

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM CỦA DẦU DỪA VÀ DỊCH CHIẾT TỎI ĐỐI VỚI NẤM MEN GÂY HẠI *Candida tropicalis* NM1 PHÂN LẬP TỪ TRÁI VẢI *Litchi chinensis* Sonn. SAU THU HOẠCH

Nguyễn Lê Huy Khanh¹, Phạm Thị Ái Niệm¹, Nguyễn Thị Thu Huyền²

¹Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh, Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Vải thiều (*Litchi chinensis* Sonn.) là loại trái theo mùa, mọng nước, có dinh dưỡng cao vì thế trái vải là môi trường lí tưởng để vi sinh vật gây hại xâm nhập, gây nên tổn thất về giá trị dinh dưỡng và kinh tế. Do đó việc xác định tác nhân vi sinh vật gây hại cũng như tìm các biện pháp để kiểm soát tác nhân gây hại đó là rất cần thiết. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định được loài nấm gây hại ở trên trái vải và bước đầu đánh giá khả năng ức chế nấm gây hại bằng dịch chiết từ tỏi và dầu dừa. Từ các mẫu trái vải thiều bị hư hỏng, ba chủng nấm men MN1, MN2 và MN3 đã được phân lập bằng phương pháp cấy trái trên môi trường thạch YPD. Quan sát hình thái khuẩn lạc của nấm men bằng mắt thường và hình thái tế bào của nấm men bằng kính hiển vi quang học cho thấy đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của 3 chủng này không có sự khác biệt đáng kể nên chủng NM1 được chọn ngẫu nhiên để định danh đến loài bằng phương pháp sinh học phân tử. Kết quả phân tích trình tự vùng ITS và LSU của gen *rRNA* của chủng nấm men NM1 cho thấy chủng nấm men NM1 thuộc loài *Candida tropicalis* với độ tương đồng 100%. Thử nghiệm lây nhiễm nhân tạo đã xác định được nấm men *Candida tropicalis* NM1 là tác nhân gây hỏng trái vải. Thử nghiệm ức chế nấm men *C. tropicalis* NM1 bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch cho thấy dịch chiết tỏi có tính kháng nấm mạnh hơn dầu dừa và dịch phối trộn dịch chiết tỏi và dầu dừa với tỷ lệ 2:1 cho hiệu quả kháng chủng nấm men này tốt nhất (đường kính vòng kháng nấm là $19,33 \pm 0,67$ mm). Các kết quả thu được đã cho thấy *C. tropicalis* NM1 là nấm men gây hại cho trái vải đồng thời cho thấy tiềm năng sử dụng các hỗn hợp chất tự nhiên như dầu dừa, dịch chiết tỏi trong việc kiểm soát nấm men gây hại trên trái vải thiều sau thu hoạch.

Từ khóa: *Candida tropicalis*, dầu dừa, dịch chiết tỏi, nấm men, trái vải thiều.

MỞ ĐẦU

Trái vải (*Litchi chinensis* Sonn.) là loại trái cây có hàm lượng đường cao, có giá trị kinh tế cao, được trồng phổ biến ở các nước có khí hậu nhiệt đới và cận nhiệt đới. Trong những năm gần đây, việc trồng vải chủ yếu phân bố sang các nước trong khu vực Đông Nam Á, trong đó Trung Quốc là nước sản xuất lớn nhất, tiếp theo là Thái Lan, Việt Nam và Ấn Độ. Việt Nam là một trong những nước xuất khẩu vải lớn nhất thế giới. Tuy sản lượng vải thu hoạch lớn nhưng điều kiện thu hái, kỹ thuật bảo quản trái sau thu hoạch còn hạn chế nên chất lượng trái có xu hướng không ổn định và suy giảm, gây ảnh hưởng đến hương vị, giá trị dinh dưỡng, hiệu quả kinh tế. Một trong các tác nhân gây ra tình trạng hư hỏng trái vải sau thu hoạch là nấm bệnh. Nấm men *Candida* được phát hiện là một trong các tác nhân gây hư hỏng ở một số trái cây như cam, trà là (*Oviasogie et al.*, 2015; *Aljasass et al.*, 2016). Gần đây việc bảo quản trái cây sau khi thu hoạch từ các nguyên liệu có nguồn gốc từ tự nhiên được quan tâm. Một số hợp chất tự nhiên như dầu dừa và tỏi đều có tính kháng nấm (*Ogbolu et al.*, 2007; *Agustantina, Soekartono*, 2021). Vì thế, trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung xác định nấm gây hại trên trái vải cũng như thăm dò khả năng kháng nấm gây hại của 2 hợp chất tự nhiên dầu dừa và tỏi để từ đó đưa ra khuyến cáo về việc bảo quản trái vải sau thu hoạch để hạn chế thiệt hại kinh tế do nấm gây hại đó gây ra.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Các mẫu trái vải (có nguồn gốc từ tỉnh Bắc Giang) được thu thập tại các cửa hàng trái cây trên địa bàn quận Bình Tân, Thành phố Hồ Chí Minh.

Dầu dừa được mua ở dạng thương phẩm trên thị trường (Dầu dừa Organic Vietcoco, ép lạnh nguyên chất, Vietcoco).

Tỏi cô đơn Lý Sơn (Quảng Ngãi) được sử dụng. Dịch chiết tỏi được chiết xuất bằng cách xay nhuyễn tỏi với nước cất và thu dịch ép.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường dịch và thạch YPD thương phẩm (Titan Biotech, Ấn Độ) được sử dụng để tăng sinh, phân lập và giữ giống các chủng nấm men từ trái vải hư hỏng.

Dung dịch SPW (saline peptone water) bao gồm 10 g/L peptone, 9 g/L NaCl, dùng để pha loãng mẫu nấm men.

Phân lập, làm thuần và lưu trữ các chủng nấm men

Chọn ngẫu nhiên các trái vải có dấu hiệu hư hỏng để tiến hành phân lập nấm men. Dùng dao vô trùng cắt 10g bao gồm thịt trái và vỏ trái cho vào môi trường lỏng YPD, sau đó tiến hành nuôi tĩnh trong 24 giờ. Dịch nuôi cấy sau đó được pha loãng đến nồng độ 10^{-5} bằng dung dịch SPW, rồi cấy trải trên môi trường thạch YPD. Đĩa sau đó được ủ ở nhiệt độ 30°C trong 24-72 giờ. Các khuẩn lạc nấm men xuất hiện được làm thuần, quan sát hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào bằng kính hiển vi quang học và được lưu trữ trong dung dịch glycerol 30% ở nhiệt độ -80°C.

Định danh chủng nấm men được lựa chọn bằng giải trình tự vùng ITS và LSU của gen *rRNA*

Chủng nấm men được tuyển chọn được nuôi cấy 24 giờ trên môi trường thạch YPD ở nhiệt độ phòng. Genome của chủng này được tách chiết theo phương pháp của Korabecna (2007). Sau đó, vùng ITS và LSU của gen *rRNA* được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đa năng đặc hiệu cho phổ rộng các loài nấm gồm: ITS5 (5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G -3') và LS5 (5'- TCC TGA GGG AAA CTT CG -3'). Thành phần phản ứng PCR bao gồm: Buffer 10X, dNTP, mồi xuôi (10uM), mồi ngược (10uM), DNA khuôn (10-100ng), Tag DNA polymerase, nước cất. Chu trình phản ứng PCR bao gồm: biến tính 5 phút ở 95°C, sau đó là 30 chu kỳ 95°C 1 phút, gắn mồi ở 56°C 45 giây, kéo dài 72°C 1 phút, và cuối cùng là 10 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR được phát hiện bằng điện di trên gel agarose 1%, sau đó được tinh sạch bằng kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) và giải trình tự trên máy 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Kết quả giải trình tự của chủng tuyển chọn được xử lý bằng phần mềm BioEdit và so sánh với các trình tự tương ứng của các chủng đã được đăng ký trên GenBank nhờ công cụ BLAST trên NCBI (National Center for Biotechnology Information). Cây phát sinh chủng loại được xây dựng bằng phần mềm MEGA 6.

Lây nhiễm nhân tạo chủng nấm men được tuyển chọn

Khả năng gây hại của chủng nấm men được lựa chọn được đánh giá bằng phương pháp gây bệnh nhân tạo theo nguyên tắc Koch (Burgess *et al.*, 2009). Các trái vải to khỏe, mọng nước, không dị dạng, đồng đều về kích thước và không có dấu hiệu bệnh lý bên ngoài được lựa chọn cho thí nghiệm. Chủng nấm men được lựa chọn được tăng sinh trong môi trường YPD lỏng ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Pha loãng dịch tăng sinh để đạt mật độ 10^4 cfu/mL theo nguyên cứu Aljasass và đồng tác giả (2016) với mật độ nấm gây hại từ $10^4 - 10^7$ cfu/mL. Thí nghiệm được tiến hành với 5 nghiệm thức: (1) Trái vải nguyên không xử lí, (2) Trái vải đã qua xử lí bằng cách nhúng nhanh vào dung dịch Javen 5% rồi để ráo nước, (3) Trái vải đã qua xử lí bằng cách nhúng nhanh vào nước cất rồi để ráo nước rồi được nhúng vào dung dịch nấm men 10^4 cfu/mL, (4) Trái vải đã qua xử lí bằng cách nhúng nhanh nước Javen 5% rồi để ráo nước rồi tạo vết thương trên trái (không làm rách màng bao ruột trái), (5) Trái vải đã qua xử lí bằng cách nhúng nhanh nước Javen 5% rồi để ráo nước rồi tạo vết thương trên trái (không làm rách màng bao ruột trái) sau đó được nhúng vào dung dịch nấm men 10^4 cfu/mL. Các trái vải của từng nghiệm thức được để lên các khay khác nhau và được bảo quản bằng cách quấn màng bao thực phẩm xung quanh khay đựng. Quan sát, ghi nhận các triệu chứng trên trái vải lây bệnh nhân tạo so với trái đối chứng về màu sắc vỏ (vỏ xuất hiện màu nâu, thối, có vị chua) và thời gian bệnh phát triển (thời điểm xuất hiện bệnh lý đến khi quả hỏng hoàn toàn, phân hủy nặng). Khi kết thúc thí nghiệm, tiến hành tái phân lập nấm men từ vị trí vết bệnh trên môi trường YPD thạch và quan sát hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào của chủng nấm men phân lập được quan sát bằng kính hiển vi quang học và định danh chủng tái phân lập thông qua phân tích trình tự gen vùng ITS và LSU của gen *rRNA* nhằm xác định chính xác loại nấm men tái phân lập gây hại trên trái vải. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Đánh giá hiệu lực kháng nấm men của các hợp chất hữu cơ tự nhiên

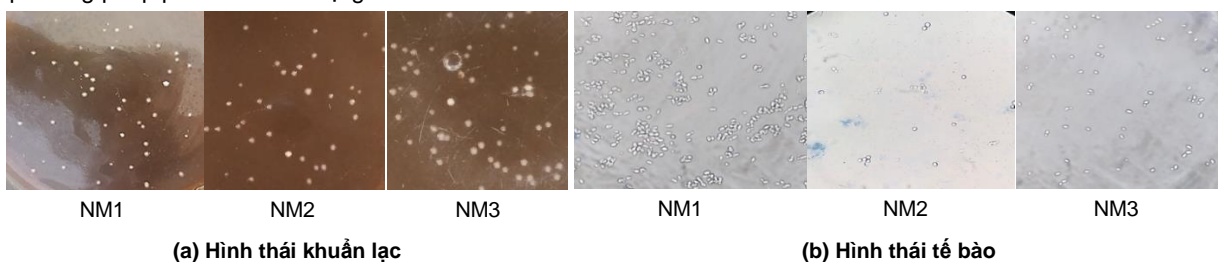
Chủng nấm men được lựa chọn được hoạt hóa trong môi trường YPD lỏng ở nhiệt độ phòng trong 24h. Hút 0,1 mL dịch nuôi cấy trải trên môi trường thạch YPD. Đặt các khoan giấy lọc Whatmann 4 lần lượt chứa 0,5 mL nguyên liệu kháng nấm men bao gồm: dầu dừa nguyên chất, dịch ép tỏi, hỗn hợp dịch ép tỏi và dầu dừa lên trên đĩa đã cấy trải nấm men. Đây là nghiên cứu đầu tiên khảo sát khả năng kết hợp dịch chiết tỏi và dầu dừa để kháng nấm nên chúng tôi tiến hành thử nghiệm các tỉ lệ phối trộn dịch chiết tỏi và dầu dừa tương ứng sau: 1:1, 2:1, 1:2, 4:1 và 1:4 (tỷ lệ 4 dịch chiết tỏi : 1 dầu dừa có mùi tỏi khá nồng nên tỷ lệ dịch chiết tỏi cao hơn không được thử nghiệm). Kháng sinh Tetracyclin 1 mg/mL, nước cất lần lượt được sử dụng làm đối chứng dương và âm (McCool *et al.*, 2008). Các đĩa được ủ ở nhiệt độ phòng, quan sát vòng kháng nấm men sau 24-96 giờ. Khả năng kháng nấm men được đánh giá thông qua đường kính vòng kháng được tính bằng mm theo công thức: đường kính vòng kháng nấm D_{kn} (mm) = D - d. Trong đó: D (mm) là đường kính vòng ức chế (bao gồm đường kính khoan giấy lọc Whatmann 4) ; d (mm) là đường kính khoan giấy lọc Whatmann 4. Đường kính vòng kháng nấm $\leq 1,1$ cm, $1,2$ cm - $1,5$ cm, $\geq 1,6$ cm lần lượt được cho là có tính kháng yếu, trung bình và cao

(Balcázar *et al.*, 2006). Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Số liệu được xử lý trên phần mềm Excel và xử lý thống kê bằng phần mềm R. 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%.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

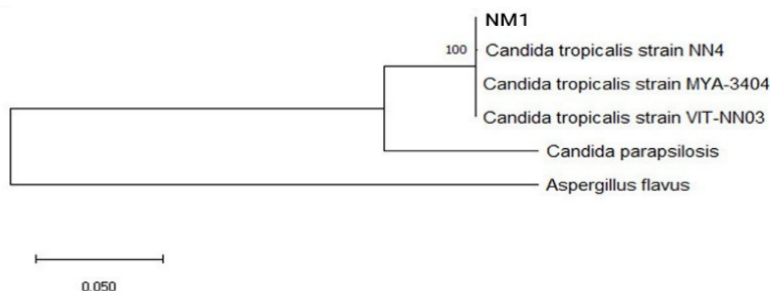
Phân lập và định danh chủng nấm men NM1

Từ các mẫu trái vải được thu nhập ngẫu nhiên trên địa bàn quận Bình Tân, Thành phố Hồ Chí Minh có xuất hiện triệu chứng bệnh lý điển hình là bệnh thối nâu trên vỏ trái như phần vỏ trái chuyển thành từng mảng màu nâu, ăn sâu vào thịt trái gây thối nhũn thịt trái, biến màu và có mùi chua lên men, chúng tôi đã tiến hành phân lập nhằm xác định thành phần nấm men có trên trái hồng. Kết quả đã phân lập và làm thuần được 3 chủng (NM1, NM2, NM3) đều có đặc điểm khuẩn lạc đặc trưng của nấm men như: có hình tròn, màu trắng đục, bề mặt bóng, viền xung quanh nhẵn (Hình 1a). Kết hợp với quan sát tế bào dưới kính hiển vi quang học (Hình 1b), chúng tôi nhận thấy tế bào các chủng có hình ovan hoặc hình trứng, và rất nhiều tế bào đang phân chia theo hình thức nảy chồi. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào của các chủng phân lập được đều là các đặc điểm cơ bản thường gặp ở nấm men (Barnett *et al.*, 2000). Do 3 chủng nấm men (NM1, NM2, NM3) có hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào không có sự khác biệt đáng kể nên chủng NM1 được lựa chọn ngẫu nhiên để định danh đến loài bằng phương pháp phân tích trình tự gen *rRNA*.



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc và tế bào các chủng nấm men được quan sát dưới kính hiển vi quang học vật kính 40X

Kết quả phân tích trình tự vùng ITS và LSU của gen *rRNA* của chủng NM1 cho thấy mức đồng nhất trình tự đạt 100% với các loài *Candida tropicalis* strain NN4, *Candida tropicalis* strain MYA-3404 và *Candida tropicalis* strain VIT-NN03 (Hình 3). Theo Kurtzman và đồng tác giả (2011), các khuẩn lạc *C. tropicalis* trên môi trường YPD có màu trắng đến kem, kết cấu dạng kem, bề ngoài mịn và có thể có mép hơi nhẵn. Đặc điểm khuẩn lạc của chủng nấm men NM1 được phân lập được có nét tương đồng (khuẩn lạc có màu trắng sữa, rìa tròn, bề mặt phẳng láng mịn, kích thước khuẩn lạc 1,5 mm) (Hình 1). Như vậy dựa vào đặc điểm hình thái và đặc điểm trình tự vùng ITS và LSU của gen *rRNA*, chủng nấm men NM1 phân lập từ vết bệnh thối nâu vỏ trái vải sau thu hoạch thuộc loài *Candida tropicalis* với độ tương đồng 100%.

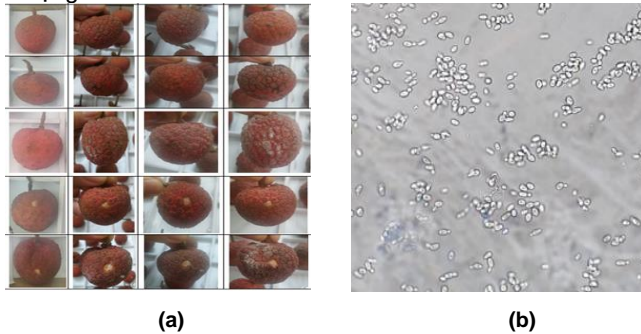


Hình 2. Sơ đồ cây phát sinh loài của chủng nấm men *C. tropicalis* NM1

Lây bệnh nhân tạo trên trái vải

Nấm men *C. tropicalis* được phát hiện là một trong các tác nhân gây hư hại trên đối tượng trái cam ở Nigeria (Oviasogie *et al.*, 2015). Bên cạnh đó, *C. tropicalis* được đánh giá là một trong những tác nhân gây bệnh khi chủng được phân lập từ nguồn mẫu trái chà là tươi (Aljasass *et al.*, 2016). Tuy nhiên, nấm men *C. tropicalis* YZ27 lại được cho là tác nhân thúc đẩy trong quá trình chống lại sự thối rữa sau thu hoạch, duy trì chất lượng của trái vải thiều Bombay (Kumar, Anal, 2021). Vì vậy cần đánh giá xem chủng nấm men *C. tropicalis* NM1 phân lập được có phải thực sự là tác nhân gây hại cho trái vải, chúng tôi đã tiến hành thử nghiệm lây nhiễm nhân tạo và đánh giá tác động của nấm men đến hình thái và chất lượng trái vải. Kết quả hình 3a cho thấy các nghiệm thức không nhúng trái vải vào dung dịch nấm men (nghiệm thức 1, 2, 4) thì trái vải bị hỏng chậm hơn so với các nghiệm thức có nhúng trái vào vào dịch nấm men (nghiệm thức 3 và 5). Cụ thể, tại thời điểm ngày thứ 2 trở đi, nghiệm thức có nhúng dịch nấm men cho kết quả trái vải bị nhiễm bệnh nhanh chóng, hiện tượng lên men chua,

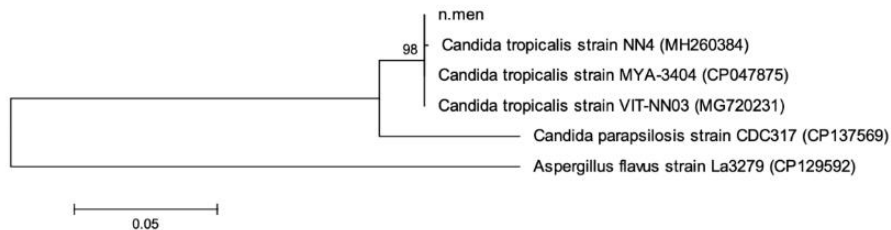
có mùi hôi nhẹ, phần vỏ và thịt trái vải tại vị trí vết thương có dấu hiệu mềm nhũn, màu sắc vỏ chuyển dần sang nâu đậm, kèm theo là sự xuất hiện của các mảng xám trắng và sau đó lan rộng ra xung quanh, gây thối quả sau khoảng 5 ngày lây nhiễm. Đặc biệt là nghiệm thức 5, sự tạo vết thương trên trái làm cho quá trình hỏng của trái vải nhanh hơn và nghiêm trọng hơn.



Hình 3. Kết quả thử nghiệm lây nhiễm nhân tạo (a) Mẫu trái vải có dấu hiệu bệnh lý sau khi lây nhiễm nhân tạo (mỗi hàng tương ứng với 1 nghiệm thức từ ngày 1 đến ngày 4 sau lây nhiễm nhân tạo. Từ hàng trên cùng đến hàng cuối cùng lần lượt tương ứng là nghiệm thức 1 đến 5), (b) Hình thái tế bào của chủng nấm men tái phân lập dưới kính hiển vi vật kính 40X

Bảng 1. Đặc điểm hình thái nấm *C. tropicalis* MN1 phân lập được trên trái vải hỏng

| Chủng nấm men | Hình thái khuẩn lạc | Kết quả quan sát dưới kính hiển vi 40X |
|--------------------|--|--|
| Chủng tái phân lập | Khuẩn lạc có màu trắng sữa, rìa tròn, bề mặt phẳng láng mịn, dạng S, kích thước khuẩn lạc: 2mm | Tế bào có hình tròn hoặc bầu dục |

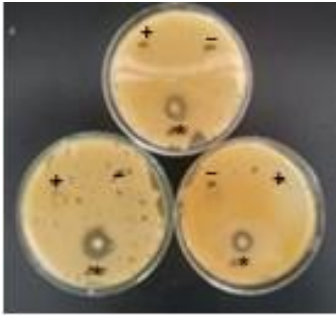


Hình 4. Sơ đồ cây phát sinh loài của chủng nấm men tái phân lập được từ vết mẫu bệnh trên trái vải hỏng

Chủng nấm men sau khi tái phân lập từ vết bệnh có đặc điểm hình thái khuẩn lạc và hình thái tế bào (Hình 3 và Bảng 1) tương tự như chủng nấm men NM1 ban đầu. Mặt khác, kết quả lây bệnh nhân tạo đối với nấm *C. tropicalis* NM1 ghi nhận tỷ lệ bệnh sau lây nhiễm là 100%, đồng thời sau khi tái phân lập nấm và phân tích trình tự gen vùng ITS và LSSU của gen *rRNA* cho kết quả có mức tương đồng 100% với loài *Candida tropicalis* (Hình 4). Điều này cho thấy nguyên nhân gây hỏng nhanh ở quả vải thiếu là do nấm men *Candida tropicalis*. Kết quả này cho thấy sự tương đồng trong nhận định *C. tropicalis* là tác nhân gây hại cho một số trái cây của một số tác giả Oviasogje và đồng tác giả (2015), Aljasass và đồng tác giả (2016) nhưng trái ngược với kết quả của Kumar, Anal (2021) rằng *C. tropicalis* ngăn cản quá trình thối rữa trái vải sau thu hoạch. Điều này có thể do đặc tính riêng biệt của từng chủng. Vì thế, để có nhận định chính xác hơn thì cần có nghiên cứu sâu hơn sau này.

Khả năng kháng nấm gây hại của dịch chiết hữu cơ trong điều kiện in vitro

Dầu dừa có tính kháng nấm vì có chứa các axit béo chuỗi trung bình như axit lauric, axit caprylic, axit capric, khả năng kháng nấm của dầu dừa cao nhất với MIC là 100% (không pha loãng). Dầu dừa được biết đến với khả năng kháng *Candida albicans* cao (Ogbolu *et al.*, 2007). Sử dụng dầu dừa nguyên chất mặc dù hiệu quả về mặt kháng nấm nhưng không hiệu quả về mặt kinh tế. Tuy nhiên, do dầu dừa có độ bóng nên có thể góp phần làm tăng tính thẩm mỹ của trái sau thu hoạch. Cùng với dầu dừa, hợp chất allicin có trong tỏi cũng là chất chống nấm tự nhiên. Dịch chiết tỏi lại được biết đến có khả năng kháng lại *C. tropicalis* cao hơn so với kháng *C. albicans* (Jafari *et al.*, 2007). Ngày nay, các hoạt chất chống nấm có trong tỏi đã được sản xuất thương mại hóa. Khả năng chống nấm của tỏi đạt mức kháng mạnh nhưng việc xử lý mùi trong các hợp chất được chiết xuất là một vấn đề khó khăn trong việc bảo quản nông sản. Từ trước đến nay chưa có công trình nào công bố về việc phối trộn 2 nguyên liệu này trong việc kháng nấm nói chung mà nấm *C. tropicalis* nói riêng. Vì vậy, trong nghiên cứu này, ngoài việc chúng tôi thử nghiệm đánh giá khả năng kháng nấm riêng lẻ của từng chất để đánh giá khả năng kháng nấm *C. tropicalis* của dầu dừa cũng như để khẳng định thêm khả năng kháng nấm *C. tropicalis* của dịch chiết tỏi, chúng tôi còn lần đầu thử nghiệm đánh giá khả năng kháng nấm *C. tropicalis* của hỗn hợp 2 nguyên liệu này nhằm xác định xem sự kết hợp này có mang lại hiệu quả kháng nấm tốt hơn riêng lẻ hay không và tỷ lệ phối trộn nào cho hiệu quả kháng nấm tốt nhất. Kết quả thử nghiệm được thể hiện qua bảng 2 và hình 5.



Hình 5. Đánh giá kháng nấm *C.tropicalis* NM1 của dịch ép tỏi và dầu dừa (tỷ lệ 2:1) bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch. Ghi chú: (+) tetraaxilin; (-) nước cất; (*) nghiệm thức

Bảng 2. Khả năng kháng nấm *C.tropicalis* NM1 của dầu dừa và dịch ép tỏi

| Nghiệm thức | Đường kính kháng nấm (mm) |
|------------------------------|---------------------------|
| Kháng sinh tetraaxilin | 11,33de ± 0,33 |
| Nước cất | - |
| 100% dầu dừa nguyên chất | 10,00e ± 0,58 |
| 100% tỏi nguyên chất | 19,00a ± 0,58 |
| 1 dịch chiết tỏi : 1 dầu dừa | 15,33bc ± 0,33 |
| 2 dịch chiết tỏi : 1 dầu dừa | 19,33a ± 0,67 |
| 2 dầu dừa : 1 dịch chiết tỏi | 13,67cd ± 0,33 |
| 4 dầu dừa : 1 dịch chiết tỏi | 12,33 de ± 0,88 |
| 4 dịch chiết tỏi : 1 dầu dừa | 17,67ab ± 0,33 |

Kháng sinh tetraaxilin được biết đến là chất có khả năng kháng *C. ablican* mạnh (McCool *et al.*, 2008). Trong nghiên cứu này cho thấy tetraaxilin cũng kháng *C. tropicalis* nhưng tính kháng yếu. Dầu dừa tuy có tính kháng nấm *C. tropicalis* nhưng tính kháng đó cũng yếu. Dịch chiết tỏi có tính kháng *C. tropicalis* mạnh và rõ rệt hơn. Trong các nghiệm thức khảo sát phối trộn dịch chiết tỏi và dầu dừa thì ở các nghiệm thức có bổ sung dịch chiết tỏi đều làm tăng tỷ lệ kháng nấm so với dầu dừa nguyên chất. Với cùng 1 tỷ lệ dịch chiết tỏi thì việc tăng tỷ lệ dầu dừa làm giảm hiệu quả kháng nấm cho thấy việc kháng nấm chủ yếu do vai trò của tỏi và dầu dừa có thể làm giảm khả năng kháng nấm của tỏi. Ở chiều ngược lại, tỷ lệ kháng nấm không tăng tuyến tính với tăng tỷ lệ dịch chiết tỏi trong phối hợp với dầu dừa. Tỷ lệ 2 dịch chiết tỏi : 1 dầu dừa có khả năng kháng nấm cao hơn 1 dịch chiết tỏi : 1 dầu dừa, tuy nhiên tỷ lệ 4 dịch chiết tỏi : 1 dầu dừa lại có hoạt tính kháng nấm thấp hơn so với tỷ lệ 2 dịch chiết tỏi : 1 dầu dừa. Dầu dừa chứa chủ yếu là các acid béo bão hoà có tính tan kém, trong khi dịch chiết tỏi trong dung môi nước có tính tan tốt hơn (Aswini *et al.*, 2024). Hợp chất lưu huỳnh kháng nấm trong tỏi khi chiết bằng nước chủ yếu là allicin (Bajac *et al.*, 2018). Allicin có khả năng phản ứng cao nhưng tính ổn định thấp (Argüelles *et al.*, 2024). Trong nghiên cứu này, tỏi cũng được chiết bằng dung môi nước. Với tỷ lệ dịch chiết tỏi nhiều hơn ở nghiệm thức 4 tỏi : 1 dầu dừa có thể lượng allicin nhiều hơn nên dễ bị phân giải nhiều hơn do các hợp chất béo bão hoà có trong dầu dừa không đủ để bảo vệ lượng allicin có nhiều hơn nên hiệu quả kháng nấm không bằng nghiệm thức 2 dịch chiết tỏi : 1 dầu dừa. Trong khi đó, hoạt tính kháng nấm của nghiệm thức 2 tỏi : 1 dầu dừa cao hơn tỏi nguyên chất có thể là do các hợp chất acid béo bão hoà của dầu dừa đủ để bảo vệ allicin làm chậm quá trình oxy hoá hợp chất này. Tuy nhiên, các nhận định này cần có những nghiên cứu sâu hơn để kiểm chứng. Trong nghiên cứu này, kết quả thực nghiệm đã đưa ra gợi ý về tỷ lệ phối trộn 2 dịch chiết tỏi : 1 dầu dừa cho hiệu quả kháng *C. tropicalis* tốt nhất (đường kính vòng kháng 19,33 ± 0,67 mm). Các kết quả thu được một lần nữa khẳng định lại nhận định của Jafari và đồng tác giả (2007) về hoạt tính kháng nấm *C. tropicalis* cao của dịch chiết tỏi và cho thấy dầu dừa có khả năng kháng nấm *C. tropicalis* yếu. Đồng thời, các kết quả này cũng cho thấy việc kết hợp giữa dịch ép tỏi và dầu dừa có khả năng kháng nấm *C. tropicalis* và tỉ lệ 2 dịch chiết tỏi : 1 dầu dừa cho hiệu quả kháng nấm tốt nhất trong các nghiệm thức thử nghiệm. Điều này đã gợi mở biện pháp phối trộn 2 loại nguyên liệu này cho việc bảo quản trái vải sau thu hoạch.

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, 3 chủng nấm men NM1, NM2 và NM3 được phân lập từ trái vải *Litchi chinensis* Sonn. sau thu hoạch. Chủng nấm men NM1 thuộc loài nấm men *Candida tropicalis* với độ tương đồng 100% và là tác nhân gây hại cho trái vải *Litchi chinensis* Sonn. sau thu hoạch. Nấm men *C. tropicalis* NM1 bị ức chế bởi dịch chiết tỏi và dầu dừa và trong điều kiện in vitro, tỷ lệ phối trộn 2 dịch chiết tỏi : 1 dầu dừa có hiệu lực kháng nấm hiệu quả nhất (D=19,33 ± 0,67 mm).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Aljasass FM, Aleid SM, Hamad SH (2016). Potential pathogenic yeasts isolated from fresh date fruits (Rutab). *Pak J Agric Sci* 53(2), 461-465.
- Agustantina TH, Soekartono RH (2021). Antifungal Activity from Garlic Extract (*Allium sativum*) Against *Candida albicans* Growth. *J Dent Indones* 4(2), 60-62.
- Argüelles JC, Sánchez-Fresneda R, Alejandra Argüelles A, Solano F (2024). Natural Substances as Valuable Alternative for Improving Conventional Antifungal Chemotherapy: Lights and Shadows. *J Fungi*, 10, 334. <https://doi.org/10.3390/jof10050334>.
- Aswini T, Dhanusha K, Priya K, Shalini R, Sumithra S, Helen W (2024). Essential oils: Characteristics, extraction and pharmacological activities. *Int J Sci Res Arch* 12(01), 2457-2475.

- Balcázar JL, De Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Cunningham D, Vendrell D, Muzquiz JL (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol* 114(3-4): 173-186.
- Bajac J, Nikolovski B, Kocić-Tanackov S, Tomšik A, Mandić A, Gvozdanović-Varga J, Vlajić S, Vujanović M, Radojković M (2018). Extraction of different garlic varieties (*Allium sativum* L.)-Determination of organosulfur compound and microbiological activity. *IV Int Cong "Food Technology, Quality and Safety"*, 104-109.
- Barnett JA, Payne, Yarrow D (2000). *Yeasts: characteristics and identification*, 3rd Ed. Cambridge University Press.
- Burgess LW, Timothy EK, Tesoriero L, Phan TH (2009). Cẩm nang chẩn đoán bệnh cây ở Việt Nam. Trung tâm Nghiên cứu Nông nghiệp Quốc tế Australia (ACIAR).
- Korabecna M (2007). The Variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): Its biological meaning and application in medical mycology. *Comm Curr Res Edu Topics and Trends in Appl Microbiol*, 2, 783-787.
- Kumar V, Anal AKD (2021). Postharvest Diseases of Litchi and Their Management. In *Postharvest Handling and Diseases of Horticultural Produce* (pp. 231-238): CRC Press.
- Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T (2011). *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier.
- Jafari AA, Bafghi AF, Anvari MH, Zarinfar H (2007) In Vitro Synergism Effect of an Aqueous Garlic Extracts against Six Commonly Clinical Isolated *Candida* Species. *Iran J Public Health* 36(Supple 2):1-2.
- McCool L, Mai H, Esmann M, Lasen B (2008). Tetracycline Effects on *Candida albicans* Virulence Factors. *Infect Dis Obstet Gynecol*. doi:10.1155/2008/493508.
- Ogbolu DO, Oni AA, Daini OA, Oloko AP (2007). In vitro antimicrobial properties of coconut oil on *Candida* species in Ibadan, Nigeria. *J Med Food* 10(2), 384-387.
- Oviasogie FE, Ogofure AG, Beshiru A, Ode JN, Omeje FI (2015). Assessment of fungal pathogens associated with orange spoilage. *Afr J Microbiol Res* 9(29), 1758-1763.

EVALUATION OF THE FUNGAL INHIBITION ABILITY OF COCONUT OIL AND GARLIC EXTRACT AGAINST *Candida tropicalis* NM1 ISOLATED FROM POST-HARVESTED LYCHEE FRUIT (*Litchi chinensis* Sonn.)

Nguyen Le Huy Khanh^{1*}, Pham Thi Ai Niem¹, Nguyen Thi Thu Huyen^{2*}

¹Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, Viet Nam

²Ho Chi Minh City University of Industry and Trade, Viet Nam

SUMMARY

Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) is a seasonal, succulent, highly nutritious fruit, so the lychee fruit is an ideal environment for harmful microorganisms to invade causing damage in terms of nutritional and economic value. Therefore, it is necessary to identify harmful microorganisms as well as find the solution to control those harmful agents. This study was conducted to identify harmful fungi on lychee and initially evaluate the ability to inhibit harmful fungi by garlic extract and coconut oil. From damaged lychee samples, three yeast strains MN1, MN2 and MN3 were isolated by spreading plate method on YPD agar medium. Observation of the colony morphology of yeast with the naked eye and the cell morphology of yeast with an optical microscope showed that the colony and cell morphology of these three strains did not differ significantly, so strain NM1 was randomly selected for species identification by molecular biology methods. Sequence analysis of the ITS and LSU regions of the *rRNA* gene of the yeast strain NM1 showed that the yeast strain NM1 belongs to the species *Candida tropicalis* with 100% similarity. Artificial infection test has determined the yeast *Candida tropicalis* NM1 as the causative agent of lychee spoilage. The inhibition test of the yeast *C. tropicalis* NM1 by the agar diffusion method showed that garlic extract had stronger antifungal properties than coconut oil and the mixture of garlic extract and coconut oil at a ratio of 2:1 showed the most effective antifungal properties (the diameter of the antifungal zone was $19,33 \pm 0,67$ mm). The obtained results showed that *C. tropicalis* NM1 is a harmful yeast for lychee fruit and showed the potential of using natural mixtures such as coconut oil and garlic extract in controlling harmful yeasts on lychee fruit after harvest.

Keywords: *Candida tropicalis*, coconut oil, garlic extract, lychee fruit, yeast.

* Author for correspondence: Tel: 0982158438; Email: huyenntthu@huit.edu.vn