

Xác định điều kiện lên men thích hợp cho chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 nhằm tăng khả năng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* gây bệnh héo rũ trên cây chuối

Nguyễn Thị Thanh Mai¹, Nguyễn Thị Thu², Bùi Xuân Tứ², Trần Văn Tuấn³,
Phạm Hồng Hiền⁴, Nguyễn Xuân Cảnh^{2*}

¹Trung tâm Sinh học Thực nghiệm, Viện Ứng dụng Công nghệ, C6, phường Thanh Xuân Bắc, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

²Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, thị trấn Trâu Quỳ, huyện Gia Lâm, Hà Nội, Việt Nam

³Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội, 334 Nguyễn Trãi, phường Thanh Xuân Trung, quận Thanh Xuân, Hà Nội, Việt Nam

⁴Ban Khoa học và Hợp tác Quốc tế, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, xã Vĩnh Quỳnh, huyện Thanh Trì, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 15/2/2024; ngày chuyển phản biện 19/2/2024; ngày nhận phản biện 8/3/2024; ngày chấp nhận đăng 12/3/2024

Tóm tắt:

Nghiên cứu tập trung xác định thành phần môi trường (nguồn carbon, nồng độ carbon, nguồn nitơ) và các điều kiện lên men (nhiệt độ, pH) thích hợp nhằm nâng cao khả năng kháng nấm bệnh *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 (*Foc* Tr4) gây bệnh héo rũ trên cây chuối của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 (chủng VNUA116). Bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch đã xác định được chủng VNUA116 có khả năng đối kháng mạnh với nấm bệnh *Foc* Tr4 ở các điều kiện lên men: môi trường khoáng YIM 301, nguồn carbon CB1 (tinh bột tan 40 g/l, D-glucose 1 g/l) và nguồn nitơ N1 (cao thịt bò 3 g/l, cao nấm men 5 g/l, pepton 3 g/l). Đồng thời, các điều kiện lên men tối ưu như pH 7, nhiệt độ 30°C, chủng VNUA116 thể hiện khả năng kháng nấm *Foc* Tr4 mạnh nhất với đường kính vòng kháng nấm đạt $30,67 \pm 0,58$ mm sau 10 ngày nuôi cấy. Nghiên cứu này đã xác định được chủng VNUA116 ở các điều kiện lên men tối ưu thể hiện khả năng ức chế nấm *Foc* Tr4 lên đến 93,20%, tương đương với nồng độ Ridomil gold 68WG 3 g/l trong phòng thí nghiệm. Điều này khẳng định chủng VNUA116 có nhiều tiềm năng ứng dụng trong sản xuất chế phẩm sinh học dùng trong phòng trừ bệnh héo rũ Panama trên cây chuối.

Từ khóa: bệnh héo rũ Panama, cây chuối, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, hoạt tính kháng nấm, xạ khuẩn.

Chỉ số phân loại: 1.6, 4.6

1. Đặt vấn đề

Bệnh héo rũ trên cây chuối là một trong những mối đe dọa nghiêm trọng nhất đối với ngành trồng chuối trên toàn thế giới. Đây là loại bệnh chưa có thuốc chữa và chưa có giống chuối nào có khả năng kháng được bệnh này. Theo tính toán, 80% sản lượng chuối toàn cầu đang bị đe dọa bởi nấm *Foc* Tr4 - đây là một trong những chủng nấm có sức tàn phá và có thể gây thiệt hại đáng kể về kinh tế [1]. Một đặc điểm quan trọng của nấm *Foc* Tr4 là tồn tại lâu dài trong đất, do đó những vùng đất này không thể tiếp tục sử dụng để trồng chuối hay các loại cây trồng khác nhiều năm sau [2]. Đối với những cây trồng bị nhiễm nấm *Foc* Tr4 thường có mức độ nhiễm bệnh và tốc độ lây lan rất nhanh, từ đó dẫn đến cây trồng có thể mất hoàn toàn năng suất [3].

Xạ khuẩn (*Actinomyces*) thuộc nhóm vi khuẩn đặc biệt có nhiều ứng dụng quan trọng trong đời sống xã hội do có khả năng sản sinh nhiều loại kháng sinh và các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học [4]. Xạ khuẩn được coi là tác nhân kiểm soát sinh học trong nông nghiệp với khả năng sinh nhiều hoạt chất có thể kiểm soát vi khuẩn và vi nấm gây bệnh thực vật [5]. Hiện nay, đã phân lập được hơn 7.000

chất chuyển hoá từ chi *Streptomyces* và khoảng 3.000 chất chuyển hoá từ các chi xạ khuẩn hiếm [6]. Trong các chất chuyển hoá này có các hợp chất chuyên biệt đóng vai trò quan trọng trong việc phòng trừ các tác nhân gây bệnh trên thực vật [7].

Khả năng sản sinh các hợp chất thứ cấp từ xạ khuẩn là không cố định và có thể bị ảnh hưởng bởi thành phần môi trường dinh dưỡng và điều kiện nuôi cấy tối ưu. Thành phần môi trường nuôi cấy đóng một vai trò vô cùng quan trọng ảnh hưởng đến hiệu suất của quá trình lên men xạ khuẩn. Do đó, lựa chọn được một môi trường lên men thích hợp là rất quan trọng và có ý nghĩa. Bên cạnh đó, những thay đổi về nguồn carbon, nguồn nitơ hay các điều kiện lên men như pH, nhiệt độ, tỷ lệ giống hay thời gian nuôi cấy đều có ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng và khả năng sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp trong đó có hoạt tính kháng nấm, kháng khuẩn của xạ khuẩn [8].

Nghiên cứu của chúng tôi năm 2023 đã công bố chủng VNUA116 được phân lập từ đất trồng chuối bị nhiễm bệnh tại Việt Nam. Trình tự toàn bộ hệ gen của chủng VNUA116 đã được lưu giữ tại Ngân hàng GenBank (số đăng nhập

*Tác giả liên hệ: Email: nxcanh@vnua.edu.vn

Determination of fermentation conditions of *Streptomyces* sp. VNUA116 to improve the antifungal activities against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing Panama wilt disease on banana plants

Thi Thanh Mai Nguyen¹, Thi Thu Nguyen²,
Xuan Tu Bui², Van Tuan Tran³,
Hong Hien Pham⁴, Xuan Canh Nguyen^{2*}

¹Center for Experimental Biology, National Center for Technological Progress,
C6 Thanh Xuan Bac Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

²Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture,
Trau Quy Town, Gia Lam District, Hanoi, Vietnam

³Faculty of Biology, University of Science, Vietnam National University - Hanoi,
334 Nguyen Trại Street, Thanh Xuan Trung Ward, Thanh Xuan District, Hanoi, Vietnam

⁴Department of Science and International Cooperation, Vietnam Academy of Agricultural Sciences,
Vinh Quynh Commune, Thanh Tri District, Hanoi, Vietnam

Received 15 February 2024; revised 8 March 2024; accepted 12 March 2024

Abstract:

This study aims to identify medium components (carbon source, carbon concentration, nitrogen source) and fermentation conditions (temperature, pH) to enhance the resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 (*Foc* Tr4), causing Panama wilt disease of *Streptomyces* sp. VNUA116 (VNUA116). By using the agar well diffusion method, it was determined that strain VNUA116 has strong anti-fungal pathogen activities *Foc* Tr4 under fermentation nutrients: YIM 301 medium, carbon source CB1 (soluble starch 40 g/l; D-glucose 1 g/l, and nitrogen source N1 beef extract 3 g/l; yeast extract 5 g/l; peptone 3 g/l). Additionally, optimal fermentation conditions were established, including pH 7, and temperature 30°C. Strain VNUA116 exhibited the highest antifungal activity, reaching a diameter of 30.67±0.58 mm after 10 days of cultivation. Furthermore, under these optimised fermentation conditions, *Streptomyces* sp. VNUA116 demonstrated an impressive inhibitory capability against *Foc*-Tr4, reaching up to 93.20%, equivalent to the concentration of the fungicide Ridomil gold 68WG at 3 g/l in laboratory conditions. This affirms the considerable potential of the VNUA116 strain for applications in the production of biofertilizers for the biological control of Panama wilt disease in banana plants.

Keywords: antifungal activity, banana plants, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Panama wilt disease, *Streptomyces*.

Classification numbers: 1.6, 4.6

CP130487). Chủng VNUA116 được chứng minh có khả năng đối kháng mạnh với nấm *Foc* Tr4 gây bệnh héo rũ Panama trên cây chuối [9]. Với mục đích sử dụng chủng VNUA116 vào sản xuất chế phẩm vi sinh phòng trừ bệnh héo rũ Panama trên cây chuối thì việc nghiên cứu và lựa chọn được các điều kiện lên men tối ưu tăng khả năng kháng nấm gây bệnh *Foc* Tr4 có ý nghĩa thực tiễn cao. Đây là hướng đi chính cho ngành sản xuất chế phẩm vi sinh khi tác nhân sinh học được sử dụng để quản lý bệnh dịch đang được quan tâm và là xu hướng phát triển nông nghiệp an toàn và bền vững hiện nay.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

Chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 (chủng VNUA116) và chủng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 (*Foc* Tr4) gây bệnh héo rũ Panama trên chuối được cung cấp và lưu giữ tại Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Lựa chọn môi trường lên men thích hợp

Chủng VNUA116 được tiến hành lên men trên 15 môi trường khác nhau ở 30°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Khả năng kháng nấm *Foc* Tr4 được đánh giá hàng ngày từ ngày thứ 5 bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch cho đến khi kết thúc thí nghiệm [10]. Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần với mỗi công thức. Chọn môi trường thích hợp cho khả năng kháng nấm cao nhất.

Môi trường bao gồm: Gause I (g/l: tinh bột tan-10; K₂HPO₄-0,5; MgSO₄·7H₂O-0,5; KNO₃-0,5; NaCl-0,5; FeSO₄·7H₂O-0,01; pH 7,2); Gause II (g/l: glucose-10; pepton-5; cao thịt-0,5; NaCl-5, pH 7,2); ISP-1 (g/l: trypton-5; cao nấm men-3; pH 7), ISP-2 (g/l: cao nấm men-4; cao malt-10; glucose-4; pH 7,3), ISP-3 (g/l: bột yến mạch-20; dung dịch muối vi lượng-1 ml; pH 7), ISP-4 (g/l: tinh bột tan-10; K₂HPO₄-1; MgSO₄·7H₂O-1; NaCl-1; (NH₄)₂SO₄-2; CaCO₃-2; dung dịch muối vi lượng-1 ml; pH 7), ISP-5 (g/l: L-asparagin-1; glyxerin-10; K₂HPO₄-1; dung dịch muối vi lượng-1 ml; pH 7), ISP-6 (g/l: pepton-10; cao nấm men-1; C₆H₈FeNO₇-0,5; pH 7,0), Emerson (g/l: cao thịt bò-4; cao nấm men-1; pepton-4; glucose-10; NaCl-2,5; pH 7,0), Casein (g/l: tinh bột tan-10; casein-0,3; KNO₃-2; K₂HPO₄-2; NaCl-2; CaCO₃-0,02; FeSO₄·7H₂O-0,01; pH 7), A-4 (g/l: glucose-10; bột đậu tương-10; NaCl-5; CaCO₃-11; pH 7), YIM 61 (g/l: bột đậu tương-20; pepton-2; glucose-20; tinh bột tan-5; cao nấm men-2; NaCl-4; K₂HPO₄-0,5; MgSO₄·7H₂O-0,5; CaCO₃-2; pH 7,8), YIM 301 (g/l: tinh bột tan-24; cao thịt-3; cao nấm men-5; pepton-3; glucose-1;

CaCO₃-4; pH 7), YIM 308 (g/l: glucose-10; cao thịt-3; pepton-3; tinh bột tan-20; cao nấm men-5; CaCO₃-3; pH 7) và YIM 310 (g/l: glucose-5; pepton-3; tinh bột tan-10; cao nấm men-3; CaCO₃-2; NH₄NO₃-3; pH 7,2).

2.2.2. Ảnh hưởng của nguồn carbon

Sau khi lựa chọn được môi trường lên men thích hợp, chủng VNUA116 được nuôi cấy trên môi trường có nguồn carbon là CB1 (tinh bột tan 24 g/l + D-glucose 1 g/l), D-glucose, D-mannitol, D-Sorbitol, D-xylose và xellulose với hàm lượng bằng với lượng carbon trong môi trường ban đầu, các thành phần khác trong môi trường không thay đổi. Lên men ở 30°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Khả năng kháng nấm *Foc* Tr4 được đánh giá hàng ngày từ ngày thứ 5 bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch cho đến khi kết thúc thí nghiệm [10]. Mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Lựa chọn nguồn cacbon cho vòng kháng nấm cao nhất.

Tiến hành thay đổi hàm lượng carbon trong môi trường, các thành phần khác không thay đổi. Mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Lựa chọn hàm lượng carbon cho vòng kháng nấm cao nhất.

2.2.3. Ảnh hưởng của nguồn nitơ

Chủng VNUA116 được tiến hành lên men trên môi trường có nguồn carbon và hàm lượng carbon đã được lựa chọn. Thay thế nguồn nitơ là N1 (cao thịt bò 3 g/l, cao nấm men 5 g/l, pepton 3 g/l), cao nấm men, cao thịt bò, bột đậu tương, pepton và KNO₃ với hàm lượng tương đương với nguồn nitơ ban đầu trong môi trường cơ sở, các thành phần khác không thay đổi. Lên men chủng VNUA116 ở 30°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Khả năng kháng nấm *Foc* Tr4 được đánh giá hàng ngày từ ngày thứ 5 bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch cho đến khi kết thúc thí nghiệm [10]. Mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Lựa chọn nguồn nitơ cho vòng kháng nấm cao nhất.

2.2.4. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ

Chủng VNUA116 được lên men trên môi trường với nguồn carbon, nguồn nitơ thích hợp cho hiệu quả kháng nấm tốt nhất, tiến hành thay đổi pH từ 5, 6, 7, 8, 9 đến 10 ở điều kiện nuôi cấy 30°C và nhiệt độ nuôi cấy 25, 30 và 35°C, tốc độ lắc 200 vòng/phút. Khả năng kháng nấm *Foc* Tr4 được đánh giá hàng ngày từ ngày thứ 5 bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch cho đến khi kết thúc thí nghiệm [10]. Mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Lựa chọn được pH và nhiệt độ cho vòng kháng nấm cao nhất.

2.2.5. Xác định hoạt tính kháng nấm bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch

Chủng VNUA116 được nuôi cấy trên môi trường kiểm tra ở các điều kiện khác nhau (nguồn carbon, nguồn nitơ,

nhiệt độ, pH), nuôi lắc 200 vòng/phút. Dịch lên men được thu từ ngày nuôi cấy thứ 5, lấy mẫu 1 lần/ngày cho đến khi kết thúc thí nghiệm. Dịch lên men được ly tâm 6000 vòng/phút trong thời gian 30 phút để thu phần dịch. Nhỏ 50 µl dịch thu được vào mỗi lỗ trên đĩa thạch PDA đã được cấy trải 100 µl dịch bào tử nấm *Foc* Tr4 (10⁶ bào tử/ml). Các đĩa petri sau khi bổ sung dịch xạ khuẩn được nuôi ở 30°C trong thời gian 5-7 ngày và đo vòng kháng nấm hình thành xung quanh giếng thạch [10].

2.2.6. Đánh giá khả năng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của chủng VNUA116 trong điều kiện in vitro

Các điều kiện lên men tối ưu được lựa chọn từ các thí nghiệm: nguồn carbon, nồng độ carbon, nguồn nitơ, pH, nhiệt độ nuôi cấy. Tiến hành lên men trên Bioreactor 5 lít, tốc độ khuấy 200 vòng/phút, lưu lượng cấp khí 0,7 dm³ không khí/lít môi trường/phút. Dịch lên men được ly tâm 6000 vòng/phút trong thời gian 30 phút để thu phần dịch. Nhỏ 50 µl dịch thu được vào mỗi lỗ trên đĩa thạch PDA đã được cấy trải 100 µl dịch bào tử nấm *Foc* Tr4 (10⁶ bào tử/ml). Các đĩa petri sau khi bổ sung dịch xạ khuẩn được nuôi ở 30°C trong thời gian 5-7 ngày và đo vòng kháng nấm hình thành xung quanh giếng thạch [10].

Mẫu đối chứng dương được sử dụng là 100µl dung dịch Ridomil gold 68WG (hoạt chất: Metalaxyl M 40 g/l, Mancozeb 640 g/l): 3 g/l.

$$\text{Hiệu lực kháng nấm (\%)} = [(C - T)/C] \times 100$$

trong đó: C là đường kính tán nấm của đối chứng âm; T là đường kính tán nấm của thí nghiệm (đối chứng dương, thí nghiệm với chủng VNUA116).

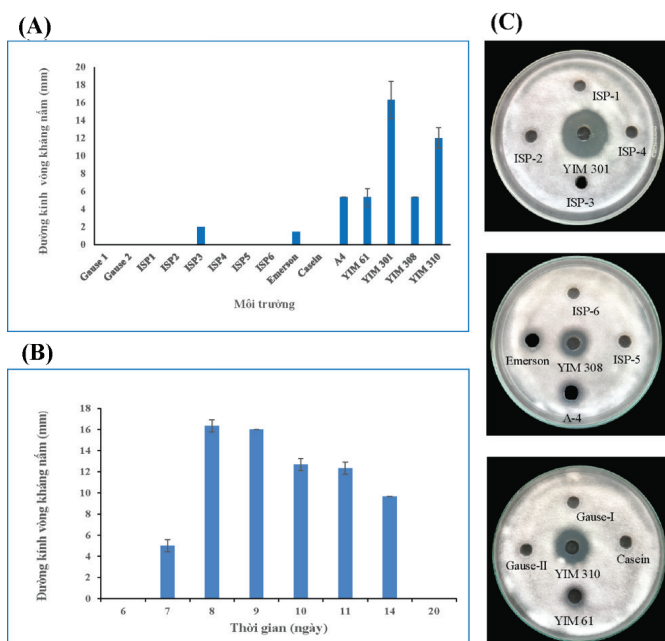
2.3. Xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được thu thập, xử lý và vẽ biểu đồ bằng phần mềm GraphPad Prism 9. Kết quả mỗi thí nghiệm được thể hiện là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn (SD) sau ba lần lặp lại ngẫu nhiên.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Lựa chọn môi trường lên men thích hợp đối với chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116

Với 15 loại môi trường lên men được khảo sát, chủng VNUA116 phát triển và thể hiện hoạt tính kháng nấm *Foc* Tr4 ở các mức độ khác nhau. Sau 8 ngày lên men có 7 loại môi trường có thể hiện khả năng kháng nấm *Foc* Tr4 ở các mức độ khác nhau, đó là môi trường ISP-3, A-4, Emerson, YIM 61, YIM 301, YIM 308 và YIM 310. Trong đó môi trường YIM 301 thể hiện khả năng kháng nấm vượt trội (hình 1).



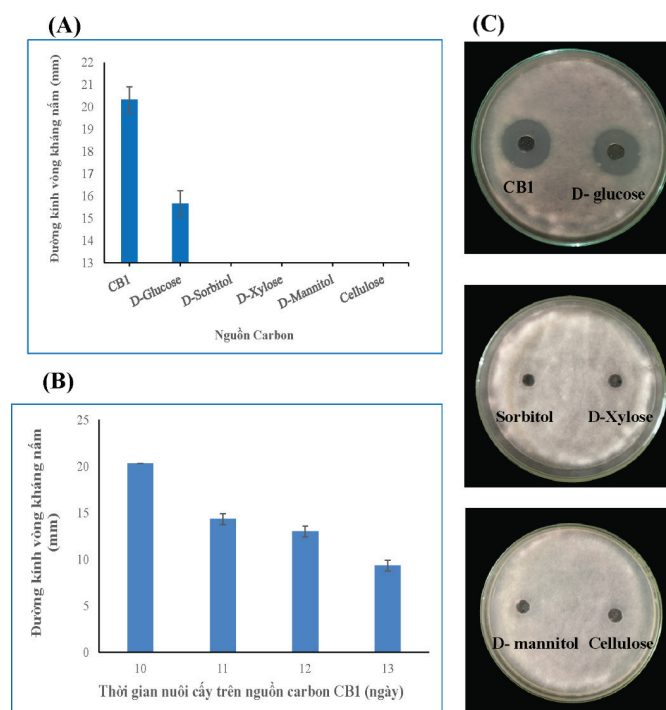
Hình 1. Khả năng ức chế nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 trên các loại môi trường khác nhau. (A) Khả năng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của dịch lên men chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 tại ngày nuôi thứ 8 trên các loại môi trường khác nhau; (B) Khả năng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của dịch lên men chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 theo thời gian nuôi cấy trên môi trường YIM 301; (C) Vòng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của dịch lên men chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 sau 8 ngày nuôi cấy trên các loại môi trường khác nhau.

Môi trường YIM 301 là môi trường tốt nhất đối với chủng VNUA116 trong việc hình thành hoạt tính kháng nấm *Foc*-Tr4. Khả năng kháng nấm của chủng VNUA116 xuất hiện từ ngày lên men thứ 7, mất đi ở ngày lên men thứ 20 và đạt cao nhất ở ngày lên men thứ 8 với đường kính vòng kháng nấm là $16,33 \pm 0,58$ mm. Đây cũng là môi trường hình thành khả năng kháng nấm sớm nhất và mạnh nhất trong 15 môi trường khảo sát. Công bố của Y. Jiang và cs (2016) [11] cho thấy, các môi trường YIM 61, YIM 301, YIM 308 và YIM 310 đều có tiềm năng ứng dụng trong lên men xạ khuẩn. Kết quả hình 1 cũng cho thấy 4 môi trường này đều thích hợp với lên men chủng VNUA116 và sinh hoạt tính kháng nấm *Foc* Tr4. Nhưng môi trường YIM 301 là thích hợp nhất. Do đó, môi trường YIM 301 đã được lựa chọn để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng của nguồn carbon

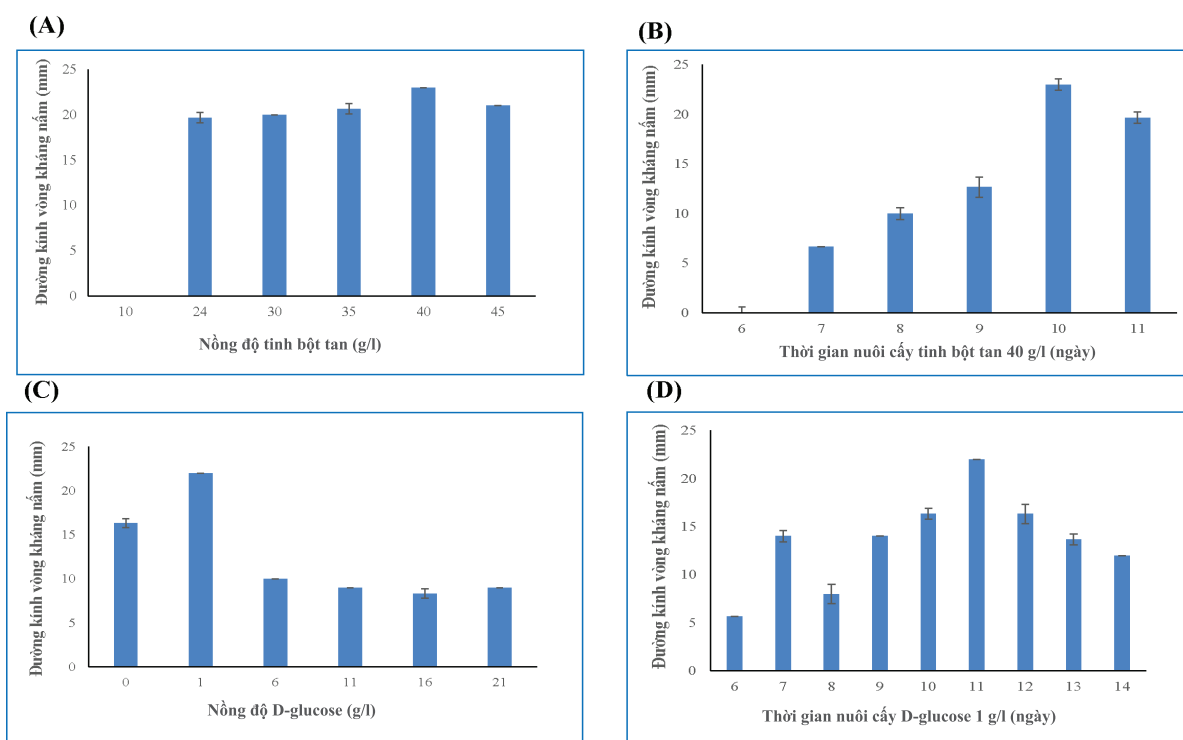
Kết quả kháng nấm *Foc* Tr4 của chủng VNUA116 cho thấy nguồn carbon CB1 và D-glucose là thích hợp với chủng VNUA116 trong việc hình thành hoạt tính kháng nấm (hình 2). Trong nghiên cứu này, hoạt tính kháng nấm xuất hiện từ ngày thứ 8 đối với cả 2 nguồn carbon CB1 và D-glucose, mất đi vào ngày thứ 18 đối với D-glucose và ngày thứ 20 đối với CB1, hoạt tính kháng nấm đạt cao nhất vào ngày thứ 10 với

cả 2 nguồn carbon CB1 và D-glucose với đường kính vòng kháng nấm lần lượt là $20,33 \pm 0,58$ và $15,67 \pm 0,58$ mm. Các nguồn carbon còn lại (D-mannitol, D-xylose, D-sorbitol và cellulose) chỉ giúp chủng VNUA116 tăng về sinh khối mà không hình thành hoạt tính kháng nấm *Foc* Tr4.



Hình 2. Khả năng ức chế nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 trên các nguồn carbon khác nhau. (A) Khả năng kháng nấm *Foc* Tr4 của dịch lên men chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 tại ngày nuôi thứ 10; (B) Khả năng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của dịch lên men chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 theo thời gian trên nguồn carbon hỗn hợp CB1; (C) Vòng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của dịch lên men chủng VNUA116 tại ngày nuôi cấy 10.

Khi tiến hành thay đổi nồng độ tinh bột tan (10, 24, 30, 35, 40 và 45 g/l) và glucose (1, 6, 11, 16, 21 g/l) trong nguồn carbon hỗn hợp CB1 thì kết quả hình 3 cho thấy: khi nồng độ tinh bột tan càng tăng thì khả năng kháng nấm càng tăng, tuy nhiên, thời gian hoạt tính kháng nấm đạt tối đa ở nồng độ tinh bột tan 40 g/l sớm hơn các nồng độ khác (tại ngày thứ 10). Nhưng với nguồn carbon là D-glucose thì ngược lại khi nồng độ D-glucose càng tăng thì hoạt tính kháng nấm tối đa hình thành càng muộn (từ ngày thứ 11 đến ngày thứ 23). Theo S. Sánchez và cs (2010) [12] công bố trong môi trường chứa hỗn hợp các nguồn carbon thì sẽ có nguồn carbon được sử dụng trước và sử dụng sau. Nguồn carbon được sử dụng đầu tiên sẽ giúp xạ khuẩn sinh trưởng nhưng chưa tạo ra chất kháng sinh hoặc rất ít. Sau khi nguồn carbon thứ nhất sử dụng hết thì nguồn carbon “tốt thứ hai” sẽ được sử dụng để hình thành chất kháng sinh [12]. Điều này giải



Hình 3. Khả năng ức chế nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 với nồng độ carbon khác nhau. (A) Khả năng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 nuôi cấy trên các nồng độ tinh bột tan khác nhau tại ngày nuôi thứ 10; **(B)** Khả năng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của dịch lên men chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 theo thời gian trên tinh bột tan 40 g/l; **(C)** Khả năng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của dịch lên men chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 nuôi cấy trên các nồng độ glucose khác nhau tại ngày nuôi thứ 11; **(D)** Khả năng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của dịch lên men chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 theo thời gian trên D-glucose 1 g/l.

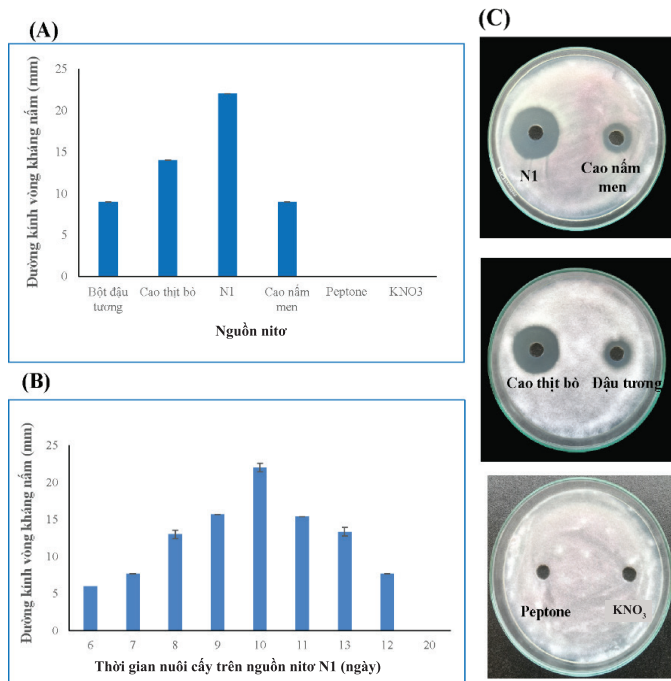
thích tại sao nồng độ glucose càng cao thì thời gian hoạt tính kháng nấm đạt tối đa của *Streptomyces* sp. VNUA116 càng muộn. Đồng thời, một số nghiên cứu cũng chỉ ra rằng nồng độ glucose làm giảm khả năng tổng hợp các chất kháng sinh do ức chế các enzyme tham gia vào quá trình này và có thể liên quan đến ảnh hưởng của sinh trưởng lên sinh tổng hợp kháng sinh [13]. Các nghiên cứu khác cũng công bố: tinh bột tan là nguồn carbon để xạ khuẩn sử dụng sản sinh nhiều loại kháng sinh như *Streptomyces fradiae* sản sinh ra Tylocin [14], *Streptomyces kanamyceticus* sản sinh ra Kanamycin [15], *Streptomyces rimosus* sản sinh ra hoạt chất kháng nấm [16] và *Streptomyces noursei* sản sinh ra Nystatin [17]. Do đó, chúng tôi đã lựa chọn nguồn carbon hỗn hợp là CB1 (tinh bột tan 40 g/l + D-glucose 1 g/l) là thích hợp nhất tạo hoạt tính kháng nấm tối đa với đường kính vòng kháng nấm đạt trên 22,5 mm ở thời gian sớm nhất (10-11 ngày) để tiến hành các nghiên cứu tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của nguồn nitơ

Trong nghiên cứu này, nguồn nitơ hỗn hợp N1 (cao thịt, cao nấm men, pepton) với tỷ lệ 3:5:3 g/l là nguồn nitơ tốt nhất cho sinh tổng hợp hoạt chất kháng nấm *Foc* Tr4 của chủng VNUA116. Khả năng kháng nấm xuất hiện vào ngày

thứ 7, mất đi vào ngày 28 và hoạt tính kháng nấm đạt tối đa vào ngày lên men thứ 10 với đường kính vòng kháng nấm đạt 22,13±0,58 mm. Cao thịt bò là nguồn nitơ thích hợp sau N1 về khả năng kháng nấm của chủng VNUA116. Khả năng kháng nấm *Foc* Tr4 của chủng VNUA116 bắt đầu hình thành vào ngày thứ 6, mất đi vào ngày thứ 28 và hoạt tính kháng nấm đạt tối đa tại ngày lên men thứ 12 với đường kính vòng kháng nấm đạt 17,33±0,58 mm.

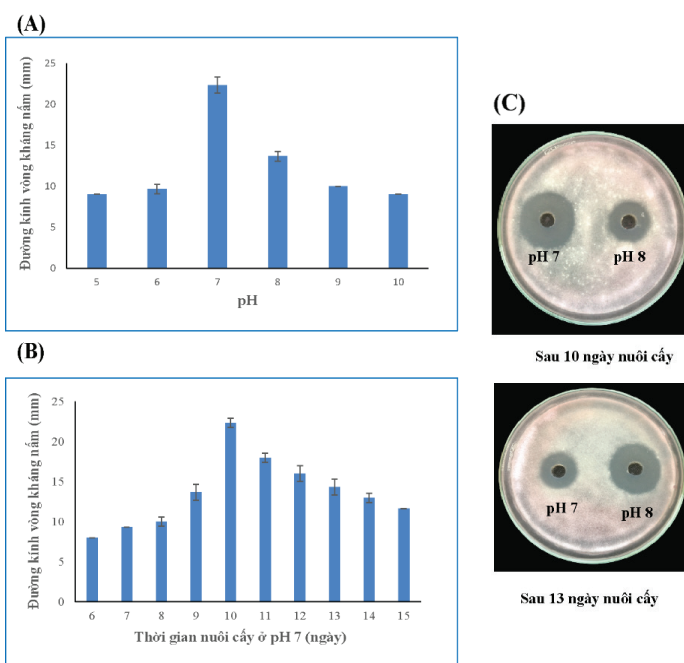
Với bột đậu tương và cao nấm men mặc dù chủng VNUA116 có sự gia tăng về sinh khối nhưng khả năng hình thành hoạt tính kháng nấm *Foc* Tr4 là không nhiều. Đối với môi trường sử dụng pepton và KNO_3 thì chủng VNUA116 không hình thành hoạt tính kháng nấm (hình 4). Điều này có thể thấy rằng, khi nguồn nitơ là các chất riêng lẻ là không thích hợp cho sinh chất kháng nấm đối với chủng VNUA116. Kết quả này cũng phù hợp với công bố của M.D. Young và cs (1985) [18] khi sử dụng nguồn nitơ riêng lẻ hoặc nitơ vô cơ làm giảm khả năng sinh tổng hợp hoạt chất kháng nấm. Trong tất cả các nguồn nitơ được khảo sát lựa chọn N1 (cao thịt, cao nấm men, pepton) với tỷ lệ 3:5:3 g/l là nguồn nitơ thích hợp nhất đối với chủng VNUA116 cho mục đích sinh tổng hợp hoạt chất kháng nấm.



Hình 4. Khả năng ức chế nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 nuôi cấy trên các nguồn nitơ khác nhau. **(A)** Khả năng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của dịch lên men chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 tại ngày nuôi cấy thứ 11; **(B)** Khả năng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của dịch lên men chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 theo thời gian nuôi cấy trên nguồn nitơ N1; **(C)** Vòng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của dịch lên men chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 tại ngày nuôi cấy 11.

3.4. Ảnh hưởng của pH

pH của môi trường không chỉ ảnh hưởng đến sự sinh trưởng, phát triển của xạ khuẩn mà còn ảnh hưởng tới quá trình sinh tổng hợp chất kháng nấm. Các kết quả nghiên cứu hình 5 cho thấy, chủng VNUA116 có thể sinh trưởng và sinh tổng hợp hoạt chất kháng nấm Foc Tr4 trong khoảng pH rộng từ pH 5-10. Ở môi trường có pH 5-6 là môi trường axit đã ức chế sự hình thành hoạt tính kháng nấm, do đó thời gian xuất hiện khả năng kháng nấm muộn (sau 10 ngày lên men) và đường kính vòng kháng nấm đạt tối đa thấp lần lượt là 13 và 19±0,58 mm sau 15 và 16 ngày. Với pH 7, chủng VNUA116 xuất hiện khả năng kháng nấm sớm nhất ngay từ ngày thứ 7 và đường kính vòng kháng nấm đạt cao nhất là 23,33±0,57 mm ở ngày thứ 10. Với pH 8, chủng VNUA116 xuất hiện khả năng kháng nấm sớm nhất từ ngày thứ 8 và đường kính vòng kháng nấm đạt cao nhất là 22,03±0,52 mm ở ngày thứ 13. Khi pH tăng lên (pH 9-10) thì thời gian xuất hiện khả năng kháng nấm muộn hơn, thời gian duy trì khả năng kháng nấm kéo dài hơn. Điều này có thể do chủng VNUA116 đã tạo thành các axit hữu cơ giúp cân bằng pH của môi trường nuôi cấy, tạo điều kiện thuận lợi cho xạ khuẩn này sinh ra các chất kháng nấm. Điều này có thể lý giải tại sao pH tăng kéo theo vùng ức chế tối đa xuất hiện muộn.



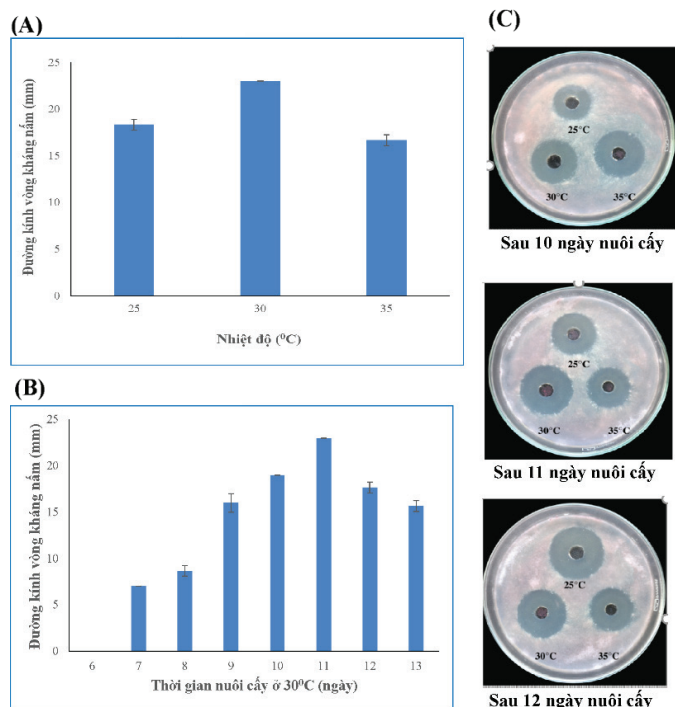
Hình 5. Khả năng ức chế nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 nuôi cấy ở pH khác nhau. **(A)** Khả năng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của dịch lên men chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 tại ngày nuôi cấy thứ 10; **(B)** Khả năng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của dịch lên men chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 theo thời gian nuôi cấy tại pH 7; **(C)** Vòng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của dịch lên men chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 tại ngày nuôi cấy 10 và 13.

Theo công bố của I. Charousová và cs (2015) [19], xạ khuẩn được biết đến là loài có khả năng sinh trưởng trong môi trường có khoảng pH 6,5-8,0 (từ trung tính tới kiềm) là lý tưởng cho sự phát triển. N. Salaria và cs (2021) [20] cũng chỉ ra rằng, pH ban đầu của môi trường sản xuất ảnh hưởng trực tiếp đến quá trình sinh tổng hợp các hoạt chất sinh học của xạ khuẩn. Tại pH 7, khả năng ức chế nấm đạt cao nhất, đồng thời thích hợp với sản xuất các hoạt chất bậc hai [20]. Do đó, pH 7 được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo với mục đích sinh tổng hợp hoạt tính kháng nấm của chủng VNUA116.

3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Trong nghiên cứu này, 30°C là nhiệt độ tối ưu cho thích hợp với chủng VNUA116 tổng hợp hoạt tính kháng nấm của chủng VNUA116. Ở nhiệt độ 30°C, các hoạt tính kháng nấm xuất hiện sớm nhất (ngày thứ 7) và đạt tối đa vào ngày thứ 11. Ở nhiệt độ 25°C, hoạt tính kháng nấm xuất hiện muộn hơn khi lên men ở nhiệt độ 30°C (ngày thứ 8). Với nhiệt độ 35°C hoạt tính kháng nấm xuất hiện sớm (ngày thứ 7) nhưng yếu hơn khi nuôi cấy ở 30°C (hình 6).

Các công bố trước đây cho thấy nhiệt độ lên men tối ưu cho sinh trưởng của xạ khuẩn là 30°C. C. Singh và cs (2017) [8] cũng đã công bố 30°C là nhiệt độ thích hợp cho sinh



Hình 6. Khả năng ức chế nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 nuôi cấy ở các nhiệt độ khác nhau. (A) Khả năng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của dịch lên men chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 tại ngày nuôi thứ 11; **(B)** Khả năng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của dịch lên men chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 theo thời gian nuôi cấy ở nhiệt độ 30°C; **(C)** Vòng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của dịch lên men chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 tại ngày nuôi cấy 10, 11 và 12.

trường và tổng hợp các chất kháng sinh của *Streptomyces* spp.. Hay như công bố của S. Bundale và cs (2015) [21] cho thấy nhiệt độ lên men tối ưu để sản xuất các chất kháng nấm là 30°C. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với công bố của các nghiên cứu trước đây. Do đó, nhiệt độ lên men 30°C được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

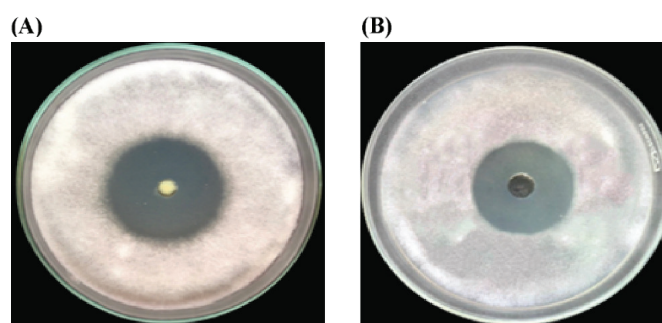
3.6. Đánh giá khả năng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 trong điều kiện *in vitro*

Tiến hành lên men thử nghiệm trên Bioreactor 5 lít với các điều kiện về thành phần môi trường, điều kiện nuôi cấy như bảng 1 để đánh giá hoạt tính kháng nấm *Foc* Tr4.

Kết quả hình 7 cho thấy, với các thành phần môi trường và điều kiện lên men tối ưu được lựa chọn, chủng VNUA116 đã thể hiện khả năng sinh chất kháng nấm với đường kính vòng kháng nấm đạt cực đại $30,67 \pm 0,58$ mm tương đương với hiệu lực kháng nấm đạt 93,20% sau 11 ngày. Kết quả này tương đương với đối chứng dương khi sử dụng Ridomil gold 68WG (hoạt chất: Metalaxyl M: 40

Bảng 1. Các yếu tố lên men tối ưu để nuôi cấy chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116.

Yếu tố	Đơn vị tính	Số lượng
Môi trường khoáng	-	YIM 301
Nguồn C		
Tinh bột tan	g/l	40
D-glucose	g/l	1
Nguồn nito		
Cao thịt	g/l	3
Cao nấm men	g/l	5
Pepton	g/l	3
Nhiệt độ	°C	30
pH	-	7
Thời gian	ngày	10



Hình 7. Khả năng ức chế nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 trong phòng thí nghiệm. (A) Đối chứng dương (thuốc Ridomil gold 68WG); **(B)** Vòng kháng nấm *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 của dịch lên men chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116.

g/l, Mancozeb: 640 g/l) với nồng độ 3 g/l khi thử nghiệm trong phòng thí nghiệm. Theo công bố của L.T. Tuong và cs (2019) [22] cũng cho thấy, sử dụng chất kháng sinh Ridomil gold 68WG với nồng độ 3 g/l có khả năng ức chế nấm *Foc* lên đến 93,75%. Nghiên cứu này có ý nghĩa thực tiễn trong việc kiểm soát bệnh cây trồng do nấm *F. oxysporum* gây ra trong nông nghiệp do việc sử dụng thuốc diệt nấm hóa học không được khuyến khích sử dụng do có nhiều bất lợi cho hệ sinh thái.

4. Kết luận

YIM 301 là môi trường lên men thích hợp đối với chủng xạ khuẩn *Streptomyces* sp. VNUA116 để tăng khả năng kháng nấm bệnh *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 gây bệnh héo rũ Panama trên cây chuối. Với nguồn carbon kết hợp CB1 (tinh bột tan 40 g/l + D-glucose 1 g/l) và nguồn nito kết hợp N1 (cao thịt bò 3

g/l, cao nấm men 5 g/l, pepton 3 g/l), hoạt tính kháng nấm *Foc* Tr4 của chủng VNUA116 xuất hiện sớm nhất ở ngày lên men thứ 7 và đường kính vòng kháng nấm đạt cực đại $30,67 \pm 0,58$ mm sau 10 ngày lên men trong điều kiện khuấy 200 vòng/phút, lưu lượng cấp khí $0,7 \text{ dm}^3$ không khí/lít môi trường/phút ở nhiệt độ 30°C và pH 7.

Hoạt tính kháng nấm *Foc* Tr4 của chủng VNUA116 được xác định tương đương với thuốc kháng nấm Ridomil gold 68WG với nồng độ 3 g/l có khả năng ức chế *Fusarium oxysporum* trong điều kiện *in vitro* tới 93,20%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] H. Fang, C. Zhong, J. Sun, et al. (2023), "Revealing the different resistance mechanisms of banana 'Guijiao 9' to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical race 4 using comparative proteomic analysis", *Journal of Proteomics*, **283-284**, DOI: 10.1016/j.jprot.2023.104937.
- [2] G. Martínez, B.O. Olivares, J.C. Rey, et al. (2023), "The advance of *Fusarium wilt* tropical race 4 in Musaceae of Latin America and the Caribbean: Current situation", *Pathogens*, **12(2)**, DOI: 10.3390/pathogens12020277.
- [3] M.O. Montiflor, S. Vellema, L.N. Digal (2019), "Coordination as management response to the spread of a global plant disease: A case study in a major Philippine banana production area", *Frontiers in Plant Science*, **10**, DOI: 10.3389/fpls.2019.01048.
- [4] N. Lee, W. Kim, S. Hwang, et al. (2020), "Thirty complete *Streptomyces* genome sequences for mining novel secondary metabolite biosynthetic gene clusters", *Scientific Data*, **7**, DOI: 10.1038/s41597-020-0395-9.
- [5] S.D. Schrey, M.T. Tarkka (2008), "Friends and foes: *Streptomyces* as modulators of plant disease and symbiosis", *Antonie Van Leeuwenhoek*, **94(1)**, pp.11-19, DOI: 10.1007/s10482-008-9241-3.
- [6] R.H. Baltz (2008), "Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes", *Curr. Opin. Pharmacol.*, **8(5)**, pp.557-563, DOI: 10.1016/j.coph.2008.04.008.
- [7] R.H. Baltz (2017), "Gifted microbes for genome mining and natural product discovery", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **44(4-5)**, pp.573-588, DOI: 10.1007/s10295-016-1815-x.
- [8] C. Singh, R.S. Parmar, P. Jadon, et al. (2017), "Optimisation of cultural conditions for production of antifungal bioactive metabolites by *Streptomyces* spp. isolated from soil", *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **6(2)**, pp.386-396, DOI: 10.20546/ijemas.2017.602.043.
- [9] M.T.T. Nguyen, S.T. Dinh, C.X. Nguyen (2023), "Complete genome sequence of *Streptomyces* strain VNUA116, a potential biocontrol against phytopathogenic fusarium wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*", *Microbiology Resource Announcements*, **12(12)**, DOI: 10.1128/MRA.00706-23.
- [10] D. Dhanasekaran, N. Thajuddin, A. Panneerselvam (2012), "Applications of actinobacterial fungicides in agriculture and medicine", *Fungicides for Plant and Animal Diseases*, IntechOpen, DOI: 10.5772/25549.
- [11] Y. Jiang, Q. Li, X. Chen, et al. (2016), "Isolation and cultivation methods of Actinobacteria", *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, IntechOpen, DOI: 10.5772/61457.
- [12] S. Sánchez, A. Chávez, A. Forero, et al. (2010), "Carbon source regulation of antibiotic production", *Journal of Antibiotics*, **63(8)**, pp.442-459, DOI: 10.1038/ja.2010.78.
- [13] R. Rafieenia (2013), "Effect of nutrients and culture conditions on antibiotic synthesis in Streptomycetes", *Asian Journal of Pharmaceutical and Health Sciences*, **3(3)**, pp.810-815.
- [14] M.C.B. Horn, S.H. Luo, S.L. Wang, et al. (1992), "Synthesis of hydrolytic enzymes during production of tylosin by *Streptomyces fradiae*", *Journal of Industrial Microbiology*, **10(1)**, pp.25-30, DOI: 10.1007/BF01583630.
- [15] O. Pringsulaka, S. Chavanich (1999), "Optimal conditions for the production of kanamycin by *Streptomyces kanamyceticus* mutants", *Journal of Scientific Research*, **24(2)**, pp.103-114.
- [16] J. Yu, Q. Liu, Q. Liu, et al. (2008), "Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02", *Bioresource Technology*, **99(6)**, pp.2087-2091, DOI: 10.1016/j.biortech.2007.03.023.
- [17] N.A. Elattal, A.A. Hamdy, A.E. Ali, et al. (2011), "Nystatin production by a local *Streptomyces* sp. isolated from Egyptian soil", *J. Pharm. Biomed. Sci.*, **1(6)**, pp.128-136.
- [18] M.D. Young, L.L. Kempe, F.G. Bader (1985), "Effects of phosphate, glucose, and ammonium on cell growth and lincomycin production by *Streptomyces lincolnensis* in chemically defined media", *Biotechnology and Bioengineering*, **27(3)**, pp.327-333, DOI: 10.1002/bit.260270318.
- [19] I. Charousová, S. Javoreková, J. Wink (2015), "Isolation and characterisation of *Streptomyces rishiriensis* (VY31) with antibiotic activity against various pathogenic microorganisms", *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, **4(1)**, pp.23-27, DOI: 10.15414/jmbfs.2015.4.special1.23-27.
- [20] N. Salaria, J. Furhan (2021), "Antibacterial potential of actinomycetes from north-western Himalayas against pathogenic bacteria", *Biology Bulletin, Russ. Acad. Sci.*, **48**, pp.281-289, DOI: 10.1134/S1062359021030146.
- [21] S. Bundale, D. Begde, N. Nashikkar, et al. (2015), "Optimisation of culture conditions for production of bioactive metabolites by *Streptomyces* spp. isolated from soil", *Advances in Microbiology*, **5(6)**, DOI: 10.4236/aim.2015.56045.
- [22] L.T. Tuong, D.P.K. Duyen, D.T.K. Uyen, et al. (2019), "Identification of agents and efficacy of chemicals for control of Panama disease pathogens on the banana in *in vitro*", *Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology*, **10(107)**, pp.118-122.