



NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG MÀNG BAO SINH HỌC TỪ DỊCH CHIẾT VI KHUẨN *Pseudomonas putida* 199B ĐẾN KHÁNG NẤM *Aspergillus flavus* T1 TRONG QUÁ TRÌNH BẢO QUẢN HẠT NGÔ GIỐNG

Nguyễn Thy Đan Huyền*, Lê Thanh Long, Trần Thị Thu Hà, Nguyễn Cao Cường,
Nguyễn Hiền Trang

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, TP. Huế, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

Tóm tắt: Chúng T1 phân lập từ các mẫu ngô nếp NK66 nhiễm nấm mốc tự nhiên được sử dụng để nghiên cứu khả năng kháng nấm của dịch chiết vi khuẩn *Pseudomonas putida* 199B. Đặc điểm hình thái của chủng T1 đã được quan sát đại thể trên môi trường PDA và vi thể trên kính hiển vi kết hợp so sánh với loài *Aspergillus flavus* đối chứng. Kết quả phân tích trình tự gen mã hóa 28S rRNA của chủng T1 cho thấy sự tương đồng trình tự cao với các trình tự tương ứng của loài *Aspergillus flavus* trên ngân hàng gen. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của dịch chiết vi khuẩn *P. putida* lên sự phát triển của nấm *A. flavus* gây bệnh trên hạt ngô sau thu hoạch và bảo quản ở điều kiện *in vitro* cho thấy dung dịch *P. putida* nồng độ 24 % đã ức chế 74,50 % sự phát triển đường kính tán nấm sau 10 ngày nuôi cấy và ức chế 79,63 % sự hình thành sinh khối sợi nấm sau 7 ngày nuôi cấy. Ở điều kiện *in vivo*, sự nảy mầm của hạt giống ngô sau 30 ngày được tạo màng bao sinh học bằng dịch chiết vi khuẩn *P. putida* nồng độ 18 % đạt 97,91 %, tỉ lệ hạt nhiễm nấm mốc giảm còn 20 % so với 72 % ở mẫu đối chứng.

Từ khóa: *Aspergillus flavus*, hạt ngô, kháng nấm, màng bao, *Pseudomonas putida*

1 Đặt vấn đề

Cây ngô (*Zea mays* L.) là một loại ngũ cốc quan trọng trên thế giới, đứng thứ ba sau lúa mì và lúa gạo, có năng suất cao và giá trị kinh tế lớn của loài người, là nguồn lương thực nuôi sống gần 1/3 dân số thế giới. Nó là lương thực chính của người dân khu vực Đông Nam Phi, Tây Phi, Nam Á và là thành phần quan trọng trong thức ăn chăn nuôi gia súc, gia cầm. Khoảng 70 % chất tinh trong thức ăn tổng hợp của gia súc là từ ngô. Ngày nay, khi khoa học công nghệ phát triển, nhu cầu về thực phẩm của con người càng đa dạng, phong phú, ngô được sử dụng trong rất nhiều sản phẩm thực phẩm. Ngoài ra, nó còn được ứng dụng trong các ngành công nghiệp nhẹ và dược phẩm [2].

Ở Việt Nam, diện tích trồng ngô cũng như sản lượng ngô tăng nhanh, năm 2010, diện tích trồng ngô là 1,126 triệu ha, sản lượng 4,606 triệu tấn, đến năm 2013 diện tích tăng lên 1,170 triệu ha, sản lượng đạt được 5,190 triệu tấn [13]. Tuy nhiên, sản lượng ngô như vậy vẫn chưa đáp ứng được nhu cầu trong nước do sâu bệnh trên đồng ruộng và sâu bệnh (nấm mốc, mối, mọt...) sau thu hoạch gây ra tổn thất lớn cho nông sản, ước tính thất thoát 10–13 %. Ngoài việc gây ra tổn thất cho nông sản, nấm mốc còn sinh ra các độc tố đặc biệt nguy hiểm với sức khỏe con người và động vật, gây ngộ độc cấp tính, gây tổn thương gan

* Liên hệ: nguyenththydanhuyen@hvae.edu.vn

(ung thư gan...), gây quái thai, gây đột biến, suy dinh dưỡng... thậm chí với liều lượng cao có thể dẫn tới tử vong. Trong khi đó nhu cầu sử dụng ngô trong ngành chăn nuôi lên đến 5,5 triệu tấn/năm. Hàng năm, nước ta phải bỏ ra nửa tỷ USD để nhập khẩu ngô hạt [2].

Hiện nay, trên thế giới cũng như ở Việt Nam việc nghiên cứu mức độ nhiễm nấm mốc và độc tố nấm trên lương thực, thực phẩm là vấn đề quan trọng nhằm bảo vệ sức khỏe con người và động vật. Kết quả nghiên cứu của Vincelli và Parker cho thấy trên ngô có nấm *Fusarium* và độc tố của nó [11]. Nghiên cứu của Nguyễn Thùy Châu đã cho thấy ngô Việt Nam nhiễm nhiều loại nấm mốc sinh độc tố mycotoxin [1].

Những năm gần đây, các biện pháp phòng trừ tác nhân gây bệnh trên các loại lương thực, thực phẩm bằng phương pháp sinh học đang được nhiều nhà khoa học quan tâm, nghiên cứu để đảm bảo an toàn sức khỏe cho người và động vật. Vi khuẩn *Pseudomonas putida* có khả năng tiết ra chất kháng sinh, tính diệt khuẩn cao, cạnh tranh về dinh dưỡng và tấn công trực tiếp lên sợi nấm gây bệnh [6, 7]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về sử dụng vi khuẩn *P. putida* trên hạt ngô hiện nay vẫn chưa được nghiên cứu đầy đủ. Nghiên cứu này khảo sát khả năng kháng nấm mốc điển hình và hiệu quả của việc tạo màng bao trên hạt nhằm bảo quản hạt giống ngô lai NK66 bằng dịch chiết vi khuẩn thông qua các chỉ tiêu như khả năng ức chế sự phát triển hình thái, sinh khối của nấm, tỷ lệ nhiễm bệnh và tỷ lệ nảy mầm của hạt giống. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng đã cho thấy dịch chiết vi khuẩn *P. putida* có hiệu quả đáng kể trong kiểm soát nấm mốc *A. flavus* gây ra trên hạt ngô sau thu hoạch và bảo quản.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1 Vật liệu

Giống ngô nếp nù (ngô lai) NK66 được thu mua tại phường Tứ Hạ, Thị xã Hương Trà, Thừa Thiên Huế.

Nấm mốc phân lập trên hạt ngô đã tách phôi bằng cách cho nhiễm bệnh tự nhiên.

Chế phẩm vi khuẩn đối kháng *P. putida* 199B được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Khoa Nông học – Đại học Nông lâm Huế.

Các hóa chất: môi trường *Pseudomonas*, xuất xứ: Meck. Agar, đường glucose: độ tinh khiết 99,9 %, xuất xứ: Việt Nam.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Phân lập, định danh nấm *A. flavus*

Môi trường PDA được dùng để phân lập nấm mốc từ hạt ngô. Dựa vào hình thái khuẩn lạc, màu sắc khuẩn lạc, đặc điểm bào tử khi soi dưới kính hiển vi so với chủng đối chứng, sơ bộ tuyển chọn ra các chủng mốc nghi ngờ là *A. flavus*. Mẫu nấm này được định danh bằng phương pháp khuếch đại (PCR), giải trình tự gene mã hóa 28S rRNA và tra cứu bằng công cụ BLAST (NCBI).

Ảnh hưởng của dịch chiết vi khuẩn *P. putida* đến sự phát triển của nấm *A. flavus* trên môi trường đặc (PDA)

Môi trường PDA tiệt trùng có chứa các nồng độ dịch chiết vi khuẩn *P. putida* (0 % (đối chứng); 6 %, 12 %, 18 % và 24 %) được phân phối vào các đĩa petri đường kính 9 cm (20 ml/đĩa), lặp lại 3 lần ở mỗi công thức. Tán nấm có đường kính 2 mm cắt từ rìa đĩa khuẩn lạc nấm *A. flavus* thuần chủng (nuôi 5 ngày ở 28 °C) được đặt vào tâm các đĩa môi trường đã chuẩn bị sẵn, nuôi ở 28 °C. Theo dõi và đo đường kính tán nấm (ĐKTN), 2 ngày/lần bằng thước kẹp điện tử.

Xác định hiệu lực ức chế được tính theo tỷ lệ (%) ức chế tốc độ phát triển của đường kính tán nấm PI (%) [4].

$$PI(\%) = \frac{c-T}{c} \times 100$$

trong đó PI là tỷ lệ ức chế (%), C là đường kính phát triển của sợi nấm trên đĩa đối chứng (mm), T là đường kính phát triển của sợi nấm trên đĩa được xử lý bằng chế phẩm (mm).

Ảnh hưởng của dịch chiết vi khuẩn *P. putida* đến sự phát triển của *A. flavus* trên môi trường lỏng (PDB)

Môi trường PDB sau khi thanh trùng, làm nguội được bổ sung dịch chiết vi khuẩn *P. putida* với các nồng độ cần khảo sát và được cho vào các đĩa petri (đường kính 9 cm) với cùng một thể tích (20 ml). Tán nấm có đường kính 2 mm cắt từ rìa đĩa khuẩn lạc nấm *A. flavus* thuần chủng được đưa vào giữa các đĩa môi trường đã chuẩn bị sẵn. Thí nghiệm thực hiện với 5 công thức ở các nồng độ dịch chiết *P. putida* lần lượt là 0 %, 6 %, 12 %, 18 % và 24 %, mỗi công thức lặp lại 3 lần. Sinh khối khô của nấm được xác định sau khi nuôi ở 28 °C trong 7 ngày bằng cách lọc qua giấy lọc và sấy ở 55 °C trong 10 giờ. Hiệu lực ức chế, IC (%) (Inhibitory Concentration) của *P. putida* lên *A. flavus* được tính theo công thức: [4]

$$IC(\%) = \frac{c-T}{c} \times 100$$

trong đó C là sinh khối khô của tán nấm ở công thức đối chứng (không xử lý chế phẩm), T là sinh khối khô của tán nấm ở công thức thí nghiệm.

Ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết vi khuẩn *P. putida* đến tỷ lệ bệnh trên hạt ngô tách phôi

Hạt ngô tách phôi được ngâm 2 phút trong dịch chiết vi khuẩn *P. putida* ở các nồng độ 0 %, 6 %, 12 %, 18 % và 24 %, gum arabic 20 % được bổ sung vào dung dịch để tạo màng bao, hỗn hợp gum arabic và dịch chiết vi khuẩn *P. putida* khô sẽ tạo ra một lớp màng bao giúp vi khuẩn *P. putida* bám chắc quanh hạt ngô và phát huy hoạt tính kháng nấm. Sau đó đổ ra phơi khô và tiến hành ủ mẫu. Tỷ lệ nấm bệnh được xác định sau 0, 15 và 30 ngày. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết vi khuẩn *P. putida* đến tỷ lệ nảy mầm trên hạt giống ngô

Hạt ngô được ngâm trong dịch chiết vi khuẩn *P. putida* ở các nồng độ 0 %, 6 %, 12 %, 18 % và 24 % trong thời gian 2 phút. Sau đó phơi khô rồi tiến hành ủ mẫu trong 0, 15 và 30 ngày, mẫu được xác định tỷ lệ nảy mầm.

2.2 Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả thí nghiệm được phân tích phương sai một nhân tố ANOVA (Anova single factor) và so sánh các giá trị trung bình bằng phép thử DUNCAN (Duncan's Multiple Range Test) trên phần mềm thống kê SAS, phiên bản 9.13.

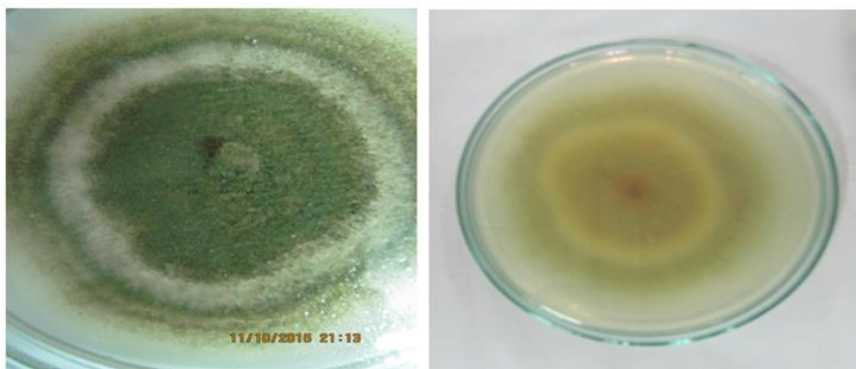
3 Kết quả và thảo luận

3.1 Kết quả phân lập, định danh nấm *Aspergillus flavus* gây mốc hạt ngô

Sau 5 ngày cho nhiễm nấm tự nhiên (Hình 1), chủng nấm T1 được đem đi nuôi cấy. Tiến hành quan sát đại thể và vi thể trên môi trường PDA và tế bào trên kính hiển vi nhận thấy chủng nấm mốc T1 có đặc điểm đại thể, vi thể giống chủng *A. flavus* theo mô tả của Gautam và Bhadauria [9].

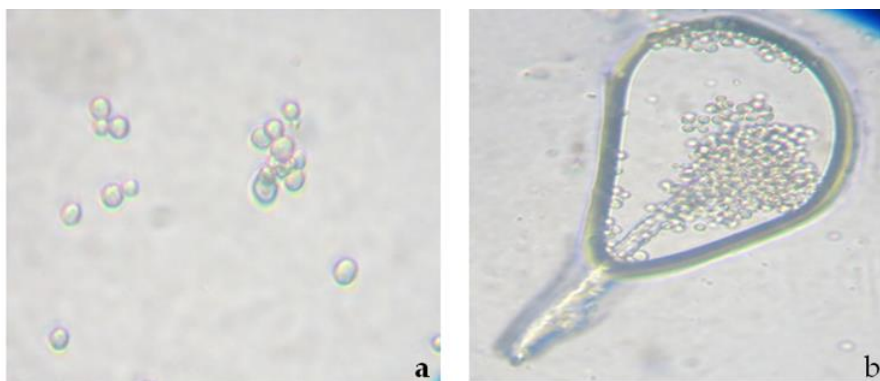


Hình 1. Mẫu hạt ngô nhiễm nấm mốc



Hình 2. Tàn nấm chủng T1 trên môi trường PDA

Kết quả so sánh với chủng đối chứng cho thấy chủng T1 có mức tương đồng cao về hình thái, màu sắc khuẩn lạc cũng như về đặc điểm sinh bào tử. Sợi nấm đa bào, phân nhánh mạnh, tản nấm tròn, xung quanh rìa khuẩn lạc có những giọt tiết màu trắng đục tiết ra sau 6–8 ngày nuôi cấy. Khuẩn lạc có màu xanh vàng, xanh xám, sợi nấm to, rời, đầu sợi nấm có hình tròn, mặt sau khuẩn lạc có màu trắng đến trắng ngà (Hình 2: mặt trước và mặt sau của tản nấm chủng T1 trên môi trường PDA). Bào tử chủng nấm T1 là bào tử phân sinh tròn hoặc hơi tròn, nhẵn, thể bình hình trụ. Túi hay bọng gắn liền với thể bình, trên đầu thể bình tạo thành một chuỗi bào tử đính (Hình 3).



Hình 3. Đặc điểm vi thể của chủng nấm T1

a) Bào tử đính; b) Bào tử đính và chuỗi bào tử đính

Chủng nấm mốc T1 được định danh bằng phương pháp giải trình tự một phần gen mã hoá cho tiểu phần ribosome 28S (28S rRNA), kết quả tra cứu qua BLAST SEARCH trên ngân hàng dữ liệu gen của NCBI được trình bày ở Hình 4.

Kết quả so sánh trình tự gen rRNA 28S của chủng nấm mốc T1 phân lập với gen trong ngân hàng gen bằng phần mềm Blast cho thấy gen tương đồng 99 % với chủng *A. flavus* MUM10220. Do đó, có thể kết luận rằng chủng nấm mốc vừa phân lập được là *A. flavus*, ký hiệu là *A. flavus* T1.

```
TCTCACCTCCTCTGACGGCCCGTTCAGGGCACTTAGACAGGGCCGACCCGA
AGCATCCTCTGCAAATTACAATGCGGACCCGAAGGAGCCAGCTTCAAATTGA
GCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGTACTGAGGCAATCCCGGTGGTTCTTTCTCC
GCTTATTGATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTG
GAAAAGATTGATTTGCGTTCGGCAAGCGCCGGCCGCTACAGAGCGGGTGACA
AAGCCCATAACGCTCGAGGATCGGACGCGGTGCCCGCTTGGGGCCCGT
CCCCCGGAGAGGGGACGACGACCAACACAAAGCCGTGCTTGATGGGCAGC
AATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACAGGGGGCGCAATGTCCGTT
AAAGACTCGATGATTCAGGAATTCTGCAATTCACACTAGTTATCGCATTCGCTG
CGTTCCTATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCAATTGTTGAAAGTTTAACTGATTG
CGATAAATCAACTCAGACTTCACTAGATCAGACAGAGTTCGTGGTGTCTCCGGC
GGGCGGGGCCCGGGGTGAGAGCCCCGGCGCATGAATGGCGGGCCCGCCG
AAGCAACTAAGGTACAGTAAACACGGGTGGGAGTTGGGCTCGTAGGAACCT
ACACTCGGTAATGATCCTTCCGAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACGACTTT
ACTTCCTCTAAATGACCGGGTTTGACCAACTTCCGGCCCTGGGGGGTCC
TTGCCA ACCCT
```

Hình 4. Kết quả giải trình tự gen 28S của chủng nấm *A. flavus* T1

3.2 Ảnh hưởng của dịch chiết vi khuẩn *P. putida* đến sự sinh trưởng của *A. flavus* T1 trên môi trường PDA

Ảnh hưởng của dịch chiết vi khuẩn *P. putida* đến sự sinh trưởng, phát triển của nấm *A. flavus* T1 trên môi trường PDA được thể hiện thông qua đường kính tán nấm, kết quả ở Bảng 1 và Hình 5.

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy nấm tràn đĩa sau 10 ngày nuôi cấy, đường kính tán nấm đạt 72,12 mm ở CT đối chứng. Khi bổ sung dịch chiết vi khuẩn *P. putida*, đường kính tán nấm ở các nồng độ tương ứng tại các thời điểm khác nhau đều nhỏ hơn so với mẫu đối chứng. Sự sai khác về đường kính tán nấm ở các công thức thí nghiệm đều có ý nghĩa thống kê. Tại thời điểm kết thúc quá trình khảo sát (10 ngày), đường kính tán nấm ở mẫu đối chứng là 72,12 mm lớn hơn các công thức có bổ sung dịch chiết vi khuẩn: 58,47 mm, 41,14 mm, 35,08 mm và 18,39 mm ở các mẫu có bổ sung dịch chiết *P. putida* tương ứng với các nồng độ dịch chiết vi khuẩn 6 %, 12 %, 18 % và 24 %. Tốc độ phát triển đường kính tán nấm *A. flavus* T1 giảm mạnh nhất ở mẫu xử lý dịch chiết vi khuẩn *P. putida* với CT IV (24 %). Điều này cho thấy ở các công thức thí nghiệm, khả năng kháng nấm *A. flavus* T1 của dịch chiết vi khuẩn *P. putida* thể hiện rất mạnh.

Hiệu lực ức chế sự phát triển nấm *A. flavus* T1 tăng theo chiều tăng nồng độ dịch chiết vi khuẩn *P. putida*, cao nhất ở nồng độ 24 % và thấp nhất ở nồng độ 6 %, tương ứng với giá trị PI lần lượt là 74,50 % và 18,93 %. Nồng độ ức chế tối thiểu MIC90 (MIC: minimum inhibitory concentration) là 29,35 %.

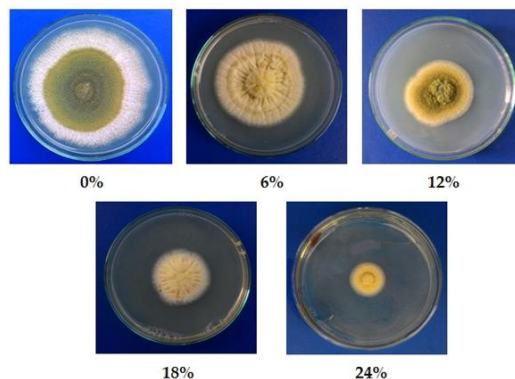
Theo Abdullah và cộng sự, *P. Putida*2, *P. Fluorescens*3 và các loài khác có thể sản xuất kháng sinh phenozine, chất có khả năng ức chế sự phát triển của nấm gây hại trên thực vật, kết quả cho thấy *P. putida*2 đã ức chế đến 94,2 % sự sinh trưởng của nấm Fusarium, trong khi *P. fluorescens*3 ức chế được 94,6 % và khi sử dụng phối hợp *P. putida*2 và *P. fluorescens*3 thì hiệu quả ức chế lên đến 100 % [6].

Akhtar và Siddiqui nghiên cứu sử dụng vi khuẩn vùng rễ kích thích sự sinh trưởng thực vật nhằm kiểm soát bệnh mục rễ phức tạp ở cây đậu. Kết quả cho thấy *P. putida* ức chế 59 % sự phát triển của nấm *Macrophomina phaseolina* và *Meloidogyne incognita*, trong khi *P. alcaligenes* và *Ps28* chỉ ức chế được 48 % và 44 % [5].

Bảng 1. Ảnh hưởng của dịch chiết vi khuẩn *P. putida* đến sự sinh trưởng, phát triển của nấm *A. flavus* T1

Nồng độ <i>P. putida</i> (%)	Ngày					PI (%) ở 10 ngày
	Đường kính tán nấm <i>A. flavus</i> T1 (mm)					
	2	4	6	8	10	
0	8,26 ^a	24,92 ^a	39,56 ^a	56,75 ^a	72,12 ^a	0
6	7,93 ^b	18,57 ^b	30,75 ^b	42,16 ^b	58,47 ^b	18,93
12	7,41 ^c	16,42 ^c	25,98 ^c	34,68 ^c	41,14 ^c	42,96
18	4,05 ^d	11,29 ^d	19,96 ^d	27,68 ^d	35,08 ^d	51,36
24	0,00 ^e	5,67 ^e	10,24 ^e	15,03 ^e	18,39 ^e	74,50

Ghi chú: Các giá trị trung bình đường kính tán nấm theo hàng dọc có sự sai khác ở mức ý nghĩa $p < 0,05$



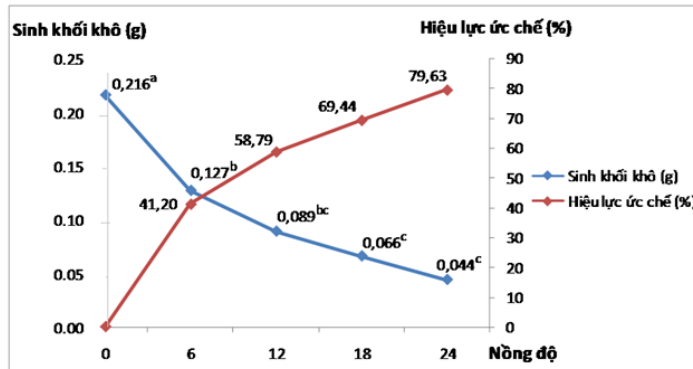
Hình 5. Nấm *A. flavus* sau 10 ngày nuôi cấy trên môi trường PDA bổ sung CPVK *P. putida* ở 28 °C

3.3 Ảnh hưởng của dịch chiết vi khuẩn *P. putida* đến sự sinh trưởng của *A. flavus* T1 trên môi trường PDB

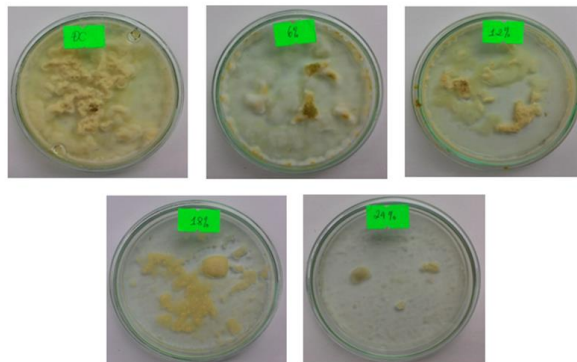
Khả năng kháng nấm của một chất được đánh giá qua việc ức chế sự sinh trưởng, phát triển hình thái khuẩn lạc nấm đồng thời cũng được đánh giá qua việc ức chế được sự tạo thành sinh khối sợi nấm. Mục đích của thí nghiệm là xác định ảnh hưởng của dịch chiết vi khuẩn *P. putida* đến sự tạo thành sinh khối nấm *A. flavus*. Kết quả thể hiện ở Hình 6 và 7.

Kết quả ở Hình 6 cho thấy quy luật ức chế sinh khối nấm *A. flavus* cũng giống quy luật ức chế sự sinh trưởng, phát triển của loại nấm này trên môi trường đặc, nồng độ CPVK *P. putida* càng cao thì lượng sinh khối sợi nấm thu được càng ít: sinh khối khô giảm dần từ 0,216 g ở nồng độ 0 % xuống 0,044 g ở nồng độ *P. putida* 24 %. Giá trị trung bình sinh khối khô thu được ở các công thức có sự sai khác về mặt thống kê.

Khi tăng nồng độ dịch chiết vi khuẩn thì hiệu lực ức chế cũng tăng lên. Nồng độ 12 %, 18 % hiệu lực ức chế đạt lần lượt là: 58,79 % và 69,44 %. Ở nồng độ 24 %, hiệu lực ức chế đạt 79,63 %. So với môi trường đặc thì môi trường lỏng cho khả năng kháng cao hơn do trong môi trường lỏng các chất kháng sinh trong dịch chiết vi khuẩn *P. putida* sẽ di chuyển dễ dàng, thẩm thấu nhanh, ức chế khả năng hấp thu dinh dưỡng, phát triển của nấm *A. flavus* tốt hơn so với môi trường đặc.



Hình 6. Ảnh hưởng của các nồng độ dịch chiết VK *P.putida* đến sinh khối nấm *A.flavus* T1 sau 10 ngày nuôi cấy ở 28 °C; Ghi chú: các giá trị trung bình có cùng chữ cái in thường là không sai khác ở mức ý nghĩa $p < 0,05$



Hình 7. Nấm *A. flavus* T1 sau 7 ngày nuôi cấy trên môi trường PDB bổ sung CPVK *P.putida* ở 28 °C

3.4 Ảnh hưởng của dịch chiết vi khuẩn *P. putida* đến khả năng kháng nấm *A. flavus* và sự nảy mầm của hạt giống ngô ở điều kiện *in vivo*

Chất lượng hạt giống quyết định năng suất cây trồng. Một trong những tiêu chí đánh giá chất lượng hạt giống là tỷ lệ nảy mầm và tỷ lệ bệnh. Các mẫu hạt được xử lý bằng cách tạo màng bao bằng dịch chiết vi khuẩn *P. putida*, sau 0, 15 và 30 ngày sẽ được đưa đi xác định tỷ lệ nảy mầm và tỷ lệ nhiễm nấm mốc. Kết quả được thể hiện ở Bảng 2 và 3.

Sau 30 ngày bảo quản, tỷ lệ nảy mầm (được tính bằng tổng số hạt nảy mầm trên tổng số hạt đem ủ) của hạt ngô giống không có sai khác có ý nghĩa thống kê so với công thức đối chứng và đều đạt trên 80 %, đảm bảo yêu cầu hạt sử dụng làm hạt giống. Tỷ lệ nảy mầm của hạt giống ngô sau 30 ngày bảo quản ở các công thức thí nghiệm đều tương đương công thức đối chứng: 98,34 % và 97,91 % tương ứng với nồng độ *P. putida* là 18 và 24 %, nồng độ *P. putida* 6 % còn có tỷ lệ nảy mầm cao hơn mẫu đối chứng là 101,66 %.

Điều này chứng tỏ sau một thời gian bảo quản, *P. putida* không ảnh hưởng đến sự nảy mầm của hạt giống ngô.

Georgieva nghiên cứu ảnh hưởng của vi khuẩn đến sự tăng trưởng của cây dưa chuột trong điều kiện nhà kính. Hạt dưa chuột được ngâm trong dung dịch vi khuẩn (*Streptomyces griseoviridis* và *P. putida* với nồng độ 1.1010 tế bào/ml) trong vòng 8 giờ, sau đó đưa đi gieo. Kết quả sau 20 ngày gieo, ở mẫu đối chứng, tỷ lệ nảy mầm đạt 73 % đến 80 %. Đối với hạt ngâm trong nước, tỷ lệ nảy mầm là 80 % đến 90 %, còn khi ngâm trong dịch chiết vi khuẩn có 86 % đến 95 % hạt nảy mầm [8].

Zulueta-Rodríguez và cộng sự nghiên cứu ảnh hưởng của hydropriming và bioprimering đến sự nảy mầm hạt *Abies hickelii* và *Abies religiosa* ở Mexico. Kết quả sau 30 ngày ủ, đối với hạt *Abies hickelii*, tỷ lệ nảy mầm cao nhất 91 % khi xử lý bởi *P. fluorescens*, 76 % khi xử lý *P. putida*, không xử lý chế phẩm tỷ lệ nảy mầm chỉ đạt 32 %. Đối với hạt *Abies religiosa*, tỷ lệ nảy mầm cao nhất là 68 % khi xử lý hạt bằng *B. subtilis*, đạt 68 % khi xử lý bằng *P. putida*, còn không xử lý chế phẩm trên hạt, tỷ lệ nảy mầm chỉ 28 % [12].

Bảng 2. Ảnh hưởng của dịch chiết vi khuẩn *P. putida* đến tỷ lệ nảy mầm của hạt giống ngô

Thời điểm (ngày)	Nồng độ dịch chiết vi khuẩn <i>P. putida</i> (%)				
	Tỷ lệ nảy mầm (%)				
	0	6	12	18	24
0	100 ^a	98,95 ^{ab}	94,77 ^{bc}	93,03 ^c	93,73 ^c
15	92 ^a	91,66 ^{ab}	88,04 ^b	87,31 ^b	90,93 ^{ab}
30	100 ^{ab}	101,66 ^a	97,91 ^{ab}	98,34 ^{ab}	97,91 ^{ab}

Ghi chú: Các giá trị trung bình về tỷ lệ nảy mầm theo hàng ngang có sự sai khác ở mức ý nghĩa $p < 0,05$

Nồng độ dịch chiết *P. putida* 18 % đã ức chế rất hiệu quả sự nhiễm nấm ở hạt giống ngô ở các công thức thí nghiệm. Ngay sau khi xử lý, tỷ lệ nhiễm nấm còn khá cao so với mẫu đối chứng. Tuy nhiên, sau 30 ngày bảo quản, màng bao phát huy tác dụng kháng nấm nên tỷ lệ nhiễm giảm đi rất nhiều, 20 % ở nồng độ dịch chiết *P. putida* so với 70 % ở công thức đối chứng (Bảng 3).

Cơ chế đối kháng với mầm bệnh của *P. putida* được giải thích là do vi khuẩn này có thể sản xuất kháng sinh phenazine, chất có khả năng ức chế sự phát triển của nấm gây hại trên thực vật [6], các chất kháng sinh như siderophore được tiết ra từ *P. putida* có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Ph. parasitica* gây bệnh thối rễ ở vùng rễ của các cây có múi [1].

Bảng 3. Tỷ lệ nhiễm nấm mốc trên hạt ngô có xử lý với dịch chiết vi khuẩn *P. putida*

Thời điểm (ngày)	Nồng độ dịch chiết vi khuẩn <i>P. putida</i> (%)				
	Tỷ lệ nhiễm <i>A. flavus</i> (%)				
	0	6	12	18	24
0	78	84	90	60	68
15	96	58	58	16	24
30	72	60	40	20	48

4 Kết luận

Chủng nấm mốc *A. flavus* T1 được phân lập từ hạt ngô giống NK66 cho nhiễm mốc tự nhiên. Chủng này được xác định bằng cách quan sát đại thể trên môi trường PDA và vi thể trên kính hiển vi, đồng thời được định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 28S rRNA. Kết quả nghiên cứu cho thấy dịch chiết vi khuẩn *P. putida* ức chế tốt sự phát triển của nấm mốc *A. flavus* gây bệnh mốc đen trên giống ngô nếp nù NK66 ở cả điều kiện *in vitro* và *in vivo*: nồng độ dịch chiết vi khuẩn 18 % ức chế 51,36 % sự phát triển nấm trên môi trường PDA và 69,44 % trên môi trường PDB; tỷ lệ nảy mầm của hạt giống ngô đạt 97,91 % sau 30 ngày bảo quản với tỷ lệ nhiễm mốc thấp (20 %).

Tài liệu tham khảo

1. Nguyễn Thuỳ Châu, Lê Hữu Hiếu, Trương Thanh Bình, Cao Văn Hùng, Vũ Xuân Dũng, Lê Văn Trường (1997), *Nghiên cứu mức độ nhiễm mốc sinh độc tố trên ngô, biện pháp phòng trừ*, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 2000–2003.
2. Trần Kim Định, Nguyễn Hữu Để, Phạm Văn Ngọc, Bùi Xuân Mạnh (2015), *Một số kết quả nghiên cứu về cây ngô ở Viện Khoa học Kỹ thuật nông nghiệp miền Nam*, Viện Khoa học Kỹ thuật nông nghiệp miền Nam.
3. Ngô Hữu Tình (2003), *Cây Ngô*, Viện nghiên cứu và phổ biến kiến thức bách khoa, Nxb. Nghệ An.
4. Adel K. Madbouly, Mohamedl M. Ibrahim, Mosaad A. Abdel-Wahhab (2014), Efficacy of corn and rice seed-borne mycoflora in controlling aflatoxigenic *Aspergillus flavus*, *Comunicata Scientiae*, 5(2), 118–130.
5. Akhtar M. S and Siddiqui Z. A. (2009), Use of plant growth-promoting rhizobacteria for the biocontrol of root-rot disease complex of chickpea, *Australasian Plant Pathology*, 38, 44–50.
6. Basher H. Abdullah, Ashwaq T. Hameed (2010), The biological activity of bacterial vaccine of *Pseudomonas putida* 2 and *Pseudomonas fluorescens* 3 isolate to protect sesame crop (*Sesamum indicum*) from *Fusarium* fungi under field conditions, *Agriculture and biology journal of North America*, 1(5), 803–811.
7. Fernando Haddad, Rodrigo M. Saraiva, Eduardo S. G. Mizubuti, Reginaldo S. Romeiro, Luiz A. Maffia (2013), Antifungal compound as a mechanism to control *Hemileia vastatrix* by antagonistic bacteria, *Trop. plant pathol.*, 38(5), 398–405.
8. Olga Georgieva (2003), *Enterobacter cloacae* Bacterium as a Growth Regularator in Greenhouse Cucumbers, *Cucurbit Genetics Cooperative Report* , 26, 4–6.

9. Gautam A. K. and Bhadauria R. (2012), Characterization of *Aspergillus* associated with commercially stored triphala powder, *African journal of Biotechnology*, 11(104), 16814–16823.
10. Kawashima K. (1991), Mechanism of aflatoxin infection of Thai maize and preventive measures, *Farming Japan*, 52, 42–46.
11. Paul Vincelli and Gary Parker, *Fumonisin, Vomitoxin and Other Mycotoxins in Corn Produced by Fusarium Fungi*, University of Kentucky–College of Agriculture.
12. Ramón Zulueta-Rodríguez, Luis G. Hernández-Montiel, Bernardo Murillo-Amador, Edgar O. Rueda-Puente, Liliana Lara Capistrán, Enrique Troyo-Diéguéz và Miguel V. Córdoba-Matson (2015), Effect of Hydropriming and Biopriming on Seed Germination and growth of Two Mexican Fir Tree Species in Danger of Extinction, *Forests*, 6, 3109–3122.
13. Seon-Woo Lee and Donald A. Cooksey (2000), Genes Expressed in *Pseudomonas putida* during Colonization of a Plant-Pathogenic Fungus, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(7), 2764–2772
14. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>

APPLICATION OF BIOACTIVE COATINGS BASED ON *Pseudomonas putida* 199B EXTRACT AGAINST *Aspergillus flavus* T1 IN CORN SEED STORAGE

**Nguyen Thy Dan Huyen*, Le Thanh Long, Tran Thi Thu Ha, Nguyen Cao Cuong,
Nguyen Hien Trang**

HU – University College of Agriculture and Forestry,
102 Phung Hung St., Hue, Thua Thien Hue, Vietnam

Abstract: The T1 strain of fungi isolated from NK66 hybrid corn seeds naturally infected with typical moldy was used to study the antifungal activity of *Pseudomonas putida* 199B extract. This strain morphology was observed macroscopically on PDA media and microscopically on a microscope and compared with *Aspergillus flavus* strain as a control. The 28S rRNA gene sequence analysis of the T1 strain showed high sequence similarity to that of other *A. flavus* strains deposited on GenBank (NCBI). The results of the influence of the *P. putida* extract on the development of *A. flavus* causing the disease on corn seed in after-harvest and storage in *in-vitro* conditions showed that the solution with a concentration of 24 % of *P. putida* extract inhibited 74.50 % the growth of colony diameter after 10 days of incubation and 79.63 % the formation of mycelia biomass after 7 days of incubation. In *in-vivo* conditions, after 30 days of storage, the hybrid corn seeds coated with 18 % of *P. putida* extract reached 97.91 % of germination rate, and the fungal infection rate decreased to 20 % compared with 72 % at the control.

Keywords: *Aspergillus flavus*, antifungal, corn seeds, *Pseudomonas putida*, coating