

- Mishra V. and Prasad D.N., 2005. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 103: 109-115.
- Nguyen T. L. D., Van H. K., Cnockaert M., De B. E., Maarten A., Le T. B., Vandamme P., 2013. A culture-dependent and -independent approach for the identification of lactic acid bacteria associated with the production of nem chua, a Vietnamese fermented meat product. *Journal of Food Research International*, 50: 232-240.
- Ramos C. L., Thorsen L., Schwan R F. and Jespersen L., 2013. Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiology* 36: 22-29.
- Zhang M., Fan X., Fang B., Ren V., Zhu C. and Zhu J., 2015. Effects of *Lactobacillus salivarius* Ren on cancer prevention and intestinal microbiota in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat model. *Journal of Microbiology*, 53: 398-405.

Investigation and identification of *Lactobacillus* sp. bacteria with probiotic characteristics isolated from some fermented food

Nguyen Thi Lam Doan

Abstract

In this study, biochemical and physiological characteristics of 40 lactobacilli strains isolated from fermented food were determined. The result showed that 7 strains belonged to *Carnobacterium*, 33 strains belonged to *Lactobacillus*. The *Lactobacillus* has presented in many probiotic products, this paper investigated probiotic properties of *Lactobacillus* sp. isolated from fermented food. The result indicated that *Lactobacillus* sp. D5.5 strain was selected with probiotic characteristics such as low pH tolerance (pH 2.0; 3.0), bile salt tolerance 0.3% after 4 h; antagonist to pathogens *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*; resistance to some antibiotic substances such as Ampicillin, Penicillin, Chloramphenicol and Gentamycin and the production of some extracellular enzymes with ring diameter of substrate resolution reached 11 - 16 mm. Moreover, *Lactobacillus* sp. D5.5 strain was analysed by *pheS* gene sequencing, compared to the known sequence database in National Center for Biotechnology Information (NCBI) and identified to be *Lactobacillus fermentum*. This strain can be used as starter culture for probiotic fermented food or for further study to make probiotic products for human.

Keywords: *Lactobacillus*, probiotic, fermented food, PCR, *pheS* gene

Ngày nhận bài: 12/9/2018
Ngày phản biện: 19/9/2018

Người phản biện: PGS. TS. Lê Thanh Bình
Ngày duyệt đăng: 15/10/2018

ẢNH HƯỞNG CỦA GIÁ THỂ VÀ PHÂN BÓN ĐẾN SINH TRƯỞNG CỦA LAN KIM TUYẾN HẬU CẤY MÔ TẠI THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Võ Thị Thanh Tuyền¹, Phạm Thị Minh Tâm², Hà Thị Loan¹

TÓM TẮT

Thí nghiệm đã được tiến hành nhằm đánh giá ảnh hưởng của giá thể và tổ hợp phân bón đến sinh trưởng của lan kim tuyến 0 - 3 tháng tuổi trong điều kiện nhà lưới tại Trung tâm Công nghệ Sinh học thành phố Hồ Chí Minh. Kết quả cho thấy trồng cây lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus*) từ 0 - 3 tháng tuổi trên hỗn hợp giá thể dớn trắng và dớn tổ quạ (tỷ lệ 1 : 1) kết hợp với phun tổ hợp phân bón NPK 30 - 10 - 10 (0,5 g/L) luân phiên với phân bón Bio trùn quế 01 (0,5 mL/L) và Rootplex (0,5 mL/L) đã thúc đẩy quá trình sinh trưởng của cây và cho tỷ lệ cây sống đạt 96,0%, chiều cao cây đạt 9,3 cm, có 7,6 lá/cây với 3,9 rễ/cây.

Từ khóa: Lan kim tuyến (*A. setaceus*), giá thể, phân bón, sinh trưởng

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Họ lan (Orchidaceae) là họ thực vật đa dạng của Việt Nam với tổng số 22.000 loài thuộc 880 chi.

Theo Võ Văn Chi và Dương Đức Tiến (1978), họ Lan là một họ lớn đứng hàng thứ hai trong ngành Ngọc lan về số lượng loài. Tại Việt Nam, lan kim

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học thành phố Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Nông Lâm thành phố Hồ Chí Minh

tuyến có khoảng 12 loài, chúng được phân bố rộng ở hầu hết các tỉnh từ Bắc tới Nam (Phạm Hoàng Hộ, 2000). Ngoài giá trị làm cảnh, loài lan kim tuyến *Anoectochilus setaceus* Blume còn là một loại thảo dược có tác dụng chữa trị các bệnh ung thư, chống tăng huyết áp và kháng khuẩn (Nguyễn Tiến Bàn, 2005).

Lan kim tuyến thường mọc rải rác, số lượng ở từng nơi không nhiều. Mặt khác, khả năng tái sinh của loài này trong tự nhiên rất thấp. Hiện nay, lan kim tuyến bị khai thác cạn kiệt có nguy cơ bị tuyệt chủng nếu không có biện pháp bảo tồn hữu hiệu. Lan Kim Tuyến được cấp báo thuộc nhóm IA của Nghị định 32/2006/CP, nghiêm cấm khai thác vì mục đích thương mại và thuộc nhóm thực vật rừng đang nguy cấp EN A1a,c,d, trong sách đỏ Việt Nam (Bộ Khoa học và Công nghệ, 2007).

Trong quy trình nhân giống *in vitro* lan kim tuyến, giai đoạn chuyển cây con từ phòng thí nghiệm ra điều kiện tự nhiên thường gặp rất nhiều khó khăn do tỷ lệ cây sống rất thấp, cây sinh trưởng kém và dễ bị sâu bệnh tấn công. Nguyên nhân là do bộ rễ cây còn non yếu, rất mẫn cảm với điều kiện ngoại cảnh và khâu xử lý giá thể trước khi trồng chưa phù hợp. Nghiên cứu này làm rõ ảnh hưởng của giá thể và phân bón đến sinh trưởng của lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) 3 tháng tuổi tại thành phố Hồ Chí Minh, có ý nghĩa quyết định đến sự thành công việc trồng cây ra ngoài tự nhiên, đáp ứng nhu cầu sử dụng lan kim tuyến ngày càng cao tại thành phố Hồ Chí Minh.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 11/2016 đến tháng 1/2017 tại khu nhà lưới của Trung tâm Công nghệ Sinh học thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu là giống lan kim tuyến (*Anoectochilus setaceus* Blume) nuôi cấy mô đã phát triển hoàn chỉnh, chiều cao cây khoảng 4,5 - 5,0 cm, có 5 - 6 lá, 2 - 3 rễ.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên, hai yếu tố, 3 lần lặp lại.

- Yếu tố giá thể (G) gồm 3 giá thể: Dớn trắng 100%; Dớn trắng và dớn tổ quạ (tỷ lệ 1 : 1); Dớn trắng và xơ dừa (tỷ lệ 1 : 1).

- Yếu tố tổ hợp phân bón (P) gồm 4 tổ hợp phân bón: (P1): NPK 30 - 10 - 10 (0,5 g/L) luân phiên Bio trùn quế 01 (0,5 mL/L) 3 ngày/lần; (P2): NPK 30 - 10 - 10 (0,5 g/L) luân phiên Bio trùn quế 01 (0,5 mL/L) và Rootplex (0,5 mL/L) phun 7 ngày/lần; (P3): HydroPhos Zn (0,5 mL/L) và RayKat Start (0,5 mL/L) phun 3 ngày/lần; (P4) Delfan (0,5 mL/L) và Comcat (0,5 g/3L) phun 3 ngày/lần.

Quy mô thí nghiệm: 20 cây/ô cơ sở, tổng số cây thí nghiệm: 720 cây.



Hình 1. Toàn cảnh bố trí thí nghiệm

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ cây sống, chiều cao cây, số lá/cây, số rễ, khối lượng cây tươi và tình hình sâu bệnh hại. Các chỉ tiêu được thu thập 10 cây trên mỗi ô cơ sở, 30 ngày/lần.

Xử lý số liệu: Số liệu thu thập được tính bằng phần mềm Microsoft Office Excel. Phân tích ANOVA trên phần mềm SAS 9.1.3.

III. KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của giá thể và tổ hợp phân bón đến tỷ lệ sống của lan kim tuyến 3 tháng tuổi

Giá thể trồng cây lan rất quan trọng, liên quan đến suốt quá trình sinh trưởng và phát triển của cây (Việt Chương và *ctv.*, 2002). Số liệu ở Bảng 1 cho thấy cây lan kim tuyến trồng trên dớn trắng và giá thể hỗn hợp dớn trắng và dớn tổ quạ (tỷ lệ 1;1) tỷ lệ cây sống cao nhất đạt từ 90,6 - 94,6%. So với nghiên cứu của Phí Thị Cẩm Miện (2012) và Mai Thị Ngọc Châm (2015), kết quả nghiên cứu này cho tỷ lệ cây sống đạt cao hơn. Ngược lại, tỷ lệ cây sống đạt thấp nhất (86,5%) khi cây được trồng trên hỗn hợp giá thể dớn trắng và xơ dừa (tỷ lệ 1:1). Phân bón và sự tương tác giữa giá thể và phân bón không ảnh hưởng đến tỷ lệ sống của cây.

Bảng 1. Ảnh hưởng của giá thể và tổ hợp phân bón đến tỷ lệ sống (%) của lan kim tuyến 3 tháng tuổi

Tổ hợp phân bón (P)	Tỷ lệ sống (%)			Tỷ lệ sống trung bình (P)
	Dón trắng (G)	Dón trắng và dón tổ quạ (G)	Dón trắng và xơ dừa (G)	
P1	92,5	94,7	87,7	91,6
P2	93,1	96,0	88,3	92,5
P3	91,9	94,2	86,5	90,9
P4	90,6	93,6	83,3	89,2
Trung bình (G)	92,0 a	94,6 a	86,5 b	
CV (%) = 5,54	F(G) = 8,21**	F(P) = 0,69 ^{ns}	F(GP) = 0,07 ^{ns}	

Ghi chú: 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 rất có ý nghĩa ($P \leq 0,01$); ns: không có ý nghĩa ($P > 0,05$).

3.2. Ảnh hưởng của giá thể và tổ hợp phân bón đến sinh trưởng của lan kim tuyến 3 tháng tuổi

Yang Dan và cộng tác viên (2012) cho rằng việc bổ sung thêm lớp giá thể mới sẽ giúp kích thích trẻ hóa cây. Với lan kim tuyến ở giai đoạn vườn ươm thì việc cung cấp các chất dinh dưỡng ảnh hưởng rõ đến sự sinh trưởng của cây con như chiều cao cây, số lá, số rễ.

Kết quả từ Bảng 2 cho thấy: Cây lan kim tuyến trồng trên hỗn hợp giá thể dón trắng và dón tổ quạ (tỷ lệ 1 : 1) đạt chiều cao cây cao nhất (7,4 cm) so với khi trồng cây lan kim tuyến trên giá thể dón trắng (6,2 cm) và hỗn hợp giá thể dón trắng và xơ dừa (tỷ lệ 1 : 1) là 5,9 cm. Tuy nhiên, chiều cao cây lan kim tuyến khi trồng trên 2 loại giá thể dón trắng và hỗn hợp dón trắng và xơ dừa (tỷ lệ 1 : 1) có sự khác biệt nhưng không có ý nghĩa. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Chu Thị Thúy Xinh (2014), cho rằng các loại giá thể đều làm tăng chiều cao cây và số lá lan kim tuyến.

Bảng 2. Ảnh hưởng của giá thể và tổ hợp phân bón đến chiều cao cây, số lá, số rễ, khối lượng tươi của lan kim tuyến 3 tháng tuổi

Chỉ tiêu	Tổ hợp phân bón (P)	Giá thể (G)			Trung bình (P)
		Dón trắng	Dón trắng và dón tổ quạ	Dón trắng và xơ dừa	
Chiều cao cây (cm)	P1	6,6 bc	7,4 b	6,5 bc	6,8 a
	P2	6,8 bc	9,3 a	6,6 bc	7,6 a
	P3	5,9 cd	6,3 bc	5,6 cd	5,9 b
	P4	5,7 cd	6,3 bc	4,8 d	5,6 b
	Trung bình (G)	6,2 b	7,4 a	5,9 b	
	CV (%) = 9,24	F(G) = 19,57**	F(P) = 19,21**	F(GP) = 2,54*	
Số lá (lá/cây)	P1	7,2	7,4	7,2	7,3 ab
	P2	7,3	7,6	7,2	7,4 a
	P3	6,7	7,1	6,7	6,8 ab
	P4	6,8	7,0	6,5	6,8 b
	Trung bình (G)	7,0	7,3	6,9	
	CV (%) = 6,01	F(G) = 3,12 ^{ns}	F(P) = 4,96**	F(GP) = 0,16 ^{ns}	
Số rễ (rễ/cây)	P1	3,3 c	3,6 b	3,2 c	3,5 a
	P2	3,2 c	3,9 a	3,2 c	3,3 a
	P3	3,0 c	3,1 c	3,0 c	3,0 b
	P4	3,0 c	3,1 c	2,9 c	3,0 b
	Trung bình (G)	3,1 b	3,4 a	3,1 b	
	CV (%) = 5,33	F(G) = 15,55**	F(P) = 13,92**	F(GP) = 2,52*	
Khối lượng tươi (mg/cây)	P1	17,7 bc	18,4 b	17,3 bc	17,8 ab
	P2	18,3 b	20,5 a	17,6 bc	18,8 a
	P3	17,1 bc	17,7 bc	16,1 c	16,9 b
	P4	16,4 c	17,0 bc	13,1 d	15,5 c
	Trung bình (G)	17,3 b	18,4 a	16,0 c	
	CV (%) = 5,12	F(G) = 21,12**	F(P) = 22,40**	F(GP) = 2,55*	

Ghi chú: 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 ($P \leq 0,05$); **: khác biệt rất có ý nghĩa ($P \leq 0,01$); ns: không có ý nghĩa ($P > 0,05$).

Phân bón ảnh hưởng đến chiều cao cây lan kim tuyến một cách rõ rệt. Sử dụng tổ hợp phân bón NPK 30 - 10 - 10 luân phiên với phân bón Bio trùn quế 01 và Rootplex phun trên lan kim tuyến tại thời điểm cây được 3 tháng tuổi cho chiều cao cây đạt cao nhất là 7,6 cm.

Nhìn chung, số lá/cây của lan kim tuyến tăng chậm. Tuy nhiên, phân bón đã ảnh hưởng rõ đến số lá của lan kim tuyến, cụ thể: khi phun tổ hợp phân bón NPK 30 - 10 - 10 luân phiên với phân bón Bio trùn quế 01 và Rootplex kích thích ra lá nhiều nhất và nhiều hơn so các tổ hợp phân bón khác.

Sự tăng trưởng chiều cao cây, số lá và số rễ có ảnh hưởng rõ rệt đến khối lượng tươi của lan kim tuyến. Trồng lan kim tuyến trên hỗn hợp giá thể dớn trắng và dớn tổ quạ (tỷ lệ 1 : 1) kết hợp phun tổ hợp phân bón NPK 30 - 10 - 10 luân phiên với phân bón Bio trùn quế 01 và Rootplex sẽ tạo nhiều rễ (3,9 rễ/cây) và cho khối lượng cây tươi (20,5 mg/cây) cao hơn so với khi trồng cây lan kim tuyến trên các nền giá thể và phun các tổ hợp phân bón khác.

3.3. Ảnh hưởng của giá thể và tổ hợp phân bón đến tỷ lệ sâu bệnh hại trên cây lan kim tuyến sau 3 tháng trồng

Qua 3 tháng nghiên cứu nhận thấy, khi trồng lan kim tuyến trên 3 giá thể khác nhau, sâu xám chỉ gây hại khi trồng lan kim tuyến trên hỗn hợp giá thể dớn trắng và xơ dừa, tỷ lệ bệnh gây hại 14,5%, 2 giá thể còn lại không bị sâu xám gây hại.

Bảng 3. Ảnh hưởng của giá thể và tổ hợp phân bón đến tỷ lệ sâu bệnh hại trên cây lan kim tuyến 3 tháng tuổi

Sâu, bệnh hại (%)	Tổ hợp phân bón (P)	Giá thể (G)			TB (P)
		Dớn trắng	Dớn trắng và dớn tổ quạ	Dớn trắng và xơ dừa	
Sâu xám (%)	P1	0	0	14,5	4,8
	P2	0	0	12,4	4,1
	P3	0	0	13,3	4,4
	P4	0	0	17,6	5,9
	TB (G)	0	0	14,5	
Bệnh thối nhũn (%)	P1	7,5	5,3	6,0	6,3
	P2	6,9	4,0	7,1	6,0
	P3	8,1	5,8	8,2	7,4
	P4	9,4	6,4	7,5	7,8
	TB (G)	8,0	5,4	7,2	

Tỷ lệ bệnh thối nhũn của cây lan kim tuyến ở 3 tháng sau trồng có sự khác biệt không đáng kể. Tỷ lệ bệnh dao động từ 5,4 đến 8,0%. Tuy nhiên, qua theo dõi cho thấy ở khi trồng lan kim tuyến trên giá thể dớn trắng, thường xuất hiện bệnh thối nhũn với tỷ lệ cao hơn so với các loại giá thể khác, do dớn trắng có khả năng giữ nước cao hơn các hỗn hợp giá thể khác (theo kết quả phân tích giá thể) tạo ẩm độ cao là môi trường thích hợp cho vi khuẩn phát triển gây bệnh.



Hình 2. Cây lan kim tuyến 3 tháng tuổi trồng trên giá thể và tổ hợp phân bón khác nhau

Ghi chú: G1P1: dớn trắng + phun phân NPK 30-10-10 luân phiên Bio trùn quế 01; G1P2: dớn trắng + phun phân NPK 30-10-10 luân phiên Bio trùn quế 01 + Rootplex; G1P3: dớn trắng + HydroPhos Zn và RayKat Start; G1P4: dớn trắng + Delfan và Comcat; G2P1: dớn trắng và dớn tổ quạ + phun phân NPK 30-10-10 luân phiên Bio trùn quế 01; G2P2: dớn trắng và dớn tổ quạ + phun phân NPK 30-10-10 luân phiên Bio trùn quế 01 + Rootplex; G2P3: dớn trắng và dớn tổ quạ + HydroPhos Zn và RayKat Start; G2P4: dớn trắng và dớn tổ quạ + Delfan và Comcat; G3P1: dớn trắng và xơ dừa + phun phân NPK 30-10-10 luân phiên Bio trùn quế 01; G3P2: dớn trắng và xơ dừa + phun phân NPK 30-10-10 luân phiên Bio trùn quế 01 + Rootplex; G3P3: dớn trắng và xơ dừa + HydroPhos Zn và RayKat Start; G3P4: dớn trắng và xơ dừa + Delfan và Comcat.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Trồng lan kim tuyến 3 tháng tuổi trên hỗn hợp giá thể dớn trắng và dớn tổ quạ (tỷ lệ 1:1) kết hợp với phun tổ hợp phân bón NPK 30 - 10 - 10 (0,5 g/L) luân phiên phân bón Bio trùn quế 01 (0,5 mL/L) và Rootplex (0,5 mL/L), cho tỷ lệ cây sống đạt cao nhất (96,0%), đồng thời cây sinh trưởng khỏe, tăng nhanh về chiều cao cây, số lá, số rễ và đạt khối lượng cây tươi cao nhất.

4.2. Đề nghị

Bước đầu có thể trồng cây lan kim tuyến từ 0 - 3 tháng tuổi trên giá thể hỗn hợp dớn trắng và dớn tổ quạ (tỷ lệ 1:1) kết hợp với phun tổ hợp phân bón NPK 30 - 10 - 10 (0,5 g/L) luân phiên phân bón Bio trùn quế 01 (0,5 mL/L) và Rootplex (0,5 mL/L) để cây sinh trưởng khỏe và có tỷ lệ sống cao. Cần tiếp tục lặp lại các thí nghiệm ảnh hưởng của giá thể và phân bón đến các giai đoạn sinh trưởng và thời vụ khác nhau trong năm để có được tính ổn định của kết quả thí nghiệm.

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 nguồn mẫu, kinh phí và cơ sở vật chất để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Nguyễn Tiến Bán, 2005. *Danh lục các loài thực vật Việt Nam*. Tập III, NXB Nông nghiệp. Hà Nội.
- Bộ Khoa học và Công Nghệ, 2007. *Sách đỏ Việt Nam (phần thực vật)*. NXB Khoa học Tự nhiên & Công nghệ. Hà Nội.
- Mai Thị Ngọc Châm, 2015. *Nghiên cứu quy trình ra*

ngôi sau in-vitro cho cây lan kim tuyến (Anoectochilus setaceus Blume) ở giai đoạn vườn ươm. Khóa luận tốt nghiệp đại học Nông Lâm Thái Nguyên, 61 trang.

Võ Văn Chi, Dương Đức Tiến, 1978. *Phân loại học thực vật - thực vật bậc cao*. Nhà xuất bản Đại học và Trung Học Chuyên Nghiệp, Hà Nội.

Việt Chương, Nguyễn Việt Thái, 2002. *Kỹ thuật trồng và kinh doanh phong lan*. Nhà xuất bản Thành phố Hồ Chí Minh, tr. 11-79.

Phạm Hoàng Hộ, 1999 - 2000. *Cây cỏ Việt Nam*. Quyển 1-3, NXB Trẻ. TP. Hồ Chí Minh.

Phí Thị Cẩm Miện, 2012. *Nghiên cứu nhân nhanh in vitro loài lan kim tuyến (Anoectochilus setaceus Blume) nhằm bảo tồn nguồn dược liệu quý*. Luận văn thạc sỹ khoa học. Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Chu Thị Thúy Xinh, 2014. *Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến sinh trưởng và phát triển của loài lan kim tuyến (Anoectochilus setaceus Blume) nuôi cấy mô ở giai đoạn vườn ươm*. Khóa luận tốt nghiệp Đại học Sư phạm Hà Nội, 34 trang.

Yang Dan, Xue-mei Yu, Shun-Xing Guo, and Zhi-xia Meng, 2012. Effects of forty-two strains of orchid mycorrhizal fungi on growth of plantlets of *Anoectochilus roxburghii*. *African Journal Microbiology Research*, 6 (7), 1411-1416.

Effects of substrates and fertilizer on the growth of *Anoectochilus setaceus* at the period of post-implant-tissue culture in Ho Chi Minh City

Vo Thi Thanh Tuyen, Pham Thi Minh Tam, Ha Thi Loan

Abstract

The study was conducted in the nethouse of Ho Chi Minh City Center for Biotechnology to evaluate the effects of substrates and fertilizer on the growth of 0 - 3 months old Jewel orchid planlets. The results showed that Jewel orchid planlets grown on substrate mixture of peat moss and cybertonium baronletz (1:1) and sprayed the fertilizer doses of NPK 30 - 10 - 10 (0.5 g.L⁻¹) alternate Bio 01 (0.5 mL.L⁻¹) and Rootplex (0.5 mL.L⁻¹) resulted in the highest survival rate (96.0%), plantlet height (9.3 cm), number of leaves (7.6 leaves.plantlet⁻¹) and the high number of roots (3.9 roots.plantlet⁻¹).

Keywords: *Anoectochilus setaceus*, substrates, fertilizer, growth

Ngày nhận bài: 16/7/2018
Ngày phản biện: 25/7/2018

Người phản biện: TS. Nguyễn Thị Lâm Hải
Ngày duyệt đăng: 18/9/2018

ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY ĐẾN HOẠT TÍNH ENZYM CHITINASE CỦA CHỦNG NẤM SỢI BX1.1 VÀ BX1.4 PHÂN LẬP TỪ BỘ XÍT BỊ BỆNH

Nguyễn Xuân Cảnh¹, Lê Thị Đường¹, Phạm Hồng Hiến², Trịnh Thị Vân²

TÓM TẮT

Nấm sợi đã được nghiên cứu, ứng dụng để sản xuất nhiều loại enzym khác nhau trong đó có chitinase. Nghiên cứu này tập trung vào đánh giá các điều kiện ảnh hưởng đến hoạt tính enzym chitinase của hai chủng nấm sợi phân lập từ các mẫu bộ xít bị nhiễm bệnh. Từ 14 chủng nấm phân lập được đã xác định được 04 chủng có khả năng sinh chitinase, hai chủng có hoạt tính mạnh nhất là BX1.1 và BX1.4 được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Kết quả đánh giá hình thái cho thấy hai chủng BX1.1 và BX1.4 mang nhiều đặc điểm giống với nấm thuộc chi *Aspergillus*. Thời gian nuôi cấy để hai chủng này cho hoạt tính mạnh nhất được xác định là hai ngày. Nồng độ cơ chất chitin bổ sung vào môi trường nuôi cấy để cảm ứng sinh enzym phù hợp nhất là 0,5% cho chủng BX1.4 và 1% cho chủng BX1.1. Khảo sát các điều kiện pH và nhiệt độ cho thấy cả hai chủng đều sinh hoạt tính mạnh nhất khi pH ban đầu là 7 và nhiệt độ nuôi cấy là 30°C.

Từ khóa: *Aspergillus* sp., chitinase, *Tessaratomya papillosa*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chitin là một polymer sinh học có công thức hóa học $(C_8H_{13}O_5N)_n$, phân bố rất rộng rãi và được tìm thấy ở nhiều đối tượng trong tự nhiên giống như cellulose. Chitin là thành phần cấu tạo chính của thành tế bào nấm cũng như một số tảo Chlorophyceae. Đây cũng là một thành phần cấu trúc quan trọng trong lớp vỏ của một số động vật không xương sống như côn trùng, nhuyễn thể, giáp xác và giun tròn... Ở động vật thủy sinh đặc biệt là trong vỏ tôm, cua ghe, mai mực, hàm lượng chitin có thể lên tới 14 - 35% trọng lượng khô. Chitin có ba dạng cấu trúc gồm α , β và γ . Chuỗi α -chitin xếp xuôi, ngược xen kẽ nhau nhưng có một cặp xếp cùng chiều. Ở chuỗi β -chitin các chuỗi sắp xếp theo một chiều nhất định, chuỗi γ -chitin có các cặp chuỗi xếp cùng chiều so le với một chuỗi ngược chiều trong cấu trúc (Li, 2006). Chitin không tan trong các dung môi như nước, dung dịch axit và kiềm loãng, cồn và các dung môi thông thường nhưng lại tan được trong một số axit vô cơ đặc (HCl, H₂SO₄, H₃PO₄,...) (Omumasaba *et al.*, 2001). Trong tự nhiên chitin được phân hủy bởi hệ enzym chitinase. Đây là một loại enzym thủy phân (hydrolase), có khả năng thủy phân chitin thành chitobiose hay chitotriose qua việc xúc tác phân giải liên kết 1,4-glucoside giữa C1 và C4 của hai phân tử N-acetyl glucosamine liên tiếp nhau trong chitin (Jolles and Muzzaralli, 1999). Chitinase được sử dụng trong rất nhiều các ứng dụng khác nhau như kiểm soát nấm gây bệnh cây trồng, xử lý chất thải, sản xuất một số các hợp chất có hoạt tính sinh học. Xạ khuẩn là đối tượng đầu tiên được nghiên

cứ để thu nhận chitinase ứng dụng trong việc phá vỡ vách tế bào nấm. Trong những năm gần đây việc sản xuất và thu nhận chitinase được tập trung nhiều trên các loài nấm sợi khác nhau như *Aspergillus* sp. và *Trichoderma* sp. (Harman, 2006; Sherief *et al.*, 1992; Shubakow and Kucheryavykh, 2004; Ulhoa and Peberdy, 1991).

Bộ xít hại nhân vãi (*Tessaratomya papillosa*), là loài côn trùng có lớp vỏ ngoài với thành phần cấu tạo chính là chitin vững chắc. Tuy nhiên, rất nhiều trong số chúng có khả năng nhiễm bệnh do nấm sợi, sợi nấm sẽ phá hủy lớp chitin và ăn sâu vào trong cơ thể bộ xít. Để thực hiện điều này khả năng cao là nấm sợi sẽ sinh ra enzym chitinase có hoạt tính cao. Chính vì vậy nghiên cứu này đặt ra nhằm tìm kiếm được các chủng nấm sợi có khả năng sinh enzym chitinase từ nguồn mẫu là bộ xít bị nhiễm nấm, đồng thời xác định các điều kiện tối ưu để các chủng này hoạt động hiệu quả.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng các chủng nấm sợi có khả năng sinh enzym chitinase được phân lập từ bộ xít bị nhiễm bệnh do nấm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp phân lập nấm sợi

Lấy 10 g mẫu bộ xít nghiền nát cho vào bình chứa 90 ml nước cất vô trùng, lắc 5 phút với tốc độ 200 vòng/phút. Sau đó lấy 1 ml dịch huyền phù trộn đều với 9 ml nước cất vô trùng, thu được dung dịch có nồng độ pha loãng là 10⁻¹, tiếp tục pha loãng với các

¹ Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Ban Khoa học và Hợp tác Quốc tế, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam