

XÁC ĐỊNH LOÀI NẤM MỐC VÀ VI KHUẨN GÂY BỆNH SAU THU HOẠCH TRÊN VẢI VÀ PHƯƠNG PHÁP PHÒNG TRỪ

Hà Viêt Cường¹, Trần Thị Định^{2*}

¹*Trung tâm nghiên cứu Bệnh cây nhiệt đới, Học Viện Nông nghiệp Việt Nam*

²*Khoa Công nghệ thực phẩm, Học Viện Nông nghiệp Việt Nam*

Email*: tt dinh@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 10.03.2016

Ngày chấp nhận: 16.05.2016

TÓM TẮT

Cây vải (*Litchi chinensis* Sonn) là cây ăn quả đặc sản có giá trị dinh dưỡng cao, với hương vị thơm ngon nhiều chất bổ, được người tiêu dùng ưa chuộng. Tuy nhiên, quả vải có thời hạn bảo quản rất ngắn, nguyên nhân chủ yếu là do vi sinh vật gây bệnh. Nghiên cứu này nhằm xác định chính xác loại vi sinh vật gây hư hỏng quả vải sau thu hoạch và nghiên cứu biện pháp phòng trừ bệnh sau thu hoạch cho vải trong điều kiện *in vitro*. Kết quả lây nhiễm nhân tạo nấm và vi khuẩn trên quả vải không bị bệnh, không bị trầy xước, đường kính quả 3,3 - 3,5cm, định danh bằng kỹ thuật sinh học phân tử cho thấy vi khuẩn *Gluconobacter oxydans* và nấm *Lasiodiplodia pseudotheobromae* là nguyên nhân chính gây bệnh sau thu hoạch trên quả vải. Kết quả thử nghiệm khả năng phòng trừ bệnh của carbendazim và chế phẩm nano bạc trong điều kiện *in vitro* cho thấy carbendazim có khả năng ức chế nấm thấp hơn vi khuẩn. Đối với chế phẩm nano bạc, *Gluconobacter oxydans* bị ức chế hoàn toàn ở nồng độ 10ppm, trong khi nấm *Lasiodiplodia pseudotheobromae* bị ức chế ở nồng độ 15ppm. Như vậy, chế phẩm nanoAg thực sự có hiệu quả trong việc ức chế hai loài vi sinh vật được xác định là nguyên nhân chính gây bệnh trong quá trình bảo quản vải sau thu hoạch.

Từ khóa: *Litchi Chinensis* Sonn, quả vải, vi sinh vật gây bệnh.

Identification of Fungi and Bacteria Causing Postharvest Decay on Litchi Fruit and Development of Control Measures

ABSTRACT

Litchi (*Litchi chinensis* Sonn), a specialty fruit, has an appealing natural red color, high nutritional value, and pleasant flavour. However, it is highly perishable and has a very short postharvest life due to microbial decay. This study aimed to identify the microorganisms causing postharvest decay on litchi fruit and to develop the control measures to inactivate them *in vitro*. Results on artificial infection and DNA sequencing demonstrated that *Gluconobacter oxydans* and *Lasiodiplodia pseudotheobromae* are the major cause of post-harvest diseases on litchi. Results on development of control measure showed that carbendazim inhibited *Gluconobacter oxydans* better than *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. Nano silver could completely inhibit *Gluconobacter oxydans* and *Lasiodiplodia pseudotheobromae* at 10 ppm and 15 ppm, respectively. In conclusion, nano-silver effectively controlled the growth of pathogens on litchi after harvest.

Từ khóa: *Litchi Chinensis* Sonn, quả vải, vi sinh vật gây bệnh

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây vải (*Litchi chinensis* Sonn) thuộc họ Bồ hòn (Sapindaceae) có nguồn gốc từ miền Nam Trung Quốc. Vải thiếu là cây ăn quả đặc sản có

giá trị dinh dưỡng cao, hương vị thơm ngon nhiều chất bổ, được người tiêu dùng trong và ngoài nước ưa chuộng. Ở nước ta, cây vải được trồng chủ yếu ở các tỉnh phía Bắc, trong đó tập trung nhiều ở Thanh Hà và Lục Ngạn. Tuy

nhiên, vải là một trong những loại quả có tuổi thọ bảo quản ngắn, tổn thất sau thu hoạch rất cao (Zhang and Quantick, 1997). Sự hư hỏng do nấm mốc gây bệnh là những vấn đề nghiêm trọng làm giảm giá trị thương phẩm của quả vải (Jiang *et al.*, 2001). Hơn nữa, quả vải có tính mùa vụ, chỉ chín tập trung trong khoảng hai tháng với sản lượng rất lớn. Điều kiện thu hái, bảo quản chưa tốt, khả năng hiểu biết về công nghệ sau thu hoạch của người trồng vải không cao nên chất lượng quả vải suy giảm nhanh chóng, gây ảnh hưởng lớn tới giá trị và tính kinh tế của loại quả này. Sau thu hoạch, những tổn thương cơ giới do quá trình thu hái, vận chuyển, côn trùng, hô hấp của quả, quá trình oxy hóa, điều kiện nhiệt độ, độ ẩm... gây ra những biến đổi sinh lý, hóa sinh, tạo điều kiện thuận lợi cho vi sinh vật xâm nhập gây thối hỏng, giảm tuổi thọ của quả. Nguyên nhân chủ yếu của bệnh hại sau thu hoạch là do vi sinh vật gây ra, đặc biệt là hai đối tượng nấm và vi khuẩn. Các bệnh do vi sinh vật gây ra thường rất nguy hiểm và tốc độ lây lan nhanh khiến cho việc bảo quản quả càng trở nên khó khăn.

Hiện nay, các nghiên cứu trong nước liên quan đến bệnh trên vải mới chỉ tập trung xác định nguyên nhân gây bệnh trước thu hoạch và bảo quản quả tươi sau thu hoạch mà chưa có nhiều nghiên cứu chuyên sâu, có hệ thống về tác nhân gây bệnh trên quả vải sau thu hoạch. Một số nghiên cứu trên thế giới đã phân lập và định tên được một vài loại nấm gây bệnh trên vải sau thu hoạch như *Peronophythora litchi* (Jiang *et al.*, 2001), *Phomopsis*, *Pestalotiopsis*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Botryosphaeria* and *Fusarium* spp. (de Jager *et al.*, 2003), *P. expansum* (Jacobs and Korsten, 2004). Tuy nhiên, hiện chưa có nhiều nghiên cứu quan tâm đến đối tượng vi khuẩn. Hơn nữa, trong cùng một nghiên cứu chưa thực hiện đồng thời việc phân lập, định tên và giải pháp ức chế sự phát triển của nhóm vi sinh vật này, do đó vấn đề chưa được giải quyết tận gốc. Vì vậy, mục đích của nghiên cứu này nhằm xác định chính xác nguyên nhân gây bệnh cho quả vải sau thu hoạch và tìm ra biện pháp phòng trừ bệnh hiệu quả.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Mẫu vải được lấy từ 5 địa điểm:

- Lô 1: Xã Tam Dị - Lục Nam - Bắc Giang

- Lô 2: Xã Quý Sơn - Lục Ngạn - Bắc Giang

- Lô 3: Vườn thực vật - Học viện Nông nghiệp Việt Nam (VTV)

- Lô 4: Huyện Thanh Hà - Hải Dương

- Lô 5: Huyện Gia Lộc - Hải Dương

Môi trường phân lập và nuôi cấy gồm môi trường WA (Water Agar) 2% và môi trường PDA (Potato Dextrose Agar).

Hóa chất sử dụng trong nghiên cứu gồm agar, khoai tây, glucose, cà rốt, glucose, cồn 90°, cồn 70°... dùng để điều chế môi trường và khử trùng.

Chế phẩm Carbendazim được mua tại Việt Nam, chế phẩm nanoAg SINASAKH là sản phẩm của công ty Cổ phần phát triển Công nghệ Đức Minh đã được Bộ Y Tế cấp phép lưu hành tại Việt Nam số: VNDP - HC - 713 - 01 - 14.

2.2. Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Trung tâm Bệnh cây nhiệt đới - Học viện Nông Nghiệp Việt Nam - Trâu Quỳ - Gia Lâm - Hà Nội năm 2015.

2.3. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm 1: Phân lập các loại vi sinh vật gây bệnh trên quả vải sau thu hoạch

Tại mỗi địa điểm lấy mẫu, lấy ngẫu nhiên 40 quả vải, bao gói trong túi plastic, giữ ở nhiệt độ thường (30 - 32°C). Khi triệu chứng bệnh xuất hiện rõ ràng, tiến hành phân loại bệnh. Mỗi nhóm chọn ra 10 quả mới nhiễm bệnh để đem đi phân lập. Sau 2 - 3 ngày, nấm và vi khuẩn từ mô bệnh phát triển trên môi trường nhân tạo. Sau đó, chúng được cấy truyền sang đĩa môi trường PDA để thu nấm thuần và đơn khuẩn lạc.

Thí nghiệm 2: Lây nhiễm nhân tạo nấm và vi khuẩn gây bệnh trên quả vải khỏe

Thí nghiệm lặp lại 3 lần độc lập trên quả vải khỏe với nấm và vi khuẩn được phân lập từ

thí nghiệm 1. Các công thức (CT) thí nghiệm được bố trí như bảng 1.

Thí nghiệm 3: Định tên vi sinh vật gây bệnh bằng phương pháp sinh học phân tử

Phương pháp định tên vi sinh vật gây bệnh được mô tả theo Lane, 1991.

Thí nghiệm 4: Đánh giá khả năng ức chế vi sinh vật gây bệnh của một số chế phẩm trong điều kiện in vitro

Thiết kế thí nghiệm được bố trí như bảng 2 cho nấm và bảng 3 cho vi khuẩn.

2.4. Phương pháp phân tích

- *Phân lập vi sinh vật*

Phương pháp phân lập vi sinh vật được mô tả theo Nguyễn Lâm 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. Riêng đặc điểm hình thái của vi khuẩn được xác định bằng theo dõi hình thái khuẩn lạc theo thời gian nuôi cấy.

- *Tái lây nhiễm trên quả vải khỏe*

Phương pháp tái lây nhiễm trên quả vải khỏe được mô tả theo Stirling, 2007.

- *Đánh giá khả năng ức chế vi sinh vật gây bệnh trong điều kiện in vitro*

* Đối với nấm:

Hiệu lực ức chế của thuốc được tính theo công thức Abbott:

$$H = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Trong đó:

H (%): là hiệu lực của thuốc tính theo phần trăm; C (mm): Kích thước tản nấm trong các công thức đối chứng; T (mm): Kích thước tản nấm trong các công thức thí nghiệm

* Đối với vi khuẩn:

Hiệu lực ức chế của chế phẩm thử nghiệm đối với vi khuẩn được xác định bằng so sánh giá trị bình quân số lượng khuẩn lạc (nếu có).

Bảng 1. Thí nghiệm lây nhiễm nhân tạo nấm và vi khuẩn gây bệnh trên quả vải

Loại vi sinh vật	Công thức lây nhiễm nhân tạo (CT)	Đối chứng (ĐC)
Nấm	Đặt viên thạch chứa nấm thuần (3 × 3mm) lên quả vải khỏe, không gây tổn thương	Đặt viên thạch PDA vô trùng (3 × 3mm)
Vi khuẩn	Không tạo tổn thương vỏ quả, sau đó nhỏ 10μl dịch vi khuẩn lên vỏ	Nhỏ 10μl nước cất vô trùng

Bảng 2. Đánh giá hiệu lực ức chế của chế phẩm đối với nấm gây bệnh trong điều kiện in vitro

Loại chế phẩm	CT	Nồng độ
Đối chứng	A0	Không xử lý chế phẩm (0 ml chế phẩm/L nước cất).
CBZ	B1	2ppm (Giảm 250 lần so với khuyến cáo)
	B2	2,5ppm (Giảm 200 lần so với khuyến cáo)
	B3	5ppm (Giảm 100 lần so với khuyến cáo)
	B4	25ppm (Giảm 20 lần so với khuyến cáo)
Chế phẩm nanoAg	C1	Chế phẩm nanoAg nồng độ 5ppm
	C2	Chế phẩm nanoAg nồng độ 10ppm
	C3	Chế phẩm nanoAg nồng độ 15ppm
	C4	Chế phẩm nanoAg nồng độ 20ppm

Bảng 3. Đánh giá hiệu lực ức chế của chế phẩm đối với vi khuẩn gây bệnh trong điều kiện *in vitro*

Loại chế phẩm	CT	Nồng độ
Đối chứng	A0	Không xử lý chế phẩm (0ml chế phẩm/L nước cất)
CBZ	B1	2 ppm (Giảm 250 lần so với khuyến cáo)
	B2	2,5ppm (Giảm 200 lần so với khuyến cáo)
	B3	5 ppm (Giảm 100 lần so với khuyến cáo)
	B4	25ppm (Giảm 20 lần so với khuyến cáo)
Chế phẩm nanoAg	C1	Chế phẩm nanoAg nồng độ 5 ppm
	C2	Chế phẩm nanoAg nồng độ 10 ppm
	C3	Chế phẩm nanoAg nồng độ 15 ppm
	C4	Chế phẩm nanoAg nồng độ 20 ppm

Bảng 4. Phân loại bệnh trên quả vải sau thu hoạch

Loại bệnh	Triệu chứng
Thối nâu	Vỏ quả chuyển thành từng mảng màu nâu, ăn sâu vào thịt quả gây thối nhũn thịt quả, biến màu, có mùi chua
Thối có nấm	Vỏ quả xuất hiện các sợi khuẩn ty lan trên bề mặt vỏ quả, ăn sâu vào thịt quả gây thối nhũn thịt quả, có mùi chua

Bảng 5. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc vi khuẩn phân lập được trên quả vải bệnh

Tên vi khuẩn	Hình thái khuẩn lạc
V1	Trong, lồi, màu vàng, nhầy, to, tốc độ mọc nhanh, ở 28°C khuẩn lạc mọc sau 1 ngày. Sau 3 - 4 ngày đường kính đạt 3 - 4mm
V2	Rất nhỏ, màu trắng, khô, mọc nhanh, ở 28 °C khuẩn lạc mọc sau 1 ngày. Sau 3 - 4 ngày đường kính đạt 2,5 - 3mm
V3	Tròn, hơi lồi, to, nhầy, tốc độ mọc chậm, màu vàng, ở 28°C khuẩn lạc mọc sau 2 - 3 ngày. Sau 3 - 4 ngày đường kính đạt 8 - 10mm
V4	Tròn, lồi, màu trắng, nhầy, bóng, to, tốc độ mọc rất nhanh, ở 28 °C khuẩn lạc mọc sau 1 ngày. Sau 3 - 4 ngày đường kính đạt 4 - 6mm
V5	Tròn, lồi, rất nhỏ, màu trắng sữa lúc non, màu vàng nâu nhân đen lúc già, tốc độ phát triển rất nhanh, ở 28°C khuẩn lạc mọc sau 1 ngày. Sau 3 - 4 ngày đường kính khuẩn lạc đạt 0,75 - 1mm
V5.1	Rất nhỏ, trắng, khô. Tốc độ phát triển chậm, ở 28°C khuẩn lạc mọc sau 2 ngày. Sau 3 - 4 ngày đường kính khuẩn lạc đạt 0,75 - 1mm

2.5. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý trên phần mềm Excel và xử lý thống kê bằng phần mềm JMP. Các nhân tố được phân tích nhờ phương pháp ANOVA một chiều. Giá trị trung bình được đánh giá nhờ phép so sánh Tukey một chiều với giới hạn tin cậy là 95%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập vi sinh vật gây bệnh

Từ 5 địa điểm lấy mẫu xuất hiện 2 loại bệnh điển hình là bệnh thối nâu và thối có nấm trên vỏ quả với các triệu chứng hoàn toàn khác nhau và được mô tả chi tiết trong bảng 4.

Bảng 4 cho thấy bệnh thối nâu và thối có nấm 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

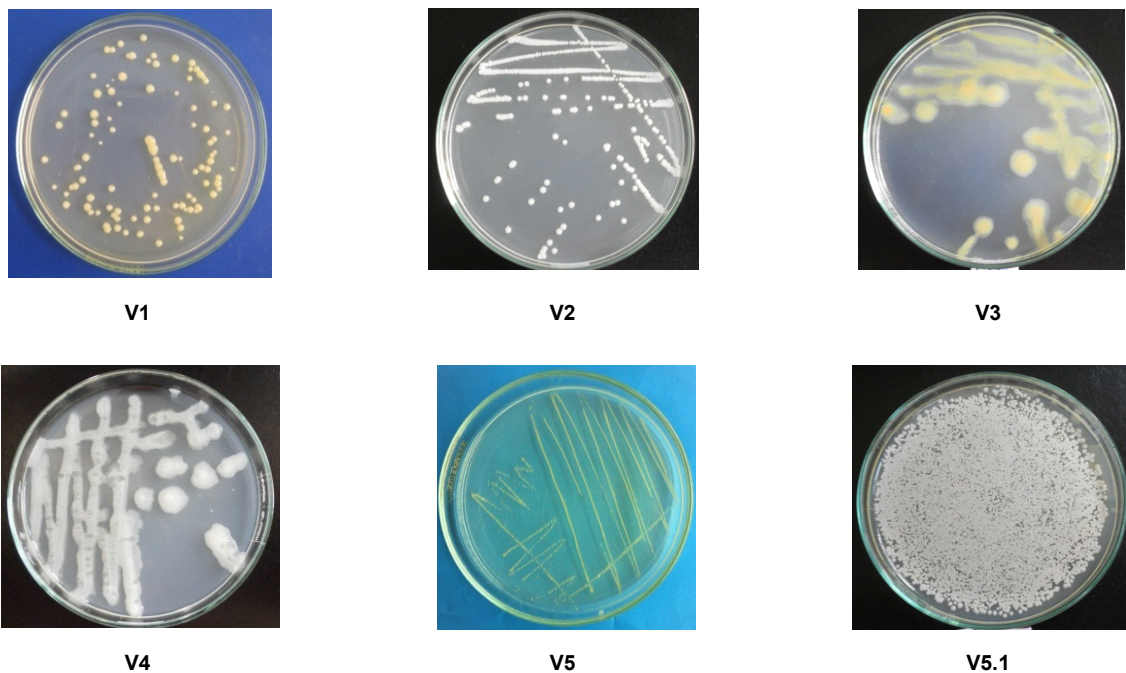
bệnh đã được phân loại như trên, tiến hành chọn ra từ mỗi lô mẫu, mỗi loại 10 quả vải bệnh đem đi phân lập nhằm xác định thành phần nấm và vi khuẩn có trên vết bệnh. Kết quả phân lập vi khuẩn thu được 6 loại với hình thái khuẩn lạc khác nhau (V1, V2, V3, V4, V5, V5.1). Đặc điểm, hình thái khuẩn lạc của chúng được thể hiện trong bảng 5 và hình 1.

Kết quả phân lập nấm gây bệnh thu được 4 loài nấm được kí hiệu là N1, N2, N3 và N4.

Đặc điểm hình thái của các loại nấm phân lập từ mẫu bệnh được mô tả trong bảng 6 và hình 2.

3.2. Lây bệnh nhân tạo trên quả vải

Thí nghiệm lây bệnh nhân tạo trên quả vải khỏe được tiến hành với 4 loại nấm và 6 loại vi khuẩn đã phân lập được từ mẫu bệnh. Với nấm, phương pháp đặt viên thạch chứa nấm thuần lên quả khỏe được sử dụng. Mỗi quả đặt 3 viên thạch tại 3 vị trí khác nhau. Sau khi triệu chứng bệnh xuất hiện từ vị trí đặt nấm, tiến hành tái phân lập vết bệnh nhằm xác định chính xác loại nấm gây bệnh trên quả vải. Tỷ lệ nhiễm bệnh sau khi lây nhiễm nhân tạo được trình bày trong bảng 7.

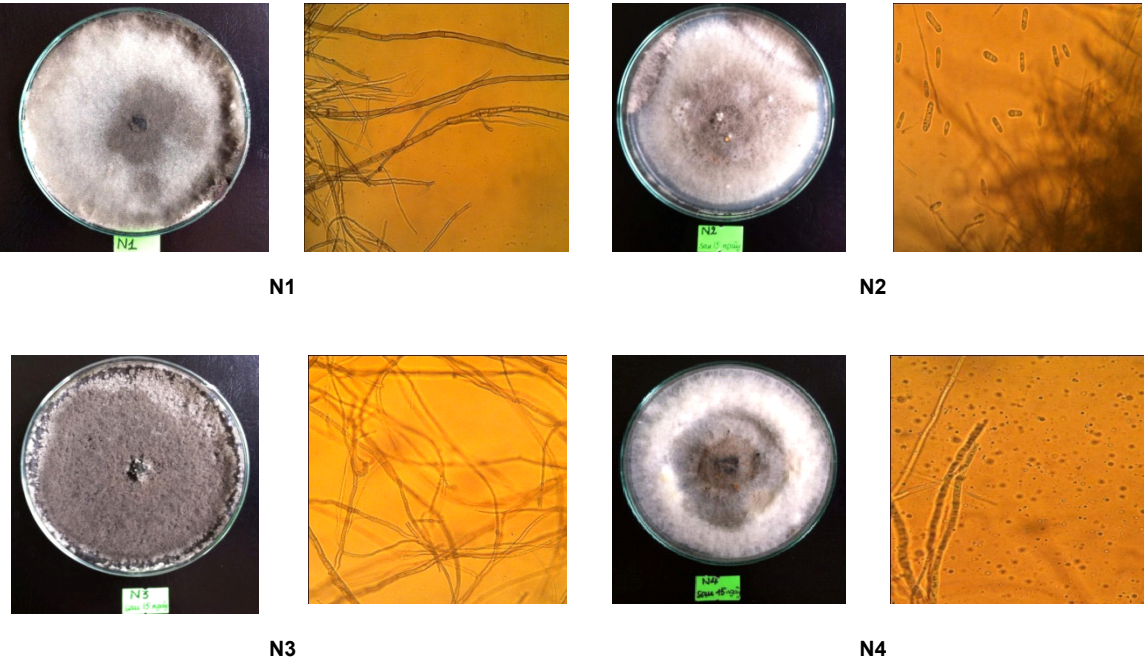


Hình 1. Hình thái khuẩn lạc của vi khuẩn phân lập được từ quả vải bệnh

Bảng 6. Đặc điểm hình thái các loại nấm phân lập được trên quả vải bệnh

Tên nấm	Hình thái tản nấm	Kết quả quan sát dưới kính hiển vi
N1	Khi non sợi khuẩn ty màu trắng, mọc thưa, tản nấm đều, khi già sợi khuẩn ty chuyển thành màu đen, mọc rất nhanh ở nhiệt độ phòng (30°C)	Không sinh bào tử. Sợi nấm phân nhánh, phân đốt
N2	Vòng ngoài tản nấm màu trắng, tản nấm đều, tâm màu xám, sợi khuẩn ty mọc lên bông xốp trên bề mặt	Sợi nấm phân nhánh, có vách ngăn. Bào tử trong suốt hình ovan
N3	Tản nấm màu trắng sữa, tạo thành vòng, sợi khuẩn ty không mọc bông xốp, phát triển nhanh, khi già sợi khuẩn ty hoá đen	Không sinh bào tử, đuôi phân 3 nhánh, trong suốt
N4	Khi non giống hình hoa cúc, tâm màu đen, ngoài rìa mọc thưa hơn, màu trắng. Khi già màu đen, bông xốp	Sợi nấm phân nhánh, sinh bào tử. Bào tử hình cầu

Xác định loài nấm mốc và vi khuẩn gây bệnh sau thu hoạch trên vải và phương pháp phòng trừ



Hình 2. Đặc điểm hình thái nấm phân lập được từ quả vải bệnh

Bảng 7. Kết quả lây bệnh nhân tạo đối với nấm

Mẫu lây nhiễm	Tỷ lệ bệnh sau lây nhiễm (%)	Kết quả tái phân lập (%)
N1	100	100
N2	0	-
N3	10	22.22
N4	10	33.33
ĐC	0	0

Bảng 8. Kết quả lây nhiễm nhân tạo vi khuẩn

Mẫu lây nhiễm	Tỷ lệ bệnh sau lây nhiễm (%)	Kết quả tái phân lập (%)
V1	0	-
V2	0	-
V3	0	-
V4	0	-
V5	100%	100%
V5.1	0	-
ĐC	0	0

Bảng 9. Kết quả tìm kiếm trên ngân hàng gen đối với mẫu nấm và vi khuẩn

Vi sinh vật	Mã trình tự	Loài xác định	Phần trăm đoạn so sánh (%)	Mức đồng nhất trình tự (%)
Nấm	163DZAC036	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	90	100
Vi khuẩn	15A1ZAA032	<i>Gluconobacter oxydans</i>	100	100

Kết quả bảng 7 cho thấy nấm N1 có tỷ lệ bệnh sau lây nhiễm là 100% ngay cả khi không tạo tổn thương vỏ quả, trong khi nấm N3 và N4 tỷ lệ bệnh chỉ là 10%. Mẫu N2 tương tự như đối chứng không có biểu hiện bệnh sau khi lây nhiễm. Từ kết quả này, có thể khẳng định nấm N1 là tác nhân gây bệnh chính trên vỏ quả vải.

Đối với vi khuẩn, mỗi mẫu vi khuẩn thực hiện lây nhiễm trên 10 quả. Sau 3 ngày theo dõi tiến hành kiểm tra mẫu. Kết quả được thể hiện trong bảng 8.

Kết quả bảng 8 cho thấy chỉ có V5 có khả năng gây bệnh thối nâu thậm chí khi không gây tổn thương vỏ quả. Kết quả tái phân lập và tỷ lệ bệnh sau lây nhiễm của vi khuẩn V5 đều đạt 100%. Do ở công thức này không tạo tổn thương vỏ quả nên thời gian để vi khuẩn xâm nhập và phá hủy lớp vỏ quả bên ngoài dài hơn vì vậy thời gian ủ bệnh lâu hơn. Tổng hợp kết quả lây nhiễm nhân tạo nấm và vi khuẩn phân lập được từ vết bệnh ban đầu bằng các công thức khác nhau, có thể kết luận nấm N1 và vi khuẩn V5 là nguyên nhân gây bệnh chính trên quả vải sau thu hoạch, loại nấm và loại vi khuẩn này có thể gây bệnh ngay cả khi không có tổn thương ngoài vỏ quả và vết bệnh phát triển rất nhanh, ăn sâu vào trong thịt quả.

3.3. Định tên vi khuẩn bằng phương pháp giải trình tự gen

Để định danh chính xác loài nấm, phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi ITS4 và ITS5 để nhân toàn bộ vùng gen mã hóa tiểu phần 16S RNA ribosome (Lane, 1991). Đối với vi khuẩn V5, phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi 27F và 1525R (Lane, 1991). Sau khi giải trình tự, kết quả được so sánh trên ngân hàng gen. Kết quả được trình bày trong bảng 9.

Kết quả tìm kiếm dựa trên đoạn gen chứa 484 nucleotide của mẫu nấm N1 cho thấy phần trăm đoạn so sánh mẫu này là 90%, mức đồng nhất trình tự đạt 100% với nấm *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. Như vậy, nấm N1 phân lập từ vết bệnh thối nâu vỏ quả vải sau thu hoạch chính là *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. *L.pseudotheobromae*, một loài có phổ gây bệnh rộng, chủ yếu trên các loài thực vật thuộc vùng

nhiệt đới và cận nhiệt đới (Ismail *et al.*, 2012). Tại Ai Cập, nấm *L. pseudotheobromae* được coi là tác nhân chính của bệnh thối trái, thối gốc và chết mầm non ở xoài. Ngoài ra, loài *L. pseudotheobromae* cũng liên quan với viêm giác mạc, các tổn thương trên móng tay và mô dưới da ở người (Abdalla *et al.*, 2003). Trong nghiên cứu này, lần đầu tiên chúng minh được nấm *L. pseudotheobromae* là nguyên nhân chính gây bệnh trên quả vải sau thu hoạch.

Kết quả tìm kiếm dựa trên đoạn 1131 nucleotide của mẫu V5 cho thấy phần trăm đoạn so sánh mẫu này là 100%, mức đồng nhất trình tự đạt 100% với vi khuẩn *Gluconobacter oxydans*. Như vậy vi khuẩn V5 phân lập từ vết bệnh thối nâu vỏ quả vải sau thu hoạch là *Gluconobacter oxydans*. Theo Kumar (2001), *Gluconobacter oxydans* còn gọi là *Acetobacter suboxydans* là một loại vi khuẩn hình que, gram âm, hiếu khí bắt buộc, thuộc họ *Acetobacteraceae*, kích thước từ 0,5 - 0,8 × 0,9 - 4,2μm, đứng đơn lẻ hoặc thành cặp, hiếm khi tạo thành chuỗi dài, có hai màng và không có lông roi, vi khuẩn này thường chứa ubiquinone, phát triển ở pH tối ưu 5,5 - 6,0, nhiệt độ phát triển từ 25-30°C và không thể chịu được nhiệt độ cao trên 37°C. Bộ gen của *Gluconobacter oxydans* có xu hướng có kích thước nhỏ, dao động khoảng 2,240 đến 3,787bp (Verma *et al.*, 1997). Vi khuẩn này không gây bệnh cho người và động vật nhưng nhiều chủng có thể gây thối hỏng, biến màu nhiều loại quả ôn đới và nhiệt đới như lê, táo... *Gluconobacter oxydans* có đóng góp quan trọng trong việc tổng hợp vitamin C, sản xuất L-sorbose từ sorbitol, acid D-gluconic và acid ketogluconic, dihydroxyl acetone từ glycerol trong công nghiệp (Muynck *et al.*, 2006).

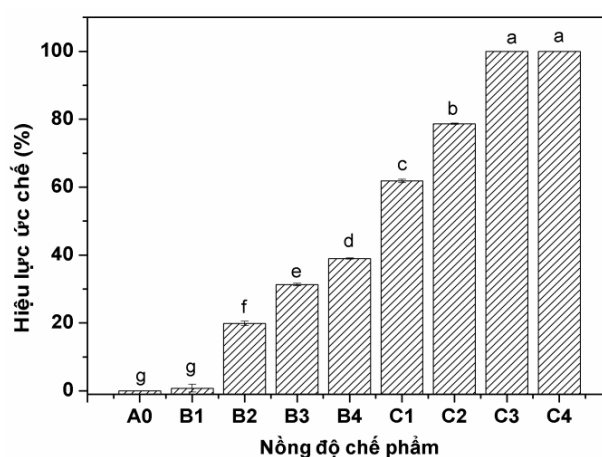
3.4. Thử nghiệm khả năng phòng trừ nấm và vi khuẩn trong điều kiện *in vitro*

Trong nghiên cứu này khả năng phòng trừ nấm *Lasiodiplodia pseudotheobromae* của carbendazim và chế phẩm nanoAg được thử nghiệm. Carbendazim là loại thuốc hóa học được sử dụng phổ biến để diệt nấm. Nồng độ khuyến cáo sử dụng của carbendazim được ghi trên bao bì: 1ml Vicarben 50 HP/lít nước (tương ứng với 500ppm). Riêng nanoAg là vật liệu có diện tích

bề mặt riêng rất lớn, có những đặc tính độc đáo như: tính khử khuẩn, chống nấm, khử mùi, không có hại cho sức khỏe con người với liều lượng tương đối cao.

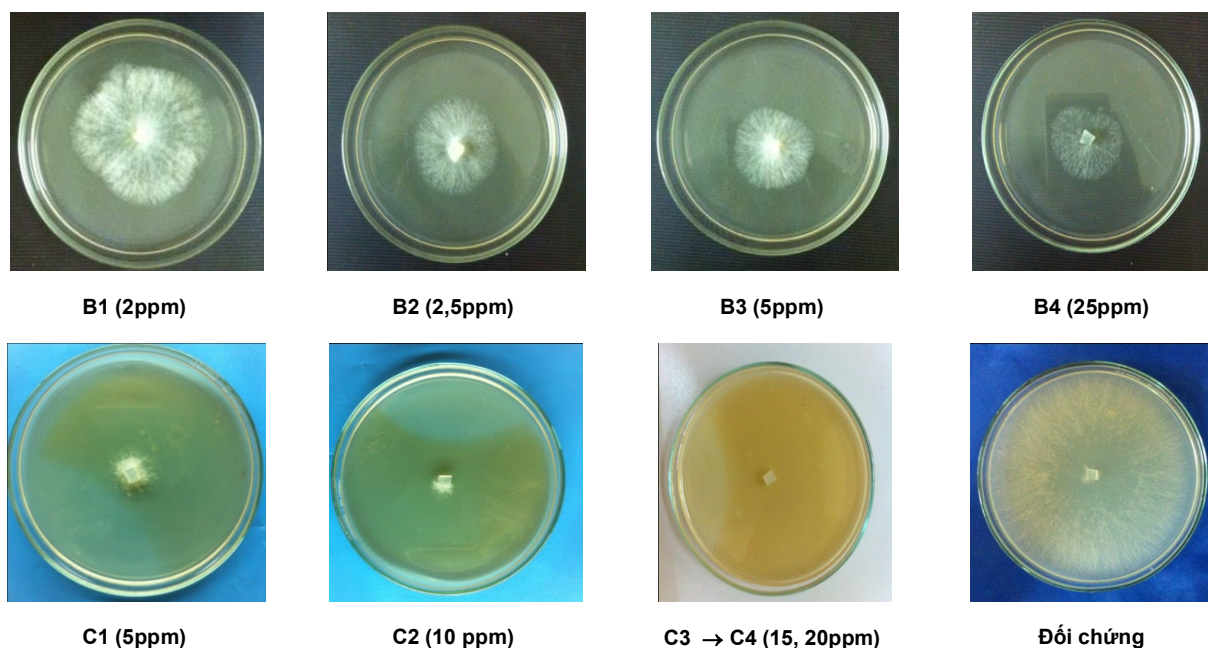
Mỗi công thức thử nghiệm được lặp lại 3 lần trên đĩa petri. Các mẫu đối chứng không được xử lý chế phẩm. Kết quả đánh giá khả năng ức chế nấm *Lasiodiplodia pseudotheobromae* được trình bày trong hình 3.

Kết quả hình 3 cho thấy có sự khác nhau rõ rệt về khả năng ức chế nấm *L. pseudotheobromae* của hai loại chế phẩm. Đối với carbendazim khi tăng nồng độ, thì hiệu lực ức chế nấm cũng tăng lên. Hiệu lực ức chế nấm *L. pseudotheobromae* đạt 38,9% ở nồng độ 25ppm (B4). Ở nồng độ 2ppm, nấm mọc với tốc độ chậm hơn, thưa hơn so với mẫu đối chứng và hiệu lực ức chế chỉ đạt 0,8%.



Hình 3. Hiệu lực ức chế *L. pseudotheobromae* của chế phẩm carbendazim và nano bạc

Chú thích: Với cùng một loại chế phẩm, kết quả có cùng chữ cái thì không có sự khác biệt về hiệu lực ức chế nấm ở độ tin cậy 95% trong phép so sánh Tukey một chiều. A0: mẫu đối chứng; B1 - B4: nồng độ carbendazim; C1 - C4: nồng độ nano Ag.



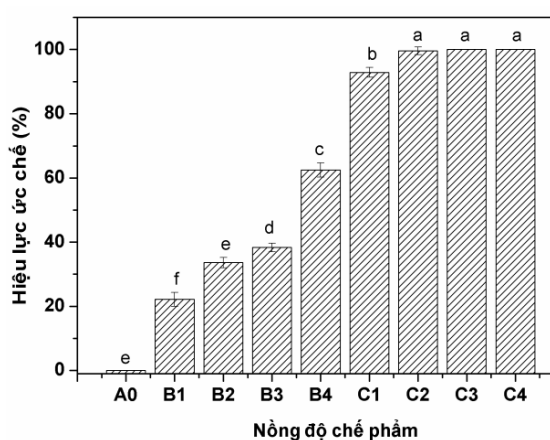
Hình 4. Tảo nấm *L. pseudotheobromae* sau 2 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA có bổ sung carbendazim và chế phẩm nano bạc

Đối với chế phẩm nanoAg, kết quả thí nghiệm cho thấy hiệu lực ức chế nấm *L. pseudotheobromae* rất cao. Các nồng độ nanoAg khác nhau có sự khác biệt về hiệu lực ức chế nấm ở độ tin cậy 95%. Ở nồng độ 5ppm hiệu lực ức chế là 61,8% (C1), khi tăng nồng độ lên 10ppm thì hiệu lực ức chế là 78,6% (C2) và lên 100% ở nồng độ ≥ 15 ppm. Như vậy, hiệu lực ức chế nấm của chế phẩm nanoAg cao hơn hẳn carbendazim. Kết quả kháng nấm *L.*

pseudotheobromae của các chế phẩm trong điều kiện in vitro được thể hiện trong hình 4.

Đối với vi khuẩn *Gluconobacter oxydans*, hiệu lực ức chế của carbendazim và chế phẩm nano bạc được thể hiện trên hình 5.

Kết quả hình 5 cho thấy hiệu lực ức chế vi khuẩn của chế phẩm nano bạc cao hơn hẳn carbendazim. Ở nồng độ 5ppm (C1), hiệu lực ức chế của nano Ag đạt 92,9%. Ở nồng độ ≥ 10 ppm

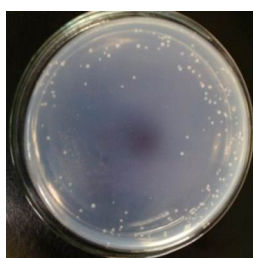


Hình 5. Hiệu lực ức chế *G. oxydans* của chế phẩm carbendazim và nano bạc

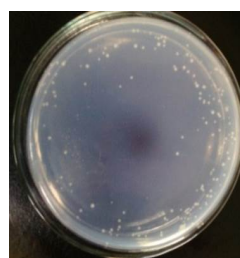
Chú thích: Với cùng một loại chế phẩm, kết quả có cùng chữ cái thì không có sự khác biệt về hiệu lực ức chế nấm ở độ tin cậy 95% trong phép so sánh Tukey một chiều. A0: mẫu đối chứng; B1 - B4: nồng độ carbendazim; C1 - C4: nồng độ nano Ag



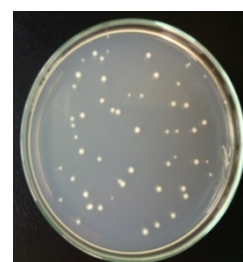
B1 (2ppm)



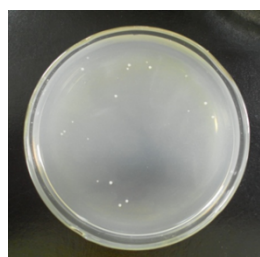
B2 (2,5ppm)



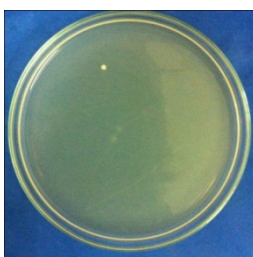
B3 (5ppm)



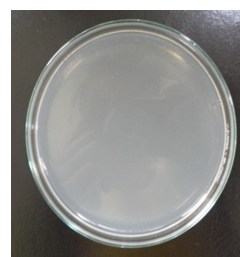
B4 (25ppm)



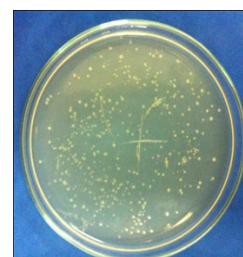
C1 (5ppm)



C2 (10 ppm)



C3 → C4 (15, 20ppm)



Đối chứng

**Hình 6. Khuẩn lạc sau 3 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA
có bổ sung carbendazim và chế phẩm nano bạc**

hoạt tính của vi khuẩn bị ức chế hoàn toàn. Với carbendazim, mặc dù hiệu lực ức chế đối với vi khuẩn cao hơn đối với nấm nhưng vẫn thấp hơn so với hiệu lực ức chế của nanoAg, cụ thể ở nồng độ giảm 250 lần so với khuyến cáo (2ppm) carbendazim không ức chế được nấm nhưng đã ức chế 22% sự phát triển của vi khuẩn, còn ở nồng độ giảm 20 lần so với khuyến cáo (25ppm) thì carbendazim có khả năng ức chế 62% sự phát triển của vi khuẩn trong khi chỉ ức chế 38 % sự phát triển của nấm. Hình thái khuẩn lạc của vi khuẩn trong các công thức xử lý được thể hiện trong hình 6.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này nấm *Lasiodiplodia pseudotheobromae* vi khuẩn *Gluconobacter oxydans* được chứng minh là nguyên nhân chính gây bệnh sau thu hoạch trên quả vải. Kết quả thử nghiệm khả năng phòng trừ bệnh của carbendazim và chế phẩm nano bạc trong điều kiện *in vitro* cho thấy carbendazim có khả năng ức chế nấm thấp hơn ức chế vi khuẩn. Đối với chế phẩm nano bạc, *Gluconobacter oxydans* bị ức chế hoàn toàn ở nồng độ 10 ppm, trong khi nấm *Lasiodiplodia pseudotheobromae* bị ức chế ở nồng độ 15 ppm. Như vậy, chế phẩm nano bạc có hiệu quả cao trong việc ức chế vi sinh vật gây bệnh trên vải. Do đó, cần tiếp tục thử nghiệm khả năng ức chế của các chế phẩm khác nhau đối với nấm và vi khuẩn trong điều kiện *in vitro* và *in vivo* nhằm tìm ra biện pháp ức chế tối ưu nhất để phòng ngừa các loại bệnh trong quá trình bảo quản vải.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Agrios, G.N. (2005). Plant pathology, 5th edition. Elsevier Academic Press.
- de Jager, E.S., Wehner, F.C., Korsten, L. (2003). Fungal post-harvest pathogens of litchi fruit in South Africa. South African Litchi Growers' Association Yearbook, 15: 24-32.
- Ismail, M., Cirvilleri, G., Polizzi, G., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Lombard, L., (2012). *Lasiodiplodia species* associated with dieback disease of Smango (*Mangifera indica*) in Egypt. Australasian Plant Pathology Society.
- Jacobs R, Korsten L (2004). Preliminary identification of *Penicillium* species isolated through the litchi export chain from South Africa to distribution centres in the Netherlands and United Kingdom. South African Litchi Growers' Association Yearbook, 16: 34-39.
- Jiang Y.M., Zhu X.R., Li Y.B. (2001). Postharvest control of litchi fruit rot by *Bacillus subtilis*. Food Science and Technology, 34: 430-436.
- Lane, D. J., (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. London, Wiley. pp. 115-175.
- Muynck, C.D., Pereira, C., Soetaert, W., Vandamme, E., (2006). Journal of Biotechnology, 125(3): 408-415.
- Kumar, A., Gupta, A., Singh, V.K., Qazi, G.N., (2001). *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications. J Mol Microbiol Biotechnol.
- Silver Nanoparticles: A Case Study in Cutting Edge Research. Cnx.org <http://cnx.org/content/m19597/latest/>
- Stirling G.R. and Eden L.M. (2007). The impact of organic amendments and mulch on root - knot nematode and *Pythium* root rot of capsicum. Presented at the Australasian Plant Pathology Society Conference, Adelaide, 24 - 27 September 2007.
- Zhang D.L. and Quantick P.C. (1997). Effect of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn) fruit. Postharvest Biology and Technology, 12(2): 195-202.
- Verma, V., Gupta, A., Felder, M., Cullum, J., Qazi, G.N. (1997). A mutant of *Gluconobacter oxydans* deficient in gluconic acid dehydrogenase.