

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG XẠ KHUẨN TỪ RỪNG NGẬP MẶN CẦN GIỜ KHÁNG NẤM *FUSARIUM* SP.

HOÀNG THỊ HỒNG*, NGUYỄN NGỌC PHƯƠNG**

TÓM TẮT

Chúng tôi đã tiến hành phân lập được 55 chủng xạ khuẩn khác nhau từ rừng ngập mặn Cần Giờ và phân thành 3 nhóm; nhóm 1: Trắng, gồm 19 chủng (34,5%); nhóm 2: Xám – nâu – đen, gồm 25 chủng (45,5%); nhóm 3: Vàng nhạt – vàng – vàng nâu, gồm 11 chủng (20%). Từ bộ sưu tập tuyển chọn được chủng xạ khuẩn F46 có khả năng kháng nấm *Fusarium* sp. mạnh. Qua các nghiên cứu đã xác định được các điều kiện nuôi cấy thích hợp cho chủng xạ khuẩn này sinh chất kháng nấm *Fusarium* sp. như sau: cao thịt 4g, peptone 4g, cao nấm men 1g, maltose 10g, nước cất 1 lít; NaCl 1%; pH = 5-6; 25°C; 84 giờ.

Từ khóa: phân lập xạ khuẩn, chất kháng nấm, *Fusarium* sp.

ABSTRACT

The isolation and selection of actinomycete species from Can Gio tropical swamp for their antifungal feature against Fusarium sp.

We have isolated 55 different species of actinomycetes from Can Gio tropical swamp and divided them into 3 groups: group 1 called White, including 19 species (34.5%), group 2 called Gray - Brown - Black, including 25 species (45.5%), group 3 called Light yellow - Yellow – Brownish yellow, including 11 species (20%). From this collection, we have succeeded in choosing an actinomycete called F46 whose antifungal feature is very strong. We have found the best planting conditions for this species to produce antifungal is as following: 4g, peptone 4g, yeast extract 1 g, maltose 10 g, distilled water 1 litre; NaCl 1%; pH = 5-6, 25°C; 84 hours culture.

Keywords: isolation of actinomycetes, antifungal, *Fusarium* sp.

1. Mở đầu

Theo thống kê của tổ chức Nông – Lương Thế giới cho thấy các loại cây trồng trên đồng ruộng hiện nay phải chống đỡ với khoảng 100.000 loài sâu, 10.000 loài nấm, 200 loài vi khuẩn, 600 loài tuyến trùng và 600 loài virus gây hại khác nhau. Đây quả là một lực lượng hùng hậu tấn công cây trồng, gây tổn thất đáng kể cho mùa màng, ước tính làm mất trắng khoảng 20% sản lượng lương thực thực phẩm hằng năm. [5]

* CN, Trường Đại học Sư phạm TPHCM

** ThS, Trường Đại học Sư phạm TPHCM

Một trong số tác nhân gây hại cây trồng nguy hiểm trong sản xuất là nhóm nấm có nguồn gốc trong đất như: *Fusarium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Pythium*,... Nhóm nấm này có phổ kí chủ rộng, gây hại trên nhiều loại cây trồng khác nhau như: các cây thuộc họ đậu, bầu bí, ngô,... Đặc biệt, là chi *Fusarium* gây bệnh héo vàng làm cây chết nhanh, một số còn sản xuất độc tố gây nguy hiểm cho động vật và con người. Nấm *Fusarium* có thể tồn tại nhiều năm trong đất, trong tàn dư thực vật và lan truyền qua hạt giống, cây nhiễm bệnh hoặc lan truyền theo nước và gió. Thời tiết ẩm áp, nhiệt độ trung bình 27°C – 30°C, độ ẩm trong đất tương đối cao là điều kiện thích hợp cho sự phát triển của nấm gây bệnh [1]. Bệnh phát triển nhiều trên đồng ruộng từ tháng 3 đến tháng 11 và gây hại mạnh nhất vào tháng 9 đến tháng 11. [6]

Để hạn chế những thiệt hại do nấm bệnh gây ra, con người đã áp dụng rất nhiều biện pháp trong công tác bảo vệ cây trồng. Trong đó, có thể nói không một biện pháp bảo vệ mùa màng nào hữu hiệu hơn biện pháp hóa học về mặt hiệu quả và quy mô [5]. Tuy nhiên, biện pháp hóa học cũng nảy sinh hạn chế của nó như: hiện tượng nhờn thuốc ở các tác nhân gây hại, gia tăng ô nhiễm môi trường (MT), mất cân bằng sinh thái, chất hóa học tồn dư trong đất gây nguy hiểm cho sức khỏe con người. Để khắc phục những hạn chế của biện pháp hóa học trong công tác bảo vệ cây trồng khỏi nấm gây hại, các nhà khoa học đã không ngừng nghiên cứu và cho ra đời chế phẩm thuốc trừ nấm có nguồn gốc sinh học. [6]

Chế phẩm trừ nấm có nguồn gốc sinh học có nhiều ưu việt hơn so với thuốc hóa học, cụ thể là: không gây hại cho con người, vật nuôi, cây trồng; cho đến nay chưa phát hiện được hiện tượng nhờn thuốc và nhanh chóng phân hủy, không gây ô nhiễm MT [6]. Có rất nhiều đối tượng vi sinh vật (VSV) được quan tâm để sản xuất các chế phẩm sinh học, một trong số đó là xạ khuẩn vì khả năng đối kháng của chúng với VSV kiểm định. Trong những năm gần đây, nhiều nhà khoa học trong nước cũng như trên thế giới đặc biệt lưu ý đến việc tìm kiếm các hợp chất sinh trưởng thứ cấp từ xạ khuẩn rừng ngập mặn (RNM). Bởi theo các nhà khoa học, chúng là nguồn sinh các chất có hoạt tính sinh học dồi dào, trong đó có chất kháng nấm. Thực tế, họ đã phát hiện nhiều hợp chất kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus, kháng ung thư,... từ xạ khuẩn RNM với hoạt tính mạnh hơn rất nhiều so với xạ khuẩn từ đất liền.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Đề tài đã sử dụng các giống vi sinh vật như sau:

- Xạ khuẩn phân lập từ đất RNM huyện Cần Giò, Thành phố Hồ Chí Minh.
- Vi sinh vật kiểm định gồm: Nấm *Fusarium* sp. nhận từ bộ sưu tập giống của Viện Công nghệ Sinh học Trường Đại học Nông Lâm, Thành phố Hồ Chí Minh.

Đề tài đã sử dụng các MT: MT Gause I, MT Gause II, MT Emerson, MT PDA, MT ISP4.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Các mẫu đất thu được bằng phương pháp lấy mẫu được bảo quản ở tủ lạnh 4°C. Tiến hành phân lập xạ khuẩn theo phương pháp phân lập xạ khuẩn của Vinogradski [3] và bảo quản trong ống thạch nghiêng chứa 5 ml MT Gause I (MT đặc), sau 6 ngày thử hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. bằng phương pháp cấy chấm điểm của Crawford, 1993 [7] (Xạ khuẩn được nuôi 3 ngày trên 1 cạnh của đĩa MT PDA, cạnh còn lại cấy chấm điểm nấm *Fusarium* sp. từ đĩa MT PDA khác nuôi trong 3 ngày, đánh giá khả năng ức chế nấm dựa vào khoảng cách vô khuẩn giữa nấm và xạ khuẩn). Tuyển chọn chủng có hoạt tính mạnh nhất.

Chủng xạ khuẩn F46 được mô tả đặc điểm hình thái bằng phương pháp quan sát đại thể và quan sát vi thể (phương pháp xẻ rãnh thạch của Okamia Suzuki, 1968).

Chủng xạ khuẩn F46 được nuôi trong các bình tam giác 250 ml chứa 50 ml các MT khác nhau (MT Gause I, MT Gause II, MT ISP4, MT Emerson dạng lỏng), thay đổi các điều kiện nuôi cấy như nguồn carbon, nguồn nitrogen, pH, nồng độ NaCl, nhiệt độ, thời gian và thử hoạt tính kháng nấm theo phương pháp khoan lỗ thạch (Sử dụng khoan nút chai vô trùng, khoan lỗ trên đĩa MT PDA. Dùng que cấy vô trùng, cấy chấm điểm nấm *Fusarium* sp. được nuôi 3 ngày trên MT PDA (đặc) vào 2 phía đối diện của lỗ thạch, sau đó hút 0,1 ml dịch nuôi cấy xạ khuẩn ở ngày thứ 3 nhỏ vào lỗ thạch mới khoan. Để ở nhiệt độ phòng, sau 3 ngày tiến hành kiểm tra kết quả dựa vào khoảng cách vô khuẩn). [4]

3. Kết quả và biện luận

3.1. Phân lập và tuyển chọn các chủng xạ khuẩn từ rừng ngập mặn Cần Giờ có khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm *Fusarium* sp.

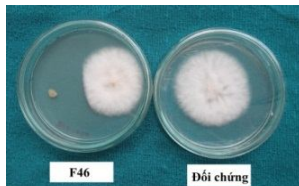
Từ 5 mẫu đất lấy tại RNM Cần Giờ, chúng tôi đã phân lập được 55 kiểu khuẩn lạc xạ khuẩn (tạm gọi là chủng) khác nhau được kí hiệu từ F1 đến F55.

Chúng tôi tiến hành phân nhóm các chủng xạ khuẩn dựa vào các đặc điểm sau: màu sắc khuẩn lạc, màu sắc mép khuẩn lạc, hình dạng mép khuẩn lạc, sắc tố tan. 55 chủng xạ khuẩn được phân thành 3 nhóm như sau:

- + Nhóm 1: Trắng, gồm 19 chủng (34,5%).
- + Nhóm 2: Xám – nâu – đen, gồm 25 chủng (45,5%).
- + Nhóm 3: Vàng nhạt – vàng – vàng nâu, gồm 11 chủng (20%).

Tiến hành tuyển chọn sơ bộ các chủng xạ khuẩn có khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm *Fusarium* sp. theo phương pháp cấy chấm điểm trên MT thạch của Crawford (1993). Kết quả cho thấy 11 trong số 55 chủng xạ khuẩn phân lập được có

khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm *Fusarium* sp. (20%). Trong đó: 4 chủng có hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. mạnh (36,36%); 6 chủng có hoạt tính kháng nấm trung bình (54,54%) và 1 chủng có khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm yếu (9,1%). Chủng xạ khuẩn F46 có khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm *Fusarium* sp. mạnh, có tiềm năng trong việc bảo vệ cây trồng trước sự gây hại của nấm *Fusarium* sp. do đó chúng tôi chọn chủng xạ khuẩn F46 để tiếp tục các nghiên cứu.



Hình 3.1. Khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm *Fusarium* sp. của chủng xạ khuẩn F46

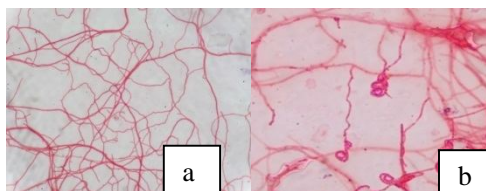
3.2. Đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn F46

Trên MT Gause I sau 7 ngày cấy chấm điểm, xạ khuẩn tạo thành những khuẩn lạc tròn có đường kính 9 mm. Mặt trên khuẩn lạc có cấu trúc tổ ong màu nâu, khuẩn ti khí sinh phát triển theo hình phóng xạ và tạo thành các vòng tròn đồng tâm bao bên ngoài. Mép khuẩn lạc màu trắng, răng cưa. Mặt dưới khuẩn lạc phẳng, khuẩn ti cơ chất có màu trắng, chính giữa có màu vàng nhạt.



Hình 3.2. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của chủng xạ khuẩn F46

Sau 3 ngày nuôi cấy trong đĩa petri bằng phương pháp xẻ rãnh thạch, quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại x1000, khuẩn ti khí sinh không có vách ngăn, cuống sinh bào tử dạng xoắn lò xo. Bào tử được hình thành trên suốt chiều dài của cuống sinh bào tử tạo thành chuỗi bào tử.



Hình 3.3. Hình thái hệ sợi khuẩn ti (a) và cuống sinh bào tử (b) của chủng xạ khuẩn F46 (x1000)

3.3. *Khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào*

Theo Ismet Ara và cộng sự (2012) [9], Humilton – Miller J.M (1973) [8] khả năng đối kháng của xạ khuẩn với nấm dựa trên khả năng sinh tổng hợp hai nhóm hợp chất sinh trưởng thứ cấp. Một là, kháng sinh nhóm polyen có tác dụng phá vỡ tính thấm thấu của màng tế bào chất, dẫn đến phá vỡ chức năng thẩm chọn lọc của màng tế bào nấm. Hai là, enzyme chitinase, glucanase phá vỡ thành tế bào của nấm. Ngoài ra, enzyme ngoại bào còn giúp xạ khuẩn có khả năng tận dụng nguồn dinh dưỡng ngoài MT cho sinh trưởng và phát triển [2]. Nhằm mục đích xác định cơ chế kháng nấm, cũng như khả năng sinh các enzyme ngoại bào của chủng xạ khuẩn F46, chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng sinh enzyme ngoại bào amylase, protease, cellulase và chitinase của chủng xạ khuẩn F46.

Bảng 3.1. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của chủng xạ khuẩn F46

Enzyme	Đường kính vòng phân giải (D – d, cm)
Amylase	0,73 ± 0,12
Protease	0,27 ± 0,12
Cellulase	0,00 ± 0,00
Chitinase	0,47 ± 0,25

Kết quả trên cho thấy chủng xạ khuẩn F46 có khả năng sinh các enzyme ngoại bào amylase, chitinase và protease. Kết quả này phù hợp với quan điểm của Nguyễn Lâm Dũng (2000) [2] và Biên Văn Minh (2006) [4] cho rằng xạ khuẩn có khả năng sinh nhiều loại enzyme ngoại bào. Khả năng sinh nhiều loại enzyme ngoại bào giúp chủng xạ khuẩn F46 tận dụng được nhiều nguồn dinh dưỡng trong MT để sinh trưởng và phát triển. Tuy nhiên khả năng sinh các enzyme ngoại bào trên đều ở mức yếu. Chủng xạ khuẩn F46 có khả năng sinh tổng hợp enzyme chitinase, có thể nói khả năng sinh enzyme chitinase đã góp phần tăng khả năng kháng nấm của chủng xạ khuẩn F46.

3.4. *Khảo sát các điều kiện lên men ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm Fusarium sp. của chủng xạ khuẩn F46*

3.4.1. *Lựa chọn môi trường lên men thích hợp*

Môi trường đóng vai trò hết sức quan trọng đối với sự sinh trưởng và phát triển của VSV. Chúng tôi tiến hành lên men trên 4 MT: Gause I, Gause II, Emerson và ISP4. Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.2.

Bảng 3.2. Hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. của chủng xạ khuẩn F46 trên các môi trường lên men khác nhau

STT	Môi trường	Hoạt tính kháng nấm <i>Fusarium</i> sp. (D – d, cm)
1	Gause I	2,0 ^a ± 0,20
2	Gause II	2,1 ^a ± 0,31
3	Emerson	2,6 ^b ± 0,10
4	ISP4	1,8 ^c ± 0,25

Ghi chú: a, b, c chỉ sự khác biệt ý nghĩa về thống kê.

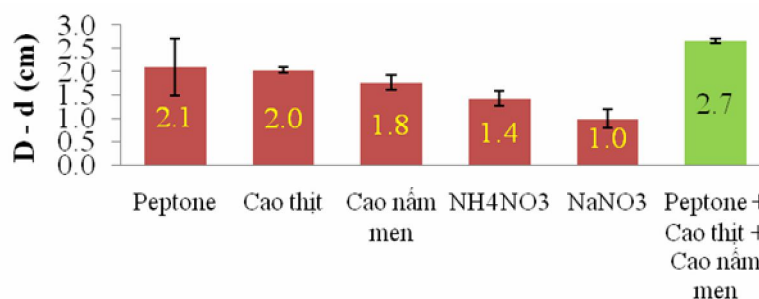
Kết quả từ Bảng 3.2 cho thấy chủng xạ khuẩn F46 sinh trưởng và sinh tổng hợp chất kháng nấm *Fusarium* sp. trên cả 4 MT. Tuy nhiên, chủng xạ khuẩn thể hiện khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm *Fusarium* sp. tốt nhất trên môi trường Emerson là MT giàu đạm hữu cơ. MT Emerson có nguồn đạm đa dạng, điều này cho thấy chủng xạ khuẩn F46 có khả năng tận dụng được nhiều nguồn dinh dưỡng khác nhau và chủng xạ khuẩn này cũng tham gia tích cực vào quá trình chuyển hóa vật chất của RNM. Bên cạnh đó, thành phần của MT Emerson tương đối đơn giản so với các MT còn lại là một ưu thế khi tiến hành các thí nghiệm về sau.



Hình 3.4. Hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. của chủng xạ khuẩn F46 trên MT lên men khác nhau

3.4.2. Khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitrogen lên khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm *Fusarium* sp. của chủng xạ khuẩn F46

Chúng tôi tiến hành nuôi xạ khuẩn F46 trong bình tam giác 250 ml chứa 50 ml MT Emerson dịch thể và thay N tổng số (peptone, cao nấm men, cao thịt) lần lượt bằng peptone, cao thịt, cao nấm men, NH_4NO_3 , NaNO_3 với lượng tương đương. Kết quả được thể hiện ở Hình 3.5.



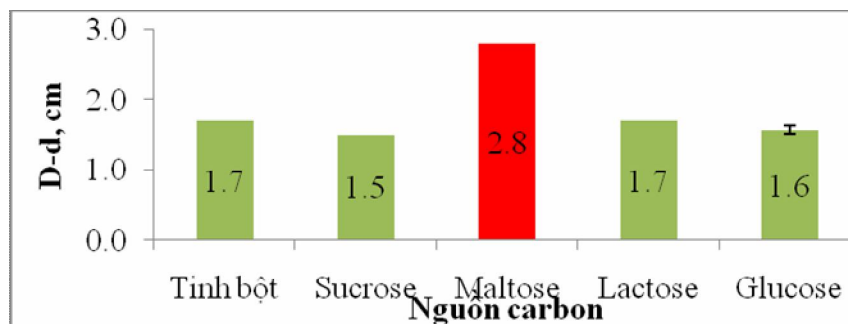
Nguồn nitrogen

Hình 3.5. Biểu đồ ảnh hưởng của nguồn nitrogen lên khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm *Fusarium sp.* của chủng xạ khuẩn F46

Qua biểu đồ cho thấy chủng xạ khuẩn F46 thể hiện khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm *Fusarium sp.* ở tất cả các nguồn N khác nhau. Với nguồn N hữu cơ chủng xạ khuẩn F46 thể hiện khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm tốt hơn so với khi sử dụng nguồn N vô cơ. Từ kết quả trên chúng tôi tiếp tục khảo sát chủng xạ khuẩn F46 trên MT Emerson với nguồn N gồm cao nấm men, cao thịt, peptone.

3.4.3. Khảo sát ảnh hưởng của nguồn carbon lên khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm *Fusarium sp.* của chủng xạ khuẩn F46

Chúng tôi tiến hành nuôi xạ khuẩn F46 trong bình tam giác 250 ml chứa 50 ml MT Emerson dịch thể và thay glucose lần lượt bằng maltose, sucrose, tinh bột, lactose với lượng tương đương. Kết quả được thể hiện qua Hình 3.6.



Hình 3.6. Biểu đồ ảnh hưởng của nguồn carbon lên khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm *Fusarium sp.* của chủng xạ khuẩn F46

Qua biểu đồ chúng tôi nhận thấy chủng xạ khuẩn F46 thể hiện khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm trên tất cả các nguồn C khác nhau. Điều này cho thấy chúng có khả năng sử dụng nhiều nguồn thức ăn khác nhau do đó có khả năng phân bố rộng rãi trong tự nhiên. Tuy nhiên, chủng xạ khuẩn F46 thể hiện khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm *Fusarium sp.* tốt nhất khi sử dụng nguồn C là maltose. Chúng tôi tiếp tục

khảo sát các điều kiện tiếp theo trên MT Emerson thay thế glucose bằng maltose với lượng tương đương (sau đây gọi là MT E-1).

3.4.4. *Khảo sát ảnh hưởng của pH ban đầu trong môi trường lên men đến khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm Fusarium sp. của chủng xạ khuẩn F46*

Chúng tôi tiến hành lên men trong bình tam giác 250ml chứa 50ml dịch MT E-1, điều chỉnh pH theo các giá trị lần lượt là 4, 5, 6, 7, 8 (Giá trị pH 6 là giá trị ban đầu của MT). Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.3.

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của pH ban đầu trong MT lên men đến khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm Fusarium sp. của chủng xạ khuẩn F46

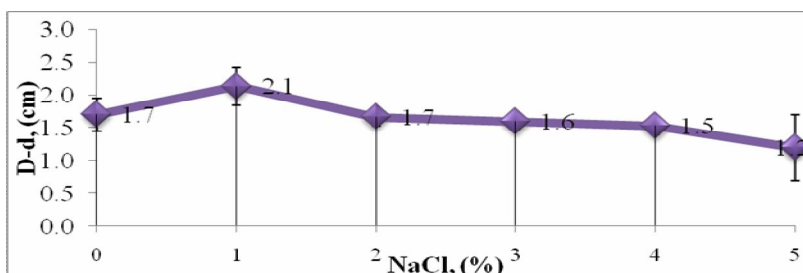
STT	pH	Hoạt tính kháng nấm <i>Fusarium sp.</i> (D – d, cm)
1	4	1,7 ^a ± 0,00
2	5	2,2 ^b ± 0,06
3	6	2,3 ^b ± 0,06
4	7	1,9 ^c ± 0,06
5	8	1,9 ^c ± 0,12

Ghi chú: a, b, c chỉ sự khác biệt ý nghĩa về thống kê

Chủng xạ khuẩn F46 thể hiện hoạt tính kháng nấm *Fusarium sp.* ở cả pH acid, trung tính và kiềm (pH 4 – 8). Chủng xạ khuẩn này thể hiện khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm mạnh nhất ở pH 5 – 6.

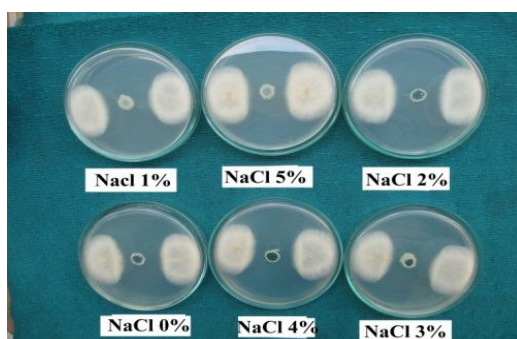
3.4.5. *Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ muối lên khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm Fusarium sp. của chủng xạ khuẩn F46*

Chủng xạ khuẩn F46 được phân lập từ đất RNM do đó độ mặn của MT ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm. Để xác định nồng độ muối thích hợp cho xạ khuẩn F46 thể hiện khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm *Fusarium sp.* mạnh nhất, chúng tôi tiến hành nuôi xạ khuẩn trong bình tam giác 250ml chứa 50ml MT E-1 và điều chỉnh nồng độ NaCl theo các giá trị lần lượt là 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% (0% là nồng độ NaCl của MT ban đầu). Kết quả được thể hiện ở Hình 3.7.



Hình 3.7. Đồ thị ảnh hưởng của nồng độ NaCl lên khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm Fusarium sp. của chủng xạ khuẩn F46

Độ mặn trung bình của RNM Cần Giờ là 1,8 – 2,0%. Chủng xạ khuẩn F46 có khả năng sinh chất kháng nấm trong giới hạn độ mặn rộng 0 – 5% và có thể sinh tổng hợp chất kháng nấm ngay cả ở độ mặn cao hơn độ mặn trung bình của RNM Cần Giờ. Tuy nhiên chủng xạ khuẩn F46 thể hiện khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm *Fusarium* sp. tốt nhất ở nồng độ NaCl 1%.



Hình 3.8. Khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm *Fusarium* sp. của chủng xạ khuẩn F46 ở nồng độ muối khác nhau

Từ kết quả trên chúng tôi tiếp tục khảo sát chủng xạ khuẩn F46 trên MT E-1 bổ sung 1% NaCl (sau đây gọi là MT E-2).

3.4.6. Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm *Fusarium* sp. của chủng xạ khuẩn F46

Nhiệt độ có ảnh hưởng sâu sắc đến quá trình trao đổi chất của VSV, chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm *Fusarium* sp. của chủng xạ khuẩn F46 ở các mức nhiệt độ 25°C, 30°C và 35°C. Kết quả được thể hiện qua Bảng 3.4.

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm *Fusarium* sp. của chủng xạ khuẩn F46

STT	Nhiệt độ	Hoạt tính kháng nấm <i>Fusarium</i> sp. (D – d, cm)
1	25°C	2,6 ^a ± 0,06
2	30°C	2,1 ^b ± 0,17
3	35°C	0,0 ^c ± 0,00

Ghi chú: a, b, c chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê.

Chủng xạ khuẩn F46 thể hiện khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm ở khoảng nhiệt độ từ 25°C đến 30°C và tối ưu ở nhiệt độ 25°C, là nhiệt độ tương ứng với nhiệt độ

trung bình của RNM Cần Giờ (25,8°C) và chủng xạ khuẩn F46 mất hoạt tính ở nhiệt độ 35°C.

3.5. Xác định động thái quá trình lên men

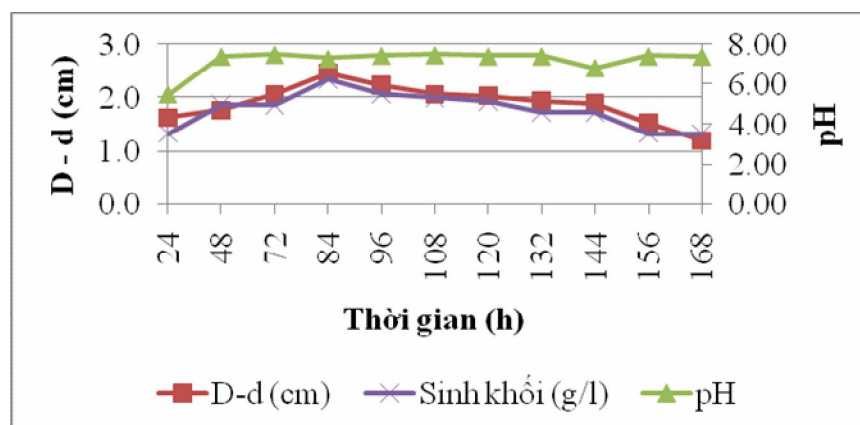
Để có được một cái nhìn khái quát về các giai đoạn sinh trưởng, phát triển và khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm *Fusarium* sp. của chủng xạ khuẩn F46, chúng tôi tiến hành nghiên cứu động thái quá trình lên men của chủng này. Chúng tôi tiến hành nuôi chủng xạ khuẩn F46 trong bình tam giác 250ml chứa 50ml MT E-2. Sau 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 84 giờ, 96 giờ, 108 giờ, 120 giờ, 132 giờ, 144 giờ, 156 giờ, 168 giờ xác định các chỉ tiêu sau: Khả năng sinh trưởng bằng phương pháp xác định trọng lượng khô tuyệt đối, khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm *Fusarium* sp. bằng phương pháp khoan lỗ thạch, sự thay đổi pH trong bình lên men.

Động thái quá trình lên men của chủng xạ khuẩn F46 được thể hiện ở Bảng 3.5 và Hình 3.9.

Bảng 3.5. Động thái quá trình lên men của chủng xạ khuẩn F46

STT	Thời gian (giờ)	Hoạt tính kháng nấm <i>Fusarium</i> sp. (D-d, cm)	Sinh khối (g/l)	pH
1	24	1,6 ^{ab} ± 0,18	1,33 ^a ± 0,18	5,48 ^d ± 0,23
2	48	1,8 ^{bc} ± 0,22	1,87 ^{bc} ± 0,02	7,40 ^{ab} ± 0,12
3	72	2,1^{de} ± 0,36	2,13 ^{cd} ± 0,02	7,49 ^b ± 0,12
4	84	2,5^g ± 0,21	2,33^d ± 0,05	7,29 ^a ± 0,12
5	96	2,2^{ef} ± 0,22	2,07 ^{cd} ± 0,03	7,44 ^{ab} ± 0,12
6	108	2,1^{ef} ± 0,22	2,00 ^{bc} ± 0,22	7,47 ^b ± 0,20
7	120	2,0^{ef} ± 0,32	1,93 ^{bc} ± 0,00	7,41 ^{ab} ± 0,23
8	132	1,9 ^{cd} ± 0,23	1,73 ^b ± 0,11	7,42 ^{ab} ± 0,12
9	144	1,9 ^a ± 0,21	1,73 ^b ± 0,22	6,81 ^c ± 0,12
10	156	1,5 ^a ± 0,17	1,33 ^a ± 0,01	7,42 ^{ab} ± 0,23
11	168	1,2 ^h ± 0,23	1,33 ^a ± 0,02	7,40 ^{ab} ± 0,23

Ghi chú: a, b, c, d, e, f, g, h chỉ sự khác biệt có ý nghĩa về thống kê.



Hình 3.9. Đồ thị động thái quá trình lên men của chủng xạ khuẩn F46

Chúng tôi nhận thấy tốc độ sinh trưởng của chủng xạ khuẩn F46 tăng dần sau 24 giờ nuôi cấy và sinh khối đạt cực đại sau 84 giờ, sau đó sinh khối giảm dần do các nguồn dinh dưỡng trong MT cạn kiệt. Chủng xạ khuẩn thể hiện khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm *Fusarium* sp. sau 24 giờ và tăng ở các mức thời gian sau đó. Trong khoảng thời gian từ 72 giờ đến 120 giờ chủng xạ khuẩn thể hiện hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. mạnh và mạnh nhất sau 84 giờ. Sau 132 giờ hoạt tính kháng nấm giảm xuống mức trung bình và giảm nhanh sau 156 giờ. Sinh khối và khả năng kháng nấm *Fusarium* sp. đạt giá trị cực đại ở cùng một thời gian thuận lợi cho quá trình thu sinh khối để trộn vào đất khi khảo sát khả năng đối kháng nấm *Fusarium* sp. của chủng xạ khuẩn F46 trên cây trồng.

pH của MT bắt đầu tăng sau 24 giờ nuôi cấy và gần như cân bằng ở khoảng thời gian từ 48 giờ đến 132 giờ. pH giảm xuống khi ở thời gian 144 giờ và tăng trở lại sau đó.

4. Kết luận và kiến nghị

4.1. Kết luận

Qua quá trình tiến hành đề tài, chúng tôi đã thu được những kết quả như sau:

- Phân lập được 55 chủng xạ khuẩn khác nhau và phân thành 3 nhóm:
 - + Nhóm 1: Trắng, chiếm 19 chủng (34,5%).
 - + Nhóm 2: Xám – nâu – đen, chiếm ưu thế với 25 chủng (45,5%).
 - + Nhóm 3: Vàng nhạt – vàng – vàng nâu, chiếm 11 chủng (20%).

11 trong số 55 chủng xạ khuẩn phân lập có hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. chiếm 20%. Trong đó, 4 chủng có hoạt tính kháng nấm mạnh, 6 chủng có hoạt tính kháng nấm trung bình và 1 chủng có hoạt tính kháng nấm yếu.

- Mô tả được đặc điểm hình thái của chủng xạ khuẩn F46

+ Hình thái đại thể: Khuẩn lạc gồm 3 lớp, lớp ngoài là những khuẩn ti khí sinh phát triển theo hình phóng xạ và tạo thành các vòng tròn đồng tâm màu trắng, lớp trong có cấu trúc xốp hơn, lớp giữa có cấu trúc tổ ong màu nâu.

+ Hình thái vi thể: khuẩn ti khí sinh không có vách ngăn, cuống sinh bào tử dạng xoắn lò xo. Bào tử được hình thành trên suốt chiều dài của cuống sinh bào tử tạo thành chuỗi bào tử.

- Chủng xạ khuẩn F46 kháng nấm *Fusarium* sp. tốt (D-d = 2,2cm > 2cm) trên MT Emerson.

- Chủng xạ khuẩn F46 thể hiện khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm tốt nhất với nguồn N hữu cơ, đa dạng (4g cao thịt + 4g peptone + 1g cao nấm men/1 lít nước cất), nguồn C là maltose, pH = 5 – 6, nồng độ NaCl là 1%, nhiệt độ 25°C).

- Chủng xạ khuẩn F46 sinh trưởng và thể hiện khả năng sinh tổng hợp chất kháng nấm *Fusarium* sp. cực đại sau 84 giờ.

4.2. Kiến nghị

Định danh đến loài chủng xạ khuẩn F46.

Xác định tính chất lí, hóa của chất kháng nấm *Fusarium* sp. sinh tổng hợp từ chủng xạ khuẩn F46.

Tiến hành thí nghiệm xác định khả năng kháng nấm *Fusarium* sp. từ dịch nuôi cấy xạ khuẩn F46 trong điều kiện in vivo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lester W. Burgess, Timothy E. Knight, Phan Thúy Hiền (2009), *Cẩm nang đoán bệnh cây trồng ở Việt Nam*, Trung tâm Nghiên cứu Nông nghiệp Quốc tế Australia, tr.126-150.
2. Nguyễn Lâm Dũng (2000), *Vi sinh vật học*, Trung tâm Công nghệ Sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội, tr.96-147.
3. Bùi Thị Việt Hà (2006), *Nghiên cứu xạ khuẩn sinh chất kháng sinh chống nấm gây bệnh thực vật ở Việt Nam*, Luận án Tiến sĩ Sinh học, Trường Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, tr.3-20.
4. Biền Văn Minh (Chủ biên), Kiều Hữu Ảnh, Phạm Ngọc Lan, Phạm Hồng Sơn, Phạm Văn Ty, Nguyễn Thị Thu Thủy (2006), *Vi sinh vật học*, Nxb Đại học Huế, 321 tr.
5. Trần Thị Thanh (2007), *Công nghệ vi sinh*, Nxb Giáo dục, tr.120-137.
6. Phạm Thị Thùy (2010), *Giáo trình công nghệ sinh học trong bảo vệ thực vật*, Nxb Giáo dục Việt Nam, tr.24-25.

7. Crawford DL, Lynch JM, Whipps JM, Ousley MA (1993), "Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen", *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), pp. 899-905.
8. Humilton – Miller J. M. T. (1973), "Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics", *Bacteriological reviews*, 37(2), pp. 166-196.
9. Ismet Ara, Bukhari N. A, Perveen K, Bakir M. A (2012), "Antifungal activiti of some actinomycetes isolated from Riyadh soil, Saudi Arabia: An evaluation for their abiliti to control *Alternaria* caused tomato blight in green house pot trial", *African Journal of Agricultural research*, Vol. 7(3), pp. 2042-2050.

(Ngày Tòa soạn nhận được bài: 21-6-2013; ngày phân biệן đánh giá: 07-8-2013;
ngày chấp nhận đăng: 30-8-2013)