CÔNG NGHỆ SINH HỌC NÔNG NGHIỆP

BIOLOGICAL CONTROL AGAINST *Colletotrichum siamense* INFECTING MANGO BY *Bacillus* sp. TH5

Tan-Viet Pham*, Dong-Trieu Pham, Ngoc-An Nguyen, Hanh Thi-Dieu Nguyen

Institute of Biotechnology and Food technology, Industrial University of Ho Chi Minh City

SUMMARY

In the agricultural domain, the management of anthracnose, caused predominantly by *Colletotrichum siamense*, poses a significant challenge to mango (*Mangifera indica*) production, globally recognized as a key tropical fruit commodity. Amidst this agricultural problem, *Bacillus* antagonists emerge as promising biocontrol agents, offering sustainable and environmentally friendly solutions to combat anthracnose incidence. In this study, antifungal characteristics of *Bacillus* sp. TH5 against *C. siamense* were investigated. The result revealed that the *Bacillus* sp. TH5 strain exhibited notable characteristics, including the presence of extracellular enzymes like cellulase, protease, and chitinase which contributed to its capability to degrade fungal mycelia. Moreover, even under high temperature conditions 60-90℃, the culture retained significant residual antifungal activity of about 50% after 15 minutes. Its activity also remained robust, with at least 71% efficacy after 2 hours of incubation across a broad pH range of 3.0 to 10.0. In simulated mango conditions, the strain TH5 demonstrated remarkable antagonistic efficacy, resulting in a reduction of anthracnose severity by over 95% and 69% after 4 and 6 days, respectively. These promising results underscore the potential of *Bacillus* sp. TH5 as an effective biocontrol agent against anthracnose in mango and other fruits, offering significant prospects for sustainable agricultural practices in the future.

Keywords: Anthracnose, antifungal, *Bacillus, Colletotrichum siamense*, mango.

INTRODUCTION

Anthracnose, a prevalent disease among mango trees, detrimentally affects the plant across its entire developmental spectrum, from the emergence of leaves to fruit maturation. Fungi from the *Colletotrichum* genus, notably strains of *C. gloeosporioides*, *C. capsici*, *C. falcatum*, *C. truncatum*, *C. sansevieriae*, *C. acutatum*, and *C. coccodes*, are implicated as primary anthracnose culprits affecting mango crops in India (Ajay, 2014). *C. siamense*, among five fungi identified within the *C. gloeosporioides* complex, has a broad host range, causing anthracnose in various crops worldwide, such as citrus, tea, chili, rubber, onions, and strawberries (EFSA, ECDC, 2018). Moreover, *C. siamense* and *C. asianum* have been identified as novel species causing mango anthracnose in Thailand (Rattanakreetakul *et al.*, 2023).

Conventionally, chemical fungicides are employed to combat Colletotrichum-induced anthracnose. However, their unmanageable use poses challenges, including the emergence of resistant pathogen strains and adverse health and environmental effects. Consequently, alternative biological control methods have garnered attention. Antagonistic microorganisms, such as *Bacillus mycoides* A1 and *Bacillus tequilensis* A3, *Bacillus subtilis* GYUN-2311, *Bacillus altitudinis* GS-16, have demonstrated efficacy against Colletotrichum-induced anthracnose in various crops including avocado, apple and hot pepper, and tea tree, respectively (Guerrero-Barajas *et al.*, 2020; Heo *et al.*, 2024; Wu *et al.*, 2024).

Given Vietnam's expanding mango industry and its aspirations for increased exports, which reached over 600,000 tons of mangoes valued at 310 million USD to 53 countries and territories (VNS, 2022), the search for novel biocontrol agents against mango anthracnose is of utmost importance. Therefore, the aim of this study is to characterize antagonistic activity of the strain *Bacillus* sp. TH5, isolated from soil, against *C. siamense*-induced anthracnose in mango fruits, thereby facilitating the sustainable growth of Vietnam's mango sector.

MATERIAL AND METHODS

Microbial strains and culture conditions

Four bacterial strains, TH5, TH6, TH7, TH8, isolated from mango cultivation areas in rural regions, and the fungal strain *Colletotrichum siamense* causing anthracnose disease, were preserved in the Collection of the Microbiotechnology Laboratory, Industrial University of Ho Chi Minh city, at -70℃. The bacterial strains were cultured overnight in Luria-Bertani broth (LB broth) at 37℃ with agitation at 150 rpm, while the fungal strain was cultured on Potato Glucose Agar (PGA) medium at room temperature for 5 days prior to subsequent studies.

Screening of bacteria with antifungal activity

To evaluate the antagonistic activity of bacterial strains against *C. siamense*, a co-culture method was conducted. Initially, a 5-day *C. siamense* PGA plate was prepared and cut into 5.0 mm diameter agar pieces. The fungal mycelial piece was placed in the center of a new PGA Petri dish and incubated at 30±2℃ for 2 days. Subsequently, 10 µL of bacterial inoculate were spotted 1.0 cm from the plate's edge, and antifungal effect was monitored daily as the plates were incubated at room temperature. Antifungal activity was determined by measuring the inhibition zone around the bacterial inoculated spot.

Identification of fungal pathogen and *Bacillus* antagonists

The bacterial strain which displayed highest antifungal activity were identified based on physiological, macroscopic, microscopic characteristics, and further confirmed by 16S rRNA gene amplification and sequencing using the bacterial universal primer pair: 27mF (5'-AGAGTTTGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492mR (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3').

Detection of putative antifungal hydrolytic enzyme production

The biosynthesis of putative enzymes involved in the hydrolysis of the mycelium cells such as chitinase, protease, and cellulase was determined by culturing bacterial strains on LB agar supplemented with the respective substrates such as chitin, casein, and carboxymethyl cellulose (10 g/L). Enzymatic activity was detected via the substrate degradation zone after 3 days of incubation at 37℃. Lugol reagent was used to detect chitinase and cellulase activity while protease activity was observed with trichloroacetic acid 10%.

Assay for hyphal growth inhibition

To examine the influence of bacterial strain TH5 on the fungal mycelia, a 5-day static co-incubation was conducted. The bacteria were initially cultured in LB medium with agitation at 150 rpm at 37℃ until the OD_{600nm} reached 0.6. The bacterial culture was then centrifuged for 15 minutes at 4000 rpm, and the supernatant was filtered using a 0.45 µm membrane filter. Concurrently, the fungal mycelium was grown in potato glucose broth for 5 days. The fungal mycelium was harvested and exposed to the filtered bacterial culture that cultured in LB broth at 37℃ for 24 hours. Sterilized LB medium was used as a control. The fungal inhibitory effects were analyzed microscopically by comparing the treated samples with the control.

Impact of temperature and pH on antagonistic activity of bacterial culture

Bacterial strain TH5 was cultured in LB broth at 37℃ for 24 hours and collected cell-free bacterial supernatant by centrifuge at 13000 rpm, 4℃ for 10 min. The thermal stability of TH5 culture supernatant were assessed by incubation at high temperature of 60-90℃ for 5, 10 and15 minutes. Similarly, for the pH stability assessment, the cultures were adjusted to pH values ranging from 3.0 to 10.0 and incubated at room temperature for 2 hours. The residual antifungal activity following these treatments was measured using an agar-well diffusion assay and expressed as a percentage compared to the untreated culture.

Disease suppression assay

Mango fruit models were employed to evaluate the biological control effect of bacterial strain TH5. The uninjured and healthy mangoes were washed with sterile distilled water three times, treated with a 100 ppm chlorine solution, then rinsed again with sterile distilled water, and disinfected with alcohol 70% as the final step. *C. siamense* mycelia were prepared by growing them in PGB medium at room temperature for 5 days, while the bacterial culture in LB medium was prepared after 16 hours of growth at 37℃. The bacterial culture and mycelium suspension were mixed in a 1:1 ratio, with 10 µL of this mixture being injected into the mango fruit (experimental sample). The same treatment was done for the positive control sample with only the mycelium suspension and the negative control sample with only sterilized LB medium. The mangoes were incubated in a sterile humidified chamber for 6 days. The development of disease symptoms was recorded and quantified based on the lesion surface area using QuPath v0.5.1 software.

Data analysis

The results of the experiments are an average of 3 replicates. The data were calculated and graphed on Microsoft Excel 2013 and ANOVA statistical analyzed by Statgraphics Centurion 18 software.

RESULTS AND DISCUSSION

Antifungal activity of *Bacillus* strains against *Colletotrichum siamense*

The ability of four different bacterial strains to inhibit *C. siamense*, which causes anthracnose in mango, after 3 and 5 days of co-culture is shown in Figure 1. After only 3 days of incubation, the TH5 strain demonstrated a clear inhibitory effect on the fungal hyphae with a distinct inhibition zone. In contrast, the TH8 strain showed less clear inhibition, and no inhibition were observed in the case of TH6 and TH7 strains (Figure 1A).

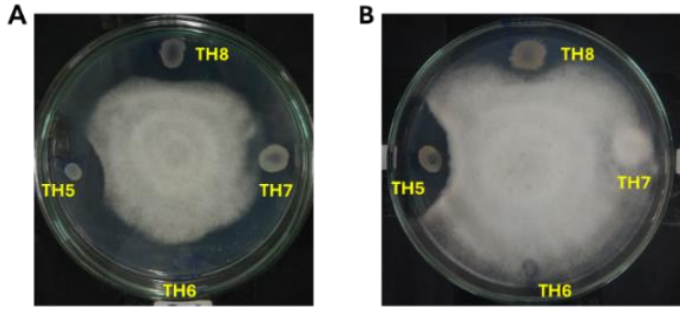


Figure 1. Antagonistic ability of *Bacillus* spp. after 3 days (A) and 5 days (B) of co-culture

The inhibitory effects of the bacterial strains were more pronounced after 5 days of incubation (Figure 1B). While the TH6 and TH7 strains were covered by the fungal mycelia, the TH5 and TH8 strains exhibited a complete inhibition zone around the bacterial inoculated spots, measuring 6.67 ± 0.72 mm and 6.0 ± 0.47 mm, respectively. Therefore, the TH5 bacterial strain with strongest antagonistic activity was selected for further studies, including in trials to inhibit this fungal strain in post-harvest mango preservation.

Identification of the bacterial strain TH5

Regarding macroscopic morphology, when cultured in LB plate at pH 7.0 and 37℃, after 48 hours, the TH5 strain formed colonies measuring 2-3 mm in diameter, with an opaque white color, raised surface, irregular edges, and a characteristic wrinkled membrane as shown in Figure 2Aa. Gram staining and endospore staining results, depicted in Figure 2Ab and Ac, indicate that the TH5 strain is a Gram-positive bacterium capable of producing endospores, which tend to be positioned asymmetrically. The catalase production test revealed that upon dissolving the colony in a drop of 3% H_2O_2, bubbles were produced suggesting that this is a catalase producing strain (data not shown). Additionally, the 16S rRNA gene of this strain was sequenced. BLAST comparison of this sequence (1446 bp) with the GenBank database showed a 99.93% similarity to *Bacillus velezensis* Bac57 (CP033054.1). A phylogenetic tree with six taxa was constructed using Mega5 software with the UPGMA method and 1000 bootstrap replicates. The results, presented in Figure 2B, show that the TH5 strain clusters with *Bacillus velezensis* Bac57 with a bootstrap value of 90%, confirming that the TH5 strain is closely related to *Bacillus velezensis* and has been designated as *Bacillus* sp. TH5.

Bacillus velezensis has been recognized as a potential research strain due to its ability to synthesize various novel lipopeptides with surfactant properties and high antimicrobial activity (Ruiz-Garcia *et al.*, 2005). In addition, the B. velezensis G341 strain isolated by Lim et al. (2017) from 4-year-old ginseng was proved to synthesize both volatile and soluble compounds, inhibiting *Botrytis cinerea*, the cause of gray mold in tomatoes, and Rhizoctonia solani, the cause of sheath blight in rice (Lim *et al.*, 2017).

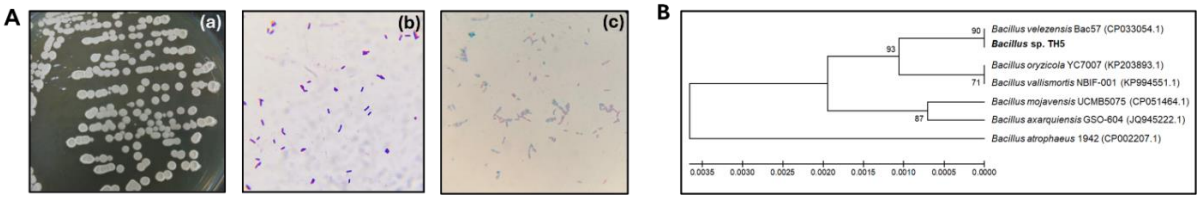


Figure 2. Identification of *Bacillus* sp. TH5. (A-a) Colony morphology, (A-b) Gram staining, (A-c) Endospore staining and (B) Phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequence region

***Bacillus* sp. TH5 production of enzymes related to cell wall degradation**

In order to further explore the factors affecting the antifungal activity of *Bacillus* sp. TH5, the biosynthesis of extracellular chitinase, protease and cellulase was investigated on culture medium corresponding substrates. The presence of hydrolytic enzymes after 3 days of incubation is shown in Figure 3. *Bacillus* sp. TH5 produced strong protease, cellulase and chitinase activity with zone of substrate hydrolysis of 3.6 ± 0.2 cm, 1.8 ± 0.2 cm and 3.4 ± 0.1 cm respectively. Compared to other studies, the extracellular protease from *Bacillus* sp. TH5 exhibited higher activity than that from *Paenibacillus polymyxa* APEC128, which possesses antifungal activity against *C. gloeosporioides* and *C. acutatum* (Kim *et al.*, 2016). Biosynthesis of hydrolytic enzyme chitinase and protease of *Bacillus* sp. TH5 are therefore consistent with the observed growth inhibition of *C. siamense.*

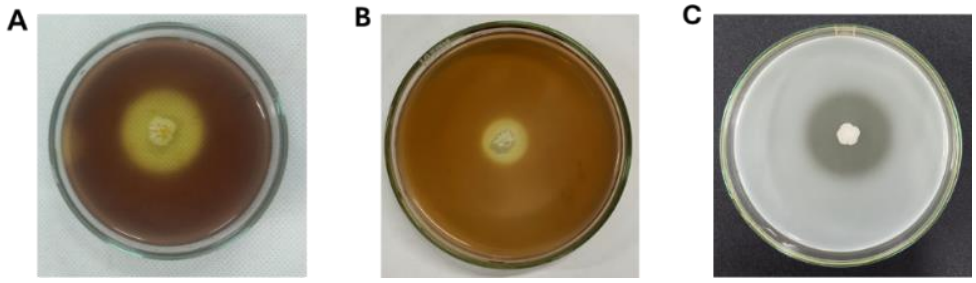


Figure 3. Biosynthesis of (A) chitinase, (B) cellulase and (C) protease of *Bacillus* sp. TH5

Effect of *Bacillus* sp. TH5 culture on the mycelia of *C. siamense*

The results showed that the mycelia in the control test were uniform and healthy, with intact cell walls and normal hyphal tips (Figure 4A). In contrast, mycelial samples incubated with bacterial culture exhibited abnormal structures, including heterogeneous thickness, delicate and thin mycelium, and several signs of shrinkage, swelling, and even disruption (Figure 4B-D). These effects are likely attributed to the hydrolytic action of extracellular protease and particularly chitinase produced by *Bacillus* sp. TH5. Similar findings regarding *Colletotrichum* mycelial damage have been reported in previous studies (Ashwini, Srividya, 2014; Nawaz *et al.*, 2018).

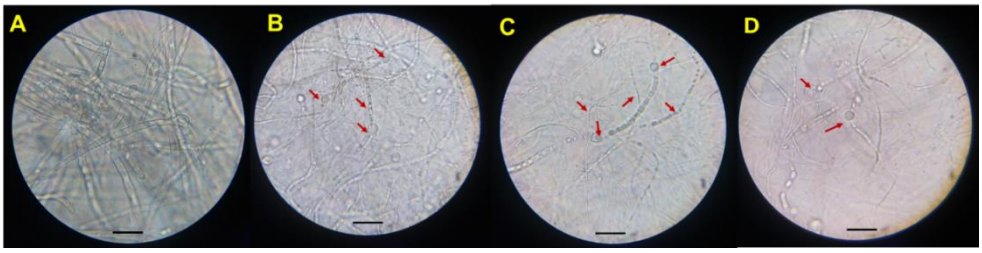


Figure 4. Antifungal effect of *Bacillus* sp. TH5 culture on fungal mycelia. (A) Healthy fungal mycelium in PGB; (B, C, D) Mixture of fungal mycelia and bacterial culture; arrows: damaged sites; scale bar: 10 µm

Temperature and pH stability of antagonistic *Bacillus* sp. TH5 culture

Figure 5A illustrates the temperature stability of the antagonistic *Bacillus* sp. TH5 culture across different temperature levels. The residual antifungal activity ranged from 66.67% to 73.33% with no significant difference observed when bacterial cultures were treated for 5 minutes at 60-90℃ (ANOVA, n = 3, $p < 0.05$). Although there was no significant difference for the 10-minute and 15-minute treatments (ANOVA, n = 3, $p < 0.05$), the inhibitory activity slightly decreased with increasing treatment time, showing 53.33-66.67% and 46.67-53.33% residual activity for the 10-minute and 15-minute treatments, respectively. The maintenance of at least 50% antifungal activity after up to 15 minutes of heat treatment indicates the heat stability of the cell-free bacterial culture of *Bacillus* sp. TH5.The thermostability of antifungal activity in cell-free cultures has also been observed in the study of Nawaz et al. (2018). Accordingly, partially purified biosurfactants from *B. licheniformis* OE-04 displayed increased antagonistic activity against *C. gossypii* after treatment at 28-100℃ (Nawaz *et al.*, 2018). The culture filtrate of *B. subtilis* B-FS06 was shown to maintain antagonistic activity against *Aspergillus flavus* after treatment at 20-100℃ for 30 minutes (Zhang *et al.*, 2008). Taken altogether, our results suggest that the culture supernatant of *Bacillus* sp. TH5 contains different components contributing to anti-*C. siamense* activity, with varying thermal sensitivities under different temperature conditions and exposure times.

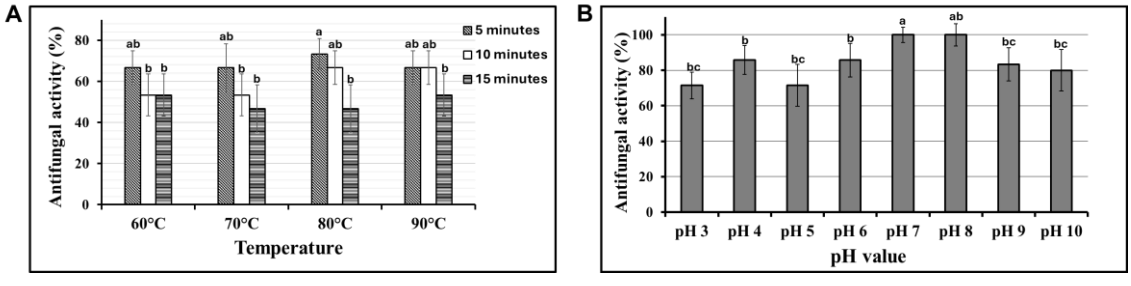


Figure 5. (A) Thermal stability and (B) pH stability of bacterial culture on the inhibition of *C. siamense*.

[a,b] Different letters indicate statistically significant differences ($p<0.05$)

The data presented in Figure 5B demonstrate that the bacterial culture maintained robust antifungal activity over a wide pH range of 3.0-10.0, with residual activity between 71% and 100%. The antifungal activity was fully stable at pH levels of 7.0 and 8.0, while at other pH levels, it decreased by only about 20% with no statistical difference (ANOVA, n = 3, $p < 0.05$). Similar pH stability has been observed in another study. For instance, *B. licheniformis* OE-04 surfactants maintained stability against *C. gossypii* over the same pH range (Nawaz *et al.*, 2018). These findings indicate that the culture supernatant of *Bacillus* sp. TH5 is pH-stable across a broad spectrum, suggesting its potential for use in both acidic and basic environments.

***C. siamense* anthracnose disease suppression assay on mango model**

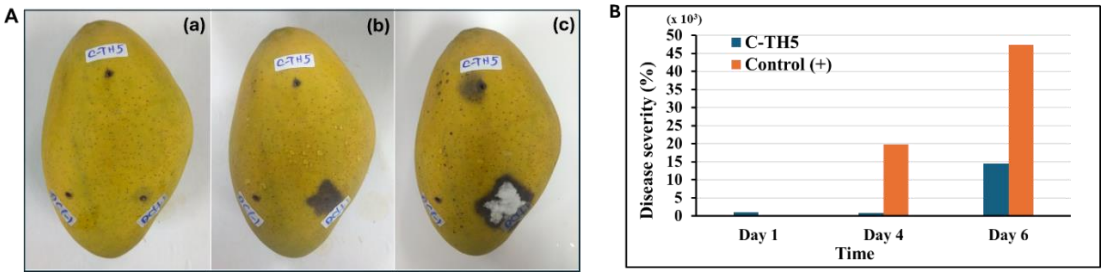


Figure 6. Disease expression of *C. siamense* in mango model (A) after 1 day (Aa), 4 days (Ab), 6 days (Ac) and the disease severity displayed in percentage (B). DC (-): sterilized LB medium; DC (+): *C. siamense* suspension; (C) C-TH5: mixture of *C. siamense* and *Bacillus* sp. TH5

Disease symptoms, including color changes and soft rot, were monitored on mango fruit after 1, 4, and 6 days of treatment (Figure 6). After the first day, there was minimal difference in disease severity between the samples injected with the mold (Figure 6Aa). However, by the fourth and sixth days, the disease symptoms caused by *C. siamense* were pronounced (Figure 6Ab-c). In the positive control sample, lesion area expanded significantly, by 1984.66% and 4735.48%, compared to the negative control after 4 and 6 days of incubation, respectively. Additionally, severe lesions with extensive fungal mycelial growth and decay were observed in the positive control sample after 6 days. In contrast, the test samples treated with a mixture of *C. siamense* and *Bacillus* sp. TH5 showed lesion area expansions of only 87.90% and 1454.75% after 4 and 6 days, respectively. This indicates that *Bacillus* sp. TH5 reduced disease severity in mango fruit caused by *C. siamense* by 95.6% and 69.3% after 4 and 6 days, respectively (Figure 6B). In related post-harvest studies, *B. amyloliquefaciens* PMB04 strains was also shown to reduce *C. gloeosporioides* anthracnose severity by 15-37.5%, *Stenotrophomonas rhizophila* decreased disease severity by 85%, and *Torulaspora indica* DMKU-RP35 along with *Pseudomonas aspenensis* DMKU-SP67 reduced disease severity by 82.4-93.9% (Konsue *et al.*, 2020; Liang *et al.*, 2022; Reyes-Perez *et al.*, 2019). Overall, these findings suggest that *Bacillus* sp. TH5 is a promising biological control agent for managing anthracnose caused by *C. siamense* on mango fruit.

CONCLUSION

Vietnam is one of the top mango-exporting countries in the world. Anthracnose disease, caused by *Colletotrichum siamense*, poses significant economic losses to the mango cultivation and trade industry in Vietnam and globally. In this present study, the bacterial strain *Bacillus* sp. TH5, isolated from mango-growing regions, demonstrated strong antagonistic properties against *C. siamense*. The antifungal activity of the culture supernatant of *Bacillus* sp. TH5 was shown to be stable across a wide range of temperatures and pH levels. With its ability to damage *C. siamense* mycelium and inhibit anthracnose symptoms when applied in mango preservation, *Bacillus* sp. TH5 has the potential to contribute significantly to the development of environmentally friendly biological control methods for managing anthracnose in agriculture.

REFERENCES

Ajay G (2014). *Colletotrichum gloeosporioides*: Biology, pathogenicity and management in India. *J Plant Physiol Pathol*, 2(2): 2-11.

Ashwini N, Srividya S (2014). Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *3 Biotech*, 4(2): 127-136.

EFSA, ECDC (2018). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA J*, 16(2): e05182.

Guerrero-Barajas C, Constantino-Salinas EA, Amora-Lazcano E, Tlalapango-Ángeles D, Mendoza-Figueroa JS, Cruz-Maya JA, and Jan-Roblero J (2020). *Bacillus mycoides* A1 and *Bacillus tequilensis* A3 inhibit the growth of a member of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* species complex in avocado. *J Sci Food Agric*, 100(10): 4049-4056.

Heo Y, Lee Y, Balaraju K, and Jeon Y (2024). Characterization and evaluation of *Bacillus subtilis* GYUN-2311 as a biocontrol agent against *Colletotrichum* spp. on apple and hot pepper in Korea. *Front Microbiol*, 14: 1322641.

Kim YS, Balaraju K, and Jeon Y (2016). Biological control of apple anthracnose by *Paenibacillus polymyxa* APEC128, an antagonistic rhizobacterium. *Plant Pathol J*, 32(3): 251.

Konsue W, Dethoup T, and Limtong S (2020). Biological control of fruit rot and anthracnose of postharvest mango by antagonistic yeasts from economic crops leaves. *Microorganisms*, 8(3): 317.

Liang YS, Fu JY, Chao SH, Tzean Y, Hsiao CY, Yang YY, Chen YK, and Lin YH (2022). Postharvest application of *Bacillus amyloliquefaciens* PMB04 fermentation broth reduces anthracnose occurrence in mango fruit. *Agriculture*, 12(10): 1646.

Lim SM, Yoon MY, Choi GJ, Choi YH, Jang KS, Shin TS, Park HW, Yu NH, Kim YH, and Kim JC (2017). Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. *Plant Pathol J*, 33(5): 488-498.

Nawaz HH, Rajaofera MJN, He Q, Anam U, Lin C, and Miao W (2018). Evaluation of antifungal metabolites activity from *Bacillus licheniformis* OE-04 against *Colletotrichum gossypii*. *Pestic Biochem Physiol*, 146: 33-42.

Rattanakreetakul C, Keawmanee P, Bincader S, Mongkolporn O, Phuntumart V, Chiba S, and Pongpisutta R (2023). Two newly identified *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in central Thailand. *Plants*, 12(5): 1130.

Reyes-Perez JJ, Hernandez-Montiel LG, Vero S, Noa-Carrazana JC, Quiñones-Aguilar EE, and Rincón-Enríquez G (2019). Postharvest biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* on mango using the marine bacterium *Stenotrophomonas rhizophila* and its possible mechanisms of action. *J Food Sci Technol*, 56: 4992-4999.

Ruiz-Garcia C, Bejar V, Martinez-Checa F, Llamas I, and Quesada E (2005). *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain. *Int J Syst Evol Microbiol*, 55(1): 191-195.

VNS (2022). Việt Nam mango exports triple in 2021. *Việt Nam News*. https://vietnamnews.vn/economy/1165874/viet-nam-mango-exports-triple-in-2021.html

Wu Y, Tan Y, Peng Q, Xiao Y, Xie J, Li Z, Ding H, Pan H, and Wei L (2024). Biocontrol potential of endophytic bacterium *Bacillus altitudinis* GS-16 against tea anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *PeerJ*, 12: e16761.

Zhang T, Shi ZQ, Hu LB, Cheng LG, and Wang F (2008). Antifungal compounds from *Bacillus subtilis* B-FS06 inhibiting the growth of *Aspergillus flavus*. *World J Microbiol Biotechnol*, 24: 783-788.

KIỂM SOÁT SINH HỌC *Colletotrichum siamense* GÂY THÁN THƯ Ở XOÀI BỞI *Bacillus* sp. TH5

Phạm Tấn Việt*, Phạm Đông Triều, Nguyễn Ngọc Ẩn, Nguyễn Thị Diệu Hạnh

Viện Công nghệ sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Trong nông nghiệp, kiểm soát bệnh thán thư, do *Colletotrichum siamense* gây ra, là thách thức đối với quy trình sản xuất xoài (*Mangifera indica*). Vi khuẩn *Bacillus* được xem như tác nhân kiểm soát sinh học đầy hứa hẹn, giải pháp bền vững và thân thiện với môi trường để chống lại bệnh thán thư trong nông nghiệp. Trong nghiên cứu này, đặc tính kháng nấm của *Bacillus* sp. TH5 chống lại *C. siamense* đã được nghiên cứu. Kết quả cho thấy *Bacillus* sp. TH5 thể hiện những đặc điểm đáng chú ý, bao gồm sự hiện diện của các enzyme ngoại bào như cellulase, protease và chitinase góp phần làm tổn thương hệ sợi nấm *C. siamense*. Hơn nữa, ngay cả trong điều kiện nhiệt độ cao 60°C-90°C, dịch nuôi cấy *Bacillus* sp. TH5 vẫn giữ được hoạt tính kháng nấm khoảng 50% sau 15 phút. Hoạt tính kháng nấm vẫn duy trì với 71% sau 2 giờ ủ trong khoảng pH từ 3,0-10,0. Trong mô hình quả xoài, chủng *Bacillus* sp. TH5 cho thấy hiệu quả đối kháng vượt trội với việc giảm mức độ gây bệnh thán thư lần lượt trên 95% và 69% sau 4 và 6 ngày. Những kết quả đầy hứa hẹn này nhấn mạnh tiềm năng của *Bacillus* sp. TH5 như một tác nhân kiểm soát sinh học hiệu quả chống lại bệnh thán thư ở xoài và các loại trái cây khác, mang lại triển vọng đáng kể cho các hoạt động nông nghiệp bền vững trong tương lai.

Từ khóa: Bệnh thán thư, thuốc kháng nấm, *Bacillus, Colletotrichum siamense*, xoài.

* Author for correspondence: Tel: +84-979865357; Email: phamtanviet@iuh.edu.vn

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN CHỦNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG CỐ ĐỊNH ĐẠM TỪ ĐẤT TRỒNG NGÔ

Nguyễn Thị Thúy Nhi, Nguyễn Thái Pháp, Dương Vi Ngọc, Nguyễn Minh Trí*

Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

TÓM TẮT

Sử dụng phân hóa học nhiều sẽ dẫn đến nhiều bất lợi cho môi trường như đất bạc màu, bị chai hóa, khả năng giữ nước kém, ảnh hưởng đến chất lượng nông sản. Để giảm thiểu sử dụng phân hóa học, việc tìm kiếm những chủng vi khuẩn có khả năng cố định đạm nhằm thay thế một phần phân hóa học là rất cần thiết.

Từ 9 mẫu đất trồng ngô ở thành phố Huế, huyện Hương Trà và huyện Quảng Điền, chúng tôi đã phân lập được 41 chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen. Số lượng vi khuẩn cố định nitrogen trong các mẫu đất dao động từ $15,82x10^5$ - $35,47x10^5$ CFU/g đất khô. Đã tuyển chọn được chủng M21 phân lập từ đất trồng ngô ven sông có khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường Ashby dịch thể với hàm lượng $N\text{-}NH_4^+$ tích lũy cao nhất (272,34 mg/L). Bằng phương pháp phân tích trình tự gen và so sánh với ngân hàng dữ liệu NCBI, chủng M21 được xác định là loài *Curtobacterium luteum* M21. Chủng *Curtobacterium luteum* M21 thể hiện sự tích lũy $N\text{-}NH_4^+$ cao nhất là sau 72 giờ nuôi cấy, pH tối thích là 5,5 và nhiệt độ tối ưu là 35^0C. Nghiên cứu này còn cho thấy ở mật độ 10^6 CFU/mL sau 4 ngày tác động đã kích thích hạt ngô náy mầm đạt tỷ lệ 100%.

Từ khóa: Cố định đạm, *Curtobacterium luteum*, đất trồng ngô, vi khuẩn

MỞ ĐẦU

Ngô là cây lương thực đứng hàng thứ 2 sau lúa gạo ở nước ta, đất trồng ngô chủ yếu là đất bãi bồi ven sông, đất ruộng một vụ, đất vườn, đất đồi... Cây ngô có nhu cầu phân bón rất lớn, tuy nhiên khi bón nhiều phân hóa học cho cây sẽ gây ra ô nhiễm môi trường, ảnh hưởng đến sức khỏe con người và động vật (Ngô Hữu Tình, 2003). Bên cạnh đó hiện nay giá phân hóa học cao sẽ dẫn đến chi phí cho sản xuất trong canh tác cây trồng tăng lên. Hơn nữa, việc sử dụng phân hóa học với liều lượng cao có thể làm cho hàm lượng NO_3^- trong sản phẩm vượt quá mức cho phép, gây ảnh hưởng không tốt đến sức khỏe người sử dụng. Do đó, việc tìm kiếm nguồn phân bón mới để thay thế phần nào phân bón hóa học là vấn đề cấp thiết.

Trong những năm gần việc nghiên cứu các loài vi khuẩn có khả năng làm tăng năng suất cây trồng, đồng thời hạn chế được những độc tính cho đất khi việc sử dụng phân bón hoá học ngày càng gia tăng. Đặc biệt là các nhóm vi khuẩn lưu trú ở vùng rễ của cây trồng. Nhóm vi khuẩn này có khả năng cố định nitrogen, phân giải phosphate... tổng hợp nhiều chất kích thích sinh trưởng thực vật như IAA (Indole-3-acetic acid), GA3 (Gibberellic)… góp phần nâng cao độ phì của đất, kích thích tăng trưởng, tăng năng suất cây trồng, hạn chế bón phân hóa học, góp phần phát triển nền nông nghiệp sinh thái bền vững.

Xuất phát từ thực tế trên, chúng tôi tiến hành nghiên cứu phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn cố định nitrogen trong đất trồng ngô ở thành phố Huế và vùng phụ cận nhằm tuyển chọn được chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen tốt, làm cơ sở để sản xuất các loại phân bón sinh học cho cây ngô, giảm lượng phân hóa học nhằm phát triển một nền nông nghiệp hữu cơ bền vững

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chủng vi khuẩn cố định nitrogen phân lập từ đất trồng ngô ở Thừa Thiên Huế và hạt giống ngô nếp Cồn Hến là giống ngô địa phương tại Thừa Thiên Huế (Trịnh Thị Sen, 2020).

Phương pháp

Thu mẫu đất: 9 mẫu đất xung quanh rễ cây ngô được lấy ở những vùng đất trồng ngô ven sông, đất vườn, đất đồi và đất trồng lúa tại thành phố Huế, huyện Hương Trà và huyện Quảng Điền vào tháng 2/2024. Thu mẫu vào lúc cây ngô bắt đầu trổ cờ, loại bỏ lớp đất bề mặt xung quanh gốc cây, lấy khoảng 500g đất xung quanh rễ ở độ sâu 20cm. Các mẫu đất được đưa về phòng thí nghiệm và hong khô trong không khí ở nhiệt độ phòng, sau đó sàn qua rây có kích cỡ 1mm và bảo quản ở 4^oC.

Phân lập và nuôi cấy vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen

Hòa tan 1g đất rồi pha trong 9mL nước cất vô trùng, để ổn định ở 30^{o}C trong 15 phút rồi pha loãng mẫu đến nồng độ 10^{-6}, cấy trải dịch pha loãng ở các nồng độ lên môi trường Ashby, nuôi cấy ở điều kiện nhiệt độ 30^{o}C trong 72 giờ (Nguyễn Lân Dũng et al., 2003).

Phương pháp phân loại chủng vi khuẩn

Quan sát hình thái: Tiến hành nuôi cấy chủng vi khuẩn được tuyển chọn trên môi trường Ashby ở nhiệt độ 30^{0}C, sau 3 ngày đo kích thước khuẩn lạc, quan sát màu sắc, hình dạng, độ dày, mép khuẩn lạc và nhuộm Gram (Nguyễn Lân Dũng *et al*., 2003).

Tuyển chọn chủng có khả năng cố định nitrogen: Các chủng vi khuẩn được nuôi cấy cùng tỷ lệ vào 50mL môi trường Ashby dịch thể, nuôi lắc 120 vòng/phút ở 30^{o}C trong 72 giờ. Ly tâm thu dịch trong và xác định hàm lượng $N\text{-}NH_4^+$ được tích lũy trong dịch nuôi cấy bằng phương pháp so màu với thuốc thử Nessler (Nguyễn Quốc Khương *et al*., 2019).

Phương pháp định danh: Chủng vi khuẩn tuyển chọn được định danh bằng phương pháp giải trình tự gen, tiến hành như sau: đầu tiên tách chiết DNA tổng số của vi khuẩn; nhân đoạn gene mã hóa 16S rRNA bằng kỹ thuật PCR. Trình tự của đoạn gene mã hóa 16S rRNA được xác định theo phương pháp của Sanger cải tiến, sử dụng máy đọc trình tự tự động ABI 3130XL. Phân tích kết quả bằng phần mềm Sequencing Analysis 5.3 và cuối cùng trình tự này được so sánh với các trình tự trên ngân hàng dữ liệu NCBI (National Center for Biotechnology Information) bằng công cụ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) để phân loại chủng vi khuẩn (Sambrook and Russell, 2001).

Xác định ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy: Chủng vi khuẩn đã tuyển chọn được nuôi cấy trong môi trường Ashby dịch thể với các điều kiện về nhiệt độ, pH và thời gian khác nhau. Sau khi nuôi cấy, ly tâm thu lấy phần dịch và xác định hàm lượng $N\text{-}NH_4^+$ bằng phương pháp so màu với thuốc thử Nessler.

Khảo sát ảnh hưởng của chủng vi khuẩn tuyển chọn đến tỷ lệ nảy mầm của hạt ngô: Chuẩn bị nguồn vi khuẩn và mật độ của chủng vi khuẩn được nuôi ở các nồng độ: 10^6, 10^7, 10^8 và 10^9 CFU/mL. Các thí nghiệm được bố trí theo khối ngẫu nhiên đầy đủ, mỗi công thức thí nghiệm có n ≥ 20 và được lặp lại 3 lần.Thí nghiệm được thực hiện với 5 công thức trên các đĩa pettri, mỗi công thức có 20 hạt ngô như sau: công thức 1: 10^6 CFU/mL, công thức 2: 10^7 CFU/mL, công thức 3: 10^8 CFU/mL, công thức 4: 10^9 CFU/mL và đối chứng là nước cất vô trùng. Thí nghiệm được kéo dài trong 4 ngày và xác định chỉ tiêu về tỷ lệ nảy mầm của hạt ngô.

Tất cả các số liệu được thống kê bằng chương trình MS. Excel 2016 qua phân tích ANOVA và ý nghĩa được chấp nhận ở $p < 0,05$ (Đặng Văn Giáp, 2000).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tiến hành phân lập các chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen trên môi trường Ashby thạch đĩa từ 9 mẫu đất trồng ngô tại thành phố Huế và vùng phụ cận, kết quả được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Số lượng vi khuẩn cố định nitrogen trong các mẫu đất trồng ngô

STT	Mẫu	Địa điểm	Số chủng phân lập	CFU/g ×10^5
1	Đất ven sông	Kim Long	6	35,47 ± 3,46
2	Đất ven sông	Hương An	5	34,86 ± 3,16
3	Đất cát	Quảng Điền	5	34,52 ± 2,97
4	Đất trồng lúa	Hương Hồ	4	27,12 ± 2,04
5	Đất trồng lúa	Hương Thủy	5	26,84 ± 2,11
6	Đất vườn	Hương An	4	22,04 ± 1,97
7	Đất vườn	Hương Long	5	21,46 ± 1,89
8	Đất đồi	Thủy Xuân	3	15,82 ± 1,56
9	Đất đồi	Hương Hồ	4	16,73 ± 1,62

Ghi chú: CFU: Colony Forming Unit (đơn vị hình thành khuẩn lạc)

Từ 9 mẫu đất trồng ngô đã phân lập được 41 chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen. Số lượng vi khuẩn cố định nitrogen trong các mẫu đất dao động trong khoảng 15,82x10^5 - 35,47x10^5 CFU/g đất khô. Số lượng vi khuẩn cố định nitrogen trong nghiên cứu này thấp hơn so với nghiên cứu của Phạm Thị Ngọc Lan (2017) với số lượng vi khuẩn cố định nitrogen trong đất trồng rau tại Hương Hồ, thị xã Hương Trà, tỉnh Thừa Thiên Huế dao động từ 0,13 x 10^6 - 22,95 x 10^6 CFU/g đất khô.

Để tuyển chọn chủng vi khuẩn cố định nitrogen mạnh, chúng tôi đã lựa chọn 5 chủng từ kết quả phân lập trên có đường kính và bề dày khuẩn lạc lớn để nuôi cấy trong môi trường Ashby dịch thể. Sau 3 ngày, xác định hàm lượng $N\text{-}NH_4^+$ tích lũy trong môi trường bằng phương pháp so màu với thuốc thử Nessler. Kết quả được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 3. Sự tích lũy hàm lượng $N\text{-}NH_4^+$ của các chủng vi khuẩn

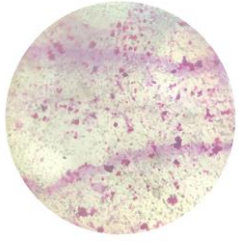
STT	Chủng vi khuẩn	Hàm lượng $N\text{-}NH_4$ (mg/L)
1	M8 (Quảng Điền: đất cát)	134,91[d]
2	M21 (Kim Long: đất phù sa ven sông)	272,34[a]
3	M24 (Hương Long: đất vườn)	178,21[c]
4	M32 (Hương Thủy: đất trồng lúa)	175,77[c]
5	M39 (Hương Hồ: đất đồi)	213,48[b]

Qua kết quả phân tích cho thấy, trong số 5 chủng vi khuẩn được tuyển chọn; chủng M21 phân lập từ đất phù sa ven sông có khả năng tích lũy sinh khối và $N\text{-}NH_4^+$ mạnh trong môi trường Ashby dịch thể với hàm lượng $N\text{-}NH_4^+$ là cao nhất (272,34 mg/L). Theo nghiên cứu của Phạm Thị Ngọc Lan đã phân lập được 15 chủng vi khuẩn cố định nitrogen mạnh từ đất trồng rau ở tỉnh Thừa Thiên Huế thì có 2 chủng *Stenotrophomonas maltophilia* N49 và *Paenibacillus mucilaginosus* N161 có khả năng cố định nitrogen cao với hàm lượng $N\text{-}NH_4^+$ lần lượt là 33,60 mg/mL và 43,41 mg/m) thì kết quả cố định nitrogen của chủng M21 mà chúng tôi đã phân lập được cao hơn nhiều. Với kết quả này, chúng tôi lựa chọn chủng M21 để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

Đặc điểm hình thái và phân loại của chủng vi khuẩn

Đặc điểm hình thái: Chủng M21 nuôi cấy trên môi trường Ashby thạch đĩa cho khuẩn lạc nhầy quánh, màu trắng sữa, dày, mép tròn, không tiết sắc tố ra môi trường. Đường kính khuẩn lạc đạt 12mm sau 3 ngày nuôi cấy. Trong điều kiện nuôi cấy lắc môi trường Ashby dịch thể, chủng M21 phát triển làm dịch nuôi cấy từ dạng lỏng chuyển sang dạng sánh. Quan sát tiêu bản chủng M21 bắt màu Gram âm, tế bào có hình bầu dục (Hình 1).

Khuẩn lạc của chủng M21



Nhuộm gram tế bào vi khuẩn

Hình 1. Chủng M21 trên môi trường Ashby thạch đĩa và ảnh tiêu bản nhuộm gram (x100)

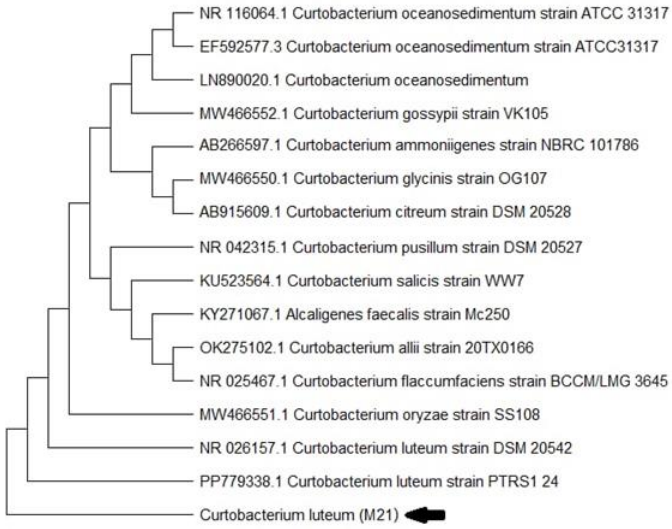
Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA của chủng M21 được thể hiện ở Hình 2.

TGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTTTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTACTAAAAG
AGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTTGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTG
TGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGGGTGGCC
GGTCACCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACAAGCT
GATAGGCCGCGAGTCCATCCCCAACCAAAAAATCTTTCCACCACCAGGCCATGCGACCAGTAGT
CATATCCAGTATTAGACGTCGTTTCCAACGCTTATCCCAGAGTCAGGGGCAGGTTACTCACGTG
TTACTCACCCGTTCGCCACTAATCCACCCAGCAAGCTGGGCTTCATCGTTCGACTTGCATGTGTT
AAGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGATCAAACTCTCCAA

Hình 2. Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA

Sử dụng công cụ Blast Search để tra cứu và so sánh trình tự này trên Ngân hàng gene. Kết quả cho thấy trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn được tuyển chọn có độ tương đồng 99,59% với trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng *Curtobacterium luteum*. Như vậy, chủng vi khuẩn được tuyển chọn được xác định là thuộc loài *Curtobacterium luteum* M21.

Cây phát sinh chủng loại được xây dựng dựa trên trình tự 16S rRNA của chủng nghiên cứu và các chủng có quan hệ họ hàng gần thuộc *Curtobacterium* được thể hiện qua Hình 3.



Hình 3. Cây phả hệ thể hiện mối quan hệ di truyền của chủng *C. luteum* M21

Ghi chú: Chủng nghiên cứu được đánh dấu bằng mũi tên.

Ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi cấy

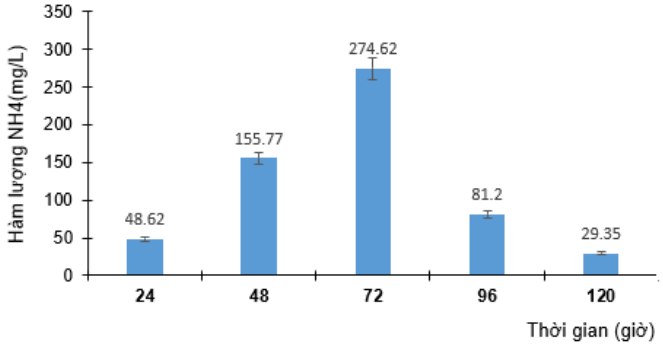
Thời gian nuôi cấy

Để thăm dò ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến sinh trưởng phát triển và tích luỹ $N\text{-}NH_4^+$, tiến hành nuôi cấy lắc chủng *C. luteum* M21 trong môi trường Ashby dịch thể. Xác định hàm lượng $N\text{-}NH_4^+$ tích lũy trong môi trường nuôi sau các mốc thời gian 24, 48, 72, 96 và 120 giờ. Kết quả được trình bày ở hình 4.

Kết quả cho thấy: Sau 48 giờ nuôi, hàm lượng $N\text{-}NH_4^+$ đã tích lũy nhiều trong môi trường, đạt giá trị cao nhất là 274,62 mg/L sau 72 giờ.

Hansen và cộng sự khi nghiên cứu khả năng cố định nitrogen của chủng *Enterobacter cloacae* đã xác định được sau 36 giờ nuôi cấy thì chủng nghiên cứu đạt giá trị cao nhất với sinh khối là 13,86 lg CFU/mL (Hansen *et al*., 2007)

Khi lượng $N\text{-}NH_4^+$ trong môi trường tăng cao vượt quá giới hạn sẽ ức chế lại vi khuẩn, vi khuẩn sử dụng lượng $N\text{-}NH_4^+$ có trong môi trường và không tổng hợp thêm $N\text{-}NH_4^+$ nên lượng $N\text{-}NH_4^+$ khảo sát vào ngày thứ 5 giảm xuống rất đáng kể (Van & Sloger, 1981). Nguyên nhân thứ hai là do hàm lượng dinh dưỡng trong môi trường nuôi sẽ tiêu hao dần theo thời gian và các vi khuẩn tạo ra các chất ức chế lẫn nhau làm ảnh hưởng đến sự phát triển mật độ vi khuẩn và ức chế quá trình tổng hợp $N\text{-}NH_4^+$.



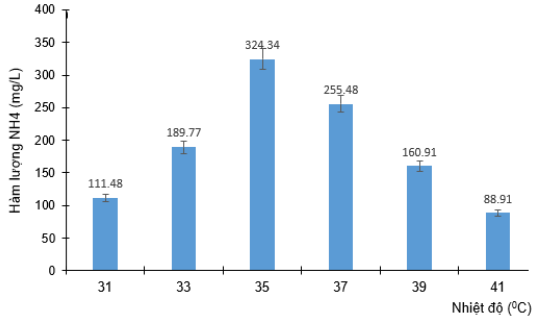
Hình 4. Khả năng cố định N của chủng *C. luteum* M21 theo thời gian nuôi cấy

Như vậy, chúng tôi nhận thấy rằng khoảng thời gian thích hợp cho cố định nitrogen của chủng *C. luteum* M21 được khảo sát là tương đương với nghiên cứu của Hansen và đồng tác giả (2007).

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Tiến hành nuôi cấy lắc chủng *C. luteum* M21 trong môi trường Ashby dịch thể ở các nhiệt độ 31^{o}C, 33^{o}C, 35^{o}C, 37^{o}C và 41^{o}C. Xác định hàm lượng $N\text{-}NH_4^+$ tích lũy trong môi trường nuôi sau 72 giờ, kết quả được trình bày ở hình 5.

Qua kết quả nghiên cứu ở Hình 4 cho thấy: Chủng *C. luteum* M21 có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt trong khoảng nhiệt độ 31^{0}C - 39^{0}C. Trong đó nhiệt độ thích hợp nhất cho vi khuẩn phát triển và tích lũy lượng N-NH_4^+ là 35^{0}C. Trên 35^{0}C là quá trình tích lũy N-NH_4^+ của vi khuẩn đã giảm xuống và vượt quá giới hạn 41^{0}C thì hàm lượng N-NH_4^+ của vi khuẩn tích lũy trong môi trường nuôi đã giảm rõ rệt.



Hình 5. Khả năng cố định N của chủng *C. luteum* M21 theo nhiệt độ nuôi

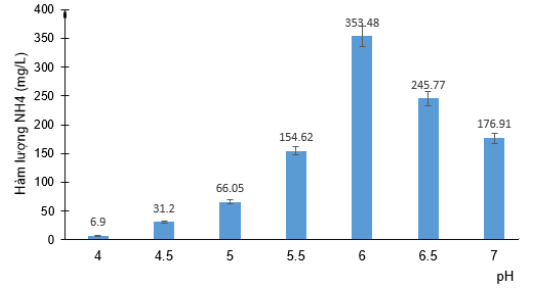
Theo nghiên cứu của Trần Thị Xuân Phương và cộng sự thì 3 chủng cố định nitrogen phân lập từ đất trồng lúa ở tỉnh Thừa Thiên Huế là HC21, HC24 và TT13 sinh trưởng phát triển tốt nhất ở nhiệt độ lần lượt là 28^{0}C và 30^{0}C (Trần Thị Xuân Phương *et al*., 2017). Còn kết quả nghiên cứu của chúng tôi về giới hạn nhiệt độ cho chủng *C. luteum* M21 sinh trưởng tốt là 25^{0}C - 35^{0}C. Điều này có thể do khu hệ vi khuẩn ở đây thích nghi với điều kiện khí hậu địa phương. Chính vì vậy chủng *C. luteum* M21 thích hợp phát triển trong giới hạn nhiệt độ này.

Ảnh hưởng của pH

pH môi trường được điều chỉnh ở các mức 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 và nuôi chủng *C. luteum* M21 ở thời gian và nhiệt độ tối ưu (72 giờ và 35^{o}C), sau đó xác định hàm lượng N-NH_4^+ tích lũy trong môi trường nuôi. Kết quả được trình bày ở hình 6.

Qua Hình 6 cho thấy: Giá trị pH của các môi trường nuôi cấy khác nhau thì sinh trưởng phát triển và khả năng tích lũy N-NH_4^+ là khác nhau. Chủng *C. luteum* M21 phát triển được trong khoảng pH rộng từ 4,5 đến 7,0; hàm lượng N-NH_4 tạo thành có sự biến thiên rõ rệt trong khoảng pH từ 4,5 đến 7,0; đạt giá trị cao nhất là 353,48 mg/mL tại pH: 6,0

Theo Trần Hải Minh, pH tối ưu cho sinh trưởng phát triển và cố định N của chủng vi khuẩn *Azotobacter* là 6,8 (Trần Hải Minh, 2012). Bên cạnh đó, kết quả nghiên cứu của Đỗ Hoành Quân về ảnh hưởng của pH môi trường đến khả năng sinh trưởng phát triển và hoạt tính cố định N của 02 chủng vi khuẩn Az03 và Az07 thuộc chi *Azotobacter* phân lập từ đất canh tác thì giá trị pH thích hợp cho sinh trưởng phát triển và cố định N của các chủng nghiên cứu từ 7,0 - 7,5 (Đỗ Hoành Quân, 2011).

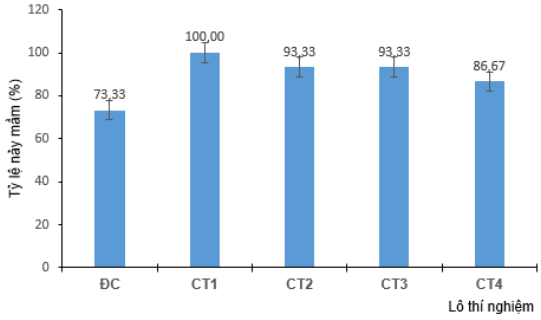


Hình 6. Khả năng cố định N của chủng *C. luteum* M21 theo pH môi trường

Khảo sát ảnh hưởng của vi khuẩn đến tỷ lệ nảy mầm hạt ngô

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của các mật độ vi khuẩn khác nhau của chủng *C. luteum* M21 đến tỷ lệ nảy mầm hạt ngô được trình bày ở Hình 7. Kết quả cho thấy chủng *C. luteum* M21 ở công thức 1 có nồng độ 10^6 CFU/mL giúp gia tăng tỷ lệ nảy mầm của hạt, có tỷ lệ nảy mầm cao nhất (100%), khác biệt ý nghĩa thống kê ($p<0,05$) khi so sánh với công thức đối chứng không có chủng vi khuẩn (73,3%). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Kiều Phương Nam cho thấy các dòng vi khuẩn *Methylobacterium* spp. từ lá cây có khả năng kích thích gia tăng tỷ lệ nảy mầm các hạt giống như đậu đũa, đậu xanh, đậu cove và cà chua (Kiều Phương Nam *et al.,* 2010).

Kết quả thí nghiệm cho thấy nồng độ 10^6 CFU/mL là thích hợp nhất để chủng *C. luteum* M21 xâm nhập vào hạt ngô, giúp gia tăng tỷ lệ nảy mầm của hạt và có thể với mật độ này vi khuẩn đã tổng hợp ra một lượng phytorhormone vừa đủ để giúp kích thích tỉ lệ nảy mầm của hạt ngô tốt nhất.



Hình 7. Tỷ lệ nảy mầm của hạt ngô khi ủ với chủng *C. luteum* M21 ở các nồng độ khác nhau (n=3)

KẾT LUẬN

Từ 9 mẫu đất trồng ngô ở thành phố Huế và vùng phụ cận, đã phân lập được 41 chủng vi khuẩn có khả năng cố định nitrogen. Số lượng vi khuẩn cố định nitrogen trong các mẫu đất dao động trong khoảng $15,82x10^5$ - $35,47x10^5$ CFU/g đất khô.

Tuyển chọn được chủng M21 phân lập từ đất ven sông có khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường Ashby dịch thể với hàm lượng $N\text{-}NH_4^+$ tích lũy cao nhất (272,34 mg/L) *và* được định danh bằng phân tích trình tự gen, so sánh với ngân hàng dữ liệu NCBI, được xác định là loài *Curtobacterium luteum* M21.

Chủng *Curtobacterium luteum* M21 thể hiện sự tích lũy $N\text{-}NH_4^+$ cao nhất là sau 72 giờ nuôi cấy, pH tối thích là 5,5 và nhiệt độ tối ưu là 35^0C.

Chủng *C. luteum* M21 ở nồng độ 10^6 CFU/mL có khả năng kích thích hạt ngô nảy mầm đạt tỷ lệ 100% sau 4 ngày ủ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ngô Hữu Tình (2003). *Cây ngô*. Nhà xuất bản Nghệ An.

Trịnh Thị Sen, Phan Thị Phương Nhi (2020). Tuyển chọn giống ngô nếp tại Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, Tập 129, Số 3D, Tr. 65-79

Nguyễn Lân Dũng, Nguyễn Đình Quyền, Phạm Văn Ty (2003). *Vi sinh vật học.* NXB Giáo dục Hà Nội

Nguyễn Quốc Khương, Lê Vĩnh Thúc, Nguyễn Thị Thái Lê, Trần Hoàng Em, Lâm Dư Mẫn, Trần Ngọc Hữu, Nguyễn Thị Thanh Xuân, Trần Chí Nhân, Lý Ngọc Thanh Xuân (2019). Phân lập, tuyển chọn vi khuẩn có khả năng cố định đạm, phân giải lân, kích thích sinh trưởng cây trồng từ đất vùng rễ cây Ngô lai. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, số 23, tr: 17–23

Sambrook J. and Russell DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Đặng Văn Giáp (2000). Phân tích dữ liệu khoa học bằng Microsoft Excel. NXB Giáo dục Hà Nội

Phạm Thị Ngọc Lan, Nguyễn Thị Việt, Lê Thị Hoa Sen (2017). Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn cố định nitrogen từ đất chuyên canh rau tại phường Hương Hồ, thị xã Hương Trà, tỉnh Thừa Thiên Huế**.** *Tuyển tập báo cáo Hội nghị Khoa học toàn quốc về Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, lần thứ 7***,** Hà Nội, tr. 1296 - 1303.

Hansen A, Xu J, Yang J (2007). Growth condition of assosiative nitrogen fixing bacteria *Enterobacter cloaceae* in Rice plant. *Agicultural Journal,* 2: 672 - 675.

Van BP, & Sloger C (1981). Ontogenetic variation of nitrogenase, nitrate reductase and glutamin synthetase activities in *Oryza sativa* rice. *Plant Physiol, 68:* 722-726.

Trần Thị Xuân Phương, Nguyễn Thị Như Ngọc, Nguyễn Thị Thuận, Lê Xuân Diễm Ngọc (2017). Tuyển chọn vi khuẩn Azotobacter có khả năng cố định nitơ và sinh tổng hợp IAA trong đất trồng lúa ở tỉnh Thừa Thiên Huế". *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp,* tập 1, trang 111 - 118

Trần Hải Minh (2012). *Phân lập và tuyển chọn chủng vi khuẩn Azotobacter có hoạt tính nitrogenase từ đất trồng lúa tại huyện Vạn Ninh, tỉnh Khánh Hòa.* Luận văn Thạc sĩ Khoa học, Đại học Nha Trang.

Đỗ Hoành Quân (2011). *Phân lập, tuyển chọn và nghiên cứu các đặc tính tăng trưởng, cố định đạm của vi khuẩn Azotobacter - thử nghiệm trên cây trồng.* Luận văn Thạc sỹ Sinh học. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh.

Kiều Phương Nam, Hồ Lê Trung Hiếu, Trần Minh Tuấn, Bùi Văn Lệ (2010). Khả năng ứng dụng vi khuẩn Methylobacterium spp. trong việc gia tăng tỉ lệ nảy mầm của hạt giống cây trồng. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*. Tập13, tr: 49-57.

ISOLATION AND SELECTION OF BACTERIAL STRAINS CAPABLE OF NEGATIVE FIXATION FROM CORN PLANTING SOIL

Nguyen Thi Thuy Nhi, Nguyen Thai Phap, Duong Vi Ngoc, Nguyen Minh Tri*

Hue University of Science, Hue University

SUMMARY

Using too much chemical fertilizer will lead to many disadvantages for the environment such as degraded soil, callousing, poor water holding capacity, and affecting the quality of agricultural products. To minimize the use of chemical fertilizers, it is necessary to find microbial strains capable of fixing nitrogen to partially replace chemical fertilizers.

From 9 samples of corn growing land in Hue city, Huong Tra district and Quang Dien district, we have isolated 41 strains of bacteria with the ability to fix nitrogen. The number of nitrogen-fixing bacteria in soil samples ranged from $15.82x10^5$ - $35.47x10^5$ CFU/g dry soil. Selected strain M21 isolated from riverside corn soil has the ability to grow well in Ashby liquid medium with the highest accumulated $N\text{-}NH_4^+$ content (272.34 mg/L). By gene sequence analysis and comparison with NCBI data bank, strain M21 was identified as Curtobacterium luteum M21. Curtobacterium luteum M21 strain showed the highest accumulation of $N\text{-}NH_4^+$ after 72 hours of culture, optimal pH was 5.5 and optimal temperature was 35^0C. This study also showed that at a density of 10^6 CFU/mL after 4 days of impact, it stimulated corn seed germination at a rate of 100%.

Keywords: Bacteria, corn soil, *Curtobacterium luteum,* nitrogen fixation.

* Author for correspondence: Tel: +84-914031085; Email: nguyenminhtri@husc.edu.vn

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN DÒNG VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP KHÔNG LƯU HUỲNH CÓ KHẢ NĂNG XỬ LÝ SULFIDE TRONG MÔI TRƯỜNG NƯỚC NUÔI TRỒNG THỦY SẢN TẠI THỊ XÃ ĐÔNG HÒA, TỈNH PHÚ YÊN

Huỳnh Tấn Trọng[1], Trương Phước Thiên Hoàng[2], Võ Trần Quốc Thắng[2], Lê Quốc Huy[1], Lê Phước Thọ[3*]

[1]Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

[2]Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

[3]Công ty TNHH Bio Nông Lâm, thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

TÓM TẮT

Trong nuôi trồng thủy sản, việc kiểm soát hàm lượng sulfide trong môi trường nước là vấn đề rất quan trọng bởi đây là tác nhân gây chết đối với động vật thủy sản và gây ra mùi hôi thối trong ao nuôi. Trong nghiên cứu này, phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh từ 20 mẫu nước tại các ao nuôi thủy sản trên địa bàn thị xã Đông Hòa, tỉnh Phú Yên. Kết quả phân lập được 8 chủng vi sinh được ký hiệu từ T1, T2,… đến T8 có khả năng xử lý sulfide, trong đó chủng T8 được định danh sinh học phân tử xác định là *Rhodopseudomonas palustris*. Trong điều kiện kỵ khí, ánh sáng tự nhiên, chủng T8 có khả năng loại bỏ sulfide cao (96,7% sulfide khi nuôi ở môi trường có hàm lượng sulfide 10 mg/L). Ở các nồng độ muối từ 0‰ – 40‰ chủng T8 tăng sinh tốt và đạt mật số từ 4,57 Log_{10} CFU/mL (tương đương 3,72 x 10^4 CFU/mL, ở nồng độ muối 40‰) đến 7,31 Log_{10} CFU/mL (2,04 x 10^7 CFU/mL, ở nồng độ muối 10‰). Điều kiện pH từ 6 – 7, độ rọi từ 1500 đến 3000 LUX (chiếu sáng liên tục 24/24 giờ) là phù hợp nhất để chủng T8 tăng sinh với mật số cao từ 9,67 đến 9,83 Log_{10} CFU/mL (4,68 đến 6,76 x 10^9 CFU/mL). Khả năng loại bỏ sulfide ngoài ao nuôi thực tế của chủng T8 cho thấy, sau 2, 4 và 7 ngày xử lý thì lượng sulfide trong ao nuôi thủy sản giảm từ 1,716 mg/L xuống lần lượt còn 1,464, 0,911 và 0,162 mg/L (giảm 90,56%). Như vậy, vi khuẩn *Rhodopseudomonas palustris* (T8) có tiềm năng cao để ứng dụng vào thực tiễn nhằm xử lý hiệu quả sulfide trong môi trường nước nuôi trồng thủy sản.

Từ khóa: Nuôi trồng thủy sản, phân lập, *Rhodopseudomonas palustris*, sulfide, vi khuẩn tía quang hợp.

MỞ ĐẦU

Theo Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn tỉnh Phú Yên, ước tính năm 2023 toàn tỉnh nuôi trồng được 2.669 ha thủy sản, sản lượng thủy sản thu hoạch luỹ kế 11 tháng đầu năm được 17.058 tấn, tăng 3,8% so với cùng kỳ. Hiện nay quy mô nuôi trồng thủy sản từ nhỏ đến vừa, chủ yếu tập trung vào các loại tôm cá với hình thức nuôi ao đất và lồng bè. Bên cạnh đó, vấn đề quản lý chất lượng môi trường nước và dịch bệnh trong nuôi trồng thủy sản cũng là thách thức lớn tại Phú Yên. Trong khi đó, Phú Yên có điều kiện tự nhiên và địa lý thích hợp để phát triển ngành thủy sản, tiềm năng đa dạng loài thủy sản và mở rộng quy mô nuôi trồng thủy sản tại Phú Yên rất lớn. Vì vậy, cần có thêm nhiều nghiên cứu khoa học để đưa ra các giải pháp hữu ích cho việc nuôi trồng thủy sản tại Phú Yên.

Ô nhiễm môi trường nước là vấn đề nhức nhối trong nuôi trồng thủy sản, trong đó ô nhiễm hữu cơ dạng sulfide là phổ biến nhất. Hàm lượng sulfide từ thức ăn dư thừa, xác tảo, mùn hữu cơ, vỏ tôm và phân thải của các loài sinh vật…tích tụ tại đáy ao nuôi được vi sinh vật chuyển hóa thành khí tác động tiêu cực đến quá trình sinh trưởng và phát triển của các loài thủy sản. Có 3 loại sulfide (H_2S, HS^- và S^{2-}) chúng tồn tại ở mức cân bằng phụ thuộc vào nhiệt độ và pH. Độc tính của sulfide chủ yếu do H_2S gây ra vì nó ức chế quá trình oxy hóa cytochrom a_3 trong quá trình hô hấp (Nicholls *et al*., 2013). Các biện pháp dùng hóa chất để xử lý sulfide chỉ mang tính chất tức thời, bị động, đồng thời làm gia tăng nguy cơ gây ô nhiễm môi trường nước nuôi trồng thủy sản. Do đó, để phòng ngừa và xử lý sulfide chủ động và thân thiện với môi trường thì việc sử dụng một số vi sinh vật có khả năng xử lý và kiểm soát tốt hàm lượng sulfide là một biện pháp phù hợp.

Vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh là nhóm vi sinh vật nhân sơ với khả năng đặc biệt về trao đổi carbon, khả năng cố định nitơ phân tử, khả năng sử dụng các hợp chất khử của lưu huỳnh làm chất cho điện tử trong quang hợp. Các chủng vi khuẩn này có thể sử dụng ánh sáng mặt trời để quang hợp nhờ có sắc tố bacteriochlorophyll trong tế bào. Vì vậy, chúng có nhiều kiểu dinh dưỡng như: quang tự dưỡng, quang dị dưỡng hoặc hóa dị dưỡng tuỳ thuộc vào sự có mặt của ánh sáng, oxy và nguồn carbon. Vi khuẩn tía quang hợp là vi khuẩn Gram âm, đơn bào, có nhiều hình dạng như: hình cầu, xoắn, hình que ngắn, hình phẩy đứng riêng lẻ hoặc đứng thành chuỗi trong những điều kiện môi trường đặc biệt. Kích thước tế bào thường từ 0,3 – 6 µm, sinh sản bằng cách nhân đôi hoặc nảy chồi (Bergey's, 2001).

Những năm gần đây vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh đang là đối tượng được quan tâm trong lĩnh vực môi trường. Zhang và đồng tác giả (2014) đã phân lập chủng *Rhodopseudomonas palustris* và tạo chế phẩm sinh học để xử lý nitơ trong nước ao nuôi cá Trắm Cỏ ở Trung Quốc. Với mục tiêu loại bỏ các kim loại nặng từ nước thải gia cầm nhóm nghiên cứu của Sayadi và đồng tác giả (2018) tại Iran đã sử dụng hai loài vi khuẩn *Rhodobacter capsulatus* và *Rhodobacter blasticus* nhằm đánh giá hiệu quả xử lý. Tuy nhiên, ở Việt Nam thì các sản phẩm vi sinh được ứng dụng để xử lý sulfide hoặc có giá thành cao hoặc chưa hiệu quả trong thực tiễn. Vì vậy ở nghiên cứu này, sẽ tiến hành phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh từ các mẫu nước thu tại các ao trên địa bàn thị xã Đông Hòa, tỉnh Phú Yên có khả năng kiểm soát tốt sulfide trong môi trường nước nuôi trồng thủy sản. Kết quả của nghiên cứu sẽ giúp tăng hiệu quả nuôi trồng thủy sản, bảo vệ môi trường và phát triển kinh tế bền vững.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mẫu nước được thu từ 20 ao (tôm thẻ chân trắng, cua biển, vẹm xanh và cá diêu hồng) ở các khu nuôi thủy sản trên địa thị xã Đông Hòa, tỉnh Phú Yên. Mẫu được thu theo TCVN 8880:2011 "Chất lượng nước – lấy mẫu để phân tích vi sinh" quy trình lấy mẫu để phân tích vi sinh vật và yêu cầu vận chuyển, xử lý và bảo quản mẫu cho đến khi bắt đầu phân tích. Sử dụng chai nhựa sạch dung tích 1000 mL, mẫu nước được lấy ở 5 – 6 vị trí khác nhau, độ sâu cách mặt nước khoảng 1 đến 1,5 m và cách bờ khoảng 1 m mỗi ao, đậy kín, đánh số, ghi địa điểm lấy mẫu, bảo quản lạnh và được vận chuyển về phòng thí nghiệm, giữ ở 4°C. Các mẫu được phân lập trong vòng không quá 24 giờ.

Phương pháp nghiên cứu

Phân lập các chủng vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh

Mẫu nước được tăng sinh vi khuẩn tía quang hợp bằng phương pháp Winogradsky's (Hunter *et al*., 2009). Các mẫu nước cho vào các chai thủy tinh thể tích 500 mL riêng biệt, sau đó bổ sung thêm 5 g $CaSO_4$ và 10 g cellulose vào và trộn đều. Một lớp paraffin với độ dày 1 cm được bổ sung trên bề mặt nhằm ngăn cản sự hòa tan chất khí vào môi trường nuôi cấy. Nuôi cấy ở nhiệt độ 28 – 30^oC, cường độ chiếu sáng 2500 LUX. Sau 2 tuần nuôi cấy, lấy 10 mL dung dịch trên cho vào 90 mL môi trường DSMZ – 27 và nuôi cấy ở cùng điều kiện. Sau khoảng một tuần, các vạch màu từ nâu vàng đến đỏ tía xuất hiện trên thành bình biểu hiện sự có mặt sắc tố đặc trưng của vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh (Nguyễn Trọng Phước *et al*., 2021). Lấy mẫu từ những bình có vạch màu rồi tiến hành phân lập trên đĩa petri chứa môi trường thạch DSMZ – 27 (bổ sung 2% agar vào môi trường DSMZ – 27). Tiến hành pha loãng xuống các nồng độ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} và cấy trang trên đĩa petri chứa môi trường thạch DSMZ – 27 agar, ủ ở điều kiện kỵ khí (trong tủ ủ CO_2), nhiệt độ từ 28 – 30^oC, chiếu sáng. Sau khoảng 3 – 5 ngày xuất hiện các khuẩn lạc tròn có màu nâu, vàng đến đỏ tía. Các khuẩn lạc này được làm thuần theo phương pháp cấy ria trên môi trường DSMZ – 27 agar và tiến hành xác định các đặc điểm hình dạng, màu sắc, hình thái tế bào bằng phương pháp nhuộm Gram và quan sát dưới vật kính 100X.

Khảo sát khả năng khử sulfide của các chủng vi khuẩn đã được làm thuần ở từng nồng độ muối NaCl khác nhau

Các chủng vi khuẩn quang hợp tía không lưu huỳnh được tuyển chọn nuôi trong 100 mL môi trường DSMZ – 27 lỏng, ánh sáng tự nhiên. Bố trí thí nghiệm 3 yếu tố hoàn toàn ngẫu nhiên: (1) yếu tố A là các chủng vi khuẩn từ T1 đến T8, (2) yếu tố B là nồng độ Na_2S ban đầu (mg/L): 10; 20 và (3) yếu tố C là điều kiện tăng sinh: hiếu khí; kỵ khí. Thí nghiệm được tiến hành với 32 nghiệm thức, lặp lại 3 lần. Khả năng khử sulfide của các chủng vi khuẩn được xác định thông qua hàm lượng sulfide còn lại bằng phương pháp Methylene Blue sau 7 ngày nuôi cấy. Thuốc thử: dung dịch PRE 1: 500 mL HCl 37% pha thành 1000 mL với nước cất, dung dịch A: Hòa tan 4 g $C_8H_{14}Cl_2N_2$ trong PRE 1 thành 1000 mL, dung dịch B: Hòa tan 16 g $FeCl_3.6H_2O$ trong PRE 1 thành 1000 mL. Tiến hành: định mức 20 mL mẫu vào bình thủy tinh. Sau đó lần lượt cho vào 1 mL thuốc thử A, 1 mL thuốc thử B. Chờ 5 phút đến khi màu xanh xuất hiện tiến hành đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 665 nm. Tương ứng với nồng độ C của mẫu ta được độ hấp thụ quang A. Dựa vào độ tương quan này để lập phương trình tương quan dạng A = aC + b và xác định hàm lượng sulfide trong mẫu.

Các chủng vi khuẩn có khả năng khử sulfide tốt ở thí nghiệm trên được tuyển chọn và nuôi cấy trong 100 mL môi trường DSMZ – 27 lỏng chứa Na_2S có nồng độ 10 mg/L ở điều kiện kỵ khí, ánh sáng tự nhiên với các nồng độ NaCl được bổ sung vào môi trường là 0, 10, 20, 30, 40‰ (Nguyễn Ngọc Phước *et al*., 2021; Trần Việt Quyền et al., 2022). Khả năng khử sulfide của các chủng vi khuẩn được xác định thông qua hàm lượng sulfide còn lại bằng phương pháp Methylene Blue, đồng thời tiến hành xác định mật độ vi khuẩn bằng phương pháp đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 660 nm sau 7 ngày. Xây dựng đường chuẩn tương quan giữa OD và mật độ tế bào (log_{10} CFU/mL): dịch tăng sinh sau 7 ngày nuôi cấy được pha loãng đạt các giá trị OD lân cận là: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5. Xác định giá trị thực tế OD ở 660 nm bằng phương pháp cấy trang trên đĩa môi trường DSMZ – 27 agar để xác định mật độ vi khuẩn.

Khảo sát khả năng tăng sinh của các chủng vi khuẩn ở điều kiện pH và độ rọi khác nhau

Từ thí nghiệm khảo sát khả năng khử sulfide và chịu mặn ở trên chọn ra 2 chủng có đặc tính tốt. Tiến hành nhân nuôi sinh khối trong bình hình trụ với 100 mL môi trường DSMZ – 27 (bổ sung 100 µL với mật độ vi khuẩn 10^5

CFU/mL). Bố trí thí nghiệm 2 yếu tố hoàn toàn ngẫu nhiên: (1) yếu tố A là pH: 5; 6; 7; 8 và (2) yếu tố B là cường độ chiếu sáng LUX (độ rọi): 750 LUX; 1500 LUX; 3000 LUX (chiếu sáng liên tục 24/24 giờ). Thí nghiệm được tiến hành với 12 nghiệm thức, lặp lại 3 lần, chỉ tiêu theo dõi là mật độ vi khuẩn. Ghi nhận kết quả sau mỗi 24 giờ trong vòng 7 ngày bằng phương pháp đo mật độ quang (OD) ở bước sóng 660 nm.

Định danh các chủng vi khuẩn bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Chủng vi khuẩn được tuyển chọn và nuôi cấy tăng sinh trong môi trường DSMZ – 27 lỏng, ở điều kiện kỵ khí có chiếu sáng (cường độ chiếu sáng 3000 LUX) trong vòng 7 ngày. Tiến hành ly trích DNA tổng số của vi khuẩn. Thực hiện phản ứng PCR với các thành phần: 2,5 µL đệm PCR; 0,5 µL DNA tổng số; 0,5 µL dNTPs; 1 µL mỗi loại mồi và 0,2 µL Taq polymerase. 27F: 5’ AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3’; 1492R: 5‘ GGTTACCTTGTTACGACTT 3’ (Lane, 1991). Chu trình nhiệt của phản ứng PCR gồm: Chu kỳ đầu biến tính ở 95^{o}C trong vòng 5 phút; Các chu kỳ sau biến tính 95^{o}C trong 30 giây; Bắt cặp mồi ở 52^{o}C trong 1 phút; kéo dài mạch ở 72^{o}C trong 30 giây (thực hiện 35 chu kỳ). Chu kỳ cuối thực hiện ở 72^{o}C trong 5 phút; rồi hạ nhiệt độ xuống 4^{o}C. Sản phẩn PCR được chạy điện di và Giải trình tự bằng bộ hóa chất BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit trên máy ABI 3500. Xây dựng cây phát sinh loài, kết quả đọc trình tự được so sánh trên ngân hàng gene NCBI để định danh loài. Sau đó xây dựng cây phát sinh loài bằng phần mềm MEGA 11. Các trình tự DNA được kiểm tra và được xác nhận với công cụ BLAST.

Khảo sát khả năng xử lý sulfide của vi khuẩn Rhodopseudomonas palustris (T8) điều kiện ngoài ao *nuôi*

Chủng vi khuẩn có khả năng khử sulfide và chịu mặn tốt, sẽ được nhân nuôi sinh khối trong môi trường DSMZ – 27 lỏng, ở nhiệt độ 28 – 30^{o}C. Sau 7 ngày, đo quang phổ hấp phụ ở 660 nm (OD660) xác định mật độ vi khuẩn. Tiến hành thu mẫu nước ở các vị trí gần đáy ao, gần bờ ao, giữa ao và gần hệ thống cấp thoát nước, sau khi thu thập đủ số lượng mẫu từ các vị trí và độ sâu khác nhau, trộn đều các mẫu này lại để tạo thành một mẫu tổng hợp nhằm đảm bảo tính đại diện cho toàn bộ ao. Mẫu nước được thu tại ao nuôi tôm của hộ Trần Văn Kiều, thôn Phước Long, xã Hòa Tâm, thị xã Đông Hòa, tỉnh Phú Yên và xác định hàm lượng sulfide trước xử lý. Sau đó, lấy 1 lít dịch vi khuẩn pha vào 100 lít nước sạch, rồi tạt đều xuống ao nuôi thủy sản chứa 1000 m^3 nước, trong điều kiện ánh sáng tự nhiên, không sục khí. Thu mẫu nước theo TCVN 5993:1995 (ISO 5667-3: 1985) về chất lượng nước - lấy mẫu – hướng dẫn bảo quản và xử lý mẫu, xác định chỉ số sulfide sau mỗi 24 giờ trong vòng 7 ngày xử lý.

Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả được thể hiện dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn của ba lần lặp lại. Số liệu được phân tích trắc nghiệm phân hạn bằng phần mềm xử lý số liệu thống kê chuyên dụng Minitab 17. Kiểm định Tukey được thực hiện để đánh giá mức độ khác biệt có ý nghĩa giữa các giá trị với mức ý nghĩa $p < 0,05$.

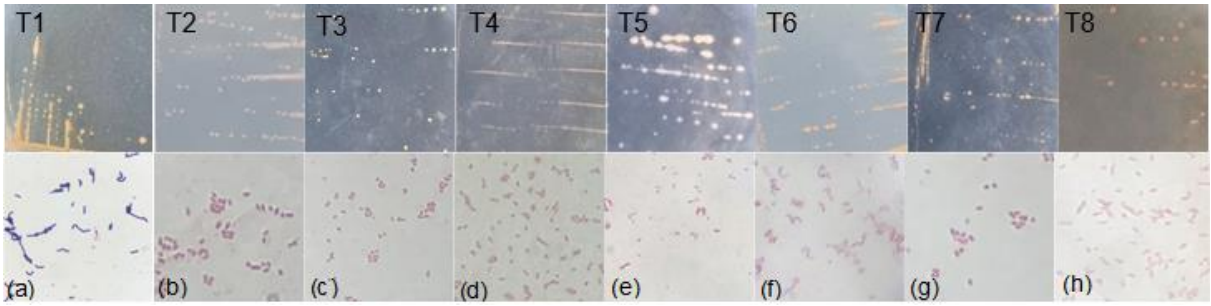
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân lập vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh

Bảng 1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn phân lập được

Ký hiệu	Phân lập tại	Hình dạng	Đường kính khuẩn lạc	Bề mặt	Sắc tố	Gram	Hình thái tế bào
T1	Ao nuôi tôm	Tròn	3,1 – 3,5 mm	Nhầy, lồi	Cam	+	Que
T2	Ao nuôi cua	Tròn	2,1 – 2, 5 mm	Lồi	Hồng	-	Cầu
T3	Ao nuôi tôm	Tròn	1,5 – 1,8 mm	Lồi	Cam	-	Cầu
T4	Ao nuôi cá	Tròn	1,0 – 1,3 mm	Lồi	Hồng	-	Cầu
T5	Ao nuôi cá	Tròn	4,3 – 4,8 mm	Nhầy, lồi	Cam	-	Que ngắn
T6	Ao nuôi tôm	Tròn	2,3 – 2,6 mm	Lồi	Cam	-	Cầu
T7	Ao nuôi tôm	Tròn	2,0 – 2,2 mm	Lồi	Cam	-	Cầu
T8	Ao nuôi vẹm xanh	Tròn	3,5 – 3,8 mm	Lồi	Đỏ tía	-	Que ngắn

Từ 20 mẫu nước đã phân lập được 8 chủng vi khuẩn với hình dạng, màu sắc khuẩn lạc và hình thái tế bào trong môi trường DSMZ – 27 agar được thể hiện ở bảng 1. Từ bảng 1 nhận thấy, ghi nhận được 5/8 chủng có màu cam 62,5%, 2/8 chủng có màu hồng chiếm 25%, 1/8 chủng có màu đỏ tía chiếm 12,5%. Bề mặt khuẩn lạc của các chủng vi khuẩn hầu hết là lồi, tròn, riêng chủng T1 và T5 nhận thấy có thêm đặc điểm nhầy nhớt. Tất cả 8 chủng vi khuẩn phân lập được nhuộm Gram và quan sát dưới kính hiển vi vật kính 100X, cho kết quả 7/8 chủng là Gram âm 87,5%, 1/8 chủng là Gram dương 12,5%. Trong đó 1/8 chủng hình que chiếm 12,5%, 2/8 chủng hình que ngắn 25% và 5/8 chủng hình cầu chiếm 62,5%. Theo Bergey’s (2001), vi khuẩn tía quang hợp là vi khuẩn Gram âm, đơn bào, có nhiều hình dạng như: hình cầu, xoắn, hình que ngắn, hình phẩy đứng riêng lẻ hoặc đứng thành chuỗi trong những điều kiện môi trường đặc biệt. Cụ thể hình khuẩn lạc mọc trên môi trường DSMZ – 27 bổ sung 2% agar trong đĩa petri và hình thái tế bào soi dưới kính hiển vi của từng chủng được thể hiện ở hình 1.



Hình 1. Khuẩn lạc và hình thái tế bào của vi khuẩn tía quang hợp sau 5 ngày dưới vật kính 100X.
(a) chủng T1; (b) chủng T2; (c) chủng T3; (d) chủng T4; (e) chủng T5; (f) chủng T6; (g) chủng T7; (h) chủng T8.

Kết quả khảo sát khả năng xử lý sulfide của các chủng vi khuẩn ở từng nồng độ muối NaCl khác nhau

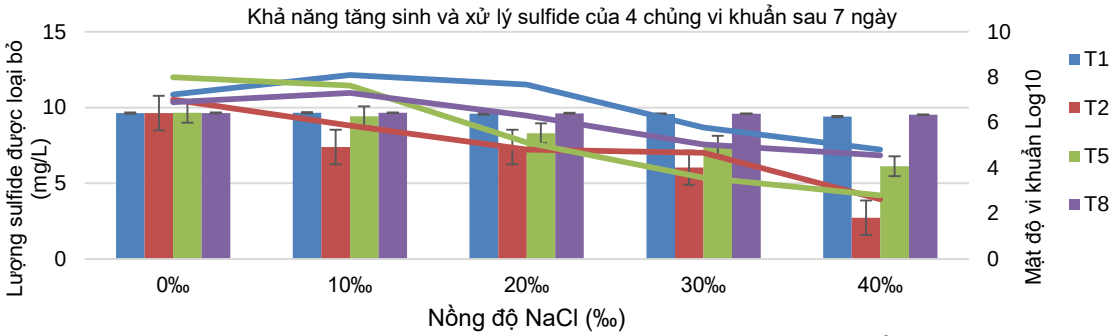
Chọn lọc 8 chủng vi khuẩn được nuôi cấy tăng sinh cấp 1 trong môi trường DSMZ – 27 lỏng. Sau 7 ngày, tiến hành tăng sinh cấp 2 trên môi trường DSMZ – 27 lỏng chứa Na_2S có nồng độ 10 và 20 mg/L ở điều kiện hiếu khí và kỵ khí.

Bảng 2. Hiệu suất xử lý sulfide của các chủng vi khuẩn sau 7 ngày nuôi cấy

Ký hiệu chủng	Hiệu suất loại bỏ sulfide (%)			
	Hiếu khí (10 mg/L)	Kỵ khí (10 mg/L)	Hiếu khí (20 mg/L)	Kỵ khí (20 mg/L)
T1	$26,74^{hi} \pm 0,50$	$96,52^{a} \pm 0,15$	$12,44^{o} \pm 0,25$	$68,28^{d} \pm 0,09$
T2	$15,49^{m} \pm 0,30$	$96,50^{a} \pm 0,17$	$8,89^{q} \pm 0,09$	$60,86^{e} \pm 0,16$
T3	$16,37^{m} \pm 0,38$	$18,55^{k} \pm 0,19$	$10,42^{p} \pm 0,16$	$20,19^{j} \pm 0,09$
T4	$26,19^{i} \pm 0,68$	$91,66^{c} \pm 0,08$	$13,80^{n} \pm 0,09$	$61,62^{e} \pm 0,09$
T5	$16,37^{m} \pm 0,80$	$96,68^{a} \pm 0,02$	$7,58^{r} \pm 0,19$	$68,01^{d} \pm 0,19$
T6	$19,31^{jk} \pm 0,38$	$94,85^{b} \pm 0,08$	$5,66^{s} \pm 0,16$	$50,76^{g} \pm 0,25$
T7	$27,29^{h} \pm 0,33$	$94,65^{b} \pm 0,15$	$6,10^{s} \pm 0,25$	$53,16^{f} \pm 0,16$
T8	$17,35^{i} \pm 0,19$	$96,66^{a} \pm 0,07$	$12,71^{o} \pm 0,16$	$68,28^{d} \pm 0,19$

Các giá trị trong cùng một bảng có các chữ cái a, b, c, d… giống nhau biểu thị khác biệt không có ý nghĩa thống kê (P = 0,05).

Dựa vào Bảng 2 cho thấy khả năng xử lý sulfide của các chủng vi khuẩn ở điều kiện kỵ khí cao hơn đáng kể so với điều kiện hiếu khí. Trong môi trường hiếu khí, oxy hiện diện có thể làm giảm khả năng xử lý sulfide của vi khuẩn do sự cạnh tranh về nguồn năng lượng. Một số loài vi khuẩn thường ưu tiên sử dụng oxy cho quá trình hô hấp hiếu khí, một quá trình cung cấp nhiều năng lượng hơn so với việc xử lý sulfide. Trong điều kiện kỵ khí, với hàm lượng sulfide ban đầu là 10 mg/L, chủng T5, T8, T1 và T2 có khả năng khử sulfide tốt nhất và không khác biệt ý nghĩa về mặt thống kê giữa 4 chủng này, hiệu suất loại bỏ sulfide ở ngày thứ 7 lần lượt là: 96,68; 96,66; 96,52 và 96,5%. Chủng T3 khử sulfide thấp nhất, sau 7 ngày hiệu suất loại bỏ sulfide. chỉ đạt 18,55%. Khi nồng độ sulfide ban đầu được tăng lên 20 mg/L, hiệu suất xử lý sulfide của các chủng vi khuẩn đều giảm so với ở nồng độ sulfide 10 mg/L. Sau 7 ngày ba chủng T1, T8 và T5 cho có năng loại bỏ sulfide tốt (hiệu suất 68,28; 68,28 và 68,01%) không khác biệt ý nghĩa, trong khi đó chủng T3 vẫn cho thấy hiệu quả xử lý thấp nhất. Có thể thấy, vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh có khả năng xử lý sulfide tối ưu trong khoảng nồng độ sulfide nhất định, khi nồng độ sulfide tăng lên gần ngưỡng chịu đựng, thì khả năng tăng sinh của vi khuẩn có thể giảm kéo theo hiệu xuất xử lý sulfide giảm đi và chúng cần thêm thời gian để xử lý sulfide. Nếu nồng độ sulfide tiếp tục tăng lên mức cao hơn, có thể dẫn đến tình trạng ức chế hoàn toàn hoặc thậm chí là chết tế bào (Hunter *et al*., 2009). Dựa vào kết quả trên chọn được 4 chủng vi khuẩn là T1, T2, T5 và T8 tiến hành khảo sát khả năng tăng sinh và xử lý sulfide ở các nồng độ muối từ 0 – 40‰.



Hình 2. Khả năng tăng sinh và xử lý sulfide sau 7 ngày của 4 chủng vi khuẩn T1, T2, T5 và T8 ở các nồng độ muối khác nhau

Từ hình 2 cho thấy chủng T1 và T8 có hiệu quả cao trong việc xử lý sulfide tại nồng độ muối 0‰ với lượng sulfide xử lý lần lượt là 9,64 mg/L và 9,65 mg/L. Tại nồng độ này, không có sự khác biệt đáng kể về mặt thống kê trong khả năng xử lý sulfide giữa các chủng vi khuẩn. Tương tự, chủng T5 thể hiện hiệu quả cao ở các nồng độ muối thấp, cụ thể là 0‰ và 10‰ với lượng sulfide xử lý lần lượt là 9,67 mg/L và 9,43 mg/L. Tuy nhiên, cả chủng T2 và T5 đều cho thấy sự hạn chế trong khả năng xử lý khi nồng độ NaCl trong môi trường tăng cao (ở nồng độ muối 40‰) lần lượt là 2,73 và 6,13 mg/L. Ngược lại, chủng T8 lại cho thấy khả năng xử lý sulfide ổn định tại các nồng độ muối khác nhau (9,54 mg/L ở 40‰). Dựa vào kết quả khảo sát mật độ vi sinh vật trên từng nồng độ muối, sau 7 ngày cả 4 chủng đều cho thấy sự phát triển mạnh mẽ ở mức nồng độ NaCl 0‰. Khi nồng độ NaCl tăng dần lên đến 40‰, sự tăng sinh của chúng bị suy giảm rõ rệt. Trong đó, chủng T2 và T5 chỉ đạt mật số vi khuẩn lần lượt là 2,63 và 2,80 Log_{10} CFU/mL (tương đương 4,27 x 10^2 và 6,31 x 10^2 CFU/mL). Ngược lại, chủng T1 và T8 lại thể hiện khả năng thích ứng môi trường có độ mặn cao, với mật số vi khuẩn là 4,82 và 4,57 Log_{10} CFU/mL (6,61 x 10^4 và 3,72 x 10^4 CFU/mL) tại 40‰. Ở nồng độ muối 10‰, cả hai chủng T1 và T8 duy trì được khả năng tăng sinh tốt đạt mật số lần lượt là 8,11 và 7,32 Log_{10} CFU/mL (1,29 x 10^8 và 2,09 x 10^7 CFU/mL).

Kết quả khảo sát khả năng tăng sinh của các chủng vi khuẩn ở từng điều kiện pH và độ rọi khác nhau

Dựa vào bảng 3 cho thấy, sau 7 ngày nuôi cấy chủng T1 phát triển cao nhất ở pH từ 6 – 7 và cường độ chiếu sáng thích hợp ở 1500 đến 3000 LUX. Cho thấy khả năng thích nghi ở các điều kiện môi trường thay đổi khác nhau. Ở điều kiện pH = 7 cường độ chiếu sáng đạt 3000 LUX, sau 7 ngày nuôi cấy mật độ vi khuẩn đạt giá trị cao nhất 8,18 Log_{10} CFU/mL (tương đương 1,51 x 10^8 CFU/mL). Chủng T1 thể hiện khả năng thích nghi và phát triển mạnh trong điều kiện pH trung tính và ánh sáng cao, cho thấy tiềm năng ứng dụng trong nhiều môi trường khác nhau, giúp tối ưu hóa quá trình nuôi cấy và sản xuất vi sinh vật.

Bảng 3. Khả năng tăng sinh của chủng T1 trong điều kiện pH và độ rọi khác nhau

Nghiệm thức (pH-độ rọi)	Mật độ vi khuẩn (Log_{10} CFU/mL)						
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5	Ngày 6	Ngày 7
5 - 750	1,98^{a} ± 0,01	2,41^{bc} ± 0,03	2,93^{b} ± 0,03	4,04^{de} ± 0,05	4,64^{de} ± 0,02	5,75^{d} ± 0,02	7,08^{e} ± 0,02
6 - 750	2,04^{a} ± 0,03	2,42^{abc} ± 0,04	3,02^{ab} ± 0,02	4,06^{de} ± 0,04	4,70^{cde} ± 0,04	5,89^{c} ± 0,01	7,55^{d} ± 0,05
7 - 750	2,03^{a} ± 0,05	2,44^{abc} ± 0,05	3,03^{ab} ± 0,03	4,10^{bcde} ± 0,04	4,68^{cde} ± 0,04	5,96^{c} ± 0,04	7,60^{cd} ± 0,03
8 - 750	2,05^{a} ± 0,04	2,40^{c} ± 0,03	2,99^{ab} ± 0,03	4,01^{e} ± 0,05	4,60^{e} ± 0,05	5,90^{c} ± 0,02	7,16^{e} ± 0,03
5 - 1500	2,03^{a} ± 0,04	2,45^{abc} ± 0,02	2,99^{ab} ± 0,03	4,10^{bcde} ± 0,04	4,71^{bcd} ± 0,02	6,10^{b} ± 0,03	7,60^{cd} ± 0,02
6 - 1500	2,06^{a} ± 0,03	2,46^{abc} ± 0,03	3,03^{a} ± 0,01	4,12^{bcde} ± 0,03	4,77^{abc} ± 0,06	6,25^{a} ± 0,02	8,08^{a} ± 0,05
7 - 1500	2,07^{a} ± 0,06	2,46^{abc} ± 0,04	3,05^{a} ± 0,04	4,19^{abc} ± 0,04	4,77^{abc} ± 0,05	6,33^{a} ± 0,05	8,15^{a} ± 0,05
8 - 1500	2,08^{a} ± 0,01	2,44^{abc} ± 0,00	3,00^{ab} ± 0,02	4,07^{cde} ± 0,04	4,67^{cde} ± 0,02	6,25^{a} ± 0,02	7,69^{bc} ± 0,02
5 - 3000	2,07^{a} ± 0,04	2,48^{abc} ± 0,02	3,00^{ab} ± 0,03	4,19^{abc} ± 0,04	4,78^{abc} ± 0,02	6,12^{b} ± 0,03	7,66^{bcd} ± 0,04
6 - 3000	2,08^{a} ± 0,05	2,50^{ab} ± 0,03	3,04^{a} ± 0,02	4,21^{ab} ± 0,02	4,84^{a} ± 0,05	6,27^{a} ± 0,03	8,13^{a} ± 0,06
7 - 3000	2,07^{a} ± 0,04	2,51^{a} ± 0,03	3,07^{a} ± 0,07	4,25^{a} ± 0,03	4,8^{ab} ± 0,00	6,33^{a} ± 0,03	8,18^{a} ± 0,06
8 - 3000	2,04^{a} ± 0,05	2,47^{abc} ± 0,02	3,01^{ab} ± 0,03	4,16^{abcd} ± 0,04	4,74^{abcd} ± 0,03	6,27^{a} ± 0,05	7,75^{b} ± 0,03

Các giá trị trong cùng một cột có các chữ cái a, b, c, d, e giống nhau biểu thị khác biệt không có ý nghĩa thống kê (P = 0,05).

Dựa vào bảng 4 cho thấy, khả năng tăng sinh ở các điều kiện khác nhau của chủng T8 sau 7 ngày có sự phát triển tốt trong điều kiện pH từ 6 – 7, độ rọi thích hợp từ 1500 đến 3000 LUX, đạt mật số cao nhất ở 3000 LUX với

pH = 6 là 9,83 Log_{10} CFU/mL (6,76 x 10^9 CFU/mL). Ở 750 LUX (tương tự điều kiện dưới đáy ao nuôi) vẫn có sự phát triển của vi khuẩn tía quang hợp với mật độ vi khuẩn khoảng 9,04 đến 9,29 Log_{10} CFU/mL (1,10 x 10^9 đến 1,66 x 10^9 CFU/mL).

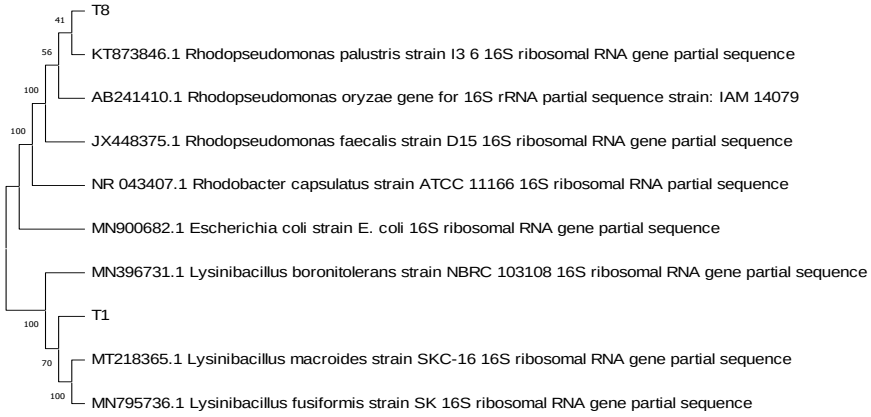
Bảng 4. Khả năng tăng sinh của chủng T8 trong điều kiện pH và độ rọi khác nhau

Nghiệm thức (pH- độ rọi)	Mật độ vi khuẩn (Log_{10} CFU/mL)						
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5	Ngày 6	Ngày 7
5 - 750	2,14 ± 0,03	2,54 ± 0,04	3,20^{b} ± 0,03	4,66^{e} ± 0,02	5,76^{f} ± 0,08	7,58^{g} ± 0,04	9,04^{f} ± 0,06
6 - 750	2,13 ± 0,04	2,56 ± 0,01	3,28^{ab} ± 0,04	4,77^{bcde} ± 0,02	6,01^{cde} ± 0,08	7,96^{de} ± 0,04	9,29^{e} ± 0,03
7 - 750	2,14 ± 0,04	2,58 ± 0,03	3,27^{ab} ± 0,04	4,71^{cde} ± 0,04	5,98^{de} ± 0,08	7,94^{de} ± 0,07	9,22^{e} ± 0,04
8 - 750	2,18 ± 0,01	2,52 ± 0,03	3,23^{ab} ± 0,06	4,70^{de} ± 0,06	5,87^{ef} ± 0,06	7,80^{f} ± 0,03	9,04^{f} ± 0,05
5 - 1500	2,14 ± 0,06	2,56 ± 0,04	3,25^{ab} ± 0,01	4,75^{bcde} ± 0,01	5,99^{cde} ± 0,03	7,80^{f} ± 0,03	9,48^{d} ± 0,05
6 - 1500	2,15 ± 0,02	2,57 ± 0,04	3,31^{ab} ± 0,03	4,82^{abc} ± 0,06	6,24^{ab} ± 0,06	8,18^{ab} ± 0,01	9,70^{abc} ± 0,02
7 - 1500	2,13 ± 0,07	2,60 ± 0,05	3,32^{ab} ± 0,03	4,80^{abcd} ± 0,03	6,21^{ab} ± 0,06	8,16^{ab} ± 0,02	9,67^{bc} ± 0,05
8 - 1500	2,17 ± 0,05	2,54 ± 0,01	3,27^{ab} ± 0,05	4,79^{bcd} ± 0,06	6,10^{bcd} ± 0,02	8,03^{cd} ± 0,04	9,49^{d} ± 0,06
5 - 3000	2,17 ± 0,04	2,57 ± 0,03	3,27^{ab} ± 0,02	4,80^{abcd} ± 0,02	6,04^{cd} ± 0,02	7,88^{ef} ± 0,04	9,57^{cd} ± 0,02
6 - 3000	2,16 ± 0,09	2,58 ± 0,02	3,34^{a} ± 0,08	4,91^{a} ± 0,01	6,29^{a} ± 0,04	8,26^{a} ± 0,05	9,83^{a} ± 0,04
7 - 3000	2,17 ± 0,02	2,60 ± 0,04	3,33^{a} ± 0,03	4,85^{ab} ± 0,04	6,26^{ab} ± 0,04	8,24^{a} ± 0,04	9,77^{ab} ± 0,01
8 - 3000	2,21 ± 0,05	2,54 ± 0,00	3,29^{ab} ± 0,07	4,84^{ab} ± 0,04	6,15^{abc} ± 0,03	8,11^{bc} ± 0,01	9,58^{cd} ± 0,10

Các giá trị trong cùng một cột có các chữ cái a, b, c, d, e, f giống nhau biểu thị khác biệt không có ý nghĩa thống kê (P = 0,05).

Kết quả định danh các chủng vi khuẩn bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Qua quá trình ly trích và giải trình tự 16S – rRNA của hai chủng T1 và T8, kết quả thu nhận đoạn trình tự mã hóa acid nucleic và phân tích trên NCBI. Tiến hành xác định độ tương đồng với các đoạn trình tự có sẵn trên NCBI của các chủng vi khuẩn tía quang hợp và vẽ cây phả hệ bằng phần mềm MEGA 11. Kết quả này có thể giúp xác định quan hệ tiến hóa và đặc điểm di truyền của 2 chủng vi khuẩn phân lập được với dữ liệu tổng hợp có sẵn.



Hình 3. Kết quả phân tích cây phả hệ của chủng T1 và T8

Chủng T1 có trình tự 16S – rRNA tương đồng cao nhất với các loài *Lysinibacillus macroides* (99,81%) và *Lysinibacillus fusiformis* (99,81%). So sánh đặc điểm hình thái và trình tự 16S – rRNA với các trình tự trên cây phả hệ xác định chủng T1 là vi khuẩn *Lysinibacillus* sp.. Đây là những vi khuẩn Gram dương được biết đến có khả năng sinh bào tử trong điều kiện bất lợi về sinh dưỡng, bào tử của một số loài thuộc chi vi khuẩn *Lysinibacillus* đã được phát hiện có thể bắt màu thuốc thử safranine hoặc fuchsin (Liu *et al*., 2019), điều này có thể là nguyên nhân gây nhầm lẫn ở bước nhuộm Gram ban đầu xác định chủng T1 là Gram âm. Sau kết quả định danh sinh học phân tử thì chủng T1 đã được thực hiện nhuộm Gram lại với kết quả là Gram dương. Tính ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản của *Lysinibacillus macroides* đã được đề cập với khả năng ảnh hưởng tích cực đến đáp ứng miễn dịch và kháng bệnh do *Streptococcus iniae* của cá chẽm (Trương Thị Hoa *et al*., 2020). Chủng T8 có trình tự mã hóa 16S – rRNA tương đồng cao nhất với loài *Rhodopseudomonas palustris* (100%) nên chủng T8 là loài vi khuẩn *Rhodopseudomonas palustris*. Đây là vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh được ứng dụng rộng rải trong xử lý môi trường. Trong nuôi trồng thủy sản *R. palustris* cho thấy khả năng xử lý tốt

các khí độc như NO_2^-, NO_3^- và H_2S. Nghiên cứu của Peirong và Wei (2013) đã sử dụng bộ lọc sinh học dạng tầng sôi kết hợp cố định vi khuẩn *Rhodopseudomonas palustris* để loại bỏ amoniac và duy trì sức khỏe cá trong hệ thống nuôi trồng thủy sản tuần hoàn, kết quả cho thấy chất lượng nước và hiệu suất xử lý amoniac được cải thiện, với tỷ lệ loại bỏ tổng NH_3-N là 80 – 95%. Như vậy chủng T8 phù hợp với mục đích nghiên cứu đề ra ban đầu.

Kết quả khảo sát khả năng xử lý sulfide của *Rhodopseudomonas palustris (T8)* điều kiện ngoài ao nuôi

Bảng 5. Khả năng xử lý sulfide của *Rhodopseudomonas palustris* trong điều kiện ngoài ao nuôi.

Chỉ tiêu theo dõi	Trước xử lý	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5	Ngày 6	Ngày 7
Lượng sulfide còn lại (mg/L)	1,716	1,638	1,464	1,196	0,911	0,670	0,340	0,162

Sau 7 ngày xử lý ao nuôi tôm với chủng T8 thì lượng sulfide trong ao giảm liên tục từ 1,716 mg/L xuống còn 0,162 mg/L (hiệu suất đạt 90,56%). Trong hai ngày đầu, chủng T8 thích nghi với điều kiện môi trường nước ở ao nuôi nên lượng sulfide giảm chậm chỉ đạt trung bình 0,126 mg/L mỗi ngày. Ở ngày thứ 3 đến ngày thứ 6, lượng sulfide giảm nhanh trung bình 0,281 mg/L mỗi ngày là do chủng T8 bắt đầu tăng sinh nhanh và khử sulfide có trong môi trường nước mạnh. Tuy nhiên, ở ngày thứ 7 nhận thấy lượng sulfide được chủng T8 xử lý chậm lại đạt 0,178 mg/L. Điều này có thể lý giải là ở những ao nuôi trồng thủy sản thì lượng sulfide liên tục được sinh ra do các loài thủy sản trong ao nuôi thải phân, thức ăn dư thừa lắng đọng, hoạt động phân huỷ của hệ vi sinh đáy ao… Vì thế, lượng sulfide luôn được duy trì ở một nồng độ tối thiểu nhất định. Mặt khác, vi khuẩn *Rhodopseudomonas palustris* được biết đến với khả năng đa dạng về sinh dưỡng (Hunter *et al.*, 2009). Trong đó hàm lượng sulfide ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình tăng sinh của chúng theo con đường quang hợp, với việc sử dụng các hợp chất khử của lưu huỳnh làm chất cho điện tử. Khi nồng độ sulfide giảm xuống mức tối thiểu, vi khuẩn tía quang hợp có xu hướng thay đổi con đường sinh dưỡng theo hướng có lợi. Do đó chuyển dần từ quang hợp sang sử dụng các hợp chất hữu cơ phù hợp hơn cho quá trình sinh trưởng và phát triển.

KẾT LUẬN

Từ 20 mẫu nước thu ở các ao nuôi thủy sản tại thị xã Đông Hòa, tỉnh Phú Yên đã phân lập được 8 chủng vi khuẩn có khả năng xử lý sulfide. Trong đó, chủng T1 và T8 có khả năng tăng sinh và xử lý sulfide tốt ở nồng độ sulfide 10 mg/L, trong môi trường bổ sung muối NaCl từ 0 – 40‰, pH từ 6 – 7, độ rọi từ 1500 – 3000 LUX. Kết quả định danh được chủng T1 là *Lysinibacillus* sp. và chủng T8 là *Rhodopseudomonas palustris*. Chủng vi khuẩn *Rhodopseudomonas palustris* có khả năng loại bỏ 90,56% lượng sulfide trong môi trường nước nuôi trồng thủy sản ngoài thực tế sau 7 ngày. Vì vậy chủng *Rhodopseudomonas palustris* có khả năng xử lý sulfide hiệu quả và tiềm năng ứng dụng cao trong nuôi trồng thủy sản, góp phần cải thiện chất lượng môi trường ao nuôi thủy sản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bergey’s (2001). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. *Springer Link, New York, USA*.

Hunter CN, Daldal F, Thurnanuer MC, Beatty JT (2009). The Purple Phototrophic Bacteria. eds. Godvindjee, *University of Illinois, Urbana, Illinois, USA*: 2-12.

Lane DJ, Stackebrandt E, Goodfellow M (1991). 16S/23S rRNA Sequencing. In Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. New York, NY, USA*:115-175.

Liu P, Zhou R, Yin T, Wang Q, Guo Z, Tian Q, Bilal M, He S, Zhu X, Shi H, Li X (2019). Novel bio-fabrication of silver nanoparticles using the cell-free extract of *Lysinibacillus fusiformis* sp. and their potent activity against pathogenic fungi. *Materials Research Express*, 6(12): 1250-1252.

Nguyễn Ngọc Phước, Nguyễn Nam Quang và Nguyễn Đức Quỳnh Anh (2021). Phân lập vi khuẩn tía quang hợp từ bùn đáy ao nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*, boone, 1931) tại tỉnh Thừa thiên – Huế. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 2: 84 – 90.

Nicholls P, Marshall DC, Cooper CE, Wilson MT (2013). Sulfide inhibition of and metabolism by cytochrome c oxidase. *Biochemical Society transactions*, 41(5): 1312–1316.

Peirong Z, Wei L (2013). Use of fluidized bed biofilter and immobilized Rhodopseudomonas palustris for ammonia removal and fish health maintenance in a recirculation aquaculture system. *Aquaculture Research*. 44(3):327-34.

Sayadi MH, Nourzadeh M (2018). Potential of anaerobically digested poultry wastewater for metal biosorption by Rhodobacter blasticus and Rhodobacter capsulatus. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 8: 47–55.

Trần Việt Quyền, Trần Hoàng Khang và Trần Văn Bé (2022). Phân lập, tuyển chọn và định danh vi khuẩn tía không lưu huỳnh, thử nghiệm khả năng xử lý sulfide trong nước ao nuôi tôm tại huyện Kiên Lương, tỉnh Kiên Giang. *Tạp chí Công thương*, 10: 380-386.

Trương Thị Hoa, Nguyễn Duy Quỳnh Trâm, Trần Nam Hà (2020). Ảnh hưởng của vi khuẩn *Lysinibacillus macroides* đến đáp ứng miễn dịch và khả năng kháng bệnh do *Streptococcus* iniae của cá chẽm (*Lates calcarifer*). *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2020*: 649 – 654.

Zhang X, Shu M, Wang Y, Fu L, Li W, Deng B, Liang Q, Shen W (2014). Effect of photosynthetic bacteria on water quality and microbiota in grass carp culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30: 2523–2531.

ISOLATION AND SELECTION OF PURPLE NON-SULFUL PHOTOSYNTHETIC BACTERIA STRATES CAPABLE OF SULFIDE TREATMENT IN AQUACULTURAL WATER ENVIRONMENT IN DONG HOA TOWN, PHU YEN PROVINCE

Huynh Tan Trong[1], Truong Phuoc Thien Hoang[2], Vo Tran Quoc Thang[2], Le Quoc Huy[1], Le Phuoc Tho[3*]

[1]*Department of Biological Sciences, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam*

[2]*Institute of Biotechnology and Environmental Research, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam*

[3]*Bio Nong Lam Company Limited, Ho Chi Minh City, Vietnam*

SUMMARY

In aquaculture, controlling sulfide content in the water environment is a very important issue because this is a deadly agent for aquatic animals and also causes a foul odor in the pond. In this study, non-sulfur photosynthetic purple bacteria were isolated and selected from 20 water samples in aquaculture ponds in Dong Hoa town, Phu Yen province. The result was the isolation of 8 microbial strains labeled T1, T2, ... T8 that have the ability to process sulfide, of which strain T8 was identified by molecular biology as *Rhodopseudomonas palustris*. Under anaerobic conditions with natural light, strain T8 has a high ability to remove sulfide (96.7% sulfide when grown in an environment with a sulfide content of 10 mg/L). At salt concentrations from 0 to 40‰, strain T8 proliferates well and reaches densities from 4.57 Log_{10} CFU/mL (equivalent 3.72 x 10^4 CFU/mL, at salt concentration 40‰) to 7.31 Log_{10} CFU/mL (2.04 x 10^7 CFU/mL, at salt concentration 10‰). pH conditions from 6 to 7, and illuminance from 1500 to 3000 LUX (continuous illumination 24/24 hours) are most suitable for strain T8 to proliferate with a high density of 9.67 to 9.83 Log_{10} CFU/mL (5.01 to 6.76 x 10^9 CFU/mL). The ability of strain T8 to remove sulfide from actual ponds was found. After 2, 4, and 7 days of treatment, the amount of sulfide in aquaculture ponds decreased from 1.716 mg/L to 1.464 mg/L, 0.911 mg/L, and 0.162 mg/L (90.56% reduction). Thus, the bacteria *Rhodopseudomonas palustris* (T8 strain) has high potential for practical application in implementing effective sulfide treatment in aquaculture water environments.

Keywords: Aquaculture, isolated, photosynthetic purple bacteria, *Rhodopseudomonas palustris*, sulfide.

[*] Author for correspondence: Tel +84-909575223; Email: phuoctho022010@gmail.com

NHÂN GIỐNG CÂY HOA CÚC MÂM XÔI (*CHRYSANTHEMUM* SP.) BẰNG NUÔI CẤY MÔ KẾT HỢP VI THỦY CANH

Nguyễn Tất Nghiệp[1,3], Ngô Thị Thương[1], Nguyễn Thị Thu Hiền[1], Chu Đức Hà[2], Bùi Thùy Liên[1,4], Cao Phi Bằng[5], La Việt Hồng[1*]

[1]*Viện Nghiên cứu Khoa học và Ứng dụng, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2*

[2]*Khoa Công nghệ Nông nghiệp, Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội*

[3]*Trường THCS Hưng Thái, Hưng Long, Ninh Giang, Hải Dương*

[4]*Khoa Sư phạm Trung học, Trường Đại học Hoa Lư, Ninh Bình*

[5]*Khoa Khoa học Tự nhiên, Trường Đại học Hùng vương, Phú Thọ*

TÓM TẮT

Cây hoa cúc mâm xôi là một trong những loại hoa cúc trồng chậu phổ biến ở Việt Nam và trên thế giới. Trong nghiên cứu này, cây hoa cúc mâm xôi được nhân nhanh bằng kỹ thuật nuôi cấy mô kết hợp vi thủy canh. Kết quả cho thấy, môi trường thích hợp cho nhân nhanh chồi *in vitro* là MS, sucrose 30 $g.L^{-1}$, agar 7 $g.L^{-1}$ chứa 0,5 $mg.L^{1}$ BAP thể hiện qua chỉ tiêu thu được là cao nhất gồm số chồi/mẫu (5,67 chồi/mẫu), chiều cao của chồi tái sinh (4,30 cm) và số lá/chồi (7,33 lá/chồi). Chồi cúc nuôi cấy mô được nuôi cấy trên hệ thống vi thủy canh chứa dung dịch dinh dưỡng là MS, bổ sung NAA 0,25 $mg.L^{-1}$ và tạo thoáng khí giữa hệ vi thủy canh và môi trường ở thời điểm 15 ngày nuôi cấy cho tỷ lệ cây cúc sống sót đạt 98,67% khi chuyển cây ra giá thể hỗn hợp đất, phân chuồng và xơ dừa (50:20:30), cây sinh trưởng tốt. Có thể ứng dụng phương pháp nuôi cấy mô kết hợp vi thủy canh để nhân nhanh cây hoa cúc mâm xôi trong sản xuất.

Từ khóa: Hoa cúc, nhân nhanh, nuôi cấy mô, kỹ thuật, vi thủy canh.

MỞ ĐẦU

Cây hoa cúc là một trong những loại hoa trồng chậu và cắt cành phổ biến trên thế giới (Zhang *et al*., 2013). Hoa cúc rất đa dạng về hình dáng, màu sắc, kích thước, được nhiều người yêu chuộng, trong đó có hoa cúc mâm xôi, loại hoa được trồng phổ biến ở nhiều nơi của nước ta nhưng nổi tiếng hơn cả là ở Sa Đéc - Đồng Tháp (Lê Huy Hàm *et al*., 2012). Cây cúc Mâm Xôi trồng trong giỏ tre được tiêu thụ trên khắp mọi miền đất nước vào dịp Tết (Trần Văn Hâu, Đặng Nguyệt Quế, 2009).

Nuôi cấy mô thực vật là phương pháp dùng để nhân nhanh cây giống trong thời gian ngắn, tiết kiệm không gian, cây giống đồng đều, sạch bệnh, phù hợp cho sản xuất lớn. Tuy nhiên, phương pháp này cũng còn những tồn tại yêu cầu hóa chất và thiết bị, kĩ thuật và đặc biệt giai đoạn rèn luyện cây mô thích nghi với môi trường tự nhiên còn chưa cao, được coi là nút thắt của việc ứng dụng phương pháp này trong sản xuất (Chandra *et al*., 2010). Một trong những nguyên nhân chính làm cho tỷ lệ sống sót thấp và quá trình sinh trưởng phát triển của cây *in vitro* kém trong giai đoạn *ex vitro* là do tỷ lệ quang hợp thực của cây thấp (Duong *et al*., 2005). Hệ thống vi thủy canh là hệ thống nhân giống kết hợp giữa vi nhân giống (nuôi cấy mô) và thủy canh (Hahn *et al*., 1996) đã chứng minh hiệu quả của phương pháp vi thủy canh so với vi nhân giống trong sản xuất cây hoa cúc trắng (Duong *et al*., 2005). Gần đây, đã có một số nghiên cứu về hệ thống vi thủy canh cho sản xuất cây cúc trắng (Hoang *et al*., 2018), cây hoa oải hương lá xẻ (La Việt Hồng *et al.,* 2018), cúc vàng (Bùi Thị Thu Hương *et al.,* 2021). Xuất phát từ lý do trên, nghiên cứu này nhằm ứng dụng ưu điểm của phương pháp nuôi cấy mô cho nhân nhanh chồi, sau đó tìm kiếm các thông số về dinh dưỡng, thời gian tạo thoáng khí, nồng độ chất ra rễ và loại giá thể của hệ thống vi thủy canh thích hợp cho chồi *in vitro* phát triển thành cây hoàn chỉnh với tỷ lệ sống sót cao.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu

Cây cúc mâm xôi *in vitro* 35 ngày trên môi trường MS (Murashige, Skoog, 1962) đang được nuôi cấy tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học thực vật, Viện Nghiên cứu Khoa học và Ứng dụng, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2.

Hệ thống vi thủy canh được thiết kế theo mô tả của La Việt Hồng (La Việt Hồng *et al.*, 2018): sử dụng hộp nhựa PE trong suốt (chiều cao 10 cm x đường kính miệng 11cm x đường kính đáy 8cm) phía trong lòng chứa miếng bọt biển (chiều dài 8cm, chiều rộng 6,5cm, dày 2cm, vừa với đáy hộp PE), trên mặt miếng bọt biển tạo các lỗ nhỏ (khe hẹp) để gắn các chồi hoa cúc mâm xôi *in vitro* (có chiều dài 3cm), miệng hộp PE được bao phủ kín bởi màng bao thực phẩm.

Phương pháp nghiên cứu

Bố trí thí nghiệm

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần nhắc lại, mỗi lần nhắc lại 10 mẫu, theo dõi trên 15 mẫu. Nhân nhanh *in vitro* cúc mâm xôi được nuôi cấy trên môi trường MS, sucrose 30 $g.L^{-1}$ và agar 7 $g.L^{-1}$ (pH 5,7±0,1). Các bình nuôi cấy được đặt trong phòng ở điều kiện nhiệt độ 25±2^{o}C, ánh sáng 3000-5000 lux, chu kỳ sáng 12 giờ sáng/12 giờ tối. Sau đó, chồi *in vitro* được sử dụng cho nghiên cứu ra rễ và rèn luyện trên hệ thống vi thủy canh.

Nhân nhanh chồi cúc mâm xôi bằng phương pháp nuôi cấy mô

Đoạn thân cúc mâm xôi (1,5 - 2,0 cm) được nuôi trong 8 công thức là môi trường MS, sucrose 30 $g.L^{-1}$, agar 7 $g.L^{-1}$ bổ sung hoặc chất điều hòa sinh trưởng BAP (6-Benzylaminopurine, Dulchefa, Hà Lan): 0,25; 0,50; 0,75 và 1,0 $mg.L^{-1}$ hoặc nước dừa (ND) ở nồng độ 5, 10, 15 (% v/v). Đối chứng không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng. Xác định các chỉ tiêu: số chồi/mẫu, chiều cao trung bình của chồi (cm), số lá/ chồi sau 4 tuần nuôi cấy.

Hoàn thiện giai đoạn rèn luyện kết hợp bằng vi thủy canh

Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch vi thủy canh

các chồi (kích thước 3 cm) nuôi cấy vào hệ thống vi thủy canh chứa 20 mL dung dịch dinh dưỡng khác nhau gồm MS, ½ MS và ¼ MS. Tạo thoáng khí sau 10 ngày. Xác định tỷ lệ sống sót (%), chiều cao cây (cm), số rễ/cây, chiều dài rễ (cm) sau 21 ngày nuôi cấy.

Ảnh hưởng của thời gian tạo thoáng khí

Hệ thống vi thủy canh chứa 20 ml dung dịch dinh dưỡng MS, chồi được nuôi cấy và che bằng màng PE thực phẩm. Tạo thoáng khí bằng cách dùng kim châm vào màng bao với kích thước 2 mm ở các thời điểm: 5, 10 và 15 ngày sau nuôi cấy. Xác định các chỉ tiêu gồm tỷ lệ sống (%), chiều cao chồi (cm), số lá/chồi ở thời điểm 21 ngày nuôi cấy.

Ảnh hưởng của nồng độ NAA

Các chồi cây hoa cúc mâm xôi *in vitro* (kích thước 3 cm) nuôi cấy vào hệ thống vi thủy canh chứa 20 mL dung dịch dinh dưỡng MS bổ sung NAA (α-naphtalene acetic acid, Dulchefa, Hà Lan): 0,0; 0,25; 0,50; 0,75 và 1,00 ($mg.L^{-1}$). Hệ thống được tạo thoáng khí sau 15 ngày nuôi cấy. Xác định các chỉ tiêu: tỷ lệ ra rễ (%), chiều dài rễ (cm), số rễ/cây, số lá/chồi ở thời điểm 21 ngày nuôi cấy.

Ảnh hưởng của giá thể

Cây hoa cúc hoàn chỉnh trên hệ thống vi thủy canh được chuyển lên bầu đất trồng chứa giá thể gồm đất+phân chuồng hoai mục+xơ dừa theo các tỷ lệ (%): 50:50:0, 50:20:30, 50:30:20. Xác định các chỉ tiêu tỷ lệ sống sót (%), số rễ/cây và chiều dài rễ (cm) sau 14 ngày sau ra ngôi.

Phân tích thống kê

Số liệu thực nghiệm được xử lý theo các tham số thống kê. Giá trị thể hiện trong các bảng là giá trị trung bình. Sự sai khác giữa 2 giá trị trung bình được kiểm tra bằng tiêu chuẩn t-test, sự sai khác giữa các giá trị trung bình được kiểm tra bằng thuật toán LSD của Fisher (Fisher's Least Significant Difference) với α = 0,05 trên phần mềm Excel 2010 (Nguyễn Văn Mã *et al.*, 2013). Số liệu thể hiện trong bảng là giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Ở các bảng số liệu, trong cùng 1 cột, ký tự theo sau khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với α=0,05

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nhân nhanh chồi cúc mâm xôi bằng phương pháp nuôi cấy mô

Nhân nhanh là một trong những giai đoạn quan trọng quyết định hiệu quả so với phương pháp nhân giống truyền thống bằng giâm hom. Trong nghiên cứu này, việc bổ sung BAP hoặc nước dừa với nồng độ khác nhau có ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng của chồi tái sinh (Bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của BAP và nước dừa đến quá trình nhân nhanh chồi cúc mâm xôi *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy

Công thức	Chất điều hòa, nước dừa		Số chồi/mẫu (chồi)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi (lá)
	BAP ($mg.L^{-1}$)	ND (%)			
CT 1	-	-	1,33^{c}	4,47^{a}	9,33^{a}
CT 2	0,25	-	3,67^{b}	3,43^{b}	5,67^{c}

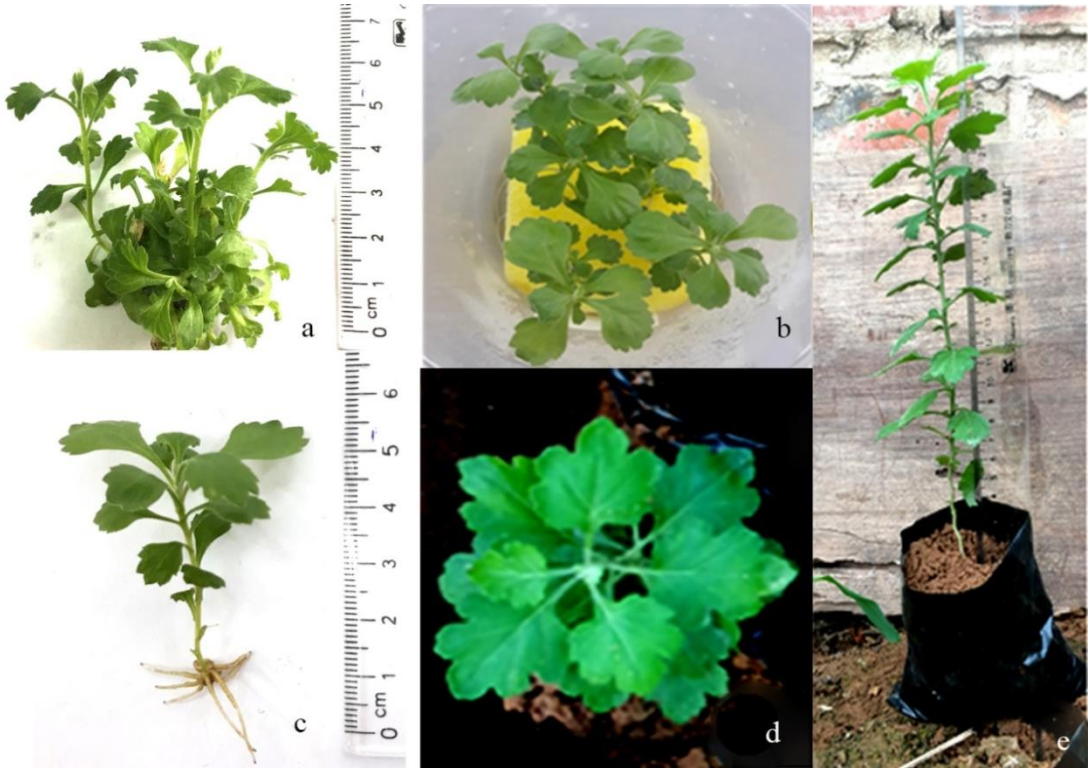
CT 3	0,50	-	5,67^{a}	4,30^{a}	7,33^{b}
CT 4	0,75	-	3,33^{b}	3,30^{b}	4,33^{cd}
CT 5	1,0	-	3,33^{b}	3,47^{b}	3,33^{d}
CT 6	-	5	1,67^{c}	3,40^{b}	5,67^{c}
CT 7	-	10	2,00^{c}	3,33^{b}	5,00^{cd}
CT 8	-	15	1,67^{c}	2,80^{b}	4,67^{cd}
	$LSD_{0,05}$		*1,11*	*0,70*	*1,65*

Dấu (-) thể hiện môi trường không chứa chất điều hòa hoặc ND, trong cùng 1 cột, ký tự theo sau khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với α=0,05

Kết quả cho thấy BAP và ND có ảnh hưởng khác nhau đối với quá trình tái sinh chồi *in vitro*, cụ thể BAP ảnh hưởng tích cực đối với quá trình này, đặc biệt ở CT 3 khi môi trường bổ sung BAP ở nồng độ 0,5 mg.L^{-1} thì số chồi/mẫu là cao nhất, đạt 5,67 (chồi/mẫu) (Hình 1a), Các CT 1 (ĐC) và CT 6-8 (bổ sung ND) thì số chồi/mẫu thấp hơn. Xét về chiều cao của chồi tái sinh cho thấy chỉ tiêu này là tương đương giữa CT 1 (ĐC) và CT 3 (môi trường bổ sung BAP 0,5 mg/l), lần lượt là 4,47 và 4,30 (cm) và cao hơn so với các CT còn lại. Ngoài ra, ở CT 1 có chỉ tiêu số lá/chồi là cao nhất (9,33 lá/chồi), tiếp sau là ở CT 3 (7,33 lá/chồi), và thấp nhất ở CT bổ sung BAP 0,75 và 1,0 mg/l và nhóm CT bổ sung nước dừa. Như vậy, xét ở cả 3 chỉ tiêu của quá trình nhân nhanh, CT 3 là môi trường bổ sung BAP 0,5 mg.L^{-1} là thích hợp để nhân nhanh chồi cúc mâm xôi *in vitro*. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Imtiaz và đồng tác giả (2019) khi cho rằng BAP là thích hợp để cảm ứng tạo cụm chồi ở cúc đại đóa (*Chrysanthemum morifolium*).

Hoàn thiện giai đoạn rèn luyện kết hợp bằng vi thủy canh

Hệ thống vi thủy canh được nghiên cứu trên các đối tượng như hoa cúc trắng (Hoang *et al*., 2018), cây hoa oải hương lá xẻ (La Việt Hồng *et al*., 2018). Để áp dụng hệ thống này trên đối tượng cúc mâm xôi thì cần xác định các thông số của hệ thống như loại dung dịch, thời gian tạo thoáng khí, nồng độ NAA để thúc đẩy ra rễ và loại giá thể để ra ngôi cây từ hệ thống vi thủy canh.



Hình 1. Nhân giống cây cúc mâm xôi bằng phương pháp nuôi cấy mô kết hợp vi thủy canh
a: Tái sinh và nhân nhanh chồi cúc mâm xôi in vitro, b: Hệ thống vi thủy canh để ra rễ và rèn luyện cây hoa cúc mâm xôi, c: Cây cúc mâm xôi trên hệ vi thủy canh (sau 14 ngày) để chuyển ra giá thể, d-e: cúc mâm xôi trên giá thể sau 14 ngày và sau 5 tháng.

Ảnh hưởng của nồng độ dinh dưỡng

Thí nghiệm này nhằm tìm ra dung dịch dinh dưỡng thích hợp cho chồi cúc mâm xôi trên hệ thống vi thủy canh. Kết quả thu được ở Bảng 2 và Hình 1b.

Bảng 2. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ dung dịch dinh dưỡng đến sự sinh trưởng của chồi cúc mâm xôi

CT	Dung dịch dinh dưỡng	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi (lá)
D1	¼ MS	63,67^{b}	4,13^{c}	7,67^{a}
D2	½ MS	84,33^{a}	4,57^{b}	8,67^{a}
D3	MS	86,33^{a}	5,00^{a}	5,00^{b}
	$LSD_{0,05}$	4,15	0,42	1,50

Phân tích cho thấy nồng độ dinh dưỡng khoáng dùng trong hệ thống vi thủy canh có ảnh hưởng khác nhau. Cụ thể, khi nồng độ MS tăng dần từ ¼, ½ và 1 thì tỷ lệ sống của chồi cúc mâm xôi cũng tăng theo, từ 63,67 đến 86,33 (%). Chiều cao chồi cũng theo quy luật tương tự, cao nhất ở D3 (đạt 5,00 cm) trong khi đó chỉ tiêu số lá/chồi không có sự khác biệt ở D2 và D3 và là hai CT tốt hơn so với D1. Ở đối tượng cây khác nhau thì cần loại và nồng độ dinh dưỡng phù hợp, ở cây cúc trắng là dung dịch ½ MS (Hoang *et al*., 2018), ở oải hương lá xẻ là dung dịch MS 10% (La Việt Hồng *et al*., 2018).

Ảnh hưởng của thời gian tạo thoáng khí

Mức độ thoáng khí giữa trong và ngoài của hệ thống vi thủy canh đóng vai trò quan trọng đối với sinh trưởng của chồi cúc vàng (Bùi Thị Thu Hương *et al.,* 2021).

Bảng 3. Kết quả ảnh hưởng của thời gian tạo thoáng khí đến sự sinh trưởng của chồi hoa cúc mâm xôi

CT	Thời gian tạo thoáng khí (ngày)	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao chồi (cm)	Số lá/chồi
K1	5 ngày	58,67^{c}	5,03^{a}	7,00^{a}
K2	10 ngày	86,67^{b}	5,47^{a}	7,33^{a}
K3	15 ngày	98,67^{a}	5,67^{a}	7,67^{a}
	$LSD_{0,05}$	2,30	0,63	2,49

Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định thời điểm tạo thoáng khí ở các thời điểm khác nhau. Kết quả thể hiện ở Bảng 3 cho thấy tỷ lệ sống (%) bị ảnh hưởng rõ rệt, tỷ lệ sống cao nhất, đạt 98,67 (%) ở thời điểm 15 ngày sau nuôi cấy (CT K3), thấp nhất ở K1 (tạo thoáng khí ở thời điểm 5 ngày sau nuôi cấy). Hai chỉ tiêu chiều cao cây và số lá/chồi không có sự khác biệt rõ rệt ở cả 3 công thức.

Ảnh hưởng của NAA

Trong nghiên cứu này, NAA với các nồng độ khác nhau được bổ sung vào hệ thống vi thủy canh, kết quả thể hiện ở Bảng 4 và Hình 1c.

Bảng 4. Kết quả ảnh hưởng của nồng độ NAA đến sự ra rễ và sinh trưởng của chồi hoa cúc mâm xôi

CT	NAA bổ sung (mg.L^{-1})	Số rễ/chồi (rễ)	Chiều dài rễ (cm)	Chiều cao chồi (cm)
N0	0,00	4,33^{b}	0,70^{b}	5,67^{ab}
N1	0,25	5,67^{a}	1,40^{a}	7,00^{a}
N2	0,50	4,33^{b}	0,63^{bc}	5,33^{b}
N3	0,75	3,33^{bc}	0,57^{bc}	5,00^{b}
N4	1,00	2,67^{c}	0,40^{c}	4,67^{b}
	$LSD_{0,05}$	*1,05*	*0,22*	*1,40*

Phân tích cho thấy NAA ảnh hưởng đến quá trình ra rễ và sinh trưởng của chồi cúc trên hệ thống vi thủy canh. Cụ thể, ở nồng độ NAA là 0,25 mg.L^{-1} ở N1, các chỉ tiêu thu được tốt nhất. Số rễ/chồi là 5,67 (rễ/chồi), chiều dài rễ đạt 1,40 (cm) và chiều cao chồi đạt 7,00 (cm) (Hình 1c) cao hơn rõ rệt so với các CT còn lại (bổ sung NAA: 0,5; 0,75 và 1.0 mg.L^{-1}). Kết quả này tương tự như công bố khi nuôi cấy oải hưởng lá xẻ trên hệ thống vi thủy canh (La Việt Hồng *et al*., 2018).

Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống

Trong nhiều nghiên cứu, sau khi chuyển cây từ hệ thống nuôi cấy vi thủy canh ra vườn ươm thì đều có tỷ lệ sống sót cao (Duong *et al*., 2005; La Việt Hồng *et al.*, 2018). Tuy nhiên, sự thay đổi hình thức nuôi cấy từ thủy canh sang giá thể rắn (đất hoặc hỗn hợp) sẽ ít nhiều tạo bất lợi cho cây trồng.

Bảng 5. Ảnh hưởng của giá thể đến tỷ lệ sống (%) của cây hoa cúc mâm xôi sau nuôi cấy vi thủy canh

CT	Đất + phân chuồng + xơ dừa (%)	Tỷ lệ sống sót (%)
G1	50+50+0	67,00^{c}
G2	50+20+30	98,67^{a}
G3	50+30+20	91,67^{b}
	$LSD_{0.05}$	*2,74*

Trong nghiên cứu này, giá thể gồm đất, phân chuồng và xơ dừa được trộn với tỷ lệ khác nhau nhằm tìm kiếm giá thể phù hợp để ra ngôi cây hoa cúc sau vi thủy canh. Kết quả cho thấy tỷ lệ sống sót cao nhất ở G2 và đạt 98,67% sau 14 ngày (Bảng 5, Hình 1d). Tiếp tục theo dõi sự sinh trưởng của cây này sau 5 tháng cho thấy cây sinh trưởng và phát triển tốt (Hình 1e). Như vậy, hỗn hợp đất+phân chuồng+xơ dừa (tỷ lệ 50:20:30) là thích hợp để ra ngôi và trồng cây cúc mâm xôi có nguồn gốc từ vi thủy canh.

KẾT LUẬN

Quá trình tái sinh và nhân nhanh chồi cúc mâm xôi được thực hiện bằng nuôi cấy chồi trên môi trường MS, sucrose 30 g.L^{-1}, agar 7 g.L^{-1} bổ sung BAP ở nồng độ 0,5 mg.L^{-1}, số chồi/mẫu là cao nhất (5,67 chồi/mẫu), chiều cao của chồi tái sinh là 4,30 (cm) và số lá/chồi là 7,33 (lá/chồi). Các thông số của hệ thống vi thủy canh cho chồi cúc mâm xôi đã được hoàn thiện. Dung dịch dinh dưỡng để nuôi cấy là MS, thời gian tạo thoáng khí là 15 ngày sau khi đưa cây lên hệ thống vi thủy canh, bổ sung NAA 0,25 mg.L^{-1} cho tỷ lệ cây sống sót cao, các chỉ tiêu sinh trưởng và ra rễ của chồi *in vitro* là tốt nhất. Sau đó, chuyển cây ra giá thể chứa hỗn hợp đất, phân chuồng và xơ dừa (50:20:30) cho tỷ lệ sống sót cao nhất (đạt 98,67%).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bùi Thị Thu Hương,Hoàng Thị Thu Hường, Đỗ Thị Xuân, Nguyễn Thị Lương, Đồng Huy Giới (2021). Nghiên cứu ảnh hưởng một số yếu tố đến chồi cúc vàng (*chrysanthemum indicum*) trong hệ thống vi thủy canh, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Lâm Nghiệp*, 2, 021-027. https://jvnuf.vjst.net/vi/article/view/496

Chandra S, Bandopadhyay R, Kumar V, Chandra R (2010). Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnol Lett*, 32(9): 1199-1205, doi:10.1007/s10529-010-0290-0

Duong TN, Nguyen TD, Truong TTA, Tran PTV, Vu HN, Pham XH, Dinh VK (2005). Microponic and hydroponic techniques in disease-free Chrysanthemum (Chrysanthemum sp.) production. *Journal of Applied Horticulture*, 7(2): 67-71.

Hahn EJ, Lee YB, Ahn CH (1996). A new method on mass-production of micropropagated Chrysanthemum plants using microponic system in plant factory. *Acta Horticulturae*, 440: 527-532.

Hoang TT, Nguyen BN, Nguyen PH, Vu QL, Vu TH, Truong TBP, Le TD, Nguyen HL, Duong TN (2018). A system for large-scale production of chrysanthemum using microponics with the supplement of silver nanoparticles under light-emitting diodes. *Scientia Horticulturae*, 232: 153-161, 2018.

Imtiaz M, Khan MA, Jalal F, Bo O (2019). Rapid *in vitro* propagation of *chrysanthemum morifolium* through shoot bud explants. *Pakistan Journal of Botany*, 51(3): 1093-1098.

La Việt Hồng, Chu Đức Hà, Tạ Thị Thu Hoài, Nguyễn Thị Thúy Mai (2018). Thiết kế hệ thống vi thủy canh đơn giản cho quy trình rèn luyện cây hoa oải hương lá xẻ (*Lavandula dentata* L.). *Báo cáo Khoa học - Hội nghị Khoa học Công nghệ Sinh học toàn quốc 2018*, 1672-1676, Nxb Khoa học Tự nhiên và Công nghệ.

Lê Huy Hàm, Nguyễn Thị Kim Lý, Lê Đức Thảo, N.K Dadlani, Nguyễn Xuân Linh, Phạm Thị Lý Thu, Trịnh Xuân Hoạt (2012). *Kỹ thuật sản xuất một số loại hoa,* Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.

Murashige T, Skoog F (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473-497.

Nguyễn Văn Mã, La Việt Hồng, Ong Xuân Phong (2013). *Phương pháp nghiên cứu sinh lý học thực vật (Methods in plant physiology)*, *Nxb ĐHQG Hà Nội.*

Trần Văn Hâu, Đặng Nguyệt Quế (2009). Ảnh hưởng của thời gian chiếu sáng bổ sung lên sự phát triển nụ hoa và phẩm chất chậu hoa cúc mâm xôi (*Chrysanthemum morifolium*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 11: 88-96.

Zhang J, Chen S, Liu R, Jiang J, Chen F, Fang W (2013). Chrysanthemum cutting productivity and rooting ability are improved by grafting. *The Scientific World Journal*, 286328. https://doi.org/10.1155/2013/286328

RAPID PROPAGATION OF *CHRYSANTHEMUM* SP. BY TISSUE CULTURE COMBINED WITH MICRO HYDROPONICS

Nguyen Tat Nghiep[1,3], Ngo Thi Thuong[1], Nguyen Thi Thu Hien[1], Chu Duc Ha[2], Bui Thuy Lien[1,4], Cao Phi Bang[5], La Viet Hong[1*]

[1]*Institute for Scientific Research and Application, Hanoi Pedagogical University 2*

[2]*Department of Agricultural Technology, University of Technology, Vietnam National University, Hanoi*

[3]*Hung Thai Secondary School, Hung Long, Ninh Giang, Hai Duong*

[4]*Department of Secondary Education, Hoa Lu University, Ninh Binh*

[5]*Faculty of Natural Science, Hung Vuong University, Phu Tho*

SUMMARY

Chrysanthemum is one of the popular potted flowering plants in Vietnam and the world. In this study, *chrysanthemum sp.* was rapidly propagated by tissue culture combined with micro-hydroponics. The study results showed that the best medium for shoot propagation in the *in vitro* stage was MS supplemented with sucrose 30 $g.L^{-1}$, agar 7 $g.L^{-1}$, and 0.5 $mg.L^{-1}$ BAP with the number of shoots/explant was 5.67, the height of shoots was 4.30 cm and the number of leaves/shoot was 7.33. Tissue-cultured chrysanthemum shoots were cultured in a micro-hydroponic system containing MS nutrient solution, supplemented with 0.25 $mg.L^{-1}$ NAA, and after the cultured 15 days, creating ventilation between the microponics system and environment; the survival rate was highest and reached 98.67% when transferred to a substrate mixed with soil, manure, and coconut fiber (50:20:30), and the plants grew well. It is feasible to rapidly multiply chrysanthemum plants in production using the tissue culture method in conjunction with micro-hydroponics.

Keywords: Chrysanthemum, propagation, tissue culture, techniques, microponics.

[*] Author for correspondence: Tel: +84-973376668; Email: laviethong@hpu2.edu.vn

PHÁT HIỆN *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) BẰNG KỸ THUẬT RT-PCR TRÊN CÂY HỌ CÀ *Solanaceae* TẠI TIỀN GIANG

Trần Đình Phong[1], Trương Quang Toản[2], Huỳnh Văn Biết[1,2*]

[1]Khoa Khoa học Sinh học – Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

[2]Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường – Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

PCFVd (*Pepper chat fruit viroid*) là một trong những loại viroid gây chậm lớn, còi cọc, lá xoăn, trái nhỏ trên các cây họ cà, nó có khả năng lây lan mạnh từ cây bệnh sang cây khỏe hoặc từ nguồn giống. Bệnh biểu hiện càng sớm thì mức độ ảnh hưởng càng nghiêm trọng làm giảm sản lượng, chất lượng nông sản. Hiện nay chưa có loại thuốc nào có thể tiêu diệt loại viroid này, do đó một trong những phương pháp phòng trừ hiệu quả nhất là sàng lọc hạt giống trước khi gieo trồng và kiểm soát, loại bỏ các cây có biểu hiện bệnh ở giai đoạn sớm chính xác là cần thiết. Trong nghiên cứu này, hai cặp primer PCFVd-FW1/RE1 và FJJ2016-77/78 được sử dụng để khuếch đại và phục vụ cho việc giải trình tự bộ gen PCFVd và cặp primer PCF-seq-F/R được sử dụng để phát triển quy trình phát hiện PCFVd, sau đó sản phẩm PCR từ các primer này được tạo dòng vào vector pJET1.2 và biến nạp vào *Escherichia coli* DH5α. Cấu trúc bậc hai của bộ gene PCFVd đã được xác định từ kết quả giải trình tự. Quy trình RT-PCR được xây dựng để phát hiện PCFVd với cặp primer PCF-seq-F/R cho sản phẩm khuếch đại có kích thước 348 bp. Nhiệt độ bắt cặp tối ưu cho phản ứng là 60°C, nồng độ primer tối ưu cho phản ứng là 0,1 µM, độ LOD của phản ứng RT-PCR được xác định là 100 copies/µL. Có 14 mẫu trên tổng 20 mẫu thực địa được phát hiện dương tính với PCFVd. Nghiên cứu đã thiết lập thành công quy trình RT-PCR tối ưu để phát hiện sự hiện diện của PCFVd. Đây là báo cáo đầu tiên về sự lây nhiễm của PCFVd trên cây ớt (*Capsicum frutescens* L.) và cây cà chua (*Solanum lycopersicum*) tại đồng bằng sông Cửu Long.

Từ khóa: Capsicum frutescens L., PCFVd, RT-PCR, *Solanum lycopersicum*, Viroid.

MỞ ĐẦU

Viroid là tác nhân gây bệnh nhỏ nhất trên thực vật, được phân thành một nhóm tác nhân dưới virus. Chúng là những phân tử RNA sợi đơn, có kích thước dao động từ 246 nt đến 399 nt. Trong các thử nghiệm In-vitro, các viroid có hình que do sự ghép cặp của các nucleotide trong cấu trúc. Viroid khác với virus ở chỗ chúng không có lớp vỏ protein. Ngoài ra, bộ gene nhỏ của chúng không mã hóa bất kì một protein nào. Viroid được chia làm hai họ là Avsunviroidae và Pospiviroidae. Pepper chat fruit viroid là một viroid thuộc họ Pospiviroidae được phát hiện lần đầu tiên trên cây ớt chuông vào năm 2006 bởi Verhoeven và đồng tác gia (Verhoeven *et al*., 2009) tại Hà Lan. Sau đó chúng được báo cáo lây nhiễm trên cà chua tại Thái Lan (Reanwarakorn *et al.*, 2011), Canada *(Verhoeven et al*., 2011) và Úc (Chambers *et al*., 2013). Tại Việt Nam, PCFVd đã được báo cáo phát hiện vào năm 2020 bởi Choi và đồng tác giả ở khu vực miền Bắc và Lâm Đồng, Việt Nam (Choi *et al*., 2020) tuy nhiên vẫn chưa có báo cáo nào về sự xuất hiện của PCFVd tại khu vực đồng bằng sông Cửu Long. PCFVd gây các triệu chứng như cây chậm lớn, còi cọc, lá xoăn, trái nhỏ trên ớt và cà chua; củ thon dài và dị dạng đối với khoai tây. PCFVd gây bệnh trên nhiều cây quan trọng của họ *Solanaceae* như cà chua, ớt và khoai tây gây thiệt hại lớn về kinh tế và rất khó kiểm soát do phạm vi kí chủ rộng. Việc phát hiện bệnh thông qua triệu chứng không hiệu quả do triệu chứng không quá rõ ràng có thể gây nhầm lẫn với các bệnh do thiếu vi khoáng chất. Vì vậy, việc phát hiện bệnh sớm thông qua các kỹ thuật sinh học phân tử được chọn để chẩn đoán bệnh do viroid gây ra là cần thiết nhằm góp phần giảm thiệt hại cho người sản xuất. Các kỹ thuật sinh học phân tử thường dùng cho việc phát hiện tác nhân viroid như là RT-PCR, Realtime-RT-PCR và LAMP. Hiện nay RT-PCR là phương pháp được dùng nhiều trong phát hiện bệnh do độ chính xác cao, giá thành rẻ và dễ thực hiện.

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân tích đặc điểm phân tử của chủng *Pepper chat fruit viroid* tại Đồng bằng sông Cửu Long và phát triển quy trình phát hiện PCFVd bằng kỹ thuật RT-PCR giúp phát hiện sớm mầm bệnh và ngăn chặn kịp thời, giúp giảm bớt thiệt hại.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Đối chứng dương PCFVd được cung cấp từ phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, trường đại học Nông Lâm TPHCM. Hai mươi mẫu lá, gồm mười mẫu lá cây ớt (*Capsicum frutescens*) (kí hiệu từ 1 đến 10) và mười mẫu lá cà chua (*Solanum lycopersicum*) (kí hiệu từ 11 đến 20)

có triệu chứng nghi nhiễm PCFVd được thu thập tại 4 vườn ở thành phố Gò Công, tỉnh Tiền Giang, Việt Nam. Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5α và plasmid pJET 1.2 được sử dụng cho nhân dòng.

Ly trích RNA và tinh sạch RNA

RNA viroid được ly trích từ các mẫu thực địa được thực hiện theo sự hướng dẫn của EZ-10 Spin Column Plant RNA Mini-Preps Kit. RNA tổng số đã được xác định nồng độ (ng/µL) và độ tinh sạch RNA bằng máy đo quang phổ (Biodrop, Anh). RNA tổng số được tinh sạch và được loại bỏ DNA theo hướng dẫn của bộ kit DNase I, RNase-free (Thermo Scientific, Hoa kỳ). Thành phần phản ứng gồm 1 µL 10X buffer, 1 µL 1U DNase I, 8 µL RNA, sau đó ủ ở 37^{o}C trong 30 phút. Tiếp theo, 1µL EDTA được thêm vào phản ứng và ủ ở 65^{o}C trong 10 phút để dừng phản ứng.

Phản ứng RT-PCR

RNA sau khi tinh sạch được sử dụng để tổng hợp cDNA theo hướng dẫn của SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit. Sử dụng máy luân nhiệt (GeneAmp® PCR System 9700) cho các bước ủ. Chu trình nhiệt cho phản ứng bao gồm: ủ primer 25^{o}C trong 10 phút; phiên mã ngược 42^{o} C trong 15 phút và 48^{o}C trong 15 phút; cuối cùng là 85^{o}C trong 5 phút để dừng phản ứng. Để kiểm soát quá trình xét nghiệm, cặp primer ACT-F/R (Bảng 1) được sử dụng để khuếch đại đoạn gene đối chứng nội actin của vật chủ.

Hai cặp primer PCFVd-FW1/RE1 và FJJ2016-77/78 (bảng 1) được sử dụng về giải toàn bộ trình tự bộ gene và cặp primer PCF-seq-F/R được sử dụng để thực hiện quy trình phát hiện PCFVd. Phản ứng RT-PCR được thực hiện trong 25 µL thể tích phản ứng gồm: 12,5 µL DreamTaq Green PCR Master Mix 2X (Thermo Scientific, Hoa Kỳ), 0,5 µL mỗi primer (10 µM), 1 µL cDNA và 9,5 µL nước DEPC (BioBasic, Canada). Phản ứng được thực hiện bằng máy luân nhiệt Bioer LifeEco, gồm các bước: tiền biến tính 95^{o}C trong 5 phút; 40 chu kì: biến tính 95^{o}C trong 30 giây, bắt cặp 60^{o}C trong 30 giây, kéo dài 72^{o}C trong 30 giây; hậu kéo dài 72^{o}C trong 7 phút. Sau đó sản phẩm RT-PCR sẽ được kiểm tra trên gel agarose 1,5% (Bioline, Vương quốc Anh) trong đệm TAE 0,5X (ABT, Việt Nam) dùng thang chuẩn HyperLadder™ 100 bp (Bioline, Vương quốc Anh) sử dụng chất nhuộm Gelred (ABT) và kết quả được quan sát dưới đèn UV.

Bảng 1. Danh sách các primer sử dụng

Tên primer	Trình tự	Kích thước	Mục đích	Nguồn
PCF-seq-F	CCGTCTTCTGACAGGAGTAATCCC	348 bp	Phát hiện PCFVd	(Yanagisawa and Matsushita, 2017)
PCF-seq-R	ACCCGCACGGCGCTTCTC			
PCFVd-FW1	ACCCTTCCTTTCTTCGGGTTTCC	348 bp	Giải trình tự toàn bộ bộ gen PCFVd	(Verhoeven *et al.*, 2009)
PCFVd-RE1	GAA AACCCTGTTTCAGCGGGG AT			
FJJ2016-77	CCGGATTCTTCTAAGGGTGCCTGTG	348 bp	Giải trình tự toàn bộ bộ gen PCFVd	(Tseng *et al.*, 2021)
FJJ2016-78	AGATCCTCTCGGGTCCCGGGTAGCT			
pJET1.2-F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	118 bp + 348 bp	Kiểm tra gen clone	CloneJET^{TM}PCR Cloning Kit
pJET1.2-R	AAGAAC ATCGATTTTCCATGGCAG			
ACT-F	AGGCCAACAGAGAGAAGATG	772 bp	Kiểm soát xét nghiệm	(Trương *et al.,* 2023)
ACT-R	ACAATGGAAGGACCAGACTC			

Tạo dòng

Sản phẩm RT-PCR khuếch đại bằng cặp primer PCF-seq-F/R, PCFVd-FW1/RE1 và FJJ2016-77/78 được chèn vào vector pJET1.2 theo hướng dẫn của CloneJETTM PCR Cloning Kit (Thermo Scientific). Vector sau khi chèn gene mục tiêu được biến nạp vào vi khuẩn *E.coli* DH5α bằng phương pháp hóa biến nạp (Sambrook and Russell, 2001). Sau khi hoàn thành các bước tạo dòng, dịch vi khuẩn sẽ được nuôi cấy trên môi trường LB rắn có bổ sung kháng sinh Ampicillin nồng độ 2 mg/L môi trường. Sau 24 giờ nuôi cấy vi khuẩn, khuẩn lạc mang gen mục tiêu được chọn lọc bằng phản ứng PCR với cặp mồi pJET1.2-F/R (Bảng 1), theo hướng dẫn CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific), sau đó sản phẩm PCR được điện di kiểm tra kích thước. Sản phẩm PCR được gửi giải trình tự bằng phương pháp Sanger tại Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa Thành phố Hồ Chí Minh.

Phân tích trình tự, kiểm tra cấu trúc thứ cấp

Trình tự toàn bộ bộ gen của PCFVd được khuếch đại bằng 2 cặp mồi PCFVd-FW1/RE1 và FJJ2016-77/78 được xử lý bằng phần mềm BioEdit để có trình tự hoàn chỉnh. Sau đó trình tự sẽ được kiểm tra bằng công cụ BLASTn của Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia Hoa Kỳ (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov). Cấu trúc thứ cấp của PCFVd sẽ được dự đoán bằng công cụ RNA Folding Form của Unafold website. Trình tự nucleotide của PCFVd đã được được gửi vào NCBI GenBank (Số gia nhập PQ059146).

Tối ưu phản ứng RT-PCR phát hiện PCFVd

Khảo sát nhiệt độ bắt cặp

Nhiệt độ bắt cặp được khảo sát ở nhiều mức nhiệt độ khác nhau nhằm tìm ra nhiệt độ tối ưu cho phản ứng. Khảo sát được thực hiện từ 55^{o}C đến 65^{o}C bằng máy luân nhiệt Bioer LifeEco, các mức nhiệt khảo sát gồm: 55^{o}C; 55,2^{o}C; 55,6^{o}C; 56,5^{o}C; 57,6^{o}C; 59^{o}C; 60^{o}C; 62,1^{o}C; 63,7^{o}C; 64,2^{o}C; 64,7^{o}C; 65^{o}C. Nhiệt độ tối ưu được chọn là nhiệt độ cho vạch DNA sáng nhất, ít tạo dimer nhất.

Khảo sát nồng độ mồi

Nồng độ mồi được khảo sát ở nhiều mức khác nhau trong khoảng từ 0,0125 µM đến 1,2 µM cụ thể như là 0,0125 µM; 0,025 µM; 0,05 µM; 0,1 µM; 0,2 µM; 0,4 µM; 0,8 µM; 1,2 µM. Nồng độ mồi tối ưu được chọn là nồng độ tại đó vạch sáng và không tạo thành dimer, ưu tiên chọn nồng độ thấp nhất giúp tiết kiệm hóa chất.

Xác định giới hạn phát hiện (LOD)

Plasmid mang đoạn gen mục tiêu sẽ được đo nồng độ (ng/µL) thông qua độ hấp thụ quang phổ A260 bằng máy quang phổ BioDrop µLITE. Số bản sao DNA plasmid có trong 1 µL được tính theo công thức của Staroscik (Staroscik, 2004).

$$\text{Copies (copies)} = \frac{\text{PC x } 6{,}022 \text{ x } 10^{23}}{\text{L x } 10^{9} \text{ x } 650}$$

Trong đó: PC nồng độ DNA plasmid (ng/µL), L là độ dài đoạn gen (bp).

Giới hạn phát hiện (LOD) của xét nghiệm RT-PCR được xác định là lượng số bản sao DNA plasmid có trong một phản ứng thấp nhất có thể phát hiện trên 90%. Lượng DNA plasmid được pha loãng từ 10^{9} đến 10^{0} được sử dụng để xác định giá trị LOD. Sản phẩm PCR được phân tích bằng gel agarose 1,5% với điện áp 100V trong 30 phút, sau đó quan sát dưới đèn UV.

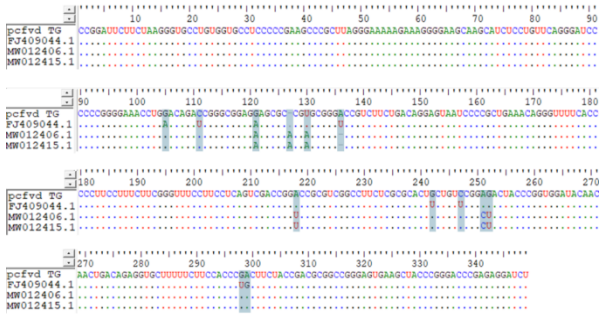
Áp dụng quy trình RT-PCR đã tối ưu lên mẫu thực địa

Tổng số 20 mẫu gồm có 10 mẫu lá ớt và 10 mẫu lá cà chua có triệu chứng nhiễm PCFVd được thu thập tại bốn vườn ở khu vực Thành Phố Gò Công, tỉnh Tiền Giang, mỗi vườn lấy 5 mẫu. Trong đó vườn 1 và 2 là các mẫu ớt, vườn 3 và 4 là các mẫu cà chua. Các mẫu thực địa được kiểm tra bằng phản ứng RT-PCR đã được tối ưu.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

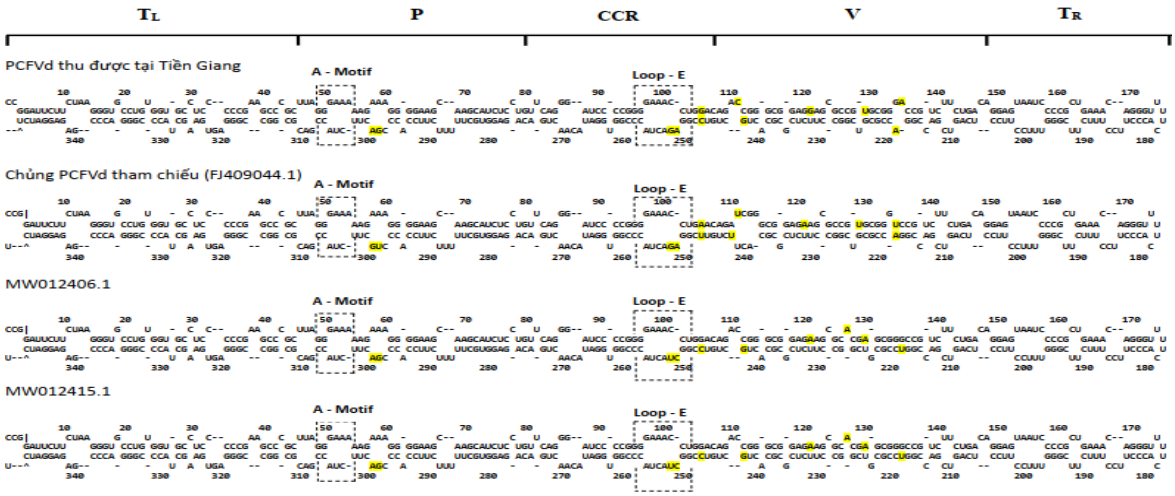
Phân tích trình tự và đặt trưng phân tử của chủng PCFVd phân lập ở Việt Nam

Cấu trúc bậc một của bộ gen PCFVd đã được xác định bằng cách giải trình tự các sản phẩm PCR từ các plasmid mang đoạn khuếch đại của hai cặp primer PCFVd-FW1/RE1 và FJJ2016-77/78. Thành phần nucleic acid của PCFVd chủng thu thập tại Tiền Giang được xác định gồm có 348 nt: 108 C (31%), 103 G (29,6%), 71 U (20,4%) và 66 A (19,0%), hàm lượng C + G là 60,6%. Kết quả so sánh trình tự thu được với các trình tự PCFVd đã được công bố trên GenBank cho thấy trình tự của đoạn gen khuếch đại tương đồng ở mức 98,28% với trình tự gen PCFVd mã số MW422292.1 đã được công bố và tương đồng 97,99% với 2 chủng PCFVd có mã số MW012415.1 và MW012406.1 tại Việt Nam. Trình tự của chủng PCFVd thu được tại Tiền Giang có sự khác biệt với trình tự nucleotide của chủng PCFVd tham chiếu có mã số FJ409044.1 tại vị trí: 105, 111, 120, 136, 242, 247, 298, 299 và khác biệt với 2 trình tự nucleotide của chủng PCFVd có mã số MW012415.1 và MW012406.1 tại vị trí: 105, 121, 127, 130, 136, 218, 251, 252 (Hình 1). Sự khác biệt về thành phần nucleic acid có thể chuyển Tetraloop motif thành Loop - E motif, ngoài ra sự thay đổi thành phần có thể dẫn đến sự thay đổi độc lực của viroid (Hadidi *et al.*, 2017). Cấu trúc thứ cấp được máy tính dự đoán năng lượng tự do có dạng hình que giống với các cấu trúc được báo cáo trước đây (Verhoeven *et al*., 2009) (Hình 2).



Hình 1. So sánh trình tự gene giữa chủng PCFVd thu được tại Tiền Giang (PCFVd TG) với trình tự tham chiếu của PCFVd (FJ409044.1) và hai chủng PCFVd thu được tại Việt Nam (MW012406.1 và MW012415.1)

Những trình tự nucleotide giống nhau được thể hiên qua dấu (.) còn những nucleotide có sự khác biệt giữa các chủng được làm nổi bật.



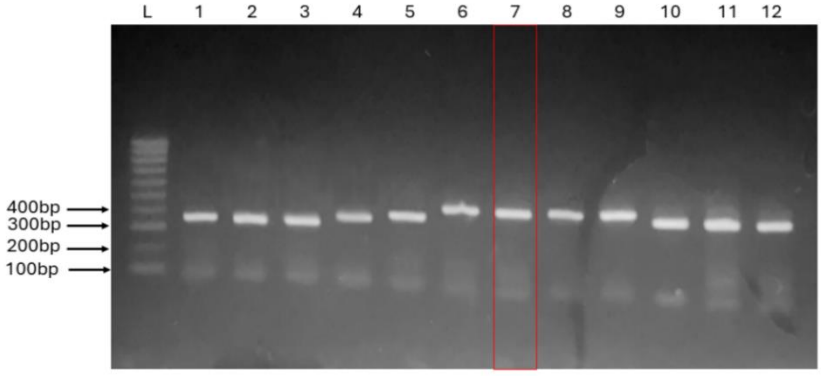
Hình 2. Cấu trúc thứ cấp của PCFVd thu được tại Tiền Giang, chủng tham chiếu (FJ409044.1) và hai chủng được công bố tại Việt Nam (MW012406.1 và MW012415.1)

Các nucleotide khác biệt giữa các chủng được làm nổi bật, các cấu trúc A- Motif và Loop-E được làm nổi bật.

Kết quả tối ưu phản ứng

Khảo sát nhiệt độ bắt cặp

Sản phẩm PCR được điện di với thang chuẩn 100 bp để kiểm tra kích thước. Từ kết quả khảo sát nhiệt độ có thể thấy primer PCF-seq-F/R có thể bắt cặp từ 55^{o}C đến 65^{o}C. Độ sáng của các band không có sự khác biệt quá nhiều vì vậy nhiệt độ tối ưu cho phản ứng được chọn là 60^{o}C, theo nhiệt độ của cặp primer ACT-F/R, để có thể thực hiện cùng một máy PCR và ở cùng một nhiệt độ.

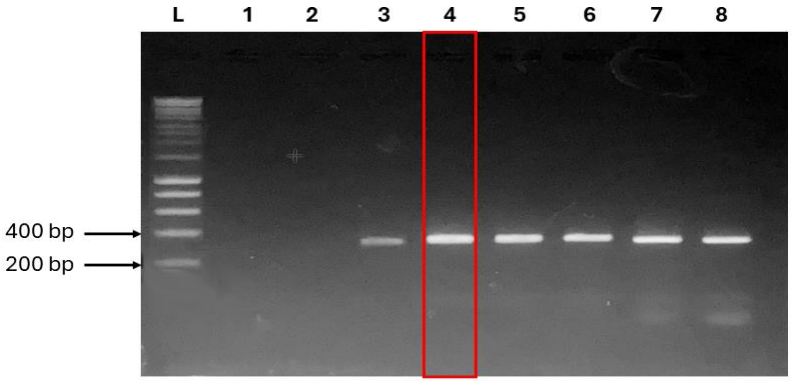


Hình 3. Kết quả khảo sát nhiệt độ bắt cặp của primer PCF-seq-F/R

L: Thang chuẩn 100bp, 1: 55℃; 2: 55,2℃; 3: 55,6℃; 4: 56,5℃; 5: 57,6℃; 6: 59℃; 7: 60℃; 8: 62,1℃; 9: 63,2℃; 10: 64,2℃; 11: 64,7℃; 12: 65℃. Nhiệt độ tối ưu được đánh dấu bằng khung màu đỏ.

Khảo sát nồng độ primer

Sản phẩm PCR giảm dần độ sáng từ nồng độ 1,2 µM đến 0,0125 µM, không thấy xuất hiện band từ nồng độ primer 0,025 µM trở xuống. Trong khi đó dimer sau phản ứng giảm dần từ nồng độ 1,2 µM xuống 0,05 µM. Tại nồng độ 0,1 µM band sáng, rõ ràng và không có tạo thành dimer, vì vậy nồng độ primer này được chọn để thực hiện các xét nghiệm sau này.



Hình 4. Kết quả khảo sát nồng độ mồi tối ưu cho phản ứng

L: Thang chuẩn; 1: 0,0125 µM; 2: 0,025 µM; 3: 0,05 µM; 4: 0,1 µM; 5: 0,2 µM; 6: 0,4 µM; 7: 0,8 µM; 8: 1,2 µM. Nồng độ mồi tối (µM) ưu được đánh dấu bằng khung đỏ.

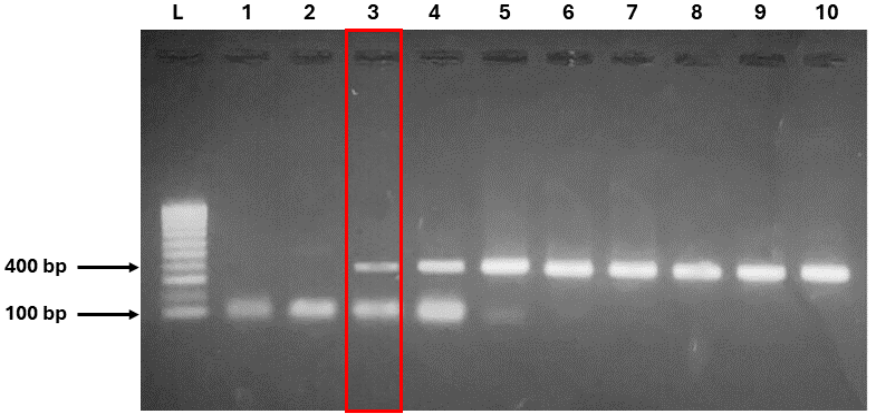
Kiểm tra xác định giới hạn phát hiện LOD

Nồng độ plasmid thu được sau khi ly trích là 15,53 ng/µL, số lượng bản copies tính được theo công thức của Staroscik là 4,3x10^9 copies/µL. Kết quả LOD của phản ứng được thể hiện trong hình 5 và bảng 2.

Bảng 2. Kết quả PCR xác định giới hạn phát hiện (LOD)

Số bản copies/µL	Lần lặp lại									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
10^0	(–)	(–)	(–)	(–)	(–)	(–)	(–)	(–)	(–)	(–)
10^1	(–)	(–)	(–)	(+)	(–)	(–)	(+)	(–)	(–)	(–)
10^2	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

(–) *Âm tính;* (+) *Dương tính*



Hình 5. Kết quả điện di xác định LOD của xét nghiệm PCR

(L) Thang DNA 100 bp; (1) – (10) độ pha loãng từ 10^0) đến 10^9(copies/µL); Khung màu đỏ hiển thị độ nhạy của xét nghiệm RT-PCR.

Kết quả cho thấy nồng độ plasmid thấp nhất có tỉ lệ phát hiện trên 90% là nồng độ 10^2. Vậy LOD phát hiện của phản ứng PCR được xác định là 10^2 copies/µL.

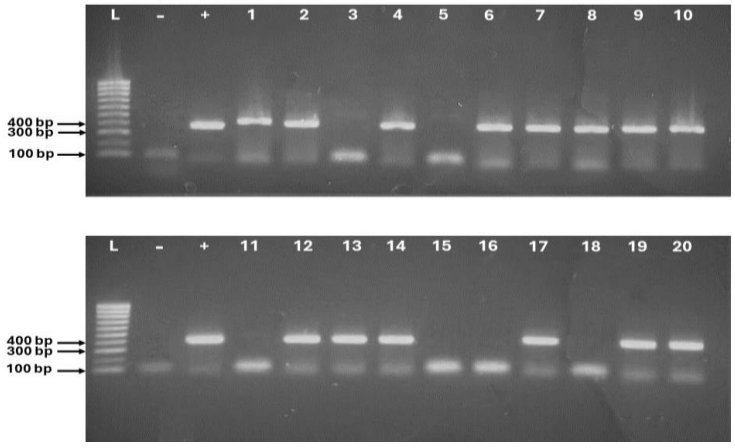
Kết quả áp dụng quy trình trên mẫu thực địa

Kết quả trong vườn 1 đã có 3/5 mẫu dương tính với PCFVd, vườn 2 có 5/5 mẫu dương tính với PCFVd (tương ứng với 8/10 mẫu ớt bị nhiễm), vườn 3 có 3/5 mẫu dương tính với PCFVd và vườn 4 có 3/5 mẫu dương tính với PCFVd (tương ứng 6/10 mẫu cà chua bị nhiễm) được thể hiện qua bảng 3 và hình 6. Kết quả kiểm tra gen actin điều xuất hiện vạch cho thấy không có mẫu thực địa âm tính giả (Hình 7).

Bảng 3. Kết quả áp dụng quy trình RT-PCR phát hiện PCFVd có triệu chứng trên mẫu thực địa

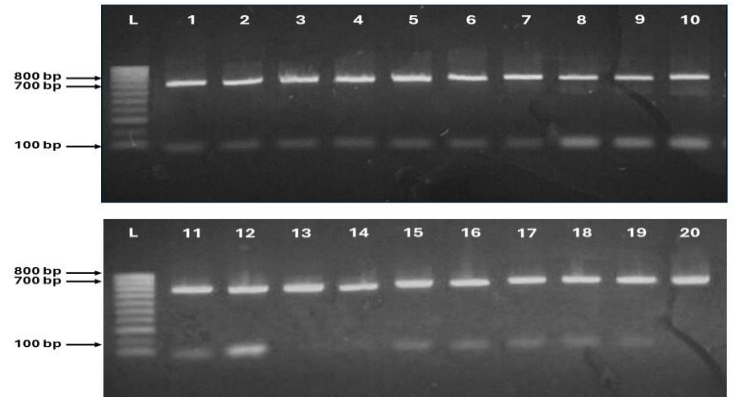
Mẫu	Triệu chứng	RT-PCR	Mẫu	Triệu chứng	RT-PCR	Mẫu	Triệu chứng	RT-PCR	Mẫu	Triệu chứng	RT-PCR	Mẫu	Triệu chứng	RT-PCR
1	(+)	(+)	**5**	(+)	(–)	**9**	(+)	(+)	**13**	(+)	(+)	**17**	(+)	(+)
2	(+)	(+)	**6**	(+)	(+)	**10**	(+)	(+)	**14**	(+)	(+)	**18**	(+)	(–)
3	(+)	(–)	**7**	(+)	(+)	**11**	(+)	(–)	**15**	(+)	(–)	**19**	(+)	(+)
4	(+)	(+)	**8**	(+)	(+)	**12**	(+)	(+)	**16**	(+)	(–)	**20**	(+)	(+)

(–) Mẫu âm tính; (+) Mẫu dương tính



Hình 6. Kết quả áp dụng quy trình trên mẫu thực địa

(L) Thang DNA 100 bp; (-) Đối chứng âm; (+) Đối chứng dương; (1) – (20) kết quả PCR kiểm tra PCFVd mẫu 1 đến 20.



Hình 7. Kết quả PCR gen actin trình trên mẫu thực địa

(L) Thang DNA 100 bp; (1)-(20) Kết quả PCR gen actin mẫu 1 đến 20

Yanagisawa và đồng tác giả (2017) đã sử dụng kỹ thuật RT-PCR và lây nhiễm ngược nhằm xác định khả năng lây nhiễm của PCFVd trên cây cà chua, kết quả chỉ ra rằng với tỷ lệ lây nhiễm PCVFd qua hạt là 0 - 1,4%, trong hợp lây nhiễm từ hạt phấn hoặc bố mẹ bị nhiễm là 65,3% - 69,2%. Với kỹ thuật giải trình tự NGS, dựa trên RNA-seq, Choi và đồng tác giả (2020) đã có thể xác định một số virus và viroid chưa được báo cáo ở Việt Nam. Đây là nghiên cứu đầu tiên báo cáo tám loại virus, bao gồm PVY, ChiVMV, CMV, CaCV, PCSV, PCV-2, TNRV và TMGMV, cũng như hai viroid, CLVd và PCFVd, lây nhiễm trên cây họ cà ở miền Bắc (Hà Nội, Vĩnh Phú, Ninh Bình) và Lâm Đồng, Việt Nam. Trong nghiên cứu này, chúng tôi cũng đã xác định được sự hiện diện của PCFVd trên cây cà chua, và cây ớt tại Tiền Giang. Việc có thêm một trình tự chủng PCFVd từ khu vực Tiền Giang là một bước quan trọng trong nghiên cứu và theo dõi viroid này. Bằng cách phân tích cấu trúc thứ cấp của chủng viroid này, mở ra cơ hội hiểu rõ hơn về tính chất, đặc điểm, và tiềm năng lây lan của viroid trong cộng đồng. Nhờ vào việc này, có thể xác định các biến đổi, mối liên hệ với các chủng khác, và đưa ra các biện pháp phòng ngừa và kiểm soát hiệu quả. Giúp giảm thiệt hại về kinh tế do PCFVd gây ra. Kỹ thuật RT – PCR phát hiện PCFVd với độ đặc hiệu và độ chính xác cao. Quy trình chẩn đoán được sử dụng để phát hiện PCFVd trên các mẫu thu thập từ thực địa. Ứng dụng quy trình này có thể tiết kiệm được thời gian, giúp tầm soát sớm mầm bệnh để có biện pháp ngăn chặn và xử lý kịp thời.

KẾT LUẬN

Xác định được thêm một trình tự nucleotide chủng PCFVd từ khu vực Tiền Giang là một bước quan trọng trong nghiên cứu và theo dõi viroid này. Kỹ thuật RT – PCR phát hiện PCFVd với nhiệt độ bắt cặp tối ưu là 60^{o}C, nồng độ primer tối ưu cho phản ứng là 0,1 µM, độ LOD là 100 copies/µL đã được xác định và ứng dụng cho việc phát hiện PCFVd trên mẫu thực địa với tỷ lệ 14/20 mẫu cây họ cà dương tính với PCFVd.

Tài liệu tham khảo

Chambers G A, Seyb A M, Mackie J, Constable F E, Rodoni B C, Letham D, Davis K, Gibbs M J (2013). First Report of Pepper chat fruit viroid in Traded Tomato Seed, an Interception by Australian Biosecurity. Plant Disease, 97:1386-1386.

Choi H, Jo Y, Cho W K, Yu J, Tran P-T, Salaipeth L, Kwak H-R, Choi H-S, Kim K-H (2020). Identification of viruses and viroids infecting tomato and pepper plants in Vietnam by metatranscriptomics. International Journal of Molecular Sciences, 21:7565.

Hadidi A, Flores R, Randles J W, Palukaitis P (2017). Viroids and Satellites Elsevier Science.

Reanwarakorn K, Klinkong S, Porsoongnurn J (2011). First report of natural infection of Pepper chat fruit viroid in tomato plants in Thailand. New Disease Reports, 24:6-6.

Sambrook J, Russell D (2001). Molecular cloning: a laboratory manual 1. 3rd Cold Spring Harbor. New York, NY:6.4-6.12.

Staroscik A (2004). Calculator for determining the number of copies of a template. URI Genomics & Sequencing Center.

Tseng Y-W, Wu C-F, Lee C-H, Chang C-J, Chen Y-K, Jan F-J (2021). Universal primers for rapid detection of six pospiviroids in Solanaceae plants using one-step Reverse-Transcription PCR and Reverse-Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification. Plant Disease, 105:2867-2872.

Trương Q T (2023). Nghiên cứu xây dựng quy trình phát hiện virus tommv (*Tomato mottle mosaic virus*) bằng kỹ thuật real time Rt-PCR. Luận văn thạc sĩ. Khoa Khoa học Sinh học, trường đại học Nông lâm TP. HCM, Việt Nam.

Verhoeven J T J, Botermans M, Jansen C C C, Roenhorst J W (2011). First report of Pepper chat fruit viroid in capsicum pepper in Canada. New Disease Reports, 23:15-15.

Verhoeven J T J, Botermans M, Schoen R, Koenraadt H, Roenhorst J W (2021). Possible Overestimation of Seed Transmission in the Spread of Pospiviroids in Commercial Pepper and Tomato Crops Based on Large-Scale Grow-Out Trials and Systematic Literature Review, Plants.

Verhoeven J T J, Jansen C, Roenhorst J, Flores R, De la Peña M (2009). Pepper chat fruit viroid: biological and molecular properties of a proposed new species of the genus Pospiviroid. Virus Research, 144:209-214.

Yanagisawa H, Matsushita Y (2017). Host ranges and seed transmission of Tomato planta macho viroid and Pepper chat fruit viroid. European Journal of Plant Pathology, 149:211-217.

DETECTION OF *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) BY RT-PCR ON *Solanaceae* IN TIEN GIANG PROVINCE

Tran Dinh Phong[1],Truong Quang Toan[2], Huynh Van Biet[1,2*]

[1]*Faculty of Biological Science, Nong Lam University, Ho Chi Minh City*

[2]*Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University, Ho Chi Minh City*

SUMMARY

PCFVd (*Pepper chat fruit viroid*) is a viroid that causes leaf stunting, leaf curling, small fruit on plants in the nightshade family. It spreads vigorously from diseased plants to healthy ones or through contaminated seeds. The earlier the disease manifests, the more severe the impact, resulting in reduced yield and post-harvest quality. Currently, there is no cure available for this viroid, so the most effective method for control is seed screening before planting and removing diseased plants. In this study, two pairs of primers, PCFVd-FW1/RE1 and FJJ2016-77/78, were used to sequence the entire PCFVd gene, and the primer pair PCF-seq-F/R was used to develop a PCFVd detection procedure. Subsequently, the PCR products from these primers were ligated into the pJET1.2 vector and transformed into *Escherichia coli* DH5α. The secondary structure of the PCFVd gene was determined from the sequencing results. An RT-PCR procedure was established to detect PCFVd using the primer pair PC-seq-F/R amplifying a 348 bp fragment. The optimal annealing temperature for the reaction was 60°C, the optimal primer concentration was 0.1 µM, and the limit of detection (LOD) of the RT-PCR reaction was determined to be 100 copies/µL. Out of 20 field samples, 14 tested positive for PCFVd. The study successfully established an optimized RT-PCR procedure to detect the presence of PCFVd. This is the first report of the presence of PCFVd in the Mekong Delta.

Keywords: Capsicum frutescens L, *PCFVd, RT-PCR, Solanum lycopersicum, Viroid*.

* Author for correspondence: Tel: +84-932 056 277; Email: hvbiet@hcmuaf.edu.vn

DỰ ĐOÁN MÔ HÌNH DI CƯ CÁ VỒ ĐÉM *Pangasius larnaudii* (SILURIFORMES: PANGASIIDAE) Ở HẠ LƯU SÔNG MEKONG

Trương Thị Oanh[1,2], Ngô Thái Bích Vân[1], Đặng Thúy Bình[2*]

[1]*Trường Đại học Bách Khoa, Đại học Đà Nẵng*

[2]*Viện Công nghệ Sinh học và Môi Trường, Trường Đại học Nha Trang*

TÓM TẮT

Cá vồ đém *Pangasius larnaudii* Bocourt, 1866 (Siluriformes: Pangasiidae) là loài cá da trơn kích thước lớn, giá trị kinh tế cao và được biết đến với khả năng di cư chặng dài để kiếm ăn và sinh sản ở hạ lưu sông Mekong. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành giải trình tự DNA dựa trên vị trí cắt giới hạn (Restriction site Associated DNA Sequencing –EzRAD) của cá vồ đém thu thập ở hạ lưu sông Mekong (Lào, Thái Lan, Campuchia và Việt Nam). Kết quả thu được 1.176 chỉ thị phân tử đa hình nucleotide đơn (Single Nucleotide Polymorphism – SNPs) trung tính để khảo sát và dự đoán mô hình di cư của loài cá này, đồng thời kiểm chứng giả thuyết về cấu trúc quần đàn theo các hệ thống di cư trong lưu vực. Sử dụng ba phương pháp, mô hình di cư hiện tại (divMigrate), lịch sử phân tách và pha trộn quần thể (Treemix) và mô phỏng lịch sử sinh học quần thể (dadi), kết quả ủng hộ giả thuyết về sự phân nhóm quần thể của cá vồ đém theo các hệ thống di cư. Đồng thời, các sự kiện và tuyến đường di cư xuôi dòng và ngược dòng được ghi nhận, phản ánh khả năng phát tán và khoảng cách di cư của *P. larnaudii*. Kết quả góp phần dự đoán mô hình di cư của cá, cung cấp dữ liệu phục vụ việc quản lý và bảo tồn nguồn lợi thủy sản trong bối cảnh môi trường sống đang ngày càng bị đe dọa bởi các hoạt động của con người.

Từ khóa: SNPs, hạ lưu sông Mekong, hệ thống di cư, mô hình di cư, *Pangasius larnaudii.*

MỞ ĐẦU

Sông Mekong bắt nguồn từ cao nguyên Tây Tạng (Trung Quốc) với chiều dài 4.909 km chảy qua địa phận của 6 quốc gia châu Á trước khi đổ ra Biển Đông, gồm Trung Quốc và Myanmar thuộc phần thượng lưu (Upper Mekong Basin-UMB); Lào, Thái Lan, Campuchia và Việt Nam thuộc phần hạ lưu (Lower Mekong Basin-LMB). Với sự đặc trưng về đa dạng các vùng sinh thái và chu kỳ nhịp lũ hàng năm, lưu vực sông Mekong được biết đến là nơi có nguồn lợi thủy sản phong phú, đặc biệt là các loài cá. Trong tổng số 1.148 loài cá được ghi nhận, khoảng 87% là loài có tập tính di cư và 50% sản lượng cá đánh bắt thuộc nhóm di cư đường dài (Hughes, 2024). Dựa trên sự phân bố và các tuyến đường di cư, ba hệ thống di cư đường dài (thượng lưu, trung lưu và hạ lưu) và ba hệ thống di cư ngang (Khorat, Sekong-Sesan-Srepok (3S) và Biển Hồ) được xác định (Kang và Huang, 2021). Trong khi hệ thống di cư hạ lưu (bao gồm hệ thống di cư ngang Biển Hồ và 3S) và trung lưu (kể cả hệ thống di cư ngang Khorat) có sự kết nối/chồng lấp với nhau thì hệ thượng lưu tương đối cô lập.

Cá vồ đém *Pangasius larnaudii* Bocourt, 1866 (Siluriformes: Pangasiidae) là loài cá da trơn có kích thước lớn (chiều dài thân đạt 130 cm, khối lượng 4,6 kg), và phân bố rộng ở sông và vùng ngập trong lưu vực LMB. Đây là loài có giá trị kinh tế cao và được biết đến với khả năng di cư chặng dài để kiếm ăn và sinh sản. Theo Poulsen và đồng tác giả (2004), thác Khôn, một hệ sinh thái phức tạp với độ cao 21 m và gồm nhiều thác ghềnh lớn nhỏ trải dài hơn 10 km nằm trên biên giới giữa Campuchia và Lào, là ranh giới giữa hệ thống di cư hạ lưu và trung lưu, điều này tạo nên sự di cư theo mùa khác nhau của cá vồ đém. Vào đầu mùa mưa, các quần thể cá ở phía trên thác Khôn di cư ngược dòng, trong khi đó sự di cư xuôi dòng diễn ra ở dưới thác Khôn. Vào đầu mùa khô, sự di cư ngược dòng được ghi nhận phổ biến ở bên dưới thác Khone và chỉ quan sát thấy một số tuyến đường di cư xuôi dòng rải rác phía trên thác Khôn. Cá vồ đém cũng được biết đến là loài di cư ngược dòng vượt thác Khôn để sinh sản. Cũng như các loài cá khác sinh sống ở sông Mekong, cá vồ đém sinh sản vào đầu mùa mưa, điều này thuận lợi cho việc trứng và ấu trùng trôi theo dòng chảy xuống vùng ngập phía Nam Campuchia và Đồng bằng sông Cửu Long-ĐBSCL (Việt Nam) để sinh trưởng và phát triển.

Cũng như các con sông lớn khác trên thế giới, sông Mekong đang phải đối mặt với những thách thức lớn về môi trường do các hoạt động của con người. Trong đó, sự phát triển hàng loạt các đập thủy điện có thể cản trở các tuyến đường di cư nhằm tiếp cận các bãi đẻ cũng như vùng ngập để trú ẩn trong mùa khô đối với cá vồ đém nói riêng và các loài cá di cư nói chung. Bên cạnh đó, việc xây dựng và vận hành các đập cũng làm thay đổi chế độ dòng chảy tự nhiên của sông, điều này không chỉ gây nhiễu tín hiệu di cư của cá trưởng thành mà còn ảnh hưởng đến sự trôi dạt của trứng và ấu trùng về hạ lưu (Poulsen *et al*., 2004). Do đó, thông tin về mô hình di cư của các loài cá ở sông Mekong trở nên cần thiết trong công tác quan trắc và quản lý nguồn tài nguyên cá trong bối cảnh môi trường sống của chúng ngày càng thay đổi.

Để dự đoán mô hình di cư, dữ liệu thông tin di truyền, chủ yếu là tần số alen, được phân tích dựa trên những công cụ tin sinh học với các thuật toán khác nhau. Trong số đó, tính năng "divMigrate" ước tính tỷ lệ di cư tương đối bất đối xứng và hướng di cư dựa trên sự chia sẻ tần số alen giữa các quần thể, và từ đó suy ra quần thể nguồn (*source*) và nhận (*sink*) (Sundqvist *et al*., 2016). Phần mềm Treemix v1.13 ước tính lịch sử phân tách và pha trộn của các quần thể dựa trên sơ đồ hình cây được xây dựng bằng thuật toán Maximum Likelihood, và sau đó, số sự kiện di cư được dự đoán (Pickrell và Pritchard, 2012). Công cụ "dadi" sử dụng phổ tần số alen (site frequency spectrum - SFS) để suy ra lịch sử phát triển sinh học quần thể gồm kích thước quần thể, tỉ lệ di cư và thời gian phân hóa (Portik *et al*., 2016). Các công cụ/ phần mềm sử dụng giá trị tối ưu để lựa chọn mô hình và thông số di cư phù hợp. Tuy nhiên, do cách tiếp cận khác nhau nên việc sử dụng công cụ hoặc chỉ số so sánh giữa các phần mềm là không phù hợp.

Cho đến nay, các nghiên cứu khảo sát mô hình di cư của cá vồ đém chỉ mới được thực hiện qua việc điều tra kiến thức của người dân địa phương (Poulsen *et al*., 2004) và sử dụng phương pháp gắn thẻ trên các cá thể ở Tonlé Sap-Campuchia và ghi nhận khoảng cách di cư dựa vào các cá thể được đánh bắt trở lại (Hogan *et al*., 2006). Nhằm bổ sung dữ liệu trong quản lý và phục hồi nguồn lợi, nghiên cứu này được thực hiện nhằm dự đoán mô hình di cư của cá vồ đém sử dụng chỉ thị phân tử đa hình nucleotide đơn, đồng thời kiểm chứng giả thuyết về cấu trúc quần đàn theo các hệ thống di cư ở LMB.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng, địa điểm và phương pháp thu mẫu

Mẫu cá vồ đém *Pangasius larnaudii* được thu từ các ngư dân đánh bắt, chợ địa phương hoặc cảng cá ở 04 quốc gia Lào, Thái Lan, Campuchia và Việt Nam thuộc lưu vực hạ lưu sông Mekong (Lower Mekong Basin-LMB) từ 2017 - 2021. Tổng cộng 192 cá thể được thu thập tại 07 quần thể dựa trên ba hệ thống di cư ở LMB gồm (i) hệ thượng lưu (Paksan-PA, n=21 cá thể), ii) hệ trung lưu (Ubon Ratchathani-UB, n=29; Ubon Ratchathani-sông Mun-UB-MR, n=24); (iii) hệ hạ lưu (Stung Treng-ST, n=32; Siêm Riệp-SR, n=30; Đồng Tháp-DT, n=32; An Giang-AG, n=24). Tất cả các mẫu cá là nguồn thực phẩm của địa phương và đã chết tại thời điểm lấy mẫu, do đó, nghiên cứu không thực hiện việc phê duyệt của Hội đồng đạo đức động vật. Mẫu cơ cá được giữ trong ethanol 95%, tiến hành mã số hóa, vận chuyển về phòng thí nghiệm Sinh học phân tử, Trường Đại học Nha Trang và bảo quản ở -20^{o}C để tiến hành các nghiên cứu về di truyền.

Tách chiết DNA và tạo thư viện gen EzRAD

DNA tổng số được tách chiết từ 30 mg mẫu cơ của từng cá thể cá vồ đém sử dụng bộ kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất và thực hiện hiệu chỉnh ở bước thu hồi với 03 lần rửa giải/ mẫu theo Dang *et al*. (2019). DNA từ các lần rửa giải được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 1,5%. Mẫu DNA với band sáng rõ và không bị đứt gãy được lựa chọn và tiến hành xác định nồng độ bằng máy đo huỳnh quang Qubit® 2.0 Flourometer (Invitrogen, Mỹ) sử dụng bộ kit Qubit dsDNA High Sensitivity (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Mẫu DNA (100 ng, ≥3 ng/µl) của từng cá thể cá vồ đém được tạo thư viện bộ gen bằng kỹ thuật ezRAD sử dụng bộ kit TruSeq Nano HT Library Preparation (Illumina, Mỹ). Quy trình tạo thư viện bộ gen được thực hiện theo Dang *et al*. (2019) gồm các bước chính: DNA bộ gen được phân cắt bằng 02 enzyme cắt giới hạn *MboI* và *Sau3AI* (New England Biolabs), tạo đầu bằng, lựa chọn phân đoạn DNA có kích thước trong khoảng 350-550 bp, gắn nucleotide A (poly-A tailing) và adapter. Thư viện bộ gen được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR và kiểm tra kết quả bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 1,5%. Các thư viện bộ gen được tiến hành giải trình tự hai chiều (pair-end) bằng hệ thống giải trình tự thế hệ mới HiSeq 4000 (Illumina, Mỹ) tại phòng Thí nghiệm Di truyền, Trường Đại học Texas A&M Corpus Christi, Hoa Kỳ.

Phương pháp xử lý số liệu

Xác định và sàng lọc các chỉ thị đa hình đơn nucleotide (Single Nucleotide Polymorphism-SNPs)

Quá trình xử lý số liệu bao gồm đánh giá chất lượng trình tự FASTQ, loại bỏ adapter và các base chất lượng thấp, lắp ráp *de novo* bộ gen tham chiếu, dóng hàng và xác định các chỉ thị SNPs thô được thực hiện theo quy trình dDocentHPC (https://github.com/cbirdlab/dDocentHPC). Dữ liệu SNPs thô được sàng lọc qua các thông số như mô tả của Dang *et al*. (2019) nhằm lựa chọn những SNPs đặc trưng của các quần thể sử dụng công cụ vcftools v0.1.11 và vcffilter v1.0.0.

Sau đó, nghiên cứu tiến hành kiểm định loci ngoại vi (outlier loci) sử dụng phần mềm Lositan Selection Workbench và BayeScan v2.1. Đối với Lositan, các loci ngoại vi được xác định bằng cách so sánh sự phân bố loci quan sát ở mức tin cậy 99% và 1% (với giá trị FDR < 0,05). Các loci ngoại vi được loại khỏi tập dữ liệu để thu nhận các SNPs trung tính sử dụng cho việc khảo sát và dự đoán mô hình di cư của cá vồ đém ở LMB.

Khảo sát và dự đoán mô hình di cư của cá vồ đém ở hạ lưu sông Mekong

Nghiên cứu tiến hành 03 phương pháp để khảo sát và dự đoán mô hình di cư của cá vồ đém ở LMB.

Thứ nhất, mô hình di cư hiện tại của các quần thể được khảo sát sử dụng tính năng "divMigrate" của gói dữ liệu "diveRsity" (Sundqvist *et al*., 2016) và thực hiện trên phần mềm RStudio. Đầu tiên, mô hình di cư đối xứng được giả định để phù hợp với các quá trình di cư xảy ra ở tất cả các quần thể và tỉ lệ di cư tương đối nằm trong khoảng từ 0 đến 1 được ước tính dựa trên số lượng cá thể di cư trên mỗi thế hệ (effective number of migrants - Nm). Sau đó, hướng và tỷ lệ di cư tương đối được tính toán với khoảng tin cậy 95% và độ lặp lại 10.000 lần. Sau đó, mô hình di cư tối ưu được suy ra dựa trên giá trị độ tương đồng cosine cao nhất.

Thứ hai, lịch sử phân tách và pha trộn của các quần thể được dự đoán sử dụng phần mềm Treemix v1.13 (Pickrell và Pritchard, 2012). Một sơ đồ hình cây của các quần thể không gốc được xây dựng bằng thuật toán Maximum Likelihood dựa trên tần số alen của tập dữ liệu SNPs trung tính. Sau đó, các sự kiện di cư có thể xảy ra (migration envents, m = 0-10) được khảo sát sử dụng phương pháp hồi quy từng bước. Số sự kiện di cư tối ưu được xác định bằng phương pháp evanno (Δm) bằng công cụ OptM v0.1.3 với mô hình có giá trị Δm cao nhất được xem là tối ưu.

Thứ ba, lịch sử sinh học quần thể cá vồ đém được thực hiện theo quy trình mô tả của Portik *et al*. (2016) (http://github.com/dportik/dadi_pipeline) sử dụng gói công cụ "dadi". Nghiên cứu tiến hành khảo sát 33 mô hình di cư dựa trên sự phân bố tần số alen trên các vị trí đa hình ba chiều (3D-SFS) của ba nhóm quần thể được giả định, gồm (i) thượng lưu (Paksan); (ii) trung lưu (Ubon Ratchathani, Ubon Ratchathani – Mun), và (iii) hạ lưu (Stung Treng, Siêm Riệp, Đồng Tháp, An Giang). Mỗi mô hình được thực hiện với các thông số bao gồm tỉ lệ đột biến trên từng base qua từng thế hệ được ước tính là $2,37 \times 10^{-5}$, thời gian thế hệ của loài là 5 năm, số lần lặp lại cho mỗi mô hình là 25 và phân tích được lặp lại 10 lần. Mô hình có giá trị Akaike's information criteria (AIC) nhỏ nhất được lựa chọn là mô hình tối ưu. Lịch sử phát triển mô hình sinh học (phân tách quần thể, thay đổi kích thước và mô hình di cư) được mô phỏng (dựa trên mô hình tối ưu với số lần lặp lại là 100 lần) sử dụng công cụ "demes" dựa trên ngôn ngữ lập trình Python.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xác định và sàng lọc các chỉ thị đa hình đơn nucleotide

Tất cả các cá thể cá vồ đém (n=192) được thu thập từ 07 quần thể ở hạ lưu sông Mekong được tách chiết DNA tổng số và đảm bảo đạt nồng độ từ 3 ng/µl trở lên để tạo thư viện gen dựa trên kỹ thuật ezRAD. Thư viện gen của cá vồ đém với dải band có kích thước trong khoảng 350 – 550 bp được giải trình tự.

Kết quả giải trình tự 192 thư viện cá vồ đém thu được 313.556.278 đoạn đọc thô (kích thước mỗi đoạn đọc là 151 bp). Sau khi loại bỏ các base chất lượng kém, adapter và đoạn đọc có chiều dài nhỏ hơn 50 bp, 259.912.528 đoạn đọc chất lượng cao (chiếm 82,9%) được thu nhận. Bộ gen tham chiếu của cá vồ đém được lắp ráp *de novo* có kích thước là 35.729.239 bp (tỉ lệ GC là 35,1%). Dóng hàng các đoạn đọc của mỗi cá thể ở các quần thể với bộ gen tham chiếu, nghiên cứu xác định được 59.769 SNPs thô. Qua các thông số lọc được trình bày ở Bảng 1, 1.270 SNPs đặc trưng được chọn lọc từ 160 cá thể cá vồ đém. Sử dụng hai phương pháp BayeScan và Lositan, nghiên cứu xác định được 94 loci ngoại vi và tiến hành loại bỏ khỏi tập dữ liệu để thu được 1.176 SNPs trung tính.

Bảng 1. Số lượng cá thể và SNPs sau các bước lọc

Các thông số lọc	Số cá thể	Số SNPs
Các loci có hai alen	192	58.326
Loại bỏ đoạn chèn/xóa (indels)	192	48.526
Chất lượng trung bình (Q) > 30	192	48.526
Độ sâu bao phủ tối thiểu (minMeanDP) ≤ 5	192	33.622
Tỷ lệ phát hiện SNPs trên tất cả các cá thể (80%)	192	9.937
Số lượng Alen thay thế (MAC) < 3	192	9.022
Tần số alen thay thế (MAF)	192	8.556
Tỷ lệ phát hiện SNPs trên từng cá thể (>80%*)	160	1.917
Cân bằng HWE với độ tin cậy p<0,001	160	1.842
1 SNP/ contig	**160**	**1.270**

Khảo sát và dự đoán mô hình di cư của cá vồ đém ở hạ lưu sông Mekong

Mô hình di cư hiện tại

Mô hình di cư tối ưu của các quần thể cá vồ đém ở LMB thể hiện sự trao đổi gen giữa các quần thể theo hướng ngược dòng và xuôi dòng, với tỉ lệ di cư tương đối dựa trên tần số alen được ghi nhận là 0,5 – 0,9, trong đó tỉ lệ di cư thấp nhất thể hiện từ SR đến UB (ngược dòng, qua thác Khone) và cao nhất từ AG đến DT (di cư ngang

giữa 2 nhánh sông) (Hình 1A). Quần thể PA thuộc hệ thống di cư thượng lưu thể hiện là địa điểm phát tán di cư (xuôi dòng) với tỉ lệ thấp (0,49). Ở hệ thống di cư trung lưu, quần thể UB thuộc dòng chính sông Mekong là địa điểm tiếp nhận nguồn từ hầu hết các quần thể và có sự di cư xuôi dòng đến quần thể DT ở ĐBSCL (tỉ lệ di cư tương đối = 0,77), trong khi đó, quần thể UB-MR thuộc dòng nhánh (sông Mun) là điểm phát tán nguồn gen đến các quần thể UB, ST, DT, AG và tiếp nhận nguồn gen từ PA và SR. Ở hệ thống di cư hạ lưu, quần thể ST thuộc khu vực giao thoa giữa hệ thống sông Mekong và 3S thể hiện là điểm tiếp nhận nguồn gen của hầu hết các quần thể và có sự di cư ngược dòng đến UB (tỉ lệ di cư tương đối = 0,83). Quần thể SR thuộc hệ thống Biển Hồ là điểm phát tán nguồn gen đến tất cả các quần thể. Trong khi AG là điểm tiếp nhận nguồn gen từ 3 quần thể (PA, UB-MR và SR) và phát tán đến 3 quần thể khác (UB, ST và DT) thì DT chủ yếu tiếp nhận nguồn gen từ hầu hết các quần thể, ngoại trừ SR. Nghiên cứu hiện tại ghi nhận sự di cư ngược dòng của cá vồ đém vượt qua thác Khôn, thể hiện qua 3 đường di cư từ AG đến UB, ST đến UB và SR đến PA với tỉ lệ di cư tương đối lần lượt là 0,64; 0,83 và 0,49.

Lịch sử phân tách và pha trộn quần thể

Sơ đồ hình cây của các quần thể được xây dựng bằng thuật toán Maximum Likelihood với 5 sự kiện di cư tối ưu (Δm=0,9) được thể hiện ở Hình 1B. Theo Hình 1B, 5 sự kiện di cư được suy ra gồm: (1) từ điểm trung gian trên thác Khone (UB và PA) và dưới thác Khone (AG và DT) đến AG (di cư xuôi dòng, tỉ lệ di cư w = 0,48), (2) từ điểm trung gian ở PA đến UB (di cư xuôi dòng, w = 0,21); (3) từ UB đến UB-MR (di cư ngang và ngược dòng, w = 0,4); (4) từ UB đến điểm trung gian của UB-MR và ST (di cư ngang và xuôi dòng, w = 0,24); và (5) từ điểm trung gian trên thác Khone (UB và UB-MR) và dưới thác Khone (SR và ST) đến DT (di cư xuôi dòng, w = 0,27).

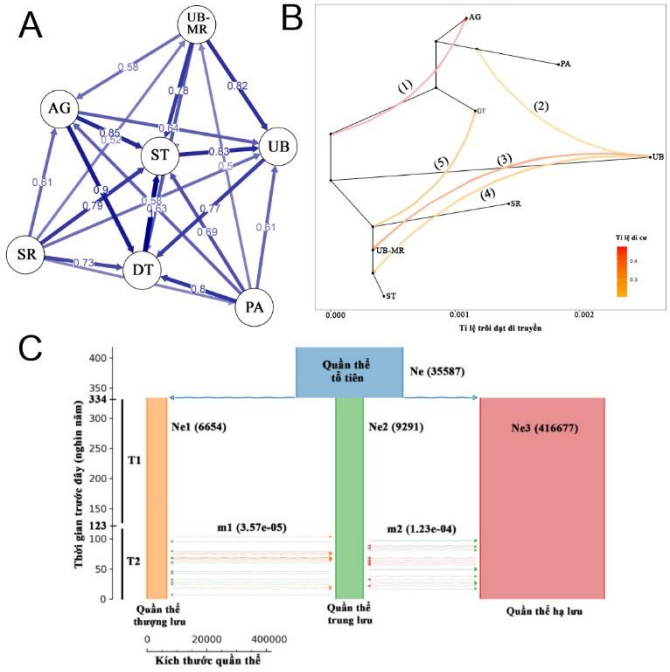
Lịch sử phát triển sinh học quần thể

Mô hình tối ưu được lựa chọn dựa vào giá trị AIC thấp nhất là "ba quần thể đồng thời phân tách, di cư thứ cấp giữa các quần thể liền kề". Mô hình lịch sử phát triển sinh học quần thể ở Hình 1C cho thấy quần thể tổ tiên giả định với kích thước quần thể ước tính là 35.587. Tại thời điểm khoảng 334 nghìn năm trước, quần thể ban đầu đồng thời phân tách thành ba quần thể, thượng lưu, trung lưu và hạ lưu với kích thước quần thể ước tính lần lượt là 6.654; 9.291; và 416.677. Tại thời điểm khoảng 123 nghìn năm trước, giữa các quần thể liền kề xảy ra sự di cư thứ cấp, trong đó tỉ lệ di cư giữa quần thể thượng lưu và trung lưu là $3,57x10^{-5}$ và giữa quần thể trung lưu và hạ lưu là $1,23x10^{-4}$.

Nghiên cứu hiện tại ủng hộ giả thuyết sự phân nhóm quần thể của cá vồ đém theo ba hệ thống di cư đường dài (thượng lưu, trung lưu và hạ lưu) và các hệ di cư ngang (Biển Hồ, Khorat) ở LMB, trong đó sự di cư thứ cấp xảy ra giữa các quần thể liền kề (thượng lưu ⇔ trung lưu, trung lưu ⇔ hạ lưu) (phân tích dadi). Các sự kiện di cư được suy ra chủ yếu là di cư xuôi dòng (Treemix) và chỉ ba tuyến đường di cư vượt Thác Khone được dự đoán (DivMigrate).

Cá vồ đém được biết là loài di cư đường dài để tìm kiếm thức ăn và sinh sản (Poulsen *et al*., 2004), tuy nhiên khoảng cách di cư của loài này vẫn chưa được xác định. Ở mô hình di cư hiện tại divMigrate, nghiên cứu ghi nhận khoảng cách di cư ngược dòng của cá vồ đém xa nhất là từ Siêm Riệp đến Paksan (hơn 1.000 km), tuy nhiên tỉ lệ di cư khá thấp (w = 0,49) (Hình 1A). Trong khi mô hình lịch sử phát triển sinh học quần thể cho thấy sự di cư thứ cấp giữa quần thể trung lưu và thượng lưu (tỉ lệ di cư $3,57x10^{-5}$) (Hình 1C) thì lịch sử phân tách và pha trộn quần thể Treemix không ghi nhận sự kiện di cư nào liên quan đến hệ thống di cư này (Hình 1B). Ở khu vực thượng lưu, cá trưởng thành thường ở lại dòng chính để sinh trưởng và phát triển, cùng với số lượng vùng ngập ở khu vực này tương đối ít (Poulsen *et al*., 2004), do đó việc di cư ngược dòng ở đoạn sông này không diễn ra hàng loạt và chỉ xảy ra với tần suất thấp. Bên cạnh đó, các nghiên cứu ở đoạn sông này còn hạn chế, do đó, thông tin về sự kết nối quần thể và tuyến đường di cư của cá vẫn chưa được biết đến.

Bên cạnh đó, thông tin về bãi đẻ của cá vồ đém vẫn chưa rõ ràng, các vùng ngập, đoạn sông dưới khu vực thác Khôn gần Stung Treng và ngay bên trên thác Khôn (Poulsen *et al*., 2004) có thể là những khu vực thích hợp cho việc sinh sản. Với việc thực hiện di cư đường dài và ngược dòng để sinh sản, nghiên cứu ghi nhận sự di cư từ quần thể hạ lưu lên trung lưu và vượt qua khu vực thác Khôn ở mô hình di hiện tại và lịch sử phát triển sinh học quần thể (ST đến UB và SR đến PA, Hình 1A); di cư thứ cấp giữa quần thể hạ lưu và trung lưu Hình 1C). Điều này có thể thấy các vùng ngập ở ngay dưới và trên thác Khôn hoặc thậm chí ở thượng lưu có thể là bãi đẻ của loài cá này.



Hình 1. Mô hình di cư của cá vồ đém ở hạ lưu sông Mekong

A. Mô hình di cư hiện tại divMigrate, mũi tên chỉ hướng di chuyển dòng gen và các con số biểu thị tỉ lệ di cư tương đối, độ đậm nhạt của mũi tên tương ứng với tỉ lệ di cư tương đối từ cao đến thấp; B. Sơ đồ hình cây của các quần thể cá vồ đém được xây dựng bằng thuật toán Maximum likelihood và các sự kiện di cư được suy ra bằng TreeMix, mũi tên chỉ hướng của dòng gen, màu sắc và độ dày của đường biểu thị tỉ lệ di cư; C. Mô hình lịch sử phát triển sinh học quần thể tối ưu dựa trên gói công cụ dadi

Ở cả 3 phương pháp trong nghiên cứu hiện tại, sự di cư xuôi dòng của cá vồ đém thể hiện rõ ràng (Hình 1). Điều này có thể được giải thích bởi hai lý do: (i) sau khi sinh sản, cá trưởng thành thường di cư xuôi dòng về các vùng ngập và vực sâu ở hạ lưu, nơi thích hợp cho hoạt động tìm kiếm thức ăn và trú ẩn vào mùa khô; (ii) cá sinh sản vào đầu mùa mưa, thời điểm này nước sông Mekong dâng cao, tạo điều kiện cho trứng và ấu trùng trôi theo dòng chảy xuống vùng ngập phía Nam Campuchia và có thể đến ĐBSCL (Poulsen *et al*., 2004).

Lịch sử phát triển sinh học quần thể của cá vồ đém cho thấy một quần thể giả định tổ tiên, tuy nhiên đến khoảng 334 nghìn năm trước đây (giai đoạn giữa kỷ Đệ tứ Quaternary, thế Pleistocen) xảy ra sự phân tách đồng thời ba nhóm quần thể thượng lưu, trung lưu và hạ lưu. Các sự kiện lịch sử về kiến tạo địa lý ở giai đoạn Pliocen - Pleistocene được xem là yếu tố tạo ra sự phân tách các quần thể. Cùng với đó, sự hình thành các hệ sinh thái do kiến tạo địa lý là điều kiện cho sự di cư thứ cấp xảy ra giữa các quần thể thượng-trung lưu, trung-hạ lưu. Điều này cũng được ghi nhận ở một số nghiên cứu trên các loài cá ở sông Mekong (Adamson *et al*., 2010; Jamaluddin *et al*., 2019).

Nghiên cứu hiện tại ghi nhận sự di cư giữa các quần thể thuộc ba hệ thống di cư (thượng – trung – hạ lưu) và các hệ di cư ngang (Biển Hồ, Khorat) (Hình 1). Đồng thời, các quần thể cá vồ đém vẫn duy trì ở mức độ khỏe mạnh với kích thước quần thể ước tính đều lớn hơn 500 (Hình 1C) (dựa theo quy tắc 50/500 của Franklin, 1980). Ở ba hệ thống di cư đường dài (thượng – trung – hạ lưu), thời điểm thu mẫu trong nghiên cứu hiện tại (2017 – 2021), hầu hết các đập thủy điện chưa đưa vào hoạt động. Ngoại trừ, đập Don Sahong (cao 22,5m) hoàn thành năm 2020 trên kênh Hou Sahong, kênh mà các loài cá di cư (kể cả cá vồ đém) có thể sử dụng để di chuyển qua khu vực thác Khôn, là điều đáng lo ngại cho tuyến đường di cư của các loài cá này. Ở hệ thống di cư ngang Biển Hồ - Mekong, việc không có các rào cản vật lý cùng với sự thay đổi hướng dòng chảy 2 lần/ năm của sông Tonle Sap đã tạo điều kiện cho cá vồ đém thực hiện di cư. Ở hệ thống di cư ngang Khorat, sự di cư của cá vồ đém từ SR đến UB-MR (Hình 1A) và UB đến UB-MR (Hình 1C) được ghi nhận. Qua đây có thể thấy kết quả dự đoán chưa ghi nhận những ảnh hưởng của đập thủy điện đến tuyến đường di cư của cá vồ đém, tuy nhiên, điều này không có nghĩa là không xảy ra trong tương lai gần. Một nghiên cứu gần đây ghi nhận sự ảnh hưởng của các con đập ở thượng nguồn sông Sesan là nguyên nhân gây cô lập quần thể cá lăng *Hemibagrus spilopterus* (Siluriformes: Bagridae) ở Đăk Lăk (Ackiss *et al*., 2019).

Trong điều kiện các mối đe dọa ngày càng tăng và việc dự đoán ảnh hưởng của những thay đổi trong khu vực đòi hỏi một cái nhìn toàn diện hơn về lịch sử tự nhiên của các loài cá phân bố ở sông Mekong. Phương thức dinh dưỡng, tăng trưởng, đặc điểm sinh học sinh sản, đa dạng di truyền và sự kết nối quần thể là những thông tin

quan trọng nhằm cung cấp sự hiểu biết toàn diện hơn về sinh thái quần thể của các loài cá. Quản lý và giảm thiểu các mối đe dọa đối với các loài quan trọng về mặt sinh thái và kinh tế đòi hỏi sự hiểu biết sâu rộng về cấu trúc và động học quần thể, trong đó khảo sát và dự đoán các mô hình di cư đóng vai trò quan trọng trong đánh giá và bảo tồn các quần đàn thủy sản.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu thu nhận được 1.176 SNPs trung tính từ 192 mẫu cá vồ đém thuộc 07 quần thể được thu thập ở LMB và tạo thư viện bộ gen. Sử dụng các phương pháp khảo sát và dự đoán mô hình di cư của cá vồ đém ở LMB (hiện tại, lịch sử phân tách và pha trộn quần thể, và mô phỏng lịch sử sinh học quần thể), nghiên cứu ghi nhận cá vồ đém là loài di cư chặng dài, mô hình và các sự kiện di cư hỗ trợ các tuyến đường di cư xuôi dòng và ngược dòng.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu này được tài trợ bởi Chương trình Đối tác nâng cao trình độ nghiên cứu khoa học (PEER) và Cơ quan Hợp tác Phát Triển Quốc tế (USAID), Hoa Kỳ qua dự án PEER 6-435. Nghiên cứu sinh Trương Thị Oanh được tài trợ bởi Tập đoàn Vingroup –Công ty CP và hỗ trợ bởi chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn (VinBigdata), mã số VINIF.2020.TS.34, VINIF.2021.TS091, and VINIF.2022.TS.091. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn các thành viên dự án PEER 6-435 đã thu mẫu ở các quốc gia thuộc LMB và ThS. Trần Quang Sáng (Trường Đại học Nha Trang) đã hỗ trợ các phân tích về tin sinh học trong nghiên cứu này.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ackiss AS, Dang BT, Bird CE, Biesack EE, Chheng P, Phounvisouk L, Vu QHD, Uy S, Carpenter KE (2019). Cryptic lineages and a population dammed to incipient extinction? Insights into the genetic structure of a Mekong River catfish. *J Hered*, 110: 535–547.

Adamson EAS, Hurwood DA, Mather PB (2010). A reappraisal of the evolution of Asian snakehead fishes (Pisces, Channidae) using molecular data from multiple genes and fossil calibration. *Mol Phylogenet Evol*, 56: 707–717.

Dang BT, Vu QHD, Biesack EE, Doan TV, Truong OT, Tran TL, Ackiss AS, Stockwell BL, Carpenter KE (2019). Population genomics of the peripheral freshwater fish *Polynemus melanochir* (Perciformes, Polynemidae) in a changing Mekong Delta. *Conserv Genet*, 20: 961–972.

Franklin IR (1980). Evolutionary changes in small populations. Soulé ME, Wilcox BM, eds. Conservation Biology: an Evolutionary-Ecological Perspective*, Sinauer, Sunderland*: 135–149.

Hogan Z, Em S, Tach P, Hortle KG (2006). Tagging fish - a case study from the Tonle Sap, Cambodia. MRC Technical Paper, 12, 1-34.

Hughes K (2024). The Mekong's forgotten fishes and the emergency recovery plan to save them. *WWF, Gland, Switzerland*.

Jamaluddin JAF, So N, Tam BM, Ahmad A, Grudpan C, Page LM, Khaironizam MZ, Mohd NSA (2019). Genetic variation, demographic history and phylogeography of tire track eel, *Mastacembelus favus* (Synbranchiformes: Mastacembelidae) in Southeast Asia. *Hydrobiologia*, 838: 163–182.

Kang B, Huang X (2021). Mekong fishes: Biogeography, migration, resources, threats, and conservation. *Rev Fish Sci Aquac*, 30: 170–194.

Pickrell JK, Pritchard JK (2012). Inference of population splits and mixtures from Genome-wide allele frequency data. *PLoS Genet*, 8: e1002967.

Portik DM, Leache AD, Rivera D, Blackburn DC, Rodel MO, Barej MF, Hirschfeld M, Burger M, Fujita MK (2016). Evaluating mechanisms of diversification in a Guineo-Congolian tropical forest frog using demographic model selection. *Mol Ecol,* 38: 42–49.

Poulsen AF, Hortle KG, Valbo-Jørgensen J, Chan S, Chhuon CK, Viravong S, Bouakhamvongsa K, Suntornratana U, Yoorong N, Nguyen TT, Tran BQ (2004). Distribution and ecology of some important riverine fish species of the Mekong River Basin. *MRC Technical Paper*, 1–116.

Sundqvist L, Keenan K, Zackrisson M, Prodöhl P, Kleinhans D (2016). Directional genetic differentiation and relative migration. *Ecol Evol*, 6: 3461–3475.

PREDICTION MODELS FOR MIGRATION PATTERNS OF *Pangasus larnaudii* (SILURIFORMES: PANGASIIDAE) IN THE LOWER MEKONG RIVER BASIN

Trương Thị Oanh[1,2], Ngô Thái Bích Vân[1], Đặng Thúy Bình[2*]

[1]*The University of Danang, University of Science and Technology*

[2]*Institute for Biotechnology and Environment, Nha Trang University*

SUMMARY

The large body catfish *Pangasius larnaudii* Bocourt, 1866 (Siluriformes: Pangasiidae) is a high value species and is known for its ability to migrate long distances to feed and reproduce in the Mekong River. In this study, we applied the EzRAD-seqs of *P. larnaudii* collected from the Lower Mekong Basin - LMB (Laos, Thailand, Cambodia, and Vietnam). As a result, 1,176 neutral single nucleotide polymorphisms (SNPs) were obtained to apply prediction models for the migration patterns of this fish species. Three approaches including divMidrate, Treemix and dadi supported the hypothzied population structure of *P. larnaudii* in concordant to three migration systems at LMB (three systems). The complex downstream and upstream migration events and pathways were documented, which likely reflect species dispersal ability and migration distance. Current predictive results provide data for forecasting fish migration, which is essential for fisheries management and conservation efforts in the face of habitats increasingly threatened by human activities.

Keywords: SNPs, Lower Mekong Basin, migration system, migration pattern, *Pangasius larnaudii.*

* Author for correspondence: Tel: +84-904135750; Email: binhdt@ntu.edu.vn

KHẢO SÁT ẢNH HƯỞNG CỦA SODIUM AZIDE ĐẾN SỰ PHÁT SINH ĐỘT BIẾN TRÊN HOA THANH TÚ (*EVOLVULUS ALSINOIDES*)

Trần Lê Nguyên, Lê Thanh Nhàn, Lê Thị Anh Thư, Nguyễn Thị Pha*

Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

TÓM TẮT

Đột biến cảm ứng là một phương pháp tạo giống khả thi được ứng dụng để cải tiến cây trồng và tạo ra sự đa dạng di truyền để tạo ra các giống cây trồng mới. Nghiên cứu này nhằm mục đích gây đột biến cây Thanh Tú *(Evolvulus alsinoides)* bằng sodium azide ở các nồng độ 0, 200, 400, 600 và 800 ppm. Các đoạn thân chứa mầm ngủ được xử lý trong 30, 60, 90 và 120 phút, trong điều kiện nhà lưới. Tỷ lệ sống sót và số lượng hoa mẫu xử lý Sodium azide giảm khi tăng nồng độ của hóa chất này. Tỷ lệ sống thấp nhất ghi nhận ở nghiệm thức xử lý 800 ppm sodium azide trong 120 phút là 5,71%, không ghi nhận sự xuất hiện hoa ở nghiệm thức này và cao nhất 82, 85% với 8,75 hoa/ chậu ở nghiệm thức xử lý 200 ppm trong 30 phút. Mười hai cá thể cây Thanh Tú xử lý sodium azide tạo được kiểu hình khác biệt so với đối chứng trong đó có 4 khác biệt ở lá và 8 khác biệt ở hoa được phân tích di truyền với 6 mồi ISSR. Kết quả ghi nhận mức độ khác biệt về di truyền của 12 cá thể khảo sát so với đối chứng là 37%, cá thể TT8-90-A (800 ppm; 90 phút) với mức độ khác biệt so với đối chứng 26%, ở nhóm 5 trong giản đồ có tiềm năng nhất trong các cá thể đột biến vì tạo được hoa có màu xanh đậm ở mép cánh hoa và viền trắng ở đầu mép cánh hoa, xuất hiện một phần màu tím phân bố đều trên các cánh hoa.

Từ khóa: Đột biến, *Evolvulus alsinoides*, ISSR, sodium azide, Thanh Tú.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Đa dạng nguồn gene giúp tạo, chọn và phát triển các giống cây trồng độc đáo và ưu việt. Trong đó, cây Thanh Tú *(Evolvulus alsinoides)* (2*n* = 26) hay còn được biết đến với tên hoa Bất Giao là một thành viên họ *Convolvulaceae*, là loài hoa được nhiều người ưa chuộng vì đặc tính dễ thích nghi và ra hoa quanh năm. Sinh sản truyền thống và lai tạo theo phương pháp thông thường không tối ưu cho Thanh Tú vì tính miên trạng của hạt Thanh Tú kéo dài trong vài tháng (Naikawadi *et al*., 2012) gây bất lợi trọng việc chọn tạo giống mới. Cây cảnh được xem là đối tượng lý tưởng cho các nghiên cứu lai tạo giống do các đặc tính thương mại của chúng, bao gồm các đặc điểm của hoa (màu sắc, kích thước, mùi hương, tuổi thọ), các đặc điểm của lá (hình dạng, kích thước, hình thành sắc tố, sự khác biệt), các đặc tính quan trọng về mặt thương mại có thể chọn qua việc xử lý đột biến (Datta *et al*., 2020). Hiện nay, các tác nhân gây đột biến bao gồm vật lý (tia gamma và X, và neutron nhanh) và hóa học (colchicine, dimethyl sulfate, diethyl sulfate, ethyl methanesulfonate, 1-methyl-1-nitrosourea, và sodium azide) trong đó sodium azide (SA) được nhiều nghiên cứu sử dụng đã chứng minh vai trò của hóa chất này trong cải biến di truyền ở thực vật. Nghiên cứu của Singh và đồng tác giả (2020) cho thấy SA có hiệu quả trong việc tạo ra sự biến đổi di truyền về các đặc tính góp phần vào năng suất ở đậu Hà Lan và có thể được sử dụng để chọn ra các thế hệ ưu việt trong quần thể hoặc được sử dụng trong các chương trình lai tạo khác nhau.

Ngày nay, các chỉ thị phân tử đã được sử dụng một cách hiệu quả trong nhân giống gây đột biến để phát hiện chính xác các đột biến thực sự và để loại bỏ các cây không bị đột biến trong những bước đầu của thí nghiệm. Thêm vào đó, các chỉ thị phân tử có thể xác định mối quan hệ di truyền giữa các đột biến và cây mẹ ban đầu (Kang *et al.*, 2013) thông qua khác biệt về kiểu gene. Chỉ thị phân tử ISSR dựa trên kỹ thuật PCR có độ tin cậy cao, không yêu cầu thông tin về trình tự gene cũng như các nghiên cứu di truyền trước (Holton *et al*., 2002). Các chỉ thị phân tử phân tử ISSR đã được sử dụng thành công cho đánh giá sự đa dạng di truyền trên nhiều loại cây trồng như đậu nành, cà phê, lúa... Nghiên cứu này kết hợp việc xử lý hóa chất SA kết hợp chỉ thị phân tử ISSR nhằm tuyển chọn các dòng Thanh Tú có khác biệt về hình thái hoa và lá, tạo nguồn vật liệu cho các nghiên cứu chọn tạo giống hoa Thanh Tú.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Đoạn thân có chiều dài từ 5-6 cm mang mầm ngủ được cắt từ cây Thanh Tú (*Evolvulus alsinoides*) 1 năm tuổi trồng tại phòng thí nghiệm Nuôi cấy mô thực vật thuộc Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ.

Phương pháp nghiên cứu

Đoạn thân cây Thanh Tú mang mầm ngủ được xử lý với hóa chất SA ở 5 mức nồng độ lần lượt 0 ppm, 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm trong 4 khoảng thời gian 30, 60, 90 và 120 phút. Sau khi ngâm, mẫu cây được trồng

trong đất chuyên trồng hoa của công ty Xuân Nông - Việt Nam. Thí nghiệm hai nhân tố hoàn toàn ngẫu nhiên, lặp lại 5 lần, mỗi lần một chậu, mỗi chậu 7 đoạn thân được bố trí thí nghiệm ở nhà lưới Trường Nông Nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ. Chỉ tiêu theo dõi: tỷ lệ sống (%) thời điểm 30 ngày; số lượng hoa/chậu thời điểm 60 ngày. Sự khác biệt về hình thái hoa, lá được mô tả.

Phương pháp tách chiết DNA tổng số: Các cá thể có khác biệt về hình thái lá, hoa được chọn để ly trích DNA tổng số theo phương pháp CTAB mô tả bởi Rogers và Bendich (1988) có cải tiến (Trần Nhân Dũng *et al*., 2011). DNA ly trích được bảo quản ở -20°C để sử dụng cho các phản ứng PCR-ISSR.

Phân tích bằng chỉ thị PCR-ISSR

Sản phẩm của quá trình ly trích DNA được sử dụng để phân tích khác biệt di truyền các mẫu thu được bằng kỹ thuật ISSR với 6 mồi (Bảng 1). Mồi ISSR được tổng hợp tại Công ty sinh hóa Phù Sa, Cần Thơ. Phản ứng PCR được thực hiện trong thể tích 15 µL. Thành phần một phản ứng PCR: 8,65 µL H_2O, 3 µL Buffer 5X, 1,2 3 µL Mồi 10 pmoL, 0,15 µL DNA polymerase 5 unit/µL, 2 µL DNA khuôn 30 µg/ µL. Phản ứng PCR được tiến hành trên máy PCR với chương trình gia nhiệt: 94℃ - 5 phút; 94℃ - 45 giây; nhiệt độ gắn mồi 47℃–52℃ (Bảng 1) –1 phút; kéo dài 72℃ trong 2 phút; thực hiện 40 chu kỳ, ổn định mẫu ở 72℃ trong 10 phút. Sử dụng máy PCR SureCycler 8800 (Agilent, Mỹ). Sản phẩm PCR được điện di trong gel agarose 2% ở hiệu điện thế 120 Volt, trong 80 phút sử dụng dung dịch đệm TBE (Tris-Borate-EDTA), với thang chuẩn 1000 bp của Fermentas.

Bảng 1. Danh sách mồi ISSR được sử dụng

STT	Tên mồi	Trình tự (5'-3')	Nhiệt độ gắn mồi (^oC)	TLTK
1	UBC 808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	47	Oumer et al., 2020
2	UBC 813	CTCTCTCTCTCTCTCTT	50	Oumer et al., 2020
3	UBC 881	GGGTGGGGTGGGGTG	47	Oumer et al., 2020
4	UBC 818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	50	Hassel và Gunnarsson, 2003
5	UBC 830	TGTGTGTGTGTGTGTGG	52	Saki et al., 2016
6	ISSR 4	CTCTCTCTCTCTCTCTGG	50	Abbasi and Afsharzadeh, 2016

**UBC: Primer set 9. University of British Columbia, Vancouver, Canada.*

Phương pháp xử lý số liệu

Phương pháp phân tích thống kê các số liệu thu được từ các thí nghiệm được nhập, xử lý bằng phần mềm Excel 2019, phân tích phương sai hai nhân tố (two-way ANOVA) và so sánh sự khác biệt (sự khác nhau giữa các kết quả trung bình của các nghiệm thức) bằng kiểm định Tukey có trong phần mềm Minitab 16 ở mức ý nghĩa 1%. Xây dựng giản đồ phả hệ theo thuật toán UPGMA của (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sneath and Sokal, 1973) được thực hiện bằng chương trình NTSYS 2.1 (Exeter Software, Mỹ) dựa trên hệ số tương đồng di truyền Jaccard (1908).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả ảnh hưởng của xử lý SA lên tỷ lệ sống và số lượng hoa Thanh Tú

Kết quả về tỷ lệ sống và số lượng hoa ghi nhận ở Hình 1 cho thấy khi gia tăng nồng độ và thời gian xử lý SA thì khả năng sống của đoạn thân cây Thanh Tú giảm từ 82,85% (200 ppm; 30 phút) xuống 5,71% (800 ppm; 120 phút) so với các nghiệm thức đối chứng (có tỷ lệ sống 100%) khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức 1% điều này cho thấy tác nhân đột biến SA đã tác động mạnh mẽ lên sức sống của đoạn thân cây Thanh Tú. Theo Salim và đồng tác giả (2009) SA ảnh hưởng lên hầu hết lên các đặc tính sinh lý của thực vật, trong đó SA tác động mạnh mẽ đến sự hô hấp của tế bào bằng cách ngăn chặn một số ion hoá trị 2 dẫn đến ức chế hình thành các enzyme hô hấp gây chết tế bào, điều này làm tăng tỷ lệ chết khi xử lý SA. Thanh Tú là dạng cây cảnh vì thế số lượng hoa là tiêu chí rất quan trọng. Thanh Tú bắt đầu nở hoa dao động ở thời điểm từ ngày 36 đến ngày 54 (tính từ thời điểm bắt đầu xử lý SA), các nghiệm thức đối chứng ra hoa sớm nhất ở 36 ngày. Nghiệm thức 800 ppm trong 30 phút ra hoa sớm ở ngày 37 và nghiệm thức ra hoa trễ nhất ở nồng độ 400 ppm trong 90 phút (ngày thứ 54). Số lượng hoa ở các nghiệm thức ghi nhận ở thời điểm 60 ngày được trình bày trong bảng 2. Có sự tương tác giữa nồng độ SA và thời gian xử lý giữa các nghiệm thức. Kết quả cho thấy số lượng hoa của các mẫu đoạn thân Thanh Tú sau 60 ngày có xu hướng giảm dần theo cả nồng độ và thời gian xử lý SA (khác biệt có ý nghĩa thống kê mức 1%). Ngoài ra, nghiệm thức xử lý SA trong thời gian và nồng độ cao nhất là 800 ppm, 120 phút không xuất hiện hoa. Số hoa nở cao nhất 8,85 hoa/chậu ở nghiệm thức là 200 ppm với thời gian xử lý là 30 phút, trong khi đó các nghiệm thức đối chứng không xử lý SA cho số hoa dao động từ 8,90-8,99 hoa/chậu. Trong nghiên cứu này, nồng độ SA càng cao kết hợp thời gian xử lý dài đã hạn chế sự ra hoa của Thanh Tú.

Quan sát các nghiệm thức ghi nhận được 12 cá thể Thanh Tú xử lý SA tạo được kiểu hình khác biệt so với đối chứng trong đó có 4 khác biệt ở lá về sự xuất hiện màu đỏ sẫm ở vị trí gân lá và toàn bộ bề mặt. Đối với hoa có 8 khác biệt về màu sắc, phần lớn các cá thể có sự xuất hiện của màu trắng ở vị trí viền cánh hoa hoặc dạng các đóm trắng trên toàn bộ bề mặt cánh hoa, ngoài ra một số cá thể có màu hoa nhạt hoặc đậm hơn so với đối chứng được mô tả chi tiết ở bảng 3. Cá thể xử lý 800 ppm, 90 phút có triển vọng trong việc phát triển giống Thanh Tú mới vì ghi nhận được màu xanh, tím và trắng trên bề mặt cánh hoa, khác biệt so với đối chứng (Hình 1). Cũng theo nghiên cứu của Singh và đồng tác giả (2020) khi tạo đột biến bằng hóa chất SA cho thấy, ở mức nồng độ của SA cao đã làm tăng sự đa dạng của đột biến sắc tố chlorophyll trong tất cả các kiểu gene, quang phổ tổng thể của đột biến cảm ứng chlorophyll của đậu hà lan nằm theo thứ tự xanh lục > màu xanh lục nhạt > màu vàng chanh > bạch tạng, điều này cho thấy nồng độ xử lý ảnh hưởng đến mức độ đột biến lên kiểu gen.

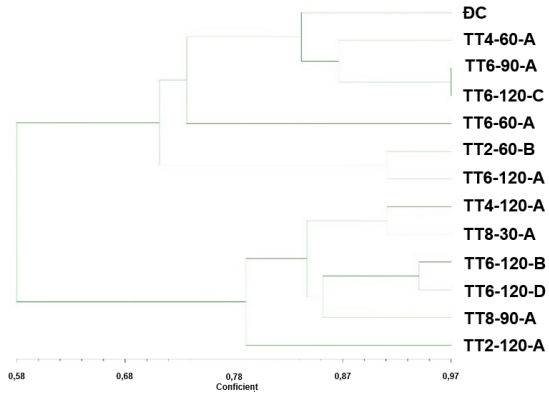
Bảng 2. Tỷ lệ sống và số lượng hoa của các nghiệm thức xử lý SA

Nồng độ SA (ppm)	Tỷ lệ sống (%)				Số lượng hoa (hoa/ chậu)			
	Thời gian xử lý SA (phút)				Thời gian xử lý SA (phút)			
	30	60	90	120	30	60	90	120
0	100,00^{a}	100,00^{a}	100,00^{a}	100,00^{a}	8,9^{ab}	8,99^{a}	8,95^{a}	8,92^{ab}
200	82,85^{ab}	62,85^{cd}	57,14^{c-e}	28,57^{h-j}	8,85^{ab}	8,30^{c}	6,59^{f}	5,84^{g}
400	74,28^{bc}	51,42^{d-f}	37,14^{f-i}	22,85^{i-k}	8,54^{bc}	7,67^{d}	5,30^{hi}	5,15^{i}
600	57,14^{c-e}	48,57^{d-g}	31,42^{g-j}	17,14^{jk}	8,37^{c}	7,05^{e}	4,33^{j}	4,23^{j}
800	51,42^{d-f}	42,85^{e-h}	28,57^{h-j}	5,71^{k}	7,78^{d}	5,58^{gh}	3,6^{k}	0^{l}
CV%	**54,5**				**35,2**			

Bảng 3. Mô tả khác biệt hình thái lá và hoa của 12 cá thể Thanh Tú

Cá thể	Nồng độ SA (ppm)	Thời gian xử lý (phút)	Mô tả khác biệt hình thái lá và hoa
TT2-60-A	200	60	Cánh hoa có màu xanh sậm hơn so với hoa đối chứng
TT2-60-B	200	60	Vị trí cuốn cánh hoa có màu xanh đậm hơn so với đối chứng và mép cánh hoa có viền màu trắng
TT4-60-A	400	60	Cánh hoa có màu xanh nhạt hơn so với hoa đối chứng
TT4-120-A	400	120	Cánh hoa có màu xanh sậm hơn so với hoa đối chứng
TT2-120-A	200	120	Cánh hoa có màu tím
TT8-30-A	800	30	Viền cánh hoa có màu xanh đậm
TT6-90-A	600	90	Gân lá có màu đỏ sẫm chạy dọc từ gân chính của phiến lá đến các gân phụ
TT6-120-A	600	120	Xuất hiện các đốm trắng trên bề mặt cánh hoa
TT6-120-C	600	120	Gân lá có màu đỏ sẫm chạy dọc từ gân chính của phiến lá đến các gân phụ
TT6-120-B	600	120	Gân lá có màu đỏ sẫm chạy dọc từ gân chính của phiến lá đến các gân phụ
TT6-120-D	600	120	Phần lá có màu đỏ sẫm lan đều từ đầu mép lá và nhạt dần về phía cuống
TT8-90-A	800	90	Hoa có màu xanh đậm ở mép cánh hoa và viền trắng ở đầu mép cánh hoa, xuất hiện một phần màu tím phân bố đều trên các cánh hoa

Hình 1. Sự khác biệt hình thái lá và hoa của 12 cá thể Thanh Tú



Hình 2. Giản đồ phả hệ

Chú thích: DC: cá thể đối chứng, TT2-60-A: Cá thể A được xử lý SA nồng độ 200 ppm trong 60 phút, TT2-60-B: Cá thể B được xử lý SA nồng độ 200 ppm trong 60 phút, TT2-120-A: Cá thể A được xử lý SA nồng độ 200 ppm trong 120 phút, TT4-60-A: Cá thể A được xử lý SA nồng độ 400 ppm trong 60 phút, TT4-120-A: Cá thể A được xử lý SA nồng độ 400 ppm trong 120 phút, TT6-120-A:Cá thể A được xử lý SA nồng độ 600 ppm trong 120 phút, TT8-30-A: Cá thể A được xử lý SA nồng độ 800 ppm trong 30 phút, TT8-90-A: Cá thể A được xử lý SA nồng độ 800 ppm trong 90 phút, TT6-120-B: Cá thể B được xử lý SA nồng độ 600 ppm trong 120 phút, TT6-120-D: Cá thể D được xử lý SA nồng độ 600 ppm trong 120 phút, TT6-120-C: Cá thể C được "xử lý SA nồng độ 600 ppm trong 120 phút, TT6-90-A: Cá thể A được xử lý SA nồng độ 600 ppm trong 90 phút.

Phân tích đa dạng di truyền dựa trên chỉ thị phân tử PCR-ISSR

Trong 6 mồi khảo sát ghi nhận 6/6 mồi có khả năng bắt cặp và khuếch đại sản phẩm trên DNA khuôn với tổng số band là 136, trung bình thu được 22,67 band/ mồi. Số band đơn hình trung bình thu được 1,5 band/ mồi, chiếm 26,4%, số band đa hình trung bình thu được 6,17 band/ mồi, chiếm 73,06% (Bảng 4). Mức độ độ đa hình của các band DNA thu được phản ánh sự khác nhau trong cấu trúc của hệ gene. Chỉ số PIC thu được trung bình là 0,26, cao nhất 0,43 ở mồi UBC 818, thấp nhất 0,04 ở mồi UBC 813. Band lớn nhất có kích thước khoảng 1000 bp ở mồi UBC 813 và mồi UBC 818 có kích thước nhỏ nhất khoảng 180 bp.

Bảng 4. Mồi ISSR được sử dụng để phân tích sự đa dạng di truyền trên Thanh Tú

STT	Mồi	Số band thu được	Số band đơn hình	Tỷ lệ band đơn hình	Số band đa hình	Tỷ lệ band đa hình	Chỉ số PIC	Kích thước band (bp)
1	UBC 818	14	0	0,00%	14	100,00%	0,43	180-1000
2	UBC 881	36	2	33,33%	4	66,67%	0,14	220-290
3	ISSR 4	11	0	0,00%	11	100,00%	0,35	300-910
4	UBC 813	66	5	83,33%	1	16,67%	0,04	500-1000
5	UBC 830	4	1	25,00%	3	75,00%	0,28	400-490
6	UBC 808	5	1	20,00%	4	80,00%	0,33	280-700
	Tổng số	**136**	**9**		**37**			
	Trung bình	**22,67**	**1,5**	**26,4%**	**6,17**	**73,06%**	**0,26**	

Hệ số tương quan di truyền và giản đồ phả hệ thể hiện mối quan hệ di truyền giữa các cá thể nghiên cứu (Bảng 5, Hình 2). Hệ số tương quan di truyền dao động trong khoảng 0,46 đến 0,97. Độ tương đồng càng nhỏ thì sự khác biệt về vật chất di truyền và khả năng đột biến xảy ra càng cao. Dựa trên các dữ liệu về khoảng cách di truyền của 12 cá thể và đối chứng, giản đồ phả hệ được chia thành 5 nhóm. Trong đó, nhóm 1 gồm đối chứng và cá thể TT2-60-A (200 ppm; 60 phút) khác biệt so với đối chứng 0,87, nhóm 2 gồm 2 cá thể TT2-60-B (200 ppm; 60 phút) và TT4-60-A (400 ppm; 60 phút) có hệ số tương đồng 0,85, nhóm 3 gồm TT4-120-A (400 ppm; 120 phút), TT2-120-A (200 ppm; 120 phút), và TT8-30-A (800 ppm; 30 phút) có hệ số tường đồng so với đối chứng dao động 0,64 - 0,77, nhóm 4 gồm TT6-90-A (600 ppm; 90 phút), TT6-120-A (600 ppm; 120 phút), TT6-120-C (600 ppm; 120 phút), TT6-120-B (600 ppm; 120 phút) và TT6-120-D (600 ppm; 120 phút) có hệ số tương đồng so với đối chứng trong khoảng 0,49 - 0,74, nhóm 5 chỉ có cá thể TT8-90-A với hệ số tương đồng so với đối chứng 0,74. Qua kết quả phân nhóm di truyền cho thấy nồng độ và thời gian xử lý SA có tác động đến vật chất di truyền khi khảo sát bằng chỉ thị PCR-ISSR. Có thể giải thích sự khác biệt này do SA tạo ra đột biến điểm trên DNA, theo

nghiên cứu của Olsen và đồng tác giả (1993) đã xác định được đột biến thay thế A-T → G-C là 86% cao hơn gấp ba lần đột biến thay thế G-C → A-T là 14% và không tìm thấy đột biến mất nucleotide.

Bảng 5. Hệ số tương quan di truyền của 12 cá thể Thanh Tú

	ĐC	TT2-60-A	TT2-60-B	TT4-60-A	TT4-120-A	TT2-120-A	TT8-30-A	TT6-90-A	TT6-120-A	TT6-120-C	TT6-120-B	TT6-120-D	TT8-90-A
ĐC	1,00												
TT2-60-A	0,87	1,00											
TT2-60-B	0,87	0,79	1,00										
TT4-60-A	0,77	0,64	0,85	1,00									
TT4-120-A	0,77	0,80	0,80	0,85	1,00								
TT2-120-A	0,67	0,64	0,74	0,74	0,90	1,00							
TT8-30-A	0,64	0,70	0,71	0,77	0,88	0,92	1,00						
TT6-90-A	0,51	0,64	0,49	0,53	0,59	0,59	0,62	1,00					
TT6-120-A	0,49	0,67	0,46	0,56	0,56	0,56	0,59	0,82	1,00				
TT6-120-C	0,49	0,49	0,51	0,62	0,56	0,56	0,59	0,82	0,95	1,00			
TT6-120-B	0,52	0,46	0,48	0,59	0,59	0,59	0,62	0,85	0,97	0,97	1,00		
TT6-120-D	0,54	0,46	0,51	0,62	0,62	0,62	0,64	0,82	0,95	0,95	0,97	1,00	
TT8-90-A	0,74	0,49	0,67	0,67	0,62	0,62	0,64	0,71	0,69	0,69	0,72	0,74	1,00

KẾT LUẬN

Gia tăng nồng độ và thời gian xử lý sodium azide thì khả năng sống của đoạn thân cây Thanh Tú giảm từ 82,85% (200 ppm; 30 phút) xuống 5,71% (800 ppm; 120 phút). SA có tác động làm biến dị kiểu hình về màu sắc hoa và lá ở 12 nghiệm thức so với đối chứng. SA có tác động đến kiểu gene dẫn đến có sự khác biệt giữa 12 cá thể được khảo sát thông qua giản đồ phả hệ thể hiện mối quan hệ di truyền giữa các cá thể chia làm 5 nhóm. Cá thể TT8-90-A xử lý 800 ppm SA trong 90 phút có sắc tố hoa không đồng nhất với sự xuất hiện của màu xanh, tím và trắng trên cùng một hoa. Đây là nguồn vật liệu tiềm năng cho các nghiên cứu tiếp theo. Bên cạnh đó, cần thêm thời gian để theo dõi sự biểu hiện các tính trạng được ghi nhận và khả năng sinh trưởng và phát triển của các cá thể đột biến. Nhìn chung, đột biến do SA gây ra cho thấy đây là một công cụ đầy hứa hẹn để hỗ trợ các chương trình chọn tạo các giống Thanh Tú mới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Salim K, Al-Qurainy F, & Anwar F (2009). Sodium azide: A chemical mutagen for enhancement of agronomic traits of crop plants. *Environment & We: An International Journal of Science & Technology, 4*: 1-21.

Abbasi S, & Afsharzadeh S (2016). An efficient and simple CTAB based method for total genomic DNA isolation from low amounts of aquatic plants with a high level of secondary metabolites. *Progress in Biological Sciences, 6*(1): 95-106.

Datta S K, Datta M, & Roy S C (2020). Application of mutation breeding for the development of ornamental plants. *In D. K. Mohapatra (Ed.), Mutation Breeding in Horticulture,* 125-142.

Hassel K, & Gunnarsson U (2003). The use of inter simple sequence repeats (ISSR) in bryophyte population studies. *Department of Biology, Norwegian University of Science and Technology, 28*: 152-157.

Holton T A, Christopher J T, McClure L, Harker N, & Henry R J (2002). Identification and mapping of polymorphic SSR markers from expressed gene sequences of barley and wheat. *Molecular Breeding, 9*: 63-71.

Jaccard P (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles, 44*(1): 223-270.

Kang E J, Lee Y M, Sung S Y, Ha B K, Kim S H, Kim D S , Kim J B, Kang S Y (2013). Analysis of the genetic relationship of gamma-irradiated *in vitro* mutants derived from standard-type chrysanthemum cv. Migok. *Horticulture, Environment, and Biotechnology, 54*: 76-81.

Naikawadi B V, Ahire L M, Nikam D T (2012). Seed characterization, viability and promotion of seed germination in nervine tonic plant Evolvulus alsinoides Linn. *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology, 6*(Special Issue 1): 5-11.

Olsen O, Wang X, & von Wettstein D (1993). Sodium azide mutagenesis: preferential generation of A-T G-C transitions in the barley Ant18 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90*: 8043-8047.

Oumer O, Tesfaye K, Getahun M, Derbew B (2020). Genetic diversity analysis of anchote (*Coccinia abyssinica*) genotypes from Ethiopia using ISSR markers. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 18*(1): 1-14.

Rogers S O, & Bendich A J (1988). Extraction of DNA from plant tissues. In S. B. Gelvin & R. A. Schilperoort (Eds.), *Plant molecular biology manual,* 1-10. Springer.

Saki S, Bagheri H, Deljou A, Zeinalabedini M (2016). Evaluation of genetic diversity amongst *Descurainia sophia* L. genotypes by inter-simple sequence repeat (ISSR) marker. *Physiology and Molecular Biology of Plants, 22*: 97-105.

Salim K, Al-Qurainy F, Anwar F (2009). Sodium azide: A chemical mutagen for enhancement of agronomic traits of crop plants. *Environment & We: An International Journal of Science & Technology, 4*: 1-21.

Singh T N, Jeberson M S, Devi Y S, Singh N B, Sinha B, Shashidhar K S, Sharma P R (2020). Study of mutation induced by sodium azide in field pea (*Pisum sativum* L.). *Journal of Current Opinion in Crop Science, 1*(1): 11-15.

Sneath P H A, & Sokal R R (1973). Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman and Company.

Trần N D, Nguyễn T H, & Lê V H (2011). Improvements in the CTAB method for DNA extraction from plants. *Vietnam Journal of Biotechnology, 9*(2): 123-130.

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SODIUM AZIDE ON MUTATION INDUCTION IN THANH TU *(EVOLVULUS ALSINOIDES)*

Tran Le Nguyen, Le Thanh Nhan, Le Thi Anh Thu, Nguyen Thi Pha*

Institute of Biotechnology and Food, Can Tho University

SUMMARY

Induced mutation is a viable and established method for crop improvement and the creation of genetic diversity to develop new plant varieties. This study aims to induce mutations in *Evolvulus alsinoides* using sodium azide (SA) at concentrations of 0, 200, 400, 600 and 800 ppm for durations of 30, 60, 90, and 120 minutes on stem segments containing dormant buds under greenhouse conditions. The survival rate and the number of flowers of Sodium azide-treated samples decreased with increasing chemical concentrations. The lowest survival rate was recorded in the treatment with 800 ppm SA for 120 minutes at 5.71%, with no flowers observed in this treatment, while the highest survival rate was 82.85% with 8.75 flowers per pot in the treatment with 200 ppm for 30 minutes. Twelve individuals of Evolvulus alsinoides treated with Sodium azide exhibited phenotypic differences compared to the control, with 4 differing in leaf characteristics and 8 in flower characteristics, which were genetically analyzed using 6 ISSR primers. The results recorded a genetic variation level of 37% for the 12 surveyed individuals compared to the control, with the individual TT8-90-A having a similarity coefficient of 0.74 with the control, being the most potential individual among the mutants due to its unique flower phenotype with the most diverse coloration.

Keywords: *Evolvulus alsinoides*, ISSR, mutations, sodium azide, Thanh Tu.

* Author for corresspondence: Tel: +84-986364168; Email: ntpha@ctu.edu.vn

PHÂN LẬP VÀ KHẢO SÁT MÔI TRƯỜNG NUÔI SINH KHỐI NẤM TRICHODERMA ỨNG DỤNG TRONG XỬ LÝ RÁC THẢI SINH HOẠT HỮU CƠ

Nguyễn Thị Kim Loan[1,2], La Việt Hồng[1], Nguyễn Thị Minh Nguyệt[1], Trần Gia Huy[3], Chu Đức Hà[4], Ong Xuân Phong[1,*]

[1]*Viện Nghiên cứu Khoa học và Ứng dụng, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2*

[2]*Trường THCS Trần Phú, Hoàng Mai, Hà Nội*

[3]*Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ*

[4]*Khoa Công nghệ Nông nghiệp, Trường Đại học Công nghệ, Đại học Quốc gia Hà Nội*

TÓM TẮT

Hiện nay, lượng rác thải sinh hoạt ngày càng nhiều gây ảnh hưởng đến sức khỏe con người và gây ô nhiễm môi trường nghiêm trọng. Rác thải sinh hoạt hữu cơ được phân loại và xử lý ngay từ hộ gia đình sẽ làm giảm lượng rác thải và góp phần bảo vệ môi trường. Nghiên cứu này đã phân lập chủng vi nấm từ đất khu vực chứa rác thải ở chợ Xuân Hòa và Cao Minh, Phúc Yên, Vĩnh Phúc, kết quả phân lập và giải trình tự xác định được chủng vi nấm là *Trichoderma asperellum* SP2. Thí nghiệm đánh giá khả năng phân giải cellulose của chủng vi nấm phân lập được cho kết quả tốt, thể hiện đường kính vòng phân giải đạt 4,3 cm. Ngoài ra, kết quả thí nghiệm cho thấy chủng nấm *T. asperellum* SP2 sinh trưởng tốt nhất trên môi trường PDA có pH = 5.5 và phát triển trên giá thể gồm 800 g thóc, 200 g cá gạo, 100 mL rỉ mật cho kết quả thời gian sinh bào tử nhanh nhất (10 ngày sau nuôi cấy).

Từ khóa: Phân hủy sinh học, rác thải sinh hoạt, *trichoderma*, vi nấm.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Rác thải sinh hoạt là các chất thải mà con người không sử dụng tới, thải ra trong cuộc sống hàng ngày như bao nilon, thức ăn, vỏ trái cây, các đồ vật không sử dụng được hoặc hư hỏng… và được chia thành 3 loại: rác tái chế, rác hữu cơ và rác vô cơ. Rác hữu cơ là những loại rác dễ dàng bị phân hủy, gồm: hoa quả, bã trà, bã cafe, rau củ, thức ăn thừa, lá cây... (Perera & Chyc, 2022). Phân hủy sinh học là một phương pháp thân thiện với môi trường, quá trình thủy phân nhờ enzyme từ vi khuẩn hoặc vi nấm. Phương pháp này có nhiều ưu điểm như thiết bị đơn giản, chi phí năng lượng thấp, không sử dụng hóa chất và dễ thực hiện so với các phương pháp tiền xử lý vật lý và hóa học truyền thống. Phân hủy sinh học là một quá trình tự nhiên tái tạo các vật liệu sinh học cần thiết trong chu trình sinh địa hóa của trái đất. Quá trình phân hủy sinh học giúp tiết kiệm chi phí và thân thiện với môi trường trong việc xử lý chất thải nguy hại như dầu tràn, thuốc trừ sâu, hạt nhân phóng xạ và kim loại nặng… Sử dụng chất xúc tác sinh học là giải pháp thay thế bền vững cho việc xử lý môi trường trong các ngành công nghiệp. Các vi khuẩn như loài *Bacillus*, đã được chứng minh là có khả năng phân hủy chất thải hữu cơ hiệu quả, tăng hiệu quả của các enzyme như amylase, gelatinase, lipase và cellulase (Chhetri *et al*., 2022). Enzyme từ các vi sinh vật đa dạng đóng một vai trò thiết yếu trong xử lý sinh học, chuyển hóa các chất ô nhiễm có hại thành sản phẩm vô hại và phục hồi môi trường (Siddiqui & Dahiya, 2022).

Trong tự nhiên, vi sinh vật phân hủy chất hữu cơ gồm có vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm và động vật nguyên sinh… Nấm sợi *Trichoderma* có hiệu quả trong việc phân hủy các chất hữu cơ như cellulose, hemiaellulose và lignin (Sen et al., 2023). Chúng đóng một vai trò quan trọng trong việc phân hủy các chất cặn bã hữu cơ và tăng cường độ phì nhiêu của đất. Chúng tham gia vào quá trình phân hủy chất hữu cơ, đặc biệt là ở giáp ranh giữa vùng cửa sông và biển. Trong đất, sự phân bố và nồng độ carbon, nitrogen trong các phần chất hữu cơ bị ảnh hưởng bởi các yếu tố đất, khí hậu, mối liên hệ giữa nấm và thực vật (Almeida *et al*., 2022).

Trichoderma được sử dụng như một tác nhân kiểm soát sinh học chống lại các mầm bệnh ở các loài thực vật khác nhau. Một số nghiên cứu cho thấy *Trichoderma* có thể sử dụng như thuốc trừ sâu sinh học để làm giảm sự phát triển của mầm bệnh và mang lại lợi ích cho sự phát triển của cây trồng (Dutta *et al*., 2023). Các chủng *Trichoderma harzianum và Trichoderma viride* đã được cải thiện thông qua xử lý chiếu xạ UV, dẫn đến tăng cường hoạt tính đối kháng chống lại nấm gây bệnh thực vật (Hassan, 2015). *Trichoderma* cũng đã được chứng minh là có nhiều lợi ích cho cây trồng, bao gồm thúc đẩy tăng trưởng thực vật, tạo ra các phản ứng phòng vệ. Một số công trình nghiên cứu trên thế giới còn cho thấy khả năng xử lý dầu diesel của chủng *Trichoderma*

harzianum strain T22 (Elshafie *et al*., 2020) hay nghiên cứu về khả năng phân hủy TNT của chủng *Trichoderma viride* (Alothman *et al*., 2020).

Với mục tiêu hướng đến người dân có thể tự nuôi sinh khối *Trichoderma* để sử dụng trong xử lý rác thải sinh hoạt hữu cơ. Trong công trình này, chúng tôi nghiên cứu "**Phân lập và nghiên cứu môi trường nuôi sinh khối nấm *Trichoderma* ứng dụng trong xử lý rác thải sinh hoạt hữu cơ**" góp phần giảm tải rác thải và bảo vệ môi trường.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Mẫu đất từ vùng chứa rác thải sinh hoạt hữu cơ: Thu thập tại chợ Xuân Hòa, chợ Cao Minh, Phúc Yên, Vĩnh Phúc.

Nguyên liệu: Thóc, cám gạo, rỉ mật mua tại chợ Xuân Hòa, Phúc Yên, Vĩnh Phúc.

Phương pháp

Phân lập và định danh chủng nấm Trichoderma

Thu thập mẫu đất nơi chứa rác thải hữu cơ ở các chợ, mỗi vị trí lấy đất các ô có kích thước 20 x 20 x20 (cm), các mẫu ở mỗi vị trí thu được đựng trong từng túi nilon riêng và có ghi ký hiệu. Phân lập bằng cách cân 1 g đất sau đó pha loãng ở nồng độ 10-5 để trang lên môi trường PDA (khoai tây 200 g + Dextro 20 g + Agar 15 g, bổ sung nước cất đến 1 lít sau đó hiệu chỉnh pH = 5,6); khi nấm phát triển trên môi trường PDA, làm thuần bằng phương pháp cấy đơn bào tử; đến khi tản nấm đồng nhất là nấm đã được làm thuần. Các chủng vi sinh vật sau khi làm thuần được sử dụng làm tiêu bản để nghiên cứu, quan sát hình thái dưới kính hiển vi, mô tả đặc điểm hình thái.

Nấm *Trichoderma* thuần được xác định tên khoa học dựa trên trình tự vùng ACT. DNA được tách chiết từ hệ sợi nấm bằng phương pháp CTAB và dùng làm khuôn cho phản ứng PCR với mồi CCT-512F/ACT-512R để khuếch đại trình tự vùng gen ITS. Trình tự của mồi ACT-512 (forward): 5'-ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC-3'; ACT-783 (reverse): 5'-TACGAGTCCTTCTGGCCCAT-3'. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5% và sau đó được tinh sạch bằng bộ Kit GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo). Sản phẩm PCR tinh sạch được giải trình tự tại công ty TNHH DNA sequencing (Việt Nam) và so sánh với cơ sở dữ liệu GenBank bằng công cụ BLAST. Cây phả hệ của các chủng nấm tương đồng được xây dựng bằng phần mềm MEGA phiên bản 11.0.13 với thuật toán maximum likelihood và giá trị bootstrap 1.000 lần lặp lại.

Nghiên cứu hoạt tính cơ bản của nấm Trichoderma

Khảo sát khả năng phát triển của nấm trên môi trường PDA được điều chỉnh giá trị pH khác nhau: pH1 = 4,5, pH2 = 5,5, pH3 = 6,5, pH4 = 7,5 giá trị pH được điều chỉnh bằng dung dịch HCl 1N và NaOH 1N. Chủng nấm *Trichoderma* sau khi được làm thuần và phân loại tiến hành nuôi trên môi trường CBM (1 lít gồm: $NH_4H_2PO_4$ 0,1 g + KCl 0,2 g + $MgS0_4.7H_2O$ 0,2 g + $CaCl_2$ 0,2 g + 4% CMC 7,89 g + Agar 12 g + H_2O 750 mL) để đánh giá hoạt tính phân hủy cellulose của *Trichoderma.* Khi tản nấm phát triển được khoảng 50 - 60% tiến hành nhuộm bằng thuốc thử red congo (2%) đổ ngập nấm và để trong 15 phút. Sau đó, đổ bỏ red congo và rửa bằng nước cất vô trùng. Sau khi đã rửa sạch bằng nước cất thì ngâm đĩa trong dung dịch NaCl (tỷ lệ NaCl và nước là 1:1). Quan sát sự đổi màu và đo đường kính vòng phân giải sau 15 phút, 6 giờ và 24 giờ.

Khảo sát thành phần môi trường sản xuất sinh khối *Trichoderma* tại nhà: Thóc được ngâm khoảng 2 tiếng sau đó vớt ra để ráo nước, trộn thóc với cám gạo và rỉ mật theo tỷ lệnhư sau (Bảng 1):

Bảng 1. Các công thức thí nghiệm phối trộn giá thể để nuôi sinh khối nấm *Trichoderma*

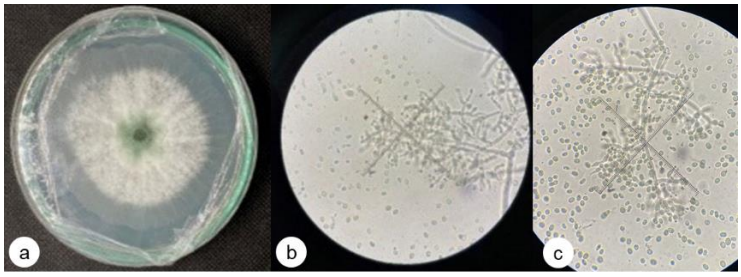
Ký hiệu công thức	Thóc (gram)	Cám gạo (gram)	Rỉ mật (mL)
CT1	700	300	50
CT2	800	200	50
CT3	900	100	50
CT4	700	300	100
CT5	800	200	100
CT6	900	100	100

Sau đó, cho vào mỗi túi PE 0,5 kg hỗn hợp giá thể đã chuẩn bị, bổ sung 1 đĩa petri nấm *Tricoderma* (giống cấp 1). Để ở điều kiện môi trường tự nhiên theo dõi thời gian phát triển nấm kín bịch giá thể. Các thí nghiệm được thực hiện với 3 lần nhắc lại và sản phẩm này có thể sử dụng làm giống cấy chuyển thành giống cấp 3 hoặc sử dụng luôn để xử lý rác thải sinh hoạt hữu cơ.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập nấm *Trichoderma* từ rác thải

Lấy mẫu đất thu được pha loãng nồng độ 10^{-5} với nước cất vô trùng và trang mẫu trên môi trường PDA, 3 ngày sau quan sát thấy các vi nấm phát triển trên bề mặt môi trường. Cấy chuyển riêng rẽ các vi nấm trên đĩa môi trường PDA để làm thuần các chủng vi nấm. Soi trên kính hiển vi thu được kết quả như Hình 1.

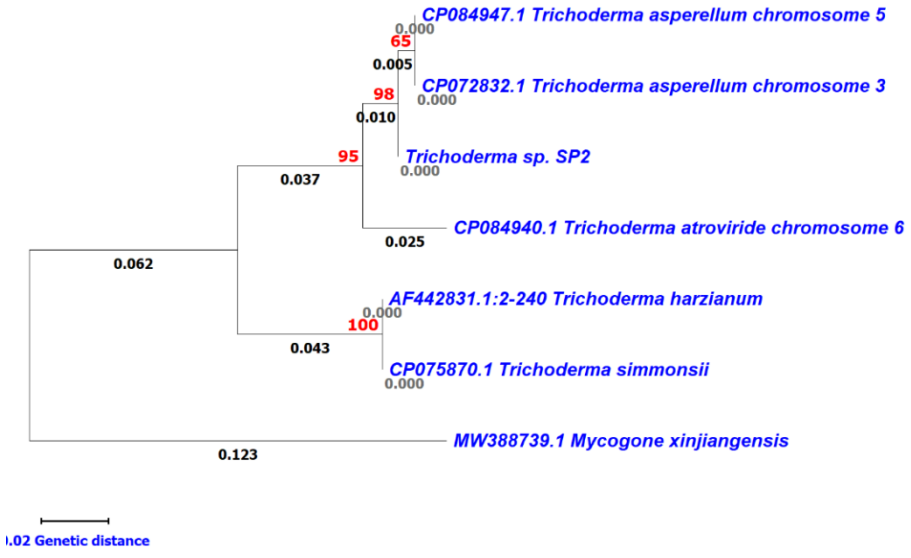


Hình 1. Chủng vi nấm *Trichoderma*

a. Tản nấm trên môi trường PDA, b. Ảnh soi kính hiển vật kính 40X, c. Ảnh soi kính vật kính 100X.

Dựa vào đặc điểm hình thái của *Trichoderma*, chúng tôi đã cấy chuyển những đĩa petri có khuẩn lạc giống với khuẩn lạc của nấm *Trichoderma* và đã thu được chủng nấm thuần. Hình thái điển hình của *Trichoderma* sp. SP2 có màu trắng, xốp, hình thành cành bào tử phân sinh có hình elip/hình cầu, bề mặt nhẵn. Sau 2 ngày nuôi cấy, tản nấm chuyển dần sang màu xanh, hình thành nhiều cành bào tử phân sinh, thể bình có dạng hình trụ *(Chu et al.*, 2022). Khuẩn lạc (còn gọi là tản nấm) có màu trắng, sau nuôi cấy khoảng 1 tuần sinh ra bào tử đính, đính trên đầu các nhánh cành, và khuẩn lạc chuyển dần sang màu xanh rêu. Bào tử có hình elip.

Trình tự của chủng phân lập được so sánh với dữ liệu của ngân hàng gene NCBI bằng công cụ BLAST, sử dụng phần mềm Mega 11 xây dựng được cây phát sinh loài kết quả được thể hiện như Hình 2. Trong cây phát sinh loài, thấy chủng phân lập *Trichoderma* sp. SP2 cùng nhánh với chủng *Trichoderma asperellum*, mặt khác khi so sánh trình tự trên Genbank, chủng phân lập tương đồng với chủng *T. asperellum*. Theo Hebert *và đồng tác giả*, các loài có sự tương đồng về trình tự nucleotide ≥ 97% có thể được xác định là cùng loài. Do vậy, tên khoa học của chủng phân lập từ đất khu vực rác thải các chợ là *Trichoderma asperellum* SP2 (Hebert *et al*., 2003).



Hình 2. Cây phát sinh loài của chủng Trichoderma phân lập

Giá trị màu đỏ trên mỗi nhánh là giá trị Boostrap của 1.000 lần nhắc lại, giá trị màu đen thể hiện tỷ lệ nucleotide khác biệt.

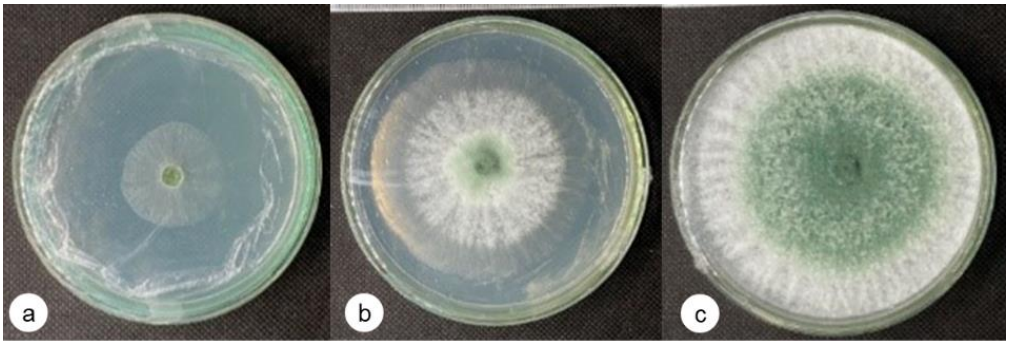
Nghiên cứu ảnh hưởng của pH môi trường đến sinh trưởng và hoạt tính cơ bản của nấm *Trichoderma*

Để đánh giá khả năng sinh trưởng của chủng vi nấm *Trichoderma asperellum* SP2 phân lập được trong môi trường giá trị pH khác nhau chúng tôi tiến hành khảo sát trên môi trường PDA được điều chỉnh giá trị pH khác nhau. Theo dõi sự phát triển của nấm đến 3 ngày và kết quả thu được tại Bảng 2.

Bảng 2. Sự phát triển nấm *Trichoderma* trên các môi trường có độ pH khác nhau (cm)

Công thức	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3
pH1	2,40 ± 0,1	5,60 ± 0,0	8,10 ± 0,1
pH2	3,10 ± 0,1	6,30 ± 0,1	9,00 ± 0,0
pH3	2,75 ± 0,2	5,80 ± 0,1	8,60 ± 0,2
pH4	2,20 ± 0,0	5,30 ± 0,1	7,80 ± 0,1

Qua Bảng 2, chúng tôi nhận thấy chủng nấm *Trichoderma asperellum* SP2 phát triển tốt nhất trên môi trường PDA có độ pH 5.5. Sau 1 ngày nuôi cấy, đường kính tản nấm đạt 2,4 cm ở công thức có độ pH 4,5. Ở độ pH 5,5 đường kính tản nấm đạt 3,1 cm. Công thức có độ pH 6,5 đường kính tản nấm đạt 2,75 cm. Ở công thức pH 7,5 đường kính tản nấm chỉ có 2,2 cm. Qua 2 và 3 ngày, đường kính tản nấm tăng lên và sự tăng giảm ở các công thức tương tự như ở ngày thứ nhất. Điều đó có nghĩa là chủng nấm *Trichoderma asperellum SP2* phát triển mạnh nhất ở pH 5,5, ở pH 4,5 và 6,5 nấm phát triển chậm hơn, chậm nhất ở độ pH 7,5. Như vậy trong thí nghiệm của đề tài, chủng *Trichoderma asperellum SP2* sinh trưởng phát triển thuận lợi ở khoảng pH từ 4,5 đến 6,5 và phù hợp nhất ở pH 5,5. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với nghiên cứu của Cabral-Miramontes và cộng sự, nấm sợi có thể phát triển ở pH 3 - 9, nhưng phát triển mạnh trong môi trường acid (Cabral-Miramontes *et al*., 2022).

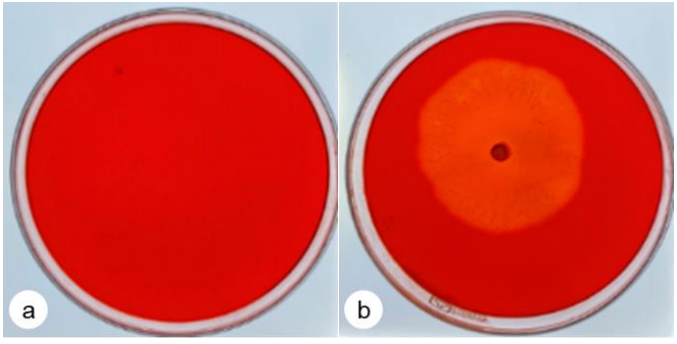


Hình 3. Đường kính phát triển tản nấm *Trichoderma* trên môi trường PDA pH=5.5

a. Sau 1 ngày, b. Sau 2 ngày, c. Sau 3 ngày.

Khả năng phân hủy *cellulose* của nấm *Trichoderma asperellum SP2:*

Trong rác thải hữu cơ, thực vật chiếm lượng lớn, mà trong thực vật chủ yếu là cellulose, ngoài ra còn có tinh bột và các thành phần khác. Chủng nấm *Trichoderma asperellum SP2* được nuôi cấy trên môi trường chứa CMC để đánh giá khả năng phân giải cellulose. Sau khi cấy 2 ngày, nhuộm thuốc thử red congo thu được kết quả như Hình 4.



Hình 4. Khả năng phân hủy cellulose

a. Thí nghiệm, b. Đối chứng.

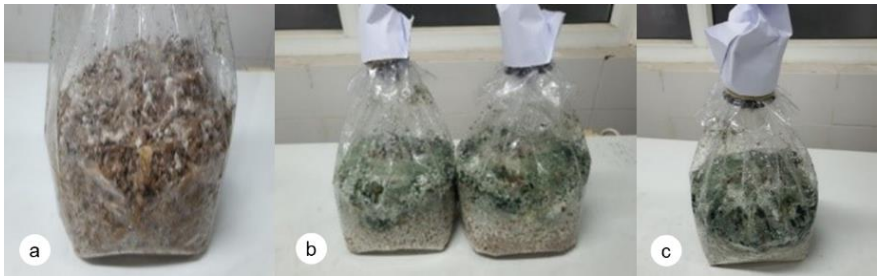
Quan sát Hình 4 thấy đĩa đối chứng hoàn toàn màu đỏ của red congo, trong khi đĩa thí nghiệm có vùng màu vàng đục, đó là do cellulose bị phân giải, nền màu đỏ là CMC không bị phân hủy. Đường kính trung bình của vòng phân giải CMC đo được là 4,3 ± 0,1 cm. Với kết quả như vậy, chủng *Trichoderma asperellum SP2* là chủng có hoạt tính phân hủy cellulose rất tốt.

Khảo sát một số thành phần môi trường để sản xuất sinh khối Trichoderma tại nhà được thể hiện Bảng 3.

Bảng 3. Khả năng sinh trưởng nấm *Trichoderma asperellum* SP2 trên các môi trường cơ chất khác nhau

Công thức	Thời gian sinh trưởng kín bịch
CT1	16,33 ± 0,58
CT2	13,33 ± 0,58
CT3	19,67 ± 0,58
CT4	15,33 ± 0,58
CT5	**10,00 ± 0,0**
CT6	19,00 ± 1,12

Kết quả theo dõi thời gian sinh trưởng của *Trichoderma asperellum SP2* ngắn nhất trong điều kiện của CT5 với thời gian nấm phát triển kín bịch là 10 ngày, còn ở các công thức khác thì thời gian sinh trưởng dài hơn, lần lượt tương ứng là CT2, CT4, CT1, CT6 và CT3. Chính vì vậy, chúng tôi đã tiến hành thử nghiệm nuôi chủng *Trichoderma asperellum* SP2 trong túi nilon chứa thóc, cám gạo và rỉ mật. Kết quả sau 10 ngày để ở điều kiện môi trường tự nhiên chúng tôi thấy các túi thóc đều đã phủ kín nấm *Trichoderma* (Hình 5).



Hình 5. Sự phát triển của *Trichoderma* trên môi trường nuôi sinh khối

a. Sau 3 ngày, b. Sau 6 ngày, c. Sau 9 ngày.

Với kết quả này, sinh khối nấm *Trichoderma asperellum* SP2 có thể sử dụng để xử lý rác thải sinh hoạt hữu cơ quy mô hộ gia đình. Do phương pháp nuôi sinh khối đơn giản người dân hoàn toàn chủ động nhằm xử lý rác thải hữu cơ của gia đình góp phần giảm thải lượng rác ra môi trường.

KẾT LUẬN

Với kết quả bước đầu nghiên cứu, chúng tôi đã phân lập và xác định chủng *Trichoderma* thu ở rác thải là chủng nấm *Trichoderma asperellum* SP2 sinh trưởng tốt nhất trên môi trường PDA có pH = 5.5, có khả năng phân giải cenlulose rất mạnh, đường kính vòng phân giải đạt 4,3 cm. Đánh giá khả năng sản xuất sinh khối của *Trichoderma asperellum* SP2 trên môi trường 800 g thóc, 200 g cám gạo và 100 mL rỉ mật cho thời gian tạo sinh khối ngắn nhất là 10 ngày nấm đã mọc kín bịch thóc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Almeida J P, Rosenstock N, Woche S, Guggenberger G, & Wallander H (2022). Nitrophobic ectomycorrhizal fungi are associated with enhanced hydrophobicity of soil organic matter in a Norway spruce forest. *Biogeosciences Discussions*, *2022*: 1-31.

Alothman Z A, Bahkali A H, Elgorban A M, Al-Otaibi M S, Ghfar A A, Gabr S A, Wabaidur S M, Habila M A, Ahmed A. Y. B. H. (2020). Bioremediation of explosive TNT by Trichoderma viride. *Molecules*, *25*(6): 1393.

Cabral-Miramontes J P, Olmedo-Monfil V, Lara-Banda M, Zúñiga-Romo E R, & Aréchiga-Carvajal E T (2022). Promotion of plant growth in arid zones by selected Trichoderma spp. strains with adaptation plasticity to alkaline pH. *Biology*, *11*(8): 1206.

Chhetri B R, Silwal P, Jyapu P, Maharjan Y, Lamsal T, & Basnet A (2022). Biodegradation of Organic Waste Using Bacillus Species Isolated from Soil. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, *10*(2): 104-111.

Phạm Thị Lý Thu, Nguyễn Thị Hồng Minh, Nguyễn Đức Anh, Đào Thị Thu Hằng, Nguyễn Đức Thành, Nguyễn Thị Bích Ngọc, Lưu Thị Mỹ Dung, Nguyễn Thị Hồng Hải, Nguyễn Thế Quyết, Chu Đức Hà, Lê Thị Minh Thành (2022). Phân lập và định danh nấm Trichoderma đối kháng với tác nhân gây bệnh vàng lá, thối rễ trên cây có múi tại một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, Số 05(138).

Dutta P, Mahanta M, Singh S B, Thakuria D, Deb L, Kumari A, Upamanya G K, Boruah S, Dey U, Mishra A (2023). Molecular interaction between plants and Trichoderma species against soil-borne plant pathogens. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1145715.

Elshafie H, Camele I, Sofo A, Mazzone G, Caivano M, Masi S, Caniani D (2020). Mycoremediation effect of Trichoderma harzianum strain T22 combined with ozonation in diesel-contaminated sand. *Chemosphere*, *252*, 126597.

Hassan A A K (2015). Improvement of antagonism and fungicides tolerance in Trichoderma harzianum and T. viride local isolates by Ultra-Violet irradiation. *Tikrit Journal of Pure Science*, *20*(4): 16-25.

Hebert P D, Cywinska A, Ball S L, DeWaard J R (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *270*(1512): 313-321.

Perera E C J, & Chyc M (2022). Morphology of household waste on the example of Sri Lanka and Poland—case study. *Science, Technology and Innovation*, *15*(1-2).

Sen K, Bai M, Li J, Ding X, Sen B, Wang G (2023). Spatial Patterns of Planktonic Fungi Indicate Their Potential Contributions to Biological Carbon Pump and Organic Matter Remineralization in the Water Column of South China Sea. *Journal of Fungi*, *9*(6): 640.

Siddiqui N M, & Dahiya P (2022). Enzyme-based biodegradation of toxic environmental pollutants. In *Development in Wastewater Treatment Research and Processes* (311-333). Elsevier.

ISOLATION AND SURVEY OF THE CULTIVATION ENVIRONMENT OF TRICHODERMA BIOMASS APPLIED IN THE TREATMENT OF ORGANIC HOUSEHOLD WASTE

Nguyen Thi Kim Loan[1,2], La Viet Hong[1], Nguyen Thi Minh Nguyet[1], Tran Gia Huy[3], Chu Duc Ha[4], Ong Xuan Phong[1*]

[1]*Institute for Scientific Research and Application, Hanoi Pedagogical University 2*

[2]*Tran Phu Secondary School, Hoang Mai, Hanoi*

[3]*Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University*

[4]*Faculty of Agricultural Technology, University of Engineering and Technology, Vietnam National University Hanoi*

SUMMARY

Currently, the increasing amount of household waste is affecting human health and causing serious environmental pollution. Organic household waste, when classified and processed at the household level, will reduce the amount of waste and contribute to environmental protection. This study isolated fungal strains from the soil in the waste areas of Xuan Hoa and Cao Minh markets, Phuc Yen, Vinh Phuc. The isolation and sequencing results identified the fungal strain as *Trichoderma asperellum* SP2. Experiments evaluating the cellulose degradation ability of the isolated fungal strain showed good results, with the diameter of the degradation zone reaching 4.3 cm. Additionally, the experimental results showed that the T. asperellum SP2 strain grew best on PDA medium with a pH of 5.5 and developed on a substrate consisting of 800 g of husks, 200 g of rice bran, and 100 mL of molasses, achieving the fastest spore production time (10 days after cultivation).

Keywords: Biodegradation, household waste, *trichoderma*, fungi.

[*] Author for correspondence: Tel: +84-985381345; Email: ongxuanphong@hpu2.edu.vn

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM *Phytophthora sp.* CỦA DỊCH CHIẾT CÂY CỎ HÔI (*Ageratum conyzoides*)

Nguyễn Bá Khánh Trình*, Trần Thị Thu Phương, Nguyễn Đinh Thảo Ngân, Nguyễn Thị Như Quỳnh

Viện Sinh học nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Ageratum conyzoides L. (*A. conyzoides*) hay còn gọi là cây cỏ hôi, là loài cỏ dại phân bố khắp mọi nơi có sự phát triển mạnh mẽ và kháng nấm bệnh cao. Một số nghiên cứu cho thấy flavonoid là hoạt chất chính có tác dụng ức chế đối với nấm *Phytophthora.* Do đó, nghiên cứu này nhằm khảo sát ảnh hưởng của nồng độ dung môi đến khả năng tách chiết hoạt chất flavonoid khi sử dụng hai loại dung môi ethanol và methanol ở các nồng độ khác nhau (30%, 50%, 70% và 90%) bằng phương pháp đo quang phổ UV-Vis. Kết quả cho thấy hàm lượng flavonoid trích được từ dịch chiết ethanol 90% (15,609 ± 0,139 mg/mL) và methanol 70% (10,135 ± 0,185 mg/mL) đạt cao nhất. Qua đó, đánh giá khả năng kháng nấm *Phytophthora* sp. bằng phương pháp đo khả năng ức chế đường kính tản nấm trên thạch đĩa trong 168 giờ sau khi cấy ở các nồng độ dịch chiết được khảo sát là 0%, 1%, 2%, 4%, 8%. Kết quả cho thấy ethanol 90% là nồng độ dung môi thích hợp để tách chiết hoạt chất kháng nấm với nồng độ dịch chiết là 8%. Ngoài ra, khi phân tích ANOVA hai yếu tố cho thấy có sự tương tác giữa giữa nồng độ dung môi và nồng độ các dịch chiết lên sự phát triển của *Phytophthora* sp.. Do đó, cây cỏ hôi (*A. conyzoides*) có tiềm năng có thể ứng dụng trong kiểm soát một số loại nấm gây hại trên cây trồng định hướng làm thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc sinh học.

Từ khóa: Ageratum conyzoides, cây cỏ hôi, dịch chiết ethanol và methanol, *Phytophthora*, kháng nấm.

MỞ ĐẦU

Cây hồ tiêu (*Piper nigrum*) là một trong những mặt hàng xuất khẩu quan trọng của Việt Nam, đóng góp lớn vào nền kinh tế nông nghiệp của nước ta. Tuy nhiên, cây hồ tiêu đang phải đối mặt với nhiều loại bệnh hại, trong đó có bệnh thối gốc/ chết nhanh do nấm *Phytophthora* sp. gây ra. Bệnh này gây ra những thiệt hại nghiêm trọng về năng suất và chất lượng cây trồng, ảnh hưởng tiêu cực đến thu nhập của người nông dân (Islam *et al.*, 2005). Hiện nay thuốc hóa học đã và đang được xem là phương pháp hiệu quả nhất trong việc phòng trừ các bệnh về nấm trên cây trồng do dễ áp dụng, hiệu quả nhanh và giá thành rẻ. Tuy nhiên nếu sử dụng trong thời gian dài sẽ làm tăng tính kháng thuốc, dư lượng thuốc trên nông sản và tồn dư trong đất ảnh hưởng nghiêm trọng tới sức khỏe con người (Nicolopoulou-Stamati *et al.*, 2016). Việc kiểm soát nấm *Phytophthora* sp. tên hồ tiêu vô cùng phức tạp và là một thách thức lớn. Vì vậy, cần tìm ra một phương pháp phòng trừ dịch hại mới thân thiện với môi trường là các biện pháp có nguồn gốc hữu cơ như: dùng thiên địch, các chủng vi sinh vật đối kháng và các loại thuốc bảo vệ thực vật có nguồn gốc hữu cơ phổ biến là hoạt chất thứ cấp chiết xuất có nguồn gốc thực vật, vi sinh vật,... Trên thế giới hiện nay đang có xu hướng nghiên cứu và sử dụng các hợp chất thiên nhiên có nguồn gốc từ thực vật, có tính kháng vi sinh vật gây bệnh và đặc biệt có độ an toàn cao, từ đó tạo ra các chế phẩm sinh học có khả năng phòng trừ các loại dịch hại trên cây trồng.

Trong số các loài thực vật có tiềm năng, cây cỏ hôi (*Ageratum conyzoides* L.) được biết đến với khả năng phát triển mạnh mẽ và chứa nhiều nhóm hoạt chất có hoạt tính sinh học như flavonoids, polyphenols, và alkaloids (Chahal *et al.*, 2021). Đặc biệt, các flavonoids đã được chứng minh có khả năng kháng lại nấm *Phytophthora* sp. (Del Río *et al.*, 2004), một trong những nguyên nhân chính gây ra bệnh thối rễ ở hồ tiêu. Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã khẳng định rằng các hoạt chất này có khả năng kháng nấm, kháng khuẩn và chống oxy hóa mạnh mẽ, mở ra triển vọng mới cho việc sử dụng chiết xuất từ cây cỏ hôi trong phòng trừ bệnh thối rễ ở cây hồ tiêu một cách hiệu quả và an toàn (Louise *et al.*, 2011; Báidez *et al.*, 2006). Tại Việt Nam, chưa có nghiên cứu nào về hoạt tính kháng nấm *Phytophthora* sp. từ chiết xuất cây cỏ hôi. Vì thế, nghiên cứu này được thực hiện nhằm khám phá tiềm năng kháng nấm của cây cỏ hôi và đánh giá khả năng ứng dụng của nó trong việc phòng trừ bệnh thối rễ ở cây hồ tiêu. Nghiên cứu này không chỉ mở ra một hướng đi mới trong việc phòng trừ bệnh thối rễ cho cây hồ tiêu mà còn góp phần vào việc bảo vệ môi trường và sức khỏe cộng đồng, là một bước tiến quan trọng trong việc tìm kiếm các giải pháp nông nghiệp bền vững và thân thiện với môi trường.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Cây Cỏ hôi (*Ageratum conyzoides* Linnaeus, 1753) trưởng thành được thu hái ở Lâm Đồng. Cây sau khi thu nhận được đưa về phòng thí nghiệm, rửa sạch và phơi khô, sau đó mang đi cắt nhỏ, xay nhuyễn bằng máy xay sinh tố, bảo quản bột trong hộp kín ở nhiệt độ phòng.

Nấm *Phytophthora* sp. được cung cấp bởi phòng Công nghệ biến đổi sinh học, Viện Sinh học nhiệt đới. Nấm được phân lập từ hồ tiêu bị bệnh và nuôi cấy trên môi trường PDA và môi trường khảo sát là PDA có bổ sung các loại dịch chiết ethanol và methanol.

Hóa chất: Methanol, $AlCl_3$, CH_3COOK, Dimethyl sulfoxide (DMSO), quercetin (Merck).

Thiết bị và dụng cụ: Cân phân tích độ chính xác 0,0001 g, bể siêu âm Elma (Đức), thiết bị cô quay chân không, máy đo quang phổ UV – Vis, falcon, bình erlen, micropipette, ống nghiệm, máy đo pH,…

Phương pháp

Phương pháp tách chiết bằng dung môi ethanol và methanol

Cân 50 g bột cây cỏ hôi, chiết siêu âm với dung môi ethanol/methanol ở 4 nồng độ 30%, 50%, 70%, 90% (tỷ lệ dung môi: dược liệu = 5:1) trong 3 giờ, ngâm trong 24 giờ. Lọc thu dịch chiết và bã cây tiếp tục ngâm chiết với dung môi theo tỉ lệ 3:1, ngâm trong 24 giờ, tiếp tục lặp lại thêm ba lần nhằm thu hết lượng hoạt chất có trong cây. Sau khi hoàn thành ngâm chiết, dịch chiết được loại bỏ dung môi bằng thiết bị cô quay chân không. Đối với dung môi ethanol (E30, E50, E70, E90) làm bay hơi dung môi với áp suất 70 – 130 mBar, 90 rpm ở nhiệt độ 60°C (Wuyep et al., 2017). Đối với dung môi methanol (M30, M50, M70, M90) làm bay hơi dung môi với áp suất 70 – 130 mBar, 90 rpm ở nhiệt độ 45°C (Yuliani and Rahayu Yuni, 2021). Thu dịch chiết cô đặc và bảo quản trong falcon ở 4°C sử dụng cho các thí nghiệm sau.

Phân tích hàm flavonoid tổng số trong các chiết xuất

Nấm *Phytophthora* sp. có thể bị ức chế sự phát sinh bào tử trong đất nhờ hoạt chất 5′-methoxynobiletin và 5,6,7,3′,4′,5′-hexamethoxyflavone thuộc nhóm flavon có trong cây cỏ hôi (Kong *et al*., 2004).

Hàm lượng flavonoid tổng số được xác định theo phương pháp tạo màu với $AlCl_3$ (Chang *et al.*, 2002), bằng cách xây dựng đường chuẩn với quercetin (QE). Cho vào ống nghiệm 0,5 mL dung dịch quercetin ở các nồng độ khác nhau 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,1 mg/mL và bổ sung 1,5 mL methanol 99,5% và chờ trong 5 phút. Sau đó, thêm tiếp 0,1 mL $AlCl_3$ 10% và để phản ứng trong 6 phút. Cuối cùng, hỗn hợp được thêm vào 0,1 mL CH_3COOK 1M và 2,8 mL nước cất, lắc đều rồi để ổn định ở nhiệt độ phòng trong 45 phút. Tiến hành song song cùng mẫu đối chứng, với mẫu đối chứng là DMSO 100%. Sau 45 phút, tiến hành đo độ hấp thụ của mẫu đối chứng và mẫu chuẩn bằng máy đo quang phổ UV-Vis ở bước sóng 430 nm. Giá trị OD được ghi nhận và tiến hành vẽ đường thẳng hiệu chuẩn để sử dụng xác định hàm lượng flavonoid tổng số trong các mẫu dịch trích. Thực hiện tiến trình thí nghiệm tương tự đối với các mẫu dịch chiết như với quercetin chuẩn. Tính toán kết quả: Dựa vào phương trình hồi quy giữa nồng độ dung dịch quercetin (y=0,0029x - 0,0152; R^2 = 0,9937) và độ hấp thụ quang, xác định nồng độ của flavonoid tổng số trong mẫu dịch chiết (mg/mL).

Phương pháp xác định khả năng ức chế đường kính tản nấm Phytophthora sp.

Dựa trên khả năng ức chế sự phát triển đường kính tản nấm (ĐKTN) của các loại dịch chiết ở nồng độ khác nhau qua đó đánh giá được khả năng ức chế sinh trưởng và phát triển của nấm. Các loại dịch chiết ethanol và methanol (30%, 50%, 70%, 90%) được bổ sung vào môi trường PDA theo dãy nồng độ (0%,1%, 2%, 4%, 8%), thí nghiệm được lặp lại 3 lần cho mỗi loại dịch chiết khác nhau. Đĩa sau khi cấy được ủ ở nhiệt độ 28°C. Quan sát hình thái và đo ĐKTN sau 168 giờ cấy. Hiệu lực ức chế (HLUC) được tính theo công thức (Al-Hetar *et al.*, 2010):

$$\text{HLUC (\%)} = \frac{\text{ĐKTN ở công thức đối chứng} - \text{ĐKTN ở công thức thí nghiệm}}{\text{ĐKTN ở công thức đối chứng}} \text{ x } 100$$

Phương pháp xử lý thống kê

Các số liệu thí nghiệm được nhập và xử lý sơ bộ, tính các giá trị trung bình và vẽ biểu đồ bằng phần mềm Excel, phân tích ANOVA bằng phần mềm Minitab, các giá trị trung bình được kiểm định bằng phép thử Tukey ở mức ý nghĩa 95%.

KẾT QUẢ

Hàm lượng flavonoids tổng số trong các chiết xuất

Bảng 1. Ảnh hưởng của hệ dung môi đến khả năng tách chiết flavonoids trong cây cỏ hôi.

Dung môi	Flavonoid (mg QE/mL)
M30	4,254 ± 0,273^{d}
M50	2,984 ± 0,027^{e}
M70	10,135 ± 0,185^{b}
M90	8,358 ± 0,204^{c}

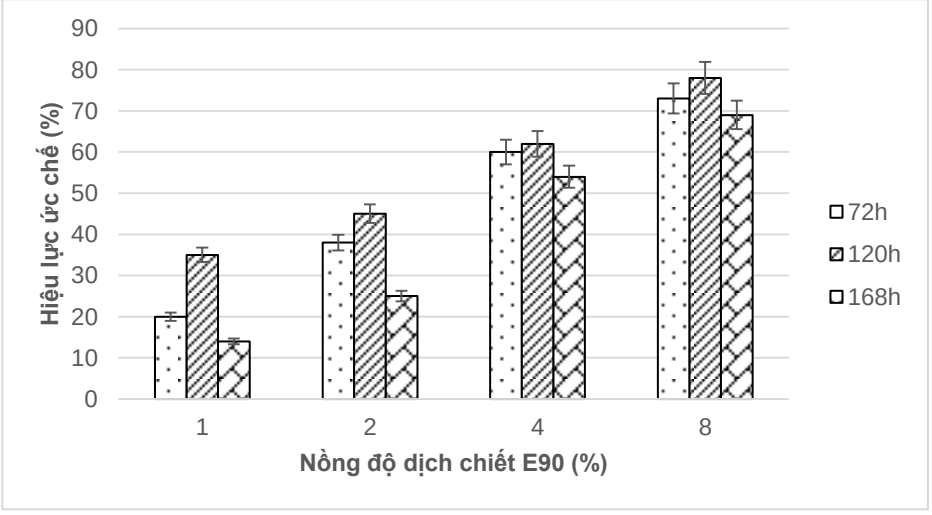
E30	4,879 ± 0,137[d]
E50	8,259 ± 0,199[c]
E70	9,527 ± 0,459[b]
E90	15,609 ± 0,139[a]

Kết quả khảo sát cho thấy, ở hàm lượng flavonoid cao nhất là ở E90 (15,609 mg/mL), tiếp theo là M70 (10,135 mg/mL) và E70 (9,527 mg/mL) (Bảng 1). Nghiên cứu của nhóm tác giả Yuliani and Rahayu Yuni (2021) đã phân tích hàm lượng flavonoid tổng số trong *A. conyzoides* ở vùng cao (3,2 ± 0,06 mg/mL) cao hơn *A. conyzoides* mọc ở vùng đồng bằng (2,9 ± 0,0 mg/mL) và ở vùng đất thấp (2,6 ± 0,06 mg/mL). Điều này cho thấy phương pháp chiết xuất ảnh hưởng đến nồng độ hợp chất hóa học trong chiết xuất. Tổng hàm lượng flavonoid trong *A. conyzoides* không chỉ bị ảnh hưởng bởi phương pháp, dung môi, nhiệt độ, thời gian chiết xuất mà còn bị ảnh hưởng bởi loại địa hình nơi cây sinh sống.

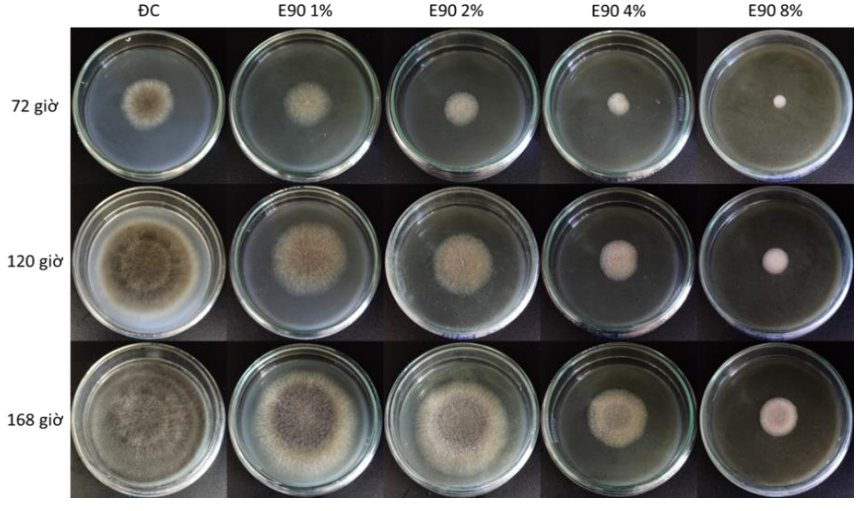
Kết luận rằng, trong nghiên cứu này ethanol 90% và methanol 70% là dung môi thích hợp nhất để thực hiện quá trình tách chiết flavonoid toàn phần từ cây cỏ hôi và do đó, chiết xuất E90 và M70 được lựa chọn trong thí nghiệm khảo sát khả năng kháng nấm *Phytophthora* sp.

Ảnh hưởng của nồng độ chiết xuất E90 đối với khả năng kháng nấm *Phytophthora* sp.

Kết quả đo ĐKTN *Phytophthora* sp. trên môi trường PDA có bổ sung dịch chiết E90 tại thời điểm 72, 120, 168 giờ. Qua đó, tính hiệu lực ức chế (HLUC), kết quả thí nghiệm ở Hình 1.



Hình 1. Hiệu lực ức chế ĐKTN *Phytophthora* sp. của dịch chiết E90 ở các nồng độ theo thời gian (%)

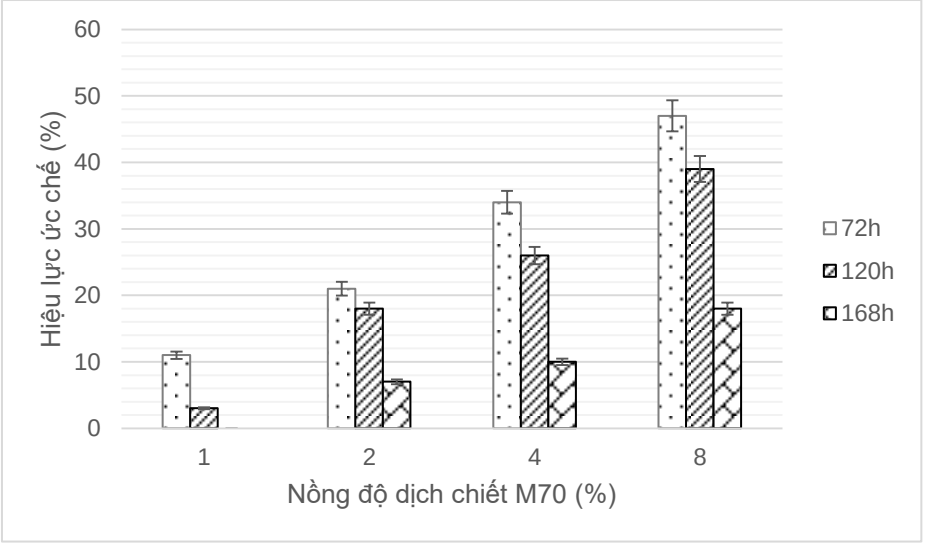


Hình 2. Hình thái nấm *Phytophthora* sp. trên môi trường PDA có bổ sung dịch chiết E90 ở các nồng độ khác nhau

Tại cùng một thời gian các đĩa chứa dịch chiết E90 8% đều cho thấy khả năng ứng chế tốt hơn so với các dịch chiết ở các nồng độ còn lại. Dịch chiết ethanol 90% khi bổ sung vào môi trường khảo sát ở các nồng độ khác nhau đều có tác dụng ức chế sự phát triển của nấm trên thạch đĩa sau 168 giờ nuôi cấy. Nấm *Phytophthora* sp. không những có đường kính giảm dần theo chiều tăng của nồng độ dịch chiết E90 mà hình thái của nó cũng có sự biến đổi rõ rệt dưới tác dụng của chất kháng nấm có trong dịch chiết. Hình 2 cho thấy khi không có dịch chiết (0%), tản nấm phát triển nhanh, tơ nấm dày, có màu nâu và sợi nấm mất dần màu nâu, chuyển dần sang trắng đục theo chiều tăng của nồng độ dịch chiết. HLUC của dịch chiết E90 cao nhất ở nồng độ 8% và HLUC sau 168 giờ là 69,3%. Vì thế, dịch chiết E90 ức chế nấm *Phytophthora* sp. tốt nhất ở nồng độ 8% và sau 168 giờ đạt hiệu lực ức chế 69,3%.

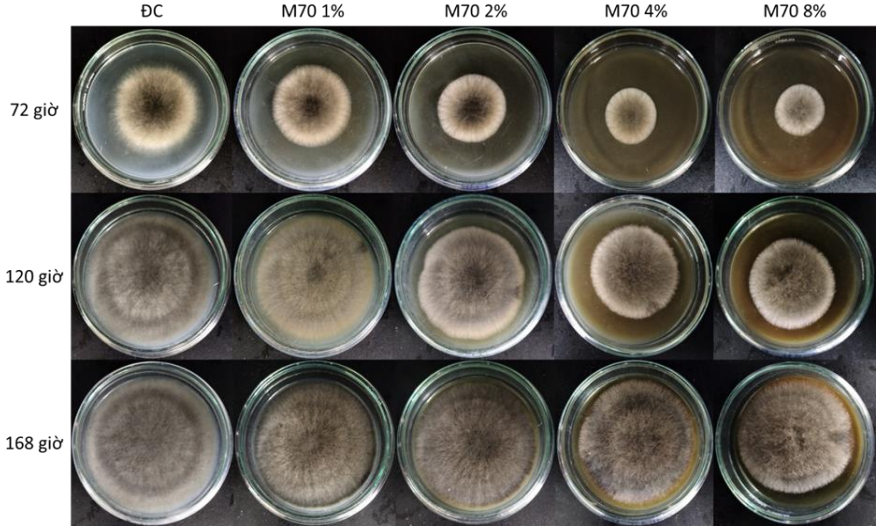
Ảnh hưởng của nồng độ dịch chiết methanol 70% đối với khả năng kháng nấm *Phytophthora* sp.

Kết quả đo ĐKTN *Phytophthora* sp. trên môi trường PDA có bổ sung dịch chiết methanol 70% (M70) tại các thời điểm 72, 120, 168 giờ. Qua đó tính hiệu lực ức chế (HLUC), kết quả thí nghiệm ở Hình 3.



Hình 3. Hiệu lực ức chế ĐKTN *Phytophthora* sp. của dịch chiết M70 ở các nồng độ theo thời gian (%)

Dịch chiết methanol 70% khi bổ sung vào môi trường khảo sát ở các nồng độ khác nhau cho thấy khả năng ức chế kém, hiệu lực ức chế sau 168 giờ chỉ đạt 18,2%. Hình 4 cho thấy hình thái nấm gần như tương tự nhau, không có sự khác biệt quá lớn so với đối chứng, tản nấm mọc dày, có màu nâu sậm. Vì thế, dịch chiết M70 ức chế nấm *Phytophthora* sp. kém hiệu quả, HLUC ở nồng độ 8% sau 168 giờ chỉ đạt 18,2%.



Hình 4. Hình thái nấm *Phytophthora* sp. trên môi trường PDA có bổ sung dịch chiết M70 ở các nồng độ khác nhau

Tóm lại, dịch chiết M70 ức chế nấm *Phytophthora* sp. kém, hiệu lực ức chế sau 168 giờ cao nhất chỉ đạt 18,2%, tản nấm mọc dày không có khác biệt đáng kể so với đối chứng. Dịch chiết E90 có tác dụng ức chế đối với nấm

Phytophthora sp.. Khi so sánh cả hai dung môi trên về HLUC thì dịch chiết E90 nhỉnh hơn hẳn khi đạt HLUC sau 168 giờ lên tới 69,3%, gấp 3,8 lần so với HLUC sau 168 giờ ở dịch chiết M70 chỉ là 18,2%. Mặc khác dịch chiết E90 còn tác động lên *Phytophthora* sp. gây ra hiện tượng mất màu sợi nấm, trong khi ở dịch chiết M70 không có được hiện tượng này. Kết quả thí nghiệm này cho thấy dịch chiết E90 ức chế nấm *Phytophthora* sp. tốt (69,3%), cao hơn 2 lần so với nghiên cứu của Ndacnou và đồng tác giả (2020) khi cũng chiết bằng dung môi ethanol nhưng hiệu quả ức chế chỉ đạt cao nhất ở 38,96%.

THẢO LUẬN

Kết quả phân tích hàm lượng flavonoid cho thấy khi chiết bằng hai loại dung môi ở những nồng độ khác nhau thì sẽ cho hàm lượng flavonoid toàn phần khác nhau. Đối với dung môi ethanol, hàm lượng flavonoid toàn phần bắt đầu tăng lên khi chiết ở nồng độ từ 30% đến 90% và hàm lượng flavonoid toàn phần đạt cao nhất tại nồng độ ethanol 90%. Đối với dung môi methanol, hàm lượng flavonoid toàn phần giảm khi chiết ở nồng độ từ 30% đến 50%, tiếp tục tăng nồng độ methanol lên 70%, tiếp tục tăng nồng độ methanol lên 90% thì hàm lượng flavonoid toàn phần không tăng mà có xu hướng giảm xuống. Điều này được giải thích là do mức độ phân cực của dung môi phụ thuộc vào hằng số điện môi, giá trị liên kết hydro, trong đó nước có hằng số điện môi, giá trị liên kết hydro cao hơn methanol và ethanol. Do đó, khi trộn lẫn methanol vào nước, ethanol và nước sẽ cho các hỗn hợp methanol - nước, ethanol - nước có mức độ phân cực khác nhau, nồng độ dung môi có độ phân cực tương đương với hợp chất được trích ly sẽ hòa tan chất đó tốt hơn. Từ kết quả thu được về hàm lượng flavonoid trong cây cỏ hôi ở nghiên cứu này và các tác giả trước đó có những khác biệt có thể là do khác nhau về nồng độ dung môi, độ phân cực của dung môi tách chiết, bộ phận thực vật sử dụng và tuổi của cây, phương pháp chiết xuất,…. Theo Omole và đồng tác giả (2012), hàm lượng flavonoid tổng trong cây cỏ hôi khi chiết bằng ethanol sử dụng bộ phận rễ (70,49 –243,02 µg QE/mL) và lá (68,92 – 182,45 µg QE/mL) thấp hơn hàm lượng flavonoid khi sử dụng tất cả các bộ phận của cây kết hợp với phương pháp tách chiết có sự hỗ trợ của sóng siêu âm, chiết bằng dung môi khác nhau và ở các nồng độ khác nhau (Omole ***et al.***, 2012).

Kết quả nghiên cứu cho thấy dịch chiết E90 từ *A. conyzoides* có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Phytophthora sp.* một cách hiệu quả, trong khi đó dịch chiết M70 cho thấy khả năng ức chế kém hơn. Điều này có thể được giải thích thông qua hàm lượng flavonoid trong các dịch chiết, với E90 có hàm lượng flavonoid cao nhất đạt 15,609 mg/mL, trong khi M70 chỉ đạt 10,135 mg/mL. Flavonoid là nhóm hợp chất đã được chứng minh có hoạt tính kháng nấm mạnh, và sự khác biệt về hàm lượng flavonoid này có thể là nguyên nhân chính dẫn đến hiệu quả ức chế khác biệt giữa hai dịch chiết (Li ***et al.***, 2022).

Tuy chưa có nghiên cứu cụ thể về khả năng kháng nấm *Phytophthora* sp. của *A. conyzoides*, kết quả của nghiên cứu phù hợp với các nghiên cứu đã công bố trước đó về các hoạt tính sinh học khác của loài cây này. Trong một nghiên cứu về các chất hóa học dị hợp do *A. conyzoides* giải phóng để kiểm soát cỏ dại và nấm gây bệnh trong đất ở các vườn cây họ cam quýt, 5′-methoxynobiletin và 5,6,7,3′,4′,5′-hexamethoxyflavone đã ức chế đáng kể sự phát triển của cỏ dại và sự nảy mầm của bào tử nấm gây bệnh trong đất *Phytophthora citrophthora*, *Pythium aphanidermatum* và *Fusarium solani* (Kong ***et al.***, 2004) Nghiên cứu khác cho thấy rằng polymethoxyflavone có tác dụng tương tự đối với nấm như thuốc diệt nấm tổng hợp, phá vỡ tính toàn vẹn của màng tế bào bằng cách ức chế tổng hợp sterol, mặc dù cơ chế tăng tính thấm của màng có thể khác nhau (Wu ***et al.***, 2014). Điều này làm cơ sở cho việc *A. conyzoides* có tiềm năng trở thành nguồn nguyên liệu kháng nấm tự nhiên, đặc biệt là khi sử dụng dịch chiết ethanol, và có thể được phát triển thành các sản phẩm sinh học bảo vệ cây trồng khỏi các loại nấm gây bệnh.

Một hạn chế của nghiên cứu này là chưa đánh giá được toàn bộ các hợp chất có trong dịch chiết và cơ chế tác động cụ thể của chúng. Hơn nữa, cần tiến hành các nghiên cứu bổ sung để khảo sát thêm các yếu tố như phương pháp chiết xuất khác và khả năng kháng nấm đối với các loài nấm khác để có cái nhìn toàn diện hơn về tiềm năng kháng nấm của *A. conyzoides*. Vì vậy, cần nghiên cứu thêm về cơ chế kháng nấm để phát triển thuốc kháng nấm mới sử dụng ngoài đồng ruộng, đặc biệt là trong điều trị bệnh chết nhanh ở cây hồ tiêu.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu cho thấy quá trình trích ly hợp chất flavonoid từ cây cỏ hôi chịu ảnh hưởng bởi dung môi và nồng độ các loại dung môi tách chiết. Ethanol 90% và methanol 70% là hai dung môi trích được nhiều flavonoid nhất.

Kết quả thu được cho thấy, dịch chiết từ dung môi ethanol 90% có hiệu quả ức chế nấm *Phytophthora* sp. tốt hơn so với dịch chiết từ dung môi methanol 70%. Nồng độ dịch chiết càng cao thì khả năng ức chế càng tốt và tốt nhất ở nồng độ 8%. Do đó có thể dùng ethanol 90% để tách chiết hoạt chất từ cây cỏ hôi ứng dụng làm thuốc kháng nấm sinh học kháng bệnh do nấm *Phytophthora* sp. trên cây trồng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Báidez AG, Gómez P, Del Río JA, Ortuño A (2006). Antifungal capacity of major phenolic compounds of Olea europaea L. against Phytophthora megasperma Drechsler and Cylindrocarpon destructans (Zinssm.) Scholten. Physiological and Molecular Plant Pathology, 69(4-6): 224-229.

Chahal R, Nanda A, Akkol EK, Sobarzo-Sánchez E, Arya A, Kaushik D, Mittal V (2021). *Ageratum conyzoides* L. and its secondary metabolites in the management of different fungal pathogens. Molecules, 26(10): 2933.

Chang C, Yang M, Wen H, Chem J (2002). Estimation of flavonoid total content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analisis, 10(7): 178-182.

Del Río JA et al.(2004). "Changes in the levels of polymethoxyflavones and flavanones as part of the defense mechanism of Citrus sinensis (cv. Valencia Late) fruits against Phytophthora citrophthora." Journal of agricultural and food chemistry 52.7, 1913-1917.Louise, Nana Wakam et al.(2011). "Flavonoïd compounds synthesis by cocoa fruits (Theobroma cacao L.) in response to Phytophthora megakarya infection." Res. J. Agric. Biol. Sci 7 : 335-342.

Li AP, He YH, Zhang SY, Shi YP (2022). Antibacterial activity and action mechanism of flavonoids against phytopathogenic bacteria. Pesticide Biochemistry and Physiology, 188: 105221.

Islam SZ, Babadoost M, Lambert KN, Ndeme A, Fouly HM (2005). Characterization of *Phytophthora* capsici isolates from processing pumpkin in Illinois. Plant Disease, 89(2): 191-197.

Jarvis, Charlie (2007): Chapter 7: Linnaean Plant Names and their Types (part A). In: Order out of Chaos. Linnaean Plant Types and their Types. London: Linnaean Society of London in association with the Natural History Museum: 252-342, ISBN: 978-0-9506207-7-0, DOI: https://doi.org/10.5281/zenodo.291971

Kong C, Liang W, Hu F, Xu X, Wang P, Jiang Y, Xing B (2004). Allelochemicals and their transformations in the Ageratum conyzoides intercropped citrus orchard soils. Plant Soil 2004, 264: 149–157.

Ndacnou MK, Pantaleon A, Tchinda JBS, Mangapche ELN, Keumedjio F, Boyoguemo DB (2020). Phytochemical study and anti-oomycete activity of Ageratum conyzoides Linnaeus. Industrial crops and products, 153 112589.

Nicolopoulou-Stamati P, Maipas S, Kotampasi C, Stamatis P, Hens L (2016). Chemical pesticides a:nd human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Frontiers in public health*, *4*: 148.

Omole OA, Oladipo JO, Orimolade BO, Ajetomobi OO, Olorunmaiye KS, Dosumu OO (2019). Anti-Oxidant and Anti-Microbial Activities of the Root and Leaf Extracts of Ageratum conyzoides L. Agriculturae Conspectus Scientificus, 84(3): 295-304.

Wu T, Cheng D, He M, Pan S, Yao X, Xu X (2014) Antifungal action and inhibitory mechanism of polymethoxylated flavones from Citrus reticulata Blanco peel against Aspergillus niger. Food Control 2014, 35: 354–359.

Wuyep PA, Musa HD, Ezemokwe GC, Nyam DD, SilaGyang MD (2017). Phytochemicals from Ageratum conyzoides L. extracts and their antifungal activity against virulent Aspergillus spp. Journal of Academia and Industrial Research: 32-39.

SURVEY OF RESISTANCE TO FUNGUS *Phytophthora* sp. OF EXTRACT OF AGERATUM CONYZOIDES

Nguyen Ba Khanh Trinh[*], Tran Thi Thu Phuong, Nguyen Dinh Thao Ngan, Nguyen Thi Nhu Quynh

Institute of Tropical Biology-Vietnam Academy of Science and Technology, Nong Lam University Ho Chi Minh City

SUMMARY

Ageratum conyzoides L. (*A. conyzoides*), also known as the billygoat-weed, is a widespread weed with vigorous growth and high resistance to fungal diseases. Some studies have shown that flavonoids are the main active compounds with inhibitory effects against the fungus *Phytophthora*. Therefore, this study aims to investigate the influence of solvent concentration on the extraction efficiency of flavonoid compounds using two different solvents, ethanol and methanol, at varying concentrations (30%, 50%, 70%, and 90%) through UV-Vis spectrophotometry. The results showed that the highest flavonoid content was extracted using 90% ethanol (15.609 ± 0.139 mg/mL) and 70% methanol (10.135 ± 0.185 mg/mL). Furthermore, the antifungal activity against *Phytophthora* sp. was evaluated by measuring the inhibition of fungal colony diameter on agar plates at 168 hours after inoculation, with the extract concentrations tested being 0%, 1%, 2%, 4%, and 8%. The results indicated that 90% ethanol was the most suitable solvent concentration for extracting antifungal compounds, with an extract concentration of 8%. Additionally, two-factor ANOVA analysis showed an interaction between solvent concentration and extract concentration on the growth of *Phytophthora* sp. Therefore, *A. conyzoides* has the potential to be applied in the control of certain fungal pathogens in crops, with the prospect of being developed into a biological plant protection agent.

Keywords: Ageratum conyzoides, ethanol and methanol extracts, *Phytophthora*, antifungal.

[*] Author for corresspondence: Tel: +84-4521955; Email: nbkt12.1lvl@gmail.com

PHÁT HIỆN KHẢ NĂNG ĐỒNG CHUYỂN HÓA AMMONIUM, NITRITE CỦA CHỦNG NITRATE HÓA DỊ DƯỠNG *Bacillus* sp. TT2 PHÂN LẬP TẠI VIỆT NAM

Nguyễn Thị Minh[1,2], Bùi Hương Giang[1,2], Chu Nhật Huy[1,2], Hoàng Minh[3],Hoàng Phương Hà[1,2*]

[1]*Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

[2]*Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

[3]*Trường phổ thông trung học Chuyên Khoa học Tự nhiên*

TÓM TẮT

Ammonium và nitrite là hai hợp chất nitrogen vô cơ gây hại cho động vật thủy sản. Phương pháp xử lý ô nhiễm nitrogen thông thường cần sự kết hợp của vi khuẩn nitrate hóa tự dưỡng hiếu khí và vi khuẩn khử nitrate dị dưỡng kỵ khí. Tuy nhiên, vi khuẩn tự dưỡng có tốc độ sinh trưởng chậm và nhu cầu về oxy khác biệt so với nhóm dị dưỡng, gây khó khăn khi áp dụng chúng trong cùng hệ thống xử lý. Trong khi đó, vi khuẩn nitrate hóa dị dưỡng có thể sinh trưởng nhanh, chuyển hóa đồng thời ammonium, nitrite và thích ứng tốt với nhiều điều kiện môi trường, đây là lợi thế để ứng dụng chúng trong xử lý ô nhiễm nitrogen tại đầm nuôi thủy sản. Vì vậy, nghiên cứu này đã sàng lọc được năm chủng vi khuẩn dị dưỡng ký hiệu TT2, TT3, TT6, TT8 và TT9 có thể xử lý ammonium và nitrite đạt hiệu suất trên 95%. Các chủng vi khuẩn này có khả năng tạo màng sinh học tốt và chuyển hóa nitrogen tối ưu khi sinh trưởng trong môi trường chứa nguồn carbon acetate, nồng độ NaCl 0-4%. Thông qua so sánh độ tương đồng của gen 16S rRNA, chủng TT2 được định danh là *Bacillus* sp. TT2. Tính chất đồng chuyển hóa ammonium và nitrite là phát hiện mới về nhóm vi khuẩn nitrate hóa dị dưỡng phân lập tại Việt Nam.

Từ khóa: Ammonium, nitrite, nuôi thủy sản, ô nhiễm nitrogen, vi khuẩn nitrate hóa dị dưỡng khử nitrate hiếu khí.

MỞ ĐẦU

Trong nuôi trồng thủy sản, các hợp chất nitrogen vô cơ gây ô nhiễm như ammonium và nitrite ảnh hưởng rất lớn đến tốc độ sinh trưởng cũng như tỷ lệ sống của vật nuôi khi tồn tại với nồng độ cao. Các nghiên cứu cho đến nay vẫn luôn đề cập đến các vấn đề loại bỏ các hợp chất nitrogen gây ô nhiễm bằng các con đường xử lý sinh học như công nghệ nitrate hóa và khử nitrate. Vi khuẩn tham gia vào quá trình nitrate hóa để chuyển đổi ammonium (NH_4^+) thành nitrite (NO_2^-) chủ yếu thuộc chi *Nitrosomonas*. Tiếp đó, vi khuẩn nitrite hóa thuộc các chi *Nitrobacter* hay *Nitrospina* sẽ oxy hóa nitrite thành nitrate. Quá trình khử nitrate được tiếp diễn trong điều kiện kỵ khí dưới tác động của vi khuẩn khử nitrate dị dưỡng để tạo thành các sản phẩm lần lượt là NO_2, NO, N_2O và N_2. Tuy nhiên, sự khác biệt về điều kiện sinh trưởng của 2 nhóm vi khuẩn này là hiếu khí tự dưỡng và kỵ khí dị dưỡng cũng như tốc độ sinh trưởng nhanh của vi khuẩn dị dưỡng dễ tạo ra sự phát triển "lấn át" so với vi khuẩn tự dưỡng, dẫn đến mất cân bằng trong quá trình chuyển hóa các hợp chất nitrogen trong cùng một hệ thống xử lý.

Trong tự nhiên, nhóm vi khuẩn nitrate hóa dị dưỡng cũng được phát hiện trong nguồn nước thải chứa ammonium và carbon hữu cơ. Các chủng vi khuẩn dị dưỡng này không lấy năng lượng cho sinh trưởng từ quá trình oxy hóa các hợp chất chứa nitrogen vô cơ, mà từ nguồn carbon hữu cơ (Robertson *et al.,* 1990). Hiện nay, nhiều chủng vi khuẩn dị dưỡng có khả năng đồng thực hiện quá trình nitrate hóa và khử nitrate hiếu khí (heterotrophic nitrification and aerobic denitrification-HNAD) như các chủng thuộc chi *Acinetobacter, Bacillus, Cuprobacter, Halomonas, Klebsiella marinobacter, Pseudomonas* và *Photobacter* được phân lập từ nhiều môi trường khác nhau đã thu hút sự chú ý và nghiên cứu của nhiều nhà khoa học (Fu *et al.,* 2022). Hiệu suất chuyển hóa nitrogen của HNAD tốt hơn so với quy trình thông thường vì có sự khác biệt về sản phẩm trung gian và các enzyme tham gia xúc tác. Khi cung cấp đủ nguồn carbon hữu cơ cho HNAD, chúng có thể phát triển nhanh chóng và thực hiện quá trình nitrate hóa và khử nitrate hiệu quả. Mặc dù nhóm vi khuẩn HNAD này nhìn thấy có tiềm năng ứng dụng thuận lợi trong xử lý ô nhiễm nitrogen vô cơ, nhưng các nghiên cứu về đặc điểm sinh học và tính đa dạng loài của chúng mới chỉ đề cập đến trong môi trường nước ngọt, sự phân lập và đánh giá vai trò của các chủng vi khuẩn HNAD này trong trường nuôi thủy sản nước lợ còn hạn chế và đặc biệt, hướng nghiên cứu về phân lập và ứng dụng nhóm vi khuẩn HNAD này trong xử lý ô nhiễm vẫn còn là vấn đề nghiên cứu mới tại Việt Nam.

Do đó, trong nghiên cứu này, mẫu nước và bùn từ ao nuôi tôm đã được sử dụng làm giàu để phân lập vi khuẩn HNAD. Các thí nghiệm kiểm tra một số đặc tính sinh của các chủng vi khuẩn phân lập sẽ được thực hiện để chứng minh hoạt tính chuyển hóa đồng thời ammonium, nitrite và khả năng thích ứng của chúng khi sinh trưởng trong môi trường nuôi thủy sản nước lợ. Từ đó, mở ra định hướng ứng dụng nhóm vi khuẩn này trong mô hình, công nghệ xử lý nước ô nhiễm các hợp chất nitrogen ngoài thực tế.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu: Mẫu nước và bùn được thu thập tại 5 vị trí khác nhau (bề mặt, giữa và đáy) trong đầm nuôi tôm thẻ chân trắng tỉnh Bạc Liêu vào ngày thứ 55 của vụ nuôi. Các mẫu được bảo quản ở 4^{o}C trong các chai lấy mẫu chuyên dụng và được trộn đều trước khi sử dụng để phân lập vi khuẩn. Môi trường làm giàu, phân lập và nuôi vi khuẩn (VK): Na_2HPO_4 4,78 g/L; KH_2PO_4 1,5 g/L; $MgSO_4.7H_2O$ 0,1 g/L; CH_3COONa 3,416 g/L; vi lượng 1 mL/L (Xia *et al.,* 2020). (Hàm lượng N-NH_4, N-NO_2, N-NO_3 được bổ sung tùy mục đích thí nghiệm).

Sàng lọc nhóm vi khuẩn HNAD từ môi trường nước nuôi tôm

Mẫu nước nuôi tôm đã thu thập được làm giàu nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitrogen bằng cách bổ sung 10% vào môi trường VK chứa 10mg N-NH_4 /L, NaCl 15% trong 10 ngày. Việc kiểm tra khả năng chuyển hóa các hợp chất nitrogen vô cơ của các mẫu được thực hiện thông qua xác định hàm lượng của ammonium, nitrite và nitrate có trong môi trường theo từng ngày. Ammonium sẽ được thêm vào môi trường để đạt nồng độ là 10 mgN/L khi 50% lượng ammonium bổ sung ban đầu trong các mẫu đã được oxy hóa thành nitrite và nitrate. Sau khi làm giàu, mẫu được pha loãng rồi tiến hành phân lập trên đĩa thạch chứa môi trường VK trong 3-5 ngày ở 30 ± 2 °C. Khuẩn lạc xuất hiện trên đĩa thạch được nuôi tách riêng rẽ trên môi trường VK đặc để phục vụ cho các thí nghiệm tiếp theo.

Đánh giá khả năng đồng chuyển hóa ammonium, nitrite của vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn được nuôi riêng rẽ trong môi trường VK có bổ sung ammonium hoặc nitrite với nồng độ ban đầu là 5 mgN/L. Sau 3 ngày nuôi lắc ở 130 vòng/phút, thu mẫu dịch nuôi và xác định khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn dựa trên giá trị OD_{600} nm. Nồng độ các hợp chất ammonium, hay nitrite và nitrate trong môi trường dịch được kiểm tra và so sánh với nồng độ ban đầu để xác định hiệu xuất chuyển hóa nitơ của từng chủng vi khuẩn. Thí nghiệm được lặp lại 03 lần. Lựa chọn những chủng vi khuẩn đồng xử lý ammonium và nitrite.

Đánh giá khả năng tạo màng biofilm của các vi khuẩn

Đánh giá khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn lựa chọn theo phương pháp của Morikawa *et al.,* 2006. Khả năng tạo bioflim của vi khuẩn được phát hiện dựa vào sự bắt màu của tím tinh thể trên các ống Eppendorf và định lượng khi đo độ hấp thụ ở bước sóng OD_{570}. Giá trị OD_{570} tỉ lệ thuận với khả năng tạo biofilm của các chủng vi khuẩn.

Đánh giá ảnh hưởng của một số điều kiện nuôi đến sinh trưởng và khả năng chuyển hóa ammonium của vi khuẩn

Ảnh hưởng của nguồn carbon: Sử dụng lần lượt các nguồn carbon sucrose, glucose, citrate, acetate, succinate với nồng độ 2 g/L bổ sung vào môi trường VK. $CaCO_3$ 2g/L được coi là nguồn carbon vô cơ cho thí nghiệm đối chứng.

Ảnh hưởng nồng độ NaCl: Bổ sung NaCl với những nồng độ cuối cùng khác nhau: 0; 1; 2; 3 và 4% vào môi trường VK.

Khả năng chuyển hóa ammonium của các chủng vi khuẩn được xác định thông qua sự giảm của hàm lượng ammonium bổ sung ban đầu (5 mgN/L) sau 3 ngày nuôi lắc ở 130 vòng/phút. Ammonium, nitrite, nitrate được xác định theo phương pháp Nessler, Griss và Salicilate tương ứng. Phương trình đường chuẩn sử dụng để xác định hàm lượng các hợp chất nitrogen là: y = 0,13*x+0,07 (R^2=0,94) đối với ammonium; y = 0,95*x+0,11 (R^2=0,98) đối với nitrite; y = 0,12*x+0,03 (R^2=0,97) đối với nitrate. Bên cạnh đó, khả năng sinh trưởng của các chủng vi khuẩn được đánh giá thông qua giá trị OD_{600}. Thí nghiệm được lặp lại 03 lần.

Xác định vị trí phân loại của vi khuẩn

Mẫu vi khuẩn đã phân lập được tách DNA tổng số và nhân bản đoạn gen 16S rRNA với cặp mồi 27F/1492R. Trình tự đoạn gen 16S rRNA được so sánh độ tương đồng với các trình tự gen được đăng ký trên ngân hàng Genbank để xác định vị trí phân loại của chủng vi khuẩn phân lập.

Xử lý số liệu

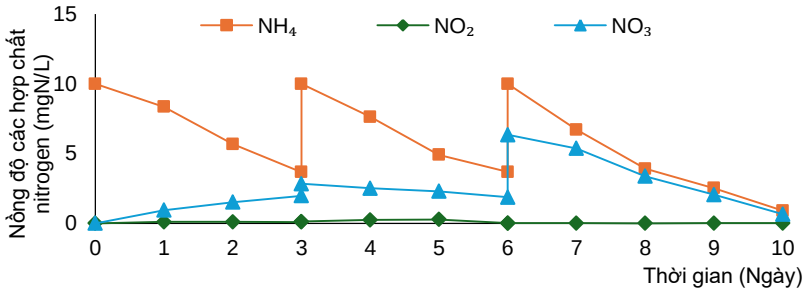
Các thí nghiệm được lặp lại ba lần. Số liệu được xử lý bằng Microsoft Office Excel 2022. Tất cả các số liệu trong thí nghiệm được trình bày dưới dạng: Trung bình ± Sai số chuẩn. Sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu trong mỗi thí nghiệm được xác định thông qua kiểm định Duncan (p < 0,05).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập nhóm vi khuẩn HNAD từ mẫu làm giàu

Trong quá trình làm giàu nhóm vi khuẩn HNAD, hàm lượng ammonium bổ sung ban đầu là 10 mg N/L, sau 3 ngày thí nghiệm đã giảm xuống còn 3,67 mgN/L, nitrate trong mẫu tăng lên 1,97 mg N-NO_3/L; bổ sung ammonium để hàm lượng đạt 10 mg N/l. Đến ngày thứ 6, hàm lượng ammonium trong mẫu chỉ ở mức 3,69 mgN-NH_4/L, nhưng lượng nitrite và nitrate trong mẫu chỉ đạt lần lượt 0,02 mgN-NO_2/L và 1,87 mgN-NO_3/L. Việc xuất hiện nitrate trong

mẫu nghiên cứu chứng tỏ đã có sự hình thành nitrite, hàm lượng nitrite này nhỏ hơn rất nhiều so với ammonium có trong mẫu do có sự chuyển tiếp thành nitrate. Bổ sung tiếp ammonium lần 2 để đạt nồng độ ban đầu 10 mg N-NH_4/L, tiếp tục theo dõi đến ngày thứ 10 thì hàm lượng ammonium và nitrate giảm và gần như không phát hiện nitrite trong dịch làm giàu ở ngày thứ 10, lượng nitrite chỉ tăng nhẹ ở mức 0,28 mg N/L ở ngày thứ 4 và 5 (Hình 1).

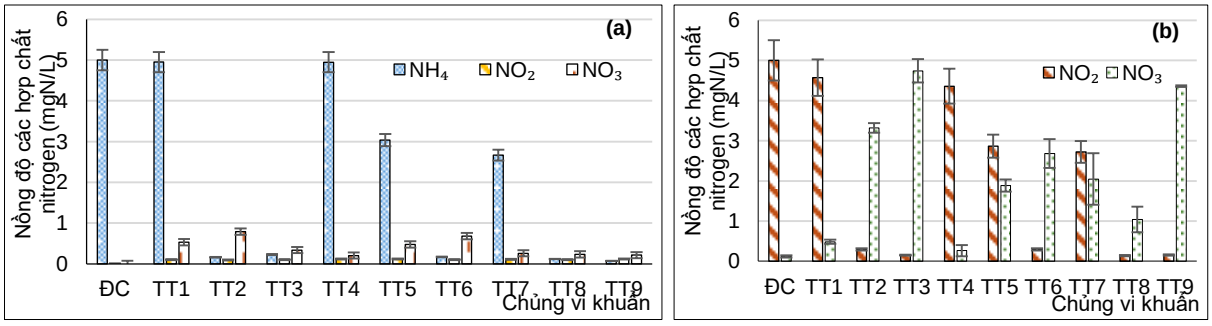


Hình 1. Khả năng chuyển hóa ammonium, nitrite và nitrate của các chủng vi khuẩn được làm giàu

Dựa trên sự biến đổi của hàm lượng các hợp chất ammonium, nitrite và nitrate trong mẫu làm giàu có thể nhận thấy, nhóm vi khuẩn chuyển hóa nitrogen tồn tại trong mẫu đã oxy hóa ammonium tạo thành nitrite và nitrite này tiếp tục chuyển hóa thành nitrate. Sau 10 ngày làm giàu mẫu, nồng độ của cả ba hợp chất đều giảm xuống rất thấp, ammonium và nitrate chỉ đạt khoảng 0,651 mgN/L, còn nitrite hầu như không phát hiện. Chứng tỏ trong môi trường nuôi làm giàu có chứa nhóm vi khuẩn dị dưỡng oxy hóa ammonium, oxy hóa nitrite và cũng có thể có vi khuẩn khử nitrate trong điều kiện hiếu khí. Mẫu dịch sau làm giàu được tiến hành phân lập trên môi trường thạch VK. Sau 3 ngày nuôi ở nhiệt độ 30 ^{o}C ± 2, kết quả thu được được 9 chủng vi khuẩn ký hiệu là TT1, TT2, TT3, TT4, TT5, TT6, TT7, TT8, TT9.

Khả năng chuyển hóa các hợp chất nitrogen vô cơ của các chủng vi khuẩn phân lập

Tiến hành thử nghiệm khả năng chuyển hóa ammonium của các chủng vi khuẩn phân lập trên môi trường dịch VK cho thấy, trong cùng một điều kiện nuôi cấy 5 chủng TT2, TT3, TT6, TT8 và TT9 có khả năng chuyển hóa ammonium tốt hơn so với bốn chủng còn lại (Hình 2 a). Với hàm lượng ammonium bổ sung ban đầu là 5mgN/L, chủng TT3 và TT8 đạt hiệu suất xử lý ammonium khoảng 96%, hàm lượng ammonium còn lại trong môi trường lần lượt là 0,23 và 0,17 mgN-NH_4/L. Các chủng TT2, TT6, TT9 cũng thể hiện hoạt tính chuyển hóa ammonium khá tốt với hàm lượng N-NH_4 còn lại đều <0,2 mgN/L. Đặc biệt hơn, lượng nitrite và nitrate tạo thành trong môi trường nuôi của 5 chủng TT2, TT3, TT6, TT8 và TT9 rất thấp, dưới ngưỡng 0,15 mgN/L. Khi nitrite được sử dụng làm nguồn nitrogen chính trong môi trường, các chủng vi khuẩn TT1 và TT4 có khả năng chuyển hóa rất kém. Chủng TT5 và TT7 lại có thể loại bỏ đến 70% lượng nitrite trong môi trường sau 3 ngày nuôi cấy. Hiệu suất loại bỏ nitrite tăng lên đến trên 95% với môi trường chỉ chứa riêng biệt từng vi khuẩn TT2, TT3, TT6, TT8 và TT9 (Hình 2 b). Tuy nhiên, hàm lượng nitrate tạo thành trong môi trường nuôi của vi khuẩn TT2, TT6 và TT8 không cân bằng với hàm lượng nitrite mất đi, điều này gợi ý rằng 3 chủng vi khuẩn này có thể đã thực hiện quá trình khử nitrate/nitrite trong điều kiện hiếu khí. Đây là một tính chất mới về nhóm vi khuẩn dị dưỡng có khả năng chuyển hóa đồng thời các hợp chất ammonium, nitrite và nitrate tại Việt Nam. Trong đó, 5 chủng vi khuẩn TT2, TT3, TT6, TT8, TT9 đã được xác định có khả năng chuyển hóa ammonium và nitrite tốt sẽ được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 2. Khả năng chuyển hóa ammonium (a) và nitrite (b) và vô cơ của các chủng vi khuẩn phân lập

Khả năng sinh biofilm của các chủng vi khuẩn chuyển hóa nitrogen lựa chọn

Vi khuẩn hình thành màng sinh học và thường được bám lên các bề mặt giá thể nhờ sự gắn kết của các polysaccharit ngoại bào giúp bảo vệ vi khuẩn trước những điều kiện môi trường khắc nghiệt. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra hiệu suất xử lý ô nhiễm nitrogen của các chủng vi khuẩn tạo màng sinh học bám dính trên các giá thể cao hơn so với vi khuẩn ở dạng tự do, Hoilijoki và đồng tác giả (2000) cũng đã chứng minh trong quá trình nitrate

hóa, vi khuẩn nitrate hóa cố định trên giá thể có thể chuyển hóa loại bỏ gần như hoàn toàn các hợp nitrogen trong khi ở dạng tự do chỉ đạt hiệu suất tối đa 61%. Vì vậy, thí nghiệm đánh giá khả năng tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn lựa chọn trong nghiên cứu này được tiến hành.

Bảng 2. Khả năng tạo màng của các chủng vi khuẩn lựa chọn

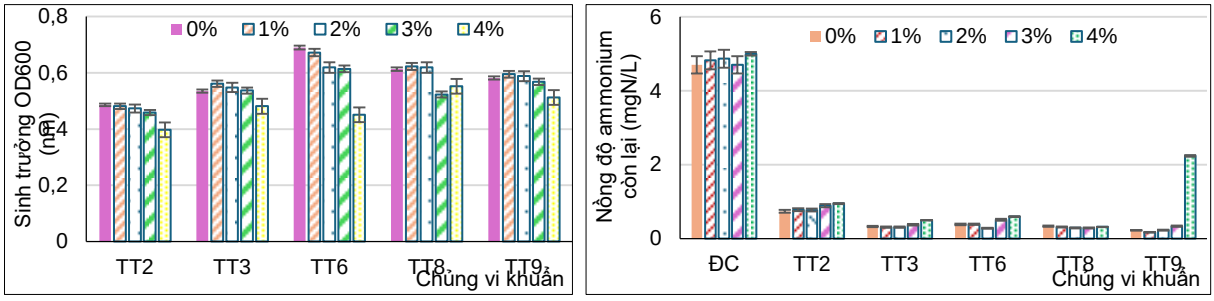
Ký hiệu chủng	Khả năng tạo màng biofilm (OD_{570} nm)	Khả năng sinh trưởng (OD_{600} nm)
ĐC	$0,21^{a} \pm 0,1$	$0,06^{a} \pm 0,1$
TT2	$1,61^{ab} \pm 0,1$	$0,49^{ab} \pm 0,2$
TT3	$1,34^{ab} \pm 0,3$	$0,57^{ab} \pm 0,4$
TT6	$1,23^{ab} \pm 0,3$	$0,48^{ab} \pm 0,9$
TT8	$2,35^{ac} \pm 0,1$	$0,60^{ab} \pm 0,2$
TT9	$2,59^{ac} \pm 0,2$	$0,56^{ab} \pm 0,5$

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu trong thí nghiệm, xác định thông qua kiểm định Duncan ($p < 0,05$).

Kết quả thể hiện ở Bảng 2 cho thấy, cả 5 chủng vi khuẩn lựa chọn đều có khả năng tạo màng bioflim, nhưng TT2, TT8 và TT9 có khả năng tạo màng tốt hơn với giá trị mật độ quang đo được ở bước sóng 570 nm lần lượt là 1,61; 2,35 và 2,59, chủng TT3 và TT6 tạo màng kém hơn, giá trị OD_{570} nm đạt lần lượt 1,24 và 1,23 sau 3 ngày nuôi cấy. Đặc điểm tạo màng sinh học của các chủng vi khuẩn nghiên cứu này sẽ tạo điều kiện giúp chúng dễ dàng bám dính/cố định trên các giá thể từ đó tăng hiệu quả và giảm hiện tượng bị rửa trôi khỏi hệ thống xử lý.

Ảnh hưởng của nồng độ muối NaCl đến sinh trưởng và hoạt tính chuyển hóa ammonium của các chủng vi khuẩn

Sự sinh trưởng và khả năng chuyển hóa ammonium của các chủng vi khuẩn đã được thử nghiệm trong môi trường có độ mặn khác nhau từ 0, 1, 2, 3 đến 4%. Kết quả chỉ ra ở Hình 3, các chủng vi khuẩn nghiên cứu đều có khả năng sinh trưởng trên môi trường chứa NaCl ở nồng độ cao tới 4%, nhưng khả năng phát triển tốt nhất ở nồng đô muối từ 0 - 3%. Trong đó, chủng TT9 cho hoạt tính loại ammonium cao nhất sau 3 ngày thử nghiệm, hàm lượng ammonium còn lại trong mẫu trong khoảng 0,1- 0,2 mg $N\text{-}NH_4$/L, tương ứng với hiệu suất xử lý đạt 96,7%. Nhưng khi nồng độ muối tăng lên 4%, hiệu suất loại ammonium của TT9 bị giảm đi đáng kể, chỉ còn lại 55,2%. Riêng các chủng TT2, TT3, TT6 và TT8 lại có khả năng chuyển hóa ammonium gần như là tương đương giữa các nồng độ muối, chứng tỏ việc thay đổi nồng độ muối thử nghiệm không làm ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và hoạt tính xử lý ammonium của các vi khuẩn này, hiệu suất chuyển hóa ammonium của chúng đạt trên 85%. Như vậy, các chủng vi khuẩn phân lập có thể phù hợp để định hướng ứng dụng trong xử lý ô nhiễm nitrogen trong môi trường nước ngọt và nước lợ.



Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ NaCl đến sinh trưởng và hoạt tính chuyển hóa ammonium của vi khuẩn lựa chọn

Ảnh hưởng của nguồn carbon đến sinh trưởng và khả năng chuyển hóa ammonium của các chủng vi khuẩn

Ở các vi khuẩn HNAD, carbon hữu cơ được sử dụng là nguồn cung cấp dinh dưỡng và năng lượng cho sinh trưởng nhưng cũng đóng vai trò làm chất cho điện tử trong quá trình nitrate hóa, khử nitrate. Thông qua quá trình chuyển hóa của chúng để loại bỏ các hợp ô nhiễm khỏi môi trường nước, từ đó giúp chất lượng nước được cải thiện.Tuy nhiên, tốc độ sinh trưởng và hiệu suất xử lý nitrogen của mỗi chủng HNAD sẽ thể hiện khác nhau tùy thuộc vào loại carbon hữu cơ sử dụng (Ren *et al.,* 2014). Trong nghiên cứu này, sau 3 ngày nuôi cấy kết quả thể hiện trong Bảng 3 cho thấy, các chủng vi khuẩn thử nghiệm không có khả năng sử dụng nguồn carbon vô cơ ($CaCO_3$) cho sinh trưởng, giá trị OD_{600} thu được chỉ ở khoảng 0,1. Trong khi đó, nguồn carbon hữu cơ đã kích thích sự sinh trưởng của chúng, thể hiện thông qua giá trị OD_{600} của chủng TT6 và TT9 đạt cao nhất lần lượt là 1,37 và 1,32 khi nguồn carbon glucose được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Như vậy, nguồn carbon hữu cơ đã kích thích sinh trưởng của các chủng vi khuẩn nghiên cứu, nhưng chúng có ảnh hưởng đến khả năng chuyển

hóa nitrogen của vi khuẩn hay không cũng là một vấn đề cần được làm rõ. Nên môi trường dịch nuôi vi khuẩn cũng được sử dụng để kiểm tra hàm lượng ammonium còn lại sau 3 ngày nuôi cấy. Tương đồng với kết quả kiểm tra khả năng sinh trưởng, khi môi trường chỉ chứa nguồn carbon vô cơ duy nhất là $CaCO_3$, hiệu suất chuyển hóa ammonium của vi khuẩn đạt được rất thấp, chỉ đạt mức dưới 30%. Khi môi trường bổ sung nguồn carbon hữu cơ, khả năng chuyển hóa ammonium của vi khuẩn tăng lên đáng kể. Trong đó, chủng TT2 và TT8 có thể xử lý trên 80% hàm lượng ammonium bổ sung ban đầu trong môi trường chứa glucose hay succinate. Trong nghiên cứu này các nguồn carbon hưu cơ sử dụng có sự khác nhau về trọng lượng phân tử và cấu trúc hóa học, đây có thể là yếu tố tác động đáng kể đến quá trình chuyển hóa ammonium của vi khuẩn. Nghiên cứu của Jia và đồng tác giả (2019) gợi ý rằng, các hợp chất cacboxylate như acetate có cấu trúc hóa học đơn giản và trọng lượng phân tử thấp hơn so với các hợp chất cacbohydrate như glucose. Các hợp chất cacboxylate này dễ dàng được vi khuẩn HNAD hấp thụ và sử dụng thông qua chu trình axit tricarboxylic. Do đó, khi acetate được bổ sung trong môi trường đã kích thích tốt hơn khả năng chuyển hóa ammonium của 5 chủng vi khuẩn TT2, TT3, TT6, TT8, TT9 thử nghiệm. Hiệu suất xử lý ammonium của các chủng đạt giá trị cao lần lượt là là 98,4; 96; 95; 97,5 và 97,7% trong môi trường bổ sung acetate. Kết quả này khá tương đồng với các nghiên cứu trước đó của nghiên cứu của Duan và đồng tác giả (2015) cũng cho thấy sodium acetate là nguồn carbon tối ưu cho chủng vi khuẩn *V. diabolicus* SF16 khi thực hiện quá trình xử lý nitrogen trong điều kiện hiếu khí. Kết quả này còn thể hiện, mật độ vi khuẩn không tỷ lệ thuận với hoạt tính chuyển hóa nitrogen của chúng. Vì vậy, dựa trên kết quả thu được, acetate được lựa chọn là nguồn carbon phù hợp cho quá trình sinh trưởng và chuyển hóa nitrogen của 5 chủng vi khuẩn tuyển chọn.

Bảng 3. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến khả năng sinh trưởng của nhóm vi khuẩn nitrate hóa

Nguồn carbon	Sinh trưởng (OD_{600} nm)				
	TT2	TT3	TT6	TT8	TT9
$CaCO_3$	$0,17^{a} \pm 0,7$	$0,19^{a} \pm 0,2$	$0,09^{a} \pm 0,3$	$0,1^{a} \pm 0,2$	$0,13^{a} \pm 0,1$
Sucrose	$0,89^{b} \pm 0,6$	$0,91^{b} \pm 0,4$	$0,94^{b} \pm 0,3$	$0,65^{b} \pm 0,4$	$0,86^{b} \pm 0,3$
Glucose	$1,28^{b} \pm 0,5$	$1,16^{b} \pm 0,3$	$1,37^{b} \pm 0,1$	$0,98^{b} \pm 0,3$	$1,32^{b} \pm 0,5$
Citrate	$0,91^{b} \pm 0,2$	$1,12^{b} \pm 0,1$	$1,18^{b} \pm 0,2$	$0,87^{b} \pm 0,3$	$1,05^{b} \pm 0,2$
Acetate	$0,95^{b} \pm 0,5$	$0,87^{b} \pm 0,8$	$1,08^{b} \pm 0,2$	$0,79^{b} \pm 0,1$	$0,97^{b} \pm 0,3$
Succinate	$0,91^{b} \pm 0,3$	$0,99^{b} \pm 0,4$	$0,75^{b} \pm 0,6$	$0,78^{b} \pm 0,3$	$0,94^{b} \pm 0,1$

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu trong thí nghiệm, xác định thông qua kiểm định Duncan ($p < 0,05$).

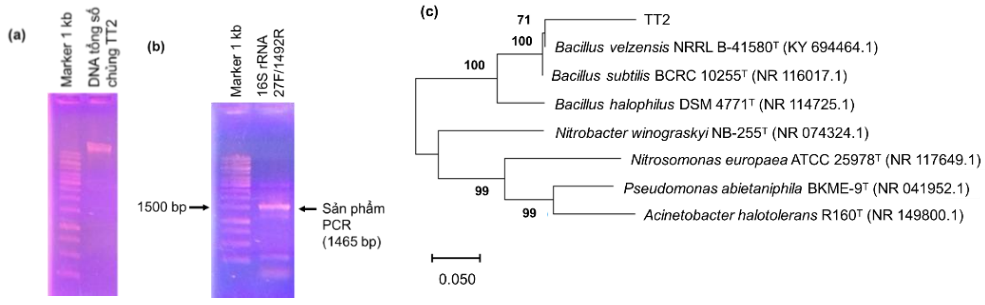
Bảng 4. Khả năng xử lý ammonium của các chủng vi khuẩn lựa chọn.

Nguồn carbon	Hiệu suất chuyển hóa ammonium (%)				
	TT2	TT3	TT6	TT8	TT9
$CaCO_3$	$17^{a} \pm 0,3$	$32,4^{a} \pm 0,4$	$29,5^{a} \pm 0,5$	$26^{a} \pm 0,2$	$27,5^{a} \pm 0,4$
Sucrose	$45^{b} \pm 0,2$	$61,8^{b} \pm 0,8$	$72^{b} \pm 0,3$	$69,5^{b} \pm 0,5$	$59,5^{b} \pm 0,2$
Glucose	$87^{c} \pm 0,5$	$75,3^{c} \pm 0,1$	$75,5^{b} \pm 0,8$	$81,3^{c} \pm 0,6$	$68,9^{c} \pm 0,4$
Citrate	$58^{d} \pm 0,8$	$65^{b} \pm 0,2$	$70^{b} \pm 0,1$	$80,8^{c} \pm 0,7$	$54,3^{b} \pm 0,7$
Acetate	$98,4^{e} \pm 0,5$	$96^{d} \pm 0,8$	$95^{c} \pm 0,5$	$97,5^{d} \pm 0,5$	$97,7^{d} \pm 0,6$
Succinate	$70^{f} \pm 0,2$	$62,9^{b} \pm 0,5$	$67,8^{b} \pm 0,6$	$83,6^{c} \pm 0,9$	$71,5^{c} \pm 0,8$

Ghi chú: Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu trong thí nghiệm, xác định thông qua kiểm định Duncan ($p < 0,05$).

Xác định vị trí phân loại của vi khuẩn

Dựa trên các kết quả nghiên cứu trên, 5 chủng vi khuẩn phân lập đều có hoạt tính chuyển hóa nitrogen tốt, đặc biệt là thể hiện hoạt tính chuyển hóa ammonium và nitrite, đồng thời các chủng TT2, TT6 và TT8 có thể có khả năng khử nitrate/nitrit trong môi trường nuôi cấy. Chủng TT2 được sử dụng để đánh giá vị trí phân loại trước tiên. Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA cho thấy TT2 có độ tương đồng đến 94% với chủng *Bacillus velezensis* C1, *Bacillus amyloliquefaciens*, nên TT2 được định danh là *Bacillus* sp. TT2 với mã số đăng ký trên ngân hàng gen là PP961884 (Hình 4).



Hình 4. Ảnh điện di DNA tổng số (a) và nhân đoạn gen 16S rRNA (b); cây phát sinh chủng loại dựa trên trình tự 16S rRNA của chủng TT2 (c)

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã sàng lọc được 5 chủng vi khuẩn nitrate hóa dị dưỡng có khả năng xử lý đồng thời các hợp chất nitrogen vô cơ ammonium, nitrite đạt hiệu suất trên 95%. Các chủng vi khuẩn này có khả năng tạo màng sinh học tốt và chuyển hóa nitrogen tối ưu khi sinh trưởng trong môi trường chứa nguồn carbon acetate, nồng độ NaCl 0-4%. Chủng vi khuẩn ký hiệu TT2 đã được định danh là *Bacillus* sp. TT2 thông qua so sánh độ tương đồng của trình tự gen 16S rRNA trên Genbank. Đây là phát hiện mới về nhóm vi khuẩn dị dưỡng có khả năng chuyển hóa đồng thời hợp chất ammonium và nitrite phân lập tại Việt Nam.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu này được hỗ trợ bởi đề tài "Nghiên cứu phát triển chế phẩm vi sinh tích hợp trên vật liệu nổi nhằm tăng hiệu quả xử lý ô nhiễm nitơ trong nuôi thâm canh tôm nước lợ" thuộc Đề án Phát triển công nghiệp sinh học ngành nông nghiệp đến năm 2030, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Duan J, Fang H, Su B, Chen J, and Lin J (2015). Characterization of a halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium and its application on treatment of saline wastewater. *Bioresour Technol,* 179: 421–428.

Fu W, Song G, Wang Y, Wang Q, Duan P, Liu C, Zhang X and Rao Z (2022). Advances in research into and applications of heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying microorganisms. *Front Environ Sci*, 10: 887093.

Hoilijoki TH, Kettunen RH, and Rintala JA (2000). Nitrification of anaerobically pretreated municipal landfill leachate at low temperature. *Water Research*, 34 (5): 1435-1446.

Jia Y, Zhou M, Chen Y, Luo J, and Hu Y (2019). Carbon selection for nitrogen degradation pathway by *Stenotrophomonas maltophilia*: Based on the balances of nitrogen, carbon and electron. *Bioresour Technol,* 294: 122114.

Morikawa M, Kagihiro S, Haruki M, Takano K, Branda S, Kolter R, Kanaya S (2006). Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces gamma-polyglutamate. *Microbiol,* 152: 2801.

Ren YX, Yang L, and Liang X (2014). The characteristics of a novel heterotrophic nitrifying and aerobic denitrifying bacterium, *Acinetobacter junii* YB. *Bioresour Technol,* 171: 1–9.

Robertson LA and Kuenen JG (1990). Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 57: 139-152.

Xia L, Li X, Fan W, Wang J (2020). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by a novel *Acinetobacter* sp. ND7 isolated from municipal activated sludge. *Bioresour Technol,* 301: 122749.

HETEROTROPHIC NITRIFICATION AND AEROBIC DENITRIFICATION BY A NOVEL *Bacillus* sp. TT2 ISOLATED IN VIETNAM

Nguyen Thi Minh[1,2], Bui Huong Giang[1,2], Chu Nhat Huy[1,2], Hoang Minh[3], Hoang Phuong Ha[1,2*]

[1]*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

[2]*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

[3]*HUS High School for Gifted Students*

SUMMARY

Ammonium and nitrite are two inorganic nitrogen compounds that are harmful to aquatic animals. Conventional nitrogen pollution treatment methods require a combination of aerobic autotrophic nitrifying bacteria and anaerobic heterotrophic denitrifying bacteria. However, autotrophic bacteria have slow growth rates and different oxygen requirements compared to heterotrophic bacteria, making it difficult to apply them in the same treatment system. Meanwhile, heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacteria can grow quickly, simultaneously metabolize ammonium and nitrite and adapt well to many environmental conditions, which is an advantage for applying them in treating nitrogen pollution in aquaculture system. Therefore, this study has screened five heterotrophic bacterial strains, named as TT2, TT3, TT6, TT8 and TT9 that can treat ammonium and nitrite with an efficiency of over 95%. These bacterial strains able to form bacterial biofilm and has highest nitrogen removal efficiency when grown in an environment containing carbon source acetate, NaCl concentration of 0-4%. Through comparing the similarity of the 16S rRNA gene, strain TT2 was identified as *Bacillus* sp. TT2, representing a new discovery of the heterotrophic nitrification and aerobic denitrification bacteria isolated in Vietnam.

Keywords: Ammonium, aquaculture, heterotrophic nitrification aerobic denitrification bacteria, nitrite, nitrogen pollution.

[*] Author for correspondence: Tel: +84-988754668; Email: hahoangp@gmail.com

ĐÁNH GIÁ MỘT SỐ ĐẶC TÍNH SINH HỌC CỦA CHỦNG *Bacillus sp.* P4 SINH TRƯỞNG TRONG MÔI TRƯỜNG CHỨA TẢO

Bùi Hương Giang[1,2], Nguyễn Thị Minh[1,2], Ngô Thị Hoài Thu[1,2], Chu Nhật Huy[1,2], Lê Thị Ánh Tuyết[1], Hoàng Phương Hà[1,2*]

[1]Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

[2]Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Vi khuẩn probiotics đang được ứng dụng rộng rãi trong nuôi thủy sản bởi chúng có khả năng sinh enzyme hỗ trợ tiêu hóa và ức chế vi khuẩn gây bệnh cho vật nuôi. Việc sản xuất sinh khối probiotics thường phụ thuộc vào các thành phần đắt tiền như cao thịt, cao nấm men, pepton… do đó làm tăng giá thành sản phẩm thu được. Bột tảo khô là nguồn dinh dưỡng giàu protein, polysaccharide, chất xơ và đặc biệt có chứa hàm lượng cao các axit béo không no đa nối đôi (PUFAs) có rất nhiều tác dụng và vai trò khác nhau. Trong nghiên cứu này, các loại tảo khô *Nannochloropsis, Isochrysis galbana* và *Spirulina platensis* đã được sử dụng làm nguồn dinh dưỡng duy nhất trong môi trường sinh trưởng của chủng lợi khuẩn P4 để đánh giá khả năng sinh enzyme tiêu hóa và kháng lại vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus.* Kết quả cho thấy, chủng P4 đạt mật độ tế bào (23,8 ± 2,33) x 10^7 CFU/mL ở môi trường chứa 1% tảo *S. platensis,* cao gấp 4 lần với trong môi trường MPA sau 48 giờ lên men. Thí nghiệm cũng chỉ ra khi bổ sung amoni, nitrat hay urê vào môi trường chứa tảo là không phù hợp để cải thiện hoạt tính probiotic của chủng, nhưng với môi trường nuôi chứa *S. platensis* (1%) bổ sung thêm mật rỉ đường (1%) không chỉ giữ được hoạt tính sinh enzyme amylase, protease, cellulase của chủng P4 với kích thước vòng phân giải cơ chất lần lượt là 11, 27, 20 mm mà còn làm tăng khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh với kích thước vòng kháng khuẩn lên đến 22 mm. Chủng P4 được định danh là *Bacillus* sp. P4 khi so sánh độ tương đồng của gen 16S rRNA. Như vậy mật rỉ đường kết hợp với sinh khối tảo khô *S. platensis* có thể là môi trường thích hợp cho sinh trưởng và sản xuất sinh khối chủng *Bacillus* sp. P4, nhằm tạo nên một sản phẩm lên men có hoạt tính probiotic tốt đồng thời vẫn chứa các thành phần PUFAs đã có trong tảo, rất quan trọng và cần thiết cho động vật thủy sản.

Từ khóa: Hoạt tính sinh enzyme tiêu hóa, mật rỉ đường, ức chế vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus, S. platensis*, vi khuẩn có lợi.

MỞ ĐẦU

Probiotic là các vi khuẩn có lợi bao gồm các vi khuẩn lactic, *Bacillus* hay nấm men...Chúng được đề xuất như một biện pháp bổ sung vào chế độ ăn giúp chống lại các bệnh liên quan đến rối loạn tiêu hóa đường ruột bởi khả năng sinh ra các enzyme và hợp chất kháng khuẩn tốt như axit lactic, hydrogen peroxide và bacteriocin (Szczerbiec *et al.*, 2022). Cho nên, nhu cầu sử dụng sinh khối của nhóm vi khuẩn có lợi này ngày càng tăng để có thể được dùng như các kháng sinh tự nhiên thay thế cho kháng sinh tổng hợp, giúp ngăn ngừa sự bùng phát của vi khuẩn gây bệnh trong nuôi thủy sản. Tuy nhiên, chất lượng và giá thành chế phẩm probiotic phụ thuộc rất nhiều vào chủng giống vi sinh vật, điều kiện nuôi và thành phần môi trường lên men. Việc lựa chọn cơ chất phù hợp cho môi trường lên men với giá thành giảm, nhưng lại kích thích sinh hoạt chất sinh học cũng như làm tăng mật độ của vi sinh vật có lợi trong quá trình sản xuất probiotic sẽ giúp nâng cao giá trị sản phẩm tạo thành.

Sinh khối khô các loài tảo bao gồm cả vi tảo và vi khuẩn lam là nguồn dinh dưỡng giàu protein, polysaccharide, axit béo không bão hòa đa nối đôi (PUFAs), carotenoid, vitamin và khoáng chất (Raheem *et al.,* 2018). Đặc biệt các ấu trùng cũng như giai đoạn trưởng thành của động vật thủy sản không thể tự tổng hợp được các PUFAs như Eicosapentaenoic (EPA), Arachidonic acid (AA) và Docosahexaemoic acid (DHA) nên chúng phải được bổ sung thông qua chuỗi thức ăn chứa vi tảo. Một số nghiên cứu cho thấy thành phần chất xơ (prebiotics) trong sinh khối tảo có tác dụng kích thích sinh trưởng của vi khuẩn có lợi (Gotteland *et al.,* 2020). Khi các vi khuẩn được sinh trưởng trong môi trường chứa sinh khối tảo đã làm tăng khả năng sống sót trong điều kiện cực trị như pH thấp, muối mật, phenol (Sylwia, Elżbieta., 2020). Việc bổ sung *Desmodesmus maximus*, *Chlorococcum* sp., và vi khuẩn lam *Spirulina platensis* cũng có thể làm tăng đáng kể mật độ của *Lactobacillus* và *Bifidobacterium.* Hiện nay các công nghệ nuôi tảo đã được phát triển nhiều, từ đó tạo ra lượng lớn sinh khối tảo với chi phí thấp. Ví dụ như tảo *Isochrysis galbana* và *Nannochloropsis oculata* có thể được nuôi trong các hệ thống nuôi kín dạng tấm với mật độ lên tới 200-500 triệu tb/mL và năng suất trung bình đạt 0,9 g/L/ngày (Phạm *et al.,* 2015).

Trong một vài nghiên cứu thăm dò về hoạt tính sinh học của các chủng vi khuẩn phân lập được, chủng P4 đã thể hiện được tính trội về một số đặc tính sinh học. Do đó trong nghiên cứu này, chủng P4 được sử dụng làm đối tượng nghiên cứu nhằm đánh giá khả năng sinh trưởng, hoạt tính sinh enzyme tiêu hóa và kháng khuẩn của nó khi được lên men trên nền sinh khối tảo. Đây là định hướng nghiên cứu mới, chi phí đầu tư thấp, ổn định và an

toàn. Mở ra khả năng sản xuất chế phẩm probitics trên quy mô lớn kết hợp hai trong một, vừa phát huy các hoạt tính sinh học của lợi khuẩn, vừa giữ được các PUFAs có trong tảo là thành phần rất cần thiết cho động vật thủy sản.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chủng vi khuẩn P4 được phân lập từ ruột tôm tại huyện Đông Hải, tỉnh Bạc Liêu, chủng vi khuẩn gây bệnh *Vibrio parahaemolyticus* được lưu giữ trong bộ chủng giống của phòng Công nghệ sinh học tái tạo môi trường. Sinh khối các loại tảo khô gồm: *Nannochloropsis, Isochrysis galbana, Spirulina platensis* sử dụng trong các thí nghiệm do phòng Công nghệ tảo, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

Môi trường MPA gồm các thành phần (g/L): NaCl (5), peptone (10), cao thịt (5); nước cất đủ 1 lít; pH 7-7,2. Đối với môi trường thạch bổ sung thêm 20 g/L agar (Trần *et al.,* 2018).

Môi trường chứa sinh khối tảo được chuẩn bị bằng cách bổ sung sinh khối khô vào dung dịch đệm PBS (Phosphate Buffered Saline) ở pH 7, sau đó được khử trùng ở 121^{o}C trong 20 phút.

Phương pháp nghiên cứu

Đặc điểm sinh học: Hình thái khuẩn lạc được xác định theo phương pháp vi sinh vật học cơ bản, hình thái tế bào được nhuộm Gram và soi trên kính hiển vi (Nguyễn *et al.,* 2003).

Đánh giá hoạt tính sinh enzyme tiêu hóa

Khả năng sinh một số loại enzyme tiêu hóa được xác định theo phương pháp của Phạm và đồng tác giả (2024):

Sinh khối chủng vi khuẩn P4 được tăng sinh trong môi trường MPA ở 30^{o}C. Sau 48 giờ nuôi lắc, ly tâm thu dịch.

Chuẩn bị các đĩa thạch chứa môi trường có bổ sung 1% từng loại cơ chất là tinh bột, casein và carboxymethyl cellulose (CMC) để kiểm tra khả năng sinh amylase, protease và cellulase tương ứng. Tiến hành đục lỗ thạch rồi nhỏ 100 μL mẫu vào các giếng, trong đó, đối chứng âm là dịch môi trường MPA không chứa vi khuẩn, giếng còn lại là dịch nuôi cấy của chủng khảo sát. Sau 24 giờ nuôi tĩnh ở 30^{o}C, vòng phân giải enzyme được nhận diện bằng thuốc thử lugol, quan sát và đo đường kính các vòng sáng màu trên nền thạch chứa cơ chất so với giếng đối chứng âm là môi trường MPA.

Khả năng đối kháng vi khuẩn gây bệnh *Vibrio parahaemolyticus*

Khả năng kháng khuẩn của vi khuẩn nghiên cứu được kiểm tra bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch theo Phạm và đồng tác giả (2024) với chủng vi khuẩn gây bệnh *Vibrio. parahaemolyticus*. Vi khuẩn gây bệnh đã chuẩn bị ở các nồng độ khác nhau và được trải đều trên đĩa thạch MPA. Tạo giếng thạch, nhỏ 100 μL dịch lên men chủng P4 (đã ly tâm loại bỏ tế bào) vào các giếng thạch. Ủ ở 30^{o}C trong 24 giờ, quan sát đường kính vòng ức chế sinh trưởng của vi khuẩn gây bệnh.

Khả năng sinh trưởng của vi khuẩn: Được kiểm tra theo phương pháp xác định mật độ vi khuẩn ở độ pha loãng tới hạn, sau đó được cấy trên môi trường MPA thạch để đếm khuẩn lạc.

Đánh giá khả năng sinh trưởng của chủng vi khuẩn P4 trên môi trường chứa sinh khối tảo

Sinh khối tảo khô *Nannochloropsis, Isochrysis galbana, Spirulina platensis* lần lượt được hòa trong đệm PBS với tỷ lệ 1% (w/v) để tạo ra các môi trường nuôi vi khuẩn khác nhau, môi trường MPA được sử dụng làm đối chứng dương. Bổ sung dịch sinh khối vi khuẩn P4 (mật độ tế bào 10^8 CFU/mL) vào các môi trường đã chuẩn bị với tỷ lệ 5% (v/v). Sau 48 giờ nuôi lắc ở 30^{o}C, kiểm tra lại mật độ vi khuẩn trên môi trường MPA, hoạt tính sinh enzyme và kháng *V. parahaemolyticus* của chủng P4 khi sinh trưởng trong môi trường chứa tảo, sau đó so sánh với môi trường MPA.

Nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn cacbon và nitơ bổ sung đến hoạt tính kháng khuẩn và sinh enzyme tiêu hóa của chủng P4

Ảnh hưởng của nguồn cacbon: Sử dụng lần lượt các nguồn cacbon khác nhau như glucose, tinh bột và mật rỉ đường với nồng độ 1% để bổ sung vào đệm PBS đã chứa 1% sinh khối tảo khô.

Ảnh hưởng của nguồn nitơ: Các nguồn nitơ $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$, hay urê với nồng độ 0,1% được bổ sung vào đệm PBS đã chứa 1% sinh khối tảo khô.

Bổ sung 5% (v/v) sinh khối vi khuẩn P4 (mật độ 10^8 CFU/mL) vào các môi trường đã chuẩn bị. Sau 48 giờ nuôi trong điều kiện hiếu khí ở 30^{o}C kiểm tra hoạt tính sinh enzyme và khả năng kháng khuẩn *V. parahaemolyticus* để lựa chọn nguồn cacbon và nitơ phù hợp.

Xác định vị trí phân loại của vi khuẩn

Mẫu vi khuẩn P4 được tách DNA tổng số và nhân bản đoạn gen 16S rRNA với cặp mồi 27F/1492R. Trình tự đoạn gen 16S rRNA được so sánh độ tương đồng với các trình tự gen được đăng ký trên ngân hàng Genbank để xác định vị trí phân loại của chủng vi khuẩn nghiên cứu.

Xử lý số liệu

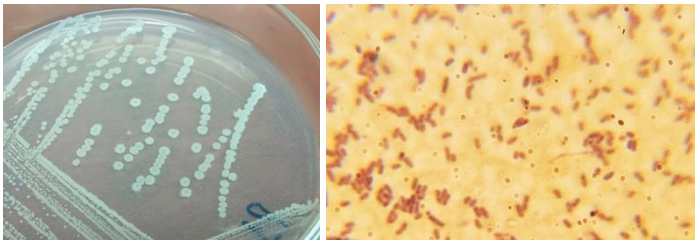
Các thí nghiệm được lặp lại ba lần. Số liệu được xử lý bằng Microsoft Office Excel 2022. Tất cả các số liệu trong thí nghiệm được trình bày dưới dạng: Trung bình ± Sai số chuẩn.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

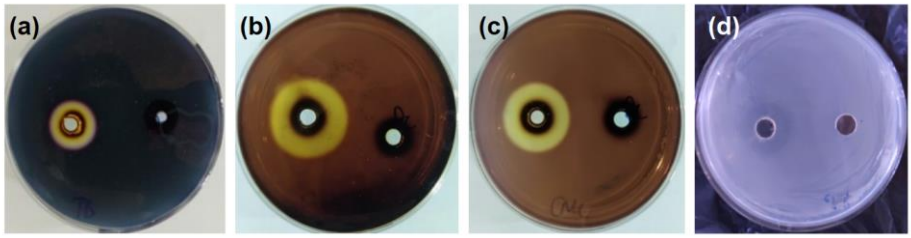
Đặc điểm hình thái, hoạt tính kháng khuẩn và sinh tổng hợp enzyme của chủng P4

Chủng vi khuẩn P4 được hoạt hóa để xác định đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào, nhuộm Gram. Sau đó, đánh giá khả năng sinh enzyme và kháng vi khuẩn gây bệnh. Kết quả chỉ ra ở Hình 1 cho thấy, chủng P4 thuộc vi khuẩn Gram dương, khuẩn lạc có hình tròn, màu trắng đục, kích thước 2-3 mm, tế bào hình que khi được chụp trên kính hiển vi.

Khi bổ sung dịch nuôi vi khuẩn P4 vào đĩa thạch chứa lần lượt các cơ chất như tinh bột, casein và CMC có thể quan sát được các vòng phân giải tạo thành (Hình 2 a-c), điều này chứng minh khả năng sinh enzym amylase, protease và cellulase của chủng. Bên cạnh đó, một số lợi khuẩn được biết đến có khả năng tiết các hợp chất sinh học như axit lactic, hydrogen peroxide và bacteriocin… có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh, nên chủng P4 cũng được tiến hành đánh giá khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* nhằm sử dụng chủng vi khuẩn này thay thế kháng sinh tổng hợp trong ức chế vi khuẩn gây bệnh, ứng dụng trong nuôi thủy sản. Kết quả đã cho thấy, chủng P4 có khả năng ức chế sự phát triển của *V. parahaemolyticus* với đường kính vòng kháng khuẩn là 9 mm (Hình 2d).



Hình 1. Hình thái khuẩn lạc chủng P4 (trái); ảnh nhuộm Gram tế bào chủng P4 (phải)



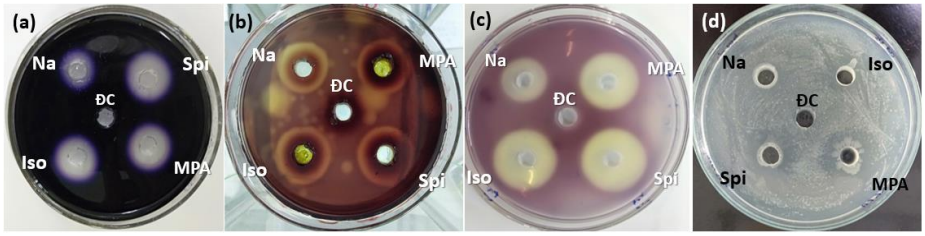
Hình 2. Vòng phân giải enzyme (a) Amylase; (b) Protease; (c) Cellulase; (d) vòng kháng *V. parahaemolyticus*

Khả năng sinh trưởng của chủng P4 trên các môi trường chứa sinh khối tảo

Nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu lựa chọn được nguồn tảo khô phù hợp giúp kích thích sinh trưởng của chủng vi khuẩn nghiên cứu nhằm thay thế cho môi trường MPA truyền thống. Chủng P4 được nuôi trong môi trường chứa riêng rẽ 1% (w/v) từng loại tảo *Nannochloropsis, Isochrysis galbana* hoặc *Spirulina platensis.* Sau 48 giờ nuôi cấy, vi khuẩn P4 đạt mật độ tế bào cao nhất trong môi trường chứa tảo *S. platensis* với giá trị (23,8 ± 2,33) x 10^7 CFU/mL, trong khi ở môi trường MPA chỉ đạt (5,2 ± 1,01) x10^7 CFU/mL, cao hơn trên 4 lần so với môi trường MPA (Bảng 1 và Hình 3).

Bảng 1. Đánh giá đặc tính sinh học của chủng *B. subtilis* P4 trong các môi trường chứa sinh khối tảo

Loại môi trường có bổ sung sinh khối tảo	Mật độ tế bào CFU/mL	Đường kính vòng hoạt tính D-d (mm)			
		Amylase	Protease	Cellulase	Kháng khuẩn
Nannochloropsis	(7,4 ± 0,32) x 10^6	5 ± 0,2	18 ± 0,5	16 ± 0,1	-
I. galbana	(10,1 ± 0,4) x 10^7	9 ± 0,3	20 ± 1,0	19 ± 0,12	7±0,44
S. platensis	(23,8 ± 2,33) x 10^7	10 ± 1,0	21 ± 1,0	18 ± 1,11	8±0,3
MPA	(5,2 ± 1,01) x 10^7	9 ± 0,8	20 ± 0,3	18 ± 0,2	9±0,5



Hình 3. Hoạt tính sinh tổng hợp enzyme và kháng khuẩn của *P4* trong môi trường nuôi cấy có bổ sung các loại sinh khối tảo khô khác nhau (a) Amylase; (b) Prote ase; (c) Cellulase; (d) Kháng *V. parahaemolyticus*

Bên cạnh giá trị mật độ tế bào, chủng P4 cũng có khả năng sinh các enzyme tiêu hóa tốt nhất trong môi trường chứa tảo *S. platensis* với kích thước vòng phân giải cơ chất tinh bột, casein và CMC lần lượt là 10, 21, 18 mm, kết quả này có cao hơn so với khi sinh trưởng trong môi trường MPA. Cùng với đó, kích thước vòng kháng vi khuẩn *V. paraharmolyticus* của chủng P4 trên các môi trường đều nằm trong khoảng 7-9 mm. Khi được nuôi cấy trong môi trường chứa tảo *Nannochloropsis,* chủng P4 không thể hiện được khả năng kháng khuẩn cùng với đó là hoạt tính sinh enzyme kém hơn các môi trường còn lại. Kết quả này chỉ ra rằng, việc sử dụng sinh khối tảo *S. platensis* thay thế cho môi trường MPA có thể duy trì được đặc tính probiotic của P4. Do vậy, sinh khối tảo *S. platensis* sẽ được lựa chọn thử nghiệm trong các nghiên cứu tiếp theo.

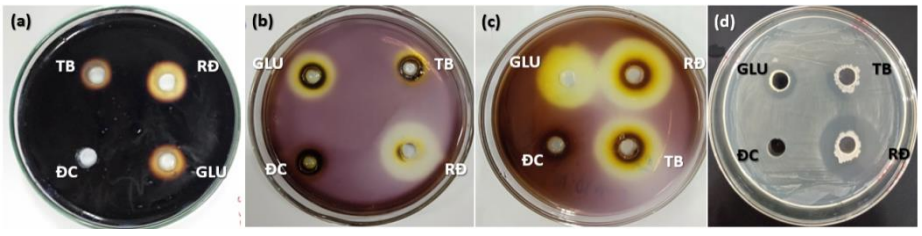
Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến hoạt tính sinh enzyme tiêu hóa và kháng khuẩn của chủng P4

Báo cáo của Anto và đồng tác giả (2006) công bố rằng, việc bổ sung lactose vào môi trường nuôi cấy sẽ kích thích khả năng tổng hợp α-amylase ngoại bào của chủng *Bacillus cereus* MTCC 1305, nên trong nghiên cứu này một số nguồn cacbon, nitơ cũng được bổ sung thêm vào môi trường nuôi chứa tảo nhằm tăng khả năng sinh enzyme tiêu hóa và ức chế vi khuẩn gây bệnh của chủng *B. subtilis* P4.

Ba nguồn cacbon thử nghiệm gồm glucose, tinh bột, mật rỉ đường được bổ sung riêng rẽ vào môi trường chứa sinh khối tảo *S. platensis* 1%. Kết quả chỉ ra ở Bảng 3, Hình 4 cho thấy, khi sử dụng nguồn cacbon là glucose và tinh bột đã làm giảm hoạt tính sinh enzyme amylase của vi khuẩn nghiên cứu. Trong khi đó, đường kính vòng kháng khuẩn của P4 đã tăng lên gấp 2 lần khi bổ sung 1% mật rỉ đường vào môi trường chứa sinh khối tảo *S. platensis* mà vẫn giữ được hoạt tính sinh enzyme tiêu hóa, thậm chí còn cao hơn so với khi nuôi cấy trong môi trường MPA. Mật rỉ đường là hỗn hợp của nhiều loại đường đơn và đường đa, vì vậy khi bổ sung nguồn cacbon này trong môi trường nuôi cấy, vi khuẩn có thể dễ dàng sử dụng các loại đường này trong nhiều quá trình chuyển hóa khác nhau. Đây có thể là nguyên nhân giúp tăng hoạt tính sinh học của vi khuẩn nghiên cứu khi so sánh với môi trường bổ sung glucose hay tinh bột. Trong nghiên cứu của Mawarda và đồng tác giả (2018) cũng cho thấy, vi khuẩn *Nocardia* sp. V1 có hoạt tính ức chế *Rhodotorula* sp. và *Fusarium graminearum* tăng lên trong môi trường chứa mật rỉ đường. Do đó mật rỉ đường được lựa chọn là nguồn cacbon phù hợp bổ sung trong môi trường chứa tảo *S. platensis* 1% để nhân nuôi lợi khuẩn P4.

Bảng 3. Đường kính vòng phân giải thể hiện hoạt tính probiotics chủng P4 sinh trưởng trong các nguồn cacbon

Đặc tính probiotics	*S. platensis*+ Glucose D-d (mm)	*S. platensis*+ tinh bột D-d (mm)	*S. platensis* + mật rỉ đường D-d (mm)
α-amylase	9 ± 1,2	7 ± 1,11	11 ± 0,58
Protease	16 ± 0,9	12 ± 1,2	27 ± 0,76
Cellulase	15 ± 1,0	14 ± 1,0	20 ± 0,3
Kháng khuẩn	5 ± 0,4	8 ± 1,53	22 ± 1,16



Hình 4. Ảnh hưởng của nguồn cacbon đến hoạt tính enzyme và kháng khuẩn của chủng P4 (a) Amylase; (b) Protease; (c) Cellulase; (d) Kháng *V. parahaemolyticus*

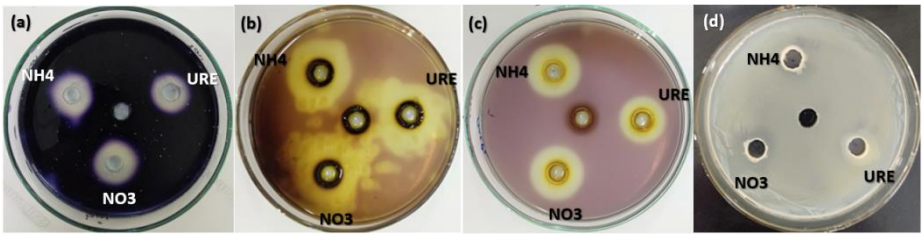
Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến hoạt tính sinh enzyme tiêu hóa và kháng khuẩn của chủng P4

Dựa trên các kết quả được trình bày trong Bảng 4 việc bổ sung 3 nguồn nitơ amoni, nitrat và urê vào môi trường chứa sinh khối tảo *S. platensis* không cải thiện đáng kể hoạt tính sinh enzyme của chủng P4, đường kính vòng

phân giải các cơ chất tinh bột, casein và CMC cũng không tăng so với môi trường chứa 1% rỉ mật đường. Hoạt tính ức chế vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* của chủng P4 chỉ thể hiện trong môi trường bổ sung nitrat với đường kính vòng kháng khuẩn chỉ đạt 12 mm. Như vậy có thể nhận định, việc bổ sung thêm nguồn nitơ không cải thiện được hoạt tính probiotics của chủng P4.

Bảng 4. Đường kính vòng phân giải thể hiện hoạt tính probiotics chủng P4 sinh trưởng trong các nguồn nitơ

Đặc tính probiotics	*S. platensis* + Amoni D-d (mm)	*S. platensis*+ Nitrat D-d (mm)	*S. platensis*+ Urê D-d (mm)
α-amylase	15 ± 1,8	15 ± 0,75	13 ± 0,25
Protease	25 ± 1,27	21 ± 0,29	21 ± 0,67
Cellulase	18 ± 0,79	20 ± 1,67	17 ± 1,28
Kháng khuẩn	-	12 ± 0,39	-



Hình 5. Ảnh hưởng của nguồn nitơ đến hoạt tính enzyme và kháng khuẩn của chủng P4 (a) Amylase; (b) Protease; (c) Cellulase; (d) Kháng *V. parahaemolyticus*

Xác định vị trí phân loại của vi khuẩn

Dựa trên các kết quả nghiên cứu trên, chủng vi khuẩn P4 phân lập có hoạt tính sinh học tốt khi sinh trưởng trong môi trường chứa 1% sinh khối tảo *Spirulina platensis* và 1% mật rỉ đường, Chủng P4 được sử dụng để đánh giá vị trí phân loại. Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA cho thấy P4 có độ tương đồng đến 98 % với chủng *Bacillus subtilis*, nên P4 được đặt tên là *Bacillus* sp. P4 với mã số đăng ký trên ngân hàng gen là PQ057067 (không thể hiện bằng hình ảnh).

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu này được tài trợ bởi đề tài cơ sở chọn lọc: "Nghiên cứu cải tiến để phát triển lợi khuẩn trong môi trường tảo giầu axit béo không bão hòa đa nối đôi (PUFAs) chứa ω-3, ω-6 nhằm định hướng làm thức ăn bổ sung cho tôm thẻ chân trắng", mã số: CSCL08.02/24-25 do TS. Hoàng Phương Hà làm chủ nhiệm.*

KẾT LUẬN

Chủng vi khuẩn P4 có khả năng sinh trưởng tốt nhất trong môi trường chứa 1% sinh khối tảo *Spirulina platensis so* với các loại tảo khác *Nannochloropsis, Isochrysis galbana* đạt mật độ tế bào đạt (23,8 ± 2,33) x 10^7 CFU/mL, cao gấp 4 lần khi sinh trưởng trong môi trường MPA. Bổ sung nguồn cacbon là mật rỉ đường 1% trong môi trường chứa tảo *S. platensis* 1% giúp chủng *B. subtilis* P4 tăng khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh *V. parahaemolyticus* mà vẫn giữ được hoạt tính sinh enzym tiêu hóa tốt. Thành phần nitơ như amoni, nitrat hay urê không có tác dụng kích thích khả năng sinh enzyme tiêu hóa và kháng khuẩn. Chủng vi khuẩn ký hiệu P4 đã được định danh là *Bacillus* sp. P4 thông qua so sánh độ tương đồng của trình tự gen 16S rRNA trên Gen Bank. Vì vậy môi trường chứa *S. platensis* (1%) + mật rỉ đường (1%) được lựa chọn là môi trường phù hợp để nuôi cấy chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. P4 thay cho môi trường truyền thống MPA, định hướng ứng dụng trong sản xuất probiotics ở qui mô công nghiệp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Anto H, Trivedi U and Patel K (2006). Alpha amylase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid-state fermentation. *Food Technol Biotechnol*, 44(2): 241- 245.

Colantoni E, Palone F, Cesi V, Leter B, Sugoni G, Laudadio I, Stronati L (2022). Innovative method to grow the probiotic *Lactobacillus reuteri* in the omega3-rich microalga *Isochrysis galbana*. *Scientific Reports*, 12(1): 3127.

Gotteland M, Riveros K, Gasaly N, et al (2020). The Pros and Cons of using algal polysaccharides as prebiotics. *Front Nutr*, 7:163.

Mawarda P C, Endah E S, Ratnaningrum D, Budiwati T A, Andayani D G S, Pudjiraharti S (2018). Antimicrobial activity of extracellular liquid obtained from molasses fermentation by *Nocardia* sp strain V1. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* , 160: 012011.

Nguyễn L D, Nguyễn Đ Q - Phạm V T (2003), *Giáo trình Vi sinh vật học*, NXB Giáo dục Việt Nam.

Phạm Đ T, Thu NTH, Hồng ĐD (2015). Nuôi trồng vi tảo biển *Nannochloropsis oculate* trong hệ thống nuôi kín dạng ống. *Tạp chí Công nghệ Sinh học,* 13(2A): 545–549.

Phạm T M H, Nguyễn T T H, Lê N U (2024). Đánh giá tiềm năng probiotic của vi khuẩn phân lập từ hệ tiêu hóa của hàu thái

bình dương *crassotrea gigas* nuôi tại Ninh Hòa, Khánh Hòa, Việt Nam. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*, Số 2/2024: 22-30.

Raheem A, Prinsen P, Vuppaladadiyam AK (2018). A review on sustainable microalgae based biofuel and bioenergy production: Recent developments. *J Clean Prod*, 181:42–59.

Sylwia Ś, Elżbieta K (2020). Algae *Chlorella vulgaris* as a factor conditioning the survival of *Lactobacillus* spp. in adverse environmental conditions. *LWT*, 133:109936.

Szczerbiec D, Piechocka J, Głowacki R, Torzewska A (2022). Organic acids secreted by *Lactobacillus* spp. isolated from urine and their antimicrobial activity against uropathogenic Proteus mirabilis. *Molecules*, 27(17): 5557.

Trần V C, Bùi V H, Lê T B L, Nguyễn X H, Phạm Q H, Biền V M (2018). *Giáo trình Vi sinh vật học môi trường*. NXB Bách Khoa – Hà Nội.

EVALUATION OF BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE *Bacillus* sp. P4 BACTERIAL STRAIN IN THE ALGAE-CONTAINING MEDIUM

Bui Huong Giang[1,2], Nguyen Thi Minh[1,2], Ngo Thi Hoai Thu[1,2], Chu Nhat Huy[1,2], Le Thi Anh Tuyet[1], Hoang Phuong Ha[1,2*]

[1]*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

[2]*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

Probiotic bacteria are commonly used in aquaculture for their ability to produce enzymes that aid in digestion and inhibit disease-causing bacteria in animals. The production of probiotic biomass often relies on costly ingredients like meat extract, yeast extract, and peptones, increasing the overall cost. Dried algae powder is a rich source of protein, polysaccharides, and prebiotics, and it particularly contains high levels of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), which have various beneficial effects. In a recent study, dried algae *Nannochloropsis*, *Isochrysis galbana*, and *Spirulina platensis* were used as the sole source of nutrients in the growth medium of probiotic strain P4 to assess its ability to produce digestive enzymes and inhibit against *V. parahaemolyticus* disease. The results indicated that strain P4 achieved a cell density of $(23.8 \pm 2.33) \times 10^7$ CFU/mL in the medium containing 1% *S. platensis* algae, which was four times higher than in the MPA medium after 48 hours of fermentation. Additionally, the experiment revealed that adding ammonium, nitrate, or urea to the medium with algae did not improve the probiotic activity of the strain. However, a culture medium containing *S.platensis* (1%) and molasses (1%) not only maintained the amylase, protease, and cellulase enzyme activity of strain P4 with substrate-hydrolysis ring sizes of 11, 27, 20 mm, respectively, but also increased the ability to inhibit pathogenic *Vibrio* bacteria with large sizes of antibacterial ring up to 22 mm. The strain P4 was identified as *Bacillus* sp. P4 when comparing the similarity of the 16S rRNA gene. Therefore, a combination of molasses and dried algal biomass *S.platensis* can provide a suitable environment for the growth and production of *Bacillus* sp. P4 strain bacterial biomass, resulting in a fermented product with good probiotic activity while retaining essential PUFAs components in algae, which are crucial for aquatic animals.

Keywords: Extracellular enzymes, molasses, *Vibrio parahaemolyticus* inhibition, *S. platensis*, probiotic.

* Author for correspondence: Tel: +84-988754668; Email: hahoangp@gmail.com

CẢM ỨNG TẠO TẠO DÒNG LAN GIẢ HẠC (*Dendrobium anosmum*) VÀ LONG TU (*Dendrobium primulinum*) ĐA BỘI BẰNG COLCHICINE

Huỳnh Hữu Đức*, Nguyễn Trường Giang, Nguyễn Thị Xuân Hiền, Nguyễn Thị Từ Vy, Nguyễn Hoàng Cẩm Tú

Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Lan giả hạc (*Dendrobium anosmum*) và lan long tu (*Dendrobium primulinum*) là một trong những loài phong lan bản địa Việt Nam, có giá trị kinh tế cao. Chúng được phân bố ở nhiều vùng khí hậu địa lý khác nhau nên có hình dạng và màu sắc hoa khác nhau. Nghiên cứu này nhằm mục tiêu tạo những cá thể mang đặc tính mới, đôi khi vượt trội so với cây lưỡng bội về mặt kiểu gen và biểu hiện kiểu hình như hình thái, sinh lý, sinh hóa để cung cấp thị trường và sử dụng trong lai tạo giống. Giống giả hạc và long tu đã được xác định chính xác loài và xử lý colchicine trong điều kiện *in vitro* để tạo dòng cây đa bội. Nồng độ colchicine ở 0,1% w/v và 0,5% w/v, thời gian xử lý 1 ngày thích hợp cho việc tạo cây đa bội ở cả giống lan giả hạc và long tu. Kết quả bước đầu đã sàng lọc được 8 dòng lan đa bội tiềm năng đối với lan giả hạc, 7 dòng đối với lan long tu có đặc điểm hình thái về thân, lá, chiều dài, chiều rộng và hình dạng khác với đối chứng về kích thước. Ngoài ra, kết quả phân tích hàm lượng DNA trong nhân đối với lan giả hạc và long tu cho thấy các dòng đa bội tiềm năng có giá trị tương ứng là 2,17-3,03 pg và 2,09-2,63 pg đều cao hơn rất nhiều so với đối chứng tương ứng là 1,98 pg và 2,63 pg. Các kết quả này cho thấy các dòng lan giả hạc và long tu đa bội tiềm năng có thể tồn tại ở dạng 3n và 4n. Những dòng lan đa bội tiềm năng này sẽ được tách riêng, nhân chồi đánh giá tính ổn định đa bội và khả năng sinh trưởng trong điều kiện *ex vitro* trong tương lai.

Từ khóa: Chất điều hòa sinh trưởng, colchicine, đa bội, lan giả hạc, nhân giống *in vitro*.

MỞ ĐẦU

Chi lan Hoàng thảo (*Dendrobium*) là loài cây ra hoa quanh năm, thích hợp cho vùng có khí hậu nhiệt đới, có giá trị kinh tế cao và rất được thị trường ưa chuộng. Hoa *Dendrobium* khá đa dạng và một số giống có mùi thơm nhẹ, có nhiều loại với nhiều màu sắc sặc sỡ như đỏ son, hồng phấn, tím, trắng hồng hay vàng nhạt. Trong đó Lan giả hạc (*Dendrobium anosmum*) và lan long tu (*Dendrobium primulinum*) là một trong những loài lan bản địa của Việt Nam đang được thị trường quan tâm bởi những đặc điểm hình thái, hoa của nó, đồng thời chúng có giá trị kinh tế cao. Đây là loại lan đang ngày càng phát triển và được nhiều người lựa chọn để trồng trang trí. Việc tạo ra những cá thể mang đặc tính mới về đặc điểm sinh trưởng, phát triển, đặc điểm hoa, hình thái và di truyền bằng các kỹ thuật khác nhau như lai tạo, gây đột biến bằng hóa học, sinh học, vật lý đã và đang được phát triển mạnh; trong đó, một số nghiên cứu đã sử dụng colchicine để tạo cây đa bội trên một số giống lan. Đồng thời kỹ thuật nhân giống hữu tính ở hoa Lan rất phức tạp vì phụ thuộc rất lớn vào tính tương hợp di truyền của giống bố và mẹ, tốn nhiều thời gian và công sức trong việc lai tạo, sàng lọc và đánh giá các tổ hợp lai. Do đó, việc nghiên cứu và phát triển một phương pháp lai tạo ra các giống hoa lan mới là thực sự cần thiết.

Kỹ thuật tạo cây đa bội là một trong những kỹ thuật mới đã và đang được ứng dụng trong việc lai tạo ra các giống cây trồng mới mang ưu điểm là có thể tạo ra những cá thể mang đặc tính mới, đôi khi vượt trội so với cây lưỡng bội về mặt kiểu gen và biểu hiện kiểu hình như hình thái, sinh lý, sinh hóa. Thể đa bội đề cập đến sự hiện diện của hơn hai bộ gen trên mỗi tế bào sinh dưỡng. Đa bội có bốn loại chính: autopolyploidy, allopolyploid, segmental allopolyploid và paleopolyploid, Trong tự nhiên, các sinh vật đa bội có thể tự hình thành bởi sự nhân đôi bộ nhiễm sắc thể của các tế bào soma hay do sự không phân ly các nhiễm sắc thể tương đồng làm phát sinh giao tử lưỡng bội (Ramsey và Schemske, 2002). Các thể đa bội cũng có thể được hình thành nhân tạo bằng cách xử lý các chất ức chế sự phân chia tế bào như colchicine. Sự hình thành và hiện diện của các thể đa bội trong các mô, cơ quan của một cơ thể sinh vật được ghi nhận một cách phổ biến. Kết quả phân tích di truyền tiến hóa cho thấy rằng tổ tiên của bất kỳ sinh vật nhân thực nào hiện nay đều đã trải qua quá trình đa bội hóa và tái đa bội hóa (Blanc *et al.*, 2003). Ngoài ra, đa bội hóa cũng là một trong những cơ chế tự nhiên được biết đến nhiều nhất và quan trọng nhất trong việc hình thành các loài mới (Otto và Whitton, 2000; Leitch và Leitch, 2008). Các kết quả nghiên cứu và phân tích cũng chứng minh rằng sự đa bội hóa của các loài thực vật đã làm tăng sự đa dạng biểu hiện gen từ đó tạo điều kiện thuận lợi cho hình thành các kiểu hình thái - tiến hóa của sinh vật một cách hợp lý và thích ứng tốt hơn so với dạng lưỡng bội ban đầu. Một số lợi thế của các thể đa bội ghi nhận được như tăng khả năng sinh trưởng, tăng dị hợp tử, tạo ra các tổ hợp gen mới, biến thể mới lạ trong tổ hợp giữa các allen từ đó tạo ra các chức năng mới hay chức năng phụ (Anssour *et al.*, 2009). Việc tạo cây đa bội trên cây lan Hồ điệp, lan Vũ nữ, lan *Dendrobium* đã được thực hiện thành công ở một số nước như Nhật Bản, Hàn Quốc, Đài

Loan, Thái Lan và góp phần tạo ra nhiều giống lan mới có giá trị cao. Grosso và đồng tác giả (2018), nghiên cứu và tạo đa bội thành công trên cây lan lai *Dendrobium phalaenopsis* × *Dendrobium loddigesii* bằng colchicine và AMP (amiprophos-methyl) với nồng độ và thời gian xử lý khác nhau trên mẫu PLBs và đã tạo cây hoàn chỉnh từ các PLBs này với tỷ lệ 80% của các thể đa bội. Yenchon và Te-chato (2012), đã cảm ứng tạo đa bội từ PLBs của lan *Dendrobium formosum* bằng colchicine ở nồng độ 0,2% trong 48 giờ cho tỷ lệ tạo cây tứ bội cao nhất với các đặc điểm hình thái và sinh lý của cây tứ bội rõ ràng khác với cây lưỡng bội như lá dày, xanh đậm và kích thước thân lớn. Kích thước lỗ khí, cả chiều dài và chiều rộng của cây tứ bội lớn hơn đáng kể so với cây lưỡng bội, trong khi mật độ của chúng thấp hơn. Vichiato và đồng tác giả (2014), tạo đa bội thành công trên lan *Dendrobium nobile*. Kết quả đánh giá cây đa bội và cây lưỡng bội về các đặc điểm hình thái của hoa, lá và giả hành cho thấy sự tăng số lượng các đốt (19,9%) và các bộ phận của hoa như chiều cao, phát hoa lớn hơn (4,5%) và chiều rộng của môi (18,5%); tuy nhiên, giảm số lượng hoa trên mỗi giả hành (40,9%) và đường kính của giả hành (64,9%) và chậm ra hoa. Choopeng và đồng tác giả (2019), sử dụng colchicine với nồng độ khác nhau xử lý trong thời gian 24, 48 và 72 giờ trên lan *Dendrobium santana x Dendrobium friedericksianum*. Các mẫu sau khi xử lý bằng colchicine được tái sinh và xác định hàm lượng DNA bằng FCM (flow cytometry – kỹ thuật dòng chảy tế bào) cho thấy hàm lượng DNA trong nhân tăng từ 33 đến 50%. Các đặc tính sinh lý, và hình thái cho thấy kích thước lớn hơn của các tế bào bảo vệ nhưng mật độ thấp hơn so với cây ban đầu. Atichart (2013), xử lý tạo cây đa bội trên lan *Dendrobium chrysotoxum* bằng colchince với nồng độ 0,04% trong 1 ngày hiệu quả nhất với 84% PLBs còn sống và tạo được 47% hoa lan tứ bội, được xác định hàm lượng DNA nhân bằng kỹ thuật dòng chảy tế bào. Trong khi đó, ở Việt Nam việc tạo các giống lan mới thông qua kỹ thuật đa bội hóa còn hạn chế và chỉ dừng lại ở mức độ nghiên cứu bước đầu.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi xử lý mẫu PLBs của lan giả hạc (*Dendrobium anosmum*) và lan long tu (*Dendrobium primulinum*) bằng colchicine với các nồng độ và thời gian xử lý khác nhau để sàng lọc, đánh giá thể đa bội, từ đó tạo ra dòng lan đa bội có đặc điểm nổi bật để cung cấp ra thị trường và sử dụng trong lai tạo giống.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Cụm PLBs *in vitro* lan giả hạc (*Dendrobium anosmum*) và lan long tu (*Dendrobium primulinum*) có kích thước 0,5 cm (đường kính).

Phương pháp nghiên cứu

Cảm ứng tạo thể đa bội lan Giả hạc và Long tu bằng chất cảm ứng colchicine với nồng độ và thời gian xử lý khác nhau.

PLBs của lan Giả hạc và Long tu được xử lý colchicine với các nồng độ 0,02; 0,1; 0,5 % w/v và cấy trên môi trường MS 1/2, bổ sung 30 g/l sucrose, 0,5 g/l peptone, 0,1 g/l inositol, 0,02 g/l glycin, 7 g/l agar, pH = 5,7 có bổ sung colchicine với các nồng độ tương ứng và nuôi cấy trong thời gian 1; 3; 7 ngày. Sau đó cấy chuyền sang môi trường trên nhưng không bổ sung colchicine. Thí nghiệm được bố trí 9 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 6 đĩa petri, mỗi đĩa 6 mẫu. Theo dõi đặc điểm sinh trưởng và phát triển của mẫu sau khi xử lý colchicine. Điều kiện nuôi cấy: cường độ ánh sáng 20 ± 2 µmol/m^2s, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày với độ ẩm phòng nuôi 70-80% và nhiệt độ phòng nuôi 22 ± 2 °C.

Biệt hóa tạo chồi từ PLB lan giả hạc và long tu sau khi xử lý cảm ứng đa bội bằng colchicine.

Mẫu PLBs của lan giả hạc và long tu sau thời gian xử lý colchicine được chuyển sang môi trường MS 1/2, bổ sung 30 g/l sucrose, 0,5 g/l peptone, 0,1 g/l inositol, 0,02 g/l glycin, 1,0 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA, 7 g/l agar, pH = 5,7 để cảm ứng tạo chồi. Điều kiện nuôi cấy: Sử dụng đèn LED có tỷ lệ ánh sáng 70% đỏ - 30% xanh dương (24 ± 2 µmol/m^2s), thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi 25 ± 3 °C, độ ẩm phòng nuôi 70 – 80%. Thời gian nuôi cấy 18 tuần. Đánh giá đặc điểm hình thái của các chồi hình thành từ các PLBs đã được sử lý colchicine, sàng lọc các chồi có đặc điểm hình thái mới khác so với đối chứng thành từng dòng đa bội giả định và tiến hành nhân nhanh các dòng đa bội này. Mỗi chồi *in vitro* được sàng lọc và tách dòng này được ghi nhận như một dòng đa bội ban đầu. Ký hiệu DG1-x cho dòng lan Giả hạc đa bội ban đầu thứ x, DL1-y cho dòng lan Long tu đa bội ban đầu thứ y.

Sàng lọc, đánh giá các dòng đa bội giả hạc và long tu đa bội trong điều kiện in vitro.

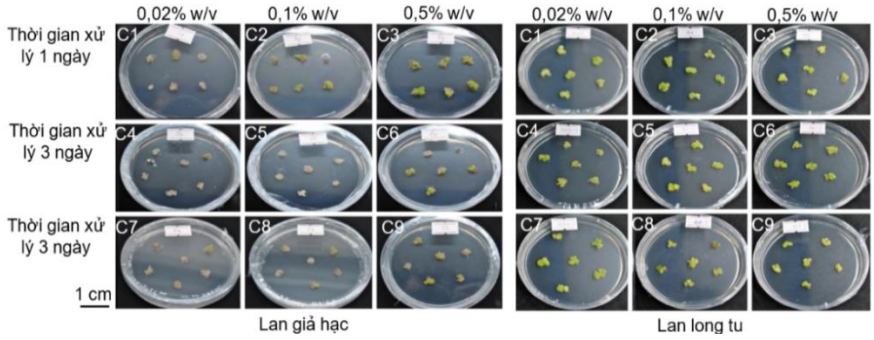
Các dòng lan giả hạc và long tu được sàng lập từ nội dung trên được tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường MS 1/2, bổ sung 30 g/l sucrose, 0,5 g/l peptone, 0,1 g/l inositol, 0,02 g/l glycin, 0,2 mg/l BA, 1 mg/l NAA, 7 g/l agar, pH = 5,7. Điều kiện nuôi cấy: Sử dụng đèn LED trắng (25 ± 2 µmol/m^2s), thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày, nhiệt độ phòng nuôi 25 ± 3 °C, độ ẩm phòng nuôi 70 – 80%. Thời gian nuôi cấy 8 tuần. Các dòng đa bội này được phân tích và xác định hàm lượng DNA trong nhân. Mẫu lá của các dòng được sàng lọc sử dụng để xác định hàm lượng DNA trong nhân bằng kỹ thuật dòng chảy tế bào (máy Flow cytometry, FCM). Cắt mẫu lá có kích thước 0,5 cm^2 và đặt trên đĩa petri, bổ sung 0,25 ml PBS 1X lên mẫu lá, dùng dao lam cắt nhuyễn. Hỗn hợp dung dịch chứa mẫu lá đã cắt nhuyễn được lọc qua CellTrics 30 µm và thu dịch vào tube 5 ml, bổ sung 5 µl PI nồng độ 1mg/ml, ủ

hỗn hợp ở nhiệt độ phòng trong thời gian 30 phút. Hỗn hợp được đo trên máy FCM (Flow cytometry) (FACSAria III) với các thông số PI (tốc độ bắn): 198, FSC (forward scatter – Ánh sáng của tia laser đi qua bên ngoài của tế bào): 140 – 200, SSC (side scatter – Ánh sáng của tia laser đi qua tâm của tế bào): 225.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Cảm ứng tạo thể đa bội lan giả hạc và long tu bằng colchicine với nồng độ và thời gian xử lý khác nhau.

Các PLBs của lan giả hạc và long tu được xử lý đa bội bằng colchicine với nồng độ và thời gian xử lý khác nhau cho kết quả như sau:



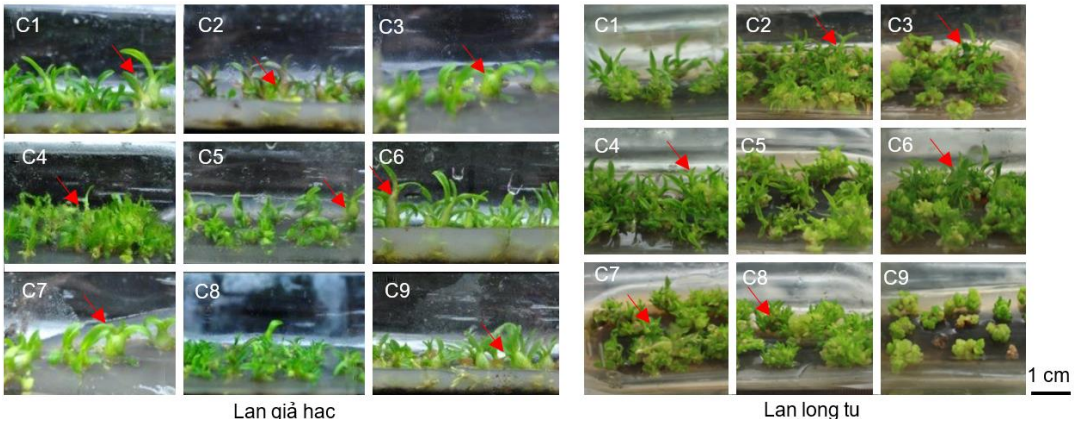
Hình 1. Ảnh hưởng của colchicine lên PLBs lan giả hạc, lan long tu với các nồng độ và thời gian xử lý

C1, C2, C3: Sau 1 ngày; C4, C5, C6: Sau 3 ngày; C7, C8, C9: Sau 7 ngày.

Đối với PLBs của lan giả hạc sau khi xử lý colchicine ở các nồng độ và thời gian xử lý khác nhau cho thấy mẫu PLBs có sự thay đổi so với mẫu ban đầu. Mẫu được xử lý ở nồng độ 0,02; 0,1; 0,5 % w/v với thời gian 1 ngày gồm các nghiệm thức C1, C2, C3; PLBs ở nghiệm thức C1 hóa nâu và chuyển từ màu xanh gần như sang hiện tượng thủy tinh thể; ở nghiệm thức C2 mẫu PLBs chuyển từ màu xanh sang vàng; nghiệm thức C3 mẫu vẫn xanh nhưng có hiện tượng hóa nâu ở vị trí tiếp xúc với môi trường. Nghiệm thức xử lý colchicine trong thời gian 3 ngày gồm C4, C5, C6; mẫu PLBs chuyển sang màu trắng đục, một số mẫu chết và chuyển màu đen ở nghiệm thức C6. Tương tự ở nghiệm thức C7, C8, C9 xử lý trong thời gian 7 ngày, mẫu PLBs cũng chuyển sang màu trắng đục, có trạng thái thủy tinh thể, một số mẫu chết. Ngược lại, đối với mẫu PLBs của long tu được xử lý với các nồng độ colchicine và thời gian xử lý trên thì sự thay đổi về hình thái PLBs không rõ rệt giữa các nghiệm thức cũng như so với mẫu ban đầu. Tuy nhiên, ở một số nghiệm thức vẫn có một số mẫu có hiện tượng thủy tinh thể, mẫu chuyển sang màu vàng và hóa nâu. Kết quả này cho thấy có sự tương tự một số kết quả trước đây về sự ảnh hưởng của colchicine đến mẫu cấy như mẫu chuyển sang màu nâu, màu trắng đục và mẫu khô chết (Yenchon và Te-chato, 2012; Vichiato *et al.*, 2014; Choopeng *et al.*, 2019).

Biệt hóa tạo chồi từ PLB lan giả hạc và long tu sau khi xử lý cảm ứng bằng chất cảm ứng đa bội colchicine.

Các mẫu PLBs sau khi xử lý colchicine ở các nồng độ và thời gian khác nhau sẽ được chuyển sang môi trường cảm ứng tạo chồi để sàng lọc các dạng chồi có khả năng đa bội và đặc điểm hình thái khác so với đối chứng.



Hình 2. Các cụm chồi lan giả hạc, long tu hình thành từ PLBs đã được xử lý colchicine ở các nồng độ và thời gian khác nhau sau 18 tuần nuôi cấy trên môi trường cảm ứng tạo chồi

C1, C2, C3: Sau 1 ngày; C4, C5, C6: Sau 3 ngày; C7, C8, C9: Sau 7 ngày.

Đối với PLBs đã được xử lý Colchicine của lan giả hạc: Sau 8 tuần nuôi cấy, nhiều mẫu PLB ở các nghiệm thức ghi nhận không có sự tăng trưởng, một số PLBs bị đen, một số có màu trắng đục và một số cụm PLB phát triển thành chồi ở các nghiệm thức C2, C3 và C7, chồi hình thành có đặc điểm hình thái khác với đối chứng là thân mập, lá dày. Ở tuần thứ 18, hầu hết các mẫu PLB ở các nghiệm thức đều sùi thành cụm PLB lớn. Các cụm chồi ở nghiệm thức C1 nhỏ có màu xanh non, cây cao 2-5 cm có lá màu xanh đậm. Các cụm chồi ở nghiệm thức C2 nhỏ, có ít cây cao 1-2 cm, vài cây có thân tím và lá viền tím. Nghiệm thức C3 chủ yếu là PLB, có ít cụm chồi, cây lùn cao 1-2 cm có thân phình to. Các cụm chồi ở nghiệm thức C4 lên nhiều, cây cao có thân ốm, một ít cây lùn có thân phình. Nghiệm thức C5 có cụm chồi nhỏ, cây lùn có thân phình to chỉ cao khoảng 1 cm và lá ngắn. Nhiều cụm chồi ở nghiệm thức C6 lên cây cao 2-3 cm có thân ốm và lá nhọn. Một số cây ở nghiệm thức C7 có thân phình to. Nghiệm thức C8 lên nhiều cụm cây và cụm chồi cao 2-4 cm. Nghiệm thức C9 có nhiều cụm chồi cao, cây lùn có thân phình to cao 1-3 cm, một vài cây có thân ốm cao 2-4 cm.

Đối với PLBs đã được xử lý Colchicine của lan long tu: Sau 4 tuần nuôi cấy nghiệm thức C1 cụm PLBs phát triển thành chồi, một vài mẫu tiết một ít phenol. Cụm PLBs ở nghiệm thức C2 chuyển sang vàng nguyên cụm. PLBs ở nghiệm thức C3 có nhiều mẫu tiết phenol, phát triển thành chồi nhỏ, màu xanh nhạt. Cụm PLBs ở nghiệm thức C4 PLB vàng xanh, bắt đầu tiết phenol. Cụm PLBs ở nghiệm thức C5 chồi hình thành, lá phát triển. Sau 6 tuần nuôi cấy, một số cụm chồi ở C1, C2, C3 có hiện tượng chết, cụm PLB ở C4 lớn dần và xanh, chồi C5 sùi cụm chồi mới, cụm chấm nhỏ xanh nhạt, lên lá dày xanh đậm; cụm PLB ở C6 vàng lớn dần, PLB xanh nảy cụm chồi lá. Sau 12 tuần, mẫu ở các nghiệm thức C1 và C4 đã phát triển lá chồi, phát triển thành cụm chồi và nhiều hơn so với các nghiệm thức còn lại. Các nghiệm thức C3, C5, C6 bắt đầu có hiện tượng hóa nâu ở phần mẫu tiếp xúc trực tiếp với môi trường và sau đó khô đen hết toàn bộ mẫu. Mẫu PLBs ở thí nghiệm C7 bị ức chế phát triển đang hình thành PLBs mới, màu vàng, lên thành cụm, phần mẫu tiếp xúc trực tiếp với môi trường cũng đang bị khô đen. Ở nghiệm thức C8 và C9 mẫu đang dần bị khô đen hoàn toàn và riêng ở nghiệm thức C9, từ những phần mẫu khô đen đang dần hình thành lại những PLBs xanh. Sau 18 tuần nuôi cấy, ở nghiệm thức C1 các cụm PLBs phát triển được cụm chồi lá nhỏ, cao 1 - 1,5 cm, 3 lá; nghiệm thức C2 và C3 các PLBs phát triển thành cụm chồi nhỏ; ở nghiệm thức C4 các PLBs và chồi nhỏ phát triển thành cụm chồi cao 1 – 1,5 cm; ở nghiệm thức C6 các mẫu PLBs hình thành cụm PLBs lớn, trong, các mẫu bị khô đen không có dấu hiệu tái sinh lại chồi mới như ở nghiệm thức C9.

Kết quả trên cho thấy ở tất cả các nghiệm thức xử lý với nồng độ colchicine và thời gian khác nhau đều cho thấy chồi hình thành có sự khác biệt so với đối chứng về mặt hình thái thân, hình thái lá, sinh trưởng và phát triển của chồi. Tuy nhiên, chồi có sự khác biệt so với đối chứng nhiều nhất ở nghiệm thức C2, C3, C7 đối với lan giả hạc và C1, C2, C3, C4 đối với lan long tu. Trên cả hai đối tượng đều cho thấy ở nghiệm thức C2, C3 cho khả năng tạo cây đa bội cao nhất so với các nghiệm thức còn lại. Kết quả này có khác biệt so với một số nghiên cứu trước đây như Yenchon và Te-chato (2012), đã cảm ứng tạo đa bội từ PLBs của lan *Dendrobium formosum* bằng colchicine ở nồng độ 0,2% trong 48 giờ cho tỷ lệ tạo cây tứ bội cao nhất với các đặc điểm hình thái và sinh lý của cây tứ bội rõ ràng khác với cây lưỡng bội như lá dày, xanh đậm và kích thước thân lớn. Kích thước lỗ khí, cả chiều dài và chiều rộng của cây tứ bội lớn hơn đáng kể so với cây lưỡng bội, trong khi mật độ của chúng thấp hơn. Atichart (2013), xử lý tạo cây đa bội trên lan *Dendrobium chrysotoxum* bằng colchince với nồng độ 0,04% trong 1 ngày hiệu quả nhất với 84% PLBs còn sống và tạo được 47% hoa lan tứ bội, được xác định hàm lượng DNA nhân bằng FCM .Như vậy nồng độ colchicine ở 0,1% w/v, 0,5% w/v, thời gian xử lý 1 ngày thích hợp cho việc tạo cây đa bội ở cả giống lan giả hạc và long tu.

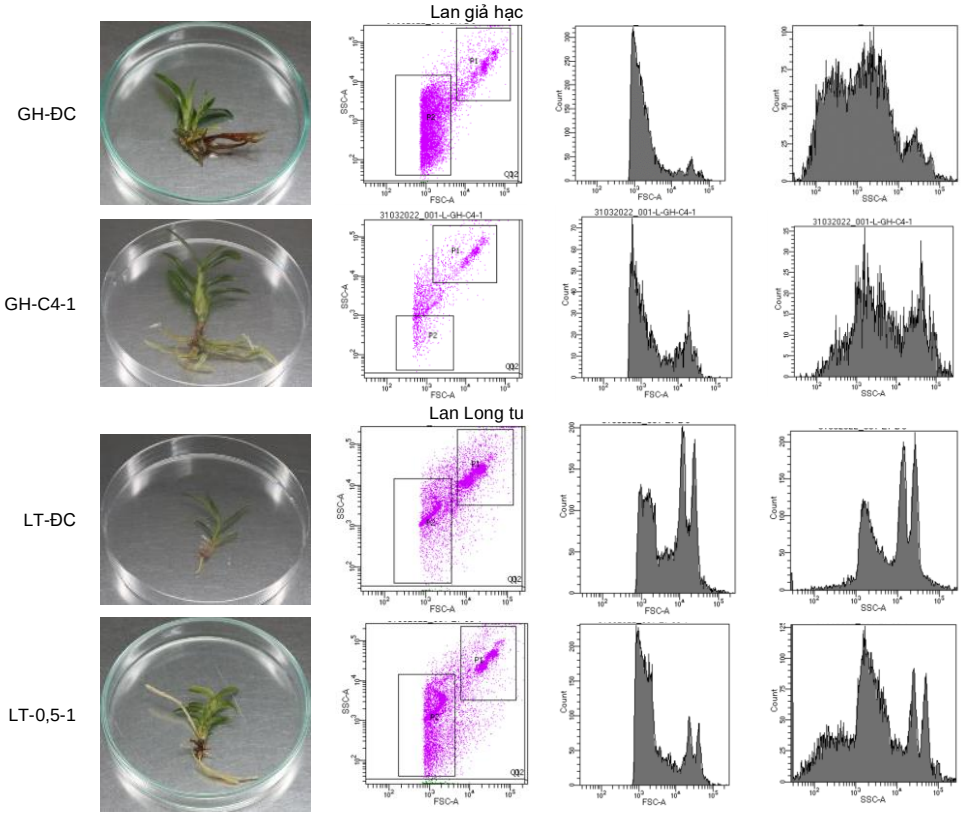
Sàng lọc, đánh giá các dòng đa bội giả hạc và long tu đa bội trong điều kiện in vitro

Chồi của lan long tu có đặc điểm hình thái khác so với đối chứng ở nội dung phát triển chồi từ PLBs đã xử lý colchicine được chọn lọc để tạo cây hoàn chỉnh trên môi trường tạo cây hoàn chỉnh. Các mẫu được tiếp tục theo dõi đặc điểm hình thái, sinh trưởng và phát triển, xác định hàm lượng DNA trong nhân. Các mẫu cây lan giả hạc và long tu *in vitro* đã được được phân tích và xác định hàm lượng DNA trong nhân cho thấy có hàm lượng DNA gấp đôi so với mẫu đối chứng

Bảng 1. Hàm lượng DNA trong nhân một số dòng lan giả hạc và long tu đa bội đã được sàng lọc

STT	Mẫu	Giá trị trung bình FSC-H (P2)	Hàm lượng DNA tương đối trên mỗi 1C (Megabase pasi DNA per 1C nucleus) (kp)	Hàm lượng DNA (pg)
Một số dòng lan giả hạc đa bội				
1	GH-ĐC	1,52	955,00	1,98
2	GH-C1-1	1,99	1.254,42	2,60
3	GH-C2-1	1,89	1.188,86	2,46
4	GH-C4-1	2,32	1.461,18	3,03
5	GH-C5-1	1,96	1.232,36	2,56
6	GH-C7-1	1,66	1.047,03	2,17
7	GH-C8-1	1,78	1.123,94	2,33
8	GH-C9-1	1,94	1.222,90	2,54

Một số dòng Long tu đa bội				
1	LT-ĐC	1,52	955,00	1,98
2	LT-0,1-1	1,68	1.058,38	2,19
3	LT-0,1-2	1,77	1.116,37	2,31
4	LT-0,1-3	1,60	1.009,21	2,09
5	LT-0,5-1	1,84	1.159,87	2,40
6	LT-0,5-2	2,01	1.269,55	2,63
7	LT-0,5-3	1,49	937,98	1,94



Hình 3. Một số dòng lan giả hạc và long tu đa bội

Nghiên cứu trên đã sàng lọc được nhiều dòng có đặc điểm hình thái về thân, lá, chiều dài, chiều rộng và hình dạng lá khác so với đối chứng về kích thước. Bước đầu chúng tôi tiến hành xác định hàm lượng DNA trong nhân trên 8 dòng đối với lan giả hạc, 7 dòng đối với lan long tu và cây đối chứng. Đối với các dòng lan giả hạc phân tích cho thấy có giá trị DNA trên 1C (Megabasse pasi DNA per 1 C nucleus) và hàm lượng DNA tương ứng là 1.047,03-1.461,18 và 2,17-3,03 pg đều cao hơn rất nhiều so với đối chứng tương ứng là 955 và 1,98 pg. Đối với lan long tu cho kết quả tương ứng là 1.009,21-1.269,55 và 2,09-2,63 pg. Kết qủa phân tích cho thấy peak ở các dòng đa bội có thể ở dạng 3n, 4n. Những kết quả ban đầu này cho thấy đã cảm ứng tạo được một số dòng lan giả hạc và long tu đa bội bằng colchicine. Từ kết quả này, các dòng lan giả hạc và long tu đa bội tiềm năng sẽ được tiến hành nhân chồi và đánh giá tính ổn định đa bội cũng như đánh giá khả năng sinh trưởng trong điều kiện vườn ươm (*ex vitro*).

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã chứng minh được khả năng cảm ứng tạo các dòng đa bội tiềm năng đối với lan giả hạc và lan long tu. Trong đó, nồng độ colchicine 0,1% w/v và 0,5% w/v; thời gian xử lý 1 ngày thích hợp cho việc cảm ứng tạo đa bội đối với mẫu PLBs của lan giả hạc và long tu. Kết quả bước đầu đã sàng lọc được 8 dòng lan giả hạc và 7 dòng lan long tu đa bội tiềm năng có thể ở dạng đa bội 3n và 4n, với hàm lượng DNA cao hơn so với các mẫu đối chứng. Kết quả này mở ra khả năng và các dòng đa bội lan giả hạc và long tu đa bội nói riêng và có thể ứng ụng trên nhiều loài lan giá trị khác nhằm mục tiêu chọn tạo giống mới.

Lời cảm ơn: *Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn Thành phố Hồ Chí Minh đã cấp kinh phí theo hợp đồng số 52/2021/HĐ-SNN ngày ngày 31 tháng 12 năm 2021 giữa Sở Nông nghiệp và Phát triển nông thôn và Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh về thực hiện nhiệm vụ khoa học và công nghệ cấp cơ sở "Nghiên cứu chọn tạo dòng lan đa bội từ một số giống lan rừng Giả hạc và Long tu Việt Nam" trợ kinh phí; Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ trang thiết bị và cơ sở vật chất để thực hiện nghiên cứu này.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Anssour S, Krügel T, Sharbel T, Saluz H, Bonaventure G, Baldwin I (2009). Phenotypic, genetic and genomic consequences of natural and synthetic polyploidization of *Nicotiana attenuata* and *Nicotiana obtusifolia*. *Annals of Botany*, 103: 1207-1217.

Atichart P (2013). Polyploid induction by colchicine treatments and plant regeneration of *Dendrobium chrysotoxum*. *Thai. J. Agric. Sci*, 46: 59-63.

Blanc J, Thouless C, Hart J, Dublin H, Douglas-Hamilton I, Craig C, Barnes R (2003). African elephant status report 2002. *Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission*, 29.

Choopeng S, Te-chato S, Khawnium T (2019). Effect of colchicine on survival rate and ploidy level of hydrid between *Dendrobium santana* x D. friedericksianum orchid. *International Journal of Agricultural Technology*, 15: 249-260.

Grosso V, Farina A, Giorgi D, Nardi L, Diretto G, Lucretti S (2018). A high-throughput flow cytometry system for early screening of *in vitro* made polyploids in *Dendrobium* hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 132: 57-70.

Leitch A, Leitch I (2008). Genomic plasticity and the diversity of polyploid plants. *Science*, 320: 481-483.

Otto SP, Whitton J (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annual review of genetics*, 34: 401-437.

Ramsey J, Schemske DW (2002). Neopolyploidy in flowering plants. *Annual review of ecology and systematics*, 33: 589-639.

Vichiato MRdM, Vichiato M, Pasqual M, Rodrigues FA, Castro DMd (2014). Morphological effects of induced polyploidy in *Dendrobium nobile* Lindl.(Orchidaceae). *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 14: 154-159.

Yenchon S, Te-chato S, 2012. Polyploidy induction of *Dendrobium formosum* by colchicine treatment *in vitro*. International Symposium on Orchids and Ornamental Plants 1025, pp. 81-88.

POLYPLOIDING INDUCTION OF *Dendrobium anosmum* AND *Dendrobium primulinum* BY COLCHICINE

Huynh Huu Duc[*], Nguyen Truong Giang, Nguyen Thi Xuan Hien, Nguyen Thi Tu Vy, Nguyen Hoang Cam Tu

Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

SUMMARY

Dendrobium anosmum and *Dendrobium primulinum* are the native orchid species with high economic value in Vietnam. Due to their distribution in many diverse geographical and climatic zones, they have different shapes and colors of the flowers. The purpose of the study is to create individuals with new characteristics, and some of them are superior to diploid plants in terms of genotype and phenotype expressions such as morphology, physiology, and biochemistry for supplying the market and use in breeding. *D. anosmum* and *D. primulinum* were accurately identified and treated with colchicine under *in vitro* conditions to create polyploid lines. The colchicine concentrations treating at 0 1% w/v and 0.5% w/v for one day are suitable for creating the polyploid orchid lines respectively. The results showed 8 potential polyploidy lines of *D. anosmum* and 7 lines of *D. primulinum*. These candidate polyploids showed differences in morphological characteristics such as stem, leaves, length, width, and shape were different from the control's size. In addition, the DNA content values for the polyploid lines indicated that the potential polyploid lines had values at 2.17-3.03 pg and 2.09-2.63 pg, respectively, much higher than the corresponding control (1.98 pg and 2.63 pg). These results showed that these lines can exist in 3n and 4n forms. These above polyploid lines will be isolated and propagated to evaluate polyploid stability and growth ability under ex vitro conditions in the future.

Keywords: Colchicine, Dendrobium anosmum, Dendrobium primulinum, plants growth regulators, polyploidy.

[*] Author for correspondence: Tel: +84-967137046; Email: hhduc.snn@tphcm.gov.vn

TÁC ĐỘNG CỦA TIA GAMMA NGUỒN ^{60}Co LÊN KHẢ NĂNG TẠO BIẾN DỊ CỦA CÁC PLBs LAN KIẾM TIÊN VŨ *(Cymbidium finlaysonianum) in vitro*

Nguyễn Hoàng Cẩm Tú, Nguyễn Trường Giang, Trần Đức Trọng, Huỳnh Hữu Đức*

Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Lan kiếm Tiên Vũ *(Cymbidium finlaysonianum)* là giống lan bản địa Việt Nam có tiềm năng thương mại hóa cao. Tuy nhiên, việc khai thác thương mại một số giống lan kiếm Tiên Vũ còn hạn chế do hệ số nhân giống thấp và một số đặc tính sinh trưởng chưa cao. Hiện nay, việc cải tiến tính trạng bằng chiếu xạ tia gamma trên các đối tượng cây trồng, đặc biệt là các giống hoa kiểng đã và đang được thực hiện thành công. Trong nghiên cứu này, nguồn xạ tia gamma ^{60}Co với các liều xạ từ 20 Gy đến 300 Gy được áp dụng trên giống lan kiếm Tiên Vũ nhằm đánh giá tác động lên khả năng sống và sinh trưởng của các PLBs. Kết quả cho thấy các PLBs có tỷ lệ sống sót và khả năng sinh trưởng phát triển giảm khi liều chiếu xạ càng cao. Trong đó, liều xạ 120 Gy được xác định là giá trị LD_{50} của PLBs lan kiếm sau 12 tuần nuôi cấy. Ngoài ra, chiếu xạ tia gamma ^{60}Co với các liều xạ thấp từ 20 Gy đến 50 Gy đều có tác động phần nào lên khả năng sinh trưởng cũng như gây ra một số khác biệt về hình dạng, cấu trúc và kích thước thân, rễ của các chồi phát sinh sau chiếu xạ. Các kết quả này khẳng định khả năng gây biến dị của tia gamma lên khả năng sống và sinh trưởng của lan kiếm nuôi cấy *in vitro* nói riêng và mở ra khả năng áp dụng trong việc tạo giống mới trên các đối tượng giống hoa kiểng khác.

Từ khóa: BA, chất điều hòa sinh trưởng, lan kiếm Tiên Vũ, liều chiếu xạ, NAA, tia gamma.

MỞ ĐẦU

Cymbidium được phân bố rộng rãi trải dài từ Tây Bắc dãy Himalaya qua Trung Quốc, Nhật Bản, Ma-lai-xi-a và kéo dài đến phía Bắc nước Úc. Chi Cymbidium được nhà thực vật học Otto Swartz - người Thụy Điển mô tả năm 1799 và được sắp xếp riêng vào một chi trong hệ thống phân loại thực vật của thế giới ngày nay. Các loài trong chi này thích nghi đa dạng với nhiều vùng khí hậu khác nhau, phần lớn sống ở các vùng rừng núi khá cao, khô và lạnh, một số loài khác phù hợp với điều kiện nóng ẩm của rừng nhiệt đới. Lan kiếm Tiên Vũ *(C. finlaysonianum)* là loài mọc bụi, phân bố ở Campuchia, Thái Lan, Ma-lai-xi-a, Phi-líp-pin, In-đô-nê-xi-a và ở Việt Nam, lan kiếm Tiên Vũ là loài được thị trường tiếp nhận và ưa chuộng, do đó việc chọn tạo giống mới của loài này là vô cùng thiết yếu. Kỹ thuật lai tạo giống lan dựa trên việc lai tạo hữu tính truyền thống cần nhiều thời gian trong khi việc ứng dụng các kỹ thuật, công nghệ mới còn nhiều hạn chế thì việc sử dụng các tia phóng xạ gây đột biến sẽ giúp việc tạo và phân lập được các dòng biến dị triển vọng làm nguyên liệu ban đầu phục vụ cho công tác chọn tạo giống lan *Cymbidium* mới.

Bức xạ ion hóa là một tác nhân gây biến dị rất hữu hiệu đối với cây trồng. Tia gamma cũng được chứng minh là có tính kinh tế và hiệu quả so với các bức xạ ion hóa khác vì khả năng thâm nhập của chúng giúp ứng dụng rộng rãi hơn trong các kỹ thuật cải tiến các loài thực vật khác nhau (Moussa, 2006). Ảnh hưởng của chiếu xạ gamma đến sự thay đổi hình thái và phản ứng sinh học của thực vật phụ thuộc vào liều lượng bức xạ (Wi *et al.*, 2007). Nuôi cấy trong điều kiện *in vitro* là điều kiện bắt buộc đối với kỹ thuật lai tạo giống và sự kết hợp giữa nuôi cấy mô tế bào và đột biến sẽ làm tăng hiệu quả đồng thời rút ngắn thời gian chọn tạo giống mới (Vinh *et al.*, 2020). Mục đích của nghiên cứu này là ứng dụng phương pháp gây đột biến phóng xạ tia gamma nguồn ^{60}Co để đánh giá tác động lên khả năng tạo biến dị của các PLBs lan kiếm *Cymbidium finlaysonianum.*

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Chồi đơn *in vitro* có từ 4 – 5 lá, cụm Protocorm-like bodies (PLBs) có chứa 2 – 3 PLB giống lan kiếm Tiên Vũ *(C. finlaysonianum) in vitro* được lưu giữ tại Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

Phương pháp nghiên cứu

Cảm ứng tạo PLBs lan kiếm làm nguồn vật liệu cho chiếu xạ

Chồi đơn *in vitro* có từ 4 – 5 lá được cắt bỏ rễ và lá, cắt đoạn thân có kích thước 1 cm (tính từ gốc), hủy đỉnh, tạo vết thương ở gốc và cấy trên môi trường ½ MS bổ sung 30 g/L sucrose; 0,5 g/L peptone; 0,1 g/L inositol; 8 g/L agar; BA (0,5 – 2,0 mg/L); NAA (0,5 – 1,0 mg/L); được điều chỉnh ở pH = 5,7. Sự kết hợp của BA và NAA ở các tỷ lệ khác nhau có thể tối ưu hóa quá trình tạo PLBs, dựa trên kết quả nghiên cứu về các đối tượng cây trồng

khác nhau, thí nghiệm được chia làm 8 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 3 chai, mỗi chai 6 mẫu (Đức *et al.*, 2022). Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ mẫu tạo PLBs (%), số PLBs (PLB/mẫu), số chồi (chồi/mẫu), tỷ lệ mẫu tăng trưởng chồi (%), tỷ lệ mẫu chết/không tạo chồi/PLBs (%).

Đánh giá tác động của liều chiếu xạ lên khả năng sinh trưởng của PLBs lan kiếm: xác định LD_{50}

PLBs được nhân nhanh từ kết quả của khảo sát trên để tạo nguồn mẫu. Cụm PLBs (2 – 3 PLB/mẫu) được cấy vào đĩa petri, mỗi đĩa petri chứa 25 mL môi trường nuôi cấy và cấy 5 cụm chồi/đĩa. Quy trình chiếu xạ được thực hiện tại Phòng Công nghệ Vật liệu và Nano, Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh. Mẫu được chiếu xạ bằng tia gamma với nguồn bức xạ gamma ^{60}Co. Nghiệm thức không xử lý chiếu xạ là nghiệm thức đối chứng. Thí nghiệm gồm 11 nghiệm thức tương ứng với 11 liều xạ (20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 150, 200 và 300 Gy), mỗi nghiệm thức 3 lần lặp lại, mỗi lần lặp lại 3 đĩa petri, mỗi đĩa petri 5 mẫu. Môi trường nuôi cấy là ½ MS bổ sung 30 g/L sucrose; 0,5 g/L peptone; 0,1 g/L inositol; 8 g/L agar; 0,5 mg/L BA; 1,0 mg/L NAA; được điều chỉnh ở pH = 5,7.

Đánh giá và sàng lọc mẫu in vitro lan kiếm sau chiếu xạ

Chồi hình thành từ các cụm PLBs sau chiếu xạ có hình thái khác biệt được sàng lọc và cấy sang môi trường biệt hóa tạo chồi ½ MS bổ sung 1,0 mg/L BA; 0,2 mg/L NAA; 30 g/L sucrose; 0,5 g/L peptone; 0,1 g/L inositol; 0,02 g/L glycin; 8 g/L agar được điều chỉnh ở pH = 5,7; theo dõi sau 12 tuần và ghi nhận các chỉ tiêu hình thái (màu sắc, chiều cao,\...).

Cây con *in vitro* tăng sinh từ chồi hay cụm chồi có hình thái khác biệt được sàng lọc và cấy phân lập thành các dòng sang môi trường tạo cây hoàn chỉnh ½ MS bổ sung 1,0 mg/L NAA; 30 g/L sucrose; 0,5 g/L peptone; 0,1 g/L inositol; 0,02 g/L glycin; 8 g/L agar được điều chỉnh ở pH = 5,7; theo dõi sau 12 tuần và ghi nhận các biến dị về hình thái cây (chiều cao, thân, lá,\...).

Điều kiện nuôi cấy và chỉ tiêu theo dõi

Điều kiện chiếu sáng 12 giờ/ngày; cường độ chiếu sáng 20 ± 2 µmol/m^2s, độ ẩm của phòng nuôi 70 – 80%, nhiệt độ phòng nuôi 25 ± 3°C. Thời gian nuôi cấy 12 tuần.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

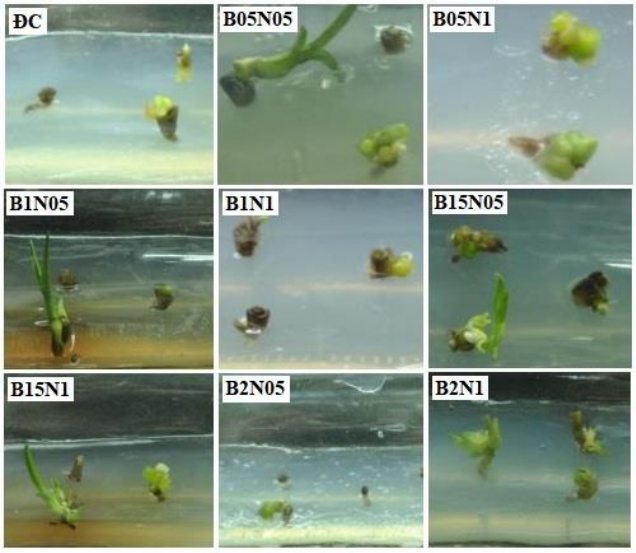
Cảm ứng tạo PLBs lan kiếm làm nguồn vật liệu cho chiếu xạ

PLBs đóng vai trò quan trọng trong quá trình nhân giống *in vitro* ở các loài lan nói chung. Ngoài ra, các nhà nghiên cứu đã chứng minh sự cân bằng giữa tỷ lệ auxin và cytokinin cũng có ý nghĩa quyết định trong quá trình nuôi cấy *in vitro* (Petrasek *et al.*, 2018). Sau 12 tuần nuôi cấy đánh giá khả năng tạo PLBs từ chồi lan kiếm Tiên Vũ cho kết quả khảo sát như sau (bảng 1, hình 1):

Bảng 1. Ảnh hưởng của chất điều hòa lên khả năng tạo PLBs từ chồi lan kiếm Tiên Vũ

NT	BA (mg/L)	NAA (mg/L)	Số PLBs (PLB/mẫu)	Tỷ lệ mẫu tạo PLB (%)	Số chồi (chồi/mẫu)	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Tỷ lệ mẫu chết/không tạo chồi/PLBs (%)
ĐC	0	0	1,00^{b}	14,4	1,93^{ab}	25,6	60
B05N05	0,5	0,5	1,07^{b}	13,3	2,33^{ab}	26,7	60
B05N1	**0,5**	**1,0**	**1,53^{a}**	**16,7**	**2,47^{a}**	**35,6**	47,7
B1N05	1,0	0,5	0,53^{bc}	8,9	2,93^{a}	33,3	47,7
B1N1	1,0	1,0	0,67^{bc}	11,1	2,40^{ab}	27,8	61,1
B15N05	1,5	0,5	0,47^{bc}	7,8	1,60^{ab}	22,2	70
B15N1	1,5	1,0	0,27^{d}	4,4	1,87^{ab}	21,1	74.5
B2N05	2,0	0,5	0,20^{d}	3,3	0,93^{b}	13,3	83,4
B2N1	2,0	1,0	0,33^{c}	5,6	1,80^{ab}	24,4	70

Ghi chú: *Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê với độ tin cậy P ≤ 0,05.*



Hình 1. Ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng lên quá trình cảm ứng tạo PLBs sau 12 tuần nuôi cấy

Tỷ lệ mẫu tạo PLBs ở các nghiệm thức khá thấp trong đó nghiệm thức B05N1 có tỷ lệ tạo PLBs cao nhất (16,7%). Các nghiệm thức còn lại có tỷ lệ tạo PLBs thấp hơn so với nghiệm thức ĐC (14,4%) lần lượt là nghiệm thức B05N05 (13,3%); nghiệm thức B1N1 (11,1%); các nghiệm thức còn lại đạt dưới 10% và thấp nhất là nghiệm thức B2N05 (3,3%). Nghiệm thức B05N1 cho khả năng tạo PLBs tốt nhất đạt 1,53 PLB/mẫu và nghiệm thức B05N05 đạt 1,07 PLB/mẫu đều cao hơn so với nghiệm thức ĐC đạt 1 PLB/mẫu. Khả năng tạo PLB có chiều hướng giảm khi tăng nồng độ chất điều hòa sinh trưởng, các nghiệm thức B1N05; B1N1; B15N05 đạt lần lượt 0,53; 0,67; 0,47 PLB/mẫu và thấp nhất ở nghiệm thức B2N05 chỉ đạt 0,2 PLB/mẫu. Một số nghiệm thức có tỷ lệ mẫu tạo chồi cao như nghiệm thức B05N05 (26,7%); B1N1 (27,8%); B1N05 (33,3%) và cao nhất ở nghiệm thức B05N1 (35,6%) và đều cao hơn nghiệm thức ĐC (25,6%). Nghiệm thức B2N1 có tỷ lệ mẫu tạo PLB khá thấp là 5,6% nhưng có tỷ lệ mẫu tạo chồi cao lên tới 24,4%. Nghiệm thức B2N05 có tỷ lệ mẫu tạo chồi thấp nhất (13,3%). Trong khi đó, các nghiệm thức có tỷ lệ mẫu tạo chồi cao đều có khả năng tạo chồi tốt như nghiệm thức B05N05 đạt 2,33 chồi/mẫu; B1N1 đạt 2,4 chồi/mẫu; B05N1 đạt 2,47 chồi/mẫu và cao nhất ở nghiệm thức B1N05 đạt 2,93 chồi/mẫu đều cao hơn so với nghiệm thức ĐC chỉ đạt 1,93 chồi/mẫu; nghiệm thức B2N05 đạt 0,93 chồi/mẫu thấp nhất trong các nghiệm thức. Kết quả trên cho thấy môi trường cho khả năng tạo PLBs lan kiếm Tiên Vũ tốt nhất là môi trường ½ MS bổ sung 0,5 mg/L BA và 1,0 mg/L NAA.

Đánh giá tác động của liều chiếu xạ lên khả năng sinh trưởng của PLBs lan kiếm

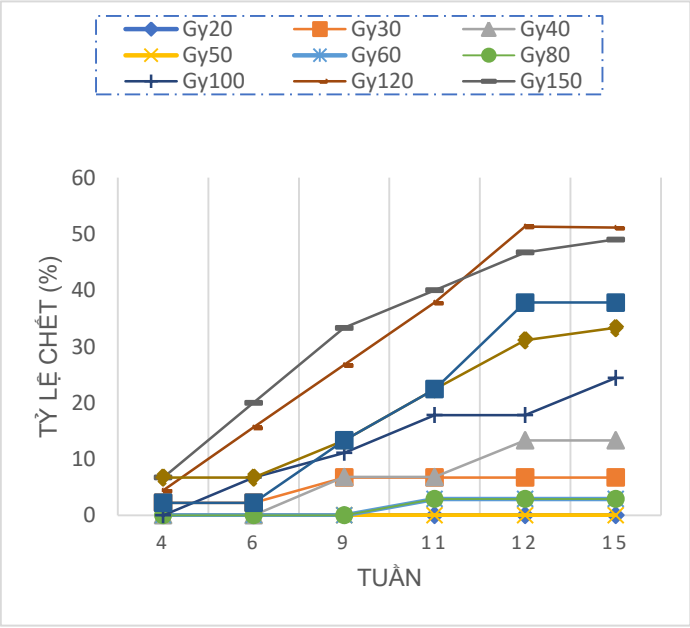
Việc thử nghiệm và xác định khả năng gây chết dưới tác động của liều xạ là yếu tố được quan tâm trước khi tiến hành xử lý chiếu xạ gây đột biến. Độ nhạy cảm của tia phóng xạ khác nhau ở các giống và khác nhau ở biểu hiện của các giai đoạn sinh trưởng và tùy thuộc vào nhiều yếu tố khác nên rất khó để dự đoán được tác động của liều chiếu. Lan kiếm Tiên Vũ thuộc loài lan kiếm lá cứng và có đặc tính khó đáp ứng với tác động của các liều xạ so với các loài lan kiếm lá mềm, đồng thời việc tiền khảo sát ở các liều xạ cao hơn từ 100 Gy đến 300 Gy cho khả năng sống sót của PLBs trong thời gian dài với vài lần cấy chuyền. Các cụm PLBs (2 – 3 PLB) lan kiếm Tiên Vũ được sử dụng làm vật liệu chiếu xạ, liều xạ 0 Gy (đối chứng) và 11 liều xạ từ Gy20 đến Gy300 được sử dụng để xác định LD_{50}.

Các cụm PLBs ở các nghiệm thức sau 1 tuần chiếu xạ hầu như không có sự thay đổi và bắt đầu có sự tăng sinh PLB. Một số cụm PLBs ở các nghiệm thức bắt đầu chuyển sang ngả vàng sau 2 tuần xử lý và các tuần sau đó, do chiếu xạ, xác định mẫu chết hoàn toàn khi cả cụm PLBs hóa nâu hoặc không tái sinh được thành chồi. Tuần thứ 4, một số liều xạ bắt đầu có các cụm PLBs chết như liều xạ Gy30 và Gy300 (2,2%); liều xạ Gy120 (4,4%); liều xạ Gy150 và Gy200 (6,7%). Các cụm PLBs chết ở các liều xạ tăng lên từ tuần thứ 6 và đến tuần thứ 9, tỷ lệ chết ở các liều xạ tiếp tục tăng: liều xạ Gy150 (33%); liều xạ Gy120 (26,7%); liều xạ Gy100, Gy200 và Gy300 (12%); liều xạ Gy30 và Gy40 (6,7%). Các cụm PLBs ở các liều xạ vẫn tiếp tục tăng ở tuần thứ 11 và ở tuần thứ 12, tỷ lệ chết ở liều xạ Gy60 và Gy80 là 3%; liều xạ Gy30 không có sự thay đổi là 7%; liều xạ Gy40 tăng lên 13%; liều xạ Gy200 và Gy300 tăng đến 32%; liều xạ Gy150 tăng nhiều chiếm 47% và liều xạ Gy120 tăng nhiều nhất đạt 51%.

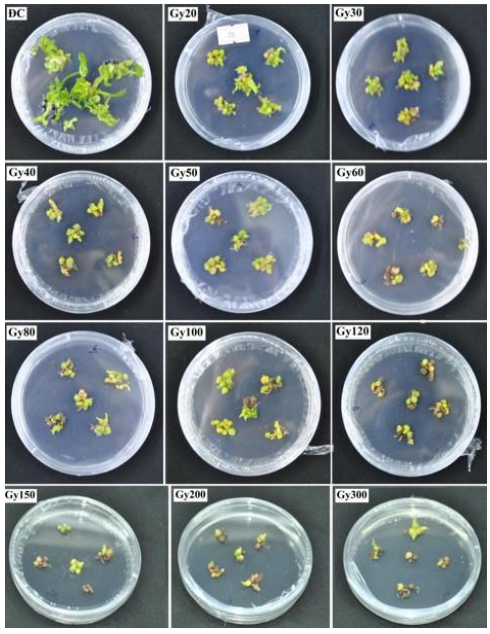
Xác định LD_{50}

Các cụm PLBs ở các liều xạ tiếp tục được theo dõi đến tuần thứ 15, tỷ lệ chết ở các liều xạ tăng thêm rất ít như liều xạ Gy100 tăng từ 18% lên 24%; liều xạ Gy150 tăng từ 46% lên 49%; liều xạ Gy200 tăng từ 31% lên 33% và hầu như không tăng thêm ở một số liều như liều xạ Gy 30 là 7%; liều xạ Gy40 là 13%; liều xạ Gy50 và Gy60 là

3%; liều xạ Gy300 là 38% và liều xạ Gy120 là 51%. Các PLB còn xanh sau thời gian ghi nhận liều xạ LD_{50} sẽ tiếp tục được sàng lọc và cấy sang môi trường nhân chồi để tiếp tục theo dõi sự biến dị ở các liều xạ (hình 2). Liều LD_{50} thường được sử dụng để dự đoán mức độ tổn thương của một giống và cũng là chỉ số thông dụng trong xử lý đột biến, là ngưỡng mà ở đó tác nhân gây đột biến có thể tạo ra những biến đổi trong bộ máy di truyền của thực vật (Vinh *et al.*, 2019). Việc tìm ra liều LD_{50} có ý nghĩa thiết thực cho việc xác định liều gây tạo đột biến một cách hiệu quả nhất. Nghiên cứu của Dehgahi và Joniyas (2017) khi tạo đột biến *in vitro* bằng phương pháp chiếu xạ ở PLBs trên đối tượng *Dendrobium Sonia-28* từ liều 10 Gy đến 200 Gy cho thấy tỷ lệ sống của PLBs tỷ lệ nghịch với liều chiếu xạ và LD_{50} đối với PLBs là xấp xỉ 43 Gy. Một nghiên cứu khác của Kim và đồng tác giả (2020) cũng trên đối tượng *Cymbidium* ở các liều xạ từ 20 Gy đến 100 Gy ghi nhận rằng tất cả quần thể được chiếu xạ tia gamma đều sống sót trong thời gian dài nên không thể ước tính được liều LD_{50}. Kết quả cho thấy, giá trị liều LD_{50} là 120 Gy (biểu đồ 1).



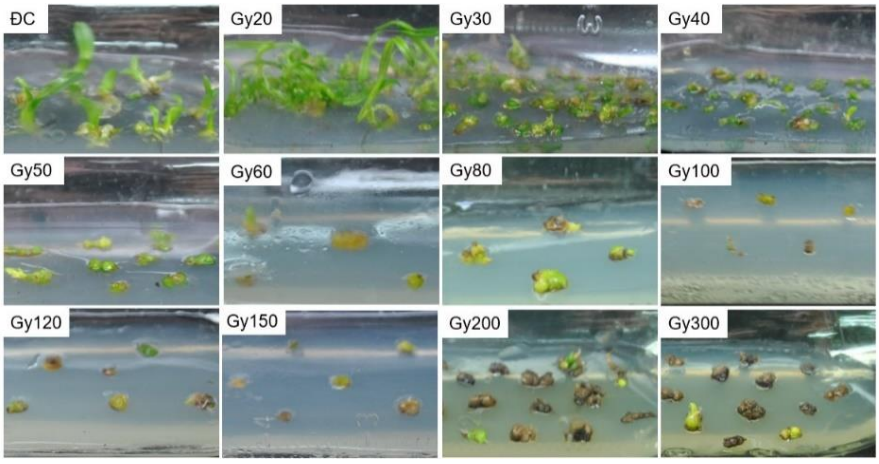
Biểu đồ 1. Tỷ lệ chết của các cụm PLBs sau chiếu xạ ở các liều xạ từ Gy20 đến Gy300



Hình 2. Hình thái các cụm PLBs sau 15 tuần chiếu ở các liều xạ từ Gy20 đến Gy300

Đánh giá và sàng lọc mẫu in vitro lan kiếm sau chiếu xạ

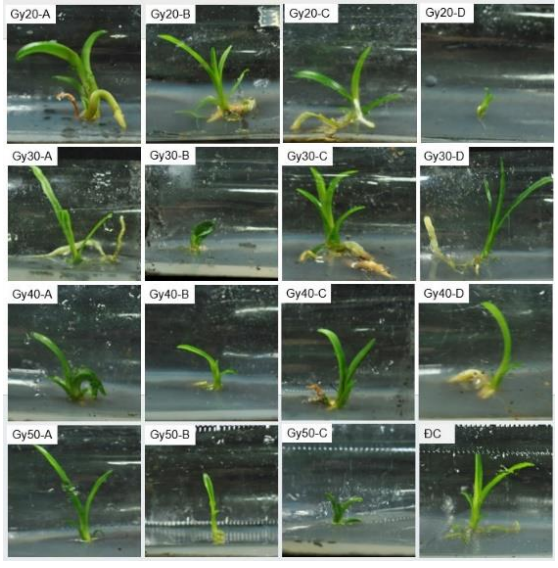
Sàng lọc chồi hình thành từ các PLBs đã chọn lọc: PLBs sau chiếu xạ có hình thái to hơn PLBs không xử lý chiếu xạ. Các cụm PLBs có các PLB còn xanh ở các liều xạ được sàng lọc và cấy lên môi trường nhân chồi và tiếp tục theo dõi sự biến dị ở các liều xạ. Nhìn chung, sự tăng trưởng của các cụm PLBs giảm dần theo liều xạ. Sau cấy chuyền 2 tuần, các cụm PLBs tiếp tục có tỷ lệ chết tăng ở các liều xạ cao như liều xạ Gy100 và Gy150 (51%); liều xạ Gy120 và Gy200 (58%) và cao nhất là Gy300 (60%). Các cụm PLBs ở các liều xạ thấp từ Gy20 đến Gy50 đa phần bị tổn thương và chuyển sang ngả vàng. Đến tuần thứ 5, các liều xạ cao tiếp tục có tỷ lệ chết tăng lên khá cao như liều xạ Gy60, Gy100, Gy120 và Gy200 là gần 85%, liều xạ Gy80 và Gy300 lên đến 91%. Các cụm PLBs ở các liều xạ cao gần như ngả vàng và hóa nâu, sau đó bị chết dần và được xác nhận là những biến dị đột biến gây chết khi có tỷ lệ chết là 100% vào tuần thứ 6 ở liều xạ Gy150, Gy300; vào tuần thứ 10 ở liều xạ Gy60 và vào tuần thứ 13 ở liều xạ Gy80, Gy100 và Gy120. Liều xạ Gy200 có tỷ lệ chết là 97% ở tuần thứ 7 nhưng không có sự thay đổi về sự tăng trưởng PLB, cụm PLB ở liều xạ này còn xanh nhưng không có khả năng phục hồi hay tăng trưởng thành chồi. Các cụm PLBs ở các liều xạ thấp từ Gy20 đến Gy50 ở tuần thứ 12 bắt đầu tăng lên nhanh chóng và sang tuần thứ 13 có tỷ lệ chết ở liều xạ Gy20 là 58%, Gy30 là 77%; Gy40 và Gy50 là 91%, tuy nhiên các cụm PLBs có khả năng phục hồi và một số PLB bắt đầu có sự hình thành chồi hay ra rễ phát triển thành cây con, đây có thể là những biến dị không gây chết nhưng ở dạng này, cây không chết nhưng sinh trưởng và phát triển chậm so với cây đối chứng. Các rối loạn của NST, DNA hay hoạt tính của các hợp chất trong thành phần cấu trúc của tế bào bị thay đổi nhưng chưa đủ gây chết cho cây là do các liều lượng phóng xạ trong quá trình chiếu xạ gây biến dị.



Hình 3. Sự sinh trưởng của PLBs ở các liều chiếu xạ tia Gamma nguồn ^{60}Co sau 20 tuần chiếu xạ

Sàng lọc cây in vitro tăng sinh từ chồi đã được chọn lọc: chồi ở các liều xạ Gy20, Gy30, Gy40 và Gy50 được chọn lọc và cấy sang môi trường tạo cây hoàn chỉnh. Cây con đã có những biểu hiện khác nhau về hình dạng và kích thước xuất hiện ở các liều từ Gy20 đến Gy50. Những sai khác về hình dạng thân, lá giữa các cây chiếu xạ và cây đối chứng như hình dạng, chiều cao cây, chiều dài rễ. Qua quan sát ghi nhận ở liều xạ Gy20 có các cây biến dị về hình thái như cây có lá dày, màu xanh đậm, hình dạng khác, rễ to và dài (hình 4-Gy20A); cây có nhiều lá, rễ to dài, màu vàng (hình 4-Gy20B); cây có nhiều rễ dài, có rễ màu trắng (hình 4-Gy20C) hoặc cây có kích thước nhỏ hơn rất nhiều (hình 4-Gy20D) so với cây đối chứng; liều xạ Gy30 có cây có lá dài, rễ dài và nhiều (hình 4-Gy30A); cây có hình dạng và kiểu lá khác (hình 4-Gy30B); cây có nhiều lá và rễ to (hình 4-Gy30C); cây có lá mỏng và dài, rễ to (hình 4-Gy30D) so với cây đối chứng; liều xạ Gy40 có cây có lá cong xuống gốc; màu xanh đậm (hình 4-Gy40A); cây có kích thước nhỏ hơn (hình 4-Gy40B); cây có ít rễ ngắn và lá có màu xanh đậm và màu xanh đậm (hình 4-Gy40C); cây có hình dạng khác (hình 4-Gy40D) so với cây đối chứng; liều xạ Gy50 có cây có rễ rất ngắn (hình 4-Gy50A); cây có hình dạng khác (hình 4-Gy50B) và cây có hình dáng khác và có kích thước nhỏ hơn rất nhiều (hình 4-Gy50C) so với cây đối chứng.

Việc đánh giá và sàng lọc hình thái các cây con sau chiếu xạ là rất cần thiết vì qua đó có thể xác định việc chiếu xạ đã tác động lên nguồn mẫu PLBs ban đầu, từ đó xác định được cây con có kiểu hình biến dị và duy trì sự biến dị đó. Kết quả cho thấy việc tác động của tia gamma với các liều xạ thấp 20, 30, 40 và 50 Gy đều có sự khác biệt so với đối chứng, trong khi với các liều xạ cao gần như không tăng trưởng và chết hoàn toàn. Nghiên cứu của Vinh và đồng tác giả (2020) cũng cho thấy khả năng sinh trưởng phát triển của cây giảm khi liều chiếu càng cao, gần như chết 100% từ liều 80 Gy trở lên sau chiếu xạ 7 tháng và PLBs tăng tần suất biến dị với phổ biến dị rộng, đa dạng về cấu trúc, màu sắc thân, lá ở các liều thấp 20, 40 và 60 Gy. Một nghiên cứu khác cũng ghi nhận rằng liều phù hợp để gây đột biến tương đương liều 20 – 30 Gy khi sử dụng nguồn gamma ^{60}Co làm tác nhân phóng xạ đối với mẫu mắt mầm và mẫu đốt thân trên đối tượng *Citrus grandis* L. Osbeck (Rusat *et al.*, 2021).



Hình 4. Sự sinh trưởng của lan kiếm sau 40 tuần chiếu xạ

Vật chất di truyền dưới tác dụng của tia gamma bị thay đổi biểu hiện ban đầu của chúng là những biến đổi hình thái có thể quan sát được. Đột biến thực vật được tạo ra bằng bức xạ ion hóa như bức xạ gamma đã chứng minh đột biến tăng dần theo liều xạ (Vinh *et al.*, 2019). Tuy nhiên, việc tăng liều xạ sẽ dẫn đến các tình trạng không mong muốn như tỷ lệ chết của mẫu hay những đột biến không có lợi cũng tăng theo. Bức xạ ion trước hết sẽ làm tổn thương DNA, hệ thống tự sửa chữa ở một số sinh vật thường dẫn đến lặp đoạn, chuyển đoạn, đảo đoạn và mất đoạn gây nên hiệu ứng gây chết và gây đột biến cho tế bào dẫn đến các kết quả biến dị khác nhau.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu cho thấy môi trường thích hợp cho khả năng tạo PLBs lan kiếm Tiên Vũ làm nguồn vật liệu cho chiếu xạ tốt nhất là môi trường ½ MS bổ sung 0,5 mg/L BA và 1,0 mg/L NAA. Sàng lọc từ các liều xạ cho thấy sự sinh trưởng của các cụm PLBs được xử lý với các liều xạ từ 20 Gy đến 300 Gy đều có sự khác biệt so với đối chứng, trong khi sự sinh trưởng của các cụm PLBs ở các liều xạ thấp từ 20 Gy đến 50 Gy PLB có khả năng tăng trưởng chồi và hình thành cây con thì ở các liều xạ cao từ 60 Gy đến 300 Gy có tỷ lệ chết cao và không có sự tái sinh cây. Liều xạ gây chết LD_{50} ở lan kiếm được xác định là 120 Gy. Kết quả cho thấy việc chiếu xạ tia gamma ^{60}Co ở các liều lượng 20, 30, 40 và 50 Gy thích hợp để tạo cây có biến dị hình thái và kích thước thân rễ khác nhau ở lan kiếm. Nghiên cứu đã chứng tỏ có sự tác động của tia phóng xạ gamma ảnh hưởng đến khả năng tạo biến dị của các PLBs lan kiếm Tiên Vũ (*C. finlaysonianum*).

Lời cảm ơn: *Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh đã hỗ trợ trang thiết bị và cơ sở vật chất để thực hiện nghiên cứu này.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Rheleh Dehgahi, Alireza Joniyas (2017). A Gamma Irradiation-Induced Variation in *Dendrobium Sonia-28* Orchid Protocorm-Like Bodies (PLBs). *Fungal Genomics & Biology*, 7: 151.

Đỗ Khắc Thịnh, Dương Lan Oanh, Nguyễn Thị Thanh Huyền, Ngô Thị Bích (2011). Nghiên cứu tạo giống lan Hồ điệp mới thích ứng với khí hậu ở Thành phố Hồ Chí Minh. *Report on scientific research topics of Southern Institute of Agricultural Science and Technology, Ho Chi Minh City, Vietnam.*

Huỳnh Hữu Đức, Nguyễn Hoàng Cẩm Tú, Nguyễn Trường Giang, Nguyễn Thị Từ Vy, Nguyễn Thị Xuân Hiền (2021). Phân tích di truyền và nhân giống *in vitro* lan Giả hạc *(Dendrobium anosmum)*. *Tuyển tập báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2021*. NXB Đại học Thái nguyên.

Kim Sang Hoon, Kim Se Won, Ahn Joon-Woo, Ryu Jaihyunk, Kwon Soon-Jae, Kang Byoung-Cheorl, Kim Jin-Baek (2020). Frequency, Spectrum, and Stability of Leaf Mutants Induced by Diverse γ-Ray Treatments in Two Cymbidium Hybrids. *Plants,* 9(4): 546

Moussa (2006). Role of gamma irradiation in the regulation of NO_3 level in rocket (Eruca vesicariasub sp. sativa) plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(2): 193–197.

Nguyễn Văn Vinh, Trần Hồng Anh, Bùi Văn Lệ, Bùi Minh Trí (2019). Khảo sát ảnh hưởng của chiếu xạ gamma ^{60}Co đến cây lan lai Dendrobium thấp cây. *The Journal of Agriculture and Development* 19(1): 32-40.

Petrasek Jan, Hoyerova Klara, Motyka Vaclav, Hejatko Jan, Dobrev Petre, Kaminek Miroslav, Vankova Radomira (2019). Auxins and Cytokinins in Plant Development 2018. *International Journal of Molecular Sciences,* 20(4): 909

Anmol RJ, Marium S, Hiew FT, Han WC, Lee K K, Wong AKY, Khan F, Sarker MR, Chan SY, Kifli N, Ming LC (2021). Phytochemical and Therapeutic Potential of *Citrus grandis* (L.) Osbeck: A Review. *J Evid Based Integr Med*. 26: 2515690X211043741.

Wi SG, Chung BY, Kim JS, Kim JH, Baek MH, Lee JW, Kim YS (2007*).* Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants, *Micron 38:* 553-564.

EFFECTS OF GAMMA RAYS FORM ^{60}Co SOURCE ON THE MUTATIONAL VARIATION OF *Cymbidium finlaysonianum'* PLBs *in vitro*

Nguyen Hoang Cam Tu, Nguyen Truong Giang, Tran Duc Trong, Huynh Huu Duc*

Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

SUMMARY

Cymbidium finlaysonianum is a native Vietnamese orchid with high commercial potential. However, the commercial exploitation of some *C. finlaysonianum* orchid varieties is limited due to low propagation coefficients and some low growth characteristics. Trait improvement using gamma-ray irradiation on plants, especially ornamental flower varieties, has been successfully implemented. This study applied a ^{60}Co gamma radiation source with a dose of 20 to 300 Gy to evaluate the impact on the survival and growth of PLBs of the *C. finlaysonianum* orchid variety. The results showed that the survival rate and growth and development ability of PLBs decreased with higher irradiation doses. In particular, the radiation dose of 120 Gy was determined to be the LD_{50} value of PLBs after 12 weeks of culture. In addition, ^{60}Co gamma-ray irradiation with low radiation doses of 20, 30, 40, and 50 Gy all have some impact on growth ability as well as causing some differences in shape, and structure size after irradiation. These results have confirmed the mutagenic ability of gamma rays on the survival and growth of *in vitro* orchids and opened up the possibility of application in creating new varieties for other ornamental flowers.

Keywords: BA, *Cymbidium finlaysonianum*, gamma rays, growth regulators, NAA, radiation dose.

* Author for correspondence: Tel: +84-967137046; Email: hhduc.snn@tphcm.gov.vn

ĐÁNH GIÁ ẢNH HƯỞNG CỦA HÀM LƯỢNG PHÂN LÂN ĐẾN SỰ CỘNG SINH CỦA NẤM ARBUSCULAR MYCORRHIZA TRÊN RỄ CÂY NGÔ TRONG ĐIỀU KIỆN NHÀ LƯỚI

Trương Phước Thiên Hoàng[1], Nguyễn Cao Hoài Hải[2], Vũ Ngọc Khánh Như[1], Võ Trần Quốc Thắng[1], Huỳnh Thị Ngọc Oanh[1], Trần Trọng Nghĩa[3], Đào Uyên Trân Đa[1]

[1]Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

[2]Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

[3]Công ty TNHH Nghiên cứu, Ứng dụng Mía đường Thành Thành Công, Tây Ninh

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm đánh giá ảnh hưởng của các hàm lượng phân lân P_2O_5 khác nhau đến tỷ lệ cộng sinh nấm nội cộng sinh (Arbuscular mycorrhiza fungi – AMF), đặc biệt là chi *Glomus* sp. lên trên rễ cây ngô trong điều kiện nhà lưới, nhằm xác định hàm lượng phân lân (P_2O_5) phù hợp để có được số lượng bào tử nấm AM và tỷ lệ nấm AM cộng sinh cao nhất trên rễ ngô, tiến hành thu sinh khối rễ để ứng dụng trong quy trình sản xuất AMF, tạo chế phẩm sinh học chứa nấm nội cộng sinh AMF cho các loại cây trồng. Thí nghiệm được bố trí đơn yếu tố, khối hoàn toàn ngẫu nhiên có 5 nghiệm thức với 5 mức P_2O_5 là 0 mg/kg (NT1); 25 mg/kg (NT2); 50 mg/kg (NT3); 100 mg/kg (NT4) và 200 mg/kg (NT5), khảo sát ở các giai đoạn theo dõi là 15,25,35,45 ngày sau khi chủng AMF (chi *Glomus* sp.). Kết quả thí nghiệm cho thấy nghiệm thức bổ sung hàm lượng P_2O_5 là 100 mg/kg đất có chỉ tiêu tổng số bào tử AMF (57,7 bào tử/50 gam đất) và tỷ lệ cộng sinh AMF với rễ cây ngô (85,7%) cao hơn so với bốn nghiệm thực còn lại. Ngoài ra, nghiệm thức bổ sung hàm lượng P_2O_5 là 100 mg/kg đất có chỉ tiêu sinh trưởng là chiều dài rễ, tổng số rễ tốt hơn bốn nghiệm thức còn lại ở giai đoạn theo dõi là 45 ngày sau khi chủng AM. Các chỉ tiêu sinh trưởng là chiều cao cây và sinh khối rễ ở các giai đoạn theo dõi giữa các nghiệm thức không có sự khác biệt ý nghĩa trong thống kê.

Từ khóa: Arbuscular mycorrhiza, cây ngô, *Glomus*, phân lân, P_2O_5.

MỞ ĐẦU

Ngày nay, các quốc gia nông nghiệp đang hướng tới một nền nông nghiệp bền vững. Các giải pháp sinh học theo hướng "tiếp cận xanh" (green approach) được nghiên cứu và ứng dụng rộng rãi. Các nghiên cứu phát triển và ứng dụng các chế phẩm sinh học dần thay thế các loại sản phẩm hóa học, giúp tăng năng suất cây trồng và bảo vệ môi trường. Nấm rễ cộng sinh Arbuscular mycorrhiza (AM) được sử dụng như một loại phân bón sinh học làm tăng khả năng hấp thu dinh dưỡng của cây trồng, mặt khác làm ổn định cấu trúc và đặc tính sinh học của đất và là yếu tố chỉ thị cho mức độ suy thoái của đất. Arbuscular mycorrhiza kích thích sinh trưởng, giúp cây trồng khỏe mạnh, ít nhiễm bệnh và tăng năng suất (Dalpe, Monreal, 2004) và cây trồng cộng sinh với mycorrhiza có khả năng chống chịu với các điều kiện bất lợi của đất đai cũng như khí hậu khắc nghiệt (Trần Văn Mão, 2004). Hàm lượng photpho trong đất ảnh hưởng đến mức độ xâm nhiễm và sự hình thành bào tử nấm rễ nội cộng sinh. Trong một số nghiên cứu khi lượng photpho hòa tan trong đất tăng lên, sự xâm nhiễm nấm AM trong rễ giảm còn trong môi trường thiếu lân sẽ kích thích sự phát triển của nấm rễ nội cộng sinh (Bolan, 1991). Sự vận chuyển lân do nấm AM bao gồm hấp thu lân từ dung dịch đất vào cây chủ nhờ hệ sợi nấm ngoại biên phát triển lan rộng trong đất, các chất dinh dưỡng như lân được hấp thụ bởi sợi nấm và hệ sợi nấm AM sẽ vận chuyển lân vào rễ cây chủ thông qua sự cộng sinh của nấm AM với rễ cây (Jakobsen,1999). Ngô là cây lương thực rất quan trọng với hàm lượng dinh dưỡng cao, cung cấp nhiều năng lượng, nên ngô được làm thức ăn cho gia súc, làm thực phẩm, nguồn cung cấp nguyên liệu cho công nghiệp và là nguồn hàng hóa xuất nhập khẩu đem lại lợi nhuận cao ở nhiều quốc gia trên thế giới. Trong nền nông nghiệp Việt Nam, ngô là cây lương thực xếp hàng thứ hai sau cây lúa, cũng là một cây trong có ý nghĩa cho sự phát triển chăn nuôi, có khoảng 21% sản lượng ngô làm lương thực cho người và 70% chất tinh từ ngô có trong thức ăn hỗn hợp cung cấp cho ngành chăn nuôi trên hầu hết các nước trên thế giới. Ngoài ra ngô cũng được xem là cây ký chủ tốt cho nấm AM dễ dàng cộng sinh trên rễ cây ngô, tạo sinh khối rễ nhiều, tỷ lệ cộng sinh với AMF cao phục vụ cho việc nhân sinh khối AMF sản xuất chế phẩm AMF nội cộng sinh phục vụ cho các loài cây trồng khác.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu

Chủng nấm AM (chi *Glomus* sp.) được thu thập từ các vùng trồng bưởi Tỉnh Bến Tre và Tiền Giang, được kế thừa từ đề tài: "Nghiên cứu nấm nội cộng sinh AM (Arbuscular Mycorrhiza) trên cây bưởi da xanh và qui trình sản

xuất, ứng dụng chế phẩm sinh học từ nấm AM trong sản xuất bưởi da xanh", chủ nhiệm đề tài: TS. Trương Phước Thiên Hoàng, đề tài của Bộ Giáo dục và Đào tạo, mã số B2023-NLS-05, năm 2023 đã được định danh và lưu trữ tại nhà lưới - Phòng Thí nghiệm Công nghệ vi sinh, Viện Nghiên cứu Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh và giống ngô NK7328 của công ty Syngenta. Phân bón sử dụng trong các thí nghiệm là MKP (KH_2PO_4 chứa 52% P_2O_5) và Ure làm phân bón nitơ (Nitơ 46%).

Phương pháp nghiên cứu

Công thức dinh dưỡng bón cho cây thí nghiệm đã được kế thừa kết quả nghiên cứu của đề tài luận án tiến sĩ nông nghiệp "Nghiên cứu sự cộng sinh của nấm Myorrhiza trên cây ngô (Zea mays L.) vùng Đông Nam Bộ" của TS. Trần Thị Dạ Thảo (2012). Thí nghiệm đơn yếu tố được bố trí khối hoàn toàn ngẫu nhiên gồm 5 nghiệm thức với 3 lần lặp lại trong nhà lưới, số cây/ NT: 30 cây. Tổng số cây thí nghiệm: 5 nghiệm thức × 3 LLL × 10 cây/ NT = 150 cây). Thí nghiệm đơn yếu tố được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại, gồm 5 nghiệm thức với liều lượng P ở các nồng độ khác nhau 0 mg/kg đất (NT1); 25 mg/kg đất (NT2); 50 mg/kg đất (NT3); 100 mg/kg đất (NT4) và 200 mg/kg đất (NT5), 30 chậu/nghiệm thức. Hàm lượng Nitơ được cố định sử dụng trong tất cả các nghiệm thức là 1000 mg/kg đất. Hạt bắp được khử trùng bề mặt bằng cồn 70^0 và gieo trực tiếp vào chậu thí nghiệm (3 hạt/chậu), 2 – 3 ngày hạt nảy mầm và sau 4 ngày tiến hành tỉa bỏ các cây dư và giữ lại 1 cây/chậu thí nghiệm. Nấm AM (chi *Glomus* sp.) bổ sung cùng thời gian gieo hạt ngô (20 bào tử/100g đất), chỉ bón 1 lần trong suốt quá trình thí nghiệm. Đất sử dụng trong thí nghiệm được hấp khử trùng (khối lượng đất/chậu: 4kg). Kích thước chậu thí nghiệm (cm): 25 × 20 × 20. Phân được bón trực tiếp vào các chậu, thời gian bắt đầu bón phân vào ngày thứ 10 sau gieo hạt, định kỳ 10 ngày/lần.

Lượng phân bón (N, P, K) được bổ sung:

- Lần 1: 5 ngày sau khi ra cây.

- Sau đó cứ lần lượt cách 10 ngày bón phân 1 lần. Sau khi lấy chỉ tiêu xong tiến hành bón phân vào chậu vào để hỗ trợ dinh dưỡng cho cây trồng.

Các chỉ tiêu và phương pháp theo dõi gồm:

- Theo dõi các mốc thời gian nấm AM cộng sinh vào rễ cây ở: 15, 25, 35 và 45 ngày sau khi gieo hạt và chủng nấm AM (các mốc thời gian được tính từ ngày đầu tiên bổ sung bào tử nấm AM vào đất trồng rễ ngô đến các thời điểm thu mẫu kiểm tra các chỉ tiêu được gọi là ngày sau chủng nấm AM – ký hiệu NSC) để thu mẫu cây, rễ, đất tiến hành kiểm tra các chỉ tiêu nông học và chỉ tiêu đếm bào tử AM và tỷ lệ cộng sinh của nấm AM.

- *Chỉ tiêu nông học:*

+ Chiều cao cây (cm), chiều dài rễ (cm) được do từ gốc đến đỉnh dài nhất của bộ rễ.

+ Số rễ (rễ) được đếm trên các rễ cấp 1. Sinh khối rễ tươi (g) được tính bằng cách thấm khô bộ rễ với giấy thấm trong 5 phút sau đó cân bộ rễ.

+ Hàm lượng P_2O_5 tổng số và P_2O_5 dễ tiêu.

- *Phương pháp thực hiện*:

+ Tỷ lệ nấm AM cộng sinh (%) = (Tổng số đoạn rễ hiện diện AMF/Tổng số đoạn rễ quan sát) x 100 theo phương pháp của Phillips và Hayman (1970).

+ Phân tích hàm lượng P_2O_5 tổng số theo TCVN 8940:2011, hàm lượng P_2O_5 dễ tiêu theo TCVN 5256:2009.

+ Tách và đếm tổng bào tử AMF trong đất: bào tử được tách khỏi đất theo kỹ thuật sàn ướt (wet sieving) kết hợp với ly tâm trong dung dịch sucrose (50%) và ly tâm ở 2000 vòng/phút. Sau đó bào tử được thu qua rây (kích thước rây 40µm), quan sát và đếm hết số bào tử thu được bằng đĩa đếm (thể tích 3ml) dưới kính lúp soi nổi theo Brundrett và đồng tác giả (1996) và TCVN 12560-1:2018.

+ Nhuộm PVLG + Melzer quan sát bào tử AMF: cho một giọt dịch thuốc nhuộm (PVLG + Melzer tỉ lệ 1:1) lên lam kính, cho bào tử AMF cần quan sát vào dịch nhuộm, để yên khoảng 5 phút cho khô bề mặt. Sau đó dùng lamen đặt lên giọt dịch đã có bào tử AMF, quan sát cấu trúc bào tử dưới kính hiển vi và định danh dựa vào các đặc điểm hình thái gồm: hình dạng bào tử, cuống bào tử, số lớp của vách, màu sắc (Brundrett et al., 1996).

- *Xử lý số liệu:*

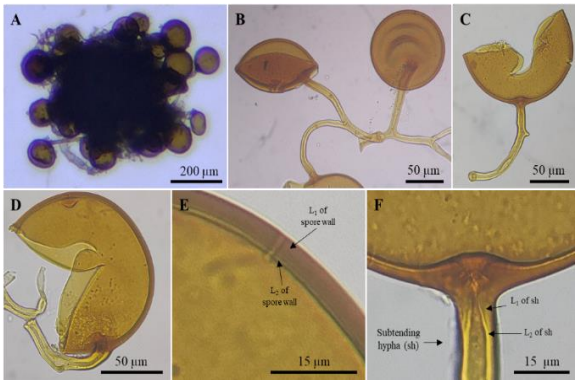
Số liệu được nhập và xử lý bằng phần mền Excel. Các số liệu xử lý thống kê ANOVA và trắc nghiệm phân hạng bằng phần mềm MINITAB 1.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hình thái AMF (chi *Glomus* sp.)

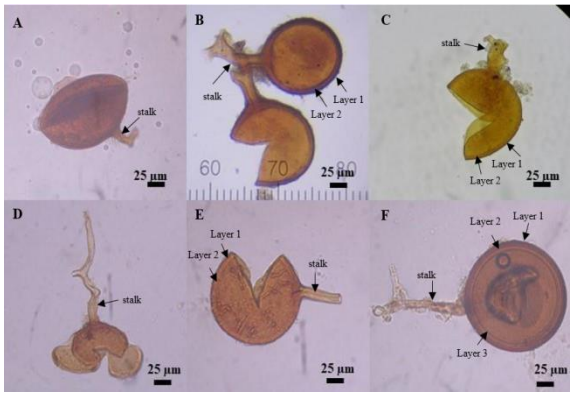
Nấm AM (chi *Glomus* sp.) được tiến hành lấy từ phòng lưu trữ giống thuộc Phòng Thí nghiệm Công nghệ vi sinh, Viện Nghiên cứu Công nghệ sinh học và Môi trường được tiến hành quan sát hình thái bào tử nhằm để xác định

lại hình thái của chi *Glomus* sp. (hình 1,2), nhận thấy các dạng kiểu hình với các đặc điểm như sau: bào tử hình cầu hoặc gần như hình cầu hoặc bào tử vô định hình, hơi nhọn ở điểm gắn với cuống bào tử, kích thước bào tử trung bình từ 90 – 130 µm.



Hình 1. Đặc điểm tổng quát các dạng kiểu hình của bào tử chi *Glomus* sp.

(A: Hình dạng bào tử dưới kính hiển vi soi nổi, B-F: Bào tử chụp dưới kính hiển vi khi nhuộm với PVLG và Melzer)



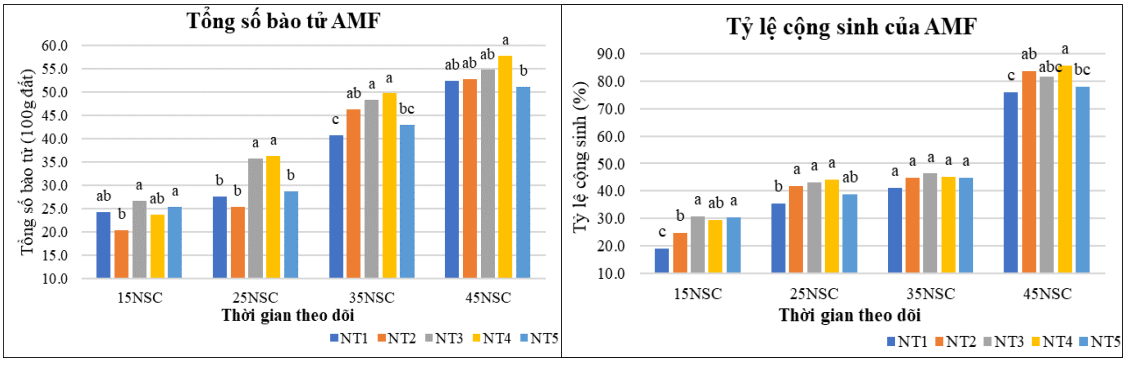
Hình 2. Đặc điểm chi tiết của kiểu hình bào tử chi *Glomus* sp.

(A: Hình dạng bào tử dưới kính soi nổi; B – F: Bào tử chụp dưới kính hiển vi khi nhuộm với PVLG và Melzer; E: Cấu trúc thành bào tử; F: Cấu trúc cuống bào tử)

Màu sắc thay đổi theo độ tuổi khi còn non có màu trắng, khi trưởng thành thường có màu cam đến nâu đỏ. Dưới kính hiển vi với độ phóng đại 400 lần, thành bào tử khá dày (2,3 - 3,8 µm), có lớp rõ rệt (1 - 3 lớp), thành dày lên khi gần cuống, thường thành có hai hoặc nhiều lớp. Cuống bào tử thẳng, kích thước 10,6 - 12,4 µm hình trụ, hoặc gần trụ, vuông gốc với bào tử. Gồm bào tử đơn lẻ hoặc bào tử dạng chùm. Bào tử có dạng hình cầu hoặc gần hình cầu, màu vàng nhạt đến vàng cam, mọc thành chùm hoặc rời rạc. Bề mặt bào tử trơn, nhẵn, kích thước bào tử khoảng 91,8 – 112,8 µm, cuống bào tử (subtending hypha) thẳng kích thước khoảng 10,6 – 12,4 µm, đính vuông gốc với thành bào tử. Thành bào tử gồm 2 lớp, lớp thứ 1 dày 2,3 – 3,8 µm, được cấu tạo bởi nhiều lớp con (laminae) sát nhau; lớp thứ 2 dày khoảng 0,6 – 1,0 µm. Bào tử nảy mầm qua thành bào tử bởi ống mầm. Cổ cuống bào tử có dạnh hình phễu với độ sâu khoảng 4,3 µm. Hình dạng bào tử nấm quan sát có đặc điểm phù hợp với đặc điểm của bào tử chi nấm *Glomus* sp. đã được Brundrett và đồng tác giả (1996), Gerdemanm và Trappe (1974), INVAM (https://invam.ku.edu/) công bố.

Ảnh hưởng của các hàm lượng P_2O_5 khác nhau đến tổng số bào tử và tỷ lệ cộng sinh của AMF

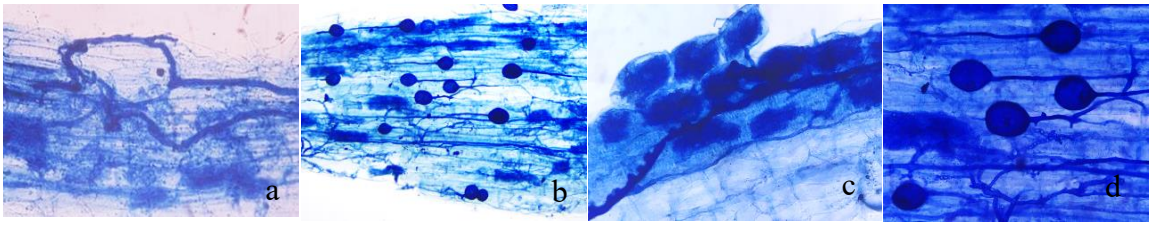
Qua hình 3, cho thấy tổng số bào tử AMF và tỷ lệ cộng sinh của AMF tăng lên rõ theo thời gian theo dõi trong 45 ngày. Ở thời điểm 15 ngày sau chủng (NSC) nấm AM, NT1 có tổng số bào tử cao hơn NT2, và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn lại. Ở giai đoạn theo dõi 25 – 35 NSC thì giữa các nghiệm thức bắt đầu có sự khác biệt về tổng số bào tử AMF. Thời điểm 45 NSC, nghiệm thức NT4 chứa 100 mg/kg P_2O_5 có tổng số bào tử AMF (57,7 bào tử/100 gam đất) cao nhất và nghiệm thức NT5 (200 mg/kg) cho tổng số bào tử AMF thấp nhất (51 bào tử/100 gam đất). Theo Nguyễn Thu Trang và đồng tác giả (2017), xác định bào tử nấm AM trong đất trồng cam tại Cao Phong, Hòa Bình dao động 73 – 248 bào tử/50 g đất. Sự khác biệt về mật số bào tử trong các nghiên cứu được ghi nhận có thể do đặc điểm của đất và điều kiện khí hậu của từng vùng địa lý khác nhau.



Hình 3. Tổng số bào tử và tỷ lệ cộng sinh của AMF trên cây ngô ở các giai đoạn theo dõi

(Các ký tự trên mỗi cột trong biểu đồ khác nhau biểu thị cho sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê)
(NT: Nghiệm thức, NSC: Ngày sau chủng)

Tỷ lệ cộng sinh của nấm AM khá thấp (19% - 46,3%) ở các giai đoạn theo dõi 15 - 35 NSC và thời điểm 35 NSC không có sự khác biệt có ý nghĩa về thống kê giữa các nghiệm thức. Ở giai đoạn 45 NSC, tỷ lệ cộng sinh của AMF với cây ngô tăng lên nhanh, mạnh rất nhiều so với thời gian theo dõi 15-35 NSC, nghiệm thứ NT4 chứa 100 mg/kg P_2O_5 có tỷ lệ cộng sinh cao nhất (85,7%) so với các nghiệm thức còn lại, nghiệm thức NT1(0 mg/kg P_2O_5) và NT5 chứa 200 mg/kg P_2O_5 cho tỷ lệ cộng sinh thấp nhất, lần lượt (74,6% và 78 %).Theo Trần Thị Dạ Thảo (2012) với nguồn chủng ban đầu là bào tử nấm, khoảng 2 - 3 ngày sau khi sợi nấm tiếp xúc với rễ cây chủ thì các giác bám hình thành và tạo thành điểm xâm nhập vào rễ cây chủ, từ điểm xâm nhiễm, sợi nấm đi vào trong sau đó phân nhánh, sợi nấm già thường có vách ngăn với bụi phân nhánh nhỏ, đôi khi dày đặc trong tế bào rễ. Túi được hình thành có vách dày, thường có hình cầu, bầu dục hoặc bất định và nghiên cứu của tác giả cũng cho thấy nấm AM bắt đầu cộng sinh từ 15 NSC và tăng dần đến 40 NSC. Theo Trần Văn Mão (2004), tỷ lệ cộng sinh của nấm trong rễ ngô đạt 23 - 27% sau 2 tuần. Hình 4 cho thấy các kiểu cộng sinh của AMF với rễ cây ngô theo dạng sợi nấm, bụi và túi khi được nhuộm màu với thuốc thử trypan blue. Tỷ lệ cộng sinh cũng thay đổi theo lượng phân lân bón vì với lượng phân lân quá cao hay quá thấp đều hạn chế sự thiết lập quan hệ cộng sinh của nấm AM với cây ngô do sự phát triển hệ sợi nấm ngoại biên bị ức chế (Swift, 2004). Do đó, chọn hàm lượng P_2O_5 là 100 mg/kg cho các thí nghiệm đánh giá sinh trưởng của cây ngô.



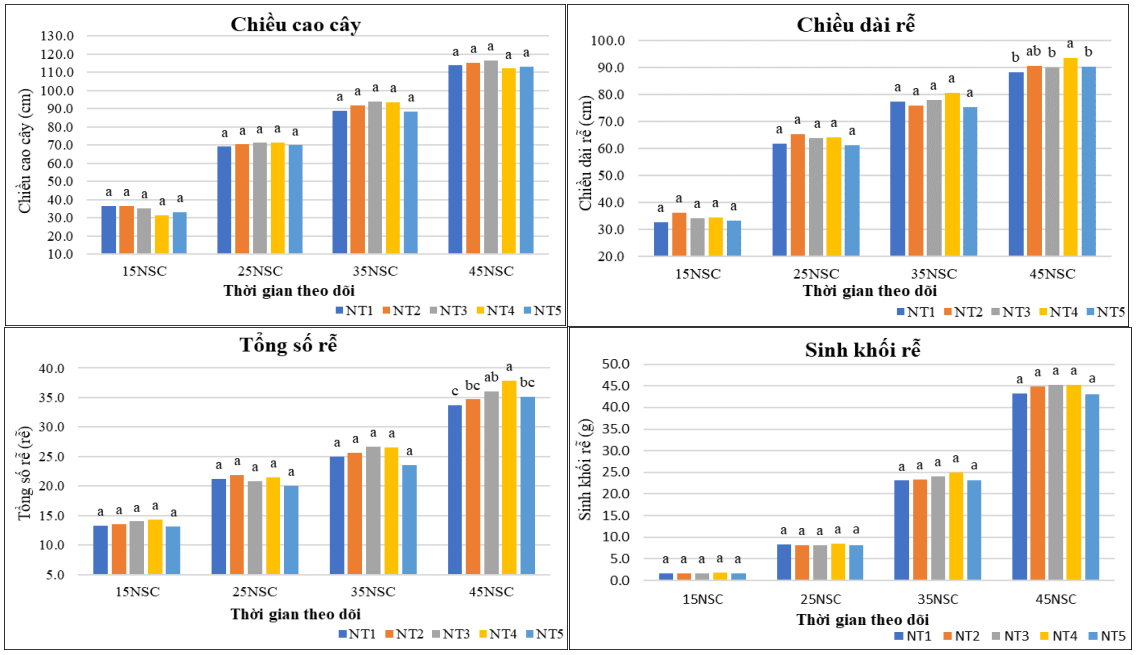
Hình 4. Cấu trúc nấm AM cộng sinh vào mô rễ cây ngô

a, b: Đoạn rễ có sợi nấm AM cộng sinh; c: Bụi; d: Túi

Ảnh hưởng của các hàm lượng P_2O_5 khác nhau đến sự sinh trưởng của cây ngô

Kết quả trên hình 5 cho thấy các nghiệm thức đánh giá chiều cao cây, chiều dài rễ, tổng số rễ, sinh khối rễ ở giai đoạn 15, 25, 35, 45 sau khi bổ sung nấm AM và P_2O_5 ở các hàm lượng khác nhau. Ở nghiệm thức 15, 25, 35, 45 NSC sử dụng P_2O_5 ở các hàm lượng khác nhau thì chiều cao cây và sinh khối rễ cây phát triển tốt theo thời gian tuy nhiên giữa các nghiệm thức cùng một thời gian theo dõi không có sự khác biệt có ý nghĩa về chiều cao. Chiều dài rễ và tổng số rễ ở nghiệm thức giai đoạn 15, 25, 35, 45 NSC sử dụng P_2O_5 ở các hàm lượng khác nhau thì chiều dài rễ phát triển tốt theo thời gian. Ở giai đoạn 15 - 35 NSC, chiều dài rễ, tổng số rễ giữa các nghiệm thức cùng một thời gian theo dõi không có sự khác biệt có ý nghĩa về thống kê. Ở thời gian theo dõi 45 NSC, chiều dài rễ và tổng số rễ giữa các nghiệm thức có sự khác biệt có ý nghĩa trong thống kê, đặc biệt nghiệm thức NT4 chứa hàm lượng P_2O_5 100 mg/kg cho chiều dài rễ, sinh khối rễ tốt nhất.

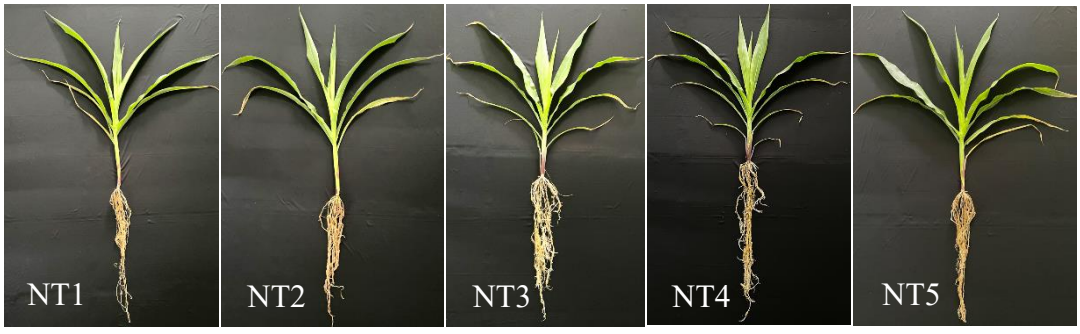
Hình 6 cho thấy hình ảnh cây ngô giai đoạn 45 NSC có chiều dài rễ và các rễ con phát triển vượt trội so với các nghiệm thức còn lại. Theo Trần Thị Dạ Thảo (2012) đã nghiên cứu tác động của nấm nội cộng sinh và phân lân đến sinh trưởng và năng suất ngô (*Zea mays* L.) trên đất nâu đỏ tỉnh Bình Phước, kết quả cho thấy mặc dù bổ sung nấm nội cộng sinh không có ảnh hưởng đến thời gian sinh trưởng của ngô nhưng giúp tăng năng suất, giúp cây hấp thu lân cao hơn. Việc cộng sinh của AMF vào rễ thực vật bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố trong đó có tác động từ cây ký chủ hay độ che phủ của thực vật, loài AMF, đặc biệt cây ngô được biết là cây ký chủ để nhân sinh khối nấm AM, vì thế, khả năng xâm nhiễm của AMF sẽ phụ thuộc vào từng giai đoạn phát triển của cây, hàm lượng dinh dưỡng bón cho cây ngô, trong đó AMF xâm nhập vào rễ non dễ dàng hơn so với rễ già. Theo Nguyễn Vũ Phong và đồng tác giả (2021) khi giâm hom tiêu trên giá thể có bổ sung AMF (250 bào tử/500g giá thể) cho kết quả chiều cao hom, số lá, số lượng rễ và khối lượng rễ tươi cao hơn so với đối chứng không có chủng AMF, ở thời gian 30 ngày sau chủng nấm AM.



Hình 5. Chiều cao cây, chiều dài rễ, tổng số rễ và sinh khối rễ trên cây ngô ở các giai đoạn theo dõi

(Các ký tự trên mỗi cột trong biểu đồ khác nhau biểu thị cho sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê)

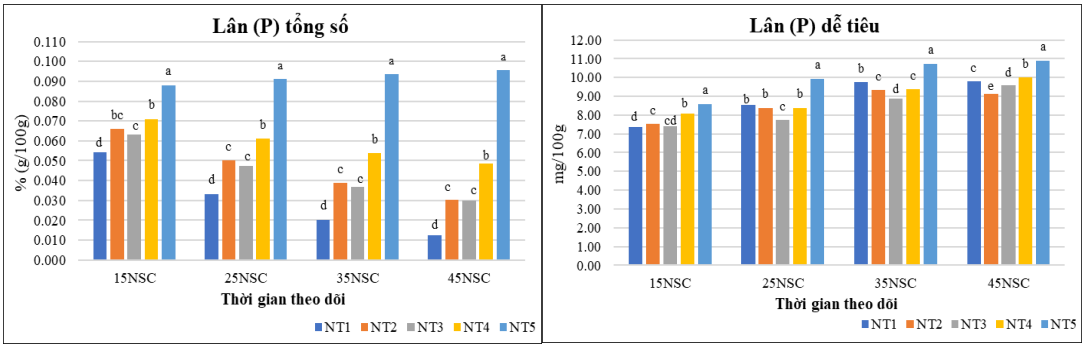
(NT: Nghiệm thức, NSC: Ngày sau chủng)



Hình 6. Rễ của cây ngô ở thời điểm 45 ngày sau khi gieo hạt và bổ sung nấm AM vào chậu trong nhà lưới

Hàm lượng dinh dưỡng của đất trồng ngô sau khi bổ sung AMF và các hàm lượng P_2O_5 khác nhau

Hình 7 cho thấy khả năng sử dụng P cho quá trình nhân sinh khối cây ngô của các giai đoạn theo dõi. Ở giai đoạn 15 NSC, lượng P_2O_5 tổng số cao ở tất cả các nghiệm thức và ở các giai đoạn theo dõi 25,35,45 NSC, hàm lượng lân tổng số trong đất trồng cây ngô của NT1 đến NT4 có giảm xuống dần theo thời gian, riêng ở NT5 hàm lượng P_2O_5 không giảm mà tăng nhẹ ở các giai đoạn theo dõi. Nghiệm thức NT1 không có bổ sung P_2O_5 cho thấy hàm lượng P_2O_5 tổng số giảm rõ rệt, từ 0,054% còn 0,012%, chứng tỏ nấm AM có sử dụng lân trong đất để chuyển hóa. Ngược lại, hàm lượng lân dễ tiêu trong các nghiệm thức tăng dần theo các giai đoạn trong quá trình nhân sinh khối ngô, tăng lên điều này chứng tỏ nấm AM đã hoạt động chuyển hóa lân tổng số thành lân dễ tiêu giúp cho quá trình cây hấp thụ dinh dưỡng tốt hơn. NT1 không bổ sung P_2O_5 cho thấy hàm lượng P dễ tiêu cũng tăng theo thời gian, cho thấy việc không bổ sung lân vào cây trồng, nấm AM sẽ lấy hàm lượng P tổng số có trong đất để chuyển hóa làm P dễ tiêu cho cây sử dụng. Đối với cây ngô, lân là dinh dưỡng rất quan trọng do lân có vai trò dự trữ và vận chuyển năng lượng, giúp cây trồng tổng hợp tinh bột, đường, làm tăng năng suất cũng như phẩm chất ngô. Nấm AM có mối tương quan nghịch với hàm lượng lân hữu dụng có nghĩa là hàm lượng dinh dưỡng trong đất càng cao thì việc ức chế khả năng xâm nhiễm của chúng vào bên trong tế bào rễ càng tăng (Sức *et al.,* 2006).



Hình 7. Hàm lượng P_2O_5 tổng số và P_2O_5 dễ tiêu trong đất trồng ngô ở ở các giai đoạn theo dõi

(Các ký tự trên mỗi cột trong biểu đồ khác nhau biểu thị cho sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê)

(NT: Nghiệm thức, NSC: Ngày sau chủng)

KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu, cho thấy tổng số bào tử AMF trong đất và tỷ lệ cộng sinh của AMF với rễ cây ngô có xu hướng tăng khi bổ sung hàm lượng P_2O_5 từ 25 mg/kg – 100 mg/kg, khác biệt rõ nhất ở giai đoạn 45 ngày sau khi chủng nấm AM (chi *Glomus* sp.), và khi tăng hàm lượng P_2O_5 lên 200 mg/kg thì tổng số bào tử AMF và tỷ lệ cộng sinh của AMF với cây ngô cũng giảm. Kết quả của nghiệm thức NT4 có bổ sung hàm lượng P_2O_5 là 100 mg/kg đất có chỉ tiêu tổng số bào tử AMF (57,7 bào tử/50 gam đất) và tỷ lệ cộng sinh AMF với rễ cây ngô (85,7%) cao hơn so với bốn nghiệm thức còn lại. Nghiệm thức NT4 có chỉ tiêu sinh trưởng là chiều dài rễ, tổng số rễ tốt hơn bốn nghiệm thức còn lại ở giai đoạn theo dõi là 45 ngày sau khi chủng AM. Các chỉ tiêu sinh trưởng là chiều cao cây và sinh khối rễ ở các giai đoạn theo dõi giữa các nghiệm thức không có sự khác biệt ý nghĩa trong thống kê.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ về kinh phí của Bộ Giáo dục và Đào tạo từ đề tài "Nghiên cứu nấm nội cộng sinh AM (Arbuscular Mycorrhiza) trên cây bưởi da xanh và quy trình sản xuất, ứng dụng chế phẩm sinh học từ nấm AM trong sản xuất bưởi da xanh", mã số B2023-NLS-05. Và sự hỗ trợ về máy móc, trang thiết bị, nhà lưới của Viện Nghiên cứu Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh. Nhóm tác giả xin trân trọng cám ơn.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bolan N S (1991). A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant and soil*, *134*(2): 189-207.

Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, and Malajczuk N (1996). *Working with mycorrhizas in forestry and agriculture*. Canberra, Australian Centre for International Agricultural Research, 32,

Dalpe Y, and Monreal M (2004). Arbuscular mycorrhiza inoculum to support sustainable cropping systems.*Crop management*, *3*(1): 1-11.

Gerdemann JW and Trappe JM (1974). The Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Mycologia Memoir,* 5:1 - 76.

Jakobsen I (1999). *Transport of phosphorus and carbon in arbuscular mycorrhizas. In Mycorrhiza*. Springer, Berlin, Heidelberg,: 305-332.

Nguyễn Thu Trang, Trần Thị Tuyết Thu và Nguyễn Viết Hiệp (2017). Nghiên cứu sự phân bố của bào tử nấm rễ nội cộng sinh Arbuscular Mycorrhiza Fungi (AMF) trong đất trồng cam ở huyện Cao Phong, tỉnh Hòa Bình. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Các Khoa học Trái đất và Môi trường*, 33(1S):235-242

Nguyễn Văn Sức, Bùi Quang Xuân, Nguyễn Viết Hiệp và Trần Thị Thu Anh (2006). Ảnh hưởng của 3 chủng nấm Mycorrhiza: SHM 04 - DH 16, SHM 04 - DH 47 và SHM 04 - TC 139 đối với khả năng hút chất dinh dưỡng và sinh trưởng của cây ngô LVN 10 trên đất bạc màu Bắc Giang, *Tạp Chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn* số 11:33-37

Nguyễn Vũ Phong, Vũ Trung Kiên, Trần Kiên và Hà Thị Trúc Mai (2021). Đặc điểm hệ nấm nội cộng sinh rễ cây hồ tiêu (*Piper nigrum* L.) ở một số tỉnh phía Nam. *Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam* 63 (9), p 44- 47. DOI: 10.31276/VJST.63(9):44-47.

Phillips JM and Hayman DS (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br, mycol. Soc*, 55: 158 - 161.

Swift C E (2004). Mycorrhiza and soil phosphorus levels. *Colorado State University. Cooperation Extention*, 1-4.

Trần Thị Dạ Thảo (2012). Nghiên cứu sự cộng sinh của nấm Mycorrhiza trên cây ngô (Zea mays L.) vùng Đông Nam Bộ. *Luận án Tiến sĩ Nông nghiệp, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh*, 147 trang.

Trần Văn Mão (2004). *Sử dụng vi sinh vật có ích tập 2*. Nhà xuất bản nông nghiệp, Hà Nội, Việt Nam, 120 trang.

EVALUATION OF THE EFFECT OF PHOSPHATE FERTILIZER CONTENT ON THE SYMBIOSIS OF ARBUSCULAR MYCORRHIZA FUNGI ON MAIZE ROOTS UNDER NET HOUSE CONDITIONS

Truong Phuoc Thien Hoang[1*], Nguyen Cao Hoang Hai [2], Vu Ngoc Khanh Nhu[1], Vo Tran Quoc Thang[1], Huynh Thi Ngoc Oanh[1], Tran Trong Nghia[3], Đao Uyên Tran Da[1]

[1]Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University, HCMC, Viet Nam

[2]Faculty of Biological Sciences, Nong Lam University, HCMC, Viet Nam

[3]Thanh Thanh Cong Sugarcane Research and Application Company Limited, Tay Ninh

SUMMARY

The objective of the study was to evaluate the effects of different phosphate fertilizer contents on the symbiotic ratio of Arbuscular mycorrhiza fungi (AMF), especially *Glomus* sp., on maize roots under net house conditions in order to determine the appropriate phosphate fertilizer content (P_2O_5) to obtain the number of AMF spores and the high ratio of symbiotic AMF on corn roots, collect root biomass for application in the production process of AMF, and create bioproducts containing AMF for crops. The experiment was arranged single-factor, completely randomized, with 5 experiments with 5 levels of P_2O_5, such as 0 mg/kg (NT1), 25 mg/kg (NT2), 50 mg/kg (NT3), 100 mg/kg (NT4), and 200 mg/kg (NT5), surveyed at the follow-up phases of 15, 25, 35, and 45 days after the AMF inoculation. Experimental results showed that the treatment adding P2O5 content of 100 mg/kg of soil had the number of total AMF spores (57.7 spores/50 grams of soil) and the rate of AMF symbiosis with corn roots (85.7%) higher than the remaining. In addition, the treatment supplemented with a P2O5 content of 100 mg/kg of soil had a better root length and total number of roots than the other four treatments during the 45-day monitoring period after AM inoculation. Growth indicators such as plant height and root biomass at monitoring stages between treatments did not have statistically significant differences.

Keywords: Arbuscular mycorrhiza, Corn plant, *Glomus*, Phosphate fertilizer, P_2O_5.

[*] Author for correspondence: Tel: +84-903975795; Email: hoangtp@hcmuaf.edu.vn

INVESTIGATION OF THE GROWTH CAPABILITY AND PHYCOCYANIN ACCUMULATION OF *ARTHROSPIRA PLATENSIS* UNDER VARYING NUTRITIONAL ENVIRONMENTS

Tran Ngoc Han, Nguyen Hoai Bao Ngoc, Nguyen Thi Kieu Duyen, Pham Thanh Cong, Nguyen Thi Van Anh, Huynh Vinh Khang*

Faculty of Biological Sciences – Nong Lam University Ho Chi Minh City

SUMMARY

Arthrospira platensis is a valuable source of diverse minerals and essential amino acids, enriched with antioxidants such as chlorophyll and phycocyanin, known to enhance health and boost the immune system. This study aimed to assess the growth capability and phycocyanin accumulation of *A. platensis* under varying environmental conditions, including different concentrations of NaCl, IAA supplementation, and their combined effects in Zarrouk medium. The results indicated that after 10 days of cultivation at 28-30°C, with a light intensity of 3500-4000 lux and pH 9, the highest fresh biomass of *A. platensis* was achieved in the medium supplemented with 1 mg/L IAA, reaching 8.45 ± 0.286 g. The highest phycocyanin accumulation occurred in the medium supplemented with 100 mM NaCl, reaching 9.81 ± 0.36 mg/g. Simultaneously, parallel investigations explored phycocyanin extraction using a 1.5% $CaCl_2$ solvent, yielding the highest concentration of 19.71 ± 2.50 mg/g with ultrasonic assistance. These findings underscore that supplementing Zarrouk medium with 100 mM NaCl and 1 mg/L IAA enhances both fresh biomass and phycocyanin content in *A. platensis*. This approach holds promise for applications in research focused on maximizing biomass production and phycocyanin yield in *A. platensis*.

Keywords: Arthrospira platensis, Fresh biomass, Phycocyanin, Pigments, Zarrouk medium.

INTRODUCTION

Arthrospira platensis, commercially known as *Spirulina platensis*, is a genus of *Cyanobacteria* characterized by photosynthetic, filamentous, helical-shaped, multicellular structures. Typically measuring between 50-500 µm in length and 3-12 µm in diameter, it thrives in alkaline environments with high temperatures and strong sunlight (Akbarnezhad *et al*., 2020*;* Wan *et al.,* 2016*).* It has high protein content (up to 70%) and significant amounts of essential fatty acids, amino acids, minerals, vitamins, and antioxidant pigments such as Chlorophyll-a (Chl-a), Carotenoids (Cart), Phycocyanin (PC) and polysaccharides. These components have potential health-promoting benefits and applications in non-communicable diseases such as diabetes mellitus, hyperlipidemia, oxidative stress-induced diseases, inflammations, allergies, hypertension, and some types of cancer (Lafarga *et al.,* 2020). The growth and accumulation of biological pigments in *A. platensis* are influenced by various factors in the culture medium, including light, high pH, salinity, temperature and nutrient composition such as Indole-3-acetic acid (IAA) and sodium chloride (NaCl). These factors impact the growth stages of *A. platensis*, altering the composition and ratio of pigments (Jasuja, 2014). This study aims to explore the effects of nutritional factors in the culture medium, specifically IAA, NaCl, and their combinations, on the growth, biomass accumulation, and pigment production (Chl-a, Cart, PC) of *A. platensis.* The research provides insights into enhancing the production of nutrient-rich foods derived from microalgae.

MATERIALS AND METHODS

Materials: *A. platensis* was obtained from the Research Institute for Aquaculture No.2 (Ho Chi Minh City, Vietnam) and stored at 4°C. Before each experiment, the microalgae were inoculated for 10-14 days in 500 mL of Zarrouk medium (Zarrouk, 1966) to achieve an optical density (OD) of approximately 1.0 at 680 nm. All containers were continuously aerated and maintained at 30 ± 2°C under continuous white fluorescent illumination at an intensity of 3500-4000 lux.

Methods

Investigation of suitable solvents for the extraction of C-Phycocyanin from A. platensis

The ultrasound-assisted method represented an advanced scientific method in research and industrial applications. This technique employed ultrasound equipment comprising a transducer and a reaction vessel to

generate high-frequency waves, effectively disrupting algae cells and liberating phycocyanin into the processing medium. This approach was characterized by its rapidity, efficiency, and preservation of the biological activity of phycocyanin, thereby ensuring optimal yield and quality of the final product. (Zhang *et al*., 2017).

The microalgae suspension was centrifuged at 4000 rpm at room temperature and washed twice with distilled water. Then, 1 g of fresh sample was extracted using 1.5% $CaCl_2$ solution, 0.1 M phosphate buffer (pH 7), and distilled water with an algae ratio of 1:100 (g/mL). The tubes were then frozen at -20°C for 24 hours. After thawing, the sample was sonicated at 120 W/40 kHz for 10 minutes at 20°C using an ultrasound device (WUC-32, Jiayuanda, China), followed by centrifugation at 4000 rpm for 10 minutes, performed in triplicate. The supernatant was collected and OD values of the microalgae suspension were measured on days 3, 5, and 10.

Investigating the effects of NaCl and IAA on the fresh biomass of A. platensis

The chemical compositions of Zarrouk medium includes (g/L): $NaHCO_3$ 16.8; NaCl 1.0; $NaNO_3$ 2.5; K_2HPO_4 0.5; K_2SO_4 1.0; EDTA 0.08; $MgSO_4.7H_2O$ 0.2; $FeSO_4.7H_2O$ 0.01; $CaCl_2.2H_2O$ 0.04 and micronutrient A5 1 mL (g/mL: H_3BO_3 286; $MnSO_4.7H_2O$ 250; $ZnSO_4.7H_2O$ 22.2; $CuSO_4.5H_2O$ 7.9; $NaMoO_4.2H_2O$ 2.1.

The experiment was divided into four groups: (1) Zarrouk medium; (2) Zarrouk medium supplemented with 100 mM NaCl equivalent to 4.87 g/L NaCl; (3) Zarrouk medium supplemented with 1 mg/L IAA prepared by dissolving 10 mg of IAA in 1M KOH; (4) Zarrouk medium supplemented with 100 mM NaCl and 1 mg/L IAA. Each treatment was conducted in triplicates. All containers were continuously aerated and maintained at 30 ± 2°C under continuous fluorescent illumination at an intensity of 3500-4000 lux. Biomass samples were collected on days 5 and 10 for analysis.

Fresh algae biomass was collected by filtering through 50-µm nylon membranes on days 5 and 10 of cultivation. Each experimental group underwent triple filtration to maximize biomass recovery. Subsequently, the fresh algal biomass from each treatment was weighed and the fresh biomass was recorded.

Analysis of phycocyanin, chlorophyll a, and carotenoids content

The concentration of phycocyanin was determined using molecular absorption spectroscopy equipment (Model 752N, Jenway, England), the extracts in the solvents were measured for absorbance at wavelengths of 620 nm and 652 nm as described by Bennett and Bogorad (1973) and Silveira và đồng tác giả *(*2007). Chlorophyll a and carotenoid were measured for absorbance at wavelengths of 665, 652 and 470 nm following the method described by Xiong và đồng tác giả *(*2017).

Statistical analysis

Data were presented as mean ± standard deviation (n = 3). Statistical significance was determined using one-way ANOVA with GraphPad Prism 9.5 software, with a significance level of *p-values < 0.05*. Charts and figures were created using GraphPad Prism 9.5 software.

RESULTS AND DISCUSSION

Selecting the appropriate solvent for extracting phycocyanin from A. platensis

Fresh *A. platensis* biomass were extracted using various solvents, including 1.5% $CaCl_2$ solution, 0.1 M phosphate buffer (pH 7), and distilled water at a ratio of 1 g algae per 100 mL of each solvent. After three consecutive extraction cycles, 1.5% $CaCl_2$ solution exhibited the highest phycocyanin yield, with mean values of 14.38 ± 3.31 mg/g, 4.28 ± 1.52 mg/g and 2.15 ± 0.55 mg/g, respectively. Phycocyanin productivity from distilled water was significantly lower compared to 1.5% $CaCl_2$, with average values of 2.97 ± 0.77 mg/g, 10.68 ± 1.68 mg/g, and 1.01 ± 0.57 mg/g. Yield from phosphate buffer solution was also lower than from 1.5% $CaCl_2$, with average values of 0.92 ± 0.18 mg/g, 9.78 ± 0.11 mg/g, and 3.08 ± 1.05 mg/g. Statistical analysis showed no significant difference among the three solvents after three extraction cycles ($p < 0.05$) (Figure 1). However, the total phycocyanin yield obtained from 1.5% $CaCl_2$ was higher than from distilled water and phosphate buffer (Figure 2) and this difference was statistically significant ($p < 0.05$). This finding aligned with İlter và đồng tác giả (2018), who investigated the extraction of phycocyanin using various solvents. They found that 1.5% $CaCl_2$ solvent yielded the highest amount of phycocyanin when using frozen algal biomass and a ratio of 1 g algae: 100 mL solvent.

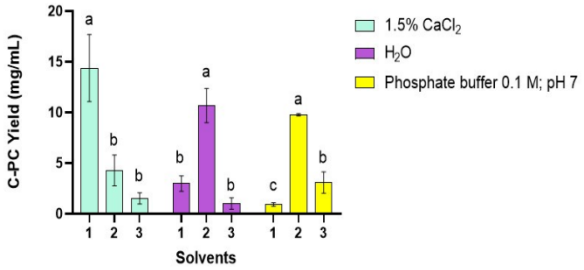


Figure 1. Phycocyanin yields after three cycles of extraction

In the same extraction cycle, columns topped by different letters are significantly different from each other ($p < 0.05$).

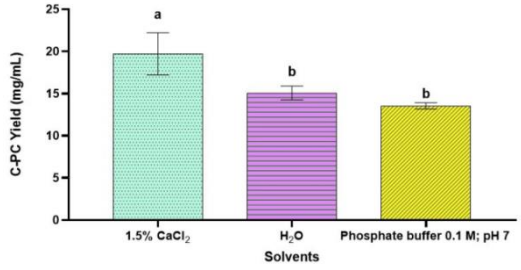


Figure 2. Total phycocyanin yields after three cycles of extraction

Columns topped by different letters are significantly different from each other ($p < 0.05$).

Efficiency of 1.5% $CaCl_2$ in Phycocyanin Extraction from A. platensis Using Ultrasound-Assisted Method

This study demonstrates that 1.5% $CaCl_2$ solution is the most effective solvent for extracting phycocyanin from *A. platensis* using ultrasound-assisted extraction. This effectiveness is attributed to $CaCl_2$'s appropriate ion strength, which facilitates phycocyanin dissolution without compromising the algae cell structure. In contrast, while distilled water effectively disrupts algae cells, it can also degrade phycocyanin, leading to lower extraction yields.

Phosphate buffer solution, though gentler on algal cells compared to distilled water, may form complexes with phycocyanin, thereby reducing extraction efficiency. In a study by İlter và đồng tác giả (2018), it was found that 1.5% $CaCl_2$ does not disrupt the cell structure of *A. platensis* algae (Figure 3). The efficacy of 1.5% $CaCl_2$ is likely due to its specific ion strength, capable of dissolving sodium-calcium channels without compromising the overall cell structure. In contrast, distilled water results in a deep blue color due to complete cell disruption by ultrasound, releasing all synthesized pigments within the cells. Despite its higher ion density, phosphate buffer solution (pH 7) causes less cell disruption compared to distilled water (Figure 3) (İlter *et al.*, 2018). Therefore, 1.5% $CaCl_2$ solution was selected as the preferred extraction solvent for achieving the highest phycocyanin content compared to the other two solvents. Subsequently, the 1.5% $CaCl_2$ solution was chosen for further experiments at a ratio of 1 g algae per 100 mL solvent using the ultrasound-assisted extraction method.

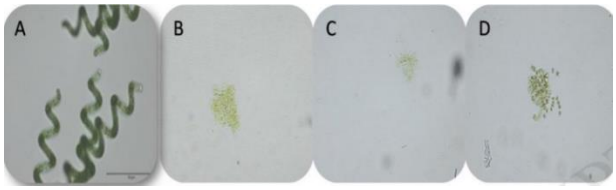


Figure 3. Microscopic images of *A. platensis* biomass extracted with three different solvents

(A): non-extracted A. platensis, (B): A. platensis extracted with sodium phosphate buffer (pH 7.4), (C): A. platensis extracted with distilled water, and (D): A. platensis extracted with 1.5% $CaCl_2$ solution (İlter *et al.*, 2018).

Investigating the effects of NaCl and IAA on fresh biomass of A. platensis

The standard cultivation medium: In the standard Zarrouk medium, *A. platensis* showed consistent growth, yielding 4.309 ± 0.1028 g and 7.596 ± 0.245 g of fresh biomass on days 5 and 10, respectively (Figure 4). After 5 days, biomass was higher without IAA supplementation compared to 1 mg/L IAA (4.309 ± 0.1028 g versus 2.236 ± 0.139 g), indicating stable growth without IAA.

The impacts of NaCl: *A. platensis* could tolerate up to 100 mM (equivalent to 5.8‰) NaCl without significant biomass reduction. Over 10 days, the fresh biomass obtained in the 100 mM NaCl treatment were 4.42 ± 0.418 g and 6.652 ± 0.461 g on days 5 and 10 (Figure 4), showing statistical significance ($p < 0.05$). Biomass was lower in the treatment containing only 100 mM NaCl compared to that in the treatment with both 100 mM NaCl and 1 mg/L IAA (6.652 ± 0.461 g *versus* 8.193 ± 0.173 g). This study highlighted that while NaCl supports stable growth, optimal biomass production requires IAA supplementation. Similarly, the research by Yu *et al.* (2024) also found that the salinity of the culture environment significantly improved the content and yield of phycocyanin. Evidence of this was that when adding 100 mM NaCl, the highest biomass content (1.89 g/L) and phycocyanin yield (30.61 mg/L) were achieved after 10 days of cultivation.

The impacts of IAA: The addition of 1 mg/L IAA had contrasting effects on *A. platensis* growth. By day 5, the algae exhibited reduced growth with a fresh biomass of 2.236 ± 0.139 g (Figure 4), which was significantly lower

compared to the nutrient-unamended control ($p < 0.05$). However, by day 10, biomass in the IAA-supplemented medium had increased substantially to 8.45 ± 0.286 g (Figure 4), surpassing the control biomass of 7.596 ± 0.245 g. The cost-effective nature of IAA supplementation proved beneficial in enhancing *A. platensis* biomass, which could be advantageous for future biomass production studies.

Combined effect of NaCl and IAA: Simultaneous supplementation of 100 mM NaCl and 1 mg/L IAA had notable effects on *A. platensis* growth. After 5 days, the algae reached their highest fresh biomass in the nutrient-unamended control supplemented with both NaCl and IAA, achieving 5.314 ± 0.242 g (Figure 4) with significant differences observed ($p < 0.05$). By day 10, biomass in this combined supplement condition further increased to 8.193 ± 0.173 g, demonstrating superior growth compared to the control supplemented with NaCl alone (6.652 ± 0.461 g). The synergistic effects of these supplements significantly boosted biomass production, highlighting potential applications in future research.

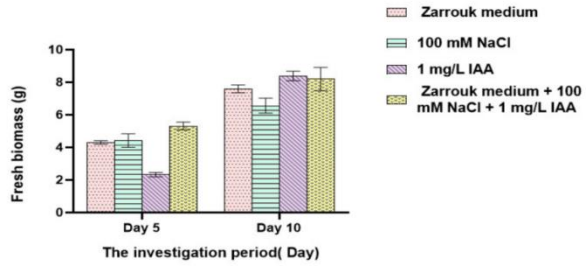


Figure 4. Fresh biomass accumulation of *A. platensis* over cultivation time

Analysis of phycocyanin, chlorophyll-a and carotenoid contents

Phycocyanin content: On days 5 and 10 of cultivation (Figure 5), *the* phycocyanin productivity in the treatment supplemented with 100 mM NaCl were 5.72 ± 0.06 mg/g and 9.81 ± 0.36 mg/g, respectively. In contrast, the treatment supplemented with 1 mg/L IAA exhibited the lowest phycocyanin accumulation of 4.69 ± 0.427 mg/g on day 5 and 6.813 ± 0.505 mg/g on day 10. Additionally, phycocyanin accumulation in the treatment supplemented with both 100 mM NaCl and 1 mg/L IAA showed relatively stable growth, with values of 5.91 ± 0.16 mg/g and 8.98 ± 0.233 mg/g on days 5 and 10, respectively. Rangkuti và đồng tác giả (2023) also found that a salinity range of 5-10‰ was the most optimal for increasing phycocyanin accumulation in algae, which was similar to the salt concentration used in the current study.

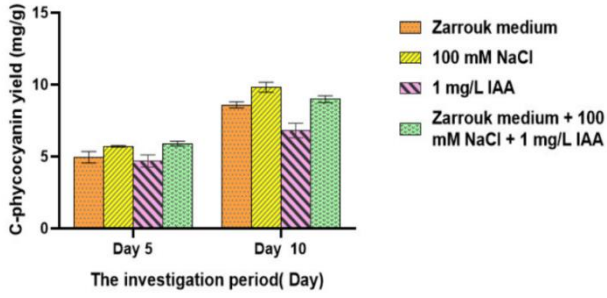


Figure 5. Phycocyanin productivity in *A. platensis* over 10 days of cultivation

Chlorophyll-a and Carotenoids Contents: The study indicates that supplementation with 100 mM NaCl significantly enhances phycocyanin accumulation in *A. platensis*. Conversely, supplementation with 1 mg/L IAA does not increase phycocyanin content in the algae. Furthermore, phycocyanin productivity also shows a significant increase in the medium supplemented with both 100 mM NaCl and 1 mg/L IAA. This suggests that the NaCl concentration used in this study (100 mM) did not exert any negative influences on the accumulation of phycocyanin in the algae. Therefore, this approach could be promising for maximizing the phycocyanin production in *A. platensis*. The study observed changes in the pigment compositions of *A. platensis* under different nutrient environments (100 mM NaCl, 1 mg/L IAA, and both factors). After 10 days of cultivation, chlorophyll-a content in the medium supplemented with 100 mM NaCl and 1 mg/L IAA significantly decreased compared to the nutrient-unamended control. This suggests that supplementation with 100 mM NaCl and 1 mg/L IAA appeared to inhibit the biosynthesis of chlorophyll-a and carotenoids by *A. platensis*. Additionally, after 10 days of cultivation, carotenoid content in the nutrient-unamended control was higher than in environments supplemented with nutrients (100 mM NaCl, 1 mg/L IAA, and both factors). This indicates that nutrient supplementation, including 100 mM NaCl and 1 mg/L IAA, may influence carotenoid synthesis differently or potentially inhibit its accumulation compared to the standard Zarrouk medium.

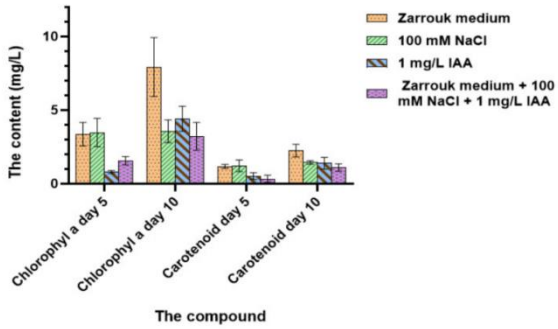


Figure 6. Chlorophyll-a and carotenoids in *A. platensis* over 10 days of cultivation

Numerous studies highlighted that phycocyanin was used in food as a dietary supplement and as a natural colorant. It was also employed in the cosmetics and biotechnology industries as a biochemical marker, including as a fluorescent probe for cellular analysis and immunological tests. The role of phycocyanin in cancer was demonstrated by its ability to inhibit tumor cell growth, suppress the cell cycle, and induce apoptosis and autophagy in these cells (Braune *et al.*, 2021; Fernandes *et al.*, 2023). The biosynthesis of pigments in *A. platensis* was complex and dependent on environmental culture conditions, making it crucial to research various nutritional supplements to enhance pigments production.

CONCLUSION

In summary, cultivating *A. platensis* under varied nutrient environments (100 mM NaCl, 1 mg/L IAA, and both) revealed distinct outcomes. Supplementation with 1 mg/L IAA enhanced growth, with the highest fresh biomass of 8.45 ± 0.286 g after 10 days. Chlorophyll-a and carotenoid levels were 7.93 ± 2.004 and 2.25 ± 0.43 µg/mL in the control. The highest accumulation of phycocyanin (9.81 ± 0.36 mg/g) was observed with 100 mM NaCl treatment. These findings indicate that while 1 mg/L IAA enhances biomass production without affecting phycocyanin levels, 100 mM NaCl consistently enhances both phycocyanin yield and biomass. To optimize nutrient conditions for maximizing both biomass and phycocyanin content, simultaneous supplementation of 100 mM NaCl and 1 mg/L IAA is recommended. This approach demonstrates the potential for scalable algae production while maintaining high phycocyanin levels.

REFERENCES

Akbarnezhad M, Shamsaie Mehrgan M, Kamali A, Javaheri Baboli M J I J o F S (2020). Effects of microelements (Fe, Cu, Zn) on growth and pigment contents of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. 19(2): 653-668.

Bennett A, Bogorad L (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. Journal of Cell Biology 58: 419–435.

Braune S, Krüger-Genge A, Kammerer S, Jung F, & Küpper J-H J L (2021). Phycocyanin from *Arthrospira platensis* as potential anti-cancer drug: review of in vitro and in vivo studies. 11(2): 91.

Dianursanti D, & Hafidzah M A (2021). The enhancement of phycocyanin yield and purity from *Spirulina platensis* using freeze-thawing method on various solvents. *In AIP Conference Proceedings* (Vol. 2344, No. 1). AIP Publishing.

Fernandes R, Campos J, Serra M, Fidalgo J, Almeida H, Casas A, Barros A I J P (2023). Exploring the benefits of phycocyanin: From *Spirulina* cultivation to its widespread applications. 16(4): 592.

İlter I, Akyıl S, Demirel Z, Koç M, Conk-Dalay M, & Kaymak-Ertekin F (2018). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using different techniques. *Journal of Food Composition and Analysis*, *70*: 78-88.

Jasuja D N (2014). Effect of Carbon Content, Salinity and pH on *Spirulina platensis* for Phycocyanin, Allophycocyanin and Phycoerythrin Accumulation. J Microb Biochem Technol, 6: 202-206.

Lafarga T, Fernández-Sevilla J M, González-López C, & Acién-Fernández F G (2020). *Spirulina* for the food and functional food industries. Food Research International, 137: 109356.

Rangkuti P M, Siswanti D U, Suyono E A (2023). Salinity Treatment as Bacterial Control and Its Impact on Growth and Nutritional Value of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) Culture in Open Pond System. *Journal of Fisheries and Environment*, *47*(1): 63-74.

Silveira ST, Burkert, JFM, Costa JAV, Burkert CAV, Kalil SJ (2007). Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. Bioresource Technology 98: 1629–1634.

Wan D, Wu Q, Kuča K (2016). Chapter 42 - Spirulina. In R. C. Gupta (Ed.), *Nutraceuticals:* 569-583.

Xiong JQ, Kurade MB, Jeon BH (2017). Ecotoxicological effects of enrofloxacin and its removal by monoculture of microalgal species and their consortium. Environ Pollut, 226: 486-493.

Yu C, Hu, Y, Zhang Y, Luo W, Zhang J, Xu P, Shao S (2024). Concurrent enhancement of biomass production and phycocyanin content in salt-stressed *Arthrospira platensis*: A glycine betaine-supplementation approach. *Chemosphere*, *353*:141387.

Zarrouk C (1966). Contribution to the study of a cyanophycea. Influence of various physical and chemical factors on growth and photosynthesis of *Spirulina* maxima. (PhD Thesis). University of Paris, Paris, France.

Zhang X F, Wang X, Luo G H (2017). Ultrasound-assisted three phase partitioning of phycocyanin from *Spirulina platensis*. *European Journal of Pure and Applied Chemistry*, *4*(1).

KHẢO SÁT KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG VÀ TÍCH LŨY PHYCOCYANIN CỦA VI TẢO *ARTHROSPIRA PLATENSIS* KHI NUÔI CẤY TRONG CÁC ĐIỀU KIỆN MÔI TRƯỜNG DINH DƯỠNG KHÁC NHAU

Trần Ngọc Hân, Nguyễn Hoài Bảo Ngọc, Nguyễn Thị Kiều Duyên, Phạm Thành Công, Nguyễn Thị Vân Anh, Huỳnh Vĩnh Khang*

Khoa Khoa học Sinh học - Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Arthrospira platensis là nguồn cung cấp các khoáng chất và acid amin thiết yếu, cùng với các chất chống oxy hóa như chlorophyll và phycocyanin, có lợi cho sức khỏe và hỗ trợ tăng cường hệ miễn dịch. Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá khả năng sinh trưởng và tích lũy phycocyanin của *A. platensis* dưới các điều kiện môi trường nuôi cấy khác nhau, bao gồm thay đổi nồng độ NaCl, IAA, và khảo sát ảnh hưởng kết hợp của các yếu tố này khi bổ sung vào môi trường Zarrouk. Kết quả cho thấy sau 10 ngày nuôi cấy ở 28-30°C, với cường độ ánh sáng 3500-4000 lux và pH 9, lượng sinh khối tươi cao nhất của *A. platensis* đạt được trong môi trường được bổ sung 1 mg/L IAA, đạt 8,45 ± 0,286 g. Hàm lượng phycocyanin tích lũy cao nhất trong môi trường nuôi cấy bổ sung 100 mM NaCl, đạt 9,81 ± 0,36 mg/g. Đồng thời, kết quả từ đề tài cũng cho thấy khi sử dụng dung môi $CaCl_2$ 1,5% với sự hỗ trợ của thiết bị siêu âm ly trích được phycocyanin cao nhất là 19,71 ± 2,50 mg/g. Từ đó, có thể kết luận rằng, việc bổ sung vào môi trường Zarrouk 100 mM NaCl và 1 mg/L IAA không chỉ giúp tảo tăng sinh khối tươi mà còn tăng tích lũy phycocyanin. Phương pháp này có tiềm năng lớn trong việc nghiên cứu tối ưu hóa sản xuất sinh khối và năng suất phycocyanin từ *Arthrospira platensis.*

*Từ khóa: Arthrospira platensi*s, sinh khối tươi, Phycocyanin, sắc tố, môi trường Zarrouk.

* Author for correspondence: Tel: +84-822551844; Email: khanghv@hcmuaf.edu.vn

USE OF *Lactobacillus paracasei* Ld3 FOR BIOPRESERVATION OF POST-HARVESTED STRAWBERRY FRUIT

Nguyen Nhu Yen[1], Le Van Thien[2], Ngo Thi Tuong Chau[3*]

[1]*Hanoi University of Natural Resources and Environment*

[2]*University of Science, Vietnam National University, Hanoi*

[3]*Ton Duc Thang University*

SUMMARY

Lactic acid bacteria are known for their biopreservative activity. In this study, an endophytic bacterium, *Lactobacillus paracasei* Ld3, was used to maintain the quality of post-harvested strawberry fruit. The sensory (color, taste, texture, flavor, and overall acceptability), physical (% weight loss and decay), microbiological (*L. paracasei* Ld3, and total yeast and mold counts), and chemical (pH, total soluble solids, titratable acidity, and total phenolic content) properties of the strawberries inoculated with *L. paracasei* Ld3 cells and the control samples were evaluated during 10 days of storage at 4^{o}C. Results showed that the inoculated strawberries had higher sensory scores than the control. Inoculation with *L. paracasei* Ld3 on the fruit surface reduced the fruit water loss and decay on day 10 by about 32.9% and 61.5%, respectively. Besides, *L. paracasei* Ld3 sustained high levels on the fruit surface, and yeast and mold fruit proliferation was inhibited in the inoculated strawberries. However, no significant difference ($p > 0.05$) was observed in pH and titratable acidity between the inoculated strawberries and the control samples at the same storage time. Moreover, inoculation with *L. paracasei* Ld3 slowed the deterioration rate of total soluble solids and total phenolic content compared to the control samples. These findings suggest that the application of *L. paracasei* Ld3 is potent for the preservation of post-harvested strawberry fruit.

Keywords: Biological control, biopreservation, endophytes, lactic acid bacteria, strawberry.

INTRODUCTION

Strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) is one of the most widely consumed fruits worldwide for its special sensory properties (taste, color) and high nutritional and nutraceutical values. However, this typical non-climacteric fruit appears greatly perishable and susceptible to fungal pathogen infection, and even more so during postharvest storage (Feliziani and Romanazzi, 2016). Chemical fungicides are one of the cheapest and most common approaches to minimizing spoilage of harvested fruit. Considering the chemical methods in terms of the development of pathogen resistance, fungicide residues in fruit, phytotoxicity to other organisms, or environmental and public health problems, microorganisms-based biological control which is safer, naturally eco-friendly and renewable for fruit preservation are needed. Endophytic bacteria are ubiquitous microbes that can naturally colonize the internal tissues of host plants without causing any harmful effects. Like human gut microflora, endophytic bacteria exhibit intimate interactions with their hosts, and have been proven to offer protection against phytopathogens. Endophytic bacteria highlight their status as an interesting source of biological control agents for combating fungal pathogens (Droby and Wisniewski, 2018). Though lactic acid bacteria (LAB) are known for their biopreservative activity, they have not been generally studied as endophytic bacteria on plants. Filling this gap, the present study was undertaken to use an endophytic bacterium, *Lactobacillus paracasei* Ld3 which is antagonistic to spoilage fungi for the preservation of post-harvested strawberries. As a result, the effect on strawberry fruit quality was evaluated by monitoring the sensory, physical, microbiological, and chemical properties of fruits during storage at 4^{o}C for 10 days.

MATERIALS AND METHODS

Fruit source

Fresh strawberries (*Fragaria* × *ananassa*) cv. Tochiotome were obtained from a strawberry farm located in Moc Chau (Son La, Vietnam), taken to the laboratory in a temperature-controlled environment, and kept at 4^{o}C for experimental use. Samples were selected for the experiment on the basis of their uniform size, weight, color, and absence of physical or pathological damage.

Source of microorganisms

An endophytic bacterium, *L. paracasei* Ld3, was isolated from the healthy strawberry fruit on Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) agar (Merck, Darmstadt, Germany) and showed antagonistic activity against *Penicilium singorense* Nd4, a pathogenic fungal strain associated with the strawberries' spoilage (Ngo *et al.,* 2023).

Preparation of bacterial inoculum

L. paracasei Ld3 was cultivated in 100 mL of MRS broth at 37°C for 48 hours. The cells were harvested by centrifugation for 15 minutes at 7,000 g at 4°C. Subsequently, the pellets were washed two times with a 0.85% NaCl solution and resuspended in 10 mL of the same solution to obtain a bacterial inoculum (about 8×10^5 CFU/mL).

Preservation procedure

Strawberries were washed with tap water, immersed in distilled water for one minute, and allowed to dry at 25^{o}C for 1 hour. Afterward, they were inoculated by a surface spraying of the bacterial inoculum under a slight agitation to allow a homogenous covering of the product. Subsequently, the strawberries were packaged in a sterile polyethylene bag (five fruits per bag) under ambient pressure and kept at 4°C for 15 storage days. Control samples were not inoculated with *L. paracasei* Ld3 sprayed with distilled water.

Sensory evaluation

The sensory analysis of the strawberry fruit was carried out following the method described by Bai và đồng tác giả (2003), with some modifications. The sensory quality was evaluated by color, taste, texture, flavor, and overall acceptability for all the samples after 0, 3, 5, 7, and 10 days of storage. Samples were randomly presented to ten non-trained panelists for sensory evaluations and were asked to score the differences between the samples where 0–2 represented extreme dislike; 3–5 fair; 6–8 good; and 9 excellent for color, taste, texture, flavor, and overall acceptability.

Physical quality evaluation

Strawberries were weighed using a digital balance (TE612 Satorius-Germany) on day zero of the experiment and at 4 intervals during the 10 days of storage. Total weight loss, expressed as the percentage loss of weight, was compared to the initial weight of the fruit. The decay percentage was calculated as the number of decayed fruit divided by the initial number of all packaged fruit multiplied by 100.

Microbiological quality evaluation

About 10 g of each package was randomly chosen, aseptically grounded, and suspended in 90 mL of sterile peptone saline solution (8.5 g NaCl/l + 1 g peptone/l). The suspension was blended with an Interscience BagMixer 400 S (Stomacher) for 2 minutes, and then a 10-fold serial dilution was made. The dilutions were plated onto Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) agar plates, and these plates were incubated at 25^{o}C for 5 days for total yeast and mold count. To determine the viability of *L. paracasei* Ld3, dilutions were plated onto MRS agar plates (Merck, Darmstadt, Germany). These plates were then placed in an anaerobic workstation (Don Whitley Scientific VA500) and incubated at 37^{o}C for 48–72 h. Colonies on the plates were counted with a colony counter (Scan 300 Interscience-France). Results of microbial counts were expressed as log CFU per g of fresh strawberries.

Chemical quality evaluation

The juice of strawberries was extracted using a slow juicer (Tefal ZC600138-Ultra Juice). The pH of the juice was measured using a pH electrode (F51BW Horiba-Japan). The titratable acidity (TA) was determined by titration of 5 mL of juice with 0.1 N NaOH using phenolphthalein as the indicator, and the result was expressed as percent citric acid (Temiz and Ozdemir, 2021). The total soluble solids (TSS) of the juices was obtained with a digital refractometer (HI96802, Hanna-Romania).

The total phenolic content (TPC) of strawberries was measured by the Folin Ciacalteu method (Panico *et al.,* 2009). Briefly, 10 g of strawberries were randomly selected and suspended in 200 mL of 80% methanol with the aid of a blender for 10 minutes. The suspension was then shaken in a 40^{o}C water bath (WTB15 Memmert-Germany) for 2 hours and filtered. To determine TPC, 0.5 mL of the filtered sample was mixed with 2.5 mL of 10% Folin Ciacalteu reagent and 2 mL of 7.5% Na_2CO_3. The sample was vortexed and placed in a 50^{o}C water bath (WTB15 Memmert, Germany) for 5 minutes. Subsequently, the sample was taken from the water bath and kept in the dark until it reached room temperature for 10 minutes. The absorbance of the sample was measured at 765 nm using a spectrophotometer (Evolution 60 Thermo Fisher-USA). The results were given on a fresh weight basis as mg gallic acid equivalents (the concentration of gallic acid was established from a calibration curve) per 100 g (mg GAE/100 g).

Statistical analyses

All experiments were performed in triplicate and are reported as mean ± standard deviations. An analysis of variance ANOVA ($p < 0.05$) was used, and differences between means were determined by Tukey's test with a 95% confidence level. Statistical analysis was performed using Minitab Software (Version 17.1, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of bacterial inoculation on the sensory properties of strawberry fruit

From the results of the sensory evaluation (Table 1, Fig. 1), it can be seen that the strawberry fruit inoculated with *L. paracasei* Ld3 resulted in higher sensory scores than the control for all quality factors tested during storage. Non-inoculated strawberry fruit had decayed due to overripening and fungal infection, exhibited inferior quality in terms of color, taste, texture, flavor, and overall acceptability, and became unacceptable after 10 days of storage.

Table 1. Effect of bacterial inoculation on the sensory properties of strawberry fruit during storage at 4°C

Parameters	Treatments	Storage (days)				
		0	3	5	7	10
Color	Inoculated fruit	8.6 ± 0.19^{Aa}	8.5 ± 0.12^{Ba}	8.2 ± 0.20^{Ca}	7.8 ± 0.28^{Da}	6.2 ± 0.13^{Ea}
	Control	8.9 ± 0.20^{Aa}	8.4 ± 0.10^{Ba}	7.2 ± 0.10^{Cb}	3.5 ± 0.57^{Db}	1.6 ± 0.12^{Eb}
Taste	Inoculated fruit	8.2 ± 0.15^{Ab}	8.1 ± 016^{Aa}	7.8 ± 0.48^{Ba}	7.5 ± 0.17^{Ca}	6.9 ± 0.32^{Da}
	Control	8.9 ± 0.16^{Aa}	8.3 ± 0.22^{Aa}	7.5 ± 0.35^{Bb}	3.6 ± 0.36^{Cb}	2.3 ± 0.39^{Db}
Texture	Inoculated fruit	8.6 ± 0.33^{Ab}	8.5 ± 0.31^{Aa}	8.3 ± 0.52^{Ba}	7.8 ± 0.26^{Ca}	6.1 ± 0.28^{Da}
	Control	8.8 ± 0.15^{Aa}	8.6 ± 0.14^{Aa}	7.7 ± 0.48^{Bb}	4.1 ± 0.42^{Cb}	2.1 ± 0.14^{Db}
Flavor	Inoculated fruit	8.5 ± 0.17^{Aa}	8.4 ± 0.16^{Aa}	8.3 ± 0.10^{Aa}	7.8 ± 0.36^{Ba}	7.0±0.10Ba
	Control	8.7 ± 0.26^{Aa}	8.5 ± 0.45^{Aa}	8.3 ± 0.52^{Aa}	4.0 ± 0.24^{Bb}	1.7 ± 0.24^{Cb}
Overall acceptability	Inoculated fruit	8.6 ± 0.16^{Aa}	8.5 ± 0.25^{Aa}	8.0 ± 0.47^{Ba}	7.4 ± 0.18^{Ca}	6.5 ± 0.39^{Da}
	Control	8.8 ± 0.13^{Aa}	8.4 ± 0.20^{Bb}	7.5 ± 0.35^{Cb}	4.5 ± 0.16^{Db}	1.9 ± 0.12^{Eb}

Different superscript lowercase letters (within each row) show differences in the storage time within the same treatment group ($p < 0.05$). Different superscript uppercase letters (within each column) indicate differences between treatment groups within the same storage time ($p < 0.05$).

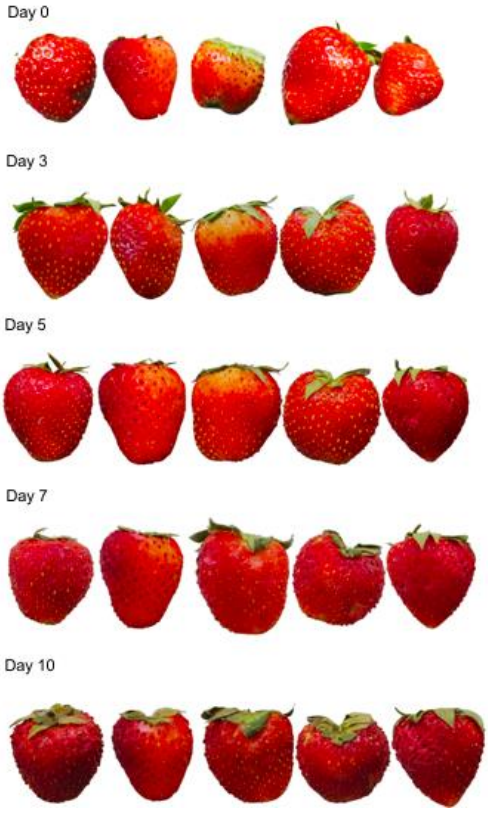


Fig.1. Photograph of inoculated strawberries during storage at 4°C

Effect of bacterial inoculation on the physical properties of strawberries

As it is shown in Table 2, the percentage of weight loss and decay tends to increase continuously during storage. Weight loss is linked to moisture evaporation and respiration on the fruit's surface (Aday and Caner, 2011), whereas the main cause of the decay of strawberries during storage is the development of rot that is caused by fungi (Feliziani and Romanazzi, 2016). On day 10, inoculation with *L. paracasei* Ld3 cells on the fruit reduced the water loss and decay by about 32.9% and 61.5%, respectively. Notably, the efficiency of water preservation and decay inhibition increased in the inoculated strawberries with increasing storage time. In fact, it must be considered that the ability of bacteria to stick effectively to the fruit surfaces for prolonged periods of time is crucial to ensuring their survival on the surface (Marques *et al.* 2002).

Table 2. Percentage of weight loss and decay of strawberries stored at 4°C for 10 days.

Parameters	Treatments	Storage (days)				
		1	3	5	7	10
Weight loss (%)	Inoculated fruit	0.9 ± 0.21^{Ea}	1.7 ± 0.45^{Da}	4.2 ± 0.69^{Cb}	6.6 ± 1.58^{Bb}	9.6 ± 0.51^{Ab}
	Control	1.0 ± 0.15^{Ea}	2.6 ± 0.54^{Da}	5.9 ± 0.72^{Ca}	8.9 ± 1.55^{Ba}	14.3 ± 1.60^{Aa}
Decay (%)	Inoculated fruit	0	6.5 ± 0.5^{Cb}	10.4 ± 0.6^{Bb}	15.6 ± 2.7^{Ab}	18.5 ± 1.8^{Ab}
	Control	0	10.0 ± 1.5^{Da}	27.1 ± 3.2^{Ca}	33.1 ± 4.6^{Ba}	48.0 ± 1.0^{Aa}

Different superscript lowercase letters (within each row) show differences in the storage time within the same treatment group ($p < 0.05$). Different superscript uppercase letters (within each column) indicate differences between treatment groups within the same storage time ($p < 0.05$).

Effect of bacterial inoculation on total yeast and mold counts of strawberry fruit

As it can be seen in Fig. 2, *L. paracasei* Ld3 sustained high levels on the fruit surface, and total yeast and mold counts increased during storage. However, total yeast and mold counts in the inoculated strawberries were found to be lower ($p < 0.05$) compared to the control. This could be related to the production of antimicrobial agents by LAB as well as the competence of LAB and other microorganisms for nutrients and space (Bernatek et al., 2022).

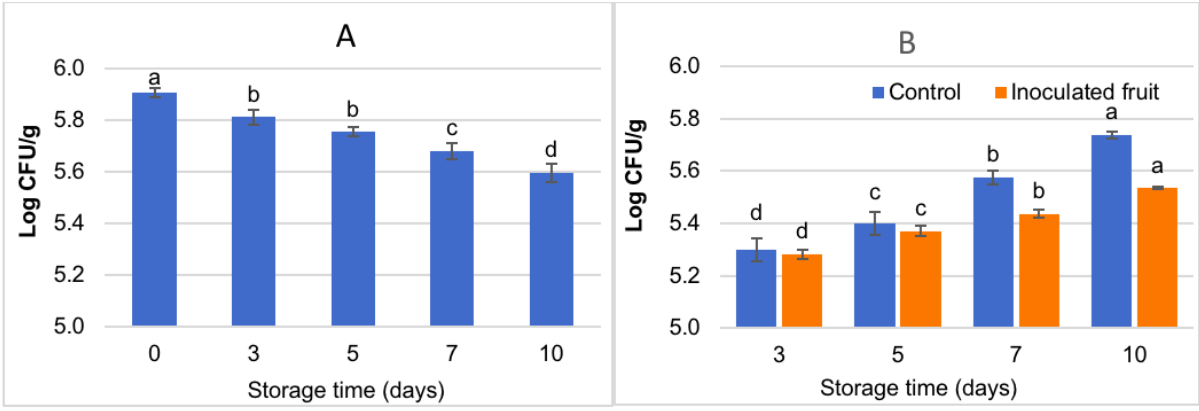


Fig. 2. *L. paracasei* Ld3 viability (A) and total yeast and mold counts (B) of strawberries stored at 4°C for 10 days.

Effect of bacterial inoculation on the chemical properties of strawberries

As indicated in Fig. 3, the pH of the strawberries increased significantly ($p < 0.05$) at the end of the storage. Meanwhile, a slight decreasing trend in TA was observed during storage. Similar to pH, there was no significant difference ($p > 0.05$) in TA between the inoculated strawberries and the control at the same storage time. It may be due to no proliferation of *L. paracasei* Ld3 and no production of acid when adhering to strawberry surfaces.

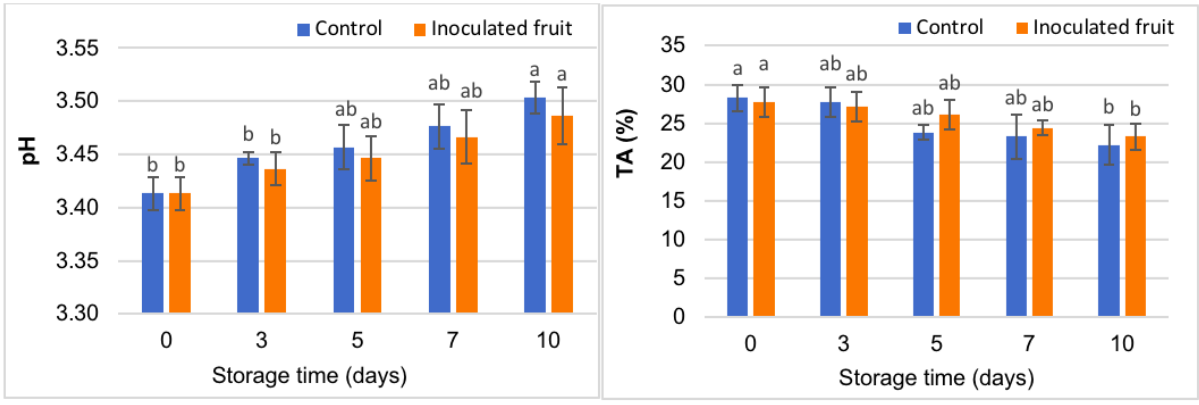


Fig. 3. Changes in pH value and TA (%) of strawberries stored at 4°C for 10 days.

TSS was detected to increase in both treatments during storage (Table 3). The increase in TSS may be shown as a significant amount of water loss by the increase in sugar content in fruit during storage (Hernández-Munoz *et al.,* 2008). However, the TSS of the inoculated strawberries was lower than that of the control. Conversely, the TPC of strawberries decreased progressively during storage (Table 3). Oxidation might be the main reason for TPC reduction (Ali *et al*., 2019). However, the strawberry inoculated with *L. paracasei* Ld3 cells showed a higher phenol content ($P < 0.05$) compared to the control. It can be due to the metabolic process of lactic bacteria. In fact, Avila et al. (2009) found that a lactic bacteria strain might be applied as functional cultures to obtain more bioactive phenolic acids in food products.

Table 3. Chemical quality of of strawberries stored at 4°C for 10 days

Parameters	Treatments	Storage (days)				
		0	3	5	7	10
TSS (%)	Inoculated fruit	$6.60±0.05^{Ea}$	$7.10±0.01^{Da}$	$7.24±0.06^{Ca}$	$7.43±0.02^{Ba}$	$7.62±0.01^{Aa}$
	Control	$6.62±0.07^{Ea}$	$6.81±0.02^{Db}$	$7.09±0.03^{Cb}$	$7.28±0.03^{Bb}$	$7.45±0.02^{Ab}$
TPC (mg GAE/100 g)	Inoculated fruit	$252±10.2^{Aa}$	$217.5±12.6^{Ba}$	$171.9±18.5C^{a}$	$168±.12.1^{Ca}$	$125±9.2^{Da}$
	Control	$258±20.5^{Aa}$	$210±18.7^{Ba}$	$162.5±15.6C^{a}$	$131.3±10.4^{Db}$	$112.5±18.6^{Db}$

Different superscript lowercase letters (within each row) show differences in the storage time within the same treatment group ($p < 0.05$). Different superscript uppercase letters (within each column) indicate differences between treatment groups within the same storage time ($p < 0.05$).

CONCLUSION

Inoculation with an endophytic bacterium, *L. paracasei* Ld3, on the surface of strawberry fruit improved the fruit sensory properties, reduced the total water loss and decay percentages, inhibited the yeast and mold proliferation, and slowed the deterioration rate of TSS and TPC. Therefore, it can be considered an alternative way to preserve post-harvested strawberry fruit.

REFERENCES

Aday MS, Caner C (2011). The applications of "active packaging and chlorine dioxide" for extended shelf life of fresh strawberries. *Packag Technol Sci,* 24: 123–136.

Ali S, Khan AS, Nawaz A, Anjum MA, Naz S, Ejaz S, Hussain S (2019). Aloe vera gel coating delays postharvest browning and maintains quality of harvested litchi fruit. *Postharvest Biol Technol,*157: 110960. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.110960.

Avila M, Hidalgo M, Sanchez-Moreno C, Pelaez Teresa Requena C, de Pascual-Teresa S (2009). Bioconversion of anthocyanin glycosides by *Bifidobacteria* and *Lactobacillus*. *Food Res Int*, 42: 1453–1461.

Bai J, Alleyne V, Hagenmaier RD, Mattheis JP, Baldwin EA (2003). Formulationof zein coatings for apple (*Malus domestica* Borkh.). *Postharvest Biol Technol*, 28: 259–268.

Bernatek M, Zukiewicz-Sobczak W, Lachowicz-Wisniewska S, Piatek J (2022). Factors determining effective probiotic activity: evaluation of survival and antibacterial activity of selected probiotic products using an “in vitro” study. *Nutrients*, 14: 3323. https://doi.org/10.3390/nu14163323.

Droby S, Cohen L, Daus A, Weiss B, Horev B, Chalutz H, Keren-Tzur M, Shachnai A (1998). Commercial testing of aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biol Control*, 12: 97–101.

Feliziani E, Romanazzi G (2016). Postharvest decay of strawberry fruit: Etiology, epidemiology, and disease management. *J Berry Res*, 6: 47–63.

Hernández-Munõz P, Almenar E, Del-Valle V, Velez D, Gavara R (2008). Effectof chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chem,* 110: 428–435.

Marques LLR, Ceri H, Manfio GP, Reid DM, Olson ME (2002). Characteristics of biofilm formation by *Xylella pestidiosa* "in vitro". *Plant Dis*, 86: 633–638.

Ngo TTC, Nguyen NY, Nguyen TTL, Phan TTL, Le VT (2023). Isolation, selection and cultivation of antagonistic lactic acid bacteria against postharvest pathogenic fungi in grapes. *VNU Journal of Science: Earth and Environmental Sciences*, 39(4): 63–73.

Panico AM, Garufi F, Nitto S, Di Mauro R, Longhitano RC, Magrì G, Catalfo A, Serrentino ME, De Guidi G (2009). Antioxidant activity and phenolic content of strawberry genotypes from *Fragaria* × *ananassa*. *Pharm Biol,* 47: 203–208.

Temiz NN, Özdemir KS (2021). Microbiological and physicochemical quality of strawberries (*Fragaria* × *ananassa*) coated with *Lactobacillus rhamnosus* and inulin enriched gelatin films. *Postharvest Biol Technol,* 173: 111433. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111433.

NGHIÊN CỨU SỬ DỤNG *Lactobacillus paracasei* Ld3 TRONG BẢO QUẢN SINH HỌC QUẢ DÂU TÂY SAU THU HOẠCH

Nguyễn Như Yến[1], Lê Văn Thiện[2], Ngô Thị Tường Châu[3*]

[1]*Trường Đại học Tài nguyên và Môi trường Hà Nội*

[2]*Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội*

[3]*Trường Đại học Tôn Đức Thắng*

TÓM TẮT

Vi khuẩn lactic được biết đến với hoạt tính bảo quản sinh học. Trong nghiên cứu này, một vi khuẩn nội sinh, *Lactobacillus paracasei* Ld3, đã được sử dụng để lưu giữ chất lượng quả dâu tây sau thu hoạch. Các đặc tính cảm quan (màu sắc, mùi vị, kết cấu, hương vị và khả năng chấp nhận tổng thể), vật lý (tỉ lệ % hao hụt khối lượng và thối hỏng), vi sinh vật (mật độ *L. paracasei* Ld3 và tổng nấm men và nấm mốc) và hóa học (pH, tổng chất rắn hòa tan, độ acid chuẩn độ và hàm lượng phenolic tổng) của quả dâu tây được cấy tế bào *L. paracasei* Ld3 và mẫu đối chứng đã được đánh giá trong 10 ngày bảo quản ở 4^{o}C. Kết quả cho thấy quả dâu tây được cấy có điểm đánh giá cảm quan cao hơn so với mẫu đối chứng. Việc cấy *L. paracasei* Ld3 trên bề mặt quả, vào ngày thứ 10, đã làm giảm khoảng 32,9% sự mất nước và 61,5% sự thối hỏng quả. Ngoài ra, mật độ *L. paracasei* Ld3 được duy trì ở mức cao trên bề mặt quả, và sự phát triển của nấm men và nấm mốc bị ức chế ở quả dâu tây được cấy tế bào *L. paracasei* Ld3. Tuy nhiên, không có sự khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$) về giá trị pH và độ acid chuẩn độ giữa quả dâu tây được cấy tế bào và mẫu đối chứng ở cùng thời gian bảo quản. Hơn nữa, việc cấy *L. paracasei* Ld3 đã làm chậm tốc độ biến đổi tổng chất rắn hòa tan và hàm lượng phenolic tổng so với đối chứng. Qua đó cho thấy tiềm năng của *L. paracasei* Ld3 trong bảo quản quả dâu tây sau thu hoạch.

Từ khóa: Kiểm soát sinh học, bảo quản sinh học, vi khuẩn nội sinh thực vật, vi khuẩn lactic, dâu tây.

[*] Author for corresspondence: Tel: +84-917691012; Email: ngothituongchau@tdtu.edu.vn

ẢNH HƯỞNG CỦA ELICITOR ĐẾN SỰ SINH TRƯỞNG VÀ HÀM LƯỢNG PHENOLIC TỔNG SỐ CỦA CÂY LAN GẤM *(Anoectochilus roxburghii*) NUÔI CẤY *IN VITRO*

Trịnh Thị Hương[1*], Phạm Văn Lộc[1], Trương Thị Thanh Ngân[1], Huỳnh Thị Cẩm Tiên[2], Trần Trọng Tuấn[3]

[1]*Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh*

[2]*Trường Đại học Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh*

[3]*Viện Sinh học Nhiệt đới - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

TÓM TẮT

Lan gấm (*Anoectochilus roxburghii*) là một cây thân thảo không chỉ có giá trị dược liệu mà còn được sử dụng làm cây hoa để trưng bày, trang trí. Trong nghiên cứu này, năm loại elicitor được khảo sát nhằm đánh giá khả năng gia tăng sự sinh trưởng và hàm lượng phenolic tổng số trong cây lan gấm nuôi cấy *in vitro*. Kết quả thu được cho thấy, cao nấm men (4 mg/L) giúp cải thiện sự sinh trưởng và hàm lượng phenolic tổng số của cây lan gấm. Sau 8 tuần nuôi cấy, khối lượng khô và hàm lượng phenolic tổng số thu nhận được lần lượt là 0,084 g và 7,23 mg GAE/mg DW. Salicylic acid không có ảnh hưởng tích cực đến sự sinh trưởng của cây lan gấm, nhưng giúp gia tăng hàm lượng phenolic tổng số ở nồng độ 2 mg/L. Sau 8 tuần nuôi cấy, khối lượng khô và hàm lượng phenolic tổng số thu nhận được lần lượt là 0,093 g và 7,04 GAE/mg DW. Chitosan, abscisic acid và methyl jasmonate không thích hợp để bổ sung vào môi trường nuôi cấy cây lan gấm. Trong đó, chitosan cải thiện một số chỉ tiêu sinh trưởng (SPAD, chiều cao cây) nhưng hàm lượng phenolic tổng số giảm; abscisic acid giúp gia tăng hàm lượng phenolic tổng số nhưng lại ức chế sự sinh trưởng của cây; methyl jasmonate ức chế cả sự sinh trưởng và hàm lượng phenolic tổng số. Các kết quả này chỉ ra rằng, các elicitor có tác động khác nhau đến sự trưởng và hàm lượng phenolic tổng số ở cây lan gấm. Việc xác định được loại elicitor với nồng độ thích hợp bổ sung vào môi trường nuôi cấy sẽ cải thiện được cả sự tích luỹ sinh khối và hàm lượng hợp chất thứ cấp trong cây, từ đó gia tăng hiệu suất nuôi cấy sinh khối các loài cây dược liệu.

Từ khóa: Absicic acid, cao nấm men, cây lan gấm, chitosan, methyl jasmonate, salicylic acid.

MỞ ĐẦU

Chi lan gấm (*Anoectochilus*) là một trong những cây dược liệu thuộc họ Orchidaceae. Tại Việt Nam, hiện thống kê được 12-15 loài, trong đó *Anoectochilus roxburghii* là loài có giá trị dược liệu cao, theo Đông y, lan gấm có tác dụng tăng cường sức khỏe, chữa các bệnh như viêm phế quản, viêm gan mãn tính, suy nhược thần kinh, đau nhức xương khớp. *A. roxburghii* có chứa hợp chất phenolic và các hợp chất khác như polysacaride, triterpenoide, amino acid... (Xi, Wang, 2013). Các hợp chất phenolic được coi là có nhiều chức năng, chẳng hạn như loại bỏ oxy hoạt tính, ngăn ngừa xơ cứng mạch máu, cải thiện dinh dưỡng cho mô, chống lão hóa và ngăn ngừa chứng mất trí do lão hóa (Chen *et al*., 2015).

Trong tự nhiên, lan gấm thường sống ở nơi ẩm ướt, mọc rải rác trong rừng sâu, tái sinh chậm và thường xuyên bị nhiều sâu bệnh hại. Do có nhiều đặc tính dược liệu mà số lượng quần thể lan gấm hoang dại bị khai thác quá mức làm suy giảm nghiêm trọng phạm vi phân bố và có nguy cơ bị tuyệt chủng nếu không có biện pháp bảo tồn hiệu quả. Chính vì thế, hiện nay các nghiên cứu về nuôi cấy *in vitro* cây lan gấm đang được quan tâm. Kỹ thuật nuôi cấy này đang được sử dụng rộng rãi để nhân giống, bảo tồn các loài cây quý hiếm cũng như ứng dụng trong nuôi cấy thu nhận sinh khối các loài cây dược liệu nhằm thu nhận được nguồn sinh khối dược liệu một cách chủ động trong thời gian ngắn mà không phụ thuộc vào điều kiện tự nhiên. Việc nuôi cấy *in vitro* tế bào thực vật mang lại hiệu suất về sinh khối cao trong môi trường giàu dinh dưỡng, nhưng nhiều hợp chất thứ cấp ở thực vật được sản sinh ra thông qua cơ chế phòng vệ trước những tác động bất lợi của môi trường. Do đó, trong nhiều trường hợp hàm lượng các hợp chất thứ cấp trong sinh khối mô tế bào thực vật nuôi cấy thấp hơn nhiều so với cây trồng ở điều kiện tự nhiên.

Các nghiên cứu nhằm cải thiện hàm lượng các hợp chất thứ cấp tập trung vào nhiều khía cạnh khác nhau như: nghiên cứu các con đường truyền tín hiệu sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp; tác nhân phiên mã và cơ chế điều hoà của chúng (Memelink *et al*., 2001), cải tiến quy trình nuôi cấy, sử dụng các elicitor, stress phi sinh học. Elicitor (chất kích kháng) là các chất có trọng lượng phân tử nhỏ thường liên quan đến phản ứng phòng vệ của thực vật bằng cách kích hoạt chuỗi tín hiệu (Patel *et al*., 2020); được phân loại thành hai loại là elicitor sinh học (có nguồn gốc từ nấm, vi khuẩn…) hay hoá học (ion kim loại, các thành phần vô cơ). Việc xử lý thực vật với các elicitor có thể gây ra các phản ứng phòng vệ, bao gồm sự tích luỹ của một dải các hợp chất thứ cấp có tính

phòng vệ ở thực vật như phytoalexin trong điều kiện không gây ảnh hưởng đối với thực vật. Các nghiên cứu của Trịnh Thị Hương và đồng tác giả (2015), Lê Giang Hồng (2022) đã cho thấy việc bổ sung elicitor vào môi trường đã góp phần gia tăng khả năng sản sinh hợp chất thứ cấp có trong mô thực vật nuôi cấy dẫn đến gia tăng giá trị dược liệu. Vì vậy, trong nghiên cứu này, kỹ thuật nuôi cấy *in vitro* cây lan gấm được ứng dụng nhằm tạo ra nguồn sinh khối một cách chủ động thay thế cho nuôi trồng truyền thống, đồng thời bổ sung elicitor vào môi trường nuôi cấy nhằm cải thiện hàm lượng phenolic tổng số - một hợp chất có hoạt tính sinh học, từ đó nâng cao giá trị dược liệu từ nguồn sinh khối lan gấm thu nhận được.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu thực vật

Nguồn vật liệu thực vật được sử dụng trong nghiên cứu là các chồi ngọn lan gấm (*A. roxburghii*) được nuôi cấy *in vitro* có chiều cao 2,5 cm với đường kính thân trung bình là 2,0 mm.

Môi trường nuôi cấy

Môi trường được sử dụng ở nghiên cứu này là môi trường MS (Murashige, Skoog) bổ sung 30 g/L sucrose, 8,0 g/L agar. Tất cả môi trường được điều chỉnh pH = 5,8 trước khi hấp khử trùng ở nhiệt độ 121^{o}C trong 15 phút.

Phương pháp bố trí thí nghiệm và chỉ tiêu theo dõi

Mẫu chồi cây lan gấm được nuôi cấy vào môi trường MS chứa 30 g/L sucrose, 8 g/L agar và bổ sung 1 trong 5 loại elicitor riêng lẻ ở các nồng độ khác nhau bao gồm: cao nấm men (1; 2; 3; 4; 5 mg/L), chitosan (1; 2; 3; 4; 5 mg/L), salicylic acid (SA) (1; 2; 3; 4; 5 mg/L), abscisic acid (ABA) (1; 2; 3; 4; 5 mg/L) và methyl jasmonate (MeJA) 95% (Sigma Aldrich) (50; 100; 150; 200; 250 µl/L). Đối chứng là môi trường MS không bổ sung elicitor.

Sau 8 tuần nuôi cấy, tiến hành ghi nhận các chỉ tiêu sinh trưởng (Hàm lượng chlorophyll-chỉ số SPAD, chiều cao cây, khối lượng khô), hàm lượng phenolic tổng số (TPC - Total Phenolic Content) và hàm lượng TPC/cây. Chỉ số SPAD được đo bằng máy Hansatech CL-01 (Anh), vị trí đo ở lá số 2 từ ngọn xuống. Hàm lượng phenolic tổng số (TPC) (mg acid galic (GAE)/ g chất khô (DW)) được xác định bằng phương pháp Folin – Ciocalteu tạo màu với thuốc thử Folin – Ciocalteu (Ainsworth, Gillespie, 2007). Hàm lượng TPC/cây được tính theo công thức sau:

Hàm lượng TPC/cây (mg GAE) = Hàm lượng TPC x Khối lượng khô của cây.

Điều kiện thí nghiệm và xử lý thống kê

Các thí nghiệm được đặt trong phòng nuôi cây có thiết lập các điều kiện: nhiệt độ 24 ± 2^{o}C, thời gian chiếu sáng 12 giờ/ngày với cường độ chiếu sáng 2.000 – 2.500 lux.

Các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, các thí nghiệm được tiến hành với 5 lần lặp lại. Số liệu thô thu thập sẽ được xử lý thống kê bằng phần mềm Statgraphics Centurion với kiểm định LSD và độ tin cậy 95%.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của cao nấm men đến sự sinh trưởng và tích lũy hàm lượng phenolic tổng số của cây lan gấm

Kết quả ghi nhận được sau 8 tuần nuôi cấy cho thấy, việc bổ sung cao nấm men vào môi trường nuôi cấy có ảnh hưởng tích cực đến các chỉ tiêu sinh trưởng cũng như hàm lượng phenolic của cây lan gấm. Chỉ số SPAD phản ánh hàm lượng chlorophyll trong lá cây. Chỉ số này càng tăng, khả năng quang hợp của cây cũng gia tăng và dẫn đến cây sinh trưởng và tích luỹ sinh khối tốt hơn. Trong thí nghiệm này, chỉ số SPAD ghi nhận nhận được ở các nghiệm thức bổ sung cao nấm men đều cao hơn đối chứng (0 mg/L), trong đó đạt cao nhất ở nghiệm thức 3 và 4 mg/L cao nấm men. Chiều cao cây không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức 0-4 mg/L, và đạt cao nhất ở nghiệm thức 5 mg/L cao nấm men. Khối lượng khô không có sự khác biệt thống kê giữa tất cả các nghiệm thức (Bảng 1). Điều này là do cây lan gấm vốn sinh trưởng chậm, do vậy khối lượng chất khô của mỗi cây lan gấm chưa thể hiện sự khác biệt nhau rõ rệt sau 8 tuần nuôi cấy. Đối với chỉ tiêu hàm lượng phenolic tổng số (TPC), kết quả thu được cho thấy bổ sung cao nấm men vào môi trường nuôi cấy giúp gia tăng khả năng tích luỹ TPC (Bảng 1). Cao nấm men là một elicitor sinh học và tác động tích cực của nó trong nuôi cấy sinh khối mô tế bào thực vật đã được ghi nhận trên nhiều đối tượng khác nhau như nuôi cấy tế bào rau má (Loc, Giang, 2012), nhân sâm (Rahimi *et al*., 2014), sâm Ngọc Linh (Nguyễn Thị Nhật Linh *et al*., 2017). Trong nghiên cứu của Jha và Yadav (2023), nhóm tác giả chỉ ra rằng elicitor có thể gắn vào protein thụ thể của màng tế bào thực vật. Các protein thụ thể này có khả năng nhận biết các elicitor và kích hoạt tín hiệu phòng vệ nội bào dẫn đến tăng cường tổng hợp các chất chuyển hóa. Tương tự, Ashraf và và đồng tác giả (2018) cũng nhấn mạnh rằng, các

elicitor ngoại sinh có thể hoạt động như chất kích thích sinh học, giúp cải thiện dinh dưỡng của thực vật, năng suất của thực vật và cơ chế phòng vệ chống lại nhiều loại stress khác nhau.

Bảng 1. Ảnh hưởng của cao nấm men đến sự sinh trưởng và hàm lượng phenolic tổng số của cây lan gấm sau 8 tuần nuôi cấy

Cao nấm men (mg/L)	SPAD	Chiều cao cây (cm)	Khối lượng khô (DW) (g)	TPC (mg GAE/g DW)	TPC/cây (µg GAE)
0	10,56^{c*}	4,52^{b}	0,076^{a}	6,14^{c}	467,8
1	14,84^{b}	4,56^{b}	0,083^{a}	7,11^{a}	588,4
2	14,38^{b}	4,64^{b}	0,078^{a}	6,64^{b}	518,3
3	17,14^{ab}	4,54^{b}	0,075^{a}	7,09^{a}	534,0
4	**18,34^{a}**	**4,84^{b}**	**0,084^{a}**	**7,23^{a}**	**607,5**
5	14,94^{b}	5,20^{a}	0,086^{a}	6,39^{bc}	549,8

**Các chữ cái a,b,c,… trong cùng một cột thể hiện mức độ khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy là 95%.*

Do cơ chế tác động của elicitor thường liên quan đến các phản ứng phòng vệ, trong một số trường hợp các elictor có những ảnh hưởng khác nhau đến pha sinh trưởng và pha tích luỹ hợp chất thứ cấp trong nuôi cấy mô thực vật. Vì vậy, việc lựa chọn được nồng độ elicitor thích hợp cho quá trình nuôi cấy sinh khối nhằm mục đích thu nhận các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học cần phải dựa trên một tiêu chí thể hiện được hiệu suất thu nhận được hợp chất thứ cấp đó từ mẻ nuôi cấy. Chỉ tiêu TPC/cây thể hiện được cả sự sinh trưởng cũng như hàm lượng TPC thu nhận được từ 1 cây lan gấm, do vậy nó đại diện cho hiệu suất phenolic thu nhận được từ quá trình nuôi cấy sinh khối lan gấm. Dựa vào chỉ tiêu này thì nồng độ cao nấm men thích hợp bổ sung vào môi trường nuôi cấy cây lan gấm là 4 mg/L.

Ảnh hưởng của chitosan đến sự sinh trưởng và tích lũy hàm lượng phenolic tổng số của cây lan gấm

Trong thí nghiệm này, chitosan là một elicitor sinh học ngoại sinh được bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Kết quả ghi nhận được cũng tương tự đối với cao nấm men, đó là bổ sung chitosan vào môi trường nuôi cấy đã giúp nâng cao chỉ số SPAD và chiều cao cây so với đối chứng (0 mg/L), và khối lượng khô không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê giữa tất cả các nghiệm thức. Tuy nhiên, hàm lượng TPC và TPC/cây ghi nhận được ở các nghiệm thức bổ sung chitosan đều thấp hơn đối chứng (Bảng 2). Điều này chứng tỏ chitosan không thích hợp để bổ sung vào môi trường nuôi cấy sinh khối cây lan gấm. Ngược lại với kết quả của chúng tôi, Nguyễn Thị Nhật Linh và đồng tác giả (2017) lại báo cáo rằng, bổ sung chitosan vào môi trường nuôi cấy sinh khối rễ bất định cây sâm Ngọc Linh gây ra ức chế sự sinh trưởng của rễ, nhưng lại nâng cao hàm lượng saponin tích luỹ trong rễ nuôi cấy. Điều này chứng tỏ rằng, đối với các loài khác nhau, thì tác động của chitosan đến sự sinh trưởng và tích luỹ các nhóm hợp chất thứ cấp là khác nhau.

Bảng 2. Ảnh hưởng của chitosan đến sự sinh trưởng và tích lũy phenolic tổng số của cây lan gấm sau 8 tuần nuôi cấy

Chitosan (mg/L)	SPAD	Chiều cao cây (cm)	Khối lượng khô (DW) (g)	TPC (mg GAE/g DW)	TPC/cây (µg GAE)
0	12,71^{b*}	3,97^{b}	0,078^{a}	7,25^{a}	565,8
1	14,90^{a}	4,68^{a}	0,080^{a}	6,48^{b}	516,9
2	14,82^{ab}	4,47^{a}	0,086^{a}	5,78^{d}	502,0
3	14,76^{ab}	4,38^{ab}	0,079^{a}	6,40^{bc}	506,7
4	15,58^{a}	4,43^{ab}	0,087^{a}	6,05^{cd}	526,6
5	15,84^{a}	4,53^{a}	0,087^{a}	6,56^{b}	569,8

**Các chữ cái a,b,c,…trong cùng một cột thể hiện mức độ khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy là 95%.*

Ảnh hưởng của salicylic acid đến sự sinh trưởng và tích lũy hàm lượng phenolic tổng số của cây lan gấm

Salicylic acid (SA) có vai trò quan trọng trong sự phát triển, quang hợp, thoát hơi nước, hấp thu và vận chuyển ion ở thực vật. SA còn cảm ứng sự biểu hiện gen liên quan đến quá trình sinh tổng hợp và sản sinh một số hợp chất biến dưỡng thứ cấp ở thực vật (Taguchi *et al*., 2001). Nghiên cứu của Rahimi và đồng tác giả (2014) cho thấy, trong nuôi cấy rễ bất định nhân sâm, SA giúp tăng khả năng tích lũy các sesquiterpenoid.

Trong nghiên cứu này, khối lượng khô của cây lan gấm thu nhận được sau 8 tuần nuôi cấy không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê giữa tất cả các nghiệm thức. Chiều cao cây đạt cao nhất ở nghiệm thức đối chứng (0 mg/L); trong khi đó, chỉ số SPAD đạt cao nhất ở nghiệm thức 1 mg/L SA (Bảng 3). Điều này cho thấy SA không

có ảnh hưởng tích cực đến sự sinh trưởng của cây lan gấm nuôi cấy *in vitro*. Tuy nhiên, hàm lượng TPC thu được ở các nghiệm thức môi trường nuôi cấy bổ sung 2–4 mg/L SA lại cao hơn so với đối chứng. Tương tự với kết quả ở nghiên cứu này, khối lượng của rễ tơ cây sâm Ngọc Linh thu được ở môi trường bổ sung SA thấp hơn đối chứng, nhưng SA lại giúp gia tăng hàm lượng saponin trong rễ tơ (Trịnh Thị Hương *et al*., 2015). Ở cây húng chanh, bổ sung SA ở nồng độ từ 100 - 200 µM, sự sinh trưởng của cây giảm, nhưng ở nồng độ 50 µM không ảnh hưởng đến số lá, tỷ lệ tạo rễ, khối lượng tươi và chỉ số diệp lục tố của cây húng chanh; bên cạnh đó cải thiện đáng kể hàm lượng flavonoid và phenolic tổng số trong cây (Lê Giang Hồng, 2022).

Bảng 3. Ảnh hưởng của SA đến sự sinh trưởng và tích lũy phenolic tổng số của cây lan gấm sau 8 tuần nuôi cấy

SA (mg/L)	SPAD	Chiều cao cây (cm)	Khối lượng khô (DW) (g)	TPC (mg GAE/g DW)	TPC/cây (µg GAE)
0	12,90^{b*}	4,86^{a}	0,091^{a}	6,41^{b}	584,0
1	16,60^{a}	4,39^{b}	0,082^{a}	6,58^{b}	536,2
2	**13,57^{b}**	**4,44^{b}**	**0,093^{a}**	**7,04^{a}**	**652,2**
3	14,17^{b}	4,34^{b}	0,084^{a}	7,11^{a}	595,9
4	12,92^{b}	4,14^{b}	0,093^{a}	6,78^{ab}	627,5
5	13,22^{b}	4,46^{b}	0,093^{a}	6,45^{b}	596,4

**Các chữ cái a,b,c,…trong cùng một cột thể hiện mức độ khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy là 95%.*

Do khối lượng khô không có sự khác biệt ý nghĩa thống kê, và sự tích luỹ TPC đạt cao nhất ở các nồng độ 2 - 4 mg/L SA (Bảng 3), nên sẽ dựa vào chỉ tiêu TPC/cây để xác định nồng độ SA phù hợp nhất. Theo đó, nồng độ SA thích hợp bổ sung vào môi trường nuôi cấy sinh khối cây lan gấm là 2 mg/L SA, với TPC/cây đạt giá trị cao nhất là 652,2 µg GAE.

Ảnh hưởng của abscisic acid đến sự sinh trưởng và tích lũy hàm lượng phenolic tổng số của cây lan gấm

Trong thí nghiệm này kết quả thu được cho thấy, sự sinh trưởng của cây lan gấm trên môi trường bổ sung ABA đều thấp hơn đối chứng (Bảng 4). Nguyên nhân là do ABA là một chất điều hoà sinh trưởng thực vật thuộc nhóm ức chế, thường liên quan đến trạng thái ngủ nghỉ của hạt, sự trưởng thành của phôi, sự lão hoá và đáp ứng với stress của thực vật. Ngược lại, chỉ tiêu TPC gia tăng tỷ lệ thuận với nồng độ ABA, đạt cao nhất là 7,22 mg GAE/g DW tại nghiệm thức 5 mg/L ABA (Bảng 4). Tương tự với nghiên cứu này, ABA cũng được báo cáo là không thích hợp cho sự sinh trưởng nhưng lại kích thích khả năng tích luỹ saponin tổng số của rễ thứ cấp (Nguyễn Thị Nhật Linh *et al*., 2017) và rễ tơ cây sâm Ngọc Linh (Trịnh Thị Hương *et al*., 2015). ABA cũng đã được báo cáo là đóng vai trò trung gian trong quá trình sinh tổng hợp một số hợp chất thứ cấp như gia tăng khả năng tích lũy phenolic và các tanshinone trong rễ tơ cây *Salvia miltiorrhiza* (Zhang *et al*., 2014).

Bảng 4. Ảnh hưởng của ABA đến sự sinh trưởng và tích lũy phenolic tổng số của cây lan gấm sau 8 tuần nuôi cấy

ABA (mg/L)	SPAD	Chiều cao cây (cm)	Khối lượng khô (DW) (g)	TPC (mg GAE/g DW)	TPC/cây (µg GAE)
0	12,24^{ab*}	5,17^{a}	0,105^{a}	6,06^{d}	636,4
1	11,01^{b}	3,52^{bc}	0,057^{b}	6,83^{b}	388,5
2	12,43^{ab}	3,63^{bc}	0,058^{b}	6,39^{cd}	367,8
3	12,76^{a}	3,74^{b}	0,061^{b}	6,32^{cd}	382,4
4	11,05^{ab}	3,75^{b}	0,055^{b}	6,56^{bc}	362,1
5	11,50^{ab}	3,27^{c}	0,051^{b}	7,22^{a}	368,6

**Các chữ cái a,b,c,… trong cùng một cột thể hiện mức độ khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy là 95%.*

Như vậy, ABA có tác động trái ngược nhau đối với sự sinh trưởng và TPC của cây lan gấm, do vậy ở thí nghiệm này, chỉ tiêu hàm lượng phenolic/cây cũng được xem là chỉ tiêu quan trọng để xác định có nên bổ sung ABA vào môi trường nuôi cấy sinh khối cây lan gấm hay không. Theo đó thì TPC/cây ghi nhận được ở tất cả nghiệm thức bổ sung ABA đều thấp hơn nhiều so với đối chứng (Bảng 4). Do đó, việc bổ sung ABA vào môi trường nuôi cấy không thích hợp cho quá trình nuôi cấy sinh khối cây lan gấm.

Ảnh hưởng của methyl jasmonate đến sự sinh trưởng và tích lũy hàm lượng phenolic tổng số của cây lan gấm

Mặc dù MeJA đã được báo cáo là tham gia vào con đường truyền tín hiệu và kích thích các enzyme xúc tác trong các phản ứng hóa sinh, hình thành nhiều hợp chất thứ cấp trong cây như polyphenol, alkaloid, quinone, terpnoid

(Dicosmo, Tower, 1984), nhưng kết quả ghi nhận được trong nghiên cứu này lại cho thấy, khi bổ sung MeJA vào môi trường nuôi cấy, cả sự sinh trưởng và TPC của cây lan gấm thu được đều thấp hơn đối chứng rõ rệt (Bảng 5). Quan sát hình thái cho thấy, ở môi trường có bổ sung MeJA, có hiện tượng vàng và rụng lá, không tạo rễ mới, và sự sinh trưởng của cây giảm dần khi nồng độ MeJA càng gia tăng (Hình 1). Hàm lượng TPC tích luỹ trong cây ở các nghiệm thức môi trường nuôi cấy bổ sung MeJA cũng thấp hơn đối chứng và giảm dần theo chiều tăng nồng độ MeJA (Bảng 5). Ngược lại với nghiên cứu của chúng tôi, nhiều công bố đã chỉ ra rằng, mặc dù MeJA làm giảm sự sinh trưởng nhưng lại kích thích sự tích luỹ các hợp chất thứ cấp như saponin tổng số của rễ tơ (Trịnh Thị Hương *et al*., 2015), và rễ thứ cấp (Nguyễn Thị Nhật Linh *et al*., 2017) sâm Ngọc Linh. Nguyên nhân sự khác biệt này là bởi sự đáp ứng đối với MeJA ngoại sinh ở các loài là khác nhau, hoặc do nồng độ MeJA được chọn khảo sát chưa phù hợp. Như vậy, ở nghiên cứu này bổ sung MeJA không thích hợp cho sự sinh trưởng và sự tích luỹ TPC của cây lan gấm nuôi cấy *in vitro*.

Bảng 5. Ảnh hưởng của MeJA đến sự sinh trưởng và tích lũy phenolic tổng số của cây lan gấm sau 8 tuần nuôi cấy

MeJA (µl/L)	SPAD	Chiều cao cây (cm)	Khối lượng khô (DW) (g)	TPC (mg GAE/g DW)	TPC/cây (µg GAE)
0	11,57^{a*}	4,94^{a}	0,091^{a}	7,07^{a}	645,8
50	2,78^{b}	3,29^{b}	0,056^{bc}	5,91^{b}	331,4
100	1,94^{bc}	3,08^{bc}	0,049^{bc}	5,81^{bc}	284,7
150	1,31^{c}	3,06^{bc}	0,058^{b}	5,53^{bc}	319,7
200	1,30^{c}	2,84^{cd}	0,048^{c}	5,63^{bc}	268,3
250	1,18^{c}	2,66^{d}	0,047^{c}	5,46^{c}	258,2

**Các chữ cái a,b,c,… trong cùng một cột thể hiện mức độ khác biệt có ý nghĩa ở độ tin cậy là 95%.*

Hình 1. Ảnh hưởng của các elicitor lên sự sinh trưởng và hàm lượng TPC của cây lan gấm nuôi cấy *in vitro* sau 8 tuần nuôi cấy. a, b, c, d, e, f: tương ứng với các nồng độ 0, 1, 2, 3, 4, 5 mg/L đối với các elicitor cao nấm men, chitosan, SA, ABA; và tương ứng với nồng độ 0, 50, 100, 150, 200, 250 µl/L đối với MeJA.

KẾT LUẬN

Các elicitor khác nhau có ảnh hưởng khác nhau đến sự sinh trưởng và tích luỹ hàm lượng phenolic tổng số ở cây lan gấm nuôi cấy *in vitro*. Trong năm loại elicitor khảo sát thì cao nấm men với nồng độ 4 mg/L và salicylic acid với nồng độ 2 mg/L là thích hợp bổ sung vào môi trường nuôi cấy để cải thiện sự sinh trưởng và hàm lượng phenolic tổng số của cây lan gấm nuôi cấy *in vitro*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ainsworth EA, Gillespie KM (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat Protoc*, 2(4): 875-877.

Ashraf MA, Iqbal M, Rasheed R, Hussain I, Riaz M, Arif MS (2018). Environmental stress and secondary metabolites in plants. *Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress*, 153-167.

Chen A, Wang S, Zhang L, Peng J (2015). Optimization of the microwave roasting extraction of palladium and rhodium from spent automobile catalysts using response surface analysis. *International Journal of Mineral Processing*, 143: 18-24.

Dicosmo F, Tower GHN (1984). Stress and secondary metabolism in ciltured plant cells. Timmermann BN, Steelink C and Loewus FA, eds. *Phytochemical Adaptation to Stress*, Plenum, USA: 97-175.

Jha S, Yadav A (2023). Assessment of carbon and fullerene nanomaterials for sustainable crop plants growth and production. *Plant Biology, sustainability and climate change*, 145-160.

Lê Giang Hồng (2022). Ảnh hưởng của elicitor salicylic acid lên sự sinh trưởng và tích lũy chất biến dưỡng thứ cấp ở cây húng chanh (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.) *in vitro*. *Tạp chí Khoa học Đại học cần Thơ*, 58(5): 77-83.

Loc NH, Giang NT (2012). Effects of elicitors on the enhancement of asiaticoside biosynthesis in cell cultures of centella (*Centella asiatica* L. Urban). *Chem Pap*, 66(7): 642-648.

Memelink J, Kijne JW, van der Heijden R, Verpoorte R (2001). Genetic modification of plant secondary metabolite pathways using transcriptional regulators. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 103-125.

Nguyễn Thị Nhật Linh, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Hoàng Lộc, Dương Tấn Nhựt (2017). Ảnh hưởng của các elicitor sinh học và phi sinh học đến sinh khối và hàm lượng saponin của rễ thứ cấp trong nuôi cấy lỏng lắc rễ bất định sâm Ngọc Linh. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 15(2): 285-291.

Patel ZM, Mahapatra R, Jampala SSM (2020). Role of fungal elicitors in plant defense mechanism. *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture*, 143-158.

Rahimi S, Devi BSR, Khorolragchaa A, Kim YJ, Kim JH, Jung SK, Yang DC (2014). Effect of salicylic acid and yeast extract on the accumulation of jasmonic acid and sesquiterpenoids in *Panax ginseng* adventitious roots. *Russ J Plant Physl*, 61(6): 811-817.

Taguchi G, Yazawa T, Hayashida N, Okazaki M (2001). Molecular cloning and heterologous expression of novel glucosyl transferases from tobacco cultured cells that have broad substrate specificity and are induced by salicylic acid and auxin. *Eur J Biochem*, 268(14): 4086-4094.

Trịnh Thị Hương, Nguyễn Hồng Hoàng, Vũ Thị Hiền, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Bá Nam, Nguyễn Phúc Huy, Vũ Quốc Luận, Bùi Thế Vinh, Trần Đình Phương, Lâm Diệp Thảo, Phạm Bích Ngọc, Trần Công Luận, Chu Hoàng Hà, Dương Tấn Nhựt (2015). Ảnh hưởng của một số elicitor lên sự sinh trưởng và tích lũy hoạt chất ở rễ sâm Ngọc Linh chuyển gen. *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 13(3): 843-851.

Xi J, Wang B (2013). Optimization of ultrahigh-pressure extraction of polyphenolic antioxidants from green tea by response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology*, 6(9): 2538-2546.

Zhang S, Yan Y, Wang B, Liang Z, Liu Y, Liu F, Qi Z (2014). Selective responses of enzymes in the two parallel pathways of rosmarinic acid biosynthetic pathway to elicitors in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *J Biosci Bioeng*, 117(5): 645-651.

EFFECT OF ELICITORS ON GROWTH AND TOTAL PHENOLIC CONTENT OF *IN VITRO Anoectochilus roxburghii*

Trinh Thi Huong[1*], Pham Van Loc[1], Truong Thi Thanh Ngan[1], Huynh Thi Cam Tien[2], Tran Trong Tuan[3]

[1]*Ho Chi Minh City University of Industry and Trade*

[2]*Ho Chi Minh City University of Technology*

[3]*Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

Anoectochilus roxburghii is a herbaceous plant that not only has medicinal value but is also used as a decorative plant. In this study, various elicitors were investigated to evaluate their potential to enhance growth and total phenolic content (TPC) in *in vitro A. roxburghii*. The results showed that yeast extract (4 mg/L) improved the growth and TPC of *A. roxburghii*. After 8 weeks of culture, the dry weight and TPC were 0.084 g and 7.23 mg GAE/mg DW, respectively. Salicylic acid had no positive effect on the growth of *A. roxburghii*, but increased the TPC with the optimal concentration of 2 mg/L, the dry weight and TPC were 0.093 g and 7.04 GAE/mg DW, respectively. Chitosan, abscisic acid and methyl jasmonate were not suitable for addition to the culture medium. Specifically, chitosan improved growth indices (SPAD, plant height) but decreased the TPC. Abscisic acid increased the TPC but inhibited plant growth. Methyl jasmonate inhibited both the growth and TPC. These results indicate that elicitors have varying effects on the growth and TPC in *A. roxburghii*. Determining the appropriate type and concentration of elicitor added to the culture medium can improve biomass and secondary compound content accumulation in the plant, thereby increasing the efficiency of biomass culture for medicinal plants.

Keywords: Absicic acid, *Anoectochilus roxburghii*, chitosan, methyl jasmonate, salicylic acid, yeast extract.

* Author for correspondence: Tel: +84-982406187; Email: huongtt@huit.edu.vn

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG PHỤ PHẨM THỦY SẢN TRONG LÊN MEN *Bacillus amyloliquefaciens* EB.CK9 VÀ ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM BỆNH THỰC VẬT

Trần Thị Hà Trang, Ngô Văn Anh*, Nguyễn Anh Dũng, Nguyễn Văn Bốn

Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại họcTây Nguyên

TÓM TẮT

Vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* có nhiều ứng dụng trong quản lý dịch hại và kích thích sinh trưởng thực vật nên được quan tâm nghiên cứu. Cho đến nay đã có nhiều nghiên cứu nhằm nhân nuôi phát triển chế phẩm vi khuẩn này. Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu sử dụng môi trường dinh dưỡng thương mại làm nguồn C/N cho quá trình lên men. Hướng tới giảm chi phí sản xuất và tạo ra sản phẩm thân thiện với môi trường, nguồn phụ phẩm thủy sản (FBP) được sử dụng làm nguồn cơ chất chính trong lên men *B. amyloliquefaciens* EB.CK9. Hoạt tính kháng nấm của chế phẩm *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 được đánh giá bằng phương pháp đồng nuôi cấy. Kết quả nghiên cứu điều kiện nhân nuôi thích hợp cho thấy chủng *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 sinh trưởng tốt (mật độ đạt $6,73x10^9$ CFU/ml) trong môi trường chứa 1,25% bột đầu cá; 0,5% NaCl; pH=7,25; lên men ở nhiệt độ 36^oC với tốc độ lắc 200 rpm trong 36 giờ. Nhằm tăng mật độ vi khuẩn trong chế phẩm và rút ngắn thời gian lên men, chủng vi khuẩn *B amyloliquefaciens* EB.CK9 được nhân nuôi thử nghiệm trong hệ thống Bioreactor (loại 14 lít). Kết quả thử nghiệm cho thấy mật độ vi khuẩn tăng đáng kể (đạt $9,85×10^{11}$ CFU/ml) chỉ sau 8h lên men. Trong điều kiện invitro, chủng *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 có khả năng kháng nấm mạnh, với hiệu lực kháng *Phytophthora palmivora*: 69,25%; *Fusarium oxysporium*: 68,34% và *Fusarium incarnatum*: 60,50%. Kết quả nghiên cứu là minh chứng cho tiềm năng ứng dụng nguồn dinh dưỡng giá rẻ bột đầu cá trong phát triển chế phẩm sinh học *B. amyloliquefaciens* EB.CK9. Nghiên cứu mở ra hướng ứng dụng phụ phẩm thủy sản trong lên men vi sinh tạo sản phẩm an toàn giúp phát triển nền nông nghiệp sạch - hiệu quả - bền vững.

Từ khóa: Bacillus amyloliquefaciens, FBP, bột đầu cá, *Fusarium oxysporium, Fusarium incarnatum, Phytophthora palmivora*.

MỞ ĐẦU

Thủy sản là ngành kinh tế mũi nhọn đem lại kim ngạch xuất khẩu cao cho Việt Nam, tổng sản lượng nuôi trồng và khai thác thủy sản năm 2023 khoảng 194.648 nghìn tấn (Tổng cục thống kê, 2023). Trong đó, sản phẩm phụ của quá trình chế biến thủy sản chiếm tới 15-20% (Trần Thị Hà Trang *et al*., 2022). Hầu hết phụ phẩm thủy sản (FBP) được thải trực tiếp ra môi trường hoặc được sử dụng tạo các sản phẩm có giá trị gia tăng thấp như phân bón và thức ăn chăn nuôi (Thi Hanh Nguyen *et al*., 2022). Hiện nay, các nghiên cứu tái chế phế liệu biển (mai mực, vỏ tôm, đầu tôm, vỏ cua, đầu cá…) thông qua quá trình lên men vi sinh vật tạo ra các sản phẩm giá trị cao đang được nhiều nhà khoa học quan tâm (Trần Thị Hà Trang *et al*., 2022; Thi Hanh Nguyen *et al.,* 2022). Do đó, tận dụng nguồn FBP trong nhân nuôi vi sinh vật tạo chế phẩm vi sinh đang là một hướng đi mới, an toàn, tiết kiệm và bền vững trong phát triển công nghệ sinh học nông nghiệp.

Vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* là ứng cử viên đầy triển vọng để phát triển các phương pháp nông nghiệp bền vững và thân thiện với môi trường. *B. amyloliquefaciens* linh hoạt, đa năng và nổi bật với nhiều đặc tính quý như: tạo ra các chất chuyển hóa thứ cấp có hoạt tính kháng khuẩn chống lại nhiều vi sinh vật gây bệnh thực vật, thúc đẩy sự phát triển của thực vật và tăng cường sức khỏe tổng thể của thực vật. Hơn nữa, *B. amyloliquefaciens* là một trong những vi khuẩn phổ biến nhất được biết đến trong xâm chiếm nội sinh thực vật, đóng một vai trò quan trọng trong việc kiểm soát sinh học các mầm bệnh thực vật có mạch (Ngô Văn Anh *et al*., 2024). Trong nghiên cứu này, tiến hành sử dụng phụ phẩm thủy sản làm nguồn cơ chất chính để lên men vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* và đánh giá hiệu quả kháng một số loài nấm bệnh thực vật của chế phẩm lên men.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

Chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 sử dụng trong nghiên cứu là chủng vi khuẩn nội sinh cây sầu riêng (Ngô Văn Anh *et al*., 2024) và các chủng nấm bệnh *Phytopthora palmivora, Fusarium incarnatum, Fusarium oxysporum* được cung cấp bởi: Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên.

Môi trường thương mại: Peptone, Yeast Extract, NaCl, PDA (Merck); Nguồn phụ phẩm thủy sản: bột đầu cá (FHP), bột vỏ tôm (SSP), bột mai mực (SPP) được cung cấp bởi Công ty Trách nhiệm hữu hạn Thương mại và Xuất nhập khẩu Minh Hoàng Phát.

Nhân nuôi vi khuẩn nội sinh *Bacillus amyloliquefaciens* EB.CK9 trong bình tam giác

Xác định nguồn cơ chất phù hợp

Tiến hành hoạt hoá và nhân nuôi chủng vi khuẩn EB.CK9 trong môi trường LB. Hút 1ml dịch nuôi cấy đã hoạt hóa cho vào các bình môi trường bổ sung các phụ phẩm thủy sản khác nhau (khử trùng ở nhiệt độ 121^{o}C, 1atm trong 15 phút, pH=7). Nhân nuôi vi khuẩn ở 36^{0}C, 200 rpm trong vòng 24h (Ngô Văn Anh *et al*., 2024). Sau 24 giờ, thu dịch lên men và xác định mật độ vi khuẩn. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Từ đó chọn được nguồn cơ chất thích hợp nhất để nhân nuôi vi khuẩn.

Các công thức môi trường bổ sung các phụ phẩm thủy sản:

CT 1: 1g peptone + 0,5g yeast extract + 0,5g NaCl + 100 ml H_2O.

CT 2: 1,5g FHP + 0,5g NaCl + 100 ml H_2O.

CT 3: 1,5g SSP + 0,5g NaCl + 100 ml H_2O.

CT 4: 1,5g SPP + 0,5g NaCl + 100 ml H_2O.

Xác định tỉ lệ phế phụ phẩm thủy sản phù hợp

Tiến hành nhân nuôi chủng vi khuẩn EB.CK9 trong các môi trường thích hợp bổ sung các tỷ lệ phế phụ phẩm khác nhau. Sau 24 giờ, thu dịch lên men và xác định mật độ vi khuẩn. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Cách tiến hành: nuôi chủng vi khuẩn trong các môi trường với tỷ lệ dinh dưỡng khác nhau của FHP gồm: 1,5%; 1,25%; 1%; 0,75% và 0,5% (khử trùng ở nhiệt độ 121^{o}C, 1atm trong 15 phút, pH=7). Hút 1ml dịch nuôi cấy đã hoạt hóa cho vào các bình môi trường trên. Tiến hành nuôi vi khuẩn ở 36^{0}C, 200 rpm trong 24h (Ngô Văn Anh et al., 2024). Dựa vào mật độ vi khuẩn chọn được tỷ lệ phế phụ phẩm thích hợp nhất để nhân nuôi vi khuẩn.

Xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp

Từ kết quả nghiên cứu nguồn cơ chất phù hợp sẽ được lựa chọn để khảo sát ở các điều kiện nuôi cấy khác lần lượt:

Khảo sát pH thích hợp của môi trường nuôi cấy: 6,5; 6,75; 7,0; 7,25; 7,5.

Khảo sát thời gian nuôi cấy thích hợp: theo dõi mật độ vi sinh vật sau 24, 36, 48, 60, 72 h nuôi cấy.

Sau khi xác định được thành phần môi trường nuôi cấy và một số thông số ảnh hưởng quan trọng đến quá trình nhân nuôi chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 trong điều kiện bình tam giác, tiến hành nhân sinh khối thử nghiệm trên hệ thống lên men tự động Bioreator.

Phương pháp nhân nuôi chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* EB.CK9 trong hệ thống Bioreactor

Kế thừa kết quả tối ưu hoá trong bình tam giác (1% FHP; 36^{o}C; pH=7,25; 200rpm) để thử nghiệm nhân nuôi trên hệ thống lên men tự động Bioreator 14 L (Brunwick, Hoa Kỳ) trong 0, 2, 4, 6, 8,10 và 12 h và theo dõi theo mật độ vi khuẩn sau nuôi cấy.

Đánh giá hoạt tính kháng một số loại nấm bệnh của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* EB.CK9

Hoạt tính kháng nấm bệnh *P. palmivora* của chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 sau khi nuôi cấy trên hệ thống Bioreactor được xác định theo phương pháp đánh giá hoạt tính kháng nấm bệnh *P. palmivora, F. incarnatum* và *F. oxysporum* trên môi trường PDA theo phương pháp đồng nuôi cấy (Ngô Văn Anh *et al*., 2024).

Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả các thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Microsoft Office Excel, phân tích ANOVA bằng phần mềm SPSS 22.0. Các số liệu biểu diễn giá trị trung bình của 3 lần lặp lại ± độ lệch chuẩn với mức ý nghĩa $p < 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả nhân nuôi vi khuẩn nội sinh *Bacillus amyloliquefaciens* EB.CK9 trong bình tam giác

Kết quả xác định nguồn cơ chất phù hợp

Sự sinh trưởng của vi khuẩn là tối ưu trong môi trường nuôi cấy có tỉ lệ N cao, dựa trên cơ sở này, tiến hành khảo sát xác định nguồn protein phù hợp cho quá trình nhân nuôi chủng *B. amyloliquefaciens* EB.CK9. Kết quả thực nghiệm thấy rằng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 phát triển mạnh trên nguồn cơ chất phụ phẩm thủy sản, tạo mật độ cao. Trong đó, nguồn phụ phẩm bột đầu cá (FHP) là nguồn dinh dưỡng mang lại sự phát triển tối ưu nhất, do hàm lượng dinh dưỡng và khoáng chất trong bột đầu cá cao hơn so với bột vỏ tôm (SSP) và bột mai mực (SPP) (Thi Hanh Nguyen *et al*., 2022; Trần Thị Hà Trang *et al*., 2022; Tri Yulianto *et al*., 2021). Mật độ vi khuẩn của chủng EB.CK9 khi lên men trong FHP đạt $4,43\times10^{8}$ CFU/ml gấp 1,25 lần khi nhân nuôi trên SSP, gấp 2,3 lần khi sử dụng cơ chất SPP và 1,89 lần với môi trường thương mại LB (Hình 1). Kết quả khá tương đồng với nghiên cứu nhân nuôi *B.amyloliquefaciens* trong môi trường LB đạt mật độ $44,5\times10^{8}$ CFU/ml (Ngô Văn Anh *et al.,* 2024). Do đó, chọn bột đầu cá làm nguồn cơ chất chính trong lên men chủng EB.CK9 ở các thí nghiệm tiếp theo.

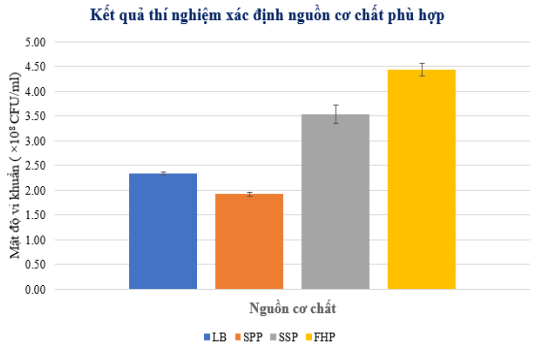
Kết quả xác định tỉ lệ phế phụ phẩm thủy sản phù hợp

Thí nghiệm xác định tỉ lệ phế phụ phẩm thủy sản phù hợp được tiến hành nhằm giảm chi phí sản xuất đồng thời bảo vệ môi trường. Từ Hình 2 thấy rằng mật độ vi khuẩn khá cao: 4,46-4,65x10^8 CFU/ml và gần như tương đương nhau ở 2 nghiệm thức sử dụng 1,25% FHP và 1,5% FHP. Khi giảm thành phần bột đầu cá trong môi trường thì mật độ EB.CK9 giảm tương ứng (Hình 2). Lựa chọn 1,25% FHP để sử dụng trong môi trường nhân nuôi cho các khảo sát tiếp theo.

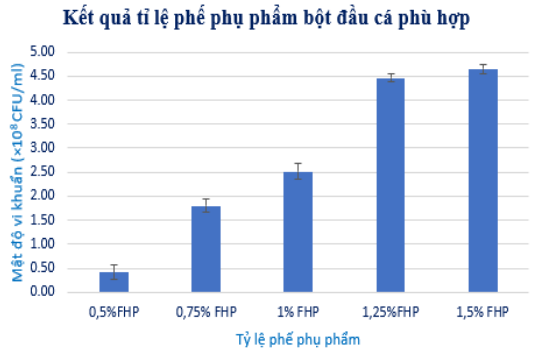
Kết quả xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp

Nồng độ ion H^+ hoặc OH^- làm thay đổi sự phân ly của các chất trong môi trường, do đó pH có nhiều tác động đến quá trình trao đổi chất, sinh trưởng và phát triển của vi sinh vật (Trần Thị Hà Trang et al., 2022). *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 là chủng trung tính, sinh trưởng tốt nhất trong dải pH từ 6,5-7,5. *B. amyloliquefaciens* subsp. plantarum sp 1901 sinh trưởng tối ưu với pH là 7,0 (Ngô Văn Anh et al., 2024). Đối với chủng *B. amyloliquefaciens* EB.CK9, các điều kiện pH khác nhau có ảnh hưởng khác biệt lên mật độ vi khuẩn, với pH=7,25 vi khuẩn EB.CK9 đạt mật độ cao 5,05x10^8 CFU/ml (Hình 3).

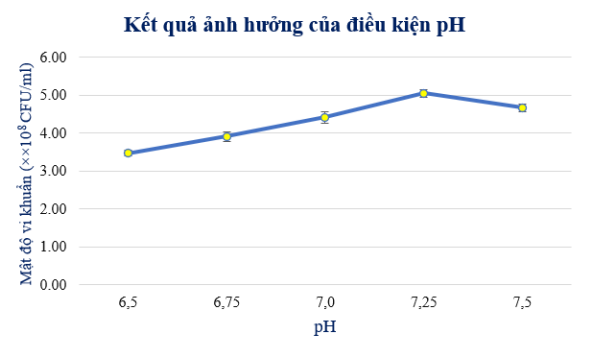
Thời gian nuôi cấy có ảnh hưởng mật thiết đến quá trình nhân nuôi vi khuẩn, mật độ của vi khuẩn có nhiều biến động qua các thời điểm nuôi cấy. *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 có sự gia tăng sinh khối mạnh sau 36 giờ nuôi cấy (6.6×10^8 CFU/ml), gấp 7.03 lần so với mật độ ở 24 giờ nhân nuôi và có sự giảm rõ rệt về mật độ sau 48 giờ lên men (Hình 4). Hiện tượng này có thể do sự bất lợi về các yếu tố hoá lý trong môi trường nhân nuôi (Trần Thị Hà Trang *et al*., 2022).



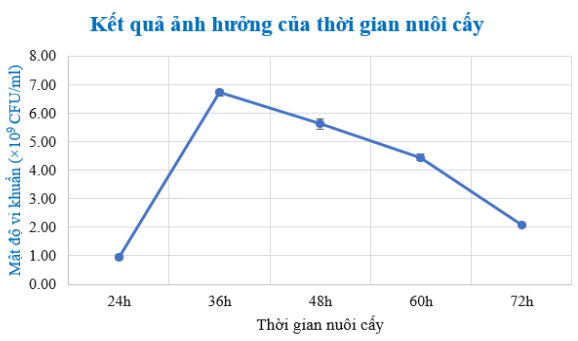
Hình 1. Ảnh hưởng của nguồn cơ chất đến mật độ vi khuẩn EB.CK9



Hình 2. Ảnh hưởng của tỉ lệ phụ phẩm đến mật độ EB.CK9



Hình 3. Ảnh hưởng của pH đến mật độ vi khuẩn EB.CK9



Hình 4. Ảnh hưởng của thời gian nuôi đến mật độ vi khuẩn EB.CK9

Kết quả nhân nuôi chủng vi khuẩn *Bacillus amyloliquefaciens* EB.CK9 trong hệ thống Bioreactor

Bacillus amyloliquefaciens là nguồn tài nguyên quý giá trong nông nghiệp với tiềm năng làm phân bón sinh học, tác nhân kiểm soát sinh học và chất tăng cường khả năng chống chịu stress cho nhiều loại cây trồng (Ngô Văn Anh *et al*., 2024). Nghiên cứu lên men thành công chế phẩm sinh học *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 trong Bioreator quy mô 14L. Có sự gia tăng sinh khối liên tục từ 0h-8h lên men, sau 8h lên men sinh khối đạt đỉnh (9,58×10^{10} CFU/ml) và giảm dần sau 10 giờ nhân nuôi (Bảng 1). Khi nhân nuôi trong Bioreator mật độ tăng nhanh trong thời gian ngắn, có sự khác biệt rõ rệt với kết quả nhân nuôi trong bình tam giác.

Hình 5. Hình ảnh nhân nuôi *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 trong Bioreactor trước và sau nuôi cấy

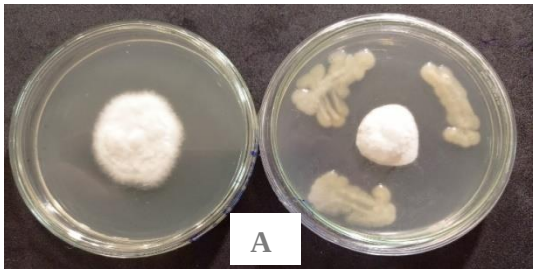
Bảng 1. Mật độ nhân nuôi *B. amyloliquefaciens* EB.CK9

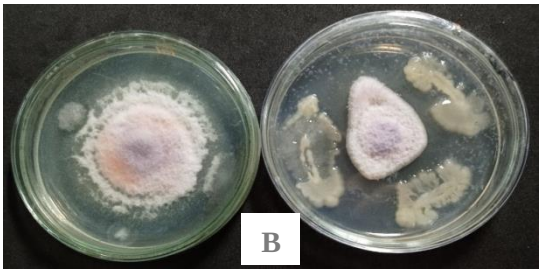
Thời gian nuôi cấy	Mật độ trung bình của chủng EB.CK9 (CFU/ml)
2h	$6,76\times10^{6}$
4h	$2,45\times10^{8}$
6h	$9,02\times10^{9}$
8h	**$9,58\times10^{10}$**
10h	$5,46\times10^{10}$

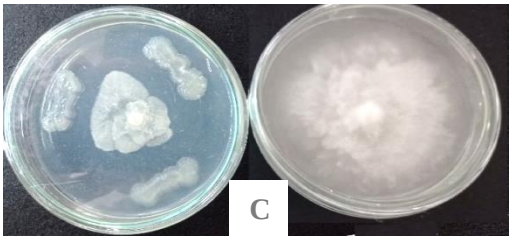
Kết quả đánh giá hoạt tính kháng một số loại nấm bệnh của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* EB.CK9

Bacillus amyloliquefaciens có khả năng sản sinh ra nhiều loại lipopeptide kháng nấm khác nhau như iturin, surfactin, fengycin… (Dhabyan Mutar Kareem Al-Mutar *et al*., 2023). Vì vậy, *B. amyloliquefaciens* là ứng cử viên đầy triển vọng trong kiểm soát sinh học với hiệu lực cao trong kháng nấm bệnh. Nghiên cứu của Geroche và đồng tác giả (2024) sử dụng *B. amyloliquefaciens*, T6-*Trichoderma harzianum*,... bằng kỹ thuật nuôi cấy kép trong thử nghiệm in vitro thấy rằng ức chế tăng trưởng *P. palmivora* 70,54% (Jeson Geroche *et al.,* 2024). *B. amyloliquefaciens* là tác nhân kiểm soát sinh học trong quản lý bệnh đen quả cacao (*P. palmivora*) với tỷ lệ kiểm soát bệnh dao động từ 53,33-66,67% trong mùa phụ và 40.00-66,67% trong mùa chính (Stephen Larbi-Koranteng *et al.,* 2020). Bốn chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ cây *Theobroma cacao* L. (Malaysia): *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pantoea agglomerans*, *Bacillus pumilus* và *Bacillus subtilis* đều có khả năng ức chế đối với mầm bệnh ca cao *P. palmivora* (Dhabyan Mutar Kareem Al-Mutar *et al*., 2023).

Hơn nữa, *B. amyloliquefaciens* còn tạo ra các hợp chất dễ bay hơi (VOC) có tác dụng ức chế sự phát triển và nảy mầm bào tử của nấm bệnh như: *B. amyloliquefaciens* NJN-6 tạo VOC ức chế *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense (Ishak Zubir *et al*., 2019). Bệnh héo do *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* là một trong những bệnh nấm tàn khốc nhất ảnh hưởng đến dưa hấu (*Citrullus lanatus* L.). Nghiên cứu của Al-Mutar và đồng tác giả (2023) đã phân lập được sáu chủng vi khuẩn vùng rễ dưa hấu thể hiện hoạt tính kháng nấm đáng kể, chống lại *F. oxysporum* f. sp. *niveum* cũng như các loại nấm gây bệnh thực vật khác: *Didymella bryoniae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium graminearum* và *Rhizoctonia solani*. Trong đó, chủng *B. amyloliquefaciens* DHA55 có hiệu quả cao nhất, đạt tỷ lệ ức chế bệnh cao 74,9% (Jun Yuan *et al*., 2012). *B. amyloliquefaciens* B1408 được phân lập từ đất vùng rễ của cây dưa chuột, có thể ngăn chặn sự xâm nhập của mầm bệnh do nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum*, làm giảm tỷ lệ mắc bệnh héo *Fusarium* tới 59,00% và thúc đẩy tăng trưởng thực vật (Lingjuan Han *et al*., 2019). Trong nghiên cứu này, chủng vi khuẩn nội sinh sầu riêng *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 có khả năng kháng nấm mạnh với tỷ lệ kháng *Phytophthora palmivora*: 69,25%; kháng *Fusarium oxysporium*: 68,34%*, Fusarium incarnatum*: 60,50% trong điều kiện in vitro (Bảng 2).







Bảng 2. Khả năng kháng nấm bệnh của chủng EB.CK9

Chủng nấm bệnh	Hiệu lực đối kháng của chủng EB.CK9 (%)
Phytophthora palmivora	69,25
Fusarium oxysporium	68,34
Fusarium incarnatum	60,50

Hình 6. Hình ảnh hoạt tính kháng nấm của chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* EB.CK9

6A: Hình ảnh kháng nấm Fusarium incarnatum; 6B: Hình ảnh kháng nấm Fusarium oxysporium; 6C: Hình ảnh kháng nấm Phytophthora palmivora.

KẾT LUẬN

Sử dụng thành công nguồn phụ phẩm thủy sản trong lên men *B. amyloliquefaciens* EB.CK9, chủng EB.CK9 sinh trưởng tốt trong môi trường chứa 1,25% FHP; 0,5% NaCl ở nhiệt độ 36^{o}C, điều kiện pH=7,25; 200 rpm trong 36 giờ đạt mật độ 6,73x10^{9} CFU/ml (điều kiện bình tam giác). Sản xuất thành công chế phẩm *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 trong hệ thống Bioreactor đạt 9,85×10^{11} CFU/ml sau thời gian lên men ngắn (8h). Chủng *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 có khả năng kháng nấm mạnh, ghi nhận kháng *P. palmivora*: 69,25%; *F. oxysporium*: 68,34% và *F. incarnatum*: 60,50%. Kết quả nghiên cứu là minh chứng cho tiềm năng ứng dụng nguồn dinh dưỡng giá rẻ bột đầu cá trong phát triển chế phẩm sinh học nông nghiệp *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 đồng thời mở ra hướng ứng dụng phụ phẩm thủy sản trong lên men vi sinh tạo sản phẩm thân thiện với môi trường.

Lời cảm ơn: *Ngô Văn Anh được tài trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số: VINIF.2023.TS.02. Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số đề tài: B2023-TTN-02.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Al-Mutar D M K, Alzawar N S A, Noman M, Azizullah, Li D, Fengming Song F (2023). Suppression of *Fusarium* Wilt in Watermelon by *Bacillus amyloliquefaciens* DHA55 through Extracellular Production of Antifungal Lipopeptides, *J. Fungi* 2023, *9*(3): 336.

Zubir I Ross E E R, Hamzah A, Aqma W S (2019). Endophytic bacteria from *Theobroma cacao* L. with antifungal activities against *Phytophthora palmivora*, *Asian Journal of Agriculture and Biology*, 7(3).

Geroche J, Macaya R D, Seprado J L (2024). Utilization of Biological Control Agents against *Phytophthora palmivora* Causing Pod Rot Disease in Cacao, *Twist* 19(1):431-438.

Yuan J, Raza W, Shen Q, Huang Q (2012). Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense, *Appl Environ Microbiol,*78(16):5942-4.

Han L, Wang Z, Li N, Wang Y, Feng J, Zhang X(2019). *Bacillus amyloliquefaciens* B1408 suppresses *Fusarium* wilt in cucumber by regulating the rhizosphere microbial community, *Applied Soil Ecology*, 136: 55-66.

Ngô Văn Anh, Trần Thị Hà Trang, Vũ Thị Thu Lê, Nguyễn Văn Bốn, Nguyễn Anh Dũng (2024). Tuyển chọn và nhân nuôi vi khuẩn nội sinh cây sầu riêng kháng nấm *Phytopthora palmivora* tại huyện Cư Kuin tỉnh Đắk Lắk, *TNU Journal of Science and Technology*, 229(09): 430 - 437.

Thi Hanh Nguyen, San-Lang Wang, Thi Huyen Nguyen, Manh Dung Doan, Thi Ha Trang Tran, Van Anh Ngo, Nhat Duoc Ho, Thi Ngoc Tran, Chien Thang Doan, Van Chung Do, Anh Dzung Nguyen and Van Bon Nguyen (2022). Utilization of Fishery-Processing By-Product Squid Pens for Scale-Up Production of Phenazines via Microbial Conversion and Its Novel Potential Antinematode Effect, *Fishes* 2022, *7*(3): 113.

Tổng cục thống kê, 2023.

Trần Thị Hà Trang, Ngô Văn Anh, Nguyễn Văn Bốn, Nguyễn Anh Dũng (2022), Nghiên cứu điều kiện nhân nuôi vi khuẩn *Bacillus velezensis* KN12 từ bột cá lên men và mật rỉ đường, *Tạp chí Khoa học Đại học Tây Nguyên*, 16 (54):1-10.

Trần Thị Hà Trang, Ngô Văn Anh, Đoàn Mạnh Dũng, Nguyễn Anh Dũng, Nguyễn Văn Bốn (2022). Nghiên cứu lên men *Bacillus siamensis* CP36 bằng nguồn phụ phẩm thủy sản tạo sản phẩm chứa chất kích thích sinh trưởng thúc đẩy tăng trưởng và sản lượng ớt, *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc 2022,* 426-431.

Yulianto T, Putri D S, Miranti S, Putra W K A (2021). Utilization of Shrimp Shell Waste as Alternative Raw for Mariculture, *E3S Web of Conferences* 324, 03006.

Larbi-Koranteng S, Awuah R T, Kankam F (2020). Biological control of black pod disease of cocoa (*Theobroma cacao* L.) with *Bacillus amyloliquefaciens*, *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. in vitro and in the field, *Article Number* - 8C724B764743, 12(2):52-63.

RESEARCH ON APPLICATION OF FISHERY BY-PRODUCTS FOR *Bacillus amyloliquefaciens* EB.CK9 FERMENTATION AND INVESTIGATION OF ITS ANTI-PLANT PHATHOGENIC FUNGI

Tran Thi Ha Trang, Ngo Van Anh*, Nguyen Anh Dzung, Nguyen Van Bon

Institute of Biotechnology and Environment, Tay Nguyen University, Dak Lak, Vietnam

SUMMARY

Bacillus amyloliquefaciens is a valuable resource in agriculture that many scientists interested study. To date, various studies on cultivation of this bacterium. However, almost studies used commercial nutrient broths as C/N sources for fermentation. Regarding the cost-efective and eco-friendly production, fishery by-products (FBP) are used as the main substrate source for *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 fermentation in this work. The antifungal of *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 was evaluated by co-culture method. Further experiments indicated that *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 growth well (the bacterial density reached $6.73x10^9$ CFU/ml)in culture medium containing 1.25% fishes head powder (FHP), 0.5% NaCl, initial pH of 7.25, and fermented at 36^0C with shaking speed of 200 rpm, in 36 hours of cultivation. For enhancing bacterial biomass and shortening cultivation time, *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 was cultured in a 14-L Bioreactor system. The experimental indicated that the bacterial density was significant enhance (reached 9.85×10^{11} CFU/ml) after 8 hours of fermentation. *B. amyloliquefaciens* EB.CK9 has strong antifungal, resistance to *Phytophthora palmivora*: 69.25%; resistance to *Fusarium oxysporium*: 68.34%, *Fusarium incarnatum*: 60.50% (in vitro). The research results are demonstrated which using the low-cost nutritional source FBP in developing the product *B. amyloliquefaciens* EB.CK9. Research opens the way to apply aquatic by-products in microbial fermentation and create safe products to help develop clean - efficient - sustainable agriculture.

Keywords: Bacillus amyloliquefaciens, FBP, FHP, *Fusarium oxysporium*, *Fusarium incarnatum*, *Phytophthora palmivora*.

* Author for correspondence: Tel: +84-374559085; Email: nvanh@ttn.edu.vn

TỐI ƯU HÓA ĐIỀU KIỆN VÀ MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI KHUẨN *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026 CÓ HOẠT TÍNH PHÂN GIẢI LÂN

Hoa Trương Minh Hiếu[1*], Phạm Thị Duy Anh[1], Trần Chí Hiếu[2], Phan Mỹ Hạnh[2]

[1]Khoa Sinh học-Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

[2]Phòng Công nghệ Vi sinh, Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Phosphorus (P) là chất dinh dưỡng đa lượng cần thiết cho sự sinh trưởng của cây trồng nhưng phần lớn P trong đất ở dạng khó tan và cây trồng không thể sử dụng. Vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* là loài có khả năng phân giải lân khó tan thành dạng tan, nhưng chưa được ứng dụng rộng rãi trong sản xuất nông nghiệp. Từ vấn đề này, nghiên cứu được thực hiện nhằm tìm ra giá trị tối ưu của các yếu tố tác động trực tiếp đến quá trình sinh trưởng của vi khuẩn. Để tìm được môi trường và điều kiện tối ưu, phải tiến hành các khảo sát đơn yếu tố chọn ra khoảng ảnh hưởng. Sau đó tiến hành sàng lọc đa yếu tố bằng thiết kế Plackett-Burman. Kết quả cho thấy có 4 yếu tố ảnh hưởng nhất: pH, tốc độ lắc, nồng độ yeast extract, tỷ lệ nạp giống ($p<0,05$), tiến hành tối ưu hóa bằng thiết kế Box-Behnken. Kết quả môi trường tối ưu cho vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026 với thành phần dinh dưỡng (w/v): mannitol 2%; yeast extract 1%; $MgSO_4$ 0,01%; KH_2PO_4 0,025%; $FeCl_3$ 0,0001%; $CaCO_3$ 0,1% và điều kiện tối ưu nuôi lắc: pH 5; nhiệt độ 30^oC; tốc độ lắc 180 vòng/phút; tỷ lệ nạp giống 5% (v/v); sau 30 giờ nuôi cấy đạt mật độ 9,690 log (CFU/mL), cao hơn 7,24 lần so với môi trường GECB ban đầu 8,830 log (CFU/mL).

Từ khóa: Box-Behnken, *Nguyenibacter vanlangensis*, phân giải lân, Plackett-Burman, tối ưu hóa.

MỞ ĐẦU

Phosphorus (P) là chất dinh dưỡng đa lượng cần thiết cho sự sinh trưởng của cây trồng, nguyên tố chính trong sản xuất nông nghiệp toàn cầu. Phosphorus rất quan trọng đối với quá trình trao đổi chất của thực vật và thực hiện nhiều chức năng bao gồm phát triển rễ, làm tăng đáng kể năng suất cây trồng và có khả năng kháng các bệnh khác nhau của cây (Xu *et al*., 2020) . Theo thống kê của Yuan Wang và đồng tác giả (2011), ước tính đến hai tỷ hecta đất nông nghiệp trên toàn thế giới bị ảnh hưởng bởi lượng P thấp và thiếu P trực tiếp gây ra sự giảm đáng kể (5-15%) năng suất cây trồng. Theo số liệu của Bộ Công Thương năm 2020, mỗi năm Việt Nam tiêu thụ khoảng 11 triệu tấn phân hóa học để phục vụ cho ngành nông nghiệp. Việc sử dụng phân bón hóa học không đúng cách gây ra ô nhiễm nguồn nước, đất, thực phẩm, ảnh hưởng đến sức khỏe con người. Bón phân lân hóa học làm đất tích lũy kim loại nặng cadmium (Cd). Dư thừa phosphorus trong các sản phẩm trồng trọt hoặc nguồn nước làm giảm khả năng hấp thu calcium, gây ra nhiều bệnh loãng xương. Trong đất, hầu hết đều có hàm lượng phosphorus tổng số cao nhưng ở dạng này cây trồng không thể hấp thụ được. Khai thác vi khuẩn phân giải phosphorus là một giải pháp sinh học mới được phát triển để tăng cường khả năng cung cấp P của vùng rễ; tuy nhiên, ảnh hưởng của những vi khuẩn này đến chất lượng đất và các giai đoạn phát triển khác nhau của thực vật vẫn chưa được biết rõ (Shen *et al*., 2011). Từ thực tiễn trên, đề tài "Tối ưu hóa điều kiện và môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026 có hoạt tính phân giải lân" cần được nghiên cứu sâu hướng đến sản phẩm sinh học hiệu quả cao nhằm giảm lượng phân hóa học, hóa chất xử lý ô nhiễm môi trường,... giúp tiết kiệm chi phí cho sản xuất nông nghiệp, bảo vệ sức khỏe con người và tài nguyên môi trường.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chủng vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026 từ bộ sưu tập giống vi sinh vật của Phòng Công nghệ Vi sinh-Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

Vi khuẩn được giữ giống trên môi trường thạch GECA và lên men trong môi trường GECB lỏng. Thành phần môi trường GECA gồm 20 g/L glucose, 3 g/L yeast extract, 3 g/L peptone và 24 g/L agarose; GECB gồm 20 g/L glucose, 3 g/L yeast extract và 3 g/L peptone.

Phương pháp

Phương pháp phân tích

Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được tính toán bằng Microsoft Office Excel. Xử lý số liệu bằng phân tích ANOVA 1 nhân tố và phân hạng bằng phần mềm The SAS System for V8. Thiết kế thí nghiệm sàng lọc đa yếu tố bằng mô hình Plackett-Burman, thí nghiệm tối ưu hóa bằng mô hình Box-Behnken và xử lý số liệu phân tích ANOVA bằng phần mềm JMP 10.

Phương pháp xác định mật độ vi sinh vật

Sử dụng phương pháp pha loãng liên tục và phương pháp trải đĩa trên môi trường thạch GECA (Parker *et al*., 2016). Kết quả thu được là mật độ vi khuẩn (CFU/mL) với Colony-forming unit là đơn vị hình thành khuẩn lạc.

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát đơn yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026

Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026 được khảo sát trên môi trường GECB. Có 9 yếu tố được lựa chọn để khảo sát là thời gian thu mẫu (16-44 giờ), nhiệt độ (20-40^{o}C), tốc độ lắc (100-260 vòng/phút), tỷ lệ nạp giống (0,5-10%), pH (4-10) được thực hiện trên môi trường GECB. Các yếu tố còn lại là nguồn carbon được thực hiện bằng cách thay đổi lần lượt nguồn đường glucose thành các nguồn khác (glycerol, mannitol, sucrose, fructose và mật rỉ) và nguồn đạm yeast extract (YE), peptone được thay thế bởi nguồn khác (casein, NH_4Cl, $(NH_4)_2HPO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, peptone và yeast extract). Kết quả của 2 yếu tố này là tiền đề để thực hiện khảo sát nồng độ (0,5-4%) nguồn carbon và nitrogen cho các thí nghiệm tiếp theo. Các thí nghiệm trên được thực hiện tuần tự, thay đổi từng yếu tố, các yếu tố không được khảo sát sẽ được cố định ở mức thời gian nuôi cấy 24 giờ, nhiệt độ 30^{o}C, tốc độ lắc 180 vòng/phút và pH 5,5.

Sàng lọc đa yếu tố ảnh hưởng bằng thiết kế Plackett-Burman

Để xác định được các yếu tố ảnh hưởng và mức độ ảnh hưởng của từng yếu tố đến sinh trưởng của vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026, ma trận sàng lọc Plackett-Burman (Plackett and Burman, 1946) được thiết kế bằng phần mềm JMP 10, dựa trên kết quả khảo sát đơn yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng của vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026 phía trên.

Trong ma trận Plackett-Burman, 12 yếu tố được nghiên cứu với 3 mức độ là thấp nhất (-1), trung tâm (0) và cao nhất (1) ứng với phạm vi khảo sát đơn yếu tố phía trên trình bày ở (Bảng 3). Mô hình được xây dựng để sàng lọc các yếu tố quan trọng ảnh hưởng nhất đến sinh khối vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026. Các yếu tố được sàng lọc có độ tin cậy ($p<0,05$) sẽ được chọn để đưa vào mô hình tối ưu hóa bằng thiết kế Box-Behnken. Những yếu tố có độ tin cậy ($p>0,05$) sẽ chọn ở mức thấp (-1) hoặc mức trung tâm (0) tùy vào dự đoán của Plackett-Burman để đưa vào Box-Behnken với giá trị không thay đổi.

Tối ưu hóa bằng thiết kế Box-Behnken

Sau khi sàng lọc bằng ma trận Plackett-Burman, các yếu tố có độ tin cậy $p<0,05$ được chọn để đưa vào thí nghiệm tối ưu hóa để tìm điểm cực trị cho từng yếu tố, nghiên cứu ở 3 mức độ là thấp nhất (-1), trung tâm (0) và cao nhất (1) trong Box-Behnken (Castillo, 2007) trên phần mềm JMP 10. Từ kết quả thực nghiệm, tiến hành phân tích trên phần mềm JMP 10 để xác định điểm tối ưu của các yếu tố cho sinh khối *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026 đạt cực đại.

Kiểm định thực tế mô hình tối ưu hóa

Theo mô hình do phần mềm JMP 10 dự đoán giá trị tối ưu của từng yếu tố làm hàm đáp ứng đạt cực đại đã được xác định. Để kiểm chứng mô hình, thí nghiệm với thành phần môi trường và điều kiện tối ưu được thực hiện 11 lần lặp lại.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả khảo sát đơn yếu tố ảnh hưởng đến sinh trưởng vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026

Bảng 1. Kết quả khảo sát đơn yếu tố ảnh hưởng đến vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026

Yếu tố	Mức tốt	Mật độ log (CFU/mL)	Yếu tố	Mức tốt	Mật độ log (CFU/mL)
Thời gian thu mẫu (giờ)	30	8,946	Nguồn carbon	Mannitol	9,090
Nhiệt độ (^{o}C)	30	8,971	Nồng độ nguồn carbon (%)	3,5	9,038
Tốc độ lắc (vòng/phút)	180	9,099	Nguồn nitrogen	Yeast extract	8,962
pH	8	9,129	Nồng độ nguồn nitrogen (%)	2	8,924
Tỷ lệ nạp giống (%)	4	9,040			

Kết quả sinh khối vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026 thu được sau từng thí nghiệm khảo sát cho thấy tất cả các yếu tố khảo sát đều có ảnh hưởng đến sinh trưởng của vi sinh vật, phụ thuộc rất lớn vào các yếu tố dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy. Do đó, các yếu tố này được đưa vào nghiên cứu sàng lọc bằng mô hình Plackett-Burman. Ngoài các yếu tố trên, các nguồn khoáng như KH_2PO_4 được thêm vào để duy trì độ ổn định pH, $FeCl_3$ để làm cofactor cho enzyme tế bào, $MgSO_4$ để cung cấp nguồn lưu huỳnh cho tế bào, NaCl để duy trì ổn định áp suất thẩm thấu màng tế bào với các mức theo môi trường nghiên cứu trước đó (*Difco & BBL Manual*, 2009).

Kết quả sàng lọc đa yếu tố ảnh hưởng bằng thiết kế Plackett-Burman

Bảng 2. Kết quả sàng lọc thực nghiệm Plackett-Burman

Pattern	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12	Y
	Nhiệt độ	Tốc độ lắc	Thời gian nuôi	Tỷ lệ nạp giống	Mannitol (%)	YE (%)	KH_2PO_4 (%)	$MgSO_4$ (%)	NaCl (%)	$FeCl_3$ (%)	$CaCO_3$ (%)	pH	log (CFU/mL)
NT 1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	0,000
NT 2	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	8,869
NT 3	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	8,079
NT 4	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1	8,708
NT 5	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	9,021
NT 6	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	8,919
NT 7	-1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	0,000
NT 8	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	8,820
NT 9	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1	1	0,000
NT 10	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	9,602
NT 11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7,394
NT 12	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1	8,845
NT 13	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	8,332
NT 14	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	9,312
NT 15	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	0,000
NT 16	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	9,253
NT 17	1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1	1	-1	8,556
NT 18	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	3,439
NT 19	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	0,000
NT 20	1	1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	8,438
NT 21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,000

Bảng 3. Mức độ ảnh hưởng và độ tin cậy của các yếu tố trong mô hình Plackett-Burman

Ký hiệu	Mức		Giá trị	
	Thấp (-1)	Cao (+1)	t Ratio	Prob>|t|
X1	25	35	-0,82	0,4355
X2	180	260	-3,18	**0,0130***
X3	16	44	-1,68	0,1306
X4	0,5	10	4,34	**0,0025***
X5	2	5	-1,26	0,2433
X6	0,5	3,5	-3,36	**0,0099***
X7	0	0,05	0,76	0,4697
X8	0	0,02	0,31	0,7616
X9	0	0,02	-1,80	0,1101
X10	0	0,0002	0,69	0,5126
X11	0	0,2	1,70	0,1282
X12	6	10	-8,36	**<,0001***
*mức ý nghĩa α=0,05				
p=0,0014				
R^2=0,939				

Kết quả phân tích ANOVA (Bảng 3) cho thấy mô hình sàng lọc có ý nghĩa thống kê (p=0,0014<0,05), hệ số hồi quy R^2 đạt 0,939, cho thấy số liệu thực nghiệm tương thích với mô hình 93,9%. Từ đó, 12 yếu tố được nghiên cứu đều có tác động nhất định đến sinh trưởng của vi khuẩn. Các yếu tố có ảnh hưởng có ý nghĩa về mặt thống kê (p<0,05), sắp xếp theo thứ tự ảnh hưởng giảm dần như sau: pH, tỷ lệ nạp giống, nồng độ yeast extract và tốc độ lắc. Các yếu tố này được đưa vào mô hình tối ưu hóa Box-Behnken và lần lượt ký hiệu là X1, X2, X3, X4.

Các yếu tố có ảnh hưởng không có ý nghĩa thống kê (p>0,05) được chọn cố định đưa vào mô hình Box-Behnken như sau: mannitol 2%; $MgSO_4$ 0,01%; KH_2PO_4 0,025%; $FeCl_3$ 0,0001%; $CaCO_3$ 0,1% (w/v); nhiệt độ 30^oC; thời gian thu mẫu 30 giờ.

Kết quả tối ưu hóa bằng thiết kế Box-Behnken

Mô hình Box-Behnken giúp xác định điểm tối ưu cho giá trị sinh khối vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026 đạt cực đại.

Bảng 4. Kết quả mô hình tối ưu Box-Behnken

Pattern	X1	X2	X3	X4	Y thực nghiệm	Y mô hình
	pH	Tỷ lệ nạp giống (%)	Nồng độ YE (%)	Tốc độ lắc (vòng/phút)	Log (CFU/mL)	Log (CFU/mL)
NT 1	7	5	0,6	150	9,201	9,146
NT 2	7	5	0,2	180	9,408	9,323
NT 3	5	5	0,6	180	9,568	9,540
NT 4	9	5	0,6	180	8,000	8,159
NT 5	7	5	1	180	9,140	8,929
NT 6	7	5	0,6	210	8,477	8,698
NT 7	7	10	0,2	150	9,236	9,313
NT 8	5	10	0,6	150	9,272	9,199
NT 9	9	10	0,6	150	8,700	8,654
NT 10	7	10	1	150	9,111	9,093
NT 11	5	10	0,2	180	9,200	9,262
NT 12	9	10	0,2	180	9,398	9,127
NT 13	7	10	0,6	180	9,272	9,281
NT 14	7	10	0,6	180	9,230	9,281
NT 15	7	10	0,6	180	9,342	9,281
NT 16	5	10	1	180	9,243	9,629
NT 17	9	10	1	180	8,477	8,426
NT 18	7	10	0,2	210	9,260	9,222
NT 19	5	10	0,6	210	9,519	9,284
NT 20	9	10	0,6	210	8,500	8,492
NT 21	7	10	1	210	9,241	9,108
NT 22	7	15	0,6	150	9,143	9,036
NT 23	7	15	0,2	180	9,243	9,396
NT 24	5	15	0,6	180	9,342	9,127
NT 25	9	15	0,6	180	9,199	9,171
NT 26	7	15	1	180	9,428	9,455
NT 27	7	15	0,6	210	9,238	9,408

Bảng 5. Kết quả mức độ ảnh hưởng của mô hình Box-Behnken

Ký hiệu	Giá trị		Ký hiệu	Giá trị	
	t Ratio	Prob>|t|		t Ratio	Prob>|t|
X1	-5,11	**0,0003***	X2X3	1,00	0,3375
X2	2,29	**0,0409***	X2X4	1,81	0,0960
X3	-1,28	0,2261	X3X4	0,23	0,8191
X4	-0,29	0,7765	X1X1	-2,28	**0,0419***
X1X2	3,14	**0,0085***	X2X2	-0,60	0,5606
X1X3	-2,35	**0,0365***	X3X3	0,54	0,5983
X1X4	-0,54	0,5959	X4X4	-1,53	0,1509
*mức ý nghĩa α = 0,05					

p mô hình	0,0071
R^2 mô hình	0,840
p Lack of Fit	0,0508

Bảng 6. Kết quả phân tích hồi quy tuyến tính sau khi loại bỏ các hệ số hồi quy không ý nghĩa thống kê

Yếu tố	Estimate	t Ratio	Prob > |t|
Intercept	**9,198**		
X1 pH (5-9)	-0,334	-5,050	**<,0001***
X2 Tỷ lệ nạp giống (5-15)	0,150	2,270	**0,0347***
X3 YE (0,2-1)	-0,084	-1,260	0,2215
X1*X2	0,356	3,110	**0,0055***
X1*X3	-0,267	-2,330	**0,0305***
X1*X1	-0,192	-2,170	**0,0426***

Kết quả phân tích ANOVA xác định các biến độc lập của phương trình hồi quy trong mô hình thực nghiệm ở Bảng 5 có độ tin cậy p<0,05. Dựa vào kết quả Bảng 6, xây dựng phương trình hồi quy có dạng $Y = 9,198 – 0,334X1 + 0,150X2 – 0,084X3 + 0,356X1X2 – 0,267X1X3 – 0,192X1^2$.

Trong đó, Y là mật độ vi khuẩn log (CFU/mL), X1, X2, X3 lần lượt là các yếu tố pH, tỷ lệ nạp giống (%) và nồng độ yeast extract (%).

Hệ số hồi quy R^2=0,840 cho thấy có 84,0% số liệu thực nghiệm tương thích với số liệu dự đoán theo mô hình. Theo Castillo (2007), giá trị R^2>0,75 thể hiện mô hình được xây dựng tương thích với thực nghiệm, khẳng định tính chính xác của mô hình và sự tồn tại của điểm tối ưu. Kết quả kiểm tra sự thiếu phù hợp (Lack of Fit) có p=0,0508>0,05 cho thấy sự thiếu phù hợp không có ý nghĩa thống kê.

Phương trình hồi quy cho thấy yếu tố pH, tỷ lệ nạp giống và hàm lượng yeast extract có tác động lớn đến sự hình thành sinh khối của vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026. Tuy nhiên, khi mật độ giống vào quá lớn dẫn đến thiếu hụt chất dinh dưỡng sau một khoảng thời gian, nên vi sinh vật chỉ tăng mật độ trong một khoảng thời gian nhất định rồi dừng lại. Ngoài ra, vi sinh vật cần dinh dưỡng ở một mức độ vừa đủ trong quá trình phát triển, nên khi tăng hàm lượng dinh dưỡng vượt mức tối ưu thì hoạt tính enzyme sẽ giảm do cơ chất tạo áp lực lớn lên quá trình sinh tổng hợp sinh học của vi khuẩn, đồng thời cơ chất tăng khi năng lực sinh tổng hợp sinh học chỉ ở mức giới hạn và đạt ngưỡng cực đại cũng làm hoạt tính enzyme giảm nên sinh khối cũng sẽ giảm. Ngược lại, khi hàm lượng dinh dưỡng thấp thì tế bào không đủ cơ chất để hình thành sinh khối.

Khi đưa 4 yếu tố ảnh hưởng chính từ thí nghiệm sàng lọc Plackett-Burman vào mô hình tối ưu hóa Box-Behnken, chỉ nhận được giá trị tối ưu của 3 yếu tố, yếu tố tốc độ lắc ảnh hưởng không có ý nghĩa thống kê (p>0,05). Điều này có thể giải thích là yếu tố tốc độ lắc ở kết quả sàng lọc bằng thí nghiệm Plackett-Burman được nghiên cứu ở khoảng giá trị khác với thiết kế Box-Behnken.

Từ mô hình tối ưu cho thấy, giá trị các yếu tố ảnh hưởng chính được xác định: pH 5, tỷ lệ nạp giống 5%, nồng độ yeast extract 1% và mật độ vi khuẩn đạt cực đại là 9,730 log (CFU/mL).

Kết quả kiểm định thực tế mô hình tối ưu hóa

Tiến hành kiểm chứng mô hình bằng thực nghiệm tại các giá trị tối ưu. Kết quả Bảng 7 cho thấy mật độ sau 30 giờ nuôi cấy là 9,690 log (CFU/mL), tương thích với mật độ mà mô hình đã dự đoán là 9,730 log (CFU/mL).

Bảng 7. Kết quả kiểm định thực tế mô hình tối ưu hóa

Dự đoán mô hình	9,730 log (CFU/mL)
Thực nghiệm	9,690 log (CFU/mL)
Môi trường ban đầu	8,830 log (CFU/mL)

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Với mục tiêu tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến sinh khối vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026, chúng tôi đã khảo sát đơn yếu tố ảnh hưởng đến mật độ vi khuẩn, sau đó sử dụng phương pháp quy hoạch thực nghiệm sàng lọc các yếu tố ảnh hưởng đến sinh khối bằng ma trận Plackett-Burman và xây dựng mô hình tối ưu hóa theo ma trận thực nghiệm Box-Behnken. Với phương pháp này chúng tôi thu nhận được sinh khối cực đại 9,690 log (CFU/mL) tại các giá trị ưu với thành phần dinh dưỡng mannitol 2%; yeast extract 1%; $MgSO_4$ 0,01%; KH_2PO_4 0,025%; $FeCl_3$ 0,0001%; $CaCO_3$ 0,1% (w/v) và kiện tối ưu nuôi lắc: pH 5, nhiệt độ 30^oC, tốc độ lắc 180 vòng/phút, tỷ lệ nạp giống 5% (v/v), sau 30 giờ. Kết quả tối ưu cao hơn môi trường ban đầu 7,24 lần (mật độ tối ưu 9,690 log (CFU/mL), mật độ trên môi trường GECB ban đầu 8,830 log (CFU/mL).

Tiếp tục nghiên cứu đánh giá nhiều chỉ tiêu khác của vi khuẩn *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026. Từ đó hướng đến nghiên cứu sản xuất chế phẩm phân bón vi sinh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Castillo ED (2007). Process Optimization, International Series in Operations Research & Management Science. *Springer US, Boston, MA.*

Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media (2009). Becton Dickinson and Company.

Parker N, Schneegurt M, Tu A.H.T, Lister P, Forster B.M (2016). Media Used for Bacterial Growth - Microbiology | OpenStax [WWW Document].

Plackett RL, Burman JP (1946). The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika,* 33: 305–325.

Shen J, Yuan L, Zhang J, Li H, Bai Z, Chen X, Zhang W, Zhang F (2011). Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. *Plant Physiology,* 156: 997–1005.

Xu X, Mao X, Van Zwieten L, Niazi NK, Lu K, Bolan NS, Wang H (2020). Wetting-drying cycles during a rice-wheat crop rotation rapidly (im)mobilize recalcitrant soil phosphorus. *J Soils Sediments,* 20: 3921–3930.

OPTIMIZATION OF CONDITONS AND CULTURE MEDIUM FOR *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026 BACTERIA WITH PHOSPHORUS-SOLUBILIZING CAPABILITY

Hoa Truong Minh Hieu[1*], Pham Thi Duy Anh[1], Tran Chi Hieu[2], Phan My Hanh[2]

[1]*Department of Biology-Biotechnology, University of Science University of Ho Chi Minh City*

[2]*Department of Microbial Biotechnology, Biotechnology Center of Ho Chi Minh City*

SUMMARY

Phosphorus (P) is an important macronutrient for the growth of plants, but most of the P in the soil is in insoluble form and cannot be used by plants. *Nguyenibacter vanlangensis* is a type of bacteria possibly phosphorus-insolubility into phosphorus-solubility, but it still not been widely used in agricultural production. Therefore, the research was to find the optimal values of factors that directly impact the growth process of bacteria. To find the optimal culture medium and conditions, single-factor surveys must be done to select the influence range. Then, multifactor screening was performed using the Plackett-Burman design. The results displayed that there were 4 most influential factors: pH, rotation speed, yeast extract, inoculum size ($p<0.05$), optimized using Box-Behnken design. Optimal culture medium of *Nguyenibacter vanlangensis* HBCM-B0026 strain results in: nutritional ingredients mannitol 2%, yeast extract 1%, $MgSO_4$ 0.01%, KH_2PO_4 0.025%, $FeCl_3$ 0.0001%, $CaCO_3$ 0.1% (w/v) and optimal condition is pH 5, temperature 30^oC, rotation speed of 180 (rpm), inoculum size 5% (v/v) after 30 hours of culture reaching a density of 9.690 log (CFU/mL), higher by about 7.24 fold than the initial GECB culture medium.

Keywords: Box-Behnken, *Nguyenibacter vanlangensis*, phosphorus-solubilizing bacteria, Plackett-Burman, optimization.

[*] Author for correspondence: Tel: +84-767618747; Email: 09hoatruongminhhieu91@gmail.com

TỐI ƯU HÓA MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY VI KHUẨN *Azotobacter chroococcum* CÓ HOẠT TÍNH CỐ ĐỊNH ĐẠM

Phạm Thị Duy Anh[1*], Hoa Trương Minh Hiếu[1], Trần Chí Hiếu[2], Phan Mỹ Hạnh[2]

[1]Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học - Trường Đại học Khoa học Tự nhiên - Thành phố Hồ Chí Minh

[2]Phòng Công nghệ Vi sinh - Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Azotobacter chroococcum không chỉ đóng vai trò chính trong việc cố định đạm mà còn giữ vai trò quan trọng trong nền nông nghiệp bền vững vì có đặc tính thúc đẩy tăng trưởng thực vật cũng như sản xuất các tác nhân kiểm soát sinh học chống lại mầm bệnh gây hại trên thực vật. Trong nghiên cứu này, quá trình nuôi cấy thu sinh khối *Azotobacter chroococcum* được tối ưu hóa bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm. Thực hiện khảo sát đơn yếu tố chọn ra khoảng ảnh hưởng của mỗi yếu tố. Sàng lọc bằng phương pháp Plackett – Burman và chọn ra 3 yếu tố có tác động mạnh nhất là pH, nồng độ $(NH_4)_2SO_4$ và tỷ lệ nạp giống ($p < 0,05$). Tìm khoảng tối ưu của 3 yếu tố ảnh hưởng chính bằng phương pháp leo dốc và tối ưu hóa môi trường nuôi cấy bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) theo cấu trúc có tâm (CCD). Thông số của thành phần và điều kiện môi trường tối ưu cho chủng *Azotobacter chroococcum* HBCM-B0068 được xác định: mannitol 0,5%; $(NH_4)_2SO_4$ 0,15%; peptone 0,15%; $MgSO_4$ 0,015%; K_2HPO_4 0,125%; NaCl 0,25%; $FeCl_3$ 0,0005%; Na_2MoO_4 0,00025%; $CaCO_3$ 0,25% (w/v); tốc độ lắc 180 vòng/phút; pH 5,3; nhiệt độ 30^oC và tỷ lệ nạp giống 6,68% (v/v) đạt mật độ tối đa là 9,477 log (CFU/mL) sau 24 giờ nuôi cấy, cao hơn 6,67 lần so với môi trường ban đầu TSB là 8,671 log (CFU/mL).

Từ khóa: Azotobacter chroococcum, cố định đạm, leo dốc nhất, Plackett – Burman, RSM – CCD.

MỞ ĐẦU

Việt Nam là nước sản xuất nông nghiệp lớn vì vậy phân bón là một yếu tố vô cùng quan trọng và không thể thiếu, giúp thúc đẩy năng suất lao động, tăng sản lượng nông nghiệp và nâng cao chất lượng cây trồng. Theo thống kê từ năm 1985 đến nay, mức tiêu thụ phân đạm liên tục gia tăng khoảng 7,2%/năm. Để nâng cao năng suất cây trồng, nông dân đã tăng lượng phân bón gấp 2-3 lần, thậm chí 5-7 lần so với nhu cầu, dẫn đến dư thừa lượng nitrat trong rau, củ, quả. Ngoài ra, việc sử dụng đạm hóa học trong trồng trọt bừa bãi khiến dư thừa nitrat và khi vượt ngưỡng sẽ biến thành nitrit gây nguy hại cho con người, ảnh hưởng tới nguồn gen các loài sinh vật. Đồng thời, phần dư thừa chưa được cây trồng hấp thu sẽ tồn tại trong đất hoặc bị rửa trôi theo nguồn nước và gây ô nhiễm nguồn nước. Trong tình huống như vậy, phân bón sinh học trở thành giải pháp thay thế tốt nhất để duy trì độ phì nhiêu của đất (Bhardwaj *et al*., 2014). Vi khuẩn cố định nitơ từ khí quyển bằng cách khử nitơ phân tử thành amoniac, chất này tiếp tục được sử dụng để đồng hóa thành các axit amin. Quá trình này được cho là cung cấp 200 triệu tấn đạm mỗi năm (Gosal *et al*., 2012).

Vì vậy, đề tài cung cấp môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* HBCM-B0068 có khả năng cố định đạm làm tiền đề cho việc sản xuất phân bón sinh học cung cấp dinh dưỡng cho cây trồng, hạn chế ô nhiễm môi trường, hướng đến nền nông nghiệp xanh và tận dụng nguồn đạm có sẵn trong không khí.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* HBCM-B0068 được cung cấp từ Phòng Công nghệ Vi sinh – Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh. Hóa chất và thiết bị máy móc sử dụng trong nghiên cứu này từ các hãng Himedia, Merck, Carl Zeiss, Mettler Toledo, Memmert, Thermo Fisher Scientific.

Phương pháp

Xác định mật độ tế bào

Xác định mật độ vi sinh trong mẫu bằng phương pháp pha loãng thập phân.

Khảo sát đơn yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tăng sinh khối vi khuẩn *Azotobacter chroococcum*

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tăng sinh khối trên môi trường TSB bao gồm: thời gian nuôi cấy (0 - 108 giờ), pH (3 - 11), nhiệt độ (20 - 40^oC), tốc độ lắc (150 - 210 vòng/phút), tỷ lệ nạp giống (0,5 - 9%), nguồn cacbon (mannitol, glucose, fructose, sucrose, mật rỉ) và nitơ (peptone, tryptone, yeast extract, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl), nồng độ cacbon (0 - 3,5%) và nitơ (0 - 4%) (Gutiérrez *et al*., 2011).

Khi khảo sát thí nghiệm đơn yếu tố, cần cố định các yếu tố còn lại ở mức phù hợp, trong trường hợp này chọn mức phù hợp cho toàn bộ thí nghiệm khảo sát như sau: thời gian là 24 giờ, nhiệt độ 30^{o}C, pH 7, tốc độ lắc 180 vòng/phút, tỷ lệ nạp giống 1% (Huang *et al*., 2019).

Sàng lọc các yếu tố có ảnh hưởng đến quá trình tăng sinh khối bằng thiết kế Plackett – Burman

Thí nghiệm Plackett – Burman được thiết kế dựa trên kết quả khảo sát đơn yếu tố chọn ra được khoảng ảnh hưởng ứng với phạm vi khảo sát, bổ sung thêm yếu tố khoáng ($MgSO_4$, K_2HPO_4, $FeCl_3$, Na_2MoO_4, $CaCO_3$ và NaCl). Hàm lượng các nguồn khoáng được lựa chọn dựa trên cơ sở các nghiên cứu (Gutiérrez *et al*., 2011; Huang *et al*., 2019; Mukhtar, 2018). Tổng 14 yếu tố được xem xét ở 3 mức độ: mức thấp (-1), mức cơ sở (0) và mức cao (+1) gồm 21 thí nghiệm được bố trí dựa theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm bằng phần mềm JMP 10 (Castillo, 2007).

Tìm khoảng tối ưu của các yếu tố ảnh hưởng chính bằng phương pháp leo dốc

Các thông số của phương pháp leo dốc được tính toán thông qua hệ số hồi quy từ phương trình hồi quy của thí nghiệm Plackett – Burman sau khi loại bỏ những yếu tố không ảnh hưởng đáng kể tới hàm mục tiêu (Nguyễn Văn Dự, Nguyễn Đăng Bình, 2011).

Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) theo cấu trúc có tâm (CCD)

Sau khi tìm được khoảng giá trị tối ưu từ thí nghiệm leo dốc, các yếu tố có ý nghĩa được đưa vào mô hình tối ưu hóa (RSM-CCD). Mỗi yếu tố được xem xét ở 5 mức độ (–α, –1, 0, +1, +α), trong đó mức trung tâm (0) dựa theo kết quả của thí nghiệm leo dốc, gồm 20 thí nghiệm được bố trí dựa theo phương pháp quy hoạch thực nghiệm bằng phần mềm JMP 10 (Nguyễn Văn Dự, Nguyễn Đăng Bình, 2011).

Kiểm định thực tế mô hình tối ưu hóa

Theo mô hình do phần mềm JMP 10 dự đoán giá trị tối ưu của từng yếu tố làm hàm đáp ứng đạt cực đại đã được xác định. Để kiểm chứng mô hình, thí nghiệm với thành phần và điều kiện môi trường tối ưu được thực hiện 11 lần lặp lại.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Khảo sát đơn yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tăng sinh khối vi khuẩn *Azotobacter chroococcum*

Bảng 1. Kết quả khảo sát đơn yếu tố

Yếu tố	Ngưỡng tốt nhất	Mật độ log (CFU/mL)	Khoảng đưa vào Plackett – Burman
Thời gian (giờ)	24	9,031	16 - 32
Nhiệt độ (^{o}C)	25	9,063	20 - 30
pH	8	9,079	5 - 11
Tốc độ lắc (vòng/phút)	180	8,922	120 - 240
Tỷ lệ nạp giống (%)	4,75	8,899	0,5 - 9
Mannitol (%)	0,5	9,002	0 - 1
Peptone (%)	0,15	8,85	0 - 0,3
$(NH_4)_2SO_4$ (%)	0,5	9,019	0 - 1

Kết quả về mật độ vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* thu được sau thí nghiệm đơn yếu tố cho thấy tất cả các yếu tố khảo sát đều có ảnh hưởng đến sinh trưởng của vi sinh vật. Do đó, các yếu tố này được đưa vào sàng lọc với mức nghiên cứu được trình bày ở Bảng 1.

Sàng lọc các yếu tố có ảnh hưởng chính đến quá trình tăng sinh khối bằng thiết kế Plackett – Burman

Bảng 2. Các biến trong ma trận Plackett – Burman và phân tích thống kê ANOVA

Ký hiệu	Yếu tố	Mức		Hệ số hồi quy	Giá trị	
		Thấp (-1)	Cao (+1)		t – Ratio	Prob > |t|
	Hệ số tự do			6,812		
X1	Nhiệt độ (^{o}C)	20	30	-0,162	-0,420	0,6919
X2	Tốc độ lắc (vòng/phút)	120	240	-0,121	-0,310	0,7658
X3	Thời gian nuôi	16	32	0,149	0,380	0,7143
X4	Tỷ lệ nạp giống (%)	0,5	9	1,071	2,750	**0,0333***
X5	Mannitol (%)	0	1	0,407	1,050	0,3360

X6	$(NH_4)_2SO_4$ (%)	0	1	-1,651	-4,240	**0,0054***
X7	Peptone (%)	0	0,3	0,671	1,720	0,1357
X8	$MgSO_4$ (%)	0	0,03	0,689	1,770	0,1269
X9	K_2HPO_4 (%)	0	0,25	-0,230	-0,590	0,5761
X10	$FeCl_3$ (%)	0	0,001	-0,451	-1,160	0,2902
X11	Na_2MoO_4 (%)	0	0,0005	0,247	0,630	0,5493
X12	$CaCO_3$ (%)	0	0,5	-0,293	-0,750	0,4801
X13	NaCl (%)	0	0,5	-0,857	-2,200	0,0700
X14	pH	5	11	-1,861	-4,780	**0,0031***
		R^2 = 0,9137			p-value = 0,0363	

Kết quả phân tích ở Bảng 2 cho thấy mô hình có ý nghĩa thống kê với p = 0,0363 < 0,05. Hệ số R^2 = 0,91, cho thấy số liệu thực nghiệm tương tích với số liệu dự đoán của mô hình.

Thí nghiệm này sàng lọc được 3 yếu tố ảnh hưởng chính là pH, nồng độ $(NH_4)_2SO_4$, tỷ lệ nạp giống. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với Huang và đồng tác giả (2019) khi tìm ra yếu tố có ảnh hưởng chính đến mật độ vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* là pH và tỷ lệ nạp giống. Phương trình hồi quy có dạng:

$$Y = 6,812 – 1,861X1 – 1,651X2 + 1,071X3$$

Trong đó, Y là hàm mục tiêu (log (CFU/mL)), X1, X2, X3 lần lượt là các yếu tố pH, nồng độ $(NH_4)_2SO_4$ (%) và tỷ lệ nạp giống (%).

Khoảng tối ưu của các yếu tố ảnh hưởng chính bằng phương pháp leo dốc

Kết quả tính toán bước chuyển động của ba yếu tố ảnh hưởng chính theo phương pháp leo dốc được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả tính toán bước chuyển động của các yếu tố ảnh hưởng chính

Thông số	pH – X1	$(NH_4)_2SO_4$ – X2	Tỷ lệ nạp giống (%) – X3
Mức thấp (-1)	5	0	0,5
Mức cơ sở (0)	8	0,5	4,75
Mức cao (+1)	11	1	9
Hệ số hồi quy bj	-1,861	-1,651	1,071
Khoảng biến thiên Δj	3,000	0,500	4,250
Δjbj	-5,583	-0,826	4,552
Bước chuyển động δj	-0,676	-0,100	0,551

Chọn bước chuyển động của δ_2 = -0,100 và tính toán các bước chuyển động còn lại.

$$\delta_3 = \delta_2 \frac{b_3 \Delta_3}{b_2 \Delta_2} = -0,100 \frac{4,552}{-0,826} = 0,551$$

$$\delta_1 = \delta_2 \frac{b_1 \Delta_1}{b_2 \Delta_2} = -0,100 \frac{-5,583}{-0,826} = -0,676$$

Bảng 4. Kết quả thí nghiệm leo dốc

Nghiệm thức	Các yếu tố ảnh hưởng			Mật độ log (CFU/mL)
	pH	$(NH_4)_2SO_4$ (%)	Tỷ lệ nạp giống (%)	
0	8,00	0,5	4,750	$9,074 \pm 0,010^{d}$
1	7,32	0,4	5,301	$9,213 \pm 0,058^{c}$
2	6,65	0,3	5,853	$9,318 \pm 0,068^{b}$
3	5,97	0,2	6,404	$9,298 \pm 0,012^{b}$
4	**5,29**	**0,1**	**6,956**	**$9,592 \pm 0,061^{a}$**
5	4,62	0,0	7,507	$9,550 \pm 0,006^{a}$

Chú thích: a, b, c, d, … là kết quả trắc nghiệm phân hạng được xét ở mức ý nghĩa (p < 0,05), những giá trị trung bình của các nghiệm thức nào có ít nhất một ký tự giống nhau thì sự khác biệt không có ý nghĩa.

Kết quả Bảng 4 cho thấy nghiệm thức 4 cho giá trị mật độ cao nhất 9,592 ± 0,061 log (CFU/mL) và sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với 4 nghiệm thức còn lại. Riêng nghiệm thức 5 tuy sự khác biệt không có ý nghĩa so với nghiệm thức 4 nhưng lý do không chọn nghiệm thức 5 vì yếu tố $(NH_4)_2SO_4$ ở nồng độ 0% là không phù hợp để tính mức alpha khi đưa vào thí nghiệm tối ưu. Vì vậy trong trường hợp này, khoảng giá trị của các yếu tố đưa vào thí nghiệm tối ưu là: pH (4,995 - 5,625), tỷ lệ nạp giống (6,680 - 7,232%), $(NH_4)_2SO_4$ (0,05 - 0,15%).

Tối ưu hóa môi trường nuôi cấy bằng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM) theo cấu trúc có tâm (CCD)

Bảng 5. Phân tích thống kê ANOVA của ma trận CCD

Nguồn	Bậc tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F-value	p-value	
Mô hình	9	0,288	0,032	19,169	**<,0001***	Ý nghĩa
Sự thiếu phù hợp (Lack of Fit)	5	0,010	0,002	1,494	**0,3349**	Không ý nghĩa
RSquare = 0,9452		RSquare Adj = 0,8959			RMSE = 0,0409	

**Có ý nghĩa ở độ tin cậy α = 0,05.*

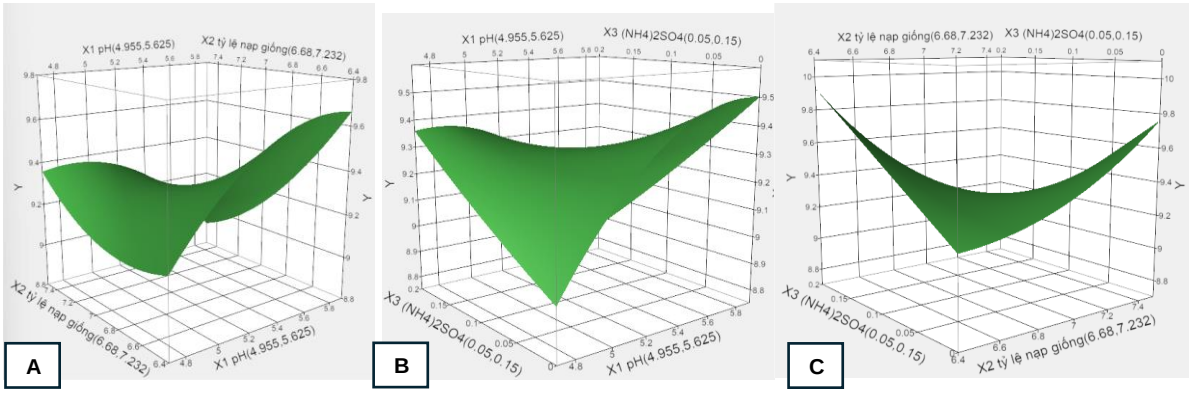
Kết quả phân tích phương sai của mô hình được trình bày trong Bảng 5, với p-value nhỏ (p-value < 0,0001), điều này cho thấy độ tương thích tốt của phương trình hồi quy so với số liệu thực nghiệm, từ đó cho thấy độ tin cậy cao trong thống kê. Hệ số hồi quy (R^2) là 0,9452 thể hiện rằng có 94,52% số liệu thực nghiệm tương tích với số liệu dự đoán của mô hình. Theo Castillo (2007), $R^2 > 0,75$ cho thấy rằng mô hình tương thích với thực tế. Kết quả kiểm định sự thiếu phù hợp của mô hình (Lack of Fit) có $p = 0,335 > 0,05$ cho thấy rằng sự thiếu phù hợp không có ý nghĩa thống kê, từ đó kết luận mô hình phù hợp (Zabeti *et al*., 2009).

Phương trình hồi quy đa thức bậc hai mô tả dự đoán mật độ vi khuẩn có dạng:

$$Y = 9,312 + 0,011X1 – 0,025X2 – 0,064X3 – 0,074X1X2 – 0,067X1X3 – 0,103X2X3 – 0,051X1^2 + 0,03X3^2$$

Trong đó, Y là mật độ vi khuẩn (log (CFU/mL)), X1, X2, X3 lần lượt là các yếu tố pH, nồng độ $(NH_4)_2SO_4$ (%) và tỷ lệ nạp giống (%).

Từ bề mặt đáp ứng của mô hình rút ra được giá trị tối ưu cho điều kiện và thành phần môi trường nuôi cấy vi khuẩn *Azotobacter chroococcum* như sau: pH 5,3; tỷ lệ nạp giống 6,68%; nồng độ $(NH_4)_2SO_4$ 0,15% và đạt mật độ tối đa là 9,486 log (CFU/mL) (Hình 1).



Hình 1. Bề mặt đáp ứng của mật độ vi khuẩn theo các cặp yếu tố ảnh hưởng

A) pH và tỷ lệ nạp giống, B) pH và nồng độ $(NH_4)_2SO_4$, C) Tỷ lệ nạp giống và nồng độ $(NH_4)_2SO_4$.

Kiểm chứng thực tế mô hình tối ưu hóa

Bảng 6. Kết quả thực nghiệm kiểm tra độ chính xác của mô hình tối ưu hóa

Nghiệm thức	Mật độ log (CFU/mL)
Môi trường ban đầu (TSB)	8,671
Môi trường tối ưu	9,477
Mô hình dự đoán	9,486

Kết quả kiểm chứng thực nghiệm của môi trường tối ưu là 9,477 log (CFU/mL) tương đương với kết quả dự đoán của mô hình là 9,486 log (CFU/mL). Từ đó cho thấy mô hình dự đoán rất đúng với thực nghiệm. Bên cạnh đó, mật độ vi khuẩn trong môi trường tối ưu cao hơn 6,67 lần so với môi trường TSB là 8,671 log (CFU/mL).

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Từ các kết quả nghiên cứu trên xác định được thông số thành phần và điều kiện môi trường tối ưu cho chủng *Azotobacter chroococcum* HBCM-B0068 là mannitol 0,5%; $(NH_4)_2SO_4$ 0,15%; peptone 0,15%; $MgSO_4$ 0,015%; K_2HPO_4 0,125%; NaCl 0,25%; $FeCl_3$ 0,0005%; Na_2MoO_4 0,00025%; $CaCO_3$ 0,25%; tốc độ lắc 180 vòng/phút; pH 5,3; nhiệt độ 30^oC và tỷ lệ nạp giống 6,68% đạt mật độ tối đa là 9,477 log (CFU/mL) sau 24 giờ nuôi cấy, cao hơn 6,67 lần so với môi trường ban đầu TSB là 8,671 log (CFU/mL).

Tiếp tục đánh giá khả năng cố định đạm của chủng *Azotobacter chroococcum* HBCM-B0068 nuôi cấy trong môi trường trước và sau khi tối ưu. Từ đó hướng đến ứng dụng sản xuất phân bón sinh học.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu này được thực hiện tại phòng Công nghệ Vi sinh thuộc Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh. Tôi xin cảm ơn đến Trung tâm Công nghệ Sinh học đã tạo điều kiện thuận lợi, cảm ơn nhóm nghiên cứu đã hỗ trợ cùng tôi thực hiện nghiên cứu này.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bhardwaj D, Ansari M, Sahoo R, Tuteja N (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbial cell factories,* 13: 66.

Castillo ED (2007). Process Optimization, International Series in Operations Research & Management Science. *Springer US, Boston, MA.*

Gosal SK, Kalia A, Uppal SK, Kumar R, Walia SS, Singh K, Singh H (2012). Assessing the Benefits of Azotobacter Bacterization in Sugarcane: A Field Appraisal. *Sugar Tech,* 14: 61–67.

Gutiérrez I, Torres Geraldo A, Moreno N (2011). Optimising carbon and nitrogen sources for Azotobacter chroococcum growth. *African Journal of Biotechnology,* 10: 2951–2958.

Huang JF, Zhang DF, Leng B, Lin ZC, Pan YT (2019). Response surface optimization of conditions for culturing Azotobacter chroococcum in Agaricus bisporus industrial wastewater. *J Gen Appl Microbiol,* 65: 163–172.

Mukhtar H (2018). Optimization of growth conditions for Azotobacter species and their use as biofertilizer. *JBMOA* 6.

Nguyễn Văn Dự, Nguyễn Đăng Bình (2011). Quy hoạch thực nghiệm trong kỹ thuật. *Khoa học và Kỹ thuật*.

Zabeti M, Daud WMAW, Aroua MK (2009). Optimization of the activity of CaO/Al2O3 catalyst for biodiesel production using response surface methodology. *Applied Catalysis A: General,* 366: 154–159.

OPTIMIZATION OF CULTURE MEDIUM FOR *Azotobacter chroococcum* BACTERIA WITH NITROGEN FIXATION CAPABILITY

Pham Thi Duy Anh[1*], Hoa Truong Minh Hieu[1], Tran Chi Hieu[2], Phan My Hanh[2]

[1]*Department of Biology - Biotechnology – University of Science University of Ho Chi Minh city*

[2]*Department of Microbial Biotechnology, Biotechnology Center of Ho Chi Minh City*

SUMMARY

Azotobacter chroococcum not only takes a key role in nitrogen fixation but also plays an important role in sustainable agriculture because of its particularity that is plant growth promoting rhizobacteria as well as the production of biological control agents against plant pathogens. In this research, the process of cultivating *Azotobacter chroococcum* biomass was optimized using the experimental planning method. We conducted a single-factor survey to determine the range of influence for each factor. Screening using the Plackett-Burman method was conducted and 3 factors with the strongest impact were selected: pH, $(NH_4)_2SO_4$ concentration and inoculum size ($p < 0,05$). Finding the optimal range of the 3 main influencing factors using the method of steepest ascent and optimizing the culture medium using the response surface method (RSM) according to the central composite design (CCD). The parameters of component and condition medium were determined: mannitol 0.5%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.15%, peptone 0.15%, $MgSO_4$ 0.015%, K_2HPO_4 0.125%, NaCl 0.25%, $FeCl_3$ 0.0005%, Na_2MoO_4 0.00025%, $CaCO_3$ 0.25% and with conditions such as rotation speed of 180 rpm, pH 5.3, temperature of 30^oC, inoculum size 6.68% (v/v) reaching a maximum density of 9.477 log (CFU/mL) after 24 hours of culture, higher by about 6.67 fold than the initial TSB culture medium is 8.671 log (CFU/mL).

Keywords: Azotobacter chroococcum, nitrogen fixation, Plackett-Burman, Method of Steepest Ascent, RSM-CCD.

[*] Author for correspondence: Tel: +84-979952601; Email: anhduypham5112002@gmail.com

PHÂN LẬP NẤM *Phytophthora* GÂY BỆNH TRÊN CÂY SẦU RIÊNG VÀ XÁC ĐỊNH CÁC ĐIỀU KIỆN SINH TRƯỞNG TỐI ƯU CỦA NẤM GÂY BỆNH

Trần Thị Hà Trang, Ngô Văn Anh*, Nguyễn Văn Bốn, Nguyễn Anh Dũng

Viện Công nghệ sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên

TÓM TẮT

Sầu riêng (*Durio zibethinus*) được mệnh danh là "Vua của các loại quả nhiệt đới", hiện nay, cây sầu riêng trở thành loại cây ăn quả chủ lực của tỉnh Đắk Lắk. Tuy nhiên, sự phát triển tự phát và không theo quy hoạch dẫn đến sự thiếu bền vững trong phát triển cây sầu riêng tại tỉnh Đắk Lắk. Bệnh hại do *Phytophthora palmivora* là bệnh hại vi sinh vật duy nhất gây chết cây sầu riêng được ghi nhận tại Việt Nam và trên thế giới. Mục tiêu của nghiên cứu này là phân lập, tuyển chọn và định danh chủng nấm bệnh *Phytophthora palmivora* làm cơ sở cho các nghiên cứu ứng dụng trong quản lý bệnh hại sầu riêng tại địa phương. Trong nghiên cứu này, sử dụng phương pháp tách đỉnh sợi nấm đơn đã phân lập được ba chủng *Phytophthora* sp. gây bệnh vàng lá thối vỏ cây sầu riêng từ mẫu bệnh tại tỉnh Đăk Lăk. Tuyển chọn được *Phytophthora* sp. DL1 gây bệnh nghiêm trọng (72,22% gây chết cây) trên cây sầu riêng trong điều kiện vườn ươm. Định danh sinh học phân tử dựa trên trình tự gen 28S rRNA xác định được chủng nấm bệnh này là *Phytophthora palmivora* DL1. Kết quả nghiên cứu điều kiện nhân nuôi thích hợp cho thấy chủng nấm *P. palmivora* DL1 sinh trưởng tốt ở pH 6,5, nhiệt độ nuôi cấy 30^0C và chiếu sáng liên tục trên môi trường PDA. Kết quả thu được trong nghiên cứu là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về kiểm soát bệnh hại do nấm *Phytophthora palmivora* gây ra trên cây sầu riêng, góp phần sản xuất sầu riêng hiệu quả và bền vững.

Từ khóa: Đắk Lắk, Sầu riêng, *Phytophthora palmivora*.

MỞ ĐẦU

Cây sầu riêng (*Durio zibethinus*) là loại cây ăn quả chủ lực của tỉnh Đắk Lắk với diện tích lớn nhất trong khu vực Tây Nguyên (chiếm 43,91%). Năng suất đạt 16,7 tấn/ha, sản lượng đạt 86,8 nghìn tấn với giá trị khoảng 4 nghìn tỉ đồng (Sở NN&PTNT tỉnh Đắk Lắk, 2021).

Tuy nhiên, sự phát triển tự phát và không theo quy hoạch đã dẫn đến sự thiếu bền vững trong phát triển cây sầu riêng tại tỉnh Đắk Lắk. Sầu riêng được sản xuất tập trung với mật độ cao hoặc được trồng xen với các loại cây trồng khác như cây cà phê, hồ tiêu hoặc trồng trên nền đất cũ hồ tiêu và cà phê mà chưa được xử lý nấm bệnh tốt nên gây thiệt hại lớn cho người dân (Chi cục trồng trọt và BVTV tỉnh Đắk Lắk, 2017; Nguyễn Văn Minh và Đỗ Thị Nga, 2021). Các nghiên cứu trong nước cũng như trên thế giới đã ghi nhận sự xuất hiện của nấm bệnh gây ảnh hưởng lớn đến năng suất và chất lượng sầu riêng (Ngô Văn Anh *et al*., 2024). Ngoài ra, bệnh hại do nấm *Phytophthora* là bệnh hại vi sinh vật gây chết cây sầu riêng được ghi nhận tại Việt Nam và trên thế giới (Nguyễn Đức Huy *et al*., 2021; Bruno Scanu *et al*., 2021; Pornprapa Kongtragoul *et al.,* 2021; Phạm Hồng Hiển *et al*., 2021).

Do đó, việc nghiên cứu đặc điểm sinh học là một trong những chỉ tiêu quan trọng trong việc phân loại và giám định tác nhân gây bệnh, làm cơ sở định hướng trong phòng ngừa và kiểm soát dịch hại do nấm *Phytophthora* gây ra. Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định được loài *Phytophthora* gây bệnh vàng lá thối vỏ nghiêm trọng trên cây sầu riêng, góp phần sản xuất sầu riêng hiệu quả và bền vững tại tỉnh Đắk Lắk.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

Môi trường: PDA (Sigma Aldrich).

Thu mẫu và phân lập các chủng nấm *Phytophthora* trong rễ và vỏ cây sầu riêng bị bệnh

Phương pháp thu thập mẫu: Thu thập mẫu rễ, mẫu vỏ cây sầu riêng từ các cây sầu riêng đang bị bệnh vàng lá thối vỏ tại 3 huyện: huyện EaHleo, huyện Krông Năng và huyện Cư Kuin, tỉnh Đắk Lắk. Người thu mẫu tại các vườn nấm bệnh cần thay bao tay y tế khi thu mẫu bệnh xong ở các vườn khác nhau để không bị nhiễm chéo mẫu và ngăn ngừa nấm bệnh lây lan sang các khu vực khác trong vườn và giữa các vườn với nhau. Mẫu thu được ở các vườn được đựng trong túi zip nilon đã khử trùng để tránh nhiễm chéo giữa các mẫu. Mẫu được mang tới phòng thí nghiệm và tiến hành phân lập, làm thuần các chủng nấm bệnh *Phytophthora* .

Lưu ý: Thời gian từ khi lấy mẫu đến khi phân lập không quá 15 ngày và giữ ở tủ lạnh 4^0C để đảm bảo phân lập được các chủng nấm bệnh.

Phương pháp phân lập: Mẫu nấm bệnh được cấy trên môi trường PDA và đem ủ ở nhiệt độ 30^0C trong vòng 3-5 ngày. Các chủng nấm được làm thuần bằng phương pháp tách cấy đỉnh sợi nấm đơn (Suksiri *et al.,* 2018).

Tuyển chọn chủng nấm Phytophthora có khả năng gây bệnh cao trên cây sầu riêng trong vườn ươm

Địa điểm thí nghiệm: Trại thực nghiệm của Viện Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Tây Nguyên.

Đối tượng nghiên cứu: 03 chủng nấm bệnh *Phytophthora* được phân lập từ thí nghiệm trước; giống sầu riêng ghép Monthong (Dona) 2 năm tuổi.

Các chủng nấm *Phytophthora* được nuôi cấy trên môi trường PDA trong 7 ngày, ở 30^0C. Chuyển sợi nấm sang bình tam giác 250 ml chứa 100 ml môi trường PD lỏng, nuôi trong máy lắc với tốc độ 150 rpm trong 7 ngày ở 30^0C. Mật độ bào tử đạt 10^7 CFU/ml được sử dụng cho thí nghiệm lây bệnh nhân tạo.

Phương pháp lây bệnh nhân tạo: Thí nghiệm được thiết kế theo kiểu khối đầy đủ ngẫu nhiên với 3 lần nhắc lại. Mỗi nghiệm thức có 12 cây, mỗi cây sầu riêng sẽ được tạo 03 vết thương trên thân cây sầu riêng (thực hiện: dùng dao mổ số 11 rạch 3 vết thương trên cây sầu riêng con với chiều sâu 0,2cm, dài 1cm). Tưới nấm bệnh *Phytophthora* vào gốc 10ml/bầu và phun lên thân cây 10ml/cây. Sau khi lây nhiễm nấm bệnh, giữ trong bầu đất và xịt phun sương ẩm lên cây sầu riêng con 1 ngày 1 lần.

Trong đó, Control (mẫu đối chứng, không tưới nấm bệnh), CT1 (nghiệm thức sử dụng chủng nhiễm chủng *Phytophthora* sp. DL1), CT2 (nghiệm thức sử dụng chủng nhiễm chủng *Phytophthora* sp. DL2) và CT3 (nghiệm thức sử dụng chủng nhiễm chủng *Phytophthora* sp. DL3).

Phân lập lại chủng nấm Phytophthora có khả năng gây bệnh cao trên cây sầu riêng trong vườn ươm

Để khẳng định đúng tác nhân gây bệnh, tiến hành thu thập mô bệnh của các cây sầu riêng trong nghiệm thức sử dụng chủng nấm *Phytophthora* sp. DL1 (CT1). Tiến hành phân lập lại chủng nấm bệnh *Phytophthora* tương tự như cách phân lập nấm từ mẫu bệnh ở thí nghiệm trước. Chủng nấm được làm thuần bằng phương pháp tách đỉnh sợi nấm đơn và so sánh hình thái chủng nấm *Phytophthora* phân lập được với chủng *Phytophthora* sp. DL1 ban đầu. Nếu tương đồng thì tiến hành định danh sinh học phân tử chủng nấm này.

Định danh sinh học phân tử chủng nấm *Phytophthora* có khả năng gây bệnh cao trên cây sầu riêng.

Chủng nấm *Phytophthora* DL1 có khả năng gây bệnh cao trên cây sầu riêng trong vườn ươm được làm thuần, gửi mẫu và định danh bằng sinh học phân tử bằng phương pháp giải trình tự Sanger tại Công ty TNHH Dịch vụ và Thương mại Nam Khoa.

Xác định điều kiện nuôi cấy của nấm *Phytophthora palmivora* gây bệnh vàng lá thối vỏ cây sầu riêng

Thí nghiệm nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm *P. palmivora* với các loại môi trường khác nhau: CA, PCA, PDA, CMA và V8 Juice (khử trùng ở nhiệt độ 121^0C, 1atm trong 15 phút) (Nguyễn Hồng Tuyên *et al*., 2015).

Từ kết quả nghiên cứu nguồn dinh dưỡng, môi trường nuôi cấy thích hợp sẽ được lựa chọn để khảo sát các điều kiện nuôi cấy khác: pH nuôi cấy, nhiệt độ nuôi cấy và điều kiện ánh sáng (Nguyễn Hồng Tuyên *et al.,* 2015).

Khảo sát nhiệt độ nuôi cấy thích hợp: 25^0C; 28^0C; 30^0C; 32^0C và 34^0C.

Khảo sát pH thích hợp của môi trường nuôi cấy: 6,0; 6,25; 6,5; 6,75 và 7,0.

Khảo sát điều kiện ánh sáng thích hợp: tối liên tục, sáng liên tục, 12 giờ sáng xen kẽ 12 giờ tối liên tục.

Cách tiến hành: được thực hiện trên đĩa petri PDA.

Chỉ tiêu chung cho 4 thí nghiệm trên: Mỗi công thức thí nghiệm lặp lại 3 lần. Theo dõi tốc độ phát triển của tản nấm sau 7 ngày nuôi cấy bằng cách đo đường kính tản nấm (cm).

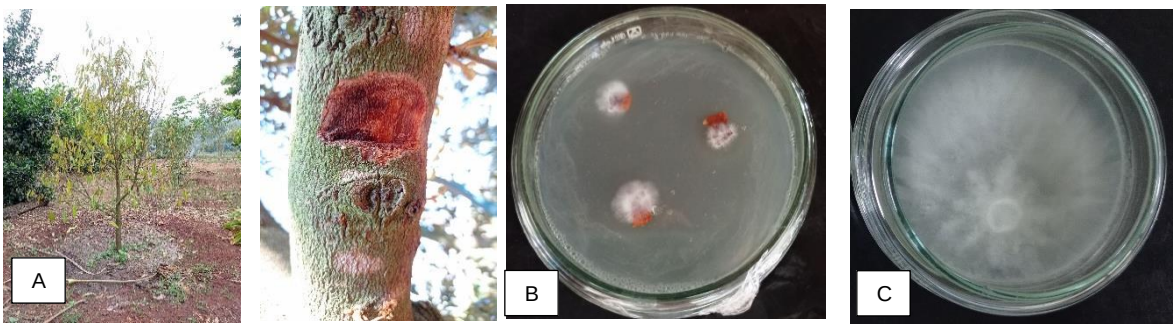
Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu sau khi ghi nhận được xử lý bằng phần mềm Microsoft Office Excel, phân tích ANOVA bằng phần mềm Statiscal Program Scientific System (SPSS) phiên bản 20.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân lập các chủng nấm *Phytophthora* trong rễ và vỏ cây sầu riêng

Thu thập được 27 mẫu sầu riêng bị bệnh vàng lá thối vỏ tại tỉnh Đắk Lắk, tiến hành phân lập được 10 chủng nấm bệnh. Sau khi nhận dạng dựa vào đặc điểm hình thái trên đĩa petri, chọn lọc được 3 chủng *Phytophthora* ký hiệu lần lượt là *Phytophthora* sp. DL1; *Phytophthora* sp. DL2 và *Phytophthora* sp. DL3.



1A. *Thu thập mẫu rễ và vỏ cây sầu riêng bị bệnh*

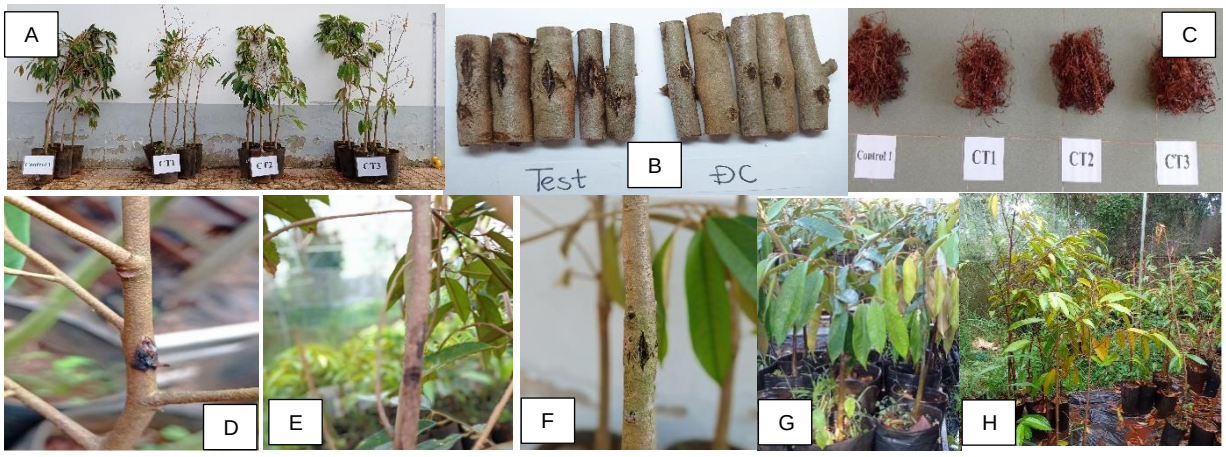
1B. *Phân lập nấm Phytophthora* ***sp.***

1C. *Làm thuần nấm Phytophthora sp.*

Hình 1. Thu thập mẫu bệnh và phân lập chủng nấm bệnh *Phytophthora* sp.

Tiến hành dòng hoá và giữ giống 3 chủng *Phytophthora* sp. để sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo.

Kết quả tuyển chọn chủng nấm *Phytophthora* có khả năng gây bệnh cao trên cây sầu riêng trong vườn ươm



Hình 2. Kết quả kiểm tra tính gây bệnh của các chủng nấm *Phytophthora* gây bệnh cao trên cây sầu riêng trong giai đoạn vườn ươm

2A. *Hình ảnh cây sầu riêng vườn ươm;* ***2B.*** *Hình ảnh đoạn thân cây sầu riêng ở CT1 và Control.* ***2C.*** *Hình ảnh rễ sầu riêng vườn ươm;* ***2D, 2E.*** *Vết bệnh trên thân sầu riêng bị sũng nước sau 21 ngày chủng nhiễm;* ***2F.*** *Vết bệnh trên thân sầu riêng khô lại sau 2 tháng;* ***2G.*** *Hình ảnh cây sầu riêng bị vàng lá, rụng lá, héo nhẹ;* ***2H.*** *Hình ảnh cây sầu riêng bị trơ cành, chết ngọn, chết cây.*

Triệu chứng của bệnh xuất hiện sau 21 ngày lây bệnh với vết bệnh thối nhỏ, sũng nước trên vỏ thân, nhựa cây tiết ra đông lại màu nâu đen (Hình 2D và 2E). Sau 2 tháng lây nhiễm, vết bệnh khô lại, một số cành phía trên vết bệnh có lá héo nhẹ, chuyển sang màu vàng và rụng sớm (Hình 2F và 2G). Sau đó, cây có dấu hiệu trơ ngọn và chết vài cành nhỏ, sau 2,5 tháng gây chết cả cây (Hình 2H). Tỷ lệ cây bị bệnh ở CT1 là cao nhất với tỉ lệ nhiễm trên thân 75%, nhiễm bệnh ở rễ 66,67%, khô cành tới 83.33% và 72.22% gây chết cây (Bảng 1).

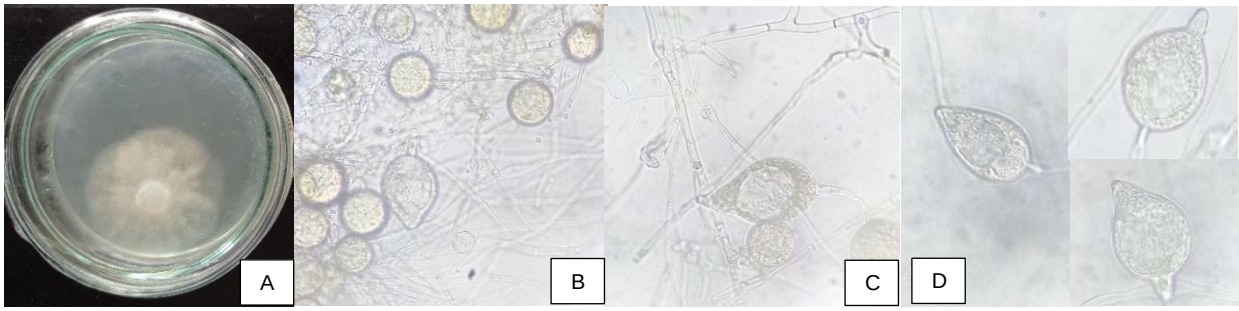
Bảng 1. Đánh giá tính gây bệnh của chủng nấm *Phytophthora* có khả năng gây bệnh cao trên cây sầu riêng trong vườn ươm

STT	Công thức	Tỉ lệ nhiễm bệnh trên thân (%)	Tỉ lệ nhiễm bệnh ở rễ (%)	Tỉ lệ khô cành (%)	Tỉ lệ cây chết (%)
1	Control	7,41	8,89	11,11	0,00
2	*Phytophthora* sp. DL1	75,00	66,67	83,33	72,22
3	*Phytophthora* sp. DL2	31,48	24,44	27,78	13,89
4	*Phytophthora* sp. DL3	52,78	55,56	50,00	41,67

Do đó, mẫu bệnh nhiễm nấm *Phytophthora* sp.DL1 được sử dụng cho thí nghiệm phân lập lại chủng nấm bệnh.

Kết quả phân lập lại chủng nấm *Phytophthora* có khả năng gây bệnh cao trên cây sầu riêng trong vườn ươm

Phân lập mô bệnh thu được từ CT1 trên môi trường PDA, chủng nấm *Phytophthora* sp. sau phân lập tương đồng 100% về hình thái với chủng nấm *Phytophthora* sp. DL1 (Hình 3A).



Hình 3. Hình ảnh chủng nấm *Phytophthora* DL1 sau khi phân lập lại, trong đó:

***3A.** Chủng nấm Phytophthora sp. DL1 trên môi trường PDA; Hình ảnh các loại bào tử của nấm Phytophthora sp. DL1 dưới kính hiển vi điện tử với độ phóng đại 100X: **3B-C.** Hình ảnh hỗn hợp bào tử hậu hình cầu và bào tử nhú hình trứng có cuống ngắn và hệ sợi nấm, **3D.** Hình ảnh bào tử hình trứng có cuống ngắn và bào tử dị dạng.*

Đặc điểm hình thái trên môi trường PDA, chủng nấm *Phytophthora* sp. DL1 có dạng hình sao, màu trắng sáng với mặt dưới đĩa petri pha lẫn màu cam nhạt, sợi nấm toả đều ra từ trung tâm, hệ sợi lan mạnh, đan xen vào nhau. Hình dạng bào tử đa dạng từ hình elip, hình trứng, hình cầu, hình dị dạng với bào tử hậu và bào tử nhú có cuống ngắn.

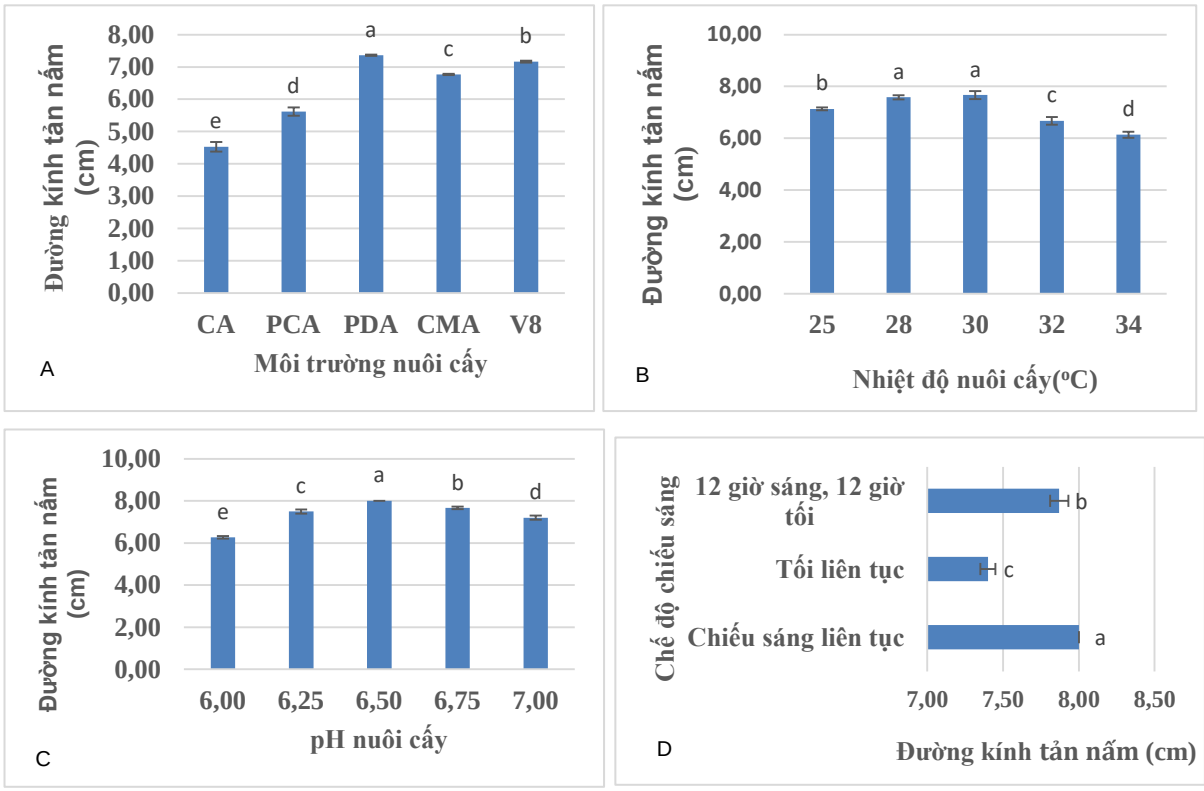
Kết quả định danh sinh học phân tử chủng nấm *Phytophthora* có khả năng gây bệnh cao trên cây sầu riêng

Tiến hành định danh theo phương pháp sinh học phân tử dựa vào trình tự gen 28S rRNA chủng *Phytophthora* sp. DL1. Sau khi tách chiết ADN từ chủng nấm, tiến hành PCR gen 28S (trình tự 28S rRNA được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu phân loại nấm). Trình tự của chủng nấm *Phytophthora* sp. DL1 được so sánh với trình tự gen có sẵn trên ngân hàng gen (NCBI); xác định được chủng nấm *Phytophthora* sp. DL1 là chủng *Phytophthora palmivova* với độ tương đồng 100% (Bảng 2) với trình tự nucleotic: “TCGGTGAAAATTGGGACCGTGAGTCCGTTTGCTTCATTGCGAGTGGATTGATGGGAACTT
TTTTAAACCTCGCCATTTAGAGGAAGGTGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA
TTACCACACCTAAAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAAAACTTAGTTGGGGGTCTCTTTCGGCGGCGGCTGC
TGGCTTCATTGCTGGCGGCTGCTGTTGGGAGAGCTCTATCATGGCGAGCGTTTGGGCTTCGGTCTGAACTA
GTAGCTTTTTTAAACCCATTCTTTATAACTGATTATACTGTAGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGC
AACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAAT
TGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGGAGTATGCCTGT
ATCAGTGTCCGTACATCAAACTTGGTTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGTGGATGTGCCAGATGTGAAGTG
TCTTGCGGCTGGTCTTCGGATCGGCTGTGAGTCCTTTGAAATGTACTG
AACTGTACTTCTCTTTGCTCCAAAAGCGTGGCGTTGCTGATTGTGGAGGCTGCTTGCGTAGCCAGTCTGGCG
ACCAGTTTGTCTGCTGTGGCATTAATGGAGGAGTGTTCGATTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAGAC
GCTTATTAAATATTTCTTCAGCTGTGGTGGTATGAGTTGGTGAACCGTAGCTATGTGAGCTTGGCTTTTGAATT
GGCTTTGCTGTTGCGAAGTAGAGTGGCGGCTTCGGCTGTCGAGGGTCGATCCATTTGGGAACTTGTGTATG
CTTCGGCATGCATCTCAATTGGACCTGATATCAGGCAAGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGG
AGGAAAAGAAACTAACAAGGATTCCCCTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGGAAGAGCTCAAGCTTAAAATCTCC
GTGCAAGTTTTGCGCGGCGAATTGTAGTCTATAGAGGCGTGGTCAGCGTGAGCACTTGGGGCAAGTTCCTT
GGAAGAGGACAGCATGGAGGGTGATACTCCCGTTC”.

Bảng 2. Kết quả định danh bằng sinh học phân tử đối với mẫu nấm *Phytophthora* sp. DL1

KẾT QUẢ THỬ NGHỆM (RESULTS)		
STT *(N.o)*	**Tên loài** *(Organism)*	**Độ tương đồng** *(Identity)*
1	*Phytophthora palmivora*	100 %
2	*Phytophthora palmivora*	100 %
3	*Phytophthora palmivora*	100 %
Ghi chú (Note):	Kết quả thể hiện tên loài có độ tương đồng cao nhất với trình tự của mẫu thử/ *Results describe organisms with highest percent identity with sample sequence.*	

Kết quả điều kiện nuôi cấy của nấm *Phytophthora palmivora* DL1 gây bệnh vàng lá thối vỏ cây sầu riêng



Hình 4. Kết quả ảnh hưởng của điều kiện nhân nuôi nhân tạo lên sự phát triển của nấm *P. palmivora* DL1.

Hướng tới sự tối ưu hoá điều kiện nuôi cấy nhân tạo của chủng *P. palmivova* DL1 làm tiền đề cho các nghiên cứu kiểm soát sinh học nấm *P. palmivova* DL1. Kết quả thực nghiệm thấy rằng môi trường dinh dưỡng có ảnh hưởng đến sự phát triển của tản nấm *P. palmivora* DL1 gây thối bệnh vàng lá, thối vỏ cây sầu riêng (Hình 4A). Nấm *P. palmivova* DL1 có khả năng sinh trưởng, phát triển tốt nhất trên môi trường PDA với đường kính khuẩn lạc nấm đạt 7.4 cm sau 7 ngày nuôi cấy. Sợi nấm màu trắng sáng, mọc dày, đan vào nhau với hệ sợi phát triển mạnh. Trên các môi trường PCA, CMA và V8 Juice nấm phát triển chậm hơn, sợi nấm mảnh, mọc thưa hơn với hệ sợi phát triển yếu hơn, đường kính khuẩn lạc nấm khoảng 5.6 – 6.8 cm sau 7 ngày. Khi mọc sợi nấm nổi rõ lên phía trên bề mặt môi trường V8 juice và không nổi lên trên bề mặt thạch ở môi trường CMA và PCA. Kết quả có sự khác biệt với các công bố trước đây: nấm *P. palmivora* gây bệnh thối đen quả ca cao sinh trưởng tốt trên môi trường PCA (Nguyễn Hồng Tuyên *et al.,* 2015); *P. palmivova* PHY02 gây bệnh thối rễ bưởi có khuẩn lạc nấm kiểu hình sao với sợi nấm phát triển tốt trên hai môi trường V8A và PDA trong khi hầu như không có sợi nấm trên môi trường CMA (Phung Manh Hung et al, 2015); chủng *P. palmivova* CHP25-S08 gây bệnh trên sầu riêng tại Thái Lan có dạng hình sao sau 10 ngày trên PDA (Suksiri *et al.,* 2018); nấm *P. palmivova* được nuôi cấy trên môi trường nhân tạo PSM và PDA (Phạm Hồng Hiển *et al.,* 2021).

Nhiệt độ là yếu tố sinh thái quan trọng ảnh hưởng đến sự sinh trưởng, phát triển của nấm *Phytophthora*. Giữa các loài *Phytophthora* khác nhau có sự mẫn cảm khác nhau với nhiệt độ (Nguyễn Hồng Tuyên *et al.,* 2015). Kết quả thí nghiệm cho thấy nấm *P. palmivora* DL1 có khả năng phát triển trong dải nhiệt độ từ 25-34^{0}C và tối ưu ở 30^{0}C với đường kính tản nấm đạt 7.9-8.0 cm (Hình 4B). Nhiệt độ thích hợp nhất cho nấm *P. palmivora* gây bệnh thối đen quả ca cao sinh trưởng trong phạm vi từ 20-35^{0}C và nấm không phát triển ở 15^{0}C và 40^{0}C (Nguyễn Hồng Tuyên *et al.,* 2015).

Một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của nấm *P. palmivora* là điều kiện pH. *P. palmivora* gây bệnh thối đen quả ca cao có khả năng phát triển trong phạm vi pH rộng từ 4.5 đến 8; nấm phát triển thích hợp nhất ở độ pH từ 6 - 7, sau 8 ngày nuôi cấy đường kính tản nấm đạt 6.6-6.8 cm. Mức pH thấp 4.5; 5 và 8 nấm *P. palmivora* phát triển chậm hơn (Nguyễn Hồng Tuyên và cs, 2015). Tương đồng với nghiên cứu trên, *P. palmivora* DL1 phát triển tốt ở độ pH 6-7 và sinh trưởng nhanh nhất ở điều kiện pH 6.5 (Hình 4C). Nấm *P. palmivora* khá nhạy cảm với ánh sáng, *P. palmivora* DL1 phát triển mạnh khi được chiếu sáng liên tục (Hình 4D).

KẾT LUẬN

Phân lập được ba chủng *Phytophthora* sp. gây bệnh vàng lá thối vỏ, kiểm tra tính gây bệnh chủng *Phytophthora* sp. DL1 gây bệnh cao (72.22% gây chết cây) trên cây sầu riêng trong điều kiện vườn ươm. Định danh sinh học phân tử dựa trên trình tự gen 28S rRNA xác đinh được *Phytophthora* sp. DL1 là *Phytophthora palmivora* DL1. Xác định được nấm *P. palmivora* DL1 sinh trưởng tốt trên môi trường PDA với pH 6.5, 30^0C trong điều kiện chiếu sáng liên tục là tối ưu. Nghiên cứu là tiền đề cho các nghiên cứu về kiểm soát bệnh hại, góp phần sản xuất sầu riêng hiệu quả và bền vững.

Lời cảm ơn: *Ngô Văn Anh được tài trợ bởi Chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), mã số: VINIF.2023.TS.02. Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số đề tài: B2023-TTN-02.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Sở NN&PTNT tỉnh Đắk Lắk, 2021.

Chi cục Trồng trọt và BVTV tỉnh Đắk Lắk, 2017.

Nguyễn Văn Minh và Đỗ Thị Nga, (2021). Thực trạng sản xuất và một số giải pháp phát triển bền vững cây sầu riêng ở tỉnh Đắk Lắk, *Kỷ yếu hội thảo sầu riêng năm 2021*, p: 144-151;

Ngô Văn Anh, Trần Thị Hà Trang, Vũ Thị Thu Lê, Nguyễn Văn Bốn, Nguyễn Anh Dũng (2024). Tuyển chọn và nhân nuôi vi khuẩn nội sinh cây sầu riêng kháng nấm *Phytopthora palmivora* tại huyện Cư Kuin tỉnh Đắk Lắk, *TNU Journal of Science and Technology* 229(09): 430 – 437.

Nguyễn Đức Huy, Hà Viết Cường, Nguyễn Văn Viên, Thiều Thị Thu Trang, Trần Nguyễn Hà và Đỗ Tấn Dũng, (2021). Nghiên cứu về bệnh xỉ mủ/ chảy trôm (*Phytopthora palmivova*) hại cây sầu riêng. *Kỷ yếu hội thảo khoa học: Ứng dụng Khoa học Công nghệ nâng cao giá trị và phát triển bền vững cây sầu riêng theo chuỗi liên kết tại Việt Nam*, Hà Nội, Tr 125-135.

Scanu B, Jung T, Masigol H, Linaldeddu B T, Jung M H, Brandano A, Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R, Janoušek J, Riolo M, Cacciola S O (2021). *Phytophthora heterospora* sp. nov., a New Pseudoconidia-Producing Sister Species of *P. palmivora*, *J. Fungi 2021*, 7(10): 870.

Kongtragoul P, Ishikawa K, Ishii H (2021). Metalaxyl Resistance of *Phytophthora palmivora* Causing Durian Diseases in Thailand, *Horticulturae*, 7: 375.

Phạm Hồng Hiển, Nguyễn Thị Chúc Quỳnh, Phùng Quang Tùng, Bạch Thị Điệp, Vũ Thị Hiền, Phạm Thị Minh Thắng, Nguyễn Xuân Cảnh, (2021). Nấm *Phytophthora* gây bệnh trên cây sầu riêng tại tỉnh Đắk Lắk và Tiền Giang, *Tạp chí Bảo vệ Thực vật,* Số 1/2021:10-14.

Suksiri S, Laipasu P, Soytong K, Poeaim S (2018). Isolation and Identification of *Phytophthora* sp. and *Pythium* sp. from Durian Orchard in Chumphon Province, Thailand, *International Journal of Agricultural Technology 2018*, Vol.14(3): 389-402.

Nguyễn Hồng Tuyên, Phạm Ngọc Dung, Lê Đình Thao, Nguyễn Thúy Hạnh (2015). Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của nấm *Phythophthora palmivora* gây bệnh thối đen quả ca cao ở Việt Nam, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 46-52.

Phung Manh Hung, Pongnak Wattanachai, Soytong Kasem, and Supatta Poaim (2015). Biological Control of *Phytophthora palmivora* Causing Root Rot of Pomelo Using *Chaetomium* spp., *Mycobiology*,(1): 63–70.

ISOLATION OF *Phytophthora* FUNGI CAUSING DISEASES ON DURIAN PLANTS AND DETERMINATION OF OPTIMAL GROWTH CONDITIONS FOR THE FUNGI

Tran Thi Ha Trang, Ngo Van Anh*, Nguyen Van Bon, Nguyen Anh Dzung

Institute of Biotechnology and Environment, Tay Nguyen University, Dak Lak, Vietnam

SUMMARY

Durian (*Durio zibethinus*) is known as the "King of tropical fruits". Currently, durian trees have become the main fruit tree of Dak Lak province. However, spontaneous and unplanned development leads to unsustainability in the development of durian trees in Dak Lak province. The disease caused by *Phytophthora palmivora* is the only microbial disease that causes death of durian trees recorded in Vietnam and the world. The study aims to isolate, select, and identify the pathogen *Phytophthora palmivora* for further studies concerning durian disease management in this locality. Using the single mycelium tip separation method, three *Phytophthora* strains causing yellow leaf rot disease on durian trees were isolated from disease samples in Dak Lak province. *Phytophthora* sp. DL1 was selected with high efficiency on nursery durian trees (72.22% tree mortality). Then, *Phytophthora* sp. DL1 was identified as *Phytophthora palmivora* DL1 by molecular biology identification based on gene sequence 28S rRNA. Further experiments indicated that *Phytophthora palmivora* DL1 strain growth well in cultivation conditions with pH 6.5, at 30^0C and continuous lighting on PDA medium. The results of this work is a premise for futher research on disease control caused by the fungus *Phytophthora palmivora* on durian trees, contributing to effective and sustainable durian production.

Keywords: Dak Lak, Durians, *Phytophthora palmivora*.

* Author for correspondence: Tel: +84-374559085; Email: nvanh@ttn.edu.vn

NGHIÊN CỨU THỬ NGHIỆM NUÔI TRỒNG NẤM NHỘNG TRÙNG THẢO (*Cordyceps militaris*) TRÊN CÁC NGUỒN ĐẠM THỰC VẬT

Nguyễn Trần Đức Duy*, Lương Thị Ngọc Hân, Đỗ Thị Như Thảo, Nguyễn Anh Thư, Nguyễn Phạm Trúc Phương, Nguyễn Thị Loan, Hoàng Đắc Hiệt

Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao, Ban quản lý Khu Nông nghiệp Công nghệ cao

TÓM TẮT

Ngày nay, ngành nuôi trồng nhân tạo nấm nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*) đang phát triển rất mạnh mẽ ở nước ta và các quốc gia trên thế giới để phục vụ cho các nhu cầu sản xuất dược liệu cũng như là thực phẩm. Nếu sử dụng các nguồn đạm từ bột ngũ cốc hoặc phế phẩm từ ngành công nghiệp sản xuất hạt ngũ cốc để sản xuất nấm nhộng trùng thảo thì sẽ có được nguồn nguyên liệu dồi dào, giá thành rẻ, phù hợp sản xuất quy mô công nghiệp. Do đó, nhiệm vụ nghiên cứu khoa học "Nghiên cứu thử nghiệm nuôi trồng nấm nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*) trên các nguồn đạm thực vật" được thực hiện với mục đích tìm ra nguồn nguyên liệu thực vật thay thế nhộng tằm tươi vào môi trường nuôi cấy nhằm chủ động được nguồn nguyên liệu giúp giảm chi phí sản xuất nhưng nấm vẫn có giá trị dinh dưỡng và dược liệu. Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng bột đậu nành là nguồn đạm phù hợp để thay thế nhộng tằm để bổ sung vào thành phần môi trường nuôi cấy tạo quả thể nấm nhộng trùng thảo. Công thức sử dụng: gạo lứt 30 g/hộp, bột đậu nành 2,55 g/hộp, 60 mL dung dịch dinh dưỡng (dịch chiết rong phổ tai 9,02 g/L, $CaCl_2$ 0,1 g/L, axit folic 5 µg/L). Năng suất và chất lượng nấm nhộng trùng thảo nuôi trồng bằng bột đậu nành: khối lượng khô quả thể đạt: 5,86 g/hộp, hàm lượng cordycepin đạt 2933 mg/kg, hàm lượng adenosine đạt: 146 mg/kg sau 50 ngày nuôi cấy.

Từ khóa: Bã đậu, bột đậu nành, *Cordyceps militaris*, khô đậu nành, nuôi trồng bán rắn.

MỞ ĐẦU

Nấm nhộng trùng thảo *Cordyceps militaris* trong vài năm gần đây được nuôi trồng rất phổ biến, loài nấm này vừa có giá trị dược liệu cao vừa dễ dàng nuôi trồng trong môi trường nhân tạo. Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu quan trọng về gen, nhu cầu dinh dưỡng, môi trường nuôi cấy, các đặc tính sinh hóa và dược lý của nấm *C. militaris*. Gần đây, bộ gen hoàn chỉnh của *C. militaris* cũng được giải trình tự làm cơ sở cho nhiều nghiên cứu sâu hơn về loài nấm này. Ngày nay, với sự phát triển của y học hiện đại, các thành phần hợp chất trong Cordyceps đã được xác định có hoạt chất sinh học quý giá như: Cordycepin có tác dụng ức chế sự phân hạch và trì hoãn sự lây lan của các tế bào ung thư, Adenosine có tác dụng điều hòa miễn dịch, bảo vệ tim mạch, manitol làm tăng độ thẩm thấu của huyết tương và dịch trong ống thận, gây lợi niệu thẩm thấu và làm tăng lưu lượng máu thận, …(Đỗ Tuấn Bách et al., 2017).

Nhộng trùng thảo là loài nấm ký sinh côn trùng không bắt buộc, trong tự nhiên, nấm *C. militaris* ký sinh trên cơ thể ấu trùng hoặc nhộng của một số loại sâu bướm. Để sản xuất quy mô lớn về số lượng quả thể nấm nhộng trùng thảo hiện nay người ta sử dụng môi trường bán rắn bao gồm gạo lứt, bột nhộng tằm và một số khoáng chất tổng hợp bổ sung (Nguyễn Thị Minh Hằng, Bùi Văn Thắng, 2017). Tuy nhiên, giá thành của nguồn nguyên liệu nhộng tằm khá cao, yêu cầu bảo quản nhộng tằm tươi trong tủ đông, do đó gây khó khăn cho việc sản xuất quy mô lớn đặc biệt là ở các vùng xa nguồn nguyên liệu này. Ngoài ra, sử dụng nguyên liệu nhộng tằm trong môi trường nuôi cấy có khả năng gây dị ứng cho một số người dùng có hệ miễn dịch quá mẫn với protein của nhộng hoặc một số ít người ăn thuần chay e ngại việc sử dụng nấm được nuôi trên cơ chất có chứa động vật. Mặt khác, các nguồn nguyên liệu giàu đạm như bột đậu nành, bã đậu nành ép dầu, bã đậu nành làm sữa đậu nành rất phổ biến với số lượng lớn. Nếu tận dụng nguồn ngũ cốc dồi dào hay phụ phẩm công nghiệp để sản xuất nấm nhộng trùng thảo thì sẽ có được nguồn nguyên liệu dễ tìm, dễ bảo quản, giá thành rẻ phù hợp sản xuất quy mô công nghiệp. Xuất phát từ mục tiêu đó, "Nghiên cứu thử nghiệm nuôi trồng nấm nhộng trùng thảo (*Cordyceps militaris*) trên các nguồn đạm thực vật" được tiến hành, nhằm xây dựng công thức môi trường có nguồn gốc thực vật để nuôi trồng nấm nhộng trùng thảo có giá trị dinh dưỡng và dược liệu.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng giống nấm *Cordyceps militaris* (Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao).

Nguyên liệu: gạo lứt đỏ huyết rồng (được cung cấp bởi công ty Gạo Mộng Tuyết, Long An), nhộng tằm tươi (được cung cấp bởi công ty Minh Linh, Lâm Đồng), bột đậu nành (được cung cấp bởi công ty thực phẩm Hòa

Phát, TP. Hồ Chí Minh), bã đậu nành ép dầu (được cung cấp bởi công ty Quang Dũng, TP. Hồ Chí Minh), bã đậu nành làm đậu hủ (được cung cấp bởi lò đậu hủ tươi tại chợ ấp 1, xã Phạm Văn Cội, TP. Hồ Chí Minh).

Phương pháp nghiên cứu

Xác định nguồn đạm thực vật phù hợp cho nuôi cấy tạo quả thể nấm nhộng trùng thảo

Thí nghiệm được bố trí dựa trên môi trường cơ bản: Gạo lứt 30 g, nhộng tằm 5 g, dung dịch dinh dưỡng 60 mL ($CaCl_2$ 0,1 g/L, axit folic 5 μg/L). Các nguồn đạm sử dụng trong nghiên cứu: bột đậu nành, bã đậu nành sau khi ép dầu, bã đậu nành làm đậu hủ. Các nguyên liệu này sẽ được phân tích hàm lượng N tổng số và các chỉ tiêu an toàn vệ sinh thực phẩm như hàm lượng kim loại nặng Pb, Hg, As, Cd, hàm lượng độc tố aflatoxin tổng, aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1, aflatoxin G2.

Kết quả phân tích sẽ làm cơ sở để chọn ra nguồn nguyên liệu và hàm lượng sử dụng sao cho nguồn nguyên liệu đạt an toàn vệ sinh thực phẩm và hàm lượng N tổng số có trong nguyên liệu bằng với hàm lượng N của nhộng tằm sử dụng trong nghiệm thức đối chứng. Mỗi nghiệm thức gồm 50 hộp, lặp lại thí nghiệm 3 lần.

- Đối chứng dương là môi trường cơ bản: Gạo lứt 30 g, nhộng tằm 5 g, dung dịch dinh dưỡng 60 mL ($CaCl_2$ 0,1 g/L, axit folic 5 μg/L).

- Đối chứng âm là môi trường cơ bản nhưng không bổ sung nhộng tằm: Gạo lứt 30 g, dung dịch dinh dưỡng 60 mL ($CaCl_2$ 0,1 g/L, axit folic 5 μg/L).

- Nghiệm thức thí nghiệm là nguồn đạm thay thế nhộng + môi trường cơ bản (không bổ sung nhộng tằm).

Chỉ tiêu theo dõi:

- Khối lượng khô quả thể (g/hộp).

- Hàm lượng cordycepin, adenosine trong quả thể khô (mg/kg).

Khảo sát hàm lượng các nguồn đạm

Hàm lượng nitơ được xác định bằng phương pháp Kjeldahl theo TCVN 10034:2013. Từ kết quả phân tích hàm lượng N, các nguyên liệu thay thế cho nhộng tằm được xác định với khối lượng là X1, X2, X3 (g). Tiến hành thí nghiệm với khối lượng nguyên liệu thay thế là 50, 75, 100, 125, 150% khối lượng sử dụng ở nội dung trên. Mỗi nghiệm thức 50 hộp, thí nghiệm lặp lại 3 lần. Các nghiệm thức với nguồn đam và hàm lượng sử dụng như ở Bảng 1.

Bảng 1. Các hàm lượng khảo sát nguồn đạm

Nghiệm thức	Nguồn đạm	Khối lượng nguồn đạm (g/hộp)
NT2.1	Bột đậu nành	0,5 X1
NT2.2		0,75 X1
NT2.3		1 X1
NT2.4		1,25 X1
NT2.5		1,5 X1
NT2.6	Bã đậu nành ép dầu	0,5 X2
NT2.7		0,75 X2
NT2.8		1 X2
NT2.9		1,25 X2
NT2.10		1,5 X2
NT2.11	Bã đậu nành làm đậu hủ	0,5 X3
NT2.12		0,75 X3
NT2.13		1 X3
NT2.14		1,25 X3
NT2.15		1,5 X3

Chỉ tiêu theo dõi: Khối lượng khô quả thể (g/hộp). Hàm lượng cordycepin, adenosine trong quả thể khô (mg/kg).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xác định nguồn đạm thực vật phù hợp cho nuôi cấy tạo quả thể nấm nhộng trùng thảo

Đánh giá an toàn vệ sinh thực phẩm của các nguồn đạm thực vật và xác định hàm lượng nitơ có trong các loại nguồn đạm

Trước khi được sử dụng để thực hiện các thí nghiệm thì các nguồn đạm sẽ được phân tích các chỉ tiêu an toàn vệ sinh thực phẩm nhằm đánh giá mức độ an toàn của các nguồn nguyên liệu trên cơ sở đó để chọn lựa nguồn nguyên liệu phù hợp. Phân tích được thực hiện tại phòng Phân tích kiểm nghiệm Nông sản thuộc Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao. Kết quả phân tích (Bảng 2) cho thấy: không phát hiện kim loại nặng Pb, Hg, As, Cd; hàm lượng độc tố aflatoxin tổng, aflatoxin B1, aflatoxin B2, aflatoxin G1, aflatoxin trong 3 nguồn nguyên liệu: bột đậu nành (BĐN), bã đậu nành sau khi ép dầu (khô nành/KN), bã đậu nành làm đậu hủ (bã đậu/BĐ). Như vậy, các nguồn đạm từ thực vật được sử dụng trong nghiên cứu là an toàn và có thể sử dụng để làm nguyên liệu nuôi trồng nấm nhộng trùng thảo.

Bảng 2. Kết quả phân tích các chỉ tiêu an toàn vệ sinh thực phẩm của các nguồn đạm từ thực vật

Chỉ tiêu	Phương pháp	Đơn vị	LOD (mg/kg)	Nguồn đạm		
				KN	BĐN	BĐ
Pb	Ref AOAC 999.10	mg/kg	0,0075	ND	ND	ND
Hg	Ref AOAC 971.21	mg/kg	0,012	ND	ND	ND
As	Ref AOAC 986.15	mg/kg	0,016	ND	ND	ND
Cd	Ref AOAC 999.10	mg/kg	0,003	ND	ND	ND
Aflatoxin tổng	TCVN 7596:2007	µg/kg	0,5	ND	ND	ND
Aflatoxin B1	TCVN 7596:2008	µg/kg	0,5	ND	ND	ND
Aflatoxin B2	TCVN 7596:2009	µg/kg	0,5	ND	ND	ND
Aflatoxin G1	TCVN 7596:2010	µg/kg	0,5	ND	ND	ND
Aflatoxin G2	TCVN 7596:2011	µg/kg	0,5	ND	ND	ND

Ghi chú: KN: Khô nành, BĐN: Bột đậu nành, BĐ: Bã đậu, ND: Not Detected.

Các nguyên liệu bã đậu nành sau khi ép dầu (khô nành/KN), bột đậu nành (BĐN), bã đậu nành làm đậu hủ (bã đậu/BĐ) và nhộng tằm tươi được phân tích bằng phương pháp Kjeldahl TCVN 10034:2013 để xác định chính xác hàm lượng nitơ có trong mỗi loại làm cơ sở để xác định hàm lượng sử dụng phù hợp cho thí nghiệm. Kết quả phân tích ở Bảng 3 cho thấy hàm lượng nitơ có trong nguyên liệu khô nành là cao nhất (7,15%) và thấp nhất là trong nguyên liệu nhộng tằm tươi (1,94%). Dựa vào kết quả này, tính ra được hàm lượng nguồn đạm được sử dụng cho thí nghiệm khảo sát các nguồn đạm sao cho hàm lượng N tổng số có trong nguyên liệu thực vật bằng với hàm lượng N của nhộng tằm (Bảng 3).

Bảng 3. Hàm lượng nitơ có trong các nguyên liệu khảo sát nguồn đạm phù hợp

Nguyên liệu	Hàm lượng Nitơ (%)	Hàm lượng quy đổi để sử dụng cho thí nghiệm (gram/hộp)
Nhộng tằm tươi	1,94	5
Bột đậu nhành (X1)	5,71	1,70
Khô nành (X2)	7,15	1,36
Bã đậu (X3)	2,23	4,35

Ảnh hưởng của các nguồn đạm lên quá trình sinh trưởng của nấm nhộng trùng thảo

Khi tơ nấm nhộng trùng thảo đã lan kín hộp và lan dày ở bề mặt, chuyển qua phòng nuôi với các điều kiện chiếu sáng 500 – 700 lux, chu kỳ chiếu sáng 12 giờ sáng/tối, nhiệt độ 18-20°C, độ ẩm được duy trì bằng máy tạo ẩm khoảng 80-85%. Để đánh giá tiềm năng thay thế nhộng tằm của các nguồn đạm từ thực vật, thí nghiệm được bố trí trên môi trường cơ bản với đối chứng dương là môi trường có sử dụng nhộng tằm tươi và đối chứng âm không bổ sung nhộng tằm.

Sau 24 giờ được cấy vào môi trường bán rắn, hệ sợi của nấm nhộng trùng thảo (NTT) bắt đầu lan ra bề mặt môi trường dinh dưỡng và tốc độ tăng trưởng diễn ra nhanh trong vài ngày kế tiếp. Hệ tơ nấm phủ kín bề mặt môi trường sau khoảng 5 - 8 ngày nuôi cấy. Mật độ hệ sợi, màu sắc hệ sợi không có sự khác biệt đáng kể giữa các nghiệm thức khảo sát. Ở ba loại nguồn đạm khảo sát, thời gian lan tơ của hệ sợi chậm hơn so với nghiệm thức đối chứng dương (5,33 ngày) và nhanh hơn so với nghiệm thức đối chứng âm (7,67 ngày), bên cạnh đó nếu so sánh thời gian lan tơ của hệ sợi giữa 3 loại nguồn đạm khác nhau (khô nành, bột đậu nành, bã đậu thì hầu như không có sự khác biệt (6,33 – 6,67 ngày). Yếu tố giúp hệ sợi phát triển nhanh trong môi trường bán rắn là sự thông thoáng của khối cơ chất và tỷ lệ

các thành phần dinh dưỡng có trong môi trường. Cả ba nguyên liệu khô nành, bột đậu nành, bã đậu đều có thành phần dinh dưỡng cao và tạo được độ xốp cho môi trường nên phù hợp cho hệ sợi nấm phát triển. Tốc độ phát triển, mật độ hệ sợi và màu sắc của hệ sợi của nấm *C. militaris* khi được nuôi trên 5 công thức môi trường được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 4. Đặc điểm sinh trưởng hệ sợi nấm trên các công thức dinh dưỡng

Nghiệm thức	Thời gian đầy tơ (ngày)	Đặc điểm hình thái sợi
ĐC âm	$7,67^{a} \pm 0,58$	Hệ sợi phát triển chậm, thời gian lan xuống đáy hộp lâu, hệ sợi mịn, tạo rãnh, vàng cam đậm khi chiếu sáng.
ĐC dương	$5,33^{b} \pm 0,58$	Hệ sợi phát triển mạnh, ăn lan ra bề mặt môi trường nhanh, hệ sợi mịn, tạo rãnh, vàng cam đậm khi chiếu sáng.
Khô nành	$6,67^{ab} \pm 0,58$	Hệ sợi phát triển tốt, ăn lan ra bề mặt môi trường, hệ sợi mịn, tạo rãnh,vàng cam đậm khi chiếu sáng.
Bột đậu nành	$6,33^{ab} \pm 0,58$	Hệ sợi phát triển tốt, ăn lan ra bề mặt môi trường, hệ sợi mịn, tạo rãnh, vàng cam đậm khi chiếu sáng.
Bã đậu	$6,67^{ab} \pm 0,58$	Hệ sợi phát triển tốt ăn lan ra bề mặt môi trường, hệ sợi mịn, tạo rãnh, vàng cam khi chiếu sáng.

Ghi chú: Các chữ cái ghi sau giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn nằm trên cùng một cột giống nhau thì không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê với P > 0,05.

Tốc độ phát triển quả thể nhanh nhất ở tất cả các lô thí nghiệm từ ngày 20 đến 35 sau khi cấy vào môi trường bán rắn. Từ lúc hình thành mầm quả thể cho đến ngày thứ 35, đầu quả thể luôn nhọn và hướng thẳng lên phía trên. Vì giai đoạn này, quả thể nấm đang thời gian sinh trưởng và tăng trưởng về chiều cao cũng như đường kính. Từ sau ngày 35 đến ngày 50 tốc độ tăng trưởng chiều cao chậm lại, đầu quả thể bắt đầu chuyển từ nhọn sang dạng tròn. Sau 50 ngày nuôi cấy tiến hành thu quả thể nấm và ghi nhận các đặc điểm chiều cao quả thể, hình dạng quả thể. Sau đó tiến hành sấy nấm bằng phương pháp sấy thăng hoa để xác định khối lượng khô (KLK) quả thể/ hộp và phân tích hàm lượng hoạt chất trong quả thể khô.

Bảng 5. Khối lượng khô quả thể nấm trên các môi trường khảo sát nguồn đạm

Nghiệm thức	Chiều cao quả thể (cm)	KLK quả thể (gram/hộp)	Đặc điểm quả thể
ĐC âm	$4,40^{b} \pm 0,23$	$2,64^{b} \pm 0,32$	Quả thể ngắn, nhỏ, chẻ ngọn, màu cam đậm, quả thể mọc nghiêng nhiều hơn mọc thẳng
ĐC dương	$6,45^{a} \pm 0,21$	$5,82^{a} \pm 0,28$	Quả thể to, dài, mọc thẳng, đầu hơi nhọn, màu cam đậm
Khô nành	$5,93^{a} \pm 0,28$	$5,59^{a} \pm 0,18$	Quả thể nhỏ đến vừa, đầu tròn, một ít quả thể mọc nghiêng, màu cam đậm
Bột đậu nành	$6,30^{a} \pm 0,18$	$5,74^{a} \pm 0,14$	Quả thể to, mọc thẳng, đầu tròn, màu cam đậm
Bã đậu	$6,06^{a} \pm 0,22$	$5,68^{a} \pm 0,22$	Quả thể to, đầu tròn, mọc thẳng, chênh lệch chiều dài quả thể nhiều, màu cam đậm

Ghi chú: Các chữ cái ghi sau giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn nằm trên cùng một cột giống nhau thì không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê với P > 0,05.

Kết quả ghi nhận ở Bảng 5 cho thấy, ở ba nghiệm thức khảo sát nguồn đạm, chiều cao quả thể không có sự khác ý nghĩa về mặt thống kê so với đối chứng dương và cao hơn đối chứng âm (có khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê). Khối lượng khô quả thể nấm NTT cao nhất ở nghiệm thức đối chứng dương (5,82 ± 0,28 g/hộp) và thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng âm (2,64 ± 0,32 g/hộp), sự khác biệt này là có ý nghĩa về mặt thống kê. Ở ba nghiệm thức nguồn đạm thay thế nhộng tằm, khối lượng khô quả thể cao nhất ở nghiệm thức bột đậu nành (5,74 g/hộp), kế tiếp là nghiệm thức bã đậu (5,68 g/hộp) và nghiệm thức khô nành thấp nhất (5,59 g/hộp), tuy nhiên sự khác biệt này là không có ý nghĩa về mặt thống kê.

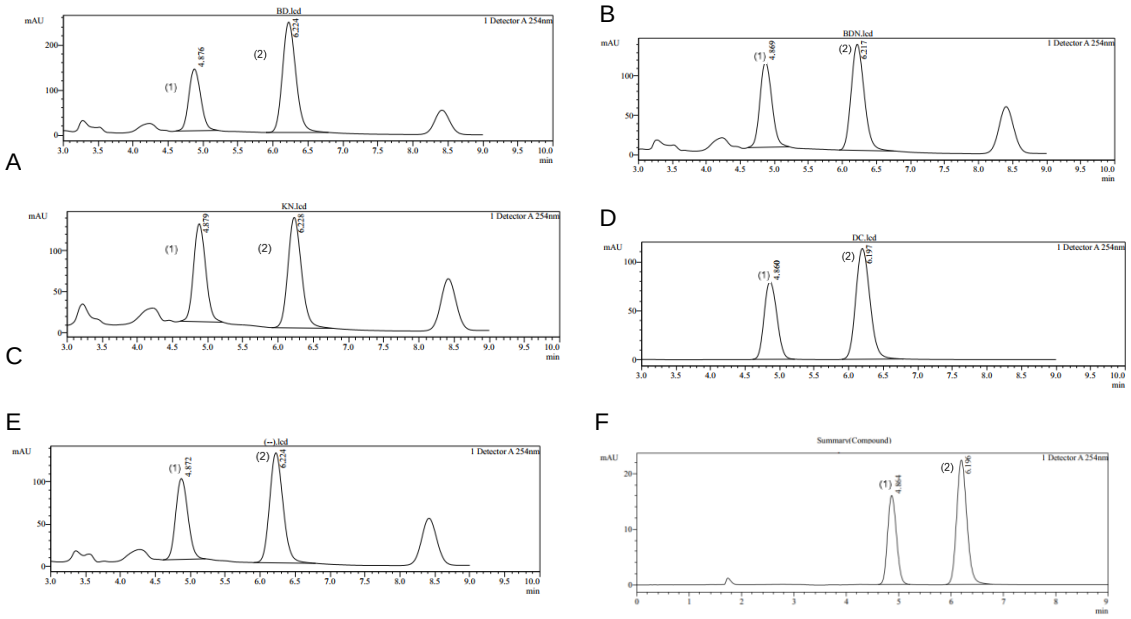
Kết quả ghi nhận trong Bảng 6 cho thấy, hàm lượng cordycepin trong quả thể nấm có sự khác biệt về mặt thống kê giữa các nghiệm thức. Nghiệm thức đối chứng âm có hàm lượng cordycepin thấp nhất (933 mg/kg), tiếp theo là nghiệm thức bã đậu (1998 mg/kg), nghiệm thức khô nành (2093 mg/kg), đối chứng dương (2701 mg/kg) và cao nhất là ở nghiệm thức bột đậu nành (2869 mg/kg). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu của tác giả Sripilai và đồng tác giả (2023), việc bổ sung bột đậu nành vào môi trường nuôi cấy giúp tăng hàm lượng cordycepin của nấm so với nghiệm thức đối chứng (Sripilai *et al.*, 2023). Bên cạnh đó, nghiên cứu của Lim và đồng tác giả (2012) cho thấy đậu nành và lúa mì được bổ sung dinh dưỡng là cơ chất tốt nhất cho sự tạo thành adenosine, cordycepin và D-mannitol của *C. militaris* khi được nuôi trên môi trường bán rắn (Lim *et al.*, 2012). Nguyễn Thị Bích Hằng và đồng tác giả (2023), xác định bã đậu nành là nguồn nguyên liệu phù hợp để bổ sung vào môi trường bán rắn nuôi trồng tạo quả thể nấm nhộng trùng thảo, năng suất nấm tăng 2,6% so với môi

trường đối chứng không bổ sung bã đậu nành (Nguyễn Thị Bích Hằng et al., 2023). Hàm lượng adenosine cũng có sự khác biệt giữa các nghiệm thức. Nghiệm thức đối chứng âm có hàm lượng adenosine thấp nhất (126 mg/kg), tiếp theo là nghiệm thức bã đậu (173 mg/kg), nghiệm thức bột đậu nành (174 mg/kg), nghiệm thức khô nành (183 mg/kg) và cao nhất là ở nghiệm thức đối chứng dương (216 mg/kg). Trong ba nguồn đạm khảo sát, hàm lượng adenosine ở nghiệm thức khô nành là cao nhất, tuy nhiên sự khác biệt này là không có ý nghĩa về mặt thống kê.

Bảng 6. Hàm lượng cordycepin, adenosine ghi nhận được trong thí nghiệm khảo sát nguồn đạm

Nghiệm thức	Hàm lượng cordycepin (mg/kg)	Hàm lượng adenosine(mg/kg)
ĐC âm	933^{c} ± 65	126^{b} ± 11
ĐC dương	2701^{a} ± 107	216^{a} ± 29
Khô nành	2093^{b} ± 110	**183^{ab} ± 11**
Bột đậu nành	**2869^{a} ± 122**	174^{ab} ± 22
Bã đậu	1998^{b} ± 103	173^{ab} ± 21

Ghi chú: Các chữ cái ghi sau giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn nằm trên cùng một cột giống nhau thì không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê với P > 0,05.



Hình 1. Sắc ký đồ HPLC của các mẫu phân tích hàm lượng cordycepin, adenosine

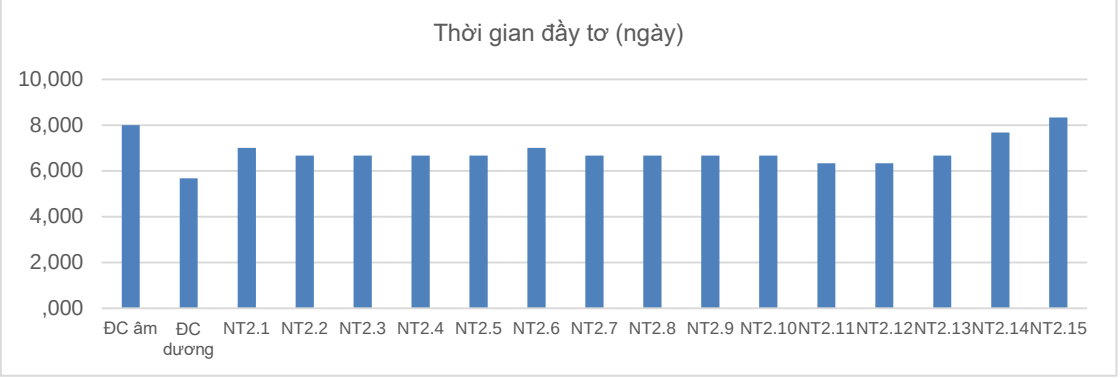
A: Bã đậu. B: Bột đậu nành. C: Khô nành. D: Đối chứng dương. E: Đối chứng âm.
F: Chất chuẩn adenosine và cordycepin. (1) adenosine. (2) cordycepin

Như vậy, dựa vào kết quả ghi nhận được của các chỉ tiêu thời gian lan tơ của hệ sợi, số lượng mầm quả thể, đặc điểm sinh trưởng của quả thể, chiều cao quả thể, khối lượng khô quả thể và hàm lượng cordycepin, adenosine trong quả thể khô thì cả ba loại nguồn đạm khảo sát đều có tiềm năng sử dụng để thay thế nhộng tằm tươi trong nuôi trồng tạo quả thể nấm NTT.

Khảo sát nồng độ các nguồn đạm

Từ kết quả khảo sát các nguồn đạm thực vật phù hợp ở nội dung trên, hàm lượng các nguồn đạm sẽ được khảo sát ở 5 mức: 0,5; 0,75; 1; 1,25 và 1,5 lần (bảng 1). Kết quả của thí nghiệm sẽ giúp chọn được nguồn đạm và nồng độ phù hợp nhất để sử dụng cho môi trường nuôi trồng nấm NTT. Bên cạnh đó, vẫn tiếp tục bố trí nghiệm thức đối chứng âm và nghiệm thức đối chứng dương như nội dung trên để làm căn cứ đánh giá và so sánh kết quả.

Sau 24 giờ được cấy vào môi trường bán rắn, hệ sợi của nấm NTT bắt đầu lan ra bề mặt môi trường dinh dưỡng và tốc độ tăng trưởng diễn ra nhanh trong những ngày kế tiếp. Hệ tơ nấm phủ kín bề mặt môi trường và ăn sâu xuống khối cơ chất sau khoảng 5 - 9 ngày nuôi cấy ở tất cả các nghiệm thức. Tỷ lệ nhiễm trong thí nghiệm này vẫn trong khoảng 0 – 4% và không khác biệt giữa các nghiệm thức khác nhau. Trong thí nghiệm này, mật độ hệ sợi, màu sắc hệ sợi có sự khác biệt giữa các nghiệm thức, đặc biệt là đối với nguồn đạm bã đậu. Thời gian hệ sợi nấm phủ kín khối cơ chất của hệ sợi của nấm *C. militaris* được nuôi trên 17 công thức môi trường được trình bày ở Hình 2.



Hình 2. Thời gian lan tơ hệ sợi nấm trên các công thức dinh dưỡng

Thời gian lan tơ của hệ sợi chậm nhất ở nghiệm thức NT2.15 (bã đậu nồng độ 1,5 – 6,52 g/ hộp) với thời gian 8,33 ngày, lâu hơn cả nghiệm thức đối chứng âm (8 ngày). Thời gian lan tơ nhanh nhất ở nghiệm thức đối chứng dương. Ở các nghiệm thức sử dụng bã đậu, sự chênh lệch về thời gian lan tơ là rất rõ rệt. Nghiệm thức có nồng độ bã đậu thấp (NT2.11 và NT2.12) thì hệ sợi phát triển rất nhanh, hệ sợi phủ kín bề mặt cơ chất chỉ sau 6,33 ngày. Tuy nhiên khi tăng nồng độ bã đậu từ 1 đến 1,5 lần (NT2.13, NT2.14, NT2.15) thì thời gian lan tơ chậm dần, hệ sợi có nhiều sợi nấm khí sinh và màu sắc của hệ sợi sau khi được kích sáng cũng nhạt hơn so với các nghiệm thức ở nồng độ thấp. Việc bổ sung quá nhiều bã đậu vào môi trường nuôi cấy (NT2.14 là 5,44 g/ hộp, NT2.15 là 6,52 g/ hộp) có thể đã ảnh hưởng đến ẩm độ và độ thông thoáng của khối cơ chất, do đó tác động mạnh lên sự tăng trưởng của hệ sợi. Đối với 2 nguồn nguyên liệu khô nành và bột đậu nành, thời gian lan tơ của hệ sợi không bị ảnh hưởng nhiều bởi hàm lượng của nguồn đạm bổ sung và thời gian lan kín tơ trong khoảng 6 - 7 ngày.

Sau 5-7 ngày được chiếu sáng, mầm quả thể sẽ được hình thành. Mật độ mầm quả thể không khác biệt nhiều giữa các nghiệm thức, dao động trong khoảng 30 - 85 mầm/ hộp đối với các nghiệm thức đối chứng âm, đối chứng dương, khô nành ở 5 nồng độ khảo sát, bột đậu nành ở 5 nồng độ khảo sát. Riêng với nguyên liệu bã đậu, mầm quả thể dao động trong khoảng 30 - 85 mầm/ hộp đối ở các nồng độ bã đậu thấp (NT2.11, NT2.12, NT2.13), ở nồng độ bã đậu cao NT2.14, NT2.15 số lượng mầm quả thể ghi nhận được trong khoảng 15 – 40 mầm/ hộp. Sau 50 ngày nuôi cấy tiến hành thu quả thể nấm và ghi nhận các chỉ tiêu chiều cao quả thể, hình dạng quả thể.

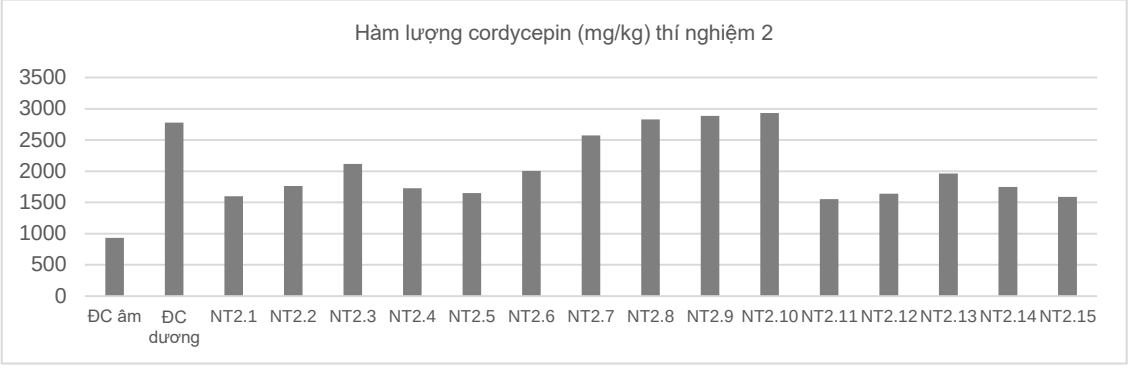
Bảng 7. Chiều cao quả thể, khối lượng khô quả thể, đặc điểm quả thể trên các môi trường khảo sát nguồn đạm

Nghiệm thức	Chiều cao quả thể (cm)	KLK quả thể (gram/hộp)	Đặc điểm quả thể
ĐC âm	3 – 6	$2,62^{c}$ ± 0,22	Quả thể nhỏ, đầu tròn, màu cam
ĐC dương	5 – 8	$5,85^{a}$ ± 0,26	Quả thể to, đầu hơi nhọn, màu cam đậm
NT2.1	4 – 7	$5,27^{ab}$ ± 0,24	Quả thể nhỏ đến vừa, đầu tròn, màu cam đậm
NT2.2	4 – 7	$5,48^{a}$ ± 0,25	Quả thể nhỏ đến vừa, đầu tròn, màu cam đậm
NT2.3	4 – 7	$5,61^{a}$ ± 0,21	Quả thể nhỏ đến vừa, đầu tròn, màu cam đậm
NT2.4	5 – 8	$5,68^{a}$ ± 0,19	Quả thể nhỏ đến vừa, đầu tròn, màu cam đậm
NT2.5	5 – 8	$5,70^{a}$ ± 0,25	Quả thể nhỏ đến vừa, đầu tròn, màu cam đậm
NT2.6	4 – 7	$5,49^{a}$ ± 0,19	Quả thể nhỏ đến vừa, đầu tròn, màu cam đậm
NT2.7	4 – 7	$5,68^{a}$ ± 0,17	Quả thể nhỏ đến vừa, đầu tròn, màu cam đậm
NT2.8	4 – 7	$5,73^{a}$ ± 0,20	Quả thể to, đầu tròn, màu cam đậm
NT2.9	5 – 8	**$5,84^{a}$ ± 0,19**	Quả thể to, đầu hơi nhọn, màu cam đậm
NT2.10	4 – 7	**$5,86^{a}$ ± 0,15**	Quả thể to, đầu hơi nhọn, màu cam đậm
NT2.11	4 – 7	$5,31^{ab}$ ± 0,25	Quả thể to, đầu tròn, màu cam đậm
NT2.12	4 – 7	$5,43^{ab}$ ± 0,30	Quả thể to, đầu tròn, màu cam đậm
NT2.13	4 – 7	$5,69^{a}$ ± 0,23	Quả thể to, đầu tròn, màu cam đậm
NT2.14	5 – 7	$5,62^{a}$ ± 0,23	Quả thể to, đầu tròn, màu cam đậm, số lượng quả thể ít
NT2.15	5 – 7	$4,77^{b}$ ± 0,16	Quả thể to, đầu tròn, màu cam đậm, số lượng quả thể ít

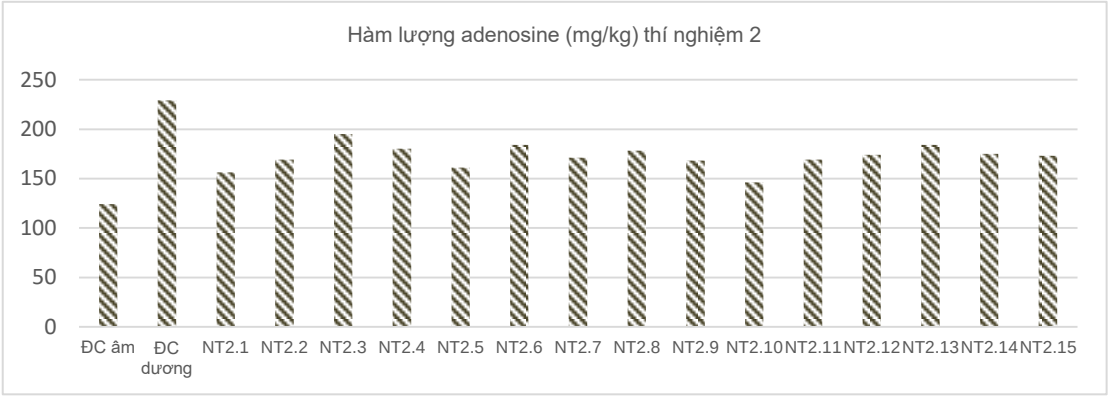
Ghi chú: Các chữ cái ghi sau giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn nằm trên cùng một cột giống nhau thì không có sự khác biệt về mặt ý nghĩa thống kê với P > 0,05.

Kết quả ghi nhận ở Bảng 7 cho thấy, khối lượng khô quả thể nấm NTT ở các nghiệm thức có sự khác biệt về mặt thống kê (P ≤ 0,05). Ở 15 nghiệm thức khảo sát nồng độ nguồn đạm, khối lượng khô quả thể nấm đều khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng âm. Điều này chứng tỏ khô nành, bột đậu nành, bã đậu là nguồn đạm phù hợp để nuôi trồng nấm NTT. Ở nghiệm thức bổ sung bột đậu nành nồng độ cao 1,25 lần – NT2.9 (5,84 g/hộp) và 1,5 lần – NT2.10 (5,86 g/hộp), khối lượng khô quả thể nấm ghi nhận được tương đương với đối chứng dương (5,86 g/hộp). Nghiệm thức bã đậu nồng độ 1,5 lần (NT2.15) có khối lượng khô quả thể thấp nhất (4,77 g/hộp) trong 15 nghiệm thức khảo sát.

Nếu xét về từng loại nguồn đạm, đối với nguồn nguyên liệu khô nành, kết quả cho thấy, khối lượng khô quả thể tăng dần (5,27 – 5,70 g/hộp) khi tăng nồng độ nguồn đạm từ 0,5 – 1,5 lần. Tương tự, đối với nguồn nguyên liệu bột đậu nành khối lượng khô quả thể cũng tăng dần (5,49 – 5,86 g/hộp) khi tăng nồng độ nguồn đạm từ 0,5 – 1,5 lần. Như vậy, khi tăng nồng độ dinh dưỡng thì giúp sợi nấm phát triển mạnh hơn, năng suất nấm cao hơn, mức dinh dưỡng phù hợp là trong khoảng 1- 1,5 lần. Đối với nguyên liệu bã đậu, khối lượng khô quả thể tăng khi tăng nồng độ từ 0,5 – 1 (5,31 – 5,69 g/hộp), tiếp tục tăng nồng độ từ 1 – 1,5 thì khối lượng khô quả thể lại giảm dần (5,69 – 4,77 g/hộp). Điều này có thể giải thích là vì khi cho quá nhiều bã đậu vào môi trường nuôi cấy sẽ ảnh hưởng đến độ ẩm của môi trường vì bã đậu ở dạng khô hút nhiều nước. Bên cạnh đó cấu trúc của bã đậu khi gặp dung dịch dinh dưỡng sẽ nở ra và lấp đầy các khoảng trống của môi trường bán rắn làm cho môi trường mất đi độ rỗng, xốp, làm ảnh hưởng đến sự lan tơ của hệ sợi dẫn đến giảm năng suất nấm.



Hình 3. Biểu đồ hàm lượng cordycepin có trong quả thể nấm trong thí nghiệm khảo sát nồng độ nguồn đạm



Hình 4. Biểu đồ hàm lượng adenosine có trong quả thể nấm trong thí nghiệm khảo sát nồng độ nguồn đạm

Kết quả phân tích hàm lượng cordycepin và adenosine trong quả thể nấm cho thấy, ở 15 nghiệm thức khảo sát nồng độ nguồn đạm, hàm lượng hoạt chất đều khác biệt có ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng âm. Hàm lượng hoạt chất có trong quả thể nấm trong thí nghiệm khảo sát nồng độ nguồn đạm được thể hiện trong Hình 3 và Hình 4.

Trong ba nguồn đạm khảo sát, hàm lượng cordycepin ghi nhận ở các nghiệm thức sử dụng bột đậu nành là cao nhất, khi tăng nồng độ bột đậu nành (từ 0,5 – 1,5 lần) thì hoạt chất cordycepin cũng tăng dần (2006 – 2933 mg/kg). Ở các nghiệm thức khô nành và bã đậu, hàm lượng cordycepin thấp hơn và khi tăng nồng độ nguồn đạm từ 0,5 – 1 lần thì hoạt chất tăng (KN: 1596 – 2118 mg/kg; BĐ: 1552 – 1965 mg/kg), tiếp tục năng nồng độ nguồn đạm 1- 1,5 thì hoạt chất giảm dần (KN: 2118 – 1651 mg/kg; BĐ: 1965 – 1589 mg/kg). Mặt khác, hàm lượng adenosine thấp nhất ở nghiệm thức đối chứng âm và cao nhất đối chứng dương, lần lượt là 124 – 229 mg/kg. Các nghiệm thức khảo sát có hàm lượng adenosine trong khoảng 146 – 195 mg/kg. Các nghiệm thức khô nành, bã đậu khi tăng nồng độ từ 0,5 – 1 lần thì hàm lượng adenosine tăng, tiếp tục tăng nồng độ 1 – 1,5 lần thì hàm lượng adenosine sẽ giảm. Các nghiệm thức bột đậu nành, khi tăng nồng độ nguồn đạm thì hàm lượng adenosine giảm dần.

KẾT LUẬN

Dựa vào các kết quả ghi nhận được của các chỉ tiêu khối lượng khô quả thể, hàm lượng cordycepin và adenosine, cả ba loại nguồn đạm khảo sát đều có tiềm năng sử dụng để thay thế nhộng tằm tươi trong nuôi trồng tạo quả thể nấm NTT. Nếu xét về giá trị kinh tế thì khô nành và bã đậu là 2 nguồn nguyên liệu phù hợp vì có giá thành rẻ. Hàm lượng phù hợp của nguồn nguyên liệu khô nành là ở mức 1,25 X2 (1,70 g/hộp), khối lượng khô quả thể nấm đạt 5,68 g/hộp, hàm lượng cordycepin đạt 1765 mg/kg. Hàm lượng phù hợp của nguồn nguyên liệu bã đậu là ở mức 1 X1 (4,35 g/hộp), khối lượng khô quả thể nấm đạt 5,69 g/hộp, hàm lượng cordycepin đạt 1965 mg/kg. Nếu xét về hàm lượng hoạt chất thì bột đậu nành là nguồn nguyên liệu phù hợp vì giúp làm tăng hàm lượng cordycepin so với đối chứng dương. Hàm lượng phù hợp của nguồn nguyên liệu bột đậu nành là ở mức 1,5 X3 (2,55 g/hộp), khối lượng khô quả thể nấm đạt 5,86 g/hộp, hàm lượng cordycepin đạt 2933 mg/kg.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi chọn bột đậu nành là nguồn đạm thay thế nhộng tằm tươi vì nguyên liệu này dễ tìm, giá thành rẻ hơn nhộng tằm tươi, cho năng suất tương đương nhộng tằm và nấm có dược chất cordycepin cao. Nồng độ bột đậu nành sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo là 2,55 g/hộp.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Đỗ Tuấn Bách, Vũ Hoài Nam, Ma Thị Trang, Hà Văn Hướng, Nguyễn Mạnh Cường, Nguyễn Duy Thuấn, Dương Văn Cường. (2017). Đánh giá ảnh hưởng của điều kiện nuôi trồng tới khả năng tạo quả thể của nấm đông trùng hạ thảo *Cordyceps militaris*. *TNU Journal of Science Technology, 161*(01): 113-118.

Lim L, Lee C, Chang E (2012). Optimization of solid state culture conditions for the production of adenosine, cordycepin, and D-mannitol in fruiting bodies of medicinal caterpillar fungus *Cordyceps militaris* (L.: Fr.) Link (Ascomycetes). *International journal of medicinal mushrooms, 14*(2).

Nguyễn Thị Bích Hằng, Triệu Thy Hòa, Đoạn Chí Cường (2023). Đặc điểm của nấm đông trùng hạ thảo (Cordyceps militaris) nuôi trồng trên cơ chất bã đậu nành. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ-Đại học Đà Nẵng*, 38-42.

Nguyễn Thị Minh Hằng, Bùi Văn Thắng (2017). Nghiên cứu nuôi trồng nấm đông trùng hạ thảo (Cordyceps militaris) trên giá thể tổng hợp và nhộng tằm.

Sripilai K, Chaicharoenaudomrung N, Phonchai R, Chueaphromsri P, Kunhorm P, Noisa P (2023). Development of an animal-free nitrogen source for the liquid surface culture of Cordyceps militaris. *Letters in Applied Microbiology, 76*(5): ovad053.

EXPERIMENTAL RESEARCH ON CULTIVATING *Cordyceps militaris* ON DIFFERENT PLANT-BASED NITROGEN SOURCES

Nguyen Tran Duc Duy*, Luong Thi Ngoc Han, Do Thi Nhu Thao, Nguyen Anh Thu, Nguyen Pham Truc Phuong, Nguyen Thi Loan, Hoang Dac Hiet

Research and Development Center for Hi-tech Agriculture

SUMMARY

Nowadays, the artificial cultivation industry of *Cordyceps militaris* mushrooms is developing vigorously in our country and other countries around the world to serve the needs of both pharmaceutical production and food. If using sustainable sources such as cereal powder or by-products from the cereal grain industry to cultivate *Cordyceps militaris* mushrooms, abundant raw materials can be obtained, with low costs, suitable for industrial-scale production. Therefore, the scientific research task "Experimental research on cultivating (*Cordyceps militaris*) different plant-based nitrogen sources" is carried out with the aim of finding a vegetable raw material substitute for fresh silkworm pupae in the cultivation environment to actively manage the raw material source, helping to reduce production costs while maintaining the nutritional and medicinal value of the mushrooms. The research results show that soybean flour is a suitable protein source to replace silkworm pupae to supplement the cultivation environment, creating *Cordyceps militaris* mushroom fruit bodies. The concentration used: 30 g of brown rice/box, 2.55 g of soybean flour/box, 60 ml of nutrient solution (extracted seaweed extract 9.02 g/L, $CaCl_2$ 0.1 g/L, folic acid 5 µg/L). The yield and quality of *Cordyceps militaris* mushrooms cultivated on soybean flour: dry fruit body weight reached 5.86 g/box, cordycepin content reached 2933 mg/kg, adenosine content reached 146 mg/kg after 50 days of cultivation..

Keywords: Soybean meal, soybean meal powder, *Cordyceps militaris*, soybean residue, semi-solic fermentation.

* Author for correspondence: Tel: 0901.479.775; Email: duy.reus97@gmail.com

NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH DUPLEX RT-qPCR PHÁT HIỆN CMNV (*Covert Mortality Nodavirus*) GÂY BỆNH TRÊN TÔM THẺ CHÂN TRẮNG

Đỗ Thị Như Thảo*, Nguyễn Phạm Trúc Phương, Lương Thị Ngọc Hân, Nguyễn Trần Đức Duy, Nguyễn Thị Loan, Hoàng Đắc Hiệt

Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nông nghiệp Công nghệ cao

TÓM TẮT

Trong các bệnh do virus gây ra trên tôm thì bệnh có tỉ lệ tôm chết cao và lây lan nhanh là bệnh do virus *CMNV* (*Covert Mortality Nodavirus*) gây ra hội chứng tôm chết bí ẩn. *CMNV* có khả năng lây lan nhanh chóng ra xung quanh và dự báo nguy cơ bùng phát trên diện rộng nếu không có biện pháp ngăn chặn kịp thời. Nghiên cứu xây dựng quy trình duplex RT-qPCR phát hiện virus *CMNV* gây bệnh trên tôm thẻ chân trắng. Phương pháp duplex RT-qPCR sử dụng Taqman probe được phát triển và tối ưu hóa với tỷ lệ nồng độ mồi RdRp/ β-actin lần lượt là 300nM/300nM; nồng độ probe tương ứng 300nM/200nM cho trình tự mục tiêu gen *RdRp* được xây dựng trên bộ hóa chất PerfeCTa® qPCR FastMix® II, Low ROX™. Với chu trình nhiệt là 95°C trong 2 phút; 40 chu kỳ 95°C trong 5 giây; 60°C trong 30 giây. Xác định được các thông số kỹ thuật như độ chọn lọc (100%), giới hạn phát hiện (LOD_{50}) với nồng độ 5-10 copy/ phản ứng trên DNA plasmid và nồng độ 12pg/ phản ứng trên cDNA ly trích. Độ biến thiên nội phản ứng của quy trình ở các nồng độ DNA có %CV từ 0,98% đến 1,94% và độ biến thiên liên phản ứng thấp nhất là 0,70%, còn hệ số biến thiên liên phản ứng cao nhất 1,91%.

Từ khóa: β-actin, *CMNV* (*Covert Mortality Nodavirus*), duplex RT-qPCR, gen *RdRp*, tôm thẻ chân trắng.

MỞ ĐẦU

Trong những năm gần đây, các đợt bệnh truyền nhiễm ở các ao nuôi đã gây ra thiệt hại kinh tế lớn cho ngành nuôi tôm thế giới. Gần đây, một bệnh virus tôm mới nổi khác đang đe dọa ngành tôm ở Trung Quốc, một trong những nước sản xuất tôm hàng đầu thế giới. Căn bệnh này được gọi là "Hội chứng tôm chết bí ẩn", do tôm chết nhiều ẩn dưới đáy nước sâu thay vì bơi lên mặt nước hoặc vùng nước nông như tôm bị bệnh đốm trắng. Sau đó đã phát hiện 1 loài virus mới có cấu trúc RNA, được đặt tên chính thức là *CMNV* thuộc phân họ Nodaviridae (Zhang *et al.*, 2014)*. CMNV* được phát hiện lần đầu tiên vào đầu năm 2009 tại các ao nuôi tôm thẻ chân trắng *(Penaeus vannamei)* mật độ cao, nơi mầm bệnh phát triển gây chết cao. Tỷ lệ gây chết của *CMNV* có thể tích lũy theo mật độ nuôi, có thể đạt tới mức 80-90% trong một số trường hợp. Từ năm 2013 đến năm 2015 đã có rất nhiều các cuộc điều tra dịch tễ học tiếp theo cho thấy *CMNV* phổ biến ở hầu hết các loại tôm như tôm thẻ chân trắng, tôm chân trắng Trung Quốc, tôm he Nhật Bản, tôm sú và tôm càng xanh. Ngoài ra đã có nhiều nghiên cứu về các vật chủ trung gian lây truyền *CMNV* như amphiod, ốc mượn hồn, còng, *Tubuca arcuata* đều phát hiện dựa trên trình tự gen *RdRp* (*RNA- dependent RNA polymerase*) mục tiêu của *CMNV* thông qua phương pháp RT-LAMP và RT-nPCR. Tỷ lệ nhiễm *CMNV* lên tới 31,8% tại các ao nuôi tôm phân bố dọc theo vùng ven biển các tỉnh của Trung Quốc (Zhang *et al*.,2017). Trong nghiên cứu khác của Zhang và đồng tác giả (2017), đã phát hiện virus *CMNV* có mặt trên *Litopenaeus vannamei*, *Fenneropenaeus chinensis, Marsupenaeus japonicus bằng các xét nghiệm mô học và phương pháp RT-PCR. Nhằm kiểm soát nguy cơ bùng dịch trên diện rộng, nhóm tác giả đã xây dựng và tối ưu hóa quy trình phát hiện virus CMNV bằng kỹ thuật RT-LAMP* với các thông số tối ưu như sau: 6 mM $MgCl_2$ và 1,6 mM dNTP, nhiệt độ ủ là 65℃ và thời gian phản ứng là 50 phút (Zhang *et al*., 2017). *Ưu điểm của kỹ thuật này so với các phương pháp chuẩn đoán khác như thời gian trả kết quả nhanh, hạn chế việc nhiễm chéo của mẫu, quan sát kết quả bằng mắt thường, thuận tiện cho việc xét nghiệm tại chỗ.* Việc chuẩn đoán mầm bệnh do *CMNV* gây ra bằng phương pháp mô học là rất khó khăn do sự biến đổi không rõ ràng. Bên cạnh đó, việc phát hiện ra *CMNV* trong mang, gan tụy, chân ngực và cơ cũng rất khó khăn do kích thước rất nhỏ. Trong đó, qPCR dựa trên đầu dò TaqMan là một phương pháp có độ nhạy và độ tin cậy cao cho phép phát hiện nhanh và chính xác các mầm bệnh virus, có khả năng phát hiện được sự hiện diện của virus trong thời kỳ ủ bệnh, là phương pháp phổ biến nhất được khuyên dùng cho phát hiện và định lượng cho động vật thủy sinh. Tính đến thời điểm hiện tại, Việt Nam vẫn chưa có công bố nào về trường hợp tôm nhiễm virus *CMNV*. Để chủ động phòng chống – kiểm soát dịch bệnh lây lan nhóm tác giả thực hiện nghiên cứu xây dựng quy trình RT-qPCR dựa trên đầu dò TaqMan để vừa khuếch đại gen mục tiêu và gen chứng nội nhằm kiểm soát quy trình với các thông số kỹ thuật đáp ứng yêu cầu ứng dụng phân tích phát hiện virus nhanh và chính xác.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu nghiên cứu

Mồi xuôi, mồi ngược, 2X PerfeCTa® qPCR FastMix® II, Low ROX™, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems™ , RNA tôm, chứng dương được cung cấp bởi công ty DNA Sequencing, plasmid chứng dương sử dụng trình tự trên NCBI được tổng hợp bởi công ty IDT- Mỹ.

Ly trích RNA tổng số của các mẫu tôm

Các mẫu tôm được thu thập ở các địa điểm khác nhau trên địa bàn thành phố Hồ Chí Minh. RNA tổng số của các mẫu tôm được ly trích bằng kit tách chiết TopPURE® Tissue Viral Extraction theo hướng dẫn nhà sản xuất. Sau quá trình ly trích RNA, các mẫu tôm được ly trích RNA được định tính và định lượng bằng máy đo BioPhotometer Plus hãng Eppendorf. Tiếp tục, thực hiện phản ứng phiên mã ngược RNA thành cDNA sử dụng bộ High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermofisher) , cDNA sau phiên mã ngược được bảo quản ở -20℃ đến 4℃ để sử dụng cho phản ứng tiếp theo.

Thiết kế mồi và probe đặc hiệu để phát hiện *CMNV* gây bệnh trên tôm

Đoạn mồi và probe phát hiện virus *CMNV* được thiết kế cho dựa trên trình tự gen *RdRp* của bộ gen *CMNV* trên Genbank (KM112247). Cặp mồi và probe β-actin được thiết kế dựa trên đoạn gen β-actin mRNA của tôm(AF300705.2). Các đoạn mồi và probe được thiết kế với sự trợ giúp của phần mềm Primer3. Bên cạnh đó, nghiên cứu có tham khảo thêm cặp mồi và probe phát hiện *CMNV* được dựa trên gen *RdRp* bằng phương pháp RT-qPCR với độ nhạy 5,7 copies/ phản ứng đã được công bố bởi Li và đồng tác giả (Li *et al.*, 2018). Mồi sau khi thiết kế được đánh giá các thông số vật lý như độ dài, nhiệt độ nóng chảy, phần trăm GC, năng lượng hình thành cấu trúc bậc hai… bằng phần mềm trực tuyến IDT. Bên cạnh đó tính đặc hiệu được kiểm tra bằng chương trình Annhyb.

Kiểm tra độ hoạt động thực tế của mồi và probe

Sau khi mồi được tổng hợp, phản ứng qPCR được thực hiện với các thành phần phản ứng PCR với DNA chứng dương đặc hiệu cho virus *CMNV* và gen chứng nội β-actin trên DNA ly trích từ mẫu tôm trắng để đánh giá khả năng hoạt động của mồi. Tiếp tục kiểm tra độ hoạt động thực tế của probe với các thành phần phản ứng cơ bản của phản ứng qPCR, DNA chứng dương đặc hiệu cho virus *CMNV* và DNA ly trích từ mẫu tôm trắng. Chỉ tiêu theo dõi: Tín hiệu huỳnh quang và chu kỳ ngưỡng C_T.

Xây dựng và tối uu hóa quy trình duplex RT-qPCR phát hiện *CMNV* gây bệnh trên tôm

Hỗn hợp phản ứng RT-qPCR bao gồm 2X PerfeCTa® qPCR FastMix® II, Low ROX™ 10µL, mẫu DNA 1µL, nồng độ mồi và probe được tối ưu bằng phương pháp ma trận 5x5. Theo đó, nồng độ gradient cuối cùng của các mồi là 100, 200, 300, 400, 500 (nM); của probe gen RdRp là 100, 200, 300, 400, 500 (nM), probe chứng nội là 50, 100, 150, 200, 250 (nM) và nước không có nuclease được bổ sung đủ thể tích 25 µL. Phản ứng khuếch đại được thực hiện trên máy Mx3005P™ qPCR system (Agilent technologies). Chu kỳ nhiệt qPCR: 95℃ trong 2 phút, 40 chu kỳ ở 95℃ trong 5 giây và 55-65℃ trong 30 giây. Khi phản ứng qPCR kết thúc, dựa vào kết quả C_T và ΔRn thu được để chọn những giá trị tối ưu nhất.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Mồi, probe và đánh giá các đặc tính của mồi, probe

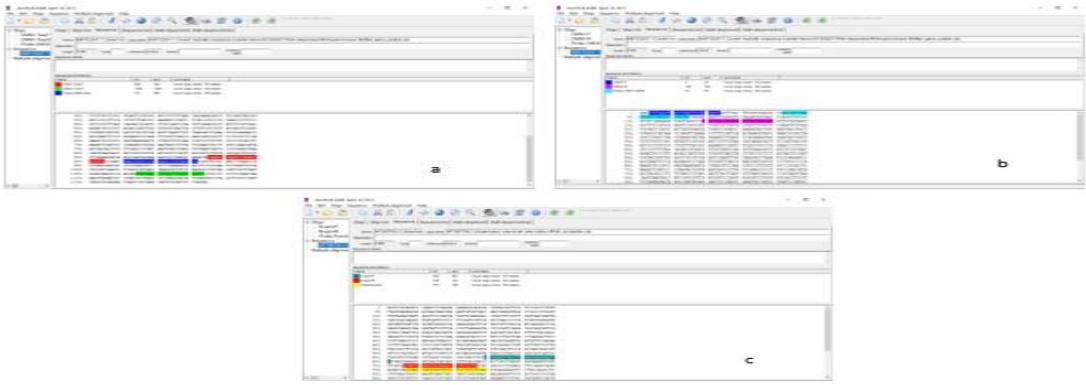
Trình tự mồi và probe để khuếch đại đoạn mồi RdRp và gen chứng nội có trình tự như Bảng 1. Các đặc tính vật lý được đánh giá bằng phần mềm IDT cũng được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Trình tự mồi và probe sử dụng trong nghiên cứu

Mồi và probe	Trình tự nucleotide	Chiều dài (bp)	Tm (°C)	%GC	(1)	(2)	(3)
CMNV-Taq-F	CGAGCTAATCCAAGCACTTC	198	53,50	50,00	-1,63	-0,96	-0,96
CMNV-Taq-R	ACCTGTTAGGTACGCTACCA		55,10	50,00	-1,34	-0,96	-0,96
Probe CMNV- Taq	6-carboxyfluorescein (FAM) – CGCTCA CGGCTTTGGATACCTT - N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhododamine (TAMRA)		59,70	54,50	-0,28	-0,96	-1,34
RdRp-F	TCTAAGTACCGATTCGAGATC	137	50,80	42,90	0,10	-0,96	-0,96
RdRp-R	GTGTTATGATCTGTGGTAGTC		50,20	42,90	0,51	-0,96	-0,96
Probe RdRp	6-carboxyfluorescein (FAM) – ACCATCAACTGTCCAGCCCGCGCCA - N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhododamine (TAMRA)		68,70	64,00	0,39	-1,34	-1,57
β-actin-F	ACAGACTACCTGATGAAGATCC	98	53,50	45,50	-2,06	-0,96	-1,34
β-actin-R	TAGCACAGTTTCTCCTTGATGT		53,90	40,90	1,30	-0,96	-1,34
Probe β-actin	/5HEX/CCACCGCTG/ZEN/CTTCCTC CTCCTCGC/3IABkFQ/		67,60	70,80	1,30	-3,14	-1,60

Chú thích: Tm: nhiệt độ nóng chảy; (1) ⊿G của cấu trúc kẹp tóc (hairpin-loop) (kcal/mol); (2) ⊿G của cấu trúc self-dimer (kcal/mol); (3) ⊿G của cấu trúc hetero-dimer (kcal/mol).

Dựa vào Bảng 1, giá trị vật lý với nhiệt độ nóng chảy (T_m) của cặp mồi CMNV-Taq-F/R (T_m: 53,50°C với 55,10°C), cặp mồi RdRp-F/R (T_m: 50,80°C với 50,20°C), cặp mồi gen chứng nội *β*-actinF/R trên tôm (T_m: 53,50°C với 53,90°C) có nhiệt độ nóng chảy ở mồi xuôi và mồi ngược không chênh lệch với nhau lớn vì khi chênh lệch nhau quá 5°C đoạn mồi sẽ không gắn vào trình tự mục tiêu và không tạo ra được sản phẩm khuếch đại. Các đoạn probe CMNV-Taq; RdRp và β-actin có chiều dài nu của lần lượt là 22 nu, 25 nu, 24 nu; không có đầu G ở đầu 5'; đoạn probe có nhiều nu C hơn nu G. Bên cạnh đó, probe CMNV-Taq; RdRp và β-actin có %GC lần lượt là 54,5%; 64,0% và 70,8% đều nằm trong khoảng 30% đến 80%. Theo Phạm Hùng Vân (2011), các probe thiết kế phải thỏa mãn những yêu cầu sau: (1) probe phải nằm gần mồi; (2) chiều dài phải ngắn hơn 30 nu; (3) không nên có G ở đầu 5' vì G hấp thụ tín hiệu huỳnh quang dẫn đến sai lệch về kết quả; (4) hàm lượng GC trong probe nằm trong khoảng 30-80%; (5) probe phải có nhiều base C hơn G; (6) nhiệt độ nóng chảy của mẫu dò phải lớn hơn nhiệt độ của mồi từ 8-10°C. Nhưng ở probe RdRp và probe β-actin T_m của probe lần lượt là 68,7°C; 67,6°C đều lớn hơn nhiệt độ mồi khoảng 20°C. Tuy nhiên, các thông số của hai probe RdRp và probe β-actin đều thỏa mãn các đáp ứng điều kiện thiết kế probe như nằm gần đoạn mồi, có chiều dài ngắn hơn 30 nu, không nên có G ở đầu 5',… Như vậy trên lý thuyết, các mồi và probe được lựa chọn trong nghiên cứu này thỏa mãn các điều kiện về đặc tính oligonucleotide để có thể hoạt động tốt trong phản ứng RT-qPCR như về T_m, hàm lượng GC, các cấu trúc thứ cấp. Tính đặc hiệu được kiểm tra bằng chương trình Annhyb cho thấy các cặp mồi và probe tương ứng chỉ bắt cặp đặc hiệu vào trình tự gen đích với mức độ tương đồng 100%.

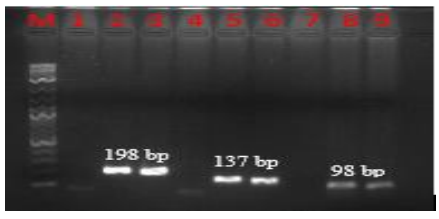


Hình 1. (a) Sự bắt cặp của cặp mồi và probe CMNV-Taq lên trình tự RdRp của CMNV; (b) Sự bắt cặp của cặp mồi và probe RdRp lên trình tự RdRp của CMNV; (c) Sự bắt cặp của cặp mồi và probe β-actin lên trình tự β-actin

Kiểm tra độ hoạt động thực tế của mồi và probe

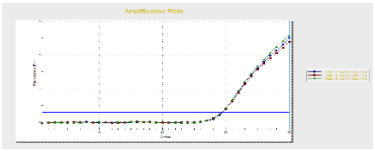
Kiểm tra khả năng hoạt động thực tế của cặp mồi CMNV-Taq-F/ CMNV-Taq-R, cặp mồi RdRp –F/ RdRp –R, cặp mồi β-actin-F/ β-actin-R bằng cách thực hiện với các thành phần phản ứng PCR với DNA chứng dương đặc hiệu cho virus CMNV và gen chứng nội β-actin trên DNA ly trích từ mẫu tôm trắng để đánh giá khả năng hoạt động của mồi. Kết quả cho thấy, sản phẩm khuếch đại của phản ứng PCR lần lượt là 198bp, 137bp, 98bp phù hợp với kích thước trình tự gen mục tiêu RdRp, β-actin (Hình 2). Các sản phẩm PCR được đem đi gửi tại Trung tâm Nghiên cứu Thử nghiệm Hóa Dược để khẳng định trình tự gen của virus *CMNV*. Kết quả giải trình tự sẽ được so sánh các trình tự với trình tự gen sẵn có trong NCBI genebank bằng cách sử dụng BLAST alignment để nhận diện. Kết quả giải trình tự sản phẩm PCR với cặp mồi CMNV-Taq-F/ R cho độ tương đồng 94,83% và cặp mồi RdRp-F/R cho độ tương đồng 98,57% với trình tự mục tiêu của gen RdRp.

Khả năng hoạt động của đoạn dò với cặp mồi tương ứng được thực hiện bằng phản ứng qPCR với tín hiệu huỳnh quang vượt ngưỡng. Cặp mồi CMNV-Taq, RdRp sử dụng probe gắn màu FAM, cặp mồi β-actin sử dụng probe gắn màu HEX. Các probe đều cho tín hiệu huỳnh quang vượt ngưỡng tương ứng với các cặp mồi (Hình 3, Hình 4, Hình 5).

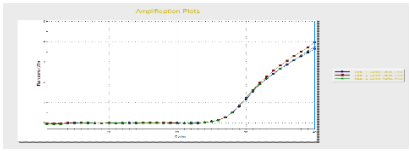


Hình 2. Kết quả PCR khuếch đại DNA của cặp mồi CMNV-Taq-F/R, RdRp-F/R, β-actinF/R

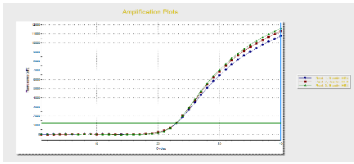
M: Thang DNA; Giếng (1): Mẫu âm với cặp mồi CMNV-Taq-F/R*; Giếng (2), (3): DNA chứng dương với cặp mồi* CMNV-Taq-F/R*; Giếng (4): Mẫu âm với cặp* RdRp-F/R*; Giếng (5),(6): DNA chứng dương với cặp mồi* RdRp-F/R*; Giếng (7): Mẫu âm với cặp mồi* β-actinF/*R; Giếng (8), (9): DNA chứng dương với cặp mồi* β-actinF/*R*



Hình 3. Biểu đồ khuếch đại tín hiệu huỳnh quang của cặp mồi và probe CMNV-Taq gắn màu FAM



Hình 4. Biểu đồ khuếch đại tín hiệu huỳnh quang của cặp mồi và probe RdRp gắn màu FAM



Hình 5. Biểu đồ khuếch đại tín hiệu huỳnh quang của cặp mồi và probe β-actin gắn màu HEX

Tiến hành dựng đường chuẩn từ 10^3 copies/ phản ứng đến 10^6 copies/ phản ứng để đánh giá hiệu quả khuếch đại trình tự mục tiêu thì cặp mồi và probe RdRp cho hiệu suất là 98,60% cao hơn so với cặp mồi và probe CMNV-Taq là 92,20%. Do đó, cặp và probe RdRp được lựa chọn để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Xây dựng và tối uu hóa quy trình duplex RT-qPCR phát hiện CMNV gây bệnh trên tôm

Nồng độ mồi là yếu tố cơ bản quyết định đến sự thành công của phản ứng qPCR. Nhằm tối ưu hóa phản ứng khảo sát các nồng độ mồi từ 100-500nM với độ tăng là 100nM trên cùng 1 nồng độ DNA plasmid dương tính *CMNV*. Gen β-actin được sử dụng làm chứng nội như một biện pháp kiểm soát quá trình ly trích (chống kết quả âm tính giả) trong quy trình xây dựng. Kết quả tối ưu nồng độ mồi CMNV-Taq/ β-actin ở tỷ lệ 300nM/300nM là tối ưu nhất, có khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại của thí nghiệm (Bảng 2).

Nồng độ probe cũng là 1 yếu tố quan trọng trong phản ứng duplex qPCR. Nồng độ probe tối ưu cho phản ứng qPCR được khảo sát đi từ 100 đến 500nM với độ tăng là 100nM đối với probe của gen đặc hiệu *RdRp* và probe của gen chứng nội β-actin được khảo sát ở nồng độ từ 50 đến 250nM với độ tăng là 50nM cùng một nồng độ DNA plasmid 10^3 copies và cDNA ly trích từ tôm, nhằm tìm ra tỷ lệ nồng độ cho giá trị C_T nhỏ nhất, cường độ tín hiệu huỳnh quang cao nhất. Kết quả bảng 3 cho thấy tỷ lệ 300nM/200nM là nồng độ phù hợp cho phản ứng duplex qPCR phát hiện trình tự gen mục tiêu *RdRp* của *CMNV* và gen chứng nội β-actin để kiểm soát phản ứng.

Bảng 2. Kết quả tối ưu nồng độ mồi CMNV-Taq/ β-actin trên DNA plasmid 10^3 copies và gen chứng nội β –actin

Nồng độ mồi CMNV-Taq/ β-actin	FAM	HEX	Nồng độ mồi CMNV-Taq/ β-actin	FAM	HEX
	Chu kỳ ngưỡng (C_T)	Chu kỳ ngưỡng (C_T)		Chu kỳ ngưỡng (C_T)	Chu kỳ ngưỡng (C_T)
100/ 100	$32,86^{a} \pm 0,26$	$28,36^{a} \pm 0,20$	300/ 400	$31,40^{cdefgh} \pm 0,34$	$25,86^{klm} \pm 0,15$
100/ 200	$31,85^{bcd} \pm 0,26$	$28,01^{ab} \pm 0,07$	300/ 500	$30,65^{gh} \pm 0,53$	$26,56^{ghij} \pm 0,15$
100/ 300	$31,41^{cdefgh} \pm 0,15$	$27,79^{abc} \pm 0,15$	400/ 100	$32,74^{ab} \pm 0,25$	$27,56^{bcd} \pm 0,22$
100/ 400	$30,97^{defgh} \pm 0,38$	$27,47^{bcd} \pm 0,19$	400/ 200	$32,23^{abc} \pm 0,24$	$26,86^{efgh} \pm 0,28$
100/ 500	$30,54^{gh} \pm 0,07$	$27,33^{cde} \pm 0,13$	400/ 300	$31,69^{cde} \pm 0,26$	$26,31^{hijkl} \pm 0,12$
200/ 100	$32,27^{abc} \pm 0,75$	$27,47^{bcd} \pm 0,33$	400/ 400	$31,02^{defgh} \pm 0,04$	$26,17^{ijklm} \pm 0,18$
200/ 200	$31,73^{cde} \pm 0,12$	$26,80^{efgh} \pm 0,28$	400/ 500	$30,82^{efgh} \pm 0,13$	$25,84^{lm} \pm 0,16$
200/ 300	$31,43^{cdefg} \pm 0,16$	$26,64^{fghi} \pm 0,09$	500/ 100	$31,64^{cdef} \pm 0,08$	$27,30^{cde} \pm 0,18$
200/ 400	$31,46^{cdefg} \pm 0,36$	$26,43^{hijk} \pm 0,24$	500/ 200	$31,24^{defgh} \pm 0,54$	$27,20^{def} \pm 0,13$
200/ 500	$30,95^{defgh} \pm 0,37$	$26,21^{ijkl} \pm 0,20$	500/ 300	$30,93^{defgh} \pm 0,03$	$26,61^{ghi} \pm 0,05$
300/ 100	$32,81^{ab} \pm 0,18$	$27,03^{defg} \pm 0,04$	500/ 400	$30,70^{fgh} \pm 0,21$	$26,16^{ijklm} \pm 0,55$
300/ 200	$31,39^{cdefgh} \pm 0,22$	$26,12^{ijklm} \pm 0,13$	500/ 500	$30,58^{gh} \pm 0,25$	$26,02^{jklm} \pm 0,19$
300/ 300	**$30,45^{h} \pm 0,36$**	**$25,60^{m} \pm 0,13$**			

Bảng 3. Kết quả tối ưu nồng độ probe CMNV-Taq/ β-actin trên DNA plasmid 10^3 copies và gen chứng nội β –actin

Nồng độ probe CMNV-Taq/β-actin	FAM	HEX	Nồng độ probe CMNV-Taq/ β-actin	FAM	HEX
	Chu kỳ ngưỡng (C_T)	Chu kỳ ngưỡng (C_T)		Chu kỳ ngưỡng (C_T)	Chu kỳ ngưỡng (C_T)
100/ 50	$32,31^{a} \pm 0,19$	$27,70^{a} \pm 0,19$	**300/ 200**	**$29,29^{l} \pm 0,33$**	**$25,35^{k} \pm 0,20$**
100/ 100	$32,03^{abc} \pm 0,12$	$27,09^{bcd} \pm 0,20$	300/ 250	$29,52^{kl} \pm 0,23$	$25,44^{k} \pm 0,17$
100/ 150	$31,83^{abc} \pm 0,22$	$26,87^{cde} \pm 0,10$	400/ 50	$31,32^{cdef} \pm 0,18$	$26,93^{cde} \pm 0,09$

100/ 200	$31,59^{abcd} \pm 0,28$	$26,62^{defg} \pm 0,10$	400/ 100	$30,89^{defg} \pm 0,22$	$26,55^{defgh} \pm 0,12$
100/ 250	$30,75^{efg} \pm 0,24$	$26,31^{fghi} \pm 0,09$	400/ 150	$30,31^{ghij} \pm 0,18$	$26,19^{ghi} \pm 0,15$
200/ 50	$32,12^{ab} \pm 0,03$	$27,49^{ab} \pm 0,14$	400/ 200	$29,86^{hijkl} \pm 0,15$	$25,87^{ijk} \pm 0,13$
200/ 100	$31,74^{abc} \pm 0,15$	$27,00^{bcd} \pm 0,12$	400/ 250	$29,75^{ijkl} \pm 0,13$	$25,60^{ijk} \pm 0,04$
200/ 150	$30,66^{efg} \pm 0,81$	$26,75^{def} \pm 0,22$	500/ 50	$32,30^{a} \pm 0,23$	$27,85^{a} \pm 0,46$
200/ 200	$30,56^{fgh} \pm 0,19$	$26,40^{efghi} \pm 0,12$	500/ 100	$31,38^{abc} \pm 0,17$	$27,40^{abc} \pm 0,17$
200/ 250	$30,26^{ghijk} \pm 0,22$	$26,23^{fghi} \pm 0,18$	500/ 150	$30,67^{bcde} \pm 0,11$	$26,88^{cde} \pm 0,13$
300/ 50	$30,51^{ghi} \pm 0,27$	$26,41^{efghi} \pm 0,17$	500/ 200	$30,22^{efg} \pm 0,03$	$26,62^{defgh} \pm 0,13$
300/ 100	$30,17^{ghijk} \pm 0,11$	$26,30^{fghi} \pm 0,17$	500/ 250	$30,22^{ghijk} \pm 0,03$	$26,08^{hij} \pm 0,07$
300/ 150	$29,70^{jkl} \pm 0,12$	$25,65^{jk} \pm 0,21$			

Bảng 4. Kết quả khảo sát nhiệt độ CMNV-Taq/ β-actin trên DNA plasmid 10^3 copies và gen chứng nội β –actin

Nhiệt độ gắn mồi (℃)	Chu kỳ ngưỡng FAM (C_T)	Chu kỳ ngưỡng HEX (C_T)
55,0	$31,59^{a} \pm 0,13$	$27,12^{a} \pm 0,14$
57,5	$30,78^{bc} \pm 0,07$	$27,02^{a} \pm 0,27$
60,0	**$29,68^{c} \pm 0,04$**	**$26,91^{a} \pm 0,23$**
62,5	$30,76^{bc} \pm 0,19$	$27,01^{a} \pm 0,26$
65,0	$31,56^{ab} \pm 0,28$	$27, 20^{a} \pm 0,12$

Nhiệt độ lai là một chỉ tiêu quan trọng ảnh hưởng lớn đến kết quả của phản ứng qPCR. Nhiệt độ lai quá cao hoặc quá thấp đều ảnh hưởng không tốt đến kết quả phản ứng qPCR. Nếu nhiệt độ lai quá thấp so với nhiệt độ biến tính của mồi và probe sử dụng thì dễ tạo ra các sản phẩm ký sinh không mong muốn. Nếu nhiệt độ lai quá cao sẽ cản trở sự bắt cặp của mồi và probe vào DNA bản mẫu thì hiệu quả nhân bản sẽ không cao. Gradient nhiệt độ khảo sát được xác định bằng cách lấy nhiệt độ trung bình giữa mồi có nhiệt độ thấp nhất và mồi có nhiệt độ cao nhất ±5 (Ta= (Tm_1+ Tm_2)/2 ±5). Khoảng gradient nhiệt độ khảo sát từ 55°C đến 65°C. Kết quả ở Bảng 4 cho thấy nhiệt độ lai 60°C là nhiệt độ thích hợp cho các cặp mồi và probe gắn vào trình tự gen *RdRp* và gen chứng nội β-actin trên tôm.

Nồng độ cDNA cao có thể dẫn đến khuếch đại sản phẩm không đặc hiệu và ức chế phản ứng PCR. Tiến hành khảo sát các nồng độ là 1, 20, 40, 60, 80 và 100 bản sao/ phản ứng với thành phần phản ứng và chu trình nhiệt như trên với nồng độ mồi và probe đã tối ưu. Trong đó, hàm lượng cDNA plasmid trong phản ứng từ 20 - 100 bản sao/ phản ứng là tối ưu nhất cho phản ứng PCR vì cường độ tín hiệu huỳnh quang đạt giá trị cao nhất.

Bảng 5. Khảo sát ảnh hưởng nồng độ cDNA plasmid đến phản ứng duplex qPCR phát hiện trình tự RdRp và β-actin

Hàm lượng DNA (bản sao/ phản ứng)	CMNV-RdRp	β-actin
	$C_{T\ FAM}$	$C_{T\ HEX}$
1	No C_T	25,32
20	37,56	24,98
40	35,98	25,19
60	34,60	25,21
80	33,73	25,28
100	32,64	25,18

Để chủ động trong phát triển quy trình duplex RT-qPCR phát hiện virus *CMNV* dựa trên trình tự gen *RdRp* và gen chứng nội β-actin, khảo sát thêm 2 loại master mix tự pha OneTaq® Standard Reaction Buffer (PCR Mix 1) và AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase with Buffer II and $MgCl_2$ (PCR Mix 2) đối chiếu với master mix đang sử dụng trong nghiên cứu. Qua đó, 2 master mix đều có thể được sử dụng để làm master mix cho phương pháp duplex RT-qPCR nhưng cần phải khảo sát và tối ưu thêm.

Độ tin cậy của thí nghiệm được thể hiện qua nhiều yếu tố trong đó độ lặp lại là một yếu tố quan trọng. Để khảo sát độ biến thiên nội phản ứng của quy trình phát hiện *CMNV* bằng duplex RT-qPCR, được thực hiện trên chứng dương *CMNV* với nồng độ từ 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, mỗi mẫu lặp lại 10 lần trong cùng một đợt thí nghiệm. Trên nguyên tắc một quy trình duplex RT-qPCR càng có các độ biến thiên nội phản ứng và liên phản ứng càng nhỏ thì

kết quả thu nhận càng đáng tin cậy. Theo Bustin (2002), C_T của phản ứng duplex RT-qPCR sử dụng Taqman probe nên nhỏ hơn 2%. Kết quả cho thấy độ biến thiên nội phản ứng của quy trình duplex RT-qPCR *CMNV* ở các nồng độ DNA có %CV từ 0,98% đến 1,94% và độ biến thiên liên phản ứng thấp nhất là 0,70%, còn hệ số biến thiên liên phản ứng cao nhất 1,91%.

Xác định các thông số kỹ thuật của quy trình

Độ chọn lọc của phương pháp duplex RT-qPCR thực hiện trên 10 mẫu tôm nhiễm CMNV và 5 mẫu nhiễm các bệnh khác trên tôm. Cho thấy phương pháp duplex RT-qPCR xây dựng phát hiện virus CMNV gây bệnh trên tôm xây dựng chỉ phát hiện virus CMNV, không phát hiện các tác nhân khác gây bệnh trên tôm.

Giới hạn phát hiện (LOD_{50}) là giá trị 1 nồng độ nhỏ nhất hay lượng chất phân tích nhỏ nhất trong mẫu thử mà phương pháp có thể phát hiện được với tỷ lệ 50%. LOD_{50} của một quy trình phân tích có ý nghĩa quan trọng trong việc định hướng sử dụng. Các cDNA ly trích từ mẫu tôm trắng này sẽ được nhiễm chủ động ở nồng độ 2-100 copy/µl. LOD_{50} trung bình của phương pháp duplex RT-qPCR phát hiện *CMNV* nhiễm trên tôm trên vật liệu di truyền của *CMNV* với nồng độ cDNA plasmid là 5 copy/phản ứng , với độ tin cậy 95%, giá trị LOD_{50} của phương pháp dao động trong khoảng 5-10 copy/ phản ứng trên cDNA plasmid. Và LOD_{50} trung bình của phương pháp duplex RT-qPCR phát hiện *CMNV* nhiễm trên tôm trên mẫu tôm ly trích với nồng độ cDNA ly trích là 12 pg/phản ứng với độ tin cậy 95%, giá trị LOD_{50} của phương pháp dao động trong khoảng 12 pg/phản ứng trên cDNA ly trích. Theo nghiên cứu Li và đồng tác giả (2018), đã định lượng virus *CMNV* dựa trên trình tự gen đặc hiệu *RdRp* bằng phương pháp RT-qPCR. Kết quả phương pháp phát hiện nồng độ thấp nhất của *CMNV* là 9,6 pg từ RNA tổng số ly trích trên mẫu tôm nhiễm *CMNV* và 5,7 bản sao của DNA plasmid. Từ đó, kết quả nghiên cứu quy trình đang xây dựng và nghiên cứu của Li và đồng tác giả (2018) là tương đương nhau.

KẾT LUẬN

Đã thiết kế cặp mồi và probe hoạt động hiệu quả và đặc hiệu phát hiện virus *Covert Mortality Nodavirus.* Quy trình duplex RT-qPCR phát hiện virus *CMNV* trên tôm đã được tối ưu hóa trên bộ hóa chất 2X PerfeCTa® qPCR FastMix® II, Low ROX™ với tỷ lệ nồng độ mồi (RdRp/β-actin) là 300nM/300nM, nồng độ probe RdRp/β-actin tương ứng 300nM/200nM. Với chu trình nhiệt là 95°C trong 2 phút; 40 chu kỳ 95°C trong 5 giây; 60°C trong 30 giây. Độ biến thiên nội phản ứng của quy trình ở các nồng độ DNA có %CV từ 0,98% đến 1,94% và độ biến thiên liên phản ứng thấp nhất là 0,70%, còn hệ số biến thiên liên phản ứng cao nhất 1,91%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Burd EM (2010). Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. Clinical microbiology reviews, 23(3): 550-576.

Bustin S (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. Journal of molecular endocrinology, 29: 23-39.

Li XP, Wan XY, Xu TT (2018). Development and validation of a TaqMan RT-qPCR for the detection of *convert mortality nodavirus* (CMNV). Journal of virological methods, 262: 65-71.

Phạm Hùng Vân (2011). PCR và Real-time PCR. Các vấn đề cơ bản và các áp dụng thường gặp. Nhà xuất bản Y học.

Zhang Q, Liu Q, Liu S (2014). A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp. Journal of General Virology, 95(12): 2700-2709.

Zhang Q, Liu S, Yang H (2017). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid and quantitative assay of *covert mortality nodavirus* in shrimp. Journal of invertebrate pathology, 150: 130-135.

Zhang Q, Xu T, Wan X (2017). Prevalence and distribution of *covert mortality nodavirus* (CMNV) in cultured crustacean. Virus Research, 233: 113-119.

DEVELOPMENT OF A DUPLEX RT-qPCR FOR THE DETECTION OF CMNV (*Covert Mortality Nodavirus*) IN SHRIMP

Do Thi Nhu Thao*, Nguyen Pham Truc Phuong, Luong Thi Ngoc Han, Nguyen Tran Duc Duy, Nguyen Thi Loan, Hoang Dac Hiet

Research and Development Center for High Technology Agriculture

SUMMARY

Among the diseases caused by viruses in shrimp, the disease with a high death rate and rapid spread is the disease caused by the *CMNV* virus (*Covert Mortality Nodavirus*), which causes mysterious shrimp mortality syndrome. *CMNV* has the ability to spread quickly to the surrounding area and predicts the risk of a large-scale outbreak if timely prevention measures are not taken. Research on building a duplex RT-qPCR process to detect *CMNV* virus causing disease in white leg shrimp. The duplex RT-qPCR method using Taqman probe was developed and optimized with the RdRp/β-actin primer concentration ratio of 300 nM/300 nM, respectively; Corresponding probe concentration of 300 nM/200 nM for the RdRp gene target sequence was built on the PerfeCTa® qPCR FastMix® II, Low ROX™ chemical kit. With a thermal cycle of 95℃ for 2 minutes; 40 cycles of 95℃ for 5 seconds; 60℃ for 30 seconds. Determine the technical parameters of the duplex RT-qPCR process to detect *CMNV* virus causing disease in white shrimp such as selectivity (100%), limit of detection (LOD_{50}) with a concentration of 5-10 copies/ Reaction on plasmid DNA and concentration of 12pg/reaction on extracted cDNA. The intra-reaction variability of the duplex RT-qPCR *CMNV* process at DNA concentrations with %CV from 0.98% to 1.94% and the lowest inter-reaction variability is 0.70%, while the coefficient The highest inter-reaction variation was 1.91%.

Keywords: β-actin, *CMNV* (*Covert Mortality Nodavirus*), duplex RT-qPCR, *RdRp* gene, shrimp.

* Author for corresspondence: Tel: +84-903109420; Email: dthao97721@gmail.com

ĐẶC ĐIỂM SINH HÓA VÀ DI TRUYỀN CỦA VI KHUẨN *Streptococcus iniae* GÂY BỆNH LỒI MẮT TRÊN CÁ CHẼM *Lates calcarifer* (Bloch, 1790)

Nguyễn Thị Thanh Thùy*, Nguyễn Thị Quế Chi, Lê Hồng Tuấn, Nguyễn Văn Hùng

Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản III

TÓM TẮT

Nghiên cứu cung cấp thông tin về đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và di truyền của 25 chủng vi khuẩn *S. iniae* phân lập từ cá chẽm *Lates calcarifer* bệnh tại các vùng nuôi ở các tỉnh Khánh Hòa, Kiên Giang, Vũng Tàu, Quảng Ninh và Hải Phòng. Các đặc điểm sinh hóa được xác định bằng kít API 20 strep, Slidex Strepto Plus (BioMerieux, Pháp), các đặc điểm di truyền bao gồm xác định sự hiện diện của 2 gen mục tiêu định danh loài *lctO* và *16S-23S ITS rDNA* và 7 gen mã hóa độc tố bằng các cặp mồi đặc hiệu, thực hiện theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Kết quả nghiên cứu ghi nhận về đặc điểm hình thái, *S. iniae* có tế bào hình cầu, nối dài tạo thành chuỗi, thuộc Gram dương, khuẩn lạc 1-1,5 mm, có màu xanh đặc trưng khi nuôi cấy trên ChromAgar Streptococcus. Phản ứng sinh hóa ghi nhận *S. iniae* âm tính với oxidase, catalase, VP, HIP, LDC, Bile ESC và SOR; Dương tính ESC, PYRA, LAP và TRE; Biến đổi ở các phản ứng PAL, ADH, RIB, ARA, MAN, LAC, INU, RAF, AMD và GLYG. Kiểm tra các kiểu huyết thanh theo nhóm Lancefield ghi nhận các chủng đều âm tính; 22 chủng có kiểu dung huyết beta (chiếm 88%), chỉ 3 chủng kiểu anpha (chiếm 12%). Các chủng *S. iniae* phát triển ở độ mặn 0% nhưng không phát triển ở 6,5%; Một số ít chủng *S. iniae* phát triển ở được ở 10˚C, không phát triển ở 45˚C. Về đặc điểm di truyền, 100% chủng dương tính với 2 cặp mồi đặc hiệu Lox(F/R) và SP1/SP1 tương ứng với 2 gen mục tiêu *lctO* và *16S-23S ITS rDNA;* có 15/25 chủng có từ 3 gen mã hóa độc tố trở lên và chỉ có 1 chủng SiTH1 hiện diện 6/7 gen khảo sát. Kết quả của nghiên cứu cung cấp dữ liệu khoa học về đặc điểm sinh học, phương pháp định danh dựa trên phân tử và các yếu tố quyết định độc lực của vi khuẩn *S. iniae.* Tuy nhiên, cần tiếp tục xác định khả năng gây bệnh thực nghiệm từ các chủng chứa gen độc tố nhằm chọn lựa chủng thích hợp cho sản xuất vaccine phòng bệnh do *S. iniae* ở cá chẽm.

Từ khóa: Gen độc tố, *Lates calcarifer, lctO, 16S-23S ITS rDNA, Streptococcucs iniae*.

MỞ ĐẦU

Trên thế giới, bệnh do nhóm vi khuẩn *Streptococcus* spp. đã và đang gây nguy hiểm cho nhiều loài cá nước lợ, mặn và nước ngọt, làm thiệt hại kinh tế cho nghề nuôi thủy sản hàng năm lên đến 150 triệu đô la (Romalde *et al*., 2009). Trong đó, loài *Streptococcus iniae* được báo cáo là tác nhân gây bệnh cho ít nhất 27 loài cá nước ngọt và cá biển ở 15 quốc gia khác nhau thuộc 4 châu lục, gồm châu Phi, châu Á, châu Úc và châu Âu (Hossain *et al*., 2014; Agnew, Barnes, 2007). Trên cá chẽm *Lates calcarifer*, bệnh do *S. iniae* được báo cáo lần đầu tiên vào năm 1999 tại Úc (Bromage *et al*., 1999), tiếp tục xuất hiện năm 2006 (Creeper, Buller, 2006) và tại Thái Lan ghi nhận bệnh này trên cá chẽm vào năm 2010 (Suanyuk *et al*., 2010). Tại Việt Nam, phát hiện *S. iniae* gây bệnh cho cá chẽm nuôi lồng tại Khánh Hòa (Hich *et al*., 2013), tại Thừa Thiên Huế (Trương Thị Hoa *et al*., 2018) đã gây thiệt hại kinh tế lớn cho người nuôi. Dấu hiệu bệnh lý thường gặp ở cá bệnh là bơi lội bất thường ở gần mặt nước hoặc bơi xoắn, thân trở nên sẫm màu hơn, xuất huyết ở thân, gốc vây, hậu môn, mắt lồi, đục. Giải phẫu nội quan thường gặp sự tích dịch ở khoang bụng, gan, thận, lách sưng phù, đôi khi xuất huyết. Bệnh do *S. iniae* có thể gây ra tỷ lệ chết lên đến 70% ở giai đoạn cá chẽm giống (Suanyuk *et al*., 2010; Creeper, Buller, 2006).

S. iniae thuộc nhóm Gram dương, tế bào hình cầu, đường kính nhỏ hơn 2 µm, thường ghép với nhau thành chuỗi dài nên được gọi là liên cầu khuẩn. Đặc điểm sinh hóa đặc trưng của vi khuẩn này là luôn âm tính với các phản ứng catalase, oxidase, VP và indol, nhạy cảm với bacitracin. Tuy nhiên, nếu chỉ dựa vào những phản ứng sinh hóa truyền thống sẽ dễ gây nhầm lẫn trong việc định danh loài vi khuẩn này. Và phương pháp sinh học phân tử là giải pháp đáng tin cậy. Trong đó, ngoài việc giải trình tự và định danh bằng gen *16S rDNA*, các gen mục tiêu mang tính bảo tồn cao của loài như gen mã hóa lactate oxidase (*lctO)* (Mata *et al.*, 2004) và *ITS rDNA* (*16S-23S rDNA* intergenic spacer region)(Zhou *et al.,*2011) đã được sử dụng định danh loài *S. iniae* một cách nhanh chóng. Đây được xem là đặc điểm di truyền mang dấu ấn của loài.

Bên cạnh đó, đặc điểm di truyền của vi khuẩn *S.iniae* còn thể hiện ở việc mang các gen mã hóa độc tố. Sự hiện diện của các gen này góp phần đánh giá khả năng gây bệnh của các chủng vi khuẩn *S. iniae* (Baums *et al*., 2013; Deng *et al*., 2017). Một số gen liên quan đến yếu tố độc lực của vi khuẩn *S.iniae* và cơ chế gây độc như: gắn kết, xâm nhập và thoát khỏi quá trình thực bào (gen *simA*) (Locke *et al*., 2008); ức chế khả năng thực bào (gen *cpsD, cpsA, cpsY*) (Locke *et al*., 2008; Lowe *et al*., 2007); tạo thành tế bào cứng chắc, trốn khỏi peptide kháng khuẩn (gen *pgmA*) (Buchanan *et al*., 2005); gây tổn thương tế bào (gen *sagA*, *sagB*) (Locke *et al*., 2007; Fuller *et al*., 2002).

Như vậy, vi khuẩn *S. iniae* chứa yếu tố gây độc quy định bởi các gen với các chức năng đảm nhiệm các vai trò khác nhau nhằm thực hiện quá trình xâm nhiễm và gây bệnh cho cá.

Với mục tiêu sàng lọc chủng vi khuẩn *S. iniae* phù hợp cho việc sản xuất vaccine phòng bệnh cho cá chẽm, nghiên cứu này cung cấp dữ liệu về đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và di truyền của 25 chủng vi khuẩn *S. iniae* phân lập từ cá chẽm bệnh nuôi thương phẩm trên nhiều vùng địa lý khác nhau tại Việt Nam.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vi khuẩn nghiên cứu

Vi khuẩn nghiên cứu gồm 25 chủng *S. iniae* có nguồn gốc phân lập từ cá chẽm bệnh tại Khánh Hòa, Kiên Giang, Vũng Tàu, Quảng Ninh, Hải Phòng, được lưu giữ tại Phòng Công nghệ sinh học và vắc xin thủy sản- Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản III. Tất cả các chủng *S. iniae* nghiên cứu được định danh bằng phương pháp so sánh trình tự gen *16S rDNA* với các trình tự tham chiếu có sẵn trên GenBank, nhờ công cụ nucleotide-BLAST (*http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST*), tỉ lệ tương đồng từ 96-100%.

Chủng chuẩn *S. iniae* ATCC29178 (DSMZ, Đức).

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu đặc điểm sinh thái, sinh lý, sinh hóa vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn được nuôi phục hồi, tăng sinh trong môi trường BHI broth hoặc TSB (bổ sung 1,5% NaCl) (Merck, Đức) ở 28 – 30 ^{o}C trong 24-36 h sử dụng cho nghiên cứu. Hình thái vi khuẩn được xác định qua tiêu bản nhuộm Gram dưới kính hiển vi (CX31J, Olympus) ở độ phóng đại 1.000 lần và khuẩn lạc trên các môi trường tổng hợp BHIA, TSA và môi trường đặc trưng CHROMagar Streptococcus (CHROMagar, Pháp). Các chỉ tiêu sinh hóa được xác định bằng bộ kít API 20 strep (BioMerieux, Pháp) thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các đặc điểm cơ bản khác gồm catalase, oxidase, khả năng khử carboxyl của lysin (LDC) và thủy giải esculine (Bile ESC) xác định bằng kít test (Công ty Nam Khoa). Khả năng chịu muối, chịu nhiệt dựa trên tăng sinh của vi khuẩn trên môi trường BHI. Khả năng dung huyết của vi khuẩn được khảo sát trên môi trường thạch máu (Blood agar base – BA, Difco) bổ sung 1,5 % NaCl và 5 % máu thỏ. Kiểu huyết thanh được xác định bằng phản ứng ngưng kết miễn dịch theo phương pháp của Lancefield bằng bộ kít Slidex Strepto Plus (BioMerieux, Pháp). Các phản ứng được thực hiện đồng thời với chủng chuẩn ATCC29178 (DSMZ, Đức) trong cùng điều kiện.

Phương pháp nghiên cứu đặc điểm di truyền vi khuẩn

Vi khuẩn sau khi nuôi tăng sinh được ly tâm ở 6.000 rmp/10 phút/4^{o}C. Thu hồi phần vi khuẩn kết lắng, tiến hành tách chiết DNA bằng bộ kít GeneJET Genomic DNA Purification (Thermo, Mỹ), các bước theo hướng dẫn của nhà sản xuất, sản phẩm DNA sử dụng cho các phản ứng PCR sau.

Khảo sát sự hiện diện các đoạn gen đặc trưng của vi khuẩn *S. iniae*, gồm đoạn gen *ITS rDNA* và lactate oxidase (*lctO*), thông tin chi tiết ở Bảng 1.

Bảng 1. Thông tin các đoạn gen khảo sát và phản ứng PCR

Gen	Trình tự mồi (5'-3')	Phản ứng PCR	Kích thước sản phẩm (bp)	Nguồn tham khảo
ITS rDNA	SP1-GAAAATAGGAAAGAGACGCAGTGTC SP2- CCTTATTTCCAGTCTTTCGACCTTC	Tổng thể tích 25 µL với vòng lặp 35 chu kỳ gồm 94^{o}C trong 1 phút, 60^{o}C trong 1 phút và 72^{o}C trong 1 phút. Hoàn tất kéo dài mạch ở 72^{o}C trong 5 phút.	377	Zhou *et al*. (2011)
lctO	LOXF- AAGGGGAAATCGCAAGTGCC; LOXR- ATATCTGATTGGGCCGTCTAA	Tổng thể tích 25 µL với vòng lặp 35 chu kỳ gồm 94^{o}C trong 1 phút, 58^{o}C trong 1 phút và 72^{o}C trong 1 phút. Hoàn tất kéo dài mạch ở 72^{o}C trong 5 phút.	870	Mata *et al*. (2004)

Các gen mã hóa protein độc tố của *S. iniae*, bao gồm *simA*, *pdi*, *pgm*, *cpsD*, *scpI*, *sagA* và *cpsA* được khảo sát bằng phản ứng PCR với các cặp mồi tương ứng. Thông tin chi tiết được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Thông tin phản ứng PCR khuếch đại gen mã hóa độc tố

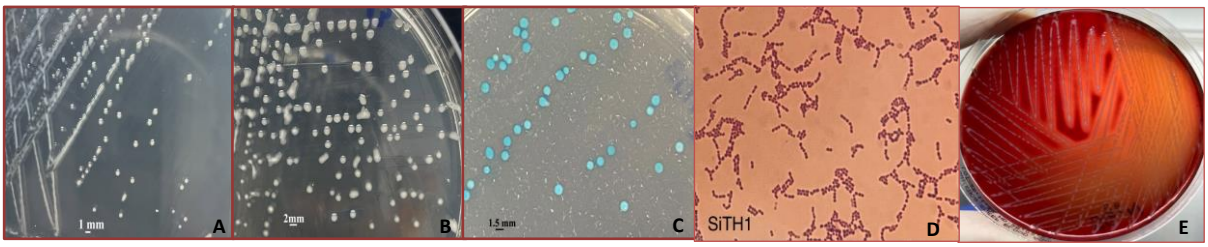
Gen	Trình tự mồi (5'-3')	Kích thước sản phẩm (bp)	Chu trình nhiệt phản ứng PCR	Nguồn tham khảo
simA	F- AATTCGCTCAGCAGGTCTTG R- AACCATAACCGCGATAGCAC	994	Biến tính ở 94°C/ 2 phút; 30 chu kỳ: 94°C/1phút, 58°C/ 1 phút, 72°C/ 1 phút; Hoàn tất kéo dài mạch ở 72°C/ 2 phút.	Baums *et al*. (2013) Deng *et al*. (2017)
pdi	F- TTTCGACGACAGCATGATTG R- GCTAGCAAGGCCTTCATTTG	381		
pgm	F- TATTAGCTGCTCACGGCATC R- TTAGGGTCTGCTTTGGCTTG	713		
cpsD	F-TGGTGAAGGAAAGTCAACCAC R-TCTCCGTAGGAACCGTAAGC	534		
scpI	F- GCAACGGGTTGTCAAAAATC R- TTAGGGTCTGCTTTGGCTTG	822		
sagA	F-AGGAGGTAAGCGTTATGTTAC R-AAGAAGTGAATTACTTTGG	190		
cpsA	F-ACGCAACTGACGAGTGTGAC R- GATCGCGACACCGAACTAAT	353	Biến tính ở 94°C/ 5 phút; 30 chu kỳ: 94°C/ 1 phút, 58°C/ 30 giây, 72°C/ 40 giây; Hoàn tất kéo dài mạch ở 72°C/10 phút.	Park *et al*. (2010)

Điện di sản phẩm PCR kèm theo thang chuẩn 1 Kb trên gel agarose 1,5% trong dung dịch đệm TBE 1X ở 110 Volt trong 20 phút. Đọc kết quả điện di trên máy soi gel UV, kiểm tra sự có mặt của sản phẩm PCR tương ứng với kích thước sản phẩm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa của vi khuẩn *S. iniae*

Hình thái vi khuẩn *S. iniae* qua tiêu bản nhuộm Gram cho thấy tế bào bắt màu xanh tím (thuộc Gr +), hình cầu, kết nối thành dạng chuỗi. Khuẩn lạc vi khuẩn *S. iniae* trên môi trường ChromAgar Streptococcus có màu xanh đặc trưng, hình tròn, lồi, bóng, đường kính từ 1-1,5 mm sau 48 giờ nuôi ở nhiệt độ 30°C (Hình 1). Đặc điểm sinh hóa của 25 chủng *S. iniae* cho thấy âm tính với oxidase, catalase, VP, HIP, LDC, Bile ESC và SOR; Dương tính với ESC, PYRA, LAP và TRE; Biến đổi ở các phản ứng PAL, ADH, RIB, ARA, MAN, LAC, INU, RAF, AMD và GLYG. Kiểm tra các kiểu huyết thanh theo nhóm Lancefield A, B, C, D, F, G của 25 chủng *S. iniae* ghi nhận đều âm tính; 22 chủng có kiểu dung huyết beta (chiếm 88%), 3 chủng có kiểu anpha (chiếm 12%). Về khả năng chịu nhiệt, 25 chủng *S. iniae* phát triển được khi nuôi cấy ở 32°C, một số ít phát triển được ở 10°C, không phát triển ở 45°C. Về khả năng chịu muối cho thấy 25 chủng *S. iniae* phát triển được ở độ mặn 0 % nhưng không phát triển ở độ mặn 6,5 %. Đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa của 25 chủng vi khuẩn *S. iniae* so sánh với chủng chuẩn ATCC29178 được tổng hợp ở Bảng 3.



Hình 1. Đặc điểm hình thái vi khuẩn *S. iniae*
(Khuẩn lạc trên môi trường TSA (A); BHIA (B); ChromStrep (C), Gram (D); Dung huyết beta (E))

Bảng 3. Đặc điểm các chủng *S. iniae* phân lập từ cá chẽm bệnh

Các phản ứng kiểm tra		ATCC 29178	Tỷ lệ kiểm tra trên 25 chủng (%)		
			Dương	Âm	Hình thái
Đặc điểm cơ bản	Hình dạng tế bào	Tế bào cầu chuỗi, rải rác có tế bào hơi ovan			Tế bào cầu chuỗi, rải rác có tế bào hơi ovan
	Gram	+	100		
	Kiểu dung huyết	B	88	12	22/25 kiểu β; 3/25 kiểu α.
	Khuẩn lạc trên Chrom Strep	Xanh lá đậm, lồi tròn, bóng, đường kính 1-1,5mm.			Xanh lá đậm, lồi tròn, bóng, đường kính 1-1,5mm.
	Khuẩn lạc trên TSA	Trắng đục, đường kính 1-1,5 mm.			Trắng đục, đường kính 1-1,5 mm.
	Oxidase	-		100	
	Catalase	-		100	
	LDC	-		100	
	Bile ESC	-		100	
Khả năng chịu nhiệt	10˚C	-	20	80	
	32˚C	+	100		
	45˚C	-		100	
Khả năng chịu muối	0 %	+	100		
	6,5 %	-		100	
Đặc điểm sinh hóa kiểm tra bằng kít API 20 STREP	VP	-		100	
	HIP	-		100	
	ESC	+	100		
	PYRA	+	100		
	αGAL	-		100	
	βGUR	-	16	84	
	βGAL	-		100	
	PAL	-	80	20	
	LAP	+	100		
	ADH	+	80	20	
	RIB	+	88	12	
	ARA	-	8	92	
	MAN	+	16	84	
	SOR	-		100	
	LAC	-	8	92	
	TRE	+	100		
	INU	-	8	92	
	RAF	-	8	92	
	AMD	+	84	16	
	GLYG	-	80	20	

So sánh với các nghiên cứu khác về *S. iniae* phân lập từ cá chẽm bệnh ở Huế (Trương Thị Hoa *et al.,* 2018), ở Khánh Hòa (Hich *et al.*, 2013) hay *S. iniae* phân lập trên cá rô đồng tại ĐBSCL (Từ Thanh Dung *et al*., 2013) cũng cho kết quả tương tự ở phần lớn các phản ứng sinh hóa. Một vài khác biệt về khả năng chịu nhiệt và chịu mặn, cụ thể, 100% chủng *S. iniae* phân lập từ cá chẽm tại Huế phát triển được ở 10^{o}C và không phát triển được ở 0% (Trương Thị Hoa *et al*., 2018); Hay 100% chủng *S. iniae* phân lập từ cá rô đồng phát triển được ở độ mặn

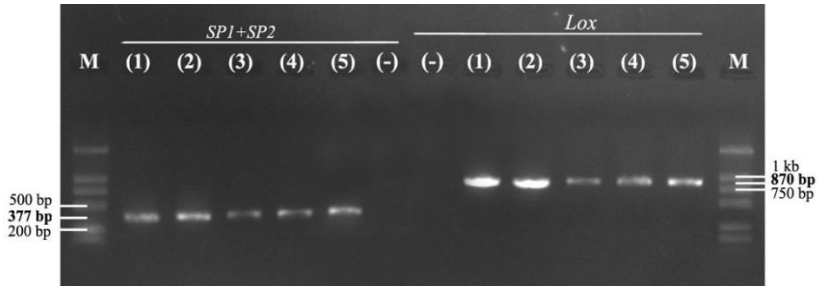
6,5% (Từ Thanh Dung *et al*., 2013). Trong khi chủng thuộc nghiên cứu này phát triển được ở 0% nhưng không phát triển ở 6,5%, nhiệt độ 10^{o}C chỉ một số ít phát triển, đa số không phát triển. Sự khác biệt này có thể do khác biệt về địa lý nguồn gốc phân lập và cả ký chủ.

Theo Lau *et al.* (2003), Buller (2004) việc định danh *S.iniae* bằng các bộ kít sinh hóa thường nhầm lẫn với loài *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* do đa số các đặc điểm sinh hóa của 2 loài vi khuẩn này rất giống nhau. Hơn nữa, cho đến nay, *S. iniae* không có trong cơ sở dữ liệu định danh của các bộ kít API 20 strep hay Rapid ID 32 Strep (Lau *et al.*, 2003; Agnew, Barnes, 2007). Chính vì thế, kết hợp thực hiện giải trình tự gen *16S rDNA* hoặc khảo sát gen đặc hiệu loài *S. iniae* bằng PCR là giải pháp tối ưu nhằm định danh chính xác loài này.

Đặc điểm di truyền của vi khuẩn *S. iniae*

Kết quả khảo sát gen đặc hiệu định danh S. iniae

Bên cạnh phương pháp giải trình tự gen *16S rDNA* của vi khuẩn *S. iniae*, phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu với đoạn gen mục tiêu *ITS rDNA* và *lctO* là hai gen mang tính bảo tồn cao giúp cho việc định danh loài nhanh và hiệu quả nhất (Mata *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2011). Kết quả điện di sản phẩm PCR với 2 cặp mồi đặc hiệu SP1/SP2 và LOXF/LOXR trên mẫu DNA tổng số của 25 chủng *S. iniae* nghiên cứu cho thấy 100% các chủng đều hiện diện hai đoạn gen mục tiêu *ITS rDNA* và *lctO* với kích thước sản phẩm PCR tương ứng khoảng 377 bp và 870 bp (Hình 2).



Hình 2. Điện di sản phẩm PCR các chủng vi khuẩn với 2 cặp mồi SP1/SP2 và LoxF/R
(M. 100bp ladder (Phusagennomics); 1. Chủng chuẩn; 2. SiTH1; 3. SiTH6; 4.SiTH19; 5. SiTH25; -. Mẫu nước cất)

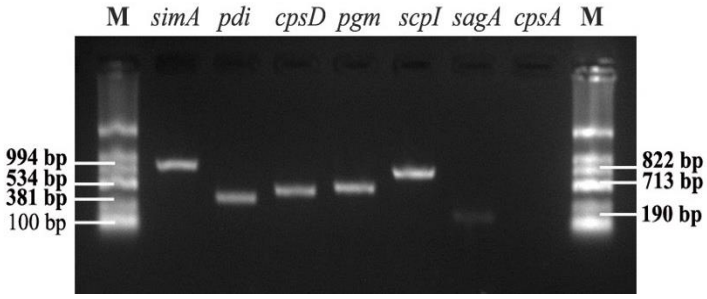
Một vài nghiên cứu trước đây cũng cho kết quả PCR dương tính với cặp mồi đặc hiệu LoxF/loxR đối với các chủng *S. iniae* như Creeper, Buller (2006), Suanyuk và đồng tác giả (2010), Rodkhum và đồng tác giả (2012). Năm 2011, Zhou và đồng tác giả (2011) đã thiết kế một cặp mồi đặc hiệu dựa trên trình tự đoạn gen *16S-23S ITS rDNA* để định danh nhanh loài *S. iniae*. Và cặp mồi này chỉ đặc hiệu cho loài *S. iniae*, không tạo ra sản phẩm PCR đối với DNA của các loài khác cùng chi như *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. parauberis* và một số loài dễ nhầm lẫn như *Lactococcus garveiae, Photobacterium damselae* subsp. *piscicda, Nocardia seriolae, Lactococcus lactis, Staphylococcus aureus, Vibrio alguillarum, Aeromonas hydrophila*. Từ đó cho thấy hai cặp mồi đặc hiệu này mang lại hiệu quả cao và đáng tin cậy trong định danh nhanh vi khuẩn *S. iniae*.

Kết quả khảo sát gen mã hóa độc tố

Vi khuẩn *S. iniae* chứa yếu tố gây độc quy định bởi các gen đảm nhiệm các vai trò khác nhau nhằm thực hiện quá trình xâm nhiễm và gây bệnh cho cá. Trong nghiên cứu này, khảo sát các gen mã hóa độc tố trên 25 chủng *S. iniae* phân lập từ cá chẽm bệnh, kết quả minh chứng sự hiện diện các gen độc tố ở Hình 3 và thống kê tần suất phát hiện các gen ở các chủng phân lập từ cá nuôi tại các vùng khác nhau thể hiện ở Bảng 4.

Bảng 4. Kết quả khảo sát gen mã hóa độc tố của 25 chủng *S. iniae*

Số gen phát hiện	0 gen	1 gen	2 gen	3 gen	4 gen	5 gen	6 gen	7 gen	Tổng
Số chủng	4	5	1	6	4	4	1	0	25
Tỷ lệ %	16	20	4	24	16	16	4	0	100
Tên chủng	SiTH15; SiTH16; SiTH20; SiTH21	SiTH17;SiTH18; SiTH22;SiTH23; SiTH24	SiTH7	SiTH5 SiTH6 SiTH8 SiTH9 SiTH11 SiTH12	SiTH10 SiTH13 SiTH14 SiTH19	SiTH2; SiTH3; SiTH4; SiTH25	SiTH1		
Nguồn gốc phân lập	Kiên Giang; Vũng Tàu	Kiên Giang; Vũng Tàu, Quảng Ninh	Cam Lâm-Khánh Hòa	Ninh Hòa-Cam Lâm-Nha Trang-Khánh Hòa	Khánh Hòa; Kiên Giang	Vạn Ninh-Khánh Hòa; Hải Phòng	Vạn Ninh-Khánh Hòa		



Hình 3. Kết quả khảo sát các gen mã hóa độc tố ở chủng vi khuẩn *S. iniae* SiTH1

(simA (M-like protein SiM): Kết dính, xâm nhập, phát triển; pdi (Peptidoglycan deacetylase): Bảo vệ chống lại sự phân giải lysozyme; pgm (Phosphoglucomutase): chống lại enzyme, peptide kháng khuẩn; sagA (Streptolysin S): Tổn thương tế bào vật chủ; cpsA, cpsD, scpI (Polysaccharide ngoại bào): Thoát khỏi hiện tượng thực bào).

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh vi khuẩn *S.iniae* chứa yếu tố gây độc quy định bởi các gen với các chức năng đảm nhiệm các vai trò khác nhau nhằm thực hiện quá trình xâm nhiễm và gây bệnh cho cá. Cơ chế gây độc thể hiện qua các đặc tính do các gen quy định như: Quy tụ và kết dính vào tế bào vật chủ, xâm nhập và phát triển (M- like protein SiM, *simA*); Gây tổn thương tế bào vật chủ (gen streptolysin S (*sagA; sagB*)); Vượt qua hệ thống miễn dịch, thoát khỏi hiện tượng thực bào và tồn tại trong tế bào miễn dịch (lớp bao nang polysaccharide ngoại bào; gen *cpsA*, *cpsY*, *cpsD*); Chống lại các enzyme và peptide kháng khuẩn (enzyme phosphoglucomutase (*pgm*); Bất hoạt tín hiệu các phân tử miễn dịch của vật chủ (protease vỏ tế bào (*cepI*)); Điều hòa gen độc lực (*cpsY) (*Locke *et al.,* 2008; Locke *et al.,* 2007; Buchanan *et al.,* 2005). Kết quả ở Hình 3 cho thấy sự hiện diện của các gen này có ở các chủng vi khuẩn *S.iniae* phân lập trên cá chẽm bệnh tại Việt Nam.

Về tần suất phát hiện, kết quả khảo sát ở Bảng 4 cho thấy, đa số các chủng có từ 3 gen độc tố trở lên (15/25 chủng) và chỉ có 1 chủng chứa 6/7 gen khảo sát (SiTH1). Chủng chứa số lượng gen độc tố càng nhiều có liên quan đến khả năng xâm nhập gây bệnh cho cá bằng các cơ chế và mức độ gây hại cũng khác nhau. Một chủng chứa đa dạng các gen độc tố luôn là ứng viên tốt cho việc sàng lọc tuyển chọn chủng đại diện nghiên cứu sản xuất vaccine. Xét về nguồn gốc phân lập, kết quả ở Bảng 4 cho thấy đa số các chủng chứa gen độc tố phân lập từ cá chẽm bệnh nuôi tại Khánh Hòa, vài chủng tại Kiên Giang, Hải Phòng. Các chủng phân lập từ Vũng Tàu không phát hiện gen độc tố. Baums *et al*. (2013) khảo sát gen độc tố của chủng *S. iniae* K288 phân lập từ cá rô phi sông Nile (*Oreochromis niloticus*), cho thấy hiện diện của 6 gen mã hóa độc tố (*simA, scpI, pdi, pgm, cpsD* và *sagA)*. Tương tự, Deng và đồng tác giả (2017) cũng phát hiện 6 gen mã hóa độc tố này trên 2 chủng *S. iniae* Ab130920 và *S. iniae* Ab131025 phân lập từ cá tầm Siberian (*Acipenser baerii*) tại Trung Quốc. Các nghiên cứu này cũng khẳng định các chủng chứa đa số gen độc tố thường là những chủng có độc lực cao khi cảm nhiễm thực nghiệm trên cá khoẻ.

KẾT LUẬN

Vi khuẩn *S. iniae* thuộc Gr +, hình cầu, kết nối thành dạng chuỗi; Khuẩn lạc *S. iniae* trên môi trường ChromAgar Streptococcus có màu xanh đặc trưng, hình tròn, lồi, bóng, đường kính từ 1-1,5 mm sau 48 giờ nuôi ở nhiệt độ 30^{o}C; *S. iniae* âm tính với oxidase, catalase, VP, HIP, LDC, Bile ESC và SOR; Dương tính ESC, PYRA, LAP và TRE; Biến đổi ở các phản ứng PAL, ADH, RIB, ARA, MAN, LAC, INU, RAF, AMD và GLYG; Kiểm tra các kiểu huyết thanh theo nhóm Lancefield A, B, C, D, F, G, các chủng *S. iniae* đều ghi nhận âm tính; 22 chủng có kiểu dung huyết beta (chiếm 88%), 3 chủng có kiểu anpha (chiếm 12%); Các chủng *S. iniae* phát triển được độ mặn 0%, một số ít phát triển ở 10^{o}C, trong khi không phát triển được ở 45˚C, độ mặn 6,5%.

100% các chủng *S. iniae* dương tính trong phản ứng PCR với 2 cặp mồi đặc hiệu Lox(F/R) và SP1/SP1 tương ứng với 2 gen mục tiêu *lctO* và *16S-23S ITS rDNA.* Kết quả khảo sát sự hiện diện của 7 gen mã hóa độc tố cho thấy 15/25 chủng có từ 3 gen mã hóa độc tố trở lên và chỉ có 1 chủng SiTH1 có 6/7 gen khảo sát. Kết quả của nghiên cứu là cơ sở để tuyển chọn chủng đại diện nghiên cứu sản xuất vaccine. Cần tiếp tục đánh giá khả năng gây bệnh trên cá khoẻ ở những chủng chứa nhiều gen độc tố nhằm chọn chủng thích hợp sản xuất vaccine phòng bệnh cho cá chẽm.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu trên là một phần kết quả thuộc đề tài "Nghiên cứu chế tạo vaccine vô hoạt phòng bệnh do Streptococcus iniae ở cá chẽm Lates calcarifer", do Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đã cấp kinh phí và Viện nghiên cứu nuôi trồng thủy sản III chủ trì thực hiện. Nhóm tác giả xin bày tỏ lòng biết ơn đến sự hỗ trợ kinh phí và cho phép sử dụng số liệu thuộc nghiên cứu này.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Agnew W, Barnes AC (2007). *Streptococcus iniae*: An aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary Microbiology*. 122: 1–15.

Baums CG, Hermeyer K, Leimbach S, Adamek M, Czerny CP, Hörstgen-Schwark G, Valentin-Weigand P, Baumgärtner W, Steinhagen D (2013). Establishment of a Model of *Streptococcus iniae* Meningoencephalitis in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J.Comp.Path*, vol 149, 94-102.

Bromage E, Thomas A, Owens L (1999). *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. *Disease of aquatic organisms*. 36: 177-181.

Buchanan JT Stannard JA, Lauth X, Ostland VE, Powell HC, Westerman ME, Nizet V (2005). *Streptococcus iniae* phosphoglucomutase is a virulence factor and a target for vaccine development. *Infection and immunity*, 73(10): 6935-6944.

Buller BN (2004). Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals-A Practical Identification Manual. *CABI Publishing*. 390pp.

Creeper JH, Buller NB (2006). An outbreak of *Streptococcus iniae* in barramundi (*Lates calcarifera*) in freshwater cage culture. *Autralian Veterinary Journal*. Vol 84, no 11. 408-411.

Deng M, Yu Z, Geng Y, Wang K, Chen D, Huang X, Ou Y, Chen Z, Zhong Z, Lai W (2017). Outbreak of Streptococcosis associated with *Streptococcus iniae* in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) in China. *Aquaculture Research*, 48: 909-919.

Fuller JD, Camus AC, Duncan CL, Nizet V, Bast DJ, Thune RL, De Azavedo JC (2002). Identification of a streptolysin S-associated gene cluster and its role in the pathogenesis of *Streptococcus iniae* disease. *Infection and immunity*, 70(10), 5730-5739.

Hich TV, Quyen VDH, Dung NH, Wergeland HI (2013). Experimental *Streptococcus iniae* infection in barramundi (*Lates calcarifer*) cultured in Vietnam. *International Journal of Aquatic Science*. 4(1): 3-12.

Hossain MMM, Ehsan A, Rahman MA, Haq M, Chowdhury MBR (2014). Transmission and pathology of *Streptococcus inane* in monosex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in aquaculture of Bangladesh. *Journal of Fisheries*, 2(1), 90-99.

Lau PKS, Woo PCY, Tse H, Leung KW, Wong SSY, Yuen KY (2003). Invasive *Streptococcus iniae* infections outside North America. *Journal of Clinical Microbiology.* 41:1004–1009.

Locke JB, Aziz RK, Vicknair MR, Nizet V, Buchanan JT (2008). *Streptococcus iniae* M-like protein contributes to virulence in fish and is a target for live attenuated vaccine development. *PloS one*, 3(7): 24-28.

Locke JB, Colvin KM, Vark N, Vicknair MR, Nizet V, Buchanan JT (2007). *Streptococcus iniae* β-hemolysin streptolysin S is a virulence factor in fish infection. *Diseases of aquatic organisms,* 76(1): 17-26.

Lowe BA, Miller JD, Neely MN (2007). Analysis of the polysaccharide capsule of the systemic pathogen *Streptococcus iniae* and its implications in virulence. *Infection and immunity*, 75(3): 1255-1264.

Mata AI, Blanco MM, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF, Gibello A (2004). Development of a PCR assay for *Streptococcus iniae* based on the lactate oxidase (*lctO*) gene with potential diagnostic value. *Veterinary Microbiology*, 101: 109-116.

Park HK, Lee S, Yoon JW, Shin JW, Shin H, Kook J, Myung SC, Kim W (2010). Indentification of the cpsA gene as a specific marker for the discrimination of *Streptococcus pneumoniae* from viridans group streptococci. *J Med Microbiol*, 59 (10): 1146-1152.

Rodkhum C, Kayansamruaj P, Priarat N, Wongtawatchai J (2012). Duplex PCR for simultaneous and unambiguous detection of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactice* asociated with Streptococcosis of cultured Tilapia in Thailand. *Thai J Vet Med*, 42(2), 153-158.

Romalde LJ, Magarinos B, Ravelo C, Toranzo AE (2009). Vaccination strategies to prevent Streptococcal infections in cultured fish. Zaccone G, Perriere C, Mathis A, Kappoor BG, eds. Fish defenses. Vol (2) Pathogens, parasites and predators. *Science publishers*. 403pp.

Suanyuk N, Sukkasame N, Tanmark N, Yoshida T, Itami T, Thune RL, Tantikitti C, Supamattaya K (2010). *Streptococcus iniae* infection in culture Asian sea bas (*Lates calcarifer*) and red tilapia (*Oreochromis* sp.) in southern ThaiLand. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 32 (4): 341-348.

Trương Thị Hoa, Nguyễn Ngọc Phước, Đặng Thị Hoàng Oanh (2018). Nghiên cứu đặc điểm bệnh học của vi khuẩn *Streptococcus iniae* trên cá chẽm (*Lates calcarifer*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, tập 54, số 3B, tr.156-163.

Từ Thanh Dung, Huỳnh Thị Ngọc Thanh, Nguyễn Khương Duy (2013). *Streptococcus iniae*, tác nhân gây bệnh "Đen thân" trên cá rô đồng *(Anabas testudineus). Tạp chí khoa học Trường đại học Cần Thơ,* 26: 96-103.

Zhou SM, Fan Y, Zhu XQ, Xie MQ, Li AX (2011). Rapid indentification of *Streptococcus iniae* by specific PCR assay utilizing genetic markers in ITS rDNA. *Journal of Fish Diseases*, 34: 265-271.

BIOCHEMICAL AND GENETIC CHARACTERISTICS OF *STREPTOCOCCUS INIAE* CAUSING POP-EYE DISEASE IN SEA BASS *LATES CALCARIFER* (BLOCH, 1790)

Nguyen Thi Thanh Thuy*, Nguyen Thi Que Chi, Le Hong Tuan, Nguyen Van Hung

Research Institute for Aquaculture No.3

SUMMARY

The study provides information on the morphological, physiological, biochemical, and genetic characteristics of 25 strains of *S. iniae* isolated from diseased seabass *Lates calcarifer* in farming areas in provinces of Vietnam such as Khanh Hoa, Kien Giang, Vung Tau, Quang Ninh, and Hai Phong. Biochemical characteristics were determined using API 20 strep kit, Slidex Strepto Plus (BioMerieux, France); Genetic characteristics included determining the presence of 2 target genes *lctO* and *16S-23S ITS rDNA* and 7 genes encoding toxins using specific primer pairs, following the manufacturer's instructions. Research results recorded that in terms of morphological characteristics, *S. iniae* has spherical cells, elongated to form chains, is Gram-positive, colonies with 1-1.5 mm diameter, and a typical green color on ChromAgar Streptococcus medium. Biochemical reactions showed that *S. iniae* strains were negative for oxidase, catalase, VP, HIP, LDC, Bile ESC and SOR; Positive ESC, PYRA, LAP, and TRE; Variabilities in PAL, ADH, RIB, ARA, MAN, LAC, INU, RAF, AMD and GLYG reactions. Lancefield serotype testing was negative in all strains; Most strains had a beta hemolytic type (88%), some strains had an alpha hemolytic type (12%). *S. iniae* grew at 0% salinity but not at 6.5%; A few grew at 10˚C, but do not grew at 45˚C. Regarding genetic characteristics, 100% of strains were positive with 2 specific primer pairs Lox(F/R) and SP1/SP1 corresponding to 2 target genes *lctO* and *16S-23S ITS rDNA*; There are 15/25 strains with more than three toxin-encoding genes and only SiTH1 strain has presented 6/7 surveyed genes. The results of the study provides basic scientific data on the biological characteristics, molecular-based identification and virulent factors of *S. iniae* bacteria. Furthermore, it is necessary to continue to determine the experimental pathogenicity of strains containing toxin genes in order to select suitable strains for vaccine production against *S.iniae* on seabass.

Keywords: Toxin-encoding genes, *Lates calcarifer, lctO, 16S-23S ITS rDNA, Streptococcucs iniae*.

* Author for correspondence: Tel: +84-975894976; Email: ngthuy@ria3.vn/ ngthuyria3@gmail.com.

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG ỨC CHẾ CỎ DẠI CỦA CHẤT CHIẾT TỪ CÂY NGÂU TÀU (*AGLAIA ODORATA* LOUR.) TRÊN CỎ LỒNG VỰC (*ECHINOCHLOA CRUS-GALLI* L.) VÀ CƠ CHẾ HOẠT ĐỘNG CỦA CHẤT CHIẾT

Nguyễn Huy Thịnh[1], Lại Tiến Dũng[1*], Chamroon Laosinwattana[2]

[1] Trung tâm Đấu tranh sinh học, Viện Bảo vệ thực vật

[2] Trường Đại học KingMongkut Ladkrabang, Bangkok, Thailand

TÓM TẮT

Cỏ dại gây ra những ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất nông nghiệp, cạnh tranh với cây trồng về ánh sáng, nước, và chất dinh dưỡng. Việc kiểm soát cỏ dại hiệu quả là rất quan trọng để duy trì năng suất cây trồng và đảm bảo các thực hành nông nghiệp bền vững. Các thuốc trừ cỏ hóa học mặc dù hiệu quả, có thể gây ra những tác động tiêu cực đến môi trường và dẫn đến sự kháng thuốc. Vì vậy, việc tìm kiếm các giải pháp thay thế tự nhiên cho quản lý cỏ dại là cần thiết. Lá cây ngâu tàu (*Aglaia odorata* Lour.) được chiết bằng dung môi ethanol ở các nồng độ 0, 25, 50, 75 và 100%; nồng độ 25% cho năng suất chiết xuất thô cao nhất. Khả năng ức chế sự nảy mầm và phát triển của hạt cỏ lồng vực (*Echinochloa crus-galli* L.) của chất chiết xuất lá cây ngâu tàu bằng dung môi ethanol 75% rất mạnh, ở nồng độ 15.000 ppm, đã ức chế hoàn toàn sự nảy mầm của hạt cỏ lồng vực, ở nồng độ trên 10.000 ppm, ức chế khả năng hấp thụ nước của hạt trong giai đoạn hạt nảy mầm. Khả năng ức chế hoạt động của enzyme α-amylase tăng lên khi tăng nồng độ chiết xuất.

Từ khóa: Aglaia odorata Lour., allelopathy, cỏ dại, chiết xuất, *Echinochloa crus-galli* L.

MỞ ĐẦU

Cỏ dại cạnh tranh với cây trồng gây ra những thiệt hại cao so với bất kỳ loại sâu bệnh hại nông nghiệp nào khác. Cỏ dại là một trong những hạn chế quan trọng nhất đối với năng suất cây trồng trên toàn thế giới, mức thiệt hại có thể tới 45–95% do cạnh tranh ánh sáng, nước và chất dinh dưỡng với cây trồng chính. Một số báo cáo chỉ ra rằng năng suất cây trồng bị giảm do cỏ dại gây ra như cỏ dại ở lúa từ 10–100%, lúa mì từ 10-60% và ngô từ 25-93% (Jabran *et al.,* 2015). Năng suất cây trồng có thể bị mất hoàn toàn nếu không kiểm soát cỏ dại. Cỏ lồng vực (*Echinochloa crus-galli* L.) còn gọi là cỏ mỳ, cỏ gạo, cỏ kê là một loại cỏ nguy hiểm, phổ biến trên ruộng lúa, gây hại trên 36 loại cây trồng, khó phòng trừ và làm giảm năng suất 40–80% (Bhullar, 2015). Hiện nay, có nhiều phương pháp phòng trừ cỏ được áp dụng, trong đó, trừ cỏ bằng biện pháp hóa học được sử dụng rất phổ biến do có hiệu quả nhanh và cao. Tuy nhiên, sử dụng thuốc hóa học thường để lại những hậu quả tiêu cực cho môi trường và sức khỏe con người. Việc sử dụng thuốc trừ cỏ không hợp lý cũng góp phần hình thành các loại cỏ kháng thuốc. Sự gia tăng của cỏ dại kháng thuốc trừ cỏ là một trong những thách thức lớn đối với hệ thống cây trồng. Vì vậy, tìm kiếm những giải pháp phòng trừ cỏ dại có hiệu quả mà khắc phục được hạn chế, những tác động đến môi trường đang được nghiên cứu và áp dụng.

Đã có những nghiên cứu cho biết về khả năng kiểm soát cỏ dại bằng sự cảm nhiễm thực vật (allelopathy). Thực vật thể hiện khả năng cảm nhiễm bằng cách giải phóng các hợp chất hóa học có khả năng ức chế cỏ dại (allellochemicals) (Jabran *et al*., 2015). Các sản phẩm từ các hợp chất allellochemicals có thể sử dụng để kiểm soát cỏ dại. Những sản phẩm này vô hại với môi trường và an toàn cho sức khỏe con người hơn so với việc sử dụng các chất hóa học (Jabran *et al.,* 2015). Nhiều loài thực vật đã được chứng minh là có hoạt tính allelopathy, chẳng hạn như một số cây: *Acacia concinna* (Willd.) DC (Boonmee và Kato-Noguchi, 2017), *Sesamum indicum* (Hussain *et al.,* 2017). Hồ Lệ Thi (2018) đã báo cáo chất chiết xuất từ cây dưa leo có khả năng ức chế sự phát triển rễ và thân của cỏ túc hình và cỏ lồng vực. Mặc dù hầu hết các loại cây trồng đều có hoạt tính allelopathy đối với cỏ dại, nhưng cần tìm kiếm các loại cây trồng có hoạt tính cảm nhiễm cao để kiểm soát cỏ dại. Qua đó, các chiến lược quản lý cỏ dại bền vững thay thế như allelopathy có thể được đưa vào các chương trình quản lý cỏ dại tổng hợp để giảm việc sử dụng thuốc trừ cỏ (Choudhary *et al.,* 2023). Cỏ dại thường sinh trưởng phát triển mạnh mẽ hơn cây trồng chính do tính thích nghi và sinh tồn cao, hạt cỏ có thể tồn tại trong đất và phát triển cùng với cây trồng chính. Để phòng trừ cỏ dại có hiệu quả cần nhắm vào giai đoạn xung yếu đó là khi hạt cỏ nảy mầm. Các sản phẩm allellochemicals chiết xuất từ thực vật có khả năng ức chế cao được xử lý vào đất sẽ ngăn cản sự nảy mầm của hạt cỏ, qua đó sớm hạn chế cỏ dại cạnh tranh với cây trồng chính.

Trong phạm vi nghiên cứu này, chất chiết thu được từ chiết xuất lá cây ngâu tàu (*Aglaia odorata* Lour.) ở các tỷ lệ dung môi ethanol được đánh giá hoạt tính ức chế đối với sự nảy mầm và phát triển của hạt cỏ lồng vực.

Phương thức hoạt động của chất chiết cũng được nghiên cứu dựa trên khả năng hấp thụ nước và hoạt động của enzyme α-amylase của hạt cỏ lồng vực trong giai đoạn nảy mầm.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Lá cây ngâu tàu trưởng thành, không bị sâu bệnh được thu thập và được rửa sạch, sấy khô trong tủ sấy ở nhiệt độ 45^{o}C trong 3 ngày rồi nghiền nhỏ bằng máy xay điện.

Hạt cỏ lồng vực trưởng thành được thu thập, giữ trong tủ sấy ở nhiệt độ 45^{o}C trong 6 tháng để phá bỏ sự ngủ nghỉ của hạt. Hạt cỏ được thử nghiệm đảm bảo tỉ lệ nảy mầm đạt trên 90%.

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi ethanol đến năng suất chiết

Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp được mô tả bởi Teerarak (2012): 20 gam lá ngâu tàu khô được ngâm trong 180 ml dung môi có tỷ lệ ethanol khác nhau (25, 50, 75 và 100% ethanol trong nước cất) ở nhiệt độ phòng, riêng chiết xuất bằng nước cất thì bảo quản ở điều kiện ở 8°C trong 3 ngày. Sau 3 ngày, lọc dung dịch qua 2 lớp vải thưa và lọc lại qua giấy lọc Whatman no. 93. Sau khi lọc, dung dịch được làm bay hơi bằng thiết bị bay hơi (Buchi R215, Thụy Sĩ), trong điều kiện chân không một phần ở 45^{o}C cho đến khi trọng lượng của chiết xuất thô không đổi. Sau đó, phần lá đã chiết được chiết lại 2 lần với cùng dung môi và cùng quy trình chiết như lần đầu. Chiết xuất thô của lần chiết thứ nhất, lần thứ hai và lần thứ ba được gộp lại và cân tổng trọng lượng. Năng suất chiết được so sánh giữa các dung môi khác nhau.

Nghiên cứu khả năng ức chế nảy mầm và phát triển của hạt cỏ lồng vực của chiết xuất từ lá cây ngâu tàu

Trong nghiên cứu này, lấy 2g chất chiết hòa tan trong 100ml nước cất để có dung dịch gốc nồng độ 2%. Sau đó pha loãng thành các nồng độ theo thứ tự là 2500, 5000, 10000, 15000 và 20000 ppm từ dung dịch gốc phương pháp nghiên cứu của Teerarak và đồng tác giả (2012).

Lấy 5 ml dịch chiết ở mỗi nồng độ (2500, 5000, 10000, 15000 và 20000 ppm) cho vào đĩa petri (đường kính 9 cm) có chứa giấy giữ ẩm, sau đó đặt 20 hạt cỏ lồng vực lên trên giấy. Các đĩa petri chỉ thêm nước cất được sử dụng làm đối chứng. Tất cả các công thức được lặp lại 4 lần theo thiết kế hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD). Hạt được coi là nảy mầm khi mầm đã nhô ra ngoài vỏ hạt ít nhất 2 mm sau bảy ngày. Tất cả các đĩa petri được đậy kín và đặt ở nhiệt độ phòng. Đánh giá tỷ lệ nảy mầm, chiều dài mầm và chiều dài rễ sau bảy ngày.

Ảnh hưởng của chiết xuất đến sự hấp thụ nước của hạt cỏ

Phương pháp của Turk và Tawaha (2003) đã được sử dụng để nghiên cứu khả năng hấp thụ nước của hạt. Cân trọng lượng hạt ban đầu (W1) của 20 hạt cỏ lồng vực khỏe mạnh cho một công thức thí nghiệm, đặt trong đĩa petri có chứa chiết xuất lá ngâu tàu và sử dụng nước cất làm đối chứng (như thí nghiệm trên), thí nghiệm nhắc lại 4 lần. Sau thời gian hấp thụ nước, trọng lượng hạt được ghi lại là trọng lượng hạt cuối cùng (W2) sau mỗi khoảng thời gian. Tỷ lệ hấp thụ nước của hạt được tính theo công thức:

Độ hấp thụ nước (%) = [(W2-W1)/W1] x 100

Ảnh hưởng của chiết xuất đến hoạt động của enzyme α-amylase trong giai đoạn nảy mầm của hạt cỏ

Phương pháp của Sadasivam (1996) được sử dụng để nghiên cứu hoạt tính của α-amylase trong hạt. Sau khi đo độ hấp thụ nước, 20 hạt cỏ lồng vực (ở các công thức trong thí nghiệm trên) được nghiền nhỏ và hòa tan trong 4 ml dung dịch 0,1 M $CaCl_2$ lạnh, ly tâm ở tốc độ 10 000 vòng/phút trong 20 phút ở 4^{o}C. Thu lấy phần dung dịch ở trên của ống nghiệm (DD 1). Hoạt tính của enzyme α-amylase sau đó được thử nghiệm bằng cách đo tốc độ tạo ra đường khử từ tinh bột hòa tan. 1 ml của DD 1 được trộn với 1 ml của dung dịch tinh bột 1% (starch 1%) trong dung dịch đệm axetat ở pH 5,5. Sau đó, ủ 15 phút ở 37^{o}C. Tiếp theo, 1 ml thuốc thử DNS (40 mM 3.5 dinitrosalicylic acid, 0.4 N NaOH and 1M K-Na tartrate) được thêm vào và đun sôi trong nồi cách thủy trong 5 phút. Sau đó làm nguội hỗn hợp. Cường độ màu được đo bằng độ hấp thụ ở bước sóng 560 nm bằng máy đo quang phổ. Thí nghiệm được lặp lại 4 lần theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD). Đồ thị chuẩn được lập bằng cách sử dụng đường maltose và lượng α-amylase có trong mẫu được tính toán từ đường cong chuẩn và được biểu thị bằng µmol maltose/phút/g (trọng lượng tươi của mẫu).

Phương pháp xử lý số liệu

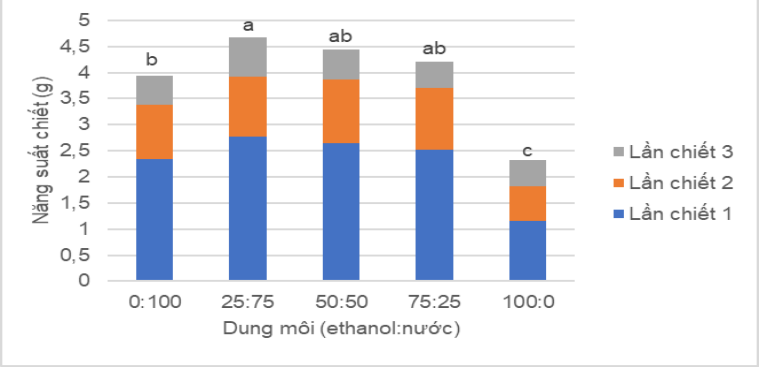
Số liệu được phân tích phương sai (One-way ANOVA) và so sánh bằng phép thử Duncan với mức ý nghĩa 5% để so sánh bằng phần mềm thống kê SAS 9.0.

KẾT QUẢ

Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi ethanol đến năng suất chiết

Dung môi là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến lượng chất chiết xuất thu được và khả năng ức chế cỏ dại của chất chiết xuất. Trong nghiên cứu này, dung môi chiết khác nhau đã ảnh hưởng đáng kể đến năng

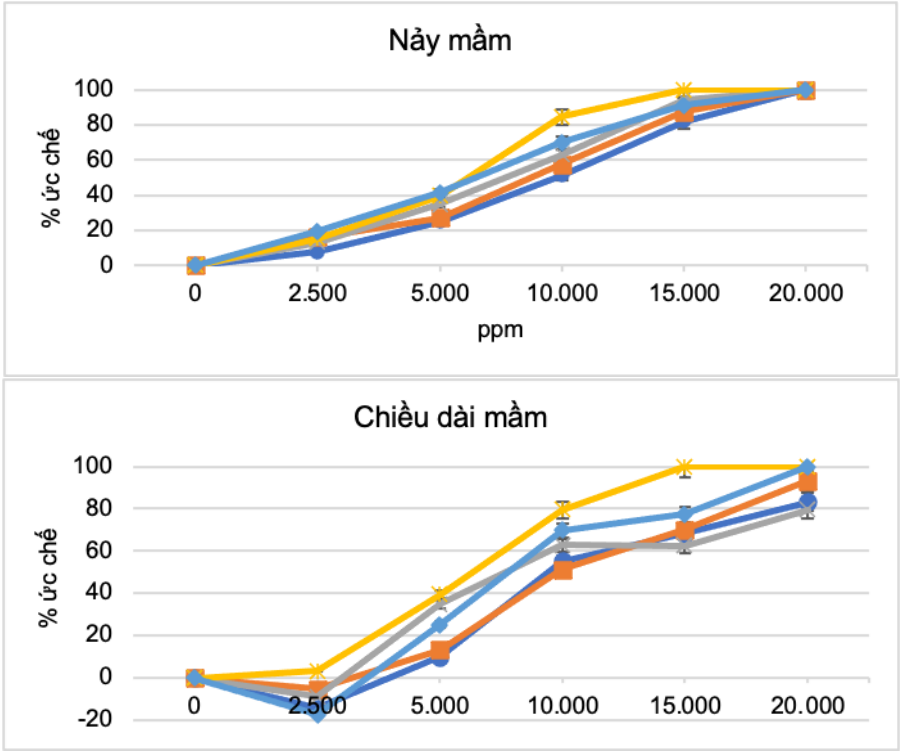
suất của chiết xuất lá cây ngâu tàu (Biểu đồ 1). Kết quả cho thấy, sau 3 lần chiết xuất, năng suất chiết xuất thu được khi sử dụng dung môi 25% ethanol là cao nhất (4,68g chiết xuất thô/100g lá khô), sau đó là ethanol 50% (4,44 g chiết xuất thô/100 g lá khô), 75% ethanol (4,2g chiết xuất thô/100g lá khô), nước (3,94 g chiết xuất thô/100 g lá khô) và năng suất chiết thu được sử dụng dung môi ethanol 100% là thấp nhất (2,32 g chiết xuất thô/100 g lá khô).

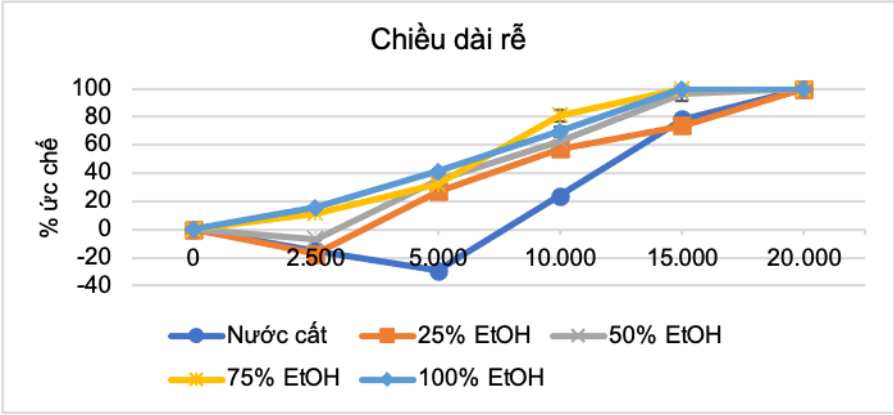


Hình 1. Ảnh hưởng của tỷ lệ dung môi ethanol đến năng suất chiết

Nghiên cứu khả năng ức chế nảy mầm và phát triển hạt cỏ lòng vực của chất chiết xuất từ lá cây ngâu tàu

Khả năng ức chế của chất chiết xuất từ lá cây ngâu tàu đến nảy mầm và phát triển của hạt cỏ lồng vực được thể hiện tại biểu đồ 2. Kết quả cho thấy chiết xuất có ảnh hưởng đáng kể đến sự nảy mầm và phát triển của hạt cỏ lồng vực. Khả năng ức chế hạt cũng tăng lên khi tăng nồng độ của chiết xuất. Tất cả các chiết xuất đều ức chế hoàn toàn sự nảy mầm của hạt ở nồng độ 20000 ppm. Chiết xuất bởi dung môi ethanol 75% ức chế hoàn toàn sự nảy mầm của hạt, chiều dài chồi và chiều dài rễ ở nồng độ 15000 ppm. Chiết xuất bởi dung môi 75% ethanol thể hiện tác dụng ức chế mạnh nhất đối với sự nảy mầm của hạt cỏ lồng vực, tiếp theo là 50% ethanol, 100% ethanol, 25% ethanol và dung môi nước cất (ức chế lần lượt là 100, 94,4, 91,1, 87,5 và 82, 1% nảy mầm hạt), ở nồng độ 15000 ppm. Ở nồng độ 10000 ppm, chiết xuất dung môi ethanol 75% ức chế sự nảy mầm hạt là 84,4%, ức chế chiều dài mầm là 79,4% và ức chế chiều dài rễ là 81,2%. Khả năng ức chế cao của chiết xuất từ cây ngâu tàu đối với hạt cỏ lồng vực là cơ sở để ứng dụng cây ngâu tàu và những thực vật tương tự trong phòng trừ cỏ dại có hiệu quả.

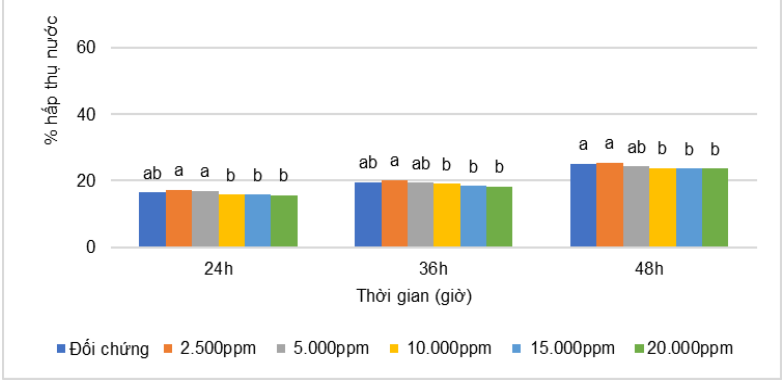




Hình 2. Khả năng ức chế nảy mầm và phát triển hạt cỏ lồng vực của chiết xuất lá cây ngâu tàu sử dụng dung môi ethanol ở các tỉ lệ khác nhau và các nồng độ chiết xuất khác nhau

Nghiên cứu ảnh hưởng của chất chiết xuất đến sự hấp thụ nước của hạt và hoạt động của enzyme α-amylase trong giai đoạn nảy mầm của hạt cỏ

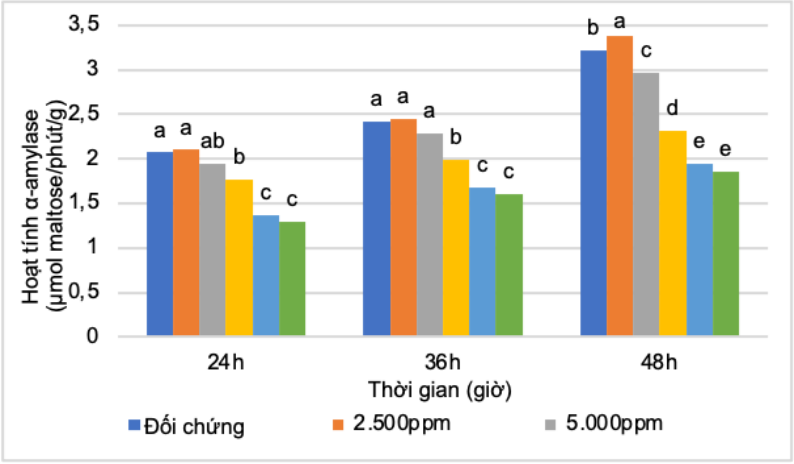
Quá trình nảy mầm bắt đầu khi một hạt ngủ đông hấp thụ nước. Sự hấp thụ nước kích hoạt các sự kiện tế bào và trao đổi chất thiết lập cho quá trình nảy mầm. Ngăn chặn sự hấp thu nước của hạt là một trong những cơ chế chính của các chất ức chế sự nảy mầm hạt. Khả năng hấp thụ nước của hạt cỏ và hoạt động của enzyme α-amylase trong giai đoạn nảy mầm của hạt cỏ đã được nghiên cứu để hiểu rõ cơ chế ức chế trên hạt cỏ lồng vực. Để hạt nảy mầm tốt, cần có đủ nước cho các hoạt động xảy ra bên trong hạt, nếu hạn chế sự hấp thụ nước sẽ dẫn đến hoạt động của enzyme α-amylase giảm, từ đó giảm độ nảy mầm của hạt cỏ. Hình 3 thể hiện tỷ lệ hấp thụ ở các giai đoạn thời gian khác nhau và nồng độ khác nhau của chiết xuất ethanol 75%. Kết quả cho thấy tỷ lệ hấp thụ nước của hạt tăng lên khi thời gian hấp thụ lâu hơn ở cùng một nồng độ. Ở nồng độ 20000 ppm, tỷ lệ hấp thụ nước sau 24, 36 và 48 giờ sau khi xử lý hạt cỏ lồng vực lần lượt là 15,72, 18,2 và 23,68%, thấp hơn đáng kể so với công thức đối chứng có tỷ lệ hấp thụ nước ở các giai đoạn thời gian 24, 36 và 48 giờ lần lượt là 16,52, 19,58 và 25,10%.



Hình 3. Ảnh hưởng của chiết xuất ethanol 75% từ lá cây ngâu tàu đến khả năng hấp thụ nước của hạt cỏ lồng vực ở các giai đoạn thời gian khác nhau

Các chữ cái khác nhau là khác biệt có ý nghĩa (p<0,05).

Trong giai đoạn hạt nảy mầm, enzyme α-amylase đóng vai trò quan trọng trong quá trình thủy phân tinh bột và protein, cung cấp năng lượng cho sự phát triển của rễ và chồi. Hoạt tính của enzyme α-amylase trong hạt cỏ lồng vực đã được thử nghiệm và kết quả được thể hiện trong hình 4. Kết quả chỉ ra rằng việc tăng nồng độ chất chiết xuất dẫn đến sự gia tăng khả năng ức chế hoạt động của enzyme α-amylase trong hạt cỏ lồng vực. Sau 24, 36 và 48 giờ, hoạt tính của enzyme α-amylase đo được có sự khác nhau đáng kể. Trong cùng thời gian ủ hạt, hoạt tính enzyne α-amylase bị ức chế mạnh nhất khi xử lý chất chiết xuất ở nồng độ 20 000 ppm, tuy vậy không có sự khác biệt đáng kể với chiết xuất ở nồng độ 15 000ppm. Ở nồng độ 20 000ppm, hoạt tính enzyme α-amylase đo được trong hạt cỏ lồng vực sau 24, 36 và 48 giờ lần lượt là 1,29, 1,61 và 1,86 µmol maltose/phút/g (trọng lượng tươi của mẫu).



Hình 4. Ảnh hưởng của chiết xuất ethanol 75% từ lá ngâu tàu đến hoạt động của enzyme α-amylase của hạt cỏ lồng vực ở các giai đoạn hấp thụ khác nhau

Các chữ cái khác nhau là khác biệt có ý nghĩa (p<0,05)

THẢO LUẬN

Trong nghiên cứu này, kết quả cho thấy rằng lượng chất chiết xuất thu được từ lá cây ngâu tàu phụ thuộc vào dung môi, tỷ lệ dung môi ethanol khác nhau dẫn đến lượng chiết xuất thu được khác nhau. Năng suất chiết của các dung môi khác nhau giảm theo thứ tự sau: 25% ethanol > 50% ethanol > 75% ethanol > 0% ethanol > 100% ethanol. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Wichittrakarn và đồng tác giả (2011), tác giả đã báo cáo rằng chiết xuất lá cây hoa cúc vạn thọ bằng dung môi ethanol với tỷ lệ 25% trong nước thu được khối lượng chiết xuất thô lớn nhất. Kết quả có thể được giải thích bằng một số yếu tố như thành phần của từng loại cây cụ thể, sự khác biệt về độ hòa tan của chất chiết trong cây ngâu tàu và tính phân cực của các hợp chất.

Kết quả cũng chỉ ra rằng tất cả các chiết xuất từ lá ngâu tàu đều thể hiện khả năng ức chế sự nảy mầm và sự phát triển của hạt cỏ lồng vực. Ngược lại với năng suất chiết, chiết xuất thu được khi chiết bằng dung môi ethanol 75% cho hiệu quả ức chế cao nhất. Sự khác nhau về khả năng ức chế nảy mầm và phát triển của chiết xuất trong các dung môi khác nhau có thể là do độ phân cực khác nhau của dung môi. Các hoạt chất khác nhau hòa tan trong các dung môi phân cực khác nhau dẫn đến sự biến đổi của chiết xuất từ cùng một loại cây trong các dung môi có tỷ lệ ethanol khác nhau. Kết quả này đồng thuận với nghiên cứu của Wichittrakarn (2011), người đã nghiên cứu dung môi chiết tối ưu để chiết *Tagetes erecta* Linn và nhận thấy rằng dung môi 75% ethanol trong nước cất cho chiết xuất có hoạt tính allelopathy cao nhất. Nghiên cứu của Trần Thanh Mến và đồng tác giả (2019) cũng cho biết cao chiết xuất ethanol từ thân, lá và hoa của cây sài đất ba thùy tại nồng độ khảo sát 5 mg/mL có hiệu quả ức chế cao nhất sự nảy mầm đối với hạt cỏ lồng vực (*Echinochloa crus-galli* L.), hạt xà lách (*Lactuca sativa* L.) và hạt cải củ (*Raphanus sativus* L.).

Chiết xuất lá ngâu tàu có thể ức chế sự nảy mầm và sự phát triển của hạt cỏ lồng vực bằng cách ức chế hoạt động của enzyme α-amylase trong hạt. Kết quả trong nghiên cứu này phù hợp với kết quả của Kato-Noguchi và Macías (2008), tác giả báo cáo rằng 6-methoxy-2-benxozazolinone có thể ức chế sự nảy mầm của hạt bằng cách ức chế sự cảm ứng của hoạt động enzyme α-amylase. Chiết xuất cũng cho thấy ức chế đáng kể sự hấp thụ nước của hạt cỏ lồng vực. Phát hiện này đồng thuận với nghiên cứu của Teerarak và đồng tác giả (2012). Tác giả đã báo cáo rằng công thức thuốc dạng bột thấm nước ở thể hạt từ chiết xuất của *Jasminum officinale* f. var. grandiflorum (Linn.) Kob. ức chế sự hấp thụ nước của hạt *Echinochloa crus-galli*. Sự khác biệt có thể là do các hợp chất allelochemical tồn tại bên trong các cây khác nhau là khác nhau.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã đánh giá khối lượng chiết xuất thô thu được khi sử dụng dung môi ethanol với tỷ lệ khác nhau trong nước từ lá cây ngâu tàu. Năng suất chiết thô thu được từ dung môi ethanol 25% là cao nhất. Tuy nhiên, chiết xuất 75% ethanol thể hiện tác dụng ức chế mạnh nhất đối với sự nảy mầm và phát triển của hạt cỏ lồng vực. Chất chiết từ lá ngâu tàu ức chế hạt cỏ lồng vực có thể qua cơ chế ức chế sự tạo ra enzyme α-amylase trong hạt trong giai đoạn nảy mầm của hạt và giảm khả năng hấp thụ nước của hạt cỏ (sau 48 giờ hoạt tính enzyme α-amylase đo được là 1,86 µmol maltose/phút/g và tỷ lệ hấp thu nước ở nồng độ 20.000ppm chỉ là 23,68%). Vì vậy, lá ngâu tàu có thể được nghiên cứu sử dụng làm thuốc trừ cỏ sinh học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bhullar G S (2015), Sustainable Rice Production, *In: Lichtfouse E., Goyal A. (eds) Sustainable Agriculture Reviews*, 16: 107-121, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16988-0_5.

Boonmee S and Kato-Noguchi H (2017). Allelopathic activity of *Acacia concinna* pod extracts. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(4): 250.

Choudhary C S, Behera B, Raza M B, Mrunalini K, Bhoi T K, Lal M K and Das T K (2023). Mechanisms of allelopathic interactions for sustainable weed management. *Rhizosphere*, 25, 100667.

Hồ Lệ Thi, Kato-Noguchi H (2018). Phân lập và định danh chất đối kháng cỏ dại (Allelochemical) từ cây dưa leo. *Tạp chí Khoa học Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, Số 3(88): 90-94.

Hussain I, Singh N, Singh A, and Singh H (2017). Allelopathic potential of sesame plant leachate against *Cyperus rotundus* L. *Annals of Agrarian Science* 15(1): 141-147.

Jabran K, Mahajan G, Sardana V, and Chauhan B S (2015). Allelopathy for weed control in agricultural systems. *Crop Protection,* 72: 57-65

Kato-Noguchi H, and Macías F (2008). Inhibition of germination and α-amylase induction by 6-methoxy-2-benzoxazolinone in twelve plant species. *Biologia plantarum,* 52(2): 351-354.

Mến T T, Quyên P L T, Phương P C, Lê C T N, Thư N T A, Khang Đ T, Yến N Đ H & Cường N Q (2019). Nghiên cứu khả năng ức chế nảy mầm hạt của cao chiết xuất từ cây sài đất ba thùy (*Wedelia trilobata* (L.) Hitchc). *Tạp chí Khoa học Đại học cần Thơ*, 55(CĐ Công nghệ Sinh học), 85-90. https://doi.org/10.22144/ctu.jsi.2019.011.

Sadasivam S (1996). Biochemical methods*. India, New Age International*.

Teerarak M, Laosinwattana C, Charoenying P and Kato-Noguchi H (2012). Allelopathic activities of *Jasminum officinale* f. var. grandiflorum (Linn.) Kob.: Inhibition effects on germination, seed imbibition, and α-amylase activity induction of *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. *African Journal of Biotechnology*, 11(31): 7850-7854.

Turk M and Tawaha A (2003). Allelopathic effect of black mustard (*Brassica nigra* L.) on germination and growth of wild oat (*Avena fatua* L.). *Crop Protection*, 22(4): 673-677.

Wichittrakarn W, Laosinwattana C, Teerarak M and Charoenying P (2011). Optimal extraction conditions use for allelochemical extract from *Tagetes erecta* Linn. *Paper presented at the The 6th World Congress of Allelopathy Symposium XX*.

ALLELOPATHIC OF CHINESE RICE FLOWER (AGLAIA ODORATA LOUR.) ON BARNYARD GRASS (ECHINOCHLOA CRUS-GALLI L.) AND ITS MODE OF ACTION

Nguyen Huy Thinh[1], Lai Tien Dung[2*], Chamroon Laosinwattana[2]

[1]Biological Control Reasearch Centre, Plant Protection Research Institute, Hanoi, Vietnam

[2]King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand

SUMMARY

Weeds cause serious impacts on agricultural productivity by competing with crops for light, water, and nutrients. Effective weed control is essential for maintaining crop yields and ensuring sustainable agricultural practices. Chemical herbicides, while effective, can have negative environmental impacts and lead to herbicide resistance. Therefore, finding natural alternatives for weed management is necessary. Leaves of Chinese rice flower (*Aglaia odorata* Lour.) were extracted by various ratios (0, 25, 50, 75 and 100%) of ethanol in water as solvents for crude extraction. The highest crude extract yield was obtained by using 25% ethanol solvent with three-time extractions. The 75% ethanol extract exhibited strong inhibition of the germination and growth of barnyard grass (*Echinochloa crus-galli* L.) seeds. At a concentration of 15,000 ppm, the extract completely inhibited germination. At concentrations above 10,000 ppm, the extract inhibited imbibition in the germination stage. The inhibition of induction of α-amylase increased with increasing concentration of the extract.

Keywords: *Aglaia odorata* Lour., allelopathy, weed control, extract, *Echinochloa crus-galli* L..

[*] Author for correspondence: Tel: +84-912668301; Email: dung1172@gmail.com

KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤM *Magnaporthe oryzae* GÂY BỆNH ĐẠO ÔN TRÊN CÂY LÚA CỦA MỘT SỐ CHỦNG XẠ KHUẨN PHÂN LẬP

Nguyễn Thị Thanh Lợi, Nguyễn Trần Mai Anh, Nguyễn Văn Thế, Phạm Quỳnh Anh, Lê Thị Thanh Xuân, Phí Quyết Tiến*

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Xạ khuẩn là nhóm sinh vật được chứng minh có tiềm năng thúc đẩy sự phát triển của cây chủ và ức chế một số mầm bệnh thực vật. Nghiên cứu này nhằm xây dựng được bộ sưu tập chủng xạ khuẩn mang đặc tính đối kháng nấm gây bệnh đạo ôn *Magnaporthe oryzae* đồng thời thúc đẩy sinh trưởng ở cây lúa. Tiến hành phân lập xạ khuẩn ở vùng rễ và các mô rễ, thân lúa khỏe và nhiễm bệnh đạo ôn trên ba loại môi trường khác nhau, đã thu nhận được 35 chủng xạ khuẩn. Sàng lọc khả năng kháng nấm bệnh đạo ôn chủng *M. oryzae* PO và SH của các chủng xạ khuẩn đã chỉ ra 11/35 chủng có hoạt tính đối kháng (*in vitro*). Đánh giá mức độ ức chế sinh trưởng nấm bệnh của 11 chủng xạ khuẩn lựa chọn theo phương pháp đồng nuôi cấy trên đĩa thạch cho thấy, tỷ lệ ức chế tương đối (RI%) nấm bệnh trong phạm vi tương ứng 20-38% và 42-53%. Hai chủng xạ khuẩn L2k3 và D2b2 thể hiện mức độ ức chế chủng PO và SH cao nhất tương ứng 38,3% và 52,9%. Trong số này, 8/11 chủng thể hiện hoạt tính enzyme ngoại bào cellulase và chitinase, 4/11 chủng có hoạt tính amylase và 2/11 chủng biểu hiện hoạt tính protease. Hai chủng xạ khuẩn R4b1 và R4b3 đều có hoạt tính mạnh của các enzym amylase, cellulase và chitinase. Sự sản sinh hormone tăng trưởng IAA được ghi nhận ở tất cả các chủng lựa chọn với hàm lượng đạt được từ 3,8-10,8 µg/mL, cao nhất được thể hiện ở chủng xạ khuẩn R4b1. Tỷ lệ các chủng có hoạt tính phân giải phosphat và kẽm khó tan, tương ứng 1/11 (9,09%) và 5/11 (45,5%) chủng xạ khuẩn được xác định. Những kết quả nhận được làm tăng thêm hiểu biết về sự phong phú và vai trò hữu ích của các chủng xạ khuẩn được phân lập là tiền đề để tạo chế phẩm sinh học kiểm soát bệnh đạo ôn trên cây lúa.

Từ khóa: Bệnh đạo ôn, cây lúa, kiểm soát sinh học, *Magnaporthe oryzae*, xạ khuẩn.

MỞ ĐẦU

Lúa là một trong những cây trồng chính cung cấp lương thực cho khoảng một nửa dân số thế giới. Các hệ thống nông nghiệp hiện đại đã mang lại sự gia tăng đáng kể năng suất gạo trong những thập kỷ qua. Tuy nhiên, các bệnh hại trên cây lúa như bệnh đạo ôn, bệnh bạc lá do vi khuẩn, bệnh thối cổ rễ, v.v… là những vấn đề lớn trong canh tác lúa gạo trên toàn thế giới (Narasimhamurthy *et al.*, 2021). Để phát triển một hệ thống nông nghiệp bền vững, cần có những phương pháp vừa đảm bảo canh tác thân thiện với môi trường vừa kiểm soát được các bệnh hại ngày càng tốt hơn.

Bệnh đạo ôn do nấm *Pyricularia oryzae/Magnaporthe oryzae* gây hại lúa nghiêm trọng nhất do mức độ phân tán rộng và nhanh trong điều kiện thuận lợi. Nấm bệnh phát triển mạnh ở nhiệt độ tương đối thấp (20-23°C), độ ẩm không khí cao và thời tiết âm u. Những triệu chứng bệnh xuất hiện sớm trên lá, lúc đầu vết bệnh nhỏ như đầu kim có màu xám xanh. Sau lan rộng thành hình thoi, xung quanh màu nâu sẫm, giữa màu trắng. Khi bệnh diễn biến nặng, các vết bệnh liên kết với nhau tạo mảng lớn, làm lá bị khô cháy, héo cây. Mầm bệnh đạo ôn có thể xâm nhập vào các mô của cây lúa ở bất kì giai đoạn phát triển nào và có thể gây mất mùa (Zewdu, 2021).

Các vi sinh vật tồn tại trong đất ở vùng rễ (rhizosphere) hoặc nội sinh trong các mô như rễ, thân và lá (endophytes) có khả năng kích thích quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật (cây lương thực và cây dược liệu) đồng thời hỗ trợ chống lại bệnh hại hoặc tác động bất lợi của các yếu tố phi sinh học. Bên cạnh nhóm vi khuẩn hữu ích, thì xạ khuẩn cũng là nhóm sinh vật nhân sơ có giá trị kinh tế và công nghệ sinh học bởi chúng sinh ra các hợp chất có hoạt tính sinh học như kháng sinh, chất chống ung thư, chất kích thích sinh trưởng, tăng cường khả năng chịu hạn, mặn. Một số chi xạ khuẩn nội sinh như *Actinomycete*, *Streptomyces, Microbispora, Kineococcus, Pseudonocardia*, *Nocardiopsis* được tìm thấy ở các mô của cây lúa (Kampapongsa và Kaewkla, 2016; Tian *et al.*, 2007), các cây trồng khác (ngô, cà chua, chuối) hay cây dược liệu (Qin *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2018). Chúng thể hiện hoạt tính kháng khuẩn hoặc kháng nấm bệnh thực vật như *Xanthomonas oryzae*, *Magnaporthe oryzae, Rhizoctonia solani*, và *Fusarium moniliforme*.

Nghiên cứu này nhằm xây dựng một bộ sưu tập các chủng xạ khuẩn vùng rễ và trong các mô cây lúa mang các đặc tính đối kháng với nấm bệnh đạo ôn và kích thích sinh trưởng cây lúa. Từ đó sàng lọc những chủng tiềm năng vừa kiểm soát sinh học vừa thúc đẩy sinh trưởng giúp phòng bệnh đạo ôn an toàn, hiệu quả và bền vững đối với hệ sinh thái.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp từ các hãng khác nhau: Invitrogen, Sigma-Aldrich, Merck, Roche, Qiagen, Trung Quốc và Việt Nam. Mẫu lúa không biểu hiện bệnh và nhiễm bệnh đạo ôn được thu thập tại Nam Định, Hưng Yên và Bắc Ninh, Việt Nam. Phần đất bao quanh rễ lúa được thu riêng, loại bỏ những phần thối hỏng, rễ lúa được rửa bỏ hết đất, cắt riêng khỏi phần thân lá. Các mẫu đất, rễ và thân lá này được sử dụng cho phân lập xạ khuẩn. Hai chủng nấm gây bệnh đạo lúa *Magnaporthe oryzae* PO và SH được cung cấp bởi phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học. Các dụng cụ, môi trường, dung dịch cho thí nghiệm được vô trùng trước khi sử dụng.

Môi trường được sử dụng cho phân lập xạ khuẩn như sau: môi trường CA (Citrate Agar) (g/L) chứa: Citric acid 0,12; $NaNO_3$ 1,5; $K_2HPO_4.3H_2O$ 0,4; $MgSO_4.7H_2O$ 0,1; $CaCl_2.H_2O$ 0,05; EDTA 0,02; Na_2CO_3 0,2; thạch 17; pH 7,2; môi trường CP (Cellulose-Proline) (g/L) chứa: Cellulose 2,5; Sodium pyruvate 2; Proline 1; KNO_3 0,25; $MgSO_4.7H_2O$ 0,2; K_2HPO_4 0,2; $CaCl_2$ 0,5; $FeSO_4.7H_2O$ 0,01; thạch 15; pH 7,2–7,4; proline được thêm sau khi khử trùng, trước khi đổ đĩa thạch; và môi trường HV (g/L) chứa: Humic acid 1; Na_2HPO_4 0,5; KCl 1,7; $CaCl_2$ 0,05; $FeSO_4$ 0,01; thạch 18; pH 6, các vitamin được thêm vào môi trường với tỷ lệ 0,00005% sau khi khử trùng: thiamine HCl, riboflavin, niacin, pyridoxine–HCl, inositol, Ca-pantothenate, p-aminobenzoic acid, 0.000025% biotin. Sau khi khử trùng, các môi trường được bổ sung các kháng sinh: Nystatin 50 mg/L; $K_2Cr_2O_7$ 25 mg/L; Nalidixic acid 25 mg/L để hạn chế sự sinh trưởng của vi khuẩn và nấm (Qin *et al.*, 2009; Musa *et al.*, 2020).

Phương pháp nghiên cứu

Phân lập xạ khuẩn

Đối với đất vùng rễ lúa, hòa tan 1 g đất trong 9 mL nước cất. Pha loãng đến các nồng độ 10^{-1}, 10^{-2} và 10^{-3} và cấy trang 0,1mL ở mỗi nồng độ lên ba loại môi trường khác nhau CA, CP và HV. Đối với rễ và thân lá lúa, các mẫu được cắt ngắn khoảng 5 cm, xử lý bề mặt bằng các dung dịch, lần lượt là Tween 80 0,1%, NaOCl 5% và $Na_2O_2S_3$ 2,5%, cồn 70%, $NaHCO_3$, nước khử trùng và được nghiền nhỏ trong cối chày sứ. Đặt mẫu nghiền lên đĩa thạch chứa ba loại môi trường như trên bằng dụng cụ vô trùng. Ủ đĩa trong tủ ổn nhiệt ở 30ºC trong thời gian từ 2-8 tuần. Các khuẩn lạc rời được lựa chọn và làm thuần khiết bằng cách cấy chuyển nhiều lần sang môi trường mới. Quan sát hình thái khuẩn lạc, ghi lại hình ảnh và lưu chủng thuần khiết trong môi trường lỏng chứa 30% glycerol, ở -70ºC để cho các thí nghiệm tiếp theo.

Khả năng ức chế nấm đạo ôn in vitro

Các chủng xạ khuẩn phân lập được kiểm tra khả năng ức chế nấm bệnh đạo ôn *M. oryzae* SH và PO bằng phương pháp đồng nuôi cấy theo Qi và đồng tác giả (2019). Đặt miếng thạch nấm có diện tích 1 cm^2 của chủng nấm PO hoặc SH (đã được hoạt hóa 3 ngày trước) trên mặt thạch PDA (khoai tây 200 g/L, Dextrose 20 g/L, thạch 20 g/L, pH = 7,4) cách mép đĩa 2 cm. Sau 2 ngày được ủ ở 30ºC, chủng xạ khuẩn được vạch một đường có chiều dài khoảng 3 cm ở phía đối diện, cách miếng thạch nấm 2 - 3 cm. Tiếp tục ủ đĩa ở 30ºC trong 5 ngày. Đĩa không có chủng xạ khuẩn được sử dụng làm đĩa đối chứng. Quan sát sự ức chế sinh trưởng của sợi nấm, so sánh với đĩa đối chứng. Tỷ lệ ức chế tương đối (Relative Inhibition - RI%) sự sinh trưởng của chủng nấm *M. oryzae* PO và SH được xác định dựa vào đường kính của nấm trên đĩa đối chứng và đĩa có chủng ức chế, theo công thức: RI% = ((D1-D2)/D1) x 100%, trong đó: D1 - đường kính (mm) khuẩn lạc nấm ở đĩa đối chứng; D2 – đường kính (mm) khuẩn lạc nấm trên đĩa đối kháng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Hoạt tính enzyme ngoại bào

Những chủng xạ khuẩn có hoạt tính ức chế nấm PO và SH cao hơn được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo. Hoạt tính enzyme ngoại bào amylase, cellulase, protease và chitinase của các chủng xạ khuẩn được xác định bằng phương pháp nuôi cấy trên đĩa thạch theo Gomez Ramirez và đồng tác giả (2004). Môi trường thạch YIM38 (Cao malt 4 g/L; cao nấm men 4 g/L; glucose 4 g/L; vi lượng YIM38 1 mL; H_2O 1L điều chỉnh tới pH =7) được bổ sung tinh bột 2 g/L (đã được hồ hóa), hoặc CMC (carboxymethyl cellulose) 0,5%, hoặc casein 1% trong NaOH 1N, hoặc bột chitin colloidal 0,2% để kiểm tra lần lượt các hoạt tính enzyme trên. Cấy chấm điểm từng chủng xạ khuẩn lên đĩa môi trường, ủ đĩa ở 30ºC trong 24 - 48 giờ. Hoạt tính amylase, cellulase và chitinase được xác định bằng cách đổ ngập dung dịch Lugol 1% (w/v) vào đĩa trong 5 phút, sau đó rửa lại với dung dịch NaCl 1M. Đối với hoạt tính protease, TCA 1% (w/v) được sử dụng. Những chủng có hoạt tính sẽ xuất hiện vòng tròn phân giải trong suốt xung quanh khuẩn lạc. Đo đường kính vòng phân giải (D – mm) và đường kính khuẩn lạc (d - mm). Hoạt tính tương đối của enzyme được tính toán theo công thức: Hoạt tính = D – d (mm), tỷ lệ thuận với đường kính vòng phân giải cơ chất. Đối chứng âm được thực hiện bằng cách nhỏ môi trường LB lỏng lên đĩa thạch. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Sự sản sinh hormone kích thích sinh trưởng IAA

Thành phần IAA từ dịch nuôi cấy xạ khuẩn, được xác định dựa vào phản ứng màu với dung dịch thuốc thử Salkowski theo Glickmann và Dessau (1995). Phản ứng được thực hiện với 1 mL dịch nuôi cấy đã được ly tâm

và loại bỏ tế bào, bổ sung 0,5 mL thuốc thử Salkowski (được chuẩn bị mới), ủ mẫu trong 30 phút (tránh ánh sáng). Sự thay đổi màu của phản ứng thành màu hồng chỉ ra sự có mặt IAA. Hàm lượng IAA được xác định bằng cách đo dung dịch phản ứng ở bước sóng OD_{540nm} và dựa vào đường chuẩn IAA.

Khả năng hòa tan phosphat, kẽm

Khả năng hòa tan phosphat, kẽm khó tan được xác định theo phương pháp của Pikovskaya với sự thay đổi nhỏ. Chia đĩa thạch thành 4 phần, đặt 10 µL dịch nuôi cấy từng chủng xạ khuẩn ở 1/4 đĩa thạch chứa môi trường P1 (g/L) có thành phần: glucose 10, NaCl 1, NH_4Cl 5, $MgSO_4.7H_2O$ 1, thạch 15, pH 7.0 được bổ sung $Ca_3(PO_4)_2$ 0,2% (w/v), đặt đĩa thạch ở 30°C trong 7 ngày. Hoạt tính được xác định khi xuất hiện vòng tròn phân giải trong suốt xung quanh khuẩn lạc. Sự phân giải kẽm cũng được xác định theo cách tương tự, trong đó môi trường Z1 (g/L) được sử dụng, chứa: glucose 10, NaCl 1, $(NH_4)_2SO_4$ 1, KCl 0,2, K_2HPO_4 0,1, $MgSO_4.7H_2O$ 1, thạch 15, pH 7.0 được bổ sung ZnO 0,2% (w/v).

Xử lý số liệu

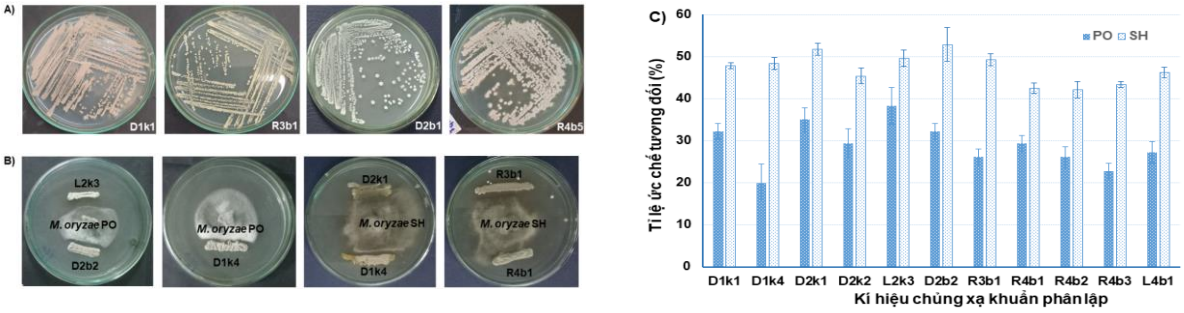
Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần. Kết quả được tính toán bằng phần mềm Excel 2010 và được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± sai số.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và đánh giá khả năng ức chế nấm gây bệnh đạo ôn của các chủng xạ khuẩn

Với 3 loại môi trường CA, CP và HV được sử dụng, căn cứ vào đặc điểm hình thái khuẩn lạc, đặc biệt ở sự hình thành của khuẩn ty cơ chất và khuẩn ty khí sinh, tổng số 35 khuẩn lạc xạ khuẩn được phân lập từ các mẫu đất và lúa không bệnh và nhiễm bệnh đạo ôn. Các chủng xạ khuẩn này được làm thuần khiết bằng cách cấy trải nhiều lần trên môi trường phân lập tương ứng. Trong số đó, 11 chủng xạ khuẩn được phân lập từ đất vùng rễ lúa và 24 chủng nội sinh từ rễ và thân lá lúa. Quan sát đặc điểm nuôi cấy các chủng xạ khuẩn trên ba loại môi trường cho thấy, chúng phát triển chậm, màu sắc khuẩn lạc chủ yếu là màu trắng có 15 chủng (chiếm 42,85%), tiếp sau là khuẩn lạc màu nâu có 11 chủng (chiếm 31,42%), màu xám có 6 chủng (chiếm 17,1%) và còn lại 3 chủng có màu vàng (chiếm 8,6%) (Hình 1A). Để có thể phân loại đến chi của các chủng xạ khuẩn này cần có các nghiên cứu sâu hơn nữa về đặc đểm vi hình thái, phân tích trình tự gen 16S rRNA, ...

Nhằm thu được đa dạng phân loài xạ khuẩn từ thực vật, nhiều nghiên cứu đã sử dụng các loại môi trường khác nhau để phân lập được nhiều nhất có thể. Qin *et al.* (2009) và Musa *et al.* (2020) đã sử dụng hàng chục môi trường khác nhau cho phân lập xạ khuẩn nội sinh từ cây dược liệu. Trên cây lúa, Kampapongsa và Kaewkla (2016) cũng đã sử dụng 4 môi trường khác nhau để phân lập xạ khuẩn nội sinh từ rễ, thân và lá lúa. Những nghiên cứu đã cho thấy, các môi trường dinh dưỡng đơn giản có chứa các vitamin (như vitamin nhóm B) hoặc axit amin (như asparagine, glutamine, serine, proline, alanine, aspartic acid) đem lại hiệu quả cao cho phân lập xạ khuẩn. Ở đó, chi xạ khuẩn thu nhận chiếm đa số hơn 50% là *Streptomyces*, ngoài ra còn có các chi khác như *Actinomycete*, *Microbispora*, *Kineococcus*, *Pseudonocardia*, *Nocardiopsis*, …Trong đất vùng rễ cây trồng (rhizosphere), sự phân lập các chủng xạ khuẩn cũng được tiến hành trên nhiều loại môi trường khác nhau (Nalini *et al.*, 2020).



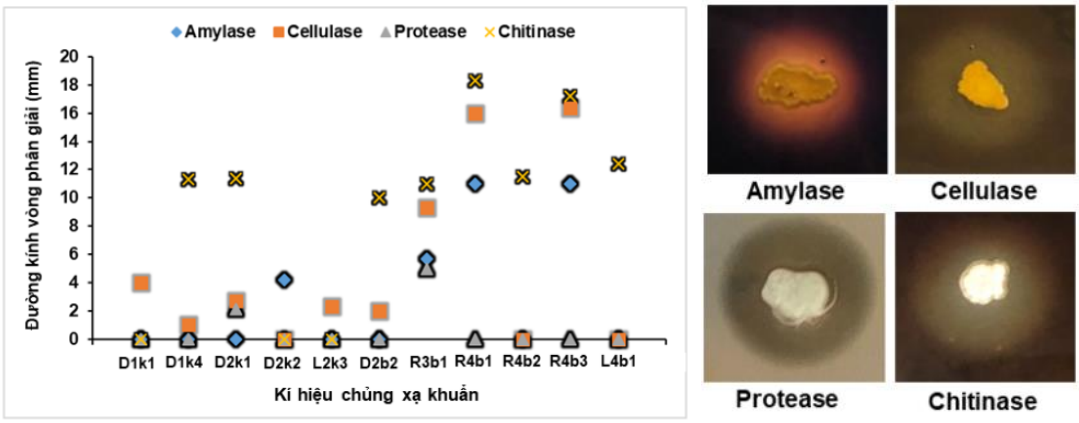
Hình 1. Chủng xạ khuẩn phân lập (A) và khả năng ức chế sinh trưởng nấm gây bệnh đạo ôn *M. oryzae* PO và SH (B, C)

Kết quả kiểm tra hoạt tính ức chế sinh trưởng nấm bệnh đạo ôn với hai chủng *M. oryzae* PO và SH *in vitro* của các chủng xạ khuẩn phân lập cho thấy 11/35 chủng thể hiện khả năng kháng nấm với mức độ ức chế khác nhau, bao gồm D1k1, D1k4, D2k1, D2k2, L2k3, D2b2, R3b1, R4b1, R4b2, R4b3 và L4b1 (Hình 1B và 1C). Tỷ lệ ức chế tương đối (RI%) của 11 chủng xạ khuẩn với hai chủng nấm đạo ôn là khác nhau. Đối với chủng nấm PO, giá trị RI% không cao, dao động từ 20 – 38%, trong đó chủng L2k3 có mức ức chế cao nhất tương ứng 38,3 ± 4,41%. Đối với chủng nấm SH, các chủng xạ khuẩn có mức ức chế không chênh lệch nhau đáng kể với giá trị RI% trong khoảng từ 42 – 53%, trong đó chủng D2b2 đạt cao nhất 52,9 ± 4,02% (Hình 1C). Như vậy, 11 chủng xạ khuẩn phân lập có khả năng ức chế chủng nấm SH cao hơn chủng PO. Tuy nhiên, không có chủng xạ khuẩn nào (được phân lập ở cả hai loại mẫu lúa không bệnh và bệnh đạo ôn) thể hiện hoạt tính ức chế mạnh với hai chủng nấm

thử nghiệm. Kết quả này đồng nhất với công bố của Kampapongsa và Kaewkla (2016), trong đó hơn 50% các chủng xạ khuẩn nội sinh được phân lập từ giống lúa nước *Oryza sativa* L. KDML 105 chỉ ra mức độ ức chế thấp với chủng nấm đạo ôn *Pyricularia oryzae* 61119, một nửa (50%) số chủng xạ khuẩn còn lại không thể hiện hoạt tính ức chế với nấm đạo ôn (Kampapongsa và Kaewkla, 2016).

Hoạt tính enzyme ngoại bào của các chủng xạ khuẩn phân lập

Các enzyme thủy phân ngoại bào như amylase, cellulase, protease và chitinase đóng vai trò quan trọng đối với sự sống của vi sinh vật và đóng góp vào sự ức chế mầm bệnh thực vật (Bardin *et al.*, 2015; Rais *et al.*, 2016). Trong nghiên cứu này, hoạt tính của bốn loại enzyme ngoại bào trên được đánh giá *in vitro* dựa vào sự thủy phân các cơ chất tương ứng là tinh bột, CMC, casein và chitin. Trong số 11 chủng xạ khuẩn được kiểm tra, 8/11 chủng (72,7%) thể hiện hoạt tính cellulase và chitinase, 4/11 chủng (36,4%) thể hiện hoạt tính amylase và chỉ có 2/11 chủng (18,2%) có hoạt tính protease. Số chủng biểu hiện hoạt tính chitinase và cellulase là cao nhất với đường kính vòng phân giải khá cao từ 10÷18 mm (chitinase) và 1÷16 mm đối với cellulase. Số chủng có hoạt tính amylase giảm đáng kể với đường kính vòng phân giải chỉ từ 4÷11 mm và ít nhất là đối với protease với đường kính chỉ đạt 2÷5 mm (Hình 2). Quan sát kết quả trên hình 2 cho thấy, hai chủng xạ khuẩn R4b1 và R4b3 đều có hoạt tính mạnh nhất ở cả ba enzyme amylase, cellulase và chitinase so với các chủng còn lại. Không có chủng xạ khuẩn nào có đường kính vòng phân giải cao hơn 20 mm, và có 5/11 chủng xạ khuẩn chỉ thể hiện duy nhất một hoạt tính enzyme ngoại bào (D1k1, D2k2, L2k3, R4b2 và L4b1). Điều này cũng có thể giải thích phần nào khả năng ức chế các chủng nấm bệnh đạo ôn của các chủng xạ khuẩn phân lập. Một số nghiên cứu trước đã chỉ ra vai trò của enzyme chitinase, protease đến sự ức chế sinh trưởng và kiểm soát mầm bệnh nấm nhờ hoạt tính phân hủy thành tế bào nấm (Singh *et al.*, 2014; Chaiharn *et al.*, 2018).

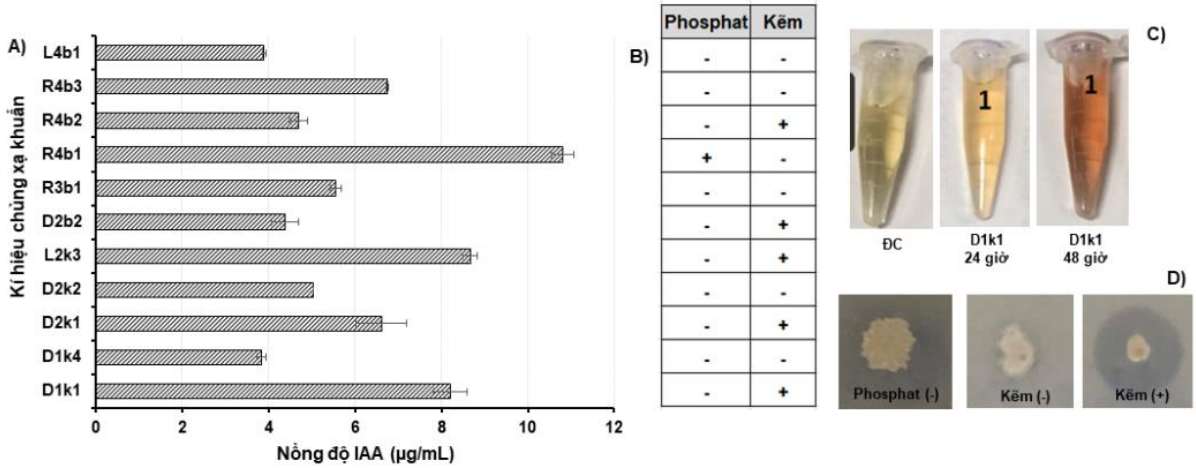


Hình 2. Hoạt tính enzyme ngoại bào của các chủng xạ khuẩn phân lập

Khả năng sản sinh hormone IAA và phân giải phosphat, kẽm của các chủng xạ khuẩn phân lập

Các chủng vi sinh vật hữu ích cộng sinh với cây trồng kích thích sinh trưởng trực tiếp bằng sự tiết hormone thực vật hoặc gián tiếp thông qua cạnh tranh dinh dưỡng, phân giải phosphat và kẽm khó tan hoặc cảm ứng tính đề kháng bệnh phổ rộng ở thực vật như kích thích sự đề kháng hệ thống, hoặc sản sinh các chất hóa học đối kháng (Compant *et al.*, 2005). Kiểm tra khả năng sản sinh IAA cho thấy, tất cả các chủng xạ khuẩn đều tổng hợp IAA với nồng độ dao động từ 3,8÷10,8 µg/mL, trong đó chủng R4b1 đã sản sinh IAA đạt mức cao nhất 10,8 ± 0,26 µg/mL (Hình 3A, 3C).

Các nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, ngoài hormone IAA giúp kích thích sinh trưởng và phát triển ở thực vật, những vi sinh vật hữu ích trong đất, rễ hay nội sinh ở các mô còn có khả năng phân giải phosphat và kẽm khó tan. Nhờ quá trình đó, vi sinh vật sẽ chuyển hóa hai thành phần này thành dạng hòa tan giúp cho thực vật dễ dàng hấp thụ để phát triển. Ở nghiên cứu này, khi kiểm tra khả năng phân giải phosphat và kẽm khó tan trong điều kiện *in vitro* của các chủng xạ khuẩn phân lập cho thấy, tỷ lệ chủng xuất hiện vòng tròn phân giải phosphat rất thấp chỉ 1/11 chủng (9,09%) trong khi tỷ lệ chủng có hoạt tính phân giải kẽm là 5/11 chủng (chiếm 45,5%) (Hình 3B, 3D). Kết quả này cho thấy, hoạt tính phân giải phosphat và kẽm ở các chủng xạ khuẩn được kiểm tra không phải là đặc tính ưu thế. Song sự nghiên cứu sâu hơn về hỗ trợ quá trình sinh trưởng và phát triển ở thực vật được dựa vào khả năng cố định ni-tơ, sự sản sinh các siderophore ở các chủng xạ khuẩn này có thể được tiến hành kiểm tra. Những đặc tính này được chỉ ra ở nhiều chi xạ khuẩn được phân lập từ các thực vật khác nhau (Singh và Dubey, 2018) và ở nhiều chủng vi khuẩn vùng rễ lúa thuộc các chi *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* và *Leclercia* (Kumar *et al.*, 2020; Melo *et al.*, 2016).



Hình 3. Khả năng sản sinh IAA (A, C) và hoạt tính phân giải phosphat, kẽm (B, D) của các chủng xạ khuẩn phân lập.

Dấu (+): Có hoạt tính; dấu (-): Không có hoạt tính; ĐC: Đối chứng.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được 35 chủng xạ khuẩn từ vùng rễ và các mô khác nhau của cây lúa được thu thập từ các tỉnh Bắc Ninh, Hưng Yên và Nam Định, trong đó có 11 chủng thể hiện sự đối kháng nấm bệnh đạo ôn *M. oryzae* PO và SH với RI% trong khoảng tương ứng 20-38% và 42-53%. Hai chủng xạ khuẩn L2k3 và D2b2 thể hiện mức độ ức chế PO và SH cao nhất lần lượt tương ứng với 38,3% và 52,9%. Hoạt tính enzyme ngoại bào cellulase và chitinase được thể hiện ở 8/11 chủng, amylase với 4/11 chủng và protease với 2/11 chủng, trong đó hai chủng xạ khuẩn R4b1 và R4b3 đều có hoạt tính mạnh của các enzym amylase, cellulase và chitinase. Sự sản sinh hormone tăng trưởng IAA được ghi nhận ở tất cả các chủng kiểm tra với giá trị từ 3,8-10,8 µg/mL, trong đó chủng R4b1 đã sản sinh IAA đạt mức cao nhất 10,8 µg/mL. Tỷ lệ các chủng có hoạt tính phân giải phosphat và kẽm khó tan, tương ứng 1/11 (9,09%) ở chủng R4b1 và 5/11 (45,5%) chủng xạ khuẩn được xác định.

Lời cảm ơn: *Công trình này được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài: Nghiên cứu hệ vi sinh vật trên cây lúa nhiễm bệnh đạo ôn tại vùng đồng bằng sông Hồng và định hướng kiểm soát bệnh bằng giải pháp sinh học. Đề tài thuộc các hướng khoa học và công nghệ ưu tiên cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, mã số: VAST02.03/22-23.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bardin M, Ajouz S, Comby M, Lopez-Ferber M, Graillot B, Siegwart M, Nicot PC (2015) Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? *Front Plant Sci* 6: 566.

Chaiharn M, Sujada N, Pathom-Aree W, Lumyong S (2018) The antagonistic activity of bioactive compound producing *Streptomyces* of Fusarium wilt disease and sheath blight disease in rice. *Chiang Mai J Sci* 45(4): 1680-1698

Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol* **71**(9): 4951.

Kampapongsa D, Kaewkla O (2016) Biodiversity of endophytic actinobacteria from jasmine rice (*Oryza sativa* L. KDML 105) grown in Roi-Et Province, Thailand and their antimicrobial activity against rice pathogens. *Ann Microbiol* 66: 587–595.

Kumar V, Jain L, Jain SK, Chaturvedi S, Kaushal P (2020) Bacterial endophytes of rice (*Oryza sativa* L.) and their potential for plant growth promotion and antagonistic activities. *S Afr J Bot* **134**: 50-63.

Melo J, Carolino M, Carvalho L *et al.* (2016) Crop management as a driving force of plant growth promoting rhizobacteria physiology. *Springerplus* **5**, 1574: 1-16.

Musa Z, Ma J, Egamberdieva D, Abdelshafy Mohamad OA, Abaydulla G, Liu Y, Li W-J and Li L (2020) Diversity and antimicrobial potential of cultivable endophytic actinobacteria associated with the medicinal plant thymus roseus. *Front Microbiol* 11:191.

Nalini BS, Muthuraju R, Vendan T, Brahmaprakash GP, YA NR, Nagaraju N, & Anil VS (2020). Isolation of plant growth promoting actinobacteria from the rhizosphere of finger millet and cowpea. *J Pharmacogn Phytochem, 9*(6): 1103-1107.

Narasimhamurthy HB, Naik G, Sehgal M, & Malik M (2021). Integrated management of rice diseases. *J Adv Agric Technol,* 4(2): 13-24.

Qin S, Li J, Chen HH, Zhao GZ, Zhu WY, Jiang CL, ... & Li WJ (2009). Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *Appl Environ Microbiol* 75(19): 6176-6186.

Rais A, Shakeel M, Hafeez FY, Hassan MN (2016) Plant growth promoting rhizobacteria suppress blast disease caused by *Pyricularia oryzae* and increase grain yield of rice. *BioControl* 61: 769-780.

Singh G, Bhalla A, Bhatti JS, Chandel S, Rajput A, Abdullah A, Andrabi W, Kaur P (2014) Potential of chitinases as a biopesticide against agriculturally harmful fungi and insects. *Res Rev J Microbiol Biotechnol* 3: 27-32.

Singh R and Dubey AK (2018) Diversity and applications of endophytic actinobacteria of plants in special and other ecological niches. Front. Microbiol. 9:1767.

Zewdu Z (2021). Rice blast biology and reaction of host to the disease. World News of Natural Sciences, 39: 11-21.

INHIBITORY CAPACITY OF ACTINOBACTERIAL ISOLATES AGAINST RICE BLAST FUNGUS *Magnaporthe oryzae*

Nguyen Thi Thanh Loi, Nguyen Tran Mai Anh, Nguyen Van The, Pham Quynh Anh, Le Thi Thanh Xuan, Phi Quyet Tien*

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

SUMMARY

Actinobacteria are a group of organisms demonstrated to have the potential to promote host plant growth and inhibit several plant pathogens. This study aims to establish a collection of actinobacterial strains showing antagonistic properties against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* and promoting growth in rice. Actinobacteria were isolated from the rhizosphere and root, stem, and leaf tissues of both healthy and rice blast-infected plants on three different media, which resulted in 35 actinobacterial isolates. Screening for antifungal activity against *M. oryzae* strains PO and SH revealed that 11 out of the 35 isolates exhibited antagonistic activity (*in vitro*). The degree of fungal inhibition by the 11 selected actinobacterial isolates was assessed through a co-culture method on agar plates, showing relative inhibition percentages (RI%) that ranged from 20-38% (for the PO strain) and 42-53% (for the SH strain). Two isolates, L2k3 and D2b2, demonstrated the highest inhibition levels at 38.3% and 52.9%, respectively. Among these, 8 out of 11 isolates demonstrated extracellular enzyme activities of cellulase and chitinase, 4 out of 11 showed amylase activity, and 2 out of 11 exhibited protease activity. Both of R4b1 and R4b3 isolates showed the strongest activity of amylase, cellulase and chitinase. The production of the growth hormone IAA was recorded in all selected isolates with concentrations ranging from 3.8 to 10.8 µg/mL, the highest being shown by R4b1 isolate. The proportions of isolates that catalyzed insoluble phosphate and zinc solubilization were 1/11 (9.09%) and 5/11 (45.5%), respectively. These results provide new insights into the diversity and beneficial roles of the isolated actinobacteria and serve as a basis for developing bio-preparations to control rice blast disease.

Keywords: Blast disease, rice plant, biocontrol, *Magnaporthe oryzae*, actinobacteria.

* Author for correspondence: Tel: +84-976860676; Email: tienpq@ibt.ac.vn

KHẢO SÁT CÁC DINH DƯỠNG VÀ DI TRUYỀN CỦA ỐC BƯƠU ĐỒNG (*Pila polita*) TỰ NHIÊN TẠI TỈNH VĨNH LONG

Trương Văn Xạ*, Trần Kim Thoa

Trường Đại học Sư phạm kỹ thuật Vĩnh Long

TÓM TẮT

Ốc bươu đồng được thu bắt ở 28 địa điểm trong tỉnh Vĩnh Long, các địa điểm được phân theo hai mùa (mùa mua và mùa khô) hoặc theo vị trí thu mẫu ven sông (sông Tiền và sông Hậu). Chỉ số môi trường nước như nhiệt độ, nitrat (NO_3^-), nitrite (NO_2^-), amoni/amoniac (NH_3/NH_4), độ mặn ở mỗi điểm thu bắt là tương đương nhau, ngoại trừ giá trị pH ở mùa mưa (7,2) cao hơn so với mùa khô (7,0) và ven sông Hậu (7,2) cao hơn so với ven sông Tiền (7,0); nồng độ oxi hòa tan ở mùa mưa (4,22 mg/L) cao hơn so với mùa khô (3,95 mg/L). Mỗi địa điểm thu bắt 210-220 cá thể ốc và tổng trọng lượng 3,0-3,5kg. Trung bình kích thước ốc bươu đồng thu bắt vào mùa khô (73,6%, chiều rộng/chiều cao vỏ ốc) lớn hơn so với mùa mưa (70,9%); ven sông Tiền (73,2%) lớn hơn so với ven sông Hậu (70,7%). Trung bình tỷ lệ thịt tươi (40-42%) và thịt khô (19-21%) tương đương nhau. Hàm lượng dinh dưỡng có trong 100 g thịt tươi lần lượt là protein tổng số (48-52mg), chất béo (0,35-0,43%), tro (2,0-2,8%), canxi (0,45-0,53%), carbohydrate (45-48%); trong đó tỷ lệ canxi và carbohydrate của các mẫu ốc thu bắt ở mùa mưa lớn hơn so với mùa khô; ven sông Hậu lớn hơn so với ở ven sông Tiền. Sản phẩm khuếch đại PCR trình tự gen bảo tồn trong ty thể bằng cặp mồi LCO1490/$HCO_2$198 được giải trình tự và so sánh độ tương đồng với dữ liệu gen trên ngân hàng. Kết quả cho thấy ốc bươu đồng trong nghiên cứu này có tên khoa học là *Pila polita* và có quan hệ di truyền gần gũi nhất với loài *P. polita* BM250710 (EU528475.1). Nghiên cứu này cung cấp dẫn liệu khoa học về điều kiện sống, thành phần dinh dưỡng và phân loại loài của ốc bươu đồng ở Vĩnh Long, từ đó góp phần bảo tồn và phát huy loài ốc nước ngọt có giá trị kinh tế cao này.

Từ khóa: Di truyền loài, dinh dưỡng, ốc bươu đồng, *Pila polita.*

MỞ ĐẦU

Ốc bươu đồng là loài ốc nước ngọt có giá trị kinh tế do thịt thơm ngon, giàu chất dinh dưỡng, có tính hàn, không độc, hỗ trợ chữa trị một số căn bệnh xơ gan và viêm gan mạn tính (Đỗ Huy Bích *et al.*, 2003). Thịt ốc bươu đồng có thì hàm lượng chất béo tỷ lệ nghịch với hàm lượng chất protein; hàm lượng protein và chất béo trong thịt ốc vào mùa khô thấp hơn so với mùa mưa (Lê Văn Bình và Ngô Thị Thu Thảo, 2020). Trước thực tế nguồn lợi ốc bươu đồng phân bố ngoài tự nhiên ở khu vực Đồng Bằng Sông Cửu Long (ĐBSCL) ngày càng suy giảm do khai thác quá mức, môi trường nước ngày càng ô nhiễm do hóa chất nông nghiệp, xâm nhập mặn. Do đó, việc nghiên cứu điều kiện sống và thành phần dinh dưỡng ốc bươu đồng là rất cần thiết.

Trình tự gen bảo tồn Cytochrome C Oxidase tiểu đơn vị I (COI) đươc sử dụng như mã vạch DNA (DNA barcode) để nhận diện và phân lại các loài (Hebert *et al*., 2003). Nghiên cứu sử dụng phân tích trình tự gen COI của ty thể để đánh giá di truyền của 4 loài *Pila ampullacea, P. angelica, P. pesmei* và *P. polita* ở Thái Lan (Thaewnon-Ngiw *et al.,* 2004). Theo Ting và đồng tác giả (2020), phân tích DNA barcode dựa trên trình tự gen COI đã xác định được 3/5 loài ốc bươu được tìm thấy ở Thái Lan là *P. celebensis, P. gracilis* và *P. pesmei*. Trong khi đó ở ĐBSCL, chưa có nghiên cứu cụ thể nào về đa dạng di truyền các loài ốc bươu đồng. Nghiên cứu này trình bày kết quả khảo sát các điều kiện môi trường, hàm lượng dinh dưỡng và ứng dụng gen COI để xác định di truyền loài cho ốc bươu đồng thu thập ở tỉnh Vĩnh Long. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm cung cấp dẫn liệu khoa học phục vụ cho các nghiên cứu về dinh dưỡng và di truyền của loài ốc bươu đồng ở khu vực ĐBSCL; từ đó góp phần bảo tồn và phát huy loài ốc nước ngọt có giá trị kinh tế cao này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

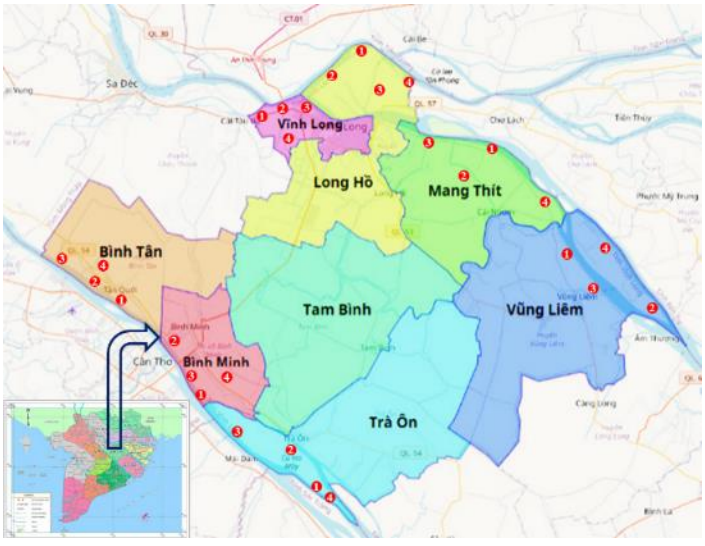
Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Các mẫu ốc bươu đồng được thu bắt ở 7 huyện trong tỉnh Vĩnh Long. Trong đó có 4 huyện ven sông Tiền là thành phố Vĩnh Long, huyện Long Hồ, Huyện Mạng Thít và huyện Vũng Liêm; và 3 huyện ven sông Hậu là Bình Tân, Bình Minh và Trà Ôn. Mỗi huyện thu bắt 4 lần được chia đều hai mùa mưa và mùa khô ở ĐBSCL: (1) từ tháng 5 đến tháng 6 năm 2022; (2) từ tháng 8 đến tháng 9 năm 2022; (3) từ tháng 12 năm 2022 đến tháng 1 năm 2023; (4) từ tháng 3 đến tháng 4 năm 2023 (Bảng 1 và Hình 1). Ở mỗi điểm thu bắt vị trí tọa độ được xác định bằng công cụ Google Maps và đánh dấu vị trí hiện trường điểm thu bắt (Hình 1).

Mẫu ốc bươu đồng được thu bắt bằng tay từ 6-10 giờ sáng, ở các thủy vực như mương vườn, kênh nội đồng và ruộng lúa. Mỗi địa điểm thu bắt 3-5 kg ốc bươu đồng.

Bảng 1. Vị trí thu bắt ốc bươu đồng tự nhiên ở Vĩnh Long

Mùa/ tháng năm	Địa điểm thu mẫu	Tọa độ	Ký hiệu mẫu
Tháng 5-6/2022 (mùa mưa)	Trường An - Vĩnh Long	10°15'03.5"N 105°56'10.3"E	TP-1
	Phước Hậu - Long Hồ	10°13'41.0"N 105°58'15.6"E	LH-1
	Mỹ An - Mang Thít	10°13'24.8"N 106°02'30.4"E	MT-1
	Quới An - Vũng Liêm	10°03'27.1"N 106°10'40.3"E	VL-1
	Mỹ Hòa - Bình Minh	10°02'54.5"N 105°49'05.8"E	BM-1
	Lục Sĩ Thành - Trà Ôn	9°57'07.0"N 105°55'34.3"E	TO-1
	Tân Quới - Bình Tân	10°05'39.3"N 105°45'46.1"E	BT-1
Tháng 8-9/2022 (mùa mưa)	Phường 3 - Vĩnh Long	10°14'42.3"N 105°58'07.7"E	TP-2
	Long Phước - Long Hồ	10°12'36.7"N 105°58'51.3"E	LH-2
	Mỹ Phước -Mang Thít	10°14'07.8"N 106°04'58.6"E	MT-2
	Trung Thành - Vũng Liêm	10°03'27.1"N 106°10'40.3"E	VL-2
	Đông Thạnh - Bình Minh	10°02'36.0"N 105°51'26.8"E	BM-2
	Tích Thiện - Trà Ôn	9°54'34.0"N 105°59'36.7"E	TO-2
	Thành Đông - Bình Tân	10°06'31.4"N 105°45'36.5"E	BT-2
Tháng 12/2022-1/2023 (mùa khô)	Phường 5 - Vĩnh Long	10°15'18.9"N 105°59'10.3"E	TP-3
	Long Phước - Long Hồ	10°12'06.8"N 105°57'48.9"E	LH-3
	Nhơn Phú - Mang Thít	10°13'15.7"N 106°04'26.7"E	MT-3
	Thanh Bình - Vũng Liêm	10°05'52.7"N 106°12'34.1"E	VL-3
	Đông Bình - Bình Minh	10°02'32.2"N 105°50'24.6"E	BM-3
	Thiện Mỹ - Trà Ôn	9°56'57.0"N 105°57'04.4"E	TO-3
	Tân An Thạnh - Bình Tân	10°08'29.9"N 105°42'12.6"E	BT-3
Tháng 3-4/2023 (mùa khô)	Phường 9 - Vĩnh Long	10°14'53.9"N 105°57'18.0"E	TP-4
	Lộc Hòa - Long Hồ	10°11'00.3"N 105°58'18.5"E	LH-4
	Mỹ Phước - Mang Thít	10°14'08.2"N 106°04'39.6"E	MT-4
	Quới Thiện - Vũng Liêm	10°09'35.4"N 106°11'05.3"E	VL-4
	Đông Thuận - Bình Minh	10°02'58.2"N 105°50'09.8"E	BM-4
	Lục Sĩ Thành - Trà Ôn	9°54'57.7"N 105°56'43.9"E	TO-4
	Tân An Thạnh - Bình Tân	10°08'09.0"N 105°41'18.2"E	BT-4



Hình 1. Vị trí thu mẫu ốc bươu đồng ở Vĩnh Long

Ghi nhận các chỉ tiêu môi trường

Nhiệt độ nước (^oC), độ mặn (‰) và giá trị pH nước vị trí thu mẫu ốc bươu đồng được xác định bằng bút đo nhiệt độ/độ mặn/pH (HI98129, HANNA, Mỹ). Bút đo được đặt trực tiếp xuống môi trường nước cần đo, cách bờ khoảng 10-20 cm, tại một địa điểm đo 3-5 vị trí theo hình dích dắc.

Chỉ số nitrite [NO_2^- (mg/L)], nitrat [NO_3^- (mg/L)], amoni/amoniac [NH_4/NH_3 (mg/L)], oxi [O_2 (mg/L)] trong nước được xác định được đo bằng bộ Sera Test Kit-Đức. Quy trình sử dụng được thực hiện theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các giá trị ghi nhận được tính trung bình với một chữ số thập phân.

Ghi nhận đặc điểm hình thái ốc bươu đồng

Đặc điểm hình thái được quan sát gồm hình dạng vỏ ốc, màu sắc, rảnh xoắn, nắp miệng ốc, miệng ốc.

Chiều cao và chiều rộng được xác định bằng thước kẹp điện tử (ABS, Mitutoyo Caliper, Nhật Bản). Chiều cao ốc bươu đồng được tính từ đỉnh ốc đến vành miệng ốc. Chiều rộng là khoảng cách rộng nhất của tầng thân và vuông góc với chiều cao vỏ.

Khảo sát tỷ lệ thịt và dinh dưỡng của ốc bươu đồng

Ốc bưu đồng sống sau khi thu bắt được đập vỡ và tách lấy cơ chân ốc (phần phần thịt tươi), rửa sạch và để ráo nước. Sử dụng 100 g thịt tươi để xác định hàm lượng dinh dưỡng thịt ốc bươu đồng. Tất cả các thí nghiệm đều được thực hiện tại phòng thí nghiệm của trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long.

Tỷ lệ thịt tươi (%) = $W_T/W_E \times 100$ (AOAC, 2000). *Trong đó*: W_T (g) là khối lượng thịt tươi; W_E (g) là tổng khối lượng cá thể ốc.

Tỉ lệ thịt khô (%) = $(W_S/W_M) \times 100$ (AOAC, 2000). *Trong đó*: W_S (g) là khối lượng thịt sấy ở nhiệt độ 60°C trong 36-48 giờ (trọng lượng không đổi); W_M (g) là khối lượng thịt trước khi sấy.

Hàm lượng protein tổng số (mg) trong thịt tươi ốc bươu đồng được xác định bằng phương pháp chưng cất đạm tổng số theo phương pháp Kjeldahl (Bradstreet, 1954).

Tỷ lệ chất béo (%) trong thịt tươi ốc bươu đồng được xác định bằng phương pháp Soxhlet (De Castro & Garcıa-Ayuso, 1998).

Tỷ lệ tro (%) = $[(m_2 - m_o)/(m_1 - m_o)] \times 100$ (Thiex *et al.*, 2003). *Trong đó:* m_o (g) là trọng lượng của cốc sứ được cân sau khi nung ở nhiệt độ 600^{o}C đến trong lượng không đổi; m_1 (g) là tổng trọng lượng thịt ốc và cốc sứ trước khi đun; m_2 (g) là tổng trọng lượng thịt ốc và cốc sứ được đun thành tro trắng (trọng lượng không đổi).

Tỷ lệ canxi (%) trong thịt tươi ốc bươu đồng được xác định bằng phương pháp chuẩn độ theo TCVN 1526-1:2007.

Tỷ lệ carbohydrate (%) = 100 - (protein tổng số + chất béo + tro + canxi) (AOAC, 2000).

Định danh loài ốc bươu đồng

Mẫu ốc dùng định danh loài được loại bỏ phần vỏ, lấy phần thịt tươi rửa sạch qua nước cất, mẫu thịt được ngâm trong ethanol 96% để ly trích DNA.

Ly trích DNA được thực hiện bằng bộ kít TopPURE® Genomic DNA Extraction Kit (HI-112, ABT, Việt Nam). Hàm lượng DNA tổng số được đo bằng máy đo độ hấp thụ quang phổ Nanodrop (BioSpectrometer Basic, Eppendorf, Đức). Mẫu DNA được trữ ở -20 ^{o}C.

Trình tự gen COI trong ty thể ốc bươu đồng được khuếch đại với mồi LCO1490: 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3' và HCO2198: 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3' (Thaewnon-Ngiw *et al.,* 2004)

Phản ứng PCR được thực hiện với tổng thể tích là 50 µL bao gồm: 38,5µL BiH_2O, 5 µL PCR Buffer 1X (10X), 1,5 µl mồi (10 µM); 1 tuýp EZ Mix (Công ty Sinh hóa Phù Sa, Cần Thơ) và 5 µL DNA (50 ng/µl). Chu trình nhiệt gồm: khởi đầu 95^{o}C trong 5 phút; sau đó phản ứng thực hiện trong 35 chu kỳ gồm biến tính 95^{o}C trong 20 giây, gắn mồi 52^{o}C trong 32 giây, kéo dài 72^{o}C trong 45 giây; và cuối cùng là quá trình ổn định 72°C trong 5 phút. Trữ mẫu ở nhiệt độ 10°C đến khi lấy mẫu.

Sản phẩm PCR được giải trình tự theo phương pháp của Sanger ở Công ty Sinh hóa Phù Sa, Cần Thơ. Kết quả giải trình tự của hai mồi, đối chiếu với dẫn liệu gen trên ngân hàng NCBI và lựa chọn những loài có trình tự tương đồng cao để xác định loài. Các chuỗi trình tự được tham chiếu với cơ sở dẫn liệu bằng công cụ BLAST trên NCBI để xác định loài dựa trên các thông số: Organism (tên loài), Q-coverage (độ bao phủ theo chiều dài của trình tự so sánh), Per. Ident (% tương đồng), Accession (mã truy cập). Độ tương đồng càng cao, kết quả càng đáng tin cậy. Các trình tự sau khi hiệu chỉnh được BLAST trên NCBI và cây phát sinh loài được xây dựng bằng phần mềm MEGA 11 với hệ số bootstrap là 1000.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chỉ số môi trường nước ở các vị trí thu bắt ốc bươu đồng

Các chỉ tiêu môi trường nước được ghi nhận từ tháng 5/2022 đến 4/2023 cùng lúc với thu bắt mẫu ốc bươu đồng tại các vị trí thu mẫu như Bảng 1.

Ở Bảng 2, các chỉ tiêu nước tại từng vị trí thu bắt ốc bươu đồng và phân loại trung bình theo mùa (mùa mưa và mùa khô) hoặc theo vị trí thu mẫu ven sông (sông Tiền và sông Hậu). Kết quả khảo sát ghi nhận, trung bình nhiệt độ nước từ 29-30 ^{o}C, độ mặn 0,15 $^{o}/_{oo}$, chỉ số NO_3 từ 0,48-0,49 mg/L, NO_2 từ 0,43-0,44 mg/L, NH_3/NH_4 từ 0,47-0,49 mg/L. Giá trị pH ở mùa mưa (7,2) cao hơn so với mùa khô (7,0); ven sông Hậu (7,2) cao hơn so với ven sông Tiền (7,0). Nồng độ oxi hòa tan trong nước ở mùa mưa (4,22 mg/L) cao hơn so với mùa khô (3,95 mg/L). Với chỉ tiêu môi trường nước cơ bản này hoàn toàn phù hợp để ốc bươu đồng tự nhiên sinh sống.

Bảng 2. Chỉ số môi trường nước ở các vị trí thu bắt ốc bươu đồng ở Vĩnh Long

Ký hiệu	Nhiệt độ (^{o}C)	pH	NO_3^- (mg/L)	NO_2^- (mg/L)	NH_3/NH_4 (mg/L)	O_2 (mg/L)	Độ mặn ($^{o}/_{oo}$)
TP-1	29,1±0,3	7,3±0,2	0,46±0,12	0,52±0,03	0,50±0,10	4,56±0,53	0,15±0,01
LH-1	27,3±0,5	7,2±0,5	0,47±0,60	0,32±0,02	0,42±0,23	4,01±0,11	0,15±0,01
MT-1	29,0±1,0	6,8±0,6	0,49±0,73	0,33±0,04	0,49±0,09	3,79±0,66	0,16±0,02
VL-1	30,5±0,8	7,1±0,4	0,48±0,75	0,42±0,04	0,44±0,11	4,86±0,75	0,19±0,01
BM-1	31,9±0,3	7,7±0,1	0,49±0,22	0,60±0,07	0,54±0,22	4,63±0,79	0,16±0,02
TO-1	29,6±0,6	7,1±0,7	0,48±0,02	0,21±0,01	0,41±0,08	4,11±0,17	0,20±0,04
BT-1	29,4±0,7	7,0±0,5	0,47±0,72	0,51±0,03	0,49±0,23	4,23±0,30	0,11±0,01
TP-2	29,0±0,2	7,2±0,1	0,48±0,60	0,41±0,03	0,48±0,27	4,11±0,40	0,15±0,01
LH-2	28,6±0,5	6,8±0,5	0,49±0,12	0,25±0,04	0,38±0,40	4,30±0,91	0,15±0,01
MT-2	29,0±0,2	7,2±0,5	0,47±0,20	0,37±0,06	0,39±0,16	4,19±0,80	0,16±0,02
VL-2	30,1±0,2	7,1±0,5	0,49±0,55	0,51±0,07	0,50±0,61	3,98±0,63	0,14±0,01
BM-2	29,8±0,4	7,8±0,1	0,49±0,80	0,57±0,08	0,51±0,27	4,20±0,77	0,16±0,02
TO-2	29,0±0,6	6,9±0,9	0,49±0,70	0,42±0,02	0,48±0,30	4,01±0,15	0,15±0,01
BT-2	30,8±0,7	7,1±0,3	0,48±0,62	0,61±0,07	0,52±0,63	4,03±0,63	0,11±0,01
TP-3	31,1±0,3	6,9±0,1	0,49±0,76	0,31±0,27	0,46±0,23	4,56±0,53	0,16±0,01
LH-3	29,5±0,5	6,7±0,5	0,49±0,42	0,45±0,07	0,48±0,10	3,81±0,70	0,12±0,01
MT-3	31,0±0,1	7,0±0,2	0,49±0,32	0,57±0,02	0,52±0,71	3,63±0,16	0,15±0,02
VL-3	31,3±0,8	7,2±0,9	0,48±0,25	0,41±0,02	0,45±0,51	4,06±0,40	0,17±0,01
BM-3	32,1±0,3	6,8±0,1	0,49±0,17	0,37±0,03	0,47±0,62	3,61±0,54	0,16±0,02
TO-3	30,2±0,5	7,2±0,7	0,49±0,83	0,22±0,02	0,45±0,28	3,91±0,37	0,18±0,01
BT-3	31,0±0,8	7,1±0,1	0,49±0,77	0,41±0,07	0,49±0,33	4,06±0,81	0,13±0,01
TP-4	30,5±0,2	6,3±0,1	0,48±0,22	0,62±0,40	0,52±0,68	3,46±0,34	0,10±0,01
LH-4	29,1±0,5	6,9±0,5	0,48±0,72	0,55±0,07	0,51±0,50	3,99±0,66	0,13±0,01
MT-4	30,0±0,2	7,0±0,1	0,48±0,39	0,46±0,07	0,51±0,29	3,82±0,66	0,14±0,02
VL-4	32,0±1,1	7,1±0,5	0,49±0,29	0,48±0,05	0,49±0,51	4,11±0,56	0,14±0,01
BM-4	33,1±0,6	7,2±0,1	0,49±0,97	0,35±0,07	0,48±0,88	3,95±0,70	0,15±0,01
TO-4	29,6±0,6	7,0±0,5	0,48±0,75	0,42±0,02	0,50±0,48	4,11±0,87	0,19±0,04
BT-4	31,0±0,7	7,1±0,4	0,49±0,81	0,50±0,02	0,51±0,93	4,19±0,53	0,13±0,02
Trung bình theo mùa							
Mùa mưa	29,5±1,1	7,2±0,3	0,48±0,01	0,43±0,13	0,47±0,05	4,22±0,29	0,15±0,02
Mùa khô	30,8±1,1	7,0±0,2	0,49±0,01	0,44±0,11	0,49±0,02	3,95±0,28	0,15±0,02
Trung bình theo vị trí thu mẫu ven sông ở Đồng bằng sông Cửu Long							
Sông Tiền	29,8±1,0	7,0±0,2	0,48±0,01	0,44±0,10	0,47±0,04	4,08±0,33	0,15±0,02
Sông Hậu	30,6±1,3	7,2±0,3	0,49±0,01	0,43±0,12	0,49±0,03	4,09±0,18	0,15±0,03

Đặc điểm hình thái ốc bươu đồng

Các đặc điểm hình thái được xác định dựa trên số ốc bươu đồng sau 1-2 ngày thu bắt. Vỏ ốc có dạng hình trứng, hẹp ngang, vỏ bóng, màu sắc từ xanh đen vàng đến nâu đen. Vỏ ốc có 4-5 rảnh xoắn rộng và sâu. Lỗ miệng hẹp, vành ngoài sắc, lỗ rốn dạng khe hẹp. Miệng vỏ ốc hình bán nguyệt lệch về bên phải. Nắp miệng có tâm ở khoảng giữa, gần cạnh trong, mặt trong màu xanh tím (Hình 2).

Hình 2. Đối tượng nghiên cứu

Ốc bươu đồng được thu bắt tại mỗi vị trí đều là ốc đã trưởng thành có kích thước 35-37 x 50-52 mm (chiều rộng x chiều cao) (Bảng 3). Tại mỗi vị trí số cá thể ốc thu bắt có sự chênh lệch nhau nhưng so sánh trung bình theo mùa (mùa mua và mùa khô) hoặc theo vị trí thu mẫu ven sông (sông Tiền và sông Hậu) tương đương nhau (mỗi vị trí thu bắt từ 210-220 cá thể ốc và tổng trọng lượng từ 3,0-3,5 kg). Trung bình tỷ lệ chiều rộng/chiều cao ốc bươu đồng thu vào mùa khô (73,6) lớn hơn so với mùa mưa (70,9); giữa sông Tiền (73,2) cao hơn so với sông Hậu (70,7) và khác biệt có ý nghĩa ($p<0,05$). Như vậy, ốc bươu đồng được thu bắt vào mùa khô và ven sông Tiền có kích thước lớn hơn so với mùa mưa và ven sông Hậu.

Bảng 3. Kích thước mẫu ốc bươu đồng tự nhiên ở Vĩnh Long

Vị trí	Số mẫu (cá thể)	Tổng trọng lượng (kg)	Chiều cao (mm)	Chiều rộng (mm)	Tỷ lệ (%) (rộng/cao)
TP-1	190	3,93	50,8±3,12	36,3±2,06	71,5±3,10
LH-1	125	2,86	40,9±3,06	29,9±2,44	73,1±2,29
MT-1	212	3,28	44,3±2,62	32,9±1,96	74,3±1,12
VL-1	315	3,34	49,8±3,04	37,9±2,03	76,1±1,92
BM-1	161	3,02	57,0±5,15	40,3±2,18	70,7±2,18
TO-1	242	3,89	49,3±4,04	35,9±2,95	72,8±3,03
BT-1	210	2,84	47,8±3,88	33,9±3,12	70,9±1,33
TP-2	260	5,62	49,8±3,71	34,8±3,88	69,9±2,22
LH-2	225	3,52	53,4±6,12	38,5±3,41	72,1±2,70
MT-2	167	2,22	49,1±4,82	35,2±2,87	71,7±2,55
VL-2	203	2,14	50,8±3,95	39,9±3,15	78,5±3,10
BM-2	202	1,97	40,4±3,76	28,8±3,59	71,3±3,12
TO-2	209	3,19	51,3±2,18	38,9±3,55	75,8±2,67
BT-2	233	3,34	53,8±7,82	36,9±2,16	68,6±2,72
TP-3	245	4,53	46,3±5,50	33,6±2,61	72,6±3,12
LH-3	150	2,49	53,8±3,52	38,1±3,31	70,8±3,02
MT-3	250	4,12	46,9±5,12	33,6±3,12	71,6±4,02
VL-3	303	3,84	50,2±4,03	39,7±3,55	79,1±3,32
BM-3	197	2,45	49,3±3,33	34,1±2,14	69,2±2,66
TO-3	121	2,19	48,3±3,92	34,9±1,98	72,3±1,82
BT-3	263	3,04	51,8±7,01	36,9±3,17	71,2±4,78
TP-4	155	3,09	50,6±6,12	39,0±3,71	77,1±4,89
LH-4	175	3,20	55,6±3,64	39,2±1,60	70,5±2,01
MT-4	156	3,02	53,9±4,73	38,5±3,12	71,4±2,32

VL-4	178	3,00	52,2±3,02	36,7±3,22	70,3±2,02
BM-4	220	2,34	51,9±5,66	36,6±2,13	70,5±3,80
TO-4	342	4,29	49,3±4,67	34,9±3,00	70,8±2,88
BT-4	207	3,21	53,8±3,88	34,9±3,70	64,9±3,21
Trung bình theo mùa					
Mùa mưa	211±46	3,2±0,9	49,2±4,7	34,7±3,5	70,7±2,7
Mùa khô	212±63	3,2±0,7	51,0±2,8	37,5±2,2	73,6±3,3
Trung bình theo vị trí thu mẫu ven sông ở Đồng bằng sông Cửu Long					
Sông Tiền	207±48	3,4±0,8	49,9±3,0	36,5±2,6	73,2±3,2
Sông Hậu	217±51	3,0±0,7	50,3±4,0	35,6±2,8	70,7±2,4

Tỷ lệ thịt và dinh dưỡng trong thịt ốc bươu đồng

Từ kết quả Bảng 4 ghi nhận trung bình theo mùa, hàm lượng chất béo, canxi và carbohydrate trong thịt ốc vào mùa mưa lần lượt là 0,39%, 0,53% và 47,3% cao hơn ($p<0,05$) so với mùa khô 0,35%, 0,43% và 45,4%; ngược lại hàm lượng protein trong thịt ốc vào mùa khô là 51,2mg cao hơn ($p<0,05$) so với mùa mưa là 49,4mg. Trung bình theo vị trí thu mẫu ven sông, hàm lượng protein và chất béo trong thịt ốc ở sông Tiền lần lượt là 52,7% và 0,43% cao hơn ($p<0,05$) so với sông Hậu là 48,4% và 0,27%; ngược lại hàm lượng canxi và carbohydrate trong thịt ốc ở sông Hậu lần lượt là 0,51% và 48,7% cao hơn ($p<0,05$) so với sông Tiền lần lượt là 0,47% và 44,6%.

Dựa vào Bảng 3 và Bảng 4 có thể kết luận, ốc bươu đồng được thu bắt vào mùa khô và ở các vị trí ven sông Tiền có kích thước, tỷ lệ thịt và protein cao hơn so với ốc được thu bắt vào mùa mưa và ở các vị trí ven sông Hậu. Trong khi đó, tỷ lệ canxi và carbohydrate của các mẫu ốc bươu đồng được thu bắt vào mùa mưa và ở các vị trí ven sông Hậu thì cao hơn.

Theo Lê Văn Bình và Ngô Thị Thu Thảo (2020), hàm lượng protein trong thịt ốc bươu đực cao hơn so với ốc bươu cái, tương ứng là 69,5 mg và 67,3 mg. Hàm lượng protein và chất béo trong thịt ốc bươu mùa mưa cao hơn so với mùa khô tương ứng là 65,5 mg, 3,00% và 61,4%, 2,52%. Tượng tự, kết quả nghiên cứu này cho thấy (hàm lượng chất béo, canxi và carbohydrate) thay đổi theo mùa và theo vị trí thu bắt mẫu khá rõ rệt. Nguyên nhân có thể là vào mùa khô thời tiết khô, độ ẩm không khí thấp, nguồn chất dinh dưỡng ít phong phú; ngược lại vào mùa mưa nguồn chất dinh dưỡng phong phú thuận lợi cho quá trình thành thục sinh dục của đối tượng thủy sản, sẽ làm hàm lượng protein trong thịt ốc bươu đồng tăng lên.

Theo Đỗ Huy Bích và đồng tác giả (2003), thành phần dinh dưỡng trong 100 g thịt ốc bươu đồng có 11,1 g protein; 0,7 g béo; 8,3 g carbohyrate, 64 mg photpho và 1310 mg canxi. Theo Lê Văn Bình và Ngô Thị Thu Thảo (2020), thành phần dinh dưỡng trong thịt ốc khô (thịt ốc sấy ở nhiệt độ 60^{o}C đến khi trọng lượng không đổi) có 58,2-67,7% protein, 0,32-0,46% xơ, 9,56-11,4% tro, 2,52% béo. Kết quả nghiên cứu này ghi nhận hàm lượng dinh dưỡng có trong 100 g thịt ốc bươu đồng tươi lần lượt là protein tổng số (48-52 mg), chất béo (0,35-0,43%), tro (2,0-2,8%), canxi (0,45-0,53%), carbohydrate (45-48%); tỷ lệ thịt tươi (40-42%) và thịt khô (19-21%). Thành phần dinh dưỡng trong thịt ốc bươu đồng có sự khác biệt giữa các nghiên cứu này có thể là do lựa chọn kích thước ốc để khảo sát và phương pháp xử lý mẫu ban đầu có sự khác nhau. Trong nghiên cứu này ốc bươu đồng có kích thước từ 35-37 x 50-52 mm (chiều rộng x chiều cao) được sử dụng để tách lấy thit tươi và sử dụng ngay sau đó để khảo sát thành phần dinh dưỡng. Như vậy, nghiên cứu này cung cấp dẫn liệu quan trọng về thành phần dinh dưỡng trong ốc bươu đồng ở Vĩnh Long.

Bảng 4. Tỷ lệ thịt và dinh dưỡng của ốc bươu đồng tự nhiên ở Vĩnh Long

Ký hiệu	Thịt tươi (%)	Thịt khô (%)	Protein tổng (mg)	Chất béo (%)	Tro (%)	Canxi (%)	Carbohydrate (%)
TP-1	42,6±2,8	21,3±0,8	47,5±4,4	0,47±0,1	3,2±0,9	0,16±0,0	48,6±3,7
LH-1	41,4±4,1	24,0±9,2	52,5±7,0	0,53±0,3	2,7±1,2	0,05±0,0	44,2±2,0
MT-1	36,1±1,9	13,6±1,9	64,1±4,7	0,31±0,1	1,9±0,1	0,77±0,1	32,9±4,2
VL-1	42,6±7,1	20,3±0,5	50,2±5,2	0,52±0,1	2,9±1,0	0,90±0,1	45,4±2,3
BM-1	41,0±3,8	13,5±2,1	45,2±4,1	0,11±0,0	1,8±0,2	0,22±0,1	52,6±4,9
TO-1	40,4±4,1	19,3±1,8	49,0±3,2	0,48±0,1	1,7±0,8	0,81±0,1	48,0±4,0
BT-1	41,8±2,9	20,8±0,5	50,7±3,0	0,24±0,0	2,9±1,0	0,60±0,0	35,5±3,9
TP-2	40,3±5,9	23,8±5,1	48,1±4,3	0,23±0,0	2,8±0,4	0,12±0,0	48,6±4,0
LH-2	36,6±7,1	23,9±4,1	42,5±14,2	0,57±0,3	2,1±0,2	0,09±0,0	54,7±3,1

MT-2	43,2±1,1	20,7±2,5	46,7±9,9	0,43±0,2	3,1±1,8	0,97±0,0	48,8±3,2
VL-2	41,9±5,7	21,3±0,9	47,5±4,0	0,27±0,1	3,0±0,7	0,99±0,1	45,2±3,3
BM-2	43,8±3,3	19,4±4,7	45,4±3,2	0,24±0,0	1,7±0,3	0,43±0,0	52,2±6,0
TO-2	39,9±6,3	22,9±1,1	50,5±2,0	0,32±0,1	1,6±0,8	0,89±0,1	46,6±3,9
BT-2	42,4±4,9	20,0±1,9	48,5±5,1	0,44±0,0	2,0±0,8	0,37±0,0	38,6±3,2
TP-3	40,3±7,8	25,1±4,8	54,5±1,8	0,38±0,1	2,2±0,5	0,06±0,0	42,7±1,9
LH-3	45,5±8,1	14,8±2,0	54,4±9,3	0,33±0,1	2,0±0,3	0,11±0,0	43,1±2,0
MT-3	39,3±0,6	20,0±0,9	52,5±8,7	0,45±0,2	2,1±0,8	1,09±0,0	43,8±3,5
VL-3	39,4±4,4	21,8±0,7	50,5±4,0	0,49±0,1	2,7±0,2	0,30±0,1	46,1±4,2
BM-3	45,4±1,7	15,1±4,1	43,7±7,0	0,17±0,0	2,1±0,8	0,90±0,0	53,1±2,2
TO-3	41,4±4,8	19,0±0,9	50,0±5,1	0,22±0,0	2,0±0,9	0,29±0,1	47,4±3,2
BT-3	42,8±5,8	22,0±1,8	51,0±3,0	0,43±0,1	2,1±1,0	0,47±0,0	46,1±3,8
TP-4	42,1±4,0	32,9±5,6	50,2±7,9	0,91±0,1	2,8±1,6	0,11±0,0	45,8±8,8
LH-4	39,2±5,3	22,2±5,9	55,4±13,3	0,22±0,1	3,4±1,5	0,05±0,0	40,9±2,9
MT-4	37,6±4,0	17,2±4,0	55,4±5,0	0,34±0,1	4,6±1,7	1,04±0,1	38,6±2,1
VL-4	38,5±4,9	26,0±4,1	52,5±7,0	0,37±0,1	2,9±1,6	0,66±0,1	43,5±5,0
BM-4	44,6±1,7	16,0±1,2	43,7±2,0	0,15±0,0	2,0±0,2	0,41±0,1	53,9±7,7
TO-4	39,4±6,9	23,0±2,9	52,0±5,6	0,27±0,1	2,2±0,9	0,35±0,0	45,1±3,7
BT-4	40,9±4,0	20,0±2,0	51,5±3,9	0,20±0,0	2,0±0,6	0,27±0,0	46,0±3,0
Trung bình theo mùa							
Mùa mưa	40,8±2,2	20,3±3,3	49,4±5,0	0,39±0,1	2,4±0,6	0,53±0,4	47,3±5,1
Mùa khô	41,2±2,6	21,1±4,9	51,2±3,7	0,35±0,2	2,5±0,7	0,43±0,4	45,4±4,1
Trung bình theo vị trí thu mẫu ven sông ở Đồng bằng xông Cửu Long							
Sông Tiền	42,8±1,8	21,8±4,3	52,7±3,8	0,43±0,2	2,8±0,5	0,47±0,5	44,6±3,9
Sông Hậu	40,4±2,7	19,3±3,2	48,4±3,5	0,27±0,1	2,0±0,3	0,51±0,2	48,7±3,7

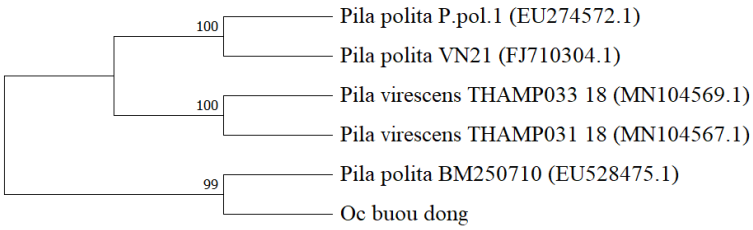
Định danh loài ốc bươu đồng

Sản phẩm khuếch đại PCR trình tự gen COI trong ty thể ốc bươu đồng bằng cặp mồi LCO1490/HCO2198 được tinh sạch ở phòng thí nghiệm Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long và giải trình tự gen tự tại công ty Sinh hóa Phù Sa. Sản phẩm giải trình tự gen mẫu ốc bươu đồng có kích thước 675 bp được sử dụng để so sánh độ tương đồng với dữ liệu gen trên ngân hàng NCBI bằng công cụ BLAST. Kết quả sự tương quan trình tự nucleotit gen COI của mẫu ốc bươu đồng nghiên cứu với loài hai loài là *P. polita* và loài *P. virescens* (Bảng 5). Dựa vào cây phát sinh loài cho thấy mẫu ốc bươu đồng trong nghiên cứu và loài *P. polita* BM250710 có mối quan hệ rất gần gũi với nhau (Hình 3). Như vậy, từ các đặc điểm hình thái và kết quả giải trình tự gen định danh loài cho thấy loài ốc bươu đồng phân bố ở Vĩnh Long có tên khoa học là *P. polita* và có quan hệ di truyền gần gũi nhất với loài *P. polita* BM250710.

Ở khu vực ĐBSCL, loài ốc bươu đồng *P. polita* sinh sống ở các loại hình thủy vực nước ngọt như ruộng, ao và mương vườn (Đặng Ngọc Thanh *et al.,* 2003). Tuy nhiên, nguồn lợi ốc bươu đồng trong tự nhiên ngày càng suy giảm do khai thác quá mức, môi trường nước ô nhiễm, sử dụng hóa chất trong nông nghiệp, xâm nhập mặn, cạnh tranh của loài ốc bươu vàng (*Pomacea canaliculata*) (Lê Văn Bình và Ngô Thị Thu Thảo, 2020). Do đó, nghiên cứu các đặc điểm di truyền của loài ốc nước ngọt này là rất cần thiết, nhằm bảo tồn và phát triển sản xuất giống ốc nước ngọt có giá trị kinh tế cao này.

Bảng 5. So sánh trình tự gen bảo tồn COI của ốc bươu đồng tự nhiên ở Vĩnh Long và dữ liệu ngân hàng gen

Loài dùng để so sánh trên ngân hàng gen	Mã truy cập	Kích thước gen (bp)	Độ phủ (%)	Tương đồng (%)	Tham khảo
Pila polita BM250710	EU528475.1	655	95%	100%	Hayes et al. (2008)
Pila virescens THAMP033_18	MN104569.1	657	95%	99,79%	Ting et al. (2020)
Pila virescens THAMP031_18	MN104567.1	657	95%	99,58%	Ting et al. (2020)
Pila polita VN21	FJ710304.1	617	93%	99,58%	Hayes et al. (2009)
Pila polita P.pol.1	EU274572.1	626	93%	99,58%	Jørgensen et al. (2008)



Hình 3. Cây phát sinh loài mẫu ốc bươi đồng

KẾT LUẬN

Ốc bươu đồng được thu bắt ở 7 huyện trong tỉnh Vĩnh Long; ở mỗi huyện bốn lần thu bắt được phân chia đều cho hai mùa (mùa mua và mùa khô) hoặc theo vị trí thu mẫu ven sông (sông Tiền và sông Hậu). Kết quả khảo sát chỉ số môi trường nước ở mỗi điểm thu bắt là tương đương nhau, ngoài trừ giá trị pH ở mùa mưa (7,2) cao hơn so với mùa khô (7,0); ven sông Hậu (7,2) cao hơn so với ven sông Tiền (7,0). Nồng độ oxi hòa tan trong nước ở mùa mưa (4,22 mg/L) cao hơn so với mùa khô (3,95 mg/L). Trung bình kích thước ốc bươu đồng được thu bắt vào mùa khô và ven sông Tiền có kích thước trung bình lớn hơn so với mùa mưa và ven sông Hậu. Hàm lượng dinh dưỡng có trong 100 g thịt ốc bươu đồng tươi lần lượt là protein tổng số (48-52mg), chất béo (0,35-0,43%), tro (2,0-2,8%), canxi (0,45-0,53%), carbohydrate (45-48%). Tỷ lệ thịt tươi (40-42% và thịt khô (19-21%). Trung bình tỷ lệ canxi và carbohydrate của các mẫu ốc thu bắt ở mùa mưa lớn hơn so với mùa khô; các mẫu ốc thu bắt ở ven sông Hậu lớn hơn so với ở ven sông Tiền. Sản phẩm khuếch đại PCR trình tự gen COI trong ty thể ốc bươu đồng bằng cặp mồi LCO1490/HCO2198 có kích thước 675 bp được sử dụng để giải trình tự. Kết quả so sánh độ tương đồng với dữ liệu gen trên ngân hàng NCBI bằng công cụ BLAST cho thấy ốc bươu đồng có tên khoa học là *Pila polita* và có quan hệ di truyền gần gũi nhất với loài *P. polita* BM250710 trên ngân hàng gen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

AOAC (2000). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. 17th edn. U.S.A: Gaithersburg.

Bradstreet RB(1954). Kjeldahl method for organic nitrogen. *Analytical Chemistry,* 26(1):185-187.

Đặng Ngọc Thanh, Hồ Thanh Hải và Dương Ngọc Cường (2003). Thành phần loài của họ ốc nhồi-Ampullariidae Gray, 1824 ở Việt Nam. *Tạp chí Sinh học*, 25(4):1-5.

De Castro ML, Garcıa-Ayuso LE (1998). Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Analytica chimica acta,* 369(1-2): 1-10.

Đỗ Huy Bích, Đặng Quang Trung, Bùi Xuân Chương, Nguyễn Thượng Dong, Đỗ Trung Đàm, Phạm Văn Hiền, Vũ Ngọc Lộ, Phạm Duy Mai, Phạm Kim Mân, Đoàn Thụ Nhu, Nguyễn Tập và Trần Toàn (2003). *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam* - tập 2. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.

Hayes KA, Cowie RH, Thiengo SC (2009). A global phylogeny of apple snails: Gondwanan origin, generic relationships, and the influence of outgroup choice (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Biological Journal of the Linnean Society,* 98(1):61-76.

Hayes KA, Joshi RC, Thiengo SC, Cowie RH (2008). Out of South America: multiple origins of non-native apple snails in Asia. *Diversity and distributions,* 14(4):701-712.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Biological Sciences*, *270*(1512):313-321.

Jørgensen A, Kristensen TK, Madsen H (2008). A molecular phylogeny of apple snails (Gastropoda, Caenogastropoda, Ampullariidae) with an emphasis on African species. *Zoologica Scripta,* 37(3):245-252.

Lê Văn Bình và Ngô Thị Thu Thảo (2019). Mức độ phong phú về mật độ và sinh lượng của ốc bươu đồng (*Pila polita*) ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Đại học cần Thơ*, *55*(2):38-50.

Lê Văn Bình và Ngô Thị Thu Thảo (2020). Biến động thành phần hóa học của thịt ốc bươu đồng (*Pila polita* Deshayes, 1830).*Tạp chí Khoa học và công nghệ nông nghiệp,* 4(1):1755-1765.

Thaewnon-Ngiw B, Klinbunga S, Phanwichien K, Sangduen N, Lauhachinda N, Menasveta P (2004). Genetic diversity and molecular markers in introduced and Thai native apple snails (*Pomacea* and *Pila*). *BMB Reports, 37*(4):493-502.

Ting NH, Annate S, Jeratthitikul E, Sutcharit C, Limpanont Y, Panha S (2020). Disappearing apple snails (Caenogastropoda: Ampullariidae) of Thailand: a comprehensive update of their taxonomic status and distribution. *Journal of Molluscan Studies,* 86(4):290-305.

A SURVEY ON NUTRITION AND GENETICS OF BLACK APPLE SNAIL (*Pila polita*) IN VINH LONG PROVINCE

Truong Van Xa*, Tran Kim Thoa

Vinh Long University of Technical Education

SUMMARY

Black apple snails were collected at 28 locations in Vinh Long province, the locations were divided into two seasons (the rainy season and the dry season) or according to riverside sampling (Tien River and Hau River). Water environment indicators such as temperature, nitrat (NO_3), nitơ dioxide (NO_2), amoni/ammonia (NH_3/NH_4), and salinity at each sample location were similar. The pH values recorded in the rainy season (7.2) and the Hau River location (7.2) were higher than those in the dry season (7.0) and the Tien River location (7.0). Dissolved oxygen concentration was recorded higher in the rainy season (4.22 mg/L) than in the dry season (3.95 mg/L). The number of snails and the total weight at each sampling site were 210-220 individuals and 3.0-3.5 kg, respectively. The average size of autumn snails caught in the dry season (73.6%, shell width/height) was larger than that in the rainy season (70.9%); the Tien River (73.2%) was larger than the Hau River (70.7%). On average, the ratio of fresh meat (40-42%) and dried meat (19-21%) was similar. The nutritional content in 100g of fresh meat was respectively total protein (48-52mg), fat (0.35-0.43%), ash (2.0-2.8%), calcium (0.45-0.53%), and carbohydrates (45-48%). The calcium and carbohydrate ratio of snail samples collected in the rainy season was greater than of the dry season. Similarly, the calcium and carbohydrate ratio of snail samples collected in the Hau River was larger than of the Tien River. The PCR amplification product of the conserved gene sequence in the mitochondria using the primer LCO1490/HCO2198 was sequenced and compared similarity with gene data on the bank. The results show that black apple snails in this study has the scientific name *Pila polita* and was most closely genetically related to *P. polita* BM250710 (EU528475.1). This study provided scientific data on the living conditions, nutritional compositions and species classification of black apple snails in Vinh Long province, thereby contributing to the conservation and promotion of this freshwater snail species with the high economic value.

Keywords: Black apple snail, nutrition, *Pila polita*, species classification.

* Author for correspondence: Tel: +84-394514348; Email: xatv@vlute.edu.vn

CHỦNG VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP *RHODOVULUM SULFIDOPHILUM* ST20 CÓ TIỀM NĂNG SỬ DỤNG LÀM PROBIOTIC TRONG NUÔI TÔM THẺ CHÂN TRẮNG *(LITOPENAEUS VANNAMEI)*

Trần Thu Hà[1,2*], Phạm Thanh Trang[1], Đinh Thị Thu Hằng[2], Nguyễn Thị Thu Huyền[3], Hoàng Thị Yến[1]

[1]*Viện Công sinh học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

[2]*Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

[3]*Trường Đại học Khoa học - Đại học Thái Nguyên*

TÓM TẮT

Vi khuẩn tía quang hợp (VKTQH) đã được ứng dụng trong một số lĩnh vực của cuộc sống như: sử dụng làm nguyên liệu để tách chiết các hoạt chất sinh học có giá trị (ubiquinol, carotenoid, acid béo không no), sử dụng làm thức ăn trong chăn nuôi gia súc, gia cầm và nuôi trồng thủy sản, sử dụng để xử lý các nguồn nước thải khác nhau… Ngoài ra, hiện nay nhiều nghiên cứu cũng đã tiến hành sàng lọc và tuyển chọn các chủng VKTQH có tiềm năng sử dụng làm probiotic trong nuôi trồng thủy sản. Trong bài báo này trình bày các kết quả nghiên cứu về chủng VKTQH có ký hiệu ST20 có tiềm năng sử dụng làm probiotic trong nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei)*. Chủng VKTQH ST20 vừa có khả năng đối kháng với vi khuẩn kiểm định *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi* gây bệnh hoại tử gan tuy cấp (AHPND) với đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt đạt 10,89±1,04 mm và 5,95±1,10 mm, đồng thời có khả năng sinh tổng hợp 3 loại enzyme protease, lipase và amylase với đường kính vòng phân giải lần lượt là 11,12±1,22 mm; 7,39±0,85 mm và 4,08±0,32 mm. Ngoài ra, chủng ST20 có khả năng tự kết dính và tạo màng biofilm. Bằng phương pháp xác định trình tự gen 16S rRNA cho thấy chủng ST20 có độ tương đồng 100% so với loài *Rhodovulum sulfidophilum*. Do vậy, chủng VKTQH ST20 có thể thuộc loài *Rhodovulum sulfidophilum* và được đặt tên là *Rhodovulum sulfidophilum* ST20.

Từ khóa: Enzyme, *Rhodovulum sulfidophilum,* vi khuẩn tía quang hợp, probiotic, *V. parahaemolyticus, V. harveyi.*

MỞ ĐẦU

Nuôi tôm thẻ chân trắng (TTCT) là một trong những hoạt động mang lại hiệu quả kinh tế cao. Theo báo cáo Tổng cục Thủy sản, năm 2023 sản lượng tôm đạt 1,21 triệu tấn, tăng 5,8% so với năm 2022, trong đó theo số liệu thống kê tính đến tháng 8/2023 sản lượng TTCT xuất khẩu của Việt Nam đạt 29.004 tấn tăng 39% so với cùng kỳ năm 2022.

Tuy nhiên, việc nuôi tôm thâm canh ở quy mô công nghiệp đang gặp nhiều khó khăn do ô nhiễm nguồn nước bởi mật độ nuôi thả cao dẫn đến dịch bệnh trên tôm phát triển nhanh chóng. Nhìn chung, các bệnh trên tôm thường do nhiễm vi khuẩn, đặc biệt là nhóm vi khuẩn *Vibrio* spp. gây ra, điển hình là các loài *V. harveyi, V. parahaemolyticus, V. vulnificus* (Chatterjee and Haldar, 2012). Một số bệnh phổ biến trong nuôi tôm như: bệnh đốm trắng, bệnh chậm lớn, bệnh phân trắng... và đặc biệt nghiêm trọng, gây thiệt hại kinh tế nhiều nhất là bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND). Để giải quyết vấn đề này, hóa chất và kháng sinh được sử dụng để cải thiện chất lượng nước nuôi và loại bỏ mầm bệnh trên tôm. Tuy nhiên, việc này đã gây tác dụng xấu cho sức khỏe người tiêu dùng, đặc biệt việc sử dụng kháng sinh trong thời gian dài dẫn đến chúng tích tụ trong sản phẩm và gia tăng các gen kháng kháng sinh ở nhóm vi khuẩn gây bệnh (Chumpol *et al.*, 2017). Do vậy, việc sử dụng các chế phẩm sinh học thân thiện với môi trường hiện nay rất được quan tâm trong nuôi tôm như: probiotic, prebiotic, symbiotic và các peptide kháng khuẩn.

Trong số các nhóm vi sinh vật thường được sử dụng làm chế phẩm sinh học như: *Bacillus, Nitrobacter, Nitrosomonas, Lactobacillus, Propiobacterium*… vi khuẩn tía quang hợp (VKTQH) là một trong những nhóm có nhiều tiềm năng ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản nói chung và nuôi tôm nói riêng như: Xử lý COD, BOD, H_2S, NO_x, kim loại nặng, thúc đẩy khả năng tăng trưởng và nâng cao chất lượng tôm nuôi bằng cách tiết ra các hợp chất có hoạt tính sinh học như chất kháng khuẩn, các enzyme tiêu hóa thức ăn (proteinase, amylase, cellulase...), vitamin B12… để kiểm soát mầm bệnh trên tôm (Miyasaka *et al*., 2023; Koga *et al*., 2022; Chumpol *et al.*, 2017).

Ở Việt Nam, những nghiên cứu ứng dụng VKTQH làm chế phẩm sinh học sử dụng trong nuôi trồng thủy sản mà đặc biệt sử dụng làm probiotic trong nuôi TTCT còn rất hạn chế. Vì vậy, trong nghiên cứu này trình bày kết quả xác định một số đặc tính probiotic và định danh đến loài chủng VKTQH tiềm năng này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Chủng VKTQH ST20 được phân lập từ ruột tôm thẻ chân trắng trong ao nuôi tôm tại ấp Tổng Cán, xã Liêu Tú, tỉnh Sóc Trăng. Khuẩn lạc của chủng ST20 có dạng hình tròn, lồi, màu đỏ nâu, đường kính khoảng 1,4-1,6 mm. Dịch huyền phù tế bào có màu đỏ nâu. Tế bào có dạng hình trứng, đường kính khoảng 0,66 - 1,07 µm, sinh sản bằng cách nhân đôi, tồn tại ở dạng đơn bào hoặc có thể tạo chuỗi tế bào. Chủng ST20 sinh trưởng tốt trong môi trường GA ở nồng độ NaCl: 15 g/L; pH: 6,5-7; 30-32℃, ánh sáng 5.000 lux.

Chủng vi khuẩn kiểm định *Vibrio parahaemolyticus* BLV10 (*V.parahaemolyticus)*: được phân lập, sàng lọc và lưu trữ tại Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen - Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Chủng chuẩn *Vibrio harveyi (V.harveyi)*: nhận được từ Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học - Đại học Quốc gia Hà Nội.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nuôi cấy VKTQH

VKTQH được nuôi trong bình thể tích 100 mL (chứa 90 mL) môi trường GA lỏng, bổ sung giống 10%, bổ sung NaCl 15 g/L, nhiệt độ 30-32℃, ánh sáng khoảng 5.000 lux đậy kín bằng nút cao su để hạn chế oxy xâm nhập. Sau 2 ngày (mật độ khoảng 5.10^8 tế bào/ml); 4 và 7 ngày (mật độ khoảng 10^9 tế bào/ml) tiến hành thu dịch nuôi sử dụng để tiến hành các thí nghiệm.

Phương pháp nuôi cấy vi khuẩn kiểm định

Các chủng vi khuẩn kiểm định *Vibrio* được nuôi trong môi trường TSB lỏng (có bổ sung NaCl 15 g/L) nuôi ở nhiệt độ phòng, lắc 150 vòng/phút. Sau 18h nuôi cấy, dịch nuôi của 2 loài vi khuẩn kiểm định trên được điều chỉnh mật độ OD_{660}=0,1.

Phương pháp xác định khả năng kháng khuẩn (Chumpol *et al*., 2017)

Sau 7 ngày nuôi cấy VKTQH trong môi trường GA lỏng tiến hành ly tâm để loại tế bào, cô đặc dịch bằng cách đông khô, sau đó hòa tan dịch đã đông khô bằng metanol 10% để thu được nồng độ dung dịch đậm đặc gấp 20 lần so với dịch nuôi ban đầu. Hút 50 µL dịch nuôi cấy vi khuẩn kiểm định trang đều trên bề mặt đĩa thạch TSA (1,5% NaCl), sau đó tiến hành đục giếng thạch. Hút 120 µL dịch VKTQH đã được cô đặc nhỏ vào từng giếng, ủ ở 35℃ trong 18h. Khả năng đối kháng của VKTQH với vi khuẩn kiểm định được xác định thông qua đường kính vòng kháng khuẩn.

Phương pháp xác định khả năng sinh enzyme (Chumpol *et al.*, 2017)

Sau 2 ngày nuôi cấy VKTQH Sử dụng môi trường GA có bổ sung các cơ chất gelatin, casein, tinh bột tan, CMC và tributyrin để tiến hành xác định khả năng sinh các loại enzyme gelatinae, protease, amylase, cellulase và lipase tương ứng. Tiến hành đục giếng thạch, hút 50 µL dịch nuôi cấy VKTQH nhỏ vào từng giếng. Nuôi cấy các đĩa trong điều kiện hiếu khí - tối, nhiệt 30-32℃, trong 5 ngày. Khả năng sinh enzyme được xác định thông qua đường kính vòng phân giải cơ chất.

Phương pháp xác định khả năng tự kết dính (Trinh Thị Phương Thảo *et al.*, 2023)

Sau 4 ngày nuôi cấy VKTQH trong môi trường GA ở 30-32℃ tiến hành ly tâm ở 8.000 vòng/15 phút để thu sinh khối. Tiếp theo tiến hành rửa sinh khối bằng đệm phosphat (pH 7.2). Sinh khối sau đó được tái huyền phù lại bằng đệm phosphat để được mật độ cuối cùng OD_{660} = 0,5. Cuối cùng, phân chia dịch tái huyền phù này vào các lọ penixicline 13 mL (chứa 10 mL dịch), lắc trong 10 giây và để lắng ở 37℃ trong 5 giờ. Sau 5 giờ tiến hành đo dịch nuôi ở bước sóng OD_{660} ở các thời điểm 0 và 5 giờ. Tỷ lệ kết dính (%) được tính bằng công thức: **(1-At/Ao) x 100**. Trong đó: At và Ao là OD_{660} tại thời điểm 5 giờ và 0 giờ.

Phương pháp xác định khả năng tạo màng Biofilm (Nguyễn Thị Minh Nguyệt *et al*., 2020)

Sau 4 ngày nuôi cấy VKTQH trên môi trường GA dịch tiến hành ly tâm 3 lần liên tiếp ở 4.000 vòng/phút trong vòng 10 phút ở 4℃ và rửa lại bằng nước cất 2 lần với thể tích tương ứng để thu sinh khối. Sau lần ly tâm cuối cùng tiến hành hòa lại sinh khối bằng nước cất vô trùng và điều chỉnh về nồng độ OD_{660} = 0,5. Cuối cùng hút 100 µL dịch trên cho vào các ống eppendorf 1,5 mL chứa 900 µL môi trường GA. Mẫu được nuôi tĩnh dưới bóng đèn sợi đốt 60W, nhiệt độ 30-32^{0}C. Sau 7 ngày tiến hành xác định khả năng tạo màng sinh học của VKTQH. Dùng pipetman hút dịch nuôi cấy nhẹ để không làm vỡ màng, rửa nhẹ màng sinh học bằng 1 mL nước cất, hút loại nước, lặp lại lần tiếp theo. Cho 1 mL dung dịch tím tinh thể 0,1% vào các ống eppendorf, ủ 10 phút để cố định. Hút bỏ dung dịch tím tinh thể, rửa liên tiếp 2 lần bằng nước cất (1mL/lần). Sau đó bổ sung 1 mL axit axetic 33%, đảo trộn hỗn hợp này, pha loãng tới hạn và đo bước sóng 570 nm. Mật độ tế bào trong màng VKTQH được xác

định bằng cách đo độ hấp thụ ở bước sóng 570 nm. Ống eppendorf không chứa sinh khối VKTQH được sử dụng làm đối chứng âm.

***Phương pháp định danh vi khuẩn sử dụng gene 16S rRNA* (Kumar, 2012)**

Sau 4 ngày nuôi cấy VKTQH trong môi trường GA tiến hành thu sinh khối bằng cách ly tâm 8.000 vòng/phút trong 15 phút. DNA bộ gen được tách chiết và tinh sạch bằng kit Gen JET (Thermo). Sử dụng cặp mồi F1 (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và R1 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3') do Devereus và cộng sự thiết kế để khuếch đại gene 16S rRNA. Quá trình PCR được thực hiện theo Kumar (2012) và giải trình tự theo phương pháp sử dụng các dideoxynucleotide của Sanger bằng máy giải trình tự gen tự động.

Phương pháp xây dựng cây phân loại

Trình tự nucleotide của gen 16S rRNA được phân tích bằng phần mềm BioEdit và so sánh mức độ tương đồng với các trình tự đã được công bố trên GenBank bằng chương trình BLAST để định danh loài vi khuẩn. Sử dụng phần mềm Mega 11 để xây dựng cây phát sinh chủng loại của VKTQH với các loài gần gũi.

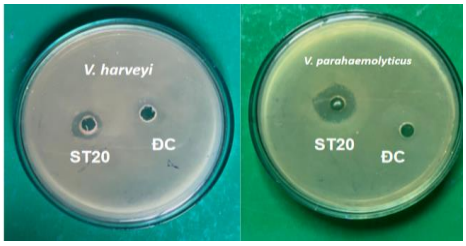
Phương pháp xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm nêu trên được tiến hành 3 lần độc lập. Kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (TB ± SD). Tính toán số liệu được thực hiện bằng phần mềm Microsoft Excel phiên bản 2019.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả đối kháng của chủng VKTQH ST20 với vi khuẩn kiểm định *V. paraheamolyticus* và *V. harveyi*

Một trong những đặc tính quan trọng nhất làm căn cứ để tuyển chọn các chủng vi khuẩn làm probiotic là khả năng đối kháng với vi khuẩn gây bệnh trên tôm. Do vậy, trong nghiên cứu này, sử dụng phương pháp khuếch tán giếng thạch để xác định khả năng đối kháng của chủng VKTQH ST20 với 2 loại vi khuẩn kiểm định (*V. paraheamolyticus* và *V. harveyi*). Kết quả được trình bày ở hình 1.

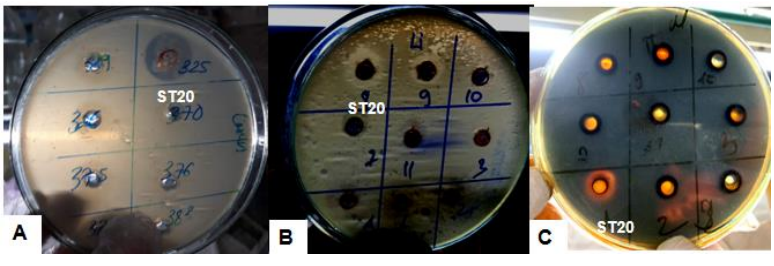


Hình 1. Kết quả đối kháng của chủng VKTQH ST20 với 2 loài vi khuẩn kiểm định *V. harveyi* (Hình A) và vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (Hình B)

Từ Hình 1 cho thấy, chủng ST20 có khả năng đối kháng với cả 2 loài vi khuẩn kiểm định *V. paraheamolyticus* với đường kính vòng kháng khuẩn là 10,89±1,04 mm và *V. harveyi* với đường kính vòng kháng khuẩn là 5,95±1,10 mm.

Kết quả sinh enzyme của chủng VKTQH ST20

Hiệu quả của chế phẩm probiotic không chỉ ở hoạt tính kháng khuẩn mà còn phụ thuộc rất nhiều vào khả năng sinh enzyme tiêu hoá thức ăn của các chủng vi sinh vật. Trong thí nghiệm này sử dụng môi trường GA và bổ sung các cơ chất: gelatin, casein, tinh bột tan, CMC và tributyrin để xác định khả năng sinh các enzyme của chủng ST20 tương ứng gelatinase, protease, amylase, cellulase và lipase. Kết quả sau 5 ngày nuôi cấy cho thấy chủng ST20 có khả năng sinh 3 loại enzyme: protease, lipase và amylase với đường kính vòng phân giải lần lượt là 11,12±1,22 mm; 7,39±0,85 mm và 4,08±0,32 mm tương ứng (Hình 2).



Hình 2. Khả năng sinh enzyme protease (A), lipase (B) và amylase (C) của chủng VKTQH ST20

Như vậy, chủng VKTQH ST20 trong thí nghiệm này vừa có khả năng đối kháng với 2 loài vi khuẩn kiểm định *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi* với đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt là 10,89±1,04 mm và 5,95±1,10 mm

đồng thời có khả năng sinh tổng hợp 3 loại enzyme protease, lipase và amylase với đường kính vòng phân giải lần lượt là 11,12±1,22 mm; 7,39±0,85 mm và 4,08±0,32 mm tương ứng.

Theo Chumpoll và đồng tác giả (2017) khi tiến hành nghiên cứu khả năng kháng khuẩn và khả năng sinh enzyme của các chủng VKTQH phân lập từ ao nuôi tôm ở một số tỉnh Thái Lan. Trong thí nghiệm này nhóm nghiên cứu cũng tiến hành ly tâm, cô đặc dịch VKTQH bằng đông khô, kết quả cho thấy chủng VKTQH TKW17 có khả nă ức chế *V. parahaemolyticus* với đường kính vòng kháng khuẩn lớn nhất là 13,21 mm và và *V. harveyi* với đường kính 17,13 mm. Đồng thời, chủng TKW17 cũng có khả năng sing tổng hợp enzyme gelatinase với đường kính phân giải cơ chất 9,93mm (Chumpol *et a*l., 2017).

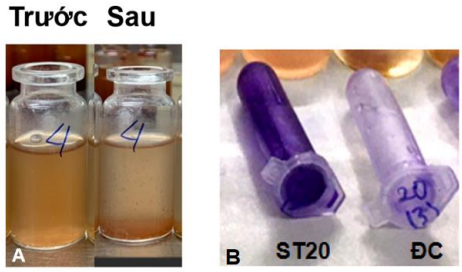
Natchapat và đồng tác giả (2018) cũng đã tuyển chọn được chủng *R. sulfidophilum* PS342 có tiềm năng ứng dụng làm chế phẩm sinh học trong nuôi tôm bởi chủng PS342 vừa có khả năng sinh tổng hợp enzyme gelatinase và vừa có khả năng đối kháng với 3 loài vi khuẩn *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* và *V. vulnificus* (Natchapat *et al*., 2018).

Kết quả tự kết dính và tạo màng biofilm của chủng VKTQH ST20

Đỗ Thị Bích Thủy và Nguyễn Thị Diễm Hương (2018) đã tiến hành xác định khả năng bám dính của các chủng vi khuẩn sử dụng làm probiotic với 2 hoặc 3 tiêu chí: tự kết dính, đồng kết dính và bám dính với đường ruột của vật chủ (Đỗ Thị Bích Thủy, Nguyễn Thị Diễm Hương, 2018). Tuy nhiên, gần đây cũng có một số tác giả đã sử dụng biofilm để xác định khả năng bám dính của các chủng vi sinh vật (Bùi Thị Việt Hà, 2021). Do vậy, trong thí nghiệm này, chúng tôi tiến hành xác định khả bám dính của chủng VKTQH ST20 dựa vào 2 tiêu chí: tự kết dính và tạo màng biofilm.

Khi các tế bào vi khuẩn tự kết dính lại với nhau sẽ tạo thành những hạt có kích thước lớn hơn và lắng xuống trong dung dịch. Vì vậy, theo theo thời gian, mật độ tế bào của dịch vi khuẩn giảm đi và mức độ giảm này phản ánh tỷ lệ đã kết dính.

Để đánh giá khả năng tạo màng biofilm của chủng VKTQH ST20, tiến hành theo phương pháp nhuộm tím tinh thể giúp phát hiện ra các tế bào bám dính trong một màng sinh học trên bề mặt giá thể đồng thời cũng cho phép định lượng mức độ hình thành màng sinh học mạnh hay yếu trong một khoảng thời gian nhất định. Chỉ số OD_{570} đo lượng tím tinh thể bắt màu với tế bào và biểu thị mật độ tế bào sống trong màng sinh học. Do vậy chỉ số OD_{570} càng cao chứng tỏ mật độ vi khuẩn trong màng sinh học càng nhiều và ngược lại. Kết quả khả năng tự kết dính cuả chủng VKTQH ST20 được mô tả ở hình 3A và tạo màng biofim được mô tả ở hình 3B.



Hình 3. Khả năng tự kết dính (A) và tạo màng biofilm (B) của chủng VKTQH ST20

Từ hình 3A cho thấy chủng ST20 có khả năng tự kết dính với % kết dính là 40,60% (ΔOD_{660} sau 5h đạt 0,297±0,013). Từ hình 3B cho thấy màu sắc tím kết tinh xuất hiện trên thành ống của chủng ST20 đậm màu. Do vậy chủng ST20 có khả năng tạo màng biofilm cao với giá trị ΔOD_{570} nm đạt 7,674 ± 0,017.

Nguyễn Thị Minh Nguyệt và cộng sự (2020) đã sàng lọc 3 chủng VKTQH ký hiệu là DQ41, PY6, PY9 có khả năng tạo màng sinh học cao nhất với giá trị OD_{570} = 7. So sánh với kết quả nghiên cứu của chúng tôi, khả năng tạo màng biofilm của chủng ST20 có giá trị OD_{570} =7,674 nm, tương đồng với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh Nguyệt và đồng tác giả (2020).

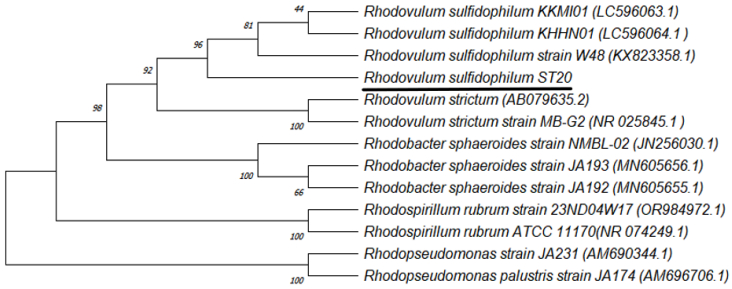
Kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự gene 16S rRNA

DNA tổng số của chủng ST20 sau khi được tách chiết bằng bộ kit Gen JET (Thermo) được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%. Kết qủa thu được băng DNA sắc nét. Sau đó, Gen 16s rRNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu do Devereus thiết kế và sản phẩm PCR thu được có kích thước khoảng 1,5 kb phù hợp với dự đoán. Tiến hành giải trình tự gene 16S rRNA và thu được trình tự nucleotide của chủng ST20 (Hình 4).

TGCCGCGTGAGCGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCAGTCGTGAAGATAATGACGGTAGCGACAGA
AGAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTTGTTCGGAATTACTGGG
CGTAAAGCGCGCGTAGGCGGACTATTAAGTCGGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAACTGCCTCCGAT
ACTGGTAGTCTAGAGTTCGAGAGAGGTGAGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGG
AACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCCAGTCGTCGGCAAGCATGCTTGTCGGTGACACAC
CTAACGGATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGC
ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAACCCTTGACATCCTGATCGCG
GTTACCCGAGAGGGTTTCCTTCAGTTCGGCTGGATCAGTGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTC
GTGAGATGTTCGGTTAAGTCCGGCAACGAGCGCAACCCACACTCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCT
AAGAGAACTGCCGATGATAAGTCGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGTTGGGC
TACACACGTGCTACAATGGCAGTGACAATGGGTTAATCCCAAAAAACTGTCTCAGTTCGGATTGTTCTCTGCA
ACTCGAGAGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGTAACAGCATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
GTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTGGGTTTACCCGAAGACGGTGCGCCAACCCTTA

Hình 4. Trình tự gene 16S rRNA của chủng VKTQH ST20

Gene 16S rRNA của chủng ST20 được so sánh với một số loài đã công bố trên GenBank và xây dựng cây phát sinh chủng loại bằng phần mềm MEGA 11 (Hình 5). Kết so sánh với các trình tự gen trên ngân hàng gen Bank và cây phát sinh chủng loại hình 5, chủng ST20 nằm cùng nhánh với các loài thuộc chi *Rhodovulum* và có độ tương đồng 100% so với loài *Rhodovulum sulfidophilum* có mã số trên GenBank là KX823358.1 và LC596063. Như vậy, chủng VKTQH ST20 có thể thuộc loài *Rhodovulum sulfidophilum* và được đặt tên là *Rhodovulum sulfidophilum* ST20.



Hình 5. Cây phát sinh chủng loại của một số loài VKTQH

KẾT LUẬN

Chủng VKTQH ST20 có khả năng đối kháng với vi khuẩn kiểm định *V. parahaemolyticus* và *V. harveyi* với đường kính vòng kháng khuẩn lần lượt đạt 10,89±1,04 mm và 5,95±1,10 mm đồng thời có khả năng sinh 3 loại enzyme protease, lipase và amylase với đường kính vòng phân giải: 11,12±1,22 mm; 7,39±0,85 mm và 4,08±0,32 mm tương ứng. Ngoài ra, chủng ST20 có khả năng tự kết dính với % kết dính là 40,60% và tạo màng biofilm với ΔOD_{570} nm =7,674±0,017.

Bằng phương pháp xác định trình tự gen 16S rRNA cho thấy chủng ST20 có độ tương đồng 100% so với loài *Rhodovulum sulfidophilum.* Do vậy, chủng VKTQH ST20 có thể thuộc loài *Rhodovulum sulfidophilum* và được đặt tên là *Rhodovulum sulfidophilum* ST20.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu này được thực hiện bằng kinh phí của Đề tài "Nghiên cứu phát triển chế phẩm sinh học từ các chủng vi khuẩn tía quang hợp bản địa để cải thiện chất lượng nước, bổ sung dinh dưỡng và phòng bệnh hoại tử gan tuỵ cấp trong ao nuôi tôm thẻ chân trắng (Penaeus vannamei)", mã số: ĐTĐL.CN-101/21.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bùi Thị Việt Hà (2021). Nghiên cứu công nghệ sản xuất một số chế phẩm probiotic từ một số loài *Lactobacillus* sp. và *Bacillus* sp. *Báo cáo tổng kết đề tài*, *Bộ Công Thương*.

Chatterjee S, Haldar S (2013). *Vibrio* related diseases in aquaculture and development of rapid and accurate identification methods. *Journal of Marine Science, Research & Development 3*: 1–7.

Chumpol S, Kantachot D, Rattanachuay P, Vuddhakul V, Nitoda T, Kanzaki H (2017). In vitro and in vivo selection of probiotic purple nonsulphur bacteria with an ability to inhibit shrimp pathogens: acute hepatopancreatic necrosis disease-causing. *Aquaculture*, 473: 327–336.

Đỗ Thị Bích Thủy, Nguyễn Thị Diễm Hương (2018). Xác định khả năng chịu mặn và một số tính chất có tiềm năng probiotic của các chủng vi khuẩn lactic thuộc loài lactobacillus fermentum phân lập từ ruột cá nục (decapterus lajang). *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế* 2.2: 799–806.

Koga A, Goto M, Hayashi S, Yamamoto S, Miyasaka H (2022). Probiotic Effects of a Marine Purple Non-Sulfur Bacterium, *Rhodovulum sulfidophilum* KKMI01, on Kuruma Shrimp. *Marsupenaeus japonicus Microorganisms,*10: 244.

Kumar A (2012). *Studies on purple non sulfur bacteria from shrimp ponds and their potential applications. PhD thesis*.

Miyasaka, H, koga A, Maki (2023). Recent progress in the use of purple non-sulfur bacteria as probiotics in aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol, 39:*145.

Nguyễn Thị Minh Nguyệt, Hoàng Phương Hà, Đồng Văn Quyền, Nguyễn Ngọc Hương Trà, Lê Thị Nhi Công (2020). Đánh giá khả năng phân hủy naphthalene và pyrene của một số chủng vi khuẩn tía quang hợp tạo màng sinh học. *Tạp Chí Công Nghệ Sinh Học* 18(3): 561–570.

Seangtumnor N, Kantachote D, Nookongbut P, Sukhoom A (2018). The potential of selected purple nonsulfur bacteria with ability to produce proteolytic enzymes and antivibrio compounds for using in shrimp cultivation. Biocatal agric biotechnol,14: 138–144.

Trịnh Thị Phương Thảo, Lê Thị Kim Thoa, Bùi Thị Khuyên, Nguyễn Thị Minh Nga, Trương Thị Phương Lan, Vũ Đức Hoàng, Nguyễn Đức Huy (2022). Khả năng kháng *Vibrio* spp. và đặc tính probiotic của *Lactobacillus farciminis* HN12. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Kỹ thuật và Công nghệ*, 131: 89–102.

PURPLE NONSULFUR BACTERIUM *RHODOVULUM SULFIDOPHILUM* ST20 HAS THE POTENTIAL OF USING AS PROBIOTIC IN FAFCIFIC WHITE SHRIMP *(LITOPENAEUS VANNAMEI)*

Tran Thu Ha[1,2*], Pham Thanh Trang[1], Dinh Thi Thu Hang[2], Nguyen Thi Thu Huyen[3], Hoang Thi Yen[1]

[1]*Institute of Biotechnology - Vietnam Academy of Science and Technology*

[2]*Graduate University of Sciences and Technology - Vietnam Academy of Science and Technology*

[3]*TNU – University of Sciences*

SUMMARY

Purple nonsulfur bacteria (PNSB) has many biotechnological applications, such as using raw material for extracting valuable biological compounds (ubiquinol, carotenoids, unsaturated fatty acids...), food for cattle, poultry and aquaculture, treatment various of wastewater sources... In addition, nowadays PNSB have been screened and selected for using as probiotic in aquaculture. In this study the results of the strain PNSB ST20 that has potential of using as a probiotic in facific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was shown. ST20 strain can inhibit not only both *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi*, which causes acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) with an inhibition zone diameter of 10.89±1.04 mm and 5.95±1.10 mm but also capable of producing 3 enzymes protease, lipase and amylase with clear zones diameters of 11.12±1.22 mm; 7.39±0.85 mm and 4.08±0.32 mm, respectively. More over strain ST20 has autoaggregation activity (40.60%) and creates biofilm (ΔOD_{570} nm =7.674±0.017). Using the 16S rRNA gene sequencing, strain ST20 may belong to the species *Rhodovulum sulfidophilum* and was named *Rhodovulum sulfidophilum* ST20.

Keywords: Enzyme, *Rhodovulum sulfidophilum, Purple nonsulfur bacteria,* probiotic, *V. parahaemolyticus, V. harveyi.*

[*] Author for correspondence: Tel: +84-912543265; Email: hoangyen.ibt@gmail.com

ĐẶC TÍNH SINH HỌC VÀ SINH HỌC PHÂN TỬ CỦA VIRUS VIÊM PHẾ QUẢN TRUYỀN NHIỄM GÂY BỆNH TRÊN GÀ TẠI MIỀN BẮC VIỆT NAM NĂM 2021

Nguyễn Thị Khuê[1,2], Đỗ Thị Roan[1,2], Phạm Văn Tiềm[3], Đoàn Thị Thanh Hương[1,2*]

[1]Viện Công nghệ sinh học (IBT)

[2]Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam (GUST), Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST)

[3]Vụ Khoa học và Công nghệ các ngành kinh tế - kỹ thuật, Bộ Khoa học và Công nghệ (MOST)

TÓM TẮT

Hai chủng virus viêm phế quản truyền nhiễm phân lập năm 2021 tại Hưng Yên (ký hiệu IBHYM) và tại Hà Nội (ký hiệu IBHM) được đánh giá một số đặc tính sinh học và đặc tính sinh học phân tử. Kết quả nghiên cứu cho thấy hai chủng virus IBV đều có khả năng thích ứng và nhân lên trên phôi gà 10 ngày tuổi, thời gian gây chết phôi nằm trong khoảng 48 – 72 giờ sau gây nhiễm, cho giá trị EID_{50}/ml trung bình là $10^{5,4}$ với chủng IBHYM và $10^{5,7}$ với chủng IBHM. Toàn bộ gen kháng nguyên S (Spike) của hai chủng đã được thu nhận gồm 3.504 nucleotide mã hóa 1168 amino acid. Phân tích phả hệ dựa trên trình tự nucleotide của 40 chủng IBV cho thấy hai chủng IBHYM và IBHM thuộc nhóm genotype QX-like. Các chủng IBV QX-like có mối quan hệ gần gũi với các chủng nhóm HN08-type, LDT3-type và 4/91-type. Tính toán khoảng cách di truyền (KCDT) cho thấy giá trị KCDT của các chủng trong cùng nhóm QX-like có tỷ lệ có tỷ lệ sai khác từ 0,04% - 0,05%, KCDT giữa nhóm genotype QX-like với các nhóm khác có tỷ lệ sai khác khá cao 0,15% - 0,37%.

Từ khóa: Liều gây nhiễm 50% phôi (EID_{50}), gen S, phả hệ, viêm phế quản truyền nhiễm (IBV).

MỞ ĐẦU

Viêm phế quản truyền nhiễm (IB - *Infectious Bronchitis*) là một bệnh truyền nhiễm cấp tính ở gà do virus IBV (*Infectious bronchitis virus*) thuộc nhóm *Gammacoronavirus* thuộc họ *Coronaviridae* bộ *Nodovirales* gây ra. Bệnh IB được phát hiện lần đầu tiên ở miền Bắc bang Dakota nước Mỹ vào năm 1931, sau đó virus gây bệnh đã được phân lập và đặt tên là virus viêm phế quản truyền nhiễm (IBV) (Schalk, Hawn, 1931). Bệnh IB dễ lây lan qua tiếp xúc với những triệu chứng đặc trưng ở đường hô hấp như: ho, hắt hơi và có tiếng ran khí quản. Ngoài ra, bệnh có thể gây ảnh hưởng đến thận, gây viêm thận cấp hoặc mạn tính, gây chảy nước mũi ở gà con và tổn thương ống dẫn trứng, làm giảm năng suất và chất lượng trứng ở đàn gà đẻ (Cavanagh and Britton, 2008). Ngoài việc giảm sản lượng trứng, chất lượng trứng cũng bị giảm mạnh ở những đàn gà nhiễm bệnh do đó ảnh hưởng đến tỷ lệ nở (Cavanagh and Naqi, 2003). Đây là bệnh gây thiệt hại kinh tế rất lớn, bệnh xảy ra quanh năm và trên mọi lứa tuổi ở gà, bệnh xảy ra nghiêm trọng nhất ở gà dưới 6 tuần tuổi và gây thiệt hại nghiêm trọng cho gà nuôi lấy trứng giống và trứng thương phẩm.

Cho đến nay, bệnh IB đã lưu hành ở khắp các quốc gia, gây tổn thất nặng nề về kinh tế. Virus gây bệnh có khả năng biến chủng rất cao với nhiều các kháng nguyên đa dạng (Cavanagh, 2007). Ngoài genotype Massachusetts (Mass), đến nay đã có thêm nhiều sero/genotype mới được công bố trên khắp thế giới như Brazil, Mỹ, Úc, châu Âu, châu Phi, châu Á (Trung Quốc, Đài Loan, Ấn Độ, Nhật bản, Hàn Quốc, Thái Lan) (De Wit *et al*., 2017; Cook *et al.*, 2012; Ghetas, 2021).

Hệ gen IBV có dạng RNA sợi đơn dương (+ssRNA), kích thước khoảng 27,5 kb đến 28 kb, gồm bốn loại protein cấu trúc: protein gai (Spike, S) gồm hai tiểu phần gen là S1 và S2; protein màng (Membrane, M); protein nhân (Nucleocapsid, N) và protein vỏ (Envelope, E). Hệ gen của IBV thường xuyên biến đổi, đặc biệt trên vùng gen S có nhiều vùng siêu biến đổi (HVR) (Wickramasinghe *et al*, 2014). Những biến đổi này liên quan và quyết định tính gây bệnh của virus, đến tiến hóa phân tử, phân nhóm kháng nguyên và phân nhóm di truyền (Cavanagh, 2007; Valastro *et al*., 2016; To *et al*., 2017).

Giống như các virus ARN khác, những thay đổi tính kháng nguyên của virus IBV thường liên quan đến sự thay đổi về trình tự nucleotide và amino acid của hệ gen, dẫn đến việc tạo ra các kiểu gen khác nhau (Jackwood *et al*., 2012). Một số nước đã tiến hành đánh giá sự bảo hộ của vaccine thương mại và cho thấy các chủng virus vaccine không tương đồng với chủng virus phân lập từ thực địa (Võ Thị Trà An *et al*, 2014; Lin and Chen, 2017). Như vậy, những thay đổi trong hệ gen của virus, đặc biệt là ở các gen kháng nguyên dẫn đến biến đổi amino acid của epitope kháng nguyên không tương thích với kháng thể do vaccine có xuất xứ từ các chủng virus cũ tạo nên. Đây chính là nguyên nhân dẫn tới việc dù gà đã được tiêm phòng vaccine nhưng vẫn nhiễm bệnh. Tình trạng

này không chỉ xảy ra ở cả Việt Nam mà còn xảy ra ở rất nhiều quốc gia trên thế giới (Võ Thị Trà An *et al,* 2014; Lin and Chen, 2017).

Trong nghiên cứu này, chủng virus viêm phế quản truyền nhiễm IBHYM phân lập tại Hưng Yên và IBHM phân lập tại Hà Nội năm 2021 đã được đánh giá một số đặc tính sinh học cũng như sinh học phân tử. Kết quả thu được là cơ sở cho việc bảo tồn nguồn gen tiềm năng phục vụ công tác nghiên cứu và sản xuất vaccine phòng bệnh cho gà tại Việt Nam.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu mẫu virus viêm phế quản truyền nhiễm

Mẫu bệnh phẩm là hỗn dịch phủ tạng (phổi, thận, ống dẫn trứng) thu nhận tại trang trại gà ở Hưng Yên năm 2021 (ký hiệu IBHYM) và Hà Nội (ký hiệu IBHM). Mẫu bệnh phẩm trước tiên được chẩn đoán dương tính IBV bằng phương pháp PCR bằng cặp mồi thiết kế trên vùng gen N đây được coi là cặp mồi chẩn đoán virus IBV đã được công bố trước đây (Feng *et al*., 2012; Do Thi Roan *et al*., 2023).

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp xác định khả năng thích ứng và ổn định của chủng virus IBV nghiên cứu trên phôi gà

Để kiểm tra về khả năng thích ứng và phát triển ổn định trên phôi gà, huyễn dịch virus chủng IBHYM và IBHM được tiêm vào xoang niệu mô của trứng gà sạch có phôi 10-11 ngày tuổi, kèm với lô đối chứng tiêm bằng PBS 1X. Phôi gà sau khi gây nhiễm được tiếp tục ấp trong tủ ấm 37^{0}C, theo dõi trong năm ngày, quan sát bệnh tích phôi và thu nước trứng xoang niệu mô đối với những phôi có bệnh tích đặc trưng để đánh giá kết quả.

Phương pháp xác định chỉ số EID_{50} (liều gây nhiễm 50% phôi) của chủng virus IBHYM và IBHM

Phương pháp xác định chỉ số EID_{50} được tiến hành gồm các bước như sau: Huyễn dịch virus hai chủng IBV phân lập năm 2021 được pha loãng theo cơ số 10 (từ 10^{-1} đến 10^{-10}) trong nước sinh lý 0,9%. Mỗi độ pha loãng tiêm cho 5 phôi, mỗi phôi tiêm 0,2 ml, thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Sau khi tiêm, theo dõi phôi ở các thời điểm từ 1 – 5 ngày. Sau 5 ngày theo dõi, trứng được mổ và kiểm tra bệnh tích đặc trưng của phôi trứng do virus IB gây ra (phôi chậm phát triển, cuộn tròn cùng với chứng suy nhược các bắp cơ và lắng urate trong thận, nước xoang niệu mô trong), từ đó tính liều gây nhiễm của virus cho 50% phôi trứng (EID_{50}) theo công thức Spearman-Karber (1938).

Phương pháp tách ARN tổng số

Do virus viêm phế quản truyền nhiệm (IBV) có hệ gen là RNA nên hệ gen của virus được tách chiết bằng bộ sinh phẩm tách chiết RNA tổng số QIAamp Viral Mini Kit (Qiagen, Đức), các bước thực hiện theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất và bảo quản ở -80^{o}C cho đến khi sử dụng.

Phương pháp chuyển đổi cDNA

DNA bổ sung (cDNA) được tổng hợp theo phương pháp chuyển đổi từ RNA hệ gen của virus bằng mồi xác suất (hexamer primers), sử dụng bộ kit chuyển đổi của hãng Thermo, Mỹ theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Thành phần phản ứng với tổng dung tích 20 µl gồm có: 2 µl (100 ng/µl) RNA tổng số; 1 µl (100 pmol/µl) mồi hexamer; 2 µl dNTP mix (10 mM); 4 µl 5X Reaction buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl2, 50 mM DTT); 2 µl M-MuLV Reverse Transcriptase (20 U/µL) và 1 µl RiboLock Rnase Inhibitor (20 U/µl), nước (nuclease free) cho vừa đủ 20 µl; Phản ứng chuyển đổi được thực hiện: 25^{o}C/5 phút, 37^{o}C/60 phút và kết thúc ở 70^{o}C/5 phút. Sản phẩm cDNA được bảo quản ở điều kiện -20^{o}C cho đến khi sử dụng để thực hiện phản ứng PCR.

Thiết kế mồi và thực hiện PCR

Các cặp mồi được sử dụng để khuếch đại gen S được thiết kế dựa vào các trình tự nucleotide công bố trên Ngân hàng gen, nhằm mục đích xác định đặc điểm phân tử và nhóm di truyền của các chủng IBV đang lưu hành. Phản ứng PCR được thực hiện với khuôn cDNA và chu trình nhiệt gồm các bước: 94^{o}C/5 phút trong 1 phút; tiếp theo là 35 chu kỳ ở 94^{o}C/1 phút, 46^{o}C/1 phút và 72^{o}C/3 phút; chu kỳ cuối kéo dài 10 phút ở 72^{o}C. Sản phẩm PCR được tinh sạch bằng QIAquick PCR Purification Kit và giải trình tự trực tiếp bằng phương pháp Sanger.

Phương pháp xử lý số liệu

Chuỗi nucleotitide được xử lý bằng chương trình Seqed1.3, so sánh bằng chương trình AssemblyLIGN1.9 và MacVecter8.2 (Accelrys Inc.) trên máy tính Mactintosh. Việc giám định chuỗi được thực hiện bằng cách truy cập vào Ngân hàng gen sử dụng chương trình BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) để xem xét thu nhận các chuỗi tương ứng cùng và khác loài/chi/họ để so sánh đối chiếu.

Các trình tự tương ứng với vùng gen S đăng ký tại Ngân hàng gen được sử dụng để so sánh đối chiếu với chuỗi gen nghiên cứu, sử dụng chqơng trình GENEDOC2.7 (http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/; Nicholas KB., 2014).

Phân tích phả hệ nguồn gốc bằng chương trình MEGA11 (https://www.megasoftware.net/; Tamura *et al.,* 2021) sử dụng phương pháp "*tiếp cận cực đại*" (ML, maximum-likelihood), thuật toán Jones-Taylor-Thornton (JTT) và Nearest-Neighbor-Interchange (NNI) với hệ số tin cậy 1000 bootstrap.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả xác định khả năng thích ứng và ổn định của chủng IBHYM và IBHM trên phôi gà

Hai chủng IBHYM và IBHM được đã tiến hành gây nhiễm trên phôi trứng gà sạch 10 ngày tuổi. Mỗi chủng virus được pha loãng bằng dung dịch PBS 1X về nồng độ 10^{-2}, tiến hành gây nhiễm vào xoang niệu nang của 10 trứng gà sạch có phôi, mỗi quả tiêm 0,2 ml, mỗi thí nghiệm lặp lại 3 lần. Hàn kín lỗ tiêm bằng keo nến, ấp tiếp ở tủ ấp 37^0C và theo dõi trong 120 giờ sau tiêm. Lô đối chứng được tiêm dung dịch PBS 1X. Hàng ngày theo dõi tỷ lệ sống chết của phôi.

Kết quả cho thấy sau 120 giờ theo dõi, cả hai chủng virus cường độc IBHYM và IBHM đều thích ứng và nhân lên trên phôi gà 10 ngày tuổi. Tính thích ứng thể hiện ở sự nhân lên của virus trong phôi gà và thời gian gây chết phôi tập trung chủ yếu trong khoảng từ 48 – 72 giờ sau gây nhiễm. Sau thời gian này phôi không chết hoặc chết rất ít. Phôi chết có biểu hiện đặc trưng của IBV: xung huyết, còi cọc, chân co quắp, màng nhung niệu bám chắt lấy thai (OIE, 2018), kích thước phôi gà của các lô thí nghiệm đều nhỏ hơn ½ so với lô đối chứng. Kết quả trên cho thấy hai chủng cường độc phân lập năm 2021 tại Hưng Yên (IBHYM) và Hà Nội (IBHM) có tính thích ứng cao và gây chết trên phôi gà 10 ngày tuổi.

Kết quả kiểm tra xác định chỉ số EID_{50} của virus IBV cường độc

Hai chủng virus IBHYM và IBHM được gây nhiễm liên tục 10 đời trên phôi gà 10 ngày tuổi. Virus thu được ở đời tiếp truyền thứ mười được sử dụng để đánh giá hiệu giá virus EID_{50}, thí nghiệm được lặp lại ba lần. Kết quả đánh giá cho thấy chỉ số EID_{50} của hai chủng virus nghiên cứu dao động từ $10^{5,2}$ – $10^{5,7}EID_{50}$/ml. Cụ thể, hiệu giá virus của chủng IBHYM đạt từ $10^{5,2}$ – $10^{5,6}EID_{50}$/ml, trung bình đạt $10^{5,4}EID_{50}$/ml; hiệu giá virus của chủng IBHM đạt từ $10^{5,6}$ – $10^{5,8}EID_{50}$/ml; trung bình đạt $10^{5,7}EID_{50}$/ml (Bảng 1). Theo tiêu chuẩn quy định, hiệu giá EID_{50} mỗi liều vaccine phải đạt hiệu giá ít nhất là 10^2 EID_{50}. Như vậy kết quả đánh giá chỉ số EID_{50} của hai chủng IBHYM và IBHM cho thấy là các chủng có tiềm năng để có thể tiếp tục nghiên cứu phát triển tạo vaccine trong tương lai (OIE, 2018; TCVN, 2018).

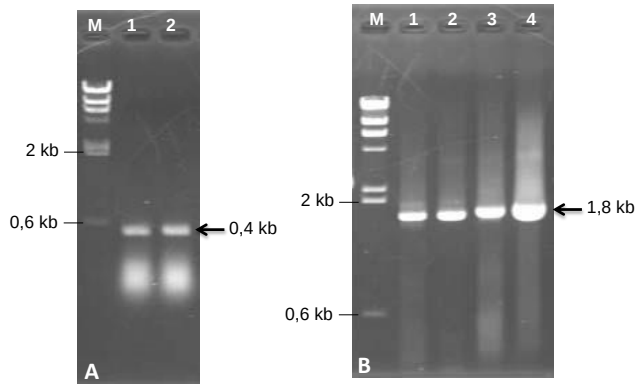
Bảng 1. Kết quả kiểm tra hiệu giá virus của ba chủng IBV nghiên cứu

Chủng thí nghiệm	Độ pha loãng virus	Hiệu giá EID_{50}/ml			Hiệu giá EID_{50}/ml trung bình
		Lần TN 1	Lần TN 2	Lần TN 3	
IBHYM	10^{-1} – 10^{-10}	$10^{5,5}$	$10^{5,2}$	$10^{5,6}$	$10^{5,4}$
IBHM	10^{-1} – 10^{-10}	$10^{5,6}$	$10^{5,8}$	$10^{5,7}$	$10^{5,7}$

Kết quả phân tích gen S của chủng IBVP7 cường độc

Đầu tiên, khuôn cDNA được sử dụng để thực hiện PCR với cặp mồi chẩn đoán (Feng *et al*., 2012; Do Thi Roan *et al.*, 2023). Kết quả đã thu được sản phẩm PCR kích thước khoảng 0,4 kb đúng như dự kiến, cho thấy dịch niệu nang sau gây nhiễm chứa virus IBV (Hình 3.1A).

Tiếp theo, tiến hành thực hiện các phản ứng PCR với các cặp mồi thu nhận từng phân đoạn gen, mỗi phân đoạn gen có kích thước khoảng 1,8 kb nhằm mục đích thu được toàn bộ gen S có kích thước khoảng 3,6 kb. Kết quả cho thấy đã khuếch đại thành công các phân đoạn gen của vùng gen S với chất lượng tốt (Hình 3.1B).



Hình 3.1. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR của chủng IBHYM và IBHM

Ghi chú: Giếng M: Thang DNA chuẩn (DNA của thực khuẩn thể λ được cắt bằng enzyme HindIII); Hình 3.1A: Sản phẩm PCR nhân đoạn gen N (kích thước khoảng 0,4 kb) để chẩn đoán IBV: Giếng 1: Chủng IBHYM; Giếng 2: Chủng IBHM. Hình 3.1B: Sản phẩm PCR nhân gen S: Giếng 1: Sản phẩm PCR chủng IBHYM sử dụng cặp mồi F2038-R22210 (kích thước khoảng 1,8 kb); Giếng 2: Sản phẩm PCR chủng IBHYM sử dụng cặp mồi F22057-R23890 (kích thước khoảng 1,8 kb); Giếng 3: Sản phẩm PCR chủng IBHM sử dụng cặp mồi F2038-R22210 (kích thước khoảng 1,8 kb); Giếng 4: Sản phẩm PCR chủng IBHM sử dụng cặp mồi F22057-R23890 (kích thước khoảng 1,8 kb).

Sản phẩm PCR được tinh sạch và giả trình tự trực tiếp bằng phương pháp Sanger. Kết quả đã thu nhận được toàn bộ gen S của hai chủng IBHYM và IBHM gồm 3504 nucleotide. Trình tự nucleotide thu nhân được tiến hành Blast trên Ngân hàng gen để kiểm tra, so sánh và tìm kiếm các chuỗi gen đã được đăng ký trong Ngân hàng gen dựa vào mức độ tương ứng về thành phần nucleotide.

Kết quả phân tích phả hệ nguồn gốc dựa trên trình tự gen S

Trình tự 3.504 nucleotide vùng gen S của hai chủng IBV nghiên cứu được phân tích phả hệ nguồn gốc cùng 40 chủng IBV của Việt Nam và thế giới trên Ngân hàng gen đại diện cho các genotype khác nhau (Hình 3.2).

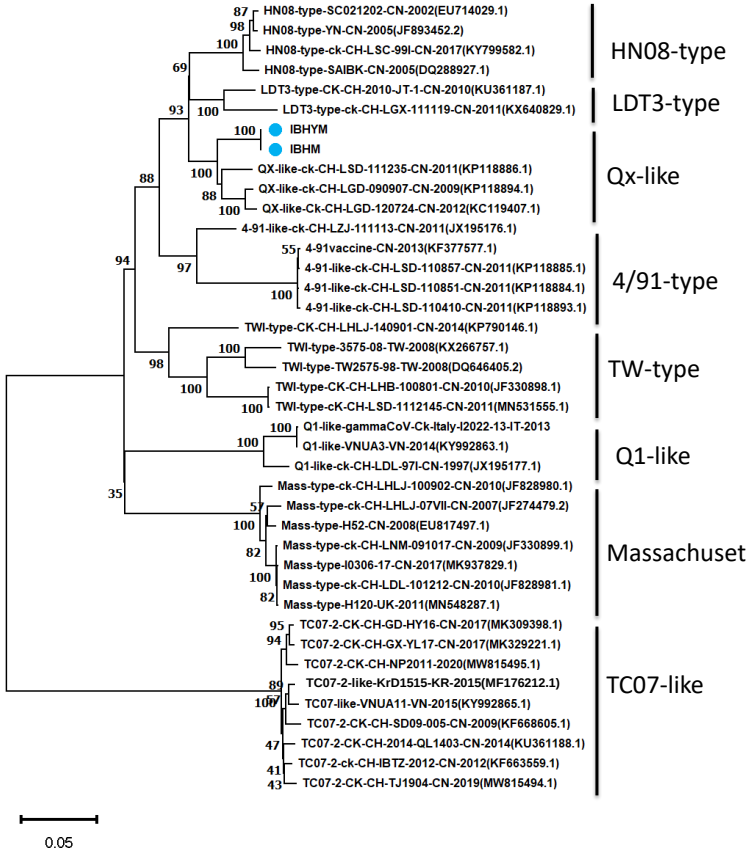
Kết quả phân tích phả hệ nguồn gốc cho thấy hai chủng IBV phân lập tại Hưng Yên và Hà Nội năm 2021 thuộc genotype QX-like với các chủng của Trung Quốc; và gần gũi với các chủng thuộc các nhóm genotype HN08 - type, LDT3 - type và 4/91- type. Đây đều là các chủng có nguồn gốc từ Trung Quốc. Kết quả phân tích này hoàn toàn phù hợp với các báo cáo trước của thế giới, genotype QX-like có độc lực cao, xuất phát từ Trung Quốc và đã lây truyền qua nhiều nước. Theo một số ghi nhận của các bác sĩ thú y, IBV thể thận 4/91 cũng đã được nhắc đến tại Việt Nam với mức độ nghiêm trọng cao.

Nhóm genotype Massachuset gồm các chủng IBV của rất nhiều nước trên thế giới bao gồm chủ yếu là Mỹ, Úc, Ý, Netherlans, Trung Quốc, Ấn Độ và Việt Nam. Đây là genotype được công bố đầu tiên trên thế giới. Chủng vaccine IB-H52 hiện đang sử dụng tại Việt Nam thuộc genotype Massachuset.

Nhóm genotype Taiwwan (TW-type) gồm các chủng của Đài Loan, Trung Quốc.

Genotype Q1-like gồm các chủng của Trung Quốc, Ý và Ba Lan. Theo các công bố trước đây, chủng Q1-like được phân bố ở nhiều nước trên thế giới. Công bố của Nguyễn Thị Loan và cộng sự năm 2017 cũng phát hiện được genotype Q1-like trên mẫu gà bệnh tại huyện Ba Vì, Hà Nội.

Genotype TC07-like lần đầu tiên được phát hiện gần đây tại Trung Quốc (Jang *et al*., 2018). Cho đến nay đây là chủng virus có nhiều đột biến nhất trong hệ gen của IBV. Các chủng IBV thuộc genotype TC07-like đứng tách thành một nhánh riêng độc lập với tất cả các genotype còn lại.



Hình 3.2. Cây phả hệ xác định mối quan hệ phả hệ của virus IBV dựa trên phân tích dữ liệu nucleotide của gen S

Ghi chú: *Biểu tượng (●) để đánh dấu các chủng IBHYM và IBHM của Việt Nam trong nghiên cứu. Đại diện các chủng IBV trên ngân hàng gen thuộc 8 genotype: 4/91-type, HN08-type, LDT3-type, QX-like, TW-type, Q1-like, Massachuset và TC07-like. Trên mỗi chuỗi có tên chủng, tiếp theo là tên quốc gia và số đăng ký Ngân hàng gen ở cuối chuỗi. Vạch ngang ở cuối hình (0.05) biểu thị sai khác nucleotide (5/1000) ở mỗi nhánh.*

Dựa vào giá trị khoảng cách di truyền (KCDT), cho thấy 2 chủng IBHYM và IBHM của Việt Nam có tỷ lệ sai khác thấp từ 0,04% - 0,05% so với 2 chủng của Trung Quốc (QX-like-2009, QX-like-2011) trong cùng nhóm genotype QX-like. Khoảng cách di truyền giữa các chủng QX-like và các chủng thuộc genotype khác dao động từ 0,15% - 0,37%; trong đó gần gũi nhất với các chủng thuộc genotype LDT3-type và HN08-type với khoảng cách di truyền tương ứng từ 0,08% - 0,11% và 0,1%. Điều này chứng tỏ rằng giữa các genotype QX-like, LDT3-type và HN08-type có mối quan hệ gần gũi với nhau. Hai chủng IBV nghiên cứu của Việt nam có tỉ lệ sai khác về trình tự gen S với các chủng Massachuset, Taiwwan và 4/91 - type tương ứng từ 0,15% - 0,21%. Các vaccine phòng IBV hiện nay chủ yếu là các chủng thuộc các genotype này; và một số vaccine QX-like đang bắt đầu được đưa vào sử dụng.

Trong số các chủng IBV, các chủng genotype TC07-like có tỉ lệ sai khác cao nhất với hai chủng của Việt Nam cũng như các chủng IBV thuộc các geotype khác, từ 0,35-0,37%.

Cho đến nay, tại Việt Nam đã có công bố về sự lưu hành của một số chủng IBV, trong đó phổ biến và gây nhiều thiệt hại nhất là các chủng thuộc QX-like. Chính vì vậy việc phân lập, đánh giá đặc điểm sinh học và lựa chọn được chủng QX-like làm chủng tiềm năng để sản xuất vaccine trong tương lai là việc làm vô cùng cần thiết hiện nay.

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy tầm quan trọng của việc tầm soát sự lưu hành của các chủng IBV tại Việt Nam, đặc biệt trong đó cần theo dõi sự xuất hiện của các biến chủng TC07-like khi vẫn chưa có vaccine phòng chủng này.

KẾT LUẬN

Hai chủng virus IBV phân lập tại Việt Nam (IBHYM và IBHM) có đặc tính sinh học ổn định sau 10 đời tiếp truyền trên phôi gà 10 ngày tuổi và có hiệu giá virus cao, EID_{50} trung bình đạt $10^{5,4}$/ml với chủng IBHYM và $10^{5,7}$/ml với chủng IBHM. Nghiên cứu cũng đã thu nhận và giải trình tự được toàn bộ gen kháng nguyên S của hai chủng IBV với kích thước 3504 bp và phân tích phả hệ nguồn gốc. Kết quả phân tích đã xác định hai chủng virus phân lập thành công thuộc genotype QX-like, là các chủng virus đang gây bệnh phổ biến tại Việt Nam. Hai chủng virus IBV sẽ được lưu giữ cho các nghiên cứu tiếp theo trong tương lai để phát triển vaccine tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Cavanagh D (2007). Corona virus avian infectious bronchitis virus, *Veterinary Research*. 38:281-297.

Cavanagh D and Naqi SA (2003). Viral diseases. Infectious bronchitis. *Diseases of poultry*, books.

Cavanagh D, Britton P (2008) Coronaviruses: General Features. In: Mahy BWJ, Regenmortel MHVV (Eds.). *Encycl Virol*. Elsevier. UK:623-623.

Cook JK, Jackwood AM, Jones RC (2012). The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathology.* 41:239-250.

De Wit JJ, Cazaban C, Dijkman R, Ramon G, Gardin Y (2017). Detection of different genotypes of infectious bronchitis virus and of infectious bursal disease vi rút in European broilers during an epidemiological study in 2013 and the consequences for the diagnostic approach. *Avian Pathology.* 47: 140-151.

Do Thi Roan, Nguyen Thi Khue, Luu Minh Duc, Nguyen Thi Thu Hien, Le Thanh Hoa, Le Thi Hue, Le Thi Kim Xuyen, Doan Thi Thanh Huong (2023) Whole genome sequencing analysis of avian infectious bronchitis virus isolated in Hung yen province in 2021.

Feng J, Hu Y, Ma Z, Yu Q, Zhao J, Liu X, Zhang G (2012). Virulent avian infectious bronchitis virus, People's Republic of China. *Emerg Infect Dis* 18(12):1994–2001.

Ghetas AM (2021) Infectious Bronchitis Virus Genotypes in the Middle East. *Avian Dis* 65(4): 647–651.

Lin SY, Chen HW (2017) Infectious bronchitis virus variants: molecular analysis and pathogenicity investigation. *Int J Mol Sci* 18(10):2030.

Jackwood DJ (2012) Molecular epidemiologic evidence of homologous recombination in infectious bursal disease viruses. *Avian Disease* 56(3): 574–577.

Jang IL, Lee HJ, Bae YC, Park SC, Lee HS, Choi KS (2018) Genetic and Pathologic Characterization of a Novel Recombinant TC07-2-Type Avian Infectious Bronchitis Virus. Avian Dis 62 (1): 109-113.

OIE, World Organisation for Animal Health, 2018. Chapter 3.3.2. Avian infectious bronchitis

Schalk A., Hawn M (1931) An apparently new respiratory disease of baby chicks. *Journal of the American Veterinary Medical Association,* 78:413–422.

Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol Biol Evol* 38: 3022–3027.

To J, Surya W, Fung TS, Li Y, Verdià-Bàguena C, Queralt-Martin M, Aguilella VM, Liu DX, Torres J (2017) Channel-Inactivating Mutations and Their Revertant Mutants in the Envelope Protein of Infectious Bronchitis Virus. *J Virol* 91(5): e02158-16.

Valastro V, Holmes EC, Britton P, Fusaro A, Jackwood MW, Cattoli G, Monne I (2016) S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. *Infection Genetics* and *Evolution* 39: 349–364.

Võ Thị Trà An và Nguyễn Thị Kim Yến (2014). So sánh hiệu quả phòng bệnh viêm phế quản truyền nhiễm của 3 quy trình tiêm chủng vacxin trên gà. *Tạp chí Khoa học Kỹ thuật Thú y*. XXI (5). 21-25.

Wickramasinghe I. N., S. J. van Beurden, E. A. Weerts and M. H. Verheije (2014). The avian coronavirus spike protein. *Virus Res*. 194:37-48

BIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND MOLECULAR BIOLOGY OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS ISOLATED IN NORTHERN VIETNAM IN 2021

Nguyễn Thị Khuê[1,2], Đỗ Thị Roan[1,2], Phạm Văn Tiềm[3], Đoàn Thị Thanh Hương[1,2*]

[1]*Institute of Biotechnology (IBT)*

[2]*Graduated University of Science and Technology (GUST), Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)*

[3]*Ministry of Science an Tecnology (MOST)*

SUMMARY

The infectious bronchitis virus strains IBHYM, isolated in Hung Yen, and IBHM, isolated in Hanoi in 2021, have been identified with certain biological and molecular biological characteristics. The research results show that both highly virulent IBV strains are capable of adapting and proliferating on 10-day-old chicken embryos, resulting in the death of the embryos after about 48-72 hours, with the average EID_{50}/ml value of $10^{5.4}$ with strain IBHYM and $10^{5.7}$ with strain IBHM. The entire S (Spike) antigen gene obtained from the two strains is 3,504 nucleotides encoding 1,168 amino acids. Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequences of 40 IBV strains shows that although the two strains, IBHYM and IBHM, are in the same QX-like genotype group, they are more closely related to the HN08-type and LDT3-type genotype groups. The calculation of their genetic distance shows that the genetic distance values of the strains within the QX-like group have a very low divergence rate, around 0.04% - 0.05%, while the genetic distance value between the QX-like genotype group and other groups has a higher divergence rate, specifically 0.15% - 0.37%.

Keywords: 50% Embryo Infective Dose (EID_{50}), gene Spike (S), phylogeny, infectious bronchitis virus (IBV).

[*] Author for correspondence: Tel: +84-988904605; Email: doantthuong74@gmail.com

STUDY ON ANTIBIOTIC RESISTANCE IN POTENTIAL PATHOGENIC BACTERIA ISOLATED FROM NHA TRANG BAY, VIETNAM

Thu Uyen Do[1], Dinh Quang Vu[1], Duc Thinh Bui[1], Tien Dung Nguyen[1], Dang Quang Nguyen[1], Son Hoang Tran[1,2], Kim Hanh Nguyen[3], Trung Du Hoang[3], Thi Thu Hang Le[1], Hoang Nam Pham[1], Anne-Laure Banuls[1,4], Jean-Christophe Auguet[2], Quang Huy Nguyen[1,*]

[1]*MICH, LMI DRISA, University of Science and Technology of Hanoi, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam*

[2]*MARBEC, UMR-UM-CNRS-IRD, Montpellier, France*

[3]*Institute of Oceanography, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam*

[4]*MIVEGEC, UMR-UM-CNRS-IRD, Montpellier, France*

SUMMARY

Antimicrobial resistance (AMR) is recognized as a critical threat to global public health. However, research efforts have predominantly focused on terrestrial systems, with marine habitats receiving comparatively less attention. This study investigates the prevalence and distribution of drug-resistant bacteria in the marine environment of Nha Trang Bay, Vietnam. 53/106 (50%) bacterial species isolated from surface water and sediment samples were identified as potential pathogens to human and animal health. The most prevalent pathogens included *Pseudomonas aeruginosa* (20.6%), *Klebsiella pneumoniae* (15.1%), *Escherichia coli* (13.2%) and *Citrobacter freundii* (7.5%). Antibiotic susceptibility testing revealed that 60.4% (32/53) pathogens were resistant to at least one antibiotic tested, in which 28.3% (15/53) isolates exhibited multidrug-resistant phenotypes. The resistance proportion was highest for Amoxicillin/clavulanic acid (80%), followed by ticarcillin, cefoxitin, nalidixic acid, and cefotaxime. Finally, 9 antibiotics-resistant genes including *sul*1, *sul*2, *tet*A, *tet*Q, *tet*B, *bla*KPC, *bla*VIM, *van*A and *mec*A were detected. These findings highlight Nha Trang Bay as a significant reservoir for emergence and transmission of drug-resistant bacteria in coastal areas, posing substantial risks to food safety, human and animal health.

Keywords: Multidrug resistance, antibiotic-resistant genes, pathogenic bacteria, marine environment, Nha Trang Bay.

INTRODUCTION

Antibiotic-resistant infections currently kill approximately 700,000 people per year around the world and are predicted to cause 10 million deaths per year by 2050. Bacteria represent the pathogens the most often (54,3%) involved in emerging infectious disease events in the last decades, and each year antibiotic-resistant bacteria (ARB) accounted for an estimated 68,000 deaths in the European Union and the United States, along with the economic losses of 55 billion (Avershina *et al,* 2021)**.** In many regions in the world, particularly in low and middle-income countries, the emergence of multidrug-resistant strains is highly concerning. Many bacterial strains even were resistant to the most potent antibiotics.

Most research on antimicrobial resistances (AMRs) has focused on inland systems with comparatively little effort directed toward water habitats. Marine and particularly coastal environments can function as transmission foci for potentially pathogenic bacteria (PPB) because of the concentrated aggregations of bacteria from different sources, both marine and terrestrial, where environmental, human, and/or animal-related bacteria can coexist, at least temporarily (Prestinaci *et al.*, 2015). This mixing and the highly altered condition of coastal marine ecosystems i.e. anthropization, contaminants, pharmaceutical residues etc. can affect species interactions, select ARB, and trigger disease emergencies, both for animals and humans (Grigorakis *et al.,* 2011). The main risk to public health and aquaculture production is assumed to be the development of a reservoir of antibiotic-resistant genes that can be transferable to human or marine livestock pathogens, and thus cause the emergence of pathogens with newly acquired antibiotic-resistant determinants. In addition, aquaculture activities apply antibiotics directly to the water or mix them into foods, promoting the development of antibiotic-resistant bacteria in aquatic animals and the environment (Ashish *et al,* 2022). Thus, the risk of infection with pathogenic antibiotic-resistant bacteria linked to the marine habitat or marine products is therefore a major world health challenge.

Vietnam is recognized as a country heavily affected by AMRs (Mckinn *et al.*, 2021). The main cause is the indiscriminate use of antimicrobials in animal production, accounting for about 70% of the total antimicrobial

consumption (Phu et al., 2022). In addition, Vietnam has become one of the biggest aquaculture producers in the world. Many aquaculture farms in Vietnam are highly connected, which can represent important reservoirs and key dissemination pathways of potential pathogens and ARGs. Nha Trang Bay is heavily impacted by anthropogenic inputs of urban and/or aquaculture origins, which are a good model for studying the AMRs circulated in sea coastal areas of Vietnam. A previous study highlighted the presence of antibiotics such as Tetracycline, Trimethoprim, Rifampicin, Nifuroxazide, and Colistin used in aquaculture operations in the Nha Trang Bay (Hedberg *et al*., 2018). Given the potential for antimicrobial-resistant bacteria and genes to transfer among humans, animals, and the environment, a One Health strategy is crucial. This study investigates the distribution of potential pathogenic antibiotic-resistant bacteria in Nha Trang Bay, Vietnam.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolation and identification

Marine water and sediment samples were collected at 12 sites across three transects including R – Recovery area (R1, R2, R3 and R4); U – Urban area (U1, U2, U3 and U4) and F - Aquaculture Farm area (F1, F2, F3 and F4) from geographical coordinates (between 12°18’97.7’’ N to 12°19’64.0’’ N latitude and 109°31’55.2’’ E to 109°21’82.5’’ E longitude) spanning the entire coastal area of Nha Trang Bay.

At each station, surface water was collected in 500 ml sterile polypropylene bottles, while sediment samples were stored in 50 ml Falcon tubes with screw caps and placed immediately in an ice box. Bacteria were then cultured on selective media (Merck, Germany) including MacConkey Agar, Aeromonas and Marine Agar. Pure isolates were identified at species level using the MALDI Biotyper® Sirius One IVD System (Bruker Daltonics, Germany).

Antibiotic susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility testing was conducted using the Kirby Bauer disc diffusion method on Mueller–Hinton Agar plates, according to the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines. Specifically, for the Enterobacteriaceae strains, six groups of antibiotics including Penicillin (Amoxicillin + clavulanic acid; Ticarcillin; Piperacillin; Amoxicillin; Ticarcillin + Clavulanic acid; Piperacillin + Tazobactam), Cephalosporins (Cefotaxime; Cefoxitin; Cefepime; Ceftazidime), Carbapenems (Ertapenem; Imipenem), Aminoglycosides (Tobramycin; Gentamicin), Fluoroquinolones (Ciprofloxacin; Levofloxacin), and Monobactams (Aztreonam) were selected. For the *Pseudomonas* strains, the groups of antibiotics tested included Cephalosporins (Cefepime), Carbapenems (Imipenem; Meropenem), Aminoglycosides (Gentamicin), Fluoroquinolones (Ciprofloxacin; Levofloxacin), and Monobactams (Aztreonam). For the *Aeromonas* and *Acinetobacter* strains, antibiotic groups were selected including Penicillin (Ticarcillin; Pipe + Tazobactam), Cephalosporin (Ceftazidime; Cefepime), Carbapenem (Imipenem; Meropenem), Aminoglycosides (Tobramycin; Gentamicin), and Fluoroquinolones (Cotrimoxazole; Ciprofloxacin; Levofloxacin).

Multidrug-resistant bacteria and Multiple Antibiotic Resistance index

Multidrug-resistant bacteria were defined as bacteria resistant to more than two classes of antibiotics among all tested antibiotics. The multiple antibiotic resistant index was calculated using the formula below (Reverter *et al.*, 2020).

$$\text{MAR} = \frac{(Number\ of\ antibiotics\ to\ which\ the\ isolate\ was\ resistance\ to\ (a))}{Total\ number\ of\ antibiotics\ tested\ (b)}$$

If the MAR index ≥ 0.2: high risk source of antibiotic contamination

Environmental DNA extraction

Environmental DNA (eDNA) of soil and water samples was extracted using the DNeasy PowerSoil Pro kit (QIAGEN, Germany) according to the manufacturer’s guideline. The eDNA samples were examined using 1% agarose gel electrophoresis and were visualized using Benchtop UV Transilluminators (Analytik Jena, Germany). The purity and quality of eDNA were determined using Nanodrop 2000 spectrophotometers (Thermo Fisher, USA).

Detection of antibiotic resistant genes

For each eDNA sample, 19 AMRs including *sul*1, *sul*2, *tet*A, *tet*Q, *tet*B, *tet*M, *bla*KPC, *bla*OXA-48, *bla*VIM, *bla*NDM, *bla*IMP, *mcr*-1, *qnr*A, *van*A, *mec*A, *erm*B, *quep*A and *rmt*B were screened by PCR as previously described. The PCR amplicons were examined on a 1% agarose gel stained with Red Safe (Intron, Korea) and were visualized under Benchtop UV Transilluminators (Analytik Jena, Germany).

RESULTS AND DISCUSSION

Distribution of potential pathogenic bacteria

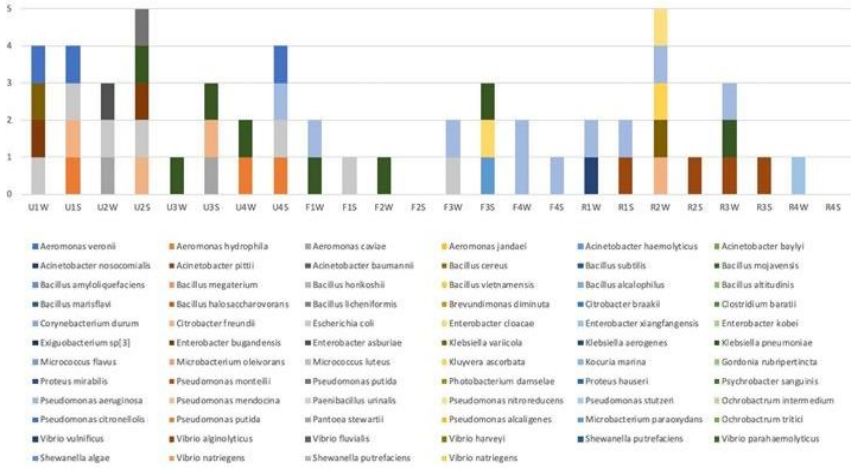


Figure 1. Distribution of potential pathogenic bacteria across different sampling areas

102 out of 156 bacterial isolates were successfully identified using MALDI-TOF MS method, in which 53 isolates were identified as potential pathogenic species (Figure 1). These pathogens were found in all surface water samples, while they were not detected in 2/12 sediment samples. Pathogens were found in high abundance in urban areas (n=26, 49.0%), followed by Recovery areas (n=15, 28.3%) and Farm areas (n=12, 22.7%). The proportion of pathogenic bacteria in water samples was slightly higher than in sediment samples (52.3% and 47.7%, respectively). Overall, the most common potential pathogenic bacteria include *Pseudomonas aeruginosa* (20.6%), *Klebsiella pneumoniae* (15.1%), *Escherichia coli* (13.2%) and *Citrobacter freundii* (7.5%). These pathogens were distributed in the Nha Trang Bay. Notably, no pathogenic species were found to be common between water and sediment samples. Our findings indicate that Nha Trang Bay is contaminated with diverse potential pathogenic bacteria linked to hospital-acquired and community-acquired infections, highlighting the health risks for both humans and animals.

Phenotypic antibiotic-resistant profile of potential pathogenic bacteria

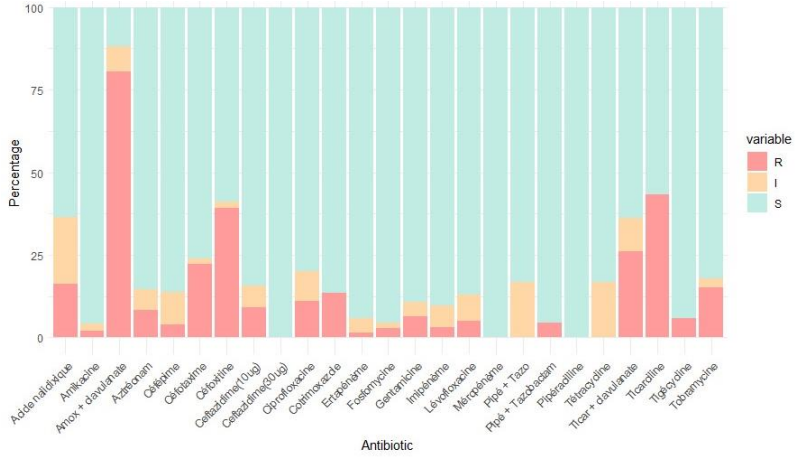


Figure 2. Proportion of antibiotic resistance

Most of the potential pathogenic bacteria were resistant to amoxicillin + clavulanic acid (80%), followed by cefoxitin, ticarcillin, nalidixic acid and cefotaxime (Figure 2). In fact, beta lactams and tetracycline are important antibiotic groups commonly used in medicine as well as in veterinary and in aquaculture as a feed additive and preventive treatment (Sodhi *et al*, 2020). Therefore, the resistance proportion to these antibiotics is very high in both clinical settings and aquacultures. Luckily, these pathogens were completely susceptible to ceftazidime, piperacillin and meropenem (100%), and were highly susceptible to amikacin, ertapenem and tigecycline (>90%). These antibiotics are very potent and the resistance rate is often very low, particularly in the environmental bacteria. This finding underlines the high risk of dissemination of these resistant pathogens in a large scale, particularly in the coastal areas around Nha Trang Bay.

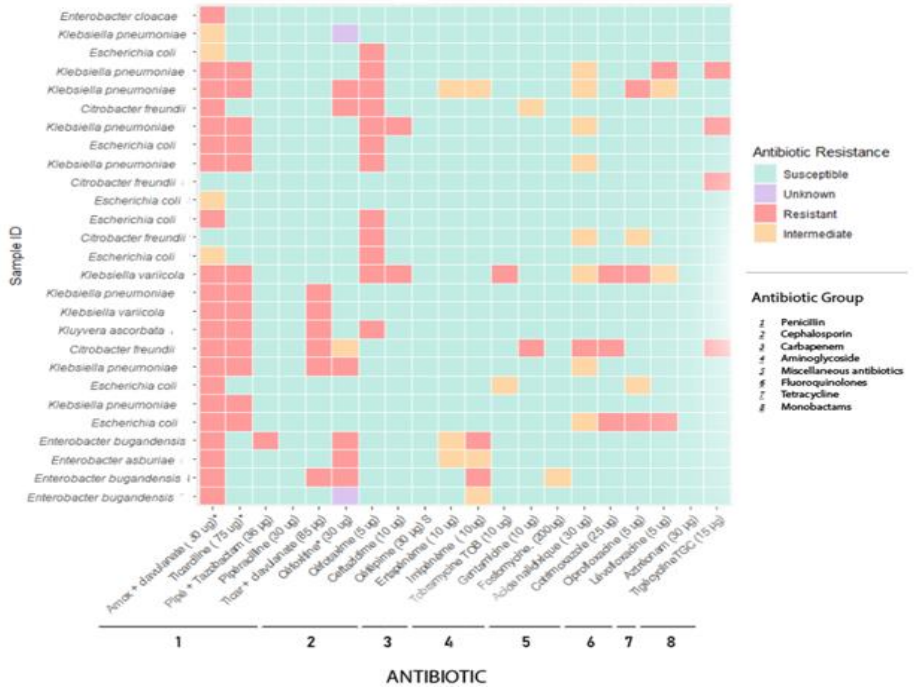


Figure 3. Antibiotic-resistant profile of *Enterobacteriaceae* species

25/27 (92.6%) Enterobacteriaceae bacteria were resistant to at least one antibiotic, while only two *Citrobacter freundii* isolates were completely susceptible to the antibiotics tested (Figure 3). Of the antibiotic-resistant phenotypes, 15 isolates displayed resistance to 3 – 7 antibiotics. The highly resistant bacteria were *Klebsiella variicola* and *Citrobacter freundii* which were resistant to seven antibiotics tested. Overall, the antibiotic-resistant profile of isolates was different within bacterial species suggesting that they acquired antibiotic resistance independently. For non- Enterobacteriaceae bacteria, the proportion of antibiotic resistance was lower than Enterobacteriaceae. These bacterial species including *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter pittii* were highly susceptible to antibiotics tested. Recent studies demonstrated that the occurrence of antibiotic-resistant bacteria is increasing in aquatic environments (Reverter *et al*. 2020, Singh *et al*. 2022). The levels of Nha Trang Bay exposure to antibiotics and their correlation to the evolution and spread of resistant bacteria need to be further investigated.

Distribution of multiple-antibiotic resistant bacteria

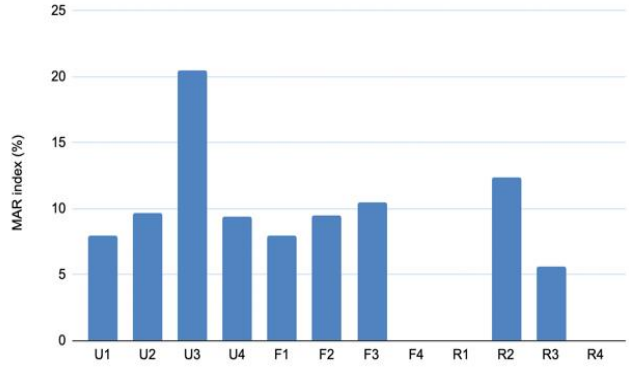


Figure 4. MAR index represented proportion of multiple-antibiotic resistant bacteria distributed in in the Nha Trang Bay

High proportion of multiple-antibiotic resistant bacteria was found in urban and aquaculture farm areas, compared to the recovery area. The Urban transect exhibited the highest MAR bacteria rates, with all four sampling locations exceeding 8%, particularly, an urban station had the MAR index of over 20% (Figure 4), indicating a high density of multidrug resistance bacteria in this area. In the fish farm transects, the MAR index was also high, ranging from 8% to 10.5%, suggesting that the rapid emergence of multidrug-resistant bacteria in these areas under the high antibiotic pressure from aquaculture activities. Finally, multidrug-resistant bacteria were detected in two transects of recovery areas, underlying the transmission dynamic of resistant bacteria beyond the Nha Trang Bay.

Distribution of antibiotic-resistant genes

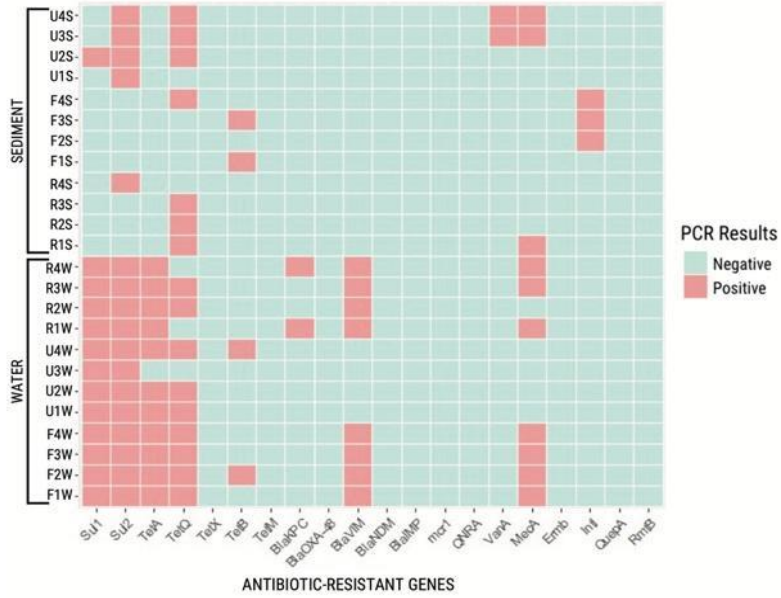


Figure 5. Occurrence of antibiotic-resistance genes in the marine environment of Nha Trang Bay

In this study, 9 antibiotics-resistant genes including *sul*1, *sul*2, *tet*A, *tet*Q, *tet*B, *bla*KPC, *bla*VIM, *van*A and *mec*A were detected in the marine environment of Nha Trang Bay (Figure 5). In concordance with studies in the world, *sul*1, *sul*2, *tet*A and *tet*Q were the most common ARGs in the environment (Singh *et al*. 2022, Xu *et al*. 2022). It is important to note that this region has a high density of aquaculture that is one of the most important sources of antibiotics released into the marine environment. This could possibly be linked to the widespread use of sulfonamides, tetracycline and beta lactams and resulting selective pressure for the corresponding ARGs. Notably, these antibiotics-resistant genes were mainly circulated in surface water (8 genes) compared to sediments (6 genes), in which *sul*1, *sul*2, *tet*Q, *tet*B, and *mec*A were shared between two habitats. In addition, the class 1 integron gene (*int*I-1) was only detected in sediments at fish farm stations. This finding suggests that *int*I-1 may facilitate the proliferation and propagation of some antibiotic-resistant genes in this region.

CONCLUSION

In general, high prevalence of multidrug-resistant bacteria along with the abundance of antibiotic-resistant genes was detected in the water and sediment samples, suggesting that the Nha Trang Bay is an important reservoir for emergence and dissemination of AMRs. Our findings may be useful for developing effective strategies to control ARG contamination in the sea coastal area.

Funding source: This study was financially supported by Vietnam Academy of Science and Technology (VAST) under project number QTFR01.01/21-22.

Acknowledgment: *We sincere thanks to the supports of USTH – VAST (Vietnam), IRD and CNRS (France).*

REFERENCES

Avershina E, Shapovalova V, Shipulin G (2021). Fighting Antibiotic Resistance in Hospital-Acquired Infections: Current State and Emerging Technologies in Disease Prevention, Diagnostics and Therapy. Front Microbiol, 12:707330.

Grigorakis K , Rigos G (2011). Aquaculture effects on environmental and public welfare - The case of Mediterranean marine culture. Chemosphere, 85: 899-919. 10.1016/j.chemosphere.2011.07.015.

Hedberg N, Stenson I, Pettersson M, Warshan D, Nguyen H, Tedengren M, Kautsky Nils (2018). Antibiotic use in Vietnamese fish and lobster sea cage farms; implications for coral reefs and human health. Aquaculture, 495: 366. 10.1016/j.aquaculture.2018.06.005.

McKinn S, Trinh DH, Drabarek D, Trieu TT, Nguyen PTL, Cao TH, Dang AD, Nguyen TA, Fox GJ, Bernays S (2021). Drivers of antibiotic use in Vietnam: implications for designing community interventions. BMJ Glob Health, 6(7):e005875.

Phu, DH., Wongtawan T, Truong D B, Van Cuong N, Carrique-Mas J, & Thomrongsuwannakij T (2022). A systematic review and meta-analysis of integrated studies on antimicrobial resistance in Vietnam, with a focus on Enterobacteriaceae, from a One Health perspective. *One Health*, 15: 100465.

Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and global health*, 109(7): 309-318.

Reverter M, Sarter S, Caruso D, Avarre JC, Combe M, Pepey E, Pouyaud L, Vega-Heredía S, de Verdal H, Gozlan RE (2020). Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance. *Nat Commun*, 11(1):1870.

Singh, A, Kaur, R, Verma S, Singh S (2022). Antimicrobials and Antibiotic Resistance Genes in Water Bodies: Pollution, Risk, and Control. *Frontiers in Environmental Science*, 10: 830861.

Sodhi KK, Kumar M, Singh DK (2021). Insight into the amoxicillin resistance, ecotoxicity, and remediation strategies. *Journal of Water Process Engineering,* 39:101858.

Xu C, Kong L, Gao H, Cheng X, Wang X (2022). A Review of Current Bacterial Resistance to Antibiotics in Food Animals. *Frontiers in microbiology,* 13:822689.

NGHIÊN CỨU VI KHUẨN KHÁNG KHÁNG SINH CÓ KHẢ NĂNG GÂY BỆNH PHÂN LẬP TỪ BIỂN NHA TRANG, VIỆT NAM

Đỗ Thu Uyên[1], Vũ Đình Quang[1], Bùi Đức Thịnh[1], Nguyễn Tiến Dũng[1], Nguyễn Đăng Quang[1], Trần Sơn Hoàng[1,2], Kim Hanh Nguyễn[3], Trung Du Hoàng[3], Lê Thị Thu Hằng[1], Phạm Hoàng Nam[1], Anne-Laure Banuls[1,4], Jean-Christophe Auguet[2], Nguyễn Quang Huy[1*]

[1]MICH, LMI DRISA, Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Việt Nam Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ, Hà Nội, Việt Nam

[2]MARBEC, UMR-UM-CNRS-IRD, Montpellier, Pháp

[3]Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội, Việt Nam

[4]MIVEGEC, UMR-UM-CNRS-IRD, Montpellier, Pháp

TÓM TẮT

Kháng thuốc (AMR) được công nhận là mối đe dọa nghiêm trọng đối với sức khỏe cộng đồng toàn cầu. Tuy nhiên, các nỗ lực nghiên cứu chủ yếu tập trung vào các hệ thống trên cạn, trong khi môi trường sống dưới biển ít được quan tâm hơn. Nghiên cứu này bước đầu xác định sự phổ biến và phân bố của vi khuẩn kháng thuốc ở biển Nha Trang, Việt Nam. Tổng cộng 53/106 (50%) loài vi khuẩn phân lập từ các mẫu nước và trầm tích được xác định là những mầm bệnh tiềm năng đối với người và động vật. Những mầm bệnh phổ biến nhất là *Pseudomonas aeruginosa* (20.6%), *Klebsiella pneumoniae* (15.1%), *Escherichia coli* (13.2%) và*Citrobacter freundii* (7.5%). Kháng sinh đồ thể hiện 60.4% (32/53) mầm bệnh đã kháng với tối thiểu một loại kháng sinh, trong đó 28.3% (15/53) chủng có kiểu hình đa kháng thuốc. Tỷ lệ kháng cao nhất đối với thuốc Amoxicillin/clavulanic acid (80%), tiếp theo đó là ticarcillin, cefoxitin, nalidixic acid, và cefotaxime. Cuối cùng, 9 gene kháng kháng sinh gồm *sul*1, *sul*2, *tet*A, *tet*Q, *tet*B, *bla*KPC, *bla*VIM, *van*A và *mec*A đã được phát hiện. Những kết quả nghiên cứu này cho thấy Vịnh Nha Trang đóng vai trò quan trọng đối với việc bùng phát và phát tán các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc trong môi trường biển, tiềm ẩn rủi ro đến an toàn thực phẩm, sức khoẻ người và động vật.

Từ khóa: Vi khuẩn gây bệnh, đa kháng thuốc, gen kháng kháng sinh, môi trường biển, Vịnh Nha Trang.

[*] Author for correspondence: Tel: +84-363372642; Email: nguyen-quang.huy@usth.edu.vn

HIỆU ỨNG KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG VÀ GIA TĂNG HOẠT TÍNH CHITINASE CỦA CHẾ PHẨM NANO BẠC/SiO_2 ỔN ĐỊNH TRONG OLIGOCHITOSAN CHẾ TẠO BẰNG PHƯƠNG PHÁP CHIẾU XẠ TRÊN CÂY ĐẬU NÀNH

Trần Đức Trọng[1], Võ Tấn Phúc[2], Nguyễn Thanh Vũ[1], Ngô Trần Vũ[1], Trần Lệ Trúc Hà[3], Lê Quang Luân[1*]

[1]*Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh*

[2]*Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh*

[3]*Trường Đại học Nguyễn Tất Thành*

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành nhằm đánh giá hiệu ứng thúc đẩy tăng trưởng và hoạt tính chitinase của chế phẩm nano bạc gắn trên vi hạt sillica ổn định trong oligochitosan (AgNPs/SiO_2/OCTS) trên cây đậu nành. Kết quả thí nghiệm ở giai đoạn nảy mầm cho thấy việc xử lý hạt với 0,4% chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS đã có tác dụng rút ngắn thời gian nảy mầm trung bình (19,59%), gia tăng đáng kể tỷ lệ nảy mầm (11,62%), chiều dài mầm (39,15%), sinh khối tươi (39,43%), sinh khối khô (46,67%) và hoạt tính chitinase (29,27%) so với hạt đậu nành ở lô đối chứng không xử lý. Bên cạnh đó, kết quả thí nghiệm trong nhà lưới cũng cho thấy việc phun 0,4 % chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS cũng đã làm gia tăng đáng kể chiều cao cây (26,91%), chiều dài rễ (29,22%), sinh khối tươi (71,91%), sinh khối khô (108,76%) và hoạt tính chitinase (20,69 - 80,33%) ở cây đậu nành giai đoạn 35 ngày tuổi. Ngoài ra, kết quả thử nghiệm trên đồng ruộng cũng cho thấy khi sử dụng chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS với nồng độ 0,4% còn có tác dụng làm tăng năng suất của cây đậu nành lên đến 51,4% so với đối chứng. Kết quả nghiên cứu này cho thấy chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma Co-60 rất có triển vọng trong việc ứng dụng vào sản xuất nông nghiệp.

Từ khóa: AgNPs/SiO_2/Oligochitosan, Chitinase, đậu nành, nano bạc, tăng trưởng.

MỞ ĐẦU

Đậu nành là một trong các loại ngũ cốc phổ biến ở Việt Nam và trên thế giới. Theo thống kê năm 2017 của Tổng cục Thống kê Việt Nam, nước ta có 68.500 ha gieo trồng đậu nành, sản lượng đạt 102.300 tấn. Tuy nhiên, sản lượng đậu nành trong nước chỉ đáp ứng được khoảng 7% nhu cầu cho các ngành công nghiệp (Tổng cục Thống kê, 2017), do đó việc gia tăng năng suất đậu nành là vấn đề đáng quan tâm trong giai đoạn hiện nay. Bên cạnh đó, với xu hướng quay trở lại nền nông nghiệp hữu cơ của Việt Nam nói riêng và thế giới nói chung hiện nay, việc sử dụng các chế phẩm bảo vệ thực vật có nguồn gốc sinh học, ứng dụng công nghệ cao, an toàn, thân thiện với môi trường và người sử dụng cũng như có khả năng thúc đẩy sinh trưởng và kích kháng giúp cây trồng đề kháng lại đa dạng các loại dịch hại do vi sinh vật gây ra từ đó gia tăng năng suất là hướng đi đúng đắn và rất cần thiết (Báo cáo phân tích xu hướng công nghệ, 2012).

Oligochitosan (OCTS) được biết đến là sản phẩm cắt mạch từ chitosan, một polymer có nguồn gốc tự nhiên chiết xuất từ phụ phẩm vỏ tôm cua của nghành chế biến thủy hải sản. Oligochitosan đã được chứng minh là có khả năng thúc đẩy hoạt động của các enzyme phytoalexin như chitinase, phenylalanine ammonia lyase và peroxidases trong quá trình nảy mầm ở hạt đậu nành và đại mạch (Luan *et al*., 2006). Trong khi đó silica chế tạo từ tro trấu vốn là phụ phẩm rất dồi dào của ngành xay xát lúa gạo với giá thành rẻ và có nhiều tiềm năng ứng dụng trong nông nghiệp. Silica (SiO_2) có trong cấu trúc vách của tế bào thực vật, giúp thực vật chống lại sự xâm nhập của vi sinh gây hại thông qua cơ chế tăng cường hoạt động của các enzyme phytoalexin (Belanger *et al*., 1995). Các nghiên cứu về khả năng tăng cường chống chịu, đề kháng thực vật của nano silica kháng lại các vi sinh vật gây bệnh và tăng cường khả năng sinh trưởng phát triển của thực vật ngày càng được quan tâm rộng rãi (Phu *et al*., 2017). Ngoài ra nano bạc (AgNPs) cũng đã được nhiều nhà khoa học chứng minh là có hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm cao, đặc biệt đối với một số chủng nấm gây bệnh trên cây trồng có thể kể đến như *Corynespora cassiicola* (Nhien *et al*., 2018), *Phytophthora capsici* (Luan *et al*., 2014), *Rhizoctonia solani* và *Colletotrichum gloeosporioides* (Trong *et al*., 2022). Thêm vào đó, nano bạc còn tham gia vào một số chu trình chuyển hóa của cây trồng giúp tăng cường sự sinh trưởng và phát triển của thực vật trong giai đoạn nuôi cấy mô (Nhut *et al*., 2014).

Nghiên cứu kết hợp cả ba loại hoạt chất nano bạc, vi hạt silica và chitosan trong cùng một chế phẩm hứa hẹn sẽ mang lại hiệu quả không chỉ thúc đẩy sinh trưởng và phát triển mà còn gia tăng hoạt tính chitinse (loại enenzyme

có tác dụng tăng khả năng kích kháng bệnh) ở cây trồng nói chung và trên cây đậu nành nói riêng. Chính vì vậy nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu đánh giá hiệu ứng kích thích sinh trưởng và gia tăng hoạt tính chitinse của AgNPs/SiO_2/OCTS chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ trên cây đậu nành nhằm ứng dụng chế phẩm như loại phân bón có khả năng kích kháng bệnh mới trong nông nghiệp.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chế phẩm nano bạc (AgNPs) (1mM) gắn trên vi hạt silica (SiO_2) (2%) ổn định trong oligochitosan (OCTS) (5%) được chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma Co-60 (Tuan et al., 2021) tại Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh. Hạt đậu nành (*Glycine max* L) có mã giống PN được cung cấp bởi Công ty TNHH giống cây trồng Phú Nông (Thành phố Hồ Chí Minh).

Phương pháp

Đánh giá hiệu quả của chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS trên mầm đậu nành

Các hạt đậu nành (không sâu, lép, hỏng) được xử lý khử trùng với cồn 70^o trước khi được ngâm trong chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS hoặc oligochitosan (OCTS) với nồng độ được mô tả ở bảng 1, đối chứng chỉ sử dụng nước cất. Sau 30 phút, các hạt được chuyển vào các khay nhựa có lót bông giữ ẩm và theo dõi sự nảy mầm trong điều kiện phòng thí nghiệm. Mỗi nghiệm thức sử dụng 100 hạt và được lặp lại 3 lần.

Bảng 1. Bố trí thí nghiệm đánh giá hiệu quả của chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS trên mầm đậu nành

Nghiệm thức	ĐC (H_2O)	OCTS	Chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS			
Nồng độ sử dụng, %	-	0,4	0,1	0,2	0,3	0,4

Tiến hành quan sát, ghi nhận các chỉ tiêu như tỉ lệ nảy mầm, thời gian nảy mầm trung bình và sinh khối tươi bằng các công thức sau (Ranal *et al.,* 2006):

Tỷ lệ nảy mầm (%) = 100×(số hạt nảy mầm/tổng số hạt)

Thời gian nảy mầm (giờ) = $(G_1T_1 + G_2T_2 + ... + G_nT_n)/(G_1 + G_2 + ... + G_n)$. *Trong đó, G: số hạt nảy mầm và T: thời gian theo dõi.*

Sinh khối tươi (g/50 mầm) được xác định bằng cách cân ngẫu nhiên 50 mầm.

Xác định hoạt tính chitinase trong mầm đậu nành: Chitinase từ các mầm đậu nành ở các lô thí nghiệm được ly trích và thu nhận theo quy trình của Dinesh và đồng tác giả (2010). Cụ thể, 1 g mầm đậu nành thu được ở các nghiệm thức được cho vào các eppendorf có chứa 1 mL đệm CH_3COONa (0,1 M, pH ~ 4,8) và làm lạnh nhanh ở -80^{o}C trong 20 phút. Mẫu sau đó được đồng hóa trong 10 phút và tiến hành ly tâm trong 30 phút với tốc độ 12000 vòng/phút ở 4^{o}C để thu dịch nổi. Bổ sung muối $(NH_4)_2SO_4$ bão hòa (80%) với tỷ lệ 1:1 vào phần dịch nổi, để lạnh ở 4^{o}C trong 1 giờ. Ly tâm dịch nổi trong 30 phút với tốc độ 12000 vòng/phút ở 4^{o}C để thu nhận tủa. Tiến hành hòa tan tủa trong đệm CH_3COONa để thu dung dịch enzyme. Hoạt tính của chitinase ở các nghiệm thức xác định bằng chitinase assay kit (CS-980-1KT, Sigma, Mỹ). Hoạt tính chitinase được tính toán dựa trên công thức sau:

$$\text{Hoạt tính chitinase (UI/mL)} = \frac{(\text{ODmẫu} - \text{ODblank}) \times 0{,}05 \times 0{,}3 \times \text{DF}}{\text{OD chuẩn} \times 15 \times 0{,}3}$$

Trong đó: OD mẫu: Độ hấp thụ của mẫu đo ở bước sóng 405 nm.

OD blank: Độ hấp thụ của đệm CH_3COONa đo ở bước sóng 405 nm.

OD mẫu chuẩn: Độ hấp thụ của mẫu chuẩn đo ở bước sóng 405 nm.

DF: Hệ số pha loãng.

Đánh giá hiệu quả của chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS trên giai đoạn cây con trồng trong nhà lưới

Các hạt đậu nành được xử lý khử trùng với cồn 70^o, sau đó được gieo trong khay nhựa chứa giá thể mùn dừa. Khi cây con được 10 ngày tuổi, tiến hành chọn các cây con đồng đều chuyển vào chậu nhựa và được để ổn định 24 giờ trong nhà lưới trước khi phân lô thí nghiệm. Thí nghiệm gồm 06 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức 5 chậu, mỗi chậu trồng 3 cây và được lặp lại 3 lần. Các nghiệm thức được phun 200 mL chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS hoặc oligochitosan với nồng độ được mô tả ở bảng 2, phun ướt đều mặt lá với tầng suất 7 ngày 1 lần, nghiệm thức đối chứng chỉ phun với nước cất. Đánh giá chỉ tiêu sinh trưởng (chiều cao cây, chiều dài rễ, sinh khối tươi và sinh khối khô) và hoạt tính chitinase của cây đậu nành khi cây được 35 ngày tuổi.

Bảng 2. Bố trí thí nghiệm đánh giá hiệu quả của chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS trên đậu nành ở giai đoạn cây con

Nghiệm thức	ĐC (H_2O)	OCTS	Chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS			
Nồng độ sử dụng, %	-	0,4	0,1	0,2	0,3	0,4

Xác định hoạt tính chitinase trong cây đậu nành 35 ngày tuổi: Các mẫu lá, rễ và thân cây con đậu nành (10 g/mẫu) ở các nghiệm thức được thu nhận vào các ống falcon 50 mL có chứa 10 mL đệm CH_3COONa, tiến hành ly trích và xác định hoạt tính chitinase theo quy trình đã trình bày ở trên.

Khảo sát khả năng gia tăng năng suất ở đậu nành của chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS trên đồng ruộng

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối hoàn toàn ngẫu nhiên, gồm 7 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức gồm 40 ô, mỗi ô trồng 3 cây và mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Khoảng cách giữa các nghiệm thức là 0,3 m, giữa các ô là 15 cm.

Gieo 5 hạt/ô, sau 15 ngày gieo hạt, tiến hành tỉa bỏ, chọn các cây đồng nhất để đạt mật độ 3 cây/ô. Phun chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS (nồng độ xem bảng 3); ĐC: Chỉ phun nước cất, không sử dụng chế phẩm và không sử dụng thuốc bảo vệ thực vật (BVTV) phòng trừ sâu bệnh hại; ĐC(+): Sử dụng thuốc BVTV thường dùng để phòng và trừ các loại sâu bệnh như sau: YomiSuper, Tilt super, Valivithaco 5WP, Ridomint Gold (phòng trị bệnh thối thân và rỉ sắt), Newgard, Peran, Fastac (trị sâu ăn lá, ăn quả và trị rệp sáp) phun khi cây được 15 ngày tuổi với liều lượng khuyến cáo của nhà sản xuất. 7 ngày 1 lần và mỗi lần sử dụng 300 mL cho mỗi nghiệm thức. Đối với các nghiệm thức sử dụng chế phẩm thì hoàn toàn không sử dụng thuốc BVTV.

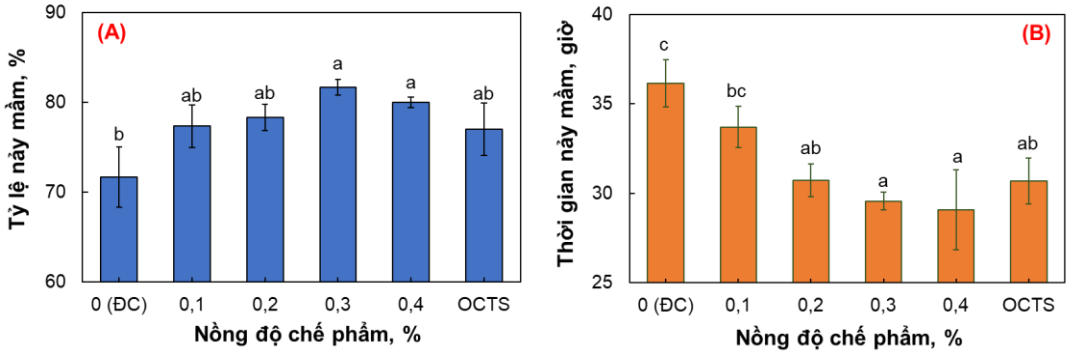
Bảng 3. Bố trí thí nghiệm đánh giá hiệu quả tăng năng suất của chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS trên đậu nành

Nghiệm thức	ĐC (H_2O)	BVTV	Chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS			
Nồng độ sử dụng, %	-	Theo khuyến cáo của nhà sản xuất	0,1	0,2	0,3	0,4

Theo dõi các chỉ tiêu phát triển như số hoa, số quả trên cây và tỷ lệ đậu quả, năng suất cá thể và năng suất thực tế của mỗi nghiệm thức trong suốt giai đoạn thí nghiệm cho đến khi thu hoạch. Ghi nhận các chỉ tiêu trên 10 ô/nghiệm thức (Các ô theo dõi được lấy ngẫu nhiên trên 2 đường chéo của nghiệm thức). Các kết quả thu được từ các thí nghiệm được tổng hợp bằng phần mềm Microsoft Excel và xử lí thống kê bằng phần mềm IBM SPSS Startistics 20.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

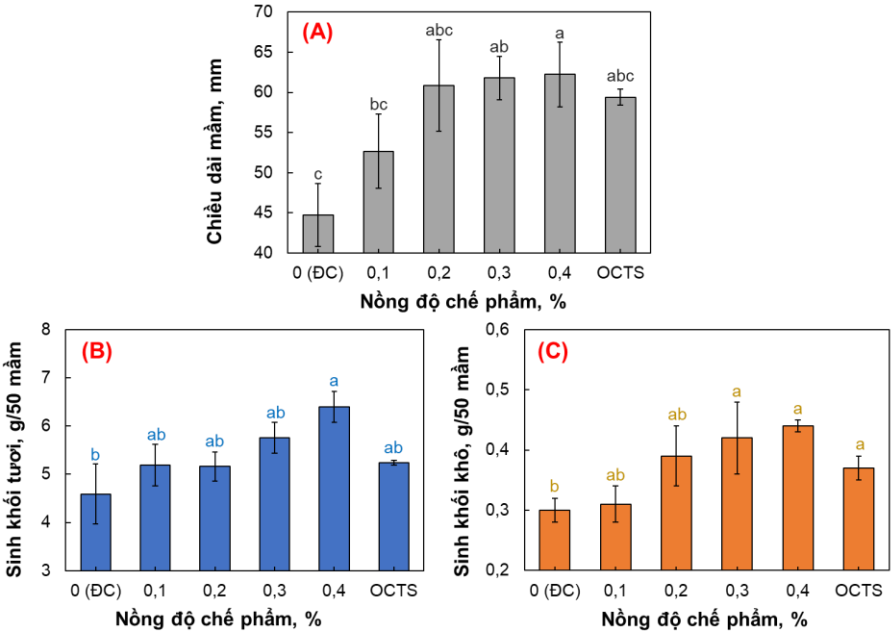
Hiệu quả của chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS trên mầm đậu nành



Hình 1. Tỷ lệ nảy mầm (A) và thời gian nảy mầm trunng bình (B) của hạt đậu nành khi được xử lý với chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS ở các nồng độ khác nhau. *Trong cùng 1 hình, các giá trị theo sau bởi cùng ký tự thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê (P <0,05)*

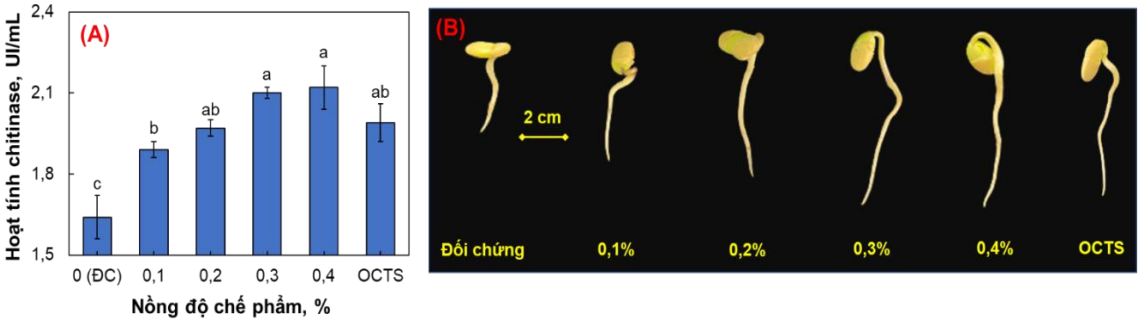
Kết quả Hình 1 cho thấy khi xử lý ngâm hạt với chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS ở các nồng độ khác nhau ảnh hưởng khá lớn đến tỷ lệ nảy mầm và thời gian nảy mầm của đậu nành. Ở nghiệm thức ĐC tỷ lệ nảy mầm và thời gian nảy mầm trung bình lần lượt đạt 71,67% và 36,15 giờ. Khi tăng nồng độ chế phẩm từ 0,1 - 0,4%, mầm đậu nành phát triển mạnh, tỷ lệ nảy mầm và sinh khối tươi của mầm tăng dần, đạt từ 77,33 - 81,67% và 5,19 - 6,4 g/50 mầm. Đồng thời, hạt đậu nành cũng nảy mầm nhanh hơn, với thời gian nảy mầm trung bình giảm từ 36,15 giờ (ở lô ĐC) xuống còn từ 29,07 - 33,71 giờ (ở các lô xử lý với chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS). Bên cạnh đó, kết quả từ hình 2 và 3B cũng cho thấy mầm đậu nành phát triển mạnh sau 3 ngày được xử lý với 0,1 - 0,4% chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS, chiều dài mầm tăng từ 17,78 - 39,15%, chỉ tiêu sinh khối tươi của mầm đậu nành tăng từ 13,07 - 39,43% và chỉ tiêu sinh khối khô của mầm đậu nành tăng từ 3,33 - 46,67% so với nghiệm thức đối chứng (SVĐC).

Kết quả nhận được từ Hình 3A còn cho thấy ở điều kiện nảy mầm bình thường (không xử lý chế phẩm) thì hoạt tính chitinase của mầm đậu nành chỉ đạt khoảng 1,64 UI/mL. Trong khi đó, hoạt tính chitinase trong mầm đậu nành tăng lên 1,89 - 2,12 UI/mL nghiệm thức sử dụng 0,1 - 0,4% chế phẩm. Hoạt tính chitinase của mầm đậu nành tăng cao nhất tại nghiệm thức xử lý với 0,3 và 0,4% chế phẩm, lần lượt đạt 2,1 và 2,12 UI/mL, cao hơn SVĐC là 28,05 và 29,27%.



Hình 2. Khả năng sinh trưởng của mầm đậu nành khi được xử lý với chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS ở các nồng độ khác nhau. *Trong đó: A, B và C lần lượt tương ứng với chiều dài mầm, sinh khối tươi và sinh khối khô. Trong cùng 1 hình, các giá trị theo sau bởi cùng ký tự thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê (P <0,05).*

Kết quả này khá tương đồng với nghiên cứu của Hameed (2013), Amira và đồng tác giả (2015), Noshad và đồng tác giả (2019) khi thông báo rằng việc sử dụng vi hạt silica, OCTS hoặc AgNPs có vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng của hạt lúa mì, đậu răng ngựa và cà chua. Bên cạch đó, việc tiền xử lý hạt đậu nành với chế phẩm còn làm gia tăng đáng kể hoạt tính chitinase, một trong những enzyme có vai trò quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp ở thực vật, thúc đẩy quá trình tạo phôi, tổng hợp ethylene, giúp thực vật chống chịu lại các điều kiện bật lợi của ngoại cảnh như khô hạn, nhiễm mặn, nhiệt độ thấp, v.v. (Smith & Osburn, 2016)



Hình 3. Hoạt tính chitinase (A) ở mầm đậu nành (B) khi được xử lý với chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS ở các nồng độ khác nhau. *Trong cùng 1 hình, các giá trị theo sau bởi cùng ký tự thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê (P <0,05).*

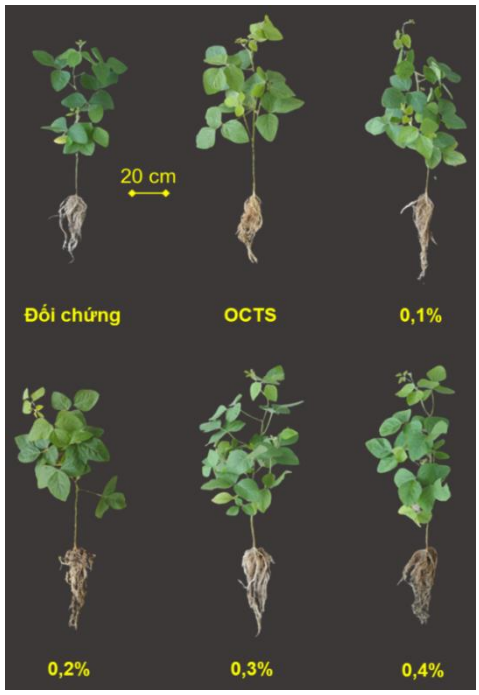
Hiệu quả của chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS giai đoạn cây con trồng trong nhà lưới

Bảng 4. Các chỉ tiêu sinh trưởng của cây đậu nành khi xử lý với chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS ở các nồng độ khác nhau trong giai đoạn 35 ngày tuổi

Nồng động chế phẩm, %	Chiều cao cây, cm (±SE)	Chiều dài rễ, cm (±SE)	Sinh khối tươi, g/cây (±SE)	Sinh khối khô, g/cây (±SE)
0(ĐC)	$65,4^{b} \pm 1,4$	$30,8^{b} \pm 1,6$	$73,5^{b} \pm 2,1$	$8,3^{c} \pm 1,0$
0,1	$65,2^{b} \pm 2,5$	$33,6^{ab} \pm 2,5$	$73,4^{b} \pm 7,2$	$8,4^{c} \pm 0,7$
0,2	$70,4^{b} \pm 0,5$	$36,8^{ab} \pm 1,0$	$73,6^{b} \pm 5,8$	$8,6^{c} \pm 0,5$
0,3	$82,8^{a} \pm 2,0$	$36,0^{ab} \pm 2,2$	$120,0^{a} \pm 10,6$	$16,0^{ab} \pm 1,6$
0,4	$83,0^{a} \pm 1,8$	$39,8^{a} \pm 2,1$	$126,4^{a} \pm 9,7$	$17,4^{a} \pm 2,7$
OCTS	$78,0^{a} \pm 1,7$	$34,8^{ab} \pm 1,9$	$93,9^{b} \pm 3,2$	$12,0^{bc} \pm 1,5$

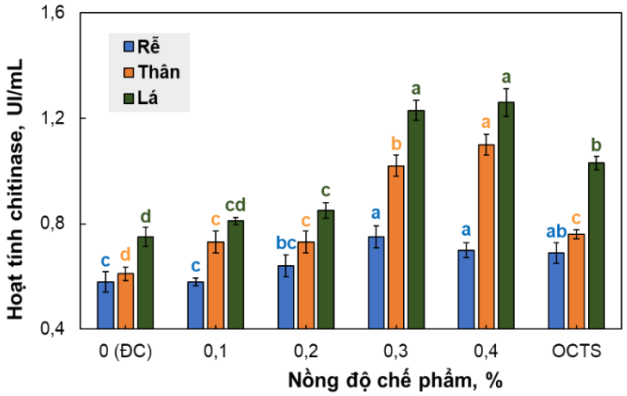
Trong cùng 1 cột, các giá trị theo sau bởi cùng ký tự thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê (P <0,05).

Kết quả từ Bảng 4 và Hình 4 cho thấy ở giai đoạn 35 ngày tuổi trồng trong điều kiện nhà lưới, chiều cao cây và chiều dài rễ của cây đậu nành ở lô ĐC lần lượt đạt 65,4 và 30,8 cm, sinh khối tươi và sinh khối khô đạt tương ứng 73,5 và 8,3 g/cây. Trong khi đó, ở các lô thí nghiệm có xử lý với chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS ở các nồng khác nhau cũng như lô thí nghiệm xử lý với oligochitosan, các chỉ tiêu về sinh trưởng được gia tăng đáng kể, đặc biệt ở nồng độ chế phẩm là 0,3 và 0,4% hiệu ứng tăng cường tăng trưởng được thể hiện rõ nhất. Cụ thể, ở lô thí nghiệm xử lý với 0,3 và 0,4% chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS chiều cao cây đậu nành đạt 82,8 và 83,0 cm tăng 26,6 và 26,9% SVĐC. Chiều dài rễ đạt 36 - 39 cm và tăng 16,9-26,2% so với lô đối chứng (hình 4). Sinh khối tươi và sinh khối khô ở lô xử lý 0,3 và 0,4% chế phẩm cũng tăng từ 63,3 - 71,9% đối với sinh khối tươi và từ 92 - 108,8% đối với sinh khối khô khi SVĐC. Các kết quả này khá phù hợp với nghiên cứu của Phu và đồng tác giả (2017), việc phun oligochitosan hoặc hợp phần oligochitosan-nanosilica làm gia tăng đáng kể chiều cao cây và sinh khối của cây đậu nành SVĐC.



Hình 4. Khả năng sinh trưởng của cây đậu nành khi được xử lý với chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS ở các nồng độ khác nhau

Kết quả nhận được từ hình 5 cũng cho thấy việc xử lý đậu nành với 0,1 - 0,4% chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS làm gia tăng hoạt tính chitinase ở rễ, thân và lá đậu nành. Cụ thể, hoạt tính chitinase ở rễ tăng 0,5 - 29,3%, ở thân tăng 19,7 - 80,3% và ở lá tăng 8,0 - 68,0% SVĐC. Trong đó, hoạt tính chitinase thu được ở các mẫu cây đậu nành được xử lý với chế phẩm AgNPs/ SiO_2/OCTS ở nồng độ 0,3 và 0,4% cho hiệu quả cao nhất.Kết quả này khá phù hợp với nghiên cứu của Luan và đồng tác giả (2006), nhóm nghiên cứu đã thông báo rằng oligochitosan không chỉ có tác dụng thúc đẩy sự tăng trưởng của thực vật mà còn tăng cường hoạt động của enzyme phytoalexin cụ thể là PAL và chitinase giúp cây trồng ngăn ngừa sự lây nhiễm các bệnh do vi sinh vật. Tuan và đồng tác giả (2019) cũng đã báo cáo rằng việc xử lý kết hợp oligochitosan và silica trên cây thanh long làm gia tăng đáng kể hoạt tính chitinase so với các cây thanh long ở lô đối chứng không xử lý cũng như cây thanh long chỉ xử lý với oligochitosan.



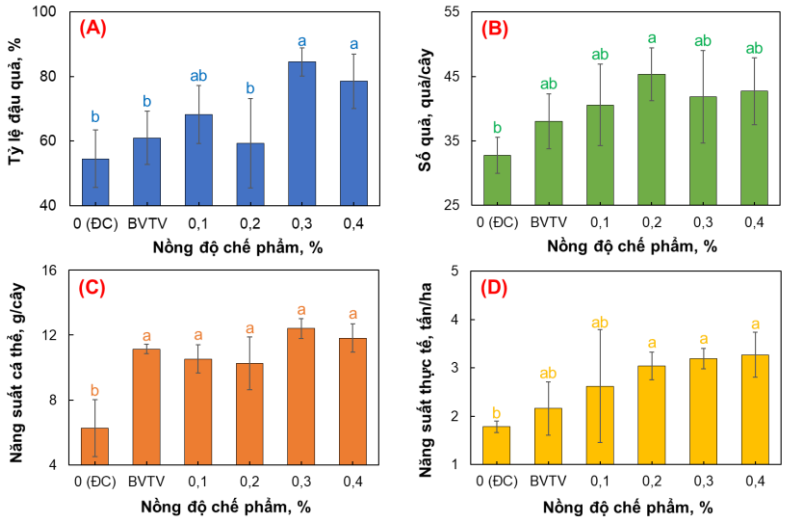
Hình 5. Hoạt tính chitinase ở mầm đậu nành khi được xử lý với chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS ở các nồng độ khác nhau.
Trong cùng 1 hình, các giá trị theo sau bởi cùng ký tự thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê (P<0,05).

Hiệu quả gia tăng năng suất của chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS trên cây đậu nành trồng ngoài đồng ruộng

Kết quả hình 6 cho thấy chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS đã có ảnh hưởng đến các chỉ tiêu cấu thành năng suất ở cây đậu nành như tỷ lệ đậu quả, số quả, năng suất cá thể và năng suất thực tế của cây đậu nành. Cụ thể, ở nghiệm thức đối chứng số quả chỉ đạt 32,73 quả/cây, tỷ lệ đậu quả là 54,56%, quả bị lép nhiều, năng suất cá thể chỉ đạt 6,26 g/cây và năng suất thực tế là 1,78 tấn/ha. Ở nghiệm thức sử dụng các biện pháp canh tác như bình thường (sử dụng thuốc BVTV và không phun chế phẩm), cây đậu nành hầu như không bị sâu bệnh. Tuy nhiên, số quả chỉ đạt 38,03 quả/cây, tỷ lệ đậu quả hầu như không tăng so với đối chứng (61,04%), quả ít lép, tuy nhiên năng suất cá thể và năng suất thực tế chỉ đạt là 11,3 g/cây và 2,16 tấn/ha. Ở những nghiệm thức sử dụng chế phẩm, số quả và tỷ lệ đậu quả cao, với 40,57 - 43,56 quả/cây, tỷ lệ đậu quả và năng suất cá thể đạt 84,53% và

11,82 - 12,4 g/cây, ở những nghiệm thức sử dụng từ 0,3 - 0,4% chế phẩm thì có số quả, tỷ lệ đậu quả, năng suất cá thể và năng suất thực tế cao nhất. Số quả có 3 hạt chiếm tỷ lệ cao, hạt to và đồng nhất. Ở các nghiệm thức này, năng suất thực tế tăng mạnh và đạt lần lượt là 3,19 và 3,27 tấn/ha, cao hơn 47,7 - 51,4% so với nghiệm thức sử dụng các biện pháp canh tác thông thường.

Các kết quả nhận được khá phù hợp với nghiên cứu của Kumaraswamy và đồng tác giả (2020) khi nhóm nghiên cứu đã thông báo rằng việc xử lý chế phẩm phân bón chitosan-SiO_2 trên cây ngô mang lại hiệu quả gia tăng năng suất lên đến 43,5% so với nghiệm thức chỉ sử dụng SiO_2 và 65,1% so với lô đối chứng không xử lý chế phẩm. El-Sawy và đồng tác giả (2010) cũng báo cáo rằng OCTS với khối lượng phân tử thấp kích thích sinh trưởng và tăng năng suất hạt đậu tằm tốt hơn so với chitosan có khối lượng phân tử cao. Vật liệu tổ hợp giữa OCTS và nano silica giúp tăng cường năng suất trên cây đậu nành lên đến 35% (Phu *et al*., 2017).



Hình 6. Các chỉ tiêu năng suất của cây đậu nành sau khi xử lý với chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS ở các nồng độ khác nhau. *Trong đó: A, B, C và D tương ứng với Tỷ lệ đậu quả, Số quả, Năng suất cá thể và năng suất thực tế. Trong cùng 1 hình, các giá trị theo sau bởi cùng ký tự thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê (P<0,05).*

KẾT LUẬN

Chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS chế tạo bằng phương pháp chiếu xạ tia gamma Co-60 đã có tác dụng thúc đẩy sinh trưởng ở các giai đoạn khác nhau trên cây đậu nành đặc biệt khi khi sử dụng chế phẩm ở nồng độ 0,4%. Cụ thể, trong giai đoạn mầm, chế phẩm làm gia tăng 11,62% tỷ lệ nảy mầm, rút ngắn 19,59% thời gian nảy mầm trung bình, tăng cường sinh trưởng mầm thể hiện qua sự gia tăng 39,15% chiều dài mầm, gia tăng 39,43% sinh khối tươi và 47,67% sinh khối khô của mầm, đồng thời tăng 29,27% hoạt tính chitinase SVĐC. Mặt khác, việc phun chế phẩm trong giai đoạn cây con trồng trong nhà lưới cũng có tác dụng tăng khả năng sinh trưởng (26,91% chiều cao cây; 29,22% chiều dài rễ; 71,91% sinh khối tươi và 108,76% sinh khối khô) và cảm ứng gia tăng hoạt tính chitnase ở rễ (20,69%), thân (80,33%) và lá (68%) đậu nành. Thêm vào đó, kết quả thử nghiệm trên đồng ruộng cũng cho thấy khi sử dụng 0,4% chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS có tác dụng tăng 43,95% tỷ lệ đậu quả và 30,46% số quả trên cây từ đó dẫn đến gia tăng năng suất đậu nành sau khi thu hoạch lên 51,4% SVĐC. Như vậy, có thể thấy chế phẩm AgNPs/SiO_2/OCTS có tiềm năng ứng dụng rất lớn trong canh tác đậu nành nói riêng và trong ngành trồng trọt nói chung.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Amira MS, Qados A, Moftah AE (2015). Influence of silicon and nano-silicon on germination, growth and yield of faba bean (*Vicia faba* L.) under salt stress conditions. *AJEA*, 5(6):509-524.

Belanger RB, Bowen PA, Ehret DL, Menzies JG (1995). Soluble silicon: Its role in crop and disease management of greenhouse crops. *Plant Dis*, 79:329-336.

Dinesh KP, SantaRam A, Shivanna MB (2010). Studies on the chitinase activity in coffee (*Coffea arabica* L.) genetic resources in India. *Res J Agric Biol Sci*, 6(4):449-452.

El-Sawy NM, El-Rehim HAA, Elbarbary AM, El-Sayed AH (2010). Radiation-induced degradation of chitosan for possible use as growth promoter in agricultural purposes. *Carbohydr Polym*, 79(3):555-562.

Hameed A (2013). Chitosan priming enhances the seed germination, antioxidants, hydrolytic enzymes, soluble proteins and sugars in wheat seeds. *Agrochimica*, VII(1): 32-46.

Kumaraswamy RV, Saharan V, Kumari S, Chandra CR, Pal A, Sharma SS, Rakshit S, Raliya R, Biswas P (2020). Chitosan-silicon nanofertilizer to enhance plant growth and yield in maize (*Zea mays L.*). *Plant Physiol Biochem*, 159:53-66.

Luan LQ, Nagasawa N, Tamada M, Nakanishi TM (2006). Enhancement of plant growth activity of irradiated chitosan by molecular weight fractionation. *RadioIsotopes*, 55:21-27.

Luan LQ, Uyen NHP, Giang PH (2014). Study on the antifungal effect of silver nano particle-chitosan prepared by irradiation method on *Phytophthora capsici* causing the blight disease on pepper plant. *Tạp chí sinh học*, 36(1se):152-157.

Noshad A, Hetherington C, Iqbal M (2019). Impact of AgNPs on Seed Germination and Seedling Growth: A Focus Study on Its Antibacterial Potential against Clavibacter *michiganensis* subsp. *michiganensis* Infection in Solanum lycopersicum. *J Nanomater*, 2019:1-12.

Nhien LTA, Luong ND, Tien LT, Luan LQ (2018). Radiation Synthesis of Silver Nanoparticles/Chitosan for Controlling Leaf Fall Disease on Rubber Trees Causing by *Corynespora cassiicola*. *J Nanomater,* 2018:1-9.

Nhut DT, Tan HT, Hien NTT, Cuong LK, Luan VQ, Nam NB, Huy NP, Hien VT, Huong TT, Hoang NH, Tuan NX, Sang NT, Cuong NV, Cuong DM, Chau NH, Buu NQ (2014). Effects of nanosilver on growth of *Chrysanthemum* sp., *Fragaria* sp., and *Gerbera* sp. cultured *in vitro*. *Tạp chí công nghệ sinh học*, 12(1):103-111.

Phu DV, Du BD, Tuan LNA, Tam HV, Hien NQ (2017). Preparation and foliar application of oligochitosan-nanosilica on the enhancement of soybean seed yield. *Int J Environ Agric Biotechnol*, 2(1):421-428.

Ranal MA, Santana DGD (2006). How and why to measure the germination process?. *Braz J Bot*, 29(1):1-11.

Smith RS, Osburn RM (2016). Combined Used of Lipo-Chitooligosaccharides and Chitinous Compounds for Enhanced Plant Growth and Yield. U.S. Patent 9,253,989,9 February 2016.

Tuan LNA, Du BD, Ha LDT, Dung LTK (2019). Induction of chitinase and brown spot disease resistance by oligochitosan and nano silica-oligochitosan in dragon fruit plants. *Agric Res*, 8(2):184-190.

Tuan NX, Trong TD, Vu NT (2021). Study on the preparation of growth promotion and phytoalexin stimulation AgNPs@SiO_2/OCTS material by irradiation method. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 3(124):74-80.

Trong TD, Vu NT, Anh NTN, Ha TLT, Luan LQ (2022). The antifungal of plant-desease effect of silver nano particles/SiO_2 stability in oligochitosan prepared by gamma Co-60 irradiation. *Proceedings of Vietnam National Conference on Biotechnology 2022*, 721-728.

Trung tâm Thông tin Khoa học và Công nghệ thành phố Hồ Chí Minh (2012). Báo cáo phân tích xu hướng công nghệ: Sử dụng chế phẩm sinh học trong canh tác cây trồng. Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh.

THE GROWTH STIMULATION AND CHITINASE ACTIVITY ENHANCEMENT EFFECTS OF IRRADIATION SYNTHESIZED SILVER NANOPARTICLES/SiO_2 STABILIZED IN OLIGOCHITOSAN ON SOYBEAN

Tran Duc Trong[1], Vo Tan Phuc [2], Nguyen Thanh Vu[1], Phan Le Tram Anh[1], Tran Le Truc Ha [3], Le Quang Luan[1*]

[1]*Biotechnology center of Ho Chi Minh city*

[2]*Nong Lam University*

[3]*Nguyen Tat Thanh University*

SUMMARY

The study was carried out to evaluate the growth promotion and chitinase activity enhancement effects of the silver nanoparticles dopped on silica microparticles and stabilized in oligochitosan (AgNPs/SiO_2/OCTS) on soybean plants. The germination test results indicated that the treatment with 0.4% of AgNPs/SiO_2/OCTS product decreased the average germination time (19.59%), remarkably enhanced the average germination rate (11.62%), sprout length (39.15%), fresh biomass (39.43%), dry biomass of sprouts (46.67%) and chitinase activity (29.27%) compared to those of soybean seeds in the untreated control group. Besides, the results from the greenhouse experiment also showed that the treatment with 0.4% of AgNPs/SiO_2/OCTS product also remarkably enhanced the plant height (26.91%), root length (29.22%), fresh biomass (71.91%), dry biomass (108.76%) and chitinase activity (20.69 - 80.33%) in 35-day-old soybean plants. Furthermore, field trial results demonstrated that the use of AgNPs/SiO_2/OCTS product at a concentration of 0.4% also increased soybean yield up to 51.4% compared to that of the control one. The above results showed that the AgNPs/SiO_2/OCTS product prepared by gamma-ray irradiation is very promising for application in agricultural production.

Keywords: AgNPs/SiO_2/Oligochitosan, Chitinase, Growth, Silver nanoparticles, Soybean.

[*] Author for correspondence: Tel: +84-913711223; Email: lequangluan@gmail.com

KHẢ NĂNG HÒA TAN PHOSPHATE KHÓ TAN CỦA CÁC CHỦNG VI KHUẨN TÍA QUANG HỢP PHÂN LẬP TỪ MẪU ĐẤT TRỒNG LÚA VÙNG VEN BIỂN GIAO THỦY- NAM ĐỊNH

Đỗ Thị Liên[1], Cung Thị Ngọc Mai[1], Đỗ Thị Tố Uyên[1], Vương Thị Nga[1], Nghiêm Thị Hà Liên[2*], Trần Thị Mai[1], Lê Thị Nhi Công[1]

[1]Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

[2]Viện Vật lý, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Việc sử dụng phân bón vi sinh đã và đang được quan tâm vì phân bón vi sinh không những giúp nâng cao năng suất, cải thiện chất lượng nông sản mà còn thân thiện với môi trường, đặc biệt là trong điều kiện đất nhiễm mặn, nhiễm phèn đang gia tăng do biến đổi khí hậu. Trong nghiên cứu này 13 chủng vi khuẩn tía quang hợp (VKTQH) được phân lập từ ruộng lúa vùng ven biển Giao Thủy, Nam Định. Các chủng phân lập được đều có khả năng sinh trưởng và có hoạt tính hòa tan 3 hợp chất P dạng khó tan như: $Ca_3(PO_4)_2$, $AlPO_4$, và $FePO_4$. Trong điều kiện vi hiếu khí, có ánh sáng, 13 chủng phân lập có khả năng hòa tan phosphate dạng $Ca_3(PO_4)_2$ dao động từ 12,8- 85,8 mg/L, dạng $AlPO_4$ dao động từ 8,8 - 75,5 mg/L dạng $FePO_4$ dao động từ 15,0 -78,9 mg/L, trong đó có 2 chủng GT_4 và GT_{21} có khả năng hòa tan 3 hợp chất P dạng khó tan cao nhất. Khuẩn lạc của chủng GT_4 có hình tròn, bề mặt lồi, rìa phẳng, màu nâu vàng. Dịch huyền phù tế bào có màu nâu đỏ. Tế bào của chủng này có hình ovan, kích thước 0,086 x 0,915 µm, sinh sản bằng cách nhân đôi. Khuẩn lạc của chủng GT_{21} không tròn, bề mặt lồi, bóng, rìa trong màu nâu đậm. Dịch huyền phù tế bào có màu đỏ nâu. Tế bào của chủng này có hình xoắn dài kích thước chiều dài 3,5-5,21 µm, chiều rộng 0,3-0,5 µm. Cả hai chủng đều không quan sát thấy "giọt" lưu huỳnh tích lũy trong tế bào và đều là vi khuẩn Gram (-). Phổ hấp thụ dịch huyền phù tế bào của 2 chủng có các cực đại nằm trong vùng 800 - 900 nm, đặc trưng cho *Bacteriochlophyll a*. Từ các đặc điểm sinh học cơ bản của 2 chủng VKTQH GT4 và GT21 như hình dạng tế bào, hình thức sinh sản, sắc tố quang hợp và kết quả phân tích trình tự nucleotide của gene 16S-rDNA, có thể cho rằng chủng GT_4 thuộc loài *Rhodobacter sphaeroides*, chủng GT_{21} thuộc chi *Rhodospirillum*.

Từ khóa: Phân bón vi sinh, phosphate khó tan, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodospirillum*, vi khuẩn tía quang hợp.

MỞ ĐẦU

Phosphorus (P) là chất dinh dưỡng đa lượng ảnh hưởng đến sinh trưởng của thực vật lớn thứ hai sau N. Phosphorus đóng vai trò quan trọng trong tất cả những tiến trình cũng như hoạt động sinh lý, sinh hóa và chuyển hóa vật chất trong cây như: sự phân chia tế bào, phát triển hệ thống rễ, sử dụng nguồn carbohydrates, quang hợp, chuyển hóa năng lượng, sinh tổng hợp tế bào, hô hấp (Khan *et al*., 2010). Cây trồng chỉ hấp thu P dạng ion hoà tan (Pi) như: HPO_4^{2-} hoặc $H_2PO_4^-$ (Malboobi *et al.,* 2009). Thế nhưng, trong đất P tồn tại dưới hai dạng là P hữu cơ và P vô cơ. P hữu cơ tồn tại trong xác bã động, thực vật và trong vi sinh vật, thường là các hợp chất chủ yếu như phytin, phospholipid, acid nucleic và các hợp chất hữu cơ khác. P vô cơ trong đất thường ở trong các dạng khoáng như apatit, phosphate sắt, phosphate nhôm và các dạng này khó tan khiến cây trồng không hút được. Ngay cả trong đất giàu P, hầu hết đều ở dạng không hòa tan, và chỉ có một tỷ lệ nhỏ (~ 0,1%phate) khả dụng cho cây trồng (Taurian *et al.*, 2012). Chính vì vậy, để đạt được năng suất cây trồng, người ta thường dùng các dạng phân lân (P) dễ tan để bón cho cây. Tuy nhiên, hiệu quả của phân bón P trên toàn thế giới chỉ đạt khoảng 10 -25% do một tỷ lệ lớn phân lân có thể hòa tan khi bón vào đất dễ dàng bị cố định thành các dạng không hòa tan như calcium monohydrogen dihydrate phosphate ($CaHPO_4.2H_2O$), calcium monohydrogen phosphate ($CaHPO_4$) hay calcium orthophosphate ($Ca_3(PO_4)_2$) và trở nên kém hữu dụng cho cây trồng. Ngoài ra, việc bón quá nhiều P sẽ gây ra ô nhiễm môi trường đất và nước. Để hạn chế những tác động không có lợi của phân bón hóa học đối với môi trường và để tăng hiệu suất sử dụng lân thì việc sử dụng các vi sinh vật chuyển hóa lân bổ sung vào đất là một trong những giải pháp thân thiện với môi trường và hữu hiệu giúp quản lý sự thiếu hụt P trong đất nông nghiệp (Sharma *et al.,* 2013). Hiện nay, đã có nhiều nghiên cứu thành công trong việc sử dụng các nhóm vi sinh vật vùng rễ ứng dụng làm phân bón vi sinh hòa tan phosphate khó tan giúp tăng năng suất cây trồng (Sarkar *et al.,* 2012). Trong các nhóm vi sinh vật vùng rễ thì vi khuẩn tía quang hợp (VKTQH) được quan tâm nghiên cứu, vì đây là nhóm vi khuẩn thủy sinh có khả năng sinh trưởng trong điều kiện kỵ khí bằng cách quang hợp nhưng không thải oxygen như những đối tượng quang dưỡng khác. Nhóm VKTQH có khả năng trao đổi chất rất đa dạng, có thể sinh trưởng được trong điều kiện quang tự dưỡng, quang dị dưỡng, chúng

có khả năng sử dụng đa dạng nguồn carbon trong điều kiện tối và có ánh sáng, trong nhóm này nhiều loài có khả năng loại bỏ sulfide. Chúng còn có khả năng hòa tan phosphate khó tan (Rana *et al.,* 2016), cố định nitrogen phân tử cũng như sản sinh các chất kích thích sinh trưởng như IAA, ALA giúp cây trồng chống chịu lại các điều kiện bất lợi (Sakpirom *et al*., 2017). Bên cạnh đó, người ta còn quan sát thấy VKTQH có mặt trong các môi trường cực trị về nhiệt độ, pH và độ muối (Sakarika *et al*., 2020). Vì vậy, sử dụng VKTQH làm phân bón sinh học có tác dụng tăng năng suất và chất lượng sản phẩm cũng như giảm các tác động bất lợi của hạn mặn hay kim loại nặng gây ra, tăng sức đề kháng của cây chống lại sâu bệnh. Sử dụng phân bón VKTQH còn hạn chế được bệnh thối rễ ở lúa do đất nhiễm sulfur vì các VKTQH có khả năng oxy hóa các hợp chất này tới sulfate (Sakarika *et al*., 2020). Điều quan trọng là ruộng lúa cung cấp các điều kiện thuận lợi cho VKTQH phát triển, đó là môi trường ngập nước thiếu khí và có chứa acetate phân hủy từ rơm rạ và dưới ánh sáng mặt trời. Điều này mang lại cho VKTQH lợi thế về khả năng cạnh tranh đối với các nhóm vi sinh vật khác.Trong nghiên cứu này, chúng tôi phân lập và tuyển chọn các chủng VKTQH có khả năng hòa tan phosphate làm tiền đề ứng dụng VKTQH làm phân bón cho lúa.

NGUYÊN LIỆU PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Đất nông nghiệp chuyên trồng lúa nước (2 vụ/năm), với các mẫu đất và mẫu nước thu thập từ các ruộng lúa nước, ruộng lúa nước nhiễm mặn ven đê biển đã gieo cấy và gieo sạ trong khoảng 1,5 – 2 tháng tại Giao Thủy, Nam Định.

Môi trường phân lập và nuôi cấy VKTQH không lưu huỳnh trong phòng thí nghiệm là môi trường DSMZ 27 bao gồm các thành phần sau: cao nấm men (0,3 g/L), succinate - Na (1 g/L), sodium acetate (0,5 g/L), K_2HPO_4 (1 g/L), KH_2PO_4 (0,5 g/L), $MgSO_4.7H_2O$ (0,4 g/L), $CaCl_2.2H_2O$ (0,05 g/L), NH_4Cl (0,4 g/L), vi lượng cao $SL_6^{(*)}$ (1 mL/L), dung dịch vitamin $B_{12}^{(**)}$ (0,4 mL/L), nước cất (1000 mL), pH (6,8).

Dung dịch vi lượng *SL_6*: HCl (25%) 6,5 mL/L; $FeCl_2.4H_2O$ 1,5 g/L; H_3BO_3 0,3 g/L; $MnCl_2.2H_2O$ 0,03 g/L; $CoCl_2.6H_2O$ 0.2 g/L; $ZnSO_4.7H_2O$ 0,1 g/L; $CuCl_2.2H_2O$ 17 mg/L; $NiCl_2.6H_2O$ 24 mg/L; $Na_2MoO_4.2H_2O$ 36 mg/L, H_2O 993 mL.

Dung dịch vitamin B12: 10 mg hòa tan 100 mL nước được khử trùng bằng màng lọc và bổ sung vào môi trường trước khi sử dụng.

*Môi trường Pikovskaya's Broth cải tiến để nghiên cứu khả năng hòa tan phosphate***:** cao nấm men (0,5 g/L), sodium acetate (1,0 g/L), $MgSO_4.7H_2O$ (0,1 g/L), $MnSO_4$ (0,0001 g/L) $FeSO_4$ (0,0001 g/L) vi lượng SL_6 (1 mL/L), dung dịch vitamin B_{12} (0,4 mL/L), nước cất (1000 mL), pH (6,8), sử dụng các nguồn phốt phát khó tan như: $Ca_3(PO_4)_2$, $AlPO_4$, và $FePO_4$ (5g/L).

Phương pháp nghiên cứu

Làm giàu và phân lập vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh

VKTQH không lưu huỳnh trong các mẫu đã được làm giàu bằng cách nuôi tích lũy trong các chai nhựa trong hình trụ có kích thước Φ = 5 cm, h = 35 cm. Các chai nhựa này được thiết kế theo kiểu cột Winogradsky có cải tiến. Các mẫu đất ruộng lúa được đưa vào chai với tỷ lệ 9: 1, các mẫu nước đưa vào với tỷ lệ 1:1, sau đó các bình này được làm đầy bằng môi trường DSMZ -27 dạng dịch. Các bình này được đậy kín và ủ dưới ánh sáng đèn sợi đốt cường độ sáng ~5000 lux. Sau khoảng một tuần, các vạch màu từ nâu vàng đến đỏ tía xuất hiện trên thành bình (là biểu hiện sự có mặt sắc tố đặc trưng của VKTQH). Lấy mẫu từ vạch màu rồi tiến hành phân lập trên đĩa petri chứa môi trường thạch DSMZ 27, ủ ở điều kiện kỵ khí (không khí được thay thế bằng khí N_2) với cường độ sáng ~5000 lux từ đèn sợi đốt, sau khoảng 3 - 5 ngày xuất hiện các khuẩn lạc tròn có màu nâu, hồng đến đỏ tía. Các khuẩn lạc này được làm sạch theo phương pháp cấy ria và tiến hành ủ mẫu dưới điều kiện kỵ khí chiếu sáng.

Nuôi cấy vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh

VKTQH được nuôi trong ống thủy tinh có nắp đậy cao su hoặc trong các bình thủy tinh hình trụ có thể tích chứa dịch môi trường DSMZ 27. Môi trường trong các bình và các ống thủy tinh được sục khí nitơ qua màng lọc vô trùng thay thế khí oxy trong môi trường sao cho nồng độ oxy hòa tan ~ 0 mg/L. Giống VKTQH được nuôi trong ống thủy tinh V= 12 mL chứa môi trường DSMZ 27 ở điều kiện kỵ khí, chiếu sáng và khi sinh trưởng của chúng ở pha log với mật độ tế bào khoảng 10^9 CFU/mL thì được cấy vào bình thí nghiệm khoảng 5 - 10% (v/v) để đạt mật độ ban đầu OD_{800} khoảng 0,1 của các chủng VKTQH.

Đánh giá sinh trưởng các chủng vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh

Sinh trưởng của các chủng VKTQH được đánh giá bằng cách xác định độ hấp phụ của dịch huyền phù tế bào tại bước sóng 800 nm (OD_{800}), vì trong tế bào VKTQH bacteriochlorophyll (Bchl) có cực đại hấp thụ ở 800 nm và độ hấp thụ này tỷ lệ với hàm lượng Bchl và do vậy tỷ lệ thuận với sinh khối của tế bào. Các chỉ số này được đo trên máy quang phổ Novaspec II hoặc máy quang phổ UV - 1650PC.

Phương pháp nghiên cứu hệ sắc tố và hình thái của vi khuẩn tía quang hợp: Phổ hấp thụ *Bacteriochlorophyll* ở trong tế bào nguyên được xác định theo phương pháp quang phổ ở vùng 400 - 900 nm trên máy quang phổ Novaspec II (Anh) và máy quang phổ UV - 1650PC (Nhật Bản). Hình thái tế bào được quan sát dưới kính hiển vi quang học OLYMPUS (Nhật Bản).

Khả năng hòa tan phosphate khó tan

Khả năng hòa tan phosphate khó tan được đánh giá bằng cách nuôi chủng vi khuẩn trong môi trường Pikovskaya cải tiến (Liu *et al.,* 2017) có chứa 5 g/L của mỗi loại phosphate khó tan ($Ca_3(PO_4)_2$, $AlPO_4$ và $FePO_4$). Các chủng thử nghiệm được nuôi cấy trong môi trường DSMZ 27 dạng dịch lỏng đạt mật độ 10^9 CFU/mL và được bổ sung vào môi trường với nồng độ 10% (v/v), các bình thí nghiệm được đậy nắp cao su và để ở điều kiện chiếu sáng khoảng 3000 lux, đối chứng chỉ chứa môi trường và không được bổ sung vi khuẩn, trong điều kiện 25 – 35 ^oC. Sau 7 ngày nuôi cấy, dịch được ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 15 phút thu dịch nổi để đánh giá hàm lượng phosphate hòa tan tạo ra trong môi trường bằng thuốc thử Molipdate.

Phương pháp xác định phosphate dễ tan: Hàm lượng phosphate dễ tiêu trong môi trường nuôi được xác định theo tiêu chuẩn Việt Nam: TCVN 5256:2009.

Phương pháp tách chiết DNA tổng số: DNA tổng số của các chủng VKTQH được tách chiết theo phương pháp chuẩn thông thường đã được mô tả theo Sambrook và đồng tác giả (2001). Độ tinh khiết và nồng độ nucleotide được xác định bằng máy quang phổ hấp thụ OD_{260}.

Phương pháp PCR (Polymerase Chain Reaction)

Gen 16S rDNA của 2 chủng được nhân bản với các cặp mồi tương ứng 27F và 1527 R trong phản ứng PCR có các thành phần sau: thể tích là 25 µL/mẫu gồm: 2,5 µL đệm 10x PCR; 2,5 µL $MgCl_2$ (25 mM); 2 µL dNTP (2,5 mM); 1 µL 27F (10 ng); 1 µL 1527R (10 ng); 2µL DNA (~100 ng); 0,25 µL Taq DNA polymerase (5 U/ µL); 13,75 µL H_2O (Mullis et al, 1986).

Chu trình nhiệt để tiến hành phản ứng PCR nhân gen 16S rDNA: 95^oC/3 phút; 30 chu kỳ (95^oC/30 giây; 50^oC/45 giây; 72^oC/50 giây); 72^oC/8 phút.

Xác định trình tự acid nucleic

Sau khi tinh sạch đoạn gen 16S rDNA, đoạn gen được giải trình tự theo nguyên lý của Sanger, 1977 (Sanger *et al.*, 1977). Sản phẩm PCR đã gắn huỳnh quang được phân tích trên máy xác định trình tự DNA tự động (ABI - Avant Genetic analyzer) với bộ kit của hãng Applied Biosystems tại Viện Nghiên cứu Hệ gen. Các phần mềm BLAST và DNAStar được sử dụng để xử lý trình tự nucleotide.

Phương pháp xử lý thống kê sinh học

Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình của các lần lặp lại thí nghiệm ± độ lệch chuẩn (Standard Deviation - SD).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân lập vi khuẩn tía quang hợp không lưu huỳnh

Từ các mẫu nước và bùn thu thập tại các ruộng lúa nước nhiễm mặn sau khi cấy 1,5 – 2 tháng tại Giao Thủy, Nam Định, chúng tôi đã phân lập được 13 chủng VKTQH. Các chủng VKTQH phân lập được có màu sắc, kích thước và hình dáng khuẩn lạc rất đa dạng. Màu sắc khuẩn lạc của chúng chủ yếu là nâu, nâu vàng, nâu đỏ, đỏ tía, đỏ đậm và hồng. Hình thái tế bào của các chủng này cũng rất đa dạng: từ hình que ngắn, hình ovan đến hình cầu. Không quan sát thấy giọt lưu huỳnh bên trong tế bào, chúng sinh sản đa phần theo kiểu phân đôi và nảy chồi. Từ các đặc điểm về hình dạng tế bào và quan sát giọt lưu huỳnh bên trong tế bào chúng tôi thấy 13 chủng phân lập được đều thuộc họ *Rhodospirillaceae* là họ VKTQH không lưu huỳnh.

Kết quả tuyển chọn VKTQH có khả năng hòa tan phosphate khó tan trong điều kiện vi hiếu khí có chiếu sáng

Các chủng phân lập được tiến hành đánh giá khả năng hòa tan phosphate khó tan. Hàm lượng phosphate dễ tan trong dịch nuôi được xác định theo phương pháp hiện màu Molypdate. Sau 7 ngày nuôi cấy, kết quả thu được trình bày trên Bảng 1 và Bảng 2.

Bảng 1. Khả năng sinh trưởng của các chủng VKTQH (OD_{800}) trong môi trường chứa các nguồn phosphate khó tan khác nhau ở điều kiện vi hiếu khí, chiếu sáng

STT	Tên chủng	OD_{800}		
		Nguồn $Ca_3(PO_4)_2$	Nguồn $AlPO_4$	Nguồn $FePO_4$
1	GT_1	2,08±0,18	1,98±0,12	2,00±0,17
2	GT_2	2,03±0,15	2,28±0,19	2,13±0,14

3	GT_{21}	2,32±0,13	2,13±0,60	2,92±0,18
4	GT_{11}	2,11±0,16	1,95±0,13	2,06±0,27
5	GT_3	2,25±0,14	2,04±0,21	2,31±0,22
6	GT_{31}	2,39±0,18	2,05±0,24	2,40±0,27
7	GT_4	2,43±0,15	2,22±0,23	2,48±0,36
8	GT_5	2,40±0,18	2,48±0,35	2,35±0,25
9	GT_6	1,78±0,12	1,78±0,14	2,09±0,22
10	GT_7	1,64±0,21	1,99±0,24	2,20±0,30
11	GT_8	2,17±0,19	1,97±0,30	2,07±0,30
12	GT_9	2,21±0,15	2,07±0,30	2,31±0,25
13	GT_{10}	2,33±0,30	2,31±0,25	2,53±0,50

Kết quả từ Bảng 1 cho thấy 13 chủng phân lập được đều có khả năng sinh trưởng tốt trong môi trường Pikovskaya cải tiến có chứa 5 g/L của mỗi loại phosphate khó tan ($Ca_3(PO_4)_2$, $AlPO_4$, và $FePO_4$). Tuy nhiên, tùy từng chủng sinh trưởng khác nhau trên môi trường có chứa nguồn phosphate khó tan khác nhau. Đối với nguồn $Ca_3(PO_4)_2$ và $FePO_4$ hầu như các chủng đều sinh trưởng khá tốt. Riêng nguồn $AlPO_4$ các chủng phân lập được cũng sinh trưởng khá tốt tuy nhiên, khả năng sinh trưởng trung bình kém hơn đối với nguồn $Ca_3(PO_4)_2$ và $FePO_4$. Ở điều kiện vi hiếu khí, chiếu sáng ngoài đánh giá khả năng sinh trưởng, các chủng phân lập được xác định khả năng hòa tan phosphate khó tan thành dạng dễ tan cho cây trồng. Kết quả đánh giá được thể hiện trên Bảng 2.

Bảng 2. Hàm lượng phosphate dễ tiêu (mg P_2O_5/L) tích lũy trong dịch nuôi của các chủng VKTQH phân lập được trong điều kiện vi hiếu khí có chiếu sáng

STT	Tên chủng	mg P_2O_5/L		
		Nguồn $Ca_3(PO_4)_2$	Nguồn $AlPO_4$	Nguồn $FePO_4$
1	GT_1	12,08±1,2	8,8±2,0	15,0±2,5
2	GT_2	44,2±2,5	20,0±1,9	45,5±3,1
3	GT_{21}	85,8±3,1	60,7±2,4	62,3±3,2
4	GT_{11}	38,4±3,6	60,0±2,5	38,4±2,5
5	GT_3	15,4±2,4	12,8±2,3	15,3±2,6
6	GT_{31}	32,5±2,3	23,7±2,1	60,8±2,2
7	GT_4	77,1±2,2	75,5±3,4	78,9±3,1
8	GT_5	72,6±2,5	26,3±2,5	60,4±2,3
9	GT_6	32,3±3,6	21,4±2,1	35,7±2,4
10	GT_7	17,9±2,1	11,2±1,1	18,9±2,2
11	GT_8	18,7±2,3	15,7±2,2	16,6±2,1
12	GT_9	15,3±2,4	16,3±2,5	22,1±2,4
13	GT_{10}	51,4±3,8	35,7±3,4	75,0±4,6

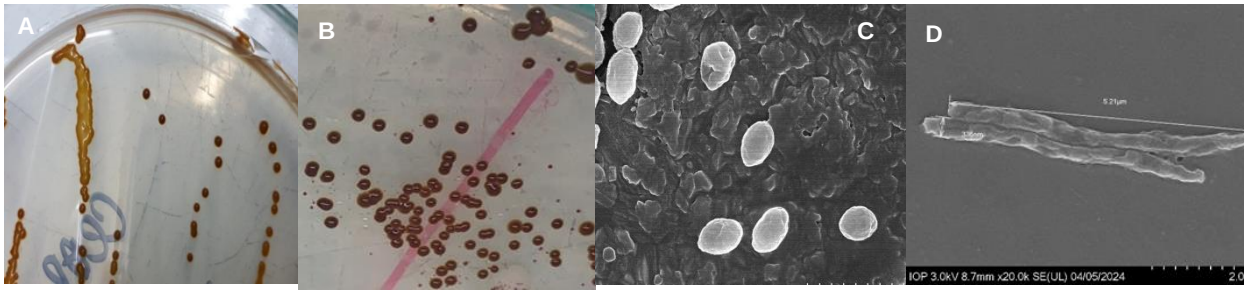
Kết quả cho thấy 13 chủng VKTQH đều có khả năng sinh trưởng và hòa tan các dạng lân khó tan như $Ca_3(PO_4)_2$, $AlPO_4$, và $FePO_4$, tuy nhiên, khả năng hòa tan phosphate ở mỗi chủng khác nhau. Trong điều kiện vi hiếu khí, sáng, các chủng sàng lọc có khả năng hòa tan phosphate dạng $Ca_3(PO_4)_2$ dao động từ 12,8±1,2 đến 85,8±3,1 mg/L, dạng $AlPO_4$ dao động từ 8,8±2,0 đến 75,5±3,4 mg/L, dạng $FePO_4$ dao động từ 15,0±2,5 đến 78,9±3,1 mg/L. Trong số 13 chủng sàng lọc, các chủng hòa tan lân dạng $Ca_3(PO_4)_2$ trong môi trường nuôi cấy Pikovskaya cải tiến dạng lỏng là cao nhất, kế đến là nghiệm thức chứa nguồn lân dạng $FePO_4$ và hòa tan kém hơn là nghiệm thức chứa nguồn $AlPO_4$. Điều này có thể giải thích là do hai nguồn $FePO_4$ và $AlPO_4$ có cấu trúc phức tạp hơn nhiều so với nguồn lân $Ca_3(PO_4)_2$ (Mendes *et al.,* 2014). Nhiều nghiên cứu công bố vi sinh vật thể hiện khả năng hòa tan lân thấp hơn trong môi trường chứa $AlPO_4$ và $FePO_4$. Mặc dù khả năng hòa tan 2 dạng lân ở 2 dạng $AlPO_4$ và $FePO_4$ thấp hơn dạng $Ca_3(PO_4)_2$ nhưng kết quả này cho thấy vi khuẩn tía có khả năng hòa tan được 2 dạng khó tan trong đất đặc biệt là vùng đất phèn nơi lân tồn tại dạng khó tan là $AlPO_4$ và $FePO_4$. Khả năng hòa tan lân dạng $Ca_3(PO_4)_2$ của các chủng phân lập được tương đương với khả năng hòa tan lân của chủng *Rhodopseudomonas* sp. KL9 do nhóm tác

giả Koh và Song (2007) công bố. Tuy nhiên, các chủng phân lập được hòa tan các dạng lân khó tan thấp hơn so với các chủng có khả năng chống chịu acid phân lập tại Thái Lan do nhóm tác giả Nookongbut và đồng tác giả công bố năm 2019. Trong số 13 chủng sàng lọc thì có các chủng GT_4, GT_{21} có khả năng hòa tan phosphate cả 3 dạng đều cao nhất và được chúng tôi lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo. Như vậy, các chủng VKTQH phân lập được từ các ruộng lúa nhiễm mặn có khả năng hòa tan các dạng phosphate khó tan, đặc biệt là 2 dạng Al – P và Fe-P. Do đó có thể ứng dụng các chủng này làm phân bón sinh học giúp chuyển hóa các dạng lân khó tan trong đất thành các dạng lân dễ tan cho cây trồng hấp thu đồng thời cải thiện hiện tượng thiếu hụt lân trong những vùng nhiễm mặn và nhiễm phèn.

Những đặc điểm sinh học cơ bản của các chủng VKTQH không lưu huỳnh được lựa chọn

Hình thái tế bào chủng GT_4: Khuẩn lạc của chủng GT_4 có hình tròn, bề mặt lồi, rìa phẳng, màu nâu vàng,đường kính từ 1,1 - 1,3 mm. Dịch huyền phù tế bào có màu nâu đỏ. Tế bào của chủng này có hình trứng, tồn tại ở dạng đơn bào hoặc có thể tạo chuỗi tế bào, kích thước 0,086 x 0,915 µm, sinh sản bằng cách nhân đôi, không quan sát thấy "giọt " lưu huỳnh tích lũy trong tế bào (Hình 1). Chủng GT_4 là vi khuẩn Gram (-). Các đặc điểm hình thái chủng này tương tự với các loài thuộc chi *Rhodobacter*.

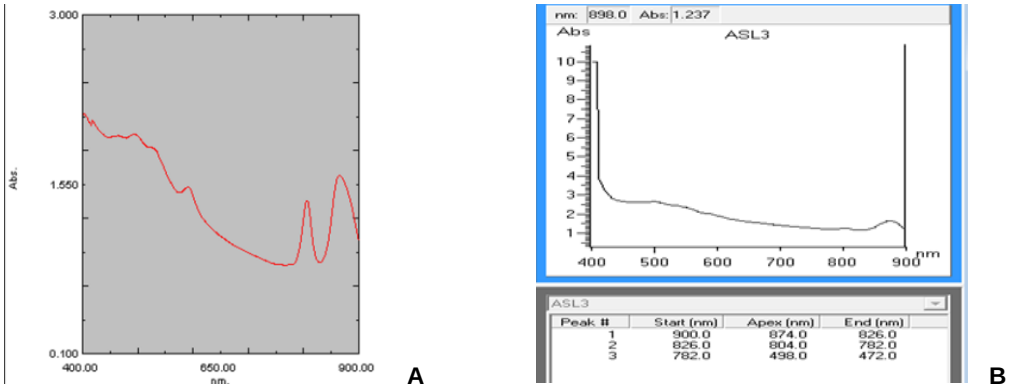
Hình thái tế bào chủng GT_{21}: Khuẩn lạc không tròn, bề mặt lồi, bóng, rìa trong màu nâu đậm d=1,2-1,6 mm. Dịch huyền phù tế bào có màu đỏ nâu. Tế bào của chủng này có dạng hình xoắn dài kích thước chiều dài 3,5-5,21 µm, chiều rộng 0,3-0,5 µm tồn tại ở dạng đơn bào hoặc có thể tạo chuỗi tế bào không quan sát thấy "giọt " lưu huỳnh tích lũy trong tế bào. Chủng GT_{21} là vi khuẩn Gram (-). Các đặc điểm hình thái chủng này tương tự với các loài thuộc chi *Rhodospirillum*



Hình 1. Hình dạng khuẩn lạc (A), hình dạng tế bào dưới kính hiển vi điện tử JEM (C) của chủng GT_4; Hình dạng khuẩn lạc (B), hình dạng tế bào dưới kính hiển vi điện tử JEM (D) của chủng GT_{21}

Đặc điểm sắc tố quang hợp

Đặc trưng cơ bản nhất để phân biệt VKTQH với các sinh vật quang dưỡng khác là khả năng tổng hợp các loại bacteriochlorophyll (Bchl) khi được chiếu sáng. Hai chủng VKTQH không lưu huỳnh lựa chọn được nuôi cấy kỵ khí, chiếu sáng trong môi trường DSMZ 27 dịch thể. Sau 4 ngày nuôi cấy, các chủng VKTQH không lưu huỳnh đều đạt tới giữa pha sinh trưởng (pha log). Dịch huyền phù tế bào được lấy ra để đo phổ hấp thụ trên máy quang phổ. Kết quả được trình bày ở Hình 2.



Hình 2. Phổ hấp phụ dịch huyền phù tế bào của các chủng lựa chọn *(Chú thích; A- Chủng GT_4: B- Chủng GT_{21})*

Kết quả cho thấy, phổ hấp phụ dịch huyền phù tế bào của các chủng có các điểm cực đại khác nhau: Chủng GT_4 có các cực đại tại 447, 476, 506, 588, 800 và 855 nm. Chủng GT_{21} có cực đại hấp thụ tại bước sóng 782, 804 và 874 nm. Trong vùng phổ 700 - 900 nm, chủng GT_{21} có cực đại tại bước sóng 804 và 874 nm, chủng GT_4 có cực đại tại 800 và 855 nm. Mặc dù chúng có các điểm cực đại khác nhau nhưng đều ở vùng 800 - 900 nm đặc trưng cho *bacteriochlorophyll* a. Kết quả này cho thấy cả 2 chủng nghiên cứu đều chứa Bchl a (Plennig & Trueper, 1992).

Xác định trình tự gen 16S - rDNA của các chủng lựa chọn

DNA tổng số của các chủng nghiên cứu được tách chiết và sử dụng đoạn mồi đặc hiệu để khuếch đại gen 16S rDNA. Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR trên bản gel điện di cho thấy chỉ có duy nhất một băng có kích thước khoảng 1500 bp, phù hợp với kích thước của gen 16S rDNA ở vi khuẩn. Sản phẩm PCR trên điện di đồ là một băng DNA duy nhất sáng rõ nét và có kích thước khoảng 1500 bp, kích thước này phù hợp với kích thước của gen 16S rDNA ở vi sinh vật có nhân nguyên thủy. Sản phẩm PCR thu được đủ tiêu chuẩn để tiến hành tinh sạch và đọc trình tự. Kết quả đọc trình tự cho thấy: gen 16S rDNA của các chủng GT_4 và GT_{21} có kích thước ~1500 bp. Chúng tôi đã tiến hành so sánh mức độ tương đồng của gen 16S- rDNA ở 2 chủng lựa chọn với những kết quả đã công bố trên Ngân hàng gen thế giới (Genbank). Kết quả so sánh được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả so sánh trình tự gen 16S- rDNA của các chủng VKTQH chọn lựa với dữ liệu trên GenBank

Chủng	Tên loài so sánh	Mã số GenBank	% tương đồng
GT_4	*Rhodobacter sphaeroides strain YL101 16S ribosomal RNA gene,*	MG576212.1	99,93
	Rhodobacter sphaeroides strain JA193 16S ribosomal RNA gene	MN605656.1	99,78
	Rhodobacter sphaeroides strain JA192 16S ribosomal RNA gene	MN605655.1	99,78
GT_{21}	*Rhodospirillum centenum* SW, complete genome	CP000613.2	99,63
	Rhodocista pekingensis partial 16S rRNA gene, strain JA405	FM177580.11	99,33
	Rhodocista sp. AR2107 partial 16S rRNA gene	AJ401217.1	99,26

Kết quả giải trình tự và phân tích đoạn gen 16S rDNA của 2 chủng vi khuẩn cho thấy đoạn gen 16S rDNA của chủng GT_4 tương đồng cao 99,93% với các đoạn tương ứng của các chủng vi khuẩn thuộc loài *R. sphaeroides* YL101 (MG576212). Chủng GT_{21}`có trình tự gen tương đồng từ 99,93 % so với loài *Rhodospirillum centenum* và tương đồng 99,33% so với loài *Rhodospirillum centenum.* Như vậy, dựa vào hệ thống phân loại của Bergey's (1989, 2005) và từ các đặc điểm sinh học cơ bản của các chủng VKTQH không lưu huỳnh chọn lựa như hình dạng tế bào, hình thức sinh sản, sắc tố quang hợp và kết quả phân tích trình tự nucleotide của gene 16S-rDNA có thể cho rằng chủng GT_4 thuộc loài *Rhodobacter sphaeroides,* chủng GT_{21} có nhiều đặc điểm giống chi *Rhodospirillum.* Tuy nhiên, để biết chủng GT_{21} thuộc loài nào thì cần có những nghiên cứu sâu hơn (vì hai loài *Rhodospirillum centenum* và *Rhodospirillum centenum* có nhiều đặc điểm sinh học đặc biệt so với các loài VKTQH). Vì vậy, chúng tôi cho rằng chủng GT_{21} thuộc chi *Rhodospirillum.*

KẾT LUẬN

Đã phân lập được 13 chủng vi khuẩn tía quang hợp có đặc điểm hình thái khuẩn lạc khác nhau từ các mẫu bùn và đất ruộng lúa thường và ruộng lúa nhiễm mặn ven biển Giao Thủy, Nam Định. Các chủng phân lập được đều có khả năng sinh trưởng và có hoạt tính hòa tan 3 hợp chất P dạng khó tan: $Ca_3(PO_4)_2$, $AlPO_4$, và $FePO_4$, trong đó có 2 chủng GT_4 và GT_{21} có khả năng hòa tan 3 hợp chất P dạng khó tan cao nhất. Dựa vào hệ thống phân loại của Bergey's (1989 và 2005), các đặc điểm sinh học cơ bản của 2 chủng VKTQH không lưu huỳnh chọn lựa như hình dạng tế bào, hình thức sinh sản, sắc tố quang hợp và kết quả phân tích trình tự nucleotide của gene 16S-rDNA, có thể cho rằng chủng GT_4 thuộc loài *Rhodobacter sphaeroides,* chủng GT_{21} thuộc chi *Rhodospirillum.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Imhoff JF, Hiraishi A, Suling J (2005). *Anoxygenic phototrophic purple bacteria*. Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 2*. George M. Garrity: 1- 41.

Imhoff JF, Trueper HG (1989). Purple non-sulfur bacteria (Rhodospirillaceae Pfennig and Trueper 197, 17AL), P: 1438-1680. In: Staley JT; Bryant M P; Pfennig N, and Holt JG. (eds.). Bergey' manual of Systematic Bacteriology. Vol. 3. Williams and Wilkins. Baltimore.

Kantachote D, Nunkaew T, Kantha T, Chaiprapat S (2016) Biofertilizers from Rhodopseudomonas palustris strains to enhance rice yields and reduce methane emissions. *Appl Soil Ecol* 100: 154–161.

Liu M, Liu X, Cheng B, Ma X, Lyu X, Zhao X, Ju Y, Min Z, Fang Y (2017). Selection and evaluation of phosphate-solubilizing bacteria from grapevine rhizospheres for use as biofertilizers. *Span J Agric Res* 14(4):e1106.

Malboobi M A, Owlia P, Behbahani M, Sarokhani E, Moradi S, Yakhchali B, Deljou A, & Morabbi HK (2009). Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(8): 1471-1477.

Mendes GDO, Freitas ALM, Pereira OL, Silva IR, Vassilev NB, Costa MD (2014). Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to differen P sources. *Annals of Microbiology*, 64 (1): 239 -249.

Nookongbut P, Kantachote D, Khương NQ, Sukhoom A, Tantirungkij M, Limtong S (2019). Selection of Acid-Resistant Purple Nonsulfur Bacteria from Peat Swamp Forests to Apply as Biofertilizers and Biocontrol Agents. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*.

Sarkar A, Islam T, Biswas G, Alam S, Hossain M, Talukder N (2012). Screening for phosphate solubilizing bacteria inhabiting the rhizoplane of rice grown in acidic soil in Bangladesh. *Acta Microbiol Immunol Hung* 59(2): 199-213.

Rana G, Meikap S, Mondol M, and Bose PP (2016). Green-fertilizer, *Rhodospirillum rubrum,* for agricultural development on fly-ash without any toxic metal ion release. *Basic Res J Agric Sci* Rev 5: 109–117

Sakarika M, Spanoghe J, Sui Y, Wambacq E, Grunert O, Haesaert G, Vlaeminck SE (2020). Purple non sulfur bacteria and plant production: benefits for fertilization, stress resistance and the environment. *Microbial biotechnology* 13 (5):133-1365.

Sakpirom J, Kantachote D, Nunkaew T, and Khan E (2017). Characterizations of purple non-sulfur bacteria isolated from paddy fields, and identification of strains with potential for plant growth-promotion, greenhouse gas mitigation and heavy metal bioremediation. *Res Microbiol* 168: 1–10.

Sambrook J, Russell DW (2001). *Molecular cloning. A Laboratory Manual,* 3 rd ed. Cold spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1997). DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the* USA 74, 5463-5467.

Sharma SB, Sayyed RZ, Trivedi MH, Gobi TA (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus* 2: 565- 587.

ABILITY TO SOLUBILIZE INSOLUBLE PHOSPHATES OF PHOTOSYNTHETIC PURPLE BACTERIAL STRAINS ISOLATED FROM RICE SOIL SAMPLES AT GIAO THUY COAST - NAM DINH

Do Thi Lien[1], Cung Thi Ngoc Mai[1], Đo Thi To Uyen[1], Vương Thi Nga[1], Nghiem Thi Ha Lien[2*], Tran Thi Mai[1], Le Thi Nhi Cong[1]

[1]*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

[2]*Institute of Physics, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

The use of microbial fertilizers has been receiving attention because they not only help increase productivity and improve the quality of agricultural products but are also environmentally friendly, especially in saline and acid soil conditions increasing due to climate change. In this study, 13 strains of photosynthetic purple bacteria were isolated from rice fields in the coastal area of Giao Thuy, Nam Dinh. All isolated strains have the ability to grow and solubilize insoluble phosphates such as: $Ca_3(PO_4)_2$, $AlPO_4$, and $FePO_4$. Under microaerobic, bright condition, 13 isolated strains had the ability to solubilize $Ca_3(PO_4)_2$ ranging from 12.8 to 85.8 mg/L, $AlPO_4$ form ranged range from 8.8 to 75.5 mg/L, $FePO_4$ form ranges from 15.0 to 78.9 mg/L, Among them, strains of GT_4 and GT_{21} were determined to exhibit the hightest phosphate solubilisasion with 3 insoluble P compounds. Colonies of GT_4 strain were a round shape, convex surface, flat edges, yellow brown color. The cell suspension is reddish brown. Using electron microscope technique shown that, cells of GT_4 strain were ovan with 0.086 x 0.915 μm in size and divided by binary fission. Colonies of strain GT_{21} were not round, the surface was convex, shiny, and the inner was dark brown. The cell suspension is red-brown in color. The cells of this strain have a long spiral shape, measuring (3.5-5.21 μm x 0.3-0.5 μm). Photosynthetic pigments were bacteriochlorophyll a in both of them. Globules of elemental sulfur were not invisible inside the cells and are Gram (-) bacteria both of strains. Obtained results of morphological and 16S rDNA gene nucleotide sequences, based on Bergey's systematic of bacteriology (2nd Edition, 2005), it can be assumed that GT_4 strain belongs to the species *Rhodobacter sphaeroides*, GT_{21} strain belongs to the genus *Rhodospirillum*.

Keyword: Insoluble phosphate; Microbial fertilizers; Photosynthetic purple bacteria; *Rhodobacter sphaeroides*; *Rhodospirillum.*

* Author for correspondence: Tel:+84-973161388; Email: lien.ibt@gmail.com

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ NẤM *Colletotrichum gloeosporioides* GÂY BỆNH THÁN THƯ TRÊN TRÁI XOÀI CỦA MỘT SỐ CHỦNG NẤM MEN

Trần Thị Thu Hà[2*], Trương Quang Toản[2], Nguyễn Thị Vân Khanh[2], Vũ Ngọc Khánh Như[2], Lê Ngọc Tường An[1], Nguyễn Thị Thu Ngân [1], Bành Hữu Tình [1], Trương Phước Thiên Hoàng[2], Đào Uyên Trân Đa[2]

[1]*Khoa Khoa học sinh học – Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh*

[2]*Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường – Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh*

[*]*Giáo viên hướng dẫn*

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm thu thập, phân lập và định danh một số dòng nấm men có trên vỏ xoài Cát Hòa Lộc có khả năng ức chế nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên trái xoài ở giai đoạn sau khi thu hoạch. Trong nghiên cứu này, các chủng nấm men phân lập từ vỏ trái xoài được định danh dựa vào nhiều phương pháp khác nhau bao gồm đặc điểm hình thái, đặc điểm sinh hóa và phân tích trình tự 26S rDNA. Kết quả xác định được ba loài nấm men bao gồm *Hanseniaspora thailandica, Hanseniaspora oputiae* và *Pichia barkeri*. Sau đó khả năng ức chế của các chủng nấm men này đối với nấm *Colletotrichum gloeosporioides* được thực hiện bằng phương pháp đồng nuôi cấy trong điều kiên *in vitro*, kết quả cho thấy có tỷ lệ đối kháng cao trên 50% sau 10 ngày nuôi cấy. Nghiên cứu này bước đầu cho thấy sử dụng nấm men để kiểm soát sinh học là phương pháp tiềm năng để kiểm soát các tác gây bệnh trên trái xoài sau thu hoạch.

Từ khóa: Colletotrichum gloeosporioides, nấm men, xoài Cát Hòa Lộc.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Xoài (*Mangifera indica* L.) là loại trái cây nhiệt đới có giá trị kinh tế quan trọng ở các quốc gia trên toàn thế giới. Đây là loại trái cây chứa nhiều chất xơ, vitamin, carotenoids và nhiều chất có hoạt tính chống oxy hóa. Tuy nhiên, xoài sau khi thu hoạch dễ bị bệnh và hư hỏng. Bệnh thán thư (anthracnose) do nấm *Colletotrichum* spp. là nguyên nhân chính dẫn đến sự hư hỏng của trái xoài sau thu hoạch, bệnh gây ra các đốm hoại tử trên vỏ, tiến triển thành vết bệnh trũng. Những thiệt hại này làm ảnh hưởng đến chất lượng của trái cây và do đó hạn chế cơ hội bán hàng cả trong nước và quốc tế.

Việc quản lý nấm *Colletotrichum* gây bệnh thán thư trên trái cây bằng cách sử dụng thuốc diệt nấm như mancozeb, carbendazim, prochloa và Tecto 60 (Chechi *et al*., 2019; Sengupta *et al*., 2020) có hiệu quả nhanh, tuy nhiên dẫn đến sự tích tụ các chất độc hại có khả năng gây nguy hiểm cho sức khỏe con người, ô nhiễm môi trường (Singh *et al*., 2016) , cùng với sự xuất hiện của các chủng kháng thuốc diệt nấm (Tian *et al*., 2016) nhu cầu cấp thiết phải phát triển chiến lượt kiểm soát sinh học mới thân thiện với môi trường (Carmona-Hernadez *et al*., 2019; Zhang *et al*., 2018). Một biện pháp khác được áp dụng là xử lý hơi nước nóng nhưng việc kiểm soát đồng nhất nhiệt độ gặp khó khăn nên xoài thường bị tổn thương do nhiệt (Arauz, 2000). Vi khuẩn, nấm men và nấm sợi được coi là tác nhân kiểm soát sinh học tiềm năng với hoạt tính kháng nấm phổ rộng (Konsue *et al*., 2020). Kiểm soát sinh học bằng cách sử dụng nấm men là một trong các phương pháp thay thế đầy hứa hẹn trong kiểm soát bệnh thối trên trái và rau sau thu hoạch. Với ưu điểm nấm men phát triển nhanh, chịu được khô hạn, không sản sinh ra các loại độc tố và phấn gây dị ứng (Droby, Chalutz, 1994). Các loài nấm men *Pichia guilliermondii*, *Candida musae*, *Issatchenkia orientalis* và *Candida quercitrusa* đã được sử dụng để ức chế sự phát triển của nấm *C. capsici* trên cây ớt (*Capsicum annum* L.) ở Thái Lan (Chanchaichaovivat *et al*., 2007),*Torulaspora globosa* được dùng để ức chế *C. sublineolum* trên cây bo bo (sorghum: *Sorghum biocolr* (L) Moench) ở Brazil (Rosa *et al*., 2010) và *Candida membranifaciens* được sử dụng đối kháng với nấm *C. gloeosporioides* trên xoài (*Mangifera indica* L.) trồng ở Ethiopia (Kefialew, Ayalew, 2008).

Để góp phần tăng cường hiệu quả và mức độ an toàn trong phòng trị nấm *C. gloeosporioides* cũng như làm cơ sở cho việc sử dụng nấm men để kiểm soát sinh học bệnh gây hại trên trái xoài sau thu hoạch và phục vụ cho những nghiên cứu sâu hơn, đề tài này được thực hiện nhằm phân lập và định danh được các dòng nấm men trên trái xoài sau thu hoạch, khả năng ức chế đối với nấm *C. gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên trái xoài.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Nguồn nấm *C. gloeosporioides* được cung cấp bởi Phòng Thí nghiệm Vi sinh ứng dụng – Viện Nghiên cứu Công

nghệ Sinh học và Môi trường- Trường Đại học Nông Lâm Tp.HCM. Tổng cộng 50 mẫu xoài Cát Hòa Lộc đã thu hoạch và hoàn toàn sạch bệnhđược thu thập ở các huyện của tỉnh Đồng Tháp. Môi trường trường nuôi cấy và thử nghiệm đặc tính sinh hóa của nấm men gồm: YPD (yeast extract 0,5%, peptone 0,5%, glucose 2,0%) và môi trường YPD agar (môi trường YPD bổ sung 1,5% agar); môi trường Christensen (urea 20 g/L; yeast extract 0,1 g/L; Na_2HPO_4 9,5 g/L; K2HPO4 9,1 g/L; phenol red 0,01 g/L; pH 6,7) (Christensen, 1946).

Phân lập và định danh nấm men dựa vào đặc điểm hình thái và các phản ứng sinh hóa

Định danh nấm men dựa vào đặc điểm hình thái

Quả xoài sau khi thu về loại bỏ những quả hư hỏng, rửa bằng nước sạch loại bỏ bụi bẩn. Phân lập theo phương pháp tạo khuẩn lạc đơn (Nguyễn Văn Minh, Dương Nhật Linh, 2008): cân 10 g mẫu vỏ quả (không bao gồm thịt quả) cho vào bình tam giác có chứa 100 ml môi trường YPG (đã được khử trùng ở 121^oC trong 15 phút) tăng sinh ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ. Pha loãng dịch tăng sinh vỏ xoài với 9 mL nước cất và cấy trang lần lượt ở các nồng độ 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} trên môi trường YPGA và ủ mẫu trong 2 ngày. Chọn khuẩn lạc riêng lẻ, cấy chuyền đến khi thu được khuẩn lạc nấm men thuần. Định danh các dòng nấm men phân lập được dựa vào các đặc điểm hình thái: khuẩn lạc, hình thái và kích thước tế bào, hình thức sinh sản của Nguyễn Đức Lượng và đồng tác giả (2006), Lương Đức Phẩm (2009), Kurtzman và đồng tác giả (2011).

Định danh nấm men dựa vào các phản ứng sinh hóa: phản ứng lên men đường, hoạt tính phân giải nitrate và urea

Khảo sát khả năng lên men đường glucose, sucrose và lactose: Với các dòng nấm phân lập được, nuôi sinh khối nấm men trong môi trường YPG đã khử trùng ở 121^oC trong 15 phút ủ ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Tiến hành hút 1 ml dung dịch sinh khối nấm men đã đạt 10^8 tế bào/mL cho vào các ống nghiệm có chứa 9ml dung dịch đường lần lượt là: glucose 2% (w/v), sucrose 2% (w/v) và lactose 2% (w/v) và ống Durham đã được khử trùng ở 115^oC trong 15 phút và ủ lên men. Quan sát và đo chiều cao cột khí CO_2 trong ống Durham bắt đầu từ sau 2 giờ cho đến thấy cột khí đầy ống Durham (chiều cao tối đa là 30mm). Phản ứng Citrate lấy khuẩn lạc đơn của các dòng nấm men cấy vào ống nghiệm chứa môi trường Simmon citrate theo đường ziczac, quan sát kết quả trong 48 giờ. Đánh giá khả năng phân giải urê: Các dòng nấm men phân lập được tăng sinh trong môi trường YPG trên máy lắc ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Cho 0,5 mL dịch tăng sinh nấm men đạt 10^8 tế bào/mL vào ống nghiệm có chứa sẵn 4,5 mL môi trường Christensen (đã được khử trùng ở 115^oC trong 15 phút) và ủ ở 30^oC trong 1 tuần. Kết quả dương tính khi môi trường chuyển sang màu đỏ sẫm

Định danh nấm men bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Các dòng nấm men sau khi được cấy ria làm thuần trên môi trường YPGA, tách chiết DNA theo phương pháp ly trích SDS - Phenol - Chloroform method (Lee và Taylor, 1998), có cải tiến. Thực hiện phản ứng PCR khuyếch đại vùng D1/D2 26S rDNA với cặp mồi NL1 (5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') và NL4 (5' GGTCCGTGT TTCAAGACGG 3') (Ochoa et al., 2007). Chu trình nhiệt được thực hiện cho phản ứng PCR: Tiền biến tính: 95^oC trong 5 phút; Biến tính: 95^oC trong 30 giây; Bắt cặp: 52^oC trong 1 phút; Kéo dài: 72^oC trong 10 phút; Hậu kéo dài: 4^oC. Chương trình Nucleotide BLAST được sử dụng để xác địnhmức độ tương đồng của trình tự được giải trình tự của các dòng nấm men trong ngân hàng gen NCBI với các thông số mặc định.

Đánh giá khả năng ức chế của các dòng nấm men và nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên trái xoài

Việc đánh giá tính đối kháng được thực hiện đồng nuôi cấy trên đĩa petri chứa môi trường nuôi cấy PGA. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, đơn yếu tố, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Các chủng nấm men phân lập được sử dụng trên các đĩa, 10 µl huyền phù nấm men thu được như mô tả ở trên được cấy ria thành hai đường thẳng đối xứng nhau, cách thành đĩa 1,5 cm ủ ở 25^oC trong 48 h, sau đó đặt khuẩn lạc *C. gloeosporioides* vào giữa hai đường ria nấm men được ủ ở nhiệt độ 25^oC. Nghiệm thức đối chứng, các đĩa PGA chỉ có khuẩn lạc *C. gloeosporioides.*

Đo bán kính tản nấm *C. gloeosporioides* ở các thời điểm 2, 4,6, 8, 10 ngày sau nuôi cấy và tính hiệu suất đối kháng theo công thức. HSĐK (%)= [(R_1-R_2)/R1)] x 100 R_1: Bán kính nấm *C. gloeosporioides* trên đĩa đối chứng (cm). R_2: Bán kính nấm *C. gloeosporioides* trên đĩa đối kháng với nấm men (cm**).**

Phân tích và xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft office excel và phân tích bằng phần mềm Statgraphics Centurion XVI (Stapoint technologies inc, Hoa Kỳ**).**

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đặc điểm hình thái, sinh hóa của các dòng nấm men phân lập được từ vỏ xoài cát Hòa Lộc

Đặc điểm hình thái của các dòng nấm men phân lập

Kết quả phân lập được 13 dòng nấm men thuần, quan sát trên kính soi nổi hình thái khuẩn lạc đa dạng về hình

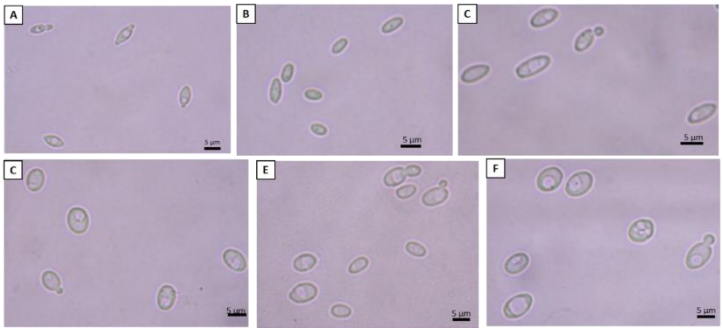
dạng của các dòng nấm men: hình tròn, màu trắng hoặc trắng kem, lồi hoặc dẹp, khuẩn lạc trơn hoặc xù xì và có các kích thước được thể hiện trong Bảng 1. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Lương Đức Phẩm (2009), tế bào nấm men có hình dạng phổ biến như hình cầu, hình oval, hình elip, hình trụ hoặc đôi khi kéo dài thành hình sợi. Nấm men có thể thay đổi hình dạng và kích thước trong các giai đoạn phát triển và điều kiện môi trường xung quanh

Hình 1. Hình thái khuẩn lạc của nấm men ở độ phóng đại 40X

Khi quan sát trên kính hiển vi, tế bào nấm men có hình elip hoặc hình oval, nảy chồi một hướng hoặc nhiều hướng. Những đặc điểm này đều giống những đặc điểm mô tả về hình thái nấm men của Fell và đồng tác giả (1998), được phân làm 6 nhóm (Bảng 2). Kết quả quan sát hình thức nảy chồi của tế bào nấm men cho thấy có hai hình thức là nảy chồi nhiều hướng và nảy chồi 1 hướng. Trong đó, các nhóm 1 có hình thức nảy chồi nhiều hướng, còn tế bào thuộc các nhóm 2,3,4,5,6 có hình thức nảy chồi một hướng

Bảng 1. Đặc điểm hình thái của 6 nhóm nấm men

Nhóm	Dòng nấm men	Hình thái khuẩn lạc	Hình thái tế bào	Hình thức nảy chồi
1	C01, C03	Trắng, dẹp	Hình elip ngắn	Nhiều hướng
2	C02	Trắng, lồi	Hình elip ngắn	Một hướng
3	C05	Trắng, trơn, lồi	Hình elip dài	Một hướng
4	C07	Trắng, dẹp	Hình oval nhỏ	Một hướng
5	C04, C08, C09	Trắng, lồi	Hình oval nhỏ	Một hướng
6	C06, C10, C11, C12, C13	Trắng, lồi	Hình oval lớn	Một hướng



Hình 2. Hình thái tế bào của các nhóm nấm men

(A) Nhóm 1, (B) Nhóm 2, (C) Nhóm 3, (D) Nhóm 4, E)Nhóm 5, (F) nhóm 6

Đặc điểm sinh hóa của các dòng nấm men

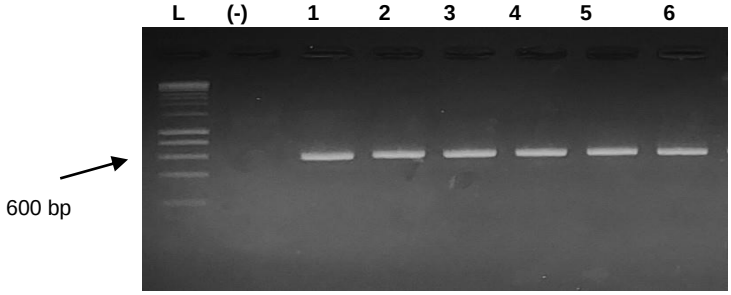
Đánh giá khả năng lên men dung dịch đường: glucose 2%, sucrose 2% và lactose 2% của các dòng nấm men bằng phương pháp lên men trong ống Durham. Theo Kurtzman và Fell (1998): khi nấm men lên men đường sẽ làm đục dung dịch trong ống nghiệm và sinh khí trong ống Durham. Kết quả ghi nhận được, 13 dòng nấm men phân lập được đều có khả năng chuyển hóa đường Glucose thành nguồn carbon để sử dụng, đa số các dòng mấm men phân lập đều chuyển hóa được đường Sucrose trừ dòng nấm men C01, C02, C03 và C05. Tất cả các dòng nấm men phân lập được đều không có khả năng chuyển hóa đường Lactose. Theo Kurtzman và đồng tác giả (2011), một số nấm men có khả năng sử dụng muối amonium làm nguồn Nitơ và sinh NH_3 làm môi trường trở nên kiềm, có màu xanh dương, kết quả cho thấy các dòng nấm men khả năng phân giải citrate trừ mẫu C01, C02, C03 và C05. Màu sắc của môi trường Christensen có sự thay đổi là do nấm men có khả năng sinh enzyme urease để phân giải urea thành CO_2 và NH_3, lượng NH_3 tăng lên làm pH tăng khiến môi trường chuyển sang màu ánh tím thông qua chất chỉ thị màu phenol red, kết quả ghi nhận các dòng nấm men thu được đều không có khả năng phân giải ure trừ mẫu C07. Từ kết quả đặc điểm hình thái (bảng 1) và đặc điểm sinh hóa (bảng 2), bước đầu phân loại sơ bộ: dòng nấm men C01, C03, C05 có đặc điểm phù hợp với chi nấm men *Hanseniaspora*, dòng nấm men C02 thuộc chi nấm men *Pichia*, dòng nấm men C07 thuộc chi nấm men *Meyerozyma*, và các dòng nấm men C04, C08, C09, C06, C10, C11, C12, C13 thuộc chi nấm men *Candida.*

Bảng 2. Kết quả đặc điểm sinh hóa và phân loại các dòng nấm men đã phân lập

Mẫu nấm men	Đặc điểm sinh hóa					Phân loại sơ bộ
	Khả năng lên men đường					
	Glucose	Sucrose	Lactose	Citrate	Phân giải ure	
C01, C03	+	-	-	-	-	*Hanseniaspora*
C02	+	-	-	-	-	*Pichia*
C05	+	-	-	-	-	*Hanseniaspora*
C07	+	+	-	+	+	*Meyerozyma*
C04, C08, C09	+	+	-	+	-	*Candida*
C06, C10, C11, C12, C13	+	+	-	+	-	*Candida*

Định danh nấm men bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Các nhóm nấm men được chọn đại diện mẫu, được làm thuần dùng để ly trích ADN và thực hiện phản ứng PCR gồm C01, C02, C04, C05, C07, C11. Theo Kurtzman và Robnett (1998) đã phân tích quan hệ phát sinh gen giữa các loại nấm men *Ascomycetous* từ sự phân kỳ trình tự *D1/D2* và mức độ khác biệt trong miền *D1/D2* của ADN ribosome tiểu đơn vị lớn (26S). Bên cạnh đó vào năm 2003, Cadez đã khuếch đại vùng gen *D1/D2* của 26S rDNA bằng cách sử dụng đoạn primer NL1 (5' GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG 3') và NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3'). Chứng tỏ rằng cặp primer NL1/NL4 sử dụng trong nghiên cứu này là thích hợp và hiệu quả.



Hình 3. Kết quả PCR của 6 dòng nấm men với cặp mồi NL1/NL4

L: Thang 1 Kbp; (-): Đối Chứng âm; Từ 1 đến 6 là các mẫu C01, C02, C04, C05, C07, C11.

Dựa vào Hình 3 cho thấy cặp mồi NL1/NL4 có khả năng bắt cặp với ADN các dòng nấm men ở kích thước khoảng 600 bp phù hợp với nghiên cứu của Kurtzman và Robnett (1998), mẫu PCR được gửi giải trình tự, so sánh với dữ liệu trên ngân hàng gen NCBI. Năm mẫu C01, C02, C04, C05 và C11 khuếch đại thành công vùng gen *D1/D2* (28S) với cặp primer NL1/NL4, kết quả giải trình tự có các peak tín hiệu huỳnh quang rõ và có độ tương đồng cao (lớn hơn 97%), khi so sánh với các nguồn nấm men được công bố trên ngân hàng gen NCBI và điều này cũng chứng minh rằng nghiên cứu của Kurtzman và Robnett (1998) về việc sử dụng cặp primer NL1/NL4 để khuếch đại vùng gen *D1/D2* (26S) là hoàn toàn chính xác, kết quả so sánh sự tương đồng của các dòng nấm men với dữ liệu trên NCBI được thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. So sánh độ tương đồng các dòng nấm men với dữ liệu trên NCBI

Mẫu nấm	Mã số trên Genbank	Tên Loài	Mức độ bao phủ	Giá trị E	Độ tương đồng
C01	MN203645.1	*Hanseniaspora opuntiae*	100%	0,0	99,81%
C02	U75735.1	*Pichia barkeri*	93%	2e - 176	97,85%
C05	DQ404527.1	*Hanseniaspra thailandica*	100%	0,0	100%
C04	KY928444.1	*Candida tropicalis*	100%	0,0	100%
C11	MK409681.1	*Candida tropicalis*	100%	0,0	100%

Kết quả giải trình tự gen và so sánh độ tương đồng trên NCBI, ta nhận thấy dòng nấm men C01 tương đồng 99,81% với trình tự loài *Hanseniaspora opuntiae*, mẫu C02 tương đồng 97,85% với trình tự loài *Pichia barker, mẫu C05 tương đồng 100% với trình tự loài Hanseniaspra thailandica,* mẫu C04, C11 tương đồng 100% với loài *Candida tropicalis.*

Dựa vào các kết quả về đặc điểm hình thái và phân tử cho thấy: Dòng nấm men C01,C03 và C05 đã được phân lập trên môi trường YPGA khuẩn lạc có hình elip ngắn hoặc dài, kích thước tế bào khoảng 3,2 - 9,1 x 2,1 - 7,3 µm, sinh sản bằng hình thức nảy chồi một hướng hoặc nhiều hướng, có khả năng lên men đường glucose nhưng không lên men sucrose và lactose, không có khả năng phân giải ure và citrate, những mô tả trên theo Lương Đức Phẩm (2009) và các nghiên cứu về nấm men của Sasitorn Jindamorakot và đồng tác giả (2009) thuộc chi nấm men *Hanseniaspora*. Kết quả giải trình tự đã xác định được mẫu C01, C05 thuộc chi nấm men *Hanseniaspora, mẫu* C01 tương đồng 99,81% với trình tự loài *Hanseniaspora opuntiae*, mẫu C05 tương đồng 100% với trình tự loài *Hanseniaspra thailandica.*

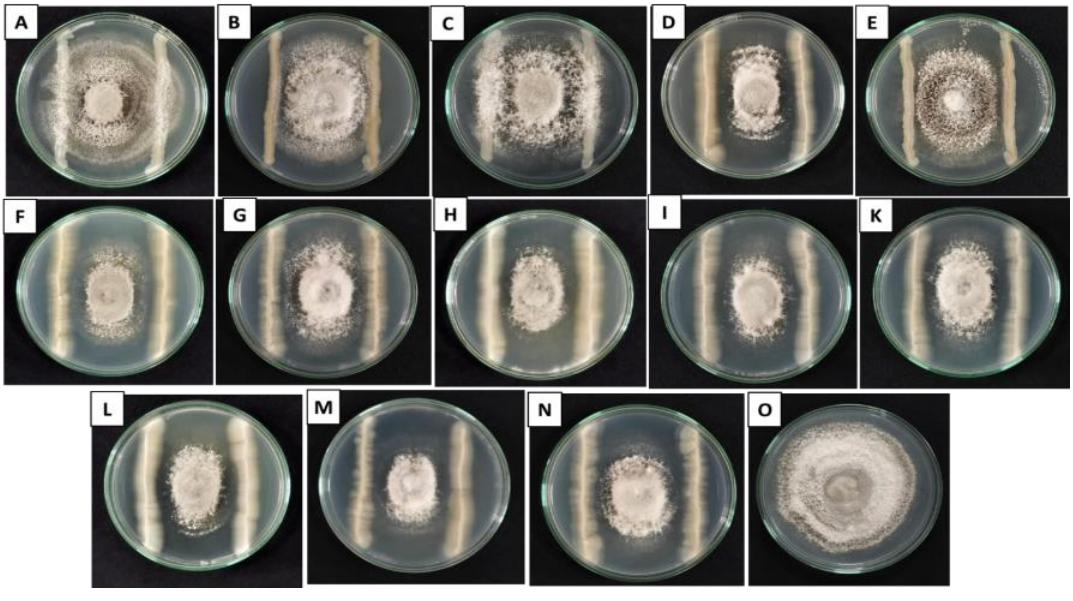
Dòng nấm men C02 khuẩn lạc có hình elip ngắn hoặc dài, kích thước khoảng 2,5 - 10 x 2 - 6 µm, sinh sản bằng cách nảy chồi một hướng, khuẩn lạc có màu trắng, bề mặt xù xì, có khả năng lên men đường glucose, nhưng không thể lên men đường sucrose và lactose, tùy vào từng loài thuộc chi *Pichia* có khả năng phân giải ure và citarte hoặc không thể, kết quả này phù hợp với mô tả về chi nấm men *Pichia* của Kutzman và đồng tác giả (2011). Mẫu C02 sau khi giải trình tự và so sánh độ tương đồng trên NCBI, có độ tương đồng 97,85% với trình tự loài *Pichia barker*. Mẫu C02 là loài *Pichia barker*

Mẫu C07 có hình oval nhỏ (5,33 – 5,00 µm), sinh sản bằng hình thức nảy chồi một hướng, có khả năng lên men đường glucose và đường sucrose, có thể phân giải ure và citrate, tuy nhiên lại không thể lên men đường lactose. Những mô tả trên phù hợp với mô tả về dòng nấm men *Meyerozyma* của Kutzman và đồng tác giả (2011) đã được tái bản lần thứ 5 đó là nấm men thuộc chi *Meyerozyma* có hình oval hay hình dài, kích thước từ 2 - 6 x 1,5 - 5 µm, sinh sản bằng hình thức nảy chồi một hướng, khuẩn lạc có màu trắng hoặc trắng ngà, trơn hoặc xù xì, có khả năng lên men đường glucose và đường sucrose và có khả năng phân giải ure.

Chi nấm men *Candida* ban đầu được biết đến là loài nấm men gây hại cho con người, tuy nhiên, những năm gần đây, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng một số loài nấm men thuộc chi *Candida* vẫn đem lại lợi ích cho con người, chủ yếu là những dụng trong việc lên men. Theo Kutzman và đồng tác giả (2011), Lương Đức Phẩm (2009) khuẩn lạc nấm men thuộc chi *Candida* có hình oval nhỏ hoặc lớn, kích thước khoảng 5,8 - 10,8 x 4,3 - 7,2 µm, sinh sản bằng hình thức nảy chồi một hướng, có khả năng lên men đường glucose và sucrose nên được ứng dụng nhiều vào lên men rượu, có khả năng sử dụng citrate hoặc không, không có khả năng lên men đường lactose và phân giải ure, các mô tả trên phù hợp với những đặc điểm hình thái và sinh hóa của các dòng nấm men C04, C06, C08, C09, C10, C11, C12, C13 đã phân lập. Kết quả giải trình tự xác định được dòng nấm men C04 và C10 là loài *Candida tropicalis*.

Khả năng đối kháng giữa nấm men và nấm *Colletotrichum gloeosporioides* gây bệnh thán thư trên trái xoài

Trên môi trường PGA, nấm men và nấm *Colletotrichum gloeosporioides* đều sử dụng nguồn dinh dưỡng có trong môi trường làm nguồn năng lượng nuôi sống cơ thể, dẫn đến sự canh tranh dinh dưỡng (Rosa và đồng tác giả, 2010). Quan sát kết quả trên đĩa petri cho thấy tất cả các dòng nấm men đều có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Colletotrichum gloeosporioides* được thể hiện dưới Hình 4.



Hình 4. Kết quả đối kháng giữa các dòng nấm men với nấm với nấm *Colletotrichum gloeosporioides* sau 10 ngày chủng

(A) – (N) Các dòng nấm men lần lượt từ C01 đến C13; (O) Đối chứng nấm Colletotrichum gloeosporioides.

Bảng 4. Hiệu suất đối kháng của nấm men đối với nấm *Colletotrichum gloeosporioides* các giai đoạn (NSC: ngày sau chủng)

Mẫu nấm men	Hiệu suất đối kháng (%)				
	2NSC	4NSC	6NSC	8NSC	10NSC
C01	27,9	28,4	12,2	18,4	27,6
C02	18,6	22,7	16,8	28,6	44,7
C03	30,2	25,0	15,0	28,6	27,2
C04	23,3	27,3	18,7	34,7	54,4
C05	25,6	25,0	12,2	25,9	36,8
C06	23,3	30,7	26,2	34,0	53,0
C07	20,9	28,4	18,7	32,0	50,0
C08	20,9	23,9	17,8	34,7	53,5
C09	18,6	29,6	18,7	33,3	50,0
C10	18,6	25,0	15,0	31,3	49,1
C11	20,9	23,9	15,0	25,9	54,4
C12	27,9	29,6	31,8	40,8	53,5
C13	30,2	28,4	22,4	34,0	54,0

Qua Bảng 4 cho thấy, các dòng nấm men phân lập được từ cỏ xoài cát Hòa Lộc có khả năng ức chế nấm *C. gloeosproides* gây bệnh thán thư trên trái xoài trong *in-vitro* 10 ngày sau cấy dao động từ 27,6% đến 54,4%. Trong đó trong đó các mẫu C11, C04 đều có hiệu suất đối kháng cao nhất là 54,4%, mẫu C13 có hiệu suất đối kháng là 54%, mẫu C12 và C08 có hiệu xuất đối kháng là 53,5%, mẫu C06 có hiệu suất đối kháng là 53%, mẫu C07 và C09 có hiệu suất đạt 50%, mẫu C09 có hiệu suất đối kháng 49,1%, mẫu C02 có hiệu suất đối kháng là 44,7%, mẫu C05 có hiệu suất đối kháng là 36,8% và mẫu C01 và C03 có hiệu suất đối kháng lần lượt là 27,6% và 27,2%. Quan sát trên đĩa cho thấy các dòng nấm men nếu có khả năng đối kháng càng cao với nấm *C. gloeosporioides* thì khi nấm *C. gloeosporioides* tiếp xúc càng gần với nấm men sợi nấm sẽ mọc chậm dần, thưa và không bung, ngược lại nếu nấm men đối kháng yếu, khi nấm *C. gloeosporioides* phát triển gần thì nấm vẫn mọc chậm nhưng sẽ phát triển sang phần nấm men.

KẾT LUẬN

Từ mẫu trái xoài cát Hòa Lộc thu được sau khi thu hoạch đã phân lập được 13 dòng nấm men và định danh được ba loài nấm men *Hanseniaspora thailandica, Hanseniaspora oputiae* và *Pichia barkeri*, bước đầu đánh giá được loài nấm *Pichia barkeri* (mẫu C02) có khả năng ức chế nấm *C. gloeosporioides* với hiệu suất đối kháng là 44,7%.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ về kinh phí của Trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM từ đề tài "Đánh giá khả năng đối kháng của nấm men có trên vỏ xoài cát Hòa Lộc đối với nấm Colletotrichum gloeosporioides gây bệnh thán thư" mã số: CS-SV23-KHSH-09. Và sự hỗ trợ về máy móc, trang thiết bị, nhà lưới của Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi trường, Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh Nhóm tác giả xin trân trọng cám ơn.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Aguirre-Güitron L, Calderon-Santoyo M, Lagaron JM, Prieto C, Ragazzo-Sanchez JA (2019). Application of powder formulation of Meyerozyma caribbica for postharvest control of *Colletotrichum gloeosporioides* in mango (Mangifera indica L.). *LWT. 113*. 108271. 10.1016/j.lwt.2019.108271.

Aguirre-Güitron L, Calderon-Santoyo M, Lagaron JM, Prieto C, Ragazzo-Sanchez JA (2022). Formulation of the biological control yeast *Meyerozyma caribbica* by electrospraying process: effect on postharvest control of anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.) and papaya (*Carica papaya* L.). *J Sci Food Agric*, 102(2), 696-706. https://doi. org/10.1002/jsfa.11400.

Arauz FL (2000) "Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated managaement," *Plant disease*, vol. 84, no. 6, pp. 600-611, 2000.

Chanchaichaovivat A, Panijpan B, Ruenwongsa P (2008). Putative modes of action of *Pichia guilliermondii* strain R13 in controlling chilli anthracnose after harvest. *Biol. Control* 47, 207–215.

Kefialew Y, Ayalew A (2008). Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (Mangifera indica). *Postharvest Biol*. Technol. 50, 8–11

Konsue W, Dethoup T, Limtong S (2020). Biological control of fruit rot and anthracnose of postharvest mango by antagonistic yeasts from economic crops leaves. *Microorganisms*, 8(3). https://doi.org/10.3390/microorganisms8030317

Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, Robert V (2011). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (Eds.), The yeasts: A taxonomic study (pp. 87-110). *San Diego: Elsevier* B.V.

Lương Đức Phẩm (2009). *Nấm men công nghiệp*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

Litz R (1997). The Mango: Botany, Production and Uses. CAB International, *Wallingford.* UK, 1997, p. 7.

Rosa MM, Tauk-Tornisielo SM, Rampazzo PE, Ceccato-Antonini SR (2010). Evaluation of the biological control by the yeast Torulaspora globosa against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. World J. Microb*. Biot*, 26: 1491–1502.

EVALUTION OF THE INHIBITORY ABILITY OF YEAST STRAINS AGAINST *Colletotrichum gloeosporioides* CAUSING ANTHRACNOSE DISEASE ON MANGOES

Tran Thi Thu Ha[2*], Truong Quang Toan[2], Nguyen Thi Van Khanh[2], Vu Ngoc Khanh Nhu [2], Le Ngoc Tuong An[1], Nguyen Thi Thu Ngan[1], Banh Huu Tinh[1], Truong Phuoc Thien Hoang[2], Đao Uyen Tran Đa[2]

[1] *Faculty of Biological Sciences – Nong Lam University – Ho Chi Minh City*

[2]*Research Institue for Biotechnology and Environment - Nong Lam University – Ho Chi Minh City*

SUMMARY

The objective of this study is to collect, isolate, and identify certain yeast strains on the Cat Hoa Loc mango peel that have the ability to inhibit the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, which causes anthracnose disease on mangoes post-harvest. In this research, yeast strains isolated from the mango peel were identified using various methods including morphological characteristics, biochemical characteristics, and 26S rDNA sequence analysis. The results identified three yeast species: *Hanseniaspora thailandica*, *Hanseniaspora opuntiae,* and *Pichia barkeri*. Subsequently, the inhibitory capability of these yeast strains against *Colletotrichum gloeosporioides* was tested using a co-culture method under in_vitro conditions, showing a high antagonistic rate of over 50% after 10 days of culture. This study initially demonstrates that the use of yeast for biological control is a potential method for controlling pathogens on mangoes post-harvest.

Keywords: Colletotrichum gloeosporioides, yeast, Cat Hoa Loc mango.

[*] Author for correspondence: Tel: +84-908913613; Email: tranthithuha@hcmuaf.edu.vn

ẢNH HƯỞNG CỦA TÁ CHẤT ĐẾN KHẢ NĂNG KÍCH THÍCH KHÁNG THỂ VÀ HIỆU QUẢ BẢO HỘ CỦA VACCINE VÔ HOẠT PHÒNG BỆNH LỒI MẮT DO *STREPTOCOCCUS INIAE* Ở CÁ CHẼM *LATES CALCARIFER*

Nguyễn Thị Thanh Thùy*, Nguyễn Thị Quế Chi, Lê Hồng Tuấn, Nguyễn Văn Hùng

Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản III

TÓM TẮT

Nghiên cứu trình bày ảnh hưởng của các loại tá chất khác nhau đến khả năng kích thích sinh kháng thể và hiệu quả bảo hộ của vaccine vô hoạt phòng bệnh do *Streptococcus iniae* ở cá chẽm *Lates calcarifer*. Vaccine vô hoạt gồm sinh khối vi khuẩn *Streptococcus iniae* SiTH1 ở nồng độ 10^{10} cfu/mL, bất hoạt bằng formalin, phối trộn với các loại tá chất Montanide ISA 763 AVG (Seppic, France), FIA (Freund's Incomplete Adjuvant) và sản phẩm ngoại màng EPS (Extracellular polysaccharide) được tách chiết từ sinh khối vi khuẩn SiTH1. Thí nghiệm gồm 5 nghiệm thức thí nghiệm tá chất (NT1:FKC+ ISA763 AVG, tỷ lệ 6:4; NT2: FKC+FIA, tỷ lệ 1:1; NT3: FKC+5 mg EPS; NT4: NT1+5 mg EPS; NT5:NT2+5 mg EPS) và 2 nghiệm thức đối chứng gồm ĐC1: FKC và ĐC2: PBS. Mỗi nghiệm thức gồm 30 cá chẽm được gây miễn dịch 1 lần bằng cách tiêm xoang bụng, liều 0,1 mL/con. Lặp lại 3 lần. Kết quả phân tích huyết thanh cá thí nghiệm sau 7, 14 và 21 ngày cho thấy hiệu giá kháng thể và hàm lượng kháng thể tăng dần từ sau 1 tuần gây miễn dịch, đạt cao nhất ở ngày thứ 14 và xu hướng giảm dần ở ngày thứ 21. Trong đó, ở mỗi thời điểm thu mẫu đều ghi nhận hiệu giá và hàm lượng kháng thể đạt cao nhất ở nhóm NT1 (FKC+ Montanide ISA 763) và NT4 (NT1+EPS), khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P<0,05$) so với các nhóm còn lại và không khác biệt giữa 2 nhóm này. Ở ngày thứ 21 sau khi gây miễn dịch, cá thí nghiệm được công cường độc bằng dịch khuẩn SiTH1 ở nồng độ 10^8 cfu/mL, liều 0,1 mL/con. Tính toán hệ số bảo hộ RPS cho thấy nhóm bổ sung tá chất là ISA763 AVG và hỗn hợp ISA763 AVG và EPS đạt cao nhất, 78,4%; Nhóm vaccine trộn tá chất FIA đạt 70-73 %, thấp nhất là nhóm vaccine không trộn tá chất chỉ đạt 48,6 %.

Từ khóa: Bảo hộ, kháng thể, *Lates calcarifer, Streptococcus iniae,* tá chất, vaccine.

MỞ ĐẦU

Vi khuẩn *Streptococcus* spp. được báo cáo là tác nhân gây nhiều bệnh nguy hiểm cho nhiều loài cá nước lợ mặn và nước ngọt, làm thiệt hại kinh tế cho nghề nuôi thủy sản hàng năm lên đến 150 triệu đô la. Trong đó, loài *Streptococcus iniae* được báo cáo là tác nhân gây bệnh cho ít nhất 27 loài cá nước ngọt và cá biển ở 15 quốc gia khác nhau thuộc 4 châu lục, gồm châu Phi, châu Á, châu Úc và châu Âu (Hossain *et al*., 2014). Trên cá chẽm *Lates calcarifer*, bệnh do *S. iniae* được báo cáo lần đầu tiên vào năm 1999 tại Úc (Bromage *et al*., 1999), tiếp tục xuất hiện năm 2006 (Creeper và Buller, 2006) và tại Thái Lan ghi nhận bệnh này trên cá chẽm vào năm 2010 (Suanyuk *et al*., 2010). Tại Việt Nam, phát hiện *S.iniae* gây bệnh cho cá chẽm nuôi lồng tại Khánh Hoà (Hich *et al*., 2013), tại Thừa Thiên Huế (Hoa *et al*., 2018) đã gây thiệt hại kinh tế lớn cho người nuôi. Dấu hiệu bệnh lý thường gặp ở cá bệnh là bơi lội bất thường ở gần mặt nước hoặc bơi xoắn, thân trở nên sẫm màu hơn, xuất huyết ở thân, gốc vây, hậu môn, mắt lồi, đục. Giải phẫu nội quan thường gặp sự tích dịch ở khoang bụng, gan, thận, lách sưng phù, đôi khi xuất huyết. Bệnh do *S. iniae* có thể gây ra tỷ lệ chết lên đến 70% ở giai đoạn cá chẽm giống (Suanyuk *et al*., 2010; Creeper và Buller, 2006).

Biện pháp trị bệnh do *S.iniae* hiện nay chủ yếu dựa vào kháng sinh. Tuy nhiên, có những loại kháng sinh dù đã được chứng minh có khả năng ức chế *S.iniae* trong phòng thí nghiệm nhưng lại không hiệu quả khi ứng dụng vào thực tế sản xuất, có thể vì chứng biếng ăn của cá bệnh. Việc sử dụng kháng sinh một cách bừa bãi đã làm gia tăng các chủng vi khuẩn *S.iniae* kháng thuốc, thậm chí xuất hiện các gen đa kháng thuốc đã làm cho việc điều trị không hiệu quả và gây lãng phí (Tawab *et al*, 2022). Vì vậy, phòng bệnh do *S.iniae* cho cá bằng vaccine là một giải pháp an toàn và hiệu quả hơn cả.

Vaccine phòng bệnh cho cá biển đã được nghiên cứu từ sớm tại các nước có nghề nuôi cá phát triển như Mỹ, Na Uy, Đức, Hà Lan, Nhật Bản... Hầu hết các vaccine dùng cho nuôi trồng thủy sản hiện nay là vaccine vi khuẩn bất hoạt như vaccine phòng bệnh do *Yersinia ruckeri, Vibrio anguillarum,Vibrio ordalii* và *Vibrio salmonnicida.* Ưu điểm của các vaccine bất hoạt này là có khả năng kích thích sinh đáp ứng miễn dịch dịch thể tốt, kháng nguyên là các chủng vi khuẩn được phân lập từ cá bệnh nên vaccine có tính đặc hiệu cao, có hiệu lực và phản ứng phụ không đáng kể (Stevenson, 1997).

Để nâng cao hiệu quả bảo vệ của vaccine ở cá, các nghiên cứu về chất bổ trợ hay tá chất (Adjuvant) được chú trọng từ những năm đầu 1990 (Van Muiswinkel, 2008). Chất bổ trợ thông thường gồm hai loại: Chất bổ trợ không

dầu (Water base) và có dầu (Oil base). Các chất bổ trợ có dầu thường dùng như Freund's adjuvant gồm FIA với thành phần chính là dầu khoáng và chất bổ trợ toàn phần (FCA) với thành phần là hỗn hợp dầu khoáng và *Mycobacterium tuberculosis* đã bất hoạt bằng nhiệt. Vaccine có bổ sung thành phần chất bổ trợ Freund's đã chứng minh có hiệu quả kích thích miễn dịch và nâng cao hệ số bảo hộ ở nhiều loài cá nước mặn và nước ngọt chống lại nhiều loại vi khuẩn như *Vibrio* spp., *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Flavobacterium columnare*; *Edwardsiella tarda*…Tuy nhiên, ở vài loài cá, tỷ lệ chịu tác dụng phụ do tiêm vaccine có chất bổ trợ có dầu khá cao. Ngày nay, nhiều loại chất bổ trợ khác nhau được nghiên cứu nhằm giảm tác dụng phụ trên cá nhưng vẫn duy trì tính ổn định của vaccine. Ví dụ như, Montanide ISA763A (W/O, non-mineral oil) được bổ sung vào vaccine trị bệnh do ký sinh trùng *Philasterides dicentrarchii* ở cá bơn nuôi đã làm tăng hệ số bảo hộ đáng kể cho cá và không có tác dụng phụ; hoặc trộn vào vaccine phòng bệnh do *Pseudomonas plecoglossicida* ở cá ayu (*Plecoglossus altivelis*) với hệ số bảo hộ RPS tăng đến 86%. EPS (Extracellular polysaccharide) tách chiết từ sản phẩm ngoại màng tế bào vi khuẩn làm tăng mức độ đa dạng và đầy đủ các độc tố kháng nguyên của vi khuẩn làm vaccine; tăng kích thích tế bào miễn dịch; một số nghiên cứu chỉ ra nếu bổ sung thêm EPS trong thành phần vaccine thì tăng RPS đến 87-100% (Klesius *et al*., 2002).

Tại Việt Nam, có vài công trình nghiên cứu về đặc điểm bênh học của vi khuẩn *Streptococcus iniae* ở cá chẽm nuôi (Hich *et al*., 2013; Hoa *et al*., 2018) nhưng chưa có nghiên cứu sâu hơn về chế tạo vaccine phòng bệnh này cho cá chẽm. Nghiên cứu này thực hiện nhằm chọn lựa loại tá chất phù hợp làm cơ sở cho sản xuất vaccine phòng bệnh do *Streptococcus iniae* cho cá chẽm nuôi tại Việt Nam.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn kháng nguyên là *Streptococcus iniae* SiTH1, đã được thẩm định đạt tiêu chuẩn phục vụ nghiên cứu sản xuất vaccine do Cục thú y chứng nhận, được lưu giữ tại Phòng Công nghệ sinh học và vắc xin thủy sản-Viện Nghiên cứu nuôi trồng thủy sản III.

Tá chất thí nghiệm

Tá chất là sản phẩm ngoại màng EPS (Extracellular polysaccharide) được tách chiết từ sinh khối vi khuẩn kháng nguyên (SiTH1) theo phương pháp của Eyngor và đồng tác giả (2008): Dịch khuẩn sinh khối được ly tâm 6000 rpm/30 phút/4^{o}C, thu dịch nổi và thêm vào trichloroacetic acid (4% w/v) tiếp tục ly tâm 3000 rpm/10 phút/4^{o}C. Thu phần kết tủa, hoàn nguyên trong nước cất tiệt trùng, chỉnh pH 7.0, ly tâm 6000 rpm/40 phút/4^{o}C. Thu phần dịch nổi và sấy thăng hoa thu EPS dạng bột.

Tá chất thương mại gồm Montanide ISA 763 AVG (Seppic, France) và FIA (Freund's Incomplete Adjuvant).

Cá chẽm giống: Cá khoẻ mạnh, cỡ 8-10 cm/con được được nhập từ công ty sản xuất giống thủy sản và nuôi thuần dưỡng trong hệ thống thí nghiệm trước 14 ngày.

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị vi khuẩn kháng nguyên

Chủng vi khuẩn *S.iniae* SiTH1 được nuôi phục hồi, tăng sinh trong môi trường BHI broth (bổ sung 1,5% NaCl) (Merck, Đức) ở 28 – 30 ^{o}C trong 36 h, xác định mật độ và bất hoạt bằng formalin 0,5%/4^{o}C/12h, ly tâm loại bỏ dịch môi trường có formalin và hoàn nguyên trong PBS (FKC-Formalin kill cell) hoặc pha trong tá chất đạt nồng độ theo yêu cầu thí nghiệm.

Chuẩn bị vaccine

Vaccine chuẩn bị ở nồng độ kháng nguyên 10^{10} cfu/mL, phối trộn theo 5 nghiệm thức thí nghiệm tá chất:

FKC+ ISA763 AVG, tỷ lệ 6:4 (NT1);

FKC+FIA, tỷ lệ 1:1 (NT2);

FKC+5 mg EPS (NT3);

NT1+5 mg EPS (NT4);

NT2+5 mg EPS (NT5).

Bố trí thí nghiệm

Cá thí nghiệm gồm 630 con cỡ 8-10 cm được chia vào các bể chứa 250 lít nước biển, 30 con/bể, sử dụng cho thí nghiệm gồm 5 nghiệm thức phối trộn tá chất và 2 nghiệm thức đối chứng gồm ĐC1: FKC và ĐC2: PBS. Cá được gây miễn dịch 1 lần bằng cách tiêm xoang bụng bằng vaccine được pha trộn theo công thức thí nghiệm, liều 0,1 mL/con. Thí nghiệm lặp lại 3 lần.

Thu huyết thanh

Thu huyết thanh 5 cá/bể ở các ngày thứ 7, 14 và 21 sau khi gây miễn dịch để phân tích kháng thể.

Thu huyết thanh cá: Lấy 1 mL máu tại tĩnh mạch cuống đuôi của cá cho vào các Eppendorf 2 mL, giữ mẫu máu ở 4 ^{o}C trong 10-12 giờ trước khi ly tâm 15.000 vòng/phút ở 4 ^{o}C, tách phần dịch huyết thanh và giữ ở -70 ^{o}C cho các nghiên cứu phân tích kháng thể.

Phân tích kháng thể

Hiệu giá kháng thể trong huyết thanh cá thí nghiệm được xác định bằng phương pháp ngưng kết kháng thể (Agglutinating antibody titre) của Roberson (1990): Lấy 100 µL huyết thanh cá chẽm đã pha loãng (1:10) cho vào giếng đầu tiên đĩa 96 giếng. Từ giếng thứ 1, dùng pipet hút thả nhiều lần cho đều, hút 50 ul cho vào giếng thứ 2, tiếp tục pha loãng theo hệ thống pha loãng 2 lần (2-fold serial dilution) trong dung dịch PBS. Ghi nhận kết quả là số thứ tự giếng có bậc pha loãng huyết thanh cao nhất xảy ra phản ứng ngưng kết. Mỗi mẫu thực hiện 3 lần, tính số trung bình.

Hàm lượng kháng thể IgM xác định bằng phương pháp miễn dịch liên kết enzyme gián tiếp (indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay- i-ELISA), cụ thể: Vi khuẩn đã bất hoạt được lưu giữ dưới dạng đông khô được hòa loãng trong PBS (pH 7,3) tương ứng với nồng độ 40 µg/mL. Cho 150 µl dịch khuẩn /giếng (Đĩa 96 giếng, Nunc MaxiSorp^{TM}), ủ qua đêm ở 4 ^{o}C. Rửa 3 lần bằng dung dịch PBS-T (PBS + 0,05 % Tween 20). Khóa các vị trí không liên kết bằng PBS-T chứa 3 % Skim milk (PBSTM) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa 3 lần bằng dung dịch PBS-T. Huyết thanh cá chẽm kiểm tra được pha loãng 50 lần trong PBS-T, tiếp tục pha loãng hệ số 2 theo dãy ống nghiệm. Cho 100 µl huyết thanh cá chẽm ở các ống pha loãng vào các giếng đã phủ kháng nguyên, ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Rửa 3 lần bằng dung dịch PBS-T. Mỗi giếng thêm 100 µL kháng thể đơn dòng chuột kháng IgM cá chẽm (Mouse anti Asian seasbass, pha loãng 1:40 trong PBS-T), ủ trong 2 giờ. Rửa 3 lần bằng dung dịch PBS-T. Sau đó, thêm 50 µL/giếng kháng thể đa dòng của thỏ kháng Ig chuột có gắn enzyme HRP (Polyclonal Rabbit anti-mouse Ig- HRP, Dako, pha loãng 1:2000 trong PBS-T), ủ trong 1 giờ. Rửa 3 lần bằng dung dịch PBS-T. Thêm 50 µL/giếng cơ chất Peroxidase gồm 0-Phenylenediamine (Sigma) pha trong dung dịch đệm Phosphate citrate. Sau 10 phút, kết thúc phản ứng bằng 50 µL dung dịch H_2SO_4 2.0 M. Đo mật độ quang của các giếng bằng máy đo quang phổ (iMark microplate reader - Bio-rad) ở bước sóng 492 nm. Mỗi mẫu huyết thanh được thực hiện lặp lại 3 lần trên cùng một đĩa.

Đánh giá hệ số bảo hộ của vaccine

Ở ngày thứ 21 sau khi gây miễn dịch, 15 con/bể được công cường độc bằng dịch khuẩn SiTH1 ở nồng độ 10^8 cfu/mL, liều 0,1 mL/con. Theo dõi trong 14 ngày, ghi nhận số cá chết/yếu, tính hệ số bảo hộ RPS.

Hệ số bảo hộ RPS (Relative percent survival) tính theo phương pháp của Ellis (1988).

RPS (%) = (1- Tỷ lệ chết tích lũy trung bình ở nhóm cá tiêm vaccine/Tỷ lệ chết tích lũy trung bình ở nhóm cá đối chứng) x 100.

***Xử lý số liệu*:** Giá trị trung bình của các nghiệm thức thí nghiệm được so sánh sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (P<0,05) bằng kiểm định ANOVA one way và Tukey HSD Post-hoc test trên phần mềm SPSS 16.0. Số liệu trình bày là số trung bình ± độ lệch chuẩn.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của tá chất phối trộn vaccine đến khả năng sinh kháng thể ở cá chẽm.

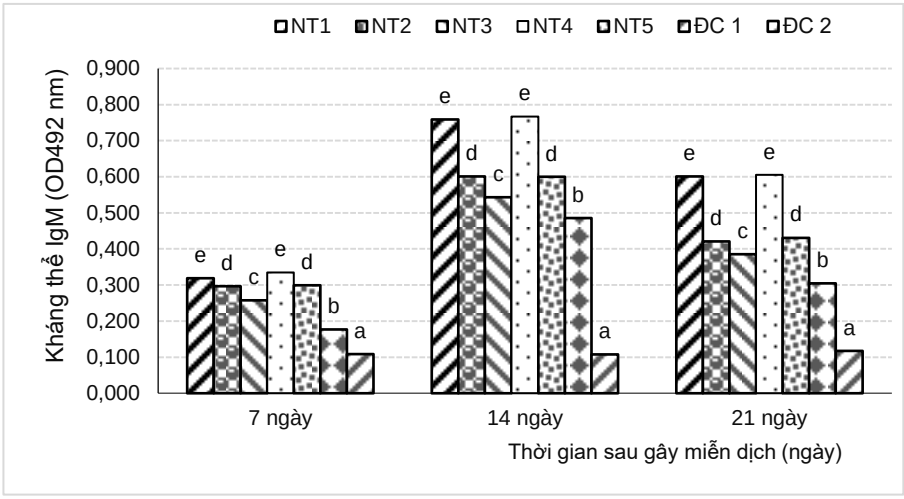
Sau khi gây miễn dịch, huyết thanh cá thí nghiệm được thu ở các ngày thứ 7, 14 và 21 để phân tích hiệu giá kháng thể và hàm lượng kháng thể. Sự khác biệt về khả năng kích thích sinh kháng thể ở các nghiệm thức thí nghiệm được thể hiện ở hiệu giá kháng thể (Bảng 1) và hàm lượng kháng thể đo được trong huyết thanh (Hình 1).

Bảng 1. Hiệu giá kháng thể (Log2) của cá sau khi gây miễn dịch bằng FKC phối trộn nhiều loại tá chất khác nhau

Nghiệm thức	Trung bình hiệu giá kháng thể (Log2, n=5)		
	7 ngày	14 ngày	21 ngày
NT1	**3,60 ± 0,55^{c}**	**6,60 ± 0,55^{d}**	**5,20 ± 0,45^{d}**
NT2	3,40 ± 0,55^{b}	6,20 ± 0,45^{c}	4,80 ± 0,45^{c}
NT3	2,40 ± 0,55^{a}	5,40 ± 0,55^{b}	3,40 ± 0,55^{b}
NT4	**3,60 ± 0,55^{c}**	**6,80 ± 0,45^{d}**	**5,40 ± 0,55^{d}**
NT5	3,40 ± 0,55^{b}	6,20 ± 0,45^{c}	5,20 ± 0,84^{cd}
ĐC1	2,20 ± 0,45^{a}	4,20 ± 0,45^{a}	3,20 ± 0,45^{a}
ĐC2	0	0	0

Ghi chú: Các chữ cái khác nhau trên cùng 1 cột thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (P<0,05).

Kết quả ở Bảng 1 cho thấy xu hướng chung hiệu giá kháng thể tăng dần từ sau 1 tuần gây miễn dịch, đạt cao nhất ở ngày thứ 14 và xu hướng giảm dần ở ngày thứ 21. Trong đó, ở mỗi thời điểm thu mẫu đều ghi nhận hiệu giá kháng thể đạt cao nhất ở nhóm NT1 (FKC+ Montanide ISA 763) và NT4 (NT1+EPS), khác biệt có ý nghĩa thống kê (P<0,05) so với các nhóm còn lại và không khác biệt giữa 2 nhóm này.



Hình 1. Kháng thể IgM cá chẽm sau khi gây miễn dịch bằng FKC phối trộn tá chất khác nhau

Tương tự, hàm lượng kháng thể IgM đo được ở các thời điểm thu mẫu cũng cho xu hướng kháng thể đạt cao nhất sau 14 ngày và giảm ở ngày thứ 21 sau khi gây miễn dịch. So sánh khả năng kích thích sinh kháng thể giữa các loại tá chất phối trộn ở cùng thời điểm cũng ghi nhận có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê của nhóm NT1 và NT4 cao hơn so với các nhóm còn lại (P<0,05) và không khác biệt giữa 2 nhóm này.

Kết quả công độc và hệ số bảo hộ của cá sau khi gây miễn dịch

Ở ngày thứ 21 sau khi gây miễn dịch, 15 con cá/bể được công cường độc bằng vi khuẩn *S.iniae* SiTH1 ở liều 0,1 mL dịch khuẩn 10^8 cfu/mL/con cá, kết quả thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả công cường độc và hệ số bảo hộ của vaccine phối trộn tá chất khác nhau

Nghiệm thức	Công thức vaccine (i.p., 0,1 mL/con, 1 liều)	Số cá/bể (con) x 3 lần lặp	Công độc ngày thứ 21	Tỷ lệ chết tích lũy trung bình (%)	RPS (%)
NT1	FKC + ISA763 AVG	15	Tiêm xoang bụng, liều 0,1 mL/con, dịch vi khuẩn 10^8 cfu/mL	**17,8 ± 3,8**	**78,4**
NT2	FKC + FIA	15		24,4 ± 3,8	70,3
NT3	FKC + 5 mg EPS	15		26,7 ± 6,7	67,6
NT4	NT1 + 5 mg EPS	15		**17,8 ± 3,8**	**78,4**
NT5	NT2 + 5 mg EPS	15		22,2 ± 3,8	73,0
ĐC 1	FKC	15		42,2 ± 3,8	48,6
ĐC 2	PBS	15		82,22 ± 3,8	0
ĐC		15	PBS, 0,1 mL/con	0	

Cá chẽm được công cường độc sau 21 ngày gây miễn dịch bằng vaccine phối trộn tá chất khác nhau đã cho kết quả có sự khác biệt về tỷ lệ chết tích lũy ở các nghiệm thức. Cụ thể, nhóm tiêm vaccine trộn tá chất cho tỷ lệ chết tích lũy thấp hơn từ 50-70% so với nhóm tiêm vaccine không trộn tá chất (ĐC1); Trong nhóm trộn tá chất, ISA763 AVG và hỗn hợp tá chất ISA763 AVG và EPS đều cho tỷ lệ chết thấp nhất, chỉ 17,8%. Trong khí đó, nhóm trộn riêng rẻ FIA và EPS hoặc hỗn hợp 2 loại này đều cho tỷ lệ chết tích lũy cao hơn và gần tương đương nhau, từ 22,2-26,7%. Tính toán hệ số bảo hộ RPS cho thấy nhóm bổ sung tá chất là ISA763 AVG và hỗn hợp ISA763 AVG và EPS đạt cao nhất, 78,4%, nhóm vaccine trộn tá chất FIA đạt 70-73 %, thấp nhất là nhóm vaccine không trộn tá chất chỉ đạt 48,6 %.

Tá chất phối trộn để tăng hiệu quả của vaccine ở cá đã được chứng minh qua nhiều nghiên cứu. Tuy nhiên, vấn đề then chốt trong chọn lựa tá chất chế tạo vacicne là đem lại hệ số bảo hộ cao, kéo dài và phải đảm bảo an toàn, tác dụng phụ ở cá là thấp nhất. Ở cá chẽm (*Lates calcarifer*), nghiên cứu của Thu Lan *et al.,* (2021) thử

nghiệm vaccine bất hoạt vi khuẩn *S.iniae* phối trộn tá chất Freund's incomplete adjuvant (FIA) với tỷ lệ 1:1 đã cho hệ số bảo hộ RPS đạt 80% đối với *S.iniae* sau 80 ngày gây miễn dịch (Nguyen Giang Thu Lan *et al.,* 2021). Một thử nghiệm khác trên cá mú (*Epinephelus coioides*), vaccine bất hoạt *S.iniae* phối trộn tá chất ASF (mineral oil-based adjuvant) và ISA 763A (non mineral oil-based adjuvant), đạt hệ số bảo hộ sau 6 tháng đến 97,7% (Huang *et al.,* 2014) Có thể thấy, các loại vaccine trộn tá chất và sử dụng đường tiêm đều cho hiệu quả bảo hộ cao hơn và thời gian bảo hộ lâu hơn. Chất bổ trợ ngoài vai trò như một chất kích thích miễn dịch không đặc hiệu, chúng còn giữ cho kháng nguyên được phóng thích từ từ trong cơ thể vật chủ, kéo dài thời gian tiếp xúc của vật chủ với kháng nguyên, xác lập tính nhớ và kích thích sinh kháng thể đặc hiệu trong thời gian dài.

Ở nghiên cứu này, hệ số bảo hộ RPS đạt cao nhất chỉ là 78,4 %, thấp hơn so với các nghiên cứu sử dụng tá chất tương tự ở trên. Điều này là do cá trong thí nghiệm này chỉ được gây miễn dịch một liều, các nghiên cứu khác đều gây miễn dịch 2 liều cách nhau 14 -28 ngày. Nhiều nghiên cứu cho thấy, cá được gây miễn dịch một liều chỉ tạo ra kháng thể sơ cấp, nồng độ kháng thể tăng dần trong máu và thường suy giảm nhanh nếu không được tiêm nhắc lại. Ở lần tiêm nhắc lại, kháng thể thứ cấp sẽ được tạo ra nhanh chóng và cao hơn rất nhiều. Vì vậy, trong qui trình sử dụng vaccine luôn có lần nhắc lại để hiệu quả bảo hộ được cao và lâu dài hơn. Đối với kết quả này, tá chất Montanide ISA 763 AVG (Seppic, France) sẽ được chọn trong nghiên cứu phối trộn cùng với vaccine phòng bệnh do *Streptococcus iniae* cho cá chẽm nuôi.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Vaccine bất hoạt từ vi khuẩn *Streptococcus iniae* SiTH1 phối trộn tá chất Montanide ISA 763 AVG (Seppic, France) tỷ lệ 6:4, sử dụng gây miễn dịch cho cá chẽm bằng đường tiêm xoang bụng, liều 0,1 mL/con. Kết quả đánh giá sau 21 ngày gây miễn dịch cho thấy khả năng kích thích sinh kháng thể đặc hiệu tốt nhất và hệ số bảo hộ RPS trong qui mô thí nghiệm là cao nhất, đến 78,4 %.

Tiếp tục nghiên cứu nồng độ kháng nguyên *Streptococcus iniae* SiTH1 phù hợp trong chế tạo vaccine bất hoạt cũng như đánh giá hiệu quả vaccine ở các qui trình sử dụng khác nhau nhằm tạo ra một loại vaccine an toàn, hiệu quả cao trong phòng bệnh cho cá nuôi.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu trên là một phần kết quả thuộc đề tài "Nghiên cứu chế tạo vaccine vô hoạt phòng bệnh do Streptococcus iniae ở cá chẽm Lates calcarifer", do Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đã cấp kinh phí và Viện nghiên cứu nuôi trồng thủy sản III chủ trì thực hiện. Nhóm tác giả xin bày tỏ lòng biết ơn đến sự hỗ trợ kinh phí và cho phép sử dụng số liệu thuộc nghiên cứu này.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bromage E, Thomas A, Owens L (1999). *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. *Dis Aquat Org*, 36: 177-181.

Creeper JH, Buller NB (2006). An outbreak of *Streptococcus iniae* in barramundi (*Lates calcarifer*) in freshwater cage culture. *Aust Vet J*, 84(11): 408–411.

Ellis AE (1988). General principles of fish vaccination. Fish Vaccination, Ellis AE, chủ biên. *Academic Press Limited, London*: 1-19.

Eyngor M, Tekoah Y, Shapira R, Hurvitz A, Zlotkin A, Lublin A, Eldar A (2008). Emergence of novel *Streptococcus iniae* exopolysaccharide-producing strains following vaccination with nonproducing strains. *Appl Environ Microbiol*, 74(22): 6892-6897.

Hich TV, Quyen VDH, Dung NH, Wergeland HI (2013). Experimental *Streptococcus iniae* infection in barramundi (*Lates calcarifer*) cultured in Vietnam. *Int J Aquat Sci*, 4(1): 3-12.

Hossain MMM, Ehsan A, Rahman MA, Haq M, Chowdhury MBR (2014). Transmission and pathology of *Streptococcus inane* in monosex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in aquaculture of Bangladesh. *J Fish*, 2(1): 90-99.

Klesius PH, Shoemaker CA, Evans JJ (2002). *Streptococcus iniae* vaccine. *US Patent* No. 6,379,677 B1.

Nguyen Giang Thu Lan; Krishna R.Salin, Siwaporn Longyant Saengchan Senapind, Ha Thanh Dong (2021). Systemic and mucosal antibody response of freshwater cultured Asian seabass (*Lates calcarifer*) to monovalent and bivalent vaccines against *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae*. *Fish Shellfish Immunol,* 108: 7-13.

Roberson BS (1990). Bacterial agglutination. Techniques in fish immunology. Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS, WBvan Muiwinkel (eds). *SOS publications, 43 DeNormandie Ave, Fair Haven, NJ 07704-3303 USA.*

Stevenson RM (1997). Immunization with bacterial antigens: yersiniosis. *Developments in biological standardization*, 90: 117-124.

Suanyuk N, Sukkasame N, Tanmark N, Yoshida T, Itami T, Thune RL, Tantikitti C, Supamattaya K (2010). *Streptococcus iniae* infection in culture Asian sea bas (*Lates calcarifer*) and red tilapia (*Oreochromis* sp.) in southern ThaiLand. *Songklanakarin J Sci Technol*, 32 (4): 341-348.

Tawab AE, Hofy FE, Ali N, Saad W, El-Mougy E, Mohammed A (2022). Antibiotic resistance genes in *Streptococcus iniae* isolated from diseased *Oreochromis niloticus*. *Egyptian J Aquatic Biology Fisheries*, 26 (2): 413-428.

Trương Thị Hoa, Nguyễn Ngọc Phước, Đặng Thị Hoàng Oanh (2018). Nghiên cứu đặc điểm bệnh học của vi khuẩn *Streptococcus iniae* trên cá chẽm (*Lates calcarifer*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 54:156-163.

Từ Thanh Dung, Huỳnh Thị Ngọc Thanh, Nguyễn Khương Duy (2013). *Streptococcus iniae,* tác nhân gây bệnh "Đen thân" trên cá rô đồng (*Anabas testudineus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ,* 26: 96-103.

Van Muiswinkel WB (2008). A history of fish immunology and vaccination. *Fish Shellfish Immunol*, 25: 397 – 408.

THE EFFECT OF ADJUVANTS IN INACTIVATED VACCINE TO STIMULATE ANTIBODY PRODUCTION AGAINST *STREPTOCOCCUS INIAE* CAUSING POP-EYE DISEASE IN SEA BASS (*LATES CALCARIFER*)

Nguyen Thi Thanh Thuy*, Nguyen Thi Que Chi, Le Hong Tuan, Nguyen Van Hung

Research Institute for Aquaculture No.3

SUMMARY

The study presents the effects of adjuvants to antibody responses and protective efficacies of an inactivated vaccine against *Streptococcus iniae* in seabass *Lates calcarifer*. Inactivated vaccine includes bacterin biomass of *Streptococcus iniae* SiTH1 at a concentration of 10^{10} cfu/mL, inactivated with formalin, mixed with adjuvants Montanide ISA 763 AVG (Seppic, France), FIA (Freund's Incomplete Adjuvant) and Extracellular polysaccharide (EPS) is extracted from SiTH1 biomass. The experiment included 5 adjuvant treatments (NT1: FKC + ISA763 AVG, ratio 6:4; NT2: FKC + FIA, ratio 1:1; NT3: FKC + 5 mg EPS; NT4: NT1 + 5 mg EPS ; NT5:NT2+5 mg EPS) and control treatments including Control 1: FKC and Control 2: PBS. Each treatment consisted of 30 seabass that were immunized once by intraperitoneal injection, dose of 0.1 mL/fish, triplication. Results analysis of fish sera at 7, 14 and 21 days post immunization showed that antibody titers gradually increased after 1 week of immunization, reaching the highest at 14 days and gradually decreasing at 21 days. In particular, at each time of sample collection, the highest antibody titer were recorded in groups NT1 (FKC + Montanide ISA 763) and NT4 (NT1 + EPS), the significant difference compared to the other groups ($P<0.05$) and there was no difference between these two groups. On day 21 after immunization, experimental fish were challenged with virulent SiTH1 at a concentration of 10^8 cfu/mL, dose of 0.1 mL/fish. The protective percent suvival (RPS) shows that vaccine mixed with ISA763 AVG or ISA763 AVG and EPS were the highest, reached 78.4%; The vaccine group mixed with FIA adjuvants reached 70-73%, the lowest was the vaccine group without adjuvants with only 48.6%.

Keywords: Protective efficacies, antibody responses, *Streptococcucs iniae*, adjuvants, vaccine.

* Author for correspondence: Tel: +84-975894976; Email: ngthuy@ria3.vn/ ngthuyria3@gmail.com.

PHÂN TÍCH DI TRUYỀN SRI LANKAN CASSAVA MOSAIC VIRUS TRÊN CÂY SẮN BỊ BỆNH KHẢM LÁ TẠI MIỀN TRUNG VIỆT NAM

Nguyễn Lê Quý Bảo, Trương Thị Hồng Hải, Hồ Ngọc Hân*

Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Thừa Thiên Huế, Việt Nam

TÓM TẮT

Bệnh khảm lá sắn đã lây lan rộng ở Việt Nam, ảnh hưởng nghiêm trọng đến ngành công nghiệp sắn. Dịch khảm lá sắn ở Việt Nam do một loại begomovirus, Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV) gây ra. Phần lớn dữ liệu di truyền về SLCMV ở Việt Nam được thu thập ở vùng Đông Nam Bộ, trong khi dữ liệu di truyền của SLCMV ở hai vùng trồng sắn trọng điểm khác: Bắc Trung Bộ và duyên hải Nam Trung Bộ nhìn chung vẫn còn thiếu. Nhằm hiểu rõ hơn về đặc tính di truyền của các chủng SLCMV gây bệnh khảm lá sắn ở miền Trung Việt Nam, chúng tôi đã thu thập mẫu sắn có biểu hiện bệnh khảm lá sắn tại hai tỉnh miền Trung: Thừa Thiên Huế và Bình Định. Sử dụng phương pháp PCR với các mồi đặc hiệu, DNA-A và DNA-B của SLCMV được phát hiện trên các mẫu sắn có biểu hiện bệnh. Giải trình tự bộ gen của SLCMV bằng phương pháp giải trình tự Sanger cho thấy các chủng SLCMV phân lập ở Thừa Thiên Huế (QTho01, mã GenBank PP437578 và PP421166) và Bình Định (BDinh01, mã GenBank PP446165 và PP446164) có mã di truyền giống đến hơn 99% so với các chủng SLCMV phân lập ở khu vực Đông Nam Á. Những kết quả này đóng góp vào cơ sở dữ liệu di truyền của begomovirus ở Việt Nam, cũng như hỗ trợ các nghiên cứu về phát hiện và chẩn đoán SLCMV bằng công cụ sinh học phân tử, giúp kiểm soát dịch bệnh.

Từ khóa: Begomovirus, Bình Định, khảm lá sắn, Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV), Thừa Thiên Huế.

MỞ ĐẦU

Sắn (*Manihot esculenta* Crantz) là một cây trồng quan trọng của Việt Nam. Xuất khẩu sắn và các sản phẩm từ sắn đạt hơn 1 tỷ đô trong 10 tháng đầu năm 2023, và dự kiến đạt 2 tỷ đô vào năm 2030 (Bộ NN&PTNT, 2024). Các vùng trồng sắn chủ lực bao gồm Bắc Trung bộ và duyên hải Nam Trung bộ, Tây Nguyên, Trung du miền núi phía Bắc và Đông Nam Bộ. Một số giống sắn cao sản chủ lực ở Việt Nam bao gồm KM94, KM140, KM149, KM419, SM937, KM98-1 và KM98-7. Đây là các giống sắn cho năng suất củ tươi và hàm lượng tinh bột cao (28-31%). Việt Nam đứng thứ hai trên thế giới về sản lượng sắn xuất khẩu, trong đó hơn 90% được xuất sang thị trường Trung Quốc.

Tại Việt Nam, bệnh khảm lá sắn được phát hiện đầu tiên năm 2017 ở huyện Tân Châu, Tây Ninh (Uke *et al*., 2018) với 102 ha nhiễm bệnh. Đầu năm 2018, bệnh lan ra Bình Dương và một số tỉnh thành lân cận. Đến 2022, dịch bệnh khảm lá sắn đã lan ra 26 tỉnh thành, ảnh hưởng đến khoảng 15% diện tích trồng sắn của Việt Nam và làm sụt giảm hơn 15% năng suất sắn tươi, hàm lượng tinh bột giảm 22-38% (Uke *et al*., 2022). Trên giống sắn chủ lực KM94, bệnh khảm lá sắn làm năng suất giảm 13-19% và hàm lượng tinh bột giảm đến 19% (Trịnh Xuân Hoạt *et al*., 2021a). Các nghiên cứu di truyền cho thấy dịch khảm lá sắn ở Việt Nam gây ra bởi Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV), một trong hai loại virus chính gây bệnh khảm lá sắn ở châu Á. Phương thức lây truyền của SLCMV bao gồm việc sử dụng hom giống nhiễm bệnh và lây truyền thông qua môi giới bọ phấn trắng mang SLCMV (Trịnh Xuân Hoạt *et al*., 2021b). Hiện nay, biện pháp chủ yếu để kiểm soát bệnh là sử dụng hom giống sạch bệnh, phát triển và nhân nhanh các giống kháng bệnh. Ngoài ra, các biện pháp quản lý dịch bệnh tổng hợp cũng đang được nghiên cứu.

SLCMV có bản chất di truyền gồm hai phân tử DNA vòng sợi đơn: DNA-A và DNA-B, mỗi phân tử dài khoảng 2,7 kb. DNA-A mã hóa 6 protein quan trọng. Sáu gen này được sắp xếp theo hai chiều ngược nhau: *AV1*, *AV2*, *AC1*, *AC2*, *AC3* và *AC4*. Gen *AV1* mã hóa protein cấu trúc, là thành phần chính của vỏ protein của virus (Stanley & Gay, 1983). Gen *AV2* mã hóa protein chưa rõ chức năng nhưng có vẻ cần thiết cho việc ức chế hệ miễn dịch của cây (Luna *et al*., 2012). Gen *AC1* (Rep) mã hóa protein có vai trò quan trọng trong quá trình nhân đôi DNA của virus (Lazarowitz *et al*., 1992). AC2 (TrAP) giúp kích hoạt sự phiên mã của các gen biểu hiện muộn của virus. AC3 (REn) tương tác với các protein chu kỳ tế bào trong cây và hỗ trợ hoạt động của AC1. AC4 có rất nhiều chức năng, bao gồm ức chế hệ miễn dịch của tế bào, điều chỉnh chu kỳ tế bào, vận chuyển của virus bên trong tế bào và liên quan đến biểu hiện triệu chứng bệnh (Fondong, 2022). DNA-B chỉ mang 2 gen, sắp xếp theo 2 chiều ngược nhau: *BV1* và *BC1*. Protein BV1 giúp vận chuyển bộ gen virus vào và ra khỏi nhân tế bào (Zhou *et al*., 2007). Mặt khác, BC1 giúp vận chuyển bộ gen của virus giữa các tế bào ký chủ (Zhou *et al*., 2011).

So với Thái Lan và Campuchia, cơ sở dữ liệu di truyền của SLCMV ở Việt Nam còn hạn chế. Bộ gen đầy đủ của SLCMV ở Việt Nam đã được phân tích ở một số tỉnh như Tây Ninh, Củ Chi, Ninh Thuận (Nguyễn Thanh Việt *et*

al., 2020; Trịnh Xuân Hoạt *et al*., 2021a) và Nghệ An (Nguyễn Văn Liêm *et al*., 2022). Nhằm hiểu rõ hơn về đặc tính di truyền của SLCMV ở các vùng trồng sắn trọng điểm của Việt Nam, chúng tôi đã phân lập và giải trình tự của SLCMV trên cây sắn biểu hiện bệnh khảm lá sắn ở hai tỉnh miền Trung Việt Nam: Thừa Thiên Huế và Bình Định. Nghiên cứu này góp phần xây dựng bộ cơ sở dữ liệu di truyền của SLCMV ở Việt Nam, tiến tới kiểm soát tốt hơn dịch bệnh trên cây sắn. Việc xây dựng bộ cơ sở dữ liệu di truyền của SLCMV ở các vùng địa lý khác nhau cũng giúp theo dõi tốc độ tiến hóa của virus, cũng như khả năng virus tái tổ hợp với các begomovirus khác, tạo ra các loại virus mới với khả năng gây hại cho nhiều loại cây trồng khác (Tiendrébéogo *et al*., 2012).

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nguyên liệu

Mẫu lá sắn KM94 biểu hiện bệnh khảm lá sắn được thu thập tại xã Quảng Thọ, huyện Quảng Điền, tỉnh Thừa Thiên Huế và xã Mỹ Chánh, huyện Phù Mỹ, tỉnh Bình Định, Việt Nam từ khoảng tháng 3 đến tháng 5 năm 2023. Các biểu hiện bệnh bao gồm lá bị khảm, vàng, biến dạng, lá nhỏ (Hình 1) và cây còi cọc.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số được tách từ lá sắn bị nhiễm SLCMV theo phương pháp CTAB của Doyle và Doyle (1987). Cụ thể, 1 g lá (từ 1 cây sắn có biểu hiện bệnh) được cắt thành từng mảnh nhỏ và nghiền với 500 µL đệm chiết CTAB (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA và 100 mM Tris-HCl, pH 8,0). Mẫu DNA được tinh sạch bằng cách chiết 2 lần với cùng thể tích hỗn hợp chloroform : isoamylalcohol (24:1) và DNA được kết tủa bằng 2/3 thể tích isopropanol ở -20°C. Kết tủa DNA được ly tâm 13.000 vòng/phút trong 10 phút và rửa hai lần với ethanol (70%). Sau đó, kết tủa được hòa tan trong 100 µL đệm TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM Na_2EDTA, pH 7,5). Nồng độ và độ tinh sạch của DNA tổng số được xác định bằng phương pháp quang phổ (NanoDrop ND-1000, Thermo, Hoa Kì).

Phương pháp khuếch đại và giải trình tự bộ gen SLCMV

Bộ gen SLCMV được khuếch đại bởi sáu cặp mồi (Bảng 1, Uke *et al*., 2018). PCR (20 µL) bao gồm 1x đệm Phusion HF; 20 ng DNA tổng số; 200 µM dNTPs; 0,5 µM mồi xuôi/ngược; 0,4 đơn vị Phusion High-Fidelity DNA polymerase. Phản ứng được thực hiện trong máy luân nhiệt: 98ºC - 30 s; 35 chu kỳ lặp lại (98ºC - 5 s, 58ºC - 15 s và 72ºC - 45 s); 72ºC - 5 phút (SimpliAmp™, Thermofisher, Hoa Kì). Sản phẩm PCR được phân tích bằng phương pháp điện di (gel agarose 1,5% w/v) trong đệm TBE 0,5X, nhuộm bằng dung dịch ethidium bromide (Biobasic, Canada) và chụp bằng hệ thống chụp gel Vilber, Bio print CX4 (Pháp). DNA được giải trình tự bằng phương pháp Sanger và mã di truyền của DNA-A và DNA-B được lắp ghép bằng phần mềm Cap3 (Huang & Madan, 1999) và SnapGene (Dotmatics, Hoa Kì). Trình tự DNA sau khi hoàn thiện được so sánh với các trình tự DNA của SLCMV trên cơ sở dữ liệu GenBank, sử dụng công cụ BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) và MEGA11.

Bảng 1. Các cặp mồi đặc hiệu để khuếch đại DNA-A và DNA-B của SLCMV (Uke *et al*., 2018)

Sản phẩm PCR	Mồi xuôi	Trình tự (5'-3')	Mồi ngược	Trình tự (5'-3')
A1 (1177 bp)	SLCMV_A_F1	CCATGAATCGGAAGCCCA	SLCMV_A_R1	ATGCGACCTTCATCTCCCTC
A2 (1171 bp)	SLCMV_A_F2	CTGAGCTGCAGTGATGAGTTCC	SLCMV_A_R2	TGAGAAACCCACGATTCAGAATTC
A3 (1049 bp)	SLCMV_A_F3	TTGTCGATGTAGGACTTGACGTC	SLCMV_A_R3	TCAGAGATGCACATGACCTTACC
B1 (1114 bp)	SLCMV_B_F1	GGAGATCGTATAATGCCGGTAAG	SLCMV_B_R1	GAGAGGGACATTGATTTCTGGT
B2 (1184 bp)	SLCMV_B_F2	CCTCGCTCTTAACGGCCCAT	SLCMV_B_R2	CAAGAAATGTGTGCGACTATCCAG
B3 (1040 bp)	SLCMV_B_F3	GATGACTCTGGTTAAGCCCTCTAGTAGTA	SLCMV_B_R3	CGGTCCAAATTGATCCTCCGATA

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

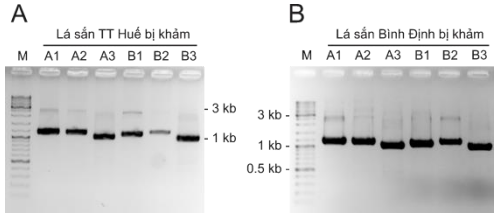
Dấu hiệu bệnh khảm lá sắn trên sắn KM94 ở Thừa Thiên Huế và Bình Định

Khảo sát sơ bộ tại ruộng sắn ở huyện Quảng Điền (Thừa Thiên Huế) và huyện Phù Mỹ (Bình Định) cho thấy phần lớn cây sắn (3-5 tuần tuổi) tại ruộng khảo sát có các biểu hiện của bệnh khảm lá sắn. Các biểu hiện này bao gồm lá khảm vàng, lá nhỏ, bị xoắn, biến dạng, tương tự với các triệu chứng bệnh khảm lá sắn được phát hiện ở Tây Ninh và Nghệ An (Uke *et al*., 2018; Nguyễn Thanh Việt *et al*., 2020; Nguyễn Văn Liêm *et al*., 2022).

Hình 1. Mẫu sắn nhiễm bệnh khảm lá tại (A, B) Thừa Thiên Huế và (C) Bình Định, miền Trung Việt Nam

Phát hiện DNA của SLCMV bằng phương pháp PCR

Mã di truyền của SLCMV bao gồm 2 phân tử DNA vòng sợi đơn: DNA-A và DNA-B, mỗi phân tử dài hơn 2700 nucleotide. Khi DNA tổng số được tách chiết từ lá sắn có biểu hiện bệnh khảm, các phản ứng PCR với mồi đặc hiệu đều tạo ra các băng DNA với chiều dài tương ứng với DNA-A và DNA-B của SLCMV (Hình 2, Bảng 1). Do đó, DNA của SLCMV hiện diện trên các cây sắn nhiễm bệnh ở Thừa Thiên Huế và Bình Định.



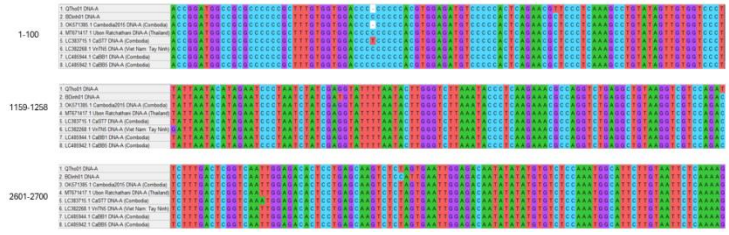
Hình 2. Sự hiện diện của SLCMV trên mẫu lá sắn biểu hiện bệnh tại (A) Thừa Thiên Huế (TT Huế) và (B) Bình Định được kiểm tra bằng phương pháp PCR. A1, A2, A3, B1, B2, B3: sản phẩm PCR đặc hiệu (Bảng 1); M: thang DNA

Trình tự DNA-A của SLCMV trên sắn ở Thừa Thiên Huế và Bình Định

DNA-A của SLCMV từ Quảng Điền, Thừa Thiên Huế (isolate QTho01, GenBank PP437578) và Phù Mỹ, Bình Định (isolate BDinh01, GenBank PP446165) có kích thước lần lượt là 2.757 và 2.758 nucleotide. Hai phân tử DNA-A này được dự đoán chứa sáu vùng đọc mở tương ứng với các gen *AV1* (29,8 kDa), *AV2* (13,5 kDa), *AC1* (38,9 kDa) *AC2* (15,0 kDa), *AC3* (15,9 kDa) và *AC4* (10,7 kDa), tương tự như DNA-A từ các chủng SLCMV khác. Trình tự DNA-A của hai chủng SLCMV isolate QTho01 và BDinh01 có mức độ giống nhau đến 99,49% (Bảng 2). DNA-A của SLCMV isolate QTho01 có mức độ giống nhau hơn 99,7% so với nhiều chủng SLCMV ở Campuchia, Thái Lan và Việt Nam (Bảng 2), trong đó cao nhất là 99,85 (isolate Cambodia2015). Các chủng SLCMV có độ giống nhau cao với QTho01 cũng thể hiện độ giống nhau cao với BDinh01 (≥ 99,6%, Bảng 2). Kết quả này tương đồng với sự gióng hàng trình tự, khi sự khác biệt về nucleotide giữa DNA-A từ QTho01 và BDinh01 so với các chủng trong khu vực là không nhiều (Hình 3).

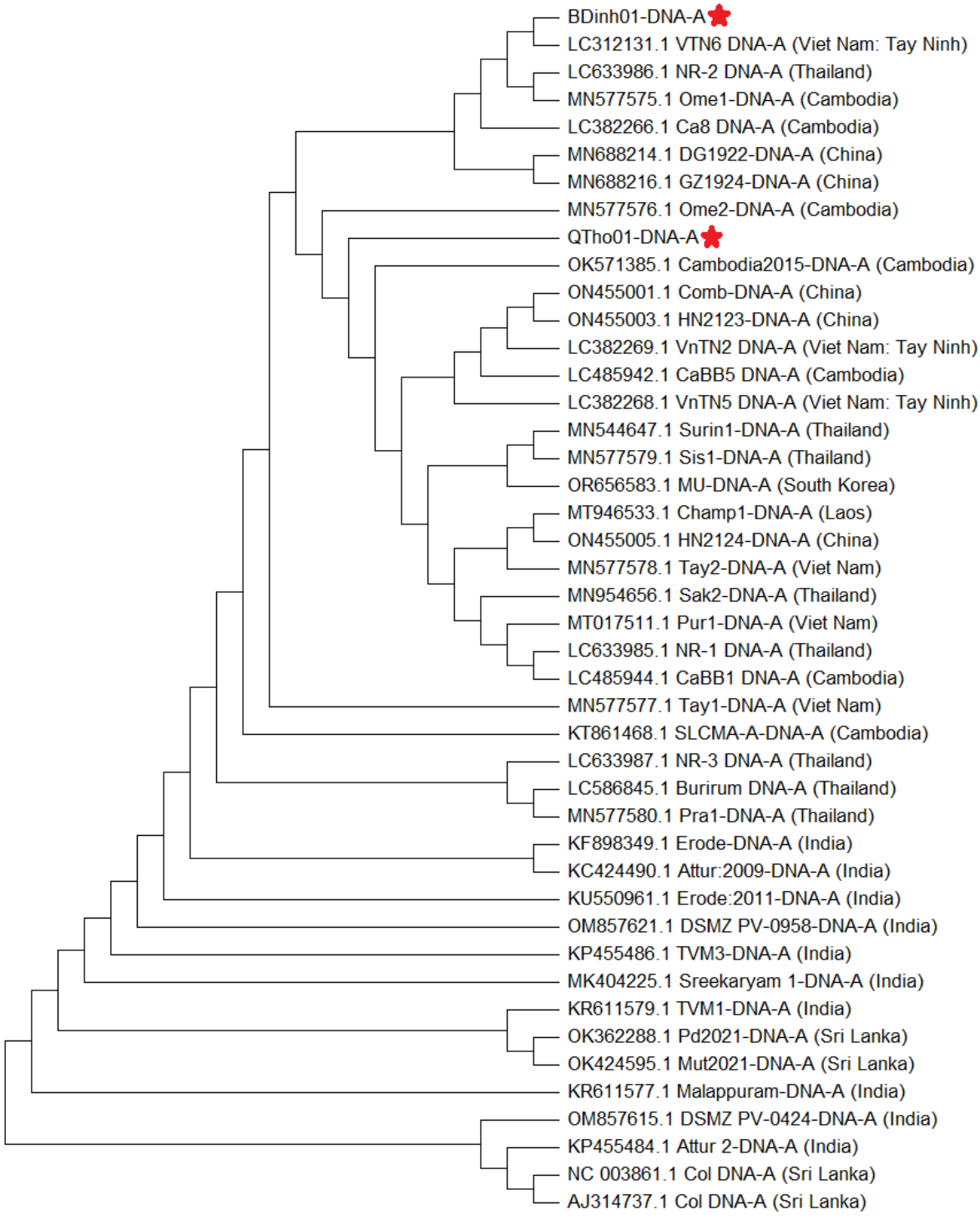
Bảng 2. Độ giống nhau giữa DNA-A của SLCMV isolate QTho01, BDinh01 và các chủng SLCMV trong khu vực.

STT	SLCMV (GenBank accession)	Nước	Độ giống nhau với DNA-A của SLCMV (%)	
			Isolate QTho01 (PP437578)	Isolate BDinh01 (PP446165)
1	Cambodia2015 (OK571385)	Campuchia	99,85	99,64
2	Ubon Ratchathani (MT671417)	Thái Lan	99,82	99,67
3	CaST7 (LC383715)	Campuchia	99,78	99,60
4	VnTN5 (LC382268)	Việt Nam	99,78	99,64
5	CaBB1 (LC485944)	Campuchia	99,78	99,64
6	CaBB5 (LC485942)	Campuchia	99,78	99,64
7	QTho01 (PP437578)	Việt Nam	100	99,49



Hình 3. Sự khác biệt giữa trình tự nucleotide của DNA-A QTho01 và BDinh01 với một số chủng SLCMV trong khu vực Đông Nam Á

Cây phát sinh loài được xây dựng bằng cách so sánh trình tự nucleotide hoàn chỉnh của DNA-A từ các chủng SLCMV (Hình 4). Chủng SLCMV QTho01 và BDinh01 được phân cụm gần với các chủng từ Campuchia, Thái Lan và Trung Quốc, thể hiện nguồn gốc chung của các chủng virus này. Các chủng SLCMV từ Ấn Độ, Sri Lanka và Hàn Quốc nằm ở những nhánh khác, phản ánh sự khác biệt về di truyền của SLCMV ở các khu vực này với các chủng ở miền Trung Việt Nam.



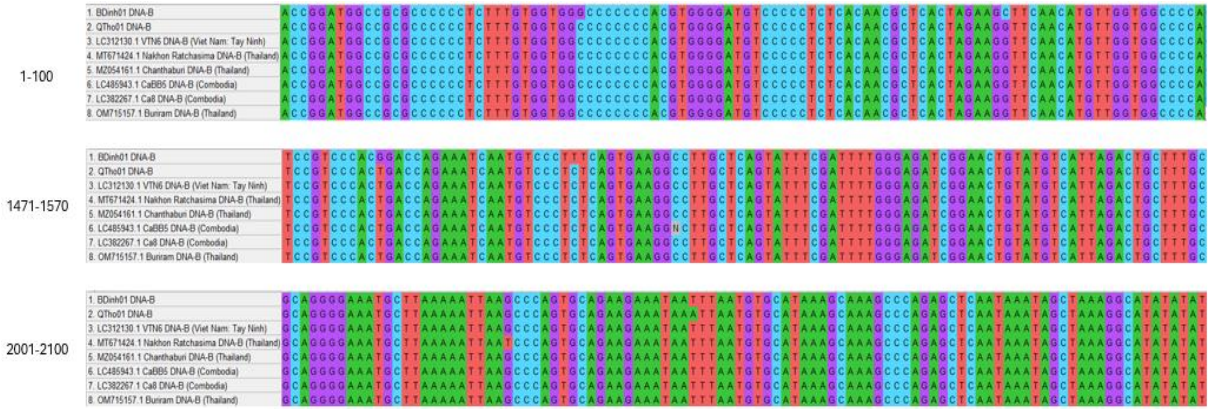
Hình 4. Cây phát sinh loài được xây dựng bằng phương pháp so sánh trình tự DNA-A hoàn chỉnh của một số chủng SLCMV bao gồm QTho01 và BDinh01

Trình tự DNA-B của SLCMV trên sắn ở Thừa Thiên Huế và Bình Định

DNA-B của SLCMV từ Quảng Điền, Thừa Thiên Huế (isolate QTho01, GenBank PP421166) và Phù Mỹ, Bình Định (isolate BDinh01, GenBank PP446164) có cùng kích thước: 2.737 nucleotide. Hai phân tử DNA-B được dự đoán chứa hai vùng đọc mở, tương ứng với các gen *BV1* (29,9 kDa) và *BC1* (32,5 kDa). Trình tự DNA-B của SLCMV isolate QTho01 và BDinh01 có mức độ giống nhau đến 99,67% (Bảng 3). Tương tự như DNA-A, DNA-B của SLCMV isolate QTho01 có mức độ giống nhau hơn 99,8% so với nhiều chủng SLCMV ở Campuchia, Thái Lan và Việt Nam (Bảng 3), trong đó cao nhất là 99,85 (isolate CaBB5). Các chủng SLCMV có độ giống nhau cao với QTho01 cũng thể hiện độ giống nhau cao với isolate BDinh01 (≥ 99,7%, Bảng 3). Kết quả này tương đồng với sự gióng hàng trình tự, khi sự khác biệt về nucleotide giữa DNA-B từ QTho01 và BDinh01 so với các chủng trong khu vực là không nhiều (Hình 5).

Bảng 3. Độ giống nhau giữa DNA-B của SLCMV isolate QTho01, BDinh01 và các chủng SLCMV trong khu vực

STT	SLCMV (GenBank accession)	Nước	Độ giống nhau với DNA-B của SLCMV (%)	
			Isolate QTho01 (PP421166)	Isolate BDinh01 (PP446164)
1	CaBB5 (LC485943)	Campuchia	99,85	99,74
2	VTN6 (LC312130)	Việt Nam	99,85	99,74
3	Buriram (OM715157)	Thái Lan	99,85	99,74
4	Ca8 (LC382267)	Campuchia	99,82	99,71
5	Chanthaburi (MZ054161)	Thái Lan	99,82	99,71
6	Nakhon Ratchasima (MT671424)	Thái Lan	99,82	99,71
7	QTho01 (PP421166)	Việt Nam	100	99,67



Hình 5. Sự khác biệt giữa trình tự nucleotide của DNA-B QTho01 và BDinh01 với một số chủng SLCMV trong khu vực Đông Nam Á

KẾT LUẬN

Kết quả PCR và giải trình tự đã phát hiện DNA-A và DNA-B của SLCMV trên mẫu sắn bị bệnh khảm lá tại xã Quảng Thọ, huyện Quảng Điền, tỉnh Thừa Thiên Huế và xã Mỹ Chánh, huyện Phù Mỹ, tỉnh Bình Định. Mã di truyền của SLCMV ở hai xã này có độ giống nhau cao với mã di truyền của các chủng SLCMV trong khu vực Đông Nam Á. Nghiên cứu này cung cấp thêm dữ liệu di truyền của các chủng SLCMV được phát hiện tại miền Trung Việt Nam, phục vụ công tác chẩn đoán và phòng trừ dịch khảm lá sắn.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.02-2023.89. Nhóm tác giả cảm ơn Nhóm nghiên cứu tiêu biểu Đại học Huế (NCTB.DHH.2024.03) đã hỗ trợ phí đăng bài.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bộ NN&PTNT (2024) Quyết định Phê duyệt Đề án "Phát triển bền vững ngành hàng sắn đến năm 2030, tầm nhìn đến năm 2050".

Doyle JJ, Doyle JL (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 19: 11-15.

Fondong V N (2022). Chapter 19 - The diverse roles of the multifunctional C4/AC4 protein in geminivirus infection. In "*Geminivirus : Detection, Diagnosis and Management*" (R. K. Gaur, P. Sharma and H. Czosnek, eds.), 309-322. Academic Press.

Huang X & Madan A (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome research*, 9(9): 868-877.

Lazarowitz S G, Wu L C, Rogers S G, and Elmer J S (1992). Sequence-specific interaction with the viral AL1 protein identifies a geminivirus DNA replication origin. *Plant Cell* 4: 799-809.

Luna A P, Morilla G, Voinnet O, and Bejarano E R (2012). Functional Analysis of Gene-Silencing Suppressors from Tomato Yellow Leaf Curl Disease Viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25: 1294-1306.

Nguyễn Thanh Việt, Trần Kiên Cường, Nguyễn Thị Nhã, Thân Văn Thái (2020) Xác định đặc điểm di truyền học của Sri Lanka cassava mosaic virus gây bệnh khảm lá sắn tại Việt Nam. *Tạp chí Khoa học & Công nghệ* Số 9: 28-32.

Nguyen Van Liem, Trinh Xuan Hoat, Le Quang Man, Nguyen Manh Hung, Ngo Quang Huy, Le Thi Hang, Mai Van Quan, Dao Thi Phuong Linh, Duong Thi Nguyen, Le Thi Kieu Oanh, Luu Thi Xuyen, Nguyen Viet Hung, Ayaka Uke, Pham Hong Hien, Tran Dinh Ha, Chetan Keswani & Thi Thu Hien Phan (2022). Molecular identification of Sri Lankan cassava mosaic virus causing mosaic disease of cassava in Nghe An province, Vietnam, *Archives of Phytopathology and Plant Protection.*

Stanley J. and Gay MR (1983) Nucleotide sequence of Cassava latent virus DNA. *Nature*, 301: 260–262.

Tiendrébéogo F, Lefeuvre P, Hoareau M, Harimalala M A, Bruyn A D, Villemot J, Traore V S E, Konate G, TraoreA S, Barro,N, Reynaud B, Traore O, Lett JM (2012). Evolution of African cassava mosaic virus by recombination between bipartite and monopartite begomoviruses. *Virology Journal* 9: 67.

Trịnh Xuân Hoạt, Ngô Quang Huy, Nguyễn Mạnh Hùng, Lê Thị Hằng (2021a). MỘT SỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ GIẢI PHÁP SỬ DỤNG HOM GIỐNG TRONG PHÒNG CHỐNG BỆNH KHẢM LÁ SẮN TẠI VIỆT NAM. *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, 3: 44-52.

Trịnh Xuân Hoạt, Nguyễn Chí Hiểu, Ngô Quang Huy, Nguyễn Đức Huy (2021b). Xác định phương thức lan truyền của Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV) gây bệnh khảm lá sắn ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 19(2): 206-214.

Uke A, Hoat T X, Quan M V, Liem N V, Ugaki M, & Natsuaki K T (2018). First report of Sri Lankan cassava mosaic virus infecting cassava in Vietnam. *Plant Disease*, 102(12): 2669.

Uke A, Tokunaga H, Utsumi Y, Vu N A, Nhan P T, Srean P, Hy N H, Ham L H, Lopez-Lavalle L A B, Ishitani M, Hung, N., Tuan, L. N., Van Hong, N., Huy, N. Q., Hoat, T. X., Takasu, K., Seki, M., and Ugaki, M. (2022). Cassava mosaic disease and its management in Southeast Asia. *Plant Mol Biol* 109: 301-311.

Zhou Y C, Garrido-Ramirez E R, Sudarshana M R, Yendluri S, & Gilbertson R L (2007). The N-terminus of the begomovirus nuclear shuttle protein (BV1) determines virulence or avirulence in Phaseolus vulgaris. Molecular plant-microbe interactions, 20(12): 1523-1534.

Zhou Y, Rojas M R, Park M R., Seo Y S, Lucas W J, & Gilbertson R L (2011). Histone H3 interacts and colocalizes with the nuclear shuttle protein and the movement protein of a geminivirus. Journal of virology, 85(22): 11821-11832.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF SRI LANKAN CASSAVA MOSAIC VIRUS IN CASSAVA PLANTS IN CENTRAL VIETNAM

Nguyen Le Quy Bao, Truong Thi Hong Hai, Ho Ngoc Han*

Institute of Biotechnology, Hue University, Thua Thien Hue, Vietnam.

SUMMARY

Cassava mosaic disease has spread across Vietnam and is a major threat to the cassava industry. The disease outbreak in Vietnam is caused by Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV), a begomovirus first detected in Sri Lankan in 2002. Genetic data on SLCMV in Vietnam is primarily limited to the Eastern South Vietnam region, whereas SLCMV genetic data in Northern Central Vietnam and the coastal Southern Central Vietnam, two major cassava growing areas, remain lacking. To further understand the genetic features of SLCMV in central Vietnam, we collected symptomatic cassava samples in two provinces in central Vietnam: Thua Thien Hue and Binh Dinh. Using PCR with specific primers, we confirmed the presence of DNA-A and DNA-B of SLCMV in symptomatic leaves. SLCMV genome sequencing, using Sanger sequencing method, revealed that SLCMV isolates from Thua Thien Hue (QTho01, GenBank accession PP437578 and PP421166) and Binh Dinh (BDinh01, GenBank accession PP446165 and PP446164) had high percent identity (more than 99%) to those of other isolates in South East Asia. These results help build the genetic database of begomovirus in Vietnam, and support future works focusing on the early detection and diagnosis of SLCMV in cassava farms, in order to control viral spread.

Keywords: Begomovirus, Binh Dinh, cassava mosaic disease, Sri Lankan cassava mosaic virus (SLCMV), Thua Thien Hue.

* Author for correspondence: Tel: +84-834328899; Email: hongochan@hueuni.edu.vn

EVALUATION OF THE INHIBITORY ABILITY OF *PIPER NIGRUM* AND *PIPER DIVARICATUM* LEAF WATER EXTRACTS ON *PHYTOPHTHORA CAPSICI* IN *IN-VITRO*

Le Hoang Duy Minh, Nguyen Tien Long, Truong Thi Hong Hai*

Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

SUMMARY

Phytophthora capsici is a notorious pathogen of many economically important crops leading to severe impacts on agriculture worldwide. Many plant species are capable of synthesizing compounds that act as a defense against pathogen attacks, showing the potential for application in preventing harmful pathogens on plants. In the current study, we conducted a chemical composition analysis and evaluated the impact of *P. nigrum* and *P. divaricatum* leaf water extracts on the growth of *P. capsici*. GC-MS analysis revealed that spathulenol derivatives (53.64%) were the major components in *P. nigrum* leaf water extract, while eugenol (43.63%) and methyl eugenol (52.24%) were the main components in *P. divaricatum* leaf water extract. Assessing the growth inhibition of *P. capsici* at different concentrations (5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL) over 72 hours, results showed that *P. divaricatum* leaf water extract (43.02 ± 3.72%) was more effective at inhibiting growth compared to *P. nigrum* leaf water extract (22.18 ± 3.82%). This study opens up prospects for the application of naturally derived anti *P. capsici* compounds in agricultural production.

Keywords: Extract, GC-MS, *in-vitro*, *Phytophthora capsici*, *Piper nigrum*, *Piper divaricatum*.

INTRODUCTION

Phytophthora capsici is an oomycete, Chromista a highly destructive plant pathogen that harms various parts of crops such as roots, stems, fruits, and basal parts (Dunn *et al*., 2014). Previously, *P. capsici* was reported to primarily infect plants in the genus capsicum, such as peppers. However, current reports indicate that this species can affect up to 49 plant families, including tomatoes, eggplants, cucurbits (cucumbers, watermelons, melons, and squashes), as well as some legumes like fava beans, common beans, snap beans, and strawberries (Dunn *et al*., 2014). *P. capsici* can cause up to 100% yield loss once it infects the host under favorable conditions. Temperatures from 25 to 28°C and humidity levels above 80% are considered optimal for the pathogen's infection, development, and disease spread. Moreover, its spores can survive for over 12 months in the absence of a host (Gandariasbeitia *et al.*, 2019). This makes management challenging and positions *P. capsici* as one of the most damaging organisms to crops, significantly affecting agricultural productivity worldwide (Dunn *et al*., 2014).

Managing diseases caused by *P. capsici* is both costly and challenging. Chemical control remains widely used due to its high effectiveness in controlling crop diseases despite numerous issues such as changes in the physicochemical properties of the soil, accumulation of toxic compounds in fruits, and the development of fungicide resistance in pathogen populations (Wan *et al*., 2020). According to Sharma và đồng tác giả (2019), the widespread use of chemical pesticides for controlling agricultural crop diseases has led to a serious global crisis. Chemical pesticides have resulted in many adverse effects, such as changes in soil fertility, loss of biodiversity, nutrient depletion, and damage to the environment and human health (Sharma *et al*., 2019). This is why integrating various control methods such as genetic, breeding, biological, and natural compound approaches is necessary to reduce reliance on chemical pesticides. The use of plant-derived compounds antagonistic to crop pathogens is considered a promising approach to replacing harmful chemical pesticides, reducing economic burdens, and being environmentally friendly.

Plants, having been exposed to pathogens for millions of years, have evolved to synthesize their own compounds for self-protection. These compounds are largely non-toxic to the environment and are mainly known in various forms such as terpenoids, phenylpropanoids, fatty acid derivatives, and amino acids (Cadena *et al*., 2018). Piperaceae is a large family of angiosperms with about 3,600 species divided into five main genera, with *Piper* being the most common. Studies on *Piper* species have shown that, besides their economic utility, these plants possess medicinal properties that have been exploited in traditional medicine since ancient times, including antibacterial, antifungal, and antioxidant capabilities (Bratati *et al*., 2022). *P. nigrum* is widely used as a food in family meals and is a well-known member of this genus. *P. divaricatum*, primarily distributed in Latin American countries, is less known and is often used for bathing in the treatment of rheumatism. Extracts of *P. divaricatum* are believed to contain high amounts of phenylpropanoids, such as methyl eugenol and eugenol, which have

several biological activities (Oliveira *et al*., 2022). Although *P. nigrum* and *P. divaricatum* are valuable economically and medicinally, research on them is increasingly of interest due to the presence of various phytochemicals and their preventive capabilities against pathogens (Bratati *et al*., 2022). In agriculture, research on the preventive capabilities of leaf extracts from Piperaceae species against pathogens such as *P. capsici* remains limited. Therefore, in the current study, we evaluated the inhibitory potential of leaf water extracts from *P. divaricatum* and *P. nigrum* on *P. capsici*.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

P. nigrum was collected in Quang Tri province and *P. divaricatum* was collected in Gia Lai province. Then they were planted in the campus of Institute of Biotechnology, Hue University, (Hue, Vietnam). Plant material was taxonomically identified by the Laboratory Molecular Biology, Institute of Biotechnology, Hue University (Hue, Vietnam) and leaves were collected for experiments.

Extracts preparation

100g of fresh leaves of *P. divaricatum* and *P. nigrum* collected were thoroughly washed in tap water and sterile distilled water. Then the leaf sample was ground using a blender. The paste was added to 1L of sterile distilled water in a beaker, stirred vigorously and left for 1 hour, then filtered through four times of sterile filter cloth to obtain the leaf water extract. Store samples at 4^{o}C.

Testing the composition of the extract by GC-MS assay

The *P. nigrum* and *P. divaricatum* leaf water extract (1ml) after extraction was brought to the Drug, cosmetic and food quality control center of Thua Thien Hue province (HueQC). The extract was checked for composition using a GC-MS system (MS-TQ8040, Shimadzu, Japan). The detected compounds were confirmed through comparison of peak spectra with mass spectra from the library database at HueQC center.

Effect of *P. nigrum* and *P. divaricatum* leaf water extracts on the growth of *P. capsici*

The effect of the extract on the growth of *P. capsci* was measured *in-vitro* using the mycelial growth rate method and was adjusted (Yin *et al*., 2021). Potato Dextrose Agar (PDA) was poured into sterilized Petri dishes and P. *nigrum* and *P. divaricatum* leaf water extracts were added to the PDA medium to achieve the desired concentration of 0 mg/ml (control), 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL. A plug of mycelium (5 mm) was taken from the edge of the colony using sterile tweezers and placed in the center of the petri dish with the above mentioned drug. Culture at room temperature for 3 days, measure mycelium length. Each treatment has 3 repetitions. The inhibition effect of the leaf water extract was calculated according to the formula: % inhibition = [(Growth diameter in the control group – Growth diameter in the extract group)/Growth diameter in the control group] x 100 (Al-Hetar *et al*., 2010)

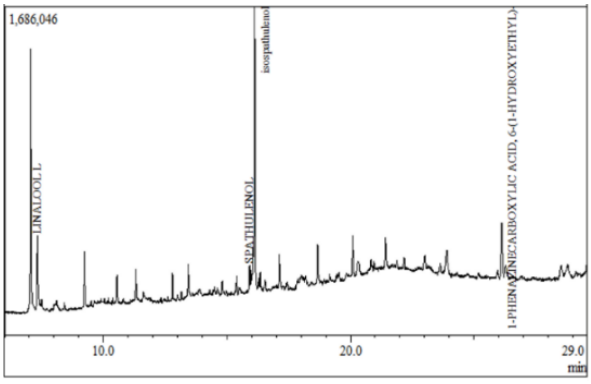
Statistical analysis

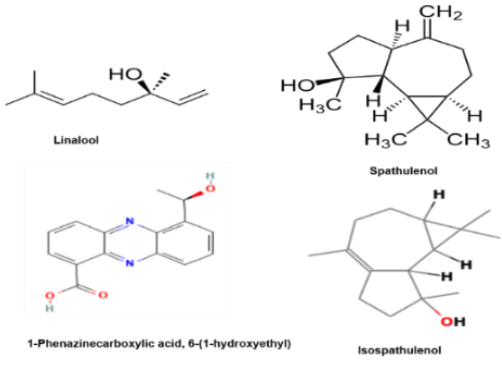
The results of the *P. capsici* resistance survey are given as the mean ± SD of the tested concentrations, each test performed in triplicate. One-way ANOVA was used to determine statistical significance.

RESULT AND DISCUSSION

GC-MS analysis

GC-MS analysis of *P. nigrum* and *P. divaricatum* leaf water extracts from was conducted, identifying and describing 8 compounds with their retention times, molecular weights, formulas, areas, and percentage areas. Each peak suggests the presence of different bioactive compounds in each extract (Figures 1 and 2).

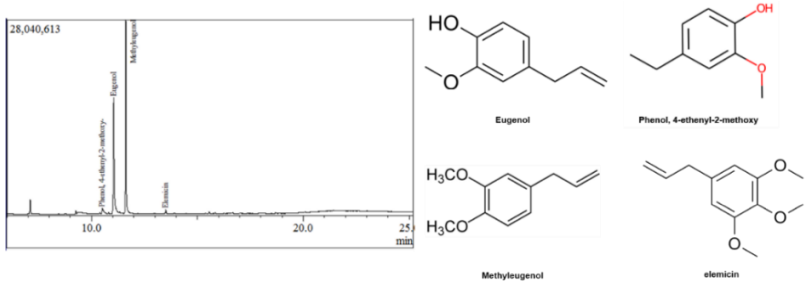




Peak	R. Time	Area	Area%	Name of Compound	Molecular Weight	Molecular Formula
1	7.332	864322	17.94	Linalool	154.25	$C_{10}H_{18}O$
2	15.921	216242	4.49	Spathulenol	220.55	$C_{15}H_{24}O$
3	16.126	2584112	53.64	Isospathulenol	150.17	$C_5H_{24}O$
4	26.122	1153086	23.93	1-Phenazinecarboxylic acid, 6-(1-hydroxyethyl)	286.27	$C_{15}H_{12}N_2O_3$

Figures 1. Results of GC-MS analysis of *P. nigrum* leaf water extract

From the GC-MS analysis of *P. nigrum* leaf water extract, the identified compounds include: linalool (17.94%), spathulenol (4.49%), isospathulenol (53.64%), and 1-Phenazinecarboxylic acid, 6-(1-hydroxyethyl) (23.93%). Similarly, four compounds were identified in the of *P. divaricatum* leaf water extract: Phenol, 4-ethenyl-2-methoxy (3.21%), eugenol (43.63%), methyl eugenol (52.24%), and elemicin (0.92%). The results from Figures 1 and 2 show that spathulenol derivatives are the main components in the *P. nigrum leaf water* extract, while eugenol derivatives are the main components in the *P. divaricatum* leaf water extract. Studies indicate that these chemical constituents exhibit various bioactivities. According to do Nascimento và đồng tác giả (2018), spathulenol exhibits the highest antioxidant activity in DPPH and MDA systems compared to reference standards, with IC_{50} values ranging from 26.13 to 85.60 µg/mL. Additionally, spathulenol (GI_{50} = 49.30 µg/mL) is particularly effective against ovarian cancer cell lines and shows anti-tuberculosis activity against M. tuberculosis with an MIC value of 231.9 µg/mL (Nascimento *et al*., 2018).



Peak	R. Time	Area	Area%	Name of Compound	Molecular Weight	Molecular Formula
1	10.508	3505466	3.21	Phenol, 4-ethenyl-2-methoxy	152,19	$C_9H_{12}O_2$
2	11.047	47604882	43.63	Eugenol	164,20	$C_{10}H_{12}O_2$
3	11.622	56989612	52.24	Methyl eugenol	178.23	$C_{11}H_{14}O_2$
4	13.511	1002328	0.92	elemicin	208.25	$C_{12}H_{16}O_3$

Figures 2. Results of GC-MS analysis of *P. divaricatum leaf water* extract

The *P. divaricatum* leaf water extract is reported to contain high levels of phenylpropanoids, such as methyl eugenol and eugenol, with various biological activities (Oliveira *et al*., 2022). In the context of research and practical applications, plant-derived compounds have been studied and extracted to combat various harmful organisms. Eugenol is one of the promising terpenes for managing biological pests. Eugenol has exhibited interesting biological properties including antibacterial, antioxidant, insecticidal, and other medicinal uses (Nasiou *et al*., 2020). Previous studies have shown that eugenol at a concentration of 660 µg/mL has toxic effects against *M. incognita* (Nasiou *et al*., 2020). Similarly to eugenol, Methyl eugenol has moderate antibacterial activity and acts as a natural anesthetic, capable of inducing rapid and comprehensive immobilization. According to Oliveira và đồng tác giả (2022), extracts from *P. divaricatum* are described as having antioxidant properties, antibacterial activity against both gram-negative and gram-positive bacteria, insecticidal effects, and antifungal properties against plant pathogens (Oliveira *et al*., 2022).

Effect of *P. nigrum* and *P. divaricatum* leaf water extracts on the growth of *P. capsici*

The effects of *P.nigrum* and *P. divaricatum* leaf water extracts on the growth ability of *P. capsici* were analyzed in this study and the results are shown in Figures 3 and 4. Over the observation period of *P. capsici* growth to determine the resistance of the two extracts, we found that both extracts had a positive effect in reducing the growth and development of *P. capsici*. The results were monitored continuously over 3 days at concentrations of 5 mg/mL, 10 mg/mL, and 50 mg/mL.

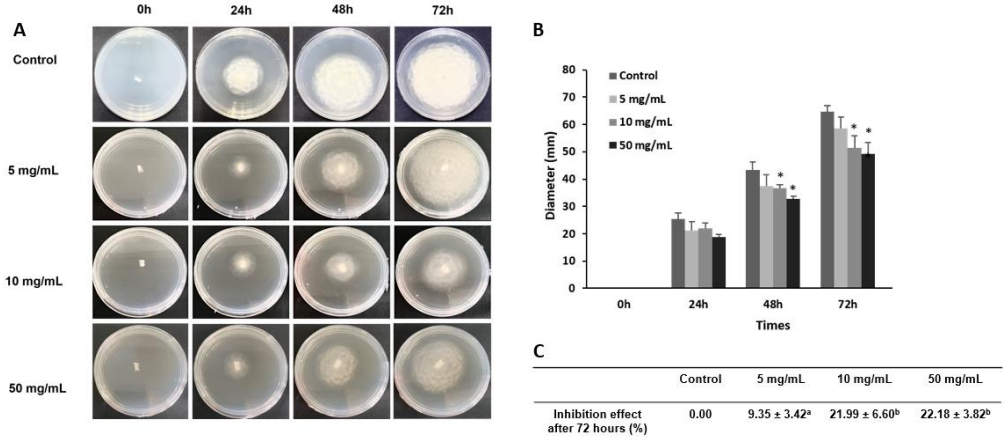


Figure 3. The effect of *P. nigrum* leaf water extract on the growth of *P. capsici*

(A): Morphology of P. capsici after 72 hours of exposure to P. nigrum leaf water extract. (B): growth diameter of P. capsici. (C): Inhibition effect of P. nigrum leaf water extract.

P. nigrum leaf water extract has an effect on the growth rate of *P. capsici* (Figure 3.A). However, the level of impact is not significant. The results showed that after 72 hours the growth diameter of *P. capsici* in the control group (64.67 ± 2.30 mm) and the 5 mg/mL concentration group (58.67 ± 4.16 mm) had no significant difference (Figure 3.B). In contrast, the 10 mg/mL (36.67 ± 1.15 mm) and 50 mg mg/mL (32.67 ± 1.15 mm) groups began to differ from the control group after 48 hours. The inhibitory effect of *P. nigrum* leaf water extract after 72 hours at concentrations of 5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL was 9.35 ± 3.42%, 21.99 ± 6.60%, 22.18 ± 3.82%, respectively. At two concentrations, 10 mg/mL and 50 mg/mL, there is no significant difference (Figure 3.C).

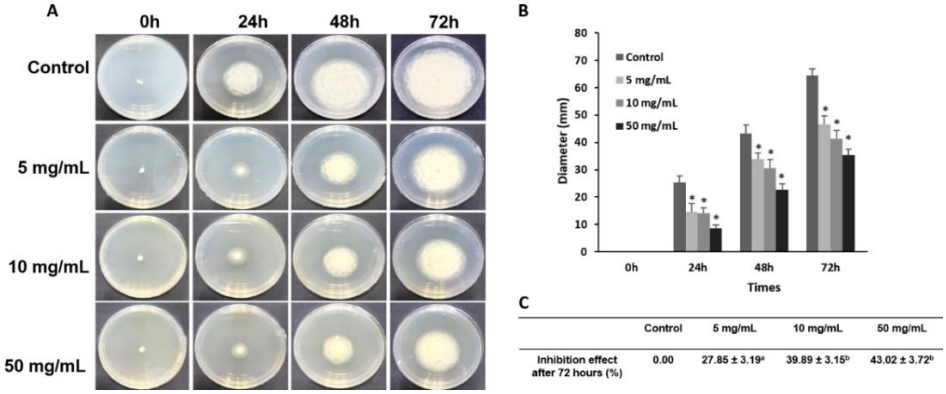


Figure 4. The effect of *P. divaricatum* leaf water extract on the growth of *P. capsici*

(A): Morphology of P. capsici after 72 hours of exposure to P. divaricatum leaf water extract. (B): growth diameter of P. capsici. (C): Inhibition effect of P. divaricatum leaf water extract.

The *P. divaricatum* leaf water extract exhibited a better inhibitory effect on the growth rate of *P. capsici* compared to the *P. nigrum* leaf water extract. Results showed that after 24 hours, there was a significant difference in the growth diameter of *P. capsici* across all concentrations: 5 mg/mL (14.67 ± 3.05 mm), 10 mg/mL (13.34 ± 2.30 mm), and 50 mg/mL (8.66 ± 1.15 mm), compared to the control group (25.34 ± 2.30 mm) and the *P. nigrum* group (Figure 4.A). After 72 hours, *P. divaricatum* leaf water extract exhibited strong resistance to *P. capsici* with growth diameters at 5 mg/mL (46.67 ± 3.05 mm), 10 mg/mL (41.34 ± 3.05 mm), and 50 mg/mL (35.34 ± 2.31 mm), which decreased by 0.27, 0.36, and 0.45 times compared to the control group (64.67 ± 2.30 mm) (Figure 4.B). The inhibition efficiency of *P. divaricatum* leaf water extract after 72 hours at concentrations of 5 mg/mL, 10 mg/mL, and 50 mg/mL was 27.85 ± 3.19%, 39.89 ± 3.15%, and 43.02 ± 3.72%, respectively, higher than *P. nigrum* group (Figure 4.C). According to Truong và đồng tác giả (2023), studies on black pepper varieties resistant to quick wilt (*P. capsici*) and slow decline (*Meloidogyne incognita*) pathogens identified two samples, *P. hancei* (HUIB_PH30) and *P. divaricatum* (HUIB_PD36), with high resistance to all biological stresses (Truong *et al*., 2023). In addition, studies on the ability of *P. divaricatum* to resist plant diseases also show that eugenol and its derivatives are the main components in the plant and have strong resistance activity against pathogens on pepper plants. When seedlings of *P. divaricatum* were introduced into a nursery containing black pepper infected with *Fusarium solani f. sp*. piperis, they exhibited complete and indefinite resistance to the fungus, demonstrating the potential

inhibitory effects of methyl eugenol and eugenol present in P. divaricatum (Da Silva *et al*., 2014). Chen *et al*. (2022) studied 26 derivatives of eugenol as agents against *P. capsici*. Results showed that among all compounds, especially derivatives 3a, 3f, and 3n, exhibited the strongest oomycete inhibitory activity against *P. capsici* with EC_{50} values of 79.05, 75.05, and 70.80, respectively (Chen *et al*., 2022). These findings underscore the potential application of *P. divaricatum* extract in preventing plant pathogens.

Inhibitory effect of *P. nigrum* and *P. divaricatum* leaf water extracts

The inhibitory effect on the growth of *P. capsici* by two extracts, *P. nigrum* and *P. divaricatum*, after 3 days of cultivation, was also compared (Figure 5). It can be observed that both *P. nigrum* and *P. divaricatum* leaf water extracts have an impact on the growth of *P. capsici* on PDA medium, with the best results observed at a concentration of 50 mg/mL. *P. divaricatum* leaf water extract showed better inhibitory effectiveness compared to *P. nigrum* leaf water extract. After 72 hours, there was no significant difference in *P. nigrum* leaf water extract between concentrations of 10 µg/mL (21.99 ± 6.60%) and 50 mg/mL (22.18 ± 3.82%). In contrast, *P. divaricatum* leaf water extract showed a significant difference at all three concentrations: 5 µg/mL (27.85 ± 3.19%), 10 µg/mL (39.89 ± 3.15%), and 50 mg/mL (43.02 ± 3.73%), which were 2.9 times, 1.8 times, and 1.9 times higher, respectively, compared to *P. nigrum* leaf water extract at the same concentrations. The difference in the impact of *P. nigrum* and *P. divaricatum* leaf water extracts on *P. capsici* could be attributed to differences in their chemical compositions. GC-MS analysis of *P. divaricatum* leaf water extract revealed eugenol (43.64%) and methyl eugenol (52.24%) as major components. Studies have consistently shown the strong antibacterial potential of these compounds. Similarly, *P. divaricatum* leaf water extract containing eugenol and methyl eugenol demonstrates potential in inhibiting plant pathogens (Oliveira *et al*., 2022; Nascimento *et al*., 2018; Chen *et al*., 2022). Conversely, although studies have indicated the potential antibacterial and antifungal properties of spathulenol in *P. nigrum* (Nascimento *et al*., 2018), GC-MS analysis showed relatively low levels (4.49%), while isospathulenol, despite its high proportion (53.64%), has limited research on its ability to inhibit plant pathogens.

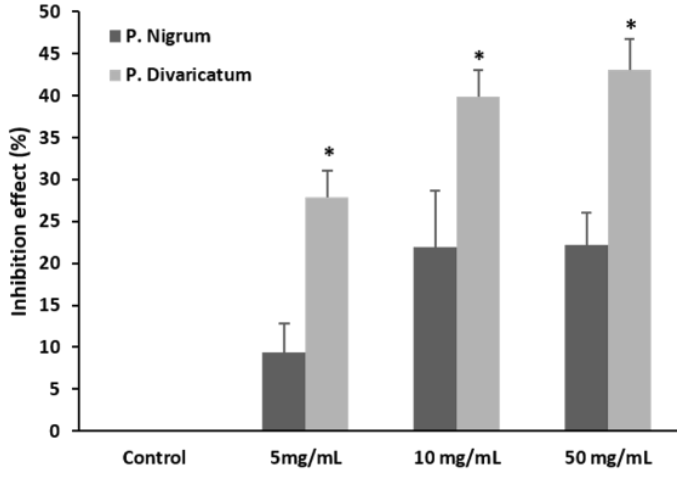


Figure 5. Inhibitory effect of *P. nigrum* and *P. divaricatum* extracts on the growth of *P. capsici*

CONCLUSIONS

This study has demonstrated that leaf water extracts from *P. nigrum* and *P. divaricatum* can affect the growth of *P. capsici*. Specifically, *P. divaricatum* leaf water extract, with chemical components such as eugenol and methyl eugenol, showed a more effective inhibition potential against *P. capsici* compared to *P. nigrum* leaf water extract. These results suggest the potential development of disease control methods against *P. capsici* using naturally sourced compounds, meeting the demand for environmentally friendly disease-resistant compounds in agricultural production.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was carried out with the support of The Ministry of Science and Technology of Vietnam (Grant no. ĐTĐL.CN08/20). The authors also acknowledge the partial support of Hue University under the Core Research Programme (grant no. NCTB.DHH.2024.03).

REFERENCES

Al-Hetar, M. Y., Zainal Abidin, M. A., Sariah, M., & Wong, M. Y. (2011). Antifungal activity of chitosan against Fusarium oxysporum f. sp. cubense. *Journal of applied polymer science*, *120*(4), 2434-2439.

Altos, L. A., Monteros-Altamirano, Á., Reis, A., & Garcés-Fiallos, F. R. (2022). Phytophthora capsici: the diseases it causes and management strategies to produce healthier vegetable crops. *Horticultura Brasileira*, *40*(1), 5-17.

Bratati, S., Adarsha, R., & Sudipta, R. (2022). Exploration of antibacterial and antioxidant potential of a few members of the family Piperaceae, Res. *J. Biotech*, *17*(8), 59-69.

Cadena, M. B., Preston, G. M., Van der Hoorn, R. A., Townley, H. E., & Thompson, I. P. (2018). Species-specific antimicrobial activity of essential oils and enhancement by encapsulation in mesoporous silica nanoparticles. *Industrial Crops and Products*, *122*, 582-590.

Chen, G., Zhu, L., He, J., Zhang, S., Li, Y., Guo, X., ... & Che, Z. (2022). Combinatorial synthesis of novel 1-sulfonyloxy/acyloxyeugenol derivatives as fungicidal agents. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, *25*(9), 1545-1551.

Da Silva, J. K. R., Silva, J. R. A., Nascimento, S. B., Da Luz, S. F., Meireles, E. N., Alves, C. N., ... & Maia, J. G. S. (2014). Antifungal activity and computational study of constituents from Piper divaricatum essential oil against Fusarium infection in black pepper. *Molecules*, *19*(11), 17926-17942.

Gandariasbeitia, M., Ojinaga, M., Orbegozo, E., Barredo, A. O., Zofío, M. N., Azcue, S. M., & Larregla, S. (2019). Winter biodisinfestation with Brassica green manure is a promising management strategy for Phytophthora capsici control of protected pepper crops in humid temperate climate regions of northern Spain. *Spanish journal of agricultural research*, *17*(1), 22.

Nascimento, K. F., Moreira, F. M. F., Santos, J. A., Kassuya, C. A. L., Croda, J. H. R., Cardoso, C. A. L., ... & Formagio, A. S. N. (2018). Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of Psidium guineense Sw. and spathulenol. *Journal of ethnopharmacology*, *210*, 351-358.

Nasiou, E., & Giannakou, I. O. (2020). The potential of eugenol as a nematicidal agent against (Treub) Chitwood. *Journal of Nematology*, *52*(1), 1-10.

Oliveira, J. S. D., Ramos, N. P., Júnior, J. L., Xavier, L. P., Andrade, E. H., Mello, A. H., ... & Da Silva, J. K. R. (2022). Secondary metabolism and plant growth of Piper divaricatum (Piperaceae) inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus supplementation. *Agronomy*, *12*(3), 596.

Sharma, A., Kumar, V., Shahzad, B., Tanveer, M., Sidhu, G. P. S., Handa, N., ... & Thukral, A. K. (2019). Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, *1*, 1-16.

Song, W., Yin, Z., Lu, X., Shen, D., & Dou, D. (2023). Plant secondary metabolite citral interferes with Phytophthora capsici virulence by manipulating the expression of effector genes. *Molecular Plant Pathology*, *24*(8), 932-946.

Truong, H. T. H., Rasphone, S., Nguyen, B. L. Q., Ho, H. N., Nguyen, C. Q., Tran, T. T., ... & Duong, T. T. (2023). Identification of Piper species that are resistant to Phytophthora capsici, Meloidogyne incognita, and waterlogging in Vietnam. *Plant Pathology*, *72*(9), 1615-1625.

Wan, J. S. H., & Liew, E. C. (2020). Efficacy of chemical and biological agents against pepper blight (Phytophthora capsici Leonion) in East Asia: a meta-analysis of laboratory and field trial data. *Journal of Plant Pathology*, *102*(3), 835-842.

Yin, F., Liu, Q., Zhang, B., Zhang, X., He, J., Xie, J., ... & Sun, R. (2021). Microemulsion preparation of Waltheria indica extracts and preliminary antifungal mechanism exploration. *Industrial Crops and Products*, *172*, 114000.

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ CỦA DỊCH CHIẾT NƯỚC LÁ *PIPER NIGRUM* VÀ *PIPER DIVARICATUM* LÊN *PHYTOPHTHORA CAPSICI* TRONG ĐIỀU KIỆN *IN-VITRO*

Lê Hoàng Duy Minh, Nguyễn Tiến Long, Trương Thị Hồng Hải*

Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

SUMMARY

Phytophthora capsici là một tác nhân gây bệnh nổi tiếng trên nhiều loại cây trồng có giá trị về mặt kinh tế dẫn đến ảnh hưởng nghiêm trọng cho ngành nông nghiệp trên toàn thế giới. Nhiều loài thực vật có khả năng tổng hợp nên các loại hợp chất có vai trò như một biện pháp bảo vệ trước các cuộc tấn công của tác nhân gây bệnh, cho thấy tiềm năng ứng dụng phòng ngừa tác nhân gây hại trên cây trồng. Trong nghiên cứu hiện tại, chúng tôi tiến hành phân tích thành phần hóa học và đánh giá khả năng ảnh hưởng của dịch chiết nước lá *P. nigrum* và *P. divaricatum* lên mức độ sinh trưởng của *P. capsici*. Phân tích GC-MS cho thấy dẫn suất của Spathulenol (53.64%) chiếm thành phần chủ yếu trong dịch chiết nước lá *P. nigrum* còn eugenol (43.63%) và methyl eugenol (52.24%) chiếm thành phần chủ yếu trong dịch chiết nước lá *P. divaricatum*. Đánh giá khả năng ức chế sinh trưởng của *P. capsici* ở các nồng độ khác nhau (5 mg/mL, 10 mg/mL, 50 mg/mL) trong 72 giờ, kết quả cho thấy dịch chiết nước lá *P. divaricatum* (43.02 ± 3.72%) có hiệu quả ức chế tốt hơn so với dịch chiết nước lá *P. nigrum* (22.18 ± 3.82%). Nghiên cứu này mở ra triển vọng cho việc ứng dụng các hoạt chất kháng *P. capsici* có nguồn gốc tự nhiên trong sản xuất nông nghiệp.

Từ khóa: Dịch chiết, GC-MS, *in-vitro*, *Phytophthora capsici, Piper nigrum, Piper divaricatum*.

* Author for correspondence: Tel: +84-961423419; Email: tthhai@hueuni.edu.vn

NGHIÊN CỨU ĐẶC TÍNH KHÁNG NẤM GÂY BỆNH THỰC VẬT CỦA CHỦNG XẠ KHUẨN NỘI SINH *Streptomyces xylanilyticus* MC5

Quách Ngọc Tùng[1], Nguyễn Trần Khánh Chi[1], Lê Hoàng Nguyệt Minh[1], Phạm Thuỳ Dương[2], Vũ Thị Hạnh Nguyên[1], Phí Quyết Tiến[1*]

[1]*Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

[2]*Trường Đại học Phương Đông*

TÓM TẮT

Kiểm soát sinh học nấm gây bệnh hại cây trồng sử dụng xạ khuẩn đối kháng hiện đang nhận được sự quan tâm của các nhà khoa học trên thế giới. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá đặc tính kháng nấm *Magnaporthe oryzae* PO gây bệnh đạo ôn trên cây lúa và *Phytophthora* sp. NL gây thối rễ trên cây sâm Ngọc Linh của chủng xạ khuẩn nội sinh MC5. Sử dụng phương pháp đồng nuôi cấy, chủng MC5 lần lượt thể hiện khả năng đối kháng mạnh với *M. oryzae* PO và *Phytophthora* sp. NL với tỷ lệ ức chế đạt 71,11 ± 1,11% và 77,41 ± 0,64%, tương ứng. Chủng MC5 có hệ khuẩn ty khí sinh màu trắng, không sinh sắc tố tan và có khả năng đồng hoá các nguồn cacbon khác nhau như glucose, fructose, sucrose, mannitol, galactose, maltose và inositol. Phân tích hình thái, đặc điểm sinh hóa và kết hợp với cây phát sinh loài dựa trên trình tự 16S rRNA đã định danh chủng nghiên cứu là *Streptomyces xylanilyticus* MC5. Hơn nữa, cao chiết etyl axetat của chủng MC5 ức chế mạnh sự phát triển của sợi nấm *M. oryzae* PO (72,8±0,4 %) và *Phytophthora* sp. NL (75,5±0,3 %) ở nồng độ 180 µg/mL sau 7 ngày nuôi cấy. Thử nghiệm khả năng ức chế sự nảy mầm bào tử cho thấy, 7 µg/mL cao chiết MC5 ức chế sự nảy nấm của bào tử *M. oryzae* PO và *Phytophthora* sp. NL tới 85,1±3,7 % và 88,3 ± 5,6 %, tương ứng. Chính vì vậy, *S. xylanilyticus* MC5 là chủng tiềm năng giúp phòng trừ bệnh trên cây lúa và sâm Ngọc Linh đạt hiệu quả cao.

Từ khóa: Đạo ôn, kháng nấm, *Streptomyces xylanilyticus,* thối rễ, xạ khuẩn nội sinh.

MỞ ĐẦU

Việt Nam có lợi thế cạnh tranh về phát triển nông nghiệp nhiệt đới với điều kiện sinh thái đa dạng, số giờ nắng nhiều, nguồn nước dồi dào và nông dân có kỹ năng, cần cù chịu khó. Tuy nhiên, trong quá trình phát triển nông nghiệp có rất nhiều tác nhân gây hại ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng nông sản. Đặc biệt, nấm bệnh là một trong những nhóm tác nhân quan trọng nhất, một số loại nấm gây bệnh phổ biến trên cây công nghiệp có thể kể ra như nấm gây thối rễ, thán thư, đốm lá, cháy lá. Trong số này, bệnh đạo ôn do nấm *Magnaporthe oryzae* gây ra gây thiệt hại lớn về sản lượng và chất lượng lúa gạo trên toàn thế giới. Khi bệnh đạo ôn bùng phát, năng suất lúa giảm 10–30%, thậm chí giảm 40–50% khi bệnh nặng (Tan, Zhao, Li, Gong & Li, 2023). Tương tự như nhiều mầm bệnh thực vật khác, *M. oryzae* không chỉ lây nhiễm trên cây lúa mà còn lây nhiễm sang các cây trồng khác như lúa mạch, lúa mì, lúa miến, ngô và kê. Bên cạnh đó, nấm *Phytophthora* spp. đã gây rất nhiều bệnh trên nhiều loại cây trồng khác nhau như thối thân và trái đu đủ, thối rễ và tàn lụi trên cam quýt, thối chồi trên bơ, sọc đen trên cao su, thối rễ, loét thân sầu riêng,…(Joo, 2005). Gần đây, chủng nấm này còn được ghi nhận là tác nhân gây thối củ, rễ, lở cổ rễ trên cây sâm Ngọc Linh. Biện pháp chủ yếu để diệt nấm bệnh hiện nay là dùng thuốc diệt nấm có nguồn gốc hóa học nhưng chưa có hiệu quả triệt để và dẫn đến nhiều hệ quả như dư lượng thuốc diệt nấm còn lại trên sản phẩm nông sản, ô nhiễm môi trường, rủi ro về hiện tượng kháng kháng sinh. Do đó, cần áp dụng các biện pháp sinh học để có thể khống chế được nguồn bệnh này mà vẫn đảm bảo năng suất cây trồng, không gây hại đến sức khỏe con người và động vật.

Hiện nay, xạ khuẩn *Streptomyces* là nhóm có nhiều tiềm năng nhất trong biện pháp sinh học sử dụng. *Streptomyces* spp. phân bố phổ biến trong nhiều loại môi trường khác nhau như đất, nước, núi lửa, ngập mặn (Quach *et al.*, 2023). Trong quá trình sống xạ khuẩn tiết ra nhiều chất có hoạt tính sinh học cao có khả năng kháng lại các loài vi sinh vật khác nhau bao gồm cả nấm và vi khuẩn. Trong số 23.000 hợp chất có hoạt tính sinh học được sản xuất từ vi sinh vật, hơn 10.000 hợp chất được phân lập từ xạ khuẩn (Zou *et al.*, 2021). Trong khoảng hơn 8.000 chất kháng sinh được biết trên thế giới hiện nay thì có hơn 80 % trong số đó có nguồn gốc từ xạ khuẩn *Streptomyces*. Các hợp chất kháng nấm đóng vai trò quan trọng trong việc bảo vệ thực vật khỏi sự tấn công của các tác nhân gây bệnh. Bệnh khô vằn ở lúa được điều trị đặc hiệu bởi validamycin A từ *Streptomyces hygroscopicus.* Xạ khuẩn nội sinh trên thực vật được định nghĩa là nhóm vi sinh vật cư trú bên trong các mô tế bào thực vật mà không cạnh tranh dinh dưỡng hay gây hại tới cây chủ (Kandel, Joubert & Doty, 2017). Gần đây, nghiên cứu tạo chế phẩm hay phân bón sinh học ức chế nấm bệnh với thành phần là xạ khuẩn nội sinh đang bắt đầu được quan tâm. *Streptomyces griseofuscus* và *Streptomyces hygroscopicus* được phân lập từ lúa thể hiện hoạt tính đối kháng với *M. oryzae* với tỉ lệ ức chế lần lượt là 54,5% và 21,8% (Tian *et al*., 2004b). Ở nghiên cứu trước, chúng tôi đã

chứng minh xạ khuẩn *Streptomyces albus* RC2 nội sinh trên cây lúa ức chế mạnh nấm gây bệnh *Lasiodiplodia theobromae, Fusarium fujikuroi* và *Scopulariopsis gossypii* nhờ khả năng sinh một loạt các chất kháng nấm (Quach *et al.,* 2023). Trong bài báo này, chúng tôi tập trung đánh giá tiềm năng kháng nấm *M. oryzae* PO gây bệnh đạo ôn trên cây lúa và *Phytophthora* sp. NL gây thối rễ trên cây sâm Ngọc Linh của xạ khuẩn nội sinh MC5.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng giống

Chủng xạ khuẩn MC5 nội sinh trên cây mắm được lưu giữ và cung cấp bởi Trung tâm giống và Bảo tồn nguồn gen Vi sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chủng nấm *M. oryzae* PO gây bệnh đạo ôn trên cây lúa và *Phytophthora* sp. NL gây thối rễ trên cây sâm Ngọc Linh được cung cấp bởi Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học và Công ty cổ phần đầu tư Panax Việt Nam.

Phương pháp nghiên cứu

Khảo sát khả năng đối kháng của chủng xạ khuẩn MC5

Hoạt tính kháng nấm của chủng xạ khuẩn MC5 được đánh giá bằng phương pháp đồng nuôi cấy trên đĩa thạch dextrose khoai tây (PDA) (Zou *et al.*, 2021). Chủng xạ khuẩn MC5 được cấy đối xứng cách tâm đĩa PDA khoảng 2 cm của đĩa PDA và một cục thạch nấm bệnh với đường kính 5 mm được đặt ở tâm đĩa thạch PDA. Đĩa không cấy xạ khuẩn MC5 được sử dụng làm đối chứng. Sau 5 - 7 ngày nuôi cấy ở 28 ^{o}C, tỉ lệ phần trăm ức chế sự phát triển của nấm bệnh (GI) tính theo công thức: GI = [(R - R1)/R] × 100 %. Trong đó: R và R1 là đường kính phát triển sợi nấm trong đĩa đối chứng và đĩa thí nghiệm đã cấy xạ khuẩn MC5.

Định danh chủng xạ khuẩn MC5

Dựa vào đặc điểm hình thái: Khuẩn ty khí sinh, khuẩn ty cơ chất và sắc tố của chủng xạ khuẩn MC5 được đánh giá theo mô tả của Khoá phân loại ISP (Shirling & Gottlieb, 1966).

Sinh học phân tử: Chủng MC5 được nuôi cấy trên môi trường ISP9 lỏng qua đêm ở 28 ºC trên máy lắc với tốc độ 180 vòng/phút. DNA tổng số của chủng MC5 được tách chiết bằng G-spin™ Total DNA Extraction Mini Kit (Intron Bio, Korea) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trình tự gen 16S rRNA được khuếch đại bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi 27F (5'-TAACACATGCAAGTCGAACG-3') và 1429R (5'-GGTGTGACGGGCGGTGTGTA-3') theo như mô tả trước đây (Quach *et al*., 2022). Kết quả giải trình tự gen hai chiều được kiểm tra bằng phần mềm BioEdit 7.2 và so sánh với các gen tham chiếu trên ngân hàng cơ sở dữ liệu GenBank (NCBI) bằng công cụ BLAST. Cây phân loại được xây dựng dựa trên mức độ tương đồng của trình tự nucleotide giữa các loài được tính toán thống kê bằng phần mềm MEGA 11.0.

Dựa vào đặc điểm hóa sinh: Đánh giá khả năng đồng hoá nguồn cacbon và nitơ của xạ khuẩn được thực hiện trên môi trường ISP9 có bổ sung 1,0 % (w/v) các nguồn đường như glucose, fructose, sucrose, mannitol, galactose, maltose và inositol và rhamnose. Khả năng sinh enzym ngoại bào của chủng MC5 được đánh giá trên môi trường ISP9 có bổ sung 1 % (w/v) các nguồncơ chất như chitin, CMC và sữa gầy.

Tách chiết chất kháng nấm từ chủng MC5

Phương pháp tách chiết chất kháng nấm từ chủng xạ khuẩn MC5 được tiến hành theo quy trình được mô tả trước đây của Quach và đồng tác giả (2022): Chủng MC5 được nuôi cấy trong môi trường lỏng PDB ở 28 ^{o}C với tốc độ lắc 180 vòng/phút trong 7 ngày. Dịch nuôi cấy được ly tâm ở tốc độ 8000 vòng/phút trong 10 phút để thu dịch trong và sau đó chiết bằng etyl axetat theo tỉ lệ 1:3 (v/v). Phần dung môi chứa chất trao đổi thứ cấp được cô quay ở 45 ºC, làm khô đến khối lượng không đổi và cân. Cao chiết thô thu nhận được bảo quản ở 4 ºC cho các thí nghiệm tiếp theo.

Đánh giá tác động của cao chiết thô MC5 tới sự phát triển sợi nấm gây bệnh

Ảnh hưởng của cao chiết thô đối với sự phát triển của sợi nấm *M. oryzae* PO gây bệnh đạo ôn trên cây lúa và *Phytophthora* sp. NL gây thối rễ trên cây sâm Ngọc Linh được đánh giá theo phương pháp trước đây (Wei *et al.*, 2020). Cao chiết thô MC5 được pha loãng bằng 5 % (v/v) dimethylsulfoxide (DMSO) và được bổ sung vào môi trường thạch PDA tới nồng độ cuối là 45, 90 và 180 µg/mL. Cục thạch nấm với đường kính 5 mm được đặt ở giữa đĩa PDA chứa cao chiết thô MC5 và đĩa bổ sung 5 % (v/v) DMSO được sử dụng làm đối chứng. Các đĩa được ủ ở 28 ºC và thí nghiệm được dừng khi nấm bệnh mọc bao phủ toàn đĩa đối chứng. Đường kính của sợi nấm ở đĩa đối chứng và đĩa thí nghiệm được ghi nhận và tỉ lệ phần trăm ức chế sự phát triển của nấm được tính toán theo công thức ở trên.

Đánh giá tác động của cao chiết thô MC5 đến sự nảy nấm của bào tử nấm

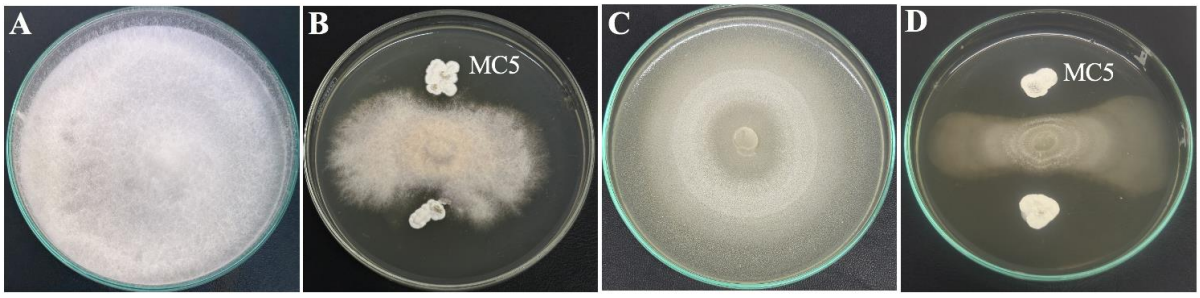
Khảo sát ảnh hưởng của cao chiết thô đến sự nảy mầm của bào tử nấm được thực hiện theo mô tả bởi Zou và đồng tác giả (2021). Chủng nấm *M. oryzae* PO và *Phytophthora* sp. NL được nuôi cấy trên môi trường thạch PDA ở 28 ºC. Sau 9 ngày nuôi cấy, bào tử được thu và hòa vào nước cất khử trùng. Mật độ bào tử được xác

định bằng buồng đếm và được điều chỉnh đến nồng độ cuối cùng là 10^5 CFU/mL. Cao chiết thô ở nồng độ 7 µg/mL được bổ sung vào môi trường lỏng PDB chứa bào tử nấm và ủ ở 28 ºC trong 72 giờ. Môi trường lỏng PDB không bổ sung cao chiết thô được sử dụng làm đối chứng. Sự nảy mầm của 100 bào tử nấm ở buồng đếm được quan sát bằng kính hiển vi quang học (Carson, Mỹ) ở thời điểm sau 72 giờ (Zou *et al.*, 2021).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đánh giá đặc tính kháng nấm của chủng xạ khuẩn MC5

Xạ khuẩn với khả năng sinh các hợp chất trao đổi thứ cấp được đánh gía là có nhiều tiềm năng để sử dụng làm tác nhân kiểm soát sinh học trong trồng trọt. Ngoài ra, nhiều hợp chất kháng nấm thương mại đã được tách chiết từ xạ khuẩn. Trong nghiên cứu này, đặc tính kháng nấm của chủng xạ khuẩn nội sinh MC5 được đánh giá bằng phương pháp đối kháng trực tiếp.

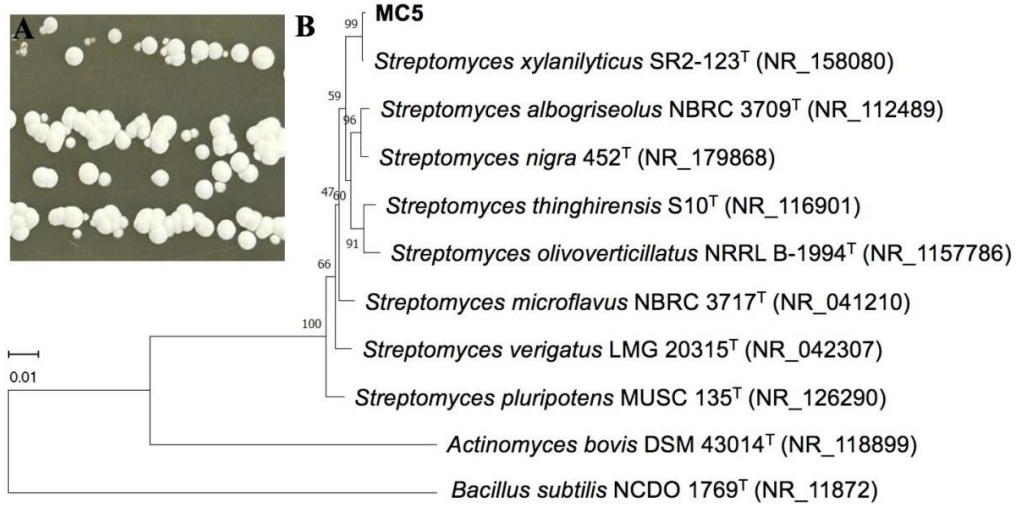


Hình 1. Hoạt tính kháng nấm *M. oryzae* PO (A,B) và *Phytophthora* sp. NL (C,D) của chủng xạ khuẩn nội sinh MC5

Kết quả Hình 1 cho thấy, chủng MC5 có khả năng ức chế nấm *M. oryzae* PO và *Phytophthora* sp. NL gây bệnh. Tỉ lệ phần trăm ức chế nấm bệnh cao nhất của chủng MC5 được ghi nhận với chủng nấm *M. oryzae* PO (71,11 ± 1,11%), tiếp theo là *Phytophthora* sp. NL (77,41 ± 0,64%). Đặc biệt, chủng xạ khuẩn MC5 duy trì hoạt tính kháng *M. oryzae* PO và *Phytophthora* sp. NL đến 20 ngày nuôi cấy. Khác biệt với kết quả trên, *M. oryzae* bị ức chế bởi *Streptomyces griseofuscus* và *Streptomyces hygroscopeus* nội sinh trên cây lúa với tỷ lệ ức chế đạt 54,5% và 21,8%, tương ứng (Tian *et al.*, 2004a). *Streptomyces halstedii* AJ-7có khả năng đối kháng với nấm *Phytophthora capsici* gây bệnh thối rễ trên ớt với hiệu quả giảm bệnh lên đến 78,9% (Joo, 2005). Do vậy, đặc tính kháng nấm của chủng xạ khuẩn MC5 là khá tiềm năng.

Định danh chủng xạ khuẩn MC5

Kết quả sau 4 ngày nuôi cấy trên các môi trường ISP cho thấy chủng MC5 sinh trưởng tốt trên các môi trường ISP1-7 nghiên cứu. Khuẩn ty khí sinh chủ yếu thuộc nhóm màu trắng (Hình 2A). Khác với khuẩn ty khí sinh, khuẩn ty cơ chất có dải màu từ trắng đến vàng nhạt trên các môi trường ISP1-7. Sắc tố tan hay melanin không được ghi nhận trên các môi trường nghiên cứu. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc khẳng định chủng xạ khuẩn MC5 thuộc chi *Streptomyces.*



Hình 2. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc (A) và cây phát sinh loài (B) biểu diễn mối quan hệ giữa chủng MC5 với các chủng có quan hệ gần dựa trên phân tích trình tự gen 16S rRNA

Để phân loại đến loài, chủng MC5 được được giải trình tự gen 16S rRNA bằng phản ứng PCR với cặp mồi 1492R và 27F. Kết quả phân tích trình tự 16S rRNA và so sánh với trình tự gen đã công bố trên GenBank bằng công cụ BLAST (NCBI) cho thấy: chủng MC5 có trình tự tương đồng cao nhất với trình tự gen của chủng tham chiếu chuẩn *Streptomyces xylanilyticus* SR2-123^T (99,53 %). Cây phát sinh loài khẳng định chủng MC5 tạo thành nhóm riêng biệt với các chủng thuộc loài *S. xylanilyticus* với giá trị bootstrap đạt 99 % (Hình 2B).

Về đặc điểm sinh hoá, chủng MC5 có khả năng đồng hoá các nguồn cacbon khác nhau như glucose, fructose, sucrose, mannitol, galactose, maltose và inositol. Nguồn cacbon không thể sử dụng là rhamnose (Bảng 1). Bên cạnh đó, chủng MC5 có thể sinh các enzym ngoại bào quan trọng như: chitinase, CMCase và protease, đây là điều kiện thuận lợi cho lựa chọn thành phần môi trường lên men rẻ tiền khi sản xuất ở quy mô công nghiệp. Đối chiếu với phương pháp phân loại truyền thống của ISP, chủng MC5 có đặc điểm tương đồng với *S. xylanilyticus* được công bố trước đây. Dựa vào kết quả nghiên cứu về đặc điểm sinh học và phân tích trình tự gen 16S rRNA, chủng xạ khuẩn nghiên cứu được định danh là *S. xylanilyticus* MC5.

Bảng 1. Đặc điểm sinh hoá của chủng xạ khuẩn MC5

Đặc điểm sinh hoá	Kết quả
Glucose	+
Fructose	+
Sucrose	+
Rhamnose	-
Mannitol	+
Galactose	+
Maltose	+
Inositol	+
Sinh enzym ngoại bào	
Chitinase	+
CMCase	+
Protease	+

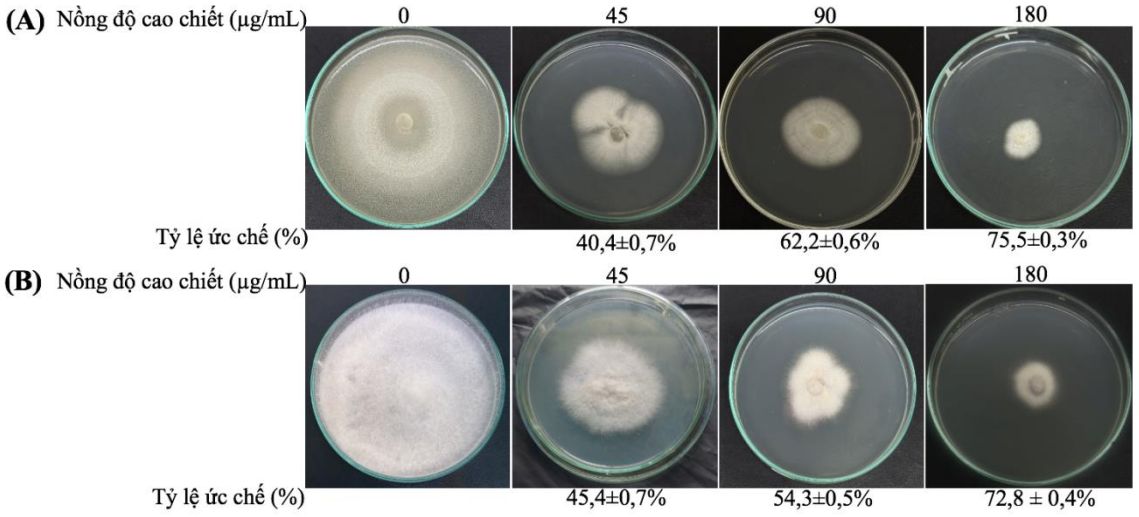
Ghi chú: (+) dương tính; (-) âm tính

Streptomyces xylanilyticus SR2-123^T là chủng xạ khuẩn mới được công bố vào năm 2017 (Moonmangmee *et al.*, 2017). Chủng xạ khuẩn này được phân lập từ mẫu đất thu thập từ Trạm nghiên cứu môi trường Sakaerat, Viện nghiên cứu khoa học và công nghệ Thái Lan, tỉnh Nakhon Ratchasima, Thái Lan. Tổng quan nghiên cứu cho thấy hiện chưa có nghiên nào nghiên cứu khả năng ức chế nấm của *S. xylanilyticus.*

Đánh giá hoạt tính ức chế nấm từ cao chiết thô của chủng MC5

Để đánh giá rõ hơn đặc tính kháng nấm của chủng MC5, dịch nuôi cấy chủng MC5 được tách chiết bằng dung môi etyl axetat nhằm thu cao chiết thô và sau đó bổ sung vào môi trường thạch PDA để thử nghiệm khả năng ức chế nấm *M. oryzae* PO và *Phytophthora* sp. NL. Kết quả Hình 3 cho thấy hoạt tính kháng 2 loại nấm bệnh tuyến tính với nồng độ cao chiết thô MC5 sử dụng. Tại nồng độ 45 µg/mL, tỉ lệ ức chế nấm bệnh *Phytophthora* sp. NL đạt 40,4 ± 0,7 % (Hình 3A). Sử dụng 90 µg/mL cao chiết ức chế nấm bệnh tới 62,2±0,6 % sau 7 ngày nuôi cấy. Tại nồng độ 180 µg/mL, sợi nấm *Phytophthora* sp. NL bị ức chế tới 75,5±0,3 %. Đối với mỗi đối chứng, nấm bệnh *Phytophthora* sp. NL phát triển mạnh trên môi trường PDA không bổ sung cao chiết thô sau 7 ngày nuôi cấy.

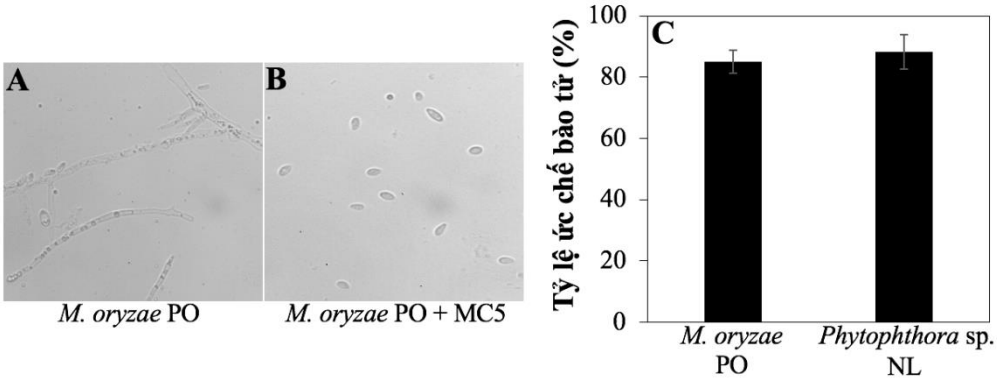
Đối với nấm *M. oryzae* PO gây bệnh đạo ôn, 45 µg/mL cao chiết thô MC5 ức chế sợi nấm tới 45,4±0,7 % sau 7 ngày nuôi cấy. Tại nồng độ 180 µg/mL, tỷ lệ ức chế được ghi nhận là 72,8±0,4 %, thấp hơn so với nấm *Phytophthora* sp. NL (Hình 3B). *Streptomyces* sp. UPMRS4 được chứng minh thể hiện hoạt tính kháng nấm *M. oryzae* lên tới 88,73%, trong khi đó chủng *Streptomyces* sp. H3-2 ở nồng độ 200 µg/mL ức chế mạnh nấm *F. oxyspoum* f. sp. *cubense* (Zou *et al.*, 2021). Do vậy, *S. xylanilyticus* AM5 có nhiều tiềm năng sử dụng làm tác nhân kiểm soát sinh học không chỉ nấm *M. oryzae và Phytophthora* spp. mà còn với các nấm bệnh trên thực vật khác.



Hình 3. Ảnh hưởng của dải nồng độ cao chiết thô từ chủng xạ khuẩn MC5 tới sự phát triển hệ sợi của chủng nấm *Phytophthora* sp. NL (A) và *M. oryzae* PO (B)

Đánh giá ảnh hưởng của cao chiết thô MC5 tới sự nảy mầm của bào tử nấm

Thử nghiệm đánh giá khả năng ức chế sự nảy mầm của bào tử *M. oryzae* PO cho thấy, 7 µg/mL cao chiết MC5 ức chế sự nảy mầm của bào tử *M. oryzae* PO lên tới 85,1±3,7 % (Hình 4A,B). Với mẫu đối chứng, tỉ lệ nảy mầm của *M. oryzae* PO được ghi nhận đạt 93,5 ± 2,1 %. Tương đồng với nghiên cứu này, tỷ lệ nảy mầm bào tử của *Phytophthora* sp. NL bị ức chế tới 88,3 ± 5,6 %. Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã chứng minh rằng cơ chế ức chế sự nảy mầm của bào tử nấm là do chất kháng nấm phá huỷ màng tế bào, làm thành tế bào dày hơn, gia tăng liposome, hạt điện tử và cuối cùng dẫn tới sự phá huỷ của tế bào nấm. Mặc dù đã có nhiều nghiên cứu chứng minh khả năng ức chế sự nảy mầm của bào tử *M. oryzae* PO bởi xạ khuẩn, tuy nhiên chưa có nhiều nghiên cứu thực nghiệm trên tế bào *Phytophthora* sp. NL. Nghiên cứu tinh sạch và xác định cấu trúc các chất kháng nấm cần được tiến hành trong tương lai nhằm khẳng định tiềm năng kiểm soát sinh học và sinh tổng hợp các chất kháng nấm mới từ *S. xylanilyticus.*



Hình 4. Tác động của của cao chiết thô MC5 tới sự nảy mầm bào tử của chủng nấm *M. oryzae* PO được quan sát trên kính hiển vi quang học 40X (A) và tỷ lệ ức chế bào tử của 2 chủng nấm (B)

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chủng xạ khuẩn nội sinh MC5 được chứng minh có khả năng đối kháng trực tiếp mạnh với nấm *M. oryzae* PO và *Phytophthora* sp. NL trên đĩa thạch PDA tới 71,11 ± 1,11% và 77,41 ± 0,64%, tương ứng. Dựa trên đặc điểm hình thái, sinh hoá và phân tích trình tự gen 16S rRNA, chủng xạ khuẩn MC5 này được phân loại là *S. xylanilyticus* MC5. Trên môi trường thạch PDA bổ sung 180 µg/mL cao chiết thô chủng MC5, hệ sợi của *M. oryzae* PO bị ức chế tới 72,8±0,4 % sau 7 ngày nuôi cấy, trong khi đó cao chiết thô MC5 cũng ức chế mạnh bào tử *Phytophthora* sp. NL tới 75,5±0,3 %. Ngoài ra, bào tử nấm *M. oryzae* PO và *Phytophthora* sp. NL cũng bị ức chế mạnh bởi 7 µg/mL cao chiết MC5 trong môi trường PDB lỏng. Kết quả nghiên cứu cho thấy tiềm năng sử dụng *S. xylanilyticus* MC5 làm chế phẩm sinh học hoặc phân bón vi sinh trong phòng trừ và kiểm soát nấm bệnh trên cây lúa và sâm Ngọc Linh. Trong tương lai, cần có những nghiên cứu chuyên sâu để phân tích thành phần chất kháng nấm trong điều kiện phòng thí nghiệm và tương tác với cây chủ trong điều kiện nhà lưới.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Joo G-J (2005). Production of an anti-fungal substance for biological control of *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight in red-peppers by *Streptomyces halstedii*. Biotechnol Lett 27**:** 201-205.

Kandel SL, Joubert PM, & Doty SL (2017). Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. Microorganisms 5**:** 77 - 89.

Moonmangmee D, Kanchanasin P, Phongsopitanun W, Tanasupawat S, & Moonmangmee S (2017). *Streptomyces xylanilyticus* sp. nov., isolated from soil. Int J Syst Evol Microbiol 67**:** 4189-4194.

Quach NT, Vu THN, Nguyen TTA, Ha H, Ho PH, Chu-Ky S*, et al.* (2022). Structural and genetic insights into a poly-γ-glutamic acid with in vitro antioxidant activity of *Bacillus velezensis* VCN56. World Journal of Microbiology and Biotechnology 38**:** 173.

Quach NT, Vu THN, Nguyen TTA, Le PC, Do HG, Nguyen TD*, et al.* (2023). Metabolic and genomic analysis deciphering biocontrol potential of endophytic *Streptomyces albus* RC2 against crop pathogenic fungi. Braz J Microbiol 54**:** 2617-2626.

Shirling EB, & Gottlieb D (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 16**:** 313-340.

Tan J, Zhao H, Li J, Gong Y, & Li X (2023). The devastating rice blast airborne pathogen *Magnaporthe oryzae*-A review on genes studied with mutant analysis. Pathogens (Basel, Switzerland) 12.

Tian XL, Cao LX, Tan HM, Zeng QG, Jia YY, Han WQ*, et al.* (2004a). Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities in vitro. World J Microbiol Biotechnol 20**:** 303-309.

Tian XL, Cao LX, Tan HM, Zeng QG, Jia YY, Han WQ*, et al.* (2004b). Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 20**:** 303-309.

Wei Y, Zhao Y, Zhou D, Qi D, Li K, Tang W*, et al.* (2020). A newly isolated *Streptomyces* sp. YYS-7 with a broad-spectrum antifungal activity improves the banana plant resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4. Front Microbiol 11.

Zou N, Zhou D, Chen Y, Lin P, Chen Y, Wang W*, et al.* (2021). A novel antifungal actinomycete *Streptomyces* sp. strain H3-2 effectively controls banana *Fusarium* Wilt. Front Microbiol 12.

ANTAGONISTIC PROPERTY OF *Streptomyces xylanilyticus* MC5 AGAINST PLANT PHYTOPATHOGENIC FUNGI

Quach Ngoc Tung[1], Nguyen Tran Khanh Chi[1], Le Hoang Nguyet Minh[1], Pham Thuy Duong[2], Vu Thi Hanh Nguyen[1], Phi Quyet Tien[1*]

[1]*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

[2]*Phuong Dong University*

SUMMARY

Biological control of plant pathogens by antagonistic actinomycetes has been paid attention from scientists around the world. The present study is focused on evaluation antifungal potential of endophytic strain MC5 against rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* PO and *Phytophthora* sp. NL causing root rot of Ngoc Linh ginseng. Using the dual culture method, endophytic strain MC5 showed strong antagonistic ability against *M. oryzae* PO and *Phytophthora* sp. NL with the mycelium inhibition rates of 71.11 ± 1.11% and 77.41 ± 0.64%, respectively. Strain MC5 has white aerobic mycelium, does not produce soluble pigments and is capable of assimilating different carbon sources such as glucose, fructose, sucrose, mannitol, galactose, maltose and inositol. Strain MC5 has white aerial mycelium, no soluble pigment and ability to assimilate different carbon sources such as glucose, fructose, sucrose, mannitol, galactose, maltose, and inositol. Morphological analysis, biochemical characteristics, and phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence identified the strain as *Streptomyces xylanilyticus* MC5. Furthermore, the ethyl acetate extract of strain MC5 strongly inhibited the growth of *M. oryzae* PO (72.8±0.4 %) and *Phytophthora* sp. NL (75.5±0.3 %) at a concentration of 180 μg/mL after 7 days. Treatment with 7 μg/mL MC5 extract inhibited the growth of *M. oryzae* PO and *Phytophthora* sp. NL to 85.1±3.7 % and 88.3±5.6 %, respectively. Therefore, *S. xylanilyticus* MC5 holds potential to prevent diseases in rice and Ngoc Linh ginseng with high efficiency.

Keywords: Antifungal, endophytic actinomycetes, rice blast, root rot, *Streptomyces xylanilyticus*.

[*] Author for correspondence: Tel: +84-2437917973; Email: tienpq@ibt.ac.vn

ĐA HÌNH GEN CALPASTATIN (*CAST)* LIÊN QUAN ĐẾN ĐỘ MỀM THỊT Ở BÒ VÀNG NUÔI TẠI CÁC TỈNH MIỀN TRUNG VÀ TÂY NAM VIỆT NAM

Lê Nữ Anh Thư[1]*, Dương Thi Hương[1] , Nguyễn Bình Nguyên[1,2] , Nguyễn Bá Trung[3] , Lê Đình Phùng[1]

[1]*Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế*

[2]*Công ty cổ phần UV Việt Nam*

[3]*Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh*

TÓM TẮT

Độ mềm thịt là một trong những yếu tố quan trọng nhất để đánh giá chất lượng thịt và quyết định thị hiếu của người tiêu dùng. Những nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng đa hình nucleotide đơn g.97395177 C>G (rs27318422) trên gen *CAST* liên kết với độ mềm thịt và được đề nghị sử dụng như chỉ thị phân tử trong chọn giống. Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân tích tần suất kiểu gen và alen của *CAST* g.97395177 C>G ở quần thể bò Vàng tại miền Trung (Thừa Thiên Huế và Quảng Trị) và Tây Nam Bộ (An Giang) sử dụng phương pháp PCR-RFLP và giải trình tự. Kết quả chỉ ra rằng *CAST* g.97395177 C>G là đa hình trong quần thể bò Vàng được khảo sát, trong đó alen C được báo cáo trong nghiên cứu trước đây cho thịt mềm hơn có tần suất lần lượt ở bò Vàng nuôi tại Thừa Thiên Huế, Quảng Trị, và An Giang là 0,25 (25%); 0,5 (50%) và 0,28 (28%). Thêm vào đó, không có sự sai khác về sự phân bố kiểu gen của bò Vàng nuôi tại miền Trung và Tây Nam Bộ. Kết quả này đề nghị rằng bò Vàng Việt Nam có thể mang kiểu gen liên kết với độ mềm thịt và đây là báo cáo đầu tiên về đa hình gen *CAST* g.97395177 C>G ở bò *Bos indicus* nói chung và bò Vàng Việt Nam nói riêng.

Từ khóa: Bò Vàng, gen *CAST*, độ mềm thịt, PCR-RFLP, đa hình nucleotide đơn (SNPs).

ĐẶT VẤN ĐỀ

Độ mềm thịt là một trong những chỉ tiêu quan trọng để đánh giá chất lượng thịt và quyết định thị hiếu của người tiêu dùng (Robyn *et al.,* 2022). Độ mềm thịt bị ảnh hưởng bởi không chỉ yếu tố sản xuất như giống, kiểu gen, tuổi, chế độ nuôi dưỡng, hoặc khối lượng giết mổ, còn bị ảnh hưởng bởi các yếu tố kỹ thuật như điều kiện giết mổ, tuổi giết mổ và quy trình chế biến (Calvo *et al.,* 2014). Trong đó, yếu tố ảnh hưởng quan trọng nhất đến độ mềm thịt sau giết mổ là sự phân giải các protein sợi cơ quan trọng bởi các enzyme nội sinh trong cơ như Capains và Calpastatins (Bhat *et al*., 2018).

Calpastatin nằm trong nhóm gen liên quan đến độ mềm của thịt (Pinto *et al.,* 2010) và mã hóa enzyme phân giải các protein sợi cơ (Consolo *et al*., 2017). Gen Calpastatin của bò zebu (*CAST*) nằm trên nhiễm sắc thể số 7 gồm 35 exon có vị trí từ g. 97310302 – g. 97446918 (NC_032656.1, *Bos_indicus* 1.0, GCF_000247795.1). Nhiều đa hình nucleotide đơn (SNPs) trên gen *CAST* đã được phát hiện có ảnh hưởng đáng kể đến độ mềm thịt và được đề nghị làm chỉ thị phân tử cho tính trạng chất lượng thịt ở bò (Kostusiak *et al.,* 2023). Trong đó, đột biến thay thế nucleotide C>G tại vị trí g.98533962 C>G (trên bộ gen *Bos taurus* UMD 3.0) liên quan đáng kể đến độ mềm thịt sau giết mổ (Schenkel *et al.,* 2006; Calvo *et al.,* 2014) ở các giống bò *Bos taurus* khác nhau.

Ở Việt Nam, bò Vàng thuộc nhóm giống bò Zebu (*Bos indicus*) được nuôi phổ biến tại các vùng nông thôn nghèo do bò có khả năng thích nghi cao với môi trường địa phương. Bò được chăn nuôi theo hình thức chăn thả tự nhiên nhằm tận dụng nguồn thức ăn sẵn có. Thịt bò Vàng được cho rằng có thớ thịt nhỏ, mịn nên được thị trường ưa chuộng (Lê Hiếu, 2023). Vì vậy, trong những năm qua, chính phủ đã thực hiện chương trình cải tạo giống bò Vàng Việt Nam theo hướng nâng cao năng suất và chất lượng thịt (Thu Hằng, 2023). Ở một số địa phương trên cả nước, để nâng cao giá trị của thịt bò nhằm cải thiện đời sống của người nông dân và kinh tế của huyện xã, chính phủ và nhà chăn nuôi địa phương đã nỗ lực xây dựng nhãn hiệu thịt bò, chẳng hạn như thịt bò Vàng A Lưới nuôi tại huyện A Lưới, tỉnh Thừa Thiên Huế, hay thịt bò Ba Tri ở huyện Ba Tri, tỉnh Bến Tre. Tuy nhiên, chất lượng thịt bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố, trong đó yếu tố di truyền đóng góp đến 53% (Kostusiak *et al*., 2023), do vậy để nâng cao chất lượng thịt và cải thiện hiệu quả chọn lọc thì ứng dụng chỉ thị di truyền phân tử là cần thiết.

Xuất phát từ những dẫn chứng này, phân tích đa hình gen *CAST* liên quan đến độ mềm thịt ở quần thể bò Vàng tại các tỉnh miền Trung (Quảng Trị và Thừa Thiên Huế) và Tây Nam (tỉnh An Giang) Việt Nam đã được thực hiện trong nghiên cứu này nhằm làm cơ sở cho chương trình cải thiện giống và nâng cao chất lượng thịt bò Vàng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thu mẫu

Đàn giống Bò Vàng được sử dụng trong nghiên cứu này được nuôi tại 3 tỉnh Thừa Thiên Huế, Quảng Trị, và An Giang. Để đánh giá sự đa hình, các cá thể gồm cả đực và cái ở các lứa tuổi khác nhau đã được thu thập mẫu máu ngẫu nhiên tại các hộ chăn nuôi bò. Trong đó, 59 mẫu máu được thu thập tại các nông hộ của huyện A Lưới, tỉnh Thừa Thiên Huế, 12 mẫu tại huyện Triệu Phong, tỉnh Quảng Trị, và 30 mẫu tại huyện Tịnh Biên và huyện Tri Tôn, tỉnh An Giang. Thể tích máu thu thập là 3 mL / mẫu và được lấy tại tĩnh mạch cổ của bò bằng ống lấy máu chân không với chất chống đông heparin. Sau đó,mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 4^{o}C và chuyển về phòng thí nghiệm để tiến hành tách chiết DNA tổng số.

Tách chiết DNA

DNA tổng số được tách chiết theo các bước cơ bản: Thu tế bào bạch cầu bằng phương pháp ly tâm, phân giải protein bằng Proteinase K, chiết DNA bằng hỗn hợp phenol : chloroform : isoamylalcohol và tủa DNA bằng ethanol. Sản phẩm DNA tổng số được đánh giá chất lượng và số lượng bằng máy đo quang phổ NANODROP ONE (Thermo Fisher Scientific Inc, Mỹ).

Khuếch đại gen *CAST*

Đột biến thay thế nucleotide C>G trên gen *CAST* nằm tại intron 7 ở vị trí g.97395177 của hệ gen bò *Bos indicus* hiện nay (NC_032656.1, *Bos_indicus* 1.0, GCF_000247795.1). Trên hệ thống cơ sở dữ liệu của ngân hàng gen NCBI, đa hình này có mã là rs27318422. Như vậy, để khuếch đại đoạn gen *CAST* g.97395177 C>G (rs27318422), chúng tôi sử dụng cặp mồi tự thiết kế bằng phần mềm Primer-BLAST (Ye *et al*., 2012). Các thông tin về mồi được sử dụng trong phương pháp PCR được trình bày ở bảng 1. Phản ứng PCR (25 µL) gồm các thành phần 10 ng DNA khuôn mẫu, đệm GoTaq Flexi 5X, mồi xuôi 10 µM, mồi ngược 10 µM, dNTP 2,0 mM, $MgCl_2$ 25 mM, GoTaq hot start polymerase 1,25 U (Promega, Mỹ), và nước cất. Phản ứng PCR được thực hiện ở nhiệt độ biến tính 94°C/30s, gắn mồi 57°C/30s, và kéo dài 72°C/30s trong 35 chu kỳ.

Bảng 1. Thông tin về *CAST* g.97395177 C>G (rs27318422) trên bò *Bos indicus* và trình tự mồi đặc hiệu

Bộ gen Bos_indicus 1.0		**Trình tự mồi (5' – 3')**	**Kích thước (bp)**	**Vị trí tham khảo trên *Bos taurus* UMD 3.0**
ID	**Vị trí**			
rs27318422	g.97395177	GTGTGGCATCAGCAGGTATTG GAAAACACGCATACACCCCA	239	g.98533962 C>G (Calvo *et al*., 2014

Điện di gel agarose: Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 2% trong đệm 0,5X TAE ở 100 V trong 30 phút. Kết quả được đọc dưới máy Gel Doc XR+(Bio-rad, Mỹ). Thang chuẩn 100 bp DNA (DM2100 ExcelBand™ Ladder, SMBIO, Đài Loan) được sử dụng để xác định kích thước các đoạn DNA trên gel agarose.

Xác định đa hình gen *CAST*

Phần mềm NEB cutter 2.0 (Vincze *et al*., 2003) đã được sử dụng để thiết kế và chọn lọc enzyme giới hạn phù hợp có thể nhận biết được điểm cắt. Trong số các enzyme giới hạn, enzyme giới hạn *Rsa*I có trình tự cắt phù hợp với trình tự mang đột biến gen *CAST* g.97395177 C>G đã được sử dụng để tìm điểm đa hình. Hỗn hợp phản ứng gồm: 5 µL sản phẩm PCR, 0,25 µL *Rsa*I, 1 µL cutsmart buffer (NEB, Nhật bản) và 3,75 µL nước cất. Hỗn hợp này được ủ ở nhiệt độ 37^{o}C qua đêm. Thông tin trình tự cắt và kích thước của các phân đoạn được cắt bởi enzyme giới hạn *Rsa*I được trình bày ở bảng 2. Kết quả phản ứng cắt giới hạn được kiểm tra trên gel agarose 3% trong đệm 0,5X TAE ở 100 V trong 30 phút.

Bảng 2. Thông tin về phản ứng cắt bằng enzyme giới hạn *Rsa*I

Enzyme giới hạn	**Trình tự cắt (5'-3')**	**Kiểu gen**	**Kích thước (bp)**
*Rsa*I	5'….GTAC….3' 3'….CATG….5'	CC	239
		CG	82, 157, 239
		GG	82, 157

Giải trình tự

Để xác định sự thành công của quy trình thiết kế mồi và enzyme giới hạn cho nghiên cứu này, 2 mẫu PCR của 2 cá thể mang kiểu gen đột biến (CG và GG) đã được chọn lọc để gửi đi giải trình tự (Azenta, Nhật Bản). Kết quả giải trình tự được phân tích sử dụng công cụ MEGA11 (Tamura *et al*., 2021).

Xử lý số liệu

Số liệu về tần suất kiểu gen, tần suất alen và Chi-bình phương (X^2) được tính toán sử dụng phần mềm Microsoft Excell (Microsoft 365 MSO, version 2305).

- Tần suất kiểu gen được tính theo công thức:

Tần suất kiểu gen = Số cá thể mang kiểu gen tương ứng/Tổng số mẫu nghiên cứu.

- Tần suất alen được tính theo các công thức:

$$p = (CC + 1/2CG)/N \text{ và } q = (GG + 1/2GC)/N$$

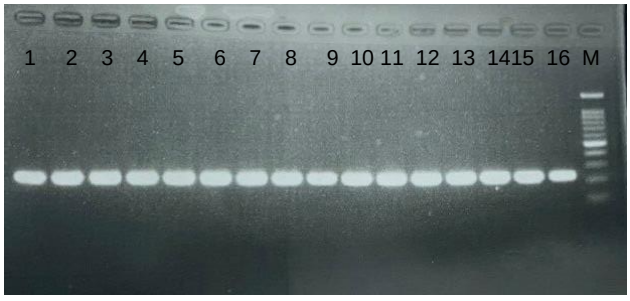
p là tần suất alen C, q là tần suất alen G, N là tổng số mẫu nghiên cứu

Sự sai khác thống kê ($p<0,05$) về sự phân phối kiểu gen *CAST* g.97395177 C>G theo quần thể khảo sát ở các địa phương khác nhau được phân tích bằng Fisher's exact test (Kim, 2017), sử dụng phần mềm R commander (R package version 2.7-1) (Fox và Bouchet-Valat, 2020).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả khuếch đại đoạn gen *CAST* g.97395177 C>G

Kết quả khuếch đại đoạn gen *CAST* g.97395177 C>G của bò Vàng với cặp mồi đặc hiệu được điện di trên gel agarose cho thấy xuất hiện 1 băng duy nhất, rõ nét với kích thước ước đoán 239 bp (Hình 1). Điều này cho thấy đã khuếch đại thành công đoạn gen trên.

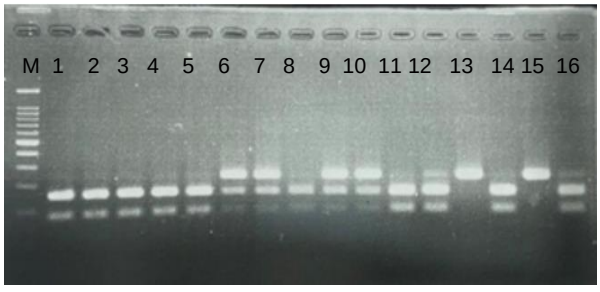


Hình 1. Kết quả khuếch đại đoạn gen CAST g.97395177 C>G (rs27318422).

M là thang kích thước chuẩn DM2100 ExcelBand™, giếng 1 – 16: mẫu DNA bò Vàng

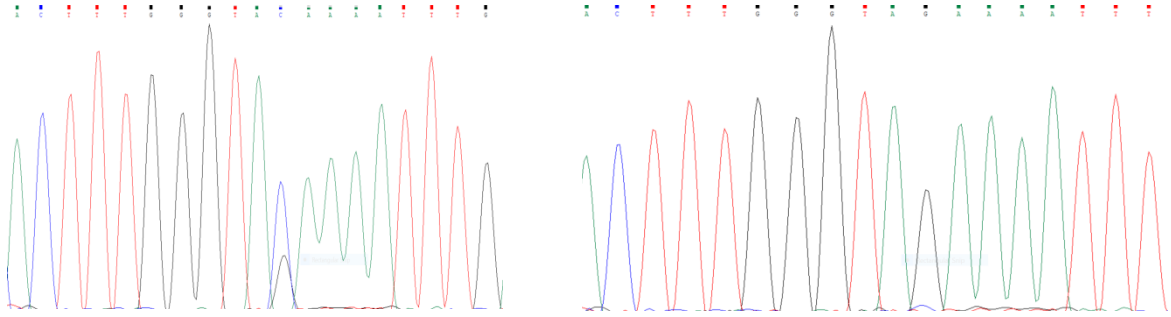
Kết quả phân tích đa hình gen *CAST* g.97395177 C>G

Để phân tích đa hình gen *CAST* g.97395177 C>G, chúng tôi đã ủ sản phẩm PCR với enzyme giới hạn *RsaI.* Sản phẩm PCR được cắt thành các phân đoạn với kích thước khác nhau tương ứng với kiểu gen CC, CG và GG như được trình bày ở bảng 2. Kết quả kiểm tra kích thước các phân đoạn trên gel agarose tương ứng với các kích thước đã được xác định. Điều này cho thấy kết quả PCR-RFLP đã thực hiện thành công (Hình 2).



Hình 2. Kết quả PCR-RFLP của *CAST* g.97395177 C>G, trong đó, M là thang kích thước chuẩn DM2100 ExcelBand, mẫu 1-16 là các kiểu gen khác nhau của *CAST* g.97395177 C>G ở bò Vàng được khảo sát

Thêm vào đó, để kiểm tra tính khoa học của quy trình thiết kế, chúng tôi đã giải trình tự 2 cá thể mang 2 kiểu gen tương ứng (CG và GG). Kết quả giải trình tự phù hợp với kết quả PCR-RFLP (Hình 3). Như vậy, quy trình thiết kế mồi và enzyme giới hạn để kiểm tra đa hình gen *CAST* g.97395177 C>G ở bò Vàng là thích hợp.



A B

Hình 3. Kết quả giải trình tự kiểu gen *CAST* g.97395177 C>G (A. Kiểu gen CG; B. Kiểu gen GG)

Bên cạnh đó, kết quả cho thấy rằng có 3 kiểu gen CC, CG và GG xuất hiện ở quần thể bò Vàng, đề nghị SNP g.97395177 C>G trên gen *CAST* là đa hình ở quần thể bò Vàng tại khu vực được khảo sát.

Tần suất kiểu gen và alen của gen *CAST* g.97395177 C>G ở bò Vàng nuôi tại các địa phương khác nhau

Kết quả đánh giá đa hình gen *CAST* g.97395177 C>G trên 101 mẫu DNA của bò Vàng được thể hiện ở Bảng 3. Qua bảng cho thấy, cả ba quần thể bò Vàng tại Quảng Trị, Thừa Thiên Huế và An Giang đều mang 3 kiểu gen CC, CG, và GG. Trong đó, ở tỉnh Thừa Thiên Huế có 35/59 cá thể mang kiểu gen GG, 18/59 mẫu mang kiểu gen CG và 6/59 mẫu mang kiểu gen CC. Tương tự, ở tỉnh An Giang có 17/30 mẫu mang kiểu gen GG, 9/30 mẫu mang kiểu gen CG và 4/30 mẫu mang kiểu gen CC. Ở tỉnh Quảng trị, số cá thể mang kiểu gen GG và CC như nhau (3/12), còn lại 6/12 cá thể mang kiểu gen dị hợp CG. Tính chung cho cả 3 vùng thì tần số alen G (0,66) cao hơn alen C (0,34). Kết quả X^2 ở cả 3 quần thể bò Vàng tại Quảng Trị, An Giang, và Thừa Thiên Huế nhỏ hơn giá trị χ2 lý thuyết (0.05;1) = 3,84 đề nghị rằng các quần thể này có cấu trúc di truyền tuân theo định luật Hardy-Weinberg, như vậy quần thể bò Vàng mang SNP g.97395177 C>G của gen *CAST* tại các địa phương khảo sát chưa chịu áp lực chọn lọc, di nhập cư, hay đột biến.

Bảng 3. Tần suất kiểu gen và alen của *CAST* g.97395177 C>G ở bò Vàng tại miền Trung và miền Tây Nam Bộ

Địa phương	Số mẫu	Tần suất kiểu gen			Tần suất alen		χ2	p
		CC	CG	GG	C	G		
Thừa Thiên Huế	59	0,10	0,31	0,59	0,25	0,75	2,25	0,216
An Giang	30	0,13	0,30	0,57	0,28	0,72	2,05	
Quảng Trị	12	0,25	0,5	0,25	0,50	0,50	0,00	
Tính chung	101	0,16	0,37	0,47	0,34	0,66		

Thêm vào đó, không có sự sai khác thống kê (p>0,05) về sự phân bố kiểu gen *CAST* g.97395177 C>G của bò Vàng tại các địa phương khác nhau hay giữa khu vực miền Trung và Tây Nam Bộ. Tuy nhiên, có sự sai khác thống kê (p=0,04) về sự phân bố kiểu gen *CAST* g.97395177 C>G của bò Vàng nuôi tại huyện A Lưới, tỉnh Thừa Thiên Huế và huyện Triệu Phong, tỉnh Quảng Trị (Bảng 4). Có sự sai khác này có thể do số lượng cá thể khảo sát ở các địa phương khác nhau

Bảng 4. Sự phân bố kiểu gen *CAST* g.97395177 C>G theo quần thể khảo sát

Địa phương	Số mẫu	Sự phân bố kiểu gen			p
		CC	CG	GG	
Miền Trung	71	9	24	38	0,95
Tây Nam Bộ	30	4	9	17	
Quảng Trị	12	3	6	3	*0,04*
Thừa Thiên Huế	59	6	18	35	
Quảng Trị	12	3	6	3	0,168
An Giang	30	4	9	17	
Thừa Thiên Huế	59	6	18	35	0,897
An Giang	30	4	9	17	

Thảo luận

Calpastatin là protein xuất hiện tự nhiên có tác dụng ức chế quá trình làm mềm thịt sau giết mổ. Vì vậy, *CAST* được sử dụng làm gen dự tuyển liên quan đến độ mềm thịt ở thịt bò (Kostusiak *et al.,* 2023). Theo nghiên cứu trước đây của Schender và đồng tác giả (2006) về ảnh hưởng của *CAST* g.97395177 C>G đến độ mềm thịt của bò Angus, Limousine, Charolais và Simmental đã chỉ ra rằng tần suất xuất hiện alen C ở 4 giống bò lần lượt là 62,5 %, 73,2%, 68,8%, và 36,4%. Bò mang kiểu gen CC có thịt mềm hơn so với bò mang kiểu gen GG và bò CG có độ mềm thịt vừa phải. Lực cắt Warner-Bratzler trung bình của thịt sau giết mổ 7 ngày ở các cá thể mang kiểu gen CC, CG, và GG lần lượt là (4,9 ± 0,11; 5,09 ± 0,12; 5,27 ± 0,15 kg/cm^2). Tương tự, Calvo và đồng tác giả (2014) đã báo cáo có sự xuất hiện của 3 kiểu gen CC, CG và GG ở cả hai giống bò Parda de Montaña và Pirenaica với tần suất alen C lần lượt là 0,7 và 0,61. Các cá thể mang kiểu gen CG có độ mềm thịt cao hơn (-1.64 kg/cm^2) so với cá thể mang kiểu gen GG. Như vậy, tần suất xuất hiện alen C ở các giống bò trong nghiên cứu này cao hơn ở quần thể bò Vàng được khảo sát trong nghiên cứu của chúng tôi. Điều này là hợp lý do các giống bò khảo sát trong nghiên cứu trước đây thuộc giống bò *Bos taurus,* được công nhận có độ mềm thịt cao hơn so với giống bò *Bos indicus* (Bressan *et al.,* 2010). Tuy nhiên, tần suất alen C trung bình của gen *CAST* g.97395177 C>G ở bò Vàng Việt Nam cũng khá cao 0,34 (34%).

Trong 3 quần thể khảo sát, bò Vàng nuôi tại A Lưới, tỉnh Thừa Thiên Huế được xem là sản phẩm nông nghiệp chủ lực của huyện A Lưới và "thịt bò Vàng A Lưới" cũng đã được Cục sỡ hữu trí tuệ trao chứng nhận nhãn hiệu tập thể. Việc phát triển bền vững nhãn hiệu này không chỉ góp phần cải thiện thu nhập cho các hộ nông dân còn đóng góp vào sự phát triển kinh tế - xã hội của huyện A Lưới. Như vậy, có thể đề nghị rằng kết quả nghiên cứu này đã cung cấp thông tin khoa học hữu ích cho chương trình cải thiện giống và nâng cao chất lượng thịt bò Vàng. Do đó, để làm cơ sở chính xác cho việc áp dụng SNPs này vào chọn lọc nâng cao độ mềm thịt của giống bò Vàng nuôi tại A Lưới và các địa phương khác ở Việt Nam, cần khảo sát tần suất alen C trong quần thể với số lượng lớn hơn và phân tích mối liên kết giữa đa hình này với độ mềm thịt của bò Vàng sau khi giết mổ và chế biến.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng quần thể bò Vàng tại khu vực miền Trung và miền Tây Nam Bộ Việt Nam có sự đa hình gen *CAST* g.97395177 C>G. Trong đó, tần suất alen C được báo cáo trong nghiên cứu trước đây cho độ mềm thịt cao hơn ở bò Vàng nuôi tại Thừa Thiên Huế, Quảng Trị và An Giang lần lượt là 0,25 (25%); 0,5 (50%) và 0,28 (28%). Không có sự sai khác thống kê về sự phân bố kiểu gen *CAST* g.97395177 C>G của bò Vàng giữa ba tỉnh khảo sát và giữa khu vực miền Trung và Tây Nam Bộ. Đây là báo cáo đầu tiên về đa hình này trên bò *Bos indicus*.

Cần tiếp tục khảo sát đa hình gen *CAST* g.97395177 C>G trên quần thể lớn hơn và phân tích mối liên kết giữa đa hình này với độ mềm thịt sau khi giết mổ và chế biến để đánh giá mức độ biểu hiện giá trị kiểu hình của gen này trong quần thể bò Vàng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bhat ZF, Morton JD, Mason SL, Bekhit A (2018). Role of calpain system in meat tenderness: A review. *Food Sci Hum Wellness*, 7 (3): 196 - 204.

Braz CU, Taylor JF, Decker JE, Bresolin T, Espigolan R, Garcia DA, Gordo DGM, Magalhães AFB, de Albuquerque LG, de Oliveira HN (2018). Polymorphism analysis in genes associated with meat tenderness in Nelore cattle. *Meta Gene*, 18: 73 - 78.

Bressan MC, Rossato LV, Rodrigues EC, Alves SP, Bessa RJB, Ramos EM, Gama LT (2010). Genotype x environment interactions for fatty acid profiles in Bos indicus and Bos taurus finished on pasture or grain. *J Anim Sci*, 89: 221–232.

Calvo JH, Iguácel LP, Kirinus JK, Serrano M, Ripoll G, Casasús I, Joy M, Pérez Velasco L, Sarto P, Albertí P, Blanco M (2014). A new single nucleotide polymorphism in the calpastatin (CAST) gene associated with beef tenderness. *Meat Sci*, 96(2): 775-782.

Consolo NRB, Ferrari VB, Mesquita LG, Goulart RS Silva LFP (2016). Zilpaterol hydrochloride improves beef yield, changes palatability traits, and increases calpain-calpastatin gene expression in Nellore heifers. *Meat Sci*. 2016, 121:375–381.

Fox J, Bouchet-Valat M (2020). Rcmdr: R Commander. R package version 2:7-1, https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Misc/Rcmdr/.

Kim HY. (2017). Statistical Notes for Clinical Researchers: Chi-Squared Test and Fisher's Exact Test. Restor Dent Endod, 42: 152-155.

Kostusiak P, Slósarz J, Gołębiewski M, Grodkowski G, and Puppel K (2023). Polymorphism of Genes and Their Impact on Beef Quality. *Curr Issues Mol Biol*, 6(45): 4749–4762.

Lê Hiếu. 2023. Thịt bò Vàng A Lưới có gì đặc biệt mà khách hàng ưa chuộng?. VOV-Miền Trung. https://vov.vn/kinh-te/thit-bo-vang-a-luoi-co-gi-dac-biet-ma-duoc-khach-hang-ua-chuong-post1012531.vov.

Pinto L, Ferraz JBS, Meirelles FV, Eler JP, Rezende FMD, Carvalho M, Almeida H, Silva R (2010). Association of SNPs on CAPN1 and CAST genes with tenderness in Nellore cattle. *Genet Mol Res*, 9:1431–1442.

Robyn DW, Tommy LW, Minh H, Xin L, Bekhit A, James M, Rozita V, Dunshea FR, Liu R, Purslow P, Zhang W (2022). Meat tenderness: advances in biology, biochemistry, molecular mechanisms and new technologies. *Meat Sci*,185: 108657.

Schenkel FS, Miller SP, Jiang Z, Mandell IB, Ye X, Li H, Wilton JW (2006). Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J Anim Sci*, 84(2): 291–299.

Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol*, 38(7): 3022–3027.

Thu Hằng (2023). Công tác giống và cải tiến di truyền trong chăn nuôi bò thịt tại Việt Nam. https://nhachannuoi.vn/cong-tac-giong-va-cai-tien-di-truyen-trong-chan-nuoi-bo-thit-tai-viet-nam/

Vincze T, Posfai J, Roberts R J (2003). NEBcutter: A Program to Cleave DNA with Restriction Enzymes. *Nucleic Acids Res*., 31: 3688–3691.

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, and Madden T L (2012). Primer-BLAST: A Tool to Design Target-Specific Primers for Polymerase Chain Reaction. *BMC Bioinformatics*., 18(13): 134.

POLYMORPHISM OF *CAST* GENE ASSOCIATED TO MEAT TENDERNESS OF YELLOW CATTLE RAISED IN THE CENTRAL AND SOUTHWESTERN OF VIETNAM

Le Nu Anh Thu[1*], Duong Thi Huong[1] , Nguyen Binh Nguyen[1,2] , Nguyen Ba Trung[3] , Le Dinh Phung[1]

[1]*University of Agriculture and Forestry, Hue University*

[2]*Vietnam UV Joint Stock company*

[3]*University of An Giang, Vietnam national Unversity – Ho Chi Minh city*

SUMMARY

Meat tenderness is one of the most important factors determining the meat quality, consumer acceptability and satisfaction. The previous studies indicated that *CAST* g.97395177 C>G (rs27318422**)** related to meat tenderness should be used as a molecular marker in selection to improve the beef quality. Therefore, this study was performed to investigate the genotypes and allele frequency of *CAST* g.97395177 C>G in Yellow cattle distributed in the central and Southwestern of Vietnam. Results showed that there was polymorphic of *CAST* g.97395177 C>G in the populations of Vietnamese Yellow cattle, in which, the C allele which previously showed the higher tenderness value than those of the G allele, has frequencies of 0.25 (25%), 0.28 (28%), and 0.5 (50%) in Yellow cattle raised in Thua Thien Hue, An Giang, and Quang Tri province respectively. In addition, there were no significant differences in the genotype distribution between the central and southwestern area ($p>0.05$). The present findings suggest that A Luoi yellow cattle have possibility to possess the favorable allele associated with the meat tenderness, and this is the first report about the polymorphism of *CAST* g.97395177 C>G in *Bos indicus* and Vietnamese Yellow cattle

Keywords: Yellow cattle, *CAST*, meat tenderness, PCR-RFLP, single nucleotide polymorphisms (SNPs).

[*] Author for correspondence: Tel: +84-914008455; Email: lenuanhthu@huaf.edu.vn.

ANTAGONISTIC EVALUATION OF *CHAETOMIUM* SP. FOR FUNGI CAUSING TUBER ROT DISEASE ON NGOC LINH GINSENG (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv.)

Phung T. N. Han[1], Dao U. T. Da[2], Tran T. T. Ha[2], Cao T. T. Loan[1*]

[1]*Faculty of Biological Sciences, Nong Lam University, HCMC, Viet Nam*

[2]*Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University, HCMC, Viet Nam*

SUMMARY

Ngoc Linh ginseng (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) is a rare and valuable medicinal herb endemic to Vietnam. However, diseases on ginseng over the years, particularly tuber rot, have severely impacted its yield and quality. This research aims to identify the cause of tuber rot disease in Ngoc Linh ginseng and explore potential biological control measures. Through isolation and morphological identification, *Fusarium solani* was identified as the pathogen responsible for tuber rot in ginseng. Pathogenicity test of isolated *F. solani* on the Ngoc Linh ginseng slices was performed using the artificial inoculation method under laboratory conditions. The results showed that the ginseng slices developed symptoms five days after re-inoculation with isolated *F. solani.* Further, the study evaluated the antagonistic activity of *Chaetomium* sp. in inhibiting the growth of *F. solani* using a dual – culture method on PGA medium. The antagonistic efficiency recorded after 11 days of culturing was 64.1% when *Chaetomium* sp. and *F. solani* wereinoculated on the same day and 71.8% when *Chaetomium* sp. was inoculated three days before *F. solani.* These results demonstrate that *Chaetomium* sp. has a high inhibitory effect on the growth of *F. solani* mycelium. The findings of this study provide a valuable foundation for developing disease prevention strategies for Ngoc Linh ginseng, contributing to the conservation and sustainable cultivation of this rare medicinal herb.

*Keywords***:** *Chaetomium*, dual - culture, *Fusarium solani*, Ngoc Linh ginseng, tuber rot.

INTRODUCTION

Ngoc Linh ginseng (*P.vietnamensis* Ha et Grushv.) is a rare and valuable medicinal herb endemic to Vietnam, first discovered in 1973 on Ngoc Linh mountain in Kon Tum province. Stems and tuber roots of ginseng contain up to 52 types of saponins, while the leaves contain 19 types of pamaran saponins (Duc *et al*.,1994). In addition, majonoside R2, a unique ocotillol-type saponin exclusive to Ngoc Linh ginseng, has garnered attention for its therapeutic potential, including neuroprotective, antioxidant, anti-inflammatory, antibacterial properties, and anticancer effects by enhancing apoptosis (Liu *et al.,* 2017; Thanh *et al*., 2023). Due to its rarity and medicinal benefits, Ngoc Linh ginseng commands a high market value, fetching between 1000 to 3000 USD per kilogram of fresh rhizomes (Lee *et al.,* 2018). However, its cultivation is challenging due to specific environmental requirements and lengthy growth periods. Besides, the problem of pests and diseases in Ngoc Linh ginseng is still ongoing, seriously affecting the quality and quantity of ginseng. In 2015, Xiaolin Jiao và đồng tác giả identified *F. solani* and *F. oxysporum* as the primary causes of root rot in *Panax Quinquefolius* in Beijing, China. Early symptoms include reddish-brown to orange-brown lesions on roots, leading to dry rot in advanced stages. Similarly, Zhang và đồng tác giả (2020) found a high incidence (33-44%) of *Fusarium*-induced root rot in these plants, with symptoms like soft, soggy, dark brown to black roots. Recently, Chen và đồng tác giả (2024) found *Pseudomonas* was the dominant bacterium, and *Fusarium*, particularly *F. oxysporum*, was the dominant fungus in *P. vietnamensis* plants with root rot. Given the high value of Vietnamese ginseng, it is crucial to prioritize the identification of effective biocontrol agents over chemical fungicides to sustainably manage root rot diseases in this plant. A study on *Chaetomium* spp demonstrated its antagonistic effects against various fungi, including *Fusarium* spp., which is known to cause root and stem rot and can severely reduce yield in different plants such as tomatoes, beans, peas, and potatoes (Seethapathy *et al.,* 2022). The study highlights *Chaetomium* spp.'s ability to inhibit these fungal pathogens through mechanisms such as mycoparasitism, where *Chaetomium* directly attacks and degrades the fungal hyphae, and the production of antifungal metabolites that suppress the growth of these pathogens. These findings suggest that *Chaetomium* could be a promising candidate for managing root rot diseases in *P. vietnamensis*, especially given its effectiveness against similar fungal pathogens in other plants. Further research specifically targeting *P. vietnamensis* would be beneficial to confirm its efficacy. Therefore, the research aims to identify the causative agent of tuber rot disease in Ngoc Linh ginseng and to provide essential scientific insights for developing targeted disease prevention measures.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Ngoc Linh ginseng's tuber with symptoms of rot, wilting, dark brown, and wet lesions were collected from Ngoc Linh mountain, located at geographical coordinates 14°59'16" - 14°59'39" north latitude and 107°54'25" - 107°54'52" east longitude. Post-harvest samples were promptly transported to the laboratory for immediate analysis.

Research methods

Fungi Isolates

Tuber samples were cleaned with tap water and sectioned at the boundary between healthy and diseased tissue. The surface was sterilized with 70% ethanol followed by a rinse with distilled water. Samples were air-dried on sterile paper for 15 minutes before being cultured on Water Agar (WA) medium. After three days of incubation at room temperature (30-35°C), sections showing peak fungal mycelium growth were removed and transferred to Potato Glucose Agar (PGA) medium. The experiment was conducted in triplicate, with two dishes per trial, and incubated for 10 days (Burgess *et al*., 2009).

Morphology identification

After culturing on PGA medium for 5-7 days, monitor the mycelial growth and observe the fungus's coloration in the petri dish. Use a microscope with a 40X objective to examine and document specific characteristics of *Fusarium* spp., including macroconidia, microconidia, chlamydospores, and other relevant features. Referencing "The *Fusarium* Laboratory Manual" (Leslie & Summerell, 2006), classify fungal morphology based on identified characteristics. Although molecular identification methods offer precise classification, the morphological approach remains a reliable and widely accepted method for identifying *Fusarium* species. This method has been extensively validated in various studies (Leslie & Summerell, 2006; Burgess *et al.,* 1994; Nelson *et al.,* 1983), and has been shown to accurately differentiate *Fusarium* species based on distinctive morphological traits, ensuring dependable results when molecular techniques are not feasible. The molecular characterization results of 23 *Fusarium* spp. in the study by Trabelsi và đồng tác giả (2017) were consistent with their morphological analyses, further supporting that identifying *Fusarium* species based on morphological characteristics is a reliable method.

Pathogenicity test

After identification, the fungi responsible for tuber rot disease in Ngoc Linh ginseng were tested for pathogenicity using artificial inoculation under controlled laboratory conditions. Healthy Ngoc Linh ginseng slices, approximately 0.5 cm ± 0.1 thick, were used for pathogenicity test. The experiment consisted of two treatments: control slices and slices inoculated with fungal spore fluid at a density of 10^6 spores/ml. Each treatment was replicated three times, with two ginseng slices per replication. To initiate infection, wounds were created on the ginseng slices using a needle. 20 µL of fungal spore fluid was applied to the wound site using a micropipette and distilled water used for control. Ginseng slices were placed in a plastic box (20 x 11 x 5.5 cm) and covered with food wrap. The wrap was punctured with a needle in several places for ventilation. The box was then incubated under laboratory conditions at 30-35°C. All tools used were sterilized with 70% ethanol. The ginseng slices were monitored continuously until symptoms of the disease appeared, documenting the progression of infection (Burgess *et al*., 2009).

Evaluation of the antagonistic activity of *Chaetomium* sp.

The antagonistic potential of *Chaetomium* sp. against the isolated fungi was assessed via the dual-culture method on PGA medium. Two experiments were conducted: Experimental 1 involved simultaneous inoculation of *Chaetomium* sp. and the isolated fungi, while Experimental 2 included *Chaetomium* sp. inoculated three days prior to the isolated fungi. Each experiment comprised a control (sole culture of the isolated fungi) and an antagonistic treatment combining *Chaetomium* sp. with the isolated fungi. The study was replicated three times, with two 8 cm diameter petri dishes per replication. Incubation occurred under controlled laboratory conditions (30-35°C). Fungal growth on the petri dishes was monitored and measured at intervals of five, seven, nine, and eleven days. Antagonistic effectiveness was evaluated using Soytong's assessment scale (1988). Antifungal efficiency is calculated according to the formula:

$$PIMG = \frac{R1-R2}{R1} \times 100\ (\%)$$

In which: *PIMG:* Percent Inhibition of Mycelial Growth; R1: Radius of the isolated fungal mycelium in the control dish; R2: Radius of the isolated fungal mycelium in antagonistic interaction.

Antagonistic efficiency is classified as follows: *PIMG* > 75%: very high antagonistic ability; *PIMG* from 61 – 75%: high antagonistic; *PIMG* from 51 - 60%: has average antagonistic; *PIMG* < 50%: low antagonistic.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation and identification fungi cause tuber rot disease on Ngoc Linh ginseng

Based on observed morphological characteristics, the pathogenic fungus causing disease in ginseng was identified as *Fusarium solani*. *F. solani* grows quickly on PGA medium, filling the petri dish within six days after inoculation. The mycelium appeared white, and spread flat across the culture medium, with a cream-colored reverse side (Figure 1).

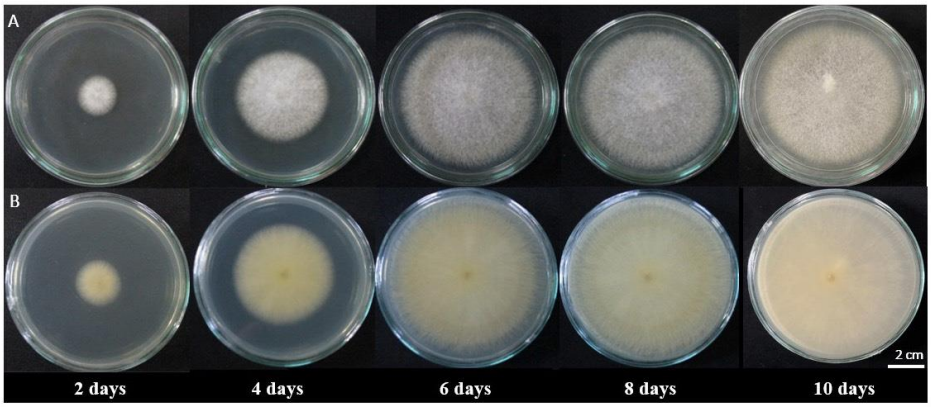


Figure 1. Characteristics of *F. solani* on the PGA medium

A: Front of the petri dish; B: Back of the petri dish

The morphology of macroconidia, microconidia, phialide and chlamydospore were observed using a 40X objective microscope (Figure 2). Macroconidia are relatively wide, slightly curved, stout, and robust, with apical cells exhibiting three shapes: papillate, blunt, and hooked. Basal cells may display a distinct foot shape, varying in development. Macroconidia typically features 5 to 7 septa, measuring approximately 29.07 – 34.45 µm x 5.31 – 5.70 µm (Figure 3).

Microconidia exhibit five basic shapes: oval, fusiform, reniform, allantoid, and obovoid (Figure 4), often lacking septa or occasionally having one, with dimensions averaging 10.89 – 13.98 µm x 5.44 – 5.91 µm. Chlamydospores are abundant in the mycelium, predominantly globose or subglobose, occurring singly, in clusters, or short chains, with an average diameter of about 6.23 µm (Figure 2G–H). Phialides of *F. solani* are monophialidic, subcylindrical or cylindrical, arising from conidiophores. Sporodochial conidiophores form on distinct collarettes at the tip, averaging approximately 87.36 µm in height (Figure 2E). The results of morphological characteristics of fungal mycelium and spores recorded above are consistent with the description of the *F. solani* of Gerlach and Nirenberg (1982), as well as of Nelson và đồng tác giả (1983).

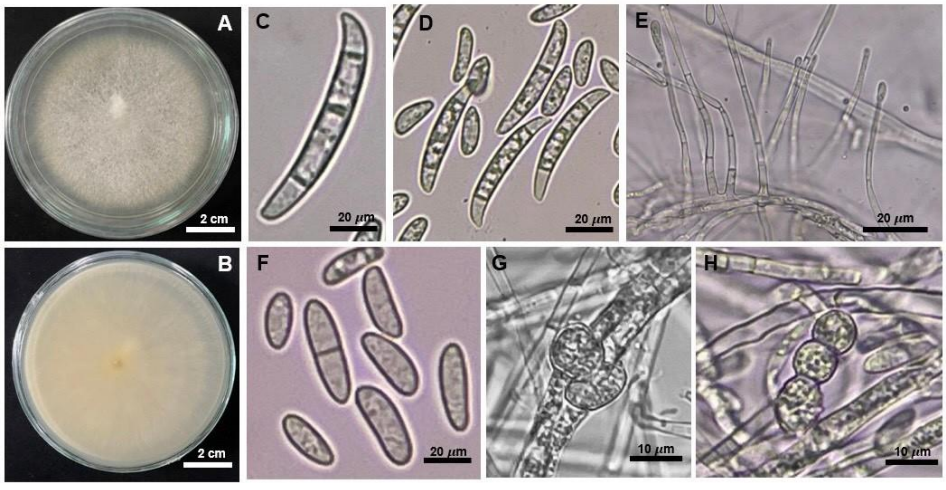


Figure 2. Characteristics of *F. solani's* spores under microscope

A: Front of the petri dish after ten days cultured; B: Back of the petri dish after ten days cultured; C: Macroconidia; D: Macroconidia and microconidia; E: Phialide; F: Microconidia; G – H: Chlamydospore.

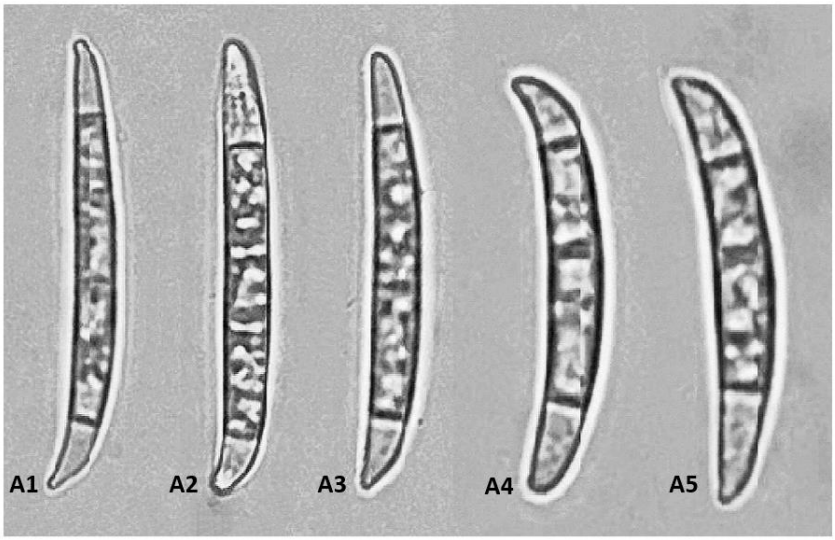


Figure 3. Morphological features of *F. solani's* macroconidia under the microscope 40X objective.

A1: Slender with no significant curvature; A2: Widest at the apical third, wedge – shaped; A3: Unequally curved; A4: Widest at the basal portion; A5: Widest at the middle portion.

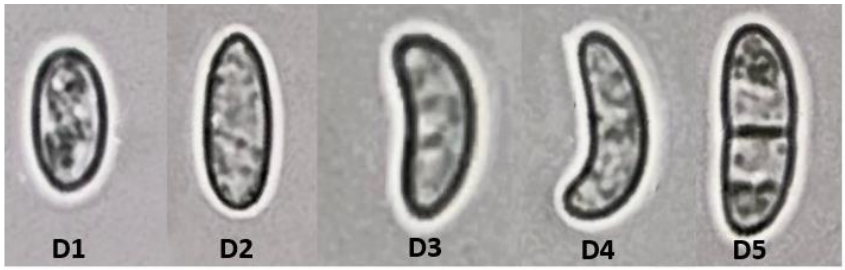


Figure 4. Basic morphological features of *F. solani's* microconidia under the microscope 40X objective

D1: Oval; D2: Fusiform; D3: Reniform; D4: Allantoid; D5: Obovoid.

Research worldwide has consistently identified *Fusarium* spp. as a prominent pathogen affecting various ginseng species such as *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius*. Lee Soon-Gu's study (2014) conducted in Korea from 1982 to 1985, involving 115 samples including rotten roots and soil, identified 11 species, with *F. solani* being predominant in 55 out of 115 isolated samples. Similarly, Zamir and Punja (1997) collected leaf and root samples from *P. quinquefolius* gardens in British Columbia between 1992 and 1996, reporting that the *Fusarium* genus accounted for 30.5%, primarily comprising *F. solani, F. oxysporum, F. avenaceum,* and *F. equiseti*. In China, Guan và đồng tác giả (2019) isolated and identified 10 *Fusarium* species from *P. ginseng* seeds, including *F. solani* and *F. oxysporum* as the most common, consistent with their role as pathogens causing rot during the ginseng growth cycle. Their research indicated that *Fusarium* spp. in seeds can infect ginseng plants and 2-year-old tubers, adversely impacting yield and quality by attacking the roots and causing tuber rot. Moreover, Jiao và đồng tác giả (2015) investigated the effects of *F. solani* and *F. oxysporum* on ginsenoside metabolism *in P. quinquefolius* roots. Their study, which involved artificially infecting roots and assessing ginsenoside concentrations, showed significant reductions in ginsenoside levels at the infection sites compared to adjacent healthy areas. This underscores *Fusarium* spp.'s ability to diminish ginsenoside content in ginseng through metabolic processes. Despite these global studies, research on pests and diseases affecting Ngoc Linh ginseng in Vietnam remains limited, leading to ineffective disease prevention strategies.

Pathogenicity test of isolated fungal disease on the Ngoc Linh ginseng slices

Testing the pathogenicity of *F. solani* on Ngoc Linh ginseng slices under controlled laboratory conditions revealed distinct disease symptoms. Within three days of inoculation, white mycelium appeared at the inoculation site, while the ginseng slices remained moist. By the fifth day, the slices exhibited drying and shrinkage, accompanied by darkening and a slight brownish tint at the infection site, indicating pronounced decay. The disease rate reached 100% by the fifth day, mirroring initial symptoms observed in rotten Ngoc Linh ginseng samples.

Figure 5. Disease symptoms appeared on Ngoc Linh ginseng slices caused by *F. solani*

Evaluation of the antagonistic activity of *Chaetomium* sp. on *F. solani* by dual – culture method

Chaetomium sp. identified and stored at the microbiology laboratory, Research Institute for Biotechnology and Environment, Nong Lam University - Ho Chi Minh City was used to evaluate the ability to antagonism with *F. solani*. The antagonism activity against *F. solani* were conducted in two ways, including *Chaetomium* sp. and *F. solani* were inoculated concurrently and *Chaetomium* sp. inoculated three days prior *F. solani*.

Table 1. The inhibitory effect of the *F. solani* by the antagonist fungus *Chaetomium* sp. inoculated concurrently

The time recorded after cultured	Radius of the *F. solani* in the control treatment (cm ± SD)*	Radius of the *F. solani* in the antagonism treatment (cm ± SD)*	*PIMG* Values (% ± SD)**
5 days	2,80 ± 0,00^{a}	2,40 ± 0,10^{b}	14,28 ± 3,57^{c}
7 days	4,33 ± 0,49^{a}	2,60 ± 0,10^{b}	39,36 ± 8,58^{b}
9 days	5,50 ± 0,10^{a}	2,50± 0,00^{b}	54,54 ± 0,83^{a}
11 days	6,50± 0,00^{a}	2,30 ± 0,12^{b}	64,10 ± 1,78^{a}

*: Different letters in the same row indicated that values were significantly different ($p < 0,05$).

**: Different letters in the same column indicated that values were significantly different ($p < 0,05$).

Table 2. The inhibitory effect of the *F. solani* by the antagonist fungus *Chaetomium* sp. inoculated three days before

The time recorded after cultured	Radius of the *F. solani* in the control treatment (cm ± SD)*	Radius of the *F. solani* in the antagonism treatment (cm ± SD)*	*PIMG* Values (% ± SD)**
5 days	2,74 ± 0,05^{a}	2,12 ± 0,08^{b}	24,12 ± 2,38^{d}
7 days	3,90 ± 0,28^{a}	2,06 ± 0,05^{b}	50,79 ± 1,84^{c}
9 days	5,14 ± 0,31^{a}	2,00 ± 0,12^{b}	62,91 ± 2,50^{b}
11 days	6,50± 0,00	1,94 ± 0,17^{b}	71,80 ± 1,78^{a}

*: Different letters in the same row indicated that values were significantly different ($p < 0,05$).

**: Different letters in the same column indicated that values were significantly different ($p < 0,05$).

After 11 days of dual-culture, *Chaetomium* sp. demonstrated significant inhibition of *F. solani* mycelium growth, achieving 64.1% and 71.8% Pathogen Inhibition Growth Rate (PIMG) when inoculated simultaneously and three days prior, respectively (Table 1, Table 2). According to Soytong's (1988) assessment scale, these results indicate highly antagonistic behavior in both experiments (Figure 6, Figure 7). Comparatively, studies by Thu Huong và đồng tác giả (2021) identified *Chaetomium* sp. strains C1 and C2 with antagonistic efficiencies of 67.7% and 51.1% against *Fusarium* spp. in *Cucurbitaceae* plants. Additionally, Wahba và đồng tác giả (2016) found that *Chaetomium globosum* could reduce *F. solani* growth by 22.2% and 38.9% when inoculated concurrently and three days prior in tomato plants suffering from root rot. These findings collectively suggest that *Chaetomium* sp. exhibits medium to high antagonistic efficacy (51% - 75%) against *F. solani*. However, research on beneficial microorganism resistance to pathogens in Ngoc Linh ginseng remains limited. Thus, this study provides a foundational basis for future research aimed at developing effective strategies to prevent tuber and root rot diseases in ginseng.

Figure 6. Evaluation of the antagonistic activity of the fungus *Chaetomium* sp. against *F. solani* after 11 days (inoculated concurrently)

Figure 7. Evaluation of the antagonistic activity of the fungus *Chaetomium* sp. against *F. solani* after 11 days (inoculated *Chaetomium* sp three days before)

CONCLUSIONS

This study identifies *Fusarium solani* as the causative agent of tuber rot disease in Ngoc Linh ginseng, consistent with findings in other Panax species. Re-inoculation of *F. solani* on Ngoc Linh ginseng slices resulted in disease symptoms appearing within five days under laboratory conditions. Moreover, the study demonstrates that *Chaetomium* sp. effectively inhibits *F. solani* growth, achieving high antagonistic efficiency after 11 days of culture. These findings provide a foundational basis for future research on disease prevention strategies for Ngoc Linh ginseng, particularly the potential use of beneficial antagonistic microorganisms to mitigate fungal diseases.

REFERENCES

Burgess LW, Knight TE, Tesoriero L, Phan HT (2009). Handbook on diagnosing plant diseases in Vietnam. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.

Burgess LW, Summerell BA, Bullock S, Gott KP and Backhouse D (1994) Laboratory manual for *Fusarium* Research. Third edition, Sydney, Australia.

Chen C, Cheng Y, Zhang F, Yu S, Cui X, Wu Y (2024). A Comparative Analysis of Microbial Communities in the Rhizosphere Soil and Plant Roots of Healthy and Diseased Yuanyang Nanqi (*Panax vietnamensis*) with Root Rot . *Agriculture*, 14(5): 719.

Duc NM, Kasai R, Ohtani K, Ito A, Nham NT, Yamasaki K, Tanaka O (1994). Saponins from Vietnam Ginseng, *Panax vietnamensis* Ha et Grushv collected in Central VietNam. *Chem. Pharm. Bull.* 42: 115 – 122.

Gerlach W, .,Nirenberg H (1982). The genus *Fusarium* – A pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bunde – sanstalt Fur Landund Forstwirtschaft (Berlin – Dahlem),* 209: 1 – 405.

Guan YM, Deng JC, Ma YY, Li Y, Zhang YY (2019). Seed – Associated Fungal Diversity and the Molecular Identification of *Fusarium* with Potential Threat to Ginseng (*Panax ginseng)* in China. *Plant Disease,* 104(2): 330-339.

Jiao X, Lu X, Chen AJ, Luo Y, Hao JJ, Gao W. (2015). Effect of *F. solani* and *F. oxysporum* Infection on the Metabolism of Ginsenosides in American Ginseng Roots. *Molecules*, *20*(6): 10535-10552.

Lee QU, Lay HL, Wu MC, Hanh Nguyen TH, Lam Nguyen D (2018). Phytoconstituents and Biological Activites of *Panax vietnamensis* (Vietnamese Ginseng): A Precious Ginseng and Call for Futher Research – A systematic review. *Natural Product Communications,* 13: 1381 – 1384.

Lee SG. (2014). Fusarium species Associated with Ginseng (*Panax ginseng*) and Their Role in the Root-Rot of Ginseng Plant. *Research in Plant Disease*, 10: 248 – 259.

Leslie JF, Summerell BA (2006). The *Fusarium* Laboratory manual. *Blackwell Publishing Professional, USA.*

Liu J, Xu Y, Yang J, Wang W, Zhang J, Zhang R, Meng Q (2017). Discovery, semissynthesis, biological activities, and metabolism of ocotillol – type saponins. *Journal of Ginseng Research*, 41: 373 – 378

Nelson PE, Toussoun TA, O. Marasas WF (1983). *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Indentification. *Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania*.

Seethapathy P, Sankarasubramanian H, Lingan R, Thiruvengadam R (2022). *Chaetomium* sp.: An Insight into its Antagonistic Mechanisms, Mass Multiplication, and Production Cost Analysis. *Agricultural Microbiology Based Entrepreneurship*, 39: 267-288.

Soytong K (1988). Identification of species of *Chaetomium* in the Philippines and screening for their biocontrol properties against seed-borne fungi of rice. PhD Thesis. Department Plant Pathology, University of the Philippines.

Trabelsi R, Sellami H, Gharbi Y, Krid S, Cheffi M, Kammoun S, Dammak M, Mseddi A, Gdoura R, Triki MA (2017). Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with olive trees dieback in Tunisia. *Biotech*,7:28.

Thanh NT, Mai. LQ, Xuyen DT., Van TTH, Hung LV, Khiem. NV, Oanh PT, Hai DV, Dien ND, Nhut DT (2023). Bioactive compounds and Biological Activities of Vietnamese Ginseng (*Panax Vietnamensis* Ha et Grushv.). *Bioactive Compounds in the Storage Organs of Plants, pp 1-25*.

Thu Huong NT, Binh NT, Huong NT (2021). Isolation and evaluation of the antagonistic activity of some fungal strains against *Fusarium* sp. causes disease in plants of the *Cucurbitaceae. Hong Duc University's Science magazine*, 55: 56-66.

Wahba Z, Barakat OS, Refae RI, Ramses SS (2016). The role of Antagonism in the Rhizospheric Region for *Chaetomium glosbosum* and *Trichoderma harzianum* against *Fusarium* spp. attacking Tomato plant*. Egypt. Acad. J. Biolog. Sci*., 7(1): 27 – 36.

Zamir K, Punja ZK (1997). Fungal pathogens of American ginseng (*Panax quinquefolium*) in British Columbia. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19:3, 301-306.

Zhang X, Gao WW, Jiao XL (2020). First report of Root rot caused by *Fusarium armeniacum* on American Ginseng in China. *Plant Disease*, 105(4): 1-6.

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG CỦA *CHAETOMIUM* SP. ĐỐI VỚI NẤM GÂY BỆNH THỐI CỦ TRÊN SÂM NGỌC LINH (*Panax Vietnamensis* Ha et Grushv.)

Phùng T. N. Hân[1], Đào U. T. Đa[2], Trần T. T. Hà[2], Cao T. T. Loan[1*]

[1]Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

[2]Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học và Môi Trường, Trường Đại học Nông Lâm, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

TÓM TẮT

Sâm Ngọc Linh (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv) là một loại dược liệu thân thảo quý hiếm, đặc hữu của Việt Nam. Tuy nhiên tình trạng bệnh hại trên sâm trong nhiều năm qua, đặc biệt là bệnh thối củ ảnh hưởng nghiêm trọng đến sản lượng và chất lượng sâm. Nghiên cứu này nhằm xác định nguyên nhân gây bệnh thối củ trên sâm Ngọc Linh và khảo sát khả năng sử dụng *Chaetoium* sp. như một biện pháp kiểm soát sinh học tiềm năng. Thông qua phương pháp phân lập và xác định hình thái, *Fusarium solani* đã được xác định là tác nhân gây bệnh thối củ trên sâm Ngọc Linh. Sau đó tiến hành thử nghiệm khả năng gây bệnh của *F. solani* trên lát sâm Ngọc Linh bằng phương pháp lây nhiễm nhân tạo ở điều kiện phòng thí nghiệm, kết quả lát sâm xuất hiện triệu chứng bệnh sau 5 ngày tiến hành lây nhiễm. Tiếp tục tiến hành đánh giá khả năng đối kháng của *Chaetomium* sp. trong việc ức chế sự phát triển của *F. solani* bằng phương pháp đồng nuôi cấy trên môi trường PGA. Hiệu suất đối kháng ghi nhận sau 11 ngày nuôi cấy lần lượt là 64.1% khi đồng nuôi cấy *Chaetomium* sp. và *F. solani* và 71.8% khi cấy *Chaetomium* sp. trước *F. solani* 3 ngày. Kết quả đạt được có thể làm tiền đề nghiên cứu về biện pháp phòng trừ bệnh trên củ sâm Ngọc Linh, góp phần bảo tồn loại dược liệu quý hiếm này.

Từ khóa: Chaetomium, đồng nuôi cấy, Sâm Ngọc Linh, *Fusarium solani,* bệnh thối củ.

[*] Author for correspondence: Tel: +84-812302430 ; Email: loan.caothithanh@hcmuaf.edu.vn

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ĐỐI KHÁNG CỦA VI KHUẨN *Bacillus* sp. VỚI NẤM *Fusarium* sp. ĐƯỢC PHÂN LẬP TỪ CÂY QUÝT HỒNG *Citrus Reticulata* Blanco BỊ BỆNH VÀNG LÁ THỐI RỄ TẠI HUYỆN LAI VUNG, TỈNH ĐỒNG THÁP

Phạm Thị Ái Niệm[1*], Nguyễn Xuân Đồng[1], Trần Tuấn Anh[1], Võ Thị Minh Thảo[1], Nguyễn Minh Khánh[1], Nguyễn Ngọc Phi[1], Trần Ngọc Quốc Tường[1], Nguyễn Lê Huy Khanh[1], Phan Thị Hồng Thanh[3], Nguyễn Tử Minh[3]

[1]*Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh*

[2]*Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh*

[3]*Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế*

TÓM TẮT

Bệnh vàng lá thối rễ trên cây quýt hồng (*Citrus Reticulata* Blanco) do nhiều tác nhân gây ra, trong đó phải kể đến là dòng nấm gây bệnh thuộc chi *Fusarium*. Nấm gây bệnh có thể tồn tại trong đất, khi gặp điều kiện thích hợp sẽ xâm nhập vào bộ rễ thông qua những vết thương do côn trùng tấn công hoặc gây ra trong quá trình canh tác. Nghiên cứu được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn các chủng vi khuẩn vùng rễ (PGPR) có khả năng ức chế đối với nấm bệnh *Fusarium* sp. và đánh giá hiệu quả đối kháng của chúng. Hoạt tính đối kháng của vi khuẩn với nấm *Fusarium* sp. được thực hiện bằng phương pháp đồng nuôi cấy. Kết quả ghi nhận 5/6 chủng phân lập có khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Fusarium* sp. với hiệu lực đối kháng dao động từ 7,7 – 41,41% sau 4 ngày đồng nuôi cấy. Chủng KL6 với hiệu suất ức chế sinh trưởng đối với nấm *Fusarium* sp. cao nhất được xác định thuộc chi *Bacillus* sp., có độ tương đồng rất cao 99,79% với loài *Bacillus siamensis* KCTC 13613 (MN176482) và loài *Bacillus amyloliquefaciens* (AB325583). Khả năng sinh tổng hợp chitinase, cellulase, protease và amylase của vi khuẩn *Bacillus* sp**.** KL6 được đánh giá trong điều kiện *in vitro*, trong đó chủng KL6 có hoạt tính protease và chitinase mạnh nhất với đường kính vòng phân giải lần lượt đạt 2,80 ± 0,35 và 2,73 ± 0,06 cm. Bên cạnh đó, khảo sát tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy cho thấy, chủng *Bacillus* sp**.** KL6 có khả năng sinh trưởng và đối kháng tốt trong điều kiện pH=7, nhiệt độ đạt 37°C với nồng độ glucose bổ sung là 2 g/L. Nghiên cứu này chỉ ra tiềm năng của việc sử dụng vi khuẩn vùng rễ *Bacillus* làm tác nhân kiểm soát sinh học trong canh tác cây quýt hồng.

Từ khóa: Bacillus siamensis, Fusarium, hiệu suất đối kháng, PGPR, quýt hồng.

MỞ ĐẦU

Trong những năm vừa qua, sản lượng và chất lượng quýt hồng (*Citrus Reticulata* Blanco) tại Lai Vung (Đồng Tháp) suy giảm nghiêm trọng. Một trong những nguyên nhân dẫn đến thực trạng trên là sự phát triển, lây lan của bệnh vàng lá thối rễ do nấm *Fusarium sp.* gây ra làm giảm năng suất và chất lượng sản phẩm quýt. Bắt đầu từ khoảng năm 2012, các vùng quýt hồng truyền thống xuất hiện bệnh lý như: vàng lá, thối rễ, héo xanh với tỷ lệ bệnh tăng dần qua các năm. Đến năm 2017, tình trạng bệnh tăng vọt cả về diện tích lẫn mức độ, lan sang giống quýt đường và cam soàn. Theo thống kê, toàn huyện có 5.372 ha cây có múi nhiễm bệnh nặng, trong đó có hơn 2.500 ha không cho năng suất, nhà vườn đã đốn bỏ 1.500 ha cây có múi các loại (Cục thống kê tỉnh Đồng Tháp, 2022). Một số nghiên cứu những năm gần đây đã có đề cập tới phân lập hệ PGPR trên riêng đối tượng cây quýt như: phòng trừ bệnh phấn trắng (Lê Thị Thanh Tâm *et al*., 2015); nghiên cứu hệ nấm*Trichoderma* để kiểm soát nấm gây bệnh *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Phytophthora*.. gây bệnh héo xanh, thối rễ trên cây có múi (Nguyễn Tiến Dũng *et al*., 2021); phân lập dòng vi khuẩn cố định đạm và tổng hợp IAA từ rễ cây quýt (Nguyễn Quốc Khương *et al*., 2021). Tuy nhiên, chưa tìm thấy nghiên cứu tập trung đề cập tới hiệu quả đối kháng nấm *Fusarium* gây bệnh vàng lá thối rễ trên cây quýt hồng từ hệ vi khuẩn vùng rễ thuộc chi *Bacillus* bản địa tại vùng Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp.

Ngày nay, trên thị trường đã phát triển nhiều dòng sản phẩm phân bón có hiệu quả trong việc khắc phục tình trạng bệnh lý do nấm *Fusarium sp.* gây ra cho giống cây ăn quả nói riêng và cây trồng nói chung. Tuy nhiên, các dòng phân bón hóa học trên thị trường còn nhiều hạn chế về hiệu quả khắc phục lâu dài cũng như tác động không mong muốn đối với môi trường và sức khỏe con người. Biện pháp kiểm soát sinh học được đánh giá hiệu quả trong việc kiểm soát nhiều bệnh hại trên cây trồng và góp phần nâng cao tính bền vững của hệ sinh thái nông nghiệp. Các loài *Fusarium* sp. phần lớn là các mầm bệnh tồn tại nhiều trong đất, do đó biện pháp kiểm soát mầm bệnh bằng hệ vi sinh vật vùng rễ (Plant Growth Promoting Rhizobacteria–PGPR) vùng rễ cho thấy tiềm

năng cao thông qua mối quan hệ cộng sinh, không ảnh hưởng hoặc gây hại cho cây trồng. Việc tăng cường hệ PGPR bản địa có lợi thông qua bổ sung chế phẩm sinh học giúp kích thích sinh trưởng cho cây, đối kháng trực tiếp với mầm bệnh, đồng thời kích thích tính kháng hệ thống ở cây trồng với sự hỗ trợ của nhiều hợp chất chuyển hoá từ vi khuẩn, từ đó kiểm soát, ngăn chặn sự phát triển của các mầm bệnh gây hại cho cây. Nghiên cứu được thực hiện với ba mục tiêu chính: (1) Phân lập được các chủng vi khuẩn vùng rễ bản địa trên cây quýt hồng có hoạt tính kháng nấm chống lại *Fusarium*, (2) Đánh giá được khả năng sản sinh một số enzyme thủy phân hỗ trợ phân hủy tế bào nấm bệnh của các chủng vi khuẩn phân lập, (3) Định danh phân loại chủng vi khuẩn đối kháng tiềm năng**.**

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Hóa chất và thiết bị

Hóa chất sử dụng trong thí nghiệm gồm: Môi trường TSB - Tryptone Soy Broth (Himedia): 17 g/L Tryptone; 3 g/L soya peptone; 5 g/L NaCl; 2,5 g/L dextrode (glucose); 2,5 g/L K_2HPO_4; điều chỉnh về pH 7,3±0,2; bổ sung thêm 20 g/L agar khi chuẩn bị môi trường đĩa thạch (TSA – Tryptone Soy Broth).

Thiết bị sử dụng: Tủ an toàn sinh học cấp II AC2-4E8 (ESCO, Nhật Bản), nồi hấp khử trùng HV-110 (Hirayama, Nhật Bản), máy lắc Innova 40R (Eppendorf, Đức), tủ ủ lạnh MIR-554-PE (PHCbi, Nhật Bản).

Nguyên liệu

Thu nhận mẫu đất trồng cây quýt hồng.

Chủng giống nấm *Fusarium* sp. được phân lập từ mẫu rễ cây quýt hồng bị bệnh tại huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp, sau đó được tiến hành gây nhiễm nhân tạo nhằm tái phân lập để xác định tác nhân gây bệnh. Kết quả phân lập như sau: xuất hiện tản nấm có sợi khô và mịn, ban đầu có màu trắng rồi chuyển dần sang màu cam đất nhạt sau 3 ngày nuôi cấy. Sau 6 ngày nuôi, đường kính khuẩn lạc nấm đạt 7,0 cm; khuẩn ty phân nhánh, có vách ngăn; bào tử nấm có hình dạng từ oval tới elip, thẳng hoặc hơi cong. Chủng giống nấm *Fusarium* sp. được lưu trữ tại Phòng Thí nghiệm Công nghệ sinh học Môi trường để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

Phương pháp

Sàng lọc hoạt tính đối kháng nấm bệnh của các chủng vi khuẩn

Khảo sát khả năng đối kháng nấm của vi khuẩn được tiến hành bằng phương pháp đồng nuôi cấy. Trong đó, đĩa petri chứa môi trường PDA được chia làm 4 phần bằng nhau, thỏi thạch (đường kính dài 5 mm) của chủng nấm được đặt vào tâm đĩa, dịch sinh khối vi khuẩn (10 µL) được cấy vào 3 giếng thạch (cách tâm khoảng 2 cm và phần còn lại là đối chứng. Mỗi thí nghiệm đều được lặp lại 3 lần. Sau 2 ngày ủ ở nhiệt độ 28°C, tiến hành quan sát sự hình thành vùng kháng nấm và tính hiệu suất ức chế nấm bệnh của vi khuẩn được tính theo công thức (Han *et al*., 2015): $H = (R – r)/ R \times 100$.

Trong đó, H: Hiệu suất ức chế (%), R: bán kính khuẩn lạc nấm ở phía đối diện vị trí đặt khoanh vi khuẩn, r: bán kính khuẩn lạc nấm ở phía đặt khoanh vi khuẩn.

Phương pháp kiểm tra khả năng tạo bào tử của vi khuẩn

Nhuộm với lục Fucshin Ziehl và xanh Methylene Loeffer theo phương pháp Ogietska (Nguyễn Lân Dũng, 2003). Quan sát tiêu bản trên kính hiển vi quang học với vật kính 100X. Tiêu bản nhuộm đúng sẽ quan sát được bào tử bắt màu xanh lục, tinh thể bắt màu hồng.

Định danh chủng vi khuẩn và xác lập mô hình tiến hóa dựa trên so sánh trình tự 16S rDNA

Vùng 16S rDNA được khuếch đại bằng PCR từ DNA tổng số với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). Sản phẩm PCR điện di trên gel agarose 1% và tinh sạch bằng bộ kit QiAquick (Qiagen, Đức) được sử dụng làm khuôn cho phản ứng giải trình tự trực tiếp với mồi 27F/1492R.

Trình tự nucleotide của các chủng được so sánh với các trình tự đã có trên Genbank, sử dụng công cụ BLAST trong NCBI (http:www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Cây tiến hóa được phân tích từ các mô hình trích xuất từ phần mềm Mega 7 và chúng được thực hiện với 1000 lần lặp lại để xác định giá trị bootstrap (Tamura K *et al*., 2011).

Xác định khả năng sinh tổng hợp enzym của chủng vi khuẩn

Khả năng sinh cellulase, protease, amylase và chitinase của chủng vi khuẩn được kiểm tra bằng cách bổ sung 1% cơ chất: CMC, casein, tinh bột và chitin vào môi trường thạch nước. Sau 24 giờ ủ ở 37ºC, đĩa nuôi cấy được nhuộm với thuốc thử congo đỏ 0,1% để xác định hoạt tính cellulase, lugol 1% để kiểm tra hoạt tính amylase và đo vòng phân giải đối với hoạt tính protease. Khả năng phân giải chitin được xác định bằng cách cấy vạch chủng vi khuẩn trên môi trường chitin agar chứa chitin từ vỏ tôm là nguồn duy nhất (0,3 g/L $MgSO_4.7H_2O$; 3 g/L $(NH_4)_2SO_4$; 1 g/L KH_2PO_4; 1 g/L Citric acid; 200 µL Tween 80; 4,5 g/L Colloidal chitin; 0,15 g/L Bromocresol purple; 15

g/L Agar; pH 4,7 ± 0,2). Đĩa nuôi cấy được ủ ở 37ºC trong 3 ngày. Chủng vi khuẩn được xác định là có khả năng sinh chitinase khi môi trường nuôi cấy chuyển sang màu tím (Bùi Thị Thanh *et al*., 2022). Sau đó, tiến hành xác định hoạt tính enzyme bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch (Shimizu M, 1992): Đường kính vòng phân giải được tính theo công thức: X=D – d. Trong đó: X - đường kính vòng phân giải (cm); D - đường kính vòng phân giải lớn (cm); d - đường kính lỗ thạch (cm). Kết quả đánh giá dựa theo: X ≥ 25mm: hoạt tính rất mạnh; X ≥ 20mm: hoạt tính mạnh; X ≥ 10mm: hoạt tính trung bình; X ≤ 10mm: hoạt tính yếu.

Khảo sát ảnh hưởng của đơn yếu tố đến mật độ và hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. của chủng vi khuẩn phân lập

Nhân nuôi sinh khối nấm *Fusarium* sp.: Nấm *Fusarium* sp. *được nhân nuôi* trên môi trường thạch PDA, ở nhiệt độ 28°C trong 2-3 ngày, đảm bảo kích thước tản nấm đạt bán kính 1,5 cm trước khi đưa vào thí nghiệm đối kháng.

Chuẩn bị sinh khối vi khuẩn *Bacillus* sp.: Chủng *Bacillus* sp. được chuyển từ ống giống vào erlen chứa 100 mL môi trường LB lỏng, pH=7 đã hấp khử trùng ở 121°C trong 15 phút. Nuôi trên máy lắc với tốc độ 200 vòng/phút trong 24 giờ. Bổ sung 10% dịch vi khuẩn đạt mật độ 10^9 CFU/mL vào 100mL môi trường LB khi thực hiện các thí nghiệm khảo sát ngưỡng tối ưu đối với các đơn yếu tố**.** Thay đổi lần lượt từng yếu tố, cố định các yếu tố còn lại, kết quả nghiên cứu của yếu tố trước sẽ được sử dụng trong nghiên cứu yếu tố tiếp theo.

Nguồn carbon bổ sung: Bổ sung các nguồn carbon (2 g/L) khác nhau theo từng nghiệm thức, bao gồm: lactose, manitol, tinh bột, glucose và đối chứng (không bổ sung nguồn carbon vào môi trường).

Yếu tố nhiệt độ: Điều chỉnh mức nhiệt khác nhau (t^o=20°C, t^o=30°C, t^o=34°C, t^o=37°C và t^o=45°C) theo từng nghiệm thức.

Yếu tố pH: điều chỉnh mức pH khác nhau (5, 6, 7, 8, 9) theo từng nghiệm thức.

Thời gian nuôi cấy trong 24 giờ, lắc 200 rpm và thu được dịch vi khuẩn. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần.

Chỉ tiêu theo dõi: Tăng trưởng sinh khối thông qua độ hấp thu Abs (OD_{600nm}) và hiệu suất kháng nấm *Fusarium* thông qua kích thước đối kháng của chủng vi khuẩn phân lập.

Phương pháp xử lý và phân tích số liệu

Số liệu được xử lý trên phần mềm Excel và xử lý thống kê bằng phần mềm R. Các nghiệm thức được lặp lại ba lần để tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn. Sự khác biệt có ý nghĩa giữa các mẫu thí nghiệm được xác định bằng phương pháp thống kê ANOVA, phân hạng LSD, Duncan với giá trị p < 0,05 được xem là sai khác có ý nghĩa.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân lập và định danh hình thái chủng vi khuẩn *Bacillus*

Từ các mẫu đất vùng rễ khu vực trồng quýt hồng tại huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp đã thu được đã phân lập được 6 chủng có đặc điểm hình thái tương đồng với chi *Bacillus* như: khuẩn lạc hình tròn, hoặc có bờ rìa răng cưa, phẳng hoặc đắp nổi, bề mặt nhẵn, mờ; màu sắc khuẩn lạc có thể là trắng đục hoặc vàng kem trên môi trường dinh dưỡng LB.

Bảng 1. Đặc điểm sinh lý, sinh hóa của chủng vi khuẩn phân lập

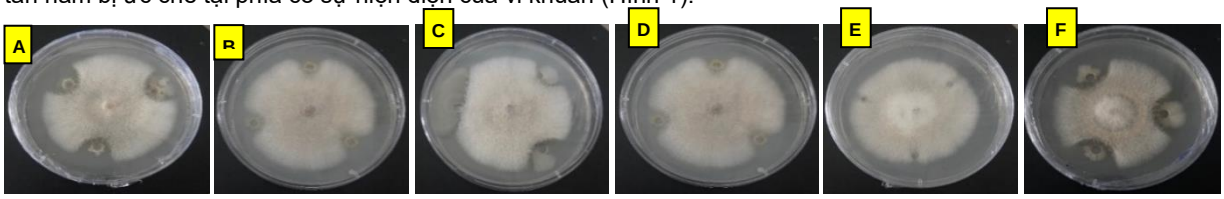
STT	Chủng	Kích thước (µm)	Khả năng di động	Khả năng sinh nội bào tử	Vị trí nội bào tử	Thử nghiệm Catalase	Thử nghiệm Oxydase
01	KL1	0,6 × 1,4	+	+	Giữa	+	+
02	KL2	0,5 × 1,2	+	+	Lệch tâm	+	+
03	KL3	0,6 × 1,8	+	+	Giữa	+	+
04	KL4	0,5 × 1,7	+	-	-	+	+
05	KL5	0,7 × 1,3	+	-	-	+	+
06	KL6	0,8 × 2,3	+	+	Giữa	+	+

Ghi chú: có: + không có: -

Khi quan sát bằng kính hiển vi quang học 100X ghi nhận tế bào vi khuẩn *Bacillus* có hình que, kích thước tế bào dao động trung bình từ 0,6–0,8 × 1,4–2,6 µm, gram dương, catalase và oxidase dương tính. Tất cả 6 chủng phân lập được đều cho thấy khả năng di động và có 4/6 chủng khả năng hình thành nội bào tử (KL1, KL2, KL3 và KL6); vị trí bào tử nằm giữa hoặc lệch tâm tế bào (Bảng 1). Những đặc điểm hình thái này tương đồng với mô tả về chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* sp. (Claus, Berkeley, 1986).

Khảo sát hoạt tính đối kháng nấm bệnh của các chủng vi khuẩn

Trong 6 chủng vi khuẩn được phân lập từ mẫu đất vùng rễ cây quýt hồng, có 5/6 chủng thể hiện khả năng ức chế sự phát triển của nấm *Fusarium* sp.. Các chủng vi khuẩn đối kháng đều phát triển nhanh và hình thành khuẩn lạc sau 72 giờ. Đa số khuẩn lạc có màu trắng sữa hoặc trắng ngà, hình dạng không đều chiếm đa số và phần lớn có dạng rìa chia thuỳ, gợn sóng hoặc răng cưa; bề mặt khô và láng. Các chủng vi khuẩn cho thấy sự phát triển của tản nấm bị ức chế tại phía có sự hiện diện của vi khuẩn (Hình 1).



Hình 1. Khả năng đối kháng nấm bệnh *Fusarium* sp. của các chủng vi khuẩn phân lập trên môi trường PDA

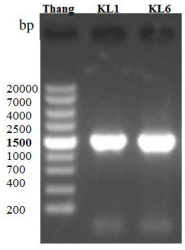
Chú thích: (A) Fusarium-KL1; (B) Fusarium-KL2; (C) Fusarium-KL3; (D) Fusarium-KL4; (E) Fusarium-KL5; (F) Fusarium-KL6

Hiệu lực đối kháng của 5/6 dòng vi khuẩn phân lập đối với nấm *Fusarium* sp. dao động từ 7,77 – 41,41% sau 4 ngày đồng nuôi cấy. Điều này cho thấy 5 dòng vi khuẩn phân lập được đều có khả năng đối kháng với nấm bệnh *Fusarium* sp.. Trong đó, dòng vi khuẩn KL6 có hiệu lực đối kháng cao nhất là 41,41 ± 2,47%, kế tiếp là chủng KL1 với hiệu suất đạt 40,77 ± 1,30% và dòng vi khuẩn KL4 có hiệu lực đối kháng thấp nhất là 7,77 ± 0,54%, riêng chủng KL5 không có dấu hiệu đối kháng với chủng nấm *Fusarium* sp. Từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 10 ngày nuôi cấy, hầu hết các dòng vi khuẩn vẫn duy trì được khả năng đối kháng nấm, đặc biệt là chủng KL6 có khả năng ức chế mạnh sự phát triển của nấm *Fusarium* sp. Theo kết quả nghiên cứu của Trần Thị Thu Thủy và đồng tác giả (2014) về đánh giá khả năng đối kháng của vi khuẩn *Bacillus* sp. đối với nấm *Fusarium moniliforme* gây bệnh trên lúa von tại khu vực đồng bằng sông Cửu Long cho thấy, có 6 chủng *Bacillus* được phân lập từ 285 mẫu bệnh có khả năng đối kháng tốt nhưng hoạt lực thay đổi tùy thuộc vào từng loài *Fusarium* ghi nhận.

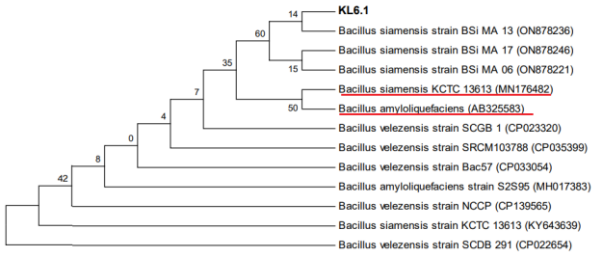
Định danh chủng vi khuẩn bằng phương pháp giải trình tự 16S rDNA

Trình tự 16S rDNA trên bộ gen được nhân bản bằng phương pháp PCR và chạy điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra kết quả (Hình 2). Kết quả cho thấy, sản phẩm PCR của chủng KL1 và KL6 đã thu nhận được có kích thước khoảng 1500 bp, tương đương kích thước đoạn 16S rDNA dự kiến.

Kết quả giải trình tự vùng 16S rDNA của dòng vi khuẩn KL6 và so sánh với các trình tự trong cơ sở dữ liệu GenBank của NCBI bằng công cụ BLAST cho thấy, chủng KL6 có độ tương đồng cao nhất với loài *Bacillus siamensis* KCTC 13613 (MN176482) và loài *Bacillus amyloliquefaciens* (AB32558) với độ tương đồng là 99,79%. Từ đó, cây phát sinh chủng loại của các loài *Bacillus* KL6 đã được xây dựng (Hình 3).



Hình 2. Hình ảnh điện di sản phẩm PCR của chủng KL1 và KL6 trên gel agarose 1%

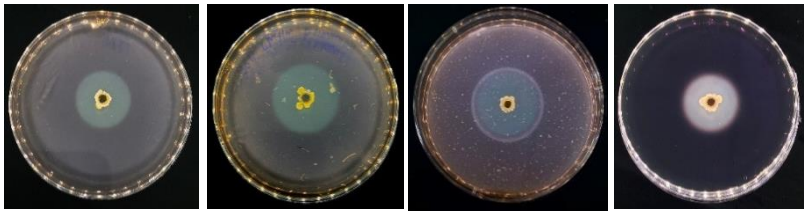


Hình 3. Cây phát sinh loài của chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. KL6

Tuy nhiên, các chủng *B. siamensis, B. amyloliquefaciens* có sự giao thoa rất cao về mặt di truyền, vì vậy kết quả định danh xác định chủng KL6 thuộc dòng *Bacillus* sp.. Chủng *Bacillus siamensis* đã được nhóm tác giả Lê Thị Thanh Tâm và đồng tác giả (2023) chứng minh có hiệu quả trong việc ức chế nấm bệnh *Fusarium* sp. gây bệnh thối rễ trên cây cà phê. Trong nghiên cứu của chúng tôi, chủng *Bacillus* sp. KL6 cũng có vai trò kiểm soát bệnh thối rễ trên cây quýt hồng tại Lai Vung (Đồng Tháp). Những kết quả này cho thấy rằng, *Bacillus* sp. là tác nhân kiểm soát sinh học tiềm năng và có thể được ứng dụng để kiểm soát mầm bệnh trong đất trồng, đặc biệt ở vùng rễ.

Kết quả đánh giá khả năng sinh tổng hợp enzyme của chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.

Theo Mishra và đồng tác giả (2020), chitinase, cellulase, protease và amylase là các enzyme quan trọng của các vi sinh vật sử dụng làm tác nhân kiểm soát sinh học bệnh, dịch hại cây trồng. Hoạt tính enzyme của chủng KL6 được thử nghiệm theo phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch chứa 1% cơ chất tương ứng là casein, tinh bột, CMC và chitin (Hình 4).



(a) Cellulase (b) Chitinase (c) Protease (d) Amylase

Hình 4. Khả năng sinh enzyme ngoại bào của vi khuẩn *Bacillus* sp.

Kết quả xác định *khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào của* vi khuẩn *Bacillus* sp. *KL6* sau 48 giờ *cho thấy, chủng KL6 có khả năng sinh enzyme ngoại bào rất mạnh (D–d >2,0 cm). Trong đó* khả năng sinh enzyme protease của chủng *Bacillus* sp. KL6 đạt giá trị cao nhất là 2,80 ± 0,35, kế tiếp là chitinase đạt 2,73 ± 0,05 cm; enzyme cellulase đạt 2,30 ± 0,10 cm và amylase đạt 2,25 ± 0,05 cm. Khả năng sản sinh các enzyme hoặc các hoạt chất kháng nấm phụ thuộc vào từng chủng vi khuẩn. Các enzyme thủy phân như chitinase, protease, cellulase, amylase... tham gia phá hủy cấu trúc của các hợp chất cao phân tử (chitin, protein, cellulose, hemicellulose...); phá vỡ thành tế bào của vi nấm, làm thay đổi cấu trúc, thành phần thế của chúng, từ đó ngăn chặn sự phát triển và hoạt động của nấm bệnh (Nguyễn Kim Nữ Thảo *et al*., 2022). Bên cạnh đó, sự tác động của nhiều cơ chế khác nhau có thể tăng cường khả năng đối kháng của các chủng vi khuẩn chống lại mầm bệnh (Nguyễn Thị Liên *et al*., 2023).

Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đến sinh trưởng và khả năng đối kháng với nấm *Fusarium sp.* của chủng vi khuẩn *Bacillus* sp.

Ảnh hưởng nguồn carbon bổ sung

Chủng *Bacillus* sp. KL6 được nuôi cấy trên môi trường có nguồn carbon thay thế (1%) gồm: lactose, maltose, tinh bột và glucose. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến sinh khối và hiệu suất đối kháng của chủng được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nguồn carbon đến sinh khối và hiệu suất đối kháng của *Bacillus* sp. KL6

Nghiệm thức	Giá trị OD_{600nm}		Hiệu suất đối kháng (H%)
	0h	24h	
NT1	0,02 ± 0,02	$0,804^{d}$ ± 0,02	$64,64^{c}$ ± 2,18
NT2		$1,83^{a}$ ± 0,05	$71,21^{a}$ ± 0,76
NT3		$1,53^{b}$ ± 0,06	$68,31^{ab}$ ± 2,10
NT4		$1,05^{c}$ ± 0,18	$65,24^{bc}$ ± 0,62
NT5		$1,63^{b}$ ± 0,02	$68,68^{a}$ ± 2,65
p-vaule		0,001	0,008

Chú thích: *NT1: Đối chứng; NT2: Glucose; NT3: Maltose; NT4: Tinh bột; NT5: Lactose.*

Ghi chú: Các giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trong cùng một cột cùng mẫu tự (a, b, c, d, e…) khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95 %, phân hạng LSD.

Kết quả cho thấy, việc bổ sung nguồn glucose vào môi trường nuôi cấy giúp vi khuẩn *Bacillus* sp. KL6 sinh trưởng và đạt hiệu suất đối kháng cao nhất: sinh khối đạt OD_{600nm} = 1,83 ± 0,05 sau 24 giờ và hiệu suất đối kháng với *Fusarium sp.* sau 4 ngày đạt 71,21±0,76%. Tiếp theo là lactose, sinh khối đạt OD_{600nm} = 1,63 ± 0,02 và hiệu suất đối kháng là 68,68±2,65%. Kết quả trên cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Phạm Tấn Việt và đồng tác giả (2019), tác giả kết luận glucose là nguồn carbon thích hợp cho khả năng sinh tổng hợp các hợp chất kháng *Fusarium* từ *B. subtilis* NN12. Nghiên cứu của Vijayaraghavan và đồng tác giả (2014) cũng ghi nhận, chủng *B. subtilis* nuôi cấy trong môi trường có bổ sung glucose (2 g/L) sẽ tăng hàm lượng các chất hoạt động bề mặt. *Ngoài ra, nghiên cứu của Bùi Thị Thanh* và đồng tác giả, (2023) cũng cho thấy, trong số bốn nguồn carbon, glucose cho hoạt tính enzyme cao nhất với 375 ± 5 FU/mL *đối với các chủng Bacillus.* Giá trị ở các nghiệm thức có sự khác biệt thống kê (p-value < 0,05).

Ảnh hưởng của nhiệt độ

Kết quả khảo sát mức độ ảnh hưởng của yếu tố pH đến sinh khối và hiệu suất đối kháng của chủng *Bacillus* sp. KL6 thể hiện qua Bảng 3 như sau:

Bảng 3. Ảnh hưởng của yếu tố pH đến sinh khối và hiệu suất đối kháng của chủng *Bacillus* sp. KL6

Nghiệm thức	Giá trị OD_{600nm}		Hiệu suất đối kháng (H%)
	0 giờ	24 giờ	
NT1	0,01 ± 0,007	$0,633^{c}$ ± 0,02	$54,22^{b}$ ± 0,39
NT2		$1,123^{b}$ ± 0,1	$55,30^{b}$ ± 1,31
NT3		$0,801^{c}$ ± 0,2	$56,66^{b}$ ± 1,03
NT4		**$1,857^{bc}$ ± 0,2**	**$60,5^{a}$ ± 2,66**
NT5		$1,08^{a}$ ± 0,4	$55,15^{c}$ ± 1,6
p-vaule		0,000	0,004

Chú thích: NT1: t^{o}= 20^{o}C; NT2: t^{o}= 30^{o}C; NT3 t^{o}= 34^{o}C; NT4: t^{o}= 37^{o}C, NT5: t^{o}= 45^{o}C.

Ghi chú: Các giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trong cùng một cột cùng mẫu tự (a, b, c, d, e…) khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95 %, phân hạng LSD.

Vi khuẩn *Bacillus* sp**.** KL6 thích hợp và phát triển tốt nhất ở nhiệt độ 37°C (OD_{600nm} = 1,857 ± 0,2) và hiệu suất đối kháng với nấm *Fusarium* sp. cao nhất, đạt 60,5% so với các điều kiện nhiệt độ còn lại. Các nghiên cứu trước đây cũng xác định được VK *Bacillus* H1, sinh trưởng thích hợp ở pH từ 6,5 – 7,5 và ở nhiệt độ 30 – 35°C (Nguyễn Thị Lan Phương, Đỗ Thu Hà, 2014). Giá trị ở các nghiệm thức có sự khác biệt thống kê (p-value < 0,05).

Ảnh hưởng của pH

Chủng *Bacillus* sp. KL6 tăng sinh trong môi trường LB được điều chỉnh pH ở các mức khác nhau (5, 6, 7, 8, 9) (Bảng 4).

Bảng 4. Ảnh hưởng của yếu tố pH đến sinh khối và hiệu suất đối kháng của *Bacillus* sp. KL6

Nghiệm thức	Giá trị OD_{600nm}		Hiệu suất đối kháng (H%)
	0h	24h	
NT1	0,022 ± 0,12	$0,46^{c}$ ± 0,05	$55,32^{b}$ ± 1,43
NT2		$0,75^{b}$ ± 0,15	$60,86^{a}$ ± 0,87
NT3		**$1,34^{a}$ ± 0,10**	**$61,16^{a}$ ± 1,07**
NT4		$0,84^{b}$ ± 0,14	$52,53^{c}$ ± 1,90
NT5		$0,40^{c}$ ± 0,06	$51,35^{c}$ ± 0,53
p-vaule		0,000	0,001

Chú thích: NT1: pH=5; NT2: pH=6; NT3: pH=7; NT 4: pH=8, NT5: pH=9.

Ghi chú: Các giá trị trong bảng là trung bình của 3 lần lặp lại. Các giá trị trong cùng một cột cùng mẫu tự (a, b, c, d, e…) khác biệt không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95 %, phân hạng LSD.

Nghiệm thức 3 (pH=7) đạt giá trị cao nhất về mức sinh trưởng sau 24 giờ nuôi cấy đạt (OD_{600nm} = 1,34 ± 0,10) cũng như hiệu suất đối kháng với nấm bệnh *Fusarium* sp. *đạt* 61,16%. Điều này chứng minh ở điều kiện tối ưu (pH từ 6–7) chủng *Bacillus* sp. KL6 cho sức sống và khả năng chịu đựng cao nhất. Trong điều kiện này, vi khuẩn phát triển mạnh và tăng nhanh về số lượng, đồng thời tăng hiệu quả đối kháng với nấm bệnh *Fusarium* sp.. Kết quả nghiên cứu cũng phù hợp với kết quả của tác giả Phan Tấn Việt và đồng tác giả (2022) ghi nhận về hoạt tính kháng nấm *Fusarium* sp. của dịch nuôi cấy vi khuẩn giảm mạnh khi pH môi trường tăng lên mức kiềm hóa pH=9 (27,5 ± 2,0%). Khoảng pH từ 6 đến 8 là giới hạn tối ưu để nuôi cấy *Bacillus* sp. nhằm tăng hiệu lực sinh tổng hợp các chất kháng nấm *Fusarium* sp.. Giá trị ở các nghiệm thức có sự khác biệt thống kê (p-value < 0,05).

KẾT LUẬN

Từ các mẫu đất trồng quýt hồng tại huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp đã tuyển chọn được 5/6 chủng vi khuẩn có khả năng đối kháng cao với nấm bệnh *Fusarium* sp.*,* dao động từ 7,77 – 41,41% sau 4 ngày đồng nuôi cấy. Trong đó, chủng KL6 có khả năng ức chế mạnh sự phát triển của nấm *Fusarium* sp. với hiệu lực đạt 41,41%. Mặt khác, xác định được chủng KL6 thuộc nhóm vi khuẩn *Bacillus* sp. bằng phương pháp giải trình tự 16S rDNA. Đồng thời, đánh giá khả năng sinh tổng hợp enzyme ngoại bào như chitinase, protease, cellulose và amylase. Trong đó, có hoạt tính protease và chitinase mạnh nhất với đường kính vòng phân giải lần lượt đạt 2,80 ± 0,35 và

2,73 ±0,06 cm. Đây chính là một cơ chế kháng nấm quan trọng của vi khuẩn. Chủng *Bacillus* sp. KL6 có khả năng sinh trưởng và đối kháng *Fusarium* sp. tốt trong điều kiện pH=7, nhiệt độ 37°C với nồng độ glucose bổ sung là 2 g/L. Từ đó, tạo cơ sở khoa học nhằm tiến hành một số thử nghiệm tiếp theo về tái lấy nhiễm và đánh giá hiệu quả ức chế một số loài nấm bệnh khác *Fusarium* gây hại trên cây quýt của chủng vi khuẩn phân lập.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bùi Thị Thanh, Phan Tuấn Anh, Nguyễn Lan Hương (2023). Khảo sát điều kiện nuôi cấy và nguồn dinh dưỡng ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp enzyme tiêu sợi huyết của chủng *Bacillus* sp. Es4. *Tạp chí Trường Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh*. Số 20(3): 479-490.

Cục Thống kê tỉnh Đồng Tháp (2016-2022). Niên giám thống kê. Phần Nông nghiệp.

Claus D, Berkeley R (1986). The genus Bacillus. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, & J. G. Holt (Eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology, DC: 1105-1139.

Han J H, Shim H, Shin J H, Kim K S (2015). Antagonistic activities of Bacillus spp. strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. The plant pathology journal, 31(2): 165.

Lê Thị Thanh Tâm, Phạm Thị Lương, Lê Thị Phương Thảo, Jennifer Jähne, Peter Lasch, Rainer Borriss (2023). Phân lập, tuyển chọn và xác định các chủng vi khuẩn bản địa có khả năng kích thích sinh trưởng và đối kháng chống lại nấm bệnh Fusarium oxysporumvà tuyến trùng nốt sưng Meloidogynesp. ở Việt Nam. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp*. Số chuyên đề: Trồng trọt 65(9)-9.2023.

Mishra P, Mishra J, Dwivedi S K, Arora N K (2020). Microbial Enzymes in Biocontrol of Phytopathogens. In book: Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries ed. by N.K. Arora.

Nguyễn Kim Nữ Thảo, Đinh Thị Ngọc Mai, Võ Hoài Hiếu, Lê Thị Hương, Phạm Thị Huệ, Ninh Thị Hạnh, Lê Vinh Hoa, Phạm Văn Quân, Nguyễn Hồng Minh (2022). Chọn lọc và nhận diện vi khuẩn đối kháng nấm bệnh gây hư hỏng quả dâu tây sau thu hoạch. *Tạp chí Kiểm nghiệm và An toàn thực phẩm*, tập 5, số 1-2022.

Nguyễn Lân Dũng (2003). *Giáo trình Vi sinh vật học*, NXB Giáo dục Việt Nam

Nguyễn Quốc Khương, Lý Ngọc Thanh Xuân, Trần Ngọc Hữu, Lưu Thị Yến Nhi, Nguyễn Hồng Huế, Trần Chí Nhân, Trần Hoài Ninh (2021). Phân lập, tuyển chọn, định danh vi khuẩn cố định đạm và tổng hợp IAA từ rễ cây quýt hồng (*Citrus reticulata* Blanco) trồng tại huyện Lai Vung, tỉnh Đồng Tháp. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*. Số 18: 21-28.

Nguyễn Tiến Dũng, Nguyễn Thị Thúy, Cao Thị Thu Dung, Quách Thị Hạnh, Nguyễn Thị Minh Trang, Nguyễn Thị Thu Hà, Phan Lệ Nga, Trần Phú Thắng,Trương Tuấn Oanh, Nguyễn Đức Thuận (2022). Nghiên cứu kỹ thuật sản xuất chế phẩm *Trichoderma* phòng trừ bệnh vàng lá - thối rễ trên cây có múi. *Tạp chí Khoa học và công nghệ Việt Nam* - Công nghệ sinh học trong nông nghiệp, thủy sản. Số 64(9)-9.2022.

Nguyễn Thị Lan Phương, Đỗ Thu Hà (2014). Xác định chủng vi khuẩn *Bacillus* sp. phân giải protein và thử nghiệm xử lý nước thải thủy sản". *Tạp chí Khoa học Và Công nghệ* - Đại học Đà Nẵng, số 11, 84.1.

Nguyễn Thị Liên, Nguyễn Thị Yến Như, Trần Thị Xuân Mai, Nguyễn Thị Pha (2016) Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn từ đất vùng rễ ớt có khả năng đối kháng với nấm *Colletotrichum* sp. gây bệnh thán thư trên ớt, *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. Số 47: 16-23.

Phạm Tấn Việt, Đinh Thị Ngọc Ngân, Lê Thị Ngọc Ly, Nguyễn Thị Kim Huệ, Lê Thị Vy Hiền, Nguyễn Thị Diệu Hạnh, Nguyễn Ngọc Ẩn (2020). Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy đến khả năng ức chế *Fusarium sp.*và *Fusarium equiseti* của *Bacillus subtilis NN12*. *Tạp chí Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm*, Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh.

Shimizu M (1992). Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. Biosci. Biotechnol. Biochem, 56(8): 1266-1269.

Tamura K (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, Molecular Biology and Evolution, 2011. 28(10): 2731-2739.

Trần Thị Thu Thủy, Lê Thị Mai Thảo, Tsutomu Arie, Tohru Teraoka (2014). Phân lập và đánh giá khả năng đối kháng của vi khuẩn *Bacillus* đối với nấm *Fusarium moniliforme* gây bệnh lúa von tại đồng bằng sông cửu long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. Số chuyên đề: Nông nghiệp (2014) (4): 204-211.

Vijayaraghavan P, Samuel G (2014). Statistical Optimization of Fibrinolytic Enzyme Production Using Agroresidues by Bacillus cereus IND1 and Its Thrombolytic Activity In Vitro. BioMed research international, 72:50-64.

ISOLATION AND SELECTION OF *Bacillus* sp. WITH ANTI-FUNGAL ACTIVITY AGAINST *Fusarium sp.*CAUSING THE DRY ROOT ROT DISEASE OF *Citrus Reticulate* Blanco IN LAI VUNG DISTRICT, DONG THAP PROVINCE

Pham Thi Ai Niem[1*], Nguyen Xuan Dong[1], Tran Tuan Anh[1], Vo Thi Minh Thao[1], Nguyen Minh Khanh[1], Nguyen Ngoc Phi[1], Tran Ngoc Quoc Tuong[1], Nguyen Le Huy Khanh[1], Phan Thi Hong Thanh[2], Nguyen Tu Minh[3]

[1]*Biotechnology Center of Ho Chi Minh City, Viet Nam*

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

[3]*University of Agriculture and Forestry, Hue University, Viet Nam*

SUMMARY

The yellowing leaf and root rot disease of the Mandarin tree (*Citrus Reticulata* Blanco) is caused by many pathogens, notably fungi of the genus *Fusarium*. The fungus can exist in the soil and when conditions are right, it will penetrate the roots of plants through wounds caused by insect bites or wounds created during human cultivation. The disease appears at many different stages of development of Tangerine trees and causes serious damage to the yield and commercial value the tree brings to us. The study was conducted to select the rhizosphere bacterial strains (PGPR) with inhibitory ability against *Fusarium sp.* and evaluate their antagonistic effectiveness. The antagonistic activity of bacteria against fungi was identified using the co-culture method. The results showed that five out of six isolated strains were able to inhibit the growth of *Fusarium sp.* fungus with an antagonistic effect of 7,7 – 41,41% after 4 days of co-culture. Strain KL6 with the highest growth inhibitory efficiency against Fusarium sp. was identified as belonging to the genus *Bacillus* sp. and it also had a very high similarity of 99,79% with *Bacillus siamensis* KCTC 13613 (MN176482) and *Bacillus amyloliquefaciens* (AB325583). The ability to biosynthesize chitinase, cellulase, protease and amylase of *Bacillus* sp. KL6 was evaluated under in vitro conditions, in which strain KL6 had the strongest protease and chitinase activity with the diameter of the degradation zone reaching 2,80 ± 0,35 and 2,73 ± 0,06 cm. Besides, surveying the optimal conditions for cultivating strain KL6 shows that it has good growth and resistance ability under pH=7, temperature reaches 37°C with additional glucose concentration of 2 g/L. This study highlights the potential of using the rhizosphere bacterium *Bacillus* as a biological control agent for mandarin cultivation.

Keywords: Bacillus siamensis, Fusarium oxysporum, Antagonistic performance, PGPR, *Citrus Reticulata Blanco*.

[*] Author for correspondence: Tel: +84-4-898208086; Email: ptaniem.snn@tphcm.gov.vn

NGHIÊN CỨU TÌNH TRẠNG VI KHUẨN KHÁNG KHÁNG SINH VÀ SỰ PHỔ BIẾN GEN KHÁNG KHÁNG SINH Ở MỘT SỐ AO NUÔI CÁ TRA TẠI CẦN THƠ VÀ ĐỒNG THÁP

Vũ Đặng Hải Long[1,2], Nguyễn Đăng Quang[2], Nguyễn Quang Huy[2*]

[1] Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội, Việt Nam

[2] MICH, Trường Đại học Khoa học và Công nghệ Hà Nội, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Hà Nội, Việt Nam

TÓM TẮT

Kháng kháng sinh (KKS) là một mối đe dọa nghiêm trọng đối với sức khỏe cộng đồng và môi trường, tác động trực tiếp đến thực hiện các mục tiêu phát triển bền vững của Liên Hợp Quốc. Có rất nhiều nghiên cứu về KKS trong lĩnh vực y tế, tuy nhiên nghiên cứu về KKS trong môi trường lại chưa được nghiên cứu ở Việt Nam. Sông Mekong, với vai trò quan trọng trong phát triển kinh tế và an ninh lương thực, đang đối mặt với sự ô nhiễm nghiêm trọng từ các hoạt động của con người. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm xác định tình trạng vi khuẩn KKS và sự phổ biến gen KKS tại một số ao nuôi cá tra ở Cần Thơ và Đồng Tháp. Tổng cộng 105 chủng vi khuẩn đã được định danh bằng phương pháp MALDI-TOF MS, trong đó xác định được 24 loài gây bệnh ở người và động vật, phổ biến nhất gồm *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae, Aeromonas hydrophila, Aeromonas caviae, Aeromonnas jandaei* và *Aeromonas veronii*. Các chủng vi khuẩn gây bệnh đã kháng với ít nhất một loại kháng sinh được thử nghiệm. Tỷ lệ KKS cao nhất đối với Amoxicillin-Clavulanic acid (64.3%), Cefepime (32.4%), Cefoxitin (55.4%), Azetronam (31.7%) và Ceftazidime (30%). Bên cạnh đó, các gen KKS gồm *Sul*1, *Sul*2, *Tet*M, *Tet*Q, *Tet*X và *bla*NDM đã được phát hiện ở tất cả các mẫu nghiên cứu (100%). Kết quả nghiên cứu này nhấn mạnh sự cần thiết của việc giám sát và quản lý chặt chẽ việc sử dụng kháng sinh trong nuôi thuỷ sản để giảm thiểu sự chọn lọc và lây lan vi khuẩn kháng thuốc trong môi trường sông và chuỗi thực phẩm, tiềm ẩn rủi ro sức khoẻ con người.

Từ khoá: Cá tra, Gen kháng thuốc, Kháng kháng sinh, Sông Mekong, Vi khuẩn gây bệnh.

MỞ ĐẦU

Sự xuất hiện và phổ biến của tình trạng kháng thuốc kháng sinh (KKS) đã trở thành mối đe dọa nghiêm trọng tới sức khỏe cộng đồng trên toàn thế giới. Ngày nay, hầu hết tất cả các nhóm kháng sinh cùng với nhiều loại vi khuẩn KKS và gen KKS đã được ghi nhận trong môi trường sông. *Enterobacteriaceae, Moraxellaceae, Pseudomonadaceae* và *Vibrionaceae* là những họ vi khuẩn thường gặp trong môi trường thủy sinh nhưng trong đó có nhiều loài là những tác nhân gây bệnh ở người và động vật (Rico *et al*., 2013). Đáng lưu ý, chúng vừa là vật chủ và có khả năng trao đổi, tiếp nhận gen KKS với nhau và với các loài khác (kể cả loài gây bệnh và không gây bệnh), dẫn đến bùng phát nhanh chóng các loài VK đa kháng thuốc (VKĐKT) (Van Boeckel *et al*., 2019).

Sông Mekong là con sông lớn nhất khu vực Đông Nam Á, lớn thứ 7 tại Châu Á và thứ 12 trên thế giới, là nguồn sống, là nơi lưu trú và nuôi dưỡng trên 100 triệu người (tương đương dân số cả Việt Nam) của 06 quốc gia gồm Trung Quốc, Mianmar, Thai Lan, Lào, Campuchia và Việt Nam. Các nghiên cứu từ Việt Nam cho thấy 70% kháng sinh được sử dụng thường xuyên trong hệ thống nuôi trồng thủy sản cùng loại và hoặc cùng nhóm kháng sinh sử dụng ở người, trong đó gồm cả những nhóm kháng sinh cực kỳ quan trọng, kháng sinh dự phòng trong điều trị. Do đó, sông Mekong có thể là một điểm nóng môi trường quan trọng, thúc đẩy sự chọn lọc và phát tán vi khuẩn KKS trên phạm vi rộng lớn của các quốc gia sông Mekong. Mục tiêu của nghiên cứu này là nhằm xác định thực trạng tình hình ô nhiễm vi khuẩn gây bệnh KKS và gen KKS tại khu vực nhánh sông Mekong (nơi cấp nước và thải nước cho ao nuôi cá tra) và trong ao nuôi cá tra ven bờ sông. Kết quả của nghiên cứu này sẽ góp phần cảnh báo, kiểm soát và đưa ra những biện pháp quản lý kịp thời góp phần giảm thiểu tối đa tác động đến cộng đồng.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Tổng cộng 17 mẫu nước và 17 mẫu bùn trầm tích đã được thu thập từ các ao nuôi cá tra tại Cần Thơ, Đồng Tháp và khu vực cấp nước/thải nước từ sông Mekong vào ao nuôi cá. Các mẫu nghiên cứu được bảo quản trong các thùng đá lạnh và được vận chuyển về phòng thí nghiệm cho các phân tích tiếp theo.

Phương pháp nghiên cứu

Phân lập và định dang các chủng vi khuẩn có khả năng gây bệnh

Đối với các mẫu nước, 30 mL nước được lọc qua màng lọc vô trùng kích thước 0.22 µL với sự hỗ trợ của bơm hút trân không. Sau đó, màng lọc được đặt trực tiếp lên bề mặt các đĩa môi trường chọn lọc Coliform CHROMAgar Orientation Medium (Merck, Đức) và Aeromonas (Merck, Đức). Đối với mẫu trầm tích, 10 g mẫu được trộn với 9 mL nước khử trùng, lắc đều trong 10 phút, sau đó thực hiện chuỗi pha loãng (10^0-10^4). Tại mỗi độ pha loãng, 100 µL dịch huyền phù sẽ được dàn trải trên bề mặt đĩa môi trường chọn lọc Coliform và Aeromonas. Các đĩa nuôi vi khuẩn được ủ ở điều kiện nhiệt độ 35^{o}C trong vòng 18 – 24h. Sau đó, các chủng vi khuẩn được phân lập, cấy ria trên môi trường chọn lọc tương ứng. Khuẩn lạc thuần được định danh bằng hệ thống MALDI-TOF MS (Bruker, Đức) sử dụng bộ kit IVD Matrix HCCA-portioned (Bruker, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Kháng sinh đồ

Vi khuẩn đã định danh được xác định kháng sinh đồ bằng phương pháp khuyếch tán trên đĩa môi trường Mueller Hinton Agar (MHA, Sigma, Đức) theo hướng dẫn M100 của Viện Tiêu chuẩn Lâm sàng và Phòng thí nghiệm (CLSI), Mỹ (CLSI 2020). Cụ thể, các loài vi khuẩn thuộc chi *Aeromonas* được xác định kháng sinh đồ với 18 loại kháng sinh và các loại vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* được xác định kháng sinh đồ với 12 loại kháng sinh (Bảng 1). Chủng vi khuẩn *Escherichia coli* ATCC 25922 được sử dụng cho tất cả các thí nghiệm làm đối chứng dương.

Bảng 1. Danh sách kháng sinh đồ của các loài vi khuẩn thuộc chi *Aeromonas* (A) và các loài vi khuẩn thuộc chi *Pseudomonas* (B)

A

Nhóm kháng sinh sử dụng cho loài vi khuẩn chi *Aeromonas*	Kháng sinh	Nồng độ	Ngưỡng đường kính vùng ức chế (mm)
Aminoglycoside	Amikacin	30 µg	S ≥ 17 R ≤ 14
	Tobramycin	10 µg	S ≥ 15 R ≤ 12
	Gentamicin	10 µg	S ≥ 15 R ≤ 12
Beta-lactam	Amoxicillin-clavulanate	20 µg + 10 µg	S ≥ 18 R ≤ 13
	Ticarcillin-clavulanate	75 µg + 10 µg	S ≥ 20 R ≤ 14
	Piperacillin-tazobactam	36 µg	S ≥ 21 R ≤ 17
Penicillin	Ticarcillin	75 µg	S ≥ 23, R ≤ 20
	Piperacillin	30 µg	S ≥ 21 R ≤ 17
Cephalosporin	Cefoxitin	30 µg	S ≥ 18 R ≤ 14
	Cefepime	30 µg	S ≥ 25 R ≤ 18
Carbapenems	Ertapenem	10 µg	S ≥ 22 R ≤ 18
	Imipenem	10 µg	S ≥ 23 R ≤ 19
Quinolone	Nalixidic acid	30 µg	S ≥ 19 R ≤ 13
	Ciprofloxacin	5 µg	S ≥ 26 R ≤ 21
	Levofloxacin	5 µg	S ≥ 21 R ≤ 16
Monobactam	Aztreonam	30 µg	S ≥ 21 R ≤ 17
Phosphonic acid	Fosfomycin	200 µg	S ≥ 16 R ≤ 12
Folate Pathway Antagonist	Trimethoprim-sulfamethoxazole	1.25 µg + 23.75 µg	S ≥ 16 R ≤ 10

B

Nhóm kháng sinh sử dụng cho loài vi khuẩn chi *Pseudomonas*	Kháng sinh	Nồng độ	Ngưỡng đường kính vùng ức chế (mm)
Carbapenems	Meropeneme	10 µg	S ≥ 18, R ≤ 14
	Imipenem	10 µg	S ≥ 23, R ≤ 19
Penicillin	Piperacillin	30 µg	S ≥ 14, R <14
	Ticarcillin	75 µg	S ≥ 23, R ≤ 20
	Ticarcillin-clavulanate	75 µg + 10 µg	S ≥ 20, R ≤14
	Piperacillin-tazobactam	36 µg	S ≥ 20, R < 20
Quinolone	Nalixidic acid	30 µg	S ≥ 19, R ≤13
	Ciprofloxacin	5 µg	S ≥ 26, R ≤21
	Levofloxacin	5 µg	S ≥ 21, R ≤16
Cephalosporin	Cefepime	30 µg	S ≥ 25, R ≤18
Monobactam	Aztreonam	30 µg	S ≥ 21, R ≤17
Aminoglycoside	Gentamicin	10 µg	S ≥ 15, R ≤ 12

S: Nhạy cảm với kháng sinh; R: Kháng với kháng sinh.

Sự đa dạng của kháng sinh được sử dụng cho phép nghiên cứu này có cái nhìn toàn diện về khả năng kháng thuốc của vi khuẩn đối với nhiều loại kháng sinh khác nhau, giúp xác định mức độ kháng kháng sinh một cách chi tiết hơn. Các kháng sinh được chọn đều có phổ kháng khuẩn rộng, bao gồm cả kháng sinh có tác dụng đối với cả vi khuẩn Gram âm và Gram dương. Ngoài ra, các kháng sinh này thường được sử dụng trong thực hành lâm sàng để điều trị các nhiễm trùng do vi khuẩn gây ra.

Trong ngành nuôi trồng thủy sản, việc sử dụng kháng sinh để phòng và trị bệnh cho cá là khá phổ biến. Những kháng sinh được chọn trong nghiên cứu này đều có khả năng đã được sử dụng trong thực tiễn nuôi trồng thủy sản, nên việc nghiên cứu sự kháng thuốc của vi khuẩn trong môi trường này sẽ cung cấp dữ liệu quan trọng để quản lý và kiểm soát sử dụng kháng sinh, giúp cung cấp dữ liệu toàn diện và hữu ích cho cả khoa học và ứng dụng thực tế.

Tách DNA tổng số

Một lít nước được lọc qua màng lọc 0.22 µM (500 mL/màng lọc) để thu nhận sinh khối vi khuẩn. DNA tổng số từ mẫu nước và trầm tích được tách chiết bằng bộ kit Dneasy PowerWater (Qiagen, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Nồng độ và độ tinh sạch DNA được xác định bằng NannoDrop ND-2000. DNA sau đó được làm khuôn nhân gen cho các nghiên cứu tiếp theo.

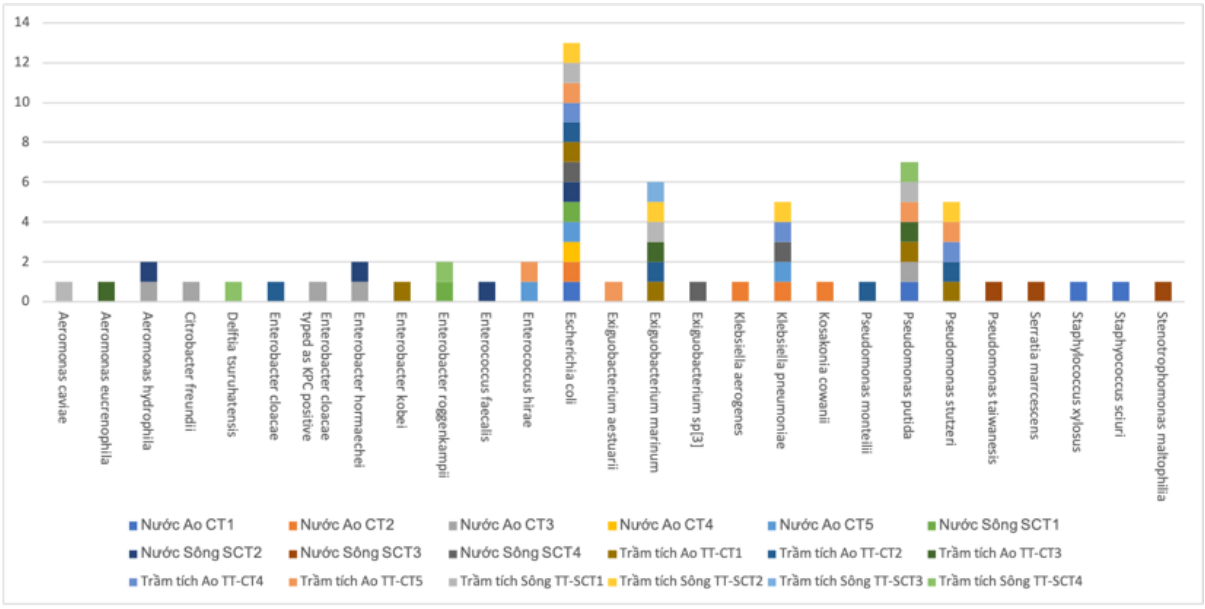
Xác định mật độ vi khuẩn và định lượng gen KKS

Tám (08) gen KKS thuộc nhóm 3 nhóm kháng sinh được sàng lọc bằng PCR gen đích gồm: Sulfonamide (*Sul1, Sul2*), Tetracycline (*TetQ, TetX, TetM*), Carbapenems (*blaKPC, blaNDM, blaVIM*). Thành phần phản ứng bao gồm hỗn hợp 10 µL Master mix qPCR, 7.2 µL H_2O, 0.4 µL primer (mỗi loại) và 2 µL DNA tổng số. Các thông số chu kỳ là 95^oC trong 2 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ 95 ^oC trong 30 giây, 52-60 ^oC (tuỳ thuộc vào nhiệt độ bắt cặp) trong 15 giây, 72 ^oC trong 10 phút. Trên hệ thống Realtime PCR Quanstudio 5 (Thermo, Mỹ).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

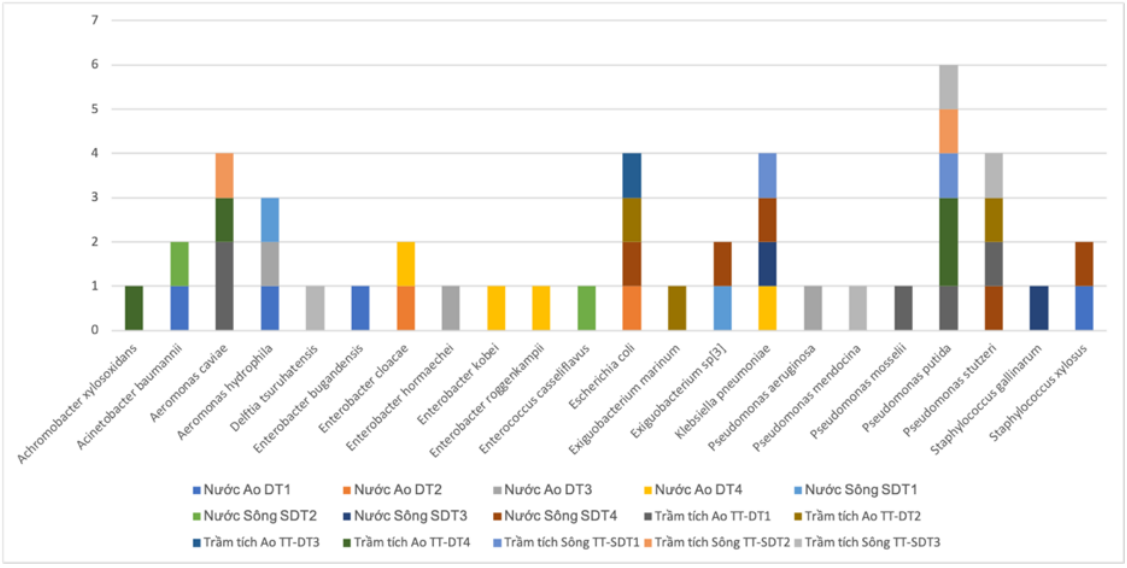
Xác định sự xuất hiện vi khuẩn gây bệnh trong ao nuôi cá tra và ở nhánh sông Mekong liền kề ao cá

Từ phân tích đặc điểm hình thái kiểu hình, tổng số 159 chủng vi khuẩn đã được phân lập từ các mẫu nước và trầm tích. Tuy nhiên, 105 chủng được định danh thành công trên hệ thống MALDI-TOF MS, trong khi 54 mẫu không thể xác định được. Hiện tại, hệ thống MALDI-TOF MS Biotyper (Bruker, Đức) đang phát triển thư viện gồm các chủng vi khuẩn gây bệnh với mục đích định danh nhanh các loài vi khuẩn gây bệnh, phục vụ trong lâm sàng, do đó cơ sở dữ liệu của hệ thống đối với định danh vi khuẩn môi trường còn hạn chế. Do đó, từ kết quả định danh đã xác định được 24 loài thuộc nhóm vi khuẩn gây bệnh ở người và động vật.



Hình 1. Phân bố của các vi khuẩn phân lập từ sông Mekong và ao cá tra tại Cần Thơ

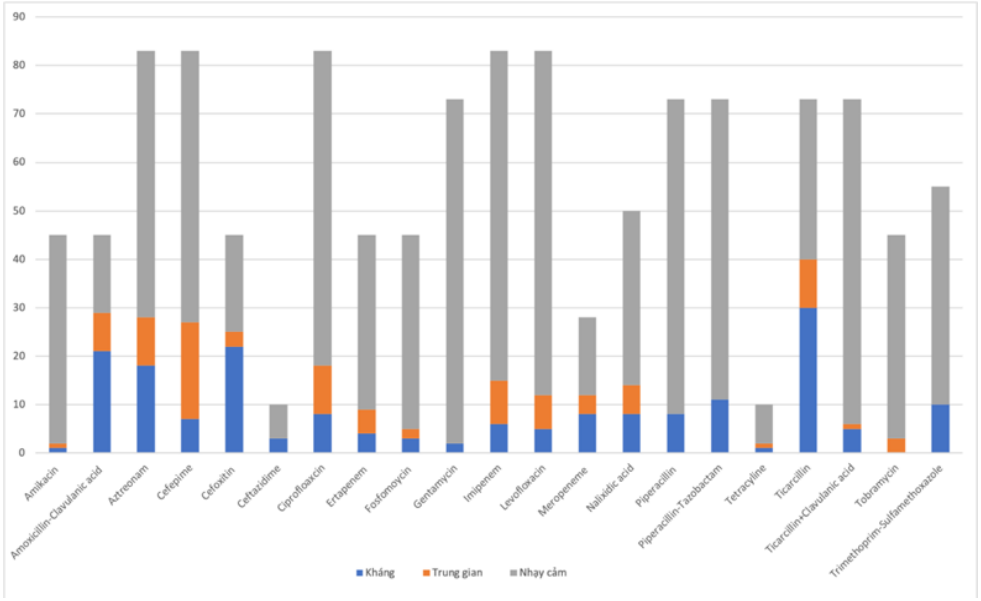
Tại Cần Thơ, 62 chủng được phân lập từ các mẫu nghiên cứu, trong đó gồm 29 chủng từ mẫu nước và 33 chủng từ mẫu trầm tích (Hình 1). 28 loài vi khuẩn đã được xác định, trong đó chiếm ưu thế nhất là nhóm vi khuẩn đường ruột *Enterobactericae* (n=10), tiếp theo là chi *Aeromonas* (n=3) và các loài vi khuẩn khác. *Escherichia coli* là loài phổ biến nhất được tìm thấy ở 13/17 (76.5%) mẫu nghiên cứu. Kết quả này cho thấy tỷ lệ nhiễm coliform trong ao cá tra và lưu vực sông Mekong ở mức rất cao. Một số loài vi khuẩn cũng xuất hiện phổ biến trong môi trường sông Mekong và ao nuôi cá tra gồm *Pseudomonas putida* (n=7), *Exguobacterium marium* (n=6) và *Pseudomonas stutzeri* (n=5). Trong khi đó, các loài vi khuẩn khác ít phổ biến hơn và được phân lập rãi rác từ các mẫu nghiên cứu. Tương tự, 43 chủng vi khuẩn được định danh phân lập từ các mẫu nước (n=24) và bùn trầm tích (n=19) tại Đồng Tháp (Hình 2). 22 loài vi khuẩn được xác định, trong đó vi khuẩn phổ biến nhất gồm *Pseudomonas putida* (n=6), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas caviae* và *Pseudomonas stutzeri* (n=4, mỗi loài). Như vậy có sự khác biệt giữa thành phần và tỷ lệ các chủng vi khuẩn phân lập được từ mẫu nghiên cứu ở Cần Thơ so với các mẫu nghiên cứu ở khu vực Đồng Tháp. Nhìn chung, các mẫu môi trường thu thập tại Cần Thơ có sự đa dạng vi khuẩn cao hơn trong cả mẫu nước và trầm tích so với Đồng Tháp.



Hình 2. Phân bố của các vi khuẩn được lấy từ mẫu nước và mẫu trầm tích tại tỉnh Đồng Tháp

Nghiên cứu này cho thấy có sự hiện diện của một số loài vi khuẩn gây bệnh ở người và động vật đang lưu hành trong nước sông Mekong và trong ao nuôi cá tra như *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae, Aeromonas hydrophila, Aeromonas caviae, Aeromonnas jandaei* và *Aeromonas veronii*. Các loài này có thể gây ra các bệnh nhiễm trùng đường tiêu hoá, nhiễm trùng da và mô mềm (Pineda-Reyes *et al*., 2024). Đáng lưu ý, sự xuất hiện của một số loài vi khuẩn như *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ở nhiều khu vực nghiên cứu tại Cần Thơ và Đồng Tháp cho thấy mức độ ô nhiễm coliform, vi khuẩn đường ruột ở mức cảnh báo.

Hiện trạng vi khuẩn gây bệnh kháng kháng sinh



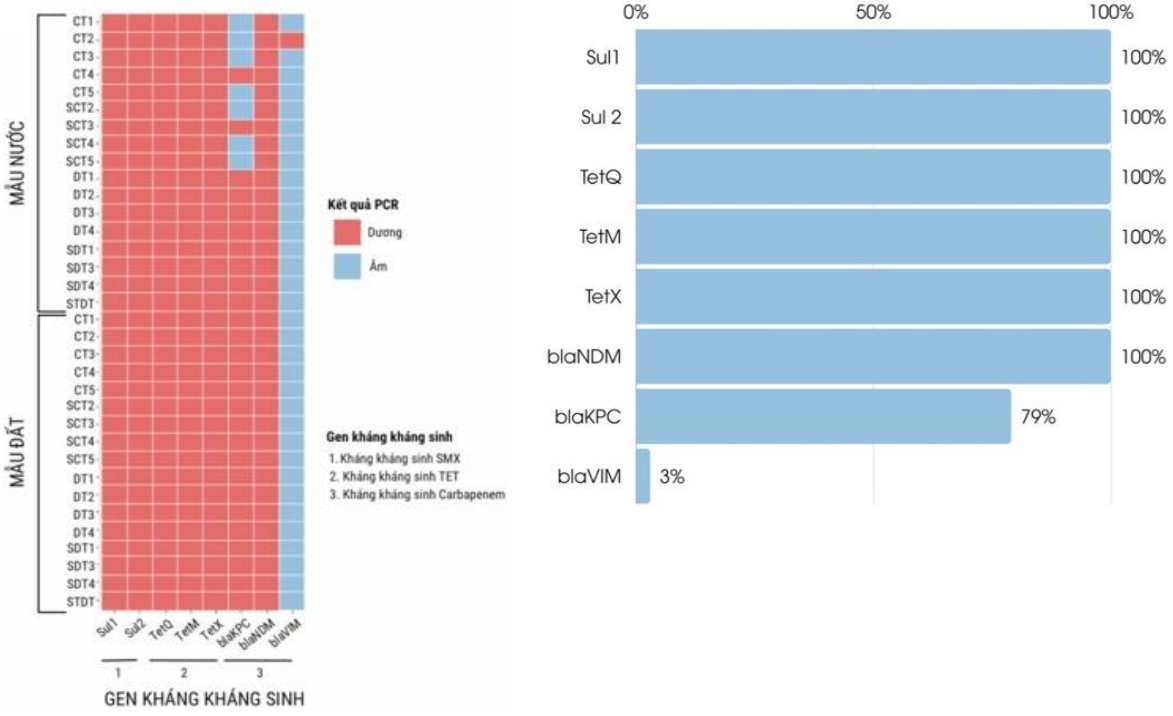
Hình 3. Tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh trong nước và trầm tích tại hai tỉnh Cần Thơ và Đồng Tháp

Nhìn chung, các chủng vi khuẩn kháng với ít nhất 1 loại kháng sinh với tỷ lệ KKS được xác định từ 4.4% đến 64.3%, tuỳ thuộc loại kháng sinh thử nghiệm (Hình 3). Cụ thể, kháng Amoxicillin-Clavulanic acid (64.3%) chiếm tỷ lệ cao nhất, tiếp theo là Cefepime (32.4%), Cefoxitin (55.4%), Azetronam (31.7%) và Ceftazidime (30%). Điều này cho thấy vi khuẩn trong ao nuôi cá và khu vực sông Mekong đã kháng với nhiều loại thuốc thường được sử dụng trong điều trị nhiễm khuẩn ở người và động vật (Paterson *et al*., 2004). Như vậy, việc sử dụng Cefoxitin, Amoxicillin-Clavulanic acid, và Ticarcillin trong nuôi trồng thuỷ hải sản có thể là nguyên nhân hàng đầu dẫn đến thúc đẩy và chọn lọc các vi khuẩn kháng thuốc trong môi trường ao nuôi cá và trong sông Mekong. Mặc dù vậy, vi khuẩn có tỷ lệ nhạy cảm rất cao đối với Gentamycin (97.26%), Amikacin (95.6%), và Tobramycin (93.33%), tiếp theo là Fosfomycin (88.89%), Levofloxacin (85.54%), Imipemen (81.92%), Ertapenem (80%) và Ciprofloxacin

(78.31%). Đây là các thuốc thuộc nhóm kháng sinh mạnh, thế hệ sau, nên tỷ lệ kháng thuốc còn thấp ở nhiều loài vi khuẩn gây bệnh. Những kết quả nghiên cứu này phù hợp với các nghiên cứu ở các khu nuôi thuỷ hải sản và ở các dòng sông trên thế giới, nơi mà tình trạng KKS đang gia tăng và diễn biến hết sức phức tạp, tiềm ẩn nguy cơ ảnh hưởng sức khoẻ người, động vật và hệ sinh thái thuỷ sinh.

Tỷ lệ và phân bố của gen KKS

Trong nghiên cứu này, các gen KKS gồm *Sul*1, *Sul*2, *Tet*M, *Tet*Q, *Tet*X và *bla*NDM đã được phát hiện ở tất cả các mẫu nghiên cứu (100%) (Hình 4). Trong khi đó, gen *bla*KPC được phát hiện trong 27/34 (79%) mẫu nghiên cứu, và xuất hiện ở toàn bộ mẫu thu thập tại Đồng Tháp. Tuy nhiên, tỷ lệ phá hiện gen *bla*VIM rất thấp (3%), được tìm thấy duy nhất ở một mẫu nước thu thập tại Cần Thơ. Các nghiên cứu trước đây chủ yếu báo cáo sự xuất hiện của các gen KKS phổ biến như *Sul*1, *Sul*2, *Tet*A… Trong khi đó khá ít nghiên cứu xác định được sự có mặt của các gen *Tet*M, *Tet*Q, *Tet*X và *bla*NDM trong môi trường thuỷ sản và trong các dòng sông. Điều này cho thấy diễn biến KKS trong lưu vực sông Mekong đang diễn ra hết sức phức tạp. Tỷ lệ xuất hiện gen KKS rất cao và phân bố ở hầu hết các khu vực nghiên cứu cho thấy nguy cơ phát tán và lây truyền nhanh các gen KKS trong hệ sinh thái này.



Hình 4. Tỷ lệ và phân bố gen KKS trong môi trường ao nuôi cá và trong sông Mekong

KẾT LUẬN

Mặc dù tỷ lệ vi khuẩn gây bệnh KKS trong ao nuôi cá tra và trong sông Mekong còn thấp, tuy nhiên đã phát hiện được những chủng vi khuẩn kháng với một số kháng sinh dự phòng, kháng sinh mạnh dùng trong điều trị lâm sàng như Carbapenems (Imipenem, Etarpenem), Levofloxacin. Bên cạnh đó, tỷ lệ rất cao (100%) và sự phân bố rộng của gen KKS nhất là *bla*NDM, *Tet*M và *Tet*Q sẽ thúc đẩy quá trình trao đổi gen ngang làm bùng phát nhanh chóng các chủng vi khuẩn KKS. Kết quả này nhấn mạnh sự cần thiết của việc giám sát và quản lý chặt chẽ việc sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thuỷ hải sản để hạn chế việc chọn lọc và lây nhiễm các chủng vi khuẩn gây bệnh KKS dự phòng tới người dân thông qua tiếp xúc trực tiếp với môi trường sông và chuỗi thức ăn.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu này được tài trợ bởi Dự án MOHIP – Đại Học Michigan – Mỹ và Chương trình phát triển Nhóm nghiên cứu tiềm năng của USTH giai đoạn 2024 – 2026 dành cho Nhóm nghiên cứu MICH.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Giebel R, Worden C, Rust SM, et al. (2010). Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. Advances in Applied Microbiology, 71: 149-184.

Karungamye P, Rugaika A, Mtei K, Machunda R. (2023). Antibiotic resistance patterns of Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Pseudomonas aeruginosa isolated from hospital wastewater. Applied Microbiology, 3(3): 867-882.

Neu HC. (1992). The crisis in antibiotic resistance. Science, 257(5073): 1064-1073.

Paterson DL, Bonomo RA. (2004). Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clinical Microbiology Reviews, 17(4): 657-686.

Pineda-Reyes R, Neil BH, Orndorff J, Williams-Bouyer N, Netherland M, Hasan NA, Tahashilder MI, Sha J, Chopra AK, Reynoso D. (2024). Clinical presentation, antimicrobial resistance, and treatment outcomes of Aeromonas human infections: A 14-year retrospective study and comparative genomics of 2 isolates from fatal cases. Clinical Infectious Diseases, 2024, ciae272.

Rico A, Tran M P, Satapornvanit K, Min J, Shahabuddin A M, Henriksson P J G, Murray F J, Little D C, Dalsgaard A, Brink P JV D (2013). Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. Aquaculture, 412-413: 231-243.

Van Boeckel TP, Pires J, Silvester R, Zhao C, Song J, Criscuolo N G, Gibert M, Bonhoeffer S, Laxminarayan R (2019). Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. Science, 365(6459).

STUDY ON ANTIBIOTIC RESISTANT BACTERIA AND ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES IN SOME PANGASIUS PONDS IN CAN THO AND DONG THAP

Vu Dang Hai Long[1,2], Nguyen Dang Quang[2], Nguyen Quang Huy[2*]

[1] Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam

[2]MICH University of Science and Technology of Hanoi, Vietnam Academy of Science and Technology, Hanoi, Vietnam

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) is a serious threat to public health and the environment, directly impacting the implementation of the United Nations' sustainable development goals. Many studies on AMR in the medical area have been conducted, nevertheless research on AMR in the environment has not been well studied in Vietnam. The Mekong River, with its important role in economic development and food security, is facing serious pollution from human activities. The objective of this study is to determine antibiotic-resistant bacteria and the prevalence of antibiotic resistant genes in some *Pangasius* ponds in Can Tho and Dong Thap provinces. A total of 105 bacterial strains were identified using the MALDI-TOF MS method, of which 24 species that cause disease in humans and animals were identified. The most common bacterial species include *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae, Aeromonas hydrophila, Aeromonas caviae, Aeromonnas jandaei* and *Aeromonas veronii*. The pathogenic bacterial strains were resistant to at least one tested antibiotic. The proportion of antibiotic resistance was highest for Amoxicillin-Clavulanic acid (64.3%), Cefepime (32.4%), Cefoxitin (55.4%), Azetronam (31.7%) and Ceftazidime (30%). In addition, antibiotic-resistant genes including *Sul1, Sul2, TetM, TetQ, TetX* and *blaNDM* were detected in all research samples (100%). Our findings highlight the need for strict monitoring and management of antibiotic use in aquaculture to minimize the selection and spread of drug-resistant bacteria in river ecosystems and the food chain which could pose potential risks to human health.

Keywords: Antibiotic resistance, Antibiotic-resistant bacteria, Antibiotic resistant genes, Pangasius, Mekong river.

[*] Corresponding author: Tel: +84-2432121576; Email: nguyen-quang.huy@usth.edu.vn

XÁC ĐỊNH SỰ HIỆN DIỆN CỦA *SALMONELLA* VÀ GEN ĐỘC TỐ ĐƯỜNG RUỘT (*Stn*) PHÂN LẬP TỪ TRỨNG GÀ

Nguyễn Thị Đông Phương[1], Đặng Ngọc Phương Uyên[1], Tạ Đặng Ý Vi[2], Huỳnh Văn Chương[2*]

[1]Bộ môn Công nghệ Thực phẩm - Khoa Hóa – Trường Đại học Bách khoa, Đại học Đà Nẵng

[2] Phòng Thí nghiệm Miễn dịch học và Vắc xin - Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

TÓM TẮT

Trứng gà là loại thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao, được tiêu thụ rộng rãi bởi các lứa tuổi và cũng là loại thực phẩm có nguy cơ gây ngộ độc thực phẩm do tác nhân xâm nhiễm chủ yếu là các loài *Salmonella* spp.. Trong nghiên cứu này, 60 mẫu trứng gà được thu thập từ một số địa điểm trong chuỗi cung ứng trứng tại thành phố Huế để kiểm tra sự có mặt của *Salmonella* trên vỏ trứng, lòng trắng và lòng đỏ. Kết quả cho thấy tỷ lệ nhiễm *Salmonella* ở vỏ trứng trung bình là 58%, đặc biệt là, các mẫu trứng thu thập tại các nông hộ và tại nhà phân phối cho tỷ lệ nhiễm đến 80%. Tỷ lệ nhiễm khuẩn ở lòng trắng trứng và lòng đỏ trứng lần lượt là 23% và 25%. Điều này cho thấy các chủng *Salmonella* có thể xâm nhiễm từ gà mái bị bệnh hoặc từ vỏ trứng đi vào bên trong lòng trắng và lòng đỏ trứng. Ngoài ra, các chủng *Salmonella* phân lập được từ các mẫu trứng đều mang gene *Stn* quy định yếu tốc độc lực ảnh hưởng đến sức khỏe của con người.

Từ khóa: Chuỗi cung ứng trứng, gene *Stn*, *Salmonella*, trứng gà, yếu tố độc lực.

MỞ ĐẦU

Trứng gà là một trong những loại thực phẩm được tiêu thụ rộng rãi trên khắp thế giới. Thành phần của trứng gồm 32-35% lòng đỏ, 52-58% lòng trắng và 9-14% vỏ trứng. Trứng chứa đầy đủ các thành phần dinh dưỡng với tỷ lệ cân đối chất đạm, chất béo, vitamin và khoáng chất, đồng thời cung cấp một lượng calo vừa phải (khoảng 150 kcal/100 g). Do đó, trứng được xem là nguồn dinh dưỡng bổ sung trong chế độ ăn uống cho mọi lứa tuổi (Miranda *et al*., 2015). Tuy là một loại thực phẩm giàu dưỡng chất và có lợi cho sức khỏe nhưng trứng lại nằm trong nhóm có nguy cơ cao gây ngộ độc thực phẩm, đặc biệt là do sự xâm nhập và phát triển của các mầm bệnh thực phẩm, trong số đó phổ biến nhất là các loài vi khuẩn *Salmonella* (Rahman *et al*., 2019).

Salmonella thuộc họ vi khuẩn Enterobactriaceae (vi khuẩn đường ruột) có dạng hình que, thuộc nhóm trực khuẩn gram âm, kị khí tùy nghi, không sinh bào tử, có khả năng di động nhờ tiên mao và sinh sống chủ yếu trong đường ruột. Ở trứng, *Salmonella* lây nhiễm vào bên trong lòng trắng và lòng đỏ trứng theo hai con đường là lây nhiễm theo chiều ngang và theo chiều dọc. Trong quá trình xâm nhiễm theo chiều ngang, mầm bệnh từ ruột bị nhiễm khuẩn hoặc từ phân bị nhiễm khuẩn xâm nhập vào bên trong qua bề mặt của vỏ trứng, trong khi xâm nhiễm theo chiều dọc là do nhiễm khuẩn trực tiếp vào lòng đỏ, lòng trắng, màng vỏ trứng hoặc vỏ trứng từ cơ quan sinh sản của gà bị nhiễm bệnh khi trứng đang hình thành (Gantois *et al*., 2009). Hiện nay, tình trạng ngộ độc thực phẩm diễn ra ngày càng thường xuyên hơn dẫn đến mối quan tâm của người tiêu dùng đến các chỉ tiêu an toàn thực phẩm càng lớn. *Salmonella* là chỉ tiêu được đặc biệt được chú ý vì khả năng gây bệnh cho người qua con đường thực phẩm. Khi xâm nhập vào cơ thể con người, chúng có khả năng gây ra nhiều bệnh nguy hiểm như sốt phó thương hàn, nhiễm khuẩn huyết, viêm đại tràng và nhiễm trùng khu trú (Rahman *et al*., 2019). Nhiều vụ ngộ độc nghiêm trọng có thể dẫn đến tử vong có nguyên nhân bắt nguồn từ thực phẩm nhiễm *Salmonella* (El-Saadony *et al*., 2022). Theo các yêu cầu về vệ sinh an toàn thực phẩm của hầu hết các nước trên thế giới và tại Việt Nam đều không cho phép sự có mặt của *Salmonella* trong 25 g hoặc 25 mL trứng hoặc các sản phẩm thực phẩm có nguồn gốc từ trứng (EC, 2007; QCVN, 2012). Cùng với điều kiện tự nhiên đặc thù khí hậu nhiệt đới ẩm, quy trình sản xuất đảm bảo từ trang trại đến bàn ăn của Việt Nam còn thô sơ, thiếu tính nhất quán càng làm tăng nguy cơ lây nhiễm *Salmonella* gây mất an toàn vệ sinh thực phẩm cho người sử dụng. Hiện nay, có ít tài liệu nghiên cứu thống kê về mức độ lây nhiễm *Salmonella* trên trứng tại các địa phương hoặc trên quy mô toàn quốc. Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục đích làm rõ tỷ lệ nhiễm *Salmonella* trên vỏ trứng gà và các thành phần của trứng gà được thu thập tại một số cơ sở cung cấp trứng ở địa bàn thành phố Huế, ngoài ra còn sử dụng kỹ thuật PCR để xác định yếu tố độc lực gây rối loạn đường ruột được quy định gene *Stn* của vi khuẩn *Salmonella* phân lập được để đánh giá rõ hơn về nguy cơ lây nhiễm gây ảnh hưởng đến sức khỏe người tiêu dùng.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên vật liệu

Tổng số 60 mẫu trứng gà được thu thập từ tháng 6-10 năm 2022 tại một số trang trại, hộ chăn nuôi, nhà cung cấp trứng, các chợ và siêu thị thuộc địa bàn thành phố Huế (bảng 2). Sử dụng găng tay vô trùng để lấy mẫu trứng và chuyển trứng vào túi zip vô trùng, ghi lại thời gian, địa điểm, ký hiệu mẫu… Mẫu sau khi lấy được cho vào thùng giấy có lót giấy tránh sự va chạm làm nứt vỏ trứng. Sau đó được vận chuyển nhanh về phòng thí nghiệm Miễn dịch học và vaccine- Viện Công nghệ Sinh Học, Đại Học Huế để tiến hành phân tích trong 24-48 giờ.

Nuôi cấy và phân lập *Salmonella*

Trứng gà được xử lý lần lượt để thu các mẫu vi khuẩn từ vỏ trứng, lòng trắng và lòng đỏ trứng. Đối với vỏ trứng, dùng gạc vô trùng tẩm môi trường tăng sinh không chọn lọc LB (Luria Bertani Broth, Himedia) lau xung quanh vỏ trứng rồi cho vào ống nghiệm chứa 9 mL môi trường LB lỏng. Đối với lòng trứng, tiến hành khử trùng vỏ trứng bằng cồn 70%, dùng dao vô trùng tách vỏ trứng, tách cẩn thận lòng trắng và lòng đỏ trứng riêng cho vào các cốc vô trùng. Tiến hành khuấy đều bằng đũa thủy tinh vô trùng để đồng hóa mẫu. Dùng pipet hút 1 mL mẫu đã được đồng hóa cho vào các ống nghiệm chứa 9 mL môi trường LB lỏng. Lắc đều các ống nghiệm rồi tiến hành nuôi tiền tăng sinh trong tủ ấm ở 37^{o}C trong 24 giờ**.**

Sau 24 giờ, các mẫu đã tiền tăng sinh được chuyển sang giai đoạn tăng sinh trong môi trường tăng sinh chọn lọc RV (Rappaport Vassiliadis, Himedia MH1491) và tiếp tục nuôi trong tủ ấm ở 37^{o}C trong 24 giờ với mục đích ức chế sự sinh trưởng các nhóm vi khuẩn khác tạo thuận lợi cho sự phân lập *Salmonella* (Rahman *et al*., 2019). Sau khi tăng sinh, tiến hành phân lập *Salmonella* spp. trên môi trường chọn lọc là HiCrome™ Improved *Salmonella* Agar (Himedia, India). Nhờ vào môi trường có sử dụng chất tạo màu và thuốc nhuộm chỉ thị giúp dễ dàng nhận dạng và phân biệt các loài *Salmonella*. Hầu hết khuẩn lạc *Salmonella* sinh trưởng trong môi trường này có màu hồng đến đỏ (Al-Wasify *et al*., 2011). Các khuẩn lạc *Salmonella* giả định được cấy chuyền và sử dụng một số phản ứng hóa sinh thích hợp để khẳng định chúng thuộc *Salmonella* spp. Lựa chọn 3-4 khuẩn lạc trên đĩa thạch, tiến hành các phản ứng sinh hóa bao gồm nuôi cấy trên môi trường TSI, phản ứng indol, urea, phản ứng methyl red, Voges-Proskauer, citrate, motility, coagulase catalase, oxidase và các loại đường (TCVN 10780-1:2017).

Xác định yếu tố độc lực bằng phản ứng PCR

Tách chiết DNA

Trước khi tiến hành tách chiết, đối với mỗi mẫu, lấy một khuẩn lạc ngẫu nhiên từ 3-4 khuẩn lạc đã khẳng định thuộc *Salmonella* spp. bằng các thử nghiệm hóa sinh đem nuôi tăng sinh trong ống nghiệm chứa 5 mL môi trường LB ở 37^{o}C trong 24 h. Sau đó thực hiện ly tâm ở tốc độ 5.000 vòng/phút trong 5 phút. Loại bỏ phần dịch nổi và rửa vi khuẩn hai lần bằng dung dịch đệm PBS (Phosphate Buffered Saline), đảo trộn và hút cho vào eppendorf 1,5 mL. Sử dụng phương pháp tách chiết bằng kit tách chiết Food DNA Extraction ViSiKit (Visitech). Mẫu đã tách chiết DNA được sử dụng ngay hoặc bảo quản ngay ở -20^{o}C.

Thăm dò gene Stn (độc tố đường ruột)

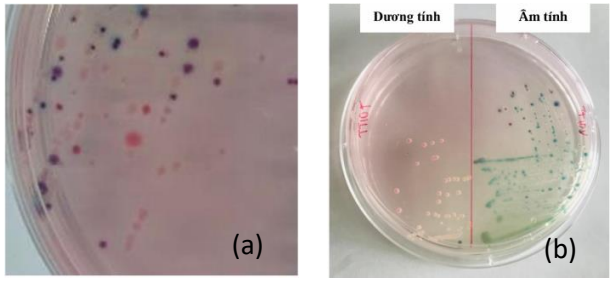
Cặp mồi sử dụng để xác định gene *Stn* (Mã hóa khả năng sản sinh độc tố đường ruột của vi khuẩn *Salmonella*) có trình tự là F-CTTTGGTCGTAAAATAAGGCG và R-TGCCCAAAGCAGAGAGATTC. Ứng dụng kỹ thuật PCR theo Chaudhary và đồng tác giả (2015) để xác định gene mã hóa *Stn* của DNA đã tách chiết từ các vi khuẩn *Salmonella* phân lập được.

Chuẩn bị mỗi mẫu phản ứng có thể tích 25 µL bao gồm 12,5 µL PCR Master Mix (2X), 1 mỗi loại primer (3,2 µM /µL), 2 µL mỗi loại DNA sử dụng, nước cất vừa đủ 25 µL cho một phản ứng. Tiến hành phản ứng trong máy PCR theo các giai đoạn: tiền biến ở 94^{o}C/ 1 phút và 35 chu kỳ nhiệt (biến tính 94^{o}C/1 phút, ủ bắt cặp mồi trong 30 s, kéo dài 72^{o}C/1 phút), và kéo dài cuối cùng ở 72^{o}C/7 phút. Chạy điện di sản phẩm PCR: sản phẩm PCR (gene *Stn*) thu được sau chu trình phản ứng được nhuộm với chất nhuộm nhỏ mẫu (6X Gelgreen), trộn vào mẫu theo tỉ lệ 1:5. Sau khi nhuộm sản phẩm PCR được chạy điện di trên Gel Agarose 2% trong dung dịch đệm TAE (Tris-Acetate EDTA) với hiệu điện thế 60 V trong 30 phút. Đọc kết quả bằng cách quan sát dưới đèn UV (300 nm) và chụp ảnh. Kích thước các băng DNA được so với DNA chuẩn (DNA marker).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* ở vỏ trứng gà

Để đánh giá mức độ ô nhiễm *Salmonella* trên trứng gà tại một số địa điểm được lựa chọn ngẫu nhiên trong chuỗi cung ứng trứng trên địa bàn thành phố Huế, chúng tôi đã tiến hành thu thập 60 quả trứng gà từ 2 trang trại, 2 nông hộ, 4 chợ, 2 nhà phân phối và 2 siêu thị để kiểm tra sự xuất hiện của *Salmonella* spp. trên bề mặt vỏ trứng, lòng trắng và lòng đỏ trứng theo trình tự nuôi cấy và phân lập *Salmonella* đã nêu. Đối với môi trường HiCrome™ Improved Salmonella Agar dựa trên việc sử dụng propylene glycol, natri deoxycholate ức chế vi khuẩn gram dương và sự có mặt của chất chỉ thị tạo màu, thuốc nhuộm chỉ thị để nhận dạng và phân biệt các loài *Salmonella*.



Hình 1. Nuôi cấy phân lập (a) và tăng sinh chọn lọc (b) *Salmonella* trên môi trường HiCrome™Improved *Salmonella* Agar

Tất cả các loài *Salmonella* được phân lập từ thực phẩm hoặc mẫu lâm sàng đều có khuẩn lạc màu hồng đến đỏ một số ít chủng có khuẩn lạc không màu. Trong khi vi khuẩn *E. coli* có màu từ xanh lam đến tím đặc trưng do có mặt enzyme đặc hiệu cho chất nền tạo màu (hình 1a). Quan sát hình thái khuẩn lạc khi cấy ria vi khuẩn đã được nuôi tăng sinh từ các mẫu thu thập được, những mẫu xuất hiện khuẩn lạc màu trắng, hồng đến đỏ là những mẫu nghi ngờ dương tính với *Salmonella*, nuôi tăng sinh các khuẩn lạc trên để tiến hành kiểm tra sinh hóa. Ngược lại với các mẫu chỉ xuất hiện các khuẩn lạc xanh hoặc tím, hoặc không xuất hiện khuẩn lạc nào khi cấy ria lên đĩa thạch HiCrome^{TM} Improved *Salmonella* Agar thì được cho là âm tính, và mẫu ban đầu này không có *Salmonella* (hình 1b). Các kiểm tra hóa sinh tiếp theo đối với các chủng dương tính cho kết quả các chủng này có những đặc trưng của loài *Salmonella* (bảng 1), các kết quả này tương tự kết quả của Rahman và đồng tác giả (2019) khi phân lập và kiểm tra hóa sinh định danh các loài *Salmonella* ở các mẫu trứng.

Bảng 1. Kết quả phản ứng sinh hóa của *Salmonella* spp.

STT	Chỉ tiêu	Kết quả	STT	Chỉ tiêu	Kết quả
1	H_2S (TSI)	+	8	Coagulase	+
2	Indol	-	9	Khả năng di động	+
3	Methyl red	-	10	Citrate	-
4	Catalase	+	11	Sucrose	-
5	Urea	-	12	Glucose	+
6	Voges Proskauer	-	13	Mantose	+
7	Oxidase reaction	-	14	Lactose	-

Từ quá trình phân lập và kiểm tra hóa sinh cơ bản liên quan đến loài *Salmonella*, kết quả về tỷ lệ nhiễm *Salmonella* trên vỏ trứng được thể hiện ở Bảng 2.

Bảng 2. Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* trên bề mặt vỏ trứng

STT	Nơi thu mẫu	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu nhiễm	Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* (%)
1	Trang trại	10	5	50
2	Nông hộ	10	8	80
3	Nhà phân phối	10	8	80
4	Chợ	20	9	45
5	Siêu thị	10	5	50
Tổng cộng		**60**	**35**	**58**

Ở các địa điểm thu mẫu là nông hộ (hộ gia đình chăn nuôi gà cầm nhỏ lẻ) và nhà phân phối sỉ (thu mua từ trứng từ các nông hộ), tỷ lệ nhiễm *Salmonella* lên đến 80%, trong khi đó ở các trang trại và siêu thị có tỷ lệ nhiễm ngang nhau (50%), và cuối cùng là các chợ với tỷ lệ nhiễm là 45%. Nông hộ và nhà phân phối có tỷ lệ nhiễm cao nhất có thể do điều kiện vệ sinh khu vực chăn nuôi và thu hoạch trứng gà còn kém, nguồn lây nhiễm *Salmonella* từ phân gà, ổ lót trứng có thể dính trực tiếp vào trứng gà. Trứng sau khi thu hoạch được các nhà phân phối thu mua mà chưa đảm bảo vệ sinh kỹ lưỡng môi trường, dụng cụ vận chuyển, vệ sinh cá nhân và thao tác vận chuyển nên tỷ lệ nhiễm *Salmonella* vẫn còn rất cao ở các nhà phân phối. Tại các chợ và siêu thị, trứng đã được làm sạch ngoài vỏ nên tỉ lệ nhiễm Salmonella ở trứng gà thu thập ở chợ và siêu thị thấp hơn (45-50%) so với các địa điểm thu thập khác, tuy nhiên khi so sánh với kết quả của Trần và đồng tác giả (2023), tỷ lệ mẫu nhiễm ở trứng thu thập tại các siêu thị ở thành phố Hồ Chí Minh chỉ là 9,5%. Đối với các trang trại nuôi gà tập trung phục vụ cho việc thu hoạch trứng, tỷ lệ nhiễm *Salmonella* ở vỏ trứng là 50% do trang trại có sự đầu tư về trang thiết bị, có quy trình khử trùng chuồng trại thường xuyên, tuy nhiên vẫn phát hiện nhiễm ở một số mẫu trứng có thể do quá trình thu hoạch người thu hoạch chưa vệ sinh cá nhân kỹ, gây ra sự lây nhiễm từ khu vực chăn nuôi này sang khu vực khác. Có thể thấy rằng các địa điểm thu mẫu ngẫu nhiên trên địa bàn thành phố Huế đều có trứng gà nhiễm vi khuẩn *Salmonella* trên vỏ trứng với tỷ lệ trung bình là 58%. Thời gian thu mẫu cũng ảnh hưởng đến tỷ lệ nhiễm *Salmonella,* chúng tôi tiến hành thu mẫu vào khoảng thời gian từ tháng 6 -10, khi nhiệt độ và độ ẩm ở mức cao tạo điều kiện thuận lợi cho các vi sinh vật phát triển, đặc biệt là các loại vi khuẩn gây ngộ độc thực phẩm. Điều này giải thích mức độ nhiễm *Salmonella* cao ở các mẫu trứng thu được tại một số địa điểm ở thành phố Huế.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi về tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *Salmonella* trên vỏ trứng ở trạng trại (50%) tương đồng với tỷ lệ nhiễm *Salmonella* trong nghiên cứu của Vân và đồng tác giả (2019) về sự nhiễm bẩn vỏ trứng vịt trong điều kiện chăn nuôi tập trung tại tỉnh Hà Tĩnh là 34,67% đến 63%. Tỷ lệ nhiễm trung bình là 58% trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với kết quả của Mai và đồng tác giả (2011) khi đánh giá tình hình nhiễm

Salmonella trên vỏ trứng gà địa bàn thành phố Cần Thơ (40%). Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* ở trứng tại các quốc gia trên thế giới rất khác nhau và đa số thấp hơn nhiều so với các kết quả điều tra tại Việt Nam, theo Owen (2016) tình hình nhiễm *Salmonella* trên trứng ở Anh chiếm tỷ lệ 1,4%, trong khi đó ở Iran có tỷ lệ nhiễm chỉ ở mức 1,33% (Moonsavy *et al*., 2015). Cá biệt, ở theo điều tra của Rahman và đồng tác giả (2019) thì tỷ lệ nhiễm *Salmonella* trên vỏ trứng là 100% khi thu thập 50 mẫu trứng tại các trang trại và chợ ở khu vực Sarva, Bangladesh (Rahman *et al*., 2019).

Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* ở lòng trắng và lòng đỏ trứng gà

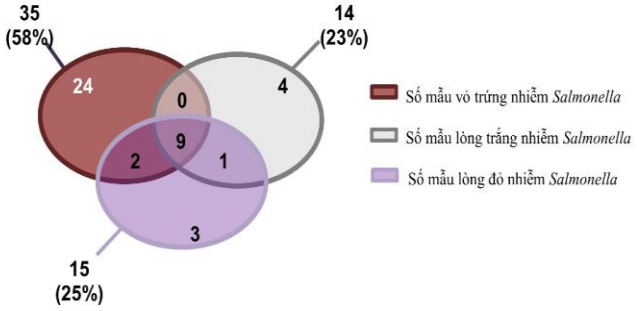
Salmonella có thể xâm nhiễm vào bên trong lòng trắng và lòng đỏ trứng theo 2 con đường là lây nhiễm theo chiều ngang và lây nhiễm theo chiều dọc (Gantois *et al*., 2009). Do vậy, việc đánh giá tỷ lệ nhiễm *Salmonella* trong lòng trắng trứng và lòng đỏ trứng là những số liệu quan trọng cho chỉ tiêu vệ sinh an toàn thực phẩm. Chúng tôi tiến hành nuôi cấy mẫu dịch trứng của cả lòng trắng và lòng đỏ của 60 mẫu trứng đã thu thập, kết quả thể hiện trên bảng 3.

Kết quả cho thấy tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *Salmonella* ở lòng trứng thấp hơn nhiều so với trên vỏ trứng, trong khoảng 23-25%. Tỷ lệ nhiễm này cao nhất tại các nhà phân phối với 40%, tỷ lệ nhiễm thấp hơn ở các chợ và siêu thị và tỷ lệ nhiễm thấp nhất ở các trang trại và nông hộ với chỉ 10%. Khác với vỏ trứng, tỷ lệ lây nhiễm *Salmonella* có trong lòng trắng và lòng đỏ trứng tương đối thấp nhờ cơ chế tự bảo vệ của trứng, được bao bọc bằng các lớp vỏ vôi và màng lụa, cùng đặc tính kháng khuẩn của lòng trắng trứng nên hạn chế được sự lây nhiễm *Salmonella* vào bên trong trứng (Gantois *et al*., 2009). Trứng gà thu thập từ các trang trại và nông hộ có tỷ lệ nhiễm rất thấp nhờ cơ chế tự bảo vệ của trứng gà vừa đẻ, các trứng thu mua từ chợ, nhà phân phối và siêu thị đã được lưu trữ trong thời gian dài, có thể điều kiện vận chuyển và bảo quản không phù hợp nên nguy cơ lây nhiễm theo chiều ngang rất cao, tỷ lệ trứng nhiễm *Salmonella* thu thập từ những khu vực này cao hơn hẳn so với trang trại và nông hộ. Vì vậy chúng tôi nhận thấy rằng cần chú ý điều kiện bảo quản trứng và trứng cần được tiêu thụ trong thời gian ngắn nhất kể từ khi sinh ra đến trước ngày hết hạn.

Bảng 3. Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* ở lòng đỏ và lòng trắng trứng

STT	Nơi thu mẫu	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu nhiễm (lòng trắng)	Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* (%) ở lòng trắng	Số mẫu nhiễm (lòng đỏ)	Tỷ lệ nhiễm Salmonella (%) ở lòng đỏ
1	Trang trại	10	1	10	1	10
2	Nông hộ	10	1	10	1	10
3	Nhà phân phối	10	4	40	4	40
4	Chợ	20	7	35	6	33
5	Siêu thị	10	1	10	3	30
		60	14	23	15	25

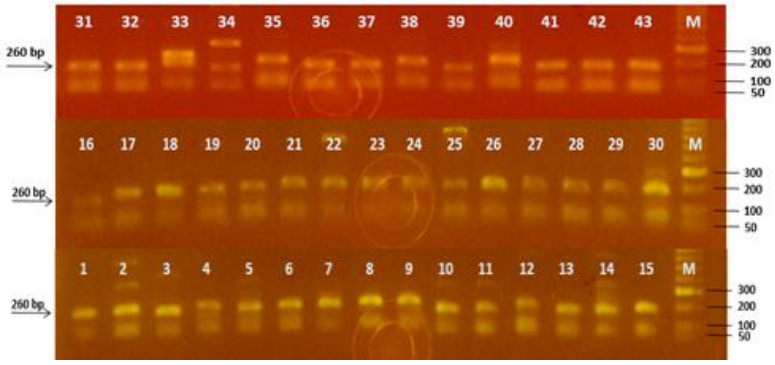
Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* tại các vị trí trên trứng gà được thể hiện ở hình 2. Sơ đồ tập hợp Venn về tỷ lệ nhiễm *Salmonella* tại các vị trí nhiễm trên trứng gà từ các mẫu thu thập được cho thấy *Salmonella* lây nhiễm nhiều nhất ở vỏ trứng. Tỷ lệ ô nhiễm của *Salmonella* trong lòng trắng và lòng đỏ trứng gà khá tương đồng nhau. Kết quả này cho thấy vỏ trứng thường dễ dàng nhiễm *Salmonella* hơn do ảnh hưởng của nhiều yếu tố, có thể do sự tiếp xúc giữa trứng với phân gà bị ô nhiễm, không khí và môi trường ô nhiễm ở khu vực chăn nuôi hoặc trong quá trình vận chuyển, phân phối trứng đến thị trường. Lòng trắng và lòng đỏ trứng có tỷ lệ nhiễm tương đương nhau và xuất hiện nhiều ở các mẫu trứng cũ có thể cho thấy sự lây nhiễm theo chiều ngang của *Salmonella* lây nhiễm từ bên ngoài vỏ vào bên trong trứng, sự lây nhiễm này ít xuất hiện ở những quả trứng mới được thu hoạch, vì vậy để giữ chất lượng và an toàn khi sử dụng các sản phẩm từ trứng gà cần được tiêu thụ trong thời gian ngắn nhất, đặc biệt đối với trứng gà ít được bảo quản tốt như trứng thu mua ở chợ và nhà phân phối. Trứng phải được bán 7 ngày trước khi hết hạn (28 ngày sau khi trứng được đẻ) (Cardoso *et al*., 2021). Một điểm đáng chú ý trong kết quả mà chúng tôi thu nhận được là có một số mẫu nhiễm *Salmonella* ở lòng đỏ hoặc lòng trắng thì không xuất hiện *Salmonella* trên vỏ trứng trong cùng một quả trứng. Cụ thể là, 10 quả trứng thu nhận ngẫu nhiên ở các trang trại thì có 1 mẫu lòng đỏ và 1 mẫu lòng trắng nhiễm *Salmonella* nhưng mẫu vỏ trứng từ quả trứng đó không bị nhiễm. Trong 10 quả trứng thu nhận tại các siêu thị thì có 1 mẫu lòng đỏ bị nhiễm *Salmonella*, còn lòng trắng và vỏ của quả trứng đó thì không bị nhiễm. Trong 20 quả trứng thu nhận tại các chợ thì có 4 mẫu lòng trắng và 2 lòng đỏ bị nhiễm. Điều này chứng tỏ *Salmonella* không chỉ xâm nhiễm theo chiều ngang mà còn có thể xâm nhiễm theo chiều dọc, tức là buồng trứng là nơi bị nhiễm *Salmonella* và sau đó vi khuẩn này lây nhiễm trực tiếp vào lòng đỏ và lòng trắng trứng (Gantois *et al.*, 2009).



Hình 2. Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* tại các vị trí trên trứng gà

Tỷ lệ *Salmonella* phân lập được có chứa gene quy định yếu tố độc lực *Stn*

Từ các mẫu nhiễm *Salmonella* ở vỏ trứng, lòng đỏ và lòng trắng trứng, tiến hành chọn mẫu cho nghiên cứu tiếp theo với nguyên tắc như sau: Các mẫu cho thấy nhiễm *Salmonella* ở cả 3 vị trí (9 mẫu) và mẫu nhiễm vị trí vỏ, lòng đỏ (26 mẫu) thì lấy mẫu nhiễm ở vỏ trứng; Mẫu nhiễm chỉ xuất hiện ở lòng trắng (4 mẫu); Lấy mẫu nhiễm ở lòng đỏ bao gồm: Mẫu nhiễm lòng đỏ (3 mẫu), mẫu nhiễm ở cả lòng đỏ và lòng trắng (1 mẫu). Do vậy, có tổng cộng 43 khuẩn lạc từ 43 mẫu đã được kiểm tra thuộc loài *Salmonella* và sử dụng phương pháp tách DNA, chạy PCR bằng cặp mồi đặc hiệu cho gen *Stn* để thăm dò tỷ lệ *Salmonella* mang yếu tố độc lực *Stn* mã hóa khả năng sinh độc tố đường ruột (Chaudhary *et al*., 2015). Kết quả cho thấy 43 mẫu kiểm tra đều mang gene chứa độc tố đường ruột. Hình 3 minh họa các sản phẩm khuếch đại cho kích thước 260 bp, tương đồng với kích thước của đoạn gene mã hóa cho độc tố đường ruột *stn*. Gen *Stn* gây độc cho tế bào biểu mô ruột và dẫn đến rối loạn đường ruột. Gen này không chỉ đặc hiệu với *Salmonella* mà còn hiện diện ở tất cả các loài *Salmonella* gây bệnh. Trong nghiên cứu của Chaudhary và đồng tác giả (2015), trong số 37 chủng *Salmonella* phân lập, tất cả các chủng phân lập đều chứa gen độc lực *Stn*. Phương pháp PCR sử dụng để thăm dò gene độc lực có ý nghĩa quan trọng đối với sức khỏe của cộng đồng khi xem xét mức độ phổ biến của các gene độc lực trong các mẫu thực phẩm được nghiên cứu. Trong nghiên cứu này, các mẫu trứng được phân phối đến tay người tiêu dùng có tỷ lệ nhiễm *Salmonella* cao, và khi thăm dò một trong những yếu tố độc lực là *Stn* thì có thể thấy tất cả chủng *Salmonella* phân lập được đều chứa gene *Stn*.



Hình 3. Kết quả điện di PCR gene *Stn* (260bp) trên gel agarose, lane 1-35: các chủng *Salmonella* từ các vỏ trứng; Lane 36-39 các chủng *Salmonella* từ lòng đỏ trứng; Lane 40-43 Các chủng *Salmonella* từ lòng trắng trứng; Lane M: HyperLadder 50bp, Bioline

Nhìn chung, các đợt bùng phát ngộ độc do vi khuẩn nói chung và bệnh do *Salmonella* nói riêng đều do sự thiếu kiểm soát và mất an toàn vệ sinh thực phẩm trong các bước chăm sóc, vệ sinh, phân phối và vận chuyển từ trang trại đến tay người tiêu dùng. Ở các nước phát triển trên thế giới, các chương trình kiểm soát trong ngành công nghiệp chăn nuôi gia súc, gia cầm đã làm giảm đáng kể bệnh nhiễm khuẩn *Salmonella* liên quan đến trứng. Tỷ lệ nhiễm *Salmonella* trên trứng ở những quốc gia này chỉ dưới 2% (Moonsavy *et al*., 2015; Owen *et al*., 2016). Trong khi đó, ở các quốc gia đang phát triển như Bangladesh, tỷ lệ nhiễm *Salmonella* thậm chí lên đến 100% trên trứng (Rahman *et al*., 2019). Kết quả của nghiên cứu này được thực hiện ở các mẫu trứng thu thập được tại địa bàn thành phố Huế cũng cho thấy mức độ nhiễm *Salmonella* trên trứng cao. Thậm chí ở các địa điểm như nông hộ và nhà phân phối thì tỷ lệ nhiễm lên đến 80% và gene *Stn* cũng hiện diện ở tất cả các chủng *Salmonella* phân lập từ mẫu trứng. Theo Biên và Sỹ (2021) cho rằng gen *Stn* có trong các chủng *Salmonella* phân lập từ mẫu thịt gà tươi là 93,33%. Trong khi đó theo Ngân và đồng tác giả (2022) cho rằng gen *Stn* có tỷ lệ 100% ở tất cả các chủng *Salmonella* phân lập ở gà. Như vậy kết quả của chúng tôi cũng tương tự với các công bố trước đây. Điều này dẫn đến khả năng gây ảnh hưởng cao cho sức khỏe của người tiêu dùng khi tiêu thụ trứng cũng như những sản phẩm liên quan đến trứng bị nhiễm *Salmonella*. Vì vậy, chúng tôi khuyến nghị cần áp dụng các chương trình kiểm soát bao gồm: giám sát tại trang trại hoặc hộ gia đình có chăm nuôi gia cầm lấy trứng, tiêu hủy đàn gia cầm

bị nhiễm bệnh, thường xuyên làm sạch và khử trùng chuồng trại, duy trì chuỗi cung ứng trứng với nhiệt độ thấp, làm sạch trứng bằng các biện pháp an toàn trước khi đóng gói và tiêu thụ, tiêm phòng cho đàn gia cầm, tiêu thụ trứng không quá hạn sử dụng (Whiley & Ross, 2015).

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu trên tổng số 60 mẫu trứng gà, tương đương với 180 mẫu từ vỏ trứng, lòng đỏ và lòng trắng trứng, cho thấy sự hiện diện của *Salmonella* trên tất cả các địa điểm lấy mẫu tại thành phố Huế. Cụ thể, tỷ lệ nhiễm *Salmonella* là 58% ở vỏ, 23% ở lòng trắng và 25% ở lòng đỏ trứng. Kết quả chạy điện di trên gel agarose sản phẩm khuếch đại PCR cho thấy tất cả các mẫu *Salmonella* phân lập được đều mang gene *Stn* quy định độc tố đường ruột gây rối loạn đường ruột cho người tiêu thụ trứng bị nhiễm *Salmonella*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Al-Wasify RS, El-Taweel GE, Kamel MM, El-Laithy MA (2011). Comparative evaluation of different chromogenic media for detection of *E. coli* O157: H7, Listeria monocytogenes and *Salmonella* spp. in water. *International Journal of Academic Research*, 3(3): 6.

Lê Thế Biên, Trương Xuân Sỹ (2021). Xác định một số gene độc lực trên các serotype salmonella gây bệnh cho người được phân lập từ thịt tươi tại tỉnh Bình Thuận. *Tạp chí Nghiên cứu khoa học và Phát triển kinh tế Trường Đại học Tây Đô*, Số 11: 252-259.

Cardoso MJ, Nicolau AI, Borda D, Nielsen L, Maia RL, Møretrø T, Ferreira V, Knøchel S, Langsrud S, Teixeira P (2021). Salmonella in eggs: From shopping to consumption—A review providing an evidence-based analysis of risk factors. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 20(3): 2716-2741.

Chaudhary JH, Nayak JB, Brahmbhatt MN, Makwana PP (2015). Virulence genes detection of Salmonella serovars isolated from pork and slaughterhouse environment in Ahmedabad, Gujarat. *Vet World*, 8(1): 121.

El-Saadony MT, Salem HM, El-Tahan AM, Abd El-Mageed TA, Soliman SM, Khafaga AF, Swelum AA, Ahmed AE, Alshammari FA, Abd El-Hack ME (2022). The control of poultry salmonellosis using organic agents: an updated overview. *Poult Sci*, 101(4): 101716.

Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey TJ, Van Immerseel F (2009). *FEMS Microbiol Rev*, 33(4): 718-738.

Trần Thị Xuân Mai, Võ Thị Thanh Phương, Trần Thị Hoàng Yến, Nguyễn Văn Bé (2011). Phát hiện nhanh *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* hiện diện trong thực phẩm bằng kỹ thuật PCR đa mồi (multiplex PCR). *Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ*, Số 20b: 198-208.

Nguyễn Thị Ngân, Phan Thị Hồng Phúc, Phạm Diệu Thùy, Dương Thị Hồng Duyên, Trần Nhật Thắng, Nguyễn Xuân Yên (2022). Nghiên cứu độc lực của các chủng *salmonella* phân lập được từ gà mắc bệnh thương hàn và sử dụng chế phẩm nanosan trong điều trị bệnh cho gà tại huyện Tam Dương, tỉnh Vĩnh Phúc. *TNU Journal of Science and Technology,* Tập 227, Số 1: 159 – 166.

Moosavy MH, Esmaeili S, Amiri FB, Mostafavi E, Salehi TZ (2015). Detection of *Salmonella* spp in commercial eggs in Iran. *Iran J Microbiol*, *7*(1): 50.

Official Journal of the European Union. European Commission Regulation (EC) No. 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No. 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *OJEU* **2007**, *L322*, 12–29

Owen M, Jorgensen F, Willis C, McLauchlin J, Elviss N, Aird H, Fox A, Kaye M, Lane C, de Pinna E (2016). The occurrence of *Salmonella* spp. in duck eggs on sale at retail or from catering in England. *Lett Appl Microbiol*, 63(5): 335-339.

Quy chuẩn quốc gia QCVN 8-3:2012/BYT về ô nhiễm vi sinh vật trong thực phẩm

Rahman MA, Ahmad T, Mahmud S, Barman NC, Haque MS, Uddin ME, Ahmed R (2019). Isolation, identification and antibiotic sensitivity pattern of *Salmonella* spp. from locally isolated egg samples. *Am J Pure Appl Sci*, 1(1): 1-11.

Trần Trọng Kha, Nguyễn Thị Phương Trang (2023). Sử dụng phương pháp loop-mediated isothermal amplification (LAMP) để phát hiện Salmonella spp. từ trứng gà. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển*, Tập 22*,* Số 3: 1-8.

TCVN 10780-1:2017 (ISO 6579-1:2017), Vi sinh vật trong chuỗi thực phẩm - Phương pháp phát hiện, định lượng và xác định typ huyết thanh của Salmonella - Phần 1: Phát hiện *Salmonella* spp.

Trần Thanh Vân, Nguyễn Thị Thuý My, Võ Văn Hùng (2019). Ảnh hưởng của một số yếu tố đến sự nhiễm bẩn vỏ trứng vịt trong điều kiện chăn nuôi tập trung tại tỉnh Hà Tĩnh. *TNU Journal of Science and Technology*, Tập 194, Số 01: 81-86.

Whiley H, Ross K (2015). Salmonella and eggs: from production to plate. *Int J Environ Res Public Health*, *12*(3): 2543-2556.

DETERMINATION OF THE PRESENCE OF *SALMONELLA* AND ENTEROTOXIN GENE (*STN*) ISOLATED FROM CHICKEN EGGS

Nguyen Thi Dong Phuong[1], Dang Ngoc Phuong Uyen[1], Ta Dang Y Vi[2], Huynh Van Chuong[2*]

[1]Department of Food Technology, Faculty of Chemical Engineering – University of Science and Technology, The University of Danang

[2]Immunology and Vaccine Laboratory - Institute of Biotechnology, Hue University

SUMMARY

Chicken egg has high nutritional and suitable for all ages, however, it belongs to a kind of food that has a risk of causing food poisoning due to the main infectious agent being *Salmonella* spp. In this study, 60 chicken eggs were collected from several locations in the egg supply chain in Hue City to test for the presence of *Salmonella* on eggshells, egg whites, and yolks. The results showed that the average *Salmonella* infection rate in egg shells was 58%, especially, egg samples collected at farmers and distributors showed an infection rate of up to 80%. The infection rates in egg whites and egg yolks are 23% and 25%, respectively. This suggests that *Salmonella* strains can be transmitted from sick hens or the eggshell into the egg white and yolk. In addition, all *Salmonella* strains isolated from egg samples carry *Stn* gene that regulate virulence factors affecting human health.

Keywords: Salmonella, chicken egg, *Stn* gene, egg supply chain, virulence factor.

[*] Author for correspondence: Tel: +84-398951050; Email: hvanchuong@hueuni.edu.vn

PHÂN LẬP VÀ KHẢO SÁT THỂ THỰC KHUẨN ĐẶC HIỆU CHO VI KHUẨN *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* GÂY BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP TRÊN TÔM

Nguyễn Thành Thắng[1], Mai Thị Hồng Nhung[1], Nguyễn Thành Trung[3], Nguyễn Thanh Hòa[1,2], Trương Quốc Phong[1,2]*

[1]*Trường Hóa và Khoa học Sự sống, Đại học Bách khoa Hà Nội*

[2]*Viện Khoa học và Công nghệ Sức khỏe, Đại học Bách khoa Hà Nội*

[3]*Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia*

TÓM TẮT

Vibrio parahaemolyticus là tác nhân chính gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease - hội chứng AHPND) trên tôm, với tỉ lệ tử vong có thể lên đến trên 90%. Từ đầu năm 2023 đến nay, cả nước có trên 1.612 ha tôm nuôi bị thiệt hại trong đó 688 ha bị thiệt hại do dịch bệnh, chủ yếu là do bệnh hoại tử gan tụy cấp tính. Các biện pháp điều trị truyền thống như các loại kháng sinh phổ rộng dần tỏ ra kém hiệu quả khi tình trạng kháng kháng sinh ở *Vibrio parahaemolyticus* ngày càng nghiêm trọng. Thể thực khuẩn (Bacteriophage) đang nổi lên như một biện pháp an toàn, thân thiện và bền vững trong việc kiểm soát vi khuẩn. Trong nghiên cứu này, chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* M1 đã được phân lập từ mẫu nước ao nuôi xuất hiện bệnh lý hoại tử gan tuy ở tôm và được định danh bằng các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh học phân tử. Nhóm nghiên cứu đã phân lập được thể thực khuẩn VP2 đặc hiệu chủng *V. parahaemolyticus* và xác định được một số đặc tính như độ bền nhiệt (-20^{o}C – 70^{o}C), pH 4-10; đặc hiệu vật chủ và không có khả năng ly giải một số chủng như *V. chlorae* ATCC 14733, *V. vulnificus* ATCC 27562*, Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis*.

Từ khóa: Phân lập, thể thực khuẩn, hoại tử gan tụy cấp, tôm, *Vibrio parahaemolyticus.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Vibrio parahaemolyticus là một loại vi khuẩn ưa mặn, Gram âm được tìm thấy trong môi trường cửa sông, biển và ven biển. *V. parahaemolyticus* là tác nhân hàng đầu gây bệnh bệnh viêm dạ dày ruột cấp tính ở người (Letchumanan *et al*., 2014). *V.parahaemolyticus* không chỉ gây bệnh cho người mà còn cho cả thủy sản. Các chủng độc lực của loài vi khuẩn này là mối đe dọa lớn đối với sự sống sót của tôm, một trong những sản phẩm quan trọng nhất trong ngành nuôi trồng thủy sản trên toàn thế giới. *V. parahaemolyticus* là tác nhân chính gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND) hoặc hội chứng chết sớm (EMS) ở tôm, với tỷ lệ chết rất cao và gây thiệt hại kinh tế lớn (Kumar *et al*., 2021). Biện pháp điều trị và dự phòng cơ bản đối với *V. parahaemolyticus* là sử dụng các loại kháng sinh.

Trong vài thập kỷ qua, *V. parahaemolyticus* kháng thuốc kháng sinh đã gia tăng do sử dụng quá nhiều kháng sinh trong nông nghiệp và nuôi trồng thủy sản. Hầu hết các chủng *V. parahaemolyticus* phân lập đều có mức độ kháng thuốc cao với streptomycin, cefazolin và ampicillin, gây ra những mối đe dọa và thách thức đặc biệt nghiêm trọng đối với sức khỏe cộng đồng và các vấn đề kinh tế trên toàn thế giới (Elias *et al*., 2023). Thể thực khuẩn (bacteriophage) là virus của vi khuẩn, chỉ lây nhiễm các tế bào vi khuẩn đặc hiệu. Thể thực khuẩn có mặt ở khắp mọi nơi và được biết đến là sinh vật phong phú nhất với 10^{31} đơn vị trên bề mặt Trái đất (Clokie *et al*., 2011). Thể thực khuẩn thường có tính đặc thù theo ký chủ cao, chỉ tác dụng lên các loài hoặc thậm chí là các chủng nhất định. Bên cạnh đó, tính đặc hiệu cao của thể thực khuẩn có thể giảm thiểu sự ảnh hưởng đến các vi khuẩn có lợi. Do vi khuẩn kháng kháng sinh ngày càng gia tăng và thiếu hụt các loại kháng sinh mới, liệu pháp thể thực khuẩn (phage therapy) đang trở nên ngày càng phổ biến do khả năng tiêu diệt vi khuẩn đặc hiệu và hiệu quả của chúng. Hiện nay, thể thực khuẩn được sử dụng rộng rãi như một tác nhân kiểm soát sinh học trong ngành công nghiệp thực phẩm và nông nghiệp, xử lý nước thải và nuôi trồng thủy sản (Plaza *et al*., 2018)..

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành phân lập vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* từ mẫu nước ở đầm tôm bị nhiễm bệnh tại Hải Phòng, phân lập thể thực khuẩn đặc hiệu cho vi khuẩn và khảo sát đặc tính của thể thực khuẩn làm cơ sở cho các nghiên cứu thử nghiệm cho việc phòng trị bệnh này trên tôm.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Môi trường

Môi trường ASPW (2% Peptone, 2% NaCl) được sử dụng trong phân lập vi khuẩn. Môi trường TCBS (Thiosulfate

Citrate Bile Sucrose)-Himedia, Ấn Độ sử dụng để nuôi cấy khuẩn lạc. Môi trường Hicrome - Himedia, Ấn Độ. Môi trường MLB, MLB 2X 1mM NaCl (Peptone, Yeast extract, NaCl, $CaCl_2$) dùng để hoạt hóa vi khuẩn. Môi trường Glucose Fermentation Broth 1% pepton, 3% NaCl, 1% Lactose và 0,8% phenol red, pH 7,4) sử dụng trong kiểm chứng đặc tính hóa sinh của *Vibrio paraheamolyticus.*Môi trường Lactose Fermentation Broth (1% pepton, 3% NaCl, 1% Lactose và 0,8% phenol red, pH 7,4) sử dụng trong kiểm chứng đặc tính hóa sinh của *Vibrio paraheamolyticus*.. Môi trường LB (Luria Bertani) (1% tryptone, 0,5% cao nấm men, 3% NaCl) sử dụng trong nuôi cấy vi khuẩn bằng khuếch tán đĩa thạch.

Các chủng vi sinh vật

Các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* phân lập được từ mẫu nước đầm tôm được lấy từ đầm nuôi tôm thẻ chân trắng ở Tân Thành, Dương Kinh, Hải Phòng và mẫu bể chứa tôm được lấy từ các bể chứa tôm ở chợ Long Biên dùng để nghiên cứu. Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* BL được cung cấp từ công ty Trúc Anh Biotech, Bạc Liêu được sử dụng để phân lập thể thực khuẩn. Các chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus ATCC17802, V. chlorae ATCC 14733, V. vulnificus ATCC 27562* được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm quốc gia được dùng để làm mẫu đối chứng cho các thí nghiệm định danh, đặc tính hóa sinh… Các chủng vi khuẩn *Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis* được cung cấp bởi phòng thí nghiệm Proteomics – Trung tâm nghiên cứu và phát triển Công nghệ Sinh học – Trường Hóa và Khoa học sự sống – Đại học Bách khoa Hà Nội được sử dụng để làm các thí nghiệm khả năng ly giải của thể thực khuẩn đặc hiệu cho *V. parahaemolyticus*.

Phương pháp

Phân lập vi khuẩn Vibrio parahaemolyticus từ mẫu nước đầm tôm

Các mẫu nước đầm tôm tại Hải Phòng được thu thập vào tháng 2/2023 và phân lập *V. parahaemolyticus* theo phương pháp được mô tả của Siddique và đồng tác giả (2021). Các thí nghiệm sinh hóa để khẳng định thêm được thực hiện theo tiêu chuẩn ISO 21872-1:2017.

Tách chiết DNA tổng số

DNA tổng số từ các chủng vi khuẩn *Vibrio* được tách chiết bằng phương pháp chiết muối theo mô tả của Miller và đồng tác giả (1988) có cải tiến (Miller *et al*., 1988). Vi khuẩn *Vibrio* sau khi được nuôi tăng sinh trong môi trường ASPW qua đêm tạo thành dung dịch huyền phù. Dung dịch huyền phù (2 mL) của *Vibrio* được cho vào ống eppendorf 1,5 mL, ly tâm 8.000 vòng/phút trong 5 phút để thu sinh khối. Cho 500 µL lysis buffer (0.15 M NaCl, 400 mM Tris–HCl pH 8.0, 60 mM EDTA,1% SDS, pH 8.0) vào từng ống eppendorf chứa sinh khối vi khuẩn, vortex để trộn mẫu. Mẫu được ủ ở nhiệt độ phòng trong 10 phút (cứ sau 5 phút, quay ngược ống để trộn mẫu). Tiếp đến, bổ sung 170 µL CH_3COONa 5M vào từng ống, vortex để trộn mẫu, ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút để thu dịch nổi. Bổ sung hỗn hợp CIAA (24 chlorofom : 1 isoamyl alcohol) theo tỉ lệ 1:1 với dịch nổi. Tiến hành ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút. Sau khi ly tâm, dịch nổi phía trên được chuyển sang ống eppendorf 1,5 mL mới, isopropanol được bổ sung theo tỷ lệ 1:1. Hỗn hợp này được ủ trong đá lạnh trong 1 giờ để kết tủa DNA. Mẫu sau khi ủ được ly tâm 12.000 vòng/phút ở trong 20 phút để thu tủa. Tủa DNA sau đó được rửa bằng cồn 70%, làm khô và hoà tan trong nước loại ion. DNA tổng số của *Vibrio* được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.

Định danh Vibrio parahaemolyticus bằng chỉ thị phân tử 16S rRNA

DNA tổng số của các chủng vi khuẩn *Vibrio* được sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR với cặp primer đặc hiệu khuếch đại đoạn gen 16S rRNA: 27F-5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R-5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3 để khuếch đại đoạn gen 16S rRNA có kích thước 1500 bp. Thành phần phản ứng PCR gồm: 5 mL 5X buffer, 2 mL dNTPs, 1,5 mL hỗn hợp primer, 2 mL DNA tổng số (80 ng); 14,25 mL nước cất vô trùng. Phản ứng PCR được thực hiện trong máy luân nhiệt MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (Biorad, Mỹ) theo chu trình: 35 chu kỳ: 98 °C/8 giây, 55 °C/5 giây, và 72 °C/1 phút 30 giây; cuối cùng 72 °C/6 phút. Sản phẩm PCR đối với gen 16S rRNA được điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra chất lượng trước khi gửi mẫu đi phân tích trình tự DNA. Gel được nhuộm bằng thuốc nhuộm RedSafe và quan sát dưới ánh sáng huỳnh quang bằng máy Gel DocTM XR (Bio-Rad, Mỹ). Sản phẩm PCR đoạn gen 16S rRNA được gởi đến Công ty 1st Base (Malaysia) để giải trình tự theo phương pháp sử dụng các dideoxynucleotide của Sanger. Trình tự nucleotide của gen 16S rRNA được phân tích bằng phần mềm BioEdit và so sánh mức độ tương đồng với trình tự đã được công bố trên GenBank bằng chương trình BLAST để định danh loài vi khuẩn.

Phân lập thể thực khuẩn

Thể thực khuẩn được phân lập từ các mẫu nước thải thu thập tại chợ Long Biên ở thành phố Hà Nội bằng phương pháp đã được mô tả bởi Van Twest và Kropinski (2009) có cải biến (Van, Kropinski, 2009). Các mẫu nước thải được ly tâm 8000 × g trong 10 phút và thu dịch nổi. Sau đó, 5 mL dịch nổi được trộn với 5 mL MLB nồng độ 2X vô trùng (1 mM $CaCl_2$) và 100 µL dịch nuôi cấy *V. parahaemolyticus* (OD 600 = 0,6). Các hỗn hợp được ủ lắc qua đêm ở 37 °C. Sau khi ủ, các hỗn hợp được ly tâm ở 8000× g trong 5 phút và phần dịch nổi được lọc qua màng lọc 0,22 µm. Phương pháp thạch hai lớp được sử dụng để phân lập các vệt tan riêng rẽ (Kropinski et al., 2009). Quy trình đổ thạch hai lớp được lặp lại 3 lần để tinh sạch thể thực khuẩn.

Khảo sát thể thực khuẩn

Hiệu quả ly giải của thể thực khuẩn được khảo sát theo phương pháp của Kalatzis và đồng tác giả (2016). Nuôi cấy vi khuẩn *V. parahaemolyticus* đến pha log (~10^6 CFU/mL) sau đó bổ sung thể thực khuẩn theo tỉ lệ MOI 0,1, 1, 10 hoặc 100. Mẫu vi khuẩn không được bổ sung thể thực khuẩn được nuôi cấy song song để làm mẫu kiểm chứng. Tất cả các mẫu đều được nuôi cấy trong tủ lắc ở 37°C trong 14 giờ. Mật độ quang học ở bước sóng 660 nm (OD660nm) được ghi lại hàng giờ để đánh giá sự phát triển của vi khuẩn. Tác dụng ly giải của thể thực khuẩn đối với vi khuẩn chủ được ước tính từ việc giảm sự phát triển của vi khuẩn.

Phổ vật chủ của thể thực khuẩn được khảo sát dựa vào phương pháp spot test trên bề mặt thạch hai lớp theo mô tả của Elizabeth Kutter (2009). Thí nghiệm được thực hiện với các chủng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* ATCC17802*, Vibrio chlorae* ATCC 14733*, Vibrio vulnificus* ATCC 27562*, Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis*.

Tỉ lệ lây nhiễm (MOI) tối ưu được xác định theo phương pháp của Yu và đồng tác giả (2013) có cải biến. Nuôi cấy vi khuẩn *V. parahaemolyticus* đến pha log (khoảng 10^6 CFU/mL), bổ sung thể thực khuẩn ở các tỷ lệ MOI 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10. Hỗn hợp được nuôi lắc ở 37℃, 6 giờ. Sau đó, ly tâm hỗn hợp ở 8000 vòng/phút trong 10 phút, dịch nổi thu được được lọc qua màng lọc 0,22 µm. Hiệu giá thể thực khuẩn được xác định bằng phương pháp đổ thạch 2 lớp.

Các điều kiện ảnh hưởng tới thực khuẩn thể

Độ ổn định nhiệt độ và pH được thử nghiệm theo phương pháp do Tan và đồng tác giả (2021) mô tả với một số sửa đổi (Tan *et al*., 2021). Độ ổn định nhiệt độ của thực khuẩn thể trong đệm SM đã được thử nghiệm ở các nhiệt độ khác nhau (−20, 25, 37, 50, 60 và 70°C) và ủ trong 1 giờ. Đối với độ ổn định pH, thực khuẩn thể được ủ ở các khoảng pH khác nhau (pH 2, 4, 6, 8, 10 và 12) trong 1 giờ bằng cách trộn 900 µL môi trường MLB đã được điều chỉnh pH với 100 µL dịch thể thực khuẩn, ủ trong 1 giờ. Sau khi ủ, hiệu giá thực khuẩn thể được xác định bằng phương pháp thạch hai lớp

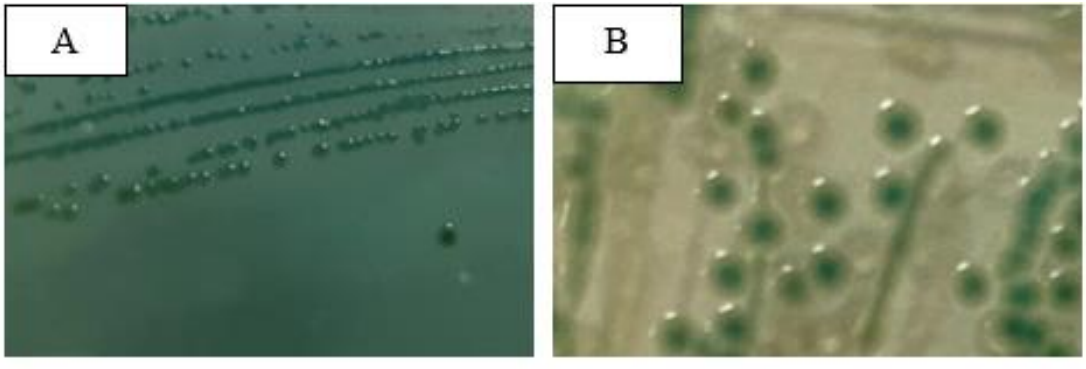
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả phân lập *Vibrio parahaemolyticus*

Năm mẫu nước đầm tôm mắc dịch AHPND đã được sử dụng để phân lập vi khuẩn *Vibrio* trên môi trường TCBS và môi trường Hicrome. Các chủng vi khuẩn phát triển trên môi trường TCBS có khuẩn lạc hình tròn, trơn nhẵn, bờ đều, màu xanh, đường kính 2–3 mm, phát triển trên môi trường Hicrome có khuẩn lạc hình tròn, trơn nhẵn tâm màu xanh ngọc và viền không màu (Hình 1). Chúng là các vi khuẩn Gram âm, hình que ngắn, có khả năng di động trong môi trường lỏng, lên men glucose và lactose, phát triển tốt trong 2-8% NaCl và không phát triển ở 0% và 10% NaCl. Dựa theo Tiêu chuẩn quốc gia ISO 21872-1:2017, bước đầu chúng tôi đã lựa chọn được 2 chủng *Vibrio* và đặt tên là M1, M3 để sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Định danh *Vibrio parahaemolyticus* bằng chỉ thị phân tử 16S rRNA

Để định danh các chủng vi khuẩn *V. parahemolyticus* dựa trên chỉ thị phân tử 16S rRNA, bước đầu tiên là tách chiết DNA tổng số của các chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. đã thu được. Gen 16S rRNA của các chủng được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp primer đặc hiệu như đã trình bày ở phần phương pháp nghiên cứu. Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra. Kết quả BLAST trên GenBank cho thấy trình tự đoạn gen 16S rRNA của chủng vi khuẩn *Vibrio* sp. M1 tương đồng 99,36% với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*, 99,22% với vi khuẩn *Vibrio neocaledonicus* và *Vibrio alginolyticus.* Kết hợp với các đặc điểm sinh hóa, có thể kết luận *Vibrio* sp. M1 thuộc loài vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus.*



Hình 1. Các khuẩn lạc Vibrio trên môi trường TCBS (A); Các khuẩn lạc Vibrio trên môi trường Hicrome (B)

Descriptions | Graphic Summary | Alignments | Taxonomy

Sequences producing significant alignments — Download — Select columns — Show 100

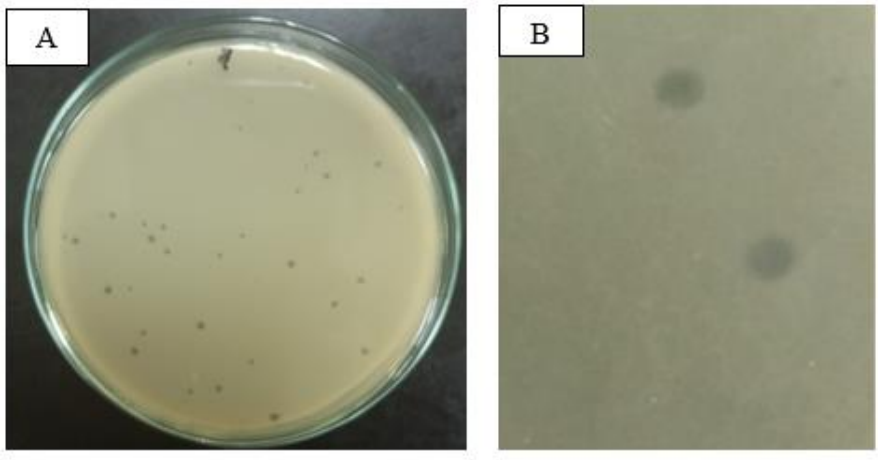
select all 100 sequences selected — GenBank | Graphics | Distance tree of results | MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Vibrio parahaemolyticus strain VPD14 chromosome 1, complete sequence	Vibrio parahaemolyticus	2532	27708	99%	0.0	99.36%	3291121	CP031781.1
Vibrio parahaemolyticus strain FDAARGOS_191 chromosome 1, complete sequence	Vibrio parahaemolyticus	2532	27695	99%	0.0	99.36%	3295711	CP020427.2
Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210633 DNA, chromosome 1, complete sequence	Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210633	2532	25214	99%	0.0	99.36%	3288558	BA000031.2
Vibrio parahaemolyticus strain TY-41 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Vibrio parahaemolyticus	2531	2531	99%	0.0	99.22%	1419	MT550813.1
Vibrio neonatus strain 5-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Vibrio neonatus	2531	2531	99%	0.0	99.22%	1453	MN939469.1
Vibrio alginolyticus strain K118 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Vibrio alginolyticus	2531	2531	99%	0.0	99.22%	1432	MN826467.1
Vibrio sp. strain 201709CJKOP-47 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Vibrio sp.	2531	2531	99%	0.0	99.22%	1452	MG867498.1
Vibrio sp. strain 201709CJKOP-46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Vibrio sp.	2531	2531	99%	0.0	99.22%	1453	MG867497.1
Vibrio sp. strain 201709CJKOP-24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Vibrio sp.	2531	2531	99%	0.0	99.22%	1455	MG867475.1

Hình 2. So sánh kết quả giải trình tự gene 16s RNA của chủng Vibrio sp. M1 trên cơ sở dữ liệu Blast

Kết quả phân lập và phổ vật chủ của thể thực khuẩn

Thể thực khuẩn được phân lập từ nước thải bằng cách sử dụng *V. parahaemolyticus* BL làm vật chủ, được đặt tên là VP2. Nó có thể tạo thành các vệt tan trong suốt có đường kính khoảng 2–3 mm (Hình 3).



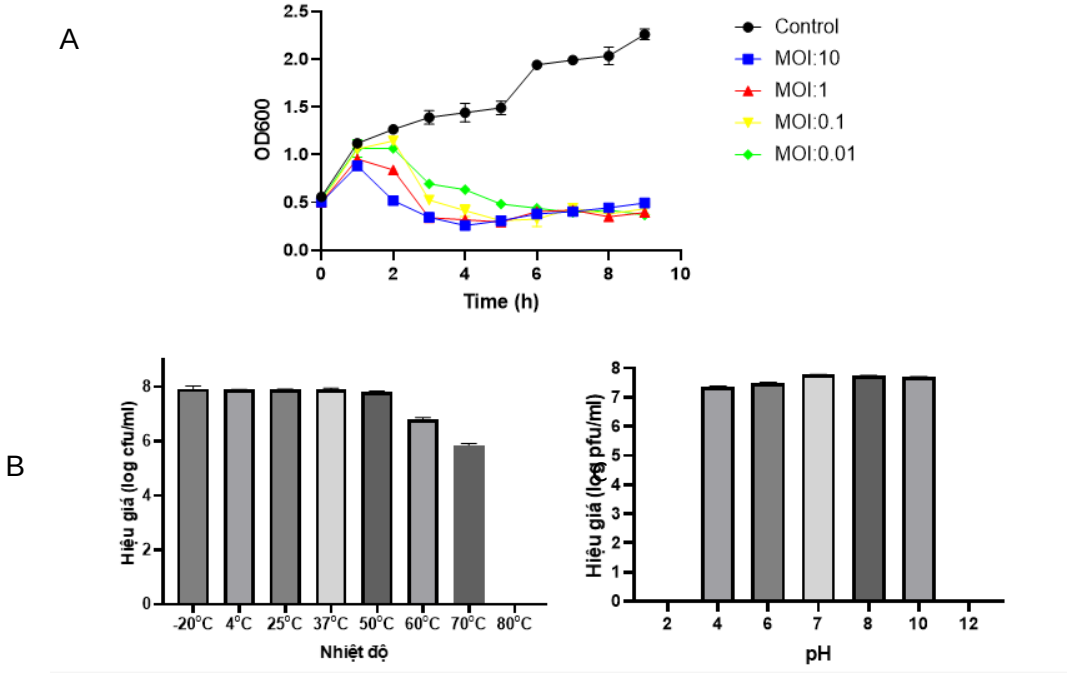
Hình 3. Kết quả phân lập thể thực khuẩn VP2 (A) Hình thái vệt tan thể thực khuẩn VP2 (B)

Cả 2 chủng *V. parahaemolyticus* M1 và ATCC 17802, *V. chlorae* ATCC 14733, *V. vulnificus* ATCC 27562, *Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis* đã được sử dụng để đánh giá phạm vi vật chủ của thể thực khuẩn VP2. Trong các thử nghiệm spot test, VP2 tạo thành các vùng ly giải rõ ràng trên tất cả các chủng *V. parahaemolyticus* cho thấy các chủng này nhạy cảm với thể thực khuẩn. Thể thực khuẩn không ly giải vi khuẩn nào khác với loài *V. parahaemolyticus* cho thấy tính đặc hiệu cao của thể thực khuẩn với loài vi khuẩn này.

Kết quả khảo sát khả năng ly giải và độ bền của thể thực khuẩn

Tại MOI 1 mật độ thể thực khuẩn VP2 đạt giá trị cao nhất (khoảng 3.1 x 10^9 PFU/ml) sau 6 giờ thí nghiệm. Với MOI 0,001; 0.01; 0.1; 10 đều thấy được có sự nhân lên của thể thực khuẩn tuy nhiên chưa đạt giá trị cao, đặc biệt tại MOI 10 có thể thấy lượng thể thực khuẩn tăng lên chỉ vào khoảng 1 log sau 6 giờ thử nghiệm, thấp nhất trong các tỷ lệ được khảo sát. Điều này thể hiện mặc dù lượng thể thực khuẩn lớn hơn số tế bào chủ nhưng sự xâm nhiễm tế bào lại không đạt hiệu quả.. Theo Kasman và đồng tác giả(2002), tuy nồng độ vi khuẩn không ảnh hưởng đến việc nhân lên của thực khuẩn thể nhưng ở số lượng thể thực khuẩn đầu vào cao hơn số lượng tế bào vi khuẩn kí chủ thì số lượng thể thực khuẩn thế hệ sau được sinh ra thấp. Khi một thể thực khuẩn độc lực xâm nhập vào tế bào chủ, nó sẽ nhân lên và ly giải tế bào, dẫn đến sự bùng phát các hạt virus. Do đó, với mỗi lần ly giải tế bào chủ, số lượng thể thực khuẩn sẽ tăng lên. Tuy nhiên, nếu tỷ lệ thể thực khuẩn cao có thể ly giải vi khuẩn mà không có sự nhân lên của thể thực khuẩn. Trong quá trình ly giải mà không có sự nhân lên, thể thực khuẩn hấp thụ vào bề mặt của tế bào chủ ở tỷ lệ MOI cao (> 100) và ly giải tế bào chủ tại nhiều vùng bề mặt tế bào dẫn đến cái chết của vật chủ giống như sự ly giải.Tỷ lệ MOI thấp có lợi cho tính khả thi thương mại của ứng dụng quy mô lớn vì nó làm giảm chi phí chuẩn bị, tinh sạch và ứng dụng của thể thực khuẩn.

Để xác định hoạt động tiêu diệt vi khuẩn của thể thực khuẩn VP2, *V. parahaemolyticus* M1 đã được nhiễm thể thực khuẩn VP2 ở MOI là 0,01, 0,1, 1 và 10, ủ lắc ở 37°C. Các mẫu nuôi được thu thập mỗi 1 giờ trong 9 giờ và sự phát triển của vi khuẩn được đo dựa trên OD600, cho thấy sự phát triển của *V. parahaemolyticus* bị ức chế khi đồng nuôi cấy với thể thực khuẩn theo cách phụ thuộc vào nồng độ, với các giá trị OD_{600nm} giảm nhanh hơn ở MOI 10 so với MOI 0,01, 0,1 hoặc 1 (Hình 4A), OD_{600nm} tăng trở lại sau 8 giờ cho thấy sự xuất hiện các vật chủ không nhạy cảm với thể thực khuẩn. Đối với các điều kiện nhiệt độ, thể thực khuẩn VP2 có tính ổn định cao ở dải nhiệt độ từ -20°C đến 50°C. Hiệu giá thể thực khuẩn bắt đầu giảm mạnh ở 60℃, giảm mạnh nhất ở 80℃ (thể thực khuẩn bị bất hoạt hoàn toàn) sau 1 giờ ủ (Hình 4B) Thể thực khuẩn VP2 ổn định từ pH 4 đến 10 trong các thí nghiệm về độ nhạy pH và bị bất hoạt hoàn toàn ở pH 2 và 12 (Hình 4C). Kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Jingyun Fu và đồng tác giả (2023), các tác giả này cũng chỉ ra rằng thể thực khuẩn vB_ValM_PVA8 không thay đổi nhiều về mật độ và ổn định ở dải pH tương đối rộng 4 – 10 (Fu *et al*., 2023).



Hình 4. Hiệu quả ly giải của VP2 (A) Hiệu giá VP2 sau 1 giờ ủ ở các nhiệt độ khác nhau (B) Hiệu giá VP2 sau 1 giờ ủ ở các pH khác nhau (C)

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã phân lập được vi khuẩn M1 từ nước đầm nuôi tôm. Một số đặc tính của chủng M1 như hình thái khuẩn lạc trên môi trường chọn lọc, kết quả nhuộm gram, khả năng chịu mặn,… phù hợp với đặc điểm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Chủng M1 được định danh là *Vibrio parahaemolyticus* dựa vào trình tự 16S rRNA với mức độ tương đồng lớn hơn 99%. Sử dụng chủng *V. parahaemolyticus* M1, chúng tôi đã phân lập thể thực khuẩn VP2 với khả năng xâm nhiễm và ly giải *V. parahaemolyticus,* đồng thời xác định được một số đặc tính (khả năng chịu điều kiện nhiệt đến 70°C, ổn định trong dải nhiệt độ từ -20°C đến 70°C và pH 4 – 10). Nghiên cứu đã cho thấy thể thực khuẩn VP2 đặc hiệu vật chủ và không có khả năng ly giải một số chủng như *V. chlorae* ATCC 14733, *V. vulnificus* ATCC 27562, *Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis* (số liệu không thể hiện). Nhóm nghiên cứu sẽ tiếp tục nghiên cứu về khả năng tiêu diệt vi khuẩn của thể thực khuẩn VP2 ở môi trường thực tế. Thể thực khuẩn VP2 có thể được sử dụng để điều trị dự phòng các vùng nuôi trồng bị nhiễm dịch hoặc bổ sung vào thức ăn chăn nuôi để kiểm soát lượng vi khuẩn. Những kết quả thu được sẽ là tiền đề cho việc ứng dụng thể thực khuẩn trong điều trị bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Letchumanan V, Chan KG, Lee LH (2014). Vibrio parahaemolyticus: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. *Front Microbiol*, 5:705.

Kumar V, Roy S, Behera BK, Bossier P, Das BK (2021). Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND): Virulence, Pathogenesis and Mitigation Strategies in Shrimp Aquaculture. *Toxins (Basel)*, 13.

Elias NA, Abu Hassan MS, Yusoff NAH, Tosin OV, Harun NA, Rahmah S, Hassan M (2023). Potential and limitation of biocontrol methods against vibriosis: a review. Aquaculture International 31(4): 2355–98.

Clokie MRJ, Millard AD, Letarov A V, Heaphy S (2011). *Phages in nature*. Bacteriophage, 1:31.

Plaza N, Castillo D, Pérez-Reytor D, Higuera G, García K, Bastías R (2018). Bacteriophages in the control of pathogenic vibrios. Electronic Journal of Biotechnology, 31: 24–33.

Siddique AB, Moniruzzaman M, Ali S, Dewan MN, Islam MR, Islam MS, Amin MB, Mondal D, Parvez AK, Mahmud ZH (2021). Characterization of Pathogenic Vibrio parahaemolyticus Isolated From Fish Aquaculture of the Southwest Coastal Area of Bangladesh. *Front Microbiol*, 12:635539.

Kropinski AM, Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP (2009). Enumeration of Bacteriophages by Double Agar Overlay Plaque Assay. *Methods Mol Biol*, (501), 69-76.

Kutter E. (2009). Phage Host Range and Efficiency of Plating. *Methods Mol Biol*, (501): 141-149.

Yu YP, Gong T, Jost G, Liu WH, Ye DZ, Luo ZH (2013). Isolation and characterization of five lytic bacteriophages infecting a Vibrio strain closely related to Vibrio owensii. *FEMS Microbiol Lett*, 348:112–9.

Tan CW, Rukayadi Y, Hasan H, Abdul-Mutalib NA, Jambari NN, Hara H, Thung TY, Lee E, Radu S (2021). Isolation and Characterization of Six Vibrio parahaemolyticus Lytic Bacteriophages From Seafood Samples. *Front Microbiol*, 12.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SPECIFIC BACTERIOPHAGES FOR *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* BACTERIA CAUSING ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS DISEASE IN SHRIMP

Nguyễn Thành Thắng[1], Mai Thị Hồng Nhung[1], Nguyễn Thành Trung[3], Nguyễn Thanh Hòa[1,2], Trương Quốc Phong[1,2*]

[1]*School of Chemistry and Life Sciences, Hanoi University of Science and Technology*

[2]*Institute of Health Science and Technology, Hanoi University of Science and Technology*

[3]National Institute For Food Control

ABSTRACT

Vibrio parahaemolyticus is the main agent causing Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) in shrimp, with a mortality rate that can exceed 90%. From the beginning of 2023 until now, more than 1,612 hectares of farmed shrimp have been damaged nationwide, of which 688 hectares have been damaged due to disease, mainly due to acute hepatopancreatic necrosis. Traditional treatment measures such as broad-spectrum antibiotics are gradually showing less effectiveness as the antibiotic resistance situation in Vibrio parahaemolyticus becomes increasingly serious. Bacteriophages are emerging as a safe, friendly, and sustainable measure in controlling bacteria. In this study, the V. parahaemolyticus M1 strain was isolated from a pond water sample where hepatopancreatic necrosis appeared in shrimp and identified by morphological, physiological, and molecular biological characteristics. The bacteriophage specific to the *V. parahaemolyticus* strain named VP2, was isolated and some characteristics were determined such as temperature stability (-20°C – 70°C), pH 4-10; host specificity to *V. parahaemolyticus*. It does not have the ability to infect some strains such as *V. chlorae* ATCC 14733, *V. vulnificus* ATCC 27562, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis.*

Keywords: Isolation, bacteriophage, acute hepatopancreatic necrosis, shirmp, *Vibrio parahaemolyticus.*

[*] Author for correspondence: Tel: +84-988793468; Email: phong.truongquoc@hust.edu.vn

ẢNH HƯỞNG CỦA TỔ HỢP PHÂN BÓN ĐẾN SỰ SINH TRƯỞNG, NĂNG SUẤT VÀ PHẨM CHẤT CỦA CÂY THÙ LÙ NAM MỸ (*Physalis philadelphica*) TRỒNG TẠI AN GIANG

Nguyễn Thị Mỹ Duyên[1*], Nguyễn Minh Thắng[1] , Nguyễn Thị Hoàng Mỹ[1] , Nguyễn Minh Trang[2]

[1]Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

[2]Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn An Giang

TÓM TẮT

Thù lù Nam Mỹ "tomatillo" (*Physalis philadelphica)* được xem là cây có nhiều dinh dưỡng có lợi cho sức khỏe, có giá trị kinh tế và được ưa chuộng ở nhiều nước trên thế giới. Thí nghiệm ảnh hưởng của phân bón (hữu cơ) đến sự sinh trưởng và năng suất của cây Thù lù Nam Mỹ (*Physalis philadelphica*) được bố trí theo khối ngẫu nhiên gồm 5 nghiệm thức và 3 lần lập lại. Kết quả cho thấy phân Đầu Trâu hữu cơ khoáng HCMK + phân hóa học NPK phù hợp cho sự phát triển của cây thù lù về đường kính gốc (2,53 cm); chiều cao cây (136,33 cm); chiều dài lớn nhất (9,67 cm); chiều rộng lá lớn nhất (6,65 cm); số nhánh cấp 1 (19,40 nhánh); số nhánh cấp 2 (37,80 nhánh). Bên cạnh đó, nghiệm thức này cho năng suất thu hoạch khá cao với tổng số quả thực thu (38,00 quả/cây); phần trăm quả loại 1 (95,32%); tổng trọng lượng quả thu (1819,83 g); số ngày ra hoa (13,93 ngày); số ngày đậu quả (6,20 ngày); từ khi đậu quả đến quả chín (29,07 ngày); đường kính quả (3,21cm); độ brix (8,80%). Hàm lượng vitamin C dao động theo độ chín của quả từ 9,26 – 11,29 mg/100g. Như vậy, việc canh tác cây trồng mới này với lượng phân bón hữu cơ hợp lý vẫn đảm bảo năng suất cây trồng, đồng thời giúp tạo ra sản phẩm có giá trị, an toàn và tốt cho sức khỏe.

Từ khóa: Phân bón hữu cơ khoáng HCMK, phân bón NPK, *Physalis philadelphica*, Thù lù Nam Mỹ, tomatillo.

MỞ ĐẦU

Thù lù Nam Mỹ (*Physalis philadelphica*), với tên tiếng Anh là tomatillo, thuộc chi Physalis, họ Solanaceae, có nguồn gốc từ Mexico và Guatemala. Theo González-Pérez và Guerrero-Beltrán, (2021) cây thù lù phát triển rộng rãi ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới trên toàn thế giới, chủ yếu tập trung ở khu vực Nam Mỹ dưới dạng cây ăn quả, làm thuốc và cây cảnh. Cây thù lù Nam Mỹ có vòng đời của cây ngắn (3 đến 4 tháng) (González-Pérez, Guerrero-Beltrán, 2021). Cây và quả Thù lù chứa vitamin, khoáng chất, hợp chất phenolic, chất chuyển hóa thứ cấp như physalin và steroid (steroidal lacton). Cây và quả được sử dụng rộng rãi trong y học cổ truyền để làm giảm một số bệnh (giảm sốt, ho, viêm amygdal, rối loạn tiêu hóa hoặc tiểu đường) và là nguyên liệu thực phẩm trong ẩm thực Mexico và Guatemala (García-Mendieta *et al.,* 2012; Maldonado*,* 2011). Quả thù lù rất quan trọng về mặt dinh dưỡng và thương mại, chính vì thế thù lù được ưa chuộng trong các chương trình trồng trọt của nhiều quốc gia về loại trái cây xuất khẩu lạ (Galarza, Daniella, 2013). Với ưu thế là một nước nông nghiệp có khí hậu nhiệt đới khá phù hợp cho sự phát triển của cây thù lù tại Việt Nam. Tuy nhiên, đây là giống cây trồng mới nên người dân chỉ trồng thử với diện tích nhỏ,còn chưa nắm được kỹ thuật trồng để cây phát triển tốt và cho năng suất cao. Nhận thấy giá trị và tìm năng kinh tế của cây Thù lù Nam Mỹ là vô cùng lớn nên việc nghiên cứu sự **"Ảnh hưởng của phân bón đến sự sinh trưởng và năng suất của cây Thù lù Nam Mỹ *Physalis philadelphica* trồng tại An Giang"** là vô cùng cần thiết.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Vườn thực nghiệm Nguyễn Như, Phường Mỹ Thới, TP. Long Xuyên, An Giang từ tháng 11/2022 đến tháng 6/2023.

Vật liệu nghiên cứu

- Hạt giống Thù lù Nam Mỹ (Blue Tomatillo F1) được nhập khẩu từ Công ty True Leaf Market

- Phân bò đã được ủ xử lý nấm Trichoderma

- Phân hữu cơ khoáng Đầu Trâu HCMK Thành phần: hữu cơ 15%, A1Ps 12%, P_2O_5 3%, K_2O 1%, CaO 0,05%, MgO 0,15%, B 300ppm, Zn 500ppm, Cu 300ppm.

- Phân vô cơ: Đầu trâu NPK 16-16-16+TE, phân urê, DAP, KNO_3.

Phương pháp nghiên cứu

Đánh giá sự sinh trưởng và năng suất của thù lù Nam Mỹ

- Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối hoàn toàn ngẫu nhiên (RCBD), gồm 5 nghiệm thức với 3 lần lặp lại. Diện tích ô thí nghiệm ngang 2m, dài 5m, mật độ trồng là 3,2 cây/m^2. Tổng diện tích thí nghiệm 400m^2.

+ P1: Phân hữu cơ (phân bò)

+ P2: Phân hữu cơ khoáng Đầu Trâu HCMK

+ P3: Phân hữu cơ (phân bò) + Phân hóa học NPK 16-16-16 + TE

+ P4: Phân hữu cơ khoáng Đầu Trâu HCMK + Phân hóa học NPK 16-16-16 + TE

+ P5: Phân hóa học NPK 16-16-16 + TE

*Phân bón:** Lượng phân bón sử dụng cho 1.000m^2

- Bón lót trước khi trồng cây giống: Phân hữu cơ 300 kg/1000m^2 (P1, P3); Phân hữu cơ khoáng Đầu Trâu HCMK 50 kg/1000m^2 (P1, P2, P4).

- Phân hoá học: Urê: 30 kg + NPK 16-16-16 + TE: 25 Kg + Super Lân: 40 kg và Sulfat Kali: 30kg/1000m^2

* Cách bón phân:

- Bón lót: 200 kg phân hữu cơ + toàn bộ super Lân + 7 kg NPK 16-16-16 + TE

- Bón thúc: theo nghiệm thức thí nghiệm: phân hữu cơ (P1, P3), phân hữu cơ khoáng Đầu Trâu HCMK (P2, P4), NPK 16-16-16 + TE. (P3, P4, P5).

+ Lần 1 (10 ngày sau trồng): 5kg mỗi loại phân.

+ Lần 2 (22-25 ngày sau khi trồng lúc cây bắt đầu có nụ): 7kg mỗi loại phân. Kết hợp phun thêm Canxi Bo đều đặng 7 ngày 1 lần để tăng khả năng đậu quả và hạn chế rụng trái.

+ Lần 3 (lúc hoa rộ): 10 kg mỗi loại.

+ Lần 4 (sau lần thu hoạch trái đầu tiên): 7kg mỗi loại. Cây cần được bón thúc thêm sau mỗi lần thu hoạch quả.

* *Các chỉ tiêu theo dõi*

- Chỉ tiêu sinh trưởng, phát triển: + Ghi nhận thời gian ra hoa, đậu trái và từ khi đậu trái đến khi trái chính (ngày), + Ghi nhận thời gian thu hoạch quả đến khi tàn cây (ngày) Chiều cao cây (cm); Đường kính gốc thân (cm); Kích thước lá (cm); Số nhánh cấp 1, số nhánh cấp 2 (nhánh/cây). Định kỳ theo dõi 2, 4, 6, 8 tuần.

- Chỉ tiêu năng suất:

+ Số lượng hoa/cây (hoa); Số lượng quả/cây (quả); Số quả thu hoạch/cây (quả) + Trọng lượng quả (gram)

+ Đường kính quả (cm): đo bằng thước kẹp

+ Phần trăm quả loại 1 (tổng số quả thu loại 1/ tổng số quả thu loại khác): quả loại 1 là quả đạt tiêu chuẩn về chất lượng, đường kính quả lớn hơn 3 cm, có màu sắc đẹp, trái không có vết bệnh.

Khảo sát các chỉ tiêu chất lượng của trái thù lù Nam Mỹ

+ Độ Brix (%): đo độ brix của 3 quả/nghiệm thức bằng máy quang kế Atago, Nhật.

+ Độ cứng quả: Sử dụng máy đo cấu trúc TA

+ Hàm lượng Vitamin C: phương pháp chuẩn độ với Iod.

Phân tích số liệu

Các số liệu thu thập được xử lý phần mềm Microsoft Excel và phân tích thống kê bằng phần mềm SPSS.

KẾT QUẢ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của phân bón đến sự ra hoa và quả thù lù Nam Mỹ

Kết quả thí nghiệm cho thấy cây thù lù thích nghi tốt với khí hậu Việt Nam khi cây sinh trưởng và cho năng suất trái khá hiệu quả. Số ngày ra hoa ở các nghiệm thức không có sự chênh lệch nhiều dao động từ 13,67 – 16,40 ngày. Tương tự, thời gian đậu quả trung bình từ 6,20 – 8,40 ngày. Thời gian từ khi đậu quả đến quả chính trung bình từ 29,07 – 32,60 ngày. Các nghiệm thức chỉ có phân hữu cơ (P1) và hữu cơ khoáng HCMK (P2) có thời gian ra hoa đậu quả và thời gian quả chính kéo dài hơn so với các nghiệm thức phân có chứa phân hóa học (P3,

P4, P5) các nghiệm thức phân này có thời gian ra hoa, đậu quả và quả chính nhanh hơn, thời gian thu hoạch đồng đều hơn. Hoa thù lù khi mới xuất hiện rất nhỏ, hoa nở màu vàng tươi và có bao phấn ở giữa (Ganapathi *et al.,* 1991), khi đậu đài hoa bằng giấy phồng lên bao quanh từng quả mọng và quả tiếp tục phát triển đến khi chín vỏ tách ra trái chuyển sang màu vàng nhạt. Đây cũng là giai đoạn tiến hành thu hoạch quả (Heinze, Midasch, 1991). Do có vòng đời ngắn nên cây thù lù chỉ thu hoạch 2 – 3 đợt trái trên vụ trồng.

Bảng 1. Ảnh hưởng của phân bón đến thời gian ra hoa, đậu quả và chín của quả

Nghiệm thức	Ngày ra hoa (Ngày)	Ngày đậu quả (Ngày)	Ngày quả chín (Ngày)
P1	16,40^{a}	24,80^{a}	32,60^{a}
P2	15,93^{ab}	23,53^{b}	31,00^{b}
P3	14,53^{b}	21,27^{c}	29,93^{c}
P4	13,93^{c}	20,13^{d}	29,07^{c}
P5	13,67^{c}	20,67^{cd}	29.93^{c}
Mức ý nghĩa	*	*	*

*Chú thích: Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các trị số có cùng ký tự đi kèm khác biệt không có ý nghĩa thống kê; *: khác biệt có ý nghĩa mức 5%,*

Ảnh hưởng của phân bón đến khả năng sinh trưởng của cây thù lù Nam Mỹ

- Chiều cao cây

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, trong 2 tuần đầu các nghiệm thức phân bón chưa tác động nhiều đến sự tăng trưởng chiều cao của cây thù lù. Tuy nhiên, giai đoạn 4 – 6 tuần cây bắt đầu sinh trưởng nhanh và có sự ảnh hưởng đến chiều cao khác nhau giữa các nghiệm thức phân bón. Trong đó, nghiệm thức Phân hữu cơ vi sinh Đầu trâu HCMK + Phân hóa học NPK đều cho chiều cao cây cao nhất 101,27 cm (tuần 4) và 118,2 cm (tuần 6). Giai đoạn 8 – 9 tuần, cây tăng trưởng chậm lại do cây bắt đầu tập trung dinh dưỡng để hình thành và phát triển trái, nghiệm thức kết hợp giữa phân Đầu trâu HCMK + Phân hóa học NPK vẫn cho thấy sự vượt trội hơn các nghiệm thức còn lại.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nghiệm thức phân bón đến chiều cao cây (cm) sau 9 tuần trồng

Nghiệm thức	2 tuần	4 tuần	6 tuần	8 tuần	9 tuần
P1	55.73^{d}	90,40^{e}	102,93^{e}	109,87^{e}	118,40^{e}
P2	56,47^{c}	94,53^{d}	110,13^{d}	117,87^{d}	122,87^{d}
P3	57,47^{b}	98,93^{b}	116,27^{b}	127,73^{b}	133,27^{b}
P4	59,20^{a}	101,27^{a}	118,20^{a}	129,60^{a}	136,33^{a}
P5	56,80^{c}	97,27^{c}	114,60^{c}	123,80^{c}	127,73^{c}
Mức ý nghĩa	*	*	*	*	*

*Chú thích: Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các trị số có cùng ký tự đi kèm khác biệt không có ý nghĩa thống kê; *: khác biệt có ý nghĩa mức 5%,*

- Kích thước lá

Bảng 3. Ảnh hưởng của phân bón đến kích thước lá sau 9 tuần trồng

Nghiệm thức	Kích thước lá									
	Chiều dài lá (cm)					Chiều rộng lá (cm)				
	2 tuần	4 tuần	6 tuần	8 tuần	9 tuần	2 tuần	4 tuần	6 tuần	8 tuần	9 tuần
P1	6,17^{c}	8,23^{e}	8,64^{e}	6,83^{e}	5,83^{e}	2,39^{e}	4,77^{e}	5,15^{e}	3,70^{e}	2,93^{e}
P2	6,20^{c}	8,57^{d}	8,84^{d}	7,03^{d}	6,07^{d}	2,51^{d}	5,08^{d}	5,31^{d}	3,92^{d}	3,23^{d}
P3	6,94^{a}	9,01^{b}	9,53^{b}	7,42^{b}	6,42^{b}	3,61^{b}	6,05^{b}	6,57^{b}	5,03^{b}	3,54^{b}
P4	7,05^{a}	9,33^{a}	9,67^{a}	7,60^{a}	6,60^{a}	3,96^{a}	6,25^{a}	6,65^{a}	5,21^{a}	4,24^{a}
P5	6,47^{b}	8,80^{c}	9,17^{c}	7,27^{c}	6,27^{c}	3,38^{c}	5,84^{c}	6,37^{c}	4,85^{c}	3,41^{c}
Mức ý nghĩa	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

*Chú thích: Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các trị số có cùng ký tự đi kèm khác biệt không có ý nghĩa thống kê; *: khác biệt có ý nghĩa mức 5%.*

Kết quả bảng 3 cho thấy kích thước lá tăng trưởng từ 2 tuần đầu tiên tăng dần và đạt giá trị lớn nhất tuần thứ 6 ở nghiệm thức P4 với chiều dài đạt 9,67 cm, chiều rộng đạt 6,65 cm, sau đó kích thước lá giảm lại ở tuần 8 và tuần 9. Do thời gian đầu cây tập chung sinh trưởng, thời gian sau cây bắt đầu ra hoa và đậu quả cây bắt đầu tập trung dinh dưỡng cho việc nuôi quả, nên lá phát triển chậm lại. Các nghiệm thức có sử dụng phân NPK cho kích thước lá (dài/rộng) cao hơn khi không sử dụng, cây thù lù trong quá trình sinh trưởng cần lượng dinh dưỡng đủ lớn để phân hóa nhánh cho giai đoạn hình thành hoa và đậu quả tiếp theo.

- Đường kính gốc

Bảng 4. Ảnh hưởng của phân bón đến đường kính gốc (cm)

Nghiệm thức	2 tuần	4 tuần	6 tuần	8 tuần	9 tuần
P1	0,47^{c}	0,99^{b}	1,43^{e}	1,51^{e}	1,61^{e}
P2	0,52^{b}	1,08^{b}	1,51^{d}	1,75^{d}	1,85^{d}
P3	0,60^{a}	1,39^{a}	1,91^{b}	2,22^{b}	2,42^{b}
P4	0,62^{a}	1,46^{a}	2,13^{a}	2,42^{a}	2,53^{a}
P5	0,61^{a}	1,39^{a}	1,75^{c}	2,01^{c}	2,35^{c}
Mức ý nghĩa	*	*	*	*	*

*Chú thích: Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các trị số có cùng ký tự đi kèm khác biệt không có ý nghĩa thống kê, *: khác biệt có ý nghĩa mức 5%.*

Theo bảng 4, giai đoạn 2 – 4 tuần đầu đường kính gốc ở các nghiệm thức có sự chênh lệch không đáng kể. Tuy nhiên, sau 6 – 8 tuần trồng đường kính gốc có sự tăng trưởng rõ rệt, gốc to nhất ở P4 (Phân hữu cơ vi sinh Đầu trâu HCMK + Phân hóa học NPK) đạt 2,13 cm và 2,42 cm, thấp nhất là P1 (Phân hữu cơ) đạt 1,43 cm và 1,51 cm. Tương tự, ở tuần 9 nghiệm thức 4 (Phân hữu cơ khoáng Đầu trâu HCMK + phân hóa học NPK) vẫn có đường kính gốc cao nhất đạt 2,53 cm.

- Số nhánh

+ Số nhánh cấp 1

Theo kết quả ở bảng 5, số nhánh cấp 1 tăng qua các tuần và đạt số nhánh cao nhất ở tuần 8 và 9, đây là giai đoạn cây tập trung cho việc ra hoa đậu quả nên số nhánh không gia tăng thêm. Trong đó số nhánh cấp 1 ở P4 (Phân hữu cơ khoáng HCMK + Phân hóa học NPK) là cao nhất đạt 19,40 nhánh ở tuần 8 và tuần 9.

+ Số nhánh cấp 2

Tương tự, số nhánh cấp 2 gia tăng qua các tuần, nghiệm thứ P4 (đạt 37,8 nhánh) vẫn thể hiện sự vượt trội hơn so với các nghiệm thức còn lại. Số nhánh nhánh cấp 2 phụ thuộc vào số lượng nhánh cấp 1 nên lần lấy chỉ tiêu giữa tuần 8 và tuần 9 số nhánh cấp 2 không tăng thêm. Do số nhánh cấp 1 không tăng thêm.

Bảng 5. Ảnh hưởng của nghiệm thức phân bón đến số nhánh cấp 1 sau 9 tuần trồng

Nghiệm thức	Số nhánh cấp 1				
	2 tuần	4 tuần	6 tuần	8 tuần	9 tuần
P1	5,87^{d}	9,73^{e}	11,40^{e}	12,40^{e}	12,40^{e}
P2	6,40^{c}	11,20^{d}	12,87^{d}	14,07^{d}	14,07^{d}
P3	7,13^{b}	13,60^{b}	15,13^{c}	16,13^{c}	16,13^{c}
P4	7,93^{a}	15,80^{a}	18,47^{a}	19,40^{a}	19,40^{a}
P5	7,20^{b}	13,00^{c}	15,80^{b}	16,80^{b}	16,80^{b}
Mức ý nghĩa	*	*	*	*	*

*Chú thích: Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các trị số có cùng ký tự đi kèm khác biệt không có ý nghĩa thống kê; *: khác biệt có ý nghĩa mức 5%,*

Bảng 6. Ảnh hưởng của nghiệm thức phân bón đến số nhánh cấp 2 sau 9 tuần trồng

Nghiệm thức	Số nhánh cấp 2				
	2 tuần	4 tuần	6 tuần	8 tuần	9 tuần
P1	10,33^{d}	18,67^{d}	22,00^{e}	23,80^{e}	23,80^{e}
P2	11,60^{c}	21,20^{c}	24,73^{d}	27,13^{d}	27,13^{d}

P3	13,40[b]	25,20[b]	28,80[c]	31,27[c]	31,27[c]
P4	15,00[a]	29,53[a]	35,00[a]	37,80[a]	37,80[a]
P5	13,53[b]	25,47[b]	30,53[b]	32,53[b]	32,53[b]
Mức ý nghĩa	*	*	*	*	*

*Chú thích: Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các trị số có cùng ký tự đi kèm khác biệt không có ý nghĩa thống kê; *: khác biệt có ý nghĩa mức 5%,*

Ảnh hưởng của phân bón đến năng suất thực tế của cây thù lù Nam Mỹ

Bảng 7. Ảnh hưởng của phân bón đến các yếu tố cấu thành năng suất

Nghiệm thức	Tổng số hoa (hoa/cây)	Tổng số quả đậu (quả/cây)	Tổng số quả thực thu (quả/cây)	Tổng trọng lượng quả thu (g/cây)
P1	407,93[c]	198,87[d]	23,27[d]	1093,96[c]
P2	423,47[c]	231,27[c]	26,20[c]	1234,91[d]
P3	462,20[b]	264,87[b]	33,00[b]	1618,31[b]
P4	504,27[a]	296,87[a]	38,00[a]	1819,83[a]
P5	447,27[b]	251,73[b]	31,00[b]	1519,07[c]
Mức ý nghĩa	*	*	*	*

*Chú thích: Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các trị số có cùng ký tự đi kèm khác biệt không có ý nghĩa thống kê; *: khác biệt có ý nghĩa mức 5%,*

Sau khoảng 6,20 – 8,40 ngày ra hoa cây sẽ đậu quả. Tuy nhiên tỉ lệ quả đậu thấp hơn nhiều so với số lượng hoa. Kết quả ở bảng 7 cho thấy số lượng hoa ở nghiệm thức 4 là 504,27 hoa/cây nhưng chỉ đậu 296,87 quả, số lượng quả đậu luôn luôn thấp hơn nhiều so với số lượng hoa có trên cây, tương tự các nghiệm thức còn lại cũng có tỉ lệ quả đậu với số lượng hoa luôn thấp. Trong đó số lượng quả thu được thấp hơn nhiều (23,27 – 38,0 quả/cây) so với tổng số quả đậu (bảng 7). Nguyên nhân do ảnh hưởng của thời tiết xuất hiện mưa khi cây đang ở giai doạn cây ra hoa và trái non mới hình thành, bên cạnh đó sậu bệnh hại xuất hiện làm cho sản lượng trái giảm nhiều.

Kết quả thu được chỉ chiếm 12,8% (P4) tổng số quả đậu. Trọng lượng quả thu được ở nghiệm thức sử dụng phân hữu cơ khoáng Đầu Trâu HCMK + phân hóa học NPK (Đầu trâu NPK 16-16-16 + TE) cho tổng lượng đạt 1819,83 gram/cây cao hơn so với các nghiệm thức khác. Điều này cho thấy tiềm năng năng suất của cây Thù lù Nam Mỹ sẽ rất cao nếu có nghiên cứu sâu hơn về các yếu tố ảnh hưởng đến sự nuôi dưỡng trái tốt, giúp tăng số quả thu được và gia tăng năng suất toàn vụ.

Ảnh hưởng của phân bón đến chất lượng quả thù lù Nam Mỹ

Quả loại 1 là những quả đạt đường kính lớn hơn 2,5 cm, có màu sắc đẹp, độ chính vừa phải, không có vết bệnh Qua bảng 4 ta thấy phần trăm quả loại 1 giữa các nghiệm thức có sự khác biệt ở mức ý nghĩa thống kê 5%, dao động từ 80,31 – 95,32%. Chất lượng quả loại 1 cao nhất được ghi nhận ở nghiệm thức 4 (95,32%).

Đường kính quả trung bình dao động từ 2,65 – 3,21 cm. Đường kính quả lớn nhất thuộc về nghiệm thức P4 (3,21cm). Ngoài ra, càng thu hoạch về sau số lượng quả loại loại 1 sẽ càng giảm.

Bảng 8. Ảnh hưởng của phân bón đến chất lượng quả qua các nghiệm thức

Nghiệm thức	Phần trăm quả loại 1 (%)	Đường kính quả (cm)	Độ brix (%)
P1	80,31[e]	2,65[d]	8,07[b]
P2	85,67[d]	2,86[c]	8,40[ab]
P3	92,63[b]	3,07[b]	8,47[ab]
P4	95,32[a]	3,21[a]	8,80[a]
P5	90,76[c]	3,03[b]	6,60[c]
Mức ý nghĩa	*	*	*

*Chú thích: Trong cùng một nhóm giá trị trung bình, các trị số có cùng ký tự đi kèm khác biệt không có ý nghĩa thống kê; *: khác biệt có ý nghĩa mức 5%,*

Độ brix của quả thù lù giao động từ 6,60 – 8,80. Trong đó, cao nhất là nghiệm thức 3 (8,80%). Ở các nghiệm thức có sử dụng phân hữu cơ (P1; P3) và phân hữu cơ khoáng Đầu Trâu HCMK (P2; P4), độ brix của các nghiệm thức có giá trị cao hơn nghiệm thức chỉ sử dụng phân hóa học (P5).

Từ các kết quả trên nhận thấy khi không sử dụng phân bón hóa học mà chỉ sử dụng phân hữu cơ hoặc hữu cơ khoáng HCMK, các nghiệm thức này cho ra năng suất và khả năng sinh trưởng kém hơn. Cây phát triển chậm, cho năng suất kém, quả không đồng đều chính không đồng loạt. Đường kính quả nhỏ (>3cm); thời gian ra hoa (>15 ngày); thời gian đậu quả (>7 ngày); thời gian quả chính (>30 ngày) dài hơn các nghiệm thức có sử dụng phân bón hóa học. Ngược lại, nếu chỉ sử dụng phân bón hóa học NPK, các cây trong nghiệm thức này phát triển nhanh và đông đều tuy nhiên cây dễ bệnh, dễ bị côn trùng tấn công, cành nhánh mềm dễ gẫy. Độ brix thấp (6,60%) hơn nhiều với các nghiệm thức có phân hữu cơ và hữu cơ khoáng.

Khảo sát các chỉ tiêu chất lượng của trái thù lù Nam Mỹ

Độ cứng thịt quả là một chỉ tiêu quan trọng đánh giá mức độ chín của trái thù lù trong quá trình thu hái và bảo quản. Việc giảm độ cứng của trái cây là do quá trình thủy phân cellulose và hemicellulose và sau một thời gian bảo quản thì các protopectin không hòa tan được chuyển thành pectin hòa tan làm mô thịt mềm (Lý Nguyễn Bình *et al.,* 2006). Kết quản phân tích cho thấy khi thù lù chưa chín, độ cứng thịt quả rất cứng (970,3), sau một thời gian bảo quản trái bắt đầu chín dần, làm cho độ cứng giảm.

Bảng 9. Các chỉ tiêu đánh giá chất lượng của trái thù lù Nam Mỹ

Ngày bảo quản	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
Độ cứng (kg lực/cm^2)	970,3	813,7	643,0	438,0	304,7	181,7	153,7	121,3	52,7	27,0	5,7
Độ Brix (%)	5,0	5,3	5,8	6,3	7,0	7,8	8,7	9,4	10,2	11,0	11,3
Vitamin C (mg/100g)	9,3	10,5	11,3	9,6	8,5	8,2	7,5	6,2	5,6	5,1	3,4

Ngược lại độ cứng của quả thì độ Brix tăng dần theo thời gian bảo quản. chứa chất rắn hòa tan, với đường fructose là đường chính. Các quả chưa chín hoặc tỷ lệ chín thấp thì tiếp tục chín trong quá trình bảo quản, tinh bột chuyển thành đường, một phần được sử dụng để sinh nhiệt, phần còn lại tích tụ trong quả làm tổng lượng đường trong quả tăng theo thời gian bảo quản. Với quá trình thủy phân thành tế bào, trong đó polysaccharide bị phân hủy thành monosaccharide (Menéndez Aguirre *et al.,* 2006). Kết quả bảng 5 cho thấy hàm lượng chất khô hòa tan của thù lù có xu hướng tăng dần theo thời gian bảo quản. Nguyên nhân là do glucid là thành phần thay đổi lớn và mạnh nhất trong khi bảo quản, chất khô hòa tan của quả biến đổi, quá trình biến đổi những chất không tan (tinh bột, protopectin, cenlulose…) thành chất hòa tan, vì vậy hàm lượng chất khô hòa tan tăng trong quá trình bảo quản. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu về quá trình bảo quản sau thu hoạch, hàm lượng chất khô hòa tan tăng và ổn định ở giai đoạn cuối (Zhu *et al.,* 2008).

Bên cạnh đó, Vitamin C là vi chất dinh dưỡng quan trọng trong quả thù lù Nam Mỹ là nguồn cung cấp tốt tiền vitamin A, khoáng chất, acid béo, vitamin C và phức hợp vitamin B, chẳng hạn như thiamine, niacin và vitamin B12 (Ramadan, 2011). Kết quả cho thấy ở nhiệt độ thường hàm lượng vitamin C tăng sau 4 ngày thu hái đạt đến 11,3 mg/100g so với 9,3 mg/100g lúc mới hái, sau đó giảm nhanh theo thời gian bảo quản. Điều này là do từ giai đoạn xanh già chuyển sang chín có nhiều loại vitamin tạo thành như vitamin B9, B15, P, K, tiền vitamin A,... đặc biệt vitamin C tăng lên rõ rệt nhưng khi chín quá thì hàm lượng này bị giảm, vitamin C lại dễ bị oxy hóa và bị chuyển thành dạng dehydroascorbic dễ bị phân hủy dưới tác dụng của nhiệt độ. Hàm lượng vitamin C giảm nhanh trong quá trình bảo quản, nhất là trong điều kiện nhiệt độ cao và thời gian bảo quản dài.

KẾT LUẬN

Nghiệm thức phân bón có sự kết hợp giữa phân Đầu Trâu hữu cơ khoáng HCMK và phân hóa học NPK cho kết quả tốt về các chỉ tiêu sinh trưởng như đường kính gốc (2,53 cm); chiều cao cây (136,33 cm); chiều dài lớn nhất (9,67 cm); chiều rộng lá lớn nhất (6,65 cm); số nhánh cấp 1 (19,40 nhánh); số nhánh cấp 2 (37,80 nhánh); Khi sử dụng kết hợp giữa phân Đầu Trâu hữu cơ khoáng HCMK và phân hóa học NPK cho ra các kết quả tốt về năng suất thu hoạch: tổng số hoa (504,27 hoa); tổng số quả (296,87 quả); tổng số quả thực thu (38,0 quả); phần trăm quả loại 1 (95,32%); tổng trọng lượng quả thu (1819,83 g); số ngày ra hoa (13,93 ngày); số ngày đậu quả (6,20 ngày); từ khi đậu quả đến quả chính (29,07 ngày); đường kính quả (3,21cm); độ brix (8,80 %). Đều cho kết quả tối ưu hơn các nghiệm thức còn lại. Mặc khác, đây là loại trái cây có chứa hàm lượng Vitamin C tương đối tốt, đạt cao nhất là 11,3 mg/100g.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Galarza, Daniella (2013). This Goose(berry) is Cooked: Let's Talk About the Pichuberry. *Los Angeles Magazine,*10-11

García-Mendieta A, Olguín MT, Solache-RíosM (2012). Biosorption properties of green tomato husk (*Physalis philadelphica* L.) for iron, manganese and iron–manganese from aqueous systems. *Desalination*,284 (4): 167-174.

Ganapathi A, Sudhakaran S, Kulothungan S (1991) The diploid taxon in Indian natural populations of *Physalis* L. and its taxonomic significance. *Cytologia,* 56(2):283-288.

González-Pérez JE, & Guerrero-Beltrán JA (2021). Tomatillo or husk tomato (Physalis philadelphica and Physalis ixocarpa): A review. *Scientia Horticulturae,* 288: 110306.

Heinze W, Midasch M (1991) Photoperiodic reaction of *Physalis peruvi*ana L. (Photoperiodische Reaktion von *Physalis peruviana* L.) *Gartenbauwissenschaft*, 56(6):262-264.

Lý Nguyễn Bình, Nguyễn Văn Mười, Nguyễn Nhật Minh Phương, Lâm Thị Việt Hà, Võ Xuân (2006). Ảnh hưởng của nhiệt độ và bao bì đến chất lượng và thời gian bảo quản xoài cát Hòa Lộc. *Tạp chí Khoa học. Trường Đại học Cần Thơ,* 9-17.

Maldonado E, Pérez-Castorena AL, Garcés C, Martínez M (2011). Philadelphicalactones C and D and other cytotoxic compounds from *Physalis philadelphica*. *Steroids,* 76(7):724-728.

Menéndez Aguirre O, Lozano SE, Ocampo MA, Torres KB, Martínez AdV, Aparicio AJ (2006). Cambios en la actividad de α-amilasa, pectinmetilesterasa y poligalacturonasa durante la maduración del maracuyá amarillo (*Passiflora edulis* var. flavicarpa Degener). *Interciencia*, 31(10):728-733.

Ramadan MF (2011) Bioactive phytochemicals, nutritional value, and functional properties of cape gooseberry (*Physalis peruviana*): An overview. *Food Res Int,* 44:1830-6.

Zhu X, Wang Q, Cao J, Jiang (2008). Effects of chitosan coating on post harvest quality ofmango (*Mangifera indica* L. cv. Tainong) fruits. *Journal ofFood Processing and Preservation*, 32(5):770-784.

EFFECT OF FERTILIZER COMBINATION ON THE GROWTH AND YIELD OF MEXICO (*Physalis philadelphica*) CULTIVATED IN AN GIANG

Nguyen Thi My Duyen[1*], Nguyen Minh Thang[1], Nguyen Thi Hoang My[1], Nguyen Minh Trang[2]

[1]*An Giang University, University of the National University of Ho Chi Minh City*

[2]*Department of Agriculture and Rural Development of An Giang province*

SUMMARY

The Mexico tomatillo (*Physalis philadelphica*) is currently a plant of great interest, considered a highly nutritious fruit beneficial to health, with significant economic value and popular in many countries. In our country, this tomatillo variety is also garnering attention. Study on the effect of fertilizer (organic) on the growth and yield of Mexico tomatillo (*Physalis philadelphica*) was conducted using a completely randomized block design with 5 fertilizer treatments and 3 replications. The results showed that the HCMK organic mineral fertilizer + NPK chemical fertilizer combination was suitable for the development of the tomatillo in terms of stem diameter (2.53 cm), plant height (136.33 cm), maximum leaf length (9.67 cm), maximum leaf width (6.65 cm), number of primary branches (19.40 branches), and number of secondary branches (37.80 branches). Additionally, this treatment yielded a high harvest with a total fruit count (38,0 fruits), percentage of grade 1 fruits (95.32%), total fruit weight (1819,83 g), days to flowering (13.93 days), days to fruit set (6.20 days), days from fruit set to ripening (29.07 days), fruit diameter (3.21 cm), and Brix degree (8.80%). Vitamin C content fluctuates according to the ripeness of the fruit from 9.26 - 11.29 mg/100g. This shows that cultivating this new crop with a reasonable amount of organic fertilizer still ensures crop productivity, while also helping to create valuable, safe and healthy products.

Keywords: HCMK organic mineral fertilizer, NPK fertilizer, *Physalis philadelphica*, Mexico tomatillo, tomatillo.

[*] Author for correspondence: Tel: +84-989054641; Email: ntmduyen@agu.edu.vn

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KÍCH THÍCH SINH TRƯỞNG VÀ NÂNG CAO TÍNH CHỊU MẶN Ở CÂY LÚA CỦA CHỦNG VI KHUẨN *ENTEROBACTER MORI* RS1

Lê Văn Mạnh, Hồ Mạnh Tường, Nguyễn Thị Hồng Hà, Phan Quyền, Bùi Phương Thảo, Chu Hoàng Hà, Đỗ Tiến Phát*

Viện công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Lúa (*Oryza sativa* L.) là cây lương thực quan trọng của nước ta, đặc biệt ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long. Trước tình hình xâm nhập mặn nghiêm trọng tại đây, việc tìm chế phẩm vi sinh nhằm cải thiện năng suất, thân thiện với môi trường và sử dụng trong điều kiện hạn mặn là điều kiện cần thiết. Vi sinh vật kích thích sinh trưởng thực vật (Plant growth promoting rhizobacteria - PGPR) là những vi sinh vật cứ trú tại vùng rễ, có tác động tới sự sinh trưởng và chống chịu mầm bệnh của cây trồng thông qua một số con đường trực tiếp hoặc gián tiếp. Mục tiêu của nghiên cứu là đánh giá khả năng kích thích sinh trưởng và khả năng chống chịu mặn trên cây lúa của chủng *Enterobacter mori* RS1 được phân lập tại Đồng bằng sông Cửu Long. Các thí nghiệm *in vitro* cho thấy chủng RS1 có khả năng cố định N, phân giải P và Ca tại chỉ số phân giải SI lần lượt là 1.39 và 1.35, sản sinh phytohormone IAA ở mức 1.35 µg/mL, sản sinh màng sinh học biofilm, chống chịu với mặn ở 8% NaCl (1370mM NaCl) và cải thiện sinh trưởng ở cây lúa. Sự biểu hiện của các gen liên quan đến tính chống chịu mặn trên cây lúa được lây nhiễm với chủng RS1 là cao hơn với cây đối chứng ở 100 mM. Kết quả cho thấy chủng *Enterobacter mori* RS1 là chủng vi sinh vật có khả năng kích thích sinh trưởng và chống chịu mặn cho cây lúa và có thể sử dụng để phát triển các chế phẩm vi sinh phục vụ cho nông nghiệp.

Từ khóa: PGPR, lúa, chịu mặn, Đồng bằng sông Cửu Long.

MỞ ĐẦU

Lúa (*Oryza sativa* L.) là cây lương thực chiếm vị trí quan trọng hàng đầu ở Việt Nam và trên thế giới. Hiện nay, hơn 110 nước trên thế giới đang sản xuất lúa gạo, trong đó, Châu Á là vùng sản xuất lúa gạo chủ yếu chiếm 90% về sản lượng cũng như về diện tích. Tuy nhiên, lúa là cây lương thực rất nhạy cảm với mặn, việc tăng độ nhiễm mặn trong đất làm cho cây lúa dễ bị tổn thương, đồng thời ức chế sinh trưởng và phát triển của cây (Collard *et al*., 2013). Stress mặn có thể được coi là stress phổ biến nhất mà cây trồng phải đối mặt hiện nay, ảnh hưởng đến hơn 20% diện tích đất canh tác, trong đó bao gồm một nửa diện tích tưới tiêu và tỷ lệ này dự kiến sẽ tăng lên trong tương. Tác động tiêu cực của stress mặn là làm giảm sự nảy mầm hạt, sự phát triển của cây con và của lá, cũng như giảm diện tích quang hợp đã được ghi nhận ở các nghiên cứu trước. Nguyên nhân chính gây hại cho cây lúa trong môi trường mặn là do sự hấp thụ ion Na^+ quá mức dẫn đến độc tố ion và stress thẩm thấu. Trong hoàn cảnh môi trường đất bị xâm nhập mặn một cách đáng nghiêm trọng, kèm theo đó là vấn đề thiếu nguồn nước ngọt đáng kể thì giải pháp hiện tại là sử dụng chế phẩm vi sinh để cải thiện những vùng đất bị nhiễm mặn đã được đưa ra (Hameed *et al*., 2008).

PGPR là vi khuẩn nội sinh thực vật cư trú bên trong rễ, thúc đẩy sinh trưởng của cây trồng thông qua một số con đường trực tiếp hoặc gián tiếp nhờ khả năng *cố định đạm, hòa tan các chất khó tan và tăng khả năng chống chịu của cây trước các yếu tố stress từ môi trường.* Trong những nghiên cứu gần đây, nhiều chủng khuẩn thuộc nhóm vi sinh vật PGPR đã được tìm ra và nghiên cứu, điển hình một số loài thuộc các chi như: *Pseudomonas* sp., *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Enterobacter* sp., *Gluconacetobacter* sp., *Herbaspirillum* sp., *Klebsiella* sp., *Paenibacillus* và *Serratia* (Andrade *et al*., 2023). Trước đó, 12 chủng vi khuẩn được phân lập từ vùng rễ của cây lúa tại vùng đất nhiễm mặn thuộc vùng đồng bằng sông Cửu Long. Chủng *Enterobacter mori* RS1 được lựa chọn nhằm đánh giá khả năng kích thích sinh trưởng ở cây lúa trong số chủng vi khuẩn đã phân lập. Chủng vi khuẩn được định danh, khảo sát một số các hoạt tính hóa sinh của chúng, đồng nuôi cấy với thực vật nhằm đánh giá khả năng kích thích sinh trưởng và tăng khả năng chống chịu mặn trên dòng lúa KD18.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Chủng vi khuẩn nội sinh được phân lập từ mẫu rễ cây lúa từ vùng đất nhiễm mặn ở Kiên Giang. Chủng khuẩn được lưu giữ dài hạn ở -80^{o}C trong dung dịch glycerol 20%. Hạt giống lúa KD18 đạt chuẩn từ Vinaseed – Công ty cổ phần tập đoàn cây trồng Việt Nam được.

Hóa chất, thiết bị và môi trường sử dụng trong nghiên cứu được cung cấp từ Phòng Công nghê Tế bào Thực vật trực thuộc Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phương pháp

Định danh vi khuẩn

DNA vi khuẩn sẽ được tách chiết theo phương pháp Alkaline lysis buffer thuộc hãng Thermo Fisher Scientific như sau: Cho 20 µL Alkaline lysis buffer (2,5 ml 10% SDS, 5,0 ml 1N NaOH và 92.5 ml H_2O khử trùng). Bổ sung 2 µL dung dịch vi khuẩn nuôi qua đêm tại 28^oC vào ống đựng dung dịch Alkaline lysis buffer và trộn đều. Đặt ống có chứa dung dịch khuẩn và Alkaline lysis buffer vào máy PCR với chu trình nhiệt 95^oC trong vòng 10 phút. Sau đó đặt các ống này trên đá trong vòng 15 phút. Thêm 180 µL H_2O khử trùng vào mỗi ống và ly tâm ở 4000 vòng/phút trong 5 phút. Dịch nổi được chuyển sang ống 200 µL mới và sử dụng như khuôn DNA cho các thí nghiệm tiếp theo.

Chủng vi sinh vật được xác định bằng phản ứng PCR để nhân trình tự gen 16S rRNA với cặp mồi 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5'-ACGGCTACCTTGTTA- 3'). Các phản ứng PCR được thực hiện với 25 µL thể tích bao gồm: 12,5 µL MasterMix (Thermo Fisher Scientific): 1 µL mỗi loại mồi 27F/1492R (100 pM), 1 µL DNA khuôn (100 ng), 9,5 µL H_2O. Phản ứng được tiến hành trên máy PCR hãng BIO RAD T100^{TM} Thermal Cycler với chu trình nhiệt như sau: biến tính ban đầu ở 94^oC trong 5 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ biến tính ở 94^oC trong 30 giây, bắt cặp ở 55^oC trong 30 giây và kéo dài ở 72^oC trong 1 phút 30 giây, với bước kéo dài cuối cùng ở 72^oC trong 10 phút. Các sản phẩm PCR (khoảng 1465 bp) được giải trình tự thương mại tại công ty LOBI Vietnam. Trình tự DNA được tìm kiếm bằng công cụ BLAST trên cơ sở dữ liệu NCBI GenBank và được so sánh trong phần mền MEGA X.

Khảo sát các đặc điểm hóa sinh của chủng RS1 trong điều kiện in vitro

Khảo sát khả năng cố định đạm của vi khuẩn bằng môi trường Ashby là phương pháp phổ biến để xác định vi khuẩn có khả năng cố định đạm tự do. Môi trường Ashby không chứa nguồn đạm cố định mà chỉ cung cấp các thành phần cơ bản cần thiết cho sự phát triển của vi khuẩn, từ đó dựa vào khả năng hình thành khuẩn lạc phát triển trên mặt thạch sau 07 ngày nuôi cấy ở 28^oC nhằm đưa ra kết quả về khả năng cố định đạm của vi khuẩn (Tian *et al.,* 2023).

Khả năng phân giải phosphate khó tan (P) được xác định bằng sự xuất hiện của vòng phân giải $Ca_3(PO_4)_2$ trên môi trường PKO - Pikovskaya's agar sau 07 ngày nuôi cấy ở 28^oC. Đồng thời, phân giải canxi (Ca) được quan sát bởi sự xuất hiện của vòng phân giải $CaCO_3$ trên môi trường CDB's agar sau 07 ngày nuôi cấy ở 28^oC (Peper et al., 2024). Chỉ số phân giải P, Ca được xác định theo công thức: SI = D/d. Trong đó: SI là chỉ số phân giải; D là đường kính vòng phân giải (cm); d là đường kính vòng khuẩn (cm).

Khả năng sản sinh phytohormone IAA của vi khuẩn trong môi trường LB + 0,1% tryptophan sau 07 ngày nuôi cấy được định lượng bằng phương pháp so màu với thuốc thử Salkowski ở bước sóng 520 nm (Gang et al., 2019). Khả năng sản sinh màng sinh học được xác định với thuốc nhuộm crystal violet ở bước sóng 580 nm sau khi nuôi cấy vi khuẩn trong môi trường LB sau 07 ngày, ở 28^oC, điều kiện tối trên đĩa 96 giếng (Nagant et al., 2010). Đánh giá khả năng chống chịu mặn của vi khuẩn được khảo sát qua thí nghiệm nuôi cấy chủng khuẩn trong môi trường LB chứa các nồng NaCl khác nhau sau 07 ngày, ở 28^oC.

Đánh giá khả năng kích thích sinh trưởng của RS1 trên cây lúa KD18 trong điều kiện in vitro

Các hạt lúa KD18 khỏe mạnh và đồng đều được đem đi khử trùng trong dung dịch Ethanol 70% trong 01 phút, Javen 60% trong 20 phút, sau đó rửa 05 lần bằng nước cất khử trùng. Chủng khuẩn RS1 được nuôi hoạt hóa trong môi trường LB lỏng ở 28°C trong 4 h. Sau đó, dịch khuẩn được đem đi ly tâm 6000 vòng/phút, thu được cặn khuẩn. Hòa loãng cặn khuẩn cùng nước cất khử trùng nhằm thu được dịch khuẩn có OD = 0,01. Bổ sung 1 mL dung dịch khuẩn thu được vào trong đĩa peptri đã chứa dung dịch NaCl ở các nồng độ khác nhau (0 mM, 100 mM) cùng 50 hạt giống lúa KD18. Sau 07 ngày, đánh giá khối lượng tươi của cây con thu được.

Đánh giá biểu hiện gen

Mẫu rễ của cây con trong thí nghiệm đánh đánh giá kích thích sinh trưởng và chống chịu mặn sau 07 ngày xử lý mặn sẽ được thu lại và bảo quản trong -80^oC. Sau đó, việc tách chiết RNA được thực hiện bằng Trizon (Chomczynski *et al.,* 1995) với một số thay đổi. Cụ thể, các mẫu rễ được nghiền bằng máy nghiền Mill MM 400 (Retsch, Đức) với bi sắt trong 02 phút. Sau đó, 1 mL Trizol được thêm vào các ống, đảo nhẹ trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Tiếp theo, 200 mL chloroform/isoamylalcohol (tỉ lệ 24:1, v/v) được thêm vào mỗi ống và ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 15 phút. Các ống eppendorf 1,5 mL chứa 600 µL dịch nổi được thêm isopropanol lạnh theo tỷ lệ 1:1 (v/v). Quá trình kết tủa RNA được thực hiện ở -20°C trong ít nhất 30 phút và kết quả RNA thu được bằng cách ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 15 phút. Sản phẩm được rửa hai lần bằng EtOH 70%, làm khô và hòa tan trong 50 µL H_2O khử trùng. cDNA được tổng hợp bằng bộ Kit tổng hợp cDNA RevertAid First Strand (Thermo Fisher Scientific) với 1 µg mRNA làm mẫu. Realtime-qPCR định lượng được thực hiện thông qua hệ thống Realtime-qPCR Rotor Gene Q (Qiagen, Hoa Kỳ) với ba lần lặp lại, sử dụng mồi khuyếch đại gồm có: OsAREB1F: TTCAAAGGTGGGCTGAGG; OsAREB1R: GCAGACTCCCTGTTCATTGAT; OsLEA3-1F: AATGATTTCCCTTTGGTGTC; OsLEA3-1R: CATCAGTACACATCACCCA; OsEREBP1F: CCAATGGATCCTCCGTGTATG; OsEREBP1R: CATCCAGGTGGAAGGCTATC; OsEREBP2F: TCGGAGTGCGTATCATCACCA; OsEREBP2R: AATCTGGCAGCTGCATCTCC; OsActin1 F: CGGTCGAACAACTGGTATCGT; OsActin1 R ATCCAACCGGAGGATAGCATG; với gen tham chiếu OsGAPDHF: AAGCCAGCATCCTATGCAGATT; OsGAPDHR: CAAAGATGCTTGACCTGTGTGTC. Sau đó, thực hiện theo chu

trình bao gồm: Khởi đầu ở 95^{o}C trong 3 phút, 40 chu kỳ 95^{o}C 10 giây, 60^{o}C 20 giây và tiếp theo là 72^{o}C 20 giây. Các gen được phân tích bằng qRT-PCR đối với cây lúa được mô tả trong báo cáo của Holmberg và đồng tác giả (2013).

Xử lý thống kê

Các thí nghiệm được lặp lại 03 lần. Sự khác biệt có ý nghĩa của các giá trị trung bình được xác nhận bằng kiểm định Duncan. Kết quả phân tích thống kê đươc xử lý bằng phần mềm GraphPad.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả đánh giá khả năng phân giải P khó tan

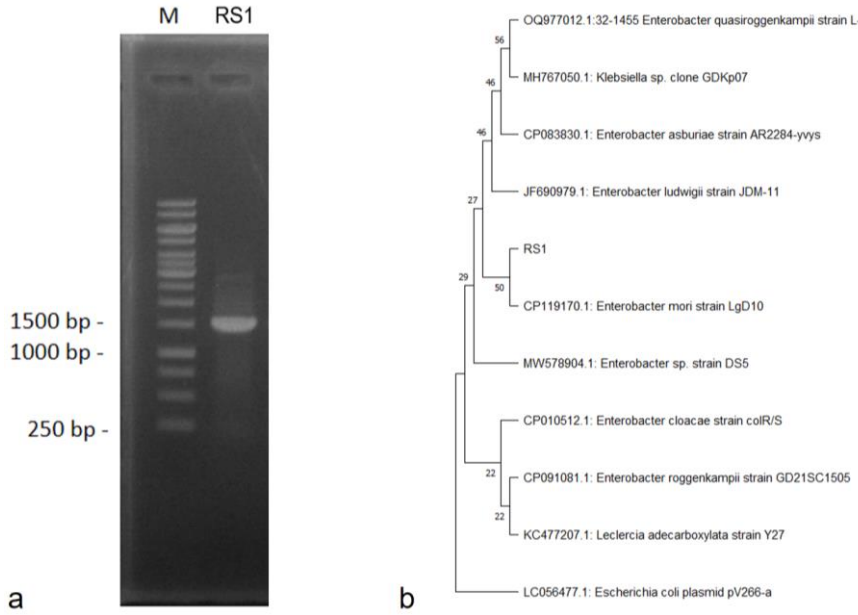
Phosphate là một nguyên tố thiết yếu cho sự sinh trưởng thực vật, vi khuẩn vùng rễ có thể chuyển đổi P từ dạng khó tan thành dạng dễ hấp thụ. Dựa trên khả năng kích thích sinh trưởng của vi sinh vật vùng rễ, khả năng phân giải P là yếu tố cần thiết để lựa chọn chủng khuẩn tiềm năng từ bộ sưu tập chủng đã được phân lập tại vùng đất nhiễm mặn thuộc Đồng bằng sông Cửu Long. Về mặt thực nghiệm có thể nhận biết khả năng hòa tan các dạng P khó tan nhờ sự hình thành vòng phân giải xung quanh khuẩn lạc trên môi trường thạch PKO. Kết quả trong Bảng 1 cho thấy chỉ số phân giải P bởi chủng RS1 bằng 1,39 ± 0,02 là cao nhất. Nhờ khả năng phân giải vượt trội, RS1 là chủng khuẩn tiềm năng được lựa chọn trong nhóm 12 chủng để thực hiện các thí nghiệm đánh giá tiếp theo.

Bảng 1. Kết quả đánh giá tuyển chọn chủng khuẩn có khả năng phân giải P

STT	Ký hiệu chủng	Chỉ số phân giải P (SI)	STT	Ký hiệu chủng	Chỉ số phân giải P (SI)
1	RS1	1,39 ± 0,02	7	RS7	1,15 ± 0,01
2	RS2	1,12 ± 0,02	8	RS8	1,29 ± 0,12
3	RS3	1,11 ± 0,03	9	RS9	1,15 ± 0,02
4	RS4	1,32 ± 0,02	10	RS10	1,12 ± 0,02
5	RS5	1,25 ± 0,05	11	RS11	1,22 ± 0,12
6	RS6	1,22 ± 0,10	12	RS12	1,14 ± 0,01

Kết quả định danh dòng vi khuẩn RS1

Dựa trên hình thái khuẩn lạc, hình thái khuẩn lạc và một số đặc điểm sinh hóa cơ bản của chủng vi khuẩn RS1, có thể xác định chủng vi khuẩn đã phân lập thuộc chi *Enterobacter.* Trình tự 16S rDNA đã được xác định và tìm kiếm trình tự tương đồng trên NCBI cho thấy độ tương đồng đạt 99,37% với chủng *Enterobacter mori* LgD10 (Hình 1).



Hình 1. Kết quả PCR nhân gen 16S rRNA từ chủng RS1 (a) và cây phân loài thể hiện sự tương đồng giữa RS1 và các chủng khuẩn khác (b)

Kết quả đánh giá một số đặc điểm hóa sinh *in vitro*

Trong tự nhiên, hoạt động cố định N của các nhóm vi khuẩn là nguồn cung cấp N chủ yếu cho thực vật. Khả năng cố định đạm được tìm thấy ở rất nhiều chi vi khuẩn vùng rễ *như Rhizobium, Azospirillium, Azotobacter, Acetobacer, Enterobacter, Pseudomonas, Burkholderia, Diazotrophicus và Cyanobacter.* Nghiên cứu của Tian và đồng tác giả (2023) phân lập được 11 chủng vi khuẩn tiềm năng, trong đó chủng khuẩn *E. mori* có thể sinh trưởng tốt trên môi trường Ashby không chứa N. Kết quả đánh cố định N cho thấy chủng vi khuẩn RS1 có thể sinh trưởng trên môi trường Ashby không chứa N (Bảng 2).

Bảng 2. Kết quả đánh giá một số đặc điểm hóa sinh trong điều kiện in vitro của chủng RS1

STT	Các đặc điểm hóa sinh trong điều kiện *in vitro*	Kết quả
1	Khả năng cố định N	+
2	Phân giải Ca (Chỉ số SI)	1,35 ± 0,04
3	Sản sinh IAA (µg/mL)	21,74 ± 0,52
4	Sản sinh màng sinh học Biofilm (OD bao nhiêu)	0,016 ± 0,007
5	Khả năng chống chịu NaCl (%)	8 (1370mM)

Một số kết quả từ các bài báo cáo liên quan tới chủng khuẩn *E. mori* không đề cập nhiều tới khả năng phân giải Ca. Tuy nhiên, trong báo cáo của Phuphaboon và đồng tác giả (2022), một số chủng khuẩn thuộc chi *Enterbacter* hoàn toàn có khả năng phân giải Ca. Kết quả đánh giá khả năng phân giải P cho thấy chủng RS1 có thể phân giải Ca với chỉ số phân giải SI là 1,35 ± 0,04 (Bảng 2).

IAA đóng một vai trò là hormone ảnh hưởng đến sự phân chia, kéo dài và biệt hóa tế bào; gia tăng tỉ lệ xylem và sự phát triển bộ rễ; ảnh hưởng đến quang hợp và khả năng kháng với một số điều kiện stress. PGPR có khả năng sản sinh IAA trong điều kiện *in vitro* khi môi trường nuôi cấy được bổ sung 1% tryptophane. Trong thí nghiệm, chủng RS1 sản sinh lượng IAA đạt 21,74 ± 0,52 µg/mL sau 07 ngày nuôi. Khả năng sản sinh IAA của chủng vi khuẩn được khảo sát là giống với một số công bố trước đó. Điển hình, các chủng thuộc chi *Enterobacter* khảo sát bởi Jan và đồng tác giả (2020) có thể sản sinh IAA dao động từ 3,02 đến 23,2 µg/mL (Bảng 2).

Màng sinh học là tập hợp các vi sinh vật được gắn kết với nhau bằng một mạng lưới cấu trúc các chất polyme ngoài tế bào. Màng sinh học được tạo ra từ nhóm chủng vi sinh vật PGPR là yếu tố tăng cường chống chịu mặn cho cây trồng vô cùng hiệu quả. Kết quả thí nghiệm cho thấy chủng RS1 có khả năng tạo màng sinh học, tuy nhiên không đáng kể, đạt giá trị OD 580nm 0,016 ± 0,007. Kết quả này tương đồng với kết quả từ nghiên cứu của Nyenje và đồng tác giả (2013) cho rằng đây là khả năng chung của các chủng khuẩn thuộc chi *Enterobacter* (Bảng 2).

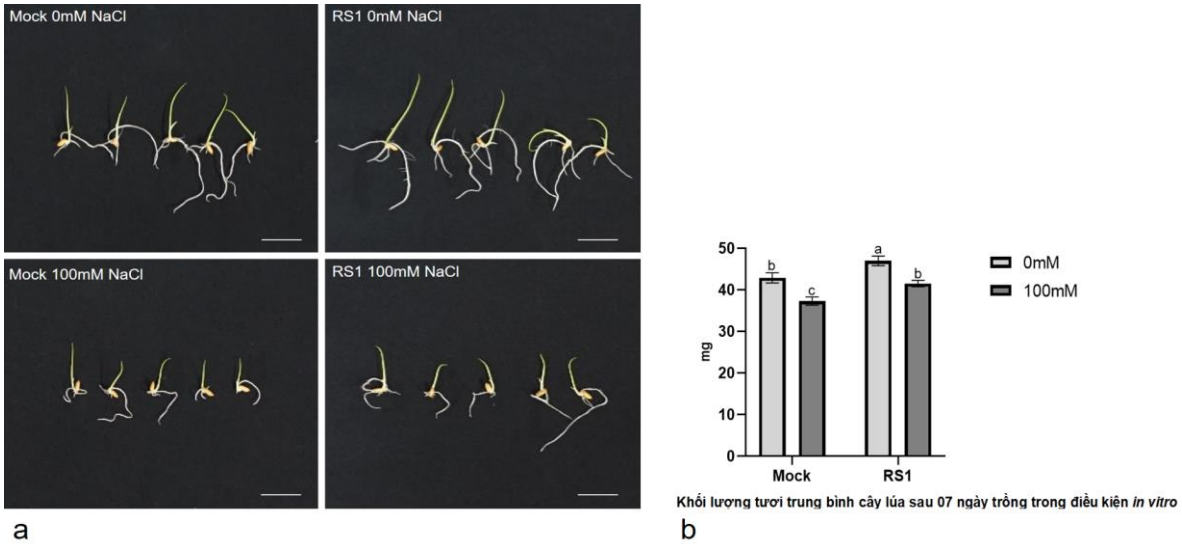
Khả năng chống chịu NaCl của vi khuẩn là khả năng của vi khuẩn sống và phát triển trong môi trường có nồng độ muối cao. Kết quả thí nghiệm nuôi chủng khuẩn tiềm năng trong môi trường LB chứa các nồng độ NaCl cho thấy RS1 bị ức chế sinh trưởng tại điều kiện 8% NaCl (tức 1370mM NaCl) và không thể sống sót tại điều kiện 9% NaCl (Bảng 2). Chi *Enterobacter* không phải là vi khuẩn ưa mặn, chúng có khả năng chịu mặn nhẹ và có thể phát triển trong môi trường có nồng độ muối nhất định lên đến khoảng 5-6%. Kết quả thí nghiệm cho thấy chủng khuẩn *E. mori* RS1 có khả năng chịu mặn tốt hơn so với các loài khác thuộc chi *Enterobacter*.

Kết quả đánh giá khả năng chống chịu mặn trên cây lúa của chủng RS1 trong điều kiện *in vitro*

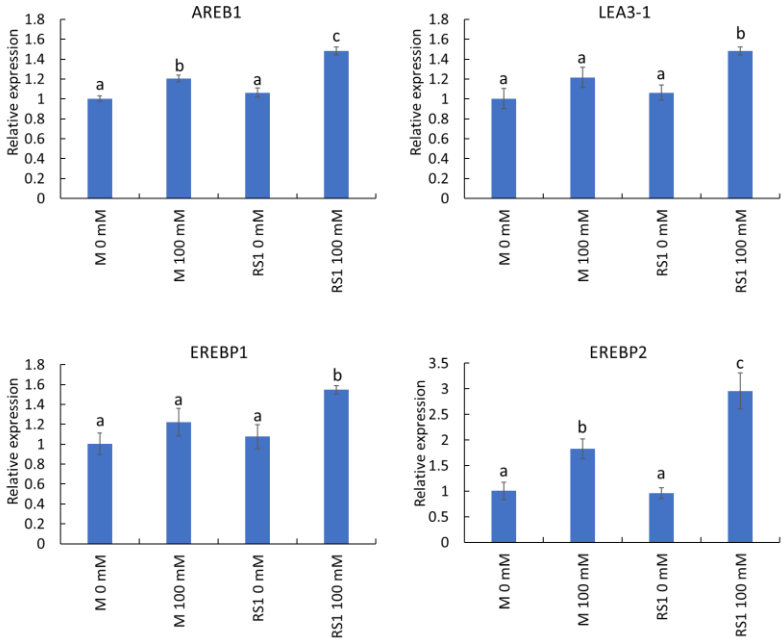
Tiến hành đánh giá khối lượng cây lúa sau 07 ngày nuôi cấy trong điều kiện *in vitro* cho thấy chủng khuẩn RS1 có thể giúp cây lúa 07 ngày tuổi sinh trưởng tốt hơn so với cây đối chứng trọng điều kiện thường và mặn (Hình 2). Ở nồng độ 100 mM NaCl, khối lượng thu được ở cây được lây nhiễm chủng RS1 có khối lượng cao hơn 11,37% so với cây đối chứng. Kết quả nghiên cứu phù hợp với các nghiên cứu trước đây về khả năng nâng cao tính chịu mặn của cây lúa của một số chủng vi khuẩn phân lập. Cụ thể, chủng *Enterobacter* sp. giúp tăng tăng khối lượng cây con trung bình tới 63,15% so với đối đối chứng trong điều kiện mặn 30 mM NaCl (Sagar *et al*., 2020). Thêm vào đó, nghiên cứu của Hussain và đồng tác giả (2022) cho thấy *E. mori* có khả năng thúc đẩy sự phát triển sinh khối của cây lúa, tăng khối lượng từ 10% đến 30% dưới điều kiện stress mặn so với cây đối chứng. Một nghiên cứu khác của Fadiji và đồng tác giả (2023) cho thấy chủng khuẩn *E. mori AYS9* có thể hỗ trợ cây lúa chống chịu nồng độ NaCl lên tới 200 mM. Bên cạnh đó kết quả thí nghiệm ở điều kiện bình thường (0 mM) cho thấy cây được lây nhiễm chủng RS1 cũng cho khối lượng cao hơn 9,53% so với cây đối chứng (Hình 2). Các kết quả trên thể hiện *E. mori* RS1 là chủng khuẩn tiềm năng có khả năng kích thích sinh trưởng và chống chịu mặn giúp cây lúa ở giai đoạn đầu sinh trưởng.

Kết quả đánh giá biểu hiện một số gen liên quan tính chống chịu mặn trên cây lúa

Kết quả đánh giá sự biểu hiện một số gen liên quan đến chống chịu mặn thuộc con đường abscisic acid-ABA (*AREB1, LEA3-1*) và ethylene-ETH (*EREBP1, 2*) được xác định. Theo đó, sự biểu hiện của tất cả các gen trên cây lúa được lây nhiễm với chủng RS1 cao hơn so với cây lúa không được lây nhiễm với chủng RS1 (cây đối chứng) ở điều kiện 100 mM. Ngoài ra, ở điều kiện bình thường (0 mM), sự biểu hiện của các gen này trên cây lúa được lây nhiễm với chủng RS1 và cây đối chứng là như nhau (Hình 3).



Hình 2. Hình thái (a) và khối lượng tươi trung bình (b) cây lúa đối chứng và được lây nhiễm sau 07 ngày trồng trong điều kiện in vitro ở các nồng độ muối khác nhau. Scale 1 cm.



Hình 3.Sự biểu hiện một số gen của cây lúa được lây nhiễm (RS1) và không được lây nhiễm (M) với chủng RS1 sau 07 ngày trồng trong điều kiện in vitro ở các nồng độ muối khác nhau

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy chủng vi khuẩn RS1 thuộc loài *Enterobacter mori*, và có khả năng cố định đạm cũng như phân giải P và Ca. RS1 có khả năng sinh tổng hợp IAA và chịu mặn trên lên tới 8% NaCl. Thêm vào đó, khối lượng tươi thu được ở cây được lây nhiễm chủng RS1 là cao hơn so với cây đối chứng ở cả điều kiện bình thường và có xử lý với mặn. Ngoài ra, các gen liên quan đến khả năng chống chịu mặn trên cây lúa được lây nhiễm chuảng RS1 là cao hơn so với cây đối chứng ở cả hai điều kiện 0 và 100 mM. Kết quả trên tạo tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo nhằm phát triển chế phẩm vi sinh có thể ứng dụng trong nông nghiệp.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài với mã số CSTE24-01 do Viện công nghệ sinh học tài trợ và sử dụng các trang thiết bị tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tian A, Gong Q (2023). Endophytic bacterial communities in wild rice (Oryza officinalis) and their plant growth-promoting effects on perennial rice. *Frontiers in Plant Science*, *14*: 1184489.

Collard B C Y (2013). Developing new flood-tolerant varieties at the International Rice Research Institute (IRRI). *SABRAO Journal of Breeding gentics*, *45*(1).

Chomczynski P, & Mackey K (1995). Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide-and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques*, *19*(6), 942-945.

De Andrade L A (2023). Plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agricultural production. *Microorganisms*, *11*(4): 1088.

Ayangbenro F A E (2023). Genomic Assessment of Enterobacter mori AYS9: A Potential Plant Growth-Promoting Drought-Resistant Rhizobacteria. *Spanish Journal of Soil Science*, *13*: 11302.

Sharma G S (2019). Analysis of indole-3-acetic acid (IAA) production in Klebsiella by LC-MS/MS and the Salkowski method. *Bio-protocol*, *9*(9), e3230-e3230.

Hameed M (2008). Morphological adaptations of some grasses from the salt range, Pakistan. *Pak. J. Bot*, *40*(4): 1571-1578.

Holmberg R C (2013). Akonni TruTip® and Qiagen® methods for extraction of fetal circulating DNA-evaluation by real-time and digital PCR. *PloS one*, *8*(8), e73068.

Hussain M B (2022). Rice interactions with plant growth promoting rhizobacteria. In *Modern Techniques of Rice Crop Production* (pp. 231-255). Singapore: Springer Singapore.

Kathi S (2024). Enterobacter spp. Virulence Factors and Biofilm Components: Synthesis, Structure, Function, and Inhibitors. In *ESKAPE Pathogens: Detection, Mechanisms and Treatment Strategies,* 349-365). Singapore: Springer Nature Singapore.

Jan-Roblero J (2020). Kosakonia. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 213-231). Academic Press.

Nagant, C (2010). Study of the initial phase of biofilm formation using a biofomic approach. *Journal of microbiological methods*, *82*(3): 243-248.

Peper A (2024). Functional characterization of core and unique calcite-dissolving bacteria communities from peanut fields. *Phytopathology*®, *114*(5): 1011-1019.

Phupaboon S (2022). Application of a modified membrane-trapping technique to determine fish microflora species from Thai silver BARB (Barbonymus gonionotus). *J. Sci. Technol*, *207*.

Sagar A (2020). ACC deaminase and antioxydant enzymes producing halophilic *Enterobacter* sp. PR14 promotes the growth of rice and millets under salinity stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *26*: 1847-1854.

Teng Z (2019). Isolation and characterization of P solubilizing bacteria from rhizosphere soils of the Yeyahu Wetland in Beijing, China. *Environmental Science and Pollution Research*, *26*: 339076-339807.

Yan Y (2022). *Bacillus velezensis* YYC promotes tomato growth and induces resistance against bacterial wilt. *Biological Control*, *172*: 104977.

EVALUATION OF THE GROWTH-PROMOTING AND SALT TOLERANCE-ENHANCING ABILITIES OF *ENTEROBACTER MORI* RS1 IN RICE PLANTS

Le Van Manh, Ho Manh Tuong, Nguyen Thi Hong Ha, Phan Quyen, Bui Phuong Thao, Chu Hoang Ha, Đo Tien Phat*

Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

ABSTRACT

Rice (*Oryza sativa* L.) is a crucial staple crop in Vietnam, especially in the Mekong Delta region. Addressing the critical challenge of saltwater intrusion, it is essential to discover potential approaches that not only enhance productivity but also promote environmental sustainability. Of which, plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are microorganisms residing in the root zone that enhance plant growth and disease resistance through various direct or indirect mechanisms. This study aims to evaluate the growth-promoting and salt tolerance capabilities of *Enterobacter mori* RS1, isolated from the Mekong Delta region, on rice plants. *In vitro* experiments demonstrated that the RS1 strain can fix nitrogen, solubilize phosphorus and calcium with solubilization indices (SI) of 1.39 and 1.35, respectively, and produce the phytohormone indole-3-acetic acid (IAA) at a concentration of 1.35 µg/mL, form biofilms, tolerate salinity at 8% NaCl (1370 mM NaCl), and enhance rice growth. The expression of salt tolerance-related genes of RS1 inoculated rice plants was higher compared to control plants under 100 mM NaCl. These findings highlight *Enterobacter mori* RS1 as a beneficial PGPR for promoting growth and enhancing salt tolerance in rice plants, suggesting its potential for developing microbial products for agricultural applications.

Keywords: PGPR, rice, salt tolerance, Mekong Delta.

* Author for correspondence: Tel: +84-374212304; Email: dtphat@ibt.ac.vn

NGHIÊN CỨU NUÔI TRỒNG VÀ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ THÀNH PHẦN DINH DƯỠNG CỦA NẤM LÁ SEN *Pleurotus giganteus* V5-9M NUÔI TRỒNG TẠI HÀ NỘI

Lê Thị Hoàng Yến[1,2*], Đồng Thị Hoàng Anh[1,2,] Trần Huyền Thanh[2,3], Nguyễn Mỹ Linh[1,2], Nguyễn Thị Anh Đào[2], Lê Hồng Anh[2], Phạm Thị Bích Đào[4],Trịnh Tam Kiệt[2]

[1]*Trung tâm Sinh học thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ*

[2]*Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội*

[3]*Trung tâm Chiếu xạ Hà Nội, Viện Năng lượng Nguyên tử Việt Nam*

[4]*Đại học Thành Đô, Kim Chung, Hoài Đức, Hà Nội.*

TÓM TẮT

Nấm lá sen *Pleurotus giganteus* là loài nấm sò có kích thước quả thể lớn, năng suất cao, tương đối dễ nuôi trồng. Quả thể nấm chứa nhiều dưỡng chất như protein, các axit amin thiết yếu, các yếu tố đa vi lượng và các thành phần hoá học có hoạt tính sinh dược học khác như các polysaccharide, các axit béo, α-axit toluic, axit oleic, nicotinamit, ergosterol, neoergosterol, methyl mandelat, 4-tert-butylphenol, 2,5, ditertbutylphenol sterol, axit hữu cơ, triterpenoit và alkaloid... Loài nấm này được nuôi trồng khá phổ biến, rộng rãi trên thế giới và ở một số tỉnh thành phía Nam. Gần đây, chúng đã được thuần hoá và nuôi trồng thành công ở Hà Nội. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu lựa chọn môi trường nuôi cấy thích hợp để nâng cao năng suất, chất lượng của loài nấm này. Ở điều kiện sinh thái vụ đông xuân Hà Nội (nhiệt độ giai đoạn sợi 15-20^{o}C, nhiệt độ giai đoạn ra quả thể 20 - 30^{o}C), với độ ẩm bổ sung 80-90% và ánh sáng 700 - 800 Lux thì môi trường có thành phần dinh dưỡng gồm: 68% mùn cưa, 15% lõi ngô, 10% hạt bo bo, 5% cám gạo, 1% $CaCO_3$ và 1% nước chiết dinh dưỡng từ giá đỗ và khoai tây là môi trường thích hợp nhất để tăng năng suất và chất lượng của nấm. Ở các điều kiện nuôi cấy này, năng suất nấm đạt được ở mức 35,2%; hàm lượng polysaccharide, protein và axit amin tổng số lần lượt đạt 7,2%; 25,7% và 4,57%.

Từ khóa: Nấm sò đại, nấm lá sen, *Pleurotus giganteus*, nuôi trồng, thành phần dinh dưỡng.

MỞ ĐẦU

Nấm lá sen có tên khoa học là *Pleurotus giganteus*, theo tiếng La tinh có nghĩa là nấm sò đại. Loài nấm này thuộc chi nấm sò Pleurotus, họ nấm Pleurotaceae, bộ Agaricales, lớp Agaricomycetes. Trước đây, tên khoa học của *Pleurotus giganteus* là *Lentinus giganteus* - nấm hương đại- do chúng mang nhiều cấu trúc điển hình của nấm hương *Lentinus*. Tuy nhiên, trong khoa học nấm hiện đại, với sự kết hợp giữa hình thái học và sinh học phân tử, *Lentinus giganteus* đã được chuyển sang chi *Pleurotus*. Đây là một trong những loài nấm ăn lớn nhất trong các loại nấm ăn được và thường được tìm thấy dưới dạng nhóm hoặc đơn lẻ trên gỗ mục chôn dưới mặt đất. Nấm có thân dày, rễ sâu và lá rộng, phân tán đều, lá xoè rộng hình lá sen, kích thước từ 3 - 35 cm (Karunarathna *et al*., 2012).

Quả thể của *P. giganteus* giàu cacbonhydrate, protein, axit béo không bão hòa và polysaccharide, chất xơ, chất béo bão hòa, chất béo không bão hòa, các loại đường fructose, glucose; các loại hoormon sinh trưởng; các nguyên tố đa lượng: kali-K, photpho-P, magiê-Mg, canxi-Ca, sodium-Na,.. và các nguyên tố vi lượng như: sắt-Fe, kẽm-Zn, đồng-Cu, mangan-Mn, selenium-Se,.. (Phan *et al*.,2019).

Bằng phân tích sắc ký GC–MS và LC–MS, Moroney và đồng tác giả (2013) đã phát hiện trong nấm lá sen có 20 hợp chất quý có khả năng cải thiện chức năng sống và nâng cao sức khoẻ con người, bao gồm các axit béo, α-axit toluic, axit oleic, nicotinamit, ergosterol, neoergosterol, methyl mandelat, 4-tert-butylphenol, 2,5, ditertbutylphenol sterol, axit hữu cơ, triterpenoit và alkaloid,…

Pleurotus giganteus còn có khả năng chống oxy hóa, kháng nấm, chống ung thư, bảo vệ gan và tăng cường thần kinh (Phan *et al*., 2019). *Pleurotus giganteus* phân bố rộng rãi trên thế giới: Úc, Papua New Guinea, Trung Quốc, Malaysia, Sri Lanka, Indonesia, Việt Nam, Lào và Thái Lan (Phan *et al*., 2019).

Ở Việt Nam, loài nấm này đã được trồng khá rộng rãi ở một số tỉnh thành phía nam và được gọi là nấm chân dài dựa vào chiều dài thân nấm (10 - 20 cm) hoặc nấm lá sen. Việc gọi tên này dựa vào kích thước và hình dạng của toàn bộ quả thể nấm - phần thân nấm dài như cuống lá và phần quả thể to, xoà rộng hình lá sen. Trong giai đoạn trước đây, việc phân loại nấm ăn, nấm dược liệu đa phần dựa vào hình thái nên vẫn còn có một số loài nấm có tên khoa học chưa được cập nhật. Nấm lá sen/ nấm chân dài đã được phân loại vào một số chi/ loài khác như *Clitocybe maxima* (Ngô Xuân Nghiễn *et al*., 2016), *Panus giganteus* (Trần Thanh Trúc *et al.*, 2019).

Trong quá trình nghiên cứu, chúng tôi đã phân lập, phân loại và nuôi trồng diện rộng được loài nấm ăn này tại Hà Nội, đem lại một sản phẩm mới cho Hà Nội và có tiềm năng phát triển tại các tỉnh thành phía bắc (Lê Thị Hoàng Yến *et al*., 2020). Trong báo cáo này, chúng tôi nghiên cứu xác định môi trường nuôi cấy thích hợp để nâng cao năng suất nấm cũng như phân tích một số thành phần dinh dưỡng trong quả thể nấm *P. giganteus* nuôi trồng tại Hà Nội. Đồng thời báo cáo cũng xác định một số yếu tố về an toàn vệ sinh thực phẩm loại nấm ăn này.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng nghiên cứu

Chủng nấm V5-9M được tuyển chọn từ đề tài 01C-06/01-2020-03 do Sở Khoa học và Công nghệ Hà Nội tài trợ.

Các phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu lựa chọn môi trường nuôi trồng nấm lá sen thích hợp

Thí nghiệm 1: Nghiên cứu sự phù hợp của giá thể sử dụng ảnh hưởng đến năng suất nấm lá sen

Các công thức môi trường: MTX1: 90% mùn cưa + 8% cám gạo + dinh dưỡng bổ sung;

MTX2: 75% mùn cưa + 15% lõi ngô + 8% cám gạo + 1% $CaCO_3$ + 1% nước chiết dinh dưỡng từ giá đỗ và khoai tây;

MTX3: 60% mùn cưa + 30% lõi ngô + 8% cám gạo + 1% $CaCO_3$ + 1% nước chiết dinh dưỡng từ giá đỗ và khoai tây;

MTX4: 75% mùn cưa + 15% hạt bông + 15% lõi ngô + 8% cám gạo + 1% $CaCO_3$ + 1% nước chiết dinh dưỡng từ giá đỗ và khoai tây;

MTX5: 60% mùn cưa + 30% hạt bông + 15% lõi ngô + 8% cám gạo + 1% $CaCO_3$ + 1% nước chiết dinh dưỡng từ giá đỗ và khoai tây.

Thí nghiệm 2: Nghiên cứu ảnh hưởng nguồn dinh dưỡng bổ sung

MTX2.1: 8% cám gạo + 75% mùn cưa + 15% lõi ngô + 1% CaCO3 + 1% nước chiết dinh dưỡng từ giá đỗ và khoai tây;

MTX2.2: 8% cám ngô + 75% mùn cưa + 15% lõi ngô + 1% CaCO3 + 1% nước chiết dinh dưỡng từ giá đỗ và khoai tây;

MTX2.3: 8% đậu tương + 75% mùn cưa + 15% lõi ngô + 1% CaCO3 + 1% nước chiết dinh dưỡng từ giá đỗ và khoai tây;

MTX2.4: 8% hạt bo bo + 75% mùn cưa + 15% lõi ngô + 1% $CaCO_3$ + 1% nước chiết dinh dưỡng từ giá đỗ và khoai tây.

Thí nghiệm 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của tỷ lệ dinh dưỡng bổ sung

Thay đổi môi trường nuôi trồng ở các công thức khác nhau:

MTX2.4.1: 70% mùn cưa + 15% lõi ngô + 4% cám gạo + 4% bo bo + 1% $CaCO_3$ + 1% nước chiết dinh dưỡng từ giá đỗ và khoai tây;

MTX2.4.2: 68% mùn cưa + 15% lõi ngô + 5% cám gạo + 10% bo bo + 1% $CaCO_3$ + 1% nước chiết dinh dưỡng từ đỗ và khoai tây;

MTX2.4.3: 63% mùn cưa + 15% lõi ngô + 10% cám gạo + 10% bo bo + 1% $CaCO_3$ + 1% nước chiết dinh dưỡng từ đỗ và khoai tây;

MTX2.4.4: 68% mùn cưa + 15% lõi ngô + 10% cám gạo + 5% bo bo + 1% $CaCO_3$ + 1% nước chiết dinh dưỡng từ đỗ và khoai tây;

MTX2.4.5: 70% mùn cưa + 15% lõi ngô + 2% cám gạo + 3% bo bo + 1% $CaCO_3$ + 1% nước chiết dinh dưỡng từ đỗ và khoai tây;

Xác định nồng độ axit amin thiết yếu bằng phương pháp HPLC

Phân tích amino acid được tiến hành trên máy sắc ký lỏng cao áp pha đảo Agilent 1200 HPLC, bơm kép G1311A, nhận biết bằng mắt huỳnh quang G1315B FLD, phát hiện kết quả ở bước sóng kích thích 348 nm và bước sóng phát quang 450 nm, buồng chạy 10-mm. Cột ZORBAX Eclipse-AAA 4,6 × 150 mm (5 µm). Hỗn hợp để phân tích sắc ký bao gồm 17 amino acid từ hỗn hợp amino acid chuẩn, citrulline và 6 amino acid bổ sung, được hòa trộn tại nồng độ khoảng 250 pmol/µl (Hernández-Orte *et al*., 2003).

Xác định nồng độ protein theo phương pháp của Bradford (1976).

Xác định hàm lượng polysaccharide tổng số theo phương pháp Foster và Cornella (1961)

Chỉ tiêu vi sinh vật:

- Xác định Escherichia coli theo tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7924-2:2008.

- Xác định Salmonella theo tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 10780-1:2017.

Xác định chỉ tiêu kim loại nặng:

- Xác định hàm lượng chì theo tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 10643:2014 (phương pháp thử AOAC 999.11).

- Xác định hàm lượng Cadimi theo tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 10643:2014 (phương pháp thử AOAC 999.11).

- Xác định hàm lượng thủy ngân theo tiêu chuẩn Việt Nam TCVN 7604:2007 (phương pháp thử AOAC 971.21).

Chỉ tiêu cảm quan:

- Kiểm tra hình thái, màu sắc, mùi vị bằng cảm quan, kiểm tra kích thước bằng cách đo trực tiếp, đảm bảo các yêu cầu đã mô tả ở trên.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của thành phần nguyên liệu đến hệ sợi nấm

Dựa vào các tài liệu đã công bố của Kumla và đồng tác giả (2013) Phan và đồng tác giả (2019), cũng như trong thực tế của quá trình nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy loài nấm này cần thời gian khá dài cho một chu trình sinh trưởng, tạo quả thể cho chúng, từ 60 - 90 ngày/ chu trình. Vì vậy, nguyên liệu dùng trong nuôi trồng loài nấm này phải đủ chất, bền ngày, đáp ứng yêu cầu dinh dưỡng cho cả chu trình sống của chúng. Mùn cưa là một trong những cơ chất thích hợp cho việc nhân nuôi loài nấm này.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng 5 loại môi trường nuôi trồng gồm mùn cưa là cơ chất chính và có bổ sung hạt bông hoặc lõi ngô ở các tỷ lệ khác nhau. Theo dõi sự sinh trưởng, phát triển của hệ sợi nấm trên các môi trường đó, kết quả được thể hiện trên Bảng 1.

Bảng 1. Ảnh hưởng của thành phần nguyên liệu đến khả năng sinh trưởng, phát triển của hệ sợi nấm lá sen

Chỉ tiêu / Công thức môi trường	Thời gian mọc kín cơ chất (ngày)	Tốc độ sinh trưởng (mm/ngày)	Tỷ lệ nhiễm (%)
MTX1	32 ± 5	4,68 ± 0,3	5 ± 1,0
MTX2	30 ± 3	5,0 ± 0,6	5 ± 1,2
MTX3	32 ± 4	4,68 ± 0,5	5 ± 0,8
MTX4	33 ± 5	4,54 ± 0,3	5 ± 0,9
MTX5	33 ± 3	4,54 ± 0,4	5 ± 0,8
CV%	8,26		
$LSD_{0.05}$	1,65		

Kết quả trên Bảng 1 cho thấy tốc độ mọc giống nấm lá sen trên các công thức môi trường khác nhau có ý nghĩa thống kê với giá trị CV% = 8,62 và $LSD_{0.05}$ = 1,65. Môi trường MTX2 gồm 75% mùn cưa + 15% lõi ngô + 8% cám gạo + 1% $CaCO_3$ + 1% nước chiết dinh dưỡng từ giá đỗ/ khoai tây là môi trường thích hợp nhất để sợi nấm lá sen sinh trưởng, phát triển. Thời gian sợi nấm lan kín bịch là 30 ± 3 ngày.-Trên các môi trường còn lại, tốc độ sợi nấm lan chậm hơn: 32 - 33 ± 3 - 5 ngày, và độ đồng đều giữa các bịch nấm thấp hơn. Như vậy, việc bổ sung lõi ngô vào môi trường nuôi cấy làm tăng tốc độ lan của sợi, rút ngắn thời gian nuôi sợi so với các nghiên cứu trước (Kumla *et al*., 2013).

Nghiên cứu ảnh hưởng của thành phần nguồn dinh dưỡng bổ sung đến hệ sợi nấm

Nấm lá sen được nhân nuôi trên môi trường công thức MTX2 bao gồm: 75 % mùn cưa + 15 % lõi ngô + 8% cám gạo + 1% $CaCO_3$ + 1% nước chiết dinh dưỡng từ giá đỗ & khoai tây, có thay đổi nguồn dinh dưỡng bổ sung, tạo ra các công thức môi trường khác nhau: công thức MTX2.1 - công thức MTX2.4. Trong các công thức đó, thành phần giá thể được giữ nguyên, thay đổi các nguồn dinh dưỡng khác nhau, lần lượt là cám gạo, cám ngô, hạt đậu tương và hạ bo bo. Kết quả được trình bày trên Bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của dinh dưỡng bổ sung đến khả năng sinh trưởng, phát triển của hệ sợi nấm lá sen

Chỉ tiêu / Công thức môi trường	Thời gian mọc kín cơ chất (ngày)	Tốc độ sinh trưởng (mm/ngày)	Tỷ lệ nhiễm nấm bệnh (%)
MTX2.1	30 ± 3	4,8 ± 0,2	5 ± 0,9
MTX2.2	31 ± 3	5,0 ± 0,4	5 ± 1,0
MTX2.3	31 ± 3	4,8± 0,5	5 ± 1,2
MTX2.4	29 ± 3	5,1 ± 0,3	2 ± 0,6

Kết quả trên Bảng 2 cho thấy nguồn dinh dưỡng bổ sung có ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển của hệ sợi nấm lá sen. Tuy nhiên, sự khác biệt không nhiều giữa các công thức môi trường. Khi sử dụng hạt bo bo (MTX2.4) làm nguồn dinh dưỡng bổ sung, số lượng ngày sợi nấm lan kín bịch sớm hơn một vài ngày, đồng thời tỷ lệ nhiễm nấm bệnh thấp hơnso với bổ sung các loại dưỡng chất khác. Vì vậy, chúng tôi khuyến cáo nên sử dụng hạt bo bo làm nguồn dinh dưỡng bổ sung vào môi trường nuôi trồng nấm lá sen. Kết qủa này cũng phù hợp với nghiên cứu trước đó của Kumla và đồng tác giả (2013).

Ảnh hưởng của tỷ lệ dinh dưỡng bổ sung lên năng suất, chất lượng nấm lá sen

Hạt bo bo là nguồn dinh dưỡng thích hợp để sợi nấm lá sen sinh trưởng phát triển tốt, tuy nhiên giá thành cao nên chúng tôi sử dụng thêm cám gạo là nguồn dinh dưỡng bổ sung và tìm hiểu tỷ lệ (bo bo / cám gạo) phù hợp (8 - 20%), vừa đảm bảo năng suất, vừa đảm bảo giá thành và lợi nhuận cho người trồng. Kết quả thể hiện trên Bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của của tỷ lệ dinh dưỡng đến hình thái quả thể và năng suất, chất lượng của nấm lá sen

Chỉ tiêu / Công thức môi trường	Kích thước mũ nấm (mm)	Kích thước thân nấm (mm)	Hiệu suất sinh học (%)	Hàm lượng polysaccharide (%)
MTX2.4.1	48- 85 × 6-10	50-250 × 15- 25	33,6	7,0
MTX2.4.2	50- 100 × 6-10	50-250 × 15-25	35,4	7,2
MTX2.4.3	50- 100 × 6-10	50-250 × 15-25	35,2	7,2
MTX2.4.4	47- 100 × 6-10	48-230 × 15-25	34,5	6,9
MTX2.4.5	45- 100 × 6-10	46-230 × 15-25	34,4	6,9
CV%	13,5			
$LSD_{0.05}$	2,02			

Công thức môi trường MTX2.4.2 (68% mùn cưa + 15% lõi ngô + 10% hạt bo bo + 5% cám gạo + 1% $CaCO_3$ + 1% nước chiết dinh dưỡng từ giá đỗ/ khoai tây) là môi trường thích hợp nhất cho việc tạo quả thể nấm lá sen, năng suất nấm đạt 35,4%, trong khi môi trường có công thức MTX2.4.3 (hàm lượng dinh dưỡng 20% (10% hạt bo bo, 10% cám gạo) năng suất nấm đạt 35,2%.

Hình 1. Quả thể nấm lá sen trên môi trường MTX2.4.3

Thành phần dinh dưỡng của nấm lá sen *Pleurotus giganteus* V5-9M

Nấm lá sen là loài nấm ngon, được ưa chuộng và do đó đã có hàng loạt các nghiên cứu sâu rộng về phân tích hàm lượng các chất dinh dưỡng trong quả thể của chúng. Trong nghiên cứu này của chúng tôi, hàm lượng protein của nấm lá sen *Pleurotus giganteus* V5-9M khá lớn, đạt mức 25,7% (Bảng 2). Hàm lượng này cao hơn khá nhiều so với các nghiên cứu định lượng protein trong quả thể *P. giganteus* trong nấm lá sen khác nuôi trồng ở Thái Lan và Ấn Độ, hàm lượng đạt 15,4% - 23,04% (Phan *et al*., 2019, Thachunglura *et al*., 2023). So với các nghiên cứu khác công bố trước đó thì protein trong nấm lá sen cao hơn nhiều so với các loài nấm khác. Chẳng hạn nấm sò xám *Pleurotus ostreatus* hàm lượng protein trong quả thể đạt 1,61 ± 0,02 g/100 g (Manzi *et al*., 2001), nấm sò trắng *Pleurotus sajor-caju* hàm lượng protein trong quả thể đạt 13,0 - 18,4 g/100 g (Bonatti, 2004).

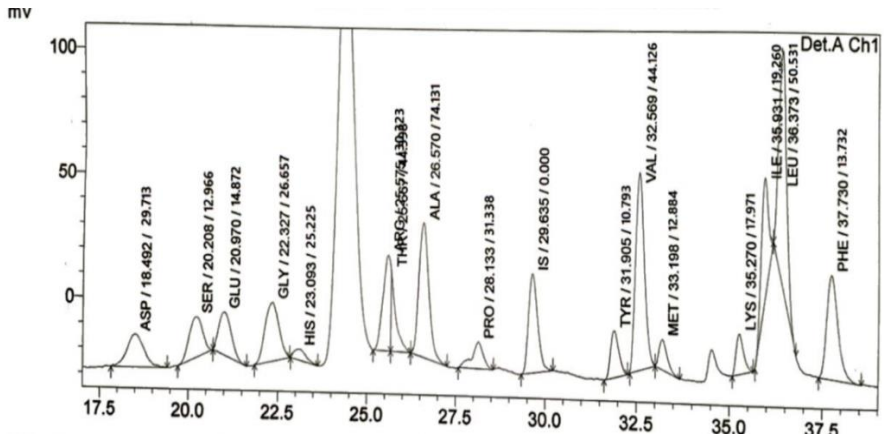
Hàm lượng protein của nấm phụ thuộc vào chủng, thành phần hóa học cơ chất, kích thước đống nấm và thời gian nuôi cấy (Shashirekha *et al*., 2005). Trong nghiên cứu này, hàm lượng protein của V5-9M tăng cao là do loài nấm này đã được nghiên cứu tối ưu hoá để nâng cao năng suất và chất lượng, việc bổ sung các nguồn dinh dưỡng thích hợp, với các tỷ lệ thích hợp (68% mùn cưa + 15% lõi ngô + 10% hạt bo bo + 5% cám gạo + 1% $CaCO_3$ + 1% nước chiết dinh dưỡng từ giá đỗ và khoai tây).

Axit amin tự do trong quả thể nấm lá sen *P. giganteus* V5-9M cũng được xác định, kết quả cho thấy có 16/17 loại axit amin thiết yếu tồn tại trong quả thể nấm lá sen với giá trị khá cao, hàm lượng: 0,129 - 0,619 (%). Hàm lượng này cao hơn công bố trước đó của Phan và đồng tác giả (2014), hàm lượng các axit amin thiết yếu trong quả thể nấm lá sen nuôi trồng tại Thái Lan chỉ đạt 0,031 - 0,204 (%). Leucine, Alanine, Arginine là các axit amin có hàm lượng cao nhất trong loài quả thể nấm V5-9M, với các giá trị lần lượt là: 0,619; 0,617 và 0,493 (%). Các giá trị này cao hơn công bố trước đó của Phan và đồng tác giả (2014) - hàm lượng Leucine, Alanine, Arginine của quả thể nấm lá sen nuôi trồng ở Thái Lan có giá trị lần lượt là: 0.20; 0.11; và 0,11 (%).

Hàm lượng axit amin tự do *ở P. giganteus* V5-9M khá cao khi so với các loài nấm ăn khác, chẳng hạn glutamine, asparagine và arginine đạt 0,204, 0,369 và 0,493 (%) trong quả thể V5-9M (Bảng 4, Hình 2), nhưng chỉ đạt 0,274, 0,176 và 0,143 (%) trong nấm sò *P. ostreatus* (Madachi *et al*., 2004).

Bảng 4. Một số thành phần hoá học và dinh dưỡng có trong quả thể nấm lá sen *Pleurotus giganteus* V5-9M

I	**Polysaccharide (%)**	7,32
II	**Protein contain (%)**	25,7
III	**Các axit amin tổng số**	4,57
1	Aspartic acid	0.369
2	Serine	0.129
3	Glutamic acid	0.204
4	Glycine	0.187
5	Hystidine	0.366
6	Arginine	0.493
7	Threonine	0.494
8	Alanine	0.617
9	Proline	0.337
10	Cystein	KPH
11	Tyrosine	0.182
12	Valine	0.482
13	Methionine	0.179
14	Lysine	0.245
15	Isoleucine	0.236
16	Leucine	0.619
17	Phenylalanine	0.212



Hình 2. Phổ phát hiện các axit amin thiết yếu có trong quả thể nấm lá sen

Hàm lượng cacbonhydrate trong nấm lá sen được công bố trước đó là khá lớn, chiếm 64,7% (Phan *et al*., 2014). Polysaccharide trong các loài nấm sò khác nhau, với các phương pháp tách chiết khác nhau đem lại kết quả chênh lệch đáng kể, từ 0,08% trong nấm *Pleurotus florida* (Maity *et al*., 2011) đến 32,4% trong *Pleurotus ostreatus* (Smiderle *et al*., 2017).Trong nghiên cứu của chúng tôi, hàm lượng polysaccharide trong nấm lá sen V5-9M đạt 7,2%.

Đánh giá một số chỉ tiêu về an toàn vệ sinh thực phẩm của nấm lá sen *Pleurotus giganteus* V5-9M

Do nấm lá sen được nuôi trồng để cung cấp cho người tiêu dùng nên ngoài việc xác định thành phần dinh dưỡng thì các chỉ tiêu khác về vi sinh vật, kim loại nặng, cảm quan của quả thể nấm cũng đã được phân tích. Kết quả trên Bảng 5 cho thấy sản phẩm nấm lá sen nuôi trồng tại Hà Nội đạt các chỉ tiêu về an toàn vệ sinh thực phẩm.

Bảng 5. Một số chỉ tiêu về an toàn vệ sinh thực phẩm của nấm lá sen V5-9M

Chỉ tiêu về vi sinh vật				Chỉ tiêu về kim loại nặng				Chỉ tiêu về cảm quan		
TT	**Chỉ tiêu**	**Đơn vị**	**Mức công bố**	**TT**	**Chỉ tiêu**	**Đơn vị**	**Mức công bố**	**TT**	**Chỉ tiêu**	**Mức công bố**
1	*E. coli*	CFU/g	KPH	1	Thủy ngân (Hg)	mg/kg	KPH	1	Chất thịt nấm	Dày đặc
2	*Salmonella*	/25g	KPH	2	Cadimi (Cd)	mg/kg	KPH	2	Màu thịt nấm	Trắng
				3	Chì (Pb)	mg/kg	KPH	3	Mùi	Thơm tự nhiên
								4	Vị	Ngọt tự nhiên

Chú thích: KPH - Không phát hiện.

Kết luận

Đã khảo sát được môi trường thích hợp cho nuôi trồng nấm lá sen *Pleurotus giganteus* V5-9M tại Hà Nội và đánh giá được thành phần dinh dưỡng cũng như các chỉ tiêu về an toàn thực phẩm cho loài nấm sò này. Khi nuôi V5-9M trên môi trường có thành phần bao gồm 68% mùn cưa, 15% lõi ngô, 10% hạt bo bo, 5% cám gạo, 1% $CaCO_3$ và 1% nước chiết dinh dưỡng từ giá đỗ/ khoai tây thì năng suất quả thể đạt 35,2%; hàm lượng các chất dinh dưỡng trong quả thể như polysaccharide, protein và axit amin tổng số lần lượt đạt 7,2%; 25,7% và 4,57%. Quả thể của *Pleurotus giganteus* V5-9M đạt được tiêu chuẩn an toàn vệ sinh thực phẩm về các chỉ tiêu không phát hiện vi sinh vật gây bệnh và không có kim koại nặng trong sản phẩm.

Tài liệu tham khảo

Bonatti M, Karnopp P, Soares HM, and Furlan SA (2004). Eval-uation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellu-losic wastes. *Food Chemistry*, 88(3): 425-428.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*(1-2): 248-254.

Foster DS and Cornella TS (1961) *Colorimetric Method of Analysis.* Nostrand Company Inc New Jersey, 08:162.

Hernández-Orte P, Ibarz MJ, Cacho J, and Ferreira V (2003). Amino acid determination in grape juices and wines by HPLC using a modification of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) method. *Chromatographia*, 58: 29-35

Karunarathna SC, Yang ZL, Raspé O, Ko, KT, Vellinga EC, Zhao RL, Bahkali AH, Chukeatirote A, Degreef J, Callac P and Hyde KD (2012). *Lentinus giganteus* revisited: new collections from Sri Lanka and Thailand. *Mycotaxon*, 118(1): 57-71.

Kumla J, Suwannarach N, Jaiyasen A, Bussaban B, & Lumyong S (2013). Development of an edible wild strain of Thai oyster mushroom for economic mushroom production. *Chiang Mai Journal of Science*, 40(2): 161-172.

Maity K, Mandal KE, Maity S, Gantait SK, Das D, Maiti TK, Sikdar RS, Islam SS (2011). Chemical analysis and study of immunoenhancing and antioxidant property of a glucan isolated from an alkaline extract of a somatic hybrid mushroom of *Pleurotus florida* and *Calocybe indica* variety APK2. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(4): 555-560.

Manzi P, Aguzzi A, Pizzoferrato L (2001). Nutritional Value of Mushrooms Widely Consumed in Italy. *Food Chemistry,* 73(3), 321-325.

Moroney S (2013). *Identification of chemical constituents in the extracts of pleurotus giganteus (Berk.) Karunarathna & KD Hyde*. Doctoral dissertation, University of Malaya.

Ngô xuân Nghiễn và Nguyễn Thị Bích Thùy (2016). Nghiên cứu nhân giống nấm chân dài *Clitocybe maxima* (Gartn. ex Mey.: Fr.) Quél. dạng dịch thể. *Tạp chí Khoa học nông nghiệp Việt Nam*, 14(11): 1817-1824.

Lê Thị Hoàng Yến, Trần Huyền Thanh, Đồng Thị Hoàng Anh, Lê Thanh Huyền, Nguyễn Mỹ Linh, Trịnh Tam Kiệt (2020). *Tạp chí Di truyền, Chuyên san Nấm và Công nghệ Sinh học*: 142-148.

Phan CW, Wang JK, Tan EYY, Tan YS, Seelan JSS, Cheah SC, Vikineswary S (2019). Giant oyster mushroom, *Pleurotus giganteus* (Agaricomycetes): Current status of the cultivation methods, chemical composition, biological, and health-promoting properties. *Food Reviews International.* 35(4): 324-341.

Shashirekha MN, Rajarathnam S, and Bano Z (2005). Effects ofsupplementing rice straw growth substrate with cotton seeds onthe analytical characteristics of the mushroom, *Pleurotus florida*(Block & Tsao). *Food Chemistry*, 92(2): 255-259.

Smiderle FR, Morales D, Gil-Ramírez A, de Jesus LI, Gilbert-López B, Lacomini M, and Soler-Rivas C (2017). Evaluation of microwave-assisted and pressurized liquid extractions to obtain β-d-glucans from mushrooms. *Carbohydrate Polymers,* 156: 165-174.

Thachunglura VL, Rai PK, Zohmangaiha LB, and Lalmuansangi ZJ (2023). *Pleurotus giganteus* as a Valuable Source of Nutrients. *Indian Journal of Science and Technology*, 16: 89-94.

Trần Thanh Trúc, Đỗ Tân Khang, Trần Nhân Dũng, Bùi Thị Minh Diệu (2019). Khảo sát ảnh hưởng nguồn dinh dưỡng đến sinh trưởng và phát triển của nấm chân dài *Panus giganteus* (Berk.) Corner. *Tạp chí Khoa học Đại học cần Thơ*, 55: 110-118.

STUDY ON CULTIVATION AND DETERMINATON OF SOME NUTRITIONAL COMPONENTS OF THE GIANT OYSTER MUSHROOM *Pleurotus giganteus* V5-9M CULTIVATED IN HANOI

Le Thị Hoang Yen[1,2*], Dong Thi Hoang Anh[1,2], Tran Huyen Thanh[2,3], Nguyen Thi My Linh[1,2], Nguyen Thi Anh Đao[2], Le Hong Anh[2], Pham Thi Bich Dao[4]

[1]Center for Experimental Biology, National Center for Technological Progress, C6 Thanh Xuan Bac Ward, Thanh Xuan Distric, Hanoi, Vietnam

[2] Íntitute of Microbiology and Biotechnology, Vietnam National University, Ha Noi.

[3]Hanoi Radiation Center, Vietnam Atomic Energy Institute

[4]Thanh Do University, Km Chung, Hoai Duc, Hanoi

SUMMARY

Pleurotus giganteus, commonly known as the giant oyster mushroom, is a species of oyster mushroom with large fruiting bodies, high yield, and relatively easy cultivation. The fruiting bodies contain many nutrients such as proteins, essential amino acids, trace elements, and other bioactive chemical components such as polysaccharides, fatty acids, α-toluic acid, oleic acid, nicotinamide, ergosterol, neoergosterol, methyl mandelate, 4-tert-butylphenol, 2,5-ditertbutylphenol, sterols, organic acids, triterpenoids, and alkaloids. This mushroom species is quite widely cultivated around the world and in several southern provinces of Vietnam. Recently, it has been successfully domesticated and cultivated in Hanoi. In this study, we optimized the cultivation conditions to enhance the yield and quality of this mushroom species under the ecological conditions of Hanoi's winter-spring season (spawn stage temperature 15-20°C, fruiting stage temperature 20-30°C), with additional humidity of 80-90% and light intensity of 700 - 800 Lux. The results showed that the mushroom yield reached 35.2% when cultivated on a substrate composed of 68% sawdust, 15% corncob, 10% millet, 5% rice bran, 1% $CaCO_3$, and 1% nutrient extract from mung bean sprouts or potatoes. Additionally, some nutritional components and quality indicators of the mushroom were analyzed. The results showed that under these optimal conditions, the polysaccharide, protein, and total amino acid contents were 7.2%, 25.7%, and 4.57%, respectively.

Keywords: Giant Oyster Mushroom, Lotus leaf mushroom, *Pleurotus giganteus*, Cultivation, Nutritional Components.

[*] Author for correspondence: Tel: +84-388563454; Emai: yenlthvtcc@gmail.com

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA THỜI GIAN NUÔI CẤY VÀ CÁC CHẤT BẢO VỆ ĐẾN KHẢ NĂNG SINH TRƯỞNG CỦA CÁC CHỦNG NẤM SỢI SAU BẢO QUẢN ĐÔNG KHÔ

Nguyễn Thị Hiếu Thu[1*], Trần Khánh Linh[1,2], Nguyễn Thị Kim Thanh[1], Ngô Cao Cường[1]

[1]Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga, Bộ Quốc phòng

[2]Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Nghiên cứu bảo quản dài hạn các chủng vi sinh vật có ý nghĩa rất lớn trong công tác xây dựng và duy trì các bộ sưu tập nguồn gen vi sinh vật có giá trị. Trong nghiên cứu này, hai chủng nấm sợi *Aspergillus gracilis* BSK6.1 và *Pestalotiopsis neglecta* BS3.2 phân lập từ các hòm gỗ được tiến hành bảo quản bằng phương pháp đông khô. Hai chủng được nuôi cấy trên môi trường thạch và thu hoạch sinh khối cho đông khô vào ba thời điểm 7, 10 và 13 ngày sau cấy. Các công thức chất bảo vệ được sử dụng bao gồm skim milk 10%, skim milk 12% và trehalose 7%, skim milk 10% và inositol 5%. Kết quả cho thấy, sau 3 tháng bảo quản bằng đông khô hai chủng nấm sợi cho tỷ lệ sống sót đạt 100%. Thời gian thu hoạch sinh khối thích hợp cho bảo quản đông khô của cả hai chủng là 7 - 10 ngày sau cấy. Khuẩn lạc của chủng BS3.2 sinh trưởng tốt hơn với công thức chất bảo vệ skim milk 10% và inositol 5%, skim milk 12% và trehalose 7%. Khuẩn lạc của chủng BSK6.1 sinh trưởng tốt hơn với công thức chất bảo vệ skim milk 12% và trehalose 7%, hoặc skim milk 10%. Kết quả bước đầu này nhằm mục đích xây dựng quy trình bảo quản hiệu quả đối với hai chủng nấm BS3.2, BSK6.1 và hướng tới áp dụng cho các loài nấm sợi khác.

Từ khóa: Bảo quản dài hạn, đông khô, chất bảo vệ, nấm trên gỗ, phá hủy sinh học.

MỞ ĐẦU

Vi sinh vật có khả năng trao đổi chất rất linh hoạt, do đó có thể dễ dàng phát triển trong nhiều điều kiện môi trường khác nhau. Chính vì vậy, vi sinh vật trong đó có nấm sợi có thể làm hỏng vật liệu gốc hữu cơ (giấy, da, giấy dầu, hàng dệt hoặc gỗ) và vật liệu gốc vô cơ (thủy tinh, kim loại hoặc đá). Nấm sợi phân bố rộng rãi trong tự nhiên và gây hư hỏng các đồ vật bằng gỗ trong nhiều môi trường khác nhau (El-Gamal *et al*., 2016). Cấu trúc của gỗ đóng vai trò là cơ chất cho nấm sinh trưởng và phát triển. Do đó, việc thu thập và lưu giữ các chủng nấm sợi gây phá huỷ vật liệu gỗ là rất quan trọng trong việc tìm kiếm các biện pháp bảo vệ phù hợp cho loại vật liệu này.

Nhiều phương pháp bảo quản đã được nghiên cứu ứng dụng trên nấm sợi bao gồm những phương pháp đơn giản và ít tốn kém như nuôi cấy liên tục, bảo quản trong dầu khoáng, trong nước, trong đất và trong silica gel. Các phương pháp phức tạp và đòi hỏi trang thiết bị phù hợp như đông khô và bảo quản lạnh trong nitơ lỏng (Ozerskaya *et al.,* 2022). Các nghiên cứu cho thấy không có phương pháp nào là phổ quát để bảo quản các loài vi sinh vật và luôn cần phải cân bằng ưu điểm và nhược điểm của các phương pháp khác nhau. Vì vậy, nên chọn nhiều phương pháp để bảo quản chủng giống và bằng cách này sẽ làm giảm khả năng mất chủng hoặc mất các đặc tính sinh học quan tâm (Ayala-Zermeño *et al*., 2017).

Đông khô là một kỹ thuật tiềm năng để bảo quản lâu dài và được sử dụng phổ biến tại nhiều cơ sở nghiên cứu và bảo tàng chủng giống vi sinh vật. Hầu hết vi khuẩn và nấm hình thành bào tử hoặc bào tử đính đều tồn tại trong quá trình đông khô (Croan, 2000). Trong đông khô, skim milk được sử dụng phổ biến như chất bảo vệ do có tác dụng bao phủ và làm ổn định các thành phần cấu trúc màng tế bào cũng như cung cấp năng lượng cho quá trình phục hồi của vi sinh vật (Chin *et al*., 2021). Bên cạnh đó, một số hợp chất như trehalose, inositol, sodium glutamate... đã được bổ sung nhằm tăng hiệu quả bảo vệ (Tan *et al.,* 2007).

Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định thời gian nuôi cấy thích hợp của các chủng nấm khi đưa vào bảo quản và tìm kiếm chất bảo vệ thích hợp cho việc đông khô và bảo quản sau đông khô các chủng này. Từ các kết quả bước đầu này sẽ xây dựng quy trình bảo quản các chủng nấm sợi nói chung bằng phương pháp đông khô nhằm nâng cao hiệu quả lưu giữ chủng giống vi sinh vật phục vụ nghiên cứu ứng dụng tại Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Chủng nấm sợi *Aspergillus gracilis* BSK6.1 và *Pestalotiopsis neglecta* BS3.2 phân lập từ vật liệu gỗ tại kho K620 (Thái Nguyên) được lưu giữ tại Phòng Vi sinh, Phân viện Công nghệ sinh học (Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga).

Các chủng nấm được nuôi cấy trên môi trường Potato Dextrose Agar PDA (Himedia, Ấn Độ) và lưu giữ ở 4^{o}C. Một số hoá chất dùng trong nghiên cứu có xuất xứ Ấn Độ, Canada, Đức.

Phương pháp

Phương pháp đông khô

Các chủng nấm sợi được nuôi cấy trên môi trường thạch đĩa ở 30^{o}C. Bổ sung 3 mL dung dịch chất bảo vệ lên bề mặt tản nấm và dùng que cấy vô trùng cào nhẹ để thu bào tử và sợi nấm. Chuyển toàn bộ dung dịch bảo vệ chứa bào tử và sợi nấm sang ống Eppendorf 5 mL, vortex thật kỹ. Hút 200 µL dịch huyền phù cho vào ống cryovial 2 mL vô trùng, đông lạnh ở −80^{o}C trong 2 giờ. Tiến hành đông khô sinh khối nấm sợi trong máy đông khô chân không ALPHA 1-2 LD plus ở nhiệt độ bình ngưng -45^{o}C và áp suất buồng 5 Pa trong 24 giờ. Các ống cryovial được đậy nắp vặn và bảo quản ở nhiệt độ +4^{o}C.

Các chủng nấm được đưa vào bảo quản tại các thời điểm 7 ngày, 10 ngày và 13 ngày tuổi. Các công thức chất bảo vệ được sử dụng bào gồm: CT1 (skim milk 10%), CT2 (skim milk 12% và trehalose 7%), CT3 (skim milk 10% và inositol 5%) (Ryan & Smith, 2007; Tan *et* al., 2007; Ozerskaya *et al*., 2013). Trehalose và inositol được khử trùng riêng ở 121°C trong 15 phút. Skim milk được khử trùng 2 lần ở 105°C trong 20 phút.

Đánh giá khả năng tồn tại và sinh trưởng sau bảo quản

Trước khi tiến hành đông khô, đặc điểm hình thái và sinh trưởng của các chủng nấm trên đĩa thạch Sabouraud Dextrose Agar SDA (Merck, Đức) được xác định và được sử dụng làm tiêu chuẩn tham khảo để đánh giá khả năng sống sót, độ thuần khiết, hình thái, màu sắc khuẩn lạc... của chúng sau khi đông khô và theo thời gian bảo quản. Hút 10 µL dịch huyền phù sinh khối nấm và các chất bảo vệ nhỏ vào giữa đĩa thạch SDA, ủ đĩa ở 30°C và theo dõi khả năng sinh trưởng ở thời điểm 4, 7, 10 và 13 ngày. Khả năng sống sót và độ thuần khiết của các chủng nấm được theo dõi tại thời điểm sau đông khô và sau 1 và 3 tháng bảo quản. Để phục hồi chủng giống, các ống mẫu đông khô được bổ sung 200 µL dung dịch đệm Phosphate Buffered Saline PBS (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na_2HPO_4, 0,24 g KH_2PO_4, nước cất 1 lít), ủ ở nhiệt độ phòng 30 phút. Hút 10 µL dịch hoàn nguyên nhỏ vào giữa đĩa thạch SDA, ủ đĩa ở 30°C và theo dõi khả năng sinh trưởng ở các thời điểm tương tự như mẫu trước đông khô. Chụp ảnh và đo đường kính khuẩn lạc. Đường kính tản nấm được tính bằng hiệu số D - d (trong đó D là đường kính khuẩn lạc (mm), d là đường kính của giọt dịch). Nếu sự phát triển, màu sắc và hình thái khuẩn lạc của các chủng nấm giống với các đặc điểm được ghi nhận trước đông khô có nghĩa là đã bảo tồn khả năng sống sót của các chủng này. Độ thuần khiết của các chủng nấm mốc cũng được đánh giá khi xác định khả năng sống sót (Berikten, 2021).

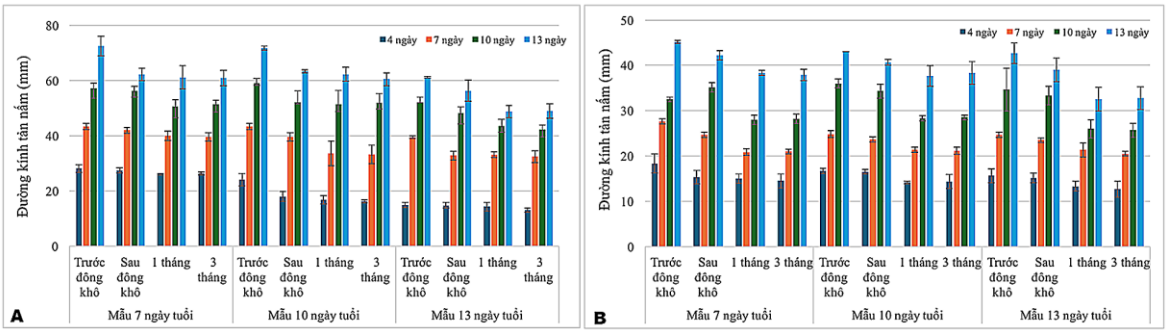
Xử lý số liệu

Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần. Kết quả được tính toán bằng phần mềm Excel 2017 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

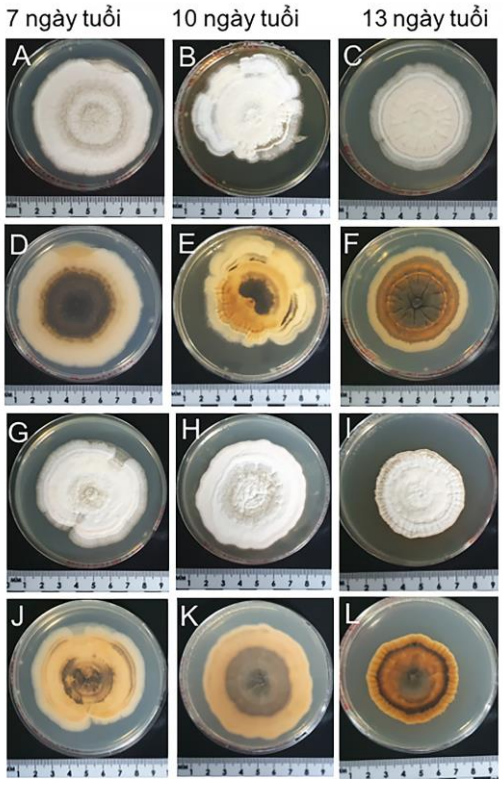
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy đến khả năng sinh trưởng và hình thái khuẩn lạc của các chủng nấm sau đông khô

Nhằm lựa chọn được thời điểm thu sinh khối thích hợp nhất cho bảo quản đông khô, các chủng nấm sợi được nuôi cấy trên đĩa thạch PDA và sinh khối nấm được đưa vào bảo quản ở các độ tuổi 7, 10 và 13 ngày sau cấy. Kết quả cho thấy độ tuổi của hai chủng nấm nghiên cứu có ảnh hưởng đến tốc độ phát triển của khuẩn lạc của chúng ở các thời điểm kiểm tra khác nhau sau đông khô (Hình 1). Trên môi trường SDA, chủng BS3.2 có khuẩn lạc dạng tỏa tròn, màu trắng, bề mặt bông xốp. Chủng BSK6.1 có khuẩn lạc dạng tỏa tròn, màu xanh lục xám, viền ngoài màu trắng, bề mặt dạng bột mịn, phẳng. Kiểm tra sau khi đông khô 48 giờ và sau bảo quản 1 và 3 tháng cho thấy, cả hai chủng vẫn đảm bảo khả năng sống sót 100% và giữ được các đặc điểm hình thái đặc trưng (Hình 2). Quan sát thí nghiệm cho thấy ở 4 ngày và 7 ngày sau khi hoàn nguyên mẫu đông khô và cấy dịch hoàn nguyên lên đĩa thạch SDA, có sự khác nhau rõ rệt về tốc độ phát triển giữa các mẫu đông khô ở cả ba thời điểm kiểm tra đối với cả 2 chủng nấm. Sau 10 và 13 ngày theo dõi, khuẩn lạc từ mẫu đông khô hoàn nguyên của mẫu 7 ngày tuổi và 10 ngày tuổi có tốc độ phát triển tương đương nhau và cao hơn hẳn so với mẫu 13 ngày tuổi. Nhìn chung, đối với cả hai chủng độ tuổi nấm 7 - 10 ngày là phù hợp nhất khi tiến hành bảo quản bằng phương pháp đông khô.



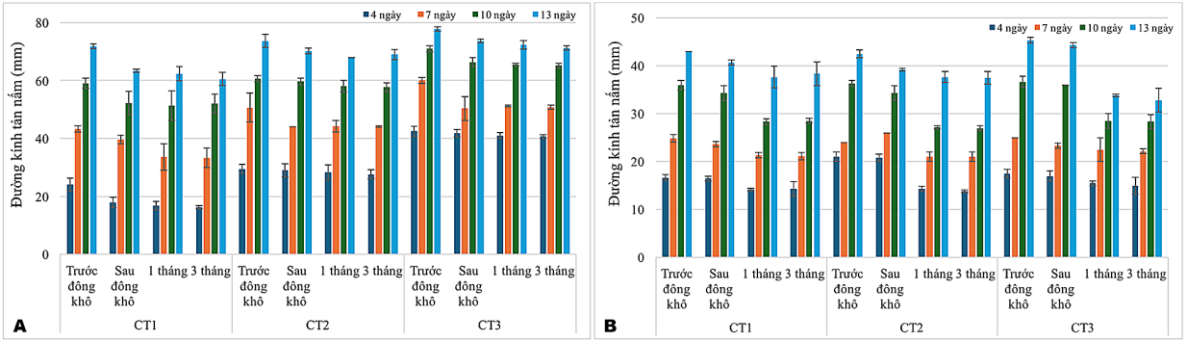
Hình 1. Đường kính hệ sợi của mẫu 7 ngày tuổi, 10 ngày tuổi và 13 ngày tuổi của chủng BS3.2 (A) và BSK 6.1 (B) trước và sau đông khô tại các thời điểm theo dõi khác nhau



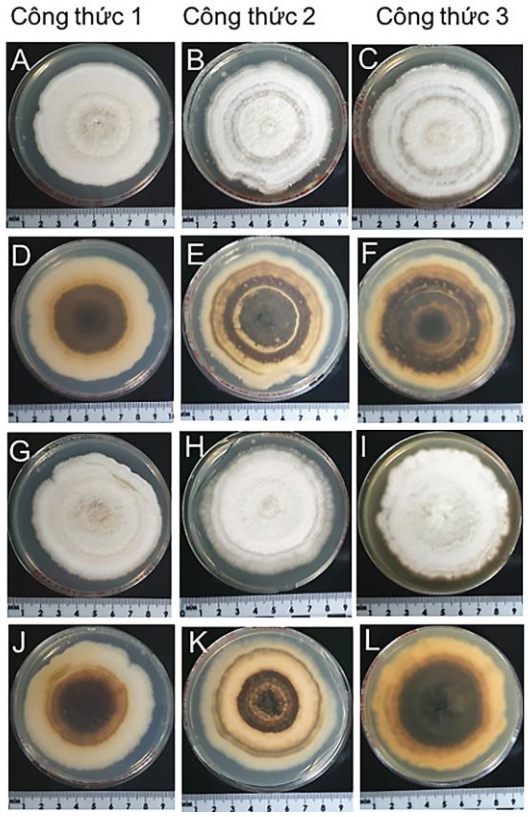
Hình 2. Hình ảnh hệ sợi của chủng BS3.2 ở các độ tuổi khác nhau trước đông khô (A - F) và sau đông khô 3 tháng (G - L) sau 13 ngày theo dõi. Mẫu 7 ngày tuổi trước đông khô (A: mặt trên, D: mặt dưới) và sau đông khô (G: mặt trên, J: mặt dưới). Mẫu 10 ngày tuổi trước đông khô (B: mặt trên, E: mặt dưới) và sau đông khô (H: mặt trên, K: mặt dưới). Mẫu 13 ngày tuổi trước đông khô (C: mặt trên, F: mặt dưới) và sau đông khô (I: mặt trên, L: mặt dưới).

Ảnh hưởng của các chất bảo vệ đến khả năng sống sót và sinh trưởng của các chủng nấm sau đông khô

Với mục tiêu lựa chọn được công thức dung dịch bảo vệ thích hợp hướng tới bảo quản lâu dài và duy trì được khả năng sống sót cao, hai chủng nấm sợi BS3.2 và BSK6.1 được thử nghiệm bảo quản với ba công thức chất bảo vệ khác nhau. Kết quả tại hình 3 chỉ ra cả ba công thức chất bảo vệ sử dụng đều cho hiệu quả bảo vệ cao, thể hiện ở tỉ lệ sống sót của cả 2 chủng giống sau đông khô và sau bảo quản 1 và 3 tháng đạt 100%. Đối với chủng BS3.2, công thức chất bảo vệ 3 (CT3: skim milk 10%, inositol 5%) và công thức chất bảo vệ số 2 (CT2: skim milk 12%, trehalo 10%) có tốc độ tăng đường kính khuẩn lạc cao hơn đáng kể so với công thức 1 (skim milk 10%). Sau bảo quản 3 tháng, CT3 cho đường kính khuẩn lạc đạt 40,67±0,58 mm và 71,17±0,76 mm; CT2 cho đường kính khuẩn lạc đạt 26,67±1,53 mm và 69,00±1,73 mm ở ngày thứ 5 và ngày 14 sau cấy. Trong khi đó, ở CT1, đường kính khuẩn lạc chỉ đạt 16,33±0,58 mm và 60,50±2,29 mm ở cùng thời điểm kiểm tra (Hình 3A, Hình 4).



Hình 3. Đường kính hệ sợi của chủng BS3.2 (A) và BSK 6.1 (B) trước và sau đông khô với các công thức chất bảo vệ khác nhau



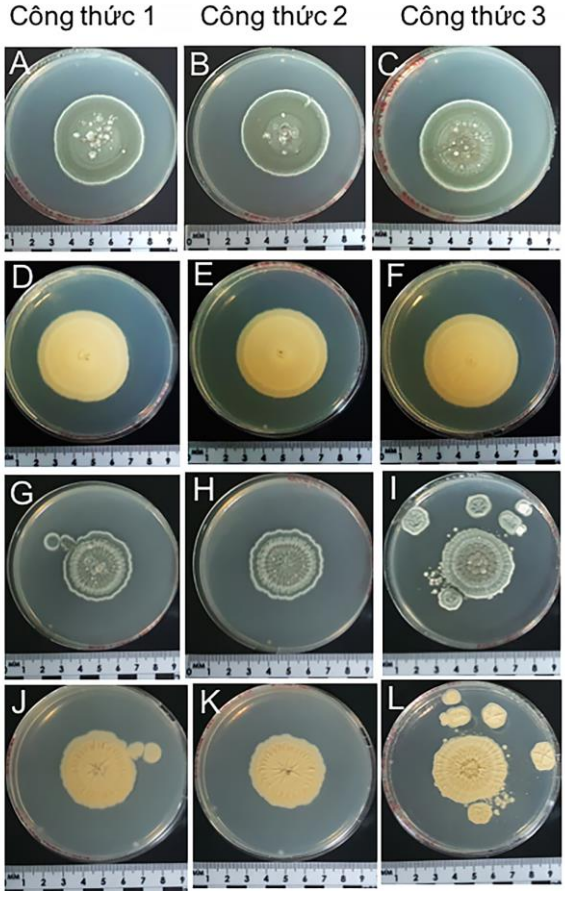
Hình 4. Hình ảnh hệ sợi của chủng BS3.2 trước đông khô (A - F) và sau đông khô 3 tháng (G - L) với các công thức chất bảo vệ khác nhau sau 14 ngày theo dõi. Công thức 1 trước đông khô (A: mặt trên, D: mặt dưới) và sau đông khô (G: mặt trên, J: mặt dưới). Công thức 2 trước đông khô (B: mặt trên, E: mặt dưới) và sau đông khô (H: mặt trên, K: mặt dưới). Công thức 3 trước đông khô (C: mặt trên, F: mặt dưới) và sau đông khô (I: mặt trên, L: mặt dưới).

Công thức chất bảo vệ 2 cũng cho tốc độ sinh trưởng khuẩn lạc cao khi kiểm tra sau đông khô và sau bảo quản 1 và 3 tháng đối với chủng BSK6.1 (Hình 3B). Công thức chất bảo vệ 1 cho hiệu quả tương đương công thức 2. Công thức 3 cho kết quả tốt khi kiểm tra sau khi đông khô. Tuy nhiên, ở thời điểm 1 và 3 tháng bảo quản sau đông khô công thức 3 cho tốc độ sinh trưởng khuẩn lạc thấp hơn hẳn so với 2 công thức còn lại, tương ứng đạt 33,83±0,29 mm và 32,83±2,47 mm (CT3), 37,67±2,25 mm và 38,33±2,52 mm (CT1), 37,67±1,15 và 37,50±1,52 mm (CT2) sau 13 ngày theo dõi (Hình 3B). Các công thức chất bảo quản có ảnh hưởng đến hình thái khuẩn lạc sau đông khô và bảo quản. Cụ thể tại thời điểm 3 tháng sau đông khô, khuẩn lạc ở cả ba công thức chất bảo quản xuất hiện các đường xẻ rãnh từ tâm và các vòng đồng tâm có màu sắc khác nhau, bề mặt khuẩn lạc gồ ghề, dạng hạt hơi lồi ở tâm, nhất là ở công thức 3 (Hình 5).

Hai chủng nấm sợi thể hiện khả năng sống sót 100% sau quá trình đông khô khi chỉ sử dụng skim milk hoặc skim milk kết hợp với inositiol hoặc trehalose như chất bảo vệ. Đặc biệt, cả hai chủng có khả năng phục hồi tốt sau đông khô và 3 tháng bảo quản với chất bảo vệ là skim milk kết hợp với trehalose. Trong tự nhiên, trehalose được sản xuất trong các bào tử và bào tử đính của nấm và nấm men để bảo vệ màng và các protein của chúng (Tan *et al*., 2007). Trehalose nội bào tích lũy trong giai đoạn tăng trưởng ổn định và đóng vai trò dự trữ carbohydrate (Croan, 2000). Các nghiên cứu gần đây đã chứng minh rằng trehalose là một trong những chất bảo vệ hiệu quả nhất đối với bảo quản vi sinh vật (Han *et al*., 2022).

Chủng BS3.2 thể hiện khả năng sinh trưởng tốt nhất sau đông khô và 3 tháng bảo quản với công thức chất bảo vệ skim milk kết hợp với inositiol nhưng chủng BSK6.1 thì ngược lại. Điều này cho thấy, quy trình bảo quản và khả năng phục hồi có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm phân loại khác nhau thậm chí giữa các loài trong cùng một nhóm (Ibatsam *et al*., 2012).

Tốc độ sinh trưởng của hai chủng nấm khảo sát bị ảnh hưởng bởi quá trình đông khô và bảo quản tuy nhiên, sự thay đổi về đặc điểm hình thái khuẩn lạc là không lớn. Tóm lại, phương pháp đông khô sử dụng trong nghiên cứu có thể bảo tồn hiệu quả các chủng nấm sợi *Aspergillus gracilis* BSK6.1 và *Pestalotiopsis neglecta* BS3.2 phân lập từ vật liệu gỗ và có thể áp dụng cho cả nhiều loài nấm sợi khác.



Hình 5. Hình ảnh hệ sợi của chủng BSK6.1 trước đông khô (A - F) và sau đông khô 3 tháng (G - L) với các công thức chất bảo vệ khác nhau sau 13 ngày theo dõi. Công thức 1 trước đông khô (A: mặt trên, D: mặt dưới) và sau đông khô (G: mặt trên, J: mặt dưới). Công thức 2 trước đông khô (B: mặt trên, E: mặt dưới) và sau đông khô (H: mặt trên, K: mặt dưới). Công thức 3 trước đông khô (C: mặt trên, F: mặt dưới) và sau đông khô (I: mặt trên, L: mặt dưới).

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xác định thời gian nuôi cấy ban đầu và công thức chất bảo vệ thích hợp cho đông khô và bảo quản sau đông khô hai chủng nấm sợi *Pestalotiopsis neglecta* BS3.2 và *Aspergillus gracilis* BSK6.1. Thời gian

nuôi cấy ban đầu thích hợp là 7 - 10 ngày trên môi trường thạch PDA ở 30^{o}C. Công thức chất bảo vệ thích hợp đối với chủng *Pestalotiopsis neglecta* BS3.2 là skim milk 10% và inositol 5% hoặc skim milk 12% và trehalose 7%. Công thức chất bảo vệ thích hợp đối với chủng *Aspergillus gracilis* BSK6.1 là skim milk 12% và trehalose 7% hoặc skim milk 10%.

Lời cảm ơn: *Công trình này được thực hiện nhờ sự hỗ trợ kinh phí của Đề tài: Xây dựng bộ cơ sở dữ liệu nguồn gen vi sinh vật của Trung tâm Nhiệt đới Việt - Nga. Mã số SH.N2.01/23.*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ayala-Zermeño MA, Gallou A, Berlanga-Padilla AM, Andrade-Michel GY, Rodríguez-Rodríguez JC, Arredondo-Bernal HC, Montesinos-Matías R (2017). Viability, purity and genetic stability of entomopathogenic fungi species using different preservation methods, *Fungal Biol,* doi: 10.1016/j.funbio.2017.07.007.

Chin YW, Lee S Yu HH, Yang SJ, Kim TW (2021). Combinatorial effects of protective agents on survival rate of the yeast starter, *Saccharomyces cerevisiae* 88-4, after Freeze-Drying. *Microorganisms*, 9(3): 613.

Croan SC (2000). Lyophilization of hypha-forming tropical wood-inhabiting Basidiomycotina. *Mycologia*, 92(4): 810–817. doi:10.1080/00275514.2000.1206

El-Gamal R, Nikolaivits E, Zervakis GI, Abdel-Maksoud G, Topakas E, Christakopoulos P (2016). The use of chitosan in protecting wooden artifacts from damage by mold fungi. *Electron J Biotechnol*, *24*: 70-78.

Han D J, Jun SJ, Lee BH, Yoo SH (2022). Cryoprotective effect of turanose on lyophilized Lactobacillus paracasei subsp. paracasei, L. casei 431. *Food Sci Biotechnol*, 31(3): 343-347.

Ibatsam K, Rukhsana B, Nasim G (2012). Preservation of *Penicillium* species by lyophilization. *Afr J Food Agric Nutr Dev*, 12(3): 6055-6064.

Ozerskaya SM, Ivanushkina NE, Kochkina GA, Eremina SS, Vasilenko AN, Chigineva NI (2013). Long-term preservation of fungal cultures in All-Russian Collection of Microorganisms (VKM): protocols and results. In *Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology* (pp.17-65). Cham: Springer International Publishing.

Ozerskaya SM, Ivanushkina NE, Kochkina GA, Danilogorskaya AA, Pinchuk IP, Vasilenko AN (2022). Various methods of long-term preservation of fungal cultures in all-Russian collection of microorganisms (VKM). In *Laboratory Protocols in Fungal Biology: Current Methods in Fungal Biology* (pp. 1-67). Cham: Springer International Publishing.

Reinprecht L, Vidholdová Z, Ižd inský J (2020). Bacterial and mold resistance of selected tropical wood species. *BioResources*, 15(3): 5198.

Ryan MJ, Smith D (2007). Cryopreservation and freeze-drying of fungi employing centrifugal and shelf freeze-drying. In: Day JG, Stacey GN (eds) *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology*™, vol 368 (pp. 127-140). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2_9.

Tan CSH, Van Ingen CW, Stalpers JA (2007). Freeze-drying fungi using a shelf-freeze drier. In: Day JG, Stacey GN (eds) *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology*™, vol 368 (pp. 119-125). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2_9.

EFFECT OF INCUBATION AND LYOPROTECTANTS ON VIABILITY OF WOODEN FUNGI

Nguyen Thi Hieu Thu[1*], Tran Khanh Linh[1,2], Nguyen Thi Kim Thanh[1], Ngo Cao Cuong[1*]

[1]*Joint Vietnam - Russia Tropical Science and Technology Research Center*

[2]*Graduate University of Science and Technology - Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

Research on the long-term preservation of microbial strains is significant in setting and maintaining valuable collections of microbial genetic resources. In this study, two strains of filamentous fungi *Aspergillus gracilis* BSK6.1 and *Pestalotiopsis neglecta* BS3.2 isolated from wooden material for preservation purpose were preserved by freeze-drying. Two strains were cultured on agar dishes and their biomass was harvested for freeze-drying on 7, 10, and 13 day-after-inoculation. Skim milk 10%, skim milk 12% and trehalose 7%, skim milk 10% and inositol 5% were used as protectant formulations. The results showed that after 3 months of freeze-drying preservation, two filamentous fungi strains had a survival rate of 100%. The appropriate time point for biomass harvesting for both strains is 7 - 10 days after incubation. Colonies of strain BS3.2 grew better with skim milk 10% and inositol 5%, skim milk 12% and trehalose 7%. While colonies of strain BSK6.1 grew better with skim milk 12% and trehalose 7%, or skim milk 10%. This preliminary result allows the development of an effective preservation process for the two fungi strains BS3.2, and BSK6.1, and possibly for other filamentous fungi species.

Keywords: Biodegradation, long-term preservation, lyophilization, protectant agents, wooden fungi.

[*] Author for correspondence: Tel: +84-934579181; Email: hieuthu5106@gmail.com

MOLECULAR PHYLOGENY OF *LASIODIPLODIA THEOBROMAE* ASSOCIATED WITH *NELUMBO NUCIFERA* IN THUA THIEN HUE, VIETNAM AND THEIR SENSITIVITY TO SILVER NANOPARTICLES

Vu Quang Hoang Nguyen[1], Quang Tan Hoang[1], Lan Thuy Tran[1], Tram Tran Thi Ngoc[1], Hoang Thi Kim Hong[2*]

[1]*Institute of Biotechnology, Hue University, Thua Thien Hue, Vietnam*

[2]*Biotechnology Department, College of Medicine and Pharmacy, Duy Tan University, Da Nang, Vietnam*

SUMMARY

In Vietnam, lotus is a plant with cultural and spiritual significance, representing purity, spiritual growth, and enlightenment. *Lasiodiplodia* fungi are associated with a wide range variety of host worldwide along with endophytes, pathogens, and saprobes. In this study, symptomatic leaves of *Nelumbo nucifera* were collected from Thua Thien Hue Provinces and *Lasiodiplodia theobromae* are characterized, identified based on combined sequence data analyses (multi locus) of internal transcribed spacer (ITS), beta tubulin (*tub2*), and translation elongation factor 1-alpha (*tef-1α*) coupled with morphological characteristics. Furthermore, AgNPs showed potent activity against *L. theobromae* at a concentration of 30 μg mL^{-1}, a 73.72% inhibition of mycelial growth was observed for the pathogen *L. theobromae* VNHUCC.NEL38 at 3 days post-inoculation. Thus, the present study indicates AgNPs may have considerable antifungal activity, these findings will contribute to the development of effective management strategies to control these diseases and improve lotus production

Keywords: Lasiodiplodia theobromae, *Nelumbo nucifera*, phylogeny, Vietnam, silver nanoparticles.

INTRODUCTION

Lasiodiplodia genus (Botryosphaeriaceae family, Botryosphaeriales) was first described by Clendenin in 1896 and is represented by *L. tubericola*, which is now recognized as *L. theobromae* (Phillips *et al*., 2013; Dou *et al*., 2017). This genus with characterized by large, ovoid to oblong, usually hyaline, aseptate ascospores and hyaline or pigmented, aseptate, one or rarely multi-septate, conidia usually with longitudinal striations. Both sexual and asexual morphs have been recorded for *Lasiodiplodia* genus. The family Botryosphaeriaceae consists of a group (monophyletic lineage) of 22 genera that are distinguished based on their ascospores and conidia, as well as their phylogenetic relationships. Conidiophores are typically reduced to conidiogenous cells, which, when present, are characterized by hyaline, cylindrical conidiophores that are sometimes septate and rarely branched *Lasiodiplodia* species have subglobose or oval smooth, thick-walled conidia that are initially hyaline and become dark brown and striated when mature

Distinguishing between *Lasiodiplodia* species based on morphological features alone is challenging and unreliable, leading to inaccurate identification because of their similar cultural and conidial characteristics. Hence, a DNA sequencing approach is recommended for accurate species identification, as well as clear phylogenetic boundaries. Recent research has advanced the recognition of various *Lasiodiplodia* species using sequence data of multi-locus with the internal transcribed spacers (ITS), partial translation elongation factor-1α (t*ef1*), and partial β-tubulin (*tub2*) with high phylogenetic support. *Lasiodiplodia* species are wide distribution, commonly found in tropical and subtropical regions and exhibit different lifestyles as endophytes, pathogens, and saprobes. These species have been known to infect various crops, including almonds (*Prunus amygdalus*), blueberries (*Vaccinium corymbosum*), baobabs, citrus fruits (*Citrus* spp.), cocoa (*Theobroma cacao*), coconuts (*Cocos nucifera*), grapevines (*Vitis* spp.), durians (*Durio* spp.), dragon fruits (*Hylocereus polyrhizus*), groundnuts (*Arachis hypogaea*), jackfruits (*Artocarpus heterophyllus*), mango (*Mangifera indica*), mulberries (*Morus* spp.), olives (*Olea europaea*), pines (*Pinus* spp.), strawberries (*Fragaria* spp.), and rice (*Oryza* spp.) (Berraf-Tebbal *et al*. 2020; El-Ganainy *et al*. 2022; Ko *et al*. 2023). There are few studies on *Lasiodiplodia*-associated leaf disease in *Nelumbo nucifera*. Therefore, the current study aimed to characterize *Lasiodiplodia* isolates from *Nelumbo nucifera* in Thua Thien Hue Province, Vietnam, using morphological and phylogenetic analyses based on ITS, *tef-1α,* and *tub2* sequence data. In addition, assessing the sensitivity of fungal reactions to AgNPs will provide essential knowledge regarding their potential use as plant protection products. This information is crucial for sustainable breeding and the design of management strategies against fungicide-resistant strains.

MATERIALS AND METHODS

Sample Collection and Fungal Isolation

Symptomatic leaf samples were collected, and stored in plastic at Gene Laboratory, Institute of Biotechnology, Vietnam, where isolation was subsequently conducted. Fungal isolation was performed using the tissue

transplantation method. Pieces of symptom-containing healthy parts of 5 × 5 mm were cut and surface disinfected using 70% ethanol and 1% a.i sodium hypochlorite (NaOCl). Then, washed 3 times with sterile distilled water (DW), and dried on sterile filter paper. The samples were placed directly on water agar (WA) and incubated at ambient temperature (28 ± 2 °C) for 2-3 days. Hyphal tips recovered from the infected tissues were cut and directly placed on potato dextrose agar (PDA; HiMedia, India) for purification. The obtained fungal samples were transferred to PDA slant/PDA-glycerol and preserved at -40 °C for further analyses. To induce sporulation, isolates were transferred to 2 % water agar with sterilized pine needles on the agar surface (PNA).

DNA Extraction, PCR Amplification, and Sequencing

Each fungal isolate was cultured on PDA for 5 days to obtain young mycelia, which were subjected to DNA extraction using the Genomic DNA Extraction Kit following the manufacturer's instructions (ABT, Vietnam). Portions of internal-transcribed spacer (ITS), translation elongation factor 1-α (*tef1-α*), and β-tubulin (*tub2*) regions were amplified using the primer pairs ITS1/ITS4 (White *et al*., 1990), EF1-728F/ EF-986R (Carbone and Kohn, 1999), and Bt2a/Bt2b (Glass and Donaldson, 1995), respectively (Table 1). PCR amplification was performed in 60 uL reaction volume containing 30 µL of Go Taq Green 2x Master Mix (Promega, USA), 5 µL of the DNA template (50 ng), 5 µL of each primer (10 pmol), and 15 µL of ddH_2O. PCR profile was denatured at 95 °C for 3 min, followed by 35 cycles of 95 °C for 30 s, annealing at 52 °C (ITS), 55°C (*tef-1α,* and *tub2)* for 30 s, elongation at 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 10 min. The PCR products were observed via 1% agarose electrophoresis gel using SafeView staining.

Table 1. Gene regions and respective primer pairs were used in the study.

Locus	Gene region	Primer	Sequence (5'-3')
internal transcribed spacer regions with intervening 5.8S nrRNA gene	ITS	ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCGG
		ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
Partial beta-tubulin gene	*tub2*	Bt2a	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC
		Bt2b	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC
Partial translation elongation factor 1-alpha	*tef*	EF1-728F	CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG
		EF1-986R	TAC TTG AAG GAA CCC TTA CC

Phylogenetic analyses

A portion of the PCR product was sequenced by the sequencing service provider First BASE Laboratories (Seri Kembangan, Malaysia). A BLASTn search was used to compare the sequences found in our study with other sequences deposited for similarity analysis in those of Genebank - NCBI (National Center for Biotechnology Information, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, accessed on 15 December 2023) database. Sequences for each locus were constructed and aligned in MAFFT v7.487 using default settings and trimmed using trimAl 2.rev0 b g. Gaps were deemed to be missing data, and ambiguously aligned areas were discarded. The alignment was further manually adjusted using BioEdit v. 7.0.9.0 if necessary.To establish the identity of the isolates at species level, phylogenetic analyses were conducted individually for individual loci and then as combined analyses of three loci (ITS, TEF, and TUB2) based on maximum likelihood (ML) in IQ-TREE. The ModelFinder was used to determine the best-fit model (Kalyaanamoorthy *et al*., 2017). Branch support was determined using 10,000 ulfabootstraps, a Bayesian posterior probabilities support and 10,000 SH-aLRT bootstrap replicates. The resulting trees were plotted using FigTree v. 1.4.2 (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree), and Interactive Tree of Life (iTOL) v.5 (Letunic and Bork, 2021), and further edited using PowerPoint (Microsoft, CA, USA) and Adobe Illustrator CC 2021 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

Pathogenicity assay

Young and healthy leaves of *Nelumbo nucifera* were collected, washed with tap water, and surface-disinfected with 1% sodium hypochlorite. They were then submerged in 70% ethanol for 1 min and rinsed twice with sterilized water. One piercing wound was made in the mid-region of each leaf using a sterilized needle to form a tiny dot. Mycelium plugs (6 × 6 mm) of ½ PDA were cut from an actively growing colony, placed at the inoculation points, and wrapped in parafilm. The plants were kept under high humidity conditions (>85% relative humidity) in a covered plastic container for 1–3 days at 28 °C. Sterile PDA plugs were used to inoculate the control plants. The non-wounding experiment was conducted similarly without causing any damage to the leaves. The petri dishes were placed inside a plastic box, and the leaves were incubated at 25 °C with humidity and a 12/12-hour fluorescent light/dark cycle. After five days, the leaves were examined for symptom development, and the diameter of the diseased spot was measured.

Antifungal effects of AgNPs against *L. theobromae*

An *in vitro* assay was carried out on PDA with 0.1, 1, 10, 20, and 30 mg/L of silver nanoparticles (AgNPs). Stock nanoparticle solution was transferred into PDA to obtain different initial AgNPs concentrations (0.1, 1, 10, 20 and

30 mgL^{-1}). Medium containing AgNPs was poured into 90 × 15 mm petri dishes and incubated at room temperature. After 48 h of incubation, an agar plug of 6x6 mm diameter containing fungi was inoculated simultaneously at the center of each Petri dish and incubated at 28 ± 2°C. Culture medium without AgNPs was inoculated and cultured under the same conditions as the control treatment. The size of the colonies was measured after 1, 2,3, 7 days and each treatment was replicated. The mycelial growth inhibition rate – MGIR (%) was calculated using the following formula: where R is the radial growth of fungi in the control plate, and r is the radial growth of fungi in silver nanoparticle treated plates.

$$MGRI(\%) = \frac{R_{control} - R_{treated}}{R_{control}}$$

RESULTS & DICCUSSION

Symptom Recognition and Fungal Isolates

The disease appeared as small irregular brown spots on the lotus leaves (only recorded as aerial/standing leaves), originating from the outer leaf margins or damaged leaf areas. Subsequently, the spots enlarged and coalesced into regular or irregular brown necrotic lesions with dark-brown margins. Lesions on leaf petioles were characterized by brown areas, separating the color between infected and non-diseased areas. On PDA, the fungal isolates produced dense fast-growing mycelia. Colonies with abundant aerial mycelia reached the lid, covering the surface of the Petri plate after 3-4 days. Initially, the aerial mycelium was white to pale gray or smoke-gray colonies, gradually becoming dark grayish on the surface and reversing with age. (Fig. 1E). The conidia were immature and mature. Both immature and mature conidia were ovoid to ellipsoid in shape and 1-septate, with longitudinal striations, a broadly rounded apex, and tapering to the truncated base. Based on the morphological characteristics of the fungal isolates, we identified the recorded isolates as *Lasiodiplodia* sp., which was consistent with the morphology described by Alves và đồng tác giả (2008).

Five strains of *Lasiodiplodia* isolated from leaves (aerial leaf) and petioles of *Nelumbo nucifera* in Thua Thien Hue Province, Vietnam, were grown in culture. From the five isolates, two representative isolates were selected for molecular analysis based on a combined analysis of ITS, *TUB2*, and *TEF* gene sequences. The final dataset comprised of 79 taxa of representative isolates of *Lasidodiplodia* genus, including two isolates obtain in this study. *Diplodia multila* (CMW7060) is used as the outgroup taxon. Phylogenetic analysis revealed that the topologies of the ML trees generated from individual and concatenated genes (ITS, *tef1-α*, and *tub2*) were similar.

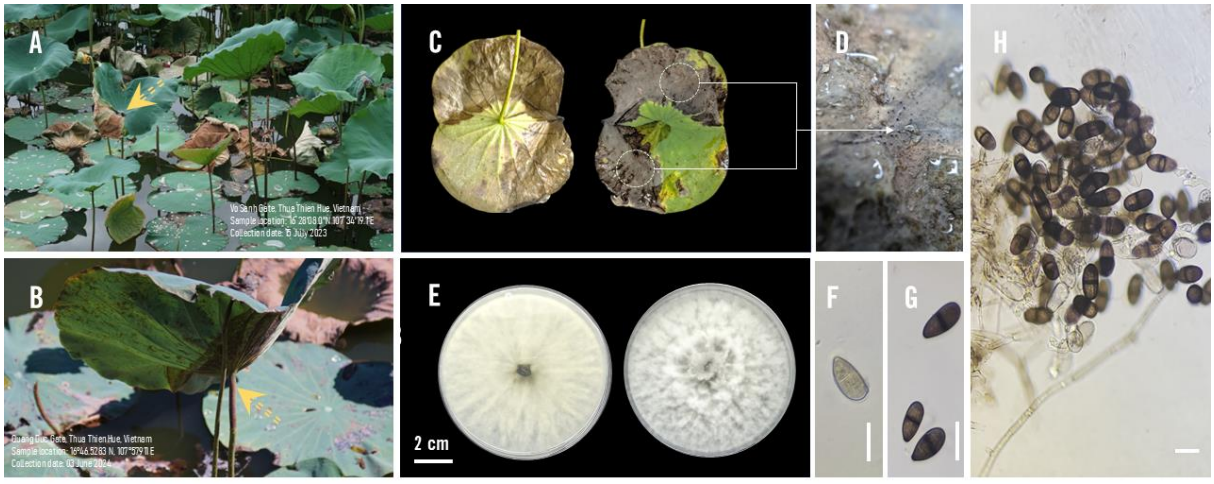
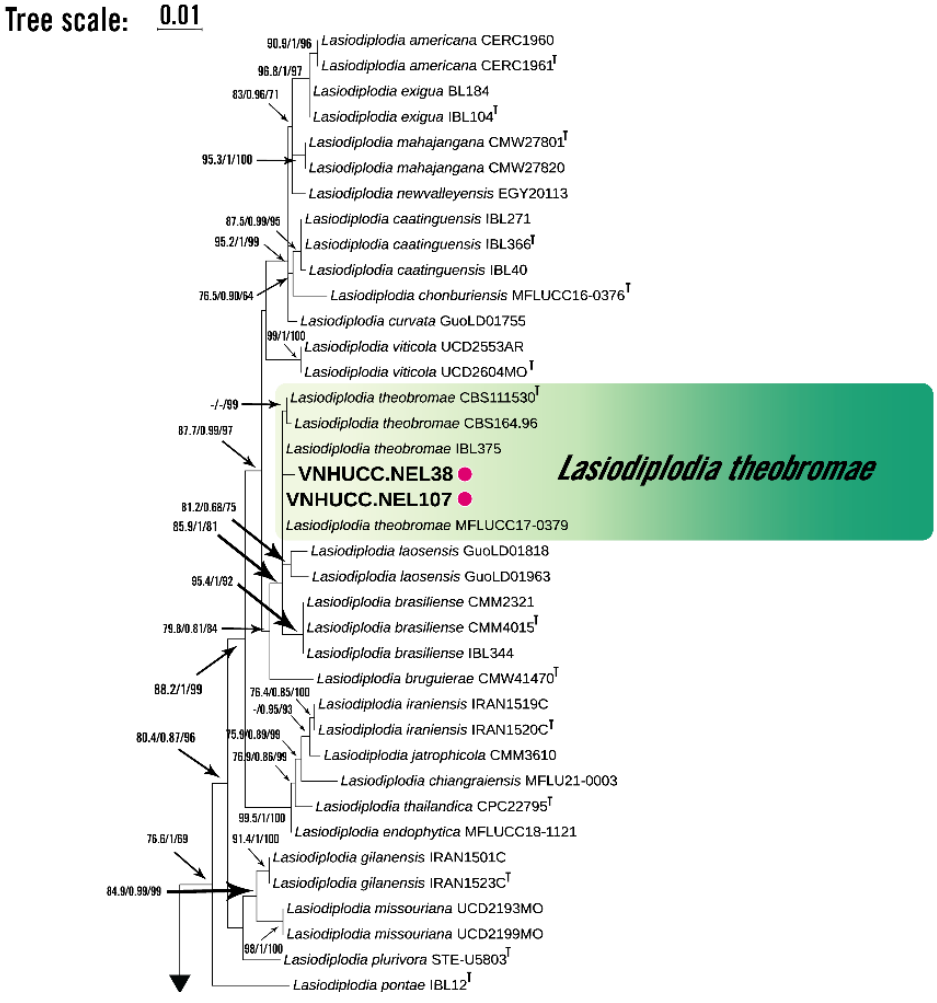


Figure 1. A, B. Symptomatic leaf samples observed in the lotus (N. nucifera) field. C, D. Zoomed in view of lesions with black pycnidia; E. Top and bottom view of VNHUCC.NEL38 colony on PDA; F: immature conidia; G: mature conidia with longitudinal striations; H: Conidia and fungal mycelia. Scale: E: 2cm; F-G: 15µm; H: 10µm.

The dataset combined alignment included 80 sequences (taxa) with 1261 characters, including gaps. ML analysis indicated 355 distinct patterns, 165 parsimony-informative, 98 singleton sites, 998 constant sites. The ML tree was contrusted with optimal log-likelihood value of -4925.922. Estimated base frequencies were as follows: A: 0.207, C: 0.306, G: 0.257, T: 0.231, rate parameters: A-C: 1.00000; A-G: 4.03082; A-T: 1.00000; C-G: 1.00000; C-T: 4.03082; G-T: 1.00000. Proportion of invariable sites: 0.614. Gamma distribution shape alpha: 0.776. Best-fit model: HKY+F+I+G4 chosen according to Bayesian Information Criterion (BIC), TIM3+F+I+G4 according Akaike Information Criterion (AIC). Two isolates VNHUCC.NEL38, VNHUCC.NEL107 developed a cluster with *L. theobromae*, (Fig. 2). Notably, within the same cluster, our two isolates developed distinct evolutionary lengths with these *L. theobromae* isolates CBS 164.96 (TYPE strain), CBS 11530, IBL375 (Pitomba - *Talisia esculenta*,

Brazil), MFLUCC 17-0379 (stem of *Hevea brasiliensis,* Thailand). The combined ITS, tef1 and tub2 phylogeny showed that *Lasiodiplodia theobromae* (including VNHUCC.NEL38, VNHUCC.NEL107) clades sister to *L. laosensis, L. brasiliense*, and *Lasiodiplodia bruguierae* with high support (85.9/1/91). As a result, all the present two isolates (VNHUCC.NEL38, VNHUCC.NEL107) were verified as *L. theobromae* by virtue of molecular identification and phylogenetic analysis.

Genus *Lasiodiplodia* is cosmopolitan and most species can be found primarily in tropics and subtropics. Many phytopathogenic fungal species with widespread distribution can be found within this genus, responsible for causing over 500 plant diseases such as fruit rot, root rot, collar rot, stem-end rot, dieback, canker, and leaf necrosis. In Vietnam, *Lasiodiplodia* species have been associated with various destructive diseases, such as fruit rot of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus)* in DakLak, stem end rot disease in pomelo (*Citrus maxima*) and mango in Ben Tre; gummosis on Thanh Tra pomelo *Citrus grandis* in Thua Thien Hue (Khuong *et al*., 2023; Thao *et al*., 2023; Trai *et al*., 2024). Recently, Cuong và đồng tác giả (2023) also reported *L. theobromae* as the causative agent of blight disease in lotus plants (Cuong *et al*., 2023). Notably, all these reports indicated that *L. theobromae* is the causative agent of the disease. To date, there have been no instances of any other species within the *Lasiodiplodia* genus.



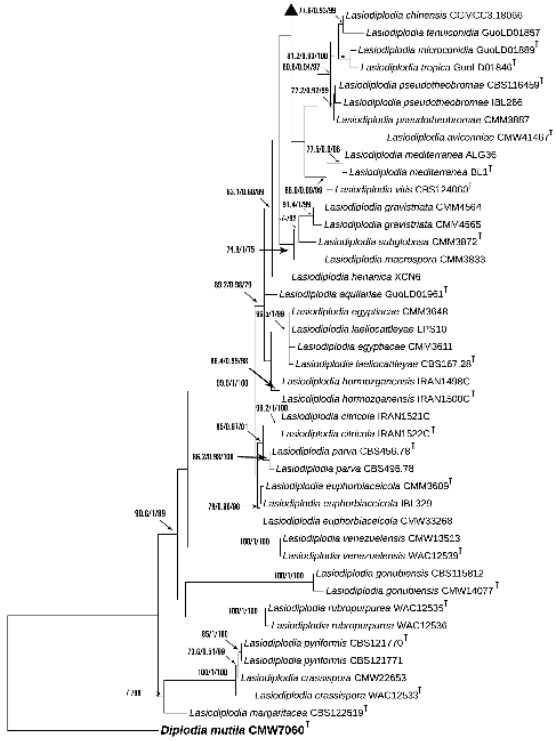


Figure 2. Maximum likelihood (ML) tree of the *Lasiodiolodia* species. *Diplodia mutila* CMW7060 was selected as the outgroup. At the nodes, bootstrap support values for ML (≥ 70%) and BYPP (≥ 0.5), SH-aLRT (≥ 75%) are displayed (SH-aLRT /BYPP/ML). Ex-type isolates are marked with "T", and our isolates obtained from this study are in bold. The scale bar indicates 0.01 nucleotide changes per site

Pathogenicity test

All isolates of *Lasiodiplodia* were pathogenic to detached leaves of lotus, resulting in visible lesions 5 days after inoculation. The symptoms observed both on the surface and internally were dark brown necrotic lesions that extended upward and downward from the point of inoculation on both wounded and unwounded samples. Lesion development in wounded samples was found to be more rapid and severe than in unwounded samples. No visible symptoms were observed in control leaves. The lotus cultivars differed significantly in the severity of foliar symptoms caused by *L. theobromae*. Two lotus varieties in Hue showed that *L. thebromae* only causes disease in the Cao san lotus variety, while the white lotus variety has no symptoms. Notably, when tested using the isolated wound method, the leaves had larger diameter lesions (114 mm), leading to visible lesions five days after infection, whereas in the non-wounded method, the lesions progressed very slowly, were barely visible, or were small (24.34 mm). Symptoms observed both on the surface and internally were dark brown necrotic lesions extending up and down (light brown) from the inoculation site in both the wounded and non-wounded methods.

Antifungal effects of AgNPs against *L. theobromae*

To determine the sensitivity of *L. theobromae* (VNHUCC.NEL38) to silver nanoparticles (AgNPs), different concentrations of were used to generate fungitoxicity curves and determine the concentration of AgNPs needed to inhibit colony growth by 50% (EC50 values). Mycelial plugs of the VNHUCC.NEL38 isolates were inoculated on PDA plates containing various concentrations of AgNPs (0, 0.1, 1, 10, 20, and 30 µg mL^{-1}) and PC (broad spectrum fungicide - hexaconazole 500 µg mL^{-1})

The effectiveness of the silver nanomaterials in inhibiting the growth of *L. theobromae* VNHUCC.NEL38 was assessed. One day after inoculation (1dpi), all concentrations exhibited a certain level of inhibition compared wih the control. However, after 2 dpi, the rapid mycelial growth of *Lasiodiplodia* species resulted in no significant differences between the control and low concentration (0.1 - 1 µg mL^{-1}) PDA plates. At higher concentrations (10 µg mL^{-1} and 20 µg mL^{-1}), the inhibition rate was 13.76%-16.27%. The concentration of 30 mg/L resulted in a high level of inhibition (73.72%). This level of inhibition was maintained at 30 µg mL^{-1} after 72 h (72.39%), whereas the remaining concentrations were no longer different from that of the control. Additionally, an inhibitory effect of up to 54.51%.was observed at a concentration of 30 µg mL^{-1} even 7 days after inoculation. VNHUCC.NEL38 also exhibited high sensitivity to PC-hexaconazole (500 µg mL^{-1}), with a relatively high inhibition rate ranging from 46.31% to 57.33% on the first and second day after inoculation. However, the inhibitory efficacy of hexaconazole against *L. theobromae* decreased rapidly by the third day of exposure, reaching 15.37%.

In conclusion, the inhibitory efficacy of AgNPs is highly dependent on the concentration and duration of exposure. In our experiment, at low concentrations (0.1 – 1 µg mL^{-1}), AgNPs have very little inhibitory effect. At high concentrations (30 mL^{-1}), AgNPs exhibit strong inhibition of mycelial growth, but this effect may decrease over time. This suggests that the effectiveness of silver compounds also depends on the duration of their expose. Tarazona (2019) demonstrated complete inhibition of the mycelium growth of *F. graminearum, F. culmorum, F. sporotrichioides, F. langsethiae, F. poae, F. proliferatum* and *F. verticillioides* after the longest exposure (20–30 h) to citrate-stabilized AgNP at concentarions of 30 and 45 mg L^{-1} (Tarazona *et al*., 2019). The antifungal activity of AgNPs is attributed to their ability to modify fungal colony morphology and disrupt cell membranes. In a study, Linh và đồng tác giả (2021) identified pathogen-caused stem-end rot mango fruits in Vietnam as *L. theobromae* XB1. In addition, nano-Cu at 4000 ppm inhibited fungal *L. theobromae* XB1 growth by 52.4% after seven days. Silver nanoparticles had a limited effect, with the highest inhibition of 80% at 400 ppm, and no growth at 25 ppm. Previous studies have reported that silver nanoparticles damage the transport system, leading to an outflow of intracellular ions and disruption of cellular processes such as metabolism and respiration. Previous studies by Xia và đồng tác giả have indicated that *Trichosporon asahii* organelles, including mitochondria, chromatin, and ribosomes, sustained significant damage when exposed to AgNPs (Xia *et al*., 2016)

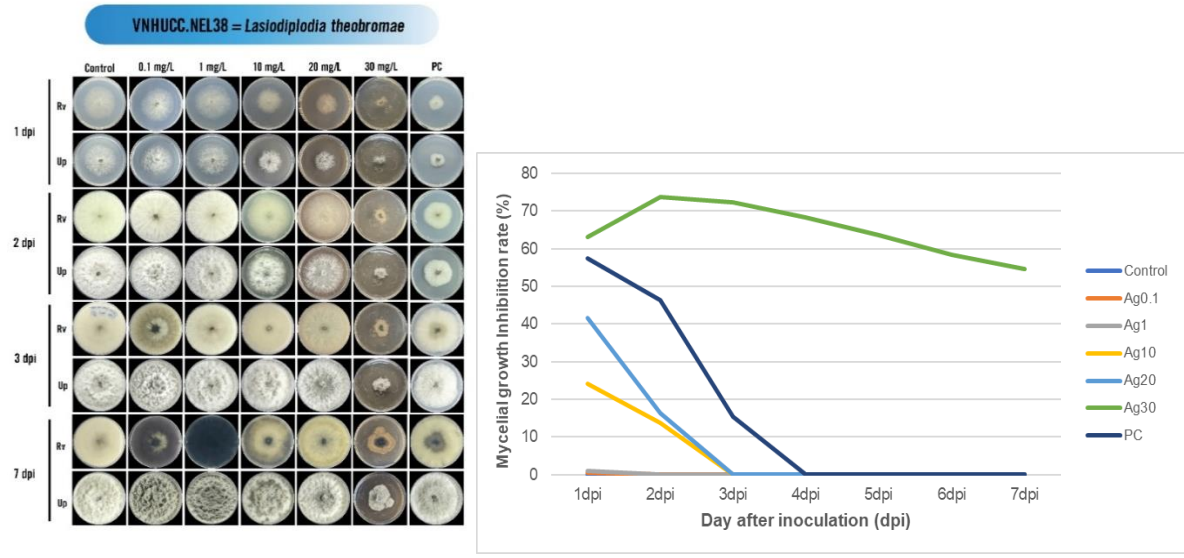


Figure 3. Mycelial growth inhibition (MGIR, %) of *L. theobromae* VNHUCC.NEL38 after application of AgNPs at different concentrations

CONCLUSION

In the current study, pathogens causing leaf blight, dieback petioles of *Nelumbo nucifera* in Thua Thien Hue, Vietnam were identified as *L. theobromae* based on morphological and molecular studies of multiple DNA sequences. This study has expanded the knowledge for disease management of *L. theobromae* in vitro by using silver nanoparticles.

Acknowledgments: *This work was supported by grant of Hue University (Grant number code: DHH2023-15-20).*

Nguyen Quang Hoang Vu was funded by Vingroup Joint Stock Company and supported by the Domestic Ph.D. Scholarship Programme of Vingroup Innovation Foundation (VINIF), Vingroup Big Data Institute (VINBIGDATA), code: [VINIF.TS.2020.TS.89; VINIF.2021.TS.145; VINIF.2022.TS.147].

REFERENCES

Alves A, Crous PW, Correia A, Phillips AJL. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in Lasiodiplodia theobromae. *Fungal Divers*. 28.

Berraf-Tebbal A, Mahamedi AE, Aigoun-Mouhous W, Špetík M, Čechová J, Pokluda R, Baránek M, Eichmeier A, Alves A. (2020). Lasiodiplodia mitidjana sp. nov. And other Botryosphaeriaceae species causing branch canker and dieback of Citrus sinensis in Algeria. *PLoS One*. 15(5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232448

Dou ZP, He W, Zhang Y. (2017). Does morphology matter in taxonomy of Lasiodiplodia? An answer from Lasiodiplodia hyalina sp. nov. *Mycosphere*. 8(2). https://doi.org/10.5943/mycosphere/8/2/5

El-Ganainy SM, Ismail AM, Iqbal Z, Elshewy ES, Alhudaib KA, Almaghasla MI, Magistà D. (2022). Diversity among Lasiodiplodia Species Causing Dieback, Root Rot and Leaf Spot on Fruit Trees in Egypt, and a Description of Lasiodiplodia newvalleyensis sp. nov. *Journal of Fungi*. 8(11). https://doi.org/10.3390/jof8111203

Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, Von Haeseler A, Jermiin LS. (2017). ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*. 14(6). https://doi.org/10.1038/nmeth.4285

Khuong NQ, Nhien DB, Thu LTM, Trong ND, Hiep PC, Thuan VM, Quang LT, Thuc LV, Xuan DT. (2023). Using *Trichoderma asperellum* to Antagonize Lasiodiplodia theobromae Causing Stem-End Rot Disease on Pomelo (Citrus maxima). *Journal of Fungi*. 9(10). https://doi.org/10.3390/jof9100981

Ko YZ, Liyanage WK, Shih HC, Tseng MN, Shiao MS, Chiang YC. (2023). Unveiling Cryptic Species Diversity and Genetic Variation of Lasiodiplodia (Botryosphaeriaceae, Botryosphaeriales) Infecting Fruit Crops in Taiwan. *Journal of Fungi*. 9(9). https://doi.org/10.3390/jof9090950

Letunic I, Bork P. (2021). Interactive tree of life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*. 49(W1). https://doi.org/10.1093/nar/gkab301

Phillips AJL, Alves A, Abdollahzadeh J, Slippers B, Wingfield MJ, Groenewald JZ, Crous PW. (2013). The Botryosphaeriaceae: Genera and species known from culture. *Studies in Mycology*. 76:51–167. https://doi.org/10.3114/sim0021

Tarazona A, Gómez J V., Mateo EM, Jiménez M, Mateo F. (2019). Antifungal effect of engineered silver nanoparticles on phytopathogenic and toxigenic Fusarium spp. and their impact on mycotoxin accumulation. *International Journal of Food Microbiology*. 306. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108259

Thao LD, Hien LT, Trang TTT, Trinh PT, Tuan DK. (2023). First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing fruit rot of jackfruit in Vietnam. *Indian Phytopatholy*. 76(4). https://doi.org/10.1007/s42360-023-00684-z

Trai VTN, Ha TTT, Hung NB. (2024). First Report of *Lasiodiplodia theobromae* Causing Gummosis on Citrus grandis (L.) Osbeck in Vietnam. *Research in Plant Disease*. 30(1):78–81. https://doi.org/10.5423/RPD.2024.30.1.78

Cuong HV, Ha TTT, Thao LQ, Thúy HTT, Vinh LV. (2023). Xác định nguyên nhân gây bệnh tàn lụi cây sen tại Thừa Thiên Huế năm 2022. *Vietnam Journal of Agricultural Sciences.* 21(5): 529-542

Xia ZK, Ma QH, Li SY, Zhang DQ, Cong L, Tian YL, Yang RY. (2016). The antifungal effect of silver nanoparticles on Trichosporon asahii. *Journal of Microbiology*, *Immunology and Infection*. 49(2). https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.04.013

PHÂN TÍCH PHÁT SINH LOÀI *LASIODIPLODIA THEOBROMAE* TRÊN CÂY SEN Ở THỪA THIÊN HUẾ VÀ ĐÁNH GIÁ MỨC ĐỘ NHẠY CẢM VỚI VẬT LIỆU NANO BẠC

Nguyễn Quang Hoàng Vũ[1*], Hoàng Tấn Quảng[1], Trần Thúy Lan[1], Trần Thị Ngọc Trâm[1], Hoàng Thị Kim Hồng[2*]

[1]*Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Thừa Thiên Huế, Việt Nam*

[2]*Khoa Công nghệ sinh học, Trường Y Dược, Đại học Duy Tân, Đà Nẵng, Việt Nam*

TÓM TẮT

Ở Việt Nam, sen là loài cây có ý nghĩa văn hóa tâm linh, tượng trưng cho sự thanh khiết, nghị lực trường tồn, đóng vai trò quan trọng vững chắc trong văn hóa tâm linh và tôn giáo. Nấm *Lasiodiplodia* đã được biết với hệ thống vật chủ đa dạng trên thế giới cùng với nhiều dạng sống từ: nội sinh, mầm bệnh gây hại và hoại sinh. Trong nghiên cứu này, các lá có triệu chứng điển hình của cây sen (*Nelumbo nucifera*) được thu thập từ các điểm trồng sen tại tỉnh Thừa Thiên Huế và phân lập. Kết quả *Lasiodiplodia theobromae* được xác định dựa trên các đặc điểm hình thái đối chiếu với phân tích dữ liệu trình tự đa locus kết hợp của 3 vùng gene ITS, beta tubulin (*tub2*) và nhân tố giãn dài dịch mã 1α (*tef-1α*). Bên cạnh đó, thử nghiệm *in vitro* với các hạt nano bạc cho thấy tiềm năng kháng nấm mạnh chống lại *L. theobromae*. Ở nồng độ 30 µg mL^{-1}, ghi nhận thấy mức độ ức chế lên đến 73,72% (3 ngày sau cấy) sự phát triển của sợi nấm đối với tác nhân gây bệnh phân lập được *L. theobromae* VNHUCC.NEL38 so với đối chứng. Do đó, nghiên cứu hiện tại chỉ ra rằng AgNP có thể có hoạt tính kháng nấm đáng kể, cần được nghiên cứu sâu hơn về quản lý bệnh sinh học, chương trình kiểm dịch. Những phát hiện này sẽ góp phần phát triển các chiến lược quản lý hiệu quả để kiểm soát các bệnh này và cải thiện quá trình canh tác, nâng cao năng suất cây sen trên địa bàn tỉnh Thừa Thiên Huế.

Từ khóa: *Lasiodiplodia theobromae*, *Nelumbo nucifera*, phân tích phát sinh loài, Việt Nam, nano bạc.

[*] Author for correspondence: Tel: +84-978939467; Email: hoangtkimhong@duytan.edu.vn