

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM MỐC *Aspergillus niger* N3 GÂY BỆNH TRÊN HẠT GIỐNG ĐẬU XANH BẰNG DỊCH CHIẾT VI KHUẨN *Pseudomonas putida*

Nguyễn Hiền Trang¹, Hà Anh Đức²

¹Khoa Cơ khí Công nghệ, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

²Chi cục An toàn vệ sinh thực phẩm tỉnh Quảng Bình

Liên hệ email: nguyenhientrang@huaf.edu.vn

TÓM TẮT

Nhiễm nấm mốc trong quá trình bảo quản nông sản là vấn đề nghiêm trọng và đáng quan tâm trong công nghiệp thực phẩm. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xác định một số điều kiện thu nhận dịch chiết vi khuẩn *Pseudomonas putida* (nhiệt độ, pH, thời gian, tốc độ lắc) và khả năng ức chế nấm mốc gây bệnh trên hạt giống đậu xanh. Chủng N3 phân lập từ các mẫu đậu xanh nhiễm nấm mốc tự nhiên được sử dụng để nghiên cứu khả năng kháng nấm của dịch chiết vi khuẩn *P. putida*. Đặc điểm hình thái của chủng N3 đã được quan sát đại thể (màu sắc, hình dáng, kích thước khuẩn lạc) trên môi trường PDA và vi thể (hình dáng bào tử) trên kính hiển vi kết hợp so sánh với loài *Aspergillus niger* đối chứng. Kết quả phân tích trình tự gen mã hóa 28S rRNA của chủng N3 cho thấy sự tương đồng trình tự cao với các trình tự tương ứng của loài *A. niger* trên ngân hàng gen. Khi khảo sát điều kiện nuôi cấy để thu nhận dịch chiết, kết quả cho thấy, ở nhiệt độ 30°C, pH 6, thời gian nuôi cấy 48 giờ và tốc độ lắc là 200 v/ph dịch chiết vi khuẩn thu được có khả năng kháng *A. niger* N3 tốt nhất. Khả năng kháng *A. niger* N3 của dịch chiết vi khuẩn cao nhất ở 2 ngày với nồng độ 18 và 24%.

Từ khóa: *Aspergillus niger* N3, dịch chiết, kháng nấm, *Pseudomonas putida*

Nhận bài: 24/05/2017

Hoàn thành phản biện: 11/06/2017

Chấp nhận bài: 15/06/2017

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu xanh là cây đậu đỗ quan trọng, đứng vị trí thứ 3 trong nhóm cây đậu đỗ ăn hạt và cung cấp nhiều chất dinh dưỡng thiết yếu. Trong các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới thì đậu xanh chiếm gần 10% diện tích và 5% sản lượng của các loại đậu đỗ ăn hạt. Tuy nhiên, nhìn chung năng suất của cây đậu xanh còn rất thấp, chỉ 5 - 6 tạ/ha do sự quan tâm chưa đúng mức. Bên cạnh đó, chất lượng của hạt giống không đảm bảo là nguyên nhân chủ yếu khiến năng suất và chất lượng đậu xanh không được như mong đợi.

Quá trình bảo quản không đảm bảo là nguyên nhân chính khiến hạt giống đậu xanh bị nhiễm bệnh, chủ yếu do nấm mốc gây ra. Điều này làm giảm chất lượng của hạt giống kéo theo là sự giảm chất lượng và năng suất của hạt đậu xanh thương phẩm sau này, đồng thời lây truyền mầm bệnh có hại cho con người hay vật nuôi. Việc sử dụng các chất hóa học trong bảo quản hạt giống nông sản đã được áp dụng từ lâu và mang lại hiệu quả cao, tuy nhiên lại gây ra ảnh hưởng tiêu cực đến môi trường sống và sức khỏe của con người. Chính vì vậy, việc nghiên cứu và đưa ra phương pháp bảo quản hạt giống đậu xanh phù hợp và an toàn là việc làm cần thiết và cấp bách của con người. Áp dụng phương pháp bảo quản phù hợp sẽ góp phần duy trì và làm tăng phẩm chất của hạt giống cũng như tiết kiệm chi phí sản xuất về sau.

P. putida là loài vi khuẩn Gram âm, nó thích nghi với môi trường trong đất, thủy sản và trong vùng rễ cây (Fonseca và cs., 2011). Vi khuẩn tạo sắc tố vàng-xanh, xanh và xanh nhạt. Nhiệt độ thích hợp cho phát triển là 4-43°C, phát triển tốt ở nhiệt độ thấp. Tác nhân kiểm soát sinh học *Pseudomonas* là đối tượng được nghiên cứu nhiều nhất về khả năng tạo ra kháng sinh. Chúng tạo ra một chuỗi những kháng sinh phenolic, như 2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG), phenazine-1-carboxylic acid (PCA). Ngoài ra còn tạo ra các kháng sinh như pyoluteorin, pyrrolnitrin (Peter và cs., 2002).

Chúng vi khuẩn *Pseudomonas* tạo chất hoạt dịch có khả năng phòng trừ hiệu quả nhiều loại bệnh cây trồng như *Pythium aphanidermatum*, *Plasmopara lactucae-radicis*, *Phytophthora capsici* và *Collectotrichum orbiculare* (Raju và Krishna, 2000). Theo Trần Thị Thu Hà và cs. (2010), Kruijt (2009) thì *P. putida* và chất hoạt hoá bề mặt (biofurfactant) được xác định là putisolvin của nó có khả năng ức chế sự sinh trưởng của nấm ở điều kiện in vitro.

Qua đó cho thấy, việc nghiên cứu khả năng kháng nấm mốc gây bệnh trên hạt giống đậu xanh bằng dịch chiết vi khuẩn *P. putida* là rất cần thiết. Từ đó nghiên cứu phát triển, sản xuất ở các dạng chế phẩm và thử nghiệm ứng dụng vào thực tiễn nhằm phòng trừ nấm mốc gây hại cho các loại nông sản.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

- Giống đậu xanh: sử dụng giống ĐX11 được thu nhận từ các hộ nông dân trồng đậu xanh ở tỉnh Quảng Trị theo vụ hè thu năm 2015.

- Vi khuẩn *P. putida* do phòng thí nghiệm Khoa cơ khí công nghệ, trường đại học Nông Lâm Huế cung cấp.

- Chủng nấm mốc *A. niger* N3 gây bệnh điển hình được phân lập từ hạt giống đậu xanh sau thu hoạch ở Quảng Trị.

2.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Đánh giá mức độ nhiễm nấm bệnh trên hạt giống đậu xanh theo phương pháp Blotter (Mathur và Olga Kongsdal, 2000)

- Lấy 200 hạt từ mẫu ban đầu, mỗi đĩa 20 hạt, lặp lại 3 lần. Giấy thấm được xit đều nước cất vô trùng và đặt vào đĩa petri. Sau khi đặt hạt vào đĩa, ghi mã số, ngày đặt và ngày kiểm tra trên mặt đĩa. Xếp các đĩa vào khay và đưa vào phòng nuôi cấy, nhiệt độ 28 - 30°C, trong vòng 5-7 ngày ủ ẩm, tiến hành kiểm tra và xác định mức độ nhiễm nấm bệnh của mẫu.

Từ sau 5 - 7 ngày ủ ẩm, tiến hành theo dõi sự phát triển của nấm bệnh trên bề mặt của hạt. Căn cứ vào đặc điểm phát triển và màu sắc của tán nấm, tiến hành xác định mức độ nhiễm nấm bệnh trên mẫu hạt và giám định các loài nấm theo tài liệu của Mathur và Olga Kongsdal (2000).

Phân lập, định danh nấm A. niger

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. niger*. 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 các điều kiện thu nhận dịch chiết vi khuẩn P. putida đến khả năng kháng

nấm mốc A. niger N3

- Ảnh hưởng của nhiệt độ

Tiến hành nuôi cấy vi khuẩn *P. putida* trong môi trường Pseudomonas trên máy lắc với thời gian là 48 giờ, pH 6, lắc 200 v/ph và ở các điều kiện nhiệt độ thay đổi khác nhau 25°C, 30°C và 35°C. Sau đó đem đi ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/15phút ở 4°C, thu dịch chiết của vi khuẩn tại mỗi nhiệt độ khác nhau. Tiến hành đổ môi trường PDA1/2 được tiệt trùng và bổ sung dịch chiết vi khuẩn *P. putida* (6%) vào đĩa peptri. Cây chấm điểm nấm mốc và đem ủ ở 35°C ± 2°C, sau 2, 3 và 4 ngày quan sát và đo đường kính tản nấm.

- Ảnh hưởng của pH

Tiến hành nuôi cấy vi khuẩn *P. putida* trong môi trường Pseudomonas trên máy lắc với thời gian là 48h, tốc độ lắc 200 v/ph, nhiệt độ đã được xác định ở trên, đồng thời pH sẽ ở mức 4, 5, 6, 7 và 8. Sau đó đem đi ly tâm 12000 vòng/15phút ở 4°C để thu dịch chiết tại mỗi pH khác nhau. Tiến hành tương tự như khảo sát nhiệt độ và đo đường kính tản nấm.

- Ảnh hưởng của thời gian

Sau khi đã chọn được nhiệt độ và pH tối ưu, tiếp tục tiến hành thí nghiệm. Nuôi cấy lắc vi khuẩn *P. putida* với tốc độ 200 v/ph, theo nhiệt độ và pH được xác định ở trên tại các thời gian là 12 giờ, 24 giờ, 36 giờ và 48 giờ. Ly tâm với tốc độ 12000 vòng/15phút ở 4°C, tại mỗi thời gian thu được các dịch chiết khác nhau. Tiến hành xác định khả năng kháng bằng cách đo đường kính tản nấm.

- Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Sau khi chọn được nhiệt độ, thời gian, pH tối ưu, ta tiến hành nuôi cấy lắc ở các điều kiện đã chọn ở trên, đồng thời thay đổi tốc độ lắc ở 150 v/ph, 200 v/ph và 250 v/ph. Ly tâm với tốc độ 12000 vòng/15phút ở 4°C, tại mỗi tốc độ lắc thu được các dịch chiết khác nhau. Sau đó tiến hành xác định khả năng kháng tương tự như các thí nghiệm trước.

- Ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết vi khuẩn P. putida đến khả năng kháng nấm mốc A. niger N3

Tiến hành nuôi cấy vi khuẩn *P. putida* ở các điều kiện đã khảo sát. Ly tâm với tốc độ 12.000 vòng/15phút ở 4°C để thu dịch chiết trong điều kiện vô trùng. Sau đó, khảo sát ở các nồng độ khác nhau: 6%, 12%, 18% và 24% trên môi trường 1/2PDA được tiệt trùng. Cây chấm điểm nấm mốc vào tâm của đĩa thạch. Các đĩa được bao gói và ủ ở 35°C ± 2°C, sau 2, 3 và 4 ngày đem ra quan sát và đo đường kính tản nấm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp xác định tỷ lệ nhiễm nấm trên hạt đậu xanh

Tiến hành xác định mức độ nhiễm nấm bệnh trên hạt giống đậu xanh theo phương pháp Blotter (Mathur và Olga Kongsdal, 2000). Các hạt được ủ sau 5 - 7 ngày, tiến hành theo dõi sự phát triển của nấm bệnh trên bề mặt của hạt.

Tỷ lệ hạt nhiễm nấm (TLHNN) được tính theo công thức:

$$\text{TLHNN (\%)} = \frac{\text{Tổng số hạt nhiễm nấm}}{\text{Tổng số hạt ủ ẩm}} \times 100$$

Phương pháp xác định hiệu lực ức chế nấm mốc A. niger N3

Tiến hành cấy chấm điểm theo phương pháp của Rama và cs. (2000). Nấm mốc sau khi nuôi cấy 5 ngày, tiến hành thí nghiệm kháng nấm. Sau đó, đĩa thử nghiệm được ủ ở 28°C, quan sát và đo đường kính của tản nấm (Rajendiran và cs., 2010). Tính hiệu quả ức chế theo công thức.

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

PI : tỷ lệ ức chế (%)

C: Đường kính phát triển của sợi nấm trên đĩa đối chứng (mm).

T: Đường kính phát triển của sợi nấm trên đĩa được xử lý bằng dịch kháng (mm).

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phân tích phương sai ANOVA để xác định sự sai khác giữa các giá trị trung bình, có ý nghĩa với độ tin cậy $p < 0,05$, sử dụng phần mềm SAS, phiên bản 9.13.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả đánh giá mức độ nhiễm nấm bệnh trên hạt giống đậu xanh, phân lập và định danh

Sử dụng phương pháp giấy thấm nhằm xác định mức độ nhiễm nấm bệnh trên hạt giống đậu xanh, sau 5 - 7 ngày ủ ẩm, trên bề mặt hạt giống đậu xanh xuất hiện nhiều loại khuẩn lạc với hình thái, màu sắc và tỷ lệ nhiễm khác nhau. Nhằm xác định được chủng nấm gây bệnh điển hình có tỷ lệ nhiễm cao, chúng tôi tiến hành xác định mức độ nhiễm nấm bệnh trên hạt giống đậu xanh với 3 lần lặp lại. Dựa vào các đặc điểm hình thái và màu sắc của các khuẩn lạc trên các mẫu đậu xanh giống, phân loại được 3 chủng nấm khác nhau là N1, N2 và N3. Tỷ lệ hạt giống nhiễm từng chủng nấm là khác nhau và được thể hiện trong bảng 1.

Kết quả từ bảng 1 cho thấy, hạt giống đậu xanh sau khi thu hoạch bị nhiễm nấm bệnh với tỷ lệ khá cao, chiếm 61,50% trong tổng số mẫu phân tích. Trong đó, tỷ lệ nhiễm nấm N1 và N2 xấp xỉ tương đương nhau lần lượt là 29,94% và 28,45%, tỷ lệ nhiễm nấm N3 cao nhất đạt 44,68%. Trên cơ sở đó, chúng tôi tiến hành lựa chọn 3 chủng nấm N1, N2, N3 đã phân lập được đưa đi giám định hình thái, trong đó chú trọng vào chủng N3 với tỷ lệ nhiễm bệnh cao nhất.

Bảng 1. Mức độ nhiễm nấm bệnh trên hạt giống đậu xanh

STT	Tỷ lệ hạt nhiễm nấm bệnh (%)	Mức độ nhiễm nấm bệnh (%)		
		N1	N2	N3
1	66,67	31,11	13,33	55,55
2	61,67	14,22	45,45	49,41
3	58,33	35,43	39,62	34,03
4	71,67	32,14	13,33	54,53
5	53,33	34,44	23,89	45,00
6	58,33	24,44	41,84	33,72
7	65,00	37,79	18,79	43,42
8	58,33	37,99	24,24	46,85
9	60,00	18,46	43,44	38,20
10	61,67	33,33	20,56	46,11
<i>TB</i>	<i>61,50</i>	<i>29,94</i>	<i>28,45</i>	<i>44,68</i>

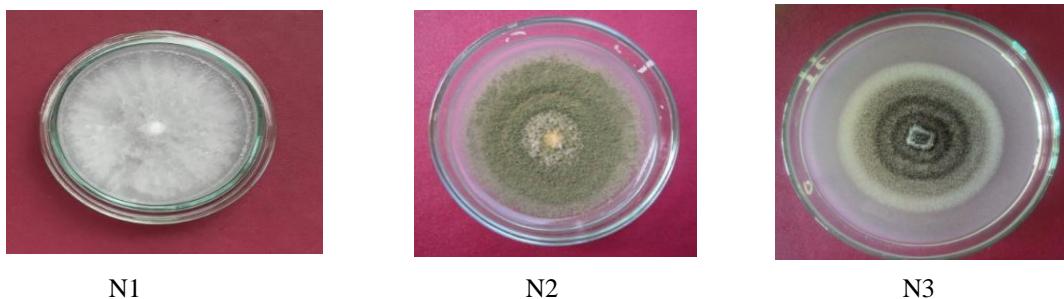
Chú thích: Số liệu của bảng 1 là kết quả của 3 lần lặp lại.

Sau khi phân lập được 3 chủng N1, N2 và N3. Các chủng nấm này được đưa đi quan sát đại thể và vi thể. Kết quả quan sát cho thấy chủng N3 có những đặc điểm hình thái, màu sắc và bào tử giống với chủng *A. niger* theo nghiên cứu của tác giả Gautam A.K. và Bhadauria R (2012). Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Đặc điểm đại thể và vi thể của các chủng nấm N1, N2 và N3

N1	Đặc điểm đại thể	Nấm phát triển và hình thành bào tử thuận lợi trên môi trường ½ PDA ở 28°C. Sợi nấm đa bào, tản nấm tròn. Khuẩn lạc có màu xanh vàng, sợi nấm to, đầu sợi nấm có hình tròn
	Đặc điểm vi thể	Cơ quan sinh sản có hình hoa cúc. Bào tử có dạng hình cầu, bề mặt có vệt tron nhãn, thể bình có dạng hình trụ
N2	Đặc điểm đại thể	Nấm phát triển và hình thành bào tử thuận lợi trên môi trường ½ PDA ở 28°C. Tản nấm tròn, khuẩn lạc có màu trắng, sợi nấm to, xốp
	Đặc điểm vi thể	Bào tử phân sinh có dạng hình lưới liềm
N3	Đặc điểm đại thể	Nấm phát triển và hình thành bào tử thuận lợi trên môi trường ½ PDA ở 28°C. Tản nấm tròn, khuẩn lạc có màu nâu đến đen, dạng bột rời lấm tấm, rìa là lớp tơ trắng
	Đặc điểm vi thể	Bào tử có dạng hình cầu, ghồ ghề, vách dày

Kết quả trên cũng phù hợp với kết quả của Nguyễn Kim Vân và cs. (2006) về nguyên nhân gây bệnh ở cây đậu đỗ, theo đó, tỷ lệ hạt giống cây đậu đỗ nhiễm nấm *A. niger* là từ 26-50%.



N1

N2

N3

Hình 1. Hình ảnh các chủng nấm N1, N2 và N3 trên môi trường PDA.

Kết quả so sánh trình tự gen rRNA 28S của chủng nấm mốc N3 phân lập với gen

trong ngân hàng gen bằng phần mềm Blast cho thấy gen tương đồng 99% với chủng *A.niger* An03c0110. Do đó, có thể kết luận rằng chủng nấm mốc vừa phân lập được là *A.niger*, ký hiệu là *A. niger* N3.

```

ACGGCCCGTTCCAGGGCACTTAGACGGGGGCCGCACCCAAAGCATCCTCTGCAA
TTACAATGCGGACTCCGAAGGAGCCAGCTTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTTAC
TCGCCGTTACTGAGGCAATCCCGGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGCTT
AAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAACCTGGAAAAAATGGTTGGA
AAACGTCGGCAGGCGCCGGCCAATCCTACAGAGCATGTGACAAAGCCCCATACGC
TCGAGGATCGGACGCGGTGCCGCGCTGCCTTTCGGGCCCCGTCCCCC
GGAGAGGGGGACGGCGACCCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGCAGCAATGAC
GCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATACCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGAC
TCGATGATTAAGTGAATTCTGCAATTCACATTAGTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTT
CATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTAACTGATTGCATTCAA
TCAACTCAGACTGCACGCTTTCAGACAGTGTTCGTGTTGGGGTCTCCGGCGGGCAC
GGGCCCGGGGGCAAAGGCGCCCCCGCGGCCGACAAGCGGCGGGCCCCGCCG
AAGCAACAGGGTATAATAGACACGGATGGGAGGTTGGGCCCAAAGGACCCGCAC
TCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTACGACTTTTACTTC
CTCTAAATGACCGGGTTTGACCAACTTCCGGCTCTGGGGGGTCGTTGCCAACCT
CCTGAGCCAGTCCGAAGGCCTCACCGAGCCATTC
    
```

Hình 2. Kết quả giải trình tự gen 28S của chủng nấm N3.

3.2. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các điều kiện thu nhận dịch chiết vi khuẩn *P.putida* đến khả năng kháng nấm mốc *A. niger* N3

Ảnh hưởng của điều kiện nhiệt độ

Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ ở các mức 25°C, 30°C và 35°C để thu được dịch chiết vi khuẩn *P. putida*. Dịch chiết được sử dụng để thực hiện khả năng kháng nấm theo phương pháp cấy chấm điểm. Kết quả được trình bày ở bảng 3 và hình 3 .

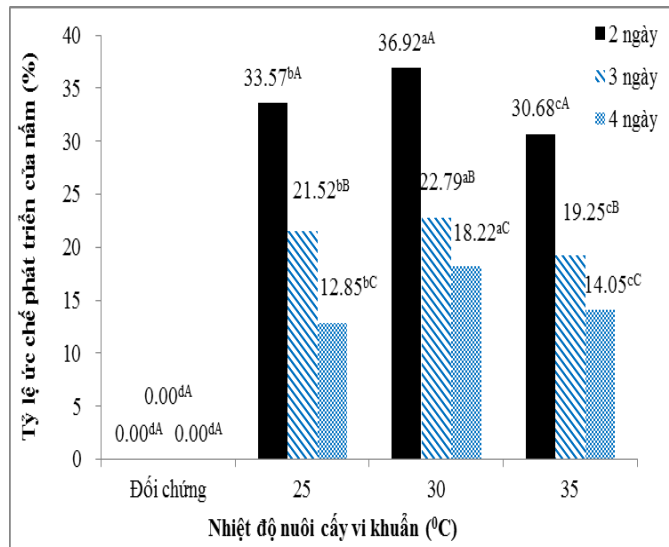
Bảng 3. Đường kính tản nấm *A. niger* N3 sau khi kháng bởi dịch chiết vi khuẩn *P. putida* theo nhiệt độ

Thời gian	Đường kính tản nấm <i>A. niger</i> N3 (mm)			
	Đối chứng	25°C	30°C	35°C
2 ngày	25,65 ^{aA}	17,04 ^{cA}	16,18 ^{dA}	17,78 ^{bA}
3 ngày	36,16 ^{aB}	28,38 ^{cB}	27,92 ^{dB}	29,20 ^{bB}
4 ngày	43,09 ^{aC}	36,48 ^{cC}	35,24 ^{dC}	37,05 ^{bC}

Ghi chú:

Giá trị trung bình với n = 3. Số liệu có mũ là chữ thường thể hiện sự sai khác theo hàng ngang (p < 0,05). Số liệu có mũ là chữ in hoa thể hiện sự sai khác theo hàng dọc (p < 0,05).

Qua kết quả thí nghiệm cho thấy, trong khoảng nhiệt độ từ 25-30°C, hiệu lực ức chế tăng theo nhiệt độ, khi tiếp tục tăng nhiệt độ đến 35°C thì hiệu lực ức chế giảm. Khi kéo dài thời gian nuôi cấy thì đường kính tản nấm tăng, hiệu lực ức chế giảm dần theo thời gian. Ở nhiệt độ 30°C khả năng kháng là cao nhất trong tất cả các ngày, đặc biệt là ở 2 ngày, đường kính tản nấm là 16,18 mm, tương đương với hiệu lực ức chế là 36,92%. Sau 4 ngày, kích thước đường kính tản nấm là 35,24 mm, hiệu lực ức chế còn 18,22%. Theo nghiên cứu



Hình 3. Biểu đồ thể hiện khả năng ức chế *A. niger* N3 của dịch chiết vi khuẩn *P. putida* khi thay đổi nhiệt độ (Số liệu có mũ là chữ in hoa thể hiện sự sai khác theo thời gian ($p < 0,05$); số liệu có mũ là chữ thường thể hiện sự sai khác theo nhiệt độ ($p < 0,05$))

của Phạm Thanh Hà và cs. (2012), phân lập và xác định hoạt tính của vi khuẩn *P. putida* CN3 sinh tổng hợp enzyme uricase. Vi khuẩn này được nuôi trên máy lắc ở 200 v/ph, 30°C, trong 48 giờ để sinh enzyme nội bào và ngoại bào nhằm phục vụ cho mục đích nghiên cứu tiếp theo. Đồng thời xác định được nhiệt độ tối ưu để cho vi khuẩn này phát triển là 25 - 30°C. Chủng *P. putida* CN3 sinh tổng hợp uricase nội bào với hoạt tính 0,45 U/mL và uricase ngoại bào với hoạt tính 0,85 U/mL.

Từ kết quả thu được, chúng tôi lựa chọn nhiệt độ tốt nhất trong điều kiện nghiên cứu để thu dịch chiết vi khuẩn *P. putida* là 30°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của điều kiện pH

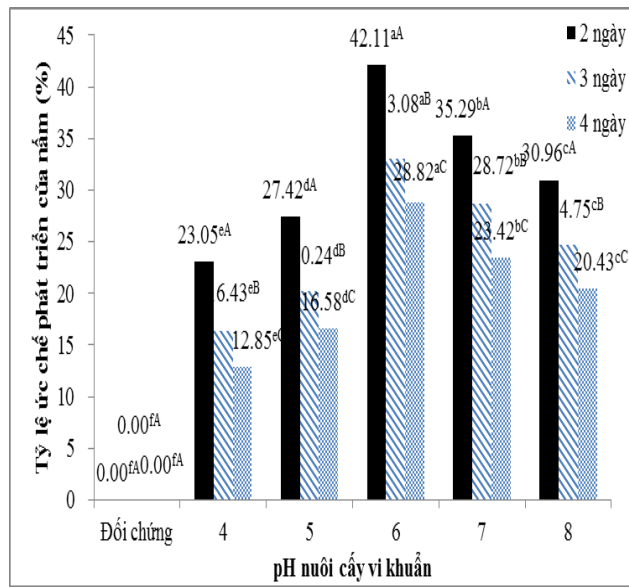
Tiến hành nuôi cấy vi khuẩn *P. putida* khi thay đổi pH ở các mức 4, 5, 6, 7 và 8 để thu dịch chiết. Xác định khả năng kháng nấm theo phương pháp cấy chấm điểm. Kết quả được trình bày ở bảng 4 và hình 4.

Bảng 4. Đường kính tản nấm *A. niger* N3 sau khi kháng bởi dịch chiết vi khuẩn *P. putida* theo pH

Thời gian	Đường kính tản nấm <i>A. niger</i> N3 (mm)					
	Đối chứng	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8
2 ngày	24,03 ^{aA}	18,49 ^{bA}	17,44 ^{cA}	13,91 ^{fA}	15,55 ^{eA}	16,59 ^{dA}
3 ngày	34,58 ^{aB}	28,90 ^{bB}	27,58 ^{cB}	23,14 ^{fB}	24,65 ^{eB}	26,02 ^{dB}
4 ngày	41,32 ^{aC}	36,01 ^{bC}	34,47 ^{cC}	29,14 ^{fC}	31,64 ^{eC}	32,88 ^{dC}

Giá trị trung bình với $n = 3$. Số liệu có mũ là chữ thường thể hiện sự sai khác theo hàng ngang ($p < 0,05$)
Số liệu có mũ là chữ in hoa thể hiện sự sai khác theo hàng dọc ($p < 0,05$).

Theo kết quả bảng 2, ở các mức pH khác nhau thì mức kháng cũng khác nhau; ở khoảng pH từ 4 - 8, hiệu lực ức chế tăng theo pH, tuy nhiên khi tiếp tục tăng pH đến 7 và 8 thì hiệu lực ức chế giảm. Tại pH 6 khả năng kháng là cao nhất trong tất cả các ngày, đặc biệt là ở 2 ngày.



Hình 4. Biểu đồ thể hiện khả năng ức chế *A. niger* N3 của dịch chiết vi khuẩn *P. putida* khi thay đổi pH. Số liệu có mũ là chữ in hoa thể hiện sự sai khác theo thời gian ($p < 0,05$); số liệu có mũ là chữ thường thể hiện sự sai khác theo pH ($p < 0,05$)

Khi kéo dài thời gian nuôi cấy thì đường kính tản nấm tăng, hiệu lực ức chế giảm dần theo thời gian. Tại pH 6, sau 2 ngày kích thước đường kính tản nấm là 13,91 mm, tương đương với hiệu lực ức chế là 42,11%. Sau 4 ngày, kích thước đường kính tản nấm là 29,14 mm, hiệu lực ức chế còn 28,82%.

Vi khuẩn *P. putida* thường sinh trưởng trong khoảng pH từ 4-8. Phạm Thanh Hà và cs. (2012) đã xác định được vi khuẩn *P. putida* CN3 có khả năng phát triển tốt ở pH = 7 và nhiệt độ 30°C. Theo kết quả kháng nấm của Hammad và cs. (2010), thì hiệu lực ức chế của tác giả này cao hơn so với nghiên cứu chúng tôi tại 2 ngày ở pH 6. Từ kết quả thu được, chúng tôi lựa chọn pH tốt nhất trong điều kiện nghiên cứu để thu dịch chiết vi khuẩn *P. putida* là 6 cho các thí nghiệm tiếp theo.

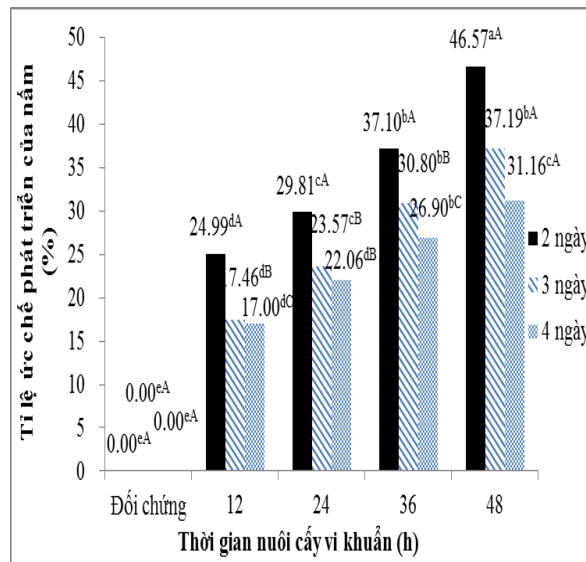
Ảnh hưởng của điều kiện thời gian

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy ở mức 12 giờ, 24 giờ, 36 giờ và 48 giờ để thu được dịch chiết vi khuẩn *P. putida*. Dịch chiết được sử dụng để thực hiện nghiên cứu khả năng kháng nấm theo phương pháp cấy chấm điểm. Kết quả được trình bày ở bảng 5 và hình 5.

Bảng 5. Đường kính tản nấm *A. niger* N3 sau khi kháng bởi dịch chiết vi khuẩn *P. putida* theo thời gian

Thời gian	Đường kính tản nấm <i>A. niger</i> N3 (mm)				
	Đối chứng	12 giờ	24 giờ	36 giờ	48 giờ
2 ngày	23,21 ^{aA}	17,41 ^{bA}	16,29 ^{cA}	14,60 ^{dA}	12,40 ^{eA}
3 ngày	33,05 ^{aB}	27,28 ^{bB}	25,26 ^{cB}	22,87 ^{dB}	20,76 ^{eB}
4 ngày	41,11 ^{aC}	34,12 ^{bC}	32,04 ^{cC}	30,05 ^{dC}	28,30 ^{eC}

Giá trị trung bình với n = 3. Số liệu có mũ là chữ thường thể hiện sự sai khác theo hàng ngang ($p < 0,05$). Số liệu có mũ là chữ in hoa thể hiện sự sai khác theo hàng dọc ($p < 0,05$)



Hình 5. Biểu đồ thể hiện khả năng ức chế *A. niger* N3 của dịch chiết vi khuẩn *P. putida* khi thay đổi thời gian.

Số liệu có mũ là chữ in hoa thể hiện sự sai khác theo thời gian ($p < 0,05$);

số liệu có mũ là chữ thường thể hiện sự sai khác theo thời gian nuôi cấy thu dịch chiết ($p < 0,05$)

Qua kết quả thu được chúng tôi nhận thấy: Ở các mức thời gian nuôi cấy khác nhau thì dịch chiết có khả năng kháng cũng khác nhau. Trong đó dịch chiết thu được ở thời gian 48 giờ có khả năng kháng là cao nhất trong tất cả các ngày, đặc biệt là ở 2 ngày. Khi kéo dài thời gian nuôi cấy thì đường kính tán nấm tăng, hiệu lực ức chế giảm dần theo thời gian. Với dịch chiết vi khuẩn thu nhận ở 48 giờ, sau 2 ngày nuôi cấy kích thước đường kính tán nấm là 12,40 mm, tương đương với hiệu lực ức chế là 46,57%. Sau 4 ngày, kích thước đường kính tán nấm là 28,30 mm, hiệu lực ức chế còn 31,16%.

Theo nghiên cứu của Phạm Thanh Hà và cs. (2012), trong 48 giờ hiệu quả kháng cũng cao nhất (46,57%). Trong khi kết quả kháng nấm của Hammad và cs. (2010) cao nhất là 94,2% thì hiệu lực ức chế của chúng tôi tại 2 ngày là 46,57%. Từ kết quả thu được, chúng tôi lựa chọn thời gian nuôi tốt nhất trong điều kiện nghiên cứu để thu dịch chiết vi khuẩn *P. putida* là 48 giờ cho các thí nghiệm tiếp theo.

Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Khảo sát ảnh hưởng của tốc độ lắc ở các mức 150, 200 và 250 v/ph để thu được dịch chiết vi khuẩn *P. putida*. Dịch chiết được sử dụng để thực hiện nghiên cứu khả năng kháng nấm theo phương pháp cấy chấm điểm. Kết quả được trình bày ở bảng 6 và hình 6.

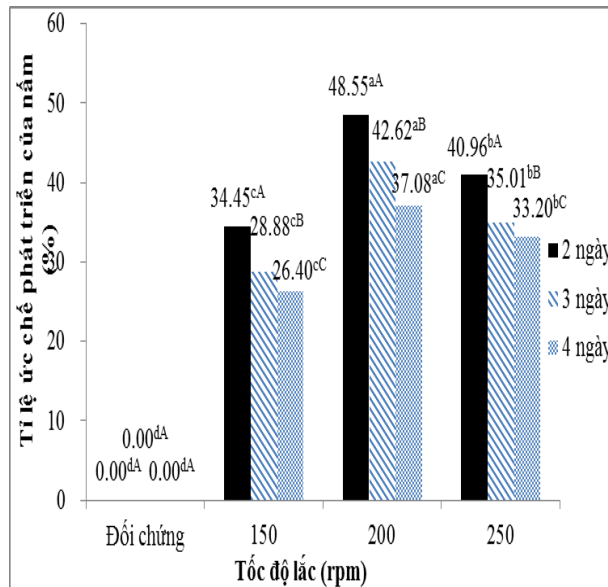
Bảng 6. Đường kính tán nấm *A. niger* N3 sau khi kháng bởi dịch chiết vi khuẩn *P. putida* theo tốc độ lắc

Thời gian	Đường kính tăng nấm <i>A. niger</i> N3 (mm)			
	Đối chứng	150 v/ph	200 v/ph	250 v/ph
2 ngày	24,12 ^{aA}	15,81 ^{bA}	12,41 ^{dA}	14,24 ^{cA}
3 ngày	35,59 ^{aB}	25,31 ^{bB}	20,42 ^{dB}	23,13 ^{cB}
4 ngày	44,09 ^{aC}	32,45 ^{bC}	27,74 ^{dC}	29,45 ^{cC}

Ghi chú:

Giá trị trung bình với $n = 3$. Số liệu có mũ là chữ thường thể hiện sự sai khác theo hàng ngang ($p < 0,05$).

Số liệu có mũ là chữ in hoa thể hiện sự sai khác theo hàng dọc ($p < 0,05$).



Hình 6. Biểu đồ thể hiện khả năng ức chế *A. niger* N3 của dịch chiết vi khuẩn *P. putida* khi thay đổi tốc độ lắc.

Số liệu có mũ là chữ in hoa thể hiện sự sai khác theo thời gian ($p < 0,05$);

số liệu có mũ là chữ thường thể hiện sự sai khác theo tốc độ lắc ($p < 0,05$)

Kết quả nghiên cứu được cho thấy ở các mức tốc độ lắc khác nhau thì khả năng kháng cũng khác nhau. Trong khoảng tốc độ lắc từ 150 – 250 v/ph, hiệu lực ức chế tăng theo tốc độ lắc, tuy nhiên khi tiếp tục tăng tốc độ lắc đến 250 v/ph thì hiệu lực ức chế giảm. Ở tốc độ lắc 200 v/ph, khả năng kháng là cao nhất trong tất cả các ngày, đặc biệt là 2 ngày.

Khi kéo dài thời gian nuôi cấy thì đường kính tản nấm tăng, hiệu lực ức chế giảm dần theo thời gian. Tại 200 v/ph, sau 2 ngày kích thước đường kính tản nấm là 12,41 mm, tương đương với hiệu lực ức chế là 48,55%. Sau 4 ngày, kích thước đường kính tản nấm là 27,74 mm, hiệu lực ức chế còn 37,08%. Vi khuẩn *P. putida* là loại vi khuẩn sống hiếu khí nếu được nuôi cấy lắc trong một điều kiện nhất định thì sẽ được cung cấp một lượng oxi rất lớn. Tuy nhiên, nếu cung cấp lượng oxi quá nhiều thì dẫn đến vi khuẩn sẽ bị ức chế sự phát triển (Muratoglu và cs., 2011).

Theo nghiên cứu Phạm Thanh Hà và cs. (2012), thì để thu enzyme ngoại bào và nội bào, các tác giả cũng đã tiến hành nuôi cấy vi khuẩn *P. putida* CN3 ở pH 7, nhiệt độ 30°C, tốc độ lắc 200 v/ph trong 48 giờ. Từ kết quả thu được, chúng tôi lựa chọn tốc độ lắc trong quá trình nuôi cấy để thu dịch chiết vi khuẩn *P. putida* là 200 v/ph.

3.3. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết vi khuẩn *P. putida* đến khả năng kháng nấm mốc *A. niger* N3

Ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết đến kích thước của đường kính tản nấm

Chúng tôi tiến hành nuôi cấy vi khuẩn *P. putida* tại các điều kiện 30°C, pH 6, thời gian 48 giờ và tốc độ lắc 200 v/ph. Dịch chiết vi khuẩn *P. putida* sau khi thu nhận, được sử dụng để thực hiện nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết đến khả năng kháng nấm *A.*

niger N3 theo phương pháp cấy chấm điểm. Kết quả được trình bày ở bảng 7, hình 7 và 8.

Bảng 7. Đường kính tản nấm *A. niger* N3 trên môi trường có bổ sung dịch chiết vi khuẩn *P. putida* ở các nồng độ khác nhau

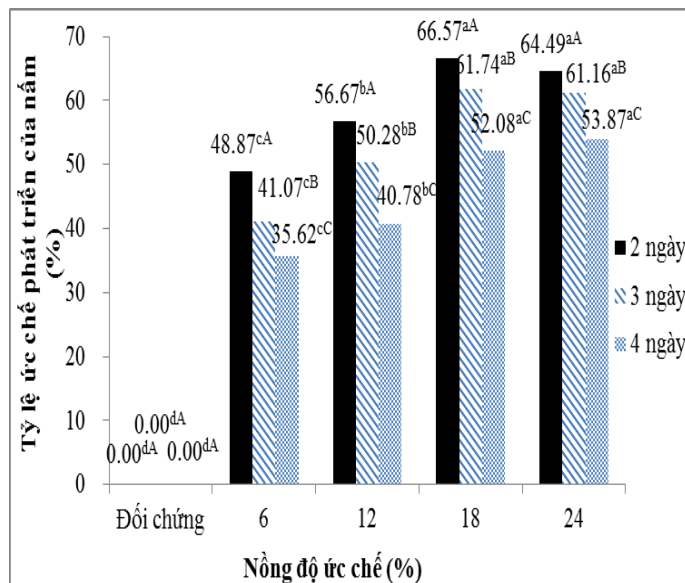
Thời gian	Đường kính tản nấm <i>A. niger</i> N3 (mm)				
	Đối chứng	6%	12%	18%	24%
2 ngày	24,23 ^{dA}	12,39 ^{cA}	10,50 ^{bA}	8,10 ^{aA}	8,12 ^{aA}
3 ngày	34,53 ^{dA}	20,35 ^{cB}	17,17 ^{bB}	13,21 ^{aB}	13,41 ^{aB}
4 ngày	42,62 ^{dA}	27,44 ^{cC}	25,24 ^{bC}	20,42 ^{aC}	19,66 ^{aC}

Giá trị trung bình với $n = 3$. Số liệu có mũ là chữ thường thể hiện sự sai khác theo hàng ngang ($p < 0,05$).

Số liệu có mũ là chữ in hoa thể hiện sự sai khác theo hàng dọc ($p < 0,05$).

Ở các mức nồng độ khác nhau thì khả năng kháng cũng khác nhau. Theo quan sát thì thấy trong các nồng độ từ 0, 6, 12, 18 và 24%, thì hiệu lực ức chế tăng theo nồng độ. Ở nồng độ 18 và 24%, khả năng kháng là cao nhất trong tất cả các ngày, đặc biệt là ở 2 ngày.

Khi kéo dài thời gian nuôi cấy thì đường kính tản nấm tăng, hiệu lực ức chế giảm dần theo thời gian. Tại 18 và 24%, sau 2 ngày kích thước đường kính tản nấm là 8,10mm và 8,12 mm, tương đương với hiệu lực ức chế là 66,49% và 66,57%. Sau 4 ngày, kích thước đường kính tản nấm là 19,66 mm và 20,42 mm, hiệu lực ức chế còn 53,87% và 52,08%. Không có sự sai khác về khả năng kháng nấm *A. niger* N3 của dịch chiết vi khuẩn *P. putida* ở nồng độ 18 và 24%.



Hình 7. Biểu đồ thể hiện khả năng ức chế *A. niger* N3 của dịch chiết vi khuẩn *P. putida* khi thay đổi nồng độ dịch chiết.

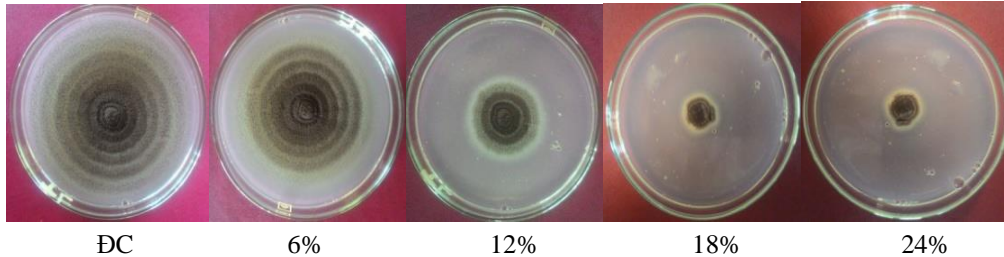
Số liệu có mũ là chữ in hoa thể hiện sự sai khác theo thời gian ($p < 0,05$);

số liệu có mũ là chữ thường thể hiện sự sai khác theo nồng độ dịch chiết ($p < 0,05$)

Kết quả nghiên cứu cho thấy khi nồng độ dịch chiết tăng thì nồng độ các chất kháng sinh cũng tăng lên. Nồng độ chất kháng sinh càng cao sẽ kìm hãm, ức chế sự phát triển của sợi nấm càng hiệu quả. Ở nồng độ 18 và 24%, hiệu lực ức chế cao nhất.

Nghiên cứu của Hammad và cs. (2010) khi sử dụng vi khuẩn *P. putida* 2 ức chế sự tăng trưởng của nấm *Fusarium* trên cây vừng (*Sesamum indicum*) đến 94,2%, còn *P.*

fluorescens 3 lực ức chế là 94,6%. Riêng hỗn hợp *P. putida* 2 và *P. fluorescens* 3 hiệu quả ức chế lên tới 100%, kết quả này cao hơn so với nghiên cứu của chúng tôi. Trong khi đó, công bố của Trần Thị Thu Hà và cs. (2010), trong 7 chủng vi khuẩn *Pseudomonas*, có 2 chủng *Pseudomonas* 214D và SS101 có khả năng phòng trừ nấm *A. niger* trên cây lạc hiệu quả nhất so với đối chứng. Kết quả cho thấy, khi sử dụng vi khuẩn *P. putida* 214D và *P. fluorescens* SS101 thì tỷ lệ bệnh thấp nhất 32,22 và 28,89%, còn đối chứng là cao nhất 77,33%. So sánh với kết quả của chúng tôi thì 2 kết quả gần tương đương nhau.



Hình 8. Kết quả kháng *A. niger* N3 sau 7 ngày nuôi cấy của dịch chiết vi khuẩn *P. putida* khi thay đổi nồng độ.

4. KẾT LUẬN

- Điều kiện thu nhận dịch chiết tốt nhất của vi khuẩn *P. putida* là tại nhiệt độ 30°C, pH 6, thời gian nuôi cấy 48 giờ và tốc độ lắc là 200 v/ph.

- Khi bổ sung dịch chiết vi khuẩn *P. putida* ở nồng độ 18 và 24% thì khả năng ức chế *A. niger* N3 tốt nhất ở 2 ngày với tỷ lệ ức chế là 66,49 và 66,57%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

Phạm Thanh Hà, Trần Đình Mẫn, Trần Thị Hoa, (2012). Phân lập, tuyển chọn và xác định hoạt tính của vi khuẩn sinh tổng hợp enzyme uricase. *Tạp chí sinh học*, 34(4), 473-478.

Trần Thị Thu Hà, Đinh Thị Phương, Đào Thị Hằng, Nguyễn Vĩnh Trường, Phạm Lê Hoàng, (2010). Ảnh hưởng của vi khuẩn đối kháng *Pseudomonas* đến bệnh héo rũ gốc mốc đen (*Aspergillus niger* Van Tiegh) trên cây lạc và khả năng tồn tại của chúng. *Tạp chí công nghệ sinh học*, 83B.

Nguyễn Kim Vân, Ngô Bích Thảo, Nguyễn Văn Viên, Đỗ Tấn Dũng, Ngô Thị Xuyên, Nguyễn Đức Huy, (2006). Nguyên nhân gây bệnh hại hạt giống lúa, ngô, đậu tương, lạc, rau ở một số tỉnh phía Bắc Việt Nam và biện pháp phòng trừ. *Tạp Chí KHKT Nông nghiệp*, 6(4), 39-47.

Tài liệu tiếng nước ngoài

Fonseca. P., Moreno. R. and Rojo. F., (2011). Growth of *Pseudomonas putida* at low temperature: global transcriptomic and proteomic analyses. *Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Campus UAM, Cantoblanco, 28049 Madrid*, 1758-2229.

Gautam A. K. and Bhadauria R., (2012). Characterization of *Aspergillus* associated with commercially stored triphala powder. *African journal of Biotechnology*, 104, 16814-16823

Hammad Ashwaq T, Farhan. H. N., Abdullah H. B., (2010). The biological activity of bacterial vaccine of *Pseudomonas putida*2 and *Pseudomonas fluorescens*3 isolates to protect sesame crop (*Sesamum indicum*) from *Fusarium* fungi under field conditions. *Agriculture and biology journal of North America*, 1(5), 803-811.

Kruijt. M., Ha Tran and Jos M. Raaijmakers, (2009). Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant growth-promoting *Pseudomonas putida* 2. *Journal of Applied Microbiology*, 107(2), 546 - 556.

- Mathur, S.B and Olga K., (2000). Common laboratory seed healthtesting methods for detecting fungi. *DGISP Copenhagen Denmark*.
- Muratoğlu. H., Zihni DEMİRBAĞ, Kazim SEZEN, (2011). An entomopathogenic bacterium, *Pseudomonas putida*, from *Leptinotarsa decemlineata*. *Department of Biology, Faculty of Sciences, Karadeniz Technical University, 61080, Trabzon - turkey*, 275-282.
- Peter A. H. M. Bakke, Debora C. M. Glandorf, Mareike Viebahn, Theodora W. M. Ouwens, Eric Smit, Paula Leeflang, Karel Wernars, Linda S. Thomashow, Jane E. Thomas-Oates⁴ & Leendert C. van Loon, (2002). Effects of *Pseudomonas putida* modified to produce phenazine-1-carboxylic acid and 2,4-diacetylphloroglucinol on the microflora of field grown wheat. *Institute of Biology, Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 617-624.
- Rajendiran, R., Jegadeeshkumar, D., Sureshkumar, B. T., and Nisha, T., (2010). Invitro assessment of antagonistic activity of *Trichoderma viride* against post harvest pathogens. *Journal of Agricultural Technology*, 6(1), 31-35.
- Raju. R. B, M. and Krishna Murthy, K. V. M., (2000). Efficacy of *Trichoderma* spp. In the management of collar rot of groundnut caused by *Aspergillus niger* Van Teighem. *Indian J. Plant Prot*, 28, 197-199.

STUDY ON ANTIFUNFAL ABILITY OF *Pseudomonas putida* EXTRACT AGAINST *Aspergillus niger* N3 FROM MUNG BEAN SEED

Nguyen Hien Trang¹, Ha Anh Duc²

¹ Faculty of Agricultural Engineering and Post-harvest Technology,
University of Agriculture and Forestry, Hue University

² Department of Food Safety and Hygiene, Quang Binh Province

Contact email: nguyenhientrang@huaf.edu.vn

SUMMARY

Mould contamination in agricultural product preservation is a serious problem that needs to paid attention more in food technology. These experiments were carried out to determine the parameters (temperature, pH, time, shaking speed) in the production of *Pseudomonas putida* extract which had the highest antifungal ability against *Aspergillus niger* N3. The N3 strain of fungi, isolated from mung bean seeds was naturally infected by the typical mold which was used to study the antifungal activity of *P. putida* extract. This strain was observed macroscopic morphology (colony color, shape, and dimension) on PDA media and microscopic morphology (spore shape) on microscopic and was compared to control *Aspergillus niger* strain. It was also identified by sequencing 28S rRNA gene. This result reveals that 28S rRNA gene sequence of the N3 strain having high similarity with that of other *A. niger* strains deposits on GenBank (NCBI). This study also indicates the highest antifungal activity of *P. putida* extracts when incubating this strain in *Pseudomonas* medium at 30oC, pH 6 for 48 hours with shaking at 200 rpm. The presence of *P. putida* extracted at 18 and 24% has the highest antifungal ability against *A. niger* N3.

Key words: Antifungal, *Aspergillus niger* N3, extract, *Pseudomonas putida*

Received: May 24, 2017

Reviewed: June 11, 2017

Accepted: June 15, 2017

