứng cùng thời điểm.

Như vậy, ở nhiệt độ phòng chủng DC2 có khả năng tăng trưởng và phát triển ổn định nhất ở nồng độ CMC 0,75%. Chủng DG2 và CC6 có mức tăng trưởng tương đương nhau.

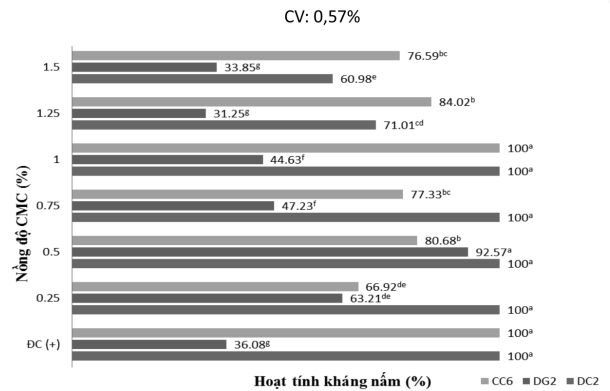
3.1.2. Ảnh hưởng của nồng độ CMC đến hoạt tính kháng nấm các dòng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. ở nhiệt độ phòng

Nấm *Lasiodiplodia pseudotheobromae* được cấy lên môi trường PDA phủ dịch đối kháng theo dõi trong 40 giờ. Kết quả kháng nấm được thể hiện ở Bảng 1 và Hình 3.

Bảng 1. Kết quả đối kháng nấm *Lasiodiplodia pseudotheobromae* của các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. kết hợp với CMC ở nhiệt độ phòng

Nghiệm thức	Khả năng kháng nấm giữa các nghiệm thức (%)	Nghiệm thức	Khả năng kháng nấm giữa các nghiệm thức (%)
NT13	31,25 ^g	NT17	80,68 ^b
NT14	33,85 ^g	NT20	84,02 ^b
NT8	36,08 ^g	NT10	92,57 ^a
NT12	44,63 ^f	NT15	100 ^a
NT11	47,23 ^f	NT5	100 ^a
NT7	60,98 ^e	NT4	100 ^a
NT9	63,21 ^{de}	NT19	100 ^a
NT16	66,93 ^{de}	NT3	100 ^a
NT6	71,01 ^{cd}	NT2	100 ^a
NT21	76,59 ^{bc}	NT1	100 ^a
NT18	77,33 ^{bc}		
CV (%) = 0,57; LSD (5%) = 2,82			

* Ghi chú: Các giá trị ở bảng là trung bình của ba lần lặp lại; trong cùng một cột, các chữ cái biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa về thống kê ở mức 5% qua phép thử Duncan; NT1 = DC2 ĐC(+); NT2 = DC2 + 0,25% CMC; NT3 = DC2 + 0,5% CMC; NT4 = DC2 + 0,75% CMC; NT5 = DC2 + 1% CMC; NT6 = DC2 + 1,25% CMC; NT7 = DC2 + 1,5% CMC; NT8 = DG2 ĐC(+); NT9 = DG2 + 0,25% CMC; NT10 = DG2 + 0,5% CMC; NT11 = DG2 + 0,75% CMC; NT12 = DG2 + 1% CMC; NT13 = DG2 + 1,25% CMC; NT14 = DG2 + 1,5% CMC; NT15 = CC6 ĐC(+); NT16 = CC6 + 0,25% CMC; NT17 = CC6 + 0,5% CMC; NT18 = CC6 + 0,75% CMC; NT19 = CC6 + 1% CMC; NT20 = CC6 + 1,25% CMC; NT21 = CC6 + 1,5% CMC; CV (Coefficient of variation - hệ số biến thiên); LSD (Least significant difference - sai khác biệt nhỏ nhất có ý nghĩa).



Hình 3. Hoạt tính kháng nấm của vi khuẩn *Lactobacillus* kết hợp CMC ở nhiệt độ phòng

Ghi chú: Số liệu ghi ở cột là giá trị trung bình của 3 lần lặp lại; Các số có cùng mẫu tự khác biệt không có ý nghĩa về thống kê ở mức 5% qua phép thử Duncan; ĐC (+) = dung dịch tăng sinh vi khuẩn *Lactobacillus* trong môi trường MRS không bổ sung CMC; 0,25 = *Lactobacillus* + 0,25% CMC; 0,5 = *Lactobacillus* + 0,5% CMC; 0,75 = *Lactobacillus* + 0,75% CMC; 1 = *Lactobacillus* + 1% CMC; 1,25 = *Lactobacillus* + 1,25% CMC; 1,5 = *Lactobacillus* + 1,5% CMC.

Ở nhiệt độ phòng, vi khuẩn *Lactobacillus* kết hợp với CMC thể hiện hoạt tính kháng nấm cao. Trong đó, 2 chủng vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* DC2, *Lactobacillus plantarum* CC6 thể hiện hoạt tính kháng nấm mạnh nhất và gần như tương đương nhau.

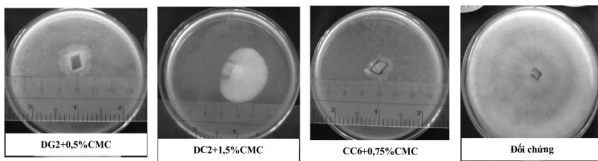
So sánh hoạt tính kháng nấm của vi khuẩn *L.fermentum* DC2 ở các nồng độ CMC khác nhau, kết quả khảo sát cho thấy các nghiệm thức DC2 ĐC (+), DC2 + 0,25% CMC, DC2 + 0,5% CMC, DC2 + 0,75% CMC và DC2 + 1% CMC kháng nấm hoàn toàn (nấm không phát triển ở đĩa khảo sát). Các nồng độ khảo sát cao hơn, vi khuẩn *L.fermentum* DC2 có thể hiện hoạt tính kháng nấm nhưng thấp, sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê.

Kết quả phân tích thống kê cho thấy, vi khuẩn *L.fermentum* DG2 ở nhiệt độ phòng nhìn chung có hoạt tính kháng nấm tương đối thấp. Nghiệm thức DG2 + 0,5% CMC vi khuẩn *L.fermentum* DG2 thể hiện hoạt tính kháng nấm cao nhất (80,86%) so với các nghiệm thức còn lại, kể cả nghiệm thức DG2 ĐC (+) (36,08%) và có sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5%. Trong khi đó, mật độ vi khuẩn *L.fermentum* DG2 ở các nghiệm thức này không có khác biệt nhiều, với giá trị trung bình khoảng 10^6 CFU/ml. Do đó, sự khác biệt trên không do ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn DG2,

mà có thể do vi khuẩn *L.fermentum* DG2 chỉ phát huy khả năng kháng nấm cao nhất khi kết hợp với nồng độ CMC thích hợp, ở những nồng độ cao hơn vượt qua ngưỡng tối ưu sẽ làm giảm hoạt tính kháng nấm của *L.fermentum* DG2.

Vi khuẩn *L.plantarum* CC6 kháng nấm hoàn toàn ở nghiệm thức CC6 ĐC (+) và CC6 + 1% CMC. Nghiệm thức CC6 + 0,5% và CC + 1,25% không kháng nấm hoàn toàn nhưng có hoạt tính kháng nấm cao và sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5% với các nghiệm thức còn lại. Hoạt tính đối kháng giữa các nghiệm thức có sự tăng giảm không ổn định. Trong khi đó, kết quả khảo sát sự sinh trưởng của vi khuẩn *L.plantarum* CC6, mật độ vi khuẩn không có sự khác biệt nhiều giữa các nghiệm thức khảo sát. Từ kết quả khảo sát, có thể thấy nồng độ CMC không ảnh hưởng đến hoạt tính kháng nấm của dung dịch đối kháng.

Một số hình ảnh kháng nấm điển hình thu nhận được:



Hình 4. Vòng kháng nấm *Lasiodiplodiapseudotheobromae* của dòng DG2+0,5% CMC, DC2+1,5% CMC, CC6 + 0,75% CMC so sánh với nấm đối chứng ở nhiệt độ phòng

3.2. Khảo sát ảnh hưởng nồng độ CMC đến khả năng sinh trưởng và tồn tại, hoạt tính kháng nấm của các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. ở nhiệt độ 13°C

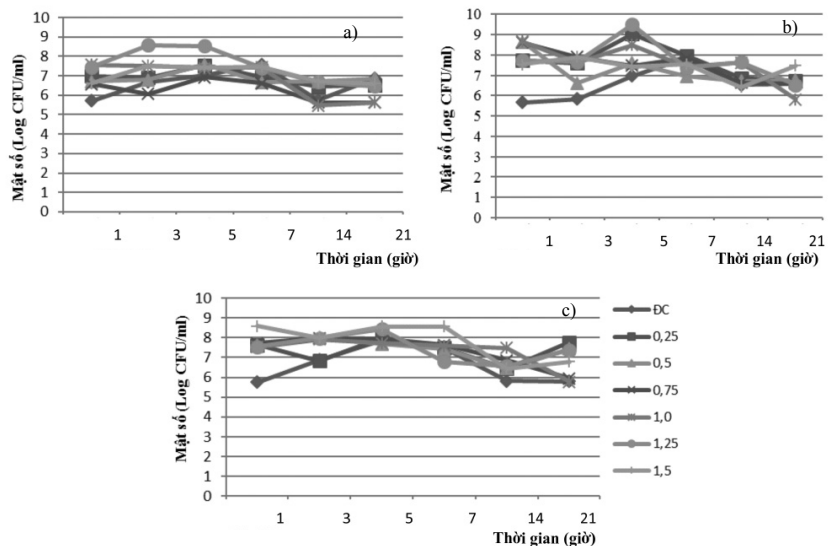
3.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ CMC đến khả năng sinh trưởng và tồn tại của các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. ở 13°C

Ở điều kiện nhiệt độ 13°C, khả năng sinh trưởng của vi khuẩn *L.fermentum* DC2, *L.fermentum* DG2 và *L.plantarum* CC6 phát triển mạnh hơn nhiều so với nhiệt độ phòng. Thời gian phát triển kéo dài hơn 21 ngày với mật độ

cao khoảng 10⁶ CFU/ml. Sự sinh trưởng của từng chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. ở các nghiệm thức thể hiện cụ thể ở Hình 5.

Xét khả năng sinh trưởng của vi khuẩn *L.fermentum* DC2 kết hợp với CMC ở những nồng độ khác nhau, nhận thấy không có sự khác biệt lớn giữa các nghiệm thức khảo sát (Hình 5a). Kết quả sát cho thấy, vi khuẩn *L.fermentum* DC2 tồn tại được trong môi trường có bổ sung CMC nồng độ thí nghiệm từ 0,25% đến 1,5% với đường tăng trưởng khá ổn định. Đặc biệt, nghiệm thức kết hợp 1,25% CMC có mật độ cao nhất là 10⁸ CFU/ml trong khoảng ngày thứ 5 đến ngày thứ 7. Nồng độ CMC hầu như không ảnh hưởng đến vi khuẩn *L.fermentum* DC2, sự chênh lệch mật độ có thể xảy ra do lỗi thao tác trong quá trình thực hiện thí nghiệm.

Ở những nghiệm thức kết hợp CMC, vi khuẩn *L.fermentum* DG2 có đường tăng trưởng tương đồng giữa các nghiệm thức (Hình 5b). Dựa vào đồ thị sinh trưởng vi khuẩn *L.fermentum* DG2 (Hình 5b), có thể thấy trong môi trường có bổ sung CMC nồng độ thí nghiệm từ 0,25% đến 1,5% thời gian để tồn tại kéo dài hơn 21 ngày với mật độ khá cao khoảng 10⁶ CFU/ml. Sau 1 ngày, mật độ vi khuẩn *L.fermentum* DG2 ở các nghiệm thức kết hợp đều đạt từ 10⁷ đến 10⁸ (CFU/ml), cao hơn khoảng 100 lần so với nghiệm thức đối chứng. Các nghiệm thức kết hợp nồng độ CMC có ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của vi khuẩn *L.fermentum* DG2 nhưng không nhiều.



Hình 5. Khả năng sinh trưởng và tồn của vi khuẩn DC2, DG2 và CC6 kết hợp CMC ở nhiệt độ 13°C

Ghi chú: DC = đối chứng; 0,25 = DC2 + 0,25% CMC; 0,5 = DC2 + 0,5% CMC; 0,75 = DC2 + 0,75% CMC; 1,0 = DC2 + 1,0% CMC; 1,25 = DC2 + 1,25% CMC; 1,5 = DC2 + 1,5% CMC

Tương tự như 2 dòng vi khuẩn *L.fermentum*, sự sinh trưởng của vi khuẩn *L.plantarum* CC6 giữa các nghiệm thức cũng không có sự khác biệt lớn. Đường tăng trưởng của vi khuẩn *L.plantarum* CC6 kết hợp với các nồng độ CMC khác nhau thể hiện cụ thể ở biểu đồ sinh trưởng (Hình 5c).

Vi khuẩn *L.plantarum* CC6 có thể tồn tại trong môi trường MRS bổ sung CMC ở nồng độ khảo sát từ 0,25% đến 1,5%. Sau 1 ngày, ở các nghiệm thức kết hợp, mật độ vi khuẩn *L.plantarum* CC6 có giá trị trung bình khoảng 10⁷ CFU/ml, cao hơn nghiệm thức đối chứng khoảng 100 lần. Trong đó, nồng độ 1,5% vi khuẩn *L.plantarum* CC6 có đường sinh trưởng cao nhất trong các nghiệm thức khảo sát. Từ ngày thứ nhất đến hơn ngày thứ 7, mật độ cao (10⁸ CFU/ml). Có thể thấy, ở 13°C vi khuẩn *L.plantarum* CC6 phát triển và tốt hơn khi có sự kết hợp với chất mang CMC.

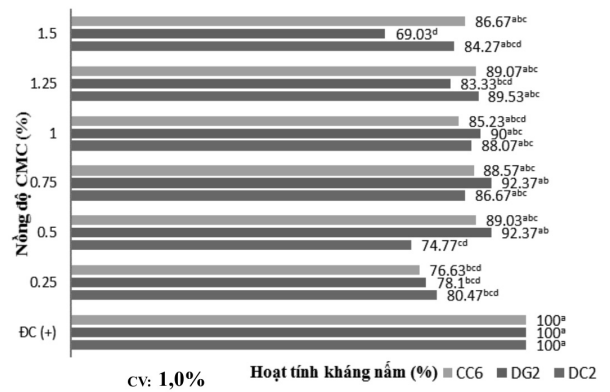
3.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ CMC đến hoạt tính kháng nấm của các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. ở 13°C

Hoạt tính kháng nấm của chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. kết hợp với các nồng độ CMC khác nhau được khảo sát ở điều kiện nhiệt độ 13°C. Sau 13 ngày, đo đường kính vòng nấm *Lasiodiplodia pseudotheobromae* trên môi trường PDA đã được phủ dung dịch đối kháng. Khả năng kháng nấm của các nghiệm thức được xác định bằng phương pháp xử lý thống kê (Bảng 2) và được biểu diễn bằng đồ thị Excel (Hình 6).

Bảng 2. Kết quả đối kháng nấm *Lasiodiplodia pseudotheobromae* của các chủng vi khuẩn *Lactobacillus* spp. kết hợp với CMC ở 13°C

Nghiệm thức	Khả năng kháng nấm giữa các nghiệm thức (%)	Nghiệm thức	Khả năng kháng nấm giữa các nghiệm thức (%)
NT36	69,03 ^d	NT32	88,57 ^{abc}
NT26	74,77 ^{cd}	NT33	89,03 ^{abc}
NT34	76,63 ^{bcd}	NT30	89,07 ^{abc}
NT41	78,1 ^{bcd}	NT23	89,53 ^{abc}
NT27	80,47 ^{bcd}	NT38	90 ^{abc}
NT37	83,33 ^{bcd}	NT40	92,37 ^{ab}
NT22	84,27 ^{abcd}	NT39	92,37 ^{ab}
NT31	85,23 ^{abcd}	NT35	100 ^a
NT25	86,67 ^{abc}	NT42	100 ^a
NT29	86,67 ^{abc}	NT28	100 ^a
NT24	88,07 ^{abc}		
CV (%) = 1,07; LSD (5%) = 5,77			

Ghi chú: Các giá trị ở bảng là trung bình của ba lần lặp lại; trong cùng một cột, các chữ cái biểu thị sự khác biệt không có ý nghĩa về thống kê ở mức 5% qua phép thử Duncan; NT22 = DC2 DC(+); NT23 = DC2 + 0,25% CMC; NT24 = DC2 + 0,5% CMC; NT25 = DC2 + 0,75% CMC; NT26 = DC2 + 1% CMC; NT27 = DC2 + 1,25% CMC; NT28 = DC2 + 1,5% CMC; NT29 = DG2 DC(+); NT30 = DG2 + 0,25% CMC; NT31 = DG2 + 0,5% CMC; NT32 = DG2 + 0,75% CMC; NT33 = DG2 + 1% CMC; NT34 = DG2 + 1,25% CMC; NT35 = DG2 + 1,5% CMC; NT36 = CC6 DC(+); NT37 = CC6 + 0,25% CMC; NT38 = CC6 + 0,5% CMC; NT39 = CC6 + 0,75% CMC; NT40 = CC6 + 1% CMC; NT41 = CC6 + 1,25% CMC; NT42 = CC6 + 1,5% CMC; CV (Coefficient of variation- hệ số biến thiên), LSD (Least significant difference - sai khác biệt nhỏ nhất có ý nghĩa).



Hình 6. Hoạt tính kháng nấm của vi khuẩn *Lactobacillus* kết hợp CMC ở nhiệt độ 13°C

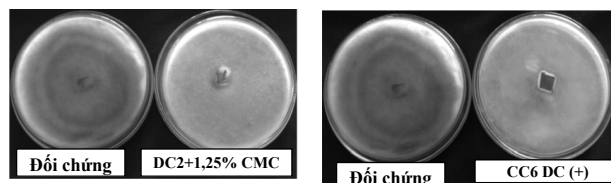
Ghi chú: Xem Hình 3.

Từ kết quả phân tích thống kê và Hình 6 có thể thấy hoạt tính kháng nấm của 3 chủng vi khuẩn *Lactobacillus* ở nhiệt độ 13°C, thể hiện mạnh nhất ở nghiệm thức *Lactobacillus* DC (+). Các nghiệm thức còn lại hoạt tính kháng nấm tương đối cao, tuy nhiên có sự khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5%.

Ở cùng nồng độ CMC kết hợp, hoạt tính kháng nấm của các chủng hầu như tương đương nhau. Tuy nhiên, nồng độ 0,5% CMC, vi khuẩn *L.fermentum* DC2 thể hiện hoạt tính đối kháng thấp nhất trong 3 chủng *Lactobacillus* spp.. Nồng độ 1,5% CMC, vi khuẩn *L.fermentum* DG2 có hoạt tính kháng nấm thấp nhất so với các nghiệm thức ở cả 3 chủng *Lactobacillus* khảo sát. Thí nghiệm khảo sát khả năng sinh trưởng và tồn tại của chủng *Lactobacillus*, mật độ vi khuẩn giữa các chủng *Lactobacillus* spp. ở các nồng độ khác biệt không có ý nghĩa về mặt thống kê ở mức 5%. Nhìn chung, ở điều kiện 13°C, vi khuẩn *L.plantarum* CC6 thể hiện hoạt tính kháng nấm mạnh nhất so

với 2 dòng *L.fermentum* DC2 và *L.fermentum* DG2, kết quả này phù hợp với kết quả khảo sát mật độ vi khuẩn, trong điều kiện nhiệt độ 13°C, vi khuẩn CC6 phát triển mạnh nhất so với 2 dòng vi khuẩn còn lại.

Một số hình ảnh kháng nấm điển hình:



Hình 7. Kết quả kháng nấm của thí nghiệm DC2 + 1,25% CMC; CC6 DC (+) so với đối chứng

3. Kết luận và kiến nghị

Kết quả khảo sát khả năng sinh trưởng và sự tồn tại của vi khuẩn *Lactobacillus* cho thấy điều kiện nhiệt độ 13°C, vi khuẩn *Lactobacillus* phát triển tốt hơn nhiệt độ phòng. Ở nhiệt độ phòng,

chủng *L.fermentum* DC2 phát triển tốt nhất. Ở nhiệt độ 13°C, chủng *L.plantarum* CC6 phát triển tốt nhất. Trong môi trường MRS mật độ vi khuẩn tỉ lệ nghịch với nồng độ CMC.

Kết quả kháng nấm cho thấy, cả 3 chủng vi khuẩn *Lactobacillus* đều có hoạt tính đối kháng ở điều kiện nhiệt độ phòng (khoảng 25±2°C) và 13°C. Đặc biệt, chủng vi khuẩn *L.fermentum* DC2 và *L.plantarum* CC6 có hoạt tính kháng nấm mạnh ở cả 2 nhiệt độ. Kết hợp với 1% và 1,5% CMC ở cả hai điều kiện nhiệt độ, vi khuẩn *Lactobacillus* thể hiện hoạt tính đối kháng chống lại nấm bệnh *Lasiodiplodia pseudotheobromae* tốt nhất.

Điều kiện 13°C là nhiệt độ tốt ưu cho sự phát triển của vi khuẩn *L.plantarum* CC6. Đồng thời ở nhiệt độ này, vi khuẩn *L.plantarum* CC6 thể hiện hoạt tính đối kháng tốt nhất. Vi khuẩn *L.fermentum* DG2 có khả năng sinh trưởng và hoạt tính kháng nấm thấp nhất trong 3 chủng *Lactobacillus* khảo sát./.

Tài liệu tham khảo

- [1]. Alam, K. M., Ahmed, M., Akter, S., Islam, N. and Eun, J. (2009), "Effect of carboxymethylcellulose and starch as thickening agents on the quality of tomato ketchup", *Pakistan Journal of Nutrition*, (8), p. 1144-1149.
- [2]. Nguyễn Thị Diễm Hương, Đỗ Thị Bích Thủy (2012), "Xác định và khảo sát một số tính chất có lợi của chủng *Lactobacillus fermentum* DC1 phân lập từ sản phẩm dưa cải Huế", *Tạp chí Khoa học Đại học Huế*, 71 (2), tr. 177-187.
- [3]. Jarvenpaa, S., Tahvonen, R. L., Ouwehand, A. C., Sandell, M., Jarvenpaa, E. and Salminen, S. (2007), "A Probiotic, *Lactobacillus fermentum* ME-3, has antioxidative capacity in soft cheese spreads with different fats", *Journal of Dairy Science*, 7 (90), p. 3171-3177.
- [4]. Kasra - Kermanshahi, R., Fooladi, J., Peymanfar, S. (2010), "Isolation and microencapsulation of *Lactobacillus* spp. from corn silage for probiotic application", *Iranian Journal of Microbiology*, 2 (2), p. 98-102.
- [5]. Trần Đình Mạnh (2013), *Phân lập, tuyển chọn các dòng vi khuẩn Lactobacillus spp. có tác dụng ức chế in-vitro một số nấm bệnh sau thu hoạch trên chôm chôm*, Luận văn Thạc sĩ ngành Công nghệ thực phẩm, Trường Đại học Nông Lâm, thành phố Hồ Chí Minh, tr. 1-51.
- [6]. Martínez-Castellanos, G., Shirai, K., Pelayo-Zaldívar, C., J. Pérez-Flores, L, D. Sepúlveda-Sánchez, D. (2009), "Effect of *Lactobacillus plantarum* and chitosan in the reduction of browning of pericarp Rambutan (*Nephelium lappaceum*)", *Food Microbiology*, 4 (26), p. 444-449.
- [7]. Trần Thụy Ái Tâm (2012), *Nghiên cứu bệnh do nấm trên chôm chôm sau thu hoạch từ hình thức canh tác theo mô hình VietGap và mô hình tự do*, Luận văn Thạc sĩ ngành Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ, Cần Thơ, tr. 12, 32-53.
- [8]. Trần Linh Thuớc, (2009), *Phương pháp phân tích vi sinh vật trong nước, thực phẩm và mỹ phẩm*, Tái bản lần thứ năm, NXB Giáo dục, Việt Nam, tr. 81-82, 86-89, 92-93.

[9]. Nguyễn Minh Thủy và Nguyễn Thị Mỹ Tuyền (2011), Bảo quản Cam mật bằng phương pháp Map (Modified Atmosphere Packaging), *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, 17(a), tr. 229-238.

[10]. Wójcik, W., Zlotek, U. (2008), "Use of chitosan film coatings in the storage of carrots (*Daucus carota*)", *Department of Food Biochemistry and Chemistry, University of Life Sciences*, p. 141-148.

[11]. Yinze, R. and Shaoying, Z. (2013), "Effect of carboxymethyl cellulose and alginate coating combined with brewer yeast on postharvest grape preservation", *ISRN Agronomy*, 871396 (2013), p. 7.

**INVESTIGATING THE EFFECT OF CARBOXYMETHYL CELLULOSE
CONCENTRATIONS ON THE GROWTH, SURVIVAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITY
OF *LACTOBACILLUS* ON POSTHARVESTING ON FUNGI OF
*LASIODIPLODIA PSEUDOTHEOBROMAE***

Summary

CMC (Carboxymethyl cellulose) is used to make food covering for freshment and nutrition quality preserved. Some *Lactobacillus* spp. strains, especially *L.plantarum* CC6, *L.fermentum* DC2 and *L.fermentum* DG2, have been proved to have high antifungal ability. The study combined CMC and 3 *Lactobacillus* spp. strains to increase the antifungal ability against *Lasiodiplodia pseudotheobromae* which causes disease on fruits, especially rambutan, for longer time preservation after harvest. The obtained results show that *Lactobacillus* spp. at 13°C develop better than the room temperature. With CMC combined 1% at room temperature and 1.5% at 13°C, *L.fermentum* DC2 and *L.plantarum* CC6 have the best quality of development and antifungal ability.

Keywords: Damaged fruit, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, Carboxymethyl cellulose, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*.

Ngày nhận bài: 19/3/2017; Ngày nhận lại: 20/7/2017; Ngày duyệt đăng: 29/9/2017.