

**NGHIÊN CỨU CẢI THIỆN SỰ TỒN TẠI CỦA XẠ KHUẨN TRONG CHẾ PHẨM TỒN TRỮ DẠNG ĐÔNG KHÔ**

Đoàn Thị Kiều Tiên, Huỳnh Văn An và Nguyễn Thị Thu Nga  
 Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

**Thông tin chung:**

Ngày nhận: 06/06/2015  
 Ngày chấp nhận: 25/05/2016

**Title:**

Study on improvement of survival of Actinomycetes in freeze-frying formulation

**Từ khóa:**

Chất phụ gia, chế phẩm đông khô, xạ khuẩn

**Keywords:**

Actinomycetes, freeze-frying formulation, additives

**ABSTRACT**

*Actinomycetes 54 RM is promising actinobacterium for controlling many fungal plant diseases. Study on additives to protect and recovery Actinomycetes 54 RM cells in formulation during and after freeze - drying condition is necessary if this bacterium will be used for applying in large scale for controlling plant diseases. In the first study on protecting effect of additives, results showed that gelatin 5% and 10% and sucrose 5% gave good effect and therefore sucrose 5% was selected for further experiments. In the second study surveyed on six different additives glucose (5% and 10%), mannitol (5% and 10%) and skim milk (10% and 20%) for recovery effect of Actinomycetes 54 RM cells from the freeze-drying state to vegetative growth state, compared to the control without additive; results showed that four additives skim milk (10% and 20%), glucose 10% and mannitol 10% gave good effect in the recovery of Actinomycetes cells from freeze-drying state to vegetative growth state. Survey the survival of actinomycetes 54 RM cells in the formulation after freeze-drying during five months storage, with four treatments adding each additive such as skim milk 10% and 20%, glucose 10% or mannitol 10% after freeze-frying, and control without additives; results showed that skim milk 10% and 20% were good additives to help Actinomycetes 54 RM cells recovery after freeze-drying with higher density compared to the other treatments in all storage periods. Freeze-drying formulation of Actinomycetes 54 RM did not reduce significantly of living cells after 5 months storage in room temperature.*

**TÓM TẮT**

*Xạ khuẩn 54 là dòng xạ khuẩn triển vọng trong phòng trừ nhiều bệnh do nấm gây hại trên cây trồng. Nghiên cứu các chất phụ gia giúp bảo vệ và cải thiện tế bào xạ khuẩn trong điều kiện đông khô là rất cần thiết cho việc ứng dụng xạ khuẩn trên diện tích rộng. Nghiên cứu đầu tiên về chất phụ gia bảo vệ tế bào xạ khuẩn 54 RM tồn tại trong điều kiện đông khô, kết quả đã ghi nhận gelatin 5% và 10%, sucrose 5% thể hiện hiệu quả bảo vệ tế bào xạ khuẩn 54 RM trong quá trình đông khô và sucrose 5% được chọn làm chất phụ gia bảo vệ tế bào xạ khuẩn trong quá trình đông khô cho các thí nghiệm tiếp theo. Nghiên cứu tiếp theo về chất phụ gia giúp tế bào xạ khuẩn 54 RM hồi phục từ tình trạng đông khô về tình trạng tăng trưởng, thí nghiệm khảo sát sáu chất phụ gia glucose (5% và 10%), mannitol (5% và 10%) và sữa ít béo (10% và 20%) và đối chứng không chất phụ gia. Kết quả các chất như sữa ít béo 10% và 20%, glucose 10% và mannitol 10% đều có hiệu quả phục hồi tế bào xạ khuẩn tốt hơn so với đối chứng. Thí nghiệm khảo sát thời gian tồn trữ của chế phẩm xạ khuẩn 54 RM dưới dạng bột đông khô. Thí nghiệm gồm nghiệm thức đối chứng và bốn nghiệm thức thêm chất bảo quản (sữa ít béo 10% và 20%, glucose 10% và mannitol 10%) với bốn lần lặp lại. Kết quả sữa ít béo 10% và 20% là chất phụ gia tốt, có khả năng phục hồi tế bào tốt so với các nghiệm thức còn lại. Chế phẩm xạ khuẩn 54 RM sau đông khô không giảm ý nghĩa về mật số sau 5 tháng tồn trữ ở nhiệt độ phòng.*

Trích dẫn: Đoàn Thị Kiều Tiên, Huỳnh Văn An và Nguyễn Thị Thu Nga, 2016. Nghiên cứu cải thiện sự tồn tại của xạ khuẩn trong chế phẩm tồn trữ dạng đông khô. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 43b: 1-7.

## 1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, có rất nhiều nhà khoa học đã và đang nghiên cứu về việc sản xuất thuốc vi sinh từ những vi sinh vật có lợi, những vi sinh vật này ức chế các vi sinh vật có hại để áp dụng trong phòng trị bệnh cây trồng. Trong đó, xạ khuẩn là nhóm vi sinh vật triển vọng trong phòng trị sinh học bệnh cây trồng (Yan Min *et al.*, 2000). Riêng ở Việt Nam, cũng có một số ghi nhận bước đầu về khả năng phòng trị của xạ khuẩn với một số vi sinh vật gây bệnh cây trồng như *Pseudomonas solanacearum* 222 (Đào Thị Lương và *ctv.*, 2002); *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* (Lê Thị Bích, 2011); *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Nguyễn Thị Thùy Linh, 2011), *Colletotrichum* sp. (Tô Huỳnh Như, 2012), *Fusarium oxysporum* (Đoàn Thị Kiều Tiên, 2012), *Rhizoctonia solani* (Nguyễn Thị Thu Nga và Nguyễn Thị Mai Thảo, 2013). Riêng xạ khuẩn 54 RM được phân lập từ đất ruộng trồng ớt tại Lương Phi - Tri Tôn - An Giang có khả năng hạn chế bệnh trên một số loại cây trồng: bệnh thán thư trên ớt (Tô Huỳnh Như, 2012), bệnh héo rũ cây mè (Đoàn Thị Kiều Tiên, 2012) và bệnh chết cây con trên cải bắp (Nguyễn Thị Thu Nga và Nguyễn Thị Mai Thảo, 2013) trong điều kiện phòng thí nghiệm và nhà lưới. Trên cơ sở đó, “Nghiên cứu cải thiện sự tồn tại của xạ khuẩn trong chế phẩm tồn trữ dạng đông khô” được thực hiện nhằm tìm ra chất bảo vệ tế bào xạ khuẩn 54 RM tốt nhất trong điều kiện đông khô cũng như tìm ra chất phụ gia giúp tế bào xạ khuẩn 54 RM hồi phục từ tình trạng đông khô về tình trạng tăng trưởng và khảo sát mật số xạ khuẩn 54 RM trong bột đông khô sau thời gian tồn trữ. Từ đó, góp phần đưa biện pháp sinh học ứng dụng vào thực tế trong công tác quản lý mầm bệnh.

## 2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

Thí nghiệm được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Bệnh cây và nhà lưới bộ môn Bảo vệ thực vật, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ từ tháng 5/2014 đến tháng 12/2014.

### 2.1 Nghiên cứu chất bảo vệ tế bào xạ khuẩn 54 RM tồn tại trong điều kiện đông khô

**Phương pháp:** Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên, 4 lần lặp lại, gồm 9 nghiệm thức và 4 chất phụ gia (glucose; sucrose; lactose; gelatin), mỗi chất được khảo sát ở hai nồng độ (5% và 10%) và một nghiệm thức đối chứng không thêm chất phụ gia (Costa *et al.*, 2000; Coman and Radvan, 2009).

**Cách tiến hành:** Nhân nuôi xạ khuẩn 54 RM với môi trường MS (Mannitol soya flour) trong 7

ngày. Sau đó thêm 10 ml nước muối sinh lí 0,9% vô trùng cho vào đĩa để thu hoạch huyền phù bào tử xạ khuẩn. Xác định mật số tế bào xạ khuẩn trong huyền phù bằng phương pháp pha loãng và chà trên đĩa môi trường MS, đếm số khuẩn lạc hình thành sau 3 ngày, từ đó xác định được mật số xạ khuẩn (cfu/ml).

**Chuẩn bị dung dịch chất phụ gia:** Các chất phụ gia được chuẩn bị với nồng độ gấp đôi, được thanh trùng bằng màng lọc vi khuẩn (đường kính 0,45  $\mu m$ ), các dụng cụ được thanh trùng trước khi sử dụng.

Bổ sung các chất phụ gia vào huyền phù xạ khuẩn trước khi đông khô: Rút 3 ml huyền phù xạ khuẩn + 3 ml dung dịch từng chất phụ gia có nồng độ gấp đôi cho vào ống falcon (50 ml) để thu được huyền phù xạ khuẩn hòa trong dung môi chất phụ gia có nồng độ tương ứng gồm glucose (5%, 10%); sucrose (5%, 10%); lactose (5%, 10%), gelatin (5%, 10%) trước khi đông khô. Nghiệm thức đối chứng bổ sung 3 ml huyền phù xạ khuẩn + 3 ml nước cất thanh trùng. Sau đó các nghiệm thức được đông khô bằng máy đông khô (Labconco) trong ba ngày ở áp suất 0,040 mbar với nhiệt độ - 50<sup>o</sup>C.

**Ghi nhận chỉ tiêu:** Xác định mật số của xạ khuẩn 54 RM còn sống ở mỗi nghiệm thức sau khi đông khô bằng phương pháp pha loãng và chà đĩa chứa 10 ml môi trường MS, sau 3 ngày mật số khuẩn lạc hình thành trên đĩa Petri tương ứng từng nghiệm thức. Đếm số khuẩn lạc hình thành x hệ số pha loãng để suy ra mật số tế bào xạ khuẩn trong mỗi nghiệm thức (cfu/ml).

**Xử lý số liệu:** Mật số bào tử được chuyển sang logarit trước khi thống kê. Các số liệu ghi nhận được xử lý trên phần mềm Microsoft Office Excel và phân tích bằng phần mềm thống kê MSTATC qua phép thử Duncan.

### 2.2 Nghiên cứu chất phụ gia giúp tế bào xạ khuẩn 54 RM hồi phục từ tình trạng đông khô về tình trạng tăng trưởng

**Phương pháp:** Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 lần lặp lại gồm 7 nghiệm thức, trong đó có 6 nghiệm thức bổ sung 3 chất phụ gia ở hai nồng độ khác nhau như: sữa ít béo (10%, 20%), mannitol (5%, 10%) và glucose (5%, 10%) và một nghiệm thức đối chứng không thêm chất phụ gia nhưng được bổ sung nước cất (Costa *et al.*, 2000; Nguyễn Thị Kim Xuyên, 2011).

**Cách tiến hành:** Nhân nuôi xạ khuẩn 54 RM trên môi trường MS trên đĩa Petri. Sau 7 ngày thu

hoạch huyền phù bảo tử, xác định mật số bằng phương pháp pha loãng và chà đĩa. Sau đó, cho chất bảo vệ (được tìm ra từ thí nghiệm 1) vào huyền phù xạ khuẩn. Huyền phù xạ khuẩn 54 RM (6 ml) được đem đi đông khô bằng máy đông khô trong 3 ngày ở áp suất 0,040 mbar với nhiệt độ -50°C.

Chuẩn bị dung dịch các chất phụ gia: Các chất phụ gia được chuẩn bị pha ở 2 nồng độ 5% và 10% ở các nghiệm thức glucose, mannitol. Riêng nghiệm thức sữa ít béo được chuẩn bị ở hai nồng độ 10% và 20%. Nước cất được thanh trùng trước khi sử dụng để pha thành dung dịch chất phụ gia, các loại đường sẽ được lọc qua màng lọc vi khuẩn với đường kính 0,45  $\mu$  m.

Bột xạ khuẩn 54 RM sau khi đông khô được bổ sung thêm các chất phụ gia là sữa, sucrose, glucose, mannitol đúng thể tích ban đầu là 6 ml. Để yên huyền phù xạ khuẩn 54 RM trong 9 phút, sau đó pha loãng đếm mật số bằng phương pháp trải trên đĩa môi trường.

**Ghi nhận chỉ tiêu:** Mật số của xạ khuẩn 54 RM (cfu/ml) ở mỗi nghiệm thức bằng phương pháp pha loãng huyền phù và chà trên đĩa chứa 10 ml môi trường MS, sau 3 ngày xác định mật số xạ khuẩn hình thành trên đĩa Petri của từng nghiệm thức. Đếm số khuẩn lạc hình thành x hệ số pha loãng để suy ra mật số tế bào xạ khuẩn trong mỗi nghiệm thức (cfu/ml).

**Xử lý số liệu:** Số liệu mật số xạ khuẩn 54 RM được chuyển sang log<sub>10</sub> và phân tích thống kê bằng phần mềm MSTATC qua phép thử Duncan.

### 2.3 Khảo sát thời gian tồn trữ của chế phẩm xạ khuẩn 54 RM dưới dạng bột đông khô

**Phương pháp:** Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên gồm nghiệm thức đối chứng (bột xạ khuẩn 54 RM sau khi đông khô không bổ sung chất phụ gia) và các nghiệm thức bổ sung thêm chất phụ gia hồi phục tế bào tốt nhất tìm thấy ở thí nghiệm 2. Mỗi nghiệm thức gồm bốn lặp lại.

**Cách tiến hành:** Nhân nuôi xạ khuẩn 54 RM trên môi trường MS trên đĩa Petri. Sau 7 ngày thu hoạch huyền phù bảo tử, xác định mật số bằng phương pháp pha loãng và chà đĩa. Sau đó, cho chất bảo vệ (được tìm ra từ thí nghiệm 1) vào huyền phù xạ khuẩn. Huyền phù xạ khuẩn 54 RM (6 ml) được đem đi đông khô bằng máy đông khô trong 3 ngày ở áp suất 0,040 mbar với nhiệt độ -50°C. Sau đông khô, các ống tube được đậy nắp kín cho vào túi nylon hàn kín lại và bảo quản ở điều kiện phòng.

Xác định mật số của xạ khuẩn 54 RM sống ở các thời điểm tồn trữ sau 0, 30, 60, 90, 120 và 150 ngày sau đông khô bằng phương pháp pha loãng huyền phù vi sinh vật và đếm mật số trên môi trường MS bằng cách cho 6 ml dung dịch từng loại chất phụ gia (được tìm ra từ thí nghiệm 2) vào ống tube chứa bột xạ khuẩn đông khô, nghiệm thức đối chứng thêm nước cất tương ứng. Để yên huyền phù xạ khuẩn 54 RM trong 9 phút sau đó xác định mật số tế bào xạ khuẩn sống bằng phương pháp pha loãng và chà đĩa trên môi trường MS.

**Ghi nhận chỉ tiêu:** Mật số của xạ khuẩn 54 RM (cfu/ml) ở mỗi nghiệm thức bằng phương pháp pha loãng huyền phù và chà trên đĩa chứa 10 ml môi trường MS, sau 3 ngày xác định mật số xạ khuẩn hình thành trên đĩa Petri của từng nghiệm thức. Đếm số khuẩn lạc hình thành x hệ số pha loãng để suy ra mật số tế bào xạ khuẩn trong mỗi nghiệm thức (cfu/ml).

**Xử lý số liệu:** Số liệu mật số xạ khuẩn 54 RM được chuyển sang log<sub>10</sub> và phân tích thống kê bằng phần mềm MSTATC qua phép thử Duncan.

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Kết quả các chất phụ gia trong bảo vệ tế bào xạ khuẩn 54 RM tồn tại trong điều kiện đông khô

Log mật số xạ khuẩn 54 RM (cfu/ml) ban đầu trước khi đông khô là 12,07. Kết quả khảo sát mật số xạ khuẩn ở các nghiệm thức có bổ sung chất bảo vệ sau đông khô. Kết quả ở Bảng 1 cho thấy, 3 nghiệm thức gelatin 5%, gelatin 10%, sucrose 5% thể hiện được vai trò bảo vệ tế bào xạ khuẩn dưới điều kiện đông khô, với log (mật số xạ khuẩn cfu/ml) lần lượt là 12,06; 12,02 và 12,04, cao hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với đối chứng với log mật số xạ khuẩn (cfu/ml) là 11,38. Các nghiệm thức còn lại glucose 5%, glucose 10%, sucrose 10% tuy cũng có mật số tế bào sống cao hơn, tuy nhiên không khác biệt ý nghĩa thống kê so với đối chứng. Lactose 5% và 10% hoàn toàn không giúp tế bào tồn tại tốt hơn trong điều kiện đông khô so với đối chứng. Kết quả này phù hợp với Costa *et al.*, (2000) cho thấy khi nghiên cứu khả năng tồn trữ của vi khuẩn *Pantoea agglomerans*, kết quả ghi nhận đường sucrose là chất phụ gia tốt nhất. Đến năm 2011, Nguyễn Thị Kim Xuyên cũng ghi nhận đường sucrose 10% cho hiệu quả giúp bảo vệ tế bào vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* 23<sub>1-1</sub> tốt trong quá trình đông khô.

Tóm lại, gelatin (5% và 10%) và sucrose 5% giúp bảo vệ tế bào xạ khuẩn 54 RM tồn tại tốt hơn

trong điều kiện đông khô. Tuy nhiên, về hiệu quả kinh tế thì đường sucrose rẻ tiền, dễ hòa tan khi áp dụng và rộng rãi ngoài thị trường. Chính vì thế, đường sucrose nồng độ 5% được chọn làm chất phụ gia bảo vệ tế bào xạ khuẩn để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

**Bảng 1: Mật số xạ khuẩn sau khi đông khô ở các nghiệm thức cộng thêm chất bảo vệ khác nhau**

STT	Nghiệm Thức	Mật số xạ khuẩn log (cfu/ml)
1	Gelatin 5%	12,06 a
2	Gelatin 10%	12,02 a
3	Glucose 5%	11,96 ab
4	Glucose 10%	11,83 abc
5	Lactose 5%	11,31 c
6	Lactose 10%	11,39 bc
7	Sucrose 5%	12,04 a
8	Sucrose 10%	11,82 abc
9	Đối chứng	11,38 bc
Mức ý nghĩa		*
CV (%)		3,29

*Ghi chú: Các số trung bình trong cùng một cột được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt qua phép kiểm định Duncan. Số liệu được chuyển sang log<sub>x</sub> trước khi phân tích thống kê  
\*: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%*

**3.2 Hiệu quả của chất phụ gia giúp tế bào xạ khuẩn 54 RM hồi phục từ tình trạng tiềm sinh sau đông khô về tình trạng tăng trưởng**

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy, bốn nghiệm thức sữa ít béo (10% và 20%), glucose 10% và mannitol 10% có log (mật số cfu/ml) trong khoảng 12,53-12,77 cao hơn và khác biệt ý nghĩa so với đối chứng với log (mật số cfu/ml) là 11,65, hai nghiệm thức là glucose 5% và mannitol 5% không khác biệt ý nghĩa so với đối chứng.

Sữa ít béo được thêm vào sau quá trình đông khô cho kết quả tế bào xạ khuẩn phục hồi tốt, làm cho tế bào gia tăng khả năng sống. Theo Costa et al. (2000), sữa gạn béo cung cấp vật liệu cho quá trình đông khô, với cấu trúc xốp giúp cho giai đoạn hấp thu nước của tế bào được diễn ra dễ dàng, thuận lợi hơn. Môi trường sữa gạn béo cũng giúp tế bào kiểm soát được tỉ lệ quá trình hút nước của tế bào và tránh được tình trạng bị sốc.

Như vậy, qua thí nghiệm cho thấy các nghiệm thức sữa ít béo (10% và 20%), glucose 10%, mannitol 10% cho kết quả phục hồi tế bào tốt và khác biệt ý nghĩa thống kê so với đối chứng. Chính

vì thế, các thí nghiệm tiếp theo sẽ được thực hiện dựa trên kết quả thí nghiệm 2 này.

**Bảng 2: Mật số xạ khuẩn sau khi được thêm vào các chất phụ gia giúp tế bào phục hồi sau quá trình đông khô**

STT	Nghiệm thức	Mật số xạ khuẩn log (cfu/ml)
1	Glucose 5%	12,33 abc
2	Glucose 10%	12,58 ab
3	Mannitol 5%	11,87 bc
4	Mannitol 10%	12,53 ab
5	Sữa ít béo 10%	12,77 a
6	Sữa ít béo 20%	12,66 a
7	Đối chứng	11,65 c
Mức ý nghĩa		*
CV(%)		3,86

*Ghi chú: Các số trung bình trong cùng một cột được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt qua phép kiểm định Duncan. Số liệu được chuyển sang log<sub>x</sub> trước khi phân tích thống kê*

*\*: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%*

**3.3 Kết quả khảo sát thời gian tồn trữ của chế phẩm xạ khuẩn 54 RM dưới dạng bột đông khô**

*Về vai trò chất phụ gia*

Nhìn chung, kết quả ở Bảng 3 thấy nghiệm thức sữa ít béo (10% và 20%) thể hiện được hiệu quả giúp tế bào phục hồi tốt, với mật số tế bào xạ khuẩn qua các thời gian khảo sát đều cao hơn và khác biệt ý nghĩa so nghiệm thức đối chứng. Chất phụ gia glucose 10% và mannitol 10% cho hiệu quả cao hơn tuy nhiên không khác biệt ý nghĩa so với đối chứng.

Tại thời điểm 0 ngày sau đông khô (NSĐK) nghiệm thức sữa ít béo (10% và 20%) được ghi nhận khả năng phục hồi tế bào tốt có khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng. Nghiệm thức sữa ít béo 10% cho mật số cao nhất với log mật số (cfu/ml) là 10,97, tiếp theo là sữa ít béo 20% với log (mật số cfu/ml) là 10,66 trong khi đối chứng chỉ đạt log (mật số cfu/ml) 8,42.

Tương tự các thời điểm 30 NSĐK, nghiệm thức sữa ít béo 10% cho log (mật số cfu/ml) là 10,60 đạt cao nhất và thấp nhất là nghiệm thức glucose 10% với log mật số cfu/ml là 9,38. Nghiệm thức sữa ít béo 10% hoàn toàn khác biệt ý nghĩa thống kê so với đối chứng.

Thời điểm 60 NSĐK, chỉ hai nghiệm thức sữa ít béo 10% và 20% về thể hiện khả năng giúp tế bào hồi phục tốt với log (mật số cfu/ml) đạt cao hơn và khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng.

Sau 90 NSĐK, các nghiệm thức có giảm mật số nhưng vẫn còn có hiệu quả phục hồi tế bào xạ khuẩn. Tại thời điểm này nghiệm thức đối chứng với log (mật số cfu/ml) là 7,90 thấp hơn và khác biệt ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức sữa ít béo ở hai nồng độ 10% và 20% với log (mật số cfu/ml) lần lượt là 10,02 và 9,93. Tương tự thời điểm trước, nghiệm thức glucose 10% và mannitol 10% vẫn không khác biệt ý nghĩa thống kê với nhau và không khác biệt so với đối chứng.

Tại thời điểm 120 NSĐK, các nghiệm thức có chứa chất bảo quản vẫn không khác biệt ý nghĩa thống kê với nhau, tương tự chỉ có nghiệm thức sữa ít béo 10% và 20% giữ mật số tế bào sống cao hơn và khác biệt ý nghĩa so với nghiệm thức đối chứng.

Ở thời điểm 150 NSĐK (5 tháng), hai nghiệm thức sữa ít béo 10% và 20% vẫn cho thấy sự hiệu quả ở việc phục hồi tế bào xạ khuẩn, với log (mật số cfu/ml) lần lượt là 9,76 và 9,71 cao hơn rất nhiều (khoảng 100 lần) và khác biệt ý nghĩa so với đối chứng chỉ đạt log (mật số cfu/ml) là 7,69. Trong khi đó, hai nghiệm thức glucose 10% và mannitol 10% cho hiệu quả không khác biệt ý nghĩa thống kê so với đối chứng.

Như vậy, sữa ít béo 10 % và 20% giúp phục hồi tế bào xạ khuẩn ở trạng thái sau đông khô tốt nhất.

Thí nghiệm của Costa *et al.*, (2000) cho thấy sử dụng sữa gạn béo 10% làm chất phụ gia giúp tế bào vi khuẩn hấp thụ nước sau khi đông khô đối với vi khuẩn *Pantoea agglomerans* và khả năng sống được của tế bào vi khuẩn này sau khi đông khô với sữa gạn béo đạt 100%.

**Bảng 3: Khả năng phục hồi của các tế bào xạ khuẩn qua các thời điểm khảo sát từ 0 đến 150 ngày sau đông khô**

STT	Nghiệm Thức	Mật số xạ khuẩn chế phẩm xạ khuẩn log (cfu/ml) 54 RM sau đông khô sau thời gian tồn trữ (NSĐK)					
		0 NSĐK	30 NSĐK	60 NSĐK	90 NSĐK	120 NSĐK	150 NSĐK
1	Glucose 10%	9,71 ab	9,38 ab	8,76 ab	8,72 ab	8,65 ab	8,56 ab
2	Mannitol 10%	9,76 ab	9,52 ab	8,94 ab	8,77 ab	8,65 ab	8,53 ab
3	Sữa ít béo 10%	10,97 a	10,60 a	10,23 a	10,02 a	9,87 a	9,76 a
4	Sữa ít béo 20%	10,66 a	10,34 ab	10,22 a	9,93 a	9,81 a	9,71 a
5	Đối chứng	8,42 b	8,31 b	8,04 b	7,90 b	7,84 b	7,69 b
Mức ý nghĩa		*	*	*	*	*	*
CV (%)		12,15	11,55	9,80	10,26	10,02	9,80

Ghi chú: Các số trung bình trong cùng một cột được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt qua phép kiểm định Duncan. Số liệu được chuyển sang logx trước khi phân tích thống kê

\*: khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. NSĐK: ngày sau đông khô

*Về thời gian tồn trữ của chế phẩm đông khô*

Qua Bảng 4 khi so sánh về thời gian tồn trữ của các sản phẩm xạ khuẩn đông khô của tất cả các nghiệm thức cho thấy trong cùng một nghiệm thức không có khác biệt ý nghĩa thống kê về mật số qua các thời gian tồn trữ được khảo sát. Như vậy, phương pháp đông khô thể hiện hiệu quả trong tồn trữ tế bào xạ khuẩn ổn định qua 5 tháng ở nhiệt độ phòng. Kết quả này cho thấy đây là phương pháp tồn trữ triển vọng trong định hướng phát triển sản phẩm sinh học thương mại.

Qua thí nghiệm thời gian tồn trữ xạ khuẩn cho thấy các tế bào xạ khuẩn được bảo vệ khi đông khô sau đó vẫn có khả năng hoạt động tốt khi được phục hồi. Các nghiệm thức bao gồm glucose 10%,

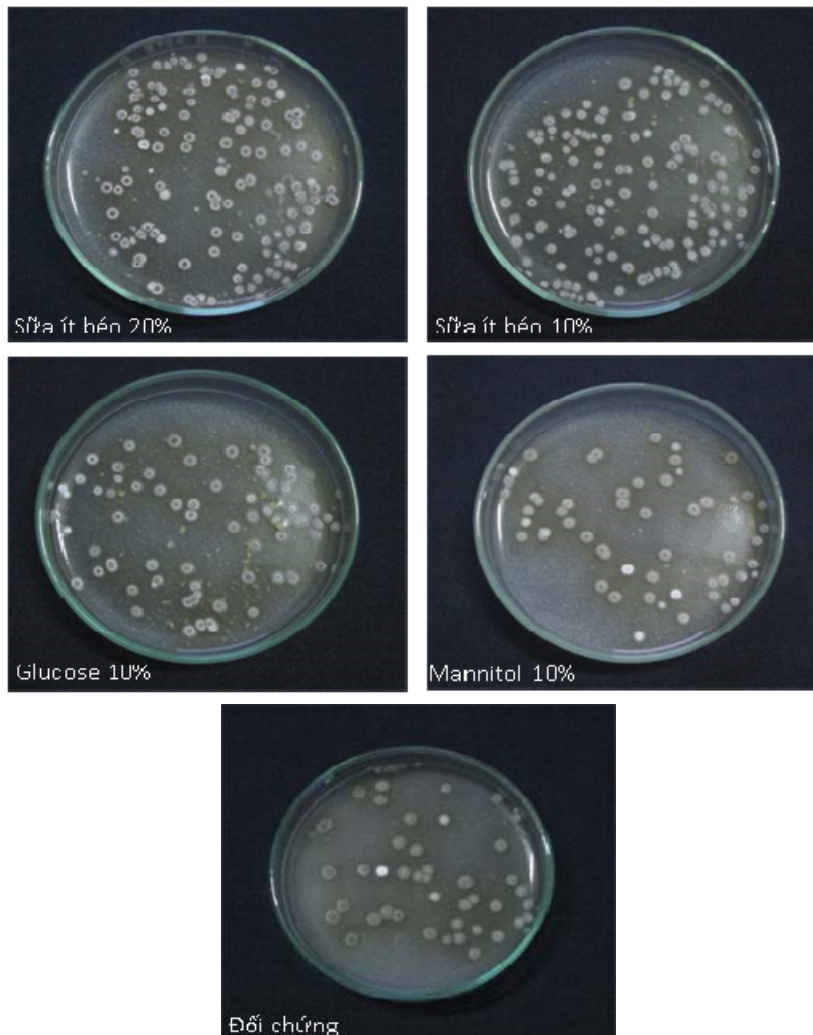
mannitol 10%, sữa ít béo 10% và 20% đều cho hiệu quả phục hồi tế bào xạ khuẩn. Qua các thời điểm tồn trữ, tuy tế bào xạ khuẩn có giảm theo thời gian nhưng vẫn đảm bảo hiệu quả phục hồi tốt, giảm ít hơn so với đối chứng. Trong đó, sữa ít béo là chất phụ gia cho hiệu quả tốt hơn so với hai chất phụ gia còn lại. Qua kết quả này thấy phương pháp đông khô giúp tế bào xạ khuẩn tồn tại được khá lâu, có thể mật số có giảm nhưng vẫn cho hiệu quả phục hồi tốt sau thời gian dài tồn trữ. Nên phương pháp đông khô tế bào là một phương pháp tốt để có thể thực hiện tồn trữ tế bào một cách lâu nhất và tốt nhất đồng thời sữa là chất phụ gia cần thiết giúp hồi phục tế bào từ trạng thái tiềm sinh sau đông khô về tình trạng tăng trưởng.

**Bảng 4: Khảo sát khả năng phục hồi của chế phẩm trong từng nghiệm thức qua các thời gian 0 đến 150 ngày sau đông khô**

STT	Thời gian khảo sát	Mật số xạ khuẩn log (cfu/ml) các chất phụ gia được cho vào chế phẩm đông khô				
		Glucose 10%	Mannitol 10%	Sữa ít béo 10%	Sữa ít béo 20%	Đối chứng
1	0 NSĐK	9,71	9,76	10,97	10,66	8,42
2	30 NSĐK	9,38	9,52	10,60	10,34	8,31
3	60 NSĐK	8,76	8,94	10,23	10,22	8,04
4	90 NSĐK	8,72	8,77	10,02	9,93	7,90
5	120 NSĐK	8,65	8,65	9,87	9,81	7,84
6	150 NSĐK	8,56	8,53	9,76	9,71	7,69
Mức ý nghĩa		ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)		11,55	11,03	13,62	7,00	8,47

Ghi chú: Các số trung bình trong cùng một cột được theo sau bởi một hoặc nhiều chữ cái giống nhau thì không khác biệt qua phép kiểm định Duncan. Số liệu được chuyển sang log<sub>x</sub> trước khi phân tích thống kê

ns: không khác biệt ở mức ý nghĩa 5%. NSĐK: ngày sau đông khô



**Hình 1: Mật số tế bào xạ khuẩn trên các nghiệm thức xử lý các chất phụ gia sau khi đông khô được khảo sát thời gian 90 ngày sau đông khô (hình được chụp ở cùng nồng độ pha loãng 10<sup>-6</sup>)**

#### 4 KẾT LUẬN

– Gelatin 5% và 10%, sucrose 5% đều thể hiện hiệu quả bảo vệ tế bào xạ khuẩn 54 RM tốt trong quá trình đông khô.

– Sữa ít béo 10% và 20%, glucose 10% và mannitol 10% được ghi nhận hiệu quả phục hồi tế bào xạ khuẩn 54 RM tốt sau quá trình đông khô.

– Khảo sát thời gian tồn trữ của chế phẩm xạ khuẩn 54 RM với chất bảo vệ sucrose 5% và chất phụ gia sữa ít béo 10% và 20% dưới dạng bột đông khô, mật số chế phẩm xạ khuẩn 54 RM sau đông khô không giảm ý nghĩa trong 5 tháng tồn trữ ở nhiệt độ phòng.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Coman, G and M., Radvan. 2009. preliminary studies regarding the behaviour of selected streptomyces strains as xylanases producers preserved by lyophilization. Scientific study & research, 4: 359 – 540.

Costa, E.,J. Usall, N. Texido, N. Garcia, I. Vinas. 2000. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subject to freeze-drying, *Microbiology*, 89: 793-800.

Đào Thị Lương, Phạm Văn Ty, Trịnh Thành Trung và Nguyễn Thị Anh Đào. 2002. Nghiên cứu đặc điểm sinh học của xạ khuẩn kháng *Pseudomonas solanacearum* gây héo cây trồng. Trung tâm Công nghệ Sinh học – Đại học Quốc gia Hà Nội.

Đoàn Thị Kiều Tiên. 2012. Đánh giá khả năng gây hại của các dòng nấm *Fusarium oxysporum* gây bệnh héo rũ trên cây mè (*Sesamum indicum* L.) và bước đầu nghiên cứu hiệu quả phòng trừ bằng biện pháp hóa học và sinh học. Luận văn thạc sĩ ngành Bảo vệ thực vật, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng. Trường Đại học Cần Thơ.

Lê Thị Bích. 2011. Đánh giá khả năng đối kháng của xạ khuẩn đối với nấm *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* trong điều kiện phòng thí nghiệm. Luận văn tốt nghiệp kỹ sư Bảo vệ thực vật. Bộ môn Bảo vệ thực vật. Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng. Trường Đại học Cần Thơ.

Nguyễn Thị Kim Xuyên. 2011. Nghiên cứu môi trường nhân nuôi và tồn trữ vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* 23<sub>1-1</sub>, Luận văn Thạc sĩ Bảo vệ thực vật, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ.

Nguyễn Thị Thu Nga và Nguyễn Thị Mai Thảo. 2013. Hiệu quả của xạ khuẩn trong phòng trừ bệnh chết cây con do nấm *Rhizoctonia solani* gây ra trên cây cải bắp. Hội thảo quốc gia Bệnh hại thực vật Việt Nam lần thứ 12 tại trường Đại học Vinh 20-21/7/2013, 229-236.

Nguyễn Thị Thùy Linh. 2011. Phòng trị bệnh đốm lá vi khuẩn trên ớt (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) bằng xạ khuẩn trong điều kiện in vitro và nhà lưới. Luận văn tốt nghiệp kỹ sư Bảo vệ thực vật. Bộ môn Bảo vệ thực vật. Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng. Trường Đại học Cần Thơ.

Tô Huỳnh Như. 2012. Đánh giá khả năng đối kháng và hiệu quả phòng trị của xạ khuẩn đối với nấm *Colletotrichum* sp. ST2 gây bệnh thán thư trên ớt. Luận văn tốt nghiệp thạc sĩ chuyên ngành Bảo vệ thực vật, Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng Dụng, Trường Đại học Cần Thơ.

Yan Min V., Da Quun T., Shi Min T. and Ding Z. 2000. The antagonism of 26 strains *Streptomyces* spp. against several vegetables pathogens, *Hebaei Agric. University*, 23: 65-68.